

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-533938  
(P2014-533938A)

(43) 公表日 平成26年12月18日(2014.12.18)

(51) Int.Cl.

**C 12 N 5/0784 (2010.01)**  
**A 61 K 39/00 (2006.01)**  
**A 61 P 35/00 (2006.01)**  
**A 61 P 17/00 (2006.01)**  
**A 61 P 37/04 (2006.01)**

F 1

C 12 N 5/00  
A 61 K 39/00  
A 61 P 35/00  
A 61 P 17/00  
A 61 P 37/04

202 M

H

テーマコード(参考)

4 B 065

4 C 085

4 C 087

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 54 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-537355 (P2014-537355)  
(86) (22) 出願日 平成24年10月22日 (2012.10.22)  
(85) 翻訳文提出日 平成26年6月19日 (2014.6.19)  
(86) 國際出願番号 PCT/US2012/061294  
(87) 國際公開番号 WO2013/059778  
(87) 國際公開日 平成25年4月25日 (2013.4.25)  
(31) 優先権主張番号 61/594,304  
(32) 優先日 平成24年2月2日 (2012.2.2)  
(33) 優先権主張国 米国(US)  
(31) 優先権主張番号 61/549,681  
(32) 優先日 平成23年10月20日 (2011.10.20)  
(33) 優先権主張国 米国(US)

(71) 出願人 514099396  
カリフォルニア ステム セル インコ  
ポレイテッド  
アメリカ合衆国 92612 カリフォル  
ニア州 アーバイン フォンカルマンアベ  
ニュー18301 スイート130  
(74) 代理人 100095407  
弁理士 木村 滉  
(74) 代理人 100109449  
弁理士 毛受 隆典  
(74) 代理人 100132883  
弁理士 森川 泰司  
(74) 代理人 100123618  
弁理士 雨宮 康仁

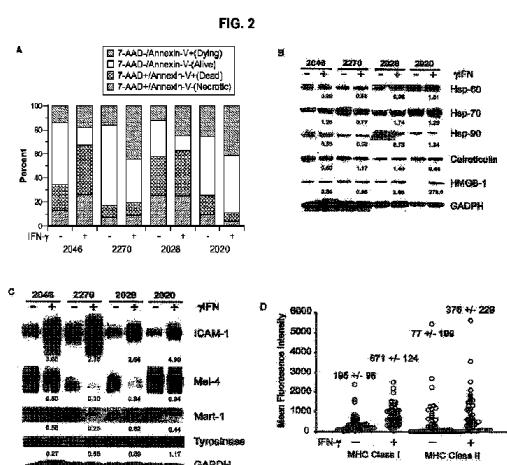
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】  $\gamma$  インターフェロンを用いた抗原提示癌ワクチン

## (57) 【要約】

本開示は、メラノーマを治療するための試薬、方法、及びキットを提供する。試薬は、インターフェロン-  
(I FN - ) 応答メラノーマ細胞を包含する。この細  
胞は、自食性及び非アポトーシス性のメラノーマ細胞で  
あり、MHCクラスIIを発現する。別の態様において  
、試薬は、I FN - に応答し、非アポトーシス性であ  
り、MHCクラスIIを発現するメラノーマ細胞をロー  
ドした、樹状細胞を包含する。

【選択図】図2 A



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

メラノーマを有する被験体から採取したメラノーマ細胞に由来するメラノーマ特異的ペプチドを含む、被験体由来の樹状細胞集団であって、

前記メラノーマ特異的ペプチドは、*in vitro*でIFN- $\alpha$ 又はIFN- $\beta$ 模倣薬で処理された前記メラノーマ細胞から樹状細胞により*in vitro*で得られ、

*in vitro*でIFN- $\alpha$ 又はIFN- $\beta$ 模倣薬で処理された前記メラノーマ細胞の60%超は、自食性及び非アポトーシス性であり、

前記樹状細胞及び前記メラノーマ細胞は、同じ被験体に由来する、  
樹状細胞集団。

10

**【請求項 2】**

*in vitro*でIFN- $\alpha$ 又はIFN- $\beta$ 模倣薬で処理された前記メラノーマ細胞の80%超が、自食性及び非アポトーシス性である、

請求項1に記載の樹状細胞集団。

**【請求項 3】**

請求項1に記載の哺乳類樹状細胞集団を含む、請求項1に記載の被験体のためのワクチン。

**【請求項 4】**

*in vitro*で得られた前記メラノーマ特異的ペプチドの実質的に全てが、細胞分裂することができないメラノーマ細胞に由来する、

請求項1に記載の樹状細胞。

20

**【請求項 5】**

前記メラノーマ特異的ペプチドの実質的に全てが、照射されることにより細胞分裂することができないメラノーマ細胞に由来する、

請求項1に記載の樹状細胞。

**【請求項 6】**

前記メラノーマ特異的ペプチドの実質的に全てが、染色体が核酸架橋剤で架橋されることにより細胞分裂することができないメラノーマ細胞に由来する、

請求項1に記載の樹状細胞。

30

**【請求項 7】**

IFN- $\alpha$ 及び照射で処理されたメラノーマ細胞に由来するメラノーマ特異的ペプチドを含む、

請求項1に記載の樹状細胞。

**【請求項 8】**

メラノーマ特異的ペプチドであって当該メラノーマ特異的ペプチドの全てがIFN- $\alpha$ 及び照射で処理されたメラノーマ細胞に由来するメラノーマ特異的ペプチドを含む、

請求項1に記載の樹状細胞。

**【請求項 9】**

自食性非アポトーシス性メラノーマ細胞が表面への接着により得られる、

請求項1に記載の樹状細胞集団。

40

**【請求項 10】**

前記メラノーマ特異的ペプチドの実質的に全てが、*in vitro*で処理されて細胞分裂することができないメラノーマ細胞に由来する、

請求項1に記載の樹状細胞。

**【請求項 11】**

被験体がヒトの被験体である、請求項1に記載の樹状細胞。

**【請求項 12】**

被験体がヒト以外の哺乳類である、請求項1に記載の樹状細胞。

**【請求項 13】**

メラノーマを有する被験体に由来する少なくとも1つの成熟樹状細胞を含むメラノーマ

50

ワクチンであって、

前記少なくとも 1 つの成熟樹状細胞は、同じ被験体に由来する少なくとも 1 つのメラノーマ腫瘍細胞との接觸により調製され、

前記少なくとも 1 つの成熟樹状細胞に接觸する前記少なくともメラノーマ腫瘍細胞は、非分裂性、自食性、及び非アポトーシス性である、

メラノーマワクチン。

【請求項 1 4】

請求項 1 に記載の免疫刺激量の樹状細胞を請求項 1 に記載の被験体に投与すること、又は請求項 1 3 に記載の免疫刺激量のワクチンを請求項 1 3 に記載の被験体に投与することを含む、

10

メラノーマ特異的抗原に対する免疫応答の刺激方法。

【請求項 1 5】

刺激された前記免疫応答が、CD4<sup>+</sup> T 細胞応答、CD8<sup>+</sup> T 細胞応答、及び B 細胞応答のうちの 1 つ又は複数を含む、

請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記 CD4<sup>+</sup> T 細胞応答、前記 CD8<sup>+</sup> T 細胞応答、又は前記 B 細胞応答が、ELIS<sup>+</sup> P O T アッセイ、細胞内サイトカイン染色アッセイ、テトラマーアッセイ、又は抗原特異的抗体産生の検出により測定することができる、

20

請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記免疫応答が 2 年全生存率 (OS) を含む生存期間を含み、前記 2 年全生存率が少なくとも 60% である、

請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記投与が前記ワクチンの皮下注射を含む、

請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記投与が、週 1 回 3 ヶ月間、次に月 1 回 5 ヶ月間行われる前記ワクチンの注射を含む、

30

請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 2 0】

同じ被験体由来のメラノーマ細胞及び樹状細胞を含む樹状細胞ワクチンの調製方法であって、

1 つ又は複数のメラノーマ細胞を細胞分裂を妨げる薬剤で処理し、

前記 1 つ又は複数のメラノーマ細胞を in vitro でインターフェロン - (IFN - ) 又は IFN - 模倣薬で処理し、

自食性及び非アポトーシス性であるメラノーマ細胞を選択し、

非自食性及びアポトーシス性であるメラノーマ細胞を除外し、

前記自食性及び非アポトーシス性であるメラノーマ細胞を 1 つ又は複数の自己樹状細胞に接觸させ、

40

少なくとも 1 つのメラノーマ由来ペプチドを前記 1 つ又は複数の自己樹状細胞に取り込ませることを含む、

調製方法。

【請求項 2 1】

第 1 の被験体に由来するインターフェロン - (IFN - ) 処理メラノーマ細胞、及び同じ第 1 の被験体に由来する抗原提示細胞 (APC) を含み、

前記メラノーマ細胞が自食性及び非アポトーシス性である、

組成物。

【請求項 2 2】

50

前記メラノーマ細胞がMHCクラスII発現性である、  
請求項21に記載の組成物。

【請求項23】

前記APCが樹状細胞、マクロファージ、又はB細胞である、  
請求項21に記載の組成物。

【請求項24】

前記メラノーマ細胞がメラノーマ特異的ペプチドを含み、  
前記メラノーマ特異的ペプチドが前記APCに含まれない、  
請求項21に記載の組成物。

【請求項25】

前記メラノーマ細胞がメラノーマ特異的ペプチドを含み、  
前記メラノーマ特異的ペプチドのうちの少なくとも1つが前記APCに取り込まれ、前記APCに含まれる、  
請求項21に記載の組成物。

【請求項26】

前記IFN- $\alpha$ 処理メラノーマ細胞が前記APCにロードされる、  
請求項21に記載の組成物。

【請求項27】

前記IFN- $\alpha$ 処理メラノーマ細胞が前記APCにロードされない、  
請求項21に記載の組成物。

【請求項28】

微小管結合タンパク質軽鎖3(LC3)分析試験によりメラノーマ細胞の自食作用が実証される、  
請求項21に記載の組成物。

【請求項29】

7-アミノアクチノマイシンD(7-ADD)試薬又はアネキシン試薬のうちの少なくとも1つを用いて前記メラノーマ細胞が非アポトーシス性であることが実証される、  
請求項21に記載の組成物。

【請求項30】

メラノーマを有し、メラノーマ細胞を含む被験体における免疫応答の刺激方法であって、  
前記被験体は前記第1の被験体と同じ被験体であり、請求項21に記載の免疫効果量の組成物を投与することを含む、  
刺激方法。

【請求項31】

請求項1に記載のワクチン又は請求項21に記載の組成物の製造方法であって、  
少なくとも1つの自食性非アポトーシス性メラノーマ腫瘍細胞を少なくとも1つの抗原提示細胞(APC)に接触させることを含み、  
前記少なくとも1つの自食性非アポトーシス性メラノーマ腫瘍細胞が第1のヒト被験体に由来し、  
前記少なくとも1つのAPCが同じ第1のヒト被験体に由来する、  
製造方法。

【請求項32】

樹状細胞ワクチンの調製方法であって、  
第1の被験体から得たメラノーマ細胞を、細胞分裂を妨げる薬剤で処理し、  
前記メラノーマ細胞をIFN- $\alpha$ 又はIFN- $\beta$ 模倣薬で処理し、  
自食性及び非アポトーシス性であるメラノーマ細胞を選択し、  
前記選択したメラノーマ細胞を同じ第1の被験体由来の自己樹状細胞に接触させることを含む、  
調製方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 3 3】

請求項 3 2 に記載の方法により調製された樹状細胞ワクチンを含む組成物。

## 【請求項 3 4】

請求項 3 3 に記載の組成物をメラノーマを有する被験体に投与することを含む、メラノーマ特異的抗原に対する免疫応答の刺激方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0 0 0 1】

## (関連出願)

10

本出願は、2011年10月20日に出願された米国仮特許出願第61/549,681号及び2012年2月2日に出願された米国仮特許出願第61/594,304号のパリ条約による優先権及び利益を主張する。これらの出願は、その全体が本明細書に完全に記載されているかのように、参照により本明細書に援用される。

## 【0 0 0 2】

本開示は、メラノーマの治療、治療に適した被験体のスクリーニング、組成物、方法、及びキットに関する。

## 【背景技術】

## 【0 0 0 3】

20

癌は、癌に対して有効な免疫応答の欠如により分類される。免疫応答の欠如は、例えば、多くの腫瘍抗原が「自己抗原」であること、腫瘍細胞によるMHCの発現が欠如し、結果として腫瘍細胞による腫瘍抗原の提示が欠如すること、マクロファージとのマクロファージが免疫応答を低下させるサイトカインを発現している腫瘍との関連、並びにT制御細胞(Tregs)の免疫抑制活性に起因する可能性がある。また、腫瘍に対する免疫応答の欠如は、腫瘍細胞が、自然免疫応答を刺激する分子、即ち、トール様受容体(TLRs)又はヌクレオチド結合性多量体ドメイン(NOD)様受容体を刺激する分子を発現しない傾向にあることにも起因する。癌は、固形腫瘍、並びに白血病及び髓異形成症候群などの血液癌も包含する。

## 【0 0 0 4】

30

免疫系は、細胞性免疫、液性免疫、及び補体反応を包含する。細胞性免疫としては、細胞のネットワーク、並びに樹状細胞、CD8<sup>+</sup>T細胞(細胞傷害性T細胞、細胞傷害性リンパ球)及びCD4<sup>+</sup>T細胞(ヘルパーT細胞)が関与する事象が挙げられる。樹状細胞(DC)は、ポリペプチド抗原を捕捉する。これらの抗原は、DCの外部から捕捉されるか、感染微生物によりDCの内部で生合成される。DCは、ポリペプチドを処理して約10アミノ酸長のペプチドを生じさせ、このペプチドをMHCクラスI又はMHCクラスIIのどちらかに運んで複合体を形成させ、この複合体をDCの表面に輸送する。MHCクラスI/ペプチド複合体を有するDCがCD8<sup>+</sup>T細胞に接触すると、結果としてCD8<sup>+</sup>T細胞が活性化され、増殖する。MHCクラスIIの役割については、MHCクラスII/ペプチド複合体を有するDCがCD4<sup>+</sup>T細胞に接触すると、結果としてCD4<sup>+</sup>T細胞が活性化され、増殖する(Munz, et al. (2010) Curr. Opin. Immunol. 22:89-93; Monaco (1995) J. Leukocyte Biol. 57:543-547; Robinson, et al. (2002) Immunology 105:252-262)。T細胞に抗原を提示する樹状細胞は、T細胞を「活性化」することができるが、この活性化されたT細胞が、効果的な免疫応答を開始できない可能性がある。CD8<sup>+</sup>T細胞による効果的な免疫応答は、多くの場合、多くの相互作用のうちの1つまたは複数によりDCを予め刺激することを必要とする。これらの相互作用としては、CD4<sup>+</sup>T細胞がDCに直接接觸すること(CD4<sup>+</sup>T細胞のCD40リガンドとDCのCD40受容体との接觸による)又はTLRアゴニストが樹状細胞のトール様受容体(TLRs)の1つに直接接觸することが挙げられる。

40

50

## 【0005】

液性免疫は、B細胞及び抗体に関連する。B細胞は、形質細胞に形質転換され、形質細胞は、抗体を発現及び分泌する。未感作B細胞は、抗原特異的B細胞がマーカーとなるCD27を発現するのに対し、CD27を発現しないことで区別される (Perez-Andres, et al. (2010) Cytometry Part B 78B (Suppl. 1) S47-S60)。分泌された抗体は、次に、腫瘍細胞の表面上に存在する腫瘍抗原に結合する。その結果、感染細胞又は腫瘍細胞は、抗体で標識されることになる。抗体が感染細胞又は腫瘍細胞に結合すると、結合した抗体は感染細胞又は腫瘍細胞の死滅を媒介し、NK細胞により死滅がもたらされる。NK細胞は、T細胞が標的抗原を認識するように、特定の標的抗原を認識するものではないが、NK細胞は、抗体の定常領域に結合することができるため、抗体で標識された細胞を特異的に死滅させることができる。NK細胞による抗体の認識は、抗体のFc領域に結合する (NK細胞の) Fc受容体を介して行われる。この種の死滅は、抗体依存性細胞傷害活性 (ADCC) と呼ばれる。また、NK細胞は、ADCC機構とは関係のない細胞も死滅させることができ、このような死滅では、標的細胞内でMHCクラスIの発現が失われるか、不十分である必要がある (例えば、Caligiuri (2008) Blood 112: 461-469参照)。

10

## 【0006】

「遅延型過敏性反応」による技術は、主に細胞性免疫に関わる免疫応答と主に液性免疫に関わる免疫応答とを区別するのに使用することができる。遅延型過敏性反応からの陽性シグナルは、細胞性免疫を意味する (例えば、Roychowdhury, et al. (2005) AAPS J. E834-E846参照)。

20

## 【0007】

自食作用は、恒常作用であり、これにより細胞質成分及び細胞小器官は、リソソームに移送されて分解される。また、自食作用は、細胞内病原体に対する自然免疫応答及び適応免疫応答と関連しており、これにより細胞内抗原は、主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) クラスII分子上にロードされてCD4<sup>+</sup> T細胞に認識される。

30

## 【0008】

添付の特許請求の範囲を含め、本明細書中で使用される場合、「a」、「an」、及び「the」のような単語の単数形は、文脈上そうでないとする明確な指示がない限り、それらの対応する複数形の言及を含む。本明細書で引用した全ての参考文献は、あたかも各個々の刊行物、特許、特許出願、及び配列表、並びに前述の刊行物及び特許文献中の図及び図面が、具体的かつ個々に参照により援用されることが示されるのと同じ程度に、参照により援用される。

40

## 【発明の概要】

## 【課題を解決するための手段】

## 【0009】

本開示は、第1の被験体から得たメラノーマ細胞を細胞分裂を妨げる薬剤で処理し、前記メラノーマ細胞をIFN- $\alpha$ 又はIFN- $\beta$ 模倣薬で処理し、自食性非アポトーシス性メラノーマ細胞であるメラノーマ細胞を選択し、前記選択したメラノーマ細胞を同じ第1の被験体に由来する自己樹状細胞に接触させることを含む、樹状細胞ワクチンの調製方法を提供する。また、前記方法により調製された樹状細胞ワクチンを含む組成物を提供する。また、本開示は、メラノーマを有する被験体に前記組成物を投与することを含むメラノーマ特異的抗原に対する免疫応答の刺激方法を提供する。

## 【0010】

メラノーマに罹患している所定の被験体に由来する哺乳類樹状細胞集団を含むワクチンであって、前記被験体はメラノーマ細胞を含み、前記被験体が含む前記メラノーマ細胞は、in vitroでIFN- $\alpha$ 又はIFN- $\beta$ 模倣薬で処理すると自食性及び非アポトーシス性となるメラノーマ細胞を含み、前記樹状細胞は、メラノーマ特異的ペプチド抗原を含み、前記メラノーマ特異的ペプチド抗原は、前記メラノーマ細胞から樹状細胞により

50

in vitroで得られ、前記樹状細胞に含まれる前記メラノーマ特異的ペプチドの60%超が自食性及び非アポトーシス性であるメラノーマ細胞に由来し、前記樹状細胞に含まれる前記メラノーマ特異的ペプチドの40%未満が非自食性及びアポトーシス性であるメラノーマ細胞に由来し、前記樹状細胞及び前記メラノーマ細胞は同じ被験体に由来するワクチンを提供する。前記自食性非アポトーシス性メラノーマ細胞は表面への接着により得られる、前記樹状細胞集団を提供する。

【0011】

ある場合には、前記メラノーマ特異的ペプチドの80%超が、自食性及び非アポトーシス性であるメラノーマ細胞に由来し、前記メラノーマ特異的ペプチドの20%未満が、非自食性及びアポトーシス性であるメラノーマ細胞に由来する、ワクチンを開示する。

10

【0012】

ある場合には、前記メラノーマ特異的ペプチドの90%超が、自食性及び非アポトーシス性であるメラノーマ細胞に由来し、前記メラノーマ特異的ペプチドの10%未満が、非自食性及びアポトーシス性であるメラノーマ細胞に由来する、ワクチンを開示する。

【0013】

ある場合には、前記メラノーマ特異的ペプチドの実質的に全てが、細胞分裂することができないメラノーマ細胞に由来する、ワクチンを開示する。

【0014】

ある場合には、前記メラノーマ特異的ペプチドの実質的に全てが、照射されることにより細胞分裂することができないメラノーマ細胞に由来する、ワクチンを開示する。

20

【0015】

ある場合には、前記メラノーマ特異的ペプチドの実質的に全てが、染色体が核酸架橋剤で架橋されることにより細胞分裂することができないメラノーマ細胞に由来する、ワクチンを開示する。

【0016】

ある場合には、前記メラノーマ特異的ペプチドの全てが、IFN-処理メラノーマ細胞又はIFN-模倣薬処理メラノーマ細胞であるメラノーマ細胞に由来する、ワクチンを開示する。

【0017】

ある場合には、前記メラノーマ特異的ペプチドの全てが、IFN-処理メラノーマ細胞でもなく、IFN-模倣薬処理メラノーマ細胞でもないメラノーマ細胞に由来する、ワクチンを開示する。

30

【0018】

ある場合には、自食性及び非アポトーシス性であるメラノーマ細胞に由来する第1の数のメラノーマ特異的ペプチドがあり、非自食性及びアポトーシス性であるメラノーマ細胞に由来する第2の数のメラノーマ特異的ペプチドがあり、前記第1の数及び前記第2の数はどちらも、S-100、HMB-45、Mel-2、Melan-A、Mel-5、MAGE-1、MART-1、又はチロシナーゼのうちの1つであるメラノーマ特異的抗原の数に相当し、前記60%超は前記第1の数に由来し、前記40%未満は前記第2の数に由来する、ワクチンを開示する。

40

【0019】

ある場合には、自食性及び非アポトーシス性であるメラノーマ細胞に由来する第1の数のメラノーマ特異的ペプチドがあり、非自食性及びアポトーシス性であるメラノーマ細胞に由来する第2の数のメラノーマ特異的ペプチドがあり、前記第1の数及び前記第2の数はどちらも、S-100、HMB-45、Mel-2、Melan-A、Mel-5、MAGE-1、MART-1、又はチロシナーゼのうちの2つであるメラノーマ特異的抗原の数に相当し、前記60%超は前記第1の数に由来し、前記40%未満は前記第2の数に由来する、ワクチンを開示する。

【0020】

ある場合には、自食性及び非アポトーシス性であるメラノーマ細胞に由来する第1の数

50

のメラノーマ特異的ペプチドがあり、非自食性及びアポトーシス性であるメラノーマ細胞に由来する第2の数のメラノーマ特異的ペプチドがあり、前記第1の数及び前記第2の数はどちらも、S-100、HMB-45、Mel-2、Melan-A、Mel-5、MAGE-1、MART-1、又はチロシナーゼのうちの3つであるメラノーマ特異的抗原の数に相当し、前記60%超は前記第1の数に由来し、前記40%未満は前記第2の数に由来する、ワクチンを開示する。その他の実施形態は、列挙した抗原のうちの4つ、5つ、6つ、7つ、又は8つを使用する。また、全く異なるメラノーマ特異的抗原の使用も包含する。

## 【0021】

ある場合には、前記メラノーマ特異的ペプチドの実質的に全てが、IFN-処理メラノーマ細胞であるメラノーマ細胞に由来する、ワクチンを開示する。

## 【0022】

ある場合には、前記メラノーマ特異的ペプチドの実質的に全てが、in vitroで処理されて細胞分裂することができないメラノーマ細胞に由来する、ワクチンを開示する。また、所定の被験体がヒトの被験体である前記ワクチンも含む。

## 【0023】

更に、本開示は、所定の被験体がヒト以外の哺乳類である、ワクチンを提供する。

## 【0024】

前記ワクチンの免疫刺激量を被験体に投与することを含む、メラノーマ特異的抗原に対する免疫応答の刺激方法を開示する。

## 【0025】

刺激された前記免疫応答が、CD4<sup>+</sup>T細胞応答、CD8<sup>+</sup>T細胞応答、及びB細胞応答のうちの1つ又は複数を含む、方法を開示する。

## 【0026】

前記CD4<sup>+</sup>T細胞応答、前記CD8<sup>+</sup>T細胞応答、又は前記B細胞応答が、ELISPO<sub>T</sub>アッセイ、細胞内サイトカイン染色アッセイ、テトラマーアッセイ、又は抗原特異的抗体産生の検出により測定することができる、方法を開示する。

## 【0027】

前記免疫応答が2年全生存率(OS)を含む生存期間を含み、前記2年全生存率が少なくとも60%である、方法を開示する。

## 【0028】

更に、前記投与が前記ワクチンの皮下注射を含む、前記方法を提供する。

## 【0029】

前記投与が、週1回3ヶ月間、次に月1回5ヶ月間行われる前記ワクチンの注射を含む、方法を開示する。

## 【0030】

樹状細胞ワクチンの調製方法を開示する。

## 【0031】

同じ被験体由来のメラノーマ細胞及び樹状細胞を含む樹状細胞ワクチンの調製方法であって、1つ又は複数のメラノーマ細胞が細胞分裂を妨げる薬剤で処理され、前記1つ又は複数のメラノーマ細胞がin vitroでインターフェロン- (IFN-) 又はIFN-模倣薬で処理され、自食性及び非アポトーシス性であるメラノーマ細胞が選択され、非自食性及びアポトーシス性であるメラノーマ細胞が除外され、前記自食性及び非アポトーシス性であるメラノーマ細胞が1つ又は複数の自己樹状細胞に提供されるか、又は前記自食性及び非アポトーシス性であるメラノーマ細胞に由来するペプチドが1つ又は複数の自己樹状細胞に提供される、調製方法を開示する。

## 【0032】

第1の被験体由来の少なくとも1つのインターフェロン(IFN)-処理メラノーマ細胞及び同じ第1の被験体由来の少なくとも1つの抗原提示細胞(APC)を含む組成物であって、前記メラノーマ細胞は、自食性、非アポトーシス性、及びMHCクラスII発

10

20

30

40

50

現性である、組成物を開示する。別の態様において、IFN- $\alpha$ 処理メラノーマ細胞がAPCにロードされる前記組成物、及びIFN- $\alpha$ 処理メラノーマ細胞がAPCにロードされない前記組成物を包含する。別の態様において、メラノーマ細胞が、ステージI、ステージII、ステージIII、又はステージIVのメラノーマを有する被験体に由来する前記組成物を含む。また、APCが少なくとも1つの樹状細胞を含む、前記組成物、関連キット、及び関連方法を検討する。

#### 【0033】

一つの態様において、本開示の医薬組成物、試薬、及び関連方法には、IFN- $\alpha$ 処理後、7-AAD陰性及びアネキシンV陰性である癌細胞の調製が用いられる。この集団は、限定されない例を挙げると、例えば、約99%7-AAD陰性及び約99%アネキシンV陰性、95%以上7-AAD陰性及び95%以上アネキシンV陰性、又は90%以上7-AAD陰性及び90%以上アネキシンV陰性とすることができます。10

#### 【0034】

さらに、微小管結合タンパク質軽鎖3(LC3)分析試験により自食作用が実証される前記組成物、及び7-アミノアクチノマイシンD(7-AAD)試薬又はアネキシン試薬のうちの少なくとも1つを用いて前記細胞が非アポトーシス性であることが実証される前記組成物を含む。

#### 【0035】

方法の態様において、第1の被験体から少なくとも1つのメラノーマ細胞を除去すること、前記第1の被験体から少なくとも1つのAPCを除去すること、及び前記メラノーマ細胞を前記APCに接触させることを含む前記組成物の製造方法、並びに前記組成物を被験体に投与することを含む、被験体又は患者においてメラノーマに対する免疫応答を刺激する方法を提供する。20

#### 【0036】

前記患者由来の前記メラノーマ細胞が非アポトーシス性、自食性であり、前記メラノーマ細胞がMHCクラスIIを発現することで添加したIFN- $\alpha$ に応答する方法、及び前記メラノーマ細胞が、抗原提示細胞にロードされる前に照射される前記方法を開示する。

#### 【0037】

前記メラノーマ細胞がIFN- $\alpha$ によるアポトーシス促進効果に非感受性であることを判断すること、及び1つ又は複数の前記組成物を被験体に投与することを含む、メラノーマ患者におけるメラノーマの処理方法を開示する。30

#### 【0038】

別の態様において、前記メラノーマ細胞がIFN- $\alpha$ によるアポトーシス促進効果に非感受性であることを判断すること、及び1つ又は複数の前記組成物を被験体に投与することを含む、メラノーマ患者においてメラノーマに対する免疫応答を刺激又は促進する方法を提供する。また、免疫応答が、1つ又は複数の液性免疫応答、細胞性免疫応答、及び自然免疫応答である、前記方法を提供する。

#### 【0039】

キットの態様において、本開示は、被験体において腫瘍抗原に対する免疫応答を試験するためのキットであって、被験体が1つ又は複数の上記方法で処理され、キットが液性免疫応答、細胞性免疫応答、又は自然免疫応答を検出する試薬を含む、キットを提供する。40

#### 【0040】

##### 定義

免疫刺激量とは、これに限定されるものではないが、ELISPOTアッセイの結果を測定可能な量まで増加させる量、ICSアッセイの結果を測定可能な量まで増加させる量、テトラマーアッセイの結果を測定可能な量まで増加させる量、抗原特異的CD4 $^{+}$ T細胞の血集団を測定可能な量まで増加させる量、抗原特異的CD8 $^{+}$ T細胞の血集団を測定可能な量まで増加させる量であるか、又は適切な対照と比較した時に、増加量が少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、1,5倍、2.0倍、3.0倍等である量とすることができます。適切な対照とは、対

照ワクチンであり、樹状細胞がメラノーマ細胞をロードしていないか、又はメラノーマ細胞由来のペプチドをロードしていない対照ワクチンとすることができます。

【0041】

「メラノーマ特異的抗原」という語は、メラノーマとの関連が濃厚な抗原であり、他の癌に関連するのではなくメラノーマに特有であると考えられる抗原を包含する。さらに、「メラノーマ特異的抗原」という語は、メラノーマとの関連が濃厚な抗原であり、乳癌、結腸直腸癌等の他の種類の癌とも関連している抗原を包含する。

【0042】

本開示のためにメラノーマ細胞に照射するといった文脈における「照射した」とは、好みしくは 線の照射であるが、 $\times$ 線、電子線、中性子線、陽子線、電磁放射線、可視光線、紫外線等の照射も包含する。一つの態様において、照射は、メラノーマ細胞の細胞分裂を妨げる機能を果たす。別の態様において、照射は、細胞分裂を妨げるだけでなく、細胞タンパク質を変性させる。照射の代わりとして、本開示では、物理的破壊、例えば、超音波処理、キャビテーション、脱水、イオン枯渇、又は1つもしくは複数の塩への暴露による毒性により、メラノーマ細胞の細胞分裂を妨げる。

10

【0043】

本開示において、インターフェロン-（IFN-）は、自食作用を誘導する。代用として又は追加して、mTOR阻害剤等の自食作用誘導剤及びmTOR非依存性試薬を使用することができる。本開示に適したmTOR阻害剤としては、例えば、ラパマイシン、タモキシフェン、トリン1、テムシロリムス、エベロリムス、IKK刺激、MAPKキナーゼ阻害剤、MEK1/2阻害剤、脱水、飢餓により誘導されるJNK1等のストレス活性化分子が挙げられる。mTOR非依存性試薬としては、リチウム、カルバマゼピン、及びバルプロ酸で誘導される低イノシトールミリン酸（IP3）レベル、又はミノキシジル等のL型カルシウムチャネルアンタゴニストに暴露することで生じる低細胞内カルシウムが挙げられる。その他のmTOR非依存性試薬としては、カルパイン（カルパスタチン）、スフィンゴリピド（S1P）、及び、例えば飢餓又は低酸素状態により誘導されるような過酸化水素等の活性酸素の化学的阻害が挙げられる。これらの試薬のうちの1つ又は複数は、IFN-の代わりに又はIFN-模倣薬の代わりに使用するために提供される。例えば、Ravikumar et al (2010) Phys. Revs. 90:1383-1435を参照。

20

【0044】

「メラノーマ特異的ペプチドの60%超」におけるような「%」という語は、ペプチド分子の数を意味し、抗原的に異なる別のペプチドの数を意味するものではない。「メラノーマ特異的ペプチドの80%超」におけるような「%」という語は、ペプチド分子の数を意味し、抗原的に異なる別のペプチドの数を意味するものではない。「メラノーマ特異的ペプチドの40%未満」におけるような「%」という語は、ペプチド分子の数を意味し、抗原的に異なるペプチドの数を意味するものではない。「メラノーマ特異的ペプチドの20%未満」におけるような「%」という語は、ペプチド分子の数を意味し、抗原的に異なるペプチド等の数を意味するものではない。

30

【0045】

「メラノーマ特異的ペプチドの60%超」におけるような「ペプチド」という語は、ペプチド分子、オリゴペプチド分子、及びポリペプチド分子の数の和を意味する。「メラノーマ特異的ペプチドの80%超」におけるような「ペプチド」という語は、ペプチド分子、オリゴペプチド分子、及びポリペプチド分子の数の和を意味する。「メラノーマ特異的ペプチドの40%未満」におけるような「ペプチド」という語は、ペプチド分子、オリゴペプチド分子、及びポリペプチド分子の数の和を意味する。「メラノーマ特異的ペプチドの20%未満」におけるような「ペプチド」という語は、ペプチド分子、オリゴペプチド分子、及びポリペプチド分子等の数の和を意味する。

40

【0046】

「自食性及び非アポトーシス性にバイアスが掛かった」という語は、in vitro

50

で IFN - で処理した際に、少なくとも 60%、少なくとも 70%、少なくとも 80%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98% が自食性及び非アポトーシス性である癌細胞、例えばメラノーマ細胞を意味する。様々なメラノーマ細胞を言及するのに使用する専門用語における以下の相違に注意されたい：自食性及び非アポトーシス性である細胞は、非自食性及びアポトーシス性である細胞と同じではない。

#### 【0047】

1つ又は複数の癌細胞に由来するペプチドといった文脈における「由来する」とは、以下を包含する。癌細胞は、例えば、ホモジナイザー又は浸透圧破裂により破壊することができ、粗抽出物を生じる。粗抽出物のペプチド、オリゴペプチド、及びポリペプチドを樹状細胞に暴露させた後に、樹状細胞によりペプチドを処理することができる。また、由来するは、癌細胞が生存しているか、癌細胞が照射処理されても依然として代謝的に活性であるか、又は癌細胞が核酸架橋剤で処理されても依然として代謝的に活性である無傷癌細胞を、樹状細胞に与えることを含む。「由来する」は、樹状細胞に取り込まれることで癌細胞に由来することになる、癌細胞残屑、遊離癌細胞タンパク質、及び照射癌細胞の混合物を含む。

10

#### 【0048】

「投与」とは、ヒト、哺乳類、哺乳類被験体、動物、獣医学的被験体、プラセボ被験体、研究被験体、実験被験体、細胞、組織、臓器、又は生体液に適用される場合、これに限定されるものではないが、外因性リガンド、試薬、プラセボ、小分子、薬剤、治療剤、診断剤、又は組成物を、被験体、細胞、組織、臓器、又は生体液等と接触させることを意味する。「投与」は、例えば、治療方法、薬物動態的方法、診断方法、研究方法、プラセボ的方法、及び実験的方法を意味することができる。細胞の処理は、試薬と細胞との接触、また、流体が細胞と接触している場合の試薬と流体との接触を包含する。また、「投与」は、試薬、診断剤、結合組成物による、又は別の細胞による、例えば細胞の、in vitro 及び ex vivoでの処理を包含する。

20

#### 【0049】

「アゴニスト」とは、リガンド及び受容体に関連する場合、受容体を刺激する、分子、分子の組み合わせ、複合体、又は試薬の組み合わせを含む。例えば、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) のアゴニストは、GM-CSF、GM-CSF の変異体もしくは誘導体、GM-CSF のペプチド模倣物、GM-CSF の生物学的機能を模倣する小分子、又は GM-CSF 受容体を刺激する抗体を包含することができる。アンタゴニストとは、リガンド及び受容体に関連する場合、受容体を阻害するか、対抗するか、下方制御するか、及び / 又は脱感作させる、分子、分子の組み合わせ、又は複合体を含む。「アンタゴニスト」は、受容体の構成的活性を阻害する任意の試薬を包含する。構成的活性とは、リガンド / 受容体相互作用が存在しない時に現れる活性である。また、「アンタゴニスト」は、受容体の刺激された (又は制御された) 活性を阻害又は妨害する任意の試薬を包含する。一例として、GM-CSF 受容体のアンタゴニストとしては、限定を示唆するものではないが、リガンド (GM-CSF) に結合してリガンドが受容体に結合するのを防ぐ抗体、受容体に結合してリガンドが受容体に結合するのを防ぐ抗体、又は抗体が受容体を不活性なコンフォメーションでロックする場合が挙げられる。

30

#### 【0050】

明示的に別段の定めをした場合を除き、又は文脈上そうでないとする指示がない限り、「発現」という語は、以下を包含する。発現は、mRNA の生合成、ポリペプチドの生合成、例えば、翻訳後修飾によるポリペプチドの活性化、又は細胞内部位の変化もしくはクロマチンへの動員による発現の活性化を包含する。言い換えれば、「発現増加」は、生合成の増加、リン酸化反応に起因する活性の増加、又は細胞質ゾルから核への移動に起因する活性の増加を包含する。

40

#### 【0051】

抗原提示細胞 (APC) とは、抗原を T 細胞に提示するために使用される免疫系の細胞である。APC としては、樹状細胞、単球、マクロファージ、辺縁帯クッパー細胞、小グ

50

リア細胞、ランゲルハンス細胞、T細胞、及びB細胞が挙げられる（例えば、Rodríguez-Pinto and Moreno（2005）Eur. J. Immunol. 35: 1097-1105を参照）。樹状細胞は、少なくとも2つの系統で生じる。第1の系統は、pre-DC1、骨髓DC1、及び成熟DC1を包含する。第2の系統は、CD34<sup>++</sup>CD45RA-初期前駆多能性細胞、CD34<sup>++</sup>CD45RA<sup>+</sup>細胞、CD34<sup>++</sup>CD45RA<sup>++</sup>CD4<sup>+</sup>IL-3Ralpha<sup>++</sup>pro-DC2細胞、CD4<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>形質細胞様pre-DC2細胞、リンパ球様ヒトDC2形質細胞様由来DC2、及び成熟DC2を包含する。（例えば、Gilliet and Liu（2002）J. Exp. Med. 195: 695-704；Bauer, et al.（2001）J. Immunol. 166: 5000-5007；Arpinati, et al.（2000）Blood 95: 2484-2490；Kadowaki, et al.（2001）J. Exp. Med. 194: 863-869；Liu（2002）Human Immunology 63: 1067-1071；McKenna, et al.（2005）J. Virol. 79: 17-27；O'Neill, et al.（2004）Blood 104: 2235-2246；Rossi and Young（2005）J. Immunol. 175: 1373-1381；Banchereau and Palucka（2005）Nat. Rev. Immunol. 5: 296-306を参照）。

## 【0052】

「有効量」とは、これに限定されるものではないが、病状又は疾患の症状又は兆候を、軽減させ、快復せ、和らげ、予防し、又は診断することができる量を包含する。明示的に又は文脈からそうではないと記載しない限り、「有効量」は、病状を軽減するのに十分な最少量に限定されるものではない。病気又は疾患の重症度、並びに病気又は疾患を予防し、治療し、又は和らげるための治療の能力は、限定を示唆するものではないが、バイオマークー又は臨床パラメーターにより測定することができる。

## 【0053】

バイオマークーとしては、ポリペプチド、ポリペプチドの位置（例えば、小胞、細胞内、膜結合型）、核酸、血球数、血清、尿、又は脳脊髄液中の代謝物レベル、腫瘍細胞数、癌幹細胞数、腫瘍レベルが挙げられる。腫瘍レベルは、RECIST基準により決定することができる（Eisenhauer, et al.（2009）Eur. J. Cancer. 45: 228-247）。発現マーカーは、mRNAの遺伝子発現又は遺伝子増幅、抗原の発現、及びポリペプチドの発現を包含する。臨床パラメーターとしては、無増悪生存率（PFS）、6ヶ月PFS、無病生存率（DFS）、無増悪期間（TTP）、遠隔転移期間（TDM）、及び全生存率が挙げられるが、限定を示唆するものではない。

## 【0054】

「標識」されている組成物は、分光光学的方法、光化学的方法、生化学的方法、免疫化学的方法、同位体方法、又は化学的方法により直接又は間接的に検出することができる。例えば、有用な標識としては、<sup>32</sup>P、<sup>33</sup>P、<sup>35</sup>S、<sup>14</sup>C、<sup>3</sup>H、<sup>125</sup>I、安定同位体、エピトープタグ、蛍光染料、高電子密度試薬、基質、又は酵素、例えば酵素結合免疫測定において用いられるもの、又は蛍光体（fluorophores）が挙げられる（例えば、Rozinov and Nolan（1998）Chem. Biol. 5: 713-728を参照）。

## 【0055】

## 免疫応答の評価方法

本開示はまた、免疫応答を特徴付けるためのELISPOTアッセイ、細胞内サイトカイン染色（ICS）、及びテトラマーアッセイを提供する（例えば、Pardollの米国特許出願公開第2007/0190029号明細書；Chattopadhyay（2008）Cytometry A. 2008 73: 1001-1009；V

10

20

30

40

50

o l l e r s ( 2 0 0 8 ) Immunology . 1 2 3 : 3 0 5 - 3 1 3 ; L  
 al v a n i , et al . ( 1 9 9 7 ) J . Exp . Med . 1 8 6 : 8  
 5 9 - 8 6 5 ; Waldrop ( 1 9 9 7 ) J . Clin . Invest . 9  
 9 : 1 7 3 9 - 1 7 5 0 ; Hudgens ( 2 0 0 4 ) J . Immunol .  
 Methods 2 8 8 : 1 9 - 3 4 ; G ou l d e r ( 2 0 0 1 ) J . Vir  
 o l . 7 5 : 1 3 3 9 - 1 3 4 7 ; G ou l d e r ( 2 0 0 0 ) J . Exp .  
 Med . 1 9 2 : 1 8 1 9 - 1 8 3 1 ; Anthony ( 2 0 0 3 ) Meth  
 ods 2 9 : 2 6 0 - 2 6 9 ; B ad o v i n a c and H ar t y ( 2 0 0  
 0 ) J . Immunol . Methods 2 3 8 : 1 0 7 - 1 1 7 を参照 ) 。患者  
 10 において免疫応答は、客観的反応 ( RECIST 基準 ) 、全生存率、無増悪生存率 ( PFS ) 、無病生存率、遠隔転移期間、6ヶ月 PFS 、12ヶ月 PFS 等を含め、腫瘍の臨床試験で使用されるエンドポイントにより評価することができる。

#### 【 0 0 5 6 】

##### ワクチン

本開示の樹状細胞ワクチンは、皮内経路、結節内経路、粘膜経路、皮下経路、又はこれらの任意の組み合わせにより投与することができる。1回の投与量は、約  $1 0 \times 1 0^3$  樹状細胞、 $2 0 \times 1 0^3$  細胞、 $5 0 \times 1 0^3$  細胞、 $1 0 0 \times 1 0^3$  細胞、 $2 0 0 \times 1 0^3$  細胞、 $5 0 0 \times 1 0^3$  細胞、 $1 \times 1 0^6$  細胞、 $2 \times 1 0^6$  細胞、 $2 0 \times 1 0^6$  細胞、 $5 0 \times 1 0^6$  細胞、 $1 0 0 \times 1 0^6$  細胞、 $2 0 0 \times 1 0^6$  細胞、 $5 0 0 \times 1 0^6$  細胞、 $1 \times 1 0^9$  細胞、 $2 \times 1 0^9$  細胞、 $5 \times 1 0^9$  細胞、 $1 0 \times 1 0^9$  細胞等を含むことができる。投与回数は、例えば、週に1回、週に2回、2週間に1回、3週間に1回、4週間に1回、月に1回、2ヶ月に1回、3ヶ月に1回、4ヶ月に1回、5ヶ月に1回、6ヶ月に1回等とすることができます。投与を行う日の合計日数は、1日、2日、又は3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、もしくは20日等とすることができます。当然のことながら、どの投与においても同じ日に2回以上の注射を含む可能性がある。一つの態様において、本開示は、腫瘍細胞全体を樹状細胞にロードすることを含み、樹状細胞にロードされたメラノーマ細胞由来タンパク質のうちの少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも99%が、腫瘍細胞全体に帰する。限定されない実施形態において、樹状細胞ワクチンは、フラスコ、バイアル、ボトル、シリング、カテーテル、カニューレ等に収められる。投与に関して、投与される樹状細胞の少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも99%が、成熟樹状細胞である。

#### 【 0 0 5 7 】

##### ワクチンの均質性

例示的な実施において、本開示は、in vitroでのロードに由来するメラノーマペプチドを含有する樹状細胞を含むワクチンであって、ワクチンが、樹状細胞 (メラノーマペプチドを含有するDC及びメラノーマペプチドを含有しないDCの集合体) を含み、樹状細胞 / メラノーマ細胞の比率が、少なくとも5 / 9 5 、 1 0 / 9 0 、 2 0 / 8 0 、 3 0 / 7 0 、 4 0 / 6 0 、 5 0 / 5 0 、 6 0 / 4 0 、 7 0 / 3 0 、 8 0 / 2 0 、 9 0 / 1 0 、 9 5 / 5 、 9 8 / 2 9 9 / 1 等であるワクチンを提供する。また、in vitroでのロードに由来するメラノーマペプチドを含有する樹状細胞を含むワクチンであって、ワクチンが、樹状細胞 (メラノーマペプチドを含有するDC及びメラノーマペプチドを含有しないDCの集合体) を含み、[樹状細胞] / [DCでもメラノーマでもない細胞] の比率が、少なくとも5 / 9 5 、 1 0 / 9 0 、 2 0 / 8 0 、 3 0 / 7 0 、 4 0 / 6 0 、 5 0 / 5 0 、 6 0 / 4 0 、 7 0 / 3 0 、 8 0 / 2 0 、 9 0 / 1 0 、 9 5 / 5 、 9 8 / 2 、 及び9 9 / 1 等であるワクチンを提供する。本開示は、第1の区画にメラノーマ細胞を含み、第2の区画に樹状細胞を含む、区画された容器を示す。2つの区画は、膜、フィルター、バ

10

20

30

40

50

ルブ、導管、連結器により隔てることができ、これによりメラノーマ細胞が樹状細胞に接触するのを防ぐが、手動による移送、又は膜の除去もしくはバルブの開放によりメラノーマ細胞が樹状細胞に接触できるようにし、メラノーマ細胞、メラノーマ細胞片、及び/又はメラノーマペプチドを樹状細胞にロードできるようにする。

【0058】

インターフェロン - 模倣薬

本開示は、模倣薬、例えば、模倣ペプチド95-132等のインターフェロン - 模倣薬を包含する (Ahmed (2007) J. Immunol. 178: 4576-4583; Fulcher (2008) FEBS Lett. 582: 1569-1574)。本開示は、全体的な目的が、自食性及び非アポトーシス性であるメラノーマ細胞に富んだメラノーマ細胞集団を得ることである、IFN - 模倣薬を提供する。IFN 模倣薬は、例えば、インターフェロン - と同じアゴニスト活性を有する抗体を包含する。

10

【0059】

メラノーマ細胞の不活性化

本開示は、癌細胞を、例えば、照射又は核酸架橋剤により不活性化させる、組成物及び方法を提供する。一例として、架橋剤は、DNAを架橋するが、タンパク質は未修飾のままにすることができる。核酸アルキル化剤は、-アラニン、N-(アクリジン-9-イル)、2-[ビス(2-クロロエチル)アミノ]エチルエステルであってもよい。幾つかの実施形態において、核酸標的化化合物は、UVA照射により活性化されたソラレン化合物である。例えば、核酸標的化化合物は、4'--(4-アミノ-2-オキサ)ブチル-4,5',8-トリメチルソラレン(本明細書中で「S-59」とも称する)であってもよい。細胞は、150マイクロモーラーのソラレンS-59及び3J/cm<sup>2</sup>のUVA光線(FX1019照射装置、バクスター・フェンバル社、ラウンドレーク、イリノイ州)で不活性化することができる。S-59での不活性化は光化学処理と呼ばれ、細胞を完全に不活性化する。様々な濃度の核酸架橋剤について、細胞の不活性化における有効性、例えば、細胞分裂の妨害における有効性を検証してもよい。S-59は、核酸を架橋するが、無傷タンパク質を未修飾のままにするという機能により、識別することができる。細胞は、0、1、10、100、及び1000nMのソラレンS-59を含有する5mLの生理食塩水中で浮遊させることができる。各サンプルは、以下のように照射することができる。S-59は、100nMの濃度で添加することができる。サンプルには、約2J/cm<sup>2</sup>の放射線量でUVA照射することができる(FX1019照射装置、バクスター・フェンバル、ラウンドレーク、イリノイ州)。次に、各サンプルを15mLチューブに移し、遠心分離し、上清を除去し、その後、5mLの生理食塩水で洗浄し、遠心分離し、上清を除去し、最終ペレットを0.5mLの生理食塩水に懸濁した(Dubenskyの米国特許7,833,775号明細書及びDubenskyの米国特許7,691,393号明細書)。

20

30

30

【0060】

非アポトーシス性であるメラノーマ細胞の富化

メラノーマ細胞集団は、例えば、非アポトーシス性自食性細胞を非自食性及びアポトーシス性である細胞から分離することにより、非アポトーシス性であるメラノーマ細胞を富化することができる。分離は、自食性非アポトーシス性細胞が表面に接着することにより行われ、他の細胞は浮遊している。また、非アポトーシス性メラノーマ細胞が富化された集団は、ホスファチジルセリンに特異的な抗体を用いてアポトーシス性細胞を除去することにより得ることができる。固定化抗体により細胞を除去する手法が利用できる(Onodera (1998) Ther. Apher. 2: 37-42)。ホスファチジルセリンに特異的な抗体は市販されている(例えば、EDミリポア社、ビレリカ、マサチューセッツ州)。また、メラノーマ細胞のバルク集団は、蛍光抗ホスファチジルセリン抗体で標識することができる。標識されたアポトーシス性メラノーマ細胞は、フローサイトメトリー、アフィニティークロマトグラフィー、免疫磁気分離法で除去され

40

50

る（例えば、Hoeppener (2012) Recent Results Cancer Res. 195: 43-58; Dainiak (2007) Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 106: 1-18を参照）。

#### 【0061】

##### アポトーシス阻害剤

アポトーシス阻害剤Z-VAD (Z-VAD-fmk)は、例えば、エンゾライフサイエンス社（エクセター、英国）、R&Dシステムズ社（ミネアポリス、ミネソタ州）、トクリスバイオサイエンス社（ブリストル、英国）、バイオモル社（ブリマスミーティング、ペンシルベニア州）、及びEMDケミカルズ社（ギブスタウン、ニュージャージー州）から購入することができる。Z-VAD-fmkは、合成ペプチドのZ-Val-Ala-Asp(OMe)-CH<sub>2</sub>Fである。カスパーーゼは、プロテアーゼファミリーのシステムイン-アスパラギン酸特異的メンバーである。カスパーーゼは、TRAIL、FAS等の死滅受容体ライゲーション、DNA損傷、ストレス、血清飢餓、及び細胞の種類によってはインターフェロンにより活性化される。カスパーーゼは、核フラグメンテーション、クロマチン凝縮、細胞質の完全性の喪失を含めた、高度に調節されたアポトーシスの過程において、重要な役割を果たす。汎カスパーーゼ阻害剤Z-VAD-fmk（カルボベンゾキシバリル-アラニル-アスパルチル-[O-メチル]-フルオロメチルケトン）は、カスパーーゼプロテアーゼの触媒部位に不可逆的に結合し、アポトーシス誘導におけるカスパーーゼプロテアーゼの機能を阻害する。IFN-に応答してアポトーシスを行う細胞の能力を阻害することは、洗浄により浮遊アポトーシス性細胞を除去する選択工程を経ずに、非アポトーシス性であるが自食性である細胞を生成する手段となり得る。

10

20

20

#### 【0062】

本開示の一つの実施形態において、腫瘍細胞は、腫瘍細胞を樹状細胞又は別のタイプの抗原提示細胞（APC）にロードする前にIFN-で処理する。別の実施形態において、腫瘍細胞は、腫瘍細胞を樹状細胞又は別のタイプのAPCにロードする前にIFN-で処理しない。

#### 【0063】

本開示は、薬剤、試薬、キット（診断キットを含む）を提供する。これらの薬剤、試薬、及びキットは、樹状細胞、抗体、又は抗原を含む。また、少なくとも1つの樹状細胞及び少なくとも1つの抗原を含む組成物の投与方法、抗体形成の刺激方法、ADC/Cの刺激方法、補体依存性細胞傷害の刺激方法、並びに患者の適性の判断、臨床試験又は通常の治療に即した患者の試験対象/除外基準の決定、及び薬剤又は試薬に対する応答の予測のための方法及びキットを提供する。補体依存性細胞傷害については説明されている（例えば、Goodman, et al. (1990) J. Clin. Oncol. 8: 1083-1092; Cheson (2010) J. Clin. Oncol. 8: 3525-3530を参照）。本開示の医薬組成物、試薬、及び関連方法は、CD83陽性樹状細胞を包含する。CD83は、IFN-処理癌細胞をロードすることにより誘発される。本開示のCD83の態様において、CD83は、少なくとも2%、少なくとも3%、少なくとも4%、6%、7%、8%、9%、10%等で誘発される。別の態様において、樹状細胞のCD83が、IFN-処理癌細胞をロードすることにより検出可能に誘導されない、DC試薬又はDC関連方法を除外する。

30

40

40

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0064】

【図1】図1は、IFN-で処理する前（左側）及びIFN-で72時間処理した後（右側）の培養腫瘍細胞のグラフを示す。処理後、培養腫瘍細胞は、浮遊性、非自食性及びアポトーシス性であるか、又は接着性、自食性及び非アポトーシス性である。浮遊性細胞では、アポトーシスのマーカーであるホスファチジルセリンの発現が見られる。浮遊性細胞では、MHCクラスIIの発現が比較的少ないが、接着性細胞では、MHCクラスIIの過剰発現が見られる。

【図2A】図2A-Dは、樹状細胞へのロードに使用したIFN-処理自己腫瘍細胞の

50

特徴を示す。自己メラノーマ腫瘍細胞は、15% FBS / ECSの RPMI 中で 1000 IU / mL の IFN- $\alpha$  で 72 時間処理した後、又は処理せずに、採取し、100 Gy で照射し、凍結保存した。次に、細胞は、AIMV 中で解凍し、DC に抗原をロードする前に、フローサイトメトリー用サンプル及び免疫プロッティングに用いる細胞溶解物を調製するためのサンプルを採取した。4 つの独立した自己メラノーマ細胞株の例を示す（図 2 A）。

【図 2 B】4 つの独立した自己メラノーマ細胞株の例を示す（図 2 B）。

【図 2 C】4 つの独立した自己メラノーマ細胞株の例を示す（図 2 C）。

【図 2 D】自己腫瘍細胞の IFN- $\alpha$  処理による主要組織適合遺伝子複合体の誘導（図 2 D）。腫瘍細胞は、1000 IU / mL の IFN- $\alpha$  で 72 時間処理した後、又は処理せずに、採取し、その後 MHC クラス I 及びクラス II を分析した。陽性集団を識別するために、対照アイソタイプ抗体を使用した。黒点データは、平均蛍光強度の中央値 + / - 95% 信頼区間を意味する。N（サンプル数）= 65。一つの態様において、本開示は、樹状細胞にロードするための非自己腫瘍細胞を除外し、かつ、樹状細胞にロードするための非自己腫瘍細胞の使用方法を除外する。

【図 3 A】図 3 A 及び 3 B は、インターフェロン- $\alpha$  で処理した又は処理していない自己メラノーマ細胞株をロードした樹状細胞の表現型を示す。4 つの自己メラノーマ細胞株のセットは、1000 IU / mL の IFN- $\alpha$  で 72 時間処理した後、又は処理せずに、照射し、凍結保存した。次に、細胞は、AIMV 中で解凍し、自己樹状細胞と約 24 時間融合させた後、採取し、CD80、CD83、CD86、及び MHC クラス II の発現をフローサイトメトリーで分析した（図 3 A）。

【図 3 B】図 3 B にデータを集約した。平均値  $\pm$  SD（標準偏差）を示す（n = 4）。

【図 4 A】図 4 A 及び 4 B は、投与量の調整に使用した樹状細胞の表現型を示す。IFN- $\alpha$  処理及び照射を行った自己腫瘍細胞をロードする前の DC サンプル（ATC ロード前 DC、N = 53）及びロードした後の DC サンプル（ATC ロード後 DC、N = 65）について、CD80、CD83、CD86、及び MHC クラス II の発現をフローサイトメトリーで評価した。FACS キャリバー（Caliber）（登録商標）ビーズを使用してフローサイトメーター機器初期設定を設定し、その後、設定は、データ収集の間中一定に保たれた（図 4 A）。

【図 4 B】図 4 B において、発現の割合（%）及び平均蛍光強度（MFI） $\pm$  SD の値を、ATC ロード前と ATC ロード後とで比較した。\* p = 0.019、\*\* p = 0.0009。

【図 5 A】図 5 A - 5 C は、インターフェロン- $\alpha$  処理メラノーマ細胞が起こす自食作用を示す。市販のメラノーマ細胞株のセットを、5% FBS / RPMI 中で 1000 IU / mL の IFN- $\alpha$  と共に 72 時間インキュベートした。SK-5-Mel 細胞培養液の位相差顕微鏡写真をインキュベーション期間の終了時に撮影した（図 5 A）ところ、自食胞を思わせる小胞を有する巨細胞が見られた。

【図 5 B】自食胞形成の確認は、IFN- $\alpha$  処理前に、GFP-LC3B 構築物のトランسفエクションにより行った（図 5 B）。

【図 5 C】IFN- $\alpha$  処理後の自食作用の誘導は、LC3B の抗体を用いたウェスタンプロッティングで確認した（図 5 C）。この LC3B の抗体は、自食性の血管形成と関連することが示されている LC3 の速移動型（faster migrating form）を認識する。

【図 6 A】図 6 A 及び 6 B は、インターフェロン- $\alpha$  に応答して誘導されたアポトーシス及び自食作用を表す。SK-5-Mel 細胞は、1000 IU / mL の IFN- $\alpha$  と共に 72 時間インキュベートした後、非接着性集団及び接着性集団を収集し、7-AAD 及びアネキシン - V を用いてフローサイトメトリーでアポトーシス及び自食作用を分析した（図 6 A）。

【図 6 B】エンゾ社製 Cytoto-ID（登録商標）オートファジー検出色素を用いて、フローサイトメトリーでメーカー提供の色素の平均強度ピークシフトを測定することにより

自食作用を測定した(図6B)。

【図6C】5%FBS/RPMIの場合と比較したピークシフトの倍率変化(fold change)を、自食作用の誘導の陽性対照としての無血清の場合と共に図6Cに示す。

【図7A】図7は、カスパーゼ活性阻害後の自食作用の誘導により、メラノーマ細胞でのIFN- $\alpha$ に応答した自食作用の誘導が影響を受けなかったことを示す。SK-5-Mel細胞は、20uMの汎カスパーゼ阻害剤z-VAD又はその対照化合物z-FAの存在下、1000IU/mLのIFN- $\alpha$ で72時間処理した。細胞を採取し、図6Cと同様にフローサイトメトリーで自食作用を分析した。

【図7B】図7は、カスパーゼ活性阻害後の自食作用の誘導により、メラノーマ細胞でのIFN- $\alpha$ に応答した自食作用の誘導が影響を受けなかったことを示す。SK-5-Mel細胞は、20uMの汎カスパーゼ阻害剤z-VAD又はその対照化合物z-FAの存在下、1000IU/mLのIFN- $\alpha$ で72時間処理した。細胞を採取し、図6Cと同様にフローサイトメトリーで自食作用を分析した。

【図8】図8は、10uMの自食作用阻害剤3-メチルアデニン(3-MA)の存在下、1000IU/mLのIFN- $\alpha$ と共に72時間インキュベートしたSK-5-Mel細胞を示す。その後、細胞は採取し、フローサイトメトリーでアポトーシス及びMHCクラスII(HLA-DR)の発現を分析した。

【図9】図9は、MHCクラスII又はアポトーシスの変化を分析した、患者の腫瘍検体(N=36)から生成された腫瘍細胞株由来のIFN- $\alpha$ 処理細胞を示す。示したデータは、平均蛍光強度±SEの平均値(average)である。

【図10】図10は、フローサイトメトリーでMHCクラスII又はアポトーシスを分析した、患者特異的ワクチン免疫療法のための樹状細胞へのロードに使用したサンプル由来のIFN- $\alpha$ 処理細胞を示す(N=54)。MHCクラスII平均蛍光強度における倍率変化及びアポトーシス細胞(アネキシン-V陽性)の割合(%)を示す。

【図11】図11は、自食性非アポトーシス性インターフェロン- $\alpha$ 処理腫瘍細胞をロードした樹状細胞を受けた患者において、MHCクラスIIの誘導とアポトーシスの欠如(インターフェロン- $\alpha$ 耐性)との相関関係が、より良好な無増悪生存率と関連することを示す(図11)。

【図12】図12は、自食性非アポトーシス性インターフェロン- $\alpha$ 処理腫瘍細胞をロードした樹状細胞を受けた患者において、MHCクラスIIの誘導とアポトーシスの欠如(インターフェロン- $\alpha$ 耐性)との相関関係が、より良好な全生存率と関連することを示す(図12)。

【図13】図13は、3試験からの生存曲線を示す。プロット(カプラン・マイヤープロット)は、臨床試験期間中に生存していた被験者の割合(%)を示す段階的曲線である。各群は、DC-54(黒丸)、TC-74(黒四角)、TC-24(黒三角)、及びDC-18(線)で示す。TC-24において最も生存率が低かった。次に生存率が低かったのは、TC-74であった。TC-24は、24人の被験者を対象とした試験における腫瘍細胞ワクチンを意味する。DC-54は、54人の被験者が治療を受け、ワクチンが照射自己腫瘍細胞と共に培養した自己樹状細胞(DC)を含む、樹状細胞ワクチンを意味する。

【発明を実施するための形態】

【0065】

自己樹状細胞の生成

樹状細胞は、フィコール分離産物のプラスチック接着法(Choi, et al. (1998) Clin. Cancer Res. 4:2709-2716; Lutf, et al. (1998) Exp. Hematol. 26:489-500; Cornforth, et al. (2011) Cancer Immunol. Immunother. 60:123-131)により、抗生物質無添加のAIM-V培地(インビトロジエン社、グランドアイランド、ニューヨーク州)中で、IL

10

20

30

40

50

- 4 (セルジェニックス社、フレイスバーグ、ドイツ) 及び GM-CSF (バーレックス社、シアトル、ワシントン州) (DC 培地) をそれぞれ 1,000 IU / mL ずつ加えて生成した。次に、IFN- $\gamma$  处理照射自己腫瘍細胞をロードする前に、フラスコを 6 日間培養した。

#### 【0066】

##### IFN- $\gamma$ 自己腫瘍細胞株の生成及び薬剤の調製

純粋腫瘍細胞は、Cornforth らに従って生成した (Cornforth, et al. (2011) Cancer Immunol. Immunother. 60: 123-131; Dillman et al. (1993) J. Immunother. Emphasis Tumor Immunol. 14: 65-69; Dillman et al. (2000) Cancer Biother. Radiopharm. 15: 161-168)。次に、腫瘍細胞は、1,000 IU / mL のインターフェロン- $\gamma$  (インターミューン社、ブリスベン、カリフォルニア州) と共に 72 時間インキュベートし、セシウム源から 100 Gy 照射し、凍結保存した (Selvan, et al. (2007) Int. J. Cancer 122: 1374-1383; Selvan, et al. (2010) Melanoma Res. 20: 280-292)。IFN- $\gamma$  处理及び照射を行った腫瘍細胞は、凍結保存から起こし、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄し、次に培養樹状細胞 (DC) に加え、その後、約 24 時間インキュベートした。抗原ロード DC は、ラバー・ポリスマンで穏やかに剥がして採取し、凍結保存した。IFN- $\gamma$  处理腫瘍細胞又は IFN- $\gamma$  未処理腫瘍細胞、及びロード DC の一定分量を、フローサイトメトリー評価及びトリパンブルー排除分析用に得た。

#### 【0067】

##### 皮膚メラノーマの病期分類

本開示の薬剤または試薬は、メラノーマがステージ I、ステージ II、ステージ III、又はステージ IV と診断されているメラノーマ患者に投与することができる (Mohr, et al. (2009) Ann. Oncology (Suppl. 6) vi14-vi21)。例えば、ステージ I は、局所転移又は遠隔転移の所見がない原発性メラノーマを有する患者を意味する。ステージ II は、リンパ系疾患又は遠隔転移の所見がない患者であり、更に、例えば、被覆上皮の潰瘍を有する 1 mm 超 2 mm 以下の厚さの病変、又は上皮潰瘍を有する 2 mm 超 4 mm 以下の厚さの病変で特徴付けられる患者を含む。ステージ III メラノーマは、病理学的に確認された局所リンパ節転移、又はイントランジット転移もしくは衛生転移を有する病変を含み、患者が、例えば、1 つ、2 つ、3 つ、又は 4 つ以上の罹患リンパ節を有する可能性がある。ステージ IV メラノーマは、遠隔転移の存在で定義され、転移は、遠位の皮膚、皮下組織、もしくはリンパ節のみにあるか、転移が肺転移に関連しているか、又は転移が他の全ての内臓部に関連している。

#### 【0068】

本開示は、予防手段である投与方法、即ち、メラノーマと未だ診断されていないか、又は診断されたことがない被験体への使用方法を包含する。被験体が早期にメラノーマと診断され、早期に治療が成功してメラノーマが根絶したことがあり (又は自然に完全寛解した経験があり)、根絶後、投与が予防的に用いられている投与方法を包含する。

#### 【0069】

##### 腫瘍抗原

限定を示唆するものではないが、本開示のメラノーマ細胞は、Mage、Mart-1、Mel-5、HMB45、S100、又はチロシナーゼのうちの 1 つ又は複数を発現する (Dillman et al. (2011) Cancer Biotherapy Radiopharmaceuticals 26: 407-415)。1 つの態様において、腫瘍抗原の検出に IFN- $\gamma$  に暴露していない細胞を使用する一方、別の態様においては、腫瘍抗原の検出を IFN- $\gamma$  で処理した細胞で行う (例えば、Cornforth et al. (2011) Cancer Biotherapy Radiopharmaceuticals 26: 407-415)。

opharmaceuticals 26:345-351を参照)。その全体が参照により本明細書に援用されるDubenskyらによる米国特許出願公開第2007/0207171号明細書に開示されているように、1つ又は複数のメラノーマ抗原又は1つ又は複数の単離したメラノーマ抗原を含む組成物を発現するメラノーマ細胞を包含する。

#### 【0070】

##### アポトーシスの測定

アポトーシスは、ヨウ化プロピジウム及び7-アミノアクチノマイシンD(7-AAD)等の色素で染色すること、ミトコンドリア内膜電位の低下を測定すること、カスパーゼの活性化又は切断を測定することにより、多くの試薬、例えば、蛍光色素標識アネキシンで検出又は測定することができる。例えば、George, et al. (2004) Cytometry Part A. 59A:237-245を参照。アポトーシスの初期事象は、細胞膜の外面においてホスファチジルセリンへ暴露することであり、蛍光色素標識アネキシンで検出することができる。利用可能な方法により、生細胞、壊死細胞、初期アポトーシス細胞、及び後期アポトーシス細胞を区別することができる。本開示では、7-AADアッセイによりアポトーシスではないとされるメラノーマ細胞、アネキシンVアッセイによりアポトーシスではないとされるメラノーマ細胞、IFN-処理後のアポトーシス用アッセイによりアポトーシスではないとされるメラノーマ細胞(Dillman et al. (2011) Cancer Biotherapy Radiopharmaceuticals 26:407-415)、又はBcl-2、カスパーゼ-3、P53、もしくはスルビビンのうちの1つ又は複数のバイオマーカーによりアポトーシスではないとされるメラノーマ細胞(Karam, et al. (2007) Lancet Oncol. 8:128-136)を使用する。本開示の医薬組成物、試薬、及び関連方法は、例えば、参照により本明細書に援用されるHerylynらの米国特許7,544,465号明細書、Thorpeらの米国特許7,714,109号明細書に従ってアポトーシスが判断される、アポトーシス性のIFN-処理メラノーマ細胞を除外する。

#### 【0071】

##### 自食作用の測定

自食作用は、多くのタンパク質及びいくつかの細胞小器官の分解に用いられる自然発生的な過程である。自食作用は、タンパク質及び細胞小器官の代謝回転、飢餓応答、細胞分化、細胞死等を媒介する。微小管結合タンパク質軽鎖3(LC3)は、自食作用をモニターするものである。1つの手法において、自食作用は、LC3-IからLC3-IIへの変換を含むLC3の変換を測定することにより検出できる。LC3-IIの量は、自食胞の数と相関する。詳細には、LC3は、細胞質性及び可溶性であるが、LC3-IIは膜上に存在する。LC3-IIは、脂質と結合するため、分子量が大きい。LC3プロセッシングは、例えば、ウェスタンプロットにより測定することができ、一方、自食作用、自食性小胞、及び自食胞は、顕微鏡検査で測定することができる。自食作用は、例えば、プロセッシング後のLC3-IIの検出、初期の自食性画分と後期の自食性画分との比率、又は自食体積により定量することができる。(Mizushima and Yoshimori (2007) Autophagy 3:542-546; 634-641, Tanida et al. (2008) Methods Mol. Biol. 445:77-88, Eng, et al. (2010) Autophagy 6:634-641)を参照。1つの態様において、本開示は、自食作用を、適切な自食性癌細胞を選択するためのスクリーニング手段として使用し、細胞は、1つ又は複数の特定の段階で自食作用が起こることにより選択できる。これらの自食作用の段階は、(1)自食胞による細胞質画分の隔離、(2)自食胞とリソソームとの融合によるオートリソソームの形成、及び(3)リソソーム内でのプロテアーゼによる自食胞の中身の分解、を含む。別の態様において、本開示は、主に第1段階を示す細胞、主に第2段階を示す細胞、主に第3段階を示す細胞、主に第1及び第2段階を示す細胞、主に第2及び第3段階を示す細胞、又は主に3つの段階全てを示す細胞を含む。さらに別の態様において、本開示は、第

10

20

30

40

50

1段階を示す細胞、第2段階を示す細胞、第3段階を示す細胞、第1及び第2段階を示す細胞、第2及び第3段階を示す細胞、又は3つの段階全てを示す細胞を含む。

【0072】

インターフェロン- (IFN-) のシグナル伝達

IFN- (II型インターフェロン) のシグナル伝達は、多くの遺伝子、例えば、IFN- 受容体、STAT1、STAT2、STAT1ホモ二量体、STAT1 / STAT2ヘテロ二量体、IRF-1、GAS、及びIRF-Eの発現に依存する。研究により、IFN- のシグナル伝達は、IFN- 受容体 (IFNGR1鎖、IFNGR2鎖) に依存していることが示されている。細胞表面におけるIFNGRの低発現は、IFN- のシグナル伝達のいくつかの側面を阻害することができる (Schroder, et al. (2004) J. Leukocyte Biol. 75: 163-189)。1つの態様において、本開示は、IFNGRの表面発現が低い癌細胞の使用を除外する。別の態様において、本開示は、STAT1ホモ二量体を発現する癌細胞をスクリーニングし、これらの細胞を使用し、STAT1ホモ二量体を発現しない細胞を実質的に除外する。さらに別の態様において、本開示は、STAT1のリン酸化 (セリン-727) が見られる細胞のスクリーニングを検討する。また、STAT1遺伝子に機能喪失突然変異を有する患者からの癌細胞の除外を検討する (例えば、Dupuis, et al. (2001) Science 293: 300-303、Schroder, et al. (2004) J. Leukoc. Biol. 75: 163-189を参照)。以下は、IRF遺伝子ファミリーに関する。IRF-1、IRF-2、及びIRF-9は、全てIFN- のシグナル伝達に関与する。本開示は、IRF遺伝子ファミリーのこれらの遺伝子の1つ又は複数を発現する癌細胞の使用、又はこれらの遺伝子の1つ又は複数を発現しない癌細胞の除外を含む。

【0073】

IFN- 応答遺伝子

いくつかの例示的な実施形態において、本開示は、IFN- に応答するメラノーマ細胞又は前腫瘍性メラノーマ細胞の使用を要する生体物質、組成物、試薬、及び方法を含む。メラノーマ細胞は、1つ又は複数のIFN- 応答遺伝子の発現のためのアッセイにより、特定、区別、及び選択することができる。多くのIFN- 応答遺伝子が、特定されている (例えば、Halonen, et al. (2006) J. Neuroimmunol. 175: 19-30、MacMicking (2004) 11: 601-609、Boehm, et al. (1997) 15: 749-795を参照)。前記アッセイには、患者からの1つ又は複数のメラノーマ細胞の除去、IFN- の添加がある場合と添加がない場合での細胞培養、及びIFN- への応答の判定を含むことができる。アッセイにおいて、IFN- 誘導性遺伝子の発現は、IFN- 誘導性遺伝子のプロモーターへの転写因子の結合、IFN- 誘導性遺伝子からのmRNAの発現、発現したポリペプチド等を感知するアッセイにより検出することができる。IFN- 応答遺伝子としては、例えば、免疫応答に使用され、転写因子、輸送タンパク質をコードする遺伝子、アポトーシス遺伝子、細胞増殖又は細胞維持に使用される遺伝子、脂質代謝に使用される遺伝子、エンドサイトーシス又はエキソサイトーシスを媒介する遺伝子、細胞内シグナル伝達遺伝子、グルコース代謝遺伝子、細胞接着遺伝子、及び確立された機能がない遺伝子を挙げることができる。

【0074】

1つの態様において、本開示は、IFN- 処理によりMHCクラスIIの発現低下を示すメラノーマ細胞、MHCクラスII発現において検出可能な変化を示さないメラノーマ細胞、10%以下のMHCクラスIIの発現増加を示すメラノーマ細胞、15%以下のMHCクラスIIの発現増加を示すメラノーマ細胞、20%以下、25%以下、30%以下、40%以下、及び50%以下等のMHCクラスIIの発現増加を示すメラノーマ細胞を除外する。1つの態様において、パーセント値は、所定の被験体又は患者からの生検又は生検の一部に存在するメラノーマ細胞集団の平均発現値を意味する。

10

20

30

30

40

50

## 【0075】

IFN - 応答癌細胞のスクリーニングに使用する IFN - 誘導性遺伝子の限定されない一覧

a b 0 0 0 6 7 7 、 J A B / S O C S 1 ; m 6 3 9 6 1 、 IFN - 誘導タンパク質 (m a g - 1 ) ; m 3 5 5 9 0 、 マクロファージ炎症性タンパク質 1 - ; m 1 9 6 8 1 、 M C P - 1 ( J E ) ; y 0 7 7 1 1 、 ザイキシン ; M 3 4 8 1 5 、 IFN - 誘導モノカイン ( M I G ) ; m 3 3 2 6 6 、 インターフェロン誘導タンパク質 1 0 ( I P - 1 0 ) ; U 4 4 7 3 1 、 プリン・ヌクレオチド結合タンパク質 ; U 8 8 3 2 8 、 サイトカインシグナル伝達抑制分子 - 3 ( S O C S - 3 ) ; M 2 1 0 6 5 、 インターフェロン制御因子 1 ; M 6 3 6 3 0 、 G T P 結合タンパク質 ( I R G - 4 7 ) ; U 1 9 1 1 9 、 G タンパク質様 L R G - 4 7 ; L 2 7 9 9 0 、 R o タンパク質 ; M 3 1 4 1 9 、 2 0 4 インターフェロン活性化タンパク質 ; a f 0 2 2 3 7 1 、 インターフェロン誘導タンパク質 2 0 3 ; U 2 8 4 0 4 、 M I P - 1 受容体 ; U 4 3 0 8 5 、 グルココルチコイド弱毒化応答 3 9 ; x 5 6 1 2 3 、 タリン ; m 3 1 4 1 9 、 2 0 4 インターフェロン活性化タンパク質 ; U 5 3 2 1 9 、 G T P アーゼ I G T P ; I 3 8 4 4 4 、 T 細胞特異的タンパク質 ; M 3 1 4 1 8 、 2 0 2 インターフェロン活性化タンパク質 ; d 3 8 4 1 7 、 芳香族炭化水素受容体 ; m 2 6 0 7 1 、 組織因子 ( m t f ) ; D 1 3 7 5 9 、 C o t 癌原遺伝子 ; M 1 8 1 9 4 、 フィプロネクチン ; u 5 9 4 6 3 、 I C H - 3 ; M 1 3 9 4 5 、 p i m - 1 癌原遺伝子 ; L 2 0 4 5 0 , D N A 結合タンパク質 ( G i l l , e t a l . ( 2 0 0 1 ) P r o c . N a t l . A c a d . S c i 9 8 : 6 6 8 0 - 6 6 8 5 を参照 ) 。本開示は、 IFN - 誘導性遺伝子 C I I T A の使用を包含する ( 例えば、 C h a n , e t a l . ( 2 0 1 0 ) J . L e u k o c y t e B i o l . 8 8 : 3 0 3 - 3 1 1 、 K w o n , e t a l . ( 2 0 0 7 ) M o l . I m m u n o l . 4 4 : 2 8 4 1 - 2 8 4 9 を参照 ) 。

## 【0076】

本開示は、薬剤投与に関して患者を認定又は選択するためのスクリーニング法として、以下の IFN - 誘導性遺伝子のうちの 1 つ又は複数の発現測定を含む。遺伝子として、 ( 遺伝子 1 ) F C G R 1 A 、 ( 遺伝子 2 ) I L 6 R 、 ( 遺伝子 3 ) C X C L 9 、 ( 遺伝子 4 ) C L C S F 1 4 、 ( 遺伝子 5 ) U B D 、 ( 遺伝子 6 ) C / E B P 、 及び ( 遺伝子 7 ) M H C 2 T A ( C I I T A ) が挙げられる ( W a d d e l l , e t a l . ( 2 0 1 0 ) P L o S O N E 5 : e 9 7 5 3 を参照 ) 。同様に、認定法においてこれらの遺伝子の特定群、例えば、遺伝子 1 及び 2 、 2 及び 3 、 3 及び 4 、 4 及び 5 、 5 及び 6 、 6 及び 7 、 1 及び 3 、 1 及び 4 、 1 及び 5 、 1 及び 6 、 1 及び 7 、 2 及び 4 、 2 及び 5 、 2 及び 6 、 2 及び 7 、 3 及び 5 、 3 及び 6 、 3 及び 7 、 4 及び 6 、 4 及び 7 、 5 及び 7 、 並びに 3 つの遺伝子の組み合わせ、例えば、 1 、 2 、 3 ; 又は 3 、 4 、 5 ; 又は 4 、 5 、 6 ; 又は 5 、 6 、 7 ; 又は 1 、 3 、 4 ; 又は 1 、 3 、 5 ; 又は 1 、 3 、 6 ; 又は 1 、 3 、 7 ; 又は 1 、 2 、 4 ; 又は 1 、 2 、 5 ; 又は 1 、 2 、 6 ; 又は 1 、 2 、 7 等を含む。 ( これらの遺伝子番号は、任意である。 )

## 【0077】

IFN - 処理

IFN - 処理に曝されたメラノーマ細胞を包含する試薬及び関連方法について、以下に示す。 IFN - 応答遺伝子の誘導が、少なくとも 2 0 % ( 対照値の 1 . 2 倍 ) 、少なくとも 3 0 % 、少なくとも 4 0 % 、少なくとも 5 0 % 、少なくとも 6 0 % 、少なくとも 7 0 % 、少なくとも 8 0 % 、少なくとも 9 0 % 、少なくとも 1 0 0 % ( 対照値の 2 倍 ) 、少なくとも 2 . 5 倍、少なくとも 3 . 0 倍、少なくとも 4 . 0 倍等である細胞を包含する。

## 【0078】

IFN - 処理後、 9 0 % 未満が自食性であるメラノーマ細胞集団、 8 0 % 未満が自食性であるメラノーマ細胞集団、 7 0 % 未満が自食性であるメラノーマ細胞集団、 6 0 % 未満が自食性であるメラノーマ細胞集団、 5 0 % 未満が自食性であるメラノーマ細胞集団、 4 0 % 未満が自食性であるメラノーマ細胞集団等は、除外する。

## 【0079】

IFN - 処理後、90%未満が非アポトーシス性であるメラノーマ細胞集団、80%未満が非アポトーシス性であるメラノーマ細胞集団、70%未満が非アポトーシス性であるメラノーマ細胞集団、60%未満が非アポトーシス性であるメラノーマ細胞集団、50%未満が非アポトーシス性であるメラノーマ細胞集団、40%未満が非アポトーシス性であるメラノーマ細胞集団等は、除外する。

## 【0080】

IFN - 処理後、90%未満が非接着性であるメラノーマ細胞集団、80%未満が非接着性であるメラノーマ細胞集団、70%未満が非接着性であるメラノーマ細胞集団、60%未満が非接着性であるメラノーマ細胞集団、50%未満が非接着性であるメラノーマ細胞集団、40%未満が非接着性であるメラノーマ細胞集団等は、除外する。

10

## 【0081】

## MHCクラスIIの発現測定

MHCクラスIIの発現は、例えば、MHCクラスII遺伝子産物に特異的な抗体又は核酸プローブを用いて測定することができる。このMHCクラスII遺伝子産物としては、HLA-DPA1、HLA-DPB1、HLA-DQA1、HLA-DQB1、HLA-DRA、HLA-DRB1、並びにHLA-DM及びHLA-DOが挙げられる（例えば、Apostolopoulos, et al. (2008) Human Vaccines 4:400-409を参照）。

20

## 【0082】

例えば、本開示は、メラノーマ細胞が、STAT1及びSTAT2を発現すること、活性化STAT1シグナル伝達経路を有すること、活性化STAT2シグナル伝達経路を有すること、又は活性化STAT1及びSTAT2シグナル伝達経路を有することを要求する試薬、処理方法、及び診断方法を包含する。

## 【0083】

本開示は、ハザード比(HR)1.0未満、HR0.9未満、HR0.8未満、HR0.7未満、HR0.6未満、HR0.5未満、HR0.4未満、HR0.3未満等を用いた生存データをもたらす医薬組成物又は薬学的試薬、関連する投与方法、及び処理方法を提供する。本開示の結果、全生存率データ、無増悪生存率データ、無増悪期間データ等が得られる。また、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%等の6ヶ月PFSを提供する。更に、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%等の6ヶ月全生存率を提供する。加えて、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%等の1年(又は2年)PFSを提供する。更に、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%等の1年(又は2年)全生存率を提供する(例えば、米国保健福祉省 食品医薬品局 産業界のためのガイダンス 抗癌剤及び生物製剤の承認のための臨床試験エンドポイント(2005年4月)を参照)。

30

## 【0084】

## IFN - の使用と自食作用の誘導

IFN - 処理後の自食作用の誘導は、主要組織適合遺伝子クラスII複合体の発現増加により測定されるため、IFN - 全身処理に対する応答を判断する方法となる。生検メラノーマ腫瘍細胞の測定可能な集団が、培養液中にIFN - に曝された際に、自食作用を行うがアポトーシスは行わない場合、このことは、これらの患者が、IFN - 全身処理に対して好ましく応答するであろうことを示す。また、生検からの細胞株の確立に成功すれば、患者も、自食性非アポトーシス性接着性細胞集団由来のIFN - 処理精製腫瘍細胞株から調製した細胞治療薬の恩恵を受けるであろう。

40

50

## 【0085】

本開示は、インターフェロン- $\gamma$ で処理した腫瘍細胞株から収集した自食性非アポトーシス性細胞から分離した主要組織適合遺伝子複合体の単離及び特性評価を含む。主要組織適合遺伝子複合体は、CD4 $^{+}$ T細胞に特異的な抗原を含有し、抗体媒介免疫応答に関連している。この複合体は、幅広い抗原レパートリーを示し、自食性細胞中で誘導されるリソーム媒介抗原プロセッシングの作用のため、非自食性細胞中には存在しないであろう。

## 【0086】

IFN- $\gamma$ 処理細胞株から生成された非アポトーシス性自食性腫瘍細胞は、樹状細胞と融合して、自食性腫瘍細胞の表面上に高レベルに存在する主要組織適合遺伝子複合体により抗原提示を増強させることができる。この過程により、2種の細胞の融合から生成される新規の細胞生産物が生じるであろう。

10

## 【0087】

IFN- $\gamma$ に応答した自食作用の誘導過程は、アポトーシスをもたらさない形で誘導されてもよい。カスパーゼ阻害剤とインターフェロン- $\gamma$ とを組み合わせて腫瘍細胞を処理することにより、細胞死（及び最終的には寛容誘導アポトーシス細胞の形成）の過程を、自食作用の誘導、又は主要組織適合遺伝子クラスII複合体の増加を阻害することなく抑制することができる。

## 【0088】

アポトーシス性細胞を死滅させ、自食性生細胞を維持する手順

メラノーマの研究により、アポトーシス性細胞の存在と臨床試験における低生存率との相関関係が実証された(Cornforth, et al. (2011) *Cancer Immunol. Immunother.* 60:123-131; Diliman, et al. (2011) *Cancer Biother. Radiopharmaceuticals* 26:407-415)。以下の研究では、*in vitro*でメラノーマ腫瘍細胞をIFN- $\gamma$ 処理した後の自食作用、アポトーシス、及びMHCクラスII分子の誘導について調べた。

20

## 【0089】

## 選別

以下に「選別」の手順を提供する。本開示は、非アポトーシス性である細胞においてメラノーマ細胞集団を富化する方法及びこれらの方法により生成される細胞を提供する。*in vitro*でのIFN- $\gamma$ 処理前に、任意のメラノーマ細胞集団において、第1の割合の細胞はアポトーシス性にバイアスが掛かる可能性があるが、第2の割合の細胞は非アポトーシス性にバイアスを掛けることができる。このような状況において、バイアスを掛けるとは、*in vitro*でのIFN- $\gamma$ 処理により第1の割合の細胞（又は第1の細胞亜集団）のアポトーシスは刺激するが、第2の割合の細胞（又は第2の細胞亜集団）のアポトーシスは刺激しないことを意味する。実施形態において、*in vitro*でのIFN- $\gamma$ 処理は、アポトーシス性にバイアスが掛かっているメラノーマ細胞にアポトーシスを経験させることにより、樹状細胞ワクチンに使用する免疫刺激性メラノーマ細胞集団を富化するために使用することができる。アポトーシス性にバイアスが掛かっているメラノーマ細胞亜集団が一旦アポトーシスを経験してしまえば、これらの細胞は、除去及び廃棄することができる。

30

## 【0090】

研究手法は、以下の通りとした。自己メラノーマ腫瘍細胞株モデルは、自食作用、アポトーシス、及びMHCクラスIIの発現の分析前に、1000IU/mLのIFN- $\gamma$ と共に72時間インキュベートした。自食作用は、LCL3IIに対する抗体を用いた免疫プロット、及びエンゾ社製Cyto-ID（登録商標）オートファジー検出キットを用いたフローサイトメトリーにより検出した。アポトーシス及びMHCクラスIIの誘導は、それぞれ7-AAD及びアネキシン-V染色、並びにMHCクラスIIに対する抗体を用いたフローサイトメトリーにより分析した。

40

## 【0091】

50

研究の結果、メラノーマ細胞株において、IFN- $\gamma$ により自食性細胞集団及びアポトーシス性細胞集団の両方が誘導されることが実証された。アポトーシス性集団は、主に非接着性集団で見られたが、自食性細胞は、フラスコに接着したままであった。阻害剤3-メチルアデニン(3-MA)を用いて自食作用を阻害すると、IFN- $\gamma$ への応答によるMHCクラスII陽性細胞の誘導が阻害される(39.4%IFN- $\gamma$ 対10.0%IFN- $\gamma$ +3-MA)。汎カスパーーゼ阻害剤Z-VADを用いたカスパーーゼ活性の阻害により、IFN- $\gamma$ 処理細胞において、アポトーシスは妨害されるが、自食作用は摂動されない(2.75±0.15IFN- $\gamma$ 対3.04±0.27IFN- $\gamma$ +Z-VAD、倍率変化)。結論として、アポトーシスの誘導は、自食作用及びMHCクラスII誘導のレベル低下に関連している。本開示は、IFN- $\gamma$ 処理後、アポトーシス性細胞は死滅させるが、自食性生細胞は維持する方法又は手順を提供し、この種の細胞系免疫療法の有効性を高めることができる。

10

## 【0092】

## 第1の研究の材料及び方法

## 自己樹状細胞の生成

樹状細胞は、前述の通り、プラスチック接着法により生成した(Choi, (1998) Clin. Cancer Res. 4:2709-2716; Luft, (1998) Exp. Hematol. 26:489-500)。簡単には、自己アフェレーシス産物を、フィコール・ハイパック(GEヘルスケア社、バッキンガムシャー、英国)密度勾配分離にかけた。得られた末梢血単核細胞は、細胞培養フラスコ(コーニング・コースター社、カミング、ニューヨーク州)において、 $1.5 \times 10^6$ 細胞/mLの割合で、IL-4(セルジェニックス社、フレイスバーグ、ドイツ)及びGM-CSF(バーレックス社、シアトル、ワシントン州)(DC培地)をそれぞれ1,000IU/mLずつ加えた抗生物質無添加のAIM-V培地(インビトロジエン社、グランドアイランド、ニューヨーク州)に撒いた。1時間インキュベートした後、非接着性集団を廃棄し、新たなDC培地をフラスコに加えた。翌朝、非接着性細胞を廃棄し、フラスコを常温のPBSで1回洗浄し、新たなDC培地を加えた。次に、フラスコを6日間培養し、その時に手法で生成したDC(ロード前DC)の割合及び表現型を判定するためにフローサイトメトリー評価を行った。

20

## 【0093】

## 自己腫瘍細胞株の生成

前述の通り生成し、特徴付けられた純粋腫瘍細胞を、2億個まで増やした後、15%FBS/ECMの RPMI(完全培地)中で1000IU/mLのIFN- $\gamma$ (インターミューン社、ブリスベン、カリフォルニア州)と共に72時間インキュベートし、セシウム源から100Gy照射し、前述のように凍結保存した(Choi, (1998) Clin. Cancer Res. 4:2709-2716; Luft, (1998) Exp. Hematol. 26:489-500; Dillman (1993) J. Immunother. Emphasis Tumor Immunol. 14:65-69)。IFN- $\gamma$ 処理照射腫瘍細胞は、凍結保存から起こし、PBSで3回洗浄した後、in vitroで培養したDCに加え、~24時間インキュベートした。抗原ロードDCは、ラバー・ポリスマンで穩やかに剥がして採取し、同量ずつ9-11等分にして凍結保存した。ロード後DC細胞を表すフローサイトメトリー評価のため、1等分量の細胞を得た。

30

## 【0094】

## フローサイトメトリー

樹状細胞集団の表現型の特徴付けは、BDファーミングン社(サンディエゴ、カリフォルニア州)から購入した表面マーカーに対するモノクローナル抗体:PerCPと結合する抗MHCクラスII抗体、APCと結合する抗CD11c抗体、PEと結合する抗CD80抗体、抗CD83抗体、抗CD86抗体、を用いて行った。対照アイソタイプを用いて陽性細胞の割合を判定した。腫瘍細胞のフローサイトメトリーは、BDファーミングン

40

50

社から購入した、F I T Cと結合するM H CクラスI及びI Iに対する抗体、アネキシン-V-P E、及び7-アミノアクチノマイシンD(7-ADD)を用いて行った。C a l i B R I T E フローサイトメトリー校正(B D ファーミング社)を各稼動の前に使用し、フローサイトメトリーデータの収集の間中、同じ機器設定を使用した。

#### 【0095】

##### 免疫プロットアッセイ

細胞質の細胞溶解物は、哺乳類タンパク質抽出試薬(Mammalian Protein Extraction Reagent)(サーモサイエンティフィック社、ロックフォード、イリノイ州)とプロテアーゼ阻害剤混合物(ロシュ社、インディアナポリス、インディアナ州)を用いて、10,000細胞/μLの割合で、氷上で調製した。約25 μLs/レーンの細胞溶解物を12.5%トリス-グリシングル上で分離し、PVDF膜に転写し、以下に対する抗体でプローブした:カルレティキュリン(MBL社、ウバーン、マサチューセッツ州)、Hsp-60、Hsp-70、Hsp-90(R&Dシステムズ社、ミネアポリス、ミネソタ州)、HMBG-1(セルシグナリング社、ダンバース、マサチューセッツ州)、ICAM-1(サンタクルーズバイオテック社、サンタクルーズ、カリフォルニア州)、M el - 4、M art - 1(シグネット社、エメリービル、カリフォルニア州)、チロシナーゼ(アップステート社、レイクプラシッド、ニューヨーク州)、及びGADPH(カルバイオケム社、ダルムシュタット、ドイツ)。

#### 【0096】

##### 免疫組織化学

メラノーマ株によるパネル抗原の発現は、免疫細胞化学的な手順を用いて測定した。細胞は、8穴チャンバースライド(サーモフィッシュ社、ロチェスター、ニューヨーク州)中で、1000 IU/mLのIFN- $\gamma$ の存在下、又は非存在下で培養した。72時間後、細胞は、1×リン酸緩衝生理食塩水(PBS)で3回洗浄し、冷アセトン中に固定した。内因性ペルオキシダーゼを阻害した後、細胞は、列挙した抗原に対する適切な一次抗体と共にインキュベートした。免疫組織化学は、ビオチン化アンチマウス又はラビット免疫グロブリン、超高感度ストレプトアビジン標識酵素、ホースラディッシュペルオキシダーゼ色素原、及び基質キット(バイオジェネックス社、サンラモン、カリフォルニア州)を用いて行った。以下の抗ヒトポリクローナル又はモノクローナル抗体の反応性は、アイソタイプ適合対照抗体:S-100及びHMB-45(バイオジェネックス社、サンラモン、カリフォルニア州)、M el - 2、M el - 5、M art - 1(シグネット社、デッダム、マサチューセッツ州)、チロシナーゼ及びM age - 1(サーモサイエンティフィック社、フリーモント、カリフォルニア州)、M el an - A、HLAクラスI及びHLAクラスII(ダコ社、デンマーク)を用いて調べた。

#### 【0097】

##### 統計分析

等分散の2標本を対象とする両側スチュードントt検定。有意差は、p値0.05で判定した。

#### 【0098】

##### 第1の研究の結果

細胞死は、自己メラノーマ腫瘍細胞株において、完全培地中でのIFN- $\gamma$ を用いた72時間のインキュベーションに応答して特異的に誘導された。トリパンブルー染色除外分析をIFN- $\gamma$ 処理又は未処理細胞に対して行ったところ、IFN- $\gamma$ 処理細胞の生存率の方が低くなるという有意な傾向が明らかになった(89.1 ± 6.8%対84.9 ± 9.3%、p = 0.014、N = 47)。アポトーシス誘導に関するフローサイトメトリーによる4つの自己メラノーマ細胞株の標本分析(図1A)から、メラノーマ細胞が、IFN- $\gamma$ 誘導アポトーシスの影響に対して特異的に感受性があり、いくつかの細胞はより後期のアポトーシスを示すか又は「死亡」した集団(7-AAD+/アネキシン-V+)であり、その他は初期アポトーシスの兆候示すか又は「瀕死」の集団(7-AAD-/アネキシン-V+)であることが明らかになった。結果としてIFN- $\gamma$ 処理後にアポトーシ

10

20

30

40

50

ス細胞が存在することは、無増悪生存率又は全生存率における有意な減少と関連した (Cornforth (2010) *Cancer Immunol. Immunother.* Resistance to the proapoptotic effects of interferon-gamma on melanoma cells used in patient-specific dendritic cell immunotherapy is associated with improved overall survival (患者特異的樹状細胞免疫療法で使用したメラノーマ細胞に対するインターフェロン-γによるアポトーシス促進効果への耐性は、全生存率の改善に関連する))。ログ・ランク検定により、メラノーマ腫瘍細胞の IFN-処理による低い生存率と研究対象の患者の全生存率とが有意に関連することが明らかになった。

10

## 【0099】

IFN- $\gamma$  の存在下又は非存在下でインキュベートした細胞の溶解物に対し、免疫の重要な仲介物質である可能性がある様々な分子についての免疫プロットを行った (図 1B)。IFN- $\gamma$  で処理したメラノーマ細胞のセットにおいて、熱ショックタンパク質が特異的に制御されているように見えるが、特に hsp-70 の場合、大部分が細胞調製物中に依然として存在している。小胞体タンパク質、カルレティキュリン、及び高移動度群ボックス1タンパク質 (HMG B-1) は、IFN- $\gamma$  で処理すると、上方制御される場合があるように見える (図 1B)。一方、通常のメラノーマ抗原 (mel-4、Mart-1、及びチロシナーゼ) は、一般的に IFN- $\gamma$  により下方制御されるように見えるが、リンパ球媒介細胞毒性への感受性と関連したリンパ球接着分子である ICAM-1 (Hamai (2008) *Cancer Res.* 68: 9854-9864) は、有意に上方制御されている (図 1C)。実際に、IFN- $\gamma$  処理メラノーマ腫瘍細胞は、細胞毒性 T リンパ球 (CTL) 活性に対してより感受性が高いことが分かった。また、メラノーマ関連抗原の一群の対象の免疫組織化学により、多くの検討した抗原において、IFN- $\gamma$  により抗原発現が下方制御されることが明らかになった (表 1)。

20

## 【0100】

IFN- $\gamma$  の使用により、主要組織適合遺伝子複合体クラス I 及び II は上方制御される (Bohn (1998) *J. Immunol.* 161: 897-908)。図 1D に見られるように、IFN- $\gamma$  を用いた自己メラノーマ細胞の処理により、MHC クラス I は、倍数誘導の中央値が  $2.91 \pm 1.13$  (95% C.I.) で、ほぼ遍在し、有意に上方制御された ( $p = 2.8 \times 10^{-8}$ )。また、MHC クラス II の平均蛍光強度は有意に高かったが、誘導の中央値は  $4.23 \pm 2.66$  (95% C.I.) とそれ程高くなかつた ( $p = 0.039$ )。自己メラノーマ細胞の表面における MHC クラス II 分子の量は、MHC クラス I 分子の量よりも一般に低いが、症例の 70%において、MHC クラス II 発現の初期量が低いことにより、IFN- $\gamma$  処理に応答した MHC クラス II 分子の誘導は、2 倍よりも高いものとなつた。抗原を樹状細胞にロードしている間、これらの分子が腫瘍細胞上に存在することにより、MHC 複合体が抗原提示細胞に「クロスドressing (cross dressing)」される機会が提供される可能性がある (Dolan (2006) *J. Immunol.* 177: 6018-6024、Dolan (2006) *J. Immunol.* 176: 1447-1455)。

30

## 【0101】

4 つの代表的な自己メラノーマ細胞株のセットを IFN- $\gamma$  と共にインキュベートし、樹状細胞に当量ずつロードした。その後、樹状細胞について、フローサイトメトリーにより CD80、CD83、CD86、及び MHC クラス II の発現を分析した。その結果、CD83 の発現が陽性である樹状細胞集団の割合に関して、IFN- $\gamma$  処理メラノーマ細胞をロードしたことで僅かであるが感知できる増加が見られたことが分かった (図 2)。また、より多くの未処理腫瘍細胞が、CD86 陽性集団の割合が明らかに減少した CD86 ドットプロット (左上象限) において認められ、IFN- $\gamma$  未処理腫瘍細胞が依然として存在することが示された。前述の通りアポトーシス細胞は樹状細胞に取り込まれる可能

40

50

性が高いため、この効果は、IFN- $\gamma$ によるアポトーシスの誘導に起因する可能性が最も高い。

【0102】

図3に示すように、ロード前DCサンプルは、CD80(39.0±16.2%)、CD83(7.1±6.9%)、CD86(73.6±19.5%)を発現し、MHCクラスII陽性で、生存率は96.2±5.0%であることが分かった。ロード後DCは、有意に高い平均蛍光強度(172.9±79.0%、p=0.0009)と共に有意に高いCD83の割合(9.4±7.1%、p=0.019)を有し、照射IFN- $\gamma$ 処理腫瘍細胞をDCにロードさせることにより、成熟が誘導される樹状細胞があることが示された(図3B)。

10

【0103】

第1の研究の考察

抗腫瘍免疫と関連した抗原ロード、成熟化、及び投与のプロトコール、並びに樹状細胞(DC)系免疫療法の指導は、当業者により実行される。この種の治療は、抗原源としての精製自己腫瘍細胞の使用を包含し、腫瘍関連抗原の患者特異的レパートリーを含む(Selvan (2010) *Melanoma Res.* 20:280-292; Dillman (2007) *Cancer Biother. Radiopharm.* 22:309-321)。臨床試験の中には、未精製の自己巨大腫瘍を使用しているものがある。この抗原源には、線維芽細胞及び壊死組織が混入している可能性がある(O'Rourke (2007) *Melanoma Res.* 17:316-322)。抗原と関連した腫瘍幹細胞が、精製細胞株中に存在している可能性がある(Dillman (2006) *New Engl. J. Med.* 355:1179-1181)。IFN- $\gamma$ 処理により、MHCクラスII分子の発現が増加する。MHCクラスII分子は、樹状細胞系療法への応答に重要である。取り込まれた物質中に存在する分子、例えば、カルレティキュリン、HMG B-1、及び熱ショックタンパク質等は、成熟シグナルに関与している可能性があり、この関与は、サイトカイン混合物による関与に加わる可能性がある。本開示のDCの調製では、成熟化の傾向が見られ、後期アポトーシス細胞の取り込みに関連する可能性がある(1p (2004) *J. Immunol.* 173:189-196)。アポトーシス細胞の使用は、腫瘍細胞溶解物又は壊死細胞をロードした樹状細胞と比べてリンパ球のIFN- $\gamma$ 分泌をより効果的に刺激した樹状細胞の生成と相關しており、アポトーシス細胞をロードした樹状細胞は、*in vivo*でより効果が高い可能性がある。IFN- $\gamma$ によるアポトーシス促進効果への耐性は、より良好な臨床転帰がもたらされる可能性がある(Cornforth (2010) *Cancer Immunol. Immunother.* 60:123-131)。成熟DCによるインターロイキン-12(IL-12)の分泌は、強力な細胞傷害性リンパ球(CTL、CD $4^+$ 8T細胞)の活性に繋がる可能性がある。*ex vivo*での成熟化が腫瘍免疫の持続に繋がるか否かという課題が取り組まれてきた。また、抗原特異的CTLを抑制することができる制御性T細胞を未成熟DCが誘導する危険が、サイトカイン成熟DCと共に生じている。DC成熟化のプロトコールを改善するために、成熟化に繋がる一連のシグナル伝達事象の再評価が検討されている。よって、本明細書に示す証拠はDCが成熟過程を開始することを示しているため、この研究における照射腫瘍細胞全体の抗原源としての使用は、*ex vivo*でのサイトカイン成熟化の必要がなく、DC免疫療法のより好ましい方法である可能性がある。注射に際し、これらの「成熟中の」DCは、ライセンシング、抗原特異的CD40L発現CD4 $+$ T細胞を引き付けるサイトカインの分泌により成熟過程を完了してもよい。免疫補助剤GM-CSFに応答して樹状細胞で生成されるCCL17/TARCのような血清ケモカインは、無増悪生存率の向上に関連している。状況によっては、樹状細胞によるリンパ球の活性化は、CD80及びCD86のような共刺激分子の発現を要する可能性がある。成熟化のマーカーとして、CD83は、成熟樹状細胞で発現されるが、より強い免疫応答を誘導することができる樹状細胞に対応する可能性がある(Prazma (2008) *Immunol. Lett.*

20

30

40

50

115:1-8)。これは、医薬品中の全細胞の一部を表すものである。どの医薬療法においても、成熟DCの数が単独で良好な患者反応と相関する可能性もあれば、相関しない可能性もある。

【0104】

第1の研究の表

表1: 患者特異的細胞系樹状細胞療法に用いられたメラノーマ細胞株におけるインターフェロン- $\gamma$ に応答した一般的な腫瘍関連抗原の発現量の変化

【0105】

【表1】

抗原	基本的 発現なし	基本的発現	IFN- $\gamma$ 処理後 の変化	
			なし	低下
S-100	74.1%	25.9%	42.9%	57.1%
HMB-45	18.5	81.5	54.5	45/5
MeI-2	3.7	96.3	46.2	53.8
Melan-A	11.1	88.9	29.2	70.8
MeI-5	18.5	81.5	72.7	27.3
MAGE-1	51.9	48.1	38.5	61.5
MART-1	11.1	88.9	14.6	85.2
チロシナーゼ	25.9	74.1	40.0	60.0

【0106】

N = 27サンプル。

【0107】

第2の研究の材料及び方法

メラノーマ細胞株

市販のメラノーマ細胞株A375、SK-Mel-5、及びSK-Mel-28を、アメリカ合衆国培養細胞系統保存機関から購入した(カタログ番号: CRL-1619、HTB-70、及びHTB-72)。A375、SK-Mel-5、及びSK-Mel-28は、5%ウシ胎仔血清入り RPMI-1640(インビトロジエン社、カタログ番号: 11875-085)中で維持した。汎カスパーーゼ阻害剤Z-VAD-fmk及びその対照化合物z-FAD-fmkをBDファーミングン社から購入した(カタログ番号: 550377及び550411)。GFP-LC3のトランスフェクションをメーカーの使用説明書に従って行い(インビオゲン社、カタログ番号: psetz-gfp1c3及び1yec-12)、DP72デジタルカメラを用いてオリンパス社製BX-51顕微鏡に顕微鏡写真を撮影した。腫瘍細胞株は、分析の前に、1000U/mLのIFN- $\gamma$ (インターミューン社、カタログ番号)と共に72時間インキュベートした。患者特異的細胞株は、説明されているように(Hamai (2008) Cancer Res. 68: 9854-9864; Tyring (1984) J. Natl. Cancer Inst. 73: 1067-1073)、外科的腫瘍サンプルの酵素消化、並びに1mMピルビン酸ナトリウム、1mMグルタミン、及びHEPES緩衝液を加えたウシ胎仔血清及び濃縮子牛血清(オメガ・サイエンティフィック社、サンディエゴ、カリフォルニア州)入りRPMI-1640組織培養培地での培養により生成した。ニコン社製DS-L1デジタル顕微鏡カメラを用いてオリンパス社製CK-2顕微鏡に位相差顕微鏡写真を

10

20

30

40

50

撮影した。

【0108】

自己樹状細胞の生成

樹状細胞は、フィコール分離産物のプラスチック接着法 (Selvan (2007) Int. J. Cancer 122: 1374 - 1383, Cornforth (2010) Cancer Immunol. 60: 123 - 131) により、抗生物質無添加の AIM - V 培地 (インビトロジエン社、カタログ番号) 中で、IL - 4 (セルジェニックス社、カタログ番号) 及び GM - CSF (バーレックス社、シートル、ワシントン州) (DC 培地) をそれぞれ 1,000 IU / mL ずつ加えて生成した。次に、IFN - 处理照射自己腫瘍細胞をロードする前に、フラスコを 6 日間培養した。

10

【0109】

フローサイトメトリー

IFN - に応答した腫瘍細胞の細胞死及び主要組織適合遺伝子複合体クラス II 発現の変化の分析は、MHC クラス II、アネキシン - V、及び 7 - アミノ - アクチノマイシン D (7 - ADD) に対する抗体を用いて行い、ベクトン - ディケンソン社製 FACS カリブル (Calibur) (登録商標) フローサイトメーターに取得した。

【0110】

ウェスタンプロット

メラノーマ腫瘍細胞溶解物は、10 - 12.5% SDS - PAGE で分離し、ニトロセルロースに転写し、一次抗体で一晩プローブした後、二次抗体の結合を行い、バンドを開けるためのノベックス A P 発色基質 (インビトロジエン社、カールスバッド、カリフォルニア州) による展開を行った。LC3 - B 抗体 (セルシグナリング・テクノロジーズ社、ボストン、マサチューセッツ州) 及び GADPH (EMDバイオサイエンシス社、ドイツ) に対する抗体を、メーカーが推奨するようにそれぞれ 1:100 及び 1:10,000 に希釈して使用した。

20

【0111】

第 2 の研究の説明

in vitro でメラノーマ腫瘍細胞を IFN - 处理した後の自食作用、アポトーシス、及び MHC クラス II 分子の誘導について調べた。自己メラノーマ腫瘍細胞株モデルは、自食作用、アポトーシス、及び MHC クラス II の発現の分析前に、1000 IU / mL の IFN - と共に 72 時間インキュベートした。自食作用は、LC3 II に対する抗体を用いた免疫プロット、及びエンゾ社製 Cyto-ID (登録商標) オートファジー検出キットを用いたフローサイトメトリーにより検出した。アポトーシス及び MHC クラス II の誘導は、それぞれ 7 - ADD 及びアネキシン - V 染色、並びに MHC クラス II に対する抗体を用いたフローサイトメトリーによりアッセイした。

30

【0112】

第 2 の研究の結果

結果として、メラノーマ細胞株において、IFN - により自食性細胞集団及びアポトーシス性細胞集団の両方が誘導されることが実証された。アポトーシス性集団は、主に非接着性集団で見られたが、自食性細胞は、フラスコに接着したままであった。阻害剤 3 - メチルアデニン (3 - MA) を用いて自食作用を阻害すると、IFN - への応答による MHC クラス II 陽性細胞の誘導が阻害される (39.4% IFN - 対 10.0% IFN - + 3 - MA)。汎カスパーゼ阻害剤 Z - VAD を用いたカスパーゼ活性の阻害により、IFN - 处理細胞において、アポトーシスは妨害されるが、自食作用は摂動されない (2.75 ± 0.15 IFN - 対 3.04 ± 0.27 IFN - + Z - VAD、倍率変化)。アポトーシスの誘導は、自食作用及び MHC クラス II 発現のレベル低下に関連している。インターフェロン - 处理純粹腫瘍細胞株由来の非アポトーシス性自食性細胞である、自己腫瘍細胞ロード樹状細胞株を投与された患者は、無増悪生存率及び全生存率が改善した (それぞれ p = 0.003、p = 0.002)。IFN - 处理後、アポトーシス性細胞は死滅させるが、自食性細胞は維持する手法により、この種の細胞系免疫療

40

50

法の有効性が高まる可能性がある。

【0113】

研究の統合分析

自己増殖性自己複製腫瘍細胞（推定腫瘍幹細胞及び／又は初期前駆細胞）は、転移性癌の新たな持効性製剤の確立に重要であり、ワクチン用の優れた抗原源である可能性がある。これらの研究は、そのような細胞由来の抗原を用いた免疫からの生存に与える影響について検討した。

【0114】

方法

データは、3つの連続したフェーズII試験から集積した。これらの試験は全て、転移性メラノーマと実証された患者を試験対象とし、患者は、自己腫瘍細胞の細胞培養液由来の抗原を使用したプロトコールで治療を受けた。皮下注射を週1回3週間行った後、月1回5ヶ月間行った。74人の患者が照射腫瘍細胞（TC）を注射され、54人の患者が照射自己腫瘍細胞（NCI-V01-1646）と共に培養した自己樹状細胞（DC）を注射された。無作為フェーズII試験では、24人の患者がTCを注射され、18人の患者がDCを注射された（NCT00436930）。

10

【0115】

結果

表2は、各試験の全生存率（OS）を集約している。統合分析において、98人がTC患者、72人がDC患者であった。年齢（51、52）、男性（62%、62%）、治療時に疾患の兆候がないこと（46%、47%）、及び治療時にM1c内臓疾患が存在すること（13%、14%）に関する特徴は、類似していた。OSは、DCで治療した患者でより長かった（中央値：63.1ヶ月対20.2ヶ月、5年OS：51%対26%、p=0.0002、マンテル・コックス・ログ・ランク検定）。また、無作為試験におけるOSの違いも有意であった（p=0.007）。

20

【0116】

自己増殖性自己複製腫瘍細胞由来の抗原で調製された患者特異的DCワクチンは、長期生存率の促進に関連し、転移性メラノーマと診断された患者集団において患者特異的TCワクチンよりも優れている。

30

【0117】

【表2】

表2					
ワクチン	患者数	死亡者数	OS中央値	2年OS	5年OS
TC	74	60	20.3ヶ月	45%	28%
DC	54	31	58.4ヶ月	72%	50%
TC	24	16	15.9ヶ月	31%	---
DC	18	5	到達せず	72%	---

40

【0118】

患者特異的ワクチンに関する3つの試験から得た生存率曲線を図13に示す。連続したフェーズI及びフェーズII治験は、自己腫瘍細胞を用いて、自己樹状細胞（DC）と組み合わせて又は組み合わせずに行った。皮下注射を3週間行い、月1回5ヶ月間行った。74人の患者がIFN-αでの前処理なしの照射腫瘍細胞を注射され、54人の患者がインターフェロン-αで前処理した照射自己腫瘍細胞（TC）と共に培養した自己樹状細胞を注射された。無作為フェーズII試験では、24人の患者がIFN-αを含まない前処理なしの腫瘍細胞（TC）を注射され、18人の患者が樹状細胞（DC）及びIFN-αを含む前処理なしの腫瘍細胞（TC）を注射された。

50

【0119】

### I FN - 処理の特徴

I FN - 処理は、アポトーシス性バイアスが掛かっているメラノーマ細胞を実際にアポトーシスに入らせ、それにより、吸収／浮遊技術で除去できるようにする。I FN - 処理により、吸着／浮遊技術で選択する前であっても、より多くの自食性非アポトーシス性細胞集団が生じる。I FN - 処理により、吸着／浮遊技術で選択した後の測定で、より多くの自食性非アポトーシス性細胞集団が生じる。I FN - 処理により、自食作用が増大することで抗原提示細胞のクロスプライミングが増強されて、より多くの自食性非アポトーシス性細胞集団が生じる。

#### 【0120】

10  
このように、本開示の基本的な新規な特徴について、本開示の例示的実施及び／又は態様に応用されたものとして図示し、説明し、指摘したが、本開示の例示的実施、開示内容、及び態様の形及び細部において、種々の省略、再構成、置換、及び変更が、本開示及び／又は請求項の精神から逸脱することなく当業者によりなされてもよいことが理解されよう。例えば、実質的に同じ方式で実質的に同じ機能を果たして同じ成果を達成する要素及び／又は方法の工程の組み合わせは全て、本開示の範囲内にあることを明確に意図する。また、あらゆる開示された形又は実施に関連して図示及び／又は説明された構造及び／又は要素及び／又は方法の工程が、設計上の選択の全般的な内容として、他のあらゆる開示又は説明又は示唆された形又は実施に組み込まれてもよいことは認識されなければならない。従って、本開示の範囲を制限しないことを意図する。このような変更は全て、添付の請求項の範囲内であることを意図する。

20

#### 【0121】

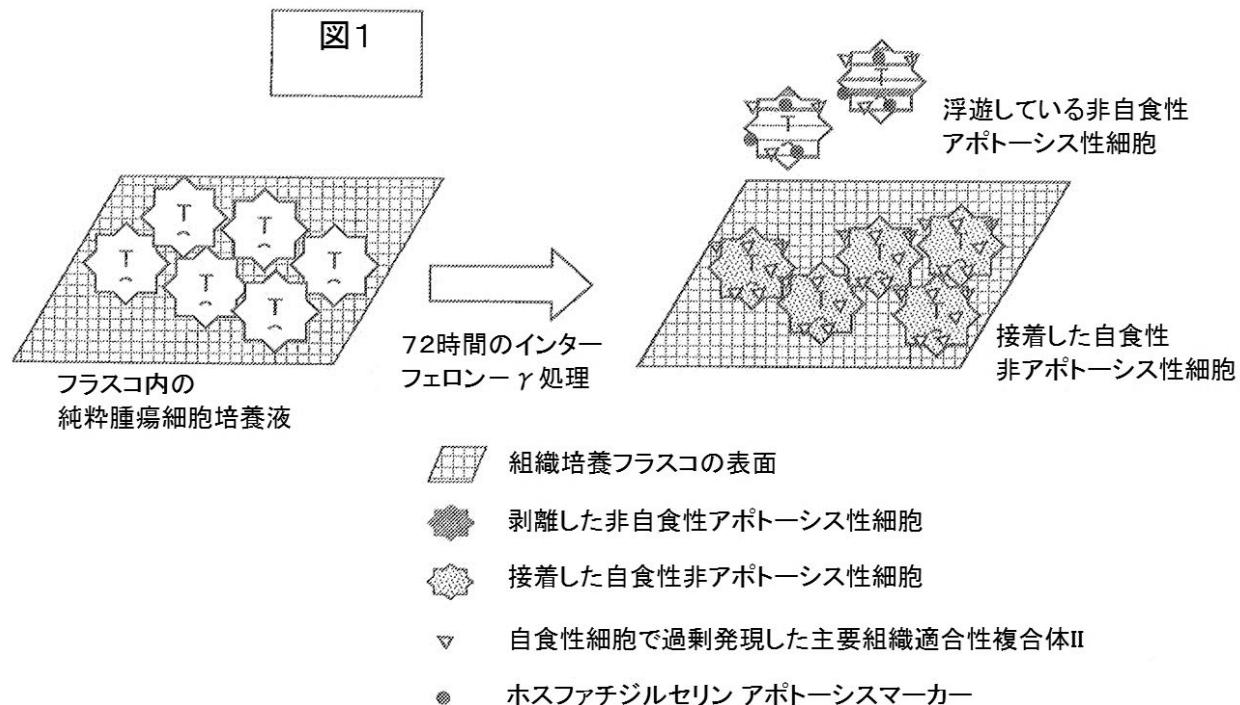
本明細書で引用した全ての刊行物、特許、特許出願、論文、及び配列表は、あたかもその全体が本明細書に記載されたかのように、参照により援用される。

#### 【0122】

要約書は、技術的開示の本質及び要点を読み手が迅速に確認できるように記載することを求める米国特許法施行規則第1条第72項b(37 CFR § 1.72(b))に準拠して提供する。要約書は、請求項の範囲又は意味を解釈又は限定するために使用されないと理解の下に提出する。

20

【図1】



【図2A】

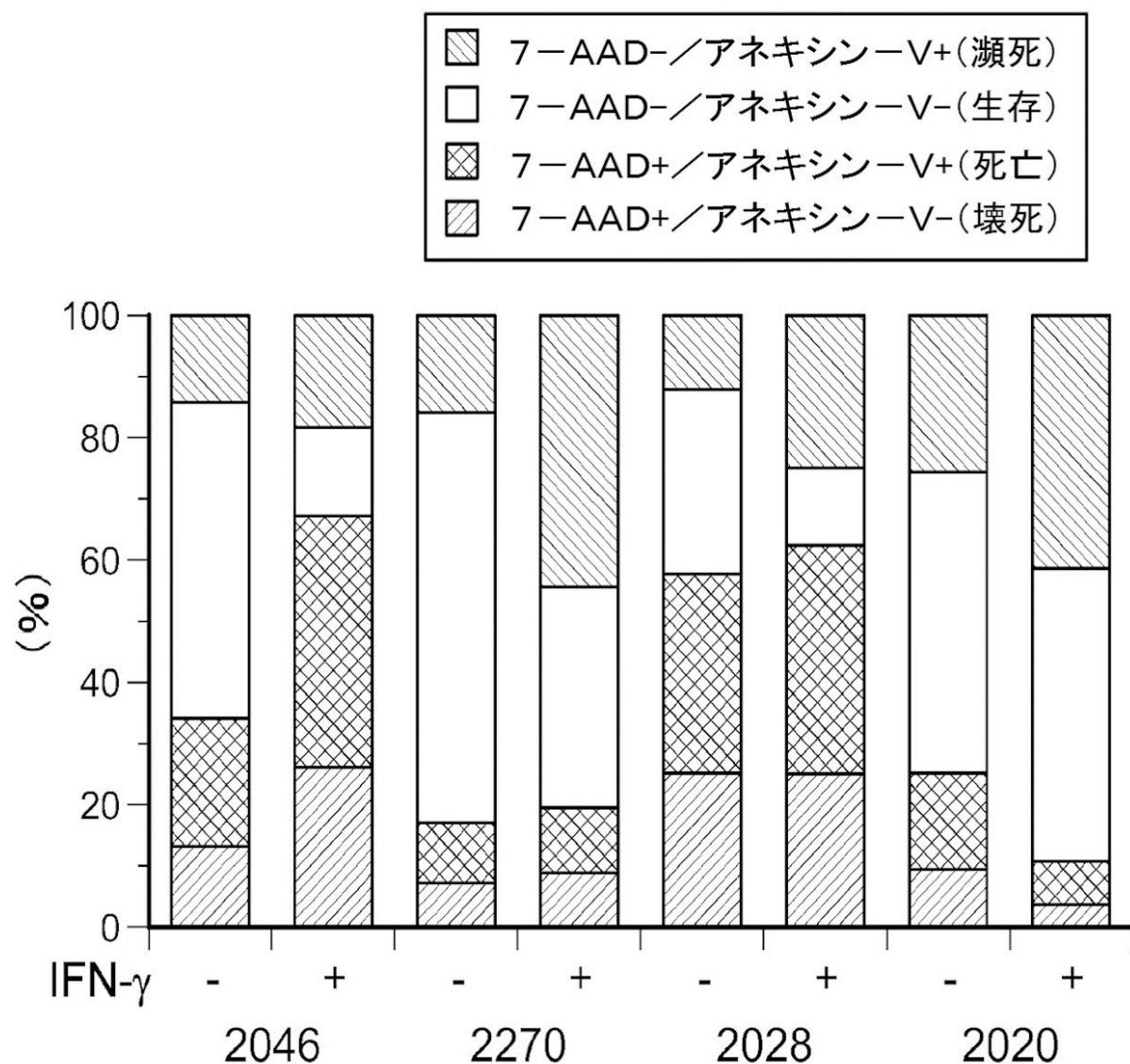
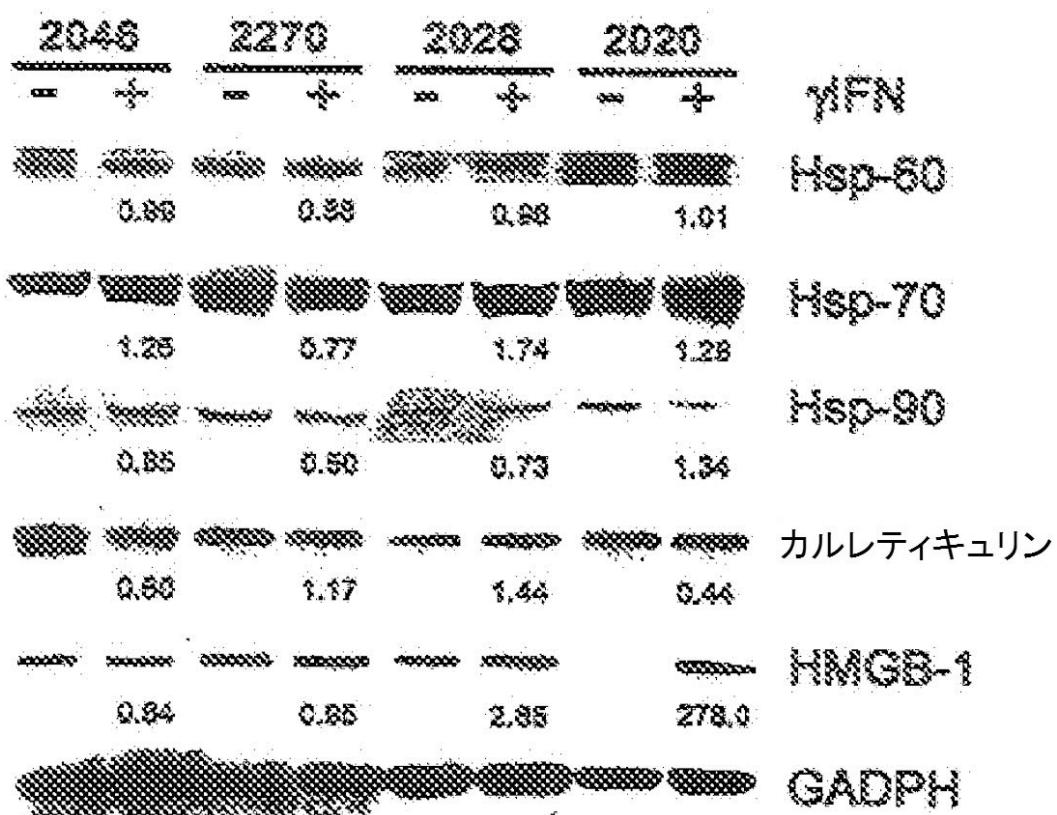


図2A

【図2B】

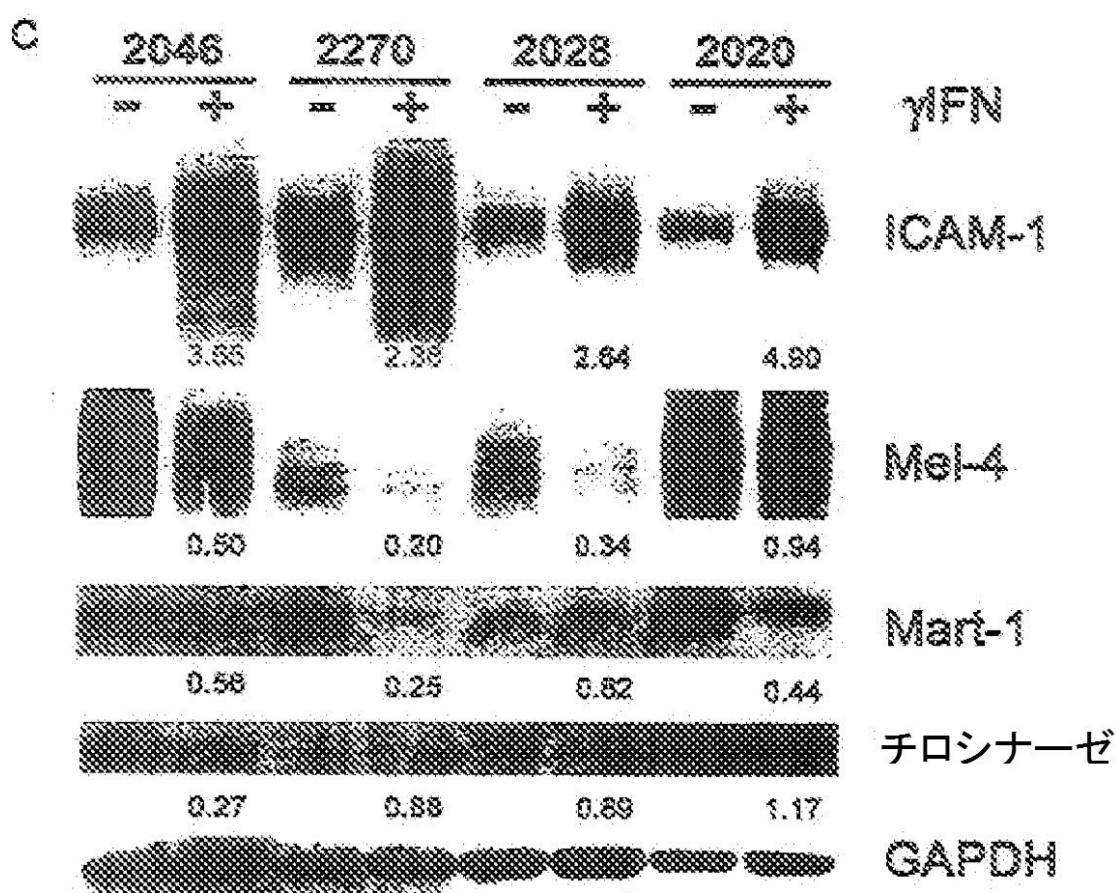
図2B

3



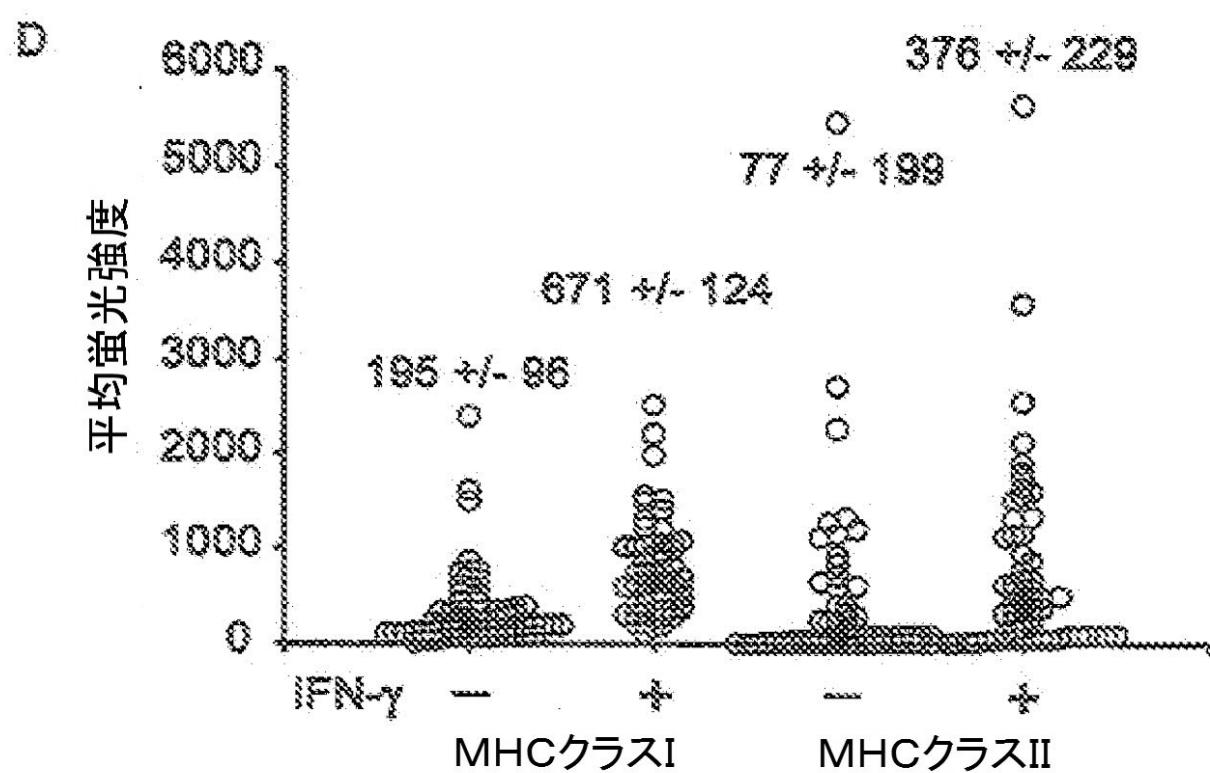
【図 2 C】

図2C



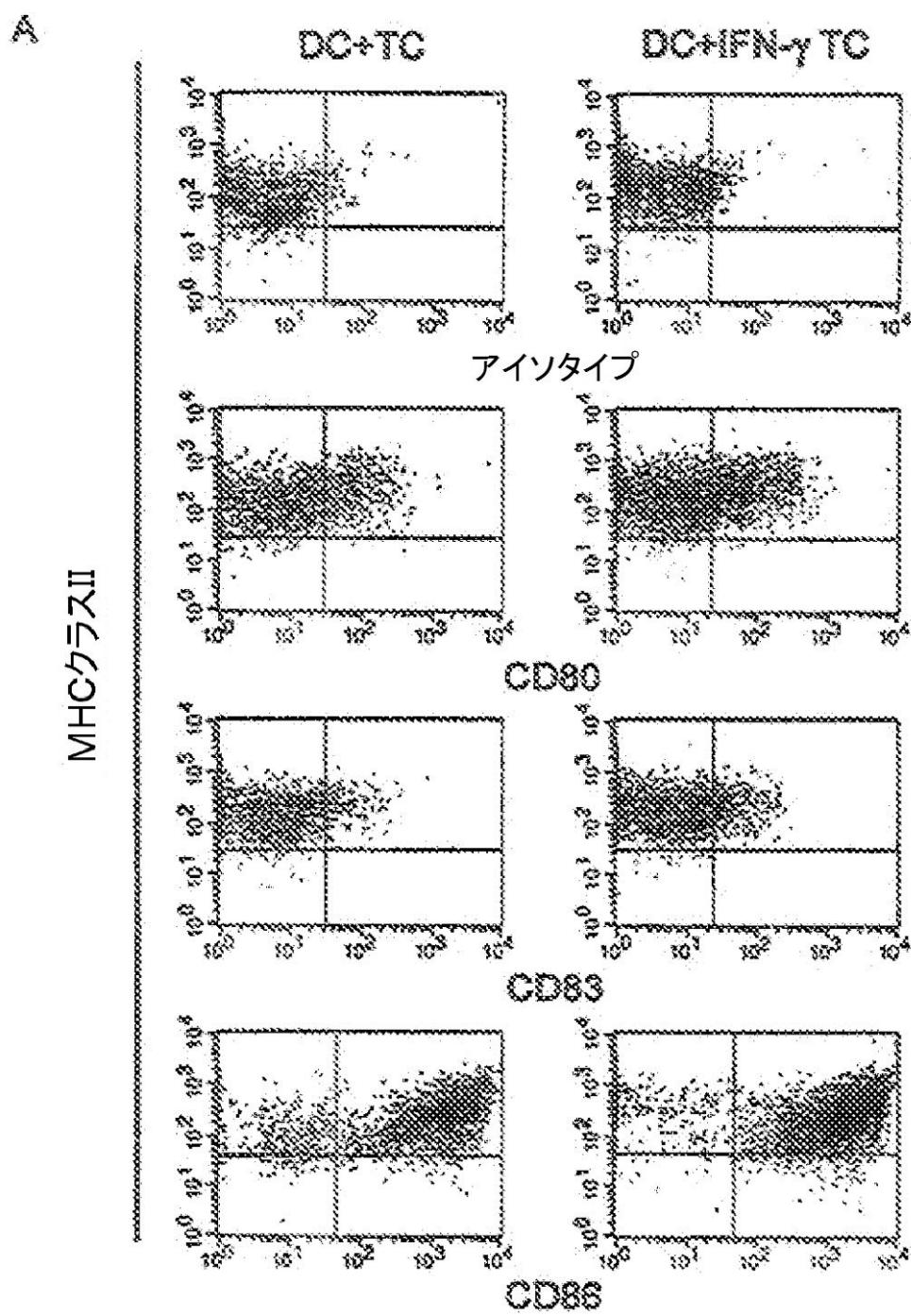
【図2D】

図2D



【図3A】

図3A



【図 3 B】

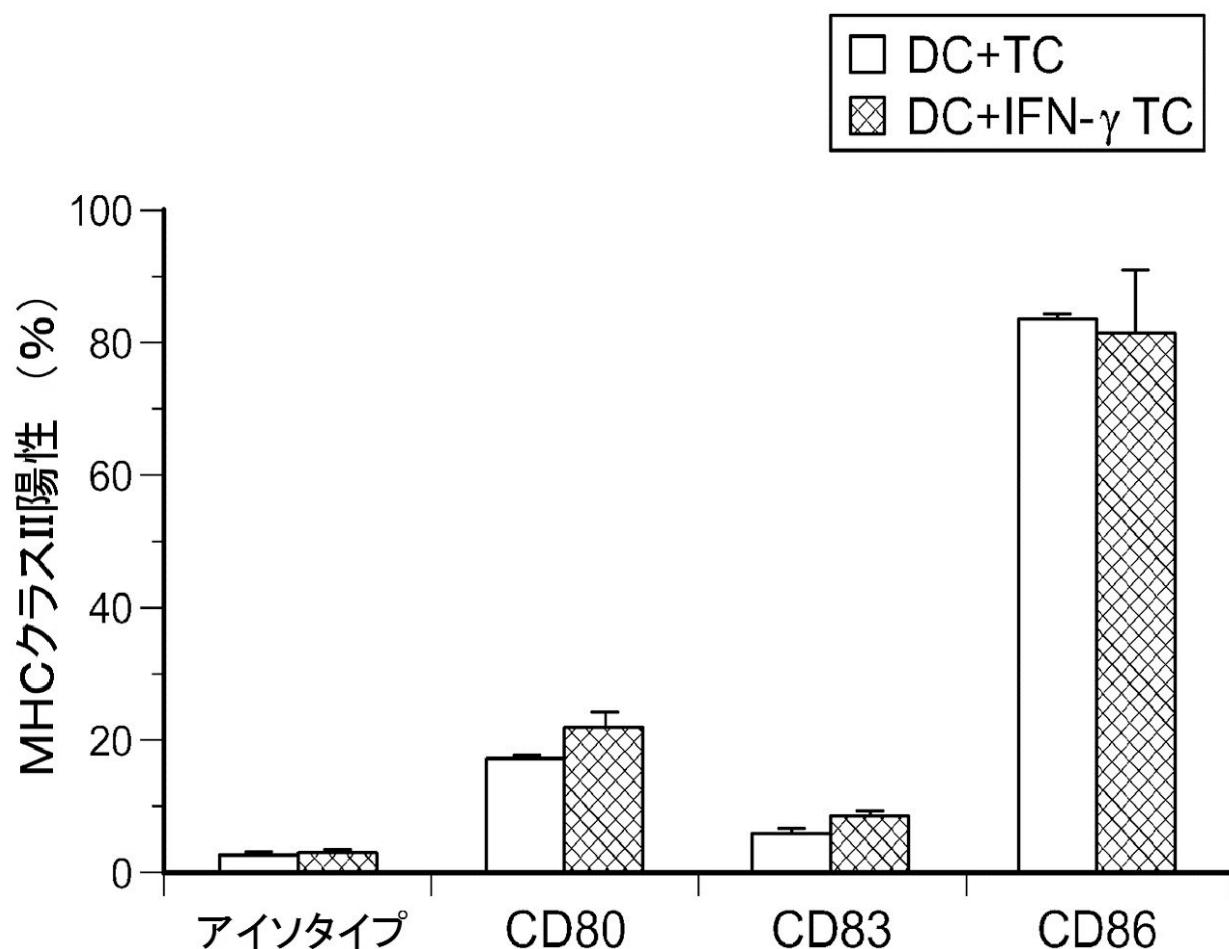
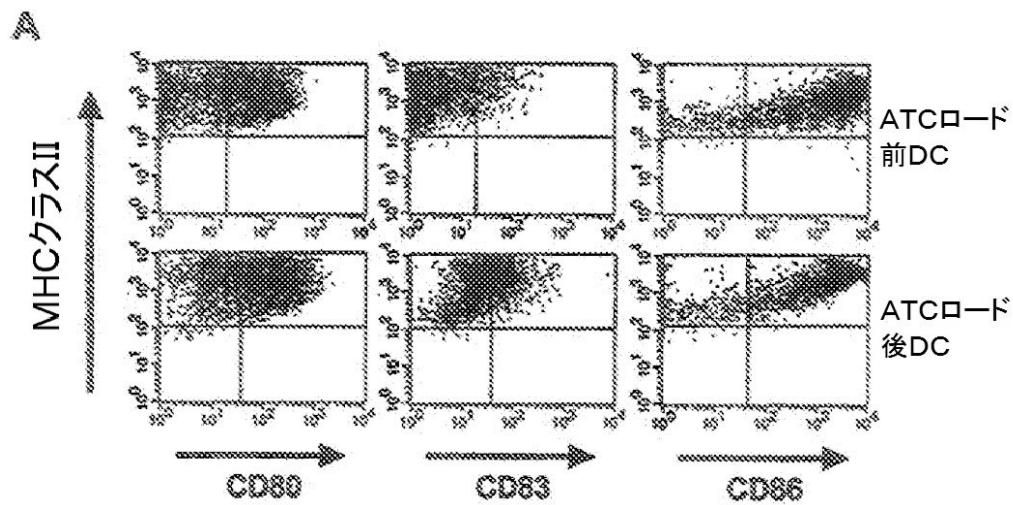
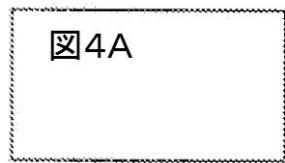


FIG. 3B

【図 4 A】



【図 4 B】

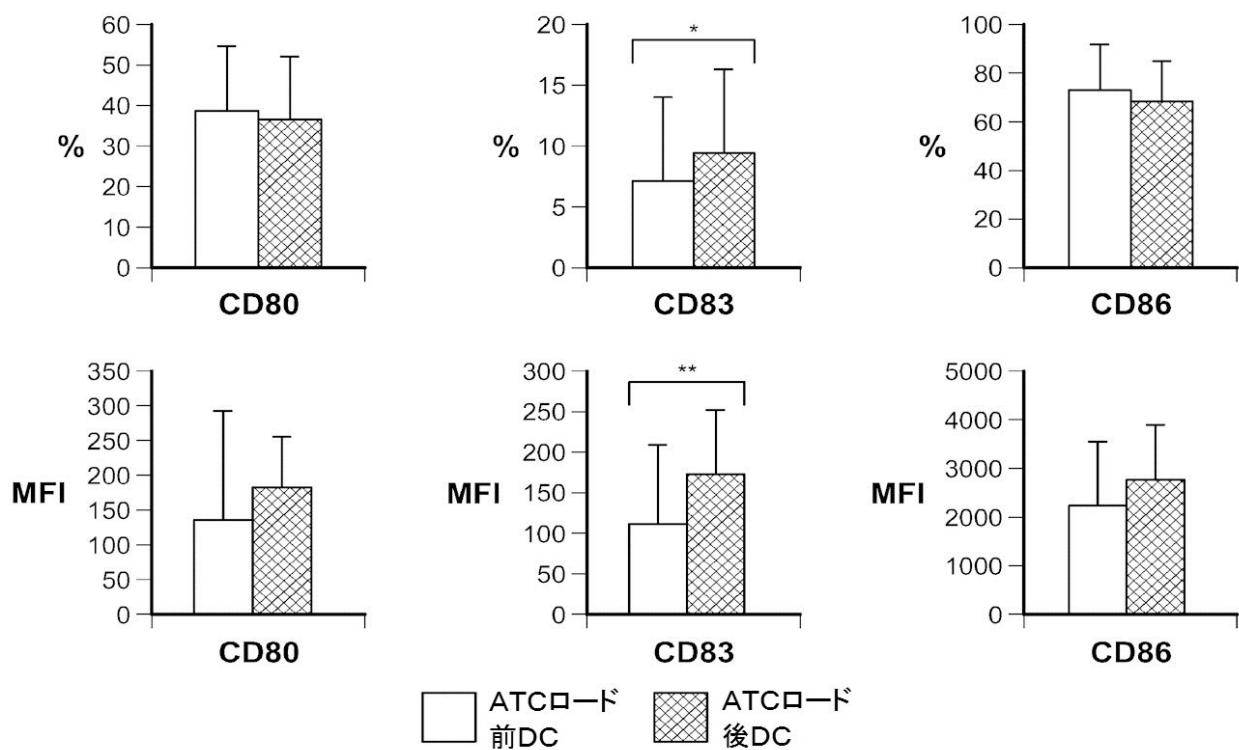


図4B

【図 5 A】

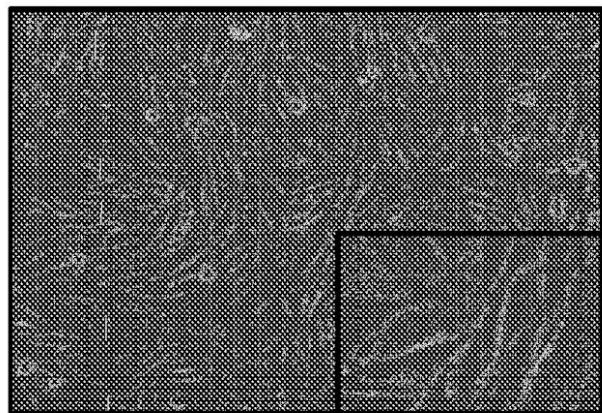
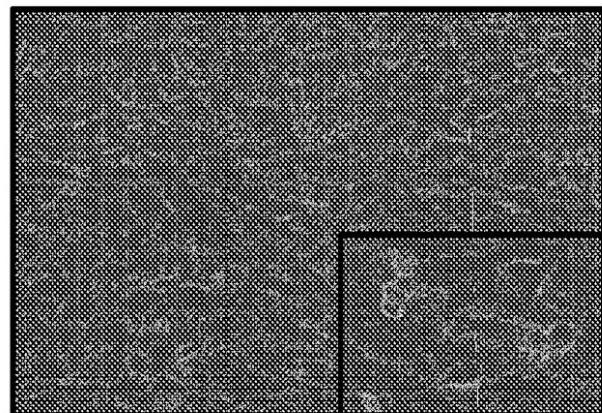
IFN- $\gamma$ なしIFN- $\gamma$ 

図5A

【図 5 B】

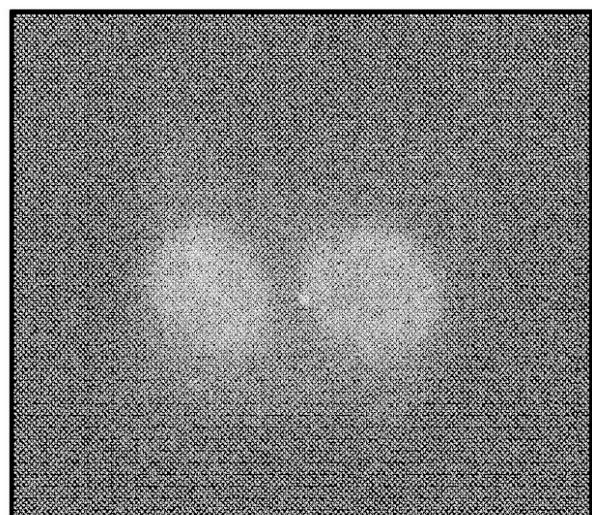
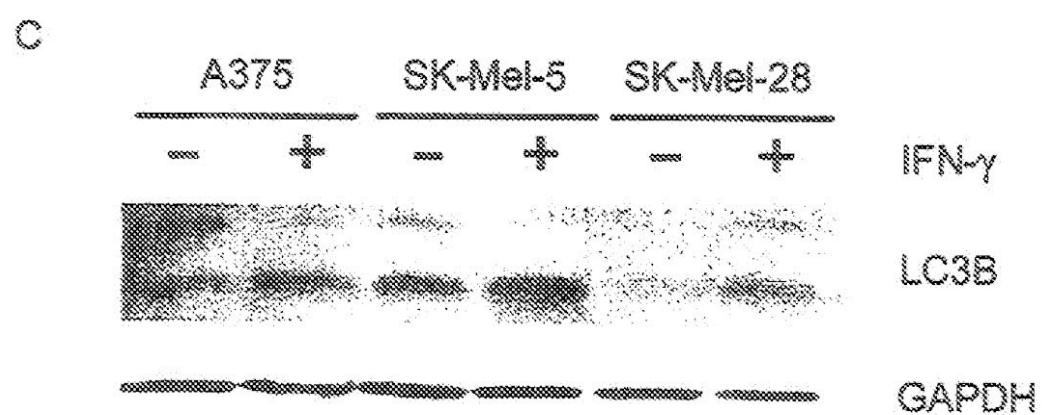
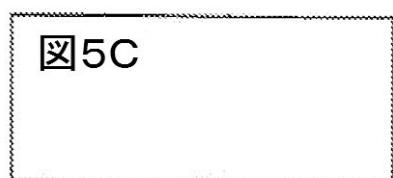
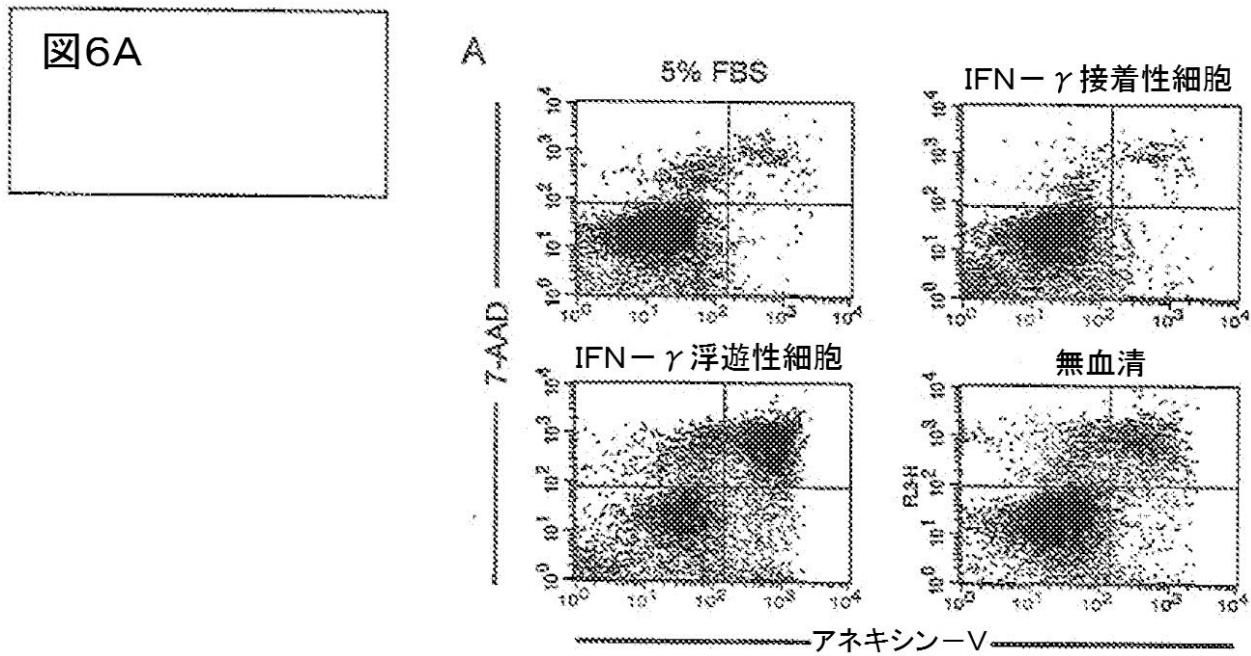
IFN- $\gamma$ なしIFN- $\gamma$ 

図5B

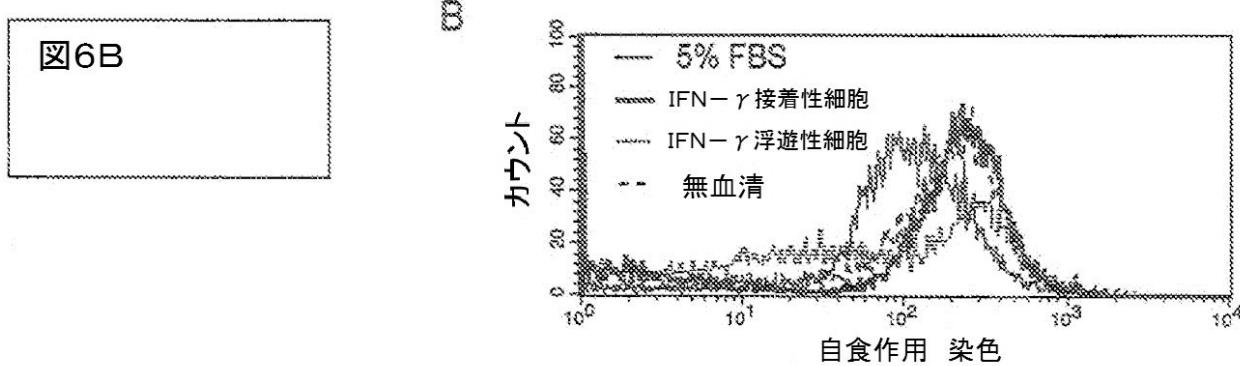
【図 5 C】



【図 6 A】



【図 6 B】



【図 6 C】

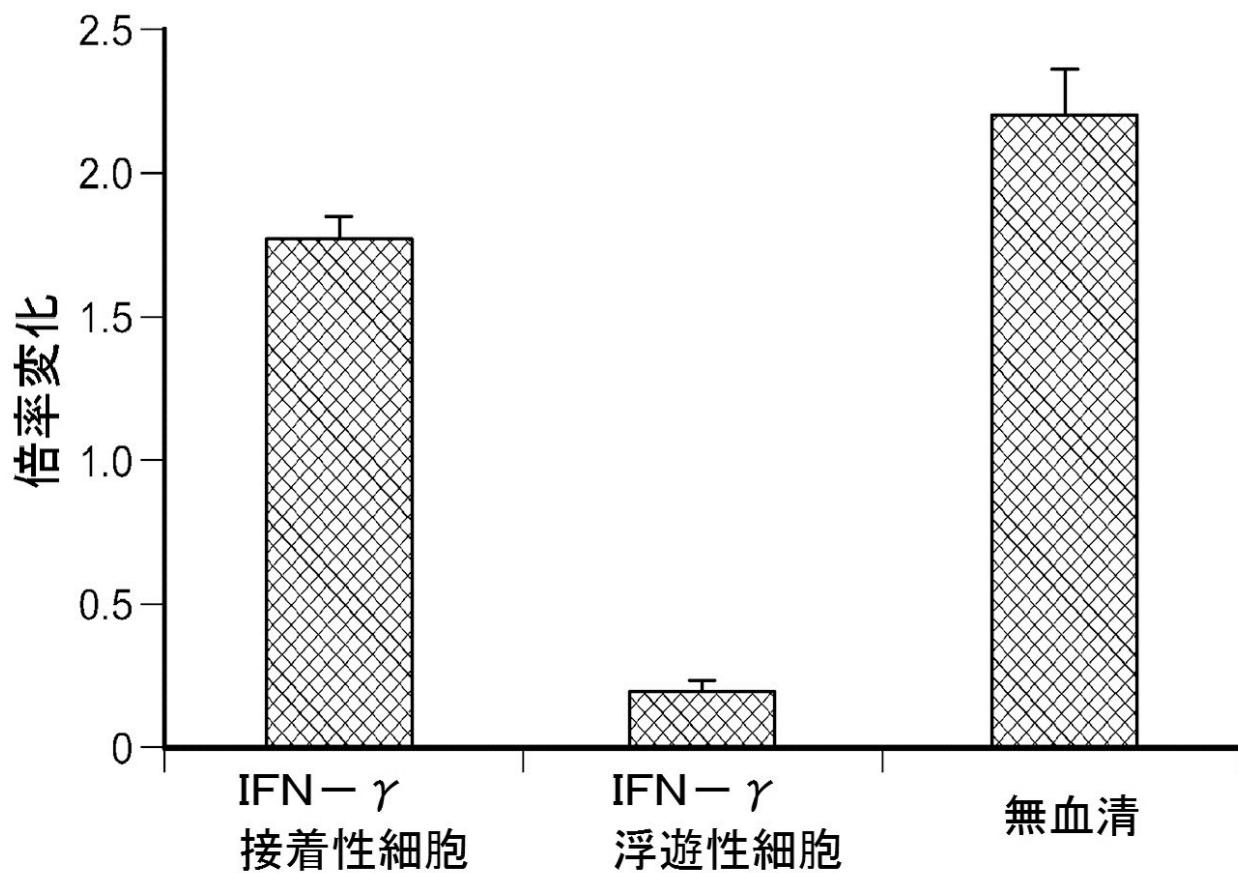


図6C

【図 7 A】

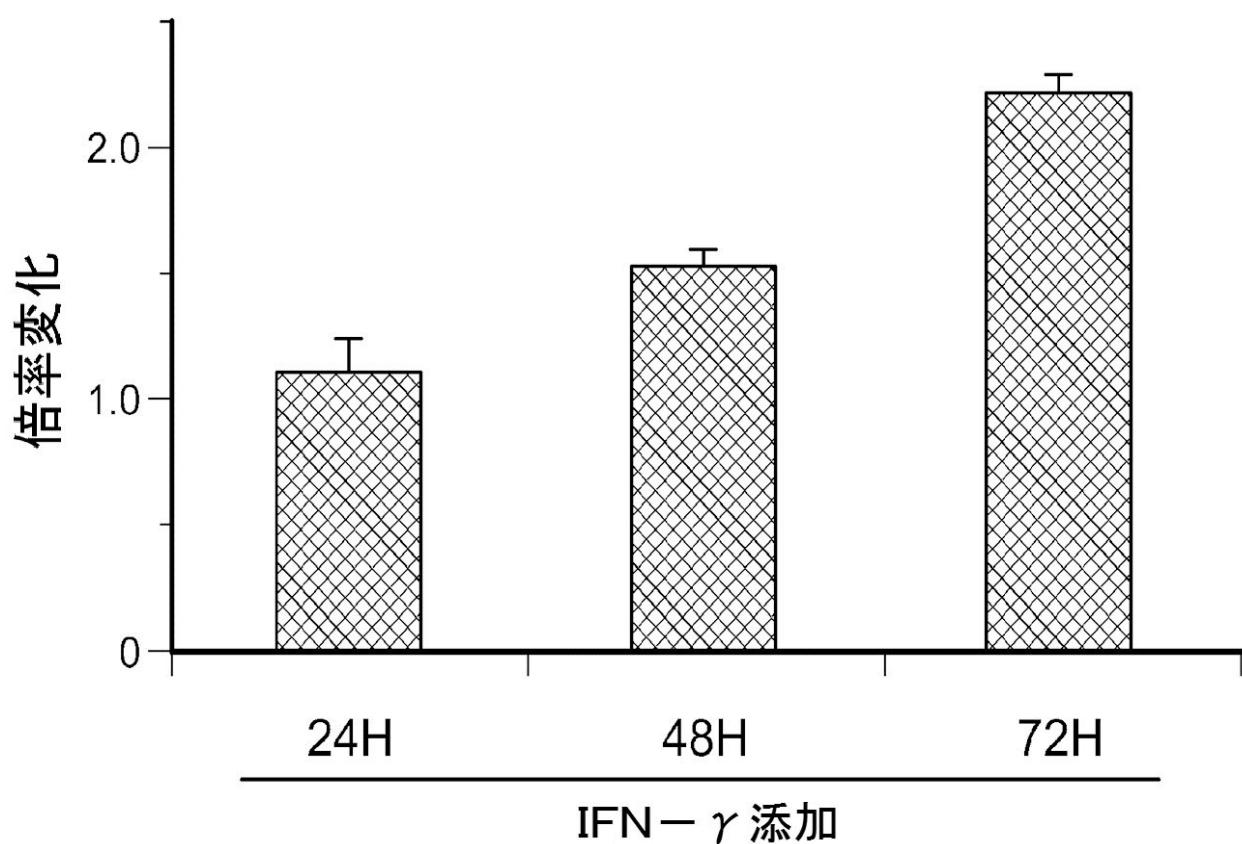


図7A

【図 7 B】

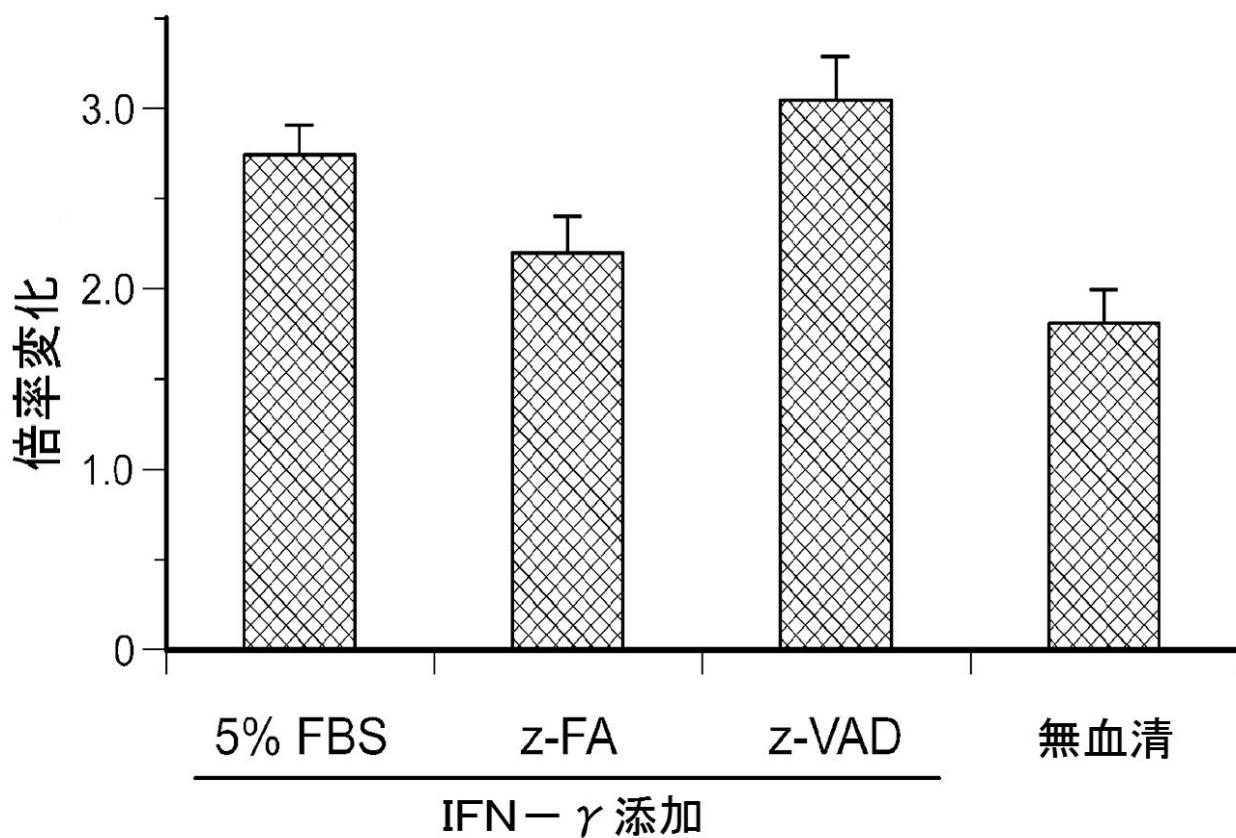


図7B

【図8】

図8

A

3-MAなし

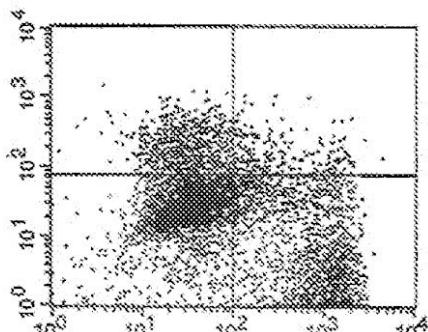
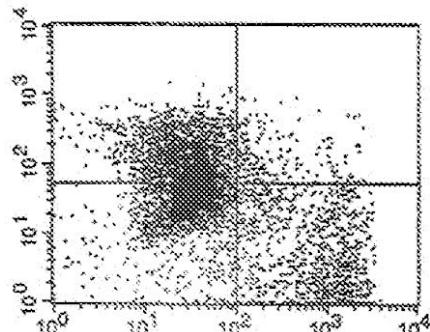
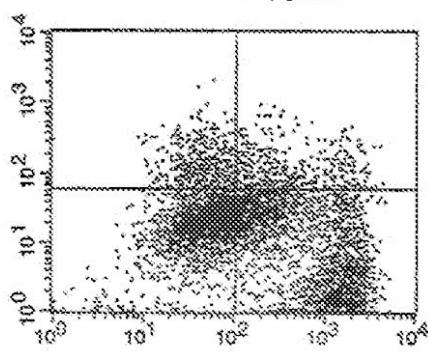
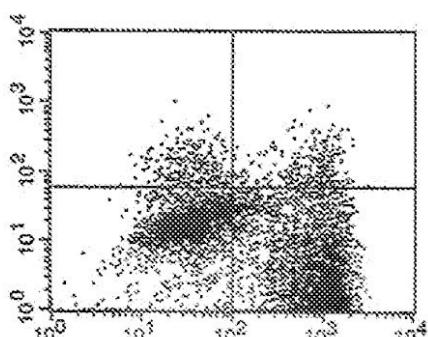
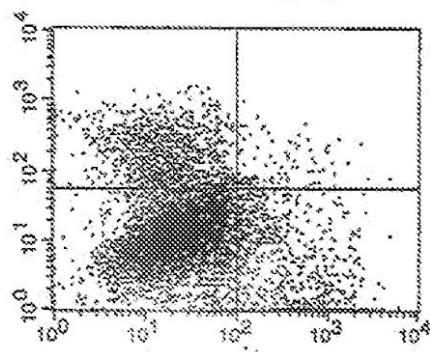
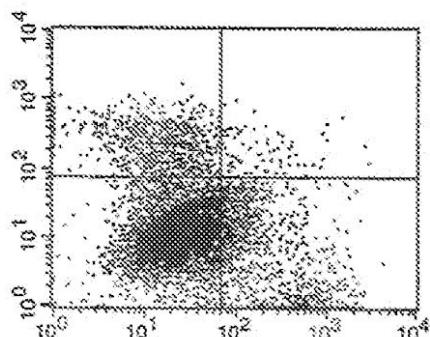
3-MA添加

5% FBS

5%FBS  
+ IFN $\gamma$ 

無血清

MHC-II



----- Annexin-V -----

【図9】

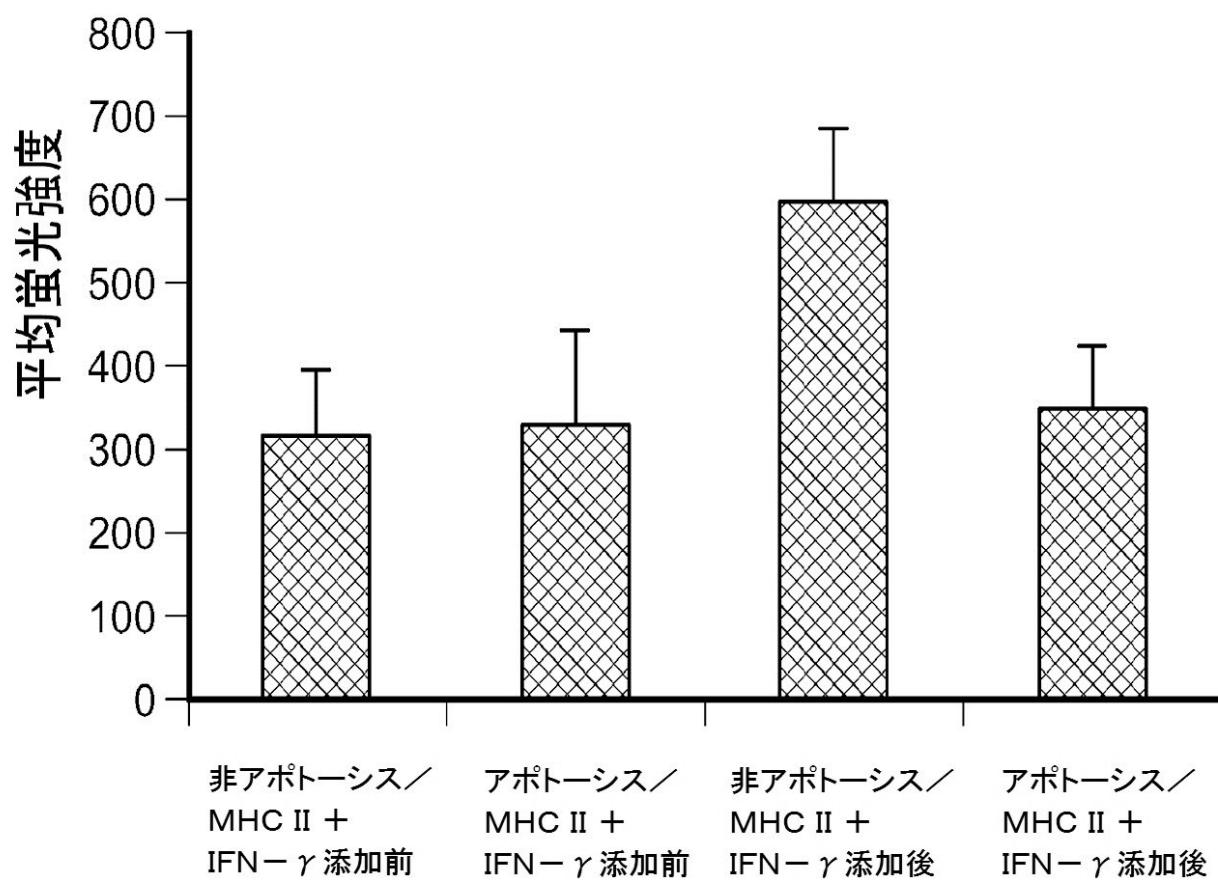
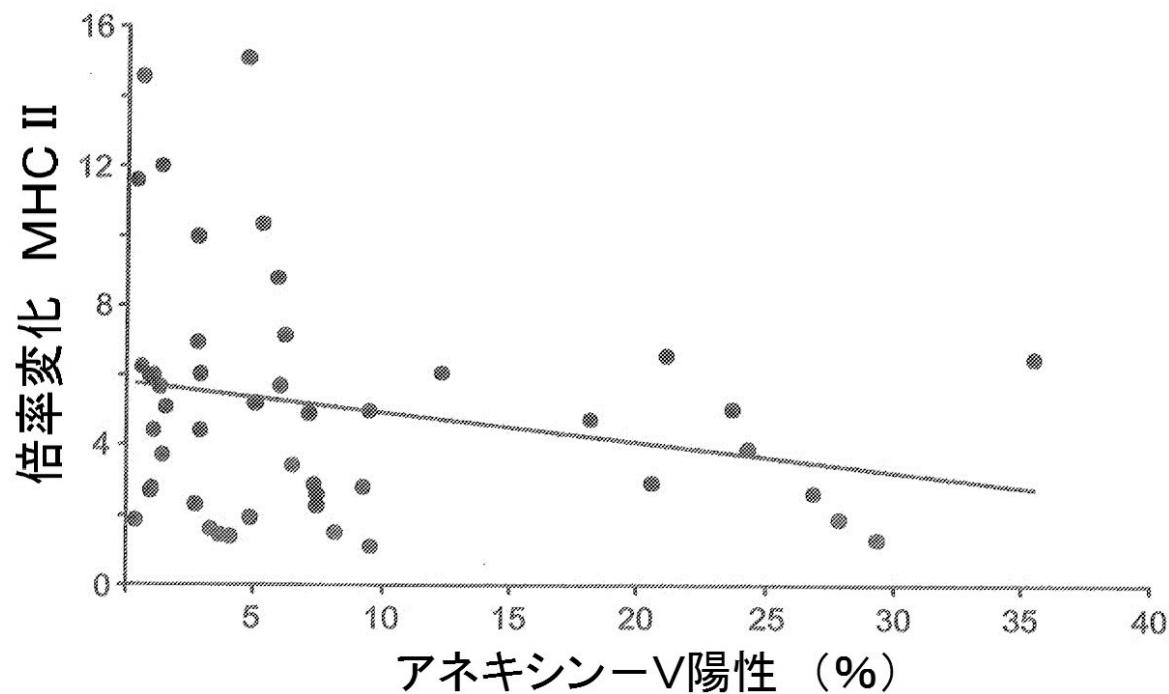


図9

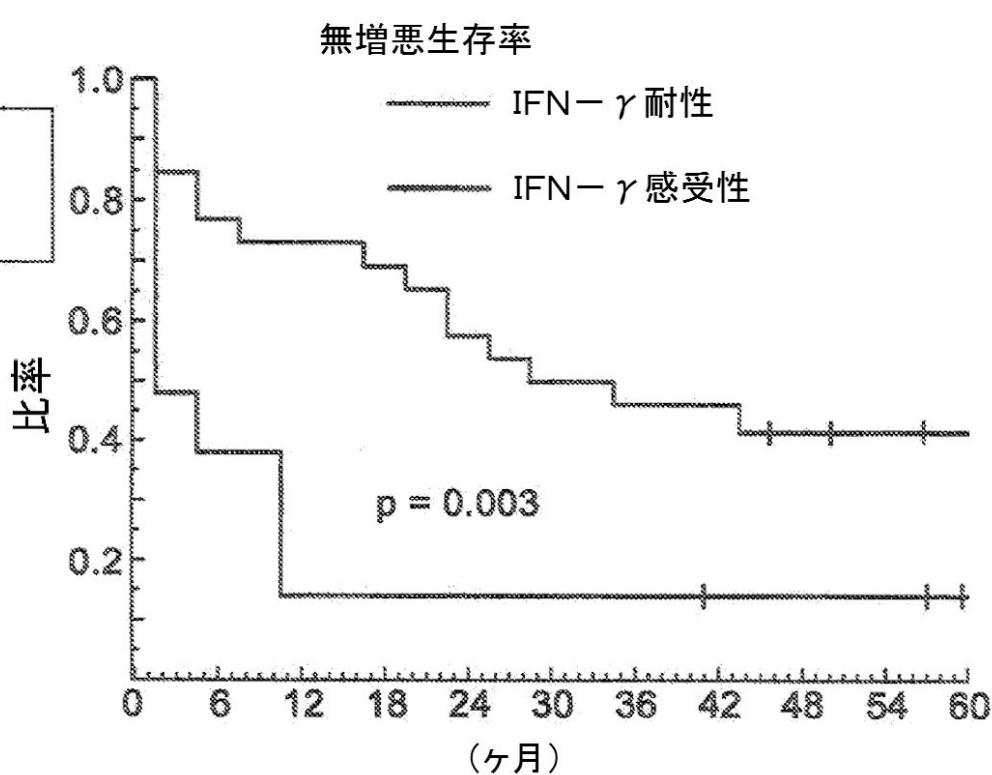
【図 10】

図10

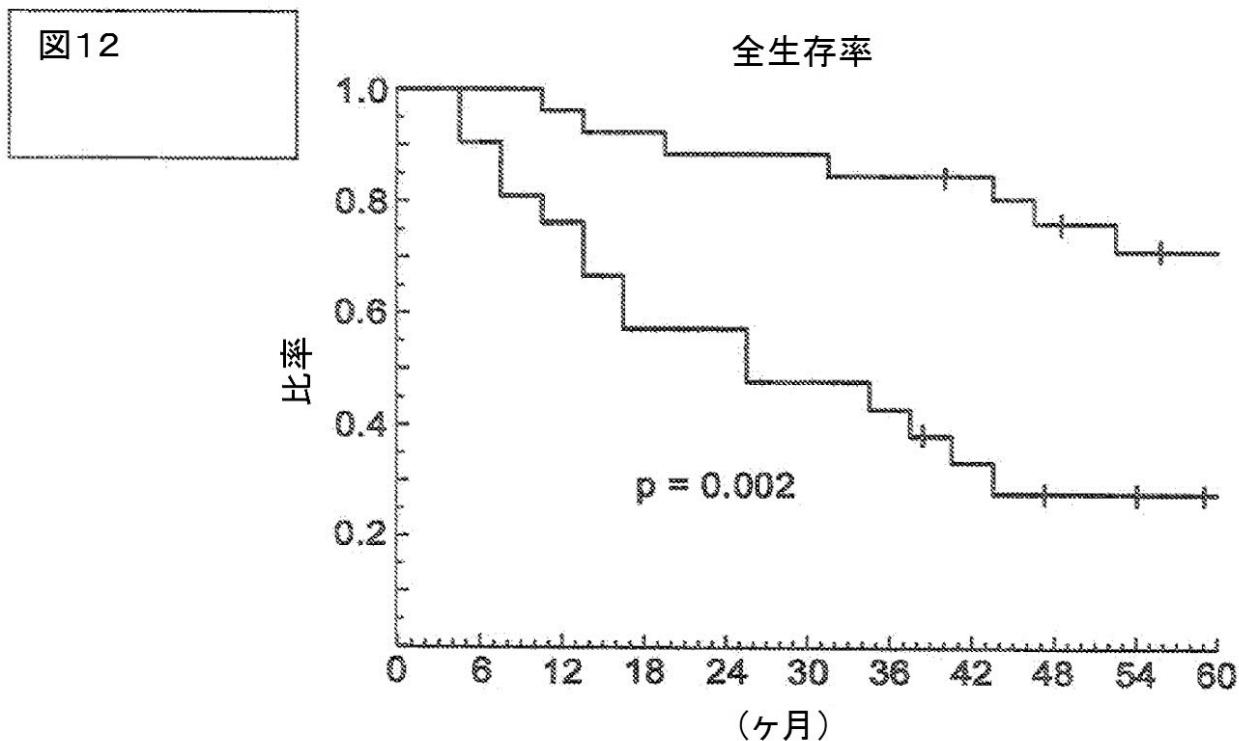


【図 11】

図11



【図12】



【図13】

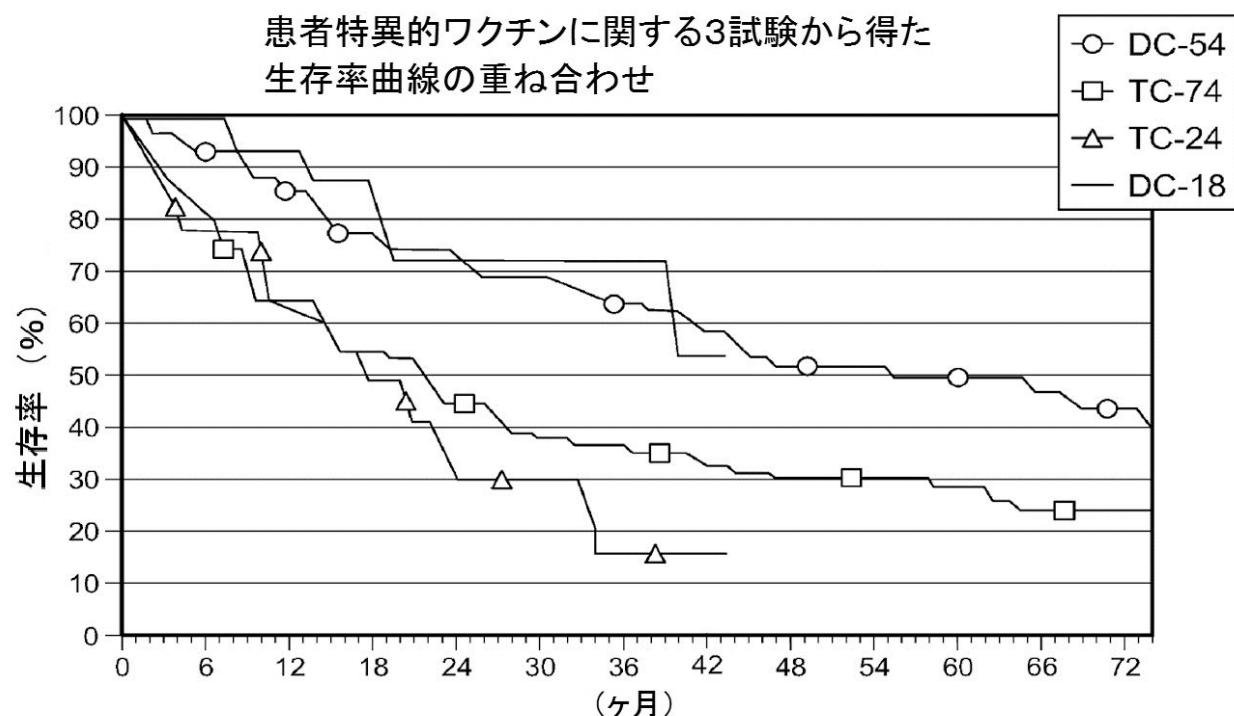


図13

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. <b>PCT/US2012/061294</b>
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
<b>A61K 38/21(2006.01)i, A61K 38/17(2006.01)i, A61K 48/00(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i</b>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K 38/21; C07K 14/57; A61K 45/00; A61P 35/00; C12N 5/08; A61K 39/00; A61P 37/04		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal) & keywords: dendritic cell, melanoma-specific peptide, IFN-gamma, melanoma, vaccine, cell division, antigen presenting cell, autophagic, non-apoptotic		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2008-0031900 A1 (PALUCKA et al.) 7 February 2008 See abstract and claims 1-4, 24.	1-13,20-29,31-33
A	US 2009-0041792 A1 (BELARDELLI et al.) 12 February 2009 See abstract and claims 1-5, 28.	1-13,20-29,31-33
A	US 2004-0106778 A1 (FAGAN et al.) 3 June 2004 See abstract and claims 1, 33, 35, 46.	1-13,20-29,31-33
A	US 2006-0140983 A1 (PALUCKA et al.) 29 June 2006 See abstract and claims 1, 2, 36.	1-13,20-29,31-33
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
<p>* Special categories of cited documents:      "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance      "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date      "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified)      "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means      "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention      "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone      "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art      "&amp;" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 11 MARCH 2013 (11.03.2013)	Date of mailing of the international search report <b>13 MARCH 2013 (13.03.2013)</b>	
Name and mailing address of the ISA/KR  Facsimile No. 82-42-472-7140	Authorized officer KIM, Seung Beom Telephone No. 82-42-481-3371 	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2012/061294

## Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: 14-19, 30, 34  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claims 14-19, 30, 34 are directed to a treatment method of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

## Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

**PCT/US2012/061294**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2008-0031900 A1	07.02.2008	AU 2007-269245 A1 CA 2691346 A1 CN 101511384 A EP 2037957 A2 EP 2037957 A4 JP 2009-542714 A KR 10-2009-0033375 A WO 2008-005859 A2 WO 2008-005859 A3	10.01.2008 10.01.2008 19.08.2009 25.03.2009 08.09.2010 03.12.2009 02.04.2009 10.01.2008 20.11.2008
US 2009-0041792 A1	12.02.2009	None	
US 2004-0106778 A1	03.06.2004	AU 2002-353224 A1 AU 2002-353224 A2 AU 2002-353224 B2 AU 2002-353227 A1 AU 2002-353227 A8 AU 2002-356317 A1 AU 2004-249497 A1 BR 0215284 A CA 2470594 A1 CA 2470666 A1 CA 2471306 A1 CA 2527091 A1 CN 1620467 A EA 007813 B1 EP 1463756 A2 EP 1468018 A2 EP 1468019 A2 EP 1636262 A1 GB 0130720 D0 IL 162598 D0 JP 2005-528083 A JP 2005-528086 A JP 2005-532034 A JP 2007-537696 A KR 10-2004-0086247 A MX PA04006049 A US 2005-0042731 A1 US 2005-0106679 A1 US 2007-0044163 A1 WO 03-054012 A2 WO 03-055912 A2 WO 03-055913 A2 WO 2004-113379 A1	09.07.2003 09.07.2003 10.04.2008 15.07.2003 15.07.2003 15.07.2003 29.12.2004 14.12.2004 03.07.2003 10.07.2003 10.07.2003 29.12.2004 25.05.2005 27.02.2007 06.10.2004 20.10.2004 20.10.2004 22.03.2006 06.02.2002 20.11.2005 22.09.2005 22.09.2005 27.10.2005 27.12.2007 08.10.2004 27.09.2004 24.02.2005 19.05.2005 22.02.2007 03.07.2003 10.07.2003 10.07.2003 29.12.2004
US 2006-0140983 A1	29.06.2006	CN 101052709 A EP 1814981 A2 EP 1814981 A4	10.10.2007 08.08.2007 30.09.2009

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No.

**PCT/US2012/061294**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		JP 2008-517946 A	29.05.2008
		US 2008-0112924 A1	15.05.2008
		US 2008-0112962 A1	15.05.2008
		US 2008-286314 A1	20.11.2008
		WO 2006-047515 A2	04.05.2006
		WO 2006-047515 A3	16.11.2006

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. F I テーマコード(参考)  
A 6 1 K 35/12 (2006.01) A 6 1 K 35/12

(81) 指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,R,S,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC

(74) 代理人 100148633  
弁理士 桜田 圭

(74) 代理人 100147924  
弁理士 美恵 英樹

(72) 発明者 コーンフォース、アンドリュー  
アメリカ合衆国 9 2 6 1 2 カリフォルニア州 アーバイン フォンカルマンアベニュー 1 8 3  
0 1 スイート 1 3 0

(72) 発明者 ディルマン、ロバート  
アメリカ合衆国 9 2 6 1 2 カリフォルニア州 アーバイン フォンカルマンアベニュー 1 8 3  
0 1 スイート 1 3 0

F ターム(参考) 4B065 AA90X AA98X AC20 BD39 CA44 CA45  
4C085 AA03 BB01 CC03 DD21 EE01 GG04  
4C087 AA01 AA02 AA03 BB63 MA16 MA66 NA14 ZA89 ZB09 ZB26