

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004年8月26日 (26.08.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/071518 A1

- (51) 国際特許分類: A61K 35/12, (74) 代理人: 特許業務法人アルガ特許事務所 (THE PATENT CORPORATE BODY ARUGA PATENT OFFICE); 〒103-0013 東京都中央区日本橋人形町1丁目3番6号共同ビル Tokyo (JP).
A61P 35/00 // A61K 39/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/014252
- (22) 国際出願日: 2003年11月10日 (10.11.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2003-038117 2003年2月17日 (17.02.2003) JP
特願2003-039122 2003年2月18日 (18.02.2003) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): メビオファーム株式会社 (MEBIOPHARM CO., LTD.) [JP/JP]; 〒107-0052 東京都港区赤坂 8-3-20 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 宇都口 直樹 (UTOGUCHI, Naoki) [JP/JP]; 〒229-1103 神奈川県相模原市橋本 6-4 2-9-405 Kanagawa (JP). 丸山 一雄 (MARUYAMA, Kazuo) [JP/JP]; 〒229-1101 神奈川県相模原市相原 5-1 5-1 2 Kanagawa (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: REMEDY FOR CANCER

(54) 発明の名称: 癌治療薬

(57) Abstract: A remedy for cancer which comprises, as the active ingredient, dendritic cells stimulated by an antigen originating in vascular endothelial cells having been cultured in a medium containing the culture supernatant of cancer cells.

(57) 要約: 本発明は、癌細胞培養上清を含有する培地で培養した血管内皮細胞由来の抗原で刺激された樹状細胞を有効成分とする癌治療薬に関する。



WO 2004/071518 A1

明 細 書

癌治療薬

技術分野

本発明は腫瘍組織の血管内皮細胞をターゲットにした癌免疫療法に関する。

背景技術

癌の治療法には外科的療法、化学療法、放射線療法などがあり、それぞれに特徴を有しており、それらの特性を考慮して、最も有効な癌治療法が選択されている。外科療法は一定の大きさ以上の癌に対しては、有効な方法であるが、手術という侵襲は患者にとって極めて負担が大きく、また脳腫瘍のように摘出が困難な部位の場合や、数ミリといった小さな癌は発見そのものが困難なことなどが、外科療法の限界となっている。化学療法は、主に注射又は経口投与という方法によるため、方法としては患者への負担が軽く、また血液を介して、抗癌剤が運搬されるため、小さな腫瘍への適応も可能である。しかしながら、抗癌剤は基本的には細胞毒であり、その副作用は極めて重篤であり、使用量、使用期間の制限によって十分な効果が得られないことが多い。放射線療法は目的とする部位に選択的に放射線を当てることが困難であり、また近傍の正常細胞にも影響を与えるという問題点を有している。

前述のとおり、これらの治療法は一長一短であることから、多くの場合、単独で行われるものではなく、有効に併用され、癌治療が行われている。しかしながら、依然、癌は我が国の死因の第一位であり、新規な癌治療法の確立は急務な課題である。

さて、これら3つの癌治療法とは異なり、4つめの方法として、生体が本来有している異物排除のシステムである「免疫」によって、癌を排除しようという「癌免疫療法」がある。初期の癌免疫療法は癌細胞断片や癌特異抗原をアジュバン

ドなどととも癌ワクチンとして投与し、細胞傷害性T細胞（CTL）を活性化し、癌を排除しようというものであるが、癌細胞自身は、本来、自己の細胞が変化したものであり、極めて抗原性が乏しく、癌免疫療法の成果はほとんど得られていなかった。

近年、樹状細胞の役割が明らかとなり、新規な癌免疫療法のブレークスルーとして注目されている。樹状細胞は、生体内において最も強力な抗原提示能を有する細胞である。そこでex vivoの系で、癌細胞断片や癌特異抗原を樹状細胞にパルスし、本樹状細胞を生体内に戻すことによって、樹状細胞がCTLを活性化し、癌免疫により癌が排除されるというものである。樹状細胞を用いた癌免疫療法は動物実験にとどまらず、ヒトにおける臨床結果でも成功例が報告されており、その可能性と有効性は新規癌治療法として注目されている（J. Immunol., 156, p. 2918 (1996)、J. Exp. Med., 183, p. 7 (1996)、Blood, 84, p. 3054 (1994)、Immunol., 95, p. 141 (1998)、J. Exp. Med., 185, p. 1101 (1997)、J. Exp. Med., 187, p. 1019 (1998)、Blood, 93, p. 780 (1999)、Science, 283, p. 1183 (1999)、J. Exp. Med., 185, p. 1101 (1997)）。

発明の開示

本発明の目的は、樹状細胞の機能を利用した新たな癌免疫療法を提供することにある。

そこで本発明者は、腫瘍組織は、正常組織に比べて増殖率が大きく、栄養の供給、及び老廃物の排除のパイプとしての血管新生が不可欠であることに着目し、まず血管内皮細胞を癌細胞培養上清を含有する培地で培養し、得られた血管内皮細胞由来の抗原で樹状細胞を刺激すれば、腫瘍組織の血管内皮細胞をターゲットにした癌免疫療法薬として有用な樹状細胞が得られることを見出し、本発明を完成した。

すなわち、本発明は、癌細胞培養上清を含有する培地で培養した血管内皮細胞

由来の抗原で刺激された樹状細胞を有効成分とする癌治療薬を提供するものである。

また、本発明は、癌細胞培養上清を含有する培地で培養した血管内皮細胞由来の抗原で刺激された樹状細胞の、癌治療薬製造のための使用を提供するものである。

さらに、本発明は、癌細胞培養上清を含有する培地で培養した血管内皮細胞由来の抗原で刺激された樹状細胞を投与することを特徴とする癌の治療法を提供するものである。

本発明の癌治療薬は、腫瘍細胞自体をターゲットとするのではなく、腫瘍組織の血管内皮細胞をターゲットとした癌免疫療法である。従って、従来の癌免疫療法に比べて以下の点で優れている。

(1) 腫瘍組織を構成する細胞は癌細胞：血管内皮細胞＝100～1000：1であり、これは1つの血管内皮細胞が100～1000個の癌細胞を支えていることを意味している。従って1つの血管内皮細胞の死は100～1000個の癌細胞の死が予想される。従って血管内皮細胞をターゲットにした場合、癌細胞をターゲットにした場合の100～1000倍効率が良い。

(2) 従来の癌免疫療法では、原発癌の場合、肝癌なら肝癌、肺癌なら肺癌と癌種によって異なった細胞を免疫しなければ効果が期待できない。しかし、血管内皮細胞をターゲットとした場合、肝癌であれ肺癌であれ血管内皮細胞を抗原とするため、癌細胞の影響を受けた血管内皮細胞という点から、これらは癌種によらず共通の性質を有し、共通の抗原を発現していることから、いかなる癌種にも有効である。

(3) 生体内で血管新生が盛んに行われている部位は、成人において腫瘍組織以外では創傷治癒部位のみであり、癌血管内皮細胞をターゲットとした場合、腫瘍への選択性が極めて高く、副作用が少ない。

図面の簡単な説明

図1は、B16癌細胞培養上清を含有する培地で培養した血管内皮細胞由来の抗原で刺激された樹状細胞のマウス肺癌に対する治療効果（肺重量）を示す図である。図中、NoneはB16のみ投与群を；None pulsed DCはB16及び何もパルスしていない樹状細胞投与群を；BAEC pulsed DCはBAECをパルスした樹状細胞投与群を；B16 CM-BAEC pulsed DCはB16と、B16の培養上清で培養したBAECをパルスした樹状細胞を投与した群を示す。

発明を実施するための最良の形態

本発明の癌治療薬の有効成分である樹状細胞は、腫瘍組織の血管内皮細胞をターゲットとする。そのため、樹状細胞を刺激するための血管内皮細胞は、癌細胞培養上清を含有する培地で培養したものをを用いる。

用いる癌細胞は、ヒト癌細胞であるのが好ましいが、癌細胞の種類は限定されない。癌細胞の例としては、胃癌、肝臓癌、大腸癌、肺癌、皮膚癌、膀胱癌、子宮頸部癌、卵巣癌、乳癌、前立腺癌、脳腫瘍などの固形癌の細胞が挙げられる。癌細胞の培養条件は、特に制限されず、例えばRPMI1640、MEM、DMEM、ハムF12、M199等の培地中、37℃、5%CO₂、95%air、飽和水蒸気条件下行うのが好ましい。なお培地には、抗生物質、炭酸水素ナトリウム、非必須アミノ酸等を添加することもできる。癌細胞の培養上清の採取は、例えば500～1500rpm、2～10分間遠心分離や、フィルターろ過することにより得られる。

血管内皮細胞としては、種は特に限定されず、ヒト、ウシ、マウスなどの血管内皮細胞が用いられる。例えば、ヒト由来であれば、臍帯静脈、臍帯動脈、大動脈、肺動脈、新生児包皮、成人皮膚等の血管の内皮細胞が用いられる。当該血管内皮細胞の培養は、前記癌細胞培養上清を含有する培地で行われる。ここで、培地中への癌細胞培養上清の添加量は、10～100v/v%、特に20～100v/v%が好ましい。血管内皮細胞培養のための培地は特に制限されず、例えばRPMI1640、M

EM、DMEM、ハムF12、M199等の培地、さらに癌細胞培養上清以外に血管内皮細胞増殖因子、ヘパリン、抗生物質等が添加されていてもよい。血管内皮細胞の培養条件は、特に制限されず、37℃、5%CO₂、95%air、飽和水蒸気条件下で2～4日間行うのが好ましい。

前記血管内皮細胞由来の抗原としては、当該血管内皮細胞自体でもよいが、血管内皮細胞内成分（例えばTotal RNA等）、血管内皮細胞破碎液又は血管内皮細胞膜小胞を用いてもよい。当該細胞内成分、細胞破碎液や膜小胞は、調製が容易であり、かつ樹状細胞に対する刺激効率が高いのでより好ましい。

細胞破碎液は、例えば凍結（-160℃）と融解（37℃）を4～6回繰り返したものを低速度で遠心（400rpm、10分間）することにより調製することができる。また、膜小胞は、例えばDMEMに100mMパラホルムアルデヒド、2mMジチオスレイトール、1mM CaCl₂、0.5mM MgCl₂を加えたもので37℃、5%CO₂、95%air、飽和水蒸気条件下で一晩処理し、次に150gで5分間遠心し、続いてその上清を4℃において30分間30000gの遠心により調製することができる。細胞内成分、例えばTotal RNAは常法により調製することができる。

樹状細胞としては、ヒト由来の樹状細胞、特に投与しようとする患者自身由来の樹状細胞又は患者とMHC適合のヒト由来の樹状細胞を用いるのが好ましい。樹状細胞は、例えば非特許文献8、9等に記載の方法により、骨髓細胞、臍帯血由来細胞、末梢血単核細胞などから分化誘導させることにより得ることができる。末梢血単核細胞から樹状細胞を分化誘導するには、例えばGM-CSF（10-100ng/mL）、IL-4（50-500IU/mL）を加えた培地で、5～10日間培養するのが好ましい。

樹状細胞を前記血管内皮細胞由来の抗原で刺激するには、例えば樹状細胞の懸濁液に当該内皮血管細胞由来抗原を添加し、4～24時間インキュベートすることにより行われる。また抗原刺激がより効率的に行われるよう、カチオニックリポソーム等を併用することが好ましい。さらに樹状細胞と血管内皮細胞の細胞融

合法によって、樹状細胞に血管内皮細胞抗原を提示させても構わない。また、血管内皮細胞のTotal RNAを樹状細胞に導入させ、抗原を提示させてもよい。当該抗原の添加量は、樹状細胞 1×10^6 個あたり蛋白濃度として $0.01 \sim 100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、特に $0.1 \sim 100 \mu\text{g}/\text{mL}$ が好ましい。

かくして得られた樹状細胞は、生体内で癌組織の血管内皮細胞特異抗原を提示し、腫瘍組織血管内皮細胞への細胞障害性T細胞 (CTL) が誘導され、腫瘍組織の血管内皮細胞が攻撃され、腫瘍組織内の血管が破綻し、腫瘍はその栄養供給路を絶たれ、腫瘍が退縮することから、癌治療薬として有用である。

得られた樹状細胞を含む細胞懸濁液は、ヒトに癌治療薬として投与することから、細胞増殖性を無くしておくのが好ましい。より安全に利用するため加熱処理、放射線処理、あるいはマイトマイシンC処理など、癌治療薬としての機能を残しつつ、癌細胞のタンパク質が変性する程度の条件下で処理をすることができる。例えば、X線照射を利用する場合、X線照射器の管球の下に樹状細胞を含むフラスコを置き、総放射線量 $1000 \sim 3300 \text{Rad}$ で照射する。マイトマイシンC処理法は、例えば、樹状細胞を $1 \sim 3 \times 10^7$ 個細胞/mLの密度で懸濁し、細胞浮遊液 1mL あたりマイトマイシンC $25 \sim 50 \mu\text{g}$ の比で添加して、 37°C 、 $30 \sim 60$ 分間保温処理する。熱による細胞処理方法は、例えば、生細胞濃度を 1×10^7 個/mLに調製した細胞懸濁液を入れた遠心管を $50 \sim 65^\circ\text{C}$ で 20 分間加熱処理を行うことで調製しうる。

本発明の癌治療薬の対象となる癌は、特に制限されないが固形癌が好ましく、例えば胃癌、肝臓癌、大腸癌、肺癌、皮膚癌、膀胱癌、子宮頸部癌、卵巣癌、乳癌、前立腺癌、脳腫瘍等が挙げられる。本発明の樹状細胞の投与量は、患者の年齢、体重、性別、癌の種類及び癌の進行度、症状等により異なり、一概に決定できないが、現在行われている細胞ワクチン療法で注入されるのと同程度の量が患者に投与されればよい。本発明の樹状細胞は、患者本人に使用することもできるが、骨髄バンク、臍帯血バンクの発達により、MHC適合の同種の多数の患者に投与

することができる。

実施例

次に実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は何らこれに限定されるものではない。

実施例 1

A. 方法

(1) 癌細胞培養上清 (癌CM) の調製

マウス黒色腫 B 1 6 細胞を RPMI1640 培地中、37℃、5%CO₂、95%air、飽和水蒸気条件でサブコンフルエント状態まで培養した。新しい培地 (ヒト臍帯静脈血管内皮細胞培養用の培地; 以下 HUVEC 培地。組成は、Medium199:RPMI1640=1:1 に混合し、15%ウシ胎児血清、血管内皮細胞増殖因子 (20 μg/mL)、ヘパリン (25 μg/mL)、抗生物質を添加したもの) に交換した。48 時間後、培地を回収し、1000 rpm、5 分間遠心し、上清を 0.22 μm のフィルターにてろ過した。これと等量の新鮮な HUVEC 培地とを混合したものを癌細胞の馴らし培地 (癌CM) として使用した。

(2) 癌CM作用血管内皮細胞の調製

上記の HUVEC 培地中にヒト臍帯静脈血管内皮細胞を 2500 個/cm² の濃度で播種、37℃、5%CO₂、95%air、飽和水蒸気条件で、培養した。翌日、癌CMに培地を交換した。37℃、5%CO₂、95%air、飽和水蒸気条件で48時間培養したものを、癌CM作用血管内皮細胞とした。

(3) 樹状細胞への抗原パルス

培養癌CM作用血管内皮細胞に膜小胞調製液 (DMEM培地に100mMパラホルムアルデヒド、2mM ジチオスレイトール, 1mM CaCl₂, 0.5mM MgCl₂を溶解) を添加し、37℃、一夜処理した。

次に上清を 150 × g で 5 分間、遠心し、続いて上清を 4℃、30 分間 300

00×gの遠心し、その沈殿を癌CM血管内皮細胞の膜小胞とし、樹状細胞へパルスする抗原とした。

また培養癌CM作用血管内皮細胞を生理食塩水に懸濁し、凍結融解を4回繰り返した細胞破碎液も樹状細胞へパルスする抗原とした。

癌CM血管内皮細胞の膜小胞又は細胞破碎液とリポフェクチンを(量比)混合し、脂質濃度として10 μ g/mLになるように調製し、20分間室温で放置した。これをマウス樹状細胞株DC2.4細胞又は骨髓由来初代培養樹状細胞の細胞懸濁液(1×10⁶個/mL)に加え、5時間インキュベートした。リン酸緩衝液で遠心、洗浄後、マイトマイシンC(50 μ g/mL)で37℃、30分間処理した。リン酸緩衝液で2回遠心、洗浄し、リン酸緩衝液に再懸濁した。

(4) 樹状細胞の投与

上記方法によって調製したDC2.4細胞又は初代培養樹状細胞(1×10⁵ cells)をB57/BL6マウスに皮下又は皮内投与した。

(5) 癌細胞の投与

DC2.4細胞又は初代培養樹状細胞投与の一週間後、B16F10細胞(1×10⁶ cells)を尾静脈内注射した。

(6) 肺転移数の評価

B16F10細胞投与一週間後、肺を摘出し、実体顕微鏡により肺に転移したコロニー数を計測した。

B. 結果

各3例の樹状細胞を投与していない群の肺転移数は(924, 799, 550)であり、樹状細胞を投与した群の肺転移数は(184, 414, 0)であった。この結果、本発明の樹状細胞は、癌細胞の肺転移を有意に抑制し、癌治療薬として有用であることが判明した。

実施例2

A. 方法

ウシ大動脈より剥離法により継代培養した血管内皮細胞(BAEC)を用いた。血管内皮細胞の培養は、DMEMに10%ウシ胎児血清を添加したものを培地とした。この血管内皮細胞を実施例1と同様にして細胞破碎液を抗原とした。

その他の操作は実施例1と同様にして、B16細胞の培養上清を含有する培地でウシ大動脈由来血管内皮細胞を培養し、得られた細胞の破碎液を抗原として、樹状細胞へパルスした。得られた樹状細胞を実施例1と同様にしてB57/BL6マウスに投与した。癌細胞投与2週間後、肺を摘出し、肺重量を測定した。

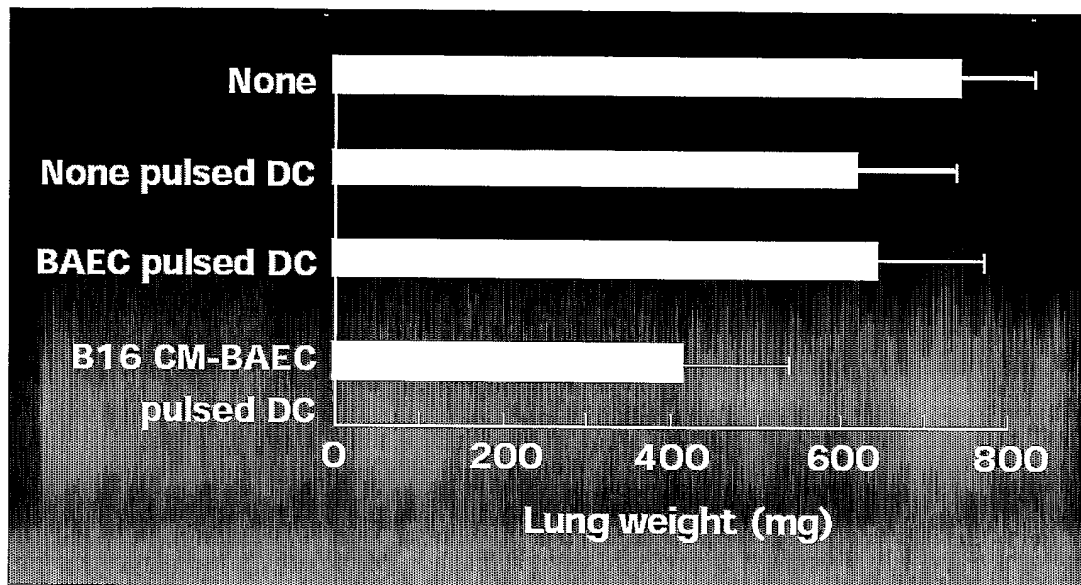
B. 結果

その結果、図1に示すようにNone群(B16のみ投与)、None pulsed DC群(B16及び何もパルスしていない樹状細胞を投与)及びBAEC pulsed DC群(B16と、BAECをパルスした樹状細胞を投与)は、肺の大部分がB16で黒色になっており、肺重量も増加していた。これに対し、B16CM-BAEC pulsed DC群(B16と、B16の培養上清で培養したBAECをパルスした樹状細胞を投与)は黒色部がわずかであり、肺重量の増加も抑制されていた。

請求の範囲

1. 癌細胞培養上清を含有する培地で培養した血管内皮細胞由来の抗原で刺激された樹状細胞を有効成分とする癌治療薬。
2. 血管内皮細胞由来の抗原が、血管内皮細胞、その細胞内成分、その細胞破砕液又はその細胞膜小胞である請求項 1 記載の癌治療薬。
3. 癌細胞培養上清を含有する培地で培養した血管内皮細胞由来の抗原で刺激された樹状細胞の癌治療薬製造のための使用。
4. 血管内皮細胞由来の抗原が、血管内皮細胞、その細胞内成分、その細胞破砕液又はその細胞小胞である請求項 3 記載の使用。
5. 癌細胞培養上清を含有する培地で培養した血管内皮細胞由来の抗原で刺激された樹状細胞を投与することを特徴とする癌の治療法。
6. 血管内皮細胞由来の抗原が、血管内皮細胞、その細胞内成分、その細胞破砕液又はその細胞小胞である請求項 5 記載の治療法。

☒ 1



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/14252

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁷ A61K35/12, A61P35/00//A61K39/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl ⁷ A61K35/12, A61P35/00, A61K39/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPlus (STN), BIOSIS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), WPI, JOIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	Naoki UTOGUCHI et al., 'Shuyo Soshiki Kekkan'nai Hisaibo o Pulse Shita Kijo Saibo ni yoru Gan Men'eki Ryoho no Kaihatsu', The Japanese Cancer Association Sokai Kiji, 25 August, 2003 (25.08.03), Vol.62, page 201, 2266-OP	1-4
P, X	Hideshi SANO et al., 'Shuyo Kekkan'nai Hisaibo o Kogen to shite Pulse Shita Kijo Saibo ni yoru Gan Men'eki Ryoho no Kaihatsu', Journal of Pharmaceutical Science and Technology, Japan, 25 March, 2003 (25.03.03), Vol.63, No.suppl., page 96, 4-4-05	1-4
P, X	RAMAJE. J. et al., 'DNA-Fc fusion vaccine targeting the end othelial antigen Tie-2.', British Journal of Cancer, 2-5 July, 2003, Vol.88, No.suppl.1, p.S38	1-4
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* 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 document 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 another 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		"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 "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 10 February, 2004 (10.02.04)		Date of mailing of the international search report 02 March, 2004 (02.03.04)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/14252

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Naoki UTOGUCHI, 'Shuyo Kekkan no Tokusei o Hyoteki ni Shita Gan Ryoho', Pharmacia, 2001, Vol.37, No.11, pages 1050 to 1051; full text; particularly, page 1050, left column, 3rd line from the bottom to right column, line 3	1-4
Y	Naoki UTOGUCHI et al., 'Shuyo Soshiki Kekkan'nai Hisaibo no Busshitsu Toka ni Kansuru Kenkyu', Xenobiotic Metabolism and disposition, 1994, Vol.9, No.suppl., p.S70-S73; full text; particularly, page S73, lines 1 to 10; abstract	1-4
Y	TREON, et al., 'Immunotherapeutic strategies for the treatment of plasma cell malignancies.', Seminars in Oncology, 2000, Vol.27, No.5, pages 598 to 613; full text; particularly, page 604, left column, lines 4 to 36	1-4
Y	CHIRIVA-INTERNATI, M. et al., 'Sperm protein 17 (Sp17) is a suitable target for immunotherapy of multiple myeloma.', Blood, 01 August, 2002 (01.08.02), Vol.100, No.3, pages 961 to 965; full text; abstract	1-4
Y	THURNER, B. et al., 'Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma.', J.Exp.Med., 1999, Vol.190, No.11, pages 1669 to 1678; full text; abstract	1-4
Y	YOUNG, JW. et al., 'Dendritic cells as adjuvants for class I major histocompatibility complex-restricted antitumor immunity.', J.Exp.Med., 1996, Vol.183, No.1, pages 7 to 11; full text; particularly, page 8, left column, line 34 to right column, line 35	1-4
Y	MOLDENHAUER, A. et al., 'Generation of dendritic cells from CD34+ cells in cytokine suspension and in coculture with TNF- α stimulated endothelial cells.', Blood, 1998, Vol.92, No.10, suppl.1, part 1-2, p.171B; abstract #3718	1-4
Y	RAFFI, S. et al., 'Coculture of CD23+ progenitor cells with TNF α stimulated endothelial cells results in long-term proliferation of functional dendritic cells.', Blood, 1997, Vol.90, No.suppl.1, page 1, p.482A-483A, 2145	1-4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/14252

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	TANIGUCHI, K. et al., 'Recognition of human activated CD44 by tumor vasculature-targeted antibody.', Biochem.Biophys.Res.Comm., 2000, Vol.269, No.3, pages 671 to 675	1-4
A	WAKAI, Y. et al., 'Effective cancer targeting using an anti-tumor tissue vascular endothelium-specific monoclonal antibody (TES-23).', Japanese Journal of Cancer Research, 2000, Vol.91, No.12, pages 1319 to 1325	1-4
A	TSUNODA, S. et al., 'Specific binding of TES-23 antibody to tumor vascular endothelium in mice, rats and human cancer tissue: a novel drug carrier for cancer targeting therapy.', British Journal of Cancer, 1999, Vol.81, No.7, pages 1155 to 1161	1-4
A	UTOGUCHI, N. et al., 'Effect of tumor cell-conditioned medium on endothelial macromolecular permeability and its correlation with collagen.', British Journal of Cancer, 1996, Vol.73, No.1, pages 24 to 28	1-4
A	UTOGUCHI, N. et al., 'Isolation and properties of tumor-derived endothelial cells from rat KMT-17 fibrosarcoma.', Japanese Journal of Cancer Research, 1995, Vol.86, No.2, pages 193 to 201	1-4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/14252

Box I 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.: 5, 6

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 5, 6 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of 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 II 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.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))	
Int. Cl ⁷ A 61 K 35 / 1 2, A 61 P 35 / 0 0 // A 61 K 39 / 0 0	
B. 調査を行った分野	
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))	
Int. Cl ⁷ A 61 K 35 / 1 2, A 61 P 35 / 0 0, A 61 K 39 / 0 0	
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの	
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)	
CAPlus (STN), BIOSIS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), WPI, JOIS	
C. 関連すると認められる文献	
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示
P, X	宇都口直樹他 ‘腫瘍組織血管内皮細胞をパルスした樹状細胞による癌免疫療法の開発’ 日本癌学会総会記事, 25 Aug. 2003, vol. 62, p. 201 2266-OP
P, X	佐野英志他 ‘腫瘍血管内皮細胞を抗原としてパルスした樹状細胞による癌免疫療法の開発’ 薬剤学, 25 Mar. 2003, vol. 63, no. s suppl., p. 96 4-4-05
	関連する 請求の範囲の番号
	1-4
	1-4
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。	
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	
の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
10.02.04	02.3.2004
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 大久保元浩 電話番号 03-3581-1101 内線 3452
	4C 8828

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	RAMAJE. J., et al. 'DNA-Fc fusion vaccine targeting the endothelial antigen Tie-2.' British Journal of Cancer, 2-5 Jul. 2003, vol. 88, no. suppl. 1, p. S38	1-4
Y	宇都口直樹 '腫瘍血管の特性を標的にしたがん療法' ファルマシア, 2001, vol. 37, no. 11, p. 1050-1051 文献全体、特にp. 1051左欄下から第3行-右欄第3行	1-4
Y	宇都口直樹他 '腫瘍組織血管内皮細胞の物質透過に関する研究' 薬物動態, 1994, vol. 9, no. suppl., p. S70-S73 文献全体、特にp. S73第1-10行、【ABSTRACT】	1-4
Y	TREON, et al. 'Immunotherapeutic strategies for the treatment of plasma cell malignancies.' Seminars in Oncology, 2000, vol. 27, no. 5, p. 598-613 文献全体、特にp. 604左欄第4-36行	1-4
Y	CHIRIVA-INTERNATI, M. et al. 'Sperm protein 17 (Sp17) is a suitable target for immunotherapy of multiple myeloma.' Blood, 2002 Aug. 1, vol. 100, no. 3, p. 961-965 文献全体、abstract	1-4
Y	THURNER, B. et al. 'Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma.' J. Exp. Med., 1999, vol. 190, no. 11, p. 1669-1678 文献全体、abstract	1-4
Y	YOUNG, JW et al. 'Dendritic cells as adjuvants for class I major histocompatibility complex-restricted antitumor immunity.' J. Exp. Med., 1996, vol. 183, no. 1, p. 7-11 文献全体、特にp. 8左欄第34行-右欄第35行	1-4

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	MOLDENHAUER, A. et al. 'Generation of dendritic cells from CD34+ cells in cytokine suspension and in coculture with TNF- α stimulated endothelial cells.' Blood, 1998, vol.92, no.10 suppl.1 part 1-2, p.171B abstract #3718	1-4
Y	RAFFI, S. et al. 'Coculture of CD23+ progenitor cells with TNF α stimulated endothelial cells results in long-term proliferation of functional dendritic cells.' Blood, 1997, vol.90, no. suppl.1 part 1, p.482A-483A 2145	1-4
A	TANIGUCHI, K. et al. 'Recognition of human activated CD44 by tumor vasculature-targeted antibody.' Biochem. Biophys. Res. Commun., 2000, vol.269, no.3, p.671-675	1-4
A	WAKAI, Y. et al. 'Effective cancer targeting using an anti-tumor tissue vascular endothelium-specific monoclonal antibody (TES-23).' Japanese Journal of Cancer Research, 2000, vol.91, no.12, p.1319-1325	1-4
A	TSUNODA, S. et al. 'Specific binding of TES-23 antibody to tumour vascular endothelium in mice, rats and human cancer tissue : a novel drug carrier for cancer targeting therapy.' British Journal of Cancer, 1999, vol.81, no.7, p.1155-1161	1-4
A	UTOGUCHI, N., et al. 'Effect of tumor cell-conditioned medium on endothelial macromolecular permeability and its correlation with collagen.' British Journal of Cancer, 1996, vol.73, no.1, p.24-28	1-4
A	UTOGUCHI, N. et al. 'Isolation and properties of tumor-derived endothelial cells from rat KMT-17 fibrosarcoma.' Japanese Journal of Cancer Research, 1995, vol.86, no.2, p.193-201	1-4

第 I 欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第 1 ページの 2 の続き)

法第 8 条第 3 項 (PCT 17 条 (2) (a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 5, 6 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

請求の範囲 5, 6 は、治療による人体の処置方法に係るものであって、PCT 第 17 条 (2) (a) (i) 及び PCT 規則 39.1 (iv) の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。
2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4(a) の第 2 文及び第 3 文の規定に従って記載されていない。

第 II 欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第 1 ページの 3 の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところこの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。