

(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2009-506780

(P2009-506780A)

(43) 公表日 平成21年2月19日(2009.2.19)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 D	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 30 頁)

(21) 出願番号	特願2008-529467 (P2008-529467)	(71) 出願人	505106324
(86) (22) 出願日	平成18年9月8日 (2006.9.8)		モロゲン・アーゲー
(85) 翻訳文提出日	平成20年5月12日 (2008.5.12)		ドイツ連邦共和国、ベルリン 1 4 1 9 5
(86) 国際出願番号	PCT/DE2006/001604		、ファベックストラッセ 3 0
(87) 国際公開番号	W02007/028380	(74) 代理人	100071010
(87) 国際公開日	平成19年3月15日 (2007.3.15)		弁理士 山崎 行造
(31) 優先権主張番号	PCT/DE2005/001594	(74) 代理人	100121762
(32) 優先日	平成17年9月8日 (2005.9.8)		弁理士 杉山 直人
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)	(74) 代理人	100126767
(31) 優先権主張番号	05090297.2		弁理士 白銀 博
(32) 優先日	平成17年10月26日 (2005.10.26)	(74) 代理人	100118647
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 赤松 利昭
		(74) 代理人	100138519
			弁理士 奥谷 雅子

最終頁に続く

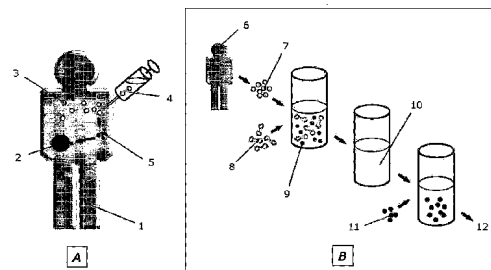
(54) 【発明の名称】 インビトロ免疫測定における機能物 ( functional )

(57) 【要約】

本発明はインビボプロセスにおける物質の効果をインビトロで検討する方法、免疫調節化合物の効果を検出する方法、及びインビボプロセスにおいて免疫システムの介在によりアポトーシス誘発及び/又は壊死誘発化合物を同定する方法に関する。

本発明の方法は、特に免疫システムの介在した細胞上の物質の効果を検討するのに適している。さらに本発明の方法は、免疫調節化合物及びアポトーシス誘発及び/又は壊死誘発化合物の投与前、投与中、及び/又は投与後のインビボ効果をインビトロでモニターするのに適している。

【選択図】 図 1



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

インビボプロセスにおける物質の効果をインビトロで検討する方法であって、以下の一連のステップを含む方法、すなわち、

- a) 細胞の分離
- b) 検討対象の物質による細胞の第一次培養
- c) 浮遊物又は第一次培養から得られる細胞及び浮遊物の混合物の収集
- d) 標的細胞の浮遊物による、又は細胞及び浮遊物の混合物による第二次培養
- e) 標的細胞の分析。

## 【請求項 2】

第一次培養のために分離された細胞が免疫システムのエフェクター細胞である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

第二次培養の標的細胞がヒトの細胞又は高等哺乳動物の細胞である、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

## 【請求項 4】

ステップ 1.d) 及び 1.e) が患者の血液、血清又は血漿を用いて実施される、請求項 1 乃至 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 5】

検討される物質が免疫調節及びアポトーシス誘発又は壊死誘発化合物である、請求項 1 乃至 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 6】

免疫調節化合物の同定及び/又は免疫調節化合物の効果の検出及びインビボプロセスにおいて免疫システムが介在した、アポトーシス誘発及び/又は壊死誘発化合物の同定に適したインビトロ検出方法であって、前記方法は以下の一連のステップを含む：

- a) 免疫システムのエフェクター細胞を、その免疫調節効果が検討される物質又はアポトーシス誘発及び/又は壊死誘発物質による第一次培養、続いて
- b) 浮遊物又は第一次培養から得られる細胞及び浮遊物の混合物の収集、続いて
- c) 標的細胞の浮遊物による、又は第一次培養から得られる細胞及び浮遊物の混合物による第二次培養、及び最終的に
- d) 免疫調節及び/又はアポトーシス誘発及び/又は壊死誘発効果の、適当な検出方法による分析。

## 【請求項 7】

第一次培養のための細胞がステップ 1.a) において事前に分離される、請求項 6 に記載の方法。

## 【請求項 8】

第一次培養のための免疫システムのエフェクター細胞は、好ましくは、例えば、B-、T- 及びNK 細胞、単球、樹脂状細胞の様なFACS又はMACS により分類される血液の抹消血単核球細胞、脾臓細胞又は細胞混合物の亜母集団であるのが良い、請求項 6 又は 7 に記載の方法。

## 【請求項 9】

第一次培養のための細胞及び第二次培養の標的細胞がヒトの細胞又は高等哺乳動物の細胞である、請求項 6 乃至 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 10】

ステップ 6.c) 及び 6.d) が患者の血液、血清又は血漿を用いて実施される、請求項 6 乃至 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 11】

第二次培養の標的細胞が腫瘍細胞又は遺伝子的に腫瘍由来の細胞株である、請求項 1 乃至 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 12】

10

20

30

40

50

その効果が検討される免疫調節化合物が、CpG含有オリゴデオキシヌクレオチド又は単鎖領域に少なくとも一つのCpGモチーフを持つ部分的に二重鎖を持つDNA構築体である、請求項1乃至11のいずれか1項に記載の方法。

【請求項13】

その効果が検討されるアポトーシス誘発及び/又は壊死誘発化合物が、好ましくはアンチセンスオリゴデオキシヌクレオチド、si-RNA、抗体又は化学治療剤である、請求項1乃至12のいずれか1項に記載の方法。

【請求項14】

全血、血球、血球垂母集団、血清又は血漿が、治療前、治療中及び/又は治療後に第一次培養で検討される物質として用いられる、請求項1乃至13のいずれか1項に記載の方法

10

【請求項15】

培養が培養器で行われる、請求項1乃至14のいずれか1項に記載の方法。

【請求項16】

浮遊物が遠心分離により収集される、請求項1乃至15のいずれか1項に記載の方法。

【請求項17】

特異タンパク質の発現がその標的細胞の分析により検討される、請求項1乃至16のいずれか1項に記載の方法。

【請求項18】

規定の遺伝子の発現が標的細胞の分析により検討される、請求項1乃至17のいずれか1項に記載の方法。

20

【請求項19】

前記標的細胞が分析のために染色される、特にアネキシンV又はヨウ化プロピジウム染料により染色される、請求項1乃至18のいずれか1項に記載の方法。

【請求項20】

アポトーシス及び/又は壊死検出方法が、標的細胞の分析により実施される、請求項1乃至19のいずれか1項に記載の方法。

【請求項21】

細胞サイクル分析が実施される、請求項1乃至20のいずれか1項に記載の方法。

【請求項22】

抗体又は他の競合物質が、検討される物質と共に第一次培養に加えられる、請求項1乃至21のいずれか1項に記載の方法。

30

【請求項23】

インビボプロセスにおいて免疫調節化合物を同定し、及び/又は免疫調整化合物の効果を検出し、及び免疫システムの介在によるアポトーシス誘発及び/又は壊死誘発化合物を同定するのに適したインビトロ検出方法を実施するためのキットであり、

- ・ 保存用に調製された一定分量の免疫システムのエフェクター細胞、
- ・ 第一次及び第二次培養を実施する手段、
- ・ 検討される化合物により第一次培養中に細胞の培養反応物として放出されるメッセンジャー物質の検出のための、そのウエルの表面が抗体により覆われている24から96ウエルを持つ複数ウエルプレート、及び/又は

40

・ 検討される化合物より誘発される免疫反応による表面分子の発現の変化を検討するために、RT-PCRを実施するための手段であり、キットは表面分子のmRNAを増殖させるために好適なプライマ、増殖のための酵素及び必要な緩衝液、及び/又はFACS分析の手段を含み、そのため、キットは好適な蛍光マークされた抗体であって、表面抗原に向けられる抗体及びさらに、緩衝液及び化学品の様な標的細胞を生成する手段を含む、前記キット。

【請求項24】

そのような化合物の投与前、投与中及び/又は投与後に、免疫調節化合物の効果のインビトロでの提示、及びインビボプロセスにおいて、免疫システムが介在したアポトーシス

50

誘発及び/又は壊死誘発化合物を同定するためのキットであって、少なくとも以下の成分、すなわち、

- ・ 保存用、及び/又は患者の血液、血清又は血漿による培養のために調製された一定量の標的細胞、
- ・ 第二次培養を実施する手段、
- ・ 検討される化合物による第一次培養中の細胞の培養反応物として放出されるメッセンジャー物質の検出のための、そのウエルの表面が抗体により覆われている24から96ウエルを持つ複数ウエルプレート、及び/又は
- ・ 検討される化合物により誘発される免疫反応による表面分子の発現の変化の検討するための、RT-PCRを実施するための手段であり、キットは表面分子のmRNAを増殖させるために好適なプライマ、増殖のための酵素及び必要な緩衝液及び/又はFACS分析の手段を含み、そのため、キットは好適な蛍光マークされた抗体であって、表面抗原に向けられる抗体及びさらに、緩衝液及び化学品の様な標的細胞を生成する手段を含む、を含む、前記キット。

10

【請求項25】

含まれる標的細胞が、腫瘍細胞又は遺伝子的に腫瘍由来の細胞株である請求項24のキット

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

本発明はインビボプロセスにおける物質の効果をインビトロでモニターする方法、及びインビボプロセスにおいて免疫システムの介在によりアポトーシス及び/又は壊死を引起す化合物を同定することのみならず、免疫調節化合物を同定し及び/又は免疫調節化合物の効果をインビトロで検出する方法に関する。

20

【0002】

製薬工業界では、近年極めて多岐にわたる疾病の治療を目的とした全く新しい種類の物質が開発されている。これらはまた遺伝子治療による薬剤、又は例えば、タンパク質又はDNA構築体の様な遺伝子治療により修飾された、体内で自然に生じる物質を含む。

【0003】

疾病の薬剤による治療において、これらのまったく新しい種類の物質の幾つかを用いた治療の例はなく、動物実験や患者に対する臨床的研究に直接頼ることなく、これらの薬剤による効果を試験する方法に対する要望がある。新しい、知られていない物質を用いるそのような実験は、純粋に倫理的な理由により忌避されている。それに代わって、そのためのステップを準備し、これらの物質のインビボ効果に関する見解を示すことのできる結果を得るため、インビトロの検討が示唆されている。この場合インビトロでの実験が、インビボの状態に可能な限り近づくことが極めて重要である。

30

【0004】

更に、治療法（例えば、免疫治療又は免疫システムに影響を与える治療）による治療前、治療中及び/又は治療後の患者をモニターする簡単な方法を開発することが重要となり、そこにおいて有機体又は免疫システムの反応が、対応する治療法との関係で検討される。

40

【0005】

1950年台から、転移を伴った進行した癌の治療唯一の選択肢であった放射線治療及び化学療法の様な従来の癌治療法と並んで、今や患者に対する副作用が少なく、しかし治療目的の達成においては非常に効果がある治療法を開発することが目標となっている。

【0006】

この一つのアプローチが免疫治療であり、この治療法は遺伝子組み換えにより癌に対する自然免疫反応を高めることを目標とする。すなわち、免疫システムの癌細胞に対する「注目度」に好影響を与え、そして免疫反応に影響を与え、身体自身が腫瘍と闘うようにさせるものである。

【0007】

50

現在、殆どどの臨床研究は腫瘍の除去をベースとしており、それに続いて腫瘍細胞を治療遺伝子によりイクスピボでトランスフェクションし、腫瘍細胞集団を放射線照射し、それに続いて新たに組み換えされた腫瘍細胞を再移植する。この腫瘍細胞のワクチン接種により抗癌反応が増大するが、その程度は移入される治療遺伝子により種々異なる。

【0008】

しかし腫瘍細胞のトランスフェクションに加え、免疫調節物質もまた開発されつつあり、これは免疫システムが腫瘍細胞と闘うことを誘発することを意図している。これらの免疫調節物質は、腫瘍細胞が特異的に攻撃され、最終的には破壊される様に免疫システムを誘発し、又は「プログラム」することが意図される。このようなアプローチにおいては、癌治療における免疫調節物質は、免疫システムを通して関係する腫瘍又は下地となっている種類の腫瘍細胞に間接的に働きかける。

10

【0009】

新しい物質の、インビボプロセスに対する効果、例えば、腫瘍細胞の破壊をインビボで検討することのできる方法は、一方で主要な倫理的観点からの理由による遠慮を考慮する必要のあるインビボ実験を避け、他方で数多くの物質を、短時間に多くの異なる腫瘍細胞で試験することを可能とする。更に、その様な方法に依れば、誘発されるインビボ効果について、いわゆる「治療モニター」によって治療の進行を示すことが可能になると思われる。

【発明の開示】

【0010】

この技術の先進性を考慮すれば、本発明の目標は、ヒト又は高等哺乳動物におけるインビボプロセスでの物質の有効性を、インビトロで検討することを可能にする方法を提供することである。

20

【0011】

この目標は各独立請求項に記載の特徴により実現される。

【0012】

本発明においては：

免疫システムのエフェクター細胞は、免疫細胞の混合物であり、例えば、PBMC（抹消血単核球細胞（ヒト又は高等哺乳動物）、脾臓細胞（動物モデル）等）又はFACS又はMACSにより分類される亜母集団、例えば、B-、T- 及びNK 細胞、単球、樹脂状細胞等を言う。

30

【0013】

CpG-モチーフは、メチル化されていないシトシン グアニン モチーフを言う。

【0014】

dSLIMは、二重ステムループ免疫調節オリゴデオキシリボヌクレオチド（double Stem-Loop Immunomodulating Oligodeoxyribonucleotide）を言い、各ループはCpG-モチーフを示し、好ましくは3つであるのが良い。

【0015】

ODNはオリゴデオキシリボヌクレオチドを言う。

【0016】

PBMCは、抹消血単核球(peripheral mononuclear blood cell) を言う。

40

【0017】

数多くの一般的な概念は以下に記載の様に解される：

本発明の免疫調節化合物は、免疫システム又は単にその個々の細胞、特にエフェクター細胞の反応に影響を与えることのできる物質と理解されるべきである。化合物とともに、これらはまたDNA構築体、タンパク質、抗体、糖分子又は免疫システム又は免疫システムの細胞を反応する様にする特性を示すその他の物質を含む。これは、特に本発明においてエフェクター細胞と呼ばれる免疫システムの細胞に関係し、同細胞は免疫システムの反応に影響を与え又は反応を介在することができる。この介在は特定のメッセンジャー物質の放出により起こる。

50

## 【0018】

したがって、本発明は以下に示すステップを含む方法に関する：

- a) 細胞の分離
- b) 検討対象の物質による細胞の第一次培養
- c) 浮遊物又は第一次培養からえられる細胞及び浮遊物の混合物の収集
- d) 標的細胞の浮遊物による、又は細胞及び浮遊物の混合物による第二次培養
- e) 標的細胞の分析

代替的实施の態様では、免疫調節化合物の同定及び/又は免疫調節化合物の効果の検出、及びインビボプロセスにおいて免疫システムが介在した、アポトーシス誘発及び/又は壊死誘発化合物の同定を意図したインビトロ検出方法に関し、前記方法は以下の一連のステップを含む：

- a) 免疫システムのエフェクター細胞を、その免疫調節効果が検討されるアポトーシス誘発及び/又は壊死誘発物質による第一次培養、続いて
- b) 浮遊物又は第一次培養から得られる細胞及び浮遊物の混合物の収集、続いて
- c) 標的細胞の浮遊物による、又は第一次培養から得られる細胞及び浮遊物の混合物による第二次培養、及び最終的に
- d) 免疫調節及び/又はアポトーシス誘発及び/又は壊死誘発効果を適当な検出方法により分析する。

## 【0019】

この方法のステップは、インビボプロセスでの物質の効果を、インビトロで検討することを可能とすることを示す。その結果、新しいタイプの化合物は臨床試験において動物又は患者を危険に曝すことなく、インビボの状態に非常に近い状態で試験することができる。さらに、既に計画され/実施された治療の影響をモニター（関係するパラメータを分析することにより）することができる。本発明のこの方法は、また、本発明の持つ意味より「治療モニター」（therapy monitoring）とも呼ばれる。この用語はインビボ治療効果をインビトロモニターする場合についてのみ用いられる。本発明のこの方法自体は、治療が旨く行くかどうかについてモニターすることができることを除いては、治療そのものとは関係しない。

## 【0020】

本発明の好ましい実施の態様においては、分離された細胞は上記の定義に従えば免疫システムのエフェクター細胞である。本発明の方法は、免疫システムが介在した細胞上の物質の効果を検討する場合特に好適である。

## 【0021】

第一次培養において免疫システムの細胞と物質が、後者に効果を及ぼすことが可能となった後に、第二次培養では物質のインビボ効果が、中でも免疫システムの分泌生成物を含む、第一次培養から得られた浮遊物又は細胞及び浮遊物の混合物を標的細胞と共に培養することにより明らかとなる。

## 【0022】

好ましい標的細胞にはヒトの細胞又は高等動物の細胞である。本発明の特に好ましい実施の態様における方法では、分離された細胞、特に免疫システムの細胞が第一次培養で用いられ、第二次培養では標的細胞として、腫瘍細胞又は遺伝子的に腫瘍細胞由来の細胞株が使用される。本発明の、この方法の実施の態様においては、後者は「インビトロ免疫アッセイの機能物」（Functional in vitro immunoassay）と呼ぶことができる。

## 【0023】

原則的に、元の出所が異なる腫瘍細胞の何れのタイプのものも、腫瘍細胞と考えることができる。「インビトロ免疫アッセイの機能物」の目的は、免疫システムにより腫瘍細胞中のアポトーシス又は壊死を引起すのに適した物質を同定し又は調査、検討することである。

## 【0024】

しかし、本発明の方法の他の目的は、MHC-I（例えば、HLA-ABC）及び接着分子（例えば、I

10

20

30

40

50

CAM-1)の腫瘍細胞表面での発現の増強を契機として、免疫システムにより腫瘍細胞を認識することを調査、検討することである。本発明の方法の決定的に有利な点は、インビボ効果が、その実施に不都合を伴う臨床研究において動物及び/又は患者において実験をすることなく検出されることである。

【0025】

本発明の方法を実施するために、免疫調節物質により誘発される免疫反応による表面分子の発現の変化を検討するためのキットが提供される。キットは保存用に調製された一定分量の細胞を含み、好ましくは検討される物質による第一次培養のための免疫システムのエフェクター細胞、第一次及び第二次培養を実施する手段、及び第二次培養から得られる細胞の表面分子の、発現パターンの分析のための手段を含む。第二次培養の標的細胞の、表面抗原の発現パターンの分析用に、本発明のキットはRT-PCRを実施するための手段を含み、キットは表面分子からmRNAを増殖させるために好適なプライマ、増殖のための酵素及び必要な緩衝液及び/又はFACS分析の手段を含み、そのため、キットは好適な蛍光マークされた抗体であって、表面抗原に向けられる抗体及びアポトーシス/壊死マーカー、及びさらに、緩衝液及び化学品の様な標的細胞を生成する手段を含む。

10

【0026】

さらに本発明の方法は治療のモニターにも適しており、その場合、患者の全血、血球、血清又は血漿が、治療の前、治療中及び/又は治療後(例えば、免疫システムを変え又は免疫システムに影響を与える免疫療法又は治療)に第一次培養で検討される物質として用いられる。

20

【0027】

この更なら本発明の手段によって、患者に投与された治療薬であって、好ましくは免疫システムに刺激作用を与える治療薬が既にインビボ効果を生み出しているか否かを調べることができる。この方法では患者の血液が、そこに含まれる細胞及び/又はメッセンジャー物質又はその部分(例えば、血清及び/又は血漿又は細胞亜母集団)によって調査、検討されるが、この実施の態様においては、本発明の方法は、結局治療において、好ましくは免疫治療において患者に投与された物質のインビボ効果を間接的に検出するのに役立つ。

【0028】

本発明の方法での「治療モニター」で使用することのできる抗体が特に知られていない場合は、治療薬の投与後の血液中(血漿/血清)のサイトカインの変化、又は免疫システムの反応に続いて生成される特異の抗体の変化によってインビボ効果をモニターすることが可能である。

30

【0029】

本発明の方法による治療において、それぞれのケースで使用される治療薬の効果の治療モニター法として提供される治療法は、癌、感染、アレルギー及び自己免疫疾患の様な疾病に適している。

【0030】

上に述べた有利な点を持つため、また免疫調節効果を持ち又はアポトーシス又は壊死を誘発することの可能な化合物は、本発明の方法において用いることが望ましい。

【0031】

本発明によれば、CpGモチーフ含有オリゴデオキシヌクレオチド及びdSLIM(二重ステムループ免疫調節オリゴデオキシリボヌクレオチド(double Stem-Loop immunomodulating Oligodeoxyribonucleotides), EP 1 196 178 B1を参照)は免疫調節化合物として望ましい。しかし、本発明の範囲において、他の生分子、例えば、天然又は遺伝子組み換えされた抗体、DNAベース及び/又はRNAベース物質(アンチセンスオリゴデオキシヌクレオチド、si-RNA等)、アミノ酸化合物、メッセンジャー物質又は他の免疫調節剤(例えば、アルミニウム塩、イミダゾキノリン、リポ多糖類、サポニン誘導体、リン脂質、スクアレン等)もまた使用しても良い。

40

【0032】

本発明によれば、特にこれらの化合物は細胞の維持に必要なプロセスを恒久的に中断する

50

のに適したアポトーシス誘発及び/又は壊死誘発化合物と考えることができる。ここで特にDNAベース及び/又はRNAベース物質（アンチセンス オリゴデオキシヌクレオチド、si-RNA等）、抗体又は化学治療剤が考えられる。

【0033】

さらに本発明の方法は、第一次培養において免疫調節又はアポトーシス誘発及び/又は壊死誘発物質により、分離された細胞を培養するのに続き、細胞により放出されるメッセンジャ - 物質を同定するのに使用することができる。このため、第二次培養の標的細胞に加えられる前に、第一次培養からの浮遊物はメッセンジャ - 物質の可能性のある物質を特に認識する抗体により事前培養される。抗体とメッセンジャ - 物質のエピトープの間との相互反応により、メッセンジャ - 物質は標的細胞にシグナルを送ることができず、この様にしてその機能がブロックされる。本発明の方法のこの実施の態様は、何れの特定のメッセンジャ - 物質が誘発される効果、例えば、アポトーシスを生じさせるかを検出するために重要である。

10

【0034】

24から96ウエルの複数ウエルプレートは、誘発により放出されたメッセンジャ - 物質を同定するために、本発明の方法のキットを使用するのが好ましく、そこではプレートの各ウエルの表面はメッセンジャ - 物質（例えば、IFN- $\gamma$ ）のエピトープを指向する抗体で覆われており、第一次培養から得られた浮遊物の部分をこの様に事前処理されたプレートによって培養し、そしてその部分を標的細胞で培養した後にメッセンジャ - 物質の可能性を持つ多数の物質を短時間に試験し、それらが事実、免疫反応に介在しており、又はアポトーシスを誘発するかを見出すことができる可能性がある。

20

【0035】

したがって、本発明はまた調査、研究対象の物質により、第一次培養において細胞の培養の反応結果として放出されるメッセンジャ - 物質を同定するための本発明の方法を適用するキットの使用に関する。このタイプのキットは保存用に調製された一定量の細胞を含み、好ましくは免疫システムのエフェクター細胞であるのが良く、第一次培養のための検討される物質を含み、第一次及び第二次培養を実施する手段、及びさらに24から96ウエルを持つ複数ウエルプレートを持ち、このウエルの表面は抗体により覆われ、種々異なるウエルの表面は異なる抗体で覆われ、しかし好ましくは少なくとも各2つのウエルは同一の抗体で覆われているのが好ましい。

30

【0036】

本発明の方法の必要な培養ステップは、5%のCO<sub>2</sub>を含む培養器中で実施されるのが好ましい。しかし、各ケースで培養される細胞の必要条件に応じた他の培養条件もまた考慮される。

【0037】

浮遊物又は第一次培養からの浮遊物及び細胞の混合物の収集は、本発明に従い遠心分離により行われる。しかし、本発明では、例えば、浮遊物は通過させるが、細胞又は他の存在する細胞破片は通さない孔サイズを持つ細胞ろ過装置により、細胞を浮遊物から分離するのに適した他の任意の方法であっても良い。さらに特異抗体を用いる細胞の分離システム及び/又は細胞選定システム、それに続いて磁力(MACS)又は蛍光(FACS)ベースを用いる選定方法も考慮される。

40

【0038】

本発明の方法による細胞の分析では、標的細胞中のタンパク質の発現の変化を示すことを可能とすることを意図している。ここで特にFACS測定（蛍光活性化細胞選別(Fluorescent Activated Cell Sorting)）、ウエスタンブロット法、ゲルろ過又はサイトスピン(cytospins)が考慮の対象になる。

【0039】

更に、ある遺伝子の発現の変化の分析方法、例えば、RT-PCR、リアルタイム PCR、RNAseタンパク質アッセイ及びノーザン及びサザンブロット法が考慮される。

【0040】

50

インビボ効果の分析では、最後にアポトーシスアッセイ、例えば、細胞をアネキシン V 又はチューネル (TUNEL) アッセイ又は細胞周期分析、例えば、ヨウ化プロピジウム染色法により染色することも考慮される。

【0041】

以下に記載する実施例及び実験結果は、本発明の方法はインビトロの検討によりインビトロ プロセスにおける物質の効果を示すことができるばかりでなく、また、むしろ本発明の方法を競合アッセイに拡張することにより見出された効果の特異性を試験し及び記録するのにも適していることを示している。

【0042】

本発明のさらに有利な実施の態様は、従属請求項及び明細書に基づく。本発明の方法の実行可能性を含み、本発明の態様の実施例及び図面を用いて以下に更に詳説するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

10

【0043】

短核細胞の収集

本発明の方法の実施するため、抹消血短核細胞(PBMC)が全血あるいは「淡黄色被覆」(buffy coat)と呼ばれるものから抽出された。これは全血からの赤血球の濃縮物の生成中に生じる副産物である。

【0044】

PBMCは、赤血球、顆粒球及び死細胞を分離するためにFicoll勾配を用いて遠心分離された。Ficollは非電荷のスクロース ポリマーであり、その密度は、そのポリマーが全血又は淡黄色被覆で被覆され、そして遠心分離された場合、密度の低い部分はFicoll層を通り底に集まるが、リンパ球及び単球は血漿(上部)及びFicoll(下部)の間の中間相に集まる様に設定される。中間相は遠心分離後の細胞を含んでいるが、分離されそしてPBSで数度洗浄された。これに続いて、分離された細胞は細胞培養媒体中に取り上げられミリリットル当り  $1 - 4 \times 10^6$  の細胞濃度に調節された。

20

【0045】

二重ステムループ免疫調節オリゴデオキシリボヌクレオチド (double Stem-Loop Immunomodulating Oligodeoxyribonucleotide)

二重ステムループ免疫調節オリゴデオキシリボヌクレオチドはCpG配列を持つ分子である。これはヌクレオチドグループにより線状オリゴデオキシヌクレオチド(ODN)を共有結合によって閉じることにより得られるため、エクソヌクラーゼによる分解から保護される。したがって、dSLIM、「二重ステムループ免疫調節剤」(double stem loop immunomodulator)と呼ばれるダンベル型分子が得られる。免疫調節活性は、ツール様受容体、中でもdSLIM分子の特別な構造に結合する非メチル化CpG配列による免疫システムの非特異的活性化に基づく。dSLIMの各グループは、3つの非メチル化CpGモチーフを含む。

30

【0046】

ISS30タイプの二重鎖ステムループ免疫調節剤(dSLIM)(例えば、dSLIM30L1)はSOPにより合成され、続く配列の品質管理はBクラス実験に拠った。このために一本鎖ヘアピン型5'-リン酸化オリゴデオキシリボヌクレオチド(ODN)はT4-DNAリガーゼで結紮された。残っている開始材料をT7DNAポリメラーゼ及びクロマトグラフィー精製により消化した後、残りのdSLIMがエタノール/ナトリウム マグネシウムアセテート沈殿により濃縮され、PBS中で溶解された。抽出手順はWO 01/07055に記載されている。

40

【0047】

dSLIMによる免疫細胞(PBMC)の第一次培養

分離された細胞(PBMC)は複数ウェルプレートに播種された。バッチサイズ、及び、したがって、ウェルサイズは、後に集菌される培養浮遊物が標的細胞による第二次培養に必要な、正確な容積を持つ様選択された。

【0048】

最初のバッチは非刺激細胞を含んでいた(ネガティブ コントロール)。第二のバッチは  $0.1 - 10 \mu\text{M}$  dSLIM-30L1で刺激された。さらに2回のバッチ細胞が、最大可能なポ

50

ジティブな結果を与え、機器の較正及びFACSの補償をするために0.1 - 10  $\mu\text{M}$ のオリゴデオキシヌクレオチド(ODN)で刺激を与えられた。更なるバッチ細胞は、比較のため他の0.1 - 10  $\mu\text{M}$ のODNで刺激された。各バッチは37 でCO<sub>2</sub>培養器中で48時間培養された。これらのバッチの浮遊物は遠心分離により回収され、その後の作業のため-80 で冷凍された。

#### 【0049】

標的細胞(例えば、HT-29)による二次培養

標的細胞による第二次培養では、最適な濃度及び容積は標的細胞が播種される濃度及び容積を考慮して事前に決定されねばならなかった。その目的は第二次培養の後に、分析のために各ウエルで少なくとも5  $\times$  10<sup>5</sup>の標的細胞が利用できることである。ここで細胞は3日間最適な成長条件が確保され、必要な密度を保ち且つ可能な限り間隔が開いている様に種を蒔き、そして3日後に殆んど密集する状態であることが確実となる様にすべきである。非最適成長条件はまた壊死又はアポトーシスを引起し、その結果実験結果を損なう。本件の場合、HT-29結腸癌細胞が標的細胞として使用された。

#### 【0050】

細胞は、対応するサイズのバッチで事前に決定された最適密度で播種され、37 でCO<sub>2</sub>培養器中で一夜培養された(例えば、24ウエルプレートで各ウエル700  $\mu\text{l}$ 中2.4  $\times$  10<sup>5</sup>細胞)。

#### 【0051】

次の日、粘着性を持つようになった細胞から媒体を除去し、第一次培養からの浮遊物を添加し(間接刺激)、又は指示された物質(dSLIM-30L1, lin30L1)を直接に媒体に添加する(直接刺激)ことで刺激が与えられた。ネガティブコントロールとして間接バッチに媒体のみが添加された。これらの細胞は、刺激されていない細胞(第一次培養からの刺激されていない浮遊物の添加)から区別するために非処理細胞と呼ばれた。

#### 【0052】

バッチ-直接刺激及び間接刺激は再び37 でCO<sub>2</sub>培養器中で48時間培養された。その後、各々の場合について、所望の分析が細胞上で実施された。そのためにまず浮遊物が細胞から除去され、そして細胞はPBSで洗浄された。細胞はトリプシン/EDTAを用いてウエルから除去され、そして更に洗浄ステップを経た後、続く細胞数の決定のために遠心分離管に移された。

#### 【0053】

表面抗原の染色

刺激バッチからの細胞は遠心分離され、特別の染色緩衝液で洗浄された。その後、細胞懸濁液はミリリットル当り1  $\times$  10<sup>6</sup>細胞の濃度に調製された。

#### 【0054】

この細胞懸濁液500  $\mu\text{l}$  (0.5  $\times$  10<sup>6</sup>細胞)はFACSチューブにおいて遠心分離され、50  $\mu\text{l}$ の染色緩衝液に取り出された後、抗体(例えば、FITCと接合したICAM-1 (CD54)及びPEと接合したHLA-ABC)が添加された。機器の較正及び補正のため個々に染色された陽性試料が与えられると同様に、各抗体に対応するイソタイプコントロールが与えられた。培養ステップの後に、細胞は2度PBSで洗浄され、測定のため500 - 1000  $\mu\text{l}$  PBS中で再懸濁された。死んだ細胞を判別するために7-AADが加えられ、更に10分間培養された。続いてFACS測定が行われた。

#### 【0055】

アポトーシス/壊死細胞の染色

アポトーシス細胞はアネキシンV-PEで染色された。これは細胞内のアポトーシスプロセスを示す。これらの細胞を壊死細胞から区別するために7-AADにより対比染色がされた。

#### 【0056】

刺激されたバッチ細胞は遠心分離されて除かれ、PBSで2度洗浄された。その後細胞は特別なアネキシン結合バッファーで希釈され、ミリリットル当り1  $\times$  10<sup>6</sup>の細胞濃度に調整された。この細胞懸濁液100  $\mu\text{l}$  (1  $\times$  10<sup>5</sup>細胞)当り5  $\mu\text{l}$  アネキシンV-PE

10

20

30

40

50

及び7-AADが加えられ、完全に混合した後に室温で15分間培養された。その後400  $\mu$ lの結合バッファが加えられ、直ちにFACS測定が実施された。

【0057】

FACSによるフローサイトメトリー測定

A. アポトーシス/壊死

蛍光2 (アネキシンV-PE) 及び蛍光3 (7-AAD)が測定された。そのための機器は、非刺激細胞 (直接バッチ) 及び/又は非処理細胞 (間接バッチ) を用いて較正された。

【0058】

SSC (側方散乱 = 細胞粒度 ; side scatter = cell granularity) に対するFSC (前方散乱 = 細胞サイズ ; forward scatter = cell size) のドットプロットでは、細胞集団が中心の位置になる様に調整された。続いて蛍光2 及び蛍光3 のPMT較正及び補償がなされた。その後全てのサンプルが測定され(5000 細胞)。

10

【0059】

B. 表面抗原

蛍光1 (ICAM 1 -FITC)、蛍光2 ((HLA-ABC-PE) 及び蛍光3 (7-AAD)が測定された。

【0060】

機器は非特異結合の比較のために対応するアイソタイプコントロール (ダブル染色) 及び蛍光標的を付した抗体 (シングル染色) によりlin-30L1によって刺激された細胞を用いて較正された。

【0061】

FSCのSSCに対するドットプロットでは、細胞集団が中心となる様に調整された。そして、アイソタイプコントロール、及びシングル染色による補償を用いて蛍光1、2 及び3 のPMT較正を行った。この後全てサンプルが測定された (10000細胞)。ここで死んだ細胞 (7-AAP陽性細胞) は除外された (ドットプロット中の蛍光3 対FSC)。

20

【0062】

結果の解釈

A. アポトーシス/壊死

7-AAD対アネキシンVを示すドットプロットが作られた。その後非処理細胞に基づいて四分円が作られた。各四分円中の細胞の位置により、それぞれアポトーシス部分又は壊死部分に属する。

30

【0063】

- ・ 生細胞はアネキシン陰性及び7AAD陰性である (LL四分円)
- ・ アポトーシス細胞はアネキシン陽性及び7AAD陰性である (LR四分円)
- ・ 壊死細胞はアネキシン陽性及び7AAD陽性である (UR四分円)、又は
- ・ アネキシン陰性及び7AAD陽性である (UL四分円)

B. 表面マーカー

2ドットプロット (蛍光1 対FSC, 及び蛍光2 対FSC) は生細胞によって作られた。細胞の蛍光強度 (蛍光1 / ICAM-1又は2 / HLA-ABC) は、各ドットプロット中の細胞の位置に応じて読み取られた。そして関連するコントロールとの対比がなされた。

【0064】

以下についてテストバッチとコントロールとの対比を行った。

40

【0065】

- ・ 表面マーカー陽性細胞の数 (対応する表面マーカーを持つ細胞の数)
- ・ 表面マーカーの蛍光強度 (細胞表面の表面マーカー分子の数)

本発明の方法を用いた実施例の結果を図面に示す。

【0066】

図面の内容は以下の通りである。

【0067】

図1は、本発明の方法による各ステップの順序を示す図表である。左側のA部分は、インビボの典型的な応用例を表わし、右側のB部分は、「インビトロ免疫アッセイの機能」を

50

表わす本発明の実施の態様に関わる方法を示す。

【0068】

図2は、本発明の方法を応用したdSLIM免疫調節剤のインビトロ効果の分析結果を示す。図の右側に示す様に、dSLIMで培養されたPBMCの浮遊物を用いることによりHT-29腫瘍細胞（結腸癌）中にアポトーシス及び壊死が誘発される。ここでアポトーシスは、直接dSLIMで処理された細胞の例から、浮遊物で処理された細胞の例への増加に見られるように、17%から46.7%に増大している。

【0069】

図3は、HT-29細胞中でのdSLIM免疫調節剤のインビトロ効果を分析したものである。dSLIMで培養されたPBMCの浮遊物を使用することによりHLA-ABC表面マーカーの発現増強が誘発される。細胞集団の移動が図面中の最右翼の図に見ることが出来る。

10

【0070】

本発明の方法を用いたHT-29で得られた実験結果を確認するために、同様な実験がHEK-293で実施された。結果を図4及び5に示す。

【0071】

図4は、dSLIMがアポトーシス（アネキシンV）及び壊死（7-AAD）を誘発することを示す。そこで、アポトーシス細胞の数が、ODNを含まない浮遊物で処理された細胞に比べて、dSLIMで処理された細胞からの浮遊物のために12.1%から21.7%に上昇している。壊死細胞の数は9.2%から16%へ上昇している。

20

【0072】

図5は、PBMCのdSLIM浮遊物によって標的細胞（HT-29）を培養することによりHLA-ABC表面マーカーを誘発の増大することを示す。図の上の部分は、ODNで処理されていないPBMCから得られた浮遊物で処理された細胞集団の、dSLIMで処理されたPBMCから得られた浮遊物で培養された細胞へのシフト（発現の増加）を示す。

【0073】

図6は、本発明の方法を適用したHT-29細胞中でのdSLIMの作用機構、及びアポトーシス及び壊死の検出の分析結果を示す。ここでは、PBMCの第一次培養のステップで、dSLIMの効果を無効にすることのできる抗体（anti-IFN- $\gamma$ 、緑色のフレーム）が加えられる。比較のため特異性を証明するために抗体（anti-IFN- $\gamma$ 、anti-TNF- $\alpha$ ）で実験を行った。容易に分かる様に（緑色フレーム）、anti-IFN- $\gamma$ 抗体はアポトーシス細胞及び壊死細胞の数を両者ともに減少させる。

30

【0074】

図7での、本発明の方法の応用は図6の方法に対応するが、標的細胞（HT-29）上の表面マーカーICAM-1（CD54）の発現が分析される。細胞集団のシフトを比較のために図の下部に示す。

【0075】

図8及び9は、本発明の方法をRenca腫瘍細胞に応用した実験結果を示し、dSLIMと線状ODNの効果が比較のため検討された。しかしCpGを含む線状オリゴデオキシヌクレオチドは又dSLIMと異なる配列を持ち、ホスホロチオリン酸エステルによる分解から保護される。

40

【0076】

図8は、標的細胞のdSLIMによる処理によって表面マーカーHLA-ABC（上の部分）の発現が増強され、一方線状CpG-ODNは効果を持たないことを示す。図の右の表は数値による違いを示す。図9に示すように、dSLIMは線状CpG-ODNよりも明らかにアポトーシス及び壊死を誘発させる可能性がある。アポトーシスの誘発の違いは下の部分にパーセントで示す。

【0077】

図10及び11は、本発明の方法を適用して標的細胞としたHT-29中で、dSLIMと線状CpG-ODNを比較したものである。これらの実験結果はRenca腫瘍細胞により得られ、図8及び9に示す結果に対応する。図の配置は図8及び9に対応する。

【0078】

図12、13及び14は、癌患者の治療において、本発明の方法を、成長腫瘍細胞（図12）

50

及びアポトーシス/壊死細胞（図13）の数及びICAM-1/HLA-ABC表面マーカー（図14）の発現の変化をインビトロモニターに適用したものを示す。

【0079】

治療の最初の週の最初の5日間の各日は、2.5 mg dSLIMが直腸癌患者で、肝臓に転移した患者に投与された。第1週の6日目に放射線照射をし、その後化学療法を施した。インビボ効果をインビトロ分析するため、最初の週の、最初の6日の各日に血液サンプルが患者から採取された。化学療法の間、血液サンプルが各週末にかけて採取された。

【0080】

血漿が血液サンプルから分離され、腫瘍細胞株HT-29の細胞により培養された。その後成長可能な細胞（図12）及びアポトーシス/壊死細胞の数が決定され、表面マーカーICAM-1 / HLA-ABCの発現が調査された。 10

【0081】

図12は、HT-29細胞を8つの血液サンプルから採取した血漿で培養した結果を示す。成長可能なHT-29細胞の数が既にdSLIM投与の2日目に明確に減少していることが、見ることができる。成長可能な細胞の数は2日目に1日目の細胞の数の半分未満になっており、これはコントロール中の成長可能な細胞の数に匹敵する。

【0082】

図13は、癌患者の治療中の1, 2, 5及び20日目のアポトーシス/壊死腫瘍細胞のインビトロモニターを示す。このインビボ効果のモニターにおいて、dSLIM投与後の一日目にアポトーシス/壊死細胞の数が既に明確に増加していることが見られる。 20

【0083】

図14は、血液サンプル1, 2, 3及び8中の血液から採取した血漿を用いて、癌患者を治療する間の表面マーカーICAM-1 / HLA-ABCの発現の変化を調査した結果を示す。ここでサンプル1は2つの表面マーカーの発現の変化を示す参考値として用いられた。

【0084】

治療の2日目に既にICAM-1は更に強く発現しており、これは蛍光強度の位置のシフトにより、図の下の部分に見ることが出来、これにより、ICAM-1はより強く発現していることが分かる。

【0085】

HLA-ABCでは、2日目ではまだ蛍光強度のシフトは起きていない。これは治療の3日目まで起きず、またHLA-ABCは発現強度がより大きいことを示す。 30

【図面の簡単な説明】

【0086】

【図1】本発明の方法の概略図である。

【図2】HT-29腫瘍細胞中のアポトーシス及び壊死の検出によるdSLIM免疫調節剤のインビトロ効果の分析を示す。

【図3】HT-29腫瘍細胞中のHLA-ABC表面マーカーの発現の検出によるdSLIM免疫調節剤のインビトロ効果の分析を示す。

【図4】HEK-293腫瘍細胞中のアポトーシス及び壊死の検出によるdSLIM免疫調節剤のインビトロ効果の分析を示す。 40

【図5】HEK-293腫瘍細胞中のHLA-ABC表面マーカーの発現の検出によるdSLIM免疫調節剤のインビトロ効果の分析を示す。

【図6】本発明の方法を用いたHT-29腫瘍細胞中のアポトーシス及び壊死の検出によるdSLIM免疫調節剤の作用機構の分析を示す。

【図7】本発明の方法を用いたHT-29腫瘍細胞中のHLA-ABC表面マーカーの発現の検出によるdSLIM免疫調節剤の作用機構の分析を示す。

【図8】Renca腫瘍細胞中のHLA-ABC表面マーカーの発現の検出によるdSLIMと線状CpG-ODNの効果の比較を示す。

【図9】Renca腫瘍細胞中のアポトーシス及び壊死の検出によるdSLIMと線状CpG-ODNの効果の比較を示す。 50

【図10】 HT-29腫瘍細胞中の、HLA-ABC表面マーカーの発現の検出によるdSLIMと線状CpG-ODNの効果の比較を示す。

【図11】 HT-29腫瘍細胞中のアポトーシス及び壊死の検出によるdSLIM dSLIMと線状CpG-ODNの効果の比較を示す。

【図12】 癌患者を治療する間の成長腫瘍細胞のインビトロモニターを示す。

【図13】 癌患者を治療する間のアポトーシス/壊死腫瘍細胞のインビトロモニターを示す。

【図14】 癌患者を治療する間の腫瘍細胞の表面マーカーのインビトロモニターを示す。

【符号の説明】

【0087】

10

A: インビボの状況

B: インビトロ免疫アッセイ

- 1: 患者
- 2: 標的組織、例えば、腫瘍
- 3: 免疫細胞
- 4: 試験材料、例えば、dSLIM
- 5: 活性化免疫細胞
- 6: ドナー
- 7: 免疫細胞、例えば、PBMC
- 8: 試験材料、例えば、dSLIM
- 9: 活性化免疫細胞、例えば、PBMC
- 10: 浮遊物
- 11: 標的細胞、例えば、腫瘍細胞
- 12: 分析

20

【図1】

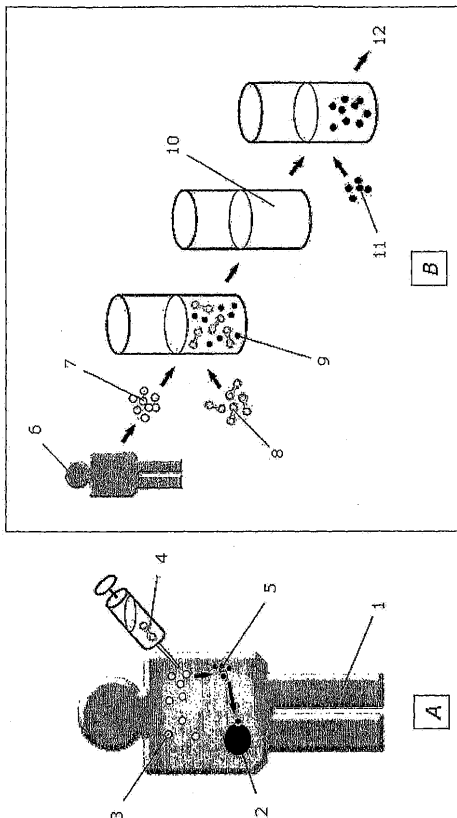


図1

【図2】

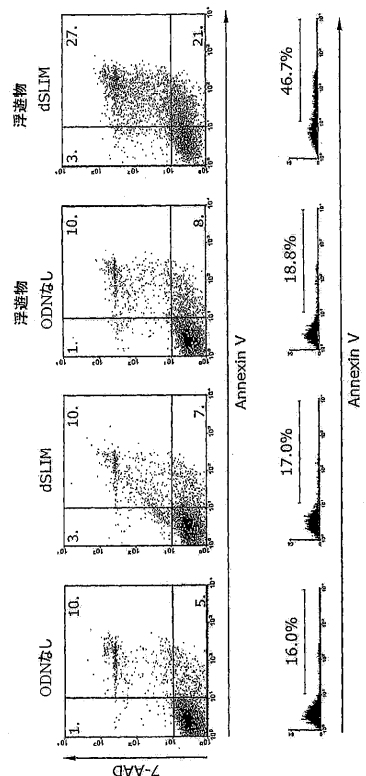


図2

【 図 3 】

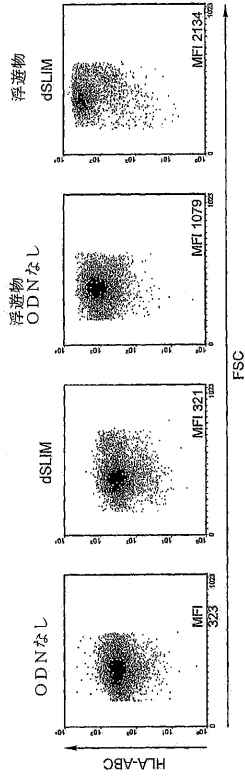


図 3

【 図 4 】

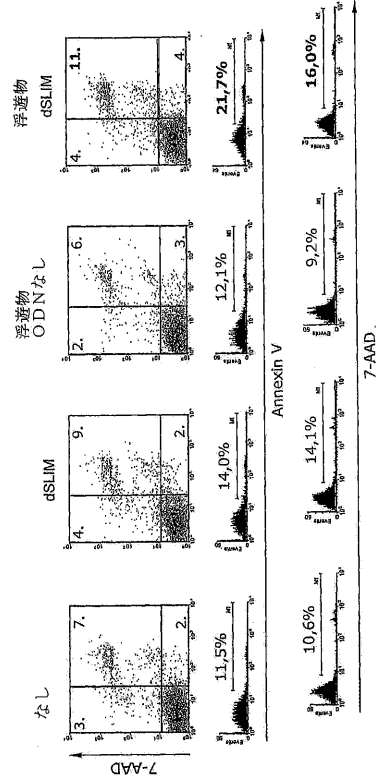


図 4

【 図 5 】

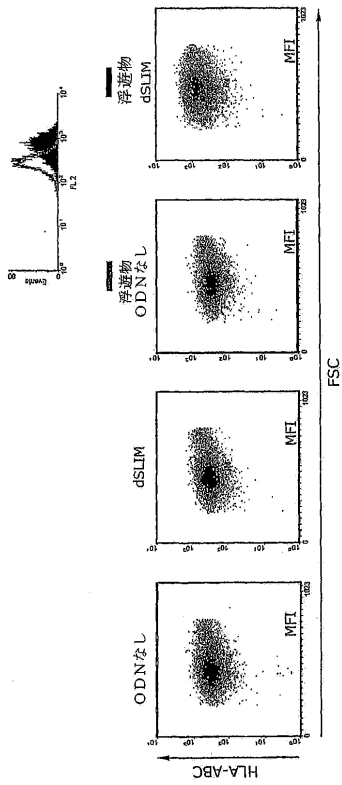


図 5

【 図 6 】

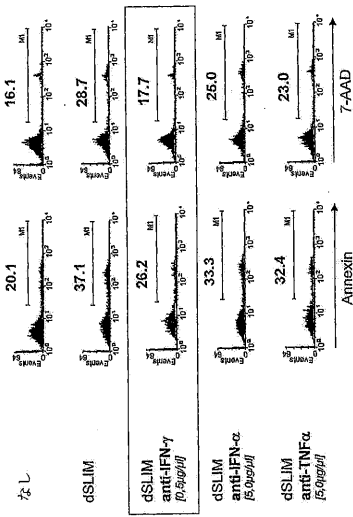


図 6

【 図 7 】

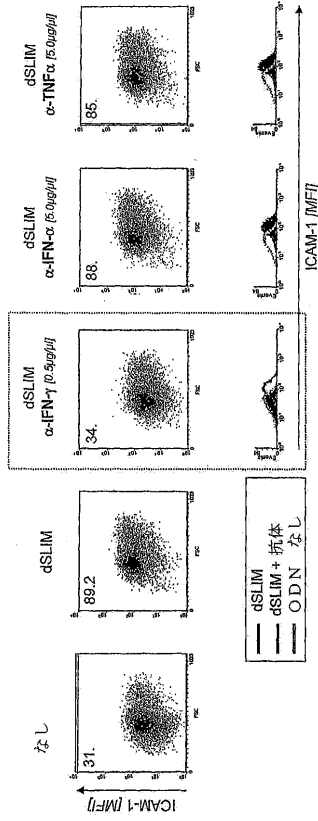


図 7

【 図 9 】

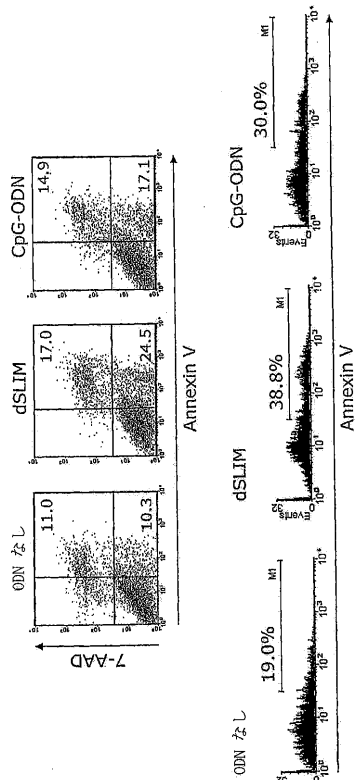


図 9

【 図 8 】

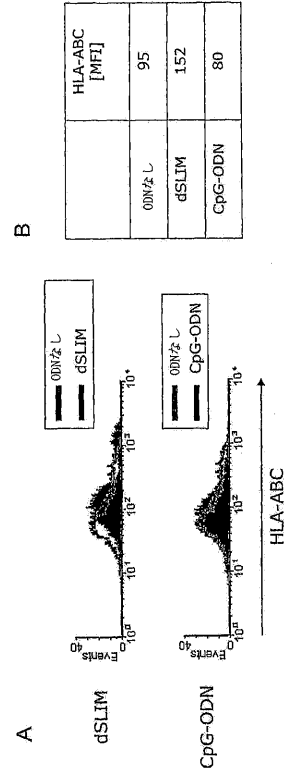


図 8

【 図 10 】

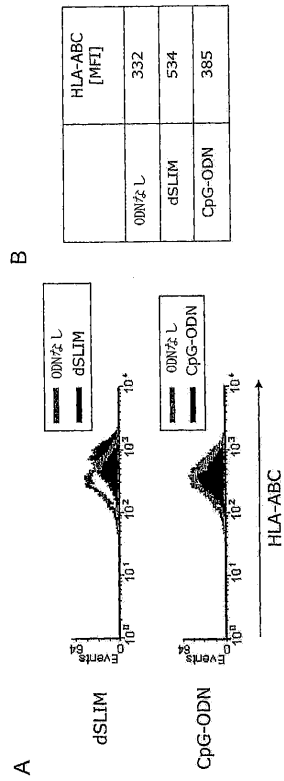


図 10

【 図 1 1 】

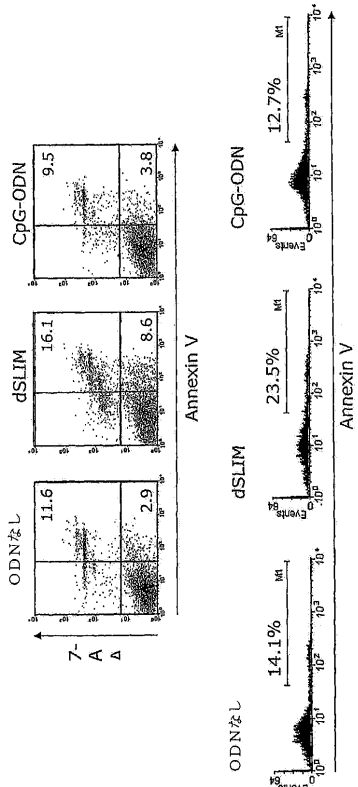


図 1.1

【 図 1 3 】

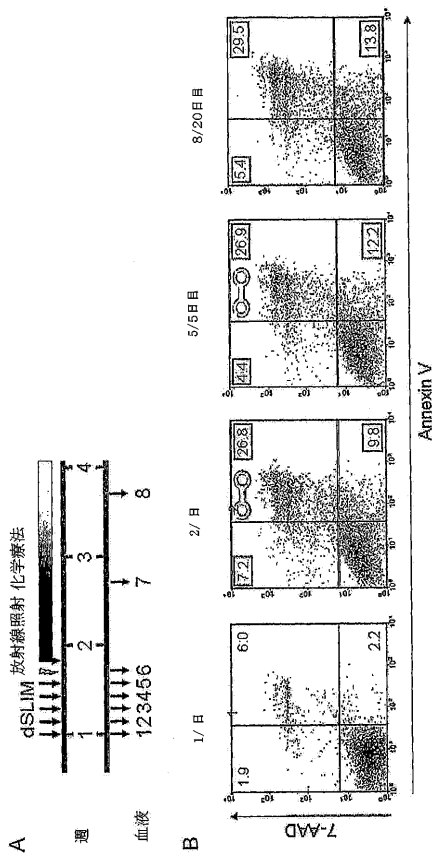


図13

【 図 1 2 】

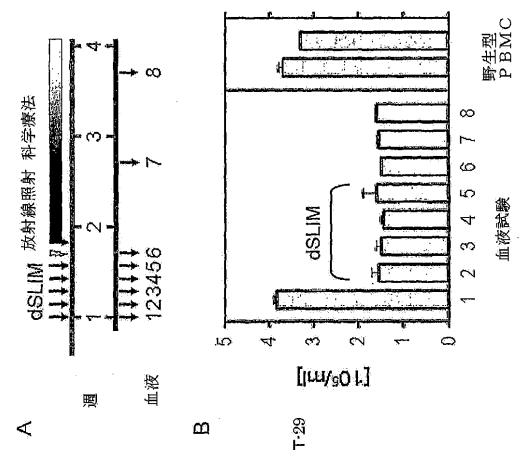


図 1 2

【 図 1 4 】

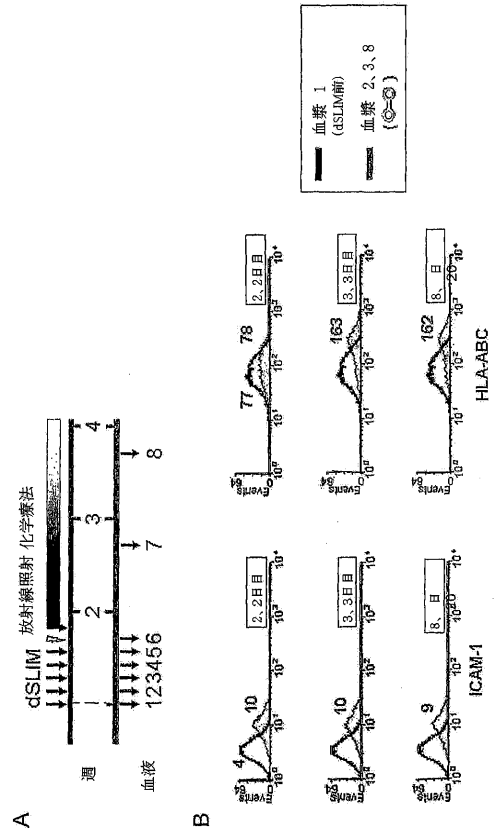


図14

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/DE2006/001604

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/50		
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) G01N		
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 practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HAJTO T ET AL: "Increased secretion of tumor necrosis factors alpha, interleukin 1, and interleukin 6 by human mononuclear cells exposed to beta-galactoside-specific lectin from clinically applied mistletoe extract." CANCER RESEARCH. 1 JUN 1990, vol. 50, no. 11, 1 June 1990 (1990-06-01), pages 3322-3326, XP000992739 ISSN: 0008-5472	1-3,5-9, 11,13, 15,16, 19-25
Y	page 3322, column 2, paragraph 4 - page 3323, column 2, paragraph 2 page 3325, column 2, paragraph 3 - paragraph 4 ----- -/--	12
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" 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. *Z* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
15 January 2007	29/01/2007	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer  Schlegel, Birgit	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/DE2006/001604

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FREI K ET AL: "Antigen presentation and tumor cytotoxicity by interferon-gamma-treated microglial cells." EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY. SEP 1987, vol. 17, no. 9, September 1987 (1987-09), pages 1271-1278, XP002414516 ISSN: 0014-2980 page 1273, column 2, paragraph 1	19
X	WITTIG B ET AL: "Therapeutic vaccination against metastatic carcinoma by expression-modulated and immunomodified autologous tumor cells: a first clinical phase I/II trial." HUMAN GENE THERAPY. 10 FEB 2001, vol. 12, no. 3, 10 February 2001 (2001-02-10), pages 267-278, XP002414517 ISSN: 1043-0342 the whole document	4,10,14
Y	SCHMIDT MANUEL ET AL: "Immune-modulatory function of CpG sequence motifs in covalently-closed, double-stem-loop DNA constructs (dSLIM)." BLOOD, vol. 102, no. 11, 16 November 2003 (2003-11-16), pages 769a-770a, XP002414518 & 45TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY; SAN DIEGO, CA, USA; DECEMBER 06-09, 2003 ISSN: 0006-4971 abstract	12
Y	WO 2005/063280 A (MOLOGEN AG [DE]; DOBRIC TOMISLAV [DE]; WITTIG BURGHARDT [DE]; SCHMIDT) 14 July 2005 (2005-07-14) examples 1,2	12
X	DATABASE BIOSIS [Online] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 16 November 2000 (2000-11-16), CHAN ANISSA S H ET AL: "CpG DNA promotes the maturation and function of human monocyte-derived dendritic cells (MoDC) via indirect effects" XP002414525 Database accession no. PREV200100291196 abstract	1-3,5-9, 12,17,18

-/--

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/DE2006/001604

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	<p>&amp; BLOOD, vol. 96, no. 11 Part 2, 16 November 2000 (2000-11-16), page 210b, 42ND ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY; SAN FRANCISCO, CALIFORNIA, USA; DECEMBER 01-05, 2000 ISSN: 0006-4971</p> <p>-----</p> <p>DATABASE BIOSIS [Online] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; November 2005 (2005-11), SCHMIDT MANUEL ET AL: "dSLIM Immunomodulators induce anti-tumor responses both in vitro and in vivo." XP002414526 Database accession no. PREV200600133935 abstract</p> <p>&amp; BLOOD, vol. 106, no. 11, Part 2, November 2005 (2005-11), page 470B, 47TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-SOCIETY-OF-HEMATOLOGY; ATLANTA, GA, USA; DECEMBER 10 -13, 2005 ISSN: 0006-4971</p> <p>-----</p>	1-25

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No  
PCT/DE2006/001604

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005063280 A	14-07-2005	EP 1699480 A1	13-09-2006

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/DE2006/001604****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.: **Claims 1-5, 10-22 (industrial applicability)**  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
**see additional sheet PCT/ISA/210**
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 additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
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

International application No.

**PCT/DE2006/001604**

Box No. IV Text of the abstract (Continuation of item 5 of the first sheet)

**PCT/ISA/210***Continuation of Box II.1*

Claims 1-5, 10-22 (industrial applicability)

Independent claim 1 and all claims dependent thereon, namely claims 2-5, describe a method in which, according to step (a), cells are isolated. This step comprises a method for the treatment of the human or animal body by surgery, which, according to PCT Rule 39.1(iv), does not have to be searched. The search covering the claims was restricted to a method characterized by the steps (b) – (e), namely the ex vivo aspects.

In dependent claim 10, the method steps 6(c) and 6(d) are carried out with blood, serum or plasma of a patient. The blood sample of the patient appears to represent the supernatant of the primary incubation. Step 6(b) relates to the “obtention of the supernatant from the primary incubation” and could therefore include a method for the treatment of the human or animal body by surgery (i.e. the obtention of the blood sample), which, according to PCT Rule 39.1(iv), does not have to be searched. The search on claim 10 was restricted to possible ex vivo aspects of the method. The same applies to claims 11-22 which are dependent on claim 10.

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/DE2006/001604

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES INV. G01N33/50		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
B. RESEARCHIERTE GEBIETE		
Researchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) G01N		
Researchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die researchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	HAJTO T ET AL: "Increased secretion of tumor necrosis factors alpha, interleukin 1, and interleukin 6 by human mononuclear cells exposed to beta-galactoside-specific lectin from clinically applied mistletoe extract." CANCER RESEARCH, 1 JUN 1990, Bd. 50, Nr. 11, 1. Juni 1990 (1990-06-01), Seiten 3322-3326, XP000992739 ISSN: 0008-5472	1-3,5-9, 11,13, 15,16, 19-25
Y	Seite 3322, Spalte 2, Absatz 4 - Seite 3323, Spalte 2, Absatz 2 Seite 3325, Spalte 2, Absatz 3 - Absatz 4 ----- -/-	12
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
<p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :</p> <p>*A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>*E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>*L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>*O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benützung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>*P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> <p>*T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>*X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>*Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>*&amp;* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p>		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts
15. Januar 2007		29/01/2007
Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter  Schlegel, Birgit

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2006/001604

G. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	FREI K ET AL: "Antigen presentation and tumor cytotoxicity by interferon-gamma-treated microglial cells." EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY. SEP 1987, Bd. 17, Nr. 9, September 1987 (1987-09), Seiten 1271-1278, XP002414516 ISSN: 0014-2980 Seite 1273, Spalte 2, Absatz 1	19
X	WITTIG B ET AL: "Therapeutic vaccination against metastatic carcinoma by expression-modulated and immunomodified autologous tumor cells: a first clinical phase I/II trial." HUMAN GENE THERAPY. 10 FEB 2001, Bd. 12, Nr. 3, 10. Februar 2001 (2001-02-10), Seiten 267-278, XP002414517 ISSN: 1043-0342 das ganze Dokument	4,10,14
Y	SCHMIDT MANUEL ET AL: "Immune-modulatory function of CpG sequence motifs in covalently-closed, double-stem-loop DNA constructs (dSLIM)." BLOOD, Bd. 102, Nr. 11, 16. November 2003 (2003-11-16), Seiten 769a-770a, XP002414518 & 45TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY; SAN DIEGO, CA, USA; DECEMBER 06-09, 2003 ISSN: 0006-4971 Zusammenfassung	12
Y	WO 2005/063280 A (MOLOGEN AG [DE]; DOBRIC TOMISLAV [DE]; WITTIG BURGHARDT [DE]; SCHMIDT) 14. Juli 2005 (2005-07-14) Beispiele 1,2	12
X	DATABASE BIOSIS [Online] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 16. November 2000 (2000-11-16), CHAN ANISSA S H ET AL: "CpG DNA promotes the maturation and function of human monocyte-derived dendritic cells (MoDC) via indirect effects" XP002414525 Database accession no. PREV200100291196 Zusammenfassung	1-3,5-9, 12,17,18

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2006/001604

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	<p>&amp; BLOOD, Bd. 96, Nr. 11 Part 2, 16. November 2000 (2000-11-16), Seite 210b, 42ND ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY; SAN FRANCISCO, CALIFORNIA, USA; DECEMBER 01-05, 2000 ISSN: 0006-4971</p> <p>-----</p> <p>DATABASE BIOSIS [Online] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; November 2005 (2005-11), SCHMIDT MANUEL ET AL: "dSLIM Immunomodulators induce anti-tumor responses both in vitro and in vivo." XP002414526 Database accession no. PREV200600133935 Zusammenfassung &amp; BLOOD, Bd. 106, Nr. 11, Part 2, November 2005 (2005-11), Seite 470B, 47TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-SOCIETY-OF-HEMATOLOGY; ATLANTA, GA, USA; DECEMBER 10 -13, 2005 ISSN: 0006-4971</p> <p>-----</p>	1-25

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/DE2006/001604

## Feld II Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1.  Ansprüche Nr. 1-5, 10-22 (industrielle Anwendbarkeit)  
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich  
siehe BEIBLATT PCT/ISA/210
2.  Ansprüche Nr. \_\_\_\_\_  
weil sie sich auf Teile der Internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen,  
daß eine sinnvolle Internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3.  Ansprüche Nr. \_\_\_\_\_  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

## Feld III Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die Internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1.  Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser Internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2.  Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3.  Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser Internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr. \_\_\_\_\_
4.  Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der Internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:  
\_\_\_\_\_

## Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

Internationales Aktenzeichen PCT/DE2006 /001604

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld II.1

Ansprüche Nr.: 1-5, 10-22 (industrielle Anwendbarkeit)

Unabhängiger Anspruch 1 und alle davon abhängigen Ansprüche 2-5 beschreiben ein Verfahren, in dem in Schritt (a) Zellen isoliert werden. Dieser Schritt enthält ein Verfahren zur chirurgischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers, was gemäss Regel 39.1(iv) PCT nicht gesucht werden muss. Die Suche von den Ansprüchen wurde auf Verfahren beschränkt, das durch die Schritte (b) - (e) charakterisiert ist, i.e. die ex vivo Aspekte.

Im abhängigen Anspruch 10 werden Verfahrensschritte 6(c) und 6(d) mit Patientenblut, -serum, oder -plasma durchgeführt. Die Patientenblutprobe scheint dabei den Überstand der primären Inkubation darzustellen. Schritt 6(b) bezieht sich auf die "Gewinnung des Überstandes aus der primären Inkubation" und könnte daher ein Verfahren zur chirurgischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers beinhalten (also die Gewinnung der Blutprobe), was gemäss Regel 39.1(iv) PCT nicht gesucht werden muss. Die Suche von Anspruch 10 wurde auf mögliche ex vivo Aspekte des Verfahrens beschränkt. Analoges gilt für die von Anspruch 10 abhängigen Ansprüche 11-22.

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Internationales Aktenzeichen  
PCT/DE2006/001604

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 2005063280 A	14-07-2005	EP 1699480 A1	13-09-2006

## フロントページの続き

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

(74)代理人 100138438

弁理士 尾首 亘聰

(74)代理人 100123892

弁理士 内藤 忠雄

(72)発明者 シュミット、マヌエル

ドイツ連邦共和国、ベルリン 1 4 1 9 5、ティールアレ 2 3

(72)発明者 ヴィッティヒ、ブルクハルト

ドイツ連邦共和国、ベルリン 1 4 1 2 9、ザルツアッハシュトラッセ 3 3

(72)発明者 ザンダー、アストリット

ドイツ連邦共和国、ベルリン 1 0 1 1 5、リニエンシュトラッセ 1 5 1

(72)発明者 チェン、イユー

アメリカ合衆国、カリフォルニア州 9 5 1 2 0、サンノゼ、メンロ・ドライブ 6 4 3 4

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA05 QA18 QQ03 QQ08 QQ42 QQ52 QR32 QR48 QR51

QR66 QR77 QS33 QS36 QX02

专利名称(译)	在体外免疫测定中具有功能		
公开(公告)号	<a href="#">JP2009506780A</a>	公开(公告)日	2009-02-19
申请号	JP2008529467	申请日	2006-09-08
[标]申请(专利权)人(译)	莫洛根股份公司		
申请(专利权)人(译)	Morogen AG		
[标]发明人	シュミットマヌエル ヴィッティヒブルクハルト ザンダーアストリット チェンイユー		
发明人	シュミット、マヌエル ヴィッティヒ、ブルクハルト ザンダー、アストリット チェン、イユー		
IPC分类号	C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/5047 G01N33/56966 G01N2500/10		
FI分类号	C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA18 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR32 4B063/QR48 4B063/QR51 4B063/QR66 4B063/QR77 4B063/QS33 4B063/QS36 4B063/QX02		
代理人(译)	山崎 行造 杉山直人 白银 博 赤松俊明 内藤忠雄		
优先权	PCT/DE2005/001594 2005-09-08 WO 2005090297 2005-10-26 EP		
其他公开文献	JP2009506780A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明涉及体外研究物质在体内过程中的作用的方法和体外检测方法，用于鉴定免疫调节化合物和/或检测免疫调节化合物的作用和鉴定诱导细胞凋亡的方法。和/或在体内过程中由免疫系统介导的坏死诱导化合物。根据本发明的方法特别适用于研究物质对免疫系统介导的细胞的作用。此外，根据本发明的方法适用于在施用免疫调节化合物和诱导细胞凋亡和/或诱导坏死的化合物之前，期间和/或之后体外监测体内效应。

