

(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2019-537712

(P2019-537712A)

(43) 公表日 令和1年12月26日 (2019. 12. 26)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006. 01)	GO 1 N 33/53	Z N A P 4 B O 6 3
A 6 1 P 37/02 (2006. 01)	A 6 1 P 37/02	4 C O 8 4
A 6 1 P 43/00 (2006. 01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1 4 C O 8 6
A 6 1 K 45/00 (2006. 01)	A 6 1 K 45/00	4 H O 4 5
A 6 1 K 45/06 (2006. 01)	A 6 1 K 45/06	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 97 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2019-520795 (P2019-520795)
 (86) (22) 出願日 平成29年10月25日 (2017. 10. 25)
 (85) 翻訳文提出日 平成31年4月18日 (2019. 4. 18)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2017/077293
 (87) 国際公開番号 W02018/077942
 (87) 国際公開日 平成30年5月3日 (2018. 5. 3)
 (31) 優先権主張番号 PCT/EP2016/075647
 (32) 優先日 平成28年10月25日 (2016. 10. 25)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 517010699
 バイオンテック エールエヌアー ファー
 マシューティカルズ ゲーエムペーハー
 ドイツ・5 5 1 3 1・マインツ・アン・デア・
 ゴルトグルーベ・1 2
 (74) 代理人 100108453
 弁理士 村山 靖彦
 (74) 代理人 100110364
 弁理士 実広 信哉
 (74) 代理人 100133400
 弁理士 阿部 達彦

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫療法剤のための用量決定

(57) 【要約】

本発明は、免疫療法化合物の投与に応答した免疫系の反応における変動等、個々の対象内の天然の変動により、その有効性及び毒性が個体間で同じ用量で変動し得る、免疫療法化合物の投与に適した用量を決定するための方法に関する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

個体への投与のための免疫療法剤の適した用量を決定するための方法であって、
(a)免疫療法剤の複数の異なる用量を個体の免疫反応性材料と別々に接触させる工程と、
(b)免疫療法剤の複数の異なる用量に起因する少なくとも1種の免疫学的反応を測定する工程と
を含む方法。

【請求項 2】

工程(b)が、少なくとも1種の免疫学的反応を定性的に及び/又は定量的に測定する工程、好ましくは、少なくとも1種の免疫学的反応を定量的に測定する工程によって特徴付けられる、請求項1に記載の方法。

10

【請求項 3】

免疫療法剤の複数の異なる用量が、2、3、4、5、6、7、8、9、10又は10を超える異なる用量である、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項 4】

免疫療法剤の複数の異なる用量が、用量漸増、好ましくは、線形又は対数用量漸増を表す、請求項1から3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

免疫療法剤が、Toll様受容体(TLR)アゴニスト、好ましくは、TLR-7又はTLR-8アゴニストである、請求項1から4のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 6】

免疫療法剤が、少なくとも1種の免疫反応性ペプチド若しくはタンパク質、又は少なくとも1種の免疫反応性ペプチド若しくはタンパク質をコードする核酸を含む、請求項1から5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

核酸が、RNAを含む、請求項6に記載の方法。

【請求項 8】

免疫療法剤が、RNA及び少なくとも1種の脂質を含む、請求項7に記載の方法。

【請求項 9】

免疫療法剤が、RNAリポプレックス製剤を含む、請求項8に記載の方法。

30

【請求項 10】

複数の異なる用量が、免疫療法剤のための標準用量範囲を下回る少なくとも1用量を含む、請求項1から9のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

複数の異なる用量が、免疫療法剤のための標準用量範囲内にある少なくとも1用量を含む、請求項1から10のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

工程(a)及び(b)が、逐次行われる、請求項1から11のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

工程(b)が、工程(a)の2～48時間後、好ましくは、工程(a)の4～24時間後に行われる、請求項12に記載の方法。

40

【請求項 14】

少なくとも1種の免疫学的反応が、少なくとも1種のサイトカインの産生を含む、請求項1から13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

少なくとも1種のサイトカインが、インターロイキン6(IL-6)、腫瘍壊死因子- α (TNF- α)、インターフェロン- α (IFN- α)、インターフェロン- γ (IFN- γ)、インターフェロングamma誘導性タンパク質10(IP-10)、インターロイキン-1 β (IL-1 β)、インターロイキン-2(IL-2)及びインターロイキン-12p70 (IL-12p70)からなる群から選択される、請求項14に記載の方法。

50

【請求項 16】

少なくとも1種のサイトカインが、インターフェロン- α (IFN- α)である、請求項15に記載の方法。

【請求項 17】

in vitro方法である、請求項1から16のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 18】

個体の免疫反応性材料が、個体から単離された血液細胞を含む、請求項17に記載の方法。

【請求項 19】

免疫反応性材料が、個体から単離された全血を含む、請求項18に記載の方法。

10

【請求項 20】

全血が、個体由来の自家樹状細胞、好ましくは形質細胞様樹状細胞(pDC)及び/又は単球由来未成熟樹状細胞(iDC)を富化されている、請求項19に記載の方法。

【請求項 21】

個体の免疫反応性材料が、末梢血単核細胞(PBMC)から本質的になる又はこれを含む、請求項18に記載の方法。

【請求項 22】

少なくとも1種の免疫学的反応が免疫療法剤に対する許容される治療効果を示す用量が、個体への免疫療法剤の投与に適した用量を反映する、請求項17から21のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 23】

工程(a)が、in vivoで実行され、個体への免疫療法剤の1用量の投与によってそれぞれ特徴付けられる別々の投与工程において免疫療法剤の複数の異なる用量を個体の免疫反応性材料と別々に接触させる工程によって特徴付けられる、請求項1から16のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 24】

別々の投与工程が、その後に実行され、7~28日間の間、好ましくは、7日間、14日間、21日間又は28日間、より好ましくは、7日間又は14日間等、2~30日間の間隔によって互いに隔てられている、請求項23に記載の方法。

【請求項 25】

少なくとも1種の免疫学的反応を測定する工程が、別々の投与工程のそれぞれの後に別々に実行される、請求項23又は24に記載の方法。

30

【請求項 26】

別々の投与工程の第1の投与工程が、免疫療法剤のための標準用量範囲を下回る免疫療法剤の用量の投与によって特徴付けられ、別々の投与工程におけるその後の投与工程において投与される用量が、任意選択で、別々の投与工程の第1の投与工程において投与される用量よりも高い、請求項23から25のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 27】

(c)少なくとも1種の副作用の有無を検出する工程を更に含む、請求項23から26のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 28】

少なくとも1種の副作用が、許容できない副作用である、請求項27に記載の方法。

【請求項 29】

工程(c)が、別々の投与工程のそれぞれの後に実行される、請求項27又は28に記載の方法。

【請求項 30】

少なくとも1種の副作用が、複数の異なる用量のうち1用量の投与後に検出される場合、その後の全用量が、少なくとも1種の抗毒剤と共に投与される、請求項27から29のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 31】

50

少なくとも1種の副作用が、少なくとも1種の抗毒剤と共に投与されない複数の異なる用量のうち1用量の投与後に検出される場合、その後に投与されるべき免疫療法剤の次の用量が、以前の投与工程において投与された用量と同一又はそれ未満である、請求項30に記載の方法。

【請求項 3 2】

以前の投与工程の直後の、その後の投与工程に、工程から工程への用量漸増スキームを任意選択で表す1回又は複数の更なる投与工程が更に続く、請求項31に記載の方法。

【請求項 3 3】

少なくとも1種の副作用が、少なくとも1種の抗毒剤と共に投与される複数の異なる用量のうち1用量の投与後に検出される場合、その後に投与されるべき免疫療法剤の次の用量が、以前の投与工程において投与された用量未満である、請求項30から32のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 3 4】

抗毒剤が、解熱薬、好ましくは、パラセタモール(アセトアミノフェン)を含む、請求項30から33のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 5】

副作用が、錯感覚、疲労、頭痛、筋肉痛、胸部圧迫又は胸の痛み、振戦、昇温又は発熱、耳鳴、関節痛、眩暈、発汗、筋緊張低下及び頻拍のうち1種又は複数から選択される、請求項27から34のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 6】

副作用が、複数の異なる用量のいずれの投与後にも検出されない場合、少なくとも1種の免疫学的反応が免疫療法剤に対する許容される治療効果を示す用量が、個体への免疫療法剤の投与に適した用量を反映する、請求項23から35のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 3 7】

少なくとも1種の副作用が、複数の異なる用量のいずれかの投与後に検出される場合、少なくとも1種の抗毒剤と共に投与されるその後の投与工程における用量であって、少なくとも1種の免疫学的反応が免疫療法剤に対する許容される治療効果を示す用量が、個体への免疫療法剤の投与に適した用量を反映する、請求項23から35のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 8】

副作用が、少なくとも1種の抗毒剤と共に投与される複数の異なる用量のいずれの投与後にも検出されない場合、少なくとも1種の免疫学的反応が許容される治療効果の最も強い徴候をもたらす用量が、個体への免疫療法剤の投与に適した用量である、請求項37に記載の方法。

30

【請求項 3 9】

少なくとも1種の副作用が、少なくとも1種の抗毒剤と共に投与された複数の異なる用量のいずれかの投与後に検出される場合、副作用が検出されない又は重篤さが最小である又は疾患の重症度を踏まえて他の面で許容されると考慮される最高用量が、個体への免疫療法剤の投与に適した用量である、請求項37に記載の方法。

【請求項 4 0】

適した用量が、少なくとも1種の抗毒剤と共に投与するためのものである、請求項38又は39に記載の方法。

40

【請求項 4 1】

個体が、ヒト対象である、請求項1から40のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 2】

免疫療法剤の適した用量で個体を処置する方法であって、

(a)免疫療法剤の複数の異なる用量を個体の免疫反応性材料と別々に接触させる工程と、
(b)免疫療法剤の複数の異なる用量に起因する少なくとも1種の免疫学的反応を測定する工程であって、少なくとも1種の免疫学的反応が免疫療法剤に対する許容される治療効果を示す用量が、個体への投与に適した用量を反映する、工程と、

50

(c)適した用量で免疫療法剤を個体に投与する工程とを含む方法。

【請求項 4 3】

免疫療法剤の適した用量で個体を処置する方法であって、請求項1から41のいずれか一項に記載の方法に従って適していると決定された免疫療法剤の用量を個体に投与する工程を含む方法。

【請求項 4 4】

免疫療法剤の適した用量が、少なくとも1種の抗毒剤と共に投与される、請求項42又は43に記載の方法。

【請求項 4 5】

免疫療法剤が、1種又は複数のネオエピトープをコードする核酸である、請求項42から44のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 6】

核酸が、一本鎖RNAである、請求項45に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、免疫療法化合物の投与に応答した免疫系の反応における変動等、個々の対象における天然の変動により、その有効性及び毒性が個体間で同じ用量で有意に変動し得る、免疫療法化合物に適した用量を決定するための方法に関する。

【背景技術】

【0002】

通常、治療化合物のための治療有効用量は、容易に決定される。抗生物質又は鎮痛薬等、治療化合物の効果的な量を決定するために、用量が多いほど治療効果が大きくなることを予想して、所望の治療効果が観察されるまで、増加量の治療化合物が、対象のコホートに与えられる。しかし、与えることができる治療化合物の用量を制限する一因子は、より多いが依然として治療的な量の化合物の投与に伴い観察される望まれない副作用の出現である。斯かる量又は毒性用量は、単純に、発熱、悪心又は臓器不全、ショック等のより重篤な効果等、副作用が観察されるまで、与える化合物の量を増やしていくことによっても容易に決定される。斯かる治療有効及び毒性用量は通常、体重1キログラム当たりを基礎として決定される、又は当該個体に関する他の何らかの変数に対して正規化されるため、効果的且つ無毒性である治療化合物のための用量は、任意の患者に対して容易に外挿される。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

【特許文献 1】WO 2009/144230

【特許文献 2】WO 97/24447号

【特許文献 3】PCT/EP2006/009448号

【特許文献 4】WO96/33739号

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献 1】「A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)」、H. G. W. Leuenberger、B. Nagel、及びH. Kolbl編、(1995) Helvetica Chimica Acta、CH-4010、スイス、Basel

【非特許文献 2】Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版、J. Sambrookら編、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor 1989

【非特許文献 3】Mahviら、Immunology and cell Biology 75:456 ~ 460頁、1997

【非特許文献 4】Maloyら、2001、Proc Natl Acad Sci USA 98:3299 ~ 303頁

【非特許文献 5】Zhangら、2011、The impact of next-generation sequencing on genom

10

20

30

40

50

ics. J. Genet Genomics 38(3)、95 ~ 109頁

【非特許文献 6】Voelkerdingら、2009、Next generation sequencing: From basic research to diagnostics. Clinical chemistry 55、641 ~ 658頁

【非特許文献 7】Teer及びMullikin、2010、Human Mol Genet 19(2): R145 ~ 51頁

【非特許文献 8】Hodgesら、2007、Nat. Genet. 39: 1522 ~ 1527頁

【非特許文献 9】Choiら、2009、Proc. Natl. Acad. Sci USA 106: 19096 ~ 19101頁

【非特許文献 10】Hoytら (EMBO J. 25(8)、1720 ~ 9頁、2006)

【非特許文献 11】Zhangら (J. Biol. Chem.、279(10)、8635 ~ 41頁、2004)

【非特許文献 12】Abastadoら、1993、J. Immunol. 151(7): 3569 ~ 75頁

【非特許文献 13】Schlessingerら、2005、Proteins、61(1): 115 ~ 26頁

【非特許文献 14】Allardら、2004、Clinical Cancer Research 10:6897 ~ 6904頁

【非特許文献 15】Nagrathら、2007、Nature 450: 1235 ~ 1239頁

【非特許文献 16】Soら、1997、Mol. Cells 7:178 ~ 186頁

【非特許文献 17】Kriegら、1995、Nature 374:546 ~ 549頁

【非特許文献 18】Hall、1995、IL-12 at the crossroads、Science 268:1432 ~ 1434頁、1995

【非特許文献 19】Remington's Pharmaceutical Sciences、Mack Publishing Co.(A. R Gennaro編、1985)

【非特許文献 20】Kwissaら、2012、Distinct TLR adjuvants differentially stimulate systemic and local innate immune responses in nonhuman primates、Blood 119:2044 ~ 2055頁

【非特許文献 21】Schillerら、2006、Immune response modifiers--mode of action、Exp. Dermatol. 15:331 ~ 341頁

【非特許文献 22】Hornungら、2005、Sequence-specific potent induction of IFN- α by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7、Nat. Med. 11(3):263 ~ 270頁

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

しかし、治療剤が、投与される量が多いほど観察される治療効果が高くなるという予想を満たさない場合等、標準方法を使用して、有効な治療及び/又は毒性用量、及び/又は全個体へのその外挿を決定することができない状況がある。本発明者らは、Toll様受容体アゴニストである免疫療法剤の投与の文脈において、異なる個体に投与される同じ用量が、異なる結果、例えば、異なるレベルの治療効果及び/又は異なるレベルの副作用をもたらすことを観察した。本発明者らは、異なる個体から単離された細胞が、同じ量の免疫療法剤に対して、サイトカイン発現によって測定される細胞活性化の観点から異なって応答することも観察した。本発明は、特定の免疫療法剤の許容される治療効果を保証し、好ましくは、許容される毒性プロファイルをもたらす、全個体の単位当たりを基礎とする、例えば、体重、表面積に基づく普遍的用量が存在しないような、免疫療法剤に対する免疫学的反応が、個体の免疫系における天然の変動に晒されていることを示す、これらの観察に、部分的に基づく。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明は、免疫療法剤の適した用量を決定するための方法であって、その量が、好ましくは、当該個体にとって治療的且つ無毒性である、方法に関する。特定の機構に限定されることを望むものではないが、免疫療法剤、例えば、RNAに基づく分子が、治療効果をもたらすために、その活性及び量が個体間で変動する多くのネイティブな因子に依存し、これにより、同じ薬剤が同じ用量で投与される場合に、異なる個体において観察される、治療的可変性の効果及び望まれない可変性の効果の両方をもたらすと考えられる。

【0007】

10

20

30

40

50

特に、本発明は、個体への投与のための免疫療法剤の適した用量を決定するための方法であって、(a)免疫療法剤の複数の異なる用量を個体の免疫反応性材料と別々に接触させる工程と、(b)免疫療法剤の複数の異なる用量に起因する少なくとも1種の免疫学的反応を測定する工程とを含む方法に関する。ある実施形態では、工程(b)は、少なくとも1種の免疫学的反応を定性的に及び/又は定量的に測定すること、好ましくは、少なくとも1種の免疫学的反応を定量的に測定することにより特徴付けられる。本発明の方法において使用される用量は、免疫療法剤の量である。用量は、例えば、ピコグラム、ナノグラム、マイクログラム、ミリグラム及びグラム、又は他の単位システムにおけるそれらの同等の量で表すことができる。用量又は量は、絶対量であり得る、即ち、用量は、個体の年齢、性別、体重、脂肪組織の量を反映する肥満度指数、皮膚の表面積等に関して変動しない。或いは、用量は、年齢、性別、体重、脂肪組織の量を反映する肥満度指数、皮膚の表面積等、個体間の変動を考慮に入れることができる。複数の異なる用量は、異なる量における別々の用量を表し、好ましくは、異なる量は、同じ方法で定量化され(同じ単位で表現され)、例えば、複数の異なる用量は全て、体重1kg当たりのmgの単位で表される、又は全て絶対量である。複数の異なる用量を接触させる工程がin vitroで行われるある実施形態では、用量は、絶対量であり得る、又は免疫反応性材料の種類を考慮に入れることができる、例えば、免疫反応性材料が、免疫細胞を含む場合、用量は、免疫細胞の数又は免疫細胞のサブタイプの数とを考慮に入れることができる。

10

【0008】

免疫療法剤を個体の免疫反応性材料と接触させるための、又は免疫学的反応を測定するための、当該技術分野で公知のいずれかの方法は、本発明の目的のために用いることができる。例示的な実施形態は、免疫反応性材料が、個体から単離された全血又は免疫細胞の精製集団等、個体から単離された免疫細胞を含む細胞組成物である場合を含む。免疫療法剤の複数の異なる用量が個体に投与される実施形態では、免疫反応性材料は、免疫系それ自体であり、個体の身体における免疫細胞によって生成される免疫学的反応が測定される。例えば、免疫療法剤の投与後に、血液又はリンパ液を個体から単離し、サイトカインの発現等、所望の免疫学的反応に関して検査することができる。免疫療法剤が個体に投与される一実施形態では、斯かる投与は、皮膚上であり得る、即ち、皮膚スクラッチ又は皮膚ブリック検査であり得る。

20

【0009】

ある実施形態では、本方法は、in vivoで実行される若しくはin vitroで実行される、又は工程のうち少なくとも1種は、in vivoで実行され、他の工程は、in vitroで実行され、例えば、接触工程は、in vivoで実行され、免疫学的応答の測定工程は、例えば、個体から血液を収集し、血液又は血液から単離された細胞において免疫学的反応を測定することにより、in vitroで行われる。好ましくは、本方法の全工程は、in vitroで実行される。

30

【0010】

本発明の方法において有用な免疫療法剤は、動物、好ましくは、ヒトの免疫系の少なくとも1種の成分に変化をもたらすことができる、いずれかの薬剤、分子、化合物、組成物等である。例えば、免疫療法剤は、特定の種類の免疫細胞を活性化することができる、又は特定の種類の免疫細胞を静止状態にすることができ、その活性化又は静止状態は、例えば、サイトカインの発現の変化によって測定することができる。免疫系の少なくとも1種の成分における他の効果は、免疫細胞を増殖させる又は分化させること、例えば、血液中の免疫細胞数の増加又は減少を含むことができる。更に、免疫療法剤は、抗体の産生を誘導することができる、又は細胞傷害性T細胞等、免疫細胞を活性化して、細胞傷害性効果を誘導することができる。サイトカイン発現の変化は、後述する通り本発明の方法の文脈における免疫学的反応として有用であるが、ある実施形態では、サイトカインは、免疫系に変化をもたらす(免疫学的反応を引き起こす)その能力を考慮すると、免疫療法剤であってもよい。本発明の方法において有用な例示的な免疫学的反応を下に記す。

40

【0011】

50

ある実施形態では、免疫療法剤は、Toll様受容体(TLR)のアゴニスト、例えば、TLR-1、TLR-2、TLR-3、TLR-4、TLR-5、TLR-6、TLR-7、TLR-8、TLR-9、TLR-10、TLR-11、TLR12又はTLR13アゴニストである化合物である。好ましくは、TLRは、TLR-3、TLR-7、TLR-8及びTLR-9等、細胞の内側に位置するTLRである。同様に好ましくは、免疫療法剤は、Toll様受容体-7(TLR-7)又はToll様受容体-8(TLR-8)のアゴニストである。TLR-7アゴニストは、公知であり、一本鎖RNA分子等の化合物、並びにチアゾロキノロン(thiazoloquinolone)等のイミダゾ-キノリン化合物、抗ウイルス化合物イミキモド及びレシキモドを含む。他のTLR-7アゴニスト化合物は、N-(4-(4-アミノ-2-(2-メトキシエチル)-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)-N-(テトラヒドロ-2H-ピラン-4-イル)アセトアミド、N-{4-[4-アミノ-2-(2-メトキシエチル)-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル]ブチル}-N-(1,1-ジオキソチエタン-3-イル)アセトアミド、N-(4-(4-アミノ-2-エチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)-N-(1,1-ジオキシド(dioxido)チエタン-3-イル)アセトアミド、ポリ(dチミジン)、グアノシンアナロググロキソリピン及びプロピリミン、並びに他のヌクレオチドベースアナログを含む。TLR-8アゴニストはまた、一本鎖RNA分子、並びに2-エチル-1-(4-((2-メチルテトラヒドロフラン-3-イル)アミノ)ブチル)-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-4-アミン及び1-(4-(シクロヘキシルアミノ)ブチル)-2-エチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-4-アミンを含む。プロタミン及びRNAを含む粒子が、例えば、形質細胞様樹状細胞によって取り入れられるとTLR-7を、又は例えば、単球によって取り入れられるとTLR-8を活性化することができることが観察された(WO 2009/144230)。一実施形態では、免疫療法剤は、ウイルス、例えば、RNAウイルスであり得る。免疫療法剤は、好ましくは、一本鎖RNA分子又は他のRNAに基づく分子等、核酸分子であり得、この核酸分子は、免疫反応性ペプチド又はタンパク質をコードする。より好ましくは、その免疫学的反応が測定される免疫療法剤は、1種又は複数のペプチドをコードする一本鎖RNA分子であり、各ペプチドは、腫瘍組織等の罹患細胞又は組織において特異的に発現されるエピトープを含む。RNAからのこのようなペプチド(免疫反応性ペプチド)の発現は、MHC分子との複合体における細胞表面におけるその提示と、最終的に、エピトープを発現する罹患細胞又は組織に対する免疫応答の誘導をもたらす。好まれる実施形態では、RNA分子は、カチオン性脂質、カチオン性ポリマー、及び負に荷電した核酸と複合体を形成することができる正電荷を有する他の物質と複合体形成することができる。追加的で例示的な免疫療法剤を下に記載する。

【0012】

本明細書中で使用する場合、本発明の方法において有用な免疫反応性材料は、免疫療法剤と接触させると、ある特徴の変化(免疫学的反応)を測定することができる、個体の免疫系の全体又は一部を含む。好ましくは、免疫反応性材料は、全血又はリンパ液等、免疫系の細胞、例えば、免疫細胞若しくは免疫反応性細胞、又は免疫細胞若しくは免疫反応性細胞を含む組成物を含む。免疫細胞は、実質的に精製されていてもよい、例えば、80%、85%、90%、95%、99%純粋であってもよい。用語「免疫細胞」は、個体の身体防御に関与する免疫系の細胞を指す。用語「免疫細胞」は、マクロファージ、単球(マクロファージの前駆体)、好中球、好酸球及び好塩基球等の顆粒球、樹状細胞、マスト細胞、並びにB細胞、T細胞及びナチュラルキラー(NK)細胞等のリンパ球を含む白血球を含む、特異的な種類の免疫細胞及びその前駆体を包含する。マクロファージ、単球(マクロファージの前駆体)、好中球、樹状細胞及びマスト細胞は、貪食細胞である。ある実施形態では、個体の免疫反応性材料は、個体の血液から単離された細胞を含む、又は免疫反応性材料は、個体から単離された全血を含む、又は免疫反応性材料は、個体から単離されたリンパ液を含む。ある実施形態では、本方法がin vitroで実行される場合、個体の免疫反応性材料は、末梢血単核細胞(PBMC)を含む若しくはこれから本質的になる、又は免疫反応性材料が全血である場合、全血は、形質細胞様樹状細胞(pDC)及び/又は単球由来未成熟樹状細胞(iDC)等、樹状細胞を任意選択で補充されてよい。樹状細胞は、異種若しくは同系供給源に由来することができる、又は自家であり得、好ましくは、自家である。免疫療法剤は、免疫細胞であり得るため、本発明のある実施形態では、免疫反応性材料及び免疫療法剤は両者共に、免疫細胞であり得る。

10

20

30

40

50

【0013】

本明細書中で使用する場合、本発明の方法の文脈における免疫学的反応は、免疫系又は免疫系の成分の測定可能な特徴の変化であり、好ましくは、免疫療法剤の投与による治療効果を示すことが公知の変化である。例えば、免疫学的反応は、免疫細胞の活性の変化を含み、この活性は、免疫細胞の分化表現型の変化、又は免疫細胞の増殖能力の変化、又は核酸若しくはタンパク質レベルのいずれかでの、免疫細胞によって産生される1種若しくは複数のサイトカインの発現若しくは量の変化であり得る。免疫学的反応は、リンパ球又はT細胞等、個体における特異的な種類の免疫細胞の量の変化であり得る。免疫学的反応は、個体における血小板数又は血小板活性化動態の変化であってもよい。免疫学的反応は、皮膚における炎症性反応、例えば、接触性皮膚炎等、個体の炎症性状況の変化であってもよい。免疫学的反応は、抗原に対する細胞傷害性T細胞応答の誘導等、標的抗原に対する免疫応答の誘導を含むこともできる。好ましくは、測定される免疫学的反応は、例えば、サイトカインそれ自体を検出することにより、又はサイトカインをコードする核酸を検出することにより測定される、免疫細胞によって分泌される1種又は複数のサイトカインの量/濃度の変化である。

10

【0014】

サイトカインは、細胞によって放出され、他の細胞の挙動に影響を与えるという点において、細胞シグナリングにおいて重要な小型のタンパク質の幅広いカテゴリーであるが、サイトカインは、自己分泌シグナリングに関与することもできる。サイトカインは、幅広い範囲の免疫細胞、並びに内皮細胞、線維芽細胞及び様々なストロマ細胞を含む、幅広い範囲の細胞によって産生され、所与のサイトカインは、2種類以上の細胞によって産生され得る。例示的なサイトカインは、モノカイン、リンホカイン、インターロイキン(interleukine)又はケモカイン、例えば、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12、IL-15、IL-21、INF- α 、INF- γ 、GM-CSFを含む。ある実施形態では、サイトカインは、リンパ系恒常性の調節に関与し、好ましくは、サイトカインは、T細胞の発生、プライミング、増大、分化及び/又は生存に関与し、好ましくはこれらを誘導又は増強する。一実施形態では、サイトカインは、インターロイキンである。好まれる実施形態では、サイトカインは、次のうち1種又は複数である：インターロイキン-6(IL-6)、インターロイキン-12(IL-12)、腫瘍壊死因子-アルファ(TNF- α)、インターフェロン-アルファ2a(IFN- α 2a)等のインターフェロン-アルファ(IFN- α)、インターフェロン-ガンマ(IFN- γ)、インターフェロン-ガンマ誘導性タンパク質(IP10)、インターロイキン1-ベータ(IL-1 β)、インターロイキン2(IL-2)、インターロイキン12p70(IL-12p70)。

20

30

【0015】

インターロイキン1-ベータ(IL-1 β)は、カスパーゼ1(CASP1/ICE)によってタンパク質分解によりプロセシングされてその活性型となるプロタンパク質として活性化マクロファージによって産生される、サイトカインのインターロイキン1ファミリーのメンバーである。このサイトカインは、炎症性応答の重要なメディエータであり、細胞増殖、分化及びアポトーシスを含む種々の細胞活性に関与する。中枢神経系(CNS)におけるこのサイトカインによるシクロオキシゲナーゼ-2(PTGS2/COX2)の誘導は、炎症性疼痛過敏症に寄与することが見出された。

40

【0016】

インターロイキン-2(IL-2)は、免疫の原因となる白血球細胞(白血球、多くの場合リンパ球)の活性を調節するタンパク質である。IL-2は、微生物感染に対する、また、外来性(「非自己」)及び「自己」の間の判別における身体の天然応答の一部である。IL-2は、免疫系の鍵となる機能、例えば、主に、T細胞におけるその直接的効果を介した、寛容及び免疫における鍵となる役割を有する。T細胞が成熟する胸腺において、IL-2は、さもなければプライミングされて体内の正常な健康細胞を攻撃する他のT細胞を抑制する、調節性T細胞へのある特定の未成熟T細胞の分化を促進することにより自己免疫性疾患を予防する。IL-2は、また、初期T細胞も抗原によって刺激されて、これにより、身体が感染を撃退することを助ける場合、T細胞からエフェクターT細胞への及びメモリーT細胞への分化

50

を促進する。

【0017】

インターロイキン6(IL-6)は、炎症誘発性サイトカイン及び抗炎症性マイオカインの両方として作用し、T細胞及びマクロファージによって分泌されて、例えば、感染中及び外傷後、特に、炎症をもたらす熱傷又は他の組織損傷後に、免疫応答を刺激する。IL-6は、マウスにおいて、細菌の肺炎球菌(*Streptococcus pneumoniae*)に対する抵抗性に要求されることが示されてきたため、IL-6は、感染と戦う役割も果たす。抗炎症性サイトカインとしてのIL-6の役割は、TNF- α 及びIL-1におけるその阻害効果により並びにIL-1RA及びIL-10の活性化により媒介される。

【0018】

インターロイキン12(IL-12)は、抗原刺激に応答して、樹状細胞、マクロファージ、好中球及びヒトB-リンパ芽球様細胞によって天然に産生される。IL-12は、2種の別々の遺伝子のIL-12A(p35)及びIL-12B(p40)によってコードされるヘテロ二量体サイトカインである。活性ヘテロ二量体(「p70」と称される)及びp40のホモ二量体は、タンパク質合成後に形成される。IL-12は、ナイーブT細胞からTh1細胞への分化に関与し、T細胞の成長及び機能を刺激することができるT細胞刺激因子として公知である。IL-12は、T細胞及びナチュラルキラー(NK)細胞からのインターフェロン-ガンマ(IFN- γ)及び腫瘍壊死因子-アルファ(TNF- α)の産生を刺激し、NK細胞及びCD8+細胞傷害性Tリンパ球の細胞傷害活性の増強を媒介し、また、抗血管新生活性を有する。

【0019】

腫瘍壊死因子-アルファ(TNF- α)(カケキシン(cachexin)又はカケクチン)は、全身性炎症に関与し、急性期反応を構成するサイトカインの1種である。TNF- α は、活性化マクロファージによって主に産生されるが、樹状細胞、単球、CD4+リンパ球、NK細胞、好中球、マスト細胞、好酸球及びニューロン等、多くの他の細胞型によって産生される場合もある。TNF- α の主要な役割は、免疫細胞の調節にある。内在性発熱物質であるTNF- α は、発熱、アポトーシス細胞死、カヘキシー、炎症を誘導し、腫瘍発生及びウイルス複製を阻害し、IL-1及びIL-6産生細胞を介して敗血症に応答することができる。

【0020】

ヒトI型インターフェロン(IFN)は、免疫系の活性の調節を助けるインターフェロンタンパク質の大きいサブグループに属する。哺乳類型は、IFN- α (アルファ)、IFN- β (ベータ)、IFN- κ (カッパー)、IFN- δ (デルタ)、IFN- ϵ (イプシロン)、IFN- τ (タウ)、IFN- ω (オメガ)及びIFN- ζ (ゼータ、リミチン(limitin)としても公知)と命名される。これらは、ウイルス感染に対する自然免疫応答に主として関与する。その合成の原因となる遺伝子は、IFNA1、IFNA2、IFNA4、IFNA5、IFNA6、IFNA7、IFNA8、IFNA10、IFNA13、IFNA14、IFNA16、IFNA17、IFNA21と呼ばれる13種のサブタイプに分類される。これらの遺伝子は、9番染色体上のクラスターで一緒に見出される。IFN- β タンパク質は、自然免疫応答に主として関与する抗ウイルス活性を有する。2種類のIFN- β 、IFN- β 1(IFNB1)及びIFN- β 3(IFNB3)について記載されている。IFN- α 及びIFN- β は、樹状細胞、リンパ球(NK細胞、B細胞及びT細胞)、マクロファージ、線維芽細胞、内皮細胞、骨芽細胞及びその他を含む多くの細胞型によって分泌される。これらは、マクロファージ及びNK細胞の両方を刺激して、抗ウイルス応答を誘発し、また、腫瘍に対して活性である。形質細胞様樹状細胞は、Toll様受容体(TLR)活性化に応答したI型IFNの最も強力な産生者であると同定され、よって、例えば、TLR-7、8及び/又は9は、天然IFN産生細胞と呼ばれてきた。

【0021】

インターフェロンガンマ(IFN- γ)は、インターフェロンのII型クラスの唯一のメンバーである二量体形成された可溶性サイトカインである。IFN- γ は、ウイルス、一部の細菌及び原生動物感染に対する自然及び適応免疫に重大な意味を持つ。IFN- γ は、マクロファージの重要な活性化因子及びクラスII主要組織適合遺伝子複合体(MHC)分子発現の誘導因子である。異常なIFN- γ 発現は、多数の自己炎症性及び自己免疫性疾患に関連付けられる。免疫系におけるIFN- γ の重要性は、一部には、直接的にウイルス複製を阻害するその能力

に、最も重要なことには、その免疫賦活性及び免疫調節性効果に端を発する。IFN- γ は、自然免疫応答の一部として、マクロファージ、ナチュラルキラー(NK)及びナチュラルキラーT細胞(NKT)によって、また、抗原特異的免疫が発生したら、CD4+Th1及びCD8+細胞傷害性Tリンパ球エフェクターT細胞(CTL)によって主に産生される。

【0022】

C-X-Cモチーフケモカイン10(CXCL10)又は小型の誘導性サイトカインB10としても公知のインターフェロンガンマ誘導性タンパク質10(IP-10)は、例えば、IFN- γ に応答していくつかの細胞型によって分泌される、CXCケモカインファミリーに属する小型のサイトカインである。そのような細胞型は、マクロファージ、樹状細胞、単球、内皮細胞及び線維芽細胞を含む。IP-10は、単球/マクロファージ、T細胞、NK細胞及び樹状細胞に対する化学誘引、内皮細胞へのT細胞接着の促進、抗腫瘍活性、並びに骨髄コロニー形成及び血管新生の阻害等、いくつかの役割に起因すると考えられている。

10

【0023】

ある実施形態では、免疫学的反応の測定は、分子に特異的に結合する標識されたりガンド、例えば、核酸にハイブリダイズする標識された核酸プローブ、及び/又はサイトカイン等のペプチドに特異的に結合する標識抗体若しくはその断片/誘導体の使用を伴う。

【0024】

本発明によると、核酸の存在又は量の測定は、ハイブリダイゼーション又は核酸増幅技法を伴う方法等、公知核酸検出方法を使用して実行することができる。一実施形態では、RT-PCR又はノーザンブロット解析を使用して、mRNA転写物が検出される、又はその含量が決定される。斯かる核酸検出方法は、核酸にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドの使用を伴うことができる。適したオリゴヌクレオチドは典型的には、5~数百ヌクレオチドの長さ、より典型的には、約20~70ヌクレオチドの長さ又はより短く、更により典型的には、約10~30ヌクレオチドの長さに変動する。

20

【0025】

本発明によると、サイトカイン等のペプチドの存在又は量の測定は、ペプチドに特異的に結合する抗体を使用した免疫検出が挙げられるがこれらに限定されない、多数の方法で実行することができる。ペプチドを検出するために抗体を使用するための方法は、周知であり、ELISA、競合的結合アッセイその他を含む。一般に、斯かるアッセイは、検出をもたらす標識、例えば、指標酵素、放射標識、フルオロフォア又は常磁性粒子に直接的又は間接的に結合された、ペプチドに特異的に結合する抗体又は抗体断片を使用する。

30

【0026】

本発明によると、免疫学的反応が、細胞成長若しくはその欠如、又は細胞の分化状況の変化を測定することにより検出される場合、斯かる測定は、細胞数の計数、又は細胞増殖を決定するための細胞DNAへの³H取り込みの測定が挙げられるがこれらに限定されない、多数の方法で実行することができる。分化の変化は、特定の分化状況に関連する細胞タンパク質の発現の変化を観察することにより、又は特定の分化状況に関連する細胞の視覚的表現型の変化を観察することにより測定することができる。追加的な方法は、当該技術分野で公知であり、本明細書における方法において容易に使用することができる。

40

【0027】

本方法のある実施形態では、少なくとも1種の免疫学的反応が測定される、又は2種以上の免疫学的反応が測定される、又は3、4、5、6、7、8、9、10種以上の免疫学的反応が測定される。

【0028】

本方法のある特定の実施形態では、免疫療法剤の複数の異なる用量は、2、3、4、5、6、7、8、9、10又は10を超える異なる用量であり得る。更に、免疫療法剤の複数の異なる用量は、用量漸増、好ましくは、線形又は対数用量漸増、例えば、1、2、3、4、5等、又は1、3、9、27、81、243等、又は0.1、1、10、100、1000等を表すことができる。一実施形態では、工程(a)及び(b)は、逐次行われる。好ましくは、工程(b)は、工程(a)の2~48時間後に、好ましくは、工程(a)の4~24時間後に行われる。

50

【0029】

好まれる一実施形態では、本方法の工程(a)(免疫療法剤の複数の異なる用量を個体の免疫反応性材料と別々に接触させる工程)は、in vivoで実行され、別々の投与工程において免疫療法剤の複数の異なる用量を個体の免疫反応性材料と別々に接触させる工程によって特徴付けられ、それぞれは、個体への免疫療法剤の1用量の投与によって特徴付けられる。別々の投与工程は、その後に実行することができ、7~28日間の間等、2~30日間の間の時間間隔によって互いに隔てられ、好ましくは、7日間、14日間、21日間又は28日間だけ隔てられ、より好ましくは、7日間又は14日間だけ隔てられている。好ましくは、少なくとも1種の免疫学的反応の測定は、別々の投与工程のそれぞれの後に別々に実行される。一実施形態では、別々の投与工程は、例えば、皮膚に複数の異なる用量を実質的に同時に投与することにより、実質的に同時に実行することができる。本実施形態では、測定される免疫学的反応は、例えば、視覚的に検出され得る接触性皮膚炎であり得る。

10

【0030】

多くの種類の免疫療法剤が、治療効果をもたらすように患者に与えられてきており、斯かる知識を考慮して、治療効果をもたらす斯かる種類の免疫療法剤のための標準用量又は標準用量範囲が公知である。斯かる標準用量又は用量の範囲が公知の場合、工程(a)において接触される複数の異なる用量は、好ましくは、標準用量若しくは範囲を下回る用量、及び/又は標準用量範囲内にある用量、及び/又は標準用量若しくは範囲を超える用量を含むであろう。例えば、個体にがんワクチンとして与えられるRNA分子の標準用量範囲が、5~100 µgの間である場合、工程(a)において接触される例示的な複数の異なる用量は、2 µg、10 µg及び150 µgであり得る。標準用量又は用量の範囲が、特定の種類の免疫療法薬に関して公知でない場合、同様の種類の免疫療法薬に関する公知用量若しくは用量の範囲を本発明の方法において用いることができる、又は標準用量若しくは用量の範囲を経験的に決定し、次いで、個体にとっての免疫療法剤の適した用量を決定するために本発明に従って適用することができる。

20

【0031】

ある実施形態では、複数の異なる用量は、免疫療法剤のための標準用量範囲を下回る少なくとも1用量を含む。ある実施形態では、複数の異なる用量は、免疫療法剤のための標準用量範囲内にある少なくとも1用量を含む。ある実施形態では、別々の投与工程の第1の投与工程は、免疫療法剤のための標準用量を下回る免疫療法剤の用量の投与によって特徴付けられ、別々の投与工程におけるその後の投与工程において投与される用量は、任意選択で、別々の投与工程の第1の投与工程において投与される用量よりも高い。

30

【0032】

ある実施形態では、接触工程が、in vitroで行われる場合、免疫療法剤のための標準用量又は用量の範囲は、in vivoにおける同じ免疫療法剤のための標準用量と同等であることが公知のものである。斯かる同等性は、当該技術分野で公知である、又は当該技術分野で公知の方法を使用して決定することができる。一実施形態では、標準用量は、in vivoで投与(接触)された場合と同じものであり得るが、例えば、in vitroで使用される免疫反応性材料の量(例えば、免疫細胞の数)によって、及び/又はin vivoでの接触と比較された免疫反応性材料の容量によって調整することができる。ある実施形態では、in vitroでの接触のための標準用量は、血液若しくはリンパ液1ml当たりの、又は公知標準用量が個体に投与される場合の個体において観察される特異的な種類の免疫細胞の数当たりの免疫療法剤の量/濃度と同じである。ある実施形態では、標準「in vitro」用量は、標準「in vivo」用量が個体に投与される場合に全血において達成される免疫療法剤の濃度と同等である。例えば、1mg/kgの標準用量が、全血における10 µg/mlの免疫療法剤の濃度をもたらす場合、in vivo標準用量における1mg/kgのin vitroでの同等標準用量は、免疫反応性材料が全血であれば10 µg/mlである。

40

【0033】

本発明の方法は、望まれない免疫学的反応、例えば、高すぎる若しくは低すぎるレベルのサイトカイン発現等、少なくとも1種の望まれない反応、又は免疫反応性材料と免疫療

50

法剤との接触に起因する、例えば、個体への免疫療法剤の投与に起因する臓器毒性等、副作用若しくは有害事象若しくは反応の有無を検出するための工程を更に含むことができる。この工程は、*in vitro*であれ*in vivo*であれ、免疫反応性材料と免疫療法剤とを接触させる工程それぞれの後に実行することができる。一実施形態では、達成されるべき治療効果が、特異的な種類の細胞の量の低下である場合、望まれない反応は、サイトカインの発現増加であり得、この発現増加は、治療的となる免疫療法剤の能力を低減させることが公知である。副作用は、接触工程が*in vivo*で実行される場合に検出され得る望まれない反応のサブセットであり、重症度において変動し得る、個体にとってのあるレベルの不快感を反映する望まれない反応である。より重篤な副作用は、許容できない副作用と本明細書において命名されている。例示的な副作用として、錯感覚、疲労、頭痛、筋肉痛、胸部圧迫若しくは胸の痛み、振戦、昇温若しくは発熱、耳鳴、関節痛、眩暈、発汗、筋緊張低下及び/又は頻拍が挙げられるがこれらに限定されない。例示的な許容できない副作用は、臓器不全を最終的にもたらし得る全身性炎症応答症候群等、個体の生命を脅かすものであり得る。

10

【0034】

ある実施形態では、少なくとも1種の副作用が、複数の異なる用量のうち1用量の投与後に検出される場合、その後の全用量は、少なくとも1種の抗毒剤と共に投与することができる。ある実施形態では、少なくとも1種の許容できない副作用が、複数の異なる用量のうち1用量の投与後に検出される場合、その後の全用量は、少なくとも1種の抗毒剤と共に投与されるであろう。その後の用量は、少なくとも1種の抗毒剤の投与を誘発した許容できない又は許容できない副作用を引き起こした用量と同一であっても又はそれよりも低くてもよい。用量が、抗毒剤の非存在下で許容できる又は許容できない副作用を引き起こすが、抗毒剤の存在下で投与された場合に耐受性を示す場合、続く用量は、より高くすることができるが、抗毒剤の存在下でのみ投与することができる。抗毒剤は、好ましくは、NSAID等の解熱薬、例えば、イブプロフェン、ナプロキセン、ケトプロフェン及びニメスリド；アスピリン、並びにサリチル酸コリン、サリチル酸マグネシウム及びサリチル酸ナトリウム等の関連するサリチル酸塩；パラセタモール(アセトアミノフェン)；メタミゾール；ナブメトン；並びにフェナゾンである。

20

【0035】

ある実施形態では、少なくとも1種の副作用が、少なくとも1種の抗毒剤と共に投与されない複数の異なる用量のうち1用量の投与後に検出される場合、その後に投与されるべき免疫療法剤の次の用量は、以前の投与工程において投与された用量と同一又はそれ未満である。好ましくは、少なくとも1種の望まれない反応が、許容できない副作用である場合、その後に投与されるべき免疫療法剤の次の用量は、以前の投与工程において投与された用量未満である。以前の投与工程の直後の、その後の投与工程は、工程から工程への用量漸増スキームを任意選択で表す1回又は複数の更なる投与工程が更に続くことができる。

30

【0036】

ある実施形態では、少なくとも1種の副作用が、少なくとも1種の抗毒剤と共に投与される複数の異なる用量のうち1用量の投与後に検出される場合、その後に投与されるべき免疫療法剤の次の用量は、以前の投与工程において投与された用量未満である。

40

【0037】

ある実施形態では、副作用が、複数の異なる用量のいずれの投与後にも検出されない場合、少なくとも1種の免疫学的反応が許容される治療効果を示す用量は、個体への免疫療法剤の投与に適した用量を反映する。ある実施形態では、2以上の用量が、適した用量であると決定される場合、少なくとも1種の免疫学的反応が許容される治療効果の最も強い徴候をもたらす用量は、個体に投与される免疫療法剤の用量である。許容される治療効果の最も強い徴候は、測定されている免疫学的反応に依存するであろう。例えば、最も強い徴候は、サイトカインの発現が、投与される複数の異なる用量の間で観察される最大又は最小である場合であり得る。許容される治療効果をもたらす投与される最高用量は、必ずしも許容される治療効果の最も強い徴候をもたらされる同じ用量ではない。

50

【0038】

ある実施形態では、少なくとも1種の副作用が、複数の異なる用量のいずれかの投与後に検出される場合、少なくとも1種の抗毒剤と共に投与されるその後の投与工程における用量であって、少なくとも1種の免疫学的反応が、免疫療法剤のための許容される治療効果を示す用量は、個体への免疫療法剤の投与に適した用量を反映する。本実施形態の態様では、副作用が、少なくとも1種の抗毒剤と共に投与される複数の異なる用量のいずれの投与後にも検出されない場合、少なくとも1種の免疫学的反応が許容される治療効果の最も強い徴候をもたらす用量は、個体への免疫療法剤の投与に適した用量である。本態様は、抗毒剤と共に投与されるこれらの用量では副作用が検出されないため、適した用量である複数の異なる用量が存在する状況に関係する。許容される治療効果の最も強い徴候は、測定されている免疫学的反応に依存するであろう。例えば、最も強い徴候は、サイトカインの発現が、少なくとも1種の抗毒剤と共に投与される複数の異なる用量の間で観察される最大又は最小である場合であり得る。副作用が検出されない少なくとも1種の抗毒剤と共に投与される最高用量は、必ずしも許容される治療効果の最も強い徴候をもたらされる同じ用量ではない。本実施形態の別の態様では、少なくとも1種の副作用が、少なくとも1種の抗毒剤と共に投与された複数の異なる用量のいずれかの投与後に検出される場合、副作用が検出されない又は重篤さが最小である又は疾患の重症度を踏まえて他の面で許容されると考慮される最高用量は、個体への免疫療法剤の投与に適した用量である。本態様は、少なくとも1種の抗毒剤と共に投与される用量のいくつかが副作用をもたらす、又は少なくとも1種の抗毒剤と共に投与される全用量により副作用が検出される状況に関係する。よって、適した用量は、治療有効であり、副作用が検出されない、又は副作用の重篤さが最小である、又は副作用が疾患の重症度を踏まえて他の面で許容されると考慮される用量である。

10

20

【0039】

本発明によると、特定の個体のための特定の免疫療法剤に適した用量であると決定される用量は、該免疫療法剤のための個体において許容される、好ましくは最適な治療効果を示すことが公知の少なくとも1種の免疫学的反応が、個体への免疫療法剤の投与に適した用量を反映する用量である。好ましくは、適した用量は、少なくとも1種の抗毒剤と共に投与されるのであれ投与されないののであれ、個体における最小限の望まれない反応又は副作用ももたらす。ある実施形態では、免疫反応性材料と免疫療法剤とを接触させる工程が、*in vivo*で行われる場合、少なくとも1種の免疫学的反応が、許容される治療効果を示す用量は、直接的に適した用量を反映する、即ち、個体への免疫療法剤の投与に適した用量は、免疫反応性材料と接触される複数の異なる用量のうち1又は複数と同じ又は同様のものになるであろう。ある実施形態では、免疫反応性材料と免疫療法剤とを接触させる工程が、*in vitro*で行われる場合、*in vitro*方法で使用される複数の異なる用量は、必ずしも許容される治療効果をもたらすであろう個体に投与されるであろうものと同じものではない。よって、少なくとも1種の免疫学的反応が、*in vitro*での許容される治療効果を示す用量は、間接的に適した用量を反映することができる。*in vitro*で接触される用量及びその同等*in vivo*用量の間の関係性は、公知である、又は当該技術分野で公知の方法を使用して決定することができる、のいずれかである。例えば、*in vitro*で接触される免疫療法剤の用量が、接触されている免疫細胞の数と比べた量(例えば、 $10\text{ng}/10^8$ 細胞)である場合、同等*in vivo*用量は、同じ数の同じ免疫細胞($10\text{ng}/10^8$ 個の同じ細胞)と比べた、血液中の同じ又は同様の量の免疫療法剤をもたらす用量である。

30

40

【0040】

治療効果は、免疫療法剤によってもたらされることが予想される治療効果に依存するであろう。一実施形態では、許容される治療効果として、疾患の進行の抑止又は緩徐化;個体における新たな疾患の発症の阻害又は緩徐化;症状の頻度若しくは重症度及び/又は疾患を現在有する若しくは以前有した個体における再発の減少;及び/又は個体の寿命の延長、即ち、増加が挙げられるがこれらに限定されない。一実施形態では、例示的な最適な治療効果は、更なる処置が要求されないような、疾患が排除された治療効果である。ある実施

50

形態では、疾患ががんである場合、許容される治療効果は、少なくとも腫瘍のサイズ及び/又は数が増加されない治療効果、好ましくは腫瘍のサイズ及び/又は数が減少される治療効果であり、最適な治療効果は、ありとあらゆる腫瘍の完全消失となり、免疫療法剤の更なる投与が要求されない治療効果となるであろう。

【0041】

少なくとも1種の免疫学的反応又は少なくとも1種の免疫学的反応の特異的变化が、許容される治療効果を示すことが決定された場合、同じ反応又はその変化をもたらす用量は、用量が、許容される治療効果をもたらすのに適した用量であることを示す。更に、少なくとも1種の免疫学的反応又はその変化の強さ又は弱さは、該用量における治療効果の強さ又は弱さを示すこともできる。多くの免疫療法剤に対する少なくとも1種の免疫学的反応及び治療効果の間の相関は公知である。更に、斯かる相関は、当該技術分野で公知の方法を使用して決定することができる。例えば、少なくとも1種の免疫学的反応は、治療効果、好ましくは、許容される治療効果をもたらした用量の免疫療法剤が投与された1種又は複数の個体において測定することができ、個体の間に一貫して観察される少なくとも1種の免疫学的反応は、免疫療法剤に対する治療効果、好ましくは、許容される治療効果を示す。例えば、許容される治療効果をもたらす免疫療法剤の用量が、3種の異なるサイトカインの発現の増加及びある特定の種類の免疫細胞からより成熟した免疫細胞への分化と一貫して相関する場合、3種の異なるサイトカインの発現の増加及び免疫細胞の分化は、許容される治療効果を示す免疫学的反応である。斯かる様式において、任意の免疫療法剤に対する治療効果を示す、免疫学的反応のセット又は「パラメータのセット」を決定することができる。本発明のある実施形態では、免疫療法剤に対する許容される治療効果を示す免疫学的反応の公知セットが、免疫療法剤の用量が投与された個体において観察されるものと同じ又は実質的に同じものである場合、投与される用量は、個体への免疫療法剤の投与に適した用量を反映する。

【0042】

本発明の例示的な実施形態として、(i)特定の免疫療法剤に対する許容される治療効果が、特定のサイトカインの発現の最高レベルによって示されることが公知である場合、個体に適した用量は、該特定のサイトカインの発現の最高レベルをもたらす用量によって反映される、又は(ii)特定の免疫療法剤に対する許容される治療効果が、特定のサイトカインの発現の最低レベルによって示されることが公知である場合、個体に適した用量は、該特定のサイトカインの発現の最低レベルをもたらす用量によって反映される、又は(iii)特定の免疫療法剤に対する許容される治療効果が、特定のサイトカインの発現の誘導によって示されることが公知である場合、個体に適した用量は、該特定のサイトカインの発現の誘導をもたらす用量によって反映される、又は(iv)特定の免疫療法剤に対する許容される治療効果が、複数のサイトカインの特異的発現パターンによって示されることが公知である場合、個体に適した用量は、複数のサイトカインの実質的に同じ特異的発現パターンをもたらす用量によって反映される、又は(v)特定の免疫療法剤に対する許容される治療効果が、特定の免疫細胞の分化の誘導によって示されることが公知である場合、個体に適した用量は、特定の免疫細胞の分化の同じ若しくは同様の誘導をもたらす用量によって反映される、又は(vi)特定の免疫療法剤に対する許容される治療効果が、免疫細胞、例えば、T細胞のエフェクター機能の誘導若しくは増強によって示されることが公知である場合、個体に適した用量は、免疫細胞のエフェクター機能の同じ若しくは同様の誘導若しくは増強をもたらす用量によって反映される、実施形態が挙げられるがこれらに限定されない。

【0043】

本発明は、更に、免疫療法剤の適した用量で個体を処置する方法であって、本発明の方法に従って適することが決定された用量の免疫療法剤を個体に投与する工程を含む方法に関する。好ましくは、免疫療法剤は、TLRアゴニストである。ある実施形態では、免疫療法剤の適した用量で個体を処置する方法は、(a)免疫療法剤の複数の異なる用量を個体の免疫反応性材料と別々に接触させる工程と、(b)免疫療法剤の複数の異なる用量に起因す

る少なくとも1種の免疫学的反応を測定する工程であって、少なくとも1種の免疫学的反応が、免疫療法剤に対する許容される治療効果を示す用量が、個体への投与に適した用量を反映する、工程と、(c)適した用量で免疫療法剤を個体に投与する工程とを含む。ある実施形態では、免疫療法剤の適した用量で個体を処置する方法は、適した用量で免疫療法剤を個体に投与する工程であって、適した用量が、(a)免疫療法剤の複数の異なる用量を個体の免疫反応性材料と別々に接触させる工程と、(b)免疫療法剤の複数の異なる用量に起因する少なくとも1種の免疫学的反応を測定する工程とによって決定され、少なくとも1種の免疫学的反応が、免疫療法剤に対する許容される治療効果を示す用量が、個体への投与に適した用量を反映する、工程を含む。

【0044】

10

ある実施形態では、免疫療法剤の適した用量は、少なくとも1種の抗毒剤と共に投与される。本実施形態は、免疫療法剤の適した用量が、少なくとも1種の抗毒剤の投与なしでは少なくとも1種の副作用が検出される用量である場合である。

【0045】

好まれる実施形態では、本方法は、がんを処置するための免疫療法の方法であり、免疫療法剤は、がん細胞において特異的に発現される1種又は複数のエピトープをコードする核酸、好ましくは、一本鎖RNAである。好ましくは、1種又は複数のエピトープは、ネオエピトープである。

【0046】

本発明の他の特長及び利点は、以下の詳細な説明及び特許請求の範囲から明らかであろう。

20

【発明を実施するための形態】

【0047】

本発明を以下に詳述するが、方法、プロトコル及び試薬は変動し得るため、本発明は本明細書中に記載の特定の方法、プロトコル及び試薬に限定されないことを理解されたい。また、本明細書中で使用する用語は特定の実施形態を説明する目的のみのものであり、添付の特許請求の範囲によってのみ限定される本発明の範囲を限定することを意図しないことも理解されたい。別段に定義しない限りは、本明細書中で使用する全ての技術用語及び科学用語は、当業者によって一般的に理解されるものと同じ意味を有する。

【0048】

30

以下に本発明の要素を記載する。これらの要素は具体的な実施形態を用いて記載するが、これらを任意の様式及び任意の数で組み合わせる追加の実施形態を作製し得ることを理解されたい。様々に記載した好ましい実施形態は、本発明を明白に記載した実施形態のみに限定すると解釈されるべきでない。この記載は、明白に記載した実施形態を任意の数の開示した及び/又は好ましい要素と組み合わせる実施形態を支援及び包含すると理解されたい。更に、内容により別段に示される場合以外は、本出願中の全ての記載した要素の任意の順列及び組合せが、本出願の説明によって開示されているとみなされるべきである。

【0049】

好ましくは、本明細書中で使用する用語は、「A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)」、H. G. W. Leuenberger、B. Nagel、及びH. Kolbl編、(1995) Helvetica Chimica Acta、CH-4010、スイス、Baselに記載されている通りに定義する。

40

【0050】

別段に指定しない限りは、本発明の実施には当分野の文献(例えばMolecular Cloning: A Laboratory Manual、第4版、M.R. Green、J. Sambrookら編、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor 2012を参照)に記載されている生化学、細胞生物学、免疫学、及び組換えDNA技法の慣用方法を用いる。

【0051】

内容により別段に要する場合以外は、本明細書全体及び続く特許請求の範囲全体にわたって、単語「含む(comprise)」、並びに「含む(comprises)」及び「含むこと(comprising)

50

)」等の変形は、記述したメンバー、整数若しくはステップ又はメンバー、整数若しくはステップの群の包含を暗示するが、任意の他のメンバー、整数若しくはステップ又はメンバー、整数若しくはステップの群を排除せず、但し、一部の実施形態では、そのような他のメンバー、整数若しくはステップ又はメンバー、整数若しくはステップの群を排除し得る、即ち、対象が記述したメンバー、整数若しくはステップ又はメンバー、整数若しくはステップの群の包含からなると理解されたい。用語「a」及び「an」及び「the」並びに本発明の記載との関連で(特に特許請求の範囲との関連で)で使用する同様の言及は、本明細書中に別段に指定しない又は内容により明らかに矛盾しない限りは、単数形及び複数形をどちらもカバーすると解釈されたい。本明細書中の値の範囲の列挙は、範囲内のそれぞれの別々の値を個々に言及する省略方法としての役割を果たすことのみを意図する。本明細書中で別段に指定しない限りは、それぞれの個々の値は、本明細書中で個々に列挙されているかのように、本明細書中に組み込まれている。

10

【0052】

本明細書中に記載の全ての方法は、本明細書中で別段に指定しない又は内容により明らかに矛盾しない限りは、任意の適切な順序で行うことができる。

【0053】

本明細書中で提供する任意且つ全ての例、又は例示的な言葉(例えば「等(such as)」)の使用は、本発明をより良好に例示することのみを意図し、他の箇所の特許請求の範囲に記載した本発明の範囲に対する限定を提示しない。本明細書中のいかなる言葉も、本発明の実施に必須である任意の非特許請求要素を示すと解釈されるべきでない。

20

【0054】

いくつかの文書が本明細書の本文全体にわたって引用されている。本明細書中で引用した文書のそれぞれ(全ての特許、特許出願、科学的出版物、製造者の仕様書、指示書等が含まれる)は、上記であるか下記であるかにかかわらず、その全体で本明細書中に参考として組み込まれている。本明細書中にいかなるものも、先行発明に基づいて本発明がそのような開示に先行する権利を有さないという承認として解釈されるべきでない。

【0055】

本発明は、免疫療法剤の適した用量を投与することによる疾患の免疫療法を想定し、この適した用量は、本明細書に記載されている方法によって決定される。免疫療法剤の有効性は、その免疫系に関して個体間の天然の変動に依存するであろうから、適した治療有効で、好ましくは無毒性の用量は、患者毎に個々に決定される必要がある。好まれる実施形態では、免疫療法剤は、がんを処置するためのものである。好まれる実施形態では、免疫療法は、活性な免疫療法の方法によってもたらされ得る。

30

【0056】

本発明は、特に、個体に適した用量の免疫療法剤の決定を対象にする。斯かる適した用量が同定されたら、特異的標的に対する免疫応答等、免疫学的反応を誘導するために、該用量で免疫療法剤を個体に投与することができる。好まれる実施形態では、免疫応答は、エピトープを発現する罹患細胞の死をもたらす、T細胞受容体又は人工T細胞受容体等の適切な抗原受容体を介して腫瘍細胞において発現されたエピトープを認識するT細胞等の適切なエフェクター細胞の誘導及び/又は活性化である。

40

【0057】

本発明内に包含される免疫療法アプローチは、エピトープを含有するペプチド又はポリペプチド、ii)エピトープを含有するペプチド又はポリペプチドをコードする核酸、及びi ii)エピトープを含有するペプチド又はポリペプチドをコードする組換えウイルスによる免疫化を含む。

【0058】

樹状細胞(DC)は、MHCクラスII及びI抗原提示経路の両方を介して、T細胞に対して末梢組織において捕捉された抗原を提示する白血球集団である。DCは、免疫応答の強力な誘導因子であり、このような細胞の活性化は、抗腫瘍免疫の誘導に重大な意味を持つ工程であることが周知である。樹状細胞は、2種の十分に特徴付けされた表現型の間を判別する単

50

純な方法として使用することができる、「未成熟」及び「成熟」細胞として簡便にカテゴリー化される。しかし、この命名法は、分化のあらゆる可能な中間ステージを除外するものと解釈するべきではない。未成熟樹状細胞は、Fcγ受容体及びマンノース受容体の高発現と相関する、抗原取り込み及びプロセッシングのための高い能力を有する抗原提示細胞として特徴付けられる。成熟表現型は典型的に、これらのマーカーのより低い発現、但し、クラスI及びクラスII MHC、接着分子(例えば、CD54及びCD11)並びに共刺激分子(例えば、CD40、CD80、CD86及び4-1 BB)等、T細胞活性化の原因となる細胞表面分子の高発現によって特徴付けられる。DC成熟は、斯かる抗原提示DCがT細胞プライミングをもたらす、DC活性化の状態と称されるが、未成熟DCによるその提示は、寛容をもたらす。DC成熟は主に、自然受容体(パターン認識受容体)炎症誘発性サイトカイン(TNF、IL-1、IFN)によって検出される微生物特色(細菌DNA、ウイルスRNA、エンドトキシン等)を有する生体分子、CD40LによるDC表面におけるCD40のライゲーション、及びストレス性細胞死を起こす細胞から放出される物質に起因する。DCは、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)及びIL-4等のサイトカインと共に、in vitroで骨髓細胞、及びパフィーコート又は全血に由来する細胞を培養することによって得ることができる。

10

【0059】

好まれる免疫療法剤は、免疫反応性ペプチド又は1種若しくは複数の斯かるペプチドをコードする核酸であり、このペプチドは、疾患特異的突然変異に起因するエピトープ、好ましくは、ネオエピトープを含むことができる。用語「疾患特異的突然変異」は、本発明の文脈において、罹患細胞の核酸に存在するが、対応する正常な罹患していない細胞の核酸には存在しない体細胞突然変異に関する。疾患は癌であり得るため、用語「腫瘍特異的突然変異」又は「癌特異的突然変異」は、腫瘍又は癌細胞の核酸に存在するが、対応する正常な、即ち、非腫瘍性又は非癌性細胞の核酸には存在しない体細胞突然変異に関する。用語「腫瘍特異的突然変異」及び「腫瘍突然変異」並びに用語「癌特異的突然変異」及び「癌突然変異」は、本明細書において互換的に使用される。

20

【0060】

免疫療法剤が抗原又は前記抗原をコードする核酸である実施形態では、「細胞免疫応答」、「細胞応答」、「抗原に対する細胞応答」又は同様の用語は、クラスI又はクラスII MHCを有する抗原の提示によって特徴付けられる細胞に対する細胞免疫学的応答を含むことを意味する。細胞性応答は、「ヘルパー」又は「キラー」のいずれかとして作用するT細胞又はTリンパ球と呼ばれる細胞に関する。ヘルパーT細胞(CD4⁺T細胞とも呼ばれる)は免疫応答を調節することによって中心的な役割を果たし、キラー細胞(細胞毒性T細胞、細胞溶解性T細胞、CD8⁺T細胞又はCTLとも呼ばれる)は癌細胞等の疾患細胞を死滅させ、更なる疾患細胞の産生を防止する。好ましくは、抗腫瘍CTL応答は、1種又は複数の腫瘍発現抗原を発現し、好ましくは、クラスI MHCを有する腫瘍発現抗原を提示する腫瘍細胞に対し刺激される。

30

【0061】

本発明による「抗原」は、抗体若しくはTリンパ球(T細胞)との特異的応答等、免疫応答の標的である、及び/又はこれを誘導するいずれかの物質、好ましくは、ペプチド又はタンパク質をカバーする。好ましくは、抗原は、T細胞エピトープ等、少なくとも1つのエピトープを含む。好ましくは、本抗原は、発明との関連において、任意選択でプロセッシング後に、好ましくは抗原(抗原を発現する細胞が含まれる)に特異的である免疫反応を誘導する分子である。抗原又はそのT細胞エピトープは、抗原(抗原を発現する細胞を含む)に対する免疫応答をもたらす、MHC分子の文脈において、疾患細胞、特に癌細胞を含む、好ましくは細胞、好ましくは抗原提示細胞によって提示される。抗原は、好ましくは、天然起源の抗原に対応する又はこれに由来する産物である。斯かる天然起源の抗原は、アレルゲン、ウイルス、細菌、真菌、寄生生物並びに他の感染病原体及び病原体を含むことができる若しくはこれに由来することができる、又は抗原は、腫瘍抗原であってもよい。本発明によれば、抗原は、天然起源の産物、例えば、ウイルスタンパク質又はその部分に対応することができる。好ましい実施形態では、抗原は、表面ポリペプチド、即ち、細胞、病原

40

50

体、細菌、ウイルス、真菌、寄生生物、アレルゲン又は腫瘍の表面に天然にディスプレイされるポリペプチドである。抗原は、細胞、病原体、細菌、ウイルス、真菌、寄生生物、アレルゲン又は腫瘍に対する免疫応答を誘発することができる。

【0062】

用語「疾患関連抗原」又は「疾患特異的抗原」は、疾患に関連する又はこれに特異的ないずれかの抗原を指すようにその最も広義で使用される。斯かる抗原は、宿主の免疫系を刺激して、疾患に対する細胞性抗原特異的免疫応答及び/又は液性抗体応答を生じるであろうエピトープを含有する分子である。したがって、疾患関連抗原を治療目的で 사용할ことができる。疾患関連抗原は、好ましくは、微生物による感染、典型的には微生物抗原に関連する、又は癌、典型的には腫瘍に関連する。

10

【0063】

用語「病原体」は、生物、好ましくは、脊椎動物の生物において疾患を引き起こすことができる病原性生物学的材料を指す。病原体は、細菌、単細胞性真核生物(原生動物)、真菌等の微生物と共にウイルスを含む。

【0064】

本発明の文脈において、用語「腫瘍抗原」又は「腫瘍関連抗原」は、正常条件下で、限定された数の組織及び/又は器官において、又は特異的発生段階で特異的に発現されるタンパク質に関し、例えば、腫瘍抗原は、正常条件下で、胃組織、好ましくは胃粘膜、生殖器、例えば精巣、栄養膜組織、例えば胎盤又は生殖系列細胞において特異的に発現され得、1種又は複数の腫瘍又は癌組織において発現又は異常に発現される。この関連において、「限定された数」とは、好ましくは3つ以下、より好ましくは2つ以下を意味する。本発明との関連において、腫瘍抗原には、例えば、分化抗原、好ましくは細胞種特異的分化抗原、即ち正常状態下では特定の細胞種中で特定の分化段階において特異的に発現されるタンパク質、癌/精巣抗原、即ち正常状態下では精巣中及び場合によっては胎盤中で特異的に発現されるタンパク質、並びに生殖系列特異的抗原が含まれる。本発明の文脈において、腫瘍抗原は、好ましくは、癌細胞の細胞表面に関連し、好ましくは、正常組織において発現されない又はごく稀にしか発現されない。好ましくは、腫瘍抗原又は腫瘍抗原の異常な発現が癌細胞を同定する。本発明の文脈において、対象、例えば、がん疾患を患う患者におけるがん細胞によって発現される腫瘍抗原は、自己タンパク質又は非自己タンパク質であり得る。好まれる実施形態では、本発明の文脈における腫瘍抗原は、正常条件下で特異的にがん性組織において、又は非必須の組織若しくは臓器、即ち、免疫系によって損傷されても対象の死亡をもたらさない組織若しくは臓器において、又は免疫系が到達不能な若しくはほぼ到達不能な、若しくは寛容機構により、例えば高濃度の T_{reg} 細胞の存在により保護されている臓器若しくは身体構造において発現される。腫瘍抗原のアミノ酸配列は、正常組織において発現される腫瘍抗原と、がん組織において発現される腫瘍抗原との間で同一であり得る、又はアミノ酸配列は、例えば、単一アミノ酸のみが、又は2個以上のアミノ酸が、好ましくは2、3、4、5、6、7、8、9若しくは10個を超えるアミノ酸が異なり得る。用語「腫瘍抗原」、「腫瘍発現抗原」、「癌抗原」及び「癌で発現される抗原」は均等物であり、本明細書中で互換性があるように使用される。

20

30

【0065】

用語「エピトープ」、「抗原ペプチド」、「抗原エピトープ」、「免疫原性ペプチド」及び「MHC結合ペプチド」は、本明細書において互換的に使用されており、抗原等の分子における抗原決定基、即ち、免疫系によって認識される、例えば、特に、MHC分子の文脈で提示されたときにT細胞によって認識される免疫学的に活性な化合物の部分又は断片を指す。タンパク質のエピトープは、好ましくは前記タンパク質の連続的又は不連続的な一部分を含み、好ましくは5~100、好ましくは5~50、より好ましくは8~30、最も好ましくは10~25個のアミノ酸の長さである。例えば、エピトープは、好ましくは8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、又は25個のアミノ酸の長さであり得る。本発明によれば、エピトープは、細胞の表面におけるMHC分子等、MHC分子に結合することができるため、「MHC結合ペプチド」又は「抗原ペプチド」であり得る。用語「

40

50

主要組織適合抗原複合体」及び略語「MHC」は、MHCクラスI及びMHCクラスII分子を含み、あらゆる脊椎動物に存在する遺伝子の複合体に関する。MHCタンパク質又は分子は、免疫反応におけるリンパ球及び抗原提示細胞又は罹患細胞の間のシグナリングに重要であり、MHCタンパク質又は分子は、ペプチドに結合し、これをT細胞受容体による認識のために提示する。MHCによってコードされるタンパク質は、細胞の表面に発現され、T細胞に対して自己抗原(細胞それ自体に由来するペプチド断片)及び非自己抗原(例えば、侵入微生物の断片)の両方をディスプレイする。好ましい斯かる免疫原性部分は、MHCクラスI又はクラスII分子に結合する。本明細書中で使用する場合、当該技術分野で公知のいずれかのアッセイを使用して結合が検出可能である場合、免疫原性部分は、MHCクラスI又はクラスII分子「に結合する」と言われる。用語「MHC結合ペプチド」は、MHCクラスI及び/又はMHCクラスII分子に結合するペプチドに関する。クラスI MHC/ペプチド複合体の場合、結合ペプチドは、典型的に8~10アミノ酸長であるが、より長い又は短いペプチドが有効となる場合もある。クラスII MHC/ペプチド複合体の場合、結合ペプチドは、典型的に10~25アミノ酸長、特に13~18アミノ酸長であるが、より長い及び短いペプチドが有効な場合もある。

10

【0066】

本明細書中で使用する場合、用語「ネオエピトープ」は、正常非癌性又は生殖系列細胞等の参照には存在しないが、癌細胞等の罹患細胞に見出されるエピトープを指す。これには、特に、正常な非癌細胞又は生殖系列細胞中に対応するエピトープが見つかるが、癌細胞中の1つ又は複数の突然変異が原因でエピトープの配列が変化することによってネオエピトープを生じるような状況が含まれる。更に、ネオエピトープは、罹患細胞に対して特異的であるのみならず、疾患を有する患者に対して特異的であってもよい。

20

【0067】

本発明の特に好ましい一実施形態では、エピトープ又はネオエピトープは、T細胞エピトープである。本明細書中で使用する場合、用語「T細胞エピトープ」は、T細胞受容体によって認識される立体配置におけるMHC分子に結合するペプチドをいう。典型的には、T細胞エピトープは、抗原提示細胞の表面に提示される。

【0068】

本明細書中で使用する場合、用語「免疫原性アミノ酸修飾の予測」は、斯かるアミノ酸修飾を含むペプチドが、ワクチン接種において免疫原性となるか、したがって、エピトープ、特にT細胞エピトープとして有用となるかに関する予測をいう。

30

【0069】

本発明によれば、T細胞エピトープは、2つ以上のT細胞エピトープを含むワクチン配列及び/又はポリペプチド等、より大きな実体の一部としてワクチン中に存在することができる。提示されたペプチド又はT細胞エピトープは、適したプロセッシング後に産生される。

【0070】

T細胞エピトープは、TCR認識又はMHCへの結合に必須ではない1つ又は複数の残基において修飾することができる。斯かる修飾されたT細胞エピトープは、免疫学的に均等と考慮することができる。

40

【0071】

好ましくは、T細胞エピトープは、MHCによって提示され、T細胞受容体によって認識されると、適切な共刺激シグナルの存在下で、ペプチド/MHC複合体を特異的に認識するT細胞受容体を保有するT細胞のクローン増大を誘導することができる。

【0072】

好ましくは、T細胞エピトープは、抗原の断片のアミノ酸配列に実質的に対応するアミノ酸配列を含む。好ましくは、抗原の前記断片は、MHCクラスI及び/又はクラスII提示ペプチドである。

【0073】

本発明によるT細胞エピトープは、好ましくは、抗原、又は疾患細胞、特に癌細胞等、

50

抗原の発現によって、好ましくは抗原の提示によって特徴付けられる細胞に対する免疫応答、好ましくは細胞性応答を刺激することができる抗原の部分又は断片に関する。好ましくは、T細胞エピトープは、クラスI MHCを有する抗原の提示によって特徴付けられる細胞に対する細胞性応答を刺激することができ、好ましくは、抗原応答性細胞傷害性Tリンパ球(CTL)を刺激することができる。

【0074】

一部の実施形態では、抗原は、自己抗原、特に、腫瘍抗原である。腫瘍抗原及びその決定は、当業者に知られている。

【0075】

用語「免疫原性」は、好ましくは、癌に対する処置等、治療的処置に関連する免疫応答を誘導するための相対的有効性に関する。本明細書中で使用する場合、用語「免疫原性(である)」は、免疫原性を有するという特性に関する。例えば、用語「免疫原性修飾」は、ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質の文脈で使用する場合、前記修飾に起因する及び/又はこれに対して向ける免疫応答を誘導するための、前記ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質の有効性に関する。好ましくは、修飾されていないペプチド、ポリペプチド又はタンパク質は、免疫応答を誘導しない、異なる免疫応答を誘導する、又は異なるレベル、好ましくはより低レベルの免疫応答を誘導する。

10

【0076】

本発明によれば、用語「免疫原性」又は「免疫原性である」は、好ましくは、生物学的に関連性がある免疫応答、特に、ワクチン接種に有用な免疫応答を誘導するための相対的有効性に関する。よって、アミノ酸修飾又は修飾されたペプチドは、対象における標的修飾に対する免疫応答を誘導する場合、免疫原性であり、この免疫応答は、治療又は予防的に有益となることができる。

20

【0077】

「抗原プロセッシング」又は「プロセッシング」とは、ポリペプチド又は抗原の、前記ポリペプチド又は抗原の断片のプロセッシング産物への分解(例えばポリペプチドのペプチドへの分解)、及び、細胞、好ましくは抗原提示細胞による、特異的T細胞に対する提示のための、これらの断片のうちの1つ又は複数とMHC分子との会合(例えば結合による)をいう。

【0078】

ある実施形態では、免疫療法剤は、その細胞表面においてMHC分子と会合してタンパク質抗原のペプチド断片を提示する細胞である抗原提示細胞(APC)を含むことができる。一部のAPCは抗原特異的T細胞を活性化し得る。プロフェッショナル抗原提示細胞は、貪食、飲作用によるか、又は受容体媒介エンドサイトーシスによるかのどちらかで抗原を内部移行し、その後、クラスII MHC分子と結合した抗原の断片をその膜上に表示することに、非常に効率的である。T細胞は抗原提示細胞の膜上の抗原-クラスII MHC分子複合体を認識してそれと相互作用する。その後、更なる共刺激シグナルが抗原提示細胞によって生成され、T細胞の活性化をもたらす。共刺激分子の発現はプロフェッショナル抗原提示細胞の決定的な特長である。プロフェッショナル抗原提示細胞の主な種類は、最も広範囲の抗原提示を有しており恐らく最も重要な抗原提示細胞である樹状細胞、マクロファージ、B-細胞、及び特定の活性上皮細胞である。

30

40

【0079】

非プロフェッショナル抗原提示細胞は、ナイーブCD4⁺T細胞との相互作用に必要なMHCクラスIIタンパク質を構成的に発現しない。これらは、IFN γ 等の特定のサイトカインによる非プロフェッショナル抗原提示細胞の刺激の際にのみ発現される。

【0080】

抗原提示細胞は、提示しようとするペプチドを含むペプチド又はポリペプチドをコードする核酸、好ましくはRNA、例えば、抗原をコードする核酸を細胞に形質導入することにより、MHCクラスI及びクラスII提示ペプチドを負荷することができる。

【0081】

一部の実施形態では、樹状又は他の抗原提示細胞を標的とする遺伝子送達媒体を含む本

50

発明の免疫療法剤を患者に投与し、*in vivo*で起こるトランスフェクションをもたらすことができる。例えば、樹状細胞のインビボ形質移入は、一般に、WO 97/24447号に記載のもの、又はMahviら、*Immunology and cell Biology* 75:456~460頁、1997によって記載されている遺伝子銃手法等の、当技術分野で知られている任意の方法を使用して行い得る。

【0082】

用語「抗原提示細胞」には標的細胞も含まれる。

【0083】

「標的細胞」とは、細胞性免疫応答等の免疫応答の標的である細胞を意味するものとする。標的細胞には、抗原又は抗原エпитープ、即ち抗原に由来するペプチド断片を提示する細胞が含まれ、癌細胞等の全ての望ましくない細胞が含まれる。好ましい実施形態では、標的細胞とは、本明細書中に記載の抗原を発現しており、好ましくはクラスI MHCを用いて前記抗原を提示している細胞である。

10

【0084】

用語「一部分」とは画分をいう。アミノ酸配列又はタンパク質等の特定の構造に関して、用語、その「一部分」は、前記構造の連続的又は不連続的な画分を指定し得る。好ましくは、アミノ酸配列の一部分は、前記アミノ酸配列のアミノ酸のうちの少なくとも1%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、好ましくは少なくとも40%、好ましくは少なくとも50%、より好ましくは少なくとも60%、より好ましくは少なくとも70%、更により好ましくは少なくとも80%、最も好ましくは少なくとも90%を含む。好ましくは、一部分が不連続的な画分である場合、前記不連続的な画分は構造の2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、又はそれより多くの部分から構成され、それぞれの部分は構造の連続的な要素である。例えば、アミノ酸配列の不連続的な画分は、前記アミノ酸配列の2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、又はそれより多く、好ましくは4個以下の部分から構成されていてよく、それぞれの部分は、好ましくはアミノ酸配列の少なくとも5個の連続的なアミノ酸、少なくとも10個の連続的なアミノ酸、好ましくは少なくとも20個の連続的なアミノ酸、好ましくは少なくとも30個の連続的なアミノ酸を含む。

20

【0085】

用語「部分」及び「断片」は本明細書中で互換性があるように使用され、連続的な要素をいう。例えば、アミノ酸配列又はタンパク質等の構造の一部とは、前記構造の連続的な要素をいう。

30

【0086】

構造の一部分、一部又は断片は、好ましくは前記構造の1つ又は複数の機能的特性を含む。例えば、エピトープ、ペプチド又はタンパク質の一部分、一部又は断片は、好ましくはそれが由来するエピトープ、ペプチド又はタンパク質に免疫学的に均等である。本発明との関連において、アミノ酸配列等の構造の「一部」は、構造又はアミノ酸配列全体の少なくとも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85%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも94%、少なくとも96%、少なくとも98%、少なくとも99%を好ましくは含み、好ましくはそれからなる。

【0087】

40

ある実施形態では、免疫療法剤は、免疫反応性細胞であり得る。免疫反応性細胞は、免疫反応においてエフェクター機能を果たす細胞であるという点において、免疫反応性材料に関する。免疫反応性細胞は、好ましくは、抗原、又は抗原若しくは抗原に由来する抗原ペプチドの提示によって特徴付けられる細胞に結合し、免疫応答を媒介することができる。例えば、そのような細胞は、サイトカイン及び/又はケモカインを分泌し、抗体を分泌し、癌細胞を認識し、任意選択でそのような細胞を排除する。例えば、免疫反応性細胞は、T細胞(細胞毒性T細胞、ヘルパーT細胞、腫瘍浸潤性T細胞)、B細胞、ナチュラルキラー細胞、好中球、マクロファージ、及び樹状細胞を含む。好ましくは、本発明の関連において、「免疫反応性細胞」はT細胞、好ましくはCD4⁺及び/又はCD8⁺T細胞である。本発明のある実施形態では、個体の免疫反応性材料は、好ましくは、免疫反応性細胞又は免疫反応

50

性細胞を含む組成物を含むことができる。

【0088】

「免疫反応性細胞」は、特にMHC分子の文脈で抗原提示細胞又は癌細胞等の疾患細胞の表面上等に提示された場合に、抗原又は抗原に由来する抗原ペプチドもある程度の特異性で認識することができる。好ましくは、前記認識は、抗原又は前記抗原に由来する抗原ペプチドを認識する細胞が応答性又は反応性となることを可能にする。細胞が、MHCクラスI分子の文脈において抗原又は抗原に由来する抗原ペプチドを認識する受容体を保有するヘルパーT細胞(CD4⁺T細胞)である場合、そのような応答性又は反応性は、サイトカインの放出並びに/又はCD8⁺リンパ球(CTL)及び/若しくはB細胞の活性化を含み得る。細胞がCTLである場合、そのような応答性又は反応性は、例えばアポトーシス又はパーフォリン媒介性細胞溶解による、MHCクラスI分子の文脈において提示された細胞、即ちクラスI MHCを用いた抗原の提示によって特徴付けられる細胞の排除を含み得るCTL応答性には、持続的なカルシウム流、細胞分裂、IFN- γ 及びTNF- α 等のサイトカインの産生、CD44及びCD69等の活性化マーカーの上方制御、並びに抗原発現標的細胞の特異的細胞溶解性死滅が含まれ得る。また、CTL応答性は、CTL応答性を正確に示す人工レポーターを使用しても決定し得る。抗原又は抗原に由来する抗原ペプチドを認識し、応答性又は反応性であるようなCTLは、本明細書中で「抗原応答性CTL」とも呼ばれる。細胞がB細胞である場合、そのような応答性は免疫グロブリンの放出を含み得る。

10

【0089】

用語「T細胞」及び「Tリンパ球」は、本明細書中で互換性があるように使用され、Tヘルパー細胞(CD4⁺T細胞)及び細胞溶解性T細胞を含む細胞毒性T細胞(CTL、CD8⁺T細胞)が含まれる。

20

【0090】

T細胞はリンパ球として知られる白血球の群に属しており、細胞媒介性免疫において中心的な役割を果たす。これらは、T細胞受容体(TCR)と呼ばれる特別な受容体がある細胞表面上に存在することによって、B細胞及びナチュラルキラー細胞等の他のリンパ球種から識別することができる。胸腺はT細胞の成熟を司っている主要な器官である。T細胞のいくつかの異なる部分組が発見されており、それぞれが明白に異なる機能を有する。

【0091】

Tヘルパー細胞は、他の機能のなかでとりわけB細胞の形質細胞への分化並びに細胞毒性T細胞及びマクロファージの活性化を含めた免疫プロセスにおいて、他の白血球を援助する。これらの細胞は、その表面上にCD4タンパク質を発現するため、CD4⁺T細胞としても知られる。ヘルパーT細胞は、共刺激の文脈における抗原提示細胞(APC)の表面上に発現されるMHCクラスII分子によってペプチド抗原が提示された際に活性化される。活性化された後、これらは迅速に分裂し、活性免疫応答を調節又は援助するサイトカインと呼ばれる小タンパク質を分泌する。

30

【0092】

細胞毒性T細胞はウイルス感染細胞及び腫瘍細胞を破壊し、また移植片拒絶にも関連付けられている。これらの細胞は、その表面上にCD8糖タンパク質を発現するため、CD8⁺T細胞としても知られる。このような細胞は、身体の全有核細胞の表面に存在する、共刺激の文脈におけるMHCクラスIに会合した抗原に結合することによりその標的を認識する。

40

【0093】

大多数のT細胞では、T細胞受容体(TCR)がいくつかのタンパク質の複合体として存在する。実際のT細胞受容体は、独立したT細胞受容体アルファ及びベータ(TCR α 及びTCR β)遺伝子から産生される2つの別々のペプチド鎖から構成されており、 α -及び β -TCR鎖と呼ばれている。 γ δ T細胞(ガンマデルタT細胞)は、その表面上に明白に異なるT細胞受容体(TCR)を保有するT細胞の小さな部分組を表す。しかし、 γ δ T細胞中では、TCRは1本の γ -鎖及び1本の δ -鎖からなっている。このT細胞の群は α β T細胞よりもはるかに稀である(全T細胞の2%)。

【0094】

50

本発明によれば、用語「抗原受容体」は、T細胞等の免疫エフェクター細胞におけるモノクローナル抗体の特異性等の任意の特異性を付与する、T細胞受容体及び操作された受容体等の天然起源の受容体を含む。このようにして、多数の抗原特異的T細胞を養子細胞移入のために生成することができる。よって、本発明に従った抗原受容体は、例えば、T細胞自身のT細胞受容体の代わりに又はこれに加えて、T細胞に存在し得る。斯かるT細胞は、標的細胞の認識のために抗原のプロセッシング及び提示を必ずしも要求しないが、寧ろ、好ましくは特異性により、標的細胞に存在するいずれかの抗原を認識することができる。好ましくは、前記抗原受容体は、細胞の表面に発現される。本発明の目的のため、抗原受容体を含むT細胞は、本明細書中で使用する場合、用語「T細胞」によって含まれる。特に、本発明によれば、用語「抗原受容体」は、癌細胞等の標的細胞における標的構造(例えば、抗原)を認識する、即ち、これに結合し(例えば、標的細胞の表面に発現された抗原への抗原結合部位又は抗原結合ドメインの結合により)、細胞表面に前記抗原受容体を発現するT細胞等の免疫エフェクター細胞に特異性を付与することができる、単一分子又は分子の複合体を含む人工的受容体を含む。好ましくは、抗原受容体による標的構造の認識は、前記抗原受容体を発現する免疫エフェクター細胞の活性化をもたらす。抗原受容体は、1個又は複数のタンパク質単位を含むことができ、前記タンパク質単位は、本明細書に記載されている1個又は複数のドメインを含む。本明細書中で使用する場合、「抗原受容体」は、「キメラ抗原受容体(CAR)」、「キメラT細胞受容体」又は「人工的T細胞受容体」であってもよい。

10

20

30

40

50

【0095】

抗原は、同じ又は異なるペプチド鎖に存することができる、抗体及びT細胞受容体の抗原結合部分を介する等、抗原結合部位を形成することができるいずれかの抗原認識ドメイン(本明細書において単に「ドメイン」とも称される)を介して抗原受容体によって認識され得る。一実施形態では、抗原結合部位を形成する2個のドメインは、免疫グロブリンに由来する。一実施形態では、抗原結合部位を形成する2個のドメインは、T細胞受容体に由来する。モノクローナル抗体に由来する単鎖可変断片(scFv)並びにT細胞受容体可変ドメイン、特にTCRアルファ及びベータ単鎖等、抗体可変ドメインが特に好ましい。高い親和性で所与の標的に結合する実際にほぼ全てのものを抗原認識ドメインとして使用することができる。

【0096】

T細胞の活性化における第1のシグナルは、別の細胞における主要組織適合抗原複合体(MHC)によって提示される短いペプチドへのT細胞受容体の結合によってもたらされる。これは、該ペプチドに特異的なTCRを有するT細胞のみが活性化されることを確実にする。パートナー細胞は通常、プロフェッショナル抗原提示細胞(APC)、通常、ナイーブ応答の場合は樹状細胞であるが、B細胞及びマクロファージが重要なAPCとなる場合もある。MHCクラスI分子によってCD8+ T細胞に提示されるペプチドは典型的に、8~10アミノ酸の長さである;MHCクラスII分子の結合間隙の端は開いているため、MHCクラスII分子によってCD4+ T細胞に提示されるペプチドは典型的により長い。

【0097】

本発明の文脈において、分子は、標準のアッセイにおいて標的に対して有意な親和性を有しており、前記事前に決定された標的と結合する場合に、前記事前に決定された標的と結合することができる。「親和性」又は「結合親和性」は多くの場合、平衡解離定数(K_D)によって測定する。分子は、標準のアッセイにおいて標的に対して有意な親和性を有しておらず、前記標的と有意に結合しない場合に、前記標的と(実質的に)結合することができない。

【0098】

細胞毒性Tリンパ球は、抗原又は抗原ペプチドを抗原提示細胞内にインピボで取り込ませることによって、インピボで産生し得る。抗原又は抗原ペプチドはタンパク質として、DNA(例えばベクター内)として、又はRNAとして表し得る。抗原はプロセッシングされてMHC分子のペプチドパートナーを生じ得る一方で、その断片は更なるプロセッシングを必要とせ

ずに提示され得る。特にこれらがMHC分子と結合できる場合は後者の状況である。一般に、皮内注射による患者への投与が可能である。しかし、注射は、リンパ節に結節内(intra nodally)で実行することもできる(Maloyら、2001、Proc Natl Acad Sci USA 98:3299~303頁)、又は静脈内注射することもできる。他の投与機序は、筋肉内及び皮下投与を含むことができる。生じる細胞は目的の複合体を提示し、自己細胞毒性Tリンパ球によって認識され、これはその後増殖する。

【0099】

CD4+又はCD8+T細胞の特異的活性化は様々な方法で検出し得る。特異的T細胞活性化を検出する方法には、T細胞の増殖、サイトカイン(例えばリンホカイン)の産生、又は細胞溶解活性の発生を検出することが含まれる。CD4+T細胞では、特異的T細胞活性化を検出する好ましい方法はT細胞の増殖の検出である。CD8+T細胞では、特異的T細胞活性化を検出する好ましい方法は細胞溶解活性の発生を検出である。

10

【0100】

「抗原の提示によって特徴付けられる細胞」若しくは「抗原を提示する細胞」又は同様の表現とは、MHC分子、特にMHCクラスI分子の文脈において、それが発現する抗原又は前記抗原に由来する断片を、例えば抗原のプロセッシングによって提示する疾患細胞、例えば癌細胞、又は抗原提示細胞等の細胞を意味する。同様に、用語「抗原の提示によって特徴付けられる疾患」とは、特にクラスI MHCを用いた抗原の提示によって特徴付けられる細胞を含む疾患を示す。細胞による抗原の提示は、細胞に、抗原をコードしているRNA等の核酸を形質移入させることによって達成し得る。

20

【0101】

「提示されている抗原の断片」又は同様の表現とは、例えば抗原提示細胞に直接加えた場合に、MHCクラスI又はクラスII、好ましくはMHCクラスIによって提示され得る断片を意味する。一実施形態では、断片は、抗原を発現する細胞によって天然に提示される断片である。

【0102】

用語「免疫学的に均等」とは、免疫学的に均等なアミノ酸配列等の免疫学的に均等な分子が、例えば液性及び/若しくは細胞性免疫応答の誘導等の免疫学的効果の種類、誘導された免疫反応の強度及び/若しくは持続期間、又は誘導された免疫反応の特異性に関して、同じ若しくは本質的に同じ免疫学的特性を示す及び/又は同じ若しくは本質的に同じ免疫学的効果を発揮することを意味する。本発明の文脈において、用語「免疫学的に均等」は、好ましくは、免疫化に使用するペプチドの免疫学的効果又は特性に関して使用することができる。例えば、アミノ酸配列が対象の免疫系に曝された際に参照アミノ酸配列と反応する特異性を有する免疫反応を誘導する場合に、前記アミノ酸配列は参照アミノ酸配列に免疫学的に均等である。

30

【0103】

用語「免疫エフェクター機能」は、本発明の文脈において、本明細書中で使用する用語「免疫学的反応」によって包含され、例えば、腫瘍細胞の死滅、又は腫瘍播種及び転移の阻害を含む腫瘍成長の阻害及び/又は腫瘍発生の阻害をもたらす、免疫系の成分によって媒介されるいずれかの機能を含む。好ましくは、本発明の文脈における免疫エフェクター機能はT細胞に媒介されるエフェクター機能である。そのような機能は、ヘルパーT細胞(CD4+T細胞)の場合は、MHCクラスII分子の文脈におけるT細胞受容体による抗原又は抗原に由来する抗原ペプチドの認識、サイトカインの放出並びに/又はCD8+リンパ球(CTL)及び/若しくはB細胞の活性化、CTLの場合は、MHCクラスI分子の文脈におけるT細胞受容体による抗原又は抗原に由来する抗原ペプチドの認識、例えばアポトーシス又はパーフォリン媒介性細胞溶解による、MHCクラスI分子の文脈において提示された細胞、即ちクラスI MHCを用いた抗原の提示によって特徴付けられる細胞の排除、IFN- γ 及びTNF- α 等のサイトカインの産生、並びに抗原発現標的細胞の特異的細胞溶解性死滅を含む。

40

【0104】

用語「主要組織適合抗原複合体」及び略語「MHC」は、MHCクラスI及びMHCクラスII分子

50

を含み、あらゆる脊椎動物に発生する遺伝子の複合体に関する。MHCタンパク質又は分子は、免疫反応におけるリンパ球及び抗原提示細胞又は罹患細胞の間のシグナリングに重要であり、MHCタンパク質又は分子は、ペプチドに結合し、これをT細胞受容体による認識のために提示する。MHCによってコードされるタンパク質は、細胞の表面に発現され、T細胞に自己抗原(細胞自身に由来するペプチド断片)及び非自己抗原(例えば、侵入微生物の断片)の両方をディスプレイする。

【0105】

MHC領域は、3つのサブグループのクラスI、クラスII及びクラスIIIに分けられる。MHCクラスIタンパク質は、 α 鎖及び β 2ミクログロブリン(第15染色体によってコードされるMHCの部分ではない)を含有する。これらは、細胞傷害性T細胞に抗原断片を提示する。大部分の免疫系細胞、特に、抗原提示細胞において、MHCクラスIIタンパク質は、 α 及び β 鎖を含有し、これらは、Tヘルパー細胞に抗原断片を提示する。MHCクラスIII領域は、補体成分等の他の免疫成分をコードし、そのいくつかはサイトカインをコードする。

10

【0106】

MHCは、多遺伝子性(いくつかのMHCクラスI及びMHCクラスII遺伝子が存在する)及び多型(各遺伝子の複数のアレルが存在する)の両方である。

【0107】

本明細書中で使用する場合、用語「ハプロタイプ」は、1本の染色体に見出されるHLAアレル及びそれにコードされるタンパク質を指す。ハプロタイプは、MHC内のいずれか1個の遺伝子座に存在するアレルを指すこともできる。MHCの各クラスは、いくつかの遺伝子座によって表される:例えば、クラスIはHLA-A(ヒト白血球抗原-A)、HLA-B、HLA-C、HLA-E、HLA-F、HLA-G、HLA-H、HLA-J、HLA-K、HLA-L、HLA-P及びHLA-V、並びにクラスIIはHLA-DR A、HLA-DRB1-9、HLA-DQA1、HLA-DQB1、HLA-DPA1、HLA-DPB1、HLA-DMA、HLA-DMB、HLA-DOA及びHLA-DOB。用語「HLAアレル」及び「MHCアレル」は、本明細書において互換的に使用される。

20

【0108】

MHCは、極度の多型を呈する。ヒト集団内において、各遺伝子座において、別個のアレルを含む多数のハプロタイプが存在する。各アレルが、特定の配列パターンを呈するペプチドに結合するタンパク質をコードするという点において、クラスI及びクラスIIの両方の異なる多型MHCアレルは、異なるペプチド特異性を有する。

30

【0109】

本発明の文脈において、MHC分子は、好ましくは、HLA分子である。

【0110】

本発明の文脈において、用語「MHC結合ペプチド」は、MHCクラスI及び/又はクラスII結合ペプチド、又はプロセシングされてMHCクラスI及び/又はクラスII結合ペプチドを産生することができるペプチドを含む。クラスI MHC/ペプチド複合体の場合、結合ペプチドは典型的に、8~12、好ましくは8~10アミノ酸長であるが、より長い又は短いペプチドが有効な場合もある。クラスII MHC/ペプチド複合体の場合、結合ペプチドは典型的に、9~30、好ましくは10~25アミノ酸長、特に13~18アミノ酸長であるが、より長い及び短いペプチドが有効な場合もある。

40

【0111】

ある実施形態では、本発明の方法において有用な免疫療法剤は、抗原ペプチド又は抗原ペプチドをコードする核酸を含むことができる。「抗原ペプチド」は、好ましくは、抗原、又は罹患細胞、特に癌細胞等、抗原の発現、好ましくは抗原の提示によって特徴付けられる細胞に対する免疫応答、好ましくは細胞性応答を刺激することができる、抗原の部分又は断片に関する。好ましくは、抗原ペプチドは、クラスI MHCを有する抗原の提示によって特徴付けられる細胞に対する細胞性応答を刺激することができ、好ましくは、抗原応答性細胞傷害性Tリンパ球(CTL)を刺激することができる。好ましくは、抗原ペプチドは、MHCクラスI及び/又はクラスII提示ペプチドである、又はプロセシングして、MHCクラスI及び/又はクラスII提示ペプチドを産生することができる。好ましくは、抗原ペプチドは

50

、抗原の断片のアミノ酸配列に実質的に対応するアミノ酸配列を含む。好ましくは、抗原の前記断片は、MHCクラスI及び/又はクラスII提示ペプチドである。好ましくは、抗原ペプチドは、斯かる断片のアミノ酸配列に実質的に対応するアミノ酸配列を含み、プロセシングされて、斯かる断片、即ち、抗原に由来するMHCクラスI及び/又はクラスII提示ペプチドを産生する。

【0112】

ペプチドは、直接的に、即ち、プロセシングなしで、特に、切断なしで提示される必要がある場合、MHC分子、特にクラスI MHC分子への結合に適した長さを有し、好ましくは、7~20アミノ酸の長さ、より好ましくは7~12アミノ酸の長さ、より好ましくは8~11アミノ酸の長さ、特に9又は10アミノ酸の長さである。

10

【0113】

ペプチドが、追加的な配列、例えば、ワクチン配列の又はポリペプチドを含むより大きい実体の部分であり、プロセシング後に、特に、切断後に提示される必要がある場合、プロセシングによって産生されるペプチドは、MHC分子、特に、クラスI MHC分子への結合に適した長さを有し、好ましくは、7~20アミノ酸の長さ、より好ましくは7~12アミノ酸の長さ、より好ましくは8~11アミノ酸の長さ、特に9又は10アミノ酸の長さである。好ましくは、プロセシング後に提示される必要があるペプチドの配列は、抗原のアミノ酸配列に由来する、即ち、その配列は、抗原の断片に実質的に対応し、好ましくはこれと完全に同一である。よって、MHC結合ペプチドは、抗原の断片に実質的に対応し、好ましくはこれと完全に同一である配列を含む。

20

【0114】

クラスI MHCによって提示されるペプチドの配列に実質的に対応するアミノ酸配列を有するペプチドは、クラスI MHCによって提示されるペプチドのTCR認識に、又はMHCへのペプチドの結合に必須ではない1個又は複数の残基が異なり得る。斯かる実質的に対応するペプチドも、抗原応答性CTLを刺激することができ、免疫学的に同等であると考慮することができる。TCR認識に影響を与えないが、MHCへの結合の安定性を改善する残基が提示されるペプチドとは異なるアミノ酸配列を有するペプチドは、抗原ペプチドの免疫原性を改善することができ、本明細書において、「最適化されたペプチド」と称することができる。これらの残基のいずれが、MHC又はTCRのいずれかに結合に影響を与える可能性が高くなり得るかに関する現存知識を使用して、実質的に対応するペプチドの設計のための合理的アプローチを用いることができる。機能的なその結果得られるペプチドは、抗原ペプチドとして考慮される。

30

【0115】

抗原ペプチドは、MHCによって提示されると、T細胞受容体によって認識可能となるべきである。好ましくは、抗原ペプチドは、T細胞受容体によって認識される場合、適切な共刺激シグナルの存在、抗原ペプチドを特異的に認識するT細胞受容体を保有するT細胞のクローナル増大を誘導することができる。好ましくは、抗原ペプチドは、特に、MHC分子の文脈で提示される場合、これが由来する抗原、又は抗原の発現によって特徴付けられ、好ましくは、抗原の提示によって特徴付けられる細胞に対する免疫応答、好ましくは、細胞性応答を刺激することができる。好ましくは、抗原ペプチドは、クラスI MHCを有する抗原の提示によって特徴付けられる細胞に対する細胞性応答を刺激することができ、好ましくは、抗原応答性CTLを刺激することができる。斯かる細胞は、好ましくは、標的細胞である。

40

【0116】

用語「ゲノム」とは、生物又は細胞の染色体中の遺伝情報の総量に関する。

【0117】

用語「エクソーム」は、発現される遺伝子のコード部分であるエクソンによって形成された、生物のゲノムの一部をいう。エクソームはタンパク質及び他の機能的遺伝子産物の合成において使用される遺伝的写真を提供する。これはゲノムの最も機能的に関連性のある部分であり、したがって生物の表現型に寄与する可能性が最も高い。ヒトゲノムのエ

50

クソームは全ゲノムの1.5%を構成すると推定されている(Ngら、2008、PLoS Gen., 4(8):1~15頁)。

【0118】

用語「トランスクリプトーム」は、1個の細胞又は細胞の集団において産生されるmRNA、rRNA、tRNA及び他の非コードRNAを含むあらゆるRNA分子のセットに関する。本発明の文脈において、トランスクリプトームは、1個の細胞、細胞の集団、好ましくは、癌細胞の集団、又はある時点における所定の個体のあらゆる細胞において産生されるあらゆるRNA分子のセットを意味する。

【0119】

「核酸」とは、好ましくはデオキシリボ核酸(DNA)又はリボ核酸(RNA)、より好ましくはRNA、最も好ましくはインビトロ転写RNA(IVT RNA)又は合成RNAである。核酸にはゲノムDNA、cDNA、mRNA、組換え産生及び化学合成の分子が含まれる。核酸は一本鎖又は二本鎖の直鎖状又は共有結合の環状閉鎖分子として存在し得る。核酸は単離することができる。用語「単離した核酸」とは、核酸が、(i)インビトロ、例えばポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって増幅された、(ii)クローニングによって組換え産生された、(iii)例えば切断及びゲル電気泳動による分離によって精製された、又は(iv)例えば化学合成によって合成されたことを意味する。核酸(nucleic)は細胞内への導入、即ち形質移入のために、特にDNA鋳型からのインビトロ転写によって調製することができるRNAの形態で用いることができる。RNAは、施用前に配列の安定化、キャッピング、及びポリアデニル化によって更に修飾することができる。

【0120】

用語「遺伝物質」とは、DNA若しくはRNAのどちらかの単離した核酸、二重らせんの一区間、染色体の一区間、又は生物若しくは細胞のゲノム全体、特にそのエクソーム若しくはトランスクリプトームをいう。

【0121】

用語「突然変異」は、参照と比較した、核酸配列の変化又は差(ヌクレオチド置換、付加又は欠失)を指す。「体細胞突然変異」は生殖細胞(精子及び卵子)以外の身体の細胞のうちの任意のもので起こる場合があり、したがって子供には伝わらない。これらの変更は(必ずしもではないが)癌又は他の疾患を引き起こす場合がある。好ましくは、突然変異は非同義突然変異である。用語「非同義突然変異」は、ネオエピトープの形成を好ましくはもたらず、翻訳産物におけるアミノ酸置換等のアミノ酸変化をもたらず突然変異、好ましくはヌクレオチド置換を指す。

【0122】

用語「突然変異」には点突然変異、インデル、融合、クロモスリブシス及びRNA編集が含まれる。

【0123】

用語「インデル」とは、共存する挿入及び欠失並びにヌクレオチドの正味増加又は減少をもたらず突然変異として定義される、特別な突然変異クラスを説明する。ゲノムのコード領域では、インデルの長さが3の倍数でない限り、これらはフレームシフト突然変異を生じる。インデルは点突然変異と対照させることができる。インデルが配列からヌクレオチドを挿入及び欠失させる場合には、点突然変異はヌクレオチドのうちの1つを置き換える置換の一形態である。

【0124】

融合は、2つの以前は別々の遺伝子から形成されたハイブリッド遺伝子を生じることができる。これは転座、中間部欠失、又は染色体逆位の結果として生じることができる。多くの場合、融合遺伝子は癌遺伝子である。発癌性融合遺伝子は、新しい又は2つの融合パートナーからの異なる機能を有する遺伝子産物をもたらし得る。或いは、原癌遺伝子は強力なプロモーターと融合しており、したがって、発癌性機能は上流融合パートナーの強力なプロモーターによって引き起こされる上方制御によって機能し始める。また、発癌性融合転写物は、トランス-スプライシング又はリードスルー事象によっても引き起こされ得

る。

【0125】

用語「クロモスリブシス」とは、単一の破壊事象によってゲノムの特異的領域が碎かれ、その後縫合される遺伝的現象をいう。

【0126】

用語「RNA編集」又は「RNA編集する」とは、塩基構成中の化学的变化によってRNA分子中の情報内容が変更される分子プロセスをいう。RNA編集には、シチジン(C)からウリジン(U)及びアデノシン(A)からイノシン(I)等のヌクレオシド改変、脱アミノ化、並びに非鋳型のヌクレオチド付加及び挿入が含まれる。mRNAのRNA編集は、ゲノムDNA配列によって予測されているものと異なるように、コードされているタンパク質のアミノ酸配列を有効に変更する。

10

【0127】

用語「癌突然変異シグネチャ」とは、非癌性の参照細胞と比較した場合に癌細胞中に存在する一組の突然変異をいう。

【0128】

本発明の文脈における「参照」を使用して、腫瘍検体から得られる結果を相関及び比較することができる。典型的には、「参照」は、患者又は1つ若しくは複数の異なる個体、好ましくは健康な個体、特に同じ種の個体のどちらかから得られた、1つ又は複数の正常検体、特に癌疾患によって影響を受けていない検体に基づいて入手し得る。「参照」は、十分に多数の正常検体を試験することによって経験的に決定することができる。

20

【0129】

疾患特異的突然変異は、いずれか適した配列決定方法によって決定することができ、次世代配列決定(NGS)技術が好まれる。方法のシーケンシングステップの速度を上げるために、将来は第三世代シーケンシング方法がNGS技術を置き換える可能性がある。明確にする目的のために、本発明の文脈における用語「次世代シーケンシング」又は「NGS」とは、ゲノム全体を小片に切断することによって核酸鋳型をゲノム全体に沿ってランダムに並行して読み取る、サンガー化学として知られる「従来の」シーケンシング方法とは対照的に、全ての新規高スループットシーケンシング技術を意味する。そのようなNGS技術(超並列シーケンシング技術としても知られる)は、全ゲノム、エクソーム、トランスクリプトーム(ゲノムの全ての転写された配列)又はメチローム(ゲノムの全てのメチル化された配列)の核酸配列情報を非常に短期間、例えば、1~2週間以内、好ましくは1~7日間以内、又は最も好ましくは24時間未満以内に送達することができ、原理上は単一細胞シーケンシング手法を可能にする。市販されている又は文献中例えば、Zhangら、2011、The impact of next-generation sequencing on genomics. J. Genet Genomics 38(3): 95~109頁又はVoelkerdingら、2009、Next generation sequencing: From basic research to diagnostics. Clinical chemistry 55: 641~658頁に詳述されているものに言及されている複数のNGSプラットフォームを、本発明の文脈において使用することができる。

30

【0130】

好ましくは、DNA及びRNA調製物はNGSの出発物質として役割を果たす。そのような核酸は、生体物質等の試料から、例えば、新鮮な、フラッシュ凍結した若しくはホルマリン固定したパラフィン包埋腫瘍組織(FFPE)から又は新たに単離した細胞から又は患者の末梢血中に存在するCTCから、容易に得ることができる。正常な突然変異していないゲノムDNA又はRNAは正常な体性組織から抽出することができるが、本発明の文脈においては生殖系列細胞が好ましい。生殖系列DNA又はRNAを、非血液学的悪性腫瘍に罹患している患者における末梢血単核細胞(PBMC)から抽出する。FFPE組織又は新鮮に単離した単一細胞から抽出した核酸は非常に断片化されているが、これらはNGSの応用には適している。

40

【0131】

エクソームシーケンシングのためのいくつかの標的NGS方法が文献(総説には、例えばTeer及びMullikin、2010、Human Mol Genet 19(2): R145~51頁を参照)に記載されており、これらの全てを本発明と併せて使用することができる。これらの方法の多く(例えばゲノ

50

ム捕捉、ゲノム分配、ゲノム濃縮等として記載)はハイブリダイゼーション技法を使用し、アレイに基づく(例えばHodgesら、2007、Nat. Genet. 39: 1522~1527頁)及び液体に基づく(例えばChoiら、2009、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106: 19096~19101頁)ハイブリダイゼーション手法が含まれる。また、DNA試料の調製及び続くエクソームの捕捉のための市販のキットも入手可能であり、例えば、Illumina Inc.社(カリフォルニア州San Diego)は、TruSeq(商標)DNA試料の調製キット(DNA Sample Preparation Kit)及びTruSeq(商標)エクソーム濃縮キット(Exome Enrichment Kit)を提供している。

【0132】

例えば腫瘍試料の配列を生殖系列試料の配列等の参照試料の配列と比較する際に癌特異的体細胞突然変異又は配列相違の検出において偽陽性の発見数を減らすために、これらの試料種のうちの一方又は両方の複製中の配列を決定することが好ましい。したがって、生殖系列試料の配列等の参照試料の配列を2回、3回又はそれより多く決定することが好ましい。或いは又はそれに加えて、腫瘍試料の配列を2回、3回又はそれより多く決定する。また、生殖系列試料の配列等の参照試料の配列及び/又は腫瘍試料の配列はまた、ゲノムDNA中の配列を少なくとも1回決定し、前記参照試料及び/又は前記腫瘍試料のRNA中の配列を少なくとも1回決定することによって、複数回決定することも可能であり得る。例えば、生殖系列試料等の参照試料の複製間の変異を決定することによって、予想される体細胞突然変異の偽陽性率(FDR)を統計的量として推定することができる。1つの試料の技術的反復は同一の結果を生じるはずであり、この「対同一物比較」中に検出された全ての突然変異は偽陽性である。特に、参照試料に対する腫瘍試料における体細胞突然変異検出の偽発見率を決定するために、参照試料の技術的反復を、偽陽性の数を推定するための参照として使用することができる。更に、様々な品質関連の測定基準(例えばカバレッジ又はSNP品質)を、機械学習手法を使用して単一の品質スコアへと合わせ得る。所定の体性変異について、上回る品質スコアを有する全ての他の変異を計数してよく、これによりデータセット中の全ての変異の順位付けが可能となる。

【0133】

本発明の文脈において、用語「RNA」とは、少なくとも1つのリボヌクレオチド残基を含み、好ましくは完全に又は実質的にリボヌクレオチド残基から構成される分子に関する。「リボヌクレオチド」とは、 β -D-リボフラノシル基の2'位にヒドロキシル基を有するヌクレオチドに関する。用語「RNA」は、二本鎖RNA、一本鎖RNA、部分的又は完全に精製したRNA等の単離したRNA、本質的に純粋なRNA、合成RNA、並びに1つ又は複数のヌクレオチドの付加、欠失、置換及び/又は変更によって天然に存在するRNAと異なる修飾RNA等の組換え産生したRNAを含む。そのような変更には、例えば、RNAの末端への又は内部での、例えばRNAの1つ若しくは複数のヌクレオチドでの非ヌクレオチド物質の付加を含めることができる。また、RNA分子中のヌクレオチドは、天然に存在しないヌクレオチド又は化学合成ヌクレオチド又はデオキシヌクレオチド等の非標準のヌクレオチドも含むことができる。これらの変更されたRNAは、類似体又は天然に存在するRNAの類似体と呼ぶことができる。

【0134】

用語「RNA」には「mRNA」が含まれ、好ましくはそれに関する。用語「mRNA」とは「メッセンジャーRNA」を意味し、DNA鋳型を使用することによって作製され得、ペプチド又はポリペプチドをコードしている「転写物」に関する。典型的には、mRNAは、5'-UTR、タンパク質コード領域、及び3'-UTRを含む。mRNAは細胞中及びインビトロにおいて限定された半減期しか持たない。本発明の文脈において、mRNAはDNA鋳型からインビトロ転写によって作製し得る。インビトロ転写方法は当業者に知られている。例えば、様々なインビトロ転写キットが市販されている。

【0135】

RNAの安定性及び翻訳効率は必要に応じて改変し得る。例えば、RNAの安定化効果を有する及び/又は翻訳効率を増加させる1つ又は複数の修飾によって、RNAを安定化させ、その翻訳を増加させ得る。そのような修飾は、例えば、本明細書中に参考として組み込まれて

いるPCT/EP2006/009448号に記載されている。本発明の実施形態で使用するRNAの発現を増加させるために、コード領域、即ち発現されるペプチド又はタンパク質をコードしている配列内で、好ましくは発現されるペプチド又はタンパク質の配列を変更させずに修飾することによって、GC含有率を増加させてmRNAの安定性を増加させ、コドン最適化を行い、したがって細胞内の翻訳を亢進させ得る。

【0136】

本発明で使用するRNAの文脈における用語「修飾」には、前記RNA中に天然で存在しない、RNAの任意の修飾が含まれる。

【0137】

本発明の一実施形態では、本発明に従って使用するRNAは非キャップ5'-三リン酸を有さない。そのような非キャップ5'-三リン酸の除去は、RNAをホスファターゼで処理することによって達成することができる。

10

【0138】

本発明によるRNAは、その安定性を増加する及び/又は細胞毒性を低下するために、修飾されたりボヌクレオチドを有し得る。例えば、一実施形態では、本発明に従って使用するRNA中で、シチジンを5'-メチルシチジンで部分的又は完全に、好ましくは完全に置換する。或いは又はそれに加えて、一実施形態では、本発明に従って使用するRNA中で、ウリジンをプソイドウリジンで部分的又は完全に置換する。好まれる実施形態では、修飾リボヌクレオチドを有する本発明に係るRNAは依然として、Toll様受容体アゴニストとして作用する能力を有する。

20

【0139】

一実施形態では、用語「修飾」とは、RNAに5'-cap又は5'-cap類似体を提供することに関する。用語「5'-cap」とは、mRNA分子の5'末端上に見つかるcap構造をいい、一般に、普通ではない5'から5'の三リン酸結合を介してmRNAと連結したグアノシンヌクレオチドからなる。一実施形態では、このグアノシンは7位でメチル化されている。用語「従来の5'-cap」とは、天然に存在するRNA5'-cap、好ましくは7-メチルグアノシンキャップ(m⁷G)をいう。本発明の文脈において、用語「5'-cap」には、RNAcap構造に似ており、好ましくはインビボ及び/又は細胞内でそれと付着している場合にRNAを安定化させる及び/又はRNAの翻訳を亢進させる能力を有するように修飾されている、5'-cap類似体が含まれる。

30

【0140】

RNAに5'-cap又は5'-cap類似体を提供することは、前記5'-cap又は5'cap類似体の存在下におけるDNA鋳型のインビトロ転写によって達成してよく、前記5'-capが作製されたRNA鎖内に同時転写的に取り込まれるか、又は、RNAは、例えばインビトロ転写によって作製されてよく、5'-capは、キャッピング酵素、例えばワクシニアウイルスのキャッピング酵素を使用して転写後にRNAに付着させてよい。

【0141】

RNAは更なる修飾を含み得る。例えば、本発明で使用するRNAの更なる修飾は、天然に存在するポリ(A)テイルの伸長若しくは切断、又は、前記RNAのコード領域に関連していないUTRの導入、例えば、グロビン遺伝子、例えばアルファ2-グロビン、アルファ1-グロビン、ベータ-グロビン、好ましくはベータ-グロビン、より好ましくはヒトベータ-グロビンに由来する1つ若しくは複数、好ましくは2コピーの3'-UTRによる既存の3'-UTRの交換若しくはその挿入等の、5'-若しくは3'-非翻訳領域(UTR)の変更であり得る。

40

【0142】

マスキングされていないポリ-A配列を有するRNAは、マスキングされたポリ-A配列を有するRNAよりも効率的に翻訳される。用語「ポリ(A)テイル」又は「ポリ-A配列」とは、典型的にはRNA分子の3'末端上に位置するアデニル(A)残基の配列に関し、「マスキングされていないポリ-A配列」とは、RNA分子の3'末端のポリ-A配列がポリ-A配列のAで終了し、ポリ-A配列の3'末端、即ち下流に位置するA以外のヌクレオチドが続かないことを意味する。更に、約120塩基対の長いポリ-A配列は、RNAの最適な転写安定性及び翻訳効率をもたらす。

50

【0143】

したがって、本発明に従って使用するRNAの安定性及び/又は発現を増加させるために、好ましくは10～500、より好ましくは30～300、更により好ましくは65～200、特に100～150個のアデノシン残基の長さを有するポリ-A配列と共に存在するようにこれを修飾し得る。特に好ましい実施形態では、ポリ-A配列は約120個のアデノシン残基の長さを有する。本発明に従って使用するRNAの安定性及び/又は発現を更に増加させるために、ポリ-A配列をマスキングしないことができる。

【0144】

更に、RNA分子の3'-非翻訳領域内への3'-非翻訳領域(UTR)の取り込みは、翻訳効率の亢進をもたらすことができる。2個以上のそのような3'-非翻訳領域を取り込ませることによって、相乗効果を達成し得る。3'-非翻訳領域は、それらが導入されるRNAに対して自己又は異種であり得る。特定の一実施形態では、3'-非翻訳領域はヒトβ-グロビン遺伝子に由来する。

10

【0145】

上述の修飾の組合せ、即ちポリ-A配列の取り込み、ポリ-A配列の脱マスキング及び1つ又は複数の3'-非翻訳領域の取り込みは、RNAの安定性及び翻訳効率の増加に対して相乗的な影響を有する。

【0146】

用語、RNAの「安定性」とは、RNAの「半減期」に関連する。「半減期」とは、分子の活性、量、又は数の半分を排除するために必要な期間に関する。本発明の文脈において、RNAの半減期は前記RNAの安定性の指標である。RNAの半減期は、RNAの「発現の持続期間」に影響を与え得る。長い半減期を有するRNAは長期間の間発現されることを予測することができる。

20

【0147】

もちろん、RNAの安定性及び/又は翻訳効率を減少させることが望ましい場合は、RNAの安定性及び/又は翻訳効率を増加させる上述の要素の機能を妨害するようにRNAを修飾することが可能である。

【0148】

用語「発現」とは、最も一般的な意味で使用され、例えば転写及び/又は翻訳による、RNA及び/又はペプチド若しくはポリペプチドの産生を含む。RNAに関して、用語「発現」又は「翻訳」とは、特にペプチド又はポリペプチドの産生に関する。また、これは核酸の部分的発現も含む。更に、発現は一過性又は安定であることができる。

30

【0149】

用語発現には、「異常な発現」又は「異常発現」も含まれる。「異常な発現」又は「異常発現」とは、参照、例えば、特定のタンパク質、例えば腫瘍抗原の異常な発現又は異常発現に関連している疾患に罹患していない対象の状態と比較して、発現が変更されている、好ましくは増加していることを意味する。発現の増加とは、少なくとも10%、特に少なくとも20%、少なくとも50%若しくは少なくとも100%、又はそれより多くの増加をいう。一実施形態では、発現は患部組織中でのみ見付き、健康な組織中の発現は抑制されている。

40

【0150】

用語「特異的に発現される」とは、タンパク質が本質的に特異的組織又は器官中でのみ発現されることを意味する。例えば、胃粘膜中で特異的に発現される腫瘍抗原とは、前記タンパク質が主に胃粘膜中で発現され、他の組織中では発現されない又は他の組織若しくは器官種中では有意な程度には発現されないことを意味する。したがって、胃粘膜の細胞中で排他的に発現され、精巢等の任意の他の組織中では有意により少ない程度に発現されるタンパク質は、胃粘膜の細胞中で特異的に発現される。一部の実施形態では、腫瘍抗原はまた、正常状態下では、複数の組織型又は器官、例えば2つ又は3つの組織型又は器官であるが、好ましくは3つ以下の異なる組織又は器官種中で特異的に発現され得る。この場合、腫瘍抗原はこれらの器官中で特異的に発現される。例えば、腫瘍抗原が正常状態下で

50

肺及び胃中で好ましくはほぼ同程度に発現される場合、前記腫瘍抗原は肺及び胃中で特異的に発現される。

【0151】

本発明の文脈において、用語「転写」とは、DNA配列の遺伝暗号がRNAへと転写されるプロセスに関する。続いて、RNAはタンパク質へと翻訳され得る。本発明によれば、用語「転写」は「インビトロ転写」を含み、用語「インビトロ転写」とは、RNA、特にmRNAが、無細胞系中で、好ましくは適切な細胞抽出物を使用してインビトロ合成されるプロセスに関する。好ましくは、クローニングベクターを転写物の作製に応用する。これらのクローニングベクターは一般に転写ベクターと命名され、用語「ベクター」によって包含される。本発明で使用するRNAは好ましくはインビトロ転写RNA(IVT-RNA)であり、適切なDNA鋳型のインビトロ転写によって得られ得る。転写を制御するためのプロモーターは、任意のRNAポリメラーゼの任意のプロモーターであることができる。RNAポリメラーゼの具体的な例は、T7、T3、及びSP6 RNAポリメラーゼである。好ましくは、インビトロ転写は、T7又はSP6プロモーターによって制御される。インビトロ転写のためのDNA鋳型は、核酸、特にcDNAをクローニングし、それをインビトロ転写のための適切なベクター内に導入することによって得られ得る。cDNAはRNAの逆転写によって得られ得る。

10

【0152】

用語「翻訳」とは、メッセンジャーRNAの鎖がアミノ酸の配列のアセンブリを指示してペプチド又はポリペプチドを作製する、細胞のリボソーム中のプロセスに関する。

【0153】

本発明の文脈において核酸と機能的に連結することができる発現制御配列又は調節配列は、該核酸に関して相同又は異種であり得る。コード配列及び調節配列は、コード配列の転写又は翻訳が調節配列の制御下又は影響下となるように一緒に共有結合されている場合に、「機能的に」一緒に連結されている。調節配列とコード配列との機能的連結を用いてコード配列を機能的タンパク質へと翻訳させる場合は、調節配列の誘導は、コード配列の読み枠のシフト又はコード配列が所望のタンパク質若しくはペプチドへと翻訳されないことを引き起こさずに、コード配列の転写をもたらす。

20

【0154】

本発明との関連において、用語「発現制御配列」又は「調節配列」とは、核酸の転写又は誘導されたRNAの翻訳を制御する、プロモーター、リボソーム結合配列及び他の制御要素を含む。ある実施形態では、調節配列を制御することができる。調節配列の正確な構造は種又は細胞種応じて変動する可能性があるが、一般に、TATAボックス、キャッピング配列、CAAT配列等の転写又は翻訳の開始に関与している5'-非転写並びに5'-及び3'-非翻訳配列を含む。特に、5'-非転写調節配列は、機能的に結合した遺伝子の転写制御のプロモーター配列が含まれるプロモーター領域を含む。また、調節配列は、エンハンサー配列又は上流の活性化配列も含むことができる。

30

【0155】

好ましくは、細胞中で発現させるRNAを前記細胞内に導入する。本発明による方法の実施形態では、細胞内に導入するRNAは適切なDNA鋳型のインビトロ転写によって得られる。

40

【0156】

「発現することができるRNA」及び「コードしているRNA」等の用語は本明細書中で互換性があるように使用され、特定のペプチド又はポリペプチドに関しては、RNAは、適切な環境中で、好ましくは細胞内に存在する場合、発現させて前記ペプチド又はポリペプチドを産生することができることを意味する。好ましくは、RNAは、細胞の翻訳機構と相互作用して、それが発現することができるペプチド又はポリペプチドを提供することができる。

【0157】

「移す」、「導入する」又は「形質移入する」等の用語は本明細書中で互換性があるように使用され、核酸、特に外因性又は異種の核酸、特にRNAを細胞内に導入することに関

50

する。本発明によれば、細胞は、器官、組織及び/又は生物の一部を形成することができる。本発明によれば、核酸の投与は、裸の核酸として達成する、又は投与試薬と組み合わせて達成するのいずれかである。ある。好ましくは、核酸の投与は裸核酸の形態である。好ましくは、RNAはRNase阻害剤等の安定化物質と組み合わせて投与する。また、本発明は、長期間の持続的発現を可能にするために核酸を細胞内に繰返し導入することも想定している。

【0158】

細胞は、例えばRNAと複合体を形成すること又はRNAを封入若しくはカプセル封入する小胞を形成することによってRNAと会合させ、裸RNAと比較して増加したRNAの安定性をもたらすことができる、任意の担体を用いて形質移入することができる。有用な担体には、例えば、カチオン性脂質、リポソーム、特に陽イオン性リポソーム、及びミセル等の脂質含有担体、並びにナノ粒子が含まれる。カチオン性脂質は負荷電の核酸と複合体を形成し得る。任意のカチオン性脂質を使用し得る。

10

【0159】

好ましくは、細胞、特にインビボで存在する細胞内へのペプチド又はポリペプチドをコードしているRNAの導入は、細胞中での前記ペプチド又はポリペプチドの発現をもたらす。特定の実施形態では、核酸を特定の細胞に標的化することが好ましい。そのような実施形態では、核酸を細胞に投与するために適用する担体(例えばレトロウイルス又はリポソーム)は、標的化分子を示す。例えば、標的細胞上の表面膜タンパク質又は標的細胞上の受容体のリガンドに特異的な抗体等の分子を、核酸担体内に取り込ませ得る、又はそれと結合させ得る。核酸をリポソームによって投与する場合、標的化及び/又は取り込みを可能にするために、エンドサイトーシスに関連している表面膜タンパク質と結合するタンパク質をリポソーム配合物内に取り込ませ得る。そのようなタンパク質は、特定の細胞種、内部移行されるタンパク質に対する抗体、細胞内の位置を標的とするタンパク質等に特異的なカプシドタンパク質又はその断片を包含する。

20

【0160】

用語「細胞」又は「宿主細胞」は、好ましくは、無処置の細胞、即ち、酵素、オルガネラ、又は遺伝物質等のその正常な細胞内成分を放出していない無処置の膜を有する細胞である。無処置の細胞は、好ましくは、生細胞、即ちどの正常な代謝機能を実施することができる生細胞である。好ましくは、前記用語は、外因性の核酸を用いて形質転換又は形質移入することができる任意の細胞に関する。用語「細胞」には、原核細胞(例えば大腸菌(*E. coli*))又は真核細胞(例えば、樹状細胞、B細胞、CHO細胞、COS細胞、K562細胞、HEK293細胞、HELA細胞、酵母細胞、及び昆虫細胞)が含まれる。外因性の核酸は、細胞内に(i)それ自体で自由に分散して、(ii)組換えベクター内に組み込まれて、又は(iii)宿主細胞ゲノム若しくはミトコンドリアDNA内に組み込まれて見つかり得る。ヒト、マウス、ハムスター、ブタ、ヤギ、及び霊長類からの細胞等の哺乳動物細胞が特に好ましい。細胞は多数の組織型に由来してよく、初代細胞及び細胞系が含まれる。具体的な例には、ケラチノサイト、末梢血白血球、骨髓幹細胞、及び胚性幹細胞が含まれる。更なる実施形態では、細胞は抗原提示細胞、特に樹状細胞、単球、又はマクロファージである。

30

【0161】

核酸分子を含む細胞は、好ましくは核酸によってコードされているペプチド又はポリペプチドを発現する。

40

【0162】

用語「クローン増殖」とは、特定の実体が増えるプロセスをいう。本発明の文脈において、この用語は、好ましくは、リンパ球が抗原によって刺激され、増殖し、前記抗原を認識する特異的リンパ球が増幅される免疫学的応答との関連で使用される。好ましくは、クローン増殖はリンパ球の分化をもたらす。

【0163】

「低下させる」又は「阻害する」等の用語は、好ましくは5%以上、10%以上、20%以上、より好ましくは50%以上、最も好ましくは75%以上の全体的なレベルの減少を引き起こす能

50

力に関する。用語「阻害する」又は同様の語句には、完全な又は本質的に完全な阻害、即ちゼロ又は本質的にゼロまでの低下が含まれる。

【0164】

「増加させる」、「亢進させる」、「促進する」又は「延長する」等の用語は、好ましくは、少なくとも約10%、好ましくは少なくとも20%、好ましくは少なくとも30%、好ましくは少なくとも40%、好ましくは少なくとも50%、好ましくは少なくとも80%、好ましくは少なくとも100%、好ましくは少なくとも200%、特に少なくとも300%の増加、亢進、促進又は延長に関する。また、これらの用語は、ゼロ又は測定不可能又は検出不可能なレベルからゼロより高いレベル又は測定可能若しくは検出可能なレベルへの増加、亢進、促進又は延長にも関し得る。

10

【0165】

本発明によれば、用語「ペプチド」とは、ペプチド結合によって共有結合した、2個以上、好ましくは3個以上、好ましくは4個以上、好ましくは6個以上、好ましくは8個以上、好ましくは10個以上、好ましくは13個以上、好ましくは16個以上、好ましくは21個以上、且つ好ましくは8、10、20、30、40又は50個まで、特に100個のアミノ酸を含む物質をいう。用語「ポリペプチド」又は「タンパク質」とは、大きなペプチド、好ましくは100個を超えるアミノ酸残基を有するペプチドをいうが、一般に、用語「ペプチド」、「ポリペプチド」及び「タンパク質」は同義語であり、本明細書中で互換性があるように使用される。本発明によれば、ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質に関する用語「修飾」又は「配列変化」は、野生型ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質の配列等、親配列と比較した、ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質における配列変化に関する。この用語は、アミノ酸挿入変異体、アミノ酸付加変異体、アミノ酸欠失変異体及びアミノ酸置換変異体、好ましくはアミノ酸置換変異体を含む。本発明によるこれらの配列変化は全て、新たなエピトープを潜在的に生じ得る。

20

【0166】

アミノ酸挿入変異体は、特定のアミノ酸配列中に1個若しくは2個又はそれより多くのアミノ酸の挿入を含む。

【0167】

アミノ酸付加変異体は、1、2、3、4若しくは5個、又はそれより多くのアミノ酸等の1つ又は複数のアミノ酸のアミノ及び/又はカルボキシ末端融合を含む。

30

【0168】

アミノ酸欠失変異体は、配列からの1個又は複数のアミノ酸の除去、例えば、1、2、3、4若しくは5個又はそれ以上のアミノ酸の除去を特徴付けられる。

【0169】

アミノ酸置換変異体は、配列中の少なくとも1つの残基が除去され、別の残基がその代わりに挿入されることによって特徴付けられる。

【0170】

本発明によれば、本発明の方法における検査に使用される修飾又は修飾されたペプチドは、修飾を含むタンパク質に由来することができる。

【0171】

本発明によれば、用語「由来する」とは、特定の实体、特に特定のペプチド配列が、それが由来する物体に存在することを意味する。アミノ酸配列、特に特定の配列領域の場合、「由来する」とは、特に、関連するアミノ酸配列が、それが存在するアミノ酸配列に由来することを意味する。

40

【0172】

免疫療法剤は、本明細書に記載されている方法によって適した用量が決定されたら、適した用量で免疫療法剤を投与することにより、疾患、例えば、抗原を発現し、抗原ペプチドを提示する罹患細胞の存在によって特徴付けられる疾患を有する対象の処置に使用することができる。特に好ましい疾患は、癌疾患である。本明細書に記載されている免疫療法剤を免疫化又はワクチン接種に使用して、本明細書に記載されている疾患を予防すること

50

もできる。

【0173】

斯かる免疫療法剤の1つは、がん細胞においてのみ発現されるネオエピトープに基づいて設計されたがんワクチン等、ワクチンである。

【0174】

本発明によれば、用語「ワクチン」とは、投与の際に、病原体又は癌細胞等の疾患細胞を認識して攻撃する免疫応答、特に細胞性免疫応答を誘導する、医薬調製物(医薬組成物)又は生成物に関する。ワクチンは、疾患の防止又は処置に使用し得る。用語「個人化癌ワクチン」又は「個別化癌ワクチン」は、特定の癌患者に関わり、癌ワクチンが、個々の癌患者の必要又は特殊な状況に適応されることを意味する。

10

【0175】

本発明に従って提供される癌ワクチンは、患者に投与した場合に、患者の腫瘍に特異的なT細胞の刺激、プライミング及び/又は増大用の1つ又は複数のT細胞エピトープを提供することができる。T細胞は、好ましくは、T細胞エピトープが由来する抗原を発現している細胞に対して方向付けられる。よって、本明細書中に記載されているワクチンは、好ましくは、クラスI MHCによる1つ又は複数の腫瘍関連ネオ抗原の提示によって特徴付けられる癌疾患に対する細胞性応答、好ましくは、細胞傷害性T細胞活性を誘導又は促進することができる。本明細書において提供されたワクチンは癌特異的突然変異を標的とするため、これは患者の腫瘍に特異的となる。

20

【0176】

本発明の一実施形態では、ワクチンは、患者に投与されると、適したエピトープであると予測されるアミノ酸修飾又は修飾ペプチドを取り込む、2種以上、5種以上、10種以上、15種以上、20種以上、25種以上、30種以上、好ましくは最大60種、最大55種、最大50種、最大45種、最大40種、最大35種又は最大30種のT細胞エピトープ等、1種又は複数のT細胞エピトープ(ネオエピトープ、適したネオエピトープ、本明細書で同定される適したネオエピトープの組合せ)を好ましくは提供するワクチンに関する。患者の細胞、特に抗原提示細胞によるこれらのエピトープの提示は、好ましくは、MHCに結合した際にT細胞がエピトープを標的化すること、したがって、患者の腫瘍、好ましくは原発性腫瘍及び腫瘍転移が、MHCに提示されたT細胞エピトープが由来する抗原を発現し、腫瘍細胞の表面上に同じエピトープを提示することをもたらす。

30

【0177】

更に別の工程を行って、がんワクチン接種のためのエピトープを含有する同定されたアミノ酸修飾又は修飾ペプチドの有用性を決定することができる。したがって、更なる工程は以下のうちの1つ又は複数を含むことができる:(i) 修飾が既知の又は予測されたMHCに提示されたエピトープ中に位置するかどうかの評価、(ii) 修飾がMHCに提示されたエピトープ中に位置するかどうかのインビトロ及び/又はin silico試験、例えば、修飾が、MHCに提示されたエピトープへとプロセッシングされる及び/又はそれとして提示されるペプチド配列の一部であるかどうかの試験、並びに(iii) 想定された修飾されたエピトープが、特にその天然の配列構成で存在する場合、例えば天然に存在するタンパク質中で前記エピトープにも隣接するアミノ酸配列に隣接している場合、及び抗原提示細胞中で発現された場合に、所望の特異性を有する患者のT細胞等、T細胞を刺激することができるかどうかのインビトロ試験。そのような隣接配列は、それぞれ3個以上、5個以上、10個以上、15個以上、20個以上、好ましくは50個まで、45個まで、40個まで、35個まで又は30個までのアミノ酸を含んでいてよく、N末端及び/又はC末端でエピトープ配列に隣接してよい。

40

【0178】

本発明に従って決定される修飾されたペプチドは、癌ワクチン接種用のエピトープとしてその有用性について順位付けし得る。したがって、一態様では、同定された修飾されたペプチドが、提供するそれぞれのワクチンにおけるその有用性について分析及び選択される、手動又はコンピュータベースの分析処理が使用され得る。好ましい実施形態では、前記分析処理はコンピュータアルゴリズムベースの処理である。好ましくは、前記分析処理

50

は、以下の工程のうちの1つ又は複数、好ましくは、前記分析方法は、免疫原性となるその能力の予測に従ってエピトープを決定及び/又はランク付けする工程を含む。

【0179】

本発明に従って同定され、ワクチン中に提供されるエピトープは、好ましくは、ポリエピトープポリペプチド又は前記ポリペプチドをコードする核酸、特にRNA等、前記エピトープを含むポリペプチドの形態で存在する。更に、エピトープは、ワクチン配列の形態でポリペプチド中に存在し得る、即ち、その天然配列の文脈で、例えば、天然起源のタンパク質において前記エピトープに同様に隣接するアミノ酸配列に隣接して存在し得る。そのような隣接配列は、それぞれ5個以上、10個以上、15個以上、20個以上、好ましくは50個まで、45個まで、40個まで、35個まで又は30個までのアミノ酸を含んでいてよく、N末端及び/又はC末端でエピトープ配列に隣接してよい。したがって、ワクチン配列は、20個以上、25個以上、30個以上、35個以上、40個以上、好ましくは50個まで、45個まで、40個まで、35個まで又は30個までのアミノ酸を含み得る。一実施形態では、エピトープ及び/又はワクチン配列はポリペプチド中で頭-尾で並んでいる。

10

【0180】

一実施形態では、本明細書で同定されるエピトープ及び/又はワクチン配列はリンカー、特に中性リンカーによって離間されている。本発明との関連において使用される用語「リンカー」とは、エピトープ又はワクチン配列等の2つのペプチドドメインの間に付加して前記ペプチドドメインを接続するペプチドに関する。リンカー配列に関して特に制限はない。しかし、リンカー配列は2つのペプチドドメイン間の立体障害を減らし、良好に翻訳され、エピトープのプロセッシングを支援又は許可することが好ましい。更に、リンカーは免疫原性の配列要素を有さない、又は僅かしか有さないべきである。リンカーは、好ましくは、所望しない免疫反応を生じ得る、近接エピトープ間の接合部縫合から生じたもの等の非内在性エピトープを作成するべきではない。したがって、ポリエピトープワクチンは、好ましくは、所望しないMHC結合性接合部エピトープの数を減らすことができるリンカー配列を含有するべきである。Hoytら(EMBO J. 25(8)、1720~9頁、2006)及びZhangら(J. Biol. Chem., 279(10)、8635~41頁、2004)は、グリシンに富んだ配列はプロテアソームプロセッシングを損なわせ、したがって、グリシンに富んだリンカー配列の使用は、プロテアソームによるプロセッシングが可能なリンカーに含有されるペプチドの数を最小限にする働きを持つことを示している。更に、グリシンは、MHC結合溝位置で強力な結合を阻害することが観察された(Abastadoら、1993、J. Immunol. 151(7): 3569~75頁)。Schlessingerら、2005、Proteins、61(1): 115~26頁は、アミノ酸配列中に含まれたアミノ酸グリシン及びセリンは、プロテアソームによってより効率的に翻訳及びプロセッシングされ、コードされているエピトープへのより良好な接近を可能にする、より柔軟なタンパク質をもたらすことを発見した。リンカーは、それぞれ3個以上、6個以上、9個以上、10個以上、15個以上、20個以上、好ましくは50個まで、45個まで、40個まで、35個まで又は30個までのアミノ酸を含み得る。好ましくは、リンカーはグリシン及び/又はセリンアミノ酸に富んでいる。好ましくは、リンカーのアミノ酸の少なくとも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%、又は少なくとも95%はグリシン及び/又はセリンである。好ましい一実施形態では、リンカーはアミノ酸グリシン及びセリンから実質的に構成される。一実施形態では、リンカーはアミノ酸配列(GGS)_a(GSS)_b(GGG)_c(SSG)_d(GSG)_eを含み、式中、a、b、c、d及びeは独立して、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、又は20から選択される数字であり、a+b+c+d+eは0とは異なり、好ましくは2以上、3以上、4以上又は5以上である。一実施形態では、リンカーは、配列GGSGGGGSG等の、実施例中に記載のリンカー配列を含めた本明細書中に記載の配列を含む。

20

30

40

【0181】

特に好まれる一実施形態では、ポリエピトープポリペプチド等、1種又は複数のネオエピトープが組み込まれているポリペプチドは、核酸、好ましくは、in vitro転写された又は合成RNA等のRNAの形態で患者に投与され得る免疫療法剤であり、この核酸は、抗原提示

50

細胞等の患者の細胞において発現されて、ポリペプチドを産生することができる。本発明の目的のため、用語「ポリエピトープポリペプチド」によって含まれ、好ましくは、抗原提示細胞等の患者の細胞において発現されて、1種又は複数のポリペプチドを産生することができる、核酸、好ましくは、*in vitro*転写された又は合成RNA等のRNAの形態の、1種又は複数のマルチエピトープポリペプチドの投与も想定される。複数のマルチエピトープポリペプチドを投与する場合、異なるマルチエピトープポリペプチドによって提供される適したネオエピトープは異なる又は部分的に重複していてもよい。ひとたび抗原提示細胞等の患者の細胞中に存在すると、本発明によるポリペプチドはプロセッシングされ、本発明に従って同定された適したネオエピトープを産生する。本発明に従って提供されるワクチンの投与は、MHCに提示されたエピトープが由来する抗原を発現する細胞に対するCD4+ヘルパーT細胞応答を誘発することができる、MHCクラスIIに提示されたエピトープを好ましくは提供し得る。代替的に又はその上、本発明に従って提供されるワクチンの投与は、MHCに提示されたネオエピトープが由来する抗原を発現する細胞に対するCD8+T細胞応答を誘発することができる、MHCクラスIに提示されたネオエピトープを提供し得る。更に、本発明に従って提供されるワクチンの投与は、1つ又は複数のネオエピトープ(既知のネオエピトープ及び本発明に従って同定された適したネオエピトープが含まれる)、並びに癌特異的体細胞突然変異を含有しないが、癌細胞によって発現され、好ましくは癌細胞に対する免疫応答、好ましくは癌特異的免疫応答を誘導する1つ又は複数のエピトープを提供し得る。一実施形態では、本発明に従って提供されるワクチンの投与は、MHCクラスIIに提示されたエピトープである及び/又はMHCに提示されたエピトープが由来する抗原を発現する細胞に対するCD4+ヘルパーT細胞応答を誘発することができるネオエピトープ、並びに癌特異的体細胞突然

10

20

変異を含有せず、MHCクラスIに提示されたエピトープである及び/又はMHCに提示されたエピトープが由来する抗原を発現する細胞に対するCD8+T細胞応答を誘発することができるエピトープを提供する。一実施形態では、癌特異的体細胞突然変異を含有しないエピトープは腫瘍抗原に由来する。一実施形態では、癌特異的体細胞突然変異を含有しないネオエピトープ及びエピトープは癌の処置において相乗効果を有する。好ましくは、本発明に従って提供されるワクチンは細胞毒性及び/又はヘルパーT細胞応答のポリエピトープ刺激に有用である。

【0182】

30

本発明に従って提供されるワクチンは組換えワクチンであり得る。

【0183】

用語「組換え」とは、本発明との関連において、「遺伝子操作によって作製された」ことを意味する。好ましくは、本発明との関連での組換えポリペプチド等の「組換え実体」は天然に存在せず、好ましくは、天然では組み合わされないアミノ酸又は核酸配列等の実体の組合せの結果である。例えば、組換えポリペプチドは、本発明との関連において、ネオエピトープ、又は異なるタンパク質若しくは同じタンパク質の異なる部分が例えばペプチド結合若しくは適切なリンカーによって一緒に融合されたものに由来するワクチン配列等の、いくつかのアミノ酸配列を含有し得る。

【0184】

40

本明細書中で使用する用語「天然に存在する」とは、物体を自然で見つけることができることをいう。例えば、生物(ウイルスを含めて)中に存在し、天然源から単離することができ、人によって実験室内で意図的に改変されていないペプチド又は核酸は、天然に存在する。

【0185】

本発明によれば、用語「疾患」とは、癌疾患、特に本明細書中に記載の癌疾患の形態を含めた任意の病理状態をいう。

【0186】

用語「正常な」とは、健康な状態又は健康な対象若しくは組織、即ち非病的状態における状態をいい、「健康な」とは、好ましくは非癌性であることを意味する。

50

【0187】

「抗原を発現する細胞を含む疾患」とは、患部組織又は器官の細胞において抗原の発現が検出されることを意味する。患部組織又は器官の細胞中の発現は、健康な組織又は器官の状態と比較して増加してよい。増加とは、少なくとも10%、特に少なくとも20%。少なくとも50%、少なくとも100%、少なくとも200%、少なくとも500%、少なくとも1000%、少なくとも10000%又は更にそれより多くの増加をいう。一実施形態では、発現は患部組織中でのみ見つかかり、健康な組織中の発現は抑制される。本発明によれば、抗原を発現する細胞を含む又はそれに関連する疾患には癌疾患が含まれる。

【0188】

癌(医学用語は悪性新生物)とは、細胞の群が非制御の成長(正常な限界を超えた分裂)、侵襲(近接組織の侵入及び破壊)、並びに場合によっては転移(リンパ又は血液を介した身体内の他の位置への拡散)を示す疾患のクラスである。これら3つの癌の悪性特性により、これらが自己限定的であり浸潤又は転移しない良性腫瘍から区別される。ほとんどの癌は腫瘍を形成するが、白血病等の一部のものは形成しない。

10

【0189】

悪性腫瘍は、癌と本質的に同義である。悪性疾患、悪性新生物、及び悪性腫瘍は癌と本質的に同義である。

【0190】

本発明によれば、用語「腫瘍」又は「腫瘍疾患」とは、好ましくは腫脹又は病変を形成する、細胞の異常成長(新生細胞、腫瘍形成性細胞又は腫瘍細胞と呼ばれる)をいう。「腫瘍細胞」とは、迅速な非制御の細胞増殖によって成長し、新しい成長を開始した刺激が終わった後に成長し続ける異常細胞を意味する。腫瘍は構造的組織化及び正常組織との機能的協調の部分的又は完全な欠如を示し、通常は、良性、前悪性又は悪性のいずれかであり得る明確な組織塊を形成する。

20

【0191】

良性腫瘍は、癌の悪性特性のうち全3種を欠如する腫瘍である。よって、定義によると、良性腫瘍は、無制限の侵襲性様式で成長せず、周囲の組織に侵入せず、非隣接性組織に拡散(転移)しない。

【0192】

新生物とは、新形成の結果としての異常な組織塊である。新形成(ギリシャ語で新しい成長)とは、細胞の異常増殖である。細胞の成長は、その周りの正常組織の成長を上回り、協調的でない。成長は刺激が終わった後さえも同じ過剰な様式で持続する。これは通常は塊又は腫瘍を引き起こす。新生物は良性、前悪性又は悪性であり得る。

30

【0193】

本発明との関連による「腫瘍の成長」又は「腫瘍成長」とは、腫瘍の大きさが大きくなる傾向及び/又は腫瘍細胞が増殖する傾向に関する。

【0194】

本発明の目的のために、用語「癌」及び「癌疾患」は、用語「腫瘍」及び「腫瘍疾患」と互換性があるように使用される。

【0195】

癌は腫瘍に似ている細胞の種類、したがって腫瘍の起源であると推定される組織の種類によって分類される。これらはそれぞれ組織学及び位置である。

40

【0196】

本発明による用語「癌」は、白血病、精上皮腫、黒色腫、奇形腫、リンパ腫、神経芽細胞腫、神経膠腫、直腸癌、子宮内膜癌、腎臓癌、副腎癌、甲状腺癌、血液癌、皮膚癌、脳癌、子宮頸癌、腸癌、肝臓癌、結腸癌、胃癌、腸管癌、頭頸部癌、胃腸癌、リンパ節癌、食道癌、結腸直腸癌、脾臓癌、耳、鼻及び咽頭(ENT)癌、乳癌、前立腺癌、子宮癌、卵巣癌及び肺癌並びにその転移を含む。その例は、肺癌腫、乳房癌腫、前立腺癌腫、結腸癌腫、腎細胞癌腫、子宮頸癌腫、又は上述の癌種若しくは腫瘍の転移である。また、本発明によれば、用語癌は癌の転移及び癌の再発(relapse)も含む。

50

【0197】

「転移」とは、その元の部位から身体別の部分への癌細胞の拡散を意味する。転移の形成は非常に複雑なプロセスであり、原発性腫瘍からの悪性細胞の脱離、細胞外基質の侵襲、体腔及び血管に入るための内皮基底膜の貫通、その後、血液によって輸送された後に、標的器官の浸潤に依存する。最後に、標的部位での新しい腫瘍、即ち二次腫瘍又は転移性腫瘍の成長は血管形成に依存する。腫瘍転移は、多くの場合、原発性腫瘍の除去後にも起こり、これは腫瘍細胞又は構成要素が残って転移能を発生し得るためである。一実施形態では、本発明による用語「転移」とは、原発性腫瘍及び所属リンパ節系から離れた転移に関する「遠隔転移」に関する。

【0198】

二次又は転移性腫瘍の細胞は元の腫瘍のものに似ている。これは、例えば卵巣癌が肝臓に転移する場合、二次腫瘍は異常肝細胞ではなく異常卵巣細胞から構成されていることを意味する。この場合、肝臓中の腫瘍は肝臓癌ではなく転移性卵巣癌と呼ばれる。

【0199】

用語「循環腫瘍細胞」又は「CTC」とは、原発性腫瘍又は腫瘍転移から脱離して血流中に循環する細胞に関する。CTCは、続く様々な組織中の更なる腫瘍(転移)の成長の種子を構成し得る。循環腫瘍細胞は、転移性疾患に罹患している患者の全血1mLあたり約1~10個のCTCの頻度で見つかる。CTCを単離するための研究方法が開発されている。当技術分野においてCTCを単離するためのいくつかの研究手法、例えば、上皮細胞が正常な血液細胞中では存在しない細胞接着タンパク質EpCAMを一般的に発現することを使用する技法が記載されている。免疫磁気ビーズに基づく捕捉は、血液検体を、磁気粒子とコンジュゲートさせたEpCAMに対する抗体で処理し、続いて、タグ付けされた細胞を磁場中で分離することを含む。その後、単離した細胞を別の上皮マーカー、サイトケラチン、及び一般的な白血球マーカーCD45に対する抗体で染色することによって、稀なCTCを汚染白血球から識別する。この頑強且つ半自動的な手法は、CTCを約1個のCTC/mLの平均収率及び0.1%の純度で同定する(Allardら、2004、Clin Cancer Res 10: 6897~6904頁)。CTCを単離するための第2の方法は、EpCAMに対する抗体でコーティングすることによって機能的にした80,000個のマイクロポストを包埋したチャンバに全血を流すことを含む、マイクロ流体に基づくCTC捕捉装置を使用する。その後、CTCをサイトケラチン又は前立腺癌におけるPSA若しくは乳癌におけるHER2等の組織特異的マーカーのいずれかに対する二次抗体で染色し、マイクロポストを複数の平面で三次元座標に沿って自動走査することによって可視化する。CTC-チップは、患者中のサイトケラチン(cytokerating)陽性循環腫瘍細胞を、収率の中央値が50個の細胞/ml、純度の範囲が1~80%で同定することができる(Nagrathら、2007、Nature 450: 1235~1239頁)。CTCを単離するための別の可能性は、血液の管中のCTCを捕捉、同定、及び計数するVeridex, LLC社(ニュージャージー州Raritan)のCellSearch(商標)循環腫瘍細胞(CTC)試験を使用することである。CellSearch(商標)システムは、全血中のCTCを数上げるための米国食品医薬品局(FDA)に認可された方法であり、免疫磁気標識及び自動デジタル顕微鏡観察の組合せに基づく。CTCを単離するための他の方法が文献中に記載されており、その全てを本発明と併せて使用することができる。

【0200】

再発(relapse又はrecurrence)は、人が、過去に影響を受けていた状態によって再度影響を受ける場合に起こる。例えば、患者が腫瘍疾患を患い、前記疾患の処置を受けて成功し、前記疾患を再度発症する場合、前記新しく発症した疾患は再発(relapse又はrecurrence)としてみなされ得る。しかし、本発明によれば、腫瘍疾患の再発(relapse又はrecurrence)は、元の腫瘍の部位疾患で起こってもよいが、必ずしもそうである必要はない。したがって、例えば、患者が卵巣腫瘍を患っており、受けた処置が成功した場合、再発(relapse又はrecurrence)は、卵巣腫瘍の発生又は卵巣とは異なる部位での腫瘍の発生であり得る。また、腫瘍の再発(relapse又はrecurrence)には、腫瘍が元の腫瘍の部位とは異なる部位で発生する状況及び元の腫瘍の部位で発生する状況も含まれる。好ましくは、患者が処置を受けた元の腫瘍は原発性腫瘍であり、元の腫瘍の部位とは異なる部位での腫瘍は二

10

20

30

40

50

次又は転移性腫瘍である。

【0201】

用語「免疫療法」は、免疫応答の誘導、増強又は抑制による、疾患又は状態の処置に関する。免疫応答を誘発又は増幅するように設計された免疫療法は、活性化免疫療法として分類されるが、免疫応答を低下又は抑制する免疫療法は、抑制免疫療法として分類される。用語「免疫療法」は、抗原免疫化若しくは抗原ワクチン接種又は腫瘍免疫化若しくは腫瘍ワクチン接種を含む。用語「免疫療法」は、また、不適切な免疫応答が、リウマチ性関節炎、アレルギー、糖尿病又は多発性硬化症等の自己免疫性疾患の文脈で、より適切な応答にモジュレートされるような免疫応答の操作に関する。

【0202】

用語「免疫化」又は「ワクチン接種」は、例えば治療上又は予防上の理由から、免疫応答を誘導する目的で、個体に抗原を投与するプロセスを表す。

【0203】

「処置する」とは、対象における腫瘍の大きさ若しくは腫瘍の数の低下;対象における疾患の抑止若しくは緩徐化;対象における新たな疾患の発症の阻害若しくは緩徐化;疾患に現在罹患している若しくは以前に罹患していた対象において症状及び/若しくは再発の頻度若しくは重篤度を減少させること;及び/又は対象の寿命の延長、即ち、増加を含む、疾患を予防又は排除するために、本明細書に記載されている免疫療法剤又は免疫療法剤を含む組成物を対象に投与することを意味する。特に、用語「疾患の処置」には、疾患の発症又はその症状を治癒すること、持続期間を短縮すること、進行若しくは悪化を寛解、防止、遅延若しくは阻害すること、又は防止若しくは遅延させることが含まれる。

【0204】

「危険性がある」とは、一般集団と比較して疾患、特に癌を発症する可能性が正常よりも高いと同定された対象、即ち患者を意味する。更に、疾患、特に癌を患っていた、又は現在患っている対象とは、そのような対象は疾患を発症し続け得るため、疾患を発症する危険性が増加した対象である。また、癌を現在患っている、又は患っていた対象も癌の転移の危険性が増加している。

【0205】

免疫療法の予防的投与、例えば免疫療法剤又は免疫療法剤を含む組成物の予防的投与は、好ましくはレシピエントを疾患の発症から保護する。免疫療法の治療的投与、例えば免疫療法剤の治療的投与は、疾患の進行/成長の阻害をもたらす得る。これは、好ましくは疾患の排除をもたらす疾患の進行/成長の減速、特に疾患の進行の破壊を含む。

【0206】

免疫療法は、本明細書中に提供する薬物が疾患細胞を患者から除去するように機能する、様々な技法のうちの任意のものを使用して行い得る。そのような除去は、患者において抗原又は抗原を発現する細胞に特異的な免疫応答を亢進又は誘導することの結果として起こり得る。

【0207】

免疫療法剤及び組成物は、単独で、又は手術、照射法、化学療法及び/若しくは骨髄移植(自己、同系の、アロジェネイック又は非関連)等の従来の治療レジメンと組み合わせて使用し得る。

【0208】

用語「インビボ」とは、対象内の状況に関する。

【0209】

用語「対象」、「個体」、「生物」又は「患者」は、脊椎動物、特に、哺乳類に関し、本明細書において互換的に使用されている。例えば、本発明の文脈における哺乳類は、ヒト、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、ヒツジ、ウシ、ヤギ、ブタ、ウマ等の飼育慣らされた哺乳類、マウス、ラット、ウサギ、モルモット等の実験動物と共に、動物園の動物等の檻に入れられた動物である。これらの用語は、また、鳥類(特に、ニワトリ、アヒル、ガチョウ、シチメンチョウ等の飼育慣らされた鳥類)及び魚類(特に、養殖魚類、例えば、サケ又

10

20

30

40

50

はナマズ)等の非哺乳類脊椎動物に関する。また、本明細書中で使用する用語「動物」にはヒトも含まれる。

【0210】

用語「自己」とは、同じ対象に由来する全てのものを記載するために使用する。例えば、「自己移植」とは、同じ対象に由来する組織又は器官の移植をいう。そのような手順は、そうでなければ拒絶をもたらす免疫学的障壁を克服するため有利である。

【0211】

用語「異種」とは、複数の異なる要素からなるものを記載するために使用する。一例として、1つの個体の骨髄を別の個体内に移入することは異種移植を構成する。異種遺伝子とは、対象以外の供給源に由来する遺伝子である。

10

【0212】

免疫化又はワクチン接種のための組成物の一部として、好ましくは1種又は複数の免疫療法剤を、免疫応答を誘導する又は免疫応答を増加させるための1種又は複数のアジュバントと一緒に投与する。用語「アジュバント」とは、免疫応答を延長又は亢進又は加速する化合物に関する。本発明の組成物は、好ましくはアジュバントを加えずにその効果を発揮する。それでも、本出願の組成物は任意の既知のアジュバントを含有し得る。アジュバントは油乳濁液(例えばフロイントアジュバント)、無機化合物(ミョウバン等)、細菌産物(百日咳菌(*Bordetella pertussis*)毒素等)、リポソーム、及び免疫刺激複合体等の化合物の異種群を含む。アジュバントの例は、モノホスホリル-脂質-A(MPL SmithKline Beecham)、QS21(SmithKline Beecham)、DQS21(SmithKline Beecham、WO96/33739号)、QS7、QS17、QS18、及びQS-L1等のサポニン(Soら、1997、Mol. Cells 7:178~186頁)、不完全フロイントアジュバント、完全フロイントアジュバント、ビタミンE、モンタナイド(montanid)、ミョウバン、CpGオリゴヌクレオチド(Kriegら、1995、Nature 374:546~549頁)、並びにスクワレン及び/又はトコフェロール等の生分解性の油から調製される様々な油中水乳濁液である。

20

【0213】

また、患者の免疫応答を刺激する他の物質も投与し得る。例えば、リンパ球に対するその調節特性のおかげで、ワクチン接種中でサイトカインを使用することが可能である。そのようなサイトカインは、例えば、ワクチンの保護作用を増加させることが示されたインターロイキン-12(IL-12)(Hall、1995、IL-12 at the crossroads、Science 268:1432~1434頁を参照)、GM-CSF及びIL-18を含む。

30

【0214】

免疫応答を亢進し、したがってワクチン接種において使用し得るいくつかの化合物が存在する。前記化合物は、B7-1及びB7-2(それぞれCD80及びCD86)等のタンパク質又は核酸の形態で提供される同時刺激分子を含む。

【0215】

本発明によれば、「腫瘍検体」は、循環腫瘍細胞(CTC)等の腫瘍又は癌細胞を含有する身体試料、特に、体液を含む組織試料及び/又は細胞性試料等の試料である。本発明によれば、「非腫瘍性検体」は、循環腫瘍細胞(CTC)等の腫瘍又は癌細胞を含有しない身体試料、特に、体液を含む組織試料及び/又は細胞性試料等の試料である。そのような身体試料は、パンチ生検を含めた組織生検によって、及び血液、気管支吸引液、痰、尿、糞便又は他の体液を採取することによって等の従来の様式で得られ得る。本発明によれば、用語「試料」には、生体試料の画分又は単離物、例えば核酸若しくは細胞の単離物等の加工試料も含まれる。

40

【0216】

本明細書に記載されている免疫療法剤及びその組成物は、注射又は注入によるものを含むいずれか従来の経路により投与することができる。投与は、例えば、経口的に、静脈内に、腹腔内に、筋肉内に、皮下に又は経皮に実施し得る。一実施形態では、投与はリンパ節内への注射によって等の結節内で実施する。他の投与形態は、本明細書中に記載の核酸を用いた樹状細胞等の抗原提示細胞のインビトロ形質移入、次いで抗原提示細胞の投与を

50

想定している。

【0217】

用語「薬学的に許容される」は、医薬組成物の活性成分の作用と相互作用しない材料の無毒性を指す。

【0218】

本発明の医薬組成物は、塩、バッファー、保存剤、担体及び任意選択で他の治療剤を含むことができる。好ましくは、本発明の医薬組成物は、1種又は複数の薬学的に許容される担体、希釈剤及び/又は賦形剤を含む。

【0219】

用語「賦形剤」は、結合剤、潤滑剤、増粘剤、表面活性剤、保存料、乳化剤、バッファー、調味料又は着色料等、活性成分ではない、医薬組成物中のあらゆる物質を示すことが意図される。

10

【0220】

用語「希釈剤」は、希釈及び/又は菲薄化用の薬剤に関する。更に、用語「希釈剤」は、流体、液体又は固体懸濁液及び/又は混合培地のうちいずれか1種又は複数を含む。

【0221】

用語「担体」は、ヒトへの投与に適した、1種又は複数の適合性固体又は液体フィラー又は希釈剤に関する。用語「担体」は、活性成分の適用を容易にするために活性成分と組み合わされる、天然又は合成の有機又は無機成分に関する。好ましくは、担体成分は、ピーナッツ油、ダイズ油、ゴマ油、ヒマワリ油等、鉱物油、動物又は植物に由来するものを含む、水又は油等の無菌液体である。塩溶液並びに水性デキストロース及びグリセリン溶液を水性担体化合物として使用することもできる。

20

【0222】

治療用途のための薬学的に許容される担体又は希釈剤は、医薬品技術分野で周知であり、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences、Mack Publishing Co.(A. R Gennaro 編、1985)に記載されている。適した担体の例として、例えば、炭酸マグネシウム、ステアリン酸マグネシウム、タルク、糖、ラクトース、ペクチン、デキストリン、デンプン、ゼラチン、トラガント、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース・ナトリウム、低融点ワックス、カカオバターその他が挙げられる。適した希釈剤の例として、エタノール、グリセロール及び水が挙げられる。

30

【0223】

医薬品担体、賦形剤又は希釈剤は、意図される投与経路及び標準薬務に関して選択することができる。本発明の医薬組成物は、担体、賦形剤若しくは希釈剤として又はこれに加えて、いずれか適した結合剤、潤滑剤、懸濁剤、コーティング剤及び/又は可溶化剤を含むことができる。適した結合剤の例として、デンプン、ゼラチン、グルコース、無水ラクトース、フリーフローラクトース、ベータ-ラクトース、トウモロコシ甘味料等の天然の糖、アカシア、トラガント等の天然及び合成のガム、又はアルギン酸ナトリウム、カルボキシメチルセルロース並びにポリエチレングリコールが挙げられる。適した潤滑剤の例として、オレイン酸ナトリウム、ステアリン酸ナトリウム、ステアリン酸マグネシウム、安息香酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウムその他が挙げられる。保存料、安定剤、色素及び更には調味料が、医薬組成物中に提供されて良い。保存料の例として、安息香酸ナトリウム、ソルビン酸及びp-ヒドロキシ安息香酸のエステルが挙げられる。抗酸化剤及び懸濁剤が使用されてもよい。

40

【0224】

一実施形態では、組成物は、水性組成物である。水性組成物は、溶質、例えば、塩を任意選択で含むことができる。一実施形態では、組成物は、フリーズドライされた組成物の形態である。フリーズドライされた組成物は、それぞれの水性組成物をフリーズドライすることによって得ることができる。

【0225】

本発明を、図及び実施例によって詳述し説明し、これらは例示目的でのみ使用し、限定

50

することを意図しない。説明及び実施例のおかげで、同様に本発明に含まれる更なる実施形態が当業者によって利用可能である。

【図面の簡単な説明】

【0226】

【図1a i - i i i】図1aは、15名の個々の患者への異なる用量の四価RNA_(LIP)ワクチンの投与前(プレ)及び後(2、6、24及び48時間)の、全身性リンパ球数を示すヒストグラムである。2回複製の平均値が描写されている。V=来診、一方、それぞれV2は第1の投与を表し、V3は第2の投与を表し、V4は第3の投与を表し、V5は第4の投与を表し、V6は第5の投与を表し、V7は第6の投与を表し、V8は第7の投与を表し、V9は第8の投与を表す。コホートI患者は、6回の投与(V2~V7)のみを受けた。血液試料採取及び解析を標準方法に従って行った。

10

【図1a i v - v】図1aは、15名の個々の患者への異なる用量の四価RNA_(LIP)ワクチンの投与前(プレ)及び後(2、6、24及び48時間)の、全身性リンパ球数を示すヒストグラムである。2回複製の平均値が描写されている。V=来診、一方、それぞれV2は第1の投与を表し、V3は第2の投与を表し、V4は第3の投与を表し、V5は第4の投与を表し、V6は第5の投与を表し、V7は第6の投与を表し、V8は第7の投与を表し、V9は第8の投与を表す。コホートI患者は、6回の投与(V2~V7)のみを受けた。血液試料採取及び解析を標準方法に従って行った。

【図1b i - i i i】図1bは、15名の個々の患者への異なる用量の四価RNA_(LIP)ワクチンの投与前(プレ)及び後(2、6、24及び48時間)の、全身性血小板数を示すヒストグラムである。2回複製の平均値が描写されている。V=来診、一方、それぞれV2は第1の投与を表し、V3は第2の投与を表し、V4は第3の投与を表し、V5は第4の投与を表し、V6は第5の投与を表し、V7は第6の投与を表し、V8は第7の投与を表し、V9は第8の投与を表す。コホートI患者は、6回の投与(V2~V7)のみを受けた。血液試料採取及び解析を標準方法に従って行った。

20

【図1b i v - v】図1bは、15名の個々の患者への異なる用量の四価RNA_(LIP)ワクチンの投与前(プレ)及び後(2、6、24及び48時間)の、全身性血小板数を示すヒストグラムである。2回複製の平均値が描写されている。V=来診、一方、それぞれV2は第1の投与を表し、V3は第2の投与を表し、V4は第3の投与を表し、V5は第4の投与を表し、V6は第5の投与を表し、V7は第6の投与を表し、V8は第7の投与を表し、V9は第8の投与を表す。コホートI患者は、6回の投与(V2~V7)のみを受けた。血液試料採取及び解析を標準方法に従って行った。

30

【図1c i - i i i】図1cは、15名の個々の患者への異なる用量の四価RNA_(LIP)ワクチンの投与前(プレ)及び後(2、6、24及び48時間)の、全身性血清サイトカインレベル(IFN- α)を示すヒストグラムである。2回複製の平均値が描写されている。V=来診、一方、それぞれV2は第1の投与を表し、V3は第2の投与を表し、V4は第3の投与を表し、V5は第4の投与を表し、V6は第5の投与を表し、V7は第6の投与を表し、V8は第7の投与を表し、V9は第8の投与を表す。コホートI患者は、6回の投与(V2~V7)のみを受けた。血液試料採取及び解析を標準方法に従って行った。

【図1c i v - v】図1cは、15名の個々の患者への異なる用量の四価RNA_(LIP)ワクチンの投与前(プレ)及び後(2、6、24及び48時間)の、全身性血清サイトカインレベル(IFN- α)を示すヒストグラムである。2回複製の平均値が描写されている。V=来診、一方、それぞれV2は第1の投与を表し、V3は第2の投与を表し、V4は第3の投与を表し、V5は第4の投与を表し、V6は第5の投与を表し、V7は第6の投与を表し、V8は第7の投与を表し、V9は第8の投与を表す。コホートI患者は、6回の投与(V2~V7)のみを受けた。血液試料採取及び解析を標準方法に従って行った。

40

【図1d i - i i i】図1dは、15名の個々の患者への異なる用量の四価RNA_(LIP)ワクチンの投与前(プレ)及び後(2、6、24及び48時間)の、全身性血清サイトカインレベル(IL-6)を示すヒストグラムである。2回複製の平均値が描写されている。V=来診、一方、それぞれV2は第1の投与を表し、V3は第2の投与を表し、V4は第3の投与を表し、V5は第4の投与を表し、V6は第5の投与を表し、V7は第6の投与を表し、V8は第7の投与を表し、V9は第8の投与

50

を表す。コホートI患者は、6回の投与(V2~V7)のみを受けた。血液試料採取及び解析を標準方法に従って行った。

【図1div-v】図1dは、15名の個々の患者への異なる用量の四価RNA_(LIP)ワクチンの投与前(プレ)及び後(2、6、24及び48時間)の、全身性血清サイトカインレベル(IL-6)を示すヒストグラムである。2回複製の平均値が描写されている。V=来診、一方、それぞれV2は第1の投与を表し、V3は第2の投与を表し、V4は第3の投与を表し、V5は第4の投与を表し、V6は第5の投与を表し、V7は第6の投与を表し、V8は第7の投与を表し、V9は第8の投与を表す。コホートI患者は、6回の投与(V2~V7)のみを受けた。血液試料採取及び解析を標準方法に従って行った。

【図1ei-iii】図1eは、15名の個々の患者への異なる用量の四価RNA_(LIP)ワクチンの投与前(プレ)及び後(2、6、24及び48時間)の、全身性血清サイトカインレベル(IFN- γ)を示すヒストグラムである。2回複製の平均値が描写されている。V=来診、一方、それぞれV2は第1の投与を表し、V3は第2の投与を表し、V4は第3の投与を表し、V5は第4の投与を表し、V6は第5の投与を表し、V7は第6の投与を表し、V8は第7の投与を表し、V9は第8の投与を表す。コホートI患者は、6回の投与(V2~V7)のみを受けた。血液試料採取及び解析を標準方法に従って行った。

【図1eiv-v】図1eは、15名の個々の患者への異なる用量の四価RNA_(LIP)ワクチンの投与前(プレ)及び後(2、6、24及び48時間)の、全身性血清サイトカインレベル(IFN- γ)を示すヒストグラムである。2回複製の平均値が描写されている。V=来診、一方、それぞれV2は第1の投与を表し、V3は第2の投与を表し、V4は第3の投与を表し、V5は第4の投与を表し、V6は第5の投与を表し、V7は第6の投与を表し、V8は第7の投与を表し、V9は第8の投与を表す。コホートI患者は、6回の投与(V2~V7)のみを受けた。血液試料採取及び解析を標準方法に従って行った。

【図1fi-iii】図1fは、15名の個々の患者への異なる用量の四価RNA_(LIP)ワクチンの投与前(プレ)及び後(2、6、24及び48時間)の、全身性血清サイトカインレベル(IP-10)を示すヒストグラムである。2回複製の平均値が描写されている。V=来診、一方、それぞれV2は第1の投与を表し、V3は第2の投与を表し、V4は第3の投与を表し、V5は第4の投与を表し、V6は第5の投与を表し、V7は第6の投与を表し、V8は第7の投与を表し、V9は第8の投与を表す。コホートI患者は、6回の投与(V2~V7)のみを受けた。血液試料採取及び解析を標準方法に従って行った。

【図1fiv-v】図1fは、15名の個々の患者への異なる用量の四価RNA_(LIP)ワクチンの投与前(プレ)及び後(2、6、24及び48時間)の、全身性血清サイトカインレベル(IP-10)を示すヒストグラムである。2回複製の平均値が描写されている。V=来診、一方、それぞれV2は第1の投与を表し、V3は第2の投与を表し、V4は第3の投与を表し、V5は第4の投与を表し、V6は第5の投与を表し、V7は第6の投与を表し、V8は第7の投与を表し、V9は第8の投与を表す。コホートI患者は、6回の投与(V2~V7)のみを受けた。血液試料採取及び解析を標準方法に従って行った。

【図2】図2a~図2hは、RNA-リボソーム製剤と単離されたPBMCとの6時間インキュベーション後(黒ドット)及び24時間インキュベーション後(白ドット)の、サイトカイン発現の量を示すヒストグラムである。単一データ点は、3回複製した実験の平均値である。

【図3】図3a~図3hは、RNA-リボソーム製剤と全血との6時間インキュベーション後(黒ドット)及び24時間インキュベーション後(白ドット)の、サイトカイン発現の量を示すヒストグラムである。単一データ点は、3回複製した実験の平均値である。

【図4】図4a~図4cは、全血(黒丸)、pDCを富化された全血(黒四角)及びiDC(黒三角)におけるRNA-リボソーム製剤の6時間インキュベーション後の、サイトカイン発現の量を示すヒストグラムである。単一データ点は、3回複製した実験の平均値である。

【図5】図5a~図5cは、全血(黒丸)、pDCを富化された全血(黒四角)及びpDC(黒三角)におけるRNA-リボソーム製剤の24時間インキュベーション後の、サイトカイン発現の量を示すヒストグラムである。単一データ点は、3回複製した実験の平均値である。

【図6a】図6aは、TLR-7の小分子アゴニストとPBMCとのインキュベーション後の、24時

10

20

30

40

50

【図6 j】図6jは、TLR-7の小分子アゴニストとPBMCとのインキュベーション後の、24時間後の、サイトカイン発現の量を示すヒストグラムである。黒い丸、N-(4-(4-アミノ-2-(2-メトキシエチル)-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)-N-(テトラヒドロ-2H-ピラン-4-イル)アセトアミド(SM1)、白丸、N-{4-[4-アミノ-2-(2-メトキシエチル)-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル]ブチル}-N-(1,1-ジオキソチエタン-3-イル)アセトアミド(SM2)。

10

20

30

40

50

(SM2)。

【図7h】図7hは、TLR-7の小分子アゴニストと全血とのインキュベーション後の、24時間後の、サイトカイン発現の量を示すヒストグラムである。黒い丸、N-(4-(4-アミノ-2-(2-メトキシエチル)-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)-N-(テトラヒドロ-2H-ピラン-4-イル)アセトアミド(SM1)、白丸、N-{4-[4-アミノ-2-(2-メトキシエチル)-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル]ブチル}-N-(1,1-ジオキソチエタン-3-イル)アセトアミド(SM2)。

【図7i】図7iは、TLR-7の小分子アゴニストと全血とのインキュベーション後の、24時間後の、サイトカイン発現の量を示すヒストグラムである。黒い丸、N-(4-(4-アミノ-2-(2-メトキシエチル)-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)-N-(テトラヒドロ-2H-ピラン-4-イル)アセトアミド(SM1)、白丸、N-{4-[4-アミノ-2-(2-メトキシエチル)-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル]ブチル}-N-(1,1-ジオキソチエタン-3-イル)アセトアミド(SM2)。

【図7j】図7jは、TLR-7の小分子アゴニストと全血とのインキュベーション後の、24時間後の、サイトカイン発現の量を示すヒストグラムである。黒い丸、N-(4-(4-アミノ-2-(2-メトキシエチル)-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)-N-(テトラヒドロ-2H-ピラン-4-イル)アセトアミド(SM1)、白丸、N-{4-[4-アミノ-2-(2-メトキシエチル)-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル]ブチル}-N-(1,1-ジオキソチエタン-3-イル)アセトアミド(SM2)。

【図8a】図8aは、TLR-7の小分子アゴニストとPBMCとのインキュベーション後の、24時間後の、相対的CD69発現によって測定される特定の免疫細胞の活性化のレベルを示すヒストグラムである。黒い丸、N-(4-(4-アミノ-2-(2-メトキシエチル)-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)-N-(テトラヒドロ-2H-ピラン-4-イル)アセトアミド(SM1)、白丸、N-{4-[4-アミノ-2-(2-メトキシエチル)-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル]ブチル}-N-(1,1-ジオキソチエタン-3-イル)アセトアミド(SM2)。

【図8b】図8bは、TLR-7の小分子アゴニストとPBMCとのインキュベーション後の、24時間後の、相対的CD69発現によって測定される特定の免疫細胞の活性化のレベルを示すヒストグラムである。黒い丸、N-(4-(4-アミノ-2-(2-メトキシエチル)-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)-N-(テトラヒドロ-2H-ピラン-4-イル)アセトアミド(SM1)、白丸、N-{4-[4-アミノ-2-(2-メトキシエチル)-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル]ブチル}-N-(1,1-ジオキソチエタン-3-イル)アセトアミド(SM2)。

【図8c】図8cは、TLR-7の小分子アゴニストとPBMCとのインキュベーション後の、24時間後の、相対的CD69発現によって測定される特定の免疫細胞の活性化のレベルを示すヒストグラムである。黒い丸、N-(4-(4-アミノ-2-(2-メトキシエチル)-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)-N-(テトラヒドロ-2H-ピラン-4-イル)アセトアミド(SM1)、白丸、N-{4-[4-アミノ-2-(2-メトキシエチル)-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル]ブチル}-N-(1,1-ジオキソチエタン-3-イル)アセトアミド(SM2)。

【図8d】図8dは、TLR-7の小分子アゴニストとPBMCとのインキュベーション後の、24時間後の、相対的CD69発現によって測定される特定の免疫細胞の活性化のレベルを示すヒストグラムである。黒い丸、N-(4-(4-アミノ-2-(2-メトキシエチル)-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)-N-(テトラヒドロ-2H-ピラン-4-イル)アセトアミド(SM1)、白丸、N-{4-[4-アミノ-2-(2-メトキシエチル)-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル]ブチル}-N-(1,1-ジオキソチエタン-3-イル)アセトアミド(SM2)。

【図8e】図8eは、TLR-7の小分子アゴニストとPBMCとのインキュベーション後の、24時間後の、相対的CD69発現によって測定される特定の免疫細胞の活性化のレベルを示すヒストグラムである。黒い丸、N-(4-(4-アミノ-2-(2-メトキシエチル)-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)-N-(テトラヒドロ-2H-ピラン-4-イル)アセトアミド(SM1)、白丸、N-{4-[4-アミノ-2-(2-メトキシエチル)-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル]ブチル}-N-(1,1-ジオキソチエタン-3-イル)アセトアミド(SM2)。

【図9a】図9aは、TLR-7の小分子アゴニストと全血とのインキュベーション後の、24時

間後の、相対的CD69発現によって測定される特定の免疫細胞の活性化のレベルを示すヒストグラムである。黒い丸、N-(4-(4-アミノ-2-(2-メトキシエチル)-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)-N-(テトラヒドロ-2H-ピラン-4-イル)アセトアミド(SM1)、白丸、N-{4-[4-アミノ-2-(2-メトキシエチル)-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル]ブチル}-N-(1,1-ジオキソチエタン-3-イル)アセトアミド(SM2)。

【図9b】図9bは、TLR-7の小分子アゴニストと全血とのインキュベーション後の、24時間後の、相対的CD69発現によって測定される特定の免疫細胞の活性化のレベルを示すヒストグラムである。黒い丸、N-(4-(4-アミノ-2-(2-メトキシエチル)-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)-N-(テトラヒドロ-2H-ピラン-4-イル)アセトアミド(SM1)、白丸、N-{4-[4-アミノ-2-(2-メトキシエチル)-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル]ブチル}-N-(1,1-ジオキソチエタン-3-イル)アセトアミド(SM2)。

【図9c】図9cは、TLR-7の小分子アゴニストと全血とのインキュベーション後の、24時間後の、相対的CD69発現によって測定される特定の免疫細胞の活性化のレベルを示すヒストグラムである。黒い丸、N-(4-(4-アミノ-2-(2-メトキシエチル)-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)-N-(テトラヒドロ-2H-ピラン-4-イル)アセトアミド(SM1)、白丸、N-{4-[4-アミノ-2-(2-メトキシエチル)-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル]ブチル}-N-(1,1-ジオキソチエタン-3-イル)アセトアミド(SM2)。

【図9d】図9dは、TLR-7の小分子アゴニストと全血とのインキュベーション後の、24時間後の、相対的CD69発現によって測定される特定の免疫細胞の活性化のレベルを示すヒストグラムである。黒い丸、N-(4-(4-アミノ-2-(2-メトキシエチル)-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)-N-(テトラヒドロ-2H-ピラン-4-イル)アセトアミド(SM1)、白丸、N-{4-[4-アミノ-2-(2-メトキシエチル)-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル]ブチル}-N-(1,1-ジオキソチエタン-3-イル)アセトアミド(SM2)。

【図9e】図9eは、TLR-7の小分子アゴニストと全血とのインキュベーション後の、24時間後の、相対的CD69発現によって測定される特定の免疫細胞の活性化のレベルを示すヒストグラムである。黒い丸、N-(4-(4-アミノ-2-(2-メトキシエチル)-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)-N-(テトラヒドロ-2H-ピラン-4-イル)アセトアミド(SM1)、白丸、N-{4-[4-アミノ-2-(2-メトキシエチル)-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル]ブチル}-N-(1,1-ジオキソチエタン-3-イル)アセトアミド(SM2)。

【図10a】図10aは、小分子TLR-7アゴニスト、N-(4-(4-アミノ-2-(2-メトキシエチル)-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)-N-(テトラヒドロ-2H-ピラン-4-イル)アセトアミド(SM1)の静脈内投与後の時点における、雄又は雌カニクイザルの血液中のサイトカイン分泌のレベルを示すグラフである。

【図10b】図10bは、小分子TLR-7アゴニスト、N-(4-(4-アミノ-2-(2-メトキシエチル)-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)-N-(テトラヒドロ-2H-ピラン-4-イル)アセトアミド(SM1)の静脈内投与後の時点における、雄又は雌カニクイザルの血液中のサイトカイン分泌のレベルを示すグラフである。

【図10c】図10cは、小分子TLR-7アゴニスト、N-(4-(4-アミノ-2-(2-メトキシエチル)-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)-N-(テトラヒドロ-2H-ピラン-4-イル)アセトアミド(SM1)の静脈内投与後の時点における、雄又は雌カニクイザルの血液中のサイトカイン分泌のレベルを示すグラフである。

【図10d】図10dは、小分子TLR-7アゴニスト、N-(4-(4-アミノ-2-(2-メトキシエチル)-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)-N-(テトラヒドロ-2H-ピラン-4-イル)アセトアミド(SM1)の静脈内投与後の時点における、雄又は雌カニクイザルの血液中のサイトカイン分泌のレベルを示すグラフである。

【図10e】図10eは、小分子TLR-7アゴニスト、N-(4-(4-アミノ-2-(2-メトキシエチル)-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)-N-(テトラヒドロ-2H-ピラン-4-イル)アセトアミド(SM1)の静脈内投与後の時点における、雄又は雌カニクイザルの血液中のサイトカイン分泌のレベルを示すグラフである。

【図10f】図10fは、小分子TLR-7アゴニスト、N-(4-(4-アミノ-2-(2-メトキシエチル)-

0

20

30

40

50

50

50

50

50

50

50

50

【図10r】図10rは、小分子TLR-7アゴニスト、N-(4-(4-アミノ-2-(2-メトキシエチル)-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)-N-(テトラヒドロ-2H-ピラン-4-イル)アセトアミド(SM1)の静脈内投与後の時点における、雄又は雌カニクイザルの血液中のサイト

【図 10 ee】 図10eeは、小分子TLR-7アゴニスト、N-(4-(4-アミノ-2-(2-メトキシエチ

50

ル)-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)-N-(テトラヒドロ-2H-ピラン-4-イル)アセトアミド(SM1)の静脈内投与後の時点における、雄又は雌カニクイザルの血液中のサイトカイン分泌のレベルを示すグラフである。

【図10ff】図10ffは、小分子TLR-7アゴニスト、N-(4-(4-アミノ-2-(2-メトキシエチル)-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)-N-(テトラヒドロ-2H-ピラン-4-イル)アセトアミド(SM1)の静脈内投与後の時点における、雄又は雌カニクイザルの血液中のサイトカイン分泌のレベルを示すグラフである。

【図10gg】図10ggは、小分子TLR-7アゴニスト、N-(4-(4-アミノ-2-(2-メトキシエチル)-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)-N-(テトラヒドロ-2H-ピラン-4-イル)アセトアミド(SM1)の静脈内投与後の時点における、雄又は雌カニクイザルの血液中のサイトカイン分泌のレベルを示すグラフである。

10

【図10hh】図10hhは、小分子TLR-7アゴニスト、N-(4-(4-アミノ-2-(2-メトキシエチル)-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)-N-(テトラヒドロ-2H-ピラン-4-イル)アセトアミド(SM1)の静脈内投与後の時点における、雄又は雌カニクイザルの血液中のサイトカイン分泌のレベルを示すグラフである。

【図10ii】図10iiは、小分子TLR-7アゴニスト、N-(4-(4-アミノ-2-(2-メトキシエチル)-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)-N-(テトラヒドロ-2H-ピラン-4-イル)アセトアミド(SM1)の静脈内投与後の時点における、雄又は雌カニクイザルの血液中のサイトカイン分泌のレベルを示すグラフである。

【図10jj】図10jjは、小分子TLR-7アゴニスト、N-(4-(4-アミノ-2-(2-メトキシエチル)-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)-N-(テトラヒドロ-2H-ピラン-4-イル)アセトアミド(SM1)の静脈内投与後の時点における、雄又は雌カニクイザルの血液中のサイトカイン分泌のレベルを示すグラフである。

20

【図10kk】図10kkは、小分子TLR-7アゴニスト、N-(4-(4-アミノ-2-(2-メトキシエチル)-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)-N-(テトラヒドロ-2H-ピラン-4-イル)アセトアミド(SM1)の静脈内投与後の時点における、雄又は雌カニクイザルの血液中のサイトカイン分泌のレベルを示すグラフである。

【図11a】図11aは、小分子TLR-7アゴニスト、N-(4-(4-アミノ-2-エチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)-N-(1,1-ジオキシドチエタン-3-イル)アセトアミド(SM3)の静脈内投与後の時点における、雄カニクイザルの血液中のサイトカイン分泌のレベルを示すグラフである。

30

【図11b】図11bは、小分子TLR-7アゴニスト、N-(4-(4-アミノ-2-エチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)-N-(1,1-ジオキシドチエタン-3-イル)アセトアミド(SM3)の静脈内投与後の時点における、雄カニクイザルの血液中のサイトカイン分泌のレベルを示すグラフである。

【図11c】図11cは、小分子TLR-7アゴニスト、N-(4-(4-アミノ-2-エチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)-N-(1,1-ジオキシドチエタン-3-イル)アセトアミド(SM3)の静脈内投与後の時点における、雄カニクイザルの血液中のサイトカイン分泌のレベルを示すグラフである。

【図11d】図11dは、小分子TLR-7アゴニスト、N-(4-(4-アミノ-2-エチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)-N-(1,1-ジオキシドチエタン-3-イル)アセトアミド(SM3)の静脈内投与後の時点における、雄カニクイザルの血液中のサイトカイン分泌のレベルを示すグラフである。

40

【図11e】図11eは、小分子TLR-7アゴニスト、N-(4-(4-アミノ-2-エチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)-N-(1,1-ジオキシドチエタン-3-イル)アセトアミド(SM3)の静脈内投与後の時点における、雄カニクイザルの血液中のサイトカイン分泌のレベルを示すグラフである。

【図11f】図11fは、小分子TLR-7アゴニスト、N-(4-(4-アミノ-2-エチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)-N-(1,1-ジオキシドチエタン-3-イル)アセトアミド(SM3)の静脈内投与後の時点における、雄カニクイザルの血液中のサイトカイン分泌のレベルを示すグラフである。

50

示すグラフである。

【図 1 1 g】図11gは、小分子TLR-7アゴニスト、N-(4-(4-アミノ-2-エチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)-N-(1,1-ジオキシドチエタン-3-イル)アセトアミド(SM3)の静脈内投与後の時点における、雄カニクイザルの血液中のサイトカイン分泌のレベルを示すグラフである。

【図 1 1 h】図11hは、小分子TLR-7アゴニスト、N-(4-(4-アミノ-2-エチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)-N-(1,1-ジオキシドチエタン-3-イル)アセトアミド(SM3)の静脈内投与後の時点における、雄カニクイザルの血液中のサイトカイン分泌のレベルを示すグラフである。

【図 1 1 i】図11iは、小分子TLR-7アゴニスト、N-(4-(4-アミノ-2-エチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)-N-(1,1-ジオキシドチエタン-3-イル)アセトアミド(SM3)の静脈内投与後の時点における、雄カニクイザルの血液中のサイトカイン分泌のレベルを示すグラフである。

【図 1 1 j】図11jは、小分子TLR-7アゴニスト、N-(4-(4-アミノ-2-エチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)-N-(1,1-ジオキシドチエタン-3-イル)アセトアミド(SM3)の静脈内投与後の時点における、雄カニクイザルの血液中のサイトカイン分泌のレベルを示すグラフである。

【図 1 1 k】図11kは、小分子TLR-7アゴニスト、N-(4-(4-アミノ-2-エチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)-N-(1,1-ジオキシドチエタン-3-イル)アセトアミド(SM3)の静脈内投与後の時点における、雄カニクイザルの血液中のサイトカイン分泌のレベルを示すグラフである。

【図 1 1 l】図11lは、小分子TLR-7アゴニスト、N-(4-(4-アミノ-2-エチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)-N-(1,1-ジオキシドチエタン-3-イル)アセトアミド(SM3)の静脈内投与後の時点における、雄カニクイザルの血液中のサイトカイン分泌のレベルを示すグラフである。

【図 1 1 m】図11mは、小分子TLR-7アゴニスト、N-(4-(4-アミノ-2-エチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)-N-(1,1-ジオキシドチエタン-3-イル)アセトアミド(SM3)の静脈内投与後の時点における、雄カニクイザルの血液中のサイトカイン分泌のレベルを示すグラフである。

【図 1 2 a】図12aは、TLR-8の小分子アゴニスト、2-エチル-1-(4-((2-メチルテトラヒドロフラン-3-イル)アミノ)ブチル)-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-4-アミン(SM4)と異なるヒト個体から単離されたPBMCとの24時間インキュベーション後の、サイトカイン発現の量を示すグラフである。

【図 1 2 b】図12bは、TLR-8の小分子アゴニスト、2-エチル-1-(4-((2-メチルテトラヒドロフラン-3-イル)アミノ)ブチル)-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-4-アミン(SM4)と異なるヒト個体から単離されたPBMCとの24時間インキュベーション後の、サイトカイン発現の量を示すグラフである。

【図 1 2 c】図12cは、TLR-8の小分子アゴニスト、2-エチル-1-(4-((2-メチルテトラヒドロフラン-3-イル)アミノ)ブチル)-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-4-アミン(SM4)と異なるヒト個体から単離されたPBMCとの24時間インキュベーション後の、サイトカイン発現の量を示すグラフである。

【図 1 2 d】図12dは、TLR-8の小分子アゴニスト、2-エチル-1-(4-((2-メチルテトラヒドロフラン-3-イル)アミノ)ブチル)-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-4-アミン(SM4)と異なるヒト個体から単離されたPBMCとの24時間インキュベーション後の、サイトカイン発現の量を示すグラフである。

【図 1 2 e】図12eは、TLR-8の小分子アゴニスト、2-エチル-1-(4-((2-メチルテトラヒドロフラン-3-イル)アミノ)ブチル)-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-4-アミン(SM4)と異なるヒト個体から単離されたPBMCとの24時間インキュベーション後の、サイトカイン発現の量を示すグラフである。

【図 1 2 f】図12fは、TLR-8の小分子アゴニスト、2-エチル-1-(4-((2-メチルテトラヒド

10

20

30

40

50

ロフラン-3-イル)アミノ)ブチル)-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-4-アミン(SM4)と異なるヒト個体から単離されたPBMCとの24時間インキュベーション後の、サイトカイン発現の量を示すグラフである。

【図13a】図13aは、TLR-8の小分子アゴニスト、1-(4-(シクロヘキシルアミノ)ブチル)-2-エチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-4-アミン(SM5)と異なるヒト個体から単離されたPBMCとの24時間インキュベーション後の、サイトカイン発現の量を示すグラフである。

【図13b】図13bは、TLR-8の小分子アゴニスト、1-(4-(シクロヘキシルアミノ)ブチル)-2-エチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-4-アミン(SM5)と異なるヒト個体から単離されたPBMCとの24時間インキュベーション後の、サイトカイン発現の量を示すグラフである。

【図13c】図13cは、TLR-8の小分子アゴニスト、1-(4-(シクロヘキシルアミノ)ブチル)-2-エチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-4-アミン(SM5)と異なるヒト個体から単離されたPBMCとの24時間インキュベーション後の、サイトカイン発現の量を示すグラフである。

【図13d】図13dは、TLR-8の小分子アゴニスト、1-(4-(シクロヘキシルアミノ)ブチル)-2-エチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-4-アミン(SM5)と異なるヒト個体から単離されたPBMCとの24時間インキュベーション後の、サイトカイン発現の量を示すグラフである。

【図13e】図13eは、TLR-8の小分子アゴニスト、1-(4-(シクロヘキシルアミノ)ブチル)-2-エチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-4-アミン(SM5)と異なるヒト個体から単離されたPBMCとの24時間インキュベーション後の、サイトカイン発現の量を示すグラフである。

【図13f】図13fは、TLR-8の小分子アゴニスト、1-(4-(シクロヘキシルアミノ)ブチル)-2-エチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-4-アミン(SM5)と異なるヒト個体から単離されたPBMCとの24時間インキュベーション後の、サイトカイン発現の量を示すグラフである。

【図13g】図13gは、TLR-8の小分子アゴニスト、1-(4-(シクロヘキシルアミノ)ブチル)-2-エチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-4-アミン(SM5)と異なるヒト個体から単離されたPBMCとの24時間インキュベーション後の、サイトカイン発現の量を示すグラフである。

【図13h】図13hは、TLR-8の小分子アゴニスト、1-(4-(シクロヘキシルアミノ)ブチル)-2-エチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-4-アミン(SM5)と異なるヒト個体から単離されたPBMCとの24時間インキュベーション後の、サイトカイン発現の量を示すグラフである。

【実施例1】

【0227】

承認されたインターベンショナルフェーズI臨床試験(NCT02410733)内で、悪性メラノーマを有する15名のヒト患者を、増加量のナノ粒子状リボソーム製剤化RNAに基づく免疫療法薬で、静脈内投与により、1(V2)、8(V3)、15(V4)、22(V5)、29(V6)、36(V7)、50(V8)及び64(V9)日目に(患者1、2及び3は、1、8、15、22、29、43日目のみ)処置した。免疫療法薬は、静脈内投与後に効率のTLR7誘発I型インターフェロン駆動免疫活性化及びT細胞刺激をもたらす、1種のメラノーマ関連抗原をそれぞれコードする4種の個々のRNA-リボプレックス($\text{RNA}_{(\text{LIP})}$)産物を含んだ。第1のワクチン接種サイクルの7.2 μg 全RNAから開始し、第2のワクチン接種サイクルの14.4 μg 全RNA、残るワクチン接種サイクルのそれぞれ最大29、50、75又は100 μg 全RNAの増加用量レベルで、患者を処置した。

【0228】

各ワクチン接種サイクルの前後で、バイタルサイン及び有害事象/重篤有害事象(副作用)を評価及び報告した。個々のワクチン接種サイクル($\text{RNA}_{(\text{LIP})}$ 投与後0(ワクチン接種前)、2、6、24及び48時間(h)目)において、血液学的解析及び全身性サイトカイン測定のために血液試料を得た。リンパ球数(図1a)、血小板数(図1b)及び血清サイトカイン発現レベル(図1c~図1f)を患者毎に決定した。

【0229】

第1の患者(女性、1982年生まれ)は、免疫療法薬の投与後数時間以内に、頭痛、疲労、振戦及び発熱等、免疫系活性化に典型的に関連する症状を経験した。これらの症状は、用量依存性であり、14.4 μg の用量(第2のワクチン接種サイクル)で観察された。29 μg RNA(第3のワクチン接種サイクル)による処置後に、中等度発熱関連頻拍及び低血圧がその上観察された。観察された症状は、パラセタモールの投与によって容易に管理できたが、にも

かわらず、この患者の残るワクチン接種サイクルでの14.4 μ g全RNAへの用量低下をもたらした。観察された血液学的変化は、全身性リンパ球及び血小板の可逆的用量依存性低下、並びに全身性IFN- α 、IL-6、IFN- γ の僅かな一過性増加及びIP-10の強い分泌を含んだ。これらの観察は、RNA_(LIP)免疫療法に考えられる作用機序と合致しており、大規模前臨床試験から観察された結果を確認する。

【0230】

第2の患者(女性、1947年生まれ)は、全3種の用量レベルで免疫療法薬(ワクチン接種)の投与に非常に良好な耐容性を示し、免疫療法薬に係る有害事象は観察されなかった。更に、用量依存性様式でのIFN- γ 及びIL-6の軽微な一過性増加並びに実質的IP-10分泌に加えて、ごく僅かな血液学的変化が検出された。しかし、総分泌サイトカイン量は、図1c ~ 図1fに描写される通り、第1の患者と比較して有意に少なかった。 10

【0231】

第3の患者(男性、1950年生まれ)は、治験責任医師の裁量で投与前後に与えたパラセタモールの同時投与による、全3種の用量レベルにおける免疫療法薬の投与に非常に良好な耐容性を示した。この患者に関して、24時間以内に消散した第3のワクチン接種サイクル(29 μ g)後の軽度発熱が、観察された唯一の臨床症状であった。第1の患者と同様に、但し、より少ない程度までの全身性リンパ球の用量依存性一過性減少、並びにIFN- α 、IFN- γ 及びIP-10の用量依存性一過性増加が観察された一方、全身性IL-6の量は、第1及び第2の患者におけるものよりも有意に高かったが、同様に24時間以内に完全に反転した。

【0232】

第4の患者(女性、1971年生まれ)は、それぞれ7.2 μ g又は14.4 μ g全RNAのいずれかによる投与後数時間以内に、頭痛、疲労及び悪寒等、免疫系活性化に典型的に関連する症状を経験した。両方の投薬量において、循環リンパ球の軽微な一過性減少が検出され、第1の患者に匹敵するIFN- γ 、IP-10及びIFN- α の中等度一過性用量依存性サイトカイン誘導が観察された一方、14.4 μ gによる投与後のIL-6増加は、軽微により高く、第3の患者のサイトカインレベルに寧ろ匹敵する。 20

【0233】

第5の患者(男性、1980年生まれ)は、免疫療法薬の投与に非常に良好に耐容性を示し、第2のワクチン接種サイクル(14.4 μ g)後に体温が軽微に増加し、第3のワクチン接種サイクル(14.4 μ g)後に軽度関節痛が見られた。血小板数は有意に影響されなかった一方、14.4 μ gによる第2のワクチン接種サイクル後に、中等度だが完全に一過性のリンパ球減少症が観察された。他の5名の患者と比較して最低であった第2のワクチン接種サイクル後のIP-10分泌のごくわずかで完全に可逆的な増加を除いて、全身性サイトカインの増加はほぼ観察されなかった。 30

【0234】

第6の患者(女性、1974年生まれ)は、免疫療法薬の投与に非常に良好に耐容性を示した。この患者により、悪寒、頭痛及び手足の疼痛(全て軽度)が、14.4 μ g(第2のワクチン接種サイクル)の投与後に報告された唯一の臨床観察有害事象であった。加えて、血小板及びリンパ球の完全に可逆的で軽微な用量依存性減少が観察された。更に、第2のワクチン接種サイクル(14.4 μ g)後の全身性IFN- α 及びIFN- γ の僅かな用量依存性増加が検出され、後者は、強度が第1及び第4の患者に匹敵した。 40

【0235】

同様に、RNA_(LIP)処置に対する個体間感受性が、患者7、8、9、10、11、12、14、15及び16(年齢範囲27~75歳)に観察された。これは、血液学的変化の異なる強度、及び特に用量29 μ g全RNAにおける全身性サイトカインレベルの変動する一過性誘導、及び反復性RNA_(LIP)投薬に関する多岐の有害事象プロファイルによって反映される。患者の大部分は、最大75及び100 μ g全RNAの用量でも同様に反復性RNA_(LIP)に非常に良好に耐容性を示した一方、選択された患者は、100 μ g RNA_(LIP)(患者16)による処置後に重篤な発熱を、又は7.2 μ g(患者11)、14.4 μ g(患者10)及び75又は100 μ g全RNA_(LIP)(患者16)による処置後に高血圧の悪化を経験した。 50

【0236】

15名の患者の間の各用量で経験される観察される有害事象の間の差に基づくだけではなく、免疫療法薬の投与後の様々な時点における血液学的変化及び血清サイトカイン発現レベルの個体間差にも基づき、データは、異なる個体が、同じ用量の同じ免疫療法剤の投与後の誘導される免疫学的反応のその強度において変動することを明らかに示す。

【実施例2】

【0237】

次の試験の目的は、リボソームと複合体形成したRNA分子と細胞が接触された後に、ある特定のサイトカインの発現を測定することにより、単離された末梢血単核細胞(PBMC)又は全血中の細胞の*in vitro*活性化に関する情報を得ることであり、このRNA分子は、ある特定の腫瘍抗原(RNA_{LIP})をコードする。コードされた抗原は、NY-ESO1、多種多様な腫瘍において発現されるがん抗原(RBL001.1)、チロシナーゼ(RBL002.2)、MAGE-A3、メラノーマ関連抗原(RBL003.1)及びTPTE、チロシン-タンパク質ホスファターゼ(RBL004.1)であった。

10

【0238】

本試験の第1のパートにおいて、健康なドナーから得られるヒトヘパリン処置した全血及びPBMC(ヘパリン処置した全血から単離)の試料を、等しい分量のリボソームで製剤化されたRBL001.1、RBL002.2、RBL003.1及びRBL004.1の混合物と接触させた。全血におけるサイトカイン分泌に関する樹状細胞(DC)の役割に関する情報を得るために、試験の第2のパートにおいて、ヘパリン処置した全血は、形質細胞様DC(pDC)又は単球由来未成熟DC(iDC)を富化し、その後、リボソームで製剤化されたRNA分子(RNA-LIP)と共にインキュベートした。

20

【0239】

本試験の両パートにおける一次エンドポイントとして、培養上清におけるサイトカイン発現の解析により接触の6時間及び24時間後に、これらの細胞の活性化を決定した。試験の第1のパートのため、次のサイトカインを解析した: IP-10、IFN- γ 、TNF- α 、IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-12及びIFN- α 2。試験の第2のパートにおいて、IP-10、IL-6及びIFN- α 2のみを解析した。

【0240】

4種の異なるRNA-LIP組成物と接触された培養されたPBMCにおいて、全ての検出可能なサイトカインの用量依存性誘導が観察された(図2a~図2h)。図3a~図3hから分かる通り、発現を検出することができる全血において、サイトカインIFN- γ 、TNF- α 、IL-1 β 、IL-2及びIL-12のレベルの変更はなかった。また、IFN- α 2は、希釈剤対照と比較して全血においていずれの用量でも有意に増加しなかった。しかし、ケモカインIP-10(CXCL10)は、全血において用量依存性様式で上方調節されることが観察された。全血におけるIL-6の誘導増加は、4名のドナーのうち1名のみから得られる細胞においてごく低レベルで観察された。

30

【0241】

樹状細胞富化全血による試験において、IP-10、IFN- α 2及びIL-6の用量依存性誘導も観察された。

【0242】

単離されたPBMCから観察された結果は、全血と比較していくつかの差を示し、単離されたPBMCによる検査システムのより高い感受性を示唆する。単離されたPBMCにより、検査したサイトカインについて、サイトカインレベル増加が観察された一方、全血中のPBMCにより、サイトカイン検出は、IFN- α 2、IP-10及びIL-6に限定された。試験の第2のパートにおいて、全血におけるサイトカイン分泌は、異なる種類のDCの富化により増加し、DCが、RNA-リボソーム複合体の取り込みのための主要細胞型であることを示唆する。このデータに基づき、新鮮pDCの富化は、IFN- α 2分泌増加をもたらすため、pDCが、全血におけるリボソームで製剤化されたRNA取り込みのための主要細胞型であることが仮定され得る。

40

【0243】

更に、これらの結果は、同じ用量における個体の免疫反応性材料(PBMC、全血及びDCを

50

富化された全血)と免疫療法剤(RNA-LIP)との接触に应答した様々な免疫学的反応における有意な個体変動を明らかに示す。

【 0 2 4 4 】

材料:

試験において使用される材料及びその個々の供給源を次に示す:Customer 7-plex(Cat.: L5002JFHHC)、IFN- α 2 single Plex(Cat.:171-B6010M)、IP-10 single Plex(Cat.:171-B5020M)、IL-6 single Plex(Cat.:171-B5006M)、Cytokine Standards Group II(Cat.:171-D60001)、Cytokine Standards Group I(Cat.:171-D50001)、Bio-Plex Pro Reagent Kit(Cat.:171-304070M)は全て、Bio-Rad Laboratories GmbH社から得られ;ピルビン酸ナトリウム(Cat.:11360-039)、非必須アミノ酸(Cat.:11140-035)、ペニシリン-ストレプトマイシン(Cat.:15140-122)、HEPES(Cat.:15360-056)、RPMI-1640+Glutamax(商標)(Cat.:61870-010)は全て、Invitrogen、GIBCO社(登録商標)から得られ;ヒト血清AB型は、LONZA社から得られ;IL-4(Cat. No.:130-093-924)、CD14-ビーズ(Cat.:130-050-201)、CD304-ビーズ(Cat.:130-090-532)は全て、Miltenyi Biotech GmbH社から得られ;Leucomax、モルグラモスチム(rHuman GM-CSF)は、Novartis社から得られ;Ficoll-Paque PLUS(Cat.:17-1440-03)は、GE Healthcare社から得られる。

10

【 0 2 4 5 】

方法:

健康な志願者から全血を無菌シリンジ内に収集した。抗凝固薬としてヘパリンを使用した。ヘパリン処置した全血を使用して、Ficoll-Paque上の密度遠心分離によってPBMCを生成した。全血から単離された新鮮に調製されたPBMCを使用することによりiDCを単離し、CD14+単球の単離は、磁性ビーズに基づく分離によって行った。全血から単離された新鮮に調製されたPBMCを使用することによりpDCを単離し、pDCの単離は、磁性ビーズに基づく分離によって行った。

20

【 0 2 4 6 】

本試験の第1のパートのため、健康なドナー(n=4)からヘパリン処置した全血を収集した。全血の1パートを使用して、PBMCを生成した。その後、PBMCを培地に再懸濁し、96ウェルプレートに播種した。詳細には、用量群当たり 5×10^5 個のPBMCをウェル当たり180 μ Lにおいて播種した。次いで、リボソームと複合体形成したRNA(RNA-リボソーム混合物)を含有する溶液の20 μ Lを、最終容量200 μ L(各溶液の1:10希釈)及び最終細胞密度 2.5×10^6 PBM C/mLに達するように添加した。検査した全用量に関して、3回複製からデータを作成した。同じドナーから得られた残りの全血を直接的にピペッティングして、96ウェルプレートのウェルに入れた。詳細には、全用量群に関して3回複製して180 μ L全血を播種し、リボソームと複合体形成したRNAを含有する溶液の20 μ Lを、最終容量200 μ L及びスパイク溶液の1:10希釈に達するように添加した。下のTable 1(表1)及びTable 2(表2)は、個々の検査試料の概要を述べる:

30

【 0 2 4 7 】

【表 1】

Table 1: 試験の第1のパートの用量群(単離されたPBMC)

用量群	検査システム	検査品目/IVT RNA	最終用量($\mu\text{g RNA/ml}$)
#1	PBMCs	RNA-リポソーム混合物	3.33
#2	PBMCs	RNA-リポソーム混合物	1.111
#3	PBMCs	RNA-リポソーム混合物	0.370
#4	PBMCs	RNA-リポソーム混合物	0.123
#5	PBMCs	RNA-リポソーム混合物	0.041
#6	PBMCs	RNA-リポソーム混合物	0.014
対照	PBMCs	希釈剤/NaCl(0.9%)	0

10

【0248】

【表 2】

20

Table 2: 試験の第1のパートの用量群(全血)

用量群	検査システム	検査品目/IVT RNA	最終用量($\mu\text{g RNA/ml}$)
#1	全血	RNA-リポソーム混合物	3.33
#2	全血	RNA-リポソーム混合物	1.111
#3	全血	RNA-リポソーム混合物	0.370
#4	全血	RNA-リポソーム混合物	0.123
#5	全血	RNA-リポソーム混合物	0.041
#6	全血	RNA-リポソーム混合物	0.014
対照	全血	希釈剤/NaCl(0.9%)	0

30

【0249】

試験の第2のパートのため、ヘパリン処置した全血を同じドナー(n=2)から2回収集した。初回、ヘパリン処置した全血を使用して、PBMCを生成し、その後、CD14+単球を単離した。単離された単球を5日間培養して、iDCを生成した。サイトカインIL-4及びGM-CSF(それぞれの1000U/ml)を培養培地に添加して、iDCの生成を刺激した。3日後に、細胞に、サイトカインを含む新鮮培地を与えた。次に、同じドナー由来のヘパリン処置した全血を2回目のために収集した。この血液の1パートを使用して、PBMCを生成し、その後、pDCを単離した。後に、全血の残りを上述通りにウェルに播種した:96ウェルプレートにおけるウェル当たり180 μL 。最高用量群に関して、100 μL 全血をピペティングした。自家pDC又はiDCの添加を次に示す:Table 3(表3)に示す通りに、10,000個のDCを全血試料に添加した。DCの添加後に、リポソームで製剤化されたRNAを含有する溶液の20 μL を、最終容量200 μL 及び溶液の1:10希釈に達するように添加した。

40

【0250】

50

【表 3】

Table 3: 試験の第2のパートの用量群

用量群	検査システム	10,000個のDC(型)をスパイク	検査品目/IVT RNA	最終用量 ($\mu\text{g RNA/ml}$)
#1	全血	-	RNA-リボソーム混合物	50
#2	全血	-	RNA-リボソーム混合物	10
#3	全血	-	RNA-リボソーム混合物	2
#4	全血	-	RNA-リボソーム混合物	0.4
#5	全血	-	RNA-リボソーム混合物	0.08
#6	全血	-	RNA-リボソーム混合物	0.016
対照	全血	-	希釈剤/NaCl(0.9%)	0
#1	全血	iDCs	RNA-リボソーム混合物	50
#2	全血	iDCs	RNA-リボソーム混合物	10
#3	全血	iDCs	RNA-リボソーム混合物	2
#4	全血	iDCs	RNA-リボソーム混合物	0.4
#5	全血	iDCs	RNA-リボソーム混合物	0.08
#6	全血	iDCs	RNA-リボソーム混合物	0.016
対照	全血	iDCs	希釈剤/NaCl(0.9%)	0
#1	全血	pDCs	RNA-リボソーム混合物	50
#2	全血	pDCs	RNA-リボソーム混合物	10
#3	全血	pDCs	RNA-リボソーム混合物	2
#4	全血	pDCs	RNA-リボソーム混合物	0.4
#5	全血	pDCs	RNA-リボソーム混合物	0.08
#6	全血	pDCs	RNA-リボソーム混合物	0.016
対照	全血	pDCs	希釈剤/NaCl(0.9%)	0

10

20

30

【0251】

実験予定表

試験の第1のパート:

1日目:ヘパリン処置した全血(n=4)の収集

各ドナーのPBMCの調製

PBMC及び全血の播種

RNA-LIPの溶液の添加及びインキュベート

6時間の時点で上清/血漿を収集し、-65~-85 で凍結

2日目:24時間の時点で上清/血漿を収集し、-65~-85 で凍結

任意の後日に凍結した上清の解析を実行

試験の第2のパート:

1日目:全血(n=2)の収集

各ドナーからのPBMCの調製

40

50

PBMCからのCD14+単球の単離

単離されたCD14+単球を培養してiDCを生成

4日目:iDCのフィーディング

6日目:iDCの収集

全血(n=2;同じドナー)の収集

各ドナーのPBMCの調製

PBMCからのpDCの単離

全血の播種

それぞれiDC又はpDCの添加

RNA-LIPを含有する溶液の添加

6時間の時点で上清/血漿を収集し、-65~-85 で凍結

7日目:24時間の時点で上清/血漿を収集し、-65~-85 で凍結

任意の後日に上清/血漿の解析を実行

【0252】

結果:

RNA-LIP混合物とのPBMCの24時間インキュベーション後に、全サイトカインの用量依存性分泌が検出された。しかし、サイトカインの濃度レベルにおける高変動(20~60,000pg/ml)が観察された。サイトカイン応答は、8種の選択されたサイトカインのうち5種、即ち、IP-10、IFN- γ 、TNF- α 、IL-1 β 及びIL-6によって支配された(Table 4(表4)を参照)。その上、分泌の時点における差も観察された:IL-1 β 、IL-6及びTNF- α は既に、インキュベーション(高RNA濃度で)6時間後に検出され、レベルは24時間後に著しく増加せず、RNA-LIP組成物の添加に応答する、異なるドナー由来の細胞の能力における変動を示す。

【0253】

10

20

【表 4 A】

Table 4: 単離されたPBMCの結果の要約

サイトカイン	結果	
IFN- α 2	全ドナーから得られる試料における24時間後に検出可能な上昇した分泌用量依存性誘導 低レベルにおける値及び用量0.014～0.37 μ g/mLにおいて著しく上昇せず	10
IP-10	全ドナーから得られる試料における24時間後に検出可能な上昇した分泌用量依存性誘導 4/4名のドナーにおける、0.37 μ g/mLにおいて検出可能な上昇したレベル 3/4名のドナーにおける、0.12 μ g/mLにおいて検出可能な上昇したレベル	20
IL-6	全ドナーから得られる試料における6時間及び24時間後に検出可能な上昇した分泌用量依存性誘導 4/4名のドナーにおける、0.37 μ g/mLにおいて検出可能な上昇したレベル 3/4名のドナーにおける、24時間後に0.12 μ g/mLにおいて検出可能な上昇したレベル	30
IFN- γ	全ドナーから得られる試料における24時間後に検出可能な上昇した分泌用量依存性誘導 4/4名のドナーにおける、0.37 μ g/mLにおいて検出可能な上昇したレベル	40

【表 4 B】

TNF- α	全ドナーから得られる試料における6時間後及び24時間後に検出可能な上昇した分泌 用量依存性誘導 4/4名のドナーにおける、6時間後のみに0.37 μ g/mLにおいて検出可能な上昇したレベル	10
IL-1 β	全ドナーにおける6時間及び24時間後に検出可能な上昇した分泌 用量依存性誘導 4/4名のドナーにおける、0.37 μ g/mLにおいて検出可能な上昇したレベル 2/4名のドナーにおける、24時間後に0.12 μ g/mLにおいて検出可能な上昇したレベル	20
IL-2	全ドナーから得られる試料における6時間後及び24時間後に検出可能な上昇した分泌 用量依存性誘導 低レベルにおける値及び用量0.014～0.37 μ g/mLにおいて上昇せず	30
IL-12	全ドナーから得られる試料における24時間後に検出可能な上昇した分泌 用量依存性誘導 2/4名のドナーにおける、0.37 μ g/mLにおいて検出可能な上昇したレベル	

【0255】

単離されたPBMCによる試験に加えて、全血における類似の実験を行った。これらの試験において、次のサイトカインに関して、RNA-LIP組成物とのインキュベーション後に、著しい濃度までの上昇したサイトカイン分泌は検出不能であった：IFN- γ 、TNF- α 、IL-1 β 、IL-2及びIL-12(Table 5(表5)及び図3a～図3hを参照)。いくつかのデータ点において、3回複製のうち1回のみにおいて観察された上昇したレベルを外れ値と考慮したことに留意されたい。IFN- α 2に関して、希釈剤対照を含む、4名のドナーのうち3名のいくつかの試料において検出可能な低レベルのベースライン分泌が見られた。24時間後に、検査した最高用量で、全ドナーに関してIP-10の上昇した分泌が検出された。4名のドナーのうち2名において、用量#3(0.37 μ g/mL)において検出可能な上昇したレベルが依然として見られた。非常に低レベルであるが、IL-6は、24時間後に、検査した最高用量で、4名のドナーのうち2名においてRNA-LIPの添加後に上昇した。

【 0 2 5 6 】

【 表 5 】

Table 5: 全血の結果の要約

サイトカイン	結果	
IFN- α 2	4名のドナーのうち3名から得られるいくつかの試料において非常に低レベルで検出可能な分泌 用量依存性なし及びいずれの希釈においても対照と比較して検出可能な明瞭な上昇なし	10
IP-10	全ドナーから得られる試料における24時間後に検出可能な上昇した分泌 用量依存性誘導 4名のドナーのうち2名から得られる試料において、0.37 μ g/mLにおいて上昇したレベルが検出可能であった	20
IL-6	4名のドナーのうち2名から得られる試料において、非常に低レベルで、最高用量でのみ検出可能な上昇した分泌	
IFN- γ	検出可能な上昇した分泌なし	
TNF- α	検出可能な上昇した分泌なし	30
IL-1 β	検出可能な上昇した分泌なし	
IL-2	検出可能な上昇した分泌なし	
IL-12	検出可能な上昇した分泌なし	

【 0 2 5 7 】

40

全血における活性化及びサイトカイン分泌のためのDCの役割を検査するために、試験の第2のパートを行った。そこで、自家iDC又はpDCを富化したヘパリン処置した全血を、0.016 ~ 50 μ g/mLの用量範囲でRNA-LIP組成物と共にインキュベートした。図4a ~ 図4c及び図5a ~ 図5cに提示する結果は、IFN- α 2、IP-10及びIL-6の明確な用量依存性誘導を示す。IFN- α 2に関して、検査した2種の最高用量(10及び50 μ g/mL)でのみ、全血におけるRNA-LIP組成物との24時間インキュベーション後に、上昇した分泌が観察された。用量3(2 μ g/mL)により、検出可能な分泌増加は見られなかった。しかし、ヘパリン処置した全血へのpDCの添加は、2 μ g/mL用量でIFN- α 2の分泌を増加させた。対照的に、iDCの添加は、全血単独と比較して、このサイトカインの分泌増加をもたらさなかった。著しいことに、0.4 ~ 50 μ g/mL RNA-LIP(0.08 μ g/mLにより軽微に)との24時間インキュベーション後に、IP-10の

50

レベル上昇が検出され、このことは、試験の第1のパートの結果を確認した。いずれの種類のDCの添加も、添加なしと比較して、検出されたサイトカインの更により大きい分泌をもたらしたが、iDCを富化した全血において最高レベルが検出された。IL-6に関して、試験の第1のパートの結果が確認された、即ち、2 µg/mLよりも高い用量により、発現レベル増加が検出された。そこで、全血へのiDCの添加も、全血単独と比較して、発現のレベル増加をもたらした。

【0258】

考察及び結論

試験の第1のパートに関して、両方の検査システムである単離されたヒトPBMC及び全血において、RNA-LIP組成物とのインキュベーション後に、いくつかのサイトカインが分泌された。しかし、検査システム間の差は、PBMCが、検査システムとしてより高い感度を有することを示唆する。一方で、全8種の被験サイトカインに関して、単離されたPBMCにおけるサイトカインレベル増加を検出することができた。検査システムとして全血を使用したところ、サイトカイン検出は、IFN-α2、IP-10及びIL-6に限定された。単離されたPBMCは、血清(FCS)及び抗生物質を補充した培養培地と共に培養された一方で、全血における培養は、PBMCがヒト血漿及び赤血球細胞と共に培養されたことを意味するため、異なる結果は、異なる培養条件に起因し得る。

【0259】

試験の第2のパートにおいて、全血におけるIFN-α2分泌が、pDCの添加により増加されることが示された。pDCが、TLR-7活性化後にIFN-αを分泌することが公知である(Kwissら、2012、Distinct TLR adjuvants differentially stimulate systemic and local innate immune responses in nonhuman primates、Blood 119:2044~2055頁;Schillerら、2006、Immune response modifiers--mode of action、Exp. Dermatol. 15:331~341頁、Hornungら、2005、Sequence-specific potent induction of IFN-alpha by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7、Nat. Med. 11(3):263~270頁)。TLR-7は、エンドソーム内のRNAによって活性化されるため、これは、pDCが、RNAの取り込みのための主要細胞型であることを示す。

【0260】

これらの実験の結果は、同じ濃度(同じ用量)で同じ免疫療法剤と接触された、異なる個体から単離された同じ免疫反応性材料が、有意に異なる免疫学的反応をもたらすことも示し、これにより、同じ用量の免疫療法剤が、異なる個体において異なる効果を有し、したがって、あらゆる個体において治療有効及び/又は耐容性を示す用量は1つもないという結論が更に支持される。

【実施例3】

【0261】

次の試験の目的は、様々な濃度の小さなTLR-7アゴニスト化合物、即ち、N-(4-(4-アミノ-2-(2-メトキシエチル)-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)-N-(テトラヒドロ-2H-ピラン-4-イル)アセトアミド(本明細書においてSM1と命名)及びN-{4-[4-アミノ-2-(2-メトキシエチル)-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル]ブチル}-N-(1,1-ジオキソチエタン-3-イル)アセトアミド(本明細書においてSM2と命名)と共に細胞をインキュベートした後に、ある特定のサイトカインの分泌及び一般的活性化マーカー(CD69)の誘導を測定することにより、単離された末梢血単核細胞(PBMC)又は新鮮全血中の細胞のin vitroでの活性化に関する情報を得ることであった。より詳細に後述する通り、健康なドナーから得られるヒトのヘパリン処置した全血及びPBMC(パフィーコートから単離)を、等モル量のアゴニスト化合物SM1又はSM2と共に24時間インキュベートした。

【0262】

実験に使用したPBMCは、Ficoll-Paque上の密度遠心分離によりパフィーコートから単離した。その後、PBMCを細胞培養培地に再懸濁し、96ウェルプレートに播種した。詳細には、用量群当たり 5×10^5 個のPBMCをウェル当たり190 µlにおいて播種した。次いで、指定濃度の10 µLのアゴニストを、最終容量200 µL(各溶液の1:20希釈)及び最終細胞密度 2.5×10

10

20

30

40

50

⁶PBMC/mLに達するように添加した。プレートを37℃及び5%CO₂で24時間インキュベートした。その後、上清を収集し、直ちに解析した、又は凍結し、解析まで-80℃に維持した。検査したアゴニストの全用量に関して、それぞれ生物学的に2回複製して、10個体(両方の試験パートのため)からデータを作成した。

【0263】

健康な志願者から全血を無菌シリンジ内に収集した。抗凝固薬としてヘパリンを使用した。新鮮なヘパリン処置した全血を直接的にピペティングして、96ウェルプレートに入れた。詳細には、異なる個体(CBAのためのn=10名のドナー;フローサイトメトリーのためのn=8)由来の190 µL全血を、全用量群のために2回複製して播種し、10 µLの検査品目溶液を、最終容量200 µL及びスパイク溶液の1:20希釈に達するように添加した。プレートを37℃及び5%CO₂で24時間インキュベートした。その後、上清を収集し、直ちに解析した、又は凍結し、解析まで-80℃に維持した。

【0264】

CD69発現により細胞活性化を測定するために、細胞ペレットを収集し、直ちにフローサイトメトリー染色及び測定を行った。

【0265】

希釈剤DMSO(ジメチルスルホキシド)により系列希釈において各アゴニストを調製した:8工程における5倍。PBMC又は全血と共にインキュベートしたアゴニスト化合物濃度は、10 µM、2 µM、0.4 µM、0.08 µM、0.016 µM、0.0032 µM、0.0006 µM及び0.0001 µMであった。

【0266】

試験の第1のパートの一次エンドポイントとして、サイトメトリックビーズアッセイ(CBA)による細胞培養上清(PBMC)及び血漿(全血)におけるサイトカイン分泌の誘導の解析によって、細胞の活性化を決定した。次のサイトカイン/ケモカインを解析した(IFN-α、IP-10、IFN-γ、IL-1β、TNF-α、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12p70及びIL-2)。試験の第2のパートのため、フローサイトメトリーによるいくつかの種類の免疫細胞における一般的活性化マーカーCD69の発現の解析により、細胞活性化を決定した。次の種類の免疫細胞を精査した:形質細胞様樹状細胞(pDC)、骨髄樹状細胞(mDC)、単球、B細胞及びNK細胞。

【0267】

特に、サイトカイン濃度の決定のため、全10種のサイトカイン/ケモカイン(IFN-α、IP-10、IFN-γ、IL-1β、TNF-α、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12p70及びIL-2)を含む、サイトメトリックビーズアッセイ(Multiplex-Kit、(ProcartaPlex;eBioscience))を使用した。Luminex(登録商標)システムにより解析を行った。

【0268】

フローサイトメトリーのため、表面マーカーのCD3、CD16、CD19、CD14、BDCA2及びBDCA3並びに活性化マーカーCD69を組み合わせる抗体混合物で細胞ペレットを染色した。このフローパネルにより、B細胞、NK細胞、単球、形質細胞様樹状細胞(pDC)及び骨髄樹状細胞(mDC)の活性化を解析することが可能になった。BD FACSCanto II(商標)により測定を行った。

【0269】

TLR7アゴニストと共にインキュベートした培養PBMCにおいて、10種の測定されたサイトカインのうち8種の一貫した用量依存性誘導が観察された(図6a~図6h)。IL-12p70及びIL-2のみが一貫して誘導されず、僅かな事例において、一部のドナーのPBMCにおいて低レベルでのみ発現された(図6i~図6j)。異なるアゴニスト濃度での異なるドナーのサイトカインレベルの比較は、両方のアゴニスト化合物に関して高い可変性を示し、これは、in vitro設定での免疫細胞と例示的なTLR7アゴニストのインキュベーションによって例証される通り、外部刺激に対する免疫系の高い個体間応答性に起因すると考えられる。

【0270】

各アゴニスト化合物と全血のインキュベーション後に(図7a~図7j)、検出されたサイトカインの用量応答曲線は、PBMCを使用して為された観察に大部分、類似していた。しかし

10

20

30

40

50

、PBMCとは対照的に、各アゴニスト化合物とのインキュベーション後にIL-12p70分泌の一貫した用量依存性誘導も見られる(図7j)。PBMCにおいて観察される通り、サイトカイン分泌の用量応答曲線は、高度に個別的であり、血液ドナーの免疫系のそれぞれの応答性に依存する。

【0271】

TLR7アゴニストとPBMC及び全血のインキュベーション後の細胞活性化もフローサイトメトリーにより解析した(CD69の発現)。サイトカイン分泌により為された観察と同程度に、両方のアゴニスト化合物、PBMC(図8a～図8e)及び全血(図9a～図9e)に関して、全ての解析された免疫細胞集団(pDC、mDC、単球、B細胞及びNK細胞)の一貫した用量依存性活性化が見られる。更に、サイトカインにより分かる通り、免疫細胞活性化の強度も、異なるドナー由来の血液試料間で高度に可変性である。

10

【0272】

上述の結果は、異なる個体が、免疫療法剤、本事例ではTLR7アゴニストに応答した誘導された細胞免疫学的反応のその強度が有意に変動することを明らかに示す。

【実施例4】

【0273】

次の試験の目的は、カニクイザルモデルにおける血液中の様々なサイトカインの発現における、異なる量のTLR-7の小分子アゴニスト、N-(4-(4-アミノ-2-(2-メトキシエチル)-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)-N-(テトラヒドロ-2H-ピラン-4-イル)アセトアミド(SM1)及びN-(4-(4-アミノ-2-エチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)-N-(1,1-ジオキシドチエタン-3-イル)アセトアミド(SM3)のin vivo投与の効果を観察することであった。その発現が決定された様々なサイトカインは、インターフェロンアルファ、インターロイキン1受容体アンタゴニスト、インターロイキン4、6、8、10、12、15、18、単球走化性タンパク質1、顆粒球コロニー刺激因子、マクロファージ炎症性タンパク質1ベータ、腫瘍壊死因子アルファ及び血管内皮成長因子を含む。

20

【0274】

アゴニスト化合物の1種の定義される単一用量を、30分間注入においてカニクイザルに静脈内投与した。投与開始後のいくつかの時点で、サルから血液試料(およそ0.25mL血漿のために0.5mL)を前腕橈側皮静脈又は伏在静脈血管からK3EDTAチューブ内に収集した。遠心分離に先立ち血液試料をクラッシュアイス上に貯蔵した。4 及びおよそ1800gで10分間の遠心分離によって血漿を得て、標識を付けたマイクロチューブに等分し、70 以下で凍結貯蔵した。サイトカイン決定に先立ち、凍結した血漿試料を解凍し、希釈した。

30

【0275】

インターフェロンアルファElisaキット(例えば、VeriKine™ Cynomolgus/Rhesus IFN α ELISA Kit)及びLuminex(登録商標)非ヒト霊長類サイトカイン/ケモカインキット(例えば、Milliplex Non-Human Primate Cytokine/Chemokine Magnetic Premixed 23 Plex Panel)を製造業者の説明書に従って使用してサイトカインレベルを決定した。まず、低用量のアゴニスト化合物(30[SM1を受ける動物のみ]、100[SM1を受ける動物のみ]又は300 μ g/kg)をサルに投与した。後に、14日目に、第2の、より高用量の同じアゴニスト化合物(1、3又は10mg/kg)を同じサルに投与した。結果を図10a～図10kk(SM1)及び図11a～図11m(SM3)に描写し、TLR-7アゴニストのin vivo投与が、高度に個別的な様式で様々なサイトカインの産生をもたらすことを示す。

40

【0276】

図10(SM1):

アゴニスト化合物SM1を、下に説明する通り、30 μ g/kg、100mg/kg、300 μ g/kg及び1mg/kg、3mg/kg及び10mg/kgの用量で、個体P0101(雄)、P0102(雄)、P0501(雌)、P0502(雌)、P0201(雄)、P0202(雄)、P0601(雌)、P0602(雌)、P0301(雄)、P0302(雌)、P0701(雌)、P0702(雌)として表示されたカニクイザルに静脈内注入によって投与した。投与後168時間までの様々な時点で血液へのサイトカイン分泌を測定した。注入開始後最大12又は24時間目の様々なサイトカインの血漿濃度を図に示す。

50

【 0 2 7 7 】

各サルに、同じアゴニストを2回与えた。第1の投与は、低用量30 $\mu\text{g/kg}$ 、100 $\mu\text{g/kg}$ 又は300 $\mu\text{g/kg}$ のうち1種で行い、第2の投与は、より高用量1mg/kg、3mg/kg又は10mg/kgのうち1種で行った。第1の用量として30 $\mu\text{g/kg}$ を受けるサルに、1mg/kgの第2の用量を与えた。第1の用量として100 $\mu\text{g/kg}$ を受けるサルに、3mg/kgの第2の用量を与えた。第1の用量として300 $\mu\text{g/kg}$ を受けるサルに、10mg/kgの第2の用量を与えた。

【 0 2 7 8 】

- 図10a: 動物P0101、P0102、P0501、P0502(i)は30 $\mu\text{g/kg}$ 、動物P0201、P0202、P0601、P0602(ii)は100 $\mu\text{g/kg}$ の用量におけるインターフェロナルファ分泌
- 図10b: 動物P0301、P0302、P0701、P0702(i)は300 $\mu\text{g/kg}$ 、動物P0101、P0102、P0501、P0502(ii)は1mg/kgの用量におけるインターフェロナルファ分泌 10
- 図10c: 動物P0201、P0202、P0601、P0602(i)は3mg/kg、動物P0301、P0302、P0701、P0702(ii)は10mg/kgの用量におけるインターフェロナルファ分泌
- 図10d: 動物P0101、P0102、P0501、P0502(i)は30 $\mu\text{g/kg}$ 、動物P0201、P0202、P0601、P0602(ii)は100 $\mu\text{g/kg}$ の用量におけるインターロイキン1受容体アゴニスト分泌
- 図10e: 動物P0301、P0302、P0701、P0702(i)は300 $\mu\text{g/kg}$ 、動物P0101、P0102、P0501、P0502(ii)は1mg/kgの用量におけるインターロイキン1受容体アゴニスト分泌
- 図10f: 動物P0201、P0202、P0601、P0602(i)は3mg/kg、動物P0301、P0302、P0701、P0702(ii)は10mg/kgの用量におけるインターロイキン1受容体アゴニスト分泌
- 図10g: 動物P0101、P0102、P0501、P0502(i)は30 $\mu\text{g/kg}$ 、動物P0201、P0202、P0601、P0602(ii)は100 $\mu\text{g/kg}$ の用量におけるインターロイキン8分泌 20
- 図10h: 動物P0301、P0302、P0701、P0702(i)は300 $\mu\text{g/kg}$ 、動物P0101、P0102、P0501、P0502(ii)は1mg/kgの用量におけるインターロイキン8分泌
- 図10i: 動物P0201、P0202、P0601、P0602(i)は3mg/kg、動物P0301、P0302、P0701、P0702(ii)は10mg/kgの用量におけるインターロイキン8分泌
- 図10j: 動物P0101、P0102、P0501、P0502(i)は30 $\mu\text{g/kg}$ 、動物P0201、P0202、P0601、P0602(ii)は100 $\mu\text{g/kg}$ の用量におけるインターロイキン10分泌
- 図10k: 動物P0301、P0302、P0701、P0702(i)は300 $\mu\text{g/kg}$ 、動物P0101、P0102、P0501、P0502(ii)は1mg/kgの用量におけるインターロイキン10分泌
- 図10l: 動物P0201、P0202、P0601、P0602(i)は3mg/kg、動物P0301、P0302、P0701、P0702(ii)は10mg/kgの用量におけるインターロイキン10分泌 30
- 図10m: 動物P0101、P0102、P0501、P0502(i)は30 $\mu\text{g/kg}$ 、動物P0201、P0202、P0601、P0602(ii)は100 $\mu\text{g/kg}$ の用量における単球走化性タンパク質1分泌
- 図10n: 動物P0301、P0302、P0701、P0702(i)は300 $\mu\text{g/kg}$ 、動物P0101、P0102、P0501、P0502(ii)は1mg/kgの用量における単球走化性タンパク質1分泌
- 図10o: 動物P0201、P0202、P0601、P0602(i)は3mg/kg、動物P0301、P0302、P0701、P0702(ii)は10mg/kgの用量における単球走化性タンパク質1分泌
- 図10p: 動物P0101、P0102、P0501、P0502(i)は30 $\mu\text{g/kg}$ 、動物P0201、P0202、P0601、P0602(ii)は100 $\mu\text{g/kg}$ の用量における顆粒球コロニー刺激因子分泌
- 図10q: 動物P0301、P0302、P0701、P0702(i)は300 $\mu\text{g/kg}$ 、動物P0101、P0102、P0501、P0502(ii)は1mg/kgの用量における顆粒球コロニー刺激因子分泌 40
- 図10r: 動物P0201、P0202、P0601、P0602(i)は3mg/kg、動物P0301、P0302、P0701、P0702(ii)は10mg/kgの用量における顆粒球コロニー刺激因子分泌
- 図10s: 動物P0101、P0102、P0501、P0502(i)は30 $\mu\text{g/kg}$ 、動物P0201、P0202、P0601、P0602(ii)は100 $\mu\text{g/kg}$ の用量におけるインターロイキン4分泌
- 図10t: 動物P0301、P0302、P0701、P0702(i)は300 $\mu\text{g/kg}$ 、動物P0101、P0102、P0501、P0502(ii)は1mg/kgの用量におけるインターロイキン4分泌
- 図10u: 動物P0201、P0202、P0601、P0602(i)は3mg/kg、動物P0301、P0302、P0701、P0702(ii)は10mg/kgの用量におけるインターロイキン4分泌
- 図10v: 動物P0101、P0102、P0501、P0502(i)は30 $\mu\text{g/kg}$ 、動物P0201、P0202、P0601、P0602(ii)は100 $\mu\text{g/kg}$ の用量におけるインターロイキン4分泌 50

2(ii)は100 µg/kgの用量におけるインターロイキン6分泌

図10w:動物P0301、P0302、P0701、P0702(i)は300 µg/kg、動物P0101、P0102、P0501、P0502(ii)は1mg/kgの用量におけるインターロイキン6分泌

図10x:動物P0201、P0202、P0601、P0602(i)は3mg/kg、動物P0301、P0302、P0701、P0702(ii)は10mg/kgの用量におけるインターロイキン6分泌

図10y:動物P0101、P0102、P0501、P0502(i)は30 µg/kg、動物P0201、P0202、P0601、P0602(ii)は100 µg/kgの用量におけるインターロイキン18分泌

図10z:動物P0301、P0302、P0701、P0702(i)は300 µg/kg、動物P0101、P0102、P0501、P0502(ii)は1mg/kgの用量におけるインターロイキン18分泌

図10aa:動物P0201、P0202、P0601、P0602(i)は3mg/kg、動物P0301、P0302、P0701、P0702(ii)は10mg/kgの用量におけるインターロイキン18分泌 10

図10bb:動物P0101、P0102、P0501、P0502(i)は30 µg/kg、動物P0201、P0202、P0601、P0602(ii)は100 µg/kgの用量におけるマクロファージ炎症性タンパク質1ベータ分泌

図10cc:動物P0301、P0302、P0701、P0702(i)は300 µg/kg、動物P0101、P0102、P0501、P0502(ii)は1mg/kgの用量におけるマクロファージ炎症性タンパク質1ベータ分泌

図10dd:動物P0201、P0202、P0601、P0602(i)は3mg/kg、動物P0301、P0302、P0701、P0702(ii)は10mg/kgの用量におけるマクロファージ炎症性タンパク質1ベータ分泌

図10ee:動物P0101、P0102、P0501、P0502(i)は30 µg/kg、動物P0201、P0202、P0601、P0602(ii)は100 µg/kgの用量における腫瘍壊死因子アルファ分泌

図10ff:動物P0301、P0302、P0701、P0702(i)は300 µg/kg、動物P0101、P0102、P0501、P0502(ii)は1mg/kgの用量における腫瘍壊死因子アルファ分泌 20

図10gg:動物P0201、P0202、P0601、P0602(i)は3mg/kg、動物P0301、P0302、P0701、P0702(ii)は10mg/kgの用量における腫瘍壊死因子アルファ分泌

図10hh:動物P0101、P0102、P0501、P0502(i)は30 µg/kg、動物P0201、P0202、P0601、P0602(ii)は100 µg/kgの用量における血管内皮成長因子分泌

図10ii:動物P0301、P0302、P0701、P0702(i)は300 µg/kg、動物P0101、P0102、P0501、P0502(ii)は1mg/kgの用量における血管内皮成長因子分泌

図10jj:動物P0201、P0202、P0601、P0602(i)は3mg/kg、動物P0301、P0302、P0701、P0702(ii)は10mg/kgの用量における血管内皮成長因子分泌

図10kk:動物P0101、P0102、P0501、P0502(i)は1mg/kg、動物P0201、P0202、P0601、P0602(ii)は3mg/kg、動物P0301、P0302、P0701、P0702(iii)は10mg/kgの用量におけるインターロイキン12分泌 30

【0279】

図11(SM3):

アゴニスト化合物SM3を、300 µg/kg、1mg/kg、3mg/kg及び10mg/kgの用量で、個体16962、17477、17479、17607、16988、30018、16669、17613、14030、16216として表示された雄カニクイザルに静脈内注入によって投与した。投与後の168時間までの様々な時点で血液へのサイトカイン分泌を測定した。注入開始後最大12又は24時間目の様々なサイトカインの血漿濃度を図に示す。

【0280】

図11a:動物16962、17477、17479、17607(i)は300 µg/kg、動物16962、16988、17479、30018(ii)は1mg/kgの用量におけるインターフェロンアルファ分泌

図11b:動物16669、17607、17613(i)は3mg/kg、動物14030、16216、17477(ii)は10mg/kgの用量におけるインターフェロンアルファ分泌

図11c:動物14030、16216、17477は10mg/kgの用量における顆粒球コロニー刺激因子分泌

図11d:動物16962、16988、17479、30018(i)は1mg/kg、動物14030、16216、17477(ii)は10mg/kgの用量におけるインターロイキン10分泌

図11e:動物16962、17477、17479、17607(i)は300 µg/kg、動物16962、16988、17479、30018(ii)は1mg/kgの用量におけるインターロイキン15分泌

図11f:動物16669、17607、17613(i)は3mg/kg、動物14030、16216、17477(ii)は10mg/kgの 50

用量におけるインターロイキン15分泌

図11g: 動物16962、17477、17479、17607(i)は300 µg/kg、動物16962、16988、17479、30018(ii)は1mg/kgの用量におけるインターロイキン1受容体アゴニスト分泌

図11h: 動物16669、17607、17613(i)は3mg/kg、動物14030、16216、17477(ii)は10mg/kgの用量におけるインターロイキン1受容体アゴニスト分泌

図11i: 動物14030、16216、17477は10mg/kgの用量におけるインターロイキン10分泌

図11j: 動物16962、17477、17479、17607(i)は300 µg/kg、動物16962、16988、17479、30018(ii)は1mg/kgの用量における単球走化性タンパク質1分泌

図11k: 動物16669、17607、17613(i)は3mg/kg、動物14030、16216、17477(ii)は10mg/kgの用量における単球走化性タンパク質1分泌

図11l: 動物14030、16216、17477は10mg/kgの用量における腫瘍壊死因子アルファ分泌

図11m: 動物14030、16216、17477は10mg/kgの用量におけるマクロファージ炎症性タンパク質1ベータ分泌

【実施例5】

【0281】

次の試験の目的は、in vitroでのヒトPBMCによるサイトカイン分泌における、TLR8の2種の小分子アゴニスト、2-エチル-1-(4-((2-メチルテトラヒドロフラン-3-イル)アミノ)ブチル)-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-4-アミン(SM4)及び1-(4-(シクロヘキシルアミノ)ブチル)-2-エチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-4-アミン(SM5)の効果を観察することであった。発現が決定された様々なサイトカインは、腫瘍壊死因子アルファ、インターロイキン1ベータ、インターロイキン6、8、10及び12p70、インターフェロンガンマ、インターロイキン10並びにインターフェロンガンマ誘導性タンパク質10を含む。

【0282】

4名のヒト自発的血液ドナーから採取した新鮮血液試料からPBMCを単離した。PBMCを標準プロトコールに従って単離し、10%ウシ胎仔血清を含有する細胞培養培地に細胞数 2×10^6 /mLで再懸濁し、ウェル当たり100 µlにおいて96ウェルプレートに播種し、その後、37で6時間インキュベートした。アゴニスト化合物をDMSOに溶解し、その後、最終検査濃度の1000倍の濃度まで1又はいくつかの工程でDMSOに希釈することにより、各アゴニスト化合物の適切なストック溶液を産生した。アゴニストの適切な前希釈物を培地で調製した；第1の工程において、アゴニストを1:100希釈し、第2の工程において、25 µLの前希釈物及び125 µLの培地をウェル内の100 µLの細胞に添加した。細胞を37で24時間インキュベートし、次いで上清を収集し、特定のヒトサイトカインに特異的なLuminex(登録商標)ビーズアッセイ又はELISAアッセイにより製造業者の説明書に従って解析した。

【0283】

図12及び図13に描写されている結果は、TLR8アゴニストへのヒトPBMCの曝露が、高度に個別化された様式での測定されたサイトカインの分泌をもたらしたことを示す。

【0284】

図12(SM4):

アゴニスト化合物SM4をin vitroアッセイにおいて、様々な濃度、即ち、0.1 µM、0.3 µM、1 µM、3 µM、10 µM及び30 µMで、個体130325、100621、110126、110125として表示された4名の血液ドナー由来の新鮮に調製されたヒトPBMCに添加した。アゴニスト化合物の添加24時間後に、上清へのサイトカイン分泌を上述通りに測定した。異なる量のアゴニストとの24時間インキュベーション後の上清における様々なサイトカインの濃度を示す。

【0285】

図12a: 24時間後の個体130325、100621、110126、110125のPBMCからの腫瘍壊死因子アルファ分泌

図12b: 24時間後の個体130325、100621、110126、110125のPBMCからのインターロイキン1ベータ分泌

図12c: 24時間後の個体130325、100621、110126、110125のPBMCからのインターロイキン6分泌

図12d:24時間後の個体130325、100621、110126、110125のPBMCからのインターフェロンガンマ分泌

図12e:24時間後の個体130325、100621、110126、110125のPBMCからのインターロイキン10分泌

図12f:24時間後の個体130325、110126、110125のPBMCからのインターフェロンガンマ誘導性タンパク質10分泌

【0286】

図13(SM5):

アゴニスト化合物SM5を、0.1 μ M、0.3 μ M、1 μ M、3 μ M、10 μ M及び30 μ Mの様々な濃度で、個体131105、130618、130325、131120として表示された4名の血液ドナー由来の新鮮に調製されたヒトPBMCにin vitroアッセイにおいて添加した。アゴニスト化合物の添加24時間後に、上清へのサイトカイン分泌を上述通りに測定した。異なる量のアゴニストとの24時間インキュベーション後の上清における様々なサイトカインの濃度を示す。

10

【0287】

図13a:24時間後の個体131105、130618、130325、131120のPBMCからの腫瘍壊死因子アルファ分泌

図13b:24時間後の個体131105、130618、130325、131120のPBMCからのインターロイキン1ベータ分泌

図13c:24時間後の個体131105、130618、130325、131120のPBMCからのインターロイキン6分泌

20

図13d:24時間後の個体131105、131120のPBMCからのインターロイキン8分泌

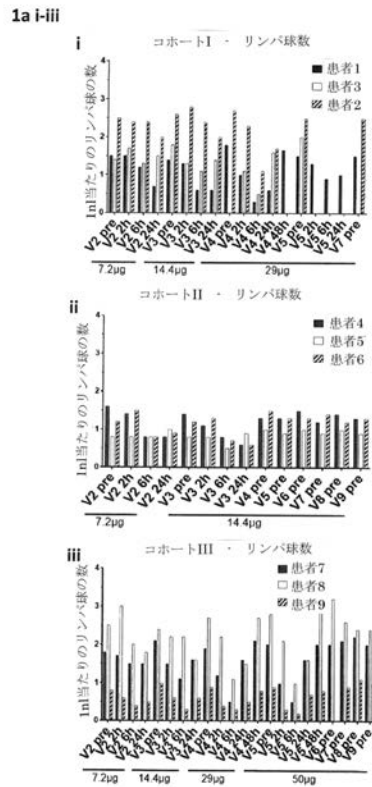
図13e:24時間後の個体131105、130618、130325、131120のPBMCからのインターフェロンガンマ分泌

図13f:24時間後の個体131105、130618、130325、131120のPBMCからのインターロイキン10分泌

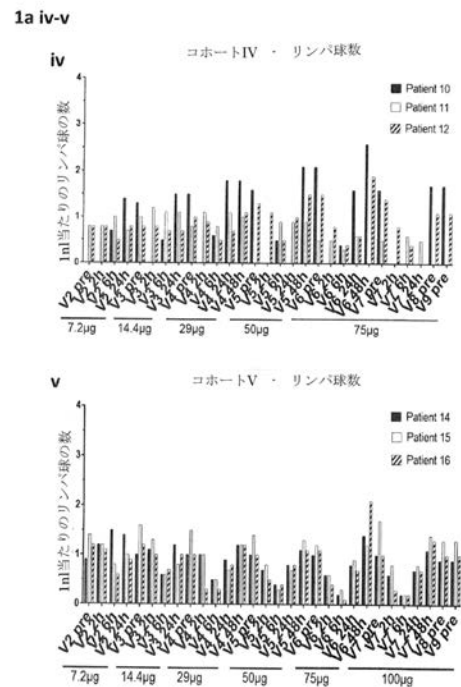
図13g:24時間後の131105、130618、130325、131120のPBMCからのインターフェロンガンマ誘導性タンパク質10分泌

図13h:24時間後の個体131105、131120のPBMCからのインターロイキン12p70分泌

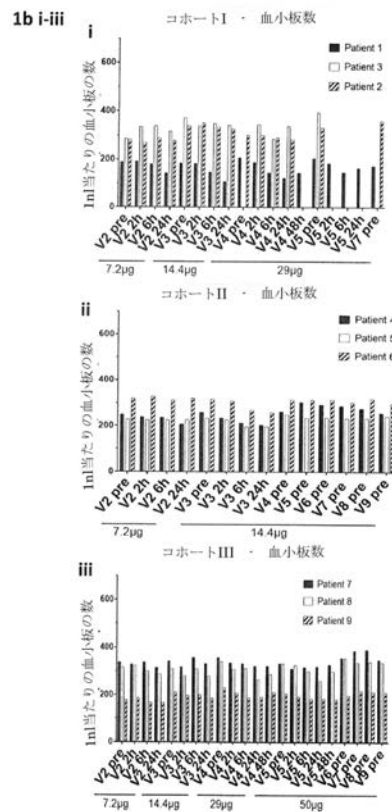
【図1a i - i i i】



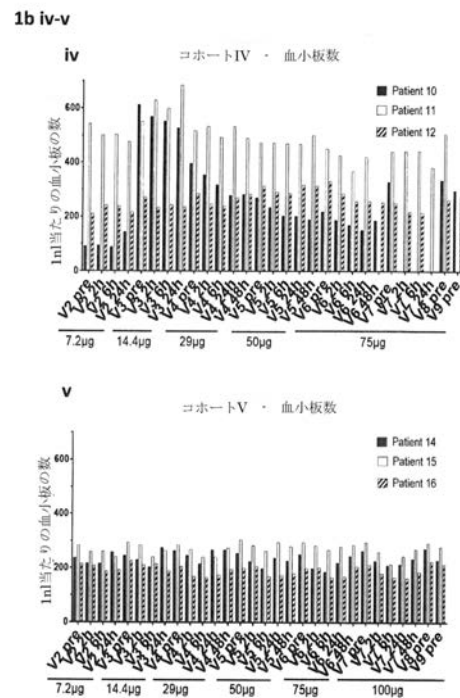
【図1a i v - v】



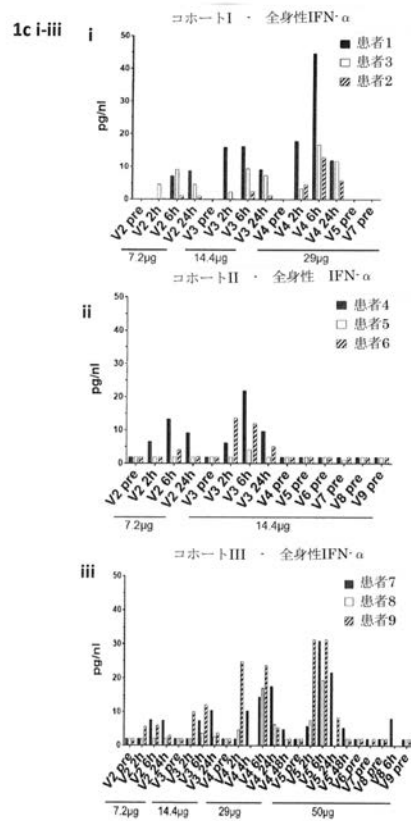
【図1b i - i i i】



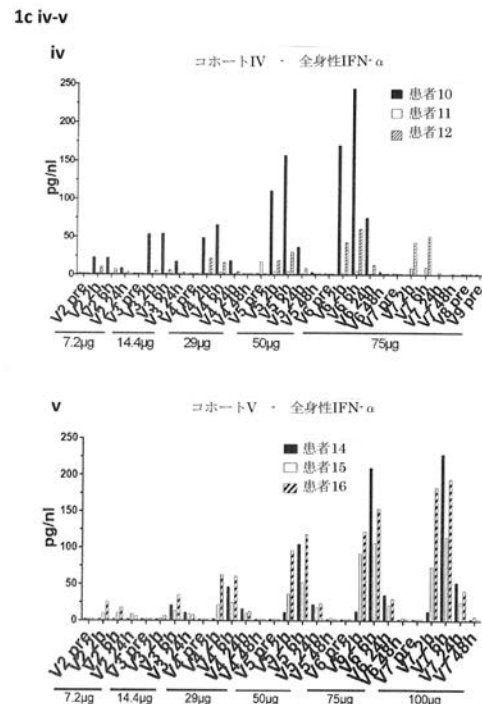
【図1b i v - v】



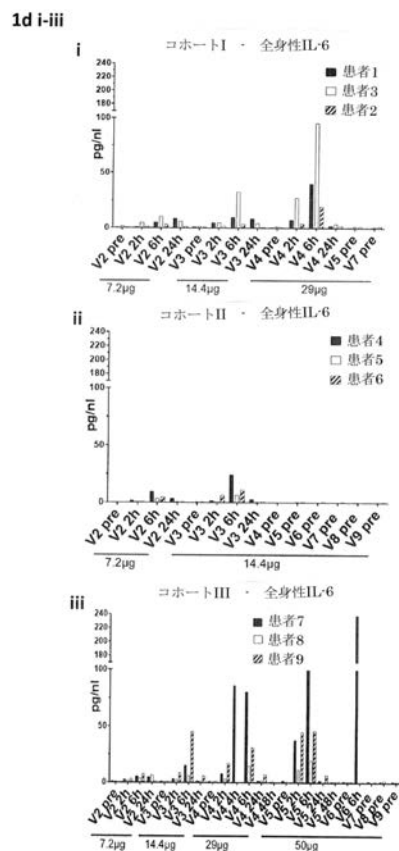
【図1c i - i i i】



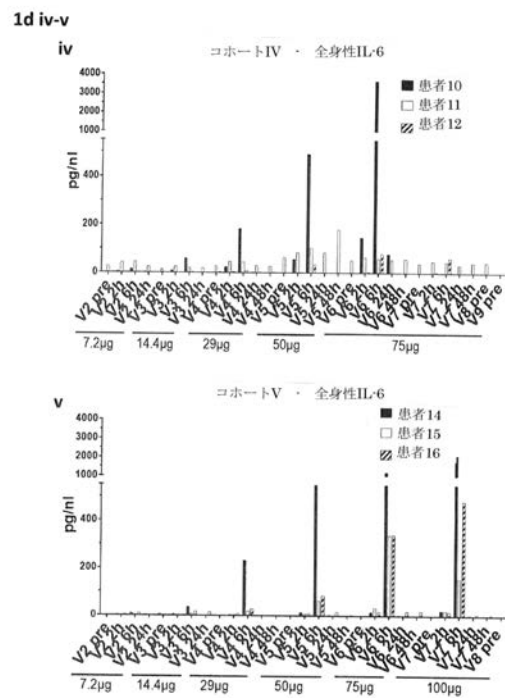
【図1c i v - v】



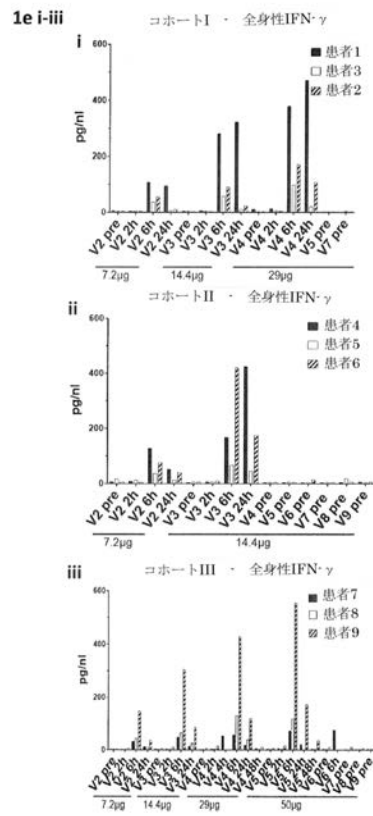
【図1d i - i i i】



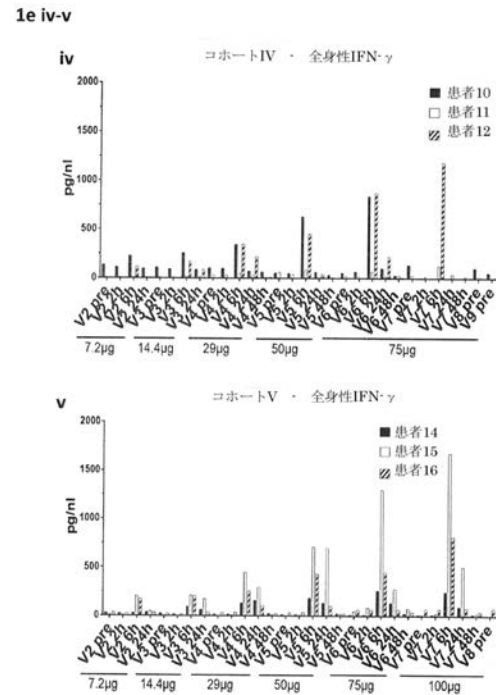
【図1d i v - v】



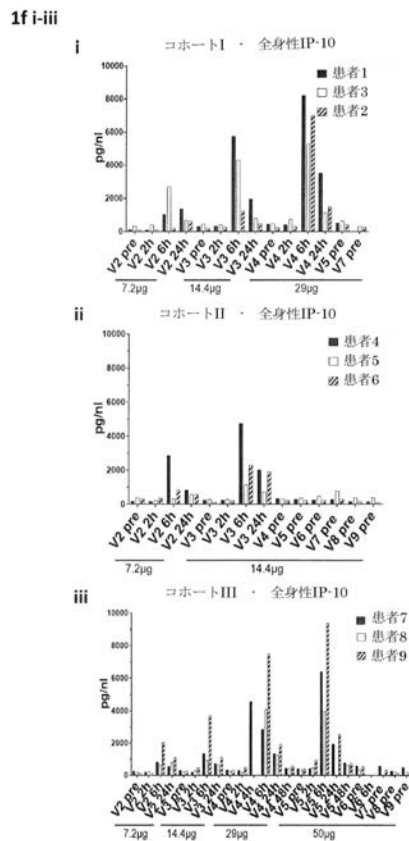
【図1e i - i i i】



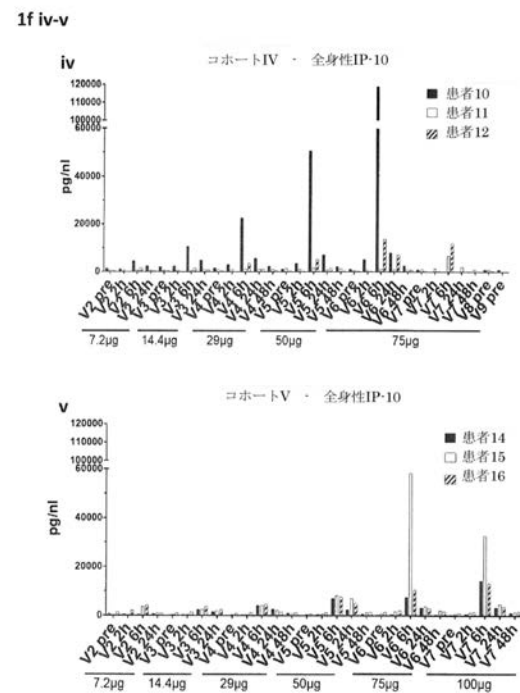
【図1e i v - v】



【図1f i - i i i】



【図1f i v - v】



【図2】

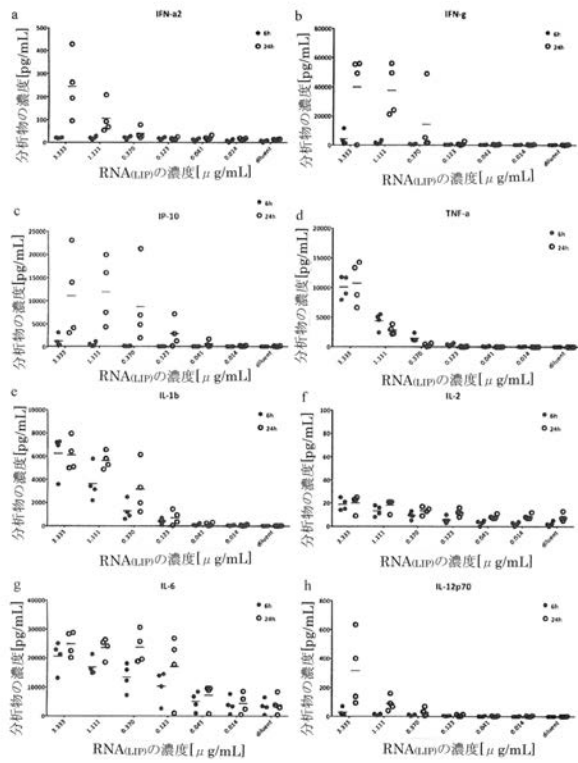
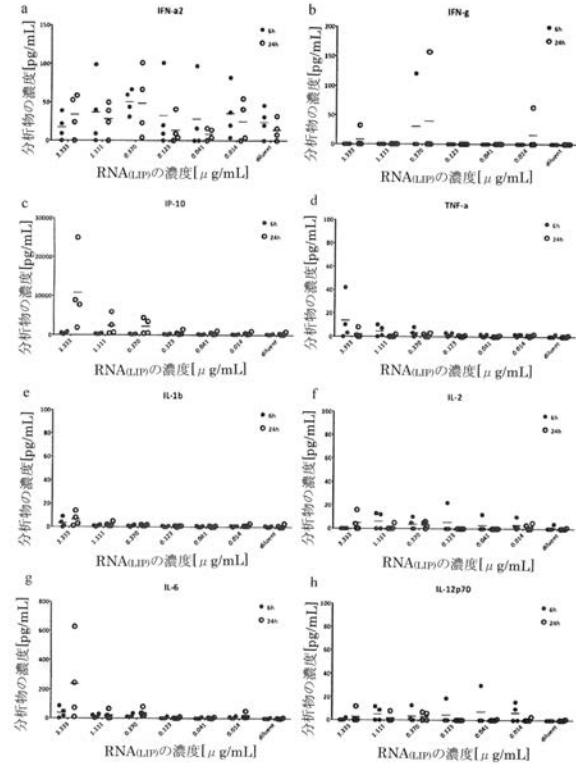


図2a～図2h, PBMCにおけるサイトカイン分泌

【図3】



Figures 3a-3h, Cytokine Secretion in Whole Blood

【図4】

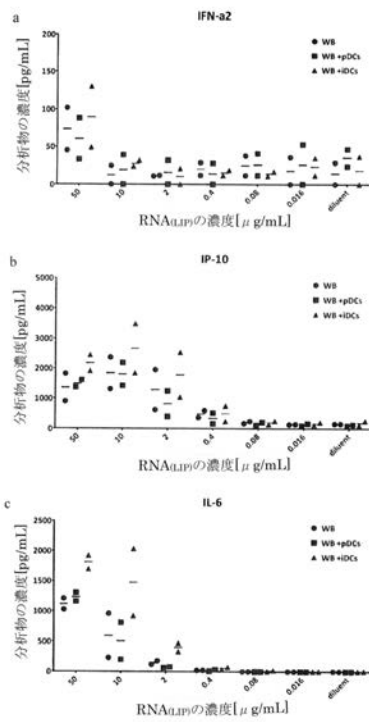


図4a～図4c, DCを有する全血におけるサイトカイン分泌(6時間)

【図5】

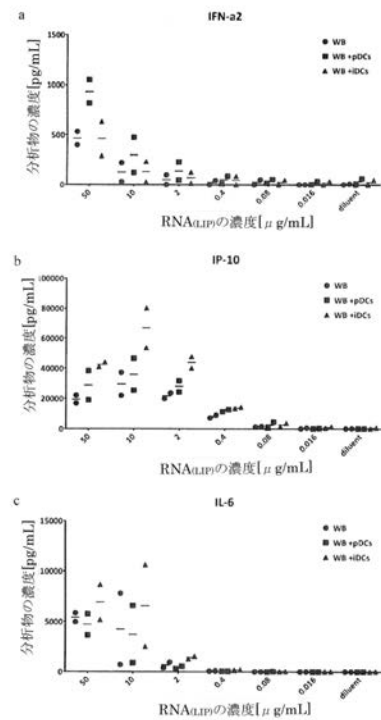
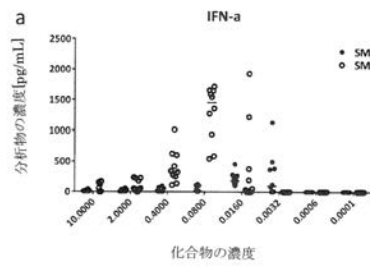
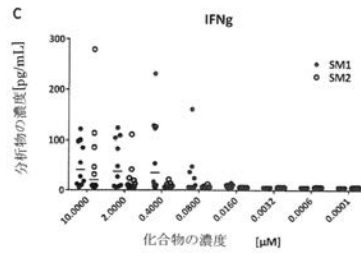


図5a～図5c, DCを有する全血におけるサイトカイン発現(24時間)

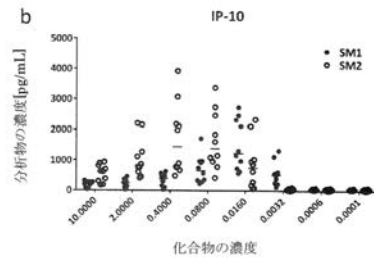
【図 6 a】



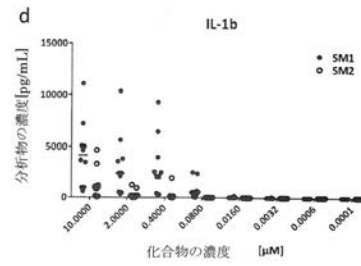
【図 6 c】



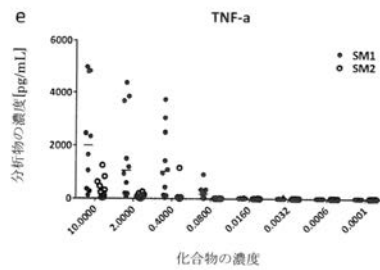
【図 6 b】



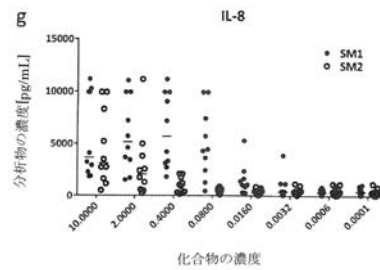
【図 6 d】



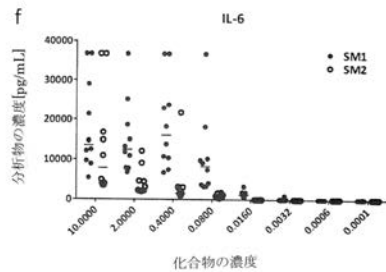
【図 6 e】



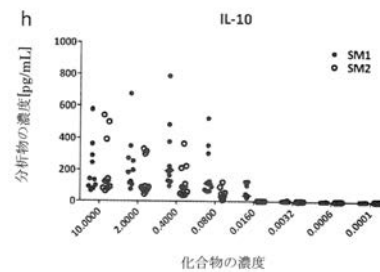
【図 6 g】



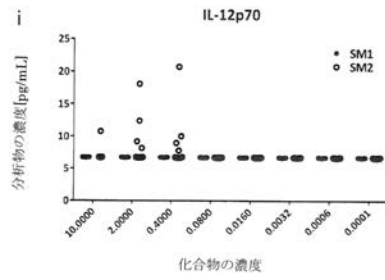
【図 6 f】



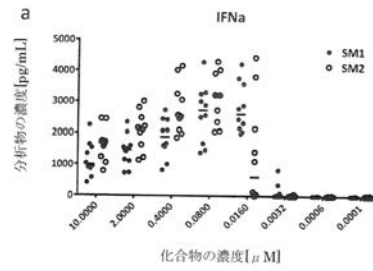
【図 6 h】



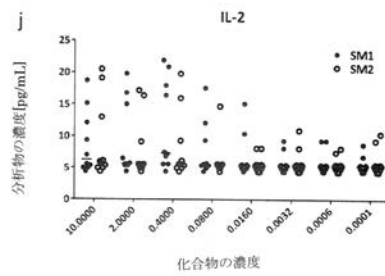
【図 6 i】



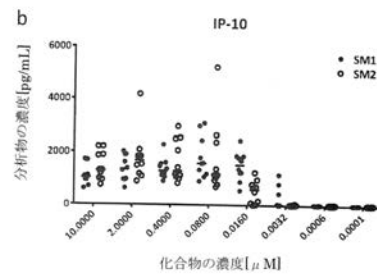
【図 7 a】



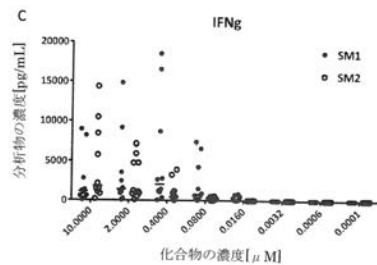
【図 6 j】



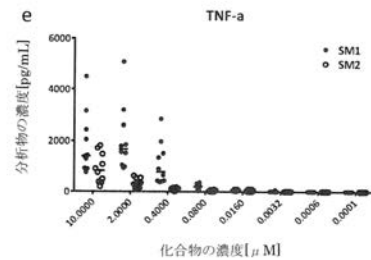
【図 7 b】



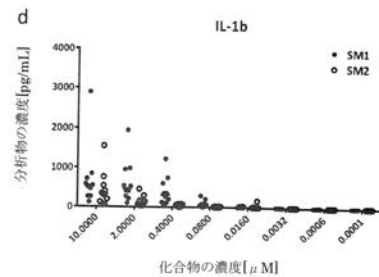
【図 7 c】



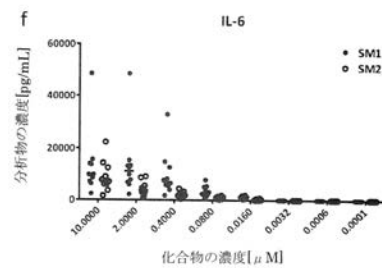
【図 7 e】



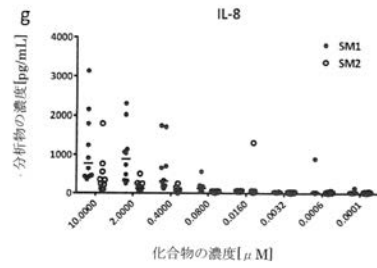
【図 7 d】



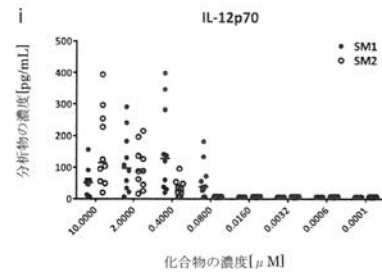
【図 7 f】



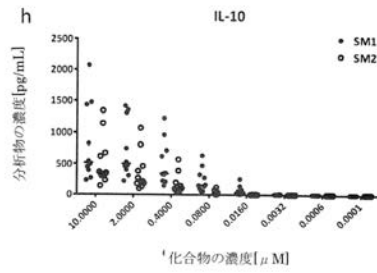
【図 7 g】



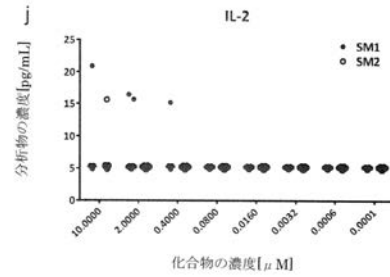
【図 7 i】



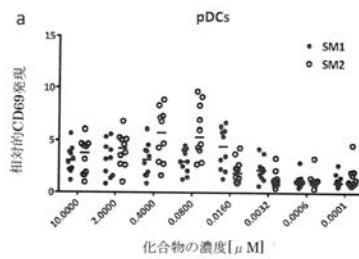
【図 7 h】



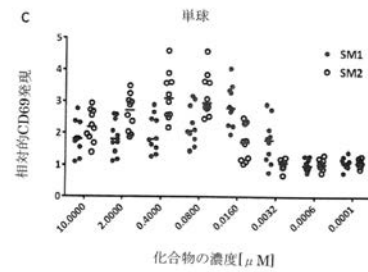
【図 7 j】



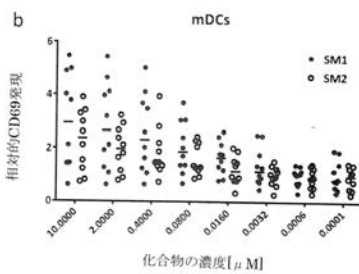
【図 8 a】



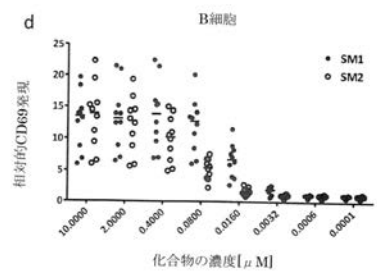
【図 8 c】



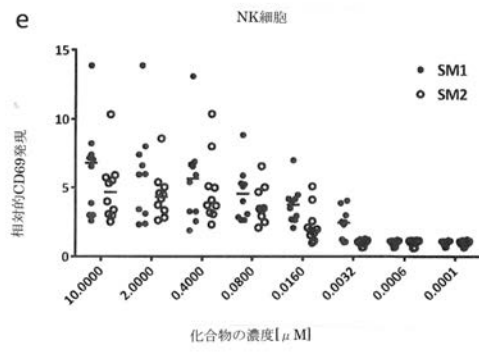
【図 8 b】



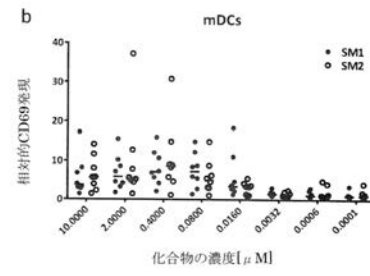
【図 8 d】



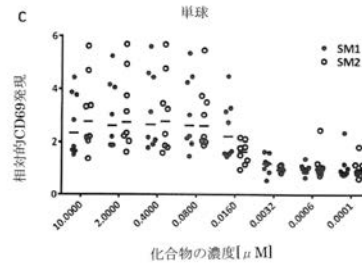
【図 8 e】



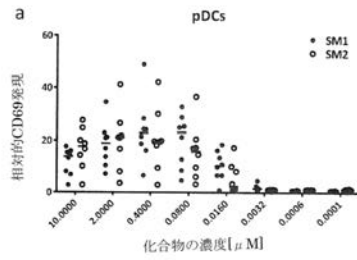
【図 9 b】



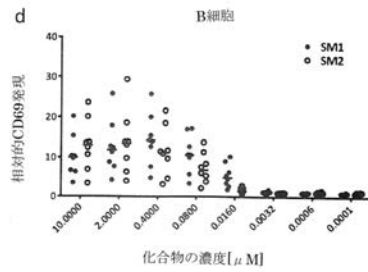
【図 9 c】



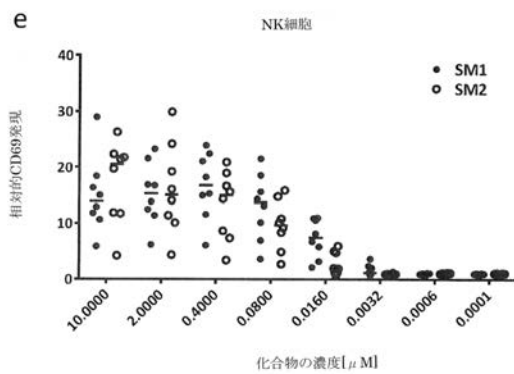
【図 9 a】



【図 9 d】

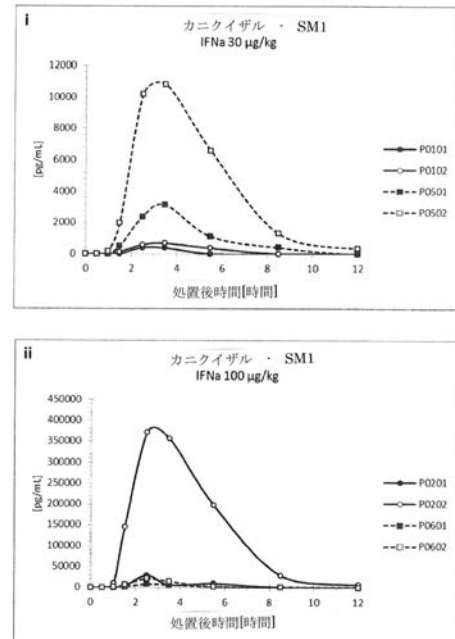


【図 9 e】



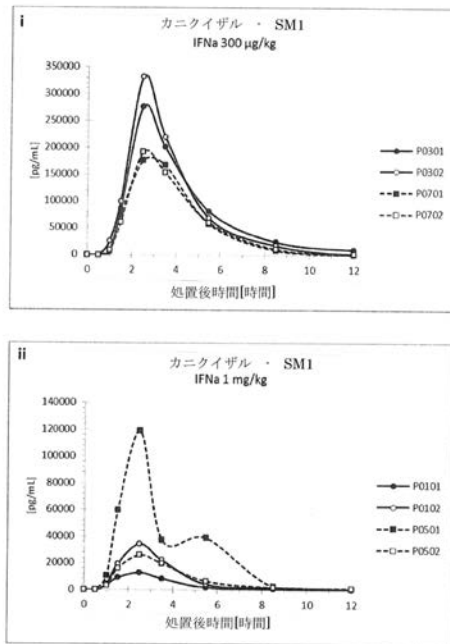
【図 10 a】

Fig. 10a



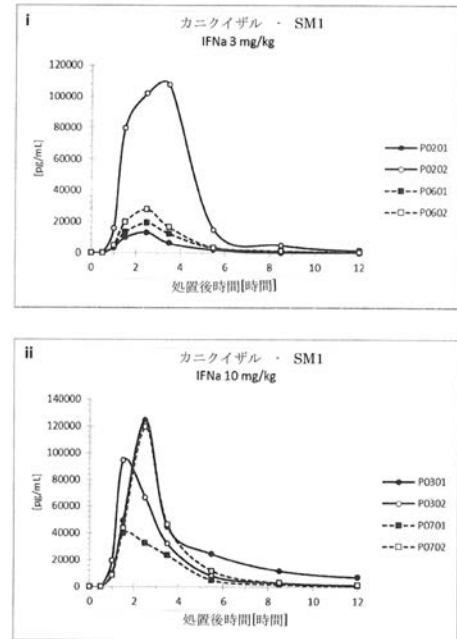
【図10b】

Fig. 10b



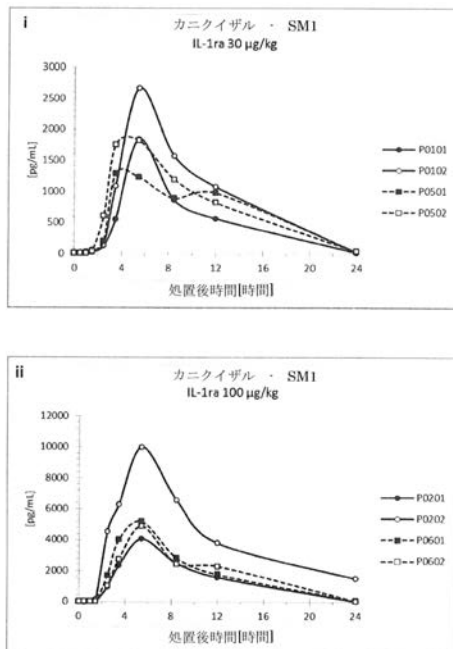
【図10c】

Fig. 10c



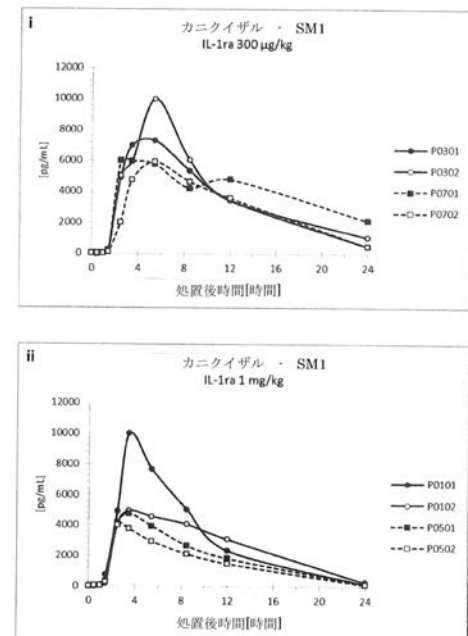
【図10d】

Fig. 10d



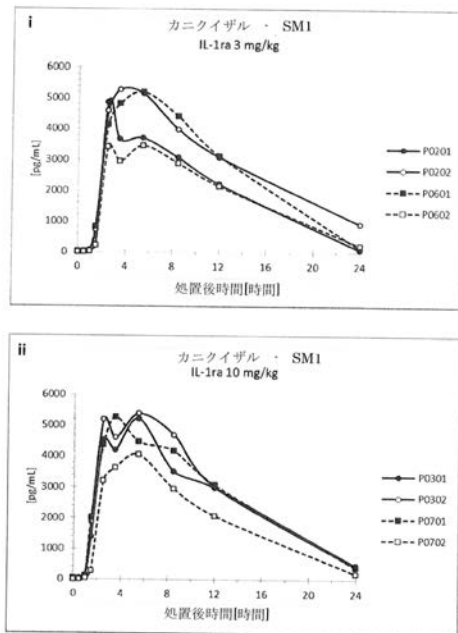
【図10e】

Fig. 10e



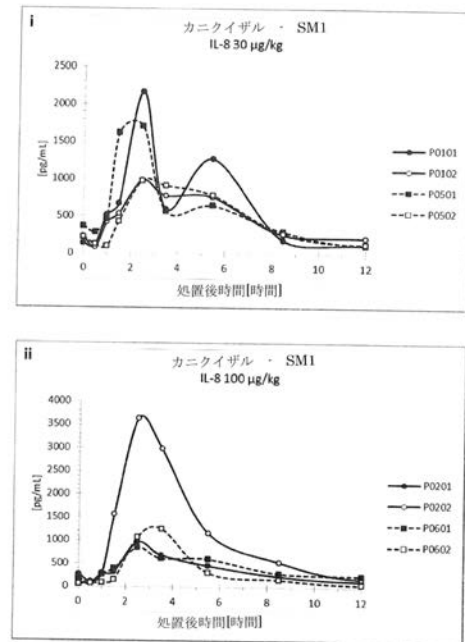
【図10f】

Fig. 10f



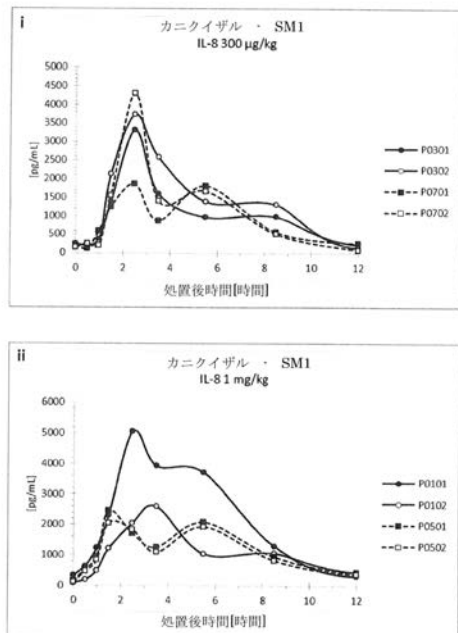
【図10g】

Fig. 10g



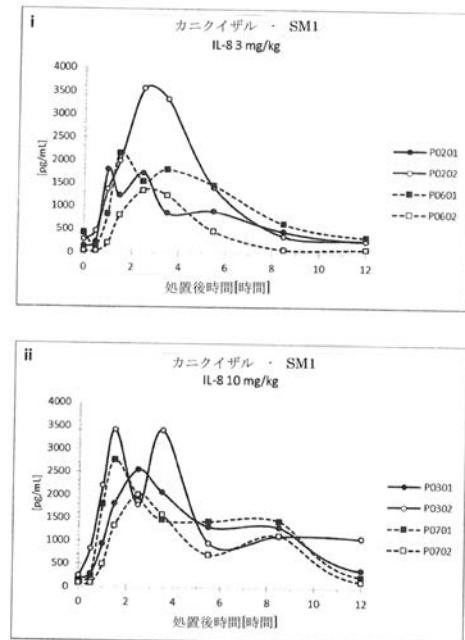
【図10h】

Fig. 10h



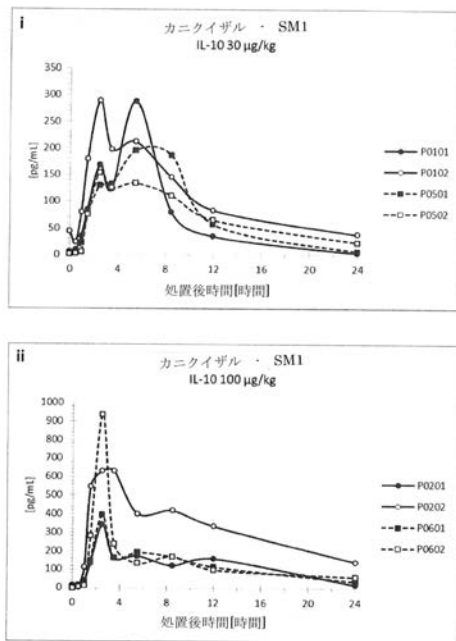
【図10i】

Fig. 10i



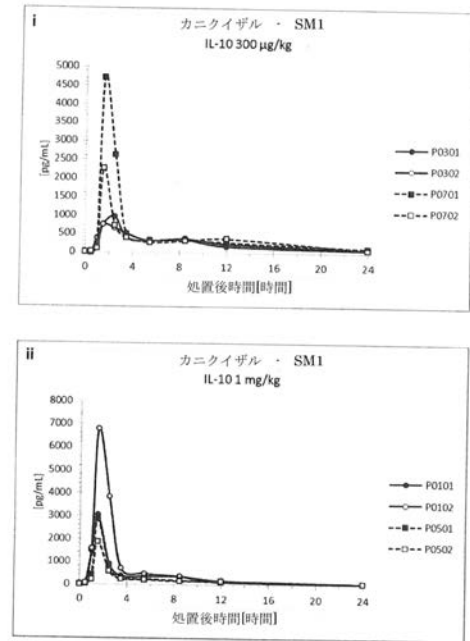
【図 10 j】

Fig. 10j



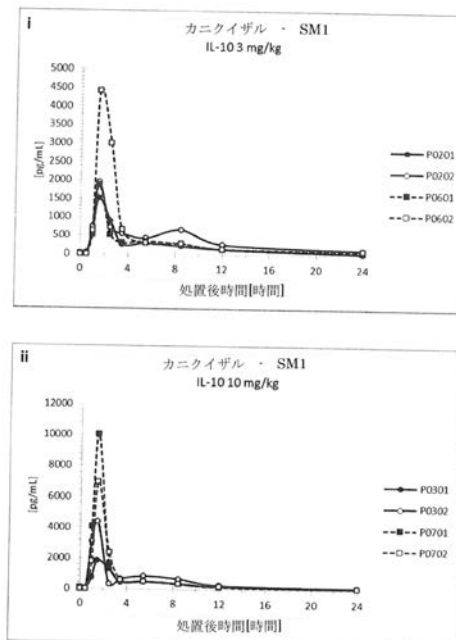
【図 10 k】

Fig. 10k



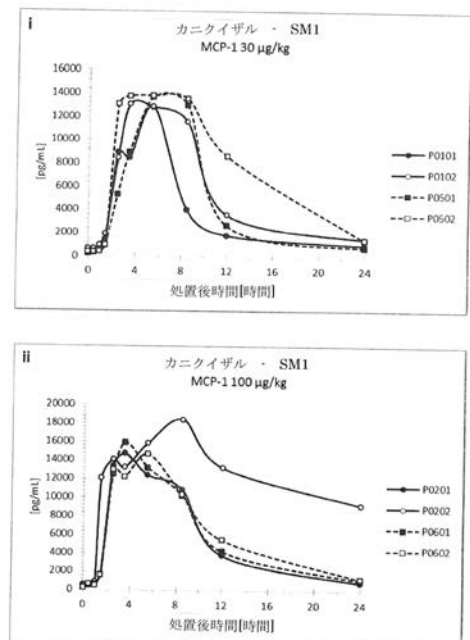
【図 10 l】

Fig. 10l



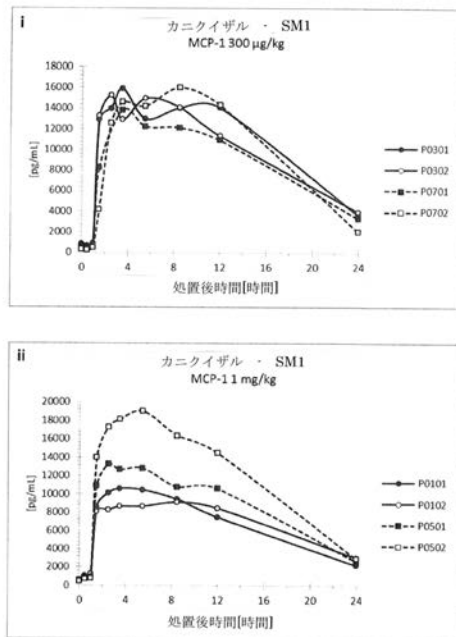
【図 10 m】

Fig. 10m



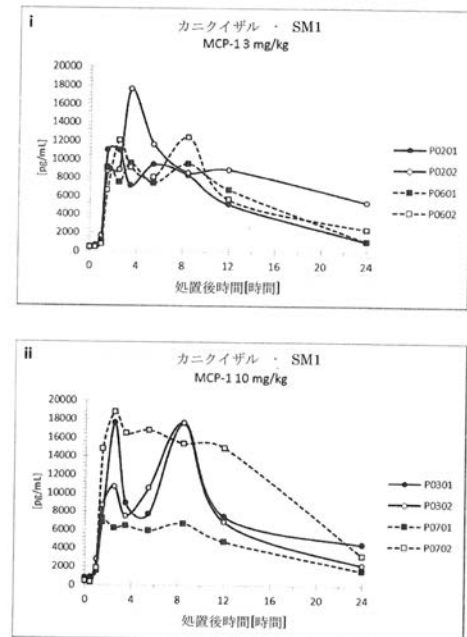
【図10n】

Fig. 10n



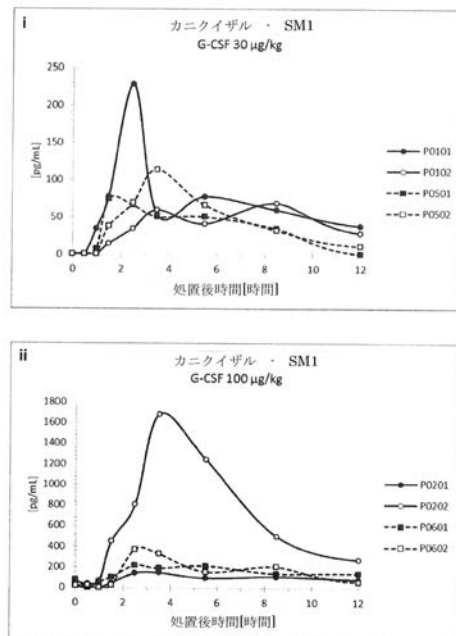
【図10o】

Fig. 10o



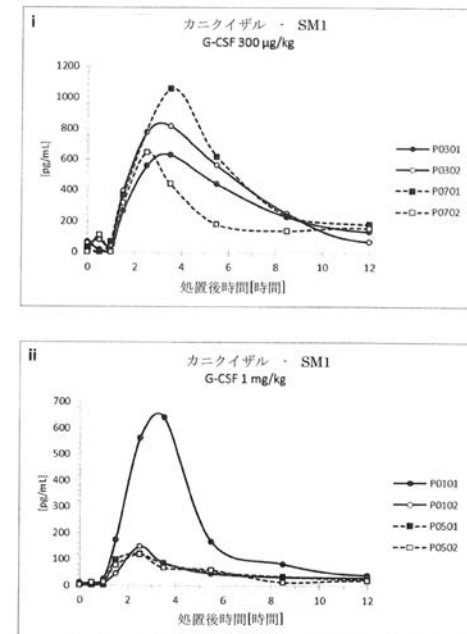
【図10p】

Fig. 10p



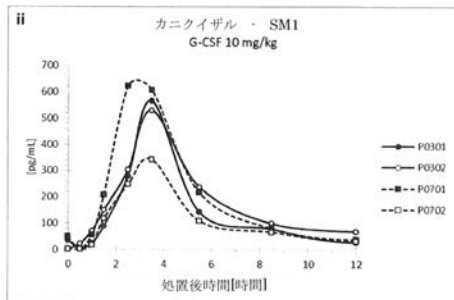
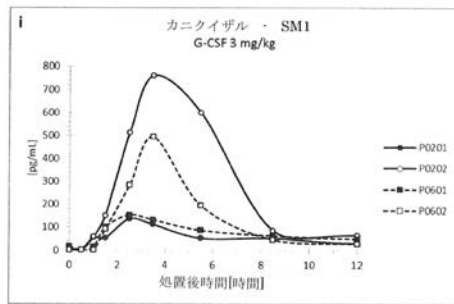
【図10q】

Fig. 10q



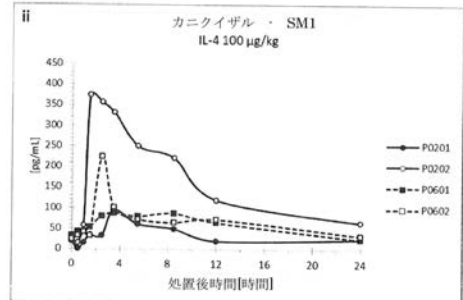
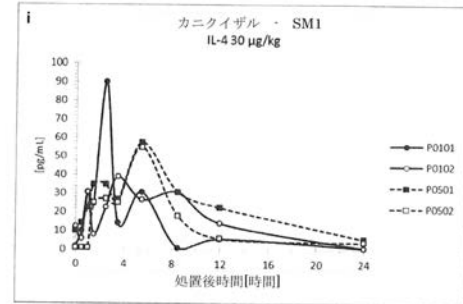
【図10r】

Fig. 10r



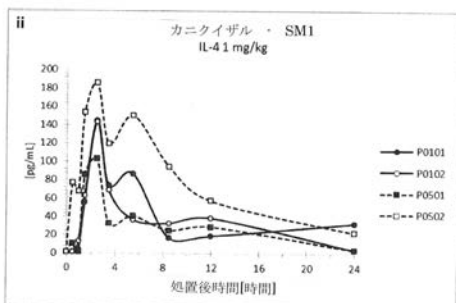
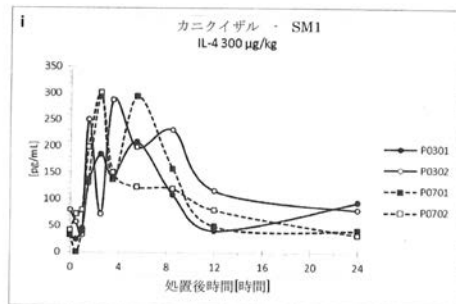
【図10s】

Fig. 10s



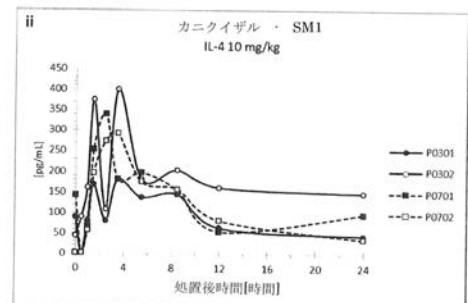
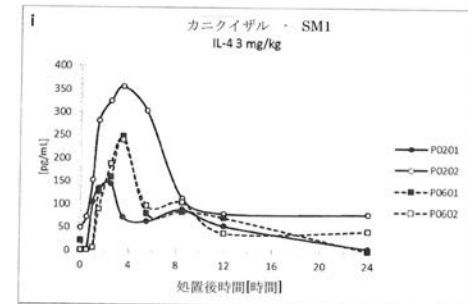
【図10t】

Fig. 10t



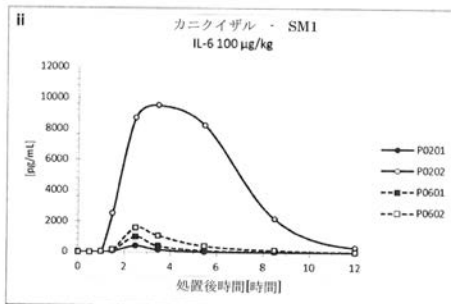
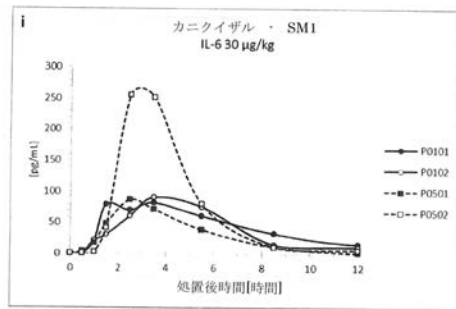
【図10u】

Fig. 10u



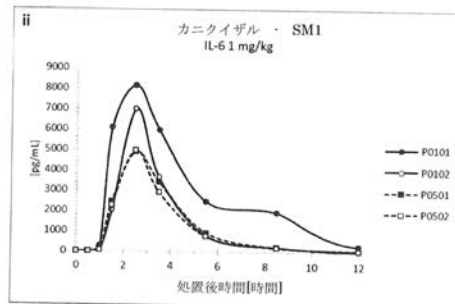
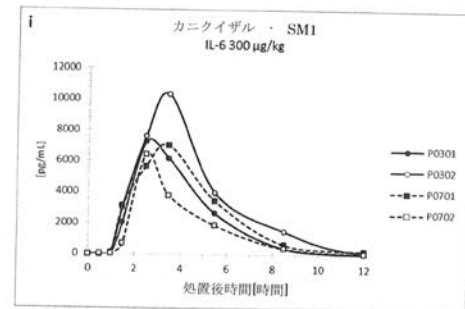
【図 10 v】

Fig. 10v



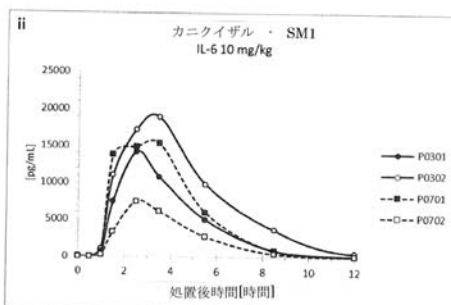
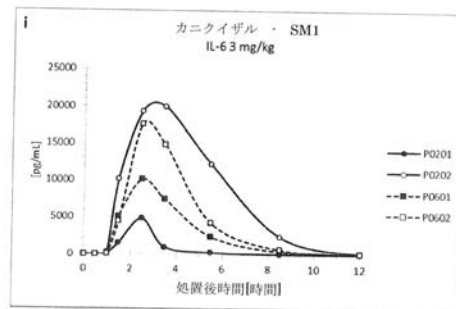
【図 10 w】

Fig. 10w



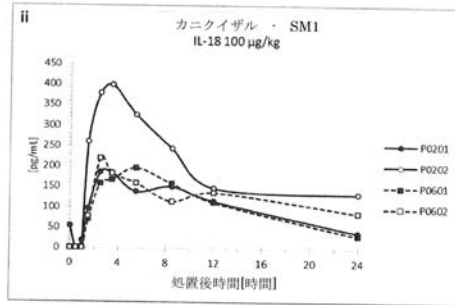
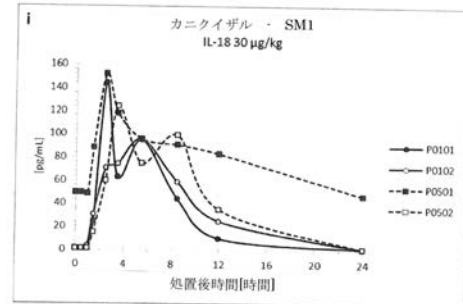
【図 10 x】

Fig. 10x



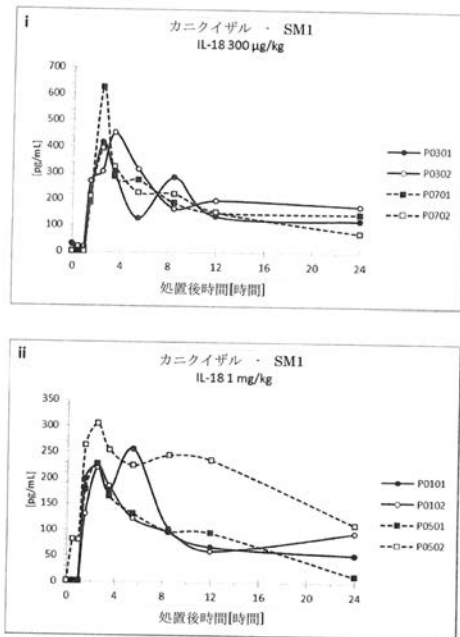
【図 10 y】

Fig. 10y



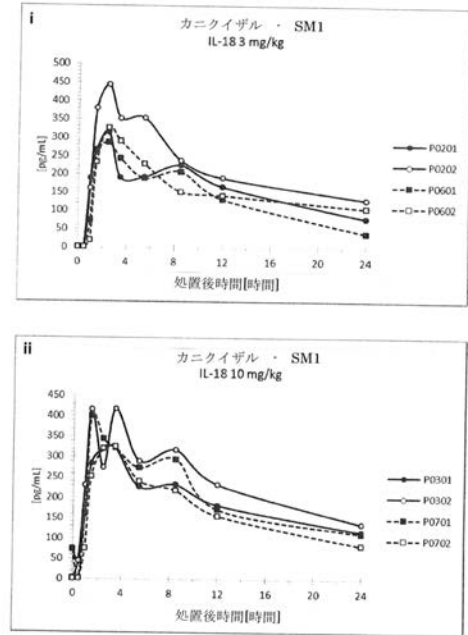
【図10z】

Fig. 10z



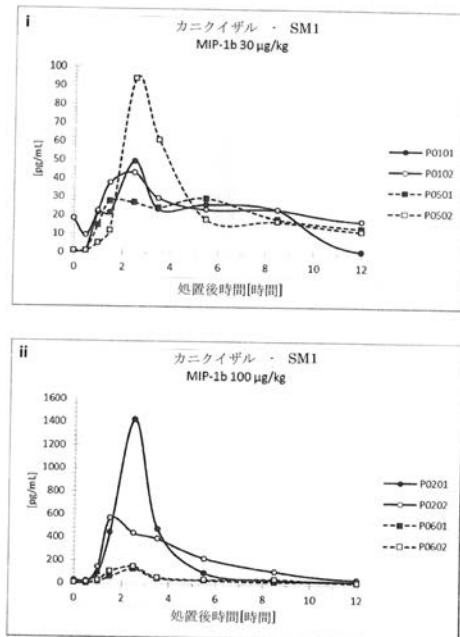
【図10aa】

Fig. 10aa



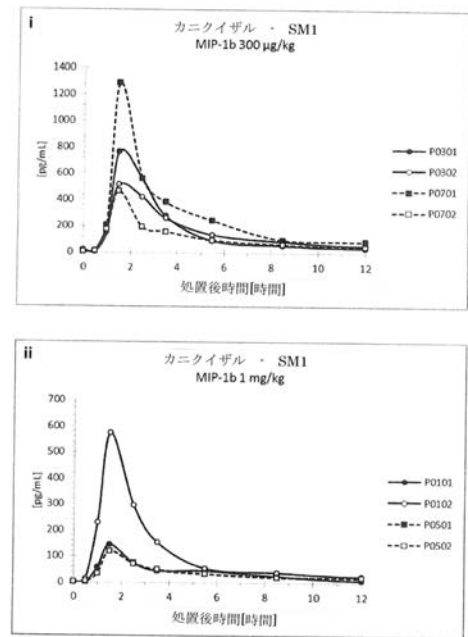
【図10bb】

Fig. 10bb



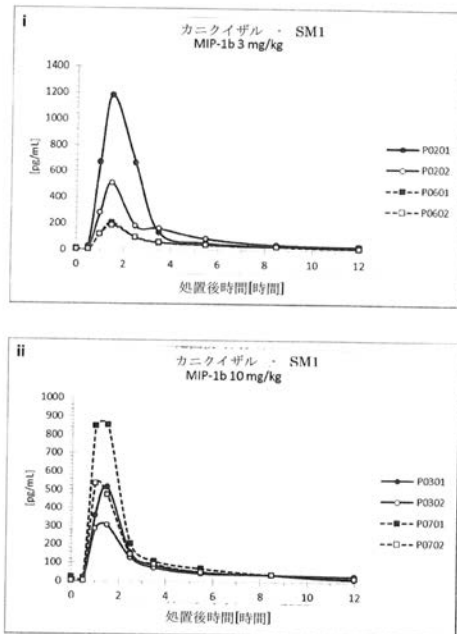
【図10cc】

Fig. 10cc



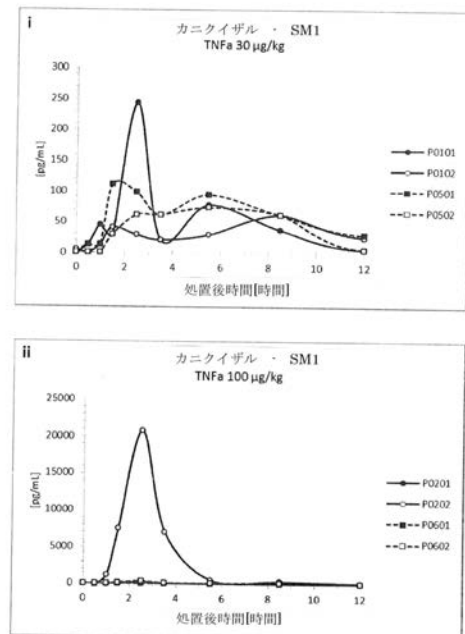
【図10dd】

Fig. 10dd



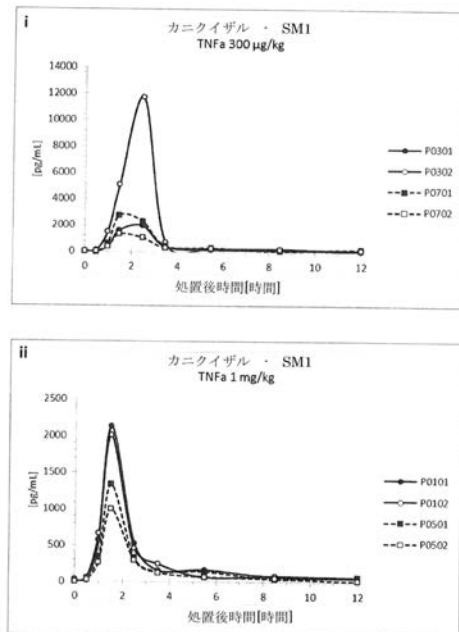
【図10ee】

Fig. 10ee



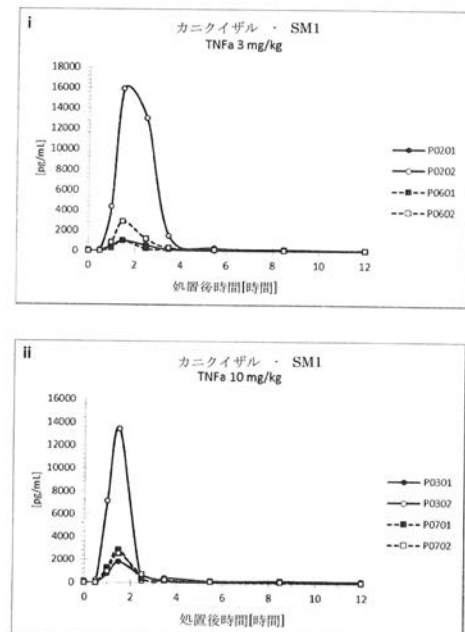
【図10ff】

Fig. 10ff



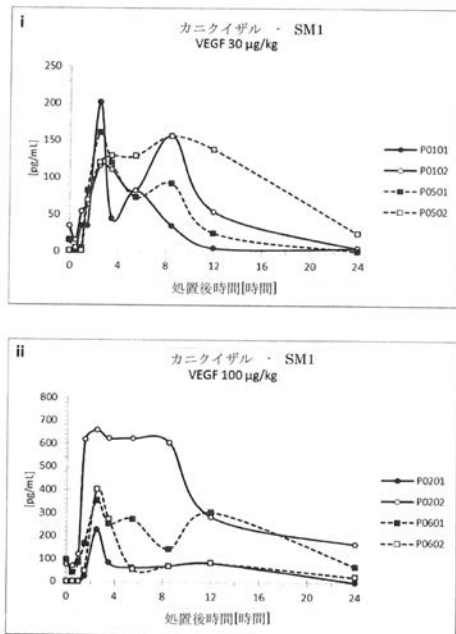
【図10gg】

Fig. 10gg



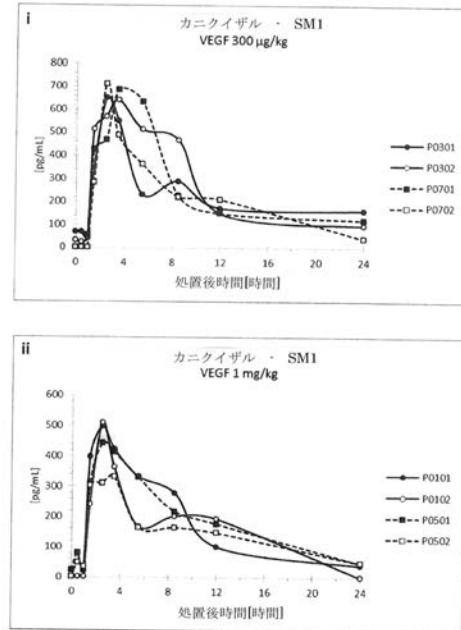
【図10hh】

Fig. 10hh



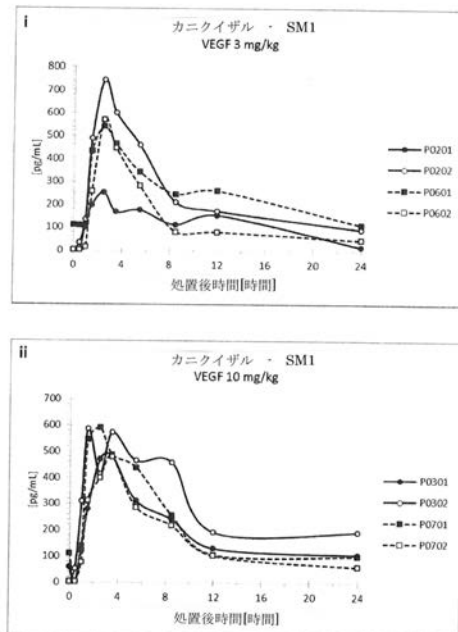
【図10ii】

Fig. 10ii



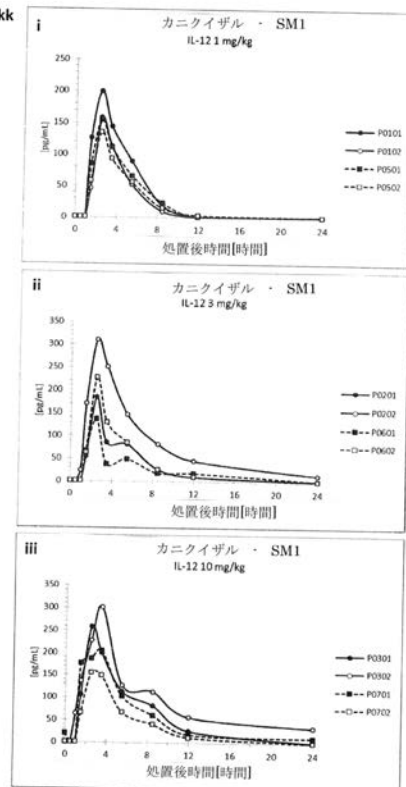
【図10jj】

Fig. 10jj

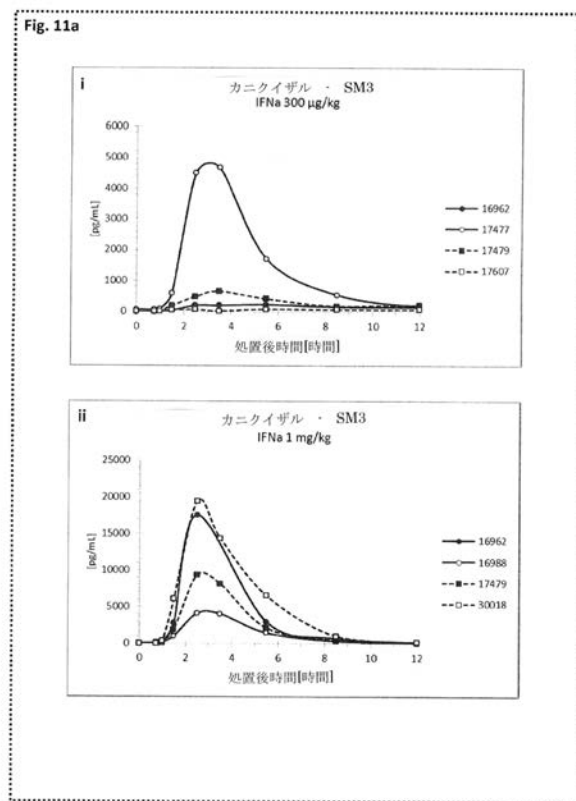


【図10kk】

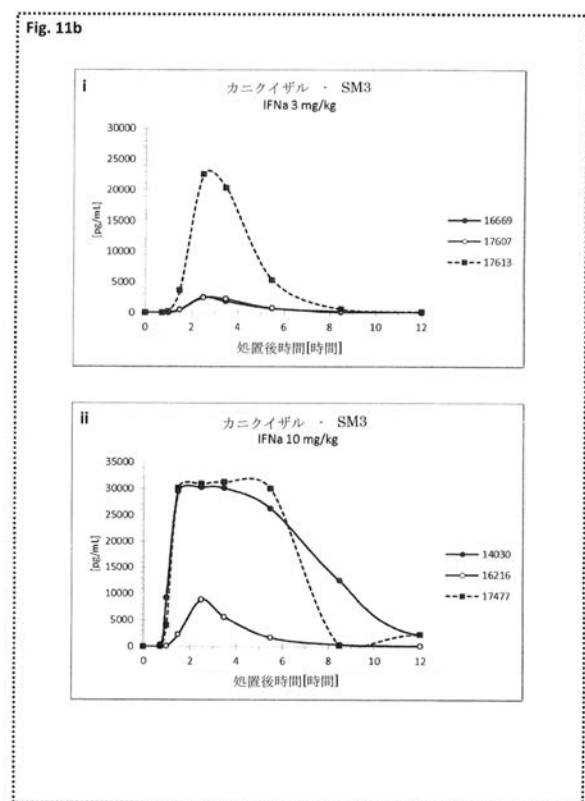
Fig. 10kk



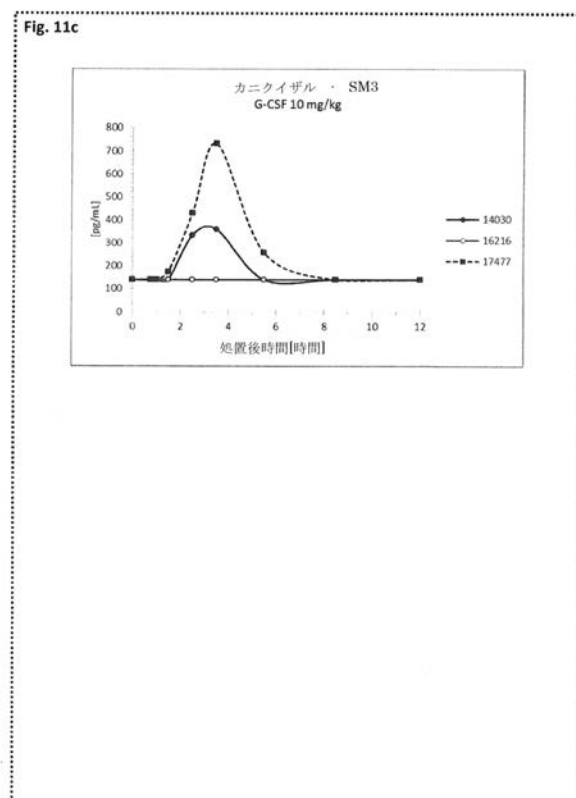
【図 1 1 a】



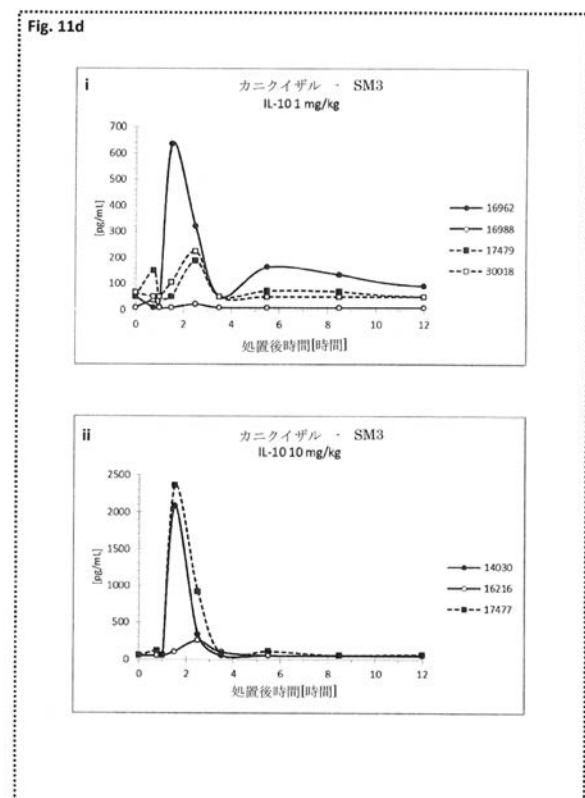
【図 1 1 b】



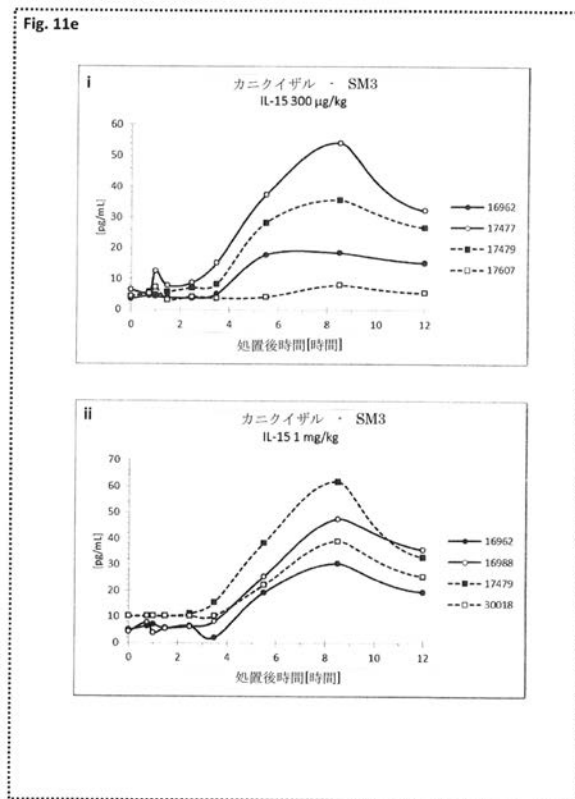
【図 1 1 c】



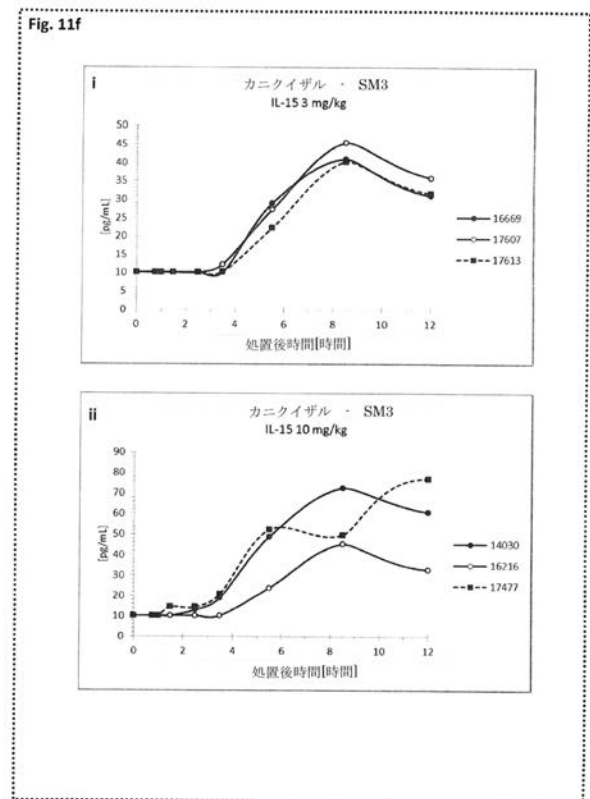
【図 1 1 d】



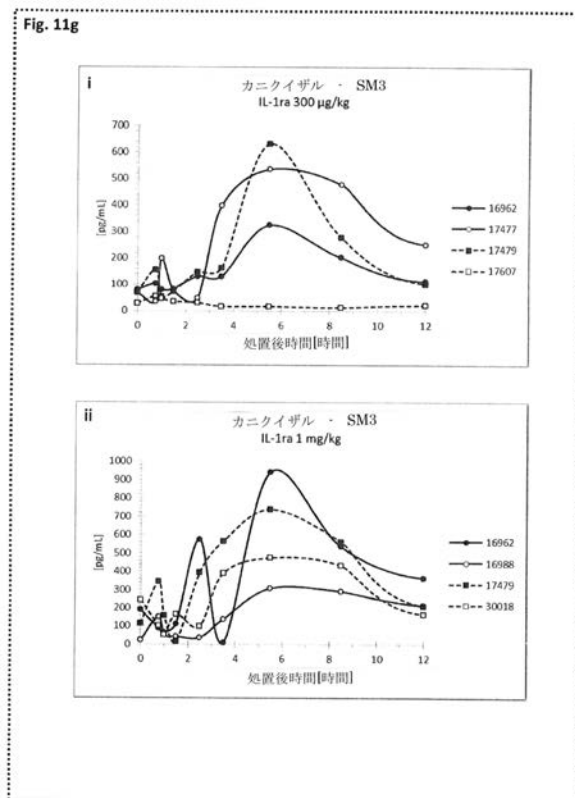
【図 11 e】



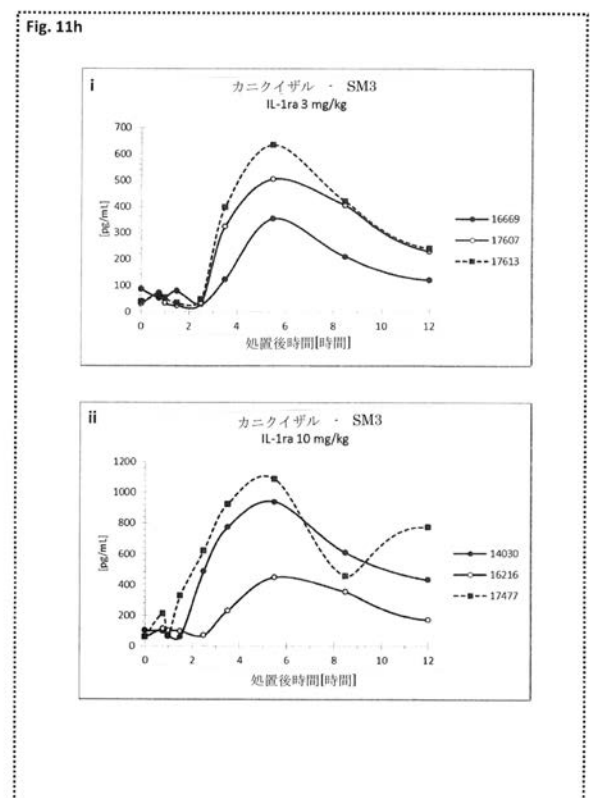
【図 11 f】



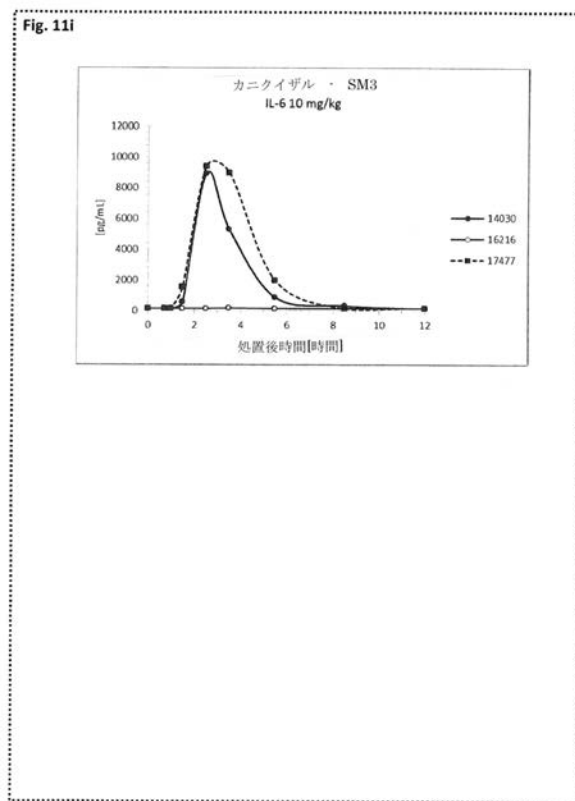
【図 11 g】



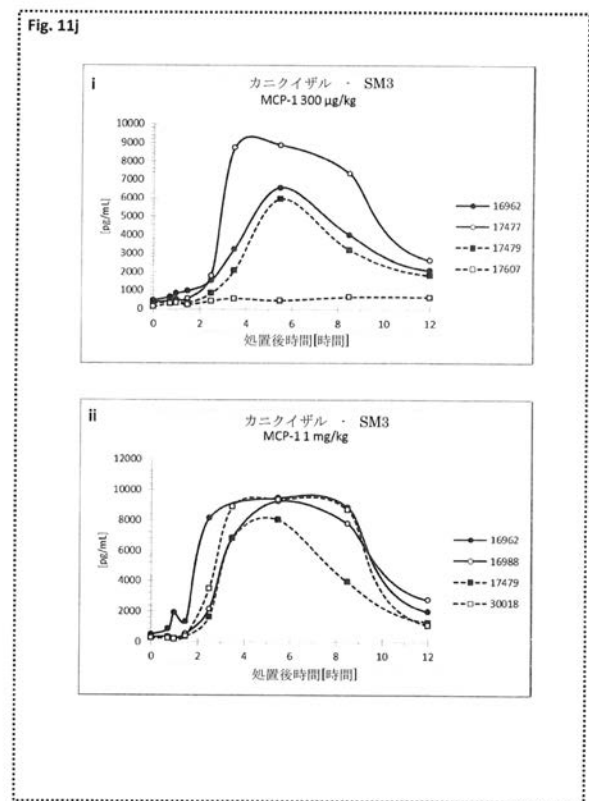
【図 11 h】



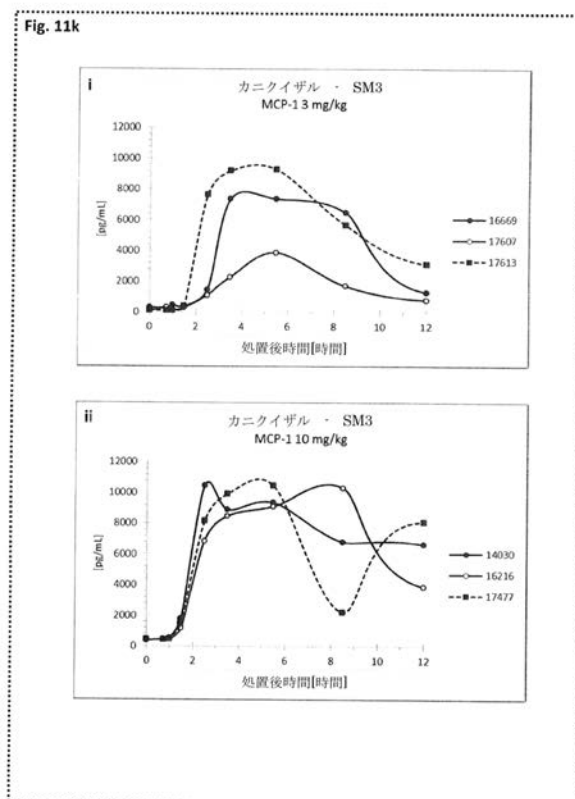
【図 1 1 i】



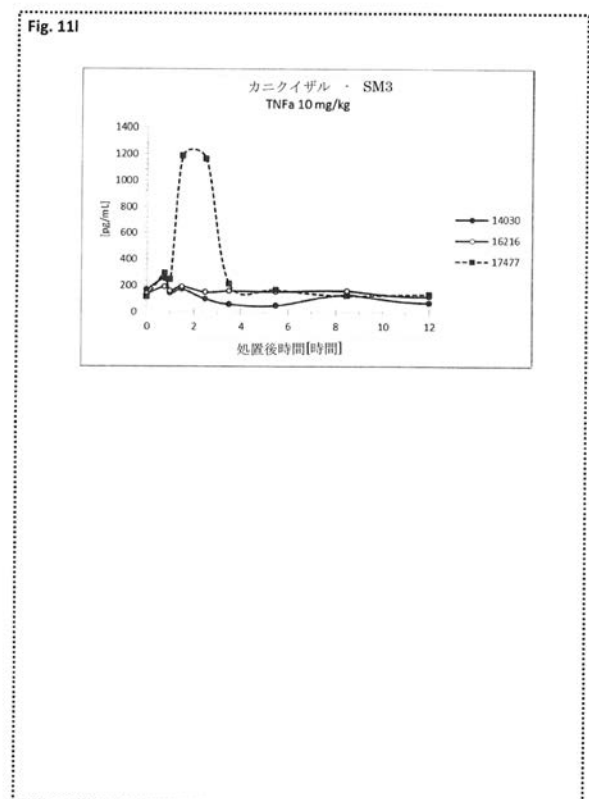
【図 1 1 j】



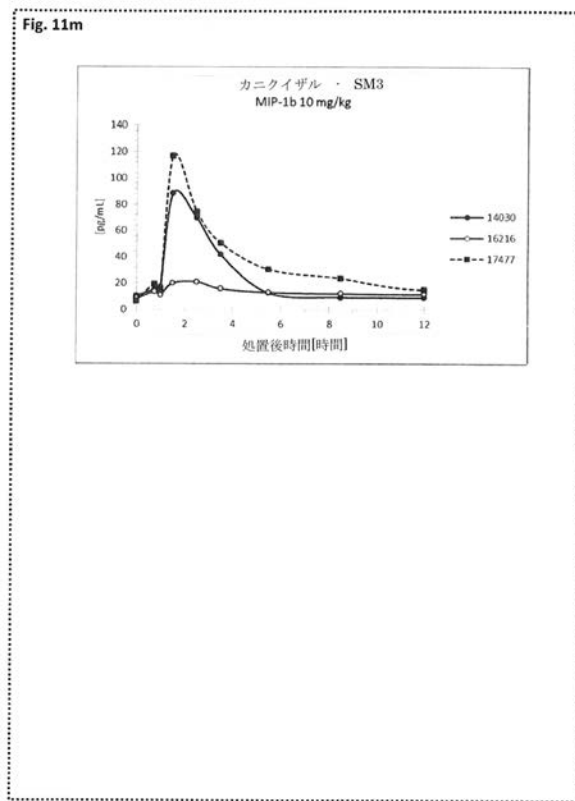
【図 1 1 k】



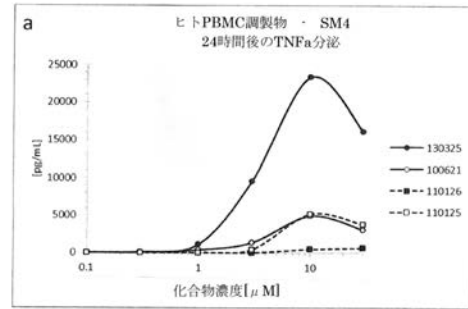
【図 1 1 l】



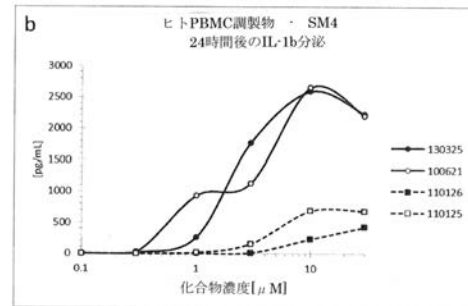
【図 1 1 m】



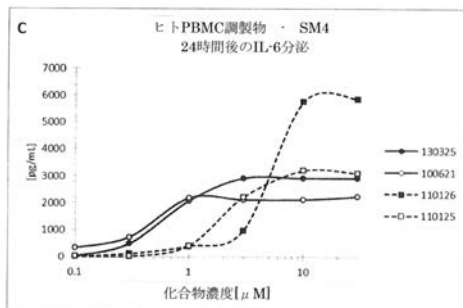
【図 1 2 a】



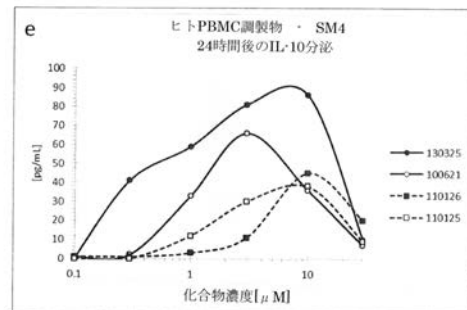
【図 1 2 b】



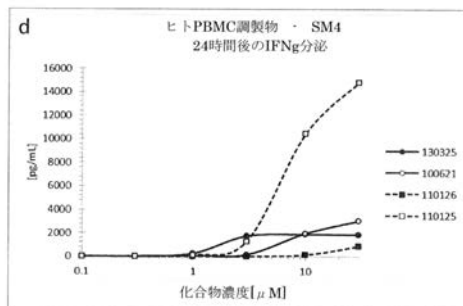
【図 1 2 c】



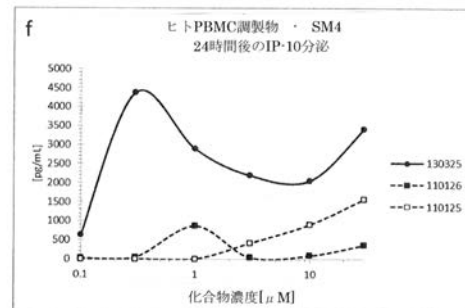
【図 1 2 e】



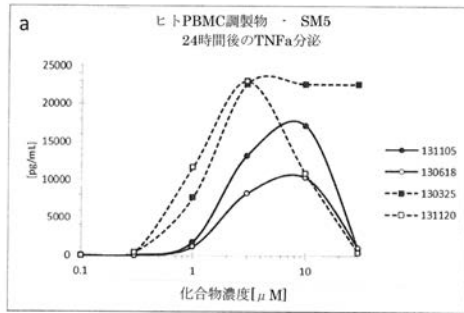
【図 1 2 d】



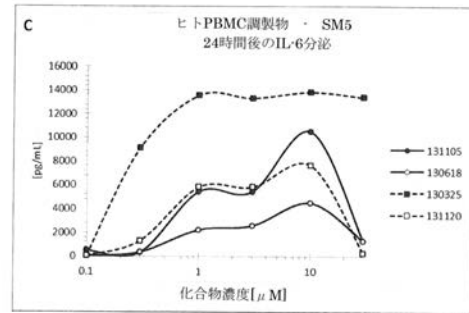
【図 1 2 f】



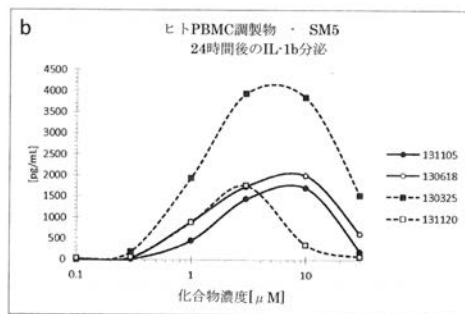
【図 1 3 a】



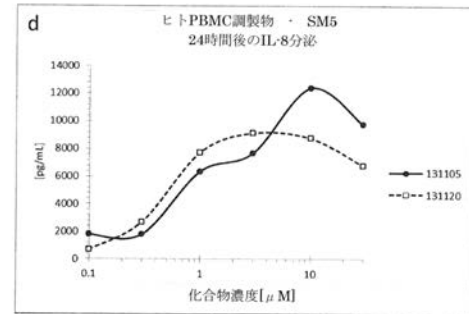
【図 1 3 c】



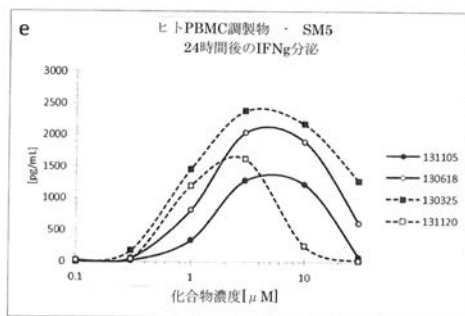
【図 1 3 b】



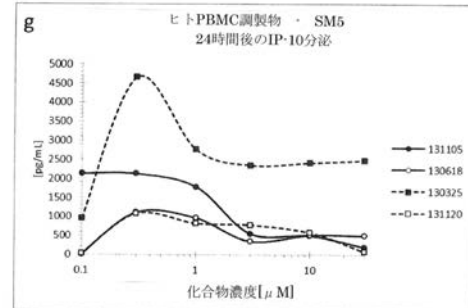
【図 1 3 d】



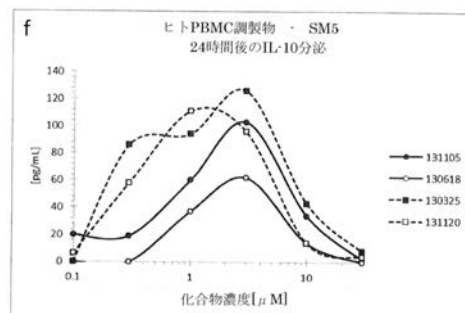
【図 1 3 e】



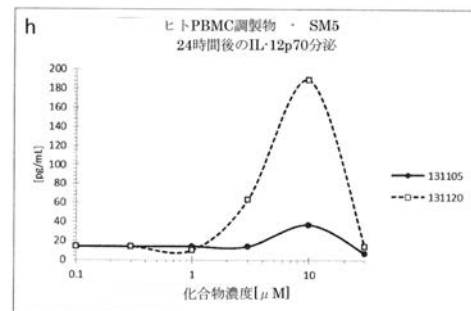
【図 1 3 g】



【図 1 3 f】



【図 1 3 h】



【配列表】

2019537712000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2017/077293

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. G01N33/50
ADD.

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 practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2013/126402 A1 (UNIV VIRGINIA PATENT FOUND [US]; SLINGLUFF JR CRAIG L [US]; ENGELHARD) 29 August 2013 (2013-08-29) pg 8, l 1-19; pg 12, l 1-14; pg 19, l 6-8; pg 28, l 11-13; pg 30, l 9-pg 31, l 20; pg 36, l 20-pg 37, l 10; fig 1-2. -----	1-6, 14-25, 41-45
X	WO 2011/061487 A1 (ALLIGATOR BIOSCIENCE AB [SE]; TOETTERMAN THOMAS [SE]; SANDIN LINDA [SE]) 26 May 2011 (2011-05-26) pg 1, l 10-15; pg 3, l 12-14; pg 6, l 1-10; pg 14, l 1-pg 15, l 30; pg 13, l 10-12; pg 29, l 6-25; pg 39, l 5-10; cl 1-2, 12; fig 5. ----- -/--	1-20, 22-46

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ 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 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 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

20 March 2018

Date of mailing of the international search report

12/04/2018

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Motrescu-Hateley, E

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2017/077293

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2016/156398 A1 (BIONTECH RNA PHARMACEUTICALS GMBH [DE]; TRON - TRANSLATIONALE ONKOLOGI) 6 October 2016 (2016-10-06) the whole document -----	1-46
A	WO 2007/109825 A1 (ADELAIDE RES & INNOVATION PTY [AU]; HERSEY PETER [AU]; COVENTRY BRENDON) 4 October 2007 (2007-10-04) the whole document -----	1-46

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2017/077293

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2013126402 A1	29-08-2013	US 2015231217 A1 WO 2013126402 A1	20-08-2015 29-08-2013
WO 2011061487 A1	26-05-2011	CA 2781181 A1 CN 102803961 A EP 2502071 A1 US 2013004483 A1 WO 2011061487 A1	26-05-2011 28-11-2012 26-09-2012 03-01-2013 26-05-2011
WO 2016156398 A1	06-10-2016	AU 2016239318 A1 CA 2978980 A1 EP 3277263 A1 WO 2016155809 A1 WO 2016156398 A1	21-09-2017 06-10-2016 07-02-2018 06-10-2016 06-10-2016
WO 2007109825 A1	04-10-2007	AU 2006341189 A1 US 2010221289 A1 US 2016375116 A1 WO 2007109825 A1	04-10-2007 02-09-2010 29-12-2016 04-10-2007

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 38/02 (2006.01)	A 6 1 K 38/02	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)	A 6 1 K 31/7105	
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	
C 0 7 K 14/725 (2006.01)	C 0 7 K 14/725	
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, 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, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(72)発明者 シュテファン・ヨーゼフ・クリストフ・フリードリヒ・シュトロープル
ドイツ・5 5 1 3 1・マインツ・アン・デア・ゴルトグルーベ・1 2・バイオンテック・アーゲー
内

(72)発明者 ロマン・ペーター・レーゼマン
ドイツ・5 5 1 3 1・マインツ・アン・デア・ゴルトグルーベ・1 2・バイオンテック・アーゲー
内

(72)発明者 ウグール・シャヒン
ドイツ・5 5 1 3 1・マインツ・アン・デア・ゴルトグルーベ・1 2・バイオンテック・アーゲー
内

(72)発明者 ヴェロニカ・ヤーンデル
ドイツ・5 5 1 3 1・マインツ・アン・デア・ゴルトグルーベ・1 2・バイオンテック・アーゲー
内

(72)発明者 ドレーン・シュヴァルク・コカラキス
ドイツ・5 5 1 3 1・マインツ・アン・デア・ゴルトグルーベ・1 2・バイオンテック・アーゲー
内

(72)発明者 イヴ・ヒューゼマン
ドイツ・5 5 1 3 1・マインツ・アン・デア・ゴルトグルーベ・1 2・バイオンテック・アーゲー
内

(72)発明者 カトリン・ドラー
ドイツ・5 5 1 3 1・マインツ・アン・デア・ゴルトグルーベ・1 2・バイオンテック・アーゲー
内

(72)発明者 ロベルト・ヤブロウスキー
ドイツ・5 5 1 3 1・マインツ・アン・デア・ゴルトグルーベ・1 2・バイオンテック・アーゲー
内

F ターム(参考) 4B063 QA18 QQ03 QQ08 QQ52 QQ79 QR35 QR48 QR72 QR77 QS07
QS24 QX01
4C084 AA01 AA13 AA17 AA20 BA44 NA14 ZB07 ZC75
4C086 AA01 AA10 EA16 MA01 MA02 MA04 NA06 ZB07 ZC75
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA50 EA50 FA71

專利名称(译)	免疫療法の剂量确定		
公开(公告)号	JP2019537712A	公开(公告)日	2019-12-26
申請号	JP2019520795	申請日	2017-10-25
[标]发明人	ウグールシャヒン イヴヒューゼマン		
发明人	シュテファン・ヨーゼフ・クリストフ・フリードリヒ・シュトロープル ロマン・ペーター・レーゼマン ウグール・シャヒン ヴェロニカ・ヤーンデル ドレーン・シュヴァルク-コカラキス イヴ・ヒューゼマン カトリン・ドラー ロベルト・ヤブロウスキー		
IPC分类号	G01N33/53 A61P37/02 A61P43/00 A61K45/00 A61K45/06 A61K38/02 A61K48/00 A61K31/7105 C12Q1/02 C12N15/12 C07K14/725 G01N33/15		
CPC分类号	A61P37/02 A61P43/00 G01N33/5047 G01N33/6854 G01N2800/52 A61K31/7105 A61K45/06 G01N33/6866 G01N2333/56		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.P A61P37/02 A61P43/00.121 A61K45/00 A61K45/06 A61K38/02 A61K48/00 A61K31/7105 C12Q1/02 C12N15/12 C07K14/725 G01N33/15.Z		
F-TERM分类号	4B063/QA18 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ52 4B063/QQ79 4B063/QR35 4B063/QR48 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS07 4B063/QS24 4B063/QX01 4C084/AA01 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/AA20 4C084/BA44 4C084/NA14 4C084/ZB07 4C084/ZC75 4C086/AA01 4C086/AA10 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA02 4C086/MA04 4C086/NA06 4C086/ZB07 4C086/ZC75 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/EA50 4H045/FA71		
代理人(译)	村山彦 安倍晋三龙彦		
優先権	PCT/EP2016/075647 2016-10-25 WO		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本発明提供了免疫治療性化合物，由于个体受試者内的自然变化，例如由于给予免疫治療性化合物而引起的免疫系统反应的变化，其功效和毒性在相同剂量下可能因个体而异。一种确定合适的给药剂量的方法。

(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2019-537712 (P2019-537712A)
		(43) 公表日	令和1年12月26日 (2019. 12. 26)
(51) Int. Cl.		F I	テーマコード (参考)
G O 1 N 33/53 (2006.01)		G O 1 N 33/53	Z N A P 4 B 0 6 3
A 6 1 P 37/02 (2006.01)		A 6 1 P 37/02	4 C 0 8 4
A 6 1 P 43/00 (2006.01)		A 6 1 P 43/00	1 2 1 4 C 0 8 6
A 6 1 K 45/00 (2006.01)		A 6 1 K 45/00	4 H 0 4 5
A 6 1 K 45/06 (2006.01)		A 6 1 K 45/06	
		審査請求 未請求 予備審査請求 未請求	(全 97 頁) 最終頁に続く
(21) 出願番号	特願2019-520795 (P2019-520795)	(71) 出 願 人	517010699
(86) (22) 出 願 日	平成29年10月25日 (2017. 10. 25)		バイオネット エールエヌアー ファー
(85) 翻訳文提出日	平成31年4月18日 (2019. 4. 18)		マシューティカルズ ゲームベーパー
(86) 国際出願番号	PCT/EP2017/077293		ドイツ・55131・マインツ・アン・デ
(87) 国際公開番号	W02018/077942		アイ・ゴルトグルーベ・12
(87) 国際公開日	平成30年5月3日 (2018. 5. 3)	(74) 代理人	100108453
(31) 優先権主張番号	PCT/EP2016/075647		弁理士 村山 清彦
(32) 優先日	平成28年10月25日 (2016. 10. 25)	(74) 代理人	100110364
(33) 優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁 (EP)		弁理士 実広 信哉
		(74) 代理人	100133400
			弁理士 阿部 達彦
(54) 【発明の名称】 免疫療法剤のための用量決定			