

(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2004-512030  
(P2004-512030A)

(43) 公表日 平成16年4月22日(2004.4.22)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 5/06</b>	C 1 2 N 5/00	4 B 0 2 4
<b>A 6 1 K 35/14</b>	A 6 1 K 35/14	4 B 0 6 3
<b>A 6 1 P 31/00</b>	A 6 1 P 31/00	4 B 0 6 5
<b>A 6 1 P 35/00</b>	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 7
<b>A 6 1 P 37/02</b>	A 6 1 P 37/02	
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 127 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2002-526899 (P2002-526899)	(71) 出願人	598093026 オーソーマクニール・ファーマシューチカル・インコーポレーテッド アメリカ合衆国ニュージャージー州08869-0602ラリタン・ユースルート ナンバー202
(86) (22) 出願日	平成13年9月6日(2001.9.6)	(74) 代理人	100060782 弁理士 小田島 平吉
(85) 翻訳文提出日	平成15年3月17日(2003.3.17)	(72) 発明者	ビテイエロ, アントネラ アメリカ合衆国カリフォルニア州92037ラジヨラ・ハイアベニュー7389
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/028016	(72) 発明者	マカリオ, リタ イタリア・アイー27100パビア・ピア ボルタ24
(87) 国際公開番号	W02002/022648		最終頁に続く
(87) 国際公開日	平成14年3月21日(2002.3.21)		
(31) 優先権主張番号	60/233,009		
(32) 優先日	平成12年9月15日(2000.9.15)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 特異的細胞溶解性T細胞応答を誘導するための組成物および方法

(57) 【要約】

本発明は、病理学的に異常な細胞に対し選択的なCD8<sup>+</sup> Tリンパ球のエキスビポでの誘導方法を提供する。該方法は、アポトーシス性の病理学的に異常な細胞を、少なくとも樹状細胞(DC)、CD4<sup>+</sup> T細胞およびCD8<sup>+</sup> Tリンパ球を有する混合物と接触させること、ならびに、病理学的に異常な細胞に対する抗原特異性および/もしくは選択的細胞溶解活性を有するCD8<sup>+</sup> Tリンパ球(TL)を生成するのに十分な時間の間、アポトーシス性の病理学的に異常な細胞を該混合物とともに培養することよりなる。本発明はさらに、1種もしくはそれ以上の標的抗原に対し選択的なCD8<sup>+</sup> TLのエキスビポの誘導方法を提供する。該方法は、1種もしくはそれ以上の標的抗原を、少なくとも樹状細胞(DC)、CD4<sup>+</sup> T細胞、CD8<sup>+</sup> TLおよびIL-7を有する混合物と接触させること、ならびに、1種もしくはそれ以上の標的抗原に対する選択的免疫反応性を有するCD8<sup>+</sup> TLを生成するのに十分な時間の間、前記1種もしくはそれ以上の標的抗原を該混合物とともに培養することよりなる。本発明はさらに、病理学的に異常な細胞により媒介される疾患を有する患者の治療方法を提供する。該方法は、有効量の、病理学的に異常な細胞に対する抗原特異性および/もしくは選択的細胞溶解活性を有する、本発明の方法により産生されるCD8<sup>+</sup> TLを投与することよりなる。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

アポトーシス性の病理学的に異常な細胞を、少なくとも樹状細胞 (DC)、CD4<sup>+</sup> T細胞およびCD8<sup>+</sup> Tリンパ球を有する混合物と接触させること、ならびに、前記病理学的に異常な細胞に対する抗原特異性を有するCD8<sup>+</sup> Tリンパ球 (TL) を生成させるのに十分な時間の間、前記アポトーシス性の病理学的に異常な細胞を前記混合物とともに培養することを含んで成る、病理学的に異常な細胞に対し選択的なCD8<sup>+</sup> T細胞のエクスピボでの誘導方法。

## 【請求項 2】

前記病理学的に異常な細胞が、腫瘍細胞、病理学的病原体に感染した細胞、小胞、非重要臓器からの細胞、B細胞、細胞ライセート、細胞画分、細胞成分および疾患もしくは病状を媒介する物質を産生する細胞よりなる群から選択される細胞をさらに含んで成る、請求項 1 記載の方法。 10

## 【請求項 3】

前記混合物、もしくはアポトーシス性の病理学的に異常な細胞の前記培養物および前記混合物への、IL-7の添加をさらに含んで成る、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 4】

前記CD8<sup>+</sup> TLがナイーブCD8<sup>+</sup> TLをさらに含んで成る、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 5】

前記DCが実質的に単離されたDCをさらに含んで成る、請求項 1 記載の方法。 20

## 【請求項 6】

前記CD4<sup>+</sup> T細胞が実質的に単離されたCD4<sup>+</sup> T細胞をさらに含んで成る、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 7】

前記CD8<sup>+</sup> TLが実質的に単離されたCD8<sup>+</sup> TLをさらに含んで成る、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 8】

前記病理学的に異常な細胞に対する抗原特異性および細胞溶解活性を有する前記CD8<sup>+</sup> TLを単離することをさらに含んで成る、請求項 1 記載の方法。 30

## 【請求項 9】

2もしくはそれ以上の世代の間、前記病理学的に異常な細胞に対する抗原特異性を有する前記CD8<sup>+</sup> TLを培養すること、ならびにCD8<sup>+</sup> 記憶TLを単離すること(前記CD8<sup>+</sup> 記憶TLは前記病理学的に異常な細胞に対する抗原特異性および細胞溶解活性を有するCD8<sup>+</sup> TLを産生する能力を有することを特徴とする)をさらに含んで成る、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 10】

病理学的に異常な非B細胞白血病細胞を、少なくとも樹状細胞 (DC)、CD4<sup>+</sup> TLおよびCD8<sup>+</sup> Tリンパ球を有する混合物と接触させること、ならびに、前記病理学的に異常な非B細胞白血病細胞を、前記病理学的に異常な非B細胞白血病細胞に対する抗原特異性を有するCD8<sup>+</sup> TLを生成させるのに十分な時間の間、前記混合物とともに培養することを含んで成る、病理学的に異常な細胞に対し選択的なCD8<sup>+</sup> Tリンパ球 (TL) のエクスピボでの誘導方法。 40

## 【請求項 11】

前記病理学的に異常な非B細胞白血病細胞が、細胞ライセート、細胞画分、細胞成分もしくは小胞をさらに含んで成る、請求項 10 記載の方法。

## 【請求項 12】

前記混合物、もしくは病理学的に異常な非B細胞白血病細胞の前記培養物および前記混合物への、IL-7の添加をさらに含んで成る、請求項 10 記載の方法。

## 【請求項 13】

前記 CD8<sup>+</sup> T L がナイーブ CD8<sup>+</sup> T L をさらに含んで成る、請求項 10 記載の方法。

【請求項 14】

前記 DC が実質的に単離された DC をさらに含んで成る、請求項 10 記載の方法。

【請求項 15】

前記 CD4<sup>+</sup> T 細胞が実質的に単離された CD4<sup>+</sup> T 細胞をさらに含んで成る、請求項 10 記載の方法。

【請求項 16】

前記 CD8<sup>+</sup> T L が実質的に単離された CD8<sup>+</sup> T L をさらに含んで成る、請求項 10 記載の方法。

10

【請求項 17】

前記病理学的に異常な非 B 細胞白血病細胞に対する抗原特異性および細胞溶解活性を有する前記 CD8<sup>+</sup> T L を単離することをさらに含んで成る、請求項 10 記載の方法。

【請求項 18】

2 もしくはそれ以上の世代の間、前記病理学的に異常な細胞に対する抗原特異性を有する前記 CD8<sup>+</sup> T L を培養すること、および CD8<sup>+</sup> 記憶 T L を単離すること（前記 CD8<sup>+</sup> 記憶 T L は前記病理学的に異常な非 B 細胞白血病細胞に対する抗原特異性を有する CD8<sup>+</sup> T L を産生する能力を有することを特徴とする）をさらに含んで成る、請求項 10 記載の方法。

【請求項 19】

20

a) 前記病理学的に異常な細胞を、病理学的に異常な細胞の抗原を提示する樹状細胞 (DC) を産生させるのに十分な時間の間、少なくとも DC および単離された CD4<sup>+</sup> T 細胞を有する第一の混合物と接触させること；

b) CD8<sup>+</sup> T L を添加して第二の混合物を生じさせること；ならびに

c) 前記第二の混合物を、前記病理学的に異常な細胞に対する抗原特異性を有する CD8<sup>+</sup> T L を生成させるのに十分な時間の間培養すること

を含んで成る、病理学的に異常な細胞に対し選択的な CD8<sup>+</sup> T リンパ球 (T L) のエクスピボでの誘導方法。

【請求項 20】

前記病理学的に異常な細胞が、腫瘍細胞、小胞、細胞ライセート、細胞画分、細胞成分、生体もしくは非生体臓器からの細胞、B 細胞、疾患もしくは病状を媒介する物質を産生する細胞、または病理学的病原体に感染した細胞をさらに含んで成る、請求項 19 記載の方法。

30

【請求項 21】

段階 (a)、段階 (b) もしくは段階 (c) への IL-7 の添加をさらに含んで成る、請求項 19 記載の方法。

【請求項 22】

前記 CD8<sup>+</sup> T L がナイーブ CD8<sup>+</sup> T L をさらに含んで成る、請求項 19 記載の方法。

【請求項 23】

40

前記 DC が実質的に単離された DC をさらに含んで成る、請求項 19 記載の方法。

【請求項 24】

前記 CD8<sup>+</sup> T L が実質的に単離された CD8<sup>+</sup> T L をさらに含んで成る、請求項 19 記載の方法。

【請求項 25】

前記病理学的に異常な細胞に対する抗原特異性および細胞溶解活性を有する前記 CD8<sup>+</sup> T L を単離することをさらに含んで成る、請求項 19 記載の方法。

【請求項 26】

2 もしくはそれ以上の世代の間、前記病理学的に異常な細胞に対する抗原特異性を有する前記 CD8<sup>+</sup> T L を培養すること、および CD8<sup>+</sup> 記憶 T L を単離すること（前記 C

50

D 8<sup>+</sup> 記憶 T L は前記病理学的に異常な細胞に対する抗原特異性を有する C D 8<sup>+</sup> T L を産生する能力を有することを特徴とする ) をさらに含んで成る、請求項 19 記載の方法。

【請求項 27】

アポトーシス性の病理学的に異常な細胞を、少なくとも樹状細胞 ( D C )、C D 4 0 L もしくは I L - 1 2 および C D 8<sup>+</sup> T L を有する混合物と接触させること、ならびに、前記病理学的に異常な細胞に対する抗原特異性を有する C D 8<sup>+</sup> T L を生成させるのに十分な時間の間、前記アポトーシス性の病理学的に異常な細胞を前記混合物とともに培養することを含んで成る、病理学的に異常な細胞に対し選択的な C D 8<sup>+</sup> T リンパ球 ( T L ) のエキスビボでの誘導方法。

10

【請求項 28】

前記病理学的に異常な細胞が、腫瘍細胞、小胞、細胞ライセート、細胞画分、細胞成分、生体もしくは非生体臓器からの細胞、B 細胞、疾患もしくは病状を媒介する物質を産生する細胞、または病理学的病原体に感染した細胞をさらに含んで成る、請求項 27 記載の方法。

【請求項 29】

前記混合物、もしくはアポトーシス性の病理学的に異常な細胞の前記培養物および前記混合物への、I L - 7 の添加をさらに含んで成る、請求項 27 記載の方法。

【請求項 30】

前記 C D 8<sup>+</sup> T L がナイーブ C D 8<sup>+</sup> T L をさらに含んで成る、請求項 27 記載の方法。

20

【請求項 31】

実質的に精製された C D 4 0 L もしくは C D 4 0 の活性化を誘導する分子もしくは I L - 1 2 をさらに含んで成る、請求項 27 記載の方法。

【請求項 32】

前記病理学的に異常な細胞に対する抗原特異性および細胞溶解活性を有する前記 C D 8<sup>+</sup> T L を単離することをさらに含んで成る、請求項 27 記載の方法。

【請求項 33】

病理学的に異常な非 B 細胞白血病細胞を、少なくとも樹状細胞 ( D C )、C D 4 0 L もしくは I L - 1 2 および C D 8<sup>+</sup> T L を有する混合物と接触させること、ならびに、前記病理学的に異常な非 B 細胞白血病細胞に対する抗原特異性を有する C D 8<sup>+</sup> T L を生成させるのに十分な時間の間、前記病理学的に異常な非 B 細胞白血病細胞を前記混合物とともに培養することを含んで成る、病理学的に異常な細胞に対し選択的な C D 8<sup>+</sup> T リンパ球 ( T L ) のエキスビボでの誘導方法。

30

【請求項 34】

前記病理学的に異常な非 B 細胞白血病細胞が、細胞ライセート、細胞画分、細胞成分、小胞もしくは病理学的病原体に感染した細胞をさらに含んで成る、請求項 33 記載の方法。

【請求項 35】

前記混合物、もしくは病理学的に異常な非 B 細胞白血病細胞の前記培養物および前記混合物への、I L - 7 の添加をさらに含んで成る、請求項 33 記載の方法。

40

【請求項 36】

前記 C D 8<sup>+</sup> T L がナイーブ C D 8<sup>+</sup> T L をさらに含んで成る、請求項 33 記載の方法。

【請求項 37】

実質的に精製された C D 4 0 L もしくは C D 4 0 の活性化を誘導する分子もしくは I L - 1 2 をさらに含んで成る、請求項 33 記載の方法。

【請求項 38】

前記病理学的に異常な非 B 細胞白血病細胞に対する抗原特異性および細胞溶解活性を有する前記 C D 8<sup>+</sup> T L を単離することをさらに含んで成る、請求項 33 記載の方法。

【請求項 39】

50

a) 前記病理学的に異常な細胞を、病理学的に異常な細胞の抗原を提示するDCを産生させるのに十分な時間の間、少なくとも樹状細胞(DC)およびIL-12を有する第一の混合物と接触させること；

b) CD8<sup>+</sup> T:を添加して第二の混合物を生じさせること；ならびに

c) 前記病理学的に異常な細胞に対する抗原特異性を有するCD8<sup>+</sup> TLを生成させるのに十分な時間の間、前記第二の混合物を培養すること

を含んで成る、病理学的に異常な細胞に対し選択的なCD8<sup>+</sup> Tリンパ球(TL)のエクスピボでの誘導方法。

【請求項40】

前記病理学的に異常な細胞が、腫瘍細胞、小胞、細胞ライセート、細胞画分、細胞成分、生体もしくは非生体臓器からの細胞、疾患もしくは病状を媒介する物質を産生する細胞、または病理学的病原体に感染した細胞をさらに含んで成る、請求項39記載の方法。 10

【請求項41】

段階(a)、段階(b)もしくは段階(c)へのIL-7の添加をさらに含んで成る、請求項39記載の方法。

【請求項42】

前記CD8<sup>+</sup> TLがナイーブCD8<sup>+</sup> TLをさらに含んで成る、請求項39記載の方法。

【請求項43】

実質的に精製されたIL-12をさらに含んで成る、請求項39記載の方法。 20

【請求項44】

前記病理学的に異常な細胞に対する抗原特異性および細胞溶解活性を有する前記CD8<sup>+</sup> TLを単離することをさらに含んで成る、請求項39記載の方法。

【請求項45】

前記1種もしくはそれ以上の標的抗原を、少なくとも樹状細胞(DC)、CD4<sup>+</sup> T細胞、CD8<sup>+</sup> TLおよびIL-7を有する混合物と接触させること、ならびに、前記1種もしくはそれ以上の標的抗原に対する選択的免疫反応性を有するCD8<sup>+</sup> TLを生成させるのに十分な時間の間、前記1種もしくはそれ以上の標的抗原を前記混合物とともに培養することを含んで成る、1種もしくはそれ以上の標的抗原に対し選択的なCD8<sup>+</sup> Tリンパ球(TL)のエクスピボでの誘導方法。 30

【請求項46】

前記CD8<sup>+</sup> TLがナイーブCD8<sup>+</sup> TLをさらに含んで成る、請求項45記載の方法。

【請求項47】

DC、CD4<sup>+</sup> T細胞およびCD8<sup>+</sup> TLよりなる群から選択される実質的に単離された細胞をさらに含んで成る、請求項45記載の方法。

【請求項48】

前記1種もしくはそれ以上の標的抗原に対する選択的免疫反応性を有する前記CD8<sup>+</sup> TLを単離することをさらに含んで成る、請求項45記載の方法。

【請求項49】

2もしくはそれ以上の世代の間、選択的免疫反応性を有する前記CD8<sup>+</sup> TLを培養すること、およびCD8<sup>+</sup> 記憶TLを単離すること(前記CD8<sup>+</sup> 記憶TLは前記1種もしくはそれ以上の標的抗原に対する選択的免疫反応性を有するCD8<sup>+</sup> TLを産生する能力を有することを特徴とする)をさらに含んで成る、請求項45記載の方法。 40

【請求項50】

前記1種もしくはそれ以上の標的抗原を、少なくとも樹状細胞(DC)、CD40LもしくはIL-12、CD8<sup>+</sup> TLおよびIL-7を有する混合物と接触させること、ならびに、前記1種もしくはそれ以上の標的抗原に対する選択的免疫反応性を有するCD8<sup>+</sup> TLを生成させるのに十分な時間の間、前記1種もしくはそれ以上の標的抗原を前記混合物とともに培養することを含んで成る、1種もしくはそれ以上の標的抗原に対し選択的 50

な  $CD8^+$  Tリンパ球 (TL) のエキスピボでの誘導方法。

【請求項 5 1】

前記  $CD8^+$  TL がナイーブ  $CD8^+$  TL をさらに含んで成る、請求項 5 0 記載の方法。

【請求項 5 2】

実質的に単離された DC もしくは  $CD8^+$  TL をさらに含んで成る、請求項 5 0 記載の方法。

【請求項 5 3】

実質的に精製された  $CD40L$  もしくは  $CD40$  の活性化を誘導する分子もしくは  $IL-12$  をさらに含んで成る、請求項 5 0 記載の方法。

10

【請求項 5 4】

前記 1 種もしくはそれ以上の標的抗原に対する選択的免疫反応性を有する前記  $CD8^+$  TL を単離することをさらに含んで成る、請求項 5 0 記載の方法。

【請求項 5 5】

a) 病理学的に異常な細胞を突然変異誘発剤で処理して病理学的に異常な細胞の突然変異体集団を生じさせること；

b) 病理学的に異常な細胞の前記突然変異体集団を、前記病理学的に異常な細胞に対し選択的な細胞傷害性 Tリンパ球 (CTL) と接触させて、前記 CTL との反応性を喪失した突然変異体の病理学的に異常な細胞を同定すること；

c) 病理学的に異常な細胞のポリペプチドをコードする核酸の発現可能な集団を前記突然変異体細胞に導入して、前記ポリペプチドを発現する突然変異体細胞の集団を生じさせること；および

20

d) 前記病理学的に異常な細胞に対し反応性の前記 CTL との反応性を復帰させる病理学的に異常な細胞のポリペプチドを発現する突然変異体細胞を同定することを含んで成る、病理学的に異常な細胞に関連する抗原の同定方法。

【請求項 5 6】

前記病理学的に異常な細胞のポリペプチドをコードする核酸を単離することをさらに含んで成る、請求項 5 5 記載の方法。

【請求項 5 7】

( a ) 病理学的に異常な細胞に関連することが疑わしい 1 種もしくはそれ以上の抗原を、前記 1 種もしくはそれ以上の抗原を発現する病理学的に異常な細胞に対し選択的な細胞傷害性 Tリンパ球 (CTL) と接触させること；および

30

( b ) 前記 1 種もしくはそれ以上の抗原に対する、前記 1 種もしくはそれ以上の抗原を発現する病理学的に異常な細胞に対し選択的な前記 CTL の免疫反応性を測定すること (ここで、前記 1 種もしくはそれ以上の抗原に対する選択的な免疫反応性を有する CTL は、前記病理学的に異常な細胞と関連するとして前記 1 種もしくはそれ以上の免疫反応性の抗原を特徴づける)

を含んで成る、病理学的に異常な細胞と関連する抗原の同定方法。

【請求項 5 8】

有効量の、前記病理学的に異常な細胞に対する抗原特異性もしくは細胞溶解活性を有する  $CD8^+$  Tリンパ球 (TL) を投与すること (前記病理学的に異常な細胞に対する選択的細胞溶解活性を有する前記  $CD8^+$  TL は請求項 1 記載の方法により産生される) を含んで成る、病理学的に異常な細胞により媒介される疾患を有する患者の治療方法。

40

【請求項 5 9】

有効量の、前記病理学的に異常な細胞に対する抗原特異性もしくは細胞溶解活性を有する  $CD8^+$  Tリンパ球 (TL) を投与すること (前記病理学的に異常な細胞に対する選択的細胞溶解活性を有する前記  $CD8^+$  TL は請求項 1 9 記載の方法により産生される) を含んで成る、病理学的に異常な細胞により媒介される疾患を有する患者の治療方法。

【請求項 6 0】

有効量の、前記病理学的に異常な細胞に対する抗原特異性もしくは細胞溶解活性を有する

50

CD8<sup>+</sup> Tリンパ球 (TL) を投与すること (前記病理学的に異常な細胞に対する選択的細胞溶解活性を有する前記CD8<sup>+</sup> TLは請求項27記載の方法により産生される) を含んで成る、病理学的に異常な細胞により媒介される疾患を有する患者の治療方法。

【請求項61】

有効量の、前記病理学的に異常な細胞に対する抗原特異性もしくは細胞溶解活性を有するCD8<sup>+</sup> Tリンパ球 (TL) を投与すること (前記病理学的に異常な細胞に対する選択的細胞溶解活性を有する前記CD8<sup>+</sup> TLは請求項39記載の方法により産生される) を含んで成る、病理学的に異常な細胞により媒介される疾患を有する患者の治療方法。

【請求項62】

有効量の、前記病理学的に異常な非B細胞白血病細胞に対する細胞溶解活性を有するCD8<sup>+</sup> 細胞溶解性Tリンパ球 (CTL) を投与すること (前記病理学的に異常な非B細胞白血病細胞に対する選択的細胞溶解活性を有する前記CD8<sup>+</sup> CTLは請求項10記載の方法により産生される) を含んで成る、病理学的に異常な非B細胞白血病細胞により媒介される疾患を有する患者の治療方法。 10

【請求項63】

有効量の、前記病理学的に異常な非B細胞白血病細胞に対する細胞溶解活性を有するCD8<sup>+</sup> 細胞溶解性Tリンパ球 (CTL) を投与すること (前記病理学的に異常な非B細胞白血病細胞に対する選択的細胞溶解活性を有する前記CD8<sup>+</sup> CTLは請求項33記載の方法により産生される) を含んで成る、病理学的に異常な非B細胞白血病細胞により媒介される疾患を有する患者の治療方法。 20

【請求項64】

有効量の、前記病理学的に異常な細胞に関連する1種もしくはそれ以上の標的抗原に対する免疫反応性を有するCD8<sup>+</sup> 細胞溶解性Tリンパ球 (CTL) を投与すること (免疫反応性を有する前記CD8<sup>+</sup> CTLは請求項45記載の方法により産生される) を含んで成る、病理学的に異常な細胞により媒介される疾患を有する患者の治療方法。

【請求項65】

有効量の、前記病理学的に異常な細胞に関連する1種もしくはそれ以上の標的抗原に対する免疫反応性を有するCD8<sup>+</sup> 細胞溶解性Tリンパ球 (CTL) を投与すること (免疫反応性を有する前記CD8<sup>+</sup> CTLは請求項50記載の方法により産生される) を含んで成る、病理学的に異常な細胞により媒介される疾患を有する患者の治療方法。 30

【請求項66】

a) 未熟DCを、DCが抗原を取り込むのに十分な時間の期間の間、抗原と接触させること; ならびに

b) 成熟DCへのDCの成熟を誘導するのに十分な時間の期間の間、DCおよび抗原をCD4<sup>+</sup> T細胞とともに培養すること

を順序正しく連続的にもしくは同時に含んで成る、インビトロでの成熟樹状細胞 (DC) の調製方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(関連出願の交差引用)

本出願は2000年9月15日に出願された米国仮出願番号第60/233,009号明細書の利益を主張する。 40

【0002】

(発明の背景)

本発明は全般として、自己免疫障害、感染性疾患、アレルギーおよび癌のような増殖性疾患のような病理学的に異常な細胞により媒介される疾患および病状に、また、より具体的には、癌および他の細胞増殖性障害を治療するのに使用することができる免疫細胞の調製方法に関する。

【0003】

癌は米国での死亡の第一の原因の1つである。毎年、50万人を超える米国人が癌で死亡 50

し、また、100万人以上が該疾患で新たに診断されている。癌性腫瘍は、細胞がその正常な成長調節機構を免れそして制御されない様式で増殖する場合に生じる。腫瘍細胞は、原発性腫瘍の治療が完全でないかもしくは該疾患の実質的進行前に開始されないかのいずれかの場合に二次的部位に転移する可能性がある。癌に関係した死亡率は、予防、早期検出および厳しい治療により減少させることができる。

#### 【0004】

癌の治療に対する障害は、正常組織を容赦しつつ癌に選択的に標的を定めることができる作用物質の相対的欠如である。例えば、一般に限局された治療である放射線治療および外科手術は、治療領域中の正常組織に対するかなりの損傷を引き起こして瘢痕形成および重症の症例では正常組織の機能の喪失をもたらす可能性がある。一般に全身に投与される化学療法は、骨髄、粘膜、皮膚および小腸のような器官に対するかなりの損傷を引き起こす可能性がある。他の癌療法は、腫瘍細胞表面タンパク質に向けられた抗体、および細胞傷害性作用物質に結合された抗体を包含する。治療的抗体は腫瘍特異的細胞表面タンパク質の認識により腫瘍細胞に標的を向けられる。特定の腫瘍に結合するかもしくはトキシンを送達する抗体の産生は、従って、タンパク質標的が同定されること、および細胞表面上に該タンパク質が露出されることを必要とする。抗体治療の有効性および副作用は変動し、そしていくつかの治療的抗体は個体中で重大なアレルギー応答を引き起こす可能性がある。

10

#### 【0005】

癌と闘うための身体の免疫系の使用を必要とする他の療法が開発中である。免疫療法の一アプローチは、ワクチンおよびサイトカインのような作用物質を使用して癌患者の免疫系を間接的に刺激することを目標とする。より直接的な免疫療法の一アプローチは、腫瘍を攻撃する免疫細胞を投与することにより患者の抗腫瘍免疫を増大させることである。養子免疫療法と称される後者の方法は、脳、腎、皮膚および血液の悪性病変を包含する数種の癌に罹っている患者を治療するために、変動するの程度の成功を伴い使用されている。養子免疫療法治療後の長期の癌の退縮は、再現可能に観察されていない。

20

#### 【0006】

養子免疫療法の一方法は腫瘍特異的細胞傷害性Tリンパ球(CTL)を使用することを必要とする。CTLは、主要組織適合遺伝子複合体(MHC)のクラスI分子とともに細胞の表面上の抗原を認識すること、およびその後該細胞を破壊することが可能であるCD8<sup>+</sup>Tリンパ球の特化された一変形である。免疫系におけるCTLの役割は、感染した細胞、腫瘍細胞および外来細胞を認識かつ排除することである。養子免疫療法のために、患者もしくはドナー由来の抗腫瘍CTLの一集団を、エクスピボ培養法を使用して生成させることができる。

30

#### 【0007】

腫瘍関連抗原由来のペプチドを使用するエクスピボでの抗腫瘍CTLの生成方法、およびその後の癌患者へのCTLの投与方法が、変動する成功を伴い報告されている。しかしながら、CTLを生成させるためのこうしたアプローチは、腫瘍特異的抗原が既知でありかつ抗原提示細胞により提示されるペプチドを生成させるように適切にプロセッシングされる場合に限定される。エクスピボでペプチドに誘導されるCTLに対する別の欠点は、生じるCTLが腫瘍細胞表面上の対応する抗原を認識する能力を保持することができるかどうかの予測不能性である。ペプチドに対し生成されたCTLの親和性が、内在性にプロセッシングされた抗原を認識するのに十分でないかもしれないからである。従って、エクスピボで生成されたCTLの治療的使用に必要とされる所望の特異性もしくは有効性は、一般に達成するのが困難であった。エクスピボで生成されたCTLでの別の問題は、2もしくは3回以上の再刺激の間のインビトロでのCTLの維持における困難であった。さらに、この方法は、標的腫瘍細胞上のただ1種の抗原を認識するCTLを生成することによりさらに制限される。

40

#### 【0008】

従って、養子免疫療法のために培養物中で選択的CTLを生成および維持することの必要

50

性が存在する。本発明はこの必要性を満足し、そして関係する利点を同様に提供する。

【0009】

(発明の要約)

本発明は、病理学的に異常な細胞に対し選択的なCD8<sup>+</sup> Tリンパ球のエキスピボでの誘導方法を提供する。該方法は、アポトーシス性の病理学的に異常な細胞を、少なくとも樹状細胞(DC)、CD4<sup>+</sup> T細胞およびCD8<sup>+</sup> Tリンパ球を有する混合物と接触させること、ならびに、病理学的に異常な細胞に対する抗原特異性および/もしくは細胞溶解活性を有するCD8<sup>+</sup> Tリンパ球(TL)を生成させるのに十分な時間の間、アポトーシス性の病理学的に異常な細胞を該混合物とともに培養することよりなる。

【0010】

本発明はさらに、1種もしくはそれ以上の標的抗原に対し選択的なCD8<sup>+</sup> Tリンパ球のエキスピボでの誘導方法を提供する。該方法は、1種もしくはそれ以上の標的抗原を、少なくとも樹状細胞(DC)、CD4<sup>+</sup> T細胞、CD8<sup>+</sup> T細胞およびIL-7を有する混合物と接触させること、ならびに1種もしくはそれ以上の標的抗原に対する抗原特異性および/もしくは選択的免疫反応性を有するCD8<sup>+</sup> Tリンパ球(TL)を生成させるのに十分な時間の間、前記1種もしくはそれ以上の標的抗原を該混合物とともに培養することよりなる。

【0011】

本発明はさらに、病理学的に異常な細胞により媒介される疾患を有する患者の治療方法を提供する。該方法は、有効量の、本発明の方法により産生されるCD8<sup>+</sup> Tリンパ球を投与することよりなり、ここでCD8<sup>+</sup> Tリンパ球は病理学的に異常な細胞に対する抗原特異性および/もしくは細胞溶解活性を有する。

【0012】

(発明の詳細な記述)

本発明は、病理学的に異常な細胞により媒介される疾患を有する個体の治療における使用のためのCD8<sup>+</sup> T細胞の生成方法に向けられる。腫瘍細胞、細胞ライセート、細胞画分、細胞成分、または小胞、またはB細胞、疾患もしくは病状を媒介する物質を産生する細胞、または感染性病原体の影響により異常にされた細胞のような病理学的に異常な細胞に対する抗原特異性および/もしくはそれに対し選択的な細胞溶解活性を有するCD8<sup>+</sup> Tリンパ球(TL)のエキスピボ産生方法が提供される。加えて、細胞は、それが、異常なタンパク質、もしくはある種の環境下で正常にもかかわらず疾患の誘導もしくは進行に関与するタンパク質を産生するために異常とみなすことができる。病理学的に異常な細胞のような標的細胞に対する細胞溶解活性を有するCD8<sup>+</sup> Tリンパ球はCTLと称される。本方法の一利点は、特定の腫瘍もしくは疾患に関係した抗原を同定する必要性を排除して、病理学的に異常な細胞全体に対し選択的なCTLを生成させることができることである。本方法はまた、ペプチド抗原のプロセッシングおよび提示に関連する未知の因子も排除する。該方法の別の利点は、全標的細胞に対し生成されるCTLが病理学的標的に対する多特異的応答を提供する可能性があることである。さらに、全細胞を使用するCTLの誘導は、各個体のCD8<sup>+</sup> T細胞レパートリー中に存在するCTLの選択を見込む。事実、数例の患者において、いくつかのCTL特異性が寛容により存在しないかもしれないことが既知である。さらに、全腫瘍細胞に対するCTLを生成させることは、標的細胞中で起こった個々の突然変異に特異的なCTLの誘導を見込む。

【0013】

本発明はまた、CD8<sup>+</sup> CTL、および、CD8<sup>+</sup> 記憶細胞の特徴であるより長い時間の期間の間インビトロで維持することができるそれらの前駆細胞の抗原特異的CD8<sup>+</sup> TLの生成方法も提供する。CD8<sup>+</sup> 記憶細胞は、治療的に投与される場合に選択的に標的を定められた病理学的に異常な細胞に対する長期の免疫を患者に提供することができるCTLの拡張のための前駆細胞である。CD8<sup>+</sup> 記憶細胞は、その抗原特異性を維持して最低5回の刺激の間インビトロで増殖する能力を有するCD8<sup>+</sup> 細胞を指す。刺激は、抗原により、あるいは例えば有糸分裂促進剤またはT細胞受容体もしくは共刺激分

10

20

30

40

50

子に対し向けられた抗体を包含する非特異的手段により、または当業者に公知の手順により維持することができる。

【0014】

病理学的に異常な細胞を認識する選択的CTLおよび抗原特異的CD8<sup>+</sup> T Lは、癌、ならびに異常な ( a b n o r m a l ) もしくは病理学的に異常な ( a b e r r a n t ) 細胞の排除が有効な治療を提供する可能性がある他の疾患の治療への養子免疫療法アプローチに有用である。病理学的に異常な細胞を選択的に破壊するCTLは、疾患に罹った細胞の排除が病理学的に異常な細胞の存在もしくは不必要な増殖に関連する症状を減少させる可能性があるために、疾患を治療するために有用である。養子免疫療法における使用のための病理学的に異常な細胞に対し選択的なCTLの生成は、病理学的に異常な細胞の破壊もしくは減少が利益を提供するとみられる病状の症状を低減させる、もしくはそれらを治癒させるために利用可能な治療の選択肢を増大させることができる。

10

【0015】

一態様において、本発明は腫瘍細胞に対する選択的細胞溶解活性をもつCTLのエクスピボ生成に向けられる。腫瘍選択的なCTLは、ドナーの末梢血からのCD8<sup>+</sup> T細胞および樹状細胞を、養子免疫療法治療において生成物のCTLを受領することができる急性骨髄性白血病 ( A M L ) を有する個体から単離されたアポトーシス性の腫瘍細胞とともにインキュベートすることにより調製する。樹状細胞およびアポトーシス性の病理学的に異常な細胞を、樹状細胞が該病理学的に異常な細胞の抗原を提示するように十分な時間の間一緒にインキュベートする。ドナーからの単離されたCD8<sup>+</sup> T LをIL-7およびIL-12の存在下に樹状細胞およびアポトーシス性の病理学的に異常な細胞の混合物に添加し、そして該集団を抗原特異的CD8<sup>+</sup> T Lおよび選択的CTLを産生させるのに十分な時間の間インキュベートする。生じる腫瘍選択的なCTLは、疾患を治療もしくはその重症度を低下させるために骨髄レシピエントに投与することができる。

20

【0016】

別の態様において、本発明は、腫瘍細胞に対し選択的なCTLの集団をそれから拡張させることができるCD8<sup>+</sup> 記憶T細胞のエクスピボ生成に向けられる。本発明の方法を使用して調製されるCD8<sup>+</sup> 記憶T細胞集団は、抗原での反復されるインビトロ刺激を再現可能に生き残ることができる。該方法は、樹状細胞、CD8<sup>+</sup> T LおよびCD4<sup>+</sup> T細胞の混合物をIL-7の存在下に標的腫瘍細胞とともに培養することを必要とする。生じるCD8<sup>+</sup> 細胞集団は、抗原特異的なCD8<sup>+</sup> T L、腫瘍細胞に対し選択的なCTLを含有し、そして2もしくはそれ以上の世代後に、5もしくはそれ以上の世代の間エクスピボで拡張させることができるCD8<sup>+</sup> 記憶T Lを含有する。

30

【0017】

本発明の方法を使用して生成される抗腫瘍CTLは癌を有する個体を治療するのに利用することができる。例えば、養子免疫療法を使用して、骨髄移植片を受領した後に癌の再発を有する造血癌を伴う患者に抗腫瘍免疫を導入することができる。抗腫瘍CTLは、患者からの腫瘍細胞と組合せられた骨髄ドナーのCD8<sup>+</sup> T L、樹状細胞およびCD4<sup>+</sup> T細胞から生成させることができる。BMTレシピエントの腫瘍細胞が骨髄ドナーのCD8<sup>+</sup> T LおよびCD4<sup>+</sup> T細胞および樹状細胞に同一のHLAであるこの場合には、ナイーブ ( n a i v e ) ドナーのCD8<sup>+</sup> T Lは非主要HLA抗原に対する一次免疫応答を表す。本発明の方法を使用して、CD8<sup>+</sup> 記憶T Lの生成は、これらのエクスピボで誘導された一次応答の長期の維持を見込む。

40

【0018】

例えば、本発明の方法を使用して生成された抗腫瘍CTLは、養子免疫療法処置の6ヶ月後に、骨髄ドナーの末梢血および骨髄、ならびに骨髄レシピエントの末梢血から誘導されることが見出された。免疫学的記憶を有する腫瘍選択的CTLの生成は、養子療法治療により長期の保護免疫を提供することができる確率を向上させることができる。

【0019】

本明細書で使用されるところの「病理学的に異常な細胞」という用語は、哺乳動物細胞も

50

しくは組織の疾患もしくは異常な状態に関連する生理学もしくは表現型の変化により正常から変えられている細胞を指す。病理学的に異常な細胞は、疾患もしくは異常な状態を引き起こす、または疾患もしくは異常な状態の結果である起こっている変化により、正常細胞と区別することができる。これらの病理学的に異常な細胞から、化学的および物理的破壊、遠心分離、勾配分離ならびにクロマトグラフィーのような当該技術分野で既知の標準的技術を使用して、細胞ライセート、細胞画分、細胞成分もしくは小胞のような非細胞調製物を作成することができる。こうした非細胞調節物は本発明の方法で有用であり、そして病理学的に異常な細胞の全細胞調製物の代わりに用いることができる。

#### 【0020】

病理学的に異常な細胞は細胞機能の調節もしくは制御の喪失を有する細胞を包含する。細胞機能の制御の喪失は、病理学的に異常な細胞を正常と区別する細胞変化につながる可能性がある。細胞機能の例は増殖および分化である。増殖の制御の喪失は、細胞もしくは組織の異常な状態を引き起こす細胞変化をもたらす可能性がある。例えば、癌細胞は異常でありそして調節されない様式で増殖し、それは組織破壊をもたらす。本明細書で使用されるところの「腫瘍細胞」という用語は癌細胞を指す。癌の特定の例は、前立腺、乳房、肺、卵巣、子宮、脳および皮膚の癌を包含する。同様に、自己免疫疾患を媒介する細胞の増殖は異常に調節され、それは例えば宿主の細胞および組織の破壊を伴う免疫機構の継続された増殖および活性化をもたらす。自己免疫疾患は例えば慢性関節リウマチ、糖尿病および多発性硬化症を包含する。

10

#### 【0021】

病理学的に異常な細胞は、例えば、疾患もしくは病状を媒介することが可能な物質を産生する細胞を包含する。こうした病理学的に異常な細胞の一例は、アレルギー症状の出現の原因であるIgE抗体を産生するB細胞である。病理学的に異常な細胞はまた、身体の特定の器官（該器官が生体(vital)臓器であるにしろ非生体臓器であるにしろ）で見出される細胞および特定の細胞型も包含する。例えば、ある器官は上皮、筋細胞および/もしくは線維芽細胞のようないくつかの異なる細胞型より構成されるかもしれない。これらの細胞型の1種もしくはそれ以上が病理学的に異常であるかもしれない、そして、であるから、本発明の方法により産生されるCD8<sup>+</sup> T LおよびCTLにより標的とされる可能性がある。

20

#### 【0022】

細胞機能の調節もしくは制御の喪失はまた、病理学的病原体による細胞の感染によっても起こる可能性がある。「病理学的病原体」という用語は疾患を引き起こす感染性病原体を指す。病理学的病原体の例は、ウイルス、細菌、真菌、アメーバおよび寄生虫を包含する。感染性疾患の特定の例は、DNAもしくはRNAウイルス性疾患、細菌性疾患および寄生虫疾患を包含する。

30

#### 【0023】

「アポトーシス」という用語はプログラムされた細胞死の過程を指す。プログラムされた細胞死は、細胞が特定の生理学的もしくは発達シグナルに回答しそしてその死および生物体からの除去につながるプログラムされた一連の事象を受ける、調節された一過程である。アポトーシスの特徴づける細胞事象の例は、細胞の収縮、チトクロームcの放出を伴うミトコンドリアの機能停止、細胞表面の小胞形成(blebbing)、クロマチン分解、および原形質膜の表面上でのホスファチジルセリンの露出である。アポトーシスは、壊死、もしくは傷害から生じる細胞死(膜の完全性のその後の早期の喪失、次いで細胞およびオルガネラの溶解を伴う細胞およびオルガネラ全体の腫脹を特徴とする)とは異なる。壊死は、アポトーシスと異なり、インビボでの炎症応答により付随される。

40

#### 【0024】

「CD4<sup>+</sup> T細胞」という用語は、CD4タンパク質を産生しそして樹状細胞と相互作用して樹状細胞による抗原提示もしくはその成熟を誘導することが可能であるリンパ球を指す。こうしたCD4<sup>+</sup> T細胞は、限定されるものでないが血液のような天然の供給源から単離された細胞、培養物中で成長された細胞系およびCD4<sup>+</sup> T細胞クローンを挙

50

げることができる。

【0025】

「選択的」という用語は、 $CD8^+$  細胞溶解性T細胞に関して使用される場合に、非標的細胞と比較して特定の病理学的に異常な標的細胞を優先的に認識しかつそれに対する細胞溶解活性を有する $CD8^+$  細胞溶解性Tリンパ球（CTL）を意味することを意図している。選択的CTLは、非標的細胞の一集団から標的の病理学的に異常な細胞を区別することができるか、もしくは区別するようにされることができ、そして非標的細胞と実質的に交差反応しない。免疫反応性もしくは抗原特異性に関して使用される場合の「選択的」という用語は、CTLもしくは $CD8^+$  TLのT細胞受容体が特定の標的抗原に優先的に結合することを意味することを意図している。選択的免疫反応性を表すCTLは非標的抗原と実質的に交差反応せず、そして標的抗原を表す病理学的に異常な細胞を正常のもしくは非標的細胞と区別することができる。

10

【0026】

「エキスビオ」という用語は、細胞に関して使用される場合に、身体の外側の細胞を意味することを意図している。従って、エキスビオ細胞培養法は個体から細胞を収穫することを必要とする。エキスビオ培養法は個体のいかなる組織もしくは器官から収穫された細胞にも応用可能である。エキスビオ培養物の細胞培養条件は多様な組成を包含する。細胞は不均質な混合物中であることができるか、もしくは単離された細胞であることができる。培地は非合成もしくは合成細胞培地であることができるか、または添加された因子を含有することができる。培地は細胞の治療的潜在能力を高める因子を含有することができる。例えば、成長、生存率もしくは分化を促進する因子を使用することができる。添加される因子は他の細胞、タンパク質因子および化学的試薬を包含することができる。

20

【0027】

「十分な時間」という用語は、 $CD8^+$  T細胞が誘導されることを可能にする時間の期間を意味することを意図している。 $CD8^+$  T細胞誘導過程は、少なくとも樹状細胞による抗原のプロセッシングおよび提示、 $CD8^+$  T細胞による抗原の認識、ならびに細胞溶解活性の活性化を包含する。この過程の完了を見込む十分な時間は短いもしくは長い時間の期間であることができる。該方法の多様な細胞集団における差異が抗原取り込みの速度の差異をもたらすことができるからである。 $CD8^+$  T細胞の誘導のための十分な時間に影響を及ぼす可能性のある因子は、例えば、培養物中の細胞の型、多様な細胞型の純度、細胞型の濃度、および樹状細胞が未熟であるかもしくは培養のある時点で抗原を提示しているかどうか、である可能性がある。十分な時間は、反応混合物の組成に依存して、即座に、数分、数時間、数日もしくは数週間以内に起こることができる。例えば、 $CD8^+$  T細胞を、抗原を提示する調製された成熟樹状細胞を含有する反応混合物に添加する場合、 $CD8^+$  T細胞のプライミングは比較的短い時間の期間中で起こることができる。樹状細胞の抗原の取り込みおよびプロセッシングの段階は、 $CD8^+$  T細胞を未熟樹状細胞および標的の病理学的に異常な細胞または他の抗原（1種もしくは複数）を含有する反応混合物に添加する場合に比較して、既に起こっているからである。

30

【0028】

本明細書で使用されるところの「単離された」という用語は、それが天然で会合されている1種もしくはそれ以上の成分から分離されている細胞を指す。単離された細胞はまた、結合組織線維のような非細胞性組織成分から精製された細胞も包含する。単離された細胞は、例えば、非細胞性組織成分から新たに精製されたか、または1もしくはそれ以上の世代の間培養されたかのいずれかの初代細胞であることができる。単離された細胞の一例は、末梢血単核細胞（PBM C）の調製物中の細胞のような血液から分離された細胞である。

40

【0029】

「実質的に」という用語は、単離された細胞に関して使用される場合に、1種の細胞が精製された細胞集団の90～99%に相当することを意味することを意図している。例えば、実質的に単離された細胞は、90～95%純粋、95%純粋、95～99%純粋である

50

ことができるか、または99%もしくはそれ以上純粋のようであることができる。

【0030】

「実質的に精製された」という用語は、CD40リガンド(CD40L)もしくはIL-12に関して使用される場合に、該タンパク質が、それらが天然に会合される他の成分を実質的に含まないことを意味することを意図している。例えば、CD40LおよびIL-12タンパク質は通常、細胞中で他のタンパク質とともに見出される。これらのタンパク質は、培養された細胞を処理するのにCD40LもしくはIL-12を使用する場合には不必要な汚染物質として作用するかもしれない。

【0031】

「非B細胞白血病細胞」という用語は、B細胞白血病細胞もしくはプレB細胞白血病細胞でないいずれかの細胞型を指す。非B細胞白血病細胞は正常の非癌性B細胞を包含し、そしてまたB細胞リンパ腫細胞のような非白血病癌のB細胞も包含する。非B細胞白血病細胞はT細胞白血病細胞のような他の型の白血病細胞を包含する。非B細胞白血病細胞はB細胞もしくはプレB細胞白血病細胞でないいずれかの型の癌細胞であることができ、また、非癌性の病状もしくは疾患により病理学的に異常である細胞を包含するいずれかの型の非癌細胞であることができる。

10

【0032】

本明細書で使用されるところの「抗原」という用語は、抗原提示細胞によりプロセッシングかつ提示されそしてその後T細胞受容体により認識される可能性のある分子を意味することを意図している。こうした分子は例えばポリペプチドであることができる。

20

【0033】

「標的」という用語は、CD8<sup>+</sup>T細胞の免疫反応性に関して使用される場合は、いずれかの予め決められた抗原である。予め決められた抗原は、例えば細胞もしくはポリペプチドであることができる。

【0034】

本明細書で使用されるところの「ナイーブ」という用語は、CD8<sup>+</sup>T細胞に関して使用される場合に、CD8<sup>+</sup>T細胞がインビボで特定の標的細胞もしくは抗原のいずれかに遭遇していないことを意味することを意図している。従って、ナイーブCD8<sup>+</sup>T細胞は、それが特定の標的細胞もしくは抗原に対し選択的なCTL活性が可能であるために、エクスピボで特定の標的細胞もしくは抗原に曝露されなければならない。

30

【0035】

本明細書で使用されるところの「インシトゥ」という用語は、選択的CTL活性に関して使用される場合に、選択的CTLが身体の無傷の構造中の標的の病理学的に異常な細胞を破壊することができることを意味することを意図している。例えば、選択的CTLは細胞の不均質な集団中の標的細胞を破壊することができる。とりわけ、選択的CTLは腫瘍細胞のような病理学的に異常な細胞を、血液もしくは骨髄のような組織から排除することができる。

【0036】

本明細書で使用されるところの「治療すること」という用語は、病理学的に異常な細胞により媒介される病理学的状態の重症度の低減もしくは予防を意味することを意図している。重症度の低減は、例えば、臨床症状、生理学的指標、生化学的マーカーもしくは代謝指標の停止もしくは減少を包含する。疾患の予防は、例えば、疾患の発生を排除すること、もしくは疾患にかかった個体を疾患前のそれらの健康状態に復帰させることを包含する。

40

【0037】

本明細書で使用されるところの「有効量」という用語は、個体に投与される場合に病理学的状態の程度、量もしくは拡大の速度の減少を遂げるのに必要とされるCD8<sup>+</sup>細胞溶解性T細胞の量を意味することを意図している。治療上有効であるために必要とされるCTL調製物の投薬量は、例えば、治療されるべき病理学的状態ならびに標的抗原の豊富さのレベルおよび密度、ならびに個体の体重および病状、ならびに以前のもしくは同時の治療に依存することができる。該方法により提供される選択的CTLの特定の適用について

50

の有効用量とみなされる適切な量は、本明細書に提供される手引きを使用して当業者により決定されることができる。例えば、投与のための量は、下述されるところのインビトロもしくはインビボ細胞傷害性アッセイから外挿することができる。当業者は、患者の病状を治療の経過を通じてモニターする必要があること、および投与される組成物の量を治療に対する個体の応答に従って調節することができることを認識するであろう。

【0038】

本発明は、病理学的に異常な細胞に特異的なCD8<sup>+</sup> T細胞の細胞溶解活性のエクスピボでの誘導方法を提供する。該方法は、アポトーシス性の病理学的に異常な細胞を、少なくとも樹状細胞(DC)、CD4<sup>+</sup> T細胞およびCD8<sup>+</sup> T細胞を有する混合物と接触させること、ならびに前記病理学的に異常な細胞に対する選択的細胞溶解活性を有するCD8<sup>+</sup> 細胞溶解性T細胞(CTL)を生成させるのに十分な時間の間、前記アポトーシス性の病理学的に異常な細胞を前記混合物とともに培養することよりなる。

10

【0039】

本発明はさらに、非B細胞白血病細胞である病理学的に異常な細胞に対し特異的なCD8<sup>+</sup> T細胞の誘導方法を提供する。

【0040】

本発明の方法は、好ましくは病理学的に異常な細胞の排除が個体に対し利益を提供する可能性がある場合に、いずれかのアポトーシス性の病理学的に異常な細胞もしくは非B細胞白血病の病理学的に異常な細胞に対し選択的なCTLの集団を生成させるために使用することができる。こうした利益は、疾患の重症度、疾患の症状、疾患の進行もしくは疾患の進行速度を低下させることを包含する可能性がある。特定の型病理学的に異常な細胞は、例えば、正常細胞に比較して異常に調節される細胞を包含する。病理学的に異常な細胞は、疾患により正常から変化されている細胞であることができるか、またはそれらの存在により疾患を引き起こす変えられた細胞、もしくは疾患を引き起こす因子を産生する細胞であることができる。従って、本発明の方法は、癌、自己免疫障害、感染性疾患およびアレルギーのような疾患を媒介する病理学的に異常な細胞に応用可能である。

20

【0041】

病理学的状態の上の範疇の特定の言及により、当業者はこうした用語がこれらの病理学的状態の全部の分類および型を包含することを理解するであろう。例えば、癌という用語は、悪性、良性、軟部組織もしくは充実性の腫瘍として特徴づけられようと、全部の既知の癌を包含することを意図している。例示により、既知の癌の非網羅的一覧を下に表1に提供する。同様に、ならびに表1に示される癌の分類および型への類似により、感染性疾患および自己免疫性疾患という用語は、これらの病理学的状態の全部の分類および型を包含することを意図している。当業者は多様な分類および型の感染性および自己免疫性疾患ならびにアレルギーに馴染みがある。

30

【0042】

【表1】

表1

腫瘍および癌の型	
副腎腫瘍、聴神経腫、腺癌、末端部黒子黒色腫、男性胚腫、心房粘液腫、星状細胞腫	
基底細胞癌、良性耳腫瘍、胆管癌、骨新生物、骨腫瘍、脳腫瘍(原発性、続発性および転移性)、乳癌、気管支癌、ハーキット腫	10
子宮頸癌、食道癌、腎もしくは尿管癌、陰茎癌、会陰部癌、睾丸癌、外陰部癌、腎盂もしくは尿管癌腫、胃癌、精巣癌、小脳橋角腫瘍、結腸癌、結腸直腸癌、絨毛癌、上毛芽腫、上毛上皮腫、頭蓋咽頭腫、子宮癌、咽頭もしくは声帯癌	
子宮内膜癌、上衣腫、ユイグ肉腫	
胃癌、多形性膠芽腫	
肝細胞癌、ホジキンリンパ腫、組織球性リンパ腫、副腎腫、心腫瘍	20
腸癌、島細胞腫瘍	
大腸新生物、白血病、喉頭癌、肝癌、肺癌、リンパ球性リンパ腫、リンパ芽性リンパ腫、悪性黒子型黒色腫	
悪性黒色腫、悪性プラズマ細胞腫、髄芽腫、髄膜腫、肺への転移癌、転移性胸膜腫瘍、多発性骨髄腫、粘液腫	
腎芽細胞腫、神経膠腫、非ホジキンリンパ腫、非小細胞肺癌	
乏突起膠腫、骨肉腫、骨原性癌腫、口腔癌	
腺癌、下垂体腫瘍、プラズマ細胞骨髄腫、前立腺新生物	30
腎細胞癌、腎新生物、網膜芽腫、細網細胞癌	
神経鞘腫、唾液管腫瘍、肉腫、フドウ状肉腫、精上皮腫、セルトリライディッチ細胞腫、小細胞肺癌、扁平上皮癌、脊髄腫瘍	
咽頭癌、甲状腺髄質癌腫、甲状腺癌、栄養膜腫瘍	
ウイルス腫瘍	40

## 【0043】

本発明の方法は、異常に調節される病理学的に異常な細胞に対し選択的であるCTL細胞を産生させることに応用可能である。異常に調節される細胞は、例えば、制御されない細胞増殖を表す細胞、ならびに細胞周期の特定の期で機能不全を表して変えられた増殖の特徴もしくは形態学的表現型につながる細胞を包含する。異常に調節される細胞型の特定の例は、癌のような腫瘍細胞および組織過形成の特徴である過形成細胞を包含する。別の特定の例は、刺激後に異常に活性化されたようになるかもしくはダウンレギュレートすることに失敗する免疫細胞を包含する。こうした異常に調節される免疫細胞は自己免疫疾患を媒介する。異常に調節される細胞はまた、生化学的もしくは生理学的に機能不全である細胞も包含する。細胞の機能もしくは増殖の他の型の異常な調節は当業者に既知であり、そ

して、本発明のCTLの生成方法に応用可能な同様に病理学的に異常な細胞である。

【0044】

病理学的に異常な細胞は、上述されたもののような異常に調節される細胞を包含し、そして加えて、例えば感染性病原体のような病理学的病原体に感染した細胞を包含する。細胞を異常にする感染性病原体は、例えば、生存もしくは繁殖のために宿主細胞の機械装置を必要とする病原体を包含する。例えば、ウイルスは細胞を感染させそして癌を引き起こす。DNAウイルス、RNAウイルスおよび寄生虫がこうした感染性病原体内に包含される。DNAウイルスの特定の例はアデノウイルスおよびパルボウイルスを包含する。RNAウイルスの特定の例は急性灰白髄炎、インフルエンザおよびレトロウイルスを包含する。迅速に突然変異するウイルスは本発明の方法に応用可能である。抗原の供給源としての病理学的に異常な細胞の使用は、迅速に突然変異するウイルスに感染した細胞上の複数のエピトープに対し特異的であるCTL細胞を提供する可能性がある。1標的抗原を選択的に認識するCTL集団に比較して、複数の標的抗原に対し選択的なCTL集団は、ウイルスを含有する細胞が破壊されることができ確率を増大させる可能性がある。生存もしくは繁殖のために真核生物宿主細胞の機械装置を利用する寄生虫は例えばトリパノソーマを包含する。これらおよび宿主細胞の機械装置を利用する当該技術分野で既知の他の病原体により感染した細胞は異常にされる。それらは正常な細胞機能が損なわれており、それは形態学および生化学的变化に現れる可能性があるからである。であるから、本発明の方法により生成されるCTLはこれらの細胞を標的とすることができる。

10

【0045】

病理学的に異常な細胞は、正常なタンパク質発現の調節における変化のような、タンパク質の変化により異常である細胞を包含する。タンパク質発現の変化は、タンパク質の増大された発現、外来タンパク質の発現、特定の段階の特定の細胞型中での通常は発現されないタンパク質の発現、および突然変異体タンパク質の発現を包含する。正常から変えられたタンパク質発現を有する病理学的に異常な細胞はまた、正常細胞のものと異なる細胞表面抗原も有する可能性がある。病理学的に異常な細胞はまた、あるアレルギーに対し特異的なIgE抗体、または他の疾患もしくは病状を媒介する可能性がある他の型の抗体を作成するB細胞のような、疾患もしくは病状を引き起こすタンパク質を作成している細胞も包含する。

20

【0046】

非プレB細胞白血病細胞を包含する非B細胞白血病細胞である病理学的に異常な細胞は、白血病以外の疾患もしくは病状により病理学的に異常であるB細胞であることができる。例えば、非B細胞白血病細胞はB細胞リンパ腫細胞のような異なる型のB細胞癌細胞であることができる。非B細胞白血病細胞は、B細胞もしくはプレB細胞白血病細胞以外の型の白血病細胞であることができる。例えば、非B細胞白血病細胞はT細胞白血病細胞であることができる。B細胞白血病細胞はCD40を発現していないB細胞もしくはプレB細胞であることができる。こうした細胞はCD40Lに応答することが不可能である。

30

【0047】

上の異常な(aberrant)および異常な(abnormal)細胞の分類および細胞型の全部は、不必要な細胞の成長および合併症につながる可能性のある望ましくない生理学的特徴および表現型を表す。であるから、これらの異常に調節されるもしくは異常な細胞は、正常細胞に比較して抗原の合成もしくは発現において差異を表すことができる。これらの差異は、本発明の方法により生成される標的の病理学的に異常な細胞に対し選択的であるCTLにより区別することができる。

40

【0048】

本発明の方法によれば、CD8<sup>+</sup> T細胞の一集団が、病理学的に異常な細胞に対し選択的である細胞溶解性Tリンパ球(CTL)を生成させるよう誘導される。CTLにより選択的に認識される細胞が、直接の細胞傷害性もしくはアポトーシスの誘導のいずれかにより破壊されることができる。CTLは、MHCクラスI分子と複合体形成されるポリペプチドフラグメントの形態の抗原を認識する成熟CD8<sup>+</sup> T細胞である。CD8<sup>+</sup> T細胞の

50

表面上で複合体形成されたT細胞受容体(TCR)への抗原の結合は、細胞内変化の開始に関与する一事象であり、これがCD8<sup>+</sup> T Lの細胞溶解性Tリンパ球(CTL)への分化につながる。CTLは、TCRにより結合されることができる標的抗原を表示する細胞に対する細胞溶解活性を表す。

【0049】

病理学的に異常な細胞に対し選択的であるCTLを生成させるために、CD8<sup>+</sup> T Lを、CTLプライミング過程を増加する細胞もしくは因子の存在下に病理学的に異常な細胞によりプライミングする。従って、プライミングは、誘導抗原を発現する病理学的に異常な細胞を選択的に認識かつ溶解する活性のCTLになるためのCD8<sup>+</sup> T細胞の曝露である。CTLの誘導のための一要件は抗原提示細胞による抗原の提示である。ほとんど全部の有核細胞がMHCクラスIを発現するが、しかしCD8<sup>+</sup> T細胞をプライミングすることが可能でないかもしれない。付加的な補助受容体、共刺激分子および他の因子が効率的なプライミングに必要であるからである。従って、プライミングのための必要とされる因子の全部を発現することができる専門の抗原提示細胞の使用は、病理学的に異常な細胞に対し選択的なCTLをプライミングするためのエクスピボで培養された細胞の混合物中でのCTLプライミングの効率を増大させる可能性がある。

10

【0050】

樹状細胞は、抗原を効率的にプロセッシングしかつ提示しそしてCD8<sup>+</sup> T Lの細胞溶解応答を強力に誘導することができる、専門の抗原提示細胞(当業者に公知かつ彼らにより普遍的に使用される用語)である。樹状細胞による抗原の提示はアポトーシス細胞の樹状細胞の貪食作用後に起こることができる。従って、樹状細胞とともに、アポトーシス性であるかもしくはアポトーシスを受けることができる病理学的に異常な細胞を、本発明の方法における標的細胞として使用することができる。

20

【0051】

樹状細胞の機能を果たす細胞を、本発明の方法で樹状細胞の代わりに用いることができる。樹状細胞のこうした置換物は、例えば、組換えタンパク質の発現により抗原もしくは共刺激分子を与える細胞であることができる。こうした人工的抗原提示細胞を産生させるための組換えタンパク質の発現は当該技術分野で公知であり、そして当業者は、本発明の方法での使用のための人工的抗原提示細胞中での発現のための組換えタンパク質を決定することができる。

30

【0052】

本発明の方法は、従って、少なくともCD8<sup>+</sup> T L、樹状細胞および病理学的に異常な細胞(アポトーシス性であるかしくはアポトーシスを受けることができる)を、標的の病理学的に異常な細胞に対し選択的なCTLの誘導のために利用する。この混合物に添加される他の細胞および因子は、当初のCD8<sup>+</sup> T細胞のプライミングの効率もしくはCTL応答のレベルを増加することができる。例えば、CTL誘導混合物中へのCD4<sup>+</sup> T細胞の包含は、CD8<sup>+</sup> 記憶CTLの効率的なプライミングおよび産生に必要なとされる付加的な因子を提供することができる。

【0053】

CD4<sup>+</sup> T細胞は、細胞抗原に対するCD8<sup>+</sup> T Lの応答を可能にするT細胞の援助(helper)を提供する。インビボにおいて、このT細胞の援助はCD4<sup>+</sup> T細胞による樹状細胞の活性化から生じ、そしてCD40-CD40Lの相互作用により媒介される可能性がある。いくつかの因子を、CD8<sup>+</sup> T細胞のプライミングのための細胞の混合物のインキュベーションにおいてCD4<sup>+</sup> T細胞により提供される機能の代わりに用いることができる。

40

【0054】

例えば、本発明のエクスピボの方法において、樹状細胞の成熟を促進する、CD4<sup>+</sup> T細胞により樹状細胞に提示される因子CD40リガンド(CD40L)が、CTL応答の樹状細胞の誘導を促進するのに十分であることが見出された。CD40Lの機能は、CD40Lのものに類似の様式でCD40に結合しかつ活性化することが可能であるCD40

50

抗体のような分子により置換することができる。さらに、成熟樹状細胞により産生されることが因子インターロイキン - 12 ( I L - 12 ) もまた C D 4 0 L の代わりに用いられることが見出された。

【 0 0 5 5 】

従って、本発明の方法において、C D 4 0 L および I L - 12 の添加を、C D 4 <sup>+</sup> T 細胞の最低 1 種の機能の代わりに用いることができるが、とは言え、これらの因子は、C D 8 <sup>+</sup> 記憶 T L の産生を誘導するために効果的に機能しないかもしれない。加えて、インターロイキン - 7 ( I L - 7 ) が C T L 応答のレベルをさらに増大させることが見出された。従って、C T L 産生の効率を増大させるための、病理学的に異常な細胞に対し選択的な C T L の生成のために集成された細胞の混合物のインキュベーションに、有効量の I L - 7 を添加することが、有利である可能性がある。上で挙げられたもののような因子の使用は下により詳細に論考されるであろう。

10

【 0 0 5 6 】

本発明の方法は、病理学的に異常な細胞に対し選択的な C T L を生成させることができる細胞の集団の混合物を提供する。細胞の混合物は、C D 4 <sup>+</sup> T 細胞を包含する他の成分と組合せることができる、最小の C D 8 <sup>+</sup> 細胞、樹状細胞および病理学的に異常な細胞の集団を含有する。

【 0 0 5 7 】

C D 8 <sup>+</sup> L、樹状細胞、病理学的に異常な細胞および C D 4 <sup>+</sup> 細胞の調製物は、多くの多様な免疫学的細胞型を含有することができる。従って、病理学的に異常な細胞に対し選択的な C T L を誘導するために集成された細胞混合物は、引用される細胞型以外の細胞型を含有することができる。

20

【 0 0 5 8 】

本発明の方法での使用のための細胞は、細胞の不均質な集団、単離された細胞もしくは実質的に単離された細胞であることができる。細胞の不均質な集団は、骨髄のような多くの免疫学的細胞型を含有する細胞の天然に存在する混合物であることができる。単離された細胞は、末梢血単核細胞 ( P B M C ) の調製物中の細胞のような分画された集団中の細胞であることができるか、または特定の細胞型が濃縮もしくは枯渇された細胞の集団であることができる。実質的に単離された細胞は、精製されている細胞のような他の細胞型を実質的に含まない細胞であることができる。

30

【 0 0 5 9 】

従って、本発明の細胞混合物は、引用されるおよび引用されない細胞を包含する多様な細胞を含有することができる。細胞混合物は多様な細胞調製物を使用して集成することができる。従って、細胞集団を変えることにより、効率的な C D 8 <sup>+</sup> のプライミングおよび C T L の生成について細胞混合物を至適化することが可能である。

【 0 0 6 0 】

C T L 誘導混合物中に含有される細胞集団は、増大されたもしくは減少された純度の細胞を調製すること、および特定の得ることができる結果を促進するように培養物中の特定の細胞型を処理することによるような、いくつかの方法で変えることができる。例えば、細胞を、特定の密度もしくは数への細胞の拡張、細胞の分化、特定の細胞系統の分化、アポトーシス、またはいずれかの所望の得ることができる細胞の状態もしくは表現型を促進する因子で処理することができる。成長もしくは分化を促進する条件は、培養された細胞の成長培地中にタンパク質因子もしくは化学的試薬を包含することができる。これらの因子および試薬は粗混合物の成分であることができるか、単離することができるかもしくは実質的に単離することができる。因子の例は、血清、天然に存在するタンパク質、部分的に精製されたタンパク質および実質的に単離されたタンパク質のような粗混合物を包含する。

40

【 0 0 6 1 】

混合物中の細胞集団の調製物は C T L のプライミングもしくは生成の効率を遂げることができる。例えば、C D 8 <sup>+</sup> T L および樹状細胞の双方を、P B M C の単一培養物中で同

50

時に調製することができる。とりわけ、個体から収穫されたP B M Cは、下に論考される  
ところの既知の方法を使用してC D 4<sup>+</sup> T細胞を最初に枯渇させることができる。C D  
4<sup>+</sup> T細胞枯渇の一目的は、一般にC D 8<sup>+</sup> T Lより速く成長するC D 4<sup>+</sup> T細胞  
がC D 8<sup>+</sup> 細胞集団を駆逐するほど成長することを予防することにより、C D 8<sup>+</sup> T  
Lの成長を促進することである。枯渇されたP B M Cをその後、病理学的に異常な細胞と  
組合せることができる。P B M C混合物を、C D 8<sup>+</sup> T Lによる提示された抗原の認識  
を可能にする十分な時間の間インキュベートした後に、病理学的に異常な細胞に対し選択  
的なC T Lが生成される。

**【0062】**

C T L生成のために細胞の混合物を集成するための1種以上の細胞型を得るための一細胞  
集団を使用することの利点は、付加的な細胞集団の単離および培養が必要とされないこと  
である。加えて、単一ドナーからの細胞を使用することにより、細胞型がH L Aが同一  
であり、そしてドナーおよびレシピエントの細胞集団のH L A適合を考慮する必要性が従  
って必要とされないことが既知である。単一の供給源からの細胞型を含有する細胞混合物  
の使用は、細胞の供給源を得ることもしくは十分な量の細胞サンプルを得ることが困難で  
ある場合に有利である。

**【0063】**

単一の供給源から得られたC D 8<sup>+</sup> T L、C D 4<sup>+</sup> T細胞および樹状細胞の混合物の  
使用が便宜を提供するとは言え、細胞混合物をC T L生成の効率を増大させるように変え  
ることができる。C D 8<sup>+</sup> T Lのプライミングの効率を増大させるために、例えば細胞  
の集団を個別に単離しそして培養物中で処理することができる。C D 4<sup>+</sup> T細胞および  
C D 8<sup>+</sup> T L、樹状細胞、ならびに病理学的に異常な細胞の単離方法は、下に詳細に記  
述される。本発明の方法の細胞型のそれぞれは、C D 8<sup>+</sup> のプライミングもしくは生成を  
誘導するための細胞集団の混合物の、全体的有効性へのそれらの特定の寄与を高めるよ  
うに培養物中で処理することができる。

**【0064】**

標的の病理学的に異常な細胞に対する選択的C T Lの誘導を促進もしくは増加する因子を  
、細胞集団の混合物の培養物、もしくは細胞集団を集成する前に独立に培養された特定の  
細胞集団に添加することができる。本発明の方法で有用である可能性のある因子は、サイ  
トカイン、増殖因子、分化因子、細胞の生存率の維持に關与するタンパク質、およびアポ  
トーシスを促進する因子である。

**【0065】**

本発明の方法のエキスピボ細胞培養物中に存在することができるサイトカインの例は、例  
えばG M - C S F、ならびにI L - 2、I L - 7およびI L - 12のようなインターロイ  
キンを包含する。エキスピボ細胞培養物中に存在することができる増殖因子の例は、例え  
ば本発明の方法で使用される特定の細胞型の細胞の成長を引き起こすもしくはそれに寄与  
するタンパク質を包含する。増殖因子の特定の例は、線維芽細胞増殖因子、血小板由来増  
殖因子およびトランスフォーミング増殖因子である。分化因子の例は、該方法の特定の  
細胞型中での細胞の分化の過程に寄与するもしくはそれを増加するタンパク質である。分  
化因子の特定の一例は血清由来因子である。細胞の生存率の維持に寄与する因子の例は、  
成長ホルモンおよびインターフェロンを包含する。アポトーシスを誘導させるために使  
用される因子の特定の例は下に詳細に提供される。

**【0066】**

細胞培養物中での使用のための因子は、天然の供給源から調製もしくは単離、または組換  
え法により製造することができる。サイトカインI L - 7およびI L - 12のような特定  
の因子は、例えば天然の細胞により提供されることができるか、もしくは組換え法による  
産生後に単離されるような実質的に精製された形態で提供されることができる。組換え法  
によるタンパク質産生、細胞中での特定のタンパク質の検出、および生化学的方法による  
タンパク質の単離は、当該技術分野で公知である。多くの因子は商業的供給源により得る  
ことができる。フィーダー ( f e e d e r ) 細胞もまた、タンパク質を膜に結合されたも

10

20

30

40

50

しくは分泌された形態で培養される細胞に供給することができる。こうした因子を提供する細胞の例は、増殖することができない照射された細胞のような照射されたフィーダー細胞である。フィーダー細胞の特定の一例は、組織培養物表面に接着しそしてCD8<sup>+</sup> T Lのプライミングを促進する因子を与えるかもしくは分泌する照射された単球である。

【0067】

選択的CTLの生成方法で使用される因子の濃度は、混合物中に存在する特定の細胞型、特定の細胞の特徴、インキュベーション時間、タンパク質の純度、および細胞の単離の程度に依存して変動する可能性がある。特定の細胞型の特徴は個体間で異なるかもしれない、同一の培養条件下で異なる成長もしくは分化速度をもたらす。因子の濃度は、病理学的に異常な細胞に対し選択的なCTLを生成させるために使用される細胞集団間でのこれらの差異のいずれかによる細胞挙動の差異を説明するように調節することができる。例えば、細胞培地中の増殖因子の濃度を、特定の細胞のより速い成長速度を促進するように増大させることができる。

10

【0068】

因子は1種もしくはそれ以上の細胞機能を有する可能性がある。例えば、ある細胞型中での成長を促進する因子はまた別の細胞型中で分化を促進するかもしれない。特定の細胞型に対する特定の因子の影響は当該技術分野で既知の方法により決定することができる。こうした方法は例えば細胞の数、生存率および表現型のアッセイを包含する。樹状細胞および樹状細胞混合物を包含する多様な細胞の培地に添加することができる因子の特定の例は、下により詳細に記述される。

20

【0069】

例えば、単球は樹状細胞への効率的な分化を促進する条件下で処理することができる。P B M C中に存在するもしくはそれから収集された単球は、十分な時間の間、GM-CSFおよびIL-4を添加することにより、樹状細胞に分化するように誘導することができる。

【0070】

樹状細胞は、抗原の取り込みの効率を増大させるように培養物中で処理することができる。未熟樹状細胞は貪食作用により病理学的に異常な細胞を効率的に取り込むが、しかし抗原をプロセッシングし、しかし抗原をより少なく効率的に提示する一方、成熟樹状細胞は、より少なく効率的に抗原を取り込みかつプロセッシングする一方で抗原をより効率的に提示する。従って、樹状細胞の成熟前に未熟樹状細胞に病理学的に異常な細胞を与えることが有利である。未熟樹状細胞および病理学的に異常な細胞の混合物を調製すること、ならびに樹状細胞に成熟因子を導入する前に抗原取り込みを起こさせることにより、CD8<sup>+</sup> T Lのプライミングの効率を増大させることができる。

30

【0071】

本発明の方法で使用される樹状細胞は未熟もしくは成熟樹状細胞であることができる。樹状細胞の成熟を誘導する因子は例えばTNF- $\alpha$ 、LPSおよびCD40Lを包含する。CD4<sup>+</sup> T細胞の存在もまた樹状細胞成熟因子を提供する可能性がある。従って、樹状細胞に抗原をプロセッシングさせるために、十分な時間の間、CD4<sup>+</sup> Tもしくは他の成熟因子の非存在下で樹状細胞および病理学的に異常な細胞を培養することが有利である可能性がある。抗原をプロセッシングさせる樹状細胞をその後、CTLの生成に必要とされる付加的な細胞および因子に加えて、抗原提示を促進する細胞および因子と混合することができる。抗原提示を至適化する条件下でインキュベートされた樹状細胞を最初に調製することにより、CD8<sup>+</sup> T Lのプライミングの効率を増大させることができる。

40

【0072】

本発明はエクスピボでのCD8<sup>+</sup> T Lの誘導方法を提供する。該方法は：(a)前記病理学的に異常な細胞を、病理学的に異常な細胞の抗原を提示する樹状細胞(DC)を生じさせるのに十分な時間の間、少なくともDCおよび単離されたCD4<sup>+</sup> T細胞を有する第一の混合物と接触させること；(b)CD8<sup>+</sup> T Lを添加して第二の混合物を生じさせること、ならびに(c)前記病理学的に異常な細胞に対する選択的な細胞溶解活性を有

50

する  $CD8^+$  細胞溶解性 T リンパ球 (CTL) を生成させるのに十分な時間の間、前記第二の混合物を培養することよりなる。

【0073】

病理学的に異常な細胞に対し選択的な CTL の産生のために集成される細胞混合物の一例は以下のとおりである。例えば、PBM C の一調製物を分画していくつかの細胞集団を生じさせることができる。細胞集団は単離もしくは実質的に単離することができる。とりわけ、単球は、PBM C から収集しそして GM - CSF および IL - 4 を十分な時間の間添加することにより樹状細胞に分化するように誘導することができる。この未熟樹状細胞集団を、病理学的に異常な細胞の抗原の取り込みおよびプロセッシングを見込むのに十分な時間の期間の間、アポトーシス性の病理学的に異常な細胞と組合せることができる。PBM C からの  $CD4^+$  T 細胞の枯渇は、 $CD4^+$  T 細胞集団および  $CD4^+$  を枯渇された PBM C 集団の双方を提供することができる。

10

【0074】

生じる 3 種の細胞集団はその後個別に培養することができる。 $CD4^+$  T 細胞を、例えばそれらを非分裂性にする放射により処理しそしてその後  $CD4^+$  が枯渇された PBM C に戻すことができる。この PBM C 集団を、病理学的に異常な細胞および IL - 7 とともにインキュベートされた樹状細胞集団と組合せることができる。病理学的に異常な細胞は例えば腫瘍細胞であることができる。細胞の混合物をその後、病理学的に異常な細胞に対する選択的な CTL 産生を可能にするのに十分な時間の間、インキュベートすることができる。細胞の集団は例えば保存することができるか、さらに単離することができるか、もしくは個体を治療するのに使用することができる。

20

【0075】

$CD8^+$  T L のプライミングの効率の増大方法は、MHC クラス II 分子と会合された特定のペプチド抗原を認識する  $CD4^+$  T 細胞で  $CD4^+$  T の集団を濃縮することを必要とする。本発明の方法で使用される  $CD4^+$  T 細胞の集団において、細胞の小さな一画分のみが、病理学的に異常な細胞から生じられかつ病理学的に異常な細胞に対し選択的な CTL を生成させるために集成された細胞集団の混合物中の樹状細胞上で提示される抗原に対し特異的であることができる。全  $CD4^+$  T 細胞集団中の抗原特異的な  $CD4^+$  T 細胞の数を増大させるために、 $CD4^+$  T 細胞の一濃縮方法を使用することができる。例えば、 $CD4^+$  T 細胞集団を破傷風トキソイドのような免疫原を使用して増大させることができる。破傷風トキソイドに対して以前に免疫化された個体からの  $CD4^+$  T 細胞の一集団を得、エクスピボで培養し、そして未熟樹状細胞に成熟シグナルをより効果的に提供することができる MHC クラス II 拘束性  $CD4^+$  T 細胞の濃縮された集団をもたらすように破傷風トキソイドで処理することができる。MHC クラス II 拘束性抗原に対し特異的であるクローン化された  $CD4^+$  T 細胞を得、拡張し、そして反復される使用のため保存することができる。当業者は、クローン細胞系を得、細胞を拡張しそして細胞を長期保存のため調製する方法を知っているであろう。

30

【0076】

エクスピボの培養された混合物中での CTL の産生は、 $CD8^+$  T L が提示された抗原を認識しそして CTL への分化拘束を誘発するのに十分な時間の期間の間のインキュベーションの間に起こる。例えば、少なくとも樹状細胞、アポトーシス性の病理学的に異常な細胞、 $CD4^+$  T 細胞および  $CD8^+$  T L の細胞混合物からの選択的 CTL の誘導は、約 6 ないし 40 時間の期間、好ましくは約 20 時間で起こる可能性がある。細胞の混合物からの CTL 誘導の分化拘束に十分な時間の期間は、例えば細胞型の集団の混合物中の樹状細胞に与えられる抗原もしくは共刺激分子の量を包含するいくつかの因子の調節により調節することができる。

40

【0077】

当業者は、所望のインキュベーション時間を達成するのに例えばどの因子、細胞組成もしくは濃度を使用することができるかを知っているであろう。さらに、当業者は、 $CD8^+$  T L をプライミングしかつ標的の病理学的に異常な細胞に対し選択的な成熟する CTL

50

にそれらを分化拘束するのに十分な時間の期間を増大もしくは減少させるかのいずれかのために、例えばどの因子、細胞組成もしくは濃度を調節することができるかを知っているであろうか、もしくは決定することができる。

【0078】

例えば、産生されるべきCTLに必要なとされるインキュベーション時間を決定するために、細胞を多様な時点で、例えば5、15、30および45分、ならびに1時間間隔で1もしくはそれ以上の日数もしくは週の間、培養物から除去し、そして標的抗原の認識後にCTL活性もしくはインターフェロン産生について試験することができる。標的抗原を表示する病理学的に異常な細胞は、標的細胞の溶解もしくはその中でのアポトーシスの誘導のいずれかにより、選択的CTLにより破壊されることができる。CTL活性は当該技術分野で公知の方法により測定することができる。細胞傷害性の活性の測定方法は下および実施例に詳細に論考される。

10

【0079】

本発明の方法で使用することができる特定の因子はIL-7、IL-12およびCD40Lを包含する。CD4<sup>+</sup>T細胞を含むもしくは含まない、少なくとも樹状細胞、アポトーシスの病理学的に異常な細胞およびCD8<sup>+</sup>TLのエクスピボで培養された混合物中で使用されるIL-7の濃度は、例えば1~30ng/ml、30~65ng/mlもしくは65~100ng/mlであることができる。樹状細胞、アポトーシスの病理学的に異常な細胞およびCD8<sup>+</sup>TLのエクスピボで培養された混合物中のIL-12の濃度は、例えば1~30pg/ml、30~65pg/mlもしくは65~100pg/mlであることができる。樹状細胞、アポトーシスの病理学的に異常な細胞およびCD8<sup>+</sup>TLのエクスピボで培養された混合物中での使用のためのCD40Lを発現する天然の細胞もしくは組換え細胞上に細胞表面タンパク質として提示されるCD40Lの有効量は、当業者により決定されることができる。当業者は、組換え細胞中でのCD40Lの発現のレベルを調節することができること、およびCD40L細胞を反応混合物中で力価測定して(titrated)添加されるべき細胞の有効濃度を決定することができることを知っているであろう。当業者は、細胞のこうした有効濃度から外挿して、本発明の方法を使用する病理学的に異常な細胞に対し選択的なCTLを誘導するための単離されたもしくは実質的に単離されたCD40Lタンパク質の有効量を決定することが可能であろう。

20

30

【0080】

本発明の方法での使用のために細胞を照射することができる。誘導期間の間の特定の細胞の成長が望ましくない場合に、病理学的に異常な細胞に対し選択的なCTLを誘導するために細胞混合物を集成する前に、特定の細胞を照射することが有利である可能性がある。例えば、樹状細胞、CD4<sup>+</sup>T細胞および病理学的に異常な細胞のような細胞を照射することができる。これらの細胞型の成長もしくは拡張は、増大された細胞数が誘導過程が起こるのに必要でないかもしれず、また、CD8<sup>+</sup>T細胞より速い速度で成長する細胞型の拡張が生成されるCTL集団の不必要な汚染を提供する可能性があるために、望ましくないかもしれないからである。

【0081】

既に論考されたとおり、本発明の方法での使用のための細胞は細胞混合物もしくは単離された細胞であることができる。CD8<sup>+</sup>TLおよびCD4<sup>+</sup>T細胞、樹状細胞ならびに病理学的に異常な細胞の調製は細胞の単離を包含することができる。本発明の方法での使用のための細胞は、例えば、密度遠心分離、遠心分離エリユトリエーション、蛍光標式細胞分取、免疫親和性細胞分離および磁性分取(magnetic sorting)(SchindhelmとNordson, Ex vivo Cell Therapy, (1999)第11章 アカデミック プレス(Academic Press)、サンディエゴ)のような当該技術分野で公知のいくつかの方法により単離することができる。

40

【0082】

密度勾配遠心分離は、変動する密度の溶液中で遠心分離される場合の特定の密度の細胞の

50

移動に基づく。細胞は、細胞密度および媒体の密度が等しい勾配の領域で一バンドに集まる傾向があることができる。密度勾配遠心分離法の例は、フィコール (F i c o l l )、フィコール - ハイパーク ( F i c o l l - H y p a q u e ) およびパーコール ( P e r c o l l ) のような試薬を用いて調製された勾配上に細胞を負荷することを包含する。

【 0 0 8 3 】

遠心分離エリュートションは、血液細胞を分離するために十分に開発された、細胞沈降速度の相対的差異に基づく方法である。蛍光標示式細胞分取 ( F A C S ) は、蛍光マーカ分子で標識された細胞が高散乱特性および蛍光に基づいて個別に分析されかつ分取される、選択的細胞分離方法である。

【 0 0 8 4 】

免疫親和性細胞分離は、低い固有の細胞親和性で物質に固定されるモノクローナル抗体、レクチンもしくは他の結合ドメインのような基質との細胞の相互作用に基づく。細胞は、固相支持体に結合された基質への細胞表面分子の結合により、基質に選択的に結合する。捕捉された細胞は、剪断応力、もしくは細胞と基質との間の相互作用を混乱させる化学的作用物質を使用して分離させる。

【 0 0 8 5 】

磁性分取は、細胞が常磁性もしくは強磁性物質を含有する親和性基質で標識される、細胞分離の一方法である。磁性で標識された細胞を磁場による捕捉により細胞集団から枯渇させることができるか、もしくは、標識された細胞を磁場の除去により回収することができる。ダイナビーズ ( D y n a b e a d s ) は商業的に入手可能である磁性細胞分離媒体の特定の一例である。

【 0 0 8 6 】

C D 8 <sup>+</sup> T L 単離の特定のの方法の例は、枯渇されるべき細胞上に存在する細胞表面タンパク質に対する抗体で被覆されたビーズを使用する C D 4 <sup>+</sup>、C D 1 4 <sup>+</sup>、C D 1 9 <sup>+</sup> もしくは C D 5 6 <sup>+</sup> 細胞の枯渇のような陰性磁性細胞選択法、または C D 8 に対する抗体で被覆された磁性ビーズを用いる C D 8 についての陽性選択のような陽性磁性細胞選択方法である。

【 0 0 8 7 】

樹状細胞の単離方法の一例は、フィコール - ハイパーク ( F i c o l l - H y p a q u e ) 密度勾配遠心分離によるような P B M C を収集すること、そして上述されたところの樹状細胞の分化を促進する条件下でそれらを培養することである。樹状細胞は、C D 2 -、C D 1 9 - および C D 5 6 - 陽性細胞を包含する他の細胞型の枯渇のような他の既知の方法により P B M C からさらに単離することができる。

【 0 0 8 8 】

C D 4 <sup>+</sup> T 細胞の特定の単離方法は、例えば、細胞集団から C D 8 <sup>+</sup> T L を低下もしくは除去する陰性磁性細胞分離、および C D 4 <sup>+</sup> T 細胞の濃縮された集団を得るための陽性磁性細胞分離である。

【 0 0 8 9 】

病理学的に異常な細胞の単離方法は、細胞型および調製物の所望の純度により決定することができる。当業者は、上述された方法を包含するどの方法が特定の病理学的に異常な細胞の単離に応用可能であるかを知っているであろう。

【 0 0 9 0 】

本発明の方法で使用される C D 8 <sup>+</sup> T L および C D 4 <sup>+</sup> T 細胞、樹状細胞ならびに病理学的に異常な細胞の集団は、複数の供給源から得ることができる。例えば、細胞は C T L を使用して治療されるべき病理学的状態に悩まされる個体から、もしくはレシピエント個体に実質的に組織適合性である個体から得ることができる。こうした個体は、例えば、H L A が同一の同胞、もしくは H L A が適合された親族、もしくは H L A が適合された関係のない個体であってよい。組織適合性抗原の型分類方法は当該技術分野で公知である。こうした抗原型分類方法を使用して、当業者は、どのレベルの抗原類似性が、細胞がレシピエント個体と免疫学的に適合性であるために必要であるかを知っているであろうか、も

10

20

30

40

50

しくは決定することができる。ドナー細胞とレシピエントとの間の寛容できる差異は多様な組織で異なる可能性があり、そして当業者により既知であるかもしくは容易に決定されることができる。移植抗原適合性の評価方法は当業者に公知である。

【0091】

本発明の方法での使用のための細胞は、個体の多様な組織もしくは器官から得ることができる。当業者は、特定の細胞型のどの供給源が病理学的に異常な細胞に対し選択的なCTLの調製に最も適しているかを決定する方法を知っているであろう。1種以上の組織のような、一個体の1種以上の供給源から細胞を収穫することが可能であるかもしれない。当業者は、必要とされる細胞の数および一個体の身体中での細胞型の到達可能性を考慮することにより、特定の細胞のどの特定の供給源が好ましいかを決定することが可能であろう。例えば、特定の一細胞型が一組織中で別の組織に比較してより豊富であるかもしれないか、もしくは、特定の一組織が細胞収穫のためにより到達可能であるかもしれない。一例は、血液細胞は比較的非侵襲的な処置により個体から除去することができるために、血液のような組織は骨髄のような組織よりもより到達可能であることである。

【0092】

CD8<sup>+</sup> T LおよびCD4<sup>+</sup> T細胞は、例えば、組織適合性の個体もしくはCTLレシピエントのような個体の血液、骨髄もしくは他の組織から得ることができる。該方法の好ましいCD8<sup>+</sup> T Lは、選択的CTLのレシピエントとHLAが合致されるCD8<sup>+</sup> T Lである。CD4<sup>+</sup> T細胞はCD8<sup>+</sup> 自己由来であることができるか、もしくは異種であることができる。本発明の方法での使用のためのCD4<sup>+</sup> T細胞は、樹状細胞に対し同種反応性(alloreactive)であるか、もしくはMHCクラスIIを共有する。

【0093】

樹状細胞、もしくは樹状細胞に分化することが可能な単球は、本発明の方法での使用のために一個体の数種の組織から得ることができる。例えば、樹状細胞もしくは単球は、一個体からの血液、骨髄もしくは他の組織から得ることができる。

【0094】

本発明の方法で使用されるべき病理学的に異常な細胞は多くの供給源から得ることができる。一供給源は、本発明の方法により生成されるCTLを使用する養子免疫療法を受領することができる個体である。病理学的に異常な細胞は、細胞の均質もしくは不均質な集団からの細胞であることができるか、または単離された細胞であることができる。病理学的に異常な細胞は、腫瘍または他の疾患に罹っている組織もしくは器官からのような個体から取り出された細胞を包含する。病理学的に異常な細胞に対し選択的なCTLの誘導方法は、細胞、均質および不均質な細胞集団、組織および器官のような天然の供給源からの細胞、培養された細胞、病理学的病原体による感染もしくは核酸での形質導入によるように変えられた培養された細胞に当てはまる。加えて、限定されるものでないが細胞ライセート、小胞、細胞画分もしくは細胞成分、異常な細胞から溶出されたタンパク質もしくはペプチドの混合物を挙げることを含む広範な抗原を使用することができる。

【0095】

本発明の病理学的に異常な細胞は、アポトーシス性の病理学的に異常な細胞であることができる。アポトーシス性の病理学的に異常な細胞は、病理学的に異常な細胞の集団中に存在することができるか、病理学的に異常な細胞の集団から単離することができるか、もしくはいくつかの方法により病理学的に異常な細胞中で誘導することができる。アポトーシスの誘導は細胞型に依存して多様な方法で達成されている(総説についてはMcConkeyら(1996) Molecular Aspects of Medicine 17:1を参照されたい)。

【0096】

アポトーシスは、内在性膜タンパク質である受容体の細胞外ドメインへのTNF、リンホトキシンおよびFasリガンドのような細胞死活性化物質の結合により誘発されることができる。細胞死受容体の活性化は、カスパーゼ酵素の活性化をもたらす細胞質へのシグナ

10

20

30

40

50

ルの伝達、およびついに細胞の死に達するシグナル伝達事象のカスケードにつながる。当業者は、どの試薬が特定の細胞型（1種もしくは複数）においてアポトーシスを誘導するかを知っているであろう。1種もしくはそれ以上の細胞系でアポトーシスを誘導するのに使用されている試薬の例は、アクチノマイシンD、アフィジコリン、A23187、カフェイン、カンプトテシン、シクロヘキシミド、デキサメサゾン、ドキシソルピシン、5-フルオロウラシル、ヒドロキシ尿素、スタウロスポリン、タキソール、チミジンおよびビンブラスチンを包含する（Oncogene Research Productsウェブサイト）。

【0097】

当該技術分野で公知のいくつかの方法を、アポトーシス細胞を検出するのに使用することができる。こうした方法は、アポトーシスの間に起こる形態学的変化を検出するための光学および電子顕微鏡検査、特徴的な細胞の収縮および増大された粒度を検出するためのフローサイトメトリーもしくは密度勾配遠心分離、トリパンプルー、臭化エチジウムおよびアクリジンオレンジのような色素を使用する膜の完全性の評価、アガロースゲル分析、インビトロおよびインシトゥDNA末端標識、PCR分析、コメットアッセイおよびELISA系を包含する技術を使用する特徴的な非無作為的DNA断片化の測定、アポトーシスの間に活性化されるプロテアーゼ酵素のカスパーゼファミリーからの一カスパーゼの活性の検出、アネキシンVのようなホスファチジルセリン結合タンパク質の検出、組織トランスグルタミナーゼ活性の測定、ならびにカルシウムイオンの流入の測定（Promega Notes 69: technically speaking - detecting apoptosis）を包含する。

【0098】

アポトーシス細胞は上述されたもののような細胞分離方法を使用して非アポトーシス細胞から分離することができる。従って、アポトーシス性の病理学的に異常は、アポトーシス細胞を天然に含有する病理学的に異常な細胞の一集団もしくはアポトーシス細胞を含有するように誘導された細胞中に存在する可能性があり、そして本発明の方法での使用のためこうした供給源から単離することができる。

【0099】

本発明の方法は病理学的に異常な細胞に対し選択的なCTLの生成をもたらす。CTLは細胞の不均質な集団、単離された細胞もしくは実質的に単離された細胞であることができる。CTL集団は標的の病理学的に異常な細胞上の1種もしくはそれ以上の抗原に対し選択的であるCTLを含有する可能性がある。病理学的に異常な細胞に対し特異的であるCTLの精製は、標的細胞もしくは抗原に対する細胞溶解活性を表すCTLを選択することにより実施することができる。標的に対し特異的なCTLの選択方法、およびCTLの細胞溶解活性を測定するためのアッセイは当該技術分野で公知である。CTLの選択された一集団を、上述された分離方法を包含する当該技術分野で公知の方法を使用して精製することができる。本発明の方法により産生されるCTLの不均質なもしくは単離された一集団は、標的の病理学的に異常な細胞の破壊における特定のCTL調製物の有効性を決定するためにインビトロで特徴づけすることができる。

【0100】

細胞溶解活性のアッセイの一例はクロム-51 ( $^{51}\text{Cr}$ ) 遊離アッセイである。実施例IIでより詳細に記述されるこの方法において、CTLに媒介される活性を、培養された $^{51}\text{Cr}$ 標識標的細胞の溶解を測定することにより決定する。CTLの機能を測定するための別のアッセイは標的細胞増殖アッセイである。標的細胞増殖アッセイは、インビトロでの標的細胞の増殖を阻害するCTLの能力を測定する。簡潔には、標的細胞を、例えば細胞系および個体から単離された初代細胞を包含する適切な供給源から収集し、そして成長培地に懸濁して試験されるべき各サンプルについて1mlあたり約 $10^4$ 個の生存可能な細胞の濃度を達成する。しかしながら、標的細胞の量および濃度は標的細胞の利用可能性に従って調節することができる。CTLを1mlあたり約 $10^6$ 個の生存可能な細胞の濃度でサンプルに添加するか、もしくは標的細胞に対するCTLの多様な比をプレート培

養して、異なるCTL濃度での標的細胞の増殖を測定することができる。標的細胞に対するエフェクターの比は約500:1ないし0.1:1の間であることができる。細胞は典型的には約1ないし24時間インキュベートする。

#### 【0101】

本発明の方法を使用して生成されるCTLの寿命を超える対照を有することが望ましい可能性がある。細胞の生存率の一制御方法は、細胞を殺すトキシンを産生する細胞により取り込まれる化合物を代謝する自殺遺伝子を導入することである。例えば、CTL中へのチミジンキナーゼ遺伝子の導入は、ガンシクロピルの添加による殺傷に対しCTLを感受性に行うことができる。この方法を使用して、チミジンキナーゼを発現するCTLを、CTLもしくは関連する標的選択的な細胞溶解活性が必要とされないもしくは望ましい場合に排除することができる。チミジンキナーゼ遺伝子および自殺基質ガンシクロピルの使用は当該技術分野で公知である。細胞中へのチミジンキナーゼ遺伝子を含有するベクターの形質導入方法は当該技術分野で公知である。

10

#### 【0102】

病理学的に異常な細胞に対し選択的なCD8<sup>+</sup>記憶CTLもまた本発明の方法を使用して生成させることができる。病理学的に異常な細胞に対し選択的なCD8<sup>+</sup>記憶CTLは、2もしくはそれ以上の世代の間、病理学的に異常なに対する選択的な細胞溶解活性を有するCTLを培養することにより得ることができる。CD8<sup>+</sup>記憶CTLは、ナイーブCD8<sup>+</sup>TLより効率的に抗原に应答する能力を有し、そしてエクスピボ培養物中で抗原で再刺激することができる。CD8<sup>+</sup>記憶CTLはエクスピボ培養物中でCTLと区別することができる。CD8<sup>+</sup>記憶CTLは複数の再刺激(典型的には少なくとも5回の再刺激)を受ける能力を有するからである。病理学的に異常な細胞に対し選択的な記憶CD8<sup>+</sup>TLの単離は、上述された方法を包含する当該技術分野で公知の方法により達成することができる。

20

#### 【0103】

病理学的に異常な細胞の標的抗原に対し選択的であるCTLは、病理学的に異常な細胞に対し選択的なCTLと同一の治療的応用に有用である。標的抗原認識の結果が標的抗原に対し選択的なCTLによる細胞の溶解であるからである。従って、エクスピボ培養物中で生成される標的抗原に対し選択的なCTLは養子免疫療法に有用である可能性がある。

#### 【0104】

既に論考されたとおり、ペプチド抗原である標的抗原に対し特異的なCTLの使用は予測可能に成功裏でなかった。このアプローチは、標的抗原に対し選択的なCTLを産生する確率を増大させる可能性がある因子の包含により改良される可能性がある。本発明の方法は、エクスピボ培養物中の細胞の混合物中でIL-7を利用することにより、CTL産生の増大された効率という利点を提供する。本発明の方法で提供される場所のIL-7の使用は、標的細胞に対するCTL応答を生じさせる効率を増大させ、そして従って標的抗原に対し選択的なCTLが産生されることができる確率を増大させる。

30

#### 【0105】

本発明は、1種もしくはそれ以上の標的抗原に対し選択的なCD8<sup>+</sup>TLのエクスピボの誘導方法を提供する。該方法は、前記1種もしくはそれ以上の標的抗原を、少なくとも樹状細胞(DC)、CD4<sup>+</sup>T細胞、CD8<sup>+</sup>TLおよびIL-7を有する混合物と接触させること、ならびに、前記1種もしくはそれ以上の標的抗原に対する選択的免疫反応性を有するCD8<sup>+</sup>細胞溶解性Tリンパ球(CTL)を生成させるのに十分な時間の間、前記1種もしくはそれ以上の標的抗原を前記混合物とともに培養することよりなる。

40

#### 【0106】

本発明は、病理学的に異常な細胞に対し選択的な抗原の同定方法を提供する。本発明の方法を使用して病理学的に異常な細胞もしくはその産物に対し生成されたCTLを、それらが認識する抗原を同定するのに使用することができる。これは当業者に既知である手順を使用して達成することができる。1つのこうした方法は、病理学的に異常な細胞からクラスI MHCを精製すること、およびそれと会合されたペプチドを遊離させることに存す

50

る。該ペプチド混合物をその後画分に分離し、そして分析して抗原ペプチドを含有する画分を決定する。その後、利用可能な技術（商業的に入手可能であるアルゴネックス（Argonex）、バージニア州シャーロットビル；およびHuntら、Science（1992）255：5049の技術のような）を使用してペプチド配列を決定する。これらの技術を利用するための制限する物質は、抗原特異的CD8<sup>+</sup> T Lであり、それは本発明の方法を使用して提供される。

【0107】

別の方法は：（a）病理学的に異常な細胞を突然変異誘発剤で処理して病理学的に異常な細胞の突然変異体集団を生じさせること；（b）病理学的に異常な細胞の前記突然変異体集団を前記病理学的に異常な細胞に対し選択的なCTLと接触させて、前記CTLとの反応性を喪失した突然変異体の病理学的に異常な細胞を同定すること；（c）前記突然変異体細胞中に、病理学的に異常な細胞のポリペプチドをコードする核酸の発現可能な集団を導入して前記ポリペプチドを発現する突然変異体細胞の集団を生じさせること；および（d）前記病理学的に異常な細胞に対し反応性の前記CTLとの反応性を復帰する、病理学的に異常な細胞のポリペプチドを発現する突然変異体細胞を同定することよりなる。

10

【0108】

病理学的に異常な細胞もしくは標的抗原に対し選択的なCTLの一集団を使用して、該病理学的に異常な細胞に対し選択的な抗原を同定することができる。選択的な抗原を同定するために使用されるCTLの集団は、例えば該病理学的に異常な細胞に対する多特異性もしくは単一特異性の反応性を表す可能性がある。病理学的に異常な細胞の抗原もしくは未知の標的抗原の同定方法は、病理学的に異常な細胞に対し選択的なCTLにより認識される抗原がもはや存在しないように突然変異誘発された標的の病理学的に異常な細胞の集団を得ること、抗原に欠陥のある病理学的に異常な細胞中にcDNAライブラリーを導入すること、および病理学的に異常な細胞を認識するCTLの能力を復帰するcDNAを発現する病理学的に異常な細胞を選択することを必要とする。その後、cDNAを細胞からレスキューし、そして配列決定して標的抗原の正体を決定する。

20

【0109】

病理学的に異常な細胞の一集団の突然変異誘発は当該技術分野で公知の方法を使用して実施することができる。例えば、細胞を照射もしくはメタンスルホン酸エチルのような化学的突然変異原での処理のような方法により突然変異させることができる。クラスIおよび抗原をプロセッシングする機械装置を未だ保持しかつ病理学的に異常な細胞に対し選択的なCTLにより認識されない突然変異された細胞は、それがCTLにより溶解されないことができるために同定することができる。抗原を欠失された細胞中へのcDNAライブラリーの導入は、化学的試薬を使用するトランスフェクションおよび電気穿孔法のような当該技術分野で公知の方法により実施することができる。CTLにより認識されることができる形質導入された細胞は、CTLにより認識されるタンパク質をコードするcDNAを含有する。抗原を復帰された細胞の同定は、病理学的に異常な細胞に対し選択的なCTLの機能的活性を使用して形質導入された細胞集団をスクリーニングすることにより実施することができる。その後、cDNAのレスキューおよび配列決定を、当該技術分野で公知の方法を使用して実施する。

30

40

【0110】

本発明は病理学的に異常な細胞に対し選択的な抗原の同定方法を提供する。該方法は：（a）病理学的に異常な細胞に対し選択的であることが疑わしい1種もしくはそれ以上の抗原を、前記1種もしくはそれ以上の抗原を発現する病理学的に異常な細胞に対し選択的なCTLと接触させること、および（b）前記1種もしくはそれ以上の抗原に対する、前記1種もしくはそれ以上の抗原を発現する病理学的に異常な細胞に対し選択的な前記CTLの免疫反応性を測定することよりなり、ここで、前記1種もしくはそれ以上の抗原に対する選択的免疫反応性を有するCTLは、前記1種もしくはそれ以上の免疫反応性抗原を、前記病理学的に異常な細胞に対し選択的であるとして特徴づけする。

【0111】

50

病理学的に異常な細胞、または本発明の方法を使用して生成される1種もしくはそれ以上の標的抗原に対し選択的なCTLの一集団はまた、病理学的に異常な細胞に対し選択的かつ従って特定の疾患もしくは病状と関連することが疑わしい、1種もしくはそれ以上の標的抗原の選択性を同定もしくは確認するのにも使用することができる。簡潔には、該方法は、疑わしい1種もしくはそれ以上の抗原を発現する病理学的に異常な細胞に対し選択的なCTL集団もしくはCTLクローンを用いて1種もしくはそれ以上の標的抗原をスクリーニングすることを必要とする。疑わしい抗原に対するCTLの選択的免疫反応性は、病理学的に異常な細胞に対する抗原の選択性を示すかもしくは確認する。同様に、疑わしい抗原は、最初に宿主細胞中で抗原を発現させること、およびその後該疑わしい抗原を発現する細胞に対するCTLの細胞溶解活性を測定することによりスクリーニングすることができる。選択的な細胞溶解活性は、病理学的に異常な細胞に対する1種もしくはそれ以上の抗原の選択性を示すかもしくは確認する。1種もしくはそれ以上の疑わしい抗原を発現する細胞は、例えば、天然に存在する細胞、もしくは疑わしい標的抗原をコードする発現可能な核酸で改変された細胞であることができる。核酸での細胞の改変方法および細胞中でのポリペプチドの発現の同定方法は当該技術分野で公知である。

10

**【0112】**

上の方法を使用して同定された抗原は、治療薬の開発のための標的として使用することができる。例えば、小分子化合物およびペプチドのライブラリーをスクリーニングして、ある抗原に特異的に結合する分子を同定することができるか、もしくは、特定の治療的抗体を抗原に対して生じさせることができる。本方法を使用して同定された抗原はまた、診断法の開発にも使用することができる。

20

**【0113】**

本発明の方法を使用して生成される病理学的に異常な細胞に対し選択的なCTLは、該病理学的に異常な細胞を伴うヒトの病状もしくは疾患の治療に応用可能である。上述されたもののようなインビトロもしくはインシトゥ機能性アッセイで選択的細胞溶解活性を有することが決定されるCTLは、一個体中で選択的細胞溶解活性を有することがありそうである。CTLは不均質な集団中で標的細胞もしくは抗原を認識することができるからである。従って、本発明の方法を使用して生成される、病理学的に異常な細胞もしくは標的抗原に対し選択的な記憶CTLを包含するCTLでの個体の治療方法が本発明で提供される。

30

**【0114】**

本発明は、病理学的に異常な細胞により媒介される疾患を有する患者の治療方法を提供する。該方法は、有効量の、前記病理学的に異常な細胞に対する選択的細胞溶解活性を有するCD8<sup>+</sup> CTLを投与することよりなり、前記病理学的に異常な細胞に対する選択的細胞溶解活性を有する前記CD8<sup>+</sup> CTLは、本発明の方法を使用して産生される。

**【0115】**

本発明はさらに、病理学的に異常な非B細胞白血病細胞により媒介される疾患を有する患者の治療方法を提供する。該方法は、有効量の、前記病理学的に異常な非B細胞白血病細胞に対する選択的細胞溶解活性を有するCD8<sup>+</sup> CTLを投与することよりなり、前記病理学的に異常な非B細胞白血病細胞に対する選択的細胞溶解活性を有する前記CD8<sup>+</sup> CTLは本発明の方法により産生される。

40

**【0116】**

本発明はさらに、病理学的に異常な細胞により媒介される疾患を有する患者の治療方法を提供する。該方法は、有効量の、前記病理学的に異常な細胞に関連する1種もしくはそれ以上の標的抗原に対する選択的免疫反応性を有するCD8<sup>+</sup> CTLを投与することよりなり、選択的免疫反応性を有する前記CD8<sup>+</sup> CTLは本発明の方法により産生される。

**【0117】**

既に記述されたとおり、多くの型の病理学的に異常な細胞が存在し、その全部は正常細胞と区別される。病理学的に異常な細胞に対し選択的なCTLは正常細胞の集団内のその細

50

胞を選択的に認識かつ破壊することができるため、病理学的に異常な細胞はCTLで治療することができる。従って、病理学的に異常な細胞を選択的に標的とするCTLの使用は、こうした細胞の破壊が疾患の重症度を低下させるかもしくは疾患の進行の速度を遅らせることができる個体の治療に応用可能である。

【0118】

当業者は、病理学的に異常な細胞に対し選択的なCTLでの治療が特定の病理学的状態に有益であるかどうかを決定する方法を知っているであろうし、また、病理学的状態を有する個体中での病理学的に異常な細胞の存在を決定する方法を知っているであろう。当業者は、疾患の病理学的に異常な細胞を、個体中で不必要な影響を引き起こすことなく排除することができるかどうかを決定することが可能であろう。例えば、身体中で有益な機能を供給しない腫瘍細胞を除去することが有利である。しかしながら、疾患に罹っているがしかしにもかかわらず器官の不可欠の細胞のような身体中である機能を提供する細胞を排除することは、一般に望ましくない。しかしながら、例えば、限定されるものでないが前立腺、卵巣、乳房、甲状腺、胸腺、生体および非生体臓器の選択された細胞型、もしくはIGEを合成するB細胞を挙げることができる、個体の生存に影響を及ぼすことなく除去することができるある種の非生体臓器および生体もしくは非生体臓器からの細胞が存在する。この場合、疾患に罹っている細胞および正常な細胞もしくは組織もしくは器官により共有される自己抗原を認識するCTLを使用することができる。

10

【0119】

病理学的状態を治療するのに有効なCTLの量は、標的細胞集団の減少に影響を及ぼすもしくは標的細胞集団の増大の速度を遅らせるのに必要とされる量である。治療上有効な用量は、例えば、治療されるべき病理学的に異常な細胞を特徴とする病理学的状態、投与の経路および形態、個体の体重および病状、ならびに以前のもしくは同時の治療に依存することができる。例えば、個体の身体中の一領域に局在化される病理学的に異常な細胞は、その特定の部位でのCTLの注入により効果的に治療されるかもしれない。

20

【0120】

注入される用量は、細胞の比較的大きな集団が比較的大用量のCTLを必要とする可能性があるような、病理学的に異常な細胞の集団の大きさに依存して変動する可能性がある。個体の体重は例えば静脈内注入のような全身的経路により送達されるCTLの投薬量を遂げることができる。例えば、病理学的に異常な細胞が血液中を循環している造血癌を伴う個体を治療するために、有効用量は、少なくとも部分的に、投与されるCTLの濃度が小児のような低体重の個体および成体のようなより高体重の個体についてほぼ同一であるように、個体の体重により決定されるとみられる。

30

【0121】

該方法の特定の応用についての適切な有効用量は、本明細書に提供される手引きを使用して当業者により決定することができる。例えば、該量は既に記述されたところのインピトロもしくはインピボアッセイから外挿することができる。当業者は、患者の病状を治療の経過の間中モニターすることができること、および投与されるCTL製剤の量を相応して調節することができることを認識するであろう。

【0122】

投与するための病理学的に異常な細胞に対し選択的なCTLの有効量は、特定の疾患もしくは病状を治療するために使用されるある用量のCTLの有効性を決定するための試験の実施方法を知っているであろう当業者により決定されることができる。当業者はまた、病理学的に異常な細胞に対し選択的なCTLは、単一用量として最も効果的に投与することができるか、もしくは複数用量として最も効果的に投与することができるかどうかも決定することができる。

40

【0123】

CTLの製剤は静脈内注入(infusion)によるように全身的に送達させることができるか、もしくは注入(injection)によるような病理学的状態の一部で局所的に投与することができる。CTL製剤の投与のための適切な部位は既知であるか、も

50

しくは治療されている個体の臨床的適応症に依存して、当業者により決定されることができる。

【0124】

病理学的に異常な細胞に対し選択的なCTLは、製薬学的に許容できる媒体と一緒に懸濁剤として投与することができる。こうした製薬学的に許容できる媒体は、例えば緩衝生理的食塩水溶液であることができる。製薬学的に許容できる媒体は、滅菌であるかもしくは汚染する粒子および生物体を実質的に含まないことができる。当業者は、多様な投与様式で使用されるべきCTLのための製薬学的に許容できる媒体を知っているかもしくは決定することが可能であろう。

【0125】

病理学的状態は、病理学的に異常な細胞に対し選択的であるCTL、記憶CTLもしくはCTLおよび記憶CTLの組合せ剤で治療することができる。CTLおよび記憶CTLは同時にもしくは別個の機会に投与することができる。記憶CTLの投与は、病理学的に異常な細胞に対する長期の免疫という利点を提供する可能性があり、そして従って疾患の再発を予防することができる。当業者は、特定の疾患もしくは病状の効果的な治療のためにどの型のCTLを使用するかを知っているであろうか、もしくは決定することができる。

【0126】

異常な細胞の成長を特徴とする病理学的状態の治療方法は、付加的には、他の治療とともに実施することができる。例えば、癌を治療するために、本発明の方法は、外科手術、サイトカインおよび増殖因子の投与を包含する化学療法、放射もしくは当該技術分野で既知の他の方法のような慣習的な癌治療の前、間もしくは後に実施することができる。同様に、感染性疾患を包含する病理学的状態を治療するために、本発明の方法を、感染性病原体に対する抗生物質投与もしくは当該技術分野で既知の他の方法のような慣習的治療の前、間もしくは後に実施することができる。自己免疫障害の病理学的状態の治療もまた、本発明の選択的CTL細胞排除方法を特定の自己免疫疾患のための慣習的治療と組み合わせることによっても達成することができる。慣習的な治療は、例えば、化学療法、ステロイド療法、インスリンならびに他の増殖因子およびサイトカイン療法、受動免疫、T細胞受容体結合の阻害剤およびT細胞受容体ワクチン接種を包含する。病理学的に異常な細胞に対し選択的CTLを受領する個体を免疫刺激剤で治療することが有利であるかもしれない。当業者は、特定の免疫刺激剤、ならびに免疫刺激剤の投与の適切な時間および様式を決定することが可能であろう。

【0127】

本発明の方法は、これらもしくは当該技術分野で既知の他の方法とともに、また、慣習的治療の開始の前、間もしくは後の多様な時点で投与することができる。異常な細胞の成長を特徴とする病理学的状態のための治療の記述については、例えば、The Merck Manual、第16版（編者 Berkow, R.）ニュージャージー州ラーウェイ、1992を参照されたい。

【0128】

同様に、当該技術分野で公知の他の細胞治療の方法を、本発明の方法により生成される選択的CTLとともに付加的に使用することができる。こうした他の方法は、例えば、組織およびその細胞成分の再生もしくは再形成のための細胞置換療法、ならびに治療的タンパク質もしくは巨大分子の産生のための遺伝子的に改変された細胞を使用する細胞療法を包含する。細胞置換療法の特定の例は、例えば癌患者の除去された骨髄細胞を再形成するために使用することができる造血幹および前駆細胞療法、ならびにパーキンソン病の治療のための神経幹および前駆細胞療法を包含する。治療的タンパク質の産生のための細胞療法は、例えば、例えばインスリン、他のサイトカイン、増殖因子および酵素を産生するように遺伝子的に改変された多様な細胞型およびそれらの前駆細胞の移植を包含する。こうした遺伝子的細胞療法は例えば糖尿病、癌の治療に応用可能である。細胞置換および遺伝子的細胞療法の多様な他の例は当該技術分野で公知であり、そして本発明の方法により産生される選択的CTLとともにの使用に同様に応用可能である。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 2 9 】

複数投与を包含する慣習的療法と同時のもしくは交互投与で送達される、病理学的に異常な細胞に対し選択的なCTLの投与。同時投与は、例えば、同一の製剤中で一緒に、もしくはほぼ同一の時刻もしくはすぐ続いて送達される異なる製剤中であることができる。交互投与は例えば時間的に別個の投与でCTL製剤および慣習的な治療的治療を送達することであることができる。既に記述されたとおり、選択的CTLおよび慣習的療法の時間的に別個の投与は、異なる送達様式および経路を同様に使用することができる。

## 【 0 1 3 0 】

本発明の別の応用は成熟樹状細胞の調製である。本発明の方法により産生される成熟樹状細胞は、その後、CTLの養子的導入と組合せの投与を包含するワクチン接種に使用することができる。本発明の方法の本応用は、本明細書に記述される場所の未熟樹状細胞を調製すること、それらに抗原（アポトーシス細胞、小胞、細胞ライセート、細胞画分もしくは成分、タンパク質もしくはペプチドのような）およびTヘルパーエピトープを適用すること、ならびにこれらの樹状細胞を、該樹状細胞のクラスII MHCと会合されるヘルパーエピトープに特異的なヘルパーT細胞とともにインキュベートすることを含んで成る。

10

## 【 0 1 3 1 】

本発明の多様な態様の活動に実質的に影響を及ぼさない改変もまた、本明細書に提供される本発明の定義内に包含されることが理解される。従って、以下の実施例は本発明を具体的に説明するがしかし制限しないことを意図している。

20

## 【 0 1 3 2 】

## 実施例 1

樹状細胞によるCD8<sup>+</sup> 細胞傷害性の活性の活性化のための条件

本実施例は、CD40LもしくはIL-12のいずれかでの樹状細胞(DC)の刺激がインビトロでCD8<sup>+</sup> TLにおけるCTL活性を誘導すること、およびIL-7がこの応答を増加することを示す。

## 【 0 1 3 3 】

ヒトCTLのインビトロ誘導のための至適条件を決定するため、HLA-A2 DCを使用して、精製されたCD8<sup>+</sup> Tリンパ球(CD8<sup>+</sup> TL)を活性化した。クラスII MHC抗原に対し特異的なCD8<sup>+</sup> TLの高い前駆細胞頻度が1回のみのインビトロ刺激後にCTL応答の検出を見込むため、クラスII MHC抗原に対する応答を検討した。HLA-A2 DCおよびCD8<sup>+</sup> TLの調製を下述する。

30

## 【 0 1 3 4 】

CD8<sup>+</sup> TLはHLA-A2陰性の健康な血液ドナーのPBMCから単離した。CD8<sup>+</sup> 陽性細胞はダイナビーズ(Dynabeads)およびデタッチャビーズ(Detachabead)(ダイナル(Dynal)、ニューヨーク州レイクサクセス)での陽性選択後に回収し、そして使用前に凍結されて保存した。融解した後に、細胞をダイナビーズ(Dynabeads)でCD4<sup>+</sup>、CD14<sup>+</sup>、CD19<sup>+</sup> およびCD56<sup>+</sup> をさらに枯渇させた。蛍光標示式細胞分取器(FACS)分析は、この細胞集団が>99% CD8<sup>+</sup> であったことを示した。DCは、本質的にF. SallustoとA. Lanzavecchia、J. Exp. Med. (1992) 176: 1693-1702により記述されたとおりに末梢血単球から生成させた。健康な血液ドナーからのHLA-A2陽性のPBMCをフィコール-ハイパーク(Ficoll-Hypaque)密度勾配遠心分離により単離し、そして4×10<sup>6</sup>個/mlの濃度でRPMI-FCS培地に懸濁した。この懸濁物の15mlのアリコートに150mm組織培養皿でプレート培養した。37℃で90分後に非付着細胞を廃棄し、そしてプレートをPBSで5回洗浄し、そしてその後、2%FCSおよび2%EDTAを含有するPBSの存在下に37℃で30分間インキュベートした。付着細胞を、ピペット操作(pipetting)次いで掻き取るにより分離させた。その後、細胞懸濁物を、製造元の説明書に従ってダイナビーズ(Dynabeads)(ダイナルAS(Dynal AS)、ノルウェー・オスロ)を

40

50

用いてCD2<sup>-</sup>、CD19<sup>-</sup>およびCD56<sup>+</sup> - 陽性細胞をさらに枯渇させた。この細胞集団 (< 0.5% CD3<sup>+</sup> かつ > 90% CD14<sup>+</sup>) を、500 U/ml のヒト組換えIL-4 (ジェンザイム (Genzyme)、マサチューセッツ州ボストン) および800 U/ml のヒト組換え顆粒球-単球コロニー刺激因子GM-CSF (ファーマーミンゲン (Pharmingen)、カリフォルニア州サンディエゴ) の存在下、RPMI-1640 (RPMI-FCS) 中で6穴プレート (細胞1.5 × 10<sup>6</sup> 個/ウェル) 中でプレート培養した。

#### 【0135】

HLA-A-2 特異的CTLの誘導は、2 mM L-グルタミン、50 μg/ml ゲンタミシン 1% 非必須アミノ酸、1 mM ピルビン酸ナトリウムおよび5% のブールされたヒト血清で補充されたRPMI 1640 (RPMI-HS) 中で培養された細胞で実施した。上述されたとおり調製されたDC (細胞10<sup>4</sup> 個/ウェル) およびCD8<sup>+</sup> 細胞 (細胞10<sup>5</sup> 個/ウェル) を、200 μl の最終容量中、96穴平底プレート中で培養した。細胞はCTL活性アッセイ前に37 °C で6日間インキュベートした。

10

#### 【0136】

CTLの細胞傷害性活性は、JY (A2<sup>+</sup>) および221 (A2<sup>-</sup>)<sup>51</sup> Cr 標識標的細胞を使用する<sup>51</sup> Cr 遊離アッセイにより定量的に測定した。該アッセイは、96穴培養プレートを2組の複製プレート (96穴U字型底) に分割することにより実施した。各組について、一方のプレートは15 μl を含有し、および他方のプレートは75 μl の元の培養物を含有した。一組は<sup>51</sup> Cr 標識221 標的細胞 (細胞10<sup>4</sup> 個/ウェル) を受領した一方、他の組は<sup>51</sup> Cr 標識JY 標的細胞 (細胞10<sup>4</sup> 個/ウェル) を受領した。NK活性によるいずれかの抗原非特異的細胞傷害性活性を減少させるために、全部のウェルが2 × 10<sup>5</sup> 個のK562細胞を受領した。37 °C で6時間後に100 μl の上清中の<sup>51</sup> Cr 含量を測定し、そして特異的溶解のパーセントを、式: 溶解パーセント = 100 × (実験的遊離 - 自発的遊離) / (最大遊離 - 自発的遊離) に従って計算した。試験された多様な条件の効率の適正な比較のために、データを溶解単位 (LU) 30 / 10<sup>6</sup> 個の投入 (input) 細胞として表す。1 LUは6時間のアッセイで10<sup>4</sup> 個の標的細胞の30% 溶解を達成するのに必要とされる投入細胞の数と定義する。特異的CTL活性は、JY細胞から得られたLUから、221細胞から得られたLUを差し引くことにより得る。標的細胞とのCTLの曝露もしくはインキュベーションの期間は、定量的結果が望ましいかもしくは定性的結果が望ましいかどうか依存して変動することができる。一般には、曝露の時間は約30分と6時間との間であり、好ましくは、該期間は約2ないし5時間の間であり、そしてより好ましくは、該期間は約3ないし4時間である。ヒトナチュラルキラー (NK) 感受性細胞系K562; クラスI陰性であるように突然変異誘発されかつ選択されたエプスタイン-バーウイルス (EBV) で形質転換された細胞系3A4-721.221、およびEBVで形質転換されたHLA-A2ホモ接合性細胞系JYを、10% ウシ胎児血清 (FCS; シグマ (Sigma)、ミズーリ州セントルイス)、4 mM L-グルタミン、1% 非必須アミノ酸、1 mM ピルビン酸ナトリウム、5 × 10<sup>-5</sup> M 2-メルカプトエタノールおよび50 μg/ml ゲンタミシン (全部ギブコ (Gibco)、ニュージャージー州グランドアイランドから) を含有するRPMI-1640培地 (ギブコ (Gibco)、ニュージャージー州グランドアイランド) (RPMI-FCS) 中で成長させた。

20

30

40

#### 【0137】

多様なDC成熟シグナルがCD8<sup>+</sup> 活性化を遂げたかどうかを決定するために、DCをリポ多糖 (LPS)、腫瘍壊死因子 (TNF) もしくはCD40Lで攻撃し、そして、精製されたCD8<sup>+</sup> 細胞中でのCTL活性を誘導する処理されたDCの能力を、記述されたところの<sup>51</sup> Cr 遊離により測定した。上述されたとおり調製されたDCをTNF (20 ng/ml)、LPS (20 ng/ml) もしくは添加物なし (未熟DC) のいずれかで処理した。37 °C での40時間のインキュベーション後にDCを収集しかつプレート培養した。照射された (25, 000ラド) CD40Lで形質転換された細胞 (Cellaら、J. Exp. Med. 184: 747-752 (1996)) を未熟D

50

Cに添加することにより、CD8<sup>+</sup> 細胞とともにの培養の時点でDCをCD40Lで攻撃した。

【0138】

代表的実験からの結果を図1に示す。未熟DC (imm-DC)、LPS処理されたDC (LPS-DC)、TNF- $\alpha$  で処理されたDC (TNF-DC) もしくはCD40Lで処理されたDC (CD40L-DC) により誘導された細胞傷害性の活性は、CD40Lで処理されたCDのみが、精製されたCD8<sup>+</sup> T細胞から細胞傷害性の活性を誘導することが可能であったことを示した(図1A)。CTL活性は4種の試験されたCD8<sup>+</sup> 細胞集団の3種で検出された。

【0139】

CD8<sup>+</sup> T細胞のCTL活性の誘導における、LPS、TNF- $\alpha$  もしくはCD40Lで処理されたDC間で観察される差異が、単球、未熟DCおよび成熟DCの抗原のプロセッシングおよび提示能力の差異によったかどうかを決定するために、クラスI分子、TAPトランスポーター、PA28 (イムノプロテアソーム調節物質) およびイムノプロテアソームの発現レベルを、フローサイトメトリー (FACSscan、ベントン ディッケンソン (Benton Dickenson)、イタリア・ミラノ) および適切な抗体との免疫沈降法により検査した。上述されたところのGM-CSFおよびIL-4での処理の後、生じる未熟DCは、処理されない単球に比較して4ないし5倍のクラスI分子、TAPトランスポーター、PA28およびイムノプロテアソームの増大された発現を表した。クラスI分子の発現のレベルは、LPS、CD40LもしくはTNF- $\alpha$  での処理に際して2倍さらに増大した。成熟DCにおけるクラスI分子の発現レベルは多様な処理により遂げられず、CD8<sup>+</sup> T細胞のCTL活性の誘導におけるLPS、TNF- $\alpha$  もしくはCD40Lで処理されたDC間で観察された差異が、抗原のプロセッシングおよび提示の能力の差異の結果でないことを示した。

【0140】

サイトカインIL-2は、CTLの発生および機能において重要な役割を有することが既知である (Trinchieri, Ann. Rev. Immunol. (1995) 13: 251-76)。CD40L-DCによる細胞傷害性の誘導がIL-12により置換されかつ/もしくは他のリンホカインにより増大される可能性があるかどうかを決定するための研究を実施した(図1)。IL-12(図1B)、IL-7(図1C)もしくはIL-12およびIL-7(図1D)の存在下でimm-DCもしくはCD40L-DCにより誘導される細胞傷害性の活性を測定した。IL-4もしくはIL-6の添加は細胞傷害性の活性に対する影響を有しなかった。未熟DCへのIL-12の添加は、4種の精製されたCD8<sup>+</sup> 細胞集団のうち2種でCD40Lの代わりに用いることが可能であった。IL-7は未熟DCに対する影響を有しなかったが、しかし、CD40Lで処理されたDCおよびIL-12で処理された未熟DCにより誘導された細胞傷害性の活性をおよそ3倍高めた。さらに、IL-7の存在下で、細胞傷害性の活性は全4種のCD8<sup>+</sup> 集団で検出された。従って、全CD8<sup>+</sup> ドナーに対する、および試験された全部の系における細胞傷害性の応答の最も首尾一貫した誘導をもたらした処理は、CD40L-DCおよびIL-7の組合せであった。試験された系は、スーパー抗原TSST、インフルエンザA型ウイルス由来のA2拘束性マトリックスペプチド、およびA2拘束性チロシナーゼペプチドに対するCTLの応答を包含した。

【0141】

実施例2

LB特異的CD8<sup>+</sup> CTL系統の誘導

本実施例は、CD8<sup>+</sup> CTLの活性が特異的白血病性芽細胞(LB)に反応して誘導されることを示し、そしてCD8<sup>+</sup> CTL細胞系の発生を立証する。

【0142】

IL-7と組合せのCD40LおよびIL-12がCD8<sup>+</sup> T細胞のDCに誘導されるCTL活性を効果的に促進したという観察結果は、LB特異的CTLを誘導するための手順

10

20

30

40

50

の開発のための基礎を提供した。BMTドナーおよびレシピエントからの利用可能な血液の少ない量のため、既に記述された手順を以下のとおり改変した。簡潔には、DCを、非付着細胞を除去した直後に、BMTドナーから単離された付着性PBMCにIL-4およびGM-CSFを直接添加することにより準備した。7日の培養期間後に、DCは、機械的操作により活性化される休止期 (resting) DCについて記述された (Gallucciら、Nature Medicine (1999) 5: 1249 - 1255) 表現型に類似の活性化抗原のパターンを表した。CD8<sup>+</sup> T LをCD4<sup>+</sup> 細胞の陰性枯渇により得た。

#### 【0143】

本実施例および後の実施例に記述される研究は、同種異系の骨髄移植片 (BMT) を与えられた4例の小児急性骨髄性白血病 (AML) 患者および彼らのドナーを包含した。BMTレシピエントのいずれも再発を経験しなかった。経過観察は移植後23から28ヶ月までの範囲にわたった。3例の患者 (MR、GAおよびPM) はHLAが同一の同胞からBMTを受領した一方、患者EVはHLAが合致された関係のないドナーからBMTを受領した。BMTレシピエントを、移植後6ヶ月間、LB特異的な細胞傷害性の活性について評価し、このときに免疫抑制療法を停止した。IRCCS Policlinico San Matteo小児科の施設審査委員会が該プロトコルを承認した。

#### 【0144】

初期研究において、LB特異的CTLは、IL-7およびIL-12と一緒にLBおよびDCを使用してCD8<sup>+</sup> T L (CD4<sup>+</sup> < 1%) をプライミングすることにより誘導した。2名のBMTドナー (MR-donおよびGA-don) からのCD8<sup>+</sup> T Lが第二の刺激後にLB特異的CTLを含有したこと、しかしこれらの培養物は拡張するそれらの低い傾向により維持するのが困難であったことが観察された (データは示されない)。

#### 【0145】

LB特異的CTL系統の拡張の欠如の問題を克服するために、CD4<sup>+</sup> が濃縮された照射された自己細胞を、CD8<sup>+</sup> T Lのプライミングのインキュベーションに添加した。このアプローチを使用して、4名のBMTドナー (MR-don、GA-don、EV-donおよびPM-don) の末梢血もしくは骨髄のいずれか由来のCD8<sup>+</sup> T Lから白血病特異的CTL系統を生成させた。使用された培地は10 ng/mlのIL-7および10 pg/mlのIL-12で補充されたRPMI-HSであった。CD8<sup>+</sup> 細胞 (細胞0.5ないし1 × 10<sup>6</sup> 個/ml) を48穴プレートに添加し、そして、1 mlの最終容量中で、照射された (20,000ラド) BMTレシピエントのLB (細胞5 × 10<sup>5</sup> 個/ml)、照射された (3,000ラド) CD8<sup>+</sup> が自己由来のCD4<sup>+</sup> リンパ球 (細胞3ないし5 × 10<sup>5</sup> 個/ml) およびCD8<sup>+</sup> が自己由来のDC (細胞2 × 10<sup>5</sup> 個/ml) と共培養した。

#### 【0146】

7日後に、照射された (20,000ラド) BMTレシピエントのLB (細胞5 × 10<sup>5</sup> 個/ml) および付着性の照射された (3000ラド) フィーダー細胞 (Vitelliorら、J. Clin. Invest. 95: 351 - 349 (1995)) で培養物を再刺激した。2日後、25 U/mlの組換えインターロイキン-2 (rIL-2) を培養物に添加した。同一のプロトコルを各連続する回の刺激に使用した。LBは、彼らの診断の時点での患者からのヘパリン添加された骨髄吸引物 (> 90% LB) から調製した。

#### 【0147】

培養物を、5:1のエフェクター対標的 (E:T) 比でのレシピエントLBに対する各その後の再刺激の7日後の細胞溶解活性について試験した (図2)。BMTレシピエントのPBMC ( )、BMTドナーのBMC ( ) およびBMTドナーのPBMC ( ) 由来のLB特異的CTL系統の細胞溶解活性を測定した。7日間隔で実施された細胞培養物の刺激を、図2中のII、III、IVおよびVにより表す。第四の再刺激後に低温保存された (cryopreserved)、融解されたLBに向けられたCTLの細胞溶解活

性を I V a として表す。図 2 ( A - D ) はそれぞれ M R、G A、E V、P M のドナー / レシピエント対を指す。

【 0 1 4 8 】

本研究は、細胞溶解活性が一次刺激後に観察されなかったことを示した。しかしながら、第二の刺激後 ( 初期培養の 1 4 ないし 1 6 日後 ) に、L B 特異的な細胞傷害性が、試験された全培養物中で観察され、そしてさらなる再刺激の後に維持もしくは増加された。C T L 活性化の同一の力学および大きさが、造血および免疫系がドナー起源のものであった場合に、移植後 6 ヶ月の 4 例の B M T レシピエント ( M R、G A、E V および P M ) の P B M C から C D 8 <sup>+</sup> 細胞を得た場合に観察された。L B 特異的 C T L 系統の細胞傷害性の能力は低温保存により影響を及ぼされなかった。

10

【 0 1 4 9 】

上述されたところの D C、標的細胞、I L - 1 2 および I L - 7 の存在下の培養物中での L B に向けられた C T L の拡張する能力を検査した。図 3 は、B M T レシピエント E V ( ) もしくは B M T ドナー E V ( ) の P B M C 由来の L B に向けられた C T L の細胞拡張の代表的結果を示す。データは C T L の拡張速度に基づく理論的計算を表す。C T L の拡張速度は以下のとおり計算した：拡張速度 = 再刺激後の細胞の総数 / 再刺激された細胞の数。C D 8 <sup>+</sup> が濃縮された応答体 ( r e s p o n d e r ) 細胞の初期数は 1 0 <sup>6</sup> 個であった。反復された刺激の後に、C T L は細胞傷害性の漸増的増大、および培養された細胞の絶対数の変動可能なしに継続的な拡張を立証した。これらの細胞は、培養の開始時に接種された細胞に比較して 9 ないし 2 0 倍の範囲で拡張された。

20

【 0 1 5 0 】

養子免疫療法のための L B 特異的 C T L 系統の潜在的な使用を鑑み、該細胞系を、体宿主性移植片反応 ( G V H R ) のためのインビトロ対照として移植前に患者から得られた非白血病性細胞に対して試験した。使用された自己標的細胞は骨髄レシピエント細胞 ( B M R C ) および有糸分裂促進剤で刺激された T 細胞 ( T - P H A ) であった。非白血病性 B M R C は、B M T 処置の前および完全な血液学的寛解の立証後に得た。T - P H A 細胞系は、低温保存された移植前 P B M C を P H A で刺激すること、および 1 0 0 U / m l の r I L - 2 ( シータス ( C e t u s )、カリフォルニア州エメリービル) で補充された R P M I - F C S 中での連続的継代により、各患者について樹立した。培養物の大多数は、非白血病性 B M R 細胞もしくは T - P H A に対して試験された最高のエフェクター対標的比 ( E : T 比 ) ( 4 0 : 1 まで ) で反応性を示さなかったかもしくは低い反応性 ( < 1 0 % の溶解 ) を示したかのいずれかであった。

30

【 0 1 5 1 】

レシピエント抗原に対する C T L 系統の反応性を排除するために、患者 E V の移植前の非白血病性レシピエント細胞に向けられた C T L 前駆細胞 ( C T L p ) の頻度を、既に記述された ( M o n t a g n a ら、J. Clin. Immunol., ( 1 9 9 6 ) 1 6 : 1 0 7 - 1 1 4 ) とおりの限界希釈アッセイ ( L D A ) により評価した。該患者のドナーは H L A が合致された関係のないドナーであった。4 つのドナー - レシピエント対のうち、他の 3 対は H L A が同一の同胞であったため、この対は G V H D の最高の危険にさらされた。C T L p の頻度の分析を：( I ) いかなるインビトロ活性化の前のドナーの P B M C、( i i ) L B 細胞での第四の刺激後に回収された、ドナーから得られた C D 8 <sup>+</sup> エフェクター細胞、および ( i i i ) L B 細胞での第四の刺激後に回収された、B M T 6 ヶ月後のレシピエントから得られた C D 8 <sup>+</sup> エフェクター細胞について実施した。表 I I の結果は、4 回のインビトロの L B 刺激後に、レシピエントの移植前の非白血病性細胞に対する C T L p の頻度が、L B 細胞での刺激前のドナー P B M C から得られた頻度に比較して増大しなかったことを立証する。

40

【 0 1 5 2 】

【表 2】

表2.

レシピエントの自己抗原に対するCTLpの頻度はLBおよびDCでのインビトロ刺激後に変化しない

供給源	CTLp頻度
PBMC EV don	1/381,000
CTL* EV pt	1/325,000
CTL* EV don	1/317,000

10

\* LB特異的CTL系統を4回の刺激後に得、そしてBMTレシピエントの移植前PHA芽細胞で試験した。

【0153】

実施例3

LB特異的CTL系統の特徴づけ

本実施例はLB特異的CTL系統の表現型分析を示す。

20

【0154】

LB特異的CTL細胞系の表現型分析を、各細胞傷害性アッセイの時点で実施した。初代培養物および第四の刺激後から得られた代表的な結果を表IIIに報告する。初代培養物中では、LBに向けられた細胞傷害性の活性が検出不可能であった場合に、 $CD3^+$  および/もしくは $CD8^+$  リンパ球は32%から79%までの範囲にわたった一方、かなりの比率の $CD56^+$  リンパ球(20%から66%までの範囲にわたる)が存在した。第四の刺激後に、エフェクター細胞の大多数は $CD3^+$  および $CD8^+$  リンパ球であった一方、 $CD56^+$  細胞の比率は20%未満に減少した。興味深いことに、 $CD4^+$  細胞もまた、刺激前の1%未満から第4回の刺激により約10%まで増大した。

【0155】

30

【表3】

表3  
LB特異的CTL系統の表面の表現型

CTL系統 BMT-レシピエント	初回刺激後の エフェクター細胞		4回の刺激後の エフェクター細胞	
	%	(範囲)	%	(範囲)
CD3	48	(42-57)	94	(93-96)
CD8	45	(32-55)	82	(73-88)
CD4	5	(4-6)	8	(7-10)
CD56	50	(36-66)	14	(11-20)
$\gamma\delta$	10	(5-14)	30	(13-65)
CTL系統* BMT-ドナー	初回刺激後の エフェクター細胞		4回の刺激後の エフェクター細胞	
	%	(範囲)	%	(範囲)
CD3	66	(58-79)	92	(87-97)
CD8	50	(41-62)	84	(80-88)
CD4	6	(3-10)	11	(8-15)
CD56	28	(20-30)	9	(6-15)
$\Gamma\delta$	8	(5-16)	21	(3-52)

\*PBMCから得られた

【0156】

実施例 4

LB特異的CTL系統はCD8<sup>+</sup> クラスI拘束性である。

【0157】

本実施例は、CTLの細胞溶解活性がCD8<sup>+</sup> 細胞およびHLAクラスI抗原に拘束性(restricted)であったことを示す。どのT細胞集団が白血病細胞の溶解を媒介していたかを決定するために、細胞傷害性アッセイを封鎖抗体の存在下で実施した。標的細胞を、抗HLAクラスIもしくはクラスIIモノクローナル抗体(mAb)(25 μg/ml)とともにインキュベートし、また、エフェクター細胞はCD4<sup>+</sup> およびCD8<sup>+</sup> に対し特異的なmAbとともに4で30分間インキュベートした。同一濃度の各mAbを、細胞傷害性アッセイの開始から約4時間後に培養物に添加した。

【0158】

3回のインビトロ刺激の後に、BMTレシピエントのPBMC(PBMC rec)およびBMTドナーの骨髄細胞(BM don)もしくはPBMC(PBMC don)から得られたCTL系統を、培地のみ( )、抗HLAクラスI( )、抗HLAクラスII( )、抗CD8<sup>+</sup> ( )および抗CD4<sup>+</sup> ( )mAbの存在下にLB標的細胞に対して10:1のE/T比でCTL活性について試験した(図4)。EV(図4A)およびPM(図4B)のドナー/レシピエント対由来のLB特異的CTL系統の代表的実験を報告する。

【0159】

全部の場合で、LB反応性の溶解は、抗HLAクラスIおよび抗CD8<sup>+</sup> mAbにより阻害されたが、しかし抗HLAクラスIIおよび抗CD4<sup>+</sup> mAbによりされず、CD8<sup>+</sup> 細胞が細胞溶解の原因であったことを示した。反復された刺激の後、LB特異的CTL系統に含有されたCD4<sup>+</sup> 細胞は5%と12%との間の範囲にわたった。従って、CD4<sup>+</sup> 細胞の枯渇実験を、細胞溶解活性の媒介におけるこの亜集団の関与を排除するために、細胞傷害性アッセイの前に実施した。これらの結果は、LBに向けられた細胞傷害性の活性がCD4<sup>+</sup> エフェクター細胞の枯渇により影響を及ぼされなかったことを立証した。

【0160】

10

20

30

40

50

## 実施例 5

CTLに媒介されるLBの溶解はパーフォリン依存性である

本実施例は、LBに向けられた細胞傷害性がコンカナマイシンAおよび塩化ストロンチウムにより阻害されることを示す。

## 【0161】

CTLの細胞溶解活性は、それが結合する標的細胞の直近への分泌顆粒の内容物の分泌を指す。該顆粒はパーフォリン、多様なリソゾーム酵素および標的細胞を破壊するカルシウム結合タンパク質を含有する。LBに向けられた細胞傷害性の活性における標的の溶解の原因である機構を同定するために、顆粒のエキソサイトーシス経路の役割を、液胞型H<sup>+</sup>-ATPアーゼの阻害剤コンカナマイシンA(CMA)もしくは顆粒化およびエフェクター細胞から顆粒内容物の放出を引き起こす塩化ストロンチウム(SrCl<sub>2</sub>)のいずれかを使用することにより分析した。

10

## 【0162】

エフェクター細胞を、1、10および100 nM/Lの濃度のコンカナマイシンA(CMA)(シグマ(Sigma)、イタリア・ミラノ)で2時間、もしくは5、25および50 mM/Lの濃度のSrCl<sub>2</sub>(シグマ(Sigma))で18時間処理し、2回洗浄し、そしてその後、20:1、10:1および5:1のE:T比で8時間、<sup>51</sup>Cr標識レシピエントLBとともにインキュベートした。3回の刺激後の、レシピエントPMのPBMC( )、ドナーPMのBMC( )およびドナーPMのPBMC( )由来のLBに向けられたCTLから表示される細胞傷害性の活性に対する、CMA(図5A)およびSrCl<sub>2</sub>(図5B)の影響を立証する、5:1のE:T比で実施された研究の結果を図5に示す。

20

## 【0163】

従って、LBに向けられた細胞傷害性はCMAもしくはSrCl<sub>2</sub>のいずれかでの処理により阻害された(平均の阻害=87%、図5)。これらの試薬は、パーフォリンに基づく標的の溶解を選択的に封鎖するため、標的細胞の溶解はパーフォリン依存性であると結論された。

## 【0164】

本出願を通じて、多様な刊行物をカッコ内で引用している。これらの刊行物の開示はそっくりそのまま、本発明が関する従来技術をより十分に記述するために、これにより本出願中で引用することにより組み込まれる。

30

## 【0165】

本発明は開示された態様に関して記述したとは言え、当業者は、詳述された特定の実験は本発明を単に具体的に説明することを容易に認識するであろう。多様な改変を、本発明の技術思想から離れることなく行うことができることが理解されるべきである。従って、本発明は下の請求の範囲によってのみ制限される。

## 【図面の簡単な説明】

## 【図1A、1B、1C、1D】

発明にかかる、IL-12、IL-7、もしくはIL-12およびIL-7の存在下の、未熟樹状細胞およびLPS、TNFもしくはCD40Lで処理された樹状細胞により誘導されるCD8細胞の細胞傷害性の活性、ならびに未熟もしくはCD40Lで処理された樹状細胞により誘導されるCD8細胞の細胞傷害性の活性を示す。

40

## 【図2A、2B、2C、2D】

発明にかかる、骨髄移植片レシピエントのPBMC、骨髄移植片ドナーの骨髄細胞および骨髄移植片ドナーのPBMC由来のLB特異的CTL系統の細胞溶解活性を示す。4例のドナー/レシピエント対を図A-Dに表す。

## 【図3】

発明にかかる、CTL数がLBでの各インビトロ刺激後に増大することを示す。

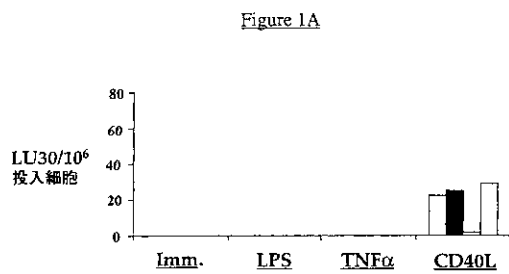
## 【図4A、4B】

発明にかかる、LB特異的CTL系統がクラスI拘束性CD8<sup>+</sup>であることを示す。

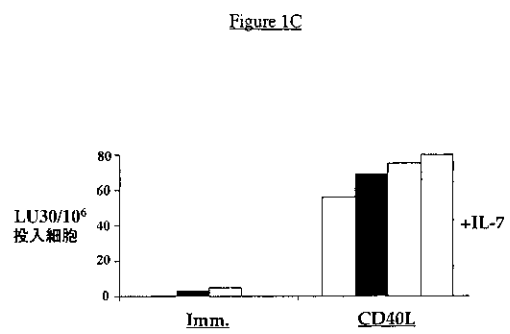
50

【図5A、5B】  
発明にかかる、CTLに媒介されるLB溶解がパーフォリン依存性であることを示す。

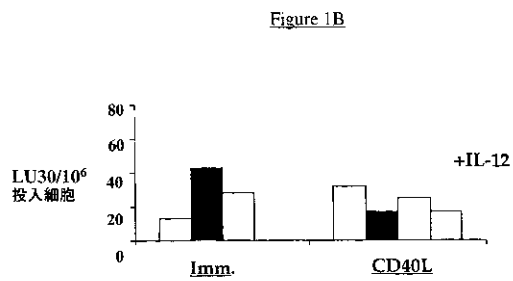
【図1A】



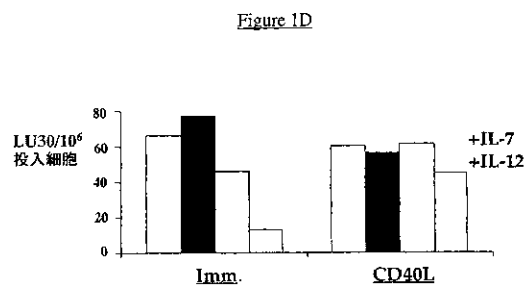
【図1C】



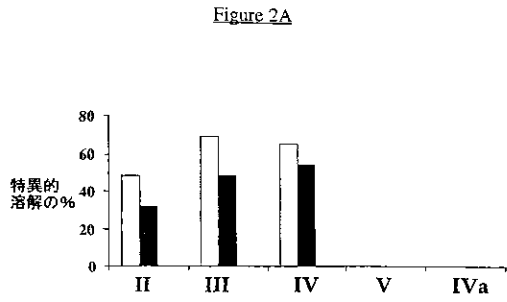
【図1B】



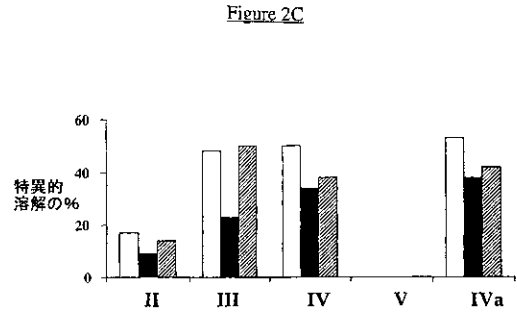
【図1D】



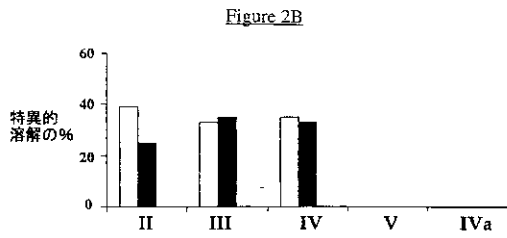
【 図 2 A 】



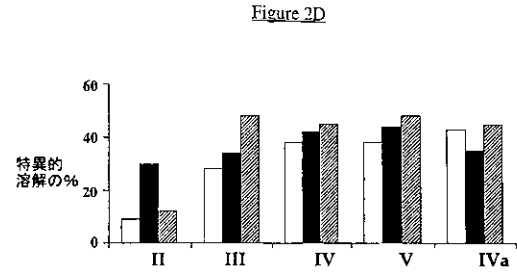
【 図 2 C 】



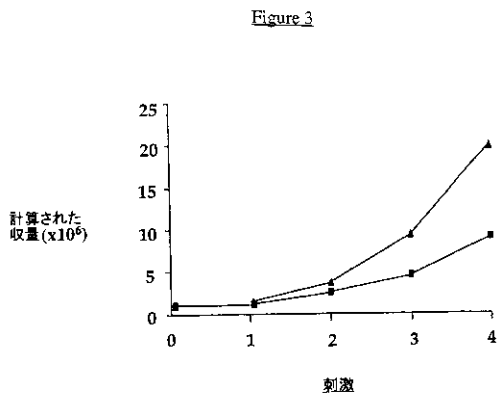
【 図 2 B 】



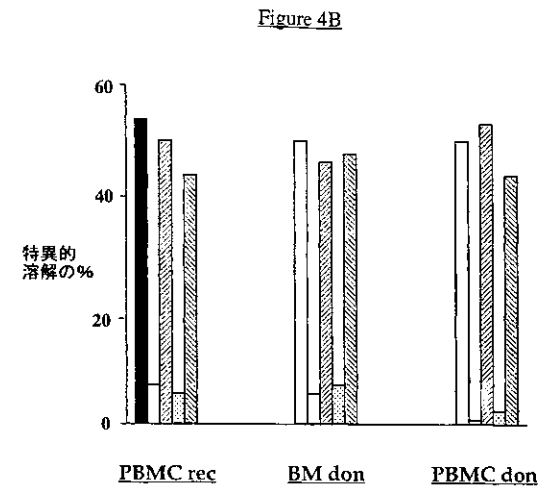
【 図 2 D 】



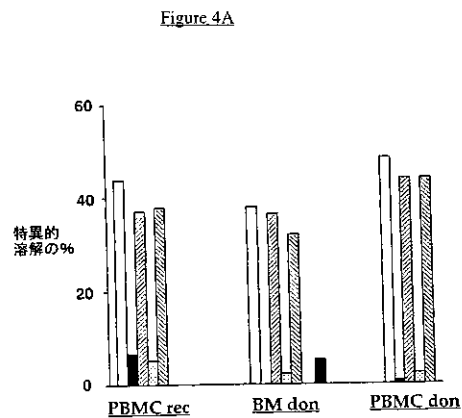
【 図 3 】



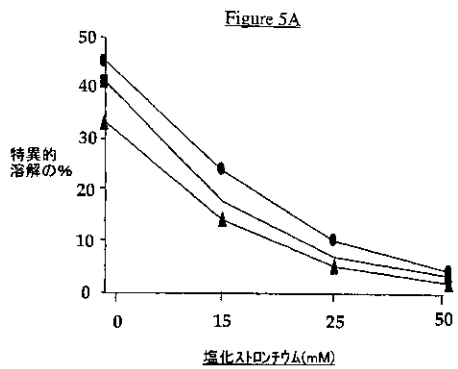
【 図 4 B 】



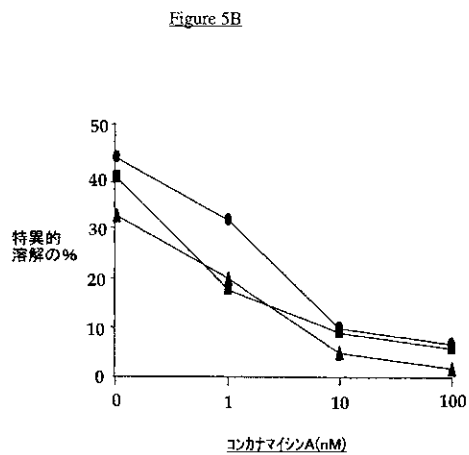
【 図 4 A 】



【 図 5 A 】



【 図 5 B 】



## 【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
21 March 2002 (21.03.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/22648 A2

- (51) International Patent Classification: C07K
- (31) International Application Number: PCT/US01/28016
- (22) International Filing Date:  
6 September 2001 (06.09.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:  
60/233,009 15 September 2000 (15.09.2000) US
- (71) Applicant: ORTHO-MCNEIL PHARMACEUTICAL, INC. [US/US]; U.S. Route 202, Raritan, NJ 08869 (US).
- (72) Inventors: VITTELLO, Antonella, 7389 High Avenue, La Jolla, CA 92037 (US); MACCARRO, Rita, Via Volta 24, I-27100 Pavia (IT); MONTAGNA, Daniela, Via Risorgimento 8, I-27012 Dressana (IT).
- (74) Agent: WALLIN, John, W. III, Johnson & Johnson, One Johnson & Johnson Plaza, New Brunswick, NJ 08933-7003 (US).
- (81) Designated States (national): AP, AG, AI, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GU, GT, HK, HR, HU, ID, IL, IN, JP, KR, KG, KP, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:  
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



(54) Title: COMPOSITIONS AND METHODS FOR INDUCING SPECIFIC CYTOLYTIC T CELL RESPONSES

(57) Abstract: The invention provides a method of inducing CD8<sup>+</sup> T lymphocytes selective for a pathologically aberrant cell *in vivo*. The method consists of contacting an apoptotic pathologically aberrant cell with a mixture having at least dendritic cells (DC), CD4<sup>+</sup> T cells and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes, and culturing an apoptotic pathologically aberrant cell with the mixture for sufficient time to generate CD8<sup>+</sup> T lymphocytes (TL) having antigenic specificity for, and/or selective cytolytic activity toward a pathologically aberrant cell. The invention further provides a method of inducing CD8<sup>+</sup> TL selective for one or more target antigens *in vivo*. The method consists of contacting one or more target antigens with a mixture having at least dendritic cells (DC), CD4<sup>+</sup> T cells, CD8<sup>+</sup> TL and IL-7, and culturing said one or more target antigens with the mixture for sufficient time to generate CD8<sup>+</sup> TL having selective immune reactivity toward one or more target antigens. The invention further provides a method of treating a patient having a disease mediated by a pathologically aberrant cell. The method consists of administering an effective amount of a CD8<sup>+</sup> TL produced by the methods of the invention having antigenic specificity for, and/or selective cytolytic activity toward a pathologically aberrant cell.

WO 02/22648 A2

WO 02/22648

PCT/US01/28016

**TITLE OF THE INVENTION**

COMPOSITIONS AND METHODS FOR INDUCING SPECIFIC CYTOLYTIC T CELL RESPONSES

**5 CROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATION**

This application claims the benefit of United States Provisional Application Serial No. 60/233,009, filed on 15 September 2000.

**BACKGROUND OF THE INVENTION**

10 This invention relates generally to diseases and conditions that are mediated by pathologically aberrant cells, such as autoimmune disorders, infectious diseases, allergy, and proliferative diseases such as cancer and, more specifically, to methods of preparing immune cells that can be used to treat cancer and other cell proliferation disorders.

15

Cancer is one of the leading causes of death in the United States. Each year, more than half a million Americans die from cancer, and more than one million are newly diagnosed with the disease. Cancerous tumors result when a cell escapes from its normal growth regulatory mechanisms and proliferates in an uncontrolled fashion.

20 Tumor cells can metastasize to secondary sites if treatment of the primary tumor is either not complete or not initiated before substantial progression of the disease. Cancer-related mortality can be decreased by prevention, early detection, and rigorous therapies.

25 A hurdle to treating cancer is the relative lack of agents that can selectively target the cancer, while sparing normal tissue. For example, radiation therapy and surgery, which generally are localized treatments, can cause substantial damage to normal tissue in the treatment field, resulting in scarring and in severe cases, loss of function of normal tissue. Chemotherapy, which generally is administered systemically, can  
30 cause substantial damage to organs such as bone marrow, mucosae, skin and the small

WO 02/22648

PCT/US01/28016

intestine. Other cancer therapies include antibodies directed to tumor cell surface proteins, and antibodies conjugated to cytotoxic agents. Therapeutic antibodies are targeted to tumor cells by the recognition of tumor-specific cell surface proteins. The production of antibodies that bind or deliver toxin to a particular tumor therefore  
5 requires that a protein target be identified, and that the protein be exposed on the cell surface. The efficacy and side effects of antibody therapies vary, and some therapeutic antibodies can cause serious allergic responses in individuals.

Other therapies involving the use of the body's immune system to fight cancer are  
10 under development. One immunotherapy approach aims to stimulate the immune system of the cancer patient indirectly using agents such as vaccines and cytokines. A more direct immunotherapy approach is to increase the anti-tumor immunity of the patient by administering immune cells that attack the tumor. The latter method, referred to as adoptive immunotherapy, has been used with varying degrees of success  
15 to treat patients suffering from several cancers, including malignancies of the brain, kidney, skin, and blood. Long-term cancer regression after adoptive immunotherapy treatment has not been reproducibly observed.

One method of adoptive immunotherapy involves using tumor-specific cytotoxic T  
20 lymphocytes (CTLs). CTLs are a specialized variety of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes that are capable of recognizing an antigen on the surface of a cell in association with Class I molecules of the Major Histocompatibility Complex (MHC) and subsequently destroying the cell. The role of CTLs in the immune system is to recognize and eliminate infected cells, tumor cells, and foreign cells. For adoptive immunotherapy,  
25 a population of anti-tumor CTLs derived from the patient, or a donor, can be generated using ex vivo culture methods.

Methods for generating anti-tumor CTLs ex vivo using peptides derived from tumor associated antigens and subsequently administering the CTLs to a cancer patient have  
30 been reported with varying success. However, such approaches for generating CTLs

WO 02/22648

PCT/US01/28016

are limited to cases in which a tumor-specific antigen is known and appropriately processed to generate peptides that are presented by antigen presenting cells. Another drawback to ex vivo peptide induced CTL is the unpredictability of whether the resulting CTL will retain the ability to recognize the corresponding antigen on the tumor cell surface because the affinity of the CTLs generated against the peptide might not be sufficient to recognize the endogenously processed antigen. Therefore, the desired specificity or efficacy needed for therapeutic use of ex vivo generated CTL has been generally difficult to achieve. Another problem with ex-vivo generated CTL has been the difficulty in maintaining the CTL in vitro for more than 2 or 3 rounds of restimulation. Moreover, this method is further limited by generating CTLs that recognize only one antigen on the target tumor cell.

Thus, there exists a need to generate and maintain selective CTLs in culture for adoptive immunotherapy. The present invention satisfies this need and provides related advantages as well.

#### **SUMMARY OF THE INVENTION**

The invention provides a method of inducing CD8<sup>+</sup> T lymphocytes selective for a pathologically aberrant cell ex vivo. The method consists of contacting an apoptotic pathologically aberrant cell with a mixture having at least dendritic cells (DC), CD4<sup>+</sup> T cells and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes, and culturing an apoptotic pathologically aberrant cell with the mixture for sufficient time to generate CD8<sup>+</sup> T lymphocytes (TL) having antigenic specificity for, and/or cytolytic activity toward a pathologically aberrant cell.

The invention further provides a method of inducing CD8<sup>+</sup> T lymphocytes selective for one or more target antigens ex vivo. The method consists of contacting one or more target antigens with a mixture having at least dendritic cells (DC), CD4<sup>+</sup> T cells, CD8<sup>+</sup> T cells and IL-7, and culturing said one or more target antigens with the

WO 02/22648

PCT/US01/28016

mixture for sufficient time to generate CD8<sup>+</sup> T lymphocytes (TL) having antigenic specificity for, and/or selective immune reactivity toward one or more target antigens.

5 The invention further provides a method of treating a patient having a disease mediated by a pathologically aberrant cell. The method consists of administering an effective amount of a CD8<sup>+</sup> T lymphocytes produced by the methods of the invention wherein the CD8<sup>+</sup> T lymphocytes have antigenic specificity for, and/or cytolytic activity toward a pathologically aberrant cell.

10

**BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS****FIGURE 1 - Panel A, Panel B, Panel C and Panel D:**

Shows cytotoxic activity of CD8 cells induced by immature dendritic cells and dendritic cells treated with LPS, TNF, or CD40L, and the cytotoxic activity of CD8 cells induced by immature or CD40L-treated dendritic cells in the presence of IL-12, IL-7, or IL-12 and IL-7.

15

**FIGURE 2 - Panel A, Panel B, Panel C and Panel D:**

Shows cytolytic activities of LB-specific CTL lines derived from PBMCs of bone marrow transplant recipients, bone marrow cells of bone marrow transplant donors and from PBMCs of bone marrow transplant donors. Four donor/recipient pairs are represented in panels A-D.

20

**FIGURE 3:**

Shows that CTL numbers increase after each in vitro stimulation with LBs.

25

**FIGURE 4 - Panel A and Panel B:**

Shows that LB-specific CTL lines are CD8<sup>+</sup>, class I restricted.

**FIGURE 5 - Panel A and Panel B:**

Shows that CTL-mediated LB lysis is perforin dependent.

30

**DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION**

This invention is directed to methods of generating CD8<sup>+</sup> T cells for use in treating an individual having a disease mediated by a pathologically aberrant cell. Provided are methods for *ex vivo* production of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes (TL) that have antigenic specificity for, and/or cytolytic activity selective for a pathologically aberrant cell, such as a tumor cell, a cell lysate, a cell fraction, a cell component, or a vesicle, or a B cell, a cell producing a substance that mediates a disease or a condition, or cell rendered abnormal due to the effects of an infectious agent. In addition, a cell can be considered abnormal because it produces abnormal proteins or proteins that albeit normal under certain circumstances, are involved with the induction or progression of disease. The CD8<sup>+</sup> T lymphocytes having cytolytic activity against a target cell, such as a pathologically aberrant cell, are referred to as a CTL. An advantage of this method is that CTLs selective for a whole pathologically aberrant cell can be generated, eliminating the need to identify a specific tumor or disease-related antigen. This method also eliminates unknown factors associated with processing and presentation of peptide antigens. Another advantage of the method is that CTLs generated against a whole target cell can provide a poly-specific response against a pathological target. Furthermore, induction of CTLs using the whole cell allows for the selection of the CTLs that are present in each individual's CD8<sup>+</sup> T cell repertoire. In fact, it is known that, in some patients, some CTL specificities may be absent due to tolerance. Moreover, generating CTLs against the whole tumor cell allows for the induction of CTLs specific for individual mutations that have occurred in the target cell.

The invention also provides methods for generating CD8<sup>+</sup> CTLs, and their precursor antigen-specific CD8<sup>+</sup> TL, that can be maintained *in vitro* for longer periods of time, which is a characteristic of CD8<sup>+</sup> memory cells. CD8<sup>+</sup> memory cells are progenitors for the expansion of CTLs that, when administered therapeutically, can provide a patient with long-term immunity against a selectively targeted pathologically aberrant cell. CD8<sup>+</sup> memory cells refer to a CD8<sup>+</sup> cell that has the capacity to proliferate *in*

WO 02/22648

PCT/US01/28016

in vitro for at least five rounds of stimulation, maintaining its antigen specificity. The stimulation can be maintained by the antigen or by non-specific means including, for example by mitogens or antibodies directed against the T cell receptor or co-stimulatory molecules or by procedures well known to those skilled in the art.

5

Selective CTLs and antigen-specific CD8<sup>+</sup> TL, that recognize pathologically aberrant cells are useful for adoptive immunotherapy approaches to treating cancer, as well as other diseases in which the elimination of abnormal or pathologically aberrant cells can provide effective treatment. CTLs that selectively destroy a pathologically

10

aberrant cell are useful for treating disease because the elimination of diseased cells can reduce symptoms associated with the presence or unwanted proliferation of pathologically aberrant cells. The generation of CTLs selective for pathologically aberrant cells for use in adoptive immunotherapy will increase the treatment options available for reducing the symptoms of, or curing, conditions in which destruction or

15

reduction of pathologically aberrant cells would provide benefit.

In one embodiment, the invention is directed to the ex vivo generation of CTLs with selective cytolytic activity toward tumor cells. Tumor-selective CTLs are prepared by incubating CD8<sup>+</sup> T cells and dendritic cells from the peripheral blood of a donor with

20

apoptotic tumor cells isolated from an individual having acute myeloid leukemia (AML) who will receive the product CTLs in an adoptive immunotherapy treatment. Dendritic cells and apoptotic pathologically aberrant cells are incubated together for sufficient time so that dendritic cells present antigens of the pathologically aberrant cell. Isolated CD8<sup>+</sup> TL from the donor are added to the mixture of dendritic cells and

25

apoptotic pathologically aberrant cells in the presence of IL-7 and IL-12, and the populations are incubated for a sufficient time to produce antigen-specific CD8<sup>+</sup> TL and selective CTLs. The resulting tumor-selective CTLs can be administered to the bone marrow recipient to treat or reduce the severity of disease.

WO 02/22648

PCT/US01/28016

In another embodiment, the invention is directed to the ex vivo generation of CD8<sup>+</sup> memory T cells from which a population of CTLs selective for a tumor cell can be expanded. CD8<sup>+</sup> memory T cell populations prepared using the method of the invention can reproducibly survive repeated in vitro stimulation with antigen. The method involves culturing a mixture of dendritic cells, CD8<sup>+</sup> TL and CD4<sup>+</sup> T cells with target tumor cells in the presence of IL-7. The resulting CD8<sup>+</sup> cell population contains antigen-specific CD8<sup>+</sup> TL, CTLs selective to the tumor cell and, after two or more generations, contains CD8<sup>+</sup> memory TL that can be expanded ex vivo for five or more generations.

Anti-tumor CTL generated using the methods of the invention can be utilized to treat an individual having cancer. For example, adoptive immunotherapy can be used to introduce anti-tumor immunity to a patient with a hematopoietic cancer who has cancer relapse after receiving a bone marrow transplant. Anti-tumor CTL can be generated from the CD8<sup>+</sup> TL, dendritic cells, and CD4<sup>+</sup> T cells of the bone marrow donor combined with the tumor cells from the patient. In this case, in which tumor cells of the BMT recipient are HLA identical to the CD8<sup>+</sup> TL and CD4<sup>+</sup> T cells and dendritic cells of the bone marrow donor, naive donor CD8<sup>+</sup> TL exhibit a primary immune response against non-major HLA antigens. Using the methods of the invention, the generation of CD8<sup>+</sup> memory TL allows for long-term maintenance of these ex vivo induced primary responses.

For example, anti-tumor CTLs generated using the methods of the invention were found to be induced from the peripheral blood and bone marrow of the bone marrow donor, as well as from the peripheral blood of the bone marrow recipient, six months after the adoptive immunotherapy procedure. The generation of tumor-selective CTLs that have immunological memory will improve the probability that long-term protective immunity can be provided by adoptive therapy treatment.

WO 02/22648

PCT/US01/28016

As used herein, the term "pathologically aberrant cell" refers to a cell that is altered from normal due to changes in physiology or phenotype associated with a disease or abnormal condition of a mammalian cell or tissue. A pathologically aberrant cell can be distinguished from a normal cell due to an alteration that has occurred that causes a disease or abnormal condition, or that is the result of a disease or abnormal condition. From these pathologically aberrant cells can be made sub-cellular preparations, such as cell lysates, cell fractions, cell components or vesicles, using standard techniques known in the art, such as chemical and physical disruption, centrifugation, gradient separation and chromatography. Such sub-cellular preparations are useful in the methods of the present invention and can be substituted for whole cell preparations of pathologically aberrant cells.

Pathologically aberrant cells include cells that have a loss of regulation or control of a cellular function. Loss of control of a cellular function can lead to cellular changes that distinguish a pathologically aberrant cell from normal. Examples of cellular functions are proliferation and differentiation. Loss of control of proliferation can result in cellular changes that cause an abnormal condition of a cell or tissue. For example, cancer cells are abnormal and proliferate in an unregulated manner, which results in tissue destruction. As used herein, the term "tumor cell" refers to a cancer cell. Specific examples of cancers include prostate, breast, lung, ovary, uterus, brain and skin cancer. Similarly, the proliferation of cells mediating autoimmune diseases are aberrantly regulated, which results in, for example, the continued proliferation and activation of immune mechanisms with destruction of the host's cells and tissue. Autoimmune diseases include, for example, rheumatoid arthritis, diabetes, and multiple sclerosis.

Pathologically aberrant cells include, for example, cells that produce substances capable of mediating a disease or condition. An example of such a pathologically aberrant cell is a B cell that produces an IgE antibody responsible for the appearance of allergic symptoms. Pathologically aberrant cells also include cells and specific cell

WO 02/22648

PCT/US01/28016

types found in specific organs of the body, whether the organ is a vital or non-vital organ. For example, an organ may be comprised of several different cell types, such as epithelial, myocyte and/or fibroblast. One or more of these cells types may be pathologically aberrant, and as such can be targeted by the CD8<sup>+</sup> TL and CTL  
5 produced by the methods of the present invention.

Loss of regulation or control of cellular functions can also occur due to infection of a cell by a pathological agent. The term "pathological agent" refers to an infectious agent that causes disease. Examples of pathological agents include viruses, bacteria,  
10 fungi, amoeba, and parasites. Specific examples of infectious diseases include DNA or RNA viral diseases, bacterial diseases, and parasitic diseases.

The term "apoptosis" refers to the process of programmed cell death. Programmed cell death is a regulated process in which a cell responds to a specific physiological or developmental signal and undergoes a programmed series of events that leads to its  
15 death and removal from the organism. Examples of the cellular events that characterize apoptosis are cell shrinkage, mitochondrial break down with the release of cytochrome c, cell surface blebbing, chromatin degradation, and phosphatidylserine exposure on the surface of the plasma membrane. Apoptosis is distinct from necrosis,  
20 or cell death that results from injury, which is characterized by overall cell and organelle swelling, with subsequent early loss of membrane integrity followed by cell and organelle lysis. Necrosis, unlike apoptosis, is accompanied by an inflammatory response in vivo.

The term "CD4<sup>+</sup> T cells" refers to lymphocytes that produce the CD4 protein, and are able to interact with dendritic cells to induce antigen presentation by or maturation of the dendritic cells. Such CD4<sup>+</sup> T cells include, but are not limited to, cells isolated from natural sources such as blood, cell lines grown in culture, and CD4<sup>+</sup> T cell  
25 clones.

WO 02/22648

PCT/US01/28016

The term "selective", when used in reference to CD8<sup>+</sup> cytolytic T cell, is intended to mean a CD8<sup>+</sup> cytolytic T lymphocyte (CTL) that preferentially recognizes and has cytolytic activity toward a particular pathologically aberrant target cell, compared to a non-target cell. A selective CTL can distinguish, or can be made to distinguish, a target pathologically aberrant cell from a population of non-target cells, and does not substantially cross-react with non-target cells. When used in reference to immune reactivity or antigenic specificity, the term "selective" is intended to mean that a T cell receptor of a CTL or CD8<sup>+</sup> TL preferentially binds to a particular target antigen. A CTL that exhibits selective immune reactivity does not substantially cross-react with non-target antigens, and can distinguish a pathologically aberrant cell exhibiting the target antigen from a normal or non-target cell.

The term "ex vivo" when used in reference to a cell is intended to mean a cell outside of the body. Therefore, an ex vivo cell culture method involves harvesting cells from an individual. Ex vivo culture methods are applicable to a cell harvested from any tissue or organ of an individual. Cell culture conditions of ex vivo cultures include a variety of compositions. Cells can be in a heterogeneous mixture or can be isolated cells. Medium can be an undefined or defined cell culture medium or can contain added factors. Medium can contain factors that enhance the therapeutic potential of the cells. For example, factors can be used to promote growth, viability or differentiation. Added factors can include other cells, protein factors, and chemical reagents.

The term "sufficient time" is intended to mean a period of time that allows a CD8<sup>+</sup> T cell to be induced. The CD8<sup>+</sup> T cell induction process includes at least processing and presenting of an antigen by dendritic cells, recognition by CD8<sup>+</sup> T cells of an antigen, and activation of cytolytic activity. A sufficient time that allows for the completion of this process can be a small or large period of time because differences in the various cell populations of the methods will result in differences in rates of antigen uptake. Factors that can affect the sufficient time for CD8<sup>+</sup> T cell induction can be, for

WO 02/22648

PCT/US01/28016

example, the types of cells in a culture, the purity of various cell types, concentrations of cell types, and whether dendritic cells are immature or are presenting antigen at the time of culture. A sufficient time can occur instantaneously, within minutes, hours, days or weeks, depending on the composition of the reaction mixture. For example, when a CD8<sup>+</sup> T cell is added to a reaction mixture that contains prepared mature dendritic cells presenting antigen, priming of the CD8<sup>+</sup> T cells will occur in a relatively small period of time because the step of dendritic cell antigen uptake and processing has already occurred compared to a case in which a CD8<sup>+</sup> T cell is added to reaction mixture that contains immature dendritic cells and target pathologically aberrant cells or other antigen(s).

As used herein, term "isolated" refers to a cell that is separated from one or more components with which it is associated in nature. An isolated cell also includes a cell purified from non-cellular tissue components, such as connective tissue fibers. An isolated cell can be, for example, a primary cell, either freshly purified from non-cellular tissue components, or cultured for one or more generation. An example of an isolated cell is a cell that has been separated from blood, such as a cell of a preparation of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs).

The term "substantially" when used in reference to an isolated cell is intended to mean a cell represents 90-99% of a purified cell population. For example, a substantially isolated cell can be 90-95% pure, 95 % pure, 95-99% pure, or can be as pure as 99% or greater.

The term "substantially purified" when used in reference to CD40 Ligand (CD40L) or IL-12 is intended to mean that the proteins are substantially free of other components with which they are naturally associated. For example, CD40L and IL-12 proteins are normally found with other proteins in cells. These proteins may act as unwanted contaminants when CD40L or IL-12 is used to treat cultured cells.

WO 02/22648

PCT/US01/28016

The term "non-B-cell leukemia cell" refers to any cell type that is not a B cell-leukemia cell or a pre-B cell leukemia cell. A non-B-cell leukemia cell includes a normal non-cancerous B cell, and also includes a B cell of a non-leukemia cancer, such as a B-cell lymphoma cell. Non-B-cell leukemia cells include other types of

5 leukemia cells, such as T-cell leukemia cells. Non-B-cell leukemia cells can be any type of cancer cell that is not a B-cell or pre-B-cell leukemia cell, and can be non-cancer cells of any type, including cells that are pathologically aberrant due to a non-cancer condition or disease.

10 As used herein, term "antigen" is intended to mean a molecule that can be processed and presented by an antigen-presenting cell and subsequently recognized by a T cell receptor. Such a molecule can be for example, a polypeptide.

The term "target", when used in reference to the immune reactivity of a CD8<sup>+</sup> T cell is

15 any predetermined antigen. A predetermined antigen can be, for example, a cell or polypeptide.

As used herein, the term "naive" when used in reference to a CD8<sup>+</sup> T cell is intended to mean that a CD8<sup>+</sup> T cell, has either not seen a particular target cell or antigen in vivo. Therefore, a naive CD8<sup>+</sup> T cell must be exposed to a particular target cell or antigen ex vivo in order for it to be capable of CTL activity selective for the particular target cell or antigen.

20

As used herein, the term "in situ" when used in reference to selective CTL activity is

25 intended to mean that selective CTLs can destroy a target pathologically aberrant cell in an intact structure of the body. For example, a selective CTL can destroy a target cell in a heterogeneous population of cells. Specifically, a selective CTL can eliminate a pathologically aberrant cell, such as a tumor cell, from a tissue, such as blood or bone marrow.

WO 02/22648

PCT/US01/28016

As used herein, the term "treating" is intended to mean reduction in severity or prevention of a pathological condition mediated by a pathologically aberrant cell. Reduction in severity includes, for example, an arrest or decrease in clinical symptoms, physiological indicators, biochemical markers or metabolic indicators.

5 Prevention of disease includes, for example, precluding the occurrence of the disease or restoring a diseased individual to their state of health prior to disease.

As used herein, the term "effective amount" is intended to mean an amount of CD8<sup>+</sup> cytolytic T cells required to effect a decrease in the extent, amount or rate of spread of a pathological condition when administered to an individual. The dosage of a CTL preparation required to be therapeutically effective will depend, for example, on the pathological condition to be treated and the level of abundance and density of the target antigens as well as the weight and condition of the individual, and previous or concurrent therapies. The appropriate amount considered as an effective dose for a particular application of selective CTLs provided by the method can be determined by those skilled in the art, using the guidance provided herein. For example, the amount for administration can be extrapolated from in vitro or in vivo cytotoxicity assays as described below. One skilled in the art will recognize that the condition of the patient needs to be monitored throughout the course of therapy and that the amount of the composition that is administered can be adjusted according to the individual's response to therapy.

10  
15  
20

The invention provides a method of inducing the cytolytic activity of CD8<sup>+</sup> T cells specific for a pathologically aberrant cell ex vivo. The method consists of contacting an apoptotic pathologically aberrant cell with a mixture having at least dendritic cells (DC), CD4<sup>+</sup> T cells and CD8<sup>+</sup> T cells, and culturing said apoptotic pathologically aberrant cell with said mixture for sufficient time to generate CD8<sup>+</sup> cytolytic T cells (CTL) having selective cytolytic activity toward said pathologically aberrant cell.

25

WO 02/22648

PCT/US01/28016

The invention further provides a method of inducing CD8<sup>+</sup> T cells specific for a pathologically aberrant cell that is a non-B-cell leukemia cell.

- 5 The methods of the invention can be used to generate a population of CTLs selective for any apoptotic pathologically aberrant cell or non-B-cell leukemia pathologically aberrant cell, preferably when elimination of a pathologically aberrant cell can provide benefit to an individual. Such benefits can include reducing disease severity, disease symptoms, disease progression, or rate of disease progression. Particular
- 10 types of pathologically aberrant cells include, for example, those cells that are abnormally regulated compared to a normal cell. Pathologically aberrant cells can be cells that are changed from normal due to disease, or can be altered cells that cause disease by their presence, or cells that produce factors that cause disease. Therefore, the methods of the invention are applicable to pathologically aberrant cells that
- 15 mediate diseases such as cancer, autoimmune disorders, infectious diseases, and allergies.

- By specific mention of the above categories of pathological conditions, those skilled in the art will understand that such terms include all classes and types of these
- 20 pathological conditions. For example, the term cancer is intended to include all known cancers, whether characterized as malignant, benign, soft tissue or solid tumor. By exemplification, a non-exhaustive list of known cancers is provided below in Table 1. Similarly, and by analogy to the classes and types of cancers shown in Table 1, the terms infectious diseases and autoimmune diseases are intended to include all
- 25 classes and types of these pathological conditions. Those skilled in the art are familiar with the various classes and types of infectious and autoimmune diseases and allergies.

Table 1.

TUMOR AND CANCER TYPES
adrenal tumor, acoustic neuroma, adenocarcinoma, acral lentiginous melanoma, arthenoblastoma, atrial myxoma, astrocytoma
basal cell cancer, benign ear tumors, bile duct cancer, bone neoplasm, bone tumor, brain tumor (primary, secondary and metastatic), breast cancer, bronchogenic carcinoma, Burkitt's tumor
cancer of the cervix, cancer of the esophagus, cancer of the kidney or ureter, cancer of the penis, cancer of the perineum, cancer of the testicle, cancer of the vulva, carcinoma of the renal pelvis or ureter, carcinoma of the stomach, carcinoma of the testes, cerebellopontine angle tumor, colon cancer, colorectal cancer, choriocarcinoma, chorioblastoma, chorioepithelioma, craniopharyngioma, cancer of the uterus, cancer of the larynx or vocal chords.
endometrial cancer, ependymoma, Ewing's sarcoma
gastric cancer, glioblastoma multiforme
hepatocellular carcinoma, Hodgkin's lymphoma, histiocytic lymphoma, hypernephroma, heart tumor
intestinal cancer, islet cell tumors
large bowel neoplasm, leukemia, laryngeal cancer, liver cancer, lung cancer, lymphocytic lymphoma, lymphoblastic lymphoma, lentigo maligna melanoma
malignant melanoma, malignant plasmacytoma, meduloblastoma, meningioma, metastatic cancer to the lung, metastatic pleural tumor, multiple myeloma, myxoma
nephroblastoma, neuroglioma, non-Hodgkin's lymphoma, non-small cell lung cancer
Oligodendroglioma, osteosarcoma, osteogenetic carcinoma, oral cancer
Pancreatic cancer, pituitary tumor, plasma cell myeloma, prostatic neoplasm
renal cell carcinoma, renal neoplasm, retinoblastoma, reticulum cell carcinoma
Schwannoma, salivary duct tumor, sarcoma, sarcoma botryoides, seminoma, Sertoli-Leydig cell tumor, small cell lung cancer, squamous cell cancer, spinal cord tumor
Throat cancer, thyroid-medullary carcinoma, thyroid cancer, trophoblastic tumor
Wilms tumor

The methods of the invention are applicable to producing CTL cells that are selective for pathologically aberrant cells that are aberrantly regulated. Aberrantly regulated cells include, for example, cells that exhibit uncontrolled cell proliferation as well as cells that exhibit dysfunction in specific phases of the cell cycle, leading to altered

5 proliferative characteristics or morphological phenotypes. Specific examples of aberrantly regulated cell types include neoplastic cells such as cancer and hyperplastic cells characteristic of tissue hyperplasia. Another specific example includes immune cells that become aberrantly activated or fail to down regulate following stimulation. Such aberrantly regulated immune cells mediate autoimmune diseases. Aberrantly

10 regulated cells also includes cells that are biochemically or physiologically dysfunctional. Other types of aberrant regulation of cell function or proliferation are known to those skilled in the art and are similarly pathologically aberrant cells applicable to methods of generating CTLs of the invention.

15 Pathologically aberrant cells include aberrantly regulated cells such as those described above, and additionally include, for example, cells that are infected with a pathological agent, such as an infectious agent. Infectious agents that render a cell abnormal include, for example, those agents that require host cell machinery for survival or propagation. For example, viruses infect cells and cause cancer. Included

20 within such infectious agents is DNA viruses, RNA viruses and parasites. Specific examples of DNA viruses include adenoviruses and parvoviruses. Specific examples of RNA viruses include poliomyelitis, influenza and retroviruses. Viruses that rapidly mutate are applicable to the methods of the invention. The use of a pathologically aberrant cell as a source of antigen can provide CTL cells that are specific for

25 multiple epitopes on a cell infected with a rapidly mutating virus. Compared to a CTL population that selectively recognizes one target antigen, a CTL population selective for multiple target antigens can increase the probability that a virus-containing cell will be destroyed. Parasites that utilize eukaryotic host cell machinery for survival or propagation include, for example, trypanosomes. The cells infected by

30 these and other agents known in the art, which utilize host cell machinery, are

WO 02/22648

PCT/US01/28016

rendered abnormal because they are compromised in normal cellular function, which can manifest in morphological and biochemical changes. As such, CTLs generated by the methods of the invention can target these cells.

- 5 Pathologically aberrant cells include cells that are abnormal due to changes in proteins, such as changes in regulation of normal protein expression. Changes in protein expression include increased expression of a protein, expression of a foreign protein, expression of a protein not normally expressed in a particular cell type at a particular stage, and expression of a mutant protein. Pathologically aberrant cells
- 10 having changed protein expression from normal can also have cell surface antigens that are distinct from those of normal cells. Pathologically aberrant cells also include cells that are making a protein that causes a disease or condition, such as B cells making IgE antibodies specific for an allergen, or other types of antibodies that can mediate other diseases or conditions.
- 15 Pathologically aberrant cells that are non-B-cell leukemia cells, including non-pre-B-cell leukemia cells, can be B cells that are pathologically aberrant due to a disease or condition other than leukemia. For example, a non-B-cell leukemia cell can be a different type of B-cell cancer cell, such as a B-cell lymphoma cell. Non-B-cell
- 20 leukemia cells can be leukemia cells of a type other than B cell or pre-B-cell leukemia cells. For example, a non-B-cell leukemia cell can be a T-cell leukemia cell. A B-cell leukemia cell can be a B cell or pre-B cell that is not expressing CD40. Such a cell is incapable of responding to CD40L.
- 25 All of the above aberrant and abnormal cell classifications and cell types exhibit undesirable physiological characteristics and phenotypes that can lead to unwanted cell growth and complications. As such, these aberrantly regulated or abnormal cells will exhibit differences in antigen synthesis or expression compared to normal cells. These differences can be distinguished by CTL that are selective for the target
- 30 pathologically aberrant cells generated by the methods of the invention.

According to the methods of the invention, a population of CD8<sup>+</sup> T cells is induced to generate cytolytic T lymphocytes (CTLs) that are selective for a pathologically aberrant cell. A cell that is selectively recognized by a CTL will be destroyed by either direct cytotoxicity or by the induction of apoptosis. CTLs are mature CD8<sup>+</sup> TL  
5 that recognize antigen in the form of polypeptide fragments complexed with MHC class I molecules. The binding of an antigen to a T cell receptor (TCR) complexed on the surface of a CD8<sup>+</sup> TL is one event involved in the initiation of intracellular changes that lead to differentiation of CD8<sup>+</sup> TL to cytolytic T lymphocytes (CTLs). CTLs exhibit cytolytic activity toward cells that display a target antigen which can be  
10 bound by a TCR.

In order to generate CTLs that are selective for a pathologically aberrant cell, CD8<sup>+</sup> TL are primed by a pathologically aberrant cell in the presence of cells or factors that augment the CTL priming process. Therefore, priming is the exposure of CD8<sup>+</sup> T  
15 cells to become active CTLs that selectively recognize and lyse pathologically aberrant cells expressing the inductive antigen. One requirement for induction of CTL is the presentation of antigen by an antigen-presenting cell. Nearly all nucleated cells express MHC class I, but may not be capable of priming CD8<sup>+</sup> T cells because additional co-receptors, co-stimulatory molecules and other factors are necessary for  
20 efficient priming. Therefore, the use of a professional antigen presenting cell, which can express all of the required factors for priming, can increase the efficiency CTL priming in a mixture of cells cultured *ex vivo* for priming CTLs selective for a pathologically aberrant cell.

25 Dendritic cells are professional antigen-presenting cells (a term well known to and commonly used by those skilled in the art) that can efficiently process and present antigens and potently induce CD8<sup>+</sup> TL cytolytic responses. Presentation of antigens by dendritic cells can occur after dendritic cell phagocytosis of an apoptotic cell. Therefore, in combination with a dendritic cell, a pathologically aberrant cell which is

WO 02/22648

PCT/US01/28016

apoptotic, or which will undergo apoptosis, can be used as a target cell in the methods of the invention.

5 A cell that performs the function of a dendritic cell can be substituted for a dendritic cell in the methods of the invention. Such a substitute for a dendritic cell could be, for example, a cell that presents antigens or co-stimulatory molecules due to expression of a recombinant protein. Expression of recombinant proteins to produce such artificial antigen presenting cells is well known in the art and those of skill could determine a recombinant protein for expression in an artificial antigen-presenting cell  
10 for use in the methods of the invention.

The methods of the invention therefore utilize at least a CD8<sup>+</sup> TL, a dendritic cell and a pathologically aberrant cell, which is apoptotic or which will undergo apoptosis, for the induction of CTLs selective for the target pathologically aberrant cell. Other cells  
15 and factors added to this mixture can augment the efficiency of priming or level of CTL response of the initial CD8<sup>+</sup> T cells. For example, the inclusion of CD4<sup>+</sup> T cells in the CTL induction mixture can provide additional factors required for efficient priming and production of a CD8<sup>+</sup> memory CTL.

20 CD4<sup>+</sup> T cells provide T cell help that enables CD8<sup>+</sup> TL response to cellular antigens. In vivo, this T cell help results from the activation of dendritic cells by CD4<sup>+</sup> T cells and can be mediated by CD40-CD40L interaction. Several factors can substitute for a function provided by a CD4<sup>+</sup> T cell in an incubation of a mixture of cells for priming a CD8<sup>+</sup> T cell.

25 For example, in the ex vivo methods of the invention, CD40 Ligand (CD40L), a factor presented by a CD4<sup>+</sup> T cell to a dendritic cell that promotes dendritic cell maturation, was found to be sufficient for promoting dendritic cell induction of a CTL response. The function of CD40L can be substituted by a molecule, such as CD40  
30 antibody, that is capable of binding to and activating CD40 in a manner similar to that

WO 02/22648

PCT/US01/28016

of CD40L. Further, interleukin-12 (IL-12), a factor that can be produced by a mature dendritic cell, was also found to substitute for CD40L.

Therefore, in the methods of the invention, the addition of CD40L and IL-12 can substitute for at least one function of a CD4<sup>+</sup> T cell, although these factors may not effectively function to induce the production of CD8<sup>+</sup> memory TL. In addition, interleukin-7 (IL-7) was found to further increase the level of CTL response. It can be therefore advantageous to add an effective amount of IL-7 to an incubation of a mixture of cells assembled for the generation of a CTL selective for a pathologically aberrant cell to increase the efficiency of CTL production. The use of factors such as those mentioned above will be discussed in greater detail below.

The method of the invention provides mixtures of populations of cells that can generate a CTL selective for a pathologically aberrant cell. Cell mixtures contain populations of least CD8<sup>+</sup> cells, dendritic cells and pathologically aberrant cells that can be combined with other components, including CD4<sup>+</sup> T cells.

Preparations of CD8<sup>+</sup> L, dendritic cells, pathologically aberrant cells and CD4<sup>+</sup> cells can contain many different immunological cell types. Therefore, cell mixtures assembled for inducing a CTL selective for a pathologically aberrant cell can contain cell types other than the referenced cell types.

A cell for use in the methods of the invention can be a heterogeneous population of cells, an isolated cell or a substantially isolated cell. A heterogeneous population of cells can be a naturally occurring mixture of cells that contains many immunological cell types, such as bone marrow. An isolated cell can be a cell in a fractionated population, such as a cell in a preparation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC), or can be a population of cells that has been enriched in, or depleted of, a particular cell type. A substantially isolated cell can be a cell that is substantially free of other cell types, such as a cell that is purified.

Therefore, the cell mixtures of the invention can contain a variety of cells including referenced and non-referenced cells. The cell mixture can be assembled using a variety of cell preparations. Therefore, by altering the cell populations, it is possible  
5 to optimize a cell mixture for efficient CD8<sup>+</sup> priming and CTL generation.

Cell populations contained in a CTL induction mixture can be altered in several ways, such as by preparing a cell of increased or decreased purity and by treating a particular cell type in culture to promote a particular obtainable outcome. For  
10 example, a cell can be treated with a factor that promotes cell expansion to a particular density or number, cell differentiation, specific cell lineage differentiation, apoptosis, or any desired obtainable cell condition or phenotype. Conditions that promote growth or differentiation can include protein factors or chemical reagents in the growth medium of cultured cells. These factors and reagents can be components  
15 of a crude mixture, can be isolated, or can be substantially isolated. Examples of factors include crude mixtures such as serum, naturally occurring proteins, partially purified proteins, and substantially isolated proteins.

The preparations of cell populations in a mixture can effect the efficiency of CTL priming or generation. For example, both CD8<sup>+</sup> TL and dendritic cells can be prepared simultaneously in a single culture of PBMCs. Specifically, PBMCs harvested from an individual can be first depleted of CD4<sup>+</sup> T cells using known methods as discussed below. One purpose of CD4<sup>+</sup> T cell depletion is to promote the growth of CD8<sup>+</sup> TL by preventing CD4<sup>+</sup> T cells, which generally grow faster than  
20 CD8<sup>+</sup> TL, from overgrowing a CD8<sup>+</sup> cell population. The depleted PBMCs can then be combined with a pathologically aberrant cell. After incubating the PBMC mixture for a sufficient time that allows recognition of presented antigen by CD8<sup>+</sup> TL, CTLs selective for a pathologically aberrant cell are generated.

WO 02/22648

PCT/US01/28016

- An advantage of using one cell population for obtaining more than one cell type for assembling a mixture of cells for CTL generation is that isolation and culturing of additional cell populations is not required. In addition, by using cells from a single donor, it is known that cell types are HLA-identical, and the need to consider HLA matching of donor and recipient cell populations is therefore not required. The use of a cell mixture containing cell types from a single source is advantageous in a case in which it is difficult to obtain a source of cells, or to obtain a cell sample of sufficient amount.
- 10 Although the use of a mixture of CD8<sup>+</sup> TL, CD4<sup>+</sup> T cells and dendritic cells obtained from a single source provides convenience, a cell mixture can be altered to increase the efficiency of CTL generation. In order to increase the efficiency of CD8<sup>+</sup> TL priming, for example, populations of cells can be individually isolated and treated in culture. Methods for isolating CD4<sup>+</sup> T cells and CD8<sup>+</sup> TL, dendritic cells, and
- 15 pathologically aberrant cells are described in detail below. Each of the cell types of the methods of the invention can be treated in culture to enhance their particular contribution to the overall effectiveness of a mixture of cell populations to induce CD8<sup>+</sup> priming or generation.
- 20 Factors that promote or augment induction of selective CTL against a target pathologically aberrant cell can be added to a culture of a mixture of cell populations or to a specific cell population cultured independently prior to assembling a cell mixture. Factors that can be useful in the methods of the invention are cytokines, growth factors, differentiation factors, proteins involved in maintenance of cell
- 25 viability, and apoptosis-promoting factors.
- Examples of cytokines that can be present in an *ex vivo* cell culture of the methods of the invention include, for example, GM-CSF and interleukins such as IL-2, IL-7, and IL-12. Examples of growth factors that can be present in an *ex vivo* cell culture
- 30 include, for example, those proteins that cause or contribute to cell growth of

particular cell type employed in the methods of the invention. Specific examples of growth factors are fibroblast growth factor, platelet-derived growth factor, and transforming growth factor  $\beta$ . Examples of differentiation factors are those proteins that contribute to or augment the process of cell differentiation in a particular cell type of the method. A specific example of a differentiation factor is serum-derived factor.

5 Examples of factors that contribute to the maintenance of cell viability include growth hormone and interferon alpha. Specific examples of factors used for inducing apoptosis are provided in detail below.

10 Factors for use in cell culture can be prepared or isolated from natural sources or produced by recombinant methods. Specific factors, such as the cytokines IL-7 and IL-12 can be, for example, provided by a natural cell or provided in substantially purified form, such as being isolated following production by recombinant methods. Protein production by recombinant methods, detection of specific proteins in cells,

15 and protein isolation by biochemical methods are well known in the art. Many factors can be obtained through commercial sources. Feeder cells can also supply proteins to cultured cells in membrane bound or secreted forms. Examples of cells that provide such factors are irradiated feeder cells such as irradiated cells that cannot proliferate. A specific example of a feeder cell is an irradiated monocyte that adheres to a tissue

20 culture surface and presents or secretes factors that promote CD8+ TL priming.

The concentrations of factors used in the method of generating selective CTLs can vary depending on the particular cell types present in a mixture, the characteristics of a particular cell, the incubation time, purity of proteins and degree of isolation of

25 cells. The characteristics of particular cell types may vary from individual to individual, resulting in different growth or differentiation rates under identical culture conditions. Concentration of factors can be adjusted to account for differences in cell behavior due to any of these differences between cell populations used to generate CTLs selective for a pathologically aberrant cell. For example, the concentration of a

WO 02/22648

PCT/US01/28016

growth factor in a cell culture medium can be increased to promote a faster growth rate of a particular cell.

Factors can have one or more cellular functions. For example, a factor that promotes growth in a cell type may also promote differentiation in another cell type. The effect of a particular factor on a particular cell type can be determined by methods known in the art. Such methods include, for example, assay of cell number, viability, and phenotype. Specific examples of factors that can be added to the culture media of various cells including a dendritic cell and dendritic cell mixtures are described in more detail below.

For example, monocytes can be treated under conditions that promote efficient differentiation to dendritic cells. Monocytes present in or collected from PBMCs can be induced to differentiate into dendritic cells by adding GM-CSF and IL-4 for a sufficient time.

Dendritic cells can be treated in culture to increase the efficiency of uptake of antigen. Immature dendritic cells efficiently take up pathologically aberrant cells by phagocytosis, but process antigens, but present antigens less efficiently, whereas mature dendritic cells take up and process antigen less efficiently while presenting antigens more efficiently. Therefore, it is advantageous to present a pathologically aberrant cell to an immature dendritic cell prior to dendritic cell maturation. By preparing a mixture of an immature dendritic cell and a pathologically aberrant cell and allowing antigen uptake to occur prior to introducing dendritic cells to maturation factors, the efficiency of CD8+ TL priming can be increased.

Dendritic cells used in the methods of the invention can be immature or mature dendritic cells. Factors that induce dendritic cell maturation include, for example, TNF- $\alpha$ , LPS, and CD40L. The presence of a CD4+ T cell can also provide a dendritic cell maturation factor. Therefore, it can be advantageous to culture a

dendritic cell and a pathologically aberrant cell in the absence of a CD4<sup>+</sup> T or other maturation factor for a sufficient time in order to allow a dendritic cell to process an antigen. A dendritic cell having processed antigen can then be mixed with cells and factors that promote antigen presentation in addition to the additional cells and factors required for CTL generation. By first preparing dendritic cells that have been 5 incubated under conditions to optimize antigen presentation, the efficiency of CD8<sup>+</sup> TL priming can be increased.

The invention provides a method of inducing CD8<sup>+</sup> TL ex vivo. The method consists of: (a) contacting said pathologically aberrant cell with a first mixture having at least 10 dendritic cells (DC) and isolated CD4<sup>+</sup> T cells for sufficient time to produce DCs presenting pathologically aberrant cell antigen; (b) adding CD8<sup>+</sup> TL to produce a second mixture, and (c) culturing said second mixture for sufficient time to generate CD8<sup>+</sup> cytolytic T lymphocytes (CTL) having selective cytolytic activity toward said 15 pathologically aberrant cell.

An example of a cell mixture assembled for production of CTL selective for a pathologically aberrant cell is as follows. For example, one preparation of PBMCs can be fractionated to yield several cell populations. Cell populations can be isolated 20 or substantially isolated. Specifically, monocytes can be collected from PBMCs and induced to differentiate into dendritic cells by adding GM-CSF and IL-4 for sufficient time. This immature dendritic cell population can be combined with the apoptotic pathologically aberrant cells for a sufficient period of time to allow for the uptake and processing of the pathologically aberrant cell antigens. Depletion of CD4<sup>+</sup> T cells 25 from the PBMCs can provide both a CD4<sup>+</sup> T cell population and a CD4<sup>+</sup>-depleted PBMC population.

The resulting three cell populations can then be cultured individually. CD4<sup>+</sup> T cells can be treated, for example, by radiation, to render them non-dividing, and then 30 returned to the CD4<sup>+</sup>-depleted PBMCs. This PBMC population can be combined

WO 02/22648

PCT/US01/28016

with the dendritic cell population that has been incubated with the pathologically aberrant cells, and IL-7. The pathologically aberrant cell can be, for example, a tumor cell. The mixture of cells can then be incubated for sufficient time to allow selective CTL production against the pathologically aberrant cell. The population of cells can  
5 for example, be stored, further isolated or used to treat an individual.

A method for increasing the efficiency of CD8<sup>+</sup> TL priming involves enriching a population of CD4<sup>+</sup> T cells with CD4<sup>+</sup> T cells that recognize a specific peptide antigen associated with MHC class II molecules. In a population of CD4<sup>+</sup> T cells  
10 used in the methods of the invention, only a small fraction of cells will be specific for the antigen derived from the pathologically aberrant cell and presented on the dendritic cell in the mixture of cell populations assembled to generate CTLs selective for a pathologically aberrant cell. To increase the number of antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cells in the total CD4<sup>+</sup> T cell population, a method of CD4<sup>+</sup> T cell enrichment can be  
15 used. For example, a CD4<sup>+</sup> T cell population can be increased using an immunogen, such as tetanus toxoid. A population of CD4<sup>+</sup> T cells from an individual that was previously immunized against tetanus toxoid can be obtained, cultured *ex vivo*, and treated with tetanus toxoid to result in an enriched population of MHC Class II restricted CD4<sup>+</sup> T cells that can more effectively provide the maturation signal to  
20 immature dendritic cells. A cloned CD4<sup>+</sup> T cell that is specific for an MHC class II restricted antigen can be obtained, expanded and stored for repeated use. One of skill in the art would know how to obtain a clonal cell line, expand cells and prepare cells for long-term storage.

25 The production of CTLs in an *ex vivo* cultured mixture occurs during incubation for a time period sufficient for CD8<sup>+</sup> TL to recognize presented antigen and trigger commitment into CTLs. For example, the induction of selective CTLs from a cell mixture of at least dendritic cells, apoptotic pathologically aberrant cells, CD4<sup>+</sup> T cells and CD8<sup>+</sup> TL could occur in a time period of about 6 to 40 hours, preferably in about  
30 20 hours. The time periods sufficient for commitment of CTL induction from a

WO 02/22648

PCT/US01/28016

mixture of cells can be modulated by adjustment of several factors, including, for example, the amount of antigen or co-stimulatory molecules presented to a dendritic cell in a mixture of a population of cell types.

- 5 Those skilled in the art will know what factors, cellular compositions or concentrations, for example, can be used to achieve a desired incubation time. Moreover, those skilled in the art will know or can determine what factors, cellular compositions or concentrations, for example, can be adjusted to either increase or decrease the time period sufficient to prime CD8<sup>+</sup> TL and commit them into maturing
- 10 CTLs selective for a target pathologically aberrant cell.

For example, to determine the incubation time required for CTLs to be produced, cells can be removed from culture at various time points, for example, at 5, 15, 30, and 45 minutes, and at hourly intervals for one or more days or weeks, and tested for CTL

15 activity or interferon gamma production after recognition of the target antigen. Pathologically aberrant cells that display the target antigen will be destroyed by selective CTLs, either through lysis of, or induction of apoptosis in, target cells. CTL activity can be measured by methods well known in the art. Methods for measuring cytotoxic activity are discussed below and in the examples in detail.

- 20 Specific factors that can be used in the methods of the invention include IL-7, IL-12, and CD40L. The concentration of IL-7 used in an *ex vivo* cultured mixture of at least dendritic cells, apoptotic pathologically aberrant cells, and CD8<sup>+</sup> TL, with or without CD4<sup>+</sup> T cells can be, for example, 1-30 ng/ml, 30-65 ng/ml or 65-100 ng/ml. The
- 25 concentration of IL-12 in an *ex vivo* cultured mixture of dendritic cells, apoptotic pathologically aberrant cells, and CD8<sup>+</sup> TL, for example, can be 1-30 pg/ml, 30-65 pg/ml or 65-100 pg/ml. The effective amount of CD40L presented as a cell surface protein on a natural cell or recombinant cell expressing CD40 L for use in an *ex vivo* cultured mixture of dendritic cells, apoptotic pathologically aberrant cells, and CD8<sup>+</sup>
- 30 TL can be determined by those of skill in the art. Those of skill in the art will know

WO 02/22648

PCT/US01/28016

that the level of expression of CD40L in recombinant cells can be modulated, and that CD40L cells can be titrated into a reaction mixture to determine the effective concentration of cells to be added. Those of skill in the art will be able to extrapolate from such an effective concentration of cells to determine an effective amount of  
5 isolated or substantially isolated CD40L protein for inducing CTL selective for a pathologically aberrant cell using the methods of the invention.

For use in the methods of the invention, a cell can be irradiated. It can be advantageous to irradiate a particular cell prior to assembling the cell mixture for  
10 inducing CTL selective for a pathologically aberrant cell when growth of the particular cell during the induction period is not desired. For example, a cell such as a dendritic cell, CD4<sup>+</sup> T cell, and pathologically aberrant cell can be irradiated because growth or expansion of these cell types may not be desired because increased cell numbers may not be necessary for the induction process to occur and expansion of  
15 cell types that grow at faster rates than a CD8<sup>+</sup> T cell could provide unnecessary contamination of a generated CTL population.

As discussed previously, cells for use in the methods of the invention can be a cell mixture or an isolated cell. The preparation of CD8<sup>+</sup> TL and CD4<sup>+</sup> T cells, dendritic  
20 cells and pathologically aberrant cells can include isolation of a cell. A cell for use in the methods of the invention can be isolated by several methods well known in the art, such as, for example, density centrifugation, centrifugal elutriation, fluorescent-activated cell sorting, immunofluorescence cell separation, and magnetic sorting (Schindhelm and Nordon, *Ex vivo Cell Therapy*, (1999) Chapter 11 Academic Press,  
25 San Diego).

Density gradient centrifugation is based on the migration of cells of a particular density when centrifuged in a solution of varying density. Cells will tend to collect in a band at the zone of the gradient at which cell density and the density of the medium

WO 02/22648

PCT/US01/28016

are equal. Examples of density gradient centrifugation methods include loading cells onto gradients prepared with reagents such as Ficoll, Ficoll-Hypaque, and Percoll.

5 Centrifugal elutriation is a method based on the relative differences in cell sedimentation velocity that has been well developed for separating blood cells. Fluorescent-Activated cell sorting (FACS) is a selective cell separation method by which cells labeled with fluorescent marker molecules are individually analyzed and sorted on the basis of light scatter properties and fluorescence.

10 Immunoaffinity cell separation is based on the interaction of cells with a substrate, such as a monoclonal antibody, lectin, or other binding domain, that is immobilized to a material with low intrinsic cell affinity. Cells selectively attach to the substrate through binding of cell surface molecules to a substrate bound to the solid-phase support. Captured cells are detached using shear stress or chemical agents that disrupt  
15 the interaction between the cell and substrate.

Magnetic sorting is a method of cell separation in which cells are labeled with an affinity substrate that contains paramagnetic or ferromagnetic material. Magnetically labeled cells can be depleted from a cell population through capture by a magnetic  
20 field, or labeled cells can be recovered by removal of a magnetic field. Dynabeads are a specific example of a magnetic cell separation medium that is commercially available.

Examples of specific methods of CD8<sup>+</sup> T<sub>H</sub> isolation are negative magnetic cell  
25 selection methods, such as depletion of CD4<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, or CD56<sup>+</sup> cells, using beads coated with antibodies to cell surface proteins present on the cells to be depleted, or positive magnetic cell selection methods, such as positive selection for CD8 with magnetic beads coated with antibodies to CD8.

WO 02/22648

PCT/US01/28016

An example of a method for isolating dendritic cells is to collect PBMC, such as by Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation and culture them under conditions that promote dendritic cell differentiation, as described above. Dendritic cells can be further isolated from PBMC by other known methods, such as depletion of other cell types, including CD2-, CD19- and CD56-positive cells.

Specific methods for isolating CD4<sup>+</sup> T cells are, for example, negative magnetic cell separation to reduce or remove CD8<sup>+</sup> TL from a cell population, and positive magnetic cell separation, to obtain an enriched population of CD4<sup>+</sup> T cells.

The method for isolating a pathologically aberrant cell will be determined by the cell type and by the desired purity of the preparation. Those of skill in the art will know which methods, including those methods described above, are applicable to the isolation of a particular pathologically aberrant cell.

The populations of CD8<sup>+</sup> TL and CD4<sup>+</sup> T cells, dendritic cells and pathologically aberrant cells used in the method of the invention can be obtained from multiple sources. For example, cells can be obtained from an individual afflicted with a pathological condition to be treated using a CTL, or from an individual that is substantially histocompatible to the recipient individual. Such an individual might be, for example, an HLA-identical sibling, or HLA-matched relative, or HLA-matched unrelated individual. Methods for typing histocompatibility antigens are well known in the art. Using such antigen typing methods, those skilled in the art will know or can determine what level of antigen similarity is necessary for a cell to be immunologically compatible with a recipient individual. The tolerable differences between a donor cell and a recipient can vary with different tissues and are known or can be readily determined by those skilled in the art. Methods for assessing transplantation antigen compatibility are well known to those skilled in the art.

WO 02/22648

PCT/US01/28016

A cell for use in the methods of the invention can be obtained from a variety of tissues or organs of an individual. Those of skill in the art will know how to determine which source of a particular cell type is most suitable for the preparation of CTLs selective for a pathologically aberrant cell. It may be possible to harvest a cell from more than  
5 one source in an individual, such as more than one tissue. Those of skill in the art will be able to determine which specific source of a particular cell is preferred by considering the number of cells needed and the accessibility of the cell type in the body of an individual. For example, a particular cell type may be more abundant in one tissue compared to another tissue, or a particular tissue may be more accessible  
10 for cell harvest. An example is that a tissue such as blood is more accessible than a tissue such as bone marrow because blood cells can be removed from an individual by a relatively non-invasive procedure.

CD8<sup>+</sup> TL and CD4<sup>+</sup> T cells can be obtained, for example, from the blood, bone  
15 marrow, or other tissue, of an individual such as a histocompatible individual or a CTL recipient. The preferred CD8<sup>+</sup> TL of the method are CD8<sup>+</sup> TL that are HLA-matched with the recipient of selective CTLs. CD4<sup>+</sup> T cells can be CD8<sup>+</sup>-autologous, or can be heterologous. A CD4<sup>+</sup> T cell for use in the methods of the invention are allereactive to a dendritic cell, or share MHC class II.

20 Dendritic cells, or monocytes capable of differentiating into dendritic cells, can be obtained from several tissues of an individual for use in the methods of the invention. For example, dendritic cells or monocytes can be obtained from the blood, bone marrow, or other tissue from an individual.

25 A pathologically aberrant cell to be used in the methods of the invention can be obtained from many sources. One source is an individual who will receive adoptive immunotherapy using CTLs generated by the methods of the invention. A pathologically aberrant cell can be a cell from a homogeneous or heterogeneous  
30 population of cells, or can be an isolated cell. Pathologically aberrant cells include

cells removed from an individual, such as from a tumor or other diseased tissue or organ. The method of inducing CTL selective for pathologically aberrant cells applies to cells, homogeneous and heterogeneous cell populations, cells from natural sources such as tissues and organs, cultured cells, cultured cells that have been altered, such as  
5 by infection by a pathological agent or by transduction with nucleic acids. In addition, a wide variety of antigens, including but not limited to, cell lysate, vesicles, cell fractions or cell components, a protein or a mixture of peptides eluted from the aberrant cell can be used.

10 Pathologically aberrant cells of the invention can be apoptotic pathologically aberrant cells. Apoptotic pathologically aberrant cells can be present in a population of pathologically aberrant cells, can be isolated from a population of pathologically aberrant cells or can be induced in pathologically aberrant cells by several methods. Induction of apoptosis has been accomplished in a variety of ways, depending on the  
15 cell type (for review see McConkey et al. (1996) Molecular Aspects of Medicine 17:1).

Apoptosis can be triggered by the binding of cell death activators such as TNF, lymphotoxin, and Fas ligand to the extracellular domains of receptors that are integral  
20 membrane proteins. Cell death receptor activation leads to transmission of a signal to the cytoplasm resulting in activation of caspase enzymes, and a cascade of signaling events that culminate in death of a cell. Those skilled in the art will know which reagents induce apoptosis in a particular cell type or types. Examples of reagents that have been used to induce apoptosis in one or more cell lines include actinomycin D,  
25 aphidicolin, A23187, caffeine, camptothecin, cycloheximide, dexamethasone, doxorubicin, 5-fluorouracil, hydroxyurea, staurosporine, taxol, thymidine, and vinblastine (Oncogene Research Products web site).

Several methods well known in the art can be used to detect apoptotic cells. Such  
30 methods include light and electron microscopy to detect morphological changes that

occur during apoptosis, flow cytometry or density gradient centrifugation to detect characteristic cell shrinkage and increased granularity, assessment of membrane integrity using dyes such as trypan blue, ethidium bromide and acridine orange, measurement of the characteristic, nonrandom DNA fragmentation using techniques  
5 including agarose gel analysis, *in vitro* and *in situ* DNA end-labeling, PCR analysis, comet assays and ELISA systems, the detection of the activity of a caspase from the caspase family of protease enzymes that are activated during apoptosis, the detection of a phosphatidylserine binding protein such as annexin V, measurement of tissue transglutaminase activity, and measurement of calcium ion flux (Promega Notes 69:  
10 technically speaking-detecting apoptosis).

Apoptotic cells can be separated from non-apoptotic cells using cell separation methods such as those described above. Therefore, an apoptotic pathologically aberrant can be present in a population of pathologically aberrant cells that naturally  
15 contains apoptotic cells, or in cells induced to contain apoptotic cells, and can be isolated from such sources for use in the methods of the invention.

The methods of the invention result in the generation of CTL selective for a pathologically aberrant cell. A CTL can be a heterogeneous population of cells, an  
20 isolated cell or substantially isolated cell. A CTL population can contain CTLs that are selective for one or more antigens on a target pathologically aberrant cell. Purification of a CTL that is specific for a pathologically aberrant cell can be performed by selecting a CTL that exhibits cytolytic activity against the target cell or antigen. Methods for selecting a CTL specific for a target and assays for measuring  
25 cytolytic activity of CTLs are well known in the art. A selected population of CTL can be purified using methods well known in the art, including the separation methods described above. A heterogeneous or isolated population of CTL produced by the methods of the invention can be characterized *in vitro* to determine the effectiveness of a particular CTL preparation in destroying target pathologically aberrant cells.

An example of a cytolytic activity assay is a chromium-51 ( $^{51}\text{Cr}$ ) release assay. In this method, which is described in more detail in Example II, CTL-mediated activity is determined by measuring the lysis of cultured  $^{51}\text{Cr}$ -labeled target cells. Another assay for measuring the function of CTLs is a target cell proliferation assay. A target cell proliferation assay measures the ability of a CTL to inhibit proliferation of target cells *in vitro*. Briefly, target cells are collected from an appropriate source, including for example, cell lines and primary cells isolated from an individual, and suspended in growth medium to achieve a concentration of about  $10^4$  viable cells/ml for each sample to be tested. However, the amount and concentration of target cells can be adjusted according to the availability of target cells. CTLs are added to a sample at a concentration of about  $10^6$  viable cells/ml, or different ratios of CTL to target cells can be plated to determine target cell proliferation at differing CTL concentrations. The ratios of effector to target cells can be between about 500:1 to 0.1:1. Cells are typically incubated for about 1 to 24 hours.

It can be desirable to have control over the lifespan of a CTL generated using the methods of the invention. One method for controlling the viability of a cell is to introduce a suicide gene that metabolizes a compound taken up by a cell to produce a toxin that kills the cell. For example, introduction of a thymidine kinase gene into a CTL can render the CTL susceptible to killing by addition of ganciclovir. Using this method, a CTL expressing thymidine kinase can be eliminated if the CTL or the associated target-selective cytolytic activity are not needed or desired. The use of the thymidine kinase gene and the suicide substrate ganciclovir is well known in the art. Methods of transducing a vector containing a thymidine kinase gene into a cell are well known in the art.

$\text{CD8}^+$  memory CTLs selective for a pathologically aberrant cell can also be generated using the methods of the invention. A  $\text{CD8}^+$  memory CTL selective for a pathologically aberrant cell can be obtained by culturing CTL having selective cytolytic activity toward a pathologically aberrant for two or more generations. A

WO 02/22648

PCT/US01/28016

CD8<sup>+</sup> memory CTL has the capability to respond to antigen more efficiently than a naïve CD8<sup>+</sup> TL, and can be re-stimulated with antigen in an ex vivo culture. A CD8<sup>+</sup> memory CTL can be distinguished from a CTL in an ex vivo culture because a CD8<sup>+</sup> memory CTL have the ability to undergo multiple restimulations, typically at least  
5 five restimulations. Isolation of a memory CD8<sup>+</sup> TL selective for a pathologically aberrant cell can be achieved by methods well known in the art, including those methods described above.

A CTL that is selective for a target antigen of a pathologically aberrant cell is useful  
10 for the same therapeutic applications as a CTL selective for a pathologically aberrant cell because the result of target antigen recognition is lysis of a cell by the CTL selective for the target antigen. Therefore, CTLs selective for a target antigen generated in ex vivo culture can be useful for adoptive immunotherapy.

As discussed previously, the use of CTLs specific for target antigens that are peptide  
15 antigens have not been predictably successful. This approach could be improved by the inclusion of a factor that could increase the probability of producing a CTL selective for a target antigen. The methods of the invention provide the advantage of increased efficiency of CTL production by utilizing IL-7 in a mixture of cells in ex  
20 vivo culture. The use of IL-7, as provided in the methods of the invention, increases the efficiency of producing CTL response toward target cells and thus increases the probability that a CTL selective for a target antigen will be produced.

The invention provides a method of inducing CD8<sup>+</sup> TL selective for one or more  
25 target antigens ex vivo. The method consists of contacting said one or more target antigens with a mixture having at least dendritic cells (DC), CD4<sup>+</sup> T cells, CD8<sup>+</sup> TL and IL-7, and culturing said one or more target antigens with said mixture for sufficient time to generate CD8<sup>+</sup> cytolytic T lymphocytes (CTL) having selective immune reactivity toward said one or more target antigens.

WO 02/22648

PCT/US01/28016

The invention provides a method of identifying an antigen selective for a pathologically aberrant cell. CTLs that have been generated against the pathologically aberrant cell or its products, using the methods of the invention, can be used to identify the antigen that they recognize. This can be achieved using procedures that are known to those skilled in the art. One such method consists in purifying the Class I MHC from the pathologically aberrant cell and releasing the peptides associated with it. The peptide mixture is then separated in fractions and analyzed to determine the fraction containing the antigenic peptide. The peptide sequence is then determined using available techniques (such as the techniques of Argonex, Charlottesville, VA which are commercially available; and Hunt et al., *Science* (1992) 255:5049). The limiting material for utilizing these techniques is the antigen-specific CD8<sup>+</sup> TL, which are provided using the methods of the present invention.

Another method consists of: (a) treating a pathologically aberrant cell with a mutagenizing agent to produce a mutant population of pathologically aberrant cells; (b) contacting said mutant population of pathologically aberrant cells with a CTL selective for said pathologically aberrant cell to identify a mutant pathologically aberrant cell that has lost reactivity with said CTL; (c) introducing an expressible population of nucleic acids coding for a pathologically aberrant cell polypeptides into said mutant cell to produce a population of mutant cells expressing said polypeptides, and (d) identifying a mutant cell expressing a pathologically aberrant cell polypeptide that restores reactivity with said CTL reactive for said pathologically aberrant cell.

A population of CTLs selective for a pathologically aberrant cell or target antigen can be used to identify an antigen selective for the pathologically aberrant cell. Populations of CTLs used for identifying selective antigens can exhibit, for example, poly-specific or monospecific reactivity toward the pathologically aberrant cell. The method for identifying an antigen of a pathologically aberrant cell or unknown target antigen involves obtaining a population of target pathologically aberrant cells that has been mutagenized so that an antigen recognized by a CTL selective for a

WO 02/22648

PCT/US01/28016

pathologically aberrant cell is no longer present, introducing a cDNA library into the antigen-deficient pathologically aberrant cells, and selecting a pathologically aberrant cell that expresses a cDNA which restores the ability of a CTL to recognize the pathologically aberrant cell. A cDNA is then rescued from the cell and sequenced to  
5 determine the identity of a target antigen.

Mutagenesis of a population of pathologically aberrant cells can be performed using methods well known in the art. For example, cells can be mutated by methods such as irradiation or treatment with chemical mutagens, such as ethyl methanesulfonate. A  
10 mutated cell that, still retains Class I and the antigen processing machinery, and is not recognized by a CTL selective for the pathologically aberrant cell can be identified because it will not be lysed by a CTL. The introduction of a cDNA library into the antigen-deleted cells can be performed by methods well known in the art, such as transfection using chemical reagents and electroporation. A transduced cell that can  
15 be recognized by a CTL contains a cDNA encoding a protein that is recognized by the CTL. The identification of an antigen-restored cell can be performed by screening a transduced cell population using the functional activity of the CTLs selective for the pathologically aberrant cell. Rescue and sequencing of the cDNA is then performed using methods well known in the art.

The invention provides a method of identifying an antigen selective for a pathologically aberrant cell. The method consists of: (a) contacting one or more antigens suspected of being selective for a pathologically aberrant cell with a CTL selective for a pathologically aberrant cell expressing said one or more antigens, and  
20 (b) determining the immunoreactivity of said CTL selective for a pathologically aberrant cell expressing said one or more antigens toward said one or more antigens, wherein a CTL having selective immunoreactivity for said one or more antigens characterizes said one or more immunoreactive antigens as being selective for said pathologically aberrant cell.  
25

WO 02/22648

PCT/US01/28016

A population of CTLs selective for a pathologically aberrant cell or for one or more target antigens generated using the methods of the invention can also be used to identify or corroborate the selectivity of one or more target antigens suspected of being selective for a pathological aberrant cell and therefore, associated with a particular disease or condition. Briefly, the method involves screening one or more target antigens with a CTL population or CTL clone selective for a pathologically aberrant cell expressing the suspect one or more antigens. Selective immunoreactivity of the CTLs towards the suspect antigen indicates or confirms the selectivity of the antigen for the pathologically aberrant cell. Similarly, the suspect antigens can be screened by first expressing the antigens in a host cell and then determining the cytolytic activity of the CTLs towards the cells expressing the suspect antigens. Selective cytolytic activity indicates or confirms the selectivity of the one or more antigens for the pathologically aberrant cell. Cells that express one or more suspect antigens can be, for example, naturally occurring cells or cells modified with expressible nucleic acids encoding the suspect target antigen. Methods for modifying cells with nucleic acids and identifying the expression of polypeptides in cells are well known in the art.

An antigen identified using the above method can be used as a target for the development of therapeutic agents. For example, libraries of small molecule compounds and peptides can be screened to identify molecules that specifically bind to an antigen, or specific therapeutic antibodies can be raised to the antigen. An antigen identified using this method can also be used for the development of diagnostic methods.

CTL selective for a pathologically aberrant cell generated using the methods of the invention are applicable for the treatment of human conditions or diseases that involve the pathologically aberrant cell. CTL that are determined to have selective cytolytic activity *in vitro* or *in situ* functional assays such as those described above are likely to have selective cytolytic activity in an individual because a CTL will recognize the

WO 02/22648

PCT/US01/28016

target cell or antigen in a heterogeneous population. Therefore, provided in the invention are methods for treating an individual with a CTL, including a memory CTL, selective for a pathologically aberrant cell or target antigen, generated using the methods of the invention.

5

The invention provides a method of treating a patient having a disease mediated by a pathologically aberrant cell. The method consists of administering an effective amount of a CD8<sup>+</sup> CTL having selective cytolytic activity toward said pathologically aberrant cell, said CD8<sup>+</sup> CTL having selective cytolytic activity toward said pathologically aberrant cell being produced using the methods of the invention.

10

The invention further provides method of treating a patient having a disease mediated by a pathologically aberrant non-B-cell leukemia cell. The method consists of administering an effective amount of a CD8<sup>+</sup> CTL having selective cytolytic activity toward said pathologically aberrant non-B-cell leukemia cell, said CD8<sup>+</sup> CTL having selective cytolytic activity toward said pathologically aberrant non-B-cell leukemia cell being produced by the methods of the invention.

15

The invention further provides a method of treating a patient having a disease mediated by a pathologically aberrant cell. The method consists of administering an effective amount of a CD8<sup>+</sup> CTL having selective immune reactivity toward one or more target antigens associated with said pathologically aberrant cell, said CD8<sup>+</sup> CTL having selective immune reactivity being produced by the methods of the invention.

20

As previously described, there are many types of pathologically aberrant cells, all of which are distinguished from normal cells. Pathologically aberrant cells can be treated with a CTL because a CTL selective for a pathologically aberrant cell can selectively recognize and destroy that cell within a population of normal cells. Therefore, the use of CTLs that selectively target pathologically aberrant cells is

25

WO 02/22648

PCT/US01/28016

applicable to treating individuals in which the destruction of such cells can reduce the severity of disease or slow the rate of disease progression.

Those of skill in the art will know how to determine if treatment with CTLs selective  
5 for a pathologically aberrant cell is beneficial for a particular pathological condition,  
and will know how to determine the presence of a pathologically aberrant cell in an  
individual having a pathological condition. Those of skill will be able to determine if  
pathologically aberrant cells of a disease can be eliminated without causing unwanted  
10 effects in an individual. For example, it is advantageous to remove a tumor cell that  
serves no beneficial function in the body. However, eliminating a cell that is diseased  
but nevertheless provides a function in the body, such as an essential cell of an organ,  
is not generally desired. However, there are certain non-vital organs and cells from  
vital or non-vital organs that can be removed without affecting the survival of the  
15 individual, including for example, but not limited to, the prostate, ovary, breast,  
thyroid, thymus, selected cell types of vital and non-vital organs, or B cells that  
synthesize IgE. In this case, CTLs that recognize a self-antigen that is shared by a  
diseased cell and a normal cell or tissue or organ can be used.

The amount of CTLs effective for treating a pathological condition is an amount  
20 required to affect a decrease in target cell population or slow the rate of increase in a  
target cell population. The therapeutically effective dose will depend, for example, on  
the pathological condition characterized by the pathologically aberrant cell to be  
treated, the route and form of administration, the weight and condition of the  
individual, and previous or concurrent therapies. For example, pathologically  
25 aberrant cells that are localized to one region in the body of an individual may be  
effectively treated by injection of CTLs at that particular site.

The injected dose can vary depending on the size of the population of pathologically  
aberrant cells such that a relatively large population of cells can require a relatively  
30 large dose of CTLs. The weight of an individual can effect the dosage of CTL

WO 02/22648

PCT/US01/28016

delivered by a systemic route, such as, for example, intravenous infusion. For example, for treating an individual with hematopoietic cancer in which pathologically aberrant cells are circulating in the blood, the effective dose would be determined, at least in part, by the body weight of the individual so that that the concentration of administered CTL is approximately the same for low body weight individuals, such as children, and higher body weight individuals, such as adults.

The appropriate effective dose for a particular application of the methods can be determined by those skilled in the art, using the guidance provided herein. For example, the amount can be extrapolated from *in vitro* or *in vivo* assays as described previously. One skilled in the art will recognize that the condition of the patient can be monitored throughout the course of therapy and that the amount of CTL preparation that is administered can be adjusted accordingly.

An effective amount of CTLs selective for a pathologically aberrant cell to administer can be determined by those of skill in the art, who will know how to perform tests to determine the efficacy of a dose of CTLs used for treating a particular disease or condition. Those of skill in the art can also determine whether CTLs selective for a pathologically aberrant cell can be most effectively administered as a single dose or multiple doses.

A preparation of CTLs can be delivered systemically, such as by intravenous infusion, or can be administered locally at a site of the pathological condition, such as by injection. Appropriate sites for administration of a CTL preparation are known, or can be determined, by those skilled in the art depending on the clinical indications of the individual being treated.

A CTL selective for a pathologically aberrant cell can be administered as a suspension together with a pharmaceutically acceptable medium. Such a pharmaceutically acceptable medium can be, for example, a buffered saline solution. Pharmaceutically

WO 02/22648

PCT/US01/28016

acceptable mediums can be sterile or substantially free from contaminating particles and organisms. Those of skill in the art will know or be able to determine pharmaceutically acceptable media for CTL to be used in various modes of administration.

5

A pathological condition can be treated with a CTL, a memory CTL, or a combination of a CTL and memory CTL that are selective for a pathologically aberrant cell. A CTL and memory CTL can be administered simultaneously or on separate occasions. Administration of a memory CTL can provide the advantage of long term immunity against a pathologically aberrant cell and can thus prevent relapse of disease. Those of skill in the art will know or can determine which type of CTL to use for effective treatment of a particular disease or condition.

10

The methods of treating a pathological condition characterized by aberrant cell growth additionally can be practiced in conjunction with other therapies. For example, for treating cancer, the methods of the invention can be practiced prior to, during, or subsequent to conventional cancer treatments such as surgery, chemotherapy, including administration of cytokines and growth factors, radiation or other methods known in the art. Similarly, for treating pathological conditions, including infectious disease, the methods of the invention can be practiced prior to, during, or subsequent to conventional treatments, such as antibiotic administration, against infectious agents or other methods known in the art. Treatment of pathological conditions of autoimmune disorders also can be accomplished by combining the selective CTL cell elimination methods of the invention with conventional treatments for the particular autoimmune diseases. Conventional treatments include, for example, chemotherapy, steroid therapy, insulin and other growth factor and cytokine therapy, passive immunity, inhibitors of T cell receptor binding and T cell receptor vaccination. It may be advantageous to treat an individual receiving CTL selective for a pathologically aberrant cell with an immunostimulant. Those of skill in the art will be

15

20

25

WO 02/22648

PCT/US01/28016

able to determine the particular immunostimulant and appropriate time and mode of administration of an immunostimulant.

5 The methods of the invention can be administered in conjunction with these or other methods known in the art and at various times prior, during or subsequent to initiation of conventional treatments. For a description of treatments for pathological conditions characterized by aberrant cell growth see, for example, The Merck Manual, Sixteenth Ed, (Berkow, R., Editor) Rahway, NJ, 1992.

10 Similarly, other cell therapy methods well known in the art can additionally be employed in conjunction with selective CTLs generated by the methods of the invention. Such other methods include, for example, cell replacement therapy for the regeneration or reconstitution of tissues and cellular components thereof, and cell therapy using genetically modified cells for the production of a therapeutic protein or  
15 macromolecule. Specific examples of cell replacement therapy include hematopoietic stem and progenitor cell therapy, which can be used, for example, to reconstitute ablated bone marrow cells of cancer patients, and neuronal stem and progenitor cell therapy for the treatment of Parkinson's disease. Cell therapy for production of a therapeutic protein includes, for example, the transplantation of a variety of cell types  
20 and progenitors thereof genetically modified to produce, for example, insulin, other cytokines, growth factors, and enzymes. Such genetic cell therapies are applicable, for example, to the treatment of diabetes, cancer. Various other examples of cell replacement and genetic cell therapy are well known in the art and are similarly applicable for use in conjunction with the selective CTLs produced by the methods of  
25 the invention.

The administration of CTLs selective for a pathologically aberrant cell simultaneous with or delivered in alternative administrations with the conventional therapy, including multiple administrations. Simultaneous administration can be, for example,  
30 together in the same formulation or in different formulations delivered at about the

WO 02/22648

PCT/US01/28016

same time or immediately in sequence. Alternating administrations can be, for example, delivering a CTL preparation and conventional therapeutic treatment in temporally separate administrations. As described previously, the temporally separate administrations of selective CTLs and conventional therapy can similarly use different modes of delivery and routes.

Another application of this invention is the preparation of mature dendritic cells. The mature dendritic cells produced by the methods of this invention could then be used for vaccination, including administration in combination with the adoptive transfer of CTL. This application of the method of this invention comprises preparing immature dendritic cells, as herein described, pulsing them with antigen (such as apoptotic cells, vesicles, cell lysates, cell fractions or components, proteins or peptides) and a T helper epitope and incubating these dendritic cells with helper T cells specific for the helper epitope associated with the Class II MHC of the dendritic cell.

It is understood that modifications which do not substantially affect the activity of the various embodiments of this invention are also included within the definition of the invention provided herein. Accordingly, the following examples are intended to illustrate but not limit the present invention.

#### EXAMPLE 1

##### **CONDITIONS FOR ACTIVATION OF CD8<sup>+</sup> CYTOTOXIC ACTIVITY BY DENDRITIC CELLS**

This example shows that stimulation of dendritic cells (DC) with either CD40L or IL-12 induces CTL activity in CD8<sup>+</sup> TL in vitro, and that IL-7 augments this response.

To determine the optimal conditions for in vitro induction of human CTL, HLA-A2 DC were used to activate purified CD8<sup>+</sup> T lymphocytes (CD8<sup>+</sup> TL). The response to a class I MHC antigen was investigated because the high precursor frequency of CD8<sup>+</sup> TL specific for class I MHC antigens allows for the detection of a CTL response after

WO 02/22648

PCT/US01/28016

only one round of *in vitro* stimulation. The preparation of HLA-A2.DC and CD8<sup>+</sup> TL are described below.

- CD8<sup>+</sup> TL were isolated from PBMC of HLA-A2-negative healthy blood donors.
- 5 CD8<sup>+</sup> positive cells were recovered after positive selection with Dynabeads and Detachabead (DynaL, Lake Success, NY) and stored frozen prior to use. After thawing, cells were further depleted of CD4<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, and CD56<sup>+</sup> with Dynabeads. Fluorescence-activated cell sorter (FACS)-analysis showed that this cell population was >99% CD8<sup>+</sup>. DC were generated from peripheral blood monocytes
- 10 essentially as described by F. Sallusto and A. Lanzavecchia, *J. Exp. Med.* (1992) 176:1693-1702. HLA-A2-positive PBMC from healthy blood donors were isolated by Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation and suspended at a concentration of  $4 \times 10^6$ /ml in RPMI-FCS medium. Of this suspension, 15-ml aliquots were plated in 150-mm tissue culture dishes. After 90 minutes at 37°C, non-adherent cells were
- 15 discarded, and plates were washed five times with PBS and subsequently incubated at 37°C for 30 minutes in the presence of PBS containing 2% FCS and 2% EDTA. Adherent cells were detached by pipetting followed by scraping. The cell suspension was then further depleted of CD2-, CD19-, and CD56<sup>+</sup>-positive cells with Dynabeads (DynaL AS, Oslo, Norway) according to the manufacturer's instructions. This cell
- 20 population (<0.5% CD3<sup>+</sup> and >90% CD14<sup>+</sup>) was plated in six well-plates ( $1.5 \times 10^6$  cells/well) in RPMI-FCS in the presence of 500 U/ml human recombinant IL-4 (Genzyme, Boston, MA) and 800 U/ml human recombinant granulocyte-macrophage colony stimulating factor GM-CSF (Pharmingen, San Diego, CA).
- 25 Induction of HLA-A-2 specific CTL was performed on cells cultured in RPMI 1640 supplemented with 2 mM L-glutamine, 50 µg/ml gentamycin 1% non-essential amino acids, 1mM sodium pyruvate, and 5% pooled human serum (RPMI-HS). DC ( $10^4$  cells/well) and CD8<sup>+</sup> cells ( $10^5$  cells/well), prepared as described above, were
- 30 cultured in 96 well flat-bottomed plates in a final volume of 200 µl. Cells were incubated for six days at 37°C prior to CTL activity assay.

WO 02/22648

PCT/US01/28016

The cytotoxic activity of CTL was quantitatively measured by  $^{51}\text{Cr}$ -release assay using JY (A2<sup>+</sup>) and 221 (A2<sup>-</sup>)  $^{51}\text{Cr}$ -labeled target cells. The assay was performed by splitting the 96 well culture plate into two sets of replicate plates (96-well U-bottomed). For each set, one plate contained 15  $\mu\text{l}$  and the other plate contained 75  $\mu\text{l}$  of the original culture. One set received  $^{51}\text{Cr}$ -labeled 221 target cells ( $10^4$  cells/well) while the other set received  $^{51}\text{Cr}$ -labeled JY target cells ( $10^4$  cells/well). In order to decrease any antigen non-specific cytotoxic activity due to NK activity, all the wells received  $2 \times 10^5$  K562 cells. After six hours at 37°C, the  $^{51}\text{Cr}$  content in 100  $\mu\text{l}$  of supernatant was measured, and the percent specific lysis was calculated according to the formula: percent lysis =  $100 \times (\text{experimental release} - \text{spontaneous release}) / (\text{maximum release} - \text{spontaneous release})$ . For proper comparison of the efficiency of the different conditions tested, the data are expressed as lytic units (LU)  $30/10^6$  input cells. One LU is defined as the number of input cells required to achieve 30% lysis of  $10^4$  target cells in a six hour assay. Specific CTL activity is obtained by subtracting the LU obtained from 221 cells from the LU obtained from JY cells. The period of exposure or incubation of CTLs with target cells can vary depending on whether quantitative or qualitative results are desired. Generally, the period of exposure is between about 30 minutes and six hours, preferably the period is between about two to five hours and more preferably the period is about three to four hours.

K562, a human natural killer (NK)-sensitive cell line; 3A4-721.221, an Epstein-Barr virus (EBV)-transformed cell line that has been mutagenized and selected to be class I negative, and JY, an EBV-transformed HLA-A2 homozygous cell line, were grown in RPMI-1640 media (Gibco, Grand Island, NJ) containing 10% fetal calf serum (FCS; Sigma, St. Louis, MO), 4 mM L-glutamine, 1% nonessential amino acids, 1 mM sodium pyruvate,  $5 \times 10^{-5}$  M 2-mercaptoethanol, and 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  gentamycin (all from Gibco, Grand Island, NJ) (RPMI-FCS).

To determine if different DC maturation signals effected  $\text{CD8}^+$  activation, DC were challenged with lipopolysaccharide (LPS), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), or  $\text{CD40L}$ , and the ability of treated DC to induce CTL activity in purified  $\text{CD8}^+$  cells

WO 02/22648

PCT/US01/28016

was determined by the  $^{51}\text{Cr}$ -release as described. DC prepared as described above were treated with either TNF- $\alpha$  (20 ng/ml), LPS (20 ng/ml), or no additive (immature DC). Following a 40 hour incubation at 37°C, DC were collected and plated. DC were challenged with CD40L at the time of culture with the CD8 $^+$  cells by adding irradiated (25,000 rads) CD40L-transfected cells (Cella et al., *J. Exp. Med.* 184: 747-752 (1996)) to the immature DC.

The results from four representative experiments are shown in Figure 1. Cytotoxic activity induced by immature DC (imm-DC), LPS treated DC (LPS-DC), TNF- $\alpha$ -treated DC (TNF-DC), or CD40L-treated DC (CD40L-DC) indicated that only CD40L treated DC were capable of inducing cytotoxic activity from purified CD8 $^+$  T cells (Figure 1A). CTL activity was detected in three of the four tested CD8 $^+$  cell populations.

To determine if the differences observed between DC treated with LPS, TNF- $\alpha$ , or CD40L in inducing CTL activity of CD8 $^+$  T cells were due to differences in antigen processing and presentation capacity of monocytes, immature DC, and mature DC, the expression levels of class I molecules, TAP transporters, PA28 (an immunoproteasome regulator), and immunoproteasomes were examined by flow cytometry (FACScan, Benton Dickenson, Milano, Italy) and immunoprecipitation with appropriate antibodies. After treatment with GM-CSF and IL-4 as described above, the resulting immature DC exhibited increased expression of class I molecules, TAP transporters, PA28, and immunoproteasomes by four to five fold as compared to untreated monocytes. The level of expression of class I molecules was further increased by two fold upon treatment with LPS, CD40L, or TNF- $\alpha$ . The expression levels of class I molecules in mature DC were not effected by the various treatments, indicating that differences observed between DC treated with LPS, TNF $\alpha$ , or CD40L in inducing CTL activity of CD8 $^+$  T cells are not the result of differences in antigen processing and presentation capacity.

WO 02/22648

PCT/US01/28016

The cytokine IL-12 is known to have an important role in CTL development and function (Trinchieri, *Ann. Rev. Immunol.* (1995) 13:251-76). A study was performed to determine if induction of cytotoxicity by CD40L-DC could be substituted by IL-12 and/or increased by other lymphokines (Figure 1). Cytotoxic activity induced by imm-DC or CD40L-DC in the presence of IL-12 (Figure 1B), IL-7 (Figure 1C), or IL-12 plus IL-7 (Figure 1D) was measured. Addition of IL-4 or IL-6 had no effect on cytotoxic activity. The addition of IL-12 to immature DC was able to substitute for CD40L in two of the four purified CD8<sup>+</sup> cell populations. IL-7 had no effect on immature DC but enhanced the cytotoxic activity induced by CD40L-treated DC and IL-12-treated immature DC by approximately three -fold. Furthermore, in the presence of IL-7, cytotoxic activity was detected in all four CD8<sup>+</sup> populations. Thus, the treatment that resulted in the most consistent induction of cytotoxic response for all CD8<sup>+</sup> donors, and in all systems tested, was the combination of CD40L-DC and IL-7. The tested systems included the CTL response against the super antigen TSST, against the A2-restricted matrix peptide derived from the influenza A virus, and against the A2-restricted tyrosinase peptide.

#### EXAMPLE 2

##### 20 INDUCTION OF LB-SPECIFIC CD8<sup>+</sup> CTL LINES

This example shows that CD8<sup>+</sup> CTL activity is induced in response to specific leukemic blasts (LB) and demonstrates the development of CD8<sup>+</sup> CTL cell lines.

25 The observation that CD40L and IL-12 in combination with IL-7 effectively promoted DC-induced CTL activity of CD8<sup>+</sup> TL provided the basis for developing of a procedure for inducing LB-specific CTL. Due to the low amount of blood available from BMT donors and recipients, the previously described procedures were modified as follows. Briefly, DC were prepared by adding IL-4 and GM-CSF directly to  
30 adherent PBMC isolated from BMT donors immediately after non-adherent cells were removed. After a seven day culture period, DC expressed a pattern of activation

WO 02/22648

PCT/US01/28016

antigens similar to a phenotype described for resting DC activated by mechanical manipulation (Gallucci et al., *Nature Medicine* (1999) 5:1249-1255). CD8<sup>+</sup> TL were obtained by negative depletion of CD4<sup>+</sup> cells.

5 The studies described in this Example and subsequent Examples included four pediatric acute myeloid leukemia (AML) patients, given allogeneic bone marrow transplants (BMT), and their donors. None of the BMT recipients experienced relapse. The follow-up ranged from 23 to 28 months after transplant. Three patients (MR, GA, and PM) received BMT from an HLA-identical sibling, whereas patient  
10 EV received BMT from an HLA-matched unrelated donor. BMT recipients were evaluated for LB-specific cytotoxic activity for six months after transplant, when immunosuppressive therapy had ceased. The institutional review board of the Department of Pediatrics Science, IRCCS Policlinico San Matteo, approved the protocol.

15 In an initial study, LB-specific CTL were induced by priming CD8<sup>+</sup> TL (CD4<sup>+</sup><1%) using LB plus DC together with IL-7 and IL-12. It was observed that CD8<sup>+</sup> TL from two BMT donors (MR-don and GA-don) contained LB-specific CTL after a second stimulation, but that these cultures were difficult to maintain due to their low  
20 propensity to expand (data not shown).

To overcome the problem of lack of expansion of LB-specific CTL lines, CD4<sup>+</sup>-enriched irradiated autologous cells were added to a CD8<sup>+</sup> TL priming incubation. This approach was used to generate leukemia-specific CTL lines from CD8<sup>+</sup> TL  
25 derived from either peripheral blood or bone marrow of four BMT donors (MR-don, GA-don, EV-don, and PM-don). The medium used was RPMI-HS supplemented with 10 ng/ml IL-7 and 10 pg/ml IL-12. CD8<sup>+</sup> cells (0.5 to 1 x 10<sup>6</sup> cells/ml) were added to 48 well-plates and co-cultured with irradiated (20,000 rads) BMT recipient LB (5 x 10<sup>5</sup> cells/ml), irradiated (3,000 rads) CD8<sup>+</sup>-autologous CD4<sup>+</sup> lymphocytes (3 to 5 x  
30 10<sup>5</sup> cells/ml) and CD8<sup>+</sup>-autologous DC (2 x 10<sup>5</sup> cells/ml) in a final volume of 1 ml.

WO 02/22648

PCT/US01/28016

After seven days, cultures were re-stimulated with irradiated (20,000 rads) BMT recipient LB ( $5 \times 10^5$  cells/ml) and adherent irradiated (3000 rads) feeder cells (Vitiello et al., *J. Clin. Invest.* 95: 351-349 (1995)). Two days later, 25 U/ml of recombinant interleukin-2 (rIL-2) was added to the cultures. The same protocol was used for each successive round of stimulation. LB were prepared from heparinized bone marrow aspirates (>90% LB) from patients at the time of their diagnosis.

Cultures were tested for cytolytic activity seven days after each subsequent re-stimulation against recipient LB at an effector to target (E:T) ratio of 5:1 (Figure 2). Cytolytic activity of LB-specific CTL lines derived from PBMC of BMT recipient ( $\square$ ), BMC of BMT donor ( $\blacksquare$ ) and from PBMC of BMT donor ( $\boxplus$ ) was determined. Cell culture stimulations performed at seven day intervals are represented by II, III, IV, and V in Figure 2. Cytolytic activity of thawed LB-directed CTL, cryopreserved after the fourth re-stimulation, is represented as IVa. Figure 2 (A-D), refer to MR, GA, EV, PM donor/recipient pairs, respectively.

This study revealed that cytolytic activity was not observed after the primary stimulation. However, after the second stimulation (14 to 16 days following the initial culturing), LB-specific cytotoxicity was observed in all cultures tested and was maintained or augmented after further re-stimulation. The same kinetics and magnitude of CTL activation were observed when  $CD8^+$  cells were obtained from PBMC of the four BMT recipients (MR, GA, EV, and PM) six months after transplant, when hematopoietic and immune systems were of donor origin. The cytotoxic capacity of LB-specific CTL lines was not affected by cryopreservation.

The ability of LB-directed CTL to expand in culture in the presence of DC, target cells, IL-12 and IL-7, as described above, was examined. Figure 3 shows representative results of cell expansion of LB-directed CTL derived from BMT recipient EV ( $\blacktriangle$ ) or BMT donor EV ( $\blacksquare$ ) PBMC. Data represent a theoretical calculation based on the expansion rates of the CTL. The expansion rates of the CTL

WO 02/22648

PCT/US01/28016

were calculated as follows: expansion rate = total number of the cells after re-stimulation/number of re-stimulated cells. The initial number of CD8<sup>+</sup>-enriched responder cells was 10<sup>6</sup>. After repeated stimulation CTL demonstrated an incremental increase in cytotoxicity and a variable but continuous expansion of the absolute number of cultured cells. These cells were expanded in the range of nine to twenty times compared to cells seeded at the beginning of the cultures.

In view of the potential use of LB-specific CTL lines for adoptive immunotherapy, the cell lines were tested against non-leukemic cells obtained from patients before transplant as an *in vitro* control for the graft versus host reaction (GVHR). The autologous target cells used were Bone marrow recipient cells (BMRC), and Mitogen-stimulated T-cells (T-PHA). Non-leukemic BMRC were obtained before the BMT procedure and after demonstration of complete haematological remission. T-PHA cell lines were established for each patient by stimulating cryopreserved pre-transplant PBMC with PHA and serial passaged in RPMI-1640 supplemented and 100 U/ml of rIL-2 (Cetus, Emeryville, CA). The majority of cultures showed either no or low reactivity (<10% lysis) at the highest effector to target ratio (E:T ratio) tested (up to 40:1) against non-leukemic BMR cells or T-PHA.

To exclude reactivity of the CTL lines against recipient antigens, the frequency of CTL precursors (CTL<sub>p</sub>) directed to the pre-transplant, non-leukemic recipient cells of patient EV was evaluated by limiting dilution assay (LDA) as previously described (Montagna, et al., *J. Clin. Immunol.*, (1996) 16:107-114). The patient's donor was an HLA-matched unrelated donor. Of the four donor-recipient pairs, this pair was at highest risk of GVHD since the other three pairs were HLA-identical siblings. Analysis of CTL<sub>p</sub> frequency was performed for: (i) PBMC of the donor before any *in vitro* activation, (ii) CD8<sup>+</sup> effector cells obtained from the donor, recovered after the fourth stimulation with LB cells, and (iii) CD8<sup>+</sup> effector cells obtained from the recipient six months after BMT, recovered after the fourth stimulation with LB cells. The results in Table II demonstrate that, after four rounds of *in vitro* LB-stimulation,

WO 02/22648

PCT/US01/28016

the frequency of CTLp against recipient pre-transplant non-leukemic cells did not increase compared to the frequency obtained from donor PBMC before stimulation with the LB cells.

5

Table 2.

**CTLp FREQUENCY TOWARDS RECIPIENT'S SELF-ANTIGENS DOES NOT CHANGE AFTER IN VITRO STIMULATION WITH LB AND DC**

10

Source	CTLp Frequency
PBMC EV don	1/381,000
CTL* EV pt	1/325,000
CTL* EV don	1/317,000

\* LB-specific CTL lines obtained after 4 stimulations and tested on pre-transplant PHA blasts of BMU recipient.

15

### **EXAMPLE 3**

#### **CHARACTERIZATION OF LB-SPECIFIC CTL LINES**

20

This example shows the phenotypic analysis of LB-specific CTL lines.

Phenotypic analysis of LB-specific CTL cell lines was performed at the time of each cytotoxicity assay. Representative results obtained from primary cultures and after the fourth stimulation are reported in Table III. In primary cultures, when LB-directed cytotoxic activity was undetectable, CD3<sup>+</sup> and/or CD8<sup>+</sup> lymphocytes ranged from 32% to 79%, whereas a considerable proportion of CD56<sup>+</sup> lymphocytes (ranging from 20% to 66%) was present. After the fourth stimulation, the great majority of effector cells were CD3<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> lymphocytes, while the proportion of CD56<sup>+</sup> cells decreased to less than 20%. Interestingly, CD4<sup>+</sup> cells also increased from less than 1% before stimulation to around 10% by the fourth round of stimulation.

30

WO 02/22648

PCT/US01/28016

TABLE 3.

SURFACE PHENOTYPE OF LB-SPECIFIC CTL LINES

CTL LINES BMT-RECIPIENTS	EFFECTOR CELLS AFTER PRIMARY STIMULATION		EFFECTOR CELLS AFTER 4 STIMULATIONS	
	%	(range)	%	(range)
CD3	48	(42-57)	94	(93-96)
CD8	45	(32-55)	82	(73-88)
CD4	5	(4-6)	8	(7-10)
CD56	50	(36-66)	14	(11-20)
$\gamma\delta$	10	(5-14)	30	(13-65)
CTL LINES* BMT-DONORS	EFFECTOR CELLS AFTER PRIMARY STIMULATION		EFFECTOR CELLS AFTER 4 STIMULATIONS	
	%	(range)	%	(range)
CD3	66	(58-79)	92	(87-97)
CD8	50	(41-62)	84	(80-88)
CD4	6	(3-10)	11	(8-15)
CD56	28	(20-30)	9	(6-15)
$\Gamma\delta$	8	(5-16)	21	(3-52)

5

\*Obtained from PBMC.

## EXAMPLE 4

10 **LB-SPECIFIC CTL LINES ARE CD8<sup>+</sup> CLASS I RESTRICTED**

This example shows that cytolytic activity of CTL was restricted to CD8<sup>+</sup> cells and HLA class I antigen. To determine which T-cell populations were mediating the lysis of the leukemia cells, the cytotoxic assays were performed in the presence of blocking antibodies. Target cells were incubated with anti-HLA class I or class II monoclonal antibodies (mAb) (25  $\mu$ g/ml), and effector cells were incubated with mAb specific for CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> for 30 minutes at 4°C. The same concentration of each mAb was added to cultures after about four hours from the beginning of cytotoxicity assay.

15  
20 After three *in vitro* stimulations, CTL lines, obtained from PBMC of BMT recipients (PBMC rec) and from bone marrow cells (BM don) or PBMC (PBMC don) of BMT donors, were tested for CTL activity, at an E/T ratio of 10:1, against LB target cells in

WO 02/22648

PCT/US01/28016

the presence of media only (□), anti-HLA class I (■), anti-HLA class II (▨), anti-CD8<sup>+</sup> (▩) and anti-CD4<sup>+</sup> (▧) mAbs (Figure 4). Representative experiments of LB specific CTL lines derived from EV (Figure 4A) and PM (Figure 4B) donor/recipient pairs are reported.

5

In all cases, LB-reactive lysis was inhibited by anti-HLA class I and anti-CD8<sup>+</sup> mAb but not by anti-HLA class II and anti-CD4<sup>+</sup> mAb, indicating that CD8<sup>+</sup> cells were responsible for the cytolysis. After repeated stimulation, CD4<sup>+</sup> cells contained in LB-specific CTL lines ranged between 5% and 12%. Thus, depletion experiments of CD4<sup>+</sup> cells were performed before cytotoxicity assays to exclude the involvement of this subpopulation in mediating cytolytic activity. These results demonstrated that LB-directed cytotoxic activity was unaffected by depletion of CD4<sup>+</sup> effector cells.

10

#### EXAMPLE 5

15

##### CTL-MEDIATED LB LYSIS IS PERFORIN DEPENDENT

This example shows that LB-directed cytotoxicity is inhibited by concanamycin A and strontium chloride:

20

Cytolytic activity of a CTL refers to the secretion of the contents of secretory granules into the immediate vicinity of the target cell to which it attaches. The granules contain perforins, various lysosomal enzymes, and calcium binding proteins that destroy the target cell. To identify the mechanism responsible for target lysis in LB-directed cytotoxic activity, the role of the granule exocytosis pathway was analyzed by using either concanamycin A (CMA), an inhibitor of vacuolar type H<sup>+</sup>-ATPase, or strontium chloride (SrCl<sub>2</sub>), which causes degranulation and release of granule contents from effector cells.

25

Effector cells were treated with concanamycin A (CMA) (Sigma, Milano, Italy) at concentrations of 1, 10, and 100 nM/L for two hours, or with SrCl<sub>2</sub> (Sigma) at

WO 02/22648

PCT/US01/28016

concentrations of 5, 25, and 50 mM/L for 18 hours, washed twice, and then incubated with <sup>51</sup>Cr-labeled recipient LB for eight hours at E:T ratios of 20:1, 10:1, and 5:1. Shown in Figure 5 are the results of studies performed with an E: T ratio of 5:1, demonstrating the effect of CMA (Figure 5A) and SrCl<sub>2</sub> (Figure 5B) on cytotoxic activity displayed from LB-directed CIL obtained from the PBMC of recipient PM (■), the BMC of donor PM (▲), and the PBMC of donor PM (●) after three stimulations.

Thus, LB-directed cytotoxicity was inhibited by treatment with either CMA or SrCl<sub>2</sub> (mean inhibition = 87%, Figure 5). Because these reagents selectively block perforin-based target lysis it was concluded that target cell lysis is perforin-dependent.

Throughout this application various publications have been referenced within parentheses. The disclosures of these publications in their entireties are hereby incorporated by reference in this application in order to more fully describe the state of the art to which this invention pertains.

Although the invention has been described with reference to the disclosed embodiments, those skilled in the art will readily appreciate that the specific experiments detailed are only illustrative of the invention. It should be understood that various modifications can be made without departing from the spirit of the invention. Accordingly, the invention is limited only by the claims below.

**WHAT IS CLAIMED IS:**

1. A method of inducing CD8<sup>+</sup> T cells selective for a pathologically aberrant cell  
5 *ex vivo*, comprising contacting an apoptotic pathologically aberrant cell with a  
mixture having at least dendritic cells (DC), CD4<sup>+</sup> T cells and CD8<sup>+</sup> T  
lymphocytes, and culturing said apoptotic pathologically aberrant cell with  
said mixture for sufficient time to generate CD8<sup>+</sup> T lymphocytes (TL) having  
antigenic specificity for said pathologically aberrant cell.
- 10 2. The method of Claim 1, wherein said pathologically aberrant cell further  
comprises a cell selected from a group consisting of a tumor cell, a cell  
infected with a pathological agent, a vesicle, a cell from a non-vital organ, a B  
cell, cell lysates, cell fractions, cell components, and cells producing a  
substance that mediates a disease or condition.
- 15 3. The method of Claim 1, further comprising addition of IL-7 to said mixture or  
to said culture of apoptotic pathologically aberrant cell and said mixture.
4. The method of Claim 1, wherein said CD8<sup>+</sup> TL further comprise naive CD8<sup>+</sup>  
20 TL.
5. The method of Claim 1, wherein said DCs further comprise substantially  
isolated DCs.
- 25 6. The method of Claim 1, wherein said CD4<sup>+</sup> T cells further comprise  
substantially isolated CD4<sup>+</sup> T cells.
7. The method of Claim 1, wherein said CD8<sup>+</sup> TL further comprise substantially  
isolated CD8<sup>+</sup> TL.

WO 02/22648

PCT/US01/28016

8. The method of Claim 1, further comprising isolating said CD8<sup>+</sup> TL having antigenic specificity for and cytolytic activity against said pathologically aberrant cell.
- 5 9. The method of Claim 1, further comprising culturing said CD8<sup>+</sup> TL having antigenic specificity for said pathologically aberrant cell for two or more generations, and isolating CD8<sup>+</sup> memory TL, said CD8<sup>+</sup> memory TL being characterized as having the ability to produce CD8<sup>+</sup> TL having antigenic specificity for and cytolytic activity against said pathologically aberrant cell.
- 10 10. A method of inducing CD8<sup>+</sup> T lymphocytes (TL) selective for a pathologically aberrant cell *ex vivo*, comprising contacting a pathologically aberrant non-B-cell leukemia cell with a mixture having at least dendritic cells (DC), CD4<sup>+</sup> T cells and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes, and culturing said pathologically aberrant non-  
15 B-cell leukemia cell with said mixture for sufficient time to generate CD8<sup>+</sup> TL having antigenic specificity for said pathologically aberrant non-B-cell leukemia cell.
11. The method of Claim 10, wherein said pathologically aberrant non-B-cell  
20 leukemia cell further comprises a cell lysate, cell fraction, cell component, or a vesicle.
12. The method of Claim 10, further comprising addition of IL-7 to said mixture or to said culture of pathologically aberrant non-B-cell leukemia cell and said  
25 mixture.
13. The method of Claim 10, wherein said CD8<sup>+</sup> TL further comprise naive CD8<sup>+</sup> TL.

WO 02/22648

PCT/US01/28016

14. The method of Claim 10, wherein said DCs further comprise substantially isolated DCs.
15. The method of Claim 10, wherein said CD4<sup>+</sup> T cells further comprise substantially isolated CD4<sup>+</sup> T cells.
16. The method of Claim 10, wherein said CD8<sup>+</sup> TL further comprise substantially isolated CD8<sup>+</sup> TL.
17. The method of Claim 10, further comprising isolating said CD8<sup>+</sup> TL having antigenic specificity for and cytolytic activity toward said pathologically aberrant non-B-cell leukemia cell.
18. The method of Claim 10, further comprising culturing said CD8<sup>+</sup> TL having antigenic specificity for said pathologically aberrant cell for two or more generations, and isolating CD8<sup>+</sup> memory TL, said CD8<sup>+</sup> memory TL being characterized as having the ability to produce CD8<sup>+</sup> TL having antigenic specificity for said pathologically aberrant non-B-cell leukemia cell.
19. A method of inducing CD8<sup>+</sup> T lymphocytes (TL) selective for a pathologically aberrant cell *ex vivo*, comprising:
- a) contacting said pathologically aberrant cell with a first mixture having at least dendritic cells (DC) and isolated CD4<sup>+</sup> T cells for sufficient time to produce DCs presenting pathologically aberrant cell antigen;
  - b) adding CD8<sup>+</sup> TL to produce a second mixture; and
  - c) culturing said second mixture for sufficient time to generate CD8<sup>+</sup> TL having antigenic specificity for said pathologically aberrant cell.

WO 02/22648

PCT/US01/28016

20. The method of Claim 19, wherein said pathologically aberrant cell further comprises a tumor cell, a vesicle, a cell lysate, a cell fraction, a cell component, a cell from a vital or non-vital organ, a B cell, cells producing a substance that mediates a disease or condition, or a cell infected with a pathological agent.
21. The method of Claim 19, further comprising addition of IL-7 to step (a), step (b) or step (c).
22. The method of Claim 19, wherein said CD8<sup>+</sup> TL further comprise naive CD8<sup>+</sup> TL.
23. The method of Claim 19, wherein said DCs further comprise substantially isolated DCs.
24. The method of Claim 19, wherein said CD8<sup>+</sup> TL further comprise substantially isolated CD8<sup>+</sup> TL.
25. The method of Claim 19, further comprising isolating said CD8<sup>+</sup> TL having antigenic specificity for and cytolytic activity toward said pathologically aberrant cell.
26. The method of Claim 19, further comprising culturing said CD8<sup>+</sup> TL having antigenic specificity for said pathologically aberrant cell for two or more generations, and isolating CD8<sup>+</sup> memory TL, said CD8<sup>+</sup> memory TL being characterized as having the ability to produce CD8<sup>+</sup> TL having antigenic specificity for said pathologically aberrant cell.

WO 02/22648

PCT/US01/28016

27. A method of inducing CD8<sup>+</sup> T lymphocytes (TL) selective for a pathologically aberrant cell *ex vivo*, comprising contacting an apoptotic pathologically aberrant cell with a mixture having at least dendritic cells (DC), CD40L or IL-12 and CD8<sup>+</sup> TL, and culturing said apoptotic pathologically aberrant cell with said mixture for sufficient time to generate CD8<sup>+</sup> TL having antigenic specificity for said pathologically aberrant cell.
28. The method of Claim 27, wherein said pathologically aberrant cell further comprises a tumor cell, a vesicle, a cell lysate, a cell fraction, a cell component, a cell from a vital or non-vital organ, a B cell, cells producing a substance that mediates a disease or condition, or a cell infected with a pathological agent.
29. The method of Claim 27, further comprising addition of IL-7 to said mixture or to said culture of apoptotic pathologically aberrant cell and said mixture.
30. The method of Claim 27, wherein said CD8<sup>+</sup> TL further comprise naive CD8<sup>+</sup> TL.
31. The method of Claim 27, further comprising substantially purified CD40L, or a molecule that induces CD40 activation, or IL-12.
32. The method of Claim 27, further comprising isolating said CD8<sup>+</sup> TL having antigenic specificity for and cytolytic activity toward said pathologically aberrant cell.

WO 02/22648

PCT/US01/28016

33. A method of inducing CD8<sup>+</sup> T lymphocytes (TL) selective for a pathologically aberrant cell ex vivo, comprising contacting a pathologically aberrant non-B-cell leukemia cell with a mixture having at least dendritic cells (DC), CD40L or IL-12 and CD8<sup>+</sup> TL, and culturing said pathologically aberrant non-B-cell leukemia cell with said mixture for sufficient time to generate CD8<sup>+</sup> TL having antigenic specificity for said pathologically aberrant non-B-cell leukemia cell.
34. The method of Claim 33, wherein said pathologically aberrant non-B-cell leukemia cell further comprises a cell lysate, a cell fraction, a cell component, a vesicle or a cell infected with a pathological agent.
35. The method of Claim 33, further comprising addition of IL-7 to said mixture or to said culture of pathologically aberrant non-B-cell leukemia cell and said mixture.
36. The method of Claim 33, wherein said CD8<sup>+</sup> TL further comprise naive CD8<sup>+</sup> TL.
37. The method of Claim 33, further comprising substantially purified CD40L, or a molecule that induces CD40 activation or IL-12.
38. The method of Claim 33, further comprising isolating said CD8<sup>+</sup> TL having antigenic specificity for and cytolytic activity toward said pathologically aberrant non-B-cell leukemia cell.
39. A method of inducing CD8<sup>+</sup> T lymphocytes (TL) selective for a pathologically aberrant cell ex vivo, comprising:

30

WO 02/22648

PCT/US01/28016

- 5 a) contacting said pathologically aberrant cell with a first mixture having at least dendritic cells (DC) and IL-12 for sufficient time to produce DCs presenting pathologically aberrant cell antigen;
- b) adding CD8<sup>+</sup> T: to produce a second mixture; and
- c) culturing said second mixture for sufficient time to generate CD8<sup>+</sup> TL having antigenic specificity for said pathologically aberrant cell.
- 10
40. The method of Claim 39, wherein said pathologically aberrant cell further comprises a tumor cell, a vesicle, a cell lysate, a cell fraction, a cell component, a cell from a vital or non-vital organ, a cell producing a substance that mediates a disease or condition, or a cell infected with a pathological agent.
- 15
41. The method of Claim 39, further comprising addition of IL-7 to step (a), step (b) or step (c).
- 20
42. The method of Claim 39, wherein said CD8<sup>+</sup> TL further comprise naïve CD8<sup>+</sup> TL.
43. The method of Claim 39, further comprising substantially purified IL-12.
- 25
44. The method of Claim 39, further comprising isolating said CD8<sup>+</sup> TL having antigenic specificity for, and cytolytic activity toward said pathologically aberrant cell.

WO 02/22648

PCT/US01/28016

45. A method of inducing CD8<sup>+</sup> T lymphocytes (TL) selective for one or more target antigens ex vivo, comprising contacting said one or more target antigens with a mixture having at least dendritic cells (DC), CD4<sup>+</sup> T cells, CD8<sup>+</sup> TL and IL-7, and culturing said one or more target antigens with said mixture for sufficient time to generate CD8<sup>+</sup> TL having selective immune reactivity toward said one or more target antigens.
46. The method of Claim 45, wherein said CD8<sup>+</sup> TL further comprise naive CD8<sup>+</sup> TL.
47. The method of Claim 45, further comprising substantially isolated cells selected from the group consisting of DCs, CD4<sup>+</sup> T cells and CD8<sup>+</sup> TL.
48. The method of Claim 45, further comprising isolating said CD8<sup>+</sup> TL having selective immune reactivity toward said one or more target antigens.
49. The method of Claim 45, further comprising culturing said CD8<sup>+</sup> TL having selective immune reactivity for two or more generations, and isolating CD8<sup>+</sup> memory TL, said CD8<sup>+</sup> memory TL being characterized as having the ability to produce CD8<sup>+</sup> TL having selective immune reactivity toward said one or more target antigens.
50. A method of inducing CD8<sup>+</sup> T lymphocytes (TL) selective for one or more target antigens ex vivo, comprising contacting said one or more target antigens with a mixture having at least dendritic cells (DC), CD40L or IL-12, CD8<sup>+</sup> TL and IL-7, and culturing said one or more target antigens with said mixture for sufficient time to generate CD8<sup>+</sup> TL having selective immune reactivity toward said one or more target antigens.

WO 02/22648

PCT/US01/28016

51. The method of Claim 50, wherein said CD8<sup>+</sup> TL further comprise naive CD8<sup>+</sup> TL.
52. The method of Claim 50, further comprising substantially isolated DCs or CD8<sup>+</sup> TL.
53. The method of Claim 50, further comprising substantially purified CD40L, or a molecule that induces CD40 activation, or IL-12.
54. The method of Claim 50, further comprising isolating said CD8<sup>+</sup> TL having selective immune reactivity toward said one or more target antigens.
55. A method of identifying an antigen associated with a pathologically aberrant cell, comprising:
- a) treating a pathologically aberrant cell with a mutagenizing agent to produce a mutant population of pathologically aberrant cells;
  - b) contacting said mutant population of pathologically aberrant cells with a cytotoxic T lymphocyte (CTL) selective for said pathologically aberrant cell to identify a mutant pathologically aberrant cell that has lost reactivity with said CTL;
  - c) introducing an expressible population of nucleic acids coding for a pathologically aberrant cell polypeptides into said mutant cell to produce a population of mutant cells expressing said polypeptides; and
  - d) identifying a mutant cell expressing a pathologically aberrant cell polypeptide that restores reactivity with said CTL reactive for said pathologically aberrant cell.

WO 02/22648

PCT/US01/28016

56. The method of Claim 55, further comprising isolating the nucleic acid encoding said pathologically aberrant cell polypeptide.
- 5
57. A method of identifying an antigen associated with a pathologically aberrant cell, comprising:
- 10
- (a) contacting one or more antigens suspected of being associated with a pathologically aberrant cell with a cytotoxic T lymphocyte (CTL) selective for a pathologically aberrant cell expressing said one or more antigens; and,
  - 15
  - (b) determining the immunoreactivity of said CTL selective for a pathologically aberrant cell expressing said one or more antigens toward said one or more antigens, wherein a CTL having selective immunoreactivity for said one or more antigens characterizes said one or more immunoreactive antigens as being associated with said pathologically aberrant cell.
  - 20
58. A method of treating a patient having a disease mediated by a pathologically aberrant cell, comprising administering an effective amount of a CD8<sup>+</sup> T lymphocyte (TL) having antigenic specificity for or cytolytic activity toward said pathologically aberrant cell, said CD8<sup>+</sup> TL having selective cytolytic activity toward said pathologically aberrant cell being produced by the method of Claim 1.
- 25

WO 02/22648

PCT/US01/28016

59. A method of treating a patient having a disease mediated by a pathologically aberrant cell, comprising administering an effective amount of a CD8<sup>+</sup> T lymphocyte (TL) having antigenic specificity for or cytolytic activity toward said pathologically aberrant cell, said CD8<sup>+</sup> TL having selective cytolytic activity toward said pathologically aberrant cell being produced by the method of Claim 19.
60. A method of treating a patient having a disease mediated by a pathologically aberrant cell, comprising administering an effective amount of a CD8<sup>+</sup> T lymphocyte (TL) having antigenic specificity for or cytolytic activity toward said pathologically aberrant cell, said CD8<sup>+</sup> TL having selective cytolytic activity toward said pathologically aberrant cell being produced by the method of Claim 27.
61. A method of treating a patient having a disease mediated by a pathologically aberrant cell, comprising administering an effective amount of a CD8<sup>+</sup> T lymphocyte (TL) having antigenic specificity for or cytolytic activity toward said pathologically aberrant cell, said CD8<sup>+</sup> TL having selective cytolytic activity toward said pathologically aberrant cell being produced by the method of Claim 39.
62. A method of treating a patient having a disease mediated by a pathologically aberrant non-B-cell leukemia cell, comprising administering an effective amount of a CD8<sup>+</sup> cytolytic T lymphocyte (CTL) having cytolytic activity toward said pathologically aberrant non-B-cell leukemia cell, said CD8<sup>+</sup> CTL having selective cytolytic activity toward said pathologically aberrant non-B-cell leukemia cell being produced by the method of Claim 10.

WO 02/22648

PCT/US01/28016

63. A method of treating a patient having a disease mediated by a pathologically aberrant non-B-cell leukemia cell, comprising administering an effective amount of a CD8<sup>+</sup> cytolytic T lymphocyte (CTL) having cytolytic activity toward said pathologically aberrant non-B-cell leukemia cell, said CD8<sup>+</sup> CTL having selective cytolytic activity toward said pathologically aberrant non-B-cell leukemia cell being produced by the method of Claim 33.
64. A method of treating a patient having a disease mediated by a pathologically aberrant cell, comprising administering an effective amount of a CD8<sup>+</sup> cytolytic T lymphocyte (CTL) having immune reactivity toward one or more target antigens associated with said pathologically aberrant cell, said CD8<sup>+</sup> CTL having immune reactivity being produced by the method of Claim 45.
65. A method of treating a patient having a disease mediated by a pathologically aberrant cell, comprising administering an effective amount of a CD8<sup>+</sup> cytolytic T lymphocyte (CTL) having immune reactivity toward one or more target antigens associated with said pathologically aberrant cell, said CD8<sup>+</sup> CTL having immune reactivity being produced by the method of Claim 50.
66. A method for preparing mature dendritic cells (DC) *in vitro*, comprising sequentially in order or simultaneously:
- a) contacting immature DC with an antigen for a period of time sufficient for the DC to take-up the antigen; and
  - b) culturing the DC and the antigen with CD4<sup>+</sup> T cells for a period of time sufficient to induce the maturation of the DC into mature DC.

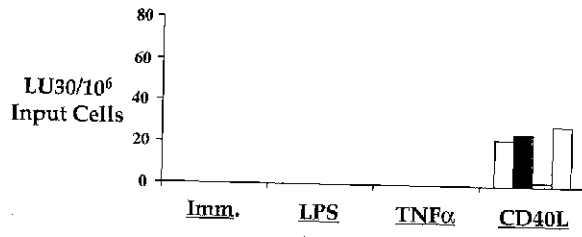
WO 02/22648

PCT/US01/28016

67. The method of Claim 66, wherein said antigen is selected from a group consisting of a pathologically aberrant cell, a cell lysate, a cell fraction, a cell component, a vesicle, a cell from a vital or non-vital organ, a B cell, a cell producing a substance that mediates a disease or condition and a cell infected with a pathological agent.
- 5

**Figures**

Figure 1A



**Figure 1B**

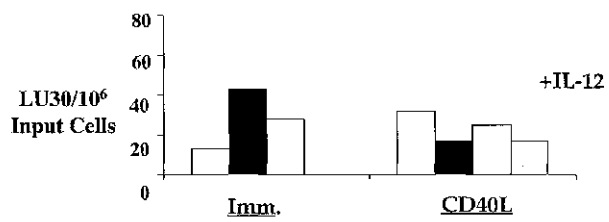


Figure 1C

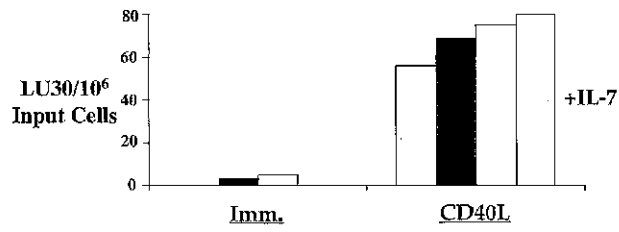
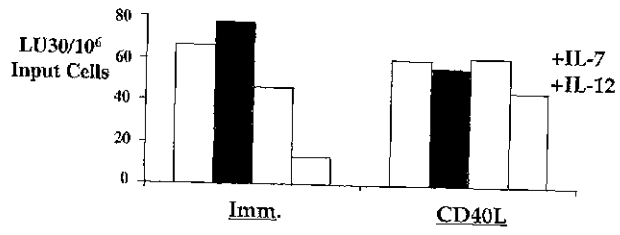


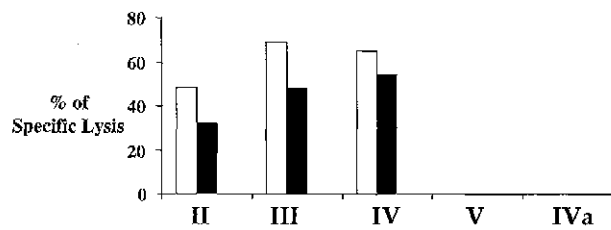
Figure 1D



WO 02/22648

PCT/US01/28016

Figure 2A



WO 02/22648

PCT/US01/28016

Figure 2B

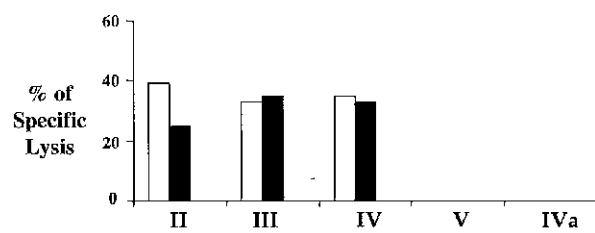


Figure 2C

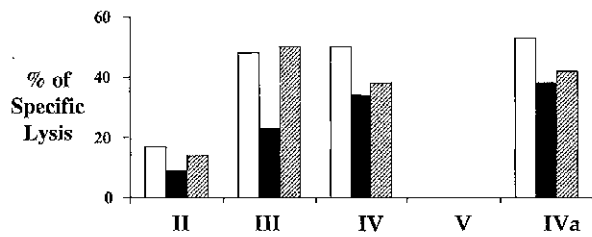
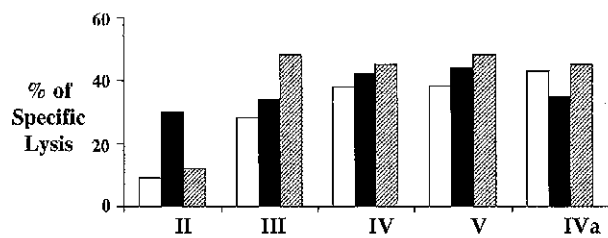


Figure 2D



WO 02/22648

PCT/US01/28016

Figure 3

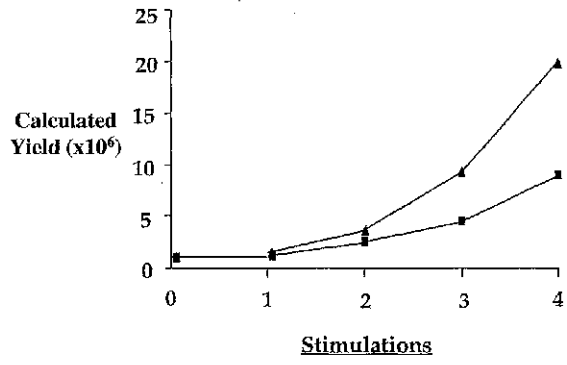


Figure 4A

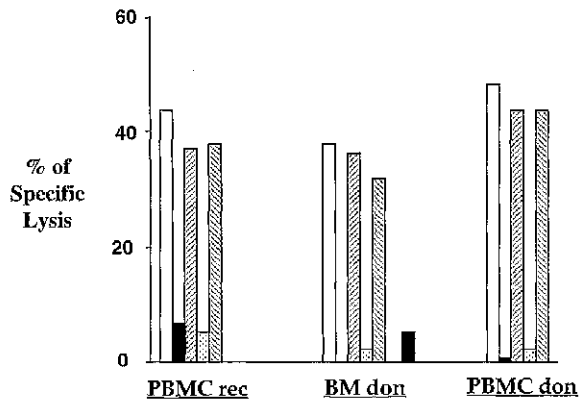


Figure 4B

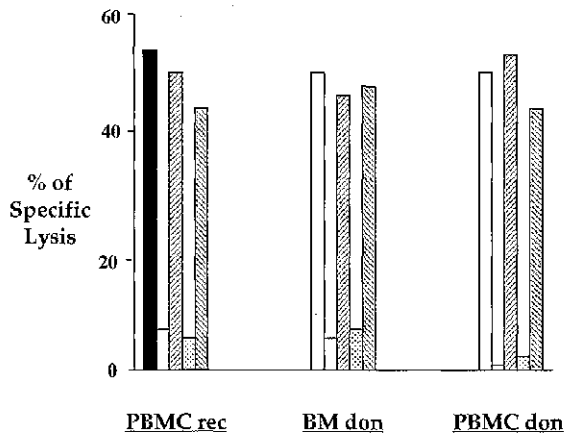


Figure 5A

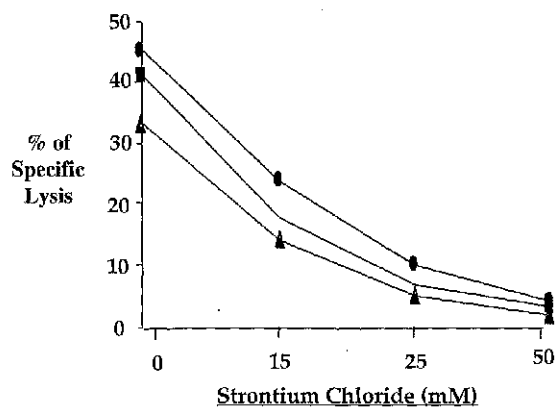
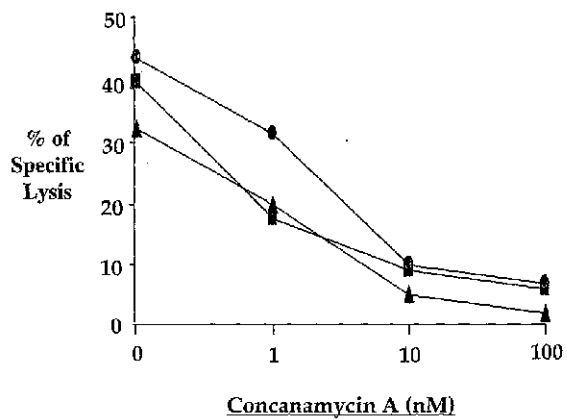


Figure 5B



## 【国際公開パンフレット(コレクション)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
21 March 2002 (21.03.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/22648 A3

- (51) International Patent Classification: C12N 5/00, 5/02, A61K 39/00, 39/38
- (21) International Application Number: PCT/US01/28016
- (22) International Filing Date: 6 September 2001 (06.09.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/233,000 15 September 2000 (15.09.2000) US
- (71) Applicant: ORTHO-VICNEIL PHARMACEUTICAL, INC. (US/US); U.S. Route 202, Raritan, NJ 08869 (US).
- (72) Inventors: VITIELLO, Antonella; 7389 High Avenue, La Jolla, CA 92037 (US); MACCARIO, Rita; Via Volta 24, I-27100 Pavia (IT); MONTAGNA, Daniela; Via Risorgimento 8, I-27042 Bressana (IT).
- (74) Agent: WALLJEN, John, W., III; Johnson & Johnson, One Johnson & Johnson Plaza, New Brunswick, NJ 08933-7803 (US).
- (81) Designated States (*optional*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LR, LS, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW); Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TL, TM); European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR); OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published: with international search report — before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
- (85) Date of publication of the international search report: 30 May 2002
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*



(54) Title: COMPOSITIONS AND METHODS FOR INDUCING SPECIFIC CYTOLYTIC T CELL RESPONSES

(57) Abstract: The invention provides a method of inducing CD8<sup>+</sup> T lymphocytes selective for a pathologically aberrant cell *ex vivo*. The method consists of contacting an apoptotic pathologically aberrant cell with a mixture having at least dendritic cells (DC), CD4<sup>+</sup> T cells and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes, and culturing an apoptotic pathologically aberrant cell with the mixture for sufficient time to generate CD8<sup>+</sup> T lymphocytes (TL) having antigenic specificity for, and/or selective cytolytic activity toward a pathologically aberrant cell. The invention further provides a method of inducing CD8<sup>+</sup> TL selective for one or more target antigens *ex vivo*. The method consists of contacting one or more target antigens with a mixture having at least dendritic cells (DC), CD4<sup>+</sup> T cells, CD8<sup>+</sup> TL, and IL-7, and culturing said one or more target antigens with the mixture for sufficient time to generate CD8<sup>+</sup> TL having selective immune reactivity toward one or more target antigens. The invention further provides a method of treating a patient having a disease mediated by a pathologically aberrant cell. The method consists of administering an effective amount of a CD8<sup>+</sup> TL, produced by the methods of the invention having antigenic specificity for, and/or selective cytolytic activity toward a pathologically aberrant cell.

WO 02/22648 A3

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US01/28018												
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>														
IPC(7) : C12N 5/00, 5/08, A61K 39/00, 39/38 US CL. : 435/373, 386, 424/184.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC														
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>														
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/373, 386; 424/184.1														
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) WEST, MEDLINE, CAPLUS, BIOSIS, EMBASE														
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>														
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
Y	BAXEVANTIS, C.N. et al. Tumor-Specific CD4+ T Lymphocytes from Cancer Patients Are Required for Optimal Induction of Cytotoxic T Cells Against the Autologous Tumor. The Journal of Immunology. 2000, Vol. 164, pages 3902-3912, see entire document.	1-67												
Y	GALLUCCI, S. et al. Natural adjuvants: Endogenous activators of dendritic cells. Nat. Med. November 1999, Vol. 5, No. 11, pages 1249-1255, see entire document.	1-67												
Y	FALKENBURG, J.H.F. et al. Complete Remission of Accelerated Phase Chronic Myeloid Leukemia by Treatment With Leukemia-Reactive Cytotoxic T Lymphocytes. Blood. 15 August 1999, Vol. 94, No. 4, pages 1201-1208, see entire document.	1-67												
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.														
<table border="0"> <tr> <td>* Special categories of cited documents</td> <td>** 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.</td> </tr> <tr> <td>** Documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>** 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</td> </tr> <tr> <td>** Earlier document published on or after the international filing date</td> <td>** 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 combinations being obvious to a person skilled in the art</td> </tr> <tr> <td>** Document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special cases (as specified)</td> <td>** Document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>** Document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td></td> </tr> <tr> <td>** Document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents	** 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.	** Documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	** 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	** Earlier document published on or after the international filing date	** 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 combinations being obvious to a person skilled in the art	** Document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special cases (as specified)	** Document member of the same patent family	** Document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		** Document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
* Special categories of cited documents	** 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.													
** Documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	** 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													
** Earlier document published on or after the international filing date	** 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 combinations being obvious to a person skilled in the art													
** Document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special cases (as specified)	** Document member of the same patent family													
** Document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means														
** Document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed														
Date of the actual completion of the international search 11 JANUARY 2002		Date of mailing of the international search report 02 APR 2002												
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20521 Facsimile No. (703) 505-5250		Authorized officer GERALD R. EWOLLYT <i>Janice Ford for</i> Telephone No. (703) 505-0156												

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)\*

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US03/45015

C (Continuation): DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ALBERT, M.L. et al. Immature Dendritic Cells Phagocytose Apoptotic Cells via alphaVbeta5 and CD56, and Cross-present Antigens to Cytotoxic T Lymphocytes. <i>J. Exp. Med.</i> 05 October 1998, Vol. 188, No. 7, pages 1569-1568, see entire document.	1-67
Y	ALBERT, M.L. et al. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. <i>Nature.</i> 05 March 1998, Vol. 392, pages 86-89, see entire document.	1-67
Y	CARDOSO, A.A. et al. Ex Vivo Generation of Human Anti-Pre-B Leukemia-Specific Autologous Cytolytic T Cells. <i>Blood.</i> 15 July 1997, Vol. 90, No. 2, pages 549-551, see entire document.	1-67

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 37/08	A 6 1 P 37/08	
C 1 2 N 5/10	G 0 1 N 33/53	Y
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 5/00	B
G 0 1 N 33/53	C 1 2 N 15/00	A
// C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/02	

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

(72)発明者 モンターニヤ,ダニエラ

イタリア・アイ - 2 7 0 4 2 プレサナ・ピアリソルギメント 8

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA36 BA80 CA04 DA02 GA11 HA15  
 4B063 QA19 QQ02 QQ08 QQ12 QQ13 QQ79 QR59 QR69 QR72 QR77  
 QR80 QS24 QS28  
 4B065 AA90X AA90Y AB01 AC14 BA18 BB19 BB23 BB34 CA24 CA44  
 4C087 AA01 AA02 BB37 NA13 ZB07 ZB13 ZB26 ZB32

专利名称(译)	用于诱导特异性溶细胞性T细胞应答的组合物和方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004512030A</a>	公开(公告)日	2004-04-22
申请号	JP2002526899	申请日	2001-09-06
[标]申请(专利权)人(译)	奥索 - 麦克尼尔药品公司		
申请(专利权)人(译)	奥索 - 麦克尼尔杉机俞蒂卡尔酒店股份有限公司每次的Rete		
[标]发明人	ビテイエロアントネラ マカリオリタ モンターニヤダニエラ		
发明人	ビテイエロ,アントネラ マカリオ,リタ モンターニヤ,ダニエラ		
IPC分类号	G01N33/53 A61K35/14 A61K39/00 A61P31/00 A61P35/00 A61P37/02 A61P37/08 C07K14/725 C12N5/0783 C12N5/10 C12N15/09 C12Q1/02 G01N33/50 C12N5/06		
CPC分类号	A61K39/0011 A61K2039/5154 A61K2039/5158 A61K2039/57 A61P31/00 A61P35/00 A61P37/02 A61P37/08 C12N5/0636 C12N2501/23 C12N2501/52 C12N2502/11 G01N33/505		
FI分类号	C12N5/00.E A61K35/14.Z A61P31/00 A61P35/00 A61P37/02 A61P37/08 G01N33/53.Y C12N5/00.B C12N15/00.A C12Q1/02		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA36 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/GA11 4B024/HA15 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ12 4B063/QQ13 4B063/QQ79 4B063/QR59 4B063/QR69 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QS24 4B063/QS28 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA18 4B065/BB19 4B065/BB23 4B065/BB34 4B065/CA24 4B065/CA44 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BB37 4C087/NA13 4C087/ZB07 4C087/ZB13 4C087/ZB26 4C087/ZB32		
优先权	60/233009 2000-09-15 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明提供了一种体外诱导对病理学异常细胞具有选择性的CD8 + T淋巴细胞的方法。该方法包括使凋亡的病理异常细胞与至少具有树突状细胞(DC), CD4 + T细胞和CD8 + T淋巴细胞的混合物接触,并用该混合物培养凋亡的病理异常细胞足够的时间以生成CD8 + T淋巴细胞(TL)对病理异常细胞具有抗原特异性和/或具有选择性的细胞溶解活性。本发明进一步提供了一种离体诱导对一种或多种靶抗原具有选择性的CD8 + TL的方法。该方法包括使一种或多种靶抗原与至少具有树突状细胞(DC), CD4 + T细胞, CD8 + TL和IL-7的混合物接触,并将所述一种或多种靶抗原与混合物培养足够的时间以产生CD8 + 对一种或多种靶抗原具有选择性免疫反应性的TL。本发明进一步提供了一种治疗患有由病理异常细胞介导的疾病的患者的方法。该方法包括施用有效量的通过本发明的方法产生的CD8 + TL,其对病理学异常细胞具有抗原特异性和/或对病理异常细胞具有选择性的细胞溶解活性。

腫瘍および癌の型
副腎腫瘍、聴神経腫、腺癌、末梢部黒子黒色腫、男性胚腫、心房粘液腫、星状細胞腫
基底細胞癌、良性耳腫瘍、胆管癌、骨新生物、骨腫瘍、脳腫瘍(原発性、続発性および転移性)、乳癌、気管支癌、パージ腫
子宮頸癌、食道癌、腎もしくは尿管癌、陰莖癌、会陰部癌、睾丸癌、外陰部癌、腎盂もしくは尿管癌腫、胃癌、精巣癌、小脳橋角腫瘍、結腸癌、結腸直腸癌、絨毛癌、上毛芽腫、上毛上皮腫、頭蓋癌腫、子宮癌、咽頭もしくは声帯癌
子宮内膜癌、上衣腫、ユーク肉腫
胃癌、多形性嚔芽腫
肝細胞癌、ホジキンリンパ腫、組織球性リンパ腫、副腎腫、心腫瘍
腸癌、島細胞腫瘍
大腸新生物、白血病、喉頭癌、肝癌、肺癌、リンパ球性リンパ腫、リンパ芽性リンパ腫、悪性黒子型黒色腫
悪性黒色腫、悪性プラズマ細胞腫、髓芽腫、髓膜腫、肺への転移癌、転移性胸膜腫瘍、多発性骨髄腫、粘液腫
腎芽細胞腫、神経膠腫、非ホジキンリンパ腫、非小細胞肺癌
乏突起膠腫、骨肉腫、骨原性癌腫、口腔癌
膀胱癌、下垂体腫瘍、プラズマ細胞骨髄腫、前立腺新生物
腎細胞癌、腎新生物、網膜芽腫、細胞癌腫
神経鞘腫、唾液管腫瘍、肉腫、フトウ状肉腫、精上皮腫、セトリライディット細胞腫、小細胞肺癌、扁平上皮癌、脊髄腫瘍
咽頭癌、甲状腺髓質癌腫、甲状腺癌、羊膜腫瘍
ウイルス腫瘍