

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2010年10月14日(14.10.2010)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2010/116669 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 39/39 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 35/76 (2006.01) A61P 37/04 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2010/002263
- (22) 国際出願日: 2010年3月29日(29.03.2010)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2009-094873 2009年4月9日(09.04.2009) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人神戸大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION KOBE UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒6578501 兵庫県神戸市灘区六甲台町1-1 Hyogo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 白川利朗(SHIRAKAWA, Toshiro) [JP/JP]; 〒6578501 兵庫県神戸市灘区六甲台町1-1 国立大学法人神戸大学内 Hyogo (JP). 斎藤彩(SAITO, Aya) [JP/JP]; 〒6578501 兵庫県神戸市灘区六甲台町1-1 国立大学法人神戸大学内 Hyogo (JP). 松岡孝幸(MAT-

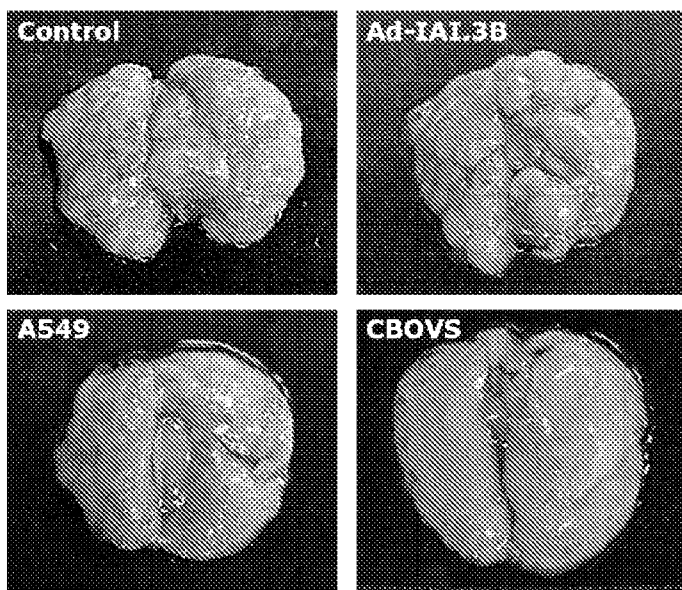
SUOKA, Takayuki) [JP/JP]; 〒6578501 兵庫県神戸市灘区六甲台町1-1 国立大学法人神戸大学内 Hyogo (JP).

- (74) 代理人: 庄司隆, 外(SHOJI, Takashi et al.); 〒1030004 東京都中央区東日本橋3-4-1 6階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ,

[続葉有]

- (54) Title: TUMOR IMMUNITY INDUCER
- (54) 発明の名称: 腫瘍免疫誘導剤

[図2]



(57) Abstract: Disclosed is a novel tumor immunity inducer. Specifically disclosed is a tumor immunity inducer comprising: an adjuvant for a tumor vaccine, which can enhance the efficacy of the tumor vaccine effectively; and the tumor vaccine. Also disclosed is a process for producing the tumor immunity inducer. Further disclosed is a method for treating a malignant tumor using the tumor immunity inducer. The tumor immunity inducer can be constructed by introducing an adenovirus into a tumor vaccine cell that can act as a tumor vaccine. The tumor immunity inducer has a tumor immunity-inducing effect and therefore can reduce a tumor weight and can also reduce a tumor area in a tissue.

(57) 要約: 新規な腫瘍免疫誘導剤を提供する。詳しくは、腫瘍ワクチンの効果を有効に増強しうる腫瘍ワクチン用アジュバントと腫瘍ワクチンを含む腫瘍免疫誘導剤を提供する。また、当該腫瘍免疫誘導剤の製造方法を提供し、さらには上記腫瘍免疫誘導剤を用いる悪性腫瘍の治療方法を提供する。アデノウイルスを、腫瘍ワクチンとして機能しうる腫瘍ワ

クチン細胞に導入することで、腫瘍免疫誘導剤を構築することができた。本発明の腫瘍免疫誘導剤は、腫瘍免疫誘導効果により、腫瘍重量の減少及び組織における腫瘍面積を低減化させる。

WO 2010/116669 A1

CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, 添付公開書類:
TD, TG).

— 國際調查報告 (條約第 21 條(3))

明 細 書

発明の名称：腫瘍免疫誘導剤

技術分野

[0001] 本発明は、腫瘍ワクチンの効果を有効に増強しうる腫瘍ワクチン用アジュバントと腫瘍ワクチンを含む腫瘍免疫誘導剤に関する。また、本発明は当該腫瘍免疫誘導剤の製造方法に関し、さらには上記腫瘍免疫誘導剤を用いる悪性腫瘍の治療方法に関する。

[0002] 本出願は、参照によりここに援用されるところの日本出願特願2009-094873号優先権を請求する。

背景技術

[0003] 腫瘍ワクチン療法は、体内における免疫機能、なかでも細胞性免疫反応の中心的役割をはたすキラーリンパ球、特に細胞傷害性Tリンパ球（CTL）を含む適応免疫系を活性化して、正常細胞を傷害することなく腫瘍細胞を特異的に殺し、腫瘍の再発を防止し、転移を阻害し、あるいは既存腫瘍の治癒を期待する療法である。腫瘍ワクチンについては、多種類が開発されている（非特許文献1、特許文献1）。大まかに分類すれば、(1)すでに性状が明らかになっている腫瘍抗原ペプチドを用いるもの；(2)未同定の腫瘍抗原ペプチドが含まれる腫瘍組織の抽出液を用いるもの；(3)これらを抗原提示細胞、特に強力な抗原提示機能がある樹状細胞に結合させたもの（非特許文献2）；(4)樹状細胞に腫瘍抗原タンパクを取り込ませ負荷したもの；(5)樹状細胞と腫瘍細胞を融合させたもの；(6)腫瘍抗原をリポソームに結合させ、リポソームごと取り込ませるもの（非特許文献3）；(7)腫瘍細胞そのものを放射線や固定剤で不活性化処理して投与するもの；(8)遺伝子治療法で、抗原提示細胞刺激効果あるいはリンパ球刺激効果があるサイトカイン遺伝子を腫瘍細胞に導入し、それをワクチンとして投与するもの、又は腫瘍抗原遺伝子を適切な細胞に導入し、その遺伝子を発現している腫瘍細胞をワクチンとして投与するもの；(9)腫瘍抗原遺伝子をウイルス又は細菌に組み込み患者に感染させる

もの；(10)生きている腫瘍細胞、腫瘍抗原ペプチド又は腫瘍細胞抽出液を投与し、別途、サイトカインを大量投与するか（非特許文献4）、あるいはサイトカインを徐放性に製剤化して投与するもの（非特許文献5）などがある。

[0004] また、上述のような腫瘍ワクチンは、アジュバントとともに使用するのが好ましいが、そのようなアジュバントとしては、例えば、Freund Complete Adjuvant、Freund Incomplete Adjuvant、BCG等の細菌製剤、ツベルクリン等の細菌成分製剤、keyhole limpet hemocyanineや酵母マンナン等の天然高分子物質、Alum、TiterMax Gold等の合成アジュバント製剤等が挙げられる（特許文献1）。他のアジュバントの例として、(a)可溶性タンパク；及び(b)ムコ多糖（ただし上記(a)の可溶性タンパクとコアセルベーションにより沈殿を生成するムコ多糖である）のコアセルベーションによる沈殿を含み、さらに該沈殿とともに共沈殿した(c)ツベルクリンに含有される可溶性タンパクを含むことを特徴とするものも報告されている（特許文献2）。さらに、他のアジュバントの例として、効率よくペプチド特異的なCTLを誘導することができる CpGモチーフを含む ISS-ODN、細胞傷害性T細胞を刺激する QS21、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、酸化アルミニウム、油性エマルジョン、サポニン、ビタミンE溶解物等が報告されている（特許文献3）。

[0005] 生体内の細胞ならびに疾病治療に用いられる培養細胞に遺伝子を導入する遺伝子治療法において、高効率な遺伝子導入を達成するベクターとして組換え型アデノウイルスが広く用いられている。組換え型アデノウイルスを用いた遺伝子治療法、特に生体内の細胞に組換え型アデノウイルスを投与する場合における最大の問題点は、時に重篤な全身性炎症反応を引き起こす自然免疫系の活性化である。一方、貪食細胞（マクロファージ、好中球、および樹状細胞）、NK（ナチュラルキラー）細胞などが関与する自然免疫系の活性化は腫瘍ワクチンの目的である適応免疫系の活性化に重要な役割を果たす。

先行技術文献

特許文献

- [0006] 特許文献1：特開2002-212099号公報
特許文献2：特開2003-306444号公報
特許文献3：特許第3536039号公報

非特許文献

- [0007] 非特許文献1：Nature Med. 4(5 Suppl)：pp. 525-531 (1998)
非特許文献2：Nature Med. 4：pp. 328-332 (1998)
非特許文献3：Biochem. Biophys. Res. Comm. 240：pp. 793-797 (1997)
非特許文献4：Nature Med. 4：pp. 321-327 (1998)
非特許文献5：Cancer Res. 53：pp. 5841-5844 (1993)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0008] 本発明は、新規な腫瘍免疫誘導剤を提供することを課題とする。詳しくは、腫瘍ワクチンの効果を有効に増強しうる腫瘍ワクチン用アジュバントと腫瘍ワクチンを含む腫瘍免疫誘導剤を提供することを課題とする。また、本発明は当該腫瘍免疫誘導剤の製造方法を提供することを課題とし、さらには上記腫瘍免疫誘導剤を用いる悪性腫瘍の治療方法を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

- [0009] 本発明者らは、アデノウイルスを用いた遺伝子治療法などで、特に生体内の細胞にアデノウイルスを投与する場合は、時に重篤な全身性炎症反応を引き起こす自然免疫系の活性化が問題となることに着目し、上記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、アデノウイルスそのものが腫瘍ワクチン用アジュバントとして機能しうることを初めて見出し、本発明を完成した。またアデノウイルスを、腫瘍ワクチンとして機能しうる腫瘍ワクチン細胞に導入することで、腫瘍免疫誘導剤を構築することに成功し、本発明を完成した。

[0010] すなわち本発明は、以下よりなる。

1. 腫瘍ワクチン用アジュバントとしてのアデノウイルスと腫瘍ワクチンを含む腫瘍免疫誘導剤。
2. アデノウイルスが、非増殖型アデノウイルスである、前項1に記載の腫瘍免疫誘導剤。
3. 腫瘍ワクチンが、腫瘍細胞由来物である前項1又は2に記載の腫瘍免疫誘導剤。
4. 腫瘍細胞由来物が、自家腫瘍細胞由来物又は他家腫瘍細胞由来物である、前項3に記載の腫瘍免疫誘導剤。
5. 他家腫瘍細胞がA549細胞、PC-3細胞、LNCaP細胞、HT-3細胞、COLO679細胞、Caki-1細胞、KE39細胞、KB細胞から選択されるいずれかの樹立腫瘍細胞株由来物である、前項4に記載の腫瘍免疫誘導剤。
6. 前項1～5のいずれか1に記載の腫瘍免疫誘導剤を含む癌治療剤。
7. 腫瘍ワクチンとなりうる腫瘍細胞由来物に、アデノウイルスを導入する工程を含む、腫瘍免疫誘導剤の製造方法。
8. アデノウイルスを腫瘍ワクチンとなりうる腫瘍細胞由来物に導入する工程が、アデノウイルスを腫瘍細胞由来物に感染させる工程である、前項7に記載の腫瘍免疫誘導剤の製造方法。
9. アデノウイルスが、非増殖型アデノウイルスである前項7又は8に記載の腫瘍免疫誘導剤の製造方法。
10. 腫瘍ワクチンとなりうる腫瘍細胞由来物が、自家腫瘍細胞由来物又は他家腫瘍細胞由来物である、前項7～9のいずれか1に記載の腫瘍免疫誘導剤の製造方法。
11. 他家腫瘍細胞がA549細胞、PC-3細胞、LNCaP細胞、HT-3細胞、COLO679細胞、Caki-1細胞、KE39細胞、KB細胞から選択されるいずれかの樹立腫瘍細胞株由来物である、前項10に記載の腫瘍免疫誘導剤の製造方法。

- 1 2. 前項 6 に記載の癌治療剤を含む皮下注射用製剤。
- 1 3. 前項 6 に記載の癌治療剤を投与することによる腫瘍免疫誘導方法。
- 1 4. 癌治療剤の投与が、皮下注射による投与である前項 1 3 に記載の腫瘍免疫誘導方法。
- 1 5. 前項 1 ~ 5 のいずれか 1 に記載の腫瘍免疫誘導剤を投与することによる悪性腫瘍の治療方法。

発明の効果

- [0011] 本発明の腫瘍ワクチン用アジュバントとして機能しうるアデノウイルスと腫瘍ワクチンを含む腫瘍免疫誘導剤は、腫瘍ワクチンによる腫瘍免疫を効果的に増強させうる。即ち、本発明の腫瘍免疫誘導剤は、腫瘍免疫誘導効果により、腫瘍重量の減少及び組織における腫瘍面積を低減化させうる。本発明のアデノウイルスと腫瘍ワクチンを含む腫瘍免疫誘導剤は、皮下投与又は静脈内投与することで、全身においてより確実に免疫能を増強させることができ、癌の転移などについても効果的に作用しうる。さらに前記腫瘍免疫誘導剤を用いた本発明の悪性腫瘍の治療方法により、優れた効果を奏する。
- [0012] なお、腫瘍ワクチン用アジュバントとして機能しうるアデノウイルスが、増殖型アデノウイルスの場合には、腫瘍ワクチン細胞内でのウイルス活性が、ロットごとにばらつく傾向を示し、腫瘍免疫誘導剤としてロットごとに一定の品質を維持することは困難である。一方、腫瘍ワクチン用アジュバントとして機能しうるアデノウイルスが、遺伝子改変により増殖が不可能となった非増殖型アデノウイルスの場合には、腫瘍ワクチン細胞にアデノウイルスが感染しても、アデノウイルスが複製、増殖せず、アデノウイルスタンパクが腫瘍ワクチン細胞に提示されるのみで、細胞内のウイルス活性がロットごとにばらつくこともない。

図面の簡単な説明

- [0013] [図1] DBA/2 マウスモデルを用いた腫瘍免疫確認のための各種投与スケジュールを示す図である。(実施例 1)
- [図2] KLN205 細胞の静脈内投与後 26 日目に摘出した肺組織を示す写真

図である。(実験例 1-1)

[図3] K L N 2 0 5 細胞の静脈内投与後 2 6 日目に摘出した肺組織における腫瘍重量を示す図である。(実験例 1-2)

[図4] K L N 2 0 5 細胞の静脈内投与後 2 6 日目に摘出した肺組織の組織切片における腫瘍部位を示す写真図である。(実験例 1-3)

[図5] K L N 2 0 5 細胞の静脈内投与後 2 6 日目に摘出した肺組織の組織切片における腫瘍面積の割合を示す図である。(実験例 1-3)

[図6] K L N 2 0 5 細胞の静脈内投与後 2 6 日目に摘出した肺組織の組織切片における H E 染色像の強拡像を示す写真図である。(実験例 1-3)

[図7] K L N 2 0 5 細胞の静脈内投与後 2 6 日目に摘出した肺組織の組織切片における抗 C D 4 5 R 抗体での免疫染色結果を示す写真図である。(実験例 1-4)

[図8] K L N 2 0 5 細胞の静脈内投与後 2 6 日目に摘出した肺組織の組織切片における抗 C D 3 抗体での免疫染色結果を示す写真図である。(実験例 1-4)

[図9] 非増殖型アデノウイルスを含む K L N 2 0 5 細胞の皮下投与後 0、5、10、15、20 及び 26 日目に摘出した肺組織における腫瘍重量を示す図である。(実施例 2)

[図10] 3 ロットについて、制限増殖型アデノウイルスを A 5 4 9 細胞(非小細胞性肺癌細胞株)に同条件で感染させたときの、A 5 4 9 細胞内外でのアデノウイルス活性を確認した図である。(参考例)

発明を実施するための形態

[0014] 本発明は、腫瘍ワクチン用アジュバントとしてのアデノウイルスと腫瘍ワクチンを含む腫瘍免疫誘導剤に関する。本発明の腫瘍ワクチン用アジュバントはアデノウイルスからなる。本発明のアデノウイルスは、標的とする腫瘍細胞に感染しうるものであれば、非増殖型アデノウイルス又は増殖型アデノウイルスであってもよい。増殖型アデノウイルスの場合は、天然型であってもよいし、制限増殖型アデノウイルスであってもよい。腫瘍ワクチン細胞に

アデノウイルスを感染させた腫瘍免疫誘導剤を作製する場合は、品質安定性の観点からは、非増殖型アデノウイルスが好ましい。また、腫瘍ワクチン細胞内で制限的に増殖しうる制限増殖型アデノウイルスを用いてもよい。この場合の制限増殖型アデノウイルスは、治療対象の標的とする腫瘍細胞、ならびに本発明の腫瘍ワクチン細胞において特異的に増殖するようウイルス遺伝子を改変し、標的細胞を融解・殺傷するcell lysis作用を有するものであってもよい。

[0015] 本発明のアデノウイルスが組換え型の場合には、遺伝子組換えによって増殖能を持たない非増殖型アデノウイルス又は腫瘍細胞内で特異的に増殖する制限増殖型アデノウイルスが用いられる。非増殖型アデノウイルスは、アデノウイルスの増殖に必須の遺伝子である初期遺伝子E1AならびにE1Bを欠損させることにより構築することができ、制限増殖型アデノウイルスは、初期遺伝子E1Aの上流に以下の各種プロモーターを挿入するか、あるいはE1AまたはE1Bの一部を欠損させることにより構築することができる。

[0016] 制限増殖型アデノウイルスは、腫瘍特異的プロモーターを有し、腫瘍細胞特異的に増殖しうる。具体的には、アデノウイルスの増殖に必須であるE1遺伝子を腫瘍特異的プロモーターで制御する。腫瘍特異的プロモーターとしては、特に限定されないが、例えば1A1、3Bプロモーター（1A1、3Bプロモーター）、ミッドカインプロモーター、 β -HCGプロモーター、SCCA1プロモーター、cox-2プロモーター、PSAプロモーター、又はその他の腫瘍特異的プロモーターが挙げられる。また、制限増殖型アデノウイルスは、使用する腫瘍ワクチン細胞において増殖可能であれば、例えばONYX社のE1B遺伝子欠失型の制限増殖型アデノウイルス、あるいはE1A遺伝子の一部欠損型のAd5- Δ 24アデノウイルスなど腫瘍特異的プロモーターを有しないものであってもよい。

[0017] 非増殖型アデノウイルスは、アデノウイルスの増殖に必須であるE1遺伝子を欠損させたヒトアデノウイルス5型に、治療遺伝子とそれを制御するプ

ロモーターを人為的に組み込んだ組換え型アデノウイルスとすることができる。人為的に組み込む治療遺伝子は、特に限定されないが、例えばp53腫瘍抑制遺伝子あるいはHSV-TK遺伝子が挙げられる。当該治療遺伝子を制御するプロモーターについても、そのような機能を有するプロモーターであればよく、特に限定されないが、例えばサイトメガロウイルス（CMV）プロモーター、ラウスサルコーマウイルス（RSV）プロモーター、又はオステオカルシン（Osteocalcin：OC）プロモーターが挙げられる。非増殖型アデノウイルスとして具体的にはAd-CMV-p53、Ad-RSV-HSV-TK、又はAd-OC-HSV-TKなどの組換え型アデノウイルスが挙げられる。

[0018] 使用する各プロモーター配列の長さ等については、腫瘍特異的プロモーター活性が得られる限りにおいて特に限定されるものではない。上記1A1.3Bプロモーターは、国際公開第03/025190号パンフレットやCancer Research 63, 2506-2512(2003)の記載にしたがって設計・調製し、ウイルスゲノムに挿入することができる。上記のミッドカインプロモーター、 β -HCGプロモーター、SCCA1プロモーターについては、それぞれ、国際公開第02/10368号パンフレット、国際公開第01/90344号パンフレット、国際公開第00/60068号パンフレットの記載にしたがって設計・調製し、ウイルスゲノムに挿入することができる。その他のプロモーターについても自体公知の方法にしたがって設計・調製し、ウイルスゲノムに挿入することができる。

[0019] 本発明の制限増殖型アデノウイルスに、腫瘍特異的プロモーターを組み込ませる場合は、例えば治療対象となる癌の種類や腫瘍ワクチンに使用する細胞の種類に応じて、以下のプロモーターを選択することができる。例えば、卵巣癌に対しては1A1.3Bプロモーター、脳腫瘍、悪性グリオーマなどに対してはミッドカインプロモーター、精巣癌に対しては β -HCGプロモーター、扁平上皮癌に対してはSCCA1プロモーター及びSCCA2プロモーター、大腸癌に対してはCEAプロモーター、前立腺癌に対してはPSAプロモーター、肝癌に対してはAFPプロモーター、を使用することがで

きる。勿論、他の公知の腫瘍特異的プロモーター、例えば、種々の悪性腫瘍に対してプロモーター活性を発揮し、広い作用スペクトラムを有するc o x - 2プロモーターや、その他オステオカルシンプロモーター等の各種癌特異性プロモーターを選択してもよい。上記ミッドカインプロモーターについては、脳腫瘍、悪性グリオーマのほか種々の悪性腫瘍に対して使用可能であり、この点においてc o x - 2プロモーターと同様に広い作用スペクトラムを有する。

[0020] 本発明の腫瘍ワクチン用アジュバントは、上述のアデノウイルスに、例えば、GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor : 顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子)、IL-2 (インターロイキン-2) などの免疫活性化物質の遺伝子をさらに組み込んだ組換え型アデノウイルスであってもよい。

[0021] 本発明における腫瘍ワクチンは、ワクチン機能を有する腫瘍細胞由来物であり、アデノウイルスが感染可能な細胞であれば良く特に制限されないが、ワクチネーション (腫瘍免疫) に使用する腫瘍細胞としては、自家腫瘍細胞が望ましく、それと類似した抗原を提示すると考えられる一般に入手可能な他家腫瘍細胞を使用してもよい。具体的には、自家腫瘍細胞のほか、他家腫瘍細胞の例として、例えば他患者由来の樹立腫瘍細胞株、A549細胞 (非小細胞性肺癌細胞株) PC-3細胞 (前立腺癌細胞株)、LNCaP細胞 (前立腺癌細胞株)、HT-3細胞 (子宮頸部扁平上皮癌細胞株)、COLO 679細胞 (悪性黒色腫細胞株)、Caki-1細胞 (腎細胞癌株)、KE39細胞 (胃癌細胞株)、KB細胞 (頭頸部癌細胞株) 等が挙げられる。本発明において、腫瘍ワクチンとして使用する腫瘍細胞由来物を、以下、「腫瘍ワクチン細胞」という場合もある。腫瘍ワクチン細胞は、細胞の増殖性をなくすために、自体公知の方法、又は今後開発される方法により、予め不活化処理しておくことが好ましく、そのような処理法として放射線照射処理やエタノール処理、ホルマリン処理等が挙げられる。前記腫瘍細胞への放射線の照射量は、いわゆる当業者が適宜決定することができ、例えば120 Gy

以上600Gy以下、好ましくは200Gy以上500Gy以下程度に設定することができる。

[0022] 本発明の、腫瘍ワクチン用アジュバントとしてのアデノウイルスと腫瘍ワクチンを含む腫瘍免疫誘導剤は、腫瘍ワクチン細胞である腫瘍細胞に、上記アデノウイルスが感染していることを要する。本発明の腫瘍免疫誘導剤の保存は、例えば液体窒素中あるいは -150°C 程度の温度にて保存することができる。一方、腫瘍ワクチン用アジュバントとしてのアデノウイルスは、例えば -80°C 程度の温度にて保存することができる。

[0023] 上記アデノウイルスを、腫瘍ワクチン細胞に感染させる方法は、常法に従って行えばよく特に限定されるものではないが、例えば前記腫瘍ワクチン細胞をディッシュに播き、これにアデノウイルスを感染可能な量、具体的には1,000~100,000vp/cellを添加し、95% O_2 、5% CO_2 、 37°C 、牛胎児血清FCS(-)、RPMI培地等、腫瘍ワクチン細胞を培養しうる培養液の条件下で、6~36時間程度、好ましくは12~33時間程度培養し、感染させる方法が簡便である。なお、3~6時間感染の場合は、FCS(-)の状態で、それ以上の時間感染させる場合は、3~6時間まではFCS(-)の状態におき、後にFCSを10%加えるとよい。アデノウイルスの感染量及び感染時間は、治療対象の腫瘍の大きさ・種類、腫瘍ワクチン細胞の種類、投与量、使用する腫瘍ワクチン用アジュバントを構成するアデノウイルスの種類、投与方法などに応じて適宜決定することができる。また、腫瘍ワクチン細胞を培養する培養液や、培養に必要な結成等の条件については、腫瘍ワクチン細胞の種類に応じて、適宜選択し、改変することができる。

[0024] 本発明の腫瘍免疫誘導剤は、少なくとも腫瘍ワクチン用アジュバントとしてのアデノウイルスと腫瘍ワクチン細胞を構含む腫瘍免疫誘導剤調製用キットから製造することができる。本発明の腫瘍免疫誘導剤を必要とする場合に、当該腫瘍免疫誘導剤調製用キットに含まれるアデノウイルスと腫瘍ワクチン細胞を用い、予め当該腫瘍ワクチン細胞に当該アデノウイルスが感染しうる日数を考慮して、必要時に当該腫瘍免疫誘導剤が得られるように製造する

ことができる。

[0025] 本発明は、腫瘍免疫誘導剤の製造方法にも及ぶ。腫瘍免疫誘導剤は、腫瘍ワクチンとなりうる腫瘍細胞由来物、即ち腫瘍ワクチン細胞に腫瘍ワクチン用アジュバントとしてのアデノウイルスを感染させる工程を含む方法により製造することができる。具体的には、腫瘍ワクチン細胞の培養処理を含み、適宜上述の腫瘍ワクチン細胞の不活化処理などの処理を行い、腫瘍ワクチン用アジュバントとしてのアデノウイルスを当該腫瘍ワクチン用細胞に感染させる工程を含む方法によることができる。アデノウイルスを感染させる方法は、例えば、上述の方法により行うことができる。

[0026] 本発明は当該腫瘍免疫誘導剤を含む癌治療剤にも及ぶ。本発明の腫瘍免疫誘導剤を含む癌治療剤は、既存の腫瘍ワクチンと同様の投与方法により腫瘍内局所投与、皮内投与、あるいは皮下投与などにより投与することができる。また、特に腫瘍免疫誘導剤は静脈内投与により全身投与することができる。このような投与方法に用いられる注射剤は常法に従って製造され、希釈剤として一般に生理食塩水、細胞培養液等を用いることができる。さらに必要に応じて、殺菌剤、防腐剤、安定剤、等張化剤、無痛化剤などを加えてもよい。投与量は、腫瘍の大きさ・種類、症状の程度、患者の年齢、体重などに応じて適宜決定することができる。本発明の癌治療剤は、数回にわたり患者に投与してもよいし、複数回のクールに分け、一クール当たりの投与回数、投与間隔などを任意に設定してもよい。

[0027] 本発明の癌治療剤は、ほぼ全ての悪性腫瘍に適用することができ、治療対象となる癌の種類は、卵巣癌、扁平上皮癌（子宮頸部癌、皮膚癌、頭頸部癌、食道癌、肺癌等）、消化器癌（大腸癌、膵癌、肝癌、胃癌等）、神経芽細胞腫、脳腫瘍、乳癌、精巣癌、前立腺癌などが例示される。

[0028] 本発明は、腫瘍免疫誘導方法及び悪性腫瘍の治療方法にも及ぶ。具体的には、上述のいずれかの悪性腫瘍の治療及び／又は予防のために、本発明の腫瘍免疫誘導剤を有効量投与することによる腫瘍免疫誘導方法治療方法に及ぶ。投与方法としては、上述したように、本発明の腫瘍免疫誘導剤を含む癌治

療剤を、既存の腫瘍ワクチンと同様に、腫瘍内局所投与、皮内投与、あるいは皮下投与などによることができ、特に本発明の腫瘍免疫誘導剤は静脈内投与により全身投与することができる。治療のための投与量は、腫瘍の大きさ・種類、症状の程度、患者の年齢、体重などに応じて適宜決定することができる。本発明の癌治療剤は、数回にわたり患者に投与してもよいし、複数回のクールに分け、一クール当たりの投与回数、投与間隔などを任意に設定してもよい。この治療方法は、自体公知の治療方法、例えば化学療法、抗体などによる生物学的製剤療法及び／又は放射線療法等と併用して行なってもよい。

実施例

[0029] 以下、本発明の理解を深めるために実施例により本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではないことはいうまでもない。

[0030] (実施例 1) マウスモデルにおける腫瘍免疫 (1)

本実施例では、腫瘍ワクチン細胞にアジュバントとしての制限増殖型アデノウイルスを加えることによるマウスモデルでの腫瘍免疫惹起の増強効果を確認した。本実施例で用いた癌治療剤は、制限増殖型アデノウイルスを腫瘍ワクチン細胞に予め感染させた腫瘍免疫誘導剤である。

[0031] 1) 材料

腫瘍ワクチン細胞として、A 5 4 9 細胞 (非小細胞性肺癌細胞株) を用いた (Int. J. Cancer 17(1): 62-70 (1976) 参照)。腫瘍ワクチン細胞は、A 5 4 9 細胞に 4 0 0 G y の放射線を照射して作製した。

[0032] アジュバントとしての制限増殖型アデノウイルスとして、E 1 A 遺伝子及び E 3 遺伝子を有し、かつ、E 1 A 遺伝子上流に腫瘍特異的プロモーターとして癌特異的 IAI. 3B プロモーター (IAI. 3B プロモーター) を有するアデノウイルス (AdE3-IAI. 3B) を用いた。AdE3-IAI. 3B は、Cancer Res. 63(10): 2506-12 (2003) に基づいて作製した。

[0033] 本発明の腫瘍免疫誘導剤 (ハイブリッド型腫瘍ワクチン: C B O V S 1)

は、A549細胞にAdE3-IAI.3B (4,000 v. p. /cell) を33時間感染させ、その後400 Gyの放射線を照射して作製した。

[0034] 肺転移モデルとして、DBA/2マウス(12週齢)に、以下に示す方法でKLN205細胞(マウス肺扁平上皮癌細胞株)を静脈内投与したモデルを作製した(In Vitro. 16(10):884-92 (1980))。

[0035] 2) 方法

ヒト成人の半数以上がアデノウイルスに感染していることから、予めマウスにアデノウイルスへの免疫を付加するため、Ad-β-gal (非増殖型アデノウイルス)をマウスの大腿へ 1×10^{11} v. p. /マウスの投与量で筋肉注射(i. m.)にて感作した。

その26日後、肺の多発転移巣を作製する目的で、DBA/2マウスにKLN205細胞、 5×10^5 個/マウスを静脈内投与(i. v.)した(Day 0)。KLN205細胞の静脈内投与後11日より、本発明の腫瘍免疫誘導剤(CBOVS1)を5日間隔で3回静脈内投与し、KLN205細胞の静脈内投与後26日目における転移癌の増殖抑制効果及び腫瘍免疫増強効果を確認した。比較対照として、AdE3-IAI.3B(アデノウイルス)、A549細胞ワクチン(腫瘍ワクチン)又はPBSを、同様に5日間隔で3回静脈内投与し、KLN205細胞の静脈内投与後26日目における転移癌の増殖抑制効果及び腫瘍免疫増強効果を確認した。本発明の腫瘍免疫誘導剤又は比較対照の投与量は表1に示し、投与スケジュールは図1に示した。

[0036] [表1]

Group	匹数	投与液	投与液濃度 (/ ml)	投与回数
コントロール	3	PBS	-	0.1ml / animal i.v. 3 times every 5 days
Ad-IAI.3B	3	Ad-IAI.3B	0.24×10^8 pfu	
A549	3	A549	0.5×10^6 cells	
CBOVS1	5	CBOVS	0.5×10^6 cells 0.24×10^8 pfu	

[0037] (試験例1-1) 肉眼所見

実施例1に記載の方法でマウスモデルに各種投与した後、KLN205細胞の静脈内投与後26日目に各マウスから肺を摘出し、肉眼で観察した。そ

の結果、CBOVS 1 投与群では他の 3 群に比較して腫瘍の増殖抑制が確認された。また A549 細胞ワクチン投与群でも AdE3-IAI.3B 投与群及びに無治療群（コントロール群）に比較して腫瘍の増殖抑制が確認された（図 2）。

[0038] （試験例 1-2）腫瘍重量

試験例 1-1 と同様に、KLN205 細胞の静脈内投与後 26 日目に各マウスから肺を摘出し、肺重量を測定した。その結果、CBOVS 1 投与群及び A549 細胞ワクチン投与群では、他の 2 群に比較して腫瘍増殖による肺重量の増加の抑制が確認された（図 3）。

[0039] （試験例 1-3）腫瘍面積

試験例 1-1 と同様に、KLN205 細胞の静脈内投与後 26 日目に各マウスから肺を摘出し、10%中性ホルマリンにて固定し、パラフィン包埋切片を作製した後、HE（ヘマトキシリン・エオジン）染色した。その後、HE 染色像をコンピューター解析し、肺組織における腫瘍の占める面積を計算した。その結果、CBOVS 1 投与群及び A549 細胞ワクチン投与群では、他の 2 群に比較して腫瘍面積の減少を認めた。CBOVS 1 投与群では腫瘍面積のさらなる減少を認めた（図 4、5）。また HE 染色像の強拡大像では CBOVS 1 投与群において腫瘍の崩壊所見が認められた（図 6）。

[0040] （試験例 1-4）免疫染色

試験例 1-1 と同様に、KLN205 細胞の静脈内投与後 26 日目に各マウスから肺を摘出し、CD45R 及び CD3 を免疫染色し、肺組織を観察した。ここで、CD45R 染色では B 細胞を検出し、CD3 染色では T 細胞を検出する。

摘出した肺試料を、10%中性ホルマリンにて固定した後、パラフィン包埋切片を作製した。該パラフィン包埋切片をクエン酸バッファー (pH6.0) 内でオートクレーブし、抗原賦活化処理を行った。CD45R 抗原の賦活化のために 120°C で 10 分間処理し、CD3 抗原賦活化のために 120°C で 15 分間処理した。各組織切片を室温で 15 分間、3%過酸化水素/メタノール処理し、内因性ペルオキシダーゼを不活性化処理した。さらに、8%スキム

ミルクにて37°C30分間ブロッキング処理後、一次抗体で各抗原と抗原抗体反応させ、常法により洗浄操作後、二次抗体で標識した。一次抗体では、抗CD45R抗体として抗CD45Rラットモノクローナル抗体（550286、BD Pharmingen社製、100倍希釈）、抗CD3抗体として抗CD3εヤギポリクローナル抗体（sc-1127、Santa Cruz社製、50倍希釈）を用いた。一次抗体は4°Cでオーバーナイト反応させた。二次抗体としては、各々抗ラットIgGHRP標識二次抗体（sc-2020、Santa Cruz社製、500倍希釈）、及び抗ヤギIgGHRP標識二次抗体（sc-2006、Santa Cruz社製、50倍希釈）を用い、室温で40分反応させた。

[0041] 上記の結果、CBOVS1投与群においてのみ腫瘍巣へのB細胞（抗CD45R抗体陽性）ならびにT細胞（抗CD3抗体陽性）の誘導、浸潤が確認された。以上のことよりA549を用いた腫瘍ワクチン細胞にアジュバント剤としての制限増殖型アデノウイルスを加え、感染させることにより、腫瘍細胞に対する適応免疫系を活性化しワクチン効果を高めることができ、腫瘍免疫誘導剤となりうるということが明確となった（図7、8）。

[0042] （実施例2）マウスモデルにおける腫瘍免疫（2）

本実施例では、腫瘍ワクチン細胞にアジュバントとしての非増殖型アデノウイルスを加えることによるマウスモデルでの腫瘍免疫惹起の増強効果を確認した。

[0043] 1) 材料

皮下腫瘍モデル作製の腫瘍細胞及び腫瘍ワクチン作製の細胞として、いずれもKLN205細胞（マウス肺扁平上皮癌細胞株）（In Vitro. 16(10):884-92（1980））を使用した。腫瘍ワクチン細胞は、KLN205細胞に200Gyの放射線を照射して作製し、IR-KLN205とした。

[0044] 本発明の腫瘍免疫増強剤は、以下の方法で作製した。アジュバントとしてAd-β-gal（非増殖型ウイルス）を使用した。1×10⁵ cellsのKLN205細胞に、1×10¹⁰ vpのAd-β-galを12時間感染させ、その後200Gyの放射線を照射し、本発明の腫瘍免疫増強剤を作製した。

[0045] 2) 方法

ヒト成人の半数以上がアデノウイルスに感染していることから、DBA/2マウスにアデノウイルスへの免疫を付加するため、Ad- β -gal (1×10^{10} vp/マウス) を0、7、14、21日の計4回、大腿へ予め筋肉注射(i.m.)し、感作した。DBA/2マウスにAd- β -gal投与後25日目に、当該DBA/2マウス(12週齢)にKLN205細胞(1×10^5 cells/マウス)を皮下注射し、KLN205細胞による腫瘍マウスモデルを作製した(In Vitro. 16(10):884-92 (1980))。

[0046] 次に、上記作製した腫瘍マウスモデルに、30日~66日まで3日おきに計11回、本発明の腫瘍免疫誘導剤を皮下投与した。また、比較対照として、同様にPBS、Ad- β -gal (1×10^{10} vp)、放射線照射した腫瘍ワクチン細胞(IR-KLN205細胞: 1×10^5 cells)、事前にAd- β -galを感染させないが、Ad- β -gal (1×10^{10} vp) 及びIR-KLN205細胞(1×10^5 cells)を各腫瘍マウスモデルにそれぞれ皮下注射した。

[0047] (試験例2-1) 腫瘍の大きさ

各試験系において、腫瘍の大きさを5日毎に計測した。図9のグラフにおける0日目(Day 0)は、本発明の腫瘍免疫誘導剤を投与した日を示しており、上述のAd- β -galを予め投与した初日から数えて30日目と同じ意味である。

[0048] 上記の結果、非増殖型アデノウイルスAd- β -gal単独の皮下注射では腫瘍免疫誘導効果(抗腫瘍効果)を認めなかった。IR-KLN205細胞(腫瘍ワクチン細胞)及びAd- β -gal+IR-KLN205細胞については腫瘍免疫誘導効果を認めたが、KLN205細胞にAd- β -galを感染させずに、KLN205細胞とAd- β -galを加えた系では、腫瘍ワクチン細胞単独投与に較べて、腫瘍免疫誘導効果の違いは殆ど認められなかった。IR-KLN205細胞に対してAd- β -galを感染させた腫瘍免疫誘導剤を投与した場合、腫瘍ワクチン細胞単独と比較して腫瘍増大作用が抑制され、有意な腫瘍免疫誘導効果が確認された(図9)。

[0049] (参考例) 増殖型アデノウイルスを用いた腫瘍免疫誘導剤の安定性

腫瘍ワクチン細胞にアデノウイルスタンパク (抗原ペプチド) を発現させるためアデノウイルスをワクチン細胞に感染させた場合、非増殖型アデノウイルスの場合はワクチン細胞内でアデノウイルスが増殖しないので品質管理は比較的容易である。しかしながら増殖型アデノウイルスをワクチン細胞に感染させて腫瘍免疫誘導剤を作製した場合、ワクチン細胞内でアデノウイルスが増殖するので、細胞内のアデノウイルスの力価をロットごとに一定に保つことが非常に困難である。アデノウイルスの力価の異なるロットを同一の薬剤とすることは安全性ならびに有効性に非常に大きな問題があると考えられる。

[0050] 本参考例では、以下のように制限増殖型アデノウイルス (AdE3-IAI. 3B) を用い、同様の材料及び製造条件で作製した腫瘍免疫誘導剤 (3つのロット) において、1ワクチン細胞内のアデノウイルス力価 (PFU) を確認した。

[0051] 1) 制限増殖型アデノウイルス (AdE3-IAI. 3B) を用いた腫瘍免疫誘導剤の作製

対数増殖期にある A 5 4 9 細胞 1.5×10^7 cell を、10% FCS 加 RPMI 培養液 25 ml を加えた 15 cm ディッシュ (コーニング社) に播種し、一夜培養した。翌日その内 1 ディッシュをサンプルとして取り出し、培養上清を完全に吸引し、PBS を 5 ml 加え、これを完全に吸引し、この操作を再度行い、FCS を取り除いた。この後、トリプシン溶液 2 ml を加えて 5 分程度 CO_2 インキュベーターに入れ、細胞が剥離したことを確認した。その後、FCS 加 RPMI を予め 20 ml 入れた 50 ml 容のチューブに、上記トリプシン処理にて 15 cm ディッシュより完全に剥離した A 5 4 9 細胞を加え、1 ディッシュあたりの細胞数をカウントした。

[0052] 各ディッシュに FCS を加えていない RPMI のみの培養液を 12.5 ml 加え、4000 vp/cell となるよう制限増殖型アデノウイルス (AdE3-IAI. 3B) を各ディッシュに加えた。これを、5% CO_2 、37°C で 3 時間プレインキュベーションし、全細胞にウイルス感染を成立させた。さらに、20% FCS 加 RPMI を 12.5 ml 加え、総量 25 ml の培養液にて感染させた。

- [0053] 24時間感染後、各15cmディッシュの培養液を完全に吸引し、PBS 5mlで洗浄し、吸引し、これを再度繰り返した。トリプシン溶液2mlを加えてCO₂インキュベーターにて5分程度静置し、細胞を剥離した後、10%FCS加RPMIをあらかじめ20ml入れた50ml容のチューブに前記剥離したA549細胞を加え、1500rpmで5分間遠心処理を行なった。その後、PBSを加えて軽くタッピングすることにより細胞をほぐし、再度1500rpmで5分間遠心処理を行なった後、PBSを加え、軽くタッピングすることにより細胞をほぐし、全細胞数をカウントした。細胞のダメージを防ぐため、ボルテックスは使用しなかった。
- [0054] 5%アルブミン^(R) (ZLBベアリンガー) 95%及びグリセリン5%含む保存液を作製し、上記制限増殖型アデノウイルスが感染したA549細胞(5×10⁷個/ml)を入れ、凍結用バイアルに各々1mlずつ分注した。さらに、100μlずつ別のバイアルに分注し、これを活性検定用とした。活性検定用のバイアルを室温にて400GyでX線照射した。
- [0055] 2) 制限増殖型アデノウイルス(AdE3-IAI.3B)のウイルス力価の測定
ウイルス力価は、PFU(plaque-forming unit)アッセイにより測定した。PFU assayは、Williamsburg Bioprocessing Foundation(WilBio)のホームページ情報(<http://www.wilbio.com/>)に示す方法に基づいて多少の改良をして行った。PFUアッセイは、アデノウイルスの生物活性を測定する方法として、最も古典的で基本的な方法である。
- [0056] 10%FCS加DMEM (high glucose) 培養液25ml (15cmディッシュ)で培養した対数増殖期にある293細胞を用いた。PBS 5mlで2回洗浄し、トリプシン溶液2mlを加え、CO₂インキュベーターで3~5分程度反応させた後、10倍量の10%FCS加DMEM (high glucose)を加えてトリプシンを中和し、ディッシュから剥離した293細胞の細胞数を白血球計算盤にて算定した。293細胞を培養液で希釈し、4000個/100μlを96穴プレートの各ウェルに撒き、CO₂インキュベーター内で一晩静置培養した。

- [0057] 上記活性検定用に分注しておいた100 μ l保存液中のA549細胞を、卓上遠心器で5000rpm \times 5分間遠心し、上清を別のチューブに移し、保存液上清（細胞外ウイルス）とした。FCS不含DMEM（high glucose）液を、A549細胞を含む100 μ lのペレットに入れて軽く攪拌し、液体窒素にて5分凍結し、37 $^{\circ}$ Cのウォーターバスで融解し、これを計3回繰り返した。終了後、十分に攪拌した後、5000rpm \times 5分間遠心し、この上清を細胞上清（細胞内ウイルス）とした。
- [0058] 保存液上清（細胞外ウイルス）及び細胞上清（細胞内ウイルス）の各溶液をウイルス液とし、当該ウイルス液10 μ lとFCS不含DMEM（high glucose）培養液390 μ lで40倍に希釈し、以後、ウイルス希釈液100 μ lと培養液300 μ lで4倍希釈系列を作製した。
- [0059] 上述の一晩静置培養した293細胞を含む96穴プレートの各ウェルから培養液を吸引し、上記希釈したウイルス液100 μ l/ウェルずつ加えた。CO₂インキュベーター内で1時間反応させた後、各ウェルに20%FCS加DMEM（high glucose）液を100 μ lずつ加え、その後、CO₂インキュベーター内で15日間培養した。培養液は5日毎に80 μ lずつ加えた。培養10日目から15日目まで各ウェルにおける293細胞の細胞変性効果（cytopathic effect; CPE）を確認した。IC₅₀を計算し、ウイルス力価（PFU値）を算定した。
- [0060] A549の細胞内外のアデノウイルス力価を確認した結果、図10に示すように、細胞内のウイルス力価にばらつきを生じることが観察された。従って、実用化の際の品質管理上の必須事項である、腫瘍ワクチン細胞内のウイルス力価を安定的に維持するためには、制限増殖型アデノウイルスよりは、非増殖型アデノウイルスの方が好ましいと考えられた。

産業上の利用可能性

- [0061] 以上詳述したように、本発明の腫瘍ワクチン用アジュバントとして機能しうるアデノウイルスと腫瘍ワクチンとを含む腫瘍免疫誘導剤は、腫瘍ワクチンによる腫瘍免疫を効果的に増強させうる。即ち、本発明の腫瘍免疫誘導剤

は、腫瘍免疫効果により、腫瘍重量の減少及び組織における腫瘍面積を低減化させうる。本発明のアデノウイルスと腫瘍ワクチンを含む腫瘍免疫誘導剤は、皮下投与又は静脈内投与することで、全身においてより確実に免疫能を増強させることができ、癌の転移などについても効果的に作用しうる。さらに前記腫瘍免疫誘導剤を用いた本発明の悪性腫瘍の治療方法により、優れた効果を奏する。

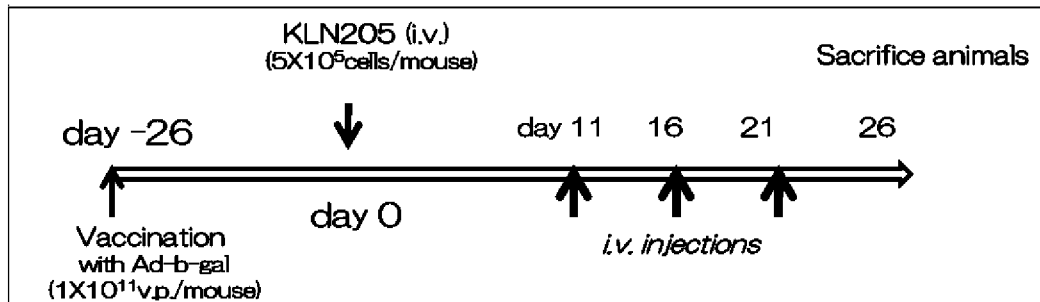
[0062] なお、腫瘍ワクチン用アジュバントとして機能しうるアデノウイルスが、増殖型アデノウイルスの場合には、腫瘍ワクチン細胞内でのウイルス活性が、ロットごとにばらつく傾向を示し、腫瘍免疫誘導剤としてロットごとに一定の品質を維持することは困難である。一方、腫瘍ワクチン用アジュバントとして機能しうるアデノウイルスが、非増殖型アデノウイルスの場合には、腫瘍ワクチン細胞にアデノウイルスが感染しても、アデノウイルスが増殖するわけではないので、腫瘍ワクチン細胞内でのウイルス活性は、ロットごとにばらつくこともない。

請求の範囲

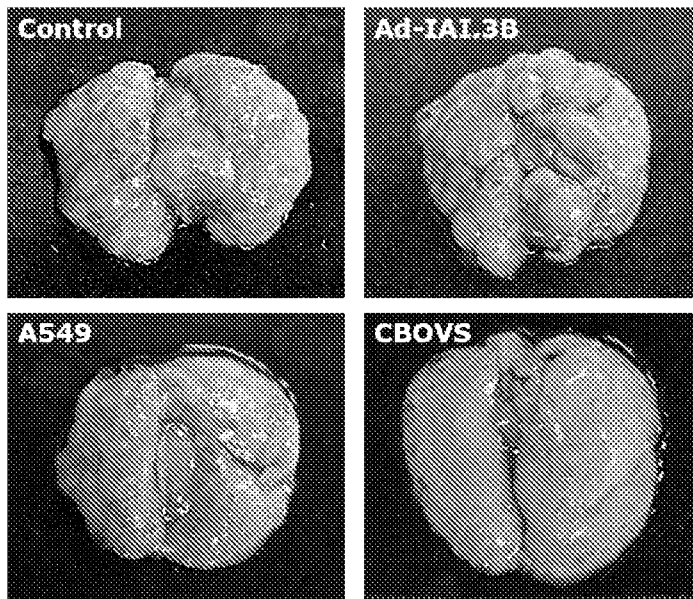
- [請求項1] 腫瘍ワクチン用アジュバントとしてのアデノウイルスと腫瘍ワクチンを含む腫瘍免疫誘導剤。
- [請求項2] アデノウイルスが、非増殖型アデノウイルスである、請求項1に記載の腫瘍免疫誘導剤。
- [請求項3] 腫瘍ワクチンが、腫瘍細胞由来物である請求項1又は2に記載の腫瘍免疫誘導剤。
- [請求項4] 腫瘍細胞由来物が、自家腫瘍細胞由来物又は他家腫瘍細胞由来物である、請求項3に記載の腫瘍免疫誘導剤。
- [請求項5] 他家腫瘍細胞がA549細胞、PC-3細胞、LNCaP細胞、HT-3細胞、COLO679細胞、Caki-1細胞、KE39細胞、KB細胞から選択されるいずれかの樹立腫瘍細胞株由来物である、請求項4に記載の腫瘍免疫誘導剤。
- [請求項6] 請求項1～5のいずれか1に記載の腫瘍免疫誘導剤を含む癌治療剤。
- [請求項7] 腫瘍ワクチンとなりうる腫瘍細胞由来物に、アデノウイルスを導入する工程を含む、腫瘍免疫誘導剤の製造方法。
- [請求項8] アデノウイルスを腫瘍ワクチンとなりうる腫瘍細胞由来物に導入する工程が、アデノウイルスを腫瘍細胞由来物に感染させる工程である、請求項7に記載の腫瘍免疫誘導剤の製造方法。
- [請求項9] アデノウイルスが、非増殖型アデノウイルスである請求項7又は8に記載の腫瘍免疫誘導剤の製造方法。
- [請求項10] 腫瘍ワクチンとなりうる腫瘍細胞由来物が、自家腫瘍細胞由来物又は他家腫瘍細胞由来物である、請求項7～9のいずれか1に記載の腫瘍免疫誘導剤の製造方法。
- [請求項11] 他家腫瘍細胞がA549細胞、PC-3細胞、LNCaP細胞、HT-3細胞、COLO679細胞、Caki-1細胞、KE39細胞、KB細胞から選択されるいずれかの樹立腫瘍細胞株由来物である、請求項10に記載の腫瘍免疫誘導剤の製造方法。

- [請求項12] 請求項6に記載の癌治療剤を含む皮下注射用製剤。
- [請求項13] 請求項6に記載の癌治療剤を投与することによる腫瘍免疫誘導方法。
- [請求項14] 癌治療剤の投与が、皮下注射による投与である請求項13に記載の腫瘍免疫誘導方法。
- [請求項15] 請求項1～5のいずれか1に記載の腫瘍免疫誘導剤を投与することによる悪性腫瘍の治療方法。

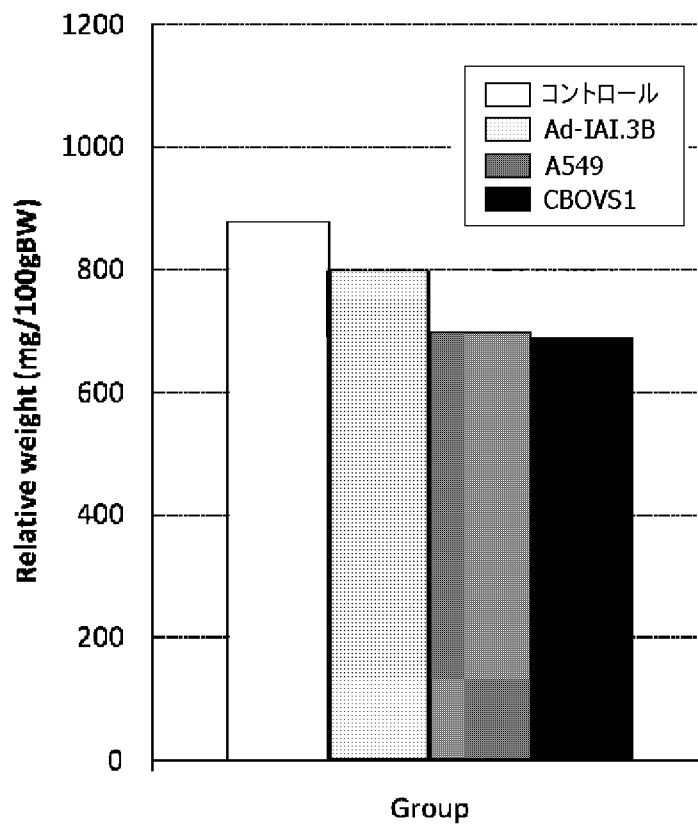
[図1]



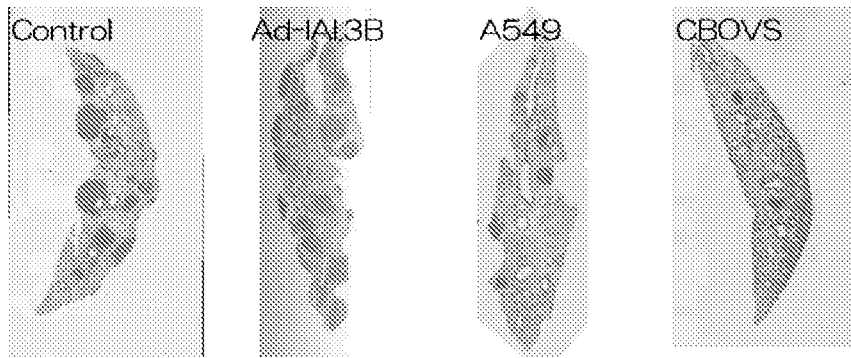
[図2]



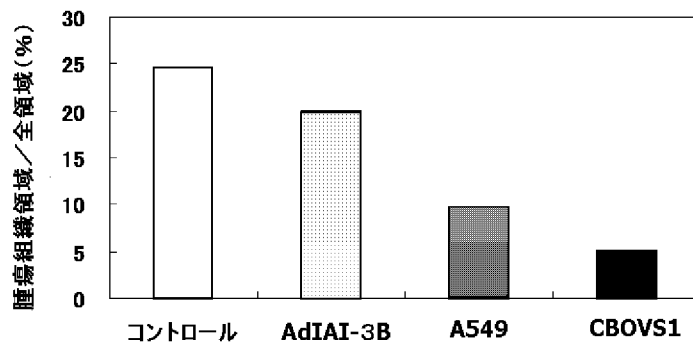
[図3]



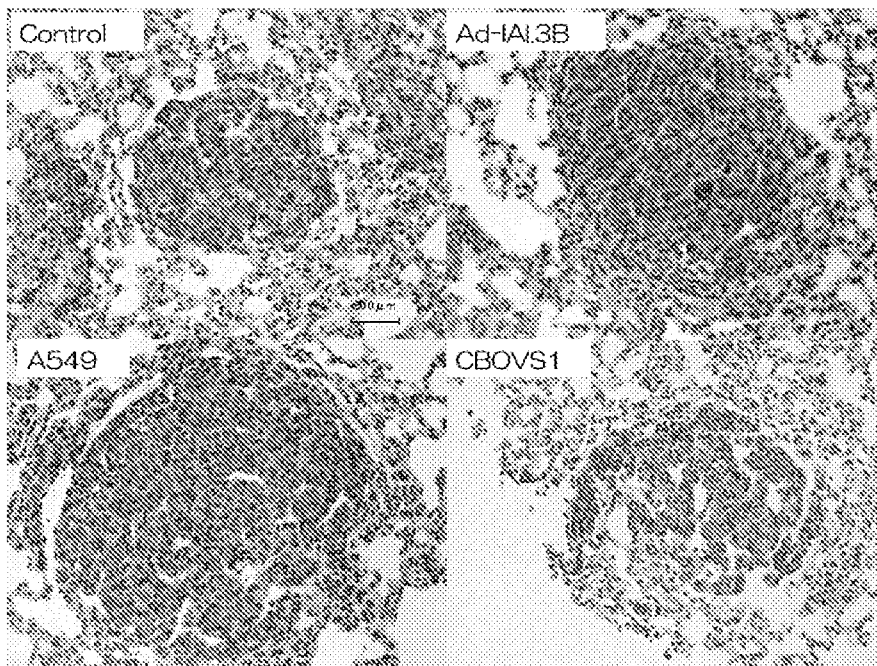
[図4]



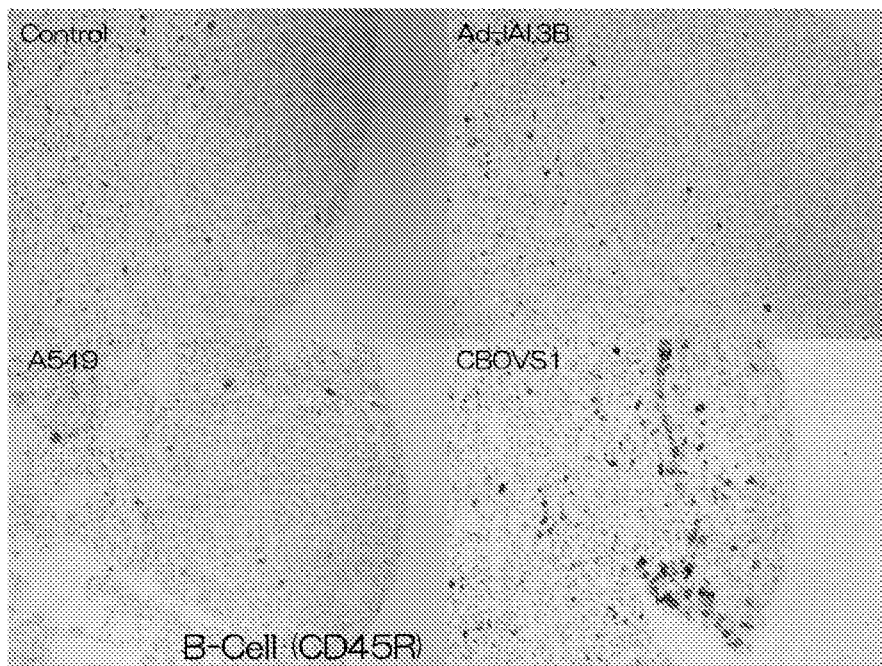
[図5]



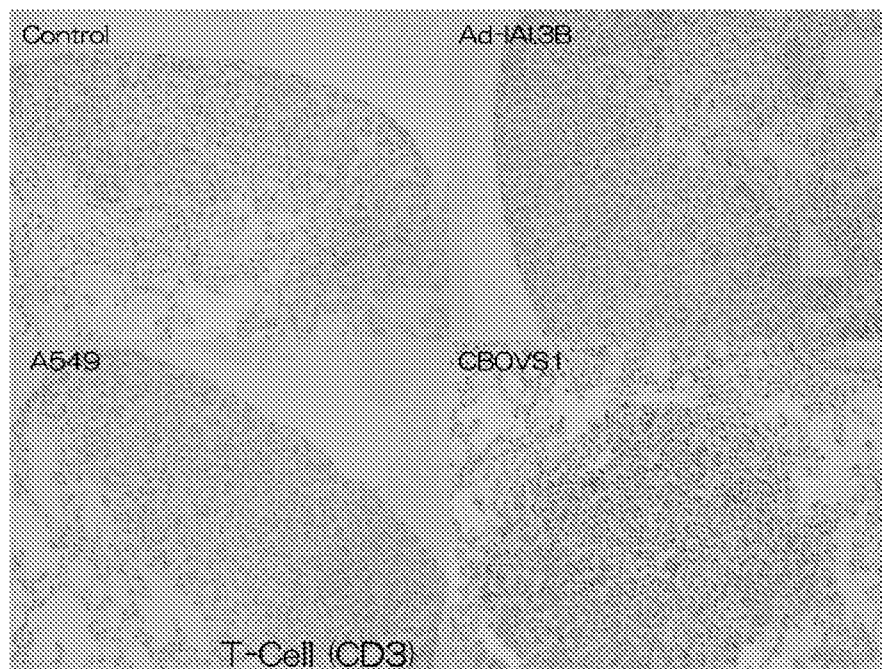
[図6]



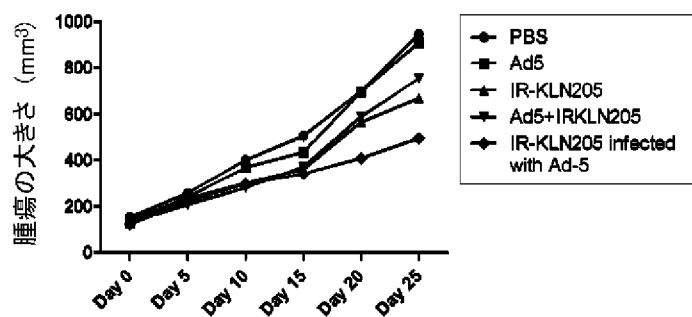
[図7]



[図8]

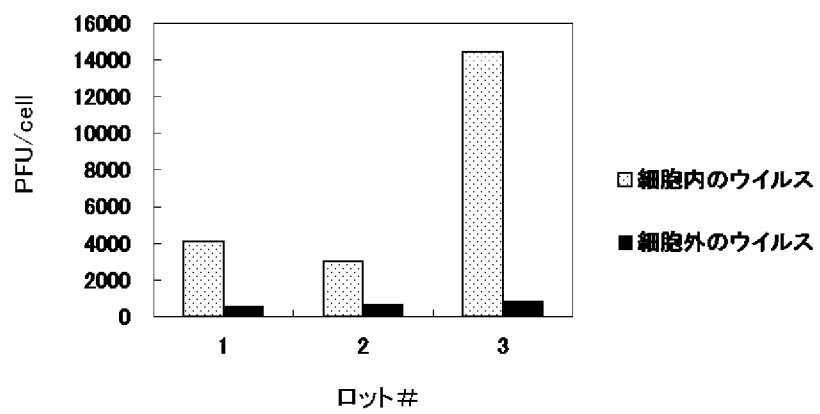


[図9]



腫瘍免疫誘導剤処理後(日)

[図10]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/002263

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K39/39(2006.01) i, A61K35/76(2006.01) i, A61K39/00(2006.01) i, A61P35/00(2006.01) i, A61P37/04(2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K39/39, A61K35/76, A61K39/00, A61P35/00, A61P37/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2010
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2010	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2010

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (STN), CAPLUS (STN), EMBASE (STN), MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Massimo Maddaloni, The Journal of Immunology, Vol.177, 2006, Pages 5524-5532	1-12
Y	WO 2008/64451 A1 (UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA), 05 June 2008 (05.06.2008), claims 1 to 37 & EP 2094301 A & CA 2673757 A & JP 2010-510992 A	1-12
Y	Lucy Deriy, Cancer Gene Therapy, Vol.12, 2005, Pages 528-539	1-12

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
21 April, 2010 (21.04.10)

Date of mailing of the international search report
11 May, 2010 (11.05.10)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2010/002263

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

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

- 1. Claims Nos.: 13-15
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 13 to 15 include methods for treatment of the human body by surgery or therapy.

- 2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

- 3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

- 1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
- 2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
- 3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

- 4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

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

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A61K39/39(2006.01)i, A61K35/76(2006.01)i, A61K39/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P37/04(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A61K39/39, A61K35/76, A61K39/00, A61P35/00, A61P37/04

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2010年
日本国実用新案登録公報	1996-2010年
日本国登録実用新案公報	1994-2010年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS (STN), CAPLUS (STN), EMBASE (STN), MEDLINE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	Massimo Maddaloni, The Journal of Immunology, Vol.177, 2006, Pages 5524-5532	1-12
Y	WO 2008/64451 A1 (UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA) 2008.06.05, 請求項 1-37 & EP 2094301 A & CA 2673757 A & JP 2010-510992 A	1-12
Y	Lucy Deriy, Cancer Gene Therapy, Vol.12, 2005, Pages 528-539	1-12

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

21.04.2010

国際調査報告の発送日

11.05.2010

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
 郵便番号100-8915
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

長部 喜幸

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

4C

3229

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

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求項 13-15 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、請求項13-15は、人の身体の手術又は治療による処置を包含するものである。
2. 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

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

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

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。