

(19) 日本国特許庁(JP)

**再公表特許(A1)**

(11) 国際公開番号

**W02010/030002**

発行日 平成24年2月2日 (2012.2.2)

(43) 国際公開日 **平成22年3月18日 (2010.3.18)**

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
<b>C 1 2 N 5/10 (2006.01)</b>	C 1 2 N 5/00 1 O 2	4 B O 6 5
<b>A 6 1 K 35/12 (2006.01)</b>	A 6 1 K 35/12	4 C O 8 4
<b>A 6 1 K 35/76 (2006.01)</b>	A 6 1 K 35/76	4 C O 8 5
<b>A 6 1 K 48/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 48/00	4 C O 8 7
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 28 頁) 最終頁に続く

出願番号	特願2010-528765 (P2010-528765)	(71) 出願人	304026696 国立大学法人三重大学 三重県津市栗真町屋町1577
(21) 国際出願番号	PCT/JP2009/065938		
(22) 国際出願日	平成21年9月11日 (2009.9.11)		
(31) 優先権主張番号	特願2008-234812 (P2008-234812)	(71) 出願人	302019245 タカラバイオ株式会社 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号
(32) 優先日	平成20年9月12日 (2008.9.12)		
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		
(31) 優先権主張番号	特願2009-115589 (P2009-115589)	(74) 代理人	100081422 弁理士 田中 光雄
(32) 優先日	平成21年5月12日 (2009.5.12)		
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(74) 代理人	100084146 弁理士 山崎 宏
		(74) 代理人	100122301 弁理士 富田 憲史
		(72) 発明者	珠玖 洋 三重県津市江戸橋二丁目174番地 国立 大学法人三重大学大学院医学系研究科内 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 外来性 G I T R リガンド発現細胞

## (57) 【要約】

本発明により、外来性の G I T R L 又は G I T R L 誘導体を発現する細胞、当該細胞の製造方法、当該細胞を有効成分として含有する治療剤又は予防剤、当該細胞の治療剤又は予防剤の製造における使用、当該細胞を対象に投与する工程を包含する方法、G I T R L 又は G I T R L 誘導体をコードする遺伝子を含むウイルスベクター、当該ウイルスベクターを有効成分として含有する治療剤又は予防剤、当該ウイルスベクターの治療剤又は予防剤の製造における使用、及び当該ウイルスベクターを対象に投与する工程を包含する方法が提供される。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

外来性のGITRL (Glucocorticoid - Induced Tumor necrosis factor Receptor Ligand) 又はGITRL誘導体を発現する細胞。

## 【請求項 2】

GITRL誘導体がGITRL又はGITRLフラグメントと免疫グロブリンのFcフラグメントの融合タンパク質 (GITRL - Fc) である請求項 1 記載の細胞。

## 【請求項 3】

細胞が腫瘍細胞又は免疫細胞である請求項 1 又は 2 記載の細胞。

10

## 【請求項 4】

細胞が不活化処理された腫瘍細胞である請求項 3 記載の細胞。

## 【請求項 5】

GITRL 又はGITRL誘導体をコードする遺伝子を含むベクターで細胞を形質転換させる工程を包含する、請求項 1 に記載の細胞の製造方法。

## 【請求項 6】

GITRL誘導体がGITRL - Fcである請求項 5 記載の製造方法。

## 【請求項 7】

細胞が腫瘍細胞又は免疫細胞である請求項 5 又は 6 記載の製造方法。

## 【請求項 8】

細胞が不活化処理された腫瘍細胞である請求項 7 記載の製造方法。

20

## 【請求項 9】

GITRL 又はGITRL誘導体をコードする遺伝子を含むウイルスベクター。

## 【請求項 10】

レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター及びセンダイウイルスベクターからなる群より選択されるベクターにGITRL 又はGITRL誘導体をコードする遺伝子が含まれてなる請求項 9 記載のウイルスベクター。

## 【請求項 11】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の細胞を有効成分として含有する治療剤又は予防剤。

30

## 【請求項 12】

請求項 11 に記載の治療剤又は予防剤の製造における、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の細胞の使用。

## 【請求項 13】

対象を処置する方法であって、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の細胞を対象に投与する工程を包含する方法。

## 【請求項 14】

請求項 9 又は 10 記載のウイルスベクターを有効成分として含有する治療剤又は予防剤。

## 【請求項 15】

請求項 14 に記載の治療剤又は予防剤の製造における、請求項 9 又は 10 記載のウイルスベクターの使用。

40

## 【請求項 16】

対象を処置する方法であって、請求項 9 又は 10 記載のウイルスベクターを対象に投与する工程を包含する方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、腫瘍の処置のために治療剤又は予防剤、例えばワクチンとして用いるための、遺伝子改変されたグルココルチコイド誘導腫瘍壊死因子受容体 (Glucocorti

50

coid-induced tumor necrosis factor receptor、以下GITRと記載する)リガンド発現細胞、及びその誘導体発現細胞に関する。さらに本発明は、GITRリガンド発現細胞又はその誘導体発現細胞により誘導される増強された細胞性免疫応答、及び制御性T細胞が関与する免疫抑制の制御に関する。

【背景技術】

【0002】

生体は主として免疫応答により異物から守られており、免疫システムはさまざまな細胞とそれが作り出す可溶性の因子によって成り立っている。なかでも中心的な役割を果たしているのが白血球、特にリンパ球である。このリンパ球はBリンパ球(以下、B細胞と記載することがある)とTリンパ球(以下、T細胞と記載することがある)という2種類の主要なタイプに分けられ、いずれも抗原を特異的に認識し、これに作用して生体を防御する。

10

【0003】

腫瘍の治療法として、外科手術、化学療法、放射線療法に次ぐ第4の方法である免疫療法が近年関心を集めている。免疫療法は本来ヒトが有する免疫力を利用するため、患者への肉体的負担が他の治療法と比べて軽いと言われている。免疫療法には体外で誘導した細胞傷害性Tリンパ球(CTL)や末梢血リンパ球などから種々の方法で拡大培養して得られるリンフォカイン活性化細胞、ナチュラルキラーT(NKT)細胞、T細胞などを移入する療法、体内での抗原特異的CTLの誘導を期待する樹状細胞移入療法やペプチドワクチン療法、Th1細胞療法、更にこれら細胞に種々の効果を期待できる遺伝子を体外で導入して体内に移入する免疫遺伝子治療法などが知られている。これらの免疫療法において、CD4陽性T細胞及びCD8陽性T細胞が極めて重要な役割を果たしていることが古くから知られている。

20

【0004】

CD8陽性T細胞は、生体内においても試験管内においても直接的に腫瘍細胞を破壊する能力を持つ主要なエフェクター細胞である。この細胞は、MHCクラスIに提示された抗原ペプチドの特異性に関して厳格である。これに対し、NKT細胞は、抗原特異性の制約が緩く、固有性の免疫応答を示すエフェクター細胞であると考えられている。

【0005】

一方、CD4陽性T細胞は、直接には腫瘍細胞を破壊しないが、抗腫瘍免疫応答を複数の機構を通して制御する基本的な役割を担っているとされている。MHCクラスII分子に提示された腫瘍抗原ペプチドを認識したCD4陽性T細胞は、抗原提示細胞(APC)との相互作用によるCTLの活性化及び増殖を増幅する。

30

【0006】

これに対し、CD25陽性CD4陽性T細胞(制御性T細胞:Treg)は、抗腫瘍免疫応答や種々の自己免疫病の進展を抑制することが示されている(特許文献1及び非特許文献1参照)。すなわち、制御性T細胞は、CD4陽性T細胞を標的としてヘルパー機能を制御することを通して細胞障害性のCD8陽性T細胞の活性を抑制するため、一部の腫瘍は増殖のためにこのシステムを利用して免疫システムからの攻撃を回避していると考えられている。

40

【0007】

制御性T細胞において発現している遺伝子として見出されたGITR(非特許文献1参照)は、細胞表面の膜貫通タンパク質受容体であり、腫瘍壊死因子受容体(TNFR)スーパーファミリーの一員である。GITRは、非活性化T細胞上に構成的に存在することが示されている。GITRは、GITRリガンド(以下GITRLと記載する)と称される別の膜貫通タンパク質に結合する。GITRに対する作動性抗体は、制御性T細胞の免疫抑制活性を解除することが示されていることから、GITRLはGITRを介して制御性T細胞の活性を制御するという機能的な役割を果たしていることが示唆されている(非特許文献2参照)。

【先行技術文献】

50

## 【特許文献】

【0008】

【特許文献1】US2003049696号公報

## 【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】S. Sakaguchi et al., Immunol. Rev. 182 (2001), pp18-32

【非特許文献2】McHugh et al., Immunity 16 (2002), pp311-23

## 【発明の概要】

10

## 【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明の目的は上記現状に鑑み、汎用性のある免疫系増強作用を有し、治療剤又は予防剤（ワクチン）として有用な物質、当該物質を使用する対象の処置方法などを提供することにある。

## 【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明者らはGITRL又はその誘導体を発現し得るよう改変した細胞を生体に投与することにより、強力な腫瘍に対するワクチン効果と局所的な抗腫瘍細胞性免疫応答が誘導されることを見出し本発明を完成させた。

20

【0012】

すなわち本発明を概説すれば、

[1] 外来性のGITRL又はGITRL誘導体を発現する細胞、

[2] GITRL誘導体がGITRL又はGITRLフラグメントと免疫グロブリンのFcフラグメントの融合タンパク質（GITRL-Fc）である[1]の細胞、

[3] 細胞が腫瘍細胞又は免疫細胞である[1]又は[2]の細胞、

[4] 細胞が不活化処理された腫瘍細胞である[3]の細胞、

[5] GITRL又はGITRL誘導体をコードする遺伝子を含むベクターで細胞を形質転換させる工程を包含する、[1]の細胞の製造方法、

[6] GITRL誘導体がGITRL-Fcである[5]の製造方法、

30

[7] 細胞が腫瘍細胞又は免疫細胞である[5]又は[6]の製造方法、

[8] 細胞が不活化処理された腫瘍細胞である[7]の製造方法、

[9] GITRL又はGITRL誘導体をコードする遺伝子を含むウイルスベクター、

[10] レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター及びセンダイウイルスベクターからなる群より選択されるベクターにGITRL又はGITRL誘導体をコードする遺伝子が含まれてなる[9]のウイルスベクター、

[11] [1]～[4]のいずれかの細胞を有効成分として含有する治療剤又は予防剤、

[12] [11]の治療剤又は予防剤の製造における、[1]～[4]のいずれかの細胞の使用、

[13] 対象を処置する方法であって、[1]～[4]のいずれかの細胞を対象に投与する工程を包含する方法、

40

[14] [9]又は[10]のウイルスベクターを有効成分として含有する治療剤又は予防剤、

[15] [14]の治療剤又は予防剤の製造における、[9]又は[10]のウイルスベクターの使用、及び

[16] 対象を処置する方法であって、[9]又は[10]のウイルスベクターを対象に投与する工程を包含する方法、

に関する。

## 【発明の効果】

【0013】

50

本発明により、腫瘍に対する強力なワクチン作用、特定の抗原に対する免疫応答誘導作用を発揮し得る細胞、当該細胞を有効成分として含有する治療剤又は予防剤、並びにこれらを使用する対象の処置方法が提供される。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】図1は、pMT-mGFCの概略図である。

【図2】図2は、マウスGITRL-Fcの測定結果を示す図である。

【図3】図3は、マウス腫瘍径の経時変化を示す図である。

【図4】図4は、テトラマーアッセイの結果を示す図である。

【図5】図5は、マウス腫瘍径の経時変化を示す図である。

【図6】図6は、マウス腫瘍径の経時変化を示す図である。

【図7】図7は、テトラマーアッセイの結果を示す図である。

【図8】図8は、マウス腫瘍径の経時変化を示す図である。

【図9】図9は、マウス腫瘍径の経時変化を示す図である。

【図10】図10は、マウス腫瘍径の経時変化を示す図である。

【図11】図11は、T細胞の活性化を示す図である。

【図12】図12は、制御性T細胞の割合を示す図である。

【図13】図13は、CD8陽性T細胞の割合を示す図である。

【図14】図14は、マウス腫瘍径の経時変化を示す図である。

【図15】図15は、マルチファンクション性細胞の割合を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0015】

本明細書において「GITRL」とは、グルコシルチコイド誘導腫瘍壊死因子受容体(GITR)に結合するリガンドを意味し、TNFSF18(tumor necrosis factor(ligand) superfamily, member 18)とも呼ばれる。ヒトGITRLのアミノ酸配列は、配列表の配列番号6又はSwiss Prot ID No: Q9UNG2に示される。また、ヒトGITRLの塩基配列は、配列表の配列番号7又はGenBank Accession No: NM\_005092に示される。GITRLは177個のアミノ酸からなり、第1~28位の細胞内ドメイン、第29~49位の膜貫通ドメイン、及び第50~177位の細胞外ドメインから構成される。

【0016】

本明細書において「GITRL誘導體」とは、(A)GITRLの一部を有するフラグメント、又は(B)GITRL又はGITRLフラグメントを含む融合タンパク質であって、GITRと相互作用してGITRを発現する細胞に刺激を伝え得る分子を意味する。「GITRL-Fc」とは、GITRL又はGITRLフラグメントと、免疫グロブリンのFcフラグメント(CH2領域及びCH3領域)の融合タンパク質を意味する。

【0017】

本明細書において「外来性GITRL」とは、人為的に外部から導入されたGITRLをコードする核酸から発現されるポリペプチドを意味する。前記核酸が導入される細胞内には、外来性のGITRLをコードする核酸と同一の配列を有する内在性の核酸が存在する場合もある。また「外来性GITRL誘導體」とは、人為的に外部から導入されたGITRL誘導體をコードする核酸から発現されるポリペプチドを意味する。

【0018】

本明細書中において「不活化処理」とは、細胞を増殖不能にする処理を施すことを意味する。この処理により、継続的な有糸分裂を行うことができないが、処理前に発現されていたタンパク質(例えばGITRL又はGITRL誘導體、サイトカイン、又は腫瘍抗原など)を発現する能力を依然として保持している細胞を得ることができる。不活化処理は、後述のように当業者に公知の多数の方法によって実現され得る。不活化処理は、少なくとも約90%、好ましくは約95%、またより好ましくは実質的に100%の細胞の増殖

10

20

30

40

50

を阻害する処理である。

【0019】

本発明において「同種同系」とは、同じ個体（すなわち自己）又は遺伝的に同一の個体、すなわち自家を意味する。「同種異系」とは、同一種の異なる個体、すなわち他家を意味する。

【0020】

本明細書中において「腫瘍細胞」とは、自律的増殖を示し、その結果、制御不能な細胞増殖を特徴とする、異常増殖の表現型又は異常な細胞状態を示す細胞をいう。「腫瘍細胞」は、「悪性腫瘍細胞」又は「良性腫瘍細胞」を含み、「新生物由来の細胞」ともいう。「腫瘍」とは、腫瘍細胞の集合体又は腫瘍細胞全体を意味する。

10

【0021】

本明細書において「発現」とは、細胞内における内因性遺伝子又は導入遺伝子のコード領域の転写及び/又は翻訳を意味する。

【0022】

本明細書において「形質転換」とは、細胞内に外来性の核酸を導入することを意味する。例えば、形質転換には、ウイルスベクター又は非ウイルスベクターを用いて細胞内に外来性核酸を導入することが含まれる。哺乳動物細胞を形質転換するための種々の技術については、例えばKeownら、Methods of Enzymology 185: 527-537 (1990)に記載される。

【0023】

(1) 本発明の細胞、ベクター及び本発明の細胞の製造方法

本発明は、腫瘍の治療又は予防に使用される、外来性のGITRL又はGITRL誘導体を発現する細胞に関する。発現されるGITRL又はGITRL誘導体は、GITRと相互作用してGITRを発現する細胞に刺激を伝える分子であれば特に限定は無い。前記の刺激の結果としては、GITRを発現する細胞が保持する免疫抑制作用の低下が例示される。本発明の製造方法には、例えば配列番号6に示されるアミノ酸配列を有する天然のGITRL又はその誘導体をコードする遺伝子を使用することができる。これらのGITRL又はGITRL誘導体をコードする遺伝子は、細胞内タンパク質もしくは細胞表面提示タンパク質を含む細胞膜タンパク質、又は細胞外に放出される分泌タンパク質として発現させることができる。本発明のGITRL又はGITRL誘導体を発現する細胞は、この細胞内、細胞膜上、又は細胞周辺にGITRL又はGITRL誘導体を局在化させることができ、GITRL自体を生体に投与するのに比べて、全身的な影響を低減させることができる。

20

30

【0024】

GITRL誘導体には、アミノ酸配列を改変したGITRLの改変体、GITRLの一部を有するフラグメント、特に配列番号6に示されるヒトGITRLのアミノ酸番号50~177の細胞外ドメイン、又はアミノ酸番号47~177を有するGITRLフラグメントが含まれる。また、GITRL誘導体は、配列番号7の塩基配列を有する核酸の相補鎖に、ストリンジентな条件でハイブリダイズする核酸にコードされるポリペプチドであってもよい。ここで「ストリンジентな条件」とは、例えばプローブとともに0.5% SDS、5x Denhardt's、100 µg/ml 変性サケ精子DNAを含む6x SSC (1x SSCは0.15M NaCl、0.015M クエン酸ナトリウム、pH 7.0を示す)中、68℃にて12~20時間インキュベートする条件を言う。プローブにハイブリダイズしたDNAは、例えば0.5% SDSを含む0.1x SSC中、68℃にて洗浄を行った後に検出することができる。

40

【0025】

GITRL誘導体には、GITRL又はGITRLフラグメントと他のタンパク質とを融合させた融合タンパク質が含まれる。前記の融合タンパク質は、分泌シグナル、細胞内局在化シグナル、又はタグ配列を含んでいてもよく、レセプター、リガンド、もしくは抗体などの他のタンパク質又はこれらのフラグメントとの融合タンパク質が例示される。G

50

I T R L 誘導体として、前記 G I T R L 又は G I T R L フラグメントと、免疫グロブリンの F c フラグメントの融合タンパク質である G I T R L - F c が、タンパク質の生産性及び生体内での安定性の観点から本発明に好適に使用できる。免疫グロブリンの F c フラグメントとしては、I g G、I g M、I g A、I g D、又は I g E の由来のいずれのフラグメントでも使用できるが、I g G のアイソタイプ I g G 2 由来のフラグメントが、細胞毒性が低い点で好適に使用できる。免疫グロブリンの F c フラグメントとの融合タンパク質は、市販の製品（例えば p F U S E - h I g G 2 - F c 2、インビボジェン社）を使用して調製することができる。G I T R L - F c の F c フラグメントは、融合タンパク質の C 末端側又は N 末端側のどちらにあってもよいが、F c フラグメントが C 末端に存在する G I T R L 誘導体が好適に使用できる。

10

**【0026】**

外来性の G I T R L 又は G I T R L 誘導体を発現させる細胞には特に限定はないが、例えば腫瘍細胞又は免疫細胞が好適に使用される。腫瘍細胞は、同じ個体由来の自己由来の自家腫瘍細胞であっても、対象と異なる個体由来の他家腫瘍細胞であってもよく、また株化されている腫瘍細胞株であってもよい。腫瘍細胞株としては治療又は予防が必要な腫瘍又は悪性腫瘍と同じ種類起源の腫瘍細胞株の使用が好ましい。本発明の G I T R L 又は G I T R L 誘導体を発現する腫瘍細胞は、制御性 T 細胞活性の抑制とともに、近傍に存在する免疫細胞を活性化させることができ、前記腫瘍細胞の細胞表面に存在する腫瘍抗原に対応する免疫システムを強力に誘導することができる。

20

**【0027】**

本発明の好ましい態様において、G I T R L 又は G I T R L 誘導体を発現させた腫瘍細胞は、不活化処理される。不活化処理は、X 線もしくは  $\gamma$  線照射などの物理的な処理、マイトマイシン C、又はシクロヘキシミドなどの薬剤による化学的な処理が含まれる。不活化処理は、G I T R L 又は G I T R L 誘導体の発現を維持し、かつ発現細胞の増殖を抑制するものであれば特に限定されないが、例えば、約 10 ~ 約 1000 c G y、さらにより好ましくは約 50 ~ 約 500 c G y の X 線照射である。

**【0028】**

本発明の別の態様では、G I T R L 又は G I T R L 誘導体を発現させる細胞として免疫細胞が使用される。使用できる免疫細胞としては、C D 8 陽性 T 細胞、又は C D 4 陽性 T 細胞などの T 細胞や抗原提示細胞が例示される。これらの細胞は、同種同系の自家免疫細胞であっても、同種異系の他家免疫細胞であっても、又は株化された免疫細胞株であってもよい。腫瘍の治療を目的とする場合には、当該腫瘍で発現している腫瘍抗原を認識する T 細胞レセプター ( T C R ) を発現する T 細胞が好適である。特定の腫瘍抗原を特異的に認識する T C R を発現し、かつ G I T R L 又は G I T R L 誘導体を発現する T 細胞は、腫瘍細胞に親和性を有しているため腫瘍細胞又は腫瘍細胞の周囲に G I T R L 又は G I T R L 誘導体を選択的に輸送することができる。したがって、本発明の G I T R L 又は G I T R L 誘導体を発現する免疫細胞が特異的に集積する腫瘍近傍において、制御性 T 細胞の活性が抑制され、その結果免疫細胞が活性化される。すなわち、特定の腫瘍抗原を発現する腫瘍細胞に対応する免疫システムを強力に誘導することができる。

30

**【0029】**

本発明の細胞は、G I T R L 又は G I T R L 誘導体をコードする遺伝子と調節エレメントが作動可能に連結された核酸構築物を含むウイルスベクター又は非ウイルスベクターを利用して、細胞を e x v i v o で形質転換することにより製造できる。

40

**【0030】**

ここで、「作動可能に連結される」とは、核酸配列が別の核酸配列と機能的な関係で配置されていることを意味し、例えば、プロモーター又は調節エレメントの制御下に R N A 又はタンパク質をコードする D N A 配列が配置される場合、あるいは、プロモーター又は調節エレメントがコード D N A 配列又は構造 D N A 配列の発現レベルに影響を及ぼすように配置される場合、該プロモーター又は調節エレメントは、該 R N A 又はタンパク質をコードする D N A 配列に「作動可能に連結される」といわれる。

50

## 【 0 0 3 1 】

「調節エレメント」は、ヌクレオチド配列の発現の制御に関する配列である。調節エレメントとしては、プロモーター、エンハンサー、又は終止コドンが挙げられる。調節エレメントには、典型的にはヌクレオチド配列の適切な翻訳に必要な配列も包含される。

## 【 0 0 3 2 】

「プロモーター」とは、RNAポリメラーゼの結合部位を含み、DNAからのRNAの転写を開始させる、コード領域の上流に通常位置する非翻訳DNA配列をいう。プロモーター領域はまた、遺伝子発現の調節因子として作用する他のエレメントを含んでもよい。

## 【 0 0 3 3 】

また、本発明の細胞を製造するために使用できるベクターとして、例えば、レトロウイルス（レンチウイルスを含む）ベクター、アデノウイルス（Ad）ベクター（その複製可能型、複製欠損型を含む）、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター、シミアンウイルス40（SV-40）ベクター、ヘルペスウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、センダイウイルスベクター又は非ウイルス性プラスミドベクターのような、ウイルスベクター又は非ウイルスベクターが挙げられるが、これらに限定されない。また、遺伝子導入の際にレトロネクチン（登録商標、タカラバイオ社製）などの遺伝子導入効率を向上させる物質を用いることもできる。

10

## 【 0 0 3 4 】

ウイルスベクターを使用しない遺伝子導入方法としては、本発明を限定するものではないが、例えば、リポソームもしくはリガンド-ポリリジンなどの担体を使用する方法、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法、又はパーティクルガン法などを使用することができる。これらの場合には、プラスミドDNA、直鎖状DNA又はRNAに組み込まれた外来遺伝子が導入される。

20

## 【 0 0 3 5 】

本発明の細胞を製造するのに使用されるGITRL又はGITRL誘導体遺伝子発現ベクターは、構成的プロモーター、誘導性プロモーター、腫瘍選択的プロモーター又はエンハンサーなどの、異種の制御配列を含み得る。例えば、E2Fプロモーター、テロメラーゼ（hTERT）プロモーター、サイトメガロウイルスエンハンサー/ニワトリ-アクチン/ウサギ-グロビンプロモーター、伸長因子1-プロモーター（EF1-プロモーター）、グリア特異的プロモーター、又はニューロン特異的プロモーターなどが挙げられるが、これらに限定されない。ここで、「エンハンサー」とは、コード配列に作動可能に連結された場合に、プロモーターに作動可能に連結されたコード配列の転写を、プロモーター単独で達成される転写活性化よりも高い程度まで増加させる（すなわち、プロモーターからの転写を増加させる）ヌクレオチド配列を意味する。

30

## 【 0 0 3 6 】

さらに、本発明において、構成的プロモーター（例えば、サイトメガロウイルス（CMV）前初期プロモーター、RSV LTR、MoMLV LTR、CAGプロモーター、ホスホグリセレートキナーゼ-1プロモーター（PGK）又はSV-40プロモーター）が使用され得る。GITRL又はGITRL誘導体遺伝子発現ベクターはまた、シグナルペプチド又はタグペプチドをコードする核酸も含み得る。さらに、前記ベクターは、イントロンを含んでもよく、含まなくてもよい。すなわち、前記ベクターは、多数の導入遺伝子、導入遺伝子の組み合わせ、又は導入遺伝子/調節エレメントの組み合わせを含み得る。

40

## 【 0 0 3 7 】

本発明の外来性GITRL又はGITRL誘導体を発現する細胞は、前記ベクターにより形質転換する前、あるいは、不活化処理を実施する場合、不活化処理を実施する前に、細胞を培養する工程を含んでもよい。また、前記ベクターにより形質転換した後、不活化処理を実施する場合は、不活化処理を実施する前に細胞を培養する工程を含んでもよい。前記培養は培養する細胞に応じて公知の培地、培養条件に従い、適宜設定することができる。

50

## 【0038】

さらに、前記の、G I T R L又はG I T R L誘導体をコードする遺伝子及び調節エレメントが作動可能に連結された核酸構築物を含むベクターも本発明に包含される。以下、前記のベクターを本発明のベクターと記載する。当該ベクターは、以上に説明した本発明の細胞の製造の他、ベクター自体を対象に投与して対象の細胞にG I T R L又はG I T R L誘導体を発現する能力を付与することに使用できる。

## 【0039】

本発明のベクターの種類には特に限定はなく、前記の種々のウイルスベクター又は非ウイルスベクターを使用することができる。好適な態様としては、細胞への感染効率の高いウイルスベクターが使用される。さらに好ましくは、生体(対象)に直接投与可能なものが使用される。生体に直接投与可能なウイルスベクターとしては、特に本発明を限定するものではないが、例えばレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、又はセンダイウイルスベクターなどが挙げられる。

10

## 【0040】

本発明の外来性G I T R L又はG I T R L誘導体を発現する細胞は、周囲の免疫系細胞の免疫応答を誘導する。誘導される免疫応答は、腫瘍増殖抑制能の測定(例えば腫瘍径測定による)、抗原特異的細胞障害性アッセイ、細胞増殖アッセイ、細胞溶解性細胞アッセイ、及び組換え腫瘍関連抗原又は免疫原性フラグメント、又は抗原由来のペプチドを用いたインビボ遅延型過敏性試験を用いて、G I T R L又はG I T R L誘導体を発現する細胞の最初の投与前、又は処置の開始後の種々の時点で、対象において評価され得る。また、C D 8陽性T細胞、C D 4陽性T細胞、又は制御性T細胞などの免疫細胞の構成比により評価できる。さらに、インターフェロン(I F N) - もしくは腫瘍壊死因子(T N F) - などのサイトカインの産生、又はC D 1 0 7 aなどの細胞表面抗原により免疫応答を評価することが可能であり、複数のサイトカイン産生又は細胞表面抗原を示す細胞は、マルチファンクション性細胞と呼ばれ、免疫療法において有用である。免疫応答の増加を測定するためのさらなる方法としては、遅延型過敏性試験、ペプチド主要組織適合遺伝子複合体テトラマーを用いたフローサイトメトリー、リンパ球増殖アッセイ、酵素結合免疫吸着検定法、酵素結合免疫スポット検定法(enzyme-linked immunospot assay)、サイトカインフローサイトメトリー、直接細胞毒性アッセイ、定量的逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応によるサイトカインmRNAの測定、又は限界希釈法のような、T細胞応答を測定するのに通常使用されるアッセイが挙げられる。

20

30

## 【0041】

(2)本発明の治療剤又は予防剤、治療剤又は予防剤を製造するための細胞又はベクターの使用

前記(1)に記載する本発明の外来性のG I T R L又はG I T R L誘導体を発現する細胞、G I T R L又はG I T R L誘導体をコードする遺伝子及び調節エレメントが作動可能に連結された核酸構築物を含むベクターを使用して、これらを有効成分として含有する本発明の治療剤又は予防剤を製造することができる。

## 【0042】

G I T R L又はG I T R L誘導体を発現する腫瘍細胞は、治療剤又は予防剤(細胞ワクチン)として使用することができる。特定の理論に限定されるものではないが、G I T R L又はG I T R L誘導体を発現する腫瘍細胞の近傍では、発現したG I T R Lにより制御性T細胞の活性が抑制され、抗原提示細胞、C D 8陽性T細胞、又はC D 4陽性T細胞を含む免疫細胞の抑制が解除、すなわち活性化され、当該腫瘍細胞に対する免疫システムが強化されるため、本発明の細胞は強力な細胞ワクチンとなる。

40

## 【0043】

G I T R L又はG I T R L誘導体を発現する免疫細胞は、治療剤又は予防剤として使用することができる。特定の理論に限定されないが、例えば特定の腫瘍抗原を特異的に認識するT C Rを発現し、かつG I T R L又はG I T R L誘導体を発現するT細胞は、腫瘍細胞又は腫瘍細胞の周囲に、G I T R L又はG I T R L誘導体を特異的に輸送することがで

50

きる。したがって、本発明のGITRL又はGITRL誘導体が発現され、免疫細胞が特異的に集積する腫瘍近傍において制御性T細胞の活性が抑制され、免疫細胞を活性化させることができる。すなわち、特定の腫瘍抗原を発現する腫瘍細胞に対応する免疫システムを強力に誘導することができる。

【0044】

GITRL又はGITRL誘導体をコードする遺伝子及び調節エレメントが作動可能に連結された核酸構築物を含むベクターは、生体内において細胞にGITRL又はGITRL誘導体を発現する能力を付与することができる。よって当該ベクターが導入された細胞が前記の腫瘍細胞又は免疫細胞と同じ機能を発揮する。例えば、本発明のベクターを腫瘍内に投与すれば、GITRL又はGITRL誘導体を発現する腫瘍細胞を腫瘍内に投与するのと同等の効果を発揮する。

10

【0045】

本発明の治療剤又は予防剤は、GITRL又はGITRL誘導体を発現する細胞が効果を発揮する疾患を治療又は予防の対象とする。そのような疾患としては、腫瘍疾患（白血病、固形腫瘍など）、ウイルス、細菌、又は真菌が原因となる感染性疾患（インフルエンザ、結核、もしくは深在性真菌症など）が例示される。本発明の治療剤又は予防剤は、例えば腫瘍細胞又は感染細胞の消滅、減少、又は増殖抑制に有効である。

【0046】

また、本発明の治療剤又は予防剤は、皮内、筋肉内、皮下、腹腔内、鼻腔内、動脈内、静脈内（留置カテーテルによる方法を含む）、腫瘍内、又は輸入リンパ管内に投与される。さらに、本発明の治療剤又は予防剤は免疫療法での使用に適している。免疫療法においては、対象の治療に適したT細胞又は不活性化腫瘍細胞が、例えば注射や点滴により対象の静脈、動脈、皮下、又は腹腔内などに投与される。本発明の治療剤又は予防剤は前記の対象への使用において非常に有用であり、製薬分野で公知の方法に従い、例えば、公知の非経口投与に適した有機又は無機の担体、賦形剤、又は安定剤などと混合し、点滴剤、注射剤として調製できる。

20

【0047】

本発明の治療剤又は予防剤は、有効量の外来性のGITRL又はGITRL誘導体を発現する細胞、又はGITRLもしくはGITRL誘導体をコードする遺伝子及び調節エレメントが作動可能に連結された核酸構築物を含むベクターを含有する。本明細書中において有効量とは、前記治療剤又は予防剤を対象に投与した場合に、治療剤又は予防剤を投与していない対象と比較して、治療もしくは予防効果を発揮する細胞の量である。具体的な有効量としては、投与形態、投与方法、使用目的及び対象の年齢、体重、又は症状などによって適宜設定され一定ではない。例えば、GITRL又はGITRL誘導体を発現する細胞を有効成分とする本発明の治療剤又は予防剤における本発明のGITRL又はGITRL誘導体を発現する細胞の含有量としては、特に限定はないが、例えば、好適には $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^{11}$  cells/mL、より好適には $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^{10}$  cells/mL、更に好適には $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^9$  cells/mLが例示される。また、本発明の治療剤又は予防剤の投与量としては、特に限定はないが、例えば、成人一日あたり、好適には $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^{12}$  cells/日、より好ましくは、 $1 \times 10^7$

30

40

【0048】

本発明の治療剤又は予防剤は、さらに賦形剤を含んでもよい。前記賦形剤としては、生理学的適合性の緩衝液、例えばリン酸塩又はHepes、栄養分、例えばデキストロース、生理学的適合性のイオン、又はアミノ酸（特に、他の免疫原性成分を含まないもの）を含むかあるいは含まない、種々の細胞培養培地、又は等張食塩水が挙げられる。担持試薬、例えばアルブミンもしくは血漿画分、又は非活性増粘剤も用いられ得る。

【0049】

(3) 本発明の処置方法

50

本発明は、対象を処置する方法であって、GITRL又はGITRL誘導体を発現する細胞、又はGITRL又はGITRL誘導体をコードする遺伝子及び調節エレメントが作動可能に連結された核酸構築物を含むベクターを対象に投与し免疫応答を誘導する工程を含む方法に関する。

【0050】

本発明の対象の処置方法に使用される細胞は、前記(1)に記載する本発明のGITRL又はGITRL誘導体を発現する細胞の製造方法により得ることができる。当該細胞は、対象又は他の生体から採取された細胞を材料として前記(1)の方法で製造されたものであってもよい。また、対象への投与に先立って、製造された細胞を培養する工程及び/又は適切なマーカーにより選別する工程をさらに含んでもよい。

10

【0051】

本発明の対象の処置方法ではGITRL又はGITRL誘導体を発現する細胞、又はGITRL又はGITRL誘導体をコードする遺伝子及び調節エレメントが作動可能に連結された核酸構築物を含むベクター、すなわち、前記(2)に記載する本発明の治療剤又は予防剤を対象に投与する。本明細書中において対象とは、特に限定はないが、好ましくは本発明の方法により製造される細胞に感受性を示す疾患に罹患した生体(例えばヒト患者、もしくは非ヒト動物)又は前記疾患予防を要する生体を示す。

【0052】

細胞の投与は、対象の皮内、筋肉内、皮下、腹腔内、鼻腔内、動脈内、静脈内(留置カテーテルによる方法を含む)、腫瘍内、又は輸入リンパ管内に投与され得る。

20

【実施例】

【0053】

以下に、本発明を実施例により更に具体的に説明するが、本発明は以下の実施例の範囲のみに限定されるものではない。

【0054】

実施例1：マウスGITRL-Fc発現レトロウイルスベクターの構築

BALB/cマウス(日本クレア社製)の脾臓よりmRNAを抽出し、配列番号1記載のmGITRL-FLFプライマー及び配列番号2記載のmGITRL-FLRプライマーを用いてRT-PCRを行い、EcoRV-マウスGITRL-BglIIを得た。得られたPCR断片を制限酵素EcoRVとBglII(タカラバイオ社製)で切断し、pFUSE-mFc2ベクター(インビボジェン社製)のEcoRV-BglIIサイトにクローニングしてpFuse-mFc/mGITRLを作製した。pFuse-mFc/mGITRLを鋳型に、配列番号3記載のmGF5プライマー及び配列番号4記載のmFc3プライマーを用いてPCRを行い、得られた増幅産物をpCR-Bluntベクター(インビトロジェン社製)にクローニングしてpCRblunt-mGFcを作製した。pCRblunt-mGFcを制限酵素NotI及びSalI(タカラバイオ社製)にて消化して得られたマウスGITRL-Fc部位を切り出し、pMINベクター[ジーンセラピー 第7巻、第797-804頁(2000)]のNotI-SalIサイトにクローニングし、pMT-mGFcを作製した。図1にpMT-mGFcの概略を示す。なお、本プラスミドはGenBank Accession:NP\_899247に示されるマウスGITRLのアミノ酸番号44~173の領域とマウスIgG2由来のFcフラグメントとの融合ポリペプチドをコードしている。

30

40

【0055】

調製したpMT-mGFcをRetrovirus Packaging Kit Eco(タカラバイオ社製)に含まれているプラスミドpGP、pE-ecoと共に用い、HEK293T細胞を形質転換して2日間培養した細胞上清液を獲得し、0.45µmフィルター(Millex HV、ミリポア社製)にてろ過し、MT-mGFc/ECOLEトロウイルスを作製した。

【0056】

実施例2：マウスGITRL-Fc遺伝子導入細胞の作製

50

レトロネクチン(タカラバイオ社製)を用いて、製品プロトコールに従い、化学発癌剤メチルコラントレン誘発マウス線維肉腫細胞CMS5 [ジャーナル オブ エクスペリメンタル メディシン 第146巻、第720-734頁(1977)]に実施例1で調製したMT-mGFC/ECORetroウイルスを感染させ、マウスGITRL-Fc遺伝子導入CMS5細胞を作製した。さらに限界希釈法にてクローニングを行い、マウスGITRL-Fc遺伝子導入CMS5細胞クローン1、マウスGITRL-Fc遺伝子導入CMS5細胞クローン7(それぞれclone1、clone7と以下記載する)を取得した。

#### 【0057】

クローンの細胞におけるマウスGITRL-Fcの発現測定は、以下の方法で行った。すなわち、96wellプレートにマウスGITRL-Fc遺伝子導入CMS5細胞を $2 \times 10^5$  cells / 200  $\mu$ lで撒き、10時間後に10倍希釈したGolgi Plug (BD Bioscience社製)を2  $\mu$ l加え、さらに9時間培養した。Cyt ofix / Cytoperm Kit (BD Bioscience社製)を用いて細胞の固定と膜浸透化を行い、anti-mouse IgG mAb-FITC conjugate (Caltag社製)で染色してフローサイトメーターにて各クローン細胞のマウスGITRL-Fc発現量を測定した。図2にフローサイトメーターによる細胞内マウスGITRL-Fcの測定結果を示す。図2(a)はマウスGITRL-Fc遺伝子非導入細胞、(b)はマウスGITRL-Fc遺伝子導入バルク細胞、(c)はclone1の測定結果を示す。図2(c)に示される通り、マウスGITRL-Fc遺伝子導入クローン細胞において、マウスGITRL-Fcの産生を確認した。

10

20

#### 【0058】

##### 実施例3：担癌実験

8~10週令のBALB/cマウス(日本クレア社製)及び8~10週令のC.B-17/lcr-scid/scidJcrマウス(日本クレア社製)の右背部に、clone1、clone7をそれぞれ $1 \times 10^6$  cells / 0.1 mLで皮下注射し、皮下注射後2~3日毎に腫瘍径を測定した。腫瘍径は、腫瘍の最大直径と最小直径を測定してその数値を乗じることにより算出した。マウスは各群5匹を使用した。

#### 【0059】

図3にそれぞれのマウスにおける腫瘍径の経時変化を示す。横軸は日数、縦軸は腫瘍径の積(長径 $\times$ 短径: mm $\times$ mm)を示す。各マウスGITRL-Fc遺伝子導入CMS5細胞クローンにおいて、免疫機能不全のC.B-17/lcr-scid/scidJcrマウスでは腫瘍径が増加し続けるのに対し、通常の免疫機能を持つBALB/cマウスでは腫瘍径が縮小し、17日目までに腫瘍がほとんど観察されなくなった。なお、図中黒丸はBALB/cマウス右背部にclone1を移植した場合、黒三角はBALB/cマウス右背部にclone7を移植した場合、白丸はC.B-17/lcr-scid/scidJcrマウス右背部にclone1を移植した場合、白三角はC.B-17/lcr-scid/scidJcrマウス右背部にclone7を移植した場合の腫瘍径の積をそれぞれ示す。

30

#### 【0060】

##### 実施例4：担癌マウスにおける腫瘍特異的細胞傷害性Tリンパ球の誘導確認

8~10週令のBALB/cマウスの右背部に、CMS5もしくは実施例2で調製したclone1をそれぞれ $1 \times 10^6$  cells / 0.1 mLで皮下注射し、皮下注射後8日目及び14日目に脾臓細胞と所属リンパ節細胞を採取し、以下の方法でテトラマーアッセイを行った。すなわち、CMS5の腫瘍拒絶抗原エピトープペプチド9m(配列番号5)をマウス肥満細胞腫細胞P1.HTR細胞[ソマティックセルアンドモレクラージェネティクス 第11巻、第467-475頁(1985)] $5 \times 10^5$  cellsに終濃度1  $\mu$ Mで加えて2時間、37 で培養したもの(9mペプチドパルスP1.HTR細胞)と、脾臓細胞を1対40の比率で混合、また、9mペプチドパルスP1.HTR細胞と所属リンパ節細胞と脾臓細胞を1対40対8で混合して、1週間共培養したのち、

40

50

9mとマウスH2/K<sup>d</sup>とのtetramer (9m/K<sup>d</sup> tetramer - PE conjugate) (The Ludwig Institute Core Factory, Lausanne, Switzerland製)にて染色を行い、フローサイトメーターにて解析した。

#### 【0061】

図4にフローサイトメーターの解析結果を示す。囲っている部分が9m/K<sup>d</sup> tetramer - PE conjugateに反応した細胞を示す。図4(A)~(D)に示されるようにCMS5を皮下注射したマウスでは、8日目と14日目に採取された脾臓細胞と所属リンパ節細胞全てにおいて9m/K<sup>d</sup> tetramer - PE conjugateに反応する細胞が検出されないのに対して、図4(E)~(H)に示されるように clone 1を皮下注射したマウスでは、14日目の脾臓細胞と所属リンパ節細胞それぞれにおいて、9m/K<sup>d</sup> tetramer - PE conjugateに反応する細胞が有意に出現していることが確認された。すなわち clone 1担癌マウスのみ、CMS5に対する腫瘍特異的細胞傷害性Tリンパ球が誘導されていることが確認された。

10

#### 【0062】

実施例5：各種抗体を投与したCMS5GITRL-Fc担癌マウスにおける腫瘍増殖の観察

8~10週令のBALB/cマウスの右背部に、実施例2で調製した clone 1を  $1 \times 10^6$  cells / 0.1 mLで皮下注射した。その際、抗マウスCD4抗体(クローンGK1.5) 50 µg、もしくは抗マウスCD8抗体(クローンLy2.2) 25 µgを、皮下注射前日から3日毎に2週間、眼窩静脈より投与、もしくは抗マウスCD25抗体(クローンPC61) 250 µgを、皮下注射前日に一回眼窩静脈より投与した。皮下注射後2~3日毎に実施例3と同様の方法で腫瘍径を測定した。マウスは各群3匹を使用した。

20

#### 【0063】

図5にそれぞれのマウスにおける腫瘍径の経時変化を示す。横軸は日数、縦軸は腫瘍径の積(mm×mm)を示し、白丸は各々3匹のマウスの結果、黒丸はその平均値を示す。図5中、GITRL-Fcは何も抗体を投与していないマウス、anti-CD25は抗マウスCD25抗体を投与したマウス、anti-CD4は抗マウスCD4抗体を投与したマウス、anti-CD8は抗マウスCD8抗体を投与したマウスの結果を示す。何も抗体を投与していないマウス及び抗マウスCD25抗体を投与したマウスでは腫瘍径が縮小し、15日目までに腫瘍がほとんど観察されなくなったのに対し、抗マウスCD4抗体を投与したマウス及び抗マウスCD8抗体を投与したマウスでは、それぞれ3匹中2匹において腫瘍径が増加し続け、抗腫瘍効果にCD4陽性T細胞及びCD8陽性T細胞が関与していることが示された。

30

#### 【0064】

実施例6：放射線照射・不活化したマウスGITRL-Fc遺伝子導入CMS5細胞を投与したマウスにおけるCMS5腫瘍増殖と腫瘍特異的細胞傷害性Tリンパ球の誘導確認

8~10週令のBALB/cマウスに、100 cGyのX線を照射・不活化したCMS5もしくは100 cGyのX線を照射・不活化した実施例2の clone 1をそれぞれ  $5 \times 10^6$  cells / 0.1 mLで右背部に皮下注射を行い、7日後にCMS5を  $1 \times 10^6$  cells / 0.1 mLで右背部に皮下注射した。皮下注射後2~3日毎に実施例3と同様の方法で腫瘍径を測定し、14日目に脾臓細胞と所属リンパ節細胞を採取し、実施例4と同様の方法でテトラマーアッセイを行った。

40

#### 【0065】

図6はそれぞれのマウスにおける腫瘍径の経時変化を示し、横軸は日数、縦軸は腫瘍径の積(mm×mm)を示す。図7はテトラマーアッセイの結果を示す。X線照射・不活化したCMS5を投与したマウスと比較して、X線照射・不活化した clone 1を投与したマウスでは、腫瘍の増殖が抑制され(図6)、CMS5に対する腫瘍特異的細胞傷害性Tリンパ球が有意に誘導されていた(図7)。このことは、X線照射・不活化したCMS

50

5 G I T R L - F c がワクチンとしての機能を保持していることを示す。

【 0 0 6 6 】

実施例 7 : 各種抗体にてブロックしたマウスに、X 線照射・不活化した C M S 5 G I T R L - F c を投与した際の C M S 5 腫瘍増殖の観察

8 ~ 10 週令の B A L B / c マウスに、1 0 0 c G y の X 線を照射・不活化した実施例 2 の c l o n e 1 をそれぞれ  $5 \times 10^6$  c e l l s / 0 . 1 m L で右背部に皮下注射を行った。抗マウス C D 4 抗体 ( クロウン G K 1 . 5 ) 5 0  $\mu$  g、もしくは抗マウス C D 8 抗体 ( クロウン L y t 2 . 2 ) 2 5  $\mu$  l を、6 日目から 3 日毎に 2 週間、眼窩静脈より投与、もしくは抗マウス C D 2 5 抗体 ( クロウン P C 6 1 ) 2 5 0  $\mu$  g を、6 日目に一回眼窩静脈より投与した。7 日目に C M S 5 を  $1 \times 10^6$  c e l l s / 0 . 1 m L で右背部に皮下注射した。C M S 5 の皮下注射後 2 ~ 3 日毎に実施例 3 と同様の方法で腫瘍径を測定した。

10

【 0 0 6 7 】

図 8 にそれぞれのマウスにおける腫瘍径の経時変化を示す。図 8 中、横軸は日数、縦軸は腫瘍径の積 ( m m x m m ) を示し、白丸はそれぞれ 3 匹のマウスの結果、黒丸はその平均値を示す。図 8 中、G I T R - F c は何も抗体を投与していないマウス、a n t i - C D 2 5 は抗マウス C D 2 5 抗体を投与したマウス、a n t i - C D 4 は抗マウス C D 4 抗体を投与したマウス、a n t i - C D 8 は抗マウス C D 8 抗体を投与したマウスの結果を示す。何も抗体を投与していないマウス及び抗マウス C D 2 5 抗体を投与したマウスでは腫瘍径の増殖が抑制されたのに対し、抗マウス C D 4 抗体を投与したマウス及び抗マウス C D 8 抗体を投与したマウスでは、有意に腫瘍径が増加し続け、X 線照射・不活化した C M S 5 G I T R L - F c のワクチン効果に C D 4 陽性 T 細胞と C D 8 陽性 T 細胞が関与していることが示された。

20

【 0 0 6 8 】

実施例 8 : マウス G I T R L - F c 遺伝子導入細胞の作製

マウス大腸癌細胞株 C T 2 6 ( A T C C C R L - 2 6 3 8 ) に実施例 2 記載の方法で M T - m G F c / E C O レトロウイルスを感染させ、マウス G I T R L - F c 遺伝子導入 C T 2 6 細胞を作製した。さらに限界希釈法にてクローニングを行い、マウス G I T R L - F c 遺伝子導入 C T 2 6 細胞クローン 2 1 ( C T 2 6 - 2 1 と以下記載する ) を取得した。

30

また、マウスメラノーマ細胞株 B 1 6 ( A T C C C R L - 6 4 7 5 ) に、G I T R L - F c 遺伝子を組み込んだプラスミドベクター p c D N A 3 . 1 ( インビトロジェン社製 ) をリポフェクタミン 2 0 0 0 ( インビトロジェン社製 ) を用いて導入し、マウス G I T R L - F c 遺伝子導入 B 1 6 細胞を作製した。さらに限界希釈法にてクローニングを行い、マウス G I T R L - F c 遺伝子導入 B 1 6 細胞クローン 2 及びクローン 3 ( それぞれ、B 1 6 - 2、及び B 1 6 - 3 と以下記載する ) を取得した。

【 0 0 6 9 】

実施例 9 : 担癌実験

8 ~ 10 週令の B A L B / c マウス ( 日本クレア社製 ) の右背部に、C T 2 6、C T 2 6 - 2 1 ( それぞれ  $1 \times 10^6$  c e l l s / 0 . 1 m L )、B 1 6、B 1 6 - 2、B 1 6 - 3 ( それぞれ  $5 \times 10^5$  c e l l s / 0 . 1 m L ) を皮下注射し、皮下注射後 2 ~ 3 日毎に実施例 3 と同じ方法で腫瘍径を測定した。マウスは各群 5 匹を使用した。

40

図 9 及び図 10 にそれぞれのマウスにおける平均腫瘍径の経時変化を示す。横軸は日数、縦軸は腫瘍径の積 ( 長径 x 短径 : m m x m m ) を示す。マウス G I T R L - F c 遺伝子導入 C T 2 6 細胞クローン ( C T 2 6 - 2 1、図 9 において黒四角で示す ) も B 1 6 細胞クローン ( B 1 6 - 2、B 1 6 - 3、それぞれ図 10 において黒四角、黒三角で示す ) も、コントロール ( 図中において白四角で示す ) と比較して、通常の免疫機能を持つ B A L B / c マウスで腫瘍径が縮小し、種々のがん細胞における G I T R L - F c の腫瘍抑制効果が示された。

【 0 0 7 0 】

50

#### 実施例10：GITRL-FcのT細胞活性化能の観察

9mペプチド特異的TCR遺伝子導入DUC18マウス由来の9mペプチド特異的CD8陽性T細胞 $3 \times 10^5$  cellsと、9mペプチドを100ng/ml、10ng/ml、1ng/mlでそれぞれパルスした野生型BALB/cマウス由来脾臓細胞 $1 \times 10^6$  cellsを混合し、10%ウシ胎仔血清(FCS)添加RPMI1640培地(図11においてcontrol、白四角で示す)、10%FCS添加RPMI1640培地にDTA-1(抗GITRアゴニスト抗体)を5 $\mu$ g/mlで添加した培地(同様にDAT-1、黒四角で示す)、10%FCS添加RPMI1640培地に実施例2で調製したマウスGITRL-Fc遺伝子導入細胞clone1の培養上清を50 $\mu$ l添加した培地(同様にCMS5GITRL-Fc sup、黒三角で示す)、10%FCS添加RPMI1640培地に実施例2で調製したマウスGITRL-Fc遺伝子導入細胞clone1の培養上清を50 $\mu$ lと抗GITRL抗体を5 $\mu$ g/mlで添加した培地(同様にCMS5GITRL-Fc sup+GITRLmAb、白三角で示す)、それぞれにて37で15時間インキュベートした。各DUC18マウス由来の9mペプチド特異的CD8陽性T細胞の細胞内IFN- $\gamma$ を抗IFN- $\gamma$ 抗体(BD Bioscience社製)で染色してフローサイトメーターにて解析した。

10

#### 【0071】

図11に、各ペプチド濃度におけるそれぞれのサンプルのCD8陽性細胞中のIFN- $\gamma$ 陽性細胞の割合を示す。GITRを刺激しエフェクター細胞を活性化するDTA-1と同様に、マウスGITRL-Fc遺伝子導入細胞上清はCTLクローンを活性化してIFN- $\gamma$ の産生を誘導する事が示された。抗GITRL抗体はマウスGITRL-Fc遺伝子導入細胞上清のIFN- $\gamma$ 産生誘導を抑制する事から、マウスGITRL-Fc遺伝子導入細胞から分泌されたGITRL-FcがGITRアゴニスト抗体と同様の機能を持ち、T細胞のGITRを刺激して活性化する事が示された。

20

#### 【0072】

#### 実施例11：GITRL-Fcによる制御性T細胞の誘導抑制能効果の観察

8~10週令のBALB/cマウスの右背部に、CMS5もしくは実施例2で調製したマウスGITRL-Fc遺伝子導入細胞clone1(図12、13においてCMS5GLFcと示す)をそれぞれ $1 \times 10^6$  cells/0.1mLで皮下注射し、皮下注射後9日目に脾臓細胞(spleen)、所属リンパ節細胞(DLN)及びCMS5の腫瘍内浸潤リンパ球(TIL)を採取し、抗CD4抗体(BD Bioscience社製)、抗Foxp3抗体(e Bioscience社製)、抗CD8抗体(BD Bioscience社製)および抗CD25抗体(BD Bioscience社製)で染色を行い、フローサイトメーターにて解析した。

30

#### 【0073】

図12に、各組織におけるCD4陽性・Foxp3陰性細胞に対するCD4陽性・Foxp3陽性細胞(制御性T細胞)の比率を、図13にCD4陽性・Foxp3陽性細胞(制御性T細胞)に対するCD8陽性細胞の比率をそれぞれ示す。

図12に示すように、マウスGITRL-Fc遺伝子導入腫瘍細胞はCMS5よりも有意に腫瘍内浸潤リンパ球中の制御性T細胞の誘導を抑制し、図13に示すように制御性T細胞に対するCD8細胞の比率を上昇させることが示された。

40

#### 【0074】

#### 実施例12：GITRL-Fc発現によるT細胞のマルチファンクショナル性獲得の観察

8~10週令のBALB/cマウスの右背部に、CMS5を $1 \times 10^6$  cells/0.1mLで皮下注射した。7日後にDUC18マウス由来の9mペプチド特異的CD8陽性T細胞を $1 \times 10^6$  cells/0.1mL尾静脈注射した群(図14、15においてACTと示す)、DUC18マウス由来の9mペプチド特異的CD8陽性T細胞を $1 \times 10^6$  cells/0.1mL尾静脈注射してさらに放射線照射・不活化したCMS5を $1 \times 10^7$  cells/0.1mL左背部に皮下注射した群(図14、15においてACT+CMS5 vacと示す)、DUC18マウス由来の9mペプチド特異的CD8陽性T

50

細胞を  $1 \times 10^6$  cells / 0.1 mL 尾静脈注射してさらに放射線照射・不活化した実施例 2 で調製したマウス GITRL - Fc 遺伝子導入細胞 clone 1 を  $1 \times 10^7$  cells / 0.1 mL 左背部に皮下注射した群 ( 図 14、15 において ACT + CMS 5 GLFc vac と示す ) を設定し、3 ~ 5 日毎に実施例 3 と同様の方法で各マウスの腫瘍径を測定した。10 日目に所属リンパ節細胞を採取して CD8 陽性細胞を抗 IFN - 抗体、抗 TNF - 抗体 ( BD Bioscience 社製 )、および抗 CD107a 抗体 ( e Bioscience 社製 ) で細胞内染色を行い、フローサイトメーターにて解析した。

#### 【0075】

図 14 は各群のマウスにおける腫瘍径の平均の経時変化を示す。横軸は日数、縦軸は腫瘍径の積 ( 長径  $\times$  短径 : mm  $\times$  mm ) を示す。DUC18 マウス由来の 9m ペプチド特異的 CD8 陽性 T 細胞 + マウス GITRL - Fc 遺伝子導入細胞の投与群は、腫瘍の増殖がほぼ抑えられ、GITRL - Fc が腫瘍抗原特異的 T 細胞の抗腫瘍効果を促進する事が示された。

図 15 は各群の所属リンパ節中の移入された 9m ペプチド特異的 CD8 陽性細胞における、IFN - 産生、TNF - 産生、CD107a 発現 ( 細胞傷害性顆粒産生能の指標 ) の 3 つの機能のうち 3 つ共を示す細胞 ( 3 )、2 つの機能を示す細胞 ( 2 )、1 つの機能のみを持つ細胞 ( 1 )、どの機能も持たない細胞 ( 0 ) のそれぞれの割合を示す。DUC18 マウス由来の 9m ペプチド特異的 CD8 陽性 T 細胞 + マウス GITRL - Fc 遺伝子導入細胞の投与群は、他の投与群に比較して 3 種類または 2 種類の機能を発現している細胞の比率が高く、GITRL - Fc によって腫瘍抗原特異的エフェクター T 細胞が効率良くマルチファンクショナル性を獲得することが示された。

#### 【0076】

実施例 13 : マウス GITRL - Fc 発現アデノウイルスベクターの作製

実施例 1 で調製した pMT - mGFC を制限酵素 NotI と SalI ( タカラバイオ社製 ) で切断してアガロースゲル電気泳動に供し、マウス GITRL - Fc 配列を含む約 1.2 kbp のフラグメントをゲルから回収した。回収したフラグメントを DNA Blunting Kit ( タカラバイオ社製 ) を用いて末端平滑化した後、コスミドベクター pAxCawt2 ( タカラバイオ社製 ) の SwaI サイトにライゲーションした。Gigapack III XL Packaging Extract ( アジレントテクノロジー社製 ) を用いて、こうして得られた組換え DNA で大腸菌 DH5 アルファ ( タカラバイオ社製 ) を形質転換した後、アンピシリン添加 LB 培地で形質転換体を選択した。さらにこの形質転換体を培養してコスミド DNA を調製し、pAxCawt2 - mGITRL - Fc A と命名した。

#### 【0077】

次に、TransIT - 293 ( ミラス バイオ社製 ) を用いて、制限酵素 BspT104I ( タカラバイオ社製 ) で切断した pAxCawt2 - mGITRL - Fc による HEK293 細胞の形質転換を行った。得られた形質転換体を培養した後、培養液を超音波破碎し、GITRL - Fc 発現アデノウイルスベクターである AxCa - mGITRL - Fc を含む遠心上清を回収して 1 次ウイルス液を得た。

1 次ウイルス液を HEK293 細胞に感染させて培養した後、培養液を超音波破碎し、遠心上清を回収して 2 次ウイルス液を得た。同様の操作により、さらに 3 次ウイルス液、4 次ウイルス液を調製した。

#### 【0078】

同様の方法で、pAcGFP1 Vector ( クロンテック社製 ) から AcGFP 遺伝子をクローニングしたコスミドベクター pAxCawt2 - AcGFP から 4 次ウイルス液を調製した。本ウイルス液に含まれるアデノウイルスベクターは AxCa - AcGFP と命名されている。

最後に、Adeno - X ( 商標 ) Rapid Titer Kit ( クロンテック社製 ) を用いて、これら 2 種の 4 次ウイルス液の力価を測定した。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 7 9 】

実施例 1 4 : マウス腫瘍細胞へのアデノウイルスベクターの感染

実施例 1 3 で調製した各アデノウイルスベクターの 4 次ウイルス液を、化学発癌剤メチルコラントレン誘発マウス線維肉腫細胞株 C M S 5、マウス大腸癌細胞株 C T 2 6 に、それぞれ M O I ( m u l t i p l i c i t y o f i n f e c t i o n : 細胞あたりのウイルス感染量) = 1 0 と 5 0 で感染させ、2 日間培養を行った。感染効率を確認するため、A x C A - A c G F P の 4 次ウイルス液を感染させた各腫瘍細胞株をフローサイトメーターにて解析した。その結果、M O I = 1 0 で感染させた C M S 5、C T 2 6 で、それぞれ 7 2 . 2 %、5 7 . 1 % の細胞にウイルスの感染が確認された。また、M O I = 5 0 で感染させた C M S 5、C T 2 6 で、それぞれ 9 9 . 1 %、9 4 . 9 % の細胞にウイルスの感染が確認された。A x C A - m G I T R L - F c と A x C A w t 2 を M O I = 5 0 で感染させた各腫瘍細胞株を以後の実施例で使用した。

10

## 【 0 0 8 0 】

実施例 1 5 : アデノウイルスベクター感染マウス腫瘍細胞を投与したマウスにおける腫瘍増殖の確認

8 ~ 1 0 週令の B A L B / c マウス ( 日本クレア社製 ) の右背部に、実施例 1 4 で調製した A x C A - m G I T R L - F c 感染 C M S 5、非感染 C M S 5、A x C A - m G I T R L - F c 感染 C T 2 6、非感染 C T 2 6 を、それぞれ  $1 \times 10^6$  c e l l s / 0 . 2 m L で皮下注射し、皮下注射後 2 ~ 3 日毎に実施例 3 と同じ方法で腫瘍径を測定した。マウスは各群 5 匹を使用した。

20

## 【 0 0 8 1 】

1 5 日後の腫瘍径の平均 ± 標準偏差 ( ( 長径 + 短径 ) / 2 : m m ) は、A x C A - m G I T R L - F c 感染 C M S 5 が  $11.74 \pm 3.49$ 、非感染 C M S 5 が  $15.59 \pm 1.84$ 、A x C A - m G I T R L - F c 感染 C T 2 6 が  $5.76 \pm 4.65$ 、非感染 C T 2 6 が  $13.26 \pm 3.45$  であった。

マウス G I T R L - F c 遺伝子導入細胞において腫瘍径が縮小し、種々のがん細胞における G I T R L - F c 発現アデノウイルスベクターの腫瘍増殖抑制効果が示された。

【 産業上の利用可能性 】

## 【 0 0 8 2 】

本発明の細胞、治療剤、予防剤、処置方法は、腫瘍や感染症などの疾患の治療又は予防に適用可能であり、強力に免疫システムを誘導することが可能である。

30

【 配列表フリーテキスト 】

## 【 0 0 8 3 】

SEQ ID NO:1: mGITRL-FLF primer

SEQ ID NO:2: mGITRL-FLR primer

SEQ ID NO:3: mGF5 primer

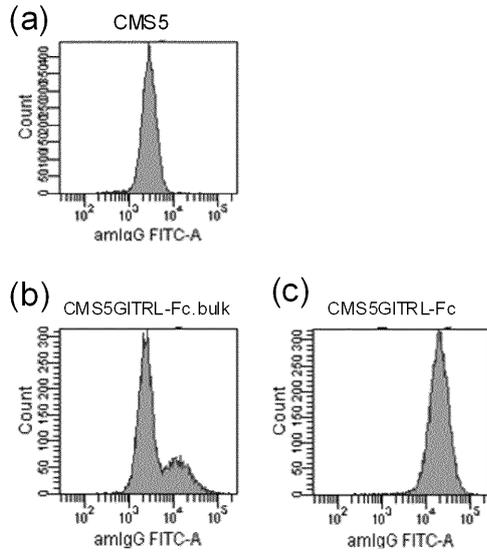
SEQ ID NO:4: mFc3 primer

SEQ ID NO:5: Epitope peptide 9m

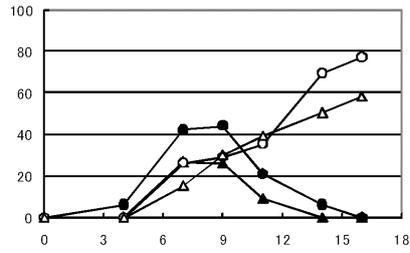
【 図 1 】



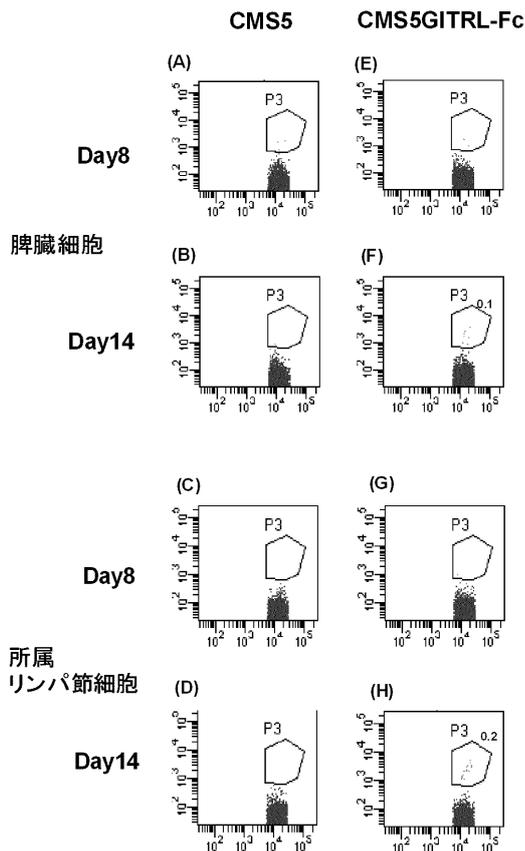
【 図 2 】



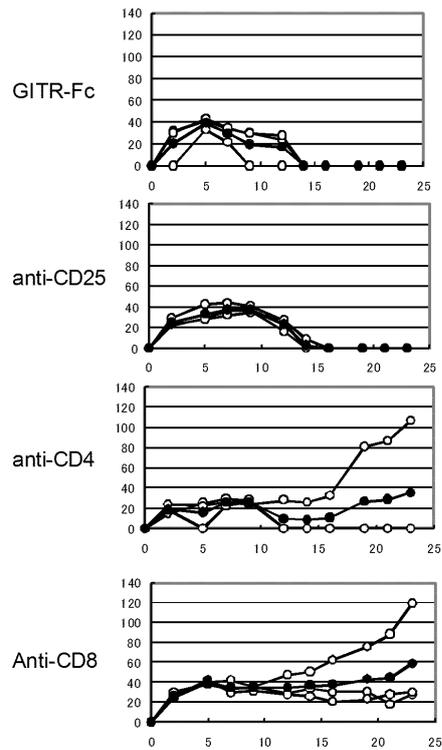
【 図 3 】



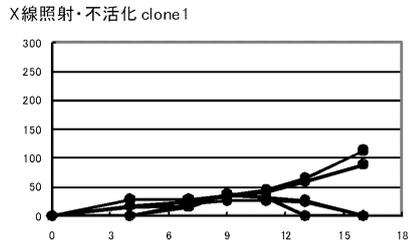
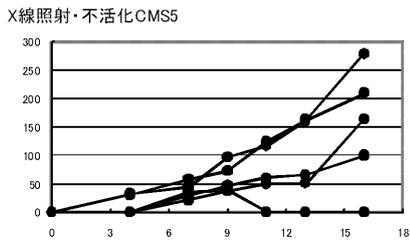
【 図 4 】



【 図 5 】

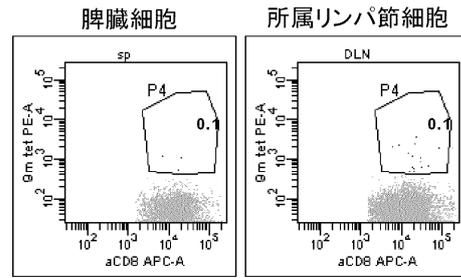


【 図 6 】

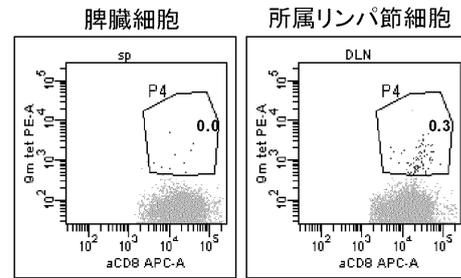


【 図 7 】

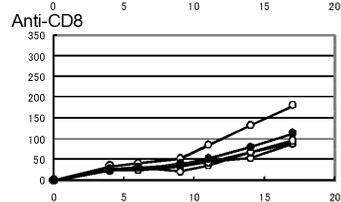
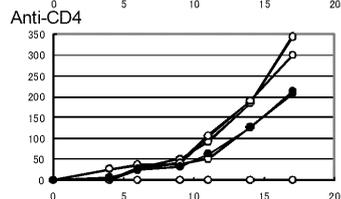
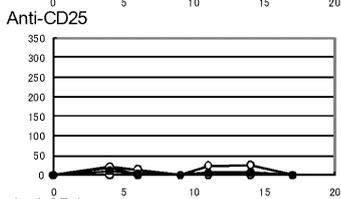
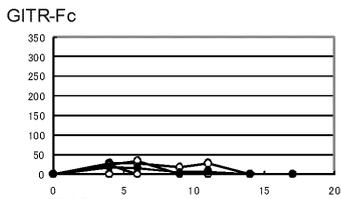
X線照射・不活化CMS5



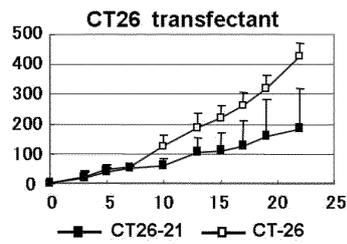
X線照射・不活化 clone1



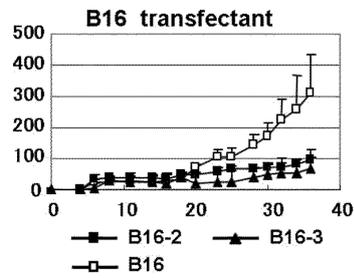
【 図 8 】



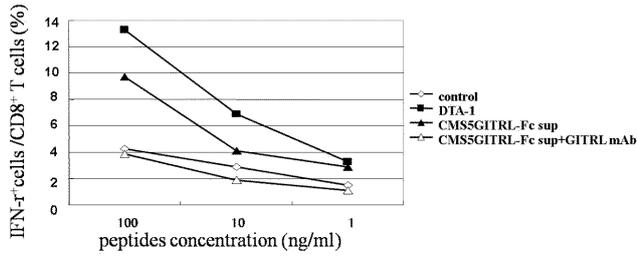
【 図 9 】



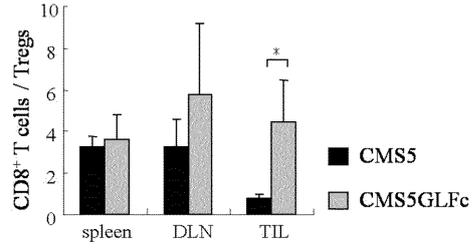
【 図 10 】



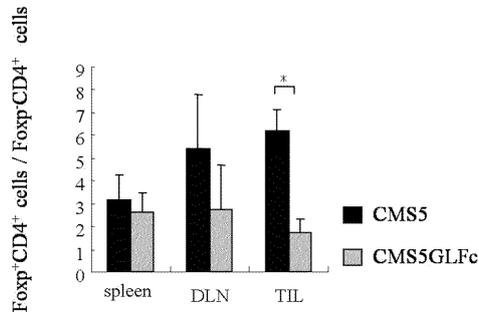
【 1 1 】



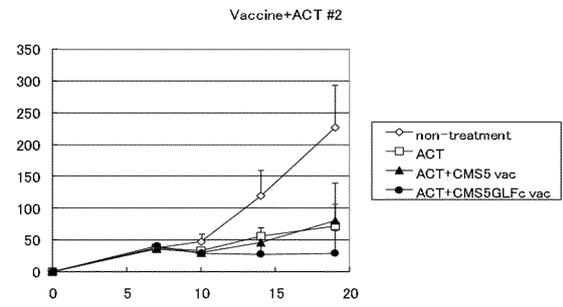
【 1 3 】



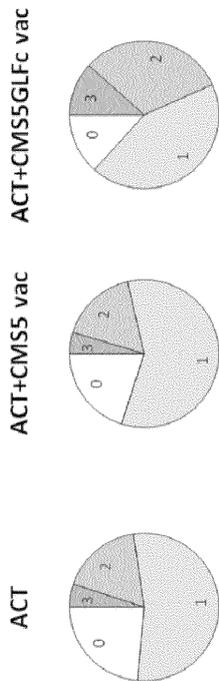
【 1 2 】



【 1 4 】



【 1 5 】



【配列表】

2010030002000001.app

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2009/065938
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> C12N15/09(2006.01)i, A61K35/12(2006.01)i, A61K35/76(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P31/04(2006.01)i, A61P31/10(2006.01)i, A61P31/12(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P37/00(2006.01)i, C12N5/00(2006.01)i 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) C12N15/09, A61K35/12, A61K35/76, A61K48/00, A61P31/04, A61P31/10, A61P31/12, A61P35/00, A61P37/00, C12N5/00 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 1996-2009 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2009 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2009 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	JP 2007-515942 A (WYETH), 21 June 2007 (21.06.2007), & EP 1631588 A2 & US 2005/0014224 A1 & WO 2004/107618 A2	1-3, 5-7, 9-12, 14, 15/ 4, 8, 11, 12
X	Hide IGARASHI et al., "G1TR Ligand Kyo Shigeki ni yoru Ko Shuyo T-saibo Men'eki Oto no Yudo", Journal of the Japanese Stomatological Society (2008 Jan), vol.57, page 94	1, 5, 11, 12
X	CALMELS, B. et al., Bypassing tumor-associated immune suppression with recombinant adenovirus constructs expressing membrane bound or secreted G1TR-L. Cancer Gene Ther. (2005) Vol.12 pp.198-205	1, 3, 5, 7, 9, 10, 14, 15
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier 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 09 December, 2009 (09.12.09)		Date of mailing of the international search report 22 December, 2009 (22.12.09)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer  Telephone No.
Facsimile No.		

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/065938

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BALTZ, K.M. et al., Cancer immunoediting by GITR (glucocorticoid-induced TNF-related protein) ligand in humans: NK cell/tumor cell interactions. FASEB J. (2007) Vol.21 pp.2442-2454	1-3,5-7,9,10
X	HU, P. et al., Construction and preclinical characterization of Fc-mGITRL for the immunotherapy of cancer. Clin Cancer Res. (2008 Jan) Vol.14 pp.579-588	1-3,5-7,9,10
Y	SIMONS, J.W. et al., Induction of immunity to prostate cancer antigens: results of a clinical trial of vaccination with irradiated autologous prostate tumor cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor using ex vivo gene transfer. Cancer Res. (1999) Vol.59 pp.5160-5168	4,8,11,12
Y	NELSON, W.G. et al., Cancer cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor using ex vivo gene transfer as vaccines for the treatment of genitourinary malignancies. Cancer Chemother Pharmacol. (2000) Vol.46 pp.667-72	4,8,11,12

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2009/065938

**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, 16  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claims 13 and 16 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required to search.
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box 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.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2009/065938									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))											
Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, A61K35/12(2006.01)i, A61K35/76(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P31/04(2006.01)i, A61P31/10(2006.01)i, A61P31/12(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P37/00(2006.01)i, C12N5/00(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. C12N15/09, A61K35/12, A61K35/76, A61K48/00, A61P31/04, A61P31/10, A61P31/12, A61P35/00, A61P37/00, C12N5/00											
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											
<table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2009年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2009年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2009年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2009年	日本国実用新案登録公報	1996-2009年	日本国登録実用新案公報	1994-2009年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2009年										
日本国実用新案登録公報	1996-2009年										
日本国登録実用新案公報	1994-2009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)											
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)											
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									
X/Y	JP 2007-515942 A (ワイス) 2007.06.21 & EP 1631588 A2 & US 2005/0014224 A1 & WO 2004/107618 A2	1-3,5-7,9-12,14,15 / 4,8,11,12									
X	五十嵐英他, GITR リガンド共刺激による抗腫瘍 T 細胞免疫応答の誘導 日本口腔科学会雑誌 (2008 Jan) Vol.57 p.94	1,5,11,12									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。		<input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。									
* 引用文献のカテゴリー		の日の後に公表された文献									
「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		「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									
「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		「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									
「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)		「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									
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」同一パテントファミリー文献									
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願											
国際調査を完了した日 09.12.2009		国際調査報告の発送日 22.12.2009									
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) 富永 みどり	4B 3845								
		電話番号 03-3581-1101 内線 3448									

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2009/065938

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	CALMELS, B. et al., Bypassing tumor-associated immune suppression with recombinant adenovirus constructs expressing membrane bound or secreted GITR-L. Cancer Gene Ther. (2005) Vol.12 pp.198-205	1,3,5,7,9,10,14,15
X	BALTZ, K.M. et al., Cancer immunoeediting by GITR (glucocorticoid-induced TNF-related protein) ligand in humans: NK cell/tumor cell interactions. FASEB J. (2007) Vol.21 pp.2442-2454	1-3,5-7,9,10
X	HU, P. et al., Construction and preclinical characterization of Fc-mGITRL for the immunotherapy of cancer. Clin Cancer Res. (2008 Jan) Vol.14 pp.579-588	1-3,5-7,9,10
Y	SIMONS, J.W. et al., Induction of immunity to prostate cancer antigens: results of a clinical trial of vaccination with irradiated autologous prostate tumor cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor using ex vivo gene transfer. Cancer Res. (1999) Vol.59 pp.5160-5168	4,8,11,12
Y	NELSON, W.G. et al., Cancer cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor using ex vivo gene transfer as vaccines for the treatment of genitourinary malignancies. Cancer Chemother Pharmacol. (2000) Vol.46 pp.S67-72	4,8,11,12

様式PCT/ISA/210 (第2ページの続き) (2007年4月)

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2009/065938

## 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、16 は、この国際調査機関が調査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、16は、治療による人体の処置方法に関するものであって、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。
2.  請求項 \_\_\_\_\_ 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。

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 31/10 (2006.01)	A 6 1 P 31/10	
A 6 1 P 31/16 (2006.01)	A 6 1 P 31/16	
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	H
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), 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, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 池田 裕明  
三重県津市江戸橋二丁目 1 7 4 番地 国立大学法人三重大学大学院医学系研究科内

(72) 発明者 三井 潤  
三重県津市江戸橋二丁目 1 7 4 番地 国立大学法人三重大学大学院医学系研究科内

(72) 発明者 竹中 由貴  
三重県津市江戸橋二丁目 1 7 4 番地 国立大学法人三重大学大学院医学系研究科内

(72) 発明者 峰野 純一  
滋賀県大津市瀬田三丁目 4 番 1 号 タカラバイオ株式会社内

(72) 発明者 加藤 郁之進  
滋賀県大津市瀬田三丁目 4 番 1 号 タカラバイオ株式会社内

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA63 CA04 DA02 EA02 GA11  
4B065 AA90X AA91X AA91Y AA93Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA45  
4C084 AA13 NA14 ZB07 ZB26 ZB27 ZB32 ZB33 ZB35  
4C085 AA03 CC21 DD62 EE01 GG01  
4C087 AA01 AA02 BB63 BC83 CA12 NA14 ZB09 ZB26 ZB27 ZB32  
ZB33 ZB35

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。