

(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2010-521675

(P2010-521675A)

(43) 公表日 平成22年6月24日 (2010. 6. 24)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 P	2 G O 4 5
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 B O 6 3
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 C O 8 4
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 T	4 C O 8 5
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 E	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 58 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2009-553753 (P2009-553753)
 (86) (22) 出願日 平成20年3月12日 (2008. 3. 12)
 (85) 翻訳文提出日 平成21年4月6日 (2009. 4. 6)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2008/056726
 (87) 国際公開番号 W02008/115750
 (87) 国際公開日 平成20年9月25日 (2008. 9. 25)
 (31) 優先権主張番号 11/687, 641
 (32) 優先日 平成19年3月17日 (2007. 3. 17)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 509004712
 ベイラー リサーチ インスティテュート
 BAYLOR RESEARCH INS
 TITUTE
 アメリカ国 テキサス75204 ダラス
 スイート125 ライブオークストリー
 ト3434
 (74) 代理人 100107984
 弁理士 廣田 雅紀
 (72) 発明者 パルッカ アンナ カロリーナ
 アメリカ国 ティーエックス75204
 ダラス 3000ブラックバーンストリー
 ト#2522

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌の治療のための組成物及び方法

(57) 【要約】

本発明は、癌に対して起こる免疫応答の種類を制御する指標として組織微小環境中の癌細胞における I L - 1 3 発現のレベルを検出することによる、癌の治療、診断及び予後のための組成物及び方法を含む。

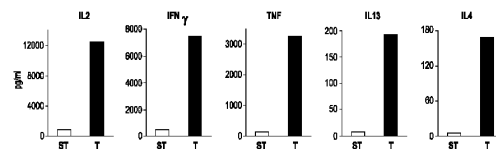


FIG. 1A

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

癌を有する疑いのある患者から採取した生体試料の組織微小環境中に存在する I L - 1 3 のレベルを決定するステップと、
前記組織微小環境中の I L - 1 3 レベルと、前記生体試料と同じ種類の正常な非癌組織中に存在することが知られている I L - 1 3 のレベルとを比較するステップと、
I L - 1 3 のレベルの上昇が癌の存在を示す、前記患者の予後を評価するステップとを含む、癌を示す疑いのある患者の診断方法。

【請求項 2】

I L - 1 3 のレベルを決定する方法が、ウェスタンブロット分析、免疫沈降、E L I S A 分析、インサイチュ蛍光、インサイチュ蛍光共鳴エネルギー移動、インサイチュ免疫沈降、及びインサイチュ免疫組織染色からなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

組織微小環境に対する I L - 1 3 の作用が S T A T 6 のリン酸化レベルを測定することにより決定される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

試料が極低温凍結されている、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

I L - 1 3 発現のレベルが経時的に追跡される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

I L - 1 3 のレベルが I L - 1 3 m R N A へのハイブリダイゼーション及び定量的 R T - P C R により検出される、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 7】

生体試料が上皮由来である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

生体試料が、乳房、前立腺、肺、大腸、卵巣、子宮内膜、腎臓、膀胱、胃、膵臓及び下垂体分泌腺から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

上皮由来の癌を治療する方法であって、
前記癌の治療を必要とする患者を同定するステップと、
癌組織を有する疑いのある前記患者から採取した生体試料の組織微小環境中に存在する I L - 1 3 のレベルを決定するステップと、
前記組織微小環境中の I L - 1 3 レベルと、前記生体試料中に存在するのと同じ種類の正常な非癌組織中に存在することが知られている I L - 1 3 のレベルとを比較するステップと、
前記組織微小環境中の細胞間 I L - 1 3 情報伝達を遮断するために十分な量の 1 又は複数の I L - 1 3 アンタゴニストで前記患者を治療するステップとを含む方法。

30

【請求項 10】

I L - 1 3 アンタゴニストが、乳癌細胞の微小環境中の I L - 1 3 を標的とする、抗 I L - 1 3 抗体、ヒト抗 I L - 1 3 抗体、ヒト化抗 I L - 1 3 抗体、二価抗 I L - 1 3 抗体、二価ヒト化抗 I L - 1 3 抗体、抗 I L - 1 3 モノクローナル抗体、F a b、F a b'、F (a b')₂、F v、ジスルフィド安定化 F v 及び一本鎖 F v 断片並びにこれらの組み合わせからなる群から選択される抗 I L - 1 3 抗原結合断片、抗 I L - 1 3 結合融合タンパク質、多価抗 I L - 1 3 抗体及び抗 I L - 1 3 キメラ抗体、ポリクローナル抗 I L - 1 3 抗体のうちの少なくとも 1 つを含む、請求項 9 に記載の方法。

40

【請求項 11】

I L - 1 3 アンタゴニストが、同族受容体に結合する I L - 1 3 の二価アンタゴニストを含み、I L - 1 3 アンタゴニストが乳癌細胞の微小環境中で結合する I L - 1 3 - I L - 1 3 受容体を標的とする、請求項 9 に記載の方法。

50

【請求項 12】

IL-13 アンタゴニストが癌を標的とする、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 13】

腫瘍特異的免疫細胞で患者を治療するステップをさらに含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 14】

樹状細胞を含む腫瘍内ワクチン接種で患者を治療するステップをさらに含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 15】

抗原負荷樹状細胞を含むワクチンで患者を治療するステップをさらに含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 16】

IL-13 アンタゴニストが、抗 IL-13 サイトカイン受容体遮断薬、抗 IL-13 受容体中和抗体、抗 IL-13 受容体アンタゴニスト、可溶性 IL-13 受容体、抗 IL-13 受容体-IL-13 結合を阻害する 1 又は複数の分子、IL-13 の下流の事象の 1 又は複数の阻害剤、不活性化 IL-13 及びこれらの組み合わせのうちの少なくとも 1 つを含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 17】

乳癌を示す疑いのある患者の診断方法であって、
乳癌を有する疑いのある前記患者から採取した生体試料の組織微小環境中に存在する IL-13 のレベルを決定するステップと、
前記組織微小環境中の IL-13 レベルと正常な非腫瘍乳房組織中に存在することが知られている IL-13 のレベルとを比較するステップであって、IL-13 のレベルの上昇が乳癌の存在を示すステップと
を含む方法。

【請求項 18】

IL-13 のレベルを決定する方法が、ウェスタンブロット分析、免疫沈降、ELISA 分析、インサイチュ蛍光、インサイチュ蛍光共鳴エネルギー移動、インサイチュ免疫沈降、及びインサイチュ免疫組織染色からなる群から選択される、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

IL-13 のレベルが、STAT6 のリン酸化レベルを測定することにより決定される、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 20】

試料が極低温凍結されている、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 21】

IL-13 発現のレベルが経時的に追跡される、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 22】

IL-13 のレベルが IL-13 mRNA へのハイブリダイゼーションにより検出される、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 23】

IL-13 発現のレベルが定量的 RT-PCR を使用して決定される、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 24】

包装された組み合わせ中に、
乳房組織微小環境中の IL-13 の発現レベルを検出可能な量の IL-13 特異的プローブ、及び
前記 IL-13 プローブの使用に関する使用説明書
を含み、前記プローブが直接的又は間接的に検出可能である、乳房試料中の IL-13 を検出するための検査キット。

【請求項 25】

乳癌を治療する方法であって、
前記乳癌の治療を必要とする患者を同定するステップと、
乳癌を有する疑いのある前記患者から採取した乳房組織試料の組織微小環境中に存在する
IL - 13 のレベルを決定するステップと、
前記試料中の IL - 13 レベルと正常な乳房組織中に存在することが知られている IL -
13 のレベルとを比較するステップと、
1 又は複数の IL - 13 アンタゴニストで前記乳癌を治療するステップと
を含む方法。

【請求項 26】

前立腺癌を治療する方法であって、
前記癌の治療を必要とする患者を同定するステップと、
前立腺癌を有する疑いのある前記患者から採取した前立腺組織試料の組織微小環境中に存
在する IL - 13 のレベルを決定するステップと、
前記生体試料中の IL - 13 レベルと正常な前立腺組織中に存在することが知られている
IL - 13 のレベルとを比較するステップと、
1 又は複数の IL - 13 アンタゴニストで前記前立腺癌を治療するステップと
を含む方法。

10

【請求項 27】

非小細胞肺癌を治療する方法であって、
前記癌の治療を必要とする患者を同定するステップと、
肺癌を有する疑いのある前記患者から採取した肺試料の組織微小環境中に存在する IL -
13 のレベルを決定するステップと、
前記生体試料中の IL - 13 レベルと正常な肺組織中に存在することが知られている IL
- 13 のレベルとを比較するステップと、
1 又は複数の IL - 13 アンタゴニストで前記肺癌を治療するステップと
を含む方法。

20

【請求項 28】

血管新生を抑制するために十分な有効量の 1 又は複数の IL - 13 アンタゴニストで患
者を治療するステップ
を含む、血管新生を阻害する方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、一般に癌治療の分野に、より詳細には癌に対する新規な診断及び治療の評価
及び開発に関する。

【背景技術】

【0002】

本発明の範囲を限定することなく、癌に対する宿主反応と関連して本発明の背景を記述
する。癌の増殖及び成長は、癌細胞と非造血細胞（線維芽細胞、内皮細胞）並びに自然免
疫系及び適応免疫系両方由来の免疫細胞からなる周囲の非悪性の間質との間の相互作用に
依存する（Coussens, L. M., and Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. Nature
420, 860-867; Joyce, J. A. (2005). Therapeutic targeting of the tumor microenvir
onment. Cancer Cell 7, 513-520）。自然免疫細胞は、好中球、マクロファージ（MΦ）
、樹状細胞（DC）、肥満細胞、及びNK細胞からなる（Janeway, C. A., Jr., and Med
zhitov, R. (2002). Innate immune recognition. Annu Rev Immunol 20, 197-216）。適
応免疫細胞は、抗原再接触時の免疫記憶及び迅速な反応が可能なT及びBリンパ球である
。しかしながら、リンパ球は抗原の種類に関して教育される必要がある。これは、免疫系
の2つの部門を橋渡しするDCの仕事となる（Banchereau, J., Briere, F., Caux, C.,
Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y., Pulendran, B., and Palucka, K. (2000). Immun
obiology of dendritic cells. Ann Rev Immunol 18, 767-811; Banchereau, J., and St

40

50

einman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-252; Shortman, K., and Liu, Y. J. (2002). Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nature Rev Immunol* 2, 151-161; Steinman, R. M. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 9, 271-296)。実際に、DCは免疫応答を誘導及び維持し、Mφとは対照的に、ナイーブリンパ球を活性化することができる。さらに、マウス及びヒトの両方における抗原負荷DCを用いたワクチン接種により、DCが癌に対する耐性を弱め、T細胞を教育することが可能であると示された (Banchereau, J., and Palucka, A. K. (2005). Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat Rev Immunol* 5, 296-306)。そのため、DCは、腫瘍による操作のための初期標的の代表である。

10

【0003】

多くの研究が、腫瘍関連マクロファージ (TAM) 及びそのサブセットの役割に重点を置いてきた (Balkwill, F., Charles, K. A., and Mantovani, A. (2005). Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell* 7, 211-217; Condeelis, J., and Pollard, J. W. (2006). Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell* 124, 263-266)。しかしながら、DCについてはあまり注目されてこなかった。ヒトにおける多くの研究が、DCによる腫瘍の浸潤を認めた (Gabrilovich, D. (2004). Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. *Nat Rev Immunol* 4, 941-952)。だが、DC浸潤の免疫学的重要性はあまり解明されていない。腫瘍は、DC機能を破壊することにより免疫エフェクターを回避すると考えられている (Gabrilovich, D. (2004). Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. *Nat Rev Immunol* 4, 941-952)。例えば、骨髄細胞中のSTAT-3の活性化は、DC成熟を阻害する (Gabrilovich, D. I., Chen, H. L., Girgis, K. R., Cunningham, H. T., Meny, G. M., Nadaf, S., Kavanaugh, D., and Carbone, D. P. (1996). Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat Med* 2, 1096-1103) 血管内皮増殖因子 (VEGF) の産生増加をもたらす (Wang, T., Niu, G., Kortylewski, M., Burdelya, L., Shain, K., Zhang, S., Bhattacharya, R., Gabrilovich, D., Heller, R., Coppola, D., et al. (2004). Regulation of the innate and adaptive immune response by Stat-3 signaling in tumor cells. *Nat Med* 10, 48-54)。乳癌細胞により分泌されたIL-6は、DCの代わりに単球分化をTAMに偏らせ (Chomarat, P., Banchereau, J., Davoust, J., and Palucka, A. K. (2000). IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nat Immunol* 1, 510-514)、それにより抗原提示から抗原分解に偏らせる (Delamarre, L., Pack, M., Chang, H., Mellman, I., and Trombetta, E. S. (2005). Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate. *Science* 307, 1630-1634)。最後に、腫瘍は、次にCD4⁺CD25⁺制御性T細胞を増大させるDCのサブセットを分泌するIL-10及び/又はTGF-βの分化を促進する (Enk, A. H., Jonuleit, H., Saloga, J., and Knop, J. (1997). Dendritic cells as mediators of tumor-induced tolerance in metastatic melanoma. *Int J Cancer* 73, 309-316; Ghiringhelli, F., Puig, P. E., Roux, S., Parcellier, A., Schmitt, E., Solary, E., Kroemer, G., Martin, F., Chaffert, B., and Zitvogel, L. (2005). Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell proliferation. *J Exp Med* 202, 919-929; Levings, M. K., Gregori, S., Tresoldi, E., Cazzaniga, S., Bonini, C., and Roncarolo, M. G. (2005). Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25⁺CD4⁺ Tr cells. *Blood* 105, 1162-1169)。

20

30

40

【先行技術文献】

【非特許文献】

50

【 0 0 0 4 】

【非特許文献 1】Coussens, L. M., and Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature* 420, 860-867

【非特許文献 2】Joyce, J. A. (2005). Therapeutic targeting of the tumor microenvironment. *Cancer Cell* 7, 513-520

【非特許文献 3】Janeway, C. A., Jr., and Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20, 197-216

【非特許文献 4】Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y., Pulendran, B., and Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Ann Rev Immunol* 18, 767-811

【非特許文献 5】Banchereau, J., and Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-252

【非特許文献 6】Shortman, K., and Liu, Y. J. (2002). Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nature Rev Immunol* 2, 151-161

【非特許文献 7】Steinman, R. M. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 9, 271-296

【非特許文献 8】Banchereau, J., and Palucka, A. K. (2005). Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat Rev Immunol* 5, 296-306

【非特許文献 9】Balkwill, F., Charles, K. A., and Mantovani, A. (2005). Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell* 7, 211-217

【非特許文献 10】Condeelis, J., and Pollard, J. W. (2006). Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell* 124, 263-266

【非特許文献 11】Gabrilovich, D. (2004). Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. *Nat Rev Immunol* 4, 941-952

【非特許文献 12】Gabrilovich, D. I., Chen, H. L., Girgis, K. R., Cunningham, H. T., Meny, G. M., Nadaf, S., Kavanaugh, D., and Carbone, D. P. (1996). Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat Med* 2, 1096-1103

【非特許文献 13】Wang, T., Niu, G., Kortylewski, M., Burdelya, L., Shain, K., Zhang, S., Bhattacharya, R., Gabrilovich, D., Heller, R., Coppola, D., et al. (2004). Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells. *Nat Med* 10, 48-54

【非特許文献 14】Chomarat, P., Banchereau, J., Davoust, J., and Palucka, A. K. (2000). IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nat Immunol* 1, 510-514

【非特許文献 15】Delamarre, L., Pack, M., Chang, H., Mellman, I., and Trombetta, E. S. (2005). Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate. *Science* 307, 1630-1634

【非特許文献 16】Enk, A. H., Jonuleit, H., Saloga, J., and Knop, J. (1997). Dendritic cells as mediators of tumor-induced tolerance in metastatic melanoma. *Int J Cancer* 73, 309-316

【非特許文献 17】Ghiringhelli, F., Puig, P. E., Roux, S., Parcellier, A., Schmitt, E., Solary, E., Kroemer, G., Martin, F., Chauffert, B., and Zitvogel, L. (2005). Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation. *J Exp Med* 202, 919-929

【非特許文献 18】Levings, M. K., Gregori, S., Tresoldi, E., Cazzaniga, S., Bonini, C., and Roncarolo, M. G. (2005). Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25+CD4+ Tr cells. *Blood* 105, 1162-1169

10

20

30

40

50

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

しかしながら、癌細胞に対して宿主が起こす免疫応答の種類を改良するための組成物及び方法が依然として必要である。

【課題を解決するための手段】

【0006】

IL-13 (インターロイキン-13) の遮断を使用して上皮由来の腫瘍を治療できることが分かっている。本発明は、優位な免疫応答がII型サイトカインの分泌を含む、癌治療を必要とする患者を特定すること、及び、II型サイトカインアンタゴニストがII型サイトカインを分泌するCD4+T細胞を遮断し、患部組織中のTh1T細胞の割合を増加させる1又は複数のII型サイトカインアンタゴニストで患部組織を治療することにより、癌に対するT細胞応答を調節する組成物及び方法を含む。

10

【0007】

本発明を、例えば前立腺や乳房などの上皮由来の癌の治療のために使用し得ることも分かっている。II型サイトカインアンタゴニストは、例えばIL-13を含むが、また抗IL-4抗体、抗IL-5抗体、抗IL-9抗体、抗IL-13抗体又は抗IL-25抗体、ヒト化抗IL-4抗体、抗IL-5抗体、抗IL-9抗体、抗IL-13抗体又は抗IL-25抗体、及びこれらの組み合わせを含んでもよい。他の実施形態において、II型サイトカインアンタゴニストは、不活性化IL-4、IL-5、IL-9、IL-13又はIL-25及びこれらの組み合わせであってもよい。これらのアンタゴニストは単回又は複数回投与で提供することができる。II型サイトカインは、例えば、抗サイトカイン受容体、中和抗体、受容体アンタゴニスト、可溶性受容体、受容体-リガンド結合に干渉する分子、及びII型シグナル伝達経路の下流の事象の阻害剤などの様々な活性物質及びこれらの組み合わせを使用して妨げてもよい。

20

【0008】

より詳細には、本発明は、癌を有する疑いのある患者から採取した生体試料の組織微小環境中に存在するIL-13のレベルを決定するステップと、この組織微小環境中のIL-13レベルとこの生体試料と同じ種類の正常な非癌組織中に存在することが知られているIL-13のレベルとを比較するステップと、IL-13のレベルの上昇が癌の存在を示す、この患者の予後を評価するステップとにより、癌を有する疑いのある患者を診断及び治療するための組成物及び方法を含む。一実施形態において、IL-13のレベルを決定する方法はウェスタンブロット分析、免疫沈降、ELISA分析、インサイチュ蛍光、インサイチュ蛍光共鳴エネルギー移動、インサイチュ免疫沈降、及びインサイチュ免疫組織染色からなる群から選択される。この方法はまた、STAT6のリン酸化のレベルを測定することにより決定される組織微小環境に対するIL-13の作用を測定するステップも含む。

30

【0009】

本発明の方法を使用する分析用の試料は、例えば組織切片、極低温凍結された切片などを含む。IL-13発現のレベルは経時的に追跡されてもよく、IL-13 mRNAへのハイブリダイゼーション、定量的RT-PCRなどによるIL-13レベルの検出を含んでもよい。一般に、生体試料は上皮由来とし、乳房、前立腺、肺、大腸、卵巣、子宮内膜、腎臓、膀胱、胃、脾臓、及び下垂体分泌腺から選択される生体試料から得ることができる。

40

【0010】

本発明はまた、上皮由来の癌を治療する方法であって、この癌の治療を必要とする患者を特定するステップと、癌組織を有する疑いのあるこの患者から採取した生体試料の組織微小環境中に存在するIL-13のレベルを決定するステップと、この組織微小環境中のIL-13レベルとこの生体試料中に存在するのと同じ種類の正常な非癌組織中に存在することが知られているIL-13のレベルとを比較するステップと、この組織微小環境中

50

の細胞間 I L - 1 3 情報伝達を遮断するために十分な量の 1 又は複数の I L - 1 3 アンタゴニストでこの患者を治療するステップとによる方法も含む。本発明で使用するための I L - 1 3 アンタゴニストの例は、例えば、乳癌細胞の微小環境中の I L - 1 3 を標的とする、抗 I L - 1 3 抗体、ヒト抗 I L - 1 3 抗体、ヒト化抗 I L - 1 3 抗体、二価抗 I L - 1 3 抗体、二価ヒト化抗 I L - 1 3 抗体、抗 I L - 1 3 モノクローナル抗体、F a b、F a b'、F (a b')₂、F v、ジスルフィド安定化 F v 及び一本鎖 F v 断片並びにこれらの組み合わせからなる群から選択される抗 I L - 1 3 抗原結合断片、抗 I L - 1 3 結合融合タンパク質、多価抗 I L - 1 3 抗体及び抗 I L - 1 3 キメラ抗体、ポリクローナル抗 I L - 1 3 抗体のうちの少なくとも 1 つを含む。治療方法は、腫瘍特異的免疫細胞、例えば樹状細胞を含む腫瘍内ワクチン接種で患者を治療するステップをさらに含んでもよい。本発明の別の実施形態は、抗原負荷樹状細胞を含むワクチンで患者を治療するステップを含む。I L - 1 3 アンタゴニストの他の例は、抗 I L - 1 3 サイトカイン受容体遮断薬、抗 I L - 1 3 受容体中和抗体、抗 I L - 1 3 受容体アンタゴニスト、可溶性 I L - 1 3 受容体、抗 I L - 1 3 受容体 - I L - 1 3 結合を阻害する 1 又は複数の分子、I L - 1 3 の下流の事象の 1 又は複数の阻害剤、不活性化 I L - 1 3 及びこれらの組み合わせのうちの少なくとも 1 つを含む。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 1 】

本発明のさらに別の実施形態は、乳癌を示す疑いのある患者の診断方法であって、乳癌を有する疑いのあるこの患者から採取した生体試料の組織微小環境中に存在する I L - 1 3 のレベルを決定するステップと、この組織微小環境中の I L - 1 3 レベルと正常な非腫瘍乳房組織中に存在することが知られている I L - 1 3 のレベルとを比較するステップであって、I L - 1 3 のレベルの上昇が乳癌の存在を示すステップとによる方法を含む。I L - 1 3 のレベルを決定する方法の例は、例えば、ウェスタンブロット分析、免疫沈降、E L I S A 分析、インサイチュ蛍光、インサイチュ蛍光共鳴エネルギー移動、インサイチュ免疫沈降、及びインサイチュ免疫組織染色を含む。I L - 1 3 のレベルは、例えば極低温凍結された試料の、S T A T 6 のリン酸化レベルを測定することにより決定されてもよい。

【 0 0 1 2 】

本発明はまた、包装された組み合わせ中に、乳房組織微小環境中の I L - 1 3 の発現レベルを検出可能な量の I L - 1 3 特異的プローブ、及びこの I L - 1 3 プローブの使用に関する使用説明書を含み、このプローブが直接的又は間接的に検出可能である、乳房試料中の I L - 1 3 を検出するための検査キットも含む。

【 0 0 1 3 】

本発明のさらに別の実施形態は、乳癌を治療する方法であって、この乳癌の治療を必要とする患者を特定するステップと、乳癌を有する疑いのあるこの患者から採取した乳房組織試料の組織微小環境中に存在する I L - 1 3 のレベルを決定するステップと、この試料中の I L - 1 3 レベルと正常な乳房組織中に存在することが知られている I L - 1 3 のレベルとを比較するステップと、1 又は複数の I L - 1 3 アンタゴニストでこの乳癌を治療するステップとによる方法を含む。本発明はまた、乳癌を治療するために十分な有効量の 1 又は複数の I L - 1 3 アンタゴニストで患者を治療することによる乳癌の治療用に適合させた組成物も含む。

【 0 0 1 4 】

別の方法は、この癌の治療を必要とする患者を同定するステップと、前立腺癌を有する疑いのあるこの患者から採取した前立腺組織試料の組織微小環境中に存在する I L - 1 3 のレベルを決定するステップと、この生体試料中の I L - 1 3 レベルと正常な前立腺組織中に存在することが知られている I L - 1 3 のレベルとを比較するステップと、1 又は複数の I L - 1 3 アンタゴニストでこの前立腺癌を治療するステップとにより、前立腺癌を治療するステップを含む。本発明はまた、前立腺癌を治療するために十分な有効量の 1 又は複数の I L - 1 3 アンタゴニストで患者を治療することによる前立腺の治療用に適合させた組成物も含む。

【 0 0 1 5 】

本発明のさらに別の方法は、非小細胞肺癌を治療する方法であって、この癌のための治療を必要とする患者を同定するステップと、肺癌を有する疑いのあるこの患者から採取した肺試料の組織微小環境中に存在する I L - 1 3 のレベルを決定するステップと、この生体試料中の I L - 1 3 レベルと正常な肺組織中に存在することが知られている I L - 1 3 のレベルとを比較するステップと、1又は複数の I L - 1 3 アンタゴニストでこの肺癌を治療するステップとを含む方法を含む。本発明はまた、非小細胞肺癌を治療するために十分な有効量の1又は複数の I L - 1 3 アンタゴニストで患者を治療することによる非小細胞肺癌の治療用に適合させた組成物も含む。

【 0 0 1 6 】

本発明の方法はまた、血管新生を抑制するために十分な有効量の1又は複数の I L - 1 3 アンタゴニストで患者を治療するステップにより、血管新生を阻害する方法も含む。

【 0 0 1 7 】

代替として又は組み合わせで、可溶性 I L - 4、I L - 5、I L - 9、I L - 1 3 又は I L - 2 5 受容体及びこれらの組み合わせである II 型サイトカインアンタゴニストを使用してもよい。実際に、本発明は、1又は複数の抗サイトカイン抗体（例えばヒト化抗体）、受容体アンタゴニスト及び不活性化サイトカインの組み合わせを使用することができる。1つの具体例は、I L - 1 3 受容体結合抗体遮断薬、可溶性 I L - 1 3 R 及びこれらの組み合わせとすることができる。他の実施形態は、II型サイトカインを分泌する C D 4 + T 細胞を減少させる（且つ I 型サイトカインを分泌する C D 4 + T 細胞を増加させる）ための I L - 1 3 アンタゴニストの使用を含む。

【 0 0 1 8 】

特定の実施形態において、I F N - γ の作用に拮抗するために抗 I F N - γ 抗体、ヒト化抗 I F N - γ 抗体、可溶性 I F N - γ 受容体及びこれらの組み合わせを含むこともまた有用である場合がある。さらに他の実施形態において、アンタゴニストはまた、抗 T N F 抗体、ヒト化抗 T N F 抗体、可溶性 T N F 受容体及びこれらの組み合わせも含んでよい。

【 0 0 1 9 】

本発明はまた、乳癌のための治療を必要とする患者を特定するステップと、I L - 1 3 アンタゴニストが II 型サイトカインを分泌する C D 4 + T 細胞を遮断する、1又は複数の I L - 1 3 アンタゴニストで患部組織を治療するステップとにより、乳癌に対する T 細胞応答を改良するための組成物及び方法も含む。I L - 1 3 アンタゴニストの例は、I L - 1 3 受容体結合抗体遮断薬、不活性化 I L - 1 3、可溶性 I L - 1 3 R 及びこれらの組み合わせを含む。

【 0 0 2 0 】

本発明の組成物は、それを必要とする患者に治療的有効量の1又は複数の II 型サイトカインアンタゴニストを投与することにより、乳癌に対する免疫を向上させるための方法と併用して使用してもよい。II型サイトカインアンタゴニストの例は、例えば、抗 I L - 4 抗体、抗 I L - 5 抗体、抗 I L - 9 抗体、抗 I L - 1 3 抗体又は抗 I L - 2 5 抗体、ヒト化抗 I L - 4 抗体、抗 I L - 5 抗体、抗 I L - 9 抗体、抗 I L - 1 3 抗体又は抗 I L - 2 5 抗体、不活性化 I L - 4、I L - 5、I L - 9、I L - 1 3 又は I L - 2 5、及びこれらの組み合わせ、可溶性 I L - 4、I L - 5、I L - 9、I L - 1 3 又は I L - 2 5 受容体及びこれらの組み合わせ、並びに列挙されたアンタゴニストの2つ以上の組み合わせを含む。組成物はまた、抗 I F N - γ 抗体、ヒト化抗 I F N - γ 抗体、可溶性 I F N - γ 受容体及びこれらの組み合わせ、並びに / 又は、抗 T N F 抗体、ヒト化抗 T N F 抗体、可溶性 T N F 受容体及びこれらの組み合わせも含んでよい。

【 0 0 2 1 】

さらに別の実施形態において、本発明の組成物及び方法はまた、癌に対する T h 1 応答を刺激するための1又は複数の I 型サイトカインも含んでよい。1又は複数の I 型サイトカインは、T h 1 応答を刺激する単回又は複数回投与で提供することができる。

【 0 0 2 2 】

本発明はまた、抗 I L - 4 抗体、抗 I L - 5 抗体、抗 I L - 9 抗体、抗 I L - 1 3 抗体若しくは抗 I L - 2 5 抗体；I L - 4、I L - 5、I L - 9、I L - 1 3 若しくは I L - 2 5 の可溶性受容体及びこれらの組み合わせ、抗 I F N - γ 抗体、ヒト化抗 I F N - γ 抗体、可溶性 I F N - γ 受容体及びこれらの組み合わせ、並びに / 又は抗 T N F 抗体、ヒト化抗 T N F 抗体、可溶性 T N F 受容体及びこれらの組み合わせから選択される有効量の 1 又は複数の II 型サイトカインアンタゴニストを提供することにより、ヒト乳癌による T h 2 分極化を抑制する方法も含む。

【 0 0 2 3 】

本発明はまた、それを必要とする対象又は患者に、抗 I L - 1 3 サイトカイン受容体遮断薬、抗 I L - 1 3 中和抗体、抗 I L - 1 3 受容体アンタゴニスト、抗 I L - 1 3 可溶性受容体、抗 I L - 1 3 受容体 - リガンド結合を阻害する分子、抗 I L - 1 3 の下流の事象の阻害剤、不活性化 I L - 1 3 及びこれらの組み合わせから選択される有効量の 1 又は複数の I L - 1 3 アンタゴニストを提供する、腫瘍中の血管新生を阻害するための組成物及び方法も含む。血管新生を阻害するための方法は、単独で又は本明細書中で教示及び議論されている任意の療法と組み合わせで使用してもよい。

10

【 0 0 2 4 】

代替として本発明はまた、抗 I L - 1 3 サイトカイン受容体遮断薬、抗 I L - 1 3 中和抗体、抗 I L - 1 3 受容体アンタゴニスト、抗 I L - 1 3 可溶性受容体、抗 I L - 1 3 受容体 - リガンド結合を阻害する分子、抗 I L - 1 3 の下流の事象の阻害剤、不活性化 I L - 1 3 及びこれらの組み合わせから選択される有効量の 1 又は複数の I L - 1 3 アンタゴニストを、それを必要とする患者に提供する、上皮細胞由来の癌による腫瘍関連マクロファージの機能を阻害するための組成物及び方法も含む。

20

【 0 0 2 5 】

本発明はまた、転移及び / 又は腫瘍間質形成を予防するために有効な量の、抗 I L - 1 3 サイトカイン受容体遮断薬、抗 I L - 1 3 中和抗体、抗 I L - 1 3 受容体アンタゴニスト、抗 I L - 1 3 可溶性受容体、抗 I L - 1 3 受容体 - リガンド結合を阻害する分子、抗 I L - 1 3 の下流の事象の阻害剤、不活性化 I L - 1 3 及びこれらの組み合わせから選択される 1 又は複数の I L - 1 3 アンタゴニストを提供することによる、転移及び / 又は腫瘍間質形成の予防のための組成物及び方法も含む。

30

【 0 0 2 6 】

本発明の特徴及び利点のより完全な理解のために、次に添付の図面と共に本発明の詳細な説明を参照する。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 2 7 】

【 図 1 】患者の乳癌試料の微小環境における 2 型サイトカインの存在を示すグラフである。P M A 及び Ionomycin で一晩活性化後の、乳房腫瘍（黒色、T）及び周囲の組織（白色、S T）（図 1 a）又は全腫瘍断片（図 1 b）の腫瘍細胞懸濁液中の、Multiplex Cytokine Bead アッセイにより測定したサイトカイン濃度（p g / m l、縦座標）。平均値 $\pm$ S D

40

【 図 2 a 】患者の乳癌試料中の C D 4 + T 細胞を分泌する I L - 1 3 を示す図である。単一細胞腫瘍懸濁液のフローサイトメトリー分析。（図 2 a）C D 4 + T 細胞浸潤のゲーティング。

【 図 2 b 】患者の乳癌試料中の C D 4 + T 細胞を分泌する I L - 1 3 を示す図である。単一細胞腫瘍懸濁液のフローサイトメトリー分析。図 2 b は、乳癌腫瘍の細胞懸濁液中の C D 4 + C D 3 + T 細胞における I L - 1 3 及び I F N - γ についての細胞質内染色の 2 つのパターンを示す。組換えヒト I L - 1 3 の添加により阻害可能であるため、染色は特異的である（b、中央パネル）。

【 図 2 c 】図 2 c は、C D 3 + C R T H 2 + T 細胞（白色）が乳癌腫瘍切片において検出可能であることを示す。

【 図 2 d 】図 2 d は、フローサイトメトリーによる C D 4 + T 細胞発現 I L - 1 3 の頻度

50

と腫瘍上清へのIL-13分泌の間の相関関係を示す。

【図3】乳癌腫瘍中のIL-13を示す写真である。

【図4a】ヒト化マウスにおいて発生したヒト乳癌腫瘍にDCが浸潤することを示す図である。CD34⁺HPC移植の4週間後に、 10×10^6 個の腫瘍細胞をヒト化マウスの脇腹に皮下接種する。図4aは接種後4日目の相対的な腫瘍サイズを示す。

【図4b】ヒト化マウスにおいて発生したヒト乳癌腫瘍にDCが浸潤することを示す図である。CD34⁺HPC移植の4週間後に、 10×10^6 個の腫瘍細胞をヒト化マウスの脇腹に皮下接種する。図4bは、Hs578T乳癌細胞を移植したヒト化マウスにおける腫瘍発生の代表的な動態を示す。

【図4c】ヒト化マウスにおいて発生したヒト乳癌腫瘍にDCが浸潤することを示す図である。CD34⁺HPC移植の4週間後に、 10×10^6 個の腫瘍細胞をヒト化マウスの脇腹に皮下接種する。図4cは、腫瘍細胞懸濁液の代表的なFACS分析である：HLA-DR（縦座標）及びLineage（横座標）mAbによる染色（左プロット）。CD123（縦座標）及びCD11c（横座標）による染色並びにリネージュ陰性HLA-DR⁺細胞のゲートにおけるpDC（CD123⁺CD11c⁻）及びmDC（CD123⁻CD11c⁺）による相互発現分析（右プロット）。

【図4d】図4dは、乳癌腫瘍を排出するリンパ節における、及び対側リンパ節におけるDC浸潤を示す。HLA-DR⁺Lin⁻細胞パーセント（縦座標）。N = 9マウス/群を同一実験で分析。Wilcoxon検定。

【図4e】図4eは、凍結組織切片におけるHLA-DR（緑色）及びDC-LAMP（赤色）染色を示す（ 10×10^6 上パネル及び 40×10^6 下パネル）。Hs578T乳癌を有するN = 10マウスを分析した。

【図5a】CD4⁺T細胞による再構成が乳癌腫瘍の早期発生の促進に関連していることを示す図である。PBS（ $100 \mu\text{l}$ ）、単独又はCD4⁺T細胞（ 10×10^6 細胞/ $100 \mu\text{l}$ PBS）と一緒に自己CD8⁺T細胞（ 10×10^6 細胞/ $100 \mu\text{l}$ PBS）を腫瘍移植後3、6及び9日目にHs578T乳癌腫瘍に（図5a）注射した（それぞれ合計のn = 36 [PBS]、21 [CD8⁺T細胞]、及び55 [CD4⁺及びCD8⁺T細胞]ヒト化マウスで、n = 13、6及び15試験）；Hs578T腫瘍（左）又はMCF-7腫瘍（右）を有するマウスのそれぞれのコホートにおける腫瘍発生の動態。

【図5b】CD4⁺T細胞による再構成が乳癌腫瘍の早期発生の促進に関連していることを示す図である。図5bは全てのマウスにおける12日目のそれぞれの腫瘍サイズを示し、各点は1匹のマウスを表す。

【図5c】図5cは、T細胞再構成の15日後にCD4⁺T細胞がOncoHumouseドナーの乳癌腫瘍から精製されたことを示す。4～6匹のマウスのT細胞をプールし、 1.5×10^6 細胞を自己OncoHumouseレシピエントの腫瘍に1回注射した。対照マウスにはPBSを与えた。11日目の腫瘍サイズ。2つの独立実験においてn = 4マウス。対のある片側t検定。

【図5d】図5dは腫瘍の脈管化を示す。

【図5e】図5eは腫瘍の脈管化を示す。

【図6】乳癌発生の促進にはCD4⁺T細胞及び自己DCが必要であることを示す図である。図6aにおいて、PBS（ $100 \mu\text{l}$ ）、GM-CSF及びIL-4を含む培養液で生成された未熟単球由来DC（ 1×10^6 細胞/ $100 \mu\text{l}$ PBS）、自己CD4⁺T細胞（ 10×10^6 細胞/ $100 \mu\text{l}$ PBS）又は両方を、CD34⁺HPC移植をせずにNOD-SCID $\beta_2\text{m}^{-/-}$ マウスのHs578T乳癌腫瘍に移した。図6bは、腫瘍発生の動態を示す（n = 3マウス/群）。

【図7】ヒト化マウスの乳癌腫瘍におけるIL-13発現CD4⁺T細胞を示す図である。図7a及び7bにおいて、自己CD4⁺T細胞（ 10×10^6 細胞/ $100 \mu\text{l}$ 、CD8⁺T細胞有り又は無し）を腫瘍移植後3、6及び9日目にOncoHumouseのHs578T乳癌腫瘍に注射した。15日目に、CD4⁺T細胞を腫瘍（図7a及び図7b）及びLN

10

20

30

40

50

(図7a)から精製した。図7aは、PMA Ionomycinによる一晩の再刺激後のMultiplex Bead Analysisによるサイトカイン分泌を示す(4試験)。図7bは、細胞内サイトカイン染色を示す(3試験の代表例、 $n = 10$ マウス)。

【図8】乳癌微小環境がmDCを調節することにより2型サイトカインを分泌するCD4⁺T細胞を誘導することを示す図である。図8aにおいて、HLA-DR⁺Lin⁻DCを、Hs578T乳房腫瘍を排出するLNから選別した(4日目、8マウス/群)。4日目の腫瘍から選別され、プレフェルジンA存在下においてPMAイオノマイシンで5時間再刺激されたDCで活性化されたCD4⁺T細胞による細胞内サイトカイン発現(図8b)。ドットプロットはCD3⁺T細胞にゲートをかけた。 $n = 8$ マウスの代表例。

【図9】乳癌発生の促進がIL-13アンタゴニストで阻害できることを示す図である。図9aにおいて、PBS(100 μ l)又は自己CD4⁺及びCD8⁺T細胞(10 $\times$ 10⁶細胞/100 μ l PBS)を腫瘍移植後3及び6日目にOncoHumouseのHs578T乳癌腫瘍に注射した。アイソタイプ対照又は抗IL-13抗体及びrhIL-13Ra2/Fcキメラの混合物(100 μ g/注射)を腫瘍移植の4、6及び8日後に投与し(2試験、6OncoHumouse/T細胞を有する群、PBS対照群において5Oncohumouse)；平均値及びSEM。図9bは腫瘍発生の動態を示す。図9bにおいて図9aと同じであるが、13日目に単一のマウスを分析した。図9cは図9bと同じであるが、マウスに抗IL-13抗体のみを注射した。対のあるt検定。

【図10】対照では再構成せずCD4⁺T細胞により再構成した前立腺癌腫瘍が上清中に高濃度のIL-13を示すことを示すグラフである。

【図11】乳癌細胞についてのIL-13染色を示す図である。(a)凍結乳癌腫瘍切片をサイトケラチン(緑色)及びIL13(赤色)で標識した。(b)異なる患者から得た腫瘍由来の切片。乳癌細胞のIL13染色はrhIL13により阻害可能である。

【図12】乳癌細胞がリン酸化STAT6を発現することを示す図である。パラフィン包埋組織切片(a~c)及び(d~e)の免疫組織染色は、2人の異なる患者由来の腫瘍を表す。(a~c)サイトケラチンを発現する乳癌細胞巢(a)もまた、STAT6を認識する抗体(b)だけでなくリン酸化STAT6(pSTAT6)を認識する抗体(c)で染色可能である。(d~e)pSTAT6染色は癌巢(d)において顕著に見られ、抗体を生成するために使用されるペプチドによりブロック可能である。

【図13a】図13aは肺腫瘍由来組織におけるIL-13の染色を示す。

【図13b】図13bは肺腫瘍由来組織におけるIL-13の染色を示す。

【図13c】図13cは肉眼では腫瘍の浸潤がない肺組織におけるIL-13の染色を示す。

【図13d】図13dは肉眼では腫瘍の浸潤がない肺組織におけるIL-13の染色を示す。

【発明を実施するための形態】

【0028】

本発明の様々な実施形態の構造及び使用を以下で詳細に論じるが、本発明が、広範な具体的文脈において具体化できる多くの適用可能な発明の概念を提供することを理解すべきである。本明細書において議論される具体的な実施形態は、本発明を行う且つ使用するための具体的方法を説明するのみであって、本発明の範囲を定めるものではない。

【0029】

本発明の理解を容易にするために、多くの用語を以下で定義する。本明細書中で定義される用語は、本発明に関する分野の当業者によって一般に理解される意味を有する。「1つの(a)」、「1つの(an)」及び「この(the)」などの用語は、単一の存在物のみを称することを意図するものではなく、説明のために具体例を使用する場合の一般的な種類を含む。本明細書中の専門用語は、本発明の具体的な実施形態を記述するために使用されるが、これらの用語の使用は、特許請求の範囲に概説されている場合を除き本発明の範囲を定めるものではない。

【0030】

本明細書において使用される場合、「IL-13 アンタゴニスト」は、IL-13 の活性を阻害、抑制又は除去する活性物質、例えば、一般にIL-13 受容体を介する、組織微小環境中の細胞間のIL-13 に誘発される情報伝達を遮断するために十分な量で供給される小分子、ペプチド及びタンパク質を指す。本発明で使用するためのIL-13 アンタゴニストの非限定的な例は、例えば、乳癌細胞の微小環境中のIL-13 を標的とする、抗IL-13 抗体、ヒト抗IL-13 抗体、ヒト化抗IL-13 抗体、二価抗IL-13 抗体、二価ヒト化抗IL-13 抗体、抗IL-13 モノクローナル抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、ジスルフィド安定化Fv 及び一本鎖Fv 断片並びにこれらの組み合わせからなる群から選択される抗IL-13 抗原結合断片、抗IL-13 結合融合タンパク質、多価抗IL-13 抗体及び抗IL-13 キメラ抗体、ポリクローナル抗IL-13 抗体のうちの少なくとも1つを含む。治療方法は、腫瘍特異的免疫細胞、例えば、樹状細胞を含む腫瘍内ワクチン接種で患者を治療するステップをさらに含んでもよい。IL-13 アンタゴニストの他の例は、抗IL-13 サイトカイン受容体遮断薬、抗IL-13 受容体中和抗体、抗IL-13 受容体アンタゴニスト、可溶性IL-13 受容体、抗IL-13 受容体-IL-13 結合を阻害する1又は複数の分子、IL-13 の下流の事象の1又は複数の阻害剤、不活性化IL-13 及びこれらの組み合わせのうちの少なくとも1つを含む。

10

【0031】

本明細書において使用される場合、「II型サイトカインアンタゴニスト」は、通常2型ヘルパーT細胞の活性化に役立つはずであるサイトカインの活性を阻害、抑制又は除去する活性物質、例えば、抗IL-4、IL-5、IL-9、IL-13 又はIL-25 抗体、ヒト化抗IL-4、IL-5、IL-9、IL-13 又はIL-25 抗体、不活性化IL-4、IL-5、IL-9、IL-13 又はIL-25、及びこれらの組み合わせ、可溶性IL-4、IL-5、IL-9、IL-13 又はIL-25 受容体及びこれらの組み合わせ、並びに上記の2つ以上の組み合わせを指す。

20

【0032】

本明細書において使用される場合、「オンコヒュー哺乳動物 (oncohummamall)」は、ヒト免疫系が移植され、ヒト癌が移植された免疫不全の非ヒト哺乳動物を指す。当業者には明らかなように、多くの既存の動物が免疫不全動物として使用され得る。また、非致死の用量の放射線、化学的処理、1又は複数の遺伝子変異を有する動物、トランスジェニック、ノックアウト、コンディショナルノックアウト、ノックインなどを作ることによる哺乳動物の遺伝子操作を含む、免疫不全動物の非致死的な生産のための多くの方法が利用可能である。「オンコヒュー哺乳動物」の1つの例は、マウスがヒト免疫系及びヒト腫瘍の少なくとも一部の導入のためのプラットフォームとして使用される「オンコヒューマウス」である。腫瘍は、1又は複数の原発腫瘍（例えば、免疫系が移植された自己由来、すなわち同一患者由来）、1又は複数の腫瘍細胞クローン及び/又は1又は複数の腫瘍細胞株であってよい。

30

【0033】

本明細書において使用される場合、「マーカー」、「検出可能なマーカー」及び「検出可能な標識」という用語は、例えば酵素、放射性同位体、高電子密度粒子、磁性粒子又は発色団などの、その特異的な機能特性及び/又は化学的特性のために検出可能な化合物及び/又は要素を指すために交換して使用でき、これらの使用がこれらの化合物及び/又は要素が付着する作用物質の検出、及び/又は所望の場合さらに定量を可能にする。扱いが容易で安価及び非毒性である蛍光標識を含む数多くの種類の検出可能な標識がある。

40

【0034】

本明細書において使用される場合、「組織微小環境 (tissue microenvironment)」は、天然組織内に、例えばインビボで細胞が存在する局所環境を指す。組織微小環境において、2種以上の組織特異的細胞種が例えば、接触（接触阻害）、サイトカイン、ケモカインなどを介して互いに相互作用及び/又は影響し得る。ほとんどの場合、器官内でごく近接した細胞は、同じ組織中に2種以上の細胞を有する隣接した細胞外環境中の物質のほとん

50

ど同時の暴露をもたらすはずである。加えて、同じ微小環境に暴露された２種以上の細胞種は、微小環境中に導入された共通の作用物質に暴露すると同様に反応する場合がある。インビトロで、組織微小環境は細胞がインビボで経験する環境を模倣する。本発明の文脈において、組織微小環境は組織内のインビボ微小環境を指すことが多いはずである。

【００３５】

サイトカイン産生の直接測定。アッセイにおけるＩＬ－１３レベルの直接測定は、例えば、インサイチュハイブリダイゼーション、ＥＬＩＳＡ、放射免疫測定法、ゲル電気泳動、ウェスタンブロッティング、免疫組織染色及び生物検定法などの方法を使用する核酸又はタンパク質発現の直接測定を含む。

【００３６】

皮膚免疫応答を評価するためのＥＬＩＳＡ技術は、当技術分野においてよく知られている。ＥＬＩＳＡプロトコルは、マイクロタイター（ＥＬＩＳＡ）プレートのウェルを、対象となるサイトカインに対するモノクローナル又はポリクローナル抗体、例えば、抗ＩＬ－１３抗体でコートするものである。手短に述べると、抗体溶液をウェル中でインキュベートさせ、非結合抗体を洗い流し、空いた部位を不活性タンパク質、例えばＰＢＳ中のウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）でブロックし、ウェル中で１～３時間インキュベートさせる。ブロッキング溶液を捨て、ＩＬ－１３を有する疑いのある試料、例えばプロテアーゼ活性を最小限に抑えながらタンパク質を除去するために処理された乳癌を有する疑いのある乳房細胞の試料をＥＬＩＳＡウェルに加える。定量のために、試料溶液をＰＢＳ緩衝液中に連続的に希釈し、インキュベーション時間の後、プレートを再度洗浄し、例えばサイトカインに対する二次抗体、例えばポリクローナルウサギ抗ＩＬ－１３抗体を使用してＩＬ－１３のレベルを直接的又は間接的に検出する。インキュベーション時間の後、プレートを再度洗浄し、例えば、二次抗体に対するビオチン標識二次抗体又は三次抗体を加え（例えば、ヤギ抗ウサギ抗体）インキュベートする。非結合物質を洗浄後、例えばホースラディッシュペルオキシダーゼ標識したストレプトアビジンを加え、０．５～１時間３７℃でインキュベートすることによって、ＩＬ－１３発現のレベルを検出する。サイトカインが抗体の２つの層の間に位置するため、このタイプのアッセイはしばしばサンドイッチＥＬＩＳＡと呼ばれる。検出用に使用される酵素に応じて検出可能な基質をウェルに加え、ＩＬ－１３の存在／非存在及び／又はレベルを決定する。特異的に結合したＩＬ－１３の量と一致する（例えば、既知の標準と比較して）シグナル強度（例えば、色、発光など）を決定する。

【００３７】

放射免疫測定。放射免疫測定は、ＥＬＩＳＡによる定量で前述したものと同様な方法で、ＩＬ－１３の産生を定量するために使用することもできる。一般に、ＩＬ－１３特異的抗体は、関連部分が参照により本明細書に組み込まれるHarlow or Sambrook, et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL (Cold Spring Harbor 1989)に記載されているものなどの標準的な技術を使用して基質に結合する。結合した抗体は次いで、乳房試料から採取した上清に暴露され、この試料から生検材料又は細胞を得て、培養液中で増殖させる。１２５Ｉ修飾されたチロシンなどの放射性標識を有する二次抗体を結合したサイトカインに加え、ノイズ比に対して検出可能なシグナルを提供するであろう比放射能で上述のようにインキュベートさせる。非結合標識物質を洗い流し、標準的な技術、例えばシンチレーションカウンターを使用して残存する標識を定量する。

【００３８】

ゲル電気泳動及びウェスタンブロッティング。別法として、ウェスタンブロット分析によりＩＬ－１３の存在を判断することができる（例えば、関連部分が参照により本明細書中に組み込まれるDidieijean, et al., J. Invest. Dermatol. 92:809 (1989)を参照）。ウェスタンブロット分析は、（皮膚ホモジネート及び層状体調製物と同様に）高タンパク質濃度又は様々な洗浄剤若しくは可溶化剤の存在のためにＥＬＩＳＡ又は機能アッセイ（例えば、ＳＴＡＴ６リン酸化）において正確に試験できない試料を分析するために使用できる。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 9 】

細胞上清試料を、標準的な電気泳動技術を使用して還元又は非還元 SDS - ポリアクリルアミドゲルに流す。ゲル中で分離したタンパク質を、この場合も一般的な技術を使用して、例えばニトロセルロース膜、ナイロン膜又は何らかの他の適した基材などの基材上に電気泳動的にプロットする。膜は、不活性タンパク質でブロックし、次いで、前述の抗体の 1 つなどの対象とするタンパク質に対する抗体を含有する溶液と一緒にインキュベートすることにより固定化タンパク質に結合することができる。抗体は、IL - 13 特異的モノクローナル抗体（例えば、抗ヒト IL - 13）又は変性サイトカインに対して産生された特異的抗 IL - 13 抗体であってもよく、又は高力価ポリクローナル抗血清であってもよい。結合したタンパク質 - 抗体複合体は直接的又は間接的に検出できる。間接的測定に 10
関して、標的を、続いて一次抗体に特異的な二次標識抗体と一緒にインキュベートすることによりタンパク質 - 抗体 - 抗体複合体を形成する。例えば、二次標識抗体を比色標識、酵素標識で標識してもよく、又は放射性標識してもよい。結合した抗体 - サイトカイン複合体を次いで、前述した標識のための適切な方法を使用してアッセイする。

【 0 0 4 0 】

免疫組織染色。免疫組織染色は、定性的及び定量的性質についての情報を提供する。インサイチュ免疫組織染色は様々な細胞種中の、又は組織の異なる領域内の特定のサイトカイン分布の可視化及び位置測定を可能にする。手短に述べると、組織試料を、例えばTissue-Tek OCT (Miles, Inc. 社, Elkhart, Ind. から市販されている) などの包埋化合物中で急速凍結し、使用するまで - 70 で保存することができる。この組織を切片、通常 6 µ 20
m 切片に切り、顕微鏡スライド上に置く。アセトン中で組織を固定後、スライドを非特異的ブロッキング剤、例えばヤギ血清と一緒にインキュベートすることにより非特異的結合部位をブロックする。続いて試料を、対象とするサイトカインに対する特異的抗体と一緒にインキュベートする。十分に洗浄後、二次標識抗体、例えばビオチン化抗体を加え、結合した標識の量を標準的な技術を使用して定量する。ビオチン化抗体を使用する場合、ビオチン化ホースラディッシュペルオキシダーゼをコンジュゲートしたアビジンを加え、その後続いて比色ペルオキシダーゼ基質と一緒にインキュベートする。次いで試料をヘマトキシリンで対比染色する。確実に染色パターンを特異的にするために、抗サイトカイン抗体との比較のために対照抗体を使用してもよい。未処理の対照組織又は細胞もまた、炎症性刺激を受けた組織又は細胞と比較する。 30

【 0 0 4 1 】

サイトカイン遺伝子発現の測定。タンパク質産生レベルでサイトカインの制御を試験することに加えて、IL - 13 mRNA レベルの直接的評価は IL - 13 発現レベル変化の有益な指標である。mRNA 及びタンパク質レベルの調節は連携して起こることが多いが、いつもそうであるとは限らない。

【 0 0 4 2 】

ノーザンブロッティング。ノーザンブロッティングは、サイトカイン濃度の間接的測定としてサイトカインの IL - 13 mRNA 産生量を測定するために使用されてきた。乳房細胞試料の RNA をアガロースゲル上で分離し、分離した RNA をナイロン又は他の適した膜上にプロットする。膜に結合した RNA を、対象とするサイトカインのアミノ酸配列をコードする mRNA に結合するはずである特異的核酸配列でプローブする。プローブを、例えば、32P 又は化学発光で標識することにより、適切な mRNA に結合しているプローブの検出を可能にする。 40

【 0 0 4 3 】

mRNA のインサイチュハイブリダイゼーション。インサイチュハイブリダイゼーションは、培養細胞又は組織切片において細胞の mRNA レベルの直接的な視覚化を可能にする定性的な手順である。異なる細胞集団における、又は組織の異なる領域における mRNA の相対的な発現を測定することができる。細胞試料を、標準的な方法及び試薬を使用して顕微鏡スライドに接着させる。固定した細胞をエタノール中でインキュベートし、少量のプローブをスライド上に載せ、スライドを覆い、スライドを一晩加湿雰囲気中でインキ 50

ュベートすることにより、対象とするサイトカインに特異的なDNAプローブと試料をハイブリダイズさせる。プローブは、本明細書中で前述したように、及び／又は当業者に知られるであろうように標識する。DIG標識プローブに関して、ウェスタンブロットで使
用した手順と同様の発色手順を行う。ヘマトキシリンで対比染色後、プローブの分布を光
学顕微鏡レベルで可視化することができる。

【0044】

RT-PCR。mRNAレベルを評価するための非常に高感度で有力な技術は、逆転写
酵素-ポリメラーゼ連鎖反応に基づく。試料から全RNAを単離し、逆転写酵素を使用し
てmRNAをDNA(cDNA)にコピーする。次いでcDNAを、対象とするmRNA
種を特異的に標的とするDNAプライマーを用いるPCR反応に加える。次いでこのPCR
産物を、様々な方法のいずれかを使用して、例えば、アガロースゲルで電気泳動し、蛍
光色素で染色し、写真撮影して検出する。PCR産物の染色強度はPCR産物の濃度に比
例し、デンストメーターを使用して定量することができる。対照として使用するため、様
々な処理条件下で発現が比較的一定なハウスキーピング遺伝子β-アクチンを、サイトカ
イン遺伝子と並行して分析する。β-アクチン発現に基づく様々な遺伝子の発現を標準化
することによって、mRNA濃度の半定量的測定をRT-PCRにより達成することができ
る。

10

【0045】

本発明によるアッセイキットは、IL-13又はその下流のエフェクター(例えば、S
TAT6のリン酸化)に対する少なくとも1つのプローブ、及びアッセイを行うための使
用説明書を含む。キットはまた、アッセイ試薬、例えば、塩、緩衝液、ヌクレアーゼ阻害
剤、制限酵素及び変性剤も含んでよい。キットは、陽性対照試験のための標的又はモデル
標的、及び陰性対照試験のための標的のない「試料」を含んでもよい。

20

【0046】

増幅アッセイキットは、前述のものの一部又は全てに加えて、プライマー、ヌクレオチ
ド、ポリメラーゼ及びアッセイ又は対照アッセイのためのポリメラーゼ鑄型を含んでもよ
い。生体染色キットは、プローブ及び使用説明書に加えて、透過化剤、リボソーム前駆体
、緩衝液、塩、対比染色剤及び光学フィルターを含んでもよい。インサイチュキットは、
プローブ及び使用説明書に加えて、固定剤、脱水剤、プロテアーゼ、対比染色剤、洗浄剤
、光学フィルター及びコートした顕微鏡スライドを含んでもよい。

30

【0047】

免疫不全動物宿主。本明細書中に記載の動物モデルを作製するために任意の免疫不全哺
乳動物を使用することができる。本明細書において使用される場合、「免疫不全」という
用語は、有効な免疫応答を起こす動物の能力を損なう変化を記述するために使用する。本
明細書において使用される場合、「有効な免疫応答」は、(これらに限定されるものでは
ないが)ウイルス、細菌、寄生生物、悪性細胞、及び／又は異種若しくは同種移植などの
侵入病原体を、例えば死滅させることが可能な、宿主動物におけるヒト免疫応答を記述す
るために使用する。免疫不全哺乳動物の1つの例は、一般に、免疫グロブリン及び機能的
T細胞抗原受容体の生成に必要なリコンビナーゼ活性を欠き、したがって機能的B及びT
リンパ球を産生しない、重症複合免疫不全(SCID)マウスと称される免疫不全マウス
である。

40

【0048】

自然発生した、又は誘導された可能性のある遺伝子欠損の結果として欠陥のあるもの
を含む、免疫不全マウス、ラット又は他の動物を使用することができる。例えば、異種又は
同種の：ヌードマウス、β2-ミクログロブリン遺伝子(NOD/SCID/β2m^{-/-})にさらに変異を有する非肥満性糖尿病免疫不全/LtSz-scid/scid(N
OD/SCID)マウス、Rag1^{-/-}、Rag2^{-/-}マウス及び／又はPEP^{-/-}マウス、これらのマウスと交雑し免疫不全の背景を有するマウスを、本明細書中に記載
のヒト免疫系及び／又は細胞を埋め込む、又は植え付けるために使用することができる。
欠陥は、例えば、組換えによる遺伝子欠損、遺伝子欠損胸腺又は欠損T細胞受容体領域、

50

NK細胞欠損、Toll受容体欠損、Fc受容体欠損、免疫グロブリン再配列欠損、代謝の欠損、これらの組み合わせなどの結果としてであってもよい。誘導された免疫不全は、免疫抑制剤、例えば、シクロスポリン、FK-506の投与、胸腺除去、放射線などの結果としてであってもよい。

【0049】

様々なトランスジェニック免疫不全マウスが現在利用可能であるか、又は交尾若しくは交雑可能であり、従来技術に従って選択できる。一般に、免疫不全マウスは、リンパ球の成熟を阻害する、特に免疫グロブリン及び/又はT細胞受容体領域、Toll受容体などを再配列する能力を欠く欠陥を有するはずである。雌の、雄の、去勢された又は去勢されていないマウスを、腫瘍増殖の経過における、例えばアンドロゲンなどの利用可能性の影響に応じて使用してもよい。マウスに加えて、免疫不全ラット又は同様なげっ歯類動物もまた、本発明の実践において採用することができる。

10

【0050】

本明細書中において使用される場合、「化合物」、「作用物質」、「活性成分」、「医薬品成分」、「活性物質」、「生物活性物質」という用語は、交換して使用でき、薬剤及び/又は薬学的に活性な成分と定義される。本発明は、1又は複数のリード化合物を単離するために、例えば、試験化合物プール中の薬学的に活性な物質として以下の薬剤のいずれかを使用又は放出することができる。本発明の方法を使用して、多くの試験化合物を試験、単離、及び精製することができる。

20

【0051】

試験化合物の例は、抗腫瘍剤、抗縮瞳薬、ステロイド、交感神経様作用薬、局所麻酔薬、抗菌剤、降圧剤、降圧利尿薬、強心剤、冠拡張薬、血管収縮薬、β遮断薬、抗不整脈剤、カルシウムアンタゴニスト、抗痙攣薬、眩暈剤、精神安定剤、抗精神病薬、筋弛緩薬、呼吸剤、非ステロイドホルモン、抗ホルモン、ビタミン、漢方薬、抗ムスカリン薬、ムスカリン受容体拮抗剤、散瞳薬、精神賦活剤、液性剤、鎮痙薬、抗うつ薬、抗糖尿病薬、食欲抑制薬、抗アレルギー薬、充血除去薬、解熱薬、抗片頭痛薬、抗マラリア薬、抗潰瘍薬、ペプチド、抗エストロゲン、抗ホルモン剤、抗潰瘍剤、麻酔薬、中枢神経系に作用を有する薬剤又はこれらの組み合わせを含む。加えて、1又は複数の以下の生物活性物質を1又は複数の担体及び本発明（それ自体が担体となり得る）を組み合わせてもよい。

30

【0052】

免疫不全マウスの異なる系統を、本発明とともに使用することができる。一実施形態において、免疫不全マウスは、腫瘍抑制遺伝子、サイトカイン、酵素、受容体、又はアポトーシス誘導物質でもある1個又は複数の遺伝子を用いて遺伝子導入することができる。代替として、第2の遺伝子を腫瘍遺伝子から得てもよい。腫瘍遺伝子の例は、ras、myc、neu、raf、erb、src、fms、jun、trk、ret、gsp、hst、bcl及びablを含む。遺伝子はまた、腫瘍抑制遺伝子を含んでもよく、腫瘍抑制遺伝子は例えば、p53、p16、p21、MMAC1、p73、zac1、BRCA1及びRbであってもよい。他の遺伝子は、腫瘍サイトカインであってもよく、サイトカインは、IL-2、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、TNF、GMCSF、β-インターフェロン及びγ-インターフェロンからなる群より選択される。他の実施形態において遺伝子は、例えば、シトシンデアミナーゼ、アデノシンデアミナーゼ、β-グルクロニダーゼ、ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ、ガラクトース-1-リン酸ウリジルトランスフェラーゼ、グルコセルブロシダーゼ、グルコース-6-ホスファターゼ、チミジンキナーゼ及びリソソーマルグルコシダーゼなどの酵素であってもよい。別の実施形態において遺伝子は、例えば、CFTR、EGFR、VEGFR、IL-2受容体及びエストロゲン受容体などの受容体であってもよい。別の実施形態において遺伝子は、例えば、Bax、Bak、Bcl-X、sub.s、Bik、Bid、Bad、Harakiri、AdE1B及びICE-CE3プロテアーゼなどのアポトーシス誘導物質であってもよい。特定の実施形態におい

40

50

て、遺伝子導入及び／又はトランスフェクトされた細胞はマウスに移植されたヒト細胞である。

【 0 0 5 3 】

本発明は、哺乳動物の腫瘍部位に、放射線療法の前に抗血管新生因子タンパク質を投与すること、放射線を電離することによって電離放射線療法の有効性を高める方法であって、抗血管新生因子投与及び放射線の組み合わせが放射線だけを電離するよりもより有効である方法をさらに提供する。

【 0 0 5 4 】

本発明はまた、例えば、薬学的に許容される担体又は希釈剤における治療化合物のプール及び／又はリードも含む。インビボ適用に関して、スクリーニング法により特定した化合物を、例えば、非経口的、経口的、又は腹腔内を含む様々な方法でオンコヒューマウスに投与することができる。非経口投与は、以下の経路による投与を含む：静脈内、筋肉内、間質、腹腔内、硬膜内、硬膜外、動脈内、皮下、眼内、滑液嚢内、経皮を含む経上皮、吸入による経肺、経眼、舌下及び口腔、眼、皮膚、眼球、直腸、膣及び吹送又は噴霧による経鼻吸入を含む局所。

【 0 0 5 5 】

II型サイトカインアンタゴニスト（など）は、例えば、不活性希釈剤と一緒に、又は同化可能な食用担体と一緒に経口投与することができ、硬質又は軟質ゼラチンカプセル内に封入することができ、又は錠剤に圧縮することができる。経口での治療的投与のために、活性化合物を賦形剤と混合し、摂取可能な錠剤、バッカル錠、トローチ、カプセル、サシェ、ロゼンジ、エリキシル剤、懸濁剤、シロップ剤、カシェ剤などの形態で 사용할ことができる。医薬組成物は、粉末剤又は顆粒剤、水性液体若しくは非水性液体中の、又は水中油若しくは油中水型エマルジョン中の液剤又は懸濁剤の形態で活性化合物を含むことができる。

【 0 0 5 6 】

錠剤、トローチ、丸剤、カプセルなどはまた、例えば、トラガカントゴム、アラビアゴム、コーンスターチ又はゼラチンなどの結合剤も含有することができる。第二リン酸カルシウムなどの賦形剤、コーンスターチ、ポテトスターチ、アルギン酸などの崩壊剤、ステアリン酸マグネシウムなどの滑剤、及びショ糖、乳糖若しくはサッカリンなどの甘味剤、又は香味剤もまた含むことができる。投与単位剤形がカプセルである場合、液体担体を含むことができる。様々な他の材料が、コーティングとして、又は別の方法で投与単位の物理的形態を修正するために存在し得る。例えば、錠剤、丸剤、又はカプセルを、シェラック、糖又は両方でコートすることができる。シロップ剤又はエリキシル剤は、活性化合物、甘味剤としてショ糖、防腐剤としてメチル及びプロピルパラベン、染料及び香料を含んでもよい。任意の投与単位の調製において使用する任意の材料は、一般に、薬学的に純粋であり、実質的に無毒であるはずである。活性化合物は、持続放出製剤及び処方中に組み込んでもよい。

【 0 0 5 7 】

II型サイトカインアンタゴニスト（など）は、例えば、非経口的又は腹腔内に投与してもよい。遊離塩基としての化合物又は薬学的に許容される塩の溶液は、適した界面活性剤、例えば、ヒドロキシプロピルセルロースと混合した水中で調製することができる。分散液もまた、グリセロール、液体ポリエチレングリコール、及びこれらの混合物中で、及び油中で調製できる。通常の保存及び使用条件下で、これらの製剤は、微生物の増殖及び／又は化学的変性を予防するための防腐剤及び／又は抗酸化剤を含有することができる。

【 0 0 5 8 】

II型サイトカインアンタゴニスト（など）の医薬品形態は、無菌水溶液又は分散液及び無菌注射溶液又は分散液の即時調製用の無菌粉末剤を含むことによって、注射用途のために調製してもよい。静脈内又は他の同様な用途について、化合物は一般に無菌であり、液体懸濁剤中で及び／又は注射器による送達のために再懸濁されて提供され得る。化合物は製造及び保存条件下で安定に存在できるが、細菌や真菌などの微生物の汚染作用から保護

10

20

30

40

50

しなければならない。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、及び液体ポリエチレングリコールなど）、これらの適した混合物、及び植物油を含有する溶媒又は分散媒とすることができる。コーティング、例えば、レシチンの使用、及び必要な大きさの粒子中に組み込むこと（分散液の場合）によって、及び当業者によく知られている界面活性剤の使用によって、適切な流動性を維持することができる。微生物の作用の予防は、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサルなどの様々な抗菌剤及び抗真菌剤によってもたらすことができる。多くの場合、等張剤、例えば、糖又は塩化ナトリウムが使用され得る。

【0059】

無菌注射溶液を、必要量のII型サイトカインアンタゴニスト（など）を適切な溶媒中に、必要であれば上記で列挙した様々な他成分と一緒に組み込み、その後続いて濾過滅菌することによって調製する。一般に分散液は、様々な無菌活性成分を基本的な分散媒及び上記で列挙したもの以外の成分のいずれかを含む無菌媒体中に組み込むことによって調製する。無菌注射溶液調製用の無菌粉末剤の場合、調製方法は、例えば、真空乾燥、凍結噴霧、加熱真空及び/又は凍結乾燥技術を含んでもよい。鼻腔又は口腔への投与に適した医薬組成物は、例えば、粉末剤、自己推進薬並びにエアゾール、アトマイザー及びネブライザーなどのスプレー処方を含む。

【0060】

本発明の治療用II型サイトカインアンタゴニスト（など）は、単独で、又は薬学的に許容される担体と組み合わせ、又は薬学的に許容される塩として、哺乳動物に投与することができ、その割合は化合物の溶解度及び化学的性質、選択した投与経路並びに標準的な医薬の実践により決定する。化合物はまた、通常、疾患及び障害、例えば癌の治療に通常適用される別の治療効果のある化合物も含むことができる。本発明の組成物及び別の治療効果のある化合物を使用した治療は、同時であってもよく、又は間隔をあけてもよい。

【0061】

本明細書中に開示されたインビボ分析は、CD34⁺HPcで再構成した免疫不全マウスに基づいており、ヒト腫瘍がヒト免疫系及びヒト癌の分析において有用であることを証明することができた。適合移植されたヒト末梢血白血球（PBL）を有する又は有さない、ヒト腫瘍異種移植片を移植された免疫不全マウス（Mosier, D. E., Gulizia, R. J., Baird, S. M., and Wilson, D. B. (1988). Transfer of a functional human immune system to mice with severe combined immunodeficiency. *Nature* 335, 256-259）は、ヒト癌を研究するためのモデルとして（Mueller, B. M., and Reisfeld, R. A. (1991). Potential of the scid mouse as a host for human tumors. *Cancer Metastasis Rev* 10, 193-200）長年使用されてきた。このマウスは、血液悪性腫瘍において臨床的意義のある予後因子の同定を可能にし（Kamel-Reid, S., Letarte, M., Doedens, M., Greaves, A., Murdoch, B., Grunberger, T., Lapidot, T., Thorner, P., Freedman, M. H., Phillips, R. A., and et al. (1991). Bone marrow from children in relapse with pre-B acute lymphoblastic leukemia proliferates and disseminates rapidly in scid mice. *Blood* 78, 2973-2981; Kamel-Reid, S., Letarte, M., Sirard, C., Doedens, M., Grunberger, T., Fulop, G., Freedman, M. H., Phillips, R. A., and Dick, J. E. (1989). A model of human acute lymphoblastic leukemia in immune-deficient SCID mice. *Science* 246, 1597-1600; Palucka, A. K., Scuderi, R., Porwit, A., Jeha, S., Gruber, A., Bjorkholm, M., Beran, M., and Pisa, P. (1996). Acute lymphoblastic leukemias from relapse engraft more rapidly in SCID mice. *Leukemia* 10, 558-563; Uckun, F. M., Sather, H., Reaman, G., Shuster, J., Land, V., Trigg, M., Gunther, R., Chelstrom, L., Bleyer, A., Gaynon, P., and et al. (1995). Leukemic cell growth in SCID mice as a predictor of relapse in high-risk B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 85, 873-878）、癌治療薬及び免疫療法の前臨床開発において重要な役割を果たしてきた（Bankert, R. B., Egilmez, N. K., and Hess, S. D. (2001). Human-SCID mouse chimeric models for the evaluation of anti-cancer therapies. *Trends Immunol* 22,

10

20

30

40

50

386-393;Kelland, L. R. (2004). Of mice and men: values and liabilities of the a thymic nude mouse model in anticancer drug development. Eur J Cancer 40, 827-836)。このようなモデルはまた、充実性腫瘍における転移機構を調べるために役立ってきた (Muller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M. E., McClanahan, T., Murphy, E., Yuan, W., Wagner, S. N., et al. (2001). Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. Nature 410, 50-56)。

【 0 0 6 2 】

以前のモデルの主な制約は、ヒト免疫微小環境がないことであった。実際、行われたアプローチは以下を含む：(i) ヒト免疫細胞の非存在下における腫瘍異種移植 (Bankert, R. B., Egilmez, N. K., and Hess, S. D. (2001). Human-SCID mouse chimeric models for the evaluation of anti-cancer therapies. Trends Immunol 22, 386-393;Mueller, B. M., and Reisfeld, R. A. (1991). Potential of the scid mouse as a host for human tumors. Cancer Metastasis Rev 10, 193-200;Reddy, S., Piccione, D., Takita, H., and Bankert, R. B. (1987). Human lung tumor growth established in the lung and subcutaneous tissue of mice with severe combined immunodeficiency. Cancer Res 47, 2456-2460) ; (ii) 腫瘍による刷り込みを受けた免疫細胞を有する腫瘍外科生検材料の異種移植 (Anderson, T. M., Hess, S. D., Egilmez, N. K., Nwogu, C. E., Lenox, J. M., and Bankert, R. B. (2003). Comparison of human lung cancer/SCID mouse tumor xenografts and cell culture growth with patient clinical outcomes. J Cancer Res Clin Oncol 129, 565-568;Iwanuma, Y., Chen, F. A., Egilmez, N. K., Takita, H., and Bankert, R. B. (1997). Antitumor immune response of human peripheral blood lymphocytes coengrafted with tumor into severe combined immunodeficient mice. Cancer Res 57, 2937-2942;Sakakibara, T., Xu, Y., Bumpers, H. L., Chen, F. A., Bankert, R. B., Arredondo, M. A., Edge, S. B., and Repasky, E. A. (1996). Growth and Metastasis of Surgical Specimens of Human Breast Carcinomas in SCID Mice. Cancer J Sci Am 2, 291) ; 及び (iii) ヒト DC をほとんど欠いているヒト末梢血リンパ球 (S C I D - h u P B L) を用いた異種移植 (Mosier, D. E., Gulizia, R. J., Baird, S. M., and Wilson, D. B. (1988). Transfer of a functional human immune system to mice with severe combined immunodeficiency. Nature 335, 256-259) 。本明細書中で使用されたアプローチでは、ヒト CD 3 4 ⁺ H P C を移植され、健全な志願者由来のヒト免疫系で再構成されたマウスが、以前に腫瘍に暴露されていないヒト免疫細胞環境中に移植された癌細胞の生態における初期の事象の分析を初めて可能とする。

[実施例]

【 0 0 6 3 】

ヒト化マウスの作製。G - C S F で動員した健全成人志願者のアフエーシスから CD 3 4 ⁺ H P C を得、前述したように精製した (Palucka, A. K., Gatlin, J., Blanck, J. P., Melkus, M. W., Clayton, S., Ueno, H., Kraus, E. T., Cravens, P., Bennett, L., Padgett-Thomas, A., et al. (2003). Human dendritic cell subsets in NOD/SCID mice engrafted with CD34+ hematopoietic progenitors. Blood 102, 3302-3310) 。アフエーシスの CD 3 4 ⁺ 画分をFicoll - 精製し、得られた P B M C を凍結保存し、自己 T 細胞の供給源として使用した。2 . 5 × 1 0 ⁶ 個の CD 3 4 ⁺ H P C を、致死量に近い放射線 (^{1 3 7} C s y - 放射線を 1 2 c G y / g 体重) を照射した N O D - S C I D β ₂ m ^{- / -} マウス (Jackson Laboratories社製) の静脈内に移植した。長期培養物から採取した 1 0 × 1 0 ⁶ 乳癌細胞 (H s 5 7 8 T、M C F 7、1 8 0 6) を、マウスの脇腹に、又は乳腺部に皮下注射した。N O D - S C I D β ₂ m ^{- / -} マウスを用いた実験において、腫瘍移植の前日に致死量に近い放射線 (^{1 3 7} C s y - 放射線を 1 2 c G y / g 体重) を照射した。腫瘍サイズを 2 ~ 3 日毎にモニターした。腫瘍体積 (楕円形) を、式：(短径) ² × 長径 / 2 を使用して計算した。

【 0 0 6 4 】

単球由来樹状細胞及び T 細胞精製：G M - C S F (1 0 0 n g / m l) (Immunex社製，

Seattle, WA) 及び I L - 4 (2 5 n g / m l) (R & D systems 社製, Minneapolis, MN) と一緒に培養することにより、P B M C の付着画分から単球由来樹状細胞を作製した。C D 4 ⁺ 及び C D 8 ⁺ T 細胞を、製造業者の使用説明書 (Miltenyi Biotec 社製, Auburn, CA) に従って磁気選別を使用して、解凍した P B M C から確実に選択した。純度は常に > 9 0 % であった。

【 0 0 6 5 】

免疫蛍光：組織を Tissue-Tek (OCT, Allegiance 社製, McGaw 社製, IL) 中で凍結し、Superfrost Plus スライド (Fisher scientific 社製, Pittsburgh, PA) 上で低温切片化し、冷アセトンで固定した。直接染色：H L A - D R F I T C (BD Pharmingen 社製, San Diego, CA) ; C R T H 2 - P E ; I L - 1 3 - P E ; C D 3 - F I T C 。間接染色：D C - L A M P (Immunotech 社製, Marseille, France) に続いて Texas-Red (Jackson ImmunoResearch 社製, West Grove, PA) にコンジュゲートした抗マウス I g G 。 Leica TCS-NT SP (Leica 社製, Deerfield, IL) を使用して共焦点顕微鏡法を行った。腫瘍脈管化を評価するために、OncoHumouse に F I T C - レクチン (2 m g / m l で 1 5 0 マイクロリットル) (Vector Laboratories 社製, Burlingame, CA) を、マウスに麻酔をかけ、P F A 4 % を静脈内注入してから 1 0 分後に静脈内 (i v) 注射した。1 0 μ m 腫瘍切片を固定し、D A P I (Vector Laboratories 社製, Burlingame, CA) と一緒に Vectashield にマウントし、プランアポ対物レンズ及び Photometrics coolsnaps HQ を備えた Olympus BX51、及び Metamorph ソフトウェア (UIC 社製) で分析した。

【 0 0 6 6 】

フローサイトメトリー：コラゲナーゼ D (2 m g / m l) (Roche Diagnostics 社製, Indianapolis, IN) で 4 5 分間、3 7 ° で消化することにより、腫瘍、リンパ節、及び脾臓から細胞懸濁液を得た。採取した骨から骨髓細胞を洗い流した。細胞懸濁液を 2 回洗浄し、P B S 2 m M E D T A 5 % A B 血清中で以下の抗体を使用して染色した：L i n 、C D 4 5 、I g D 、C D 8 0 - F I T C 、C D 1 2 3 、C D 8 6 、H L A - A B C 、C D 3 - P E 、H L A - D R - P e r C P 、C D 1 1 c 、C D 1 4 、C D 1 9 - A P C 、(BD Pharmingen 社製, San Diego, CA) 及び C D 4 0 - P E (Immunotech 社製, Marseille, France) 。

【 0 0 6 7 】

T 細胞サイトカイン：C D 8 、C D 1 4 、C D 1 9 、C D 1 6 、C D 5 6 及びグリコフォリン A マイクロビーズ (Miltenyi Biotec 社製, Auburn, CA) を使用して磁気枯渇した後、ナイーブ C D 4 ⁺ T 細胞を軟膜から得、C D 4 ⁺ C C R 7 ⁺ C D 4 5 R A ⁺ 表現型に基づいて選別した。ソートゲートから V α 2 4 ⁺ C D 4 ⁺ T 細胞を除外することによって N K T 細胞を枯渇させた。D C を、H L A - D R ⁺ L i n - C D 1 1 c ⁺ 及び H L A - D R ⁺ L i n - C D 1 2 3 ⁺ 表現型に基づいて選別した。ナイーブ C D 4 ⁺ T 細胞 (5 × 1 0 ⁴ 個 / ウェル) を D C (5 × 1 0 ³ 個 / ウェル) と一緒に、1 0 % ヒト A B 血清 (Gemini BioProducts 社製, Woodland, CA) を添加した RPMI1640 中で培養した。サイトカイン分泌を Luminex により評価するため、T 細胞を 5 日目に採取し、2 回洗浄し、1 × 1 0 ⁶ 個 / m l の濃度で再懸濁し、P M A (5 0 n g / m l) 及びイオノマイシン (1 μ g / m l) (Sigma 社製, StLouis, MO) で 1 6 時間再刺激した。サイトカイン発現を細胞内染色により評価するため、6 日目の培養から T 細胞を採取し、2 回洗浄し、P M A 及びイオノマイシンで 5 時間再刺激した。プレフェルジン A (1 0 m g / m l) (BD Pharmingen 社製, San Diego, CA) を、最後の 2 . 5 時間加えた。T 細胞を、I L - 4 、I L - 1 3 、T N F 、I F N - γ 及び I L - 2 (BD Pharmingen 社製, San Diego, CA) に対する抗 C D 3 及び A b で標識した。

【 0 0 6 8 】

インビボ I L - 1 3 遮断：腫瘍移植の 4 、6 及び 8 日目に、マウスの腫瘍内に抗 I L - 1 3 m A b 及び r h I L - 1 3 R α 2 / F c キメラ又はヤギ I g G アイソタイプ対照 (各 1 0 0 μ g / m l) (R & D systems 社製, Minneapolis, MN) を注射した。

【 0 0 6 9 】

10

20

30

40

50

浸潤性又は侵襲性乳癌と診断された患者由来の腫瘍試料を、Baylor University Medical Center Tissue Bank (IRB#005-145) から得た。試料を小断片に細かく切り、コラゲナーゼ 2.5 mg/ml 、ヒアルロニダーゼ 1 mg/ml 、DNase 20 U/ml を含有する3種類の酵素ミックス中で2～3時間、 37°C で消化した。懸濁液を濾過し、洗浄し、得られた細胞を 1×10^6 個/ ml の濃度で再懸濁し、PMA (50 ng/ml) 及びイオノマイシン ($1 \mu\text{g/ml}$) (Sigma社製, StLouis, MO) で16時間活性化した。サイトカイン産生を培養上清においてLuminexにより分析した。代替として、全腫瘍断片を、PMA及びイオノマイシンと一緒に一晚培養物中に置いた。細胞内サイトカイン染色のため、細胞をPMA及びイオノマイシンと一緒に5時間刺激した。プレフェルジンA (10 mg/ml) (BD Pharmingen社製, San Diego, CA) を、最後の2.5時間加えた。細胞を、抗CD3及び抗CD4mAbで標識し、IL-13及びIFN γ (BD Pharmingen社製, San Diego, CA) に対するAbを使用して細胞内サイトカイン染色を行った。IL-13染色を阻害するため、使用前に抗IL-13mAbを組換えヒトIL-13 ($5 \mu\text{g/ml}$) と一緒に1時間室温でインキュベートした。細胞をPFA 1%中で固定し、フローサイトメトリーにより分析した。各組織の切片1枚を、免疫蛍光分析のために凍結した。切片をCD3Alexa488mAb (BD Pharmingen社製, San Diego, CA) で標識し、DAPIでマウントした。

10

【0070】

統計：パラメトリックt検定及びノンパラメトリックMann-Whitney及びWilcoxon検定を使用して観察された差異の有意性を評価した。パラメトリックなPearson Correlation及びノンパラメトリックなSpearman相関を示されたように使用した。

20

【0071】

乳癌腫瘍に成熟樹状細胞(DC)が浸潤し、これがCD4 $^+$ T細胞との緊密なクラスターにしばしば関与することが分かった。乳癌腫瘍微小環境において、1型(IFN- γ)及び2型(大部分はIL-13)サイトカインを分泌するCD4 $^+$ T細胞が見出されることが分かった。凍結組織切片の免疫蛍光染色によって、乳癌細胞におけるIL-13発現が明らかとなった。乳癌、DC及びCD4 $^+$ T細胞偏向の間の関連を実証するために、ヒトCD34 $^+$ 造血前駆細胞(HPC)及び健常志願者由来のT細胞を移植し、ヒト乳癌細胞株を移植したNOD-SCID $\beta_2\text{m}^-/-$ マウスを使用した。その場合、乳癌細胞はヒトDCを引きつけ、ヒトDCにナイーブCD4 $^+$ T細胞を活性化するように刷り込み、IL-13を分泌する。CD4 $^+$ T細胞は腫瘍発生を促進し、これはIL-13アンタゴニストで阻害可能である。したがって、乳癌は偏ったDC成熟化を促進することにより癌誘発性(pro-cancer)免疫を誘発する。

30

【0072】

乳癌はヒトDCの特定のサブセットに富む(Bell, D., Chomarat, P., Broyles, D., Netto, G., Harb, G. M., Lebecque, S., Valladeau, J., Davoust, J., Palucka, K. A., and Banchereau, J. (1999). In breast carcinoma tissue, immature dendritic cells reside within the tumor, whereas mature dendritic cells are located in peritumoral areas. *J Exp Med* 190, 1417-1426) ことが分かっている。これらのサブセットは、Langerhans細胞や間質DCなどの大量の未熟骨髄DC(mDC)サブセットを含む。これらの細胞の存在自体は、驚くべきことではないかもしれない。実際、上皮表面をモニターするのは未熟DCの機能である。したがって腫瘍は、未熟DCの浸潤などの生理学的な組織の恒常性機構を使用することができる。興味深いことに、乳癌組織の腫瘍周辺部は成熟DC-LAMP $^+$ DCを示し、これは正常な生理学的条件下でリンパ組織にしか見られない。リンパ器官の外側の成熟DCの存在は炎症と関連しており、関節リウマチの無菌性滑膜炎において(Radstake, T. R., van Lieshout, A. W., van Riel, P. L., van den Berg, W. B., and Adema, G. J. (2005). Dendritic cells, Fc γ receptors, and Toll-like receptors: potential allies in the battle against rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 64, 1532-1538; Thomas, R., MacDonald, K. P., Pettit, A. R., Cavanagh, L. L., Padmanabha, J., and Zehntner, S. (1999). Dendritic cells and the patho

40

50

genesis of rheumatoid arthritis. *J Leukoc Biol* 66, 286-292 ; Gordon, S., and Taylor, P. R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 5, 953-964) 又は全身性自己免疫患者の血液において (Banchereau, J., Pascual, V., and Palucka, A. K. (2004). Autoimmunity through Cytokine-Induced Dendritic Cell Activation. *Immunity* 20, 539-550 ; Blanco, P., Palucka, A. K., Gill, M., Pascual, V., and Banchereau, J. (2001). Induction of dendritic cell differentiation by IFN- α in systemic lupus erythematosus. *Science* 294, 1540-1543) 観察できる。しかしながら、腫瘍における成熟 DC の存在についての免疫学的重要性は依然として不明である。

【 0 0 7 3 】

患者の乳癌組織試料に浸潤する CD 4 ⁺ T 細胞の特徴を決定した。IL - 1 3 が乳癌微小環境及び乳癌細胞の IL - 1 3 染色において見られることが分かった。これらの観察結果により本発明者らは機構研究に着手した。しかしながら、試料が入手しにくく、原因との関連を確立することが困難であり、ヒトでの研究は妨げられている。したがって、乳癌細胞株がヒューマウスにも移植されている (Palucka, A. K., Gatlin, J., Blanck, J. P., Melkus, M. W., Clayton, S., Ueno, H., Kraus, E. T., Cravens, P., Bennett, L., Padgett-Thomas, A., et al. (2003). Human dendritic cell subsets in NOD/SCID mice engrafted with CD34⁺ hematopoietic progenitors. *Blood* 102, 3302-3310) ヒト化マウスのモデルを作製した。こうしたマウスは、ヒト CD 3 4 ⁺ 造血前駆細胞 (CD 3 4 ⁺ H P C) を移植した非肥満性糖尿病免疫不全 / L t S z - s c i d / s c i d (N O D / S C I D) β 2 ミクログロブリン欠損 (N O D / S C I D / β 2 m ^{- / -}) マウス (Humo use) とすることができる。こうしたマウスは、マクロファージ、ヒト DC の全サブセット及びヒト適応免疫系の要素、B 細胞などのヒト自然免疫系の要素を発生させる (Palucka, A. K., Gatlin, J., Blanck, J. P., Melkus, M. W., Clayton, S., Ueno, H., Kraus, E. T., Cravens, P., Bennett, L., Padgett-Thomas, A., et al. (2003). Human dendritic cell subsets in NOD/SCID mice engrafted with CD34⁺ hematopoietic progenitors. *Blood* 102, 3302-3310)。自己 T 細胞の移植により、本発明者らはヒト T 細胞サブセットの調節を分析できるようになる。乳癌腫瘍に浸潤する DC はナイーブ CD 4 ⁺ T 細胞を IL - 1 3 の分泌に偏向させることが本明細書中で示される。

【 0 0 7 4 】

患者の乳癌腫瘍の微小環境は 2 型サイトカインに富んでいる。腫瘍周辺部において、乳癌腫瘍に、T 細胞との緊密なクラスターに關与する (Bell, D., Chomarat, P., Broyles, D., Netto, G., Harb, G. M., Lebecque, S., Valladeau, J., Davoust, J., Palucka, K. A., and Banchereau, J. (1999). In breast carcinoma tissue, immature dendritic cells reside within the tumor, whereas mature dendritic cells are located in peritumoral areas. *J Exp Med* 190, 1417-1426) 成熟 DC が浸潤し、免疫応答が継続していることを示唆する。乳癌腫瘍微小環境におけるこの相互作用の重要性を調べるため、乳癌患者の腫瘍生検材料における T 細胞サイトカインのパターンを分析した。乳房のインサイチュ及び侵襲性の腺管癌及び / 又は粘液癌、並びに小葉癌を含む、21 人の患者由来の試料を分析した。可能な限り、同じ患者から得た腫瘍部位並びに周囲の組織 (肉眼では腫瘍の浸潤がない) を分析した。単一細胞懸濁液 (図 1 a) 又は全腫瘍断片 (図 1 b) を 1 6 時間、P M A / Ionomycin で活性化し、上清を Cytokine Bead Array によってアッセイした。

【 0 0 7 5 】

患者の最初のコホートの単一細胞懸濁液の分析 (表 1 の P t # 1 ~ 6) では、腫瘍試料において高レベルの IL - 2、IFN - γ 及び TNF を示したが、周囲の組織は示さなかった (図 1 a 及び表 1)。さらに、高レベルの IL - 1 3 (2 0 0 p g / m l) 及び IL - 4 (1 8 0 p g / m l) が 4 個の評価可能な試料のうち 3 個において検出でき、Th 2 偏向を示唆した。組織処理がデータを偏らせるという可能性を除外するため、次の患者コホートにおいて、サイトカイン、全腫瘍断片を活性化してサイトカインパターンを分析した。図 1 b 及び表 1 に示すように、高レベルの IL - 2 及び IFN - γ が全試料において

(13/14)、IL-13が11/13試料において、及びIL-4が7/13試料において見られた(図1b及び表1)。IL-2、TNF及びIL-13のレベルは、腫瘍部位由来の上清において、腫瘍周辺組織由来の上清よりも著しく高かった(図1b)。したがって、患者の乳癌試料の微小環境はIFN- γ 及び2型サイトカインが富んでおり、T細胞偏向を示唆する。

【0076】

【表1】

表1：患者の乳癌腫瘍微小環境中の1型及び2型サイトカイン

患者コホート	IL-2 pg/ml	IFN- γ pg/ml	TNF pg/ml	IL-13 pg/ml	IL-4 pg/ml
#1-6 腫瘍細胞懸濁液 4/6 試料が評価可能	平均値± SEM 範囲 N 9574 ± 2926 796 – 12500 4/4	8365 ± 2721 1033 – 12500 4/4	5619 ± 2118 1679 – 11265 4/4	356 ± 286 10 – 1204 2/4	176 ± 95 6 – 443 3/4
#7-21 全腫瘍断片 13/14 試料が評価可能	3867 ± 1067 75 – 13022 13/13	5005 ± 2124 124 – 27599 13/13	367 ± 112 0 – 1192 11/13	196 ± 71 0 – 930 11/13	33 ± 15 0 – 199 7/13

10

20

【0077】

患者の乳癌腫瘍に1型及び2型サイトカインを分泌するCD4⁺T細胞が浸潤する。T細胞が実際に、乳癌微小環境中で検出されるサイトカイン産生に寄与するかどうかを判断するため、単一細胞懸濁液におけるT細胞組成物及びサイトカイン発現パターンを測定した。フローサイトメトリーにより、CD4⁺T細胞が優勢であることが示される(75%、図2a)。入手可能な分析用組織の量が限られていたため、本発明者らは最初2つのサイトカイン、すなわち、IFN- γ (1型サイトカイン)及びIL-13(上清分析におけるレベルがIL-4のレベルよりも高かった2型サイトカイン)に注目した。細胞内染色により、CD4⁺T細胞の最大9%までを表す可能性がある(図2b)CD4⁺T細胞を発現するIL-13の存在が示された。過剰な組換えIL-13により遮断可能であったため(図2b)、染色は特異的であった。興味深いことに、異なる腫瘍試料において2種類の染色、すなわち、IL-13及びIFN- γ の両方を発現する二重陽性T細胞、及びIL-13又はIFN- γ のいずれかを発現する単一陽性T細胞が観察され、後者はT細胞偏向の古典的定義と一致する(Mosmann, T. R., and Coffman, R. L. (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 7, 145-173)。これと一致して、Th2細胞において発現される化学誘引物質受容体相同分子(CRTH2)を発現するT細胞(Nagata, K., Tanaka, K., Ogawa, K., Kemmotsu, K., Imai, T., Yoshie, O., Abe, H., Tada, K., Nakamura, M., Sugamura, K., and Takano, S. (1999). Selective expression of a novel surface molecule by human Th2 cells in vivo. *J Immunol* 162, 1278-1286); (Cosmi, L., Annunziato, F., Galli, M. I. G., Maggi, R. M. E., Nagata, K., and Romagnani, S. (2000). CRTH2 is the most reliable marker for the detection of circulating human type 2 Th and type 2 T cytotoxic cells in health and disease. *Eur J Immunol* 30, 2972-2979)が、一部の腫瘍由来の凍結組織切片の免疫蛍光によって検出可能であった(図2c)。分析した11個の腫瘍試料におけるIL-13発現CD4⁺T細胞の平均頻度は、3.7% ± SEM 0.7%、範囲0.2% ~ 9.3%であった。IL-13の細胞内発現を示すCD4⁺CD3⁺T細胞の頻度は、腫瘍細胞上清中のIL-13濃度と高度に相関していた($r^2 = 0.79$ 、 $p = 0.007$ 、Pearson相関、図2d)。したがって、患者の乳癌試料微小環境は、1型及び2型サイトカインを分泌するCD

30

40

50

4⁺ T細胞に富む。

【0078】

乳癌細胞による高レベルのIL-13発現。次に、IL-13発現CD4⁺ T細胞が、乳癌腫瘍に浸潤する成熟DCとのクラスターに關与しているかどうかを分析した。図3aに示すように、凍結乳癌組織切片の免疫蛍光により、CD3⁺ T細胞の腫瘍浸潤の一部の抗IL-13 mAbによる共染色が示された(図3a、オーバーレイ図中の黄色の二重陽性細胞を白い矢印で示す)。これらのCD3⁺ T細胞は腫瘍周辺部に位置していた(図3a)。しかしながら多くの場合、この分析は、11個の分析された乳癌腫瘍試料の腫瘍床で觀察された高レベルの相同IL-13染色により覆された(図3b、緑色のT細胞浸潤から離れた赤色染色された細胞)。

10

【0079】

Humouseの乳癌腫瘍にヒト骨髓DCが浸潤する。乳癌、DC及びCD4⁺ T細胞偏向の間の関連を実証するために、ヒト免疫系及びヒト乳癌のインビボモデルを開発し、使用した。致死量に近い放射線を照射した成体NOD/SCID/ β_2m^- マウスに、健常志願者血液アフェレーシスから単離したヒトG-CSF動員CD34⁺ HPCを移植した。これらのマウスはDC及びB細胞を含むヒト免疫系の要素を獲得した(Palucka, A. K., Gattlin, J., Blanck, J. P., Melkus, M. W., Clayton, S., Ueno, H., Kraus, E. T., Cravens, P., Bennett, L., Padgett-Thomas, A., et al. (2003). Human dendritic cell subsets in NOD/SCID mice engrafted with CD34⁺ hematopoietic progenitors. Blood 102, 3302-3310) 4週間後、 10^7 個のヒト腫瘍細胞を脇腹に皮下(s.c.)移植した。異なる組織病理学的及び表現型の特徴を有する、原発性(Hs578T及び1806)及び転移性(MCF-7)腫瘍を表す3種類の異なる乳癌細胞株(Hs578T、MCF-7及び1806)を試験した(表2)。4日目に、3つの試験した細胞株で輪郭の明瞭な腫瘍が測定可能であった(図4a)。腫瘍発生は、二相性で(図4b)、10日間の腫瘍定着相に続いて腫瘍体積が一時的に減少した(Aspord et al. 提出済)。20日目以降、エストロゲン非依存性であるHs578T及び1806腫瘍は原発部位で進行し(図4b)、動物は遠隔転移を発症した(Aspord et al. 提出済)。

20

【0080】

【表2】

表2：分析した乳癌細胞株の特性

30

細胞株	由来組織	表現型
Hs578T	原発性腺管癌	ER ^{陰性} PR ^{陰性} Her2/neu ^低 EGFR ^低
MCF7	胸水	ER ^{陽性} PR ^{陽性} Her2/neu ^低 EGFR ^{陽性}
1806	原発性扁平上皮癌	ER ^{陰性} PR ^{陰性} Her 2/neu ^{陰性}

40

【0081】

単一細胞懸濁液を、移植後4及び30日目に採取した腫瘍から調製した。図4cに図示したようにフローサイトメリー分析を行った。Hs578T腫瘍に、T細胞、B細胞、単球及びNK細胞のリネージュ(Lin)マーカーを発現しない、したがってDCを含まないHLA-DR⁺細胞(HLA-DR⁺ Lin⁻細胞)(Pulendran, B., Banchereau,

50

J., Burkeholder, S., Kraus, E., Guinet, E., Chalouni, C., Caron, D., Maliszewski, C., Davoust, J., Fay, J., and Palucka, K. (2000). Flt3-ligand and granulocyte colony-stimulating factor mobilize distinct human dendritic cell subsets in vivo. *J Immunol* 165, 566-572) が浸潤した (単一細胞懸濁液中の HLA-DR⁺Lin⁻細胞%、平均値 ± SD = 0.62 ± 0.13)。HLA-DR⁺Lin⁻細胞は HLA-DR⁺CD11c⁺ 骨髄 DC 及び HLA-DR⁺CD123⁺ 形質細胞様 DC を含有していた (図 4 c)。3つの試験した乳癌腫瘍 (Hs578T、MCF7 及び 1806) は DC 浸潤を示し、1806 腫瘍は3つの細胞株中で最低の浸潤を示した (表 3)。DC 浸潤は Hs578T 細胞において時間とともに増加した (表 3)。最後に、DC 浸潤は乳癌に特異的であり、腫瘍細胞移植の代わりに s.c. PBS 注射を受けた対照マウスにおいて、又は移植された乳癌腫瘍のすぐ外側の部分から採取した皮膚生検材料において見られなかった (Aspord et al. 提出済)。同所移植された腫瘍において DC 誘引の同様なパターンが見られた (図示せず)。

【0082】

【表 3】

表 3：ヒト化マウスモデルにおける乳癌腫瘍中の DC 及びその排出リンパ節

細胞株	腫瘍移植後の時間	マウス数	HLA-DR+Lin ⁻ 細胞 (%)			HLA-ABC (%)
			腫瘍	排出 LN	対照 LN	BM
Hs578T	4日	16	0.74 ± 0.06	15.34 ± 3.78	4.75 ± 1.71	65.67 ± 4.99
MCF7	4日	4	0.78 ± 0.15	23.7 ± 2.6	4.45 ± 0.45	82.75 ± 2.56
1806	4日	3	0.22 ± 0.06	3 ± 1.9	0.88 ± 0.61	55.3 ± 9.35
Hs578T	30日	12	1.44 ± 0.2	2.79 ± 0.57	0.09 ± 0.01	58.71 ± 4.82
1806	30日	8	0.26 ± 0.03	12.45 ± 4	4.1 ± 1.01	56.00 ± 9.43

【0083】

乳癌腫瘍排出リンパ節もまた、図 4 d に図示するように Hs578T 細胞で DC 浸潤を示した (単一細胞懸濁液中の HLA-DR⁺Lin⁻細胞%、平均値 ± SD = 5.46 ± 1.16) (図 4 d 及び表 2)。乳癌腫瘍排出リンパ節に、成熟 DC の表現型である、HLA-DR 及び DC-LAMP を共発現するヒト DC が浸潤した (図 4 e)。対照的に、反対側のリンパ節はわずかな DC 発現 DC-LAMP を示したのみであった (図 4 e)。したがって、本発明者らの患者の所見と同様に、ヒト化マウスに移植された乳癌腫瘍は DC に富み、その成熟を誘発する。

【0084】

CD4⁺T 細胞は乳癌腫瘍の発生を促進する。CD4⁺T 細胞が患者の所見と同様に偏向するかどうかを判断するため、ヒト乳癌腫瘍を有するヒト化マウスを腫瘍内注射により T 細胞で再構成した。T 細胞は、CD34⁺HPC ドナーの血中単核細胞から単離し、したがってインビボでの CD34⁺HPC 移植後に発生した抗原提示細胞 (APC、Antigen Presenting Cell) の自己由来であり、移植した腫瘍細胞と同種であった。

【0085】

PBMC ドナーから単離された T 細胞による Hs578T 乳癌腫瘍 (CD4⁺ 及び CD8⁺ の両方) の再構成は、腫瘍発生を促進をもたらした (図 5 a)。CD4⁺T 細胞もまた、MCF-7 乳癌腫瘍の発生を促進した (図 5 a) が、1806 乳癌細胞の T 細胞は促進しなかった (図示せず)。この腫瘍発生の促進は、異なるドナー由来のヒト細胞で作製

したマウスコホートにおいて再現可能であった(図5b)。さらに、精製CD4⁺T細胞による再構成は腫瘍発生初期に全く影響を与えなかったため、この腫瘍発生の促進はCD4⁺T細胞依存的であった(図5a及び図5b)。

【0086】

次に、あらかじめ活性化したCD4⁺T細胞が腫瘍発生の促進をもたらすことができるかどうかを分析した。ヒト化マウスを構築し、Hs578T乳癌腫瘍を移植し、次いでPBMCDナードから単離したCD4⁺T細胞を注射した。15日目に、乳癌腫瘍発生が最大のときに、腫瘍を採取し、数匹のマウスからプールし、CD4⁺T細胞を選別した。次いでこれらのインビボで活性化されたCD4⁺T細胞を、同じドナーからCD34⁺HPCで構築されたヒト化マウスレシピエントの「T細胞ナイーブ」Hs578T乳癌腫瘍に注射した。対照マウスにはPBSを与えた。2回の独立した実験において、マウス当たり1.5×10⁶個のインビボ活性化CD4⁺T細胞を1回移すと、4匹の試験したマウスのうち3匹において乳癌腫瘍発生を促進した(PBSを与えた対照マウスにおいて平均腫瘍体積±SEM=51±17に対してT細胞を与えた実験マウスにおいて167±27、p=0.06;図5c)。したがって、ヒト乳癌腫瘍発生はヒトCD4⁺T細胞の存在下の方が早い。

10

【0087】

腫瘍体積の増加は血管新生と関連していた。PBSを注射したHs578T乳癌腫瘍の肉眼による分析では、15日目に明瞭に見える腫瘍及び小さい排出リンパ節を示した(図5d)。驚くべきことに、腫瘍にCD4⁺T細胞を注射した場合、腫瘍と排出リンパ節の両方が血管が見えるほど大きくなった(図5d)。腫瘍にCD4⁺T細胞を注射したマウスにFITC-レクチンを投与することによって、脈管化の増強が示された(図5e)。

20

【0088】

CD4⁺T細胞は乳癌腫瘍発生を促進するためにDCを必要とする。CD4⁺T細胞が乳癌腫瘍細胞に直接作用するかどうかを判断するために、乳癌腫瘍を有するNOD/SCID/β2m⁻マウスにおいてCD4⁺細胞の作用をヒト免疫細胞(CD34⁺HPC移植無し)の非存在下で評価した。図6aに示すように、異なるドナーから単離したT細胞を注射しても腫瘍体積に変化は見られなかった。このことは、CD4⁺T細胞の癌誘発(pro-cancer)作用がCD34⁺HPC移植により発生する細胞、おそらくDCを必要とすることを示唆した。そのため、GM-CSF及びIL-4と一緒に単球を培養することによってDCを生成し、それらを自己CD4⁺T細胞と一緒にHs578T乳癌腫瘍を有するマウスに注射した。図6bに示すように、DC又はT細胞のいずれかの注射は、腫瘍体積に変化をもたらさなかった。しかしながら、DC及びT細胞と一緒に注射すると、乳癌腫瘍発生の促進をもたらした(図6b)。したがって、DCはCD4⁺T細胞が乳癌腫瘍の初期発生を促進するために必要である。

30

【0089】

CD4⁺T細胞はIL-13を分泌するために偏向する。次に、CD4⁺T細胞をヒト化マウスの乳癌腫瘍から単離した。乳癌腫瘍から単離したCD4⁺T細胞は2型サイトカインの分泌に偏向することが分かった。CD4⁺T細胞を腫瘍及びその排出リンパ節から15日目に選別し、PMA及びIonomycinで活性化し、上清中のサイトカインを評価した。CD4⁺T細胞は多量(>10ng/ml)のIL-2及びIFN-γだけでなくIL-4、IL-13及びTNFも分泌した(図8a及び図示せず)。図7aは、特に、腫瘍に浸潤するCD4⁺T細胞において検出できた高レベルのIL-13(1080±20pg/ml)を示す。フローサイトメトリーは、最大で17%までのCD4⁺T細胞における細胞質内のIL-13発現を示した(13%±3%、IL-13⁺CD4⁺T細胞;図7b)。大部分のIL-13発現CD4⁺T細胞はまた、IFN-γ(図7b)も発現し、患者腫瘍の一部において見られる発現パターンに類似していた。

40

【0090】

乳癌腫瘍に浸潤するDCは2型サイトカインを分泌するためにCD4⁺T細胞を偏向させる。腫瘍関連DCのCD4⁺T細胞機能に対する影響をさらに調べるために、CD34

50

* H P C を移植し、H s 5 7 8 T 乳癌腫瘍を移植した N O D / S C I D / β 2 m⁻ マウス由来のヒト D C を試験した。乳癌腫瘍、その排出リンパ節、脾臓、及び骨髓から、腫瘍移植の 4 日後に D C を単離し、ナイーブ同種 C D 4⁺ T 細胞を偏向させる能力をインビボで試験した。5 日後、C D 4⁺ T 細胞を P M A 及び Ionomycin で活性化し、上清中のサイトカインを評価した。分析した全組織から単離した D C は、同種 C D 4⁺ T 細胞を誘導することにより多量 ($> 10 \text{ ng/ml}$ 、図示せず) の I L - 2 及び I F N - γ を分泌した。さらに、両方の乳癌腫瘍から、特にその排出リンパ節から単離した D C は C D 4⁺ T 細胞を活性化することにより高レベルの T N F、I L - 13 及び I L - 4 を分泌した (平均濃度 $\pm$ S E M = $4491 \pm 1599 \text{ pg/ml}$ T N F、 $7961 \pm 1342 \text{ pg/ml}$ I L - 13、及び $3345 \pm 1508 \text{ pg/ml}$ I L - 4 ; 図 8 a)。このサイトカイン分泌パターンは長時間持続し、30 日目の腫瘍から選別した D C は 2 型及び向炎症性サイトカインのさらに多量の分泌を誘発した (図示せず)。4 日目の腫瘍から単離した D C により活性化した C D 4⁺ T 細胞のフローサイトメトリー分析は、約 9 % の I L - 13 発現 C D 4⁺ T 細胞、6 % の I L - 4 発現 C D 4⁺ T 細胞及び 15 % の T N F 発現 C D 4⁺ T 細胞を示した (図 8 b)。染色パターンは T h 2 偏向と一致し、I L - 13 及び / 又は I L - 4 発現 C D 4⁺ T 細胞の大部分が単一陽性であり、I F N - γ を分泌しなかった (図 8 b)。したがって、乳癌は、2 型 (I L - 4 及び I L - 13) 及び向炎症性 (T N F、I F N - γ) サイトカインを産生するための C D 4⁺ T 細胞画分を活性化するために D C を偏向させる。同程度の数の I L - 13 発現 C D 4⁺ T 細胞が、全ナイーブ C D 4⁺ T 細胞と、又は V α 24⁺ 細胞を枯渇させたナイーブ C D 4⁺ T 細胞との培養において検出された。したがって、D C は乳癌による刷り込みを受けて、C D 4⁺ T 細胞を型サイトカインの分泌に偏向させる。

【 0 0 9 1 】

C D 4⁺ T 細胞は I L - 13 を介して腫瘍発生を促進する。ヒト乳癌腫瘍はヒト C D 4⁺ T 細胞の微小環境中でより早く発生し、C D 4⁺ T 細胞が I L - 13 を分泌するよう偏らせることが分かった。癌における I L - 13 の免疫調節の役割についての以前の報告 (Terabe, M., Matsui, S., Noben-Trauth, N., Chen, H., Watson, C., Donaldson, D. D., Carbone, D. P., Paul, W. E., and Berzofsky, J. A. (2000). NKT cell-mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R-STAT6 pathway. *Nat Immunol* 1, 515-520) と一緒にこのことは、I L - 13 が関与している可能性を示唆した。このことを明らかにするために、H s 5 7 8 T 乳癌腫瘍を有するヒト化マウスを I L - 13 アンタゴニスト、I L - 13 を中和する抗体及び可溶性 I L - 13 R で処理した。T 細胞で再構成し、アイソタイプ対照で処理したマウスは 3 週間の追跡の間ずっと、腫瘍発生を促進することが分かった (図 9 a)。一方、I L - 13 アンタゴニストで処理したマウスは腫瘍発生を持続的な阻害を示した (図 9 a)。13 日目の腫瘍体積は T 細胞無し (P B S 対照) の動物において $39 \pm 5 \text{ mm}^3$ 、及び T 細胞有りの動物において 128 ± 18 であった (平均腫瘍体積 $\pm$ S E M = $p = 0.01$; 図 9 b)。I L - 13 アンタゴニストで処理したマウスは、腫瘍発生 of 著しい阻害を示した (アイソタイプ対照で処理した動物において 13 日目の平均腫瘍体積 $\pm$ S E M = 128 ± 18 及び I L - 13 アンタゴニストで処理した動物において 168 ± 5 、 $p = 0.02$; 図 9 b)。最後に、中和 I L - 13 m A b 単独による処理は、乳癌腫瘍発生を予防するのに十分であった (アイソタイプ対照で処理した動物において 11 日目の平均腫瘍体積 = 172 ± 13 及び I L - 13 中和 m A b で処理した動物において 70 ± 11.5 、 $p = 0.03$; 図 9 c)。したがって、C D 4⁺ T 細胞で再構成した Humouse における乳癌腫瘍発生を促進は、I L - 13 アンタゴニスト処理によって中和することができる。

【 0 0 9 2 】

リンパ器官外側の成熟 D C の存在は、例えば感染症におけるものなどの感染性、又は例えば自己免疫疾患におけるものなどの無菌性の炎症に関連している (Blanco, P., Palucka, A. K., Gill, M., Pascual, V., and Banchereau, J. (2001). Induction of dendritic cell differentiation by IFN- α in systemic lupus erythematosus. *Science* 29

10

20

30

40

50

4, 1540-1543; Radstake, T. R., van Lieshout, A. W., van Riel, P. L., van den Berg, W. B., and Adema, G. J. (2005). Dendritic cells, Fc γ receptors, and Toll-like receptors: potential allies in the battle against rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 64, 1532-1538; Thomas, R., MacDonald, K. P., Pettit, A. R., Cavanagh, L. L., Padmanabha, J., and Zehntner, S. (1999). Dendritic cells and the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J Leukoc Biol* 66, 286-292)。本発明は以前、患者において乳癌腫瘍への成熟DCの浸潤を発見している (Bell, D., Chomarat, P., Broyles, D., Netto, G., Harb, G. M., Lebecque, S., Valladeau, J., Davoust, J., Palucka, K. A., and Banchereau, J. (1999). In breast carcinoma tissue, immature dendritic cells reside within the tumor, whereas mature dendritic cells are located in peritumoral areas. *J Exp Med* 190, 1417-1426)。乳癌腫瘍微小環境におけるDCの存在の免疫学的重要性を分析した。CD4⁺T細胞は乳癌患者の腫瘍試料において1型及び2型サイトカイン (主にIL-13) を分泌していることが分かった。患者から得ることができる腫瘍材料の量が限られ、原因究明の妨げとなったため、ヒトCD34⁺造血前駆細胞 (HPC) を移植し、ヒト乳癌細胞株を移植したNOD/SCID/ $\beta 2m^{-/-}$ マウスを、乳癌、DC及びCD4⁺T細胞偏向の間の関連を実証するために使用した。したがって、乳癌細胞がヒトDCを誘引し、IL-13を含む2型サイトカインを分泌するためにナイーブCD4⁺T細胞を偏向させるようDCに刷り込みをすることが本明細書において実証される。CD4⁺T細胞は初期腫瘍発生を促進し、これは血管新生の増強と関連している。この癌誘発性作用は、IL-13アンタゴニストにより予防することができる。

【0093】

IL-13が、ホジキン (Hodgkin's) 病の場合のような (Kapp, U., Yeh, W. C., Patterson, B., Elia, A. J., Kagi, D., Ho, A., Hessel, A., Tipsword, M., Williams, A., Mirtsos, C., et al. (1999). Interleukin 13 is secreted by and stimulates the growth of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *J Exp Med* 189, 1939-1946) オートクリン、又はCD4⁺T細胞により分泌されるパラクリン、或いは肥満細胞などのアクセサリ細胞であるかどうかを明らかにするために、IL-13の供給源を探索した。IL-13の供給源であれば、インビボで腫瘍発生を調節する機構に影響を与える可能性がある (Fichtner-Feigl, S., Strober, W., Kawakami, K., Puri, R. K., and Kitani, A. (2006). IL-13 signalling through the IL-13 $\alpha 2$ receptor is involved in induction of TGF- $\beta 1$ production and fibrosis. *Nat Med* 12, 99-106)。例えば、IL-13は乳癌細胞に直接的な作用を有する可能性がある。驚くべきことに、患者の腫瘍中の乳癌細胞がIL-13を発現することが分かった。乳癌細胞株及び組換えIL-13 (並びにIL-4) を使用した以前のインビトロ研究では、エストロゲンに誘導される乳癌マーカー、肉眼的 (gross) 嚢胞性疾患液体タンパク質-15 (GCDFP-15) の増殖及び獲得の阻害が実証された (Blais, Y., Gingras, S., Haagenzen, D. E., Labrie, F., and Simard, J. (1996). Interleukin-4 and interleukin-13 inhibit estrogen-induced breast cancer cell proliferation and stimulate GCDFP-15 expression in human breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* 121, 11-18; Serve, H., Oelmann, E., Herweg, A., Oberberg, D., Serve, S., Reufi, B., Mucke, C., Minty, A., Thiel, E., and Berdel, W. E. (1996). Inhibition of proliferation and clonal growth of human breast cancer cells by interleukin 13. *Cancer Res* 56, 3583-3588)。IL-13はまた、副腎アンドロゲン前駆体からの性ステロイド生合成の制御においても示されている (Gingras, S., Moriggi, R., Groner, B., and Simard, J. (1999). Induction of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta 5$ - $\Delta 4$ isomerase type 1 gene transcription in human breast cancer cell lines and in normal mammary epithelial cells by interleukin-4 and interleukin-13. *Mol Endocrinol* 13, 66-81)。肺転移を起こしやすい、乳癌の非常に侵襲性の強い変異体におけるIL-13R $\alpha 2$ 発現において最近見出された、インビボでのIL-13の直接的な作用の可能性と一致している (Minn, A. J., Gupta, G. P., Siegel, P. M., Bos, P. D., Shu, W., Giri, D. D., Viale, A., Olshen, A. B., Gerald,

W. L., and Massague, J. (2005). Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature* 436, 518-524)。間接的な経路は、IL - 13を介する腫瘍浸潤マクロファージのM2細胞への偏向を含む可能性がある (Sinha, P., Clements, V. K., and Ostrand-Rosenberg, S. (2005). Interleukin-13-regulated M2 macrophages in combination with myeloid suppressor cells block immune surveillance against metastasis. *Cancer Res* 65, 11743-11751)。これらは次に、血管新生 (Mantovani, A., Sica, A., and Locati, M. (2005). Macrophage polarization comes of age. *Immunity* 23, 344-346)を促進し、及び/又はCD8⁺T細胞の抗癌エフェクター機能を阻害する因子、例えばTGF- β (Ghiringhelli, F., Puig, P. E., Roux, S., Parcellier, A., Schmitt, E., Solary, E., Kroemer, G., Martin, F., Chauffert, B., and Zitvogel, L. (2005). Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell proliferation. *J Exp Med* 202, 919-929; Li, M. O., Wan, Y. Y., Sanjabi, S., Robertson, A. K., and Flavell, R. A. (2005). Transforming Growth Factor-beta Regulation of Immune Responses. *Annu Rev Immunol*; Terabe, M., Matsui, S., Park, J. M., Mamura, M., Noben-Trauth, N., Donaldson, D. D., Chen, W., Wahl, S. M., Ledbetter, S., Pratt, B., et al. (2003). Transforming growth factor-beta production and myeloid cells are an effector mechanism through which CD1d-restricted T cells block cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor immunosurveillance: abrogation prevents tumor recurrence. *J Exp Med* 198, 1741-1752)を分泌し、それによって腫瘍発生を増幅する。

10

20

【0094】

CD4⁺T細胞によるサイトカイン発現を2パターン観察した。1つは、IL - 13又はIFN - γ のいずれかを発現する単一陽性CD4⁺T細胞の存在下で、2型偏向の古典的定義と一致する (Mosmann, T. R., and Coffman, R. L. (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 7, 145-173)。発現パターンは、乳癌腫瘍微小環境において真正のTh1及びTh2細胞を示唆する。第2のパターンは、IL - 13発現CD4⁺T細胞の2つのサブセット：単一陽性 (真正のTh2) 及び二重陽性IL - 13及びIFN - γ を実際に示した。後者のパターンは、成熟NK細胞において観察されたIL - 4及びIFN - γ を連想させる (Kadowaki, N., Antonenko, S., Ho, S., Rissoan, M. C., Soumelis, V., Porcelli, S. A., Lanier, L. L., and Liu, Y. J. (2001). Distinct cytokine profiles of neonatal natural killer T cells after expansion with subsets of dendritic cells. *J Exp Med* 193, 1221-1226)。これらの結果は、乳癌腫瘍にNK細胞が浸潤するという可能性を提起する。しかしながら、インビトロ試験においてV α 24発現細胞の枯渇によりIL - 13の誘導が消失しなかったため、V α 24 - 陰性NK細胞の非古典的役割の可能性が考慮されなければならない。にもかかわらず、これらの結果は乳癌微小環境における2型サイトカインを分泌するCD4⁺T細胞の2つのタイプの存在を示している。

30

【0095】

CD4⁺T細胞を産生するTNFと一緒に2型サイトカインが存在することは、TSLP活性化DCにより誘導され (Soumelis, V., Reche, P. A., Kanzler, H., Yuan, W., Edward, G., Homey, B., Gilliet, M., Ho, S., Antonenko, S., Lauerma, A., et al. (2002). Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nat Immunol* 3, 673-680)、OX40リガンドに仲介される (Ito, T., Wang, Y. H., Duramad, O., Hori, T., Delespesse, G. J., Watanabe, N., Qin, F. X., Yao, Z., Cao, W., and Liu, Y. J. (2005). TSLP-activated dendritic cells induce an inflammatory T helper type 2 cell response through OX40 ligand. *J Exp Med* 202, 1213-1223) 向炎症性サイトカイン2型応答に似ている。これらの分子は乳癌微小環境中に存在する可能性がある。代替の経路としては、骨髄DCの誘引及びTh2偏向における潜在的役割がインビトロ研究で示唆されているMUC - 1 (Carlos, C. A., Don

40

50

g, H. F., Howard, O. M., Oppenheim, J. J., Hanisch, F. G., and Finn, O. J. (2005). Human tumor antigen MUC1 is chemotactic for immature dendritic cells and elicits its maturation but does not promote Th1 type immunity. *J Immunol* 175, 1628-1635) を誘導できるだろう。それにもかかわらず、 $CD4^+$ T 細胞の移植はヒト化マウスにおいて腫瘍発生を全く促進しなかったため、インビボでのこれら $CD4^+$ T 細胞の活性化は自己 DC による抗原提示に依存する。本発明者らによる他の研究は、エフェクター相、すなわちインビボ活性化された $CD4^+$ T 細胞をナイーブマウスに移植することによる腫瘍発生の促進は、T 細胞の自己腫瘍浸潤 DC の存在にも依存することを示唆している。

【0096】

PC3 細胞株を使用して前立腺癌腫瘍を確立し、3 及び 6 日目に T 細胞で再構成した ($CD4^+$ 及び $CD8^+$ T 細胞の混合物)。対照マウスは T 細胞の移動後 20 日目に PBS を与え、腫瘍を採取し、PMA 及び Ionomycin と一緒に一晩培養した。図 10 に示すように、対照ではなく、 $CD4^+$ T 細胞で再構成した腫瘍が上清中に高レベルの IL-13 を示した。これらの結果は、乳癌腫瘍の観察結果が前立腺癌、上皮由来の別の腫瘍にまで適用範囲を拡大できることを示す。

【0097】

乳癌細胞は IL-13 及びリン酸化 STAT6 染色を示す。IL-13 発現をインサイチュで測定するために、乳癌組織切片を特異的 mAb で染色し、免疫蛍光により分析した。癌細胞の非常に顕著で均一な IL-13 染色が見られた (図 11a、赤色)。この染色は過剰量の rhIL-13 により消失し (図 11b)、特異性を示した。IL-13 染色は、いくつかの腫瘍床及び全腫瘍構造を含む、分析した 11/11 乳癌腫瘍試料において検出可能であった (図 11a 及び b)。

【0098】

STAT6 リン酸化は IL-13 (及び / 又は IL-4) のサインと考えられる。分析した全乳癌腫瘍試料は、癌細胞による STAT6 の発現を示した (図 12a、12b)。11 個の腫瘍のうち 3 個がリン酸化 STAT6 (pSTAT6: 図 12c、12d) の強い細胞質発現を示した。抗 pSTAT6 抗体を生成するために使用されるペプチドの過剰量によって染色はブロックされ、特異性を示した (図 12e)。癌細胞における pSTAT6 染色はまた、強度は弱いものの、他の 5 個の分析した腫瘍において存在した。したがって、乳癌細胞は IL-13 を発現し、リン酸化 STAT6 は IL-13 が実際にシグナルを癌細胞に送達することを示す。

【0099】

図 13a 及び 13b は肺腫瘍の組織切片の肺組織を示し、図 13c 及び 13d は肉眼では腫瘍の浸潤がない肺組織を示す。図 13a 及び 13b で示すように、腫瘍組織 (しかし肉眼では腫瘍の浸潤がない) は IL-13 による染色並びに IL-13 及びサイトケラチンの二重染色細胞の存在を示す。サイトケラチン染色では、サイトケラチン-FITC コンジュゲートを二次抗体の後に加え、1 時間インキュベートした。手短に述べると、肺組織 (OCT 中に凍結) を約 6 ミクロンに切ってスライド上に載せ、-80 °C アセトン中で 5 分間固定した。凍結切片を 1 × PBS 中で 3 回、各 5 分間ずつすすぎ、5 % BSA / 0.1 % サポニンで 20 分間ブロックした。抗 IL-13 Ab (R&D 社製) をブロック中で 5 µg / mL まで希釈し、1 時間インキュベートした。組織切片を PBS / 0.1 % サポニンで 2 回、各 5 分間ずつ洗浄し、二次 Ab (Molecular Probes 社製) ヤギ抗マウス-568 を加え、PBS で洗浄し、DAPI で染色し、マウントした。

【0100】

結論として、患者試料のエキソビボ分析を使用するヒト癌の研究とヒト免疫系及びヒト癌のモデルにおけるインビボ分析を組み合わせることにより、乳癌がヒト DC を誘引し、この DC に $CD4^+$ T 細胞を癌誘発性 2 型免疫へ活性化するよう刷り込みを行うことが本明細書において実証されている。これは、IL-13 産生に依存する、例えば乳癌などの癌における療法の標的としての IL-13 アンタゴニストで予防することができる。

【0101】

このモデルは、基礎及び臨床レベルの両方で使用できる。基礎レベルでは、腫瘍が免疫系を回避するため、及び標的として療法に使用し得る分子を特定するために使用する機構の決定を可能にするはずである。臨床レベルでは、OncoHumouseにより本発明者らにはいずれ、従来の化学療法レジメンと結合させた又はさせない、ワクチン接種、抗体療法、及び適合移植などの免疫系の操作によって腫瘍細胞を排除するための戦略が設計可能となるはずである。

【 0 1 0 2 】

この明細書において論じた任意の実施形態を、本発明の任意の方法、キット、試薬又は組成物に対して実施可能であり、逆の場合も同じであることが意図される。さらに、本発明の組成物は本発明の方法を達成するために使用できる。

10

【 0 1 0 3 】

本明細書中の特定の実施形態は説明の目的で示しており、本発明を限定するものではないことを理解されたい。本発明の主な特徴は、本発明の範囲を逸脱することなく様々な実施形態において利用可能であることである。当業者であれば、ごく通常の実験を使用して、本明細書中に記載の特定の手順の多くの等価物を認識する、又は確認できるはずである。このような等価物は本発明の範囲内であると考えられ、特許請求の範囲に含まれる。

【 0 1 0 4 】

本明細書中で言及した全ての出版物及び特許出願は、本発明が関連する分野の当業者の技術水準を示すものである。全ての出版物及び特許出願は、各個別の出版物又は特許出願が参照により具体的及び個別に組み込まれていることが示されているものと同程度まで、参照により本明細書中に組み込まれる。

20

【 0 1 0 5 】

「 1 つの (a) 」又は「 1 つの (an) 」という語の使用は、特許請求の範囲及び / 又は明細書中で「含んでいる (comprising) 」という用語と組み合わせて使用する場合、「 1 つの 」を意味し得るが、「 1 又は複数の 」、「少なくとも 1 つの 」及び「 1 又は 2 以上の 」の意味とも一致する。特許明細の範囲中の「又は」という用語の使用は、二者択一のみを指す、又は二者択一が相互排他的であることが明確に示されない限り、「及び / 又は」を意味するために使用するが、本開示は二者択一及び「及び / 又は」のみを指す定義を支持する。本出願全体にわたって、「約」という用語は、値が、値を決定するために利用される装置、方法に固有の誤差変動、又は研究対象中に存在する変動を含むことを示すために使用する。

30

【 0 1 0 6 】

本明細書及び特許請求の範囲中で使用される場合、「含んでいる (comprising) 」(及び「含む (comprise) 」及び「含む (comprises) 」などの任意の形態の含んでいる (comprising))、「有している (having) 」(及び「有する (have) 」及び「有する (has) 」などの任意の形態の有している (having))、「含んでいる (including) 」(及び「含む (includes) 」及び「含む (include) 」などの任意の形態の含んでいる (including))、又は「含有している (containing) 」(及び「含有する (contains) 」及び「含有する (contain) 」などの任意の形態の含有している (containing)) という語は、包含的又は制限のないものであり、追加の、列挙されていない要素又は方法ステップを除外しない。

40

【 0 1 0 7 】

本明細書中で使用される場合、「又はこれらの組み合わせ」という用語は、その用語の前に列挙された項目の全ての順列と組み合わせを指す。例えば、「 A 、 B 、 C 、又はこれらの組み合わせ」は、 A 、 B 、 C 、 A B 、 A C 、 B C 、又は A B C 、及び特定の文脈において順序が重要な場合は、 B A 、 C A 、 C B 、 C B A 、 B C A 、 A C B 、 B A C 、又は C A B のうちの少なくとも 1 つを含むことを意図する。この例を続けると、 B B 、 A A A 、 M B 、 B B C 、 A A A B C C C C 、 C B B A A A 、 C A B A B B などの 1 つ又は複数の項目又は用語の繰り返しを含有する組み合わせを明確に含む。当業者であれば、別途文脈から明らかでない限り、任意の組み合わせにおいて項目又は用語の数に制限はないことを通

50

常は理解するはずである。

【 0 1 0 8 】

本明細書において開示及び特許請求した全ての組成物及び／又は方法は、本開示に照らして不適切な実験をすることなく、行う及び実施することができる。本発明の組成物及び方法を好ましい実施形態の観点から説明したが、本明細書中で説明された組成物及び／又は方法、並びに方法のステップにおいて、又は一連のステップにおいて、本発明の概念、精神及び範囲を逸脱することなく、変形形態が適用されてもよいことが当業者には明らかである。当業者に明らかな全てのこれらの置換物及び修正形態が、添付の特許請求の範囲により定義した通り、本発明の精神、範囲及び概念の範囲内に入ると見なされる。

【 0 1 0 9 】

参考文献

- Anderson, T. M., Hess, S. D., Egilmez, N. K., Nwogu, C. E., Lenox, J. M., and Bankert, R. B. (2003). Comparison of human lung cancer/SCID mouse tumor xenografts and cell culture growth with patient clinical outcomes. *J Cancer Res Clin Oncol* 129, 565-568.
- Balkwill, F., Charles, K. A., and Mantovani, A. (2005). Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell* 7, 211-217.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y., Pulendran, B., and Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Ann Rev Immunol* 18, 767-811.
- Banchereau, J., and Palucka, A. K. (2005). Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat Rev Immunol* 5, 296-306.
- Banchereau, J., Pascual, V., and Palucka, A. K. (2004). Autoimmunity through Cytokine-Induced Dendritic Cell Activation. *Immunity* 20, 539-550.
- Banchereau, J., and Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-252.
- Bankert, R. B., Egilmez, N. K., and Hess, S. D. (2001). Human-SCID mouse chimeric models for the evaluation of anti-cancer therapies. *Trends Immunol* 22, 386-393.
- Bell, D., Chomarat, P., Broyles, D., Netto, G., Harb, G. M., Lebecque, S., Vallaudeau, J., Davoust, J., Palucka, K. A., and Banchereau, J. (1999). In breast carcinoma tissue, immature dendritic cells reside within the tumor, whereas mature dendritic cells are located in peritumoral areas. *J Exp Med* 190, 1417-1426.
- Blais, Y., Gingras, S., Haagenzen, D. E., Labrie, F., and Simard, J. (1996). Interleukin-4 and interleukin-13 inhibit estrogen-induced breast cancer cell proliferation and stimulate GCDP-15 expression in human breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* 121, 11-18.
- Blanco, P., Palucka, A. K., Gill, M., Pascual, V., and Banchereau, J. (2001). Induction of dendritic cell differentiation by IFN- α in systemic lupus erythematosus. *Science* 294, 1540-1543.
- Carlos, C. A., Dong, H. F., Howard, O. M., Oppenheim, J. J., Hanisch, F. G., and Finn, O. J. (2005). Human tumor antigen MUC1 is chemotactic for immature dendritic cells and elicits maturation but does not promote Th1 type immunity. *J Immunol* 175, 1628-1635.
- Chomarat, P., Banchereau, J., Davoust, J., and Palucka, A. K. (2000). IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nat Immunol* 1, 510-514.
- Condeelis, J., and Pollard, J. W. (2006). Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell* 124, 263-266.

10

20

30

40

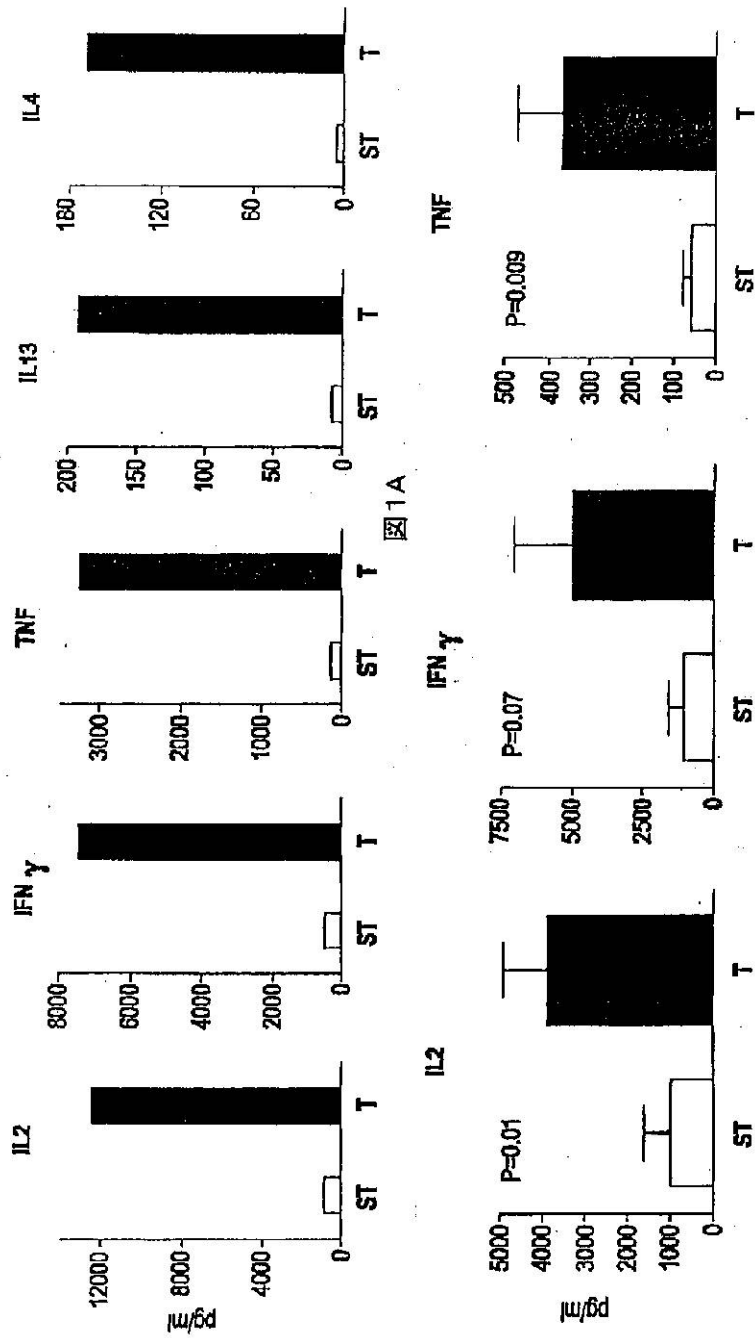
50

- Cosmi, L., Annunziato, F., Galli, M. I. G., Maggi, R. M. E., Nagata, K., and Romagnani, S. (2000). CRTH2 is the most reliable marker for the detection of circulating human type 2 Th and type 2 T cytotoxic cells in health and disease. *Eur J Immunol* 30, 2972-2979.
- Coussens, L. M., and Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature* 420, 860-867.
- Delamarre, L., Pack, M., Chang, H., Mellman, I., and Trombetta, E. S. (2005). Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate. *Science* 307, 1630-1634.
- Enk, A. H., Jonuleit, H., Saloga, J., and Knop, J. (1997). Dendritic cells as mediators of tumor-induced tolerance in metastatic melanoma. *Int J Cancer* 73, 309-316. 10
- Fichtner-Feigl, S., Strober, W., Kawakami, K., Puri, R. K., and Kitani, A. (2006). IL-13 signalling through the IL-13alpha2 receptor is involved in induction of TGF-beta1 production and fibrosis. *Nat Med* 12, 99-106.
- Gabrilovich, D. (2004). Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. *Nat Rev Immunol* 4, 941-952.
- Gabrilovich, D. I., Chen, H. L., Girgis, K. R., Cunningham, H. T., Meny, G. M., Nadaf, S., Kavanaugh, D., and Carbone, D. P. (1996). Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat Med* 2, 1096-1103. 20
- Ghiringhelli, F., Puig, P. E., Roux, S., Parcellier, A., Schmitt, E., Solary, E., Kroemer, G., Martin, F., Chauffert, B., and Zitvogel, L. (2005). Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation. *J Exp Med* 202, 919-929.
- Gingras, S., Moriggl, R., Groner, B., and Simard, J. (1999). Induction of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4 isomerase type 1 gene transcription in human breast cancer cell lines and in normal mammary epithelial cells by interleukin-4 and interleukin-13. *Mol Endocrinol* 13, 66-81.
- Gordon, S., and Taylor, P. R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 5, 953-964. 30
- Ito, T., Wang, Y. H., Duramad, O., Hori, T., Delespesse, G. J., Watanabe, N., Qin, F. X., Yao, Z., Cao, W., and Liu, Y. J. (2005). TSLP-activated dendritic cells induce an inflammatory T helper type 2 cell response through OX40 ligand. *J Exp Med* 202, 1213-1223.
- Iwanuma, Y., Chen, F. A., Egilmez, N. K., Takita, H., and Bankert, R. B. (1997). Antitumor immune response of human peripheral blood lymphocytes coengrafted with tumor into severe combined immunodeficient mice. *Cancer Res* 57, 2937-2942.
- Janeway, C. A., Jr., and Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20, 197-216. 40
- Joyce, J. A. (2005). Therapeutic targeting of the tumor microenvironment. *Cancer Cell* 7, 513-520.
- Kadowaki, N., Antonenko, S., Ho, S., Rissoan, M. C., Soumelis, V., Porcelli, S. A., Lanier, L. L., and Liu, Y. J. (2001). Distinct cytokine profiles of neonatal natural killer T cells after expansion with subsets of dendritic cells. *J Exp Med* 193, 1221-1226.
- Kamel-Reid, S., Letarte, M., Doedens, M., Greaves, A., Murdoch, B., Grunberger, T., Lapidot, T., Thorner, P., Freedman, M. H., Phillips, R. A., and et al. (1991). Bone marrow from children in relapse with pre-B acute lymphoblastic leukemia proliferates and disseminates rapidly in scid mice. *Blood* 78, 2973-2981. 50

- Kamel-Reid, S., Letarte, M., Sirard, C., Doedens, M., Grunberger, T., Fulop, G., Freedman, M. H., Phillips, R. A., and Dick, J. E. (1989). A model of human acute lymphoblastic leukemia in immune-deficient SCID mice. *Science* 246, 1597-1600.
- Kapp, U., Yeh, W. C., Patterson, B., Elia, A. J., Kagi, D., Ho, A., Hessel, A., Tipword, M., Williams, A., Mirtsos, C., et al. (1999). Interleukin 13 is secreted by and stimulates the growth of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *J Exp Med* 189, 1939-1946.
- Kelland, L. R. (2004). Of mice and men: values and liabilities of the athymic nude mouse model in anticancer drug development. *Eur J Cancer* 40, 827-836.
- Levings, M. K., Gregori, S., Tresoldi, E., Cazzaniga, S., Bonini, C., and Roncarolo, M. G. (2005). Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25+CD4+ Tr cells. *Blood* 105, 1162-1169.
- Li, M. O., Wan, Y. Y., Sanjabi, S., Robertson, A. K., and Flavell, R. A. (2005). Transforming Growth Factor-beta Regulation of Immune Responses. *Annu Rev Immunol*.
- Mantovani, A., Sica, A., and Locati, M. (2005). Macrophage polarization comes of age. *Immunity* 23, 344-346.
- Minn, A. J., Gupta, G. P., Siegel, P. M., Bos, P. D., Shu, W., Giri, D. D., Viale, A., Olshen, A. B., Gerald, W. L., and Massague, J. (2005). Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature* 436, 518-524.
- Mosier, D. E., Gulizia, R. J., Baird, S. M., and Wilson, D. B. (1988). Transfer of a functional human immune system to mice with severe combined immunodeficiency. *Nature* 335, 256-259.
- Mosmann, T. R., and Coffman, R. L. (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 7, 145-173.
- Mueller, B. M., and Reisfeld, R. A. (1991). Potential of the scid mouse as a host for human tumors. *Cancer Metastasis Rev* 10, 193-200.
- Muller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M. E., McClanahan, T., Murphy, E., Yuan, W., Wagner, S. N., et al. (2001). Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410, 50-56.
- Nagata, K., Tanaka, K., Ogawa, K., Kemmotsu, K., Imai, T., Yoshie, O., Abe, H., Tada, K., Nakamura, M., Sugamura, K., and Takano, S. (1999). Selective expression of a novel surface molecule by human Th2 cells in vivo. *J Immunol* 162, 1278-1286.
- Palucka, A. K., Gatlin, J., Blanck, J. P., Melkus, M. W., Clayton, S., Ueno, H., Kraus, E. T., Cravens, P., Bennett, L., Padgett-Thomas, A., et al. (2003). Human dendritic cell subsets in NOD/SCID mice engrafted with CD34+ hematopoietic progenitors. *Blood* 102, 3302-3310.
- Palucka, A. K., Scuderi, R., Porwit, A., Jeha, S., Gruber, A., Bjorkholm, M., Beran, M., and PISA, P. (1996). Acute lymphoblastic leukemias from relapse engraft more rapidly in SCID mice. *Leukemia* 10, 558-563.
- Pulendran, B., Banchereau, J., Burkeholder, S., Kraus, E., Guinet, E., Chalouni, C., Caron, D., Maliszewski, C., Davoust, J., Fay, J., and Palucka, K. (2000). Flt3-ligand and granulocyte colony-stimulating factor mobilize distinct human dendritic cell subsets in vivo. *J Immunol* 165, 566-572.
- Radstake, T. R., van Lieshout, A. W., van Riel, P. L., van den Berg, W. B., and Adema, G. J. (2005). Dendritic cells, Fc{gamma} receptors, and Toll-like receptors: potential allies in the battle against rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 64, 1532-1538.

- Reddy, S., Piccione, D., Takita, H., and Bankert, R. B. (1987). Human lung tumor growth established in the lung and subcutaneous tissue of mice with severe combined immunodeficiency. *Cancer Res* 47, 2456-2460.
- Sakakibara, T., Xu, Y., Bumpers, H. L., Chen, F. A., Bankert, R. B., Arredondo, M. A., Edge, S. B., and Repasky, E. A. (1996). Growth and Metastasis of Surgical Specimens of Human Breast Carcinomas in SCID Mice. *Cancer J Sci Am* 2, 291.
- Serve, H., Oelmann, E., Herweg, A., Oberberg, D., Serve, S., Reufi, B., Mucke, C., Minty, A., Thiel, E., and Berdel, W. E. (1996). Inhibition of proliferation and clonal growth of human breast cancer cells by interleukin 13. *Cancer Res* 56, 3583-3588. 10
- Shortman, K., and Liu, Y. J. (2002). Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nature Rev Immunol* 2, 151-161.
- Sinha, P., Clements, V. K., and Ostrand-Rosenberg, S. (2005). Interleukin-13-regulated M2 macrophages in combination with myeloid suppressor cells block immune surveillance against metastasis. *Cancer Res* 65, 11743-11751.
- Soumelis, V., Reche, P. A., Kanzler, H., Yuan, W., Edward, G., Homey, B., Gilliet, M., Ho, S., Antonenko, S., Lauerma, A., et al. (2002). Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nat Immunol* 3, 673-680.
- Steinman, R. M. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 9, 271-296. 20
- Terabe, M., Matsui, S., Noben-Trauth, N., Chen, H., Watson, C., Donaldson, D. D., Carbone, D. P., Paul, W. E., and Berzofsky, J. A. (2000). NKT cell-mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R-STAT6 pathway. *Nat Immunol* 1, 515-520.
- Terabe, M., Matsui, S., Park, J. M., Mamura, M., Noben-Trauth, N., Donaldson, D. D., Chen, W., Wahl, S. M., Ledbetter, S., Pratt, B., et al. (2003). Transforming growth factor-beta production and myeloid cells are an effector mechanism through which CD1d-restricted T cells block cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor immunosurveillance: abrogation prevents tumor recurrence. *J Exp Med* 198, 1741-1752 30
- Thomas, R., MacDonald, K. P., Pettit, A. R., Cavanagh, L. L., Padmanabha, J., and Zehntner, S. (1999). Dendritic cells and the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J Leukoc Biol* 66, 286-292.
- Uckun, F. M., Sather, H., Reaman, G., Shuster, J., Land, V., Trigg, M., Gunther, R., Chelstrom, L., Bleyer, A., Gaynon, P., and et al. (1995). Leukemic cell growth in SCID mice as a predictor of relapse in high-risk B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 85, 873-878.
- Wang, T., Niu, G., Kortylewski, M., Burdelya, L., Shain, K., Zhang, S., Bhattacharya, R., Gabrilovich, D., Heller, R., Coppola, D., et al. (2004). Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells. *Nat Med* 10, 48-54. 40

【図 1】



【図 1B】

【図 2 a】

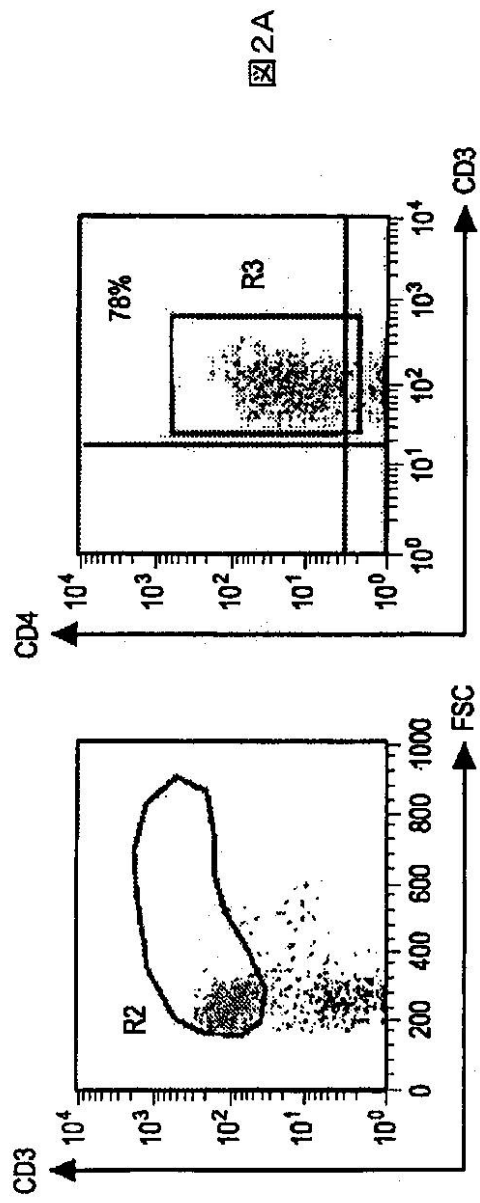


図 2A

【 図 2 b 】

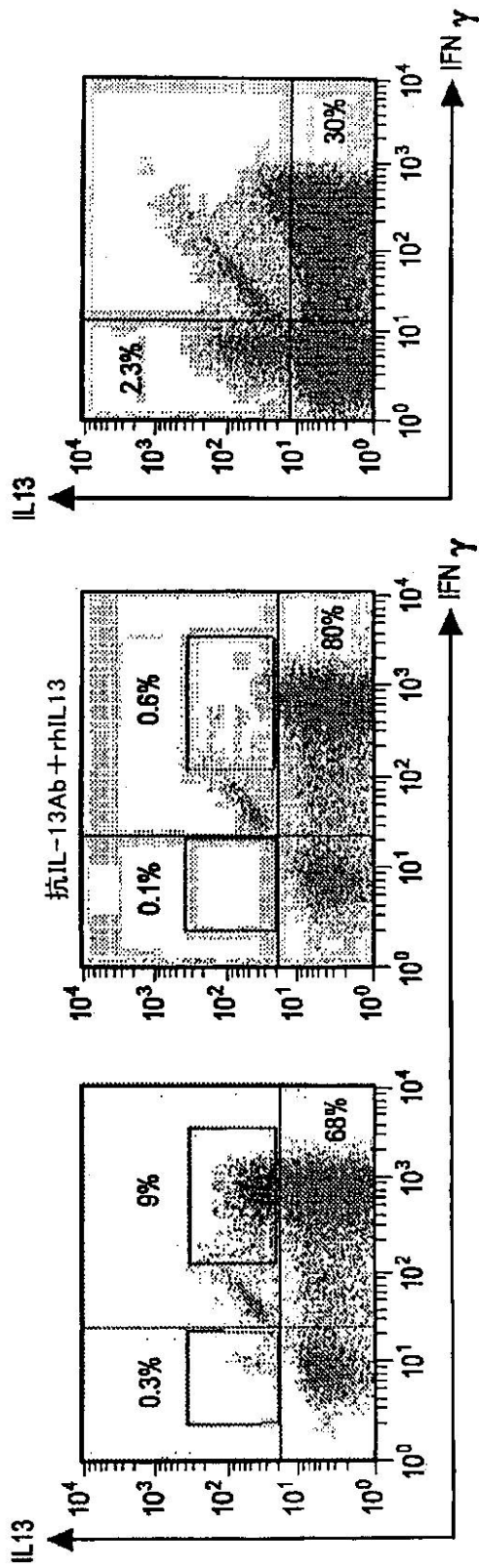


図 2B

【図 2 c】

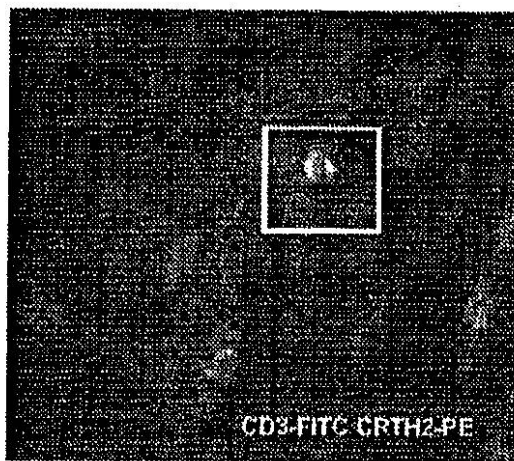


図 2C

【図 2 d】

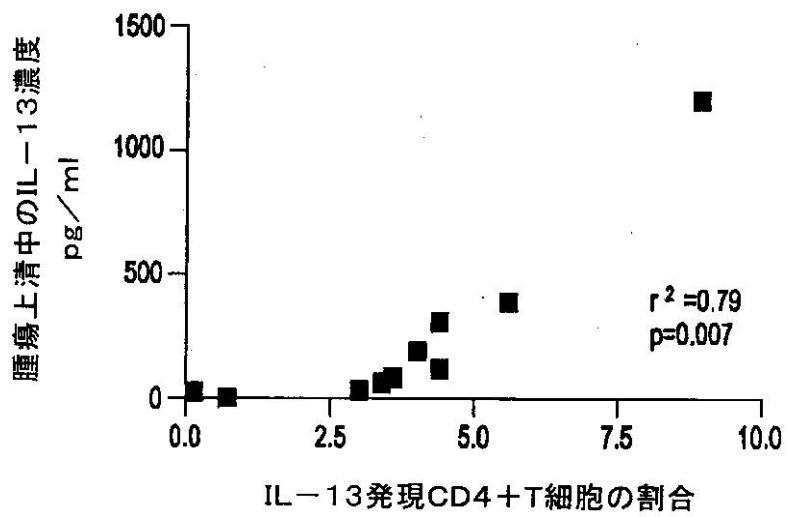


図 2D

【図3】

図3A

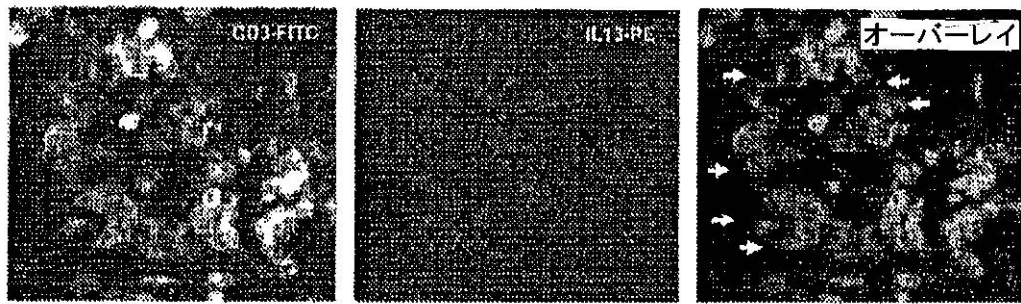


図3B

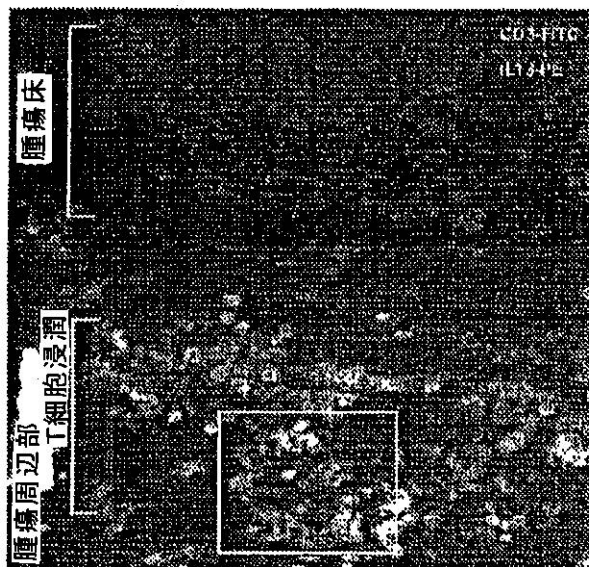
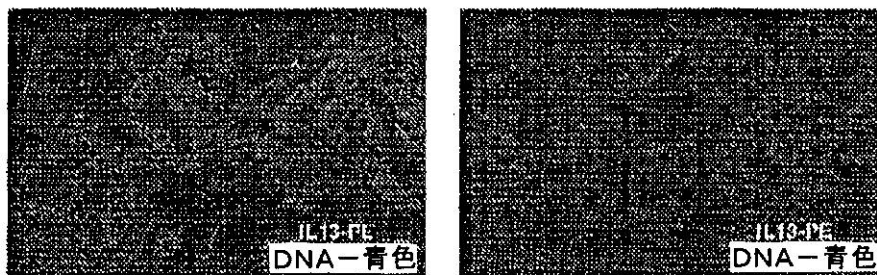


図3C



図3D



【図 4 a】

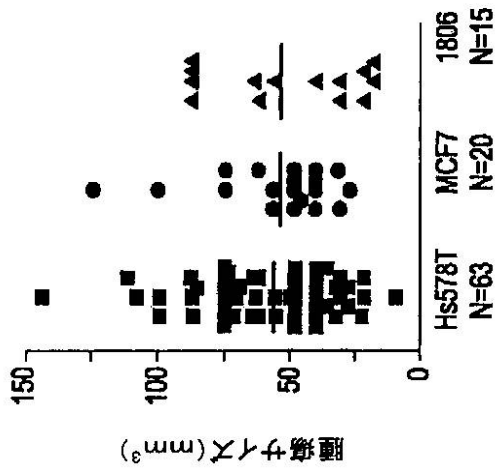


図 4A

【図 4 b】

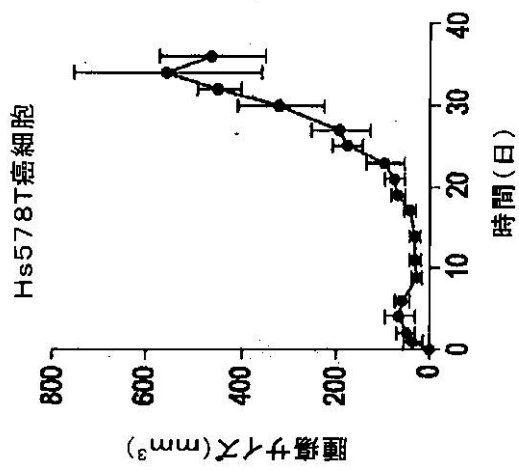


図 4B

【図 4 c】

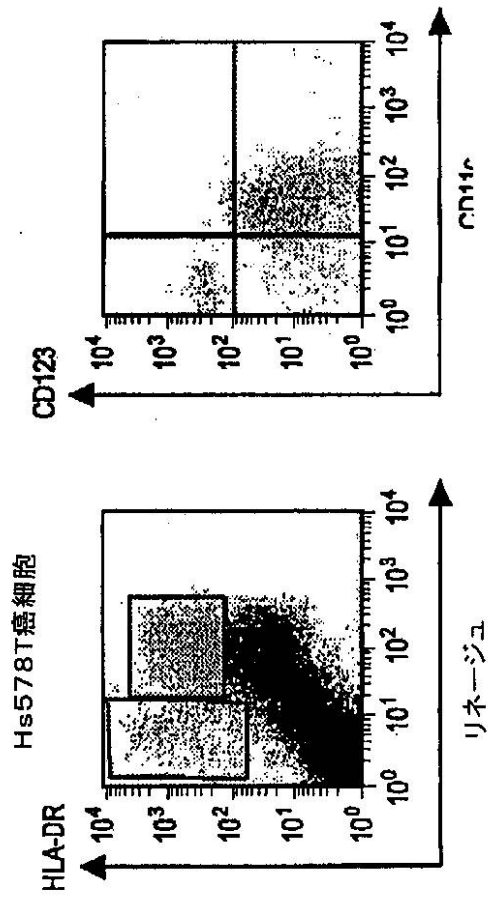


図 4C

【図 4 d】

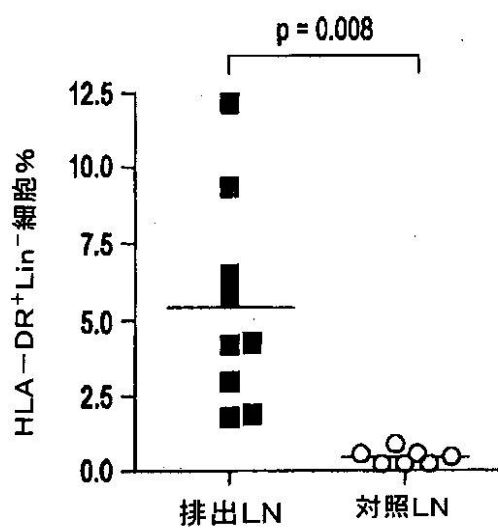


図4D

【図 4 e】

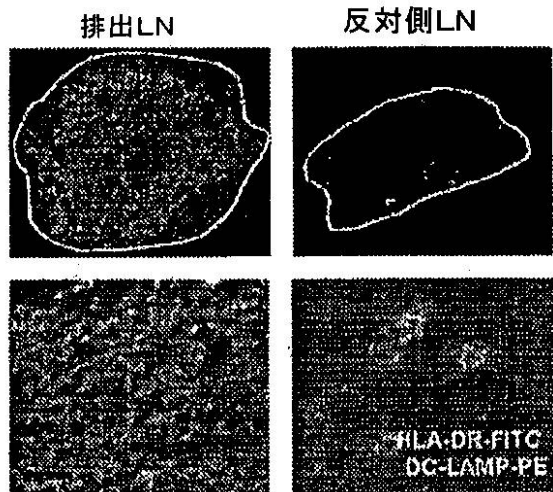


図4E

【図 5 a】

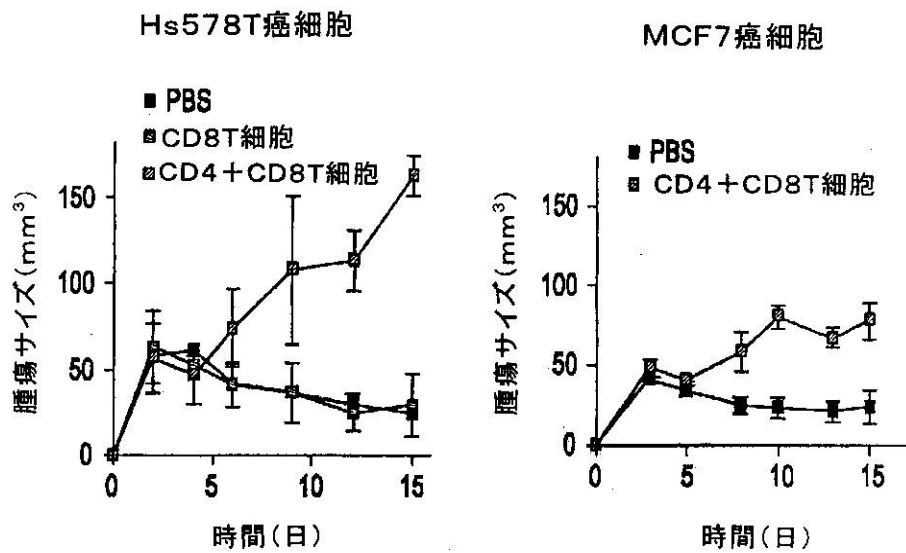


図5A

【図 5 b】

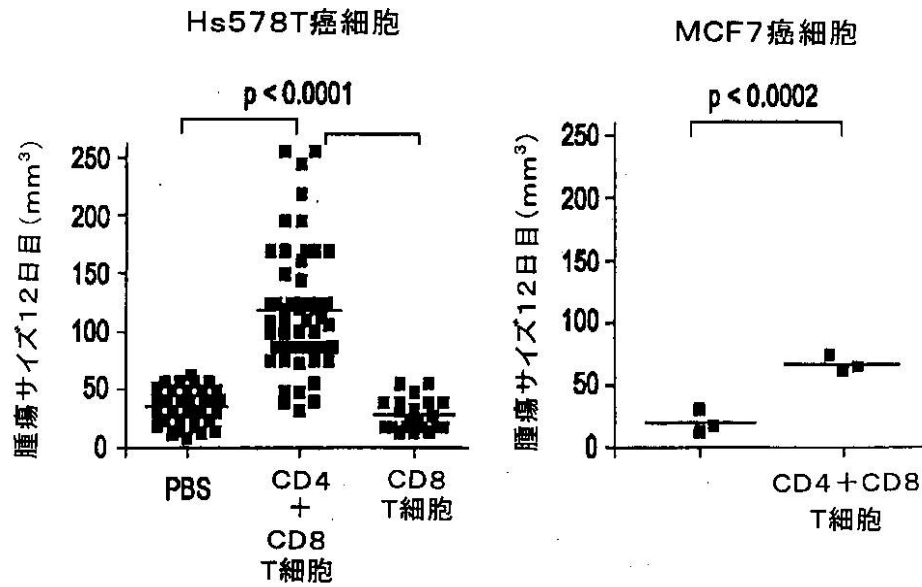


図5B

【図 5 c】

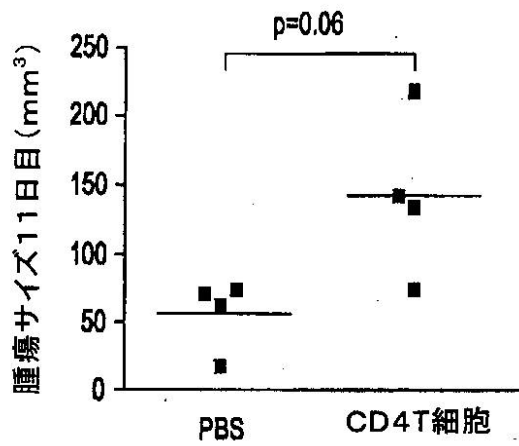


図5C

【図 5 d】

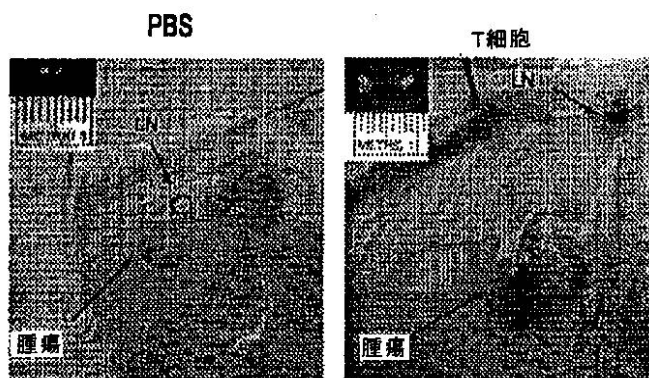


図5D

【図 5 e】

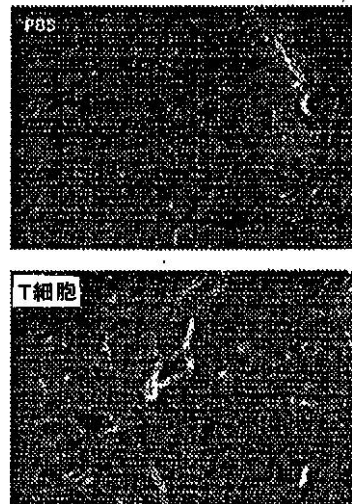


図 5E

【図 6】

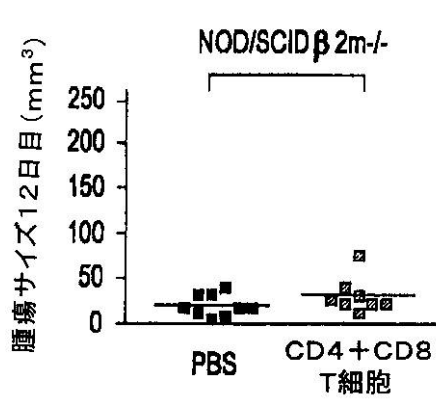


図 6A

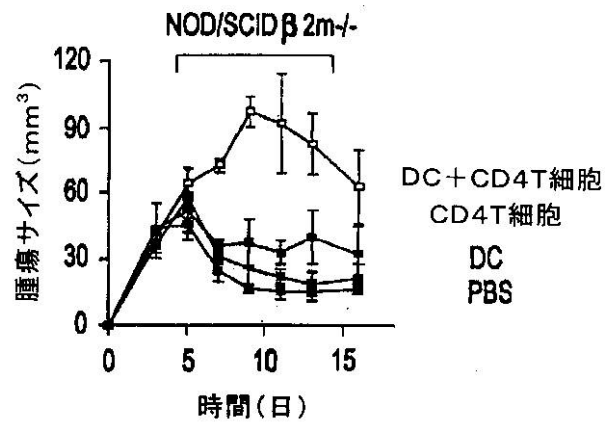


図 6B

【図 7】

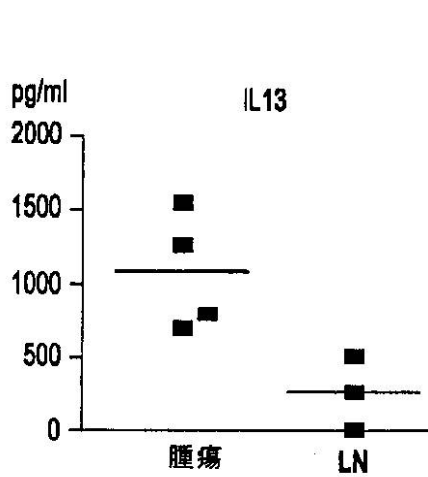


図 7A

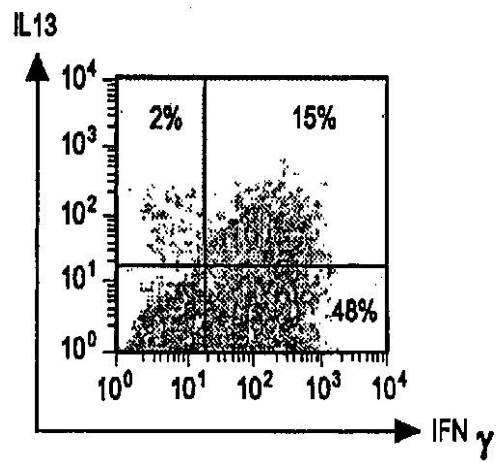


図 7B

【 図 8 】

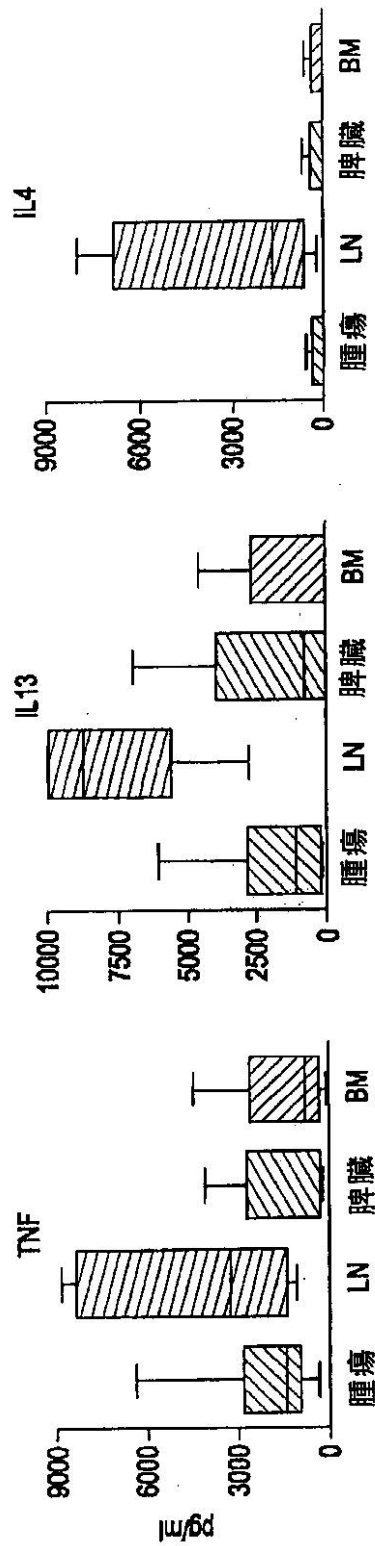


図 8A

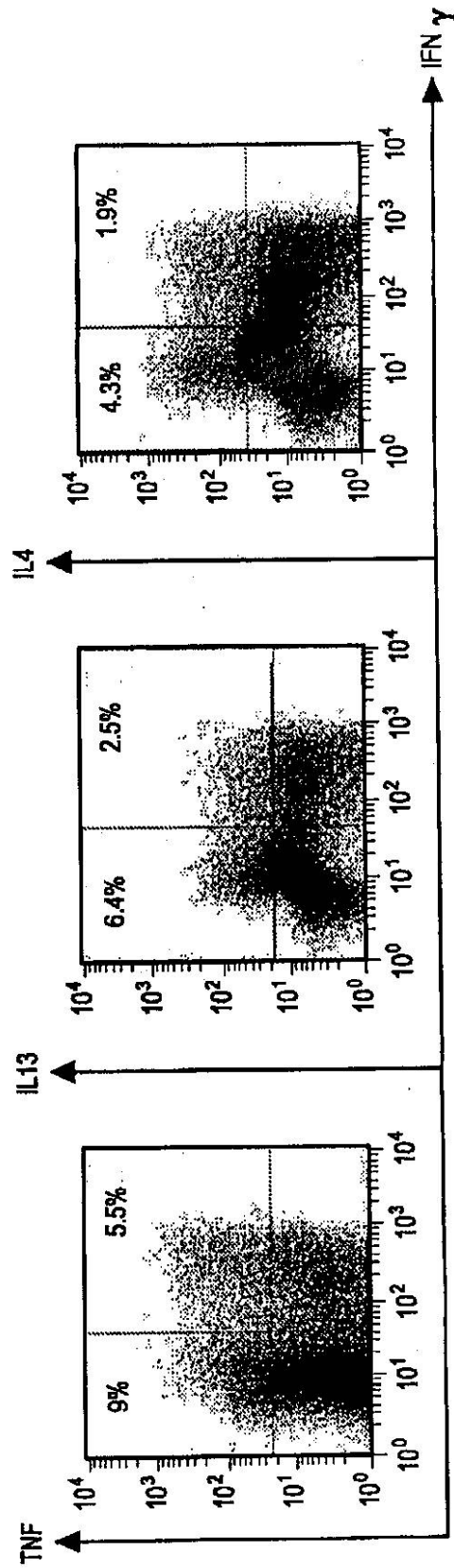


図 8B

【 図 9 】

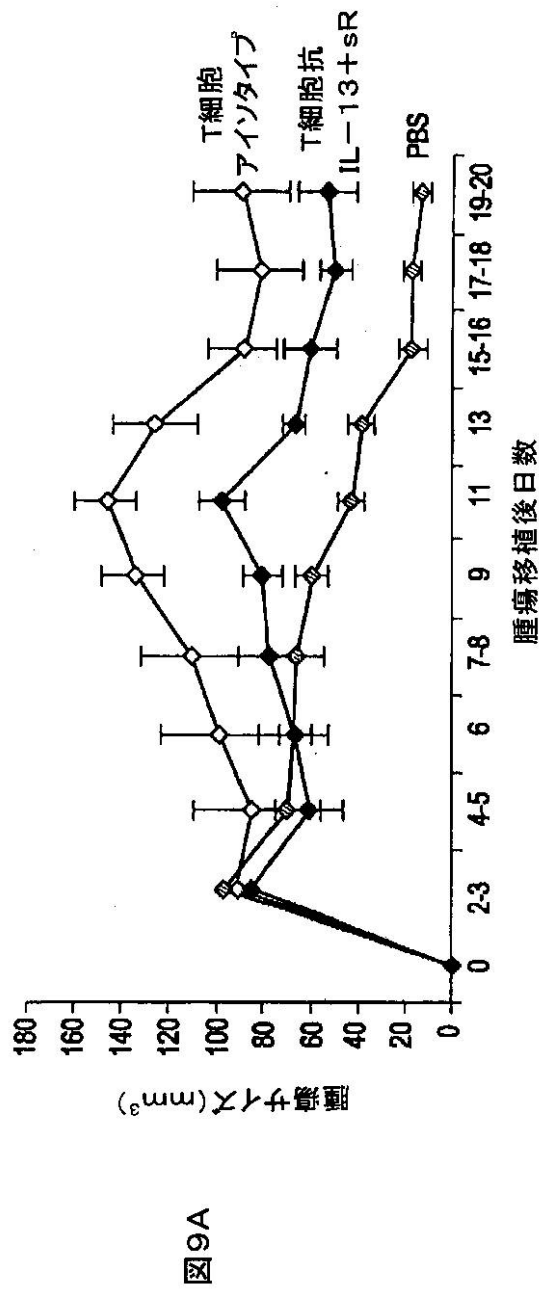
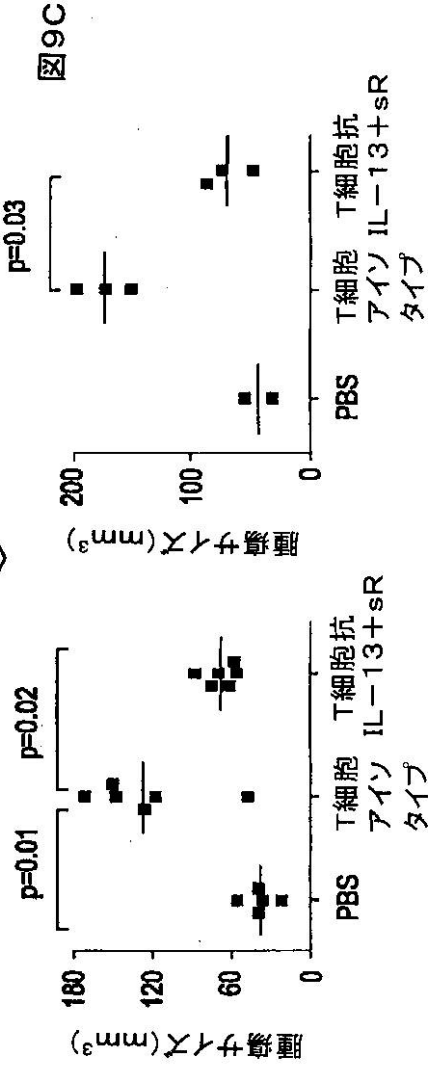


図9B



【図 10】

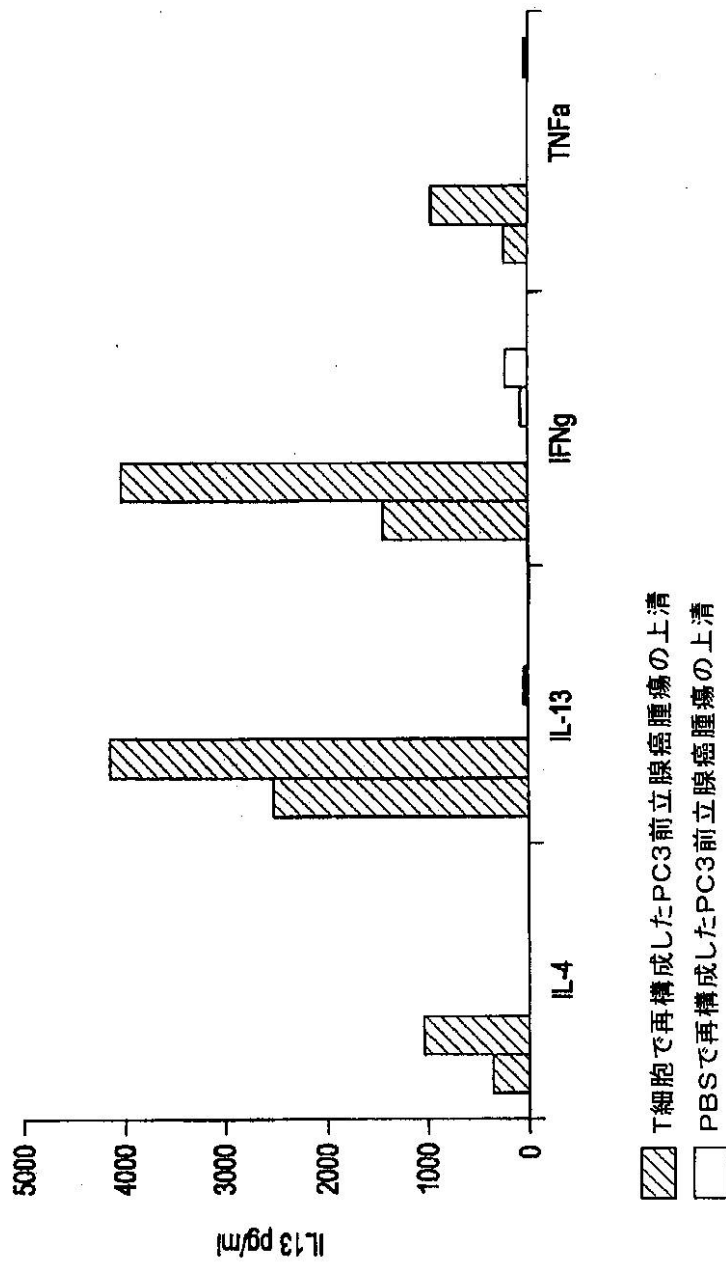
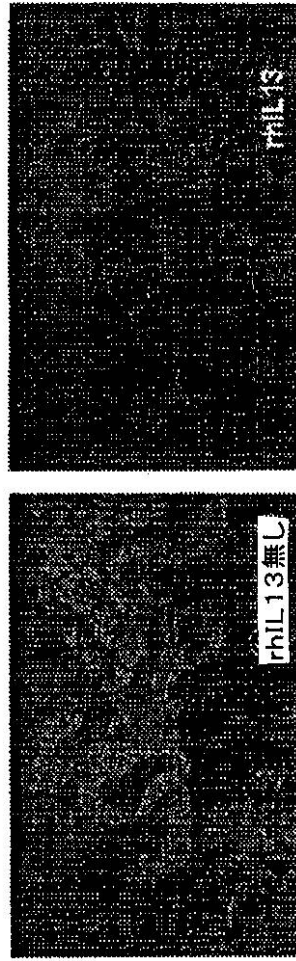


図10

【図 11】



図11A



IL-13-PE DNA 青色

図11B

【図 12】

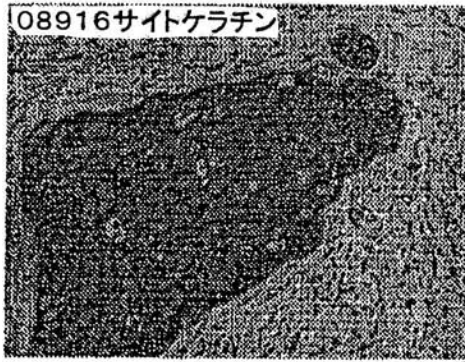


図12A

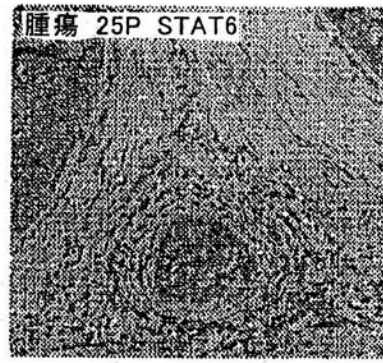


図12D



図12B



図12E



図12C

【図 13 a】

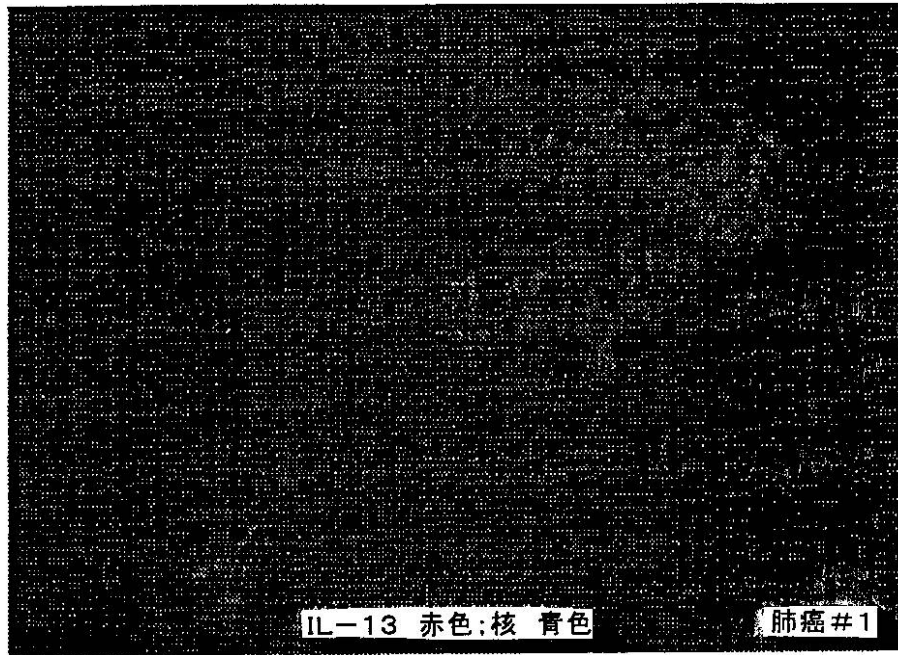


図 13A

【図 13 b】



図 13B

【図 1 3 c】



図13C

【図 1 3 d】



図13D

【手続補正書】

【提出日】平成21年10月8日(2009.10.8)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

患者から除去した生体試料の組織微小環境中に存在する I L - 1 3 のレベルを決定するステップと、

前記組織微小環境中の I L - 1 3 レベルと、前記生体試料と同じ種類の正常な非癌組織中に存在することが知られている I L - 1 3 のレベルとを比較するステップと、

I L - 1 3 のレベルの上昇が癌の存在を示す、I L - 1 3 レベルを評価するステップとを含む、由来の生体試料のインビトロでの分析方法。

【請求項 2】

I L - 1 3 のレベルが、ウェスタンブロット分析、免疫沈降、E L I S A 分析、インサイチュ蛍光、インサイチュ蛍光共鳴エネルギー移動、インサイチュ免疫沈降、及びインサイチュ免疫組織染色からなる群から選択される技術によって決定される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

組織微小環境中の I L - 1 3 のレベルが S T A T 6 のリン酸化レベルを測定することにより決定される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

生体試料が極低温凍結されている、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

I L - 1 3 発現のレベルが経時的に追跡される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

I L - 1 3 のレベルが I L - 1 3 m R N A へのハイブリダイゼーション及び定量的 R T - P C R により検出される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

生体試料が上皮由来である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

生体試料が、乳房、前立腺、肺、大腸、卵巣、子宮内膜、腎臓、膀胱、胃、膵臓及び下垂体分泌腺から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

上皮由来の癌の治療に使用される、I L - 1 3 から作製される薬剤であって、組織微小環境中の細胞間 I L - 1 3 情報伝達を遮断するために十分な量の 1 又は複数の I L - 1 3 アンタゴニストを含む、

前記細胞間 I L - 1 3 情報伝達を遮断するために十分な量が、生体試料中のインビトロでの I L - 1 3 のレベルと、前記生体試料と同じ種類の正常な非癌組織中に存在することが知られている I L - 1 3 のレベルとを比較することによって決定されることを含む薬剤。

【請求項 10】

1 又は複数の I L - 1 3 アンタゴニストが、乳癌細胞の微小環境中の I L - 1 3 を標的とする、抗 I L - 1 3 抗体、ヒト抗 I L - 1 3 抗体、ヒト化抗 I L - 1 3 抗体、二価抗 I L - 1 3 抗体、二価ヒト化抗 I L - 1 3 抗体、抗 I L - 1 3 モノクローナル抗体、F a b、F a b'、F (a b')₂、F v、ジスルフィド安定化 F v 及び一本鎖 F v 断片並びにこれらの組み合わせからなる群から選択される抗 I L - 1 3 抗原結合断片、抗 I L - 1 3 結合融合タンパク質、多価抗 I L - 1 3 抗体及び抗 I L - 1 3 キメラ抗体、ポリクローナル抗 I L - 1 3 抗体のうちの少なくとも 1 つを含む、請求項 9 に記載の薬剤。

【請求項 11】

1 又は複数の I L - 1 3 アンタゴニストが同族受容体に結合する I L - 1 3 の二価アンタゴニストを含む、I L - 1 3 アンタゴニストが乳癌細胞の微小環境中で結合する I L - 1 3 - I L - 1 3 受容体を標的とする、請求項 9 に記載の薬剤。

【請求項 12】

1 又は複数の I L - 1 3 アンタゴニストが癌を標的とする、請求項 9 に記載の薬剤。

【請求項 13】

1 又は複数の腫瘍特異的免疫細胞をさらに含む、請求項 9 に記載の薬剤。

【請求項 14】

樹状細胞を含む腫瘍内ワクチン接種をさらに含む、請求項 9 に記載の薬剤。

【請求項 15】

抗原負荷樹状細胞を含むワクチンをさらに含む、請求項 9 に記載の薬剤。

【請求項 16】

IL - 13 アンタゴニストが、抗 IL - 13 サイトカイン受容体遮断薬、抗 IL - 13 受容体中和抗体、抗 IL - 13 受容体アンタゴニスト、可溶性 IL - 13 受容体、抗 IL - 13 受容体 - IL - 13 結合を阻害する 1 又は複数の分子、IL - 13 の下流の事象の 1 又は複数の阻害剤、不活性化 IL - 13 及びこれらの組み合わせのうちの少なくとも 1 つを含む、請求項 9 に記載の薬剤。

【請求項 17】

生体試料の分析のためのインビトロでの方法であって、
乳癌を有する疑いのある前記患者から採取した生体試料の組織微小環境中に存在する IL - 13 のレベルを決定するステップと、
前記組織微小環境中の IL - 13 レベルと正常な非腫瘍乳房組織中に存在することが知られている IL - 13 のレベルとを比較するステップであって、IL - 13 のレベルの上昇が乳癌の存在を示すステップと
を含む方法。

【請求項 18】

IL - 13 のレベルが、ウェスタンブロット分析、免疫沈降、ELISA 分析、インサイチュ蛍光、インサイチュ蛍光共鳴エネルギー移動、インサイチュ免疫沈降、及びインサイチュ免疫組織染色からなる群から選択される方法によって決定される、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

IL - 13 のレベルが、STAT6 のリン酸化レベルを測定することにより決定される、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 20】

生体試料が極低温凍結されている、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 21】

IL - 13 発現のレベルが経時的に追跡される、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 22】

IL - 13 のレベルが IL - 13 mRNA へのハイブリダイゼーションにより検出される、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 23】

IL - 13 発現のレベルが定量的 RT - PCR を使用して決定される、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 24】

包装された組み合わせ中に、
乳房組織微小環境中の IL - 13 の発現レベルを検出可能な量の IL - 13 特異的プローブ、及び
前記 IL - 13 プローブの使用に関する使用説明書
を含み、前記プローブが直接的又は間接的に検出可能である、乳房試料中の IL - 13 を検出するための検査キット。

【請求項 25】

乳癌の治療に使用される、IL - 13 から作製される薬剤であって、
組織微小環境中の細胞間 IL - 13 情報伝達を遮断するために十分な量の 1 又は複数の IL - 13 アンタゴニストを含み、
前記細胞間 IL - 13 情報伝達を遮断するために十分な量が、生体試料中のインビトロでの IL - 13 のレベルと、前記生体試料と同じ種類の正常な非癌乳房組織中に存在することが知られている IL - 13 のレベルとを比較することによって決定されることを含む薬剤

剤。

【請求項 26】

前立腺癌の治療に使用される、IL-13 から作製される薬剤であって、
組織微小環境中の細胞間 IL-13 情報伝達を遮断するために十分な量の 1 又は複数の IL-13 アンタゴニストを含み、
前記細胞間 IL-13 情報伝達を遮断するために十分な量が、生体試料中のインビトロでの IL-13 のレベルと、前記生体試料と同じ種類の正常な非癌前立腺組織中に存在することが知られている IL-13 のレベルとを比較することによって決定されることを含む薬剤。

【請求項 27】

非小細胞癌の治療に使用される IL-13 から作製される薬剤であって、
組織微小環境中の細胞間 IL-13 情報伝達を遮断するために十分な量の 1 又は複数の IL-13 アンタゴニストを含み、
細胞間 IL-13 情報伝達を遮断するために十分な量は、生体試料中のインビトロでの IL-13 のレベルと、前記生体試料と同じ種類の正常な非癌肺組織中に存在することが知られている IL-13 のレベルを比較することによって決定されることを含む薬剤。

【請求項 28】

血管新生を抑制するために十分な有効量の 1 又は複数の IL-13 アンタゴニストを含む、血管新生を阻害する治療に使用される、IL-13 から作製される薬剤。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US08/56726

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: CO7K 16/24,21/04;C12P 21/06(2006.01);C12N 5/06(2006.01) USPC: 435/69.1,335,320.1;530/388.23;536/23.53 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) U.S.: 435/69.1, 335, 320.1; 530/388.23; 536/23.53 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		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHAVEY, C. et al. Oestrogen receptor negative breast cancers exhibit high cytokine content. Breast Cancer Research. Vol. 9, No. 1, pages 1-11.	1, 2, 7, 8, 17, 18 and 24
X	RIPLEY, D. et al. Differential expression of interleukins IL-13 and IL-15 in normal ovarian tissue and ovarian carcinomas. 2004, Vol 92, pages 761-768, see entire document.	1, 2, 4 and 6-8
X	US 2006/0063228 A1 (KASALIAN et al) 23 March 2006 (23.03.2006), page 1, section 0005; page 2, section 0011 and 0012; page 8, sections 0050 and 0051; page 9, section 0065; page 22, section 0175; page 26, sections 0209-0211; and page 27, sections 0220-0222.	1-3, 7-13, 16-19 and 22-28
Y		4-6, 14, 15, 20 and 21
☐ 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	"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
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 07 June 2008 (07.06.2008)		Date of mailing of the international search report 26 AUG 2008
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201		Authorized officer Alana M. Harris, Ph.D. Telephone No. 571-272-1600

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2007)

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)		A 6 1 K 39/00		H
G 0 1 N 33/68 (2006.01)		C 1 2 Q 1/68		A
G 0 1 N 33/574 (2006.01)		G 0 1 N 33/68		
		G 0 1 N 33/53		M
		G 0 1 N 33/574		A

(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, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, 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, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 バンチェレイア ジャック エフ.

アメリカ国 ティーエックス 7 5 2 3 0 ダラス ノーヘイブン 6 7 3 0

F ターム(参考) 2G045 AA26 DA36 FB02 FB03

4B063 QA18 QQ08 QQ53 QR07 QR08 QR32 QR56 QR62 QS25 QS34
QX02

4C084 AA17 AA19 MA02 NA14 ZB261 ZC411

4C085 AA03 AA13 AA14 AA16 BB01 CC03 EE01

专利名称(译)	用于治疗癌症的组合物和方法		
公开(公告)号	JP2010521675A	公开(公告)日	2010-06-24
申请号	JP2009553753	申请日	2008-03-12
[标]申请(专利权)人(译)	贝勒研究协会		
申请(专利权)人(译)	贝勒研究所		
[标]发明人	パルッカアンナカロリーナ バンチェレイアジャックエフ		
发明人	パルッカ アンナ カロリーナ バンチェレイア ジャック エフ.		
IPC分类号	G01N33/53 A61K45/00 A61P35/00 A61K39/395 A61K39/00 C12Q1/68 G01N33/68 G01N33/574		
CPC分类号	A01K67/0271 A01K2227/105 A01K2267/0331		
FI分类号	G01N33/53.P A61K45/00 A61P35/00 A61K39/395.T A61K39/395.E A61K39/00.H C12Q1/68.A G01N33/68 G01N33/53.M G01N33/574.A		
F-TERM分类号	2G045/AA26 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ53 4B063/QR07 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02 4C084/AA17 4C084/AA19 4C084/MA02 4C084/NA14 4C084/ZB261 4C084/ZC411 4C085/AA03 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/BB01 4C085/CC03 4C085/EE01		
优先权	11/687641 2007-03-17 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明包括通过检测组织微环境中癌细胞中IL-13表达水平作为控制针对癌症的免疫应答类型的指示剂来治疗，诊断和预测癌症的组合物和方法。

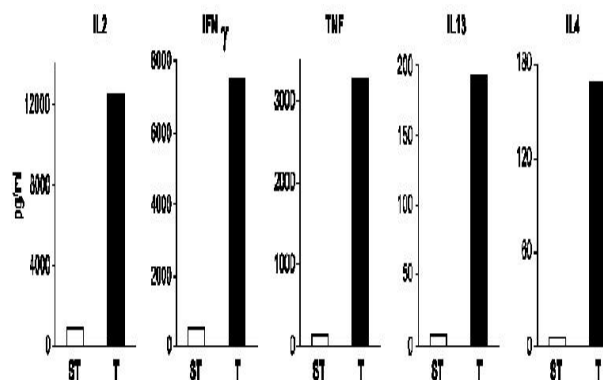


FIG. 1A