

(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2017-522902

(P2017-522902A)

(43) 公表日 平成29年8月17日(2017.8.17)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 1/00 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/00 F	2 G 0 4 5
<b>G 0 1 N 33/68 (2006.01)</b>	G 0 1 N 33/68	4 B 0 6 5
C 1 2 N 5/078 (2010.01)	C 1 2 N 1/00 B	
	C 1 2 N 5/078	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 21 頁)

(21) 出願番号	特願2017-517405 (P2017-517405)	(71) 出願人	516373694
(86) (22) 出願日	平成27年6月10日 (2015.6.10)		ポリバイオセプト アーバー
(85) 翻訳文提出日	平成29年2月9日 (2017.2.9)		スウェーデン国 エスー 1 1 2 3 4 スト
(86) 国際出願番号	PCT/EP2015/062992		ックホルム サンクト エリクスガータン
(87) 国際公開番号	W02015/189301		4 3 エー
(87) 国際公開日	平成27年12月17日 (2015.12.17)	(74) 代理人	100079049
(31) 優先権主張番号	102014211052.1		弁理士 中島 淳
(32) 優先日	平成26年6月10日 (2014.6.10)	(74) 代理人	100084995
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		弁理士 加藤 和詳
		(72) 発明者	ガイヤー、 ヤーコブ
			ドイツ連邦共和国 2 7 7 1 1 オスター
			ホルツ-シャルムベック プレーマーシュ
			トラーセ 6

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞免疫療法用培養培地

## (57) 【要約】

本発明は、a) 第1のドナーに由来する第1の血液製剤を少なくとも提供する工程、b) 前記第1の血液製剤中の少なくとも1つの品質因子の濃度を測定する工程、c) 測定された品質因子の濃度を、前記品質因子について予め定められた濃度範囲と比較する工程、d) 前記品質因子について測定された濃度が前記予め定められた範囲内にある場合には、前記細胞培養培地用に前記第1の血液製剤を選択し、ここでさらに前記第1の選択された血液製剤を第1の加工血液製剤に変換してもよく、前記場合以外の場合には、前記第1の血液製剤を選択しない工程、を含む、2以上のドナーに由来する血液製剤の混合物を含む細胞培養培地を作製する方法を提供する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

- a) 第 1 のドナーに由来する第 1 の血液製剤を少なくとも提供する工程、
  - b) 前記第 1 の血液製剤中の少なくとも 1 つの品質因子の濃度を測定する工程、
  - c) 測定された品質因子の濃度を、前記品質因子について予め定められた濃度範囲と比較する工程、
  - d) 前記品質因子について測定された濃度が前記予め定められた範囲内にある場合には、細胞培養培地用に前記第 1 の血液製剤を選択し、ここでさらに前記第 1 の選択された血液製剤を第 1 の加工血液製剤に変換してもよく、前記場合以外の場合には、前記第 1 の血液製剤を選択しない工程を含む、
- 2 以上のドナーに由来する血液製剤の混合物を含む細胞培養培地を作製する方法。

10

## 【請求項 2】

異なるドナーに由来する、2 つ以上の血液製剤を用いて前記工程 a) ~ d) が行われ、前記選択された血液製剤又は加工血液製剤を組み合わせることで培養培地を形成する、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

- a) 2 以上のドナーに由来する血液製剤の第 1 の混合物を少なくとも提供する工程、
  - b) 前記第 1 の混合物中の少なくとも 1 つの品質因子の濃度を測定する工程、
  - c) 測定された品質因子の濃度を、前記品質因子について予め定められた濃度範囲と比較する工程、
  - d) 前記品質因子に対して測定された前記濃度が前記予め定められた範囲内にある場合には、細胞培養培地用に前記第 1 の混合物を選択し、前記場合以外の場合には、前記第 1 の混合物を選択しない工程を含む、
- 2 以上のドナーに由来する混合血液製剤を含む細胞培養培地を作製する方法。

20

## 【請求項 4】

前記血液製剤が全血、血漿、血清、及びそれらのサブセットから選択される、請求項 1 ~ 請求項 3 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 5】

前記少なくとも 1 つの品質因子が、サイトカインから、又はエストラジオール、コルチゾール、性ホルモン結合グロブリン (SHBG)、インスリン、及びインスリン様増殖因子 1 (IGF - 1) からなる群から選択される、請求項 1 ~ 請求項 4 のいずれか一項に記載の方法。

30

## 【請求項 6】

前記サイトカインが、インターロイキン 6 (IL - 6)、インターフェロン - (IFN)、インターロイキン 1 受容体アゴニスト (IL - 1RA)、インターロイキン 5 (IL - 5)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM - CSF)、腫瘍壊死因子 (TNF)、CCCL5 (RANTES)、インターロイキン 2 (IL - 2)、インターロイキン 1b (IL - 1b)、エオタキシン、塩基性 FGF、上皮増殖因子 (EGF)、血小板由来増殖因子 (PDGF - 88)、C - X - C モチーフケモカイン 10 (CXCL - 10) 100 pg / ml、インターロイキン 13 (IL - 13)、インターロイキン 4 (IL - 4)、MCP 1、インターロイキン 8 (IL - 8)、MIP 1a、インターロイキン 10、顆粒球コロニー刺激因子 (GCSF)、インターロイキン 15 (IL - 15)、インターロイキン 7 (IL - 7)、インターロイキン 12 p 70 (IL 12 p 70)、インターロイキン 17 a (IL - 17 a)、インターロイキン 9 (IL - 9)、及びインターロイキン 21 (IL - 21) からなる群から選択される、請求項 5 に記載の方法。

40

## 【請求項 7】

前記品質因子が SHBG、IGF - 1、CCCL5 及び IL - 6 からなる群から選択される、請求項 6 に記載の方法。

50

## 【請求項 8】

2 以上の品質因子を検査する、請求項 1～請求項 7 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 9】

前記品質因子が、CCCL5、エオタキシン、PDGF-88、CXCL-10、IL-10、IL-13、IL-1b、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL12p70、IL-15、IL-17a、IL-21、塩基性FGF、EGF、IFN、GCSF、GM-CSF、MCP1、MIP1a、MIP1b、PDGF、IL-1RA、TNF、エストラジオール、コルチゾール、IGF-1、及びSHBGから選択される、請求項 8 に記載の方法。

## 【請求項 10】

10

4 つの品質因子を試験し、前記品質因子がSHBG、IGF-1、CCCL5、及びIL-6である、請求項 1～請求項 9 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 11】

前記予め定められた濃度範囲が、前記血液製剤の体積基準で

CCCL5について3 ng/ml未満、

エオタキシンについて500 pg/ml未満、

PDGF-88及びCXCL-10について100 pg/ml未満、

IL-10について200 pg/ml未満、

IL-13について50 pg/ml未満、

20

IL-1b、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL12p70、IL-15、IL-17a、IL-21、塩基性FGF、EGF、IFN、GCSF、GM-CSF、MCP1、MIP1a、MIP1b、PDGF、IL-1RA、及びTNFについて20 pg/ml未満、

エストラジオールについて少なくとも65 pmol/l、好ましくは少なくとも75 pmol/l、より好ましくは少なくとも85 pmol/l、

コルチゾールについて少なくとも190 nmol/l、好ましくは少なくとも210 nmol/l、より好ましくは少なくとも220 nmol/l、

IGF-1について少なくとも100 µg/l、好ましくは少なくとも130 µg/l、より好ましくは少なくとも140 µg/l、

30

SHBGについて31 nmol/l未満、好ましくは29 nmol/l未満

である、請求項 5～請求項 9 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 12】

a) 前記ドナーに由来する血液製剤を提供すること、

b) 第 1 のドナーの血液製剤中の少なくとも 1 つの品質因子の濃度を測定すること、

c) 測定された品質因子の濃度を、前記品質因子について予め定められた濃度範囲と比較すること、

d) 血漿プールにおける濃度値、前記品質因子について測定された濃度が予め定められた範囲内にある場合は、血漿又は血清の提供に対して前記ドナーを選択し、前記場合以外の場合には、前記第 1 のドナーを選択しないこと、

を含むドナーの選択を含む、

40

請求項 1～請求項 11 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 13】

細胞培養培地の体積基準で

3 ng/ml未満の濃度のCCCL5、

500 pg/ml未満の濃度のエオタキシン、

100 pg/ml未満の濃度のPDGF-88及び/又はCXCL-10、

200 pg/ml未満の濃度のIL-10、

50 pg/ml未満の濃度のIL-13、

20 pg/ml未満の濃度のIL-1b、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、

50

IL-7、IL-8、IL-9、IL12p70、IL-15、IL-17a、IL-2

1、塩基性 FGF、EGF、IFN、GCSF、GM-CSF、MCP1、MIP1a、MIP1b、PDGF、IL-1RA、及び/又は TNF、

少なくとも 65 pmol/l、好ましくは少なくとも 75 pmol/l、より好ましくは少なくとも 85 pmol/l の濃度のエストラジオール、

少なくとも 190 nmol/l、好ましくは少なくとも 210 nmol/l、より好ましくは少なくとも 220 nmol/l の濃度のコルチゾール、

少なくとも 100 µg/l、好ましくは少なくとも 130 µg/l、より好ましくは少なくとも 140 µg/l の濃度の IGF-1、及び/又は

31 nmol/l 未満、好ましくは 29 nmol/l 未満の濃度の SHBG、を含む、細胞培養培地。

10

【請求項 14】

少なくとも 1 つの血液製剤、特に血漿及び/又は血清、を含む、請求項 13 に記載の細胞培養培地。

【請求項 15】

2 以上のドナーに由来する血清を含む、請求項 14 に記載の細胞培養培地。

【請求項 16】

前記細胞培養培地が合成培地である、請求項 13 に記載の細胞培養培地。

【請求項 17】

60.080.0 g/l の濃度のタンパク質、

4.5 mmol/l ~ 5.5 mmol/l の濃度のグルコース、

15 mmol/l ~ 30 mmol/l の濃度の非タンパク質窒素、

3.5 mmol/l ~ 7.0 mmol/l の濃度の尿素窒素、

3.0 mmol/l ~ 5.0 mmol/l の濃度のアミノ酸窒素、

70.0 µmol/l ~ 140.0 µmol/l の濃度のクレアチニン、

25.0 µmol/l ~ 70.0 µmol/l の濃度のクレアチン、

3.0 µmol/l ~ 5.0 µmol/l の濃度の尿素、

4.5 g/l ~ 8.5 g/l の濃度の総脂質、

0.6 mmol/l ~ 2.4 mmol/l の濃度のトリグリセリド、

4.0 mmol/l ~ 6.5 mmol/l の濃度のコレステリン、

0.3 mmol/l ~ 0.4 mmol/l の濃度の脂質、

0.7 mmol/l ~ 0.8 mmol/l の濃度のエステル化成分、

2.0 mmol/l ~ 3.0 mmol/l の濃度のリン脂質、

0.3 mmol/l ~ 0.9 mmol/l の濃度の脂肪酸、

4.0 mmol/l ~ 6.0 mmol/l の濃度の有機酸、

0.1 mmol/l ~ 0.2 mmol/l の濃度のピルビン酸塩、

0.1 mmol/l ~ 0.2 mmol/l の濃度のクエン酸塩、及び/又は

0.3 mmol/l ~ 0.5 mmol/l の濃度のケトン

を更に含む、請求項 13 ~ 請求項 16 のいずれか一項に記載の細胞培養培地。

20

30

【請求項 18】

29 nmol/l 未満の濃度の SHBG、

100 µg/l 以上の濃度の IGF-1、

20 pg/ml 未満の濃度の IL-6、及び

3 ng/ml 未満の濃度の CCL5

のいずれか 1 つを含む、請求項 13 ~ 請求項 17 のいずれか一項に記載の細胞培養培地。

40

【請求項 19】

29 nmol/l 未満の濃度の SHBG、

100 µg/l 以上の濃度の IGF-1、

20 pg/ml 未満の濃度の IL-6、及び

3 ng/ml 未満の濃度の CCL5 を含む、

50

請求項 13 ~ 請求項 19 のいずれか一項に記載の細胞培養培地。

【請求項 20】

更に P B S を含む、請求項 13 ~ 請求項 19 のいずれか一項に記載の細胞培養培地。

【請求項 21】

細胞を培養するための請求項 13 ~ 請求項 20 のいずれか一項に記載の細胞培養培地の使用。

【請求項 22】

前記細胞がリンパ球、特に患者に由来するリンパ球、である、請求項 21 に記載の使用。

【請求項 23】

前記リンパ球を前記細胞培養培地中で成長させ、増加させ、及び / 又は増殖させる、請求項 22 に記載の使用。

【請求項 24】

前記リンパ球が、少なくとも 1 つの抗原、I L - 2、I L - 15、及び I L - 21 のサイトカインカクテルの存在下、前記細胞培地中で増殖される、請求項 23 に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、品質基準の高い細胞培養培地、特に免疫細胞の成長及び増殖のための細胞培養培地、及び作製方法に関する。

【背景技術】

【0002】

活性細胞免疫療法と呼ばれる新たな治療クラスは、がんの治療に対して最も有望な前進の 1 つである。活性免疫療法は、身体自身の免疫細胞を使用して抗原特異的抗腫瘍効果を促進する目的で患者の免疫系を賦活する。このため、免疫細胞を *i n - v i t r o* で培養して細胞数を増加し、分化を誘導する。

【0003】

*i n - v i t r o* での細胞培養では、制御された温度、細胞付着のための基体、及び適切な成長培地、並びに正しい pH 及び浸透圧を保持するインキュベーター等の幾つかの基本的な環境要求を満たさなければならない。

【0004】

細胞培養培地製剤は文献において十分に説明され、多数の培地が商業的に入手可能である。細胞培養培地は、一般的には、適切なエネルギー源、及び細胞周期を調節する化合物を含む。典型的な培養培地は、アミノ酸、ビタミン、無機塩、グルコース、並びに増殖因子、ホルモン、及び付着因子の供給源としての血清である補足物で構成される。栄養素に加えて、培地は pH 及び浸透圧の保持も補助する。

【0005】

細胞培養培地製剤は文献において十分に説明され、多数の培地が商業的に入手可能である。免疫細胞、特にリンパ球の培養及び増殖 ( *expansion* ) の場合、典型的には細胞培養培地は、免疫細胞に対して身体の自然環境に類似した環境を提供することから、血清又は血漿に由来する。

【0006】

しかしながら、現状の培養培地中で増殖されるリンパ球の増殖速度及び活性は、まだ十分ではない。さらに、リンパ球増殖結果の量、質及び生存能力に関する予測できる結果は、今のところまれであり、必要とされる品質を識別するために幾つかのバッチの血清を検査する必要があることが通常である。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

したがって、本発明の目的は、従来技術の少なくとも 1 つの不利益を克服することであ

10

20

30

40

50

る。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明は、特に、使用される細胞培養培地の品質が、細胞免疫療法でのリンパ球の増殖プロセスの結果に対して大きな影響を有するという知見に基づく。特に、本発明者らは、リンパ球の増殖に関して細胞培養培地の品質を決定する多様な品質因子を規定した。本発明者らは、エストラジオール、コルチゾール、IGF-1、インスリン、及びSHBG等の品質因子が特定の既定濃度で存在しなければならないことを決定することができた。個々の品質因子に対して決定された基準を満たす細胞培養培地は、哺乳動物細胞、特に免疫系の細胞の培養結果を改善する。

10

【0009】

したがって、本発明は、

- a) 少なくとも第1のドナーに由来する第1の血液製剤 (blood product) を提供する工程、
  - b) 前記第1の血液製剤中の少なくとも1つの品質因子の濃度を測定する工程、
  - c) 測定された品質因子の濃度を、前記品質因子について予め定められた濃度範囲と比較する工程、
  - d) 前記品質因子について測定された濃度が前記予め定められた範囲内にある場合には、細胞培養培地用に前記第1の血液製剤を選択し、ここでさらに前記第1の選択された血液製剤を第1の加工血液製剤に変換してもよく、前記予め定められた範囲内にない場合は、前記第1の血液製剤を選択しない工程、
- を含む、2以上のドナーに由来する血液製剤の混合物を含む細胞培養培地を作製する方法を提供する。

20

本発明は、細胞培養培地の体積に基づいて、

- 3 ng / ml 未満の濃度のCCCL5、
  - 500 pg / ml 未満の濃度のエオタキシン、
  - 100 pg / ml 未満の濃度のPDGF-88及び/又はCXCL-10、
  - 200 pg / ml 未満の濃度のIL-10、
  - 50 pg / ml 未満の濃度のIL-13、
  - 20 pg / ml 未満の濃度のIL-1b、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL12p70、IL-15、IL-17a、IL-21、塩基性FGF、EGF、IFN、GCSF、GM-CSF、MCP1、MIP1a、MIP1b、PDGF、IL-1RA、及び/又はTNF、
  - 少なくとも65 pmol / l、好ましくは少なくとも75 pmol / l、より好ましくは少なくとも85 pmol / lの濃度のエストラジオール、
  - 少なくとも190 nmol / l、好ましくは210 nmol / l、より好ましくは220 nmol / lの濃度のコルチゾール、
  - 少なくとも80 µg / l、好ましくは少なくとも120 µg / l、より好ましくは少なくとも140 µg / lの濃度のIGF-1、及び/又は
  - 31 nmol / l 未満、好ましくは29 nmol / l 未満の濃度のSHBG
- を含む細胞培養培地を更に含む。

30

40

最後に、本発明は細胞を培養するための細胞培養培地の使用を提供する。

【発明を実施するための形態】

【0010】

本発明者らは、細胞培養免疫療法に対しては、細胞培養培地に関してより一層高い品質基準を満たさなければならないことを見出した。実施例に示されるように、各品質因子における差異は、リンパ球懸濁物の結果において著しい変化をもたらす。特に、品質因子が予め定められた範囲にある培地により、免疫細胞の成長、増加 (proliferation) 又は増殖 (expansion) は細胞の増殖速度、生存率及び活性の増加をもたらす。これらの品質因子の識別により、特に免疫療法用の細胞集団のための改善された細胞培養培地の作製方法

50

が特定できる。

【 0 0 1 1 】

したがって、本発明は、

- a) 第 1 のドナーに由来する第 1 の血液製剤を少なくとも提供する工程、
  - b) 前記第 1 の血液製剤中の少なくとも 1 つの品質因子の濃度を測定する工程、
  - c) 測定された品質因子の濃度を、前記品質因子について予め定められた濃度範囲と比較する工程、
  - d) 前記品質因子について測定された濃度が前記予め定められた範囲内にある場合には、細胞培養培地用に前記第 1 の血液製剤を選択し、ここでさらに前記第 1 の選択された血液製剤を第 1 の加工血液製剤に変換してもよく、前記場合以外の場合には、前記第 1 の血液製剤を選択しない工程、
- を含む、2 以上のドナーに由来する血液製剤の混合物を含む細胞培養培地を作製する方法を提供する。

10

【 0 0 1 2 】

本発明による方法は、リンパ球増殖のための因子と組み合わせて、細胞を強力に増加させ且つ増殖されたリンパ球の活性を高める、高品質な細胞培養培地を提供する。さらに、上記方法は、T 細胞等のリンパ球の *in vitro* 増殖を促進する、品質が常に一定である細胞培養培地の提供を保証する。

【 0 0 1 3 】

本明細書における「細胞培養培地」又は「成長培地」は、動物又は植物の細胞の成長を支持するように設計された液体又はゲルである。成長培地の、pH、グルコース濃度、増殖因子及び他の栄養素の存在は変化し得る。細胞培養培地には 2 つのクラス、すなわち、血液製剤系培地及び合成培地がある。

20

【 0 0 1 4 】

本発明によれば、「血液製剤系培地」は少なくとも 1 つの血液製剤を含有する。

【 0 0 1 5 】

本明細書における「合成培地」は、化学的に明確な培地である。かかる培地は血液製剤等のいかなる天然由来のプロス (*broth*) も含まない。代わりに、全ての構成成分が規定の濃度で上記培地に添加されている。

【 0 0 1 6 】

本明細書における「血液製剤」は、哺乳動物の全血、又は全血のサブセット、特に血漿、血清又は更に血漿及び血清のサブセットを指す。

30

【 0 0 1 7 】

本明細書における「加工血液製剤」は、血漿、血清及びそれらのサブセットを含む。

【 0 0 1 8 】

本明細書における「血漿」は、哺乳動物の血液血漿を指す。血漿は、通常全血中に血液細胞を懸濁状態で保持する青白い (*pale white*)、時に黄色の血液の液体成分である。血漿は、大半は水であり、溶解したタンパク質、グルコース、凝血因子、電解質、ホルモン、及び二酸化炭素を含有する。血液血漿を、血液から、例えば抗凝固剤を含有する新鮮血の遠心分離によって調製することができ、ここで血液細胞は遠心分離管の底に落ちる。この際の上清が血液血漿である。

40

【 0 0 1 9 】

本明細書における「血清」は、凝固因子を含まない血液血漿である。

【 0 0 2 0 】

本明細書における「凝固因子」は、「凝血因子」とも呼ばれ、フィブリノゲン、プロトロンビン、又は第 V I I 因子等の様々なタンパク質を含む。

【 0 0 2 1 】

本明細書における「全血のサブセット」は、全血の一部の構成成分を含む全血に由来する溶液又は懸濁物を指す。血漿及び血清は全血のサブセットである。

【 0 0 2 2 】

50

本明細書における「ドナー」は、それらから血液製剤が得られる、哺乳動物、特にヒトを指す。提供物は、全血(WB)であってもよく、又はアフエレーシスによって回収される全血の特定の構成成分であってもよい。

【0023】

本明細書における「アフエレーシス」は、ドナーの血液を1つの特定の構成要素を分離して残りを循環系に戻す装置を通過させる、医療技術である。例えば、血漿アフエレーシスは、血液血漿のみの回収をもたらし、全ての他の成分をドナーに戻す。

【0024】

本明細書における、ドナーから「血液製剤を得ること」は、特に血液をドナーの静脈から直接採取することによって、ドナーから血液を回収する動作を指す。

【0025】

本明細書における「サイトカイン」は、細胞シグナル伝達において重要な幅広く大雑把なカテゴリーの小さなタンパク質(約5~20kDa)である。サイトカインは細胞によって放出され、他の細胞の行動に影響を与える。また、サイトカインは、自己分泌シグナル伝達に参与することができる。サイトカインとして、ケモカイン、インターフェロン、インターロイキン、リンホカイン、腫瘍壊死因子、及び増殖因子が挙げられる。

【0026】

また、「臨床的に有用なリンパ球」は、抗原編集された(antigen-edited)リンパ球を指す。臨床的に有用なという用語は、リンパ球の下位集団に対しても使用される。特に、好ましい臨床的に有用なリンパ球は、臨床的に有用なT細胞又は抗原編集されたT細胞である。

【0027】

本発明による「臨床的に有用な抗原」は、疾患に関連する抗原である。したがって、臨床的に有用な抗原は腫瘍関連抗原TAA、病原体関連抗原(PAA)、又は自己抗原であり得る。腫瘍反応性リンパ球はTAAに特異的であり、TAAと相互作用する。感染性疾患反応性リンパ球はPAAに特異的であり、PAAと相互作用し、自己免疫疾患反応性リンパ球は自己抗原に特異的であり、自己抗原と相互作用する。

【0028】

本発明によれば、「抗原」(Ag)は、それぞれ適応免疫応答の受容体、TCRまたは抗体の標的としての機能を果たす、あらゆる構造体である。抗原は、特に、タンパク質、多糖類、脂質、およびその部分構造(ペプチド等)である。脂質及び核酸は、タンパク質又は多糖と組み合わされた場合に、特に抗原性を示す。

【0029】

1人のドナー又は複数のドナーに由来する血液製剤の提供は、血液製剤を得るプロセスを含まない。

【0030】

本発明によれば、品質因子は、血液中に見られ得る任意の構成成分であってもよく、その濃度は免疫系の細胞及び幹細胞等の感受性の高い細胞株の成長及び特性に影響を及ぼす。

【0031】

免疫系の細胞として、B細胞、T細胞、NK細胞、単球、樹状細胞、顆粒球、及び血小板が挙げられるが、これらに限定されない。

【0032】

血液由来培地は、1人のドナーから別のドナーへ変わると含有物にばらつきがあるという不利益を有する。

【0033】

本明細書における「病原体関連因子」は、血液中の病原体の存在を識別する因子である。一般的に検査される病原体は、例えば、抗トリパノソーマ・クルージ、B型肝炎ウイルス(HBV)、C型肝炎ウイルス(HCV)、パルボウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス、E型肝炎ウイルス(HEV)、並びにヒト免疫不全ウイルス1型及び2型(HIV-1、

10

20

30

40

50



H I V - 2 ) である。病原体関連因子に対する検査は、感染した血液製剤の使用のリスクを最小化する。品質因子は病原体関連因子ではないことが好ましい。

【 0 0 3 4 】

ヒト血液ドナーは、ボランティアのドナー及びモニターされた職業的ドナーを含む。いずれのドナーも健康な個体でなくてはならない。さらに、ヒト血液ドナーは、年齢、体重、及び食餌等の特定の基準を満たさなければならない。モニターされた職業的血液ドナーが登録される。登録においては、ドナー及び提供される血液試料に関する様々なデータが記録される。

【 0 0 3 5 】

第 1 の血液製剤の提供は、特に、血液製剤の血液バッグキット、バッグ、容器 ( c o n t a i n e r ) 、容器 ( v e s s e l ) 、又はマルチウェルプレートへの移動を含む。ある一つの実施形態によれば、第 1 のドナーに由来する第 1 の血液製剤を血液バッグキットに移す。

【 0 0 3 6 】

ある一つの実施形態によれば、第 1 のドナーに由来する第 1 の血液製剤をマルチウェルプレートに移す。マルチウェルプレートは、特に、24 ウェルプレート、48 ウェルプレート、96 ウェルプレート、又は192 ウェルプレートである。マルチウェルプレートは多数のウェルを有するプレートである。ウェルの数は限定されない。

【 0 0 3 7 】

品質因子の濃度の測定について、様々な方法が当該技術分野で知られている。本発明のある実施形態によれば、品質因子は、比濁分析、計濁法、及び E L I S A から選択される方法によって測定される。比濁計は、液体又は気体コロイド中に懸濁された粒子の濃度を測定する計器である。

【 0 0 3 8 】

比濁分析 ( 及び計濁法 ) は、E u r o n o r m E N 2 7 0 2 7 ( G e r m a n D I N - N o r m t h e I S O N o r m 7 0 2 7 と同じ ) に規定される。比濁計は、光線及び光源の片側に設置された光検出器を用いることによって懸濁された粒子を測定する。比濁計では、血液製剤の試料に対して品質因子に特異的な抗体を添加する。その後、抗体と品質因子との相互作用は、光の片側散乱を引き起こす関与をもたらす。したがって、増加又は減少のいずれかを識別することができる。比濁法では、片側散乱光の増加を測定する。計濁法では前方散乱光の減少を測定する。比濁測定の結果は、ネフェロメ濁度単位 ( N T U ) として与えられ、品質因子の規定の濃度値との N T U 曲線による校正によって、品質因子の濃度値に関連付けられる。

【 0 0 3 9 】

酵素結合免疫吸着測定法 ( E L I S A ) は、抗原の存在及び品質を決定するための固相アッセイであり、特にサンドイッチ E L I S A を使用することができる。病原体関連因子の存在は、特に、P C R に基づく方法によって特定される。

【 0 0 4 0 】

品質因子の測定された濃度を品質因子の予め定められた濃度範囲と比較することは、特定の品質因子に対する測定から得られた読み出された情報を得て、その品質因子の値が予め定められた範囲の範囲内にあるかどうかを確認することを意味する。検査を検査装置又は検査装置に接続された装置によって自動で行ってもよい。または、測定を行う人によって手動で比較を行うことができる。

【 0 0 4 1 】

本発明による品質因子としてはサイトカイン又は幾つかのサイトカインが好ましい。品質因子是一群のサイトカインであってもよい。さらに、品質因子は全てのサイトカインであってもよい。実施例に示されるように、様々なサイトカインについて、その存在が規定の範囲外、すなわち特定の閾値を上回ると、免疫系の細胞又は幹細胞の成長及び / 又は増殖の能力に関して培地の品質が著しく減じることが特定された。特に、免疫療法用の品質で増殖されたリンパ球を得ることができない。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 4 2 】

したがって、ある一つの実施形態によれば、品質因子はサイトカインである。しかしながら、免疫系の細胞を成長、特に増殖させる能力に関して増殖培地の品質に強く影響を及ぼす他の構成成分が見いだされている。

## 【 0 0 4 3 】

興味深いことに、規定の範囲外の品質因子を含む培地、すなわち、選択されない培地でも、組換えタンパク質発現のための細胞の成長に有用な可能性がある。同定されている更なる品質因子は、エストラジオール、コルチゾール、性ホルモン結合グロブリン ( S H B G )、インスリン、及びインスリン様増殖因子 1 ( I G F - 1 ) である。

## 【 0 0 4 4 】

更なる品質因子は具体的には言及されない場合があるが、標準的な細胞株の成長に必ずしも影響を及ぼさなくても、リンパ球の成長及び増殖に関して培地の品質に影響を及ぼす可能性がある。本発明の一つの実施形態によれば、少なくとも 1 つの品質因子はエストラジオール、コルチゾール、S H B G、インスリン、及び I G F - 1 からなる群から選択される。

## 【 0 0 4 5 】

様々なサイトカインがあり、その存在が予め定められた範囲外であれば、その血液製剤は選択されない。1 つの品質因子は R A N T E S としても知られている、C C L 5 である。C C L 5 の予め定められた範囲は 5 n g / m l 未満、特に 3 n g / m l 未満である。

## 【 0 0 4 6 】

全ての濃度値は I S O 7 0 2 7 による比濁法によって定義される。したがって、上限は 5 n g / m l、特に 3 n g / m l であり、品質因子について定義される全ての濃度は血液製剤の体積 ( volume ) に基づく。

## 【 0 0 4 7 】

更なる品質因子はサイトカインであるエオタキシンである。エオタキシンの予め定められた範囲は、8 0 0 p g / m l 未満、特に 5 0 0 p g / m l である。別の品質因子は P D G F - 8 8 である。P D G F - 8 8 の予め定められた範囲は、1 5 0 p g / m l 未満、特に 1 0 0 p g / m l 又はである。更なる品質因子は C X C L - 1 0 である。C X C L - 1 0 の予め定められた範囲は、1 5 0 p g / m l 未満、特に 1 0 0 p g / m l 未満である。更なる品質因子はサイトカイン I L - 1 0 である。I L - 1 0 の予め定められた範囲は 2 0 0 p g / m l 未満である。別の品質因子はサイトカイン I L - 1 3 である。I L - 1 3 の予め定められた範囲は 8 0 p g / m l 未満、特に 5 0 p g / m l 未満である。更なる品質因子は I L - 1 b である。I L - 1 b の予め定められた範囲は 3 0 p g / m l 未満、特に 2 0 p g / m l 未満である。更なる品質因子は I L - 2 である。別の品質因子は I L - 4 である。I L - 5 は別の品質因子である。I L - 7 は別の品質因子である。また、I L - 8 は別の品質因子である。更なる品質因子は I L - 9 である。また、本発明によれば、I L - 1 2 p 7 0 は品質因子である。別の品質因子は I L - 1 5 である。本発明による一つの品質因子は I L - 1 7 a である。I L - 2 1 は別の品質因子である。更なる品質因子は塩基性 F G F である。上皮増殖因子 ( E G F ) は更なる品質因子である。別の品質因子はインターフェロンガンマ ( I F N ) である。顆粒球コロニー刺激因子 ( G C S F ) は本発明による別の品質因子である。顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 ( G M - C S F ) は本発明による更なる品質因子である。さらに、M C P 1 が品質因子として特定された。別の特定された品質因子は M I P 1 a である。また、M I P 1 b もそうである。更なる品質因子は P D G F である。さらに I L - 1 R A は別の品質因子であり、腫瘍壊死因子 ( T N F ) は別の品質因子である。これらの因子は全てヒト血液中に存在し得る既知のサイトカインである。

## 【 0 0 4 8 】

I L - 1 b、I L - 2、I L - 4、I L - 5、I L - 6、I L - 7、I L - 8、I L - 9、I L 1 2 p 7 0、I L - 1 5、I L - 1 7 a、I L - 2 1、塩基性 F G F、E G F、I F N、G C S F、G M - C S F、M C P 1、M I P 1 a、M I P 1 b、P D G F、I

10

20

30

40

50

11 R A、及び T N F の因子については、30 pg/ml未満、特に20 pg/ml未満である。

【0049】

上に列挙される全てのサイトカインは、培養、特にリンパ球、免疫細胞、又は同じく幹細胞の増殖に影響を及ぼすことが分かった。したがって、これらのサイトカインは、特定の上限までのみ許容される。他の品質因子は、少なくともある程度まで血液製剤中に含まれる必要がある。

【0050】

ある一つの実施形態によれば、品質因子はエストラジオールである。エストラジオールは、少なくとも65 pmol/lの濃度で血液製剤中に存在しなければならない。エストラジオールの好ましい濃度は少なくとも75 pmol/lである。エストラジオールの濃度は少なくとも85 pmol/lであることがより好ましい。

10

【0051】

本発明のある一つの実施形態によれば、品質因子はコルチゾールである。コルチゾールの予め定められた範囲は、少なくとも190 nmol/l、好ましくは少なくとも210 nmol/l、より好ましくは少なくとも220 nmol/lである。

【0052】

本発明の一つの実施形態によれば、品質因子はインスリン様増殖因子1 (IGF-1)である。ある一つの実施形態によれば、IGF-1の予め定められた範囲は少なくとも100 µg/l、好ましくは少なくとも130 µg/l、より好ましくは少なくとも140 µg/lである。

20

【0053】

本発明による細胞培養培地が満たさなければならない様々な更なるパラメーターが存在する。特に、標準的な培養因子が予め定められた範囲内に存在する。したがって、上記方法は、標準的な培養因子を測定すること、及びそれらと予め定められた範囲を比較することを更に含む。

【0054】

標準的な培養因子としては、タンパク質、グルコース、非タンパク質窒素、尿素窒素、アミノ酸窒素、クレアチニン、クレアチン、尿素、総脂質、トリグリセリド、コレステリン、脂質、エステル化成分、リン脂質、脂肪酸、有機酸、ピルビン酸、クエン酸、ケトンが挙げられる。

30

【0055】

細胞培養培地の総体積を基準とした前記予め定められた範囲は、タンパク質については60.080.0 g/l、グルコースについては4.5 mmol/l~5.5 mmol/l、非タンパク質窒素については15 mmol/l~30 mmol/l、尿素窒素については3.5 mmol/l~7.0 mmol/l、アミノ酸窒素については3.0 mmol/l~5.0 mmol/l、クレアチニンについては70.0 µmol/l~140.0 µmol/l、クレアチンについては25.0 µmol/l~70.0 µmol/l、尿素については3.0 µmol/l~5.0 µmol/l、総脂質については4.5 g/l~8.5 g/l、トリグリセリドについては0.6 mmol/l~2.4 mmol/l、コレステリンについては4.0 mmol/l~6.5 mmol/l、脂質については0.3 mmol/l~0.4 mmol/l、エステル化成分については0.7 mmol/l~0.8 mmol/l、リン脂質については2.0 mmol/l~3.0 mmol/l、脂肪酸については0.3 mmol/l~0.9 mmol/l、有機酸については4.0 mmol/l~6.0 mmol/l、ピルビン酸塩については0.1 mmol/l~0.2 mmol/l、クエン酸塩については0.1 mmol/l~0.2 mmol/l、及び/又はケトンについては0.3 mmol/l~0.5 mmol/lである。

40

【0056】

本発明のある一つの実施形態によれば、上記工程は、2つ以上の血液製剤を用いて行われ、選択された血液製剤又は加工血液製剤を合わせて培養培地を形成する。1人のドナー

50

からは、一度に約 200 ml ~ 500 ml の血液製剤が得られるに過ぎない。したがって、細胞の培養のため、数人のドナーの幾つかの血液製剤を合わせなければならない。細胞培養培地の作製に対しては、選択された血液製剤のみを使用する。

【0057】

もし選択されない試料において、血液製剤中の 1 又は複数の品質因子が、適用可能であれば、品質因子の上限値の 30 % 未満、より好ましくは 20 % 未満、最も好ましくは 10 % 未満で上限を超える場合、該血液製剤は一時的に選択されない血液製剤とされる。さらに、もし選択されない試料において、血液製剤中の 1 又は複数の品質因子が、適用可能であれば、品質因子の上限値の 30 % 未満、より好ましくは 20 % 未満、最も好ましくは 10 % 未満で下限を超える場合、該血液製剤は一時的に選択されない血液製剤とされる。一時的に選択されない血液製剤は、該選択されない血液製剤と少なくとも 1 つの選択された血液製剤を混合して規定の範囲内の品質因子を有する混合された血液製剤を得ることができるのであれば、選択された血液製剤となる場合がある。そうでなければ、一時的に選択されない血液製剤は、選択されない血液製剤となる。

10

【0058】

また、製品の混合物中の少なくとも 1 つの品質因子の濃度を決定することができる。したがって、本発明は、

【0059】

a) 2 以上のドナーに由来する血液製剤の第 1 の混合物を少なくとも提供する工程、  
b) 前記第 1 の混合物中の少なくとも 1 つの品質因子の濃度を測定する工程、  
c) 測定された品質因子の濃度を、前記品質因子について予め定められた濃度範囲と比較する工程、  
d) 前記品質因子に対して測定された前記濃度が前記予め定められた範囲内にある場合には、細胞培養培地用に前記第 1 の混合物を選択し、前記場合以外の場合には、前記第 1 の混合物を選択しない工程  
を含む、2 以上のドナーに由来する血液製剤の混合物を含む細胞培養培地を作製する方法を更に提供する。

20

【0060】

また、上記混合物に血液製剤を添加して培養培地を形成する前に血液製剤において直接に品質因子の濃度を測定することが好ましい。また、様々な血液製剤の混合物をスクリーニングし、これらが品質因子によって決定される要求を満たすかどうかを確認することが可能である。

30

【0061】

血液製剤を、選択後、及び、最終製品すなわち細胞培養培地への添加前に、加工血液製剤へと変換することができる。血液製剤を加工することは、ある一つの種類の血液製剤を別の種類の血液製剤とすることを意味する。例えば、測定され選択された血液製剤は全血であり、その後さらに血漿へと変換される。または、測定され選択された血液製剤は全血であり、加工血液製剤は血清である。別の選択肢では、選択された血液製剤は血漿であり、加工血液製剤は血清である。別の選択肢では、選択された血液製剤は血漿であり、加工血液製剤は血清のサブセットである。また、選択された血液製剤が血清であり、加工血液製剤は血清がサブセットであってもよい。

40

【0062】

提供される血液製剤は血漿であることが好ましい。血漿は、例えば免疫系の細胞の培養に頻繁に使用される。さらに、ドナーから血漿アフエーシスによって容易に血漿を回収することができる。したがって、血漿はまた加工血液製剤でもある。血漿を使用することは、更なる加工工程を必要としないという利点を有する。そのようにして、加工工程を省く。

【0063】

2 以上の品質因子を検査することが好ましく、例えば 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 の品質因子を検

50

査する。より多くの品質因子を検査することは、高度に活性なリンパ球の培養及び増殖に対するより高い品質基準を実際に満たす最終細胞培養培地を得る機会を増す。しかしながら、1つの試料において大量の因子を検査することはまた、プロセスの複雑化を増すことにもなる。したがって、15未満、12未満、10未満、8未満、6未満の品質因子を検査することが好ましい。

#### 【0064】

本発明のある一つの実施形態によれば、検査される品質因子の数は、2～6の範囲、好ましくは3～5の範囲、好ましくは4である。既知の品質因子の特定のサブセットは、その細胞培養培地がリンパ球の増殖又は幹細胞の培養に適格な細胞培地である高い可能性を見出すのに十分であることが分かった。試料全体が高品質試料であるとの指標を提供することを示した品質因子は、SHBG、IGF-1、CCL5、及びIL-6である。したがって、品質因子はSHBGであることが好ましい。また、品質因子としてIGF-1が好ましい。同様に、CCL5は好ましい品質因子である。また、IL-6も好ましい品質因子である。本発明のある一つの実施形態によれば、検査される品質因子は、SHBG、IGF-1、CCL5、及びIL-6で全部である。

10

#### 【0065】

また、品質因子に対する検査は、好適なドナー、特にモニターされる職業的ドナーの選択に使用されてもよい。モニターされる職業的ドナーは、定期的に血液製剤の提供を行い、登録に記録される。

20

#### 【0066】

本発明による方法を用いて、血液ドナーを高品質の血液製剤の提供に適していると識別することができる。したがって、本発明による方法は、ドナーのレベルに対して更なる選択工程を提供する。

#### 【0067】

ある一つの実施形態によれば、上記方法は、

- a) 前記ドナーに由来する血液製剤を提供すること、
- b) 第1のドナーの血液製剤中の少なくとも1つの品質因子の濃度を測定すること、
- c) 測定された品質因子の濃度を、前記品質因子について予め定められた濃度範囲と比較すること、
- d) 血漿プールにおける濃度値 (if the concentration value for the plasma pool)、前記品質因子について測定された濃度が予め定められた範囲内にある場合は、血漿又は血清の提供用に前記ドナーを選択し、前記場合以外の場合には、前記第1のドナーを選択しないこと、を含むドナー選択を含む。

30

選択されないドナーは、高品質血液製剤に関する登録から除外される。

#### 【0068】

また、本発明は、体積基準で

3 ng/ml未満の濃度のCCL5、

500 pg/ml未満の濃度のエオタキシン、

100 pg/ml未満の濃度のPDGF-88及び/又はCXCL-10、

200 pg/ml未満の濃度のIL-10、

40

50 pg/ml未満の濃度のIL-13、

20 pg/ml未満の濃度のIL-1b、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-12p70、IL-15、IL-17a、IL-21

、塩基性FGF、EGF、IFN、GCSF、GM-CSF、MCP1、MIP1a、MIP1b、PDGF、IL-1RA、及び/又はTNF、

少なくとも65 pmol/l、好ましくは少なくとも75 pmol/l、より好ましくは少なくとも85 pmol/lの濃度のエストラジオール、

少なくとも190 nmol/l、好ましくは少なくとも210 nmol/l、より好ましくは少なくとも220 nmol/lの濃度のコルチゾール、

少なくとも100 µg/l、好ましくは少なくとも130 µg/l、より好ましくは少な

50

くとも  $140 \mu\text{g} / \text{l}$  の濃度の  $\text{IGF} - 1$ 、及び / 又は  
 $31 \text{nmol} / \text{l}$  未満、好ましくは  $29 \text{nmol} / \text{l}$  未満の濃度の  $\text{SHBG}$ 、  
を含む細胞培養培地に関する。

上記培地は、安定しており且つ再現可能な結果を出せる制御された人工の環境における  
T細胞の培養及び増殖に必要な栄養素を提供する。

#### 【0069】

細胞培養培地は、本発明による作製方法によって得られた培地であることが好ましい。  
ある一つの実施形態によれば、細胞培養培地は、少なくとも1つの血液製剤、特に血漿及  
び / 又は血清を含む。血液製剤は血清であることがより好ましい。更なる実施形態によれ  
ば、細胞培養培地は2以上のドナーに由来する血液製剤を含む。2以上のドナーに由来す  
る血液製剤は、血清及び / 又は血漿から選択されることが好ましい。2以上のドナーに由  
来する製剤は血清であることがより好ましい。代替的な実施形態によれば、細胞培養培地  
は合成培地である。

10

#### 【0070】

本発明による細胞培養培地が満たさなければならない様々な更なるパラメーターが存在  
する。特に、標準的な培養因子は予め定められた範囲内にある。標準的な培養因子とし  
ては例えば、タンパク質、グルコース、非タンパク質窒素、尿素窒素、アミノ酸窒素、クレ  
アチニン、クレアチン、尿素、総脂質、トリグリセリド、コレステリン、脂質、エステル  
化成分、リン脂質、脂肪酸、有機酸、ビルビン酸、クエン酸、ケトンが挙げられる。

#### 【0071】

20

したがって、本発明の細胞培養培地は、  
 $60.080.0 \text{g} / \text{l}$  の濃度のタンパク質、  
 $4.5 \text{mmol} / \text{l} \sim 5.5 \text{mmol} / \text{l}$  の濃度のグルコース、  
 $15 \text{mmol} / \text{l} \sim 30 \text{mmol} / \text{l}$  の濃度の非タンパク質窒素、  
 $3.5 \text{mmol} / \text{l} \sim 7.0 \text{mmol} / \text{l}$  の濃度の尿素窒素、  
 $3.0 \text{mmol} / \text{l} \sim 5.0 \text{mmol} / \text{l}$  の濃度のアミノ酸窒素、  
 $70.0 \mu\text{mol} / \text{l} \sim 140.0 \mu\text{mol} / \text{l}$  の濃度のクレアチニン、  
 $25.0 \mu\text{mol} / \text{l} \sim 70.0 \mu\text{mol} / \text{l}$  の濃度のクレアチン、  
 $3.0 \mu\text{mol} / \text{l} \sim 5.0 \mu\text{mol} / \text{l}$  の濃度の尿素、  
 $4.5 \text{g} / \text{l} \sim 8.5 \text{g} / \text{l}$  の濃度の総脂質、  
 $0.6 \text{mmol} / \text{l} \sim 2.4 \text{mmol} / \text{l}$  の濃度のトリグリセリド、  
 $4.0 \text{mmol} / \text{l} \sim 6.5 \text{mmol} / \text{l}$  の濃度のコレステリン、  
 $0.3 \text{mmol} / \text{l} \sim 0.4 \text{mmol} / \text{l}$  の濃度の脂質、  
 $0.7 \text{mmol} / \text{l} \sim 0.8 \text{mmol} / \text{l}$  の濃度のエステル化成分、  
 $2.0 \text{mmol} / \text{l} \sim 3.0 \text{mmol} / \text{l}$  の濃度のリン脂質、  
 $0.3 \text{mmol} / \text{l} \sim 0.9 \text{mmol} / \text{l}$  の濃度の脂肪酸、  
 $4.0 \text{mmol} / \text{l} \sim 6.0 \text{mmol} / \text{l}$  の濃度の有機酸、  
 $0.1 \text{mmol} / \text{l} \sim 0.2 \text{mmol} / \text{l}$  の濃度のビルビン酸塩、  
 $0.1 \text{mmol} / \text{l} \sim 0.2 \text{mmol} / \text{l}$  の濃度のクエン酸塩、及び / 又は  
 $0.3 \text{mmol} / \text{l} \sim 0.5 \text{mmol} / \text{l}$  の濃度のケトン  
を更に含む。

30

40

#### 【0072】

細胞培養培地は、上に言及される全てのパラメーターを満たすことが好ましい。ある一  
つの実施形態によれば、細胞培養培地は、  
 $29 \text{nmol} / \text{l}$  未満の濃度の  $\text{SHBG}$ 、  
 $100 \mu\text{g} / \text{l}$  以上の濃度の  $\text{IGF} - 1$ 、  
 $20 \text{pg} / \text{ml}$  未満の濃度の  $\text{IL} - 6$ 、及び  
 $3 \text{ng} / \text{ml}$  未満の濃度の  $\text{CCl} 5$  のいずれか1つを含む。

更なる実施形態によれば、細胞培養培地は、  
 $29 \text{nmol} / \text{l}$  未満の濃度の  $\text{SHBG}$ 、

50

100  $\mu\text{g}/\text{l}$  以上の濃度の IGF - 1、  
20  $\text{pg}/\text{ml}$  未満の濃度の IL - 6、及び  
3  $\text{ng}/\text{ml}$  未満の濃度の CCL5 を含む。

【0073】

本発明による細胞培養培地は、血液製剤の混合物からなってもよい。該細胞培養培地は、血液製剤の混合物に加えて更なる構成成分を含むことが好ましい。好ましい実施形態によれば、更なる構成成分は水、NaCl、PBS、DTT、TCEP、及び2-メルカプトエタノールから選択される。

【0074】

本発明による細胞培養培地は、様々な種々の細胞を培養するのに適している。したがって、本発明は、細胞を培養するための上記細胞培養培地の使用を更に提供する。主な利点は、不死細胞株の培養以外に、患者から得られた細胞、特に免疫系の細胞又は幹細胞の培養にも成功し得ることである。

【0075】

本発明による培地、特に本発明による方法によって得られた培地により、リンパ球のより高い増殖速度が見られる。本明細書における「増殖 (expansion)」又は「クローン増殖 (clonal expansion)」は、もとは単一の細胞に由来する娘細胞の産生を意味する。リンパ球のクローン増殖では、全ての子孫は同じ抗原特異性を共有する。

【0076】

さらに、本発明による培養培地により、細胞培養において総細胞数が増加し得る。特に、同じ抗原特異性を有するリンパ球の増殖された娘細胞の総数の増加が増加し得る。

【0077】

したがって、使用のある一つの実施形態によれば、細胞は免疫系の細胞、特にリンパ球である。リンパ球は患者から得られることが好ましい。ある一つの実施形態によれば、リンパ球を上記細胞培養培地中で成長、増加 (proliferated) 及び / 又は増殖 (expanded) させる。

【0078】

ある一つの実施形態によれば、培養培地は腫瘍に由来するT細胞の増殖に使用される。増殖は、IL - 2、IL - 15、及びIL - 21のサイトカインカクテルの使用を含むことが好ましい。本発明によれば、IL - 2、IL - 15、及びIL - 21の組成物は、「サイトカインカクテル」とも呼ばれる。

【0079】

本明細書における「インターロイキン2」又は「IL - 2」は、配列番号1によって定義されるヒトIL - 2、及びその機能的等価物を指す。本明細書における「インターロイキン15」又は「IL - 15」は、ヒトIL 15及びその機能的等価物を指す。本明細書における「インターロイキン21」又は「IL - 21」はヒトIL - 21及びその機能的等価物を指す。

【0080】

本発明による細胞培養培地、好ましくは本発明による方法によって得られた培地は、IL - 2、IL - 15及び / 又はIL - 21のサイトカイン混合物と組み合わせてリンパ球を増殖することに特に適している。本発明による細胞培養培地は、好ましくはこのサイトカインの混合物と組み合わせて、成長速度を増し、増殖した細胞の総数を増加させるのみならず、細胞プロファイルも改善する。特に、CD45RA / CCR7表現型によって定義される成熟及び分化が改善される。最後に、サイトカインIL - 2、IL - 15及びIL - 21の混合物を用いてのリンパ球の増殖では、臨床的に有用なリンパ球、特にT細胞の生存率を増加させる。

【0081】

能動細胞免疫療法では、成長及び増殖の速度が増加すると、患者に由来するリンパ球を得て患者に標準的なリンパ球を再導入するまでの時間が減少する。(臨床的に有用な) リンパ球の生存率が増加すると、能動的な免疫療法製剤の治療的効果が増加する。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 8 2 】

上の記載及び関連する図面において提示される教示の利益を有する、本明細書において述べられた本発明について、多くの改変及び他の実施形態が、本発明が関連する技術分野の当業者には思い浮かぶであろう。したがって、本発明は開示される具体的な実施形態に限定されず、改変及び他の実施形態は添付の特許請求の範囲に含まれると意図されることが理解されるべきである。具体的用語が本明細書で採用されるが、それらは総称的及び記述的な意味においてのみ使用され、限定の目的で使用されるものではない。

## 【 実施例 】

## 【 0 0 8 3 】

実施例 1 - 種々の細胞培養培地中におけるリンパ球の増殖

10

NY - ESO - 1 で感作された健康なドナーに対してアフエレーションを行った。血液成分の分離の後、白血球を含有する製剤をその余から分離した。

1000 U / ml の IL - 2、10 ng / ml の IL - 15、及び 10 ng / ml の IL - 21 を含む培地 M1 中に細胞を懸濁した。培地は、更に 10  $\mu$  mol の NY - ESO - 1 ペプチドを含有した。細胞は、良好に増殖し、4 日後に 10<sup>6</sup> / ml の濃度に達した。

同時に、同じプロトコルに従って培地 M2 中でリンパ球を増殖させた。顕著なリンパ球の増殖は検出されなかった。

## 【 0 0 8 4 】

実施例 2 - 細胞培養培地の組成の分析

20

標準的な検査では、細胞培養培地間で何らの相違も明らかにならなかった。比濁法及び表 1 において構成成分として列挙される物質に対する抗体を使用して、培地 M1 及び培地 M2 をより詳しく分析した。

## 【 0 0 8 5 】

## 【 表 1 】

構成成分	単位	M1	M2
トリグリセリド	mmol / l	1. 1	0. 99
コレステロール	mmol / l	4. 1	2. 8
HDL - コレステロール	mmol / l	1. 1	0. 9
LDL - コレステロール	mmol / l	2. 5	1. 5
エストラジオール	pmol / l	86	57
T3	pmol / l	11	12
T4	pmol / l	4. 4	4. 5
コルチゾール	nmol / l	231	179
テストステロン	nmol / l	12	12
SHGB	nmol / l	26	31
インスリン	ml E / l	7. 2	5. 0
IGF - 1	$\mu$ g / l	157	86
S - GH	$\mu$ g / l	0. 3	0. 3

30

## 【 0 0 8 6 】

実施例 3 - 異なるドナーの血漿の分析

40

細胞培養培地の分析からの結果によれば、モニターされた異なる職業的ドナーに由来する血漿試料を得て、エストラジオール、コルチゾール、インスリン、及び IGF - 1 の濃度について分析した。結果を表 2 に提示する。

## 【 0 0 8 7 】



【表 2】

構成成分	単位	P 1	P 2	P 3	P 4	P 5
エストラジオール	pmol/l	53	56	58	88	87
コルチゾール	nmol/l	231	233	177	235	230
インスリン	mIU/l	7.2	4.9	7.3	7.4	7.5
IGF-1	μg/l	84	154	158	157	156

本発明の方法によれば、血漿試料 P 1 ~ P 4 を選択しない。血漿試料 P 5 をリンパ球の培養に選択する。 10

## 【0088】

## 実施例 4 - 異なるドナーの血漿の分析

血漿選択を確認するため、その後、血漿試料 P 1 ~ P 5 を細胞培養のために調製した。NY - ESO - 1 で感作された健康なドナーの末梢血から得られたリンパ球を上に記載されるプロトコルに従って培養した。P 5 に由来する細胞培養培地での増殖は、培地 M 1 での増殖に匹敵した（実施例 1 を参照されたい。）

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2015/062992

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12N5/0787 C12N5/0786  
ADD.

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

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N

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

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

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2007/037682 A1 (GLYCOSTEM B V [NL]; SPANHOLTZ JAN [DE]) 5 April 2007 (2007-04-05)	13-17, 20,21
Y	abstract page 15, line 9 - line 27 page 17, line 16 - page 18, line 18 -----	1-12,18, 19,22-24
X	WO 99/67365 A1 (MEDI CULT AS [DK]; LINDENBERG SVEND [DK]; MIKKELSEN ANNE LIS [DK]; SMI) 29 December 1999 (1999-12-29)	13-17, 20,21
Y	abstract page 5, line 17 - line 28 -----	1-12,18, 19,22-24
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents :

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

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

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

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

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

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

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

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

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 August 2015

Date of mailing of the international search report

20/08/2015

Name and mailing address of the ISA/

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

Authorized officer

Grötzinger, Thilo

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2015/062992

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	STEVE J. MCFAUL ET AL: "Hemoglobin stimulates the release of proinflammatory cytokines from leukocytes in whole blood", JOURNAL OF LABORATORY AND CLINICAL MEDICINE, vol. 135, no. 3, 1 March 2000 (2000-03-01), pages 263-269, XP055206586, ISSN: 0022-2143, DOI: 10.1067/mlc.2000.105180	13-17, 20,21
Y	abstract page 264, right-hand column, last paragraph page 265, right-hand column, last paragraph page 266, left-hand column, paragraph 1	1-12,18, 19,22-24
X	----- MCNAMEE J P ET AL: "Effect of pro-inflammatory cytokines on spontaneous apoptosis in leukocyte sub-sets within a whole blood culture", CYTOKINE, ACADEMIC PRESS LTD, PHILADELPHIA, PA, US, vol. 31, no. 2, 21 July 2005 (2005-07-21), pages 161-167, XP004962352, ISSN: 1043-4666, DOI: 10.1016/J.CYTO.2005.05.001	13-17, 20,21
Y	abstract figure 1	1-12,18, 19,22-24
X	----- BIESECKER L G ET AL: "Interleukin-6 is a component of human umbilical cord serum and stimulates hematopoiesis in embryonic stem cells in vitro", EXPERIMENTAL HEMATOLOGY, ELSEVIER INC, US, vol. 21, no. 6, 1 June 1993 (1993-06-01), pages 774-778, XP009185719, ISSN: 0301-472X	13-17, 20,21
Y	abstract page 774, right-hand column, last paragraph - page 775, left-hand column, paragraph 1 page 775; figure 1	1-12,18, 19,22-24
	-----	

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2015/062992

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007037682	A1	05-04-2007	DK 1941027 T3 13-10-2014
			EP 1941027 A1 09-07-2008
			ES 2502841 T3 06-10-2014
			PT 1941027 E 09-10-2014
			SI 1941027 T1 28-11-2014
			US 2009017539 A1 15-01-2009
			WO 2007037682 A1 05-04-2007
-----			
WO 9967365	A1	29-12-1999	AT 407363 T 15-09-2008
			AU 760165 B2 08-05-2003
			AU 4360499 A 10-01-2000
			AU 4360599 A 10-01-2000
			BR 9911470 A 20-03-2001
			CA 2335632 A1 29-12-1999
			CA 2335793 A1 29-12-1999
			CN 1313951 A 19-09-2001
			CN 1607391 A 20-04-2005
			EE 200000763 A 17-06-2002
			EP 1088056 A1 04-04-2001
			EP 1090300 A1 11-04-2001
			ES 2313785 T3 01-03-2009
			HR P20000888 A2 31-12-2001
			HU 0103392 A2 28-01-2002
			ID 27197 A 08-03-2001
			IS 5768 A 12-12-2000
			JP 2002519640 A 02-07-2002
			NO 20006519 A 21-02-2001
			NO 20006545 A 21-02-2001
			NZ 509451 A 28-03-2003
			PL 345318 A1 03-12-2001
			RU 2227916 C2 27-04-2004
			SK 19152000 A3 03-12-2001
			TR 200003830 T2 21-01-2002
			US 2001028878 A1 11-10-2001
			US 2002115211 A1 22-08-2002
			WO 9967365 A1 29-12-1999
			WO 9967644 A1 29-12-1999
-----			

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72)発明者 マエウレアー、マーカス

スウェーデン国 エス - 1 8 4 4 4 アケルスベルガ カールスボルグスパーゲン 2 4

(72)発明者 ドドオ、アーネスト

スウェーデン国 エス - 1 1 2 3 4 ストックホルム サンクト エリクスガータン 4 3 エー

Fターム(参考) 2G045 AA40 DA36 DA37 DA54

4B065 AA92X AA94X BB25 BB40 BD39 CA60