

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：97117013

※ 申請日期：97.5.8

※IPC 分類：~~A61H 1/00~~

一、發明名稱：(中文/英文)

癌治療劑

A61K 35/14 (2006.01)

A61K 35/26 (2006.01)

A61K 35/12 (2006.01)

二、申請人：(共 2 人)

A61P 35/00 (2006.01)

姓名或名稱：(中文/英文)

1. 日商寶生物股份有限公司
TAKARA BIO INC.
2. 國立大學法人三重大學
MIE UNIVERSITY

代表人：(中文/英文)

1. 加藤 郁之進
KATO, IKUNOSHIN
2. 豐田 長康
TOYODA, NAGAYASU

住居所或營業所地址：(中文/英文)

1. 日本國滋賀縣大津市瀬田三丁目4番1號
4-1, SETA 3-CHOME, OTSU-SHI, SHIGA-KEN, JAPAN
2. 日本國三重縣津市栗真町屋町1577
1577, KURIMAMACHIYA-CHO, TSU-SHI, MIE, JAPAN

國 籍：(中文/英文)

1. 日本 JAPAN
2. 日本 JAPAN

三、發明人：(共 8 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 珠玖 洋
SHIKU, HIROSHI
2. 影山 慎一
KAGEYAMA, SHINICHI
3. 北野 滋久
KITANO, SHIGEHISA
4. 出野 美津子
IDENO, MITSUKO
5. 富田 啟祐
TOMITA, KEISUKE
6. 榎 龍嗣
ENOKI, TATSUJI
7. 竹迫 一任
TAKESAKO, KAZUTOH
8. 加藤 郁之進
KATO, IKUNOSHIN

國 籍：(中文/英文)

1. 日本 JAPAN
2. 日本 JAPAN
3. 日本 JAPAN
4. 日本 JAPAN
5. 日本 JAPAN
6. 日本 JAPAN
7. 日本 JAPAN
8. 日本 JAPAN

四、聲明事項：

☐主張專利法第二十二條第二項☐第一款或☐第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

☒申請前已向下列國家(地區)申請專利：

【格式請依：受理國家(地區)、申請日、申請案號 順序註記】

☒有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 日本；2007年05月11日；特願2007-127436

2.

☐無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1.

2.

☐主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

☒主張專利法第三十條生物材料：

☐須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

☒不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於一種可用於醫療領域之癌治療劑及治療方法。

【先前技術】

關於癌症治療，目前實行手術療法、放射線療法、化學療法、免疫療法(細胞療法或疫苗療法)等。其中，一般採用使用抗癌劑之化學療法。多數抗癌劑不僅會傷害癌細胞，亦會傷害增殖旺盛之正常細胞，因此副作用較多。例如，存在由於骨髓抑制而產生所謂血液毒性之副作用的情況，由此，會使末梢血液中之嗜中性白血球、血小板、淋巴細胞等減少至正常值以下。於此情形時，為了儘可能地投予大量之抗癌劑，較為有效的是設置一定的恢復期間，一面將副作用抑制至最低限度，一面反覆進行投予，從而多次實施治療。又，於使用抗癌劑之化學療法中，通常併用多種抗癌劑。

於經常對癌症患者實施之細胞療法之一的過繼免疫療法中，係在體外對患者自身之淋巴細胞進行培養，再將所獲得之淋巴細胞投予患者。作為培養法有各種方法，目前主要使用以下方法：添加淋巴細胞生長因子即介白素-2 (IL-2)或介白素-15 (IL-15)；將抗CD3抗體刺激、或者使用抗CD3抗體和抗CD28抗體之共刺激，與淋巴細胞生長因子加以組合等。又，為了培養淋巴細胞使其可識別或傷害腫瘤淋巴細胞，亦可於添加成為抗原之腫瘤細胞、腫瘤抗原蛋

白質或腫瘤抗原肽、或者經抗原處理之抗原提示細胞後，再進行培養。

於過繼免疫療法中，針對於利用IL-2及抗CD3抗體之作用，由在體外進行誘導之細胞毒性T細胞(CTL)或末梢血液淋巴細胞等進行擴大培養而獲得淋巴介質活性細胞，再移植入該淋巴介質活性細胞之療法中，將上述細胞進行擴大培養時如何維持細胞毒殺活性、或者如何將淋巴細胞在體外高效率地進行擴大培養、如何高效率地擴大培養具有適於治療之能力的淋巴細胞等問題，本發明者等已對使用纖維結合蛋白或其片段所產生之效果進行了研究(例如，專利文獻1~6)。

一般而言，為了使移植入之細胞不被抗癌劑之細胞毒性、血液毒性等所殺傷，而不將過繼免疫療法與血液毒性較強之抗癌劑併用。針對投予抗癌劑之癌症患者的過繼免疫療法，可充分空出抗癌劑使用後之期間而實施。即，可於抗癌劑之治療期間結束後實施。

又，於疫苗療法中，目前係將腫瘤抗原蛋白質或源自腫瘤抗原蛋白質的抗原肽，與用以提高免疫原性之佐劑(佛氏不完全佐劑，CpG等)混合，而製成製劑後進行使用。另外，先前已對用以提高該等抗原免疫原性之衍生物(與GM-CSF所形成之嵌合蛋白質等)、將蛋白質或肽攝入抗原提示細胞而成者、用以表現抗原基因之DNA疫苗等進行了試驗，該等可單獨使用，或者與佐劑混合使用。用作上述疫苗之抗原，均係在體外進行製備，再進行投予。

[專利文獻1]國際公開第03/016511號案

[專利文獻2]國際公開第03/080817號案

[專利文獻3]國際公開第2005/019450號案

[專利文獻4]日本專利特開2007-061020號公報

[專利文獻5]國際公開第2007/020880號案

[專利文獻6]國際公開第2007/040105號案

【發明內容】

[發明所欲解決之問題]

抗癌劑係藉由殺傷癌細胞而發揮其效果，但多數抗癌劑在殺傷癌細胞之同時，亦會殺傷正常細胞。此時，抗癌劑殺傷淋巴細胞等血液中之細胞，從而使白血球數減少。因此，關於抗癌劑之投予，目前假設抗癌劑在患者體內會產生代謝，而空出一定時間等待該等功能恢復，再進行數療程之投予，但亦存在對癌症無法獲得充分之殺傷效果的個案。

另一方面，使用抗癌劑之治療，會導致由於以淋巴細胞為代表之白血球的減少所造成的免疫功能降低，從而增大罹患感染症之危險性。又，亦會導致針對癌細胞之免疫反應的恢復變慢。

本發明之目的在於提供一種投予生物體有效之癌治療方法、癌治療劑及癌治療用套組。

[解決問題之技術手段]

本發明之第一發明係關於一種癌治療方法，其特徵在於包括下述(A)步驟及(B)步驟：

(A) 對患者實施伴有淋巴細胞數減少之處理；及

(B) 繼上述(A)步驟後迅速向患者投予淋巴細胞。

於本發明之第一發明中，作為伴有淋巴細胞數減少之處理，可例示投予抗癌劑及/或照射放射線。又，作為抗癌劑，可例示：選自由分類為代謝拮抗劑、抗生素(抗腫瘤性抗生素)、微小管抑制劑、拓撲異構酶抑制劑、鉑製劑、烷化劑及腎上腺皮質類固醇劑之抗癌劑所組成群中者；至於較好的態樣，可舉出：選自由氟尿嘧啶(fluorouracil)、甲胺喋呤(methotrexate)、吉西他濱(gemcitabine)、氟達拉濱(fludarabine)、博來黴素(bleomycin)、阿黴素(adriamycin)、絲裂黴素(mitomycin)、紫杉醇(paclitaxel)、多烯紫杉醇(docetaxel)、長春新鹼(vincristine)、伊立替康(irinotecan)、滅必治(etoposide)、順鉑(cisplatin)、卡鉑(carboplatin)、奈達鉑(nedaplatin)、阿黴素(doxorubicin)、地塞米松及環磷醯胺所組成之群中的至少1個。又，於本發明之第一發明中，例示有於(A)步驟後1小時~10日後實施(B)步驟之態樣。進而，於本發明之第一發明中，作為所投予之淋巴細胞，例示有含有淋巴細胞之培養物，特別例示有：所投予之淋巴細胞藉由在抗CD3抗體的存在下進行培養而獲得之淋巴細胞培養物。又，作為所投予之淋巴細胞，例示有藉由培養自患者體內採集之淋巴細胞而獲得之淋巴細胞培養物。又，作為所投予之淋巴細胞，例示有：藉由於纖維結合蛋白(fibronectin)、纖維結合蛋白之片段、或者其等之混合物之存在下進行培養而獲得之淋巴

細胞培養物。於本發明之第一發明中，例示有：包括於(B)步驟中或者於(B)步驟後進一步投予癌疫苗及/或淋巴細胞刺激因子之步驟的態樣。

本發明之第二發明係關於一種含有淋巴細胞之癌治療劑，其係用於繼上述處理後、迅速向已實施伴有淋巴細胞數減少之處理的患者進行投予。於本發明之第二發明中，作為伴有淋巴細胞數減少之處理，例示有投予抗癌劑及/或照射放射線。又，於本發明之第二發明中，例示有含有淋巴細胞之癌治療劑，其係用於在上述處理之1小時~10日後、向已實施伴有淋巴細胞數減少之處理的患者進行投予。又，作為淋巴細胞，例示有培養物，特別是例示有藉由在抗CD3抗體之存在下進行培養而獲得之淋巴細胞培養物。又，作為淋巴細胞，例示有藉由培養自患者體內採集之淋巴細胞而獲得之淋巴細胞培養物。又，作為淋巴細胞，例示有：在纖維結合蛋白、纖維結合蛋白的片段、或者其等之混合物之存在下進行培養而獲得之淋巴細胞培養物。

本發明之第三發明係關於一種癌治療用套組，其分別含有引起組淋巴細胞數減少之抗癌劑及本發明之第二發明的治療劑。於本發明之第三發明中，作為抗癌劑，例示有：選自由分類為代謝拮抗劑、抗生素(抗腫瘤性抗生素)、微小管阻斷劑、拓撲異構酶阻斷劑、鉑製劑、烷化劑及腎上腺皮質類固醇劑的抗癌劑所組成之群中的至少1個；作為較好的態樣，可舉出：選自由氟尿嘧啶、甲胺喋呤、吉西

他濱、氟達拉濱、博來黴素、阿黴素、絲裂黴素、紫杉醇、多烯紫杉醇、長春新鹼、伊立替康、減必治、順鉑、卡鉑、奈達鉑、艾黴素、地塞米松及環磷醯胺所組成之群中的至少1個。

本發明之第四發明係關於一種癌治療用套組，其分別含有本發明之第二發明的治療劑、及癌疫苗及/或淋巴細胞刺激因子。

本發明之第五發明係關於一種癌治療用套組，其分別含有本發明之第三發明的癌治療用套組、及癌疫苗及/或淋巴細胞刺激因子。

本發明之第六發明係關於一種淋巴細胞之用途，其係用於製造本發明之第二發明的治療劑。

本發明之第七發明係關於一種抗癌劑及淋巴細胞之用途，其係用於製造本發明之第三發明之癌治療用套組。

本發明之第八發明係關於一種淋巴細胞以及癌疫苗及/或淋巴細胞刺激因子之用途，其係用於製造本發明之第四發明之癌治療用套組。

本發明之第九發明係關於一種引起淋巴細胞數減少的抗癌劑、淋巴細胞、以及癌疫苗及/或淋巴細胞刺激因子之用途，其係用於製造本發明之第五發明之癌治療用套組。

[發明之效果]

根據本發明，可提供一種癌治療方法及癌治療劑，其可活化針對癌之細胞性免疫，而具有較高的治療效果。以抗癌劑為代表之毒殺癌細胞之治療法，係毒殺癌細胞而向體

內釋放出大量腫瘤抗原。於此狀況下所投予之淋巴細胞，會引起針對所釋放的腫瘤抗原之免疫應答，而獲得針對癌細胞之毒殺性。即，亦有所投予之淋巴細胞發揮出到目前為止尚無之新疫苗療法之功能的癌治療劑。進而，該治療方法及治療劑，亦可藉由避免由於淋巴細胞數減少所造成的免疫功能降低，而降低感染症之危險性。

【實施方式】

本發明提供一種癌治療方法，其包括以下兩個步驟：

(A) 對患者實施伴有淋巴細胞減少的步驟、及

(B) 繼上述(A)步驟後迅速向患者投予淋巴細胞的步驟。

作為(A)步驟中所實施之處理，若係以治療患者為目的而實施，並且結果引起患者淋巴細胞數減少之處理，則無特別限定。通常，上述處理係以抑制癌細胞增殖或者毒殺癌細胞為目的者，例如可例示投予抗癌劑或照射放射線。作為引起被投予患者之淋巴細胞數減少之抗癌劑，對本發明並無特別限定，例如可例示：代謝拮抗劑(氟尿嘧啶、甲胺喋呤、吉西他濱、氟達拉濱)、抗生素(博來黴素、阿黴素、絲裂黴素)、微小管阻斷劑(紫杉醇、多烯紫杉醇、長春新鹼)、拓撲異構酶抑制劑(伊立替康、滅必治、阿黴素)、鉑製劑(順鉑、卡鉑、奈達鉑)、烷化劑(環磷醯胺)、腎上腺皮質類固醇劑(地塞米松)等。再者，本發明亦包括：將此處具體例示之抗癌劑製成其等於藥學上所容許之酯及/或其等於藥學上所容許之鹽而加以使用之態樣。該等抗癌劑，可單獨投予或者適當地併用投予，亦可將引起

淋巴細胞數減少之抗癌劑與不引起淋巴細胞減少之其他抗癌劑併用。又，作為抗癌劑，若係引起被投予患者之淋巴細胞數減少者，則亦包括在癌轉移抑制劑中。

於本發明中，所謂淋巴細胞數之減少，意指與實施(A)步驟前相比，血液中之淋巴細胞數有所減少。例如，為血液中之淋巴細胞數減少至成人為1000/ μ L以下、幼兒為3000/ μ L以下之狀態。

(A)步驟可進行單次處理，亦可重複進行多次。處理之次數或條件，例如抗癌劑之投予量，可考慮對癌細胞之作用或對患者之損傷而確定。例如，於(A)步驟係投予抗癌劑之情形時，可分成數次例如2~5次來投予抗癌劑，再進入後面的(B)步驟。此處抗癌劑之投予量，可全部設為相同量，亦可相對於最初之投予量而降低第2次以後之投予量。又，於(A)步驟為投予抗癌劑之情形時，對於其投予並無特別限定，可採用公知之投予方法、投予量。

於(B)步驟中向患者投予之淋巴細胞，若可防止或減輕由(A)步驟中所引起之淋巴細胞數減少所導致之患者免疫功能之再建，即免疫功能之降低，且可維持或恢復患者之免疫能力者，則無特別限定。作為上述淋巴細胞，可使用含有淋巴細胞之細胞群。例如可例示：含有藉由公知方法自末梢血液、臍帶血、骨髓等材料中分離出之淋巴細胞的細胞群；或含有源自上述材料之淋巴細胞之前驅細胞例如由單核細胞所製備之淋巴細胞的細胞群。再者，上述材料，可為自患者自身所採集者(自身淋巴細胞)、自患者以

外之供體所採集者(供體淋巴細胞)中之任意者，但較好的是使用自患者自身所採集者。於自患者採集上述材料或者淋巴細胞之情形時，其採集時間在(A)步驟之前或之後均可。又，於(B)步驟中，向患者投予之淋巴細胞，亦可為導入有外來基因者。再者，所謂「外來基因」，意指被人為地導入至基因導入對象之淋巴細胞中的基因，亦包含與基因導入對象的淋巴細胞來源相同者。

進而，於(B)步驟中，向患者投予之淋巴細胞之投予量或其各條件，可根據免疫狀態來設定。雖然並不特別限定本發明，例如作為成人每日之投予量，可例示：較好的是 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^{12}$ cells/日，更好的是 $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^{11}$ cells/日，更好的是 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^{11}$ cells/日。又，投予量亦視(A)步驟中的處理而改變。通常，淋巴細胞係藉由注射或點滴而投予至靜脈、動脈、皮下、腹腔內等。

進而，上述含有淋巴細胞之細胞群，亦可為將合適的細胞群供於人工之細胞培養操作而獲得的培養物。作為較好的態樣，可例示：作為上述培養，係使用使淋巴細胞數擴大之條件，再將所獲得之培養物投予患者的癌治療方法。例如，可將藉由使用含有周邊血液單核細胞或臍帶血液單核細胞、造血幹細胞等淋巴細胞或淋巴細胞之前驅細胞的材料，在抗CD3抗體、抗CD28抗體、細胞激素(IL-2、IL-15、介白素-7 (IL-7)、介白素-12 (IL-12)、干擾素- γ (IFN- γ)、干擾素- α (IFN- α)、干擾素- β (IFN- β))、趨化素(chemokine)等公知之淋巴細胞刺激因子或者共刺激因子的

存在下實施培養而獲得之細胞群，用於本發明之治療方法中。可較好地例示：藉由在IL-2及抗CD3抗體之存在下實施培養而獲得之細胞群。

特別是，作為本發明治療方法所使用之供於人工之細胞培養操作而獲得之培養物，可例示：在纖維結合蛋白、纖維結合蛋白之片段或其等之混合物的存在下實施培養而獲得之細胞群。此處，作為纖維結合蛋白之片段，可例示含有序列表之序列號1~8所表示的胺基酸序列(纖維結合蛋白之III-8、III-9、III-10、III-11、III-12、III-13、III-14、CS-1區域)的片段，可較好地例示：纖維結合蛋白之細胞結合區域(III-8至III-10之區域)、肝素結合區域(III-12至III-14之區域)、CS-1區域中之任一區域的片段。此處，所謂纖維結合蛋白之片段，亦包括重複含有上述序列表之序列號1~8所表示的胺基酸序列的片段。作為本發明所使用之纖維結合蛋白之片段，尤其好的是由如下之多肽所構成者，該多肽具有序列表之序列號9~23所表示之胺基酸序列的片段，或者具有與上述所例示之纖維結合蛋白的片段相同功能，且具有構成該片段之多肽的胺基酸序列中有1個或多個胺基酸發生取代、缺失、插入或附加的胺基酸序列。

胺基酸之置換等，較好的是，在可維持多肽原本之功能的範圍內，可改變該多肽之物理化學性狀等的程度者。例如，胺基酸之置換等，較好的是具有實質上不改變多肽本來所具有之性質(例如，疏水性、親水性、電荷、pK等)之

範圍的保存性者。例如，胺基酸之置換為：1. 甘胺酸、丙胺酸，2. 纈胺酸、異白胺酸、白胺酸，3. 天冬胺酸、麩胺酸、天冬醯胺、麩醯胺酸，4. 絲胺酸、蘇胺酸，5. 離胺酸、精胺酸，6. 苯丙胺酸、酪胺酸之各群組內之置換；胺基酸之缺失、附加、插入，較好的是多肽中具有與其等對象部位周邊性質類似之性質的胺基酸，在實質上不改變對象部位周邊性質之範圍內的缺失、附加、插入。

藉由在纖維結合蛋白、纖維結合蛋白之片段或者其等之混合物的存在下實施培養而獲得之細胞群之製造方法，例如可依據國際公開第 03/016511 號案、國際公開第 03/080817 號案、國際公開第 2005/019450 號案、日本專利特開 2007-061020、國際公開第 2007/020880 號案、或國際公開第 2007/040105 號案中所記載之方法來實施。

本發明所使用之含有淋巴細胞之細胞群，較好的是含有高比例之 T 細胞的細胞群，尤其好的是，含有高比例之未活化 T 細胞、或表現未活化 T 細胞之表面抗原標記物即 CD45RA、CD62L、CCR7、CD27、CD28 等之 T 細胞（以下，稱為未活化類 T 細胞）的細胞群。（A）步驟後之患者體內，於血液中含有大量源自被殺傷之癌細胞之游離癌抗原，其等被巨噬細胞或樹狀細胞等抗原提示細胞所吞噬，形成大量提示癌抗原之狀態，從而形成易於誘導具有癌抗原特異性細胞毒殺活性之 CTL 的狀態。因此，其具有以下優點：藉由於（B）步驟中投予含有高比例之未活化 T 細胞或未活化類 T 細胞的細胞群，使該細胞在患者體內與癌抗原

接觸，而誘導成為具有特異性殺傷患者之癌細胞之能力的CTL。進而，含有高比例之未活化T細胞或未活化類T細胞的細胞群，可在患者體內長期生存。作為用以獲得含有高比例之未活化類T細胞之細胞群的手段，並無特別限定，例如較好的的是在上述纖維結合蛋白、纖維結合蛋白之片段或者其等之混合物的存在下，對含有淋巴細胞或淋巴細胞之前驅細胞的材料進行培養。又，作為含有高比例之未活化T細胞的細胞群，可使用含有高比例之以上述未活化T細胞之表面抗原標記物作為指標，並藉由公知方法所分離出之未活化T細胞的細胞群。

又，作為含有上述淋巴細胞之細胞群，可使用含有高比例之癌細胞特異性CTL的細胞群。此處，作為含有高比例之癌細胞特異性細胞毒性T細胞的細胞群，例如可使用以如下方式而獲得之培養物：使用實施(A)步驟後或實施(B)步驟後自患者體內所採集之周邊血液單核細胞，將其供於如上述之人工細胞培養操作而獲得的培養物。如上所述，於實施(A)步驟後，形成易於誘導具有癌抗原特異性細胞毒殺活性的CTL的狀態，末梢血液中含有大量之癌抗原特異性CTL，因此適宜作為投予患者之淋巴細胞之培養物的材料。又，如下所述，於多次實施由(A)步驟及(B)步驟所構成之步驟之情形時，可於實施(B)步驟後，自患者體內採集周邊血液單核細胞，將其用於下一循環之(B)步驟中之淋巴細胞投予。又，作為含有高比例的癌細胞特異性細胞毒性T細胞之細胞群，亦可例示：自癌性胸腹水或附近

淋巴結等所採集之腫瘤組織浸潤淋巴細胞(TIL)或者該淋巴細胞之培養物等。

可對患者實施(A)步驟後，迅速地實施(B)步驟。此處，所謂「迅速地實施」，包括在可獲得由投予(B)步驟中之淋巴細胞所帶來之所需效果的範圍內，於(A)步驟後設置適當之間隔而實施(B)步驟的情況。例如，於投予抗癌劑作為(A)步驟之情形時，上述間隔，可考慮所使用抗癌劑之體內動態例如血漿半衰期等，在伴有淋巴細胞數減少之範圍內適當地設定。作為(A)步驟與(B)步驟之間隔，例如為1小時~10日，較好的是3小時~8日，更好的是12小時~6日。又，於實施放射線照射作為(A)步驟之情形時的(A)步驟與(B)步驟之間隔，亦可同樣地設定。又，放射線之照射量，可根據通常之治療進行適當選擇。再者，如下所述，在多次實施(A)步驟後實施(B)之情形時，係設為由最後實施之(A)步驟而算出的間隔。

又，於實施(A)步驟後，亦可藉由確認患者血液中之淋巴細胞數而監測淋巴細胞數減少的狀態，而確定(B)步驟之實施時期。上述態樣並非特別限定本發明者，例如可在患者之血液中之淋巴細胞數以成人計減少為1000/ μ L以下，以幼兒計減少為3000/ μ L以下時，進行淋巴細胞之投予。又，亦可藉由測定作為淋巴細胞數減少之指標例如血液中之嗜中性白血球數或白血球數，來推測淋巴細胞數減少而實施。上述態樣並非特別限定本發明者，例如可在患者血液中之嗜中性白血球數減少至1500/ μ L以下或者患者

血液中之白血球數減少至4000/ μ L時實施(B)步驟。

於本發明之治療方法中，亦可投予可針對欲治療之癌而發揮疫苗之功能的成分，即癌疫苗。例如，亦可投予：腫瘤抗原、具有可提示抗原之能力的細胞、經抗原提示之細胞、藉由人工操作而喪失增殖能力之源自腫瘤組織的細胞、或自腫瘤組織之萃取物等。

進而，於本發明之治療方法中，亦可適當投予淋巴細胞刺激因子，例如：抗CD3抗體、抗CD28抗體、細胞激素(IL-2、IL-15、IL-7、IL-12、IFN- γ 、IFN- α 、IFN- β 等)、趨化素等。再者，於本說明書中，所謂淋巴細胞刺激因子，係指包含淋巴細胞增殖因子者。

上述癌疫苗或淋巴細胞刺激因子向患者之投予，較好的是，在與(B)步驟之淋巴細胞投予的同時或者其後實施，藉此可期待自體外投予之淋巴細胞的活化。

進而，作為本發明之較好的態樣，可例示：多次反覆進行上述(A)、(B)兩步驟之組合的癌治療方法。例如，可於實施(A)步驟前，自患者體內採集周邊血液單核細胞，將該周邊血液單核細胞作為材料，藉由如上述之公知培養方法製造包含淋巴細胞之細胞群，使用該細胞群在適當時期實施(B)步驟。可多次實施如此之包含(A)、(B)兩步驟之療程。再者，於兩個療程後之(B)步驟中，可藉由使用漿於實施前一療程之(A)步驟後或者實施(B)步驟後自患者體內所採集之淋巴細胞例如周邊血液單核細胞作為材料，並且實施如上述之公知培養方法而獲得之細胞群，可進行含有

更高比例之癌細胞特異性細胞毒性T細胞的細胞群之投予。

對於應用本發明治療方法之癌，並無特別限定，例如可例示：食道癌、肺癌、骨髓瘤、卵巢癌、頭頸部癌等。如上所述，本發明中可併用癌疫苗，因此，本發明之治療方法適於對已知適當疫苗之癌進行治療，例如表現MAGE-A4、NY-ESO-1、SAGE、WT-1、MAGE-A3、gp100、MART-1等腫瘤抗原的癌之治療。又，本發明之治療方法，亦可應用於切除腫瘤組織後所實施之抗癌劑治療。

根據本發明，尤其可提供一種以骨髓瘤、食道癌、頭頸部癌、卵巢癌等難治性癌為對象之，使用人類淋巴細胞之癌免疫重建療法。本發明之所謂癌免疫重建療法，係指將細胞毒性強之癌治療處理(例如，投予抗癌劑、照射放射線)與作為過繼免疫療法之投予培養淋巴細胞加以組合而成的療法。藉由化學性、物理性癌治療之處理，而殺傷癌細胞使癌縮小，並且藉由投予淋巴細胞，而強化一般之免疫功能，並強化癌免疫。進而，本發明之癌免疫重建療法，藉由在進行使用抗癌劑或照射放射線之處理後，快速地向患者補充淋巴細胞，可於維持免疫功能方面維持充分之淋巴細胞數。藉此，可大幅降低由病毒或細菌、真菌等病原性微生物所造成之感染症之危險性。

所投予之淋巴細胞，與利用抗癌劑等破壞癌細胞而釋放出之腫瘤抗原、或由針對抗癌劑之生存能力較高的巨噬細胞或樹狀細胞等所提示的腫瘤抗原相接觸，藉此大量誘導

針對所欲治療之癌的特異性細胞毒性。進而，由於抗癌劑等使抑制性淋巴細胞減少，故而可促進上述細胞毒性淋巴細胞之活化。又，當淋巴細胞數恢復時，可投予如上述之癌疫苗，以進一步促進癌免疫。

藉由投予抗癌劑，可縮小癌，作為其副作用，淋巴細胞等血球細胞會減少。本發明之癌免疫重建療法之另一方面，藉由在該淋巴細胞減少變得容易引起各種感染症之前，將淋巴細胞，較好的是經擴大培養之自身淋巴細胞送回患者體內，可預防感染症。進而，可防止通常於癌症患者中可見之免疫功能降低，而提昇患者之生活品質(Quality of Life)。

以下，就本發明之治療劑加以說明。本發明提供一種可用於上述本發明之癌治療方法的癌治療劑。本發明之治療劑，其特徵在於：含有淋巴細胞作為其有效成分。又，該治療劑，係用於繼上述處理後向實施有伴有淋巴細胞減少之處理之患者進行快速投予的癌治療劑。雖然不特別限定本發明，例如附加有為了用於本發明之癌治療方法之指導書的含有淋巴細胞之製劑，係包括在本發明中。

所謂作為本發明治療劑之有效成分的淋巴細胞，意指於上述本發明之癌治療方法之(B)步驟中，投予患者之淋巴細胞或者含有淋巴細胞之細胞群。如上所述，上述淋巴細胞或者含有淋巴細胞之細胞群，可為源自患者自身之自身淋巴細胞、自患者以外之供體所採集的供體淋巴細胞中之任意者，亦可為供於人工細胞培養操作而獲得之培養物。

本發明之治療劑，可將作為有效成分之淋巴細胞、含有淋巴細胞之細胞群、含有上述細胞或細胞群之培養物，與公知之適於非經口投予之有機或無機載體、賦形劑、穩定劑等進行混合，而製成點滴劑、注射劑。對於其投予方法亦無特別限定，可利用與含有細胞之公知醫藥品相同之方法，例如利用注射或點滴進行靜脈內投予。

進而，本發明提供一種分別含有引起淋巴細胞數減少之抗癌劑及上述治療劑之癌治療用套組。此處，作為引起淋巴細胞數減少之抗癌劑，可例示上述本發明之治療方法中所使用者，其係使用於(A)步驟中之處理。

又，作為本發明之癌治療用套組之另一態樣，可提供一種分別含有上述治療劑或癌治療用套組、及上述癌疫苗及/或淋巴細胞刺激因子之癌治療用套組。

進而，作為本發明之癌治療用套組之另一態樣，亦可提供一種將本發明癌治療方法中之(A)步驟之處理中所使用之抗癌劑、與(B)步驟中所投予之淋巴細胞之採集或培養中所使用之器具加以組合之套組。此處，對於上述器具並無特別限定，可例示：採血用袋、細胞培養用容器(燒瓶、袋等)或其他器具。例如，覆蓋抗CD3抗體及/或上述纖維結合蛋白片段之容器、或覆蓋上述成分之載體(珠粒等)，尤其適用於本發明所使用之淋巴細胞之培養。

又，本發明亦包括：本發明之癌治療劑製造中的淋巴細胞或抗癌劑之用途、本發明之癌治療用套組製造中的抗癌劑及淋巴細胞之用途、本發明之癌治療方法中的淋巴細胞

之用途。例如，可藉由使用源自患者自身之培養淋巴細胞及引起淋巴細胞數減少之抗癌劑，來製造或提供本發明之癌治療劑。又，可將引起淋巴細胞數減少之抗癌劑及源自患者自身之培養淋巴細胞作為構成成分，來製造本發明之癌治療用套組。進而，本發明包括：引起淋巴細胞數減少之抗癌劑、淋巴細胞、癌疫苗及/或淋巴細胞刺激因子在癌治療用套組製造中之用途。例如，可藉由將源自患者本身的培養淋巴細胞以及癌疫苗及/或淋巴細胞刺激因子用作本發明癌治療用套組之構成成分，來製造或提供本發明之第四發明之癌治療用套組。

根據本發明，於擴大培養源自免疫功能低下之癌症患者的淋巴細胞時，可藉由使用將如抗CD3抗體之CD3配位子，與如人類CH-296片段[包含序列表之序列號13中所揭示之胺基酸序列的多肽，RetroNectin(註冊商標)：Takara Bio公司製造：以下簡單記作CH-296]之纖維結合蛋白類(選自纖維結合蛋白、纖維結合蛋白之片段、或者其等之混合物中者)固定化之培養器材，即使培養時間為短期，且無論患者罹患何種癌，均可獲得較高之淋巴細胞擴大培養率。又，即使以低於培養淋巴細胞時所使用之通常血漿濃度(1~10%)之血漿濃度條件下實施培養，亦未見擴大培養率有較大之降低。

根據本發明，藉由使用淋巴細胞擴大培養時將如抗CD3抗體的CD3配位子、與如CH-296的纖維結合蛋白類固定化之培養器材，無論患者罹患何種癌，均可自患者外周血單

核細胞(PBMC)獲得 $CCR7^+CD45RA^+$ 細胞群、 $CD27^+CD45RA^+$ 細胞群、 $CD28^+CD45RA^+$ 細胞群、 $CD62L^+CD45RA^+$ 細胞群、 $CCR7^+CD62L^+CD45RA^+$ 細胞群。該等細胞表現型，均係未活化類T細胞中可見之表現型。未活化類T細胞，係可獲得向淋巴結集聚、於體內之高生存性、分化成對源自癌症患者之癌細胞顯示較高的細胞毒殺活性之細胞等，在送回體內時顯示較高之癌治療效果之細胞的指標。即，根據本發明，可使用癌症患者PBMC，製造或提供一種以高比率擴大未活化類T細胞之癌治療效果較高之細胞群。又，由本發明之癌症患者PBMC進行淋巴細胞擴大培養時，使用將CD3配位子及纖維結合蛋白類固定化之培養器材而獲得的細胞，係顯示極高之癌細胞毒殺活性之對癌治療有效的細胞。進而，在對源自癌症患者或供體之淋巴細胞進行擴大培養時，可藉由使用將CD3配位子及纖維結合蛋白類固定化之培養器材，而穩定地獲得較高之淋巴細胞擴大培養率。

再者，在對淋巴細胞進行擴大培養時，使用將CD3配位子及纖維結合蛋白類固定之培養器材之情形，與使用僅將CD3配位子固定之培養器材之情形相比，可獲得含有高含量之上述未活化類T細胞群的淋巴細胞，尤其是 $CCR7^+$ 細胞之比率顯著變高。已知有CCR7係淋巴結內趨化素即CCL21的受體，可期待CCR7表現細胞在淋巴結內識別抗原、分化成細胞毒性淋巴細胞。因此，根據本發明，可製造癌治療效果較高之細胞群，該細胞群係以高比例擴大培

養可在體內識別源自患者之癌細胞、且可獲得較高之進攻能力的CCR7⁺細胞而成。

又，使用將CD3配位子及纖維結合蛋白類固定之培養器材而擴大培養出的淋巴細胞，具有以下效果：在非自身細胞之存在下供於異體混合淋巴細胞反應(Allogeneic mixed lymphocyte reaction (MLR))之情形，與僅使用將CD3配位子固定之培養器材所獲得的淋巴細胞相比，非自身抗原識別細胞之增殖率較高。該細胞針對非自身抗原顯示較高之抗原識別能力，而非自身抗原特異性地發揮增殖能力，因此可獲得較高之治療效果。

使用將CD3配位子及纖維結合蛋白類固定之培養器材而獲得之淋巴細胞之，可將細胞增殖抑制在50%之抗癌劑濃度(50%增殖抑制濃度，以下記作GI₅₀)，就各抗癌劑而言，係高於一般所述的投予後血中殘存濃度之值，因此，上述淋巴細胞即使在各種抗癌劑之存在下亦顯示出較強之增殖性。又，上述GI₅₀高於使用僅將CD3配位子固定之培養器材而獲得之淋巴細胞的GI₅₀。因此，根據本發明，可製造或提供一種被賦予抗癌劑耐性之細胞群。例如，使用癌症患者PBMC，可獲得對抗癌劑顯示出耐性之細胞群，使用該細胞群之過繼免疫療法，對於與抗癌劑組合之癌治療極為有效。

進而，本發明之賦予淋巴細胞以抗癌劑耐性，可針對源自癌症患者及源自供體之任意淋巴細胞而進行，尤其可用於生物活性降低之源自癌症患者的淋巴細胞之擴大方法。

使用將CD3配位子及纖維結合蛋白類固定之培養器材而獲得擴大培養淋巴細胞，將該淋巴細胞加以分離，提高未活化類T細胞之比率，再與抗癌劑例如絲裂黴素C (MMC)投予相組合而進行投予，藉此使細胞投予後之T細胞率及T細胞恢復率進一步提高。此情況表示，未活化類T細胞在生物體內之存活率較高，可藉由投予經擴大培養的未活化類T細胞，而使因投予抗癌劑所造成之淋巴細胞數減少恢復至早期水平。因此，使用高效率地增殖未活化類T細胞而成的細胞群之過繼免疫療法，對於與抗癌劑併用之癌治療極為有效。

根據本發明，可提供一種與抗癌劑併用之抗癌劑耐性之細胞醫藥品。作為該細胞醫藥品之態樣，含有被賦予抗癌劑耐性之細胞作為有效成分。該等細胞醫藥品，可在所投予之抗癌劑殘留於體內之狀態下進行投予，而在抗癌劑之存在下，即抗癌劑之殘留狀態下發揮效果。該等細胞醫藥品，可作為源自免疫功能降低之癌症患者的淋巴細胞而製造，可作為在賦予抗癌劑殘留下所使用的被賦予抗癌劑耐性的源自癌症患者之細胞醫藥品。

根據本發明，可提供一種賦予源自癌症患者或供體的淋巴細胞以抗癌劑耐性之方法，該方法包括在CD3配位子及纖維結合蛋白類之存在下培養淋巴細胞的步驟；該方法可用於對癌症患者實施之過繼免疫療法。

本發明之另一態樣，係關於源自癌症患者之被賦予抗癌劑耐性之擴大培養淋巴細胞在抗癌劑殘留下之用途、源自

癌症患者之被賦予抗癌劑耐性之培養淋巴細胞在癌治療劑製造中之用途、及源自癌症患者之被賦予抗癌劑耐性之培養淋巴細胞之癌治療方法。

進而，根據本發明，可提供一種含有CD3配位子及纖維結合蛋白類之賦予源自癌症患者之淋巴細胞以抗癌劑耐性的套組，以及包括在CD3配位子與纖維結合蛋白類之存在下培養淋巴細胞之步驟之，源自癌症患者的被賦予抗癌劑耐性之淋巴細胞之製造方法。

[實施例]

以下，舉出實施例更具體地說明本發明，但本發明並不受該等記載之任何限定。

實施例1使用小白鼠同系腫瘤模型進行抗癌劑投予後移植入T細胞之效果的研究

(1) 高轉移性B16F10細胞之製備

於麻醉下，將小白鼠黑色素瘤細胞株B16F10(由東北大學加齡研出售)經由尾靜脈投予7週齡的雌性C57BL/6小白鼠(日本SLC公司製造)，於14日後將轉移至肺的腫瘤回收。重複3次以下操作：將所回收之腫瘤分散直至成為單一細胞，在體外(in vitro)進行培養，然後再次投予小白鼠。若最終投予 1×10^5 個細胞，則獲得在14日內可見約有50~100個肺轉移之高轉移性B16F10細胞(以下記作hB16F10)。

(2) 由患癌小白鼠製備脾臟淋巴細胞

以成為 5×10^5 cells/mL之方式，將hB16F10懸浮於

Dulbecco磷酸緩衝生理食鹽水(Baxter公司製造、西格瑪公司製造、或萊富公司(Invitrogen)公司製造，以下記作DPBS)中。將0.2 mL該細胞懸浮液，於麻醉下經由尾靜脈投予7週齡的雌性C57BL/6小白鼠，以形成肺轉移腫瘤。14日後摘出脾臟，於RPMI1640培養基(西格瑪公司製造)中，用載玻片將其搗碎。將10隻小白鼠之經搗碎的脾臟集中回收至管中，使用RPMI1640培養基調整為45 mL，於冰上靜置5分鐘後，通過40 μ m細胞過濾器(Becton Dickinson 公司製造)移入新的管中。離心後除去上清液，作為溶血操作，將沈澱懸浮於2 mL之ACK緩衝液(0.15 M之 NH_4Cl 、0.01 M之 KHCO_3 、0.01 mM之 Na_2EDTA ，pH值為7.4)中。於該懸浮液中進一步添加2 mL之ACK緩衝液使其懸浮，然後以使細胞懸浮液成為50 mL之方式添加RPMI1640培養基。離心後除去上清液，將細胞懸浮於10 mL之RPMI1640培養基中，通過細胞過濾器而移入新的管中。以使細胞懸浮液成為40 mL之方式添加RPMI1640培養基，然後離心除去上清液，之後，將細胞懸浮於將包含RPMI1640培養基及8%人類血清白蛋白(HAS，製劑名：Buminate, Baxter公司製造)之CP-1(極東製藥工業公司製造)進行等量混合而成者中，保存於液氮中直至使用為止。

(3) 抗小白鼠CD3抗體及人類CH-296片段之固定化

將抗小白鼠CD3抗體及人類CH-296片段[包含序列表之序列號13中所揭示之胺基酸序列的多肽，RetroNectin(註冊商標)：Takara Bio公司製造，以下簡單記作CH-296]固

定於以下實驗中所使用之培養器材上。即，以800 μL /孔向12孔細胞培養盤(Corning公司製造)中各添加包含抗小白鼠CD3抗體(R&D Systems公司製造)(最終濃度為7 $\mu\text{g/mL}$)之ACD-A液(Terumo公司製造)，於4 $^{\circ}\text{C}$ 下進行整夜培養。其後，於CH-296刺激群中，以終濃度成為25 $\mu\text{g/mL}$ 之方式添加人類CH-296，進而於室溫下培養5小時。於使用前不久，將包含抗體及CH-296之ACD-A液自培養器材中抽吸除去後，將各孔用DPBS清洗2次，用RPMI1640培養基清洗1次，而供於實驗。

(4) 使用尼龍纖維精製脾臟淋巴細胞

使用用以提高淋巴細胞純度之尼龍纖維，對實施例1-(2)中所製備之脾臟淋巴細胞進行精製。向10 mL注射器(Terumo公司製造)中填充入0.6 g尼龍纖維(和光純藥公司製造)，用DPBS (Dulbecco's磷酸鹽緩衝液)進行平衡化後，於121 $^{\circ}\text{C}$ 下殺菌20分鐘。用含有10%胎牛血清(MP Bio Medicals公司製造，以下記作FBS)之RPMI1640培養基，將該管柱平衡化，於5% CO_2 培養器中，於37 $^{\circ}\text{C}$ 下培養1小時。以不超過 2×10^8 cells之方式，將實施例1-(2)中所製備之脾臟淋巴細胞懸浮於2~3 mL含有10% FBS的RPMI1640培養基中，加入至管柱中，然後於5% CO_2 培養器中於37 $^{\circ}\text{C}$ 下培養1小時。將預先保溫在37 $^{\circ}\text{C}$ 之含有10% FBS之RPMI1640培養基15 mL添加至管柱中，將所溶出之細胞回收。

(5) 小白鼠T細胞群之擴大培養

以成為 1.5×10^6 cells/mL 之方式，將實施例 1-(4) 中所製備之淋巴細胞，懸浮於含有 10% FBS、0.1 mM 之 NEAA mixture (Cambrex 公司製造)、1 mM 之丙酮酸鈉 (Cambrex 公司製造)、50 μ M 之 2-巰基乙醇 (Nacalai Tesque 公司製造)、含有 0.2% HSA 之 GT-T503 培養基 (Takara Bio 公司製造) (以下記作培養用培養基) 中。預先以 1.4 mL/孔，將培養用培養基添加於實施例 1-(3) 中所製備之抗小白鼠 CD3 抗體或者抗小白鼠 CD3 抗體及人類 CH-296 固定化盤中，以 1 mL/孔添加上述細胞懸浮液，於 5% CO₂ 培養器中，於 37°C 下進行培養 (培養第 0 日)。於培養第 3 日，以成為 1.5×10^5 cells/mL 之方式，用培養用培養基，將細胞懸浮液加以稀釋，將全部量移入未進行任何固定化之新的 175 cm² 細胞培養燒瓶 (Corning 公司製造) 中。此時，以終濃度成為 100 U/mL 之方式添加小白鼠 IL-2 (R & D Systems 公司製造)，又，以最終濃度成為 10 ng/mL 之方式添加小白鼠 IL-7 (R & D Systems 公司製造)。於培養第 7 日將細胞回收，供於以下同系腫瘤模型之試驗中。

(6) C57BL/6-hB16F10 之同系腫瘤模型中投予抗癌劑後移植入 T 細胞群之評價

於麻醉下，以與實施例 1-(2) 同樣之方式，經由尾靜脈向 7 週齡的雌性 C57BL/6 小白鼠投予 hB16F10。3 日後，於作為抗癌劑之順鉑 (日醫工公司製造) 投予群中，以 5 mg/kg 之用量進行腹腔內投予；又，於絲裂黴素 C (KYOWA MEDEX 公司製造，以下記作 MMC) 投予群中，以 2 mg/kg 之用量進

行腹腔內投予。進而，於2日後，分別以成為 2.5×10^8 cells/mL之方式，將實施例1-(4)中所製備之細胞或者實施例1-(5)中所製備之細胞分別懸浮於DPBS中，經由尾靜脈投予0.2 mL該懸浮液。設定未投予細胞之群作為對照。定期測定末梢血液中之淋巴細胞數，直至細胞投予後第14日。又，肺轉移數，係於最終日(細胞投予後第14日)將小白鼠麻醉後放血處死，摘出肺，測量已發生轉移之群落數。其結果為，於任一細胞投予群中，末梢血液中的淋巴細胞數均較多，可認為對伴有因投予抗癌劑而導致淋巴細胞數減少之感染症，顯示預防效果。又，細胞投予群之肺轉移數均小於僅投予抗癌劑群，可確認與抗癌劑之併用效果。

實施例2由癌症患者周邊血液單核細胞(PBMC)擴大培養淋巴細胞-1

(1) PBMC及完成滅活之血漿的分離

對獲得知情同意之人類癌症患者供體，實施50~58 mL之加肝素採血，然後將所得血液以 $700 \times g$ 進行20分鐘離心。分別將離心後之上清液即血漿部分及含有PBMC之細胞部分加以回收。對於血漿部分，係於 56°C 下進行30分鐘滅活處理後，以 $900 \times g$ 進行30分鐘離心。回收離心後之上清液，作為完成滅活之血漿，供於各實驗。含有PBMC之細胞部分，係以DPBS進行稀釋，疊加於Ficoll-paque (GE Healthcare Bioscience公司製造)上，以 $700 \times g$ 進行20分鐘離心。用移液管，將中間層之PBMC加以回收、清洗，利用

自動血球測量裝置(Nucleocounter Chemometec公司製造)算出活細胞數，供於各實驗。

(2) 抗CD3單株抗體(OKT3)及CH-296之固定化

將OKT3及CH-296固定於以下實驗中所使用的培養器材上。即，將含有OKT3(最終濃度5 $\mu\text{g/mL}$)及CH-296(最終濃度25 $\mu\text{g/mL}$)之ACD-A液分別以10.4 mL/袋(培養開始面積為86 cm^2 之情形)或者以26.0 mL/袋(培養開始面積為215 cm^2 之情形)添加於氣體透過性培養袋Culti Life 215 (Takara Bio公司製造)中，於5% CO_2 中，於37°C下培養5小時。又，於使用前，用RPMI1640培養基將上述袋清洗3次，然後供於各實驗。

(3) 淋巴細胞之擴大培養

將實施例2-(1)中所分離之 $0.7\sim 1.2\times 10^7$ cells之周邊血單核細胞(PBMC)懸浮於120 mL之含有0.6~1.0%完成滅活之血漿之KBM551 (Takara Bio公司製造，以下記作含有血漿之KBM551)中(培養開始面積為86 cm^2 時)，或者將 $2.1\sim 4.2\times 10^7$ cell之PBMC懸浮於300 mL之含有0.6~1.0%完成滅活之血漿的含血漿之KBM551中(培養開始面積為215 cm^2 時)，再添加至實施例2-(2)中所製作之OKT3及CH-296固定化Culti Life 215中。以終濃度成為200 U/mL之方式，添加IL-2(製劑名：Proleukin, Chiron公司製造)，於5% CO_2 中，於37°C下進行培養(培養第0日)。於培養開始第4日，將各Culti Life 215內之細胞液加以懸浮，將一部分稀釋後移入未進行任何固定化之氣體透過性培養袋Culti Life Eva

(Takara Bio公司製造)中。此時，每100 cm²培養面積添加9.4 mL細胞液，每100 cm²培養面積添加68.8 mL含血漿之KBM551。以濃度成為200 U/mL之方式，添加IL-2，於5% CO₂中於37℃下進行培養。繼續進行培養，於培養開始第7日，於各Culti Life Eva中添加細胞液及不含等量血漿之KBM551(以下，記作無血漿KBM551)進行2倍稀釋後，以終濃度成為200 U/mL之方式添加IL-2。於培養開始後第10日，將各Culti Life Eva內之細胞液懸浮後，除去一半量，添加與細胞液為等量之無血漿KBM551，進行2倍稀釋後，以終濃度成為200 U/mL之方式添加IL-2。於培養開始第10日及第14日，使用自動血球測量裝置測量活細胞數，將其與培養開始時之細胞數進行比較，算出擴大培養率。結果示於表1。

[表 1]

癌患者編號	癌種類	擴大培養率(倍率)	
		培養開始第10日	培養開始第14日
PT001	胃癌	x431	N. T.
PT002	乳癌	x554	N. T.
PT003	乳癌	x358	N. T.
PT004	胰癌	x319	N. T.
PT005	胰癌	x466	N. T.
PT006	乳癌	x610	N. T.
PT007	食道癌	x290	x385
PT008	咽喉癌	x338	x646
PT009	大腸癌	x471	x1013
PT010	胃癌	x336	N. T.
PT011	乳癌	x463	N. T.
PT012	直腸癌	x435	x1036
PT013	乳癌	x796	x1484

N. T.=No Test(未測試)

如表1所示，於擴大培養源自免疫能力或淋巴細胞活性降低之癌症患者之淋巴細胞時，使用將抗CD3抗體及CH-296固定化的培養器材，結果於任一癌種之任意培養期間均獲得較高之淋巴細胞擴大培養率。又，可明瞭，即使在低於通常淋巴細胞培養時所使用之血漿濃度(1~10%)的血漿濃度條件下，亦可獲得較高之擴大培養率。

(4) CCR7⁺CD45RA⁺細胞、CD27⁺CD45RA⁺細胞、CD28⁺CD45RA⁺細胞、CD62L⁺CD45RA⁺細胞、CCR7⁺CD62L⁺CD45RA⁺細胞之分析(+表示抗體反應性呈陽性)

用含有1%牛血清白蛋白(BSA，西格瑪公司製造)之DPBS(以下記作1% BSA/DPBS)或者DPBS，將實施例2-(3)中所製備的培養第10日及第14日之細胞加以清洗，然後將細胞懸浮於1% BSA/DPBS中，添加FITC標記小白鼠IgG1/RD1標記小白鼠IgG1/PC5標記小白鼠IgG1 (Beckman Coulter公司製造)作為陰性對照。同樣地，準備添加有RD1標記小白鼠抗人類CD45RA抗體(Beckman Coulter公司製造)/FITC標記小白鼠抗人類CCR7抗體(R & D Systems公司製造)之細胞、添加有RD1標記小白鼠抗人類CD45RA抗體/FITC標記小白鼠抗人類CD28抗體(eBioscience公司製造)/PC5標記小白鼠抗人類CD27抗體(Beckman Coulter公司製造)之細胞、及添加有RD1標記小白鼠抗人類CD45RA抗體/FITC標記小白鼠抗人類CCR7抗體/PC5標記小白鼠抗人類CD62L抗體(Beckman Coulter公司製造)之細胞。添加各抗體後，於冰上培養30分鐘。培養後，用含有0.1% BSA之

DPBS(以下記作0.1% BSA/DPBS)將細胞進行清洗，再次懸浮於DPBS中。將該細胞供於流動式細胞測量儀(Cytomics FC500: Beckman Coulter 公司製造)，算出各細胞群中CCR7⁺CD45RA⁺細胞、CD27⁺CD45RA⁺細胞、CD28⁺CD45RA⁺細胞、CD62L⁺CD45RA⁺細胞、CCR7⁺CD62L⁺CD45RA⁺細胞之比例。結果示於表2、表3、表4、表5、表6。

[表 2]

癌患者編號	癌種類	CCR7 ⁺ CD45RA ⁺ (%)	
		培養開始第10日	培養開始第14日
PT001	胃癌	13.4	N. T.
PT002	乳癌	16.9	N. T.
PT003	乳癌	8.1	N. T.
PT004	胰癌	39.7	N. T.
PT005	胰癌	18.7	N. T.
PT006	乳癌	44.3	N. T.
PT007	食道癌	13.6	12.5
PT008	咽喉癌	4.2	9.5
PT009	大腸癌	23.4	8.0
PT010	胃癌	19.4	N. T.
PT011	乳癌	4.7	N. T.
PT012	直腸癌	16.4	12.2
PT013	乳癌	37.3	42.8

[表 3]

癌患者編號	癌種類	CD27 ⁺ CD45RA ⁺ (%)	
		培養開始第10日	培養開始第14日
PT001	胃癌	47.0	N. T.
PT002	乳癌	58.2	N. T.
PT003	乳癌	35.1	N. T.
PT004	胰癌	56.3	N. T.
PT005	胰癌	49.8	N. T.
PT006	乳癌	80.8	N. T.
PT007	食道癌	33.8	29.0
PT008	咽喉癌	32.3	31.7
PT009	大腸癌	24.6	24.5
PT010	胃癌	50.4	N. T.
PT011	乳癌	26.5	N. T.
PT012	直腸癌	44.3	25.7
PT013	乳癌	N. T.	63.8

[表 4]

癌患者編號	癌種類	CD28 ⁺ CD45RA ⁺ (%)	
		培養開始第10日	培養開始第14日
PT001	胃癌	53.7	N. T.
PT002	乳癌	61.1	N. T.
PT003	乳癌	34.1	N. T.
PT004	胰癌	59.0	N. T.
PT005	胰癌	48.8	N. T.
PT006	乳癌	82.8	N. T.
PT007	食道癌	39.5	40.3
PT008	咽喉癌	49.4	52.6
PT009	大腸癌	24.5	36.0
PT010	胃癌	45.7	N. T.
PT011	乳癌	32.9	N. T.
PT012	直腸癌	41.8	23.9
PT013	乳癌	86.6	65.2

[表 5]

癌患者編號	癌種類	CD62L ⁺ CD45RA ⁺ (%)	
		培養開始第10日	培養開始第14日
PT006	乳癌	91.5	N. T.
PT007	食道癌	29.0	48.4
PT008	咽喉癌	79.4	20.6
PT009	大腸癌	31.7	73.4
PT012	直腸癌	37.7	N. T.
PT013	乳癌	74.5	N. T.

[表 6]

癌患者編號	癌種類	CCR7 ⁺ CD62L ⁺ CD45RA ⁺ (%)	
		培養開始第10日	培養開始第14日
PT006	乳癌	32.7	N. T.
PT007	食道癌	46.4	14.7
PT008	咽喉癌	12.5	8.8
PT009	大腸癌	10.3	12.6
PT012	直腸癌	9.8	N. T.
PT013	乳癌	35.5	N. T.

如表 2、表 3、表 4、表 5、表 6 所示，藉由在進行淋巴細胞擴大培養時使用將抗 CD3 抗體及 CH-296 固定之培養器材，自任一癌種之患者 PBMC 均可獲得 CCR7⁺CD45RA⁺細胞群、CD27⁺CD45RA⁺細胞群、CD28⁺CD45RA⁺細胞群、CD62L⁺CD45RA⁺細胞群、CCR7⁺CD62L⁺CD45RA⁺細胞群。該等中之任一細胞群均為未活化類 T 細胞中可見之表現型，可期待其向淋巴結的集聚、體內生存性的上升、向針對源自癌症患者的癌細胞顯示高細胞毒殺活性之細胞的分化等，將擴大培養後之淋巴細胞送回體內時之較高的癌治療效果。根據該實施例可明瞭，在使用癌症患者 PBMC

進行淋巴細胞擴大培養時使用抗CD3抗體及CH-296，藉此可製造未活化類T細胞高效率增殖之癌治療效果較高的細胞群。

(5) 非自身特異性細胞毒殺活性之測定

實施例2-(3)中所製備之培養開始後第10日及第14日之細胞的細胞毒殺活性，係藉由使用Calcein-AM之細胞毒殺活性測定法[Lichtenfels R.等人，J. Immunol. Methods，第172卷，第2號，第227~239頁(1994)]進行評價。以成為 1×10^6 cells/mL之方式將K562細胞(ATCC CCL-243，以下記作K562)及Daudi細胞(ATCC CCL-213，以下記作Daudi)懸浮於含有5% FBS之RPMI1640培養基中，然後以終濃度成為25 μ M之方式添加Calcein-AM(同仁化學研究所公司製造)，於37下培養1小時。用不含Calcein-AM的培養基將細胞加以清洗後，形成Calcein標記標的細胞。

於實施例2-(3)中，將作為源自癌患者編號PT008之細胞而製備的培養開始後第10日及第14日之細胞，作為效應細胞，以成為 $3 \times 10^5 \sim 9 \times 10^6$ cells/mL之方式，用含有5%人類AB型血清、2 mM之L-麩醯胺酸(全部係Cambrex公司製造)、1 mM之丙酮酸鈉、 $1 \times$ NEAA Mixture、100 μ g/mL硫酸鏈黴素(明治製菓公司製造)之RPMI1640培養基(以下記作5HRPMI)進行階段稀釋後，以100 μ L/孔分別注入96孔細胞培養盤(Becton Dickinson 公司製造或者Corning公司製造)之各孔中，以100 μ L/孔向該等孔中添加調整為 1×10^5 /mL之Calcein標記標的細胞(K562或者Daudi)。此時，

以 E/T 比來表示效應細胞 (E) 相對於 Calcein 標記標的細胞 (T) 之比，對 E/T 比 90、30、10、3 進行測定。以 210×g，對加入有上述細胞懸浮液之盤離心 1 分鐘後，於 5% CO₂ 之存在下，於 37℃ 下培養 4 小時。4 小時後，自各孔中採集 100 μL 培養上清液，利用螢光分析儀[Berthold technologies 公司製造](激發波長 485 nm/測定波長 538 nm)測定自培養上清液中釋放出之 Calcein 量。「細胞毒殺活性(%)」係依據下式 1 算出。

$$\text{式 1: 細胞毒殺活性(\%)} = \frac{(\text{各孔之測定值} - \text{最小釋放量})}{(\text{最大釋放量} - \text{最小釋放量})} \times 100$$

於上式中，最小釋放量，係僅含有 Calcein 標記標的細胞的孔之 Calcein 釋放量，表示 Calcein 自 Calcein 標記標的細胞中之自然釋放量。又，最大釋放量，表示向 Calcein 標記標之細胞中加入 0.1% Triton X-100 (Nacalai Tesque 公司製造) 作為界面活性劑，而將細胞完全破壞時之 Calcein 釋放量。測定結果示於表 7。

[表 7]

癌患者編號	癌種類	標的細胞	E/T 比	細胞毒殺活性(%)	
				培養開始第 10 日	培養開始第 14 日
PT008	咽喉癌	K562	90	77.8	60.1
PT008	咽喉癌	K562	30	68.6	31.6
PT008	咽喉癌	K562	10	38.7	12.0
PT008	咽喉癌	K562	3	10.4	0.2
PT008	咽喉癌	Daudi	90	68.9	54.8
PT008	咽喉癌	Daudi	30	59.0	40.1
PT008	咽喉癌	Daudi	10	45.6	32.7
PT008	咽喉癌	Daudi	3	15.8	17.6

如表7所示，使用由癌症患者PBMC進行淋巴細胞擴大培養時，將抗CD3抗體及CH-296固定之培養器材的細胞，無論培養時間如何，均顯示極高之癌細胞毒殺活性，係對癌症治療有效之細胞。

實施例3 由癌症患者PBMC擴大培養淋巴細胞-2

(1) OKT3及CH-296之固定化

以與實施例2-(2)同樣之方法，將OKT3及CH-296固定於以下實驗中所使用之培養器材上。

(2) 淋巴細胞之擴大培養

以與實施例2-(3)同樣的方法，進行淋巴細胞之擴大培養。其中，培養時之基礎培養基，係使用含有0.2%人類HAS之GT-T503(以下記作0.2% HSA/GT-T503)；於培養開始時及培養開始第4日所使用之培養基，係使用含有0.6%源自癌症患者之自身血漿的0.2% HSA/GT-T503；於培養開始第7日、第10日所使用之培養基，係使用不含有血漿之0.2% HSA/GT-T503。於培養開始第10日，使用自動血球測量裝置測量活細胞數，再與培養開始時之細胞數進行比較，算出擴大培養率。結果示於表8。

[表8]

癌患者編號	癌種類	擴大培養率(倍率)
PT001	胃癌	x603
PT002	乳癌	x498
PT003	乳癌	x359

如表8所示，於淋巴細胞擴大培養時，藉由使用將抗CD3抗體及CH-296固定之培養器材，無論培養中所使用培

養基之種類或性質如何，均穩定地獲得較高之淋巴細胞之擴大培養率。

(3) CCR7⁺CD45RA⁺ 細胞、CD27⁺CD45RA⁺ 細胞、CD28⁺CD45RA⁺細胞之分析

對於實施例3-(2)中所製備之培養第10日之細胞，以與實施例2-(4)同樣的方法，進行CCR7⁺CD45RA⁺細胞、CD27⁺CD45RA⁺細胞、CD28⁺CD45RA⁺細胞之分析。結果示於表9、表10、表11。

[表 9]

癌患者編號	癌種類	CCR7 ⁺ CD45RA ⁺ (%)
PT001	胃癌	10.3
PT002	乳癌	22.0
PT003	乳癌	10.1

[表 10]

癌患者編號	癌種類	CD27 ⁺ CD45RA ⁺ (%)
PT001	胃癌	26.8
PT002	乳癌	33.5
PT003	乳癌	23.6

[表 11]

癌患者編號	癌種類	CD28 ⁺ CD45RA ⁺ (%)
PT001	胃癌	27.5
PT002	乳癌	43.2
PT003	乳癌	26.5

如表9、表10、表11所示，於源自癌症患者的淋巴細胞之擴大培養中，藉由使用將抗CD3抗體及CH-296固定之培養器材，無論培養中所使用培養基之種類或性質如何，均

可自任一癌種類之患者PBMC獲得CCR7⁺CD45RA⁺細胞群、CD27⁺CD45RA⁺細胞群、CD28⁺CD45RA⁺細胞群。該等中之任意細胞群均係未活化類T細胞中可見之表現型，可期待其向淋巴結之集聚、體內生存性之上升、分化為對源自癌症患者的癌細胞顯示較高之細胞毒殺活性的細胞等，將擴大培養後之淋巴細胞送回至體內時之較高的癌治療效果。由該實施例可明瞭，藉由於使用癌症患者PBMC進行淋巴細胞擴大培養時使用抗CD3抗體及CH-296，可製造以高比率擴大培養未活化類T細胞之癌治療效果較高的細胞群。

實施例4 由癌症患者PBMC進行淋巴細胞之擴大培養-3

(1) OKT3及CH-296之固定化

以與實施例2-(2)同樣的方法，將OKT3及CH-296固定於以下實驗中所使用之培養器材上。

(2) 淋巴細胞之擴大培養

以與實施例2-(3)同樣的方法，進行源自癌症患者編號PT006之淋巴細胞的擴大培養。其中，於培養開始時及第4日，所使用之含有血漿之KBM551中的自身血漿濃度為0.6%或1.2%，於培養開始第7日使用無血漿KBM551或者含有0.6%血漿之KBM551，且設為表12所示之血漿終濃度。於培養開始後第10日，不稀釋細胞液，而以終濃度為200 U/mL之方式添加IL-2。結果示於表12。

[表 12]

癌患者 編號	癌種類	培養液中之血漿終濃度				培養 日數	擴大培養率(倍率)	
		培養 開始 第0日	培養 開始 第4日	培養 開始 第7日	培養 開始 第10日		培養 開始 第10日	培養 開始 第14日
PT006	乳癌	0.6%	0.6%	0.6%	0.6%	10日	x640	N.T.
PT006	乳癌	1.2%	1.2%	0.6%	0.6%	14日	x645	x795

如表 12 所示，於淋巴細胞擴大培養時，藉由使用將抗 CD3 抗體及 CH-296 固定化之培養器材，無論培養液中之血漿濃度如何，均穩定地獲得較高之淋巴細胞的擴大培養率。

(3) CCR7⁺CD45RA⁺ 細胞、CD27⁺CD45RA⁺ 細胞、CD28⁺CD45RA⁺ 細胞之分析

對於實施例 4-(2) 中所製備之培養第 10 日及第 14 日之細胞，以與實施例 2-(4) 同樣的方法，進行 CCR7⁺CD45RA⁺ 細胞、CD27⁺CD45RA⁺ 細胞、CD28⁺CD45RA⁺ 細胞之分析。結果示於表 13、表 14、表 15。

[表 13]

癌患者 編號	癌種類	培養液中之血漿終濃度				培養 日數	CCR7 ⁺ CD45RA ⁺ (%)	
		培養 開始 第0日	培養 開始 第4日	培養 開始 第7日	培養 開始 第10日		培養 開始 第10日	培養 開始 第14日
PT006	乳癌	0.6%	0.6%	0.6%	0.6%	10日	42.9	N.T.
PT006	乳癌	1.2%	1.2%	0.6%	0.6%	14日	32.1	42.6

[表 14]

癌患者 編號	癌種類	培養液中之血漿終濃度				培養 日數	CD27 ⁺ CD45RA ⁺ (%)	
		培養 開始 第0日	培養 開始 第4日	培養 開始 第7日	培養 開始 第10日		培養 開始 第10日	培養 開始 第14日
PT006	乳癌	0.6%	0.6%	0.6%	0.6%	10日	78.4	N. T.
PT006	乳癌	1.2%	1.2%	0.6%	0.6%	14日	74.6	68.1

[表 15]

癌患者 編號	癌種類	培養液中之血漿終濃度				培養 日數	CD28 ⁺ CD45RA ⁺ (%)	
		培養 開始 第0日	培養 開始 第4日	培養 開始 第7日	培養 開始 第10日		培養 開始 第10日	培養 開始 第14日
PT006	乳癌	0.6%	0.6%	0.6%	0.6%	10日	80.5	N. T.
PT006	乳癌	1.2%	1.2%	0.6%	0.6%	14日	76.2	70.4

如表 13、表 14、表 15 所示，於進行淋巴細胞擴大培養時，藉由使用將抗 CD3 抗體及 CH-296 固定化之培養器材，無論培養液中的血漿濃度如何，均獲得 CCR7⁺CD45RA⁺細胞群、CD27⁺CD45RA⁺細胞群、CD28⁺CD45RA⁺細胞群。該等中之任一細胞組群均係未活化類 T 細胞中可見之表現型，可期待其向淋巴結之集聚、體內生存性之上升、分化為對源自癌症患者之癌細胞顯示高細胞毒殺活性的細胞等，將擴大培養後之淋巴細胞送回至體內時較高的癌治療效果。由該實施例可明瞭，於使用癌症患者 PBMC 進行淋巴細胞擴大培養時，可藉由使用抗 CD3 抗體及 CH-296，來製造以高比率擴大培養未活化類 T 細胞之癌治療效果較高的細胞群。

實施例 5 源自癌症患者 PBMC 之淋巴細胞之擴大培養 -

4(使用培養燒瓶之培養)

(1) OKT3及CH-296之固定化

將OKT3及CH-296固定於以下實驗中所使用之培養器材上。即，將含OKT3(終濃度5 $\mu\text{g/mL}$)及CH-296(終濃度25 $\mu\text{g/mL}$)之ACD-A液，以0.45 mL/孔添加於12孔細胞培養盤(Corning公司製造)中，於5% CO_2 中，於37°C下培養5小時。此時，亦設定僅將OKT3固定化之群。於使用前不久，自該等培養器材中，將含有OKT3或OKT3及CH-296之ACD-A液吸引除去後，用DPBS清洗2次，用RPMI1640培養基清洗1次後，供於各實驗。

(2) 淋巴細胞之擴大培養

將實施例2-(1)中所分離之源自人類癌症患者之PBMC 0.53×10^6 cells，懸浮於含有0.6%血漿之KBM551或者0.2% HSA/GT-T503 5.3 mL中，再添加於實施例5-(1)中所製作之OKT3固定化盤或者OKT3及CH-296固定化盤中。以終濃度成為200 U/mL之方式，添加IL-2，於5% CO_2 中於37°C下進行培養(培養第0日)。於培養開始第4日，將各孔內之細胞液加以懸浮，使用含有0.6%血漿之KBM551或者0.2% HSA/UT-T503，將其一部分稀釋8.3倍，將稀釋液7.8 mL移入未進行任何固定化之25 cm^2 細胞培養燒瓶(Corning公司製造)中，在任一燒瓶中，以終濃度成為200 U/mL之方式添加IL-2。繼續進行培養，於7第日向各群的培養液中添加等量之無血漿KBM551或0.2% HSA/GT-T503進行2倍稀釋，於任一群中以終濃度成為200 U/mL之方式添加IL-2。

於培養開始後第10日，使用無血漿KBM551或者0.2% HSA/GT-T503，將各群的細胞培養液稀釋2倍，分別將各稀釋液15.6 mL移入設置有未進行任何固定化之新的25 cm²細胞培養燒瓶者中。以終濃度達到200 U/mL之方式於各群中添加IL-2。於培養開始後第10日及第14日，藉台盼藍(Trypan blue)染色法測量活細胞數，與培養開始時之細胞數進行比較，算出擴大培養率。結果示於表16。

[表 16]

癌患者 編號	癌種類	初期刺激	基礎培養基	擴大培養率(倍率)	
				培養 開始 第10日	培養 開始 第14日
PT003	乳癌	OKT3	0.2% HSA/GT-T503	×200	N. T.
PT003	乳癌	OKT3+CH-296	0.2% HSA/GT-T503	×289	N. T.
PT003	乳癌	OKT3	KBM551	×193	N. T.
PT003	乳癌	OKT3+CH-296	KBM551	×249	N. T.
PT006	乳癌	OKT3	KBM551	×202	×382
PT006	乳癌	OKT3+CH-296	KBM551	×386	×620
PT008	咽喉癌	OKT3	KBM551	×119	×292
PT008	咽喉癌	OKT3+CH-296	KBM551	×229	×575
PT012	直腸癌	OKT3	KBM551	×281	×723
PT012	直腸癌	OKT3+CH-296	KBM551	×532	×824

如表16所示，於進行淋巴細胞擴大培養時，藉由使用將抗CD3抗體及CH-296固定化之培養器材，與使用僅將OKT3固定化之培養器材之群進行比較，無論癌種類如何，均獲得較高之淋巴細胞之擴大培養率，於源自癌症患者之淋巴細胞之擴大培養中顯示出顯著的效果。

(3) CCR7⁺CD45RA⁺細胞、CD62L⁺CD45RA⁺細胞、CCR7⁺CD62L⁺CD45RA⁺細胞之分析

以與實施例2-(4)同樣的方法，對實施例5-(2)中製備的培

養第10日及第14日之細胞進行CCR7⁺CD45RA⁺細胞、CD62L⁺CD45RA⁺細胞、CCR7⁺CD62L⁺CD45RA⁺細胞之分析。結果示於表17、表18、表19。

[表 17]

癌患者 編號	癌種類	初期刺激	基礎培養基	CCR7 ⁺ CD45RA ⁺ (%)	
				培養 開始 第10日	培養 開始 第14日
PT003	乳癌	OKT3	0.2% HSA/GT-T503	13.3	N. T.
PT003	乳癌	OKT3+CH-296	0.2% HSA/GT-T503	28.1	N. T.
PT003	乳癌	OKT3	KBM551	5.4	N. T.
PT003	乳癌	OKT3+CH-296	KBM551	11.0	N. T.
PT006	乳癌	OKT3	KBM551	24.9	36.9
PT006	乳癌	OKT3+CH-296	KBM551	41.8	69.0
PT008	咽喉癌	OKT3	KBM551	4.6	4.2
PT008	咽喉癌	OKT3+CH-296	KBM551	7.3	17.2
PT012	直腸癌	OKT3	KBM551	19.4	25.0
PT012	直腸癌	OKT3+CH-296	KBM551	36.0	40.1

[表 18]

癌患者 編號	癌種類	初期刺激	基礎培養基	CD62L ⁺ CD45RA ⁺ (%)	
				培養 開始 第10日	培養 開始 第14日
PT003	乳癌	OKT3	0.2% HSA/GT-T503	52.5	N. T.
PT003	乳癌	OKT3+CH-296	0.2% HSA/GT-T503	54.3	N. T.
PT003	乳癌	OKT3	KBM551	50.9	N. T.
PT003	乳癌	OKT3+CH-296	KBM551	62.9	N. T.
PT006	乳癌	OKT3	KBM551	79.2	75.7
PT006	乳癌	OKT3+CH-296	KBM551	91.6	92.8
PT008	咽喉癌	OKT3	KBM551	53.0	N. T.
PT008	咽喉癌	OKT3+CH-296	KBM551	59.7	N. T.
PT012	直腸癌	OKT3	KBM551	56.0	43.4
PT012	直腸癌	OKT3+CH-296	KBM551	65.3	62.3

[表 19]

癌患者 編號	癌種類	初期刺激	基礎培養基	CCR7 ⁺ CD62L ⁺ CD45RA ⁺ (%)	
				培養 開始 第10日	培養 開始 第14日
PT003	乳癌	OKT3	0.2% HSA/GT-T503	13.1	N. T.
PT003	乳癌	OKT3+CH-296	0.2% HSA/GT-T503	27.7	N. T.
PT003	乳癌	OKT3	KBM551	5.1	N. T.
PT003	乳癌	OKT3+CH-296	KBM551	10.9	N. T.
PT006	乳癌	OKT3	KBM551	24.6	36.7
PT006	乳癌	OKT3+CH-296	KBM551	41.7	68.9
PT008	咽喉癌	OKT3	KBM551	4.2	3.9
PT008	咽喉癌	OKT3+CH-296	KBM551	7.2	17.0
PT012	直腸癌	OKT3	KBM551	17.1	23.4
PT012	直腸癌	OKT3+CH-296	KBM551	30.9	38.9

如表 17、表 18、表 19 所示，於進行淋巴細胞擴大培養時，使用將抗 CD3 抗體及 CH-296 固定化之培養器材的群，與使用僅將抗 CD3 抗體固定化之培養器材的群進行比較，無論癌種類如何，均獲得 CCR7⁺CD45RA⁺ 細胞群、CD62L⁺CD45RA⁺ 細胞群、CCR7⁺CD62L⁺CD45RA⁺ 細胞群。該等中之任一細胞組群均係未活化類 T 細胞中可見之表現型，可期待向淋巴結之集聚、體內生存性之上升、分化為對源自癌症患者的癌細胞顯示高細胞毒殺活性之細胞等，將擴大培養後之淋巴細胞送回至體內時之較高的癌治療效果。又，於該實施例中，於進行淋巴細胞擴大培養時，藉由使抗 CD3 抗體及 CH-296 產生作用，與僅使 OKT3 產生作用時相比，CCR7 陽性細胞之比率顯著增加。已知有 CCR7 係淋巴結內趨化素即 CCL21 之受體，可期待 CCR7 表現細胞於淋巴結內識別抗原、分化為細胞毒性淋巴細胞。因此，可認為，本發明中所製造之淋巴細胞，係在體

內識別源自患者之癌細胞，而具有較高之進攻能力的細胞。即，由實施例可明瞭，在使用癌症患者PBMC進行淋巴細胞擴大培養時，可藉由使用抗CD3抗體及CH-296，來製造以高效率增殖CCR7陽性細胞之癌治療效果較高的細胞群。

實施例6 使用培養淋巴細胞之異體混合淋巴細胞反應(MLR)-1

(1) 所使用淋巴細胞之冷凍保存與融解

將實施例2-(3)中擴大培養之源自癌患者編號PT007之培養開始第10日的細胞，懸浮於RPMI1640培養基中，等量添加以17:8之比例將細胞凍害保護液CP-1(極東製藥公司製造)與25% HSA混合而成的保存液，使其懸浮後，保存於液氮中。使用時，將該等保存培養細胞於37°C水浴中急速融解，用含有10 µg/mL之DNase (Calbiochem公司製造)的RPMI1640培養基進行清洗後，以台盼藍染色法算出活細胞數，供於各實驗。

(2) PBMC之分離及保存

對獲得知情同意之健康人類供體實施血球成分採血後，將採血液用DPBS進行2倍稀釋，疊加於Ficoll-paque上之後，以700×g進行20分鐘離心。離心後，用移液管將中間層之PBMC加以回收，並進行清洗。以成為 5×10^7 cells/mL之方式，將所採集之源自供體的PBMC，懸浮於RPMI1640培養基中，然後以與實施例6-(1)同樣的方法保存及融解於液氮中後，以台盼藍染色法算出活細胞數，供於各實驗。

(3) 異體混合淋巴細胞反應

使用實施例6-(1)及6-(2)中所製備之細胞，來進行異體混合淋巴細胞反應。

使用5HRPMI，將實施例6-(1)中所融解之培養細胞調整為 2×10^6 cells/mL，而用作應答細胞。另一方面，使用X射線照射裝置(HITEX公司製造260型)，向實施例6-(2)中所製備的源自異體供體(非自身供體：與實施例6-(1)的患者不同之健康人供體)之PBMC進行X線照射(0.88 C/kg)，用5HRPMI進行清洗，然後調整為 2×10^6 cells/mL，而用作刺激細胞。

以應答細胞：刺激細胞之比例為1:1之方式，以0.5 mL/孔，向24孔細胞培養用盤(Corning公司製)中添加所製備之各細胞液。此時，亦設定僅添加應答細胞之群。以終濃度成為500 U/mL之方式，向各孔中添加IL-2，於5% CO₂中、於37°C下開始培養(培養第0日)。再者，淋巴細胞培養培養基中之患者自身血漿濃度如表20所示。

於培養開始第2日，向各孔中添加1 mL之5HRPMI，以終濃度成為500 U/mL之方式添加IL-2(最終細胞液量：2 mL/孔)。

於培養開始第4日，將各孔內之細胞懸浮後，以一半量分入2個孔中，向全部孔中添加1 mL之5HRPMI，並以終濃度成為500 U/mL之方式添加IL-2(最終細胞液量：2 mL/孔)。繼續培養直至培養開始第7日，以台盼藍染色法測量活細胞數，與培養開始時的細胞數進行比較，算出擴大培

養率。結果示於表20。

[表 20]

淋巴細胞培養基中 之血漿濃度	應答細胞： 刺激細胞之比例	擴大培養率 (倍率)
0.6%	1:1	x6.0
0.6%	1:0	x2.3
1.2%	1:1	x5.4
1.2%	1:0	x3.7

如表20所示可明瞭，於進行淋巴細胞擴大培養時，使用將抗CD3抗體及CH-296固定化的培養器材之淋巴細胞，無論淋巴細胞培養中之血漿濃度為如何，在非自身細胞存在下，藉由異體混合淋巴細胞反應，非自身抗原識別細胞均會增殖。由此可明瞭，該培養淋巴細胞，針對非自身抗原顯示出較高之抗原識別能力，具有非自身抗原特異性地發揮增殖能力之優異效果。

(4) 植物凝集素母細胞(Phytohemagglutinin blast)之製備

用5HRPMI將實施例6-(2)中所製備之源自非自身健康人供體之PBMC調製成 1×10^6 cells/mL，以3 mL/孔，播種於6孔細胞培養用盤(Corning公司製造)中。以終濃度成為100 U/mL之方式添加IL-2，以終濃度成為2 μ g/mL之方式添加Phytohemagglutinin (Sigma公司製造，以下記作PHA)，於5% CO₂中，於37°C下進行培養。於培養第4日，向培養細胞液中添加12 mL之5HRPMI，以終濃度成為100 U/mL之方式添加IL-2後，以成為5 mL/孔之方式，將細胞液分配於6孔細胞培養用盤中。繼續培養直至培養開始第7日，而

製備植物凝集素母細胞(幼稚化)。

(5) 非自身特異性細胞毒殺活性之測定

使用實施例6-(3)所製備之培養第7日之細胞，以與實施例2-(5)同樣的方法測定非自身特異性細胞毒殺活性。其中，使用實施例6-(4)中幼稚化之PHA幼稚化細胞作為標的細胞，添加Calcein-AM，然後於37℃下培養2小時。將該Calcein標記標的細胞進一步與30倍量之K562細胞混合，作為細胞毒殺活性測定用標的細胞，測定細胞毒殺活性。再者，K562細胞，係用以排除實施例6-(1)中所製備之應答細胞中所混入的NK細胞之非特異性細胞毒殺活性。測定結果示於表21。

[表 21]

淋巴細胞培養基中 之血漿濃度	E/T比	細胞毒殺活性(%)
0.6%	90	22.0
0.6%	30	12.6
0.6%	10	5.1
0.6%	3	1.1
1.2%	90	30.1
1.2%	30	16.9
1.2%	10	7.0
1.2%	3	2.2

如表21所示可明瞭，於淋巴細胞擴大培養時，使用將抗CD3抗體及CH-296固定化之培養器材的淋巴細胞，無論淋巴細胞培養中之血漿濃度如何，藉由與非自身細胞之異體混合淋巴細胞反應，均獲得非自身抗原特異性細胞毒殺活性，顯示出較強之免疫能力。

實施例 7 使用培養淋巴細胞之異體混合淋巴細胞反應 (MLR)-2

(1) 所使用之淋巴細胞的冷凍保存及融解

使用實施例 2-(3)中所培養之源自癌患者編號 PT012 之培養開始第 10 日及第 14 日的細胞，以與實施例 6-(1)相同之方法進行處理。其中，在進行淋巴細胞擴大培養時，亦設定僅將 OKT3 固定於培養器材上的群。

(2) 異體混合淋巴細胞反應

使用實施例 7-(1)中所製備之源自癌症患者之自身淋巴細胞及以與實施例 6-(2)同樣的方法所製備之源自健康人之非自身 PBMC，以與實施例 6-(3)相同之方法進行異體混合淋巴細胞反應。結果示於表 22。

[表 22]

淋巴細胞擴大 培養日數	初期刺激	應答細胞： 刺激細胞之比例	擴大培養率 (倍率)
10日	OKT3	1:1	x5.3
10日	OKT3 ⁺ CH-296	1:1	x6.3
14日	OKT3	1:1	x3.7
14日	OKT3 ⁺ CH-296	1:1	x4.8
10日	OKT3	1:0	x3.0
10日	OKT3 ⁺ CH-296	1:0	x2.8
14日	OKT3	1:0	x1.1
14日	OKT3 ⁺ CH-296	1:0	x0.9

如表 22 所示可明瞭，進行淋巴細胞擴大培養時，使用將抗 CD3 抗體及 CH-296 固定化之培養器材的淋巴細胞，與使用僅將 OKT3 固定之培養器材的群相比，在非自身細胞之存在下，藉由異體混合淋巴細胞反應會使非自身抗原識別

細胞以更高之擴大培養率進行增殖。又，即使淋巴細胞擴大培養日數為短時間，以顯示出良好之效果。

(3) PHA幼稚化細胞之製備

使用實施例6-(2)中所製備之源自異體供體之PBMC，以與實施例6-(4)相同之方法進行處理。

(4) 非自身特異性細胞毒殺活性之測定

使用實施例7-(2)中所製備之培養第7日之細胞，以與實施例6-(5)相同之方法測定非自身特異性細胞毒殺活性。測定結果示於表23。

[表 23]

淋巴細胞擴大 培養日數	初期刺激	E/T比	細胞毒殺活性 (%)
10日	OKT3	90	15.2
10日	OKT3+CH-296	90	19.1
14日	OKT3	90	27.6
14日	OKT3+CH-296	90	29.9

如表23所示可明瞭，使用淋巴細胞擴大培養時，將OKT3及CH-296固定化之培養器材的淋巴細胞，與僅將OKT3固定化之培養器材的群相比，無論淋巴細胞擴大培養日數如何，異體混合淋巴細胞反應之非自身抗原特異性細胞毒殺活性均較高。

實施例8 使用培養淋巴細胞之各種抗癌劑耐性試驗-1

(1) 所使用之淋巴細胞

以與實施例6-(1)相同之方法，將實施例2-(3)中所製備之源自癌患者編號PT009之培養開始第10日的細胞進行冷凍

保存及融解清洗，將其懸浮於含有 IL-2(最終濃度 222 U/mL)之 5HRPMI(以下記作 IL-2/5HRPMI)中，通過 40 μ m 細胞過濾器後，以台盼藍染色法算出活細胞數，供於各實驗。

(2) 抗癌劑耐性試驗

以 130 μ L/孔，向 96 孔細胞培養盤(Corning 公司製造)中添加 IL-2/5HRPMI，使用以 5HRPMI 進行階段性稀釋之卡鉑(製劑名：Paraplatin 注射液，Bristol-Myers 公司製造)、氟尿嘧啶注射液(製劑名：5-FU 注 250 協和，協和醃酵工業公司製造)、順鉑(製劑名：順鉑注「日醫工」，日醫工公司製造)、硫酸長春新鹼(製劑名：Oncovin 注射用，日本化藥公司製造)、阿黴素鹽酸鹽(製劑名：Adriacin 注用 10，協和醃酵工業公司製造)、磷酸地塞米松鈉(製劑名：Decadron 注射液，萬有製藥公司製造)，分別以 20 μ L/孔添加經階段稀釋之試驗藥劑。試驗細胞添加群中，用 IL-2/5HRPMI 將實施例 8-(1)中所製備的細胞加以調整使細胞濃度成為 4×10^6 cells/mL，並以 50 μ L/孔(每孔為 2×10^4 cells)進行添加。另一方面，於對照群中，以 50 μ L/孔添加 IL-2/5HRPMI。

將該等培養盤於 37°C 下，於 5% CO₂之存在下培養 20 小時。以 20 μ L/孔，向培養後之盤的各孔中添加 WST-1 (Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System, Takara Bio 公司製造)，於 37°C 下，於 5% CO₂之存在下培養 4 小時。於室溫下，以 500 $\times$ g 將培養後之盤離心 5 分鐘。離心後自盤之

各孔中採集 100 μ L 上清液，使用多功能微盤分析儀 (microplate reader) (BIO-RAD 公司製造，型號 680XR)，測定於吸收波長 450 nm 處及對照波長 630 nm 處之吸光度 [以下，記作吸光度 (450 nm~630 nm)]，根據下式算出特異性吸光度 (450 nm~630 nm)。

式 2：特異性吸光度 (450 nm~630 nm) = 試驗細胞添加群之吸光度 (450 nm~630 nm) - 對照群之吸光度 (450 nm~630 nm)

以各抗癌劑濃度之特異性吸光度 (450 nm~630 nm) 為基礎，算出將細胞增殖抑制在 50% 之抗癌劑濃度作為 50% 增殖抑制濃度 (以下，記作 GI_{50})，實施針對各種抗癌劑之耐性試驗。結果示於表 24。

[表 24]

抗癌劑	GI_{50} (μ g/mL)
卡鉑	215.5
氟尿嘧啶	639.3
順鉑	3.7
硫酸長春新鹼	0.2
阿黴素鹽酸鹽	0.5
磷酸地塞米松鈉	38.9

如表 24 所示，相對於各抗癌劑之 GI_{50} ，就各抗癌劑而言，係高於通常所述之投予後血液中之殘留濃度的值。因此，於淋巴細胞擴大培養時使用將抗 CD3 抗體及 CH-296 固定化之培養器材的淋巴細胞，即使在各種抗癌劑之存在下亦顯示出增殖性。由該實施例可明瞭，使用癌症患者之 PBMC 進行淋巴細胞擴大培養時，藉由使用抗 CD3 抗體及 CH-296，可獲得對抗癌劑顯示出耐性之細胞群；使用該細

胞群之過繼免疫療法，對於與抗癌劑組合之癌症治療較為有效。

實施例9 使用培養淋巴細胞之各種抗癌劑耐性試驗-2

(1) 所使用之淋巴細胞之擴大培養

以與實施例2-(3)相同之方法進行健康人淋巴細胞之擴大培養，以與實施例8-(1)相同之方法，以台盼藍染色法算出活細胞數，供於各實驗。其中，進行淋巴細胞擴大培養時，亦設定僅將OKT3固定於培養器材上的群。

(2) 抗癌劑耐性試驗

以與實施例8-(2)相同之方法，實施抗癌劑耐性試驗。其中，作為試驗藥劑，係使用卡鉑、氟尿嘧啶注射液、硫酸長春新鹼、阿黴素鹽酸鹽、磷酸地塞米松鈉、紫杉醇注射液(製劑名：Taxol注，Bristol-Myers公司製造)，並且分別以20 μ L/孔添加經階段稀釋之試驗藥劑。其中，紫杉醇，係使用作為稀釋溶劑之人類AB型血清，除此以外之藥劑係使用5HRPMI。結果示於表25。

[表 25]

抗癌劑	GI ₅₀ (μ g/mL)	
	初期刺激 OKT3	初期刺激 OKT3+CH-296
卡鉑	116.16	161.31
氟尿嘧啶	2293.08	3273.11
硫酸長春新鹼	4.42	24.34
阿黴素鹽酸鹽	0.25	0.41
磷酸地塞米松鈉	86.33	118.97
紫杉醇	34.08	39.73

如表25所示，進行淋巴細胞擴大培養時，使用將抗CD3抗體及CH-296固定化之培養器材之淋巴細胞，即使在各種抗癌劑之存在下亦顯示出增殖性。又，其藥劑耐性高於使用僅將OKT3固定化之培養器材的群。由該實施例可明瞭，使用PBMC進行淋巴細胞擴大培養時，藉由使用抗CD3抗體及CH-296，可獲得對抗癌劑之耐性度更高的細胞群，使用該細胞群之過繼免疫療法於與抗癌劑治療併用之癌症治療方面較為有效。

實施例10 使用小白鼠同系腫瘤模型之抗癌劑投予後移植入未活化類T細胞之效果的研究-1

(1) 小白鼠T細胞群之擴大培養

以與實施例1-(5)相同之方法，進行小白鼠T細胞群之擴大培養。其中，不使用人類CH-296，另外，於培養第6日將細胞回收，而供於以下實驗。

(2) 經擴大培養之小白鼠T細胞群之未活化類T細胞與效應類T細胞之分離

將實施例10-(1)中所獲得之細胞加以回收，取出必要量，然後以 $500\times g$ 於室溫下離心5分鐘，除去上清液。其後，以成為 1.11×10^8 cells/mL之方式，懸浮於包含0.5% BSA及2 mM乙二胺四乙酸二鈉之DPBS(以下，記作0.5% BSA/DPBS)中。向該細胞液中，每 1×10^7 個細胞添加10 μ L之CD62L (L-選擇素，L-selectin)微珠粒(小白鼠)(MACS公司製造)，於暗處於4°C下經常進行攪拌並培養15分鐘。其次，向該細胞液中，每 1×10^7 個細胞加入1 mL之0.5%

BSA/DPBS，以 $500\times g$ 於室溫下離心5分鐘，除去上清液後，每 1×10^8 個細胞加入 0.5 mL 之 0.5% BSA/DPBS，充分懸浮，於冰浴上靜置，而製成 CD62L 微珠粒標記細胞液。繼而，於 Vario MACS™ separator (MACS 公司製造，以下記作分離裝置) 中設置 LS 管柱 (MACS 公司製造，以下記作分離管柱)，用 3 mL 之 0.5% BSA/DPBS 加以清洗。向管柱中添加 CD62L 微珠粒標記細胞液，使其溶出後，進而用 9 mL 之 0.5% BSA/DPBS 加以清洗，回收溶出部分，將所得 CD62L⁻ 細胞作為效應類 T 細胞。自分離裝置拆除管柱，添加 5 mL 之緩衝液，將利用分離管柱所附帶之活塞進行擠出回收而獲得之 CD62L⁺ 細胞作為未活化類 T 細胞。

(3) C57BL/6-hB16F10 之同系腫瘤模型中之抗癌劑投予及 T 細胞群之移植

於麻醉下，將 7 週齡的雌性 C57BL/6 小白鼠的右鼠蹊部剃除約 9 平方厘米的毛，向其皮下投予 0.1 mL 以成為 4×10^6 cells/mL 之方式懸浮於 RPMI1640 培養基中的 hB16F10。其後，以如下方式設定群。將 A 群作為無處理群、將 B 群作為 MMC 單獨投予群、將 C 群作為 MMC 及未活化類 T 細胞併用投予群、將 D 群作為 MMC 及效應類 T 細胞併用投予群。腫瘤接種 3 日後及 4 日後，於 A 群中，腹腔內投予 0.2 mL 生理食鹽水 (大塚製藥公司製造)，於其他群中，腹腔內投予 2 mg/kg 用量之 MMC。腫瘤接種第 6 日，用 RPMI1640 培養基，將實施例 10-(2) 中所製備之各小白鼠 T 細胞製備成 5×10^8 cells/mL，向 C 群、D 群之各個體中分別由尾靜脈投予

0.2 mL之未活化類T細胞、效應類T細胞。又，於A群、B群之各個體中，分別由尾靜脈投予0.2 mL之RPMI1640培養基。

(4) 向C57BL/6-hB16F10之同系腫瘤模型投予抗癌劑後移植入T細胞群之評價

淋巴細胞數之評價，係藉由測定由尾靜脈所採集之血液樣品中所含的白血球數及T細胞數而進行。每1隻小白鼠採血22 μ L，移入加入有3 μ L肝素鈉(Mitsubishi Pharma公司製造)之0.5 mL管中。自其血液樣品中取出15 μ L，添加於將Flow-Count (Beckman Coulter公司製造)14 μ L與Hamster anti-mouse CD3e FITC (eBioscience公司製造)0.5 μ L混合而成的液體中，進行15分鐘處理後用低張溶液使紅血球溶血，再供於流動式細胞測量儀，將CD3e⁺細胞作為T細胞，算出T細胞率及T細胞之恢復率。測定日係設為投予細胞前以及細胞投予4日後。再者，T細胞率，表示將A群(無處理群)之T細胞數設為100%時之比率。又，T細胞之恢復率，為細胞投予4日後之T細胞數相對於投予細胞前之T細胞數的比率。結果示於表26及表27。

[表 26]

		T細胞率(%)	
		投予細胞前	細胞投予4日後
A群	無處理群	100	100
B群	MMC	84.1	118.2
C群	MMC+未活化類T細胞	80.8	143.7
D群	MMC+效應類T細胞	84.1	138.5

[表 27]

		T細胞恢復率
A群	無處理群	1.0
B群	MMC	1.4
C群	MMC+未活化類T細胞	1.8
D群	MMC+效應類T細胞	1.6

如表 26、27 所示，藉由於同系腫瘤模型中，將 MMC 投予與未活化類 T 細胞投予加以組合，與將 MMC 與效應類 T 細胞併用投予之情形進行比較，細胞投予後之 T 細胞率及 T 細胞恢復率較高。此情況表示未活化類 T 細胞在活體內之存活率較高。由該實施例顯示，藉由將抗癌劑與經擴大培養之未活化類 T 細胞投予加以組合，可使因投予抗癌劑所造成之淋巴細胞數減少恢復至早期水平。又，已確認，使用以高效率增殖未活化類 T 細胞之細胞群的過繼免疫療法，於與抗癌劑併用之癌治療方面極為有效。

(5) 向 C57BL/6-hB16F10 之同系腫瘤模型中投予抗癌劑及 T 細胞後之抗腫瘤活性的評價

為了測定實施例 10-(3) 中所實施之評價系統中的抗腫瘤活性，利用電子游標卡尺測定各個體於腫瘤接種後第 14 日之腫瘤大小。其結果示於表 28 (腫瘤大小係以腫瘤之長徑與短徑之積來表示)。

[表 28]

		腫瘤大小(mm ²)	標準誤差
A群	無處理群	98.6	8.5
B群	MMC	82.5	13.0
C群	MMC+未活化類T細胞	55.6	5.8
D群	MMC+效應類T細胞	78.4	8.0

如表 28 所示，藉由於同系腫瘤模型中將 MMC 投予與未活化類 T 細胞投予加以組合，與將 MMC 和效應類 T 細胞進行併用投予之情形相比，獲得腫瘤大小較小而抗腫瘤活性較高之結果。根據該實施例，藉由將抗癌劑與經擴大培養之未活化類 T 細胞投予加以組合，可顯示出與抗癌劑投予併用效果之腫瘤增殖抑制作用。又，已確認，使用以高效率增殖未活化類 T 細胞之細胞群的過繼免疫療法，於與抗癌劑併用之癌症治療方面極為有效。

實施例 11 使用小白鼠同系腫瘤模型之抗癌劑投予後移植入未活化類 T 細胞之效果的研究-2

(1) 小白鼠 T 細胞群之擴大培養

以與實施例 1-(5) 同樣的方法，進行小白鼠 T 細胞群之擴大培養。

(2) 經擴大培養之小白鼠 T 細胞群之未活化類 T 細胞與效應類 T 細胞的分離

使用實施例 11-(1) 中所擴大培養之小白鼠 T 細胞，以與實施例 10-(2) 相同之方式進行未活化類 T 細胞與效應類 T 細胞之分離。

(3) C57BL/6-hB16F10 之同系腫瘤模型中之抗癌劑投予及 T 細胞群之移植

作為本研究中之抗癌劑，係使用環磷醯胺(製劑名：Endoxan，鹽野義製藥公司製造，以下記作 CPA)。以與實施例 10-(3) 相同之方法，於小白鼠皮下投予 hB16F10。其

後，以如下方式設定群。將A群作為無處理群、將B群作為CPA單獨投予群、將C群作為CPA及未活化類T細胞併用投予群、將D群作為CPA及效應T細胞併用投予群。於腫瘤接種後第4日，於A群中腹腔內投予0.2 mL生理食鹽水，於其他群中以100 mg/kg之用量腹腔內投予CPA。於次日，用RPMI1640培養基，將實施例11-(2)中所製備之各小白鼠T細胞製備成 3.75×10^8 cells/mL，向C群、D群之各個體分別由尾靜脈投予0.2 mL之未活化類T細胞、效應類T細胞。又，於A群、B群之各個體中，由尾靜脈分別投予0.2 mL之RPMI1640培養基。

(4) 向C57BL/6-hB16F10之同系腫瘤模型投予抗癌劑後移植入T細胞群的評價

淋巴細胞數之評價，係以與實施例10-(4)相同之方式進行。其中，測定日係在細胞投予6日後。結果示於表29。

[表 29]

		T細胞率(%)
A群		100
B群	CPA	52.2
C群	CPA+未活化類T細胞	68.6
D群	CPA+效應類T細胞	43.5

如表29所示，藉由於同系腫瘤模型中將CPA投予與未活化類T細胞投予加以組合，與單獨投予CPA之情形或者將CPA和效應類T細胞併用投予之情形相比，細胞投予後之T細胞率較高。此情況表示未活化類T細胞在生物體內之存活率較高。由該實施例可顯示，藉由將抗癌劑與經擴大培

養之未活化類T細胞投予加以組合，可使因投予抗癌劑投予所造成之淋巴球數減少恢復至早期水平。又，使用以高效率增殖未活化類T細胞之細胞群的過繼免疫療法，於與抗癌劑併用之癌症治療方面極為有效。

(5) 向C57BL/6-hB16F10同系腫瘤模型投予抗癌劑及T細胞後之抗腫瘤活性的評價

以與實施例10-(5)相同之方法，評價實施例11-(3)中所實施之評價系統中之抗腫瘤活性。其中，腫瘤大小之測定日係腫瘤細胞接種後第11日及第13日。結果示於表30。

[表30]

		腫瘤大小(mm ²)	
		第11日	第13日
A群		46.6	78.6
B群	CPA	32.6	47.3
C群	CPA+未活化類T細胞	26.4	40.4
D群	CPA+效應類T細胞	33.9	44.3

如表30所示，藉由於同系腫瘤模型中將投予CPA與投予未活化類T細胞加以組合，與單獨投予CPA之情形或者將CPA和效應類T細胞併用投之情形相比，於任一測定日，腫瘤大小均較小，而獲得抗腫瘤活性較高之結果。根據該實施例，藉由將抗癌劑與經擴大培養的未活化類T細胞投予加以組合，可顯示出與抗癌劑投予併用效果之腫瘤增殖抑制作用。又，已確認，使用以高效率增殖未活化類T細胞之細胞群的過繼免疫療法，於與抗癌劑併用之癌症治療方面極為有效。

[產業上之可利用性]

根據本發明，可提供一種可活化針對癌的細胞性免疫，而具有較高治療效果之癌治療方法及癌治療劑。進而，該治療方法及治療劑，亦可藉由避免由淋巴細胞數減少所造成之免疫能力降低，而降低感染症之危險性。

[序列表自由內容]

序列編號1：纖維結合蛋白之部分區域III-8。

序列編號2：纖維結合蛋白之部分區域III-9。

序列編號3：纖維結合蛋白之部分區域III-10。

序列編號4：纖維結合蛋白之部分區域III-11。

序列編號5：纖維結合蛋白之部分區域III-12。

序列編號6：纖維結合蛋白之部分區域III-13。

序列編號7：纖維結合蛋白之部分區域III-14。

序列編號8：纖維結合蛋白之部分區域CS-1。

序列編號9：纖維結合蛋白之片段C-274。

序列編號10：纖維結合蛋白之片段H-271。

序列編號11：纖維結合蛋白之片段H-296。

序列編號12：纖維結合蛋白之片段CH-271。

序列編號13：纖維結合蛋白之片段CH-296。

序列編號14：纖維結合蛋白之片段C-CS1。

序列編號15：纖維結合蛋白之片段CH-296Na。

序列編號16：纖維結合蛋白之片段CHV-89。

序列編號17：纖維結合蛋白之片段CHV-90。

序列編號18：纖維結合蛋白之片段CHV-92。

序列編號19：纖維結合蛋白之片段CHV-179。

序列編號20：纖維結合蛋白之片段CHV-181。

序列編號21：纖維結合蛋白之片段H-275-Cys。

序列編號22：纖維結合蛋白之片段H296-H296。

序列編號23：纖維結合蛋白之片段H105-H105。

序列表

<110> 日商寶生物股份有限公司
國立大學法人三重大學

<120> 癌治療劑

<130> 668313

<140> 097117013

<141> 2008-05-08

<150> JP 2007-127436

<151> 2007-05-11

<160> 23

<170> PatentIn 第3.3版

<210> 1

<211> 87

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 纖維結合蛋白之部分區域Ⅲ-8

<400> 1

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg Val
1 5 10 15

Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu Val Arg
20 25 30

Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu Ser Ile Ser
35 40 45

Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu Pro Gly Thr Glu
50 55 60

Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln His Glu Ser Thr Pro
65 70 75 80

Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr
85

<210> 2

<211> 90

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 纖維結合蛋白之部分區域Ⅲ-9

<400> 2

Gly Leu Asp Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn
1 5 10 15

Ser Phe Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr
20 25 30

Arg Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp
35 40 45

Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr Pro
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg Glu Glu
65 70 75 80

Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr
85 90

<210> 3

<211> 94

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 纖維結合蛋白之部分區域Ⅲ-10

<400> 3

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp
65 70 75 80

Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 4

<211> 84

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 纖維結合蛋白之部分區域Ⅲ-11

<400> 4

Gln Met Gln Val Thr Asp Val Gln Asp Asn Ser Ile Ser Val Lys Trp
 1 5 10 15

Leu Pro Ser Ser Ser Pro Val Thr Gly Tyr Arg Val Thr Thr Thr Pro
 20 25 30

Lys Asn Gly Pro Gly Pro Thr Lys Thr Lys Thr Ala Gly Pro Asp Gln
 35 40 45

Thr Glu Met Thr Ile Glu Gly Leu Gln Pro Thr Val Glu Tyr Val Val
 50 55 60

Ser Val Tyr Ala Gln Asn Pro Ser Gly Glu Ser Gln Pro Leu Val Gln
 65 70 75 80

Thr Ala Val Thr

<210> 5

<211> 92

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 纖維結合蛋白之部分區域Ⅲ-12

<400> 5

Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp Leu Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro Thr
 1 5 10 15

Ser Leu Ser Ala Gln Trp Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr Gly Tyr
 20 25 30

Arg Val Arg Val Thr Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met Lys Glu Ile
 35 40 45

Asn Leu Ala Pro Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser Gly Leu Met Val
 50 55 60

Ala Thr Lys Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr
 65 70 75 80

Ser Arg Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr Leu Glu
 85 90

<210> 6
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>

<223> 纖維結合蛋白之部分區域Ⅲ-13

<400> 6

Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr
 1 5 10 15

Thr Ile Thr Ile Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe
 20 25 30

Gln Val Asp Ala Val Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr
 35 40 45

Ile Lys Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly
 50 55 60

Thr Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser
 65 70 75 80

Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser Thr
 85

<210> 7
 <211> 90
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>

<223> 纖維結合蛋白之部分區域Ⅲ-14

<400> 7

Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn
 1 5 10 15

Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr
 20 25 30

Ile Ile Lys Tyr Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro
 35 40 45

Arg Pro Arg Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile Thr Gly Leu Glu Pro
 50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gln Lys
 65 70 75 80

Ser Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr
85 90

<210> 8
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 纖維結合蛋白之部分區域CS-1

<400> 8

Asp Glu Leu Pro Gln Leu Val Thr Leu Pro His Pro Asn Leu His Gly
1 5 10 15

Pro Glu Ile Leu Asp Val Pro Ser Thr
20 25

<210> 9
<211> 274
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 纖維結合蛋白之片段C-274

<400> 9

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg Val
1 5 10 15

Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu Val Arg
20 25 30

Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu Ser Ile Ser
35 40 45

Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu Pro Gly Thr Glu
50 55 60

Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln His Glu Ser Thr Pro
65 70 75 80

Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp Ser Pro Thr Gly Ile Asp
85 90 95

Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe Thr Val His Trp Ile Ala Pro
100 105 110

Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg Ile Arg His His Pro Glu His Phe
115 120 125

Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile
130 135 140

Thr Leu Thr Asn Leu Thr Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val
145 150 155 160

Ala Leu Asn Gly Arg Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser
165 170 175

Thr Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro
180 185 190

Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr
195 200 205

Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu
210 215 220

Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys
225 230 235 240

Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly
245 250 255

Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu
260 265 270

Ile Asp

<210> 10

<211> 271

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 纖維結合蛋白之片段H-271

<400> 10

Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp Leu Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Ser Ala Gln Trp Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr Gly Tyr
20 25 30

Arg Val Arg Val Thr Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met Lys Glu Ile
 35 40 45
 Asn Leu Ala Pro Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser Gly Leu Met Val
 50 55 60
 Ala Thr Lys Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ser Arg Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr Leu Glu Asn Val Ser Pro
 85 90 95
 Pro Arg Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile
 100 105 110
 Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala
 115 120 125
 Val Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys Pro Asp
 130 135 140
 Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr Lys
 145 150 155 160
 Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro Val Val
 165 170 175
 Ile Asp Ala Ser Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu Arg Phe Leu
 180 185 190
 Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln Pro Pro Arg Ala
 195 200 205
 Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro
 210 215 220
 Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile
 225 230 235 240
 Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu
 245 250 255
 Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr
 260 265 270

<210> 11
 <211> 296

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 纖維結合蛋白之片段H-296

<400> 11

Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp Leu Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Ser Ala Gln Trp Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr Gly Tyr
20 25 30

Arg Val Arg Val Thr Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met Lys Glu Ile
35 40 45

Asn Leu Ala Pro Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser Gly Leu Met Val
50 55 60

Ala Thr Lys Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ser Arg Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr Leu Glu Asn Val Ser Pro
85 90 95

Pro Arg Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile
100 105 110

Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala
115 120 125

Val Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys Pro Asp
130 135 140

Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr Lys
145 150 155 160

Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro Val Val
165 170 175

Ile Asp Ala Ser Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu Arg Phe Leu
180 185 190

Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln Pro Pro Arg Ala
195 200 205

Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro
210 215 220

Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile
225 230 235 240

Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu
245 250 255

Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr Asp
260 265 270

Glu Leu Pro Gln Leu Val Thr Leu Pro His Pro Asn Leu His Gly Pro
275 280 285

Glu Ile Leu Asp Val Pro Ser Thr
290 295

<210> 12

<211> 549

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 纖維結合蛋白之片段CH-271

<400> 12

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg Val
1 5 10 15

Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu Val Arg
20 25 30

Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu Ser Ile Ser
35 40 45

Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu Pro Gly Thr Glu
50 55 60

Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln His Glu Ser Thr Pro
65 70 75 80

Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp Ser Pro Thr Gly Ile Asp
85 90 95

Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe Thr Val His Trp Ile Ala Pro
100 105 110

Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg Ile Arg His His Pro Glu His Phe
115 120 125

Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile
 130 135 140

Thr Leu Thr Asn Leu Thr Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val
 145 150 155 160

Ala Leu Asn Gly Arg Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser
 165 170 175

Thr Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro
 180 185 190

Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr
 195 200 205

Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu
 210 215 220

Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys
 225 230 235 240

Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly
 245 250 255

Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu
 260 265 270

Ile Asp Lys Pro Ser Met Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp Leu Lys Phe
 275 280 285

Thr Gln Val Thr Pro Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp Thr Pro Pro Asn
 290 295 300

Val Gln Leu Thr Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr Pro Lys Glu Lys Thr
 305 310 315 320

Gly Pro Met Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro Asp Ser Ser Ser Val Val
 325 330 335

Val Ser Gly Leu Met Val Ala Thr Lys Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala
 340 345 350

Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr
 355 360 365

Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr
 370 375 380

Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr
 385 390 395 400

Gly Phe Gln Val Asp Ala Val Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln
 405 410 415

Arg Thr Ile Lys Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln
 420 425 430

Pro Gly Thr Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala
 435 440 445

Arg Ser Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser Thr Ala Ile Asp Ala Pro
 450 455 460

Ser Asn Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser
 465 470 475 480

Trp Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu
 485 490 495

Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly
 500 505 510

Val Thr Glu Ala Thr Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr Thr
 515 520 525

Ile Tyr Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro Leu Ile
 530 535 540

Gly Arg Lys Lys Thr
 545

<210> 13
 <211> 574
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 纖維結合蛋白之片段CH-296

<400> 13

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg Val
 1 5 10 15

Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu Val Arg
 20 25 30
 Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu Ser Ile Ser
 35 40 45
 Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu Pro Gly Thr Glu
 50 55 60
 Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln His Glu Ser Thr Pro
 65 70 75 80
 Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp Ser Pro Thr Gly Ile Asp
 85 90 95
 Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe Thr Val His Trp Ile Ala Pro
 100 105 110
 Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg Ile Arg His His Pro Glu His Phe
 115 120 125
 Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile
 130 135 140
 Thr Leu Thr Asn Leu Thr Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val
 145 150 155 160
 Ala Leu Asn Gly Arg Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser
 165 170 175
 Thr Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro
 180 185 190
 Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr
 195 200 205
 Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu
 210 215 220
 Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys
 225 230 235 240
 Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly
 245 250 255
 Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu
 260 265 270

Ile Asp Lys Pro Ser Met Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp Leu Lys Phe
 275 280 285
 Thr Gln Val Thr Pro Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp Thr Pro Pro Asn
 290 295 300
 Val Gln Leu Thr Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr Pro Lys Glu Lys Thr
 305 310 315 320
 Gly Pro Met Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro Asp Ser Ser Ser Val Val
 325 330 335
 Val Ser Gly Leu Met Val Ala Thr Lys Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala
 340 345 350
 Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr
 355 360 365
 Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr
 370 375 380
 Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr
 385 390 395 400
 Gly Phe Gln Val Asp Ala Val Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln
 405 410 415
 Arg Thr Ile Lys Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln
 420 425 430
 Pro Gly Thr Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala
 435 440 445
 Arg Ser Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser Thr Ala Ile Asp Ala Pro
 450 455 460
 Ser Asn Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser
 465 470 475 480
 Trp Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu
 485 490 495
 Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly
 500 505 510

Val Thr Glu Ala Thr Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr Thr
515 520 525

Ile Tyr Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro Leu Ile
530 535 540

Gly Arg Lys Lys Thr Asp Glu Leu Pro Gln Leu Val Thr Leu Pro His
545 550 555 560

Pro Asn Leu His Gly Pro Glu Ile Leu Asp Val Pro Ser Thr
565 570

<210> 14

<211> 302

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 纖維結合蛋白之片段C-CS1

<400> 14

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg Val
1 5 10 15

Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu Val Arg
20 25 30

Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu Ser Ile Ser
35 40 45

Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu Pro Gly Thr Glu
50 55 60

Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln His Glu Ser Thr Pro
65 70 75 80

Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp Ser Pro Thr Gly Ile Asp
85 90 95

Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe Thr Val His Trp Ile Ala Pro
100 105 110

Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg Ile Arg His His Pro Glu His Phe
115 120 125

Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile
130 135 140

Thr Leu Thr Asn Leu Thr Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val
145 150 155 160

Ala Leu Asn Gly Arg Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser
165 170 175

Thr Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro
180 185 190

Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr
195 200 205

Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu
210 215 220

Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys
225 230 235 240

Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly
245 250 255

Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu
260 265 270

Ile Asp Lys Pro Ser Asp Glu Leu Pro Gln Leu Val Thr Leu Pro His
275 280 285

Pro Asn Leu His Gly Pro Glu Ile Leu Asp Val Pro Ser Thr
290 295 300

<210> 15
<211> 658
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 纖維結合蛋白之片段CH-296Na

<400> 15

Met Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg
1 5 10 15

Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu Val
20 25 30

Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu Ser Ile
35 40 45

Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu Pro Gly Thr
 50 55 60
 Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln His Glu Ser Thr
 65 70 75 80
 Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp Ser Pro Thr Gly Ile
 85 90 95
 Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe Thr Val His Trp Ile Ala
 100 105 110
 Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg Ile Arg His His Pro Glu His
 115 120 125
 Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser
 130 135 140
 Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile
 145 150 155 160
 Val Ala Leu Asn Gly Arg Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln
 165 170 175
 Ser Thr Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr
 180 185 190
 Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg
 195 200 205
 Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln
 210 215 220
 Glu Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu
 225 230 235 240
 Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg
 245 250 255
 Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 260 265 270
 Glu Ile Asp Lys Pro Ser Gln Met Gln Val Thr Asp Val Gln Asp Asn
 275 280 285
 Ser Ile Ser Val Lys Trp Leu Pro Ser Ser Ser Pro Val Thr Gly Tyr
 290 295 300

Arg Val Thr Thr Thr Pro Lys Asn Gly Pro Gly Pro Thr Lys Thr Lys
 305 310 315 320
 Thr Ala Gly Pro Asp Gln Thr Glu Met Thr Ile Glu Gly Leu Gln Pro
 325 330 335
 Thr Val Glu Tyr Val Val Ser Val Tyr Ala Gln Asn Pro Ser Gly Glu
 340 345 350
 Ser Gln Pro Leu Val Gln Thr Ala Val Thr Ala Ile Pro Ala Pro Thr
 355 360 365
 Asp Leu Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp
 370 375 380
 Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr Pro
 385 390 395 400
 Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro Asp Ser
 405 410 415
 Ser Ser Val Val Val Ser Gly Leu Met Val Ala Thr Lys Tyr Glu Val
 420 425 430
 Ser Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg Pro Ala Gln Gly
 435 440 445
 Val Val Thr Thr Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg Ala Arg Val
 450 455 460
 Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp Arg Thr Lys Thr
 465 470 475 480
 Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Val Pro Ala Asn Gly Gln
 485 490 495
 Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile
 500 505 510
 Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu
 515 520 525
 Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser Thr Ala
 530 535 540

Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser
545 550 555 560

Leu Leu Val Ser Trp Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile
565 570 575

Ile Lys Tyr Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg
580 585 590

Pro Arg Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly
595 600 605

Thr Glu Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser
610 615 620

Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr Asp Glu Leu Pro Gln Leu Val
625 630 635 640

Thr Leu Pro His Pro Asn Leu His Gly Pro Glu Ile Leu Asp Val Pro
645 650 655

Ser Thr

<210> 16
<211> 367
<212> PRT
<213> 人エ

<220>
<223> 纖維結合蛋白之片段CHV-89

<400> 16

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg Val
1 5 10 15

Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu Val Arg
20 25 30

Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu Ser Ile Ser
35 40 45

Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu Pro Gly Thr Glu
50 55 60

Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln His Glu Ser Thr Pro
65 70 75 80

Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp Ser Pro Thr Gly Ile Asp
 85 90 95
 Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe Thr Val His Trp Ile Ala Pro
 100 105 110
 Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg Ile Arg His His Pro Glu His Phe
 115 120 125
 Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile
 130 135 140
 Thr Leu Thr Asn Leu Thr Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val
 145 150 155 160
 Ala Leu Asn Gly Arg Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser
 165 170 175
 Thr Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro
 180 185 190
 Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr
 195 200 205
 Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu
 210 215 220
 Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys
 225 230 235 240
 Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly
 245 250 255
 Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu
 260 265 270
 Ile Asp Lys Pro Ser Met Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg Ala Arg Val
 275 280 285
 Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp Arg Thr Lys Thr
 290 295 300
 Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Val Pro Ala Asn Gly Gln
 305 310 315 320
 Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile
 325 330 335

Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu
340 345 350

Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser Thr
355 360 365

<210> 17
<211> 368
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 纖維結合蛋白之片段CHV-90

<400> 17

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg Val
1 5 10 15

Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu Val Arg
20 25 30

Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu Ser Ile Ser
35 40 45

Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu Pro Gly Thr Glu
50 55 60

Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln His Glu Ser Thr Pro
65 70 75 80

Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp Ser Pro Thr Gly Ile Asp
85 90 95

Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe Thr Val His Trp Ile Ala Pro
100 105 110

Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg Ile Arg His His Pro Glu His Phe
115 120 125

Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile
130 135 140

Thr Leu Thr Asn Leu Thr Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val
145 150 155 160

Ala Leu Asn Gly Arg Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser
165 170 175

Thr Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro
180 185 190

Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr
195 200 205

Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu
210 215 220

Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys
225 230 235 240

Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly
245 250 255

Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu
260 265 270

Ile Asp Lys Pro Ser Met Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu Arg Phe
275 280 285

Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln Pro Pro Arg
290 295 300

Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu Lys Pro Gly Ser Pro
305 310 315 320

Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr
325 330 335

Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala
340 345 350

Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr
355 360 365

<210> 18

<211> 370

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 纖維結合蛋白之片段CHV-92

<400> 18

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg Val
1 5 10 15

Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu Val Arg
 20 25 30
 Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu Ser Ile Ser
 35 40 45
 Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu Pro Gly Thr Glu
 50 55 60
 Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln His Glu Ser Thr Pro
 65 70 75 80
 Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp Ser Pro Thr Gly Ile Asp
 85 90 95
 Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe Thr Val His Trp Ile Ala Pro
 100 105 110
 Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg Ile Arg His His Pro Glu His Phe
 115 120 125
 Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile
 130 135 140
 Thr Leu Thr Asn Leu Thr Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val
 145 150 155 160
 Ala Leu Asn Gly Arg Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser
 165 170 175
 Thr Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro
 180 185 190
 Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr
 195 200 205
 Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu
 210 215 220
 Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys
 225 230 235 240
 Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly
 245 250 255

Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu
260 265 270

Ile Asp Lys Pro Ser Met Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp Leu Lys Phe
275 280 285

Thr Gln Val Thr Pro Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp Thr Pro Pro Asn
290 295 300

Val Gln Leu Thr Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr Pro Lys Glu Lys Thr
305 310 315 320

Gly Pro Met Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro Asp Ser Ser Ser Val Val
325 330 335

Val Ser Gly Leu Met Val Ala Thr Lys Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala
340 345 350

Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr
355 360 365

Leu Glu
370

<210> 19
<211> 457
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 纖維結合蛋白之片段CHV-179

<400> 19

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg Val
1 5 10 15

Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu Val Arg
20 25 30

Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu Ser Ile Ser
35 40 45

Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu Pro Gly Thr Glu
50 55 60

Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln His Glu Ser Thr Pro
65 70 75 80

Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp Ser Pro Thr Gly Ile Asp
 85 90 95

Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe Thr Val His Trp Ile Ala Pro
 100 105 110

Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg Ile Arg His His Pro Glu His Phe
 115 120 125

Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile
 130 135 140

Thr Leu Thr Asn Leu Thr Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val
 145 150 155 160

Ala Leu Asn Gly Arg Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser
 165 170 175

Thr Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro
 180 185 190

Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr
 195 200 205

Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu
 210 215 220

Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys
 225 230 235 240

Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly
 245 250 255

Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu
 260 265 270

Ile Asp Lys Pro Ser Met Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg Ala Arg Val
 275 280 285

Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp Arg Thr Lys Thr
 290 295 300

Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Val Pro Ala Asn Gly Gln
 305 310 315 320

Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile
 325 330 335

Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu
340 345 350

Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser Thr Ala
355 360 365

Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser
370 375 380

Leu Leu Val Ser Trp Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile
385 390 395 400

Ile Lys Tyr Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg
405 410 415

Pro Arg Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly
420 425 430

Thr Glu Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser
435 440 445

Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr
450 455

<210> 20

<211> 459

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 纖維結合蛋白之片段CHV-181

<400> 20

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg Val
1 5 10 15

Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu Val Arg
20 25 30

Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu Ser Ile Ser
35 40 45

Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu Pro Gly Thr Glu
50 55 60

Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln His Glu Ser Thr Pro
65 70 75 80

Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp Ser Pro Thr Gly Ile Asp
 85 90 95
 Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe Thr Val His Trp Ile Ala Pro
 100 105 110
 Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg Ile Arg His His Pro Glu His Phe
 115 120 125
 Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile
 130 135 140
 Thr Leu Thr Asn Leu Thr Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val
 145 150 155 160
 Ala Leu Asn Gly Arg Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser
 165 170 175
 Thr Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro
 180 185 190
 Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr
 195 200 205
 Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu
 210 215 220
 Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys
 225 230 235 240
 Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly
 245 250 255
 Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu
 260 265 270
 Ile Asp Lys Pro Ser Met Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp Leu Lys Phe
 275 280 285
 Thr Gln Val Thr Pro Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp Thr Pro Pro Asn
 290 295 300
 Val Gln Leu Thr Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr Pro Lys Glu Lys Thr
 305 310 315 320

Gly Pro Met Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro Asp Ser Ser Ser Val Val
325 330 335

Val Ser Gly Leu Met Val Ala Thr Lys Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala
340 345 350

Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr
355 360 365

Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr
370 375 380

Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr
385 390 395 400

Gly Phe Gln Val Asp Ala Val Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln
405 410 415

Arg Thr Ile Lys Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln
420 425 430

Pro Gly Thr Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala
435 440 445

Arg Ser Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser Thr
450 455

<210> 21
<211> 276
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 纖維結合蛋白之片段H-275-Cys

<400> 21

Met Ala Ala Ser Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp Leu Lys Phe Thr Gln
1 5 10 15

Val Thr Pro Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp Thr Pro Pro Asn Val Gln
20 25 30

Leu Thr Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro
35 40 45

Met Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser
50 55 60

Gly Leu Met Val Ala Thr Lys Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu Lys
65 70 75 80

Asp Thr Leu Thr Ser Arg Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr Leu Glu
85 90 95

Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr
100 105 110

Thr Ile Thr Ile Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe
115 120 125

Gln Val Asp Ala Val Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr
130 135 140

Ile Lys Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly
145 150 155 160

Thr Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser
165 170 175

Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn
180 185 190

Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln
195 200 205

Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu Lys Pro
210 215 220

Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly Val Thr
225 230 235 240

Glu Ala Thr Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr Thr Ile Tyr
245 250 255

Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro Leu Ile Gly Arg
260 265 270

Lys Lys Thr Cys
275

<210> 22
<211> 594
<212> PRT
<213> 人エ

<220>

<223> 纖維結合蛋白之片段H296-H296

<400> 22

Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp Leu Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Ser Ala Gln Trp Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr Gly Tyr
20 25 30

Arg Val Arg Val Thr Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met Lys Glu Ile
35 40 45

Asn Leu Ala Pro Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser Gly Leu Met Val
50 55 60

Ala Thr Lys Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ser Arg Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr Leu Glu Asn Val Ser Pro
85 90 95

Pro Arg Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile
100 105 110

Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala
115 120 125

Val Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys Pro Asp
130 135 140

Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr Lys
145 150 155 160

Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro Val Val
165 170 175

Ile Asp Ala Ser Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu Arg Phe Leu
180 185 190

Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln Pro Pro Arg Ala
195 200 205

Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro
210 215 220

Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile
225 230 235 240

Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu
 245 250 255
 Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr Asp
 260 265 270
 Glu Leu Pro Gln Leu Val Thr Leu Pro His Pro Asn Leu His Gly Pro
 275 280 285
 Glu Ile Leu Asp Val Pro Ser Thr Ala Met Ala Ile Pro Ala Pro Thr
 290 295 300
 Asp Leu Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp
 305 310 315 320
 Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr Pro
 325 330 335
 Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro Asp Ser
 340 345 350
 Ser Ser Val Val Val Ser Gly Leu Met Val Ala Thr Lys Tyr Glu Val
 355 360 365
 Ser Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg Pro Ala Gln Gly
 370 375 380
 Val Val Thr Thr Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg Ala Arg Val
 385 390 395 400
 Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp Arg Thr Lys Thr
 405 410 415
 Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Val Pro Ala Asn Gly Gln
 420 425 430
 Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile
 435 440 445
 Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu
 450 455 460
 Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser Thr Ala
 465 470 475 480

Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser
 485 490 495

Leu Leu Val Ser Trp Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile
 500 505 510

Ile Lys Tyr Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg
 515 520 525

Pro Arg Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly
 530 535 540

Thr Glu Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser
 545 550 555 560

Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr Asp Glu Leu Pro Gln Leu Val
 565 570 575

Thr Leu Pro His Pro Asn Leu His Gly Pro Glu Ile Leu Asp Val Pro
 580 585 590

Ser Thr

<210> 23
 <211> 234
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 纖維結合蛋白之片段H105-H105

<400> 23

His Met Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr
 1 5 10 15

Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr
 20 25 30

Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val
 35 40 45

Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile Thr Gly Leu
 50 55 60

Glu Pro Gly Thr Glu Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn
 65 70 75 80

Gln Lys Ser Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr Asp Glu Leu Pro

85

90

95

Gln Leu Val Thr Leu Pro His Pro Asn Leu His Gly Pro Glu Ile Leu
 100 105 110

Asp Val Pro Ser Thr His Met Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu Arg
 115 120 125

Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln Pro Pro
 130 135 140

Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu Lys Pro Gly Ser
 145 150 155 160

Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly Val Thr Glu Ala
 165 170 175

Thr Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr Thr Ile Tyr Val Ile
 180 185 190

Ala Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys
 195 200 205

Thr Asp Glu Leu Pro Gln Leu Val Thr Leu Pro His Pro Asn Leu His
 210 215 220

Gly Pro Glu Ile Leu Asp Val Pro Ser Thr
 225 230

五、中文發明摘要：

本發明提供一種癌治療方法，其特徵在於包括下述(A)步驟及(B)步驟：

(A) 對患者實施伴有淋巴細胞數減少之處理、及

(B) 繼上述(A)步驟後迅速向患者投予淋巴細胞；

以及提供一種用於該治療方法之癌治療劑及癌治療用套組。該治療方法作為免疫重建療法，可藉由避免因淋巴細胞數減少所造成之免疫能力降低，而降低發展成感染症之危險性。

六、英文發明摘要：

十、申請專利範圍：

1. 一種癌治療方法，其特徵在於包括下述(A)步驟及(B)步驟：
 - (A) 向患者實施伴有淋巴細胞數減少之處理；及
 - (B) 繼上述(A)步驟後迅速向患者投予淋巴細胞。
2. 如請求項1之治療方法，其中伴有淋巴細胞數減少之處理為投予抗癌劑及/或照射放射線。
3. 如請求項2之治療方法，其中抗癌劑係選自由分類為代謝拮抗劑、抗生素(抗腫瘤性抗生素)、微小管抑制藥、拓撲異構酶抑制藥、鉑製劑、烷化劑及腎上腺皮質類固醇劑之抗癌劑所組成群中的至少1種。
4. 如請求項1之治療方法，其中(B)步驟係於(A)步驟後1小時~10日後實施。
5. 如請求項1至4中任一項之治療方法，其中所投予之淋巴細胞為培養物。
6. 如請求項5之治療方法，其中所投予之淋巴細胞為藉由培養自患者體內採集之淋巴細胞而獲得的淋巴細胞培養物。
7. 如請求項5之治療方法，其中所投予之淋巴細胞為藉由在抗CD3抗體存在下進行培養而獲得的淋巴細胞培養物。
8. 如請求項5之治療方法，其中所投予之淋巴細胞為藉由在纖維結合蛋白、纖維結合蛋白的片段、或者其等之混合物之存在下進行培養而獲得的淋巴細胞培養物。

9. 如請求項1之治療方法，其包括於(B)步驟中或者(B)步驟之後，進一步投予癌疫苗及/或淋巴細胞刺激因子的步驟。
10. 一種含有淋巴細胞之癌治療劑，其係用於繼上述處理後、迅速向實施有伴有淋巴細胞數減少處理之患者進行投予者。
11. 如請求項10之治療劑，其中伴有淋巴細胞數減少之處理為投予抗癌劑及/或照射放射線。
12. 如請求項10之治療劑，其係用於在上述處理1小時~10日後、向實施有伴有其中淋巴細胞數減少的處理之患者進行投予者。
13. 如請求項10之治療劑，其中淋巴細胞為培養物。
14. 如請求項13之治療劑，其中淋巴細胞為藉由培養自患者體內採集之淋巴細胞而獲得之淋巴細胞培養物。
15. 如請求項13之治療劑，其中淋巴細胞為藉由在抗CD3抗體存在下進行培養而獲得之淋巴細胞培養物。
16. 如請求項13之治療劑，其中淋巴細胞為藉由在纖維結合蛋白、纖維結合蛋白之片段、或者其等之混合物之存在下進行培養而獲得之淋巴細胞培養物。
17. 一種癌治療用套組，其分別含有引起淋巴細胞數減少之抗癌劑及如請求項10之治療劑。
18. 如請求項17之癌治療用套組，其中抗癌劑為選自由分類為代謝拮抗劑、抗生素(抗腫瘤性抗生素)、微小管抑制藥、拓撲異構酶抑制藥、鉑製劑、烷化劑及腎上腺皮質

類固醇劑之抗癌劑所組成群中的至少1種。

19. 一種癌治療用套組，其分別含有如請求項10至16中任一項之治療劑、癌疫苗及/或淋巴細胞刺激因子。
20. 一種癌治療用套組，其分別含有如請求項17或18項之癌治療用套組、癌疫苗及/或淋巴細胞刺激因子。
21. 一種淋巴細胞之用途，其係用於製造如請求項10至16項中任一項之治療劑。
22. 一種引起淋巴細胞數減少之抗癌劑及淋巴細胞之用途，其係用於製造如請求項17或18項之癌治療用套組。
23. 一種淋巴細胞及癌疫苗及/或淋巴細胞刺激因子之用途，其係用於製造如請求項19之癌治療用套組。
24. 一種引起淋巴細胞數減少之抗癌劑、淋巴細胞、及癌疫苗及/或淋巴細胞刺激因子之用途，其係用於製造如請求項20之癌治療用套組。

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：(無)

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)