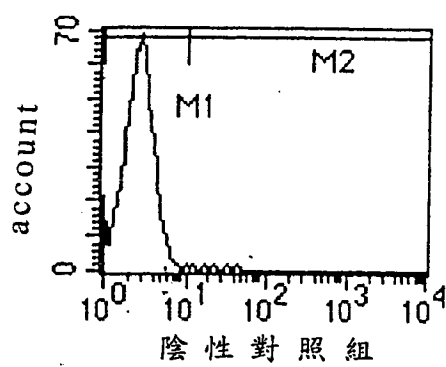
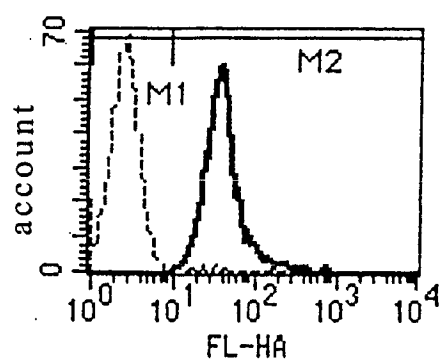




maker	%gate
All	100.00
M1	99.90
M2	0.10



maker	%gate
All	100.00
M1	0.00
M2	100.00

圖 2

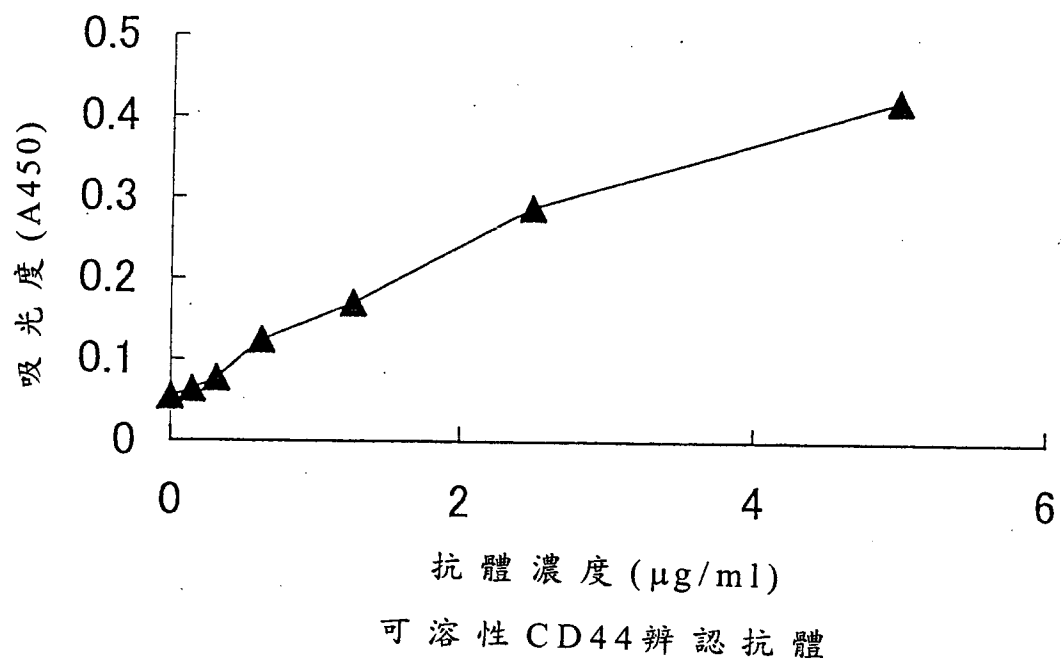


圖 3

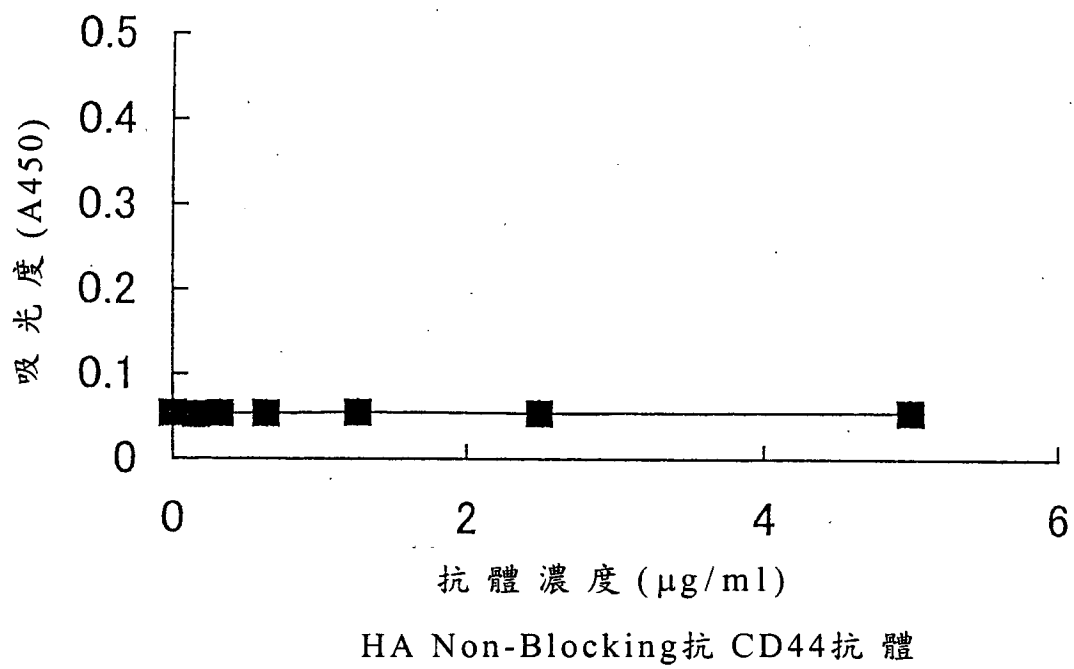
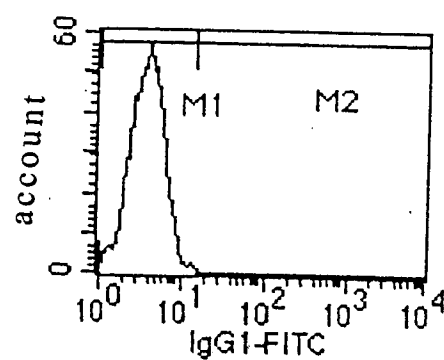
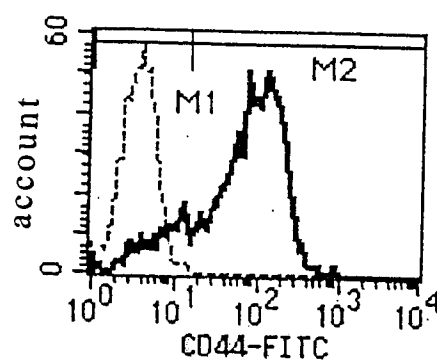


圖 4

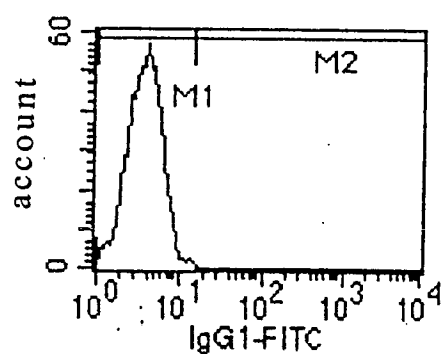


maker	%gate
All	100.00
M1	100.00
M2	0.00

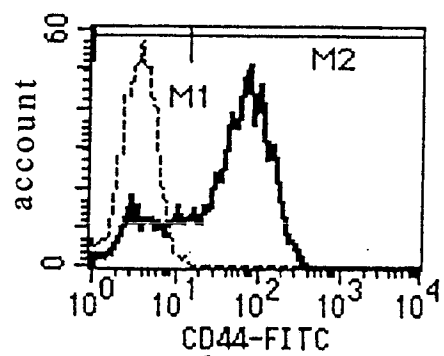


maker	%gate
All	100.00
M1	12.95
M2	87.19

圖 5



maker	%gate
All	100.00
M1	100.00
M2	0.00



maker	%gate
All	100.00
M1	20.00
M2	80.16

圖 6

發明專利分割說明書

分割案

(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：95111709

※申請日期：91.8.15

原申請案號：091118623

※IPC 分類：C12N 5/02, 5/06 (2006.01)

A61K 35/14 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

擴大培養抗原特異之細胞傷害性T細胞之方法

METHOD OF EXTENDED CULTURE FOR ANTIGEN-SPECIFIC
CYTOTOXIC T LUMPHOCYTES

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

日商寶生物股份有限公司

TAKARA BIO INC.

代表人：(中文/英文)

加藤 郁之進

IKUNOSHIN KATO

住居所或營業所地址：(中文/英文)

日本國滋賀縣大津市瀬田三丁目4番1號

國 籍：(中文/英文)

日本 JAPAN

三、發明人：(共 3 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 佐川 裕章

HIROAKI SAGAWA

2. 出野 美津子

MITSUKO IDENO

3. 加藤 郁之進

IKUNOSHIN KATO

國 籍：(中文/英文)

1. 日本 JAPAN

2. 日本 JAPAN

3. 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；2001年08月15日；特願2001-246747
2. 日本；2001年12月11日；特願2001-376966
3. 日本；2002年03月25日；特願2002-84428

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權。

☐ 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】

本發明係關於一種對於醫療領域有用之誘導、維持及擴大培養細胞傷害性T細胞之方法，該細胞傷害性T細胞為具有抗原特異性細胞傷害活性者。

【先前技術】

生物體主要係藉由免疫反應免受異物侵害，免疫系統則根據以各式各樣細胞及由其所開始作出之可溶性因子所建構而成。其中身負執行中心任務者為白血球，特別是淋巴球。淋巴球分為B淋巴球(以下稱為B細胞)及T淋巴球(以下稱為T細胞) 2種主要之類型，兩者皆可特異性辨識抗原，並對其作用以防禦生物體。

T細胞係可次分類為：協助者T細胞(以下稱為 T_H)，其具有CD (Cluster Designation) 4標記，主要參與抗體產生之輔助或各種免疫反應之誘導；細胞傷害性T細胞[T_C ；細胞傷害性T淋巴球(cytotoxic T lymphocyte)，亦可稱殺手T細胞，以下亦以CTL記載之]，其具有CD8標記，其主要可表現細胞傷害活性。CTL最重要之任務係於執行辨認腫瘤細胞或病毒感染細胞等，並加以破壞、除去之，其並非如B細胞般針對抗原產生特異性反應之抗體，而是直接辨識標的細胞膜表面上所存在之主要組織相容性複合物(major histocompatibility complex, MHC：於人類中亦可稱為人類白血球抗原(human leukocyte antigen, HLA))類別I分子所結合之標的細胞衍生之抗原(抗原胜肽)後作用。此時，

CTL膜表面之T細胞接受器(T cell receptor, 以下稱為TCR)係特異性辨識上述之抗原胜肽及MHC類別I分子後, 判斷抗原胜肽為來自於自身者, 或為非來自於自身者。若所判斷之標的細胞為非來自於自身者, 則經由CTL特異性破壞、去除之。

近年來, 對於如藥劑治療法或放射線治療法之對病患有沉重的肉體負擔之治療法的評價已漸漸改變, 而對於病患肉體負擔較輕之免疫治療法則興趣高漲。其中, 將對以來自正常免疫機能之人類CTL或來自T細胞為目標之抗原具有特異性反應之CTL於生物體外(in vitro)誘導後, 移入患者之過繼性免疫療法的有效性特別引人注目。例如, 用於動物模型之過繼性免疫療法, 係顯示其對於病毒之感染及腫瘤有效之治療法[Greenberg, P. D. 著, Advances in Immunology, 1992年發行], 另外, 經由對於免疫不全患者投予CTL並未顯示其毒性下, 藉由進行急速且持續的排除細胞巨大性病毒(cytomegalovirus)之特異性CTL反應之重塑[Reusser P.等著, Blood, 第78卷, 第5號, 第1373-1380頁(1991)]等, 對於來自先天性、後天性及醫原性之T細胞免疫不全症患者之使用也備受矚目。在此療法中較為重要的是在維持或增強CTL之抗原特異性傷害活性的狀態下, 維持或增加其細胞數。

此外, 對於CTL細胞數之維持及增加方面, 從利用動物模型之研究, 推測於人類之過繼性免疫療法中之有效細胞數可知, $10^9 \sim 10^{10}$ 個抗原特異性T細胞是必要的[Greenberg,

P. D.著，Advances in Immunology, 1992年發行]。亦即，在過繼性免疫療法中，其最大之問題所在可說是如何在短時間內於生物體外獲得如此數量之細胞數。

關於CTL之抗原特異性傷害活性之維持及增強方面，誘導CTL抗原之特異性反應時，一般使用對於作為目標之抗原反覆刺激之方法，然而，此方法雖然可在一時間增加細胞數，但最終細胞數仍減少，而無法得到必要之細胞數。對此目前可行之對策，係冷凍保存反覆由抗原刺激之初期階段中之細胞，亦或是僅冷凍保存一部份利用選殖所得之具抗原特異性之CTL株後，當其細胞數或抗原特異性傷害活性經過長期培養而下降時，將冷凍之細胞融解後再反覆施以抗原刺激。

雖然已有使用小鼠T細胞長期培養以建立T細胞之方法被發表[Paul W. E.等著，Nature, 第294卷，第5843號，第697~699頁(1981)]，其係一種分離・株化T細胞之方法，此方法無法將T細胞增殖至 $10^9 \sim 10^{10}$ 個細胞。其次，美國第5,057,423號專利中亦揭示一種將干擾素2 (IL-2)以高濃度大量使用於誘導淋巴因子活性化殺手(LAK)細胞，可於3~4日將細胞數增加至100倍之方法。若以通常1個細胞增殖分裂成2個約需24小時之情形觀之，係為飛躍性細胞數。另外，亦有嘗試使用相同高濃度之IL-2誘導腫瘤浸潤淋巴球(TIL)之過繼性免疫療法[Rosenberg S. A.等著，New Engl. J. Med., 第313卷，第23號，第1485~1492頁(1985); Rosenberg S. A.等著，New Engl. J. Med., 第319卷，第25

號，第1676~1680頁(1988); Ho M.等著，Blood，第81卷，第8號，第2093~2101頁(1993)]。然而，前者係一種針於抗原之非特異性T細胞之取得法，後者則僅為為使用活化性多株淋巴球集團而具有特異性者。此外，有報告指出：上述方法中為同時促進細胞增殖而使用高濃度之IL-2，則以高濃度IL-2處理之T細胞在非IL-2高濃度存在下受到特異性抗原刺激時，有可能引起細胞凋亡(apaptosis) [Lenardo M. J.等，Nature，第353卷，第6347號，第858~861頁(1991); Boehme S. A.等，Eur. J. Immunol.，第23卷，第7號第1552~1560頁(1993)]，由此可知由上述方法所得之LAK細胞或TIL之有效性尚有問題存在。

另外，在T細胞增殖因子與IL-2存在下以低密度($5 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ 個/ml)培養T細胞，經過7日之急速增殖，最終可增殖達細胞數 $3 \sim 5 \times 10^5$ 個/ml之飽和濃度。然而，亦有報告指出，一但達到該飽和濃度，經常有細胞死亡的情形[Gillis S. 等，Immunological Rev.，第54卷，第81~109頁(1981)]。因此，藉由LAK細胞、TIL及低密度之T細胞培養方法無論在實用面上、有用面上都仍有問題存在。

其次，關於抗原特異性之CTL方面，有報導指出來自同系異種之細胞巨大性病毒(CMV)特異性CTL於生物體外進行5~12週培養予以增殖後，對於免疫不全患者使用靜脈投予之過繼性免疫療法 [Riddell S. A.等.，Science，第257卷，第5067號，第238~240頁(1992)]、自身CMV感染纖維芽細胞與IL-2 [Riddell S. A.等.，J. Immunology，第146

卷，第8號，第2795~2804頁(1991)]及抗CD3單株抗體(抗CD3 mAb)與LI-2 [Riddell S. A.等., J. Immunol. Methods, 第128卷，第2號，第189~201頁(1990)]分離及大量培養CMV特異性CTL株之方法。然而，此等方法中亦有大問題存在，亦即，得到 1×10^9 個/ml之抗原特異性CTL須約3個月，期間因患者之症狀惡化，故因應各狀況之對策取得十分困難。

國際公開第96/06929號中揭示REM法(rapid expansion method)以作為此等問題點之解決方法。此REM法係使含有抗原特異性CTL及 T_H 之T細胞初期集團在短時間內增殖(expand)之方法，亦即，其特徵點為可將個別T細胞株予以增殖之以提供大量T細胞，然而仍有下列之問題點存在。REM法中，其係將使用抗CD3抗體、IL-2及藉由放射線照射去除其增殖性之PBMC(peripheral blood mononuclear cell，末梢血單核細胞)與EB病毒(Epstein-Barr virus，以下簡稱EBV)感染細胞，增殖抗原特異性CTL數，然而其無法否定EBV轉形B細胞(EBV-B細胞)混入T細胞之危險性(安全性問題)，而有做為餵養細胞之大量PBMC(必要之抗原特異性CTL數之至少約40倍之PBMC)為必要、無法充分滿足已增殖之CTL抗原特異性細胞傷害性活性、使用T細胞株以外之T細胞集團予以增殖時，含有T細胞之抗原特異性細胞傷害活性將與細胞增殖同時下降等問題點存在。

亦即，過去的抗原特異性CTL製備法中，對於以短時間內，且充分量製備含有對於治療之使用具有有效之抗原特

異性細胞傷害活性之CTL，為過繼性免疫療法中必要不可欠缺之問題仍處於無法解決之現狀。

【發明內容】

本發明之目的，係提供一種誘導、維持及擴大培養CTL (cytotoxic T lymphocyte)之方法，其中CTL係適合使用於過繼性免疫法且保持高抗原特異性之細胞傷害活性值者。

亦即，本發明係關於：

(1) 一種用於誘導細胞傷害性T細胞之方法，該細胞傷害性T細胞具有抗原特異性之細胞傷害活性，其係包含在選自由以下(A)~(E)所組成之群組中至少一種物質存在下，將對細胞傷害性T細胞具有分化能力之前驅細胞與抗原呈現細胞共同培養之步驟：

(A) 對於CD44具有結合活性之物質；

(B) 可控制CD44配位子藉由結合於CD44所發散之訊號的物質；

(C) 可抑制成長因子結合於成長因子受器之物質；

(D) 可抑制成長因子藉由結合於成長因子受器所發散之訊號的物質；及

(E) 纖維黏連蛋白、其片段或彼等之混合物；

(2) 根據上述(1)之方法，其中對於CD44具有結合活性之物質係CD44配位子及/或抗CD44抗體；

(3) 根據上述(2)之方法，其中CD44配位子為玻尿酸(hyaluronic acid)；

(4) 根據上述(1)之方法，其中可抑制成長因子結合於成長

- 因子受器之物質為對成長因子具有結合活性之物質；
- (5) 根據上述(1)之方法，其中對成長因子具有結合活性之物質為抗成長因子抗體；
- (6) 根據上述(1)、(4)及(5)中任一項之方法，其中成長因子為選自由肝細胞成長因子、類胰島素增殖因子-1及類胰島素增殖因子-2所組成之群組中之至少一種成長因子；
- (7) 根據上述(1)之方法，其中纖維黏連蛋白之片段為包含選自由以下(a)~(c)所組成之群組中之至少一種區域者：
- (a) VLA-4結合區域；
- (b) VLA-5結合區域；及
- (c) 肝素結合區域；
- (8) 一種用於維持細胞傷害性T細胞之方法，該細胞傷害性T細胞具有抗原特異性之細胞傷害活性，其係包含在選自由上述(1)之(A)~(E)所組成之群組中至少一種物質存在下，繼續培養細胞傷害性T細胞之步驟；
- (9) 根據上述(8)之方法，其中對於CD44具有結合活性之物質為CD44配位子及/或抗CD44抗體；
- (10) 根據上述(9)之方法，其中CD44配位子為玻尿酸；
- (11) 根據上述(8)之方法，其中可抑制成長因子結合於成長因子受器之物質為對成長因子具有結合活性之物質；
- (12) 根據上述(11)之方法，其中對成長因子具有結合活性之物質為抗成長因子抗體；
- (13) 根據上述(8)、(11)及(12)中任一項之方法，其中成長因子為選自由肝細胞成長因子、類胰島素增殖因子-1及類

胰島素增殖因子-2所組成之群組中之至少一種成長因子；

(14) 根據上述(8)之方法，其中纖維黏連蛋白之片段為包含選自由以下(a)~(c)所組成之群組中之至少一種區域者：

(a) VLA-4結合區域；

(b) VLA-5結合區域；及

(c) 肝素結合區域；

(15) 一種用於擴大培養細胞傷害性T細胞之方法，該細胞傷害性T細胞具有抗原特異性之細胞傷害活性，其係包含在選自由上述(1)之(A)~(E)所組成之群組中至少一種物質存在下，培養細胞傷害性T細胞之步驟；

(16) 根據上述(15)之方法，其中於上述步驟中，進一步在抗CD3抗體存在下，培養細胞傷害性T細胞；

(17) 根據上述(15)或(16)之方法，其中於上述步驟中，同時培養細胞傷害性T細胞與餵養細胞；

(18) 根據上述(17)之方法，其中餵養細胞為非病毒感染細胞；

(19) 根據上述(15)~(18)中任一項之方法，其中對於CD44具有結合活性之物質為CD44配位子及/或抗CD44抗體；

(20) 根據上述(19)之方法，其中CD44配位子為玻尿酸；

(21) 根據上述(15)~(18)中任一項之方法，其中可抑制成長因子結合於成長因子受器之物質為對成長因子具有結合活性之物質；

(22) 根據上述(21)之方法，其中對成長因子具有結合活性之物質為抗成長因子抗體；

(23) 根據上述(15)~(18)、(21)及(22)中任一項之方法，其中成長因子為選自由肝細胞成長因子、類胰島素增殖因子-1及類胰島素增殖因子-2所組成之群組中之至少一種成長因子；

(24) 根據上述(15)之方法，其中纖維黏連蛋白之片段為包含選自由以下(a)~(c)所組成之群組中之至少一種區域者：

(a) VLA-4結合區域；

(b) VLA-5結合區域；及

(c) 肝素結合區域；

(25) 一種細胞傷害性T細胞之回收方法，其係包含自藉由上述(1)~(24)中任一項之方法所得之含有細胞傷害性T細胞的培養物中，篩選含有高含量之細胞傷害性T細胞之細胞集團之的步驟，該細胞傷害性T細胞係具有抗原特異性之細胞傷害活性；

(26) 一種具有細胞傷害活性之細胞傷害性T細胞；其係以上述(1)~(25)中任一項之方法所調製；及

(27) 一種治療劑，其係含有上述(26)之細胞傷害性T細胞作為有效成分。

【實施方式】

實施發明之最佳型態

本發明係意外的發現，藉由選自由以下(A)~(E)所組成之群組中至少一種物質(本發明中係使用該物質作為有效成分)，可發揮維持或增強CTL之抗原特異性細胞傷害活性之能力，因而完成本發明：

- (A) 對於CD44具有結合活性之物質；
- (B) 可控制CD44配位子藉由結合於CD44所發散之訊號的物質；
- (C) 可抑制成長因子結合於成長因子受器之物質；
- (D) 可抑制成長因子藉由結合於成長因子受器所發散之訊號的物質；及
- (E) 纖維黏連蛋白、其片段或彼等之混合物。

因此藉由本發明可提供一種誘導、維持及擴大培養CTL之方法，其中CTL係適合使用於過繼性免疫法且保持高抗原特異性之細胞傷害活性值者。

以下具體說明本發明。

(1) 本發明之細胞傷害性T細胞之誘導方法

一般已知經由抗原呈現細胞誘導之CTL，使其維持、增殖期間，其抗原特異性細胞傷害活性會逐漸下降，根據本發明，提供一種抗原特異性CTL之誘導方法，其誘導後之細胞即使經過長時間予以維持或增殖，亦不會產生如過去所觀察之抗原特異性細胞傷害活性顯著下降之情形。

本發明之CTL誘導方法，係以在上述之有效成分存在下誘導CTL為一大特徵。CTL之誘導係以在該有效成分存在下，為了賦予所得之CTL對於期望之抗原辨識能力，藉由將適當的抗原呈現細胞同時與對CTL具有分化能力之前趨細胞作培養以實施之。前趨細胞係在成為CTL前階段中，若為對CTL付有分化命運之細胞者，則無特別之限定，可列舉如末梢血單核球(PBMC)、自生細胞、記憶細胞等。

抗原呈現細胞則只要是可呈現具有可辨認T細胞之抗原之能力者，則無特別之限制，本發明中可使用者如單球、B細胞、T細胞、巨噬細胞、樹狀細胞、線維芽細胞等可呈現所希望之抗原者。

抗原呈現細胞欲於具有抗原呈現能力者上附加抗原胜肽，可在藉由在其表面予以呈現抗原胜肽的方式製備[參考如文獻：Bednarek M. A.等著、J. Immunol, 第147卷，第12號，第4047-4053頁(1991)]。另外，具有抗原呈現能力之細胞在具有處理(process)抗原之能力情況下，藉由於該細胞上附加抗原，使得抗原得以被送入細胞內而受到處理化(processing)，已片段化之抗原胜肽係呈現於細胞表面。此外，將抗原胜肽附加於具有抗原呈現能之細胞上時，所使用之抗原呈現細胞，可使用符合欲誘導之CTL之HLA拘束性之抗原胜肽。

再者，本發明中所使用之抗原並無特別之限制，可列舉如細菌、病毒等外來性抗原，或腫瘤關連抗原(癌抗原)等之內在性抗原等。

本發明中，抗原呈現細胞以非增殖性者為佳，可藉由進行如X光等放射線照射，或以絲裂黴素(mitomycin)等藥劑處理，以使細胞成為非增殖性。

本發明CTL之誘導方法中所使用之培養基並無特別之限制，可使用將CTL、其前趨細胞、及對於抗原呈現細胞之維持、生育必要之成分混合製備而成之眾所皆知之培養基，如市售之培養基即可。此類培養基除其原本之構成成分

外，亦可含有適當之蛋白質、細胞激素類、或其他成分。本發明中以含有干擾素-2 (IL-2)之培養基最為適合。此外，此等之蛋白質、細胞激素類、或其他成分亦可固定於本發明之方法中所使用之培養器材或微珠(microbeads)等基體上而使用。此等成分係以可得所欲之效果的量，藉由如下述之已知的固定方法固定於培養器材等上即可。

CD44係廣泛存在於造血系細胞、纖維芽細胞、巨噬細胞等上之細胞表面受器，已有報告指出玻尿酸(hyaluronic acid)、硫酸乙醯肝素、硫酸軟骨素(chondroitin sulfate)、造骨蛋白(osteopontin)、膠原蛋白類型1、膠原蛋白類型4、纖維黏連蛋白、serglycin等可作為其之配位子。已知其之功能為以藉由細胞-細胞間、及細胞-細胞外基質間之黏著，將訊息傳遞至細胞內，發揮其他黏著分子之活化、細胞激素之產生等之功能。已知CD44亦存在於CTL中，當玻尿酸或抗CD44抗體一結合至CD44，則引起存在於CD44之細胞內區域的酪胺酸磷酸激酶區域(tyrosine kinase domain)之活化，及藉此之細胞內基質蛋白質之酪胺酸的磷酸化，因而進行細胞內之訊息傳遞。亦即，已知藉由CD44配位子與抗CD44抗體結合於CD44，可使訊息被發散，並與各種功能相聯繫。

本發明中之對於CD44具有結合活性之物質，除須表現可維持或增強CTL之特異性細胞傷害活性的能力外，並無特別之限制，例如可列舉CD44配位子及/或抗CD44抗體。CD44配位子除須表現可維持或增強CTL之特異性細胞傷害

活性的能力外，並無特別之限制，可列舉如玻尿酸、硫酸乙醯肝素(heparan sulfate)等，特別以玻尿酸為佳。此外，抗CD44抗體除須表現可維持或增強CTL之特異性細胞傷害活性的能力外，並無特別之限制，可使用如市售之抗CD44抗體、衍生物(如螢光標識之衍生物等)亦除須表現可維持或增強CTL之特異性細胞傷害活性的能力外，使用並無特別之限制。

再者，本發明中無論是否有CD44與對於CD44具有結合活性之物質之結合，藉由控制由CD44配位子結合於CD44所發散之訊息，亦可獲得期望之效果。亦即，本發明除對於CD44具有結合活性之物質外，亦可使用可控制藉由CD44配位子結合於CD44而發散之訊息的物質作為有效成分而實施。此處藉由CD44配位子結合於CD44而發散之訊息亦包含自受領該訊息之生物體分子所發散之訊息。亦即，該訊息可舉例如存在於CD44之細胞內區域的酪胺酸磷酸基酶區域之活化，及藉由已活化之上述酪胺酸磷酸激酶之細胞內基酶區質蛋白質之酪胺酸的磷酸化等，另外可列舉如各種磷酸化酵素等作為控制該等訊息之物質。此外，本說明書中所謂控制，係指將已活化之訊息，於訊息傳遞路徑中傳遞至下游區域，或指抑制已活化之訊息傳遞至下游區域。

目前已知成長因子係可促進各種細胞之分裂或成長之多肽的總稱，其係藉著細胞膜上的特異性受器作用於標的細胞，大多數之該受器係活化存在於細胞內區域之酪胺酸磷

酸基酶區域，以進行將訊息傳遞至標的細胞。

本發明中之成長因子，除藉由抑制成長因子結合於成長因子受器，或藉由控制由成長因子結合於成長因子受器所發散之訊息，可顯示維持或增強CTL之特異性細胞傷害活性的能力外，並無特別之限制，可舉例如肝細胞增殖因子(HGF)、類胰島素增殖因子-1 (IGF-1)、類胰島素增殖因子-2 (IGF-2)、神經成長因子(NGF)、神經營養因子、上皮成長因子、牛奶衍生之成長因子、鹼性纖維芽細胞增殖因子(bFGF)、腦衍生之纖維芽細胞增殖因子、酸性纖維芽細胞增殖因子、角化細胞(keratinocyte)增殖因子、血小板衍生之成長因子(PDGF)、血小板鹼性蛋白質、血小板第4因子、結合組織活化胜肽、細胞群落刺激因子(colony stimulating factor)、紅血球生成素(erythropoietin)、血小板生成素(thrombopoietin)、T細胞成長因子、B細胞成長因子、軟骨衍生因子、內皮細胞衍生因子、眼衍生成長因子、精巢衍生成長因子、睪丸賽氏細胞(sertoli cell)衍生成長因子、乳腺刺激因子、脊髓衍生成長因子、巨噬細胞衍生成長因子、循環間葉(recycle mesenchymal)成長因子、轉形增殖因子- α 、轉形增殖因子- β 、肝素結合性類EGF增殖因子、雙調蛋白(amphiregulin)、平滑肌細胞衍生成長因子(SDGF)、 β -細胞素(β -cellulin)、表皮調節素(epiregulin)、神經調節素-1(neuregulin)、-2及-3、血管內皮增殖因子、神經營養素(neurotrophin)、腦衍生神經營養因子(BDNF)、神經營養素(NT)-3、-4、-5、-6及-7、神經

膠質細胞株衍生神經營養因子 (glial cell-line-derived neurotrophic factor, GDNF)、幹細胞因子、腎細胞因子 (midkine)、多效蛋白 (pleiotrophin)、Ephrin、血管生成素 (angiopoietin)、活化素 (activin)、腫瘤壞死因子等。若根據本發明，以肝細胞成長因子、類胰島素增殖因子-1、類胰島素增殖因子-2作為成長因子為宜。

HGF為一種可表現肝細胞增殖作用、蛋白質合成促進作用、膽汁鬱滯改善作用、甚者有預防由藥劑導致之腎衰竭的作用等之成長因子，已知c-Met可作為HGF之受器，HGF所表現之多樣性生理作用皆藉著c-Met而進行。c-Met係於其細胞內之區域上具有酪胺酸磷酸基酶區域。

類胰島素增殖因子(IGF)為一種無法以胰島素抗體中和之類胰島素的活性物質，已知IGF存在有IGF-1與IGF-2二種，IGF所結合之受器有胰島素受器、IGF-1受器、IGF-2受器，其中胰島素受器及IGF-1受器係於其細胞內區域上具有酪胺酸磷酸基酶區域。

本發明之可抑制成長因子結合於成長因子受器之物質，除須表現可維持或增強CTL之特異性細胞傷害活性的能力外，並無特別之限制，可列舉如對成長因子具有結合活性，並藉由與成長因子形成複合體而抑制成長因子結合於成長因子受器之物質；或對成長因子具有結合活性，並可抑制成長因子結合於成長因子受器之物質。前者可列舉如抗成長因子抗體，適合者如抗HGF抗體、抗IGF-1抗體、抗IGF-2。後者如抗成長因子受器抗體，以抗c-Met抗體、抗

胰島素受器抗體、抗IGF-1受器抗體、抗IGF-2受器抗體為宜。

此外，本發明中無論是否有成長因子與成長因子受器之結合，藉由控制由成長因子結合於成長因子受器所發散之訊息，亦可獲得期望之效果。亦即，本發明除對於可抑制成長因子結合於成長因子之物質外，亦可使用可控制藉由成長因子結合於成長因子受器而發散之訊息的物質作為有效成分而實施。此處藉由成長因子結合於成長因子受器而發散之訊息亦包含自受領該訊息之生物體分子所發散之訊息。該訊息可舉例如存在於成長因子之細胞內區域的酪胺酸磷酸基酶區域之活化，及藉由已活化之上述酪胺酸磷酸激酶之細胞內基質蛋白質之酪胺酸的磷酸化等，另外可列舉磷激酶抑制劑(kinase inhibitor)等作為控制該等訊息之物質。

本說明書所記載之纖維黏連蛋白及其片段係自天然取得者，或使用慣用之基因重組技術人為合成者皆可，纖維黏連蛋白及其片段可根據Ruoslahti E.等人於J. Biol. Chem.第256卷，第14號，第7277~7281頁(1981)之記載，可自天然起源之物質以實質上純粹之形態製造，此處本說明書所記載之實質上純粹之纖維黏連蛋白或纖維黏連蛋白片段係指此等於天然中同時與纖維黏連蛋白存在，其本質上未含來自於該供給源之其他蛋白質等，上述纖維黏連蛋白及其片段於本發中可分別單獨或混合複數種使用。

可使用於本發明之纖維黏連蛋白片段及有關於該片段之

製備之有用訊息可藉由 Kimizuka F.等(J. Biochem.第110卷，第2號，第284~291頁(1991))、Kornblihtt A. R.等(EMBO J.第4卷，第7號，第1755~1759頁(1985))、及 Sekiguchi K.等(Biochemistry, 第25卷，第17號，第4936~4941頁(1986))等所獲得。

纖維黏連蛋白為分子量220~250 kD之巨大糖蛋白，可與膠原蛋白、肝素(heparin)、纖維蛋白(fibrin)、整合素(integrin)家族之VLA-4及VLA-5、細胞、細菌等之多數生物體高分子結合。此外，纖維黏連蛋白係區分為數個區域之結構作為功能性區域(代謝，Vol. 23，No. 11(1986))，區域1係分子量約30,000，可與肝素、纖維蛋白、黃色葡萄球菌等結合。區域2係分子量約40,000，可與膠原蛋白結合。區域3係分子量約20,000，一般認為其可與纖維蛋白微弱結合。區域4係分子量約75,000，為細胞結合區域。區域5(肝素結合區域)係分子量約35,000，可與肝素強力結合。區域6係分子量約30,000，可與纖維蛋白結合。區域7係羧基末端之分子量約3,000的區域。再者，區域4上包含VLA-5結合區域，區域5與區域6之間則包含VLA-4結合區域。此外，已知纖維黏連蛋白具有稱為ED-A、ED-B、IIICS之三個模組(module)，可進行選擇性之剪接(splicing)。再者，IIICS上包含具有細胞黏著活性之CS-1及CS-5(FIBRONECTIN, Edited by Deane F. Mosher, ACADEMIC PRESS, INC, (1988))。

本發明中並無特別限定者，纖維黏連蛋白片段可列舉適

合者如具有選自該等之區域1~7、VLA-4結合區域、VLA-5結合區域、ED-A、ED-B、IIICS、CS-1及CS-5之區域的片段。此外，本發明中所使用之纖維黏連蛋白片段之分子量並無特別限制，以1~200 kD為佳，更佳者為5~190 kD，以10~180 kD之片段最為適合。

在本發明中，特別合適之纖維黏連蛋白片段係使用具有選自由下列(a)~(c)所組成之群組中之至少一種區域之片段：(a)纖維黏連蛋白衍生之細胞結合區域-整合素 $\alpha 5\beta 1$ (VLA-5)結合區域；(b) 整合素 $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4)結合區域；及(c)肝素結合區域。具有VLA-5結合區域之片段可以具有序列編號:1之胺基酸序列之片段為例，具有VLA-4結合區域之片段可以具有序列編號:2之胺基酸序列之片段為例，具有肝素結合區域之片段可以具有序列編號:3之胺基酸序列之片段為例。

再者，適合於本發明使用之片段於具有上述結合活性之範圍內，亦可在纖維黏連蛋白衍生之胺基酸序列中包含1個以上胺基酸之取代、缺失、插入、附加。例如，在本發明中亦可使用於2個不同區域間插入1個以上的胺基酸作為連結子(linker)之片段。

本說明書中所記載之實質上純粹的纖維黏連蛋白片段之製造，例如可根據第5,198,423號美國專利所記載，利用基因重組載體製造，該專利中對於以下實施例所記載之重組片段H-271 (序列編號:3)、H-296 (序列編號:4)、CH-271 (序列編號:5)、CH-296 (序列編號:6)，及彼等之取得方法皆

有詳細記載。此外，以下實施例中所使用之C-274片段(序列編號:1)係可藉由第5,102,988號美國專利所載之方法取得。再者，C-CS1片段(序列編號:7)則可利用第3104178號日本專利所載之方法製得。

上述之CH-271、CH-296、C-274、C-CS1之各片段係包含具有結合於VLA-5活性之細胞結合區域的多肽，而C-CS1、H-296、CH-296則是包含具有結合於VLA-4活性之細胞結合區域的多肽，另外，H-271、H-296、CH-271及CH-296則是具有肝素結合區域之多肽。

本發明亦可使用變異上述各區域之片段，纖維黏連蛋白之肝素結合部位係由三個III型類似序列(III-12、III-13、III-14)所構成，本發明亦可使用包含缺失上述III型類似序列中之一個或二個的肝素結合部位之片段，例如，纖維黏連蛋白之細胞結合部位(VLA-5結合區域，Pro1239~Ser1515)與一個III型類似序列結合之片段-CHV-89(序列編號:8)、CHV-90(序列編號:9)、CHV-92(序列編號:10)，或與二個III型類似序列結合之片段-CHV-179(序列編號:11)、CHV-181(序列編號:12)。CHV-89、CHV-90、CHV-92係分別包含III-13、III-14、III-12者，CHV-179包含III-13及III-14，CHV-181則包含III-12及III-13。CHV-89、CHV-90、CHV-179可利用第2729712號日本專利所載之方法製得，而CHV-181可利用第97/18318號國際公開公報所載之方法獲得。此外，根據上述文獻所記載之質體建構定型性質體，在使用該質體以基因工程方法取得CHV-

92。

此外，以下實施例中所使用之H-275-Cys (序列編號:13)係具有有纖維黏連蛋白之肝素結合區域，且C末端上具有Cys殘基之片段，本發明亦可使用該片段。

本發明中所使用之片段的細胞結合區域與細胞之結合可利用慣用之方法分析，例如Williams D. A.等人之方法(Nature, 第352卷，第6334號，第438~441頁(1991))亦包含在該方法中，該方法係對於固定於培養盤之片段測定細胞之結合的方法。

再者，在上述方法中，亦可藉由使用肝素(例如標識之肝素)代替細胞，以相同之方法進行片段之肝素結合區域的評估。

如上所述，由於纖維黏連蛋白為一種巨大分子，因此由其便利點觀之，對於本發明中使用者以纖維黏連蛋白片段較為適合。此外，本發明中所使用之纖維黏連蛋白或其片段若使用來自動物衍生之血漿或臟器時，由於在來自於動物之病毒(HCV、HIV等)污染、純度、均一性方面要需特別注意之必要，因此以使用如上述之基因工程所得之纖維黏連蛋白或其片段為佳。

本發明中所使用之有效成分係可單獨使用或混合二種以上使用。

本發明中，將對CTL具有分化能力之前趨細胞與抗原呈現細胞同時培養(共培養)後，誘導CTL用之一般性條件係遵照周知條件[參考如文獻：Bednarek M. A.等，J.

Immunol, 第147卷, 第12號, 第4047-4053頁(1991)]即可。對於共培養條件並無特別之限定, 可使用一般之細胞培養中所使用之條件, 例如可使用37°C, 5% CO₂等條件培養。此共培養雖通常以2-15日實施之, 亦可在其間更換新製備之抗原呈現細胞後進行再刺激。另外, 亦可以適當之時間間隔更換新鮮之培養基。

在進行共培養之培養基中, 本發明之有效成分之含量若可得到預期效果則無特別之限定, 以0.001~1000 µg/ml為佳, 0.01~100 µg/ml則更佳。此外, 本說明書中, 培養基中含有有效成分等之成分, 亦包含將有效成分事先固定於細胞培養時置入培養基用之培養器材, 或製入培養基用之微珠等之基體, 使此等基體與培養基接觸, 而使該成分(與培養基接觸後, 無論是否以固定於基體上)含有於培養基中之態樣。再者, 有效成分以溶解於培養基中, 或固定於培養器材或微珠等之基體上存在為佳。另外, 上述之有效成分以選自由玻尿酸、抗CD44抗體、抗HGF抗體、抗IGF-1抗體、抗IGF-2抗體及纖維黏連蛋白片段所組成之群組中之至少一種為佳。

如此誘導之CTL係具有特異性辨識預期抗體之能力, 如藉由其細胞傷害活性, 特異性破壞具有該抗原之細胞。此CTL之細胞傷害活性可以周知的方法評估之。例如例如可測定藉由抗原提示細胞所提示之胜肽與以放射線物質、螢光物質等標識之標的細胞相對之傷害性、放射能之取得之CTL增殖之抗原特異性增加或由CTL或標的細胞脫離之

GM-CSF、IFN- γ 等之細胞激素的量而進行評估。(參照後述之實施例1-1-(3))。此外，藉由以螢光素等標識之抗原胜肽或複合體之使用亦可直接確認之。在此況下，使CTL和已與CTL抗原特異性抗體結合之第1螢光標記接觸後，再和已與第2螢光標記結合之抗原胜肽-MHC複合體接觸，可進行藉由FACS (fluorescence-activated cell sorting)分析此雙重標識細胞之存在。

利用本發明之方法所誘導之CTL，其優越之性質係誘導後之細胞即使經過長時間予以維持或急速增殖，仍不會有如過去所觀察之抗原特異性之細胞傷害活性顯著下降之情形。因此，利用將誘導後之CTL純種系化，可維持已安定化之具有細胞傷害活性之淋巴球，例如藉由對於已誘導之CTL給予抗原、各種細胞激素、抗CD3抗體刺激可使其增殖、擴大培養。對於此種CTL之維持、擴大培養並無特別之限制，可使用周之方法進行，例如可使用後面會提到之本發明之細胞傷害性T細胞之維持方法、擴大培養方法。

(2) 本發明之細胞傷害性T細胞之維持方法

本發明之細胞傷害性T細胞之維持方法，係維持CTL保有原來的抗原特異性之細胞傷害活性之方法，該方法係以於含有本發明之有效成分之培養基中繼續培養CTL為一大特徵，因而可持續性的維持含有該細胞之抗原特異性之細胞傷害活性。

對於可能適用於上述方法之CTL並無特別之限制，可以本發明之方法維持利用周知之方法所得之CTL抗原特異性

之細胞傷害活性。再者，根據上述(1)中所記載之本發明之細胞傷害性T細胞之誘導方法，亦適合使用於所得之CTL的維持。

本發明中CTL之繼續培養的一般性條件，依周知之條件[例如參照文獻：Carter J.等，Immunology, 第57卷，第1號，第123-129頁(1986)]即可。本發明之細胞傷害性T細胞之維持方法所使用之培養基並無特別之限定，例如可使用上述CTL之誘導方法中所使用之培養基。

本發明之方法係於培養基中添加上述有效成分而實施。進行培養之培養基中，本發明之有效成分之含量若可得到預期之效果者則無特別之限制，以0.001~1000 $\mu\text{g/ml}$ 為佳，0.01~100 $\mu\text{g/ml}$ 則更佳。此外，有效成分以在培養基中溶解後存在，或固定於培養器材或微珠等之基體上存在者為佳。另外，上述之有效成分以選自由玻尿酸、抗CD44抗體、抗HGF抗體、抗IGF-1抗體、抗IGF-2抗體及纖維黏連蛋白片段所組成之群組中之至少一種為佳。其中可更進一步於培養基中添加細胞激素或其他周知成分，對於本發明而言，適合使用含有IL-2之培養基。此外，於上述相同的，此等細胞激素或其他周知之成分亦可固定於培養器材或微珠等之基體上使用。對於培養條件並無特別之限定，可使用一般之細胞培養中所使用之條件，例如可使用37°C，5% CO₂等條件培養，此外，亦可以適當之時間間隔更換新鮮培養基。

如上述藉由含有本發明之培養基中繼續培養CTL，抑制

其特異性之細胞傷害活性下降，因而可維持CTL。如此所得本發明之效果，可藉由上述1-1-(3)所記載之方法測定、確認利用本發明之方法所維持之CTL具有細胞傷害活性。此外，以該方法所維持之CTL可以周知之擴大培養法予以增殖，所增殖之CTL亦可保持特異性之細胞傷害活性。其中CTL之擴大培養方法，係適合使用後面會提到之本發明之CTL擴大培養方法。

(3) 本發明之細胞傷害性T細胞之擴大培養方法

藉由於適當條件下進行培養細胞傷害性T細胞，可使其細胞數增加(擴大培養)。以往開發出不少CTL的擴大培養方法，亦已知由Riddell等所開發，可在短時間內使CTL增殖效率佳之REM法，該方法係藉由X光照射，在IL-2、抗CD3單株抗體之存在下，使用作為非增殖性之PBMC (做為飼養細胞使用)及以EBV轉形之B細胞(EBV-B細胞)，培養CTL之方法。然而，該方法之問題點在無法否定其具有EBV-B細胞混入T細胞之危險性。

本發明細胞傷害性T細胞之擴大培養方法係可在保有原來抗原特異性之細胞傷害活性下，使該細胞數增加之方法，該方法之特徵為於本發明之上述有效成分存在下培育(培養)細胞。

本發明之方法中對可適用之CTL並無限定，可將自生物體所取得之具有細胞傷害活性之CTL、以周知方法所得之CTL、藉由上述(1)中所記載之本發明CTL之誘導方法所得之CTL、藉由上述(2)中所記載之本發明CTL之維持方法所

得之CTL皆可適用於本發明之CTL的擴大培養。另外，本發明中，CTL之擴大培養的一般性條件係依周知之條件[例如參照文獻：Uberi J. P. 等，Clin. Immunol. Immunophathol.第70卷，第3號，第234-240頁(1994)]即可。

本發明之細胞傷害性T細胞之擴大培養方法中，加上上述有效成分，於更進一步含有抗CD3抗體(較佳為CD3單株抗體)之培養基中培養CTL較為理想。再者，CTL與適當之餵養細胞共培養則更為適合。

上述方法中所使用之培養基並無特別之限定，可使用混合生長必要之成分所製作之周知培養基，如市售之培養基即可。此外，將CTL與餵養細胞進行共培養時，以對於CTL、餵養細胞間兩者之維持、生長適用之培養基較為理想。此等培養基除其本身之構成成分外，亦可含有適當之蛋白質、細胞激素類、其他周知之成分，如本發明中亦適合使用含有IL-2之培養基。可以活化CTL上之T細胞受器為目的而添加抗CD3抗體，特別是抗CD3單株抗體。再者，抗CD3抗體在培養基中之含量依周知之條件決定即可，例如0.01~400 $\mu\text{g/ml}$ 較佳。此外，此等蛋白質、細胞激素類、其他周知成分可溶解於培養基中含有之，亦可固定於培養器材或微珠等基體中含有之。

本發明中之CTL之擴大培養方法，係於培養基中添加上述有效成分而實施之。此外，上述之有效成分係以選自由玻尿酸、抗CD44抗體、抗HGF抗體、抗IGF-1抗體、抗

IGF-2抗體及纖維黏連蛋白片段所組成之群組中之至少一種為佳。另外，進行培養之培養基中，本發明之有項成分含量若可得到本發明之預期效果者則無特別之限定，以0.001~1000 $\mu\text{g/ml}$ 為佳，0.01~100 $\mu\text{g/ml}$ 則更佳。此外，有效成分以在培養基中溶解後存在，或固定於培養器材或微珠等基體上存在者為佳。

本發明之方法中所使用之餵養細胞，若可與抗CD3抗體(特別是CD3單株抗體)合作而刺激CTL，並活化T細胞受器或副刺激受器(costimulatory signal receptor)者則無特別之限定，本發明中以使用PBMC或EBV-B細胞為例。通常餵養細胞以如放射線照射之手段去除其增殖能力後使用。再者，餵養細胞在培養基中之含量係依周知條件決定即可，例如 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ cells/ml為佳。

本發明之特佳樣態中，餵養細胞可使用如EBV-B細胞以外之非病毒感染細胞，具體而言，可使用自體或非自體衍生之PBMC。據此可排除擴大培養之CTL中混入EBV-B細胞的可能性，可提高利用如過繼性免疫療法之CTL的醫療安全性。

本發明之細胞傷害性T細胞之擴大培養方法中，對其培養條件並無特別之限定，可使用一般的細胞培養中所使用之條件，例如可使用37°C，5% CO₂等條件培養，此外，亦可以適當之時間間隔更換新鮮培養基。

再者，關於CTL之擴大培養方法，若添加於使用本發明所之有效成分之培養基中則無特別之限定，上述以外之過

去的CTL擴大培養法中，本發明之有效成分添加於培養基之態樣亦包含於本發明中。

根據本發明之擴大培養方法，如藉由14天之擴大培養可得細胞數增加100~1000倍之CTL。更進一步，如此所得之CTL與如REM法之過去的CTL擴大培養法所得者比較起來，可保持較高之抗原特異性之細胞傷害活性。

如此所得本發明之效果，可藉由上述1-1-(3)所記載之方法測定、確認利用本發明之方法所擴大培養之有CTL之細胞傷害活性。

此外，本發明中所使用之有效成分係對CTL之抗原特異性之細胞傷害活性之維持或增強發生作用，可使用CTL誘導劑、CTL維持劑或CTL擴大培養劑(以下亦稱此等為CTL培養劑)。該CTL培養劑係由有效成分本身，或更進一步其他如包含CTL誘導方法中所使用之培養基、CTL維持方法中所使用之培養基或CTL擴大培養方法中所使用之培養基之任意之成分，CTL或飼養細胞等之培養、生長所必要之成分，及適當之蛋白質、細胞激素類(以IL-2為佳)，預期之其他成分所組成。此外，此等含CTL培養劑之培養基可當作CTL誘導用、維持用、或擴大培養用培養基(CTL用培養基)使用。此外，此等CTL培養劑亦可事先混合於培養基中(包含溶解)，亦可固定於培養器材或微珠等基體上。此等培養基含有任意細胞培養所需之基本成分。另外，上述CTL培養劑及CTL用培養基可利用周知之方法以適當混合而製造。

再者，根據本發明可提供將上述有效成分固定於如培養盤、培養皿、燒瓶、袋子等之任意培養器材(容器)或珠子、薄膜等之基體(詳言之，即細胞培養時與培養基接觸之基體部分)上所成之CTL誘導用、維持用或擴大培養用之此等基體。有效成分固定於基體上之量只要能獲得本發明所希望之效果者則無特別之限制，使用該基體誘導CTL時，有效成分係以於本發明之CTL誘導方法、維持方法或擴大培養方法之說明中所記載之有效成分的較佳培養基含量範圍，於基體所使用之任意培養基中所可含有之量為宜。此外，除上述有效成分外，亦可任意固定上述蛋白質、細胞激素類、其他成分。固定方法並無特別之限制，例如可使用蛋白質吸附、生物素(biotin)與抗生物素蛋白(avidin)或鏈黴抗生物素蛋白(streptavidin)之結合、化學性固定等周知之固定方法。該器材系適合使用於本發明之CTL誘導方法、維持方法或擴大培養方法。

藉由使用上述之上述CTL之誘導方法、維持方法及擴大培養方法所得含有CTL之培養物中，通常亦混入協助者T細胞等CTL以外之細胞。本發明中，從該培養物經離心分離等回收該培養物中之細胞，作為本發明之方法所得之CTL，可原狀使用之。

再者，更進一步從該培養物中，以周知之方法分離富含具有抗原特異性細胞傷害活性之CTL的細胞集團(或培養物)，可作為以本發明之方法所得之CTL使用。亦即，本發明中，藉由施予上述含有CTL之培養物之CTL以外的細胞(如

協助者T細胞)與CTL之分離操作，可製備有關於抗原特異性之細胞傷害活性之濃縮細胞集團以使用。藉由分離如此之上述細胞集團，所得之抗原特異性之細胞傷害活性之濃縮係過去的REM法所不及之處。因此，本發明之一實施態樣，係提供一種細胞傷害性T細胞之回收方法，其包含從本發明之CTL之誘導方法、維持方法及擴大培養方法之任一項所得之含有CTL的培養物中篩選富含具有抗原特異性之細胞傷害活性之CTL的細胞集團之步驟。另外，本發明之CTL回收方法，其一為所謂選擇性取得具高抗原特異性之細胞傷害活性之CTL細胞集團之方法，廣義而言，亦所謂產生或獲得該CTL細胞集團之方法。關於該細胞集團之篩選方法並無特別之限定，例如從利用上述之CTL之誘導方法、維持方法及擴大培養方法所得含有CTL之培養物中，使用針對CTL細胞表面上所表現之細胞表面抗原的抗體(如與抗CD8抗體結合之磁性珠或管柱)，選擇性僅回收CTL，可得富含CTL之細胞集團。此外，利用流量細胞計數器(flow cytometer)亦可選擇性分離CTL。此外，從利用本發明之CTL之誘導方法、維持方法及擴大培養方法所得含有CTL之培養物中，經去除CTL以外之細胞可得富含CTL之細胞集團。例如為從該培養物中去除協助者T細胞，利用與協助者T細胞表面上所表現之細胞表面抗原所對應之抗體(如抗CD4抗體)結合之磁性珠或管柱，選擇性去除協助者T細胞，可得富含CTL之細胞集團。另外，對於協助者T細胞之去除亦可利用流量細胞計數器。如此所得之富含

CTL之細胞集團與從含有之CTL培養物中非選擇性的回收細胞集團比較，其具有較強之細胞傷害活性，更適合作為利用本發明之方法所得之CTL使用。再者，本發明中富含CTL之細胞集團，包含僅有CTL之細胞集團。

再者，使用藉由本發明CTL之維持方法及擴大培養方法所得之CTL，可進一步進行藉由本發明CTL之維持及擴大培養，例如自經由本發明之擴大培養方法所得之CTL，以上述之方法獲得富含CTL之部分，藉由使用該部分再度進行本發明之擴大培養方法，亦可進一步獲得細胞傷害活性高之CTL。另外，藉由本發明之擴大培養方法所得之CTL，利用本發明之維持方法亦可維持其細胞傷害活性。

此外，本發明提供利用上述本發明CTL之誘導方法、維持方法及擴大培養方法所得之CTL（含有藉由上述回收方法，自利用此等方法所得之含有CTL的培養物中所回收之CTL）。其CTL皆具有抗原特異性之細胞傷害活性，擁有即使經過長時間繼續培養或擴大培養，其細胞傷害活性僅少量下降之性質。再者，本發明亦提供含有該CTL作為有效成分之治療劑，該治療劑特別適合用於過繼性免疫療法。在過繼性免疫療法中，以如經由對靜脈之投予方式，對病患投予具有適合於患者治療之抗原特異性細胞傷害活性之CTL。該治療劑係以製藥領域中週知之方法製備之，例如以藉由本發明之方法製備之CTL為有效成分，與例如適合於週知之非經口投予之有機或無機載體、賦形劑、安定劑等混合以製備之。對於該CTL，特別是經由本發明之CTL

擴大培養方法，不使用EBV感染細胞所製備之CTL係適合於此目的。此外，治療劑中之CTL含量、治療劑之投予量、該治療劑相關之各條件可依週知之過繼性免疫療法適當決定之。

以下列舉實施例更加具體說明本發明，但本發明不限定於此等所記載者。

實施例1使用玻尿酸保持抗原特異性細胞傷害活性之CTL的擴大培養

實施例 1-1

(1) PBMC之分離及保存

自保有HLA-A2.1之人類健康捐贈者進行成分採血後，以PBS(-)稀釋2倍，堆積(stacking)於Ficoll-paque (Pharmacia公司製)上後，以500 g離心20分鐘。以吸管回收中間層之末梢血單核細胞(PBMC)並加以清洗。將所採取之PBMC懸浮於由90% FBS (Bio Whittaker公司製)/10% DMSO (SIGMA公司製)所組成之保存液，保存於液態氮中。CTL誘導時再將此等保存之PBMC於37℃水浴中急速溶解，以含10 µg/ml DNase (Calbiochem公司製)之RPMI1640培養基(Bio Whittaker公司製)清洗後，以錐藍(trypan blue)染色法計算出活細胞數以供各實驗使用。

(2) 抗流感病毒記憶CTL之誘導

抗流感病毒(influenza virus)記憶CTL之誘導係以改變一部份之Bednarek等人之方法[Bednarek M. A.等. J. Immunology.第147卷，第4047-4053頁(1991)]實施之。亦

即，將實施例 1-1-(1)所配製之 PBMS 懸浮於含 5% 人類 AB 型血清、0.1 mM 非必須胺基酸、1 mM 丙酮酸鈉、2 mM L-穀胺酸 (皆由 Bio Whittaker 公司製)、10 mM HEPES (Nakaraitesuku 公司製)、1% 鏈黴素-盤尼西林 (GIBCO BRL 公司製) 之 RPMI1640 培養基 (Bio Whittaker 公司製) (以下簡稱為 5HRPMI) 中，使其成為 4×10^6 cells/ml 後，於 24 孔細胞培養盤 (Falcon 公司製) 中以每孔 1 ml 接種，於 5% 之 CO_2 濕式培育箱 37°C 培育 1.5 小時，分離附著於塑膠板之單核細胞。接著，以 RPMI1640 培養基回收非附著性之細胞，作為反應者細胞 (responder cell) 於冰上保存之。於所分離之單核細胞中，添加 0.5 ml 之含有作為抗原之 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 流感病毒蛋白質衍生抗原決定胜肽 (epitope peptide) (序列表之序列編號：18 所記載之基質蛋白衍生 HLA-A2.1 結合性胜) 及 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之 $\beta 2$ 微球蛋白 (microglobulin, Scrips 公司製) 之 5HRPMI，於室溫中培育 2 小時後，以 X 光照射 (5500R) 以作為抗原呈現細胞。自各孔吸取去除胜肽液後，以 RPMI1640 培養基清洗各孔，將冰上保存之反應者細胞懸浮於 5HRPMI 中使其成為 $0.5 \sim 2 \times 10^6$ cells/ml，以每孔 1 ml 添加於抗原呈現細胞上，此時，添加玻尿酸 (Calbiochem 公司製) 使其樣品最終濃度為 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。亦設定為未添加樣品之群組作為對照組。培養皿於 5% CO_2 中 37°C 培養。培養開始後之第 2 日，於各孔中添加 1 ml 含有 60 U/ml 之 IL-2 (鹽野義製藥公司製) 與 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 玻尿酸之 5HRPMI (對照組僅含 IL-2)，此外在第 5 日時，去除一半培養上清液後，添加 1

ml之相同 IL-2及含有玻尿酸之培養基(對照組僅含 IL-2)。

第7日時，以與上述之相同方法配製抗原呈現細胞後，將1週所培養之反應者細胞懸浮於5HRPMI使其成為 $0.5\sim 2\times 10^6$ cells/ml，以每孔1 ml添加於所配製之抗原呈現細胞上，進行再刺激。此時，添加玻尿酸使其最終濃度為10 $\mu\text{g/ml}$ (對照組則不添加)。再刺激後第2日，於各孔中添加1 ml之含有60 U/ml之IL-2及10 $\mu\text{g/ml}$ 玻尿酸之5HRPMI (對照組僅含IL-2)，再過5日，將培養上清液去除一半後，於各孔中添加1 ml與去除前相同內容物之培養基，再持續培養2日後進行CTL誘導。

(3) CTL細胞傷害活性之測定

實施例1-1-(2)所配製之誘導開始後第14日之CTL的細胞傷害活性係以利用Calcein-AM之細胞傷害活性測定法[Rudolf Lichtenfels 等, J. Immunol. methods, 第172卷, 第2號, 第227-239頁(1994)]進行評估。與抗原決定胜肽共培養1夜，或將在抗原決定胜肽未存在下培養之保持HLA-A2.1的 EBV轉形B細胞(細胞名221A2.1)懸浮在含5% FBS (fetal bovine serum, 牛胎血清, Bio Whittaker公司製)之RPMI1640培養基中，使其成為 1×10^6 cells/ml，添加Calcein-AM (Dotite公司製)使其最終濃度為25 μM ，於37 $^{\circ}\text{C}$ 培養1小時。細胞於不含Calcein-AM之培養基中清洗後與20倍量之K562細胞(ATCC CCL-243)混合以作為Calcein標識之標的細胞。再者，K562細胞係用於排除經由混入反應者細胞中之NK細胞所引起之非特異性傷害活性。

以實施例 1-1-(2) 所配製之記憶 CTL 作為效應細胞 (effector cell)，以 5HRPMI 梯度稀釋為 1×10^5 cells/ml 至 9×10^6 cells/ml 後，以每孔 100 μ l 加入 96 孔細胞培養盤，並於每孔再添加 100 μ l 之配製為 1×10^5 cells/ml 之以 Calcein 標識之標的細胞。加入上述細胞懸浮液之培養盤以 400 g 離心 1 分鐘後，置於 37°C 之濕式 CO₂ 培育箱培育 4 小時。4 小時後自各孔採取 100 μ l 培養上清液，利用螢光平板讀取器 (485 nm/538 nm) 測定培養上清液中所釋放之 Calcein 量。「特異性細胞傷害活性 %」依下式 1 計算。

式 1：特異性細胞傷害活性 (%) =

$$\{(\text{各孔之測定值} - \text{最小釋放量}) / (\text{最大釋放量} - \text{最小釋放量})\} \times 100$$

上式中最小釋放量係標的細胞及僅含 K562 細胞之孔的 Calcein 量，表示來自標的細胞之 Calcein 自然釋放量。此外，最大釋放量係表示於標的細胞添加 0.1% 界面活性劑 Triton X-100 (Nakaraitesuku 公司製) 後，將細胞完全破壞之際的 Calcein 釋放量。其結果為：誘導不久後，特異性細胞傷害活性雖被誘導，但與誘導時玻尿酸添加之有無所引起之細胞傷害活性幾乎沒有差別。

(4) CTL 之擴大培養

以 5HRPMI 清洗由實施例 1-1-(2) 所配製之 CTL 後，配製為 3×10^4 cells/ml。另一方面，以 X 光照射 (3300R) 藉由與實施例 1-1-(1) 相同之方法所採取之 HLA-A2.1 非保持 allogenic PBMC，再以培養基清洗後，配製為 $2 \sim 5 \times 10^6$ cells/ml。將

此等 3×10^4 cells/ml 之 CTL 及 $4 \sim 10 \times 10^6$ cells/ml 之 allogenic PBMC 懸浮於 10 ml 之 5HRPMI 中，進一步添加最終濃度為 50 ng/ml 之抗 CD3 抗體 (Janssen Kyowa 公司製) 後，放入 12.5 cm^2 之燒瓶 (Falcon 公司製)，於 37°C 之濕式 CO_2 培育箱中培養 14 日。此時，設定添加於實施例 1-1-(2) 之 CTL 誘導之際所添加之玻尿酸的群組 (最終濃度 10 $\mu\text{g/ml}$)，與未添加之群組。期間完全不添加藉由胜肽之刺激，培養開始第 1 日添加最終濃度為 120 U/ml 之 IL-2，進一步培養開始後第 4 日以後，每 2-3 日去除一半上清液後，於各瓶中添加 5 ml 之含 60 U/ml IL-2 之 5HRPMI。此時，於玻尿酸添加群組之培養基中添加同濃度之樣品。擴大培養開始後，第 14 日以與實施例 1-1-(3) 相同之方法測定 CTL 之特異性細胞傷害活性，其結果如表 1 所示。此外，表中之 E/T 比係指相對於標的細胞數 (T) 之效應細胞數 (E) 之比，胜肽添加係指針對於標的細胞之胜肽添加之有無。擴大增值率係相對擴大培養開始時之細胞數之擴大培養結束時之細胞數之比作為增殖率求得。

表 1

樣品	樣品添加*		擴大增 殖率 (倍)	胜肽 添加¶	細胞傷害活性(%)			
	CTL	擴大			E/T比			
	誘導時	培養時			1	3	10	30
對照組	-	-	547	-	7.3	8.4	9.1	12.7
	-	-	547	+	8.1	11.2	21.5	45.9
玻尿酸	+	+	493	-	7.3	8.6	13.1	17.0
	+	+	493	+	31.1	49.8	90.8	105.6

*: + ; 添加樣品, - ; 未添加樣品

¶: + ; 添加胜肽, - ; 未添加胜肽

其結果為：於CTL誘導時與繼續培養時添加玻尿酸之樣品群組中，即使在14日的擴大培養後，仍特異性維持其高細胞傷害活性。另一方面，於CTL誘導時及擴大培養時皆未添加樣品之群組中，其活性皆明顯下降。亦即，如此顯示，藉由CTL誘導時與擴大培養時添加玻尿酸，可在長期特異性保持細胞傷害活性之狀態下，擴大培養CTL。

實施例 1-2

(1) 抗流感病毒記憶CTL之誘導

使用以實施例 1-1-(1)之方法分離、保存之PBMC，並以與實施例 1-1-(2)相同之方法進行抗流感病毒記憶CTL之誘導。此時，添加玻尿酸使其最終濃度達10 µg/ml，另外，設定未添加樣品之群組。

如此所配製之誘導開始後第14日CTL之細胞傷害活性以

實施例 1-1-(3)之相同方法評估。其結果為，誘導不久後，特異性細胞傷害活性雖被誘導，但誘導時抗體添加之有無所引起之細胞傷害活性幾無差別。

(2) CTL之擴大培養

使用以實施例 1-2-(1)所配製之 CTL，並以實施例 1-1-(4)相同之方法擴大培養 CTL。此時，完全不添加實施例 1-2-(1)中之 CTL 誘導時所添加之玻尿酸。期間完全不添加藉由胜肽之刺激，培養開始第 1 日添加最終濃度為 120 U/ml 之 IL-2，進一步培養開始後第 4 日以後，每 2-3 日去除一半上清液後，於各瓶中添加 5 ml 之含 60 U/ml IL-2 之 5HRPMI。擴大培養開始後，於第 14 日以與實施例 1-1-(3)相同之方法測定 CTL 之特異性細胞傷害活性，其結果如表 2 所示。

表 2

樣品	樣品添加*				細胞傷害活性(%)			
	CTL 誘導時	擴大 培養 時	擴大增 殖率 (倍)	胜肽 添加 ¶	E/T 比			
					1	3	10	30
對照組	-	-	480	-	0	0	0.4	6.8
	-	-	480	+	4	11.2	29.3	59.7
玻尿酸	+	+	423	-	0	0	1.9	14.3
	+	+	423	+	7.2	23.3	59.6	85.1
	+	-	393	-	3.0	1.4	4.7	9.3
	+	-	393	+	9.9	22.1	47.7	78.0

*: + ; 添加樣品，- ; 未添加樣品

¶: + ; 添加胜肽，- ; 未添加胜肽

其結果為：僅於CTL誘導時添加玻尿酸之群族中，即使於擴大培養時未添加此等樣品，其在14日的擴大培養中，仍特異性維持其高細胞傷害性活性。另一方面，於CTL誘導時及擴大培養時皆未添加此等樣品之群組中，其活性皆明顯下降。亦即，如此顯示：即使僅於CTL誘導時添加玻尿酸，亦可在長期特異性保持細胞傷害活性之狀態下，擴大培養CTL。

實施例 1-3

(1) 抗流感病毒記憶CTL之誘導

使用以與實施例 1-1-(1)記載之方法所分離、保存中之PBMC，並以與實施例 1-1-(2)相同之方法進行抗流感病毒記憶CTL之誘導。此時，此時，設定添加玻尿酸(表3中稱為HA)的群組(最終濃度10 µg/ml)，與完全未添加樣品之群組。關於玻尿酸添加群組亦分別設定添加最終濃度為0.2 µg/ml之玻尿酸結合Blocking抗體之抗CD44抗體(表中稱為HA Blocking抗CD44抗體)，及玻尿酸結合Non-blocking抗體之抗CD44抗體(表中稱為HA Non-blocking抗CD44抗體)(分別為Ancell公司製之單株抗體)之群組，以研究抗體引起之抑制效果。

如此所配製之誘導開始後第14日CTL之細胞傷害活性以實施例 1-1-(3)之相同方法評估。其結果為：誘導不久後，特異性細胞傷害活性雖被誘導，但誘導時抗體添加之有無所引起之細胞傷害活性幾無差別。

(2) CTL之擴大培養

實施例 1-3-(1)所配製之 CTL 以實施例 1-1-(4)相同之方法，進行 CTL 之擴大培養。此時，設定添加於實施例 1-3-(1)之 CTL 誘導之際所添加之玻尿酸至最終濃度 10 $\mu\text{g/ml}$ 的群組，與自誘導時起完全未添加玻尿酸之群組。此外，關於誘導時同時添加玻尿酸與抗 CD44 抗體之群組，再擴大培養時亦添加同樣之樣品及抗體。期間完全不添加藉由胜肽之刺激，培養開始第 1 日添加最終濃度為 120 U/ml 之 IL-2，進一步培養開始後第 4 日以後，每 2-3 日去除一半上清液後，於各瓶中添加 5 ml 之含 60 U/ml IL-2 之 5HRPMI。擴大培養開始後，於第 14 日以與實施例 1-1-(3)相同之方法測定 CTL 之特異性細胞傷害活性，其結果如表 3 所示。

表 3

樣品	樣品添加*		擴大 增殖率 (倍)	胜肽 添加 ¶	細胞傷害活性(%)			
	CTL 誘導時	擴大 培養時			E/T比			
					1	3	10	30
對照組	-	-	330	-	2.4	6.2	7.4	9.6
	-	-	330	+	3.9	5.8	7.2	10.9
HA	+	+	350	-	0	0	1.9	5.3
	+	+	350	+	4.8	15.3	35.3	70.2
HA+HA Blocking	+	+	357	-	5.9	4.7	15.0	14.9
抗CD44抗體	+	+	357	+	10.9	11.8	19.5	17.5
HA+HA Non-Blocking	+	+	413	-	6	4.7	5	7.6
抗CD44抗體	+	+	413	+	12.2	17.5	34.9	69.9

*：+；添加樣品，-；未添加樣品

¶：+；添加胜肽，-；未添加胜肽

其結果為：於CTL誘導時與擴大培養時添加玻尿酸之群組中，CTL即使在14日之擴大培養後，仍特異性維持其高細胞傷害活性。另一方面，CTL誘導時及培養時皆未添加樣品之群組中，其活性皆明顯下降。此外，同時添加玻尿酸與抗CD44抗體(玻尿酸結合Blocking抗體)之群組中，由玻尿酸所導致之CTL活性維持效果完全受到抑制。另一方面，同時添加玻尿酸與抗CD44抗體(玻尿酸結合Non-blocking抗體)之群組中，由玻尿酸所導致之CTL活性維持效果則未受到抑制。亦即，由此顯示：由玻尿酸所導致之細胞傷害活性維持之效果係藉由玻尿酸結合於細胞表面之CD44抗原而發揮。

實施例2 使用抗人類CD44抗體保持特異性細胞傷害活性之CTL的擴大培養

(1) 抗流感病毒記憶CTL之誘導

使用以與實施例1-1-(1)記載之方法所分離、保存中之PBMC，並以與實施例1-1-(2)相同之方法進行抗流感病毒記憶CTL之誘導。此時，添加經純化之小鼠IgG1(Genzyme/Techne公司製)或實施例1-3-(1)所使用之2種抗人類CD44抗體，使其最終濃度達0.2 µg/ml，另外，亦設定為未添加抗體之群組。

如此所配製之誘導開始後第14日CTL之細胞傷害活性以實施例1-1-(3)之相同方法評估。其結果為，誘導不久後，特異性細胞傷害活性雖被誘導，但誘導時抗體添加之有無，對於細胞傷害活性並無差別。

(2) CTL之擴大培養

使用實施例2-(1)所配製之CTL，並以與實施例1-1-(4)相同之方法進行CTL之擴大培養。此時，設定分別添加實施例2-(1)中之CTL誘導時添加之經純化之小鼠IgG1 (Genzyme/Techne公司製)或上述2種抗人類CD44抗體以使其最終濃度達0.2 $\mu\text{g/ml}$ 之群組，及自誘導時起完全未添加抗體之群組。期間完全不添加藉由胜肽之刺激，培養開始第1日添加最終濃度為120 U/ml之IL-2，進一步培養開始後第4日以後，每2-3日去除一半上清液後，於各瓶中添加5 ml之含60 U/ml IL-2及0.2 $\mu\text{g/ml}$ 小鼠IgG1或上述2種抗人類CD44抗體之5HRPMI。但在未添加抗體之群組中，則即使在更換培養基時亦不進行抗體之添加。擴大培養開始後，於第14日以與實施例1-1-(3)相同之方法測定CTL之特異性細胞傷害活性，其結果如表4所示。

表 4

樣品	樣品添加*		擴大 增殖率 (倍)	胜肽 添加¶	細胞傷害活性(%)		
	CTL 誘導時	擴大 培養時			E/T比		
					3	10	30
對照組	-	-	413	-	5.9	10.5	12.8
	-	-	413	+	4.0	14.8	48.9
小鼠IgG1	+	+	357	-	5.6	0	2
	+	+	357	+	6.2	6.8	13.3
HA Non-Blocking	+	+	357	-	10.3	14.2	21.2
抗CD44抗體	+	+	357	+	32.4	60.1	104.8
HA Blocking	+	+	420	-	1.6	1.3	3.5
抗CD44抗體	+	+	420	+	9.5	9.8	17.7

*：+；添加樣品，-；未添加樣品

¶：+；添加胜肽，-；未添加胜肽

其結果為：於CTL誘導時與擴大培養時抗CD44抗體(玻尿酸結合Non-Blocking抗體)之群組中，CTL即使在14日之擴大培養後，仍特異性維持其高細胞傷害活性。另一方面，CTL誘導時及培養時皆未添加抗體之群組及抗CD44抗體(玻尿酸結合阻斷抗體)添加群組中，其活性皆明顯下降。亦即，由此顯示：藉由再CTL誘導及擴大培養時添加即使在抗人類CD44抗體中亦不抑制與玻尿酸之結合的抗體，可在長期特異性保持細胞傷害活性之狀態下，擴大培養CTL。

實施例3 玻尿酸及抗人類CD44抗體與可溶性或細胞表面上之CD44抗原之結合性

CD44中有以可溶性狀態存在於培養上清液中者(以下稱為可溶性CD44)，及存在於細胞膜表面者(以下稱為細胞表面之CD44)2種模式，CD44為玻尿酸之受器，從藉由於CTL擴大培養時添加玻尿酸，可有維持細胞傷害活性之效果，研究此活性維持效果究竟與何種CD44抗原特異性相關。

實施例3-1

(1) 可溶性CD44與玻尿酸之結合性評估

可溶性CD44與玻尿酸之結合性係以下列方法評估。亦即，將含有5 $\mu\text{g/ml}$ 抗人類CD44抗體(可溶性CD44辨識抗體，Ancell公司製)之PBS (Nissui公司製)，以每孔100 μl 加入孔中，將在室溫下培養1夜之Nunc-Immuno盤(Nunc公司製)以0.025%之Tween 20 (SIGMA公司製)/PBS清洗3次後，每孔添加300 μl 之BlockS (大日本製藥公司製)，於室溫下培養1小時以上。另一方面，將玻尿酸以最終濃度分別為0、0.25、0.5、1 $\mu\text{g/ml}$ 添加於含有可溶性CD44 (15 ng/ml)之RPMI培養基中，以37 $^{\circ}\text{C}$ 培養1小時。以0.025%之Tween 20/PBS再度清洗阻斷後之各盤的個孔3次後，於每孔添加100 μl 之含可溶性CD44 (15 ng/ml)之RPMI培養基，該培養基為含有事先培養的含玻尿酸或不含玻尿酸者，進一步於每孔中添加50 μl 之HRP標識Conjugate (BenderMed公司製，為可溶性CD44測定用ELISA所附試劑)，並於室溫培養3

小時。培養後，各孔以0.025%之Tween 20/PBS清洗3次，再於每孔添加100 μ l之TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) 溶液(SIGMA公司製)，於室溫下培養15分鐘後，每孔添加50 μ l之2N硫酸以停止反應。各吸光度係使用platereader (450 nm)測定之，其結果如圖1所示。

其結果為：即使於含有可溶性CD44之培養基中添加玻尿酸，亦完全不會抑制源於可溶性CD44辨識抗體之辨識。亦即，玻尿酸完全不會與存在於培養基中的可溶性CD44結合，由此可知：培養基中之可溶性CD44完全未參與藉由玻尿酸以維持CTL特異性細胞傷害活性之效果。

(2) 抗流感病毒記憶CTL之誘導

使用以與實施例1-1-(1)記載之方法所分離、保存中之PBMC，並以與實施例1-1-(2)相同之方法進行抗流感病毒記憶CTL之誘導。

如此所配製之誘導開始後第14日CTL之細胞傷害活性以實施例1-1-(3)之相同方法評估。其結果為：誘導不久後誘導特異性細胞傷害活性。

(3) CTL之擴大培養

使用實施例3-1-(2)所配製之CTL，並以與實施例1-1-(4)相同之方法進行CTL之擴大培養。期間完全不添加藉由肽之刺激，培養開始第1日添加最終濃度為120 U/ml之IL-2，進一步培養開始後第4日以後，每2-3日去除一半上清液後，於各瓶中添加5 ml之含60 U/ml IL-2之5HRPMI。擴大培養開始後，於第14日以與實施例1-1-(3)相同之方法測定

CTL之特異性細胞傷害活性，確認此等CTL確實具有特異性細胞傷害活性。

(4) 玻尿酸與細胞表面上CD44之結合性評估

使用含1%三聚甲醛(paraformaldehyde, Nakarai公司製)之PBS (Nissui公司製)固定實施例3-1-(3)所配製 2×10^5 cells之CTL後，以PBS清洗之。將所固定之細胞懸浮於含10 $\mu\text{g/ml}$ 之FL標識玻尿酸(Molecular Probes公司製)之PBS中，以37°C培養30分鐘。亦設定於未含FL標識玻尿酸(FL-HA)之PBS中培養之群組作為陰性對照組。培養後，以PBS清洗，再度懸浮於含1%三聚甲醛之PBS中，將所配製之CTL放於FACS Vantage (Becton, Dickinson公司製)上，以測定CTL細胞表面上之螢光強度，其結果如圖2所示。

其結果為：FL標識之玻尿酸係結合於CTL之細胞表面上，亦即，由玻尿酸所維持之CTL特異性細胞傷害活性效果係藉由玻尿酸結合於CTL之細胞表面上所存在之CD44而發揮。

實施例3-2

(1) 抗人類CD44抗體(HA Non-Blocking 抗CD44抗體)與可溶性CD44之結合性評估

HA Non-Blocking抗CD44抗體與可溶性CD44之結合性係以下列方法評估。亦即，將含有5 $\mu\text{g/ml}$ HA Non-Blocking抗CD44抗體或抗人類CD44抗體(可溶性CD44辨識抗體，Ancell公司製)之PBS (Nissui公司製)，以每孔100 μl 加入孔中作為一次抗體，將在室溫下培養1夜之Nunc-Immuno盤

(Nunc公司製)以0.025%之Tween 20 (SIGMA公司製)/PBS清洗3次後，每孔添加300 μ l之BlockS (大日本製藥公司製)，於室溫下培養1小時以上。以0.025%之Tween 20/PBS再度清洗阻斷後之各盤的個孔3次後，於每孔添加100 μ l之含可溶性CD44 (15 ng/ml)之RPMI培養基，進一步於每孔中添加50 μ l之HRP標識Conjugate (BenderMed公司製，為可溶性CD44測定用ELISA所附試劑)，並於室溫培養3小時。培養後，各孔以0.025%之Tween 20/PBS清洗3次，再於每孔添加100 μ l之TMB溶液(SIGMA公司製)，於室溫下培養15分鐘後，每孔添加50 μ l之2N硫酸以停止反應。各吸光度係使用platereader (450 nm)測定之，實驗連續進行二次，採其平均值。其結果如圖3、圖4所示。其結果為：使用作為一次抗體之可溶性CD44辨識抗體可依據抗體濃度辨識培養基中之可溶性CD44。另一方面，HA Non-Blocking抗CD44抗體完全不會辨識培養基中之可溶性CD44。亦即，HA Non-Blocking抗CD44抗體完全不會與存在於培養基中的可溶性CD44結合，由此可知：培養基中之可溶性CD44完全未參與藉由HA Non-Blocking抗CD44抗體以維持CTL特異性細胞傷害活性之效果。

(2) 抗流感病毒記憶CTL之誘導

使用以與實施例1-1-(1)記載之方法所分離、保存中之PBMC，並以與實施例1-1-(2)相同之方法進行抗流感病毒記憶CTL之誘導。

如此所配製之誘導開始後第14日CTL之細胞傷害活性以

實施例 1-1-(3)之相同方法評估。其結果為：誘導不久後誘導特異性細胞傷害活性。

(3) CTL之擴大培養

使用實施例 3-2-(2)所配製之 CTL，並以與實施例 1-1-(4)相同之方法進行 CTL 之擴大培養。期間完全不添加藉由胜肽之刺激，培養開始第 1 日添加最終濃度為 120 U/ml 之 IL-2，進一步培養開始後第 4 日以後，每 2-3 日去除一半上清液後，於各瓶中添加 5 ml 之含 60 U/ml IL-2 之 5HRPMI。擴大培養開始後，於第 14 日以與實施例 1-1-(3)相同之方法測定 CTL 之特異性細胞傷害活性，確認此等 CTL 確實具有特異性細胞傷害活性。

(4) 抗人類 CD44 抗體 (HA Non-Blocking 抗 CD44 抗體) 與細胞表面上 CD44 之結合性評估

使用含 1% 三聚甲醛 (Nakarai 公司製) 之 PBS (Nissui 公司製) 固定實施例 3-2-(3) 所配製 2×10^5 cells 之 CTL 後，以 PBS 清洗之。將所固定之細胞懸浮於含 1 $\mu\text{g/ml}$ 之抗-CD44/FITC (FITC 標識之 HA Non-Blocking 抗 CD44 抗體 (CD44-FITC) Ancell 公司製) 之 1% BSA (SIGMA 公司製) PBS 中，置於冰上培養 30 分鐘。亦設定於含 1 $\mu\text{g/ml}$ 之小鼠 IgG1/FITC (FITC 標識之小鼠 IgG 抗體 (IgG1-FITC)，DAKO 公司製) 之 PBS 中培養之群組作為對照組。培養後，以 PBS 清洗，再度懸浮於含 1% 三聚甲醛之 PBS 中，將所配製之 CTL 放於 FACS Vantage (Becton, Dickinson 公司製) 上，以測定 CTL 細胞表面上之螢光強度，其結果如圖 5 所示。

其結果暗示：FITC標識之HA Non-Blocking抗CD44抗體係結合於CTL之細胞表面上，亦即，由抗人類HA Non-Blocking 抗CD44抗體所維持之CTL特異性細胞傷害活性效果係藉由HA Non-Blocking抗CD44抗體結合於CTL之細胞表面上所存在之CD44而發揮。

實施例3-3

(1) 抗流感病毒記憶CTL之誘導

使用以實施例1-1-(1)之方法分離、保存之PBMC，並以與實施例1-1-(2)相同之方法進行抗流感病毒記憶CTL之誘導。此時，添加HA Non-Blocking抗CD44抗體使其最終濃度達0.2 $\mu\text{g/ml}$ ，另外，設定未添加樣品之群組。

如此所配製之誘導開始後第14日CTL之細胞傷害活性以實施例1-1-(3)之相同方法評估。其結果為：誘導不久後，特異性細胞傷害活性雖被誘導，但誘導時抗體添加之有無所引起之細胞傷害活性幾無差別。

(2) CTL之擴大培養

使用以實施例3-3-(1)所配製之CTL，並以實施例1-1-(4)相同之方法擴大培養CTL。此時，分別添加於實施例3-3-(1)中之CTL誘導時所添加之HA Non-Blocking抗CD44抗體，使最終濃度達0.2 $\mu\text{g/ml}$ ，另外，誘導時未添加抗體之群組此時亦不添加抗體。期間完全不添加藉由胜肽之刺激，培養開始第1日添加最終濃度為120 U/ml之IL-2，進一步培養開始後第4日以後，每2-3日去除一半上清液後，於各瓶中添加5 ml之含60 U/ml IL-2及0.2 $\mu\text{g/ml}$ HA Non-Blocking

抗CD44抗體之5HRPMI。但未添加抗體之群組，在更換培養基時亦不進行抗體之添加。擴大培養開始後，於第14日以與實施例1-1-(3)相同之方法測定CTL之特異性細胞傷害活性，其結果確認：在CTL誘導時及擴大培養時添加HA Non-Blocking抗CD44抗體之群組中，其CTL即使在14日的擴大培養中，仍特異性維持其高細胞傷害性活性。另一方面，於CTL誘導時及擴大培養時皆未添加此等抗體之群組中，其活性皆明顯下降。

(3) 添加HA Non-Blocking 抗CD44抗體擴大培養後，在CTL之細胞表面上之抗體性評估

使用含1%三聚甲醛(Nakarai公司製)之PBS (Nissui公司製)固定實施例3-1-(3)所配製 2×10^5 cells之CTL後，以PBS清洗之。將所固定之細胞懸浮於含1 $\mu\text{g/ml}$ 之FITC標識之小鼠IgG或FITC標識之小鼠IgG抗體之1% BSA (SIGMA公司製)PBS中，置於冰上培養30分鐘。培養後，以PBS清洗，再度懸浮於含1%三聚甲醛之PBS中，將所配製之CTL放於FACS Vantage (Becton, Dickinson公司製)上，以測定CTL細胞表面上之螢光強度，其結果如圖6所示。

其結果為：確認了在添加HA Non-Blocking抗CD44抗體之條件下所擴大培養之CTL的細胞表面上結合有該抗體，亦即，由HA Non-Blocking 抗CD44抗體所維持之CTL特異性細胞傷害活性效果係藉由該抗體結合於CTL之細胞表面上所存在之CD44而發揮。

實施例4 使用抗人類HGF抗體之保持特異性細胞傷害活性

之CTL的擴大培養

實施例 4-1

(1) 抗流感病毒記憶CTL之誘導

使用以實施例 1-1-(1)之方法分離、保存之PBMC，並以與實施例 1-1-(2)相同之方法進行抗流感病毒記憶CTL之誘導。此時，添加經純化之小鼠IgG1 (Genzyme/Techne公司製)或抗人類HGF抗體(小鼠之單株抗體，Genzyme/Techne公司製)以使其最終濃度達2 $\mu\text{g/ml}$ ，另外，設定未添加抗體之群組。

如此所配製之誘導開始後第14日CTL之細胞傷害活性以實施例 1-1-(3)之相同方法評估。其結果為：誘導不久後，特異性細胞傷害活性雖被誘導，但誘導時抗體添加之有無所引起之細胞傷害活性幾無差別。

(2) CTL之擴大培養

使用以實施例 4-1-(1)所配製之CTL，並以實施例 1-1-(4)相同之方法擴大培養CTL。此時，設定分別添加與實施例 4-1-(1)中之CTL誘導時所添加之小鼠IgG1或抗人類HGF抗體相同之抗體，使最終濃度達2 $\mu\text{g/ml}$ 之群組，及自誘導時起完全未添加抗體之群組。期間完全不添加藉由胜肽之刺激，培養開始第1日添加最終濃度為120 U/ml之IL-2，進一步培養開始後第4日以後，每2-3日去除一半上清液後，於各瓶中添加5 ml之含60 U/ml IL-2及2 $\mu\text{g/ml}$ 小鼠IgG1或抗人類HGF抗體之5HRPMI。但未添加抗體之群組，在更換培養基時亦不進行抗體之添加。擴大培養開始後，於第14

日以與實施例1-1-(3)相同之方法測定CTL之特異性細胞傷害活性，其結果如表5所示。

表5

樣品	樣品添加*		擴大	胜肽 添加 ¶	細胞傷害活性(%)			
	CTL	擴大	增殖率		E/T比			
	誘導時	培養時	(倍)		1	3	10	30
對照組	-	-	340	-	0.6	0.6	1.5	19.4
	-	-	340	+	0	3.2	6.8	21.3
小鼠IgG1	+	+	207	-	0	0	0.1	3.9
	+	+	207	+	0	4.1	9.3	30.3
抗HGF抗體	+	+	435	-	1.2	3.1	0	4.0
	+	+	435	+	7.2	19.5	39.6	74.5

*：+；添加樣品，-；未添加樣品

¶：+；添加胜肽，-；未添加胜肽

其結果為：在CTL誘導時及擴大培養時添加抗人類HGF抗體之群組中，其CTL即使在14日的擴大培養中，仍特異性維持其高細胞傷害性活性。另一方面，於CTL誘導時及擴大培養時皆未添加此等抗體之群組中，其活性皆明顯下降。亦即，藉由在CTL誘導時及擴大培養時添加抗人類HGF抗體，可在長期特異性保持細胞傷害活性之狀態下，擴大培養CTL。

實施例4-2

(1) 抗流感病毒記憶CTL之誘導

使用以實施例1-1-(1)之方法分離、保存之PBMC，並以與實施例1-1-(2)相同之方法進行抗流感病毒記憶CTL之誘

導。此時，添加抗人類HGF抗體(小鼠之單株抗體，Genzyme/Techne公司製)以使其最終濃度達2 $\mu\text{g/ml}$ ，另外，設定未添加抗體之群組。

如此所配製之誘導開始後第14日CTL之細胞傷害活性以實施例1-1-(3)之相同方法評估。其結果為：誘導不久後，特異性細胞傷害活性雖被誘導，但誘導時抗體添加之有無所引起之細胞傷害活性幾無差別。

(2) CTL之擴大培養

使用以實施例4-2-(1)所配製之CTL，並以實施例1-1-(4)相同之方法擴大培養CTL。此時，完全不添加與實施例4-2-(1)中之CTL誘導時所添加之抗人類HGF抗體。期間完全不添加藉由胜肽之刺激，培養開始第1日添加最終濃度為120 U/ml之IL-2，進一步培養開始後第4日以後，每2-3日去除一半上清液後，於各瓶中添加5 ml之含60 U/ml IL-2之5HRPMI。擴大培養開始後，於第14日以與實施例1-1-(3)相同之方法測定CTL之特異性細胞傷害活性，其結果如表6所示。

表 6

樣品	樣品添加*		擴大 增殖率 (倍)	胜肽 添加 ¶	細胞傷害活性(%)			
	CTL 誘導時	擴大 培養時			E/T比			
					1	3	10	30
對照組	-	-	547	-	7.3	8.4	9.1	12.7
	-	-	547	+	8.1	11.2	21.5	45.9
抗HGF抗體	+	+	540	-	6.8	7.3	8.5	10.2
	+	+	540	+	23.3	40.8	72.4	103.4
	+	-	463	-	7.4	7.9	10.5	14.4
	+	-	463	+	22.2	38.1	70.4	94.5

*：+；添加樣品，-；未添加樣品

¶：+；添加胜肽，-；未添加胜肽

其結果為：在僅於CTL誘導時添加抗人類HGF抗體之群組中，即使在擴大培養時未添加此等抗體，在14日的擴大培養中，仍特異性維持其高細胞傷害性活性。另一方面，於CTL誘導時及擴大培養時皆未添加此等抗體之群組中，其活性皆明顯下降。亦即，即使僅在CTL誘導時添加抗人類HGF抗體，亦可在長期特異性保持細胞傷害活性之狀態下，擴大培養CTL。

實施例5 使用抗人類IGF-1抗體之保持特異性細胞傷害活性之CTL的擴大培養

實施例5-1

(1) 抗流感病毒記憶CTL之誘導

使用以實施例 1-1-(1)之方法分離、保存之 PBMC，並以與實施例 1-1-(2)相同之方法進行抗流感病毒記憶 CTL 之誘導。此時，添加經純化之山羊 IgG (CHEMICON international 公司製)或抗人類 IGF-1 抗體(山羊之多株抗體，Genzyme/Techne 公司製)以使其最終濃度達 2 $\mu\text{g/ml}$ ，另外，設定未添加抗體之群組。

如此所配製之誘導開始後第 14 日 CTL 之細胞傷害活性以實施例 1-1-(3)之相同方法評估。其結果為：誘導不久後，特異性細胞傷害活性雖被誘導，但誘導時抗體添加之有無所引起之細胞傷害活性幾無差別。

(2) CTL 之擴大培養

使用以實施例 5-1-(1)所配製之 CTL，並以實施例 1-1-(4)相同之方法擴大培養 CTL。此時，設定分別添加與實施例 5-1-(1)中之 CTL 誘導時所添加之山羊 IgG 或抗人類 IGF-1 抗體，使最終濃度達 2 $\mu\text{g/ml}$ 之群組，及自誘導時起完全未添加抗體之群組。期間完全不添加藉由胜肽之刺激，培養開始第 1 日添加最終濃度為 120 U/ml 之 IL-2，進一步培養開始後第 4 日以後，每 2-3 日去除一半上清液後，於各瓶中添加 5 ml 之含 60 U/ml IL-2 及 2 $\mu\text{g/ml}$ 山羊 IgG 或抗人類 IGF-1 抗體之 5HRPMI。但未添加抗體之群組，在更換培養基時亦不進行抗體之添加。擴大培養開始後，於第 14 日以與實施例 1-1-(3)相同之方法測定 CTL 之特異性細胞傷害活性，其結果如表 7 所示。

表 7

樣品	樣品添加*		擴大 增殖率 (倍)	胜肽 添加 ¶	細胞傷害活性(%)			
	CTL 誘導時	擴大 培養時			E/T比			
					1	3	10	30
對照組	-	-	340	-	0.8	0.6	1.5	19.4
	-	-	340	+	0	3.2	6.8	21.3
山羊IgG	+	+	463	-	0	0	1.6	5.6
	+	+	463	+	0.7	2.1	6.6	18.9
抗IGF-1抗體	+	+	368	-	0	0	0.4	3.4
	+	+	368	+	13.0	40.2	80.4	90.9

*：+；添加樣品，-；未添加樣品

¶：+；添加胜肽，-；未添加胜肽

其結果為：在CTL誘導時及擴大培養時添加抗人類IGF-1抗體之群組中，其CTL即使在14日的擴大培養中，仍特異性維持其高細胞傷害性活性。另一方面，於CTL誘導時及擴大培養時皆未添加此等抗體之群組中，其活性皆明顯下降。亦即，藉由在CTL誘導時及擴大培養時添加抗人類IGF-1抗體，可在長期特異性保持細胞傷害活性之狀態下，擴大培養CTL。

實施例 5-2

(1) 抗流感病毒記憶CTL之誘導

使用以實施例 1-1-(1)之方法分離、保存之PBMC，並以與實施例 1-1-(2)相同之方法進行抗流感病毒記憶CTL之誘

導。此時，添加抗人類 IGF-1 抗體(山羊之多株抗體，Genzyme/Techne 公司製)以使其最終濃度達 2 $\mu\text{g/ml}$ ，另外，設定未添加抗體之群組。

如此所配製之誘導開始後第 14 日 CTL 之細胞傷害活性以實施例 1-1-(3)之相同方法評估。其結果為：誘導不久後，特異性細胞傷害活性雖被誘導，但誘導時抗體添加之有無所引起之細胞傷害活性幾無差別。

(2) CTL 之擴大培養

使用以實施例 5-2-(1)所配製之 CTL，並以實施例 1-1-(4)相同之方法擴大培養 CTL。此時，完全不添加與實施例 5-2-(1)中之 CTL 誘導時所添加之抗人類 HGF 抗體。期間完全不添加藉由胜肽之刺激，培養開始第 1 日添加最終濃度為 120 U/ml 之 IL-2，進一步培養開始後第 4 日以後，每 2-3 日去除一半上清液後，於各瓶中添加 5 ml 之含 60 U/ml IL-2 之 5HRPMI。擴大培養開始後，於第 14 日以與實施例 1-1-(3)相同之方法測定 CTL 之特異性細胞傷害活性，其結果如表 8 所示。

表 8

樣品	樣品添加*		擴大 增殖率 (倍)	胜肽 添加¶	細胞傷害活性(%)		
	CTL 誘導時	擴大 培養時			E/T比		
					1	3	30
對照組	-	-	547	-	7.3	8.4	9.1
	-	-	547	+	8.1	11.2	21.5
抗IGF-1抗體	+	+	637	-	3.8	3.2	7.5
	+	+	637	+	20.8	47.4	69.0
	+	-	553	-	9.4	11.6	15.0
	+	-	553	+	49.6	82.6	111.0

*：+；添加樣品，-；未添加樣品

¶：+；添加胜肽，-；未添加胜肽

其結果為：於CTL誘導時添加抗人類IGF-1抗體之群組中，即使在擴大培養時未添加此等抗體，在14日的擴大培養中，仍特異性維持其高細胞傷害性活性。另一方面，於CTL誘導時及擴大培養時皆未添加此等抗體之群組中，其活性皆明顯下降。亦即，即使僅在CTL誘導時添加抗人類IGF-1抗體，亦可在長期特異性保持細胞傷害活性之狀態下，擴大培養CTL。

實施例6 使用抗人類IGF-2抗體之保持特異性細胞傷害活性之CTL的擴大培養

(1) 抗流感病毒記憶CTL之誘導

使用以實施例1-1-(1)之方法分離、保存之PBMC，並以

與實施例 1-1-(2)相同之方法進行抗流感病毒記憶 CTL 之誘導。此時，添加經純化之小鼠 IgG1 (Genzyme/Techne 公司製)或抗人類 IGF-2 抗體(小鼠之單株抗體，Genzyme/Techne 公司製)以使其最終濃度達 2 $\mu\text{g/ml}$ ，另外，設定未添加抗體之群組。

如此所配製之誘導開始後第 14 日 CTL 之細胞傷害活性以實施例 1-1-(3)之相同方法評估。其結果為：誘導不久後，特異性細胞傷害活性雖被誘導，但誘導時抗體添加之有無所引起之細胞傷害活性幾無差別。

(2) CTL 之擴大培養

使用以實施例 6-(1)所配製之 CTL，並以實施例 1-1-(4)相同之方法擴大培養 CTL。此時，設定分別添加與實施例 6-(1)中之 CTL 誘導時所添加之小鼠 IgG1 或抗人類 IGF-2 抗體相同之抗體，使最終濃度達 2 $\mu\text{g/ml}$ 之群組，及自誘導時起完全未添加抗體之群組。期間完全不添加藉由胜肽之刺激，培養開始第 1 日添加最終濃度為 120 U/ml 之 IL-2，進一步培養開始後第 4 日以後，每 2-3 日去除一半上清液後，於各瓶中添加 5 ml 之含 60 U/ml IL-2 及 2 $\mu\text{g/ml}$ 小鼠 IgG1 或抗人類 IGF-2 抗體之 5HRPMI。但未添加抗體之群組，在更換培養基時亦不進行抗體之添加。擴大培養開始後，於第 14 日以與實施例 1-1-(3)相同之方法測定 CTL 之特異性細胞傷害活性，其結果如表 9 所示。

表 9

樣品	樣品添加*		擴大 增殖率 (倍)	胜肽 添加 ¶	細胞傷害活性(%)			
	CTL 誘導時	擴大 培養時			E/T比			
					1	3	10	30
對照組	-	-	237	-	2.1	3.9	5.6	9.7
	-	-	237	+	0	4.1	6.9	12.4
小鼠IgG1	+	+	370	-	0	0	0	0
	+	+	370	+	0	0	0	3.1
抗IgG-2抗體	+	+	225	-	3.9	5.0	5.8	10.2
	+	+	225	+	7.1	16.5	37.7	71.5

*：+；添加樣品，-；未添加樣品

¶：+；添加胜肽，-；未添加胜肽

其結果為：在CTL誘導時及擴大培養時添加抗人類IGF-2抗體之群組中，其CTL即使在14日的擴大培養中，仍特異性維持其高細胞傷害性活性。另一方面，於CTL誘導時及擴大培養時皆未添加此等抗體之群組中，其活性皆明顯下降。亦即，即使僅於CTL誘導時添加抗人類IGF-2抗體，亦可在長期特異性保持細胞傷害活性之狀態下，擴大培養CTL。

實施例7 保持腫瘤關連抗原特異性細胞傷害活性之CTL之擴大培養

實施例7-1

(1) 腫瘤關連抗原(MAGE3)特異性CTL之誘導

使用以與實施例 1-1-(1)記載之方法所分離、保存中之 PBMC，進行腫瘤關連抗原(melanoma-associated antigen 3, MAGE3)特異性 CTL 之誘導。腫瘤關連抗原(MAGE3)特異性 CTL 之誘導係使用改變一部份之 Plebanski M. 等之方法 [(Eur. J. Immunol., 第 25 卷，第 6 號，第 1783-1787 頁 (1995)] 實施之。亦即，將實施例 1-1-(1)所配製之 PBMC 懸浮於 5HRPMI 中，使其成為 $2\sim 4\times 10^7$ cells/ml 後分成一半。一半量作為反應者細胞置於冰上保存，另一半量用作抗原呈現細胞，添加等量含作為抗原胜肽之 80 $\mu\text{g/ml}$ 黑色素瘤(melanoma)抗原 MAGE3 衍生抗原表現胜肽(序列表之序列編號：19 所記載之黑色素瘤抗原 MAGE3 衍生 HLA-A2.1 結合性胜肽)及 6 $\mu\text{g/ml}$ 之 $\beta 2$ 微球蛋白(microglobulin, Scrips 公司製)之 5HRPMI，置於 5% CO_2 濕式培育箱內，37°C 培育 2 小時。接著再以 5HRPMI 清洗，與置於冰上保存之反應者細胞混合後，配製為 2×10^6 cells/ml。添加 IL-7 及 KLH 使其最終濃度分別達 25 ng/ml、5 $\mu\text{g/ml}$ ，以每孔 2 ml 加入 24 孔細胞培養盤(Falcon 公司製)，此時，於培養基中添加玻尿酸(Calbiochem 公司製)使其最終濃度達 10 $\mu\text{g/ml}$ ，另外，亦設定未添加樣品之群組為對照組。培養盤置於 5% CO_2 中以 37°C 培養。培養開始後第 4 日去除一半上清液後，於各孔中添加 1 ml 含 60 U/ml IL-2 與 10 $\mu\text{g/ml}$ 玻尿酸之 5HRPMI (對照組中僅含 IL-2)。第 7 日時以與上述相同方法配製抗原呈現細胞後，以 X 光照射(5500R)，配製為 4×10^6 cells/ml。將經 1 週培養之反應者細胞懸浮於 5HRPMI 中使其成為 $2\times$

10^6 cells/ml，再與已配製之抗原呈現細胞等量混合後，以每孔1 ml加入24孔細胞培養盤，進一步添加最終濃度為25 ng/ml之IL-7進行再刺激。此時，添加玻尿酸使其最終濃度達10 μ g/ml（對照組則不添加）。再刺激後第1日，於各孔中添加1 ml含60 U/ml IL-2與10 μ g/ml 玻尿酸之5HRPMI（對照組中僅含IL-2），第3日時去除一半培養上清液後，分別添加1 ml與去除前相同內容之培養基。以1週1次進行相同之再刺激，總共實施4次以誘導CTL。

(2) CTL細胞傷害活性之測定

實施例7-1-(1)所配製之CTL誘導開始後第35日的CTL之特異性細胞傷害活性，以與實施例1-1-(3)相同之方法測定之。然而，此時使用在與抗原表現胜肽共培養1夜，或在非抗原表現胜肽存在下所培養之HLA-A2.1保持EBV轉形B細胞（細胞名221A2.1）作為標的細胞。其結果為，誘導不久後，特異性細胞傷害活性雖被誘導，但誘導時玻尿酸添加的添加與否，對於細胞傷害活性並無差別。

(3) CTL之擴大培養

使用實施例7-1-(1)所配製之CTL，以與實施例1-1-(4)同樣之方法，進行CTL之擴大培養。此時，分別設定於培養基中添加與實施例7-1-(1)之CTL誘導之際所添加之玻尿酸使其最終濃度達10 μ g/ml之群組，與自誘導開始完全未添加玻尿酸之群組。期間完全不添加藉由胜肽之刺激，培養開始第1日添加最終濃度為120 U/ml之IL-2，進一步培養開始後第4日以後，每2-3日去除一半上清液後，於各瓶中添

加 5 ml 之含 60 U/ml IL-2 之及 10 μ g/ml 玻尿酸之 5HRPMI。然而，未添加樣品之群組中，即使在更換培養基之際，亦不進行樣品之添加。擴大培養開始後，第 14 日以與實施例 1-1-(3) 相同之方法測定 CTL 之特異性細胞傷害活性，其結果如表 10 所示。

表 10

樣品	樣品添加*		擴大增殖率 (倍)	胜肽 添加¶	細胞傷害活性(%)	
	CTL	擴大			E/T比	
	誘導時	培養時			2	6
對照組	-	-	237	-	0	0
	-	-	237	+	29.8	56.0
玻尿酸	+	+	217	-	3.6	0
	+	+	217	+	50.3	67.7

*: + ; 添加樣品，- ; 未添加樣品

¶: + ; 添加胜肽，- ; 未添加胜肽

其結果為，CTL 誘導時及擴大培養時添加玻尿酸之群組中，CTL 在 14 日的擴大培養後，亦保持特異性高細胞傷害活性。另一方面，無論是 CTL 誘導時或擴大培養時皆未添加樣品之群組中，其活性則明顯下降。亦即，即使在腫瘤關連抗原 (MAGE3) CTL 擴大培養時，藉由 CTL 誘導時及擴大培養時添加玻尿酸，可在特異性長期保持高細胞傷害活性之狀態下進行 CTL 之擴大培養。

實施例 7-2

(1) 腫瘤關連抗原(MART1)特異性CTL之誘導

使用以與實施例 1-1-(1)記載之方法所分離、保存中之 PBMC，以與實施例 7-1-(1)相同之方法進行腫瘤關連抗原 (Melanoma antigen recognized by T cell, MART1)特異性 CTL之誘導。使用黑色素瘤抗原 MART1 衍生抗原表現胜肽 (序列表之序列編號：20 所記載之黑色素瘤抗原 MART1 衍生 HLA-A2.1 結合性胜肽)作為抗原胜肽。此時，添加玻尿酸 (Calbiochem 公司製)使其最終濃度達 10 µg/ml，另外，亦設定未添加樣品之群組為對照組。

如此所配製之誘導開始後第 35 日的 CTL 之細胞傷害活性以實施例 1-1-(3)之相同方法評估。然而，此時使用在非抗原表現胜肽存在下所培養之 HLA-A2.1 保持 EBV 轉形 B 細胞 (細胞名 221A2.1)、在 2 夜 100 U/ml IFN- γ 存在下所培養之 HLA-A2.1 保持癌細胞株 (細胞名 624 mel；HLA-A2.1 非保持 MART1 表現細胞)、或 HLA-A2.1 非保持癌細胞株 (細胞名 888 mel；HLA-A2.1 非保持 MART1 表現細胞)作為標的細胞。

其結果為，誘導不久後，特異性細胞傷害活性雖被誘導，但誘導時樣品添加之有無，對於細胞傷害活性並無差別。

(2) CTL 之擴大培養

使用實施例 7-2-(1)所配製之 CTL，以與實施例 1-1-(4)同樣之方法，進行 CTL 之擴大培養。此時，分別設定於培養基中添加與實施例 7-2-(1)之 CTL 誘導之際所添加之玻尿酸

使其達10 $\mu\text{g/ml}$ 以作為樣品之群組，與自誘導開始完全未添加樣品之群組。期間完全不添加藉由胜肽之刺激，培養開始第1日添加最終濃度為120 U/ml之IL-2，進一步培養開始後第4日以後，每2-3日去除一半上清液後，於各瓶中添加5 ml之含60 U/ml IL-2之及10 $\mu\text{g/ml}$ 玻尿酸之5HRPMI。然而，未添加樣品之群組中，即使在更換培養基之際，亦不進行樣品之添加。擴大培養開始後，第14日以與實施例1-1-(3)相同之方法測定CTL之特異性細胞傷害活性，其結果如表11所示。

表 11

樣品	樣品添加*		擴大 增殖率 (倍)	胜肽 添加¶	標的 細胞	細胞傷害活性(%)		
	CTL 誘導時	擴大 培養時				E/T比		
						2	7	20
對照組	-	-	287	-	221A2.1	0	3.8	4.1
	-	-	287	+	221A2.1	8.1	27.5	43.5
	-	-	287	-	888 mel	32.5	44.8	43.7
	-	-	287	-	624 mel	27.4	55.8	81.6
						E/T比		
						2	6	17
玻尿酸	+	+	217	-	221A2.1	0	0	0
	+	+	217	+	221A2.1	9.1	52.8	74.4
	+	+	217	-	888 mel	0	0	0
	+	+	217	-	624 mel	29.6	73.8	90.6
	+	+	217	-	624 mel	29.6	73.8	90.6

*：+；添加樣品，-；未添加樣品

†：+；添加胜肽，-；未添加胜肽

其結果為，CTL誘導時及擴大培養時添加玻尿酸之群組中，CTL在14日的擴大培養後，亦保持特異性高細胞傷害活性。另一方面，無論是CTL誘導時或擴大培養時皆未添加樣品之群組中，其活性則明顯下降。此外，關於腫瘤細胞株相對之特異性細胞傷害活性，CTL誘導時及擴大培養時添加玻尿酸之群組中，CTL即使在14日的擴大培養後，亦保持特異性高細胞傷害活性。亦即，即使在腫瘤關連抗原(MART1) CTL擴大培養時，藉由CTL誘導時及擴大培養時添加玻尿酸，可在特異性的長期保持高細胞傷害活性之狀態下進行CTL之擴大培養。

實施例8 與REM法之比較及與REM法之組合

(1) 抗流感病毒記憶CTL之誘導

使用以與實施例1-1-(1)記載之方法所分離、保存中之PBMC，並以與實施例1-1-(2)相同之方法進行抗流感病毒記憶CTL之誘導。此時，於培養基中添加玻尿酸使其最終濃度達10 $\mu\text{g/ml}$ 作為樣品，另外，亦設定為未添加樣品之群組。

如此所配製之誘導開始後第14日CTL之細胞傷害活性以實施例1-1-(3)之相同方法評估。使用5 $\mu\text{g/ml}$ 之實施例1-1-(2)所記載之流感病毒蛋白質衍生抗原決定胜肽作為抗原胜肽。

(2) 藉由保持特異性活性之抗CD3抗體之擴大培養

實施例8-(1)所配製之CTL以5HRPMI清洗後，配製為 5×10^4 cells/ml。另一方面，以與實施例1-1-(1)相同方法採取

之 HLA-A24 及 A2.1 非保持 allogenic PBMC 以 X 光照射 (3300R)，再以培養基清洗後配製成 5×10^6 cells/ml。將此等 CTL (3.0×10^4 cells) 與 allogenic PBMC ($4 \sim 10 \times 10^6$ cells) 懸浮於 10 ml 之 5HRPMI 中，再進一步加入最終濃度 50 ng/ml 之抗 CD3 抗體 (Yansen 合作公司製) 後放入 12.5 cm^2 之燒瓶 (Falcon 公司製)，置入 37°C 之濕式 CO_2 培育箱中培養 14 日。此時，分別設定於培養基中添加玻尿酸使其最終濃度達 $10 \mu\text{g/ml}$ 以作為樣品之群組，與未添加之群組。期間完全不添加藉由胜肽之刺激，培養開始第 1 日添加最終濃度為 120 U/ml 之 IL-2，進一步培養開始後第 4 日以後，每 2-3 日去除一半上清液後，於各瓶中添加 5 ml 之含 60 U/ml IL-2 之 5HRPMI。此時，於樣品添加群組之培養基中添加玻尿酸使其最終濃度達 $10 \mu\text{g/ml}$ 。擴大培養開始後，第 14 日以與實施例 1-1-(3) 相同之方法測定 CTL 之特異性細胞傷害活性，其結果如表 12 所示。

另一方面，利用 REM 法之擴大培養則如以下般實施之。HLA-A24 及 A2.1 非保持 allogenic PBMC 以 X 光照射 (3300R)，再以培養基清洗後配製成 5×10^6 cells/ml。此外，將 Epstein-Barr Virus 感染人類 B 細胞株 (EBV-B 細胞) 以 X 光照射 (8000R)，再以培養基清洗後配製成 1×10^6 cells/ml。將實施例 8-1-(1) 所配製之 CTL (3.0×10^4 cells) 與 allogenic PBMC ($4 \sim 10 \times 10^6$ cells)、EBV-B 細胞 (2.5×10^6 cells) 懸浮於 10 ml 之 5HRPMI 中，再進一步加入最終濃度 50 ng/ml 之抗 CD3 抗體 (Yansen 合作公司製) 後，放入 12.5 cm^2 之燒瓶

(Falcon公司製)，置入37℃之濕式CO₂培育箱中培養14日。此時，分別設定於培養基中添加玻尿酸使其最終濃度達10 µg/ml以作為樣品之群組，與未添加之群組。期間完全不添加藉由胜肽之刺激，培養開始第1日添加最終濃度為120 U/ml之IL-2，進一步培養開始後第4日以後，每2-3日去除一半上清液後，於各瓶中添加5 ml之含60 U/ml IL-2之5HRPMI。此時，於樣品添加玻尿酸使其最終濃度達10 µg/ml。擴大培養開始後，第14日以與實施例1-1-(3)相同之方法測定CTL之特異性細胞傷害活性，其結果如表12所示。

表 12

樣品	樣品添加*		EBV-B 細胞†	擴大 增殖率 (倍)	胜肽 添加‡	細胞傷害活性(%)
	CTL	擴大				E/T比
	誘導時	培養時				10
對照組	-	-	-	392	-	6.2
	-	-	-	392	+	10.6
玻尿酸	+	+	-	335	-	2.3
	+	+	-	335	+	60.0
REM法	-	-	+	427	-	11.5
	-	-	+	427	+	52.8
REM法	+	+	+	587	-	8.1
+玻尿酸	+	+	+	587	+	95.5

*：+；添加樣品，-；未添加樣品

†：+；添加EBV-B細胞，-；未添加EBV-B細胞

‡：+；添加胜肽，-；未添加胜肽

其結果為：在未添加玻尿酸下誘導之CTL（未添加CTL活性維持物質），以REM法擴大培養情況下可維持其高細胞傷害活性。然而，未使用EBV-B細胞之方法所進行之擴大培養中，其細胞傷害活性明顯下降。

另一方面，只要於CTL誘導時與擴大培養時皆事先添加玻尿酸，即使未添加EBV-B細胞，其14日之大量培養後亦可維持其非常高之CTL細胞傷害活性。再者，根據本發明之擴大培養後之抗原特異性細胞傷害活性與REM法相較下則為較高。

另外，以REM法擴大培養之情況下，於擴大培養時先進行，只要於CTL誘導開始事先添加具本發明方法之CTL活性維持效果的物質之一的玻尿酸，再藉由以習知技術誘導之CTL細胞，單純利用REM法擴大培養即可維持其高細胞傷害活性。

亦即，根據本發明CTL之擴大培養方法中，利用REM法所必須之EBV-B細胞為非必要，可迴避使用EBV-B細胞之危險性。再者，可維持較REM法高之CTL活性，由此可知，本發明之CTL細胞之擴大方法係較REM法更安全之優異方法。

再者，由於只要將玻尿酸導入REM法即可進一步維持高活性，故玻尿酸係可應用於所謂CTL之擴大培養方法。亦即，藉由於各種CTL擴大培養方法中使用本發明所使用之物質，可在特異性的長期維持高細胞傷害活性之狀態下擴大培養CTL。

實施例9 纖維黏連蛋白片段之配製

(1) 纖維黏連蛋白片段之配製

纖維黏連蛋白衍生之片段H-271、H-296、CH-271、CH-296係可藉由第5,198,423號美國專利公報所記載之方法配製。

纖維黏連蛋白衍生之片段H-274係可藉由第5,102,988號美國專利公報所記載之方法配製。

纖維黏連蛋白衍生之片段C-CS1係可藉由第3104178號日本專利公報所記載之方法配製。

纖維黏連蛋白衍生之片段CHV-89、CHV-179係可藉由第2729712號日本專利公報所記載之方法配製。

此外，纖維黏連蛋白衍生之片段CHV-90係可藉由上述公報所記載之方法配製。亦即，藉由該公報所載之操作建構質體pCHV90後，培養保存有該質體之轉形體，自該培養物配製CHV-90。

纖維黏連蛋白衍生之片段CHV-181係可藉由國際公開公報第97/18318號所記載之方法建構含有編碼CHV-181之DNA的質體(pCHV181)後，培養導入該質體之大腸桿菌(*Escherichia coli* HB101/pCHV181)，自該培養物以與上述CHV-179相同之方法配製。

(2) CHV-92之配製

有關表現上述胜肽CHV-181用之質體pCHV181係建構質體CHV92，質體CHV92係編碼一段缺失區域，該缺失區域係缺失編碼CHV-181之區域中的III-13區域，缺失作係根

據第2729712號日本專利公報所記載，自質體pCHV179缺失編碼III-14之區域的操作。

培養以上述質體pCHV92轉形之大腸桿菌HB101 (*Escherichia coli* HB 101/pCHV92)，根據第2729712號日本專利公報所記載之CHV-89多肽的純化方法，自該培養物中進行純化操作，可得經純化之CHV-92標準品。

(3) H-275-Cys之配製

使多肽H-275-Cys表現用之質體係根據以下操作建構之。亦即，以質體pCH102為模板，使用以序列表之序列編號:14之鹼基序列表示之引子12S，與以序列表之序列編號:15之鹼基序列表示之引子14A進行PCR，可得約0.8 kb之編碼纖維黏連蛋白之肝素結合多肽的DNA片段，將所得之DNA片段以NcoI、BamHI（皆為寶酒造公司製）消化（digestion）後，將其與以NcoI、BamHI所消化之pTV118N（寶酒造公司製）進行連結反應（ligation）以建構質體pRH1。

將質體載體pINIII-ompA₁ [Ghrayeb J.等，EMBO J., 第3卷，第10號，第2437~2442頁(1984)]以BamHI與HincII（寶酒造公司製）消化，回收含有核糖蛋白停止轉錄子（riboprotein terminator）區域之約0.9 kb的DNA片段，將其與以BamHI與HincII消化之上述質體pRH1混合以進行連結反應，可得順序包含lac 啟動子（lac promoter）、編碼肝素結合多肽的DNA片段及核糖蛋白終端子之質體pRH1-T。

以此質體pRH1-T為模板，使用以序列表之序列編號:16之鹼基序列表示之引子Cys-A，與以序列表之序列編號:17

之鹼基序列表示之引子Cys-S進行PCR反應後，將所回收之增幅DNA片段以NotI(寶酒造公司製)消化之，在使該DNA片段進行自體連結反應(self ligation)。以SpeI及ScaI(寶酒造公司製)消化所得之環狀DNA，可得2.3 kb之DNA片段，將該片段與以SpeI及ScaI(寶酒造公司製)消化質體pRH1-T所得之2.5 kb DNA片段混合以進行連結反應，可得質體pRH-Cys。該質體係編碼於上述之H-271的N末端側附加Met-Ala-Ala-Ser四個胺基酸，且於C末端側附加Cys之多肽(H-275-Cys)者。

多肽H-275-Cys係以下列方法配製。將以上述質體pRH-Cys轉形之大腸桿菌(*Escherichia coli* HB101/pRH-Cys) HB101於120 ml之LB培養基中，37℃培養一夜。將自培養液所回收之菌體懸浮於40 ml之碎裂用緩衝溶液(50 mM Tris-HCl、1 mM EDTA、150 mM NaCl、1 mM DTT、1 mM PMSF，pH 7.5)中，進行超音波處理以碎裂菌體。將進行離心所得之上清液施加於以純化用緩衝溶液(50 mM Tris-HCl，pH 7.5)平衡之-High Trap-Heparin管柱(Pharmacia公司製)，以相同緩衝液清洗管柱內之未吸附部分，以具有0~1M NaCl濃度梯度之純化用緩衝溶液進行溶離，以SDS-PAGE分析溶離液，收集相當於H-275-Cys之分子量部分，可得已純化之H-275-Cys標準品。

實施例10 使用纖維黏連蛋白片段(FNfr)之保持特異性細胞傷害活性CTL之擴大培養

(1) 抗流感病毒記憶CTL之誘導

使用以實施例1-1-(1)之方法分離、保存之PBMC，並以與實施例1-1-(2)相同之方法進行抗流感病毒記憶CTL之誘導。此時，添加實施例9所載之各纖維黏連蛋白片段(以下稱為FNfr)使其最終濃度達10 $\mu\text{g/ml}$ ，另外，設定未添加FNfr之群組。

如此所配製之誘導開始後第14日CTL之細胞傷害活性以實施例1-1-(3)之相同方法評估。其結果為：誘導不久後，特異性細胞傷害活性雖被誘導，但誘導時FNfr添加之有無所引起之細胞傷害活性幾無差別。

(2) CTL之擴大培養

使用以實施例10-(1)所配製之CTL，並以實施例1-1-(4)相同之方法擴大培養CTL。此時，添加與CTL誘導時所添加者相同之FNfr，使最終濃度達10 $\mu\text{g/ml}$ ，此外，未添加FNfr而進行誘導之對照組則不添加FNfr。期間完全不添加藉由胜肽之刺激，培養開始第1日添加最終濃度為120 U/ml之IL-2，進一步培養開始後第4日以後，每2-3日去除一半上清液後，於各瓶中添加5 ml之含60 U/ml IL-2之5HRPMI，或含10% Hyclone FBS、0.1 mM 非必須胺基酸、1 mM 丙酮酸鈉、2 mM L-穀氨酸(皆Bio Whittaker公司製)、10 mM HEPES (Nakaraitesuku公司製)、1% 鏈黴素-盤尼西林(Gibco BRL公司製)之RPMI1640培養基(Bio Whittaker公司製)(以下略稱為10HyclineRPMI)。此時，於FNfr添加群之培養基中添加同濃度之FNfr。擴大培養開始後，於第14日以與實施例1-1-(3)相同之方法測定CTL之特

異性細胞傷害活性，僅維持何者之擴大培養前之特異性細胞傷害性係以「特異性細胞傷害活性維持(%)」計算。「特異性細胞傷害活性維持(%)」係以下列式2計算。

式2:特異性細胞傷害活性維持(%)={擴大培養後之特異性細胞傷害活性(%) / 擴大培養前之特異性細胞傷害活性(%)}
×100

其結果如表13所示。

表 13

培養基	纖維黏連 蛋白片段	擴大增殖率 (倍)	細胞傷害活性維持 (%) E/T比=3
5HRPMI	對照組(未添加FNfr)	417	17.3
	CH-271	397	53.5
	H-296	413	49.3
	C-CS1	393	49.3
	CHV-92	370	66.2
10HycloneRPMI	對照組(未添加FNfr)	130	48.1
	CH-271	132	250.8
	H-296	75	162.3
	H-271	52	72.2
	C-CS1	130	100.2
	CHV-92	35	157.8
培養基	纖維黏連 蛋白片段	擴大增殖率 (倍)	細胞傷害活性維持 (%) E/T比=10
10HycloneRPMI	對照組(未添加FNfr)	42	46.3
	CHV-89	35	69.0
	CHV-90	36	75.6

如表13所示：在CTL誘導時及擴大培養時添加各種纖維

黏連蛋白片段之群組的CTL，與未添加纖維黏連蛋白之對照組相較之下，即使在14日的擴大培養後，仍特異性維持其高細胞傷害性活性。亦即，藉由在纖維黏連蛋白片段之共同存在下進行誘導、擴大培養，可在長期特異性保持細胞傷害活性之狀態下，擴大培養CTL。

實施例11 於纖維黏連蛋白存在下之CTL的誘導、擴大培養

(1) 抗流感病毒記憶CTL之誘導

使用以實施例1-1-(1)之方法分離、保存之PBMC，並以與實施例1-1-(2)相同之方法進行抗流感病毒記憶CTL之誘導。此時，添加FNfr使得纖維黏連蛋白(Calbiochem公司製)最終濃度達10 µg/ml (對照組中則不添加)。誘導開始後第14日CTL之細胞傷害活性以實施例1-1-(3)之相同方法評估之結果為：誘導時FNfr添加之有無所引起之細胞傷害活性幾無差別。

(2) CTL之擴大培養

將實施例11-(1)所配製之CTL，以實施例10-(2)相同之方法擴大培養。此時，於誘導時添加纖維黏連蛋白中添加工纖維黏連蛋白(Calbiochem公司製)，使最終濃度達10 µg/ml (對照組則不添加)以與實施例1-1-(3)相同之方法測定所得之CTL之特異性細胞傷害活性，僅維持何者之擴大培養前之特異性細胞傷害性係以「特異性細胞傷害活性維持(%)」計算。「特異性細胞傷害活性維持(%)」係上述式2計算。

其結果如表14所示。

表 14

	擴大增殖率 (倍)	細胞傷害活性維持 (%) E/T比=3
對照組(未添加纖維黏連蛋白)	130	48.1
纖維黏連蛋白	157	148.9

如表14所示：在纖維黏連蛋白之存在下進行CTL誘導時及擴大培養之群組，可保持高細胞傷害活性。另一方面，在CTL誘導時及擴大培養時皆未添加纖維黏連蛋白之對照組細胞傷害性活性明顯下降。亦即，藉由在CTL誘導時及擴大培養時添加纖維黏連蛋白，可在長期特異性保持細胞傷害活性之狀態下，擴大培養CTL。

實施例12 在已固定之纖維黏連蛋白(FN)片段存在下之CTL擴大培養

(1) FN片段之固定

將纖維黏連蛋白片段固定於以下實驗所使用之培養器材(容器)上。亦即，將1~2 ml含各種纖維黏連蛋白片段(最終濃度10 $\mu\text{g/ml}$)之PBS分別添加至24孔培養盤、12.5 cm^2 燒瓶中，於室溫下培養2小時後，直到使用為止保存於4℃。此外，使用前以PBS清洗上述培養盤、燒瓶2次。

(2) 抗流感病毒記憶CTL之誘導

使用以實施例1-1-(1)之方法分離、保存之PBMC，並以與實施例1-1-(2)相同之方法進行抗流感病毒記憶CTL之誘

導。此時，使用已固定FNfr之培養盤作為培養器材(對照組則使用未做固定處理之培養盤)。誘導後之CTL之細胞傷害活性以實施例1-1-(3)之相同方法評估之結果為：誘導時所使用之培養盤上是否固定有FNfr引起之細胞傷害活性幾無差別。

(3) CTL之擴大培養

將實施例12-(2)所配製之CTL，以實施例10-(2)相同之方法擴大培養。此時，使用已固定各種FNfr之燒瓶作為培養器材(對照組則使用未作固定處理之燒瓶)。此外，培養基係使用10Hyclone/RPMI。

如此擴大培養之CTL之細胞傷害活性與擴大培養前相較，僅維持何者係以「特異性細胞傷害活性維持(%)」計算。「特異性細胞傷害活性維持(%)」係上述式2計算。

其結果如表15所示。

表 15

纖維黏連蛋白片段	擴大增殖率	細胞傷害活性維持(%)
	(倍)	E/T比=3
對照組(FNfr未固定)	130	48.1
CH-271	128	95.4
H-296	27	95.0
H-271	40	133.9
C-CS1	130	73.8
H-275-Cys	87	137.7
CHV-92	122	92.7

如表15所示：在CTL誘導時及擴大培養時使用固定有纖

維黏連蛋白片段之培養器材(培養盤、燒瓶)之群組的CTL，即使在擴大培養後亦可保持高細胞傷害活性。另一方面，再CTL誘導時及擴大培養時皆未使用固定有纖維黏連蛋白之器材的對照組，其細胞傷害性活性明顯下降。亦即，藉由使用經固定之纖維黏連蛋白片段，可與溶解於培養基之片段同樣可在長期特異性保持細胞傷害活性之狀態下，擴大培養CTL。

實施例13 保持腫瘤關連抗原特異性細胞傷害活性之CTL之擴大培養

(1) 腫瘤關連抗原(MART1)特異性CTL之誘導

使用以與實施例1-1-(1)記載之方法所分離、保存中之PBMC，以與實施例7-2-(1)相同之方法進行腫瘤關連抗原(Melanoma antigen recognized by T cell, MART1)特異性CTL之誘導。此時，添加抗HGF抗體使其最終濃度達2 $\mu\text{g/ml}$ ，另外，亦設定未添加樣品之群組為對照組。

如此所配製之誘導開始後第35日的CTL之細胞傷害活性以實施例1-1-(3)之相同方法評估。然而，此時使用與抗原表現胜肽共同培養一夜或在非抗原表現胜肽存在下所培養之HLA-A2.1保持EBV轉形B細胞(細胞名221A2.1)、在2夜100 U/ml IFN- γ 存在下所培養之HLA-A2.1保持癌細胞株(細胞名624 mel; HLA-A2.1非保持MART1表現細胞)、或HLA-A2.1非保持癌細胞株(細胞名938 mel; HLA-A2.1非保持MART1表現細胞)作為標的細胞。

其結果為，誘導不久後，特異性細胞傷害活性雖被誘導

，但誘導時樣品添加之有無，對於細胞傷害活性並無差別。

(2) CTL之擴大培養

使用實施例 13-(1)所配製之 CTL，以與實施例 1-1-(4)同樣之方法，進行 CTL 之擴大培養。此時，分別設定於培養基中添加與實施例 13-(1)之 CTL 誘導之際所添加之抗 HGF 抗體使其達 2 $\mu\text{g/ml}$ 以作為樣品之群組，與自誘導開始完全未添加樣品之群組。期間完全不添加藉由胜肽之刺激，培養開始第 1 日添加最終濃度為 120 U/ml 之 IL-2，進一步培養開始後第 4 日以後，每 2-3 日去除一半上清液後，於各瓶中添加 5 ml 之含 60 U/ml IL-2 之及 2 $\mu\text{g/ml}$ 抗 HGF 抗體之 5HRPMI。然而，未添加樣品之群組中，即使在更換培養基之際，亦不進行樣品之添加。擴大培養開始後，第 14 日以與實施例 1-1-(3)相同之方法測定 CTL 之特異性細胞傷害活性，其結果如表 16 所示。

表 16

樣品	樣品添加*		擴大 增殖率 (倍)	胜肽 添加†	標的 細胞	細胞傷害活性(%)
	CTL	擴大				E/T比
	誘導時	培養時				3
對照組	-	-	83	-	221A2.1	0
	-	-	83	+	221A2.1	31.7
	-	-	83	-	938 mel	2.3
	-	-	83	-	624 mel	60.0
						E/T比
						3
抗HGF抗體	+	+	107	-	221A2.1	0
	+	+	107	+	221A2.1	59.1
	+	+	107	-	938 mel	0
	+	+	107	-	624 mel	81.2
	+	+	107	-	624 mel	81.2

*：+；添加樣品，-；未添加樣品

†：+；添加胜肽，-；未添加胜肽

其結果為：CTL誘導時及擴大培養時添加抗HGF抗體之群組中，CTL在14日的擴大培養後，亦保持特異性高細胞傷害活性。另一方面，無論是CTL誘導時或擴大培養時皆未添加此等樣品之群組中，其活性則明顯下降。此外，關於腫瘤細胞株相對之特異性細胞傷害活性，CTL誘導時及擴大培養時添加抗HGF抗體之群組中，CTL即使在14日的擴大培養後，亦保持特異性高細胞傷害活性。亦即，即使在腫瘤關連抗原(MART1) CTL擴大培養時，藉由CTL誘導

時及擴大培養時添加抗HGF抗體，可在特異性的長期保持高細胞傷害活性之狀態下進行CTL之擴大培養。

序列表說明

序列編號1：為取名C-274之人類纖維黏連蛋白衍生胜肽片段之胺基酸序列。

序列編號3：為取名H-271之人類纖維黏連蛋白衍生胜肽片段之胺基酸序列。

序列編號4：為取名H-296之人類纖維黏連蛋白衍生胜肽片段之胺基酸序列。

序列編號5：為取名CH-271之人類纖維黏連蛋白衍生胜肽片段之胺基酸序列。

序列編號6：為取名CH-296之人類纖維黏連蛋白衍生胜肽片段之胺基酸序列。

序列編號7：為取名C-CS1之人類纖維黏連蛋白衍生胜肽片段之胺基酸序列。

序列編號8：為取名CHV-89之人類纖維黏連蛋白衍生胜肽片段之胺基酸序列。

序列編號9：為取名CHV-90之人類纖維黏連蛋白衍生胜肽片段之胺基酸序列。

序列編號10：為取名CHV-92之人類纖維黏連蛋白衍生胜肽片段之胺基酸序列。

序列編號11：為取名CHV-179之人類纖維黏連蛋白衍生胜肽片段之胺基酸序列。

序列編號12：為取名CHV-181之人類纖維黏連蛋白衍生

胜肽片段之胺基酸序列。

序列編號13：為取名H-275-Cys之人類纖維黏連蛋白衍生胜肽片段之胺基酸序列。

序列編號14：為引子12S之鹼基序列。

序列編號15：為引子14A之鹼基序列。

序列編號16：為引子Cys-A之鹼基序列。

序列編號17：為引子Cys-S之鹼基序列。

序列編號18：係為基於流感病毒之基質蛋白衍生之HLA-A2.1結合性胜肽所設計胜肽之胺基酸序列。

序列編號19：係為基於黑色素瘤抗原MAGE3衍生之HLA-A2.1結合性胜肽所設計之胜肽胺基酸序列。

序列編號20：係為基於黑色素瘤抗原MART1衍生之HLA-A2.1結合性胜肽所設計之胜肽胺基酸序列。

產業上之利用可能性

根據本發明，提供一種在高活性保持其抗原特異性細胞傷害活性下誘導、維持及擴大培養CTL之方法。

該方法對於需要大量CTL之過繼性免疫療法之細胞醫療領域極為有用，另外，以該方法所配製之CTL係以安全之方法配製，可作為安全性極高之醫藥使用。

【圖式簡單說明】

圖1係表示玻尿酸對於抑制可溶性CD44與可溶性CD44辨識抗體結合之活性圖。

圖2係表示FL標記識玻尿酸與CTL細胞表面上之CD44結合活性圖。

圖 3 係表示可溶性 CD44 辨識抗體與培養機中之可溶性 CD44 之結合活性圖。

圖 4 係表示 HA Non-Blocking 抗 CD44 抗體與培養機中之可溶性 CD44 之結合活性圖。

圖 5 係表示 HA Non-Blocking 抗 CD44 抗體與 CTL 細胞表面上之 CD44 結合活性圖。

圖 6 係表示添加 HA Non-Blocking 抗 CD44 抗體擴大培養後，於 CTL 之細胞表面上之本抗體結合活性圖。

序列表

<110> 寶生物股份有限公司

<120> 抗原特異性細胞傷害性T細胞之擴大方法

<130> 02-050-TW

<140> 091118623

<141> 2002/08/15

<150> JP 2001-246747

<151> 2001-08-15

<150> JP 2001-376966

<151> 2001-12-11

<150> JP 2002-084428

<151> 2002-03-25

<160> 20

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 人造序列說明：取名為 C-274 之纖維

黏連蛋白片段

<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 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> 2

<211> 25

<212> PRT

<213> 現代人

<400> 2

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> 3

<211> 271

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 人造序列說明：取名為H-271之纖維

黏連蛋白片段

<400> 3

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> 4

<211> 296

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 人造序列說明：取名為 H-296 之纖維

黏連蛋白片段

<400> 4

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> 5

<211> 549

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 人造序列說明：取名為 CH-271 之纖維

黏連蛋白片段

<400> 5

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> 6

<211> 574

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 人造序列說明：取名為CH-296之纖維

黏連蛋白片段

<400> 6

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> 7

<211> 302

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 人造序列說明：取名為 C-CS1 之纖維

黏連蛋白片段

<400> 7

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> 8

<211> 367

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 人造序列說明：取名為 CHV-89之纖維

黏連蛋白片段

<400> 8

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> 9

<211> 368

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 人造序列說明：取名為 CHV-90 之纖維

黏連蛋白片段

<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 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> 10

<211> 370

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 人造序列說明：取名為 CHV-92 之纖維

黏連蛋白片段

<400> 10

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> 11

<211> 457

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 人造序列說明：取名為 CHV-179 之纖維

黏連蛋白片段

<400> 11

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> 12

<211> 472

<212> PRT

<213> 人 造 序 列

<220>

<223> 人 造 序 列 說 明 : 取 名 為 CHV-181之 纖 維

黏 連 蛋 白 片 段

<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
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

465

470

<210> 13

<211> 276

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 人造序列說明：取名為 H-275-Cys

之纖維黏連蛋白片段

<400> 13

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> 14



<211> 38

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<223> 人造序列说明：引子 12S

<400> 14

aaaccaatggc agctagcgct attcctgcac caactgac

38

<210> 15

<211> 36

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<223> 人造序列说明：引子 14A

<400> 15

aaaggaatccc taactagtct ttttccttcc aatcag

36

<210> 16

<211> 40

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<223> 人造序列说明：引子 Cys-A

<400> 16

aaaagcggcc gctagcgcaa gccatgggtct gtttcctgtg

40

<210> 17

<211> 41

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<223> 人造序列说明：引子 Cys-S

<400> 17

aaaagcggcc gcactagtgc atagggatcc ggctgagcaa c

41

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 人造序列說明：基於流感病毒之基質蛋白衍生
之 HLA A2.1結合性胜肽所設計之胜肽

<400> 18

Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu

1

5

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 人造序列說明：基於黑色素瘤抗原 MAGE3衍生
之 HLA A2.1結合性胜肽所設計之胜肽

<400> 19

Phe Leu Trp Gly Pro Arg Ala Leu Val

1

5

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 人造序列說明：基於黑色素瘤抗原 MART1 衍生
之 HLA A2.1 結合性胜肽所設計之胜肽

<400> 20

Ala Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val

1

5

五、中文發明摘要：

本發明係提供一種用於誘導具有抗原特異性之細胞傷害活性之細胞傷害性T細胞的方法，其係包含在選自由以下(A)~(E)所組成之群組中至少一種物質存在下，將對細胞傷害性T細胞具有分化能力之前驅細胞與抗原呈現細胞共同培養之步驟：(A)對於CD44具有結合活性之物質；(B)可控制CD44配位子藉由結合於CD44所發散之訊號的物質；(C)可抑制成長因子結合於成長因子受器之物質；(D)可抑制成長因子藉由結合於成長因子受器所發散之訊號的物質；及(E)纖維黏連蛋白、其片段或彼等之混合物。本發明亦提供一種用於維持具有抗原特異性之細胞傷害活性之細胞傷害性T細胞的方法，其係包含在選自由上述(A)~(E)所組成之群組中至少一種物質存在下，繼續培養細胞傷害性T細胞之步驟，及提供一種擴大培養具有抗原特異性之細胞傷害活性之細胞傷害性T細胞的方法，其係包含在選自由上述(A)~(E)所組成之群組中至少一種物質存在下，培養細胞傷害性T細胞之步驟。

六、英文發明摘要：

A method of inducing cytotoxic T lymphocytes having an antigen-specific cytotoxic activity; a method of maintaining these cells; a method of continuously culturing these cells; and a method of the extended culture for these cells. Namely, cytotoxic T lymphocytes are cultured in the presence of at least one substance selected from the group consisting of: (A) a substance having a CD44-binding activity, (B) a substance capable of controlling a signal generated by the binding of CD44 ligand to CD44, (C) a substance capable of inhibiting the binding of a growth factor to a growth factor receptor, (D) a substance capable of controlling a signal generated by the binding of the growth factor to the growth factor receptor, and (E) fibronectin, its fragment or a mixture of the same.

97年10月3日修(更)正本

十、申請專利範圍：

1. 一種用於誘導細胞傷害性T細胞之方法，該細胞傷害性T細胞具有抗原特異性之細胞傷害活性，該方法之特徵在於包含在對成長因子具有結合活性之抗成長因子抗體存在下，將對細胞傷害性T細胞具有分化能力之前驅細胞與抗原呈現細胞共同培養之步驟，其中成長因子為選自由肝細胞增殖因子、類胰島素增殖因子-1及類胰島素增殖因子-2所組成之群組中之至少一種。
2. 一種用於維持細胞傷害性T細胞之方法，該細胞傷害性T細胞具有抗原特異性之細胞傷害活性，該方法之特徵在於包含在對成長因子具有結合活性之抗成長因子抗體存在下，繼續培養細胞傷害性T細胞之步驟，其中成長因子為選自由肝細胞成長因子、類胰島素增殖因子-1及類胰島素增殖因子-2所組成之群組中之至少一種。
3. 一種用於擴大培養細胞傷害性T細胞之方法，該細胞傷害性T細胞具有抗原特異性之細胞傷害活性，該方法之特徵在於包含在對成長因子具有結合活性之抗成長因子抗體存在下，培養細胞傷害性T細胞之步驟，其中成長因子為選自由肝細胞成長因子、類胰島素增殖因子-1及類胰島素增殖因子-2所組成之群組中之至少一種。
4. 根據申請專利範圍第3項之方法，其中於上述步驟中，進一步在抗CD3抗體存在下，培養細胞傷害性T細胞。
5. 根據申請專利範圍第3或4項之方法，其中於上述步驟中，同時培養細胞傷害性T細胞與餵養細胞。

6. 根據申請專利範圍第5項之方法，其中餵養細胞為非病毒感染細胞。
7. 一種細胞傷害性T細胞之回收方法，其係包含自藉由申請專利範圍第1~6項中任一項之方法所得之含有細胞傷害性T細胞的培養物中，篩選含有高含量之細胞傷害性T細胞之細胞集團，並回收該細胞集團之的步驟，該細胞傷害性T細胞係具有抗原特異性之細胞傷害活性。

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)