

# 發明專利說明書

200404002

(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： 9210 7705

※ 申請日期： 921440 ※IPC 分類：A61K35/14 ; A61K48/00

## 壹、發明名稱：(中文/英文)

用於腫瘤、傳染性疾病及自體免疫疾病之預防/治療的經源自 HLA 配對捐者活化的淋巴球，使用淋巴球的治療方法，含有淋巴球做為其主要成分的調配物，製造該調配物的方法及用於製備該調配物的製備套組  
HLA MATCHING DONOR-ORIGINATING ACTIVATED LYMPHOCYTES TO BE USED IN PREVENTION/TREATMENT OF TUMORS, INFECTIOUS DISEASES AND AUTOIMMUNE DISEASES, TREATMENT METHOD ACHIEVED BY USING THE LYMPHOCYTES, FORMULA HAVING THE LYMPHOCYTES AS A MAIN CONSTITUENT THEREOF, METHOD FOR MANUFACTURING THE FORMULA AND PREPARATION KIT TO BE USED TO PREPARE THE FORMULA

## 貳、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

淋巴細胞技術股份有限公司 / Lymphotec Inc.

代表人：(中文/英文)

關根 暉彬 / SEKINE, Teruaki

住居所或營業所地址：(中文/英文)

日本東京都文京區白山 5-26-9

5-26-9, Hakusan, Bukyo-ku, Tokyo, Japan

國 籍：(中文/英文)

日本 / Japan

參、發明人：(共 4 人)

1. 姓名：(中文/英文)

黑岩 保幸 / KUROIWA, Yasuyuki

住居所地址：(中文/英文)

日本茨城縣日立中市高場 2055-5  
2055-5, Takaba, Hitachinaka-shi, Ibaraki, Japan

國籍：(中文/英文)

日本 / Japan

2. 姓名：(中文/英文)

森尾 友宏 / MORIO, Tomohiro

住居所地址：(中文/英文)

日本東京都新宿區大京町 7-1-204  
7-1-204, Daikyo-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 160-0015 Japan

國籍：(中文/英文)

日本 / Japan

3. 姓名：(中文/英文)

清水 則夫 / SHIMIZU, Norio

住居所地址：(中文/英文)

日本山梨縣北巨摩郡雙葉町宇津谷 5421-18  
5421-18 Utsuya, Futaba-cho, Kitakoma-Gun, Yamanashi, Japan

國籍：(中文/英文)

日本 / Japan

4. 姓名：(中文/英文)

關根 暉彬 / SEKINE, Teruaki

住居所地址：(中文/英文)

日本東京都江東區鹽濱 1-1-13-420  
1-13-420, Shiohara 1-chome, Koto-ku, Tokyo, Japan

國籍：(中文/英文)

日本 / Japan

### 肆、聲明事項：

本案係符合專利法第二十條第一項  第一款但書或  第二款但書規定之期間，其日期為： 年 月 日。

◎ 本案申請前已向下列國家（地區）申請專利

主張國際優先權：

【格式請依：受理國家（地區）；申請日；申請案號數 順序註記】

1. 日本；2002.04.08；2002-104644
2. 日本；2003.02.18；2003-039618
- 3.
- 4.
- 5.

主張國內優先權（專利法第二十五條之一）：

【格式請依：申請日；申請案號數 順序註記】

- 1.
- 2.

主張專利法第二十六條微生物：

國內微生物 【格式請依：寄存機構；日期；號碼 順序註記】

國外微生物 【格式請依：寄存國名；機構；日期；號碼 順序註記】

熟習該項技術者易於獲得，不須寄存。

## 玖、發明說明：

### 【發明所屬之技術領域】

本發明係關於用於預防與治療腫瘤、傳染性疾病及自體免疫疾病之源自 HLA 配對捐者的活化淋巴球、使用淋巴球的治療方法、含有淋巴球做為其主要成分的調配物、製造該調配物的方法及用於製備該調配物的製備套組，本發明之目的係使腫瘤（諸如癌症）及傳染性疾病之治療及預防更為有效。

### 【先前技術】

近幾年來，有很大的關注係集中在以淋巴球作為重要的生物防禦（biophylaxic）方法以支持免疫系統。根據其單株抗體的反應性，在達成細胞介導的免疫反應中扮演了尤其重要角色的 T-淋巴球係如下分類。例如，對於抗-CD3 抗體（CD 表示「分化群（cluster of differentiation）」）有明顯反應性的 T-淋巴球被分類為 CD3 陽性細胞。至今，定量及定性之重要研究工作係放在 T-淋巴球上，特別是關於顯現出的抗原及其功能之間的關係。

除此之外，Sekine 先生（本發明的發明人之一）於之前在日本未審查的專利公開案第 H 03-80076 號中報導淋巴球可以藉由使用固相（solid-phase）抗-CD3 抗體（以淋巴球覆蓋）及白血球介素 2 增殖，也報導了如此增殖的自體淋巴球可達到明顯的抗腫瘤效果。許多其他研究者也報導可以藉由使用抗-CD3 抗體或白血球介素 2 來增殖源自周邊血或其相似物的淋巴球，得到的自體淋巴球顯示有抗腫瘤活性。

再者，當白血病發生在經骨髓移植的病患時，捐者白血球輸注（此後簡稱為「DLT」）及捐者淋巴球注入（此後簡稱為「DLI」）係兩種會採用之已完善建立的治療方法，其係施以相當大量之骨髓捐者的淋巴球。而且，微嵌合性的存在已在近年來被證實，能使 HLA 配對的母親及小孩之間顯現有免疫耐受性，結果，各種形式的研究展開了，利用微嵌合性的優點以迅速引起病患症狀的減輕，使得更安全的器官移植成為可能。廣為人知的是，當兄弟姐妹之間有微嵌合性時，兄弟姐妹間（sibling-to-sibling）腎臟移植的成功率非常高。

然而，上述之 T-淋巴球及微嵌合性誘導的研究仍舊處於實驗階段，目前尚未有針對實現該研究之實施應用的應用技術被發展出來，此外，僅僅藉由將收得的自體移植淋巴球增殖，並不能永遠確保有效的抗腫瘤效果，尤其是癌症。實施 DLT 治療是另一個必須提到的困難。

根據個別白血球所屬的白血球族群，白血球被分類為許多不同的「基因座（loci）」，如 HLA（人類白血球抗原）。在這些基因座中，有基因座 DQ 及 DP，還有四個基因座 A、B、C 及 DR，是器官移植時需要小心檢查的重要因子。這些基因座各由兩個基因複本所組成，一個源自父親，另一個源自母親（對偶基因），每一個基因座係高度多型性的（polymorphic）。因為這個原因，廣義的輸血包括移植（諸如周邊血肝細胞移植）及 DLT，至少要有四對捐者及病患的 HLA 基因座必須達成配對，且八個 HLA 分子的一致率是重要的因子。

因為在這些情況下，要使病患及捐者的白血球 HLA 達到完全的配對幾乎是不可能的，所以實際上只要主要的 HLA 有相配，就進行骨髓移植或輸血。然而，HLA 配對錯誤可能會對接受骨髓移植或 DLT 治療的病患造成致命的副作用，例如致命的輸血後移植物抗宿主疾病（此後簡單稱為「PT-GVHD」）。

除此之外，有許多即使他們有 HLA 配對捐者的病患，仍無法進行骨髓移植或輸血，這是因為處置前的器官病顯現及傳染性疾病。儘管已試圖用源自捐者之淋巴球來治療不能做骨髓移植之癌症病患的腫瘤，但是那些方法都還未被證明為很有效的。

如上所述，當不能做骨髓移植時，使用自體移植（源自病患）之淋巴球或源自捐者之淋巴球的抗腫瘤效果並不理想，且其抗病毒效果及其對自體免疫疾病的影響尚未明瞭。還有另外的問題是，大量製備淋巴球會對淋巴球捐者造成很大的負擔。再者，必須與造血幹細胞移植併用的 DLI，在作為治療選擇時，有很大的限制，因為 DLI 不能在無法促進造血幹細胞移植的病患，還有因為與 DLI 幹細胞移植併用需要很高的 HLA 一致性，所以找到配對捐者的希望甚微。

#### 【發明內容】

因此，本發明之發明人完成的本發明，係專注研究努力於開發可達到高抗腫瘤效果、抗病毒效果及抗自體免疫疾病

效果之源自捐者淋巴球，以及開發製備此等淋巴球的方法。

本發明係關於源自 HLA 配對捐者活化的淋巴球，其具有高抗腫瘤效果及抗病毒效果，亦提供高度有效性的自體免疫疾病治療，其取得係藉由收集 HLA 配對捐者周邊血中或與病患有明顯微嵌合性之源自 HLA 配對捐者周邊血中的細胞，然後以（例如）白血球介素 2 及抗-CD3 抗體或其相似物刺激及增殖細胞，製造此等活化之淋巴球的方法，藉由施以活化的淋巴球來治療具有腫瘤、病毒感染或自體免疫疾病之 HLA 配對病患的方法，含有淋巴球為其主要成分的調配物，製造調配物的方法，以及用於製造調配物的製備套組。

本發明之細節將於下面描述，總體來說，本發明的特徵在於：源自 HLA 配對捐者活化之淋巴球的製備，係藉由收集 HLA 配對捐者或具有微嵌合性之 HLA 配對捐者周邊血的細胞，並刺激及增殖如此收集之細胞。

收集的細胞可以（例如）用白血球介素 2 及抗-CD3 抗體的多株活化作用來刺激及增殖。或者，抗原專一之活化淋巴球的獲得，可以藉由用適當的抗原或其相似物誘生出抗原專一的 T-淋巴球或其相似物，然後用 CD3 抗體、CD26 抗體及細胞活素（諸如白血球介素 2）其一，或用其組合。除此之外，在增殖及活化了收集之源自 HLA 配對捐者的淋巴球之後，具抗原專一的活化淋巴球可以經由篩選來選取，或者，抗原專一的活化淋巴球可以用適當的抗原來製備源自 HLA 配對捐者的淋巴球。



疾病及自體免疫疾病之調配物的方法，其包括：從含有源自 HLA 配對捐者淋巴球的周邊血分離出單核細胞的步驟、增殖及活化分離之單核細胞中的源自 HLA 配對捐者淋巴球的步驟，以及萃取該經增殖及活化的淋巴球，則含有該淋巴球為其主要成分的調配物就製備完成。

本發明之特定細節將依序解釋如後。

(收集之周邊血的種類)

根據本發明，收集的周邊血必須是源自 HLA 配對捐者的周邊血及，更理想的為顯示有微嵌合性之 HLA 配對捐者的周邊血。雖然較佳的收集之周邊血是與 HLA 病患具有完美 HLA 配對的，以確保無 GVHD-誘發的副作用產生，但是也可以收集具有部份 HLA 配對的周邊血來取代。

例如，在 A、B、C 及 DR 4 個基因座中，具有 1、2、3 或 4 個基因座與病患相對應之基因座配對之源自捐者的周邊血可以被使用。或者，在 8 個 HLA 基因（顯現在四個基因座）中至少有兩個 HLA 基因與病患相配的捐者周邊血可以被使用。然而，在這個例子中，較理想的是有四個 HLA 基因達成配對。

此外，使用顯示微嵌合性之源自捐者的源自 HLA 配對捐者活化之淋巴球是有效的。雖然微嵌合性在生物醫學領域是已被完善建立的概念，下面提供了其概略的解釋。「微嵌合性 (micro-chimerism)」(源自另一個個體的細胞在身體中以大約 1/1000 的比例存在的狀況) 在懷孕時發生，媽媽及胎兒經由胎盤互相交換少量的細胞。

事實上，微嵌合性可在懷孕婦女中被常態偵測到。除此之外，即使在分娩之後，非常多的母親維持了一段時間的微嵌合性，所以，可以維持對小孩 HLA（源自父親）之免疫耐受性。由於這個現象，母親及其小孩形成了免疫耐受性三角。

因此，本發明的發明人由其研究中證實，源自 HLA 配對捐者（具有微嵌合性之兄弟姊妹）之活化的淋巴球，對於預防及治療腫瘤、傳染性疾病及自體免疫疾病非常有效。除此之外也顯示，即使 HLA 基因沒有配對，只要其顯露微嵌合性，周邊血可以被使用得更加安全。

這意味著，只要有微嵌合性，源自沒有血緣關係之陌生人的周邊血可以和源自父母親、祖母、祖父、兄弟姊妹、叔叔、阿姨、子女或孫子女的周邊血同樣有效的被使用。應注意的是，小孩（基因上遺傳了父母親之 HLA）的每一半 HLA 組成與父母親之一的 HLA 相符合，以及，其 HLA 有 25% 的機會與其兄弟姊妹達到配對。與沒有血緣的陌生人達到此 HLA 配對的機會是數百~數萬分之一，基於這個原因，源自陌生人的淋巴球在正常情況下不能使用。然而，如果捐者具有微嵌合性，則該捐者的淋巴球可以作為調配物的原料。

再者，較佳的係選擇一個與受捐者具有排斥傾向（works along the rejective direction）之 HLA 組合的捐者。例如，在具有排斥傾向的 HLA 組合中，捐者的 A 基因座可以包含 A2 及 A24 血清，而接收活化淋巴球之病患的 A

基因座可以包含 A2 及 A2 血清。因為病患的淋巴球能夠減弱捐者之具有 A24 血清的淋巴球，所以可以避免嚴重的副作用（諸如 GVHD）。具有排斥傾向之 HLA 組合可以是 B、C 及 DR 基因座，A 基因座也可以。

#### （收集淋巴球）

根據本發明之源自捐者之活化的淋巴球可以從捐者的周邊血製備。雖然從捐者手臂靜脈收集血很容易，但只要血液含有淋巴球，關於收集區並沒有特定的限制。或者，可以使用從臍帶血收集的淋巴球。只需要收集少量的周邊血；介於 0.001 毫升及 500 毫升的範圍之間，實際應用時，較理想的是收集的周邊血的量在大約 10 毫升~100 毫升的範圍之間。

#### （淋巴球的調整）

肝素或檸檬酸可以加到收集的周邊血中以預防凝結。根據本發明源自捐者之活化的淋巴球可以藉由使用收集的周邊血作為基礎原料而取得，從周邊血製備淋巴球，然後培養以增殖及活化淋巴球。除此之外，根據本發明之淋巴球可以從捐者骨髓經由灌洗術（pheresis）或其相似者製備。應注意的是，在本發明的說明中，術語「培養」收集的淋巴球意指人工增殖（培養）組織細胞，其達成係藉由將細胞組織小樣本放到含有使細胞存活之必要養分的培養溶液中，及術語「增殖」意指活體外組織細胞人工的數量

增加，其係經由上述培養來達成。除此之外，術語「活化」意指控制實施以活化停滯的功能，其係藉由加入增殖劑或活化劑到培養溶液中來刺激細胞，更明確的是，控制實施以達成細胞內抗腫瘤、抗病毒及抗自體免疫疾病的特性。

(源自周邊血之淋巴球的增殖及活化)

源自收集的周邊血之活化的淋巴球可以經由技藝中已知的任何淋巴球培養方法增殖。關於可以採用的培養方法並沒有特定的限制，該培養可以經由，例如，單獨使用白血球介素 2 或抗-CD3 抗體之一或組合使用他們來達成，如日本未審查之專利公開第 H 3-80076 號所揭示。較理想的是將淋巴球培養在白血球介素 2 及抗-CD3 抗體都存在的環境中，以達到較佳的增殖效果。

除了經由多株增殖/活化來增殖及活化淋巴球（藉由如上所述之使用白血球介素 2 及抗-CD3 抗體），具有抗原專一之活化的淋巴球可以藉由先用前述之適當的抗原或其相似物衍生出抗原專一 T-淋巴球或其相似物來取得，然後單獨使用 CD3 抗體、CD26 抗體、各種分裂素及細胞活素（諸如白血球介素 2）之一或組合使用之。

或者，具有抗原專一之活化的淋巴球可以藉由篩選具體實例中得到的活化的淋巴球來選擇，具有抗原專一之活化的淋巴球可以利用適當的抗原得到，或具有抗原專一之活化的淋巴球可以經抗原刺激以增殖及活化該淋巴球來製備。在這些狀況下，抗原專一的淋巴球可以從 CD8 陽性細

胞或 CD4 陽性細胞衍生出。

除了精製的抗原，來自癌細胞或病毒、癌細胞本身、病毒本身或對癌細胞或病毒顯示交叉反應性之抗原性物質的萃取物都可以被用於這些目的。上述的任何物質均可以用於此方法中，只要其具有增殖及活化淋巴球的功能。除此之外，用於該方法的白血球介素 2 是市面上可獲得的產品，且其必需溶解，以在培養基溶液中達到 1 ~ 2000U/毫升的濃度。

白血球介素 2 可以被溶解及使用於廣泛用在細胞培養的任何培養基溶液中，諸如水、生理鹽溶液、Dulbecco 氏磷酸緩衝溶液、RPMI-1640、DMEM、IMDM 及 AIM-V。一旦白血球介素 2 溶解了，該溶液可冷藏儲存以確保其活性不降低。應注意的是，關於用於此目的之培養基溶液的種類並沒有特定的限制，只要其適合淋巴球的培養，舉例來說，可以使用源自有機體的培養溶液，諸如血清或添加了胺基酸、維他命、核酸鹼基及其相似物到平衡鹽（balanced saline）中的合成培養基。理想的培養基溶液例子包括 RPMI-1640、AIM-V、DMEM 及 IMDM，在這之中，RPMI-1640 尤佳。

雖然使用含有正常人類血清的培養基以得到較佳的增殖是較理想的，但是也可以使用市面上可獲得的培養基產品。除此之外，除了人類血清：可以使用源自牛胎的血清。或者，可以使用無血清培養基。該培養可以採用任何的一般操作培養方法，例如，在 CO<sub>2</sub> 培養箱中。在此例子中

，較理想的是維持 CO<sub>2</sub> 濃度在 1 ~ 10% 範圍內，更佳是在 3 ~ 7% 範圍內，溫度維持在 30 ~ 40°C 範圍內，更理想是在 35 ~ 38°C 範圍內。

關於培養的天數雖然沒有特定的限制，但前提是培養期必須夠長，使得來自抗-CD3 抗體的刺激訊息可以傳達到細胞。所以，較理想的是讓培養程序持續大約 2 ~ 20 天，尤其理想的是，當培養淋巴球 3 ~ 14 天的時間達到較佳培養效果時，可以有穩定的刺激訊息交流到達細胞。為了確保較好的培養效果，更佳的是，可以在培養期進行細胞的顯微觀察、如所需的測量細胞數目及如所需的補充培養溶液。

應注意的是，在培養開始之後，剛開始 1 ~ 2 天並沒有觀察到細胞數目顯著的增加，細胞增殖是在約第三天才被第一次觀察到，一旦細胞開始真的增殖，培養溶液顏色會從橙色變成黃色。除此之外，培養溶液必須以大約 10% ~ 500%（相對於補充之前培養基溶液的量）的比例補充。再者，培養溶液必須每 1 ~ 7 天補充一次，更佳的是每 3 ~ 5 天一次，以預防任何培養溶液的降解，及維持白血球介素 2 的活性程度。

進而，在有抗-CD3 抗體存在下的環境中培養完成之後，可以在沒有任何抗-CD3 抗體的刺激下繼續培養程序。也就是說，可以藉由抗-CD3 抗體不在固相的器具（例如培養瓶、旋轉瓶、培養的氣體可通透袋）繼續培養，直到施用淋巴球，。

當如上所述持續培養淋巴球，培養必須在與起始培養（在抗-CD3 抗體的影響下）設定相同的狀況下進行，但是第二培養沒有任何抗-CD3 抗體的刺激。更佳是調整人類血清濃度，或如需要的使用無血清培養基，以達到較好的操作性、較佳的成本支出及較佳的安全性。

培養的開始係將含有白血球介素 2 與臍帶血或懸浮其中之單核細胞的培養基溶液放入一抗-CD3 抗體在固相的培養容器中。在此狀況下，如需要的藉由添加各種細胞活素或分裂素到培養溶液中，淋巴球增殖及活化的效果會進一步的改善。應注意的是，雖然用來刺激淋巴球細胞的抗-CD3 抗體可以利用精製的 CD3 分子在動物或細胞內製備，市面上可獲得之具有絕佳穩定性及價格的 OKT-3 抗體（製造商：Orthopharmaceutical）亦可以使用。

然而，關於用來刺激淋巴球的抗體種類並沒有限制，只要該抗體可以增進淋巴球的增殖及活化，例如，可以用抗-CD20 抗體來取代抗-CD3 抗體。除此之外，較理想的是使用固相抗-CD3 抗體，以達到較佳的淋巴球增殖效果及較好的操作性。抗體可以固相存在於由玻璃、聚氨酯（polyurethane）、聚烯烴（polyolefine）或聚苯乙烯所構成之培養容器中。市售之容易取得的由塑膠或其相似物所構成的滅菌細胞培養瓶可用於這些目的，在這情況下，瓶子的大小可以適當的選擇。

除此之外，藉由添加抗-CD3 抗體稀釋液到用於處理抗體使到固相之目的的容器中，抗體可以被引誘到固相，然

後靜置容器 2 ~ 24 小時，溫度設定在 4 ~ 37°C。較佳的，當處理抗-CD3 抗體使到固相，將抗-CD3 抗體以生理緩衝溶液（諸如已滅菌的 Dulbecco 氏磷酸緩衝溶液）稀釋到 0.1 ~ 30 微克/毫升的濃度。達到固相之後，抗-CD3 抗體可以儲存在冷房或冰箱（4°C）中直到使用，在此狀況下，液體可以在使用時移除，抗-CD3 抗體於室溫以生理緩衝溶液（諸如 Dulbecco 氏磷酸緩衝溶液）沖洗後就可以使用了。

如此得到之源自捐者周邊血的活化淋巴球可以製作或製備成調配物，其可用來廣範圍的應用在生物防禦上，預防或治療腫瘤及各種傳染性疾病。除此之外，源自捐者周邊血之活化的淋巴球（其含有 CD4 陽性細胞及 CD8 陽性細胞）被預期可提供較佳的抗腫瘤效果。

再者，若有任何副作用（諸如 GVHD）的風險，製備之源自周邊血之活化的淋巴球可以用抗 CD4 抗體或其相似物處理以製備細胞族群（population）（其主要成分為 CD4 陽性細胞）用於治療。另一方面，當副作用（諸如 GVHD）的風險低時，或當需要較佳的抗腫瘤效果時，含有 CD8 陽性細胞之源自周邊血之活化淋巴球可以直接用於治療。後者，活化的淋巴球可以細胞族群（CD8 陽性細胞含量調整到適當的量）用於治療。

（含有源自周邊血之活化淋巴球為其主要成分的調配物）

從周邊血取得之源自 HLA 配對捐者活化的淋巴球（其

含有主要成分增殖的周邊血細胞) 可以製備成調配物，其係藉由懸浮於(例如)含有人類白蛋白之生理鹽溶液中作為注入溶液，如此製備之調配物可以用於預防及治療腫瘤及各種傳染性疾病。應注意的是，術語「調配物」在此係涵蓋所有具有生物防禦功能的物質，其主要成分為活化的淋巴球，此等調配物可以有各種形式，只要其含有從捐者周邊血取得之源自 HLA 配對捐者活化之淋巴球。

例如，可以將源自周邊血之 HLA 配對的活化淋巴球懸浮於適當的溶液中以得到調配物，雖然如上所述以懸浮於含有人類白蛋白的生理鹽溶液(其係作為注入液)中的形式來提供調配物是較佳的，但是本發明並非限於此實例。除此之外，含有源自周邊血之活化淋巴球為其主要成分的調配物，可以藉由在試管內直接增殖周邊血來製備，或者，可以先將單核細胞從周邊血分離出來，然後在試管增殖該分離的單核細胞，來製備含有源自周邊血之活化淋巴球為其主要成分的調配物。

再者，許多基因都可以被放入源自周邊血之活化的淋巴球中，該淋巴球係包含在根據本發明之調配物裡，或，可以刪除或修飾任何原本含在活化之淋巴球中的基因。源自周邊血之活化淋巴球(去除了可人類免疫缺陷病毒感染之輔因子)可以用於預防或治療由病毒感染而造成的人類免疫缺陷疾病，或用於預防或治療發生在由人類免疫缺陷病毒所造成之免疫缺陷情況下的各種感染。

含有源自 HLA 配對捐者活化之淋巴球(如上所述收集

自周邊血) 為其主要成分的調配物可以用於廣泛範圍的臨床應用，以預防及治療癌症病患、有免疫缺陷的病患、具有自體免疫疾病的病患、需要臍帶血注入之疾病(諸如過敏病患)的病患，以及有各種感染的病患。根據本發明之調配物可以用於治療腫瘤以及預防腫瘤再發，也可以用於治療白血病及各種實體(solid)腫瘤。

此外，如上所述使用該調配物來預防或治療腫瘤，也可以改善病患的 QOL (生活品質)。即，如果(例如)一抗癌藥物造成了持續的腎臟或肝失調，或病患因手術而留有永久的疤痕，甚至在其疾病已經治癒之後，此等治療的副作用或其相似狀況常常破壞了病患的生活品質。然而，使用根據本發明之調配物來治療病患，其 QOL 可以大大的改善。

含有本發明源自 HLA 配對捐者活化之淋巴球作為其主要成分的調配物，對於治療各種癌症及腫瘤、免疫缺陷失調及各種感染係有效的，如後詳述。更特定來說，其對於治療肺癌、胃癌、結腸癌、直腸癌、腎臟癌、胰臟癌、膽囊癌、卵巢癌、子宮癌、睪丸癌、前列腺癌、白血病、肉瘤及腦瘤有效，對於治療天生的及後天的免疫缺陷也有效。

先天免疫缺陷疾病包括了嚴重聯合免疫缺陷、Wiscott Aldrich 徵候群、腺苷酸脫氨酶(Adenosine deaminase)缺陷、嘌呤核苷磷酸化酶缺陷、高 IgM 徵候群及聯合的免疫缺陷，根據本發明之調配物還可以用於治療其他免疫缺陷。除此之外，典型的後天免疫缺陷例子包括了因使用抗

癌症藥物、免疫抑壓劑或類固醇所造成的續發性（secondary）免疫缺陷，以及由人類免疫缺陷病毒感染所造成的 AIDS，本發明也可以用於治療除了這些以外的其他免疫缺陷。

除此之外，可以使用根據本發明調配物治療之典型自體免疫疾病的例子包括全身性紅斑狼瘡、慢性關節風濕、乾燥症（Sjögren's syndrome）、重症肌無力、惡性貧血及 Hashimoto 氏疾病，本發明也可以用於治療其他自體免疫疾病。根據本發明之調配物可以作為治療對特定病毒或其相似物沒有免疫能力或低免疫能力的病患的預防或醫療上方法，以及治療免疫能力差的病患。可以用根據本發明調配物治療的過敏疾病包括支氣管氣喘、西洋杉花粉過敏及蕁麻疹，根據本發明的調配物也可以用於治療其他過敏症，也可以用於減輕各種過敏症的症狀。

可以使用根據本發明調配物治療的傳染性疾病包括病毒感染、微生物感染（microbisms）、真菌感染、原生動物感染、衣原體感染及黴漿菌感染。這當中，病毒感染包括巨大細胞病毒（cytomegalovirus）感染及 Epstein-Barr 病毒感染。然而，本發明的應用並非限於治療這些病毒感染，本發明的調配物可以大範圍的應用於預防及治療各種其他病毒感染諸如疱疹，包括單純疱疹病毒及帶狀疱疹病毒（Varicella-zoster virus）、各種反轉錄病毒包括人類白血病毒及人類免疫缺陷病毒、腺病毒及克沙奇病毒。

可以使用根據本發明的調配物而治療的微生物感染（microbisms）包括由綠膿桿菌（*pseudomonas aeruginosa*）及抗甲氧苯青黴素（methicillin）黃色葡萄球菌屬所造成的感染。然而，根據本發明的調配物可以用於治療任何在人類會顯示致病性之細菌所造成的傳染性疾病。尤其，根據本發明的調配物可以有效的用於預防及治療由不知名病原體、不易被鑑認的病原體所造成的傳染性疾病，或用於預防及治療此等感染所造成的疾病。

先前所述之微嵌合性可用 PCR（聚合酶連鎖反應）分析容易的偵測。例如，當測定 HLA-A 基因座的 A-24 微嵌合性時，決定有沒有微嵌合性可以藉由先用 HLA-A 基因座引子放大該反應、使用 A-24 引子來進行巢式-PCR、然後用適當的偵測系統偵測任何微嵌合性。

（用於製備含有源自周邊血之活化淋巴球為其主要成分之調配物的製備套組）

雖然本發明之源自 HLA 配對捐者活化之淋巴球成分可以作為單一試劑製備物，它們也可以在套組中製備，其係藉由合併含有白血球介素 2 培養溶液及固相抗-CD3 抗體在一瓶中。在後者，本發明之該調配物可以使用套組來更容易的製備。

應注意的是，用於製備該調配物的培養溶液可以事先倒適量於塗覆有固相抗-CD3 抗體的分離瓶中，然後這些瓶子可以儲存在冷凍櫃中。於套組（其如上所述結合了至少

兩種成分作為多重試劑) 製備活化的淋巴球，當對於活化的淋巴球需求增加時，可以使用該套組以更容易的製備根據本發明的調配物。可用於本發明上述所有方式之從周邊血製備來的源自 HLA 配對捐者活化之淋巴球，或含有此等活化淋巴球的調配物，可以儲存於冷凍櫃中備用，一旦需要時，可用於預防或治療各種疾病。

#### (劑量)

雖然調配物(含有從周邊血製備來的 HLA 配對活化淋巴球作為其主要成分)之劑量需依照特定病患的狀態或特定治療目的做適當的調整，正常情況下的標準投藥劑量介於  $1 \times 10^2$  到  $1 \times 10^9$  個淋巴球(相對於 1 公斤體重)。除此之外，較佳係每公斤施用  $1 \times 10^3$  個淋巴球或更多以進一步增進效果，但是一旦劑量超過每公斤  $5 \times 10^8$  個淋巴球，效果並沒有再增加。所以，最適劑量範圍係每公斤  $1 \times 10^3 \sim 5 \times 10^8$  個淋巴球。

#### (投藥形式及方法)

上述調配物必須以液體形式投藥，即，以注射或以點滴。更特定言之，較佳係以注射或以點滴(其含有分散在生理鹽溶液中的細胞)施用如上所述而製備的細胞，其添加了人類血血清白蛋白到 0.01 ~ 5% 的濃度。該調配物需以靜脈內點滴來投藥，或靜脈內注射、動脈注射或局部注射。雖然施用的溶液量必須根據投藥方法、投藥部位或其

相似者調整，但正常狀況下，施用的溶液量較佳係在 1 ~ 500 毫升範圍內，同時，需確定在施用的溶液內含有前述所需的淋巴球細胞數。除此之外，此投藥的頻率係每天一次~每月一次，且淋巴球必須施用至少多於一次。

### 【實施方式】

( 具體實例 1 )

No. 1. ( 血液收集及淋巴球分離 )

以注射器從靜脈收集 ( 藉由添加肝素 ) 捐者 ( 其與急性淋巴白血病患者完全 HLA 配對 ) 20 毫升的周邊血。然後維持無菌狀態，在乾淨的工作檯將注射針從注射器鬆脫，並將注射針取代為 19 G × 1 1/2'' 的注射針。將 15 毫升的清洗培養基 ( RPMI 1640+6 ) ( 500 毫升，製造商：Nikken 生物醫學研究中心，GM1106 ) 倒入兩個 50 毫升的離心管中 ( 製造商：Iwaki Glass Co. Ltd.，2341-050 )，以培養溶液稀釋 ( 係數 3 ) 收集的血液以增加溶液的量之後，將全部混合液慢慢倒入該兩個離心管中，使恰等量的混合液倒入該兩管中。

完全蓋上離心管的蓋子之後，倒轉及搖動二或三次。用 10 毫升微量吸管將 3 毫升 Lymphoceptor 1 ( 100 毫升，製造商：Immunobiological Bio-research Center Co. Ltd.，23010 ) 放入六個 15 毫升的離心管中，然後，將 10 毫升經培養基稀釋的血液慢慢在 Lymphoceptor 1 分層，避免擾亂各離心管表面。然後在離心機以 1800 rpm 離心離心管 15 分鐘，並維持離心溫度為 20°C。

當離心完成，以吸引器將各離心管的內容物吸到淋巴球層上方大約 1 公分，不要吸除淋巴球細胞，並維持無菌狀態。然後，使用 5 毫升微量吸管汲取 (drawn off) 淋巴球細胞層，但是不吸凝血層，再將如此萃取的淋巴球細胞層收集到事先已放入 25 毫升清洗培養基 (RPMI 1640+6) 的 50 毫升離心管中。在移出離心管並輕輕混合 (藉由蓋上蓋子上下顛倒之) 之後，再將離心管放入離心機中離心 10 分鐘 (1800 rpm)，離心溫度設定為 20°C。

離心之後，去除上清液，並完全打散及攪動細胞沉澱。測定細胞數目後，將細胞置於懸浮液中 (PBS 濃度  $0.5 \times 10^6$ /毫升)。在 15 毫升容量的離心管中，當細胞與 Dynabeads CD4 (進口商/販賣者: Veritas) 以細胞/珠珠比例 1 : 4 混合之後，將混合物 4°C 培養 30 分鐘。放置一磁鐵 (進口商/販賣者: Veritas) 使與離心管外壁接觸以收集結合到 Dynabeads CD4 的 CD4 陽性細胞，無菌地用吸引器吸除沒有與任何 Dynabeads CD4 結合的細胞。

接著用震盪器 (vortex) 將與 Dynabeads CD4 結合的細胞完全鬆散開。然後在 50 毫升的培養基中輕輕倒轉混合之，該培養基係藉由注入 1 毫升 3500U/毫升的 IL-2 (製造商: Cetus) 及 5 毫升人類血液血清到 44 毫升培養基 (RPMI 1640 + 7 製造商: Immunological Bio-research Center Co. Ltd.) 中得到，這樣就製備了細胞懸浮液。

將 10 微升細胞懸浮液放入一管中 (進口商/販賣者:

Assist Co. Ltd. , 72.690) , 然後將懸浮液與 40 微升 Türk 溶液混合。取 10 微升混合液放到血球計數器 (hemocytometer) (製造商: Elmer Inc. , 9731) 上, 並在顯微鏡下測定細胞數目。全細胞計數為  $1.0 \times 10^7 \sim 7.0 \times 10^7$ 。

#### No. 2 (塗覆了 OKT3 之瓶子的製備)

將已用 PBS (-) 調整到 5 微克/毫升濃度的 10 毫升 OKT3 溶液 (進口商/販賣者: Jansen Kyowa, Co. Ltd. , 製造商: Orthopharmaceutical: OKT3 注射) 放入底面積 225 平方公分的培養瓶中, 確認瓶底表面已被溶液平均的覆蓋。

隔天, 用吸引器吸除瓶中的 OKT3 溶液, 然後將 50 毫升 PBS (-) 倒入瓶中。蓋上蓋子, 待完全搖動瓶子之後, 打開蓋子並去除液體。接下來, 維持無菌狀態, 將 50 毫升 PBS (-) 倒入瓶中, 然後蓋子蓋上, 充分搖動瓶子。然後打開蓋子去除液體。將瓶內或蓋子上存有之任何濕氣用吸引器完全吸除, 如此, 就製備好了塗覆有 OKT3 的瓶子。

#### No. 3 (淋巴球的活化培養)

將如上述 No. 1 (血液收集及淋巴球分離) 所製備的 50 毫升細胞懸浮液倒入如上述 No. 2 (塗覆了 OKT3 之瓶子的製備) 所製備的塗覆了 OKT3 的瓶中, 然後於  $37^{\circ}\text{C}$ , 二氧化碳氣體濃度為 5% 的環境下, 將懸浮液培養於瓶中。三

天後，添加 50 毫升培養基，並繼續在 37°C、二氧化碳氣體濃度為 5%的環境下培養。然後，四天後，添加 150 毫升培養基，在 37°C 培養（二氧化碳氣體濃度 5%的環境下）。最後一次補充培養基後，繼續培養兩天（37°C，二氧化碳氣體濃度 5%的環境下）。結果取得  $2.0 \times 10^8 \sim 7.0 \times 10^8$  個活化的淋巴球。

#### No. 4 （淋巴球的增殖培養）

將經由上面 No. 3（淋巴球的活化培養）所述而製備的淋巴球轉移到含有 750 毫升 LL-7 培養基（Nikken 生物醫學研究中心）之氣體可通透的培養袋中，然後將此轉移的淋巴球培養在二氧化碳氣體培養箱中（CDP-300A；Hirasawa Co. Ltd.），37°C，二氧化碳氣體在 5%內的大氣下。

四天後，藉由使用無菌的結合裝置（製造商：Terumo）將含有細胞的氣體可通透培養袋（製造商：Nipro Co. Ltd.，Nipro 培養袋 A-1000）與另一個含有新培養基的氣體可通透培養袋連結，並將兩氣體可通透的培養袋中的培養基完全混合。然後，切斷袋子間的連接，並在連接處無菌密封之後，將細胞培養在 37°C、5%二氧化碳氣體大氣下。

#### No. 5 （用於投藥之調配物的製備）

三天後，將兩氣體可通透培養袋中之含有細胞的培養

基轉移到容量 250 毫升的離心管中，並經離心分離細胞。然後，用倒出的方式排出培養溶液，將生理鹽溶液加到細胞沉澱中以再懸浮細胞，然後經離心沖洗細胞。接下來，用含有人類白蛋白的生理鹽溶液（濃度 0.1%，以取代先前使用的生理鹽溶液）進行相似的沖洗操作，如此，細胞沉澱就適應好了。

接下來，將 200 毫升含有人類白蛋白的生理鹽溶液（2%濃度）加到細胞沉澱中以懸浮細胞，在懸浮液通過 100 微米不鏽鋼網過濾之後，將製備物裝進輸血袋中，並已可用於投藥。應注意的是，轉移到輸血袋中的細胞數目為  $0.5 \sim 10 \times 10^9$ 。

#### No. 6（冷凍櫃儲存調配物）

應注意的是，如上 No. 5（用於投藥之調配物的製備）所述而製備之活化的淋巴球可以如需要的儲存於冷凍櫃中。為了解釋調配物保存於冷凍櫃中的特定具體實例，將上述 No. 5（用於投藥之調配物的製備）所取得之活化的淋巴球經由離心來分離，用倒出的方式排出培養基，並取得細胞沉澱，將 18 毫升的細胞保存溶液（其製備係藉由混合 5 毫升人類血液血清、5 毫升二甲亞砜（dimethyl sulfoxide）（製造商：Nakaraitesky Co. Ltd.，在此後可稱為「DMSO」）及 40 毫升培養基（RPMI 1640 + 7））加到細胞沉澱中，將細胞沉澱及保存溶液混合完全，並將 3 毫升混合液倒入五個 5 毫升細胞保存管每一管中（ $5 \times$

10<sup>7</sup> 個細胞/管)。然後將這些管子置於極低溫冷凍櫃中並保存於-80°C。

除此之外，冷凍的細胞必須解凍及液化以供使用，其係藉由將冷凍細胞從冷凍櫃取出，並用 37°C 熱阻礙 (heat block) (製造商：Titek Inc. ; TAL-IG) 4 分鐘溫暖之。我們無菌的轉移大約 3 毫升的含有如此解凍並液化之細胞的細胞保存溶液到 15 毫升的離心管中，添加 10 毫升培養溶液以懸浮細胞，然後離心 (在 1000 rpm, 20°C, 進行 5 分鐘) 分離細胞。然後，用倒出的方式去除上清液，用上面 1~4 所述的方法培養細胞，用於投藥的調配物則如上 No. 5 (用於投藥之調配物的製備) 所述製備。我們亦製備該已可用於投藥之調配物，其係藉由用培養的生理鹽溶液沖洗該解凍及液化的細胞，然後加 10 毫升含有人類血液血清白蛋白的生理鹽溶液 (5% 濃度) 以使其懸浮。

#### No. 7 (施用調配物)

如上 No. 5 (用於投藥之調配物的製備) 所述製備的調配物，或如上 No. 6 (冷凍櫃儲存調配物) 所述保存於冷凍櫃的調配物，係經靜脈注射到未經造血幹細胞移植的急性淋巴白血病患者中。投藥給急性白血病患者 (其已證明對各種化學治療藥物有抗性，且儘管有化學治療卻未減輕症狀者) 總共 30 次調配物。以每數天到每 12 天 (通常每 7 天) 的時間注射  $1.7 \times 10^8 \sim 4.2 \times 10^9$  個細胞。

## No. 8 (效果評估)

當施用源自 HLA 配對捐者活化之淋巴球之前，試過各種化學治療都證明無效，且觀察到白血病細胞增加時，下列係在施用源自 HLA 配對捐者活化淋巴球之後紀錄的：

(1) 白血病細胞並未明顯增加。相反的，有觀察到慢慢減少的趨勢（抗腫瘤效果）；

(2) 在治療期間病患並無得到任何嚴重的感染，且觀察到嗜中性白血球增加（投藥之後以 500/微升或更快的速度增加）（抗傳染性疾病效果）；及

(3) 在治療前期，痛苦減低（QOL 改善及抗自體免疫疾病效果）。

所以很清楚的是，源自 HLA 配對捐者活化之淋巴球是有效之預防及醫療上對抗腫瘤、傳染性疾病及自體免疫疾病的方法，並有效的改善病患生活品質。除此之外，施用源自 HLA 配對捐者活化之淋巴球幾乎沒有觀察到任何副作用，也沒有觀察到 GVHD 症狀或高溫。

## (具體實例 2)

如具體實例 1 製備活化的淋巴球，但是周邊血係收集自與急性骨髓性白血病病患顯示有微嵌合性的血親（具有兩個 HLA 基因座與病患配對）。活化的淋巴球（已可用於投藥的調配物）係如具體實例 1 製備，且此調配物係經由靜脈注射到未經造血幹細胞移植的急性骨髓性白血病病患。僅投藥該調配物一次。投藥三天後，觀察到病患周邊血

的白血病細胞減少，且周邊血中的白血病細胞在投藥七天後完全消失。所以，很清楚的是，源自具有微嵌合性之捐者的活化淋巴球具有抗腫瘤效果。

( 具體實例 3 )

如具體實例 1 製備活化的淋巴球，但是周邊血係收集自與腎臟癌病患顯示微嵌合性的血親（具有兩個 HLA 基因座與病患相配）。活化的淋巴球（已可用於投藥的調配物）係如具體實例 1 製備，且此調配物係經由靜脈注射到腎臟癌病患內。每月投藥該調配物，總共 3 次。在最早投藥的兩週後，觀察到部分腎臟癌減少，且腎臟癌在第三次投藥的兩週之後完全消失。所以，很清楚的是，源自具有微嵌合性之捐者的活化淋巴球具有抗腫瘤效果。

如同上述具體實例已證明的，取得活化的淋巴球（作為高度有效預防及醫療上對抗腫瘤、病毒感染及自體免疫疾病的方法）可以藉由收集及活化 HLA 配對捐者的淋巴球，然後用白血球介素 2 及抗-CD3 抗體或其相似物刺激及增殖這些活化的淋巴球。已清楚證明源自 HLA 配對捐者活化之淋巴球可有效改善病患的 QOL 以及有效對抗腫瘤、傳染性疾病及自體免疫疾病，係高度有用於預防及醫療上對抗腫瘤、傳染性疾病及自體免疫疾病的方法。

除此之外，源自 HLA 配對捐者活化之淋巴球幾乎沒有被觀察到有任何不好的副作用，也沒有顯現 GVHD 症狀或高溫。

再者，本發明可以被用於改善病患生活品質的特定目的，其係藉由減少不舒服及增加病患的食慾，還有治療腫瘤（諸如癌症）及各種傳染性疾病、預防腫瘤及傳染性疾病再發、及預防腫瘤及傳染性疾病的目的。根據本發明之調配物可以用作預防及醫療上治療各種實體腫瘤以及白血病的方法。

尤其，本發明的優點可以進一步的提升，其係藉由結合本發明及其他醫療上的方法（諸如化學治療或放射線治療），或結合本發明及其他免疫治療來治療病患。進而，本發明可以作為改善病患在造血幹細胞移植前狀況的目的。

除此之外，淋巴球活化的穩定性及效果可以被大大的改善，其係藉由使用至少白血球介素 2 或抗-CD3 抗體來活化源自 HLA 配對捐者之活化淋巴球，在以適當的抗原或其相似物導出具有抗原專一的 T-淋巴球或其相似物之後，藉由使用下列之一：CD3 抗體、CD26 抗體或細胞活素諸如白血球介素 2，或組合使用之，以取得抗原專一之活化的淋巴球，或用一抗原刺激增殖及活化源自 CD8 陽性細胞或 CD4 陽性細胞之抗原專一的淋巴球，以製備具有抗原專一之活化的淋巴球。然後，可以製備出含有活化淋巴球的調配物，容易取得及方便進行投藥，以用做預防及醫療上對抗腫瘤、各種傳染性疾病及自體免疫疾病的方法。在此觀念下，本發明預期可對新生藥品領域進一步的發展有很大的貢獻。

藉由製備懸浮液形式之增殖及活化的淋巴球的調配物（其中該淋巴球係懸浮於含有人類白蛋白的注射生理鹽溶液中），可以減少在投藥時有效活化的淋巴球數目變低的程度。

除此之外，GVHD 的風險可被進一步的降低，其係藉由確認用以投藥的源自 HLA 配對捐者之活化淋巴球含有具有排斥傾向（works along the rejective direction）的 HLA。

藉由使用收集自具有微嵌合性之捐者的淋巴球，可以取得甚至更有效於預防及治療腫瘤、傳染性疾病及自體免疫疾病之活化的淋巴球，同時，可以減少副作用諸如 GVHD 的發生。藉由使用含有 CD8 陽性細胞以及 CD4 陽性細胞之活化的淋巴球，這些優點可以更加明顯。

藉由以製備套組銷售源自 HLA 配對捐者活化之淋巴球，該套組係用於製備由源自 HLA 配對捐者的淋巴球組成之活化的淋巴球，及至少活化該淋巴球的白血球介素 2，或用於製備含有源自 HLA 配對捐者活化之淋巴球的調配物，根據本發明源自 HLA 配對捐者活化之淋巴球即使在很遠的地方都可以容易的取得，且源自 HLA 配對捐者的淋巴球可以增殖及活化，以用於預防及治療腫瘤、各種傳染性疾病及自體免疫疾病的治療，不須任何高深知識或廣泛的經驗。

製造含有淋巴球之調配物的方法，該調配物係用於預防及治療腫瘤、各種傳染性疾病及自體免疫疾病，包括了將單核細胞從含有源自 HLA 配對捐者的淋巴球的周邊血分

離出來的步驟，用（例如）至少白血球介素 2 或抗-CD3 抗體活化及增殖分離出的單核細胞中源自 HLA 配對捐者的淋巴球的步驟，及萃取已被活化及增殖的淋巴球，並製備成含有淋巴球為其主要成分的調配物的步驟。結果，含有源自 HLA 配對捐者淋巴球的調配物可以有效率的製造，且同時，可防止任何活性程度及有效之淋巴球數目減低。

當經由培養來增殖淋巴球時，在 3 ~ 14 天培養期中，培養溶液可以 10% ~ 500%（相較於培養基溶液的量）的比例補充，且此等在 3 ~ 14 天培養期期間每 3 ~ 5 天一次的補充，可以有效預防培養溶液的任何降解，及預防白血球介素 2 活性程度有任何的減少。再者，在活化及增殖淋巴球的培養期間裡，藉由添加各種細胞活素或分裂素，活化之淋巴球的效果可以被進一步的提昇。

此外，已活化及增殖的含有 CD4 陽性細胞及 CD8 陽性細胞之源自 HLA 配對捐者的淋巴球，證明比單獨含有 CD4 陽性細胞的源自 HLA 配對捐者活化淋巴球更有效。

### 伍、中文發明摘要：

根據本發明，製備高度有效於治療腫瘤、病毒感染及自體免疫疾病病患的源自 HLA 配對捐者之活化淋巴球，係藉由收集源自 HLA 配對捐者之周邊血或具有微嵌合性 (micro-chimerism) 之源自 HLA 配對捐者之周邊血中的細胞，並用 (例如) 白血球介素 2 及抗-CD3 抗體或其相似物來刺激及增殖如此收集的細胞。如此製備的源自 HLA 配對捐者之活化淋巴球可以用於醫療或預防的目的，投藥給有腫瘤、病毒感染或自體免疫疾病的 HLA 配對病患。

### 陸、英文發明摘要：

According to the present invention, HLA matching donor-originating activated lymphocytes highly effective in the treatment of patients with tumors, viral infections and autoimmune diseases are prepared by collecting cells contained in peripheral blood originating from an HLA matching donor or peripheral blood originating from an HLA matching donor achieving micro-chimerism and by stimulating and propagating the cells thus collected with, for instance, interleukin 2 and anti-CD3 antibodies or the like. The HLA matching donor-originating activated lymphocytes thus prepared can be administered to an HLA matching patient with a tumor, a viral infection or an autoimmune disease for therapeutic or preventive purposes.

## 拾、申請專利範圍：

1．一種用於預防及治療腫瘤、傳染性疾病及自體免疫疾病之預防及醫療上的淋巴球，其特徵在於該淋巴球係藉由活化源自 HLA 配對捐者的淋巴球而取得。

2．根據申請專利範圍第 1 項之預防的及醫療上的淋巴球，其特徵在於該源自 HLA 配對捐者的淋巴球係以白血球介素 2 活化。

3．根據申請專利範圍第 1 項之預防的及醫療上的淋巴球，其特徵在於該源自 HLA 配對捐者的淋巴球係以抗-CD3 抗體活化。

4．根據申請專利範圍第 1 項之預防的及醫療上的淋巴球，其特徵在於該源自 HLA 配對捐者的淋巴球係抗原專一性活化的淋巴球，其係藉由以適當的抗原導出抗原專一的淋巴球，然後用其中一種；CD3 抗體、CD26 抗體及白血球介素 2，或用 CD3 抗體、CD26 抗體及白血球介素 2 的組合而取得。

5．根據申請專利範圍第 1 項至第 4 項中任一項之預防的及醫療上的淋巴球，其特徵在於該源自 HLA 配對捐者的淋巴球係藉由先活化及增殖收集之源自 HLA 配對捐者的淋巴球，然後經由選擇自抗原專一之活化淋巴球篩選或以適當的抗原導出抗原專一之活化的淋巴球來製備及使用。

6．根據申請專利範圍第 1 項至第 4 項中任一項之預防的及醫療上的淋巴球，其特徵在於該源自 HLA 配對捐者的淋巴球係藉由製備以抗原刺激經活化及增殖的抗原專一

淋巴球而取得。

7．根據申請專利範圍第4項之預防的及醫療上的淋巴球，其特徵在於該抗原是精製的抗原、一種來自癌細胞或病毒萃取物、一種癌細胞或病毒、或一種可以與癌細胞或病毒交叉反應的抗原物質。

8．根據申請專利範圍第1項至第4項中任一項之預防的及醫療上的淋巴球，其特徵在於該源自HLA配對捐者的淋巴球含有具有排斥傾向（works along the rejective direction）之HLA。

9．根據申請專利範圍第1項至第4項中任一項之預防的及醫療上的淋巴球，其特徵在於該源自HLA配對捐者的淋巴球係收集自具有微嵌合性的捐者。

10．根據申請專利範圍第1項至第4項中任一項之預防的及醫療上的淋巴球，其特徵在於該淋巴球的正確劑量係每公斤體重在 $1 \times 10^3 \sim 5 \times 10^8$ 的範圍內。

11．一種用於預防及治療腫瘤、各種傳染性疾病及自體免疫疾病之預防的及醫療上的調配物，其特徵在於取得源自HLA配對捐者活化之淋巴球。

12．根據申請專利範圍第11項之預防的及醫療上的調配物，其特徵在於藉由懸浮活化的淋巴球及增殖於含人類白蛋白的注入生理鹽溶液中製備。

13．根據申請專利範圍第11或12項之預防的及醫療上的調配物，其特徵在於該淋巴球正確的劑量為每公斤體重在 $1 \times 10^3 \sim 5 \times 10^8$ 的範圍內。

1 4 · 一種調配物製備套組，其特徵在於由源自 HLA 配對捐者的淋巴球及至少用以活化該淋巴球之白血球介素 2 的組合而構成。

1 5 · 一種調配物製備套組，其特徵在於由源自 HLA 配對捐者的淋巴球及至少用以活化該淋巴球之抗-CD3 抗體的組合而構成。

1 6 · 一種製造用於預防及治療腫瘤、各種傳染性疾病及自體免疫疾病之預防及醫療上調配物的方法，其特徵在於包括：

從含源自 HLA 配對捐者的淋巴球之周邊血分離單核細胞的步驟；

分離出之該單核細胞中該源自 HLA 配對捐者的淋巴球係被活化及增殖的步驟；及

被活化及增殖的該淋巴球係經萃取及製備成以該淋巴球為其主要成分之調配物的步驟。

1 7 · 根據申請專利範圍第 1 6 項之製造用於預防及治療腫瘤、各種傳染性疾病及自體免疫疾病之預防及醫療上調配物的方法，其特徵在於：

該淋巴球係經過 3 ~ 14 天持續培養期的增殖，其係藉由使用合併有白血球介素 2 或抗-CD3 抗體之一，或白血球介素 2 及抗-CD3 抗體兩者的培養基。

1 8 · 根據申請專利範圍第 1 6 或 1 7 項之製造用於預防及治療腫瘤、各種傳染性疾病及自體免疫疾病之預防及醫療上調配物的方法，其特徵在於：

培養溶液係以 10% ~ 500% 的比例添加，相對於該 3 ~ 14 天培養期培養基溶液的量，以預防任何該培養溶液之降解及預防任何培養增殖該淋巴球時白血球介素 2 活性的減少。

19. 根據申請專利範圍第 18 項之製造用於預防及治療腫瘤、各種傳染性疾病及自體免疫疾病之預防及醫療上調配物的方法，其特徵在於：

該培養溶液係在該 3 ~ 14 天培養期中每 3 ~ 5 天加一次。

20. 根據申請專利範圍第 19 項之製造用於預防及治療腫瘤、各種傳染性疾病及自體免疫疾病之預防及醫療上調配物的方法，其特徵在於：

各種細胞活素或分裂素係在活化及增殖該淋巴球之培養中加到培養溶液裡。

21. 根據申請專利範圍第 16 項之製造用於預防及治療腫瘤、各種傳染性疾病及自體免疫疾病之預防及醫療上調配物的方法，其特徵在於：

該活化及增殖之源自 HLA 配對捐者的淋巴球係含有 CD4 陽性細胞及 CD8 陽性細胞。

### 拾壹、圖式：

無。

**柒、指定代表圖：**

(一)本案指定代表圖為：第（ 無 ）圖。

(二)本代表圖之元件代表符號簡單說明：

無

**捌、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：**

無