



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本 (11)證書號數：TW I607017 B

(45)公告日：中華民國 106 (2017) 年 12 月 01 日

(21)申請案號：102105556

(22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 02 月 18 日

(51)Int. Cl. : C07K14/54 (2006.01)

C07K14/555 (2006.01)

C12N5/0784 (2010.01)

C07K14/705 (2006.01)

(30)優先權：2012/02/10 日本

2012-027332

(71)申請人：醫療法人社團博心厚生會 (日本) HAKUSHINKOUSEIKAI FOUNDATION (JP)

日本

生命科學研究所有限公司 (日本) LIFE SCIENCE RESEARCH INSTITUTE LTD.

(JP)

日本

(72)發明人：阿部博幸 ABE, HIROYUKI (JP)；川崎廣明 KAWASAKI, HIROAKI (JP)

(74)代理人：蔡坤財；李世章

(56)參考文獻：

US 2006/0002899A1

Chen BD & Clark CR, "Interleukin 3 (IL 3) regulates the in vitro proliferation of both blood monocytes and peritoneal exudate macrophages: synergism between a macrophage lineage-specific colony-stimulating factor (CSF-1) and IL 3", The Journal of Immunology, Vol.137, No.2, p.563~570, 1986

審查人員：施雅儀

申請專利範圍項數：21 項 圖式數：3 共 31 頁

(54)名稱

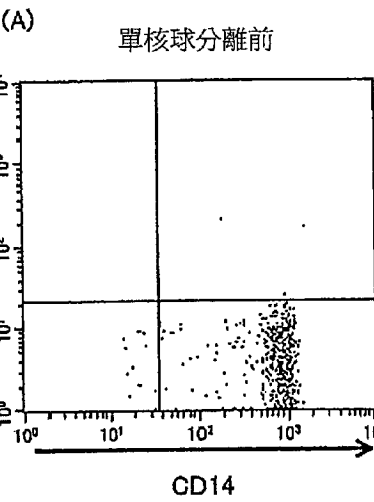
單核球增殖劑、單核球增殖用培養基、單核球之製造方法、樹突細胞之製造方法、及樹突細胞疫苗之製造方法

(57)摘要

本發明的問題在於提供一種可使單核球高效且容易地增殖之手段。為解決上述問題，本發明提供一種單核球增殖劑，該單核球增殖劑係由 Flt-3L、IL-3 或 IFN- γ 之中的一種以上所組成，且於將單核球分化為樹突細胞之處理前使用。又，本發明提供一種單核球增殖用培養基，該單核球增殖用培養基係包含 Flt-3L、IL-3 或 IFN- γ 之中的一種以上，且於將單核球分化為樹突細胞之處理前使用。本發明的單核球增殖用培養基，亦可包含 GM-CSF。

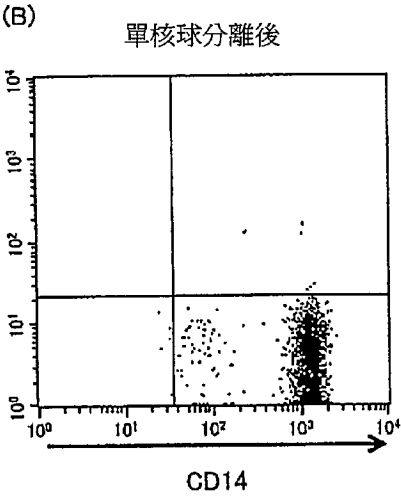
指定代表圖：

第 1 圖



Gated Events:548 Total Events:10000

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	0	0.00	0.00
UR	3	0.55	0.03
LL	11	2.01	0.11
LR	534	97.45	5.34



Gated Events:2951 Total Events:10000

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	0	0.00	0.00
UR	7	0.24	0.07
LL	6	0.20	0.06
LR	2938	99.56	29.38

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】

單核球增殖劑、單核球增殖用培養基、單核球之製造方法、樹突細胞之製造方法、及樹突細胞疫苗之製造方法

【技術領域】

【0001】 本發明係有關於一種單核球增殖劑、單核球增殖用培養基、單核球之製造方法、樹突細胞之製造方法、及樹突細胞疫苗之製造方法。

【先前技術】

【0002】 近年來，在癌症的治療中，開始著眼於使用樹突細胞疫苗。樹突細胞疫苗，係由在來自於疫苗投予對象（例如，癌症患者）之樹突細胞中導入（脈衝）癌抗原後之樹突細胞製備而成，且被投予至疫苗投予對象的體內。由於所投予之樹突細胞向 T 細胞呈獻(提呈，present)癌抗原，經呈獻抗原之 T 細胞(CTL)特異性地攻擊癌細胞，因此，可不損傷體內正常細胞地治療癌

【0003】 然而，製造樹突細胞疫苗時所需的樹突細胞，無法由體內直接分離。因此，樹突細胞係藉由以下方法來獲得：從自疫苗投予對象提取之血液中分離單核球，並使該單核球分化為樹突細胞。

【0004】 作為提取用於製造先前已知的樹突細胞疫苗之單核球之方法，已知一種使用成分采血裝置來分離血液中的白血

球之方法（以下，將該方法稱為「清血法(apheresis)」）。然而，清血法不僅裝置的運用需要花費費用，而且裝置的操作亦需要高度的技術。又，利用清血法，不僅會提取單核球，還會提取包含單核球以外之成分（白血球或紅血球或血小板等）之混合物。因此，在清血法之後，通常進行單核球的分離步驟，以去除紅血球或血小板等除單核球以外之成分。

【0005】 爲了將樹突細胞疫苗應用於臨床，期望在 1 次投予中使用大約 1×10^7 個細胞數量。一般空出一定間隔地對相同的對象進行 8 次左右的清血法，以確保此種細胞數量。又，由於血液中存在之單核球的比例較少，因此，若使用清血法以獲得可足以製造樹突細胞疫苗之充分量的單核球，則須使血液在清血裝置內循環來充分提取白血球成分，但這在體力上或時間上將對患者造成非常大的負擔。因此，在清血法中，若患者的病情驟變，可能不得不中途中斷清血法，並放棄樹突細胞疫苗療法。又，當利用清血法來提取單核球的成分時，雖然通常可製作 5～8 批左右的樹突細胞疫苗，但所得到之樹突細胞疫苗的實際量，係根據患者的血液狀態等而變動。

【0006】 又，在自手臂等提取末梢血液等先前的采血方法中，雖然患者的負擔較輕，但存在以下缺點，即直接利用先前方法使所得到之單核球分化爲樹突細胞，亦無法獲得充分量的細胞數量。因此，由末梢血液的采血所獲得之單核球來製作充分細胞數量的樹突細胞疫苗，在該過程中使單核球增殖成爲一課題，期望一種克服該課題之技術。又，在此種技術中，考慮到樹突細胞疫苗的投予間隔，樹突細胞疫苗的製

作期間，更期望為可以 2 周左右製作。

【0007】 因此，為解決上述課題，考慮到使自血液中分離之單核球在體外增殖。作為此種方法，在專利文獻 1 中，揭示有以下事項：在阻礙單核球中的特定物質之表現之狀態下，培養單核球。然而，此方法需要重組體的製作步驟、和較長的培養時間。

[先行技術文獻]

(專利文獻)

【0008】 專利文獻 1：日本特表 2010-515442 號公報

【發明內容】

【0009】 [發明所欲解決之問題]

本發明的目的在於提供一種可使單核球高效且容易地增殖之手段。

【0010】 [解決問題之技術手段]

本發明人發現，參與造血幹細胞的增殖等之特定的細胞激素(cytokine)可高效地增殖單核球，從而完成本發明。具體而言，本發明提供如下者。

【0011】 (1)一種單核球增殖劑，其係由 Flt-3L、IL-3 或 IFN- γ 之中的一種以上所組成，且於將單核球分化為樹突細胞之處理前使用。

【0012】 (2)一種單核球增殖用培養基，其包含 Flt-3L、IL-3 或 IFN- γ 之中的一種以上，且於將單核球分化為樹突細胞之處理前使用。

【0013】 (3)如第(2)項所述之單核球增殖用培養基，其中，包

含 GM-CSF。

【0014】 (4)一種單核球之製造方法，其包含增殖步驟，該增殖步驟係藉由在如第(2)或(3)項所述之單核球增殖用培養基中培養，來使原料單核球增殖。

【0015】 (5)如第(4)項所述之單核球之製造方法，其中，使用包含單核球及除單核球以外之白血球成分之混合物，作為上述原料單核球。

【0016】 (6)如第(4)或(5)項所述之單核球之製造方法，其中，在上述增殖步驟之前，包含降低步驟，該降低步驟係降低體液中的除單核球以外之成分的含率，以獲得上述原料單核球。

【0017】 (7)如第(6)項所述之單核球之製造方法，其中，使用磁珠來進行上述降低步驟，該磁珠對於上述原料單核球中的單核球及除單核球以外之白血球成分、血漿、紅血球中的至少一個，具有高於其他成分的親和性。

【0018】 (8)如第(6)或(7)項所述之單核球之製造方法，其中，由 100 mL 以下的末梢血液，來獲得上述原料單核球。

【0019】 (9)如第(6)至(8)項中的任一項所述之單核球之製造方法，其中，不包含冷凍保存步驟，該冷凍保存步驟係將上述單核球冷凍保存。

【0020】 (10)一種樹突細胞之製造方法，其包含：

單核球製造步驟，其係利用如第(4)至(9)項中的任一項所述之單核球之製造方法，來製造單核球；及，

分化步驟，其係使上述單核球製造步驟中所得之單核

球分化為樹突細胞。

【0021】 (11)如第(10)項所述之樹突細胞之製造方法，其中，在上述分化步驟中，上述單核球係在包含 Flt-3L、IL-3 或 IFN- γ 之中的一種以上之培養基中培養。

【0022】 (12)如第(10)或(11)項所述之樹突細胞之製造方法，其中，包含使上述樹突細胞脈衝之脈衝步驟。

【0023】 (13)一種樹突細胞疫苗之製造方法，其包含：

樹突細胞製造步驟，其係利用如第(10)至(12)項中的任一項所述之樹突細胞之製造方法，來製造樹突細胞；及，

製備步驟，其係將上述樹突細胞製造步驟中所得之樹突細胞製備成樹突細胞疫苗。

【0024】 (14)如第(13)項所述之樹突細胞疫苗之製造方法，其中，不包含冷凍保存步驟，該冷凍保存步驟係將上述單核球及上述樹突細胞中的至少一方冷凍保存。

【0025】 (15)如第(13)或(14)項所述之樹突細胞疫苗之製造方法，其中，上述原料單核球係利用自上述樹突細胞疫苗的投予對象提取之體液而獲得。

【0026】 (發明之效果)

根據本發明，可提供一種可使單核球高效且容易地增殖之手段。

【圖式簡單說明】

【0027】 第 1(A)圖係表示將單核球自末梢血液分離之前的細胞樣本(3×10^5 cells)中所包含之單核球數量之圖。

第 1(B)圖係表示將單核球自末梢血液分離之後的細胞樣

本(3×10^5 cells)中所包含之單核球數量之圖。

第 2 圖是表示在本發明的一實施方式之單核球增殖劑的存在下培養 3 天後，將單核球培養 11 天並分化為樹突細胞時的細胞數量的歷時變化之圖。

第 3(A)圖係表示利用本發明的單核球增殖劑而增殖之單核球分化為成熟樹突細胞之圖。

第 3(B)圖係表示利用本發明的單核球增殖劑而增殖之單核球分化為成熟樹突細胞之圖。

第 3(C)圖係表示在(A)及(B)中所得之成熟樹突細胞具有抗原呈獻功能之圖。

【實施方式】

【0028】 以下，說明本發明的實施方式，但並非意圖限定本發明。

【0029】 < 單核球增殖劑 >

本發明的單核球增殖劑，係由 Flt-3L、IL-3 或 IFN- γ 中的一種以上所組成，且於將單核球分化為樹突細胞之處理前使用。再者，本發明的單核球增殖劑的使用態樣並無特別限定，通常認為能以下形態來使用：添加至可培養單核球之培養基中、或預混為培養基的成分。

【0030】 「將單核球分化為樹突細胞之處理」係指在使單核球分化為樹突細胞的適宜的條件下，即在指定量的特定細胞激素（GM-CSF、IL-4、及 IL-6 等）的存在下，來培養單核球。已知在分化處理的過程中，單核球數量雖然亦有所增加，但本發明的單核球增殖劑並非在該分化處理中使用，而係在前

一階段中使用。

【0031】 關於上述各細胞激素，使單核球分化為樹突細胞之量，係指在包含該量的細胞激素之培養基中，在 37℃、5%的 CO₂ 的條件下培養 6 天，此時全部細胞數量中的樹突細胞的數量為 20%以上之量，具體的量係根據培養基的成分和培養條件而不同。

【0032】 根據本發明的單核球增殖劑，在供上述分化處理之前，可使單核球增殖，直至足以製造樹突細胞疫苗的量（例如， $10^6 \sim 10^7$ cells/mL 以上），由於無需多次重複單核球的培養步驟以製造樹突細胞疫苗，因此較為容易。

【0033】 Flt-3L(Flt3-Ligand)、IL-3（介白素(interleukin)-3）、及 IFN- γ （干擾素(interferon)- γ ），已知是作為參與造血幹細胞的增殖等之細胞激素，經本申請案發明人檢討，結果驚奇地發現，可有效地使單核球增殖。

【0034】 (Flt-3L)

用以使單核球增殖之適宜的 Flt-3L 的量並無特別限定，在單位可培養單核球之培養基中，可為 100～10000 IU/mL，較佳為 1000～5000 IU/mL，最佳為 1000～3000 IU/mL。

【0035】 (IL-3)

用以使單核球增殖之適宜的 IL-3 的量並無特別限定，在單位可培養單核球之培養基中，可為 100～10000 IU/mL，較佳為 100～5000 IU/mL，最佳為 500～3000 IU/mL。

【0036】 (IFN- γ)

用以使單核球增殖之適宜的 IFN- γ 的量並無特別限定，

在單位可培養單核球之培養基中，可為 1～1000 ng/mL，較佳為 1～500 ng/mL，最佳為 1～50 ng/mL。

【0037】 本發明的單核球增殖劑可單獨使用 Flt-3L、IL-3 或 IFN- γ 中的任一種，或組合 2 種以上使用。如上所述，由於 Flt-3L、IL-3 及 IFN- γ 具有類似的功能，因此，可預想即使組合使用，亦不會阻礙彼此的功能。當組合該等中的 2 種以上時，各個細胞激素的調配量可在上述範圍內，或少於上述範圍。

【0038】 利用本發明的單核球增殖劑而增殖之細胞是否為單核球，係藉由利用流動式細胞測量術(flow cytometry)，解析所得到之細胞的細胞表面標誌(cell surface marker)來確認。作為單核球的細胞表面的標誌，可列舉 CD14 等。具有此種標誌之細胞，則可認為係單核球。

【0039】 <單核球增殖用培養基>

本發明的單核球增殖用培養基，包含 Flt-3L、IL-3 或 IFN- γ 之中的一種以上，且於將單核球分化為樹突細胞之處理前使用。具體而言，單核球增殖用培養基，進而可包含可用於培養單核球之營養成分、pH 調整劑等。作為包含相關成分之培養基，並無特別限定，可列舉淋巴球用無血清合成培養基、AIM-V、及 RPMI-1640 等。再者，本說明書中的「培養基」，不僅包含經液化之已製備之形態，亦包含製備前的成分混合物（通常為粉狀體）。

【0040】 本發明的單核球增殖用培養基，進而亦可包含參與單核球的分化之細胞激素（GM-CSF(Granulocyte Macrophage

Colony-Stimulating Factor; 顆粒單核球群落刺激生長因子))。

【0041】 單核球存在以下傾向：於 GM-CSF 的存在下，分化為巨噬細胞；於 GM-CSF 及 IL-4 的存在下，易分化為樹突細胞。然而，經本發明者檢討，結果發現，若利用包含 GM-CSF 之本發明的單核球增殖用培養基，可顯著促進單核球的增殖。雖然 GM-CSF 本身具有單核球的增殖效果係先前已知，但若利用包含 GM-CSF 之本發明的單核球增殖用培養基，可顯著促進單核球的增殖，而不會使單核球分化。又，亦可向本發明的單核球增殖用培養基中，加入 GM-CSF，進而包含未達使單核球分化為樹突細胞之量（例如，500～2,000 IU/mL）的 IL-4。本發明的單核球增殖用培養基中所包含之 GM-CSF，可列舉 500～2,000 IU/mL 的範圍。

【0042】 本發明的單核球增殖用培養基中，亦可包含細胞培養中通常所使用之試劑。作為此種試劑，可列舉抗生物質（建他黴素 (gentamicin)、康黴素 (kanamycin) 等）、白蛋白 (albumin)、及血清（胎牛血清等）等。又，本發明的單核球增殖用培養基中，亦可包含來自於活體（例如，人類、豬、牛、馬、山羊、綿羊、兔、袋鼠、及猴等哺乳類動物）之自體血漿（即，意味著欲增殖之單核球與自體血漿係由相同活體獲得）。又，本發明的單核球增殖用培養基中，亦可包含溶鏈菌氯化物 (picibanil chloride)、前列腺素 (prostaglandin)E2(PGE2)等，以促進對樹突細胞的分化誘導。

【0043】 <單核球之製造方法>

本發明的單核球之製造方法包含增殖步驟，該增殖步驟

係藉由在本發明的單核球增殖用培養基中培養，來使原料單核球增殖。

【0044】 （增殖步驟）

作為本發明中的增殖步驟所使用之條件，並無特別限定，自在許多單核球開始分化之前使單核球增殖之觀點來看，可在 30～40℃、2～8%的 CO₂ 的條件下培養。培養時間可根據所需之單核球的量而適當調整，亦可為 3～20 天、3～18 天、3～14 天、及 3～10 天。培養中，可利用先前公知的方法，適當進行培養基交換。

【0045】 根據本發明的單核球之製造方法，可以例如 14 天之較短的培養時間，使原料單核球中的單核球增殖至可臨床使用之級別（例如， $10^6 \sim 10^7$ cells/mL 以上）。可臨床使用之級別，係指當將使增殖之單核球分化之樹突細胞製備成樹突細胞疫苗時，所得到之樹突細胞疫苗可直接作為非冷凍處理疫苗使用之級別。

【0046】 在本發明的單核球之製造方法中，以在本發明的單核球增殖用培養基中培養單核球，亦即對單核球的負荷較少的條件，使單核球增殖。因此，根據本發明的單核球之製造方法，可期待以較高的活細胞率（例如，超過 90%）獲得單核球。

【0047】 （原料單核球）

本發明中的原料單核球，係包含單核球之樣本(試料)。原料單核球，可僅由單核球組成，又，由於根據本發明的單核球之製造方法可使單核球選擇性地高效地增殖，因此，亦可

為包含單核球、與除單核球以外之白血球成分（例如，淋巴球、NK 細胞、及 NKT 細胞）之混合物。此混合物亦可進而包含血漿、紅血球。作為混合物，亦可為主要包含單核球及淋巴球之單核球組分，該組分係利用密度梯度離心分離法 (density-gradient centrifugation) 等自血液等體液的樣本獲得。

【0048】 （降低步驟）

在上述增殖步驟之前，較佳為進行降低步驟，該降低步驟，係降低體液中的除單核球以外之成分的含率，以獲得上述原料單核球。可用以下方法來進行降低，例如：使用磁珠之方法、密度梯度離心法、僅將體液中的成分中的單核球黏結於培養皿以分離單核球之方法、或該等方法的組合等。

【0049】 自可容易且高產率地收回單核球、且對單核球損傷較小之點而言，較佳為使用磁珠。此磁珠對於原料單核球中的單核球及除單核球以外之白血球成分、血漿、紅血球中的至少一個（較佳為全部），具有高於其他成分的親和性。所述磁珠可具有以下結構：在帶有磁性之載體上，結合有對欲分離之物質之抗體等。又，對將體液密度梯度離心所得到之單核球組分(components)，進行利用磁珠之處理，自進一步提高單核球的產率之點而言較佳。

【0050】 若使用對單核球具有高親和性之磁珠，則主要可自體液中分離單核球（稱為單核球的陽性選擇）。藉由利用先前公知的方法將磁珠自經分離之單核球取出，而獲得原料單核球。此態樣自所準備之磁珠的種類較少之方面而言較為有利，但需將磁珠自單核球中取出之步驟，恐怕多少會損傷單

核球。

【0051】 若使用對除單核球以外之白血球成分、血漿、紅血球中的至少一個具有高親和性之磁珠，則可自體液中將除單核球以外之成分移除（稱為單核球的陰性選擇）。其結果為，可獲得主要包含單核球之原料單核球。此態樣自所準備之磁珠的種類較多之方面而言可能不利，但無需將磁珠自單核球中取出之步驟，自可確實獲得優質的單核球之方面而言較佳。進行單核球的陰性選擇之樣本，可為將體液密度梯度離心所得到之單核球組分。此時，使用對淋巴球具有高親和性之磁珠。

【0052】 當使用磁珠時，可使用磁性細胞分離裝置。磁性細胞分離裝置，係藉由將血液等體液的樣本與磁珠等試劑，一起放置於裝置內，基於特定的程式，將單核球自體液分離。使用此種裝置，自可迅速且高產率地將單核球自體液分離之方面而言較佳。若高產率地分離單核球，則可顯著提高由本發明的單核球增殖劑所實施之單核球的增殖效率。

【0053】 作為本發明中適宜的磁性細胞分離裝置，可列舉例如「RoboSep(商標)」(股份有限公司 Veritas)等。

【0054】 (體液)

作為用於獲得原料單核球之樣本，可列舉血液或脊髓液等體液。血液係提取自活體（例如，人類癌症患者），可列舉末梢血液、臍帶血等。其中，自減輕被提取者的負擔之觀點來看，較佳為末梢血液。作為體液的提取方法並無特別限定，可使用利用注射器、蝴蝶針等自手臂、手腕、及腳等部

位提取之方法等。在本發明的單核球之製造方法中，由於所使用之體液的量可較少，因此，相較於先前所使用之清血法等方法，提取體液時對活體之負擔（費用、時間等）明顯較少。

【0055】 先前，自活體提取大量的血液，例如 300～400 mL，以製造樹突細胞疫苗。然而，根據本發明的單核球之製造方法，所使用之體液的量可較少，如 100 mL 以下、90 mL 以下、80 mL 以下、70 mL 以下、60 mL 以下、50 mL 以下、40 mL 以下、35 mL 以下、30 mL 以下、25 mL 以下、20 mL 以下、15 mL 以下、10 mL 以下、5 mL 以下、1 mL 以下、及 0.5 mL 以下。體液量的下限並無特別限定，可為例如 0.1 mL 以上。

【0056】 利用本發明的單核球之製造方法所得到之單核球，可直接經過分化步驟而分化為樹突細胞，亦可利用先前公知的方法冷凍保存。經冷凍保存之單核球，在解凍後，可供單核球的分化步驟。然而，自預防可分化之單核球的損失之觀點來看，較佳為不冷凍保存單核球。在本發明中，由於無需進行多次單核球的培養以獲得可供分化步驟之單核球，因此，可供單核球的分化步驟，而不冷凍保存單核球。

【0057】 < 樹突細胞之製造方法 >

本發明的樹突細胞之製造方法包含：單核球製造步驟，其係利用本發明的單核球之製造方法，來製造單核球；及，分化步驟，其係使上述單核球製造步驟中所得之單核球分化為樹突細胞。

【0058】 （分化步驟）

使單核球分化為樹突細胞之方法自身，為先前公知。即，若在包含例如 IL-4 等之分化用培養基中培養單核球，則單核球分化為未成熟樹突細胞。若在包含 TNF- α 等之培養基中培養所得到之未成熟樹突細胞，則未成熟樹突細胞分化為成熟樹突細胞。本發明中的樹突細胞，包含未成熟樹突細胞或成熟樹突細胞之兩者。

【0059】 在本發明的分化步驟中，較佳為使用包含 Flt-3L、IL-3 或 IFN- γ 之中的一種以上的培養基。藉此，可一邊使單核球增殖一邊分化為樹突細胞，可獲得更多的樹突細胞。然而，當增殖步驟中所得之單核球的數量充分、或所需之樹突細胞的數量並不多時，亦可不使用包含上述成分之培養基。

【0060】 （脈衝步驟）

向所得到之未成熟樹突細胞或成熟樹突細胞中，導入（脈衝）自癌細胞提取之物質（肽(peptide)等）或癌特異性抗原、人工抗原等，藉此，可獲得可呈獻所需抗原之樹突細胞。再者，脈衝步驟亦可在製造樹突細胞之過程中進行，亦可如後所述地在樹突細胞的製造後的疫苗製備的過程中進行。

【0061】 作為脈衝的方法，並無特別限定，可向樹突細胞中導入所需的抗原之方法即可，可列舉將樹突細胞與所需的抗原一起培養之方法等。一般，由於未成熟樹突細胞的抗原的易導入度高於成熟樹突細胞，因此，較佳為對未成熟樹突細胞進行脈衝。

【0062】 所得到之細胞是否為樹突細胞，係藉由利用流動式細胞測量術，解析樹突細胞的細胞表面標誌來確認。作為樹

突細胞的細胞表面的標誌，可列舉 CD83 等。具有此種標誌之細胞，可認為係樹突細胞。

【0063】 利用本發明的樹突細胞之製造方法所得到之樹突細胞是否具有抗原呈獻功能，係藉由利用流動式細胞測量術，解析樹突細胞的細胞表面標誌來確認。作為具有抗原呈獻功能之樹突細胞的細胞表面的標誌，可列舉 MHC class I 分子 (HLA-A、B、C)、及 MHC class II 分子 (HLA-DR) 等。具有此種標誌之樹突細胞，可認為具有抗原呈獻功能。

【0064】 < 樹突細胞疫苗之製造方法 >

本發明的樹突細胞疫苗之製造方法包含：樹突細胞製造步驟，其係利用本發明的樹突細胞之製造方法，來製造樹突細胞；及，製備步驟，其係將上述樹突細胞製造步驟中所得之樹突細胞製備成樹突細胞疫苗。

【0065】 （製備步驟）

將樹突細胞製備成樹突細胞疫苗之方法並無特別限定，可列舉將樹突細胞與普通的疫苗製劑中的處方藥劑（生理鹽水、林格氏(Ringer)溶液等）混合之方法。又，當使用未經過脈衝步驟之樹突細胞時，對樹突細胞進行脈衝步驟。

【0066】 本發明的樹突細胞疫苗之製造方法亦可不包含冷凍保存步驟，該冷凍保存步驟係將單核球及樹突細胞中的至少一種冷凍保存。在本發明的樹突細胞疫苗之製造方法中，由於可在短期間內獲得足以製造樹突細胞疫苗之充分量的單核球或樹突細胞，因此，可適時製備，而無需貯存單核球或樹突細胞。因此，可將視需要製造之單核球或樹突細胞提供至

樹突細胞疫苗的製造，而並不冷凍保存。藉此，可避免可能由冷凍而產生之細胞的損傷、或樹突細胞的抗原呈獻功能的降低。

【0067】 所得到之樹突細胞疫苗可利用皮內注射等先前已知的方法，而投予至活體。

【0068】 原料單核球，較佳為由自樹突細胞疫苗的投予對象提取之體液而獲得。藉由使用來自於樹突細胞疫苗的投予對象之原料單核球，可獲得有害的副作用較少的樹突細胞疫苗。然而，只要容許因投予樹突細胞疫苗而可產生免疫反應，亦可使用自非投予對象提取之體液。

【0069】 [實施例]

以下，基於實施例來說明本發明，但本發明並不限定於下述實施例。

【0070】 < 實施例 1：單核球的分離 >

自 3 名癌症患者的手臂中，提取 25 mL 末梢血液。分別使用聚蔗糖 (Ficoll) 溶液（通用電氣醫療日本公司 (GE Healthcare Japan Corporation)），對此末梢血液進行密度梯度離心，而獲得單核球組分的細胞。將所得到之單核球組分的細胞放置於磁性細胞分離裝置（商品名；RoboSep，股份有限公司 Veritas），並按照單核球分離用所設定之程式，分離 CD14⁺ 單核球、及 CD16⁺ 單核球。

【0071】 對於分離單核球之前的末梢血液、及將單核球自末梢血液分離後的樣本，按照下述的條件，測量各樣本中的單核球數量。

對於各樣本中的 3×10^5 cells 的細胞，利用流動式細胞測量術解析細胞表面的標誌。再者，使用單核球的標誌即 CD14，來作為標誌。結果示於第 1 圖。如第 1 圖所示，比較分離單核球之前(A)與分離之後(B)，可知藉由分離步驟，樣本中的單位細胞數量的單核球的個數（分離前：534 個，分離後：2938 個）顯著增加，可獲得單核球濃縮之樣本。

【0072】 < 實施例 2：單核球的增殖 >

按照下述的條件，在包含本發明的單核球增殖劑（本例中使用 Flt-3L）之單核球增殖用培養基中，培養按照上述的方法分離之癌症患者的單核球（CD14⁺單核球、及 CD16⁺單核球）。

【0073】 （單核球增殖用培養基的組成）

淋巴球用無血清合成培養基（X-VIVO 15，寶生物工程股份有限公司(TAKATA BIO INC)）

Flt-3L（Cellgenix 公司）2000 IU/mL

GM-CSF（Miltenyi Biotec 公司）1000 IU/mL

建他黴素 50 ng/mL

5%自體血漿（自各癌症患者所得到之血漿）

【0074】 向上述單核球增殖用培養基中，加入經分離之單核球，使單位培養基中單核球為 2×10^5 cells/mL，在 37℃、5%的 CO₂ 的條件下培養 3 天。在培養第 4 天時，以實施例 3 中的單核球分化用培養基(1)培養 8 天。在培養第 12 日時，以實施例 3 中的單核球分化用培養基(1)培養 3 天。即，培養期間合計為 14 天。

【0075】 將培養開始時間點、培養 3 天後、培養 6 天後、培養 11 天後及培養 14 天後的各時間點的單核球收回，進行錐藍(trypan blue)染色，利用顯微鏡觀察，測量細胞數量。結果示於第 2 圖。如第 2 圖所示，於培養第 3 天的時間點，單核球增殖至 2×10^6 cells/mL 左右。於此時間點，可供分化步驟。進而，在分化步驟中，亦可期待藉由在本發明的單核球增殖劑的存在下培養，來獲得 10^7 cells/mL 以上的樹突細胞。

【0076】 < 實施例 3：單核球的分化 >

按照下述的條件，培養上述中所得之單核球。

【0077】 (單核球分化用培養基(1)的組成)

向單核球增殖用培養基中，加入 1000 IU 的 IL-4 (Miltenyi Biotec 公司)，藉此，來製備用於使單核球分化為未成熟樹突細胞之培養基。以下，將此培養基稱為「單核球分化用培養基(1)」。

【0078】 (單核球分化用培養基(2)的組成)

向單核球分化用培養基(1)中，進而加入下述成分，藉此，來製備用於使未成熟樹突細胞分化為成熟樹突細胞之培養基。以下，將此培養基稱為「單核球分化用培養基(2)」。

IL-1 β (Miltenyi Biotec 公司) 10 ng/mL

IL-6 (Miltenyi Biotec 公司) 1000 IU/mL

PGE2 (Cayman Chemical 公司) 1 μ g/mL

TNF- α (Miltenyi Biotec 公司) 20 ng/mL

0.1KE 溶鏈菌氯化物 (中外製藥)

建他黴素 50 ng/mL

5%自體血漿（自各癌症患者所得到之血漿）

【0079】 將增殖後之單核球（即，在實施例 2 的條件下培養第 3 天所得到之單核球），在單核球分化用培養基(1)中，以與單核球的增殖相同的條件培養 8 天，使其分化為未成熟樹突細胞。於 8 天的培養的結束時間點，加入抗原肽來進行脈衝。

【0080】 將所得到之未成熟樹突細胞，在單核球分化用培養基(2)中，以與單核球的增殖相同的條件培養 3 天，使其分化為成熟樹突細胞。

【0081】 對於所得到之成熟樹突細胞，利用流動式細胞測量術來解析細胞表面的標誌。再者，使用成熟樹突細胞的標誌即 CD83、及單核球的標誌即 CD14，作為標誌。結果示於第 3(A)圖。又，使用成熟樹突細胞的標誌即 CD83 來作為標誌，利用流動式細胞測量術，來解析所得到之成熟樹突細胞的數量。結果示於第 3(B)圖。如第 3(A)圖及第 3(B)圖所示，根據分化後的細胞中不存在表現 CD14 之細胞（即單核球），但存在表現 CD83 之細胞（即成熟樹突細胞），可知單核球分化為成熟樹突細胞。

【0082】 又，使用 MHC class I 分子(HLA-A、B、C)、及 MHC class II 分子(HLA-DR)作為標誌，利用流動式細胞測量術，來解析所得到之成熟樹突細胞的抗原呈獻功能。結果示於第 3(C)圖。如第 3(C)圖所示，可知所得到之成熟樹突細胞表現出 MHC class I 分子及 MHC class II 分子，具有抗原呈獻功能。

【0083】 < 實施例 4：關於各種細胞激素對單核球增殖之影

響之檢討＞

按照下述的條件，檢討本發明的單核球增殖劑（Flt-3L、IL-3 或 IFN- γ ）及各種細胞激素（SCF、IFN- α 或 IFN- β ）對單核球增殖之影響。

【0084】 將按照實施例 1 所述之方法分離之單核球加入至 96 孔培養皿內，使培養基中的單核球為 1×10^3 cells/well，在 37℃、5%的 CO₂ 的條件下培養 6 天。再者，該培養基的組成如下所述。

（培養基組成）

淋巴球用無血清合成培養基（X-VIVO 15，寶生物工程股份有限公司）

依據表 1 的基質(matrix)組合之細胞激素（各細胞激素的使用量如下所述）

2000 IU/mL Flt-3L

1000 IU/mL IL-3

10 ng/mL IFN- γ

10 ng/mL SCF

10 ng/mL IFN- α

10 ng/mL IFN- β

1000 IU/mL GM-CSF

1000 IU/mL IL-4

再者，表 1 中，「增殖因子」係本發明的單核球增殖劑（Flt-3L、IL-3 或 IFN- γ ）及各種細胞激素（SCF、IFN- α 及 IFN- β ）的統稱。

【0085】 在顯微鏡下，目測培養結束後的細胞數量，與「未添加增殖因子」且「未添加 GM-CSF 及 IL-4」的條件的結果相比較地，判定各種細胞激素對單核球增殖之影響。結果示於表 1。再者，判定基準如下所述。

- ±：無變化
- ＋：稍微促進單核球的增殖
- ＋＋：促進單核球的增殖
- ＋＋＋：顯著促進單核球的增殖

【0086】 [表 1]

	未添加GM-CSF 及IL-4	添加GM-CSF	添加GM-CSF 及IL-4
未添加增殖因子	－	＋＋	＋＋
添加Flt-3L	＋	＋＋＋	＋＋＋
添加IL-3	＋	＋＋＋	＋＋＋
添加IFN- γ	＋	＋＋＋	＋＋＋
添加SCF	±	±	±
添加IFN- α	±	±	±
添加IFN- β	±	±	±

【0087】 如表 1 所示，依據本發明的單核球增殖劑（Flt-3L、IL-3 或 IFN- γ ），可促進單核球的增殖。又，藉由加入本發明的單核球增殖劑，進而組合 GM-CSF，可顯著促進單核球的增殖。

【0088】 <實施例 5：關於單核球的活細胞率之檢討>

依據下述的條件，檢討樹突細胞的活細胞率，該樹突細胞係藉由使利用本發明的單核球增殖劑而增殖之單核球分化而得。

【0089】 自 20 名癌症患者的手臂中，提取約 25 mL 末梢血

液。與實施例 1 同樣地，自所得之末梢血液分離單核球。繼而，與實施例 2 同樣地，使單核球增殖，與實施例 3 同樣地使，所得之單核球分化為成熟樹突細胞。

【0090】 針對所得之成熟樹突細胞，進行錐藍染色，測量總細胞數（所得之成熟樹突細胞的總數）與活細胞率。結果示於表 2。再者，基於下式來計算活細胞率。

活細胞率(%) = 活細胞的總數（未染色細胞的數量）/ 總細胞數（染色細胞的數量與未染色細胞的合計數量）×100

【0091】 [表 2]

	總細胞數($\times 10^7$)	活細胞率
患者 1	1.05	97.2%
患者 2	1.09	96.5%
患者 3	1.10	97.0%
患者 4	1.15	97.0%
患者 5	1.03	97.0%
患者 6	1.01	97.3%
患者 7	1.03	98.1%
患者 8	1.04	97.3%
患者 9	1.23	97.5%
患者 10	1.04	97.7%
患者 11	1.06	97.9%
患者 12	1.17	96.7%
患者 13	1.10	98.7%
患者 14	1.14	97.8%
患者 15	1.07	97.1%
患者 16	1.12	97.1%
患者 17	1.03	97.9%
患者 18	1.05	98.2%
患者 19	1.11	96.7%
患者 20	1.02	97.8%

【0092】 如表 2 所示，根據本發明，可期待穩定地獲得 1.0×10^7 以上的細胞數量、及約 97% 以上的活細胞。

【符號說明】

無

【生物材料寄存】

國內寄存資訊【請依寄存機構、日期、號碼順序註記】

無

國外寄存資訊【請依寄存國家、機構、日期、號碼順序註記】

無

【序列表】 (請換頁單獨記載)

無

發明摘要

※ 申請案號：102105556

※ 申請日：2013 年 2 月 18 日

※IPC 分類：

C07K 14/54 (2006.01)

C07K 14/555 (2006.01)

C12N 5/0784 (2010.01)

C07K 14/705 (2006.01)

【發明名稱】

單核球增殖劑、單核球增殖用培養基、單核球之製造方法、樹突細胞之製造方法、及樹突細胞疫苗之製造方法

【中文】

本發明的問題在於提供一種可使單核球高效且容易地增殖之手段。為解決上述問題，本發明提供一種單核球增殖劑，該單核球增殖劑係由 Flt-3L、IL-3 或 IFN- γ 之中的一種以上所組成，且於將單核球分化為樹突細胞之處理前使用。又，本發明提供一種單核球增殖用培養基，該單核球增殖用培養基係包含 Flt-3L、IL-3 或 IFN- γ 之中的一種以上，且於將單核球分化為樹突細胞之處理前使用。本發明的單核球增殖用培養基，亦可包含 GM-CSF。

【英文】

無

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第 1 圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

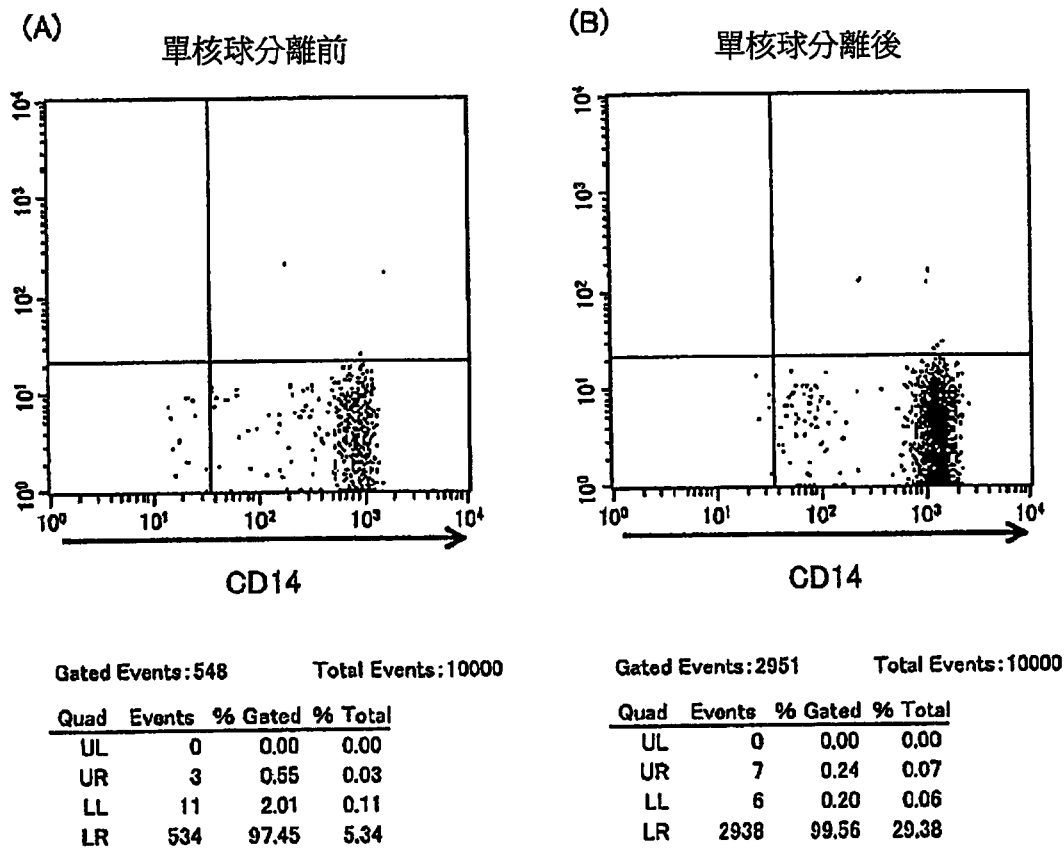
無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

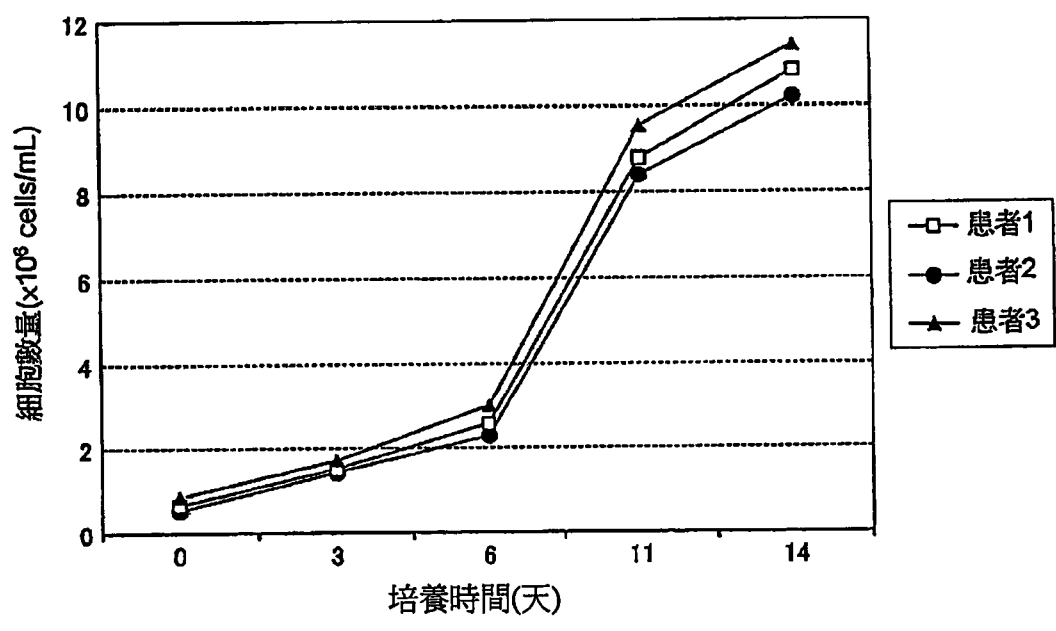
無

圖式

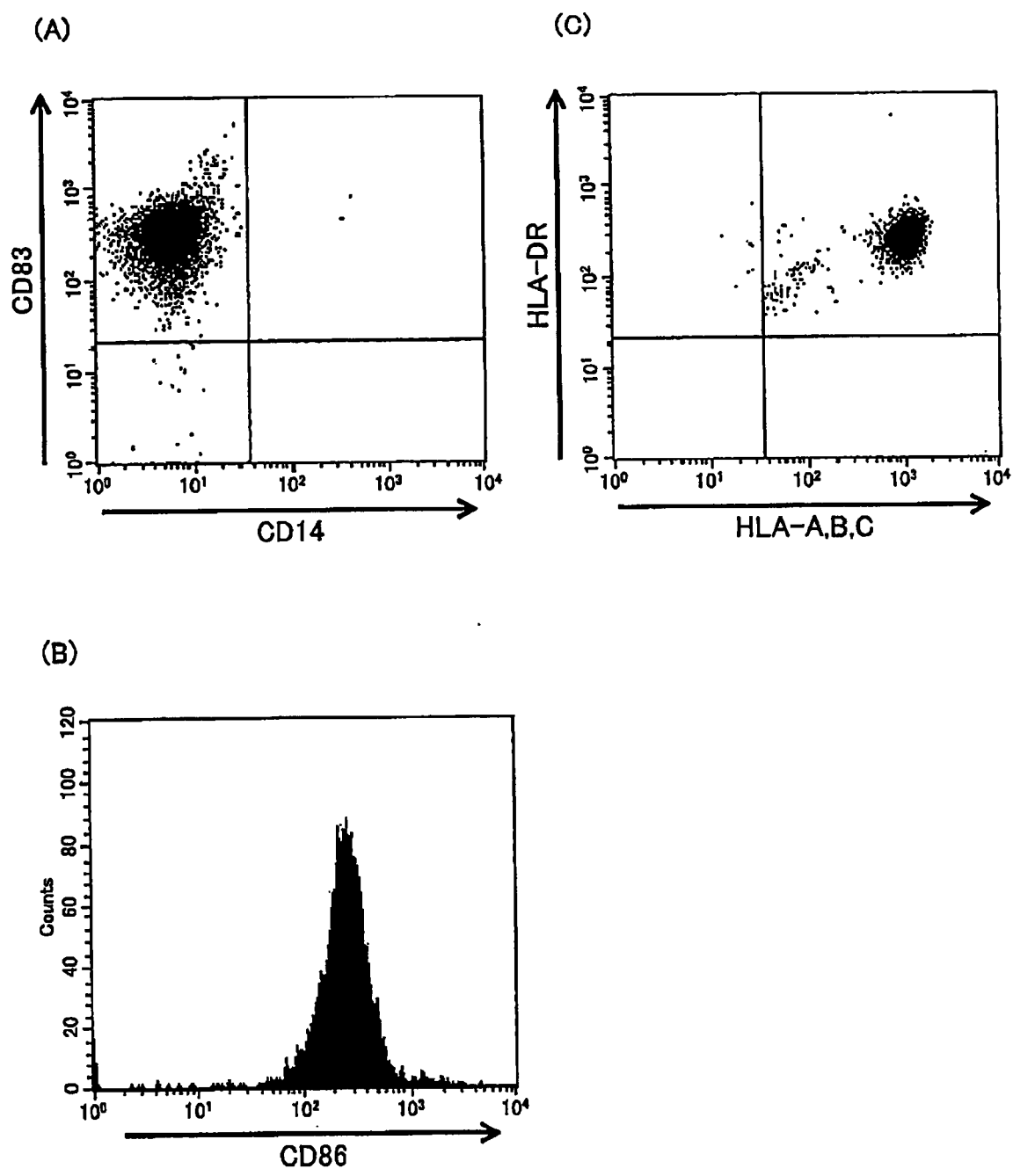
第 1 圖



第 2 圖



第 3 圖



發明摘要

※ 申請案號：102105556

※ 申請日：2013 年 2 月 18 日

※IPC 分類：

C07K 14/54 (2006.01)

C07K 14/555 (2006.01)

C12N 5/0784 (2010.01)

C07K 14/705 (2006.01)

【發明名稱】

單核球增殖劑、單核球增殖用培養基、單核球之製造方法、樹突細胞之製造方法、及樹突細胞疫苗之製造方法

【中文】

本發明的問題在於提供一種可使單核球高效且容易地增殖之手段。為解決上述問題，本發明提供一種單核球增殖劑，該單核球增殖劑係由 Flt-3L、IL-3 或 IFN- γ 之中的一種以上所組成，且於將單核球分化為樹突細胞之處理前使用。又，本發明提供一種單核球增殖用培養基，該單核球增殖用培養基係包含 Flt-3L、IL-3 或 IFN- γ 之中的一種以上，且於將單核球分化為樹突細胞之處理前使用。本發明的單核球增殖用培養基，亦可包含 GM-CSF。

【英文】

無

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第 1 圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無

申請專利範圍

1. 一種由 Flt-3L、IL-3 或 IFN- γ 之中的一種以上所組成之物作為單核球增殖劑之用途，該單核球增殖劑是在將單核球分化為樹突細胞之處理前使用。
2. 一種包含 Flt-3L、IFN- γ 或 100~10000 IU/mL 的 IL-3 之中的一種以上之物作為單核球增殖用培養基之用途，該單核球增殖用培養基是在將單核球分化為樹突細胞之處理前使用。
3. 如請求項 2 所述之用途，其中，該單核球增殖用培養基包含 GM-CSF。
4. 一種單核球之製造方法，其包含增殖步驟，該增殖步驟係藉由在如請求項 2 或 3 所述之用途的單核球增殖用培養基中培養，來使原料單核球增殖。
5. 如請求項 4 所述之單核球之製造方法，其中，使用包含單核球及除單核球以外之白血球成分之混合物，作為前述原料單核球。
6. 如請求項 4 所述之單核球之製造方法，其中，在前述增殖步驟之前，包含降低步驟，該降低步驟係降低體液中的除單核球以外之成分的含率，以獲得前述原料單核球。

7. 如請求項 5 所述之單核球之製造方法，其中，在前述增殖步驟之前，包含降低步驟，該降低步驟係降低體液中的除單核球以外之成分的含率，以獲得前述原料單核球。

8. 如請求項 6 所述之單核球之製造方法，其中，使用磁珠來進行前述降低步驟，該磁珠對於前述原料單核球中的單核球及除單核球以外之白血球成分、血漿、紅血球中的至少一種，具有高於其他成分的親和性。

9. 如請求項 7 所述之單核球之製造方法，其中，使用磁珠來進行前述降低步驟，該磁珠對於前述原料單核球中的單核球及除單核球以外之白血球成分、血漿、紅血球中的至少一種，具有高於其他成分的親和性。

10. 如請求項 6 至請求項 9 中的任一項所述之單核球之製造方法，其中，由 100 mL 以下的末梢血液，來獲得前述原料單核球。

11. 如請求項 6 至請求項 9 中的任一項所述之單核球之製造方法，其中，不包含冷凍保存步驟，該冷凍保存步驟係將前述單核球冷凍保存。

12. 如請求項 10 所述之單核球之製造方法，其中，不包含冷

凍保存步驟，該冷凍保存步驟係將前述單核球冷凍保存。

13. 一種樹突細胞之製造方法，其包含：

單核球製造步驟，其係利用如請求項 4 至請求項 12 中的任一項所述之單核球之製造方法，來製造單核球；及

分化步驟，其係使前述單核球製造步驟中所得之單核球分化為樹突細胞。

14. 如請求項 13 所述之樹突細胞之製造方法，其中，在前述分化步驟中，前述單核球係在包含 Flt-3L、IL-3 或 IFN- γ 中的一種以上之培養基中培養。

15. 如請求項 13 或 14 所述之樹突細胞之製造方法，其中，包含使前述樹突細胞脈衝之脈衝步驟。

16. 一種樹突細胞疫苗之製造方法，其包含：

樹突細胞製造步驟，其係利用如請求項 13 至請求項 15 中的任一項所述之樹突細胞之製造方法，來製造樹突細胞；及

製備步驟，其係將前述樹突細胞製造步驟中所得之樹突細胞製備成樹突細胞疫苗。

17. 如請求項 16 所述之樹突細胞疫苗之製造方法，其中，不包含冷凍保存步驟，該冷凍保存步驟係將前述單核球及前述

樹突細胞中的至少一方冷凍保存。

18. 如請求項 16 或 17 所述之樹突細胞疫苗之製造方法，其中，前述原料單核球係利用自前述樹突細胞疫苗的投予對象提取之體液而獲得。

19. 一種在體外增殖單核球的方法，其包含下述步驟：自末梢血液樣本分離單核球，並藉由在單核球增殖用培養基中培養所分離的單核球，來增殖所分離的單核球；其中，

前述單核球增殖用培養基包含 500～2000 IU/mL 的 GM-CSF、及選自由下述所構成之群組中的至少一種細胞激素：(a) 1～1000 ng/mL 的 IFN- γ 、(b) 500～3000 IU/mL 的 IL-3、(c) 1000～3000 IU/mL 的 Flt-3L。

20. 如請求項 19 所述之在體外增殖單核球的方法，其中 IFN- γ 為 1～500 ng/mL。

21. 如請求項 19 所述之在體外增殖單核球的方法，其中 IFN- γ 為 1～50 ng/mL。