

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4832760号
(P4832760)

(45) 発行日 平成23年12月7日 (2011. 12. 7)

(24) 登録日 平成23年9月30日 (2011. 9. 30)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K 39/00 (2006. 01)

A 6 1 K 39/00

A 6 1 P 35/00 (2006. 01)

A 6 1 P 35/00

A 6 1 P 37/02 (2006. 01)

A 6 1 P 37/02

A 6 1 P 43/00 (2006. 01)

A 6 1 P 43/00 1 O 5

A 6 1 K 9/08 (2006. 01)

A 6 1 K 9/08

請求項の数 18 (全 19 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2004-563893 (P2004-563893)
 (86) (22) 出願日 平成15年12月22日 (2003. 12. 22)
 (65) 公表番号 特表2006-514653 (P2006-514653A)
 (43) 公表日 平成18年5月11日 (2006. 5. 11)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2003/040822
 (87) 国際公開番号 W02004/058323
 (87) 国際公開日 平成16年7月15日 (2004. 7. 15)
 審査請求日 平成18年12月21日 (2006. 12. 21)
 (31) 優先権主張番号 10/323, 664
 (32) 優先日 平成14年12月20日 (2002. 12. 20)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

前置審査

(73) 特許権者 511111806
 バイオサンテ ファーマシューティカルズ
 , インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 60069 イリノイ州
 , リンカーンシャーアイア, パークレー ブ
 ールバード 111
 (74) 代理人 100091096
 弁理士 平木 祐輔
 (74) 代理人 100118773
 弁理士 藤田 節
 (74) 代理人 100122389
 弁理士 新井 栄一
 (74) 代理人 100111741
 弁理士 田中 夏夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞製品の凍結保護の改善をもたらす直接注射可能な製剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

5重量% ~ 22重量% のヒドロキシエチルデンプン (HES)、1重量% ~ 15重量% のグリセロール、およびヒト血清アルブミン (HSA) を含む凍結保護媒体中に組換え生癌細胞を含んでなる組成物であって、該HSAが10%までの濃度で存在する、該組成物。

【請求項 2】

8重量% のHES、2重量% のHSA、および5重量% のグリセロールを含む凍結保護媒体中に組換え生癌細胞を含んでなる組成物。

【請求項 3】

HESが、

(a) 0.60 ~ 0.80の分子置換度でヒドロキシエチル基によりエーテル化されたHES、

(b) 0.40 ~ 0.60の分子置換度でヒドロキシエチル基によりエーテル化されたHES、または

(a) および (b) の組合せ

を含む、請求項1または2に記載の組成物。

【請求項 4】

HESが、

(a) 0.70の分子置換度でヒドロキシエチル基によりエーテル化されたHES、

(b) 0.4 ~ 0.5の分子置換度でヒドロキシエチル基によりエーテル化されたHES、または

(a) および (b) の組合せ

10

20

を含む、請求項3記載の組成物。

【請求項 5】

HESが、

(a) 420～480kDaの分子量を有するHES、

(b) 200～290kDaの分子量を有するHES、または

(a) および (b) の組合せ

を含む、請求項1～4のいずれかに記載の組成物。

【請求項 6】

組換え生癌細胞が、サイトカインまたは共刺激分子の、導入された異種核酸コード配列を含む、請求項1～5のいずれかに記載の組成物。

10

【請求項 7】

サイトカインが顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) である、請求項6記載の組成物。

【請求項 8】

該癌細胞が、肺癌細胞、膵癌細胞、前立腺癌細胞、腎癌細胞、骨髓腫細胞および白血病細胞よりなる群から選ばれる、請求項1～7のいずれかに記載の組成物。

【請求項 9】

組換え生癌細胞組成物が、患者由来の腫瘍細胞を含む、請求項1～8のいずれかに記載の組成物。

【請求項 10】

20

組換え生癌細胞が自己細胞、同種異系細胞、またはバースタンダー細胞である、請求項9記載の組成物。

【請求項 11】

複数の組換え生癌細胞を得て、

その複数の組換え生癌細胞を濃縮し、

請求項1～5のいずれかに記載の凍結保護媒体に、該組換え生癌細胞を懸濁させて懸濁液を得、

該懸濁液を極低温凍結状態にまで凍結して凍結懸濁液を得る

ことを含んでなり、該懸濁液を液体状態にまで解凍した後に、該組換え生癌細胞の少なくとも60%が依然として生存可能であることを特徴とする、組換え生癌細胞の生存度を維持するための方法。

30

【請求項 12】

該癌細胞が、肺癌細胞、膵癌細胞、前立腺癌細胞、腎癌細胞、骨髓腫細胞および白血病細胞よりなる群から選ばれる、請求項11記載の方法。

【請求項 13】

凍結の前または極低温凍結状態の組換え生癌細胞に放射線照射することを更に含む、請求項12記載の方法。

【請求項 14】

凍結される懸濁液を-200 ～ -35 の温度で凍結する、請求項11～13のいずれかに記載の方法。

40

【請求項 15】

組換え生癌細胞がバースタンダー細胞であり、該方法が、凍結懸濁液を解凍して解凍懸濁液を得、患者由来の腫瘍細胞を準備し、該解凍懸濁液を、その患者由来の腫瘍細胞と混合して対象に投与するのに適した混合懸濁液を得ることを更に含む、請求項11～14のいずれかに記載の方法。

【請求項 16】

患者由来の腫瘍細胞が、放射線照射された腫瘍細胞を含む、請求項15記載の方法。

【請求項 17】

請求項11、13または14に記載の方法により製造され凍結または解凍された懸濁液。

【請求項 18】

50

請求項1～10のいずれかに示した5重量%～22重量%のヒドロキシエチルデンプン（HES）を3重量%～15重量%のグリセロール、およびヒト血清アルブミン（HSA）と共に含む凍結保護媒体を含有する容器と、細胞生存度を維持するための該凍結保護媒体の使用を示す説明部材とを含んでなる、細胞生存度を維持するためのキットであって、HSAが10%までの濃度で存在する、該キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、細胞ワクチンの凍結保護のための組成物および方法に関する。より詳しくは、本発明は、組換え生癌細胞と共にヒドロキシエチルデンプン（HES）およびグリセロールまたはDMSOを含む凍結保護媒体を含む特定の組成物の用途に関する。該組成物は、癌治療用の細胞ワクチンとしての使用のために、所望により、凍結し解凍することが可能である

10

【背景技術】

【0002】

腫瘍細胞増殖における或る時期に、患者の免疫系は、その増殖が異常（または非自己）であると認識する能力を有する。その結果として、癌と闘うために患者自身の免疫系を利用する種々の方法が開発されている。典型的な方法には、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体、非特異的免疫系刺激物質、例えばサイトカイン、タンパク質またはペプチドサブユニットワクチン（例えば、癌細胞にしばしば関連している抗原、例えば腫瘍特異抗原および腫瘍関連抗原の使用）、養子免疫療法または細胞療法、遺伝子治療、細胞ワクチンなどが含まれる。例えば、WO 00/33871を参照されたい。

20

【0003】

細胞（またはその誘導体）が治療剤である細胞ワクチンは、現在、癌の治療のための臨床試験の段階にある。そのような細胞ワクチンは、全細胞が、広範囲の抗原（例えば、細胞表面上の抗原）のビヒクルである点で、単離されたタンパク質ワクチンよりも優れている。例えば、Dranoffら WO 93/06867、Gansbacherら、WO 94/18995、Jaffeeら WO 97/24132、Mitchellら WO 90/03183およびMortonら WO 91/06866（それらのそれぞれを、参照により本明細書に明示的に組み入れることとする）を参照されたい。

【0004】

30

そのような細胞ワクチンにおいて使用する細胞は、例えば、該細胞に対する免疫応答をモジュレーションするタンパク質を発現するよう修飾されうる。例えば、サイトカインまたは共刺激分子をコードする遺伝子を、例えば、患者から摘出した原発腫瘍に由来する細胞内に導入して組換え癌細胞を作製することが可能である。サイトカインまたは共刺激分子が発現されると、それは該細胞に対する免疫応答をモジュレーションしうる。該組換え癌細胞をin vitroで増殖させ、更なる増殖の予防のために治療し、患者に戻すことが可能である。細胞ワクチンでの有効な治療のためには、適当な投与時機および良好な細胞生存度が要求される。したがって、個々の治療に適した選択された時点で使用する組換え癌細胞が保存されることが重要である。輸送を可能にし、治療における使用の前に細胞に生じる細胞分裂の量を減少させ、適当かつ再現性ある用量が患者に運搬されることを保証するためには、生存度の維持および保存が重要である。

40

【0005】

生存度を維持しつつ細胞組成物を凍結することが、多数の研究の対象となっている。凍結および解凍の後の細胞生存度の維持は依然として難題である。細胞の液体成分が固体に変化する凍結過程においては、氷の結晶が形成され、細胞に損傷が生じうる。氷の結晶が形成された場合には、細胞に対する少なくとも2つのタイプの損傷が考えられうる。氷の結晶の急速な成長は膜および細胞下細胞小器官を物理的に破壊することがあり、細胞を溶解しさえしうる。氷の結晶の遅い成長は（氷の結晶からの電解質の排除による）細胞の脱水および細胞外氷形成を引き起こしうる。例えば、Gorlin, (1996) Journal of Infusional Chemotherapy, 6(1):23-27を参照されたい。

50

【 0 0 0 6 】

氷結晶形成の影響を最小限にするために、典型的には、凍結保護物質を含有する媒体中で細胞を凍結する。凍結保護物質は、種々の様態で、凍結中の細胞を保護する。束一性 (collagiative) 凍結保護物質は細胞を透過し、膜を横切る浸透圧勾配を減少させる。ガラス形成性凍結保護物質は溶液のガラス形成を増強し、それにより細胞周囲にガラス壁を形成し、これが脱水を予防する。凍結保護物質は、氷結晶形成を抑制することによっても働きうる。例えば、Gorlin, (1996) Journal of Infusional Chemotherapy, 6(1):23-27を参照されたい。

【 0 0 0 7 】

細胞の水透過性および溶質濃度に対する細胞の感受性は細胞型によって様々である (Leiboら, (1970) Cryobiology, 6(4): 315-332)。その結果、特定のタイプの細胞を維持するためには、種々のタイプおよび組合せの凍結保護物質が有効であることが判明している。例えば、ヒト骨髓前駆細胞はデキストラン、グリセロールおよびジメチルスルホキシドの凍結保護物質の組合せにより維持されることが示されており (Odavicら (1980) Experientia 36:1122-1124)、マウス骨髓幹細胞はポリビニルピロリドン (PVP)、スクロースまたはグリセロールにより維持されることが示されている。例えば、Stiffら (1987) Blood, 70(4): 974-978; Venkataraman, (1997) Cryobiology, 34:276-283; Wangら, (1998) Cryobiology, 37:22-29; Mertenら, (1995) Biologicals, 23:185-189; ならびにYoshidaおよびTakeuchi, (1991) Cytotechnology 5:99-106を参照されたい。骨髓移植に使用するヒト単球および未分画細胞を凍結保護するために、ヒドロキシエチルデンプン (HES) のような高分子が使用されている。例えば、Takashiら, (1988) Biophysical Journal, 54: 509-518; およびStiffら (1987) Blood, 70(4): 974-978を参照されたい。

【 0 0 0 8 】

細胞ワクチン用の凍結保護媒体は未だ報告されていない。したがって、治療剤として使用する細胞ワクチンを成功裏に維持するために使用しうる凍結保護媒体および方法が依然として必要とされている。前記を考慮して、凍結および解凍の後で高い生存度で細胞の維持および回収の成功をもたらす、細胞ワクチンにおいて使用する物質および方法が強く望まれている。本明細書に記載する詳細な説明から明らかなとおり、本発明はこの要求について検討するものである。

【 発明の開示 】

【 0 0 0 9 】

本発明は、凍結保護媒体と組換え生癌細胞とを含む、凍結および解凍中に該細胞を保護し維持するための組成物および方法を提供する。該凍結保護媒体は、ヒドロキシエチルデンプン (HES) またはその誘導体を単独で又はDMSOもしくはグリセロールと共に含む。

【 0 0 1 0 】

本発明の組成物は、約5重量% ~ 約22重量%のヒドロキシエチルデンプン (HES) またはその誘導体を単独で又は約1重量% ~ 約15重量%のDMSOもしくはグリセロール、および場合によっては、約0重量% ~ 約10重量%のヒト血清アルブミン (HSA) と共に含む凍結保護媒体中に組換え生癌細胞を含む。

【 0 0 1 1 】

該組成物は、約8重量%のHESまたはその誘導体および5重量%のDMSOまたはグリセロール、および場合によっては、約2重量%のヒト血清アルブミン (HSA) を含む。

【 0 0 1 2 】

本発明のHESは種々の分子を含む。例えば、HES分子は、(a) 約0.60 ~ 0.80の分子置換度でヒドロキシエチル基によりエーテル化されていたり、(b) 約0.40 ~ 0.60の分子置換度でヒドロキシエチル基によりエーテル化されていたり、または(a) および(b) の組合せを伴うことが可能である。HESの他の具体例には、(a) 約0.70の分子置換度でヒドロキシエチル基によりエーテル化されたHES分子、(b) 約0.4 ~ 約0.5の分子置換度でヒドロキシエチル基によりエーテル化されたHES分子、または(a) および(b) の組合せが含まれるが、これらに限定されるものではない。1つの実施形態においては、HESは、(a)

約420～約480kDaの分子量を有する分子、(b)約200～約290kDaの分子量を有する分子、または(a)および(b)の組合せを含む。

【0013】

多数のタイプの組換え生癌細胞、例えば、それぞれ、患者に由来する腫瘍細胞、自己細胞、同種異系細胞およびバースタンダー細胞を、本発明の実施において使用することが可能である。典型的には、本発明の実施に使用する組換え生癌細胞は、サイトカインまたは共刺激分子の、導入された異種核酸コード配列または遺伝子を含む。

【0014】

組換え生癌細胞の生存度を維持するための方法も本発明に含まれる。そのような方法は、複数の組換え生癌細胞を得、該細胞を濃縮し、該細胞を凍結保護媒体(例えば、前記のもの)に懸濁させて懸濁液を得、該懸濁液を極低温凍結状態にまで凍結して凍結懸濁液を得ることを含む。該懸濁液を液体状態にまで解凍した後、組換え生癌細胞の少なくとも約60%、約65%、約70%、約75%またはそれ以上が依然として生存可能である。1つの実施形態においては、凍結前または極低温凍結状態、すなわち、該懸濁液が約-200～約-35の温度で凍結している状態で、組換え生癌細胞に放射線照射する。該方法は更に、該凍結懸濁液を解凍し、該解凍懸濁液を患者に投与することを含む。場合によっては、該投与工程の前に該解凍懸濁液を洗浄しない。

【0015】

本発明は更に、本明細書に記載の方法により製造された凍結または解凍懸濁液を含む。

【0016】

細胞生存度を維持するためのキットも本発明に含まれる。本発明のキットは、凍結保護媒体(例えば、前記のもの)を含有する容器と、細胞生存度を維持するための該凍結保護媒体の使用を示す説明部材とを含む。

【0017】

図面の簡潔な説明

図1は、凍結保護媒体にLNCaP細胞を懸濁させ-80で凍結する前(凍結前)、-80で凍結し37で解凍を行った直後(初期解凍)および24時間後のLNCaP細胞の生存度(%)を示すグラフである。試験した凍結保護媒体は以下のとおりであった:1×PBSのみ;5%グリセロールのみ;24% HSA、5%グリセロール;5% HSA、5%グリセロール;5%グリセロール/5% HSA/PBS中の飽和HES;5%グリセロール/5% HSA/PBS中の20%ヘタスターチ;5%グリセロール/5% HSA/PBS中の20%ペンタスターチ;5%グリセロール/5% HSA/PBS中の15%PEG(10K);5%グリセロール/5% HSA/PBS中のデキストラン50K。

【0018】

図2Aおよび2Bは、-80で凍結し37で解凍した直後(初期解凍)または解凍の24時間後(24時間後)のLNCaP細胞の生細胞回収率(生存度%)を示すグラフである。該LNCaP細胞は、第2の高分子の存在下または非存在下に高分子1B(20% HES)のみを(図2A)あるいは第2の高分子の存在下または非存在下に高分子1B(20% HES)+5%グリセロールを(図2B)含む凍結保護媒体に懸濁させた。

【0019】

図3Aおよび3Bは、いくつかの独立して産生されたPC-3細胞培養(それらのそれぞれは、20% HES+5% DMSOまたは5%グリセロールに懸濁させ、-80に凍結し、ついで37で解凍した)の生存度(%) (図3A)およびGM-CSFの分泌(図3B)を示すグラフである。

【0020】

図4Aおよび4Bは、いくつかの独立して産生されたLNCaP細胞培養(それらのそれぞれは、20% HES+5% DMSOまたは5%グリセロールに懸濁させ、-80に凍結し、ついで37で解凍した)の生存度(%) (図4A)およびGM-CSFの分泌(図4B)を示すグラフである。

【0021】

図5は、-80で凍結し37で解凍した直後または解凍の24時間後のLNCaP細胞の生細胞回収率(%)を示すグラフである。該細胞は、PBS中に8%～26% HESおよび5%グリセロ

10

20

30

40

50

ールを含む凍結保護媒体中で凍結した。

【0022】

図6Aは、時間ゼロ（凍結開始時）ならびに-80℃で3ヵ月、6ヵ月および12ヵ月の保存の後の種々の凍結保護媒体中のPC-3細胞の生存度（％）を示すグラフである。

【0023】

図6Bは、時間ゼロ（凍結開始時）ならびに-80℃で3ヵ月、6ヵ月および12ヵ月の保存の後の種々の凍結保護媒体中のPC-3細胞のGM-CSF分泌を示すグラフである。試験した製剤がこの図に示されている。

【0024】

詳細な説明

10

細胞を複数のアリコートとして凍結し、解凍時にそれらの生存度を維持することは、多くの点で有利である。例えば、凍結細胞は、将来の使用、例えば治療（例えば、細胞ワクチン）のために、保存および／または輸送することが可能である。しかし、細胞を凍結しその生存度を維持することは簡単なことではない。細胞の水透過性および溶質濃度に対する細胞の感受性は細胞型によって異なるため、特定の型の細胞を維持するためには種々のタイプおよび組合せの凍結保護物質が必要となる。本発明は、ヒドロキシエチルデンプン（HES）またはその誘導体を単独で又はDMSOもしくはグリセロールと共に含む凍結保護媒体を使用する、組換え癌細胞の生存度を維持するための組成物および方法を提供する。

【0025】

定義

20

特に示さない限り、すべての科学技術用語は、それが関連している技術分野において一般に用いられているのと同じ意義を有すると理解される。本発明は、記載されている特定の方法論、プロトコールおよび試薬に限定されるものではなく、それらは種々に変更されうると理解されるべきである。本発明の目的において、以下の用語を以下に定義する。

【0026】

「自己」なる語は、ある個体に由来し、その同じ個体のための細胞ワクチンとして使用されうる癌細胞またはその細胞の初代後代に関して用いられる。

【0027】

本明細書中で用いる「同種異系」なる語は、ある個体が保持しているが、無関係の個体に由来する癌細胞系から樹立された同じ型の癌細胞に関して用いられる。あるいは、同種異系癌細胞系は、ある個体が保持している腫瘍には無関係であるがその個体の腫瘍と共通の腫瘍関連抗原を有する腫瘍型に由来する。一般に、同種異系は、ある種内の遺伝的相違、すなわち、同じ種の個体間の相違に関して用いられる。したがって、細胞ワクチンとして使用する同種異系細胞は、それが投与される個体のものとは遺伝的に異なる。

30

【0028】

本明細書中で用いる「バースタンダー」なる語は、主要組織適合性クラスI（MHC-I）抗原および主要組織適合性クラスII（MHC-II）抗原を天然で欠いているか、またはMHC-I抗原およびMHC-II抗原を欠くよう修飾された哺乳類細胞系、好ましくは、ヒト細胞系に関して用いられる。理論的には、サイトカインまたは共刺激分子のパラ分泌産生能を有する任意の哺乳類細胞系、好ましくは、ヒト細胞系を使用することが可能である。典型的なバースタンダー細胞系としては、K562（ATCC CCL-243; Lozzioら, (1975) Blood 45(3): 321-334; Kleinら (1976) Int. J. Cancer 18: 421-431）が挙げられる。サイトカインまたは共刺激分子をコードする異種核酸または遺伝子をバースタンダー細胞内に導入することが可能であり、それを、細胞ワクチンにおいて使用する癌細胞と混合することが可能である。

40

【0029】

「導入」なる語は、サイトカインまたは共刺激分子の異種核酸コード配列または遺伝子を含む核酸分子（例えば、ベクター）を自己、同種異系またはバースタンダー細胞系に付与して、該細胞系内で発現されない該サイトカインまたは共刺激分子が発現されるよう、あるいは該核酸分子の付与の結果として、より高レベルで該サイトカインまたは共刺激分

50

子が発現されるようにすることを意味する。「ベクター」は、DNA分子、例えばプラスミド、ウイルスまたは他のビヒクルを包含し、これらは、1以上の異種または組換えDNA配列、例えばサイトカインまたは共刺激分子遺伝子または関心コード配列を、機能的プロモーターおよび幾つかの場合には更にはエンハンサーの機能的制御下で含有する。ベクターまたは他のDNA配列に関して用いる組換えまたは異種は、天然に見出される場合には典型的には連結されていないDNA配列の連結を単に示すものである。

【0030】

「患者に由来する腫瘍細胞」なる語は、患者から摘出された腫瘍から回収された細胞を意味する。典型的には、単離された腫瘍から細胞懸濁液を調製する。患者に由来する腫瘍細胞は、細胞ワクチンとして使用される場合には、更なる増殖を停止させるのに有効な方法で処理される。すなわち、該細胞に放射線照射する。

10

【0031】

「組換え癌細胞」なる語は、サイトカインまたは共刺激分子の異種核酸コード配列または遺伝子が導入された癌細胞を意味する。

【0032】

本明細書中で用いる「ワクチン」なる語は、癌の治療のための治療計画の一部として患者に投与するための細胞組成物（例えば、組換え生癌細胞）を意味する。該ワクチンは、典型的には、サイトカインまたは他の共刺激分子を発現するよう癌細胞の一部または全部が遺伝的に修飾された癌細胞を含有する。

【0033】

20

「極低温凍結状態」なる語は、所望の期間にわたり細胞が凍結および/または保存される温度を有する状態を意味する。例えば、極低温凍結状態は、例えば、約-200 ~ 約-35 の温度、約-180 ~ 約-35 の温度、約-150 ~ 約-35 の温度、約-200 ~ 約-50 の温度、約-200 ~ 約-60 の温度などを有する状態を意味する。

【0034】

「凍結保護媒体」なる語は、凍結および/または解凍の際に細胞を懸濁させる媒体を意味する。例えば、本明細書に記載の凍結保護媒体は、ヒドロキシエチルデンプン（HES）またはその誘導体を単独で又はDMSOもしくはグリセロールと共に含む。凍結保護媒体はヒト血清アルブミン（HSA）をも含む。 「低温保護媒体」なる語は、「凍結保護剤」と互換的に使用される。「凍結保護媒体」の成分は本明細書中では「高分子」と記載される。

30

【0035】

本明細書における「核酸」もしくは「オリゴヌクレオチド」なる語または文法的等価表現は、互いに共有結合した少なくとも2つのヌクレオチドまたはその類似体を意味する。本発明の核酸は典型的には一本鎖または二本鎖であり、一般にはホスホジエステル結合を含有するが、場合によっては、例えばホスホルアミド、ホスホロチオアート、O-メチルホロアミジット結合またはペプチド核酸バックボーンおよび結合を含む代替的バックボーンを有する核酸類似体が含まれる。一本鎖の表現は、もう一方の鎖の配列をも特定し、したがって、該配列の相補体をも含む。

【0036】

40

本明細書中で用いる「ヒドロキシエチルデンプン」または「HES」なる語は、HES自体と同じ凍結保護物質としての特性を示す、ヒドロキシエチルデンプンまたはその誘導体の高分子（重合体）を意味する。本発明のHESは、後記で更に詳しく説明するとおり、種々の分子を含む。

【0037】

本明細書中で用いる「患者」なる語は任意の哺乳動物を意味する。本発明は、ヒトおよび他の哺乳動物の両方の対象に有用である。

【0038】

凍結保護媒体

本発明は、極低温凍結状態への凍結および液体状態への解凍中の組換え生癌細胞の生存

50

度を維持するための凍結保護製剤を提供する。これらの維持された組換え生癌細胞は、所望により、細胞ワクチンとして、例えば、癌の治療に使用することが可能である。

【0039】

本発明の凍結保護媒体は、少なくとも1つの凍結保護物質、例えばヒドロキシエチルデンプン（HES）を含み、しばしば、他の凍結保護物質、例えばDMSOまたはグリセロール、場合によっては、ヒト血清アルブミン（HSA）をも含む。1つの実施形態においては、本発明の凍結保護媒体はヒト血清アルブミン（HSA）を含有しないか実質的に含有しないことが可能である。HSAはヒト由来の物質であるため、この補助物質の排除は、細胞産物が外来因子で汚染される潜在的リスクを軽減しうる。

【0040】

本発明の凍結保護媒体は、高分子、ヒドロキシエチルデンプン（HES）を含む。HESは、典型的には、血漿増量剤として有用である。最も一般的なヒドロキシエチルデンプンであるヘタスターチはコーンスターチに由来し、約450,000ダルトンの分子量を有する。ペンタスターチは、約264,000ダルトンの分子量を有する、ヘタスターチの類似体である。本発明のHESは種々の分子を含む。例えば、HESは、（a）約0.60～0.80の分子置換度でヒドロキシエチル基によりエーテル化されていたり、（b）約0.40～0.60の分子置換度でヒドロキシエチル基によりエーテル化されていたり、または（a）および（b）の組合せを伴うことが可能である。HESの他の具体例には、（a）約0.70の分子置換度でヒドロキシエチル基によりエーテル化されたHES分子、（b）約0.4～約0.5の分子置換度でヒドロキシエチル基によりエーテル化されたHES分子、または（a）および（b）の組合せが含まれるが、これらに限定されるものではない。1つの実施形態においては、HESは、（a）約420～約480kDaの分子量を有する分子、（b）約200～約290kDaの分子量を有する分子、または（a）および（b）の組合せを含む。例えば、HESは、ヘタスターチ（B. Braun-McGaw）および／またはペンタスターチ（B. Braun-McGaw）を含みうる。

【0041】

HESは、DMSOと組合されて、赤血球および血小板の凍結保存のための保護物質として使用されている。例えば、Ashwood-Smithら（1972）Cryobiology 9:441-449を参照されたい。

【0042】

本発明の凍結保護媒体においては、場合によっては、ジメチルスルホキシド（DMSO）またはグリセロールも使用する。そのメカニズムは本発明には含まれないが、DMSOおよびグリセロールは、膜を横切る浸透圧勾配を減少させることにより作用しうる。これらの物質は、増加した細胞溶液容量を維持し、（粒子の性質ではなく粒子の数に左右される）束一的作用を細胞内でもたらす。これは非凍結細胞溶液中の毒性電解質の過剰濃度を回避する。十分な凍結保護化合物が存在すれば、該塩濃度は決定的損傷レベルまでは上昇せず、やがて、温度が非常に低くなって、該細胞が許容しうるのに十分な程度に損傷反応が遅くなる。

【0043】

1つの態様においては、本発明の組成物は、凍結保護媒体中に組換え生癌細胞を含み、該凍結保護媒体は、ヒドロキシエチルデンプン（HES）またはその誘導体を単独で又はDMSOと共に含む。1つの実施形態においては、該組成物は約5重量％～約22重量％のHESまたはその誘導体および約1重量％～約15重量％のDMSO、および場合によっては、約0重量％～約10重量％のヒト血清アルブミン（HSA）を含む。もう1つの実施形態においては、組成物は、約5重量％～約15重量％のHESまたはその誘導体および約1重量％～約10重量％のDMSO、および場合によっては、約0重量％～約10重量％のヒト血清アルブミン（HSA）を含みうる。もう1つの実施形態においては、組成物は、約5重量％～約10重量％のHESまたはその誘導体および約1重量％～約6重量％のDMSO、および場合によっては、約0重量％～約10重量％のヒト血清アルブミン（HSA）を含みうる。例えば、1つの好ましい実施形態においては、本発明の組成物は、最終比率約8重量％のHES、約2重量％のHSAおよび約5重量％のDMSOを含む凍結保護媒体中に組換え生癌細胞を含む。HESはペンタスターチ、ヘタスターチ、

それらの組合せ又は誘導体を含みうる。

【0044】

また、本発明の組成物は、凍結保護媒体中に組換え生癌細胞を含み、該凍結保護媒体は、ヒドロキシエチルデンプン（HES）またはその誘導体を単独で又はグリセロールと共に含む。1つの実施形態においては、組成物は約5重量%～約22重量%のHESまたはその誘導体および約1重量%～約15重量%のグリセロール、および場合によっては、約0%～約10%のヒト血清アルブミン（HSA）を含む。もう1つの実施形態においては、組成物は、約5重量%～約15重量%のHESまたはその誘導体および約1重量%～約10重量%のグリセロール、および場合によっては、約0%～約10%のヒト血清アルブミン（HSA）を含む。さらにもう1つの実施形態においては、組成物は、約5重量%～約10重量%のHESまたはその誘導体および約1重量%～約6重量%のグリセロール、および場合によっては、約0%～約10%のヒト血清アルブミン（HSA）を含む。例えば、もう1つの好ましい実施形態においては、本発明の組成物は、最終比率約8重量%のHES、約2重量%のHSAおよび約5重量%のDMSOを含む凍結保護媒体中に組換え生癌細胞を含む。HESはペンタスターチ、ヘタスターチ、それらの組合せ又は誘導体を含みうる。

10

【0045】

本発明の凍結保護媒体は、典型的には、生理的pHである溶液中で希釈される。本発明の実施に使用する典型的な溶液には、リン酸緩衝食塩水（PBS）、ダルベッコ変法イーグル培地（DMEM）、IDMEM、MEM、RPMI 1640、ハム（Ham）F-12、ノルモゾル（Normosol）、乳酸添加リンゲル液、ハンクス平衡塩溶液（HBSS）およびそれらの組合せが含まれるが、これらに限定されるものではない。また、凍結保護媒体は、補助物質、例えば水、塩類液、pH緩衝剤、担体または賦形剤、他の安定剤および/またはバッファー、あるいは凍結および解凍過程の後の組換え生癌細胞の生存度および/またはサイトカインもしくは他の共刺激分子の発現を増強する他の試薬を含有しうる。

20

【0046】

典型的には、該細胞懸濁液を、例えば、約-200～約-35の温度、約-180～約-35の温度、約-150～約-35の温度、約-200～約-50の温度、約-200～約-60の温度などの温度で凍結する。1つの実施形態においては、凍結細胞を、何らかの再結晶が生じうる温度未満の温度、例えば、純水のガラス転移温度未満の温度（例えば、約-135未満）で保存する。該細胞を凍結するためには、当技術分野で公知の標準的な方法を用いる。例えば、本発明の凍結保護媒体と組換え細胞とを含有する容器を固体二酸化炭素とアルコールとの混合物中または液体窒素中に浸漬することが可能である。また、所望の温度、例えば約-35以下に調節された冷凍庫内に、該溶液を直接配置することが可能である。極低温装置、例えば、自動化冷凍庫または速度制御冷凍庫（Cryo-Med, Mt. Clemens, MIまたはUTL-80, Neslab Instruments Inc., Portsmouth, NH）を使用することも可能である。凍結される細胞を、典型的には、所望の温度、例えば約-35以下に調節された冷凍庫内に移す。液体窒素（液相および/または気相）を使用して該細胞を凍結し保存することも可能である。本明細書に記載の方法の実施においては、当技術分野で公知の他の凍結方法および装置を使用することも可能である。

30

【0047】

凍結および解凍の際の組換え生癌細胞の生存度を維持するための方法が、本発明に含まれる。典型的な方法は、複数の組換え生癌細胞（例えば、哺乳類細胞、例えば肺癌細胞、膵癌細胞、前立腺癌細胞、腎癌細胞、骨髄腫細胞、白血病細胞など）を得、当技術分野で通常用いられる標準的な方法を用いてそれらの複数の組換え生癌細胞を濃縮し、HESまたはその誘導体を単独で又はDMSOおよび約0重量%～約10重量%のヒト血清アルブミン（HSA）と共に含む凍結保護媒体に該組換え生癌細胞を懸濁させて懸濁液を得る工程を含み、ここで、該懸濁液を液体状態に解凍した後、少なくとも約60%、65%、70%、75%またはそれ以上の組換え生癌細胞が依然として生存可能である。1つのアプローチにおいては、組換え生癌細胞に放射線照射する（すなわち、凍結前に放射線照射する、または極低温凍結状態で放射線照射する）。典型的には、凍結される懸濁液を約-200～約-35の温度で

40

50

凍結する。

【0048】

該組換え癌細胞を、典型的には、*in vitro*で増殖させ、増殖不能になるように該細胞を処理し、患者に戻す。1つの実施形態においては、該細胞を、放射線照射により増殖不能にする。典型的には、該細胞を組織培養プレート上でプレーティングし、Cs源を使用して室温で放射線照射し、約50～約200ラド/分、好ましくは、約120～約140ラド/分の線量率で放射線照射する。好ましいアプローチにおいては、*in vitro*で細胞の大部分が増殖するのを抑制するのに十分な総線量で、該細胞に放射線照射する。したがって、望ましくは、約10,000～20,000ラド、最適には約15,000ラドの総線量で該細胞に放射線照射して、該細胞の100%が増殖不能となるようにする。

10

【0049】

1つの実施形態においては、本明細書に記載の方法により製造された凍結懸濁液が本発明に含まれる。もう1つの実施形態においては、本明細書に記載の方法により製造された解凍懸濁液が本発明に含まれる。

【0050】

1つの実施形態においては、該方法は更に、凍結懸濁液を解凍して解凍懸濁液を得、該解凍懸濁液を対象に投与することを含む。場合によっては、該投与工程の前に該解凍懸濁液を洗浄しない。

【0051】

解凍は、例えば室温でサンプルをゆっくりと解凍することにより、または凍結サンプルを、例えば37℃の温度に調節された液体、例えば水に浸漬することにより行うことが可能である。細胞は、該細胞を解凍媒体と混合することによっても解凍することが可能である。所望により、自動化冷凍庫を使用して、細胞を解凍することが可能である。

20

【0052】

1つの実施形態においては、複数の組換え生癌細胞は自己または同種異系であり、サイトカインまたは共刺激分子、例えば顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)の、導入された異種核酸コード配列を更に含む。もう1つの実施形態においては、該組換え生癌細胞はバースタンダー細胞であり、該方法は、凍結懸濁液を解凍して解凍懸濁液を得、患者由来の腫瘍細胞を準備し、該解凍懸濁液を、患者由来の腫瘍細胞(例えば、放射線照射された腫瘍細胞)と混合して、混合懸濁液を得、該混合懸濁液を対象に投与することを含む。

30

【0053】

本発明の方法は、複数の組換え生癌細胞(例えば、自己細胞、同種異系細胞、バースタンダー細胞など)を得、その複数の組換え生癌細胞を濃縮し、8重量%のHESまたはその誘導体、約2重量%のHSAおよび約5重量%のDMSOを含む凍結保護媒体にその複数の組換え生癌細胞を懸濁させて懸濁液を得、該懸濁液を極低温凍結状態まで凍結して凍結懸濁液を得、その複数の生組換え癌細胞または凍結懸濁液に放射線照射することを含み、ここで、該懸濁液を液体状態に解凍した後、少なくとも約60%、約65%、約70%、約75%またはそれ以上の該組換え生癌細胞が依然として生存可能である。1つの実施形態においては、該方法は更に、該凍結懸濁液を解凍して解凍懸濁液を得、該解凍懸濁液を対象に投与することを含み、ここで、該投与工程の前に該解凍懸濁液を洗浄しない。この方法により製造された解凍懸濁液も本発明に含まれる。

40

【0054】

凍結および解凍の後、解凍された組換え生癌細胞を対象に戻し、または運搬し、または導入する。該細胞は、それが得られた組織部位、または該治療計画に適した他の部位に運搬することが可能である。所望により、該細胞を、標準的で良く知られた移植技術を用いて、対象における関心のある組織、皮膚、器官または身体系に移植することが可能であり、あるいは標準的な運搬または輸注技術を用いて、血液またはリンパ系に運搬することが可能である。解凍組換え生癌細胞のそのような運搬、投与または導入は、典型的には、本明細書に記載されており当技術分野で公知の投与経路または方法の1以上を用いて行う。1

50

つの態様においては、解凍組換え生癌細胞の投与量は、該部位または組織系における疾患または状態を治療するのに十分かつ有効な量である。該解凍組換え生癌細胞は、例えば、筋肉内、皮内、皮下、経口、腹腔内、鞘内、静脈内に投与したり、体腔内に配置したり（例えば、手術中に行うものを含む）、吸入により又は膣もしくは直腸へ投与することが可能である。

【0055】

典型的には、解凍組換え生癌細胞を、所望の表現型を誘導または軽減するのに十分な量、すなわち、「有効量」で投与する。必要に応じて、解凍組換え生癌細胞の1回または複数回の投与を行うことが可能である。投与時点で、対象は任意の発生・発育段階（例えば、胚、胎児、乳児、若年または成体）にありうる。

10

【0056】

組換え癌細胞

本発明の実施において使用する組換え生癌細胞は、in vivoで癌または腫瘍細胞を注射してそれに対する新たな又は増強された免疫応答を生成させることを含む能動免疫療法において有用である。使用する腫瘍細胞は、患者由来の腫瘍細胞（自己または同種異系）またはバスタンダー細胞でありうる。多数のタイプの組換え生癌細胞が本発明の実施において有用である。典型的には、組換え生癌細胞は、サイトカインまたは共刺激分子の、導入された異種核酸コード配列または遺伝子を含む。典型的なサイトカインまたは共刺激分子には、免疫応答の開始、増強、強化、増大および/または延長に關与する任意の分子が含まれるが、これらに限定されるものではない。いくつかの実施形態においては、サイトカインまたは共刺激分子はGM-CSF、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-6、IL-7、IL-10、CD2、IL-12、IL-15、IL-18、TGF、B7、MIP-1a、MIP-1p、MIP-2、M-CSF、G-CSFおよび/またはICAMである。1つの好ましい実施形態においては、サイトカインはGM-CSFである。他の実施形態においては、2以上のサイトカインまたは共刺激分子が本発明の組換え生癌細胞により発現される。

20

【0057】

1つの実施形態においては、異種核酸コード配列または遺伝子を癌細胞、例えば肺癌細胞、膀胱癌細胞、前立腺癌細胞、腎癌細胞、骨髄腫細胞、白血病細胞などに導入する。細胞内にin vitroで又はex vivoで核酸分子（例えば、ベクター）を運搬するためには、種々の方法を用いることが可能である。本発明の生癌細胞は、典型的には、異種核酸コード配列で遺伝的に操作（例えば、形質転換、形質導入またはトランスフェクト）される。核酸を細胞内に導入するための多数のアプローチが当技術分野で公知である。そのような方法には、エレクトロポレーション、リポソームとの膜融合（リポフェクション）、DNAの高速射撃、リン酸カルシウム媒介トランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、ウイルスベクターによる感染、ポリリシンのようなポリカチオン化合物の使用、受容体特異的リガンドの使用、単一の細胞内への直接的マイクロインジェクション、スフェロプラスト融合（それにより、該核酸分子を含有する大腸菌（E. coli）の外細胞壁を除去し、ポリエチレングリコールなどを使用して該大腸菌を動物細胞と融合させる）などが含まれる。BergerおよびKimmel, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology, Volume 152 Academic Press, Inc., San Diego, CA ("Berger"), Sambrookら, Molecular Cloning - A Laboratory Manual (3rd Ed.), Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 2000 ("Sambrook"), and Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubelら編, John Wiley & Sons, Inc., (supplemented through 2002)（それらのそれぞれを、参照により本明細書に明示的に組み入れることとする）を参照されたい。

30

40

【0058】

本発明の実施に使用するベクターにおいては、サイトカインまたは共刺激分子の異種核酸コード配列または遺伝子は、該コード配列または遺伝子の発現を駆動しうるプロモーターに機能しうる形で連結されている。コード配列または遺伝子は、プロモーターが該コード配列または遺伝子の転写を指令しうる場合に、「機能しうる形で連結」されている。「

50

遺伝子」は、タンパク質またはmRNA分子をコードする任意の核酸配列である。遺伝子はコード配列または非コード（例えば、調節）配列を含むが、「コード配列」はコードDNAに限定される。「プロモーター」は、RNAポリメラーゼの結合を導いてRNA合成を促進するDNA配列である。「エンハンサー」は、隣接遺伝子の転写を刺激または抑制する、DNAのシス作用性要素である。サイトカインまたは共刺激分子の遺伝子またはコード配列が、それが導入された細胞内で適切に転写され翻訳されるよう、すべての適当な転写、翻訳およびプロセッシングシグナル（例えば、スプライシングおよびポリアダニル化シグナル）をベクター上に適切に配置する。宿主細胞内での有効な発現のためのそのようなベクターの構築は当業者の知見の範囲内に十分に含まれる。

【0059】

本明細書中で用いるサイトカインまたは共刺激分子の遺伝子またはコード配列はゲノムまたはcDNA配列、それらの変異配列および突然変異体を含み、該遺伝子またはコード配列が、該サイトカインまたは共刺激分子の特徴的機能を有するタンパク質を発現しうる限り、それらは自然界から単離されたものであっても、全体的または部分的に合成されたものであってもよい。遺伝子またはコード配列の修飾手段は当技術分野で良く知られている。

【0060】

真核細胞、より詳しくは動物細胞、例えば哺乳類細胞、例えばヒト細胞内への核酸の導入に適した任意のベクターを使用することが可能である。好ましくは、該ベクターは該細胞に適合しており、例えば、サイトカインまたは共刺激性遺伝子またはコード配列の発現を該細胞内で引き起こしうる。本発明の実施に使用する典型的なベクターには、ウイルス、プラスミド、レトロトランスポゾン、コスミドなどが含まれるが、これらに限定されるものではない。ウイルスベクターには、パルボウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、レンチウイルスベクターなどが含まれるが、これらに限定されるものではない。多数の非ウイルスベクターも、単独で又はウイルスベクターと組合されて、サイトカインまたは共刺激分子の異種核酸コード配列を細胞内に導入（例えば、トランスフェクト）するのに有用である。適当な非ウイルスベクターには、プラスミド、コスミドおよびファジミド、リポソーム、水-油エマルション、ポリエチレンイミン、バイオリスチック（biolistic）ペレット/ビーズおよびデンドリマーが含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0061】

本発明の1つの態様においては、ex vivo法を用い、この場合、複数の細胞を個体から摘出し、前記で詳しく説明したとおり、サイトカインまたは共刺激分子を発現させるのに有効な方法によりサイトカインまたは共刺激分子の異種核酸コード配列または遺伝子を細胞内に導入する。

【0062】

ex vivo法は、典型的には、自己細胞または同種異系細胞の場合に用いる。サイトカインまたは共刺激分子の異種核酸コード配列または遺伝子をそのような自己または同種異系細胞内に導入し、ついでそれを発現させて、組換え生癌細胞を産生させることが可能である。本明細書に記載の凍結保護媒体および方法を用いて、自己または同種異系組換え生癌細胞を凍結することが可能である。解凍したら、該組換え生癌細胞を細胞ワクチンとして患者に投与することが可能である。

【0063】

バースタンダー細胞は、その表面上に主要組織適合性クラスI（MHC-I）抗原および主要組織適合性クラスII（MHC-II）抗原を欠く細胞であり、したがって、汎用サイトカインまたは共刺激分子産生細胞系として有用である。サイトカインまたは共刺激分子の異種核酸コード配列または遺伝子をそのようなバースタンダー細胞内に導入し、ついでそれを発現させて組換え生バースタンダー細胞系を産生させることが可能である。該バースタンダー細胞系は、本明細書に記載の凍結保護媒体および方法を用いて凍結することが可能である。解凍したら、該組換えバースタンダー細胞を細胞ワクチンとして患者に投与することが可能である。能動免疫療法におけるバースタンダー細胞の使用は、参照により明示的に本

10

20

30

40

50

明細書に組み入れる米国特許第6,464,973号に記載されている。

【0064】

組換え生癌細胞は、個々の細胞型に適するように修飾された通常の栄養培地内で培養することができる。培養方法およびその変法は当業者の知見の範囲内に十分に含まれる。細胞の単離および培養に関する参考文献には、Freshney (2000) Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique, fourth edition, Wiley-Liss, New Yorkおよびこれに引用されている参考文献; Payneら (1993) Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems John Wiley & Sons, Inc. New York, NY; GemborgおよびPhillips (編) (1995) Plant Cell, Tissue and Organ Culture; Fundamental Methods Springer Lab Manual, Springer-Verlag (Berlin Heidelberg New York) ならびにAtlasおよびParks (編) The Handbook of Microbiological Media, second edition (1997) CRC Press, Boca Raton, FL. 10
が含まれる。

【0065】

キット

組換え生癌細胞の生存度を維持するためのキットも本発明に含まれる。1つの態様においては、本発明のキットは、約5重量%～約22重量%のヒドロキシエチルデンプン (HES) またはその誘導体を単独で又は約1重量%～約15重量%のDMSO、および場合によっては、約0%～約10%のヒト血清アルブミン (HSA) と共に含む凍結保護媒体を含有する容器と、細胞生存度を維持するための該凍結保護媒体の使用を示す説明部材とを含む。もう1つの実施形態においては、本発明のキットは、約5重量%～約15重量%のヒドロキシエチルデンプン (HES) またはその誘導体を単独で又は約1重量%～約10重量%のDMSO、および場合によっては、約0%～約10%のヒト血清アルブミン (HSA) と共に含む凍結保護媒体を含有する容器と、細胞生存度を維持するための該凍結保護媒体の使用を示す説明部材とを含む。さらにもう1つの態様においては、本発明のキットは、約5重量%～約10重量%のヒドロキシエチルデンプン (HES) またはその誘導体を単独で又は約1重量%～約6重量%のDMSO、および場合によっては、約0%～約10%のヒト血清アルブミン (HSA) と共に含む凍結保護媒体を含有する容器と、細胞生存度を維持するための該凍結保護媒体の使用を示す説明部材とを含む。 20

【0066】

キットはまた、約5重量%～約22重量%のヒドロキシエチルデンプン (HES) またはその誘導体、約3重量%～約15重量%のグリセロール、および場合によっては、約0%～約10%のヒト血清アルブミン (HSA) を含む凍結保護媒体を含有する容器と、細胞生存度を維持するための該凍結保護媒体の使用を示す説明部材とを含みうる。もう1つの実施形態においては、キットはまた、約5重量%～約15重量%のヒドロキシエチルデンプン (HES) またはその誘導体、約3重量%～約10重量%のグリセロール、および場合によっては、約0%～約10%のヒト血清アルブミン (HSA) を含む凍結保護媒体を含有する容器と、細胞生存度を維持するための該凍結保護媒体の使用を示す説明部材とを含みうる。さらにもう1つの実施形態においては、キットはまた、約5重量%～約10重量%のヒドロキシエチルデンプン (HES) またはその誘導体、約3重量%～約6重量%のグリセロール、および場合によっては、約0%～約10%のヒト血清アルブミン (HSA) を含む凍結保護媒体を含有する容器と、細胞生存度を維持するための該凍結保護媒体の使用を示す説明部材とを含みうる。 30
40

【0067】

該キット中のHESは、本明細書に記載の種々の分子を含みうる。1つの実施形態においては、HESは、(a) 約0.70の分子置換度でヒドロキシエチル基によりエーテル化されたHES分子、(b) 約0.4～約0.6の分子置換度でヒドロキシエチル基によりエーテル化されたHES分子、または(a) および(b) の組合せを含む。もう1つの実施形態においては、HESは、(a) 約420～約480kDaの分子量を有する分子、(b) 約200～約290kDaの分子量を有する分子、または(a) および(b) の組合せを含む。

【0068】

該説明部材は包装材に添付されたり、添付文書として含められうる。該説明部材は、典 50

型的には、書かれた又は印刷された部材を含むが、これらに限定されるものではない。そのような説明部材を保存しそれを一般使用者に連絡しうる任意の媒体が本発明で意図される。そのような媒体には、電子記憶媒体（例えば、磁気ディスク、テープ、カートリッジ、チップ）、光学媒体（例えば、CD ROM）などが含まれるが、これらに限定されるものではない。本明細書中で用いる「説明部材」なる語は、該説明を提供するインターネットサイトのアドレスを含みうる。

【 0 0 6 9 】

以下の実施例は本発明を例示するために記載されており、本発明を限定するものではない。

【実施例 1】

10

【 0 0 7 0 】

組換え生癌細胞の凍結および解凍の後の生存度およびサイトカイン産生

本発明は、組換え生癌細胞の凍結保存のための製剤および方法を提供する。該細胞は自己、同種異系またはバスタンダー細胞でありうる。本明細書に記載の製剤および方法は、あらゆるタイプの組換え生癌細胞に適用可能である。本明細書に記載の方法および製剤の開発においては、同種異系ヒト前立腺腫瘍細胞系LNCaPを標準的な条件下で培養し、ペレット化し、多数の異なる凍結保護媒体に再懸濁させた。LNCaP細胞を各凍結保護媒体に懸濁させ、-80 で凍結し、ついで37 の水浴中で解凍し、培地で洗浄した。トリパン排除法を用いる血球計による顕微鏡検査で、生存度を評価した。図1は、凍結保護媒体にLNCaP細胞を懸濁する前（凍結前）、-80 で凍結し37 で解凍を行った直後（初期解凍）および24時間後のLNCaP細胞の生存度（%）を示すグラフである。凍結保護媒体がPBS中にHES（ヘタスターチまたはペンタスターチのいずれか）を5% グリセロールおよび5% HSAと共に含んでいた場合には、約60%を超える生存度が維持された。

20

【 0 0 7 1 】

5% グリセロールの存在下および非存在下ならびに第2の高分子の存在下または非存在下で高分子1B（20% HES）に懸濁させた後のLNCaP細胞の生存度を、トリパン排除法を用いる血球計による顕微鏡検査で評価した。該懸濁液を-80 で凍結し、37 の水浴中で解凍し、培地で洗浄し、ついで、37 での解凍の直後および24時間後に生存度を評価した。高分子1B（20% HES）を単独で第2の高分子の存在下または非存在下（図2A）、あるいは高分子1B（20% HES）+ 5% グリセロールを第2の高分子の存在下または非存在下（図2B）で含む凍結保護媒体に、該LNCaP細胞を懸濁させた。該凍結保護媒体中で20% HESを5% グリセロールと共に使用した場合には、各場合において、初期解凍時および24時間後に、約60%を超える生存度が維持された。いくつかの独立して産生されたPC-3前立腺癌細胞培養の生存度およびGM-CSF分泌を、20% HES + 5% DMSOまたはグリセロール中への懸濁および-80 での凍結の後に評価した。該凍結細胞懸濁液を37 の水浴中で解凍し、培地で洗浄し、ついで生存度を評価した。100万個の該培地懸濁細胞を培養フラスコ内に播き、24時間にわたり付着させた。24時間後、培地を交換した。48時間の時点で、培地を集め、GM-CSF濃度に関してELISAにより測定した。分泌GM-CSFの量を100万個の細胞当たりの分泌速度に正規化した。PC-3細胞の生存度（%）を図3Aに示し、該細胞によるGM-CSF分泌を図3Bに示す。凍結保護媒体中でDMSOまたはグリセロールを使用した場合には、80%を超える生存度が維持され、各場合において、150ng/10⁶細胞/日を超えるGM-CSF分泌レベルが認められた。

30

40

【 0 0 7 2 】

いくつかの独立して産生されたLNCaP細胞培養の生存度およびGM-CSF分泌を、20% HES + 5% DMSOまたはグリセロール中への懸濁および-80 での凍結の後に評価した。該凍結細胞懸濁液を37 の水浴中で解凍し、培地で洗浄し、ついで生存度を評価した。100万個の該培地懸濁細胞を培養フラスコ内に播き、24時間にわたり付着させた。24時間後、培地を交換した。48時間の時点で、培地を集め、GM-CSF濃度に関してELISAにより測定した。分泌GM-CSFの量を100万個の細胞当たりの分泌速度に正規化した。LNCaP細胞の生存度（%）を図4Aに示し、該細胞によるGM-CSF分泌を図4Bに示す。凍結保護媒体中でDMSOを使用し

50

た場合には、60%を超える生存度が維持され、10ng/10⁶細胞/日を超えるGM-CSF分泌レベルが検出された。

【0073】

もう1つの研究において、LNCaP細胞を、PBS中の5%グリセロールおよびそれぞれ8%～26% HESを含有する個々の凍結保護媒体に懸濁させ、ついで-80℃で凍結した。該凍結細胞懸濁液を37℃の水浴中で解凍し、培地で洗浄し、ついで生存度を評価した。ついで該細胞を、細胞培養培地を含有するフラスコ内に播いた。24時間後、該細胞を集め、生存度に関して測定した。図5は、37℃での解凍の直後（初期解凍）および24時間後のLNCaP細胞の生細胞回収率（%）を示すグラフである。結果は、5%グリセロールおよび約10%～26% HES（ペンタスターチ）を該凍結保護媒体中に含有させた場合には、60%を超える生存度が維持されたことを示している。

10

【実施例2】

【0074】

組換え生癌細胞の長期凍結および解凍後の生存度およびサイトカイン産生

組換えPC-3細胞の生存度および該細胞によるGM-CSF産生に対する種々の凍結保護培地の効果を、時間ゼロ（凍結開始時）ならびに-80℃で3ヵ月、6ヵ月および12ヵ月の保存の後に評価した。試験した製剤は、24%ヒト血清アルブミン（HSA）、5%グリセロール；8% HSA、10% DMSO、1%ペンタスターチ；8% HSA、10% DMSO；8% HSA、10% DMSO、5%ペンタスターチ；8% HSA、5% DMSO；20%ペンタスターチ；10% DMSO；および20%ペンタスターチ、5% DMSOを含むものであった。1年の保存期間を隔てて、該凍結細胞懸濁液を37℃の水浴中で解凍し、培地で洗浄し、ついで生存度に関して測定した。100万個の該培地懸濁細胞を培養フラスコ内に播き、24時間にわたり付着させた。24時間後、培地を交換した。48時間の時点で、培地を集め、GM-CSF濃度に関してELISAにより測定した。分泌GM-CSFの量を100万個の細胞当たりの分泌速度に正規化した。該細胞の生存度（%）を図6Aに示し、該細胞によるGM-CSF分泌を図6Bに示す。試験した各凍結保護媒体において、60%を超える生存度が維持された。凍結保護媒体中で5%または10% DMSOをペンタスターチと共にHSAの存在下または非存在下で使用した場合に、最も一貫した経時的GM-CSF分泌が検出された（200ngを超えるGM-CSF/10⁶細胞/日）。

20

【0075】

本明細書中に引用されている全ての刊行物、特許および特許出願の全体を、あらゆる目的で、参照により本明細書に組み入れることとする。本発明は、好ましい実施形態を強調して記載されているが、好ましい実施形態の変更を行いうること、および本発明は、本明細書に具体的に記載されている以外の様態でも実施されうると意図されることが、当業者に明らかであろう。したがって、本発明は、特許請求の範囲により定められる本発明の精神および範囲内に含まれる全ての修飾を含むものである。

30

【図面の簡単な説明】

【0076】

【図1】図1は、凍結保護媒体にLNCaP細胞を懸濁させ-80℃で凍結する前（凍結前）、-80℃で凍結し37℃で解凍を行った直後（初期解凍）および24時間後のLNCaP細胞の生存度（%）を示すグラフである。試験した凍結保護媒体は以下のとおりであった：1×PBSのみ；5%グリセロールのみ；24% HSA、5%グリセロール；5% HSA、5%グリセロール；5%グリセロール/5% HSA/PBS中の飽和HES；5%グリセロール/5% HSA/PBS中の20%ヘタスターチ；5%グリセロール/5% HSA/PBS中の20%ペンタスターチ；5%グリセロール/5% HSA/PBS中の15%PEG（10K）；5%グリセロール/5% HSA/PBS中のデキストラン50K。

40

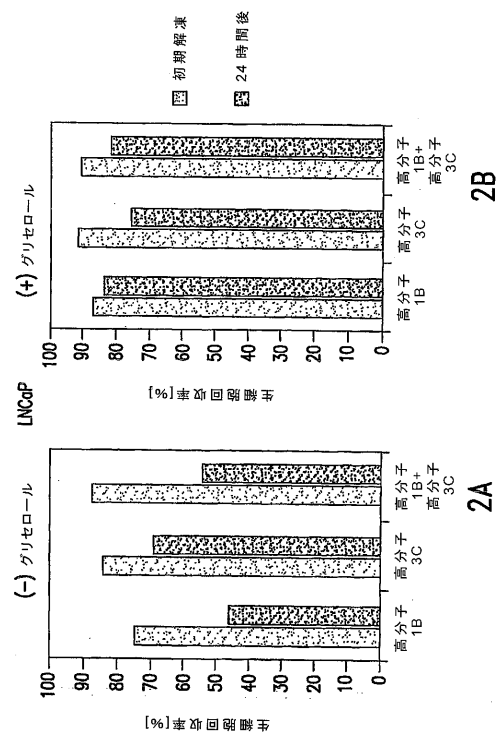
【図2】図2Aおよび2Bは、-80℃で凍結し37℃で解凍した直後（初期解凍）または解凍の24時間後（24時間後）のLNCaP細胞の生細胞回収率（生存度%）を示すグラフである。該LNCaP細胞は、第2の高分子の存在下または非存在下に高分子1B（20% HES）のみを（図2A）あるいは第2の高分子の存在下または非存在下に高分子1B（20% HES）+ 5%グリセロールを（図2B）含む凍結保護媒体に懸濁させた。

50

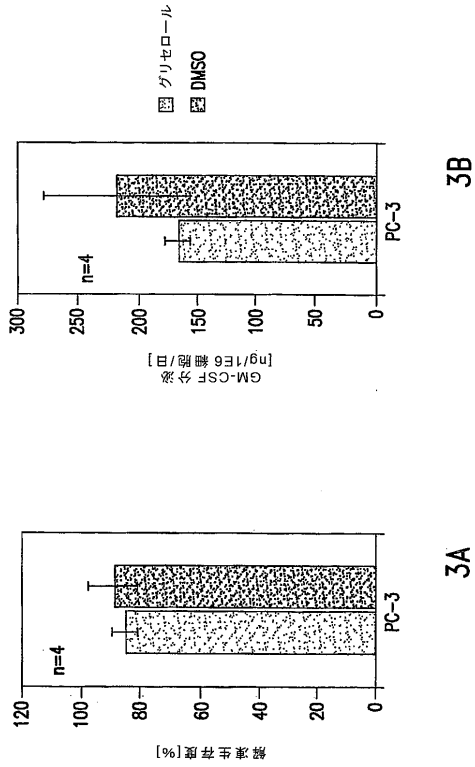
【図 6 B】図6Bは、時間ゼロ（凍結開始時）ならびに-80 で3ヵ月、6ヵ月および12ヵ月の保存の後の種々の凍結保護媒体中のPC-3細胞のGM-CSF分泌を示すグラフである。試験した製剤がこの図に示されている。

10

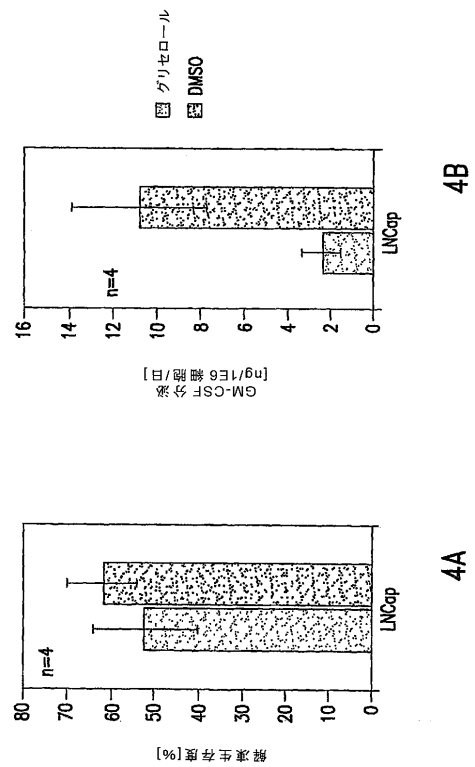
【圖 2】



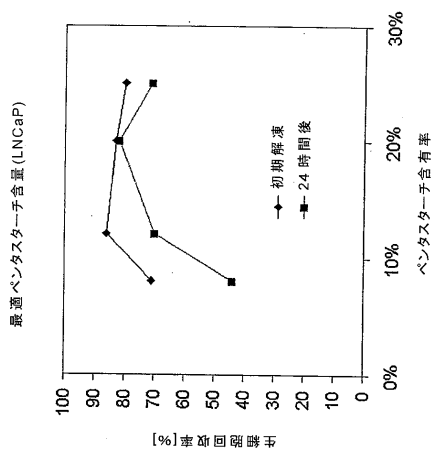
【図 3】



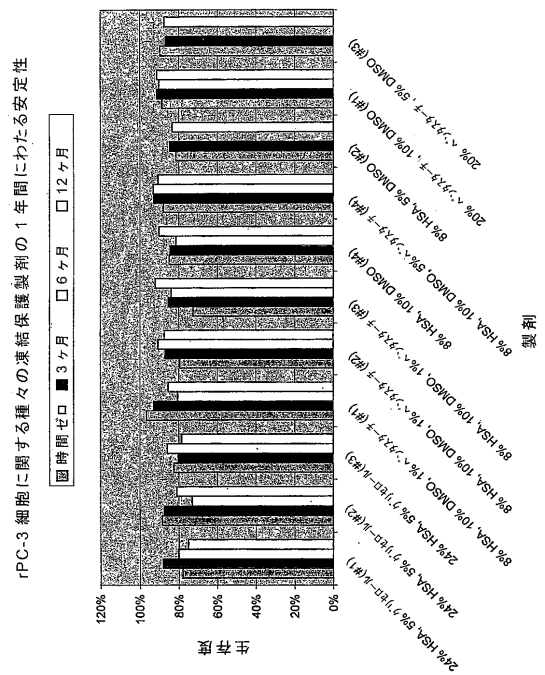
【図 4】



【図 5】

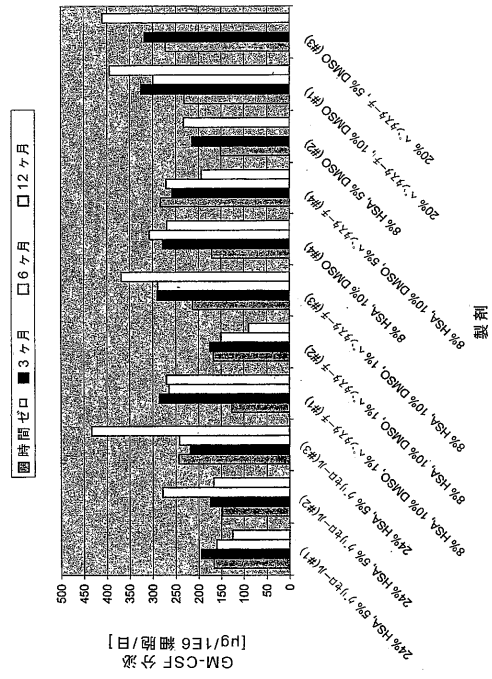


【図 6 A】



【図 6 B】

rPC-3 細胞に関する種々の凍結保護製剤の 1 年間にわたる安定性



フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

A 6 1 K 47/36 (2006.01)

A 6 1 K 47/36

A 6 1 K 47/42 (2006.01)

A 6 1 K 47/42

A 6 1 K 47/10 (2006.01)

A 6 1 K 47/10

(74)代理人 100171505

弁理士 内藤 由美

(72)発明者 フレイ, デヴィッド

アメリカ合衆国 9 4 0 1 9 カリフォルニア州, ハーフ ムーン ベイ, パルマ ストリート
5 4 5

(72)発明者 リン, アンディー

アメリカ合衆国 9 4 3 0 6 カリフォルニア州, パロ アルト, ダンカン プレイス 3 9 3 4

(72)発明者 バニク, ガウタム

アメリカ合衆国 9 4 4 0 4 カリフォルニア州, フォスター シティー, ジェミニ レーン 7
6 7

審査官 安居 拓哉

(56)参考文献 特表平08-507921(JP, A)

特開昭62-055088(JP, A)

特開平06-315395(JP, A)

特表2002-531521(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 39/00-39/44

C12N 5/00-5/28

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)