

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2017年8月24日(24.08.2017)



(10) 国際公開番号

WO 2017/142014 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 35/17 (2015.01) A61P 29/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) C12N 5/0783 (2010.01)
A61K 45/00 (2006.01) C12N 5/0786 (2010.01)
A61P 1/04 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2017/005704
- (22) 国際出願日: 2017年2月16日(16.02.2017)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2016-028090 2016年2月17日(17.02.2016) JP
- (71) 出願人: 医療法人社団 混志会(KOSHIKAI, NON-PROFIT MEDICAL CORPORATION) [JP/JP]; 〒1010062 東京都千代田区神田駿河台二丁目1番地45 ニュー駿河台ビル3階 Tokyo (JP). 株式会社メディネット(MEDINET CO., LTD.) [JP/JP]; 〒2220033 神奈川県横浜市港北区新横浜二丁目3番12号 Kanagawa (JP).
- (72) 発明者: 後藤 重則(GOTO Shigenori); 〒1010062 東京都千代田区神田駿河台二丁目1番地45 ニュー駿河台ビル3階 瀬田クリニック東京内 Tokyo (JP). 木村 佳司(KIMURA Yoshiji); 〒2220033 神奈川県横浜市港北区新横浜二丁目3番12号 株式会社メディネット内 Kanagawa (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人浅村特許事務所(ASAMURA PATENT OFFICE, P.C.); 〒1408776 東京都品川区東品川2丁目2番24号 天王洲セントラルタワー Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第21条(3))

(54) Title: DRUG FOR INFLAMMATORY DISEASE

(54) 発明の名称: 炎症性疾患を対象とした医薬

(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing a treatment for inflammatory disease, in particular, a method and a drug for alleviating the symptoms associated with ulcerative colitis. Cytoimmunotherapy is also used for patients suffering from inflammatory disease.

(57) 要約: 本発明の課題は、炎症性疾患の治療、とりわけ潰瘍性大腸炎の症状軽減方法、及びそのための医薬を提供することにある。免疫細胞療法を炎症性疾患の患者にも適用する。



WO 2017/142014 A1

明 細 書

発明の名称：炎症性疾患を対象とした医薬

技術分野

[0001] 本発明は、炎症性疾患を対象とした医薬に関するものである。

背景技術

[0002] 現在、がん免疫細胞治療として、1) 樹状細胞ワクチン療法、2) NK細胞療法、3) $\gamma\delta$ T細胞療法、4) $\alpha\beta$ T細胞療法、5) 細胞傷害性T細胞 (CTL) 療法などが盛んに行われている (特許文献1及び非特許文献1)。

[0003] 樹状細胞ワクチン療法とは、末梢血液中の単球から分化させた樹状細胞 (Dendritic Cells: DC) に、その標的となるがん細胞を貪食させて体内に戻し、がん細胞を傷害する能力のある細胞 (主にT細胞) や抗体産生機能をもつB細胞にがんや病原体の目印 (抗原) を伝える役割を担う「抗原提示細胞 (Antigen Presenting Cell: APC)」として機能させることにより、がんを治療する方法である。

[0004] NK (Natural Killer) 細胞療法とは、末梢血中に含まれるNK細胞などの異常細胞を傷害する能力の高い細胞を、IL-2など複数の刺激物質を用いて活性化、増殖させて体内に戻し、がんを治療する方法である。NK細胞は、自然免疫系を担うリンパ球の1種で、強い細胞傷害能を有しており、特に、MHC class I分子が発現低下または消失した細胞を認識し殺傷する機構を有すること、および、抗体依存性細胞傷害 (ADCC) における主たるエフェクター細胞として機能することなどから、腫瘍細胞やウイルス感染細胞の拒絶に重要な細胞である。

[0005] $\gamma\delta$ T細胞は、リンパ球ストレス (細胞傷害) 監視機構 (lymphoid stress-surveillance) と呼ばれる生体防御反応を担う中心的な細胞であり、 $\gamma\delta$ T細胞療法とは、患者から採血した梢血中にわずかに存在する (1~5%) $\gamma\delta$ 型T細胞受容体 ($V\gamma 9 V\delta 2$ 受容体) を

もつ $\gamma\delta$ T細胞を選択的に増殖させ、体内に戻す治療法である。 $\gamma\delta$ T細胞は $\alpha\beta$ T細胞が認識する「抗原」に依存することなく、がん細胞表面に比較的共通して発現する分子などを認識することでがんを殺傷する「抗原非特異的」な抗腫瘍効果が得られる。

[0006] $\alpha\beta$ T細胞療法とは、末梢血液中に含まれるリンパ球を約2週間、インターロイキン-2 (IL-2) と抗CD3抗体を用いて培養し、その全体を活性化・増殖させたのち体内に戻す治療法である。末梢血のTリンパ球の大半が $\alpha\beta$ 型のT細胞受容体 (T Cell Receptor: TCR) を持つ $\alpha\beta$ T細胞であり、増殖した細胞の多くも $\alpha\beta$ T細胞ということになる。 $\alpha\beta$ T細胞は、上記樹状細胞などから、抗原を提示され、その抗原をもつ細胞に攻撃を加える。

[0007] 細胞傷害性T細胞 (CTL) 療法は、体外でがん細胞を用いて末梢血単核球中のT細胞を刺激することにより、細胞傷害性T細胞 (CTL) を誘導し、体内に戻す治療法である。がん細胞自体が抗原提示細胞 (APC) としての役割を果たし、自身のがんに対する攻撃能力を持った細胞傷害性T細胞 (CTL) を効率的に増やすことが可能になる。

[0008] 免疫細胞治療は、従来の外科治療、放射線治療、化学治療の三大療法に比べて副作用がほとんどないという利点を有しており、第4のがん治療法として実際の肺がん患者に対して先進医療として施されている。

先行技術文献

特許文献

[0009] 特許文献1：国際公開第2006/006720号パンフレット

[0010] 非特許文献1：メディネットホームページ<http://www.medinet-inc.co.jp/english/service/technology.html>

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0011] 本願発明者である医師らは、上記がん免疫細胞療法を実際に患者に施している臨床医師らである。本願発明者らは、がん免疫療法を行った患者の症状の経時観察を行ううちに、潰瘍性大腸炎を発症している患者の症状が緩和軽減されていることを発見した。

すなわち本願発明は、免疫細胞治療の別用途、炎症性疾患、特に潰瘍性大腸炎への適応拡大を目的とするものである。

課題を解決するための手段

[0012] 炎症性疾患とは、炎症性サイトカインの過剰な生成を伴う疾患を指す。炎症性サイトカインとしては、IL-1、IL-6、IL-8、IL-12、IL-18、腫瘍壊死因子（TNF α/β ）などがある。

従って炎症性疾患とはこれに限定されないが、クローン病、関節リウマチ、乾癬（尋常性乾癬、関節症性乾癬、膿疱性乾癬、乾癬性紅皮症を含む）、強直性脊椎炎、潰瘍性大腸炎、ベーチェット病による難治性網膜ぶどう膜炎などがこれにあたる。

[0013] 炎症性腸疾患（IBD: inflammatory bowel disease）とは、クローン病および潰瘍性大腸炎を含み、下痢および腹痛をもたらす消化管各部の慢性炎症を特徴とする、再発と寛解を繰り返す病態である。

炎症は、消化管粘膜における細胞性免疫反応により生じる。病因については不明であるが、免疫反応には、サイトカイン、インターロイキン、腫瘍壊死因子（TNF）、及び脂質メディエーターなどの炎症メディエーターの放出が関与している。

[0014] <潰瘍性大腸炎>

潰瘍性大腸炎（UC: Ulcerative colitis）とは、大腸の粘膜にびらんや潰瘍ができる大腸の炎症性疾患である。特徴的な症状としては、下血を伴うまたは伴わない下痢と腹痛が起こる。病変は、直腸から連続的に、そして上行性に広がる性質があり、最大で直腸から結腸全体に広がる。潰瘍性大腸炎は、病変の広がりや経過により下記のように分類される。

- 1) 病変の拡がりによる分類：全大腸炎、左側大腸炎、直腸炎
- 2) 病期の分類：活動期、寛解期
- 3) 重症度による分類：軽症、中等症、重症、激症
- 4) 臨床経過による分類：再燃寛解型、慢性持続型、急性激症型、初回発作型

[0015] わが国の潰瘍性大腸炎の患者数は約 16 万人で、若年者から高齢者まで発症し、性別による差は認められない。潰瘍性大腸炎の原因は、自己免疫反応の異常や食生活等が原因と考えられているが、現在も不明である。

[0016] 潰瘍性大腸炎を発症すると、下痢や血便が認められ、痙攣性または持続的な腹痛を伴うことがある。重症になると、発熱、体重減少、貧血などの全身症状がおこる。また、腸管以外の合併症として皮膚の症状、関節や目の症状が出現することもある。

[0017] 潰瘍性大腸炎に対しては、例えば、5-アミノサリチル酸薬（5-ASA）製薬の経口・直腸からの投与、副腎皮質ステロイド薬、血球成分除去療法、免疫調節薬・抑制薬、抗TNF α 受容体拮抗薬、抗TNF α 抗体などの内的治療法により腸の炎症を抑えることで症状を改善することができるが、完治に導く方法は存在しない。内科的治療で、症状が改善しない場合には、大腸全摘術等の外科的治療が行われることもある。

[0018] 細胞性免疫反応に起因すると考えられているため、上記薬物療法・外科療法以外に、非薬物療法の治療法として、血球成分除去療法（CAP療法）なども用いられている。たとえば、重症激症患者及び難治性患者に対しては、顆粒球、単球を除去するGCAP療法、ステロイド治療抵抗性の患者に対しては白血球（顆粒球、単球及びリンパ球）除去療法（LCAP療法）なども適用され、一定の成果が上げられているものの、普遍的に有効な治療法はいまだが確立されておらず、厚生労働省の特定医療疾患に指定されている。

[0019] 本願発明者らは、上記免疫細胞療法を行った患者の経時観察以外に生化学的パラメータの検証を行い、上記血球成分除去療法とは逆に、体外で増殖させた免疫細胞を患者に戻す免疫細胞療法により、炎症性腸疾患の症状の軽減

緩和が確かになされていることを確認し、本願発明を完成させた。

[0020] 従って、本発明は本発明の構成は以下の [1] から [29] の通りである。

[1] 免疫細胞を含む、炎症性疾患治療用又は予防用医薬組成物；

[2] 免疫細胞が、リンパ球である、[1] の医薬組成物；

[3] 免疫細胞が、培養されたリンパ球である、[1] に記載の医薬組成物；

[4] リンパ球が、 $\alpha\beta$ T細胞、 $\gamma\delta$ T細胞、NK細胞又はCD16⁺及び／又はCD56⁺細胞のいずれかを主成分とする、[3] に記載の医薬組成物；

[5] 免疫細胞が末梢血単核球由来である、[1] の医薬組成物；

[6] 炎症性疾患が炎症性腸疾患である、[1] ～ [5] のいずれかの医薬組成物；

[7] 炎症性腸疾患が潰瘍性大腸炎である、[6] の医薬組成物；

[8] TNF α 阻害剤の投与と共にあるいは続いて投与される、[1] ～ [7] のいずれかの医薬組成物。

[9] TNF α 阻害剤が抗TNF α 抗体である、[8] の医薬組成物。

[0021] [10] 炎症性疾患治療用又は予防用医薬の製造のための、単離された免疫細胞の使用；

[11] 免疫細胞が単離されたリンパ球である、[10] の使用；

[12] 免疫細胞が単離された後、培養されたリンパ球である、[11] の使用；

[13] リンパ球が、 $\alpha\beta$ T細胞、 $\gamma\delta$ T細胞、NK細胞又はCD16⁺及び／又はCD56⁺細胞のいずれかを主成分とする、[12] の使用；

[14] 免疫細胞が末梢血単核球由来である、[10] の使用；

[15] 炎症性疾患が炎症性腸疾患である、[10] ～ [14] のいずれかの使用；

[16] 炎症性腸疾患が潰瘍性大腸炎である、[15] の使用。

[0022] [17] 単離された免疫細胞を患者に投与することを含む、炎症性疾患の治

療又は予防方法；

[18] 免疫細胞がリンパ球である、[17]の方法；

[19] 免疫細胞が、培養されたリンパ球である、[17]の方法；

[20] リンパ球が、 $\alpha\beta$ T細胞、 $\gamma\delta$ T細胞、NK細胞又はCD16⁺及び／又はCD56⁺細胞のいずれかを主成分とする、[19]の方法；

[21] 免疫細胞が末梢血単核球由来である、[17]の方法；

[22] 炎症性疾患が、炎症性腸疾患である、[17]～[21]のいずれかの方法；

[23] 炎症性腸疾患が、潰瘍性大腸炎である、[22]の方法。

- [0023] [24] 1) 患者から末梢血単核球を単離するステップ、
2) 末梢血単核球を培養して免疫細胞を得るステップ、及び
3) 得られた免疫細胞を患者に投与するステップを含む、

炎症性疾患の治療又は予防方法；

[25] 免疫細胞がリンパ球である、[24]の方法；

[26] リンパ球が、 $\alpha\beta$ T細胞、 $\gamma\delta$ T細胞、NK細胞又はCD16⁺及び／又はCD56⁺細胞のいずれかを主成分とする、[25]の方法；

[27] 炎症性疾患が、炎症性腸疾患である、[24]～[26]のいずれかの方法；

[28] 炎症性腸疾患が潰瘍性大腸炎である、[27]の方法。

- [0024] [29] 採取した末梢血単核球を培養して組成物を取得することからなる、
該組成物を有効成分とする炎症性腸疾患治療剤又は予防剤の製造方法。

発明の効果

- [0025] 本願発明を用いることにより、患者のQOL (Quality of Life) の高い炎症性疾患の治療、炎症の軽減緩和を行うことが可能になる。

発明を実施するための形態

- [0026] 以下、本発明を実施するための形態について説明する。

<免疫細胞調製の準備>

まず、免疫細胞の細胞源となる末梢血単核球 (PBMCs) を準備する。

ここでP B M C sとは、末梢血から分離された、リンパ球（NK細胞、NK T細胞、 $\alpha\beta$ T細胞、 $\gamma\delta$ T細胞など）、単球などを含む細胞集団を意味する。P B M C sを準備する方法は、特に限定されない。例えば、採血により得られた末梢血を密度勾配遠心法により分離し、P B M C sを得ることができる。一回の採血量は、免疫細胞療法の種類と治療を行う患者に応じて適宜設定すればよいが、例えば20～75 mL程度である。

また、多量の細胞を確保する必要がある場合には、成分採血装置を用いて単核球成分を採取することにより、直接P B M C sを取得することが可能である。

[0027] 採取したP B M C sは培養液（培地）に懸濁し、増殖又は活性化させたい免疫細胞の種類に応じて、サイトカイン等を添加して培養を行う。培養とは、リンパ球等の細胞の増殖、活性化又は加工を目的として実施する工程を含む。

[0028] P B M C sを懸濁させる培養液の種類は、免疫細胞を増殖させることができれば特に限定されない。そのような培養液の例には、A I M－V培地、R P M I－1 6 4 0培地、ダルベッコ改変イーグル培地（D M E M）、イスコフ培地等が挙げられる。これらの培養液には必要に応じて血清を添加してもよい。添加される血清の例としては、自己血漿が挙げられる。

[0029] P B M C sの培養条件は、免疫細胞を増殖及び活性化させることができれば特に限定されない。通常は、34～38℃（好ましくは37℃）かつ2～10%（好ましくは5%）CO₂条件下で、7～20日程度培養すればよい。この際、培養する細胞数に応じて、培養液を適宜追加する。さらに、培養液量の増加に合わせて、1 L－2等を適宜追加する。

[0030] <NK細胞の製造方法>

NK細胞の製造する場合、抗C D 1 6抗体等、NK細胞に特異的に発現する分子のアゴニストや、1 L－2等を培地に添加して培養する方法が一般的である（例えば、特許4 2 7 5 6 8 0等）。本発明の医薬に用いるNK細胞としては、そのいずれの方法を用いても構わない。また、特許文献W O 2 0

09／151183等に記載された方法により調製されたCD16⁺及び／又はCD56⁺細胞をNK細胞として用いても構わない。

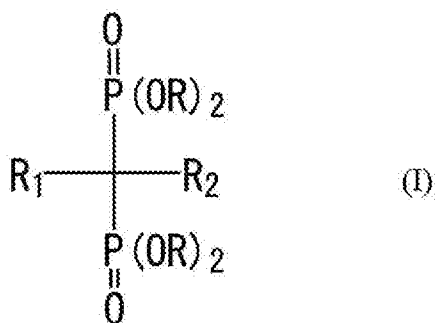
[0031] ＜ $\gamma\delta$ T細胞の製造方法＞

次に、 $\gamma\delta$ T細胞の製造方法について例示する。

採取したPBMCsをビスホスホネートおよびIL-2を添加した培養液に播種し、 $\gamma\delta$ T細胞を培養する。PBMCsをビスホスホネートおよびIL-2の存在下で培養することにより、 $\gamma\delta$ T細胞を選択的に増殖および活性化させて、活性化 $\gamma\delta$ T細胞を高純度を含む細胞集団を調製することができる（特許文献1参照）。

[0032] 本発明において、ビスホスホネートとは、特に制限されず、P-C-Pの骨格を有する化合物をいう。本発明に用いるビスホスホネートは、例えば、下記一般式〔化1〕で表わされる化合物、その塩、及びそれらの水和物が挙げられる。

[0033] 〔化1〕



[0034] 上記〔化1〕中、Rは、水素原子又は低級アルキル基であり、R₁とR₂は、それぞれ独立して、水素原子、ハロゲン原子、ヒドロキシル基、アミノ基、チオール基、置換されていてもよいアリール基、置換されていてもよいアルキル基、低級アルキルアミノ基、アルアルキル基、シクロアルキル基及び複素環式基からなる群から選択され、またR₁とR₂は同じ環状構造の一部を形成してもよい。

上記R₁とR₂における置換基としては、例えば、ハロゲン原子、低級アルキル基、ヒドロキシル基、チオール基、アミノ基、アルコキシ基、アリール

基、アリールチオ基、アリールオキシ基、アルキルチオ基、シクロアルキル基、複素環式基等からなる群から選択される。

[0035] 本明細書において、ハロゲン原子としては、例えば、フルオロ原子、クロロ原子、臭素原子等；アルキル基としては、例えば、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、ペンチル、ヘプチル、オクチル、ペンタデカニル基等の直鎖又は分枝鎖 C_1-C_{30} アルキル基等；低級アルキル基としては、例えば、直鎖又は分枝鎖 C_1-C_{10} アルキル基等；アリール基としては、例えば、フェニル、ナフチル基等；アルアルキル基としては、例えば、アリール-低級アルキル基等；シクロアルキル基としては、例えば、シクロオクチル、アダマンチル等の C_1-C_{10} シクロアルキル基等；複素環式基としては、ピリジル、フリル、ピロリジニル、イミダゾリル、キノリル、イソキノリル基等をそれぞれ示す。

[0036] また、本発明において、ビスホスホネートは、薬学的に許容されるものが好ましく、骨吸収抑制作用を有し、一般的に骨粗鬆症治療薬として使用されているものがあげられる。その例として、パミドロン酸、アレンドロン酸、ゾレドロン酸、リセドロン酸、イバンドロン酸、インカドロン酸およびこれらの塩、ならびにこれらの水和物が含まれる。これらは、窒素原子を有するアミノビスホスホネートであり、パミドロン酸、アレンドロン酸、ゾレドロン酸およびこれらの塩、ならびにこれらの水和物が特に好ましい。市販されているビスホスホネート系骨代謝改善薬としては、例えば、パミドロン酸二ナトリウム五水和物（AREDIA（登録商標）；ノバルティスファーマ株式会社）、ゾレドロン酸水和物（ZOMETA（登録商標）；ノバルティスファーマ株式会社）などが挙げられる。

[0037] PBMCsの培養時に添加するビスホスホネートの濃度は、 $0.05 \sim 100 \mu M$ の範囲内が好ましく、 $0.1 \sim 30 \mu M$ の範囲内がより好ましい。より具体的には、ビスホスホネートとしてパミドロン酸もしくはその塩またはこれらの水和物、アレンドロン酸もしくはその塩またはこれらの水和物を添加する場合は、ビスホスホネートの濃度は、 $1 \sim 30 \mu M$ の範囲内が好ま

しい。また、ビスホスホネートとしてゾレドロン酸もしくはその塩またはこれらの水和物を添加する場合は、ビスホスホネートの濃度は、 $0.1 \sim 10 \mu\text{M}$ の範囲内が好ましい。

[0038] PBMCsの培養時に添加するIL-2の濃度は、 $50 \sim 2000 \text{ U/mL}$ の範囲内が好ましく、 $400 \sim 1000 \text{ U/mL}$ の範囲内がより好ましい。

[0039] PBMCsの培養条件は、 $\gamma\delta$ T細胞を増殖および活性化させることができれば特に限定されない。通常は、 $34 \sim 38^\circ\text{C}$ （好ましくは 37°C ）かつ $2 \sim 10\%$ （好ましくは 5% ） CO_2 存在下で、 $7 \sim 14$ 日程度培養すればよい。この際、培養する細胞数に応じて、培養液を適宜追加する。更に、培養液量の増加に合わせて、IL-2を $50 \sim 2000 \text{ U/mL}$ 、より好ましくは $400 \sim 1000 \text{ U/mL}$ となるように適宜追加する。

[0040] 以上の手順により、 $\gamma\delta$ T細胞を大量に含む細胞集団を得ることができる。得られた細胞集団は、後述するように $\gamma\delta$ T細胞療法において患者に投与する細胞として利用することができる。

[0041] 培養は、 $34 \sim 38^\circ\text{C}$ 、好ましくは 37°C で、 $2 \sim 10\%$ 、好ましくは 5% の CO_2 条件下で行い、培養期間は1日 $\sim$ 20日、特に1 $\sim$ 2週間程度が好ましい。

使用する培地は特に限定されないが、AIM-V培地（インビトロジェン）、RPMI-1640培地（インビトロジェン）、ダルベッコ改変イーグル培地（インビトロジェン）、イスコフ培地（インビトロジェン）、KBM培地（コージンバイオ）、ALY S培地（細胞科学研究所）等細胞培養に使用されている市販の培地を使用することができる。また、必要に応じて $5 \sim 20\%$ の牛血清、牛胎児血清、ヒト血清、ヒト血漿等を添加することができる。

[0042] < $\alpha\beta$ T細胞の製造方法>

次に、 $\alpha\beta$ T細胞の製造方法について例示する。

$\alpha\beta$ T細胞を培養する方法としては、抗CD3抗体及びIL-2を用いた

方法が好ましい。

抗CD3抗体は培地中に添加しても、培養容器に固相化してもよいが、抗CD3抗体を固相化したフラスコ等の培養容器にリンパ球を播種することで、より好適に培養できることが知られている（例えば、特許3056230）。IL-2の濃度は培地中に100～2000IU/mLの濃度となるように添加することが好ましい。

培養は、34～38℃、好ましくは37℃で、2～10%、好ましくは5%のCO₂条件下で行い、培養期間は1日～20日、特に1～2週間程度が好ましい。

使用する培地は特に限定されないが、AIM-V培地（インビトロジェン）、RPMI-1640培地（インビトロジェン）、ダルベッコ改変イーグル培地（インビトロジェン）、イスコフ培地（インビトロジェン）、KBM培地（コージンバイオ）、ALYS培地（細胞科学研究所）等細胞培養に使用されている市販の培地を使用することができる。また、必要に応じて5～20%の牛血清、牛胎児血清、ヒト血清、ヒト血漿等を添加することができる。

[0043] <免疫細胞を含む医薬>

本発明の医薬は、上述の本発明の製造方法により製造された免疫細胞を含む、炎症性疾患を治療・予防するための医薬である。

[0044] 本発明の医薬は、例えば、本発明の製造方法により製造された免疫細胞を医薬品として利用可能な液体（例えば、生理食塩水）に懸濁させた注射剤（細胞懸濁液）である。この注射剤は、静脈内や皮内、皮下などに注射されてもよいし、病変部に直接注入されてもよいし、点滴として全身投与されてもよい。

[0045] 本発明の医薬は、必須成分として免疫細胞を含むが、任意成分としてその他の成分を含んでいてもよい。

[0046] 本発明の医薬に含まれる免疫細胞の数は、投与方法や疾患の種類に応じて適宜設定されうる。通常は、 $10^8 \sim 10^{12}$ 個/人（好ましくは 10^9 個/人

）となるように設定すればよい。

[0047] 本発明の医薬の製造方法は、特に限定されない。例えば、本発明の医薬は、1) 培養した免疫細胞を遠心分離法などにより回収し；2) 回収した免疫細胞を洗浄液（例えば、生理食塩水やPBSなど）で洗浄し；3) 洗浄した免疫細胞を遠心分離法などにより回収し；4) 回収した免疫細胞を医薬品として利用可能な液体（例えば、生理食塩水）に懸濁させることにより、経静脈投与が可能な点滴剤として製造されうる。

[0048] 以下、本発明について実施例を参照して詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例により限定されない。

実施例 1

[0049] <1. 免疫細胞の培養及び投与>

同意をいただいた患者から、末梢血を67.5 mL採取し、遠心分離法により末梢血単核球の培養を行った。瀬田クリニック新横浜CPC（細胞加工施設）にて、およそ14日間の培養を行い、活性化自己NK細胞を調製した。品質検査後、得られた活性化自己NK細胞を点滴剤として調製し、患者に経静脈投与を行った。

[0050] <2. 結果>

当該患者は、数年前から潰瘍性大腸炎により血便、頻便の症状があらわれており、メサラジン（5-アミノサリチル酸：5-ASA）を服用しても改善が認められなかった。そこで、インフリキシマブの投与が2年前から開始され、一般的な用法・用量に従い2週間間隔の投与から4週間間隔に延長され、来院時も6～8週間間隔で投与されていた。インフリキシマブ（抗ヒトTNF α モノクローナル抗体）の投与により、症状の緩和は認められたが、血便の症状は続いていた。

[0051] 2015年3月にNK細胞1回目投与後、翌日より血便が軽減し、まもなく血便が消失した。そのため、潰瘍性大腸炎の主治医と相談し、インフリキシマブの投与を中止し、経過観察を行うこととなった。これまでに計5回の投与を実施し、患者は血便やその他の潰瘍性大腸炎の自覚症状はなく、軽快

状態を継続している（2017年1月末現在）。また、3回目投与後に実施した内視鏡検査の結果でも炎症状態の明らかな改善が確認された。

[0052] まとめ

潰瘍性大腸炎の治療薬を長期にわたり投与しても改善しなかった症状が、免疫細胞の投与することで治療薬の投与なく軽快状態が続いていることから、免疫細胞治療は、炎症性疾患、とりわけ潰瘍性大腸炎の症状の治癒緩和に有効であることが、臨床医の総合的な診断の下、確認された。

[0053] 従って本願発明に係る免疫療法は、メサラジンやインフリキシマブなどのような、炎症性サイトカインの生成作用を阻害することにより症状の治癒緩和を生じる医薬の代用としてあるいは併用で用いることができる。

治療疾患対象としては、潰瘍性大腸炎だけでなく、炎症性サイトカイン、とりわけTNF α と関連する疾患、たとえば、クローン病、関節リウマチ、乾癬（尋常性乾癬、関節症性乾癬、膿疱性乾癬、乾癬性紅皮症を含む）、強直性脊椎炎、ベーチェット病による難治性網膜ぶどう膜炎などにも適用できる。

産業上の利用可能性

[0054] 本発明の治療薬は、従来、完治することができなかった内科的な手法により、炎症性疾患の治療、とりわけ潰瘍性大腸炎の症状軽減緩和を行うことが可能である。

請求の範囲

- [請求項1] 免疫細胞を含む、炎症性疾患治療用又は予防用医薬組成物。
- [請求項2] 前記免疫細胞が、リンパ球である、請求項1に記載の医薬組成物。
- [請求項3] 前記免疫細胞が、培養したリンパ球である、請求項1に記載の医薬組成物。
- [請求項4] 前記リンパ球が、 $\alpha\beta$ T細胞、 $\gamma\delta$ T細胞、NK細胞又はCD16⁺及び／又はCD56⁺細胞のいずれかを主成分とする、請求項3に記載の医薬組成物。
- [請求項5] 前記免疫細胞が末梢血単核球由来である、請求項1に記載の医薬組成物。
- [請求項6] 前記炎症性疾患が炎症性腸疾患である、請求項1～5のいずれか一項に記載の医薬組成物。
- [請求項7] 前記炎症性腸疾患が潰瘍性大腸炎である、請求項6の医薬組成物。
- [請求項8] TNF α 阻害剤の投与と共にあるいは続いて投与される、請求項1～7のいずれか一項に記載の医薬組成物。
- [請求項9] 前記TNF α 阻害剤が抗TNF α 抗体である、請求項8に記載の医薬組成物。
- [請求項10] 炎症性疾患治療用又は予防用医薬の製造のための、単離された免疫細胞の使用。
- [請求項11] 前記免疫細胞が単離されたリンパ球である、請求項10に記載の使用。
- [請求項12] 前記リンパ球が単離された後、培養されたリンパ球である、請求項11に記載の使用。
- [請求項13] 前記リンパ球が、 $\alpha\beta$ T細胞、 $\gamma\delta$ T細胞、NK細胞又はCD16⁺及び／又はCD56⁺細胞のいずれかを主成分とする、請求項12に記載の使用。
- [請求項14] 前記免疫細胞が末梢血単核球由来である、請求項10に記載の使用。

- [請求項15] 前記炎症性疾患が炎症性腸疾患である、請求項10～14のいずれか一項に記載の使用。
- [請求項16] 前記炎症性腸疾患が潰瘍性大腸炎である、請求項15に記載の使用。
- [請求項17] 単離された免疫細胞を患者に投与することを含む、炎症性疾患の治療又は予防方法。
- [請求項18] 前記免疫細胞がリンパ球である、請求項17に記載の方法。
- [請求項19] 前記リンパ球が、培養されたリンパ球である、請求項18に記載の方法。
- [請求項20] 前記リンパ球が、 $\alpha\beta$ T細胞、 $\gamma\delta$ T細胞、NK細胞又はCD16⁺及び／又はCD56⁺細胞のいずれかを主成分とする、請求項19に記載の方法。
- [請求項21] 前記免疫細胞が末梢血単核球由来である、請求項17に記載の方法。
- [請求項22] 前記炎症性疾患が、炎症性腸疾患である、請求項17～21のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項23] 前記炎症性腸疾患が、潰瘍性大腸炎である、請求項22に記載の方法。
- [請求項24] 1) 患者から末梢血単核球を単離するステップ、
2) 末梢血単核球を培養して免疫細胞を得るステップ、及び
3) 得られた免疫細胞を患者に投与するステップを含む、
炎症性疾患の治療又は予防方法。
- [請求項25] 前記免疫細胞がリンパ球である、請求項24に記載の方法。
- [請求項26] 前記リンパ球が、 $\alpha\beta$ T細胞、 $\gamma\delta$ T細胞、NK細胞又はCD16⁺及び／又はCD56⁺細胞のいずれかを主成分とする、請求項25に記載の方法。
- [請求項27] 前記炎症性疾患が、炎症性腸疾患である、請求項24～26のいずれか一項に記載の方法。

[請求項28] 前記炎症性腸疾患が潰瘍性大腸炎である、請求項27に記載の方法

。

[請求項29] 採取した末梢血単核球を培養して組成物を取得することからなる、
該組成物を有効成分とする炎症性腸疾患治療剤又は予防剤の製造方法

。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/005704

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K35/17(2015.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61P1/04(2006.01)i, A61P29/00(2006.01)i, C12N5/0783(2010.01)n, C12N5/0786(2010.01)n According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K35/17, A61K39/395, A61K45/00, A61P1/04, A61P29/00, C12N5/0783, C12N5/0786 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2017 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2017 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2017 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CApus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 2016-501526 A (Enlivex Therapeutics Ltd.), 21 January 2016 (21.01.2016), claims; paragraph [0085]; examples & WO 2014/087408 A1 claims; page 25, line 25 to page 26, line 3; examples & US 2015/0275175 A1 & EP 2929015 A1	1-7, 10-29 8, 9
X	JP 2008-174564 A (University of Southern California), 31 July 2008 (31.07.2008), claims; paragraph [0050]; examples & WO 2000/066158 A2 claims; page 11, lines 12 to 19; examples & JP 2002-543152 A & US 6358506 B1 & EP 1173549 A2	1-7, 10-29
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 09 March 2017 (09.03.17)		Date of mailing of the international search report 21 March 2017 (21.03.17)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/005704

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2010-527978 A (UCL Business PLC), 19 August 2010 (19.08.2010), claims; paragraphs [0031] to [0032] & WO 2008/142405 A1 claims; page 7, lines 6 to 15 & US 2010/0196402 A1 & EP 2160601 A1	8, 9

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A61K35/17(2015.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61P1/04(2006.01)i, A61P29/00(2006.01)i, C12N5/0783(2010.01)n, C12N5/0786(2010.01)n

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A61K35/17, A61K39/395, A61K45/00, A61P1/04, A61P29/00, C12N5/0783, C12N5/0786

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 7 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 7 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 7 年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	JP 2016-501526 A (エンリヴェックス セラピューティクス リミテッド)	1-7, 10-29
Y	2016.01.21, 特許請求の範囲、段落 0 0 8 5、実施例、等 & WO 2014/087408 A1, Claims、25 頁 25 行-26 頁 3 行、Examples & US 2015/0275175 A1 & EP 2929015 A1	8, 9

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

0 9 . 0 3 . 2 0 1 7

国際調査報告の発送日

2 1 . 0 3 . 2 0 1 7

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官 (権限のある職員)

伊藤 基章

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 3 9

4 U

4 1 4 6

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	JP 2008-174564 A (ユニバーシティ オブ サザン カリフォルニア) 2008.07.31, 特許請求の範囲、段落0050、実施例、等 & WO 2000/066158 A2, Claims、11 頁 12-19 行、Examples & JP 2002-543152 A & US 6358506 B1 & EP 1173549 A2	1-7, 10-29
Y	JP 2010-527978 A (ユーシーエル ビジネス ピーエルシー) 2010.08.19, 特許請求の範囲、段落0031-0032 & WO 2008/142405 A1, Claims、7 頁 6-15 行 & US 2010/0196402 A1 & EP 2160601 A1	8, 9