



(21)申請案號：111133861

(22)申請日：中華民國 111 (2022) 年 09 月 07 日

(51)Int. Cl. : C12N1/04 (2006.01) A01N1/02 (2006.01)

(30)優先權：2021/09/08 日本 2021-146461

(71)申請人：日商蓋亞生物製藥有限公司(日本) GAIA BIOMEDICINE INC. (JP)
日本

(72)發明人：原田結 HARADA, YUI (JP)；米滿吉和 YONEMITSU, YOSHIKAZU (JP)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：7 項 圖式數：13 共 62 頁

(54)名稱

細胞之處理方法

(57)摘要

本發明提供一種於維持較高之活性之狀態下，將冷凍之高活性 NK 細胞進行解凍之方法。將滿足以下條件之用於懸浮高活性 NK 細胞之液體用於解凍之細胞之解凍。本發明提供一種液體，其用於懸浮用以向人類投予之細胞，且滿足以下條件。(1)含有鉀離子；(2)pH 值為 6.4 以上；(3)不以 135 mEq/L 以上之濃度含有氯化物離子；(4)不以 0.423 mM 以上之濃度含有鈣離子；(5)滲透壓為 200 ~ 396 mOsm。

【發明摘要】

【中文發明名稱】

細胞之處理方法

【中文】

本發明提供一種於維持較高之活性之狀態下，將冷凍之高活性NK細胞進行解凍之方法。將滿足以下條件之用於懸浮高活性NK細胞之液體用於解凍之細胞之解凍。本發明提供一種液體，其用於懸浮用以向人類投予之細胞，且滿足以下條件。(1)含有鉀離子；(2)pH值為6.4以上；(3)不以135 mEq/L以上之濃度含有氯化物離子；(4)不以0.423 mM以上之濃度含有鈣離子；(5)滲透壓為200~396 mOsm。

【指定代表圖】

無

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

細胞之處理方法

【技術領域】

【0001】

本發明係關於一種對高活性NK細胞(natural killer cells，自然殺手細胞)等用以向人類投予之細胞進行處理之方法。

【先前技術】

【0002】

NK細胞於腫瘤細胞或病毒感染細胞之毒殺方面較為重要。2017年8月，美國以幼兒及年輕成年人之復發/難治性B細胞性急性淋巴母細胞性白血病(B-ALL)為適應症，核准了嵌合抗原受體(CAR)T細胞療法，但近年來代替CAR-T，CAR-NK之臨床應用不斷擴大(非專利文獻1)。

【0003】

於欲向患者投予細胞時，為了避免引起排斥反應，首先研究使用自患者本人所採集之細胞。但是，根據患者之狀態不同，有時難以採集治療所需量之細胞。又，能夠於體外活化、增生之程度有個人差異，存在增生活化困難之病例。此外，由於細胞之活化、增生需要一定時間，故而有無法立即開始治療之問題。就該方面而言，較理想為預先使細胞活化，加以保存以備投予。

【0004】

作為保存細胞之方法，於短時間保存之情形時，已知有不進行冷凍而以懸浮狀態保存之方法(例如專利文獻1)，又，於長時間保存之情形

時，已知有進行冷凍之保存方法(例如專利文獻2)。進而，為了將細胞進行冷凍，且於解凍後亦獲得維持較高之存活率之細胞，研究有使用含有鈉鹽、鉀鹽、糖、凍傷保護劑、以及碳酸氫鹽及/或碳酸鹽之用於冷凍之溶液(專利文獻3)。

【0005】

又，關於如NK細胞般保存困難之細胞，已知有一種細胞之保存方法，其係於含有鈉鹽、鉀鹽、糖類、以及蛋白質作為有效成分之溶液中保存細胞(專利文獻4)。進而，已知有一種冷藏保存用細胞保存液，其含有鉀離子及乳酸根離子，滲透壓為200～350 mOsm/ kg，pH值為6.0～8.0(專利文獻5)，該保存液中，糖類之含量為0.5～150 mM，鈣離子之濃度為1～4 mM。進而，已知有一種細胞/組織保存液，其滲透壓為270～450 mOsm/l，pH值為7～8，且含有K⁺或有機酸根陰離子(專利文獻6)。作為有機酸，例示有乳酸。進而，已知作為NK細胞等哺乳動物細胞懸浮液，使用生理水溶液，且已知作為生理水溶液，可使用等張(250～380 mOsm/l)水溶液，如林格氏溶液(乳酸林格氏溶液)等(專利文獻7)。該文獻之實施例中，使用乳酸林格氏溶液(Otsuka Pharmaceutical Factory公司製造之「Lactec Injection」)(段落0038)，其包含鉀或乳酸，pH值為6.0～7.5，且不含葡萄糖。

[先前技術文獻]

[專利文獻]

【0006】

[專利文獻1]日本專利特開2006-230396號公報

[專利文獻2]日本專利特開2002-233356號公報

[專利文獻3]WO2011/021618

[專利文獻4]WO2013/115322

[專利文獻5]日本專利4947948號公報

[專利文獻6]WO2002/001952

[專利文獻7]日本專利特開2013-233102號公報

[專利文獻8]WO2021/177279(PCT/JP2021/007863，於本申請案之優先日未公開)

[非專利文獻]

【0007】

[非專利文獻1] Liu E, et al. N Engl J Med. 2020; 382: 545-53

【發明內容】

[發明所欲解決之問題]

【0008】

然而，於先前之使用二甲基亞砷之類的保護劑之冷凍方法中，能夠保存T細胞系或原代NK細胞，但對於細胞毒殺活性較高之NK細胞而言並不充分，因冷凍解凍操作而使其活性及存活率顯著降低。上述問題藉由程式冷凍器(program freezer)、細胞密度調整、葡聚糖、白蛋白、或羧基化聚-L-離胺酸等之添加等均無法解決。並且，若以一定量之細胞死亡為前提進行投予用細胞之包裝，則於解凍後必須進行用於再活化培養之步驟，且所獲得之細胞必須進一步進行洗淨。因此，存在如下現狀：對於經冷凍儲備之高活性NK細胞，為了處理臨床用之細胞，必須利用滿足一定基準之細胞培養加工設施(CPC)。

【0009】

另一方面，本發明者等人對將高活性NK細胞進行冷凍、解凍之方法進行了研究(專利文獻8)。其中，判明即便於解凍之細胞之存活率維持得較高之情形時，有時亦無法維持較高之細胞毒殺活性。又，可知關於解凍之細胞，若維持較高之細胞毒殺活性，則提示存活率亦較高之可能性，因而利用規定方法評價之細胞毒殺活性較高係對解凍之細胞有用之評價基準。

【0010】

本發明之課題之一在於提供一種對於具有較高之活性之細胞而言有效之解凍方法。進一步特定而言，提供一種以利用規定方法評價之細胞毒殺活性為60%以上、較理想為80%以上之方式，將冷凍之高活性NK細胞進行解凍之方法。

[解決問題之技術手段]

【0011】

本發明者等人發現於將冷凍之細胞進行解凍時，用於稀釋之液體之組成特別重要。又，發現此種用於稀釋之液體之組成亦可僅設為「藥品、醫療機器等之品質、有效性及安全性之確保等相關之法律(1960年法律第四百四十五號)所許可的輸液等所使用之成分，從而完成了本發明。

【0012】

本發明提供以下內容。

[1]一種液體，其係用於懸浮用以向人類投予之細胞，且滿足以下條件。

- (1)含有鉀離子；
- (2)pH值為6.4以上；

(3)不以135 mEq/L以上之濃度含有氯化物離子；

(4)不以0.423 mM以上之濃度含有鈣離子；

(5)滲透壓為200~396 mOsm。

[2]如1所記載之液體，其用於稀釋包含用以向人類投予之細胞之冷凍物或其解凍物。

[3]如1或2所記載之液體，其以4.00 mEq/L以上之濃度含有鉀離子，不含鈣離子，且

pH值為7.0~8.3。

[4]一種醫藥組合物，其包含懸浮於如1至3中任一項之液體之用以向人類投予之細胞之集群，且用以向人類投予之細胞為高活性NK細胞。

[5]如4所記載之醫藥組合物，其中高活性NK細胞之集群係經過冷凍步驟者。

[6]如5所記載之醫藥組合物，其中冷凍前之高活性NK細胞之集群係使用包含白蛋白、運鐵蛋白、胰島素、及IL-2之培養基所回收者。

[7]一種輸注用醫藥組合物之提供方法，該輸注用醫藥組合物包含用以向人類投予之細胞，該提供方法包括以下步驟。

(1)利用動物細胞培養用培養基將該細胞進行洗淨之步驟；

(2)使視需要洗淨之該細胞懸浮於冷凍保存液之步驟；

(3)將懸浮於冷凍保存液之該細胞進行冷凍而保存(入庫)之步驟；

(4)將經冷凍保存之該細胞進行解凍之步驟；以及

(5)使解凍之該細胞懸浮於如1至3中任一項所記載之液體，製成輸注用醫藥組合物之步驟。

【0013】

又，本發明提供以下內容。

[1]一種液體，其係用於懸浮用以向人類投予之細胞，且滿足以下條件。

- (1)含有鉀離子；
- (2)pH值為6.4以上；
- (3)不以135 mEq/L以上之濃度含有氯化物離子；
- (4)不以5.55 mM以上之濃度含有葡萄糖；
- (5)不以0.423 mM以上之濃度含有鈣離子；
- (6)滲透壓為200～396 mOsm。

[2]如1所記載之液體，其用於稀釋包含用以向人類投予之細胞之冷凍物或其解凍物。

[3]如1或2所記載之液體，其以4.00 mEq/L以上之濃度含有鉀離子，不含鈣離子，不含葡萄糖，且pH值為7.0～8.3。

[4]一種醫藥組合物，其包含懸浮於1～3中任一項之液體之用以向人類投予之細胞之集群，且用以向人類投予之細胞為高活性NK細胞。

[5]如4所記載之醫藥組合物，其中高活性NK細胞之集群係經過冷凍步驟者。

[6]如5所記載之醫藥組合物，其中冷凍前之高活性NK細胞之集群係使用包含白蛋白、運鐵蛋白、胰島素、及IL-2之培養基所回收者。

[7]一種輸注用醫藥組合物之提供方法，該輸注用醫藥組合物包含用以向人類投予之細胞，該提供方法包括以下步驟。

- (1)利用動物細胞培養用培養基將該細胞進行洗淨之步驟；
- (2)使視需要洗淨之該細胞懸浮於冷凍保存液之步驟；
- (3)將懸浮於冷凍保存液之該細胞進行冷凍而保存(入庫)之步驟；
- (4)將經冷凍保存之該細胞進行解凍之步驟；以及
- (5)使解凍之該細胞懸浮於如1至3中任一項所記載之液體，製成輸注用醫藥組合物之步驟。

【圖式簡單說明】

【0014】

圖1係將高活性NK細胞進行冷凍、解凍後之細胞毒殺活性。設定基於Plasma-Lyte A構成成分之濃度而不含葡萄糖酸鈉之組(1)、不含葡萄糖酸鈉且使其他各成分增量16%調整了滲透壓之組(2)、不含葡萄糖酸鈉且利用NaCl調整了滲透壓之組(3)、作為陽性對照之Plasma-Lyte A(4)、生理鹽水(5)、於生理鹽水中添加有與Plasma-Lyte A相同濃度之葡萄糖酸鈉之組(6)。於解凍稀釋後第3小時，於(5)、(6)中確認到顯著之活性降低。

圖2係將高活性NK細胞進行冷凍、解凍後之細胞毒殺活性。設定均不含葡萄糖酸鈉且基於Plasma-Lyte A構成成分之濃度而自Plasma-Lyte A中去除了 Mg^{2+} 、 K^{+} 、 CH_3COO^{-} (乙酸)各一種成分之組(1)~(3)、於生理鹽水中追加有各一種成分之組(4)~(6)。於解凍稀釋後第3小時，於去除了 K^{+} 、 CH_3COONa 之組(2)、(3)中可見活性之降低，於去除了 Mg^{+} 之組(1)中未見降低。又，根據(4)~(6)之實驗，確認到僅 K^{+} 單獨有助於活性。

圖3係將高活性NK細胞進行冷凍、解凍後之細胞毒殺活性。設定作為陽性對照之Plasma-Lyte A(1)、作為陰性對照之生理鹽水(2)、基於Plasma-Lyte A構成成分之濃度而不含葡萄糖酸鈉及氯化鎂且相對於生理

鹽水之滲透壓比製備為0.80、0.95、1.0、1.10之(3~6)。又，設定僅利用NaCl將滲透壓比調整為1.0之組(7)。關於活性，於(3)~(6)中未確認到影響，但於僅利用NaCl將滲透壓比調整為1.0之組(7)中確認到降低傾向。

圖4係將高活性NK細胞進行冷凍、解凍後之細胞毒殺活性。設定作為陽性對照之Pasma-Lyte A(1)、作為陰性對照之生理鹽水(2)，製備以K⁺濃度成為5 mEq/L之方式於磷酸緩衝液中補充K⁺之組(3)、THAM點滴靜脈注射(4)、生理鹽水/MEYLON/KCl之調配液(6)、水/MEYLON/KCl/NaCl之調配液(7)。又，以K⁺濃度成為2.5 mEq/L之方式製備THAM/MEYLON之調配液(5)、水/CH₃COONa/KCl/NaCl之調配液(8)。於(3)中，與生理鹽水(2)相比確認到活性之提昇，但無法充分地達成活性之維持。又，關於(5)、(8)，活性之維持亦不充分。

圖5係將高活性NK細胞進行冷凍、解凍後之細胞毒殺活性。設定作為陽性對照之Plasma-Lyte A(1)、作為陰性對照之生理鹽水(2)，製備SOLMALT(7)、以及作為基於SOLMALT而調整了pH值之組之SOLMALT/MEYLON調配液(3)、SOLMALT/THAM調配液(4)。又，製備自Plasma-Lyte A中去除了葡萄糖酸鈉/Mg²⁺兩者且其他成分包含與Plasma-Lyte A相同濃度之調配液(5)、自Plasma-Lyte A中去除了葡萄糖酸鈉/Mg²⁺兩者且僅將NaCl減量而滲透壓與(5)相同之調配液(6)。又，追加使用THAM之SOLMALT之pH值調整後添加水而使滲透壓降低之組(8)。於(7)中無法維持活性，但關於(3)、(4)確認到活性改善之傾向。確認到該傾向具有再現性，關於使用THAM之SOLMALT之pH值調整後添加水而使滲透壓降低之組(8)，亦能夠獲得同樣之結果。又，根據本結果，於實驗上確認到若pH值降至6.0，則難以維持活性，且可容許至8.8(圖5)。

圖6係將高活性NK細胞進行冷凍、解凍後之細胞毒殺活性。設定作為陽性對照之Plasma-Lyte A(1)、作為陰性對照之生理鹽水(2)，製備SOLMALT(7)、以及作為基於SOLMALT而調整了pH值之組之SOLMALT/MEYLON調配液(3)、SOLMALT/THAM調配液(4)。又，製備自Plasma-Lyte A中去除了葡萄糖酸鈉/Mg²⁺兩者且其他成分包含與Plasma-Lyte A相同濃度之調配液(5)、自Plasma-Lyte A中去除了葡萄糖酸鈉/Mg²⁺兩者且僅將NaCl減量而滲透壓與(5)相同之調配液(6)。可明確於置換為RPMI後觀察到於剛解凍稀釋後未觀察到之成活率(viability)之降低。

圖7-1係將高活性NK細胞進行冷凍、解凍後之細胞毒殺活性。設定作為陽性對照之Pasma-Lyte A(1)、作為陰性對照之生理鹽水(2)，製備作為基於SOLMALT利用MEYLON調整了pH值之組之SOLMALT：MEYLON = 20：1調配液(3)、SOLMALT：MEYLON = 10：1調配液(4)、SOLMALT/MEYLON/水之調配液(5)、KLINISALZ(6)、作為基於KLINISALZ利用MEYLON製備了pH值之組之KLINISALZ/MEYLON之調配液(7)。又，製備Plasma-Lyte A + 14萬IU/mL IMUNACE(8)、Plasma-Lyte A + 875 μM牛磺熊去氧膽酸(TUDCA)之混合液(9)。可明確於(3)中能夠維持活性。再者，可知(8)與Pasma-Lyte A(1)之活性維持能力同等，IMUNACE之添加無助於至少以K562為對象之活性。pH值較低之KLINISALZ(6)、製備了pH值但滲透壓較高之KLINISALZ/MEYLON之調配液(7)無法維持活性。

圖7-2再現性良好地確認到置換為RPMI後之成活率降低與活性之間之較高之關聯。

圖8係將高活性NK細胞進行冷凍、解凍後之細胞毒殺活性。製備利用MEYLON將pH值調整為7.6~8.0且K⁺濃度調整為5 mEq/L之白蛋白/K.C.L./MEYLON之調配液(1)、白蛋白/K.C.L./生理鹽水/MEYLON之調配液(2)、進而作為Cl⁻濃度調整為80 mMq/L之組之白蛋白/K.C.L./生理鹽水/AMIZET/水/MEYLON之調配液(3)、K.C.L./生理鹽水/AMIZET/水/MEYLON之調配液(4)、作為陽性對照之Pasma-Lyte A(6)。(2)及(4)顯示良好之活性維持能力，(3)顯示顯著之好效果。

圖9係將高活性NK細胞進行冷凍、解凍後之細胞毒殺活性。全部將滲透壓設定為300 mOsm，製備白蛋白/K.C.L./生理鹽水/AMIZET/水/MEYLON之調配液(1)、K.C.L./生理鹽水/AMIZET/水/MEYLON之調配液(2)、白蛋白/K.C.L./生理鹽水/AMIZET/水/MEYLON之調配液(3)、作為陽性對照之Pasma-Lyte A(5)。(2)顯示良好之活性維持能力，(1)及(3)顯示顯著之好效果。

圖10係對解凍後3小時內之活性造成影響之因子之鎖定。根據統計解析之結果，提示對於維持活性，Cl⁻濃度、pH值之影響較大，又，K⁺可能存在閾值。

圖11係適於靜脈內投予之其他調整液之利用1。上：基於7-AAD染色之成活率。下：Plasma-Lyte A(1)、調整液(2)之細胞毒殺活性。將K562細胞作為靶細胞(T)以混合比(E:T)1:1、2:1共培養2小時之情形。

圖12係適於靜脈內投予之其他調整液之利用2。上：基於7-AAD染色之成活率。下：Plasma-Lyte A(1)、調整液(2)之細胞毒殺活性。將K562細胞作為靶細胞(T)以混合比(E:T)1:1、2:1、4:1共培養2小時之情形。

圖13係葡萄糖之影響。利用於Plasma-Lyte A中添加有各濃度之葡萄糖之液體進行稀釋之情形時的細胞毒殺活性。GAIA-102(E)與K562細胞(T)以ET比為0.5：1、1：1、或2：1進行混合，測定毒殺活性。根據以ET比4點(包括0)算出之細胞毒殺活性率，藉由使用JMP(註冊商標)Pro統計解析軟體之非線性回歸分析算出E：T=1：1之計算值。#1：將葡萄糖之濃度設為0、1、2、4、8、16、26、50 g/L，#2：將葡萄糖之濃度設為0、4、8、16、26、38、50 g/L。

【實施方式】

【0015】

就本發明而言，除特別記載之情形以外，mM均以與mmol/L相同之含義使用。以x~y表示數值範圍時，其範圍包含兩端之值x及y。

【0016】

本發明係關於一種冷凍之用以向人類投予之細胞之解凍或融解方法。就本發明而言，記為解凍或融解時，除特別記載之情形以外，意指使冷凍者融化。於解凍或融解時，有時添加液體進行稀釋。

【0017】

[可應用之細胞]

本發明可應用於各種細胞。本發明可良好地應用之細胞之一為向人類投予之細胞，較佳為向人類投予且於體外經過藉由使用某些細胞激素之活化操作之細胞，此種細胞包括細胞毒殺活性較高之NK細胞(高活性NK細胞)等。活化操作典型地係藉由使用包含介白素(IL)-2之培養基溫育細胞而進行。再者，以下有時以將本發明應用於NK細胞或高活性NK細胞之情形為例進行說明，但業者基於該說明，亦能夠適當理解將本發明應用於除

NK細胞或高活性NK細胞以外之細胞之情形。

【0018】

一般而言，所謂NK細胞，係指不表現T細胞受體(TCR)、作為T細胞普遍標記物之CD3(Cluster of Differentiation 3，分化簇3)、及作為膜免疫球蛋白之B細胞受體的大型顆粒性淋巴細胞，人類通常為CD16陽性且CD56陽性。關於是否為NK細胞，業者可基於細胞表面標記物之表現模式等而容易地判斷。NK細胞具有細胞毒殺活性，該細胞毒殺活性之有無或程度可利用公知之各種方法進行測定。NK細胞可包含末梢血NK細胞、臍帶血NK細胞、原代NK細胞、培養NK細胞、高活性NK細胞。

【0019】

(原材料)

本發明可良好地應用之高活性NK細胞等之原材料可為末梢血、臍帶血、骨髓及/或淋巴結、藉由血球分離法所採集之血液(血球分離血液)。又，原材料亦可為由選自由如下細胞所組成之群中之至少一種細胞所製備者：來自選自由胚胎幹細胞、成體幹細胞及人工多能幹(iPS)細胞所組成之群組中之任一種幹細胞之造血幹細胞、來自臍帶血之造血幹細胞、來自末梢血之造血幹細胞、來自骨髓血之造血幹細胞、臍帶血單核細胞、末梢血單核細胞。原材料之供體有時為接受利用高活性NK細胞等之免疫治療之患者本人、該患者之近親、或與患者無血緣關係之健康者。供體亦可為複數個。

【0020】

(培養基)

用以培養高活性NK細胞等之培養基包含KBM501培養基(Kohjin Bio

股份有限公司。包含1,750 JRU/mL之IL-2)、COSMEDIUM 008(Cosmo Bio。包含1,750 JRU/mL之IL-2)、FKCM101(Fukoku。不含IL-2或以175 IU/mL包含IL-2)、CellGro SCGM培養基(CellGenix, 岩井化學藥品股份有限公司)、X-VIVO15培養基(Lonza, Takara Bio股份有限公司)、Gibco(註冊商標)、CTS(註冊商標)、AIM V(註冊商標)、Medium(Thermo Fisher Scientific。用以將T細胞及樹狀細胞進行增生、操作之已知組成之無血清培養基)、CTS OpTmizer T細胞擴增基本培養基(Thermo Fisher Scientific。人類T淋巴細胞之生長及增生用)、IMDM(Iscove's Modified Dulbecco's Medium, Iscove改良之Dulbecco培養基)、MEM(Minimum Essential Medium, 最低必需培養基)、DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium, Dulbecco改良之Eagle培養基)、RPMI-1640等, 但並不限定於該等。較佳例為KBM501培養基、FKCM101或COSMEDIUM 008。再者, 就本發明而言, 對細胞(進行)培養時, 除特別記載之情形以外, 係指為了選自由細胞之存活維持、細胞之擴增、及細胞之活化所組成之群中之任一種目的, 使細胞於培養基或以培養基為基準之液體中維持一定時間。於在特定溫度下進行一定時間處理情形時, 有時係指(進行)溫育。

【0021】

培養基中有時可以可達成本發明之目的之濃度添加IL-2。IL-2之濃度有時為2500 IU/mL~2813 IU/mL。IL-2較佳為具有人類之胺基酸序列, 就安全方面而言, 較佳為利用重組DNA(Deoxyribonucleic Acid, 去氧核糖核酸)技術來生產。IL-2之濃度有時以國內標準單位(JRU)及國際單位(IU)表示。由於1 IU為約0.622 JRU, 故而既有之培養基之1750 JRU/mL

相當於約2813 IU/mL。

【0022】

有時與上述之IL-2同時或代替IL-2，以可達成本發明之目的之濃度添加選自由IL-12、IL-15、及IL-18所組成之群中之任一者(非專利文獻2：Leong JW et al. Biol Blood Marrow Transplant 20 (2014) 463-473)。各者之濃度無論其他細胞激素之有無或濃度如何，均有時為1 pg/mL ~ 1 µg/mL。IL-2較佳為具有人類之胺基酸序列，就安全方面而言，較佳為利用重組DNA技術來生產。

【0023】

培養基中有時添加受驗者之自體血清、可自BioWhittaker公司及其他公司獲取之人類AB型血清、或可自日本紅十字會獲取之獻血人類血清白蛋白。自體血清及人類AB型血清較佳為以1至10%之濃度添加，獻血人類血清白蛋白較佳為以1至10%之濃度添加。亦可與血清一起或代替血清而添加人類血小板溶解物(Human platelet lysate：HPL)。HPL有市售，售賣有UltraGRO™系列(AventaCell BioMedical公司)等。於使用HPL之情形時，亦可於培養基中進而添加肝素鈉。

【0024】

培養基中，於無損NK細胞之培養效果之條件下，有時包含適當之蛋白質、細胞激素、抗體、化合物及其他成分。細胞激素除上述之IL-2、IL-12、IL-15、及IL-18以外，有時為IL-3、IL-7、IL-21、幹細胞因子(SCF)、及/或FMS樣酪胺酸激酶3配體(Flt3L)。該等均較佳為具有人類之胺基酸序列，就安全方面而言，較佳為利用重組DNA技術來生產。

【0025】

培養基較佳為無血清培養基。無血清培養基較佳為包含血清白蛋白、運鐵蛋白、及胰島素。開發、市售有用以培養淋巴細胞之無血清培養基，於本發明中可利用該等。無血清培養基之較佳例之一係於基礎培養基中添加有作為支持人類T細胞之增生之組成市售之CTS免疫細胞SR(Thermo Fisher Scientific)者。

【0026】

關於培養基之更換或補充，於獲得目標培養效果之條件下，培養開始後何時進行皆可，但較佳為每3~5天進行。

【0027】

培養時所使用之培養容器包含可商業獲取之皿(dish)、燒瓶、板(plate)、多孔板，但並不限定於該等。關於培養條件，於無損NK細胞之培養效果之條件下，並無特別限定，但通常為37°C、5%CO₂及飽和水蒸氣氛圍下之培養條件。關於培養期間，於獲得目標培養效果之條件下，並無特別限定。

【0028】

本發明可良好地應用之高活性NK細胞等中包含下述之[1]、[2]、[3]及[4]。

【0029】

[1]如下NK細胞，其具備下述(1)及(2)之特徵：

- (1)為CD16陽性、CD56高表現性、且CD57陰性。
- (2)為NKG2C陽性、NKG2A陰性~低表現性、及CD94陽性。

【0030】

[1]之高活性NK細胞亦可為CD16高表現性。又，[1]之高活性NK細

胞無論是否為CD16高表現性，均可進而具備下述特徵。

(3)將該NK細胞設為效應細胞(E)，將K562細胞設為靶細胞(T)以混合比(E:T)1:1進行共培養之情形時之細胞毒殺活性為50%以上。

【0031】

[1]之高活性NK細胞亦可如下所示：

如下NK細胞：自來自健康人之末梢血單核細胞，使用CD3珠粒(例如，CliniMACS CD3，Miltenyi Biotec公司，目錄編號130-017-601)、LD管柱(例如，Miltenyi Biotec，目錄編號130-042-901)及分離緩衝液(例如，包含0.5%人類AB型血清(經滅活處理者)、2 mM EDTA(ethylene diamine tetraacetic acid，乙二胺四乙酸)之PBS(phosphate buffer saline，磷酸鹽緩衝液))，去除CD3陽性細胞而獲得細胞集群，將所獲得之細胞集群於適當之培養基(例如，添加有5%人類AB型血清(經滅活處理者)之COSMEDIUM 008)中培養14天而獲得，且具備下述(1)及(3)之特徵：

(1)為CD16陽性、CD56高表現性、且CD57陰性。

(3)將該NK細胞作為效應細胞(E)，將K562細胞作為靶細胞(T)以混合比(E:T)1:1進行共培養之情形時之細胞毒殺活性為50%以上。

【0032】

[1]之高活性NK細胞之特徵之詳情及更具體之製造方法可參照日本專利特開2018-193303。

【0033】

[2]下述之細胞：

為CCR5陽性、CCR6陽性及CXCR3陽性且CD3陰性之細胞。

【0034】

[2]之細胞亦可進而為CD11c高表現性。

【0035】

[2]之細胞亦可如下所示：

為CCR5陽性、CCR6陽性、CXCR3陽性、整合素 α 1陽性、整合素 α 3陽性及整合素 β 3陰性且為CD3陰性之細胞。或者如下細胞：為CCR5陽性、CCR6陽性、CXCR3陽性、CD11a高表現性及CD11c高表現性且為CD3陰性，且高表現性係藉由與自末梢血中獲得且未進行實質上之培養之NK細胞之集群中的表現比較來判斷。

【0036】

根據本發明者等人之研究，[2]之細胞對形成有腫瘤塊之實體癌顯示極高之細胞毒殺活性。[2]之細胞之特徵之詳情及更具體之製造方法可參照日本專利特開2019-170176。

【0037】

[3]可利用下述方法而獲得之高活性NK細胞：

於自新鮮末梢血或自冷凍血球分離血液獲得之單核細胞中，添加CD3珠粒(例如，CliniMACS CD3，Miltenyi Biotec，130-017-601(每 1×10^7 個細胞為5 μ L))，及於使用冷凍血球分離血液之情形時進而添加CD34珠粒(例如，CliniMACS CD34，Miltenyi Biotec，130-017-501(每 1×10^7 個細胞為2.5 μ L))加以懸浮，於4 $^{\circ}$ C下溫育15分鐘後，添加分離緩衝液(例如，包含0.5%人類AB型血清(於56 $^{\circ}$ C下進行了30分鐘之滅活處理者)、2 mM EDTA之PBS)充分懸浮，並進行離心。去除上清液，以成為LD管柱(例如，Miltenyi Biotec，130-042-901)每一管柱中最多 1×10^8 個細胞之細胞數之方式懸浮於0.5 mL之分離緩衝液中。預先添加分離緩衝液2

mL後，於LD管柱中添加細胞懸浮液，回收來自LD管柱之溶出液。進而，將分離緩衝液1 mL添加至LD管柱中，並回收溶出液。對所回收之液體進行離心分離，去除上清液後，於使用末梢血之情形時以成為 5×10^5 個細胞/mL之方式，於使用冷凍血球分離血液之情形時以成為 1×10^6 個細胞/mL之方式，於適當之培養基(例如，包含5%人類AB型血清(於 56°C 下進行了30分鐘之滅活處理者)或於5%UltraGRO(AventaCell、HPCPLCRL10)中添加有2 U/mL肝素鈉者之任一者之KBM501培養基)中使細胞懸浮，適當更換培養基，並培養至第14天。

【0038】

[3]之高活性NK細胞之具體之製造方法可參照本說明書之實施例之項。

【0039】

[4]於獲得[1]~[3]之細胞時，藉由與IL-2同時或代替IL-2，以可達成本發明之目的之濃度添加選自由IL-12、IL-15、及IL-18所組成之群中之任一者進行培養而獲得之細胞。此種細胞之具體之製造方法可參照上述非專利文獻2。

【0040】

再者，以下有時以使用高活性NK細胞之情形為例來說明本發明，但業者依據該說明，亦能夠理解將本發明用於其他於體外經過藉由使用某些細胞激素之活化操作之細胞之情形。

【0041】

(細胞毒殺活性)

就本發明而言，對高活性NK細胞等提及活性或細胞毒殺活性時，除

特別記載之情形以外，係指對象細胞(效應細胞、E)對靶細胞(T)之溶解能力。細胞毒殺活性可以由效應細胞致死之靶細胞之百分率(%)表示，可藉由下式求出。

【0042】

(與效應細胞共培養之情形時之細胞死亡－自然細胞死亡(陰性對照))/(最大細胞死亡(陽性對照)－自然細胞死亡(陰性對照)) \times 100

【0043】

於測定細胞毒殺活性時，一般而言根據效應細胞之細胞毒殺活性之程度等，效應細胞與靶細胞之混合比(E：T)、效應細胞與靶細胞之共培養之時間可根據所使用之細胞之種類或活性之強度而適當設定。將NK細胞設為效應細胞時，靶細胞有時為K562細胞、急性骨髓性白血病細胞、慢性骨髓性白血病細胞，但並不限定於該等。效應細胞與靶細胞、活細胞與死細胞可藉由經放射性物質、螢光色素等標記之抗體等試劑來區分及定量。將NK細胞設為效應細胞時之細胞毒殺活性例如可於下述條件下進行測定，即，將K562細胞設為靶細胞，設為E：T=1：0.05～10、較佳為1：0.1～5，將溫育時間設為0.5～18小時、較佳為1～12小時之條件。

【0044】

就本發明而言，提及NK細胞等之活性較高時，除特別記載之情形以外，係指將靶細胞設為K562細胞，以E：T=2：1進行混合，共培養1～3小時、進一步特定而言2小時之情形時之細胞毒殺活性為50%以上。活性較佳為60%以上，更佳為70%以上。

【0045】

[回收]

於本發明中，於後述之冷凍步驟之前，自培養體系中回收應冷凍之高活性NK細胞等。回收可藉由進行離心分離將培養基與細胞分離來進行。視需要，亦可向培養體系中添加適當濃度之EDTA，使黏著之細胞自培養容器表面剝離。又，亦可利用適當之溶液將回收培養基後之培養容器表面進行洗淨，獲得殘留之細胞。對於所獲得之細胞，視需要利用適當之溶液進行洗淨，並懸浮於適當之溶液中。

【0046】

於回收步驟中，為了進行細胞之剝離或洗淨，可使用培養基、等張液、緩衝液等溶液。作為可使用之培養基之例，可例舉：KBM501培養基、COSMEDIUM 008、FKCM101、CellGro SCGM培養基、X-VIVO15培養基、Gibco(註冊商標)、CTS(註冊商標)、AIM V(註冊商標)培養基、CTS OpTmizer T細胞擴增基本培養基、IMDM、MEM、DMEM、RPMI-1640。所謂等張液，係指具有與體液(血漿)之滲透壓(285 ± 5 mOsm/L)大致相等之滲透壓之液體，就本發明而言，係指滲透壓為 285 ± 13 mOsm/L之液體。例如，Plasma-Lyte A之滲透壓為294 mOsm/L，PBS(-)之滲透壓為 280 ± 4 mOsm/L(冰點下降法)。作為可使用之等張液之例，可例舉：Plasma-Lyte A(Baxter)、生理鹽水、林格氏溶液(乳酸林格氏溶液、乙酸林格氏溶液、碳酸氫鹽林格氏溶液等)、5%葡萄糖水溶液。作為可使用之緩衝液之例，可例舉：磷酸緩衝生理鹽水(Phosphate-buffered saline：PBS)、Tris(Tris(hydroxymethyl)aminomethane，三羥甲基胺基甲烷)鹽酸緩衝液、Tris乙酸緩衝液、HEPES(4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid，4-(2-羥乙基)哌啶-1-乙磺酸)緩衝液。

【0047】

回收步驟中所使用之溶液之較佳例之一為培養基，更佳為人類淋巴細胞培養用培養基。人類淋巴細胞培養用培養基可包含人類血清白蛋白、人類運鐵蛋白、重組型人類胰島素、及重組型人類IL-2。此種培養基之較佳例為KBM501培養基、FKCM101或COSMEDIUM 008。KBM501培養基包含人類血清白蛋白、人類運鐵蛋白、重組型人類胰島素、重組型人類IL-2，且不包含其以外之蛋白質。又，KBM501培養基包含抗生素(康黴素)、 NaHCO_3 、L-麩醯胺、pH值調整劑。

【0048】

於回收步驟中，若使用PBS(-)，則有時解凍時之細胞之存活率降低而欠佳。PBS(-)典型地包含氯化鈉136.9 mM、氯化鉀2.68 mM、磷酸氫二鈉8.1 mM、磷酸氫鉀1.47 mM。

【0049】

[預處理]

於本發明中，於後述之冷凍步驟之前，亦可對應冷凍之高活性NK細胞等進行預處理。所謂預處理，係指使所回收之細胞懸浮於包含添加劑之溶液。預處理包括利用包含添加劑之溶液進行回收。

【0050】

作為用於預處理之添加劑，可使用選自由膽汁酸及苯丁酸所組成之群中之任一者。膽汁酸之例為牛磺熊去氧膽酸(TUDCA)、熊去氧膽酸(UDCA)、鵝去氧膽酸、膽酸、豬去氧膽酸、去氧膽酸、7-氧代石膽酸、石膽酸、碘去氧膽酸、豬膽酸、牛磺鵝去氧膽酸、牛磺去氧膽酸、甘胺熊去氧膽酸、牛磺膽酸、甘胺膽酸或其類似物、衍生物。苯丁酸之例為4-苯丁酸(4-PBA)、甘油基(三-4-PBA)、苯乙酸、2-POAA-OMe、2-POAA-

NO₂、2-NOAA或其藥學上所容許之鹽、類似物、衍生物或前藥。用於預處理之添加劑之尤佳例為選自由TUDCA及4-PBA所組成之群中之任一者。

【0051】

於使用膽汁酸作為用於預處理之添加劑之情形時，濃度可適當設定，但較佳為100～5000 μm，更佳為200～2500 μm，進而較佳為400～1000 μm。此種範圍特別適於使用TUDCA之情形。於使用苯丁酸作為用於預處理之添加劑之情形時，濃度可適當設定，但較佳為1～1000 μm，更佳為5～500 μm，進而較佳為10～100 μm。此種範圍特別適於使用4-PBA之情形。

【0052】

用於預處理之添加劑之其他例為二甲基亞砷(DMSO)。濃度可適當設定，但較佳為0.5～15%，更佳為1～12.5%，進而較佳為2～10%。

【0053】

用於預處理之溶液與回收時所使用之溶液同樣地，可為培養基、等張液、緩衝液等溶液。預處理中所使用之溶液之較佳例之一為培養基，更佳為人類淋巴細胞培養用培養基，進而較佳為KBM501培養基、FKCM101或COSMEDIUM 008。又，用於預處理之培養基可包含人類血清白蛋白、人類運鐵蛋白、重組型人類胰島素、及重組型人類IL-2，亦可包含抗生素(康黴素)、NaHCO₃、L-麩醯胺、pH值調整劑。

【0054】

用於預處理之時間並無特別限定。為了進行預處理，亦可於使細胞懸浮後，將懸浮液靜置數分鐘～數小時、例如5分鐘～4小時、更佳為30

分鐘～3小時。靜置可於環境溫度(例如為1～30℃、典型地為15～25℃)下進行，亦可於CO₂培養箱中(例如為36～42℃、典型地為37℃)進行。

【0055】

預處理時之細胞密度可適當設定，設為適於細胞之維持之細胞密度即可。具體而言，為 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ 個細胞/mL，較佳為 $2 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$ 個細胞/mL，更佳為 $5 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$ 個細胞/mL。

【0056】

於尤佳之態樣中，預處理係以細胞密度成為 $5 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$ 個細胞/mL之方式，懸浮於添加有TUDCA 400～1000 μm或4-PBA 10～100 μm之KBM501培養基、FKCM101或COSMEDIUM 008。此時，可於37℃、5%CO₂下溫育30分鐘～3小時。

【0057】

本發明中預處理並非必需，但藉由將高活性NK細胞等於冷凍前利用添加有4-PBA或TUDCA之KBM501培養基進行預處理，與未進行預處理之情形相比，能夠改善將細胞解凍時之存活率(亦可稱為回收率)。

【0058】

[冷凍]

於本發明中，經回收、較佳為經預處理之細胞按照通常之程序進行冷凍。具體而言，視需要確認細胞數或存活率，進行離心分離而去除上清液後，以成為適當之細胞密度之方式使細胞懸浮於冷凍保存液。將細胞懸浮液分注至冷凍保存用之容器後，利用-80℃之超低溫冷凍器進行冷凍、保存。視需要，利用液氮罐進行冷凍保存。

【0059】

本發明中可使用之冷凍保存液可含有鈉鹽、鉀鹽、糖類、碳酸氫鹽、碳酸鹽、及凍傷保護劑。

【0060】

可使用之鈉鹽只要為於溶解於溶劑中時產生鈉離子者，則並無特別限定，可為含氧酸鹽、鹵化物、氧化物、氫氧化物、無機鹽或有機酸鹽等。鈉鹽可使用一種或組合使用複數種。於本發明中，作為一種，可良好地使用氯化鈉，作為複數種，可良好地使用氯化鈉及檸檬酸鈉。鈉鹽含量並無特別限定，作為冷凍保存液中所含之全部鈉離子之最終濃度，較佳為0.01~5000 mM，更佳為0.1~1000 mM，進而較佳為1~300 mM。

【0061】

可使用之鉀鹽只要為於溶解於溶劑中時產生鉀離子者，則並無特別限定，可為含氧酸鹽、鹵化物、氧化物、氫氧化物、無機鹽或有機酸鹽等。鉀鹽可使用一種或組合使用複數種。於本發明中，可良好地使用氯化鉀。鉀鹽含量並無特別限定，作為冷凍保存液中所含之全部鉀離子之最終濃度，較佳為0.01~5000 mM，更佳為0.1~1000 mM，進而較佳為1~100 mM。

【0062】

可使用之碳酸氫鹽只要為溶解於溶劑中時產生碳酸氫根離子者，則並無特別限定，可使用與各種陽離子之鹽。例如可例舉：碳酸氫銨、碳酸氫鉀、碳酸氫鈣、碳酸氫鈉、碳酸氫鎂等。可使用之碳酸鹽只要為於溶解於溶劑中時產生碳酸根離子者，則並無特別限定，可使用與各種陽離子之鹽。例如可例舉：碳酸銨、碳酸鉀、碳酸鈣、碳酸鈉、碳酸鋇、碳酸鎂等。該等碳酸氫鹽及/或碳酸鹽可使用一種或組合使用複數種。於本發明

中，可良好地使用碳酸氫鈉。碳酸氫鹽及/或碳酸鹽之含量並無特別限定，作為冷凍保存液中所含之碳酸氫根離子與碳酸根離子之合計之最終濃度，較佳為0.01~1000 mM，更佳為0.1~500 mM，進而較佳為1~100 mM。

【0063】

冷凍保存液中之鈉離子與鉀離子之濃度比(鈉離子/鉀離子)較佳為1/1000~1000/1，更佳為1/100~100/1，進而較佳為1/10~100/1，進而較佳為1/1~100/1，進而較佳為10/1~50/1。

【0064】

可使用之糖類為單糖、寡糖或糖醇，例如作為單糖，可例舉葡萄糖、半乳糖、果糖、甘露糖、木糖、阿拉伯糖，作為寡糖，可例舉海藻糖、蔗糖、麥芽糖、乳糖、纖維雙糖，作為糖醇，可例舉木糖醇、山梨糖醇等。該等糖類可使用一種或組合使用複數種，於本發明中，較佳為選自由葡萄糖、半乳糖、果糖、甘露糖、木糖、及阿拉伯糖所組成之群中之至少一種糖類，更佳為葡萄糖。糖類之含量於冷凍保存液中，較佳為0.01~100 g/L，更佳為0.1~100 g/L，進而較佳為0.25~50 g/L。

【0065】

作為可使用之凍傷保護劑之例，可例舉：二甲基亞砷(DMSO)、羥基乙基澱粉(HES)、乙二醇、甘油等。凍傷保護劑可使用一種或組合使用複數種。於本發明中，可良好地使用選自由DMSO及羥基乙基澱粉所組成之群中之任一種。於併用DMSO及羥基乙基澱粉作為凍傷保護劑之情形時，總含量較佳為包含於上述範圍內，且關於各者之濃度，DMSO濃度較佳為0.01~50%，更佳為1~30%，進而較佳為2~15%，羥基乙基澱粉濃度較

佳為0.01~50%，更佳為1~30%，進而較佳為2~15%。

【0066】

於本發明之較佳態樣中，除上述之本發明之細胞之冷凍保存方法中所使用的溶液之必需成分以外，亦可進而含有選自由蛋白質、鎂鹽及鈣鹽所組成之群中之成分。具體而言，可使用之蛋白質可例舉血清白蛋白、血清球蛋白等。又，作為血清白蛋白，可例舉人類血清白蛋白、或牛血清白蛋白。於本發明中，較佳為人類血清白蛋白。關於蛋白質之含量，於冷凍保存液中，較佳為0.01~50%，更佳為1~30%，進而較佳為2~15%。可使用之鎂鹽只要為溶解於溶劑中時產生鎂離子者，則並無特別限定，可使用含氧酸鹽、鹵化物、氧化物、氫氧化物、無機鹽或有機酸鹽等。鎂鹽可使用一種或組合使用複數種。於本發明中，可良好地使用氯化鎂。鎂鹽含量並無特別限定，作為冷凍保存液中所含之全部鎂離子之最終濃度，較佳為0.01~10 mM，更佳為0.1~5 mM。可使用之鈣鹽只要為溶解於溶劑中時產生鈣離子者，則並無特別限定，可使用含氧酸鹽、鹵化物、氧化物、氫氧化物、無機鹽或有機酸鹽等。鈣鹽可使用一種或組合使用複數種。於本發明中，可良好地使用氯化鈣。鈣鹽含量並無特別限定，作為冷凍保存液中所含之全部鈣離子之最終濃度，較佳為0.01~10 mM，更佳為0.1~5 mM。又，冷凍保存液中，除上述成分以外，亦可進而含有對細胞無毒殺性之物質、例如維生素類、胺基酸類等。又，冷凍保存液中，除上述成分以外，就發揮pH值調整或緩衝作用之觀點而言，亦可含有磷酸根離子。

【0067】

冷凍保存液之滲透壓較理想為於冷凍時不對細胞造成損傷之範圍，就於冷凍時提高成分向細胞之滲透性及抑制冰晶形成之觀點而言，例如為

500 ~ 8000 mOsm/L，亦可為1000 ~ 7500 mOsm/L，亦可為1500 ~ 7000 mOsm/L，亦可為1800 ~ 5000 mOsm/L。冷凍保存液之pH值較理想為不對細胞造成損傷之範圍，例如為3.0 ~ 10.0，更佳為4.5 ~ 9.0。

【0068】

於本發明中，亦可使用市售之冷凍保存用液。作為可使用之製品之例，可例舉細胞/組織用冷凍保存液CELLBANKER系列(STEM-CELLBANKER(註冊商標))，進一步特定而言，可例舉STEM-CELLBANKER(ZENOAQ、CB045)。

【0069】

冷凍時之細胞較佳為處於對數增生期者。

【0070】

冷凍時之細胞密度可適當設定，具體而言，為 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^8$ 個細胞/mL，較佳為 $2 \times 10^6 \sim 1 \times 10^8$ 個細胞/mL，更佳為 $1 \times 10^7 \sim 5 \times 10^7$ 個細胞/mL。於一較佳態樣中，細胞以 4×10^7 個細胞/mL保存於5 mL之容量之容器中。高活性NK細胞之冷凍出貨時能夠高密度冷凍會使製品進一步小型化，有助於降低運輸成本。

【0071】

[解凍、融解、稀釋]

於本發明中，經冷凍保存之細胞可按照各種程序解凍。例如，可將放入有細胞之冷凍保存用容器於37°C之溫浴等中視需要一面振動一面迅速解凍。或者，可於自冷凍庫中取出後不進行積極之加溫，而放置於室溫下進行自然解凍。解凍時或解凍後之細胞冷凍物可利用適當之液體進行稀釋。

【0072】

(用於稀釋之液體)

本發明提供一種滿足以下條件之用於懸浮用以向人類投予之細胞之液體、進一步特定而言用於稀釋細胞冷凍物之液體：

(1)含有鉀離子；

(2)pH值為6.4以上；

(3)不以135 mEq/L以上之濃度含有氯化物離子(即，氯化物離子之濃度未達135 mEq/L或不含氯化物離子)；

(4)不以5.55 mM以上之濃度含有葡萄糖(即，葡萄糖之濃度未達5.55 M或不含葡萄糖)；

(5)不以0.423 mM以上之濃度含有鈣離子(即，鈣離子之濃度為0.423 mM以下或不含鈣)；

(6)滲透壓為200~396 mOsm。

【0073】

再者，就本發明而言，提及液體不含某種成分時，除特別記載之情形以外，係指利用通常之測定方法檢測不出之情形。

【0074】

稀釋液之鉀離子之濃度較佳為0.50~8.0 mM，更佳為1.0~7.0 mM，進而較佳為2.5~6.0 mM。或者，以氯化鉀之形式，較佳為包含0.496~5.96 mM。

【0075】

於一較佳態樣中，稀釋液之鉀離子之濃度為4.00 mEq/L以上。上限值並無特別限定，例如為18.0 mEq/L以下，較佳為15.0 mEq/L以下，更佳

為10.0 mEq/L以下，進而較佳為7.50 mEq/L以下。

【0076】

於另一較佳態樣中，無論其他成分之有無、濃度如何，稀釋液均不含鈣離子。又，於另一較佳態樣中，無論其他成分之有無、濃度如何，稀釋液均不含葡萄糖。於又一較佳態樣中，稀釋液之pH值為7.0~8.3，較佳為7.2~8.1，進而較佳為7.3~7.9。

【0077】

稀釋液中所含之離子可為來自可用作醫藥之鹽者。此種鹽可為碳酸鹽、碳酸氫鹽、含氧酸鹽、鹵化物、氧化物、氫氧化物、無機鹽或有機酸鹽等。鹽可使用一種或組合使用複數種。

【0078】

稀釋液可含有鈉鹽、葡萄糖酸鹽、及乙酸鹽。亦可進而含有鎂鹽。稀釋液之鈉離子之濃度較佳為14.0~200 mM，更佳為28.0~182 mM，進而較佳為70.0~168 mM。或者，較佳為以氯化鈉之形式包含9.00~108 mM，以葡萄糖酸鈉之形式包含2.30~27.7 mM，以乙酸鈉之形式包含2.70~32.5 mM。稀釋液之葡萄糖酸根離子之濃度較佳為2.3~32.3 mM，更佳為4.6~29.9 mM，進而較佳為12.5~27.7 mM。稀釋液之乙酸根離子之濃度較佳為2.7~37.8 mM，更佳為5.4~35.1 mM，進而較佳為13.5~32.5 mM。

【0079】

稀釋液可使用被核准之醫藥品而構成。以下示出此種醫藥品之例。

【0080】

統稱名：AMIZET

售賣名：AMIZET B輸液

藥效分類名：複方胺基酸製劑

組成(1袋200 mL中)

有效成分 L-異白胺酸1,700 mg、L-白胺酸2,700 mg、離胺酸蘋果酸鹽(以L-離胺酸計)2,432 mg(1,600 mg)、L-甲硫胺酸780 mg、L-苯丙胺酸1,540 mg、L-蘇胺酸960 mg、L-色胺酸320 mg、L-纈胺酸1,800 mg、半胱胺酸蘋果酸鹽(以L-半胱胺酸計)310 mg(200 mg)、L-酪胺酸100 mg、L-精胺酸2,220 mg、L-組胺酸940 mg、L-丙胺酸1,720 mg、L-天冬胺酸100 mg、L-麩胺酸100 mg、甘胺酸1,100 mg、L-脯胺酸1,280 mg、L-絲胺酸840 mg

添加物 琥珀酸(pH值調節劑) 適量

電解質 不含Na⁺、Cl⁻

【0081】

統稱名：MEYLON

售賣名：MEYLON靜脈注射8.4%

非專有名 碳酸氫鈉

組成(20 mL中)

碳酸氫鈉 1.68 g(8.4%)

電解質濃度 Na⁺ 1000 mEq/L、HCO₃⁻ 1000 mEq/L

【0082】

統稱名：K.C.L.

售賣名：K.C.L.點滴液15%

非專有名 氯化鉀

製劑名 氯化鉀製劑

組成

成分 氯化鉀 3 g(15w/v%、2莫耳溶液)[鉀(K)量：40 mEq(1573.36 mg)]

添加物 含有核黃素磷酸酯鈉6 mg

【0083】

統稱名：獻血白蛋白

售賣名：獻血白蛋白25%靜脈注射12.5 g/50 mL

藥效分類名：血漿分化製劑(人血清白蛋白製劑)

組成(50 mL中)

有效成分 人血清白蛋白 12.5 g

添加物 乙醯色胺酸250.97 mg、氫氧化鈉43.44 mg、辛酸鈉169.75 mg

pH值 6.4~7.4、滲透壓比(相對於生理鹽水之比)0.5~1.0

【0084】

(較佳態樣)

稀釋液之一尤佳態樣如下所述：

獻血白蛋白 25%	20.0 mL
生理鹽水	111.12 mL
AMIZET	19.08 mL
蒸餾水	56.68 mL
MEYLON	1.6 mL
K.C.L.	0.4 mL

pH值 = 7.2

【0085】

另一較佳組成如下所述。

獻血白蛋白 25%	11.112 mL
生理鹽水	111.12 mL
AMIZET	19.08 mL
水	56.68 mL
MEYLON	1.6 mL
K.C.L.	0.4 mL

pH值 = 7.2

【0086】

另一較佳組成如下所述。

獻血白蛋白 25%	20.0 mL
生理鹽水	111.12 mL
AMIZET	19.08 mL
水	56.68 mL
MEYLON	1.6 mL
K.C.L.	0.4 mL

pH值 = 7.2

【0087】

用於冷凍保存之液體以及用於稀釋之液體中所懸浮之細胞可直接用於投予。就用於投予之觀點而言，較佳為將用於冷凍保存之液體與用於稀釋之液體混合後之混合液成為等張(具有與體液大致相等之滲透壓，具體而言為 285 ± 13 mOsm/L)。用於冷凍保存之液體於較佳態樣中為高張液(例如為 $1500 \sim 7000$ mOsm/L)，因此用於稀釋之液體可為滲透壓較低之液

體。業者可考慮用於冷凍保存之液體被用於稀釋之液體稀釋之倍率，適當決定用於稀釋之液體之成分濃度。

【0088】

於任一種組成中，用於稀釋之液體均較佳為不以40%以上之濃度含有血清，更佳為完全不含血清。其原因在於，若包含血清，則有時細胞之存活率降低。

【0089】

懸浮於用於稀釋之液體時之細胞密度可適當設定，可設為適於細胞之維持之細胞密度，或設為適於投予之細胞密度。具體而言，為 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ 個細胞/mL，較佳為 $2 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$ 個細胞/mL，更佳為 $5 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$ 個細胞/mL。

【0090】

於用於稀釋之液體中，細胞能夠維持較長時間。亦可於使細胞懸浮用於稀釋之液體後，將懸浮液靜置數分鐘～數小時、例如5分鐘～6小時、更佳為30分鐘～4小時。靜置可於環境溫度(例如為 $1 \sim 30^\circ\text{C}$ 、典型地為 $15 \sim 25^\circ\text{C}$)下進行，亦可於 CO_2 培養箱中(例如為 $36 \sim 42^\circ\text{C}$ 、典型地為 37°C)進行。

【0091】

[於醫藥組合物中之利用]

本發明提供一種醫藥組合物，其包含利用適當方法回收且視需要經預處理並冷凍保存之高活性NK細胞等。

【0092】

由本發明所提供之醫藥組合物可應用於治療及/或預防對高活性NK細

胞等具有敏感性之各種疾病。此種疾病之例為癌或感染症，具體而言，包含皮膚癌、口腔癌、膽囊癌、膽管癌、肺癌、肝癌、胃癌、大腸癌、胰臟癌、腎癌、卵巢癌、膀胱癌、前列腺癌、神經胚細胞瘤、白血病、或由病毒、細菌等所致之感染症，但並不限定於該等。再者，本發明者等人使用利用本申請案之方法冷凍、解凍之細胞，確認對於無治療之情況下會於30天以內死亡之大腸癌模型動物之效果。

【0093】

利用本發明之醫藥組合物之細胞療法有時單獨實施或與外科療法、化學療法、放射線療法、抗體醫藥品等組合實施。

【0094】

以下示出由本發明所提供之醫藥組合物之一態樣之優勢。

【0095】

(劑型)

注射劑(細胞懸浮液)

【0096】

(成分、含量)

構成細胞：高活性NK細胞等

含量： 6×10^6 個 $\sim 4.8 \times 10^9$ 個細胞/60 kg

【0097】

(副成分)

複合電解質溶液 10 \sim 45%

氯化鈉溶液 10 \sim 45%

20 \sim 30%人類血清白蛋白溶液 5 \sim 30%

二甲基亞砷 2~15%

其他

或者，

作為醫藥添加物可容許之冷凍保存液 100%

【0098】

(製備法)

於37°C之恆溫水槽等中進行解凍，直至冷凍之組合物完全解凍。解凍後迅速地無菌地懸浮於另行準備之作為醫藥添加物可容許之等張液中。

【0099】

(解凍後之穩定性)

關於解凍後之有效期，於室溫下保存時為6小時，較佳為4小時。

[實施例]

【0100】

1. 實施例間共通之方法

A). 高活性NK細胞GAIA-102之培養方法

將冷凍血球分離血液(HemaCare/Cellero)作為原材料，於解凍後使用Lovo細胞處理系統(FRESENIUS KABI)進行洗淨及濃縮，獲得PBMCs。

【0101】

使用CliniMACS Prodigy(註冊商標)(Miltenyi Biotec)，自所獲得之PBMCs去除CD3陽性細胞及CD34陽性細胞，利用KBM501培養基^{*1}溶出。對溶出液中之細胞數進行計數，算出總細胞數。培養係使用黏著培養用袋640 cm²，將以成為5×10⁵個細胞/mL之方式利用KBM501培養基所製備之細胞懸浮液每袋接種200 mL，於CO₂培養箱(37°C、5%CO₂)中進行。

於培養第9天，以最終液量成為每袋650 mL之方式追加KBM501培養基，溫育至第14天。

【0102】

※1：添加有5%UltraGRO(AventaCell、HPCPLCRL10)及2 U/mL肝素鈉(Nipro)之KBM 501(Kohjin Bio)

【0103】

B).高活性NK細胞GAIA-102之回收方法

於培養第14天回收培養液，進而於培養袋中添加1 mM EDTA而使黏著之細胞剝離，將包含剝離細胞之全部細胞回收液進行離心後，利用KBM501培養基進行洗淨、再懸浮。

C).高活性NK細胞GAIA-102之冷凍方法

對按照高活性NK細胞之培養方法、回收方法中所記載之程序所獲得之GAIA-102之活細胞數進行計數，使 2×10^8 個細胞懸浮於5 mL之HSC-BANKER(ZENOAQ、CB071)，於 -80°C 下進行冷凍。

【0104】

D).基於7-AAD染色之成活率測定方法

將於各條件下解凍之GAIA-102以 1×10^5 個細胞/孔製備於96孔板(IWAKI，4870-800SP)中並進行離心分離，去除上清液後，添加利用PBS稀釋之7-AAD溶液(Beckman Coulter，A07704)加以懸浮，於室溫下溫育20分鐘。使用流式細胞儀(BD LSR Fortessa，BD生物科學公司)對染色後之細胞進行測定，利用FlowJo軟體進行解析，根據7-AAD陽性率算出成活率。

【0105】

E).對腫瘤細胞之毒殺活性測定方法

測定細胞毒殺活性時，準備使解凍之GAIA-102與K562細胞反應過之組、作為陰性對照之僅K562細胞之組、作為陽性對照之K562細胞經10%福馬林處理之組。

【0106】

《GAIA-102》

基於冷凍時之活細胞數分取所需量之於各條件下解凍、稀釋之GAIA-102後，利用10%FBS/RPMI1640製備成 1×10^6 個細胞/ml之濃度。

【0107】

《K562》

利用無血清RPMI1640培養基使K562細胞懸浮，使用PKH26紅色螢光細胞連接子套組(PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit)進行染色後，利用10%FBS/RPMI1640製備成 2×10^6 個細胞/mL。

【0108】

將GAIA-102與K562細胞以細胞比成為2：1之方式添加至96孔板(IWAKI，4870-800SP)中進行混合，於 37°C 、5% CO_2 下反應2小時。反應後，進行離心分離($500 \times g$ 、5分鐘)，去除上清液後，添加利用PBS稀釋之7-AAD溶液加以懸浮，於室溫下溫育20分鐘。使用流式細胞儀進行測定，利用FlowJo軟體進行解析，算出細胞毒殺活性率(溶解百分率)^{*2}。

【0109】

※2：細胞毒殺活性率 = $(\text{K562細胞之死細胞率} - \text{陰性對照之死細胞率}) / (\text{陽性對照之死細胞率} - \text{陰性對照之死細胞率}) \times 100$

【0110】

關於所使用之試劑、點滴劑

於解凍之溶劑驗證中，試劑、點滴劑係使用下述者。

【0111】

氯化鈉(Nacalai Tesque)

氯化鉀(Nacalai Tesque)

氯化鎂六水合物(Nacalai Tesque)

乙酸鈉三水合物(Nacalai Tesque)

葡萄糖酸鈉(Nacalai Tesque)

TUDCA(東京化成工業股份有限公司)

水(Nacalai Tesque)

Plasma-Lyte A(Baxter)

生理鹽水 大塚生食注(大塚製藥股份有限公司)

D-PBS(Nacalai Tesque)

SOLMALT輸液(Terumo股份有限公司)

THAM點滴靜脈注射套組(大塚製藥股份有限公司)

MEYLON靜脈注射8.4%(大塚製藥股份有限公司)

KLINISALZ輸液(Kyowa CritiCare股份有限公司)

IMUNACE 35注射(共和藥品股份有限公司)

獻血白蛋白25%靜脈注射(日本製藥股份有限公司)

K.C.L.點滴液15%(丸石製藥股份有限公司)

AMIZET B輸液(Terumo股份有限公司)

【0112】

2.各實施例之方法

2-1)Plasma-Lyte A成分驗證

將經48小時以上冷凍之GAIA-102於37°C下於水浴中解凍後，於室溫下靜置至3.5小時。於自解凍起30分鐘及3小時後進行基於7-AAD染色之成活率測定、毒殺活性測定。

【0113】

解凍後，利用下表所示之溶液1~6稀釋41倍。設定基於Plasma-Lyte A構成成分之濃度而不含葡萄糖酸鈉之組(1)、不含葡萄糖酸鈉且使其他各成分增量16%調整了滲透壓之組(2)、不含葡萄糖酸鈉且利用NaCl調整了滲透壓之組(3)、作為陽性對照之Plasma-Lyte A(4)、生理鹽水(5)、於生理鹽水中添加有與Plasma-Lyte A相同濃度之葡萄糖酸鈉之組(6)。再者，除特別記載之情形以外，滲透壓均藉由計算而求出。

【0114】

[表1]

*括號內為製劑中之含量

	1	2	3	4	5	6
	不含葡萄糖酸鈉之Plasma-Lyte A同成分液			Plasma-Lyte A	生理鹽水	生理鹽水+葡萄糖酸鈉
	—	滲透壓調整16%	滲透壓調整NaCl			
NaCl	2.63 g	3.05 g	3.255 g	(2.63 g)	(4.5 g)	
KCl	0.185 g	0.215 g	0.185 g	(0.185 g)	—	—
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.150 g	0.174 g	0.150 g	(0.150 g)	—	—
CH ₃ COONa · 3H ₂ O	1.840 g	2.134 g	1.840 g	(1.840 g)	—	—
葡萄糖酸鈉	—	—	—	(2.9 g)	—	2.9 g
水(ml)	至500	至500	至500	—	—	80.65
Plasma-Lyte A(ml)	—	—	—	500	—	—
生理鹽水(ml)	—	—	—	—	500	至500

【0115】

結果：

於任一組中均未確認到解凍後之成活率之降低，另一方面，於生理鹽水(5)、生理鹽水中添加有與Plasma-Lyte A相同濃度之葡萄糖酸鈉之組

(6)中確認到顯著之活性降低(圖1)。該現象係於解凍稀釋後第3小時觀察到，於剛解凍後觀察不到。可明確解凍稀釋後之活性無法僅利用NaCl及葡萄糖酸鈉來保持。

【0116】

2-2)Plasma-Lyte A必需成分之特定

對葡萄糖酸鈉以外之成分進行驗證。將經48小時以上冷凍之GAIA-102於37°C下於水浴中解凍後，於室溫下靜置至3.5小時。於自解凍起30分鐘及3.5小時後進行基於7-AAD染色之成活率測定、毒殺活性測定。

【0117】

解凍後，利用下表所示之溶液稀釋41倍。設定均不含葡萄糖酸鈉且基於Plasma-Lyte A構成成分之濃度而自Plasma-Lyte A中去除了Mg²⁺、K⁺、CH₃COO⁻(乙酸)各一種成分之組(1)~(3)、於生理鹽水中追加有各一種成分之組(4)~(6)。

【0118】

[表2]

	1	2	3	4	5	6	7
	去除Mg ²⁺	去除K ⁺	去除CH ₃ COO ⁻	生理鹽水+Mg ²⁺	生理鹽水+K ⁺	生理鹽水+CH ₃ COO ⁻	Plasma-Lyte A
NaCl	2.630 g	2.630 g	2.630 g	-	-	-	-
KCl	0.185 g	-	0.185 g	-	0.185 g	-	-
MgCl ₂ · 6H ₂ O	-	0.150 g	0.150 g	0.150 g	-	-	-
CH ₃ COONa · 3H ₂ O	1.840 g	1.840 g	-	-	-	1.840 g	-
水(ml)	至500	至500	至500	-	-	-	-
Plasma-Lyte A(ml)	-	-	-	-	-	-	500
生理鹽水(ml)	-	-	-	至500	至500	至500	-

【0119】

結果：

關於成活率，僅於去除了K⁺之組(2)中，於解凍稀釋後第3小時確認

到略微之降低。另一方面，關於活性，於去除了 K^+ 及 CH_3COONa 之組(2)、(3)中可見降低，於去除了 Mg^+ 之組(1)中未見降低。又，根據於生理鹽水中追加有各一種成分之組(4)~(6)之實驗，確認到僅 K^+ 單獨有助於活性(圖2)。

【0120】

2-3) K^+ 與 C_3HCOO^- 之最佳濃度範圍之探索

將經48小時以上冷凍之GAIA-102於 $37^\circ C$ 下於水浴中解凍後，於室溫下靜置至3.5小時。於自解凍起30分鐘及3小時後進行基於7-AAD染色之成活率測定、毒殺活性測定。

【0121】

解凍後，利用下表所示之溶液稀釋41倍。設定作為陽性對照之Plasma-Lyte A(1)、作為陰性對照之生理鹽水(2)、基於Plasma-Lyte A構成成分之濃度而不含葡萄糖酸鈉及氯化鎂且相對於生理鹽水之滲透壓比製備為0.80、0.95、1.0、1.10之(3~6)。又，設定僅利用NaCl將滲透壓比調整為1.0之組(7)。

【0122】

[表3]

	1	2	3	4	5	6	7
	Plasma-Lyte A	生理鹽水	不含葡萄糖酸鈉及 $MgCl_2$ 之Plasma-Lyte A同成分液				
	滲透壓比 0.95	滲透壓比 1.00	滲透壓比 0.80	滲透壓比 0.95	滲透壓比 1.00	滲透壓比 1.10	滲透壓比 1.00
NaCl	-	-	2.630 g	3.130 g	3.290 g	3.600 g	3.510 g
KCl	-	-	0.185 g	0.220 g	0.231 g	0.253 g	0.185 g
$CH_3COONa \cdot 3H_2O$	-	-	1.840 g	2.190 g	2.300 g	2.520 g	1.840 g
水	-	-	500 mL	500 mL	500 mL	500 mL	500 mL
Plasma-Lyte A	500 mL	-	-	-	-	-	-
生理鹽水	-	500 mL	-	-	-	-	-

【0123】

結果：

關於各濃度下之成活率，於解凍稀釋後3.5小時之內，未觀察到降低。關於活性，於(3)~(6)中亦未確認到影響，但於僅利用NaCl將滲透壓比調整為1.0之組(7)中，確認到降低傾向(圖3)。

【0124】

2-4)利用CH₃COONa/KCl~以往製品之可代替性之驗證1

將經48小時以上冷凍之GAIA-102於37°C下於水浴中解凍後，於室溫下靜置至3小時。於自解凍起3小時後進行毒殺活性測定。

【0125】

解凍後，利用下表所示之溶液稀釋41倍。設定作為陽性對照之Pasma-Lyte A(1)、作為陰性對照之生理鹽水(2)，製備以K⁺濃度成為5 mEq/L之方式於磷酸緩衝液中補充K⁺之組(3)、THAM點滴靜脈注射(4)、生理鹽水/MEYLON/KCl之調配液(6)、水/MEYLON/KCl/NaCl之調配液(7)。又，以K⁺濃度成為2.5 mEq/L之方式製備THAM/MEYLON之調配液(5)、水/CH₃COONa/KCl/NaCl之調配液(8)。

【0126】

[表4]

	1	2	3	4	5	6	7	8
	Plasma-Lyte A	生理鹽水	PBS KCl	THAM	THAM 生理鹽水	生理鹽水 MEYLON KCl	水 MEYLON KCl NaCl	水 乙酸鈉 KCl NaCl
Plasma-Lyte A	500 mL	-	-	-	-	-	-	-
生理鹽水	-	500 mL	-	-	-	500 mL	-	-
PBS	-	-	500 mL	-	-	-	-	-
THAM	-	-	-	500 mL	250 mL	-	-	-
MEYLON	-	-	-	-	250 mL	13.5 mL	13.5 mL	-
水	-	-	-	-	-	-	500 mL	500 mL
KCl	-	-	0.037 g	-	-	0.185 g	0.185 g	0.090 g
NaCl	-	-	-	-	-	-	4.5 g	2.630 g
CH ₃ COONa · 3H ₂ O	-	-	-	-	-	-	-	1.840 g

【0127】

結果：

於以K⁺濃度成為5 mEq/L之方式於磷酸緩衝液中補充K⁺之組(3)中，與生理鹽水(2)相比，確認到活性之提昇，但無法充分達成活性之維持。又，關於以K⁺濃度成為2.5 mEq/L之方式製備之THAM/MEYLON之調配液(5)、水/CH₃COONa /KCl/NaCl之調配液(8)，活性之維持亦不充分(圖4)。

【0128】

2-5)利用CH₃COONa/KCl～以往製品之可代替性之驗證2

將經48小時以上冷凍之GAIA-102於37℃下於水浴中解凍後，於室溫下靜置至3小時。於自解凍起3小時後進行毒殺活性測定。

【0129】

解凍後，利用下表所示之溶液稀釋41倍。設定作為陽性對照之Plasma-Lyte A(1)、作為陰性對照之生理鹽水(2)，製備SOLMALT(7)、以及作為基於SOLMALT調整了pH值之組之SOLMALT/MEYLON調配液(3)、SOLMALT/THAM調配液(4)。又，製備自Plasma-Lyte A中去除了葡萄糖酸鈉/Mg²⁺兩者且其他成分包含與Plasma-Lyte A相同濃度之調配液(5)、自Plasma-Lyte A中去除了葡萄糖酸鈉/Mg²⁺兩者且僅將NaCl減量而滲透壓與(5)相同之調配液(6)。又，追加使用THAM之SOLMALT之pH值調整後添加水而使滲透壓降低之組(8)。亦測定製備後之各溶劑之pH值。

【0130】

[表5]

	1	2	3	4	5	6	7	8
	Plasma-Lyte A	生理鹽水	SOLMALT MEYLON	SOLMALT THAM	水 乙酸鈉 KCl NaCl	水 乙酸鈉 KCl NaCl	SOLMALT	SOLMALT THAM 水
Plasma-Lyte A	500 mL	—	—	—	—	—	—	—
生理鹽水	—	500 mL	—	—	—	—	—	—
SOLMALT	—	—	500 mL	500 mL	—	—	500 mL	500 mL
THAM	—	—	—	50 mL	—	—	—	50 mL
MEYLON	—	—	25 mL	—	—	—	—	—
水	—	—	—	—	500 mL	500 mL	—	126.5 mL
KCl	—	—	—	—	0.180 g	0.230 g	—	—
NaCl	—	—	—	—	2.630 g	2.400 g	—	—
CH ₃ COONa · 3H ₂ O	—	—	—	—	1.840 g	2.300 g	—	—

【0131】

結果：

於SOLMALT(7)中無法維持活性，但關於基於SOLMALT而調整了pH值之SOLMALT/MEYLON調配液(3)、SOLMALT/THAM調配液(4)，確認到活性改善之傾向。確認到該傾向具有再現性，關於使用THAM之SOLMALT之pH值調整後添加水而使滲透壓降低之組(8)，亦可獲得同樣之結果。又，根據本結果，於實驗上確認到若pH值降至6.0，則難以維持活性，且可容許至8.8(圖5)。

【0132】

2-6)活性之維持與成活率之關係

關於利用2-5)中所記載之溶液稀釋之組，於解凍後1小時及3小時後進行基於7-AAD染色之成活率測定、毒殺活性測定，亦對用於毒殺活性測定之反應後之GAIA-102之成活率進行解析。

【0133】

結果：

可明確於置換為RPMI後觀察到於剛解凍稀釋後未觀察到之成活率之

降低。可明確於置換為RPMI後，隨著時間經過而觀察到成活率之降低，且其降低幅度與活性之關聯極高(圖6)。

【0134】

2-7)活性之維持與滲透壓/pH值之關係

將經48小時以上冷凍之GAIA-102於37°C下於水浴中解凍後，於室溫下靜置至3小時。於自解凍起3小時後進行毒殺活性測定。解凍後，利用下表所示之溶液稀釋41倍。設定作為陽性對照之Plasma-Lyte A(1)、作為陰性對照之生理鹽水(2)，製備作為基於SOLMALT利用MEYLON調整了pH值之組之SOLMALT：MEYLON = 20：1調配液(3)、SOLMALT：MEYLON = 10：1調配液(4)、SOLMALT/MEYLON/水之調配液(5)、KLINISALZ(6)、作為基於KLINISALZ利用MEYLON製備了pH值之組之KLINISALZ/MEYLON之調配液(7)。又，製備Plasma-Lyte A + 14萬IU/mL IMUNACE(8)、Plasma-Lyte A + 875 μM牛磺熊去氧膽酸(TUDCA)之混合液(9)。亦測定製備後之各溶劑之pH值。

【0135】

[表6]

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	Plasma-Lyte A	生理鹽水	SOLMALT MEYLON (20：1)	SOLMALT MEYLON (10：1)	SOLMALT MEYLON 水	KLINISALZ	KLINISALZ MEYLON	Plasma-Lyte A IMUNACE	Plasma-Lyte A IMUNACE TUDCA
Plasma-Lyte A	500 mL	-	-	-	-	-	-	500 mL	500 mL
生理鹽水	-	500 mL	-	-	-	-	-	-	-
SOLMALT	-	-	500 mL	500 mL	375 mL	-	-	-	-
MEYLON	-	-	25 mL	50 mL	37.5 mL	-	20 mL	-	-
水	-	-	-	-	125 mL	-	-	-	-
KLINISALZ	-	-	-	-	-	500 mL	500 mL	-	-
IMUNACE	-	-	-	-	-	-	-	5 mL	-
100 mM TUDCA	-	-	-	-	-	-	-	-	4.375 mL

【0136】

關於利用所記載之溶液解凍之組，於解凍後1小時及3小時後進行基於7-AAD染色之成活率測定、毒殺活性測定，亦對用於毒殺活性測定之反應後之GAIA-102之成活率進行解析。

【0137】

結果：

可明確於作為基於SOLMALT而利用MEYLON調整了pH值之組之SOLMALT：MEYLON = 20：1調配液(3)中，可維持活性。再者，可知Plasma-Lyte A + 14萬IU/mL IMUNACE(8)與Pasma-Lyte A(1)之活性維持能力同等，IMUNACE之添加無助於至少以K562為對象之活性。pH值較低之KLINISALZ(6)、製備了pH值但滲透壓較高之KLINISALZ/MEYLON之調配液(7)無法維持活性(圖7-1)。再現性良好地確認到置換為RPMI後之成活率降低與活性之間之較高之關聯(圖7-2)。

【0138】

2-8)對解凍後3小時內之活性造成影響之因子之鎖定1

將經48小時以上冷凍之GAIA-102於37°C下於水浴中解凍後，於室溫下靜置至3小時。於自解凍起3小時後進行毒殺活性測定。解凍後，利用下表所示之溶液稀釋41倍。製備利用MEYLON將pH值調整為7.6~8.0且K⁺濃度調整為5 mEq/L之白蛋白/K.C.L./MEYLON之調配液(1)、白蛋白/K.C.L./生理鹽水/MEYLON之調配液(2)、進而作為Cl⁻濃度調整為80 mMq/L之組之白蛋白/K.C.L./生理鹽水/AMIZET/水/MEYLON之調配液(3)、K.C.L./生理鹽水/AMIZET/水/MEYLON之調配液(4)、作為陽性對照之Pasma-Lyte A(6)。亦測定製備後之各溶劑之pH值。

【0139】

[表7]

	1	2	3	4	6
	白蛋白 K.C.L. MEYLON	白蛋白 K.C.L. 生理鹽水 MEYLON	白蛋白 K.C.L. 生理鹽水 AMIZET 水 MEYLON	K.C.L. 生理鹽水 AMIZET 水 MEYLON	Plasma-Lyte A
白蛋白	500 mL	250 mL	23.4 mL	—	—
K.C.L.	1.25 mL	1.25 mL	1.25 mL	1.25 mL	—
生理鹽水	—	250 mL	234 mL	244 mL	—
AMIZET	—	—	80 mL	80 mL	—
水	—	—	162.6 mL	176 mL	—
MEYLON	37.6 mL	25 mL	16.7 mL	16.7 mL	—
Plasma-Lyte A	—	—	—	—	500 mL
pH值	7.7	7.7	7.7	7.8	7.2
滲透壓	404.7 mOsm	371.4 mOsm	348.4 mOsm	348.4 mOsm	

【0140】

結果：

(2)及(4)顯示良好之活性維持能力，(3)顯示顯著之好效果(圖8)。

【0141】

2-9)對解凍後3小時內之活性造成影響之因子之鎖定2

將經48小時以上冷凍之GAIA-102於37°C下於水浴中解凍後，於室溫下靜置至4小時。於自解凍起3小時後進行毒殺活性測定，於4小時後進行基於7-AAD染色之成活率測定。解凍後，利用下表所示之溶液稀釋41倍。全部將滲透壓設定為300 mOsm，製備白蛋白(獻血白蛋白25%靜脈注射：Benesis，日本血液製劑機構)/K.C.L./生理鹽水/AMIZET/水/MEYLON之調配液(1)、K.C.L./生理鹽水/AMIZET/水/MEYLON之調配液(2)、白蛋白/K.C.L./生理鹽水/AMIZET/水/MEYLON之調配液(3)、作為陽性對照之Pasma-Lyte A(5)。亦測定製備後之各溶劑之pH值。

【0142】

[表8]

	1	2	3	5
	白蛋白 K.C.L. 生理鹽水 AMIZET 水 MEYLON	K.C.L. 生理鹽水 AMIZET 水 MEYLON	白蛋白 K.C.L. 生理鹽水 AMIZET 水 MEYLON	Plasma-Lyte A
白蛋白	29.66 mL	–	220 mL	–
K.C.L.	1.25 mL	1.25 mL	1.25 mL	–
生理鹽水	296.60 mL	308.44 mL	220 mL	–
AMIZET	40.98 mL	54.87 mL	3.82 mL	–
水	128.76 mL	132.71 mL	52.18 mL	–
MEYLON	4 mL	2.74 mL	4 mL	–
Plasma-Lyte A	–	–	–	500 mL
pH值	7.3	7.3	7.3	7.2
滲透壓	300 mOsm	300 mOsm	300 mOsm	300 mOsm

【0143】

結果：

(2)顯示良好之活性維持能力，(1)及(3)顯示顯著之好效果。

【0144】

2-10)統計解析

彙總本發明者等人至此為止進行之實驗資料，使用JMP(註冊商標)Pro 15(SAS Institute Inc.)進行統計解析。根據統計解析之結果，提示對於維持活性，Cl⁻濃度及pH值之影響較大，又，K⁺可能存在閾值(圖10)。

【0145】

2-11)適於靜脈內投予之其他調整液之利用1

利用Plasma-Lyte A及下表之調整液將解凍後之GAIA-102稀釋41倍，於室溫下靜置3小時後，測定對K562之毒殺活性、及基於7-AAD染色之成活率。

調整液顯示超過Plasma-Lyte A之效果(圖11)。

【0146】

[表9]

■製備液200 mL

pH值=7.2

獻血白蛋白25% : 11.112 mL 滲透壓 : 288 mOsm(計算值)

生理鹽水 : 111.12 mL K⁺ : 4 mEq/L

AMIZET : 19.08 mL Na⁺ : >99 mEq/L

水 : 56.68 mL Cl⁻ : 93 mEq/L

MEYLON : 1.6 mL pH值 : 7.3

K.C.L. : 0.4 mL

【0147】

2-12)適於靜脈內投予之其他調整液之利用2

又，利用Plasma-Lyte A及假定使用時添加白蛋白之下表之調整液將解凍後之GAIA-102稀釋45倍，於室溫下靜置3小時後，測定對K562之毒殺活性、及基於7-AAD染色之成活率。調整液顯示超過Plasma-Lyte A之效果(圖12)。

【0148】

[表10]

■製備液33 mL

pH值=7.3

獻血白蛋白25% : 3.00 mL

生理鹽水 : 17.65 mL

AMIZET : 3.03 mL

水 : 9.00 mL

MEYLON : 0.25 mL

K.C.L. : 0.06 mL

【0149】

3)葡萄糖之影響之確認

將冷凍之GAIA-102於水浴中以37°C解凍2分鐘40秒後，利用各稀釋液稀釋10倍。

【0150】

[表11]

稀釋液：
• Plasma-Lyte A(PL-A)
• PL-A + 葡萄糖(1 g/L)
• PL-A + 葡萄糖(2 g/L)
• PL-A + 葡萄糖(4 g/L)
• PL-A + 葡萄糖(8 g/L)
• PL-A + 葡萄糖(16 g/L)
• PL-A + 葡萄糖(26 g/L)
• PL-A + 葡萄糖(38 g/L)
• PL-A + 葡萄糖(50 g/L)

【0151】

於室溫下靜置3小時後，評價對K562之毒殺活性。依據上述「E).對腫瘤細胞之毒殺活性測定方法」中所記載之方法，其中GAIA-102(E)與K562細胞(T)以ET比為0.5：1、1：1、或2：1進行混合，測定毒殺活性。根據利用ET比4點(包括0)算出之細胞毒殺活性率，藉由使用JMP(註冊商標)Pro統計解析軟體之非線性回歸分析算出E：T=1：1之計算值。

【0152】

結果：

葡萄糖濃度為26 g/L以下之稀釋液、尤其是葡萄糖濃度為16 g/L以下之稀釋液維持較高之毒殺活性(圖13)。

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種液體，其用於懸浮用以向人類投予之細胞，且滿足以下條件：

- (1)含有鉀離子；
- (2)pH值為6.4以上；
- (3)不以135 mEq/L以上之濃度含有氯化物離子；
- (4)不以0.423 mM以上之濃度含有鈣離子；
- (5)滲透壓為200～396 mOsm。

【請求項2】

如請求項1之液體，其用於稀釋包含用以向人類投予之細胞之冷凍物或其解凍物。

【請求項3】

如請求項1之液體，其以4.00 mEq/L以上之濃度含有鉀離子，不含鈣離子，且pH值為7.0～8.3。

【請求項4】

一種醫藥組合物，其包含懸浮於如請求項1至3中任一項之液體之用以向人類投予之細胞之集群，且用以向人類投予之細胞為高活性NK細胞。

【請求項5】

如請求項4之醫藥組合物，其中高活性NK細胞之集群係經過冷凍步驟者。

【請求項6】

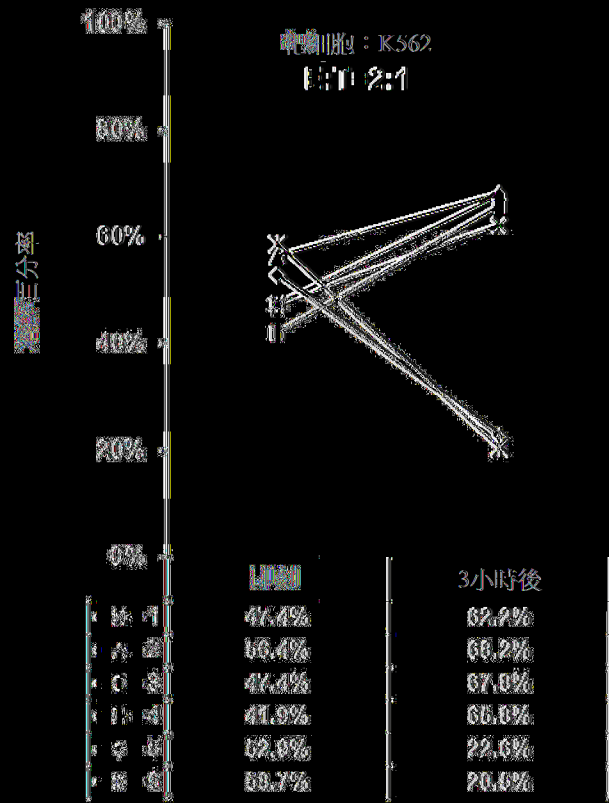
如請求項5之醫藥組合物，其中冷凍前之高活性NK細胞之集群係使用包含白蛋白、運鐵蛋白、胰島素、及IL-2之培養基所回收者。

【請求項7】

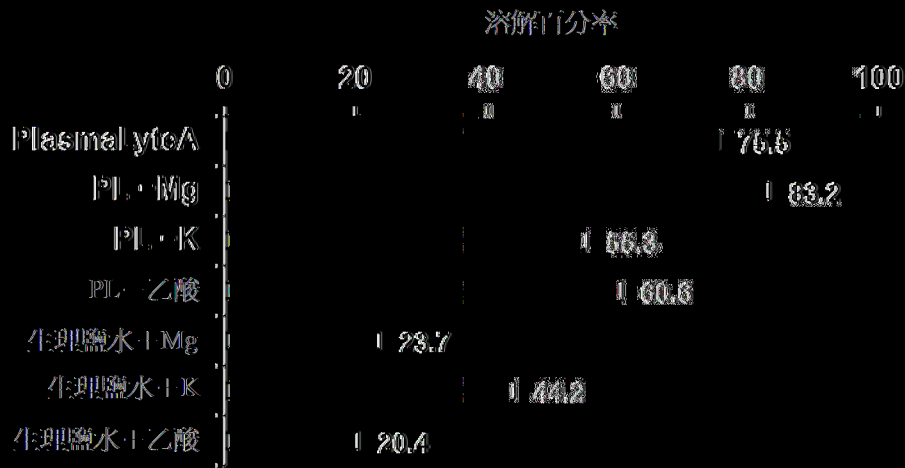
一種輸注用醫藥組合物之提供方法，該輸注用醫藥組合物包含用以向人類投予之細胞，該提供方法包括以下步驟：

- (1)利用動物細胞培養用培養基將該細胞進行洗淨之步驟；
- (2)使視需要洗淨之該細胞懸浮於冷凍保存液之步驟；
- (3)將懸浮於冷凍保存液之該細胞進行冷凍而保存(入庫)之步驟；
- (4)將經冷凍保存之該細胞進行解凍之步驟；以及
- (5)使解凍之該細胞懸浮於如請求項1至3中任一項之液體，製成輸注用醫藥組合物之步驟。

(發明圖式)



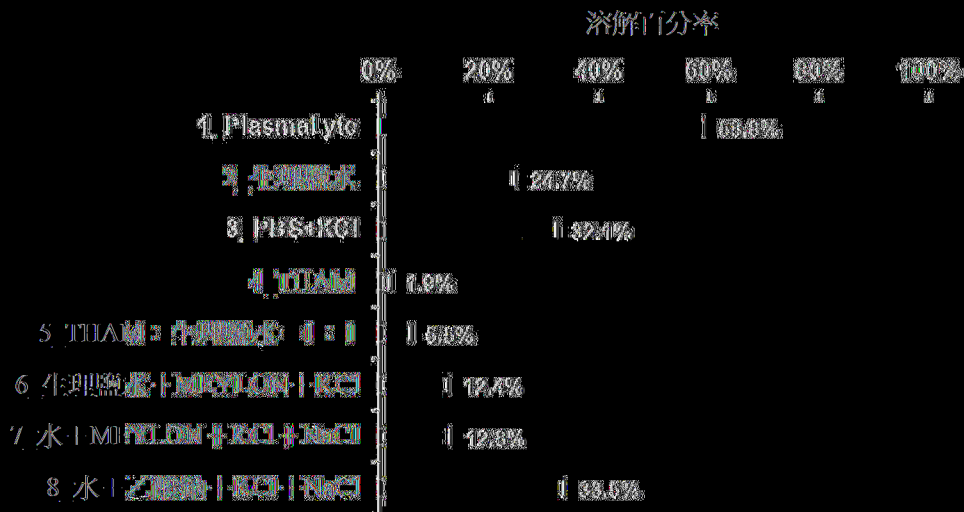
(圖1)



(圖2)

渗透压(mOsm)	K ⁺ (ml/gCl)	CH ₃ COO ⁻ (ml/gCl)	0%	溶解百分率				
				20%	40%	60%	80%	99%
284	5	27	1 Plasma-lyte 水				0 88.4%	
300	5	0	2 生理鹽水	1 77.8%				
277	5	27	3 1% NaCl				1 88.4%	
284	5.00	32.13	4 1% NaCl				1 88.4%	
300	5.25	33.75	5 1% NaCl				0 88.4%	
330	6.00	36.00	6 1% NaCl				1 88.4%	
284	5	27	7 1% NaCl + 1% NaCl				0 88.4%	

(圖3)

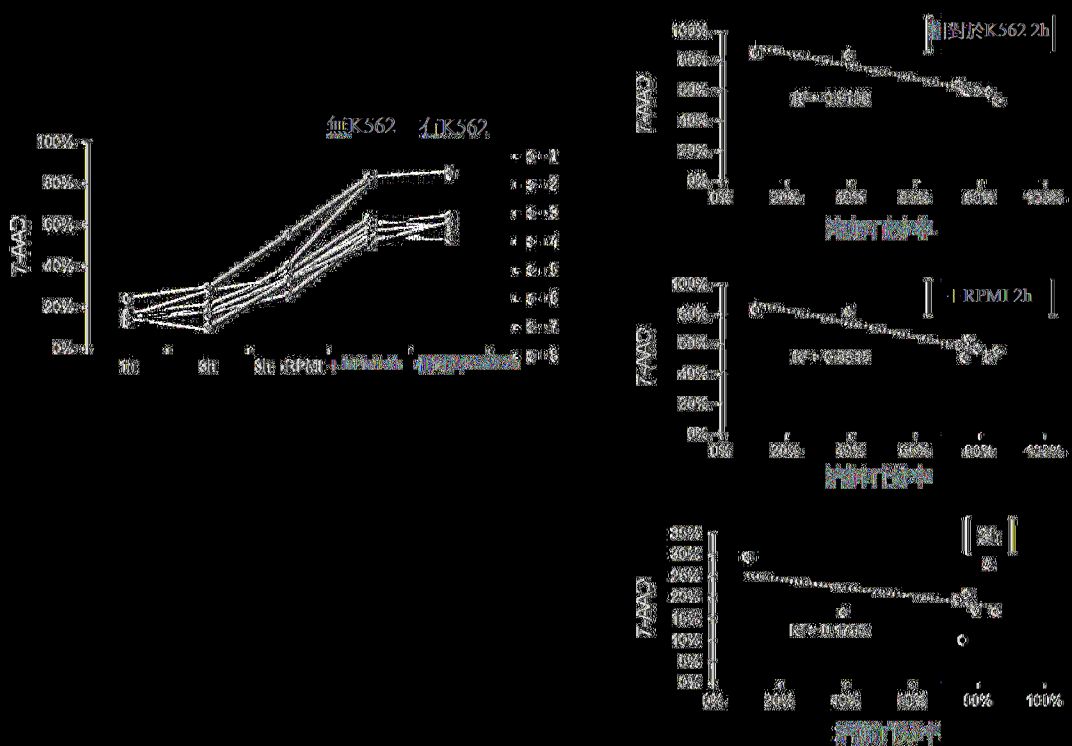


(圖4)

	pH					K ⁺ (mEq/L)					CaCl ₂ CO ₃ (mEq/L)					滲透壓(mOsm)					
	0	4	6	8	10	0	5	10	15	20	0	10	20	30	40	50	0	100	200	300	400
1. Plasmalyte					7.0					0						0					294
2. 生理鹽水					7.4					0						0					308
3. SOL.MALT-I-MBYLON					7.4					1.17					1.70					306	
4. SOL.MALT-I-THIAM					7.4					1.17					1.70					308	
5. 水-I-乙酸鈉-I-KCl-I-NaCl(-PI)					7.6					0					0.27					247	
6. 水-I-乙酸鈉-I-KCl-I-NaCl					7.6					0					0.27					288	
7. SOL.MALT-I					7.6					1.17					1.70					308	
8. SOL.MALT-I-THIAM-I-PI					7.6					1.17					1.70					308	

	滲透壓(mOsm)				
	0%	20%	40%	60%	80%
1. Plasmalyte					88.0%
2. 生理鹽水					88.0%
3. SOL.MALT-I-MBYLON					82.0%
4. SOL.MALT-I-THIAM					82.0%
5. 水-I-乙酸鈉-I-KCl-I-NaCl(-PI)					88.0%
6. 水-I-乙酸鈉-I-KCl-I-NaCl					88.0%
7. SOL.MALT-I					88.0%
8. SOL.MALT-I-THIAM-I-PI					88.0%

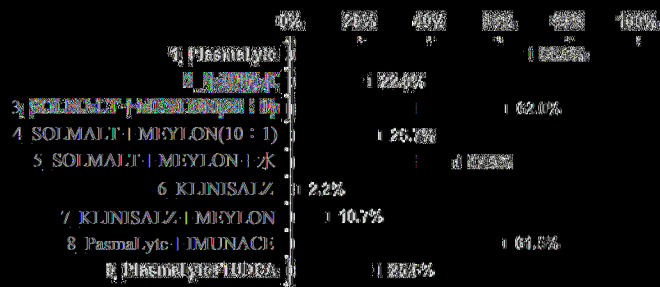
(圖5)



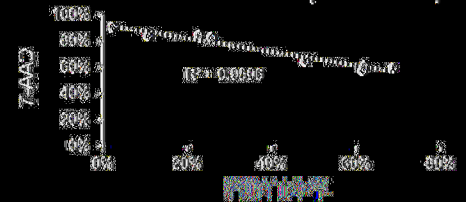
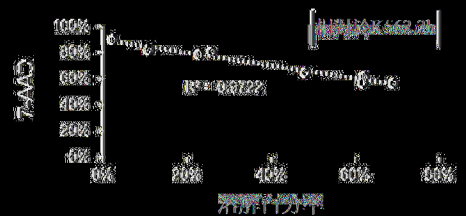
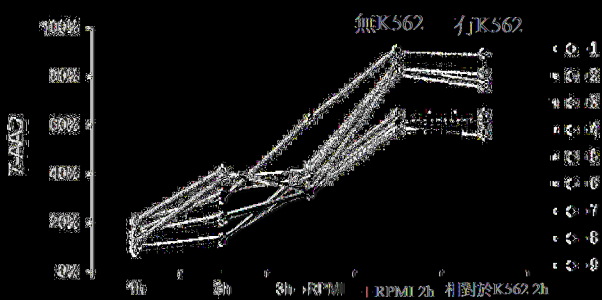
(圖6)

	pH				K ⁺ (mg/L)				PASPALYCLIC ACID				PASPALYCLIC ACID			
	0	4	8	16	0	10	20	40	0	10	20	40	0	200	400	600
1. Pasmalytic																
2. 生理鹽水																
3. SOL.MALT+MIFYLON(20:1)																
4. SOL.MALT+MIFYLON(10:1)																
5. SOL.MALT+MIFYLON+水																
6. KJINISALZ																
7. KJINISALZ+MIFYLON																
8. Pasmalytic+IMUNACH																
9. Pasmalytic+IMUNACH																

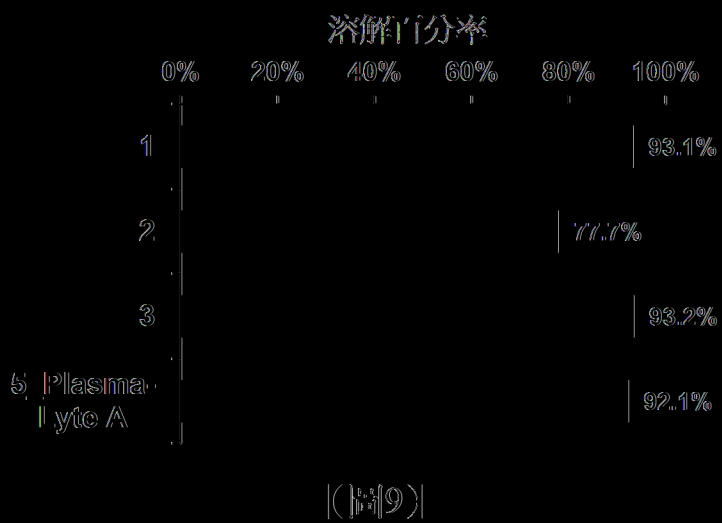
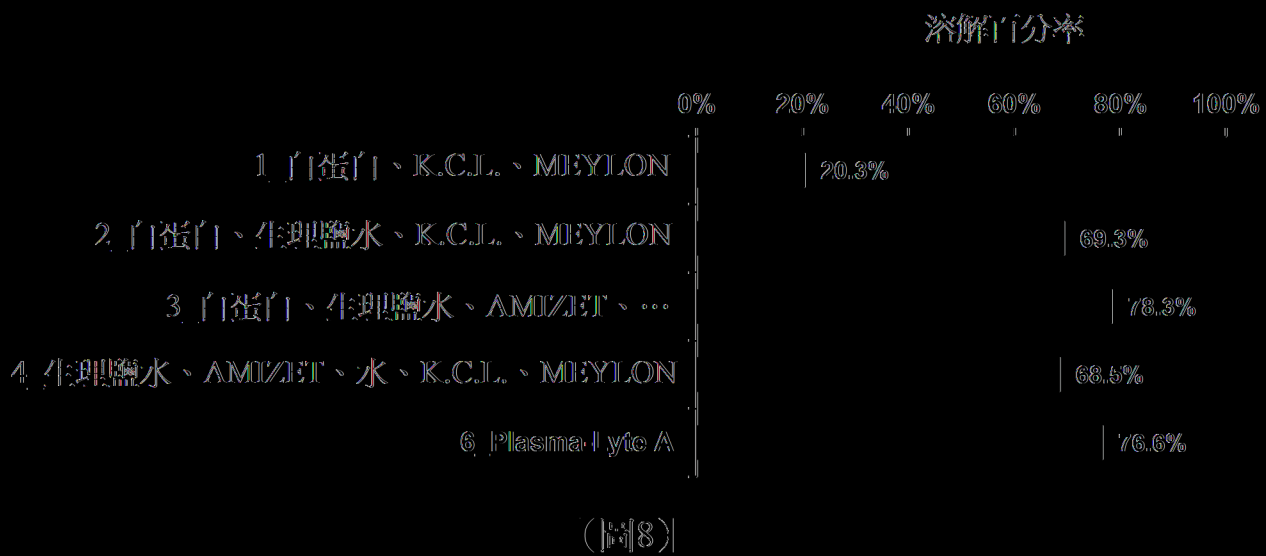
溶解百分率

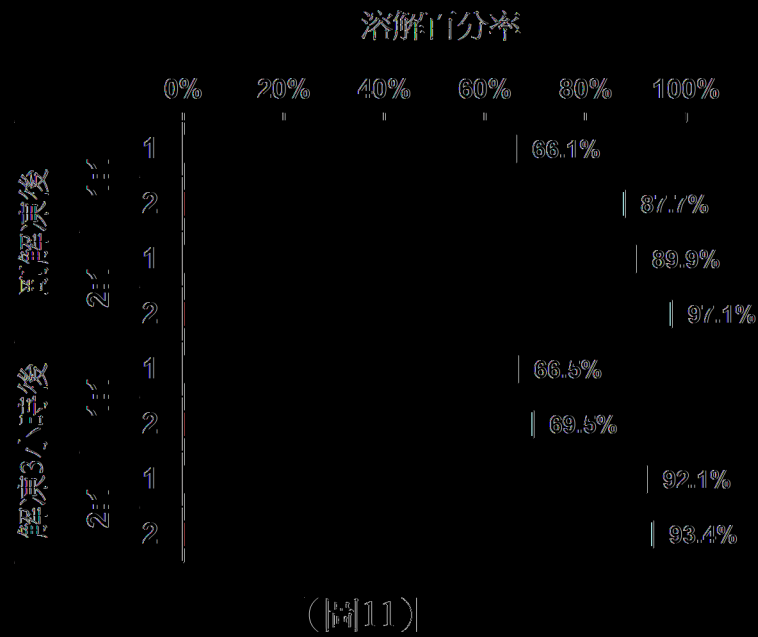
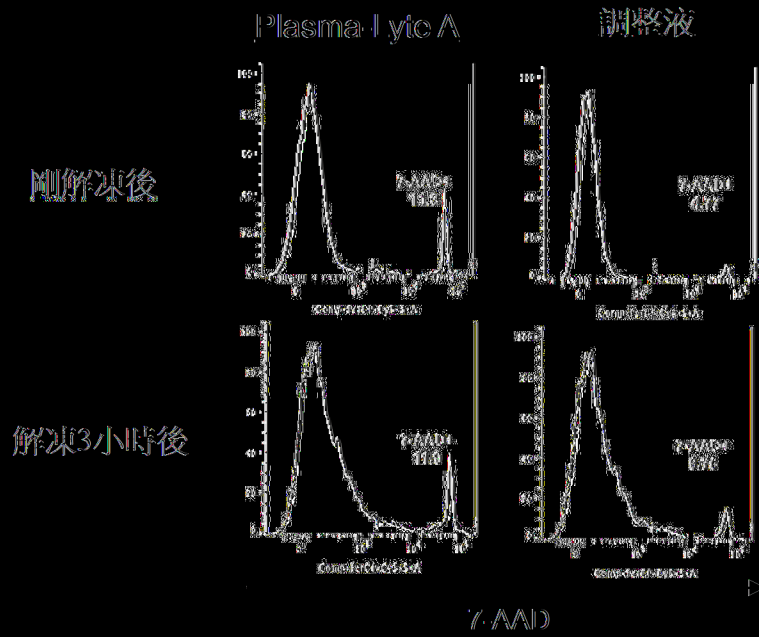


(圖 7-1)

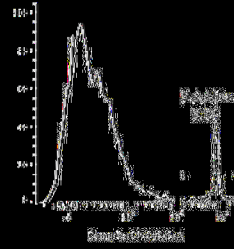


(圖 7-2)

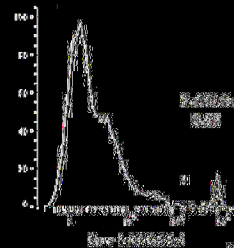




1. Plasma-Lytic A



2. 調整液



7-AAD

溶解百分率

	0%	20%	40%	60%	80%	100%
1%					80.0%	
					87.7%	
2%					95.1%	
					96.6%	
4%					98.1%	
					97.6%	

(表 12)

表 2

解凍3小時後之CAA-102之校三
之紅酒毒殺淨化率

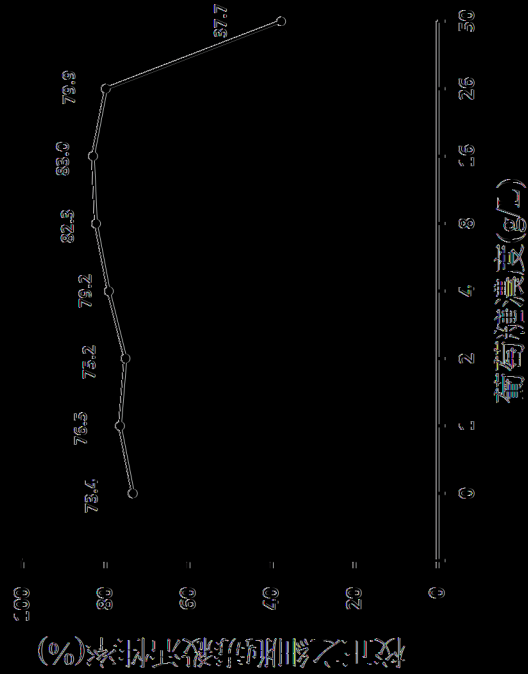
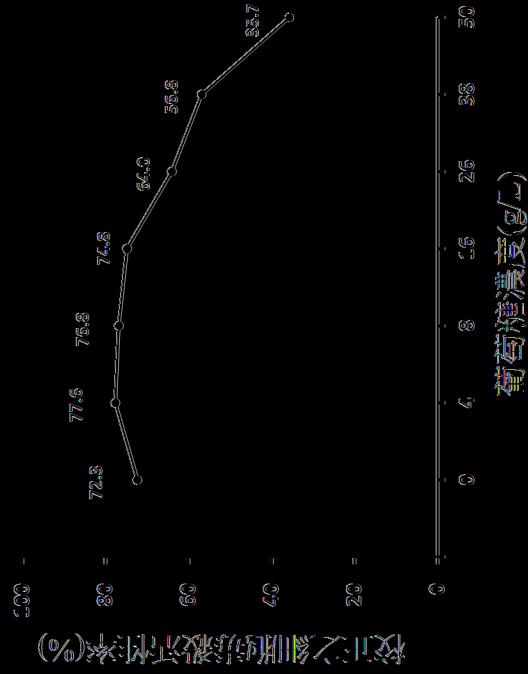


表 2

解凍3小時後之CAA-102之校三
之紅酒毒殺淨化率



[圖 13]