(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
2023年3月16日(16.03.2023)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2023/038037 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 1/04 (2006.01)	*A61K 47/12* (2006.01)
A61K 9/10 (2006.01)	*A61K 47/18* (2006.01)
A61K 9/19 (2006.01)	*A61K 47/26* (2006.01)
A61K 35/14 (2015.01)	*A61K 47/42* (2017.01)
A61K 35/26 (2015.01)	*A61P 31/04* (2006.01)
A61K 35/28 (2015.01)	*A61P 31/12* (2006.01)
A61K 35/51 (2015.01)	*A61P 35/00* (2006.01)
A61K 35/545 (2015.01)	*A61P 35/02* (2006.01)
A61K 47/02 (2006.01)	*A61P 37/04* (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2022/033487

(22) 国際出願日： 2022年9月7日(07.09.2022)

(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 2021-146461 2021年9月8日(08.09.2021) JP

(71) 出願人:株式会社ガイアバイオメディシン(**GAIA BIOMEDICINE INC.**) [JP/JP]; 〒1620821 東京都新宿区津久戸町１番８号 Tokyo (JP).

(72) 発明者:原田 結(**HARADA Yui**); 〒8190395 福岡県福岡市西区元岡７４４ 国立大学法人九州大学内 Fukuoka (JP). 米満 吉和(**YONEMITSU Yoshikazu**); 〒8190395 福岡県福岡市西区元岡７４４ 国立大学法人九州大学内 Fukuoka (JP).

(74) 代理人:特許業務法人特許事務所サイクス(**SIKS & CO.**); 〒1040031 東京都中央区京橋一丁目８番７号 京橋日殖ビル８階 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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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：
一 国際調査報告（条約第21条(3)）

(54) **Title:** METHOD FOR TREATING CELLS

(54) 発明の名称： 細胞の処理方法

(57) **Abstract:** To provide a method for thawing frozen highly active NK cells while maintaining high activity. A solution for suspending highly active NK cells that satisfies the following is used in thawing of the thawed cells. A solution for suspending cells for administration to humans that satisfies the following is provided. (1) Includes potassium ions, (2) has a pH of 6.4 or greater, (3) does not include chloride ions in a concentration of 135 mEq/L or greater, (4) does not include calcium ions in a concentration of 0.423 mM or greater, (5) has an osmotic pressure of 200-396 mOsm.

(57) 要約：高い活性を維持したまま、凍結した高活性ＮＫ細胞を解凍する方法を提供する。以下を満たす、高活性ＮＫ細胞を懸濁するための液を解凍した細胞の解凍に用いる。以下を満たす、ヒトに投与するための細胞を懸濁するための液を提供する。（１）カリウムイオンを含む、（２）ｐＨ６．４以上である、（３）塩化物イオンを、１３５ｍＥｑ／Ｌ以上の濃度で含まない、（４）カルシウムイオンを０．４２３ｍＭ以上の濃度で含まない、（５）浸透圧が２００～３９６ｍＯｓｍである。

WO 2023/038037 A1

明　細　書

発明の名称 ： 細胞の処理方法

技術分野

[0001] 本発明は、高活性ＮＫ細胞等のヒトに投与するための細胞を処理する方法に関する。

背景技術

[0002] ＮＫ細胞は腫瘍細胞やウイルス感染細胞の傷害において重要である。２０１７年８月には米国において、小児および若年成人の再発・難治性Ｂ細胞性急性リンパ芽球性白血病（Ｂ－ＡＬＬ）を適応症として、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）Ｔ細胞療法が承認されたが、近年ではＣＡＲ－Ｔに代わりＣＡＲ－ＮＫの臨床応用が拡大しつつある（非特許文献１）。

[0003] 患者に細胞を投与しようとするときには、拒絶反応が起こらないように、患者自身から採取した細胞を用いることがまず検討される。しかし、患者の状態によっては治療に必要な量の細胞の採取が難しいことがある。また体外で活性化し、増殖できる程度には個人差があり、増殖活性化が困難なケースが存在する。加えて、細胞の活性化・増殖には一定期間を要するため、直ちに治療が開始できないという問題がある。この点、前もって細胞を活性化しておき、投与に備えて保存しておくことができれば望ましい。

[0004] 細胞を保存する方法としては、短時間保存の場合は凍結を行わずに懸濁状態で保存する方法が知られており（例えば、特許文献１）、また長時間保存の場合は凍結を行う保存方法が知られている（例えば、特許文献２）。さらに細胞を凍結し、解凍後においても高い生存率を維持した細胞が得られるとして、ナトリウム塩、カリウム塩、糖、凍害保護剤、ならびに炭酸水素塩および／または炭酸塩を含有する凍結のための溶液を用いることが検討されている（特許文献３）。

[0005] また、ＮＫ細胞のような保存が困難な細胞において、ナトリウム塩、カリウム塩、糖類、並びにタンパク質を有効成分として含有する溶液中で細胞を

保存する、細胞の保存方法が知られている（特許文献４）。さらに、カリウムイオンと乳酸イオンを含有し、浸透圧が200～350mOsm/kgであり、ｐ Hが6.0～8.0である冷蔵保存用細胞保存液が知られており（特許文献５）、この保存液は、糖類の含有量は0.5～150 mMであり、カルシウムイオンの濃度が1～4mMである。さらに、浸透圧が２７０～４５０ｍＯｓｍ／ｌ、ｐＨが７～８で、K^+や有機酸アニオンを含む細胞・組織保存液が知られている（特許文献６）。有機酸として乳酸が例示されている。さらに、NK細胞等の哺乳動物細胞懸濁液として、生理的水溶液を用いることが知られており、生理的水溶液としては、リンゲル液（乳酸リンゲル液）などの等張（２５０～３８０ｍＯｓｍ／ｌ水溶液が使用できることが知られている（特許文献７）。ここの実施例では、乳酸リンゲル溶液（大塚製薬工場社製「ラクテック注」）が用いられ（段落0038）、これはカリウムや乳酸を含み、ｐＨは6.0～7.5であり、グルコースは含まない。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特開2006-230396号公報

特許文献2：特開2002-233356号公報

特許文献3：WO2011/021618

特許文献4：WO2013/115322

特許文献5：特許4947948号公報

特許文献6：WO2002/001952

特許文献7：特開2013-233102号公報

特許文献8：WO2021/177279（PCT/JP2021/007863、本願の優先日には未公開）

非特許文献

[0007] 非特許文献1：Liu E, et al. N Engl J Med. 2020;382:545-53

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] しかしながら、従来のジメチルスルホキシドのような保護剤を用いる凍結方法では、Ｔ細胞系や初代ＮＫ細胞の保存は可能だが、細胞傷害活性の高いＮＫ細胞には十分でなく、凍結解凍操作によって、その活性と生存率が著しく低下する。これは、プログラムフリーザー、細胞密度調整、デキストラン、アルブミン、またはカルボキシル化ポリ－Ｌ－リジン等の添加等では解決不可能であった。そして一定量の細胞が死ぬことを前提に投与用細胞のパッケージングを行うと、解凍後には再活性化培養のための工程が必要となり、得られた細胞はさらに洗浄することが必須となる。そのため、凍結され、ストックされた高活性ＮＫ細胞は、臨床用の細胞を扱うため一定の基準を満たす細胞培養加工施設（ＣＰＣ）の利用が必要となる現状がある。

[0009] 一方で本発明者らは高活性ＮＫ細胞を凍結し、解凍する方法を検討してきた（特許文献８）。その中で、解凍した細胞の生存率が高く維持されている場合であっても、高い細胞傷害活性が維持されていない場合があることが判明した。また、解凍した細胞について高い細胞傷害活性が維持されていれば、生存率も高い可能性が示唆され、所定の方法で評価した細胞傷害活性が高いことが、解凍した細胞についての有用な評価基準であることが分かった。

[0010] 本発明の課題の一つは、高い活性を有する細胞のために有効な解凍方法を提供することにある。より特定すると、凍結した高活性ＮＫ細胞を、所定の方法で評価した細胞傷害活性が６０％以上であるように、望ましくは８０％以上であるように解凍する方法を提供することである。

課題を解決するための手段

[0011] 本発明者らは、凍結した細胞を解凍する際に、希釈に用いる液の組成が特に重要であることを見出した。またそのような希釈に用いる液の組成は、「薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律（昭和三十五年法律第百四十五号）で認可されている輸液等に使用されている成分のみとすることもできることを見出し、本発明を完成した。

[0012] 本発明は、以下を提供する。

［１］ 以下を満たす、ヒトに投与するための細胞を懸濁するための液。

（１）カリウムイオンを含む

（２）ｐＨ６．４以上である

（３）塩化物イオンを、１３５ｍＥｑ／Ｌ以上の濃度で含まない

（４）カルシウムイオンを０．４２３ｍＭ以上の濃度で含まない

（５）浸透圧が２００～３９６ｍＯｓｍである

［２］　ヒトに投与するための細胞を含む凍結物またはその解凍物を希釈するためのものである、１に記載の液。

［３］　カリウムイオンを４．００ｍＥｑ／Ｌ以上の濃度で含み、

カルシウムイオンを含まず、

ｐＨが７．０～８．３である、１または２に記載の液。

［４］　１～３のいずれか１項に記載の液に懸濁されたヒトに投与するための細胞の集団を含み、ヒトに投与するための細胞が高活性ＮＫ細胞である、医薬組成物。

［５］　高活性ＮＫ細胞の集団が、凍結工程を経たものである、４に記載の医薬組成物。

［６］　凍結前の高活性ＮＫ細胞の集団が、アルブミン、トランスフェリン、インスリン、およびＩＬ－２を含む培地を用いて回収されたものである、５に記載の医薬組成物。

［７］　以下を含む、ヒトに投与するための細胞を含む輸注用医薬組成物の提供方法。

（１）該細胞を、動物細胞培養用培地で洗浄する工程；

（２）所望により洗浄した該細胞を、凍結保存液に懸濁する工程；

（３）凍結保存液に懸濁した該細胞を、凍結して保存する（在庫化する）工程；

（４）凍結保存した該細胞を、解凍する工程；そして

（５）解凍した該細胞を、１～３のいずれか１項に記載された液に懸濁し、輸注用医薬組成物とする工程。

[0013]　また、本発明は、以下を提供する。

［１］　以下を満たす、ヒトに投与するための細胞を懸濁するための液。

（１）カリウムイオンを含む

（２）ｐＨ６．４以上である

（３）塩化物イオンを、１３５ｍＥｑ／Ｌ以上の濃度で含まない

（４）グルコースを５．５５ｍＭ以上の濃度で含まない

（５）カルシウムイオンを０．４２３ｍＭ以上の濃度で含まない

（６）浸透圧が２００～３９６ｍＯｓｍである

［２］　ヒトに投与するための細胞を含む凍結物またはその解凍物を希釈するためのものである、１に記載の液。

［３］　カリウムイオンを４．００ｍＥｑ／Ｌ以上の濃度で含み、

カルシウムイオンを含まず、

グルコースを含まず、

ｐＨが７．０～８．３である、１または２に記載の液。

［４］　１～３のいずれか１項に記載の液に懸濁されたヒトに投与するための細胞の集団を含み、ヒトに投与するための細胞が高活性ＮＫ細胞である、医薬組成物。

［５］　高活性ＮＫ細胞の集団が、凍結工程を経たものである、４に記載の医薬組成物。

［６］　凍結前の高活性ＮＫ細胞の集団が、アルブミン、トランスフェリン、インスリン、およびＩＬ－２を含む培地を用いて回収されたものである、５に記載の医薬組成物。

［７］　以下を含む、ヒトに投与するための細胞を含む輸注用医薬組成物の提供方法。

（１）該細胞を、動物細胞培養用培地で洗浄する工程；

（２）所望により洗浄した該細胞を、凍結保存液に懸濁する工程；

（３）凍結保存液に懸濁した該細胞を、凍結して保存する（在庫化する）工程；

（４）凍結保存した該細胞を、解凍する工程；そして

（５）解凍した該細胞を、１～３のいずれか１項に記載された液に懸濁し、輸注用医薬組成物とする工程。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]高活性NK細胞を凍結し、解凍した後の細胞傷害活性。Plasma-Lyte A構成成分の濃度を基にグルコン酸ナトリウム不含の群（1）、グルコン酸ナトリウム不含かつその他各成分を16%増量し、浸透圧を調整した群（2）、グルコン酸ナトリウム不含かつNaClにて浸透圧を調整した群（3）、陽性コントロールとしてPlasma-Lyte A（4）、生理食塩液（5）、生理食塩液にPlasma-Lyte Aと同濃度のグルコン酸ナトリウムを添加した群（6）を設定した。解凍希釈後3時間目で、（5）、（6）においては著しい活性低下が認められた。

[図2]高活性NK細胞を凍結し、解凍した後の細胞傷害活性。いずれもグルコン酸ナトリウムを不含とし、Plasma-Lyte A構成成分の濃度を基に、Plasma-Lyte AからMg^{2+}、K+、CH_3COO^-（酢酸）を1成分ずつ除外した群（1）～（3）、生理食塩液に1成分ずつ追加した群（4）～（6）として設定した。解凍希釈後3時間目で、K$^+$、CH_3COONaを除いた群（2），（3）において活性の低下が見られ、Mg$^+$を除去した群（1）では低下は見られなかった。また（4）～（6）での実験から、K$^+$のみ単独での活性への寄与が認められた。

[図3]高活性NK細胞を凍結し、解凍した後の細胞傷害活性。陽性コントロールとしてPlasma-Lyte A（1）、陰性コントロールとして生理食塩液（2）、Plasma-Lyte A構成成分の濃度を基に、グルコン酸ナトリウムおよび塩化マグネシウム不含とし、生理食塩液に対する浸透圧比が0.80、0.95、1.0、1.10となるよう調製した（3～6）。また、NaClのみで浸透圧比 1.0となるよう調整した群（7）を設定した。活性について、（3）～（6）では影響は認められなかったが、NaClのみで浸透圧比 1.0となるよう調整した群（7）では低下傾向が確認された。

[図4]高活性NK細胞を凍結し、解凍した後の細胞傷害活性。陽性コントロールとしてPasma-Lyte A（1）、陰性コントロールとして生理食塩液（2）を設定し、K+濃度が5mEq/Lとなるようにリン酸緩衝液にK+を補充する群（3）、サム

点滴静注（4）、生食/メイロン/KClの配合液（6）、水/メイロン/KCl/NaClの配合液（7）を調製した。また、K^+濃度が2.5mEq/Lとなるようにサム/メイロンの配合液（5）、水/ CH_3COONa /KCl/NaClの配合液（8）を調製した。（3）では生理食塩液（2）に比して活性の向上は認められたものの、活性の維持は十分に達成することはできなかった。また（5）、（8）についても活性の維持は十分ではなかった。

[図5]高活性NK細胞を凍結し、解凍した後の細胞傷害活性。陽性コントロールとしてPlasma-Lyte A（1）、陰性コントロールとして生理食塩液（2）を設定し、ソルマルト（7）、そしてソルマルトを基にpHを調整した群としてソルマルト/メイロン配合液（3）、ソルマルト/サム配合液（4）を調製した。また、Plasma-Lyte Aからグルコン酸ナトリウム/Mg^{2+}をいずれも除きその他成分がPlasma-Lyte Aと同濃度からなる配合液（5）、Plasma-Lyte Aからグルコン酸ナトリウム/Mg^{2+}をいずれも除きNaClのみを減量して浸透圧が（5）と同一となる配合液（6）を調製した。また、サムを用いたソルマルトのpH調整後に水を加えて浸透圧を低下させた群（8）を追加した。（7）では活性の維持はできなかったが、（3）、（4）については活性が改善する傾向が確認された。この傾向は再現性を持って確認され、サムを用いたソルマルトのpH調整後に水を加えて浸透圧を低下させた群（8）についても同様の結果を得ることができた。また本結果から、pHは6.0まで下がると活性の維持は困難となり、8.8までは許容可能であることが実験的に確かめられた（図５）。

[図6]高活性NK細胞を凍結し、解凍した後の細胞傷害活性。陽性コントロールとしてPlasma-Lyte A（1）、陰性コントロールとして生理食塩液（2）を設定し、ソルマルト（7）、そしてソルマルトを基にpHを調整した群としてソルマルト/メイロン配合液（3）、ソルマルト/サム配合液（4）を調製した。また、Plasma-Lyte Aからグルコン酸ナトリウム/Mg^{2+}をいずれも除きその他成分がPlasma-Lyte Aと同濃度からなる配合液（5）、Plasma-Lyte Aからグルコン酸ナトリウム/Mg^{2+}をいずれも除きNaClのみを減量して浸透圧が（5）と同一となる配合液（6）を調製した。解凍希釈直後には観察されなかったviabilityの

低下が、RPMIに置換された後に観察されることが明らかになった。

[図7-1]高活性NK細胞を凍結し、解凍した後の細胞傷害活性。陽性コントロールとしてPasma-Lyte A（1）、陰性コントロールとして生理食塩液（2）を設定し、ソルマルトを基にメイロンにてpHを調整した群としてソルマルト:メイロン=20:1配合液（3）、ソルマルト:メイロン=10:1配合液（4）、ソルマルト/メイロン/水の配合液（5）、クリニザルツ（6）、クリニザルツを基にメイロンにてpHを調製した群としてクリニザルツ/メイロンの配合液（7）を調製した。また、Plasma-Lyte A+14万IU/mLイムネース（8）、Plasma-Lyte A+875μM Tauroursodeoxycholic Acid (TUDCA)の混合液（9）を調製した。（3）において活性の維持が可能になることが明らかになった。なお（8）はPasma-Lyte A（1）と活性維持能は同等であり、イムネースの添加は少なくともK562を対象とする活性には寄与しないことが分かった。pHの低いクリニザルツ（6）、pH調製はしたものの浸透圧の高いクリニザルツ/メイロンの配合液（7）は活性を維持できなかった。

[図7-2]RPMIへの置換後のviability低下と活性との間の高い相関は再現性良く確認された。

[図8]高活性NK細胞を凍結し、解凍した後の細胞傷害活性。pHが7.6～8.0となるようメイロンにて調整し、K^+濃度が5mEq/Lとなるようにアルブミン/K.C.L./メイロンの配合液（1）、アルブミン/K.C.L./生食/メイロンの配合液（2）、さらにCl^-濃度が80mMq/Lとなるように調整した群としてアルブミン/K.C.L./生食/アミゼット/水/メイロンの配合液（3）、K.C.L./生食/アミゼット/水/メイロンの配合液（4）、陽性コントロールとしてPasma-Lyte A（6）を調製した。（2）と（4）は良好な活性維持能を示し、（3）は顕著な好成績を示した。

[図9]高活性NK細胞を凍結し、解凍した後の細胞傷害活性。すべて浸透圧が300mOsmとなるよう設定し、アルブミン/K.C.L./生食/アミゼット/水/メイロンの配合液（1）、K.C.L./生食/アミゼット/水/メイロンの配合液（2）、アルブミン/K.C.L./生食/アミゼット/水/メイロンの配合液（3）、陽性コントロ

ールとしてPasma-Lyte A（5）を調製した。（2）は良好な活性維持能を示し、（1）と（3）は顕著な好成績を示した。

[図10]解凍後3時間での活性に影響を与える因子の絞り込み。統計解析の結果から、活性の維持には、Cl^-濃度、pHの影響が大きく、またK^+には閾値が存在する可能性が示唆された。

[図11]静脈内投与に適した他の調整液の利用1。上：7-AAD染色によるViability。下：Plasma-Lyte A(1)、調整液(2)の細胞傷害活性。K562細胞を標的細胞(T)として混合比(E:T)1:1、2:1で2時間共培養した場合。

[図12]静脈内投与に適した他の調整液の利用2。上：7-AAD染色によるViability。下：Plasma-Lyte A(1)、調整液(2)の細胞傷害活性。K562細胞を標的細胞(T)として混合比(E:T)1:1、2:1、4:1で2時間共培養した場合。

[図13]グルコースの影響。Plasma-Lyte Aに各濃度のグルコースを加えた液で希釈した場合の細胞傷害活性。GAIA-102(E)とK562細胞(T)は、ET比で0.5:1、1:1、または2:1 で混合し、傷害活性を測定した。ET比4点（0を含む）で算出した細胞傷害活性率からJMP(登録商標)Pro統計解析ソフトを使用した非線形回帰分析によりE:T=1:1の計算値を算出した。#1：Glucoseの濃度を0, 1, 2, 4, 8, 16, 26, 50g/L 、#2：Glucoseの濃度を0, 4, 8, 16, 26, 38, 50g/Lとした。

発明を実施するための形態

[0015] 本発明に関し、ｍＭは、特に記載した場合を除き、ｍｍｏｌ／Ｌと同じ意味で用いている。数値範囲をｘ～ｙで表すとき、その範囲は両端の値ｘおよびｙを含む。

[0016] 本発明は、凍結した、ヒトに投与するための細胞の解凍または融解方法に関する。本発明に関し、解凍または融解というときは、特に記載した場合を除き、凍結したものを解かすことを意味する。解凍または融解の際に、液を加えて希釈することがある。

[0017] ［適用できる細胞］

本発明は、種々の細胞に適用することができる。本発明が好ましく適用で

きる細胞の一つは、ヒトに投与される細胞であり、好ましくはヒトに投与される細胞であって体外で何らかのサイトカインを用いることによる活性化操作を経た細胞であり、このような細胞には、細胞傷害活性の高いＮＫ細胞（高活性ＮＫ細胞）等が含まれる。活性化操作は、典型的にはインターロイキン（ＩＬ）－２を含む培地を用いて細胞をインキュベートすることに拠る。なお、以下では、本発明を、ＮＫ細胞または高活性ＮＫ細胞に適用する場合を例に説明することがあるが、当業者であれば、その説明に基づき、本発明をそれ以外の細胞に適用する場合についても適宜理解することができる。

[0018] 一般に、ＮＫ細胞とは、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）、Ｔ細胞普遍的マーカーであるＣＤ３、および膜免疫グロブリンであるＢ細胞受容体を発現していない大型の顆粒性リンパ球であり、ヒトでは通常ＣＤ１６陽性であり、かつＣＤ５６陽性である。ＮＫ細胞であるか否かは、当業者であれば、細胞表面マーカーの発現パターン等に基づき容易に判断することができる。ＮＫ細胞は、細胞傷害活性を有し、この細胞傷害活性の有無や程度は、公知の種々の方法で測定することができる。ＮＫ細胞は、末梢血ＮＫ細胞、臍帯血ＮＫ細胞、初代ＮＫ細胞、培養ＮＫ細胞、高活性ＮＫ細胞を包含しうる。

[0019]（原材料）

本発明が好ましく適用できる高活性ＮＫ細胞等の原材料は、末梢血、臍帯血、骨髄および／またはリンパ節、アフェレーシス法により採取された血液（アフェレーシス血液）であってよい。また原材料は、胚性幹細胞、体性幹細胞および人工多能性幹（ｉＰＳ）細胞からなるグループから選択されるいずれかの幹細胞由来の造血幹細胞、臍帯血由来の造血幹細胞、末梢血由来の造血幹細胞、骨髄血由来の造血幹細胞、臍帯血単核球、末梢血単核球からなる群から選択される少なくとも１種類の細胞から調製されたものであってもよい。原材料のドナーは、高活性ＮＫ細胞等による免疫治療を受ける患者自身、該患者の近縁者、または患者とは血縁関係のない健常者である場合がある。ドナーは複数であってもよい。

[0020]（培地）

高活性ＮＫ細胞等を培養するために用いる培地は、ＫＢＭ５０１培地（コージンバイオ株式会社。ＩＬ－２を１，７５０ＪＲＵ／ｍＬ含む。）、コスメディウム００８（コスモバイオ。ＩＬ－２を１，７５０ＪＲＵ／ｍＬ含む。）、ＦＫＣＭ１０１（フコク。ＩＬ－２不含、またはＩＬ－２を１７５ＩＵ／ｍＬ含む。）、ＣｅｌｌＧｒｏ　ＳＣＧＭ培地（セルジェニックス、岩井化学薬品株式会社）、Ｘ－ＶＩＶＯ１５培地（ロンザ、タカラバイオ株式会社）、Ｇｉｂｃｏ（登録商標）　ＣＴＳ（登録商標）　ＡＩＭ　Ｖ（登録商標）　Ｍｅｄｉｕｍ（サーモフィッシャーサイエンティフィック。Ｔ細胞および樹状細胞を増殖・操作するための既知組成の無血清培地）、ＣＴＳ　ＯｐＴｍｉｚｅｒ　Ｔ　Ｃｅｌｌ　Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ　Ｂａｓａｌ　Ｍｅｄｉｕｍ（サーモフィッシャーサイエンティフィック。ヒトＴリンパ球の成長および増殖用）、ＩＭＤＭ、ＭＥＭ、ＤＭＥＭ、ＲＰＭＩ－１６４０等を含むが、これらに限定されない。好ましい例は、ＫＢＭ５０１培地、ＦＫＣＭ１０１またはコスメディウム００８である。なお、本発明に関し、細胞について培養（する）というときは、特に記載した場合を除き、細胞の生存維持、細胞の増幅、および細胞の活性化からなる群より選択されるいずれかの目的のために細胞を一定時間、培地またはそれに準じた液の中で維持することをいう。処理を特定の温度で一定時間行う場合に、インキュベート（する）ということがある。

[0021] 培地には、ＩＬ－２が、本発明の目的を達成できる濃度で添加される場合がある。ＩＬ－２の濃度は、２５００ＩＵ／ｍＬ～２８１３ＩＵ／ｍＬの場合がある。ＩＬ－２は、ヒトのアミノ酸配列を有することが好ましく、安全上、組換えＤＮＡ技術で生産されることが好ましい。ＩＬ－２の濃度は、国内標準単位（ＪＲＵ）および国際単位（ＩＵ）で示される場合がある。１ＩＵが約０．６２２ＪＲＵであるから、既存の培地の１７５０ＪＲＵ／ｍＬは、約２８１３ＩＵ／ｍＬに相当する。

[0022] 上述したＩＬ－２と同時にまたはＩＬ－２に代えて、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、およびＩＬ－１８からなる群より選択されるいずれかが本発明の目的

を達成できる濃度で添加される場合がある（非特許文献２：Leong JW et al. Biol Blood Marrow Transplant 20 (2014) 463-473）。各々の濃度は、他のサイトカインの有無や濃度に関わらず、１ｐｇ／ｍＬ～１μｇ／ｍＬの場合がある。ＩＬ－２は、ヒトのアミノ酸配列を有することが好ましく、安全上、組換えＤＮＡ技術で生産されることが好ましい。

[0023] 培地には、被験者の自家血清、ＢｉｏＷｈｉｔｔａｋｅｒ社その他から入手可能なヒトＡＢ型血清や、日本赤十字社から入手可能な献血ヒト血清アルブミンが添加される場合がある。自家血清およびヒトＡＢ型血清は１ないし１０％の濃度で添加されることが好ましく、献血ヒト血清アルブミンは１ないし１０％の濃度で添加されることが好ましい。血清とともに、または血清の代わりに、ヒト血小板溶解物（Ｈｕｍａｎ ｐｌａｔｅｌｅｔ ｌｙｓａｔｅ：ＨＰＬ）を添加してもよい。ＨＰＬは市販されており、ＵｌｔｒａＧＲＯＴＭシリーズ（ＡｖｅｎｔａＣｅｌｌ ＢｉｏＭｅｄｉｃａｌ社）等が販売されている。ＨＰＬを用いる場合には培地にはさらにヘパリンナトリウムを添加してもよい。

[0024] 培地には、ＮＫ細胞の培養効果を損なわないことを条件として、適切なタンパク質、サイトカイン、抗体、化合物その他の成分が含まれる場合がある。サイトカインは、上述したＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、およびＩＬ－１８のほか、ＩＬ－３、ＩＬ－７、ＩＬ－２１、幹細胞因子（ＳＣＦ）、および／または、ＦＭＳ様チロシンキナーゼ３リガンド（Ｆｌｔ３Ｌ）の場合がある。これらはいずれも、ヒトのアミノ酸配列を有することが好ましく、安全上、組換えＤＮＡ技術で生産されることが好ましい。

[0025] 培地は、無血清培地であることが好ましい。無血清培地は、血清アルブミン、トランスフェリン、およびインスリンを含んでいることが好ましい。リンパ球を培養するための無血清培地が開発、市販されており、本発明においてそれらを利用することができる。無血清培地の好ましい例の一つは、基礎培地に、ヒトＴ細胞の増殖をサポートする組成として市販されているＣＴＳ Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ ＳＲ（サーモフィッシャーサイエンティフィッ

ク）を添加したものである。

[0026] 培地の交換または補充は、目的とする培養効果が得られることを条件として、培養開始後いつ行われてもかまわないが、３～５日毎が好ましい。

[0027] 培養の際に用いる培養容器は、商業的に入手可能なディッシュ、フラスコ、プレート、マルチウェルプレートを含むが、これらに限定されない。培養条件は、ＮＫ細胞の培養効果を損なわないことを条件として特に限定されないが、３７°Ｃ、５％CO_2および飽和水蒸気雰囲気下の培養条件が一般的である。培養期間は、目的とする培養効果が得られることを条件として、特に限定されない。

[0028] 本発明が好ましく適用できる高活性ＮＫ細胞等には、下記の［１］、［２］、［３］および［４］が含まれる。

[0029] ［１］ 下記（１）および（２）の特徴を備えるＮＫ細胞：

（１）ＣＤ１６陽性、ＣＤ５６高発現性、かつＣＤ５７陰性である。

（２）ＮＫＧ２Ｃ陽性、ＮＫＧ２Ａ陰性～低発現性、およびＣＤ９４陽性である。

[0030] ［１］の高活性ＮＫ細胞は、ＣＤ１６高発現性であってもよい。また［１］の高活性ＮＫ細胞は、ＣＤ１６高発現性であるか否かにかかわらず、さらに下記の特徴を備えていてもよい。

（３）該ＮＫ細胞をエフェクター細胞（Ｅ）とし、Ｋ５６２細胞を標的細胞（Ｔ）として混合比（Ｅ：Ｔ）１：１で共培養した場合の細胞傷害活性が５０％以上である。

[0031] ［１］の高活性ＮＫ細胞は、下記のように表すこともできる：

健常人由来末梢血単核球から、ＣＤ３ビーズ（例えば、ＣｌｉｎｉＭＡＣＳ ＣＤ３， ミルテニーバイオテク社， カタログ番号１３０－０１７－６０１）、ＬＤカラム（例えば、ミルテニーバイオテク，カタログ番号１３０－０４２－９０１）および分離バッファー（例えば、０．５％ヒトＡＢ型血清 （非働化処理したもの）、２ｍＭ ＥＤＴＡを含むＰＢＳ）を用いてＣＤ３陽性細胞を除去した細胞集団を、適切な培地（例えば、５％ヒトＡＢ

型血清（非働化処理したもの）を添加したコスメディウム００８）で１４日間培養して得られ、下記（１）および（３）の特徴を備えるＮＫ細胞：

（１）ＣＤ１６陽性、ＣＤ５６高発現性、かつＣＤ５７陰性である。

（３）該ＮＫ細胞をエフェクター細胞（Ｅ）とし、Ｋ５６２細胞を標的細胞（Ｔ）として混合比（Ｅ：Ｔ）１：１で共培養した場合の細胞傷害活性が５０％以上である。

[0032] ［１］の高活性ＮＫ細胞の特徴の詳細や、より具体的な製造方法は、特開２０１８－１９３３０３を参照することができる。

[0033] ［２］　下記の細胞：

ＣＣＲ５陽性、ＣＣＲ６陽性およびＣＸＣＲ３陽性であり且つＣＤ３陰性である細胞。

[0034] ［２］の細胞は、更にＣＤ１１ｃ高発現性であってもよい。

[0035] ［２］の細胞は、下記のように表すこともできる：

ＣＣＲ５陽性、ＣＣＲ６陽性、ＣＸＣＲ３陽性、Ｉｎｔｅｇｒｉｎ　α１陽性、Ｉｎｔｅｇｒｉｎ　α３陽性およびＩｎｔｅｇｒｉｎ　β３陰性であり且つＣＤ３陰性である細胞。あるいは、ＣＣＲ５陽性、ＣＣＲ６陽性、ＣＸＣＲ３陽性、ＣＤ１１ａ高発現性およびＣＤ１１ｃ高発現性であり且つＣＤ３陰性であり、高発現性は、末梢血から得た、実質的な培養を行なっていないＮＫ細胞の集団における発現との比較により判断される、細胞。

[0036] ［２］の細胞は、本発明者らの検討によると、腫瘍塊を形成した固形がんに対し、極めて高い細胞傷害活性を示す。［２］の細胞の特徴の詳細や、より具体的な製造方法は、特開２０１９－１７０１７６を参照することができる。

[0037] ［３］　下記の方法で得られうる、高活性ＮＫ細胞：

新鮮末梢血から、または凍結アフェレーシス血液から得た単核球にＣＤ３ｂｅａｄｓ（例えば、ＣｌｉｎｉＭＡＣＳ　ＣＤ３，ミルテニーバイオテク，　１３０－０１７－６０１（１ｘ１０^{7}細胞あたり５μＬ））、および凍結アフェレーシス血液を使用した場合はさらにＣＤ３４　ｂｅａｄｓ（例

えば、ＣｌｉｎｉＭＡＣＳ　ＣＤ３４，ミルテニーバイオテク，１３０－０１７－５０１（１ｘ１０^{7}細胞あたり２．５μＬ））を添加・懸濁し、４℃，１５分間インキュベート後、分離バッファー（例えば、０．５％ヒトＡＢ型血清　（５６℃で３０分の非働化処理したもの）、２ｍＭ　ＥＤＴＡを含むＰＢＳ）を加えてよく懸濁し、遠心する。上清を除去し、ＬＤカラム（例えば、ミルテニーバイオテク，１３０－０４２－９０１）１カラムあたり最大１ｘ１０^{8}　ｃｅｌｌｓまでの細胞数となるように０．５ｍＬの分離バッファーに懸濁する。分離バッファー　２ｍＬをあらかじめ添加したのち、ＬＤカラムに細胞懸濁液を添加して、ＬＤカラムからの溶出液を回収した。さらに分離バッファー　１ｍＬをＬＤカラムに添加し、溶出液を回収する。回収した液の遠心分離を行い、上清を除去後、末梢血を使用した場合は５ｘ１０^{5}ｃｅｌｌｓ／ｍＬ、凍結アフェレーシス血液を使用した場合は１ｘ１０^{6} ｃｅｌｌｓ／ｍＬとなるように適切な培地（例えば、５％ヒトＡＢ型血清（５６℃で３０分の非働化処理したもの）あるいは５％ＵｌｔｒａＧＲＯ（ＡｖｅｎｔａＣｅｌｌ、ＨＰＣＰＬＣＲＬ１０）に２Ｕ／ｍＬ　ヘパリンナトリウムを添加したもの、のいずれか一方を含むＫＢＭ５０１培地）に細胞を懸濁し、適宜培地交換しながら、１４日目まで培養する。

[0038]　［３］の高活性ＮＫ細胞の、具体的な製造方法は、本明細書の実施例の項を参照することができる。

[0039]［４］　［１］～［３］の細胞を得るに際し、ＩＬ－２と同時にまたはＩＬ－２に代えて、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、およびＩＬ－１８からなる群より選択されるいずれかが本発明の目的を達成できる濃度で添加し、培養することにより得られる細胞。このような細胞の具体的な製造方法は、前掲非特許文献２を参照することができる。

[0040]　なお以下では、本発明を、高活性ＮＫ細胞を用いる場合を例に説明することがあるが、当業者であればその説明に準じて、本発明を、他の、体外で何らかのサイトカインを用いることによる活性化操作を経た細胞を用いる場合についても理解できる。

[0041]（細胞傷害活性）

本発明に関し、高活性ＮＫ細胞等について、活性または細胞傷害活性というときは、特に記載した場合を除き、対象細胞（エフェクター細胞、Ｅ）の標的細胞（Ｔ）に対する溶解能を指す。細胞傷害活性は、エフェクター細胞により死に至った標的細胞の百分率（％）で表すことができ、次式により求められる。

[0042]（エフェクター細胞と共培養した場合の細胞死－自然細胞死(陰性コントロール)）／（最大細胞死(陽性コントロール)－自然細胞死(陰性コントロール)）×１００

[0043] 細胞傷害活性の測定に際しては、一般的には、エフェクター細胞の細胞傷害活性の程度等に応じ、エフェクター細胞と標的細胞の混合比（Ｅ：Ｔ）、エフェクター細胞と標的細胞の共培養の時間は、用いる細胞の種類や活性の強さに応じて適宜とすることができる。ＮＫ細胞をエフェクター細胞とするとき、標的細胞は、Ｋ５６２細胞、急性骨髄性白血病細胞、慢性骨髄性白血病細胞の場合があるが、これらに限定されない。エフェクター細胞と標的細胞、生細胞と死細胞は、放射性物質、蛍光色素等で標識した抗体等の試薬により、区別し、また定量することができる。ＮＫ細胞をエフェクター細胞とするときの細胞傷害活性は、例えばＫ５６２細胞を標的細胞とし、Ｅ：Ｔ＝１：０．０５～１０、好ましくは１：０．１～５とし、インキュベート時間を０．５～１８時間、好ましくは１～１２時間の条件で測定することができる。

[0044] 本発明に関し、ＮＫ細胞等の活性が高いというときは、特に記載した場合を除き、標的細胞をＫ５６２細胞とし、Ｅ：Ｔ＝２：１で混合し、１～３時間、より特定すると２時間、共培養した場合の細胞傷害活性が５０％以上であることをいう。活性は、６０％以上であることが好ましく、７０％以上であることがより好ましい。

[0045]［回収］

本発明においては、後述する凍結工程に先立ち、凍結すべき高活性ＮＫ細

胞等を培養系から回収する。回収は、遠心分離して培地と細胞を分離することにより行うことができる。必要に応じ、培養系に適切な濃度のＥＤＴＡを加え、接着した細胞を培養容器表面から剥離してもよい。また、培地を回収したあとの培養容器表面を適切な溶液で洗浄して、残った細胞を得てもよい。得られた細胞は、必要に応じ、適切な溶液で洗浄し、適切な溶液に懸濁する。

[0046] 回収工程においては、細胞の剥離や洗浄のために、培地、等張液、緩衝液等の溶液を用いることができる。使用可能な培地の例として、ＫＢＭ５０１培地、コスメディウム００８、ＦＫＣＭ１０１、ＣｅｌｌＧｒｏ ＳＣＧＭ培地、Ｘ－ＶＩＶＯ１５培地、Ｇｉｂｃｏ（登録商標） ＣＴＳ（登録商標） ＡＩＭ Ｖ（登録商標） Ｍｅｄｉｕｍ、ＣＴＳ ＯｐＴｍｉｚｅｒ Ｔ Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍ、ＩＭＤＭ、ＭＥＭ、ＤＭＥＭ、ＲＰＭＩ－１６４０が挙げられる。等張液とは、体液（血漿）の浸透圧（２８５±５ｍＯｓｍ／Ｌ）とほぼ等しい浸透圧をもつ液をいい、本発明に関しては、浸透圧が２８５±１３ｍＯｓｍ／Ｌである液をいう。例えば、Ｐｌａｓｍａ－Ｌｙｔｅ Ａの浸透圧は、２９４ｍＯｓｍ／Ｌであり、ＰＢＳ（－）の浸透圧は、２８０±４ｍＯｓｍ／Ｌ（氷点降下法）である。使用可能な等張液の例として、Ｐｌａｓｍａ－Ｌｙｔｅ Ａ（Ｂａｘｔｅｒ）、生理食塩水、リンゲル液（乳酸リンゲル液、 酢酸リンゲル液 、重炭酸リンゲル液等）、５％グルコース水溶液が挙げられる。使用可能な緩衝液の例として、リン酸緩衝生理食塩水（Ｐｈｏｓｐｈａｔｅ－ｂｕｆｆｅｒｅｄ ｓａｌｉｎｅ： ＰＢＳ）、Ｔｒｉｓ塩酸緩衝液、Ｔｒｉｓ酢酸緩衝液、ＨＥＰＥＳ緩衝液が挙げられる。

[0047] 回収工程において用いる溶液の好ましい例の一つは培地であり、より好ましくはヒトリンパ球培養用培地である。ヒトリンパ球培養用培地は、ヒト血清アルブミン、ヒトトランスフェリン、組換え型ヒトインスリン、および組換え型ヒトＩＬ－２を含んでいてもよい。このような培地の好ましい例は、ＫＢＭ５０１培地、ＦＫＣＭ１０１またはコスメディウム００８である。Ｋ

ＢＭ５０１培地は、ヒト血清アルブミン、ヒトトランスフェリン、組換え型ヒトインスリン、組換え型ヒトＩＬ－２を含み、それ以外のタンパク質は含まない。また、ＫＢＭ５０１培地は、抗生物質（カナマイシン）、$NaHCO_3$、Ｌ－Ｇｌｕｔａｍｉｎｅ、ｐＨ調整剤を含む。

[0048] 回収工程において、ＰＢＳ（－）を用いると、解凍時の細胞の生存率が低下し、好ましくない場合がある。ＰＢＳ（－）は、典型的には、塩化ナトリウム１３６．９ｍＭ、塩化カリウム２．６８ｍＭ、リン酸水素二ナトリウム８．１ｍＭ、リン酸水素カリウム１．４７ｍＭを含む。

[0049] ［前処理］

本発明においては、後述する凍結工程に先立ち、凍結すべき高活性ＮＫ細胞等を前処理してもよい。前処理とは、回収した細胞を添加剤を含む溶液に懸濁することである。前処理は、添加剤を含む溶液で回収することを含む。

[0050] 前処理に用いる添加剤としては、胆汁酸およびフェニル酪酸からなる群より選択されるいずれかを用いることができる。胆汁酸の例は、タウロウルソデオキシコール酸（ＴＵＤＣＡ）、ウルソデオキシコール酸（ＵＤＣＡ）、ケノデオキシコール酸、コール酸、ヒオデオキシコール酸、デオキシコール酸、７－オキソリトコール酸、リトコール酸、ヨードデオキシコール酸、イオコール酸、タウロケノデオキシコール酸、タウロデオキシコール酸、グリコウルソデオキシコール酸、タウロコール酸、グリココール酸またはその類似体、誘導体である。フェニル酪酸の例は、４－フェニル酪酸（４－ＰＢＡ）、グルセリル（トリ－４－ＰＢＡ）、フェニル酢酸、２－ＰＯＡＡ－ＯＭｅ、２－ＰＯＡＡ－ＮＯ２、２－ＮＯＡＡまたはその薬学的に許容される、塩、類似体、誘導体もしくはプロドラッグである。前処理に用いる添加剤の特に好ましい例は、ＴＵＤＣＡおよび４－ＰＢＡからなる群より選択されるいずれかである。

[0051] 前処理のための添加剤として胆汁酸を用いる場合は、濃度は適宜としうるが、好ましくは１００～５０００μＭであり、より好ましくは２００～２５００μＭであり、さらに好ましくは４００～１０００μＭである。このよう

な範囲は、ＴＵＤＣＡを用いる場合に特に適している。前処理のための添加剤としてフェニル酪酸を用いる場合、濃度は適宜としうるが、好ましくは１～１０００μＭであり、より好ましくは５～５００μＭであり、さらに好ましくは１０～１００μＭである。このような範囲は４－ＰＢＡを用いる場合に特に適している。

[0052] 前処理のための添加剤の他の例は、ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）である。濃度は適宜としうるが、好ましくは０．５～１５％であり、より好ましくは１～１２．５％であり、さらに好ましくは２～１０％である。

[0053] 前処理のための溶液は、回収の際に用いる溶液と同様、培地、等張液、緩衝液等の溶液であり得る。前処理において用いる溶液の好ましい例の一つは培地であり、より好ましくはヒトリンパ球培養用培地であり、さらに好ましくはＫＢＭ５０１培地、ＦＫＣＭ１０１またはコスメディウム００８である。前処理に用いる培地はまた、ヒト血清アルブミン、ヒトトランスフェリン、組換え型ヒトインスリン、および組換え型ヒトＩＬ－２を含んでいてもよく、抗生物質（カナマイシン）、$NaHCO_3$、Ｌ－Ｇｌｕｔａｍｉｎｅ、ｐＨ調整剤を含んでいてもよい。

[0054] 前処理のための時間は、特に限定されない。前処理のために細胞を懸濁した後数分～数時間、例えば５分～４時間、より好ましくは３０分～３時間、懸濁液を静置してもよい。静置は環境温度（例えば１～３０℃、典型的には１５～２５℃で行ってもよく、CO_2インキュベーター中（例えば３６～４２℃、典型的には３７℃）で行ってもよい。

[0055] 前処理の際の細胞密度は適宜とすることができるが、細胞の維持に適した細胞密度とするとよい。具体的には、1×10^5～1×10^7 ｃｅｌｌｓ／ｍＬであり、好ましくは2×10^5～5×10^6 ｃｅｌｌｓ／ｍＬであり、より好ましくは5×10^5～2×10^6 ｃｅｌｌｓ／ｍＬである。

[0056] 特に好ましい態様において、前処理は、ＴＵＤＣＡを４００～１０００μＭ、または４－ＰＢＡを１０～１００μＭ添加したＫＢＭ５０１培地、ＦＫＣＭ１０１またはコスメディウム００８に、細胞密度が5×10^5～2×10

^{6} ｃｅｌｌｓ／ｍＬとなるように懸濁することである。このとき、３７℃、５％ CO_2下で３０分～３時間インキュベートするとよい。

[0057] 本発明において前処理は必須ではないが、高活性ＮＫ細胞等を凍結前に４－ＰＢＡまたはＴＵＤＣＡを添加したＫＢＭ５０１培地で前処理することにより、前処理しなかった場合に比較して、細胞を解凍した際の生存率（回収率ということもできる）が改善され得る。

[0058] ［凍結］

本発明においては、回収され、好ましくは前処理された細胞は、通常の手順によって、凍結される。具体的には、必要に応じ細胞数や生存率を確認し、遠心分離して上清を除去した後、適切な細胞密度になるように凍結保存液に細胞を懸濁する。細胞懸濁液を凍結保存用の容器に分注した後、－８０℃のディープフリーザーで凍結し、保存する。必要に応じ、液体窒素タンクで凍結保存する。

[0059] 本発明において用いることのできる凍結保存液は、ナトリウム塩、カリウム塩、糖類、炭酸水素塩、炭酸塩、および凍害保護剤を含有しうる。

[0060] 使用可能なナトリウム塩は、溶媒に溶解した際にナトリウムイオンを生じるものであれば特に限定はなく、オキソ酸塩、ハロゲン化物、酸化物、水酸化物、無機塩または有機酸塩等であり得る。ナトリウム塩は、１種類または複数種類を組み合わせてもよい。本発明において、１種類としては塩化ナトリウムが、複数種類としては塩化ナトリウムおよびクエン酸ナトリウムが好適に使用される。ナトリウム塩含有量は特に限定されないが、凍結保存液に含まれる全ナトリウムイオンの終濃度として、好ましくは０．０１～５０００ｍＭであり、より好ましくは０．１～１０００ｍＭであり、さらに好ましくは１～３００ｍＭである。

[0061] 使用可能なカリウム塩は、溶媒に溶解した際にカリウムイオンを生じるものであれば特に限定はなく、オキソ酸塩、ハロゲン化物、酸化物、水酸化物、無機塩または有機酸塩等であり得る。カリウム塩は、１種類または複数種類を組み合わせてもよい。本発明において、塩化カリウムが好適に使用され

る。カリウム塩含有量は特に限定されないが、凍結保存液に含まれる全カリウムイオンの終濃度として、好ましくは０．０１～５０００ｍＭであり、より好ましくは０．１～１０００ｍＭであり、さらに好ましくは１～１００ｍＭである。

[0062] 使用可能な炭酸水素塩は、溶媒に溶解した際に炭酸水素イオンを生じるものであれば特に限定はなく、種々の陽イオンとの塩を用いることができる。例えば、炭酸水素アンモニウム、炭酸水素カリウム、炭酸水素カルシウム、炭酸水素ナトリウム、炭酸水素マグネシウム等が挙げられる。使用可能な炭酸塩は、溶媒に溶解した際に炭酸イオンを生じるものであれば特に限定はなく、種々の陽イオンとの塩を用いることができる。例えば、炭酸アンモニウム、炭酸カリウム、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム、炭酸バリウム、炭酸マグネシウム等が挙げられる。これら炭酸水素塩および／または炭酸塩は、１種類または複数種類を組み合わせてもよい。本発明において、炭酸水素ナトリウムが好適に使用される。炭酸水素塩および／または炭酸塩の含有量は特に限定されないが、凍結保存液に含まれる炭酸水素イオンと炭酸イオンの合計の終濃度として、好ましくは０．０１～１０００ｍＭであり、より好ましくは０．１～５００ｍＭであり、さらに好ましくは１～１００ｍＭである。

[0063] 凍結保存液におけるナトリウムイオンとカリウムイオンの濃度比（ナトリウムイオン／カリウムイオン）は、好ましくは１／１０００～１０００／１、より好ましくは１／１００～１００／１、さらに好ましくは１／１０～１００／１、さらに好ましくは１／１～１００／１、さらに好ましくは１０／１～５０／１である。

[0064] 使用可能な糖類は、単糖、オリゴ糖または糖アルコールであり、例えば、単糖としてはグルコース、ガラクトース、フルクトース、マンノース、キシロース、アラビノース、オリゴ糖としてはトレハロース、スクロース、マルトース、ラクトース、セロビオース、糖アルコールとしてはキシリトール、ソルビトール等が挙げられる。これらの糖類は、１種類または複数種類を組

み合わせてもよいが、本発明においては好ましくは、グルコース、ガラクトース、フルクトース、マンノース、キシロース、およびアラビノースからなる群より選択される少なくとも１種類の糖類であり、より好ましくはグルコースである。糖類の含有量は、凍結保存液中、好ましくは０．０１～１００ｇ／Ｌ、より好ましくは０．１～１００ｇ／Ｌ、さらに好ましくは０．２５～５０ｇ／Ｌである。

[0065] 使用可能な凍害保護剤の例として、ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）、ハイドロキシエチルスターチ（ＨＥＳ）、エチレングリコール、グリセロール等が挙げられる。凍害保護剤は、１種類または複数種類を組み合わせてもよい。本発明において、ＤＭＳＯおよびハイドロキシエチルスターチからなる群より選択されるいずれかが好適に使用される。凍害保護剤としてＤＭＳＯおよびハイドロキシエチルスターチを併用する場合、総含有量は前記範囲内に含まれることが好ましく、かつそれぞれの濃度が、ＤＭＳＯ濃度は、好ましくは０．０１～５０％、より好ましくは１～３０％、さらに好ましくは２～１５％であり、ハイドロキシエチルスターチ濃度は、好ましくは０．０１～５０％、より好ましくは１～３０％、さらに好ましくは２～１５％である。

[0066] 本発明の好適な態様においては、上記の本発明の細胞の凍結保存方法に使用される溶液の必須の成分に加えて、タンパク質、マグネシウム塩およびカルシウム塩からなる群より選択される成分をさらに含有させてもよい。使用可能なタンパク質は、具体的には、血清アルブミン、血清グロブリン等が挙げられる。また血清アルブミンとしては、ヒト血清アルブミン、またはウシ血清アルブミンが挙げられる。本発明において、ヒト血清アルブミンが好適である。タンパク質の含有量は、凍結保存液中、好ましくは０．０１～５０％、より好ましくは１～３０％、さらに好ましくは２～１５％である。使用可能なマグネシウム塩は、溶媒に溶解した際にマグネシウムイオンを生じるものであれば特に限定はなく、オキソ酸塩、ハロゲン化物、酸化物、水酸化物、無機塩または有機酸塩等を用いることができる。マグネシウム塩は、１

種類または複数種類を組み合わせてもよい。本発明において、塩化マグネシウムが好適に使用される。マグネシウム塩含有量は特に限定されないが、凍結保存液に含まれる全マグネシウムイオンの終濃度として、好ましくは０．０１～１０ｍＭであり、より好ましくは０．１～５ｍＭである。使用可能なカルシウム塩は、溶媒に溶解した際にカルシウムイオンを生じるものであれば特に限定はなく、オキソ酸塩、ハロゲン化物、酸化物、水酸化物、無機塩または有機酸塩等を用いることができる。カルシウム塩は、１種類または複数種類を組み合わせてもよい。本発明において、塩化カルシウムが好適に使用される。カルシウム塩含有量は特に限定されないが、凍結保存液に含まれる全カルシウムイオンの終濃度として、好ましくは０．０１～１０ｍＭであり、より好ましくは０．１～５ｍＭである。また、凍結保存液には、上記の成分以外に、細胞への傷害性のない物質、例えば、ビタミン類、アミノ酸類等をさらに含有させてもよい。また凍結保存液は、上記の成分以外に、ｐＨ調整や緩衝作用を発揮する観点から、リン酸イオンを含有してもよい。

[0067] 凍結保存液の浸透圧は凍結時に細胞に対して損傷を与えない範囲であることが望ましく、凍結時に細胞への成分の浸透性を高めること、および氷晶形成阻害の観点から、例えば５００～８０００ｍＯｓｍ／Ｌであり、１０００～７５００ｍＯｓｍ／Ｌであってもよく、１５００～７０００ｍＯｓｍ／Ｌであってもよく、１８００～５０００ｍＯｓｍ／Ｌであってもよい。凍結保存液のｐＨは、細胞に対して損傷を与えない範囲であることが望ましく、例えば、３．０～１０．０であり、４．５～９．０であることがより好ましい。

[0068] 本発明においては、市販の凍結保存用液を用いてもよい。使用可能な製品の例として、細胞・組織用凍結保存液セルバンカーシリーズ（ＳＴＥＭ－ＣＥＬＬＢＡＮＫＥＲ（登録商標））、より特定するとＳＴＥＭ－ＣＥＬＬＢＡＮＫＥＲ（ＺＥＮＯＡＱ、ＣＢ０４５）を挙げることができる。

[0069] 凍結の際の細胞は、対数増殖期にあるものであることが好ましい。

[0070] 凍結の際の細胞密度は適宜とすることができるが、具体的には、１ｘ１０^{6}

～２ｘ１０^{8}　ｃｅｌｌｓ／ｍＬであり、好ましくは２ｘ１０^{6}～１ｘ１０^{8} ｃｅｌｌｓ／ｍＬであり、より好ましくは１ｘ１０^{7}～５ｘ１０^{7}　ｃｅｌｌｓ／ｍＬである。好ましい態様の一つにおいては、細胞は、５　ｍＬの容量の容器に、４ｘ１０^{7}ｃｅｌｌｓ／ｍＬで保存される。高活性ＮＫ細胞の凍結出荷に際して高密度凍結が可能であることは、製品をよりコンパクトにし、輸送コストの低減に資する。

[0071] ［解凍・融解・希釈］

本発明においては、凍結保存された細胞は、種々の手順によって解凍できる。例えば、細胞の入った凍結保存用の容器を３７℃の温浴などで、必要に応じ振りながら迅速に解凍できる。あるいは、冷凍庫から取り出した後に積極的な加温をせず、室温に放置して自然解凍できる。解凍時または解凍後の細胞凍結物は適切な液で希釈することができる。

[0072] （希釈のために用いる液）

本発明は、以下を満たす、ヒトに投与するための細胞を懸濁するための液、より特定すると、細胞凍結物を希釈するための液を提供する：

（１）カリウムイオンを含む

（２）ｐＨ６．４以上である

（３）塩化物イオンを、１３５ｍＥｑ／Ｌ以上の濃度で含まない（すなわち、塩化物イオンの濃度が１３５ｍＥｑ／Ｌ未満であるか、または塩化物イオンを含まない）

（４）グルコースを５．５５ｍＭ以上の濃度で含まない（すなわち、グルコースの濃度が５．５５Ｍ未満であるか、またはグルコースを含まない）

（５）カルシウムイオンを０．４２３ｍＭ以上の濃度で含まない（すなわち、カルシウムイオンの濃度が０．４２３ｍＭ以下であるか、またはカルシウムを含まない）

（６）浸透圧が２００～３９６ｍＯｓｍである。

[0073] なお、本発明に関し、液がある成分を含まないというときは、特に記載した場合を除き、通常の測定方法では検出されない場合をいう。

[0074] 希釈液のカリウムイオンの濃度は、好ましくは０．５０～８．０ｍＭであり、より好ましくは１．０～７．０ｍＭであり、さらに好ましくは２．５～６．０ｍＭである。あるいは、塩化カリウムとして、０．４９６～５．９６ｍＭ含むことが好ましい。

[0075] 好ましい態様の一つにおいては、希釈液のカリウムイオンの濃度は４．００ｍＥｑ／Ｌ以上である。上限値は特に限定されないが、例えば１８．０ｍＥｑ／Ｌ以下であり、好ましくは１５．０ｍＥｑ／Ｌ以下であり、より好ましくは１０．０ｍＥｑ／Ｌ以下であり、さらに好ましくは７．５０ｍＥｑ／Ｌ以下である。

[0076] 別の好ましい態様の一つにおいては、他の成分の有無、濃度に関わらず、希釈液はカルシウムイオンを含まない。また、別の好ましい態様の一つにおいては、他の成分の有無、濃度に関わらず、希釈液はグルコースを含まない。さらに別の好ましい態様の一つにおいては、希釈液のｐＨは７．０～８．３であり、好ましくは７．２～８．１であり、さらに好ましくは７．３～７．９である。

[0077] 希釈液に含まれるイオンは、医薬として使用可能な塩に由来するものであってもよい。そのような塩は、炭酸塩、炭酸水素塩、オキソ酸塩、ハロゲン化物、酸化物、水酸化物、無機塩または有機酸塩等であり得る。塩は、１種類または複数種類を組み合わせてもよい。

[0078] 希釈液は、ナトリウム塩、グルコン酸塩、および酢酸塩を含有しうる。さらにマグネシウム塩を含んでいてもよい。希釈液のナトリウムイオンの濃度は、好ましくは１４．０～２００ｍＭであり、より好ましくは２８．０～１８２ｍＭであり、さらに好ましくは７０．０～１６８ｍＭである。あるいは、塩化ナトリウムとして、９．００ ～１０８ｍＭ、グルコン酸ナトリウムとして２．３０～２７．７ｍＭ、酢酸ナトリウムとして、２．７０～３２．５ｍＭ含むことが好ましい。希釈液のグルコン酸イオンの濃度は、好ましくは２．３～３２．３ｍＭであり、より好ましくは４．６～２９．９ｍＭであり、さらに好ましくは１２．５～２７．７ｍＭである。希釈液の酢酸イオンの

濃度は、好ましくは２．７～３７．８ｍＭであり、より好ましくは５．４～３５．１ｍＭであり、さらに好ましくは１３．５～３２．５ｍＭである。

[0079] 希釈液は、承認された医薬品を用いて構成することができる。このような医薬品の例を下記に示す。

[0080] 総称名：アミゼット

販売名 ： アミゼットB輸液

薬効分類名：総合アミノ酸製剤

組成（１袋２００ｍＬ中）

有効成分 Ｌ－イソロイシン １，７００ｍｇ、Ｌ－ロイシン ２，７００ｍｇ、リンゴ酸リジン、（Ｌ－リシンとして） ２，４３２ｍｇ、（１，６００ｍｇ）、Ｌ－メチオニン ７８０ｍｇ、Ｌ－フェニルアラニン １，５４０ｍｇ、Ｌ－トレオニン ９６０ｍｇ、Ｌ－トリプトファン ３２０ｍｇ、Ｌ－バリン １，８００ｍｇ、リンゴ酸システイン、（Ｌ－システインとして） ３１０ｍｇ、（２００ｍｇ）、Ｌ－チロシン １００ｍｇ、Ｌ－アルギニン ２，２２０ｍｇ、Ｌ－ヒスチジン ９４０ｍｇ、Ｌ－アラニン １，７２０ｍｇ、Ｌ－アスパラギン酸 １００ｍｇ、Ｌ－グルタミン酸 １００ｍｇ、グリシン １，１００ｍｇ、Ｌ－プロリン １，２８０ｍｇ、Ｌ－セリン ８４０ｍｇ

添加物 コハク酸（ｐＨ調節剤） 適量

電解質 Na^+，Cl^-は含有しない

[0081] 総称名：メイロン

販売名：メイロン静注8.4%

一般名 炭酸水素ナトリウム

組成（20mL中）

炭酸水素ナトリウム １．６８ｇ（８．４％）

電解質濃度 Na^+ １０００ｍＥｑ／Ｌ、HCO_3^- １０００ｍＥｑ／Ｌ

[0082] 総称名：Ｋ．Ｃ．Ｌ．

販売名：Ｋ．Ｃ．Ｌ．点滴液１５％

一般名　塩化カリウム

製剤名　塩化カリウム製剤

組成

成分　塩化カリウム　３ｇ（１５ｗ／ｖ％、２モル液）〔カリウム（Ｋ）量：４０ｍＥｑ（１５７３．３６ｍｇ）〕

添加物　リボフラビンリン酸エステルナトリウム　６ｍｇ含有

[0083] 総称名：献血アルブミン

販売名：献血アルブミン２５％静注１２．５ｇ／５０ｍＬ

薬効分類名：血漿分画製剤（人血清アルブミン製剤）

組成（５０ｍＬ中）

有効成分　人血清アルブミン　１２．５ｇ

添加物　アセチルトリプトファン２５０．９７ｍｇ、水酸化ナトリウム４３．４４ｍｇ、カプリル酸ナトリウム１６９．７５ｍｇ

ｐＨ　６．４～７．４、浸透圧比（生理食塩液に対する比）０．５～１．０

[0084] （好ましい態様）

希釈液の特に好ましい態様の一つは、下記である：

献血アルブミン 25% 20.0 mL

生理食塩水　111.12 mL

アミゼット　19.08 mL

蒸留水　　56.68 mL

メイロン　　1.6 mL

K.C.L.　　0.4 mL

pH=7.2

[0085] 別の好ましい組成は下記である。

献血アルブミン 25% 11.112 mL

生理食塩水　111.12 mL

アミゼット　19.08 mL

Water 56.68 mL

メイロン 1.6 mL

K.C.L. 0.4 mL

pH=7.2

[0086] 別の好ましい組成は下記である。

献血アルブミン 25% 20.0 mL

生理食塩水 111.12 mL

アミゼット 19.08 mL

Water 56.68 mL

メイロン 1.6 mL

K.C.L. 0.4 mL

pH=7.2

[0087] 凍結保存のための液とともに希釈のための液に懸濁された細胞は、そのまま投与に用いることができる。投与に用いるとの観点からは、凍結保存のための液と希釈のための液とを混合した後の、混合液が等張となる（体液とほぼ等しい浸透圧をもつ、具体的には２８５±１３ｍＯｓｍ／Ｌである）ことが好ましい。凍結保存のための液は、好ましい態様においては高張液（例えば、１５００～７０００ｍＯｓｍ／Ｌ）であるため、希釈のための液は浸透圧の低い液であってもよい。当業者であれば、凍結保存のための液の希釈のための液による希釈倍率を考慮し、希釈のための液の成分濃度を適宜決定できる。

[0088] いずれの組成であっても、希釈のための液は、４０％以上の濃度では血清を含まないことが好ましく、血清を一切含まないことがより好ましい。血清を含むと、細胞の生存率が低下する場合があるからである。

[0089] 希釈のための液に懸濁する際の細胞密度は適宜とすることができるが、細胞の維持に適した細胞密度とするとするか、または投与に適した細胞密度とするとよい。具体的には、１ｘ１０^{5}～１ｘ１０^{7}ｃｅｌｌｓ／ｍＬであり、好ましくは２ｘ１０^{5}～５ｘ１０^{6} ｃｅｌｌｓ／ｍＬであり、より好ましくは

５ｘ１０^{5}～２ｘ１０^{6}ｃｅｌｌｓ／ｍＬである。

[0090] 希釈のための液中で、細胞は比較的長時間維持できる。希釈のための液に細胞を懸濁した後数分～数時間、例えば５分～６時間、より好ましくは３０分～４時間、懸濁液を静置してもよい。静置は環境温度（例えば１～３０℃、典型的には１５～２５℃で行ってもよく、CO_2インキュベーター中（例えば３６～４２℃、典型的には３７℃）で行ってもよい。

[0091] ［医薬組成物への利用］

本発明は、適切な方法で回収され、必要に応じ前処理され、凍結保存された高活性ＮＫ細胞等を含む、医薬組成物を提供する。

[0092] 本発明により提供される医薬組成物は、高活性ＮＫ細胞等に感受性を有するさまざまな疾患の治療および／または予防に適用することができる。このような疾患の例は、がん、または感染症であり、具体的には、皮膚がん、口腔がん、胆嚢がん、胆管がん、肺がん、肝臓がん、胃がん、大腸がん、膵臓がん、腎臓がん、卵巣がん、膀胱がん、前立腺がん、神経芽腫、白血病や、ウイルス、細菌等による感染症を含むが、これらに限定されない。なお、本発明者らは、本願の方法で凍結・解凍された細胞を用いて、無治療では30日以内に死滅する大腸がんモデル動物に対する効果を確認している。

[0093] 本発明の医薬組成物による細胞療法は、単独か、あるいは外科療法、化学療法、放射線療法、抗体医薬品等と組み合わせて実施される場合がある。

[0094] 本発明により提供される医薬組成物の一態様の特長を下記に示す。

[0095] （剤形）

注射剤（細胞懸濁液）

[0096] （成分・含量）

構成細胞：高活性ＮＫ細胞等

含量：６×１０^{6}個～４．８×１０^{9}ｃｅｌｌｓ／６０ｋｇ

[0097] （副成分）

複合電解質液　１０～４５％

塩化ナトリウム液　１０～４５％

２０～３０％ヒト血清アルブミン液　５～３０％

ジメチルスルホキシド　２～１５％

その他

あるいは、

医薬添加物としてとして許容できる凍結保存液　１００％

[0098]（調製法）

凍結した組成物が完全に解凍するまで、37℃の恒温水槽等で解凍する。解凍後速やかに無菌的に、別途準備した医薬添加物として許容できる等張液に懸濁する。

[0099]（解凍後の安定性）

解凍後の有効期間は、室温で保存するとき、６時間、好ましくは４時間である。

実施例

[0100] 1．実施例間で共通の方法

A)．高活性NK細胞GAIA-102の培養方法

凍結アフェレーシス血液（HemaCare/Cellero）を原材料として、解凍後Lovo Cell Processing System（FRESENIUS KABI）を使用して洗浄と濃縮を行い、PBMCsを得た。

[0101] CliniMACS Prodigy(登録商標)（Miltenyi Biotec）を使用し、得られたPBMCsからCD3陽性細胞およびCD34 陽性細胞を除去し、KBM501培地※1にて溶出した。溶出液中の細胞数をカウントし、総細胞数を算出した。培養は、接着培養用バッグ 640 cm^2を使用し、5x10^5cells/mLとなるようKBM501培地にて調製した細胞懸濁液を、1バッグあたり 200 mL播種、CO_2インキュベーター（37℃，5 % CO_2）にて行なった。培養9日目に最終液量が、1バッグあたり650mLになるようにKBM501培地を追加し、14日目までインキュベートした。

[0102] ※1: 5% UltraGRO（AventaCell、HPCPLCRL10）および2U/mL ヘパリンナトリウム（ニプロ）を添加したKBM 501（コージンバイオ）

[0103] B)．高活性NK細胞GAIA-102の回収方法

培養14日目に培養液を回収、さらに培養バッグに1mM EDTAを加え接着した細胞を剥離し、剥離細胞を含むすべての細胞回収液を遠心後、KBM501培地で洗浄、再懸濁した。

C). 高活性NK細胞GAIA-102の凍結方法

高活性NK細胞の培養方法、回収方法に記載した手順にて得られたGAIA-102の生細胞数をカウントし、2x10^8cellsを5mLのHSC-BANKER（ZENOAQ、CB071)で懸濁し、-80℃で凍結した。

[0104] D). 7-AAD染色によるViability測定方法

各条件下で解凍したGAIA-102を96ウェルプレート（IWAKI, 4870-800SP）に1x10^5cells/wellにて調製して遠心分離し、上清を除去後、PBSで希釈した7-AAD溶液（Beckman Coulter, A07704）を添加、懸濁し、室温で20分間インキュベートした。染色後の細胞をフローサイトメーター（BD LSR Fortessa、BDバイオサイエンス社）を用いて測定を行い、FlowJoソフトウェアで解析し、7-AAD陽性率からViabilityを算出した。

[0105] E). 腫瘍細胞に対する傷害活性測定方法

細胞傷害活性の測定には、解凍したGAIA-102とK562細胞を反応させた群、陰性コントロールとしてK562細胞のみの群、陽性コントロールとしてK562細胞を10%ホルマリンで処理した群を用意した。

[0106] 《GAIA-102》

各条件下で解凍、希釈したGAIA-102を凍結時の生細胞数をもとに必要量分取した後、10%FBS/RPMI1640にて1x10^6 cells/ mlの濃度に調製した。

[0107] 《K562》

K562細胞を無血清RPMI1640培地にて懸濁し、PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kitを用いて染色したのち、10%FBS/RPMI1640にて2x10^6 cells/mLとなるように調製した。

[0108] GAIA-102とK562細胞は、細胞比で2:1となるように96ウェルプレート（IWAKI, 4870-800SP）に添加、混合し、37℃、5% CO_2下で2時間反応させた。反応後、遠心分離（500 x g, 5分間）し、上清を除去後、PBSで希釈した7-AAD溶液

を添加、懸濁し、室温で20分間インキュベートした。フローサイトメーターを用いて測定を行い、FlowJoソフトウェアで解析し、細胞傷害活性率（%Lysis）※2を算出した。

[0109] ※2: 細胞傷害活性率=（K562細胞死細胞率-陰性コントロール死細胞率）/（陽性コントロール死細胞率-陰性コントロール死細胞率）×100

[0110] 使用した試薬、点滴剤について

解凍の溶媒検証において、試薬・点滴剤は下記のものを用いた。

[0111] 塩化ナトリウム（ナカライテスク）

塩化カリウム（ナカライテスク）

塩化マグネシウム六水和物（ナカライテスク）

酢酸ナトリウム三水和物（ナカライテスク）

グルコン酸ナトリウム（ナカライテスク）

TUDCA(東京化成工業株式会社)

Water（ナカライテスク）

Plasma-Lyte A (Baxter)

生理食塩液　大塚生食注（大塚製薬株式会社）

D-PBS（ナカライテスク）

ソルマルト輸液（テルモ株式会社）

サム点滴静注セット（大塚製薬株式会社）

メイロン静注8.4%（大塚製薬株式会社）

クリニザルツ輸液（共和クリティケア株式会社）

イムネース注35（共和薬品株式会社）

献血アルブミン25%静注（日本製薬株式会社）

K.C.L.点滴液15%（丸石製薬株式会社）

アミゼットB輸液（テルモ株式会社）

[0112] 2. 実施例別の方法

2-1) Plasma-Lyte A成分検証

48時間以上凍結させたGAIA-102を37℃、ウォーターバスにて解凍したのち

、室温にて3.5時間まで静置した。解凍から30分および3時間後に7-AAD染色によるViability測定、傷害活性測定を行った。

[0113] 解凍後は、下表に示す溶液1～6にて41倍希釈した。Plasma-Lyte A構成成分の濃度を基にグルコン酸ナトリウム不含の群（1）、グルコン酸ナトリウム不含かつその他各成分を16%増量し、浸透圧を調整した群（2）、グルコン酸ナトリウム不含かつNaClにて浸透圧を調整した群（3）、陽性コントロールとしてPlasma-Lyte A（4）、生理食塩液（5）、生理食塩液にPlasma-Lyte Aと同濃度のグルコン酸ナトリウムを添加した群（6）を設定した。なお浸透圧は、特に記載した場合を除き、すべて計算により求めた。

[0114] [表1]

＊括弧内は製剤中の含有量

	1	2	3	4	5	6
	グルコン酸Na不含 Plasma-Lyte A 同成分液			Plasma-Lyte A	生食	生食＋グルコン酸Na
	–	浸透圧調整 16%	浸透圧調整 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)	–	–
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	0.150 g	0.174 g	0.150 g	(0.150 g)	–	–
$CH_3COONa \cdot 3H_2O$	1.840 g	2.134 g	1.840 g	(1.840 g)	–	–
グルコン酸Na	–	–	–	(2.9 g)	–	2.9 g
水 (ml)	up to 500	up to 500	up to 500	–	–	80.65
Plasma-Lyte A (ml)	–	–	–	500	–	–
生理食塩液 (ml)	–	–	–	–	500	up to 500

[0115] 結果：

いずれの群においても解凍後のviabilityの低下は確認されなかった一方で、生理食塩液（5）、生理食塩液にPlasma-Lyte Aと同濃度のグルコン酸ナトリウムを添加した群（6）においては著しい活性低下が認められた（図１）。この現象は解凍希釈後3時間目で観察され、解凍直後には観察されなかった。解凍希釈後の活性はNaClおよびグルコン酸Naのみで保持することは不可能であることが明らかになった。

[0116] 2-2）Plasma-Lyte A必須成分の特定

グルコン酸Na以外の成分について検証を行った。48時間以上凍結させたGAIA-102を37℃、ウォーターバスにて解凍したのち、室温にて3.5時間まで静置した。解凍から30分および3.5時間後に7-AAD染色によるViability測定、傷害活性測定を行った。

[0117] 解凍後は、下表に示す溶液にて41倍希釈した。いずれもグルコン酸ナトリウムを不含とし、Plasma-Lyte A構成成分の濃度を基に、Plasma-Lyte AからMg^{2+}、K^{+}、CH_3COO^{-}（酢酸）を1成分ずつ除外した群（1）～（3）、生理食塩液に1成分ずつ追加した群（4）～（6）として設定した。

[0118] [表2]

	1	2	3	4	5	6	7
	Mg^{2+} 抜き	K^{+} 抜き	$Acetate^{-}$ 抜き	生食 + Mg^{2+}	生食 + K^{+}	生食 + $Acetate^{-}$	Plasma-Lyte A
NaCl	2.630 g	2.630 g	2.630 g	–	–	–	–
KCl	0.185 g	–	0.185 g	–	0.185 g	–	–
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	–	0.150 g	0.150 g	0.150 g	–	–	–
$CH_3COONa \cdot 3H_2O$	1.840 g	1.840 g	–	–	–	1.840 g	–
水 (ml)	up to 500	up to 500	up to 500	–	–	–	–
Plasma-Lyte A (ml)	–	–	–	–	–	–	500
生理食塩液 (ml)	–	–	–	up to 500	up to 500	up to 500	–

[0119] 結果：

Viabilityにおいては、K^{+}を除いた群（2）でのみ、解凍希釈後3時間目で僅かな低下を認めた。一方活性については、K^{+}およびCH_3COONaを除いた群（2），（3）において低下が見られ、Mg^{+}を除去した群（1）では低下は見られなかった。また生理食塩液に1成分ずつ追加した群（4）～（6）での実験から、K^{+}のみ単独での活性への寄与が認められた（図２）。

[0120] 2-3) K^{+}とC_3HCOO^{-}の至適濃度範囲の探索

48時間以上凍結させたGAIA-102を37℃、ウォーターバスにて解凍したのち、室温にて3.5時間まで静置した。解凍から30分および3時間後に7-AAD染色によるViability測定、傷害活性測定を行った。

[0121] 解凍後は、下表に示す溶液にて41倍希釈した。陽性コントロールとしてPla

sma-Lyte A（1）、陰性コントロールとして生理食塩液（2）、Plasma-Lyte A構成成分の濃度を基に、グルコン酸ナトリウムおよび塩化マグネシウム不含とし、生理食塩液に対する浸透圧比が0.80、0.95、1.0、1.10となるよう調製した（3～6）。また、NaClのみで浸透圧比 1.0となるよう調整した群（7）を設定した。

[0122] [表3]

	1	2	3	4	5	6	7
	Plasma-Lyte A	生食	グルコン酸Na, $MgCl_2$不含 Plasma-Lyte A 同成分液				
	浸透圧比 0.95	浸透圧比 1.00	浸透圧比 0.80	浸透圧比 0.95	浸透圧比 1.00	浸透圧比 1.10	浸透圧比 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
$CH_3COONa・3H_2O$	–	–	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	–	–	–	–	–	–
生理食塩水	–	500 mL	–	–	–	–	–

[0123] 結果：

各濃度におけるviabilityは解凍希釈後3.5時間までにおいて低下は観察されなかった。活性についても（3）～（6）では影響は認められなかったが、NaClのみで浸透圧比 1.0となるよう調整した群（7）では低下傾向が確認された（図３）。

[0124] 2-4) CH_3COONa/KCl～既製品での代替え可能性の検証１

48時間以上凍結させたGAIA-102を37℃、ウォーターバスにて解凍したのち、室温にて3時間まで静置した。解凍から3時間後に傷害活性測定を行った。

[0125] 解凍後は、下表に示す溶液にて41倍希釈した。陽性コントロールとしてPasma-Lyte A（1）、陰性コントロールとして生理食塩液（2）を設定し、K^+濃度が5mEq/Lとなるようにリン酸緩衝液にK^+を補充する群（3）、サム点滴静注（4）、生食/メイロン/KClの配合液（6）、水/メイロン/KCl/NaClの配合液（7）を調製した。また、K^+濃度が2.5mEq/Lとなるようにサム/メイロンの配合液（5）、水/ CH_3COONa /KCl/NaClの配合液（8）を調製した。

[0126] [表4]

	1	2	3	4	5	6	7	8
	Plasma-Lyte A	生食	PBS KCl	サム	サム 生食	生食 メイロン KCl	水 メイロン KCl NaCl	水 酢酸 Na KCl NaCl
Plasma-Lyte A	500 mL	--	--	--	--	--	--	--
生理食塩液	--	500 mL	--	--	--	500 mL	--	--
PBS	--	--	500 mL	--	--	--	--	--
サム	--	--	--	500 mL	250 mL	--	--	--
メイロン	--	--	--	--	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
$CH_3COONa \cdot 3H_2O$	--	--	--	--	--	--	--	1.840 g

[0127] 結果：

K^+濃度が5mEq/Lとなるようにリン酸緩衝液にK^+を補充する群（3）では生理食塩液（2）に比して活性の向上は認められたものの、活性の維持は十分に達成することはできなかった。また、K^+濃度が2.5mEq/Lとなるように調製したサム/メイロンの配合液（5）、水/CH_3COONa /KCl/NaClの配合液（8）についても活性の維持は十分ではなかった（図４）。

[0128] 2-5) CH_3COONa/KCl～既製品での代替え可能性の検証２

48時間以上凍結させたGAIA-102を37℃、ウォーターバスにて解凍したのち、室温にて3時間まで静置した。解凍から3時間後に傷害活性測定を行った。

[0129] 解凍後は、下表に示す溶液にて41倍希釈した。陽性コントロールとしてPlasma-Lyte A（1）、陰性コントロールとして生理食塩液（2）を設定し、ソルマルト（7）、そしてソルマルトを基にpHを調整した群としてソルマルト/メイロン配合液（3）、ソルマルト/サム配合液（4）を調製した。また、Plasma-Lyte Aからグルコン酸ナトリウム/Mg^{2+}をいずれも除きその他成分がPlasma-Lyte Aと同濃度からなる配合液（5）、Plasma-Lyte Aからグルコン酸ナトリウム/Mg^{2+}をいずれも除きNaClのみを減量して浸透圧が（5）と同一となる配合液（6）を調製した。また、サムを用いたソルマルトのpH調整後に水を加えて浸透圧を低下させた群（8）を追加した。調製後の各溶媒のpHも測定した。

[0130] [表5]

	1	2	3	4	5	6	7	8
	Plasma-Lyte A	生食	ソルマルト メイロン	ソルマルト サム	水 酢酸 Na KCl NaCl	水 酢酸 Na KCl NaCl	ソルマルト	ソルマルト サム 水
Plasma-Lyte A	500 mL	–	–	–	–	–	–	–
生理食塩液	–	500 mL	–	–	–	–	–	–
ソルマルト	–	–	500 mL	500 mL	–	–	500 mL	500 mL
サム	–	–	–	50 mL	–	–	–	50 mL
メイロン	–	–	25 mL	–	–	–	–	–
水	–	–	–	–	500 mL	500 mL	–	126.5 mL
KCl	–	–	–	–	0.180 g	0.230 g	–	–
NaCl	–	–	–	–	2.630 g	2.400 g	–	–
$CH_3COONa \cdot 3H_2O$	–	–	–	–	1.840 g	2.300 g	–	–

[0131] 結果：

ソルマルト（7）では活性の維持はできなかったが、ソルマルトを基にpHを調整したソルマルト/メイロン配合液（3）、ソルマルト/サム配合液（4）については活性が改善する傾向が確認された。この傾向は再現性を持って確認され、サムを用いたソルマルトのpH調整後に水を加えて浸透圧を低下させた群（8）についても同様の結果を得ることができた。また本結果から、pHは6.0まで下がると活性の維持は困難となり、8.8までは許容可能であることが実験的に確かめられた（図５）。

[0132] 2-6）活性の維持とviabilityの関係

2-5）に記載した溶液にて希釈した群について、解凍後1時間および3時間後に7-AAD染色によるViability測定、傷害活性測定を行い、傷害活性測定のための反応後のGAIA-102のviabilityについても解析した。

[0133] 結果：

解凍希釈直後には観察されなかったviabilityの低下が、RPMIに置換された後に観察されることが明らかになった。RPMIに置換後は時間経過と共にviabilityの低下が観察され、その低下幅は活性との相関が極めて高いことが明らかになった（図６）。

[0134] 2-7）活性の維持と浸透圧/pHの関係

48時間以上凍結させたGAIA-102を37℃、ウォーターバスにて解凍したのち、室温にて3時間まで静置した。解凍から3時間後に傷害活性測定を行った。解凍後は、下表に示す溶液にて41倍希釈した。陽性コントロールとしてPasma-Lyte A（1）、陰性コントロールとして生理食塩液（2）を設定し、ソルマルトを基にメイロンにてpHを調整した群としてソルマルト:メイロン=20:1配合液（3）、ソルマルト:メイロン=10:1配合液（4）、ソルマルト/メイロン/水の配合液（5）、クリニザルツ（6）、クリニザルツを基にメイロンにてpHを調製した群としてクリニザルツ/メイロンの配合液（7）を調製した。また、Plasma-Lyte A+14万IU/mLイムネース（8）、Plasma-Lyte A+875μM Taurourso deoxycholic Acid (TUDCA)の混合液（9）を調製した。調製後の各溶媒のpHも測定した。

[0135] [表6]

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	Plasma-Lyte A	生食	ソルマルト メイロン (20:1)	ソルマルト メイロン (10:1)	ソルマルト メイロン 水	クリニザルツ	クリニザルツ メイロン	Plasma-Lyte A イムネース	Plasma-Lyte A イムネース TUDCA
Plasma-Lyte A	500 mL	–	–	–	–	–	–	500 mL	500 mL
生理食塩液	–	500 mL	–	–	–	–	–	–	–
ソルマルト	–	–	500 mL	500 mL	375 mL	–	–	–	–
メイロン	–	–	25 mL	50 mL	37.5 mL	–	20 mL	–	–
水	–	–	–	–	125 mL	–	–	–	–
クリニザルツ	–	–	–	–	–	500 mL	500 mL	–	–
イムネース	–	–	–	–	–	–	–	5 mL	–
100mM TUDCA	–	–	–	–	–	–	–	–	4.375 mL

[0136] 記載した溶液にて解凍した群について、解凍後1時間および3時間後に7-AAD染色によるViability測定、傷害活性測定を行い、傷害活性測定のための反応後のGAIA-102のviabilityについても解析した。

[0137] 結果：

ソルマルトを基にメイロンにてpHを調整した群としてソルマルト:メイロン=20:1配合液（3）において活性の維持が可能になることが明らかになった。なおPlasma-Lyte A+14万IU/mLイムネース（8）はPasma-Lyte A（1）と活性維

持能は同等であり、イムネースの添加は少なくともK562を対象とする活性には寄与しないことが分かった。pHの低いクリニザルツ（6）、pH調製はしたものの浸透圧の高いクリニザルツ/メイロンの配合液（7）は活性を維持できなかった（図７－１）。RPMIへの置換後のviability低下と活性との間の高い相関は再現性良く確認された（図７－２）。

[0138] 2-8）解凍後3時間での活性に影響を与える因子の絞り込み１

48時間以上凍結させたGAIA-102を37℃、ウォーターバスにて解凍したのち、室温にて3時間まで静置した。解凍から3時間後に傷害活性測定を行った。解凍後は、下表に示す溶液にて41倍希釈した。pHが7.6~8.0となるようメイロンにて調整し、K^+濃度が5mEq/Lとなるようにアルブミン/K.C.L./メイロンの配合液（1）、アルブミン/K.C.L./生食/メイロンの配合液（2）、さらにCl^-濃度が80mMq/Lとなるように調整した群としてアルブミン/K.C.L./生食/アミゼット/水/メイロンの配合液（3）、K.C.L./生食/アミゼット/水/メイロンの配合液（4）、陽性コントロールとしてPasma-Lyte A（6）を調製した。調製後の各溶媒のpHも測定した。

[0139] [表7]

	1	2	3	4	6
	アルブミン K.C.L. メイロン	アルブミン K.C.L. 生食 メイロン	アルブミン K.C.L. 生食 アミゼット 水 メイロン	K.C.L. 生食 アミゼット 水 メイロン	Plasma-Lyte A
アルブミン	500 mL	250 mL	23.4 mL	–	–
K.C.L.	1.25 mL	1.25 mL	1.25 mL	1.25 mL	–
生理食塩液	–	250 mL	234 mL	244 mL	–
アミゼット	–	–	80 mL	80 mL	–
水	–	–	162.6 mL	176 mL	–
メイロン	37.6 mL	25 mL	16.7 mL	16.7 mL	–
Plasma-Lyte A	–	–	–	–	500 mL
pH	7.7	7.7	7.7	7.8	7.2
浸透圧	404.7mOsm	371.4mOsm	348.4mOsm	348.4mOsm	

[0140] 結果：

（2）と（4）は良好な活性維持能を示し、（3）は顕著な好成績を示した（図８）。

[0141] 2-9）解凍後3時間での活性に影響を与える因子の絞り込み２

48時間以上凍結させたGAIA-102を37℃、ウォーターバスにて解凍したのち、室温にて4時間まで静置した。解凍から3時間後に傷害活性測定、4時間後に7-AAD染色によるViability測定を行った。解凍後は、下表に示す溶液にて41倍希釈した。すべて浸透圧が300mOsmとなるよう設定し、アルブミン（献血アルブミン25%静注:ベネシス，日本血液製剤機構）/K.C.L./生食/アミゼット/水/メイロンの配合液（1）、K.C.L./生食/アミゼット/水/メイロンの配合液（2）、アルブミン/K.C.L./生食/アミゼット/水/メイロンの配合液（3）、陽性コントロールとしてPasma-Lyte A（5）を調製した。調製後の各溶媒のpHも測定した。

[0142] [表8]

	1	2	3	5
	アルブミン K.C.L. 生食 アミゼット 水 メイロン	K.C.L. 生食 アミゼット 水 メイロン	アルブミン K.C.L. 生食 アミゼット 水 メイロン	Plasma-Lyte A
アルブミン	29.66 mL	–	220 mL	–
K.C.L.	1.25 mL	1.25 mL	1.25 mL	–
生理食塩液	296.60 mL	308.44 mL	220 mL	–
アミゼット	40.98 mL	54.87 mL	3.82 mL	–
水	128.76 mL	132.71 mL	52.18 mL	–
メイロン	4 mL	2.74 mL	4 mL	–
Plasma-Lyte A	–	–	–	500 mL
pH	7.3	7.3	7.3	7.2
浸透圧	300mOsm	300mOsm	300mOsm	300mOsm

[0143] 結果：

（2）は良好な活性維持能を示し、（1）と（3）は顕著な好成績を示した。

[0144] 2-10）統計解析

本発明者らがこれまでに行った実験データを集計し、JMP（登録商標）Pro

15（SAS Institute Inc.）を用いて統計解析を行った。統計解析の結果から、活性維持にはCl^-濃度およびpHの影響が大きく、またK^+には閾値が存在する可能性が示唆された（図１０）。

[0145] 2-11）静脈内投与に適した他の調整液の利用１

Plasma-Lyte Aおよび下表の調整液で解凍後GAIA-102を41倍希釈し、室温3時間静置後にK562に対する傷害活性、および7-AAD染色によるViabilityを測定した。

調整液はPlasma-Lyte Aを上回る成績を示した（図１１）。

[0146] [表9]

▒ 調製液 200mL

pH=7.2			
献血アルブミン 25%	:11.112 mL	浸透圧	: 288mOsm (計算値)
生理食塩水	:111.12 mL	K^+	: 4 mEq/L
アミゼット	:19.08 mL	Na^+	: >99 mEq/L
Water	:56.68 mL	Cl^-	: 93 mEq/L
メイロン	:1.6 mL	pH	: 7.3
K.C.L.	:0.4 mL		

[0147] 2-12）静脈内投与に適した他の調整液の利用２

また、Plasma-Lyte Aおよびアルブミンを用時に添加することを想定した下表の調整液で解凍後GAIA-102 を45倍希釈し、室温3時間静置後にK562に対する傷害活性、および7-AAD染色によるViabilityを測定した。調整液はPlasma-Lyte Aを上回る成績を示した（図１２）。

[0148] [表10]

▒ 調製液 33mL

pH=7.3	
献血アルブミン 25%	:3.00 mL
生理食塩水	:17.65 mL
アミゼット	:3.03 mL
Water	:9.00 mL
メイロン	:0.25 mL
K.C.L.	:0.06 mL

[0149] 3）グルコースの影響の確認

凍結させたGAIA-102を、ウォーターバスにて37℃、2分40秒で解凍したのち

、各希釈液で10倍に希釈した。

[0150] [表11]

希釈液：
• Plasma-Lyte A (PL-A)
• PL-A + Glucose (1g/L)
• PL-A + Glucose (2g/L)
• PL-A + Glucose (4g/L)
• PL-A + Glucose (8g/L)
• PL-A + Glucose (16g/L)
• PL-A + Glucose (26g/L)
• PL-A + Glucose (38g/L)
• PL-A + Glucose (50g/L)

[0151] 室温で3時間静置後、K562に対する傷害活性を評価した。上記「E). 腫瘍細胞に対する傷害活性測定方法」に記載の方法にしたがって、ただしGAIA-102(E)とK562細胞(T)は、ET比で0.5:1、1:1、または2:1で混合し、傷害活性を測定した。ET比4点（0を含む）で算出した細胞傷害活性率からJMP(登録商標)Pro統計解析ソフトを使用した非線形回帰分析によりE:T=1:1の計算値を算出した。

[0152] 結果：

グルコース濃度が26g/L以下の希釈液、特に16g/L以下では、高い傷害活性が維持された（図１３）。

請求の範囲

[請求項1] 以下を満たす、ヒトに投与するための細胞を懸濁するための液。

（１）カリウムイオンを含む

（２）ｐＨ６．４以上である

（３）塩化物イオンを、１３５ｍＥｑ／Ｌ以上の濃度で含まない

（４）カルシウムイオンを０．４２３ｍＭ以上の濃度で含まない

（５）浸透圧が２００～３９６ｍＯｓｍである

[請求項2] ヒトに投与するための細胞を含む凍結物またはその解凍物を希釈するためのものである、請求項１に記載の液。

[請求項3] カリウムイオンを４．００ｍＥｑ／Ｌ以上の濃度で含み、

カルシウムイオンを含まず、

ｐＨが７．０～８．３である、請求項１に記載の液。

[請求項4] 請求項１～３のいずれか１項に記載の液に懸濁されたヒトに投与するための細胞の集団を含み、ヒトに投与するための細胞が高活性ＮＫ細胞である、医薬組成物。

[請求項5] 高活性ＮＫ細胞の集団が、凍結工程を経たものである、請求項４に記載の医薬組成物。

[請求項6] 凍結前の高活性ＮＫ細胞の集団が、アルブミン、トランスフェリン、インスリン、およびＩＬ－２を含む培地を用いて回収されたものである、請求項５に記載の医薬組成物。

[請求項7] 以下を含む、ヒトに投与するための細胞を含む輸注用医薬組成物の提供方法。

（１）該細胞を、動物細胞培養用培地で洗浄する工程；

（２）所望により洗浄した該細胞を、凍結保存液に懸濁する工程；

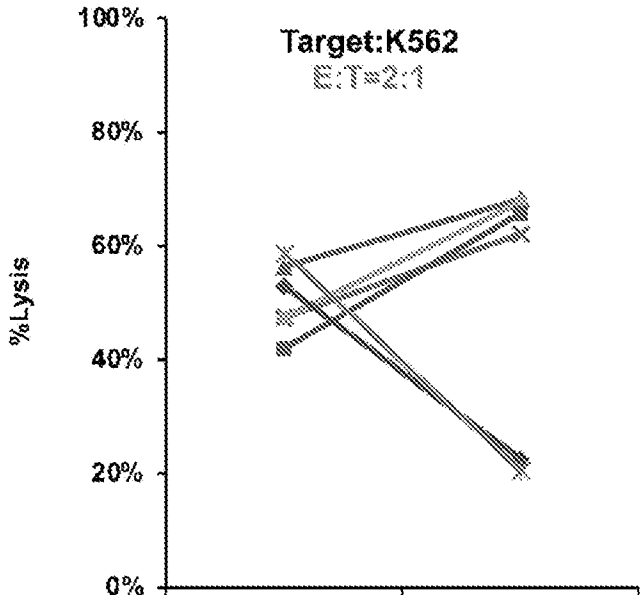
（３）凍結保存液に懸濁した該細胞を、凍結して保存する（在庫化する）工程；

（４）凍結保存した該細胞を、解凍する工程；そして

（５）解凍した該細胞を、請求項１～３のいずれか１項に記載された

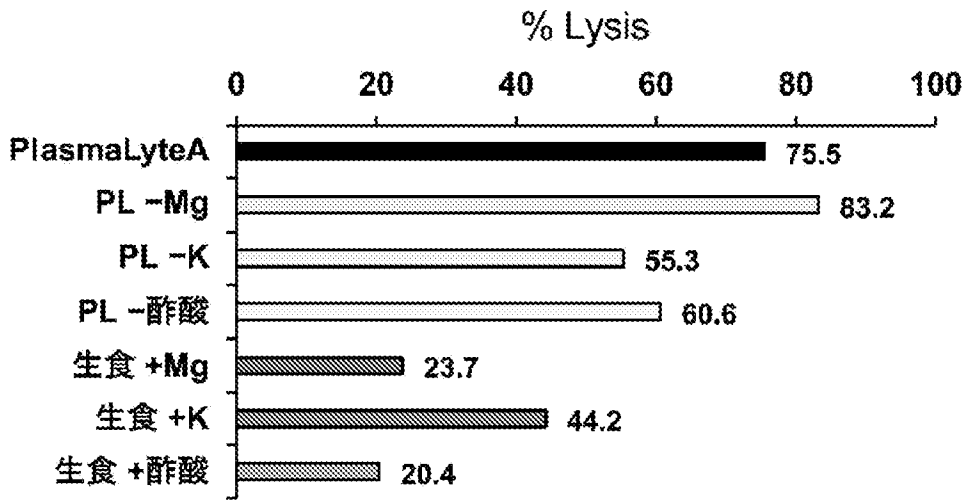
液に懸濁し、輸注用医薬組成物とする工程。

[図1]



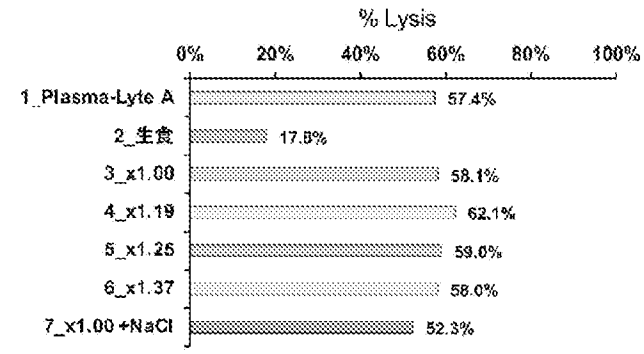
	直後	3時間後
1	47.4%	62.2%
2	56.4%	68.2%
3	47.4%	67.8%
4	41.9%	65.8%
5	52.9%	22.6%
6	58.7%	20.5%

[図2]

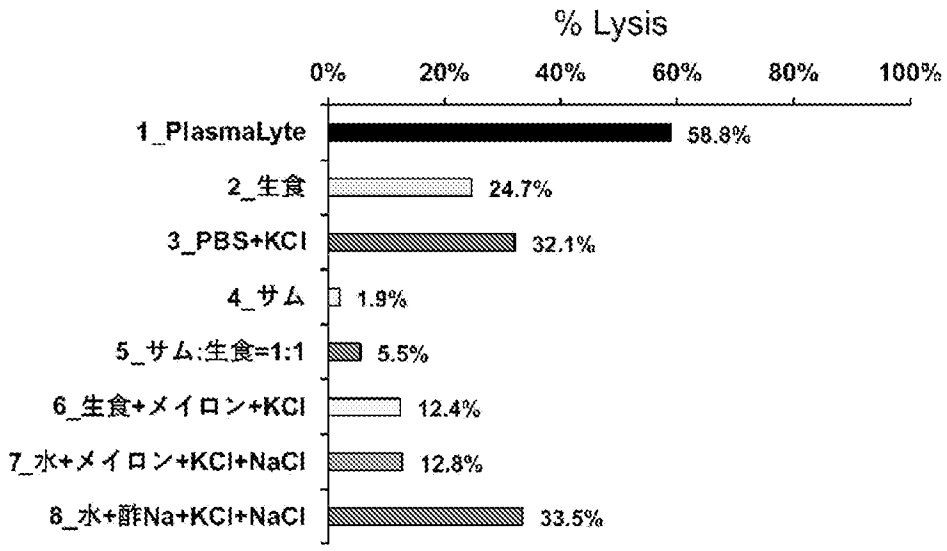


[図3]

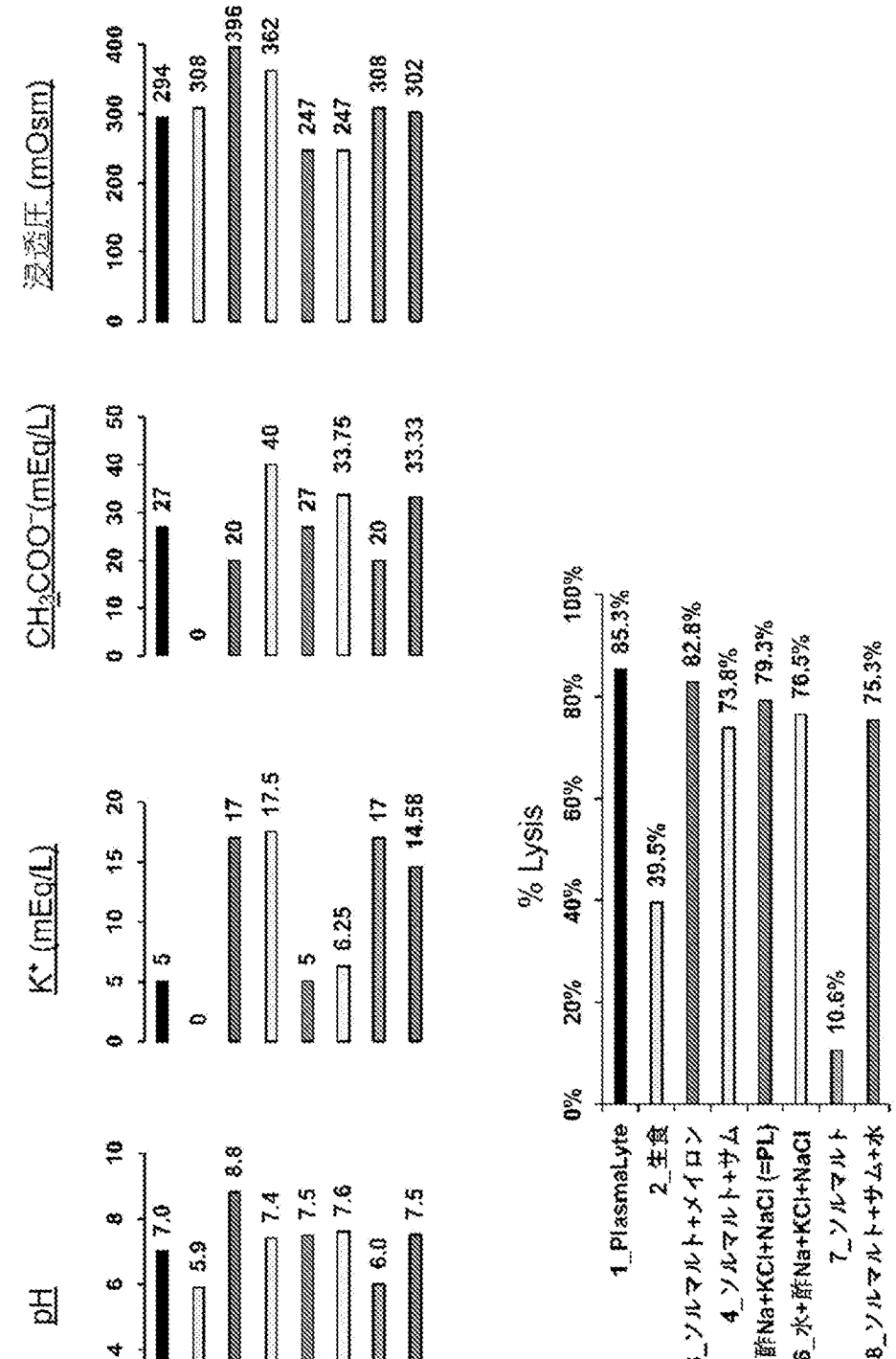
浸透圧（mOsm）	K^+（mEq/L）	CH_3COO^-（mEq/L）
294	5	27
308	0	0
247	5	27
294	5.95	32.13
308	6.25	33.75
339	6.85	36.99
294	5	27



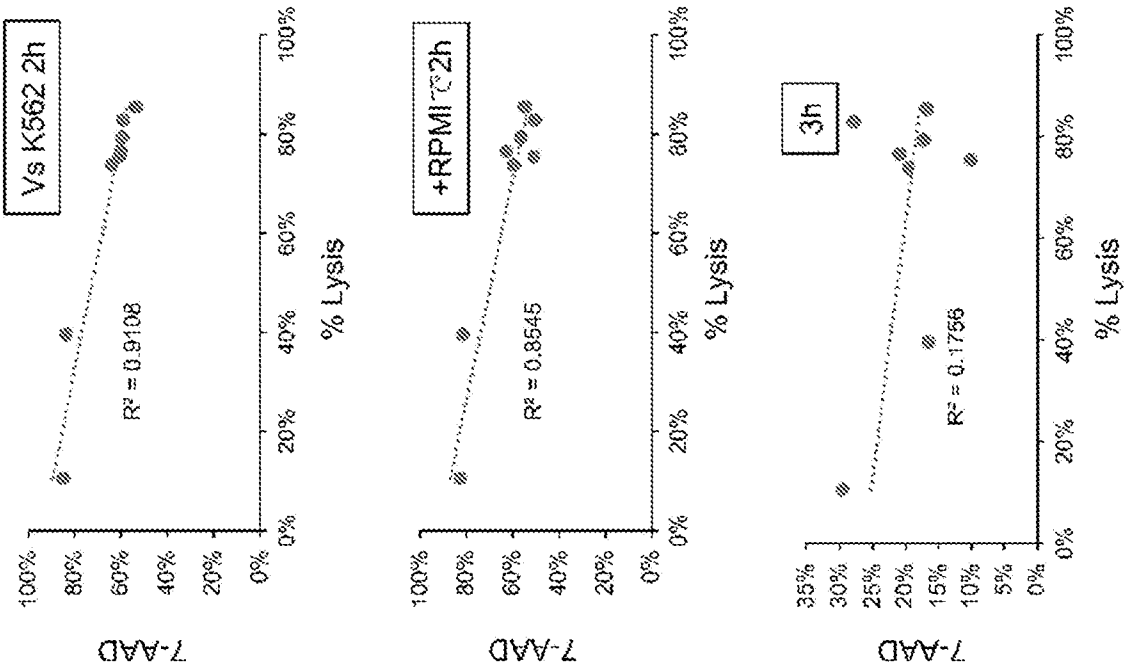
[図4]

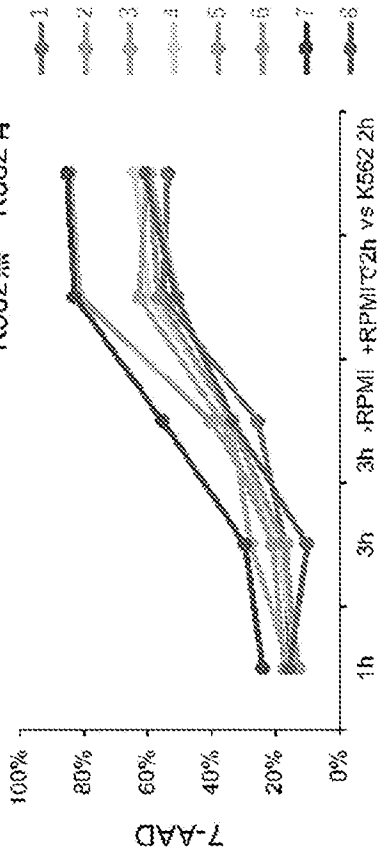

% Lysis
0%
20%
40%
60%
80%
100%
1_PlasmaLyte
58.8%
2_生食
24.7%
3_PBS+KCl
32.1%
4_サム
1.9%
5_サム:生食=1:1
5.5%
6_生食+メイロン+KCl
12.4%
7_水+メイロン+KCl+NaCl
12.8%
8_水+酢Na+KCl+NaCl
33.5%

[図5]

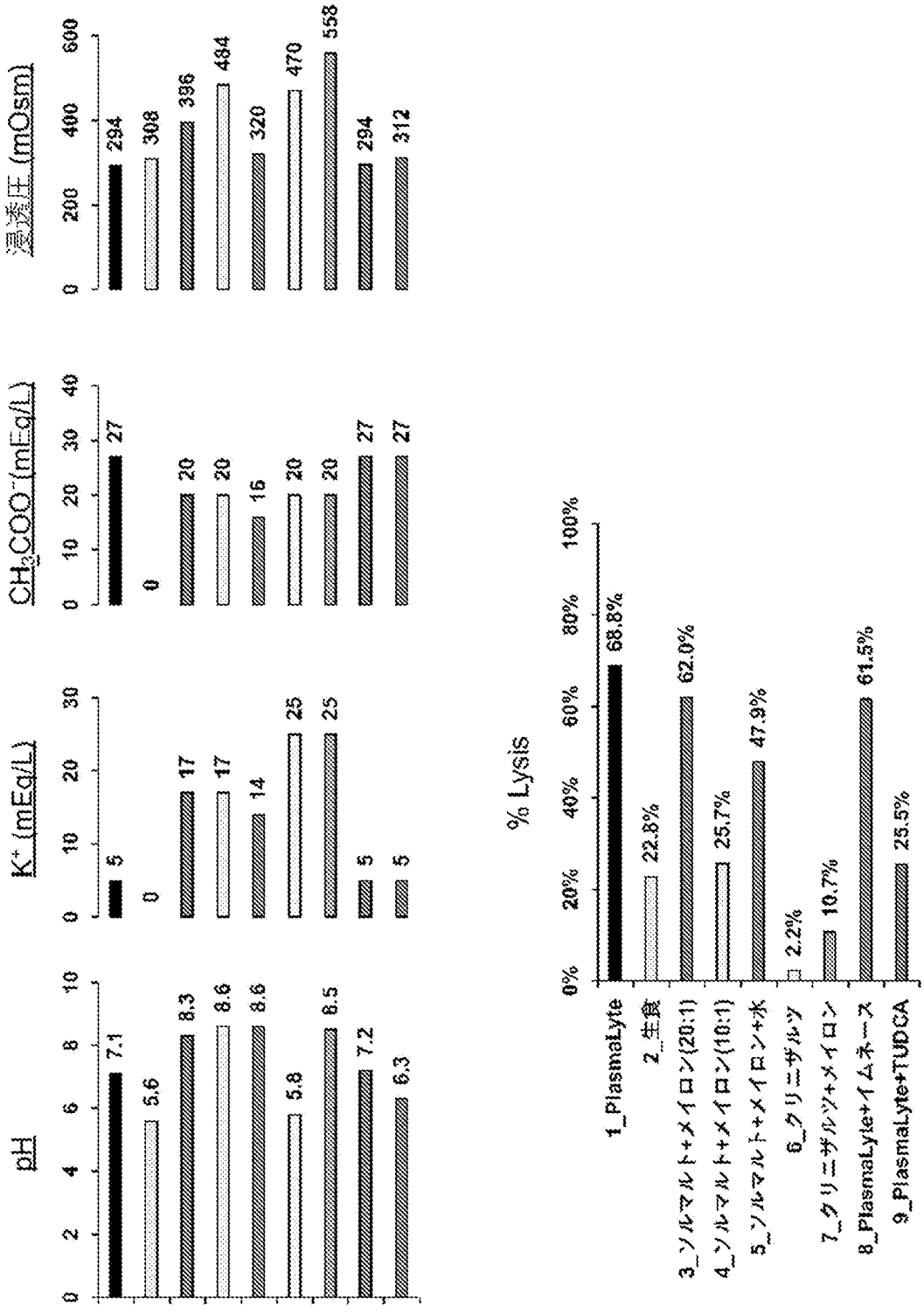

pH
0 2 4 6 8 10
1_PlasmaLyte 7.0
2_生食 5.9
3_ソルマルト+メイロン 8.8
4_ソルマルト+サム 7.4
5_水+酢Na+KCl+NaCl (=PL) 7.5
6_水+酢Na+KCl+NaCl 7.6
7_ソルマルト 6.0
8_ソルマルト+サム+水 7.5
K+ (mEq/L)
0 5 10 15 20
5
0
17
17.5
5
6.25
17
14.58
CH3COO- (mEq/L)
0 10 20 30 40 50
27
0
20
40
27
33.75
20
33.33
浸透圧 (mOsm)
0 100 200 300 400
294
308
396
362
247
247
308
302
% Lysis
0% 20% 40% 60% 80% 100%
1_PlasmaLyte 85.3%
2_生食 39.5%
3_ソルマルト+メイロン 82.6%
4_ソルマルト+サム 73.8%
5_水+酢Na+KCl+NaCl (=PL) 79.3%
6_水+酢Na+KCl+NaCl 76.5%
7_ソルマルト 10.6%
8_ソルマルト+サム+水 75.3%

[図6]


Vs K562 2h
R² = 0.9108
+RPMI 2h
R² = 0.8545
3h
R² = 0.1756
7-AAD
% Lysis
0%
20%
40%
60%
80%
100%

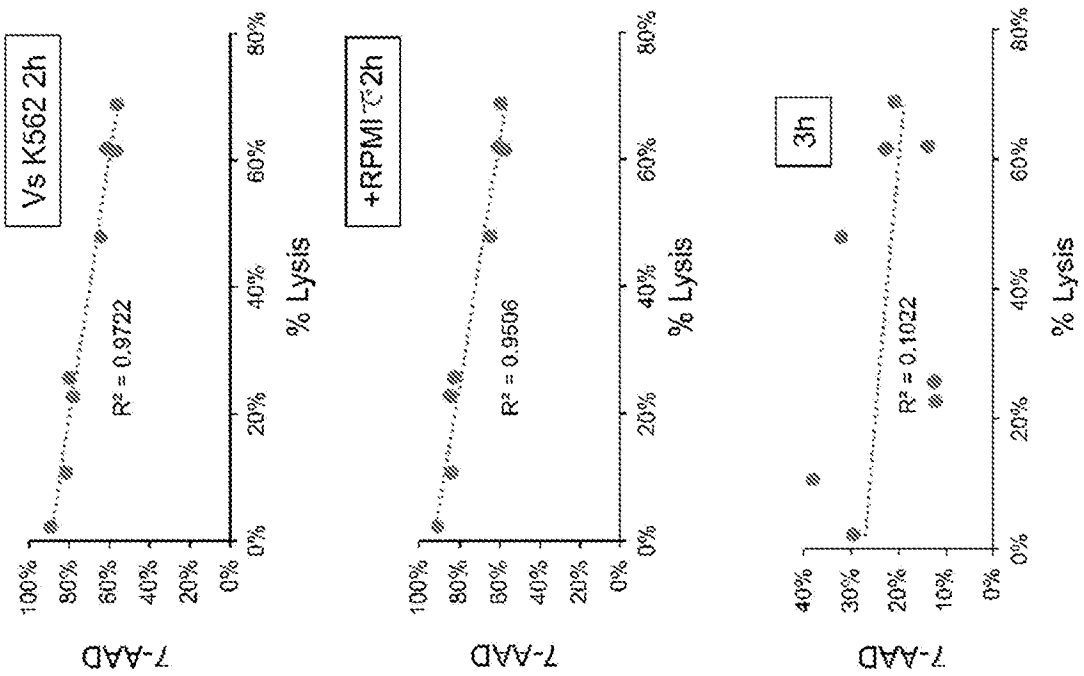

K562無 K562有
1
2
3
4
5
6
7
8
1h
3h
3h →RPMI
+RPMI 2h vs K562 2h
7-AAD
0%
20%
40%
60%
80%
100%

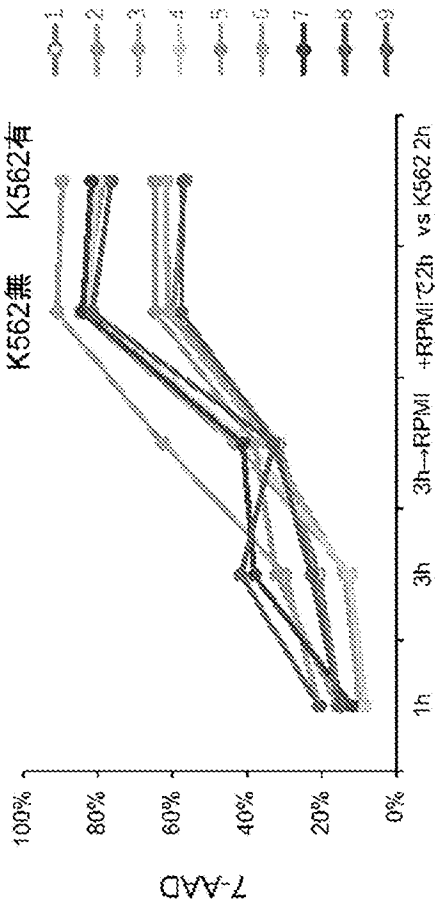
[図7-1]


pH
K+ (mEq/L)
CH3COO- (mEq/L)
浸透圧 (mOsm)
1_PlasmaLyte
2_生食
3_ソルマルト+メイロン(20:1)
4_ソルマルト+メイロン(10:1)
5_ソルマルト+メイロン+水
6_クリニザルツ
7_クリニザルツ+メイロン
8_PlasmaLyte+イムネース
9_PlasmaLyte+TUDCA
7.1
5.6
8.3
8.6
8.6
5.8
8.5
7.2
6.3
5
0
17
17
14
25
25
5
5
27
0
20
20
16
20
20
27
27
294
308
396
484
320
470
558
294
312

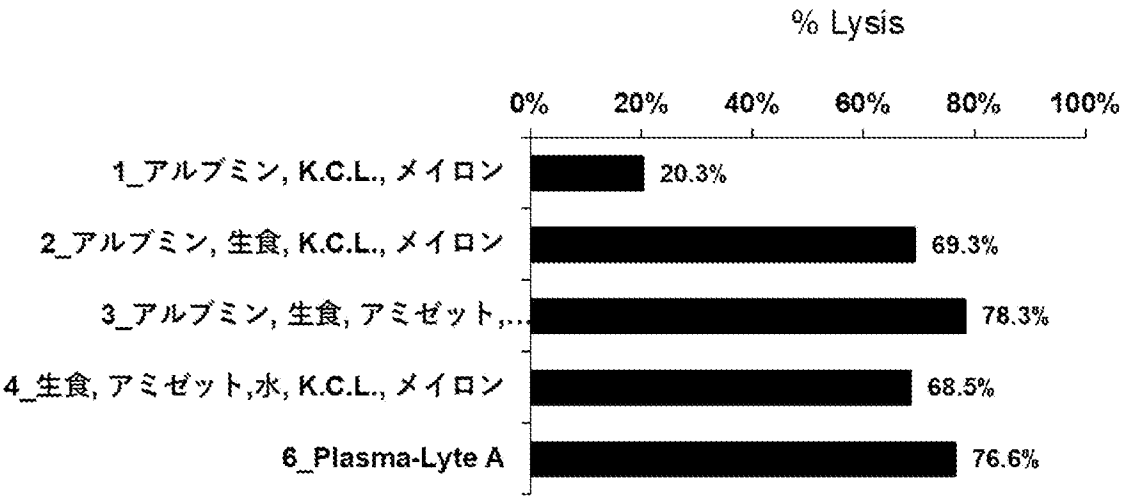
% Lysis
1_PlasmaLyte
2_生食
3_ソルマルト+メイロン(20:1)
4_ソルマルト+メイロン(10:1)
5_ソルマルト+メイロン+水
6_クリニザルツ
7_クリニザルツ+メイロン
8_PlasmaLyte+イムネース
9_PlasmaLyte+TUDCA
68.8%
22.8%
62.0%
25.7%
47.9%
2.2%
10.7%
61.5%
25.5%

[図7-2]

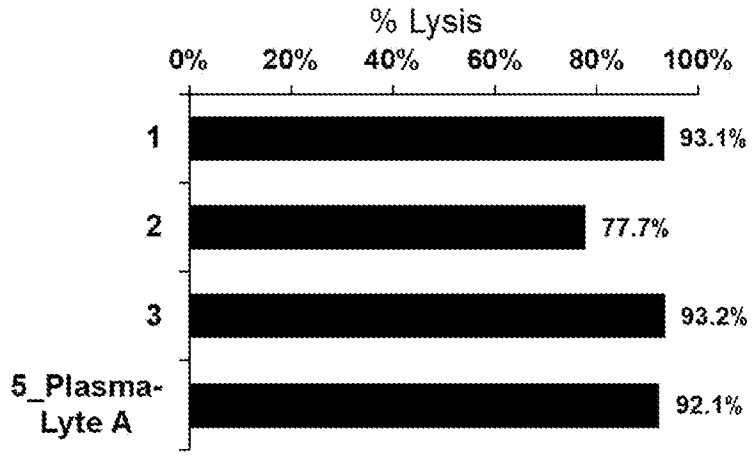

Vs K562 2h
R² = 0.9722
+RPMI で2h
R² = 0.9506
3h
R² = 0.1022
7-AAD
% Lysis
100%
80%
60%
40%
20%
0%


K562無 K562有
1
2
3
4
5
6
7
8
9
1h
3h
3h→RPMI
+RPMIで2h
vs K562 2h
7-AAD
100%
80%
60%
40%
20%
0%

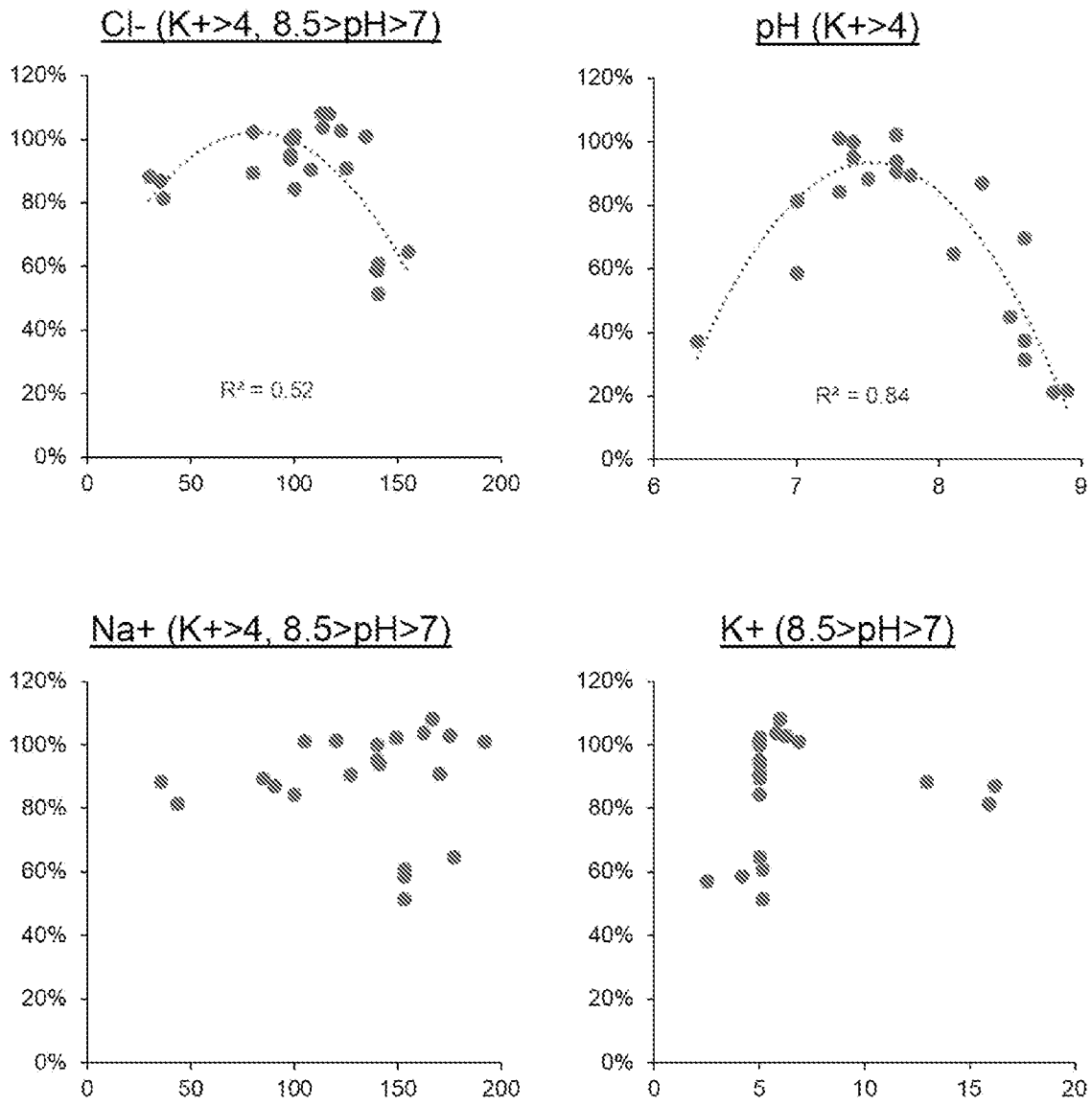
[図8]


% Lysis
0%
20%
40%
60%
80%
100%
1_アルブミン, K.C.L., メイロン
20.3%
2_アルブミン, 生食, K.C.L., メイロン
69.3%
3_アルブミン, 生食, アミゼット,..
78.3%
4_生食, アミゼット,水, K.C.L., メイロン
68.5%
6_Plasma-Lyte A
76.6%

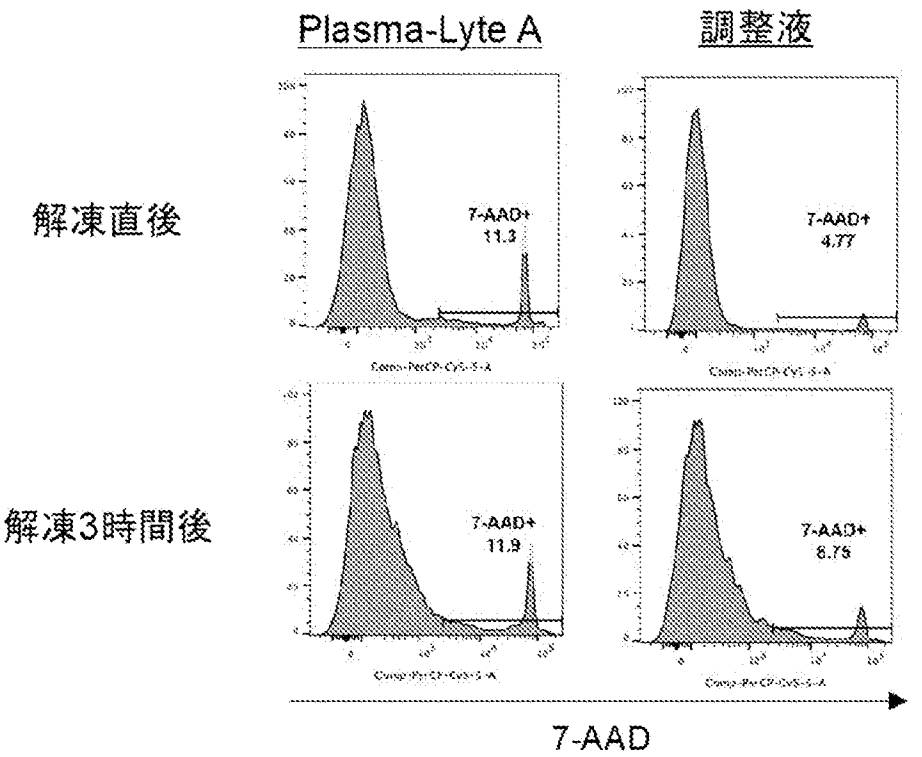
[図9]

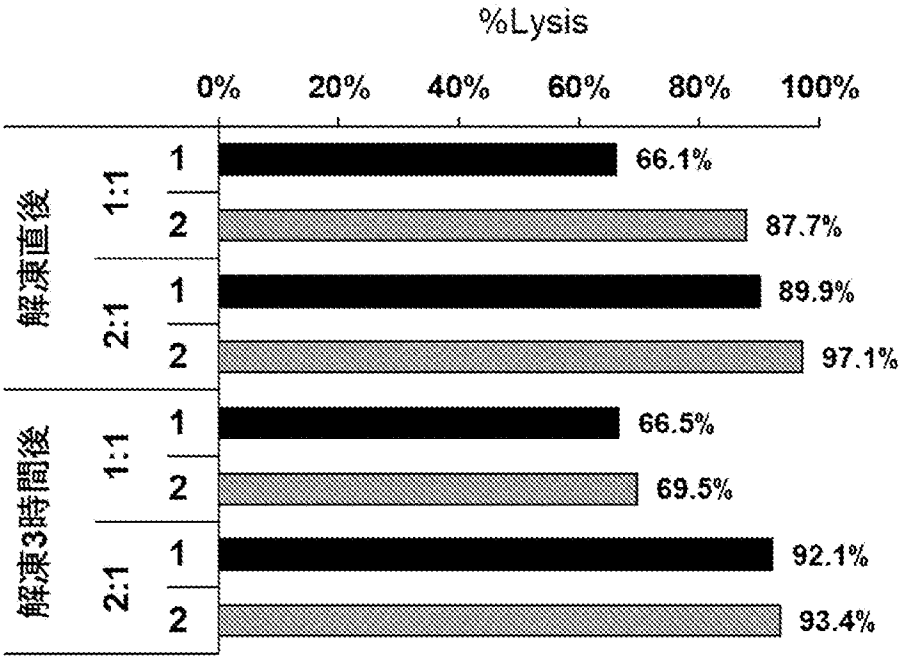

% Lysis
0%
20%
40%
60%
80%
100%
1
93.1%
2
77.7%
3
93.2%
5_Plasma-Lyte A
92.1%

[図10]

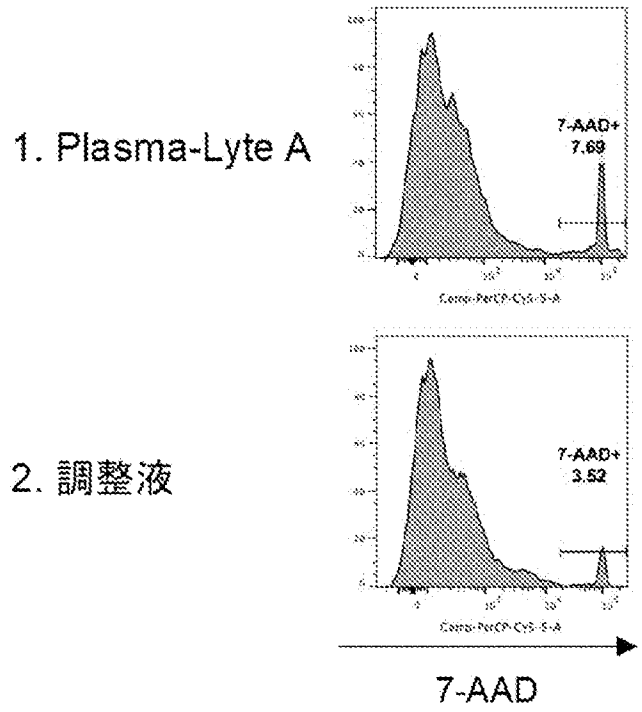

Cl- (K+>4, 8.5>pH>7)
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
0
50
100
150
200
R² = 0.52
pH (K+>4)
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
6
7
8
9
R² = 0.84
Na+ (K+>4, 8.5>pH>7)
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
0
50
100
150
200
K+ (8.5>pH>7)
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
0
5
10
15
20

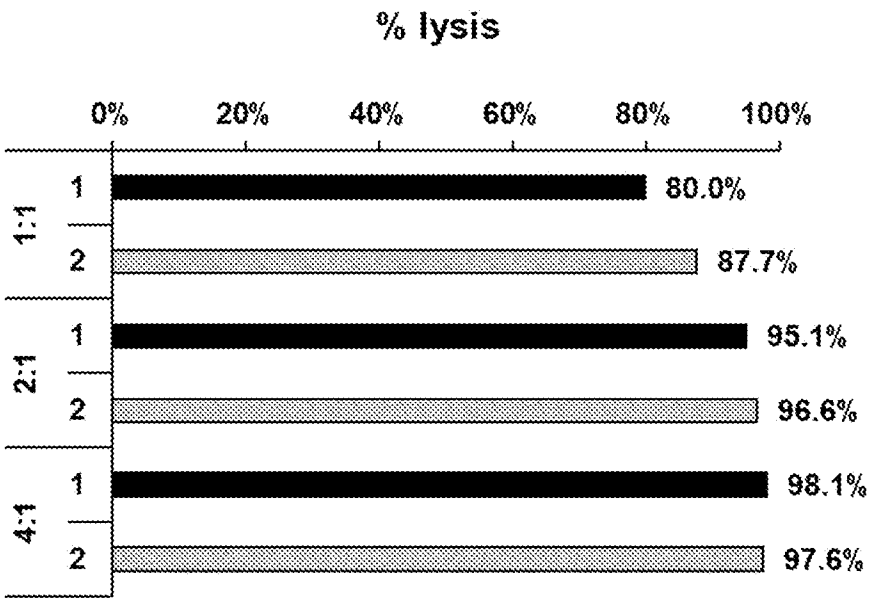
[図11]


Plasma-Lyte A
調整液
解凍直後
解凍3時間後
7-AAD+
11.3
7-AAD+
4.77
7-AAD+
11.9
7-AAD+
8.75
7-AAD

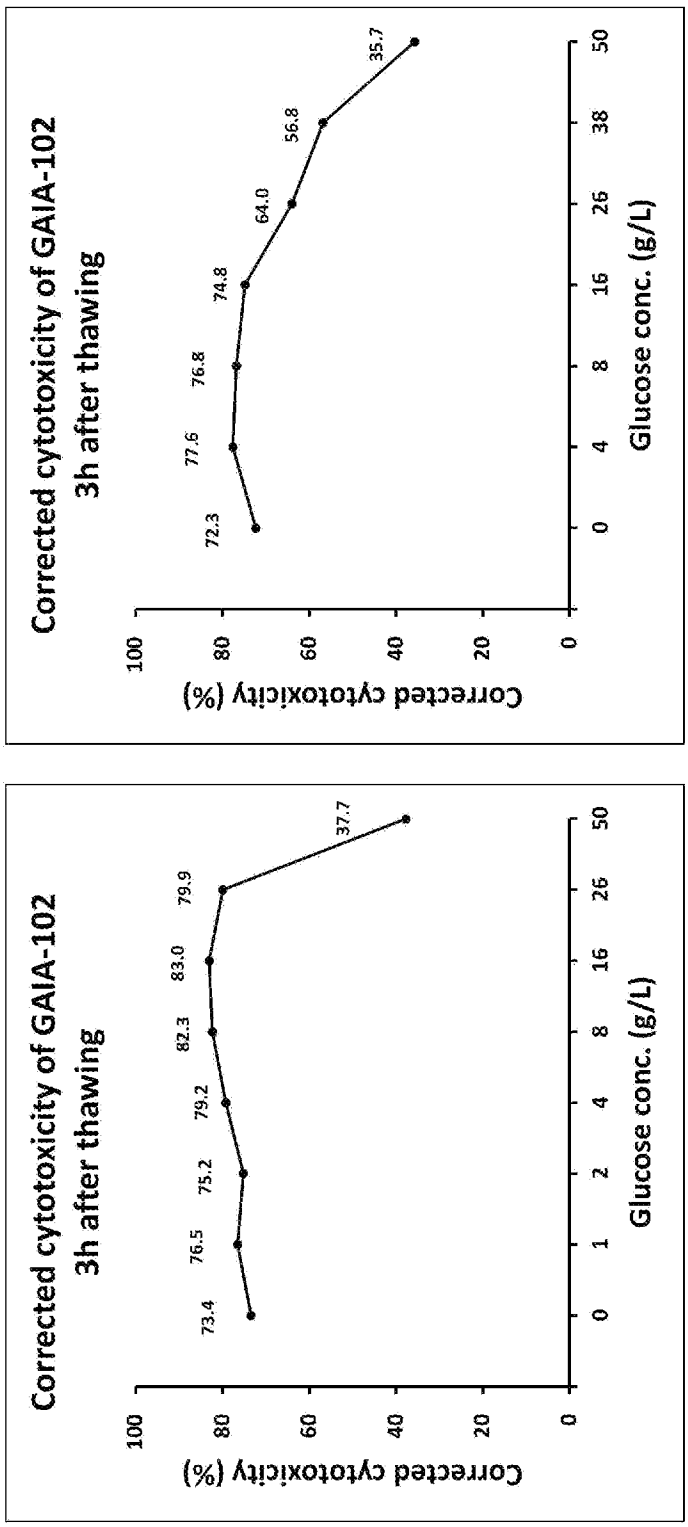

%Lysis
0%
20%
40%
60%
80%
100%
解凍直後
解凍3時間後
1:1
2:1
1
2
66.1%
87.7%
89.9%
97.1%
66.5%
69.5%
92.1%
93.4%

[図12]


1. Plasma-Lyte A
7-AAD+
7.69
2. 調整液
7-AAD+
3.52
7-AAD


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

[図13]


#1
Corrected cytotoxicity of GAIA-102
3h after thawing
Corrected cytotoxicity (%)
Glucose conc. (g/L)
73.4
76.5
75.2
79.2
82.3
83.0
79.9
37.7
#2
Corrected cytotoxicity of GAIA-102
3h after thawing
Corrected cytotoxicity (%)
Glucose conc. (g/L)
72.3
77.6
76.8
74.8
64.0
56.8
35.7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2022/033487

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 1/04(2006.01)i; ***A61K 9/10***(2006.01)i; ***A61K 9/19***(2006.01)i; ***A61K 35/14***(2015.01)i; ***A61K 35/26***(2015.01)i; ***A61K 35/28***(2015.01)i; ***A61K 35/51***(2015.01)i; ***A61K 35/545***(2015.01)i; ***A61K 47/02***(2006.01)i; ***A61K 47/12***(2006.01)i; ***A61K 47/18***(2006.01)i; ***A61K 47/26***(2006.01)i; ***A61K 47/42***(2017.01)i; ***A61P 31/04***(2006.01)i; ***A61P 31/12***(2006.01)i; ***A61P 35/00***(2006.01)i; ***A61P 35/02***(2006.01)i; ***A61P 37/04***(2006.01)i

FI: C12N1/04; A61P35/00; A61P37/04; A61K35/14 Z; A61K35/51; A61K35/28; A61K35/26; A61K35/545; A61K9/10; A61K47/02; A61K47/12; A61P35/02; A61P31/12; A61P31/04; A61K9/19; A61K47/18; A61K47/42; A61K47/26

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)

C12N1/04; A61K9/10; A61K9/19; A61K35/14; A61K35/26; A61K35/28; A61K35/51; A61K35/545; A61K47/02; A61K47/12; A61K47/18; A61K47/26; A61K47/42; A61P31/04; A61P31/12; A61P35/00; A61P35/02; A61P37/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2022
Registered utility model specifications of Japan 1996-2022
Published registered utility model applications of Japan 1994-2022

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/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	JP 2018-535666 A (CELULARITY INC.) 06 December 2018 (2018-12-06) claims, paragraphs [0371], [0372]	1-7
X	JP 2021-505207 A (CELYAD S. A.) 18 February 2021 (2021-02-18) claims, paragraph [0029]	1-7
X	JP 2018-502114 A (ANTHROGENESIS CORP.) 25 January 2018 (2018-01-25) claims, paragraphs [0308], [0309]	1-7
X	WO 2020/196297 A1 (GAIA BIOMEDICINE INC.) 01 October 2020 (2020-10-01) claims, paragraphs [0019]-[0022], [0039]	1, 3, 4

☑ 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	Date of mailing of the international search report
02 November 2022	**15 November 2022**
Name and mailing address of the ISA/JP **Japan Patent Office (ISA/JP)** **3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915** **Japan**	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2022/033487

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WILLIAMS, B. et al. NK-92 Therapy Is Well Tolerated, Has Minimal Toxicity and Shows Efficacy in a Phase I Trial of Patients with Relapsed/Refractory Hematological Malignancies Relapsing after Autologous Stem Cell Transplantation. Blood, 2015, vol. 126, no. 23, article no. 4297, pp. 1-3 entire text	1, 3, 4
A	VETERINARY PLASMA-LYTE A. July 2020, [retrieved on 2 November 2022], Internet <https://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/fda/fdaDrugXsl.cfm?setid=4ed80c6f-7d6e-416e-912a-a12a24c210f6&type=display> entire text	1-7
P, X	JP 2021-136883 A (GAIA BIOMEDICINE INC.) 16 September 2021 (2021-09-16) claims, examples	1-7
P, X	WO 2022/004805 A1 (GAIA BIOMEDICINE INC.) 06 January 2022 (2022-01-06) claims, examples	1-7
P, X	JP 2022-511786 A (CELULARITY INC.) 01 February 2022 (2022-02-01) claims, paragraphs [0444], [0445]	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2022/033487

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP 2018-535666 A	06 December 2018	WO 2017/066530 A1 claims, paragraphs [0420], [0421] US 2018/0346877 A1	
JP 2021-505207 A	18 February 2021	WO 2019/110667 A1 claims, p. 8, Brief description of fig. 4 US 2020/0318067 A1	
JP 2018-502114 A	25 January 2018	WO 2016/109668 A1 claims, paragraphs [0308], [0309] US 2018/0021378 A1	
WO 2020/196297 A1	01 October 2020	US 2022/0184122 A1 claims, paragraphs [0032]-[0044], [0059] EP 3943932 A1	
JP 2021-136883 A	16 September 2021	(Family: none)	
WO 2022/004805 A1	06 January 2022	(Family: none)	
JP 2022-511786 A	01 February 2022	WO 2020/113182 A1 claims, paragraphs [0444], [0445]	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2022/033487

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

C12N 1/04(2006.01)i; A61K 9/10(2006.01)i; A61K 9/19(2006.01)i; A61K 35/14(2015.01)i; A61K 35/26(2015.01)i; A61K 35/28(2015.01)i; A61K 35/51(2015.01)i; A61K 35/545(2015.01)i; A61K 47/02(2006.01)i; A61K 47/12(2006.01)i; A61K 47/18(2006.01)i; A61K 47/26(2006.01)i; A61K 47/42(2017.01)i; A61P 31/04(2006.01)i; A61P 31/12(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61P 35/02(2006.01)i; A61P 37/04(2006.01)i

FI: C12N1/04; A61P35/00; A61P37/04; A61K35/14 Z; A61K35/51; A61K35/28; A61K35/26; A61K35/545; A61K9/10; A61K47/02; A61K47/12; A61P35/02; A61P31/12; A61P31/04; A61K9/19; A61K47/18; A61K47/42; A61K47/26

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（ＩＰＣ））

C12N1/04; A61K9/10; A61K9/19; A61K35/14; A61K35/26; A61K35/28; A61K35/51; A61K35/545; A61K47/02; A61K47/12; A61K47/18; A61K47/26; A61K47/42; A61P31/04; A61P31/12; A61P35/00; A61P35/02; A61P37/04

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	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０２２年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２２年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２２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); CAplus/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 2018-535666 A (セルラリティ インコーポレイテッド) 06.12.2018 (2018-12-06) 特許請求の範囲, [0371], [0372]	1-7
X	JP 2021-505207 A (セリアド エス．アー．) 18.02.2021 (2021-02-18) 特許請求の範囲, [0029]	1-7
X	JP 2018-502114 A (アントフロゲネシス コーポレーション) 25.01.2018 (2018-01-25) 特許請求の範囲, [0308], [0309]	1-7
X	WO 2020/196297 A1 (株式会社ガイアバイオメディシン) 01.10.2020 (2020-10-01) 特許請求の範囲, [0019]-[0022], [0039]	1, 3, 4

☑ 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抵触するものではなく、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	国際調査報告の発送日
02.11.2022	15.11.2022

名称及びあて先
日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）
松田　芳子 4N 3126

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

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	WILLIAMS, B. et al., NK-92 Therapy Is Well Tolerated, Has Minimal Toxicity and Shows Efficacy in a Phase I Trial of Patients with Relapsed/Refractory Hematological Malignancies Relapsing after Autologous Stem Cell Transplantation, Blood, 2015, vol.126, no.23, article no.4297, p.1-3 全文	1, 3, 4
A	'VETERINARY PLASMA-LYTE A', 2020年7月, [2022年11月2日検索], インターネット<https://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/fda/fdaDrugXsl.cfm?setid=4ed80c6f-7d6e-416e-912a-a12a24c210f6&type=display> 全文	1-7
P, X	JP 2021-136883 A (株式会社ガイアバイオメディシン) 16.09.2021 (2021-09-16) 特許請求の範囲, 実施例	1-7
P, X	WO 2022/004805 A1 (株式会社ガイアバイオメディシン) 06.01.2022 (2022-01-06) 特許請求の範囲, 実施例	1-7
P, X	JP 2022-511786 A (セルラリティ インク.) 01.02.2022 (2022-02-01) 特許請求の範囲, [0444]-[0445]	1-7

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2022/033487

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2018-535666 A	06.12.2018	WO 2017/066530 A1 claims, [00420], [00421] US 2018/0346877 A1	
JP 2021-505207 A	18.02.2021	WO 2019/110667 A1 claims, p.8, Brief description of Figure 4 US 2020/0318067 A1	
JP 2018-502114 A	25.01.2018	WO 2016/109668 A1 claims, [00308], [00309] US 2018/0021378 A1	
WO 2020/196297 A1	01.10.2020	US 2022/0184122 A1 claims, [0032]-[0044], [0059] EP 3943932 A1	
JP 2021-136883 A	16.09.2021	（ファミリーなし）	
WO 2022/004805 A1	06.01.2022	（ファミリーなし）	
JP 2022-511786 A	01.02.2022	WO 2020/113182 A1 claims, [00444]-[00445]	