

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6727334号
(P6727334)

(45) 発行日 令和2年7月22日(2020.7.22)

(24) 登録日 令和2年7月2日(2020.7.2)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 1/04 (2006.01)	C 1 2 N 1/04
C 1 2 N 1/00 (2006.01)	C 1 2 N 1/00 F
C 1 2 N 5/0775 (2010.01)	C 1 2 N 5/0775
C 1 2 N 5/0783 (2010.01)	C 1 2 N 5/0783
A 6 1 K 35/17 (2015.01)	A 6 1 K 35/17 Z
請求項の数 10 (全 16 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号 特願2018-559661 (P2018-559661)	(73) 特許権者 518272614 グリーン・クロス・ラブ・セル・コーポレイション 大韓民国16924キョンギド、ヨンインシ、キフング、イヒョンロ30ボンギル107
(86) (22) 出願日 平成29年1月25日(2017.1.25)	(74) 代理人 100145403 弁理士 山尾 憲人
(65) 公表番号 特表2019-504643 (P2019-504643A)	(74) 代理人 100122301 弁理士 富田 憲史
(43) 公表日 平成31年2月21日(2019.2.21)	(74) 代理人 100157956 弁理士 稲井 史生
(86) 国際出願番号 PCT/KR2017/000859	(74) 代理人 100170520 弁理士 笹倉 真奈美
(87) 国際公開番号 W02017/135631	
(87) 国際公開日 平成29年8月10日(2017.8.10)	
審査請求日 平成30年9月20日(2018.9.20)	
(31) 優先権主張番号 10-2016-0012155	
(32) 優先日 平成28年2月1日(2016.2.1)	
(33) 優先権主張国・地域又は機関 韓国 (KR)	
	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞の凍結保存のための培地組成物およびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

培地組成物の総体積に基づいて、18～40v/v%の20%のアルブミン溶液、23～27v/v%の10%のデキストラン溶液、4～6v/v%のジメチルスルホキシドおよび30～52v/v%の細胞培養培地を含む、免疫細胞の凍結保存のための血清を含まない培地組成物。

【請求項2】

免疫細胞がナチュラルキラー細胞である、請求項1に記載の血清を含まない培地組成物。

【請求項3】

細胞と共に対象に直接投与される、請求項1に記載の血清を含まない培地組成物。

【請求項4】

請求項1に記載の血清を含まない培地組成物が加えられる細胞を凍結する工程を含む、細胞の凍結保存のための方法。

【請求項5】

請求項1に記載の血清を含まない培地組成物および活性成分としての免疫細胞を含む、がんまたは感染症を予防または処置するための医薬組成物。

【請求項6】

免疫細胞がナチュラルキラー細胞である、請求項5に記載の医薬組成物。

【請求項7】

請求項 1 に記載の血清を含まない培地組成物および活性成分としての幹細胞を含む、変性疾患を予防または処置するための医薬組成物。

【請求項 8】

幹細胞が間葉幹細胞である、請求項 7 に記載の組成物。

【請求項 9】

変性疾患が、脳神経障害、虚血性疾患、皮膚損傷、骨障害および変性関節症からなる群より選択されるいずれか 1 つである、請求項 7 に記載の組成物。

【請求項 10】

請求項 1 に記載の血清を含まない培地組成物および活性成分としての間葉幹細胞を含む、免疫疾患を予防または処置するための医薬組成物であって、ここで、該免疫疾患は、移植片対宿主疾患、移植片拒絶、自己免疫疾患、慢性炎症性疾患、炎症性疼痛、神経障害性疼痛および慢性閉塞性肺疾患（COPD）からなる群より選択される、医薬組成物。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、解凍後の優れた細胞回収率、細胞生存率、および細胞活性を示す、細胞の凍結保存のための培地組成物、および上記培地組成物と治療用細胞とを含む医薬組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

かかる方法は、動物細胞を培養するための方法の開発と共に、タンパク質薬物の製造を含む種々の分野の生物学的研究に広く適用されてきた。動物細胞を使用してタンパク質薬物を製造する際に、長期間の細胞株の特性の維持を可能にする保存方法として、凍結保存が主に使用される。

20

【0003】

凍結保存により、細胞培養および維持における難点を克服し、細菌、マイコプラズマ等からのコンタミネーションを防ぐことができる。さらに、細胞株の形質転換を防ぎ、実験および製造の再現性も確保することができる。

【0004】

一般に、動物細胞は、凍結保存中に細胞損傷を受ける、すなわち、低温への細胞の暴露は、細胞器官および細胞機能の障害をもたらす得る。故に、凍結保存後の細胞同一性を確保するために、細胞の特性および生存率を維持することができる凍結保存方法の開発および検証を実施するべきである。

30

【0005】

動物細胞の凍結保存のために使用される一般的な方法として、細胞膜を保護するために血清を補足した細胞培養培地に 10%ジメチルスルホキシド（DMSO）を加え、細胞を徐々に冷却し、液体窒素中において -196 で保管する。しかしながら、タンパク質製造のような過程におけるかかる方法の使用頻度は、血清の問題により減少しつつある。加えて、血清中の微量元素は細胞の生育に影響を及ぼすが、かかる元素を分析することは難しいという問題があり、かつ、該元素は製造時期および場所に応じて変化し得る。

40

【0006】

加えて、血清のほとんどは動物由来であり、例えそれがヒト由来であっても、それはウイルス等による感染にさらされる。故に、細胞治療剤のような直接的な治療薬として、血清を含有する組成物を使用することにおける安全性の問題がある。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

従って、本発明の発明者らは、動物細胞の長期凍結保存を可能にし、かつ、血清を含まない、故に細胞治療剤のための組成物として有用な、凍結保存のための培地組成物を確立し、本発明を完成させた。

50

【0008】

従って、本発明の目的は、細胞の凍結保存のための培地組成物を提供することにある。

【0009】

本発明の別の目的は、凍結保存のための上記培地組成物を含む医薬組成物を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明の1つの目的に従って、培地組成物の総体積に基づいて、15～55 v/v%のアルブミン、20～30 v/v%のデキストラン、2～8 v/v%のジメチルスルホキシドおよび15～55 v/v%の細胞培養培地を含む、細胞の凍結保存のための培地組成物が提供される。

10

【0011】

本発明の別の目的に従って、本発明の培地組成物および活性成分としての免疫細胞を含む、がんまたは感染症を予防または処置するための医薬組成物が提供される。

【0012】

本発明のまた別の目的に従って、本発明の培地組成物および活性成分としての幹細胞を含む、変性疾患および免疫関連疾患を予防または処置するための医薬組成物が提供される。

【発明の効果】

【0013】

本発明に従い、細胞の凍結保存のための培地組成物中で細胞を凍結する場合、該細胞を解凍する時、細胞の生存率は高く、かつ、細胞の活性も維持される。加えて、本発明の培地組成物は、洗浄、分離等のような追加の処置を用いることなく、凍結保存された治療用細胞を対象へ投与することを可能にする。故に、該組成物は、細胞の凍結保存のための優れた培地組成物として、または優れた医薬組成物として使用され得る。

20

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】図1a-1dは、本発明の実施形態において調製された細胞の凍結保存のための培地組成物中で凍結させたNK細胞を解凍し、IL-2と共に培養した後の回収率(図1aおよび1c)および生存率(図1bおよび図1d)を示す。

30

【図2】図2a-2dは、本発明の実施形態に従って調製された細胞の凍結保存のための培地組成物中で凍結させたNK細胞のK562細胞に対する細胞毒性を示し、図2aおよび2bは、該細胞の解凍直後の測定値を示し、図2cおよび図2dは、解凍およびIL-2との培養後の測定値を示す。

【図3】図3aおよび3bは、本発明の実施形態において調製された細胞の凍結保存のための培地組成物中で凍結させたHuT78細胞を解凍し、3日間培養した後に測定された細胞数(図3a)および生存率(図3b)を示す。

【図4】図4aおよび4bは、本発明の実施形態において調製された細胞の凍結保存のための培地組成物中で凍結させたK562細胞を解凍し、3日間培養した後に測定された細胞数(図4a)および生存率(図4b)を示す。

40

【発明を実施するための形態】

【0015】

以下、本発明を詳細に記載する。

【0016】

本発明は、全培地組成物に基づき、15～55 v/v%のアルブミン、20～30 v/v%のデキストラン、2～8 v/v%のジメチルスルホキシドおよび15～55 v/v%の細胞培養培地を含む、細胞の凍結保存のための培地組成物を提供する。

【0017】

本明細書で使用される場合、「凍結保存」なる語は、凍結を介して長期間安定に細胞を維持することを意味する。一般に、細胞を培養する場合、1:10000の比で変異が起

50

こり、細胞が長期の継代培養を経る場合、細胞集団は変化し、元の集団とは異なるものになり得る。深刻な場合、細胞は、それ自身の特定の機能を継代培養により失い得る。さらに、細胞は、継代培養中にマイコプラズマ等に感染し得る。かかる問題のため、細胞凍結保存を実施して、それらの固有の特性を失う前に細胞を凍結および保存し、必要とされる時にそれらを使用する。

【0018】

細胞凍結保存は、凍結保存されるべき細胞を凍結保護剤で処理することにより実施されてもよく、本発明の組成物は、凍結保護剤により細胞損傷を防ぐために、アルブミン、デキストラン、ジメチルスルホキシドおよび細胞培養培地を含み、それにより、細胞の凍結保存における安全性および安定性を改良する。

10

【0019】

本明細書で使用される場合、「凍結保護剤」なる語は、 $-80 \sim -200$ の超低温で細胞を保管する場合に使用される物質を意味する。とりわけ、該物質は、凍結および解凍過程に不可避に伴うイオンと浸透圧との不均衡による氷結晶の形成および細胞損傷を最小限にすることができる。

【0020】

本明細書で使用される場合、「アルブミン」なる語は、生物学的に活性を有する全ヒトアルブミンまたはヒトアルブミンの一部を意味する。アルブミンは、凍結保存において血清と等価な、またはより優れたアニマルフリー代替品として使用されることができ、細胞を安定化させるために、凍結保存のための組成物へ加えられる。

20

【0021】

アルブミンは、米国国立健康機関 (US National Institutes of Health) の GenBank におけるアクセッション番号 ANC98520.1 を有するタンパク質であってもよく、上記タンパク質に対して 70% 以上、とりわけ 80% 以上、より詳細には 95% 以上、最も詳細には 98% 以上の類似性を示すいずれかのアミノ酸配列を含み得る。加えて、上記アルブミンの生物学的活性と等価なまたは相当する生物学的活性を有する限り、部分的な配列が欠失し、修飾され、置換され、または加えられたアミノ酸配列を有するタンパク質バリエーションも包含され得る。

【0022】

本発明の組成物中に含有されるアルブミンの含量は、該組成物の総体積に基づき、 $15 \sim 55 \text{ v/v} \%$ 、とりわけ $18 \sim 40 \text{ v/v} \%$ 、より詳細には $20 \sim 35 \text{ v/v} \%$ であり得る。本発明の一実施形態によると、アルブミンの含量は、全組成物に基づき、 $20 \text{ v/v} \%$ 、 $35 \text{ v/v} \%$ または $50 \text{ v/v} \%$ であり得る。ここで、「 $\text{v/v} \%$ 」は、全組成物の体積に基づいた各構成要素の体積分率を意味する。

30

【0023】

本明細書で使用される場合、「デキストラン」なる語は、D-グルコースのポリマーである多糖を意味する。デキストランは、重量平均分子量に従って、デキストラン 1、デキストラン 40、デキストラン 70 等に分類されることができる。一実施形態において、デキストランはデキストラン 40 であり得る。

【0024】

本発明の組成物中に含有されるデキストランの含量は、該組成物の総体積に基づき、 $20 \sim 30 \text{ v/v} \%$ 、とりわけ $23 \sim 27 \text{ v/v} \%$ であり得る。本発明の一実施形態によると、デキストランの含量は全組成物に基づき $25 \text{ v/v} \%$ であり得る。

40

【0025】

本明細書で使用される場合、「ジメチルスルホキシド (DMSO)」は、細胞膜透過性凍結保存剤として使用される。それは、細胞膜を透過し、細胞内水と置き換わり、凍結中の氷結晶の形成を阻害する。

【0026】

本発明の組成物中に含有されるジメチルスルホキシドの含量は、該組成物の総体積に基づき、 $2 \sim 8 \text{ v/v} \%$ 、とりわけ $4 \sim 6 \text{ v/v} \%$ であり得る。本発明の一実施形態による

50

と、ジメチルスルホキシドの含量は全組成物に基づき5 v / v %であり得る。

【0027】

本明細書で使用される場合、「細胞培養培地」なる語は、糖、アミノ酸、種々の栄養素、無機物等のような、細胞の生育および増殖に不可欠な要素を含有する、インビトロでの細胞の生育および増殖のための混合物を意味する。該細胞培養培地は、例えば、細胞生育を維持するために調製される基礎培養培地、細胞からのタンパク質製造を促進するために調製される細胞培養製造培地、高い濃度で栄養素を濃縮することにより調製される濃縮培地のように、特定の細胞培養のために最適化され得る。

【0028】

上記の細胞培養培地は、L - アラニン、L - アルギニン塩酸塩、L - システイン塩酸塩一水和物、L - グルタミン、L - ヒスチジン塩酸塩一水和物、L - リジン塩酸塩、L - メチオニン、L - プロリン、L - セリン、L - スレオニン、L - バリン、L - アスパラギン一水和物、L - アスパラギン酸、L - システイン2HCl、L - グルタミン酸、L - イソロイシン、L - ロイシン、L - フェニルアラニン、L - トリプトファン、L - チロシン二ナトリウム二水和物、i - イノシトール、チアミン塩酸塩、ナイアシンアミド、ピリドキシン塩酸塩、ビオチン、D - パントテン酸カルシウム、葉酸、リボフラビン、ビタミンB12、塩化ナトリウム(NaCl)、重炭酸ナトリウム(NaHCO₃)、塩化カリウム(KCl)、塩化カルシウム(CaCl₂)、リン酸水素ナトリウム一水和物(NaH₂PO₄ · H₂O)、硫酸銅五水和物(CuSO₄ · 5H₂O)、硫酸鉄七水和物(FeSO₄ · 7H₂O)、塩化マグネシウム(無水)、硫酸マグネシウム(MgSO₄)、リン酸水素二ナトリウム(Na₂HPO₄)、硫酸亜鉛七水和物(ZnSO₄ · 7H₂O)、D - グルコース(デキストロース)、ピルビン酸ナトリウム、ヒポキサンチンNa、リノール酸、リポ酸、プトレシン2HClおよびチミジンからなる群より選択される少なくとも1つの成分を含有し得る。

【0029】

本発明によれば、細胞培養培地は、人工的な製造により調製されてもよく、または市販の培地を使用してもよい。該市販の細胞培養培地の例は、DMEM(ダルベッコ改変イーグル培地)、MEM(最小必須培地)、BEM(イーグル基礎培地)、RPMI1640、F-10、F-12、MEM(最小必須培地)、G-MEM(グラスゴー最小必須培地)、cellgro SCGM、X-VIVO、AIM-V等を包含する。

【0030】

培養培地の含量は、組成物の総体積に基づき、15 ~ 55 v / v %、とりわけ30 ~ 52 v / v %であり得る。本発明の一実施形態によると、該培養培地の含量は、全組成物100 v / v %に基づき、20 v / v %、35 v / v %、または50 v / v %であり得る。

【0031】

本発明の凍結保存のための組成物と共に保存されることができ細胞は、動物細胞であり得るが、本発明の組成物により安定に凍結保存されることができいずれの細胞を使用することもできる。該細胞は、ヒト、サル、ブタ、ウマ、ヒツジ、イヌ、ネコ、ネズミ、ウサギ等から得られてもよく、とりわけ、該動物から得られる免疫細胞、腫瘍細胞、臍帯血細胞、幹細胞、上皮細胞、一次細胞等であり得る。

【0032】

加えて、本発明の凍結保存のための組成物は、バッファー、等張剤またはアポトーシス阻害剤をさらに含み得る。該バッファーは、クエン酸塩、リン酸塩、コハク酸塩、酒石酸塩、フマル酸塩、グルコン酸塩、シュウ酸塩、乳酸塩、酢酸塩、ヒスチジンおよびトリスからなる群より選択されるいずれか1つであり得る。一方、該等張剤は、クエン酸塩、リン酸塩、コハク酸塩、酒石酸塩、フマル酸塩、グルコン酸塩、シュウ酸塩、乳酸塩、酢酸塩、ヒスチジンおよびトリスからなる群より選択され得る。一方、該等張剤は、塩化ナトリウム、塩化カリウム、ホウ酸、ホウ酸ナトリウム、マンニトール、グリセリン、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、マルトース、スクロース、エリスリトール、アラビトール、キシリトール、ソルビトール、トレハロース、およびグルコースからなる

10

20

30

40

50

群より選択される1つであり得る。該アポトーシス阻害剤は、Rho関連キナーゼ(ROCK)阻害剤、カタラーゼ、およびzVAD-fmkからなる群より選択される1つであり得る。

【0033】

本発明は、凍結保存のための組成物が加えられる細胞を凍結する工程を含む、細胞の凍結保存のための方法を提供する。

【0034】

本発明に従う凍結保存のための組成物が加えられる細胞の凍結を、従来の方法、例えば、ガラス化凍結、緩慢凍結等により実施することができる。ガラス化凍結は、制御速度凍結(controlled rate freezing)(CRF)のような装置を用いて、1分あたり定速で温度を制御することにより細胞を凍結する方法である。温度が-80に到達すると、凍結された細胞は窒素タンク中で保管される。一方、緩慢凍結は、細胞を含有している凍結保存のための組成物を含有しているバイアルを、イソプロピルアルコールを含有している凍結用コンテナボックス中に入れ、次いで、-70以下の超低温フリーザー中で12~24時間、定速で温度を下げることにより細胞を凍結する方法である。その後、該凍結細胞を液体窒素タンク中で保管する。

10

【0035】

本発明の一実施形態によると、細胞の凍結保存のための方法は、ガラス化凍結であり得る。ガラス化凍結は、CRFを用いて、1)室温の細胞を4℃へ冷却すること；2)1分あたり-1℃で、-8℃へ冷却すること；3)1分あたり-2.5℃で、-6.5℃へ冷却すること；4)1分あたり1.5℃で、-1.4℃へ温度を上昇させること；5)1分あたり-1℃で、-4.5℃へ冷却すること；および6)1分あたり-1.0℃で、-9.0℃へ冷却することにより実施される。

20

【0036】

細胞の凍結保存のための上記の方法は、バイアル中において適当な濃度で細胞を含有することにより実施されることが出来る。細胞の濃度は、1バイアルあたり $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^8$ 細胞/ml、とりわけ、 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ 細胞/mlであってもよいが、該濃度は細胞型に応じて変化し得る。

【0037】

本発明は、本発明の組成物および活性成分としての免疫細胞を含む、がんまたは感染症を予防または処置するための医薬組成物を提供する。

30

【0038】

該組成物は、上記の細胞の凍結保存のための培地組成物と同様である。しかしながら、医薬組成物として使用する場合、含まれることができる細胞培養培地は、好ましくは、血清、フェノールレッドまたはβ-メルカプトエタノールのような無毒性物質を補足した培地である。従って、本発明の医薬組成物は、ヒト毒性を有さず、故に、解凍後、対象へ直接投与されることが出来る。

【0039】

本明細書で使用される場合、「免疫細胞」なる語は、ヒトの体の免疫応答に關与する細胞を意味し、ナチュラルキラー細胞、T細胞、B細胞、および樹状細胞等を包含する。とりわけ、該免疫細胞はナチュラルキラー細胞であり得る。

40

【0040】

上記がんは、膀胱がん、乳がん、胃がん、肺がん、卵巣がん、甲状腺がん、子宮頸がん、中枢神経系がん、神経膠腫、肝臓がん、皮膚がん、膵臓がん、胃がん、結腸がん、直腸がん、食道がん、腎臓がん、肺がん、上皮性がん、血液がん、前立腺がん、軟部組織肉腫、多発性硬化症等を包含し得る。

【0041】

本明細書で使用される場合、「感染症」なる語は、ウイルスまたは病原体の感染により引き起こされる病理学的状態を意味し、気道、血液、肌接触等により伝染または感染され得る全疾患を包含する。かかる感染症の例は、限定されないが、BおよびC型肝炎、ヒト

50

パピローマウイルス（HPV）感染、サイトメガロウイルス感染、ウイルス性呼吸器疾患、インフルエンザ等を包含する。

【0042】

本発明は、本発明の組成物および活性成分としての幹細胞を含む、変性疾患を予防または処置するための医薬組成物も提供する。

【0043】

該組成物は、上記の細胞の凍結保存のための培地組成物と同様である。しかしながら、医薬組成物として使用する場合、含まれることができる細胞培養培地は、好ましくは、血清、フェノールレッドまたはβ-メルカプトエタノールのような無毒性物質を補足した培地である。従って、本発明の医薬組成物は、ヒト毒性を有さず、故に、解凍後、対象へ直接投与されることができる。

10

【0044】

本明細書で使用される場合、「幹細胞」なる語は、種々の細胞へ分化することができる多能性を有する細胞を意味する。かかる幹細胞は、ヒト胚性幹細胞、骨髄幹細胞、間葉幹細胞、ヒト神経幹細胞、口腔粘膜固有層幹細胞等を包含し得る。とりわけ、該幹細胞は間葉幹細胞であり得る。

【0045】

本明細書で使用される場合、「変性疾患」なる語は、組織の不可逆的な量的損失により、組織が元の機能を失った病理学的状態を意味する。かかる変性疾患は、限定されないが、脳神経疾患、虚血性疾患、皮膚損傷、骨疾患および変性関節炎等を包含する。

20

【0046】

本発明は、本発明の組成物および活性成分としての間葉細胞を含む、免疫疾患を予防または処置するための医薬組成物も提供する。

【0047】

本明細書で使用される場合、「免疫疾患」なる語は、過度のまたは不所望の免疫応答により組織が損傷した任意の病理学的状態を意味する。従って、「免疫学的疾患」なる語は、「過活動免疫疾患」と同じ意味を有し、「免疫疾患を予防または処置するための組成物」は、「免疫抑制剤」と同じ意味を有する。

【0048】

かかる免疫疾患は、限定されないが、移植片対宿主疾患、移植片拒絶、慢性炎症性疾患、炎症性疼痛、神経障害性疼痛、慢性閉塞性肺疾患（COPD）および自己免疫疾患を包含する。

30

【0049】

本明細書で使用される場合、「自己免疫疾患」なる語は、免疫細胞が、自己と外来物質を区別することなく自己を攻撃する場合に生じる病理学的状態を意味する。自己免疫疾患は、限定されないが、リウマチ性関節炎、橋本甲状腺炎、グレーブス病、多発性硬化症、強皮症、重症筋無力症、I型糖尿病、アレルギー性脳脊髄炎、糸球体腎炎、白斑、ベーチェット病、クローン病、強直性脊椎炎、血小板減少性紫斑病、尋常性天疱瘡、自己免疫性貧血、副腎白質ジストロフィー（ALD）、および全身性エリテマトーデス（SLE）を包含する。

40

【0050】

本発明に従う医薬組成物は、上記の活性成分に加えて、医薬上許容される添加物をさらに含み得る。

【0051】

加えて、医薬組成物は、薬学の分野における従来の方法により、患者の体への投与に適した単位剤形中へ処方され得る。かかる目的に適した処方方は、非経口投与製剤としての溶液もしくは懸濁液、または局所製剤としての軟膏を包含する。本発明の組成物を処方する場合、充填剤、増量剤、結合剤、湿潤剤、崩壊剤、界面活性剤などの希釈剤、賦形剤等を共に使用してもよい。

【0052】

50

該組成物の投与量は、組成物全体に関して、体重1kgあたり約1 μ g~50mgであってもよく、免疫細胞および幹細胞のような治療用細胞の成人のための投与量は、1日あたり1~10⁸、10~10⁵、および10²~10³であり得る。上記の投与は、一度に、または1日数回に分割された投与量で実施されることができる。しかしながら、該投与量および投与回数は、患者の体重、年齢および性別、ならびに疾患の重篤度および投与経路のような因子を考慮して決定され得る。

【0053】

本発明の形態

以下、本発明を後述の実施例、比較例および実験例を参照して詳細に記載する。しかしながら、後述の実施例、比較例および実験例は、本発明を説明することを意図されており、本発明の範囲はそれに限定されない。

10

【0054】

実施例1-3.凍結保存のための培地組成物の調製

凍結保存のための培地組成物を調製するために、5mlのDMSO、25mlのデキストラン40、50mlのAlbumin Injection、および細胞培養培地として20mlのRPMI1640を混合した(実施例1)。また、実施例2および3において、ジメチルスルホキシド(DMSO、BIONICHE PHARMA、米国)、デキストラン40(Dai Han Pharm. Co., Ltd.)、Albumin Injection(Green Cross、韓国)およびRPMI1640(Gibco、米国)を含有する凍結保存のための培地組成物を、実施例1におけるのと同じ方法により、しかし下記の表1中に示される量で調製した。

20

【0055】

比較例1-6.凍結保存のための培地組成物の調製

上記の実施例に対する比較例として、5mlのDMSOおよび95mlのAlbumin Injectionを混合し、凍結保存のための培地組成物を調製した(比較例1)。また、比較例2-6において、ジメチルスルホキシド(DMSO、BIONICHE PHARMA、米国)、デキストラン40(Dai Han Pharm. Co., Ltd.)、Albumin Injection(Green Cross、韓国)およびRPMI1640(Gibco、米国)を含有する凍結保存のための培地組成物を、実施例1におけるのと同じ方法により、しかし下記の表1中に示される量で調製した。

30

【0056】

【表1】

	実施例1	実施例2	実施例3	比較例1	比較例2	比較例3	比較例4	比較例5	比較例6
DMSO(v/v%)	5	5	5	5	5	5	5	5	5
デキストラン40(v/v%)	25	25	25	-	25	25	25	25	25
Albumin Injection (v/v%)	50	35	20	95	70	10	5	1	0
RPMI1640(v/v%)	20	35	50	-	-	60	65	69	70

40

【0057】

実験例1.凍結および解凍後のNK細胞の評価

1.1.NK細胞の凍結および解凍

NK細胞を実施例1-3および比較例1-6において調製した凍結保存のための培地組成物中で凍結させ、次いで解凍して、凍結保存のための培地組成物を評価した。

【0058】

初めに、単核細胞をヒト末梢血(ソウル国際大学病院、韓国)から単離した。CliniMACSシステムを用いて、CD3陽性細胞を該単離単核細胞から除去し、その結果得

50

られたものを種細胞として使用した。一方、2,000 cGyでガンマ線を照射した単核細胞をNK細胞培養のための支持細胞として使用した。該種細胞および支持細胞を500 IU/mlのIL-2、10 µg/mlの抗CD3抗体OKT3および1 v/v%の血清を補足したCellGro(登録商標)SCGM培地(CellGenix、ドイツ)中で、 $0.5 \times 10^6 - 1 \times 10^6$ 細胞/mlで維持された濃度で培養した。該培養を14~21日間、37 °Cおよび5%CO₂の条件下で実施した。

【0059】

培養されたNK細胞を回収し、10分間、4 °Cおよび1,500 rpmの条件下で遠心分離した。得られたペレットをRPMI1640培地を用いて洗浄し、細胞数をカウントした。該細胞を15mlチューブ中へ 1×10^8 細胞/チューブで分注し、次いで、ペレットを得るために上記と同じ条件下で遠心分離した。得られたペレットを実施例1-3および比較例1-6において調製された凍結保存のための組成物中で凍結した。

10

【0060】

下記の表2中に示す条件下で、細胞を制御速度凍結(CRF)に付し、細胞凍結を実施するために、凍結された細胞を蒸気LN₂タンク中で、一定期間保管した。該凍結細胞を回収し、恒温槽中で37 °Cで急速に解凍した。該細胞を10%ウシ胎仔血清を補足した、細胞体積の10倍に相当するRPMI1640培地中へ懸濁させ、次いで、10分間、4 °Cおよび1,200 rpmの条件下で遠心分離して細胞を得た。

【0061】

【表2】

20

0ステップ	End Temp.+4°C
1ステップ	End Temp.-8°C;勾配-1°C/分
2ステップ	End Temp.-65°C;勾配-25°C/分
3ステップ	End Temp.-14°C;勾配+15°C/分
4ステップ	End Temp.-45°C;勾配-1°C/分
5ステップ	End Temp.-90°C;勾配-10.00°C/分

【0062】

1.2.NK細胞の培養

30

得られた細胞を500 IU/mlのIL-2および10%ウシ胎仔血清を補足したRPMI1640培地中へ再懸濁させ、 2×10^6 細胞/mlの濃度を得た。再懸濁した細胞(10ml)をT75フラスコ中に分注し、培養の3日目に等体積の培地を加え、7日間培養した。

【0063】

1.3.生存細胞数および生存率の試験

培養NK細胞の生存細胞数および生存率をADAM細胞カウンターAccustainキット(DigitalBio)を用い、製造業者のマニュアルに従って測定した。

【0064】

初めに、実験例1.2において培養した細胞をカウントし、PBSを用いて 1×10^6 細胞/mlの濃度へ希釈した。希釈された細胞を丸底96ウェルプレートの2つのウェル中へ14 µl/ウェルで分注した。総細胞数を測定することができるT溶液の14 µlを該2つのウェルの1つへ加え、希釈された細胞と混合し、次いで、該混合物の14 µlを回収し、カウンターチップのTパネル中に入れた。一方、死細胞数を測定することができるN溶液の14 µlを該2つのウェルのもう1つへ加え、希釈された細胞と混合し、次いで、該混合物の14 µlを回収し、カウンターチップのNパネル中に入れた。該チップをADAMカウンター中へ挿入し、生存細胞数を測定した。結果を図1a-1d中に示す。

40

【0065】

図1aおよび1c中に示される、凍結細胞の解凍およびその次のIL-2との培養後の回収率は、下記の表3および4中に示された凍結時点でのバイアル中の細胞数に基づいた

50

、解凍および I L - 2 との培養後の生存細胞数のパーセンテージとして示された。

【 0 0 6 6 】

【表 3】

	平均	標準偏差
比較例1	36	2
比較例2	60	5.8
実施例1	72	18.1
実施例2	82	6.2
実施例3	85	27.6

10

【 0 0 6 7 】

【表 4】

	平均	標準偏差
実施例3	78.5	13.6
比較例3	67.6	23.1
比較例4	58.9	2.4
比較例5	57.8	20.8
比較例6	45.0	6.5

20

【 0 0 6 8 】

一方、図 1 b および 1 d 中に示される、凍結細胞の解凍およびその次の I L - 2 との培養後の回収率は、下記の表 5 および 6 中に示された総細胞数に基づいた生存細胞数のパーセンテージとして示された。

【 0 0 6 9 】

【表 5】

	平均	標準偏差
比較例1	42	23
比較例2	67	13
実施例1	76	6
実施例2	80	11
実施例3	79	7

30

【 0 0 7 0 】

【表 6】

	平均	標準偏差
実施例3	72	6
比較例3	68	15
比較例4	66	11
比較例5	66	9
比較例6	65	11

40

【 0 0 7 1 】

図 1 a - 1 d および表 3 - 6 中に示すように、実施例 1 - 3 の凍結保存のための培地組成物を使用した場合、7日の培養後、細胞回収率および生存率は70%以上という高さであった。一方、DMSOおよびAlbumin Injection(比較例1)、DMSO、デキストラン40、およびAlbumin Injection(比較例2)、D

50

M S O、デキストラン40、および15 v / v %未満のAlbumin InjectionおよびRPMI 1640（比較例3 - 6）を含有する凍結保存のための培地組成物は、低い細胞回収率および生存率をもたらした。

【0072】

1.4.NK細胞活性の評価

実施例1 - 3および比較例1 - 6の凍結された培地中で凍結および解凍されたNK細胞の細胞活性を試験するために、腫瘍細胞をNK細胞で処理し、腫瘍細胞に対する細胞破壊能を試験した。ここで、実験例1.1において解凍直後に得られたNK細胞の活性および実験例1.2において培養後に得られたNK細胞の活性をそれぞれ評価した。

【0073】

初めに、腫瘍細胞であるK562細胞（ATCC、米国）を、10%ウシ胎仔血清を補足したRPMI 1640培地中で37 °Cおよび5%CO₂の条件下で培養した。該培養細胞をトリプシン処理により回収し、培養培地中で1 x 10⁶細胞/mlの濃度へ懸濁させた。次いで、1mMカルセインAM（Life Technologies、米国）を加え、30 μMの終濃度を得た。該細胞を1時間、37 °Cおよび5%CO₂の条件下で培養し、該腫瘍細胞を蛍光標識した。

【0074】

標識した腫瘍細胞を10mlの培養培地を用いて洗浄し、1 x 10⁵細胞/mlの濃度で再懸濁させ、次いで、96ウェル丸底プレート中へ100 μl / ウェルで分注した。実験例1.1および実験例1.2において解凍直後および培養後に得られた細胞を、NK細胞（エフェクター細胞、E）とK562細胞（標的細胞、T）の比がそれぞれ10 : 1、3 : 1および0.3 : 1となるように混合し、次いで、プレートへ100 μl / ウェルで加えた。ここで、自然放出のため、腫瘍細胞を等量の培地と共に加え、最大放出のため、腫瘍細胞を等量の2% Triton X - 100と共に加えた。

【0075】

混合物を4時間、37 °Cおよび5%CO₂の条件下で反応させ、次いで、3分間、4 °Cで2,000 rpmで遠心分離した。次いで、得られた上清100 μlを黒ウェルプレートへ移し、蛍光検出器を用いて385 nm / 450 nmの条件下で測定した。このようにして得られた蛍光測定値を用いて、NK細胞による腫瘍細胞の溶解率（%）を後述の等式（1）により算出し、図2a - 2d中に示し、下記の表7 - 10中に示した。ナチュラルキラー細胞ドナー数は表7において6であり、ナチュラルキラー細胞ドナー数は表8において3である。

【0076】

[式1]

【数1】

$$\text{溶解率 (\%)} = \frac{\text{サンプルウェル平均蛍光値} - \text{自然放出ウェル平均蛍光値}}{\text{最大放出ウェル平均蛍光値} - \text{自然放出ウェル平均蛍光値}} \times 100$$

【0077】

【表7】

解凍直後	比較例1	比較例2	実施例1	実施例2	実施例3
E10	44	60	59	65	76
E3	22	32	32	42	52
E1	8	13	12	17	24
E0.3	2	4	9	7	8

10

20

30

40

50

【 0 0 7 8 】

【表 8】

解凍直後	実施例3	比較例3	比較例4	比較例5	比較例6
E30	90	84	82	77	66
E10	65	53	50	47	37
E3	33	24	21	21	16
E1	13	10	7	9	6
E0.3	5	5	2	3	4

10

【 0 0 7 9 】

【表 9】

培養後	比較例1	比較例2	実施例1	実施例2	実施例3
E10	84	87	86	86	88
E3	68	82	77	76	77
E1	45	61	52	46	45
E0.3	17	28	21	19	18

【 0 0 8 0 】

【表 1 0】

培養直後	実施例3	比較例3	比較例4	比較例5	比較例6
E30	84	81	84	82	80
E10	83	82	82	77	73
E3	76	71	67	65	56
E1	50	41	35	34	29
E0.3	22	14	13	14	10

20

【 0 0 8 1 】

図 2 a および 2 b、および表 7 および 8 中に示すように、凍結細胞の解凍直後の腫瘍に対する細胞毒性は、アルブミンの含量が 10% 以下、もしくは 70% 以上いずれかである場合、実施例と比較してより低いことが分かった。一般に、活性化免疫細胞を凍結すると、該細胞の機能は、細胞の活性の減少により減退することが知られる。しかしながら、解凍細胞は、凍結保存培地の組成に応じて、種々の程度の活性を維持することが分かった。とりわけ、実施例 3 において、細胞が凍結後に解凍された場合に最も高い NK 細胞活性が維持されることが分かった。

30

【 0 0 8 2 】

一方、一定期間の培養後の凍結細胞の腫瘍細胞に対する細胞毒性の試験の結果を図 2 c および 2 d、および上記の表 9 および 10 中に示し、これらは全実施例および比較例が類似の細胞毒性を示すことを示した。該結果は、培地中に加えられた IL-2 によって、減少した NK 細胞の活性の培養中の回復によるものであると予期された。

40

【 0 0 8 3 】

実験例 2 . 解凍後の腫瘍細胞の評価

実施例 1 - 3 および比較例 1 - 6 において調製された凍結保存のための培地組成物を腫瘍細胞の凍結のために同様に用いることができるのかを試験した。

【 0 0 8 4 】

初めに、ヒト T リンパ腫細胞 Hu T 7 8 (ATCC、米国) およびヒト白血病細胞 K 5 6 2 (ATCC、米国) を、10% ウシ胎仔血清を補足した RPMI 1640 培地および 20% ウシ胎仔血清を補足した RPMI 1640 培地中で 37 °C および 5% CO₂ の条

50

件下でそれぞれ培養した。該培養細胞を回収し、各培養培地中で懸濁させた。次いで、該 H u T 7 8 細胞および K 5 6 2 細胞をバイアル中に入れ、それぞれ 1×10^7 細胞 / m l および 4×10^6 細胞 / m l の濃度で凍結させた。該細胞凍結は、上記の実験例 1 . 1 中に記載されたのと同じ方法により実施された。該凍結細胞を各培養培地中で再懸濁させ、該細胞を継代培養して 1×10^6 細胞 / m l の濃度を、4 日間、 $37^{\circ}C$ および $5\% CO_2$ の条件下で培養した。

【 0 0 8 5 】

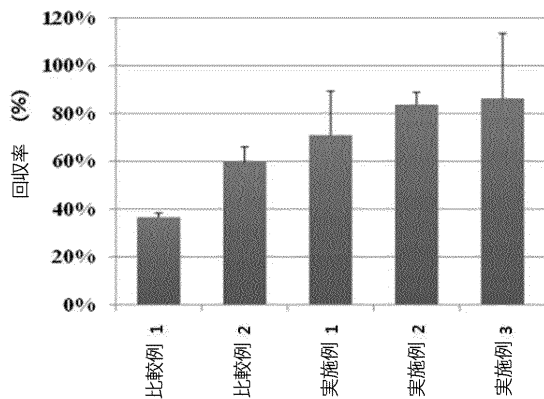
培養された細胞を、実験例 1 . 3 におけるのと同じ方法により生存細胞数および生存率について測定した。H u T 7 8 細胞の生存細胞数および生存率を図 3 a および 3 b 中に示し、K 5 6 2 細胞のものを図 4 a および 4 b 中に示した。

10

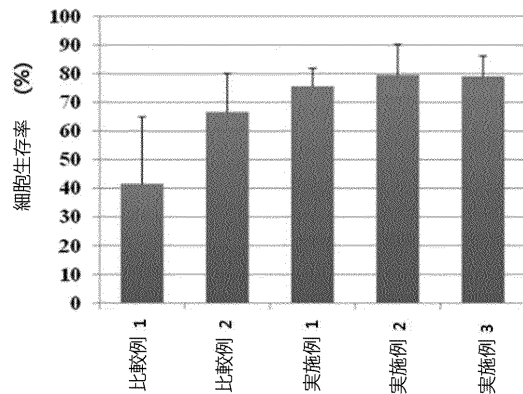
【 0 0 8 6 】

結果として、実施例 1 - 3 の凍結保存のための培地組成物中、および比較例 2 の凍結保存のための培地組成物中の腫瘍細胞 H u T 7 8 および K 5 6 2 細胞の生存細胞数および生存率は、図 3 a - 4 b 中に示されるように、類似していることが分かった。一方、比較例 1 の凍結保存のための培地組成物は、著しく低い生存細胞数および生存率を示した。

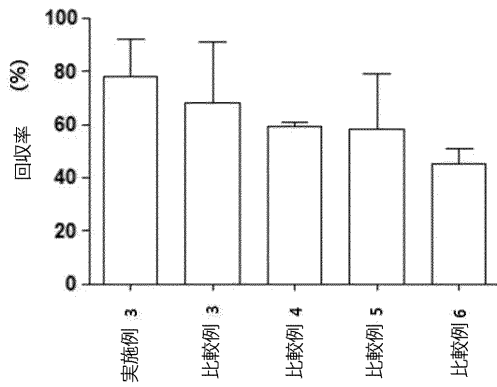
【 図 1 a 】



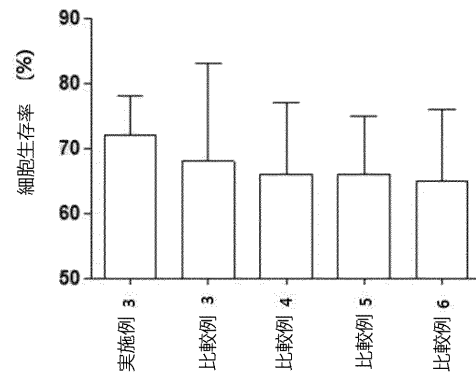
【 図 1 b 】



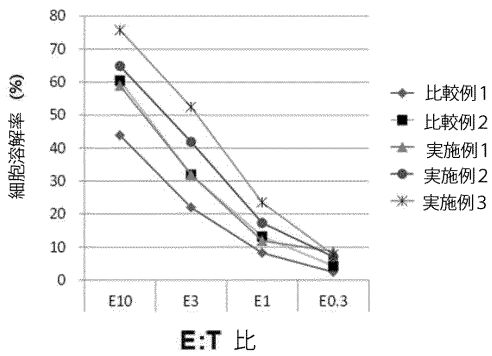
【図 1 c】



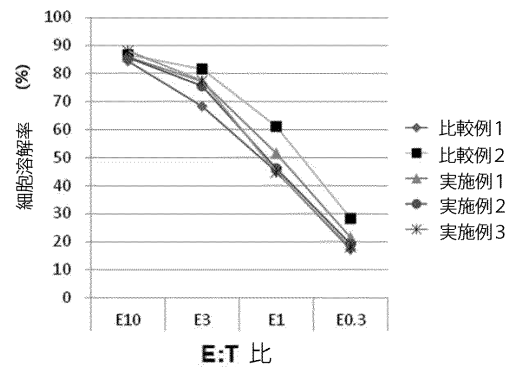
【図 1 d】



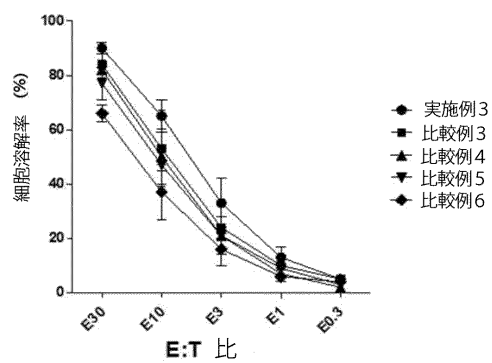
【図 2 a】



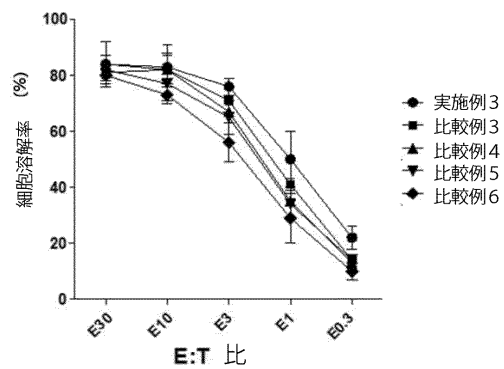
【図 2 c】



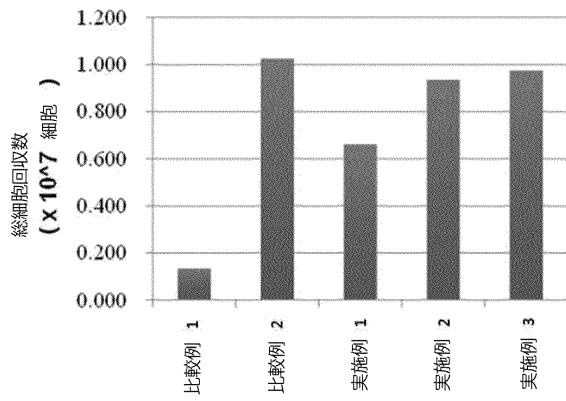
【図 2 b】



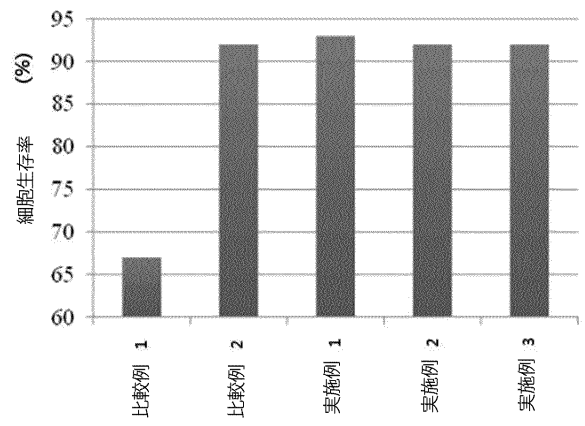
【図 2 d】



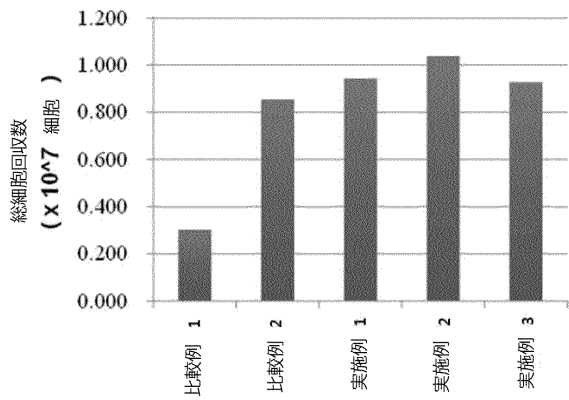
【 図 3 a 】



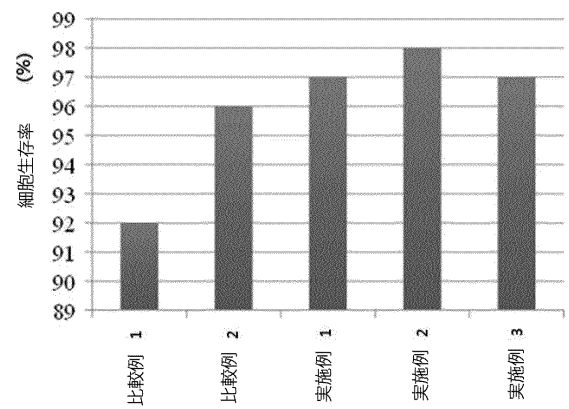
【 図 3 b 】



【 図 4 a 】



【 図 4 b 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 K	35/28 (2015.01)	A 6 1 K 35/28
A 6 1 P	31/00 (2006.01)	A 6 1 P 31/00
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 P	25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28
A 6 1 P	9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/10
A 6 1 P	17/02 (2006.01)	A 6 1 P 17/02
A 6 1 P	19/08 (2006.01)	A 6 1 P 19/08
A 6 1 P	19/02 (2006.01)	A 6 1 P 19/02
A 6 1 P	37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00

- (72)発明者 ファン・ユギョン
大韓民国 1 6 9 2 4 キョンギド、ヨンインシ、キフング、イヒョンロ 3 0 ボンギル 1 0 7
- (72)発明者 ミン・ボギョン
大韓民国 1 6 9 2 4 キョンギド、ヨンインシ、キフング、イヒョンロ 3 0 ボンギル 1 0 7
- (72)発明者 チェ・ハナ
大韓民国 1 6 9 2 4 キョンギド、ヨンインシ、キフング、イヒョンロ 3 0 ボンギル 1 0 7
- (72)発明者 キム・ヒョジン
大韓民国 1 6 9 2 4 キョンギド、ヨンインシ、キフング、イヒョンロ 3 0 ボンギル 1 0 7

審査官 宮岡 真衣

- (56)参考文献 米国特許出願公開第 2 0 0 8 / 0 1 7 1 0 1 9 (US, A 1)
中国特許出願公開第 1 0 4 8 2 3 9 6 7 (CN, A)
中国特許出願公開第 1 0 5 0 8 7 4 7 2 (CN, A)
特表 2 0 1 5 - 5 2 6 0 8 8 (JP, A)
米国特許出願公開第 2 0 1 4 / 0 2 2 0 5 5 1 (US, A 1)
国際公開第 2 0 1 7 / 0 7 3 6 5 6 (WO, A 1)
特表 2 0 1 6 - 5 0 1 8 7 3 (JP, A)
国際公開第 2 0 1 5 / 0 9 0 2 3 0 (WO, A 1)
特開 2 0 1 5 - 0 6 1 5 2 0 (JP, A)
国際公開第 2 0 0 3 / 0 6 4 6 3 4 (WO, A 1)
特開 2 0 1 5 - 2 3 2 0 0 0 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 / 0 0 - 1 / 0 4
C 1 2 N 5 / 0 0 - 5 / 0 9 5
A 6 1 K 3 5 / 1 2 - 3 5 / 5 5
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S (S T N)