

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6775426号
(P6775426)

(45) 発行日 令和2年10月28日 (2020. 10. 28)

(24) 登録日 令和2年10月8日 (2020. 10. 8)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 5/0783 (2010. 01)	C 1 2 N 5/0783
C 1 2 N 5/10 (2006. 01)	C 1 2 N 5/10
A 6 1 K 35/17 (2015. 01)	A 6 1 K 35/17 A
A 6 1 P 35/00 (2006. 01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 P 35/02 (2006. 01)	A 6 1 P 35/02

請求項の数 8 (全 25 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-572917 (P2016-572917)	(73) 特許権者	516267027
(86) (22) 出願日	平成27年3月9日 (2015. 3. 9)		エメルセル エスエーエス
(65) 公表番号	特表2017-508479 (P2017-508479A)		フランス国 エフー 3 4 2 7 0 サンーマ
(43) 公表日	平成29年3月30日 (2017. 3. 30)		チューードートレヴィエ シェマン ド
(86) 国際出願番号	PCT/EP2015/054837		オピタル 3 6
(87) 国際公開番号	W02015/132415	(73) 特許権者	516267038
(87) 国際公開日	平成27年9月11日 (2015. 9. 11)		インスティテュート ナショナル ド ラ
審査請求日	平成30年3月9日 (2018. 3. 9)		サンテ エト ド ラ レチュルシー
(31) 優先権主張番号	14305332. 0		メディカレ (インサーム)
(32) 優先日	平成26年3月7日 (2014. 3. 7)		フランス国 エフー 7 5 0 1 3 パリ リ
(33) 優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁 (EP)		ュー ド トルビアック 1 0 1
前置審査			
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 臍帯血由来のプールNK細胞並びにがん及び慢性感染症の治療のためのこれらの用途

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(A) 少なくとも n 個のUCBユニット、又はNK細胞を含有する前記UCBユニットの分画から初代NK細胞を含む細胞の集団を作製するステップであって、

(i) $n = 2$ である、少なくとも n 個の臍帯血ユニット (UCBユニット)、又は初代NK細胞を含有する前記UCBユニットの分画を提供することと、

(i i) 前記少なくとも n 個のUCBユニット、又は前記分画をプールして、細胞の集団を作製することを含む、ステップと、

(B) 前記ステップ (A) で得られた前記細胞の集団に含まれる初代NK細胞を適切な培地で増殖及び活性化して、増殖された活性化NK細胞の集団を作製するステップと、

(C) 前記増殖された活性化NK細胞を回収するステップとを含む、増殖された活性化NK細胞の集団を作製する方法であって、

前記方法は、ステップ (A) において、(i i i) 前記 (i i) で得られた前記細胞の集団からT細胞を枯渇させること、又は、前記UCBユニットをプールする前記 (i i) の前に、前記 n 個のUCBユニットのそれぞれに含有されるT細胞を枯渇させることを含み、

プールされた際の前記 n 個のUCBユニットが、主要HLAクラスI群遺伝子型について同一パターンを呈し、

前記主要HLAクラスI群が、KIR3DL2によって認識されるHLA A3/A11; KIR3DL1によって認識されるHLA Bw4; KIR2DL2/3によって認

10

20

識される H L A C 1 群 ; 及び K I R 2 D L 1 によって認識される H L A C 2 群からなる群から選択され、

前記ステップ (B) において前記初代 N K 細胞を増殖及び活性化するための前記適切な培地が、補助細胞を含み、

前記補助細胞と増殖及び活性化される初代 N K 細胞は、H L A - K I R 不一致である、方法。

【請求項 2】

前記ステップ (A) において、前記 n 個の U C B ユニットの各々は、前記 U C B ユニットのプールする前記 (i i) の前に T 細胞が枯渇させられている、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

前記補助細胞は、線照射、X 線照射、又は U V 照射細胞である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記補助細胞は不死化されている、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記 n 個の U C B ユニットの各々又は前記 U C B ユニットのプールは、赤血球が枯渇されている、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記ステップ (A) において使用される前記 U C B ユニットは、凍結保存された U C B ユニットから解凍された U C B ユニットである、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 7】

前記適切な培地が、少なくとも 1 つの適切な N K 活性化因子をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

プールされ増殖された活性化 N K 細胞の少なくとも 2 つの異なる製造ロットを、U C B ユニットから作製する方法であって、増殖及び活性化された製造ロットの各集団は、請求項 1 に記載の方法により製造され、阻害性 K I R である K I R 2 D L 2、K R 2 D L 3、K I R 2 D L 1、K I R 3 D L 1 及び K I R 3 D L 2 からなる群より選択される主要阻害性 K I R の 1 つについての異なる非発現を示す、方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、細胞治療分野、特に N K 細胞を介した治療に関する。本発明は、エキソビボ (e x v i v o) 細胞の集団 (好ましくは N K 細胞の集団) を、少なくとも 2 つの臍帯血ユニット (U C B ユニット) 又は上記細胞の集団を含有するその分画から、上記少なくとも 2 つの U C B ユニットをプールして上記細胞の集団を作製することにより、作製する方法に関する。本発明は、治療用途のための (好ましくはがん及び慢性感染症の治療のための) 組成物としての、本発明に係るプロセスにより入手可能又は入手された上記細胞 (好ましくは N K 細胞) の用途に関する。

40

【背景技術】

【0002】

ナチュラルキラー (N K) 細胞は自然免疫系の基本成分である。N K 細胞は、腫瘍細胞、及びウイルス又は細菌に感染した細胞を認識し破壊する能力がある (非特許文献 1) 。過去 20 年に亘る N K 細胞レポーター及びそれらのリガンドの同定及び特徴付けによって、腫瘍細胞による N K 細胞活性化の分子メカニズムが解明された。抑制性受容体の発見は、その先駆的な研究によって N K 細胞が主要組織適合遺伝子複合体 (M H C) クラス I 分子を欠損した腫瘍細胞を殺傷することを示した K a r r e によって提唱された「ミッシング・セルフ (m i s s i n g s e l f) 」仮説を裏付けた。抑制性受容体は M H C クラス I 分子を認識する一方、活性化受容体は種々様々なリガンドを認識する (非特許文献 2

50

）。

【0003】

NK細胞は、最小のGvH（移植片対宿主）効果及びHvG（宿主対移植片）効果を伴う移植片対白血病（GvL）効果の原因であり、NK細胞が関与する免疫療法の開発に関心が向けられている。いくつかの研究室から得られたデータは、NK細胞のアロ反応性の利用が、NK細胞供給源とは無関係に、大きな利点となり得ることを示唆している。不適合移植はNK細胞によって仲介されるアロ反応性のトリガーとなり、これは「非自己認識（missing self recognition）」に基づいている。ドナー対レシピエントのNK細胞のアロ反応は、HLA-C対立遺伝子群、HLA-Bw4群及び／又はHLA-A3/11が不一致である個人間で発生する。移植片対宿主方向KIRリガンド不一致ではなかった20組のドナー-レシピエントペアにおいて、ドナーアロ反応性NKクローンが見出されなかったことから、KIRリガンド不一致はNK細胞のアロ反応性に必須である。

10

【0004】

NK細胞の別の興味深い点は、たとえNK細胞が主にそれらの抑制性受容体で自己同一性分子（self-identity molecule）（HLA分子）も認識しても、NK細胞が、活性化シグナルと阻害性シグナルの複合的平衡を介して活性化され、感染細胞、異常細胞又は腫瘍性細胞によってのみ発現される活性化シグナルを、これらの細胞を殺傷するために必要とすることである。更に、NK細胞のみを用いた場合、ドナー及び患者は全く同じ主要HLA対立遺伝子を発現する必要がない（例えば、全臍帯血（UCB）移植において、HLA一致が>4/6）ため、ドナー選択がより容易となる。対照的に、レシピエントが一致したHLAを発現していない場合（阻害性シグナルの欠如=iKIR-HLA不一致）、抑制性受容体を発現するNKは、GvHDをもたらすことなく、より良好な腫瘍殺傷を達成する。

20

【0005】

NK細胞が天然の細胞傷害能を有していたとしても、それらの細胞障害活性は、様々な活性化メカニズムによってインビトロで改善することができ、これらのメカニズムの大部分は、NK細胞を（可変の増幅率で）増幅し、より治療効果の高い細胞をより効率的にもたらすことも可能である。

【0006】

NK細胞を増幅／活性化する良い方法を発見することは、これらの細胞の治療ポテンシャル（量及び作用強度）を向上させるために重要である。

30

【0007】

インビトロにおける活性化プロトコルには、末梢血単核球、腫瘍性細胞又は腫瘍性細胞株等の補助細胞の有無にかかわらず、IL-2、IL-15、IL-18、IL-21、SCF、Flt3-L（...）等のサイトカイン及び増殖因子の使用が含まれる（M. Villalba Gonzales et al. による特許文献1を参照）。特定のiKIR-HLA不一致（4つの主要iKIR-HLA不一致：HLA A3/A11；HLA Bw4；HLA C1；HLA C2及び関連iKIR受容体）を示す補助細胞の使用。

40

【0008】

臍帯血（UCB）は、NK細胞の良好な供給源であり、NK細胞の割合がより高く、インビボ発現／活性化が良好であることが示されている（M. Villalba Gonzales et al. による特許文献2を参照）。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0009】

【特許文献1】国際公開第WO2009/141729号公報

【特許文献2】国際公開第WO2012/146702号公報

【非特許文献】

50

【 0 0 1 0 】

【非特許文献 1】Lanier LL, 2008; Nat Immunol 9: 495 - 502

【非特許文献 2】P. A. Mathew, J Cell Sci Ther, Volume 3, Issue 7

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 1 1 】

しかし、1UCBユニットに含有されるNK細胞を良好な増幅率で増幅及び活性化することが可能ではあるものの、利用可能であり、純度が高く、高い発現率及び活性化状態を有し、NK細胞の細胞障害活性を示す臨床治療のための細胞産物（特にNK細胞産物）が提供されることが望まれている。

10

【 0 0 1 2 】

更に、上記方法は、少なくとも1人より多い（好ましくは50人、より好ましくは約100人の）患者を治療することを見込んで、同一のバッチ（製造ロット）において、大量の細胞（特に活性化NK細胞）の生産を可能とすることが望ましく、治療薬は可能な限り可変性が少ないことが必要であろう。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 1 3 】

この目的を達成するために、医薬品及び医薬部外品の製造管理及び品質管理規則（cGMP）、規制当局の商業規模の生産・化学、製造及び管理の基準に従った細胞生産プロセスで、同一の生産ロットで、大量の、特定の、濃縮された（enriched）細胞集団を入手するための能力を与える方法を提供することが望ましいであろう。

20

【 0 0 1 4 】

これが本発明の目的である。

初めて、そして驚くべき方法で、本出願人は、異なるドナーに由来するNK細胞を増幅しプールすることに成功した。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 5 】

【図 1】図 1（図 1（A）～図 1（C））は、本発明の製造プロセスの一例を示す模式図である。

30

【図 2】図 2 は、CD3 枯渇後又は CD3 枯渇無しで得られた NK 増殖を示す図である。

【図 3】図 3 は、CD3 枯渇後又は CD3 枯渇無しで得られた NK 増殖を示す図である。

【図 4】図 4 は、プールされた CD3 枯渇 UCB ユニットから得られた NK 増殖を示す図である。

【図 5】図 5 は、5 つのプールされた CD3 枯渇 UCB ユニットから得られた NK 増殖を示す図である。

【図 6】図 6 は、事前の CD3 枯渇無しでプールされた UCB ユニットから得られた NK 増殖を示す図である。

【図 7】図 7 は、CD3 非枯渇 UCB を用いた 9 日間の培養の後に、プールされた UCB ユニットから得られた NK 増殖を示す図である。

40

【図 8】図 8 は、PLH 補助細胞を用いて増幅され、2 つの KIR - HLA 一致 UCB を用いて得られた NK 増殖の増幅率を示す図である。

【図 9】図 9 は、PLH 補助細胞を用いて増幅され、2 つの KIR - HLA 不一致 UCB を用いて得られた NK 増殖の増幅率を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 6 】

第一の実施形態によれば、本発明は、下記工程を含む、細胞の集団を作製する方法に関する：

（a）少なくとも n 個（ここで、n ≥ 2、好ましくは 2 < n ≤ 100 である）の、臍帯

50

血ユニット（UCBユニット）又は上記細胞を含有するその分画、を準備する工程；及び（b）上記少なくともn個のUCBユニット又は上記細胞を含有するその分画をプールして、細胞の集団を作製する工程。

より好ましい実施形態では $3 \leq n \leq 50$ であり、 $3 \leq n \leq 25$ が最も好ましい。

【0017】

本発明との関連で、「細胞を含有するUCBユニットの分画」とは、作製されることが望まれる細胞の集団又は当該細胞の集団の一部を少なくとも含有するUCBユニットの分画を示すことが意図される。

【0018】

好ましい様式では、本発明は、

（c）工程（b）で得られたプールに含まれるT細胞を枯渇させる工程、を更に含む、本発明に係る方法に関する。

【0019】

別の好ましい実施形態によれば、本発明は、プール工程（b）の前に、n個のUCBユニットのそれぞれに含有されるT細胞を枯渇させる工程を含む本発明に係る方法に関する。

【0020】

本発明は更に、工程（b）でプールされたn個のUCBユニットが主要HLAクラスI群遺伝子型について同一パターンを示す本発明に係る方法を提供する。

【0021】

本明細書において、「主要HLAクラスI群遺伝子型について同一パターンを示す」とは、そのHLA分子の群が同一の阻害性KIRによって認識される、又は、好ましくは、プールされたn個のUCBに存在する各HLA群がNK細胞による同一の主要阻害性KIRによって認識される、UCBユニットを示すことが意図される。

【0022】

別の好ましい実施形態において、本発明は、プールされたn個のUCB中に存在する各UCBが同一の阻害性KIRによって認識されるHLA群に属する、本発明に係る方法に関する。

【0023】

本明細書で使用される場合、「KIR」又は「阻害性KIR」という用語は、当該技術分野における一般的な意味を有し、限定はされないが、KIR2DL1、KIR2DL2、KIR2DL3、KIR3DL1及びKIR3DL2が挙げられる。

【0024】

主要な（main/major）阻害性KIRは、KIR2DL1、KIR2DL2、KIR2DL3、KIR3DL1及びKIR3DL2である。

【0025】

KIR2DL1は、HLA-Cw4及び関連する「2群」対立遺伝子を認識する。KIR2DL2及びKIR2DL3は、HLA-Cw3及び関連する「1群」対立遺伝子を認識する。KIR3DL1は、Bw4モチーフを有するHLA-Bアロタイプの受容体である。最後に、KIR3DL2は、HLA-A3/11の受容体である。

【0026】

別の好ましい実施形態において、本発明は、主要HLAクラスI群が、KIR3DL2によって認識されるHLA-A3/A11、KIR3DL1によって認識されるHLA-Bw4、KIR2DL2/3によって認識されるHLA-C1群、及びKIR2DL1によって認識されるHLA-C2群からなる群から選択される、本発明に係る方法に関する。

【0027】

UCBユニットの好ましい供給源はヒトUCBユニットである。

【0028】

特に好ましい実施形態では、上記供給源は、凍結ヒトUCBの供給源である。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 9 】

別の態様において、本発明は更に、 n 個のUCBユニット中に含有される細胞から、細胞の増殖された集団を作製する方法を提供し、当該方法は下記工程を含む：

(A) 本発明に係る細胞の集団を作製する方法によって、少なくとも n 個のUCBユニット又は上記細胞を含有するその分画から、細胞の集団を作製する工程であって、所望により、工程(A)の前に、各UCBユニットを上記細胞について予備的且つ別々に増殖させてもよい、上記工程；及び

(B) 工程(A)で得られた細胞の集団から得られた所望の細胞を適切な培地中で増殖させて、所望の細胞の増殖された集団を作製する工程。

【 0 0 3 0 】

10

本発明の n 個のUCBユニット中に含有される細胞から細胞の増殖された集団を作製する方法において、工程(A)におけるプール工程(b)の前に各UCBユニットが細胞について予備的且つ別々に増殖されている場合には、工程(B)は任意の工程とすることができる。

【 0 0 3 1 】

別の好ましい態様では、本発明は更に、 n 個のUCBユニット中に含有される所望の細胞から分化細胞の集団を作製する方法を提供し、当該方法は下記工程を含む：

(A) 本発明に係る細胞の集団を作製する方法によって、上記 n 個のUCBユニット又は上記所望の細胞を含有するその分画から、細胞の集団を作製する工程であって、所望により、工程(A)の前に、各UCBユニットを細胞について予備的且つ別々に分化させてもよい、上記工程；及び

20

(B) 上記工程で得られた所望の細胞を適切な培地中で分化させて、上記分化細胞の集団を作製する工程。

【 0 0 3 2 】

n 個のUCBユニット中に含有される細胞から分化細胞の集団を作製する本発明の方法では、工程(A)におけるプール工程(b)の前に各UCBユニットが細胞について予備的且つ別々に増殖されている場合には、分化工程(B)は任意の工程とすることができる。

【 0 0 3 3 】

別の好ましい態様では、本発明は更に、活性化ナチュラルキラー(NK)細胞を含む細胞の集団を作製する方法を提供し、当該方法は下記工程を含む：

30

(A) 本発明に係る細胞の集団を作製する方法によって、少なくとも n 個のUCBユニット又はNK細胞を含有するその分画から、活性化NK細胞を含む細胞の集団を作製する工程であって、所望により、工程(A)の前に、各UCBユニットをNK細胞について予備的且つ別々に増殖してもよい、上記工程；

(B) 工程(A)で得られたNK細胞を適切な培地中で活性化して、活性化NK細胞を含む細胞の集団を作製する工程；

(C) 所望により、活性化NK細胞を上記集団から回収する工程。

【 0 0 3 4 】

別の好ましい態様では、本発明は更に、増殖された活性化NK細胞の集団を作製する方法を提供し、当該方法は下記工程を含む：

40

(A) 本発明に係る細胞の集団を作製する方法によって、少なくとも n 個のUCBユニット又はNK細胞を含有するその分画から、NK細胞を含む細胞の集団を作製する工程であって、所望により、工程(A)の前に、各UCBユニットをNK細胞について予備的且つ別々に増殖及び活性化してもよい、上記工程；

(B) 工程(A)で得られたNK細胞を適切な培地中で増殖及び活性化して、増殖された活性化NK細胞の集団を作製する工程；及び

(C) 所望により、上記増殖された活性化NK細胞を回収する工程。

【 0 0 3 5 】

本発明は更に、 n 個のUCBユニットから増殖された(所望により活性化された)NK

50

細胞の集団を作製する方法を含み、当該方法は下記工程を含む：

(i) 少なくとも n 個 (ここで、 $n \geq 2$ 、好ましくは $2 < n \leq 100$ 又は $3 \leq n \leq 50$ 、より好ましくは $3 \leq n \leq 25$) の UCB ユニット又は NK 細胞を含有するその分画を準備する工程であって、上記少なくとも n 個の UCB ユニットが、主要 HLA クラス I 群遺伝子型について同一パターンを示す (好ましくは、プールされた n 個の UCB に存在する各 HLA 群が同一の主要阻害性 KIR によって NK 細胞により認識される) 工程；

(i i) 好ましくは密度勾配分離により、より好ましくは Ficoll - Paque (登録商標) 密度勾配分離により、Hetastarch (ヒドロキシエチルデンプン ; HES) 法により、PrepaCyte (登録商標) CB 装置の使用により、又は凍結・解凍工程により、所望により各 UCB ユニットの赤血球 (red cell / erythrocyte) を枯渇させる工程；

(i i i) 所望により、工程 (i) 又は工程 (i i) で得られた細胞の集団を、工程 (i v) の前に、凍結、液体窒素中で維持、及び解凍する工程；

(i v) 各 UCB ユニット中に含有される T 細胞を枯渇させる工程；

(v) 上記工程で得られた UCB ユニットのそれぞれについて、1 UCB ユニット又は NK 細胞を含有するその分画に含有される NK 細胞を適切な培地中に、好ましくは 3 日間 ~ 28 日間、接触させることにより、各 UCB ユニットに含有される NK 細胞を別々に増殖 (及び所望により活性化) して、各 UCB ユニット中の上記増殖された集団 (及び所望により、活性化 NK 細胞) を作製する工程；

(v i) 上記工程の UCB ユニット群中、又は NK 細胞を含有するその分画中に得られた n 個の UCB ユニットからの細胞群をプールして、プールされ、増殖され、所望により活性化された NK 細胞の集団を作製する工程。

【 0036 】

本発明はまた、 n 個の UCB ユニットから、増殖され、所望により活性化された NK 細胞の集団を作製する方法を含み、当該方法は下記工程を含む：

(i) 少なくとも n 個 (ここで、 $n \geq 2$ 、好ましくは $2 \leq n \leq 100$ 又は $3 \leq n \leq 50$ 、より好ましくは $3 \leq n \leq 25$) の UCB ユニット又は NK 細胞を含有するその分画を準備する工程であって、上記少なくとも n 個の UCB ユニットが、主要 HLA クラス I 群遺伝子型について同一パターンを示す (好ましくは、プールされた n 個の UCB 中に存在する各 HLA 群が同一の主要阻害性 KIR によって NK 細胞により認識される) 工程；

(i i) 好ましくは密度勾配分離により、より好ましくは Ficoll - Paque (登録商標) 密度勾配分離 (Ficoll - Paque PREMIUM 型 (登録商標)) により、Hetastarch (ヒドロキシエチルデンプン ; HES) 法により、PrepaCyte (登録商標) CB 装置の使用により、又は凍結・解凍工程により、所望により各 UCB ユニットの赤血球を枯渇させる工程；

(i i i) 所望により、工程 (i) 又は工程 (i i) で得られた細胞の集団を、工程 (i v) の前に、凍結、液体窒素中で維持、及び解凍する工程；

(i v) 上記工程で得られた UCB ユニット群のそれぞれについて、1 UCB ユニット又は NK 細胞を含有するその分画に含有される NK 細胞を適切な培地中に、好ましくは 3 日間 ~ 28 日間、接触させることにより、各 UCB ユニットに含有される NK 細胞を別々に増殖 (及び所望により活性化) して、各 UCB ユニットについて、上記増殖された集団 (及び所望により、活性化 NK 細胞) を作製する工程；

(v) 上記工程の UCB ユニット群中、又は NK 細胞を含有するその分画中に得られた n 個の UCB ユニットからの細胞群をプールして、プールされ、増殖され、所望により活性化された NK 細胞の集団を作製する工程；及び

(v i) 所望により、工程 (v) の後に、得られたプールされた NK 細胞に含まれる T 細胞を枯渇させる工程。

【 0037 】

好ましい実施形態において、工程 (v) 後に得られたプールされた NK 細胞に含まれる T 細胞を枯渇させる工程 (v i) は、所望により実施される工程ではなく、特許請求され

10

20

30

40

50

た方法の一部である。

【 0 0 3 8 】

別の好ましい実施形態において、工程 (v) 後に得られたプールされた N K 細胞に含まれる T 細胞を枯渇させる工程 (v i) の後には、当該プロセスの最後に残っている非活性化 N K 細胞を除去することがなお望ましいかどうかにかかわらず、 C D 5 6 + バイオマーカーを発現する N K 細胞を選択する工程が続く。

【 0 0 3 9 】

本発明はまた、 n 個の U C B ユニットから、増殖 (所望により活性化) された N K 細胞の集団を作製する方法を含み、当該方法は下記工程を含む：

(i) 少なくとも n 個 (ここで、 $n \geq 2$ 、好ましくは $2 < n \leq 100$ 又は $3 \leq n \leq 50$ 、より好ましくは $3 \leq n \leq 25$) の U C B ユニット又は N K 細胞を含有するその分画を準備する工程であって、上記少なくとも n 個の U C B ユニットが、主要 H L A クラス I 群遺伝子型について同一パターンを示す (好ましくは、プールされた n 個の U C B 中に存在する各 H L A 群が同一の主要阻害性 K I R によって N K 細胞により認識される) 工程；

(i i) 好ましくは密度勾配分離により、より好ましくは F i c o l l - P a q u e (登録商標) 密度勾配分離により、 H e t a s t a r c h (ヒドロキシエチルデンプン； H E S) 法により、 P r e p a C y t e (登録商標) C B 装置の使用により、又は凍結・解凍工程により、所望により各 U C B ユニットの赤血球を枯渇させる工程；

(i i i) 所望により、工程 (i) 又は工程 (i i) で得られた細胞の集団を、工程 (i v) の前に、凍結、液体窒素中で維持、及び解凍する工程；

(i v) 所望により又は好ましくは、各 U C B ユニットに含有される T 細胞を枯渇させる工程；

(v) 上記工程の U C B ユニット群中、又は N K 細胞を含有するその分画中に得られた n 個の U C B ユニットからの細胞群をプールして、プールされた N K 細胞の集団を作製する工程；及び

(v i) プール又は N K 細胞を含有するその分画に含有される N K 細胞を適切な培地中に、好ましくは 1 ~ 5 週間、接触させることにより、上記工程で得られたプールされた N K 細胞を増殖 (所望により活性化) して、上記プールされ、増殖され、所望により活性化された N K 細胞の集団を作製する工程であって、好ましくは、当該増殖 / 活性化工程の全期間が 9 ~ 28 日間である場合、当該増殖工程後の N K 細胞の増幅率が少なくとも 100、好ましくは 200、300 又は 500 である、上記工程。

【 0 0 4 0 】

本発明はまた、 n 個の U C B ユニットから、増殖され、所望により活性化された N K 細胞の集団を作製する方法を含み、当該方法は下記工程を含む：

(i) 少なくとも n 個 (ここで、 $n \geq 2$ 、好ましくは $2 < n \leq 100$ 又は $3 \leq n \leq 50$ 、より好ましくは $3 \leq n \leq 25$) の U C B ユニット又は N K 細胞を含有するその分画を準備する工程であって、上記少なくとも n 個の U C B ユニットが、主要 H L A クラス I 群遺伝子型について同一パターンを示す (好ましくは、プールされた n 個の U C B 中に存在する各 H L A 群が同一の主要阻害性 K I R によって N K 細胞により認識される) 工程；

(i i) 好ましくは密度勾配分離により、より好ましくは F i c o l l - P a q u e (登録商標) 密度勾配分離により、 H e t a s t a r c h (ヒドロキシエチルデンプン； H E S) 法により、 P r e p a C y t e (登録商標) C B 装置の使用により、又は凍結・解凍工程により、所望により各 U C B ユニットの赤血球を枯渇させる工程；

(i i i) 所望により、工程 (i) 又は工程 (i i) で得られた細胞の集団を、工程 (i v) の前に、凍結、液体窒素中で維持、及び解凍する工程；

(i v) 上記工程の U C B ユニット群中、又は N K 細胞を含有するその分画中に得られた n 個の U C B ユニットからの細胞群をプールして、プールされた N K 細胞の集団を作製する工程；

(v) 所望により又は好ましくは、工程 (i v) の後に得られたプールされた N K 細胞に含まれる T 細胞を枯渇させる工程；及び

(v i) プール又はNK細胞を含有するその分画に含有されるNK細胞を適切な培地中に、好ましくは1～5週間、接触させることにより、上記工程で得られたプールされたNK細胞を増殖し、所望により活性化して、上記プールされ、増殖され、所望により活性化されたNK細胞の集団を作製する工程であって、好ましくは、当該増殖/活性化工程の全期間が9～28日間である場合、当該増殖工程後のNK細胞の増幅率が少なくとも100、200、300又は500である、上記工程。

【0041】

活性化/増殖されたNK細胞の作製に関連する本発明に係る全ての方法は、以下のKIRのうちの1つの発現欠損を有する、プールされたUCBユニット由来の活性化NK細胞の作製に特に適している：KIR2DL2及びKIR2DL3、KIR2DL1、KIR3DL1及びKIR3DL2。従って、この場合、本発明に従って作製された上記のような、活性化/増殖されたプールされたNK細胞は、対応するKIRリガンドを欠損した他者に由来する細胞に対しアロ反応性となり、逆に、同一のKIRリガンドを有する別の個体由来の細胞には寛容性となる。

【0042】

従って、本発明の方法によって、本発明のNK細胞を作製する方法によって得られる、プールされた活性化/増殖NK細胞の少なくとも2つ（好ましくは3つ、より好ましくは4つ）の異なる製造ロット群の集合体若しくは治療用細胞バンク；又は、上記製造ロット群の少なくとも2つ、3つ若しくは4つの分画の集合体を作製することができ、ここで、各製造ロットは主要阻害性KIRのうちの1つ（KIR2DL2及びKIR2DL3、KIR2DL1、KIR3DL1及びKIR3DL2阻害性KIRから成る群から選択されることが好ましい）の異なる発現欠損を示す。

【0043】

このような、本発明のプールされた活性化/増殖されたNK細胞を作製する方法によって得られる、プールされた活性化/増殖されたNK細胞の、少なくとも2つ（好ましくは3つ、より好ましくは4つ）の異なる製造ロット群の集合体は、本発明に含まれる。

【0044】

好ましい実施形態において、上記集合体は、複数の貯蔵容器の集合体であり、主要阻害性KIRのうちの1つの特定の発現欠損を示す、本発明のNK細胞を作製する方法によって得られる、プールされた活性化/増殖されたNK細胞、又はその分画をそれぞれ含有する、少なくとも2つ、3つ又は4つの容器を含む。

【0045】

本発明によれば、1人の患者を治療するために多量に必要とされる、特許請求された集合体の1製造ロット又はその分画は、治療を必要とする患者（好ましくは、移植されるプールされた活性化/増殖されたNK細胞の製造ロットによって認識される、特定の主要KIRリガンドを発現しない標的細胞を示す患者）における移植に使用することができる。

【0046】

UCB/NK細胞又は患者標的細胞のHLA/KIR遺伝子型同定/表現型検査は、あらゆる周知の標準法によって行われ得る。

【0047】

好ましい実施形態において、NK細胞を増殖及び活性化するのに適した培地は、補助細胞及び/又は少なくとも1つの適切なNK活性化因子を含む。

【0048】

好ましい実施形態において、補助細胞は、以下の群から選択される：

- ・哺乳類細胞、好ましくはヒト細胞、より好ましくはHLA型（HLA-typed）細胞集団由来、及び、所望により、照射細胞、特に線照射、X線照射又はUV照射細胞、好ましくは線照射細胞；

- ・形質転換哺乳類細胞、好ましくはヒト細胞であって、上記細胞において、キラー細胞免疫グロブリン様受容体（KIR）リガンドをコードする1つの遺伝子の発現が阻害されている細胞。

【0049】

好ましい実施形態において、HLA型細胞集団由来の上記細胞は、E C A C C No. 88052047、IHW番号9047及びHOM-2、ID No. HC107505、IHW番号9005の群から選択されることが好ましい、PLH細胞株由来である。

【0050】

好ましい実施形態において、上記補助細胞は、KIRリガンドをコードする1つの遺伝子の発現が阻害されており、MHC-I発現の阻害若しくは減少、及び/又はERK5遺伝子の発現の阻害を更に含む、形質転換された哺乳類細胞である。このような補助細胞を作製するための方法は、当業者に周知である（参照によって本明細書に援用される、2012年11月1日に公開されたWO2012/146702を参照）。 10

【0051】

MHC-I発現の阻害又は減少は、上記補助細胞であり、当該技術分野において周知のあらゆる方法で実行され得る。例えば、上記方法は、国際特許出願公開公報WO2009/141729A2に例示されている。典型的には、上記MHC-I発現の阻害又は減少は、-2-ミクログロブリン遺伝子発現の阻害剤を使用することにより実行される。

【0052】

上記に示されるように、上記補助細胞は、陰性のERK5表現型を示している。「陰性ERK5表現型を示す細胞」という用語は、その発現レベルと比較して、細胞内、具体的にはミトコンドリア画分内、に存在するER5タンパク質の発現レベル又は量において、少なくとも10%、好ましくは25%~90%、例えば25%~50%又は50%~75%の減少を有する、細胞を意味する。 20

【0053】

ERK5遺伝子発現の阻害又は減少は、上記補助細胞であり、当該技術分野において周知のあらゆる方法で実行され得る。例えば、上記方法は、国際特許出願公開公報WO2009/141729A2に例示されている。典型的には、上記ER5発現の阻害又は減少は、ER5遺伝子発現の阻害剤を使用することにより実行される。

【0054】

好ましい実施形態において、上記補助細胞は、好ましくはエプスタイン・バーウイルス（EBV）形質転換によって、不死化されている。

【0055】

その結果、上記補助細胞は、培養下で無制限に増殖する細胞株を構成する。細胞を不死化させる方法は、当該技術分野において周知であり、特に、ヒトリンパ球を不死化させるための「エプスタイン・バーウイルス」（「EBV」）法が使用される。 30

【0056】

好ましい実施形態において、適切な培地は、適切なNK活性化因子として、インターロイキン-2（IL-2）、IL-7、及び/若しくはIL-12及び/若しくはIL-15、又は-若しくは-インターフェロン、好ましくはヒト組換え活性化因子を含む。

【0057】

NK細胞を活性化するために補助細胞を使用しない場合、活性化は、NK細胞活性化因子を含有する以下の可能な培地を用いて行うことができる： 40

1. IL-2 5 ng/ml + / - 抗CD3 50 ng/ml + IL-7 10 ng/ml + IL-12 10 ng/ml、好ましくは7日後；
2. hIL-15 30 ng/ml + hIL-21 30 ng/ml（ペプロテック社（Peprotech））+ ヒドロコルチゾン 10^{-6} M + CD34 + 21日間の培養、例えば、NK細胞の成熟/活性化のための21日間の培養；
3. IL-2 500 U/ml + ビーズCD335（NKp46）及びCD2；
4. CD34 + 増幅からの、バイオリアクター内での、14日目~42日目のNK細胞の増殖のための、サイトカインIL-7、SCF、IL-2、IL-15（強濃度）及びGM-CSF、G-CSF、IL-6（低濃度）の混合物；0日目~9日目 = 低分子ヘパリン + サイトカイン類（強濃度）SCF、Flt3L、TPO、IL-7及び（低濃度）G 50

M - C S F、G - C S F、I L - 6 (C D 3 4 + 増幅) の混合物 ; J 9 ~ 1 4 = 低分子ヘパリン + サイトカイン類 (強濃度) S C F、F l t 3 L、I L - 1 5、I L - 7 及び G M - C S F、G - C S F、I L - 6 (低濃度、NK 分化) の混合物。 (I L - 1 8 及び I F N も使用できる)。

【 0 0 5 8 】

補助細胞存在下での活性化及び増殖 :

1 . I L - 2 5 0 0 U / m l + 自家 / 同種間の被照射支持細胞 (f e e d e r c e l l s) P B M C (2 5 G y) o u E B V - L C L (1 0 0 G y)、支持細胞 : NK の比率 2 0 : 1 (又は、U C B ユニットのスケールアップのために 1 0 : 1) (0 日目)

2 . I L - 2 2 0 0 U / m l + マイトマイシン (m y t o m y c i n) 処理された支持細胞 (P B M C + K 5 6 2 比率 1 : 1) 支持細胞 : NK の比率 8 : 1

3 . I L - 2 5 0 0 U / m l + 同種間被照射支持細胞 P B M C (5 0 0 0 r a d) (0 日目 a b d 7 日目) 支持細胞 : 全体の比率 1 0 : 1 + O K T 3 (抗 C D 3) 3 0 n g / m l (培地中、又は支持細胞とプレインキュベート)

4 . I L - 2 5 0 0 U / m l + 被照射支持細胞 J u r k a t - K L 1 (3 0 0 G y) (0 日目)

5 . I L - 2 5 0 0 U / m l + 自家被照射支持細胞 P B M C (2 0 0 0 r a d、支持細胞細胞の T リンパ球の刺激開始において、+ O K T 3 1 0 n g / m l (枯渴 d i n 非被照射画分)) 支持細胞 : NK の比率 5 : 1 (J 0)

6 . I L - 2 + I L - 1 5 + 支持細胞 被照射支持細胞 K 5 6 2 - m b 1 5 - 4 1 B B L (1 0 0 G y)

【 0 0 5 9 】

別の好ましい実施形態では、本発明の方法において、T 細胞を枯渴させる工程は、以下の工程を含む方法によって実行される :

細胞を除去抗体と接触させる工程 ; 及び

上記除去抗体によって検出された細胞を除去する工程。

【 0 0 6 0 】

除去抗体は、抗 C D 3、抗 C D 1 4、及び抗 C D 2 0 抗体からなる群から選択される少なくとも 1 つの抗体であることが好ましく、好ましくは、抗 C D 3 抗体である。

【 0 0 6 1 】

得られた枯渴処理された細胞の集団において、0 . 5 % 未満又は更には 0 . 1 % 未満又は更には 0 . 0 0 1 % 未満が、C D 3 陽性細胞である。

【 0 0 6 2 】

別の好ましい実施形態では、本発明の方法において、各 U C B ユニット又はプールされた n 個の U C B ユニットは、好ましくは密度勾配分離により、より好ましくは F i c o l l - P a q u e (登録商標) 密度勾配分離により、H e t a s t a r c h (ヒドロキシエチルデンプン ; H E S) 法により、P r e p a C y t e (登録商標) C B 装置の使用により、又は凍結・解凍工程により、赤血球 (r e d c e l l / e r y t h r o c y t e) を枯渴される。

【 0 0 6 3 】

別の好ましい実施形態では、本発明の方法において、各 U C B ユニット又はプールされた n 個の U C B ユニットは、赤血球の溶解を含む方法によって、特に、U C B ユニットのそれぞれ、又は n 個の U C B ユニットのプール細胞に含有される細胞を凍結及び解凍する工程を含む方法によって、赤血球を枯渴される。

【 0 0 6 4 】

別の好ましい実施形態では、本発明の方法において、工程 (b) 又は工程 (i) で使用される U C B ユニットは、凍結保存された U C B ユニットから解凍された U C B ユニットである。

【 0 0 6 5 】

別の好ましい実施形態では、本発明の方法において、工程 (b) 又は工程 (i) で使用

10

20

30

40

50

されるUCBユニットは、凍結保存されたUCBユニットから解凍されたUCBユニットである。

【0066】

上記方法の最後に得られる、上記プールされたUCBユニット又は細胞を含有するその分画は、-70以下の温度、好ましくは-80以下の温度、より好ましくは液体窒素中に保存されることが好ましい。

【0067】

別の好ましい実施形態において、本発明は、

各UCBユニットが予め、使用前に適切な培地（好ましくはRPMI培地）中で希釈され；及び／又は

各UCBユニット若しくはプールされたn個のUCBユニットの赤血球（red-cell / erythrocyte）枯渇の後、収集した細胞を、所望によりウシ胎児血清AB型マイナス（FBS）を含有する、適切な培地（好ましくはRPMI培地）中、又はX-VIVO（商標）型培地（ロンザ社）、AIM-V（商標）培地（インビトロジェン社）若しくはCellGro（商標）（セル・ジェニックス社（CellGenix））中に再懸濁し；及び／又は

赤血球枯渇UCBユニット又はプールされた赤血球枯渇UCBユニットそれぞれに由来する収集細胞が凍結保存される場合、収集細胞を白血球凍結保護物質を含む適切な培養液中で再懸濁する、

本発明の方法に関する。

【0068】

より好ましくは、NK細胞の増殖／活性化に適した培地中に存在するNK細胞と補助細胞との比率は、0.01～2、好ましくは0.05～1.0、より好ましくは0.1～0.5である。

【0069】

より好ましくは、NK細胞の増殖／活性化に適した培地中に存在する補助細胞、及び増殖／活性化されるNK細胞は、HLA-KIR不一致である。

【0070】

別の好ましい実施形態によれば、本発明は、

CD56＋NK細胞濃縮の工程を更に含む、本発明に係るプールされ、活性化及び／又は増殖されたNK細胞を作製するための方法に関する。

【0071】

別の好ましい実施形態によれば、本発明は、増殖され、所望により活性化されたNK細胞の集団の少なくとも2つの別々のプールをUCBユニットから作製する方法に関し、ここで、プールされたn個のUCBのNK細胞によって認識される主要HLAクラスI群はプール毎に異なっており、n個のUCBユニット由来の、増殖され、所望により、活性化されたNK細胞の集団の各プールは、本発明に係るプールされ、活性化及び／又は増殖されたNK細胞を作製するための方法によって作製される。

【0072】

より具体的には、本発明は、本発明に係るUCBユニットから増殖され、所望により活性化されたNK細胞の集団の少なくとも2つ、3つ、好ましくは4つの異なるプールを作製するための方法に関し、ここで、プールされたn個のUCBのNK細胞によって認識される主要HLAクラスI群はプール毎に異なっており、それぞれ、KIR3DL2によって認識されるHLA A3/A11、KIR3DL1によって認識されるHLA Bw4、KIR2DL2/3によって認識されるHLA C1群及びKIR2DL2によって認識されるHLA C2群からなる群から選択される。

【0073】

別の実施形態によれば、本特許出願の発明は、

本発明に係る方法によって得られる細胞の集団；又は

本発明の方法によって得られる細胞の集団であって、上記「得られる」細胞の集団が少

10

20

30

40

50

なくとも n 個（ここで、 $n \geq 2$ 、好ましくは $2 < n \leq 100$ 又は $3 \leq n \leq 50$ 、より好ましくは $3 \leq n \leq 25$ ）のUCBユニット又はNK細胞を含有するその分画に由来する細胞（好ましくはNK細胞）を含み、上記 n 個のUCBユニットが主要HLAクラスI群遺伝子型について同一パターンを更に示すことが好ましい（好ましくは、プールされた n 個のUCBのNK細胞によって認識される主要HLAクラスI群がプール毎に異なり、それぞれ、KIR3DL2によって認識されるHLA A3/A11、KIR3DL1によって認識されるHLA Bw4、KIR2DL2/3によって認識されるHLA C1群及びKIR2DL2によって認識されるHLA C2群からなる群から選択される）上記細胞の集団、に関する。

【0074】

10

より好ましくは、本発明に係る方法によって得られる上記細胞の集団は、各々プールされた n 個のUCBにおいて、KIR2DL2及びKIR2DL3、KIR2DL1、KIR3DL1、及びKIR3DL2から成る群から選択されるKIRのうちの1つの発現欠損を更に示す。

【0075】

別の態様では本発明は、本発明に係る方法によって得られる又は入手可能な、プールされ、活性化及び/又は増殖された細胞（特にNK細胞）の集団を含む組成物に関する。

【0076】

また本発明は、薬剤として使用するための、本発明に係る方法によって得られる又は入手可能な、プールされ、活性化及び/又は増殖された細胞（特にNK細胞）の集団を含む医薬組成物に関する。

20

【0077】

また本発明は、薬剤的に許容できる担体を更に含む、本発明に係る医薬組成物に関する。

【0078】

本明細書において、「薬剤的に許容できる担体」とは、副反応を引き起こさず、例えば、活性化化合物の投与を促進する、それらの寿命及び/若しくは身体における有効性を増加させる、溶液中のそれらの溶解性を増加させる、又はそれらの保存性を向上させる、医薬組成物の一部となる、化合物又は化合物の組合せを指す。このような薬剤的に許容できる担体は周知であり、選択される活性化化合物の性質及び投与様式に従って当業者によって適合される。

30

【0079】

別の態様によれば、本発明は、上記貯蔵容器のそれぞれが、本発明に係る方法によって入手可能な又は得られる、ある製造ロットの細胞の集団の分画を含有する、哺乳類細胞用（好ましくはヒト細胞用）の貯蔵容器の集合体に関する。

【0080】

本発明に係る哺乳類細胞用の上記貯蔵容器の集合体は、増殖及び/又は活性化されたNK細胞を含有することが好ましい。

【0081】

本発明に係る哺乳類細胞用の上記貯蔵容器の集合体又は本発明に係る上記組成物は、治療される患者の体重に応じて、少なくとも 10^7 個、好ましくは $2 \sim 10 \times 10^7$ 個又は $10 \sim 100 \times 10^7$ 個、の活性化及び/又は増殖されたNK細胞を含有することが好ましい。

40

【0082】

本発明に係る上記貯蔵容器の集合体のそれぞれ、又は本発明に係る上記組成物は、NK細胞を含有し、CD3+T細胞を本質的に含有しない（好ましくは0.1%未満又は0.01%未満）ことが好ましい。

【0083】

本発明に係る哺乳類細胞用の上記貯蔵容器の集合体又は本発明に係る上記組成物は、以下を含有することが好ましい：

50

マーカー C D 5 6 + を示す、少なくとも 7 5 %、好ましくは 8 5 % 超若しくは 9 0 % 超の N K 細胞；及び / 又は

C D 4 5 R A d i m を示す、少なくとも 7 5 %、好ましくは 8 0 % 超の N K 細胞。

【 0 0 8 4 】

別の態様によれば、本発明は、その用途が、腫瘍細胞の増殖を抑制するための、好ましくは、がんの予防及び / 若しくは治療のための、又は感染治療のための、本発明に係る貯蔵容器の集合体又は本発明に係る上記組成物の貯蔵容器に関する。

【 0 0 8 5 】

好ましい実施形態において、治療される上記腫瘍細胞又はがんは、造血器腫瘍の腫瘍細胞、固形腫瘍細胞又は癌腫細胞、好ましくは、白血病細胞、急性 T 細胞白血病細胞、慢性骨髄性リンパ腫 (C M L) 細胞、急性骨髄性白血病細胞、慢性骨髄性白血病 (C M L) 細胞、多発性骨髄腫細胞、又は肺、結腸、前立腺、神経膠芽腫 (g l y o b l a s t o m a) のがんから成る群から選択される。

【 0 0 8 6 】

本発明によれば、本発明に従って作製されたプールされ、活性化及び / 若しくは増殖された N K 細胞、又は本発明に係る上記組成物は、感染症又は免疫不全 / 自己免疫疾患の治療にも有用であり得る。

【 0 0 8 7 】

好ましい実施形態において、本発明に係る貯蔵容器又は組成物に含有される細胞は、治療される疾患 / 病態に応じて、全身又は局所経路によって、対象に投与される。好ましくは、上記化合物は、筋肉内、皮内、腹腔内若しくは皮下経路によって、又は経口経路によって、全身投与され得る。本発明に係る抗体を含む組成物は、長期に亘る、何回かの投与で、投与され得る。

【 0 0 8 8 】

これらの最適な投与様式、用量スケジュール及びガレヌス形態 (g a l e n i c f o r m) は、例えば、患者の年齢又は体重、患者の全体的な健康の重症度、注意される治療及び副作用に対する耐性等の、患者に適合される治療の確立において一般的に考慮される判断基準に従って、決定され得る。

【 0 0 8 9 】

本発明は更に、以下の図面及び実施例によって説明される。しかし、これらの実施例及び図面は、決して、本発明の範囲を限定していると解釈されるべきでない。

【実施例】

【 0 0 9 0 】

実施例 1 : 材料及び方法

A) 細胞 :

P L H (実施例 4) : H L A - C 1 無し、E C A C C バンク N o . 8 8 0 5 2 0 4 7、I H W 番号 9 0 4 7

この細胞株は、スカンジナビア人女性由来の B リンパ球の E B V 不死化によって得られた。この細胞は、完全に H L A 遺伝子型同定されており、C 1 群からではなく、C 2 群、A 3 / A 1 1 型及び B w 4 型からの H L A クラス I 対立遺伝子を発現する特性を有する (完全な情報については I M G T / H L A データベースを参照) 。

【 0 0 9 1 】

この細胞株は、補助細胞と U C B との間に特定の H L A 不一致を選択することを可能にすることから (H L A C 1 群、及び可能性として関連抑制性受容体 K I R 2 D L 2 / 3 を発現する)、N K 増幅 / 活性化プロトコルのための補助細胞として使用される。E B V 感染により形質転換することにより、ウイルスにより誘導されたいくつかの N K 活性化受容体リガンドが膜発現するため、その N K 活性化能が増加する。

【 0 0 9 2 】

H O M - 2 (実施例 4) : H L A - C 2 無し、I D N o . H C 1 0 7 5 0 5、I H W 番号 9 0 0 5

10

20

30

40

50

この細胞株は、カナダ人／北アメリカ人女性由来のＢリンパ球のＥＢＶ不死化によって得られた。この細胞は、完全にＨＬＡ遺伝子型同定されており、Ｃ２群からではなく、Ｃ１群、Ａ３／Ａ１１型及びＢｗ４型からの、ＨＬＡクラスⅠ対立遺伝子を発現する特性を有する（完全な情報についてはＩＭＧＴ／ＨＬＡデータベースを参照）。

【００９３】

この細胞株は、補助細胞とＵＣＢとの間に特定のＨＬＡ不一致を選択することを可能にすることから（ＨＬＡ Ｃ２群、及び可能性として関連抑制性受容体ＫＩＲ２ＤＬ１を発現する）、ＮＫ増幅／活性化プロトコルのための補助細胞として使用される。ＥＢＶ感染により形質転換することにより、ウイルスにより誘導されたいくつかのＮＫ活性化受容体リガンドが膜発現するため、そのＮＫ活性化能が増加する。

【００９４】

Ｂ）培地、緩衝液及びサイトカイン：

１．リンパ球の分離に使用されるフィコール（Ｆｉｃｏｌｌ）及びジアトリゾエートナトリウムの密度勾配細胞分離培地：Ｈｉｓｔｏｐａｑｕｅ－１０７７、シグマ・アルドリッチ社（米国ミズーリ州セントルイス）製

２．細胞を７ＡＡＤ及び蛍光性ＤＮＡプローブで標識する、Ｍｕｓｅ装置（Ｍｕｓｅ ｍａｃｈｉｎｅ）を用いる、細胞を計数し、それらの生存率を調べるためのキット：計数及び生存率キット、ミリポア社（ダルムシュタット、ドイツ）製

３．細胞培地：ＲＰＭＩ１６４０ Ｇｌｕｔａｍａｘ、インビトロジェン社（米国カリフォルニア州カールズバッド）製、フランスの卸売業者サーモ・フィッシャー・サイエンティフィック社から購入

４．細胞培地中の栄養源：胎児ウシ血清、インビトロジェン社（米国カリフォルニア州カールズバッド）製、フランスの卸売業者サーモ・フィッシャー・サイエンティフィック社から購入

５．細胞凍結用の有機溶剤：ジメチルスルホキシド（ｄｉｍｅｔｈｙｌ ｓｕｌｆｏｘｙｄｅ）、ＤＭＳＯ、ビー・ブラウン社（Ｂ．Ｂｒａｕｎ）（メルズンゲン、ドイツ）製

６．フローサイトメトリ標識用の緩衝液：ＰＢＳ、インビトロジェン社（米国カリフォルニア州カールズバッド）製、フランスの卸売業者サーモ・フィッシャー・サイエンティフィック社から購入

７．ＮＫ増幅／活性化用のサイトカイン：組換えヒトｒｈＩＬ－２、イーバイオサイエンス社（ｅｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）（米国カリフォルニア州サンディエゴ）製

８．ＮＫ増幅／活性化用のサイトカイン：組換えヒトｒｈ－ＩＬ１５、ミルテニー社（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ）（ベルギッシュグラートバハ、ドイツ）製

【００９５】

実施例２：製造プロセスの例

プロセスの詳細：図１－１～図１－３を参照されたい。

・最初の凍結の前にＵＣＢをフィコールＵＣＢ単核細胞単離で処理した。

・手動の磁気枯渇キットを用いてＣＤ３枯渇を行った。

・プールＵＣＢは、主要ＨＬＡクラスⅠ群遺伝子型について同一パターンを示す（各ＨＬＡ群は主要阻害性ＫＩＲによってＮＫ細胞により認識される）：ＫＩＲ３ＤＬ２によって認識されるＨＬＡ Ａ３／Ａ１１；ＫＩＲ３ＤＬ１によって認識されるＨＬＡ Ｂｗ４；ＫＩＲ２ＤＬ２／３によって認識されるＨＬＡ Ｃ１群；ＫＩＲ２ＤＬ１によって認識されるＨＬＡ Ｃ２群。

・プールされたＵＣＢを、発現されたプールＵＣＢのｉＫＩＲによって認識されるＨＬＡのうちの１つを欠損した補助細胞を用いて活性化する。

・ＮＫ細胞を２０～２４日間増幅した。

・使用されるサイトカインはＩＬ－２（１００ＩＵ／ｍｌ）及びＩＬ－１５（５ｎｇ／ｍｌ）である。同様の結果を得るために、これらの濃度は変更可能である。

補助細胞は、特定のＨＬＡ遺伝子型（１つの主要ＨＬＡクラスⅠ群欠損）を有するＥＢＶ不死化細胞株（ウイルス誘導性活性化リガンドを発現する細胞）である。

・補助細胞を、様々な方法によって、様々な照射線量で照射することができる（ここでは、主に20秒のUV照射が使用されたが、最後の実験には105 Gyの線照射も使用され、これはより良好な増幅結果を示した）。

・被照射補助細胞は、事前の凍結保存有り又は無しで使用され得る：新たに照射した細胞、又は被照射凍結保存細胞（凍結直前の照射）として。

・最後の3つの実験では、被照射補助細胞を、3～4日毎に（0日目；4日目；8日目；12日目；+/-15日目；+/-18日目）、NK：補助細胞比率1：4で、UCB細胞に加えた。3日間～7日間の添加頻度で、比率1：2、又は1：1～1：3の全細胞補助細胞の比率を用いて、いくつかの結果（以前の結果及び他の示されていない結果）を得た。このパラメータは、同様の増幅/活性化結果を得ながら、変更することが可能である。

10

・示された実験では、プールされたCD3枯渴UCB由来のNK細胞がプロセスの最後に既に90%超の生細胞を示していたため、プロセスの最後にCD56+選択を行わなかった。CD56選択工程は必須ではなく、NK純度を向上させ得るものであり、医薬品のために好ましい（及び、完全に必要とされ得る）。

【0096】

上記プロセスのいくつかの工程は変更可能である：

・UCBは、Hetastarch（商標）又はPrepaCytel C B（商標）装置（又は他の既存の方法及び臨床的に承認された方法）等のGMPに準拠した方法を用いて、最初の凍結の前に別様に処理される。

20

・現在の前臨床及び臨床の知見によって、iKIR-HLA不一致がiKIR-HLA一致よりも良好な結果を与えることが示されているとしても、我々の場合では、iKIR-HLAが臨床成績において異なる影響を有する可能性がまだある。そのため、差し当たっては、文献の知見に基づく開発は、NK/補助細胞不一致及びNK/患者同一不一致を用いる工程を伴うべきである。更に、前臨床及び臨床のデータによって、このパラメータは不要であれば変更可能である。

・NK増幅の培養期間は最適化可能である：14日間～28日間。

・IL-2及びIL-15の濃度は最適化可能である。

・CD3枯渴は、clinimacs等の自動の臨床的に承認された装置を用いて行われる。

30

・CD3枯渴は、赤血球除去及び体積削減の直後にも行うことが可能である（恐らく、NK回収に関してはより良好な結果）。

・結果の1つは、いくつかの不明確な場合において、CD3枯渴がUCBのプールされたNK細胞の良好な増幅/活性化に必要でないことを示している。

・唯一の薬剤的に定義されたロットで特徴付けられる、活性化された複数のドナーに由来するNK細胞の重要な量を得るために、選択的にCD3枯渴されたUCBユニットが工程の様々な時期にプールされ得る：増幅培養前、増幅培養中、又は増幅培養の最後。

【0097】

実施例3：目的

1．第一の実験

40

異なるドナー由来のTリンパ球はHLAの差異の認識によって互いに殺傷し合うことが知られているため、及びNK細胞は細胞傷害性となるのに活性化シグナルを必要とするため、同一の主要HLA群（阻害性KIRによるそれらの認識に依存）を発現するが、同一のHLA対立遺伝子を発現しない、CD3枯渴UCBをプールすることが可能であるかどうかを問うた。3つのUCBからの全単核細胞及びCD3枯渴単核細胞をプールして、CD3枯渴が必須であるかどうかを検証した。

【0098】

2．第二の実験

それぞれの主要iKIR/HLA対についてiKIR-HLA不一致を示す4つのNK細胞クラスを作製したいことから、UCBのプールが成功した理由が、以前に使用された

50

最初の特定のHLA遺伝子型同定のみによるものであったかどうか、又は、UCBの別のHLA遺伝子型同定で再現可能かどうか、を調べる必要があった：別のiKIR-HLA不一致を利用する別の補助細胞株が、同一HLA群を発現する3つのCD3枯渴UCBのプールからのNKの増幅/活性化を可能にするかどうかを問うた。

【0099】

3. 第三の実験

約100人の患者を治療するには、10個のUCBをプールする必要があることから、同一HLA群を発現する5つのUCB(半分)のプールが同一のNK増幅/活性化を可能にするかどうかを問うた。

【0100】

10

実施例4：実施例

1. 第一の実験

フィコール分離によって得られたUCB単核細胞を凍結保存し、その後解凍し、一部に対して幹細胞キットを用いてCD3枯渴した。同一の主要HLAクラス1群A3/A11+、Bw4+、C1+、C2+遺伝子型を有する3つのCD3枯渴UCB又は全UCBをプールし、4日毎に加えられるIL-2、IL-15及び被照射補助細胞PLH(A3/A11+、Bw4+、C1-、C2+遺伝子型)と一緒に、21~25日間培養した。

【0101】

2. 第二の実験

20

フィコール分離によって得られたUCB単核細胞を凍結保存し、その後解凍し、幹細胞キットを用いてCD3枯渴した。同一の主要HLAクラス1群A3/A11-、Bw4+、C1-、C2+遺伝子型を有する3つのCD3枯渴UCBをプールし、4日毎に加えられるIL-2、IL-15及び被照射補助細胞HOM-2(A3/A11+、Bw4+、C1+、C2-遺伝子型)と一緒に、21~25日間培養した。

【0102】

3. 第三の実験

フィコール分離によって得られたUCB単核細胞を凍結保存し、その後解凍し、幹細胞キットを用いてCD3枯渴した。同一の主要HLAクラス1群A3/A11-、Bw4+、C1+、C2-遺伝子型を有する5つのCD3枯渴UCBをプールし、4日毎に加えられるIL-2、IL-15及び被照射補助細胞PLH(A3/A11+、Bw4+、C1-、C2+遺伝子型)と一緒に、21日間培養した。

30

【0103】

4. 評価したパラメータ

MUSEミリポア社製システム及びフローサイトメトリーによる培養液中の細胞構成の特徴付けを用いて、生NK細胞を定期的に計数した。

フローサイトメトリーによって、NK細胞の活性化マーカーの発現を定期的に評価した(モノクローナル抗体治療との強力な相乗効果のためのCD16;共通の活性化受容体としてのCD69)。

培養20日目に、実験2及び実験3のために、周知のK562標的細胞、及び腫瘍性細胞に対して、細胞毒性を評価した(NK:K562(比率3:1)、NK:精製Bリンパ腫細胞(比率3:1)、NK:AML細胞(患者の全PBMC試料中)(比率10:1)と一緒に2時間インキュベーション)。

40

【0104】

実施例5：結果

1. 第一の実験(図2及び図3を参照)

UCB1:HLA A11:01/A29:02、B35:01/B44:02、C04:01/C16/01>HLA A3/A11+、Bw4+、C1+、C2+
UCB2:HLA A11:01/A23:01、B35:02/B49:01、C04:01/07:01>HLA A3/A11+、Bw4+、C1+、C2+

50

UCB3 : HLA A2 / A3、B18 / B51、C5 / C14 > HLA A3 / A11 +、Bw4 +、C1 +、C2 +

【0105】

Tリンパ球はサイトカインが使用される増殖においてNK細胞と競合することから（及び、EBV抗原を対象とするCD8-Tリンパ球も補助細胞によって刺激されることから）、単離されたUCBからのNK増殖は、CD3枯渇後により良好な結果を示した。

プールされたCD3枯渇UCB由来のNKは、単離されたUCB由来のNKと同様に増殖するが、UCBがCD3枯渇されていない場合、異なるドナー由来のTリンパ球はその他のTリンパ球に対して細胞傷害性であり、NK細胞は増殖することができない。

【0106】

【表1】

表1:

	UCB 1	UCB 2	UCB 3	プール UCB	CD3枯渇 UCB1	CD3枯渇 UCB2	CD3枯渇 UCB3	プール CD3枯渇 UCB
NK増幅率	2.6	17.8	15.7	1.6	20	14.9	76.7	23.9
%NK CD16+ (ADCC関連)	72.7	80.2	72.9	46	54.4	63.6	63.6	68.3
%NK CD69+	86.7	88.6	94.7	94.3	92.9	95.1	96	86.6
共通標的の溶解%	ND	ND	ND	ND	64.1	58	50.9	52.7

【0107】

NK増幅率は技術的な問題からこの実験では比較的低い。

活性化受容体は良好に発現しており、培養NK細胞の共通標的K562に対する細胞毒性は非活性化NK細胞を用いるよりも大いに良好である。

この実験によって、NK増幅のために、同一の主要HLA群の遺伝子型を有するUCBをプールすることは適しているが、事前のCD3枯渇が必要であることが示された。増幅されたNK細胞は十分に活性化されている。

【0108】

2. 第二の実験（図4参照）

UCB1 : HLA A01 / 02、B27 : 05 / B40 : 02 / C02 : 02 / C15 : 02 > HLA A3 / A11 -、Bw4 +、C1 -、C2 +

UCB2 : HLA A2 / A31、B50 / B51、C06 : 02 / 15 : 02 > HLA A3 / A11 -、Bw4 +、C1 -、C2 +

UCB3 : HLA A23 / A24、B44 / B44、C4 / C5 > HLA A3 / A11 -、Bw4 +、C1 -、C2 +

【0109】

この新たな遺伝子型を有するプールCD3枯渇UCBからのNK増殖は、単離CD3枯渇UCBを用いたNK増殖と同様である。

【0110】

10

20

30

40

【表 2】

表 2 :

	CD3 枯渴 UCB1	CD3 枯渴 UCB2	CD3 枯渴 UCB3	プールCD3 枯渴UCB
NK増幅率	86.3	184.4	47.1	124.7
%NK CD16+ (ADCC関連)	86.3	81.6	99.8	90
%NK CD69+	99.6	94.9	99.2	98.5
共通標的の溶解%	93	97.6	90.1	87.7
Bリンパ腫腫瘍性細胞 の溶解%	37	48.2	78.4	31.6

10

【0111】

20

NK増幅率は、この実験ではより高い（技術的な問題無し）が、具体的には新規の補助細胞株についてプロトコル最適化によりまだ向上させることが可能である。

活性化受容体は非常に良く発現されている。培養NK細胞の共通標的K562に対する細胞毒性は非活性化NK細胞を用いるよりも大いに良好であり、2時間のインキュベーションによりBリンパ腫腫瘍性細胞に対する有意な細胞毒性が観察される。

別の主要HLA群遺伝子型を有するCD3枯渴UCBをプールすること、並びに別のiKIR-HLA不一致及び別の補助細胞株を用いるNK細胞を増幅することは、実行可能である。増幅されたNK細胞は十分に活性化されている。

【0112】

3. 第三の実験（図5参照）

30

UCB:HLA A3/A11-、Bw4+、C1+、C2-

【0113】

【表 3】

表3:

	プールCD3枯渴UCB
NK増幅率	583.2
%NK CD16+ (ADCC関連)	81.7
%NK CD69+	99.8
共通標的の溶解%	97.9
AML腫瘍性細胞の溶解%	10.4

40

【0114】

5つのプールCD3枯渴UCBからのNK増殖は良好である。

NK増幅率はこの実験ではより高い。

活性化受容体は非常に良く発現されている。培養NK細胞の共通標的K562に対する

50

細胞毒性は非活性化NK細胞を用いるよりも大いに良好であり、2時間のインキュベーションによりAML腫瘍性細胞に対する低い特異的細胞毒性が観察される（しかし、20時間後には細胞毒性は観察できなかったが、これは、この時点において、患者細胞が解凍によって死滅するためである）。

5つのCD3枯渇UCBをプールし、重要な増幅率でNK細胞を増幅することは、我々の製造工程を用いて実行可能である。増幅されたNK細胞は十分に活性化されている。

【0115】

4. 補完的な結果

・事前のCD3枯渇無しでプールUCBからのNK細胞の良好な増幅を示す実験（再現性の無いアッセイ）：（図6参照）

PLHを用いて増幅された3つのiKIR-HLA不一致UCB：

UCB1：HLA A2：01/A68：01；B38：01/B57：01；C6：02/C12：03>C1+、C2+、A3/A11-、Bw4+

UCB2：HLA A1：01/A2：01；B52：01/B57：01；C6：02/C12：02>C1+、C2+、A3/A11-、Bw4+

UCB3：HLA A02/02；B15：09/B50：02；C06/C07>C1+、C2+、A3/A11-、Bw4-

【0116】

NK増幅は、事前のCD3枯渇無しで単離又はプールされたUCBにおいて同様であり得る。

・9日間の培養後にプールの可能性を示す実験（CD3非枯渇UCBを使用）：

1. 先と同じ実験（図7参照）

【0117】

【表4】

表4：

	UCB1	UCB2	0日目プール	9日目プール
%Bリンパ腫溶解	74	91	90	91

【0118】

有意であるがより低いNK増幅を維持しながら、9日目の活性化NK細胞（ここでは事前のCD3枯渇無し）をプールすることが可能である。

【0119】

2. PLHを用いて増幅された2つのiKIR-HLA一致UCBを用いた実験：（図8参照）

UCB1：HLA A11：01/A29：02、B35：01/B44：02、C04：01/C16/01>HLA A3/A11+、Bw4+、C1+、C2+

UCB2：HLA A11：01/A23：01、B35：02/B49：01、C04：01/07：01>HLA A3/A11+、Bw4+、C1+、C2+

NKがCD3非枯渇において適切に増幅しない場合、9日間の増幅後のUCBのプール（NK%及びNK活性化状態を増加させるが、未だ高いTリンパ球%を有する）が問題を解決すると思われる。それらは、Bリンパ腫腫瘍性細胞に対してインビトロにおける同様の良好な細胞毒性を示した（一晚、E：T比率1：1）。

【0120】

3. PLHを用いて増幅された2つのiKIR-HLA不一致UCBを用いた実験：（図9参照）

UCB1：HLA A02：02/30：01、B42：01/B53：01、C04：01/17：01>HLA A3/A11-、Bw4+、C1-、C2+

UCB2 : HLA A11 : 01 / A23 : 01、B35 : 02 / B49 : 01、C04 : 01 / 07 : 01 > HLA A3 / A11 +、Bw4 +、C1 +、C2 +

【0121】

【表5】

表5:

	UCB1	UCB2	0日目プール	9日目プール
%Bリンパ腫溶解	74	92	96	97

10

【0122】

CD3非枯渇・iKIR-HLA不一致のプールUCB由来のNK細胞は、より低い増幅率を示し、9日間の増幅後にこれらのUCBをプールすることは、より良好なNK増幅をもたらした。それらは、Bリンパ腫腫瘍性細胞に対してインビトロにおける同様の良好な細胞毒性を示した（一晚、E:T比率1:1）。

【0123】

実施例6：展望

1. プロセスの最適化

本発明に係るプールされた活性化/増殖されたNK細胞の製造プロセスが医薬品規制義務に適合され、プロセスの全ての工程が最高品質保証のために適合されることが好ましい。

20

第一に、例えば、7%（3~15%のNKがUCBの全有核細胞で一般的に観察される）等のNK割合の最小閾値を伴って、 1.4 又は 1.6×10^6 個超の全有核細胞（現在、我々のローカルなUCBバンクにおいては 1.85×10^6 個の全有核細胞）等の、UCBユニットの判定基準が設定されなければならない。

UCB単核細胞（UCBMC）単離のために上記実施例で使用された「フィコール」法は、HES6%及び遠心分離赤血球除去及び体積削減、又はPrepacyte CB単離系等の適合された手順を用いる、十分に適合された標準的且つ周知の臨床応用のための方法、及び、例えば、密閉された、無菌の、使い捨ての、バッグを備えた系を用いる製薬条件に容易に置き換えることができる。これらの系は、第一工程における全有核細胞（nucleated cell）の回収を確実に向上させる。

30

UCBMCのCD3枯渇は、最良の細胞回収及び最良のCD3枯渇品質のために、最初の凍結保存工程の前後に、例えば、CliniMACS（商標）等の適合した臨床的にアップグレード可能な物質を用いて、及び、要否を問わず、CD3枯渇のための最良の工程時間を決定することにより、製薬学的用途のために規制コンプライアンス及び/又はGMP手順により良好に適合可能であることが好ましい。

UCBMCに対する凍結、凍結保存及び解凍の手順は、製造プロセスの確認の後に、臨床応用のために自動化された手順を用いて改善可能であることが好ましい。バッグ密閉系の適合された物質が使用可能であり、凍結保存条件（培地、細胞濃度）は本発明の方法の当業者により容易に最適化可能である。これらの最適化工程が、唯一、解凍後の全細胞回収を確実に向上させるべきである。同時に、製薬ガイドラインに従う製造工程に進むべき各々の解凍されたUCBMCの判定基準が設定されるべきである。

40

好ましくは、HLA遺伝子型同定及び阻害性KIR発現評価の手順は、増幅/活性化工程のためにプールされる異なるUCBユニットを選択することを確認されるべきである：選択基準は各ロットに設定されるべきである。

好ましくは、NK増幅に対する最終的なスクリーニングを伴う、本発明の方法に含まれるかどうかにかかわらず、GMP順守のアップグレード可能な補助細胞：クローン選択のための活性化。最終的な補助細胞は、治療薬製造手順での使用のために、十分に特徴付けされなければならない。この最適化工程も、NK増幅/活性化の結果を向上させ得る。

50

照射手順は、臨床に適合した品質パラメータを伴う最良の増幅／活性化結果のために、最適化及び確認されることが好ましく、非増殖評価、細胞生存率、EBV不活性化等を含む、凍結保存した被照射補助細胞ロットの判定基準が設定されることが好ましい。

被照射補助細胞の正確な追加手順は、補助細胞を含むプロセスで使用される最終的なクローンに対して最適化される。

少なくとも5つ、好ましくは10個のプールされたUCBユニットを用いた増幅／活性化工程のために、NK培養について試験済みのWaveシステム（商標）（GEヘルスケア社）等の、バイオリアクター内の動的培養密閉系が使用されることが好ましい。

ロンザ社（Lonza）製X-VIVO（商標）培地、セルジェニックス社（Cellgenix）製CellGro SCGM（商標）又はインビトロジェン社製AIM V（商標）（NK培養について試験済み）等の動物血清非含有培地を用いる、増幅／活性化工程に使用される培地が、使用され得ることが好ましい。

CliniMACS（商標）等の適合された臨床的にアップグレード可能な物質を用いる、増幅／活性化されたNK細胞のCD56陽性選択が使用されることが好ましい。

【0124】

2．医薬品開発：最終産物の特徴付け及び判定基準

好ましくは、生成物同定工程（遺伝的安定性、キメラ現象、表現型）及び標準的な作用強度評価手順を含む、最終的な増幅／活性化産物の判定基準の工程が、プロセスに含まなければならない。

好ましくは、本発明のプロセスの前及び後のNK細胞の遺伝的安定性が確認され、それらの核型が調べられ（例えば、当業者に周知のGバンド核型分析又はcytoScanHDマイクロアレイ法によって）、異なるドナー由来の最終的なプールされたNK細胞のキメラ現象が定義されるべきである（例えば、標準的な複合PCR STR法によって）。

好ましくは、並びに最終産物をより良好に同定及び特徴付けするために、並びに判定基準を規定するために、より多くのNK表現型マーカー（NKG2D、NKG2C、CD94、NKp44、NKp30、NKp46、CD158．．．）の発現が評価される（例えば、フローサイトメトリーによって）。

各々の産物ロットは、一般的に使用される周知の標的細胞に対する有効な細胞毒性アッセイを用いて試験されることが好ましい。

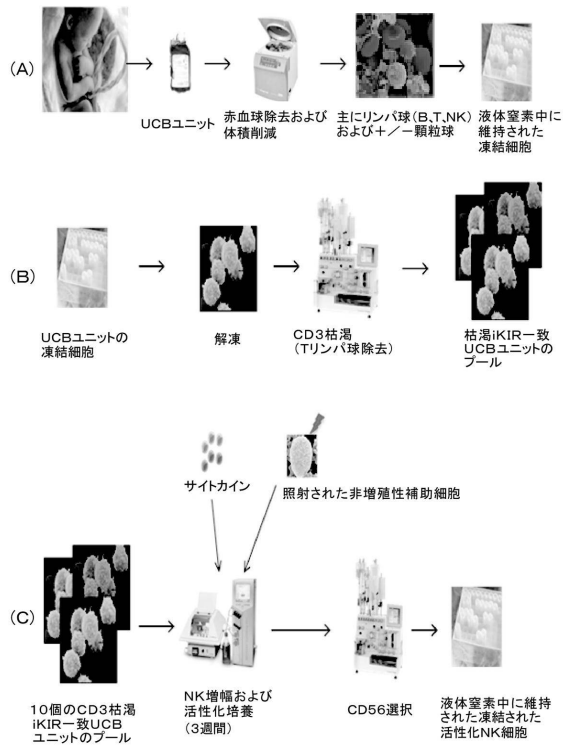
好ましくは、細菌、真菌、マイコプラズマ及びウイルス（特にEBV）等の混入物の非存在は、製造工程の間に使用されるエンドトキシン及びサイトカインの非存在として、プロセスの最終工程の間又は後に確認されなければならない。

10

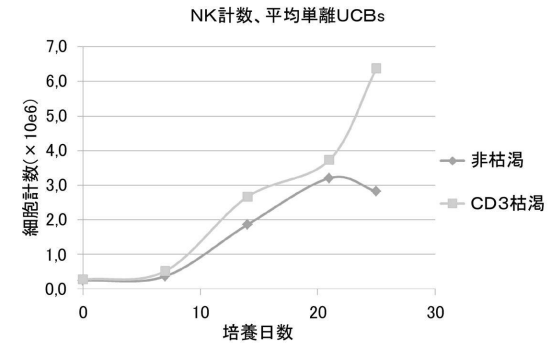
20

30

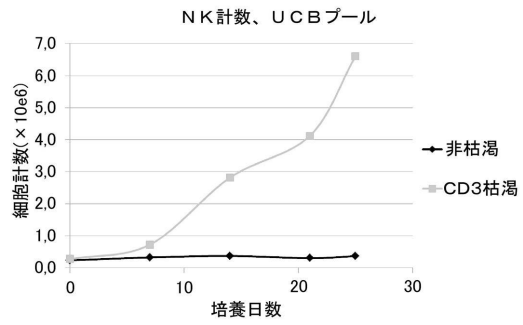
【図 1】



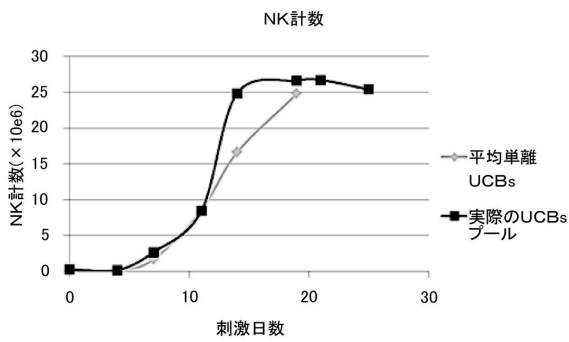
【図 2】



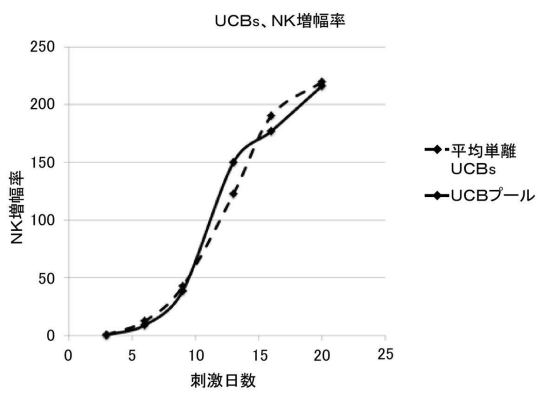
【図 3】



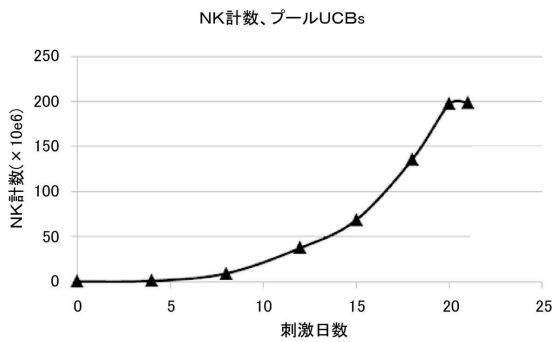
【図 4】



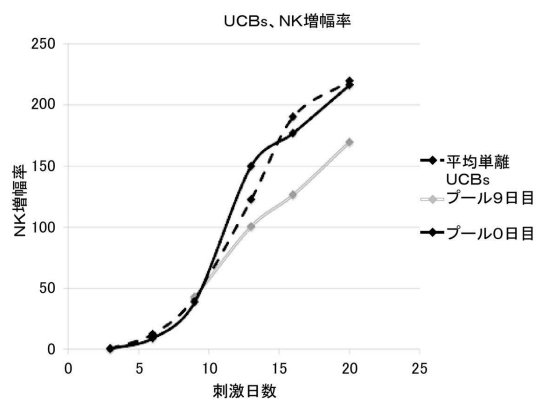
【図 6】



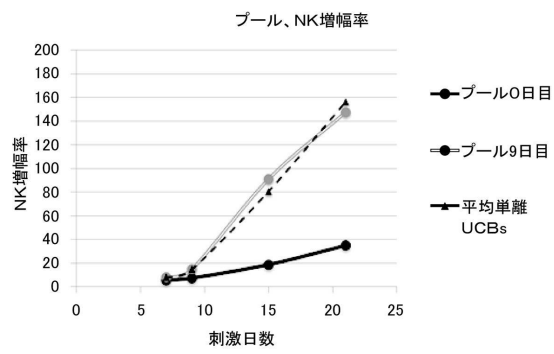
【図 5】



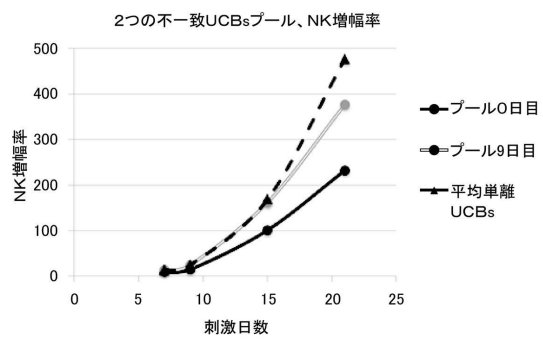
【図 7】



【図 8】



【図 9】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 K 35/51 (2015.01) A 6 1 K 35/51

(73)特許権者 518421049

サントル オピタリエ ユニヴェルシテール ド モンペリエ
フランス国 3 4 0 0 0 モンペリエ アベニュー ドワイヤン ガストン ジロー 1 9 1

(73)特許権者 515085211

ユニヴェルシテ ド モンペリエ
フランス国, 3 4 0 9 0 モンペリエ, リュ オーギュスト ブルソネ 1 6 3

(74)代理人 100079049

弁理士 中島 淳

(74)代理人 100084995

弁理士 加藤 和詳

(72)発明者 ヘンノ、 パトリック

フランス国 3 4 2 7 0 サン - マチュール - ド - トレヴィエ シェマン ド オピタル 3 6

(72)発明者 ビラルバ ゴンザレス、 マーティン

フランス国 3 4 0 7 0 モンペリエ リュー ポリーヌ ラマール 1 0 1

(72)発明者 チャオ ヤン ル

フランス国 3 4 8 3 0 ジャク ル ド プティ ニース 8

(72)発明者 ジャン フランソワ ロッシ

フランス国 3 4 9 9 0 ジュヴィニャック アヴェニュー デ ザモー ドュ ゴルフ 1 4

審査官 藤澤 雅樹

(56)参考文献 特表 2 0 1 3 - 5 3 2 4 6 9 (J P , A)

米国特許出願公開第 2 0 1 2 / 0 1 2 1 5 4 4 (U S , A 1)

カナダ国特許出願公開第 0 2 7 0 3 4 2 8 (C A , A 1)

米国特許出願公開第 2 0 1 4 / 0 0 5 0 7 1 0 (U S , A 1)

韓国公開特許第 1 0 - 2 0 1 2 - 0 1 0 0 2 0 7 (K R , A)

特開 2 0 1 3 - 0 2 7 3 8 5 (J P , A)

特開 2 0 1 3 - 0 0 6 7 9 3 (J P , A)

BONE MARROW TRANSPLANTATION (2007) Vol.40, No.4, pp.307-311

BLOOD (2011) Vol.117, No.12, pp.3277-3285

TRANSFUSION (2009) Vol.49, No.5, pp.995-1002

田中淳司, 造血細胞移植におけるNK細胞の役割, 日本造血細胞移植学会雑誌 (2013) Vol.2, No.4, pp.85-93

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 5 / 0 0

A 6 1 K 3 5 / 0 0

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)