

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7575104号  
(P7575104)

(45)発行日 令和6年10月29日(2024.10.29)

(24)登録日 令和6年10月21日(2024.10.21)

(51)国際特許分類	F I	
C 1 2 N 15/24 (2006.01)	C 1 2 N 15/24	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	Z N A
C 1 2 N 5/0789(2010.01)	C 1 2 N 5/0789	
C 1 2 N 15/867(2006.01)	C 1 2 N 15/867	Z
C 1 2 N 5/0783(2010.01)	C 1 2 N 5/0783	
請求項の数 46 (全75頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号	特願2021-548697(P2021-548697)	(73)特許権者	306010244 ラトガーズ、ザ ステイト ユニバーシテ ィ オブ ニュージャージー アメリカ合衆国 ニュージャージー 0 8 9 0 1 , ニュー ブランスウィック , サマーセット ストリート 8 3
(86)(22)出願日	令和2年2月19日(2020.2.19)	(74)代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(65)公表番号	特表2022-520871(P2022-520871 A)	(74)代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(43)公表日	令和4年4月1日(2022.4.1)	(74)代理人	100181674 弁理士 飯田 貴敏
(86)国際出願番号	PCT/US2020/018897	(74)代理人	100181641 弁理士 石川 大輔
(87)国際公開番号	WO2020/172328	(74)代理人	230113332
(87)国際公開日	令和2年8月27日(2020.8.27)		
審査請求日	令和5年2月2日(2023.2.2)		
(31)優先権主張番号	62/808,031		
(32)優先日	平成31年2月20日(2019.2.20)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
最終頁に続く			

(54)【発明の名称】 ナチュラルキラー細胞およびキメラ抗原受容体改変された細胞の拡大増殖

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

膜結合型 I L - 2 1 ( m I L - 2 1 ) を発現する改変された 7 2 1 . 2 2 1 細胞。

【請求項 2】

前記 m I L - 2 1 が、配列番号 2 に対して少なくとも 9 0 % もしくは少なくとも 9 5 % の配列同一性を含むアミノ酸配列を含み；および/または

前記 m I L - 2 1 をコードする核酸が、配列番号 1 に対して少なくとも 9 0 % もしくは少なくとも 9 5 % の配列同一性を含む核酸配列を含む、請求項 1 に記載の改変された 7 2 1 . 2 2 1 細胞。

【請求項 3】

前記 m I L - 2 1 が、ウイルスベクターを使用して前記 7 2 1 . 2 2 1 細胞において発現される、請求項 1 または請求項 2 に記載の改変された 7 2 1 . 2 2 1 細胞。

【請求項 4】

前記ウイルスベクターがレトロウイルスベクターである、請求項 3 に記載の改変された 7 2 1 . 2 2 1 細胞。

【請求項 5】

前記レトロウイルスベクターがモロニー Maus 白血病ウイルス ( M o M L V ) ベクターである、請求項 4 に記載の改変された 7 2 1 . 2 2 1 細胞。

【請求項 6】

前記 M o M L V ベクターが S F G レトロウイルスベクターである、請求項 5 に記載の改

変された 7 2 1 . 2 2 1 細胞。

【請求項 7】

前記ベクターが、配列番号 3 に対して少なくとも 9 0 % または 9 5 % の配列同一性を含む、請求項 3 から 6 のいずれか一項に記載の改変された 7 2 1 . 2 2 1 細胞。

【請求項 8】

少なくとも 1 つのさらなる異種インターロイキンおよび / またはインターロイキン受容体をさらに発現する、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の改変された 7 2 1 . 2 2 1 細胞。

【請求項 9】

IL - 2、IL - 1 2、IL - 3 3、IL - 2 7、IL - 1 8、IL - 7、mIL - 7、IL - 1 5、膜結合型 IL - 1 5 ( mIL - 1 5 )、t o l l 様受容体 ( TRL ) リガンド、UL 1 6 膜結合タンパク質 ( ULBP ) - 1、ULPB - 2 および / または主要組織適合複合体 ( MHC ) クラス I 鎖関連タンパク質 A ( MIC - A ) のうち少なくとも 1 つを発現する、請求項 1 に記載の改変された 7 2 1 . 2 2 1 細胞。

10

【請求項 1 0】

前記 IL - 2、IL - 1 2、IL - 3 3、IL - 2 7、IL - 1 8、IL - 7、mIL - 7、IL - 1 5、mIL - 1 5、TLR リガンド、ULBP - 1、ULPB - 2 および / または MIC - A のうち少なくとも 1 つをコードする異種核酸を含む、請求項 9 に記載の改変された 7 2 1 . 2 2 1 細胞。

【請求項 1 1】

少なくとも 1 つのさらなる異種サイトカイン、活性化受容体リガンド、TRL リガンド、またはそれらの受容体をさらに発現する、請求項 9 または請求項 1 0 に記載の改変された 7 2 1 . 2 2 1 細胞。

20

【請求項 1 2】

前記少なくとも 1 つのさらなる異種サイトカイン、活性化受容体リガンド、TRL リガンド、またはそれらの受容体が、IL - 1 5 受容体アルファ ( IL - 1 5 R ) を含む、請求項 8 または請求項 1 1 に記載の改変された 7 2 1 . 2 2 1 細胞。

【請求項 1 3】

IL - 1 5 R をコードする異種核酸を含む、請求項 1 2 に記載の改変された 7 2 1 . 2 2 1 細胞。

30

【請求項 1 4】

IL - 1 5 R を発現する、請求項 1 2 または請求項 1 3 に記載の改変された 7 2 1 . 2 2 1 細胞。

【請求項 1 5】

改変された 7 2 1 . 2 2 1 細胞を産生する方法であって、  
7 2 1 . 2 2 1 細胞の集団を、mIL - 2 1 をコードする核酸で形質導入またはトランスフェクトするステップ；  
前記 mIL - 2 1 を発現する前記細胞を単離するステップ；および  
前記単離された細胞に照射するステップ  
を含み、それによって前記改変された 7 2 1 . 2 2 1 細胞を産生する、方法。

40

【請求項 1 6】

前記 7 2 1 . 2 2 1 細胞の集団が、前記 m - IL 2 1 をコードする前記核酸を含むウイルスで形質導入される、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記 mIL - 2 1 が、配列番号 2 に対して少なくとも 9 0 % もしくは少なくとも 9 5 % の配列同一性を含むアミノ酸配列を含み；および / または

前記 mIL - 2 1 をコードする前記核酸が、配列番号 1 に対して少なくとも 9 0 % もしくは少なくとも 9 5 % の配列同一性を含む核酸配列を含む、  
請求項 1 5 または請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

50

前記721.221細胞の集団が、レトロウイルスベクターで形質導入される、請求項1.6に記載の方法。

【請求項19】

前記レトロウイルスベクターがモロニー Maus 白血病ウイルス (MoMLV) ベクターである、請求項1.8に記載の方法。

【請求項20】

前記MoMLVベクターがSFGレトロウイルスベクターである、請求項1.9に記載の方法。

【請求項21】

前記レトロウイルスベクターが、配列番号3に対して少なくとも90%または95%の配列同一性を含む、請求項1.8から2.0のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項22】

請求項9から1.4のいずれか一項に記載の改変された721.221細胞を産生する方法であって、

721.221細胞の集団を、前記mIL-21と、前記IL-2、IL-12、IL-33、IL-27、IL-18、IL-7、mIL-7、IL-15、膜結合型IL-15 (mIL-15)、TLRリガンド、ULBP-1、ULPB-2および/またはMIC-Aのうち少なくとも一つとをコードする核酸で形質導入またはトランスフェクトするステップ；

前記mIL-21と、前記IL-2、IL-12、IL-33、IL-27、IL-18、IL-7、mIL-7、IL-15、膜結合型IL-15 (mIL-15)、TLRリガンド、ULBP-1、ULPB-2および/またはMIC-Aのうち少なくとも一つとを発現する前記細胞を単離するステップ；ならびに

20

前記単離された細胞に照射するステップ

を含み、それによって前記改変された721.221細胞を産生する、方法。

【請求項23】

前記721.221細胞の集団が、前記m-IL21と、前記IL-2、IL-12、IL-33、IL-27、IL-18、IL-7、mIL-7、IL-15、膜結合型IL-15 (mIL-15)、TLRリガンド、ULBP-1、ULPB-2および/またはMIC-Aのうち少なくとも一つとをコードする前記核酸を含むウイルスで形質導入される、請求項2.2に記載の方法。

30

【請求項24】

前記ウイルスが、レトロウイルスまたはレンチウイルスである、請求項2.2または請求項2.3に記載の方法。

【請求項25】

前記721.221細胞の集団が、さらなる異種サイトカイン、活性化受容体リガンド、TRLリガンド、またはそれらの受容体をコードする核酸でさらに形質導入またはトランスフェクトされる、請求項1.5から2.4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項26】

前記さらなる外因性異種サイトカイン、活性化受容体リガンド、TRLリガンド、またはそれらの受容体が、膜結合型である、請求項2.5に記載の方法。

40

【請求項27】

前記さらなる異種サイトカイン、活性化受容体リガンド、TRLリガンド、またはそれらの受容体が、IL-15Rを含む、請求項2.5または請求項2.6に記載の方法。

【請求項28】

ナチュラルキラー (NK) 細胞またはT細胞の集団を拡大増殖させる方法であって、NK細胞および/またはT細胞を含む細胞の集団を、請求項1から1.0のいずれか一項に記載の改変された721.221細胞、インターロイキン-15 (IL-15)、およびインターロイキン-2 (IL-2) と、細胞の拡大増殖に十分な条件下で1~40日間接触させるステップを含む、方法。

50

## 【請求項 29】

前記細胞の集団が、末梢血、臍帯血、腹水、月経血または骨髄に由来する、請求項 28 に記載の方法。

## 【請求項 30】

前記細胞の集団が、末梢血単核球 (P B M C) を含む、請求項 28 または請求項 29 に記載の方法。

## 【請求項 31】

前記細胞の集団が、キメラ抗原受容体 (C A R) 改変された細胞を含む、請求項 28 から 30 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 32】

前記 C A R 改変された細胞が、C A R 改変された T 細胞または C A R 改変されたナチュラルキラー (N K) 細胞を含む、請求項 31 に記載の方法。

## 【請求項 33】

前記 C A R 改変された細胞が、C D 19 C A R 改変された N K 細胞を含む、請求項 31 または請求項 32 に記載の方法。

## 【請求項 34】

前記細胞の集団と前記改変された 7 2 1 . 2 2 1 細胞とを、少なくとも 1 4 ~ 2 1 日間接触させる、請求項 28 から 33 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 35】

前記ナチュラルキラー (N K) 細胞の集団または前記 T 細胞の集団が、前記細胞の集団を少なくとも 1 4 ~ 2 1 日間接触させた後に、少なくとも 5 0 0 0 倍 ~ 9 0 , 0 0 0 倍増加する、請求項 32 に記載の方法。

## 【請求項 36】

がんまたは感染性疾患もしくは免疫疾患を処置するための組成物であって、請求項 28 から 35 のいずれか一項に記載の方法によって産生されたナチュラルキラー (N K) 細胞または T 細胞を含み、前記組成物が、がんまたは感染性疾患もしくは免疫疾患を有する対象に投与されて、それによって前記がんまたは感染性疾患もしくは免疫疾患を処置することを特徴とする、組成物。

## 【請求項 37】

がんまたは感染性疾患もしくは免疫疾患を処置する方法における使用のための組成物であって、前記組成物が、ナチュラルキラー (N K) 細胞または T 細胞を含み、前記方法が、N K 細胞および / または T 細胞を含む細胞の集団を、請求項 1 から 10 のいずれか一項に記載の改変された 7 2 1 . 2 2 1 細胞、インターロイキン - 15 ( I L - 15 )、およびインターロイキン - 2 ( I L - 2 ) と、少なくとも 1 4 ~ 2 1 日間接触させ、それによってナチュラルキラー (N K) 細胞または T 細胞を含む前記組成物を産生する、ステップ；ならびに

前記 N K 細胞または T 細胞を含む前記組成物を、がんまたは感染性疾患もしくは免疫疾患を有する対象に投与し、それによって前記がんまたは感染性疾患もしくは免疫疾患を処置するステップを含む、組成物。

## 【請求項 38】

前記がんまたは免疫疾患が、自己免疫疾患、移植片拒絶、肉腫、神経芽細胞腫、固形腫瘍または血液がんを含む、請求項 36 または請求項 37 に記載の組成物。

## 【請求項 39】

前記細胞の集団が、がんまたは免疫疾患を有する対象に由来する、請求項 36 から 38 のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 40】

前記感染性疾患が、ヒト免疫不全ウイルス (H I V)、B 型肝炎ウイルス (H B V)、C 型肝炎ウイルス (H C V)、結核 (T B) またはマラリアを含む、請求項 36 または請求項 37 に記載の組成物。

10

20

30

40

50

## 【請求項 4 1】

前記血液がんが、多発性骨髄腫、白血病またはリンパ腫を含む、請求項 3 8 に記載の組成物。

## 【請求項 4 2】

前記固形腫瘍が、リンパ腫、乳がん、肝細胞癌（HCC）および膵がんを含む、請求項 3 8 に記載の組成物。

## 【請求項 4 3】

前記白血病が、急性リンパ球性白血病（ALL）または急性骨髄性白血病（AML）である、請求項 4 1 に記載の組成物。

## 【請求項 4 4】

前記リンパ腫が非ホジキンリンパ腫である、請求項 4 1 または請求項 4 2 に記載の組成物。

10

## 【請求項 4 5】

前記細胞の集団が、CAR 改変されたリンパ球を含む、請求項 3 7 から 4 4 のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 4 6】

前記 CAR 改変されたリンパ球が、CD19 CAR 改変されたナチュラルキラー細胞を含む、請求項 4 5 に記載の組成物。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

20

## 【0001】

関連出願に対する相互参照

本出願は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、2019年2月20日出願の米国仮特許出願第 62 / 808 , 031 号の利益を主張する。

## 【0002】

本開示は、改変されたフィーダー細胞を産生する方法、改変されたフィーダー細胞を含む組成物、およびそれらの使用の方法に関する。

政府支援の確認

## 【0003】

本発明は、National Institutes of Health によって授与された 1R01AI130197-01A1、HL125018、AI124769-01 および AI129594 の下で、政府支援によってなされた。政府は、本発明において一定の権利を有する。

30

## 【背景技術】

## 【0004】

NK細胞は、身体的第一線の防御を提供する、リンパ球の重要なサブセットである。NK細胞は、腫瘍細胞を自然に死滅させるその能力について元々記載され（Rosenberg et al., J Natl Cancer Inst 52: 345-52 (1974); Kiessling et al., Eur J Immunol 5: 117-21 (1975); Kiessling et al., Eur J Immunol 5: 112-7 (1975); Herberman et al., Int J Cancer 16: 230-9 (1975); Herberman et al., Int J Cancer 16: 216-29 (1975))、事前の感作を必要とするT細胞とは異なる。NK細胞は、いくつかの経路を介して腫瘍細胞またはウイルス感染細胞を死滅させる（Liu et al., Immunity 31: 99-109 (2012); Liu et al., Immunity 36: 600-11 (2012); Long et al., Annu Rev Immunol 31: 227-58 (2013)) が、これには、直接的細胞傷害性（自然細胞傷害性およびADCC）および間接的効果（例えば、サイトカイン産生、および適応免疫との相互作用）が挙げられる。これらの機能のうち、NK細胞の1つの重要な適用は、種々のがんを処置するための初代 e

40

50

x vivo 拡大増殖NK細胞または遺伝子改変されたNK細胞の使用である。いくつかの臨床試験により、NK細胞注入が、T細胞注入よりも、重度でない移植片対宿主病（GvHD）を有することが示されている。

#### 【0005】

NK細胞には、2つの主要な臨床適用が存在する。第1は、がんを処置するために遺伝子改変を有する初代ex vivo 拡大増殖NKを使用することである。具体的には、NK細胞は、ALLおよびAMLを処置するために臨床において使用されている（Miller et al., Blood 105:3051-7 (2005); Rubnitz et al., J Clin Oncol 28:955-9 (2010)）。第2に、遺伝子改変されたNK細胞、例えば、キメラ抗原受容体（CAR）改変されたNK細胞は、がん免疫療法のための新興のツールになっている（Liu et al., Leukemia 32:520-31 (2018); Liu et al., Protein Cell 9:902 (2018)）。CAR改変されたNK細胞ベースの免疫療法の臨床研究が、いくつかの型のがんについて集中的に実施されてきた（Rezvani Kand Rouse RH, Front Immunol 6:578 (2015)）。CAR-T細胞ベースの免疫療法と同様、種々の抗原特異性を再指向するように様々なCAR分子を使用して遺伝子改変されたNK細胞が、様々なグループによって調査されている（Rezvani Kand Rouse RH, Front Immunol 6:578 (2015); Hermanson DL and Kaufman DS, Front Immunol 6:195 (2015); Glienke et al., Front Pharmacol 6:21 (2015)）。

#### 【0006】

CAR改変されたT細胞療法は、血液がんの処置のための有望な免疫療法戦略になっており（Porter et al., N Engl J Med 365:725-33 (2011); Kim et al., Arch Pharm Res 39:437-52 (2016); Maude S and Barrett DM, Br J Haematol 172:11-22 (2016)）、学術および産業の両方の研究者からの著しい注目を獲得している（Glienke et al., Front Pharmacol 6:21 (2015)）。患者中へのCAR改変された免疫細胞（CAR-T、CAR-NK細胞およびCAR-NKT細胞を含む）の養子移入は、複数の血液がんを処置するにあたり、並外れた成功を示している。CAR産物を使用して多発性骨髄腫（Garfall et al., N Engl J Med 373:1040-7 (2015); Atanackovic et al., Br J Haematol 172:685-98 (2016)）、白血病（Porter et al., N Engl J Med 365:725-33 (2011); Maude et al., N Engl J Med 371:1507-17 (2014); Lee et al., Lancet 385:517-28 (2015)）、肉腫（Ahmed et al., J Clin Oncol 33:1688-96 (2015)）および神経芽細胞腫（Pule et al., Nat Med 14:1264-70 (2008); Louis et al., Blood 118:6050-6 (2011)）を処置する臨床試験は、有望な結果を示している。世界中の科学者および製薬会社は、CARの開発および最適化にかなりの労力および資金を注ぎ込んでいる（Casucci et al., Cancer Immunol Immunother 64:123-30 (2015); Gottschalk et al., Ernst Schering Found Symp Proc 69-82 (2006); Ramos et al., Cancer J 20:112-8 (2014); Savoldo B and Dotti G, Cancer J 20:112-8 (2014)）。

#### 【0007】

養子CAR T細胞療法は、腫瘍抗原特異性と免疫細胞活性化とを単一の受容体で組み合わせるものであり、患者自身のT細胞を単離するステップ、腫瘍タンパク質を認識する

10

20

30

40

50

キメラ抗原受容体 (CAR) を発現するようにそれら进行操作するステップ、およびそれらを患者中に再注入するステップを含む。養子CAR T細胞療法の1つの潜在的な問題は、患者から単離された自家T細胞の使用である。患者から単離された自家T細胞は、2つの主要な問題に直面する。1) 免疫力が低下したがん患者から直接的に単離されたT細胞は、通常、低い細胞傷害性および機能性を有し、それらの使用を妨げることになる。2) 自家T細胞は、GVHDの可能性に起因して、他の患者には使用できない。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0008】

【文献】Rosenberg et al., J Natl Cancer Inst 5 10  
2: 345-52 (1974)

【文献】Kiessling et al., Eur J Immunol 5: 117-21 (1975)

【文献】Kiessling et al., Eur J Immunol 5: 112-7 (1975)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

例えば、CAR改変された細胞免疫療法の不利益、例えば、低い細胞傷害性を軽減するための、改善された細胞傷害性細胞媒介性免疫療法がいまだに必要とされている。改善された細胞傷害性および細胞拡大増殖の能力を有する免疫療法のための細胞、例えば、NK細胞およびT細胞を拡大増殖させるための方法および組成物が、本明細書に開示される。

【課題を解決するための手段】

【0010】

改変された721.221細胞が本明細書に開示される。一部の例では、改変された721.221細胞は、膜結合型IL-21 (mIL-21)、IL-2、IL-12、IL-33、IL-27、IL-18、IL-7、mIL-7、IL-15、膜結合型IL-15 (mIL-15)、TLRリガンド、ULBP-1、ULPB-2および/または主要組織適合複合体 (MHC) クラスI鎖関連タンパク質A (MIC-A) のうち少なくとも1つを発現する。具体的な非限定的な例では、改変された721.221細胞は、例えば、ウイルス (例えば、レトロウイルス) ベクター (例えば、レンチウイルス、例えば、モロニー Maus 白血病ウイルス (MoMLV) ベクター、例えば、SFGレトロウイルスベクター) を使用して、配列番号2に対して90%もしくは95%の配列同一性を有する (および/または配列番号1に対して90%もしくは95%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされる) アミノ酸配列を含むようなmIL-21を発現する。活性化受容体リガンド、TRLリガンド、またはそれらの受容体を含むさらなる異種サイトカイン (例えば、IL-15受容体アルファ (IL-15R)) を、改変された721.221細胞中に含めることができる。一部の例では、改変された721.221細胞は、mIL-21、IL-2、IL-12、IL-33、IL-27、IL-18、IL-7、mIL-7、IL-15、mIL-15、TLRリガンド、ULBP-1、ULPB-2および/またはMIC-Aのうち少なくとも1つをコードする異種核酸を含む。特定の例では、改変された721.221細胞は、mIL-21またはmIL-21およびIL-15Rを発現する。

【0011】

改変された721.221細胞を産生する方法であって、例えば、721.221細胞の集団を、mIL-21、IL-2、IL-12、IL-33、IL-27、IL-18、IL-7、mIL-7、IL-15、膜結合型IL-15 (mIL-15)、TLRリガンド、ULBP-1、ULPB-2および/またはMIC-Aをコードする核酸で形質導入またはトランスフェクトするステップ; mIL-21、IL-2、IL-12、IL-33、IL-27、IL-18、IL-7、mIL-7、IL-15、膜結合型IL-

15 (mIL-15)、TLRリガンド、ULBP-1、ULPB-2および/またはMIC-Aを発現する細胞を単離するステップ；ならびに単離された細胞に照射するステップを含み、それによって改変された721.221細胞を産生する、方法が本明細書にさらに開示される。一部の例では、細胞は、(例えば、ウイルスベクター、例えば、レトロウイルスまたはレンチウイルスを使用する)形質導入を介して改変される。具体的な非限定的な例では、改変された721.221細胞は、例えば、レトロウイルスベクター(例えば、モロニー Maus 白血病ウイルス(MoMLV)ベクター、例えば、SFGレトロウイルスベクター)を使用して、配列番号2に対して90%もしくは95%の配列同一性を有する(および/または配列番号1に対して90%もしくは95%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされる)アミノ酸配列を含むようなmIL-21を発現する。方法は、1つまたは1つよりも多くのさらなる異種サイトカイン、活性化受容体リガンド、TRLリガンド、またはそれらの受容体(例えば、IL-15R)を発現するように721.221細胞を改変するステップをさらに含み得る。

10

#### 【0012】

例えば、リンパ球の集団を、本明細書に開示される改変された721.221細胞および少なくとも1つのサイトカイン(例えば、インターロイキン、例えば、IL-15またはIL-2)と、細胞の拡大増殖に十分な条件下で1~40日間(例えば、14~21日間)接触させることによって、ナチュラルキラー(NK)細胞またはT細胞の集団を拡大増殖させる方法もまた、本明細書に開示される。リンパ球の集団は、任意の試料型、例えば、末梢血、臍帯血、腹水、月経血または骨髄由来であり得、例えば、末梢血単核球(PBMC)を含み得る。改変された721.221細胞と接触される細胞の集団は、免疫療法のための改変された細胞、例えば、キメラ抗原受容体(CAR)改変された細胞(例えば、CAR-NKまたはCAR-T細胞、例えば、CD19 CAR改変されたNK細胞)をさらに含み得る。一部の例では、NK細胞またはT細胞の集団は、(例えば、細胞の拡大増殖に十分な条件下で少なくとも14~21日間、改変された721.221と接触させた後に)少なくとも5000倍~90,000倍増加する。

20

#### 【0013】

例えば、本明細書に開示される方法を使用して産生されたNK細胞またはT細胞(例えば、CAR改変されたNK細胞またはT細胞、例えば、CD19 CAR改変されたNK細胞)を、がんまたは感染性疾患もしくは免疫疾患を有する対象に投与し、それによってがんまたは免疫疾患を処置することによって、がんまたは感染性疾患もしくは免疫疾患を処置する方法が、本明細書にさらに開示される。一部の例では、がんまたは免疫疾患もしくは感染性疾患には、自己免疫疾患、移植片拒絶、固形腫瘍(例えば、リンパ腫、乳がん、肝細胞癌(HCC)および膵がん)、肉腫、神経芽細胞腫、血液がん(例えば、多発性骨髄腫；リンパ腫、例えば、非ホジキンリンパ腫；または白血病；例えば、急性リンパ球性白血病(ALL)または急性骨髄性白血病(acute myeloid leukemia)(AML))、HIV、B型肝炎ウイルス(HBV)、C型肝炎ウイルス(HCV)、結核(TB)またはマラリアが挙げられる。

30

#### 【0014】

本開示の上述および他の特色は、添付の図面を参照して進行する以下の詳細な説明からより明らかとなる。

40

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0015】

【図1-1】図1A~1Fは、膜IL-21を発現するK562細胞および721.221細胞の特徴付けを示す図である。(図1A)、代表的なヒストグラムが、フローサイトメトリーを使用して検出した、K562(緑)およびIL-21で形質導入されたK562(K562-mIL21、赤)によるIL-21および4-1BBLの発現を示す。平均蛍光強度(MFI)がそれぞれのヒストグラムに記される。(図1B)、代表的なヒストグラムが、フローサイトメトリーを使用して検出した、721.221(緑)およびIL-21で形質導入された721.221(721.221-mIL21、赤)上の、I

50

L - 2 1 および 4 - 1 B B L の発現を示す。M F I がそれぞれのヒストグラムに記される。(図 1 C) I L - 2 1 で形質導入された K 5 6 2 細胞 ( K 5 6 2 - m I L 2 1 ) 上の I L - 2 1 の発現の共焦点画像。(図 1 D) I L - 2 1 で形質導入された 2 2 1 細胞 ( 2 2 1 - m I L 2 1 ) 上の I L - 2 1 の発現の共焦点画像。(図 1 E)、代表的なヒストグラムが、フローサイトメトリーを使用して検出した、K 5 6 2 ( 緑 ) および K 5 6 2 - m I L 2 1 ( 赤 ) 細胞上の I C A M - 1、P D - L 1、H L A - E および M I C B の発現を示す。M F I がそれぞれのヒストグラムに記される。(図 1 F)、代表的なヒストグラムが、フローサイトメトリーを使用して検出した、7 2 1 . 2 2 1 ( 緑 ) および 7 2 1 . 2 2 1 - m I L 2 1 ( 赤 ) 細胞上の I C A M - 1、P D - L 1、H L A - E および M I C B の発現を示す。M F I がそれぞれのヒストグラムに記される。

10

【図 1 - 2】同上。

【図 1 - 3】同上。

【0016】

【図 2 - 1】図 2 A ~ 2 E は、4 つの異なる型のフィーダー細胞を用いた初代ヒト NK 細胞拡大増殖を示す図である。(図 2 A)、代表的なドットプロットが、フローサイトメトリーを使用して検出した、拡大増殖後の示された日における、異なる型のフィーダー細胞を用いて拡大増殖させた NK 細胞の純度を示す。P B M C を、0 日目に、照射した K 5 6 2、K 5 6 2 - m I L 2 1、7 2 1 . 2 2 1 および 7 2 1 . 2 2 1 - m I L 2 1 のそれぞれで刺激した。NK 細胞の純度を、7 日目に試験し、次いで、3 ~ 5 日毎に試験した。(図 2 B および 2 C)、定量的データが、2 1 日にわたって、照射した K 5 6 2、K 5 6 2 - m I L 2 1、7 2 1 . 2 2 1 および 7 2 1 . 2 2 1 - m I L 2 1 のそれぞれを用いて拡大増殖させた、11 人のドナー由来の NK 細胞の拡大増殖倍数 ( f o l d - e x p a n s i o n ) ( 図 2 B ) および純度 ( 図 2 C ) を示す。(図 2 D および 2 E)、定量的データが、2 1 日目の、示されたフィーダー細胞を用いて拡大増殖させた、11 人のドナー由来の NK 細胞の拡大増殖倍数 ( 図 2 D ) および純度 ( 図 2 E ) を示す。平均 ( 実線 ) が、9 5 % C I ( 灰色の帯 ) と共に、( 図 2 B ) および ( 図 2 C ) に示される。\* p < 0 . 0 5。\* \* p < 0 . 0 1、\* \* \* p < 0 . 0 0 1。

20

【図 2 - 2】同上。

【図 2 - 3】同上。

【0017】

【図 3 - 1】図 3 A ~ 3 E は、種々のフィーダー細胞によって拡大増殖させた NK 細胞の表現型を示す図である。(図 3 A)、代表的なヒストグラムが、K 5 6 2、K 5 6 2 - m I L 2 1、7 2 1 . 2 2 1 および 7 2 1 . 2 2 1 - m I L 2 1 を使用して拡大増殖させた NK 細胞上の C D 1 6、N K G 2 D、N K p 4 6、2 B 4 および D N A M - 1 の発現を示す。(図 3 B)、代表的なヒストグラムが、K 5 6 2、K 5 6 2 - m I L 2 1、7 2 1 . 2 2 1 および 7 2 1 . 2 2 1 - m I L 2 1 を使用して拡大増殖させた NK 細胞上の C D 6 9、C D 9 4、C D 8 a および N K G 2 C の発現を示す。(図 3 C)、代表的なヒストグラムが、K 5 6 2、K 5 6 2 - m I L 2 1、7 2 1 . 2 2 1 および 7 2 1 . 2 2 1 - m I L 2 1 を使用して拡大増殖させた NK 細胞上の N K G 2 A、C T L A - 4、K L R G 1 および P D - 1 の発現を示す。(図 3 D)、代表的なヒストグラムが、K 5 6 2、K 5 6 2 - m I L 2 1、7 2 1 . 2 2 1 および 7 2 1 . 2 2 1 - m I L 2 1 を使用して拡大増殖させた NK 細胞上の L I R 1、T I M - 3、T I G I T および L A G - 3 の発現を示す。(図 3 E)、代表的なヒストグラムが、K 5 6 2、K 5 6 2 - m I L 2 1、7 2 1 . 2 2 1 および 7 2 1 . 2 2 1 - m I L 2 1 を使用して拡大増殖させた NK 細胞上の K I R、K I R 2 D L 1、K I R 2 D L 2 / L 3、K I R 3 D L 1 および K I R 3 D L 2 の発現を示す。M F I がそれぞれのヒストグラムに示される。

30

【図 3 - 2】同上。

【0018】

【図 4 - 1】図 4 A ~ 4 H は、感受性標的細胞に対する NK 細胞の機能的比較を示す図である。(図 4 A)、定量的データが、C F S E / 7 - A A D 細胞傷害性アッセイを使用し

40

50

た、K562細胞に対する拡大増殖されたNK細胞の細胞傷害活性を示す。K562細胞をCFSEで標識し、次いで、1:4~4:1の範囲のE:T比で4時間、拡大増殖されたNK細胞と共にインキュベートした。次に、7-AADを使用して、K562細胞の溶解を決定した。(図4B)、定量的データが、無刺激後の、2時間にわたるK562による刺激の後およびPMA/イオノマイシンによる刺激の後の、CD107aを発現する拡大増殖されたNK細胞のパーセンテージを示す。(図4C)、定量的データが、CFSE/7-AAD細胞傷害性アッセイを使用した、721.221細胞に対する拡大増殖されたNK細胞の細胞傷害活性を示す。721.221細胞をCFSEで標識し、次いで、1:4~4:1の範囲のE:T比で4時間、拡大増殖されたNK細胞と共にインキュベートした。次に、7-AADを使用して、721.221細胞の溶解を決定した。(図4D)、定量的データが、無刺激後の、2時間にわたるそれぞれ721.221による刺激の後およびPMA/イオノマイシンによる刺激の後の、CD107aを発現する拡大増殖されたNK細胞のパーセンテージを示す。平均±SDが(図4A)および(図4C)に示され、平均+SDが(図4B)および(図4D)に示される。(図4E)CFSE/7-AADアプローチを使用した、NK細胞媒介性細胞傷害性についてのゲーティング戦略。NK細胞とCFSE標識した標的細胞との4時間にわたるインキュベーション後、死細胞を、7-AAD陽性サブセットでゲーティングした。(図4F)異なるエフェクター:標的(E:T)細胞比での拡大増殖されたNK細胞とのインキュベーション後の、CFSE標識したK562細胞中の7-AAD陽性細胞のパーセントの代表的なフローサイトメトリックドットプロット。(図4G)細胞表面CD107aアッセイのためのゲーティング戦略。(図4H)無刺激(NK細胞のみ、陰性対照群)後の、K562およびPMA/イオノマイシンによる刺激の後(陽性対照群)の、CD107aを発現する拡大増殖されたNK細胞のパーセントの代表的なドットプロット。\*\*\* $p < 0.001$ 、ns  $p > 0.05$ 。

【図4-2】同上。

【図4-3】同上。

【図4-4】同上。

【図4-5】同上。

【図4-6】同上。

【0019】

【図5-1】図5A~5Fでは、721.221-mIL21を用いたCD19-CAR NK細胞の拡大増殖の例示的な方法が、図5Aに概略図として示される。簡潔に述べると、221-mIL21細胞に、100Gray(10000Rad)の線量を照射した。次いで、PBMCを、IL-2およびIL-15の存在下で、照射したフィーダー細胞と共に共培養した。並行して、293T細胞をトランスフェクトすることによって、CD19-CARレトロウイルスを産生した。拡大増殖されたNK細胞を、7日目にCD19-CARレトロウイルスで形質導入した。細胞を21日間培養した。(図5B)、代表的なドットプロットが、拡大増殖後の示された日における、CD19-CAR陽性細胞中の拡大増殖されたNK細胞のパーセンテージを示す。PBMCを、0日目に、照射した721.221-mIL21で刺激し、7日目にCD19-CARレトロウイルスで形質導入した。CD19-CAR陽性細胞中のNK細胞の純度を、3~4日毎に試験した。(図5C)3人のドナー由来のCD19-CAR NK細胞の拡大増殖倍数の動的タイムラプス拡大増殖データ。CD19-CAR改変されたNK細胞を、照射したK562、K562-mIL21、221および221-mIL21フィーダー細胞を用いて21日間拡大増殖させた。(図5D)拡大増殖の21日目の、3人のドナー由来のCD19-CAR NK細胞の拡大増殖倍数の定量的データ。(図5E)3人のドナー由来のCD19-CAR陽性細胞中のNK細胞544の純度の動的タイムラプス拡大増殖データ。NK細胞を、照射した545 K562、K562-mIL21、221および221-mIL21フィーダー細胞のそれぞれを用いて拡大増殖させた。(図5F)拡大増殖後21日目の、3人のドナー由来のCD19-CAR陽性細胞中のNK細胞のパーセントの定量的データ。平均(実線)が、95%CI(灰色の帯)と共に、(図5C)および(図5D)に示される。

10

20

30

40

50

【図5 - 2】同上。

【図5 - 3】同上。

【図5 - 4】同上。

【0020】

【図6 - 1】図6A ~ 6Dは、721.221-mIL21を用いた臍帯血(CB)由来のNK細胞およびCAR-NK細胞の拡大増殖を示す図である。(図6A)示された日におけるNK細胞中のCD19-CAR陽性細胞のパーセントの代表的なフローサイトメトリドットプロット。CBMCを、0日目に、照射したフィーダー細胞で刺激し、7日目にCD19-CARレトロウイルスで形質導入した。(図6B)CBMC(n=3)から拡大増殖されたNK細胞中のCD19-CAR陽性細胞のパーセントについての定量的データ。(図6C)CFSE/7-AAD細胞傷害性アッセイを使用した、Raji細胞に対する拡大増殖されたCD19-CAR CB-NK細胞の細胞傷害活性についての定量的データ。標的細胞をCFSEで標識し、次いで、5:1~0.3125:1の範囲のE:T比で4時間、拡大増殖されたCD19-CAR CB-NK細胞と共にインキュベートした。次に、7-AADを使用して、標的細胞の溶解を検出した。(図6D)CFSE/7-AAD細胞傷害性アッセイを使用した、Daudi細胞に対する拡大増殖されたCD19-CAR CB-NK細胞の細胞傷害活性についての定量的データ。

10

【図6 - 2】同上。

【図6 - 3】同上。

【0021】

【図7 - 1】図7A ~ 7Iは、リンパ腫異種移植モデルにおける、221-mIL21で拡大増殖されたCD19-CAR NK細胞からの優れた抗腫瘍活性を示す図である。(図7A)Daudiリンパ腫異種移植モデルの実験設計の略図。雄性および雌性NSGマウス(n=5)に、-4日目に尾静脈を介して、100μLのPBS中 $2 \times 10^6$ のDaudi-FFLuc細胞をi.v.注射した。0日目に開始して、マウスに、100μLのPBS中 $1 \times 10^7$ の221-mIL21で拡大増殖されたCD19-CAR NK細胞またはK562-mIL21で拡大増殖されたCD19-CAR NK細胞を(i.v.)注射し、0、3、7および10日目に、150μLのPBS中のIL-2(50,000単位/マウス)およびIL-15(10ng/マウス)を注射(i.p.)した。動物を、腫瘍細胞追跡のために1週間に2回、IVISシステムを使用してイメージングした。(図7B)示された時点における腫瘍負荷の代表的な画像。蛍光強度の範囲は、 $1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$ 光子/秒/cm<sup>2</sup>/srの単位である。(図7C)示された時点における腫瘍負荷の定量的データ。マウスを、示された日にイメージングして、腫瘍成長を示す定量された生物発光(平均光強度)として表される腫瘍負荷を評価した。(図7D)示された日におけるマウス体重の定量的データ。(図7E)Rajiリンパ腫異種移植モデルの実験設計の略図。雄性および雌性NSGマウス(n=10)に、0日目に尾静脈を介して、100μLのPBS中 $2 \times 10^6$ のRaji-FFLuc-GFP細胞をi.v.注射した。2日目および4日目に、マウスに、100μLのPBS中、それぞれ、 $1 \times 10^7$ のK562-mIL21で拡大増殖されたCD19-CAR NK細胞、221-mIL21で拡大増殖されたCD19-CAR NK細胞、および221-mIL21で拡大増殖されたCD19-CAR-IL15 NK細胞を(i.v.)注射し、150μLのPBS中のIL-2(50,000単位/マウス)およびIL-15(10ng/マウス)を注射(i.p.)した。動物を、腫瘍細胞追跡のために1週間に1回、IVISシステムを使用してイメージングした。(図7F)示された時点における腫瘍負荷の代表的な画像。蛍光強度の範囲は、7日目については $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ 光子/秒/cm<sup>2</sup>/srの単位であり、14日目および21日目については $2 \times 10^7 \sim 5 \times 10^8$ 光子/秒/cm<sup>2</sup>/srの単位である。(図7G)それぞれPBS、K562-mIL21で拡大増殖されたCD19-CAR NK細胞、221-mIL21で拡大増殖されたCD19-CAR NK細胞、および221-mIL21で拡大増殖されたCD19-CAR-IL15 NK細胞による処置後の、腫瘍保有マウスのカプラン・マイヤー生存曲線。p値を

20

30

40

50

、ログランク（マンテル・コックス）検定によって分析した。（図7H）示された時点における腫瘍負荷の定量的データ。マウスを、示された日にイメージングして、腫瘍成長を示す定量されて表される腫瘍負荷を評価した。（図7I）示された日におけるマウス体重の定量的データ。

【図7-2】同上。

【図7-3】同上。

【図7-4】同上。

【図7-5】同上。

【0022】

【図8-1】図8A~8Bは、ヒトIL-21をコードする例示的な組換えレトロウイルスベクター、および721.221.mIL-21フィーダー細胞を用いたNK細胞拡大増殖のための例示的な方法の概略図表示を示す図である。（図8A）、IL-21構築物は、ヒトIgG1 Fab'ドメイン、CD28膜貫通ドメイン、4-1BBの細胞内ドメイン、およびCD3ゼータの細胞内ドメインを含む。（図8B）フィーダー細胞に、100Gray（10000Rad）の線量を照射し、次いで、PBMCを、NK細胞拡大増殖のために、IL-2およびIL-15と共に、照射したフィーダー細胞と共に共培養した。

10

【図8-2】同上。

【0023】

【図9】図9は、ヒト初代NK細胞が細胞表面IL-21受容体を発現することを示す図である。代表的なヒストグラムが、PBMC由来の初代NK細胞上でのIL-21Rの発現を示す。MFIがそれぞれのヒストグラムに記される。

20

【0024】

【図10-1】図10A~10Cは、膜IL-15受容体アルファを発現する721.221細胞（221-mIL-15R）を用いた初代ヒトNK細胞拡大増殖を示す図である。（図10A）、代表的なドットプロットが、フローサイトメトリーによって検出した、拡大増殖後の示された日における、2つの異なる型のフィーダー細胞を用いて拡大増殖させたNK細胞の純度を示す。PBMCを、0日目に、照射した野生型721.221（上パネル）および721.221-mIL-15Rのそれぞれで刺激した。NK細胞の純度を、7日目、14日目および21日目にチェックした。（図10Bおよび10C）、定量的データが、照射した野生型721.221および721.221-mIL-15Rのそれぞれを用いて21日間拡大増殖させた、7人のドナー由来のNK細胞の拡大増殖倍数（図10B）および純度（図10C）を示す。

30

【図10-2】同上。

【0025】

【図11-1】図11A~11Cは、膜IL-21を発現する721.221細胞を用いた初代ヒトT細胞拡大増殖を示す図である。（図11A）代表的なドットプロットが、フローサイトメトリーによって検出した、拡大増殖後の示された日における、2つの異なる型のフィーダー細胞を用いて拡大増殖させたT細胞の純度を示す。PBMCを、0日目に、照射したK562-mIL21（上パネル）および721.221-mIL21（下パネル）のそれぞれで刺激した。NK細胞の純度を、7日目、14日目および21日目にチェックした。定量的データが、照射したK562-mIL21および721.221-mIL21のそれぞれを用いて21日間拡大増殖させた、11人のドナー由来のT細胞の拡大増殖倍数（左パネル）および純度（右パネル）を示す。（図11B）代表的なドットプロットが、フローサイトメトリーによって検出した、拡大増殖後の示された日における、2つの異なる型のフィーダー細胞を用いて拡大増殖させたT細胞の純度を示す。臍帯血単球を、0日目に、照射したK562-mIL21（上パネル）および721.221-mIL21（下パネル）のそれぞれで刺激した。NK細胞の純度を、7日目、14日目および21日目にチェックした。定量的データが、照射したK562-mIL21および721.221-mIL21のそれぞれを用いて21日間拡大増殖させた、11人のドナー由

40

50

来のT細胞の拡大増殖倍数（左パネル）および純度（右パネル）を示す。（図11C）代表的なドットプロットが、フローサイトメリーによって検出した、拡大増殖後の示された日における、2つの異なる型のフィーダー細胞を用いて拡大増殖させたT細胞の純度を示す。未分化大細胞リンパ腫を有する患者由来のPBMCを、照射した721.221-mIL21フィーダー細胞で刺激した。T細胞の純度を、それぞれ7日目、20日目および28日目にチェックした。

【図11-2】同上。

【図11-3】同上。

【0026】

【図12】図12は、4つの異なる型のフィーダー細胞を用いた初代ヒトNK細胞拡大増殖を示す図である。PBMCを、照射したK562、K562-mIL21、721.221および721.221-mIL21で刺激し、定量的データが、NK細胞の拡大増殖倍数を示す。

10

【0027】

【図13-1】図13A~13Nは、221-mIL21で拡大増殖されたNK細胞が、富化された代謝経路および未成熟な表現型を示すことを示す図である。（図13A）PBMCを、照射したK562-mIL21および221-mIL21フィーダー細胞で刺激した。NK細胞を、RNA配列決定（RNA-seq）のために、7日目および14日目にフローサイトメリーを使用して、拡大増殖された細胞から精製した。7日目および14日目の、K562-mIL21または221-mIL21フィーダー細胞を用いて拡大増殖させたNK細胞の試料間距離の主成分分析（PCA）プロット。（図13B）7日目の、K562-mIL21フィーダー細胞を用いて拡大増殖させたNK細胞と比較した、221-mIL21フィーダー細胞を用いて拡大増殖させたNK細胞における差次的に発現された遺伝子（DEG）のMean-average（MA）プロット；p値はDESeq2を使用して計算した。上位15の有意なDEGを、MAプロット上に標識する。上方、上方調節されたDEG、調整した $p < 0.05$ かつ $\log_2$ 変化倍数  $> 1$ ；下方、下方調節されたDEG、調整した $p < 0.05$ かつ $\log_2$ 変化倍数  $< -1$ ；NS、有意性なし。（図13C）14日目の、K562-mIL21フィーダー細胞を用いて拡大増殖させたNK細胞と比較した、221-mIL21フィーダー細胞を用いて拡大増殖させたNK細胞におけるDEGのMAプロット。上位15の有意なDEGを、MAプロット上に標識する。上方、上方調節されたDEG、調整した $p < 0.05$ かつ $\log_2$ 変化倍数  $> 1$ ；下方、下方調節されたDEG、調整した $p < 0.05$ かつ $\log_2$ 変化倍数  $< -1$ ；NS、有意性なし。（図13D）Molecular Signatures Database（MSigDB）中の遺伝子オントロジー（GO）生物学的プロセス（BP）データセットを使用した、7日目の、K562-mIL21フィーダー細胞を用いて拡大増殖させたNK細胞と比較した、221-mIL21フィーダー細胞を用いて拡大増殖させたNK細胞における細胞のアミノ酸代謝プロセスの遺伝子セット富化分析（Gene set enrichment analysis）（GSEA）。

20

NES、正規化エンリッチメントスコア；p.調整、偽発見率（FDR）調整したp値。（図13E）MSigDB中のHallmarkデータセットを使用した、7日目の、K562-mIL21フィーダー細胞を用いて拡大増殖させたNK細胞と比較した、221-mIL21フィーダー細胞を用いて拡大増殖させたNK細胞における解糖のGSEA。NES、正規化エンリッチメントスコア；p.調整、FDR調整したp値。（図13F）フィーダー細胞としてK562-mIL21および221-mIL21のいずれかを使用したNK細胞拡大増殖の間の培地中のグルコースの動的レベル。矢印は、培地交換の時点を示す。（図13G）7日目および14日目の、K562-mIL21または221-mIL21フィーダー細胞を用いて拡大増殖させたNK細胞の定量的グルコース取り込み比較。（図13H）MSigDB中のGO\_BPデータセットを使用した、7日目の、K562-mIL21フィーダー細胞を用いて拡大増殖させたNK細胞と比較した、221-mIL21フィーダー細胞を用いて拡大増殖させたNK細胞におけるリンパ球活性化のG

30

NES、正規化エンリッチメントスコア；p.調整、偽発見率（FDR）調整したp値。（図13E）MSigDB中のHallmarkデータセットを使用した、7日目の、K562-mIL21フィーダー細胞を用いて拡大増殖させたNK細胞と比較した、221-mIL21フィーダー細胞を用いて拡大増殖させたNK細胞における解糖のGSEA。NES、正規化エンリッチメントスコア；p.調整、FDR調整したp値。（図13F）フィーダー細胞としてK562-mIL21および221-mIL21のいずれかを使用したNK細胞拡大増殖の間の培地中のグルコースの動的レベル。矢印は、培地交換の時点を示す。（図13G）7日目および14日目の、K562-mIL21または221-mIL21フィーダー細胞を用いて拡大増殖させたNK細胞の定量的グルコース取り込み比較。（図13H）MSigDB中のGO\_BPデータセットを使用した、7日目の、K562-mIL21フィーダー細胞を用いて拡大増殖させたNK細胞と比較した、221-mIL21フィーダー細胞を用いて拡大増殖させたNK細胞におけるリンパ球活性化のG

40

NES、正規化エンリッチメントスコア；p.調整、偽発見率（FDR）調整したp値。（図13E）MSigDB中のHallmarkデータセットを使用した、7日目の、K562-mIL21フィーダー細胞を用いて拡大増殖させたNK細胞と比較した、221-mIL21フィーダー細胞を用いて拡大増殖させたNK細胞における解糖のGSEA。NES、正規化エンリッチメントスコア；p.調整、FDR調整したp値。（図13F）フィーダー細胞としてK562-mIL21および221-mIL21のいずれかを使用したNK細胞拡大増殖の間の培地中のグルコースの動的レベル。矢印は、培地交換の時点を示す。（図13G）7日目および14日目の、K562-mIL21または221-mIL21フィーダー細胞を用いて拡大増殖させたNK細胞の定量的グルコース取り込み比較。（図13H）MSigDB中のGO\_BPデータセットを使用した、7日目の、K562-mIL21フィーダー細胞を用いて拡大増殖させたNK細胞と比較した、221-mIL21フィーダー細胞を用いて拡大増殖させたNK細胞におけるリンパ球活性化のG

NES、正規化エンリッチメントスコア；p.調整、偽発見率（FDR）調整したp値。（図13E）MSigDB中のHallmarkデータセットを使用した、7日目の、K562-mIL21フィーダー細胞を用いて拡大増殖させたNK細胞と比較した、221-mIL21フィーダー細胞を用いて拡大増殖させたNK細胞における解糖のGSEA。NES、正規化エンリッチメントスコア；p.調整、FDR調整したp値。（図13F）フィーダー細胞としてK562-mIL21および221-mIL21のいずれかを使用したNK細胞拡大増殖の間の培地中のグルコースの動的レベル。矢印は、培地交換の時点を示す。（図13G）7日目および14日目の、K562-mIL21または221-mIL21フィーダー細胞を用いて拡大増殖させたNK細胞の定量的グルコース取り込み比較。（図13H）MSigDB中のGO\_BPデータセットを使用した、7日目の、K562-mIL21フィーダー細胞を用いて拡大増殖させたNK細胞と比較した、221-mIL21フィーダー細胞を用いて拡大増殖させたNK細胞におけるリンパ球活性化のG

NES、正規化エンリッチメントスコア；p.調整、偽発見率（FDR）調整したp値。（図13E）MSigDB中のHallmarkデータセットを使用した、7日目の、K562-mIL21フィーダー細胞を用いて拡大増殖させたNK細胞と比較した、221-mIL21フィーダー細胞を用いて拡大増殖させたNK細胞における解糖のGSEA。NES、正規化エンリッチメントスコア；p.調整、FDR調整したp値。（図13F）フィーダー細胞としてK562-mIL21および221-mIL21のいずれかを使用したNK細胞拡大増殖の間の培地中のグルコースの動的レベル。矢印は、培地交換の時点を示す。（図13G）7日目および14日目の、K562-mIL21または221-mIL21フィーダー細胞を用いて拡大増殖させたNK細胞の定量的グルコース取り込み比較。（図13H）MSigDB中のGO\_BPデータセットを使用した、7日目の、K562-mIL21フィーダー細胞を用いて拡大増殖させたNK細胞と比較した、221-mIL21フィーダー細胞を用いて拡大増殖させたNK細胞におけるリンパ球活性化のG

50

SEA。NES、正規化エンリッチメントスコア；p調整、FDR調整したp値。(図13I) MSigDB中のGO\_BPデータセットを使用した、7日目の、K562-mIL21フィーダー細胞を用いて拡大増殖させたNK細胞と比較した、221-mIL21フィーダー細胞を用いて拡大増殖させたNK細胞におけるリンパ球分化のGSEA。NES、正規化エンリッチメントスコア；p調整、FDR調整したp値。(図13J) MSigDB中のGO\_BPデータセットを使用した、7日目の、K562-mIL21フィーダー細胞を用いて拡大増殖させたNK細胞と比較した、221-mIL21フィーダー細胞を用いて拡大増殖させたNK細胞における細胞-細胞接着のGSEA。NES、正規化エンリッチメントスコア；p調整、FDR調整したp値。(図13K) NK細胞の阻害性受容体のヒートマップ。(図13L) NK細胞の活性化受容体のヒートマップ。(図13M) NK細胞の細胞傷害機能に関連する遺伝子のヒートマップ。(図13N) NK細胞の発生および成熟に関連する遺伝子のヒートマップ。ヒートマップを、正規化-対数変換(log)を使用して変換されたRNA-seqカウントに由来するz-スコアを使用して生成した。各欄は、生物学的反復を示す。

10

【図13-2】同上。

【図13-3】同上。

【図13-4】同上。

【図13-5】同上。

【図13-6】同上。

【図13-7】同上。

【図13-8】同上。

【図13-9】同上。

20

【0028】

【図14-1】図14A~14Fは、異なる型のフィーダー細胞拡大増殖システム間での異なる細胞集団拡大増殖の動態を示す図である。(図14A)照射したK562、K562-mIL21、221および221-mIL21フィーダー細胞を用いて21日間拡大増殖させたPBMC(n=11)由来のT細胞(CD3+CD56-)のパーセントについての動的タイムラプス拡大増殖データ。(図14B)21日目の、示されたフィーダー細胞を用いて拡大増殖させたPBMC(n=11)由来のT細胞(CD3+CD56-)のパーセントについての定量的データ。(図14C)照射したK562、K562-mIL21、221および221-mIL21フィーダー細胞を用いて21日間拡大増殖させたPBMC(n=11)由来のCD3+CD56+のパーセントについての動的タイムラプス拡大増殖データ。(図14D)21日目の、示されたフィーダー細胞を用いて拡大増殖させたPBMC(n=11)由来のCD3+CD56+のパーセントについての定量的データ。(図14E)照射したK562、K562-mIL21、221および221-mIL21フィーダー細胞を用いて21日間拡大増殖させたPBMC(n=11)由来のCD3-CD56-のパーセントについての動的タイムラプス拡大増殖データ。(図14F)21日目の、示されたフィーダー細胞を用いて拡大増殖させたPBMC(n=11)由来のCD3-CD56-のパーセントについての定量的データ。平均(実線)が、95%CI(灰色の帯)と共に、(図14A、14Cおよび14E)に示される。\* p < 0.05、\*\* p < 0.01、\*\*\* p < 0.001、ns p > 0.05。

30

【図14-2】同上。

【図14-3】同上。

【0029】

【図15-1】図15A~15Kは、図S7.221-mIL21細胞を使用して改善された臍帯血由来NK細胞拡大増殖を示す図である。(図15A)拡大増殖後の示された日における、異なるフィーダー細胞を用いて拡大増殖させたNK細胞の純度の代表的なフローサイトメトリックプロット。臍帯血単核細胞(CBMC)を、0日目に、照射したK562-mIL21または221-mIL21のいずれかで刺激し、NK細胞の純度を、7日目にチェックし、次いで、3~4日毎に引き続いてチェックした。(図15B)照

40

50

射したK562 - mIL21または221 - mIL21フィーダー細胞のいずれかを用いて21日間拡大増殖させた、9人のドナー由来のCBMC由来のNK細胞の拡大増殖倍数についての動的タイムラプス拡大増殖データ。(図15C)21日の(on 21 days)、9人のドナー由来のCBMC由来のNK細胞の拡大増殖倍数についての定量的データ。(図15D)照射したK562 - mIL21および221 - mIL21フィーダー細胞を用いて21日間拡大増殖させた、9人のドナー由来のCBMC由来のNK細胞の純度についての動的タイムラプス拡大増殖データ。(図15E)21日の、9人のドナー由来のCBMC由来のNK細胞の純度についての定量的データ。(図15F)照射したK562、K562 - mIL21、221および221 - mIL21フィーダー細胞を用いて21日間拡大増殖させたCBMC(n=9)由来のT細胞(CD3 + CD56-)のパーセントについての動的タイムラプス拡大増殖データ。(図15G)21日目の、示されたフィーダー細胞を用いて拡大増殖させたCBMC(n=9)由来のT細胞(CD3 + CD56-)のパーセントについての定量的データ。(図15H)照射したK562、K562 - mIL21、221および221 - mIL21フィーダー細胞を用いて21日間拡大増殖させたCBMC(n=9)由来のCD3 + CD56+のパーセントについての動的タイムラプス拡大増殖データ。(図15I)21日目の、示されたフィーダー細胞を用いて拡大増殖させたCBMC(n=9)由来のCD3 + CD56+のパーセントについての定量的データ。(図15J)照射したK562、K562 - mIL21、221および221 - mIL21フィーダー細胞を用いて21日間拡大増殖させたCBMC(n=9)由来のCD3 - CD56-のパーセントについての動的タイムラプス拡大増殖データ。(図15K)21日目の、示されたフィーダー細胞を用いて拡大増殖させたCBMC(n=9)由来のCD3 - CD56-のパーセントについての定量的データ。平均(実線)が、95%CI(灰色の帯)と共に、(図15B、15D、15F、13Hおよび15J)に示される。\* \* p < 0.01、ns p > 0.05。

【図15 - 2】同上。

【図15 - 3】同上。

【図15 - 4】同上。

【図15 - 5】同上。

【図15 - 6】同上。

【0030】

【図16 - 1】図16A ~ 16Dは、異なるフィーダー細胞システムを使用して臍帯血単核細胞から拡大増殖させたNK細胞の表現型および機能を示す図である。(図16A)221 - mIL21(赤)およびK562 - mIL21(緑)フィーダー細胞を使用して臍帯血単核細胞から拡大増殖させたNK細胞上のNKG2D、NKp46、2B4およびCD226の発現の代表的なヒストグラム。同じドナーから新たに単離された臍帯血単核細胞由来のNK細胞もまた示される(青)。(図16B)221 - mIL21(赤)およびK562 - mIL21(緑)フィーダー細胞を使用して臍帯血単核細胞から拡大増殖させたNK細胞上のCD69、CD94、CD8aおよびCD16の発現の代表的なヒストグラム。同じドナーから新たに単離された臍帯血単核細胞由来のNKもまた示される(青)。(図16C)221 - mIL21(赤)およびK562 - mIL21(緑)フィーダー細胞を使用して臍帯血単核細胞から拡大増殖させたNK細胞上のNKG2A、NKG2C、KIRおよびKIR3DL1の発現の代表的なヒストグラム。同じドナーから新たに単離された臍帯血単核細胞由来のNKもまた示される(青)。(図16D)CFSE/7 - AAD細胞傷害性アッセイを使用した、K562細胞に対する拡大増殖されたCB - NK細胞の細胞傷害活性についての定量的データ。K562細胞をCFSEで標識し、次いで、5 : 1 ~ 0.3125 : 1の範囲のE : T比で4時間、拡大増殖されたCB - NK細胞と共にインキュベートした。次に、7 - AADを使用して、K562細胞の溶解を検出した。

【図16 - 2】同上。

【0031】

【図17-1】図17A~17Hは、異なるフィーダー細胞システムを用いたPBM CからのCD19-CAR NK細胞の拡大増殖を示す図である。(図17A)示された時点におけるNK細胞中のCD19-CAR陽性細胞のパーセントの代表的なフローサイトメトリードットプロット。PBM Cを、0日目に、照射したフィーダー細胞で刺激し、7日目にCD19-CARレトロウイルスで形質導入した。(図17B)PBM C(n=3)から拡大増殖させたNK細胞中のCD19-CAR陽性細胞のパーセントについての定量的データ。(図17C)CD19-CAR陽性細胞(n=3)中のT細胞(CD3+CD56-)のパーセントについての動的タイムラプス拡大増殖データ。(図17D)21日目の、CD19-CAR陽性細胞(n=3)中のT細胞(CD3+CD56-)のパーセントについての定量的データ。(図17E)CD19-CAR陽性細胞(n=3)中のCD3+CD56+のパーセントについての動的タイムラプス拡大増殖データ。(図17F)21日目の、CD19-CAR陽性細胞(n=3)中のCD3+CD56+のパーセントについての定量的データ。(図17G)CD19-CAR陽性細胞(n=3)中のCD3-CD56-のパーセントについての動的タイムラプス拡大増殖データ。(図17H)21日目の、CD19-CAR陽性細胞(n=3)中のCD3-CD56-のパーセントについての定量的データ。平均(実線)が、95%CI(灰色の帯)と共に、(図17C、17Eおよび17G)に示される。

10

【図17-2】同上。

【図17-3】同上。

【図17-4】同上。

【図17-5】同上。

20

【0032】

【図18-1】図18A~18Fは、221で拡大増殖されたNK細胞の富化された代謝経路および免疫表現型を示す図である。(図18A)Molecular Signatures Database(MSigDB)中の遺伝子オントロジー(GO)生物学的プロセス(BP)データセットを使用した、7日目(左)および14日目(右)の、221-mIL21およびK562-mIL21フィーダー細胞を用いて拡大増殖させたNK細胞間の遺伝子についてのGSEAのドットプロット。(図18B)14日目の、K562-mIL21フィーダー細胞を用いて拡大増殖させたNK細胞と比較した、221-mIL21フィーダー細胞を用いて拡大増殖させたNK細胞における細胞のアミノ酸代謝プロセスの遺伝子セット富化分析(GSEA)。NES、正規化エンリッチメントスコア; p.調整、FDR調整したp値。(図18C)Molecular Signatures Database(MSigDB)中のHallmarkデータセットを使用した、14日目の、K562-mIL21フィーダー細胞を用いて拡大増殖させたNK細胞と比較した、221-mIL21フィーダー細胞を用いて拡大増殖させたNK細胞における溶解のGSEA。NES、正規化エンリッチメントスコア; p.調整、FDR調整したp値。(図18D)14日目の、K562-mIL21フィーダー細胞を用いて拡大増殖させたNK細胞と比較した、221-mIL21フィーダー細胞を用いて拡大増殖させたNK細胞におけるリンパ球活性化のGSEA。NES、正規化エンリッチメントスコア; p.調整、FDR調整したp値。(図18E)14日目の、K562-mIL21フィーダー細胞を用いて拡大増殖させたNK細胞と比較した、221-mIL21フィーダー細胞を用いて拡大増殖させたNK細胞におけるリンパ球分化のGSEA。NES、正規化エンリッチメントスコア; p.調整、FDR調整したp値。(図18F)14日目の、K562-mIL21フィーダー細胞を用いて拡大増殖させたNK細胞と比較した、221-mIL21フィーダー細胞を用いて拡大増殖させたNK細胞における細胞-細胞接着のGSEA。NES、正規化エンリッチメントスコア; p.調整、FDR調整したp値。

30

40

【図18-2】同上。

【図18-3】同上。

【図18-4】同上。

【図18-5】同上。

50

【図18-6】同上。

【図18-7】同上。

【0033】

【図19-1】図19A~19Iは、拡大増殖されたNK細胞の富化された代謝経路および免疫表現型のヒートマップを示す図である。(図19A~19B)細胞のアミノ酸代謝プロセスのGSEA同定された遺伝子のヒートマップ。(図19C)解糖のGSEA同定された遺伝子のヒートマップ。(図19D~19E)リンパ球活性化のGSEA同定された遺伝子のヒートマップ。(図19E~19F)リンパ球分化のGSEA同定された遺伝子のヒートマップ。(図19G~19I)細胞-細胞接着のGSEA同定された遺伝子のヒートマップ。ヒートマップを、正規化-対数変換( $\log$ )を使用して変換されたRNA-seqカウントに由来するz-スコアを使用して生成した。各欄は、生物学的反復を示す。

10

【図19-2】同上。

【図19-3】同上。

【図19-4】同上。

【図19-5】同上。

【図19-6】同上。

【図19-7】同上。

【図19-8】同上。

【図19-9】同上。

20

【発明を実施するための形態】

【0034】

配列

本明細書で提供される任意の核酸およびアミノ酸配列は、37C.F.R. § 1.822に規定されるように、ヌクレオチド塩基およびアミノ酸についての標準的な文字略称を使用して示される。少なくとも一部の場合には、各核酸配列の一方の鎖のみが示されるが、相補鎖は、示された鎖への任意の言及によって含まれると理解される。

【0035】

配列番号1は、インターロイキン(IL)-21由来の細胞外ドメインの例示的な核酸配列である。

30

【0036】

配列番号2は、IL-21由来の細胞外ドメインの例示的なアミノ酸配列である。

【0037】

配列番号3は、膜結合型(m)IL-21で細胞を形質導入するための構築物の例示的な核酸配列である。

【0038】

配列番号4は、IL-15Rの例示的な核酸配列である。

【0039】

配列番号5は、IL-15Rの例示的なアミノ酸配列である。

【0040】

配列番号6は、IL-15の例示的な核酸配列である。

40

【0041】

配列番号7は、IL-15の例示的なアミノ酸配列である。

【0042】

配列番号8は、IL-2の例示的な核酸配列である。

【0043】

配列番号9は、IL-2の例示的なアミノ酸配列である。

【0044】

配列番号10は、IL-27の例示的な核酸配列である。

【0045】

50

- 配列番号 11 は、IL - 27 の例示的なアミノ酸配列である。  
【0046】
- 配列番号 12 は、IL - 12 B の例示的な核酸配列である。  
【0047】
- 配列番号 13 は、IL - 12 B の例示的なアミノ酸配列である。  
【0048】
- 配列番号 14 は、IL - 12 p 35 の例示的な核酸配列である。  
【0049】
- 配列番号 15 は、IL - 12 p 35 の例示的なアミノ酸配列である。  
【0050】 10
- 配列番号 16 は、IL - 12 p 40 の例示的な核酸配列である。  
【0051】
- 配列番号 17 は、IL - 12 p 40 の例示的なアミノ酸配列である。  
【0052】
- 配列番号 18 は、IL - 18 の例示的な核酸配列である。  
【0053】
- 配列番号 19 は、IL - 18 の例示的なアミノ酸配列である。  
【0054】
- 配列番号 20 は、IL - 18 の例示的な核酸配列である。  
【0055】 20
- 配列番号 21 は、IL - 18 の例示的なアミノ酸配列である。  
【0056】
- 配列番号 22 は、IL - 33 の例示的な核酸配列である。  
【0057】
- 配列番号 23 は、IL - 33 の例示的なアミノ酸配列である。  
【0058】
- 配列番号 24 は、IL - 7 の例示的な核酸配列である。  
【0059】
- 配列番号 25 は、IL - 7 の例示的なアミノ酸配列である。  
【0060】 30
- 配列番号 26 は、MICA の例示的な核酸配列である。  
【0061】
- 配列番号 27 は、MICA の例示的なアミノ酸配列である。  
詳細な説明
- 【0062】
- 1 つまたは複数のサイトカインまたはサイトカイン受容体（例えば、IL - 15 受容体アルファ（IL - 15 R<sub>α</sub>）および/または膜結合型 IL - 21）を発現する改変された 721 . 221 細胞、ならびに改変された 721 . 221 細胞を使用して免疫細胞を拡大増殖させる方法が、本明細書に記載される。改変された 721 . 221 細胞は、本明細書で示されるように、NK 細胞または T 細胞（CAR 改変された NK 細胞または T 細胞を含む）を効率的に拡大増殖させるために使用され得る。  
40
- 【0063】
- 組換え IL - 15 および IL - 2 ならびに改変された 721 . 221 細胞と組み合わせ、初代 NK 細胞は、3 週間の拡大増殖後に約 39 , 663 倍拡大増殖された。さらに、CD19 タンパク質に対して特異的な CAR 分子をコードするレトロウイルスによる形質導入は、末梢血および臍帯血の両方由来の初代 NK 細胞の拡大増殖を生じた。したがって、ヒト初代 NK 細胞および遺伝子改変された CAR - NK 細胞の拡大増殖のためのプラットフォームが記載される。
- 【0064】
- 以前の NK 拡大増殖システム（Denman et al. , PLoS One 7 :
- 50

e 3 0 2 6 4 ( 2 0 1 2 ) ; F u j i s a k i e t a l . , C a n c e r R e s 6 9 : 4 0 1 0 - 7 ( 2 0 0 9 ) ) と比較して、本明細書に記載されるNK拡大増殖に使用される721.221-mIL-21細胞は、3つの別個の利点を含む。拡大増殖されたNK細胞の数は、膜形態のIL-21と細胞培養物中の2種の可溶性サイトカインとの組合せを用いて本明細書に記載される技法を使用すると、有意により高く(721.221-mIL-21細胞での約39,663倍の増加 対 K562-mIL-21細胞を使用した3588倍の増加)、NK細胞は、*in vitro*で効率的に増殖した。721.221-mIL-21で拡大増殖されたNK細胞は、K562-mIL-21で拡大増殖されたNK細胞と比較して、増強された細胞傷害性を伴って、より高い純度をさらに特色とする。さらに、本明細書で、CAR-NK細胞は、CBバンクからのCBの721.221-mIL-21 NK拡大増殖の即座の入手可能性を使用して、および2)既製のCAR産物としてのCB由来CAR-NK細胞の使用によって、臍帯血(CB)から誘導される。

10

#### I.用語

##### 【0065】

他に示されない限り、技術用語は、従来の用法に従って使用される。分子生物学における一般的な用語の定義は、Benjamin Lewin, *Genes VII*, published by Oxford University Press, 2000 (ISBN 019879276X); Kendrew et al. (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, published by Blackwell Publishers, 1994 (ISBN 0632021829); Robert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, published by Wiley, John & Sons, Inc., 1995 (ISBN 0471186341); およびGeorge P. Redei, *Encyclopedic Dictionary of Genetics, Genomics, and Proteomics*, 2nd Edition, 2003 (ISBN: 0-471-26821-6)に見出され得る。

20

##### 【0066】

単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」および「この(the)」は、文脈が明らかに他を示さない限り、1つまたは1つよりも多くを指す。例えば、用語「1つの(an)インターロイキンを含む」は、単数または複数のインターロイキンを含み、語句「少なくとも1つのインターロイキンを含む」と等価とみなされる。用語「または」は、文脈が明らかに他を示さない限り、述べられた代替的要素の単一の要素、または2つもしくはそれよりも多くの要素の組合せを指す。本明細書で使用される場合、「含む(comprises)」は「含む(includes)」を意味する。したがって、「AまたはBを含む(comprising)」は、さらなる要素を排除せずに、「A、B、またはAおよびBを含む(including)」を意味する。

30

##### 【0067】

核酸またはポリペプチドについて与えられる全ての塩基サイズまたはアミノ酸サイズ、ならびに全ての分子量または分子質量の値は、近似であり、説明のために提供されるものであることがさらに理解される。本明細書に記載される方法および材料と類似または等価な方法および材料が、本開示の実施または試験において使用され得るが、適切な方法および材料は、以下に記載される。本明細書で言及される全ての刊行物、特許出願、特許および他の参考文献は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれ、GenBank(登録商標)受託番号(2019年2月20日時点で存在する配列について)も同様である。矛盾する場合、用語の説明を含む本明細書が優先する。さらに、材料、方法および例は、例示に過ぎず、限定を意図しない。

40

##### 【0068】

50

本開示の様々な実施形態の再吟味を促進するために、特定の用語の以下の説明が提供される。

【0069】

721.221細胞：LCL 721.221またはATCC（登録商標）CRL-1855（商標）細胞とも呼ばれ、721.221細胞は、ヒト Epstein-Barrウイルスで形質転換された細胞系に由来するBリンパ球である。721.221細胞は、クラスI組織適合抗原（主要組織適合複合体（MHC）クラスI分子としても公知）を発現しない。721.221細胞を産生する方法は、当技術分野で公知である（例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、Shimiz et al., Proc Natl Acad Sci U S A., 85(1):227-31, 1988を参照のこと）。

10

【0070】

活性化受容体リガンド：ナチュラルキラー（NK）またはT細胞の受容体に結合し、それによってNK細胞またはT細胞を活性化するリガンド。活性化受容体リガンドの例には、UL16結合タンパク質（ULBP）-1、ULPB-2および/または主要組織適合複合体（MHC）クラスI鎖関連タンパク質A（MIC-A）が挙げられる。

【0071】

自己免疫障害：免疫系が、内因性抗原に対する免疫応答（例えば、B細胞またはT細胞応答）を生じ、組織に対する傷害を結果として生じる、障害。傷害は、甲状腺炎など、ある特定の臓器に限局され得、またはグッドパスチャー病など、異なる位置にある特定の組織に関与し得、またはエリテマトーデスなど、全身性であり得る。

20

【0072】

一部の例では、自己免疫疾患には、全身性エリテマトーデス、シェーグレン症候群、関節リウマチ、I型糖尿病、ウェゲナー肉芽腫症、炎症性腸疾患、多発性筋炎、皮膚筋炎、多発性内分泌不全（multiple endocrine failure）、シュミット症候群、自己免疫性ぶどう膜炎、アジソン病、副腎炎、グレース病、甲状腺炎、橋本甲状腺炎、自己免疫性甲状腺疾患、悪性貧血、胃の萎縮症、慢性肝炎、ルポイド肝炎、アテローム性動脈硬化症、初老期認知症、脱髄性疾患、多発性硬化症、亜急性皮膚エリテマトーデス、副甲状腺機能低下症、ドレスラー症候群、重症筋無力症、自己免疫性血小板減少症、特発性血小板減少性紫斑病、溶血性貧血、尋常性天疱瘡、天疱瘡、疱疹状皮膚炎、円形脱毛症（alopecia arcata）、類天疱瘡、強皮症、進行性全身性硬化症、CREST症候群（石灰沈着症、レイノー現象、食道蠕動低下、強指症および毛細血管拡張症）、成人発症型糖尿病（II型糖尿病）、雄性および雌性の自己免疫性不妊症、強直性脊椎炎、潰瘍性大腸炎、クローン病、混合性結合組織病、結節性多発動脈炎（polyarteritis nodosa）、全身性壊死性血管炎、若年発症型関節リウマチ、糸球体腎炎、アトピー性皮膚炎、萎縮性鼻炎（atopic rhinitis）、グッドパスチャー症候群、シャーガス病、サルコイドーシス、リウマチ熱、喘息、不育症、抗リン脂質症候群、農夫肺、多形性紅斑、開心術後症候群、クッシング症候群、自己免疫性慢性活動性肝炎、愛鳥家肺、アレルギー性疾患、アレルギー性脳脊髄炎、中毒性表皮壊死症、脱毛症、アルポート症候群、肺炎、アレルギー性肺炎、線維性肺炎、間質性肺疾患、結節性紅斑、壊疽性膿皮症、輸血反応、ハンセン病、マラリア、リーシュマニア症、トリパノソーマ症、高安動脈炎、リウマチ性多発筋痛、側頭動脈炎、住血吸虫症、巨細胞動脈炎、回虫症、アスペルギルス症、サムター症候群（Sampter's syndrome）、湿疹、リンパ腫様肉芽腫症、ベーチェット病、カプラン症候群、川崎病、 Dengue熱、脳脊髄炎、心内膜炎、心内膜心筋線維症、眼内炎、持久性隆起性紅斑、乾癬、胎児赤芽球症、好酸球性筋膜炎（eosinophilic fasciitis）、シャルマン症候群、フェルティ症候群、フィラリア症、毛様体炎、慢性毛様体炎、異時性毛様体炎、フックス毛様体炎、IgA腎症、ヘノッホ・シェーンライン紫斑病、糸球体腎炎、移植片対宿主病、移植拒絶、ヒト免疫不全ウイルス感染、エコーウイルス感染、心筋症、アルツハイマー病、パルボウイルス感染、風疹ウイルス感染、予防接種後症候群、先天性風疹感染、ホジキンリンパ腫および非ホジキンリンパ腫、腎細胞癌、多発性骨髄腫、イー

30

40

50

トン・ランバート症候群、再発性多発軟骨炎、悪性黒色腫、クリオグロブリン血症、ワルデンストレーム高ガンマグロブリン血症 (Waldenström's macroglobulemia)、エプスタイン・バーウイルス感染、ルブラウイルス、ならびにエバンズ症候群が挙げられる。

【0073】

がん：「悪性腫瘍」または「悪性新生物」とも呼ばれ、がんは、細胞の制御されない異常な増殖 (proliferation) によって特徴付けられる数々の疾患のいずれをも指す。がん細胞は、いくつかの特徴的な構造的および/または分子特色のいずれかを伴う、身体他の部分へと、局所的に、または血流およびリンパ系を介して伝播する (例えば、転移する) 潜在力を有する。「がん細胞」は、特定の構造的特性を有し、分化を欠き、浸潤および転移が可能な細胞である。低悪性度および高悪性度形態が含まれる。一部の例では、がんは、固形がん (例えば、肉腫 (例えば、横紋筋肉腫、骨原性肉腫、ユーイング肉腫、軟骨肉腫および胞巣状軟部肉腫) ; 癌 (例えば、結腸直腸癌および肝細胞癌 (HCC)) ; およびリンパ腫、例えば、ホジキンリンパ腫または非ホジキンリンパ腫、例えば、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、慢性リンパ球性リンパ腫、小リンパ球性リンパ腫、マンツル細胞リンパ腫、パーキットリンパ腫、皮膚T細胞リンパ腫、AIDS関連リンパ腫もしくは中枢神経系リンパ腫) ; 神経芽細胞腫 ; 婦人科がん (例えば、卵巣がん) ; 乳がん ; 肝臓がん (例えば、肝細胞癌 (HCC)) ; 肺がん ; 前立腺がん ; 皮膚がん ; 骨がん ; 膵がん ; 脳がん (神経芽細胞腫) ; 頭頸部がん (head or neck cancer) ; 腎臓がん (例えば、ウィルムス腫瘍) ; 網膜芽細胞腫 ; 副腎皮質腫瘍 ; 類腱腫 ; 線維形成性小円形細胞腫瘍 ; 内分泌腫瘍 ; および/または血液がん (例えば、骨髄腫、例えば、多発性骨髄腫 ; リンパ腫、例えば、ホジキンリンパ腫または非ホジキンリンパ腫、例えば、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、慢性リンパ球性リンパ腫、小リンパ球性リンパ腫、マンツル細胞リンパ腫、パーキットリンパ腫、皮膚T細胞リンパ腫、AIDS関連リンパ腫もしくは中枢神経系リンパ腫 ; あるいは白血病、例えば、急性リンパ球性白血病 (ALL) もしくは急性骨髄性白血病 (AML)) である。

【0074】

キメラ抗原受容体 (CAR) : T細胞を活性化することが可能な細胞内シグナル伝達ドメインに膜貫通ドメインを介して融合された細胞外ドメインを有するキメラ融合タンパク質。CAR分子は、互いに機能的に異なり (多特異的CAR)、1つの標的上の2つの異なる部位に結合する (マルチ標的化)、2つ (またはそれよりも多くの) 標的化ドメインを有する1つの細胞外ドメイン (エクストドメイン) を含み得る。例えば、多特異的CARの1つの標的化ドメインは、細胞表面受容体、例えば、CD19であり得る (例えば、多特異的CD19ベースのCAR)。別の例では、多特異的CARの1つの標的化ドメインは、細胞表面受容体、例えば、CD19であり得、第2の標的化ドメインは、抗体またはその断片、例えば、scFvであり得る (即ち、多特異的CD19-scFv CAR)。一部の実施形態では、CD19-scFv CARは、2つの異なる標的部位に結合する (即ち、マルチ標的化CD19-scFv)。単機能性CARは、標的化細胞外ドメイン内に、単一の機能的エレメントのみを含む。一部の特定の実施形態では、CARの細胞外結合ドメインの一部は、マウスまたはヒトモノクローナル抗体に由来する。

【0075】

CAR分子の細胞内シグナル伝達ドメインは、2つの異なる細胞質シグナル伝達ドメインを含む。例えば、1つのシグナル伝達ドメインは、細胞質エフェクター機能シグナル伝達ドメインであり得、第2のシグナル伝達ドメインは、細胞質共刺激シグナル伝達ドメインであり得る。リンカーは、ドメインを互いに接続し得 (例えば、2つの標的化ドメイン)、または1つのドメインを別のドメインに接続し得る (例えば、リガンド結合ドメインを膜貫通ドメインに)。CARは、キメラ免疫受容体、ゼータカイン (zetakine) およびユニバーサルT細胞受容体としても公知である。

【0076】

10

20

30

40

50

CARを作製する方法は、利用可能である（例えば、その各々が、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、Park et al., Trends Biotechnol., 29:550-557, 2011; Grupp et al., N Engl J Med., 368:1509-1518, 2013; Han et al., J. Hematol Oncol., 6:47, 2013; PCT公報WO2012/079000、WO2013/059593; および米国特許出願公開第2012/0213783号を参照のこと）。

【0077】

接触させること：固体形態および液体形態の両方を含め、直接的な物理的会合状態に置くこと。一例では、接触させることには、液体媒体中の物質または細胞（例えば、サイトカインまたはフィーダー細胞）と1つまたは複数の他の細胞（例えば、培養物中のNK細胞またはT細胞）との間の会合が挙げられる。接触させることは、単離された細胞もしくは組織と*in vitro*で、または対象に投与することによって*in vivo*で行われ得る。

10

【0078】

培養すること、または細胞培養：規定されたセットの条件（例えば、培養培地、細胞外マトリックス、温度および/または培養時間）で*in vitro*での細胞の集団の成長。一部の例では、細胞培養物には、実質的に純粋な培養物（例えば、単離された721.221細胞または単離されたNK細胞）が挙げられる。さらなる例では、細胞培養物には、混合培養物、例えば、2つまたはそれよりも多くの型の細胞の共培養物（例えば、NK細胞とフィーダー細胞との培養物）が挙げられる。さらなる例では、細胞培養物には、細胞外マトリックスと接触して成長した細胞が挙げられる。

20

【0079】

培養培地：721.221細胞などの特定の細胞の集団の生存率、機能および/または成長を支持するために必要な培養条件と栄養素との合成セット。培養培地は、一般に、炭素供給源、窒素供給源、およびpHを維持するための緩衝剤などの成分を含む。培養培地中のさらなる成分には、血清、サイトカイン、ホルモン、成長因子、プロテアーゼ阻害剤、タンパク質加水分解物、せん断力保護物質、タンパク質、ビタミン、グルタミン、微量元素、無機塩、ミネラル、脂質および/または付着因子のうち1つまたは複数もまた挙げられる。

30

【0080】

サイトカイン：リンパ球などの他の細胞の挙動に影響を与える、細胞によって産生されるタンパク質。一実施形態では、サイトカインは、細胞の成長、分化および運動性を調節する（例えば、免疫応答、例えば炎症を刺激する）分子であるインターロイキンである。他の実施形態では、サイトカインは、活性化受容体リガンド、TRLリガンド、またはそれらの受容体であり得る。一部の例では、サイトカインには、細胞拡大増殖（例えば、NK細胞またはT細胞拡大増殖）を刺激または共刺激することが公知の分子が挙げられる。用語「サイトカイン」は、ナノモル濃度～ピコモル濃度で体液性調節因子として作用し、正常な条件または病理学的条件のいずれかの下で、個々の細胞および組織の機能的活性をモジュレートする、可溶性タンパク質およびペプチドの多様な群についての一般名として使用される。これらのタンパク質はまた、細胞間の相互作用を直接的に媒介し、細胞外環境で起こるプロセスを調節する。サイトカインの例には、腫瘍壊死因子（TNF-）、インターロイキン（IL）-2、IL-7、IL-15、膜結合型IL-21（mIL-21）を含むIL-21、インターフェロン（IFN）、IFN、IFN、IL-12、IL-33、IL-27、IL-18、IL-1ファミリー分子（例えば、IL-1、IL-1、IL-1R、IL-18、IL-36R、IL36、IL36、IL-36、IL-37、IL-38、IL-33、*toll*受容体（TLR）リガンド、活性化受容体リガンド（例えば、UL16結合タンパク質（ULBP）-1、ULPB-2、主要組織適合複合体（MHC）クラスI鎖関連タンパク質A（MIC-A））、IL-1ファミリー分子、Fc受容体、細胞間接着分子1（ICAM-1）、CD

40

50

8、2B4（表面抗原分類244（CD244）としても公知）、細胞間接着分子1（ICAM-1）、CD8、CD40、CD28、4-1BBリガンド（4-1BBL）、OX40L、TRX518、CD3抗体およびCD28抗体が挙げられるがこれらに限定されない。

【0081】

有効量：例えば、ある特定の薬剤で処置されている対象において所望の効果を達成するのに十分な、その薬剤の量。一部の例では、本明細書に開示される拡大増殖されたNK細胞またはT細胞（例えば、キメラ抗原受容体（CAR）-NK細胞またはCAR-T細胞）の有効量は、対象における疾患または障害（例えば、腫瘍、ウイルス感染、自己免疫疾患または移植片拒絶）を処置または阻害するのに十分な量である。他の例では、有効量は、対象における疾患または障害の1つまたは複数の症状を低減または寛解させるのに十分な、拡大増殖されたNK細胞またはT細胞（例えば、キメラ抗原受容体（CAR）-NK細胞またはCAR-T細胞）の量である。有効量（例えば、対象における障害を寛解、阻害および/または処置する量）は、例えば、処置されている特定の障害、処置されている対象、組成物の投与様式および他の因子に依存する。

10

【0082】

発現：遺伝子のコードされた情報が、細胞の作動的（operational）、非作動的または構造的な部分へと変換されるプロセス、例えば、タンパク質の合成。遺伝子発現は、外部シグナルによって影響され得る。例えば、ホルモンへの細胞の曝露は、ホルモン誘導性遺伝子の発現を刺激し得る。異なる型の細胞は、同一のシグナルに対して異なって応答し得る。遺伝子の発現はまた、DNAからRNA、タンパク質までの経路のいずれの場所でも調節され得る。調節には、転写、翻訳、RNA輸送およびプロセッシング、mRNAなどの中間分子の分解に対する制御、またはそれらが産生された後の特定のタンパク質分子の活性化、不活性化、区画化もしくは分解を介した制御が挙げられ得る。

20

【0083】

フィーダー細胞：ex vivoまたはin vitro培養において、別の細胞型のための支持を提供する細胞。フィーダー細胞は、フィーダー細胞と共に培養した細胞の生存、成長および/または分化（もしくは分化の阻害）のために要求される1つまたは複数の因子を提供し得る。典型的には、フィーダー細胞は、培養物中でのそれらの増殖を防止するために、照射または他の方法で処理される。本明細書に開示される一部の例では、NK細胞は、フィーダー細胞、例えば、照射された改変された721.221細胞（例えば、mIL-21発現721.221細胞）と共に培養される。

30

【0084】

異種核酸：例えば、形質導入またはトランスフェクションによって細胞中に導入される核酸。「異種」核酸またはタンパク質は、異なる遺伝的供給源に起源する核酸またはタンパク質を指す。例えば、細胞にとって異種である核酸またはタンパク質は、それが発現される細胞以外の生物または個体に起源し、これには、合成された核酸（例えば、mRNA）が含まれる。他の例では、異種核酸またはタンパク質は、それが発現される細胞以外の細胞型に起源する（例えば、721.221細胞中に通常存在しない核酸またはタンパク質は、721.221細胞にとって異種である）。さらなる例では、異種核酸には、組換え核酸、例えば、別の遺伝子由来のプロモーターに作動可能に連結したタンパク質コード核酸および/または異なる供給源由来の2つもしくはそれよりも多くの作動可能に連結した核酸が挙げられる。

40

【0085】

免疫系障害：対象における病理学的免疫応答に関連する疾患または障害（参照により本明細書に共に組み込まれる、国際特許出願公開番号WO2013/192294および米国特許出願公開第2011/00811323号を参照のこと）。例には、免疫不全（例えば、原発性または遺伝性免疫不全、および他の状態に関連する免疫不全、例えば、HIV、高齢およびがんなどに関連する免疫抑制）、サイトカインストーム、アレルギー、喘息、様々な型の炎症、および自己免疫障害が挙げられる。

50

## 【0086】

感染性 ( i n f e c t i o u s ) 疾患：伝染性 ( t r a n s m i s s i b l e ) 疾患または伝染性 ( c o m m u n i c a b l e ) 疾患としても公知であり、感染疾患は、感染から生じる病気である。感染症は、ウイルス、ウイロイド、プリオン、細菌；線虫、例えば、寄生性回虫および蟯虫；節足動物、例えば、マダニ ( t i c k )、コダニ ( m i t e )、ノミおよびシラミ；真菌、例えば、白癬；ならびに他の大寄生虫、例えば、糸虫および他の蠕虫を含む感染性因子によって引き起こされる。宿主は、免疫系、例えば、炎症が関与する自然応答 (例えば、哺乳動物では) と、その後の適応応答とを使用して、感染症と闘う。感染症を処置するために使用される医薬には、抗生物質、抗ウイルス薬、抗真菌薬、抗原虫薬および抗蠕虫薬が挙げられる。感染性疾患の具体的な例には、ヒト免疫不全症候群 ( H I V )、B 型肝炎ウイルス ( H B V )、結核 ( T B ) およびマラリアが挙げられる。

10

## 【0087】

状態を阻害することまたは処置すること：状態を「阻害すること」は、状態または疾患、例えば、腫瘍の完全な発達を阻害することを指す。状態の阻害は、疾患 (例えば、腫瘍、ウイルス感染症、自己免疫疾患または移植片拒絶) の部分的阻害から実質的に完全な阻害 (例えば、防止が挙げられるがこれに限定されない) までの範囲にわたり得る。一部の例では、用語「阻害すること」は、状態を低減させることまたは状態の開始もしくは進行を遅延させることを指す。「処置」は、それが発達し始めた後に、疾患または状態の徴候または症状を寛解させる治療介入を指す。開示されたNK細胞またはT細胞 (例えば、C A R - N K 細胞またはC A R - T 細胞) の有効量が投与される対象は、かかる障害、例えば、疾患もしくは障害の存在、または疾患もしくは障害を発達させるリスク因子についての標準的な診断技法によって同定され得る。

20

## 【0088】

単離された：「単離された」または「精製された」生物学的成分 (例えば、細胞、核酸、ペプチド、タンパク質、タンパク質複合体またはウイルス様粒子) は、他の成分 (例えば、その成分が天然に存在する細胞または生物中の他の生物学的成分) から実質的に分離されている、それとは別に産生されている、またはそれから離れて精製されている。したがって、「単離された」または「精製された」細胞、核酸、ペプチドおよびタンパク質には、標準的な精製方法によって精製された細胞、核酸およびタンパク質が挙げられる。

30

## 【0089】

用語「単離された」または「精製された」は、絶対的な純度を要求しない；むしろ、相対的な用語として意図される。したがって、例えば、単離された生物学的成分は、細胞、生物、試料または産生容器 (例えば、細胞培養システム) 内のその天然の環境にその生物学的成分がある場合よりも、その生物学的成分がより富化された、生物学的成分である。好ましくは、調製物は、その生物学的成分が、調製物の総生物学的成分含量の少なくとも50%、例えば、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%またはそれよりも多くに相当するように、精製される。

## 【0090】

ナチュラルキラー ( N K ) 細胞：特定の抗原性刺激の非存在下で、M H C クラスに従う拘束なしに標的細胞を死滅させる、免疫系の細胞。標的細胞は、腫瘍細胞またはウイルス保有細胞であり得る。NK細胞は、C D 5 6 の存在およびC D 3 表面マーカーの非存在によって特徴付けられる。NK細胞は、典型的には、正常末梢血中の単核細胞画分のおよそ10~15%を構成する。歴史的に、NK細胞は、事前の免疫化も活性化もなしにある特定の腫瘍細胞を溶解させるその能力によって、最初に同定された。NK細胞は、M H C クラスI 提示を下方調節することによって細胞傷害性Tリンパ球 ( C T L ) 応答を免れ得るウイルスおよび腫瘍に対する「バックアップ」保護機構を提供すると考えられる。直接的細胞傷害性殺滅に関与することに加えて、NK細胞は、がんおよび感染を制御するために重要であり得るサイトカイン産生においても役割を果たす。組織常在性メモリーNK細胞が含まれる。

40

50

## 【0091】

一部の例では、「CAR-NK細胞」は、CARをコードまたは発現する異種核酸で形質導入されたNK細胞である。

## 【0092】

薬学的に許容される担体：本開示において有用な薬学的に許容される担体（ビヒクル）は、従来のものである。Remington: The Science and Practice of Pharmacy, The University of the Sciences in Philadelphia, Editor, Lippincott, Williams, & Wilkins, Philadelphia, PA, 21<sup>st</sup> Edition (2005)は、1つまたは複数の治療的組成物、例えば、1つもしくは複数の改変されたNK細胞および/またはさらなる医薬品の薬学的送達に適切な組成物および製剤を記載している。

10

## 【0093】

一般に、担体の性質は、使用されている特定の投与様式に依存する。例えば、非経口製剤は、通常、薬学的かつ生理学的に許容される流体、例えば、水、生理的食塩水、平衡塩溶液、水性デキストロース、グリセロールなどをビヒクルとして含む注射可能な流体を含む。固体組成物（例えば、粉剤・散剤（powder）、丸剤、錠剤またはカプセル剤形態）について、従来の非毒性固体担体には、例えば、製薬等級のマニトール、ラクトース、デンプンまたはステアリン酸マグネシウムが挙げられ得る。生物学的に中性の担体に加えて、投与される医薬組成物は、微量の非毒性補助物質、例えば、湿潤剤または乳化剤、防腐剤およびpH緩衝剤など、例えば、酢酸ナトリウムまたはソルビタンモノラウレートを含み得る。

20

## 【0094】

対象：生きた多細胞脊椎動物生物であり、ヒトおよび非ヒト哺乳動物の両方（例えば、イヌおよびネコ、ならびにマウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ウマ、ウシおよび非ヒト霊長類を含む獣医動物）を含むカテゴリー。

## 【0095】

T細胞：免疫応答に重要な白血球。T細胞には、CD4+T細胞およびCD8+T細胞が挙げられるがこれらに限定されない。CD4+Tリンパ球は、その表面上にCD4を発現する免疫細胞である。これらの細胞は、ヘルパーT細胞としても公知であり、抗体応答ならびにキラーT細胞応答を含む免疫応答の統合を助ける。Th1細胞およびTh2細胞は、ヘルパーT細胞の機能的サブセットである。Th1細胞は、インターフェロン-ガンマを含むサイトカインのセットを分泌し、その主要な機能は、特に細胞内微生物に関する感染症に対する貪食細胞媒介性防御を刺激することである。Th2細胞は、インターロイキン(IL)-4およびIL-5を含むサイトカインのセットを分泌し、その主要な機能は、IgEおよび好酸球/肥満細胞媒介性免疫反応を刺激すること、ならびにTh1応答を下方調節することである。さらなる例では、T細胞には、調節性T細胞(Treg)、NK T細胞、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)、他の非定型のT細胞（例えば、MAIT、T細胞およびCD8+IEL）、自然リンパ球系細胞(ILC)、組織常在メモリーT細胞または任意のワクチンプライムされたT細胞が挙げられ得る。CD4+T細胞と同様に、TregもCD4を発現するが、TGFの発現によって識別される。Tregは、免疫障害、例えば、自己免疫疾患、慢性移植片対宿主病(GVHD)、糖尿病、全身性エリテマトーデス、肥満および脳炎を処置するのに役立つ得、ならびに臓器移植片受容を促進し得る。NK T細胞は、T細胞受容体、ならびにNK細胞に典型的には関連する種々の分子マーカー、例えば、CD161を共発現する。NK T細胞は、CD1d分子によって提示される脂質および糖脂質を認識でき、したがって、NK T細胞は、結核を引き起こすマイコバクテリウムなどの生物由来の糖脂質を認識するために使用され得る。

30

40

## 【0096】

一部の例では、T細胞は、「CAR-T細胞」など、遺伝子改変され得、これは、CARをコードまたは発現する異種核酸で形質導入されたT細胞であり、または、キメラサイ

50

トカイン受容体 (CCR) 発現 T 細胞であり得、これは、CCR をコードする異種核酸で形質導入された T 細胞である (例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、PCT 特許出願公開番号 WO 2017/029512 を参照のこと)。

【0097】

to11 様受容体 (TRL) リガンド: TLR リガンドは、進化的に保存されており、これには、病原体関連分子、例えば、細菌細胞表面リポポリサッカリド (LPS)、リポタンパク質、リポペプチドおよびリポアラビノマンナン; タンパク質、例えば、細菌鞭毛由来のフラジェリン; ウイルスの二本鎖 RNA; 細菌およびウイルス DNA の非メチル化 CpG アイランド; 真核生物 DNA プロモーター中の CpG アイランド; ならびに他の RNA および DNA 分子が挙げられる。

10

【0098】

形質転換された: 形質転換された細胞は、分子生物学の技法によって核酸分子が導入された細胞である。本明細書で使用される場合、形質転換という用語は、ウイルスベクターによる形質導入、プラスミドベクターによる形質転換、ならびに電気穿孔、リポフェクションおよびパーティクルガン加速による裸の DNA の導入 (例えば、「トランスフェクション」) を含む、核酸分子がかかる細胞中に導入され得る全ての技法を包含する。

【0099】

ベクター: ベクターが宿主細胞において複製および/または組み込む能力を破壊することなしに、細胞中への外来または異種核酸の挿入を可能にする核酸分子。ベクターは、宿主細胞におけるその複製を可能にする核酸配列、例えば、複製起点を含み得る。ベクターは、1 つまたは複数の選択可能なマーカー遺伝子および他の遺伝的エレメントもまた含み得る。発現ベクターは、挿入された遺伝子 (単数または複数) の転写および/または翻訳を可能にするための必要な調節配列を含むベクターである。一部の非限定的な例では、ベクターは、ウイルスベクター、例えば、レトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクターである。

20

II. いくつかの実施形態の概説

【0100】

膜結合型 IL-21 (mIL-21)、IL-2、IL-12、IL-33、IL-27、IL-18、IL-7、mIL-7、IL-15、mIL-15、IL-1 ファミリーサイトカイン、TLR リガンド、ULBP-1、ULPB-2、Fc 受容体、2B4 (CD244 としても公知)、細胞間接着分子 1 (ICAM-1)、CD8 および/または MIC-A のうち少なくとも 1 つを発現する、改変された (例えば、遺伝子操作された) 721.221 細胞、および照射された改変された 721.221 細胞系 (MHC クラス I 分子を発現しないまたは低レベルの MHC クラス I 分子を発現する、変異誘発によって誘導された B 細胞系; (Shimizu et al., Proc Natl Acad Sci U S A 85: 227-31 (1988)) を使用して、免疫細胞 (例えば、NK 細胞、T 細胞、または遺伝子改変された NK 細胞もしくは T 細胞) を拡大増殖させる方法が、本明細書に記載される。例えば、細胞を、膜結合型 IL-21 (mIL-21)、IL-2、IL-12、IL-33、IL-27、IL-18、IL-7、mIL-7、IL-15、mIL-15、IL-1 ファミリーサイトカイン、TLR リガンド、ULBP-1、ULPB-2、Fc 受容体、2B4 (CD244 としても公知)、細胞間接着分子 1 (ICAM-1)、CD8 および/または MIC-A をコードする核酸で形質導入またはトランスフェクトすることによって、改変された 721.221 細胞を産生する方法もまた開示される。改変された 721.221 細胞は、初代 NK 細胞もしくは T 細胞または改変された NK 細胞もしくは T 細胞 (例えば、CAR-NK 細胞もしくは CAR-T 細胞) を拡大増殖させる方法において使用される。最後に、拡大増殖された細胞は、疾患または障害、例えば、がん、感染性疾患または免疫疾患を処置する方法において使用される。

30

40

【0101】

最近の研究により、フィーダー細胞としての 4-1BB (CD137 としても公知) リ

50

ガンド(4-1BBL/CD137L)およびIL-21を発現するK562細胞が、NK細胞を*in vitro*で迅速に拡大増殖させるために使用されることが示されている(Denman et al., PLoS One 7:e30264 (2012))。しかし、患者の処置のためのこれらの細胞の特徴付けおよび適用は、それらの細胞が機能的かつ健常であることを確実にするために不可欠である。さらに、特異的NK細胞拡大増殖も、NK細胞免疫療法を*in vivo*で進めるために必要である。照射したフィーダー細胞をサイトカインIL-2の存在下で使用する*in vitro*のNK細胞拡大増殖に関する1つの潜在的な問題は、ナイーブ免疫細胞が、迅速な増殖および分化の後に、消耗または老化することである(Keir et al., Annu Rev Immunol 26:677-704 (2008))。実際、CAR改変された免疫細胞は、PD-1などの消耗マーカーを発現する(John et al., Oncoimmunology 2:e26286 (2013); Cherkassky et al., J Clin Invest 126:3130-44 (2016); Chong et al., Blood (2016); Gargett et al., Mol Ther 24:1135-49 (2016))。免疫細胞消耗の問題を解決するための1つのアプローチは、CAR改変されたT細胞におけるPD-1シグナル伝達を遮断することである(Cherkassky et al., J Clin Invest 126:3130-44 (2016))。別の潜在的な戦略は、CAR改変されたT細胞における代謝経路を変更すること(Ping et al., Protein Cell (2017))またはT細胞における本質的な代謝シグナル伝達(Buck et al., J Exp Med 212:1345-60 (2015))を考慮して、リンパ球代謝を強化すること(Lim WA and June CH, Cell 168:724-40 (2017))である。

#### 【0102】

以前の技法では、CAR改変されたTおよびNK細胞の拡大増殖は、抗体およびサイトカインを使用する、遺伝子改変されたTおよびNK細胞の*in vitro*刺激を要求する。かかる抗体駆動性およびサイトカイン駆動性の活性化および拡大増殖は、CAR-T/NK細胞機能をネガティブに変更し得る。例えば、CAR改変された免疫細胞の消耗が、大規模拡大増殖プログラムの終了までに誘導され得、これは、CAR-T細胞におけるPD-1、TIM-3およびLAG-3の上方調節によって明らかである(Long et al., Nat Med 21:581-90 (2015))。したがって、免疫細胞消耗が、慢性抗原刺激の間の腫瘍およびウイルスに対する損なわれた免疫応答の主要要因であることを考慮して、消耗の誘導を伴わない、新たな改変および拡大増殖戦略が*in vivo*で開発され得る(Wherry EJ, Nat Immunol 12:492-9 (2011); Virgin et al., Cell 138:30-50 (2009))。さらに、臨床適用のためのCAR改変された免疫細胞の拡大増殖は、少なくとも2~3週間かかり、これは、一部の患者にとってはかなりのハードルである。T細胞有効性の有意な低減を伴わずに大きい(9.1~14.3kb)転移エレメントを送達することが可能な「眠れる森の美女トランスポゾン」即ちpigBacシステム(Guerrero et al., Chin J Cancer 33:421-33 (2014); Singh et al., Immunol Rev 257:181-90 (2014); Maiti et al., J Immunother 36:112-23 (2013))が、膜結合型IL-15および4-1BBLリガンドを発現する遺伝子操作された人工細胞と組み合わせて、CAR改変されたT細胞免疫療法のために使用されてきた。

#### III. 改変された721.221細胞および産生の方法

##### 【0103】

CD40、CD28、4-1BBLリガンド(4-1BBL)、OX40L、TRX518、CD3抗体およびCD28抗体を含め、サイトカイン(例えば、膜結合型インターロイキン-21(mIL-21)、IL-21、IL-2、IL-12、IL-33、IL

- 27、IL-18、IL-7、mIL-7、IL-15、mIL-15、toll受容体(TLR)リガンド、または活性化受容体リガンド(例えば、ULBP-1、ULPB-2、主要組織適合複合体(MHC)クラスI鎖関連タンパク質A(MICA))、IL-1ファミリー分子、Fc受容体、細胞間接着分子1(ICAM-1)、CD8、2B4(表面抗原分類244(CD244)としても公知)、細胞間接着分子1(ICAM-1)およびCD8)のうち1つまたは複数を発現する、  
 10 改変された(例えば、遺伝子操作された)721.221細胞が、本明細書に開示される。本明細書で、これらの細胞は、「改変された721.221細胞」と呼ばれる。一部の  
 実施形態では、改変された721.221細胞は、IL-15受容体(IL-15R)をさらに発現する。一例では、改変された721.221細胞は、mIL-21を発現する。他の例では、改変された721.221細胞は、mIL-21およびIL-15Rを  
 15 発現する。

#### 【0104】

721.221細胞は、ヒトエプスタイン・バーウイルスによる形質転換によって特徴付けられるBリンパ球であり、クラスI組織適合抗原(主要組織適合複合体(MHC)クラスI分子としても公知)を発現せず、または低レベルのMHC I分子を発現しない。  
 721.221細胞は、LCL 721.221(以前にはATCC(登録商標)CRL-1855(商標)細胞とも呼ばれた)とも呼ばれる。721.221細胞は、当技術分野で使用される任意の方法によって産生され得る。721.221細胞を産生する例示的な方法は、Shimiz et al., Proc Natl Acad Sci U S A., 85(1):227-31, 1988(その全体が参照により組み込まれる)に記載されている。  
 20

#### 【0105】

一部の実施形態では、改変された721.221細胞は、mIL-21、IL-2、IL-12、IL-33、IL-27、IL-18、IL-7、mIL-7、IL-15、mIL-15、TLRリガンド、ULBP-1、ULPB-2、MICA、IL-1ファミリー分子、Fc受容体、2B4(CD244としても公知)、細胞間接着分子1(ICAM-1)および/またはCD8のうち1つまたは複数(one of more)をコードする異種核酸を含む。一部の実施形態では、核酸は、免疫細胞、例えば、ナチュラルキラー(NK)細胞またはT細胞の拡大増殖を促進するタンパク質をコードする。一部の例では、核酸は、サイトカインまたはサイトカイン受容体(例えば、インターロイキンまたはインターロイキン受容体)、例えば、mIL-21、mIL-15、IL-7、IL-2、IL-12、IL-33、IL-27、IL-18、IFN、IFN、IFN、IL-1ファミリー分子、またはそれらに対する受容体(例えば、IL-15R; 30  
 15  
 20  
 25  
 30  
 35  
 40  
 45  
 50  
 55  
 60  
 65  
 70  
 75  
 80  
 85  
 90  
 95  
 100  
 105  
 110  
 115  
 120  
 125  
 130  
 135  
 140  
 145  
 150  
 155  
 160  
 165  
 170  
 175  
 180  
 185  
 190  
 195  
 200  
 205  
 210  
 215  
 220  
 225  
 230  
 235  
 240  
 245  
 250  
 255  
 260  
 265  
 270  
 275  
 280  
 285  
 290  
 295  
 300  
 305  
 310  
 315  
 320  
 325  
 330  
 335  
 340  
 345  
 350  
 355  
 360  
 365  
 370  
 375  
 380  
 385  
 390  
 395  
 400  
 405  
 410  
 415  
 420  
 425  
 430  
 435  
 440  
 445  
 450  
 455  
 460  
 465  
 470  
 475  
 480  
 485  
 490  
 495  
 500  
 505  
 510  
 515  
 520  
 525  
 530  
 535  
 540  
 545  
 550  
 555  
 560  
 565  
 570  
 575  
 580  
 585  
 590  
 595  
 600  
 605  
 610  
 615  
 620  
 625  
 630  
 635  
 640  
 645  
 650  
 655  
 660  
 665  
 670  
 675  
 680  
 685  
 690  
 695  
 700  
 705  
 710  
 715  
 720  
 725  
 730  
 735  
 740  
 745  
 750  
 755  
 760  
 765  
 770  
 775  
 780  
 785  
 790  
 795  
 800  
 805  
 810  
 815  
 820  
 825  
 830  
 835  
 840  
 845  
 850  
 855  
 860  
 865  
 870  
 875  
 880  
 885  
 890  
 895  
 900  
 905  
 910  
 915  
 920  
 925  
 930  
 935  
 940  
 945  
 950  
 955  
 960  
 965  
 970  
 975  
 980  
 985  
 990  
 995  
 1000  
 1005  
 1010  
 1015  
 1020  
 1025  
 1030  
 1035  
 1040  
 1045  
 1050  
 1055  
 1060  
 1065  
 1070  
 1075  
 1080  
 1085  
 1090  
 1095  
 1100  
 1105  
 1110  
 1115  
 1120  
 1125  
 1130  
 1135  
 1140  
 1145  
 1150  
 1155  
 1160  
 1165  
 1170  
 1175  
 1180  
 1185  
 1190  
 1195  
 1200  
 1205  
 1210  
 1215  
 1220  
 1225  
 1230  
 1235  
 1240  
 1245  
 1250  
 1255  
 1260  
 1265  
 1270  
 1275  
 1280  
 1285  
 1290  
 1295  
 1300  
 1305  
 1310  
 1315  
 1320  
 1325  
 1330  
 1335  
 1340  
 1345  
 1350  
 1355  
 1360  
 1365  
 1370  
 1375  
 1380  
 1385  
 1390  
 1395  
 1400  
 1405  
 1410  
 1415  
 1420  
 1425  
 1430  
 1435  
 1440  
 1445  
 1450  
 1455  
 1460  
 1465  
 1470  
 1475  
 1480  
 1485  
 1490  
 1495  
 1500  
 1505  
 1510  
 1515  
 1520  
 1525  
 1530  
 1535  
 1540  
 1545  
 1550  
 1555  
 1560  
 1565  
 1570  
 1575  
 1580  
 1585  
 1590  
 1595  
 1600  
 1605  
 1610  
 1615  
 1620  
 1625  
 1630  
 1635  
 1640  
 1645  
 1650  
 1655  
 1660  
 1665  
 1670  
 1675  
 1680  
 1685  
 1690  
 1695  
 1700  
 1705  
 1710  
 1715  
 1720  
 1725  
 1730  
 1735  
 1740  
 1745  
 1750  
 1755  
 1760  
 1765  
 1770  
 1775  
 1780  
 1785  
 1790  
 1795  
 1800  
 1805  
 1810  
 1815  
 1820  
 1825  
 1830  
 1835  
 1840  
 1845  
 1850  
 1855  
 1860  
 1865  
 1870  
 1875  
 1880  
 1885  
 1890  
 1895  
 1900  
 1905  
 1910  
 1915  
 1920  
 1925  
 1930  
 1935  
 1940  
 1945  
 1950  
 1955  
 1960  
 1965  
 1970  
 1975  
 1980  
 1985  
 1990  
 1995  
 2000  
 2005  
 2010  
 2015  
 2020  
 2025  
 2030  
 2035  
 2040  
 2045  
 2050  
 2055  
 2060  
 2065  
 2070  
 2075  
 2080  
 2085  
 2090  
 2095  
 2100  
 2105  
 2110  
 2115  
 2120  
 2125  
 2130  
 2135  
 2140  
 2145  
 2150  
 2155  
 2160  
 2165  
 2170  
 2175  
 2180  
 2185  
 2190  
 2195  
 2200  
 2205  
 2210  
 2215  
 2220  
 2225  
 2230  
 2235  
 2240  
 2245  
 2250  
 2255  
 2260  
 2265  
 2270  
 2275  
 2280  
 2285  
 2290  
 2295  
 2300  
 2305  
 2310  
 2315  
 2320  
 2325  
 2330  
 2335  
 2340  
 2345  
 2350  
 2355  
 2360  
 2365  
 2370  
 2375  
 2380  
 2385  
 2390  
 2395  
 2400  
 2405  
 2410  
 2415  
 2420  
 2425  
 2430  
 2435  
 2440  
 2445  
 2450  
 2455  
 2460  
 2465  
 2470  
 2475  
 2480  
 2485  
 2490  
 2495  
 2500  
 2505  
 2510  
 2515  
 2520  
 2525  
 2530  
 2535  
 2540  
 2545  
 2550  
 2555  
 2560  
 2565  
 2570  
 2575  
 2580  
 2585  
 2590  
 2595  
 2600  
 2605  
 2610  
 2615  
 2620  
 2625  
 2630  
 2635  
 2640  
 2645  
 2650  
 2655  
 2660  
 2665  
 2670  
 2675  
 2680  
 2685  
 2690  
 2695  
 2700  
 2705  
 2710  
 2715  
 2720  
 2725  
 2730  
 2735  
 2740  
 2745  
 2750  
 2755  
 2760  
 2765  
 2770  
 2775  
 2780  
 2785  
 2790  
 2795  
 2800  
 2805  
 2810  
 2815  
 2820  
 2825  
 2830  
 2835  
 2840  
 2845  
 2850  
 2855  
 2860  
 2865  
 2870  
 2875  
 2880  
 2885  
 2890  
 2895  
 2900  
 2905  
 2910  
 2915  
 2920  
 2925  
 2930  
 2935  
 2940  
 2945  
 2950  
 2955  
 2960  
 2965  
 2970  
 2975  
 2980  
 2985  
 2990  
 2995  
 3000  
 3005  
 3010  
 3015  
 3020  
 3025  
 3030  
 3035  
 3040  
 3045  
 3050  
 3055  
 3060  
 3065  
 3070  
 3075  
 3080  
 3085  
 3090  
 3095  
 3100  
 3105  
 3110  
 3115  
 3120  
 3125  
 3130  
 3135  
 3140  
 3145  
 3150  
 3155  
 3160  
 3165  
 3170  
 3175  
 3180  
 3185  
 3190  
 3195  
 3200  
 3205  
 3210  
 3215  
 3220  
 3225  
 3230  
 3235  
 3240  
 3245  
 3250  
 3255  
 3260  
 3265  
 3270  
 3275  
 3280  
 3285  
 3290  
 3295  
 3300  
 3305  
 3310  
 3315  
 3320  
 3325  
 3330  
 3335  
 3340  
 3345  
 3350  
 3355  
 3360  
 3365  
 3370  
 3375  
 3380  
 3385  
 3390  
 3395  
 3400  
 3405  
 3410  
 3415  
 3420  
 3425  
 3430  
 3435  
 3440  
 3445  
 3450  
 3455  
 3460  
 3465  
 3470  
 3475  
 3480  
 3485  
 3490  
 3495  
 3500  
 3505  
 3510  
 3515  
 3520  
 3525  
 3530  
 3535  
 3540  
 3545  
 3550  
 3555  
 3560  
 3565  
 3570  
 3575  
 3580  
 3585  
 3590  
 3595  
 3600  
 3605  
 3610  
 3615  
 3620  
 3625  
 3630  
 3635  
 3640  
 3645  
 3650  
 3655  
 3660  
 3665  
 3670  
 3675  
 3680  
 3685  
 3690  
 3695  
 3700  
 3705  
 3710  
 3715  
 3720  
 3725  
 3730  
 3735  
 3740  
 3745  
 3750  
 3755  
 3760  
 3765  
 3770  
 3775  
 3780  
 3785  
 3790  
 3795  
 3800  
 3805  
 3810  
 3815  
 3820  
 3825  
 3830  
 3835  
 3840  
 3845  
 3850  
 3855  
 3860  
 3865  
 3870  
 3875  
 3880  
 3885  
 3890  
 3895  
 3900  
 3905  
 3910  
 3915  
 3920  
 3925  
 3930  
 3935  
 3940  
 3945  
 3950  
 3955  
 3960  
 3965  
 3970  
 3975  
 3980  
 3985  
 3990  
 3995  
 4000  
 4005  
 4010  
 4015  
 4020  
 4025  
 4030  
 4035  
 4040  
 4045  
 4050  
 4055  
 4060  
 4065  
 4070  
 4075  
 4080  
 4085  
 4090  
 4095  
 4100  
 4105  
 4110  
 4115  
 4120  
 4125  
 4130  
 4135  
 4140  
 4145  
 4150  
 4155  
 4160  
 4165  
 4170  
 4175  
 4180  
 4185  
 4190  
 4195  
 4200  
 4205  
 4210  
 4215  
 4220  
 4225  
 4230  
 4235  
 4240  
 4245  
 4250  
 4255  
 4260  
 4265  
 4270  
 4275  
 4280  
 4285  
 4290  
 4295  
 4300  
 4305  
 4310  
 4315  
 4320  
 4325  
 4330  
 4335  
 4340  
 4345  
 4350  
 4355  
 4360  
 4365  
 4370  
 4375  
 4380  
 4385  
 4390  
 4395  
 4400  
 4405  
 4410  
 4415  
 4420  
 4425  
 4430  
 4435  
 4440  
 4445  
 4450  
 4455  
 4460  
 4465  
 4470  
 4475  
 4480  
 4485  
 4490  
 4495  
 4500  
 4505  
 4510  
 4515  
 4520  
 4525  
 4530  
 4535  
 4540  
 4545  
 4550  
 4555  
 4560  
 4565  
 4570  
 4575  
 4580  
 4585  
 4590  
 4595  
 4600  
 4605  
 4610  
 4615  
 4620  
 4625  
 4630  
 4635  
 4640  
 4645  
 4650  
 4655  
 4660  
 4665  
 4670  
 4675  
 4680  
 4685  
 4690  
 4695  
 4700  
 4705  
 4710  
 4715  
 4720  
 4725  
 4730  
 4735  
 4740  
 4745  
 4750  
 4755  
 4760  
 4765  
 4770  
 4775  
 4780  
 4785  
 4790  
 4795  
 4800  
 4805  
 4810  
 4815  
 4820  
 4825  
 4830  
 4835  
 4840  
 4845  
 4850  
 4855  
 4860  
 4865  
 4870  
 4875  
 4880  
 4885  
 4890  
 4895  
 4900  
 4905  
 4910  
 4915  
 4920  
 4925  
 4930  
 4935  
 4940  
 4945  
 4950  
 4955  
 4960  
 4965  
 4970  
 4975  
 4980  
 4985  
 4990  
 4995  
 5000  
 5005  
 5010  
 5015  
 5020  
 5025  
 5030  
 5035  
 5040  
 5045  
 5050  
 5055  
 5060  
 5065  
 5070  
 5075  
 5080  
 5085  
 5090  
 5095  
 5100  
 5105  
 5110  
 5115  
 5120  
 5125  
 5130  
 5135  
 5140  
 5145  
 5150  
 5155  
 5160  
 5165  
 5170  
 5175  
 5180  
 5185  
 5190  
 5195  
 5200  
 5205  
 5210  
 5215  
 5220  
 5225  
 5230  
 5235  
 5240  
 5245  
 5250  
 5255  
 5260  
 5265  
 5270  
 5275  
 5280  
 5285  
 5290  
 5295  
 5300  
 5305  
 5310  
 5315  
 5320  
 5325  
 5330  
 5335  
 5340  
 5345  
 5350  
 5355  
 5360  
 5365  
 5370  
 5375  
 5380  
 5385  
 5390  
 5395  
 5400  
 5405  
 5410  
 5415  
 5420  
 5425  
 5430  
 5435  
 5440  
 5445  
 5450  
 5455  
 5460  
 5465  
 5470  
 5475  
 5480  
 5485  
 5490  
 5495  
 5500  
 5505  
 5510  
 5515  
 5520  
 5525  
 5530  
 5535  
 5540  
 5545  
 5550  
 5555  
 5560  
 5565  
 5570  
 5575  
 5580  
 5585  
 5590  
 5595  
 5600  
 5605  
 5610  
 5615  
 5620  
 5625  
 5630  
 5635  
 5640  
 5645  
 5650  
 5655  
 5660  
 5665  
 5670  
 5675  
 5680  
 5685  
 5690  
 5695  
 5700  
 5705  
 5710  
 5715  
 5720  
 5725  
 5730  
 5735  
 5740  
 5745  
 5750  
 5755  
 5760  
 5765  
 5770  
 5775  
 5780  
 5785  
 5790  
 5795  
 5800  
 5805  
 5810  
 5815  
 5820  
 5825  
 5830  
 5835  
 5840  
 5845  
 5850  
 5855  
 5860  
 5865  
 5870  
 5875  
 5880  
 5885  
 5890  
 5895  
 5900  
 5905  
 5910  
 5915  
 5920  
 5925  
 5930  
 5935  
 5940  
 5945  
 5950  
 5955  
 5960  
 5965  
 5970  
 5975  
 5980  
 5985  
 5990  
 5995  
 6000  
 6005  
 6010  
 6015  
 6020  
 6025  
 6030  
 6035  
 6040  
 6045  
 6050  
 6055  
 6060  
 6065  
 6070  
 6075  
 6080  
 6085  
 6090  
 6095  
 6100  
 6105  
 6110  
 6115  
 6120  
 6125  
 6130  
 6135  
 6140  
 6145  
 6150  
 6155  
 6160  
 6165  
 6170  
 6175  
 6180  
 6185  
 6190  
 6195  
 6200  
 6205  
 6210  
 6215  
 6220  
 6225  
 6230  
 6235  
 6240  
 6245  
 6250  
 6255  
 6260  
 6265  
 6270  
 6275  
 6280  
 6285  
 6290  
 6295  
 6300  
 6305  
 6310  
 6315  
 6320  
 6325  
 6330  
 6335  
 6340  
 6345  
 6350  
 6355  
 6360  
 6365  
 6370  
 6375  
 6380  
 6385  
 6390

6%、97%、98%、99%または100%の同一性)を有する核酸を含むかもしくはそれからなり、および/または配列番号2に対して少なくとも95%の同一性(例えば、少なくとも95%、96%、97%、98%、99%または100%の同一性)を有するアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなるタンパク質をコードする。一部の例では、IL-15Rをコードする核酸は、配列番号4に対して少なくとも90%の同一性(例えば、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の同一性)を有する核酸を含むかもしくはそれからなり、および/または配列番号5に対して少なくとも95%の同一性(例えば、少なくとも95%、96%、97%、98%、99%または100%の同一性)を有するアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなるタンパク質をコードする。

10

## 【0107】

本明細書に記載される改変された721.221細胞を産生する方法が、本明細書にさらに開示される。改変されたまたは組換え721.221細胞は、721.221細胞を、少なくとも1つの異種核酸(例えば、mIL-21、IL-2、IL-12、IL-33、IL-27、IL-18、IL-7、mIL-7、IL-15、mIL-15、TLRリガンド、ULBP-1、ULPB-2、MIC-A、IL-1ファミリー分子、Fc受容体、2B4、ICAM-1、CD8、CD40、CD28、4-1BBリガンド(4-1BBL)、OX40L、TRX518、CD3抗体またはCD28抗体のうち1つまたは複数をコードする核酸)、およびまた、一部の例では、IL-15Rをコードする異種核酸で形質導入またはトランスフェクトすることによって産生され得る。具体的な非限定的な例では、改変された721.221細胞は、mIL-21をコードする異種核酸を含む。他の非限定的な例では、改変された721.221細胞は、mIL-21およびIL-15Rをコードする異種核酸を含む。さらなる非限定な例では、改変された721.221細胞は、膜結合型ICAM-1、Fc受容体、CD8、ULBP-1、ULPB-2またはMIC-Aをコードする異種核酸を含む。

20

## 【0108】

一部の例では、721.221細胞は、少なくとも1つの異種核酸を含むベクター(例えば、レンチウイルスまたはレトロウイルスベクター)で形質導入または形質転換される。例えば、721.221細胞は、少なくとも1、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10個もしくはそれよりも多くの異種核酸、または約1~2、1~3、1~5、1~7もしくは1~10個の異種核酸、または約1、2もしくは3個の異種核酸で、形質導入またはトランスフェクトされ得る。

30

## 【0109】

形質導入またはトランスフェクションの任意の方法、例えば、ウイルス形質導入(例えば、レトロウイルス、例えば、MoMLVまたはレンチウイルスを使用する)もしくは非ウイルス形質導入、mRNAトランスフェクション、またはナノスケール核酸送達(例えば、化学的デンドリマー、DNAデンドリマー、ナノスフェア、ナノレイヤー、ナノロッドおよびナノチューブ)が使用され得る。

## 【0110】

一部の実施形態では、開示された方法は、721.221細胞への少なくとも1つの異種核酸の送達のために、ウイルスベクターを利用する。適切なウイルスベクターの例には、レトロウイルス(例えば、MoMLVまたはレンチウイルス)ベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクターおよび鶏痘ベクターが挙げられる。具体的な例では、レトロウイルスシステムが、1つまたは複数の異種核酸を721.221細胞中に導入するために使用される。一部の例では、MoMLVベクター、例えば、SFGレトロウイルスベクターが使用され得る。SFGベクターは、マウス白血病ウイルス(MLV)骨格に由来する。この型のマウス白血病ウイルス(MLV)ベースのレトロウイルスベクターは、頻繁に使用される遺伝子送達ビヒクルであり、臨床試験において広く使用されている。現在のSFGベクターは、リンパ球遺伝子改変、タ

40

50

ンパク質発現およびウイルス力価のための遺伝子発現のために完全に最適化されている。

【0111】

一部の例では、SFGベクターは、RD114エンベロープでシュードタイプ化されたガンマレトロウイルスベクターである。RD114でシュードタイプ化された一過性レトロウイルス過剰体(supe)は、例えば、Gene Juice (Novagen)を使用して、細胞(例えば、293T細胞)中への、Peq-Pamプラスミド(Moloney Gag Pol; 例えば、約4.69 µgで)、RDFプラスミド(RD114エンベロープ; 例えば、約3.125 µgで)およびSFG-VRC01プラスミド(例えば、約4.69 µgで)の三連トランスフェクションによって生成され得る。上清は回収され得る(例えば、約48および72時間後)。高力価産生体系を、サルおよびヒトリンパ球の複数回の形質導入によって生成した。

10

【0112】

導入される異種核酸は、任意のサイトカイン、活性化受容体リガンド、またはそれらの受容体もしくは断片、例えば、IL-21(例えば、mIL-21を産生するため)、IL-15R、IL-2、IL-12、IL-33、IL-27、IL-18、IL-7、TLRリガンド、ULBP-1、ULBP-2、MIC-A、IL-1ファミリー分子、Fc受容体、2B4、ICAM-1、CD8、CD40、CD28、4-1BBリガンド(4-1BBL)、OX40L、TRX518、CD3抗体および/あるいはCD28抗体をコードする核酸であり得る。具体的な例では、核酸は、mIL-21、IL-15R、またはそれらの組合せをコードする。他の非限定的な例では、核酸は、膜結合型ICAM-1、Fc受容体、CD8、ULBP-1、ULBP-2またはMIC-Aをコードする。

20

【0113】

少なくとも1つの異種核酸が膜結合型サイトカインをコードする核酸を含む実施形態では、少なくとも1つの異種核酸は、例えば、膜結合型サイトカインを形成するために、目的のサイトカインおよびさらなる異種核酸配列を(例えば、同じまたは別々のベクター中に)含む得る。例えば、少なくとも1つの異種核酸は、少なくとも1つの細胞外配列、少なくとも1つの膜貫通配列を含み得、および/または少なくとも1つの細胞内配列が使用され得る(例えば、同じベクター中で)。

【0114】

一部の例では、少なくとも1つの異種核酸は、少なくとも2つの細胞外配列、少なくとも3つの細胞外配列、少なくとも4つの細胞外配列もしくは少なくとも5つの細胞外配列、または約1~2、1~3もしくは1~5つの細胞外配列を含む。少なくとも1つの細胞外配列は、膜について目的のサイトカイン、例えば、インターロイキンを含み得る。具体的な例では、インターロイキンは、IL-21である。一部の例では、少なくとも1つの細胞外配列は、IgG配列由来の細胞外断片を含み得る。一部の例では、少なくとも1つの細胞外配列は、CD8配列由来の細胞外断片を含み得る。一部の例では、少なくとも1つの異種核酸は、少なくとも2つの細胞外配列を含む。具体的な例では、少なくとも2つの細胞外配列は、目的のサイトカイン、例えば、IL-21、およびIgG配列由来の細胞外断片を含む。

30

40

【0115】

一部の例では、少なくとも1つの異種核酸は、少なくとも2つの膜貫通配列もしくは少なくとも3つの膜貫通配列、または約1~2もしくは1~つの膜貫通配列(ortransmembrane sequences)を含む。一部の例では、少なくとも1つの膜貫通配列は、CD28配列由来の膜貫通断片を含み得る。他の膜貫通配列、例えば、CD40Lまたは2B4由来の膜貫通配列もまた使用され得る。一部の例では、少なくとも1つの異種核酸は、少なくとも2つの細胞内配列、少なくとも3つの細胞内配列、少なくとも4つの細胞内配列、少なくとも5つの細胞内配列もしくは少なくとも6つの細胞内配列、または約1~2、1~3もしくは1~6つの細胞内配列を含む。一部の例では、少なくとも1つの細胞内配列は、CD28配列由来の細胞内断片、4-1BB配列由来の

50

細胞内断片および/またはCD3 配列由来の細胞内断片を含み得る。一部の例では、核酸構築物は、配列番号3に対して少なくとも90%の同一性(例えば、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の同一性)を有する核酸を含むかまたはそれからなる。

#### 【0116】

721.221細胞の*in vitro*での単離および富化のための技法が、本明細書に記載される。一部の例では、バルク721.221細胞または721.221細胞サブセットは、富化手順によって、例えば、免疫-磁気ビーズまたはフロー選別の使用を介して、単離され得る。単離された721.221細胞は、細胞培養培地中で成長され得る。一例では、培地は、10%(v/v)ウシ胎仔血清(FBS)および100U/mLペニシリン-ストレプトマイシン(CORNING(登録商標))を含むRPMI-1640(CORNING(登録商標))である。単離された721.221細胞は、少なくとも1つの導入遺伝子、例えば、mIL-21および/またはIL-15Rの発現について、フローサイトメトリーによって分析され得る。一部の例では、方法は、例えば、停止試薬または条件との接触によって、721.221細胞の増殖を停止させることを含む。一部の例では、721.221細胞増殖は、照射(例えば、少なくとも1,000、少なくとも2,000、少なくとも3,000、少なくとも5,000、少なくとも7,000、少なくとも8,000、少なくとも9,000、少なくとも10,000、少なくとも11,000、少なくとも12,000もしくは少なくとも15,000、または約1,000~15,000、2,000~12,000、1,000~5,000、5,000~10,000もしくは8,000~12,000、または約10,000Radの線量などでのγ-照射)によって、またはマイトマイシン-C(MC)との接触によって、停止される。

#### 【0117】

改変された721.221細胞は、当業者に公知の様々な技法を使用して同定され得る。一部の例では、改変された721.221細胞は、フローサイトメトリーまたは免疫-磁気方法を使用して同定される。例えば、(例えば、蛍光または金属標識によって)検出可能な抗体は、例えば、目的の表面発現されたサイトカイン、TRLリガンドまたは活性化受容体リガンドを発現する改変された721.221に結合するために使用され得る。次いで、一部の例では、フローサイトメトリーまたは磁気ビーズは、改変された721.221細胞を同定するために使用され得る。

IV. 改変された721.221細胞を利用して免疫細胞を拡大増殖させる方法

#### 【0118】

本明細書に開示される改変された721.221細胞を使用して、NK細胞またはT細胞を拡大増殖させる方法が、本明細書に開示される。特定の例では、本明細書に開示される方法は、CAR改変されたNK細胞またはT細胞を拡大増殖させるために利用される。

#### 【0119】

NK細胞またはT細胞の*in vitro*または*ex vivo*での単離および富化のための技法が、本明細書に記載される。例示的な手順は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第2014/0086890号、WO特許出願公開番号2017/127729および米国特許出願公開第2013/0315884号に記載されている。当業者は、例えば、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる、Childs et al., Hematol. The Education Program 2013: 234-246, 2013; 米国特許第6,352,694号; 同第6,534,055号; 同第6,905,680号; 同第6,692,964号; 同第5,858,358号; 同第6,887,466号; 同第6,905,681号; 同第7,144,575号; 同第7,067,318号; 同第7,172,869号; 同第7,232,566号; 同第7,175,843号; 同第5,883,223号; 同第6,905,874号; 同第6,797,514号; 同第6,867,041号; および米国特許出願公開第2006/0121005号に記載されるような、NK細胞またはT細胞を拡

大増殖させるためのさらなる方法を同定することができる。

【0120】

単核細胞は、対象（例えば、健康な対象、ドナー対象、またはがん、免疫障害もしくは感染性疾患を有する対象）から、または処置される対象とHLAが一致したドナーから収集される。一部の例では、単核細胞は、アフエーシス手順によって収集される。単核細胞は、例えば、免疫-磁気ビーズ戦略を使用する陰性枯渇によって、NK細胞またはT細胞について富化される。他の例では、単核細胞は、例えば、多糖技術、例えば、Ficoll（登録商標）ベースの分離方法（GE（登録商標）Healthcare）を使用して単離されたPMBCを含む。

【0121】

一部の例では、NK細胞は、ビオチン化されたモノクローナル抗体の混合物を利用して、T細胞、B細胞、単球、樹状細胞、血小板、マクロファージおよび赤血球の単核細胞試料を枯渇させることによって、必要に応じて富化される。一部の例では、試料中の非NK細胞は、ストレプトアビジンにカップリングされた磁気ビーズを用いて除去されて、NK細胞の富化された調製物を生じる。この方法のための例示的な市販のキットは、Dynabeads（登録商標）Untouched（商標）Human NK Cellsキット（ThermoFisher Scientific、Waltham、MA）である。

【0122】

一部の例では、T細胞は、ビオチン化されたモノクローナル抗体の混合物を利用して、NK細胞、B細胞、単球、樹状細胞、血小板、マクロファージおよび赤血球の単核細胞試料を枯渇させることによって富化される。一部の例では、試料中の非NK細胞は、ストレプトアビジンにカップリングされた磁気ビーズを用いて除去されて、NK細胞の富化された調製物を生じる。この方法のための例示的な市販のキットは、EASYSSEP（商標）Human T Cell Isolation Kit（STEMCELL（商標）technologies、Cambridge、MA）である。一部の例では、試料中の非NK細胞は、ストレプトアビジンにカップリングされた磁気ビーズを用いて除去されて、NK細胞の富化された調製物を生じる。

【0123】

一部の例では、NK細胞またはT細胞は、陽性選択によって富化される。一部の例では、方法は、例えば、抗CD56抗体にコンジュゲートされた磁気ビーズ（例えば、CD56 MicroBeads、Miltenyi Biotec, Inc., Auburn, CA）を利用する、CD56<sup>+</sup>NK細胞の陽性選択などによって、NK細胞について富化することを含む。他の例では、陰性枯渇（例えば、T細胞枯渇）とその後のCD56<sup>+</sup>NK細胞の陽性選択とを含む二段階方法が、NK細胞を富化するために使用される。他の例では、方法は、例えば、抗CD4または抗CD8抗体にコンジュゲートされた磁気ビーズ（例えば、CD4またはCD8 MicroBeads、Miltenyi Biotec, Inc., Auburn, CA）を利用する、CD4<sup>+</sup>T細胞またはCD8<sup>+</sup>T細胞の陽性選択などによって、T細胞について富化することを含む。他の例では、陰性枯渇（例えば、NK細胞枯渇）とその後のCD4<sup>+</sup>T細胞またはCD8<sup>+</sup>T細胞の陽性選択とを含む二段階方法が、T細胞を富化するために使用される。当業者は、NK細胞またはT細胞の富化された集団を調製するために使用され得る他の方法を特定することができる。

【0124】

単離されたNK細胞またはT細胞は、マーカーの発現について、フローサイトメトリーによって分析され得る。一部の例では、マーカーは、単離された細胞の純度についてアッセイするために使用され得る。一部の例では、CD56は、例えば、NK細胞を分析するためのマーカーとして使用され得る。一部の例では、CD8またはCD4は、例えば、T細胞を分析するためのマーカーとして使用され得る。

【0125】

一部の実施形態では、NK細胞またはT細胞は、in vitroで拡大増殖される。一部の例では、富化されたNK細胞またはT細胞は、拡大増殖のために使用され得る。他

10

20

30

40

50

の例では、NK細胞またはT細胞は、細胞の不均一なプール、例えば、試料、例えば、組織、体液または血液試料に由来する細胞の集団を使用して拡大増殖される。一部の例では、細胞の集団は、末梢血単核球(PMBC)を含む。細胞の集団(例えば、PMBC)は、使用され得る任意の組織、体液または血液試料、例えば、末梢血、臍帯血、腹水、月経血または骨髓から生成され得る。具体的な例では、細胞の集団は、健康なドナー由来のPMBC、健康なドナー由来の臍帯血単核細胞、または非ホジキンリンパ腫(NHL)患者由来のPMBCを含む。

#### 【0126】

一部の例では、拡大増殖を増強するために、NK細胞またはT細胞は、本明細書に開示される改変された721.221細胞(例えば、mIL-21を発現する721.221細胞)を用いて拡大増殖される。本明細書に開示される改変された721.221細胞は、NK細胞またはT細胞のためのフィーダー細胞として利用される。任意の量の、拡大増殖のための細胞およびフィーダー細胞が使用され得る。一部の例では、拡大増殖のための細胞(例えば、PMBC)の量には、少なくとも約 $10^1$ 、少なくとも約 $10^2$ 、少なくとも約 $10^3$ 、少なくとも約 $10^4$ 、少なくとも約 $10^5$ 、少なくとも約 $10^6$ 、少なくとも約 $10^7$ 、少なくとも約 $10^8$ 、少なくとも約 $10^9$ 、または少なくとも約 $10^{10}$ 、約 $10^1 \sim 10^{10}$ 、 $10^4 \sim 10^8$ 、または約 $10^6$ 、例えば、 $5 \times 10^6$ 細胞が挙げられ得る。一部の例では、拡大増殖のための細胞(例えば、NK細胞またはT細胞を含む細胞の集団、例えば、PMBC)は、少なくとも約 $10^1$ 、少なくとも約 $10^2$ 、少なくとも約 $10^3$ 、少なくとも約 $10^4$ 、少なくとも約 $10^5$ 、少なくとも約 $10^6$ 、少なくとも約 $10^7$ 、少なくとも約 $10^8$ 、少なくとも約 $10^9$ 、または少なくとも約 $10^{10}$ 、約 $10^1 \sim 10^{10}$ 、 $10^5 \sim 10^9$ 、または約 $10^6$ 、例えば、 $1 \times 10^7$ 細胞のフィーダー細胞(例えば、改変された721.221細胞、例えば、mIL-21を発現する721.221細胞)と接触され得る。一部の例では、拡大増殖のための細胞(例えば、PMBC)のフィーダー細胞に対する比は、少なくとも約1:1~約1:50、例えば、少なくとも約1:1、少なくとも約1:2、少なくとも約1:5、少なくとも約1:6、少なくとも約1:7、少なくとも約1:8、少なくとも約1:9、少なくとも約1:10、少なくとも約1:15、少なくとも約1:20、少なくとも約1:25、少なくとも約1:30、少なくとも約1:35、少なくとも約1:40、少なくとも約1:45、もしくは少なくとも約1:50、または約1:2、約1:7、約3:20もしくは約1:20であり得る。一部の例では、さらなる試薬、例えば、さらなるサイトカイン、例えば、IL-2、IL-5、IL-7、IL-8および/またはIL-12が、拡大増殖を増強するために使用される。

#### 【0127】

拡大増殖のための細胞(例えば、NK細胞またはT細胞を含む細胞の集団、例えば、PMBC)は、フィーダー細胞および/または他の拡大増殖増強試薬(例えば、IL-2、IL-5、IL-7、IL-8および/またはIL-12)と、少なくとも約1~40日間、例えば、少なくとも約1、少なくとも約3、少なくとも約5、少なくとも約7、少なくとも約10、少なくとも約14、少なくとも約21、少なくとも約28、少なくとも約35、約10~30、10~20、20~30もしくは15~25、または約14日間(例えば、T細胞拡大増殖のため)もしくは約21日間(例えば、NK細胞拡大増殖、例えば、CAR-NK細胞のため)接触される。

#### 【0128】

本明細書に開示される技法を使用して(例えば、NK細胞またはT細胞をフィーダー細胞、例えば、mIL-21を例えば発現する改変された721.221細胞と接触させることによって)産生された拡大増殖されたNK細胞またはT細胞(例えば、富化された、または細胞の不均一な集団、例えば、PMBC中の)は、拡大増殖技法を制御するのに優れていることがあり得、このとき、フィーダー細胞、例えば、(例えば、mIL-21を発現する)改変された721.221細胞は使用されない。一部の例では、本明細書に開示される技法を使用する拡大増殖は、拡大増殖を、少なくとも約1倍、少なくとも約2倍

10

20

30

40

50

、少なくとも約3倍、少なくとも約4倍、少なくとも約5倍、少なくとも約6倍、少なくとも約7倍、少なくとも約8倍、少なくとも約9倍、少なくとも約10倍、少なくとも約15倍、少なくとも約20倍、1～20倍、5～15倍、1～5倍、5～10倍、10～15倍、または約10倍増強し得る。

#### 【0129】

一部の例では、拡大増殖されたNK細胞またはT細胞の細胞傷害性が評価され得る。細胞傷害性は、任意の時点で、例えば、拡大増殖されたNK細胞もしくはT細胞が拡大増殖された後に評価され得、または必要に応じて、拡大増殖されたNK細胞もしくはT細胞は、形質導入され得る（例えば、キメラ抗原受容体（CAR）を発現するために）。一部の例では、腫瘍細胞に対する細胞傷害性を評価するために、動物モデル、例えば、検出可能な腫瘍マーカー（例えば、生物発光腫瘍マーカー、例えば、ルシフェラーゼ、例えば、*ffluc*・*Daudi*腫瘍細胞）を発現する動物モデルが使用され得る。具体的な例では、NK細胞またはT細胞は、本明細書に開示される方法を用いずに産生された対照NK細胞またはT細胞と比較して、例えば腫瘍細胞に対する優れた細胞傷害性を示す。例えば、開示された方法を使用して産生されたNK細胞またはT細胞は、例えば腫瘍細胞に対するより高い細胞傷害性、少なくとも約0.5倍、少なくとも約1倍、少なくとも約2倍、少なくとも約3倍、少なくとも約4倍、少なくとも約5倍、少なくとも約6倍、少なくとも約7倍、少なくとも約8倍、少なくとも約9倍もしくは少なくとも約10倍、約0.5～10倍、1～5倍もしくは5～10倍、または約3倍高い毒性を示し得る。一部の例では、クロム放出アッセイが、細胞標的に対するNK細胞の細胞傷害性を評価するために使用され得る。当業者は、単離されたNK細胞集団（例えば、純度、生存率および/または活性）を評価するための他の方法を同定することができる。

#### 【0130】

一部の実施形態では、NK細胞またはT細胞は、目的のタンパク質を発現するようにさらに形質導入され得る。具体的な例では、NK細胞またはT細胞は、CARを発現するように形質導入され得る。次いで、改変されたNK細胞またはT細胞は、本明細書に開示される改変された721.221細胞および方法を使用して拡大増殖される。NK細胞またはT細胞は、本明細書に記載される方法を通じた任意の時点で、例えば、拡大増殖の前または拡大増殖の間に、形質導入され得る。具体的な例では、NK細胞またはT細胞は、拡大増殖の間に、例えば、拡大増殖プロセスの持続時間の少なくとも約1/4、1/3、1/2または3/4の時点で、CARで形質導入され得る。具体的な非限定的な例では、NK細胞またはT細胞は、拡大増殖の持続時間の約1/3の時点で、CARで形質導入され得、例えば、このとき、拡大増殖プロセスは、21日間にわたって行われ、NK細胞またはT細胞は、約7日目にCARで形質導入され得る。他の例では、本明細書に開示される改変された721.221細胞を使用して拡大増殖されたNK細胞またはT細胞は、CARを発現するように引き続いて改変される。

#### 【0131】

具体的な例では、NK細胞またはT細胞は、その中に送達のための目的のCARを含むウイルスベクターで形質導入され得る。適切なウイルスベクターの例には、レトロウイルス（例えば、*MoMLV*またはレンチウイルス）ベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクターおよび鶏痘ベクターが挙げられる。具体的な例では、レトロウイルスシステムが、CARをNK細胞またはT細胞中に導入するために使用される。一部の例では、*MoMLV*ベクター、例えば、*SFG*レトロウイルスベクターが使用され得る。一部の例では、CARは、少なくとも1つの異種核酸からのタンパク質またはその断片を含み得、この少なくとも1つの異種核酸は、（例えば、同じまたは異なるベクター中で）使用され得る少なくとも1つの細胞外配列、少なくとも1つの膜貫通配列および/または少なくとも1つの細胞内配列を含み得る。

#### 【0132】

一部の例では、少なくとも1つの異種核酸は、少なくとも2つの細胞外配列、少なくとも3つの細胞外配列、少なくとも4つの細胞外配列もしくは少なくとも5つの細胞外配列

10

20

30

40

50

、または約 1 ~ 2、1 ~ 3 もしくは 1 ~ 5 つの細胞外配列を含む。少なくとも 1 つの細胞外配列は、目的の任意の C A R、例えば、C D 1 9 または カッパ 軽鎖 配列 を含み得る。一部の例では、少なくとも 1 つの細胞外配列は、I g G 配列由来の細胞外断片を含み得る。C D 8 または C D 2 8 由来の細胞外配列を含む他の細胞外配列が使用され得る。一部の例では、少なくとも 1 つの異種核酸は、少なくとも 2 つの細胞外配列を含む。具体的な例では、少なくとも 2 つの細胞外配列は、目的の C A R、例えば、C D 1 9 または カッパ、および I g G 配列由来の細胞外断片を含む。

【 0 1 3 3 】

一部の例では、少なくとも 1 つの異種核酸は、少なくとも 2 つの膜貫通配列もしくは少なくとも 3 つの膜貫通配列、または約 1 ~ 2 もしくは 1 ~ 3 つの膜貫通配列を含む。一部の例では、少なくとも 1 つの膜貫通配列は、C D 2 8 配列由来の膜貫通断片を含み得る。他の膜貫通配列、例えば、4 - 1 B B 配列が使用され得る。一部の例では、少なくとも 1 つの異種核酸は、少なくとも 2 つの細胞内配列、少なくとも 3 つの細胞内配列、少なくとも 4 つの細胞内配列、少なくとも 5 つの細胞内配列もしくは少なくとも 6 つの細胞内配列、または約 1 ~ 2、1 ~ 3 もしくは 1 ~ 6 の細胞内配列を含む。一部の例では、少なくとも 1 つの細胞内配列は、C D 2 8 配列由来の細胞内断片、4 - 1 B B 配列由来の細胞内断片および / または C D 3 配列由来の細胞内断片を含み得る。

【 0 1 3 4 】

さらなる C A R、例えば、L L 1 ( 抗 C D 7 4 )、G D 2 抗原、C D 5 抗原、C D 5 7 抗原、L L 2 または R F B 4 ( 抗 C D 2 2 )、ベルツズマブ ( h A 2 0、抗 C D 2 0 )、リツキシマブ ( r i t u x u m a b ) ( 抗 C D 2 0 )、オビヌツズマブ ( G A 1 0 1、抗 C D 2 0 )、ランブロリズマブ ( 抗 P D 1 )、ニボルマブ ( 抗 P D 1 )、M K - 3 4 7 5 ( 抗 P D 1 )、A M P - 2 2 4 ( 抗 P D 1 )、ピディリズマブ ( 抗 P D 1 )、M D X - 1 1 0 5 ( 抗 P D - L I )、M E D I 4 7 3 6 ( 抗 P D - L I )、M P D L 3 2 8 0 A ( 抗 P D - L I )、B M S - 9 3 6 5 5 9 ( 抗 P D - L 1 )、イピリムマブ ( 抗 C T L A 4 )、トレビリズマブ ( t r e v i l i z u m a b ) ( 抗 C T L 4 A )、R S 7 ( 抗上皮糖タンパク質 - 1 ( T R O P - 2 としても公知の E G P - 1 ) )、P A M 4 または K C 4 ( 共に抗ムチン)、M N - 1 4 ( 抗癌胎児性抗原 ( C D 6 6 e または C E A C A M - 5 としても公知の C E A ) )、M N - 1 5 または M N - 3 ( 抗 C E A C A M - 6 )、M u - 9 ( 抗結腸特異的抗原 - p )、I m m u 3 1 ( 抗アルファ - フェトプロテイン )、R 1 ( 抗 I G F - 1 R )、A 1 9 ( 抗 C D 1 9 )、T A G - 7 2 ( 例えば、C C 4 9 )、T n、1 5 9 1 または H u J 5 9 1 ( 抗 P S M A ( 前立腺特異的膜抗原 ) )、A B - P G 1 - X G 1 - 0 2 6 ( 抗 P S M A ダイマー)、D 2 / B ( 抗 P S M A )、G 2 5 0 ( 抗炭酸脱水酵素 I X M A b )、L 2 4 3 ( 抗 H L A - D R )、アレムツズマブ ( 抗 C D 5 2 )、ベバシズマブ ( 抗 V E G F )、セツキシマブ ( 抗 E G F R )、ゲムツズマブ ( 抗 C D 3 3 )、イブリツモマブチウキセタン ( 抗 C D 2 0 ) ; パニツムマブ ( 抗 E G F R ) ; トシツモマブ ( 抗 C D 2 0 ) ; P A M 4 ( クリバツズマブ ( c l i v a t u z u m a b )、抗ムチンとしても公知)、B W A - 3 ( 抗ヒストン H 2 A / H 4 )、L G 2 - 1 ( 抗ヒストン H 3 )、M R A 1 2 ( 抗ヒストン H 1 )、P R I - 1 ( 抗ヒストン H 2 B )、L G 1 1 - 2 ( 抗ヒストン H 2 B )、L G 2 - 2 ( 抗ヒストン H 2 B )、およびトラスツズマブ ( 抗 E r b B 2 )、炭酸脱水酵素 I X、B 7、C C L 1 9、C C L 2 1、C S A p、H E R - 2 / n e u、B r E 3、C D I、C D 1 a、C D 2、C D 3、C D 4、C D 5、C D 5、C D 1 1 A、C D 1 4、C D 1 5、C D 1 6、C D 1 8、C D 1 9、C D 2 0 ( 例えば、C 2 B 8、h A 2 0、1 F 5 M A b )、C D 2 1、C D 2 2、C D 2 3、C D 2 5、C D 2 9、C D 3 0、C D 3 2 b、C D 3 3、C D 3 7、C D 3 8、C D 4 0、C D 4 0 L、C D 4 4、C D 4 5、C D 4 6、C D 4 7、C D 5 2、C D 5 4、C D 5 5、C D 5 9、C D 6 4、C D 6 7、C D 7 0、C D 7 2、G P C - 3、C D 7 4、C D 7 9 a、C D S 0、C D 8 3、C D 9 5、C D 1 2 6、C D 1 3 3、C D 1 3 7、D 1 3 8、C D 1 4 7、C D 1 5 4、C D 1 2 7 ( B 7 - H 3 としても公知)、C E A C A M - 5、C E A C A M - 6、C T L A 4、アルファ - フェトプロテイン ( A F P )、V E G F ( 例えば、A V A S T

10

20

30

40

50

IN (登録商標)、フィブロネクチンスプライスバリエーション(例えば、L19)、EGP-1(TROP-2)、EGP-2(例えば、17-1A)、EGF受容体(ErbB1)(例えば、ERBITUX(登録商標))、ErbB2、ErbB3、H因子、FHL-1、Flt-3、葉酸受容体、Ga733、GROファミリータンパク質、HMGB-1、低酸素誘導因子(HIF)、HML24、HER-2/neu、インスリン様成長因子(ILGF)、IFNファミリータンパク質、IL-2R、IL-4R、IL-6R、IL-13R、IL-15R、IL-17R、IL-18R、IL-2、IL-6、IL-8、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-25、IP-10、IGF-1R、Ia、HML24、ガングリオシド、Fas-L、HCG、L243が結合するHLA-DR抗原、CD66抗原(即ち、CD66a~dまたはそれらの組合せ)、MAGE、mCRP、MCP-1、MIP-1A、MIP-18、マクロファージ遊走阻害因子(MIF)、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC5ac、胎盤成長因子(PLGF)、PSA(前立腺特異的抗原)、PSMA、PAM4抗原、PD1受容体、NCA-95、NCA-90、A3、A33、Ep-CAM、KS-1、Le(y)、メソテリン、S100、テネイシン、TAC、Tn抗原、Thomas-Friedenreich抗原、腫瘍壊死抗原、腫瘍血管新生抗原、TNF-a、TRAIL受容体(R1およびR2)、TROP-2、VEGFR、RANTESならびにTIO1が使用され得る。他のCAR、例えば、多特異的CAR(例えば、二重特異的または三重特異的CAR、例えば、本明細書に開示される1つまたは複数のCARを含む)が可能である。

10

20

IV. 状態を処置または阻害するための方法および組成物

#### 【0135】

本明細書に記載される方法によって産生されたNK細胞またはT細胞(例えば、CAR改変されたNK細胞またはT細胞)を対象に投与することによって、疾患または障害を有する対象を処置する方法が、本明細書に開示される。具体的な非限定的な例では、NK細胞が投与される。本明細書に記載される非改変NK細胞もしくはT細胞または改変された(例えば、CAR改変された)NK細胞もしくはT細胞は、動物またはヒト対象のいずれかに投与され得る。特定の例では、NK細胞もしくはT細胞(またはCAR-NK細胞もしくはCAR-T細胞)は、無関係の個体を含む、非HLA一致ドナー由来である。他の例では、NK細胞もしくはT細胞(またはCAR-NK細胞もしくはCAR-T細胞)は、処置されている対象由来である(例えば、自家である)。一部の実施形態では、疾患または障害は、がん(例えば、固形がん(例えば、肉腫(例えば、横紋筋肉腫、骨原性肉腫、ユーイング肉腫、軟骨肉腫および胞巣状軟部肉腫);癌(例えば、結腸直腸癌);およびリンパ腫、例えば、ホジキンリンパ腫または非ホジキンリンパ腫、例えば、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、慢性リンパ球性リンパ腫、小リンパ球性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、パーキットリンパ腫、皮膚T細胞リンパ腫、AIDS関連リンパ腫もしくは中枢神経系リンパ腫);神経芽細胞腫;婦人科がん(例えば、卵巣がん);乳がん;肝臓がん;肺がん;前立腺がん;皮膚がん;骨がん;膵がん;脳がん(神経芽細胞腫);頭頸部がん;腎臓がん(例えば、ウィルムス腫瘍);網膜芽細胞腫;副腎皮質腫瘍;類腱腫;線維形成性小円形細胞腫瘍;内分泌腫瘍;および/または血液がん(例えば、骨髄腫、例えば、多発性骨髄腫;リンパ腫、例えば、ホジキンリンパ腫または非ホジキンリンパ腫、例えば、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、慢性リンパ球性リンパ腫、小リンパ球性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、パーキットリンパ腫、皮膚T細胞リンパ腫、AIDS関連リンパ腫もしくは中枢神経系リンパ腫;あるいは白血病、例えば、急性リンパ球性白血病(ALL)もしくは急性骨髄性白血病(AML))、免疫障害(例えば、自己免疫障害または移植片拒絶)、または感染性疾患(例えば、サイトメガロウイルス感染症、アデノウイルス感染症、呼吸器合胞体ウイルス感染症、エプスタイン・バーウイルス感染症またはHIV感染症)である。

30

40

#### 【0136】

本明細書に記載されるように産生された拡大増殖されたNK細胞またはT細胞は、医薬

50

組成物中に取り込まれ得る。かかる組成物は、典型的には、NK細胞またはT細胞（例えば、改変されたNK細胞またはT細胞）の集団および薬学的に許容される担体を含む。「薬学的に許容される担体」には、医薬品投与と適合性の任意のおよび全ての溶媒、分散媒、コーティング、抗細菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などが挙げられる（例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, The University of the Sciences in Philadelphia, Editor, Lippincott, Williams, & Wilkins, Philadelphia, PA, 21<sup>st</sup> Edition, 2005を参照のこと）。かかる担体または希釈剤の例には、水、食塩水、リンゲル溶液、デキストロース溶液、平衡塩溶液および5%ヒト血清アルブミンが挙げられるがこれらに限定されない。リポソームおよび非水性ビヒクル、例えば、固定油もまた使用され得る。補足的な活性化合物もまた、組成物中に取り込まれ得る。投与可能な組成物を調製するための実際の方法は、当業者に公知であるかまたは明らかであり、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, The University of the Sciences in Philadelphia, Editor, Lippincott, Williams, & Wilkins, Philadelphia, PA, 21<sup>st</sup> Edition (2005)などの刊行物においてより詳細に記載されている。非限定的な一例では、形質導入されたNK細胞は、PLASMA-LYTE（商標）多電解質溶液中に懸濁される。

10

## 【0137】

一部の例では、組成物は、約 $10^4 \sim 10^{12}$ のNK細胞またはT細胞（例えば、約 $10^4 \sim 10^8$ 細胞、約 $10^6 \sim 10^8$ 細胞または約 $10^6 \sim 10^{12}$ 細胞）を含む。例えば、組成物は、約 $10^4 \sim 10^{10}$ 細胞/kg（例えば、約 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$ または $10^8$ 細胞/kg）のNK細胞またはT細胞（about  $10^4$  to  $10^{10}$  NK or T cells cells/kg (such as about  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ , or  $10^8$  cells/kg)）が対象に投与されるように調製され得る。具体的な例では、組成物は、少なくとも $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ または $10^7$ のNK細胞を含む。NK細胞またはT細胞の集団は、典型的には、非経口、例えば、静脈内投与される；しかし、腫瘍もしくは腫瘍近傍への注射もしくは注入（局所投与）または腹腔への投与もまた使用され得る。当業者は、適切な投与経路を決定することができる。

20

30

## 【0138】

NK細胞またはT細胞の集団の複数の用量が、対象に投与され得る。例えば、NK細胞またはT細胞の集団は、毎日、1日おきに、1週間に2回、毎週、1週間おきに、3週間毎に、毎月、またはより低い頻度で投与され得る。当業者は、対象、処置されている状態、以前の処置履歴および他の因子に基づいて、投与スケジュールを選択することができる。

## 【0139】

さらなる例では、対象には、NK細胞またはT細胞の生存および/または成長を支持するために、少なくとも1つ、少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つまたは少なくとも4つのサイトカイン（例えば、IL-2、IL-15、IL-21および/またはIL-12）もまた投与される。具体的な非限定的な例では、少なくとも1つのサイトカインは、IL-2およびIL-15を含む（例えば、NK細胞の生存および/または成長を支持するため）。サイトカイン（複数可）は、NK細胞もしくはT細胞の前に、その後、またはそれと実質的に同時に投与される。具体的な例では、少なくとも1つの（例えば、IL-2および/またはIL-2）は、例えば、NK細胞と同時に投与される。

40

## 【0140】

一部の例では、方法は、過剰増殖障害、例えば、血液学的悪性疾患または固形腫瘍を処置または阻害することを含む。血液学的悪性疾患の例には、急性白血病（例えば、11q23陽性急性白血病、急性リンパ球性白血病、急性骨髄球性白血病、急性骨髄性白血病（myelogenous leukemia）および骨髄芽球性白血病、前骨髄球性白血

50

病、骨髄単球性白血病、単球性白血病および赤白血病)、慢性白血病(例えば、慢性骨髄球性(顆粒球性)白血病、慢性骨髄性白血病および慢性リンパ球性白血病)、T細胞大型顆粒リンパ球白血病を含む白血病、真性赤血球増加症、リンパ腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫(低悪性度および高悪性度形態;びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、慢性リンパ球性リンパ腫、小リンパ球性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、パーキットリンパ腫、皮膚T細胞リンパ腫、AIDS関連リンパ腫または中枢神経系リンパ腫を含む)、多発性骨髄腫、ワルデンストレーム高ガンマグロブリン血症、重鎖病、骨髄異形成症候群、ヘアリー細胞白血病および脊髄形成異常症が挙げられる。未改変のまたは改変された(例えば、CAR改変された)NK細胞またはT細胞が投与され得る。具体的な例では、本明細書の方法を使用して拡大増殖された未改変のNK細胞またはT細胞は、リンパ腫、例えば、B細胞リンパ腫;婦人科がん、例えば、卵巣がん;乳がん;肝臓がん;肺がん;または血液がん、例えば、骨髄腫もしくは白血病、例えば、多発性骨髄腫、ALLもしくはAMLを処置または阻害するために投与され得る。

10

#### 【0141】

固形腫瘍、例えば、肉腫および癌の例には、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨原性肉腫および他の肉腫、滑膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌、リンパ腫(低悪性度および高悪性度形態;ホジキンリンパ腫;および非ホジキンリンパ腫、例えば、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、慢性リンパ球性リンパ腫、小リンパ球性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、パーキットリンパ腫、皮膚T細胞リンパ腫、AIDS関連リンパ腫または中枢神経系リンパ腫を含む)、膵がん、乳がん(基底乳癌、乳管癌および小葉乳癌を含む)、肺がん、卵巣がん、前立腺がん、肝細胞癌、扁平上皮癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、甲状腺髄様癌、甲状腺乳頭癌、褐色細胞腫、皮脂腺癌、乳頭癌、乳頭腺癌、髄様癌、気管支原性癌、腎細胞癌、ヘパトーマ、胆管癌、絨毛癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸がん、精巣腫瘍、セミノーマ、膀胱癌およびCNS腫瘍(例えば、神経膠腫、星細胞腫、髄芽腫、頭蓋咽頭腫(cranio-pharyngioma)、上衣腫、松果体腫、血管芽細胞腫、聴神経腫瘍、乏突起神経膠腫、髄膜腫、黒色腫、神経芽細胞腫および網膜芽細胞腫)が挙げられる。

20

#### 【0142】

特定の例では、本明細書に開示される方法によって阻害または処置され得る血液学的悪性疾患には、多発性骨髄腫、慢性リンパ球性白血病、急性リンパ球性白血病、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、前リンパ球性/骨髄球性白血病、形質細胞白血病、NK細胞白血病、ワルデンストレーム高ガンマグロブリン血症、ホジキンリンパ腫および非ホジキンリンパ腫(低悪性度および高悪性度形態;びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、慢性リンパ球性リンパ腫、小リンパ球性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、パーキットリンパ腫、皮膚T細胞リンパ腫、AIDS関連リンパ腫または中枢神経系リンパ腫を含む)が挙げられるがこれらに限定されない。さらなる特定の例では、本明細書に開示される方法によって処置または阻害され得る固形腫瘍には、肺癌、前立腺がん、膵がん(例えば、インスリノーマ)、乳がん、結腸直腸腺癌または扁平上皮癌、神経芽細胞腫、精巣がん(例えば、セミノーマ)および卵巣がんが挙げられる。具体的な非限定的な例では、対象は、慢性骨髄性白血病、急性単球性白血病または非ホジキンリンパ腫(低悪性度および高悪性度形態;びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、慢性リンパ球性リンパ腫、小リンパ球性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、パーキットリンパ腫、皮膚T細胞リンパ腫、AIDS関連リンパ腫または中枢神経系リンパ腫を含む)を有する。当業者は、特定の腫瘍または他の障害を有する対象を処置するための適切な導入遺伝子を発現するNK細胞またはT細胞を選択することができる。

30

40

#### 【0143】

一部の例では、対象(例えば、腫瘍または過剰増殖障害を有する対象)には、1つまたは複数の化学療法剤および/または放射線療法もまた投与される。かかる薬剤には、アルキル化剤、例えば、ナイトロジェンマスタード(例えば、メクロレタミン、シクロホスファミド、メルファラン、ウラシルマスタードもしくはクロラムブシル)、スルホン酸アル

50

キル（例えば、ブスルファン）、ニトロソウレア（例えば、カルムスチン、ロムスチン、セムスチン、ストレプトゾシンもしくはダカルバジン）；代謝拮抗物質、例えば、葉酸アナログ（例えば、メトトレキセート）、ピリミジンアナログ（例えば、5 - FUもしくはシタラビン）およびプリンアナログ、例えば、メルカプトプリンもしくはチオグアニン；または天然産物、例えば、ビンカアルカロイド（例えば、ビンブラスチン、ビンクリスチンもしくはビンデシン）、エピポドフィロトキシン（例えば、エトポシドもしくはテニポシド）、抗生物質（例えば、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、ドキシソルピシン、プレオマイシン、プリカマイシンもしくはマイトマイシンC (mitocycin C)）ならびに酵素（例えば、L - アスパラギナーゼ）が挙げられる。さらなる薬剤には、白金配位錯体（例えば、シスプラチンとしても公知のシス - ジアミン - ジクロロ白金II (cis - diamine - dichloroplatinum II)）、置換尿素（例えば、ヒドロキシウレア）、メチルヒドラジン誘導体（例えば、プロカルバジン）および副腎皮質 (adrenocortical) 抑制薬（例えば、ミトタンおよびアミノグルテチミド）；ホルモンおよびアンタゴニスト、例えば、副腎皮質ステロイド（例えば、プレドニゾン）、プロゲステロン（例えば、カブロン酸ヒドロキシプロゲステロン、酢酸メドロキシプロゲステロンおよび酢酸メゲストロール (mestrol acetate)）、エストロゲン（例えば、ジエチルstilbestrolおよびエチニルエストラジオール）、抗エストロゲン薬（例えば、タモキシフェン）およびアンドロゲン（例えば、プロピオン酸テストステロン (testosterone propionate)）およびフルオキシメステロン）が挙げられる。最も一般に使用される化学療法薬物の例には、アドリアマイシン、メルファラン (Alkeran (登録商標))、Ara - C (シタラビン)、カルムスチン、ブスルファン、ロムスチン、カルボプラチナム (carboplatinum)、シスプラチナム (cisplatinum)、シクロホスファミド (Cytosoxan (登録商標))、ダウノルピシン、ダカルバジン、5 - フルオロウラシル、フルダラビン、ヒドロキシウレア、イダルピシン、イホスファミド、メトトレキセート、ミトラマイシン、マイトマイシン、ミトキサントロン、ナイトロジェンマスタード、パクリタキセル（または他のタキサン、例えば、ドセタキセル）、ビンブラスチン、ビンクリスチン、VP - 16が挙げられるが、より新たな薬物には、ゲムシタビン (Gemzar (登録商標))、トラスツズマブ (Herceptin (登録商標))、イリノテカン (CPT - 11)、ロイスタチン、ナベルピン、リツキシマブ (Rituxan (登録商標))、イマチニブ (STI - 571)、トポテカン (Hycamtin (登録商標))、カペシタビン、イブリツモマブ (Zevalin (登録商標)) およびカルシトリオールが挙げられる。

#### 【0144】

一部の例では、方法は、血液がん（低悪性度および高悪性度形態を含む；例えば、骨髄腫、例えば、多発性骨髄腫；リンパ腫、例えば、ホジキンリンパ腫または非ホジキンリンパ腫、例えば、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、慢性リンパ球性リンパ腫、小リンパ球性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、パーキットリンパ腫、皮膚T細胞リンパ腫、AIDS関連リンパ腫もしくは中枢神経系リンパ腫；あるいは白血病、例えば、急性リンパ球性白血病 (ALL) もしくは急性骨髄性白血病 (AML) を含む) を処置または阻害することを含む。例えば、方法は、血液がんを有する対象を選択することを含み得る。方法は、本明細書に開示される方法を使用して開示されたCAR改変されたリンパ球のいずれかを投与し、それによって血液がんを処置することもまた含み得る。例えば、721 . 221細胞を使用して産生されたCD19 - CAR改変されたNK細胞。一部の例では、mIL - 21および/またはIL - 15R を発現する改変された721 . 221細胞は、投与されるCD19 - CAR改変されたNK細胞を産生するために使用され得る。

#### 【0145】

具体的な非限定的な例では、方法は、白血病（例えば、急性リンパ球性白血病 (ALL) もしくは急性骨髄性白血病 (AML)）を処置または阻害することを含む。例えば、方

10

20

30

40

50

法は、白血病を有する対象を選択することを含み得る。方法は、本明細書に開示される方法を使用して開示されたC A R改変されたリンパ球のいずれか、例えば、7 2 1 . 2 2 1細胞を使用して産生されたC D 1 9 - C A R改変されたN K細胞を投与し、それによって白血病を処置することもまた含み得る。一部の例では、m I L - 2 1および/またはI L - 1 5 R を発現する改変された7 2 1 . 2 2 1細胞は、投与されるC D 1 9 - C A R改変されたN K細胞を産生するために使用され得る。

【0146】

一部の例では、方法は、固形腫瘍（低悪性度および高悪性度形態；肉腫、癌およびリンパ腫（例えば、ホジキンまたは非ホジキン）を含む）を処置または阻害することを含む。例えば、方法は、固形腫瘍を有する対象を選択することを含み得る。方法は、本明細書に開示される方法を使用して開示されたC A R改変されたリンパ球のいずれかを投与し、それによって固形腫瘍を処置することもまた含み得る。例えば、7 2 1 . 2 2 1細胞を使用して産生されたC D 1 9 - C A R改変されたN K細胞。一部の例では、m I L - 2 1および/またはI L - 1 5 R を発現する改変された7 2 1 . 2 2 1細胞は、投与されるC D 1 9 - C A R改変されたN K細胞を産生するために使用され得る。

10

【0147】

具体的な非限定的な例では、方法は、リンパ腫（低悪性度および高悪性度形態を含む；ホジキンリンパ腫および非ホジキンリンパ腫を含む）を処置または阻害することを含む。例えば、方法は、リンパ腫を有する対象を選択することを含み得る。方法は、本明細書に開示される方法を使用して開示されたC A R改変されたリンパ球のいずれか、例えば、7 2 1 . 2 2 1細胞を使用して産生されたC D 1 9 - C A R改変されたN K細胞を投与し、それによってリンパ腫を処置することもまた含み得る。一部の例では、m I L - 2 1および/またはI L - 1 5 R を発現する改変された7 2 1 . 2 2 1細胞は、投与されるC D 1 9 - C A R改変されたN K細胞を産生するために使用され得る。

20

【0148】

具体的な非限定的な例では、方法は、非ホジキンリンパ腫（低悪性度および高悪性度形態を含む；びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、慢性リンパ球性リンパ腫、小リンパ球性リンパ腫、マンツル細胞リンパ腫、パーキットリンパ腫、皮膚T細胞リンパ腫、A I D S関連リンパ腫または中枢神経系リンパ腫を含む）を処置または阻害することを含む。例えば、方法は、非ホジキンリンパ腫を有する対象を選択することを含み得る。方法は、本明細書に開示される方法を使用して開示されたC A R改変されたリンパ球のいずれかを投与し、それによって非ホジキンリンパ腫を処置することもまた含み得る。例えば、7 2 1 . 2 2 1細胞を使用して産生されたC D 1 9 - C A R改変されたN K細胞。一部の例では、m I L - 2 1および/またはI L - 1 5 R を発現する改変された7 2 1 . 2 2 1細胞は、投与されるC D 1 9 - C A R改変されたN K細胞を産生するために使用され得る。

30

【0149】

一部の例では、方法は、免疫系状態を処置または阻害することを含む。免疫系状態は、任意の型の免疫系状態、例えば、サイトカインストーム、免疫系障害（例えば、炎症性障害または自己免疫障害）であり得、または別の状態および/もしくは疾患（例えば、ヒト免疫不全ウイルス感染症、または微小重力への曝露）に関連する免疫系状態であり得る。一部の非限定的な例では、免疫系状態は、炎症性障害である。具体的な実施形態では、炎症性障害は、関節リウマチ、慢性閉塞性肺疾患、炎症性腸疾患または全身性エリテマトーデスであり得る。他の例では、免疫系状態は、自己免疫障害である。ある特定の実施形態では、自己免疫障害は、I型糖尿病、多発性硬化症、エリテマトーデス、重症筋無力症、強直性脊椎炎、セリアック病、クローン病、グレーブス病、橋本甲状腺炎、移植片拒絶または自己免疫性ぶどう膜炎である。本明細書に開示される方法を使用して拡大増殖された改変されたまたは未改変のN K細胞またはT細胞が使用され得る。具体的な例では、改変された（例えば、C A R改変された）N K細胞またはT細胞は、例えば、関節リウマチ、クローン病または移植片拒絶を処置または阻害するために使用され得る。

40

50

## 【0150】

一部の例では、対象（例えば、免疫障害、例えば、自己免疫疾患、移植片拒絶または炎症性疾患を有する対象）には、1つまたは複数の免疫調節療法（例えば、免疫調節生物製剤、例えば、ムロモナブ、イピリムマブ、アパタセプト、ペラタセプト、トレメリムマブ、BMS-936558、CT-011、MK-3475、AMP224、BMS-936559、MPDL3280A、MEDI4736、MGA271、IMP321、BMS-663513、PF-05082566、CDX-1127、抗OX40、huMAB、OX40LおよびTRX518、例えば、それらの全体が参照により本明細書に共に組み込まれる、Yao et al., Nat Rev Drug Discov, 12(2): 130-146, 2013およびKamphorst et al., Vaccine, 33(02): B21-B28, 2015; 調節性サイトカイン、例えば、IL-7; mTOR調節剤、例えば、ラパマイシン; 抗菌療法、例えば、ワクチン接種、抗真菌薬および/または抗生物質）、抗炎症剤（NSAIDs; 抗ロイコトリエン薬（antileukotrine）; 免疫選択的抗炎症性誘導体、ImSAID; 抗炎症活性を有する生物活性化合物、例えば、ブルンバギンおよびブルメリシン（plume ricin）; ならびに/またはステロイド）、疾患修飾性抗リウマチ薬物（DMARD、例えば、メトトレキセート、スルファサラジン、レフルノミド、ヒドロキシクロロキン、トファシチニブ、インフリキシマブ、エタネルセプト、アダリムマブ、セルトリズマブ、ゴリムマブ、トシリズマブ、アナキンラ、アパタセプトおよび/またはリツキシマブ）、抗マラリア薬物（例えば、クロロキンおよびヒドロキシクロロキン）、医学的手順（手術および幹細胞移植を含む）; 免疫抑制剤（例えば、移植された臓器または組織の拒絶を予防するため、自己免疫疾患および/または炎症性疾患を処置するため; 例えば、グルココルチコイド、例えば、プレドニゾン、デキサメタゾンおよびヒドロコルチゾン; 細胞分裂阻害薬、例えば、アルキル化剤および代謝拮抗物質; 抗体、例えば、Atgam、サイモグロブリン、ならびにT細胞受容体指向性抗体およびIL-2受容体指向性抗体; イムノフィリン標的化剤、例えば、シクロスポリン、タクロリムス、シロリムスおよびエベロリムス; インターフェロン（IFN）、例えば、IFN およびIFN ; オピオイド; TNF結合タンパク質、例えば、インフリキシマブ、エタネルセプトおよびアダリムマブ; ミコフェノレート; ならびに小さい生物学的薬剤、例えば、フィンゴリモドおよびミリオシン）、免疫寛容療法（例えば、組織もしくは臓器移植拒絶のリスクがある対象、アレルギーを有する対象および/または自己免疫疾患を有する対象を処置するため; 例えば、TもしくはB細胞標的化薬物またはTもしくはB細胞抑制性薬物、例えば、CAMPATH-1H、カルシニューリン阻害剤、リツキシマブ、エプラツズマブ、ベリムマブおよびアタシセプト; 抗表面抗原分類（CD）3抗体; アパタセプト; 臓器または組織レシピエントの骨髄が、ドナーの骨髄またはドナー骨髄とレシピエント骨髄との混合物で置き換えられて、臓器または組織移植片拒絶を低減させる、造血キメリズム、例えば、混合造血キメリズムの誘導; 抗原脱感作; 参照により本明細書に組み込まれる、Nepom et al., Immunol Rev; 241(1): 49-62, 2011を参照のこと）、抗ヒスタミン薬、蠕虫療法（例えば、免疫障害を処置するための、蠕虫または蠕虫の卵による対象の意図した侵襲）もまた投与される。

## 【0151】

一部の例では、方法は、治療有効量の本明細書に開示される組成物を対象に投与することによって、感染性疾患を処置または阻害することを含む。一部の態様では、感染性疾患は、アルボウイルス感染症、ボツリヌス症、ブルセラ症、カンジダ症、カンピロバクター症、水痘、クラミジア、コレラ、コロナウイルス（coronavirus）感染症、ブドウ球菌感染症、コクサッキーウイルス感染症、クロイツフェルト・ヤコブ病、クリプトスポリジウム症、シクロスポラ感染症、サイトメガロウイルス感染症、エプスタイン・バーウイルス感染症、デング熱、ジフテリア、耳感染症、脳炎、インフルエンザウイルス感染症、パラインフルエンザウイルス感染症、ジアルジア症、淋病、Haemophilus influenzae感染症、ハンタウイルス感染症、ウイルス性肝炎、単純ヘルペスウ

10

20

30

40

50

イルス感染症、HIV/AIDS、ヘリコバクター感染症、ヒトパピローマウイルス（HPV）感染症、感染性単核球症、レジオネラ症、ハンセン病、レプトスピラ症、リステリア症、ライム病、リンパ球性脈絡髄膜炎、マラリア、麻疹、マールブルグ出血熱、髄膜炎、サル痘、ムンプス、マイコバクテリア感染症、マイコプラズマ感染症、ノーウォークウイルス感染症、百日咳、蟻虫感染症、肺炎球菌疾患、Streptococcus pneumoniae感染症、Mycoplasma pneumoniae感染症、Moraxella catarrhalis感染症、Pseudomonas aeruginosa感染症、ロタウイルス感染症、オウム病、狂犬病、呼吸器合胞体ウイルス（RSV）感染症、白癬、ロッキー山紅斑熱、風疹、サルモネラ症、SARS、疥癬、性行為感染症、細菌性赤痢、帯状疱疹、スポロトリクム症、連鎖球菌感染症、梅毒、破傷風、旋毛虫症、結核、野兔病、腸チフス、ウイルス性髄膜炎、細菌性髄膜炎、ウエストナイルウイルス感染症、黄熱、アデノウイルス媒介性の感染症および疾患、レトロウイルス媒介性感染性疾患ならびにエルシニア症 人畜共通感染症から選択される。例えば、感染性疾患は、インフルエンザ、パラインフルエンザ、呼吸器合胞体ウイルスであり得る。

10

#### 【0152】

本明細書に開示される方法を使用して拡大増殖された未改変のまたは改変された（例えば、CAR改変された）NK細胞またはT細胞は、感染性疾患を処置または阻害するために使用され得る。具体的な例では、開示された方法を使用して拡大増殖されたCAR改変されたNK細胞またはT細胞は、例えば、HIV抗体VRC01、2G12、2F5、4E10、3BNC117、10-1074、VRC01LS、VRC07-532LS、3BC176、PG16、NIH45-46G54W、PG9、PG16、PGT145、PGDM1400、PGT121、PGT124、PGT128、PGT135、8ANC195、10E8および/またはPD-1に基づくCARを使用して、HIVを処置または阻害するために使用され得る。具体的な例では、開示された方法を使用して拡大増殖されたCAR改変されたNK細胞またはT細胞は、例えば、HBsAg（例えば、GENBANK（登録商標）番号KP972453.1もしくはKP972454.1）および/またはHB1を標的化するCARを使用して、HBVを処置または阻害するために使用され得る。

20

#### 【0153】

一部の例では、対象（例えば、感染性疾患、例えば、HIVを有する対象）には、1つまたは複数の抗感染剤（例えば、抗体、抗真菌薬、抗ウイルス薬および/または抗寄生虫薬）もまた投与される。具体的な例では、感染性疾患はHIVであり、対象には、抗レトロウイルス剤、例えば、ヌクレオシドおよびヌクレオチド逆転写酵素阻害剤（nRTI）、非ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤（NNRTI）、プロテアーゼ阻害剤、侵入阻害剤（もしくは融合阻害剤）、成熟阻害剤、または広域スペクトル阻害剤、例えば、天然の抗ウイルス薬もまた投与される。例示的な薬剤には、ロピナビル、リトナビル、ジドブジン、ラミブジン、テノホビル、エムトリシタピンおよびエファビレンツが挙げられる。

30

#### 【実施例】

#### 【0154】

以下の実施例は、ある特定の特色および/または実施形態を例示するために提供される。これらの実施例は、記載される特定の特色または実施形態に本開示を限定すると解釈すべきではない。

40

#### 【0155】

キメラ抗原受容体（CAR）改変されたT細胞の臨床的成功は、CAR細胞療法のより広範な実装を制限する、患者から回収された自家T細胞の操作を要求する。同種の汎用性がある細胞製品の開発は、それらの適用を有意に広げ、コストを低減させる。NK細胞の独自の生物学は、クリニックでの、CAR改変されたT細胞に代わる安全かつ有効な代替的免疫療法戦略としてそれらが機能することを可能にする。

#### 【0156】

末梢血および臍帯血の両方由来のNK細胞およびCAR改変されたNK細胞の拡大増殖

50

のためのアプローチが、本明細書に記載される。本明細書で、膜結合型インターロイキン (IL) - 21 (mIL - 21) を有する 721 . 221 ベースの人工抗原提示細胞 (APC) を開発して、臨床グレードのNK細胞およびCAR改変されたNK細胞を増殖させた。mIL - 21 を有する K562 ベースの APC とは対照的に、21日目までに、721 . 221 発現 mIL - 21 フィーダー細胞を用いてNK細胞を増殖させる (propagating) 能力 (5335倍 ~ 94170倍の範囲の拡大増殖; 例えば、図12) は、mIL - 21 を有する K562 フィーダー細胞 (662倍 ~ 7743倍の範囲の拡大増殖) よりも優れていた。721 . 221 - mIL - 21 で拡大増殖されたNK細胞および K562 - mIL - 21 で拡大増殖されたNK細胞は、表現型が類似していた。しかし、721 . 221 - mIL - 21 で拡大増殖されたNK細胞からは、優れた細胞傷害性が観察された。結論として、優れた機能性、持続性および増殖を有する、臍帯血または末梢血に由来する既製のNK細胞製品の開発は、養子免疫療法のためのそれらの臨床的使用を支持する。このアプローチは、臨床適用のために初代NK細胞およびCAR改変されたNK細胞を増殖させるための強力なツールを、免疫療法の分野に提供する。

10

【0157】

(実施例1)

方法および材料

【0158】

抗体および試薬。PEおよびAPC抗ヒトCD3抗体(クローンOKT3、BIOLEGEND(登録商標))、FITC、BV605、PE/Cy7、およびBV510抗ヒトCD56抗体(クローンHCD56、BIOLEGEND(登録商標))、PE抗ヒトCD69抗体(クローンFN50、BIOLEGEND(登録商標))、PE/Cy7抗ヒトCD8a抗体(クローンHIT8a、BIOLEGEND(登録商標))、AF647抗ヒトIL-21抗体(クローン3A3-N2、BIOLEGEND(登録商標))、APC/Fire750抗ヒトCD226抗体(DNAM-1)(クローン11A8、BIOLEGEND(登録商標))、APC/Fire750抗ヒトKLRG1(MAFA)抗体(クローンSA231A2、BIOLEGEND(登録商標))、BV421抗ヒトCD335(NKp46)抗体(クローン9E2、BIOLEGEND(登録商標))、PE/Cy7抗ヒトCD158b(KIR2DL2/L3、BIOLEGEND(登録商標))抗体(クローンDX27、BIOLEGEND(登録商標))、PE/Cy7抗ヒトCD244(2B4)抗体(クローンC1.7、BIOLEGEND(登録商標))、PE抗ヒトCD152(CTLA-4)抗体(クローンBNI3)、APC抗ヒトCD366(Tim-3)抗体(クローンF38-2E2)、PerCP/Cy5.5抗ヒトTIGIT(VSTM3)抗体(クローンA15153G)、FITC抗ヒトCD223(LAG-3)抗体(クローン11C3C65、BIOLEGEND(登録商標))、およびPerCP/Cy5.5抗ヒトCD94(クローンDX22、BIOLEGEND(登録商標))は、BIOLEGEND(登録商標)(San Diego, CA、USA)から購入した。APC抗ヒトCD16抗体(クローンB73.1、BD(商標)Biosciences)、FITC抗ヒトCD3抗体(クローンUCHT1、BD(商標)Biosciences)、BV480抗ヒトCD85j抗体(LIR-1)抗体(クローンGHI/75、BD(商標)Biosciences)、BV711抗ヒトCD314(NKG2D)抗体(クローン1D11、BD(商標)Biosciences)およびFITC抗ヒトCD107a抗体(クローンH4A3、BD(商標)Biosciences)は、BD(商標)Biosciences(San Jose, CA、USA)から購入した。FITC抗ヒトKIR/CD158抗体(クローン180704、R&D SYSTEMS(登録商標))、PE抗ヒトKIR2DL1/KIR2DS5抗体(クローン143211、R&D SYSTEMS(登録商標))、APC抗ヒトKIR3DL1抗体(クローンDX9、R&D SYSTEMS(登録商標))、AF405抗ヒトKIR3DL2/CD158k抗体(クローン539304、R&D SYSTEMS(登録商標))、APC抗ヒトNKG2A/CD159a抗体(クローン13141

20

30

40

50

1、R&D SYSTEMS (登録商標) およびPE抗ヒトNK G2C / CD159c 抗体 (クローン134591、R&D SYSTEMS (登録商標)) は、R&D SYSTEMS (登録商標) から購入した。AF647ヤギ抗ヒトIgGF (ab') 2断片抗体は、Jackson ImmunoResearch (West Grove、PA、USA) から購入した。

【0159】

細胞系。721.221細胞系は贈与であった。293T、K562およびDaudi細胞系は、AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION (登録商標) (ATCC (登録商標)) から購入した。K562-mIL21細胞および721.221-mIL21細胞を樹立するために、K562細胞および721.221細胞を、各々IL-21レトロウイルスで形質導入し、次いで、膜IL-21陽性細胞を、AF647マウスIgG1抗ヒトIL-21 (クローン3A3-N2) によって、FACS ARIA (商標) II細胞選別機 (BD (商標) Biosciences) を使用して選別した。Daudi-FFLuc細胞を樹立するために、CD19陽性Daudi細胞を、以前に記載されたように (Xiong et al., Mol Ther 26:963-75 (2018))、FFLucをコードするレンチウイルスベクターで形質導入した。K562細胞、721.221細胞、K562-mIL21細胞、721.221-mIL21細胞、Daudi細胞およびDaudi-FFLuc細胞を、10% (v/v) ウシ胎仔血清 (FBS) および100U/mLペニシリン-ストレプトマイシン (CORNING (登録商標)) を補充したRPMI-1640 (CORNING (登録商標)) 中で、5% (v/v) CO<sub>2</sub>下、37℃で培養した。NK細胞拡大増殖のために、K562、721.221、K562-mIL21細胞および721.221-mIL21細胞に、10,000 Radの線量を照射し、PBSで洗浄し、次いで、フィーダー細胞として使用した。293Tを、10% (v/v) ウシ胎仔血清 (FBS) および100U/mLペニシリン-ストレプトマイシン (CORNING (登録商標)) を補充したDME M (CORNING (登録商標)) 中で、5% (v/v) CO<sub>2</sub>下、37℃で培養した。

【0160】

初代NK細胞拡大増殖。PBMCを、リンパ球分離培地 (CORNING (登録商標)) を使用してバフィーコート (Gulf Coast Regional Blood Center) から単離した。NK細胞拡大増殖のために、 $5 \times 10^6$ のPBMCを、G-REX (登録商標) 6マルチウェル細胞培養プレート (Wilson Wolf) 中で、200U/mL IL-2 (PEPROTECH (登録商標)) および5ng/mL IL-15 (PEPROTECH (登録商標)) を有する35mLの完全RPMI-1640培地中で、 $1 \times 10^7$ の10000 Rad照射したフィーダー細胞と共に培養した。培地を3~4日毎に交換し、 $2 \times 10^7$ 細胞を、継続培養のために各ウェル中で維持した。総細胞数を、トリパンプルーを使用してカウントした。NK細胞のパーセンテージを決定するために、細胞をCD3およびCD56について染色し、その後、フローサイトメトリー分析を行った。

【0161】

CD19-CARによる拡大増殖されたNK細胞の形質導入。CD19-CARレトロウイルスを産生するために、293T細胞に、以前に記載されたように (Xiong et al., Mol Ther 26:963-75 (2018))、CD19特異的scFv、RDFおよびPegPam3を含むプラスミドの組合せでトランスフェクトした。NK細胞を、拡大増殖の7日目に回収し、RETRONECTON (登録商標) でコーティングしたプレート中で、CD19-CARレトロウイルス (SFG骨格を使用する) で形質導入した。2日後、細胞をG-REX (登録商標) 6マルチウェル細胞培養プレートに移し、200U/mL IL-2 (Pepr oT e ch) および5ng/mL IL-15 (Pepr oT e ch) を有する35mLの完全RPMI-1640培地中で維持した。培地を3~4日毎に交換し、 $2 \times 10^7$ 細胞を、継続培養のために各ウェル中で維持した。総細胞数を、トリパンプルーを使用してカウントした。NK細胞のパーセンテージ

10

20

30

40

50

およびCARの発現を決定するために、細胞を、CD3、CD56および抗ヒトIgG (H + L) F ( a b ' ) 2断片について染色し、次いで、フローサイトメトリーによって分析した。

#### 【0162】

フローサイトメトリー分析。PBMCおよび拡大増殖されたNK細胞を、FACS染色緩衝液 ( 1 % F B S を有する P B S ) 中の蛍光コンジュゲート抗体で、氷上で30分間染色し、PBSで洗浄し、FACS LSR IIまたはLSRFORTESSA (登録商標) フローサイトメーター ( B D ( 商標 ) ) で分析した。PMT電圧を調整し、データ収集前に補償値を計算した。データを、FACS DIVA (商標) ソフトウェア ( B D ( 商標 ) ) を使用して獲得し、FLOWJO (登録商標) ソフトウェア ( T r e e S t a r ) を使用して分析した。

10

#### 【0163】

フローサイトメトリーベースのNK細胞傷害性アッセイ。K562細胞および721.221細胞を各々標的細胞として使用して、NK細胞の細胞傷害性を決定した。標的細胞を回収し、PBS中5  $\mu$ MのCELLTRACE (商標) CFSE ( IN V I T R O G E N ( 登録商標 ) ) で20分間染色した。染色を、完全RPMI - 1640培地を添加することによって停止させ、次いで、PBSを使用して2回洗浄した。拡大増殖されたNK細胞を回収し、V底96ウェルプレート中で、完全RPMI - 1640培地中、5つの異なるE : T比 (エフェクター : 標的 ; それぞれ、4 : 1、2 : 1、1 : 1、0.5 : 1および0.25 : 1) の  $2 \times 10^5$  のCFSE標識した標的細胞と共に共培養した。37 °Cおよび5 % CO<sub>2</sub>での4時間のインキュベーション後、細胞を7-AAD ( E B I O S C I E N C E ( 商標 ) ) で染色し、次いで、フローサイトメトリーによって分析した。標的細胞 ( C F S E <sup>+</sup> ) をゲーティングし、次いで、7 - A A D <sup>+</sup> のパーセントを使用して、( 実験的な死 - 自発的な死 ) / ( 100 - 自発的な死 )  $\times$  100 % を使用して、NK細胞の細胞傷害性を計算した。

20

#### 【0164】

NK脱顆粒アッセイ ( C D 1 0 7 a ) 。拡大増殖されたNK細胞 (  $5 \times 10^5$  ) を、V底96ウェルプレート中で、完全RPMI - 1640培地中、 $1.5 \times 10^5$  のK562細胞と共に37 °Cで2時間インキュベートした。その後、細胞を回収し ; 洗浄し ; G O L G I S T O P ( 商標 ) で30分間、CD3、CD56およびCD107aについて染色し ; フローサイトメトリーによって分析した (例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Z h e n g e t a l . , J A l l e r g y C l i n I m m u n o l 1 3 5 , 1 2 9 3 - 1 3 0 2 , ( 2 0 1 5 ) を参照のこと)。

30

#### 【0165】

動物研究。全ての動物実験は、Houston Methodist Research Institute Institutional Animal Care and Use Committee ( I A C U C ) によって承認された。Jackson LaboratoryからのNOD.Cg - P r k d c s c i d I l 2 r g t m 1 W j l / S z J ( N S G ) マウスを、全てのin vivo実験に使用した。ヒトリンパ腫異種移植モデルを樹立するために、雄性および雌性の両方のNSGマウス ( 8 週齢 ) に、尾静脈を介して、100  $\mu$ LのPBS中  $2 \times 10^6$  のFFLuc - D a u d i細胞をi.v.注射した。0日目に開始して、マウスに、100  $\mu$ LのPBS中  $1 \times 10^7$  の721.221 - m I L 2 1 で拡大増殖されたまたはK562 - m I L 2 1 で拡大増殖されたCD19 - C A R NK細胞を ( i . v . ) 注射し、次いで、0、3、7および10日目に、150  $\mu$ LのPBS中のIL - 2 ( 5 0 , 0 0 0 単位 / マウス ) およびIL - 1 5 ( 1 0 n g / マウス ) を ( i . p . ) 注射した。イソフルラン麻酔した動物を、マウス1匹当たり150 mg / kgのD - ルシフェリン ( G O L D B I O T E C H N O L O G Y ( 登録商標 ) 、 S t . L o u i s , M O , U S A ) を腹腔内 ( i . p . ) 投与した10分後に、I V I S ( 登録商標 ) システム ( I V I S ( 登録商標 ) - 2 0 0 , P E R K I N E L M E R ( 登録商標 ) 、 W a l t h a m , M A , U S A ) を使用してイメージングした。ルシフェラーゼ

40

50

発現腫瘍細胞から放射された光子を、LIVING IMAGE (登録商標)ソフトウェア64 (CALIPER (登録商標) Life Sciences, Hopkinton, MA, USA) を使用して定量した。光強度を示す疑似カラー画像 (青は最も弱く、赤は最も強い) を生成し、グレースケールの参照画像上に重ね合わせた。一定の関心領域 (ROI) を、尾を除く動物全体上に描き、シグナルの強度を、1秒当たりの総光子として測定した。エフェクターCD19-CAR NK細胞注射の後、動物を、Houston Methodist Research Instituteの前臨床イメージングコアにおいて腫瘍細胞追跡のために1週間に2回イメージングした。

#### 【0166】

RNA-seq試料調製、配列決定およびデータ分析。NK細胞を、以前に記載したように、照射した221-mIL21およびK562-mIL21細胞を用いてPBMCにおいて拡大増殖させた。拡大増殖の7日目および14日目に、細胞を収集し、PE-抗CD3およびPE/Cy7-抗CD56抗体で、氷上で30分間染色した。FACS染色緩衝液 (2% FBSを有するPBS) で2回洗浄した後、細胞を、FACS染色緩衝液中に再懸濁し、次いで、CD3-CD56+細胞を、FACS Aria II細胞選別機 (BD Biosciences) を使用して、各反復について>98%の純度になるように選別した。精製されたNK細胞を、製造業者のプロトコールを使用して、RNA抽出のためにTrizol試薬 (Thermo Fisher Scientific) 中で直接的に溶解させた。RNA配列決定 (RNA-seq) を、BGI Group (Shenzhen, Guangdong, China) によるBGISEQ-500プラットフォームで実施した。FASTQフォーマットでのクリーンな読み取りを、低品質の読み取り (塩基の品質の50%よりも多くが15よりも低い読み取り)、アダプターによる読み取り、および10%よりも多くの未知の塩基 (N) による読み取りをフィルタリングした後に得た。FASTQファイルを、STAR2.6.1dを使用して、hg38ヒト参照ゲノムにアラインさせた。アラインされたファイルを、GenomicAlignmentsパッケージ (v.1.20.0) を使用して処理して、カウント行列を得た。10未満の読み取り中央値を有する遺伝子を、初期ステップとして、全ての比較において事前フィルタリングした。差次的に発現された遺伝子を、DESeq2パッケージ (v.1.24.0) を使用して同定し、調整したp値<0.05かつlog<sub>2</sub>変化倍数 1または-1を有すると定義した。log<sub>2</sub>変化倍数を、lfcShrinkfunctionを使用して圧縮し、次いで、それを使用して、ggpubrパッケージ (v.0.2.1) を使用してMAプロットを作成した。GSEAを、MSigDB (Broad Institute) およびclusterProfilerパッケージ (v.3.12.0) を使用して実施した。ヒートマップを、log変換されたカウントに由来するz-スコアを使用して生成した。データ分析の全てを、R (v.3.6.0) を使用して実施した。

#### 【0167】

統計分析。データを、平均±SEMとして示した。統計的有意性を、示される場合、両側対応なし学生t検定、両側対応あり学生t検定または二元配置ANOVAを使用して決定した。p<0.05を統計的に有意とみなした。

#### 【0168】

(実施例2)

人工抗原提示細胞系上での膜形態のIL-21の生成

#### 【0169】

以前の研究により、IL-21がNK細胞増殖において重要な役割を果たすことが示されている (例えば、Denman et al., PLoS One, 7(1):e30264, 2012)。人工抗原提示細胞系を、注目すべき表現型変化なしに膜形態のIL-21を発現する721.221細胞を使用して開発した (図8A)。ヒト初代細胞上でのIL-21受容体の発現もまた試験した (図9)。

#### 【0170】

ヒト初代NK細胞を拡大増殖させるために、PBMCを、末梢血または臍帯血から単離

10

20

30

40

50

した。新たに単離されたP B M Cを、200 U / m l I L - 2および5 n g / m l I L - 15の存在下で、膜I L - 21を発現する721.221細胞(221 - m I L - 21)と共に共培養した(図8B)。図8A~8Bに示されるように、I L - 21を、ヒトI g G 1、C D 28膜貫通(T M)ドメイン、C D 28細胞内ドメイン、4 - 1 B B - リガンドおよびC D 3ゼータを含むS F Gベクター中にクローニングした(図8A~8B)。対照として、野生型(W T) K 562、K 562 - m I L - 21およびW T 721.221をアッセイに含めた。K 562細胞および721.221細胞を、I L - 21レトロウイルスで形質導入し、抗ヒトI L - 21抗体で染色することによってF A C Sを使用して選別した。2週間の培養後、K 562 - m I L 21および721.221 - m I L 21上のI L - 21の発現を、F A C Sを使用して試験した。高レベルのI L - 21が、K 562 - m I L 21細胞(図1A)および721.221 - m I L 21細胞(図1B)の両方で発現された。K 562 - m I L 21細胞および721.221 - m I L 21細胞を共に、抗I L 21抗体でも染色し、m I L 21細胞もまた、抗I L - 21抗体で染色し、これらを、共焦点顕微鏡法によって、I L - 21タンパク質の適切な原形質膜局在化について評価した(図1C~1D)。膜形態のI L - 21分子は、K 562 - m I L 21細胞(図1C)および721.221 - m I L 21細胞(図1D)の細胞表面上で発現された。I L - 21受容体(I L - 21 R)のヒト初代N K細胞発現を検証した(図9)。K 562細胞および721.221細胞に対するI L - 21分子の形質導入が、活性化N K細胞リガンドおよび阻害性N K細胞リガンドの発現を変更させるかどうかを決定するために、I C A M - 1(L F A - 1のリガンド)、P D - L 1(P D - 1のリガンド)、H L A - E(C D 94 / N K G 2 A / Cのリガンド)およびM I C B(N K G 2 Dのリガンド)を、フローサイトメトリーを使用して試験した。発現のレベルは、形質導入前と形質導入後との間で同等であった(図1Eおよび1F)。結論として、同等な表面リガンドを有するK 562細胞および721.221細胞におけるI L - 21の膜発現が樹立された。

【0171】

(実施例3)

異なる型のフィーダー細胞の中でも、721.221 - m I L 21細胞によるN K細胞の優れた増殖

【0172】

フィーダー細胞としてのK 562細胞系、K 562 - m I L 21細胞系、721.221細胞系および721.221 - m I L 21細胞系の樹立後、ヒトN K細胞を拡大増殖させるための最良のフィーダー細胞系を調査した。初代ヒトN K細胞を拡大増殖させるために、上記のように、P B M Cを、健康なドナー由来のパフィーコートから単離し、フィーダー細胞プラス200 U / m l I L - 2および5 n g / m l I L - 15と共に培養した。N K細胞拡大増殖の能力を比較するために、K 562 - m I L 21および721.221 - m I L 21の両方を直接的に比較した。W T - K 562細胞系およびW T - 221細胞系を対照群として使用した。N K細胞の初期数およびN K細胞の割合は、それぞれ、5百万および10~20%であった。フローサイトメトリーデータを使用してC D 3およびC D 56を用いてゲーティングした異なる時点(0日目、7日目、12日目、17日目および21日目)における代表的なN K拡大増殖プロファイル(図2A)が示される。N K細胞の動的数(図2B)および割合(図2C)は、P B M Cを異なるフィーダー細胞と共に共培養することによる3週間の拡大増殖後に、有意に増加した。しかし、721.221 - m I L 21フィーダー細胞を用いたN K細胞の拡大増殖倍数(図2D)および拡大増殖されたN K細胞の純度(図2E)は、K 562 - m I L 21フィーダー細胞についてよりも有意に高かった。さらに、非N K細胞(C D 3 + C D 56 - 細胞、C D 3 + C D 56 + 細胞およびC D 3 - C D 56 - 細胞を含む)は、m I L 21発現フィーダー細胞の存在下で減少する(図14A~F)。したがって、721.221 - m I L - 21細胞は、ヒト初代N K細胞を拡大増殖させるためのフィーダー細胞として、K 562 - m I L 21細胞よりも優れている。

【0173】

10

20

30

40

50

## (実施例4)

末梢血に由来する拡大増殖されたNK細胞の特徴

## 【0174】

拡大増殖されたNK細胞の免疫表現型 (immunophenotyping) を決定するために、K562、K562-mIL21、721.221および721.221-mIL21で拡大増殖されたNK細胞を、活性化受容体および阻害性受容体に対する抗体を用いるフローサイトメトリーを使用して試験した。活性化受容体には、CD16、NKG2D、NKP46、2B4、DNAM-1、CD69、CD94、CD8aおよびNKG2Cが含まれた(図3Aおよび3B)。阻害性受容体には、NKG2A、CTLA-4、KIRG1、PD-1、LIR1、TIM-3、TIGIT、LAG-3、総KIR、KIR2DL1、KIR2DL2/L3、KIR3DL1およびKIR3DL2が含まれた(図3C、3Dおよび3E)。拡大増殖されたNK細胞上でのこれらの活性化受容体および阻害性受容体の発現は、同等である。NK細胞の活性化マーカーであるCD69は、221-mIL21で拡大増殖されたNK細胞において減少した。

10

## 【0175】

ex vivoで拡大増殖されたNK細胞について機能の類似性を試験するために、拡大増殖されたNK細胞の細胞傷害性を、NK感受性標的細胞721.221(図4Aおよび4B)およびK562(図4Cおよび4D)と共に共培養することによって調査した。興味深いことに、721.221-mIL-21細胞を用いて拡大増殖させたNK細胞は、K562-mIL-21細胞を用いて拡大増殖させたNK細胞と比較して、優れた細胞傷害性を示す(図4A)。この観察をさらに確認するために、CD107aアッセイを使用して、NK脱顆粒後のCD107a分子の表面レベルを試験した。K562-mIL-21で拡大増殖されたNK細胞と721.221-mIL-21で拡大増殖されたNK細胞との間で、同等の脱顆粒が観察された(図4B)。これらの拡大増殖されたNK細胞をWT K562細胞と共に共培養した場合、細胞傷害性および脱顆粒において有意な差異は観察されなかった(図4Cおよび4D)。

20

## 【0176】

臍帯血(CB)から単離されたNK細胞が、このシステムによって拡大増殖され得るかどうかをさらに試験するために、NK数の拡大増殖ならびにK562-mIL21および221-mIL21の純度を比較した。類似の結果が得られた(図15A~15K)。K562-mIL21および221-mIL21によって拡大増殖されたNK細胞の免疫表現型決定もまた、フローサイトメトリーを使用して試験した。CD69発現は、同等の細胞傷害性で、221-mIL21で拡大増殖されたNK細胞において、劇的に減少した(図16A~16D)。要約すれば、拡大増殖されたNK細胞は、新たに単離されたヒト初代NK細胞と類似の表現型、および優れた細胞傷害性を示す。

30

## 【0177】

## (実施例5)

721.221-mIL-21細胞を使用する、改善された末梢血由来CAR-NK拡大増殖

## 【0178】

721.221-mIL-21フィーダー細胞が、非遺伝子改変初代NK細胞と類似の方法でCAR-NK細胞を拡大増殖させることができるかどうかもまた試験した。CAR-NK細胞をex vivoで拡大増殖させるために、未分画のPBMCを、可溶性IL-2およびIL-15の存在下で721.221-mIL-21フィーダー細胞を用いて7日間刺激して、NK細胞の迅速な増殖を誘導し、一部の 경우에는、T細胞の非特異的拡大増殖を誘導した(図5A)。7日目に、拡大増殖されたNK細胞を、CD19-CARレトロウイルスで形質導入した。NK細胞数および純度の動態を、0日目、7日目、11日目、14日目、18日目および21日目に試験した。1人のドナー由来のex vivoで拡大増殖されたNK細胞の代表的なプロファイルは、優れたNK数および純度を示している(図5B)。5人のドナー由来のNK細胞数(図5C)および純度(図5D)の定

40

50

量的分析は、721.221-mIL-21フィーダー細胞が優れたCD19-CAR-NK細胞拡大増殖を提供することを示している。3人のドナー由来のNK細胞数(図5C~5D)および純度(図5E~5F)の定量的分析は、221-mIL21フィーダー細胞が優れたCD19-CAR-NK細胞拡大増殖を提供することを示している。

#### 【0179】

しかし、K562-mIL21によって刺激したCD19-CAR陽性NK細胞のパーセンテージは、221-mIL21細胞によって刺激したNK細胞のパーセンテージと同等であった(図17A~17H)。対照的に、非NK細胞(CD3+CD56-、CD3+CD56+およびCD3-CD56-集団を含む)は、mIL21発現フィーダー細胞の存在下で減少した(図17A~17H)。結論として、721.221-mIL-21フィーダー細胞は、K562-mIL-21フィーダー細胞を用いて拡大増殖させたCAR-NK細胞と比較して、優れたCAR-NK細胞拡大増殖能力を示す。

10

#### 【0180】

(実施例6)

721.221-mIL-21フィーダー細胞は、臍帯血由来初代NKおよびCAR-NK拡大増殖を拡大増殖させる優れた能力を示す

#### 【0181】

臍帯血由来NK細胞およびCAR-NK細胞の複数の利点(Liu et al., Leukemia 32:520-31 (2018); Nahm et al., J Immunother 41:64-72 (2018); Balassa K and Rocha V, Expert Opin Bio Ther 18:121-34 (2018))を考慮して、721.221-mIL-21フィーダー細胞が臍帯血由来NK細胞およびCAR-NK細胞を拡大増殖させることができるかどうかを試験した。CB-NK細胞をex vivoで拡大増殖させるために、未分画のCBリンパ球を、可溶性IL-2およびIL-15の存在下で721.221-mIL-21フィーダー細胞を用いて7日間刺激して、NK細胞の迅速な増殖を誘導した(図6A~6D)。対照として、未分画のCBリンパ球を、別々の群で、可溶性IL-2およびIL-15の存在下でK562-mIL21フィーダー細胞で刺激した。7日目に、拡大増殖されたNK細胞を、CD19-CARレトロウイルスで形質導入した。NK細胞数および純度の動態を、0日目、7日目、11日目、14日目、18日目および21日目に試験した。1人のドナー由来のex vivoで拡大増殖されたNK細胞の代表的なプロファイルは、優れたNK数および純度を示している(図6A)。3人のドナー由来のNK細胞数純度(図6B)の定量的分析は、721.221-mIL-21フィーダー細胞が優れたCD19-NK細胞拡大増殖を提供することを示している。

20

30

#### 【0182】

これらのex vivoで拡大増殖されたCD19-CAR、CB-NK細胞が類似の機能を示すかどうかを試験するために、拡大増殖されたNK細胞の細胞傷害性を、それらをNK感受性RajiおよびDaudi細胞と共に共培養することによって試験した。221-mIL21細胞を用いて拡大増殖させたCD19-CAR、CB-NK細胞は、K562-mIL21細胞を用いて拡大増殖させたCD19-CAR、CB-NK細胞と比較して、優れた細胞傷害性を示す(図6C~6D)。したがって、721.221-mIL-21細胞を使用する、臍帯血由来NKおよびCAR-NK拡大増殖の改善によるNK拡大増殖アプローチは、成功であった。

40

#### 【0183】

(実施例7)

拡大増殖されたCAR-NK細胞のin vivoでの有効性および副作用

#### 【0184】

拡大増殖されたCD19-CAR-NK細胞が腫瘍細胞をin vivoで死滅させることができるかどうかをさらに評価するために、721.221-mIL-21で拡大増殖されたCD19-CAR-NK細胞およびK562-mIL-21で拡大増殖されたC

50

D19-CAR-NK細胞の抗腫瘍活性を、NSGマウスにおけるリンパ腫異種移植モデルを使用して比較した(図7A~7D)。ルシフェラーゼタグ化Dauidi(FFlu-Dauidi)を、静脈内(i.v.)尾静脈注射を使用して移植した。腫瘍負荷を、腫瘍由来生物発光を測定し、その後CD19-CAR-NKを注入することによって、示された時点で評価した(図7A)。721.221-mIL-21で拡大増殖されたCD19-CAR-NK細胞で処置したマウスは、処置後に、K562-mIL-21で拡大増殖されたCD19-CAR-NKよりも優れた抗腫瘍活性を示す(図7Bおよび7C)。腫瘍成長阻害(TGI)について類似の結果が得られた。in vivoで拡大増殖されたCD19-CAR-NK細胞の毒性をさらに評価するために、マウスの体重を定量した。体重における有意な差異は観察されず(図7D)、これは、ex vivoで拡大増殖されたCD19-CAR-NK細胞からの最小限の副作用を示している。結論として、721.221-mIL-21で拡大増殖されたCD19-CAR-NK細胞は、最小限の副作用を伴って、優れた抗腫瘍活性をin vivoで示す。

10

#### 【0185】

NK細胞拡大増殖能力を、野生型221とIL-15の膜貫通提示を発現する221細胞との間で比較した。しかし、NK拡大増殖倍数およびNK拡大増殖の純度において、有意な差異は観察されなかった(図10A~10C)。

(実施例8)

T細胞の221-mIL21細胞拡大増殖の有効性

#### 【0186】

異なる供給源由来のT細胞の、721.221-mIL21を使用した拡大増殖を、さらに試験した。PBMCおよび臍帯血由来のCD3陽性T細胞サブセットを試験した。K562-mIL21細胞および721.221-mIL21細胞は共に、T細胞を拡大増殖させることができる。しかし、721.221-mIL21細胞を使用した拡大増殖は、K652-mIL21細胞と比較して、PBMCおよび臍帯血試料の両方から、優れたT細胞増加倍数をもたらした(図11A~11C)。721.221-mIL21細胞によってPBMCから拡大増殖されたT細胞のパーセンテージは、K562-mIL21細胞を使用して拡大増殖させたパーセンテージよりも低かった(図11A)。K652-mIL21細胞と721.221-mIL21細胞との間で、臍帯血由来のT細胞純度において差異は観察されなかった(図11B)。さらに、721.221-mIL21フィーダー細胞は、好ましくは、未分化大細胞リンパ腫(ALCL、稀な型の非ホジキンリンパ腫)を有する患者のPBMCから、CD4+T細胞を拡大増殖させた。721.221-mIL21フィーダー細胞による2週間の拡大増殖後、細胞の90%よりも多くが、CD4+、CD3+かつCD56-のサブセットであった(図11C)。

20

30

#### 【0187】

(実施例9)

221-mIL21フィーダー細胞拡大増殖システムは、分化度の低いメモリー様NKの発生を促進する

#### 【0188】

優れたNK細胞拡大増殖能力および機能を誘導する221-mIL21フィーダー細胞拡大増殖システムをさらに調査するために、RNA配列決定(RNA-Seq)実験を、異なるフィーダー細胞システムによって拡大増殖させたNK細胞を使用して、様々な時点において実施した。簡潔に述べると、PBMCを、照射したK562-mIL21または221-mIL21フィーダー細胞で刺激した。これらの2つの異なる拡大増殖システムから拡大増殖されたNK細胞を、RNA-Seqのために、7日目および14日目にフローサイトメトリーを使用して選別した。K562-mIL21または221-mIL21細胞を用いて拡大増殖させたNK細胞の試料間距離の主成分分析(PCA)プロットは、14日目の拡大増殖させたNK細胞と比較して、7日目に有意な差異を示す(図13A)。

40

#### 【0189】

したがって、以下のRNA-Seqデータ分析は、7日目のデータに焦点を当てた。ミ

50

ーンアベレージ (MA) プロットによる、7日目の、221-mIL21フィーダー細胞を用いて拡大増殖させたNK細胞における、差次的に発現された遺伝子 (DEG) の数は、14日目の、K562-mIL21を用いて拡大増殖させたNK細胞のものと比較して有意に増加した (図13Bおよび13C)。Molecular Signatures Database (MSigDB) 中の遺伝子オントロジー (GO) 生物学的プロセス (BP) データセットおよびhallmarkデータセットを使用する遺伝子セット富化分析 (GSEA) により、細胞のアミノ酸代謝プロセスおよび解糖に関連する遺伝子シグネチャーが、K562-mIL21フィーダー細胞拡大増殖システムを用いて拡大増殖させたNK細胞と比較して、7日目に、221-mIL21フィーダー細胞拡大増殖システムを用いて拡大増殖させたNK細胞において上方調節されたことが示され、これを、グルコース取り込みアッセイによってさらに検証した (図13D~13H; 図18A~18C; 図19A~19C)。

10

## 【0190】

予想外に、7日目の、221-mIL21フィーダー細胞拡大増殖システムを用いて拡大増殖させたNK細胞におけるリンパ球活性化、リンパ球分化および細胞-細胞接着の遺伝子シグネチャーは、K562-mIL21フィーダー細胞拡大増殖システムを用いて拡大増殖させたNK細胞と比較して有意に下方調節され (図13H~13J; 図18Aおよび18D~18F)、これは、NK細胞の発生および成熟、阻害性受容体、活性化受容体、ならびに細胞傷害機能のヒートマップによってさらに示され得る (図13K~13N; 図19D~19I)。結論として、221-mIL21フィーダー細胞拡大増殖システムは、分化度の低いメモリー様NK細胞の発生を促進する。

20

## 【0191】

本開示の原理が適用され得る多くの可能な実施形態を考慮して、例示された実施形態は例に過ぎず、範囲の限定として解釈すべきでないことを認識すべきである。むしろ、範囲は、以下の特許請求の範囲によって定義される。したがって、本発明者らは、これらの特許請求の範囲の範囲および精神内に入る全てのものを特許請求する。

一実施形態において、例えば、以下の項目が提供される。

## (項目1)

膜結合型IL-21 (mIL-21) を発現する改変された721, 221細胞。

## (項目2)

前記mIL-21が、配列番号2に対して少なくとも90%もしくは少なくとも95%の配列同一性を含むアミノ酸配列を含み; および/または  
前記mIL-21をコードする核酸が、配列番号1に対して少なくとも90%もしくは少なくとも95%の配列同一性を含む核酸配列を含む、  
項目1に記載の改変された721, 221細胞。

30

## (項目3)

前記mIL-21が、ウイルスベクターを使用して前記721, 221細胞において発現される、項目1または項目2に記載の改変された721, 221細胞。

## (項目4)

前記ウイルスベクターがレトロウイルスベクターである、項目3に記載の改変された721, 221細胞。

40

## (項目5)

前記レトロウイルスベクターがモロニー Maus 白血病ウイルス (MoMLV) ベクターである、項目4に記載の改変された721, 221細胞。

## (項目6)

前記MoMLVベクターがSFGLVレトロウイルスベクターである、項目5に記載の改変された721, 221細胞。

## (項目7)

前記ベクターが、配列番号3に対して少なくとも90%または95%の配列同一性 (sequence identify) を含む、項目3から6のいずれか一項に記載の改変

50

された721.221細胞。

(項目8)

少なくとも1つのさらなる異種インターロイキンおよび/またはインターロイキン受容体をさらに発現する、項目1から7のいずれか一項に記載の改変された721.221細胞。

(項目9)

膜結合型IL-21(mIL-21)、IL-2、IL-12、IL-33、IL-27、IL-18、IL-7、mIL-7、IL-15、膜結合型IL-15(mIL-15)、toll様受容体(TLR)リガンド、UL16膜結合タンパク質(ULBP)-1、ULPB-2および/または主要組織適合複合体(MHC)クラスI鎖関連タンパク質A(MIC-A)のうち少なくとも1つを発現する、改変された721.221細胞。

10

(項目10)

mIL-21、IL-2、IL-12、IL-33、IL-27、IL-18、IL-7、mIL-7、IL-15、mIL-15、TLRリガンド、ULBP-1、ULPB-2および/またはMIC-Aのうち1つまたは複数を含み、項目9に記載の改変された721.221細胞。

(項目11)

少なくとも1つのさらなる異種サイトカイン、活性化受容体リガンド、TLRリガンド、またはそれらの受容体をさらに発現する、項目9または項目10に記載の改変された721.221細胞。

20

(項目12)

前記少なくとも1つのさらなる異種サイトカイン、活性化受容体リガンド、TLRリガンド、またはそれらの受容体が、IL-15受容体アルファ(IL-15R)を含む、項目8または項目11に記載の改変された721.221細胞。

(項目13)

IL-15Rを含み、項目12に記載の改変された721.221細胞。

(項目14)

mIL-21およびIL-15Rを発現する、項目12または項目13に記載の改変された721.221細胞。

30

(項目15)

mIL-21を発現する、項目9または項目10に記載の改変された721.221細胞。

(項目16)

mIL-21をコードする異種核酸を含む、項目15に記載の改変された721.221細胞。

(項目17)

改変された721.221細胞を産生する方法であって、721.221細胞の集団を、mIL-21をコードする核酸で形質導入またはトランスフェクトするステップ；

40

前記mIL-21を発現する前記細胞を単離するステップ；および前記単離された細胞に照射するステップを含み、それによって前記改変された721.221細胞を産生する、方法。

(項目18)

前記721.221細胞の集団が、前記mIL-21をコードする前記核酸を含むウイルスで形質導入される、項目17に記載の方法。

(項目19)

前記mIL-21が、配列番号2に対して少なくとも90%もしくは少なくとも95%の配列同一性を含むアミノ酸配列を含み；および/または

前記mIL-21をコードする前記核酸が、配列番号1に対して少なくとも90%もし

50

くは少なくとも95%の配列同一性を含む核酸配列を含む、  
項目17または項目18に記載の方法。

(項目20)

前記721、221細胞の集団が、レトロウイルスベクターで形質導入される、項目18に記載の改変された721、221細胞。

(項目21)

前記レトロウイルスベクターがモロニー Maus 白血病ウイルス (MoMLV) ベクターである、項目20に記載の改変された721、221細胞。

(項目22)

前記MoMLVベクターがSFGレトロウイルスベクターである、項目21に記載の改変された721、221細胞。

10

(項目23)

前記レトロウイルスベクターが、配列番号3に対して少なくとも90%または95%の配列同一性を含む、項目20から22のいずれか一項に記載の改変された721、221細胞。

(項目24)

項目9から17のいずれか一項に記載の改変された721、221細胞を産生する方法であって、

721、221細胞の集団を、mIL-21、IL-2、IL-12、IL-33、IL-27、IL-18、IL-7、mIL-7、IL-15、膜結合型IL-15 (mIL-15)、TLRリガンド、ULBP-1、ULPB-2および/またはMIC-Aをコードする核酸で形質導入またはトランスフェクトするステップ；

20

前記mIL-21、IL-2、IL-12、IL-33、IL-27、IL-18、IL-7、mIL-7、IL-15、膜結合型IL-15 (mIL-15)、TLRリガンド、ULBP-1、ULPB-2および/またはMIC-Aを発現する前記細胞を単離するステップ；ならびに

前記単離された細胞に照射するステップ

を含み、それによって前記改変された721、221細胞を産生する、方法。

(項目25)

前記721、221細胞の集団が、前記m-IL21、IL-2、IL-12、IL-33、IL-27、IL-18、IL-7、mIL-7、IL-15、膜結合型IL-15 (mIL-15)、TLRリガンド、ULBP-1、ULPB-2および/またはMIC-Aをコードする前記核酸を含むウイルスで形質導入される、項目24に記載の方法。

30

(項目26)

前記ウイルスが、レトロウイルスまたはレンチウイルスである、項目24または項目25に記載の方法。

(項目27)

前記721、221細胞の集団が、さらなる異種サイトカイン、活性化受容体リガンド、TRLリガンド、またはそれらの受容体をコードする核酸でさらに形質導入またはトランスフェクトされる、項目17から26のいずれか一項に記載の方法。

40

(項目28)

前記さらなる外因性異種サイトカイン、活性化受容体リガンド、TRLリガンド、またはそれらの受容体が、膜結合型である、項目27に記載の方法。

(項目29)

前記さらなる異種サイトカイン、活性化受容体リガンド、TRLリガンド、またはそれらの受容体が、IL-15Rを含む、項目27または項目28に記載の方法。

(項目30)

ナチュラルキラー (NK) 細胞またはT細胞の集団を拡大増殖させる方法であって、細胞の集団を、項目1から10のいずれか一項に記載の改変された721、221細胞および少なくとも1つのサイトカインと、細胞の拡大増殖に十分な条件下で1~40日間接触

50

させるステップを含む、方法。

(項目31)

前記細胞の集団が、末梢血、臍帯血、腹水、月経血または骨髓に由来する、項目30に記載の方法。

(項目32)

前記細胞の集団が、末梢血単核球(PBMC)を含む、項目30または項目31に記載の方法。

(項目33)

前記細胞の集団が、キメラ抗原受容体(CAR)改変された細胞を含む、項目30から32のいずれか一項に記載の方法。

(項目34)

前記CAR改変された細胞が、CAR改変されたT細胞またはCAR改変されたナチュラルキラー(NK)細胞を含む、項目33に記載の方法。

(項目35)

前記CAR改変された細胞が、CD19 CAR改変されたNK細胞を含む、項目33または項目34に記載の方法。

(項目36)

前記少なくとも1つのサイトカインが、少なくとも1つのインターロイキンを含む、項目30から35のいずれか一項に記載の方法。

(項目37)

前記インターロイキンが、インターロイキン-15(IL-15)および/またはインターロイキン-2(IL-2)である、項目36に記載の方法。

(項目38)

前記細胞の集団と前記改変された721、221細胞とを、少なくとも14~21日間接触させる、項目30から37のいずれか一項に記載の方法。

(項目39)

前記ナチュラルキラー(NK)細胞の集団または前記T細胞の集団が、前記細胞の集団を少なくとも14~21日間接触させた後に、少なくとも5000倍~90,000倍増加する、項目34に記載の方法。

(項目40)

がんまたは感染性疾患もしくは免疫疾患を処置する方法であって、項目30から39のいずれか一項に記載の方法によって産生されたナチュラルキラー(NK)細胞またはT細胞を、がんまたは感染性疾患もしくは免疫疾患を有する対象に投与するステップを含み、それによって前記がんまたは免疫疾患を処置する、方法。

(項目41)

がんまたは感染性疾患もしくは免疫疾患を処置する方法であって、細胞の集団を、項目1から10のいずれか一項に記載の改変された721、221細胞および少なくとも1つのサイトカインと、少なくとも14~21日間接触させ、それによってナチュラルキラー(NK)細胞またはT細胞を産生する、ステップ；ならびに前記NK細胞またはT細胞を、がんまたは感染性疾患もしくは免疫疾患を有する対象に投与するステップ

を含み、それによって前記がんまたは免疫疾患を処置する、方法。

(項目42)

前記がんまたは免疫疾患が、自己免疫疾患、移植片拒絶、肉腫、神経芽細胞腫、固形腫瘍または血液がんを含む、項目40または項目41に記載の方法。

(項目43)

前記細胞の集団が、がんまたは免疫疾患を有する対象に由来する、項目40から42のいずれか一項に記載の方法。

(項目44)

前記感染性疾患が、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、B型肝炎ウイルス(HBV)、

10

20

30

40

50

C型肝炎ウイルス（HCV）、結核（TB）またはマラリアを含む、項目40または項目41に記載の方法。

（項目45）

前記血液がんが、多発性骨髄腫、白血病またはリンパ腫を含む、項目42に記載の方法。

（項目46）

前記固形腫瘍が、リンパ腫、乳がん、肝細胞癌（HCC）および膵がんを含む、項目42に記載の方法。

（項目47）

前記白血病が、急性リンパ球性白血病（ALL）または急性骨髄性白血病（AML）である、項目45に記載の方法。

（項目48）

前記リンパ腫が非ホジキンリンパ腫である、項目45または項目46に記載の方法。

（項目49）

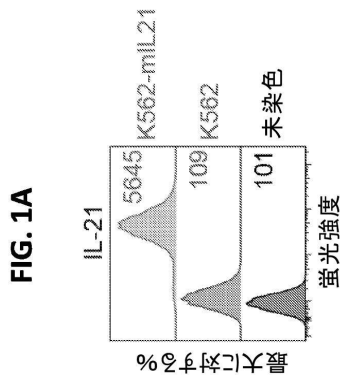
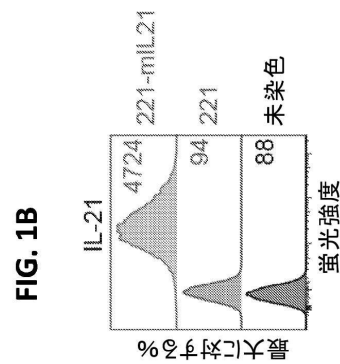
前記細胞の集団が、CAR改変されたリンパ球を含む、項目41から48のいずれか一項に記載の方法。

（項目50）

前記CAR改変されたリンパ球が、CD19 CAR改変されたナチュラルキラー細胞を含む、項目49に記載の方法。

【図面】

【図1-1】



【図1-2】

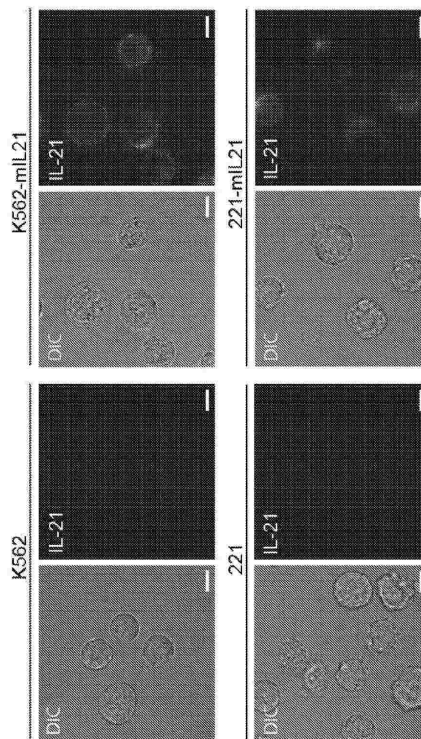


FIG. 1C

FIG. 1D

10

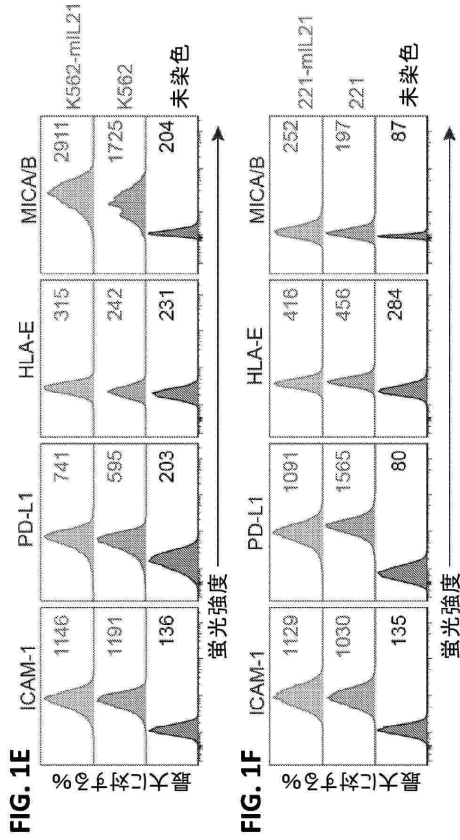
20

30

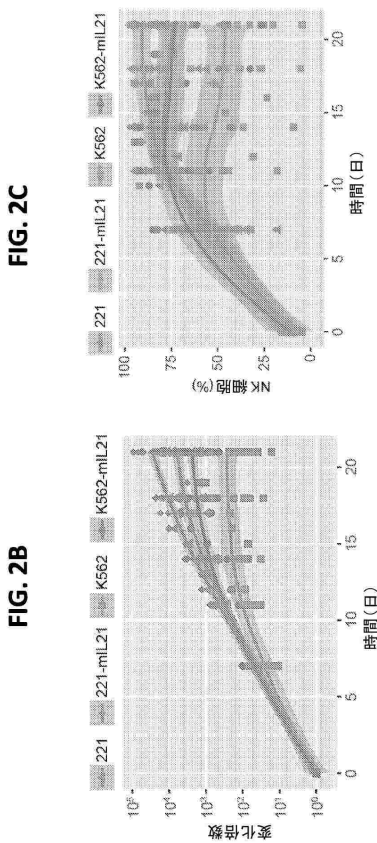
40

50

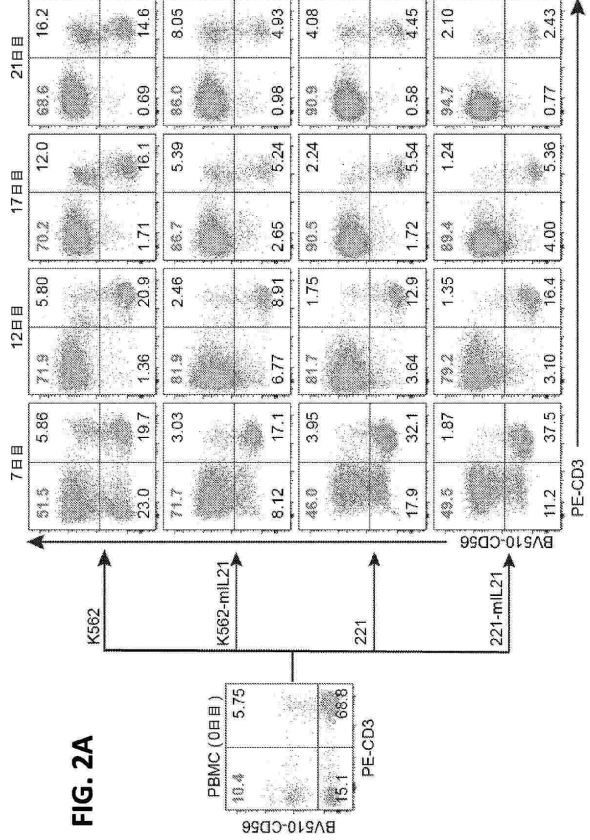
【 図 1 - 3 】



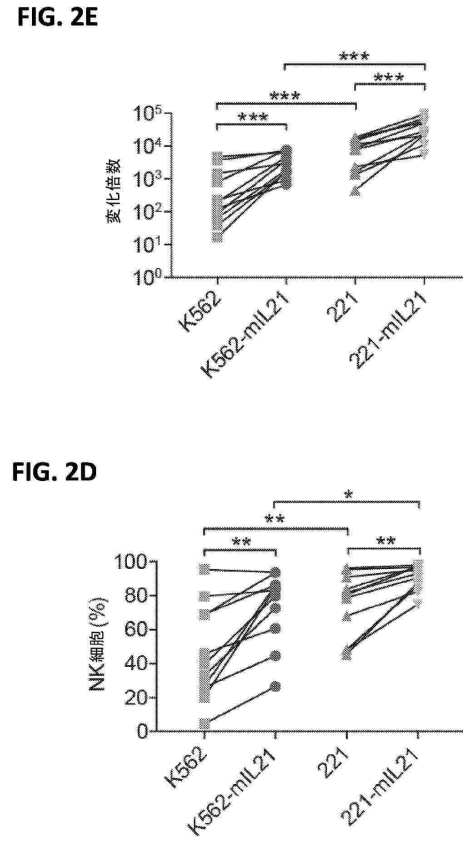
【 図 2 - 2 】



【 図 2 - 1 】



【 図 2 - 3 】



10

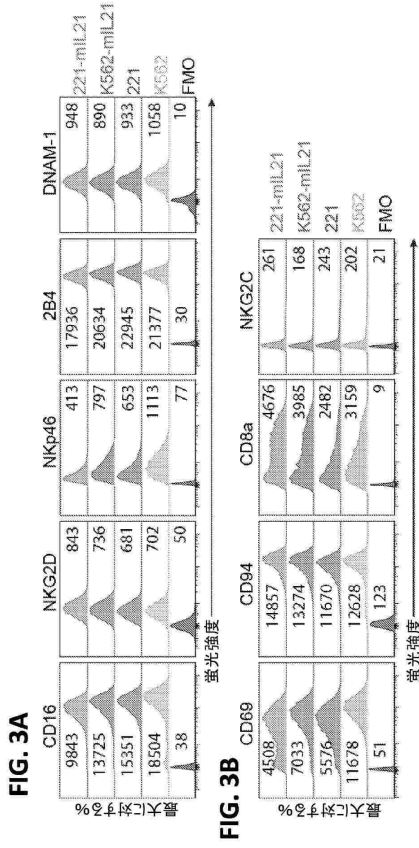
20

30

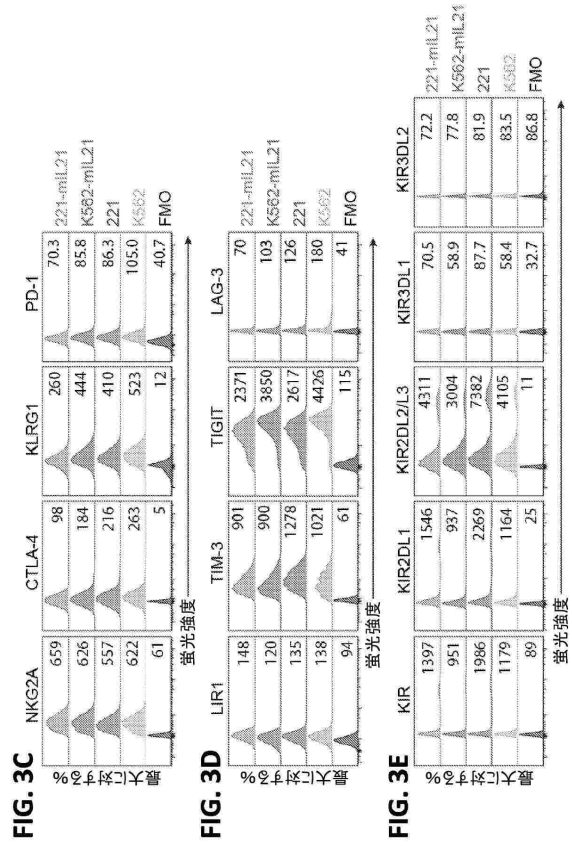
40

50

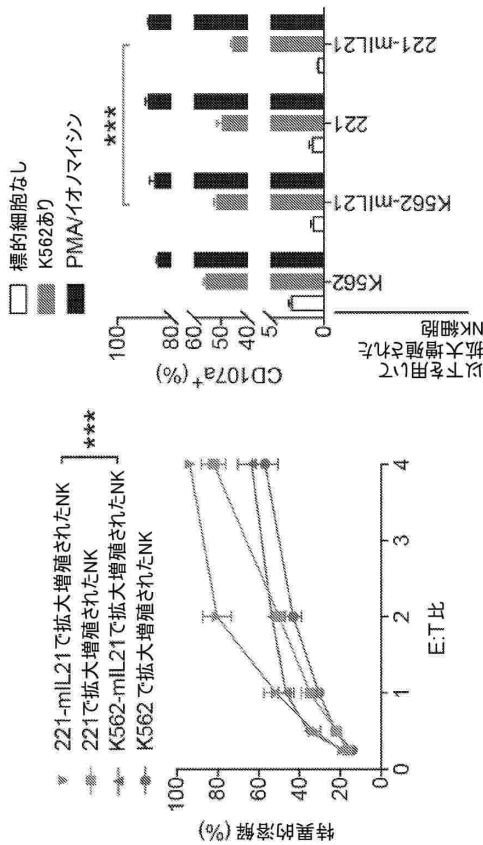
【図 3 - 1】



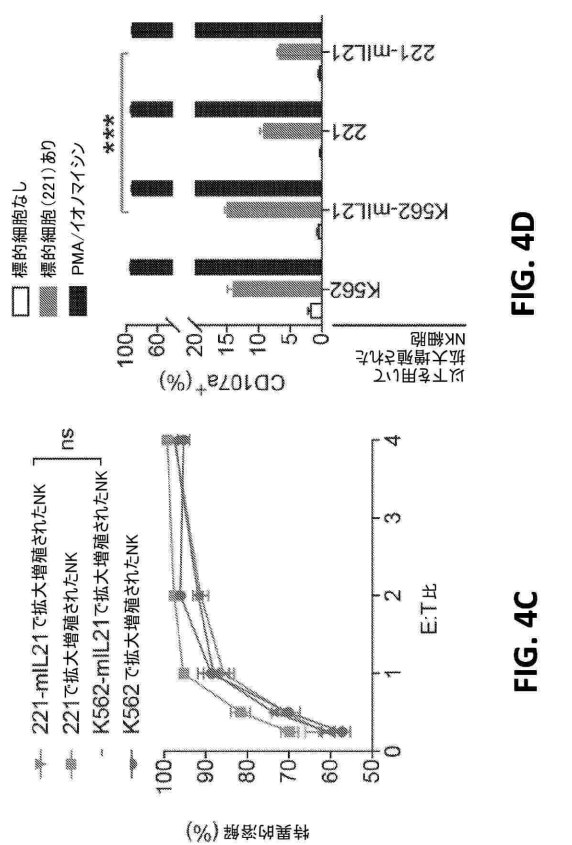
【図 3 - 2】



【図 4 - 1】



【図 4 - 2】



10

20

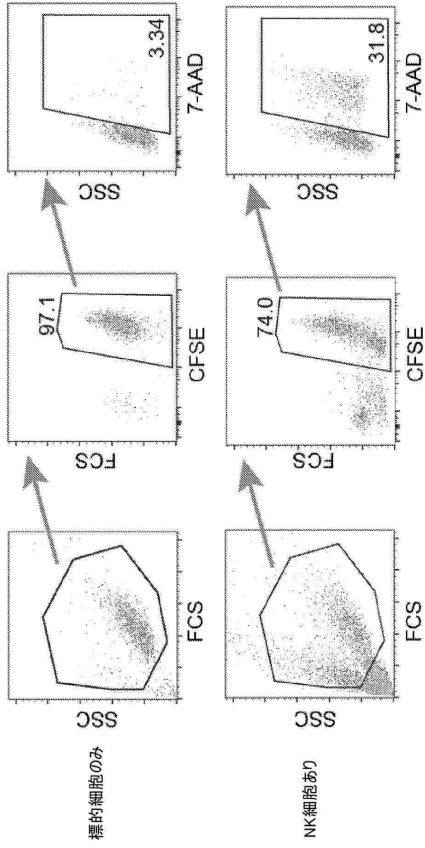
30

40

50

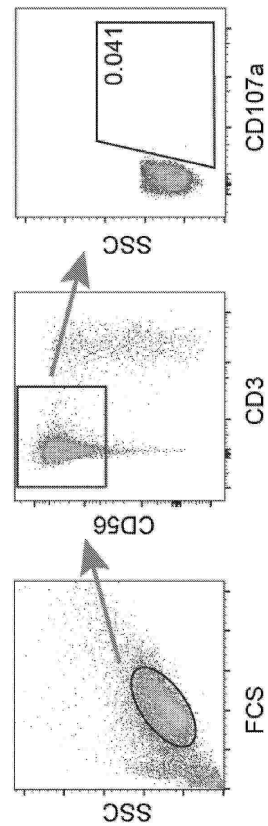
【 図 4 - 3 】

FIG. 4E



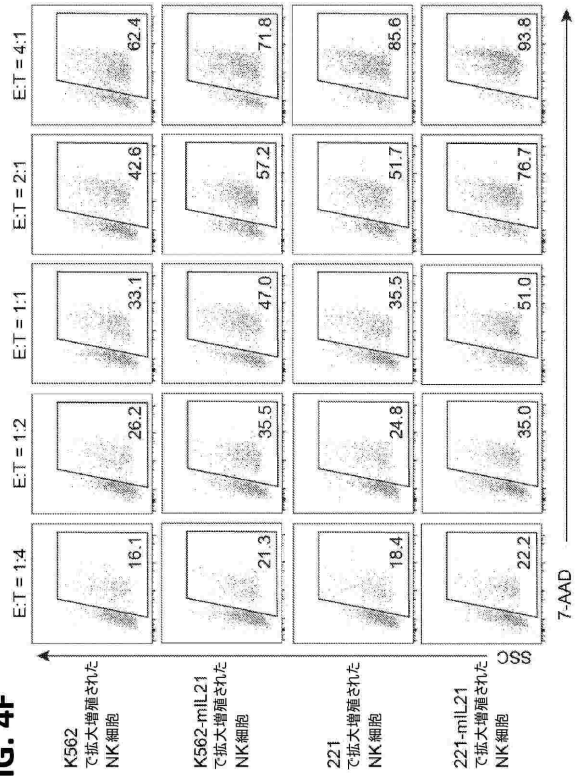
【 図 4 - 5 】

FIG. 4G



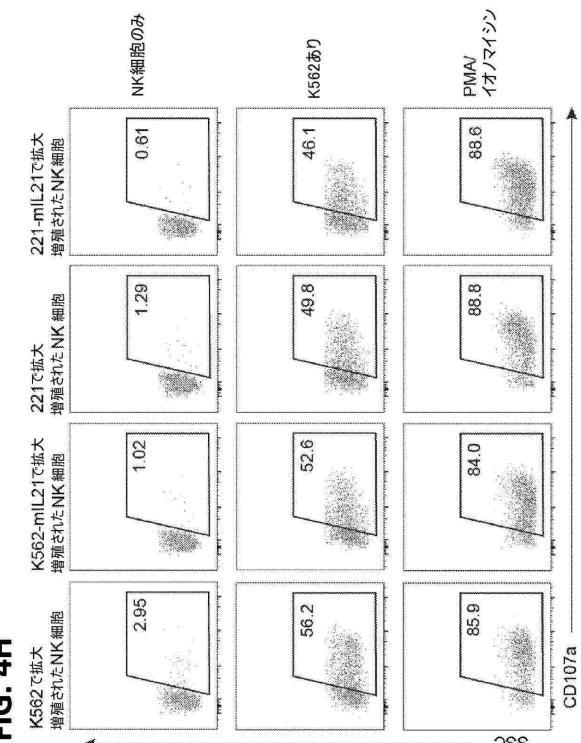
【 図 4 - 4 】

FIG. 4F



【 図 4 - 6 】

FIG. 4H



10

20

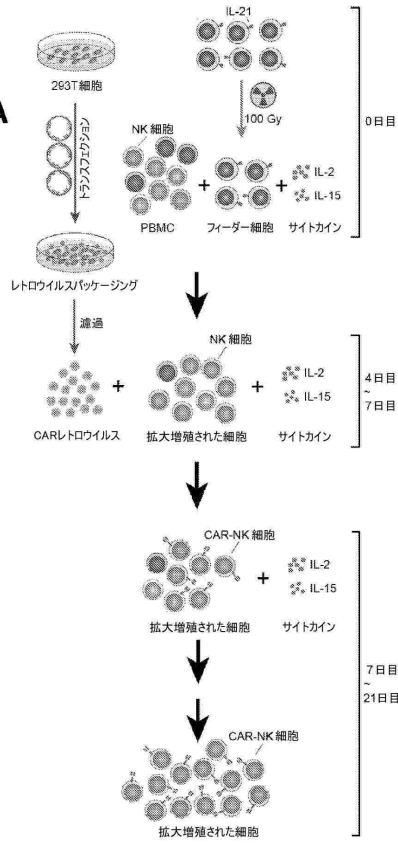
30

40

50

【 図 5 - 1 】

FIG. 5A



【 図 5 - 2 】

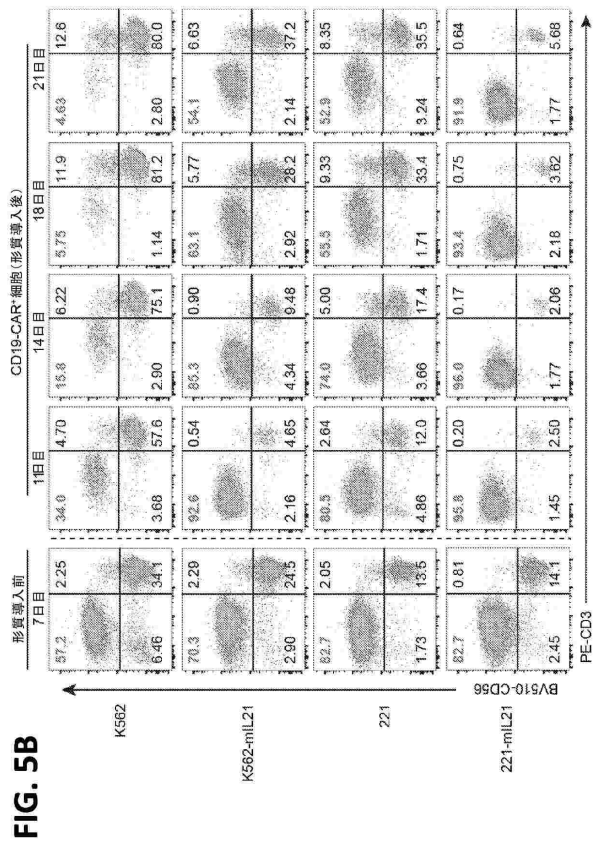


FIG. 5B

【 図 5 - 3 】

FIG. 5D

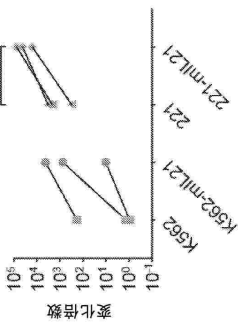
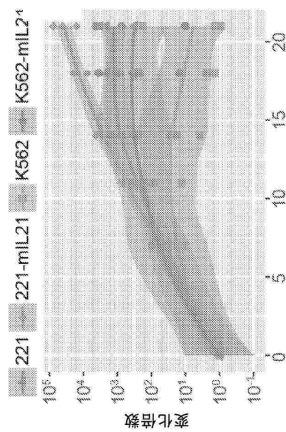


FIG. 5C



【 図 5 - 4 】

FIG. 5F

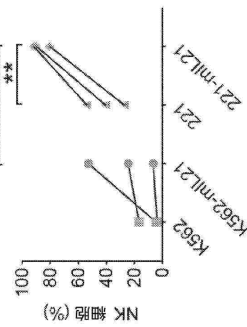
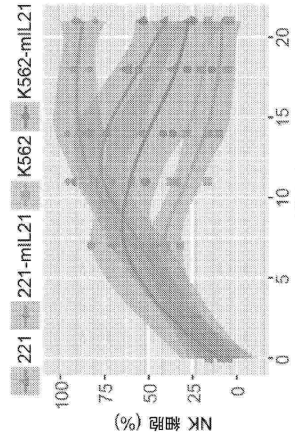


FIG. 5E



10

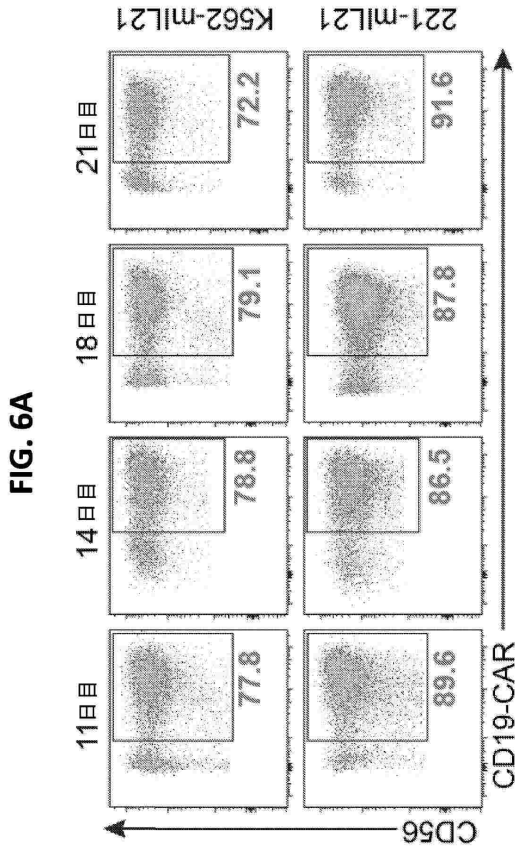
20

30

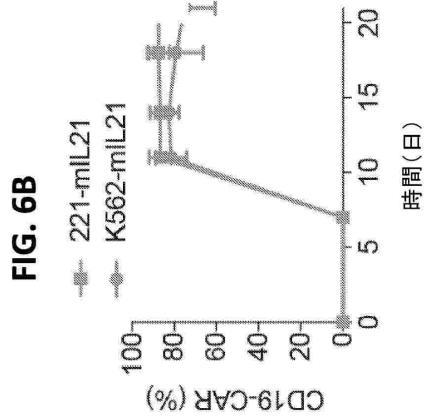
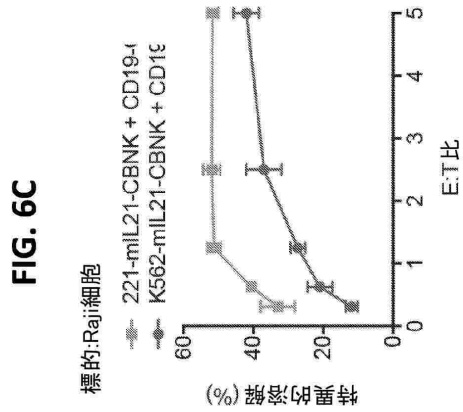
40

50

【図6-1】



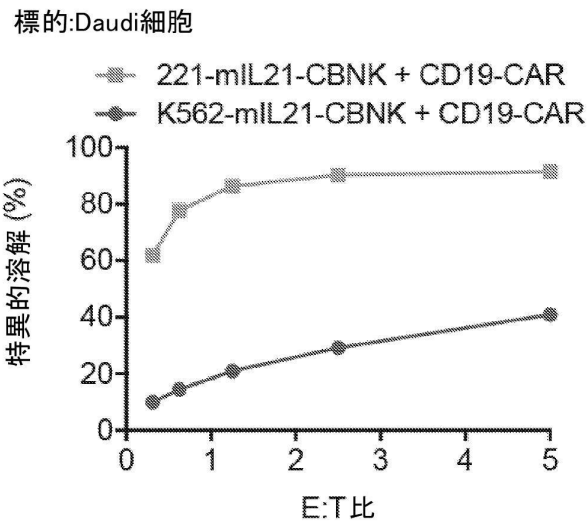
【図6-2】



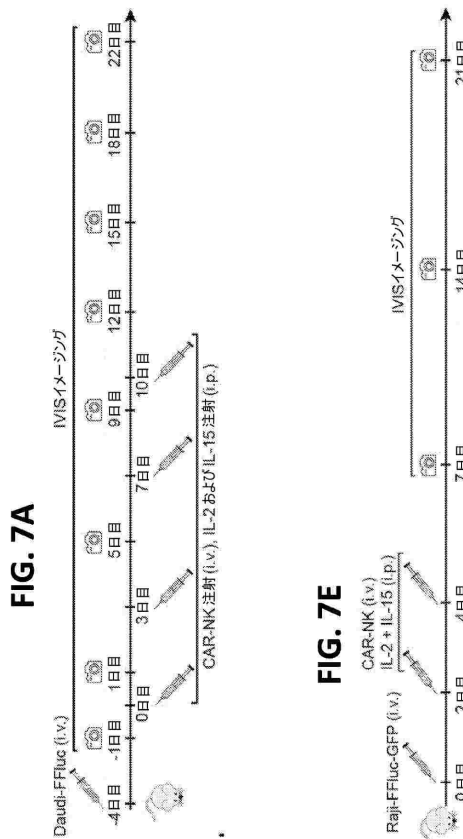
10

20

【図6-3】



【図7-1】

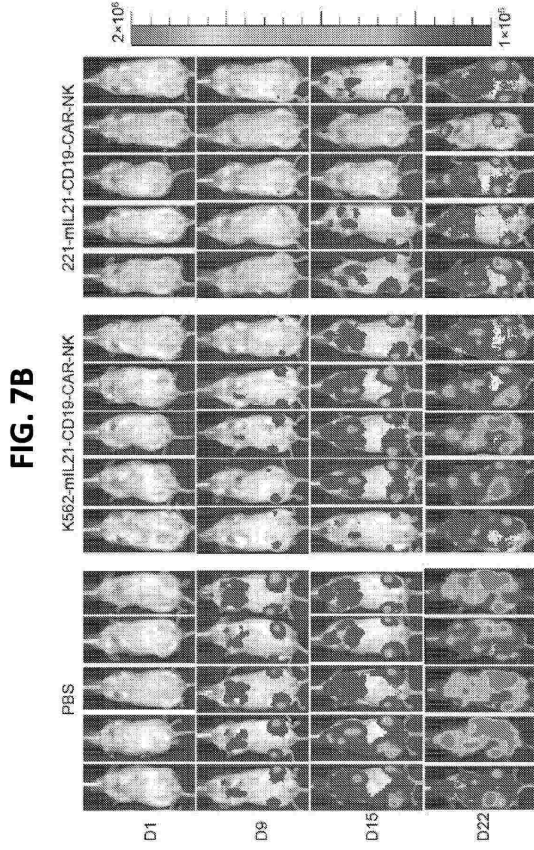


30

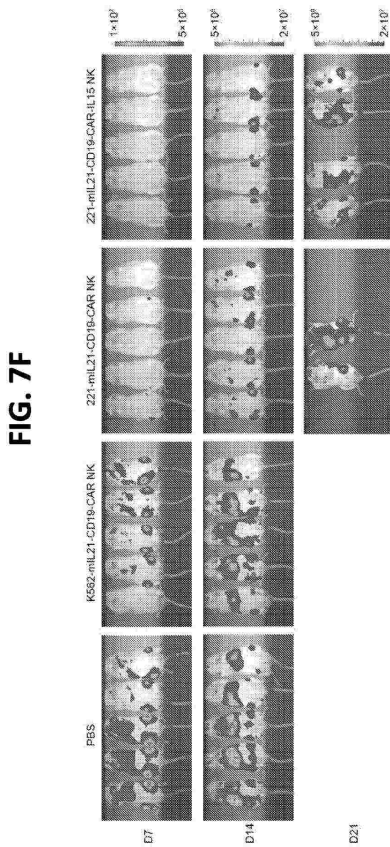
40

50

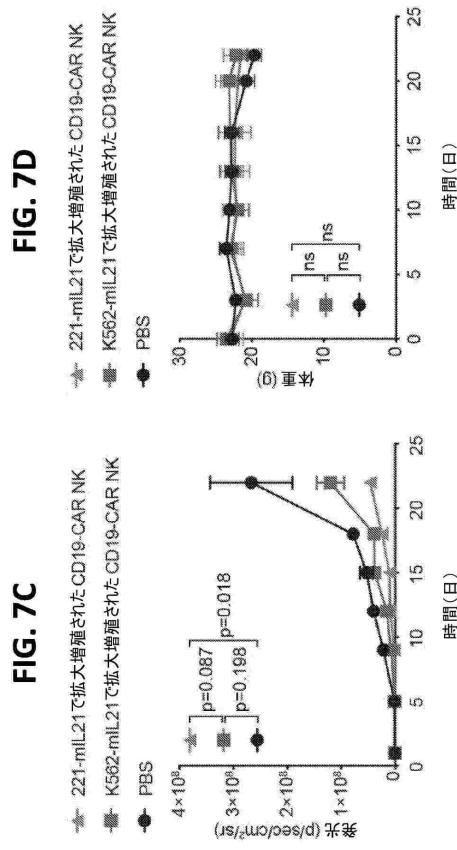
【 図 7 - 2 】



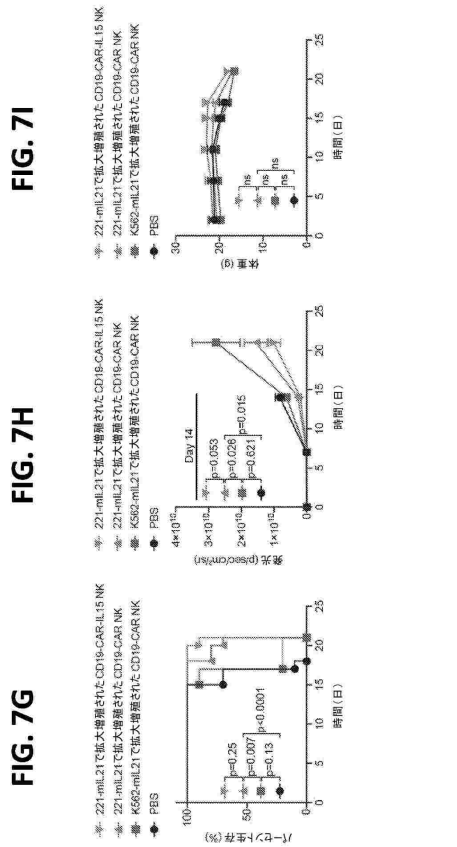
【 図 7 - 4 】



【 図 7 - 3 】

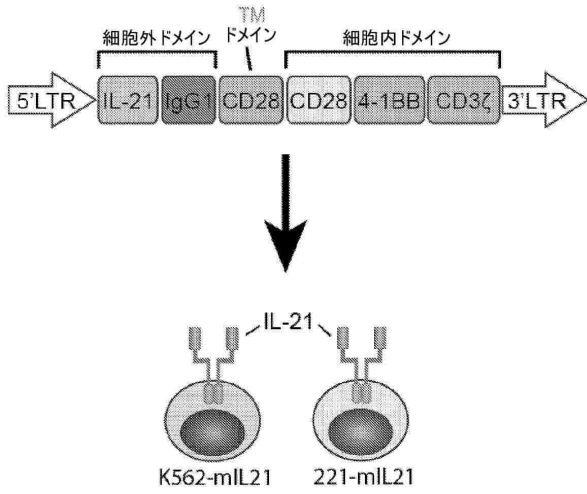


【 図 7 - 5 】



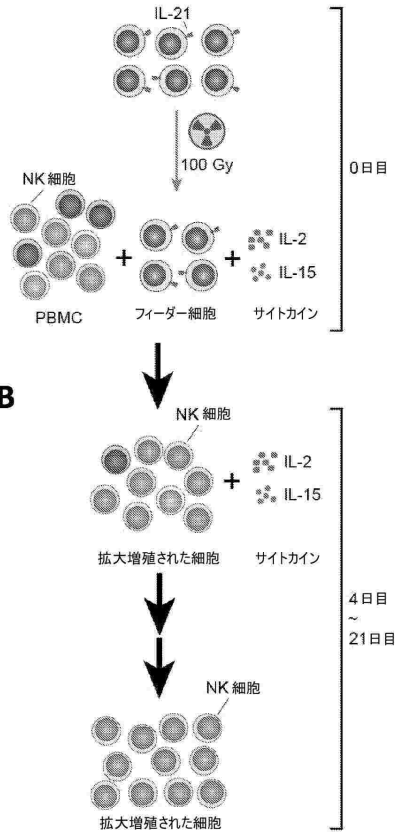
【 図 8 - 1 】

FIG. 8A



【 図 8 - 2 】

FIG. 8B



【 図 9 】

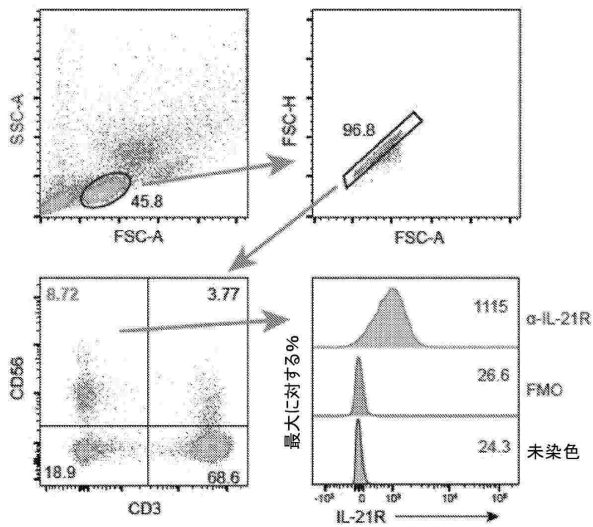


FIG. 9

【 図 10 - 1 】

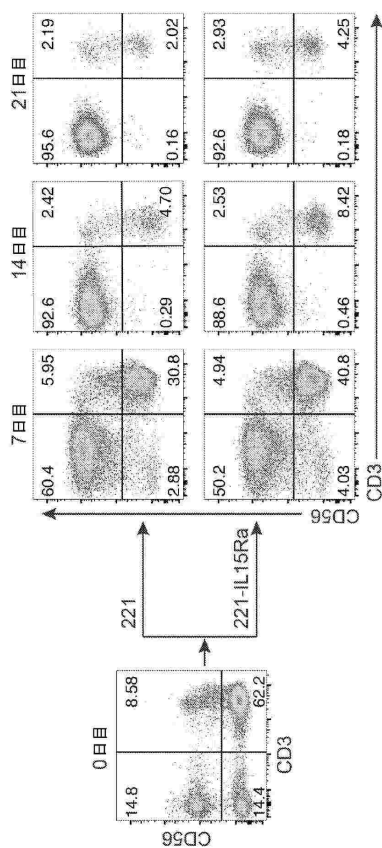


FIG. 10A

10

20

30

40

50

【図 1 0 - 2】

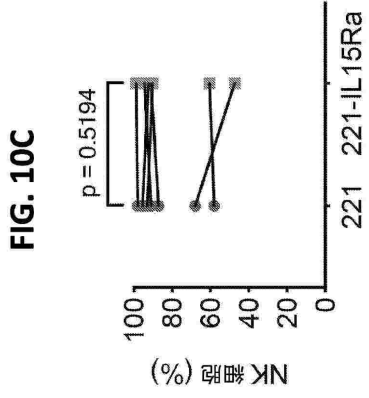
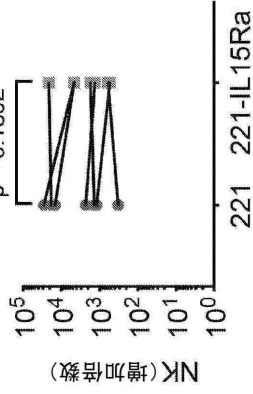


FIG. 10B



【図 1 1 - 2】

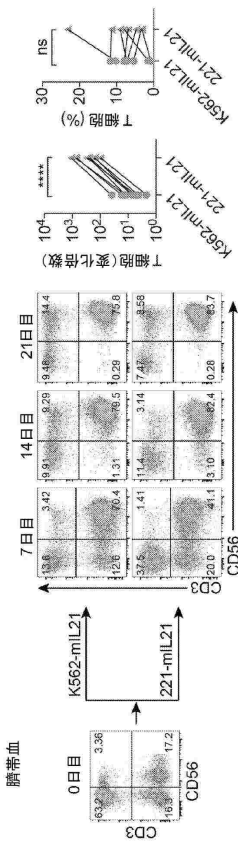


FIG. 11B

【図 1 1 - 1】

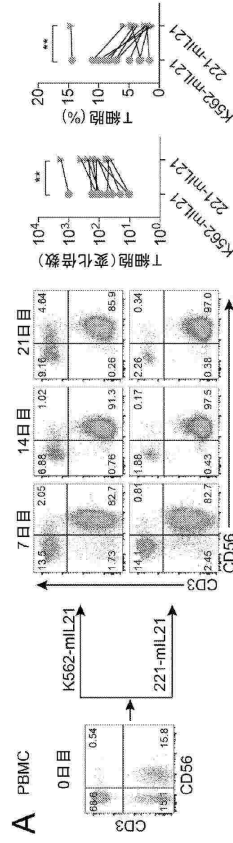


FIG. 11A

【図 1 1 - 3】

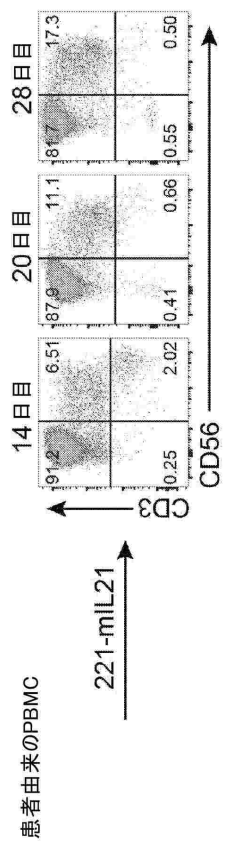


FIG. 11C

10

20

30

40

50

【 図 1 2 】

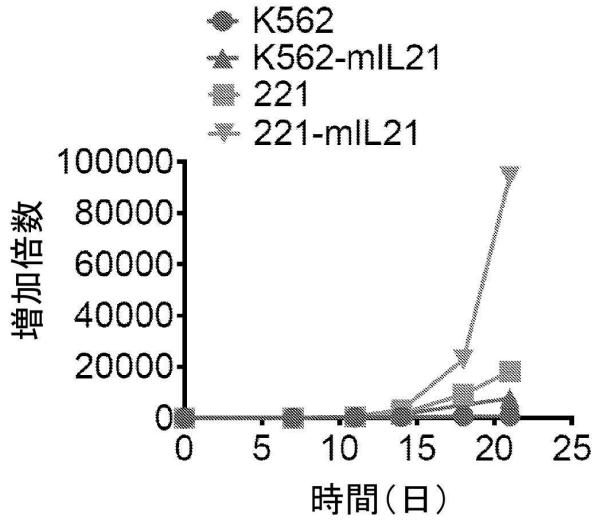


FIG. 12

【 図 1 3 - 1 】

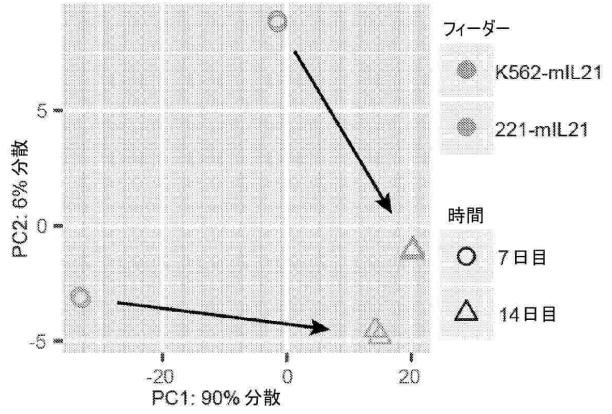


FIG. 13A

【 図 1 3 - 2 】

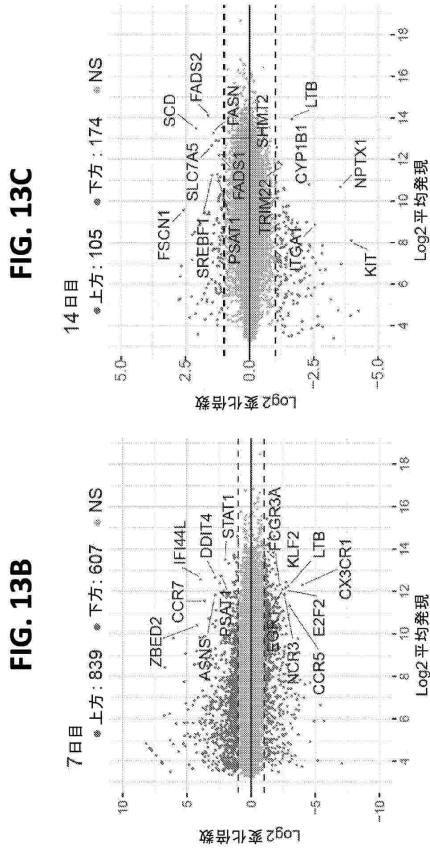


FIG. 13C

FIG. 13B

【 図 1 3 - 3 】

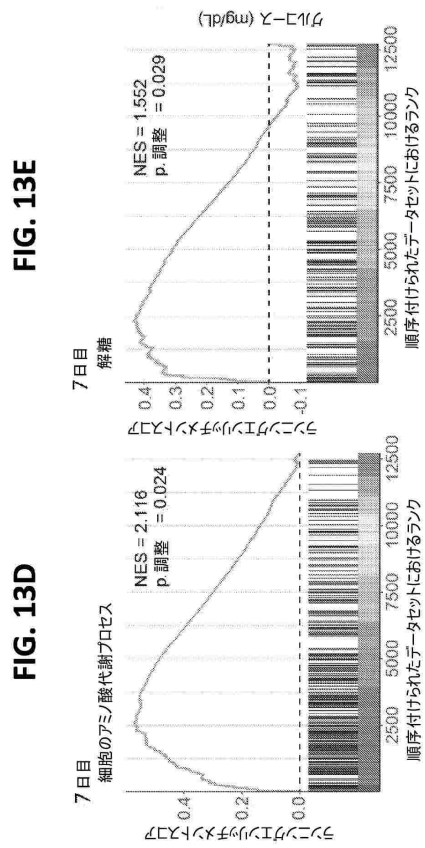


FIG. 13E

FIG. 13D

10

20

30

40

50

【 図 1 3 - 4 】

FIG. 13G

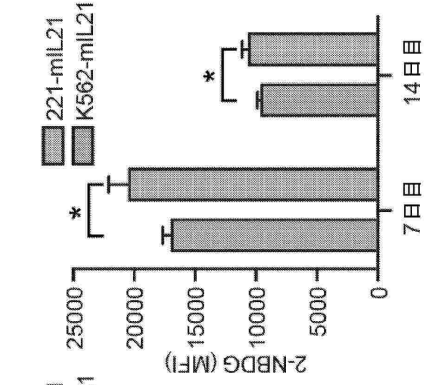
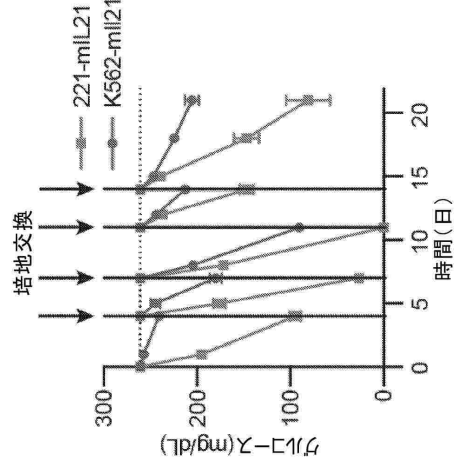
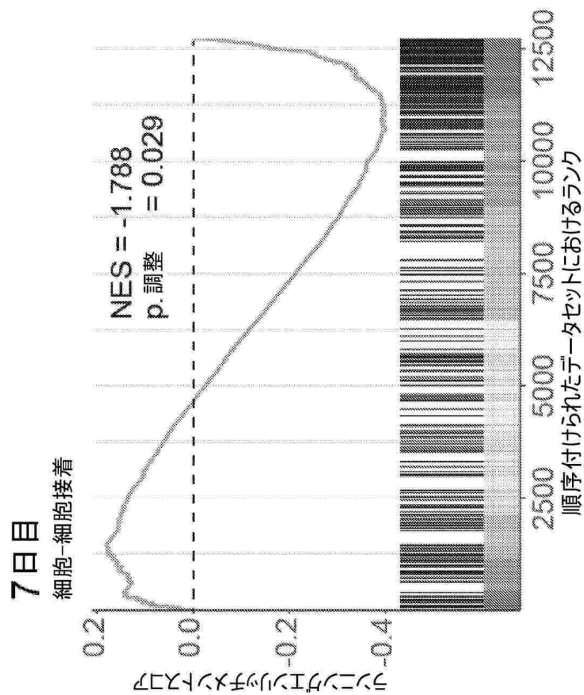


FIG. 13F



【 図 1 3 - 6 】

FIG. 13J



【 図 1 3 - 5 】

FIG. 13I

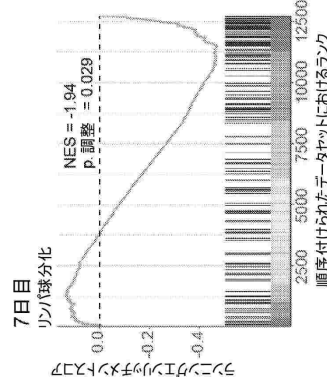
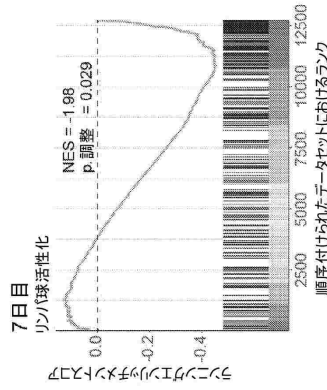


FIG. 13H

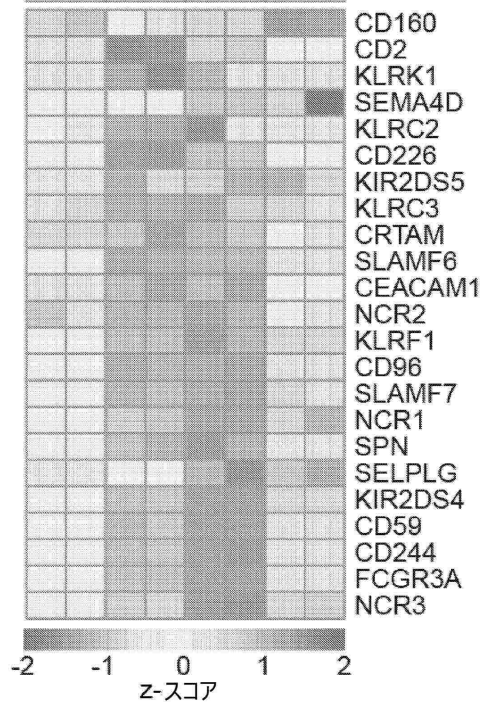


【 図 1 3 - 7 】

FIG. 13K

NK細胞阻害性受容体

K562-mlL21		221-mlL21	
D7	D14	D7	D14



10

20

30

40

50

【 図 1 3 - 8 】

FIG. 13M

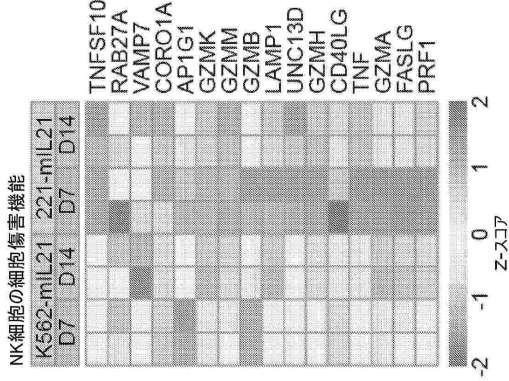
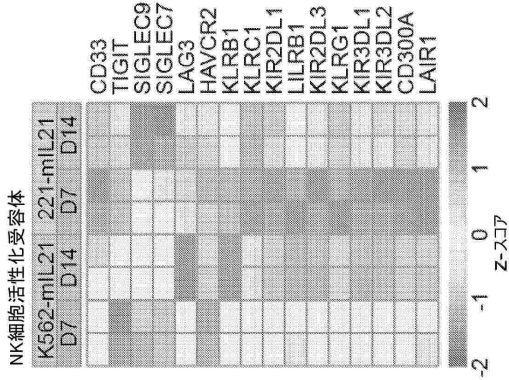
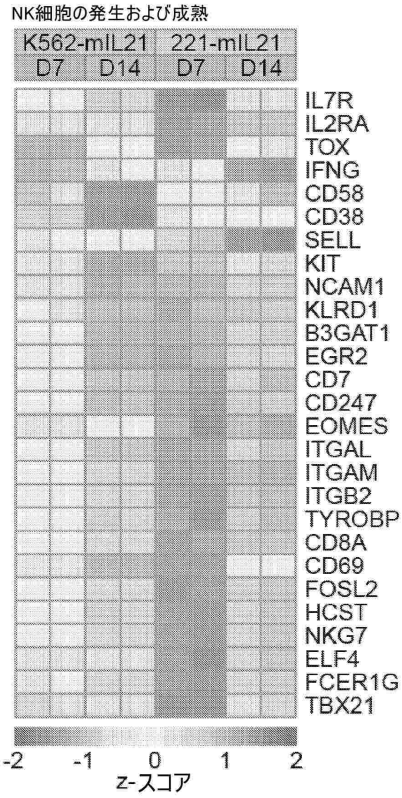


FIG. 13L



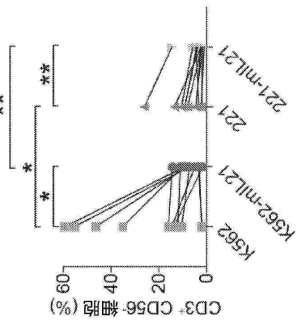
【 図 1 3 - 9 】

FIG. 13N



【 図 1 4 - 1 】

FIG. 14B



【 図 1 4 - 2 】

FIG. 14D

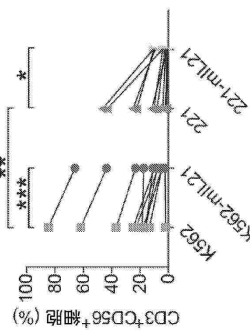


FIG. 14A

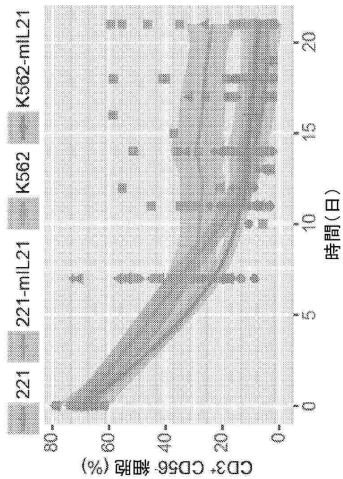
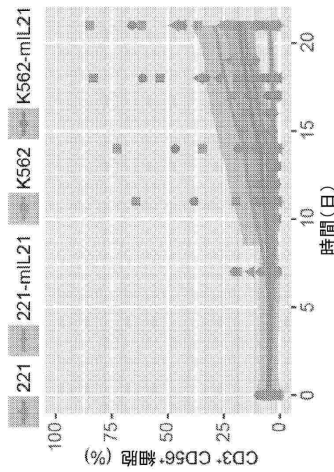


FIG. 14C



10

20

30

40

50

【 図 1 4 - 3 】

FIG. 14F

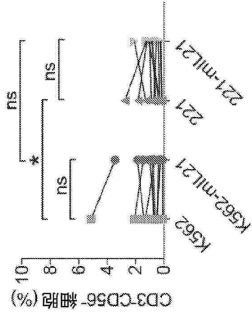
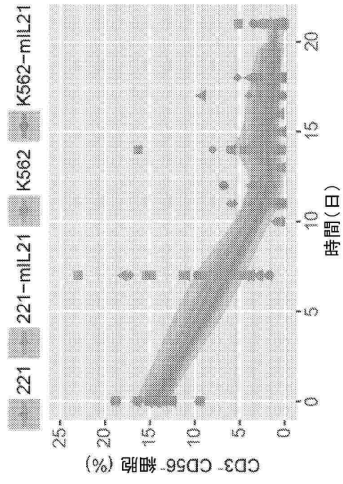


FIG. 14E



【 図 1 5 - 2 】

FIG. 15C

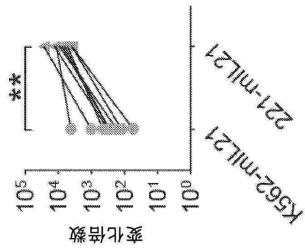
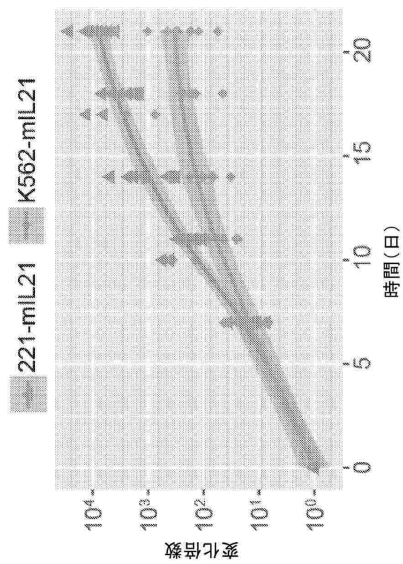
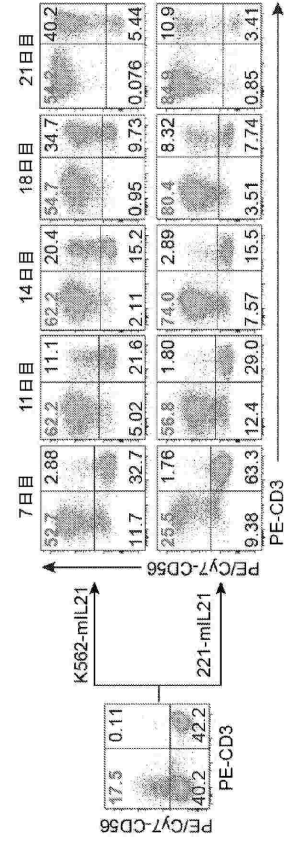


FIG. 15B



【 図 1 5 - 1 】

FIG. 15A



【 図 1 5 - 3 】

FIG. 15E

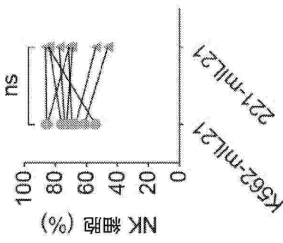
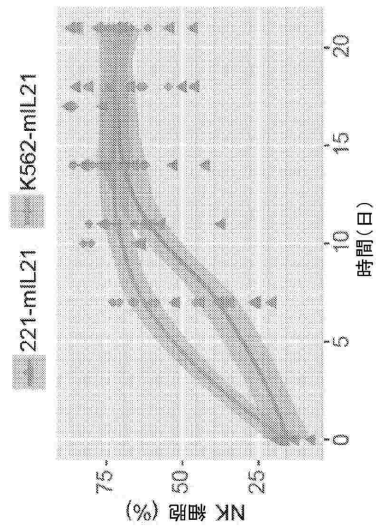


FIG. 15D



10

20

30

40

50

【 図 1 5 - 4 】

FIG. 15G

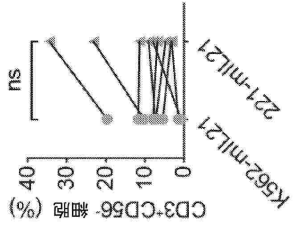
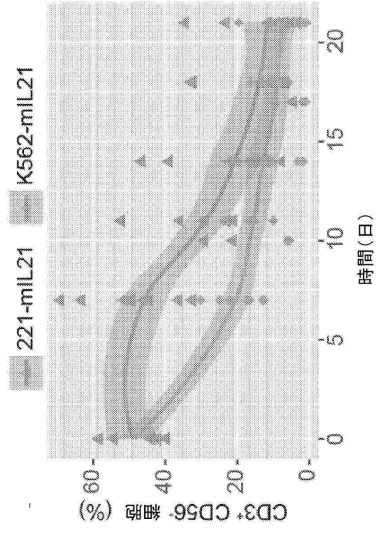


FIG. 15F



【 図 1 5 - 5 】

FIG. 15I

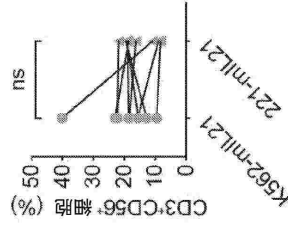
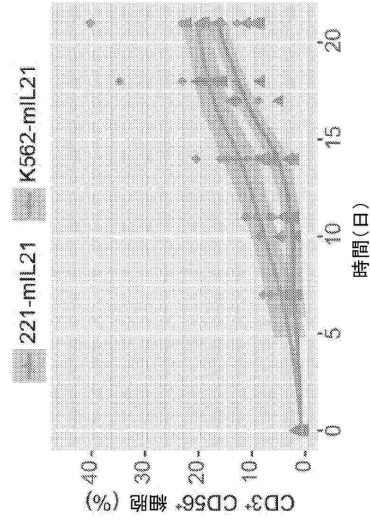


FIG. 15H



【 図 1 5 - 6 】

FIG. 15K

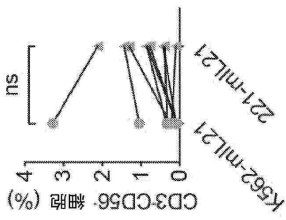
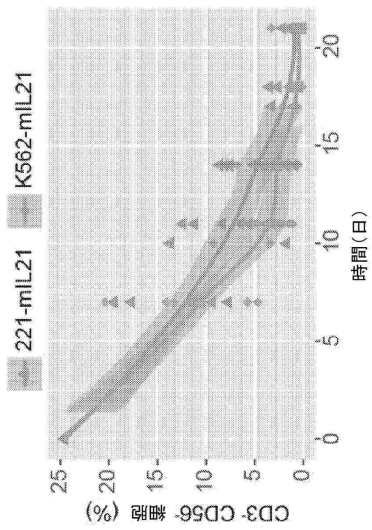


FIG. 15J



【 図 1 6 - 1 】

FIG. 16A

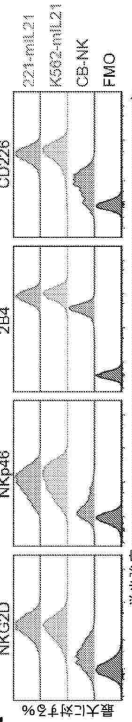


FIG. 16B

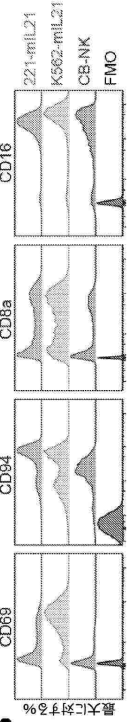
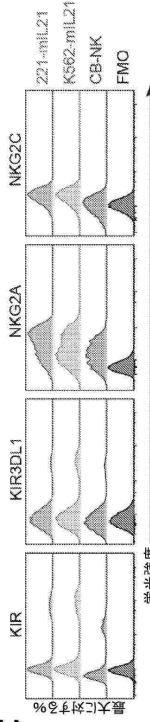


FIG. 16C



10

20

30

40

50

【 図 1 6 - 2 】

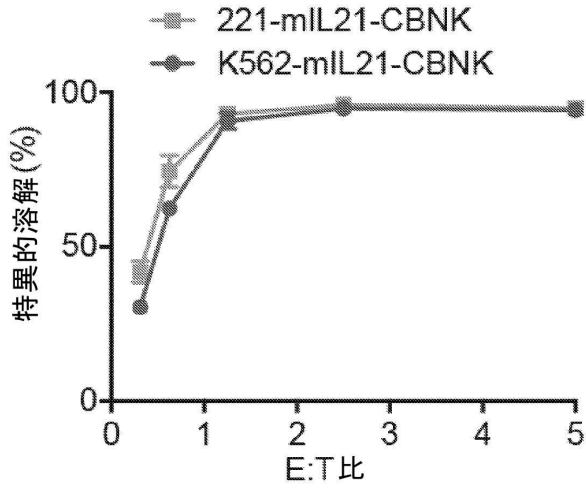


FIG. 16D

【 図 1 7 - 1 】

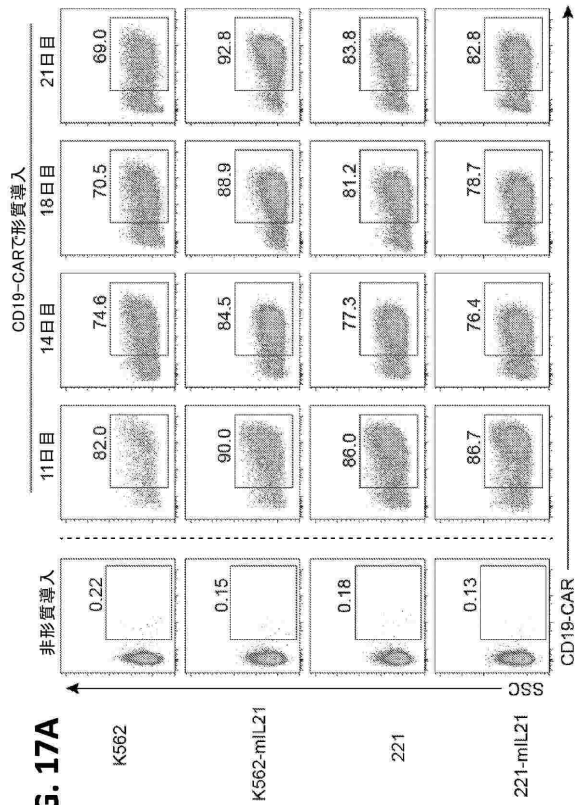


FIG. 17A

【 図 1 7 - 2 】

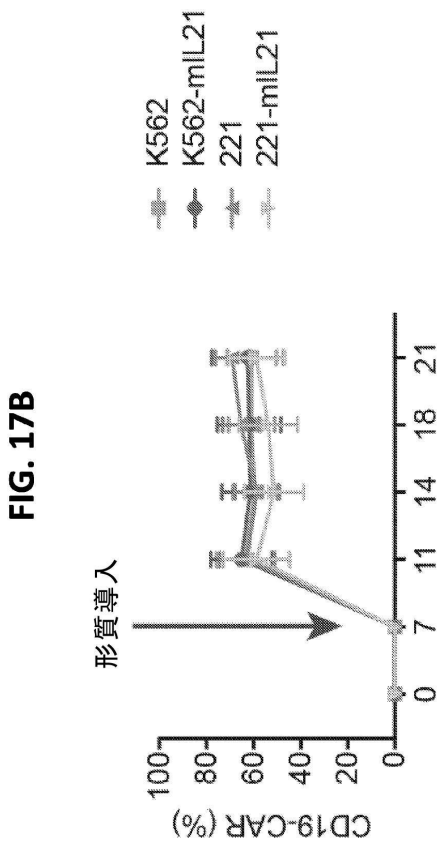


FIG. 17B

【 図 1 7 - 3 】

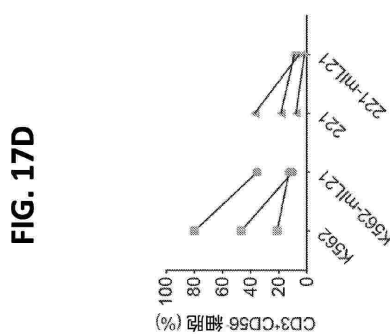
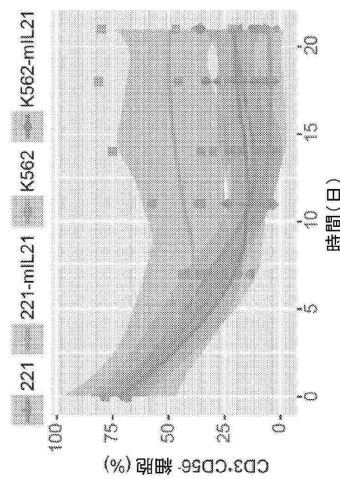


FIG. 17D

FIG. 17C



10

20

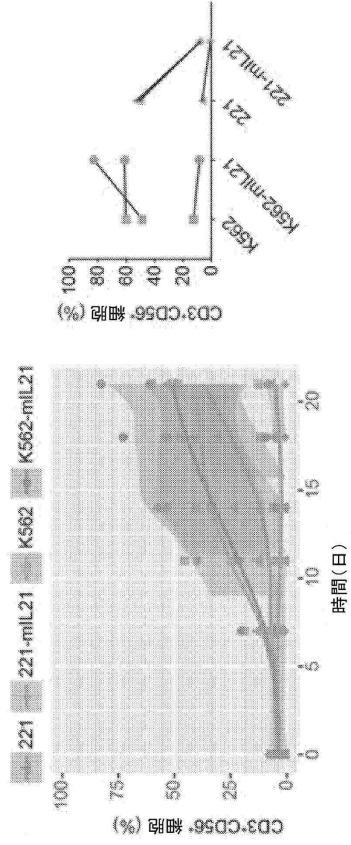
30

40

50

【 図 1 7 - 4 】

FIG. 17F



【 図 1 7 - 5 】

FIG. 17H

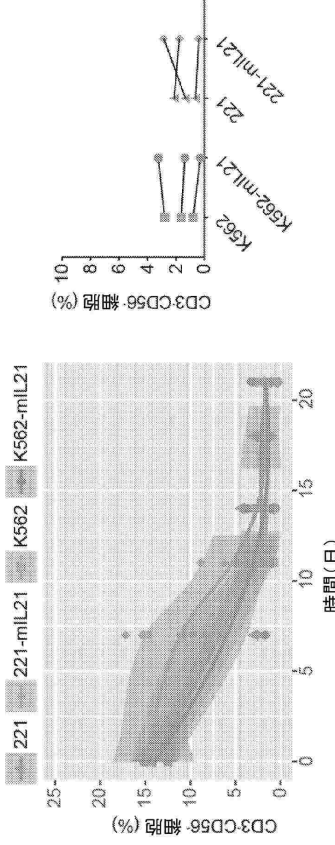


FIG. 17E

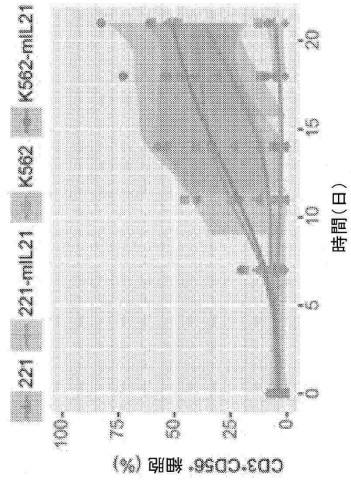
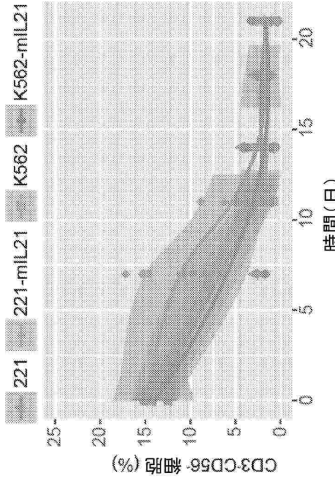
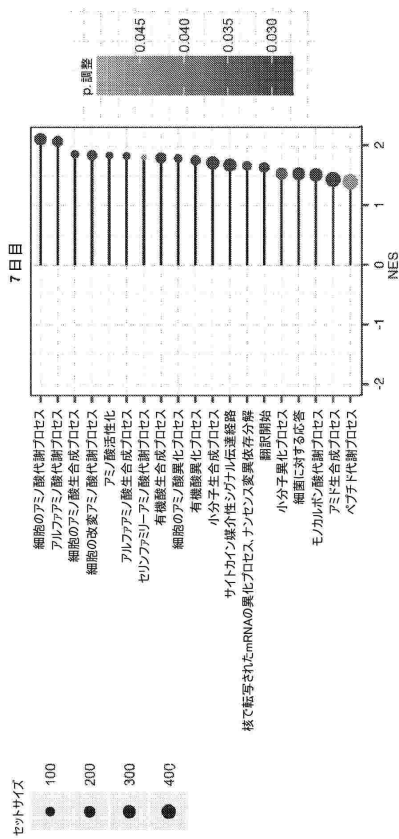


FIG. 17G



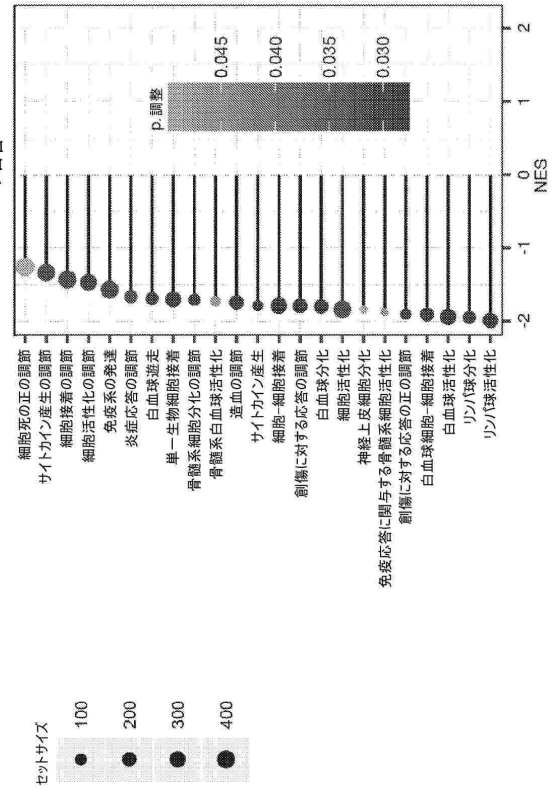
【 図 1 8 - 1 】

FIG. 18A



【 図 1 8 - 2 】

FIG. 18A



【 図 1 8 - 3 】

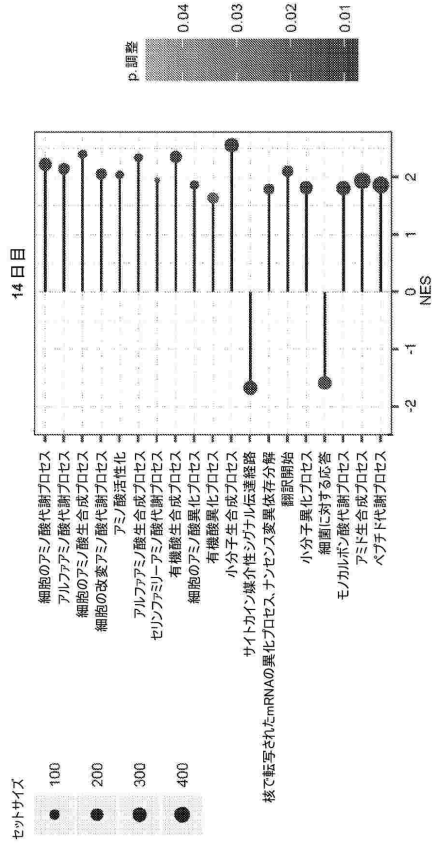


FIG. 18C

【 図 1 8 - 4 】

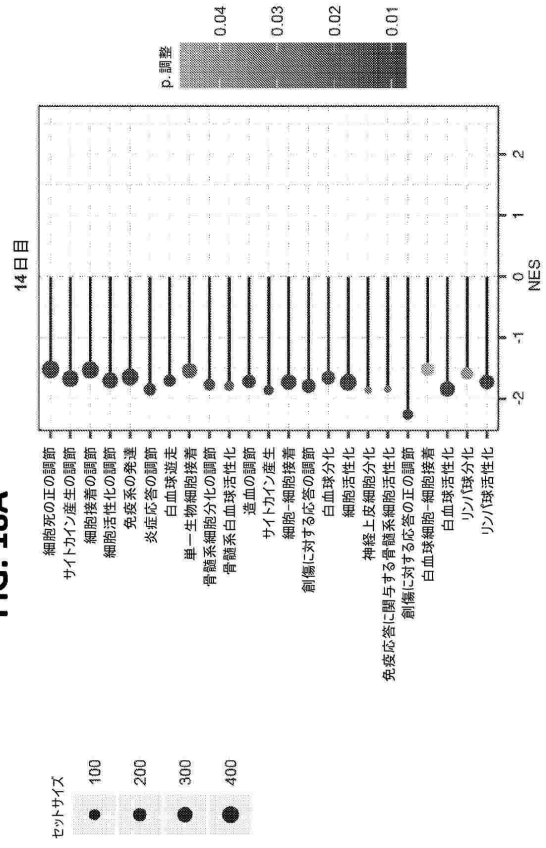


FIG. 18A

【 図 1 8 - 5 】

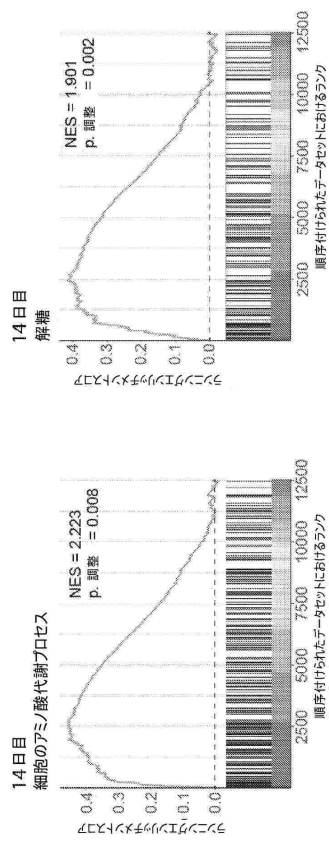


FIG. 18B

【 図 1 8 - 6 】

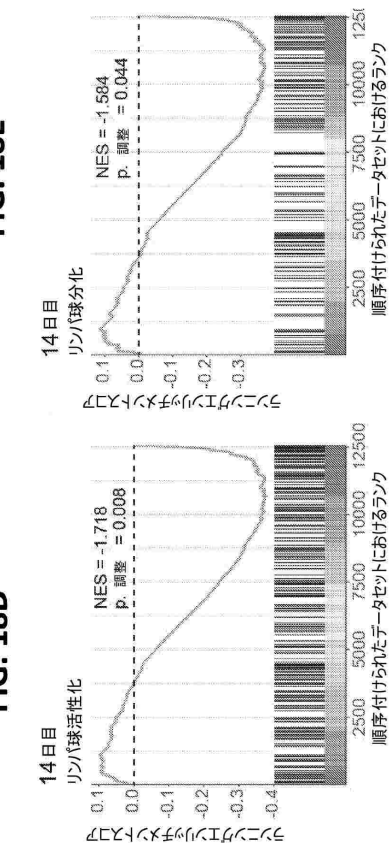
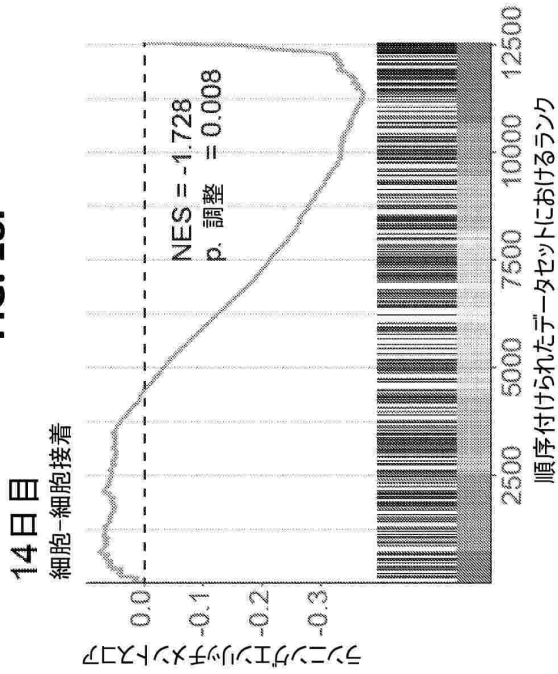


FIG. 18E

FIG. 18D

【 図 18 - 7 】

FIG. 18F



【 図 19 - 1 】

細胞のアミノ酸代謝プロセス  
 K562-miL21 221-miL21  
 D7 D14 D7 D14

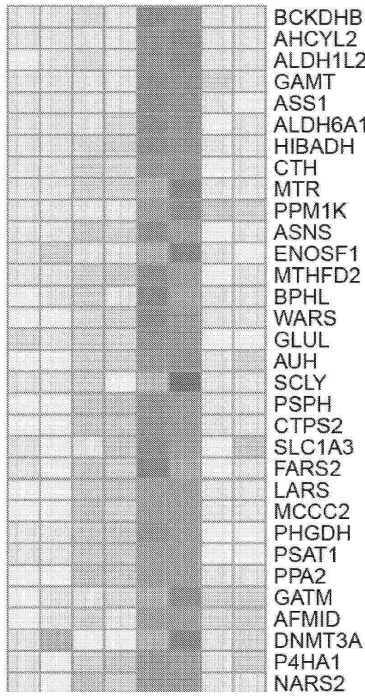


FIG. 19A



10

20

【 図 19 - 2 】

細胞のアミノ酸代謝プロセス

K562-miL21 221-miL21  
 D7 D14 D7 D14

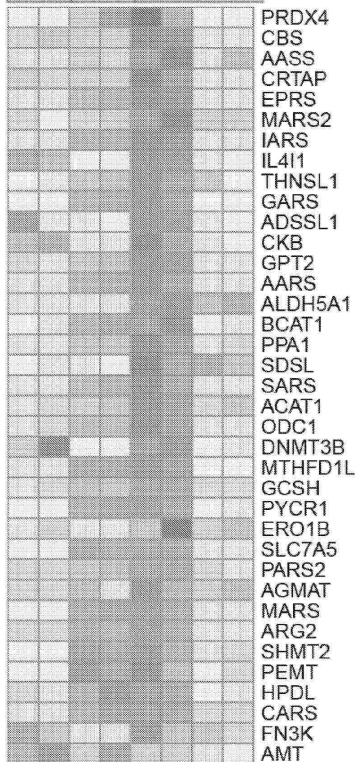
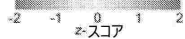


FIG. 19B



【 図 19 - 3 】

解糖

K562-miL21 221-miL21  
 D7 D14 D7 D14

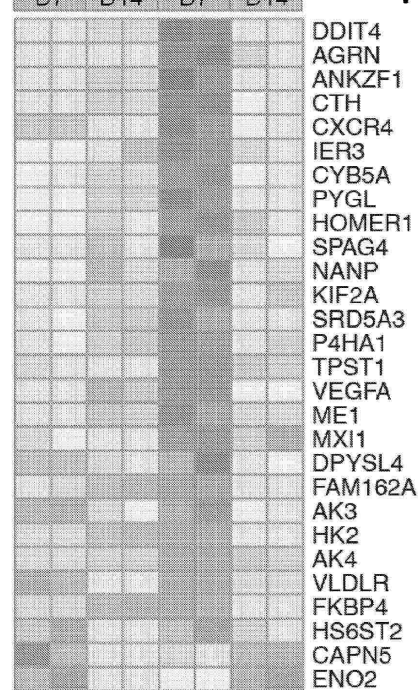
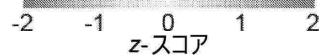


FIG. 19C



30

40

50

【図 19 - 4】

リンパ球活性化

K562-mIL21 221-mIL21  
D7 D14 D7 D14

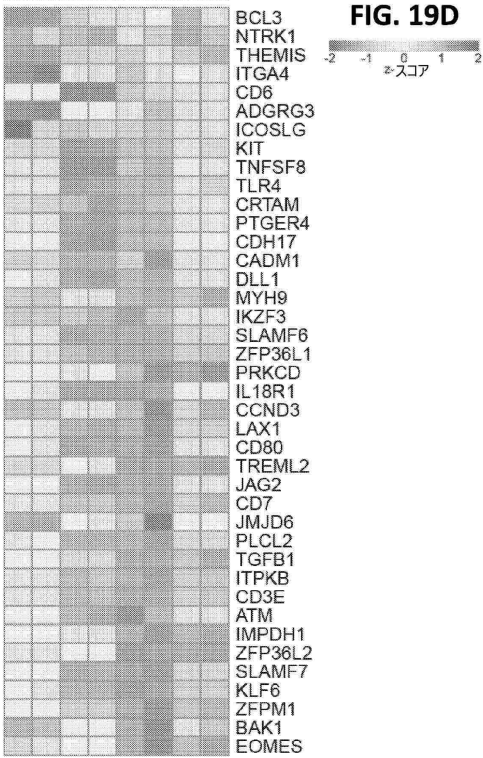


FIG. 19D

【図 19 - 5】

リンパ球活性化

K562-mIL21 221-mIL21  
D7 D14 D7 D14

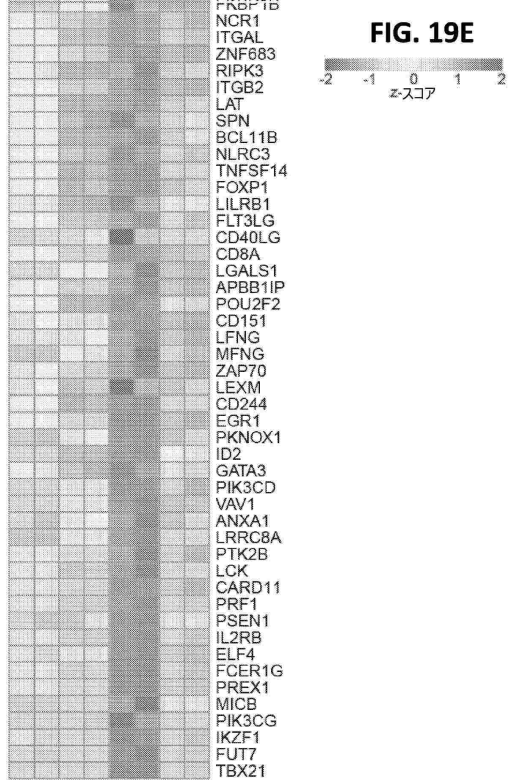


FIG. 19E

10

20

【図 19 - 6】

リンパ球分化

K562-mIL21 221-mIL21  
D7 D14 D7 D14

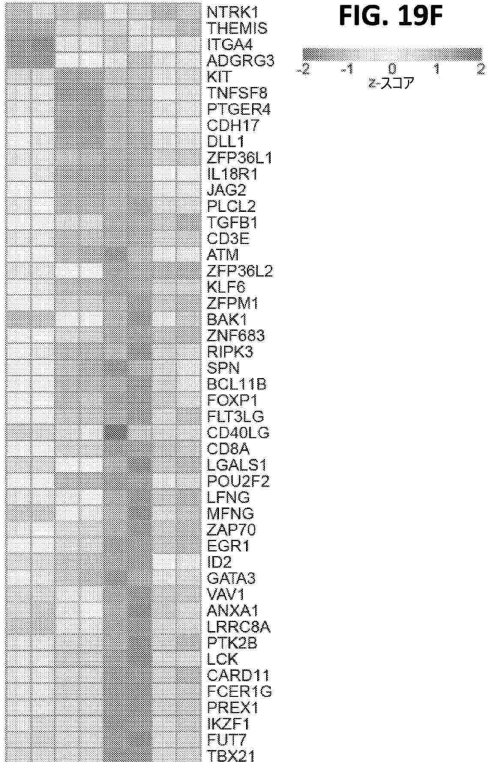


FIG. 19F

【図 19 - 7】

細胞-細胞接着

K562-mIL21 221-mIL21  
D7 D14 D7 D14

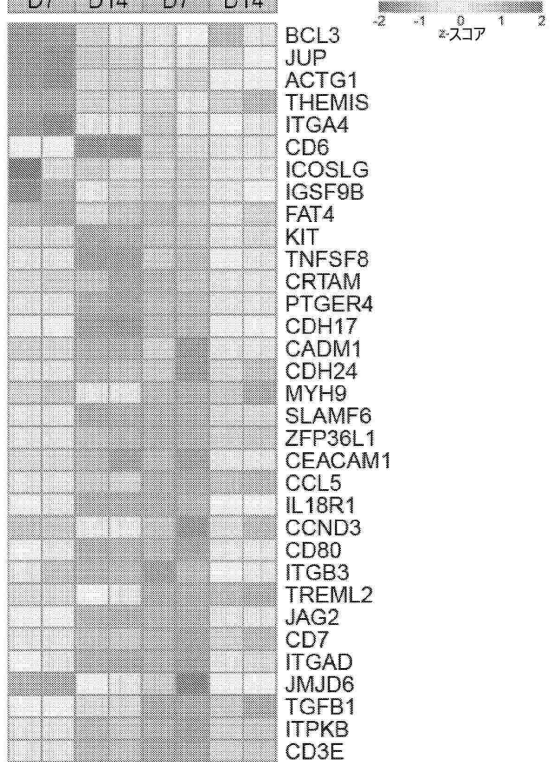


FIG. 19G

30

40

50

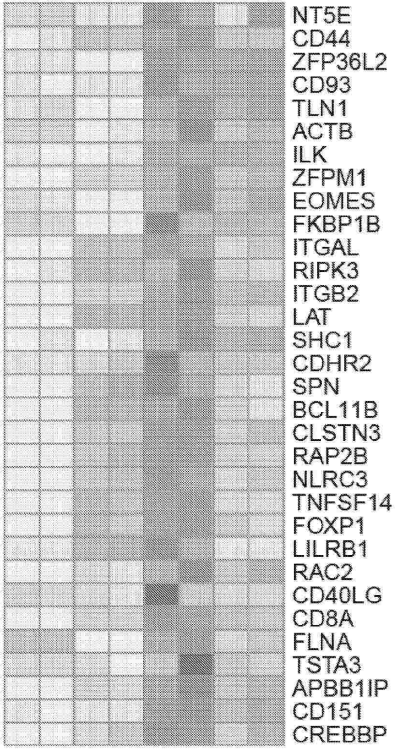
【図 19 - 8】

細胞-細胞接着

K562-mIL21		221-mIL21	
D7	D14	D7	D14

FIG. 19H

-2 -1 0 1 2  
zスコア



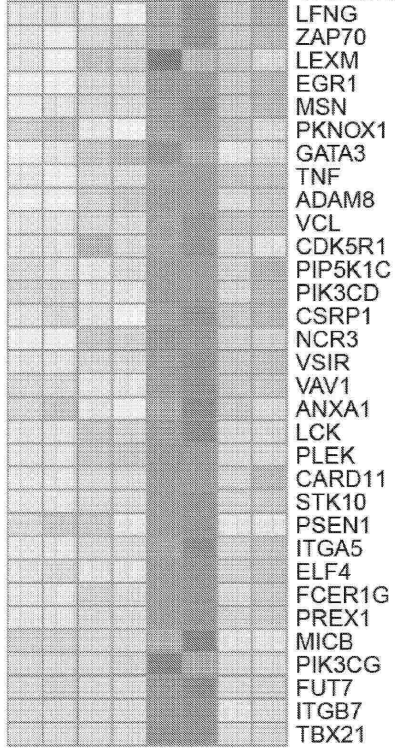
【図 19 - 9】

細胞-細胞接着

K562-mIL21		221-mIL21	
D7	D14	D7	D14

FIG. 19I

-2 -1 0 1 2  
zスコア



10

20

【配列表】

[0007575104000001.app](#)

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

F I

A 6 1 K	35/17	(2015.01)	A 6 1 K	35/17
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P	37/02	(2006.01)	A 6 1 P	37/02

弁護士 山本 健策

## (72)発明者

リウ, ドンファン

アメリカ合衆国 ニュージャージー 0 8 9 0 1, ニュー ブランswick, サマーセット ス  
トリート 8 3, ラトガーズ, ザ ステイト ユニバーシティ オブ ニュー ジャージー 気付

審査官 大久保 智之

## (56)参考文献

特表 2 0 2 0 - 5 1 6 2 3 8 ( J P , A )

Journal of Leukocyte Biology, 2015年, Vol.97, pp.761-767

## (58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 9 0

C 1 2 N 5 / 0 0 - 2 8

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 ( S T N )