

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6797803号  
(P6797803)

(45) 発行日 令和2年12月9日(2020.12.9)

(24) 登録日 令和2年11月20日(2020.11.20)

(51) Int.Cl.

F 1

A 61 K 35/17	(2015.01)	A 61 K 35/17
A 61 K 45/00	(2006.01)	A 61 K 45/00
A 61 P 35/00	(2006.01)	A 61 P 35/00
A 61 P 43/00	(2006.01)	A 61 P 43/00
A 61 K 39/395	(2006.01)	A 61 K 39/395

Z
1 2 1
E

請求項の数 17 (全 128 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-534929 (P2017-534929)
(86) (22) 出願日	平成27年12月30日 (2015.12.30)
(65) 公表番号	特表2018-502114 (P2018-502114A)
(43) 公表日	平成30年1月25日 (2018.1.25)
(86) 國際出願番号	PCT/US2015/068069
(87) 國際公開番号	W02016/109668
(87) 國際公開日	平成28年7月7日 (2016.7.7)
審査請求日	平成30年12月28日 (2018.12.28)
(31) 優先権主張番号	62/139,952
(32) 優先日	平成27年3月30日 (2015.3.30)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国(US)
(31) 優先権主張番号	62/098,547
(32) 優先日	平成26年12月31日 (2014.12.31)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国(US)

(73) 特許権者	509307635 セルジーン コーポレイション アメリカ合衆国 ニュージャージー O 7 9 0 1, サミット, モ里斯 アベニュー 8 6
(74) 代理人	100097456 弁理士 石川 徹
(72) 発明者	リン カング アメリカ合衆国 ニュージャージー州 O 8 8 2 0 エディソン ティンバー オー クス ロード 1 1 0 6
(72) 発明者	キアオクイ ズハング アメリカ合衆国 ニュージャージー州 O 7 0 3 9 リビングストン マウントヘブ ン ドライブ 1 0

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ナチュラルキラー細胞を用いて血液障害、 固形腫瘍、 又は感染性疾患を治療する方法

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

単離された活性化ナチュラルキラー(NK)細胞の集団を含む、癌を治療するための医薬組成物であって、

該活性化NK細胞は、キメラ抗原受容体(CAR)及びホーミング受容体を発現し、該CARは、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内刺激ドメイン、及び共刺激ドメインを含み、該ホーミング受容体は、VEGFR2又はCCR7である、前記医薬組成物。

## 【請求項 2】

前記CAR及びホーミング受容体を含む活性化NK細胞が、該CARを発現するよう操作されたCD34+造血幹細胞(HSC)に由来する、請求項1記載の医薬組成物。

10

## 【請求項 3】

前記細胞外ドメインが、CD123、CLL-1、CD38、及びCS-1に特異的に結合する、請求項1又は2記載の医薬組成物。

## 【請求項 4】

前記共刺激ドメインが、CD28、4-1BB、PD-1、OX40、CTLA-4、Kp46、Kp44、Kp30、DAP10又はDAP12の細胞内ドメインを含む、請求項1~3のいずれか一項記載の医薬組成物。

## 【請求項 5】

前記単離された活性化NK細胞の集団が、注射、輸液、静脈内(IV)投与、大腿内投与、又は腫瘍内投与により投与されるように用いられる、請求項1~4のいずれか一項記載の医薬組成物。

20

**【請求項 6】**

前記単離された活性化NK細胞の集団が、デバイス、マトリックス、又はスキャフォールドを用いて投与されるように用いられる、請求項1～5のいずれか一項記載の医薬組成物。

**【請求項 7】**

前記活性化NK細胞が、該細胞表面でフコシル化されている、請求項1～6のいずれか一項記載の医薬組成物。

**【請求項 8】**

前記単離された活性化NK細胞の集団が、単回投与で投与されるように用いられる、請求項1～7のいずれか一項記載の医薬組成物。

**【請求項 9】**

前記単離された活性化NK細胞の集団が、複数回投与で投与されるように用いられる、請求項1～7のいずれか一項記載の医薬組成物。

**【請求項 10】**

前記癌が、血液癌である、請求項1～9のいずれか一項記載の医薬組成物。

**【請求項 11】**

前記癌が、固体腫瘍である、請求項1～9のいずれか一項記載の医薬組成物。

**【請求項 12】**

前記単離された活性化NK細胞の集団が、免疫チェックポイントタンパク質に特異的に結合し、かつ該免疫チェックポイントタンパク質の活性と拮抗する抗体又はその抗原結合性断片の投与の前、投与の後、又は投与と同時に投与されるように用いられる、請求項1～11のいずれか一項記載の医薬組成物。

**【請求項 13】**

前記抗体が、モノクローナル抗体であり、前記免疫チェックポイントタンパク質が、CTLA-4、PD-1、PD-L1、PD-L2、又はLAG-3である、請求項12記載の医薬組成物。

**【請求項 14】**

前記単離された活性化NK細胞の集団が、二重特異性キラー細胞エンゲージャー(BiKE)の投与の前、投与の後、又は投与と同時に投与されるように用いられ、該BiKEが、腫瘍関連抗原(TAA)に特異的に結合する第一の单鎖可变断片(scFv)を含む、請求項1～13のいずれか一項記載の医薬組成物。

**【請求項 15】**

前記医薬組成物は、前記単離された活性化NK細胞の集団が、TAAの投与前、投与後、又は投与と同時に投与されるように用いられ、前記TAAが、CD123、CLL-1、CD38、CS-1、CD138、ROR1、FAP、MUC1、PSCA、EGFRvIII、EPHA2、又はGD2である、請求項14記載の医薬組成物。

**【請求項 16】**

癌を治療するためのキットであって：

(i) 単離された活性化ナチュラルキラー(NK)細胞の集団、又は該単離された活性化NK細胞の集団を含む医薬組成物であって、

該活性化NK細胞は、キメラ抗原受容体(CAR)及びホーミング受容体を発現し、該CARは、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内刺激ドメイン、及び共刺激ドメインを含み、該ホーミング受容体は、VEGFR2又はCCR7である、前記集団又は医薬組成物；及び

(ii) 該癌を治療するために使用することができる第二の薬剤又は該第二の薬剤を含む医薬組成物、

を含む、前記キット。

**【請求項 17】**

前記第二の薬剤が、抗炎症剤、免疫調節剤、細胞傷害性薬剤、癌ワクチン、化学療法剤、HDAC阻害剤、又はsiRNAである、請求項16記載のキット。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

10

20

30

40

50

本出願は、各々の開示のその全体が引用により本明細書に組み込まれている、2014年12月31日に出願された米国仮特許出願第62/098,547号、及び2015年3月30日に出願された米国仮特許出願第62/139,952号の利益を主張する。

【0002】

(1. 分野)

本明細書において提供されるものは、ナチュラルキラー細胞を第二の薬剤と組み合わせて用いて、又は標的特異性及び/又はホーミング特異性のための遺伝子改変を伴うナチュラルキラー細胞を用いて、それを必要としている対象における、血液障害、 固形腫瘍、又は感染性疾患を治療する方法である。

【背景技術】

10

【0003】

(2. 背景)

ナチュラルキラー(NK)細胞は、自然免疫系の主要成分を構成する細胞傷害性のリンパ球である。

【0004】

NK細胞は、インターフェロン又はマクロファージ由来のサイトカインに応答して活性化される。NK細胞は、該細胞の細胞傷害活性を制御する「活性化受容体」と「抑制性受容体」とに分類される2種類の表面受容体を保有する。

【0005】

数ある活性の中でも特に、NK細胞は、腫瘍の宿主拒絶反応において役割を果たし、ウイルス感染細胞を死滅させることができることが示されている。ナチュラルキラー細胞は、主要組織適合複合体(MHC)タンパク質を欠く又はそれの減少したレベルを示す細胞により活性化され得る。活性化されて増殖したNK細胞及び末梢血由来のLAK細胞は、進行したがんを有する患者のエクスピボ療法及びインビボで治療の双方において用いられており、骨髄関連疾患、例えば、白血病；乳がん；及びある種のリンパ腫に対していくらかの成功を収めている。

20

【0006】

腫瘍細胞及びウイルス感染細胞を死滅させることにおけるNK細胞の有利な性質にもかかわらず、より効果のあるNK細胞、及びNK細胞を利用するより効果のある治療レジメンの開発がいまだ強く必要とされている。

30

【発明の概要】

【0007】

(3. 発明の概要)

本発明は、それを必要としている対象において、疾患(例えば、血液障害、 固形腫瘍、又は感染性疾患)を治療する方法であって、ナチュラルキラー(NK)細胞を、該疾患を治療するために使用することができる第二の薬剤と組み合わせて用いる、前記方法を提供する。本明細書においては、それを必要としている対象において、疾患(例えば、血液障害、 固形腫瘍、又は感染性疾患)を治療する方法であって、標的特異性及び/又はホーミング特異性のための遺伝子改変を伴うNK細胞(例えば、キメラ抗原受容体(CAR)及び/又はホーミング受容体を含むNK細胞)を用いる、前記方法も提供される。

40

【0008】

一態様において、本明細書において提供されるものは、それを必要としている対象におけるがんを治療する方法であって、(a)該対象に、単離されたナチュラルキラー(NK)細胞の集団又はその医薬組成物を投与すること；及び(b)該対象に、該がんを治療するために使用することができる第二の薬剤又はその医薬組成物を投与すること；を含む、前記方法である。具体的な実施態様において、該がんは、多発性骨髄腫である。

【0009】

ある実施態様において、前記第二の薬剤は、腫瘍関連抗原(TAA)に特異的に結合する抗体又はその抗原結合性断片である。具体的な実施態様において、前記抗体は、モノクローナル抗体である。具体的な実施態様において、前記TAAは、CD123、CLL-1、CD38、CS-1(SL

50

AM7、SLAMF7、CD319、及びCRACCとも称する)、CD138、ROR1、FAP、MUC1、PSCA、EGFRvIII、EPHA2、及びGD2からなる群から選択される。より具体的な実施態様において、前記第二の薬剤は、CS-1に結合する抗体である。より具体的な実施態様において、前記第二の薬剤は、エロツズマブ(HuLuc63、Bristol Myers-Squibb/AbbVieヒト化抗CS-1モノクローナル抗体)である。

#### 【0010】

ある実施態様において、前記第二の薬剤は、腫瘍微小環境関連抗原(TMAA)に特異的に結合する抗体又はその抗原結合性断片である。具体的な実施態様において、前記抗体は、モノクローナル抗体である。具体的な実施態様において、前記TMAAは、VEGF-A、EGF、PDGF、IGF、及びbFGFからなる群から選択される。

10

#### 【0011】

ある実施態様において、前記第二の薬剤は、免疫チェックポイントタンパク質に特異的に結合し、かつ該免疫チェックポイントタンパク質の活性と拮抗する抗体又はその抗原結合性断片である。具体的な実施態様において、前記抗体は、モノクローナル抗体である。具体的な実施態様において、前記免疫チェックポイントタンパク質は、CTLA-4、PD-1、PD-L1、PD-L2、及びLAG-3からなる群から選択される。

#### 【0012】

ある実施態様において、前記第二の薬剤は、二重特異性キラー細胞エンゲージャー(BiKE)である。具体的な実施態様において、前記BiKEは、TAAに特異的に結合する第一の単鎖可変断片(scFv)を含む。さらに具体的な実施態様において、前記TAAは、CD123、CLL-1、CD38、CS-1、CD138、ROR1、FAP、MUC1、PSCA、EGFRvIII、EPHA2、及びGD2からなる群から選択される。具体的な実施態様において、前記BiKEは、CD16に特異的に結合する第二のscFvを含む。

20

#### 【0013】

ある実施態様において、前記第二の薬剤は、抗炎症剤である。

#### 【0014】

ある実施態様において、前記第二の薬剤は、免疫調節剤である。具体的な実施態様において、前記第二の薬剤は、レナリドミド又はポマリドミドである。

#### 【0015】

ある実施態様において、前記第二の薬剤は、細胞傷害性薬剤である。

30

#### 【0016】

ある実施態様において、前記第二の薬剤は、がんワクチンである。

#### 【0017】

ある実施態様において、前記第二の薬剤は、化学療法剤である。

#### 【0018】

ある実施態様において、前記第二の薬剤は、HDAC阻害剤である。他の具体的な実施態様において、前記第二の薬剤は、ロミデプシン(ISTODAX(登録商標)、セルジーン)である。

#### 【0019】

ある実施態様において、前記第二の薬剤は、siRNAである。

#### 【0020】

いくつかの実施態様において、前記単離されたNK細胞の集団又はその医薬組成物は、前記第二の薬剤又はその医薬組成物の前に投与される。いくつかの実施態様において、前記単離されたNK細胞の集団又はその医薬組成物は、前記第二の薬剤又はその医薬組成物の後に投与される。他の実施態様において、前記単離されたNK細胞の集団又はその医薬組成物は、前記第二の薬剤又はその医薬組成物と同時に投与される。

40

#### 【0021】

具体的な実施態様において、前記対象に、単離されたNK細胞の集団又はその医薬組成物を投与する工程は、注射、輸液、静脈内(IV)投与、大腿内投与、又は腫瘍内投与によるものである。具体的な実施態様において、前記対象に、単離されたNK細胞の集団又はその医薬組成物を投与する工程は、デバイス(devise)、マトリックス、又はスキヤフォールドを

50

用いて行なわれる。具体的な実施態様において、前記対象に、単離されたNK細胞の集団又はその医薬組成物を投与する工程は、注射によるものである。具体的な実施態様において、前記NK細胞の注射は、局所注射である。より具体的な実施態様において、前記局所注射は、固体腫瘍(例えば、肉腫)中に直接に行う。具体的な実施態様において、NK細胞の投与は、シリンジによる注射によるものである。具体的な実施態様において、注射によるNK細胞の投与は、腹腔鏡検査、内視鏡検査、超音波、コンピュータ断層撮影、磁気共鳴、又は放射線医学によって補助される。

#### 【0022】

具体的な実施態様において、前記対象に、第二の薬剤又はその医薬組成物を投与する前記工程は、注射、輸液、静脈内(IV)投与、大腿内投与、又は腫瘍内投与によるものである。  
10 具体的な実施態様において、前記対象に、第二の薬剤又はその医薬組成物を投与する前記工程は、デバイス、マトリックス、又はスキヤフォールドを用いて行なわれる。

#### 【0023】

様々な実施態様において、前記NK細胞は、細胞表面でフコシル化されている。

#### 【0024】

いくつかの実施態様において、前記単離されたNK細胞の集団又はその医薬組成物は、単回投与で投与される。他の実施態様において、前記単離されたNK細胞の集団又はその医薬組成物は、複数回投与で投与される。

#### 【0025】

いくつかの実施態様において、前記第二の薬剤又はその医薬組成物は、単回投与で投与される。他の実施態様において、前記第二の薬剤又はその医薬組成物は、複数回投与で投与される。  
20

#### 【0026】

別の態様において、本明細書において提供されるものは、それを必要としている対象におけるがんを治療する方法であって、該対象に、単離されたNK細胞の集団又はその医薬組成物を投与することを含み、該NK細胞が、キメラ抗原受容体(CAR)を含み、該CARが、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内刺激ドメイン、及び任意に共刺激ドメインを含む、前記方法である。本明細書においては、それを必要としている対象におけるがんを治療する方法であって、該対象に、単離されたNK細胞の集団又はその医薬組成物を投与することを含み、該NK細胞が、ホーミング受容体を含む、前記方法、及びそれを必要としている対象におけるがんを治療する方法であって、該対象に、単離されたナチュラルキラー(NK)細胞の集団又はその医薬組成物を投与することを含み、該NK細胞が、キメラ抗原受容体(CAR)及びホーミング受容体を含み、該CARが、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内刺激ドメイン、及び任意に共刺激ドメインを含む、前記方法も提供される。様々な実施態様において、前記CARは、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内刺激ドメイン、及び共刺激ドメインを含む。  
30

#### 【0027】

具体的な実施態様において、前記CAR及び/又は前記ホーミング受容体を含む前記NK細胞は、該CAR及び/又は該ホーミング受容体を発現するよう操作されたCD34+造血幹細胞(HSC)に由来する。  
40

#### 【0028】

様々な実施態様において、前記CARの前記細胞外ドメインは、抗原結合性ドメインである。具体的な実施態様において、前記抗原結合性ドメインは、scFvドメインである。ある実施態様において、前記抗原結合性ドメインは、TAAに特異的に結合する。具体的な実施態様において、前記TAAは、CD123、CLL-1、CD38、CD20、及びCS-1からなる群から選択される。より具体的な実施態様において、前記抗原結合ドメインは、CS-1に結合する抗体由來の单鎖Fv(scFv)又は抗原結合性断片を含む。より具体的な実施態様において、前記抗原結合ドメインは、エロツズマブの单鎖バージョン及び/又はエロツズマブの抗原結合性断片を含む。具体的な実施態様において、前記抗原結合ドメインは、CD20に結合する抗体由來の单鎖Fv(scFv)又は抗原結合性断片を含む。  
50

**【 0 0 2 9 】**

様々な実施態様において、前記CARの前記細胞内刺激ドメインは、CD3ゼータシグナル伝達ドメインである。

**【 0 0 3 0 】**

様々な実施態様において、前記CARの前記共刺激ドメインは、CD28、4-1BB、PD-1、OX40、CTLA-4、NKp46、NKp44、NKp30、DAP10、又はDAP12の細胞内ドメインを含む。

**【 0 0 3 1 】**

様々な実施態様において、前記ホーミング受容体は、走化性受容体である。具体的な実施態様において、前記走化性受容体は、CXCR4、VEGFR2、及びCCR7からなる群から選択される。

10

**【 0 0 3 2 】**

一実施態様において、本明細書において提供されるのは、多発性骨髄腫を有する個体を治療する方法であって、該個体に(1)レナリドミド又はポマリドミド、及び(2)CARを含むNK細胞(「CAR NK細胞」)を投与することを含み、該CAR NK細胞が、該個体における多発性骨髄腫を治療するのに効果的なものである、前記方法である。多発性骨髄腫の個体を治療する方法の具体的な実施態様において、前記CAR NK細胞は、CAR細胞外ドメインを含み、該細胞外ドメインは、CS-1結合ドメインである。具体的な実施態様において、前記CS-1結合ドメインは、CS-1に結合する抗体のscFv又は抗原結合性断片を含む。具体的な実施態様において、前記CS-1結合ドメインは、エロツズマブの単鎖バージョン及び/又はエロツズマブの抗原結合性断片を含む。

20

**【 0 0 3 3 】**

別の実施態様において、本明細書において提供されるのは、多発性骨髄腫を有する個体を治療する方法であって、該個体に、(1)レナリドミド又はポマリドミド;(2)エロツズマブ;及び(3)CAR NK細胞を投与することを含み、該CAR NK細胞が、該個体における多発性骨髄腫を治療するのに効果的なものである、前記方法である。多発性骨髄腫の個体を治療する方法の具体的な実施態様において、前記CAR NK細胞は、CAR細胞外ドメインを含み、該細胞外ドメインは、CS-1結合ドメインである。具体的な実施態様において、前記CS-1結合ドメインは、CS-1に結合する抗体のscFv又は抗原結合性断片を含む。

**【 0 0 3 4 】**

別の実施態様において、本明細書において提供されるのは、血液がん(例えば、バーキットリンパ腫)を有する個体を治療する方法であって、該個体に、(1)ロミデプシン、及び(2)CAR NK細胞を投与することを含み、該CAR NK細胞が、該個体における該血液がん(例えば、バーキットリンパ腫)を治療するのに効果的なものである、前記方法である。血液がん(例えば、バーキットリンパ腫)の個体を治療する方法の具体的な実施態様において、前記CAR NK細胞は、CAR細胞外ドメインを含み、該細胞外ドメインは、CD20結合ドメインである。具体的な実施態様において、該CD20結合ドメインは、CD20に結合する抗体のscFv又は抗原結合性断片を含む。

30

**【 0 0 3 5 】**

具体的な実施態様において、前記対象に、単離されたNK細胞の集団又はその医薬組成物を投与する工程は、注射、輸液、静脈内(IV)投与、大腿内投与、又は腫瘍内投与によるものである。具体的な実施態様において、前記対象に、単離されたNK細胞の集団又はその医薬組成物を投与する工程は、デバイス、マトリックス、又はスキャフォールドを用いて行なわれる。具体的な実施態様において、前記対象に、単離されたNK細胞の集団又はその医薬組成物を投与する工程は、注射によるものである。具体的な実施態様において、前記NK細胞の注射は、局所注射である。より具体的な実施態様において、該局所注射は、固形腫瘍(例えば、肉腫)中に直接に行う。具体的な実施態様において、NK細胞の投与は、シリンジによる注射によるものである。具体的な実施態様において、注射によるNK細胞の投与は、腹腔鏡検査、内視鏡検査、超音波、コンピュータ断層撮影、磁気共鳴、又は放射線医学によって補助される。

40

**【 0 0 3 6 】**

50

様々な実施態様において、前記NK細胞は、細胞表面でフコシル化されている。

【0037】

いくつかの実施態様において、前記単離されたNK細胞の集団又はその医薬組成物は、単回投与で投与される。他の実施態様において、前記単離されたNK細胞の集団又はその医薬組成物は、複数回投与で投与される。

【0038】

別の態様において、本明細書において提供されるものは、それを必要としている対象においてウイルス感染を治療する方法であって:(a)該対象に、単離されたナチュラルキラー(NK)細胞の集団又はその医薬組成物を投与すること;及び(b)該対象に、該ウイルス感染を治療するために使用することができる第二の薬剤又はその医薬組成物を投与することを含む、前記方法である。

10

【0039】

ある実施態様において、前記第二の薬剤は、免疫チェックポイントタンパク質に特異的に結合し、かつ該免疫チェックポイントタンパク質の活性と拮抗する抗体又はその抗原結合性断片である。具体的な実施態様において、前記抗体は、モノクローナル抗体である。具体的な実施態様において、前記免疫チェックポイントタンパク質は、CTLA-4、PD-1、PD-L1、PD-L2、及びLAG-3からなる群から選択される。

【0040】

ある実施態様において、前記第二の薬剤は、二重特異性キラー細胞エンゲージャー(BiKE)である。

20

【0041】

いくつかの実施態様において、前記単離されたNK細胞の集団又はその医薬組成物は、前記第二の薬剤又はその医薬組成物の前に投与される。いくつかの実施態様において、前記単離されたNK細胞の集団又はその医薬組成物は、前記第二の薬剤又はその医薬組成物の後に投与される。他の実施態様において、前記単離されたNK細胞の集団又はその医薬組成物は、前記第二の薬剤又はその医薬組成物と一緒に投与される。

【0042】

具体的な実施態様において、前記対象に、単離されたNK細胞の集団又はその医薬組成物を投与する工程は、注射、輸液、静脈内(IV)投与、大腿内投与、又は腫瘍内投与によるものである。具体的な実施態様において、前記対象に、単離されたNK細胞の集団又はその医薬組成物を投与する工程は、デバイズ、マトリックス、又はスキヤフォールドを用いて行なわれる。具体的な実施態様において、前記対象に、単離されたNK細胞の集団又はその医薬組成物を投与する工程は、注射によるものである。具体的な実施態様において、前記NK細胞の注射は、局所注射である。より具体的な実施態様において、前記局所注射は、固形腫瘍(例えば、肉腫)中に直接に行う。具体的な実施態様において、NK細胞の投与は、シリンジによる注射によるものである。具体的な実施態様において、注射によるNK細胞の投与は、腹腔鏡検査、内視鏡検査、超音波、コンピュータ断層撮影、磁気共鳴、又は放射線医学により補助される。

30

【0043】

具体的な実施態様において、前記対象に、第二の薬剤又はその医薬組成物を投与する前記工程は、注射、輸液、静脈内(IV)投与、大腿内投与、又は腫瘍内投与によるものである。具体的な実施態様において、前記対象に、第二の薬剤又はその医薬組成物を投与する前記工程は、デバイズ、マトリックス、又はスキヤフォールドを用いて行なわれる。

40

【0044】

様々な実施態様において、前記NK細胞は、細胞表面でフコシル化されている。

【0045】

いくつかの実施態様において、前記単離されたNK細胞の集団又はその医薬組成物は、単回投与で投与される。他の実施態様において、前記単離されたNK細胞の集団又はその医薬組成物は、複数回投与で投与される。

【0046】

50

いくつかの実施態様において、前記第二の薬剤又はその医薬組成物は、単回投与で投与される。他の実施態様において、前記第二の薬剤又はその医薬組成物は、複数回投与で投与される。

#### 【0047】

別の態様において、本明細書において提供されるものは、それを必要としている対象においてウイルス感染を治療する方法であって、該対象に、単離されたNK細胞の集団又はその医薬組成物を投与することを含み、該NK細胞が、キメラ抗原受容体(CAR)を含み、該CARが、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内刺激ドメイン、及び任意に共刺激ドメインを含む、前記方法である。本明細書においては、それを必要としている対象においてウイルス感染を治療する方法であって、該対象に、単離されたNK細胞の集団又はその医薬組成物を投与することを含み、該NK細胞が、ホーミング受容体を含む、前記方法、及びそれを必要としている対象においてウイルス感染を治療する方法であって、該対象に、単離されたナチュラルキラー(NK)細胞の集団又はその医薬組成物を投与することを含み、該NK細胞が、キメラ抗原受容体(CAR)及びホーミング受容体を含み、該CARが、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内刺激ドメイン、及び任意に共刺激ドメインを含む、前記方法も提供される。様々な実施態様において、前記CARは、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内刺激ドメイン、及び共刺激ドメインを含む。10

#### 【0048】

具体的な実施態様において、前記CAR及び/又は前記ホーミング受容体を含む前記NK細胞は、該CAR及び/又は該ホーミング受容体を発現するよう操作されたCD34+造血幹細胞(HSC)に由来する。20

#### 【0049】

様々な実施態様において、前記CARの前記細胞外ドメインは、抗原結合性ドメインである。具体的な実施態様において、前記抗原結合性ドメインは、scFvドメインである。

#### 【0050】

様々な実施態様において、前記CARの前記細胞内刺激ドメインは、CD3ゼータシグナル伝達ドメインである。

#### 【0051】

様々な実施態様において、前記CARの前記共刺激ドメインは、CD28、4-1BB、PD-1、OX40、CTLA-4、NKP46、NKP44、NKP30、DAP10、又はDAP12の細胞内ドメインを含む。30

#### 【0052】

様々な実施態様において、前記ホーミング受容体は、走化性受容体である。具体的な実施態様において、前記走化性受容体は、CXCR4、VEGFR2、及びCCR7からなる群から選択される。

#### 【0053】

具体的な実施態様において、前記対象に、単離されたNK細胞の集団又はその医薬組成物を投与する工程は、注射、輸液、静脈内(IV)投与、大腿内投与、又は腫瘍内投与によるものである。具体的な実施態様において、前記対象に、単離されたNK細胞の集団又はその医薬組成物を投与する工程は、デバイズ、マトリックス、又はスキヤフォールドを用いて行なわれる。具体的な実施態様において、前記対象に、単離されたNK細胞の集団又はその医薬組成物を投与する工程は、注射によるものである。具体的な実施態様において、前記NK細胞の注射は、局所注射である。より具体的な実施態様において、前記局所注射は、固形腫瘍(例えは、肉腫)中に直接に行う。具体的な実施態様において、NK細胞の投与は、シリンジによる注射によるものである。具体的な実施態様において、注射によるNK細胞の投与は、腹腔鏡検査、内視鏡検査、超音波、コンピュータ断層撮影、磁気共鳴、又は放射線医学によって補助される。40

#### 【0054】

様々な実施態様において、前記NK細胞は、細胞表面でフコシル化されている。

#### 【0055】

いくつかの実施態様において、前記単離されたNK細胞の集団又はその医薬組成物は、单50

回投与で投与される。他の実施態様において、前記単離されたNK細胞の集団又はその医薬組成物は、複数回投与で投与される。

#### 【0056】

本発明はまた、それを必要としている対象において疾患(例えば、血液障害、固形腫瘍、又は感染性疾患)を治療するためのキットであって、単離されたNK細胞の集団及び該疾患を治療するために使用することができる第二の薬剤を含む該キットを提供する。

#### 【0057】

一態様において、本明細書において提供されるものは、それを必要としている対象におけるがんを治療するキットであって:(a)単離されたNK細胞の集団又はその医薬組成物;及び(b)該がんを治療するために使用することができる第二の薬剤又はその医薬組成物を含む、前記キットである。前記第二の薬剤は、上で提供されるようながんを治療する方法において用いてもよい任意のものとすることができます。10

#### 【0058】

別の態様において、本明細書において提供されるものは、それを必要としている対象においてウイルス感染を治療するためのキットであって:(a)単離されたNK細胞の集団又はその医薬組成物;及び(b)該ウイルス感染を治療するために使用することができる第二の薬剤又はその医薬組成物を含む、前記キットである。該第二の薬剤は、上で提供されるようなウイルス感染を治療する方法において用いてもよい任意のものとすることができます。

#### 【0059】

本明細書において提供される方法又はキットの種々の実施態様において、前記NK細胞は、胎盤中間ナチュラルキラー(PiNK)細胞である。ある実施態様において、前記PiNK細胞は、胎盤細胞に由来する。具体的な実施態様において、該胎盤細胞は、胎盤灌流液から得られる。具体的な実施態様において、前記胎盤細胞は、機械的及び/又は酵素的に破壊されている胎盤組織から得られる。20

#### 【0060】

本明細書において提供される方法又はキットの種々の実施態様において、前記NK細胞は、活性化NK細胞である。ある実施態様において、前記活性化NK細胞は:(a)造血幹細胞又は前駆細胞の集団が増殖し、該造血幹細胞又は前駆細胞の集団内の複数の造血幹細胞又は前駆細胞が、該増殖の間にNK細胞に分化するように、該集団を、インターロイキン-15(IL-15)、並びに任意に、幹細胞因子(SCF)及びインターロイキン-7(IL-7)のうちの1つ以上を含む第一の培地中に播種すること(ここで、該IL-15並びに任意のSCF及びIL-7は、該培地の不確定成分中には含まれない);及び(b)前記工程(a)由来の細胞を、インターロイキン-2(IL-2)を含む第二の培地の中で増殖させて、活性化NK細胞の集団を製造すること、を含むプロセスにより製造される。ある実施態様において、前記活性化NK細胞は:造血幹細胞又は前駆細胞の集団を、幹細胞因子(SCF)、インターロイキン-7(IL-7)、及びインターロイキン-15(IL-15)のうちの1つ以上を含む第一の培地の中で増殖させることを含むプロセスであって、該SCF、IL-7、及びIL-15は、該培地の不確定成分中には含まれず、かつ該造血幹細胞又は前駆細胞の集団内の複数の造血幹細胞又は前駆細胞が、該増殖の間にNK細胞に分化し;かつ該方法の第二の工程が、前記第一の工程由来の細胞を、インターロイキン-2(IL-2)を含む第二の培地の中で増殖させて、活性化NK細胞を製造することを含む、前記プロセスにより製造される。30

#### 【0061】

具体的な実施態様において、前記第一の培地は、Fms様チロシンキナーゼ3リガンド(Flt3-L)、トロンボポエチン(Tpo)、インターロイキン-2(IL-2)、又はヘパリンのうちの1つ以上をさらに含む。さらに具体的な実施態様において、該第一の培地は、ウシ胎仔血清又はヒト血清をさらに含む。さらに具体的な実施態様において、前記SCFは、前記第一の培地中に、約1~約150ng/mLの濃度で存在する。さらに具体的な実施態様において、前記Flt3-Lは、前記第一の培地中に、約1~約150ng/mLの濃度で存在する。さらに具体的な実施態様において、前記IL-2は、前記第一の培地中に、約50~約1500IU/mLの濃度で存在する。さらに具体的な実施態様において、前記IL-7は、前記第一の培地中に、約1~約150ng/mLの濃度で存在する。40

濃度で存在する。さらに具体的な実施態様において、前記IL-15は、前記第一の培地中に、1～約150ng/mLの濃度で存在する。さらに具体的な実施態様において、前記Tpoは、前記第一の培地中に、約1～約150ng/mLの濃度で存在する。さらに具体的な実施態様において、前記ヘパリンは、前記第一の培地中に、約0.1～約30U/mLの濃度で存在する。

【0062】

具体的な実施態様において、上記第二の工程における前記IL-2は、前記第二の培地中に、50～約1500IU/mLの濃度で存在する。

【0063】

具体的な実施態様において、前記第二の培地は、ウシ胎仔血清(FCS)、トランスフェリン、インスリン、エタノールアミン、オレイン酸、リノール酸、パルミチン酸、ウシ血清アルブミン(BSA)、及びフィトヘマグルチニンのうちの1つ以上をさらに含む。10

【0064】

具体的な実施態様において、前記造血幹細胞又は前駆細胞は、CD34<sup>+</sup>である。

【0065】

具体的な実施態様において、前記造血幹細胞又は前駆細胞は、ヒト胎盤灌流液由来の造血幹細胞又は前駆細胞、及び臍帯由来の造血幹細胞又は前駆細胞を含み、該胎盤灌流液及び該臍帯血は、同じ胎盤由来のものである。

【0066】

具体的な実施態様において、上記工程(b)における前記フィーダー細胞は、マイトイシンCで処理された末梢血単核細胞(PBMC)、K562細胞、又は組織培養物接着性幹細胞を含む。20

【0067】

具体的な実施態様において、前記NK細胞は、CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>である。さらに具体的な実施態様において、前記NK細胞はさらに、CD94<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup>である。別のさらに具体的な実施態様において、前記NK細胞はさらに、CD161<sup>-</sup>である。別のさらに具体的な実施態様において、前記NK細胞はさらに、NKG2D<sup>+</sup>である。別のさらに具体的な実施態様において、前記NK細胞はさらに、NKp46<sup>+</sup>である。別のさらに具体的な実施態様において、前記NK細胞はさらに、CD226<sup>+</sup>である。

【0068】

本明細書において提供される方法又はキットの種々の実施態様において、前記NK細胞は、三工程プロセスNK(TSPNK)細胞である。具体的な実施態様において、前記TSPNK細胞は、NK前駆細胞である。ある実施態様において、前記TSPNK細胞は:(a)造血幹細胞又は前駆細胞を、Flt3L、TPO、SCF、IL-7、G-CSF、IL-6、及びGM-CSFを含む第一の培地中で培養すること;(b)それに続き、該細胞を、Flt3L、SCF、IL-15、及びIL-7、IL-17及びIL-15、G-CSF、IL-6、及びGM-CSFを含む第二の培地中で培養すること;及び(c)それに続き、該細胞を、SCF、IL-15、IL-7、IL-2、G-CSF、IL-6、及びGM-CSFを含む第三の培地中で培養すること、を含むプロセスにより製造される。30

【0069】

具体的な実施態様において、培養工程(a)の期間は、7～9日であり、培養工程(b)の期間は、5～7日であり、かつ培養工程(c)の期間は、5～9日である。具体的な実施態様において、培養工程(a)の期間は、7～9日であり、培養工程(b)の期間は、5～7日であり、かつ培養工程(c)の期間は、21～35日である。40

【0070】

具体的な実施態様において、前記プロセスにおいて用いられる前記造血幹細胞又は前駆細胞は、CD34<sup>+</sup>である。

【0071】

具体的な実施態様において、前記造血幹細胞又は前駆細胞は、ヒト胎盤灌流液由来の造血幹細胞又は前駆細胞、及び臍帯由来の造血幹細胞又は前駆細胞を含み、該胎盤灌流液及び該臍帯血は、同じ胎盤由来のものである。

【0072】

10

20

30

40

50

具体的な実施態様において、上記TSPNK細胞を製造するプロセスの工程(a)の最後で、CD34-細胞は、80%超の前記TSPNK細胞を含む。

【0073】

具体的な実施態様において、前記TSPNK細胞は、40%以下のCD3-CD56+細胞を含む。

【0074】

具体的な実施態様において、前記TSPNK細胞は、CD52+CD117+である細胞を含む。

【0075】

本明細書に記載される方法又はキットの種々の実施態様において、前記NK細胞は:(a)造血幹細胞又は前駆細胞を、幹細胞動員剤及びトロンボポエチン(Tpo)を含む第一の培地中で培養して、第一の細胞の集団を製造すること;(b)該第一の細胞の集団を、幹細胞動員剤及びインターロイキン-15(IL-15)を含み、Tpoを欠く第二の培地中で培養して、第二の細胞の集団を製造すること;及び(c)該第二の細胞の集団を、IL-2及びIL-15を含み、幹細胞動員剤及びLMWHを欠く第三の培地中で培養して、第三の細胞の集団を製造することを含むプロセスであって、該第三の細胞の集団が、CD56+、CD3-、CD16-又はCD16+、かつCD94+又はCD94-であるナチュラルキラー細胞を含み、かつ該ナチュラルキラー細胞の少なくとも80%が、生細胞である、前記プロセスにより製造される。10

【0076】

本明細書において提供される方法又はキットのいずれか1つにおけるがんは、血液がん又は固形腫瘍とすることができます。

【0077】

本明細書において提供される方法又はキットのいずれか1つの好適な実施態様において、前記対象は、ヒトである。20

【0078】

(3.1. 術語)

本明細書で使用されるように、さらなる改変を伴わない「ナチュラルキラー細胞」又は「NK細胞」は、任意の組織源に由来して得られるナチュラルキラー細胞を含み、成熟ナチュラルキラー細胞及びナチュラルキラー前駆細胞を含む。いくつかの実施態様において、NK細胞は、セクション5.1.1で記載されるような胎盤中間ナチュラルキラー(PiNK)細胞である。いくつかの実施態様において、NK細胞は、セクション5.1.2で記載されるような活性化NK細胞である。いくつかの実施態様において、NK細胞は、セクション5.1.3で記載されるような三工程プロセスNK(TSPNK)細胞である。ナチュラルキラー細胞は、任意の組織源に由来して得ることができ、成熟ナチュラルキラー細胞及びNK前駆細胞を含むことができる。30

【0079】

本明細書で使用されるように、「NK前駆細胞集団」という用語は、例えば、1以上の表現型マーカー、例えば、CD56、CD16、及びKIRの発現のレベルによって示したとき、まだ成熟NK細胞になっていないナチュラルキラー細胞系譜の細胞を含む細胞の集団を指す。一実施態様において、NK前駆細胞集団は、低CD16及び高CD56の細胞を含む。

【0080】

本明細書で使用されるように、「PiNK」及び「PiNK細胞」は、ヒト胎盤、例えば、ヒト胎盤灌流液又は機械的及び/もしくは酵素的に破壊されている胎盤組織から得られる胎盤中間ナチュラルキラー細胞を指す。該細胞は、例えば、CD56及びCD16に対する抗体を用いるフローサイトメトリー、例えば、蛍光活性化細胞選別により決定される場合、CD56<sup>+</sup>及びCD16<sup>-</sup>である。40

【0081】

本明細書で使用されるように、「胎盤灌流液」は、胎盤、例えば、ヒト胎盤の少なくとも一部に通した、例えば、胎盤脈管構造に通した灌流溶液を意味し、胎盤を通す間に灌流溶液によって回収される複数の細胞を含む。

【0082】

本明細書で使用されるように、「胎盤灌流液細胞」は、胎盤灌流液から単離されるか又50

は単離可能である有核細胞、例えば、全有核細胞を意味する。

【0083】

本明細書で使用されるように、「フィーダー細胞」は、第二のタイプの細胞が維持され、おそらくは増殖することができる環境を提供するために、該第二のタイプの細胞と共に培養されるある型の細胞を指す。いかなる理論に束縛されるものではないが、フィーダー細胞は、標的細胞に対して、例えば、ペプチド、ポリペプチド、電気信号、有機分子(例えば、ステロイド)、核酸分子、増殖因子(例えば、bFGF)、他の因子(例えば、サイトカイン)、及び代謝栄養素を提供することができる。ある実施態様において、フィーダー細胞は、単層で成長する。

【0084】

本明細書で使用されるように、「造血細胞」という用語は、造血幹細胞及び造血前駆細胞を含む。

【0085】

本明細書で使用されるように、「不確定成分」は、その構成成分が、通常は、提供も定量もされない成分を指す培養培地分野の専門用語である。「不確定成分」の例としては、限定するものではないが、ヒト血清(例えば、ヒト血清AB)及び胎仔血清(例えば、ウシ胎仔血清(fetal bovine serum)又はウシ胎仔血清(fetal calf serum))が挙げられる。

【0086】

本明細書で使用されるように、「+」は、特定の細胞マーカーの存在を示すために使用される場合、該細胞マーカーが、蛍光活性化細胞選別で、アイソタイプ対照と比べて検出可能な程度に存在すること;又は定量的もしくは半定量的RT-PCRで、バックグラウンドを上回って検出可能であることを意味する。

【0087】

本明細書で使用されるように、「-」は、特定の細胞マーカーの存在を示すために使用される場合、該細胞マーカーが、蛍光活性化細胞選別で、アイソタイプ対照と比べて検出可能な程度には存在しないこと;又は定量的もしくは半定量的RT-PCRで、バックグラウンドを上回るほど検出可能ではないことを意味する。

【0088】

本明細書で使用されるように、「がん」は、血液がん又は固形腫瘍を指す。

【図面の簡単な説明】

【0089】

(4. 図面の詳細な説明)

【図1】図1は、リツキシマブの異なる濃度での、Daudi細胞に対するPiNK細胞の抗体依存性細胞傷害(ADCC)活性を示す。

【0090】

【図2】図2は、MM細胞株MM285、MM293、RPMI8226、及びOPM2でのPD-L1及びCS-1の発現を示す。細胞を、製造業者のプロトコールに従い抗PD-L1 APC(Biolegend、カタログ#329708)、抗CS1 PE-Cy7(Biolegend、カタログ#331816)、及び7-AAD(BD Bioscience、カタログ#559925)で染色した。データは、BD LSRFortessa(BD Biosciences)で取得し、FLOWJO(登録商標)ソフトウェア(Tree Star)を用いて解析した。データは、7-AAD-単一細胞でゲートをかけた%陽性細胞として表した。該%陽性ゲートの設定は、染色していない試料を対照として用いて行った。各パネル内の最も左のピークは、該対照を示し、最も右のピークは、試料を示す。PD-L1陽性である細胞のパーセンテージは、以下の通りであった:71.6% MM285、70.7% MM293、66.2% OPM-2、及び94.4% RPMI8226。CS-1陽性である細胞のパーセンテージは、以下の通りであった:31.8% MM285、58.8% MM293、93.4% OPM-2、及び29.5% RPMI8226。

【0091】

【図3】図3は、示されたMM細胞株及び3:1のエフェクター対標的比での初代MM試料に対する3段階NK細胞の24時間細胞傷害性アッセイを示す。各々の試料中の生標的細胞(PKH26<sup>+</sup>T0-PRO-3<sup>-</sup>)の数を、製造業者により提供されるプロトコール(Invitrogen、カタログ#C36950

10

20

30

40

50

)に従い、計数用ビーズを用いるフローサイトメトリーにより定量化した。計数用ビーズは、長期の24時間培養の間の腫瘍細胞の増殖の可能性を考慮するために本アッセイに導入した。37 及び5% CO<sub>2</sub>で24時間のインキュベーション後、細胞を回収し、それに続き1μMのTO-PRO-3で染色して、死細胞を特定した。結果を、平均値±該平均値の標準偏差として示す。

#### 【0092】

【図4】図4は、3:1のエフェクター対標的比で、以下の追加の条件:48-ウエルプレート中、IL-15(5ng/mL)(Invitrogen、カタログ#PHC9153); IL-2(200IU/mL)(Invitrogen、カタログ#PHC0023); 抗PD-L1(10ng/mL)(Affymetrix、カタログ#16-5983-82); 抗IgG(10ng/mL)(Affymetrix、カタログ#16-4714-82); REVLIMID(登録商標)(レナリドミド; 1uM)、又はDMSO(0.1%)での3段階NK細胞のOPM2細胞に対する24時間細胞傷害性アッセイを示す。対照として、標的細胞のみをブレーティングした。37 及び5% CO<sub>2</sub>で24時間のインキュベーション後、細胞を回収し、それに続き、1μMのTO-PRO-3で染色して死細胞を特定した。結果は、平均値±該平均値の標準偏差として示す。

#### 【発明を実施するための形態】

#### 【0093】

##### (5. 詳細な説明)

本明細書において提供されるものは、それを必要としている対象において、疾患(例えば、血液障害、固体腫瘍、又は感染性疾患)を治療する方法であって、ナチュラルキラー(NK)細胞を、該疾患を治療するために使用することができる第二の薬剤と組み合わせて用いる、前記方法である。本明細書においては、それを必要としている対象において、疾患(例えば、血液障害、固体腫瘍、又は感染性疾患)を治療する方法であって、標的特異性及び/又はホーミング特異性のための遺伝子変換を伴うNK細胞(例えば、キメラ抗原受容体(CAR)及び/又はホーミング受容体を含むNK細胞)を用いる、前記方法も提供される。それを必要としている対象において疾患(例えば、血液障害、固体腫瘍、又は感染性疾患)を治療するためのキットであって、単離されたNK細胞の集団及び該疾患を治療するために使用することができる第二の薬剤を含むか、又は遺伝子変換を伴う単離されたNK細胞(例えば、キメラ抗原受容体(CAR)及び/又はホーミング受容体を含むNK細胞)の集団を含む、前記キットも、本明細書において提供される。

#### 【0094】

##### (5.1. NK細胞)

本明細書に記載されるものは、PiNK細胞、活性化NK細胞、TSPNK細胞、及び3段階法により製造されるNK細胞を含めたNK細胞である。

#### 【0095】

##### (5.1.1. 胎盤中間ナチュラルキラー(PiNK)細胞)

いくつかの実施態様において、ナチュラルキラー細胞は、胎盤中間ナチュラルキラー(PiNK)細胞である(その開示が引用により完全に本明細書に組み込まれる、米国特許第8,263,065号も参照されたい)。様々な実施態様において、PiNK細胞は、胎盤細胞に由来する。具体的な実施態様において、該胎盤細胞は、胎盤灌流液、例えば、ヒト胎盤灌流液から得られる。具体的な実施態様において、該胎盤細胞は、機械的及び/又は酵素的に破壊されている胎盤組織から得られる。

#### 【0096】

PiNK細胞は、例えば、上述のような、CD16及びCD56に対する抗体を用いるフローサイトメトリー、例えば、蛍光活性化細胞選別により決定される場合、CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>である、すなわち、CD56細胞マーカーを提示し、かつCD16細胞マーカーを欠くものとして特徴づけられる。

#### 【0097】

ある実施態様において、前記PiNK細胞は、CD3<sup>-</sup>である。

#### 【0098】

他の実施態様において、前記PiNK細胞は、完全成熟ナチュラルキラー細胞により示され

10

20

30

40

50

る1以上の細胞マーカー(例えば、CD16)を示さないか、又は完全成熟ナチュラルキラー細胞と比べて検出可能な程度に減少したレベルでそのような1以上のマーカーを示すか、又はナチュラルキラー細胞前駆体に関連するが完全成熟ナチュラルキラー細胞とは関連の無い1以上の細胞マーカーを示す。具体的な実施態様において、本明細書に記載されるPiNK細胞は、NKG2D、CD94、及び/又はNKp46を、完全成熟NK細胞よりも検出可能な程度に低いレベルで発現する。別の具体的な実施態様において、本明細書に記載される複数のPiNK細胞は、全体として、NKG2D、CD94、及び/又はNKp46を、同等数の完全成熟NK細胞よりも検出可能な程度に低いレベルで発現する。

#### 【0099】

ある実施態様において、PiNK細胞は、マイクロRNAであるhsa-miR-100、hsa-miR-127、hsa-miR-211、hsa-miR-302c、hsa-miR-326、hsa-miR-337、hsa-miR-497、hsa-miR-512-3p、hsa-miR-515-5p、hsa-miR-517b、hsa-miR-517c、hsa-miR-518a、hsa-miR-518e、hsa-miR-519d、hsa-miR-520g、hsa-miR-520h、hsa-miR-564、hsa-miR-566、hsa-miR-618、及び/又はhsa-miR-99aのうちの1つ以上を、末梢血ナチュラルキラー細胞よりも検出可能な程度に高いレベルで発現する。

#### 【0100】

分娩後の胎盤は、回収の方法に応じて胎児由来及び母親の胎盤灌流液由来の組織及び細胞を含むので、PiNK細胞は、胎児細胞のみ、もしくは実質的大部分(例えば、約90%、95%、98%、もしくは99%超)となる胎児細胞を含むことができるか、又は胎児細胞と母体細胞との混合物(例えば、該胎児細胞は、該灌流液の全有核細胞の約90%、80%、70%、60%、もしくは50%未満を構成する)を含むことができる。一実施態様において、PiNK細胞は、胎児胎盤細胞、例えば、胎盤の閉回路灌流(上記を参照されたい)から得られる細胞のみに由来しており、ここで、該灌流は、実質的大部分となる胎児胎盤細胞、又は胎児胎盤細胞のみを含む灌流液を生じさせる。別の実施態様において、PiNK細胞は、胎児細胞と母体細胞、例えば、受け皿法(上記を参照されたい)による灌流により得られる細胞に由来しており、ここで、該灌流は、胎児細胞と母体の胎盤細胞との混合物を含む灌流液を生じさせる。したがって、一実施態様において、NK細胞は、その実質的大部分が胎児の遺伝子型を有する胎盤由来中間ナチュラルキラー細胞の集団である。別の実施態様において、NK細胞は、胎児の遺伝子型を有するナチュラルキラー細胞及び母体の表現型を有するナチュラルキラー細胞を含む胎盤由来中間ナチュラルキラー細胞の集団である。

#### 【0101】

##### (5.1.2. 活性化NK細胞)

いくつかの実施態様において、ナチュラルキラー細胞は、活性化NK細胞(すなわち、2工程NK細胞、又はTSNK細胞)(その開示が引用により完全に本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第2012/0148553号も参照されたい)であり、これは、以下のセクション5.2.4において記載される任意の方法/プロセスにより製造されるNK細胞である。

#### 【0102】

具体的な実施態様において、前記活性化NK細胞は、 $CD3^-CD56^+$ である。具体的な実施態様において、前記活性化NK細胞は、 $CD3^-CD56^+CD16^-$ である。別の具体的な実施態様において、該活性化NK細胞はさらに、 $CD94^+CD117^+$ である。別の具体的な実施態様において、該活性化NK細胞はさらに、 $CD161^-$ である。別の具体的な実施態様において、該活性化NK細胞はさらに、 $NKG2D^+$ である。別の具体的な実施態様において、該活性化NK細胞はさらに、 $NKp46^+$ である。別の具体的な実施態様において、該活性化NK細胞はさらに、 $CD226^+$ である。

#### 【0103】

ある実施態様において、前記活性化NK細胞の50%、60%、70%、80%、90%、92%、94%、96%、98%超は、 $CD56^+$ 及び $CD16^-$ である。他の実施態様において、前記活性化NK細胞の少なくとも50%、60%、70%、80%、82%、84%、86%、88%、又は90%は、 $CD3^-$ 及び $CD56^+$ である。他の実施態様において、前記活性化NK細胞の少なくとも50%、52%、54%、56%、58%、又は60%は、 $NKG2D^+$ である。他の実施態様において、前記細胞の30%、20%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、又は3%未満は、 $NKB1^+$ である。ある他の実施

10

20

30

40

50

態様において、前記活性化NK細胞の30%、20%、10%、8%、6%、4%、又は2%未満は、NKAT2<sup>+</sup>である。ある他の実施態様において、前記活性化NK細胞の30%、20%、10%、8%、6%、4%、又は2%未満は、CD56<sup>+</sup>及びCD16<sup>+</sup>である。より具体的な実施態様において、前記CD3<sup>-</sup>、CD56<sup>+</sup>活性化NK細胞の少なくとも10%、20%、25%、30%、35%、40%、50%、55%、60%、65%、又は70%は、NKp46<sup>+</sup>である。他により具体的な実施態様において、前記CD3<sup>-</sup>、CD56<sup>+</sup>活性化NK細胞の少なくとも10%、20%、25%、30%、35%、40%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、又は85%は、CD117<sup>+</sup>である。他により具体的な実施態様において、前記CD3<sup>-</sup>、CD56<sup>+</sup>活性化NK細胞の少なくとも10%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、又は50%は、CD94<sup>+</sup>である。他により具体的な実施態様において、前記CD3<sup>-</sup>、CD56<sup>+</sup>活性化NK細胞の少なくとも10%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、又は50%は、CD161<sup>+</sup>である。他により具体的な実施態様において、前記CD3<sup>-</sup>、CD56<sup>+</sup>活性化NK細胞の少なくとも10%、12%、14%、16%、18%、又は20%は、CD226<sup>+</sup>である。より具体的な実施態様において、前記CD3<sup>-</sup>、CD56<sup>+</sup>活性化NK細胞の少なくとも20%、25%、30%、35%、又は40%は、CD7<sup>+</sup>である。より具体的な実施態様において、前記CD3<sup>-</sup>、CD56<sup>+</sup>活性化NK細胞の少なくとも30%、35%、40%、45%、50%、55%、又は60%は、CD5<sup>+</sup>である。  
10

#### 【0104】

活性化NK細胞は、胎児の遺伝子型又は母体の遺伝子型を有し得る。例えば、活性化NK細胞の製造に適する造血細胞の供給源としての、分娩後胎盤は、胎児由来の組織及び細胞並びに母親由来の組織及び細胞を含むために、胎盤灌流液は、胎児細胞のみ、もしくは実質的大部分となる胎児細胞(例えば、約90%、95%、98%、もしくは99%超)を含むことができるか、又は胎児細胞と母体細胞との混合物を含む(例えば、該胎児細胞が、該灌流液の全有核細胞の約90%、80%、70%、60%、もしくは50%未満を構成する)ことができる。  
一実施態様において、前記活性化NK細胞は、胎児の胎盤造血細胞、例えば、灌流が、実質的大部分となる胎児の胎盤造血細胞、又は胎児の胎盤造血細胞のみを含む灌流液を生じさせる、胎盤の閉回路灌流から得られる細胞のみに由来する。別の実施態様において、前記活性化NK細胞は、胎児細胞と母体細胞、例えば、灌流が、胎児細胞と母体の胎盤細胞との混合物を含む灌流液を生じさせる、受け皿法(上記を参照されたい)による灌流により得られる細胞に由来する。従って、一実施態様において、前記活性化NK細胞は、その実質的大部分が胎児の遺伝子型を有する胎盤由来中間ナチュラルキラー細胞の集団に由来する。別の実施態様において、前記活性化NK細胞は、胎児の遺伝子型を有するナチュラルキラー細胞及び母体の表現型を有するナチュラルキラー細胞を含む胎盤由来中間ナチュラルキラー細胞の集団に由来する。  
20  
30

#### 【0105】

ある実施態様において、活性化NK細胞について濃縮された前記活性化NK細胞又は集団は、1つ以上の機能的に関連のあるマーカー、例えば、CD94、CD161、NKp44、DNAM-1、2B4、NKp46、CD94、KIR、及びNKG2ファミリーの活性化受容体(例えば、NKG2D)を検出することによって評価することができる。

#### 【0106】

任意に、単離された又は濃縮されたナチュラルキラー細胞の細胞傷害活性は、例えば、腫瘍細胞、例えば、培養されたK562、LN-18、U937、WERI-RB-1、U-118MG、HT-29、HCC2218、KG-1、又はU266腫瘍細胞などの細胞を標的細胞として用いる細胞傷害性アッセイで評価することができる。  
40

#### 【0107】

(5.1.3.三工程プロセスNK(TSPNK)細胞)

いくつかの実施態様において、ナチュラルキラー細胞は、三工程プロセスNK(TSPNK)細胞であり、これは、以下のセクション5.2.5で記載する任意の方法/プロセスにより製造されるNK細胞である。具体的な実施態様において、前記TSPNK細胞は、NK前駆細胞である(その開示が引用により完全に本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第2012/0148553号も参照されたい)。  
50

**【 0 1 0 8 】**

(5.1.3.1.TSPNK細胞)

一実施態様において、本明細書に記載される3工程プロセスによって製造される前記単離されたTSPNK細胞集団は、本明細書に記載される3工程プロセスによって製造されるNK前駆細胞集団、例えば、該NK前駆細胞集団を製造するために使用される第三の培養工程が、該TSPNK細胞集団を製造するために使用される第三の培養工程よりも期間が短いものであること以外は同じ3工程プロセスによって製造されるNK前駆細胞集団よりも大きいパーセンテージのCD3-CD56+細胞を含む。具体的な実施態様において、前記TSPNK細胞集団は、約65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、又は99%のCD3-CD56+細胞を含む。別の具体的な実施態様において、前記TSPNK細胞集団は、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、又は99%以上のCD3-CD56+細胞を含む。別の具体的な実施態様において、前記TSPNK細胞集団は、65%～70%、70%～75%、75%～80%、80%～85%、85%～90%、90%～95%、又は95%～99%のCD3-CD56+細胞を含む。別の具体的な実施態様において、本明細書に記載される3工程プロセスによって製造されるTSPNK細胞集団は、長い第三の培養工程、例えば、18～20、19～21、20～22、又は21～23日の第三の培養工程を含む3工程プロセスを用いて製造される。

**【 0 1 0 9 】**

ある実施態様において、前記TSPNK細胞集団内の前記CD3-CD56+細胞は、さらにCD117<sup>+</sup>であるCD3-CD56<sup>+</sup>細胞を含み、ここで該TSPNK細胞集団は、本明細書に記載される3工程プロセスによって製造されるNK前駆細胞集団、例えば、該NK前駆細胞集団を製造するために使用される第三の培養工程が、該TSPNK細胞集団を製造するために使用される第三の培養工程よりも期間が短いものであること以外は同じ3工程プロセスによって製造されるNK前駆細胞集団よりも低いパーセンテージのCD3-CD56<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup>細胞を含む。

**【 0 1 1 0 】**

ある実施態様において、前記TSPNK細胞集団内の前記CD3-CD56+細胞は、さらにCD161<sup>+</sup>であるCD3-CD56<sup>+</sup>細胞を含み、ここで、該TSPNK細胞集団は、本明細書に記載される3工程プロセスによって製造されるNK前駆細胞集団、例えば、該NK前駆細胞集団を製造するために使用される第三の培養工程が、該TSPNK細胞集団を製造するために使用される第三の培養工程よりも期間が短いものであること以外は同じ3工程プロセスによって製造されるNK前駆細胞集団よりも低いパーセンテージのCD3-CD56<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>細胞を含む。

**【 0 1 1 1 】**

ある実施態様において、前記TSPNK細胞集団内の前記CD3-CD56+細胞は、さらに、NKp46<sup>+</sup>であるCD3-CD56<sup>+</sup>細胞を含み、ここで、該TSPNK細胞集団は、本明細書に記載される3工程プロセスによって製造されるNK前駆細胞集団、例えば、該NK前駆細胞集団を製造するために使用される第三の培養工程が、該TSPNK細胞集団を製造するために使用される第三の培養工程よりも期間が短いものであること以外は同じ3工程プロセスによって製造されるNK前駆細胞集団よりも大きいパーセンテージのCD3-CD56<sup>+</sup>NKp46<sup>+</sup>細胞を含む。

**【 0 1 1 2 】**

ある実施態様において、前記TSPNK細胞集団内の前記CD3-CD56+細胞は、さらにCD16-であるCD3-CD56<sup>+</sup>細胞を含み、ここで、該TSPNK細胞集団は、本明細書に記載される3工程プロセスによって製造されるNK前駆細胞集団、例えば、該NK前駆細胞集団を製造するために使用される第三の培養工程が、該TSPNK細胞集団を製造するために使用される第三の培養工程よりも期間が短いものであること以外は同じ3工程プロセスによって製造されるNK前駆細胞集団よりも大きいパーセンテージのCD3-CD56<sup>+</sup>CD16-細胞を含む。別の実施態様において、本明細書に記載される3工程プロセスを用いて製造されるTSPNK細胞は、末梢血(PB)由来NK細胞よりも長いテロメアを保有する。

**【 0 1 1 3 】**

一実施態様において、本明細書に記載される3工程プロセスによって製造されるTSPNK細胞集団は、CD117<sup>+</sup>である細胞を含む。具体的な実施態様において、該TSPNK細胞集団は、約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、7

10

20

30

40

50

0%、75%、80%、85%、又は90%以下のCD117<sup>+</sup>細胞を含む。一実施態様において、本明細書に記載される3工程プロセスによって製造されるTSPNK細胞集団は、NKG2D<sup>+</sup>である細胞を含む。具体的な実施態様において、該TSPNK細胞集団は、約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、又は90%以下のNKG2D<sup>+</sup>細胞を含む。一実施態様において、本明細書に記載される3工程プロセスによって製造されるTSPNK細胞集団は、NKp44<sup>+</sup>である細胞を含む。具体的な実施態様において、該TSPNK細胞集団は、約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、又は90%以下のNKp44<sup>+</sup>細胞を含む。一実施態様において、本明細書に記載される3工程プロセスによって製造されるTSPNK細胞集団は、CD52<sup>+</sup>である細胞を含む。具体的な実施態様において、該TSPNK細胞集団は、約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、又は90%以下のCD52<sup>+</sup>細胞を含む。特定の実施態様において、該本明細書に記載される3工程プロセスによって製造されるTSPNK細胞集団は、CD52+CD117<sup>+</sup>である細胞を含む。一実施態様において、本明細書に記載される3工程プロセスによって製造されるTSPNK細胞集団は、CD244<sup>+</sup>である細胞を含む。具体的な実施態様において、該TSPNK細胞集団は、約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、又は90%以下のCD244<sup>+</sup>細胞を含む。特定の実施態様において、本明細書に記載される3工程プロセスによって製造されるTSPNK細胞集団は、CD244+CD117<sup>+</sup>である細胞を含む。一実施態様において、本明細書に記載される3工程プロセスによって製造されるTSPNK細胞集団は、LFA-1<sup>+</sup>である細胞を含む。具体的な実施態様において、該TSPNK細胞集団は、約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、又は90%以下のLFA-1<sup>+</sup>細胞を含む。一実施態様において、本明細書に記載される3工程プロセスによって製造されるTSPNK細胞集団は、CD94<sup>+</sup>である細胞を含む。具体的な実施態様において、該TSPNK細胞集団は、約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、又は90%以下のCD94<sup>+</sup>細胞を含む。

#### 【0114】

##### (5.1.3.2.NK前駆細胞)

一実施態様において、前記単離されたNK前駆細胞集団は、非前駆体NK細胞集団、例えば、本明細書に記載される3工程法により製造される非前駆体NK細胞集団と関連するCD3-CD56<sup>+</sup>細胞のパーセンテージと比較して、低いパーセンテージのCD3-CD56<sup>+</sup>細胞を含み、例えば、該NK前駆細胞集団は、約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、又は50%のCD3-CD56<sup>+</sup>細胞を含む。別の具体的な実施態様において、該NK前駆細胞集団は、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、又は50%以下のCD3-CD56<sup>+</sup>細胞を含む。別の具体的な実施態様において、該NK前駆細胞集団は、0%～5%、5%～10%、10%～15%、15%～20%、20%～25%、25%～30%、30%～35%、35%～40%、40%～45%、又は45%～50%のCD3-CD56<sup>+</sup>細胞を含む。いくつかの実施態様において、該NK前駆細胞集団、例えば、非前駆体NK細胞集団と関連するCD3-CD56<sup>+</sup>細胞のパーセンテージと比較して、低いパーセンテージのCD3-CD56<sup>+</sup>細胞を含むNK前駆細胞集団は、1%以下、2%以下、3%以下、4%以下、5%以下、10%以下、又は15%以下のCD3-CD56<sup>+</sup>細胞を含む。別の具体的な実施態様において、本明細書に記載される3工程プロセスによって製造される該NK前駆細胞集団は、短い第三の培養工程、例えば、4～6、5～7、6～8、又は7～9日の第三の培養工程を含む3工程プロセスを用いて製造される。

#### 【0115】

ある実施態様において、該NK前駆細胞集団内の該CD3-CD56<sup>+</sup>細胞はさらに、CD117<sup>+</sup>である。具体的な実施態様において、該NK前駆細胞集団内の該CD3-CD56<sup>+</sup>細胞の約65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、又は99%は、CD117<sup>+</sup>である。別の具体的な実施態様において、NK前駆細胞集団内の該CD3-CD56<sup>+</sup>細胞の65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、又は99%以上は、CD117<sup>+</sup>である。別の具体的な実施態様において、該NK前駆細胞集団内の該CD3-CD56<sup>+</sup>細胞の65%～70%、70%～75%、75%～80%、80%～85%

、85%～90%、90%～95%、又は95%～99%は、CD117<sup>+</sup>である。

#### 【0116】

ある実施態様において、該NK前駆細胞集団内の該CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>細胞はさらに、CD161<sup>+</sup>である。具体的な実施態様において、該NK前駆細胞集団内の該CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>細胞の約40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、又は75%は、CD161<sup>+</sup>である。別の具体的な実施態様において、該NK前駆細胞集団内の該CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>細胞の40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、又は75%以上は、CD161<sup>+</sup>である。別の具体的な実施態様において、該NK前駆細胞集団内の該CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>細胞の40%～45%、45%～50%、50%～55%、55%～60%、60%～65%、65%～70%、又は70%～75%は、CD161<sup>+</sup>である。

#### 【0117】

ある実施態様において、該NK前駆細胞集団内の該CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>細胞はさらに、NKp46<sup>+</sup>である。具体的な実施態様において、該NK前駆細胞集団内の該CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>細胞の約25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%又はそれより多くは、NKp46<sup>+</sup>である。より具体的な実施態様において、該NK前駆細胞集団内の該CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>細胞の約25%、30%、35%、40%、45%、50%、又は55%以下は、NKp46<sup>+</sup>である。別の具体的な実施態様において、該NK前駆細胞集団内の該CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>細胞の25%～30%、30%～35%、35%～40%、45%～50%、又は55%以下は、NKp46<sup>+</sup>である。別の具体的な実施態様において、該NK前駆細胞集団内の該CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>細胞の25%～30%、30%～35%、35%～40%、45%～50%、50%～55%、55%～60%、60%～65%、65%～70%、70%～75%、75%～80%、80%～85%、85%～90%、又はそれより多くは、NKp46<sup>+</sup>である。より具体的な実施態様において、該NK前駆細胞集団内の該CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>細胞の25%～30%、30%～35%、35%～40%、40%～45%、45%～50%、又は50%～55%は、NKp46<sup>+</sup>である。

#### 【0118】

ある実施態様において、該NK前駆細胞集団は、CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>である細胞を含有する。ある実施態様において、該NK前駆細胞集団内のCD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>細胞は、CD16<sup>-</sup>である。ある実施態様において、該NK前駆細胞集団内のCD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>細胞は、CD16<sup>+</sup>である。具体的な実施態様において、該NK前駆細胞集団は、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、又は50%以下のCD16<sup>+</sup>細胞を含む。別の具体的な実施態様において、該NK前駆細胞集団は、0%～5%、5%～10%、10%～15%、15%～20%、又は20%～25%のCD16<sup>+</sup>細胞を含む。いくつかの実施態様において、該NK前駆細胞集団は、1%以下、2%以下、3%以下、4%以下、5%以下、10%以下、又は15%以下のCD16<sup>+</sup>細胞を含む。

#### 【0119】

ある実施態様において、該NK前駆細胞集団内の該CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>細胞はさらに、CD16<sup>-</sup>である。ある実施態様において、該NK前駆細胞集団内の該CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>細胞はさらに、CD117<sup>+</sup>及びCD161<sup>+</sup>である。ある実施態様において、該NK前駆細胞集団内の該CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>細胞はさらに、CD16<sup>-</sup>、CD117<sup>+</sup>及びCD161<sup>+</sup>である。ある実施態様において、該NK前駆細胞集団内の該CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>細胞はさらに、CD16<sup>-</sup>、CD117<sup>+</sup>、CD161<sup>+</sup>、及びNKp46<sup>+</sup>である。

#### 【0120】

一実施態様において、本明細書に記載される3工程プロセスによって製造されるNK前駆細胞集団は、約40%以下のCD3-CD56+細胞を含む。一実施態様において、本明細書に記載される3工程プロセスによって製造されるNK前駆細胞集団は、CD117<sup>+</sup>である細胞を含む。具体的な実施態様において、該NK前駆細胞集団は、約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、又は90%以下のCD117<sup>+</sup>細胞を含む。一実施態様において、本明細書に記載される3工程プロセスによって製造されるNK前駆細胞集団は、CD52<sup>+</sup>である細胞を含む。具体的な実施態様において、該NK前駆細胞集団は、約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、又は90%以下のCD52<sup>+</sup>細胞を含む。特定の実施態様において、該本明細書に記載される3工程プロセスによって製造されるNK前駆細胞集団は、CD52<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup>である細胞を含む。一実施態様において、本明細書に記載される3工程プロセスによって製造されるNK前駆細胞集団は、CD244<sup>+</sup>である細胞を含む。具

10

20

30

40

50

体的な実施態様において、該NK前駆細胞集団は、約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、又は90%以下のCD244+細胞を含む。特定の実施態様において、該本明細書に記載される3工程プロセスによって製造されるNK前駆細胞集団は、CD244+CD117+である細胞を含む。一実施態様において、本明細書に記載される3工程プロセスによって製造されるNK前駆細胞集団は、LFA-1+である細胞を含む。具体的な実施態様において、該NK前駆細胞集団は、約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、又は90%以下のLFA-1+細胞を含む。一実施態様において、本明細書に記載される3工程プロセスによって製造されるNK前駆細胞集団は、CD94+である細胞を含む。具体的な実施態様において、該NK前駆細胞集団は、約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、又は90%以下のCD94+細胞を含む。  
10

#### 【0121】

特定の実施態様において、本明細書に記載される3工程プロセスによって製造されるNK前駆細胞集団は、CD56+細胞よりも大きい割合のCD56-細胞を含む。特定の実施態様において、本明細書に記載される3工程プロセスによって製造されるNK前駆細胞集団は、インビボ又はエクスピボで、CD56+細胞の割合が増加した集団に分化する。

#### 【0122】

具体的な実施態様において、本明細書に記載される3工程プロセスによって製造されるNK前駆細胞集団は、非前駆体NK細胞集団と関連するCD34-CD117+細胞のパーセンテージと比較して、低いパーセンテージのCD34-CD117+細胞を含み、例えば、該NK前駆細胞集団は、約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、又は50%のCD34-CD117+細胞を含む。別の具体的な実施態様において、該NK前駆細胞集団は、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、又は50%以下のCD34-CD117+細胞を含む。別の具体的な実施態様において、該NK前駆細胞集団は、0%～5%、5%～10%、10%～15%、15%～20%、20%～25%、25%～30%、30%～35%、35%～40%、40%～45%、又は45%～50%のCD34-CD117+細胞を含む。いくつかの実施態様において、該NK前駆細胞集団は、1%以下、2%以下、3%以下、4%以下、5%以下、10%以下、又は15%以下のCD34-CD117+細胞を含む。別の具体的な実施態様において、本明細書に記載される3工程プロセスによって製造されるNK前駆細胞集団は、短い第三の培養工程、例えば、4～6、5～7、6～8、又は7～9日の第三の培養工程を含む3工程プロセスを用いて製造される。  
20

#### 【0123】

具体的な実施態様において、本明細書に記載される3工程プロセスによって製造されるNK前駆細胞集団は、非前駆体NK細胞集団と関連するCD161+細胞のパーセンテージと比較して、低いパーセンテージのCD161+細胞を含み、例えば、該NK前駆細胞集団は、約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、又は50%のCD161+細胞を含む。別の具体的な実施態様において、該NK前駆細胞集団は、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、又は50%以下のCD161+細胞を含む。別の具体的な実施態様において、該NK前駆細胞集団は、0%～5%、5%～10%、10%～15%、15%～20%、20%～25%、25%～30%、30%～35%、35%～40%、40%～45%、又は45%～50%のCD161+細胞を含む。いくつかの実施態様において、該NK前駆細胞集団は、1%以下、2%以下、3%以下、4%以下、5%以下、10%以下、又は15%以下のCD161+細胞を含む。別の具体的な実施態様において、該本明細書に記載される3工程プロセスによって製造されるNK前駆細胞集団は、短い第三の培養工程、例えば、4～6、5～7、6～8、又は7～9日の第三の培養工程を含む3工程プロセスを用いて製造される。  
30

#### 【0124】

具体的な実施態様において、本明細書に記載される3工程プロセスによって製造されるNK前駆細胞集団は、非前駆体NK細胞集団と関連するNKp46+細胞のパーセンテージと比較して、低いパーセンテージのNKp46+細胞を含み、例えば、該NK前駆細胞集団は、約1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、又は50%のNKp46+細胞を含む。別  
40

10

20

30

40

50

の具体的な実施態様において、該NK前駆細胞集団は、1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、又は50%以下のNKp46<sup>+</sup>細胞を含む。別の具体的な実施態様において、該NK前駆細胞集団は、0%～5%、5%～10%、10%～15%、15%～20%、20%～25%、25%～30%、30%～35%、35%～40%、40%～45%、又は45%～50%のNKp46<sup>+</sup>細胞を含む。いくつかの実施態様において、該NK前駆細胞集団は、1%以下、2%以下、3%以下、4%以下、5%以下、10%以下、又は15%以下のNKp46<sup>+</sup>細胞を含む。別の具体的な実施態様において、該本明細書に記載される3工程プロセスによって製造されるNK前駆細胞集団は、短い第三の培養工程、例えば、4～6、5～7、6～8、又は7～9日の第三の培養工程を含む3工程プロセスを用いて製造される。

#### 【0125】

10

具体的な実施態様において、本明細書に記載される3工程プロセスによって製造されるNK前駆細胞集団は、非前駆体NK細胞集団と関連するCD56<sup>+</sup>CD16-細胞のパーセンテージと比較して、低いパーセンテージのCD56<sup>+</sup>CD16-細胞を含み、例えば、該NK前駆細胞集団は、約1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、又は50%のCD56<sup>+</sup>CD16-細胞を含む。別の具体的な実施態様において、該NK前駆細胞集団は、1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、又は50%以下のCD56<sup>+</sup>CD16-細胞を含む。別の具体的な実施態様において、該NK前駆細胞集団は、0%～5%、5%～10%、10%～15%、15%～20%、20%～25%、25%～30%、30%～35%、35%～40%、40%～45%、又は45%～50%のCD56<sup>+</sup>CD16-細胞を含む。いくつかの実施態様において、該NK前駆細胞集団は、1%以下、2%以下、3%以下、4%以下、5%以下、10%以下、又は15%以下のCD56<sup>+</sup>CD16-細胞を含む。別の具体的な実施態様において、該本明細書に記載される3工程プロセスによって製造されるNK前駆細胞集団は、短い第三の培養工程、例えば、4～6、5～7、6～8、又は7～9日の第三の培養工程を含む3工程プロセスを用いて製造される。

#### 【0126】

20

一実施態様において、本明細書に記載される3工程プロセスによって製造されるNK前駆細胞集団は、CD52+CD117+である細胞を含む。具体的な実施態様において、本明細書に記載される3工程プロセスによって製造されるNK前駆細胞集団は、造血前駆細胞集団と関連するCD52<sup>+</sup>CD117+細胞のパーセンテージと比較して、より高いパーセンテージのCD52<sup>+</sup>CD117+細胞を含む。具体的な実施態様において、本明細書に記載される3工程プロセスによって製造されるNK前駆細胞集団は、非前駆体NK細胞集団と関連するCD52<sup>+</sup>CD117+細胞のパーセンテージと比較して、より高いパーセンテージのCD52<sup>+</sup>CD117+細胞を含み、例えば、該NK前駆細胞集団は、約50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%又はそれより多くのCD52<sup>+</sup>CD117+細胞を含む。別の具体的な実施態様において、該NK前駆細胞集団は、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、又は90%以上のCD52<sup>+</sup>CD117+細胞を含む。別の具体的な実施態様において、該NK前駆細胞集団は、50%～55%、55%～60%、60%～65%、65%～70%、70%～75%、75%～80%、80%～85%、85%～90%、90%～95%又はそれより多くのCD52<sup>+</sup>CD117+細胞を含む。別の具体的な実施態様において、本明細書に記載される3工程プロセスによって製造されるCD52<sup>+</sup>CD117+細胞を含む該NK前駆細胞集団は、短い第三の培養工程、例えば、4～6、5～7、6～8、又は7～9日の第三の培養工程を含む3工程プロセスを用いて製造される。具体的な実施態様において、CD52<sup>+</sup>CD117+細胞を含む該NK前駆細胞集団は、合計で12日以上、13日以上、14日以上、15日以上、16日以上、17日以上、18日以上、19日以上、20日以上、又は21日以上の培養を含む3工程プロセスを用いて製造される。具体的な実施態様において、CD52<sup>+</sup>CD117+細胞を含む該NK前駆細胞集団は、合計で少なくとも12日、13日、又は14日の培養を含むが、21～25日、25～30日、又は30～35日を超える培養を含まない3工程プロセスを用いて製造される。具体的な実施態様において、CD52<sup>+</sup>CD117+細胞を含む該NK前駆細胞集団は、合計で21日の培養を含む3工程プロセスを用いて製造される。

#### 【0127】

具体的な実施態様において、本明細書に記載されるNK前駆細胞は、非前駆体NK細胞、例えば、同等の方法を用いて製造される非前駆体NK細胞よりも大きい骨髄(例えば、インビ

30

40

50

ボ)生着能力を保有する。例えば、ある実施態様において、短い第三の培養工程、例えば、4~6、5~7、6~8、又は7~9日の第三の培養工程を含む3工程プロセスを用いて製造されるNK前駆細胞は、より長い第三の培養工程、例えば、18~20、19~21、20~22、又は21~23日の第三の培養工程を含む3工程プロセスを用いて製造される非前駆体NK細胞よりも高い効率で、骨髓(例えば、インビボ)に生着する。別の実施態様において、本明細書に記載されるNK前駆細胞は、末梢血(PB)由来NK細胞よりも長いテロメアを保有する。

#### 【0128】

##### (5.1.4. 3段階法により製造されるNK細胞)

一実施態様において、本明細書において提供されるのは、単離されたNK細胞集団であり、ここで該NK細胞は、以下に記載する3段階法に従って製造される。

10

#### 【0129】

一実施態様において、本明細書において提供されるのは、本明細書に記載される3段階法により製造される単離されたNK細胞集団であり、ここで、該NK細胞集団は、本明細書に記載される3段階法により製造されるNK前駆細胞集団、例えば、該NK前駆細胞集団を製造するために使用される第三の培養工程が、該NK細胞集団を製造するために使用される第三の培養工程よりも期間が短いものであることを除いては同じ3段階法により製造されるNK前駆細胞集団よりも大きいパーセンテージのCD3-CD56+細胞を含む。具体的な実施態様において、該NK細胞集団は、約70%又はそれより多くのCD3-CD56+細胞を含み、いくつかの実施態様において、75%、80%、85%、90%、95%、98%、又は99%のCD3-CD56+細胞を含む。別の具体的な実施態様において、該NK細胞集団は、80%、85%、90%、95%、98%、又は99%以上のCD3-CD56+細胞を含む。別の具体的な実施態様において、該NK細胞集団は、70%~75%、75%~80%、80%~85%、85%~90%、90%~95%、又は95%~99%のCD3-CD56+細胞を含む。

20

#### 【0130】

ある実施態様において、該NK細胞集団内の該CD3-CD56+細胞は、さらにNKp46+であるCD3-CD56+細胞を含む。ある実施態様において、該NK細胞集団内の該CD3-CD56+細胞は、さらにCD16-であるCD3-CD56+細胞を含む。ある実施態様において、該NK細胞集団内の該CD3-CD56+細胞は、さらにCD16+であるCD3-CD56+細胞を含む。ある実施態様において、該NK細胞集団内の該CD3-CD56+細胞は、さらにCD94-であるCD3-CD56+細胞を含む。ある実施態様において、該NK細胞集団内の該CD3-CD56+細胞は、さらにCD94+であるCD3-CD56+細胞を含む。

30

#### 【0131】

一実施態様において、本明細書に記載される3段階法により製造されるNK細胞集団は、CD117+である細胞を含む。一実施態様において、本明細書に記載される3段階法により製造されるNK細胞集団は、NKG2D+である細胞を含む。一実施態様において、本明細書に記載される3段階法により製造されるNK細胞集団は、NKp44+である細胞を含む。一実施態様において、本明細書に記載される3段階法により製造されるNK細胞集団は、CD244+である細胞を含む。

#### 【0132】

##### (5.1.5. 細胞組合せ、及び細胞/灌流液組合せ)

40

前記NK細胞、例えば、活性化NK細胞及び/又はTSPNK細胞は、本発明において、胎盤灌流液、胎盤灌流液細胞、及び/又は接着性胎盤細胞とさらに組み合わせることができる。

#### 【0133】

##### (5.1.5.1. NK細胞と灌流液又は灌流液細胞との組合せ)

具体的な実施態様において、前記ナチュラルキラー細胞は、CD56+CD16- PiNK細胞を、CD56+CD16+ナチュラルキラー細胞と組み合わせて含む。より具体的な実施態様において、該CD56+CD16+ナチュラルキラー細胞は、胎盤から、又は別の供給源、例えば、末梢血、臍帯血、骨髓などから単離することができる。従って、様々な他の実施態様において、PiNK細胞は、CD56+CD16+ナチュラルキラー細胞と、例として、例えは、約1:10、2:9、3:8、4:7:、5:6、6:5、7:4、8:3、9:2、1:10、1:9、1:8、1:7、1:6、1:5、1:4、1:3、1:2、1:1、

50

2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、又は約9:1の比率で組み合わせることができる。この文脈で使用される場合、「単離された」とは、細胞が、その通常の環境、例えば、胎盤から取り出されていることを意味する。

#### 【0134】

様々な具体的な実施態様において、前記単離されたNK細胞の集団は、少なくとも約50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、又は少なくとも約99%のPiNK細胞を含む。別の実施態様において、該複数のPiNK細胞は、増殖されていないPiNK細胞；例えば、胎盤灌流液から回収したままのPiNK細胞を含むか、又はこれからなる。別の実施態様において、該複数のPiNK細胞は、増殖されたPiNK細胞を含むか、又はこれからなる。ナチュラルキラー細胞を増殖させる方法は、本明細書の別の場所に記載されており、例えば、Ohnoらの米国特許出願公開第2003/0157713号に記載されている；Ysselらの文献J. Immunol. Methods 72(1):219-227 (1984)、及びLitwinらの文献J. Exp. Med. 178(4):1321-1326 (1993)も参照されたい。10

#### 【0135】

具体的な実施態様において、前記単離されたNK細胞の集団は、PiNK細胞を含む胎盤細胞の集団である。具体的な実施態様において、前記単離されたNK細胞の集団は、胎盤灌流液由来の全有核細胞、例えば、自己の単離されたPiNK細胞を含む胎盤灌流液細胞である。様々な他の実施態様において、活性化NK細胞を、例えば、組織源から単離されて、まだ増殖させていないNK細胞、組織源から単離されて増殖されたNK細胞、又は異なる方法により製造されるNK細胞、例えば、CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>ナチュラルキラー細胞と、例として、例えば、約1:10、2:9、3:8、4:7:、5:6、6:5、7:4、8:3、9:2、1:10、1:9、1:8、1:7、1:6、1:5、1:4、1:3、1:2、1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、又は約9:1の比率で組み合わせることができる。この文脈で使用される場合、「単離された」とは、細胞が、その通常の組織環境から取り出されていることを意味する。20

#### 【0136】

具体的な実施態様において、活性化NK細胞はまた、例えば、組織源から単離されて、まだ増殖させていないNK細胞、組織源から単離されて増殖されたNK細胞、又は異なる方法により製造されるNK細胞、例えば、CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>ナチュラルキラー細胞と、例として、例えば、約1:10、2:9、3:8、4:7:、5:6、6:5、7:4、8:3、9:2、1:10、1:9、1:8、1:7、1:6、1:5、1:4、1:3、1:2、1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、又は約9:1の比率で、組み合わせることができる。この文脈で使用される場合、「単離された」とは、細胞が、その通常の組織環境から取り出されていることを意味する。30

#### 【0137】

一実施態様において、例えば、本明細書に記載されるプロセスを用いて製造されるNK細胞、例えば、活性化NK細胞又はTSPNK細胞(例えば、NK前駆細胞)が補充されたある体積の胎盤灌流液が用いられる。具体的な実施態様において、例えば、胎盤灌流液の1ミリリットルあたり、約 $1 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ 、又はそれより多くの本明細書に記載されるプロセスを用いて製造されるNK細胞、例えば、活性化NK細胞又はTSPNK細胞(例えば、NK前駆細胞)が補充される。別の実施態様において、胎盤灌流液細胞に、本明細書に記載されるプロセスを用いて製造されるNK細胞、例えば、活性化NK細胞又はTSPNK細胞(例えば、NK前駆細胞)が補充される。ある他の実施態様において、胎盤灌流液細胞を、本明細書に記載されるプロセスを用いて製造されるNK細胞、例えば、活性化NK細胞又はTSPNK細胞(例えば、NK前駆細胞)と組み合わせる場合、該胎盤灌流液細胞は、通常、細胞の総数の、約50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、8%、6%、4%、2%、もしくは1%、又は約50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、8%、6%、4%、2%、もしくは1%超、又は約50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、8%、6%、4%、2%、もしくは1%未満を構成する。ある他の実施態様において、本明細書に記載されるプロセスを用いて製造されるNK細胞、例えば、活性化NK細胞又はTSPNK細胞(例えば、NK前駆細胞)を、複数の胎盤灌流液細胞及び/又は組み合わされたナチュラルキラー細胞と組み合わせる場4050

合、該NK細胞は、通常、細胞の総数の約50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、8%、6%、4%、2%、もしくは1%、又は約50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、8%、6%、4%、2%、もしくは1%超、又は約50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、8%、6%、4%、2%、もしくは1%未満を構成する。ある他の実施態様において、本明細書に記載されるプロセスを用いて製造されるNK細胞、例えば、活性化NK細胞又はTSPNK細胞(例えば、NK前駆細胞)を用いて胎盤灌流液を補充する場合、該細胞を懸濁させる溶液(例えば、生理食塩水溶液、培養培地など)の体積は、灌流液と細胞との総体積の約50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、8%、6%、4%、2%、もしくは1%、又は約50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、8%、6%、4%、2%、もしくは1%超、又は約50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、8%、6%、4%、2%、もしくは1%未満を構成し、ここで、該NK細胞は、補充の前に、1ミリリットルあたり約 $1 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ 個もしくはそれより多くの細胞となるように懸濁される。  
10

#### 【0138】

他の実施態様において、細胞の上記の組合せのいずれかをさらに、臍帯血又は臍帯血由来の有核細胞と組み合わせる。

#### 【0139】

2つ以上の供給源、例えば、2つ以上の胎盤から得られ、組み合わされた、例えば、プールされた、プール胎盤灌流液をさらに本発明において用いることができる。そのようなプール灌流液は、各々の供給源に由来するほぼ等体積の灌流液を含むことができるか、又は各々の供給源に由来する異なる体積を含むことができる。各々の供給源に由来する相対的な体積は、無作為に選択することができるか、あるいは例えば、1以上の細胞因子、例えば、サイトカイン、増殖因子、ホルモンなどの濃度もしくは量;各々の供給源に由来する灌流液中の胎盤細胞の数;又は各々の供給源に由来する灌流液の他の特徴に基づくことができる。同じ胎盤の複数回の灌流に由来する灌流液を同様にプールすることができる。  
20

#### 【0140】

同様に、2つ以上の供給源、例えば、2つ以上の胎盤から得られ、プールされた胎盤灌流液細胞、及び胎盤由来中間ナチュラルキラー細胞も、本発明において使用することができる。そのようなプールされた細胞は、2つ以上の供給源由来のほぼ同数の細胞を含むことができるか、又はプールされた供給源のうちの1つ以上に由来する異なる数の細胞を含むことができる。各々の供給源に由来する細胞の相対的な数は、例えば、プールされるべき細胞における1以上の特定細胞型の数、例えば、CD34<sup>+</sup>細胞の数などに基づいて選択することができる。  
30

#### 【0141】

本明細書に記載されるプロセスを用いて製造されるNK細胞、例えば、活性化NK細胞又はTSPNK細胞(例えば、NK前駆細胞)、及びこのような細胞と胎盤灌流液及び/又は胎盤灌流液細胞との組合せをアッセイして、例えば、所与の数のNK細胞もしくは所与の体積の灌流液から期待される腫瘍/感染症抑制の程度又は量(すなわち、効力)を決定することができる。例えば、一定の分量又は試料数の細胞を、そのようにしない場合には腫瘍/感染細胞が増殖するであろう条件下で、既知の数の腫瘍/感染細胞と接触又は近接させ、胎盤灌流液、灌流液細胞、胎盤ナチュラルキラー細胞、又はそれらの組合せの存在下における経時的な(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10週、又はそれより長い間の)腫瘍/感染細胞の増殖速度を、灌流液、灌流液細胞、胎盤ナチュラルキラー細胞、又はそれらの組合せの不存在下における同等数の腫瘍/感染細胞の増殖と比較する。該細胞の効力は、例えば、腫瘍細胞の増殖/感染症の伝播を、例えば、約10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、又は同様の程度抑制するために必要とされる細胞の数又は溶液の容積として表すことができる。  
40

#### 【0142】

ある実施態様において、本明細書に記載されるプロセスを用いて製造されるNK細胞、例  
50

えば、活性化NK細胞又はTSPNK細胞(例えば、NK前駆細胞)は、医薬品等級の投与可能なユニットとして提供される。そのようなユニットは、例えば、15mL、20mL、25mL、30nL、35mL、40mL、45mL、50mL、55mL、60mL、65mL、70mL、75mL、80mL、85mL、90mL、95mL、100mL、150mL、200mL、250mL、300mL、350mL、400mL、450mL、500mLなどの個別の容積で提供することができる。そのようなユニットは、他のNK細胞又は灌流液細胞と組み合わせた特定の数の細胞、例えば、NK細胞もしくはNK細胞集団、又はNK前駆細胞集団、例えば、1ミリリットルあたり $1 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ 個もしくはそれより多くの細胞、又は1ユニットあたり $1 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$ 、 $5 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^{10}$ 、 $5 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{11}$ 個もしくはそれより多くの細胞を含有するように提供することができる。  
10 具体的な実施態様において、該ユニットは、1ミリリットルあたり約、少なくとも約、もしくは多くとも約 $1 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ もしくはそれより多くのNK細胞、又は1ユニットあたり $1 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$ 、 $5 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^{10}$ 、 $5 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{11}$ 個もしくはそれより多くの細胞を含むことができる。そのようなユニットは、特定の数のNK細胞、及び/又は他の細胞のうちのいずれかを含有するように提供することができる。

#### 【0143】

上記の実施態様において、NK細胞、又はNK細胞と灌流液細胞もしくは灌流液との組合せは、レシピエントにとって自己のもの(すなわち、該レシピエントから得られたもの)とすることができ、又はレシピエントにとって同種異系(すなわち、少なくとも1人の該レシピエント以外の他の個体から得られたもの)とすることもできる。  
20

#### 【0144】

ある実施態様において、細胞の各々のユニットに表示を付けて、容積、細胞の数、細胞のタイプ、該ユニットが特定のタイプの細胞について濃縮されているかどうか、及び/又は該ユニット中の所与の数の細胞、もしくは該ユニットの所与のミリリットル数の効力、すなわち、該ユニット中の細胞が、特定のタイプ(単数もしくは複数)の腫瘍細胞の増殖の測定可能な抑制を引き起こすかどうかの1以上を明記する。

#### 【0145】

(5.1.5.2. マッチした灌流液及び臍帯血由来のNK細胞の組合せ)

30

本発明において、ナチュラルキラー細胞をさらに、胎盤灌流液及び臍帯血のマッチしたユニットの組合せから得ることができ、本明細書では、これを、組み合わされたナチュラルキラー細胞と称する。本明細書で使用されるように、「マッチしたユニット」とは、前記NK細胞が、胎盤灌流液細胞及び臍帯血細胞から得たものであり、ここで、該臍帯血細胞は、該胎盤灌流液を得た胎盤由来の臍帯血から得られたものである、すなわち、該胎盤灌流液細胞及び臍帯血細胞、並びに従って各々に由来するナチュラルキラー細胞が、同じ個体由来のものであることを示す。

#### 【0146】

ある実施態様において、前記組み合わされた胎盤キラー細胞は、CD56<sup>+</sup>及びCD16<sup>-</sup>であるナチュラルキラー細胞のみを含むか、又は実質的にそれのみを含む。ある他の実施態様において、前記組み合わされた胎盤キラー細胞は、CD56<sup>+</sup>及びCD16<sup>-</sup>であるNK細胞、及びCD56<sup>+</sup>及びCD16<sup>+</sup>であるNK細胞を含む。具体的なある実施態様において、前記組み合わされた胎盤キラー細胞は、少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は99.5%のCD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>ナチュラルキラー細胞(PiNK細胞)を含む。  
40

#### 【0147】

一実施態様において、前記組み合わされたナチュラルキラー細胞は、培養されていない。具体的な実施態様において、前記組み合わされたナチュラルキラー細胞は、同等数の末梢血由来のナチュラルキラー細胞よりも、検出可能な程度に多い数のCD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>ナチュラルキラー細胞を含む。別の具体的な実施態様において、前記組み合わされたナチュラルキラー細胞は、同等数の末梢血由来のナチュラルキラー細胞よりも、検出可能な程度に  
50

少ない数のCD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>ナチュラルキラー細胞を含む。別の具体的な実施態様において、前記組み合わされたナチュラルキラー細胞は、同等数の末梢血由来のナチュラルキラー細胞よりも、検出可能な程度に多い数のCD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>KIR2DL2/L3<sup>+</sup>ナチュラルキラー細胞を含む。別の具体的な実施態様において、前記組み合わされたナチュラルキラー細胞は、同等数の末梢血由来のナチュラルキラー細胞よりも、検出可能な程度に少ない数のCD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>NKp46<sup>+</sup>ナチュラルキラー細胞を含む。別の具体的な実施態様において、前記組み合わされたナチュラルキラー細胞は、同等数の末梢血由来のナチュラルキラー細胞よりも、検出可能な程度に少ない数のCD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>NKp30<sup>+</sup>ナチュラルキラー細胞を含む。別の具体的な実施態様において、前記組み合わされたナチュラルキラー細胞は、同等数の末梢血由来のナチュラルキラー細胞よりも、検出可能な程度に少ない数のCD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>2B4<sup>+</sup>ナチュラルキラー細胞を含む。別の具体的な実施態様において、前記組み合わされたナチュラルキラー細胞は、同等数の末梢血由来のナチュラルキラー細胞よりも、検出可能な程度に少ない数のCD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD94<sup>+</sup>ナチュラルキラー細胞を含む。10

#### 【0148】

別の実施態様において、前記組み合わされたナチュラルキラー細胞は、例えば、21日間培養されている。具体的な実施態様において、前記組み合わされたナチュラルキラー細胞は、同等数の末梢血由来のナチュラルキラー細胞よりも、検出可能な程度に少ない数のCD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>KIR2DL2/L3<sup>+</sup>ナチュラルキラー細胞を含む。別の具体的な実施態様において、前記組み合わされたナチュラルキラー細胞は、培養されていない。別の具体的な実施態様において、前記組み合わされたナチュラルキラー細胞は、同等数の末梢血由来のナチュラルキラー細胞よりも、検出可能な程度に多い数のCD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>NKp44<sup>+</sup>ナチュラルキラー細胞を含む。具体的な実施態様において、前記組み合わされたナチュラルキラー細胞は、同等数の末梢血由来のナチュラルキラー細胞よりも、検出可能な程度に多い数のCD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>NKp30<sup>+</sup>ナチュラルキラー細胞を含む。20

#### 【0149】

別の実施態様において、前記組み合わされたナチュラルキラー細胞は、同等数の末梢血ナチュラルキラー細胞よりも、検出可能な程度に多い量のグランザイムBを発現する。

#### 【0150】

組み合わされたナチュラルキラー細胞はさらに、臍帯血と組み合わせることができる。様々な実施態様において、臍帯血は、臍帯血1ミリリットルあたり約 $1 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ 個の組み合わされたナチュラルキラー細胞で、組み合わされたナチュラルキラー細胞と組み合わされる。30

#### 【0151】

##### (5.1.5.3.NK細胞と接着性胎盤幹細胞との組合せ)

他の実施態様において、単独又は胎盤灌流液もしくは胎盤灌流液細胞との組合せのいずれかでの、本明細書に記載されるプロセスを用いて製造されるNK細胞、例えば、本明細書に記載される3工程プロセスを用いて製造される活性化NK細胞又はTSPNK細胞(例えば、NK前駆細胞)に、例えば、その開示が引用により完全に本明細書中に組み込まれる、Haririの米国特許第7,045,148号及び第7,255,879号、並びに米国特許出願公開第2007/0275362号に記載されている、単離された接着性胎盤細胞、例えば、胎盤幹細胞及び胎盤多能性細胞を補充する。「接着性胎盤細胞」とは、該細胞が、組織培養物表面、例えば、組織培養プラスチックに接着することを意味する。本明細書において開示される組成物及び方法において有用な接着性胎盤細胞は、栄養芽細胞でも、胚性生殖細胞でも、胚性幹細胞でもない。ある実施態様において、接着性胎盤幹細胞を、上述のようなプロセス(例えば、2工程方法)でフィーダー細胞として用いる。40

#### 【0152】

単独又は胎盤灌流液もしくは胎盤灌流液細胞との組合せのいずれかでの、本明細書に記載されるプロセスを用いて製造されるNK細胞、例えば、活性化NK細胞又はTSPNK細胞(例えば、NK前駆細胞)に、例えば、1ミリリットルあたり $1 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ もしくはそれより多くの接着性胎盤細50

胞、又は $1 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$ 、 $5 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^{10}$ 、 $5 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{11}$ もしくはそれより多くの接着性胎盤細胞を補充することができる。該組合せ中の接着性胎盤細胞は、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、又は40集団倍加の間、又はそれより長い間培養された、例えば、接着性胎盤細胞とすることができる。

#### 【0153】

単離された接着性胎盤細胞は、初代培養で培養するか又は細胞培養で増殖したとき、組織培養基材、例えば、組織培養容器表面(例えば、組織培養プラスチック)に接着する。培養下の接着性胎盤細胞は、通常、線維芽細胞のような星状の外観をしており、いくつかの細胞質突起が中央の細胞体から伸びている。しかしながら、接着性胎盤細胞は、線維芽細胞が示すよりも多くのそのような突起を示すので、接着性胎盤細胞は、同じ条件下で培養された線維芽細胞と形態的に区別することができる。形態的には、接着性胎盤細胞は、造血幹細胞からも区別することができ、造血幹細胞は、通常、培養下では、より丸みを帯びた、又は敷石状の形態をとる。10

#### 【0154】

本明細書において提供される組成物及び方法において有用な単離された接着性胎盤細胞、及び接着性胎盤細胞の集団は、該細胞、又は該接着性胎盤細胞を含む細胞の集団を同定及び/又は単離するために使用することができる複数のマーカーを発現する。本明細書において提供される組成物及び方法において有用な接着性胎盤細胞、及び接着性胎盤細胞集団には、胎盤、又は任意のその部分(例えば、羊膜、絨毛膜、羊膜-絨毛膜板、胎盤葉、臍帶など)から直接的に得られる接着性胎盤細胞及び接着性胎盤細胞含有細胞集団が含まれる。接着性胎盤幹細胞集団は、一実施態様において、培養下の接着性胎盤幹細胞の集団(即ち、2個以上の接着性胎盤幹細胞)、例えば、容器、例えば、バッグの中の集団である。20

#### 【0155】

接着性胎盤細胞は、通常、マーカーCD73、CD105、及びCD200、並びに/又はOCT-4を発現し、かつCD34も、CD38も、CD45も発現しない。接着性胎盤幹細胞は、HLA-ABC(MHC-1)及びHLA-DRを発現することもできる。これらのマーカーを用いて、接着性胎盤細胞を同定し、かつ該接着性胎盤細胞を他の細胞型と区別することができる。接着性胎盤細胞は、CD73及びCD105を発現することができるので、それらは、間葉系幹細胞様の特徴を有することができる。CD34、CD38、及び/又はCD45の発現の欠如により、接着性胎盤幹細胞は非造血幹細胞とみなされる。30

#### 【0156】

ある実施態様において、本明細書に記載される単離された接着性胎盤細胞は、がん細胞増殖又は腫瘍成長を検出可能な程度に抑制する。

#### 【0157】

ある実施態様において、単離された接着性胎盤細胞は、単離された胎盤幹細胞である。ある他の実施態様において、単離された接着性胎盤細胞は、単離された胎盤複能性細胞である。具体的な実施態様において、単離された接着性胎盤細胞は、フローサイトメトリーによって検出したとき、CD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、及びCD105<sup>+</sup>である。より具体的な実施態様において、該単離されたCD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>接着性胎盤細胞は、胎盤幹細胞である。別のより具体的な実施態様において、該単離されたCD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>胎盤細胞は、複能性接着性胎盤細胞である。別の具体的な実施態様において、該単離されたCD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>胎盤細胞は、神經表現型の細胞、骨形成表現型の細胞、又は軟骨形成表現型の細胞に分化する潜在能力を有する。より具体的な実施態様において、該単離されたCD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>接着性胎盤細胞はさらに、CD200<sup>+</sup>である。別のより具体的な実施態様において、該単離されたCD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>接着性胎盤細胞はさらに、フローサイトメトリーによって検出したとき、CD90<sup>+</sup>又はCD45<sup>-</sup>である。別のより具体的な実施態様において、該単離されたCD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>接着性胎盤細胞はさらに、フローサイトメトリーによって検出したとき、CD90<sup>+</sup>又はCD45<sup>-</sup>である。より具体的な実施態様において、該CD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>40  
50

5<sup>+</sup>、CD200<sup>+</sup>接着性胎盤細胞はさらに、フローサイトメトリーによって検出したとき、CD90<sup>+</sup>又はCD45<sup>-</sup>である。別のより具体的な実施態様において、該CD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>、CD20<sup>0</sup><sup>+</sup>接着性胎盤細胞はさらに、フローサイトメトリーによって検出したとき、CD90<sup>+</sup>及びCD45<sup>-</sup>である。別のより具体的な実施態様において、該CD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>、CD200<sup>+</sup>、CD90<sup>+</sup>、CD45<sup>-</sup>接着性胎盤細胞はさらに、フローサイトメトリーによって検出したとき、CD80<sup>-</sup>及びCD86<sup>-</sup>である。

#### 【0158】

一実施態様において、該単離された接着性胎盤細胞は、CD200<sup>+</sup>、HLA-G<sup>+</sup>である。具体的な実施態様において、該単離された接着性胎盤細胞はまた、CD73<sup>+</sup>及びCD105<sup>+</sup>である。別の具体的な実施態様において、該単離された接着性胎盤細胞はまた、CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup>又はCD45<sup>-</sup>である。より具体的な実施態様において、該単離された接着性胎盤細胞はまた、CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup>、CD45<sup>-</sup>、CD73<sup>+</sup>、及びCD105<sup>+</sup>である。別の実施態様において、該単離された接着性胎盤細胞は、胚様体(embryoid-like bodies)の形成を可能にする条件下で培養したときに、1以上の胚様体を產生する。10

#### 【0159】

別の実施態様において、単離された接着性胎盤細胞は、CD73<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>、CD200<sup>+</sup>である。具体的な実施態様において、該単離された接着性胎盤細胞はまた、HLA-G<sup>+</sup>である。別の具体的な実施態様において、該単離された接着性胎盤細胞はまた、CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup>又はCD45<sup>-</sup>である。別の具体的な実施態様において、該単離された接着性胎盤細胞はまた、CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup>、及びCD45<sup>-</sup>である。より具体的な実施態様において、該単離された接着性胎盤細胞はまた、CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup>、CD45<sup>-</sup>、及びHLA-G<sup>+</sup>である。別の具体的な実施態様において、該単離された接着性胎盤細胞は、胚様体の形成を可能にする条件下で培養したときに、1以上の胚様体を產生する。20

#### 【0160】

別の実施態様において、単離された接着性胎盤細胞は、CD200<sup>+</sup>、OCT-4<sup>+</sup>である。具体的な実施態様において、該単離された接着性胎盤細胞はまた、CD73<sup>+</sup>及びCD105<sup>+</sup>である。別の具体的な実施態様において、該単離された接着性胎盤細胞はまた、HLA-G<sup>+</sup>である。別の具体的な実施態様において、該単離された接着性胎盤細胞はまた、CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup>、及びCD45<sup>-</sup>である。より具体的な実施態様において、該単離された接着性胎盤細胞はまた、CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup>、CD45<sup>-</sup>、CD73<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>、及びHLA-G<sup>+</sup>である。別の具体的な実施態様において、該単離された接着性胎盤細胞はまた、胚様体の形成を可能にする条件下で培養したときに、1以上の胚様体を產生する。30

#### 【0161】

別の実施態様において、単離された接着性胎盤細胞は、CD73<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>、及びHLA-G<sup>+</sup>である。具体的な実施態様において、該単離された接着性胎盤細胞はまた、CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup>、又はCD45<sup>-</sup>である。別の具体的な実施態様において、該単離された接着性胎盤細胞はまた、CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup>、及びCD45<sup>-</sup>である。別の具体的な実施態様において、該接着性幹細胞はまた、OCT-4<sup>+</sup>である。別の具体的な実施態様において、該接着性幹細胞はまた、CD200<sup>+</sup>である。より具体的な実施態様において、該接着性幹細胞はまた、CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup>、CD45<sup>-</sup>、OCT-4<sup>+</sup>、及びCD200<sup>+</sup>である。40

#### 【0162】

別の実施態様において、単離された接着性胎盤細胞は、CD73<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>幹細胞であり、ここで、該細胞は、胚様体の形成を可能にする条件下で1以上の胚様体を產生する。具体的な実施態様において、該単離された接着性胎盤細胞はまた、CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup>又はCD45<sup>-</sup>である。別の具体的な実施態様において、単離された接着性胎盤細胞はまた、CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup>、及びCD45<sup>-</sup>である。別の具体的な実施態様において、単離された接着性胎盤細胞はまた、OCT-4<sup>+</sup>である。より具体的な実施態様において、該単離された接着性胎盤細胞はまた、OCT-4<sup>+</sup>、CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup>、及びCD45<sup>-</sup>である。

#### 【0163】

別の実施態様において、接着性胎盤幹細胞は、OCT-4<sup>+</sup>幹細胞であり、ここで、該接着性

50

胎盤幹細胞は、胚様体の形成を可能にする条件下で培養したときに、1以上の胚様体を產生し、かつ該幹細胞は、がん細胞増殖又は腫瘍成長を検出可能な程度に抑制すると確認されている。

#### 【 0 1 6 4 】

様々な実施態様において、該単離された接着性胎盤細胞の少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、又は少なくとも95%は、OCT-4<sup>+</sup>である。具体的な実施態様において、該単離された接着性胎盤細胞はまた、CD73<sup>+</sup>及びCD105<sup>+</sup>である。別の具体的な実施態様において、該単離された接着性胎盤細胞はまた、CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup>、又はCD45<sup>-</sup>である。別の具体的な実施態様において、該幹細胞は、CD200<sup>+</sup>である。より具体的な実施態様において、該単離された接着性胎盤細胞はまた、CD73<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>、CD200<sup>+</sup>、CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup>、及びCD45<sup>-</sup>である。別の具体的な実施態様において、該単離された接着性胎盤細胞は、増殖されたもの、例として、例えば、少なくとも1回、少なくとも3回、少なくとも5回、少なくとも10回、少なくとも15回、又は少なくとも20回継代されたものである。10

#### 【 0 1 6 5 】

上記の実施態様のいずれかのより具体的な実施態様において、単離された接着性胎盤細胞は、ABC-p(胎盤特異的ABC輸送体タンパク質; 例えば、Allikmetsらの文献、Cancer Res. 58(23):5337-9(1998)参照)を発現する。

#### 【 0 1 6 6 】

別の実施態様において、単離された接着性胎盤細胞は、CD29<sup>+</sup>、CD44<sup>+</sup>、CD73<sup>+</sup>、CD90<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>、CD200<sup>+</sup>、CD34<sup>-</sup>、及びCD133<sup>-</sup>である。別の実施態様において、単離された接着性胎盤細胞は、IL-6、IL-8、及び単球走化性タンパク質(MCP-1)を構成的に分泌する。20

#### 【 0 1 6 7 】

上で参照されている単離された接着性胎盤細胞の各々は、哺乳動物胎盤から直接得られ、単離された細胞、又は培養され、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、25、30回、もしくはそれより多くの回数継代された細胞、又はそれらの組合せを含むことができる。腫瘍細胞抑制性の複数の上記の単離された接着性胎盤細胞は、約、少なくとも、又は最高で、 $1 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$ 、 $5 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^{10}$ 、 $5 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{11}$ 個、又はそれより多くの単離された接着性胎盤細胞を含むことができる。30

#### 【 0 1 6 8 】

(5.1.5.4. 接着性胎盤細胞馴化培地を含む組成物)

また、本発明において使用することができるものは、本明細書に記載されるプロセスを用いて製造されるNK細胞、例えば、本明細書に記載される3工程プロセスを用いて製造される活性化NK細胞又はTSPNK細胞(例えば、NK前駆細胞)、及びさらに、馴化培地を含む組成物であり、ここで、該組成物は、腫瘍抑制性であるか、又は癌もしくはウイルス感染の治療において効果がある。本明細書に記載の接着性胎盤細胞を用いて、腫瘍細胞抑制性、抗がん性、又は抗ウイルス性である馴化培地、すなわち、検出可能な腫瘍細胞抑制効果、抗癌効果、又は抗ウイルス効果を有する細胞によって分泌又は排出される1以上の生体分子を含む培地を製造することができる。様々な実施態様において、馴化培地は、該細胞が、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14日、又はそれより長い日数、その中で増殖した(すなわち、培養された)培地を含む。他の実施態様において、馴化培地は、そのような細胞が、少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%コンフルエンス、又は100%コンフルエンスにまでその中で成長した培地を含む。そのような馴化培地を用いて、細胞、例えば、胎盤細胞、又は別の種類の細胞の別々の集団の培養を支援することができる。別の実施態様において、本明細書に提供される馴化培地は、単離された接着性胎盤細胞、例えば、単離された接着性胎盤幹細胞又は単離された接着性胎盤複能性細胞、及び単離された接着性胎盤細胞以外の細胞、例えば、非胎盤幹細胞又は複能性細胞がその中で培養された培地を含む。40

#### 【 0 1 6 9 】

そのような馴化培地を、本明細書に記載されるプロセスを用いて製造されるNK細胞、例えば、活性化NK細胞又はTSPNK細胞(例えば、NK前駆細胞)、胎盤灌流液、胎盤灌流液細胞のいずれか、又はこれらの任意の組合せと組み合わせて、腫瘍細胞抑制性、抗がん性、又は抗ウイルス性である組成物を形成させることができる。ある実施態様において、該組成物は、容積で半分未満の、例えば、容積で約50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、もしくは1%、又は約50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、もしくは1%未満の馴化培地を含む。

#### 【0170】

したがって、一実施態様において、本発明において用いられるものは、本明細書に記載されるプロセスを用いて製造されるNK細胞、例えば、活性化NK細胞又はTSPNK細胞(例えば、NK前駆細胞)、及び単離された接着性胎盤細胞の培養物由来の培養培地を含む組成物であり、ここで、該単離された接着性胎盤細胞は、(a)基材に接着し;かつ(b)CD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、及びCD105<sup>+</sup>であり;ここで、該組成物は、腫瘍細胞の成長もしくは増殖を検出可能な程度に抑制するか、又は抗がん性もしくは抗ウイルス性である。具体的な実施態様において、単離された接着性胎盤細胞は、フローサイトメトリーによって検出したとき、CD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、及びCD105<sup>+</sup>である。より具体的な実施態様において、該単離されたCD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>接着性胎盤細胞は、胎盤幹細胞である。別のより具体的な実施態様において、該単離されたCD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>胎盤細胞は、複能性接着性胎盤細胞である。別の具体的な実施態様において、該単離されたCD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>胎盤細胞は、神経表現型の細胞、骨形成表現型の細胞、又は軟骨形成表現型の細胞に分化する潜在能力を有する。より具体的な実施態様において、該単離されたCD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>接着性胎盤細胞はさらに、CD200<sup>+</sup>である。別のより具体的な実施態様において、該単離されたCD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>接着性胎盤細胞はさらに、フローサイトメトリーによって検出したとき、CD90<sup>+</sup>又はCD45<sup>-</sup>である。別のより具体的な実施態様において、該単離されたCD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>接着性胎盤細胞はさらに、フローサイトメトリーによって検出したとき、CD90<sup>+</sup>又はCD45<sup>-</sup>である。より具体的な実施態様において、該CD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>、CD200<sup>+</sup>接着性胎盤細胞はさらに、フローサイトメトリーによって検出したとき、CD90<sup>+</sup>又はCD45<sup>-</sup>である。別のより具体的な実施態様において、該CD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>、CD200<sup>+</sup>接着性胎盤細胞はさらに、フローサイトメトリーによって検出したとき、CD90<sup>+</sup>及びCD45<sup>-</sup>である。別のより具体的な実施態様において、該CD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>、CD200<sup>+</sup>、CD90<sup>+</sup>、CD45<sup>-</sup>接着性胎盤細胞はさらに、フローサイトメトリーによって検出したとき、CD80<sup>-</sup>及びCD86<sup>-</sup>である。

#### 【0171】

別の実施態様において、本発明において用いられるものは、本明細書に記載されるプロセスを用いて製造されるNK細胞、例えば、活性化NK細胞又はTSPNK細胞(例えば、NK前駆細胞)、及び単離された接着性胎盤細胞の培養物由来の培養培地を含む組成物であり、ここで、該単離された接着性胎盤細胞は、(a)基材に接着し;かつ(b)CD200及びHLA-Gを発現するか、又はCD73、CD105、及びCD200を発現するか、又はCD200及びOCT-4を発現するか、又はCD73、CD105、及びHLA-Gを発現するか、又はCD73及びCD105を発現し、かつ胎盤幹細胞を含む胎盤細胞の集団を胚様体の形成を可能にする条件下で培養したときに、該集団内の1以上の胚様体の形成を促進するか、又はOCT-4を発現し、かつ胎盤幹細胞を含む胎盤細胞の集団を胚様体の形成を可能にする条件下で培養したときに、該集団内の1以上の胚様体の形成を促進し;ここで、該組成物は、腫瘍細胞の成長もしくは増殖を検出可能な程度に抑制するか、又は抗癌性もしくは抗ウイルス性である。具体的な実施態様において、該組成物は、複数の該単離された胎盤接着性細胞をさらに含む。別の具体的な実施態様において、該組成物は、複数の非胎盤細胞を含む。より具体的な実施態様において、該非胎盤細胞はCD34<sup>+</sup>細胞、例えば、造血前駆細胞、例えば、末梢血造血前駆細胞、臍帯血造血前駆細胞、又は胎盤血造血前駆細胞を含む。該非胎盤細胞は、幹細胞、例えば、間葉系幹細胞、例えば、骨髄由来間葉系幹細胞を含むこともできる。該非胎盤細胞は、1種類以上の成体細胞又は細胞株とすることもできる。別の具体的な実施態様において、該組成物は、抗

10

20

30

40

50

増殖剤、例えば、抗MIP-1 又は抗MIP-1 抗体を含む。

【0172】

具体的な実施態様において、上記の細胞又は細胞組合せのうちの1つによって馴化された培養培地は、約1:1、約2:1、約3:1、約4:1、又は約5:1の単離された接着性胎盤細胞対腫瘍細胞の比率で複数の腫瘍細胞と共に培養した複数の単離された接着性胎盤細胞から得られる。例えば、馴化された培養培地又は上清は、約 $1 \times 10^5$ 個の単離された接着性胎盤細胞、約 $1 \times 10^6$ 個の単離された接着性胎盤細胞、約 $1 \times 10^7$ 個の単離された接着性胎盤細胞、もしくは約 $1 \times 10^8$ 個の単離された接着性胎盤細胞、又はそれより多くのものを含む培養物から得ることができる。別の具体的な実施態様において、馴化された培養培地又は上清は、約 $1 \times 10^5$ ～約 $5 \times 10^5$ 個の単離された接着性胎盤細胞及び約 $1 \times 10^5$ 個の腫瘍細胞；約 $1 \times 10^6$ ～約 $5 \times 10^6$ 個の単離された接着性胎盤細胞及び約 $1 \times 10^6$ 個の腫瘍細胞；約 $1 \times 10^7$ ～約 $5 \times 10^7$ 個の単離された接着性胎盤細胞及び約 $1 \times 10^7$ 個の腫瘍細胞；又は約 $1 \times 10^8$ ～約 $5 \times 10^8$ 個の単離された接着性胎盤細胞及び約 $1 \times 10^8$ 個の腫瘍細胞を含む共培養物から得られる。10

【0173】

(5.2.NK細胞を製造する方法)

NK細胞は、任意の供給源、例えば、胎盤組織、胎盤灌流液、臍帯血、胎盤血、末梢血、脾臓、肝臓など由来の造血細胞、例えば、造血幹又は前駆体から製造してもよい。

【0174】

ナチュラルキラー細胞及び上述のようにナチュラルキラー細胞を誘導するために使用することができる細胞の1つの重要な供給源は、胎盤、例えば、満期胎盤、例えば、満期ヒト胎盤である。胎盤灌流液細胞を含む胎盤灌流液は、例えば、各々の開示の全体が本明細書に組み込まれている、米国特許第7,045,148号及び第7,468,276号、並びに米国特許出願公開第2009/0104164号に開示されている方法により得ることができる。20

【0175】

(5.2.1.細胞回収組成物)

それから造血幹又は前駆体を単離してもよい前記胎盤灌流液及び灌流液細胞、又は、例えば、前記NK細胞、例えば、本明細書において提供される3段階法により製造されるNK細胞集団との組合せにより腫瘍抑制もしくは、腫瘍細胞、がん、又はウイルス感染を有する個体の治療において有用な、前記胎盤灌流液及び灌流液細胞は、胎盤細胞回収組成物を用いた、哺乳動物、例えば、ヒト分娩後胎盤の灌流により回収することができる。灌流液は、任意の生理的に許容し得る溶液、例えば、生理食塩水溶液、培養培地、又はより複雑な細胞回収組成物を用いる胎盤の灌流によって、胎盤から回収することができる。胎盤の灌流、並びに灌流液細胞の回収及び保存に好適な細胞回収組成物は、引用により完全に本明細書中に組み込まれる関連米国特許出願公開第2007/0190042号に詳細に記載されている。30

【0176】

細胞回収組成物は、幹細胞の回収及び/又は培養に好適な任意の生理的に許容し得る溶液、例えば、生理食塩水溶液(例えば、リン酸緩衝生理食塩水、クレブス溶液、改変クレブス溶液、イーグル溶液、0.9%NaClなど)、培養培地(例えば、DMEM、H.DMEMなど)などを含むことができる。

【0177】

細胞回収組成物は、回収の時点から培養の時点まで胎盤細胞を保存する、すなわち、胎盤細胞の死を防止するか、又は胎盤細胞の死を遅延させるか、死滅する細胞の集団内の胎盤細胞の数を低下させるなどの傾向がある1以上の成分を含むことができる。そのような成分は、例えば、アポトーシス阻害剤(例えば、カスパーゼ阻害剤もしくはJNK阻害剤)；血管拡張剤(例えば、硫酸マグネシウム、抗高血圧薬、心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)、副腎皮質刺激ホルモン、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン、ニトロブルシドナトリウム、ヒドララジン、アデノシン三リン酸、アデノシン、インドメタシン、もしくは硫酸マグネシウム、ホスホジエステラーゼ阻害剤など)；壞死阻害剤(例えば、2-(1H-インドール-3-イル)-3-ペンチルアミノ-マレイミド、ピロリジンジチオカルバメート、もしくはクロナゼパム)；TNF- 阻害剤；及び/又は酸素運搬ペルフルオロカーボン(例えば、臭化ペルフ40  
50

ルオロオクチル、臭化ペルフルオロデシルなど)とすることができます。

**【0178】**

細胞回収組成物は、1以上の組織分解酵素、例えば、メタロプロテアーゼ、セリンプロテアーゼ、中性プロテアーゼ、ヒアルロニダーゼ、RNアーゼ、又はDNアーゼなどを含むことができる。そのような酵素としては、コラゲナーゼ(例えば、コラゲナーゼI、II、III、又はIV、クロストリジウム・ヒストリチクム(*Clostridium histolyticum*)に由来するコラゲナーゼなど);ディスパーーゼ、サーモリシン、エラスターーゼ、トリプシン、LIBERASE、ヒアルロニダーゼなどが挙げられるが、これらに限定されない。

**【0179】**

細胞回収組成物は、殺菌又は静菌有効量の抗生物質を含むことができる。ある非制限的な実施態様において、抗生物質は、マクロライド(例えば、トブラマイシン)、セファロスポリン(例えば、セファレキシン、セフラジン、セフロキシム、セフプロジル、セファクロル、セフィキシム、もしくはセファドロキシリ)、クラリソロマイシン、エリスロマイシン、ペニシリン(例えば、ペニシリンV)、又はキノロン(例えば、オフロキサシン、シブロフロキサシン、もしくはノルフロキサシン)、テトラサイクリン、ストレプトマイシンなどである。特定の実施態様において、抗生物質は、グラム(+)及び/又はグラム(-)細菌、例えば、緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)などに対して活性がある。

**【0180】**

細胞回収組成物は、以下の化合物のうちの1つ以上を含むこともできる:アデノシン(約1 mM ~ 約50mM);D-グルコース(約20mM ~ 約100mM);マグネシウムイオン(約1mM ~ 約50mM);一実施態様において、内皮の完全性及び細胞の生存能力を維持するのに十分な量で存在する、分子量20,000ダルトン超の巨大分子(例えば、約25g/l ~ 約100g/l、もしくは約40g/l ~ 約60g/lで存在する、合成もしくは天然のコロイド、デキストランなどの多糖類、もしくはポリエチレンギリコール);酸化防止剤(例えば、約25 μM ~ 約100 μMで存在するブチル化ヒドロキシアニソール、ブチル化ヒドロキシトルエン、グルタチオン、ビタミンC、もしくはビタミンE);還元剤(例えば、約0.1mM ~ 約5mMで存在するN-アセチルシステイン);細胞内へのカルシウム進入を防止する薬剤(例えば、約2 μM ~ 約25 μMで存在するベラパミル);ニトログリセリン(例えば、約0.05g/L ~ 約0.2g/L);一実施態様において、残留血液の凝固の防止を助けるのに十分な量で存在する抗凝血剤(例えば、約1000ユニット/l ~ 約100,000ユニット/lの濃度で存在するヘパリンもしくはヒルジン);又はアミロライド含有化合物(例えば、約1.0 μM ~ 約5 μMで存在するアミロライド、エチルイソプロピルアミロライド、ヘキサメチレンアミロライド、ジメチルアミロライド、もしくはイソブチルアミロライド)。

**【0181】**

(5.2.2. 胎盤の回収及び取扱い)

一般に、ヒト胎盤は、出産後の該胎盤の娩出後直ちに回収される。一実施態様において、該胎盤は、インフォームドコンセントの後、かつ患者の完全な病歴を得て該胎盤と関連付けられた後に、患者から回収される。一実施態様において、該病歴は、分娩後も続く。

**【0182】**

灌流液の回収前に、臍帯血及び胎盤血を除去する。ある実施態様において、分娩後、胎盤内の臍帯血を回収する。胎盤は、従来の臍帯血の回収プロセスに供することができる。通常、針又はカニューレを用い、重力の助けを借りて、胎盤を放血させる(例えば、Andersonの米国特許第5,372,581号:Hesselらの米国特許第5,415,665号を参照されたい)。針又はカニューレを、通常、臍帯静脈内に留置し、胎盤を穏やかにマッサージして、胎盤からの臍帯血の排出を助けることができる。そのような臍帯血の回収は、商業的に、例えば、LifeBank Inc.、Cedar Knolls、N.J.、ViaCord、Cord Blood Registry、及びCryoCellにより行われてもよい。一実施態様において、臍帯血を回収する間の組織破壊を最小限に抑えるために、胎盤をそれ以上操作することなく、重力排出させる。

**【0183】**

通常、臍帯血の回収及び灌流液の回収のために、胎盤を、分娩室又は出産室から別の場

10

20

30

40

50

所、例えば、実験室まで輸送する。例えば、胎盤を、近位臍帯をクランプしたまま、滅菌されたジップロック式プラスチックバッグの中に入れ、その後、このプラスチックバッグを断熱容器内に入れることによって、胎盤を(胎盤の温度を20~28℃に維持する)滅菌された断熱輸送装置に入れて輸送することができる。別の実施態様において、米国特許第7,147,626号に実質的に記載されているように、胎盤を臍帯血回収キットに入れて輸送する。一実施態様において、胎盤を、分娩から4~24時間後に、実験室に移送する。ある実施態様において、臍帯血の回収前に、近位臍帯を、例えば胎盤への挿入部から4~5cm(センチメートル)以内のところでクランプする。他の実施態様において、臍帯血の回収後、しかし、それ以上の胎盤の処理前に、近位臍帯をクランプする。

## 【0184】

10

胎盤を、灌流液の回収前に、滅菌条件下、かつ室温又は5~25℃の温度(摂氏)のどちらかで保存することができる。胎盤を灌流して残留臍帯血を除去する前に、胎盤を、48時間よりも長い時間、又は4~24時間保存してもよい。胎盤は、5~25℃の温度(摂氏)で、抗凝血剤溶液に入れて保存することができる。好適な抗凝血剤溶液は当技術分野で周知である。例えば、ヘパリン又はワルファリンナトリウム溶液を用いることができる。一実施態様において、抗凝血剤溶液は、ヘパリン溶液(例えば、1:1000溶液中に1%w/w)を含む。いくつかの実施態様において、放血された胎盤は、胎盤灌流液を回収する前に、36時間を超えない時間、保存する。

## 【0185】

20

## (5.2.3. 胎盤灌流)

哺乳動物の胎盤を灌流する方法及び胎盤灌流液を得る方法は、例として、例えば、その各々の開示が引用により完全に本明細書中に組み込まれる、Haririの米国特許第7,045,148号及び第7,255,879号、並びに米国特許出願公開第2009/0104164号、同第2007/0190042号、及び米国特許第8,057,788号として発行されている米国特許出願公開第20070275362号に開示されている。

## 【0186】

30

灌流液は、灌流溶液、例えば、生理食塩水溶液、培養培地、又は上記の細胞回収組成物を、胎盤脈管構造に通すことによって得ることができる。一実施態様において、哺乳動物の胎盤を、灌流溶液を臍帯動脈と臍帯静脈のどちらか又は両方に通すことによって灌流する。胎盤を通る灌流溶液の流れを、例えば、胎盤の中への重力流を用いて達成することができる。例えば、灌流溶液を、ポンプ、例えば、蠕動ポンプを用いて、胎盤に強制的に通す。臍帯静脈に、例えば、滅菌チューブなどの滅菌された接続装置に接続されているカニューレ、例えば、TEFLON(登録商標)又はプラスチックカニューレを挿入することができる。この滅菌された接続装置は、灌流マニホールドに接続されている。

## 【0187】

40

灌流に備えて、臍帯動脈及び臍帯静脈が胎盤の最も高い地点に位置するような形で、胎盤を配置することができる。灌流溶液を胎盤脈管構造に通すか、又は胎盤脈管構造及び周辺組織に通すことによって、胎盤を灌流することができる。一実施態様において、臍帯動脈及び臍帯静脈を、可撓性コネクタを介して灌流溶液のリザーバに接続されているピペットに同時に接続する。灌流溶液を臍帯静脈及び臍帯動脈に通す。灌流溶液は、血管壁から滲出し、及び/又は血管壁を通って胎盤の周辺組織に入り、妊娠中に母体の子宮に付着していた胎盤表面から好適な開放容器に回収される。灌流溶液を、臍帯開口部を介して導入し、母体子宮壁と接触していた胎盤壁の開口部から流出又は浸出させることもできる。別の実施態様において、灌流溶液を、臍帯静脈に通し臍帯動脈から回収するか、又は臍帯動脈に通し臍帯静脈から回収する、すなわち、胎盤脈管構造(胎児組織)のみに通す。

## 【0188】

50

一実施態様において、例えば、臍帯動脈及び臍帯静脈を、例えば、可撓性コネクタを介して灌流溶液のリザーバに接続されているピペットに同時に接続する。灌流溶液を臍帯静脈及び臍帯動脈に通す。灌流溶液は、血管壁から滲出し、及び/又は血管壁を通って胎盤の周辺組織に入り、妊娠中に母体の子宮に付着していた胎盤表面から好適な開放容器に回

収される。灌流溶液を、臍帯開口部を介して導入し、母体子宮壁と接觸していた胎盤壁の開口部から流出又は浸出させることもできる。「受け皿(pan)」法と呼ぶことができるこの方法によって回収される胎盤細胞は、通常、胎児細胞と母親細胞の混合物である。

#### 【0189】

別の実施態様において、灌流溶液を臍帯静脈に通し、臍帯動脈から回収するか、又は臍帯動脈に通し、臍帯静脈から回収する。「閉回路」法と呼ぶことができるこの方法によって回収される胎盤細胞は、通常、ほとんど胎児のものしかない。

#### 【0190】

閉回路灌流法を、一実施態様において、次のように実施することができる。分娩後胎盤を、出産後、約48時間以内に得る。臍帯をクランプし、クランプの上方で切断する。臍帯は、廃棄することができるか、又は例えば、臍帯幹細胞を回収するために、及び/もしくは生体材料の製造用に臍帯膜を処理するために、処理することができる。羊膜を灌流の間保持することができるか、又は例えば、指を用いる鈍的剥離を用いて、絨毛膜から分離することができる。羊膜を灌流前に絨毛膜から分離する場合、それを、例えば、廃棄するか、又は例えば、酵素的消化によって幹細胞を得るために、もしくは例えば、羊膜生体材料、例えば、米国特許出願公開第2004/0048796号に記載されている生体材料を製造するために、処理することができる。例えば、滅菌ガーゼを用いて、全ての目に見える血の塊及び残留血液を胎盤から除去した後、例えば、臍帯膜を一部切断して、臍帯の断面を露出させることにより、臍帯血管を露出させる。血管を確認し、それを、例えば、閉じたアリゲータークランプを各々の血管の切断端に通して前進させることによって広げる。その後、装置、例えば、灌流装置又は蠕動ポンプに接続されたプラスチックチューブを胎盤動脈の各々に挿入する。ポンプは、この目的に好適な任意のポンプ、例えば、蠕動ポンプとすることができます。その後、滅菌された回収リザーバ、例えば、250mL回収バッグなどの血液バッグに接続されたプラスチックチューブを胎盤静脈に挿入する。あるいは、ポンプに接続されたチューブを胎盤静脈に挿入し、回収リザーバ(複数可)に接続されたチューブを胎盤動脈の一方又は両方に挿入する。その後、胎盤を、一定の容積の灌流溶液、例えば、約750mLの灌流溶液で灌流する。その後、灌流液中の細胞を、例えば、遠心分離によって回収する。

#### 【0191】

一実施態様において、灌流の間、近位臍帯をクランプし、より詳細には、胎盤への臍帯挿入部から4~5cm(センチメートル)以内のところで、近位臍帯をクランプすることができる。

#### 【0192】

放血プロセスの間の哺乳動物の胎盤からの灌流液の最初の回収物は、通常、臍帯血及び/又は胎盤血の残留赤血球のために色が付いている。該灌流液は、灌流が進み、残留臍帯血細胞が胎盤から洗い流されるにつれて、より無色になっていく。通常、最初に胎盤から血液を洗い流すためには、30~100mLの灌流液で十分であるが、観察された結果次第で、より多くの又はより少ない灌流液を用いることができる。

#### 【0193】

ある実施態様において、臍帯血は、灌流の前に(例えば、重力排液法により)胎盤から除去されるが、胎盤を溶液で洗い流して(例えば、灌流して)残留血液を除去することはない。ある実施態様において、臍帯血は、灌流の前に(例えば、重力排液法により)胎盤から除去され、かつ胎盤は、溶液で洗い流されて(例えば、灌流されて)残留血液が除去される。

#### 【0194】

胎盤を灌流するために使用される灌流液の容積は、回収しようとする胎盤細胞の数、胎盤の大きさ、単一の胎盤から行われる回収の回数などによって異なり得る。様々な実施態様において、灌流液の容積は、50mL~5000mL、50mL~4000mL、50mL~3000mL、100mL~2000mL、250mL~2000mL、500mL~2000mL、又は750mL~2000mLとすることができます。通常、放血後、胎盤を700~800mLの灌流液で灌流する。

#### 【0195】

10

20

30

40

50

胎盤を、数時間又は数日間かけて、複数回灌流することができる。胎盤を複数回灌流しようとする場合、それを、容器(container)又は他の好適な容器(vessel)中、無菌条件下で維持又は培養し、細胞回収組成物、あるいは標準的な灌流溶液(例えば、抗凝血剤(例えば、ヘパリン、ワルファリンナトリウム、クマリン、ビスヒドロキシクマリン)を含むかもしくは含まない、及び/又は抗微生物剤(例えば、 $\beta$ -メルカプトエタノール(0.1mM):ストレプトマイシン(例えば、40~100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )、ペニシリン(例えば、40U/ml)、アンフォテリシンB(例えば、0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )などの抗生物質を含むかもしくは含まない標準生理食塩水溶液、例えば、リン酸緩衝生理食塩水('PBS'))で灌流することができる。一実施態様において、単離された胎盤を、灌流及び灌流液の回収前に、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、もしくは24時間、又は2もしくは3日間、又はそれより長い間、維持又は培養するように、該胎盤を、灌流液を回収しないで、しばらくの間、維持又は培養する。灌流された胎盤を、さらにもう1回以上、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24時間、又はそれより長い時間、維持し、例えば、700~800mLの灌流液で再び灌流することができる。胎盤を、1、2、3、4、5回、又はそれより多く、例えば、1、2、3、4、5、又は6時間に1回、灌流することができる。一実施態様において、回収される有核細胞の数が100細胞/mlを下回るまで、胎盤の灌流、及び灌流溶液、例えば、胎盤細胞回収組成物の回収を繰り返す。異なる時点の灌流液をさらに個別に処理して、細胞、例えば、全有核細胞の時間依存的な集団を回収することができる。異なる時点からの灌流液をブルーすることもできる。

10

20

## 【0196】

## (5.2.4. 胎盤灌流液及び胎盤灌流液細胞)

通常、単回の胎盤灌流由来の胎盤灌流液は、約1億~約5億個の有核細胞を含み、これには、NK細胞、例えば、本明細書に記載される3段階法によって製造されるNK細胞を、本明細書において開示される方法によってそれから製造し得る造血細胞が含まれる。ある実施態様において、該胎盤灌流液又は灌流液細胞は、CD34<sup>+</sup>細胞、例えば、造血幹細胞又は前駆細胞を含む。そのような細胞は、より具体的な実施態様において、CD34<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>幹細胞もしくは前駆細胞、CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>幹細胞もしくは前駆細胞、又は同様の細胞を含むことができる。ある実施態様において、該灌流液又は灌流液細胞は、それから造血細胞を単離する前に凍結保存される。ある他の実施態様において、該胎盤灌流液は、胎児細胞のみ、もしくは胎児細胞と母親細胞の組合せを含むか、又は該灌流液細胞は、胎児細胞のみ、もしくは胎児細胞と母親細胞の組合せを含む。

30

## 【0197】

## (5.2.5. 造血細胞)

様々な実施態様において、NK細胞は、造血細胞、例えば、造血幹細胞又は前駆細胞から製造される。

## 【0198】

本明細書で使用される造血細胞は、NK細胞に分化することができる任意の造血細胞、例えば、前駆体細胞、造血前駆細胞、造血幹細胞などとすることができます。造血細胞は、例えば、骨髄、臍帯血、胎盤血、末梢血、肝臓など、又はそれらの組合せなどの組織源から得ることができます。造血細胞は、胎盤から得ることができます。具体的な実施態様において、造血細胞は、胎盤灌流液から得られる。胎盤灌流液由来の造血細胞は、胎児造血細胞及び母体造血細胞、例えば、母体細胞が、造血細胞の総数の5%超を構成する混合物を含むことができる。一実施態様において、胎盤灌流液由来の造血細胞は、少なくとも約90%、95%、98%、99%、又は99.5%の胎児細胞を含む。

40

## 【0199】

別の具体的な実施態様において、造血細胞、例えば、造血幹細胞又は前駆細胞は、胎盤灌流液、臍帯血、又は末梢血から得られる。別の具体的な実施態様において、造血細胞、例えば、造血幹細胞又は前駆細胞は、胎盤灌流液及び臍帯血、例えば、該灌流液と同じ胎盤由来の臍帯血に由来する組み合わされた細胞である。別の具体的な実施態様において、

50

該臍帯血は、該胎盤灌流液が得られた胎盤以外の胎盤から単離される。ある実施態様において、該組み合わされた細胞は、該臍帯血及び胎盤灌流液をプールするか又は組み合わせることによって得ることができる。ある実施態様において、該臍帯血及び胎盤灌流液を、容積で100:1、95:5、90:10、85:15、80:20、75:25、70:30、65:35、60:40、55:45、50:50、45:55、40:60、35:65、30:70、25:75、20:80、15:85、10:90、5:95、100:1、95:1、90:1、85:1、80:1、75:1、70:1、65:1、60:1、55:1、50:1、45:1、40:1、35:1、30:1、25:1、20:1、15:1、10:1、5:1、1:1、1:5、1:10、1:15、1:20、1:25、1:30、1:35、1:40、1:45、1:50、1:55、1:60、1:65、1:70、1:75、1:80、1:85、1:90、1:95、1:100などの比率で組み合わせて、該組み合わされた細胞を得る。具体的な実施態様において、該臍帯血及び胎盤灌流液を、10:1～1:10、5:1～1:5、又は3:1～1:3の比率で組み合わせる。別の具体的な実施態様において、該臍帯血及び胎盤灌流液を、10:1、5:1、3:1、1:1、1:3、1:5、又は1:10の比率で組み合わせる。より具体的な実施態様において、該臍帯血及び胎盤灌流液を、8.5:1.5(85%:15%)の比率で組み合わせる。

#### 【0200】

ある実施態様において、前記臍帯血及び胎盤灌流液を、全有核細胞(TNC)含有量で100:1、95:5、90:10、85:15、80:20、75:25、70:30、65:35、60:40、55:45、50:50、45:55、40:60、35:65、30:70、25:75、20:80、15:85、10:90、5:95、100:1、95:1、90:1、85:1、80:1、75:1、70:1、65:1、60:1、55:1、50:1、45:1、40:1、35:1、30:1、25:1、20:1、15:1、10:1、5:1、1:1、1:5、1:10、1:15、1:20、1:25、1:30、1:35、1:40、1:45、1:50、1:55、1:60、1:65、1:70、1:75、1:80、1:85、1:90、1:95、1:100などの比率で組み合わせて、該組み合わされた細胞を得る。具体的な実施態様において、該臍帯血及び胎盤灌流液を、10:1～1:10、5:1～1:5、又は3:1～1:3の比率で組み合わせる。別の具体的な実施態様において、該臍帯血及び胎盤灌流液を、10:1、5:1、3:1、1:1、1:3、1:5、又は1:10の比率で組み合わせる。

#### 【0201】

別の具体的な実施態様において、前記造血細胞、例えば、造血幹細胞又は前駆細胞は、臍帯血及び胎盤灌流液の双方に由来するものであるが、ここで、該臍帯血は、該胎盤灌流液を得た胎盤以外の胎盤から単離されたものである。

#### 【0202】

ある実施態様において、前記造血細胞は、CD34<sup>+</sup>細胞である。具体的な実施態様において、本明細書において開示される方法において有用な造血細胞は、CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>又はCD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>である。より具体的な実施態様において、前記造血細胞は、CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>Lin<sup>-</sup>である。別の具体的な実施態様において、前記造血細胞は、CD2<sup>-</sup>、CD3<sup>-</sup>、CD11b<sup>-</sup>、CD11c<sup>-</sup>、CD14<sup>-</sup>、CD16<sup>-</sup>、CD19<sup>-</sup>、CD24<sup>-</sup>、CD56<sup>-</sup>、CD66b<sup>-</sup>及び/又はグリコフォリンA<sup>-</sup>のうちの1つ以上である。別の具体的な実施態様において、前記造血細胞は、CD2<sup>-</sup>、CD3<sup>-</sup>、CD11b<sup>-</sup>、CD11c<sup>-</sup>、CD14<sup>-</sup>、CD16<sup>-</sup>、CD19<sup>-</sup>、CD24<sup>-</sup>、CD56<sup>-</sup>、CD66b<sup>-</sup>、及びグリコフォリンA<sup>-</sup>である。別により具体的な実施態様において、前記造血細胞は、CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD33<sup>-</sup>CD117<sup>-</sup>である。別により具体的な実施態様において、前記造血細胞は、CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD33<sup>-</sup>CD117<sup>-</sup>CD235<sup>-</sup>CD36<sup>-</sup>である。

#### 【0203】

別の実施態様において、前記造血細胞は、CD45<sup>+</sup>である。別の具体的な実施態様において、前記造血細胞は、CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>である。別の実施態様において、前記造血細胞は、Thy-1<sup>+</sup>である。具体的な実施態様において、前記造血細胞は、CD34<sup>+</sup>Thy-1<sup>+</sup>である。別の実施態様において、前記造血細胞は、CD133<sup>+</sup>である。具体的な実施態様において、前記造血細胞は、CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>又はCD133<sup>+</sup>Thy-1<sup>+</sup>である。別の具体的な実施態様において、前記CD34<sup>+</sup>造血細胞は、CXCR4<sup>+</sup>である。別の具体的な実施態様において、前記造血細胞は、KDR(血管成長因子受容体2)が陽性である。具体的な実施態様において、前記造血細胞は、CD34<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup>、CD133<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup>、又はThy-1<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup>である。ある他の実施態様において、前記造血細胞は、アルデヒドデヒドロゲナーゼ(ALDH<sup>+</sup>)が陽性であり、例えば、該細胞は、CD34<sup>+</sup>ALDH<sup>+</sup>である。

#### 【0204】

10

20

30

40

50

ある他の実施態様において、前記CD34<sup>+</sup>細胞は、CD45<sup>-</sup>である。具体的な実施態様において、前記CD34<sup>+</sup>細胞、例えば、CD34<sup>+</sup>、CD45<sup>-</sup>細胞は、miRNAであるhsa-miR-380、hsa-miR-512、hsa-miR-517、hsa-miR-518c、hsa-miR-519b、及び/又はhsa-miR-520aのうちの1つ以上又は全てを発現する。

【0205】

ある実施態様において、該造血細胞は、CD34<sup>-</sup>である。

【0206】

該造血細胞はまた、系譜決定(lineage commitment)又は発生的未感作性(developmental naivete)の欠如を示す特定のマーカーを欠如していてもよい。例えば、別の実施態様において、該造血細胞は、HLA-DR<sup>-</sup>である。具体的な実施態様において、該造血細胞は、CD3<sup>4+</sup>HLA-DR<sup>-</sup>、CD133<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-</sup>、Thy-1<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-</sup>、又はALDH<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-</sup>である。別の実施態様において、該造血細胞は、系譜マーカーCD2、CD3、CD11b、CD11c、CD14、CD16、CD19、CD24、CD56、CD66b、及びグリコフォリンAのうちの1つ以上、好ましくは全てが陰性である。

10

【0207】

したがって、造血細胞は、未分化状態を示すマーカーの存在に基づくか、又は少なくともいくつかの系譜分化が起こったことを示す系譜マーカーの不存在に基づいて、本明細書において開示される方法における使用のために選択することができる。特定のマーカーの存在又は不存在に基づいて、造血細胞を含む細胞を単離する方法は、以下で詳細に論じられる。

【0208】

20

本明細書で使用される造血細胞は、実質的に均一な集団、例えば、単一の組織源由来の少なくとも約95%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の造血細胞を含む集団、又は同じ造血細胞関連細胞マーカーを示す造血細胞を含む集団とすることができます。例えば、様々な実施態様において、該造血細胞は、骨髄、臍帯血、胎盤血、末梢血、又は胎盤、例えば、胎盤灌流液由来の少なくとも約95%、98%、又は99%の造血細胞を含むことができる。

【0209】

本明細書で使用される造血細胞は、単一の個体から、例えば、単一の胎盤から、又は複数の個体から得ることができ、例えば、プールすることができる。該造血細胞を複数の個体から得て、プールする場合、該造血細胞を同じ組織源から得てもよい。したがって、様々な実施態様において、プールされた造血細胞は全て胎盤、例えば、胎盤灌流液由来のもの、全て胎盤血由来のもの、全て臍帯血由来のもの、全て末梢血由来のものなどである。

30

【0210】

本明細書で使用される造血細胞は、ある実施態様において、2つ以上の組織源由来の造血細胞を含むことができる。例えば、ある実施態様において、2つ以上の供給源由来の造血細胞を本明細書中の方法での使用のために組み合わせる場合、NK細胞を製造するために使用される複数の造血細胞は、胎盤、例えば、胎盤灌流液由来の造血細胞を含む。様々な実施態様において、NK細胞を製造するために使用される造血細胞は、胎盤由来及び臍帯血由来の;胎盤及び末梢血由来の;胎盤及び胎盤血由来の、又は胎盤及び骨髄由来の造血細胞を含む。好ましい実施態様において、該造血細胞は、臍帯血由来の造血細胞と組み合せた胎盤灌流液由来の造血細胞を含み、ここで、該臍帯血及び胎盤は、同じ個体に由来するものであり、すなわち、該灌流液及び臍帯血はマッチしている。造血細胞が2つの組織源由来の造血細胞を含む実施態様において、該源由来の造血細胞は、例えば、1:10、2:9、3:8、4:7:、5:6、6:5、7:4、8:3、9:2、1:10、1:9、1:8、1:7、1:6、1:5、1:4、1:3、1:2、1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、又は9:1の比率で組み合わせることができます。

40

【0211】

(5.2.5.1. 胎盤造血幹細胞)

ある実施態様において、造血細胞は、胎盤造血細胞である。本明細書で使用されるように、「胎盤造血細胞」は、胎盤それ自体から得られる造血細胞であって、胎盤血からも臍

50

帶血からも得られないものを意味する。一実施態様において、胎盤造血細胞はCD34<sup>+</sup>である。具体的な実施態様において、該胎盤造血細胞は、主に(例えば、少なくとも約50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、又は98%)CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>細胞である。別の具体的な実施態様において、該胎盤造血細胞は、主に(例えば、少なくとも約50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、又は98%)CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>細胞である。胎盤造血細胞は、当業者に公知の任意の手段によって、例えば、灌流によって、分娩後の哺乳動物(例えば、ヒト)胎盤から得ることができる。

#### 【 0 2 1 2 】

別の実施態様において、該胎盤造血細胞は、CD45<sup>-</sup>である。具体的な実施態様において、該造血細胞は、CD34<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>である。別の実施態様において、該胎盤造血細胞は、CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>である。10

#### 【 0 2 1 3 】

(5.2.6.PiNK細胞を製造する方法)

様々な実施態様において、PiNK細胞は、胎盤細胞に由来する。具体的な実施態様において、該胎盤細胞は、胎盤灌流液、例えば、ヒト胎盤灌流液から得られる。具体的な実施態様において、該胎盤細胞は、機械的及び/又は酵素的に破壊された胎盤組織から得られる。。

#### 【 0 2 1 4 】

(5.2.6.1.胎盤灌流液からのPiNK細胞の取得)

一実施態様において、PiNK細胞は、胎盤灌流液を得て、その後、該胎盤灌流液を、CD56<sup>+</sup>細胞に特異的に結合する組成物、例えば、CD56に対する抗体と接触させ、それに続き、該結合に基づいてCD56<sup>+</sup>細胞を単離して、CD56<sup>+</sup>細胞の集団を形成することにより回収される。該CD56<sup>+</sup>細胞の集団は、単離されたナチュラルキラー細胞の集団を含む。具体的な実施態様において、CD56<sup>+</sup>細胞を、CD16<sup>+</sup>細胞に特異的に結合する組成物、例えば、CD16に対する抗体と接触させて、CD16<sup>+</sup>細胞を、該CD56<sup>+</sup>細胞の集団から排除する。別の実施態様において、CD3<sup>+</sup>細胞も、該CD56<sup>+</sup>細胞の集団から排除する。20

#### 【 0 2 1 5 】

一実施態様において、PiNK細胞は、以下の様に胎盤灌流液から得られる。分娩後のヒト胎盤を、放血させ、胎盤脈管構造のみを通じて、例えば、約200～800mLの灌流溶液で灌流する。具体的な実施態様において、該灌流の前に、該胎盤は、臍帯血を排出させ、胎盤脈管構造を通じて、例えば、灌流溶液で洗い流し、残留血液を除去する。該灌流液を回収し、加工して残留する赤血球を全て除去する。灌流液中の全有核細胞のうちのナチュラルキラー細胞を、CD56及びCD16の発現に基づいて単離することができる。ある実施態様において、PiNK細胞の単離は、CD56に対する抗体を用いる単離を含み、ここで、単離される細胞は、CD56<sup>+</sup>である。別の実施態様において、PiNK細胞の単離は、CD16に対する抗体を用いる単離を含み、ここで、単離される細胞は、CD16<sup>-</sup>である。別の実施態様において、PiNK細胞の単離は、CD56に対する抗体を用いる単離、及びCD16に対する抗体を用いる複数の非PiNK細胞の排除を含み、ここで、単離される細胞は、CD56<sup>+</sup>、CD16<sup>-</sup>細胞を含む。30

#### 【 0 2 1 6 】

細胞分離は、当技術分野において公知の任意の方法、例えば、蛍光活性化細胞選別(FACS)、又は好ましくは、特異的抗体とコンジュゲートされたマイクロビーズを用いる磁気的細胞選別によって達成することができる。磁気細胞分離は、例えば、AUTOMACS(商標)セパレーター(Miltenyi)を用いて行うことができ、自動化することができる。40

#### 【 0 2 1 7 】

別の態様において、胎盤ナチュラルキラー細胞(例えば、PiNK細胞)を単離するプロセスは、複数の胎盤細胞を得ること、及び該複数の胎盤細胞からナチュラルキラー細胞を単離することを含む。具体的な実施態様において、該胎盤細胞は、胎盤灌流液細胞、例えば、胎盤灌流液由来の全有核細胞であるか、又はそれを含む。別の実施態様において、該複数の胎盤細胞は、胎盤組織の機械的及び/又は酵素的消化によって得られる胎盤細胞であるか、又はそれを含む。別の実施態様において、該単離を、1以上の抗体を用いて50

行う。より具体的な実施態様において、該1以上の抗体は、CD3、CD16又はCD56に対する抗体のうちの1つ以上を含む。より具体的な実施態様において、前記単離することは、前記複数の胎盤細胞におけるCD56<sup>-</sup>細胞からCD56<sup>+</sup>細胞を単離することを含む。より具体的な実施態様において、該単離することは、CD56<sup>+</sup>、CD16<sup>-</sup>胎盤細胞、例えば、胎盤ナチュラルキラー細胞、例えば、PiNK細胞を、CD56<sup>-</sup>又はCD16<sup>+</sup>である胎盤細胞から単離することを含む。より具体的な実施態様において、該単離することは、CD56<sup>+</sup>、CD16<sup>-</sup>、CD3<sup>-</sup>胎盤細胞を、CD56<sup>-</sup>、CD16<sup>+</sup>、又はCD3<sup>+</sup>である胎盤細胞から単離することを含む。別の実施態様において、前記胎盤ナチュラルキラー細胞を単離するプロセスは、少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、又は少なくとも99%がCD56<sup>+</sup>、CD16<sup>-</sup>ナチュラルキラー細胞である胎盤細胞の集団をもたらす。

10

#### 【0218】

ある実施態様において、前記胎盤ナチュラルキラー細胞、例えば、PiNK細胞は、培養下増殖される。他の実施態様において、該胎盤灌流液細胞は、培養下増殖される。具体的な実施態様において、該胎盤灌流液細胞は、フィーダー層の存在下かつ/又は少なくとも1種のサイトカインの存在下増殖される。より具体的な実施態様において、該フィーダー層は、K562細胞又は末梢血单核細胞を含む。別のより具体的な実施態様において、該少なくとも1種のサイトカインは、インターロイキン-2である。具体的な実施態様において、前記PiNK細胞は、少なくとも、約、又は最長で1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、又は28日間培養され、例えば、培養下増殖される。具体的な実施態様において、該PiNK細胞は、約21日間培養される。

20

#### 【0219】

(5.2.6.2. 胎盤組織の破壊及び消化によるPiNK細胞の取得)

胎盤ナチュラルキラー細胞、例えば、PiNK細胞は、機械的及び/又は酵素的に破壊されている胎盤組織から得ることもできる。

#### 【0220】

胎盤組織を、1種以上の組織分解酵素、例えば、メタロプロテアーゼ、セリンプロテアーゼ、中性プロテアーゼ、RNase、又はDNaseなどを用いて破壊することができる。そのような酵素としては、コラゲナーゼ(例えば、コラゲナーゼI、II、III、又はIV、クロストリジウム・ヒストリチクムに由来するコラゲナーゼなど);ディスパーゼ、サーモリシン、エラスターーゼ、トリプシン、LIBERASE、ヒアルロニダーゼなどが挙げられるが、これらに限定されない。通常、消化後に、消化した組織を、ストレーナー又はフィルターに通して、部分的に消化された細胞集塊を除去すると、実質的に単細胞の懸濁液が残る。

30

#### 【0221】

胎盤細胞の懸濁液が得られた後に、例えば、CD3及びCD56に対する抗体を用いて、ナチュラルキラー細胞を単離することができる。具体的な実施態様において、胎盤ナチュラルキラー細胞は、CD56<sup>+</sup>である細胞を選択して、第一の細胞集団を製造し;該第一の細胞集団を、CD3及び/又はCD16に対して特異的な抗体と接触させ;該第一の細胞集団から、CD3<sup>+</sup>又はCD56<sup>+</sup>である細胞を除去して、それにより、実質的にCD56<sup>+</sup>及びCD3<sup>-</sup>、CD56<sup>+</sup>及びCD16<sup>-</sup>、又はCD56<sup>+</sup>、CD3<sup>-</sup>及びCD16<sup>-</sup>である第二の細胞の集団を製造することにより単離される。

40

#### 【0222】

一実施態様において、磁気ビーズを用いて、胎盤細胞の懸濁液から胎盤ナチュラルキラー細胞を単離する。該細胞は、例えば、1以上の特異的抗体、例えば、抗CD56抗体を含む磁気ビーズ(例えば、約0.5~100 μmの直径)に結合するその能力に基づいて粒子を分離する方法である、磁気的活性化細胞選別(MACS)技術を用いて単離してもよい。特定の細胞表面分子又はハプテンを特異的に認識する抗体の共有結合的付加を含む、種々の有用な修飾を、磁気マイクロスフェア上で行い得る。その後、ビーズを該細胞と混合し、結合させる。その後、細胞を磁場に通して、特定の細胞表面マーカーを有する細胞を取り出す。一実施態様において、その後、これらの細胞を単離し、さらなる細胞表面マーカーに対する抗体と結合した磁気ビーズと再び混合することができる。該細胞を再び磁場に通して、両方

50

の抗体に結合した細胞を単離する。その後、そのような細胞を希釈して、別々のディッシュ、例えば、クローン単離用のマイクロタイターディッシュに入れることができる。

#### 【0223】

##### (5.2.7. 活性化NK細胞を製造する方法)

活性化NK細胞は、上述のような造血細胞から製造されてもよい。ある実施態様において、該活性化NK細胞は、増殖された造血細胞、例えば、造血幹細胞及び/又は造血前駆細胞から製造される。具体的な実施態様において、該造血細胞は、フィーダー細胞を用いないで、第一の培地中で、連続的に増殖させ、分化させる。その後、該細胞は、フィーダー細胞の存在下、第二の培地中で培養される。そのような単離、増殖、及び分化は、中心施設で実施することができ、それにより、使用地点、例えば、病院、軍事基地、軍部の前線などでの分散的な増殖及び分化のための輸送用の増殖された造血細胞が提供される。

10

#### 【0224】

いくつかの実施態様において、活性化NK細胞の製造は、造血細胞の集団を増殖させることを含む。細胞増殖の間に、該造血細胞集団内の複数の造血細胞が、NK細胞へと分化する。

#### 【0225】

一実施態様において、活性化ナチュラルキラー(NK)細胞の集団を製造するプロセスは:(a)造血幹細胞又は前駆細胞の集団が増殖し、該造血幹細胞又は前駆細胞の集団内の複数の造血幹細胞又は前駆細胞が、該増殖の間にNK細胞に分化するように、該集団を、インターロイキン-15(IL-15)、並びに任意に、幹細胞因子(SCF)及びインターロイキン-7(IL-7)のうちの1つ以上を含む第一の培地中に播種すること(ここで、該IL-15並びに任意のSCF及びIL-7は、該培地の不確定成分中には含まれない);及び(b)工程(a)由来の細胞を、インターロイキン-2(IL-2)を含む第二の培地中で増殖させて、活性化NK細胞の集団を製造することを含む。

20

#### 【0226】

別の実施態様において、本明細書に記載されるような活性化NK細胞は、NK細胞の増殖/分化及び成熟の2工程プロセスにより製造される。第一の工程及び第二の工程は、該細胞を独特な組合せの細胞因子を含む培地中で培養することを含む。ある実施態様において、該プロセスは、(a)造血細胞の集団を、該造血細胞集団内の複数の造血幹細胞又は前駆細胞がNK細胞に分化する第一の培地中で培養し増殖させること;及び(b)工程(a)由来のNK細胞を、該NK細胞がさらに増殖され、分化し、かつ該NK細胞が成熟する(例えば、活性化されるか又は別の方法で細胞傷害活性を有する)第二の培地中で増殖させることを含む。ある実施態様において、該プロセスは、工程(a)と(b)の間の中間工程、工程(a)の前の追加の培養工程、及び/又は工程(b)の後の追加の工程(例えば、成熟工程)を含まない。

30

#### 【0227】

##### (5.2.7.1. 第一の工程)

ある実施態様において、前記活性化NK細胞を製造するプロセスは、第一の培地中で、造血細胞の集団を培養して増殖させる第一の工程を含み、ここで、該造血細胞集団内の複数の造血幹細胞又は前駆細胞は、NK細胞へと分化する。

#### 【0228】

40

いかなるパラメーターにも、機構にも、理論にも束縛されることはないが、本明細書に記載されるような造血細胞の培養は、連続的な造血細胞の増殖及び該細胞からのNK細胞の分化をもたらす。ある実施態様において、本明細書に記載されるプロセスにおいて用いられる造血細胞、例えば、幹細胞又は前駆細胞は、フィーダー層を用いて、第一の工程で増殖させ、分化させる。他の実施態様において、造血細胞、例えば、幹細胞又は前駆細胞を、フィーダー層を用いないで、第一の工程で増殖させ分化させる。

#### 【0229】

造血細胞のフィーダー細胞非依存的な増殖及び分化は、細胞の培養及び増殖と適合する任意の容器、例えば、フラスコ、チューブ、ビーカー、ディッシュ、マルチウェルプレート、バッグなどの中で生じ得る。具体的な実施態様において、造血細胞のフィーダー細胞

50

非依存的な増殖は、バッグ、例えば、可撓性で、ガス透過性のフルオロカーボン培養バッグ(例えば、American Fluoroseal製)の中で生じる。具体的な実施態様において、造血細胞を増殖させる容器は、例えば、増殖されたNK細胞をさらに増殖させ分化させる、病院又は軍事区域などの場所への輸送に好適である。

#### 【0230】

ある実施態様において、造血細胞を、例えば、第一の培養培地中で、連続的な様式で、増殖させ分化させる。一実施態様において、該第一の培養培地は、動物成分不含培地である。本明細書に記載されるプロセスにおいて有用な例示的な動物成分不含培地としては、イーグル基本培地(BME)、ダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)、グラスゴー最小必須培地(GMEM)、ダルベッコ改変イーグル培地/栄養混合物F-12ハム(DMEM/F-12)、最小必須培地(MEM)、イスコフ改変ダルベッコ培地(IMDM)、栄養混合物F-10ハム(ハムF-10)、栄養混合物F-12ハム(ハムF-12)、RPMI-1640培地、ウィリアム培地E、STEMSPAN(登録商標)(カタログ番号Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada)、Glycostem基本成長培地(GBGM(登録商標))、AIM-V(登録商標)培地(Invitrogen)、X-VIVO(商標)10(Lonza)、X-VIVO(商標)15(Lonza)、OPTMIZER(Invitrogen)、STEMSPAN(登録商標)H3000(STEMCELL Technologies)、CELLGRO COMPLETE(商標)(Mediatech)、もしくは任意の改変型変種、又はそれらの組合せが挙げられるが、これらに限定されない。本明細書における実施態様のうちのいずれかの具体的な実施態様において、培地は、GBGM(登録商標)ではない。10

#### 【0231】

好ましい実施態様において、前記第一の培養培地は、培地添加物(例えば、栄養素、サイトカイン、及び/又は因子)のうちの1つ以上を含む。本明細書に記載されるプロセスにおける使用に適する培地添加物は、例えば、限定するものではないが、血清、例えば、ヒト血清AB、ウシ胎仔血清(FBS)、もしくはウシ胎仔血清(FCS)、ビタミン、ウシ血清アルブミン(BSA)、アミノ酸(例えば、L-グルタミン)、脂肪酸(例えば、オレイン酸、リノール酸、又はパルミチン酸)、インスリン(例えば、組換えヒトインスリン)、トランスフェリン(鉄飽和ヒトトランスフェリン)、-メルカプトエタノール、幹細胞因子(SCF)、Fms様チロシンキナーゼ3リガンド(Flt3-L)、サイトカイン、例えば、インターロイキン-2(IL-2)、インターロイキン-7(IL-7)、インターロイキン-15(IL-15)、トロンボポエチン(Tpo)、ヘパリン、又はO-アセチル-カルニチン(アセチルカルニチン、O-アセチル-L-カルニチン、又はOACとも称する)を含む。具体的な実施態様において、本明細書で使用される培地は、ヒト血清ABを含む。別の具体的な実施態様において、本明細書で使用される培地は、FBSを含む。別の具体的な実施態様において、本明細書で使用される培地は、OACを含む。2030

#### 【0232】

ある実施態様において、前記第一の培地は、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、顆粒球/マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、インターロイキン-6(IL-6)、マクロファージ炎症性タンパク質1(MIP1)、又は白血病抑制因子(LIF)のうちの1つ以上を含まない。

#### 【0233】

従って、一態様において、本明細書に記載されるものは、NK細胞を製造する2工程プロセスであって、ここで、前記第一の工程は、フィーダー細胞の非存在下で、第一の培養培地中の造血細胞の集団を増殖及び分化させることを含み、該造血細胞の集団内の複数の造血細胞が、増殖の間にNK細胞に分化し、かつ該培地は、約1～約150ng/mLの濃度のSCF、約50～約1500IU/mLの濃度のIL-2、約1～約150ng/mLの濃度のIL-7、1～約150ng/mLの濃度のIL-15、及び約0.1～約30IU/mLの濃度のヘパリンを含み、かつ該SCF、IL-2、IL-7、IL-15、及びヘパリンは、該培地(例えば、血清)の不確定成分中には含まれない。ある実施態様において、該培地は、O-アセチル-カルニチン(アセチルカルニチン、O-アセチル-L-カルニチン、又はOACとも称する)、又はミトドロニア(mitodronia)内を循環するアセチル-CoAに影響を及ぼす化合物、チアゾビシン、Y-27632、ピンテグリン(pyintegrin)、Rhoキナーゼ(ROCK)阻害剤、カスパーゼ阻害剤、もしくは他の抗アポトーシス化合物/ペプチド、NOVARS(Sheffield Bio-Science)、又は他の小分子増殖エンハンサーのうちの1つ以上を含む。ある実施態様において、前記培地は、ニコチンアミドを含む。ある実施態様において、前4050

記培地は、約0.5mM～10mMのOACを含む。一実施態様において、前記培地は、Stemspan(登録商標)H3000、及び/又はDMEM:F12、並びに約0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10mMのOACを含む。具体的な実施態様において、前記培地は、GBGM(登録商標)である。別の具体的な実施態様において、前記培地は、GBGM(登録商標)ではない。別の具体的な実施態様において、前記培地は、Stemspan(登録商標)H3000及び約5mMのOACを含む。別の具体的な実施態様において、前記培地は、DMEM:F12及び約5mMのOACを含む。前記OACは、本明細書に記載される培養プロセスの間の任意の時点に添加することができる。ある実施態様において、該OACは、第一の培地に及び/又は第一の培養工程の間に添加される。いくつかの実施態様において、該OACは、培養0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21日目に、第一の培地に添加される。具体的な実施態様において、該OACは、第一の培養工程の7日目に、第一の培地に添加される。より具体的な実施態様において、該OACは、培養の7日目に、第一の培地に添加され、第一の培養工程及び第二の培養工程にわたって存在する。ある実施態様において、該OACは、第二の培地に及び/又は第二の培養工程の間に添加される。いくつかの実施態様において、該OACは、培養22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35日目に、第二の培地に添加される。  
。

#### 【 0 2 3 4 】

別の具体的な実施態様において、該培地は、約5～20%のBSA、約1～10 μg/mLの組換えヒトインスリン、約10～50 μg/mLの鉄飽和ヒトトランスフェリン、及び約10～50 μMのメルカプトエタノールが補充されたIMDMである。別の具体的な実施態様において、該培地は、IL-11、IL-3、ホメオボックス-B4(HoxB4)、及び/もしくはメチルセルロースのうちの1つ以上、又はそのいずれをも含まない。

#### 【 0 2 3 5 】

他の具体的な実施態様において、該培地は、約0.1～約500ng/mL; 約5～約100ng/mL; 又は約20ng/mLの濃度のSCFを含む。他の具体的な実施態様において、該培地は、約10～約2000IU/mL; 又は約100～約500IU/mL; 又は約200IU/mLの濃度のIL-2を含む。他の具体的な実施態様において、該培地は、約0.1～約500ng/mL; 約5～約100ng/mL; 又は約20ng/mLの濃度のIL-7を含む。他の具体的な実施態様において、該培地は、約0.1～約500ng/mL; 約5～約100ng/mL; 又は約10ng/mLの濃度のIL-15を含む。他の具体的な実施態様において、該培地は、約0.05～約100U/mL; 又は約0.5～約20U/ml; 又は約1.5U/mLの濃度のヘパリンを含む。

#### 【 0 2 3 6 】

さらに別の具体的な実施態様において、該培地は、約1～約150ng/mLの濃度のFms様チロシンキナーゼ3リガンド(Flt-3L)、約1～約150ng/mLの濃度のトロンボポエチン(Tpo)、又は両方の組合せをさらに含む。他の具体的な実施態様において、該培地は、約0.1～約500ng/mL; 約5～約100ng/mL; 又は約20ng/mLの濃度のFlt-3Lを含む。他の具体的な実施態様において、該培地は、約0.1～約500ng/mL; 約5～約100ng/mL; 又は約20ng/mLの濃度のTpoを含む。

#### 【 0 2 3 7 】

より具体的な実施態様において、第一の培養培地は、約20ng/mLのSCF、約20ng/mLのIL-7、約10ng/mLのIL-15を含むGBGM(登録商標)である。別のより具体的な実施態様において、第一の培養培地は、約20ng/mLのSCF、約20ng/mLのFlt3-L、約200IU/mLのIL-2、約20ng/mLのIL-7、約10ng/mLのIL-15、約20ng/mLのTpo、及び約1.5U/mLのヘパリンを含むGBGM(登録商標)である。別の具体的な実施態様において、該第一の培養培地は、10%ヒト血清(例えば、ヒト血清AB)又は胎仔血清(例えば、FBS)をさらに含む。本明細書における実施態様のうちのいずれかの具体的な実施態様において、該培地は、GBGM(登録商標)ではない。

#### 【 0 2 3 8 】

別の実施態様において、造血細胞を、例えば、前記第一の培地中で、免疫調節化合物と接触させていない同等数の造血細胞と比較して、所与の時間にわたる該造血細胞の増殖の検出可能な増加をもたらすのに十分な時間及び量で、免疫調節化合物、例えば、TNF-阻害剤化合物と接触させて培養することにより、該造血細胞を増殖させる。例えば、その開

10

20

30

40

50

示が引用により完全に本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第2003/0235909号を参考されたい。ある実施態様において、免疫調節化合物は、アミノ置換イソインドリンである。好ましい実施態様において、免疫調節化合物は、3-(4-アミノ-1-オキソ-1,3-ジヒドロイソインドール-2-イル)-ピペリジン-2,6-ジオン;3-(4'アミノイソインドリン-1'-オン)-1-ピペリジン-2,6-ジオン;4-(アミノ)-2-(2,6-ジオキソ(3-ピペリジル))-イソインドリン-1,3-ジオン;又は4-アミノ-2-(2,6-ジオキソピペリジン-3-イル)イソインドール-1,3-ジオンである。別的好ましい実施態様において、免疫調節化合物は、ポマリドミド、又はレナリドミドである。

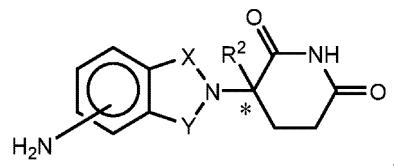
## 【0239】

免疫調節化合物の具体例としては、置換スチレンのシアノ及びカルボキシ誘導体、例えば、米国特許第5,929,117号に開示されているもの;1-オキソ-2-(2,6-ジオキソ-3-フルオロピペリジン-3イル)イソインドリン及び1,3-ジオキソ-2-(2,6-ジオキソ-3-フルオロピペリジン-3-イル)イソインドリン、例えば、米国特許第5,874,448号に記載されているもの;米国特許第5,798,368号に記載されている四置換2-(2,6-ジオキソピペルジン(dioxopiperdin)-3-イル)-1-オキソイソインドリン;これらに限定されないが、米国特許第5,635,517号に開示されているものが含まれる、1-オキソ-、及び1,3-ジオキソ-2-(2,6-ジオキソピペリジン-3-イル)イソインドリン(例えば、サリドマイドの4-メチル誘導体及びEM-12);米国特許第5,698,579号及び第5,877,200号に開示されているクラスの非ポリペプチド環状アミド;サリドマイドの加水分解産物、代謝産物、誘導体、及び前駆体、例えば、D'Amatoに対する米国特許第5,593,990号、第5,629,327号、及び第6,071,948号に記載されているものを含む、サリドマイドの類縁体及び誘導体;アミノサリドマイド、及びアミノサリドマイドの類縁体、加水分解産物、代謝産物、誘導体、及び前駆体、及び置換2-(2,6-ジオキソピペリジン-3-イル)フタルイミド及び置換2-(2,6-ジオキソピペリジン-3-イル)-1-オキソイソインドール、例えば、米国特許第6,281,230号及び第6,316,471号に記載されているもの;イソインドール-イミド化合物、例えば、2001年10月5日に出願された米国特許出願第09/972,487号、2001年12月21日に出願された米国特許出願第10/032,286号、及び国際出願第PCT/US01/50401号(国際公報第W002/059106号)に記載されているものが挙げられるが、これらに限定されない。本明細書で特定される特許及び特許出願の各々の全体は、引用により本明細書中に組み込まれている。免疫調節化合物は、サリドマイドを含まない。

## 【0240】

別の実施態様において、免疫調節化合物としては、引用により本明細書中に組み込まれている米国特許第5,635,517号に記載されているような、ベンゾ環にアミノが置換されている1-オキソ-及び1,3-ジオキソ-2-(2,6-ジオキソピペリジン-3-イル)イソインドリンが挙げられるが、これらに限定されない。これらの化合物は、以下の構造:

## 【化1】



(式中、X及びYのうちの一方は、C=Oであり、X及びYのうちの他方は、C=O又はCH<sub>2</sub>であり、かつR<sup>2</sup>は、水素もしくは低級アルキルである)を有するか、又はその医薬として許容し得る塩、水和物、溶媒和物、クラスレート、エナンチオマー、ジアステレオマー、ラセミ化合物、もしくは立体異性体の混合物である。

## 【0241】

別の実施態様において、具体的な免疫調節化合物としては:

1-オキソ-2-(2,6-ジオキソピペリジン-3-イル)-4-アミノイソインドリン;  
1-オキソ-2-(2,6-ジオキソピペリジン-3-イル)-5-アミノイソインドリン;  
1-オキソ-2-(2,6-ジオキソピペリジン-3-イル)-6-アミノイソインドリン;

10

20

30

40

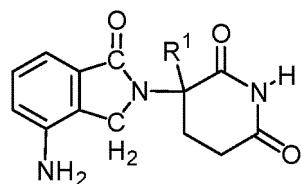
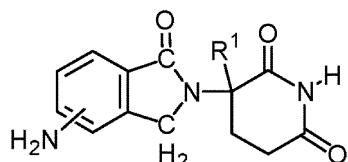
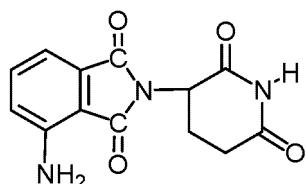
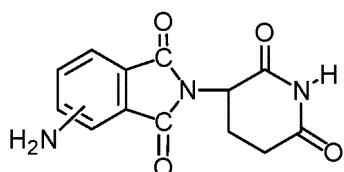
50

1-オキソ-2-(2,6-ジオキソピペリジン-3-イル)-7-アミノイソインドリン；  
 1,3-ジオキソ-2-(2,6-ジオキソピペリジン-3-イル)-4-アミノイソインドリン；及び  
 1,3-ジオキソ-2-(2,6-ジオキソピペリジン-3-イル)-5-アミノイソインドリン  
 が挙げられるが、これらに限定されない。

## 【0242】

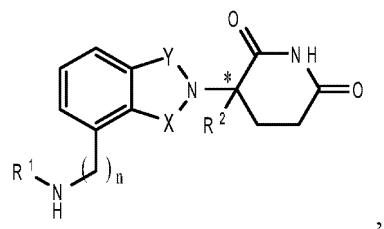
他の具体的な免疫調節化合物は、各々が引用により本明細書中に組み込まれている、米国特許第6,281,230号；第6,316,471号；第6,335,349号；及び第6,476,052号、並びに国際特許出願第PCT/US97/13375号(国際公報第W098/03502号)に記載されているものなどの、置換2-(2,6-ジオキソピペリジン-3-イル)フタルイミド及び置換2-(2,6-ジオキソピペリジン-3-イル)-1-オキソイソインドールのクラスに属する。該クラスを代表する化合物は、以下の式のものである：

## 【化2】



(式中、R<sup>1</sup>は、水素又はメチルである)。別の実施態様において、本発明は、これらの化合物の鏡像異性的に純粹な形態(例えば、光学的に純粹な(R)又は(S)エナンチオマー)の使用を包含する。さらに他の具体的な免疫調節化合物は、各々が引用により本明細書中に組み込まれている、米国特許出願番号第10/032,286号及び第09/972,487号、並びに国際出願第PCT/US01/50401号(国際公報第W002/059106号)に開示されているイソインドール-イミドのクラスに属する。ある代表的な実施態様において、前記免疫調節化合物は、以下の構造を有する化合物：

## 【化3】



10

20

30

40

50

(式中、X及びYのうちの一方は、C=Oであり、かつ他方は、CH<sub>2</sub>又はC=Oであり；R<sup>1</sup>は、H、(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)アルキル、(C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>)シクロアルキル、(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>)アルケニル、(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>)アルキニル、ベンジル、アリール、(C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>)アルキル-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)ヘテロシクロアルキル、(C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>)アルキル-(C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>)ヘテロアリール、C(O)R<sup>3</sup>、C(S)R<sup>3</sup>、C(O)OR<sup>4</sup>、(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)アルキル-N(R<sup>6</sup>)<sub>2</sub>、(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)アルキル-OR<sup>5</sup>、(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)アルキル-C(O)OR<sup>5</sup>、C(O)NHR<sup>3</sup>、C(S)NHR<sup>3</sup>、C(O)NR<sup>3</sup>R<sup>3</sup>、C(S)NR<sup>3</sup>R<sup>3</sup>、又は(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)アルキル-O(CO)R<sup>5</sup>であり；

R<sup>2</sup>は、H、F、ベンジル、(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)アルキル、(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>)アルケニル、又は(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>)アルキニルであり；

R<sup>3</sup>及びR<sup>3</sup>\*は、独立して(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)アルキル、(C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>)シクロアルキル、(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>)アルケニル、(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>)アルキニル、ベンジル、アリール、(C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>)アルキル-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)ヘテロシクロアルキル、(C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>)アルキル-(C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>)ヘテロアリール、(C<sub>0</sub>-C<sub>8</sub>)アルキル-N(R<sup>6</sup>)<sub>2</sub>、(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)アルキル-OR<sup>5</sup>、(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)アルキル-C(O)OR<sup>5</sup>、(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)アルキル-O(CO)R<sup>5</sup>、又はC(O)OR<sup>5</sup>であり；

R<sup>4</sup>は、(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)アルキル、(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>)アルケニル、(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>)アルキニル、(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)アルキル-OR<sup>5</sup>、ベンジル、アリール、(C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>)アルキル-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)ヘテロシクロアルキル、又は(C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>)アルキル-(C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>)ヘテロアリールであり；

R<sup>5</sup>は、(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)アルキル、(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>)アルケニル、(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>)アルキニル、ベンジル、アリール、又は(C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>)ヘテロアリールであり；

R<sup>6</sup>の各々の出現は、独立してH、(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)アルキル、(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>)アルケニル、(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>)アルキニル、ベンジル、アリール、(C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>)ヘテロアリール、もしくは(C<sub>0</sub>-C<sub>8</sub>)アルキル-C(O)O-R<sup>5</sup>であるか、又はR<sup>6</sup>基は、結合して、ヘテロシクロアルキル基を形成することができ；

nは、0又は1であり；かつ

\*は、キラル炭素中心を表す)；

又は、その医薬として許容し得る塩、水和物、溶媒和物、クラスレート、エナンチオマー、ジアステレオマー、ラセミ化合物、もしくは立体異性体の混合物である。上記の式の具体的な化合物において、nが0であるならば、R<sup>1</sup>は、(C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>)シクロアルキル、(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>)アルケニル、(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>)アルキニル、ベンジル、アリール、(C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>)アルキル-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)ヘテロシクロアルキル、(C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>)アルキル-(C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>)ヘテロアリール、C(O)R<sup>3</sup>、C(O)OR<sup>4</sup>、(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)アルキル-N(R<sup>6</sup>)<sub>2</sub>、(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)アルキル-OR<sup>5</sup>、(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)アルキル-C(O)OR<sup>5</sup>、C(S)NHR<sup>3</sup>、又は(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)アルキル-O(CO)R<sup>5</sup>であり；

R<sup>2</sup>は、H又は(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)アルキルであり；かつ

R<sup>3</sup>は、(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)アルキル、(C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>)シクロアルキル、(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>)アルケニル、(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>)アルキニル、ベンジル、アリール、(C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>)アルキル-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)ヘテロシクロアルキル、(C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>)アルキル-(C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>)ヘテロアリール、(C<sub>5</sub>-C<sub>8</sub>)アルキル-N(R<sup>6</sup>)<sub>2</sub>；(C<sub>0</sub>-C<sub>8</sub>)アルキル-NH-C(O)O-R<sup>5</sup>；(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)アルキル-OR<sup>5</sup>、(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)アルキル-C(O)OR<sup>5</sup>、(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)アルキル-O(CO)R<sup>5</sup>、又はC(O)OR<sup>5</sup>であり；かつその他の可変部分は、同じ定義を有する。

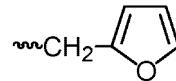
上記の式の他の具体的な化合物において、R<sup>2</sup>は、H又は(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)アルキルである。

上記の式の他の具体的な化合物において、R<sup>1</sup>は、(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)アルキル又はベンジルである。

。

上記の式の他の具体的な化合物において、R<sup>1</sup>は、H、(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)アルキル、ベンジル、CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>、CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>、又は

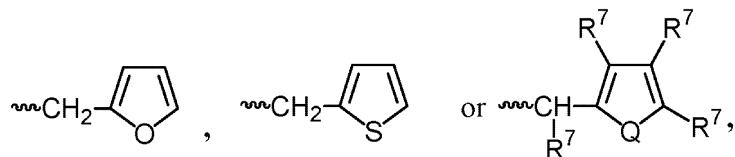
【化4】



である。

上記の式の化合物の別の実施態様において、R<sup>1</sup>は

## 【化5】



(式中、Qは、O又はSであり、かつR<sup>7</sup>の各々の出現は、独立して、H、(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)アルキル、ベンジル、CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>、又はCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>である。

上記の式の他の具体的な化合物において、R<sup>1</sup>は、C(O)R<sup>3</sup>である。 10

上記の式の他の具体的な化合物において、R<sup>3</sup>は、(C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>)アルキル-(C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>)ヘテロアリール、(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)アルキル、アリール、又は(C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>)アルキル-OR<sup>5</sup>である。

上記の式の他の具体的な化合物において、ヘテロアリールは、ピリジル、フリル、又はチエニルである。

上記の式の他の具体的な化合物において、R<sup>1</sup>は、C(O)OR<sup>4</sup>である。

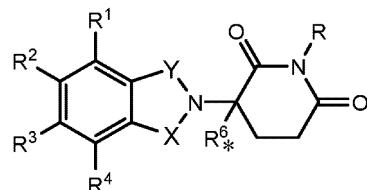
上記の式の他の具体的な化合物において、C(O)NHC(O)のHは、(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)アルキル、アリール、又はベンジルと置き換えることができる。

## 【0243】

別の実施態様において、前記免疫調節化合物は、以下の構造を有する化合物

## 【化6】

20



(式中:

X及びYの一方は、C=Oであり、かつ他方は、CH<sub>2</sub>又はC=Oであり;

Rは、H又はCH<sub>2</sub>OCOR'であり; 30

(i)R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、もしくはR<sup>4</sup>の各々は、他のものとは独立に、ハロ、炭素原子1~4個のアルキル、もしくは炭素原子1~4個のアルコキシであるか、又は(ii)R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、もしくはR<sup>4</sup>のうちの1つが、ニトロもしくは-NHR<sup>5</sup>であり、かつR<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、もしくはR<sup>4</sup>のうちの残りは、水素であり;

R<sup>5</sup>は、水素又は炭素1~8個のアルキルであり

R<sup>6</sup>は、水素、炭素原子1~8個のアルキル、ベンゾ、クロロ、又はフルオロであり;

R'は、R<sup>7</sup>-CHR<sup>10</sup>-N(R<sup>8</sup>R<sup>9</sup>)であり;

R<sup>7</sup>は、m-フェニレン又はp-フェニレン又は-(C<sub>n</sub>H<sub>2n</sub>)-であり、ここで、nは、0~4の値を有し;

R<sup>8</sup>及びR<sup>9</sup>の各々は、他方とは独立に、水素もしくは炭素原子1~8個のアルキルであるか、又はR<sup>8</sup>及びR<sup>9</sup>は一緒になって、テトラメチレン、ペンタメチレン、ヘキサメチレン、もしくは-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>X<sub>1</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-であり、ここで、X<sub>1</sub>は、-O-、-S-、もしくは-NH-であり;

R<sup>10</sup>は、水素、炭素原子~8個のアルキル、又はフェニルであり;かつ

\*は、キラル炭素中心を表す)

であるか、又はその医薬として許容し得る塩、水和物、溶媒和物、クラスレート、エナンチオマー、ジアステレオマー、ラセミ化合物、もしくは立体異性体の混合物である。

## 【0244】

具体的な実施態様において、造血細胞の増殖は、20%BITS(ウシ血清アルブミン、組換えヒトインスリン、及びトランスフェリン)、SCF、Flt-3リガンド、IL-3、及び4-(アミノ)-2-(2,6-ジオキソ(3-ペリジル))-イソインドリン-1,3-ジオン(0.05%DMSO中、10 μM)

40

50

が補充されたIMDM中で行われる。より具体的な実施態様において、約 $5 \times 10^7$ 個の造血細胞、例えば、CD34<sup>+</sup>細胞を、該培地中で、約 $5 \times 10^{10}$ 細胞～約 $5 \times 10^{12}$ 細胞まで増殖させ、これを100mLのIMDMに再懸濁して、増殖された造血細胞の集団を製造する。増殖された造血細胞の集団は、輸送しやすくするために凍結保存されることが好ましい。

#### 【0245】

様々な具体的な実施態様において、前記造血細胞のうちの少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、又は99%は、NK細胞に分化する。

#### 【0246】

ある実施態様において、本明細書に記載されるような造血細胞の増殖及び分化のプロセスは、増殖及び分化の間、前記造血細胞を含む細胞集団を、1ミリリットルあたり約 $2 \times 10^4$ ～約 $2 \times 10^5$ 細胞に維持することを含む。ある他の実施態様において、本明細書に記載されるような造血細胞の増殖及び分化のプロセスは、前記該造血細胞を含む細胞集団を、1ミリリットルあたり約 $1 \times 10^5$ 細胞以下に維持することを含む。10

#### 【0247】

増殖、及び造血細胞のNK細胞への分化のための時間は、例えば、約3日～約120日とすることができる。一実施態様において、該分化時間は、約7日～約75日である。別の実施態様において、該分化時間は、約14日～約50日である。具体的な実施態様において、該分化時間は、約21日～約28日である。

#### 【0248】

##### (5.2.7.2. 第二の工程)

造血細胞、例えば、幹細胞又は前駆細胞、及び第一の工程から得られるナチュラルキラー細胞を、第二の工程で、例えば、フィーダー層を用いないで、又はフィーダー細胞の存在下、さらに増殖させ、分化させる。本明細書に記載される細胞の培養は、第一の工程由来のNK細胞の連続的な増殖、分化、及び成熟をもたらす。第二の工程では、該NK細胞を、例えば、該第一の培地とは異なるサイトカイン及び/又は生体活性分子を含む第二の培養培地中で、連続的な様式で、増殖させ、分化させ、かつ成熟させる。ある実施態様において、第二の培養培地は、動物成分不含培地である。例示的な動物成分不含細胞培養培地は、本開示に記載されている。20

#### 【0249】

したがって、一態様において、本明細書に記載されるものは、活性化NK細胞を製造するプロセスであって、上記の第一の工程由来のNK細胞を、第二の培地中で、フィーダー細胞の存在下かつインターロイキン-2(IL-2)と接触させて増殖させることを含む、前記プロセスである。具体的な実施態様において、該第二の培地は、IL-2、例えば、10IU/mL～1000IU/mL、及びヒト血清(例えば、ヒト血清AB)、ウシ胎仔血清(fetal bovine serum)(FBS)、もしくはウシ胎仔血清(fetal calf serum)(FCS)、例えば、5%～15%FCS v/v; トランスフェリン、例えば、10 μg/mL～50 μg/mL; インスリン、例えば、5 μg/mL～20 μg/mL; エタノールアミン、例えば、 $5 \times 10^{-4}$ ～ $5 \times 10^{-5}$ M; オレイン酸、例えば、0.1 μg/mL～5 μg/mL; リノール酸、例えば、0.1 μg/mL～5 μg/mL; パルミチン酸、例えば、0.05 μg/mL～2 μg/mL; ウシ血清アルブミン(BSA)、例えば、1 μg/mL～5 μg/mL; 及び/又はフィトヘマグルチニン、例えば、0.01 μg/mL～1 μg/mL: のうちの1つ以上を含む細胞成長培地を含む。より具体的な実施態様において、該第二の培地は、FBS又はFCS、例えば、10%FCS v/v、IL-2、トランスフェリン、インスリン、エタノールアミン、オレイン酸、リノール酸、パルミチン酸、ウシ血清アルブミン(BSA)、及びフィトヘマグルチニンを含む細胞成長培地を含む。より具体的な実施態様において、該第二の培地は、イスコフ改変ダルベッコ培地(IMDM)、10%FBS又はFCS、400IU IL-2、35 μg/mLトランスフェリン、5 μg/mLインスリン、 $2 \times 10^{-5}$ Mエタノールアミン、1 μg/mLオレイン酸、1 μg/mLリノール酸(Sigma-Aldrich)、0.2 μg/mLパルミチン酸(Sigma-Aldrich)、2.5 μg/mL BSA(Sigma-Aldrich)、及び0.1 μg/mLフィトヘマグルチニンを含む。40

#### 【0250】

50

ある実施態様において、第二の培地は、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、顆粒球/マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、インターロイキン-6(IL-6)、マクロファージ炎症性タンパク質1(MIP1 $\alpha$ )、又は白血病抑制因子(LIF)のうちの1つ以上を含まない。

#### 【0251】

フィーダー細胞を使用する場合、それは、様々な細胞型から樹立することができる。これらの細胞型の例としては、限定するものではないが、線維芽細胞、幹細胞(例えば、組織培養物接着性胎盤幹細胞)、血液細胞(例えば、末梢血単核細胞(PBMC))、及びがん細胞(例えば、慢性骨髄性白血病(CML)細胞、例えば、K562)が挙げられる。具体的な実施態様において、該第二の培地中で該培養することは、例えば、フィーダー細胞、例えば、K562細胞及び/又は末梢血単核細胞(PBMC)を、該第二の培地中で起こしたとき、その1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10日後に、該細胞を用いて培養することを含む。ある実施態様において、フィーダー細胞は、任意に、それらが支持している細胞とは異なる種に由来するものである。例えば、ヒトNK細胞は、(初代培養物又はテロメア化された株由来の)マウス胚性線維芽細胞によって支持することができる。

#### 【0252】

ある実施態様において、フィーダー細胞を、任意に、放射線照射(例えば、 $\gamma$ 線照射)又は抗有糸分裂剤、例えば、マイトイシンCによる処理によって不活化し、それらが支持している細胞よりもそれらが成長するのを防ぐが、NK細胞を支持する重要な因子の合成は可能にする。例えば、細胞に、増殖を阻害するが、ヒト胚性幹(hES)細胞を支持する重要な因子の合成を可能にする用量で放射線照射する(約4000ラドの $\gamma$ 線照射)。

#### 【0253】

第二の工程のためのNK細胞の培養は、細胞の培養及び増殖と適合する任意の容器、例えば、フラスコ、チューブ、ビーカー、ディッシュ、マルチウェルプレート、バッグなどの内で生じ得る。具体的な実施態様において、NK細胞のフィーダー細胞依存的な培養は、バッグ、例えば、可撓性で、ガス透過性のフルオロカーボン培養バッグ(例えば、American Fluoroseal製)の中で生じる。具体的な実施態様において、NK細胞を培養する容器は、例えば、増殖されたNK細胞をさらに増殖させ、分化させ、かつ成熟させる、病院又は軍事区域などの場所への輸送に好適である。

#### 【0254】

工程1由来の細胞の活性化NK細胞への分化は、例えば、フローサイトメトリーによって、NK細胞特異的マーカーを検出することによって評価することができる。NK細胞特異的マーカーとしては、CD56、CD94、CD117、及びNKp46が挙げられるが、これらに限定されない。分化は、NK細胞の形態学的な特徴、例えば、大きいサイズ、数多くの小胞体(ER)における高いタンパク質合成活性、及び/又は予め形成された顆粒によって評価することができる。

#### 【0255】

工程1由来の細胞の増殖、及び活性化NK細胞への分化にかかる時間は、例えば、約3日～約120日であり得る。一実施態様において、分化時間は、約7日～約75日である。別の実施態様において、分化時間は、約14日～約50日である。具体的な実施態様において、分化時間は、約10日～約21日である。

#### 【0256】

造血細胞のNK細胞への分化は、例えば、フローサイトメトリーによって、マーカー、例えば、CD56、CD94、CD117、NKG2D、DNAM-1、及びNKp46を検出することによって評価することができる。分化は、NK細胞の形態学的な特徴、例えば、大きいサイズ、数多くの小胞体(ER)における高いタンパク質合成活性、及び/又は予め形成された顆粒によって評価することができる。NK細胞(例えば、活性化NK細胞)の成熟は、1以上の機能的に関連のあるマーカー、例えば、CD94、CD161、NKp44、DNAM-1、2B4、NKp46、CD94、KIR、及びNKG2ファミリーの活性化受容体(例えば、NKG2D)を検出することによって評価することができる。NK細胞(例えば、活性化NK細胞)の成熟は、異なる発生段階の間に特異的なマーカーを検出することによって評価することもできる。例えば、一実施態様において、プロNK細胞は

10

20

30

40

50

、CD34<sup>+</sup>、CD45RA<sup>+</sup>、CD10<sup>+</sup>、CD117<sup>-</sup>、及び/又はCD161<sup>-</sup>である。別の実施態様において、プレNK細胞は、CD34<sup>+</sup>、CD45RA<sup>+</sup>、CD10<sup>-</sup>、CD117<sup>+</sup>、及び/又はCD161<sup>-</sup>である。別の実施態様において、未熟なNK細胞は、CD34<sup>-</sup>、CD117<sup>+</sup>、CD161<sup>+</sup>、NKp46<sup>-</sup>、及び/又はCD94/NKG2A<sup>-</sup>である。別の実施態様において、CD56<sup>bright</sup> NK細胞は、CD117<sup>+</sup>、NKp46<sup>+</sup>、CD94/NKG2A<sup>+</sup>、CD16<sup>-</sup>、及び/又はKIR<sup>+/-</sup>である。別の実施態様において、CD56<sup>dim</sup> NK細胞は、CD117<sup>-</sup>、NKp46<sup>+</sup>、CD94/NKG2A<sup>+/-</sup>、CD16<sup>+</sup>、及び/又はKIR<sup>+</sup>である。具体的な実施態様において、NK細胞(例えば、活性化NK細胞)の成熟は、CD161<sup>-</sup>、CD94<sup>+</sup>及び/又はNKp46<sup>+</sup>であるNK細胞(例えば、活性化NK細胞)のパーセンテージにより決定される。より具体的な実施態様において、成熟NK細胞(例えば、活性化NK細胞)のうちの少なくとも10%、20%、25%、30%、35%、40%、50%、55%、60%、65%、又は70%は、NKp46<sup>+</sup>である。別のより具体的な実施態様において、成熟NK細胞(例えば、活性化NK細胞)のうちの少なくとも10%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、又は50%は、CD94<sup>+</sup>である。別のより具体的な実施態様において、成熟NK細胞(例えば、活性化NK細胞)のうちの少なくとも10%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、又は50%は、CD161<sup>-</sup>である。  
10

#### 【0257】

ある実施態様において、造血細胞のNK細胞への分化を、例えば、CD3、CD7もしくはCD127、CD10、CD14、CD15、CD16、CD33、CD34、CD56、CD94、CD117、CD161、NKp44、NKp46、NKKG2D、DNAM-1、2B4、又はTO-PRO-3の発現レベルを、例えば、これらの細胞マーカーのうちの1つ以上に対する抗体を用いて検出することによって評価する。そのような抗体は、例えば、蛍光標識、例えば、FITC、R-PE、PerCP、PerCP-Cy5.5、APC、APC-Cy7、又はAPC-H7のような、検出可能な標識にコンジュゲートすることができる。  
20

#### 【0258】

##### (5.2.8.TSPNK細胞を製造する方法)

TSPNK細胞は、上述のような造血細胞から製造されてもよい。ある実施態様において、前記TSPNK細胞は、増殖された造血細胞、例えば、造血幹細胞及び/又は造血前駆細胞から製造される。

#### 【0259】

一実施態様において、前記TSPNK細胞は、3工程プロセスによって製造される。ある実施態様において、本明細書に記載される3工程プロセスによりNK前駆細胞集団又はNK細胞集団を製造する、本明細書に記載されるような造血細胞の増殖及び分化のプロセスは、該造血細胞を含む細胞集団を、増殖及び分化の間、1ミリリットルあたり約 $2 \times 10^4$ ～約 $6 \times 10^6$ 細胞、例えば、1ミリリットルあたり約 $2 \times 10^4$ ～約 $2 \times 10^5$ 細胞で維持することを含む。ある他の実施態様において、本明細書に記載されるような造血細胞の増殖及び分化のプロセスは、該造血細胞を含む細胞集団を、1ミリリットルあたり約 $1 \times 10^5$ 細胞以下で維持することを含む。ある他の実施態様において、本明細書に記載されるような造血細胞の増殖及び分化のプロセスは、該造血細胞を含む細胞集団を、1ミリリットルあたり約 $1 \times 10^5$ 細胞、1ミリリットルあたり $2 \times 10^5$ 細胞、1ミリリットルあたり $3 \times 10^5$ 細胞、1ミリリットルあたり $4 \times 10^5$ 細胞、1ミリリットルあたり $5 \times 10^5$ 細胞、1ミリリットルあたり $6 \times 10^5$ 細胞、1ミリリットルあたり $7 \times 10^5$ 細胞、1ミリリットルあたり $8 \times 10^5$ 細胞、1ミリリットルあたり $9 \times 10^5$ 細胞、1ミリリットルあたり $1 \times 10^6$ 細胞、1ミリリットルあたり $2 \times 10^6$ 細胞、1ミリリットルあたり $3 \times 10^6$ 細胞、1ミリリットルあたり $4 \times 10^6$ 細胞、1ミリリットルあたり $5 \times 10^6$ 細胞、1ミリリットルあたり $6 \times 10^6$ 細胞、1ミリリットルあたり $7 \times 10^6$ 細胞、1ミリリットルあたり $8 \times 10^6$ 細胞、又は1ミリリットルあたり $9 \times 10^6$ 細胞以下で維持することを含む。  
30  
40

#### 【0260】

ある実施態様において、前記3工程プロセスは、造血幹細胞又は前駆細胞、例えば、CD34<sup>+</sup>幹細胞又は前駆細胞を、例えば、本明細書に記載されるように、第一の培地中で特定の期間培養することを含む第一の工程(「工程1」)を含む。ある実施態様において、第一の培地は、造血前駆細胞の増殖を促進する1以上の因子、増殖する造血前駆集団内のリンパ球分化の開始のための1以上の因子、及び/又は間質フィーダー支持物を模倣する1以上の  
50

因子を含有する。ある実施態様において、第一の培地は、1以上のサイトカイン(例えば、Flt3L、TPO、SCF)を含む。ある実施態様において、第一の培地は、IL-7を含む。ある実施態様において、第一の培地は、サブng/mL濃度のG-CSF、IL-6、及び/又はGM-CSFを含む。具体的な実施態様において、第一の培地は、サイトカインFlt3L、TPO、及びSCF、IL-7、並びにサブng/mL濃度のG-CSF、IL-6及びGM-CSFを含む。具体的な実施態様において、第一の培地中で、CD34+細胞は、増殖を経て、系譜特異的前駆体になり、これは、その後、CD34-になる。ある実施態様において、この増殖は、速やかに起こる。ある実施態様において、工程1の最後で、該CD34-細胞は、全集団の50%超、55%超、60%超、65%超、70%超、75%超、80%超、又はそれより多くを構成する。より具体的な実施態様において、工程1の最後で、CD34-細胞は、全集団の80%超を構成する。

10

#### 【0261】

ある実施態様において、その後、「工程2」において、該細胞を、例えば、本明細書に記載されるように、第二の培地中で特定の期間培養する。ある実施態様において、第二の培地は、リンパ球前駆細胞の増殖をさらに促進し得る因子、NK系譜に沿った発生に寄与し得る因子、及び/又は間質フィーダー支持物を模倣する因子を含有する。ある実施態様において、第二の培地は、1以上のサイトカイン(例えば、Flt3L、SCF、IL-15、及び/又はIL-7)を含む。ある実施態様において、第二の培地は、IL-17及び/又はIL-15を含む。ある実施態様において、第二の培地は、サブng/mL濃度のG-CSF、IL-6、及び/又はGM-CSFを含む。具体的な実施態様において、第二の培地は、サイトカインFlt3L、SCF、IL-15、及びIL-7、IL-17及びIL-15、並びにサブng/mL濃度のG-CSF、IL-6、及びGM-CSFを含む。

20

#### 【0262】

ある実施態様において、その後、「工程3」において、該細胞を、例えば、本明細書に記載されるように、第三の培地中で特定の期間培養する。ある実施態様において、第三の培地は、NK前駆細胞であり得るCD56+CD3-CD16-細胞の分化及び機能的活性化を促進する因子を含む。一実施態様において、そのような因子は、IL2とIL12とIL18、IL12とIL15、IL12とIL18、IL2とIL12とIL15とIL18、又はIL2とIL15とIL18を含む。ある実施態様において、第三の培地は、間質フィーダー支持物を模倣する因子を含む。ある実施態様において、第三の培地は、1以上のサイトカイン(例えば、SCF、IL-15、IL-7、IL-2)を含む。ある実施態様において、第三の培地は、サブng/mL濃度のG-CSF、IL-6及び/又はGM-CSFを含む。具体的な実施態様において、第三の培地は、サイトカインSCF、IL-15、IL-7、IL-2、並びにサブng/mL濃度のG-CSF、IL-6、及びGM-CSFを含む。

30

#### 【0263】

具体的な実施態様において、前記3工程プロセスを用いて、NK細胞(例えば、成熟NK細胞)集団を製造する。具体的な実施態様において、該3工程プロセスを用いて、NK前駆細胞集団を製造する。ある実施態様において、該3工程プロセスを、間質フィーダー細胞支持物の非存在下で実施する。ある実施態様において、該3工程プロセスを、外因的に添加されるステロイド(例えば、コルチゾン、ヒドロコルチゾン、又はそれらの誘導体)の非存在下で実施する。

#### 【0264】

ある実施態様において、本明細書に記載される3工程プロセスにおいて用いられる第一の培地は、2工程法に関連してセクション5.2.4で記載されている第一の培地又は第二の培地の成分のうちのいずれかを含有していてもよい。ある実施態様において、該3工程プロセスにおいて用いられる第一の培地は、動物血清、例えば、ヒト血清(例えば、ヒト血清AB)、ウシ胎仔血清(fetal bovine serum)(FBS)、もしくはウシ胎仔血清(fetal calf serum)(FCS)、例えば、1% ~ 20%v/v血清、例えば、5% ~ 20%v/v血清;幹細胞因子(SCF)、例えば、1ng/mL ~ 50ng/mL SCF;FMS様チロシンキナーゼ-3リガンド(Flt-3リガンド)、例えば、1ng/ml ~ 30ng/mL Flt-3リガンド;インターロイキン-7(IL-7)、例えば、1ng/mL ~ 50ng/mL IL-7;トロンボポエチン(TPO)、例えば、1ng/mL ~ 100ng/mL、例えば、1ng/mL ~ 50ng/mL TPO;インターロイキン-2(IL-2)、例えば、最大2000IU/mL、例えば、50IU/mL ~ 500IU/mL;及び/又はヘパリン、例えば、低重量ヘパリン(LWH)、例えば、0.1IU/mL ~ 10IU/mLヘパリン:

40

50

のうちの1つ以上を含む培地を含む。ある実施態様において、該第一の培地は、以下のもの:抗生物質、例えば、ゲンタマイシン;抗酸化剤、例えば、トランスフェリン、インスリン、及び/又は -メルカプトエタノール;亜セレン酸ナトリウム;アスコルビン酸;エタノールアミン;並びにグルタチオンのうちの1つ以上をさらに含む。ある実施態様において、該第一の培地は、OACをさらに含む。ある実施態様において、該第一の培地は、インターロイキン-6(IL-6)、白血病抑制因子(LIF)、G-CSF、GM-CSF、及び/又はMIP-1 をさらに含む。ある実施態様において、該第一の培地は、1以上の抗酸化剤、例えば、ホロ-トランスフェリン、インスリン溶液、還元グルタチオン、亜セレン酸ナトリウム、エタノールアミン、アスコルビン酸、b-メルカプトエタノール、O-アセチル-L-カルニチン、N-アセチルシステイン、(+/-)リポ酸、ニコチニアミド、又はレスベラトロールをさらに含む。ある実施態様において、前記第一の培地の基剤を提供する培地は、当業者に公知の細胞/組織培養培地、例えば、市販の細胞/組織培養培地、例えば、GBGM(登録商標)、AIM-V(登録商標)、X-VIVO(商標)10、X-VIVO(商標)15、OPTMIZER、STEMSPAN(登録商標)H3000、CELLGRO COMPLETE(商標)、DMEM:ハムF12(「F12」)(例えば、2:1比、又は高グルコースもしくは低グルコースDMEM)、Advanced DMEM(Gibco)、EL08-1D2、Myelocult(商標)H5100、IMDM、及び/もしくはRPMI-1640であるか;又は公知の細胞/組織培養培地中に通常含まれる成分、例えば、GBGM(登録商標)、AIM-V(登録商標)、X-VIVO(商標)10、X-VIVO(商標)15、OPTMIZER、STEMSPAN(登録商標)H3000、CELLGRO COMPLETE(商標)、DMEM:ハムF12(「F12」)(例えば、2:1比、又は高グルコースもしくは低グルコースDMEM)、Advanced DMEM(Gibco)、EL08-1D2、Myelocult(商標)H5100、IMDM、及び/もしくはRPMI-1640に含まれる成分を含む培地である。本明細書における実施態様のうちのいずれかの具体的な実施態様において、該培地は、GBGM(登録商標)ではない。  
10  
20

#### 【0265】

ある実施態様において、本明細書に記載される3工程プロセスにおいて用いられる第二の培地は、2工程法に関連してセクション5.2.4で記載されている第一の培地又は第二の培地の成分のうちのいずれかを含有していてもよい。ある実施態様において、該3工程プロセスにおいて用いられる第二の培地は、動物血清、例えば、ヒト血清(例えば、ヒト血清A B)、FBSもしくはFCS、例えば、5% ~ 20% v/v血清;SCF、例えば、1ng/mL ~ 50ng/mL SCF;Flt-3リガンド、例えば、1ng/ml ~ 30ng/mL Flt-3リガンド;IL-7、例えば、1ng/mL ~ 50ng/mL IL-7;インターロイキン-15(IL-15)、例えば、1ng/mL ~ 50ng/mL IL-15;及び/又はヘパリン、例えば、LWH、例えば、0.1IU/mL ~ 10IU/mL ヘパリンのうちの1つ以上を含む培地を含む。ある実施態様において、該第二の培地は、以下のもの:抗生物質、例えば、ゲンタマイシン;抗酸化剤、例えば、トランスフェリン、インスリン、及び/又は -メルカプトエタノール;亜セレン酸ナトリウム;アスコルビン酸;エタノールアミン;並びにグルタチオンのうちの1つ以上をさらに含む。ある実施態様において、該第二の培地は、OACをさらに含む。ある実施態様において、該第二の培地は、インターロイキン-6(IL-6)、白血病抑制因子(LIF)、G-CSF、GM-CSF、及び/又はMIP-1 をさらに含む。ある実施態様において、該第二の培地は、1以上の抗酸化剤、例えば、ホロ-トランスフェリン、インスリン溶液、還元グルタチオン、亜セレン酸ナトリウム、エタノールアミン、アスコルビン酸、b-メルカプトエタノール、O-アセチル-L-カルニチン、N-アセチルシステイン、(+/-)リポ酸、ニコチニアミド、又はレスベラトロールをさらに含む。ある実施態様において、前記第二の培地の基剤を提供する培地は、当業者に公知の細胞/組織培養培地、例えば、市販の細胞/組織培養培地、例えば、GBGM(登録商標)、AIM-V(登録商標)、X-VIVO(商標)10、X-VIVO(商標)15、OPTMIZER、STEMSPAN(登録商標)H3000、CELLGRO COMPLETE(商標)、DMEM:ハムF12(「F12」)(例えば、2:1比、又は高グルコースもしくは低グルコースDMEM)、Advanced DMEM(Gibco)、EL08-1D2、Myelocult(商標)H5100、IMDM、及び/もしくはRPMI-1640であるか;又は公知の細胞/組織培養培地中に通常含まれる成分、例えばGBGM(登録商標)、AIM-V(登録商標)、X-VIVO(商標)10、X-VIVO(商標)15、OPTMIZER、STEMSPAN(登録商標)H3000、CELLGRO COMPLETE(商標)、DMEM:ハムF12(「F12」)(例えば、2:1比、又は高グルコースもしくは低グルコースDMEM)、Advanced DMEM(Gibco)、EL08-1D2、Myelocult(商標)H5100、IMDM、及び/もしくはRPMI-1640に含まれる成分を含む培地である。本明細書における実施態様のうちのいずれかの具体的な実施態様において、該培地は、GBGM(登録商標)ではない。  
30  
40  
50

しくはRPMI-1640に含まれる成分を含む培地である。本明細書における実施態様のうちのいずれかの具体的な実施態様において、該培地は、GBGM(登録商標)ではない。

#### 【0266】

ある実施態様において、本明細書に記載される3工程プロセスにおいて用いられる第三の培地は、2工程法に関連してセクション5.2.4で記載されている第一の培地又は第二の培地の成分のうちのいずれかを含有していてもよい。ある実施態様において、該3工程プロセスにおいて用いられる第三の培地は、動物血清、例えば、ヒト血清(例えば、ヒト血清A B)、FBSもしくはFCS、例えば、5% ~ 20% v/v血清;SCF、例えば、1ng/mL ~ 50ng/mL SCF;Flt-3リガンド、例えば、1ng/ml ~ 30ng/mL Flt-3リガンド;IL-7、例えば、1ng/mL ~ 50ng/mL IL-7;IL-15、例えば、1ng/mL ~ 50ng/mL IL-15;及び例えば、0 ~ 2000IU/mLの範囲のインターロイキン-2(IL-2)、例えば、50IU/mL ~ 1000IU/mLのIL-2のうちの1つ以上を含む培地を含む。ある実施態様において、該第三の培地は、以下のもの:抗生物質、例えば、ゲンタマイシン;抗酸化剤、例えば、トランスフェリン、インスリン、及び/又は -メルカプトエタノール;亜セレン酸ナトリウム;アスコルビン酸;エタノールアミン;並びにグルタチオンのうちの1つ以上をさらに含む。ある実施態様において、該第三の培地は、OACをさらに含む。ある実施態様において、該第三の培地は、インターロイキン-6(IL-6)、白血病抑制因子(LIF)、G-CSF、GM-CSF、及び/又はMIP-1 をさらに含む。ある実施態様において、該第三の培地は、1以上の抗酸化剤、例えば、ホロ-トランスフェリン、インスリン溶液、還元グルタチオン、亜セレン酸ナトリウム、エタノールアミン、アスコルビン酸、b-メルカプトエタノール、0-アセチル-L-カルニチン、N-アセチルシスティン、(+/-)リポ酸、ニコチニアミド、又はレスベラトロールをさらに含む。ある実施態様において、第三の培地の基剤を提供する培地は、当業者に公知の細胞/組織培養培地、例えば、市販の細胞/組織培養培地、例えばGBGM(登録商標)、AIM-V(登録商標)、X-VIVO(商標)10、X-VIVO(商標)15、OPTMIZER、STEMSPAN(登録商標)H3000、CELLGRO COMPLETE(商標)、DMEM:ハムF12(「F12」)(例えば、2:1比、又は高グルコースもしくは低グルコースDMEM)、Advanced DMEM(Gibco)、EL08-1D2、Myelocult(商標)H5100、IMDM、及び/もしくはRPMI-1640であるか;又は公知の細胞/組織培養培地中に通常含まれる成分、例えば、GBGM(登録商標)、AIM-V(登録商標)、X-VIVO(商標)10、X-VIVO(商標)15、OPTMIZER、STEMSPAN(登録商標)H3000、CELLGRO COMPLETE(商標)、DMEM:ハムF12(「F12」)(例えば、2:1比、又は高グルコースもしくは低グルコースDMEM)、Advanced DMEM(Gibco)、EL08-1D2、Myelocult(商標)H5100、IMDM、及び/もしくはRPMI-1640に含まれる成分を含む培地である。本明細書における実施態様のうちのいずれかの具体的な実施態様において、該培地は、GBGM(登録商標)ではない。10  
20  
30

#### 【0267】

ある実施態様において、本明細書に記載される3工程プロセスにおいて、前記造血幹細胞又は前駆細胞を、前記第二の培地中で前記培養することの前に、前記第一の培地中で、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、又は20日間培養する。ある実施態様において、該第一の培地中で培養された細胞を、前記第三の培地中で前記培養することの前に、前記第二の培地中で、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、又は20日間培養する。ある実施態様において、該第一の培地及び該第二の培地中で培養された細胞を、前記第三の培地中で、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、又は30日間、又は30日よりも長い期間培養する。40

#### 【0268】

ある実施態様において、本明細書に記載される3工程プロセスにおいて、前記造血幹細胞又は前駆細胞を、前記第二の培地中で前記培養することの前に、前記第一の培地中で、2~12日間、3~11日間、例えば、3~5、4~6、5~7、6~8、7~9、8~10、又は9~11日間培養する。ある実施態様において、該第一の培地中で培養された細胞を、前記第三の培地中で前記培養することの前に、前記第二の培地中で、1~10日間、例えば、1~3、2~4、3~5、4~6、5~7、6~8、又は7~9日間培養する。ある実施態様において、該第一の培地及び該第二の培地中で培養された細胞を、前記第三の培地中で、2~27日間、例えば、3~50

25日間、例えば、3~5、4~6、5~7、6~8、7~9、8~10、9~11、10~12、11~13、12~14、13~15、14~16、15~17、16~18、17~19、18~20、19~21、20~22、21~23、22~24、又は23~25日間培養する。

#### 【0269】

具体的な実施態様において、本明細書に記載される3工程プロセスにおいて、前記造血幹細胞又は前駆細胞を、前記第二の培地中で前記培養することの前に、前記第一の培地中で、9日間培養し；前記第三の培地中で前記培養することの前に、前記第二の培地中で、5日間培養し；かつ前記第三の培地中で、7日間培養する、すなわち、該細胞を、合計で21日間培養する。

#### 【0270】

具体的な実施態様において、本明細書に記載される3工程プロセスにおいて、前記造血幹細胞又は前駆細胞を、前記第二の培地中で前記培養することの前に、前記第一の培地中で、7~9日間培養し；前記第三の培地中で前記培養することの前に、前記第二の培地中で、5~7日間培養し；かつ前記第三の培地中で、21~35日間培養する、すなわち、該細胞を、合計で35日間培養する。より具体的な実施態様において、本明細書に記載される3工程プロセスにおいて、前記造血幹細胞又は前駆細胞を、前記第二の培地中で前記培養することの前に、前記第一の培地中で、9日間培養し；前記第三の培地中で前記培養することの前に、前記第二の培地中で、5日間培養し；かつ前記第三の培地中で、21日間培養する、すなわち、該細胞を、合計で35日間培養する。

#### 【0271】

##### (5.2.9. 3段階NK細胞を製造する方法)

3段階法によるNK細胞及びNK細胞集団の製造は、造血細胞の集団を増殖させることを含む。細胞増殖の間に、該造血細胞集団内の複数の造血細胞が、NK細胞へと分化する。一態様において、本明細書において提供されるのは、NK細胞を製造する方法であって、造血幹細胞又は前駆細胞、例えば、CD34<sup>+</sup>幹細胞又は前駆細胞を、幹細胞動員剤及びトロンボポエチン(Tpo)を含む第一の培地中で培養して、第一の細胞の集団を製造すること、それに続き、該第一の細胞の集団を、幹細胞動員剤及びインターロイキン-15(IL-15)を含み、Tpoを欠く第二の培地中で培養して、第二の細胞の集団を製造すること、及びそれに続き、該第二の細胞の集団を、IL-2及びIL-15を含み、幹細胞動員剤及びLMWHを欠く第三の培地中で培養して、第三の細胞の集団を製造することを含み、ここで、該第三の細胞の集団は、CD56<sup>+</sup>、CD3-であるナチュラルキラー細胞を含み、かつ該ナチュラルキラー細胞の少なくとも70%、例えば、80%は生細胞であり、ある実施態様では、そのようなナチュラルキラー細胞は、CD16-であるナチュラルキラー細胞を含む、前記方法である。ある実施態様において、そのようなナチュラルキラー細胞は、CD94-であるナチュラルキラー細胞を含む。

#### 【0272】

一実施態様において、本明細書において提供されるのは、NK細胞集団を製造する3段階法である。ある実施態様において、本明細書に記載される3段階法による、本明細書に記載されるように造血細胞の増殖及び分化によりNK細胞集団を製造する方法は、該造血細胞を含む細胞集団を、1ミリリットルあたり約 $2 \times 10^4$ ~約 $6 \times 10^6$ 細胞に維持することを含む。ある態様において、該造血幹細胞又は前駆細胞は、はじめに、前記第一の培地中に、 $1 \times 10^4$ ~ $1 \times 10^5$ 細胞/mLで接種される。具体的な態様において、該造血幹細胞又は前駆細胞は、はじめに、前記第一の培地中に、約 $3 \times 10^4$ 細胞/mLで接種される。

#### 【0273】

ある実施態様において、前記造血幹細胞又は前駆細胞は、哺乳動物細胞である。具体的な実施態様において、前記造血幹細胞又は前駆細胞は、ヒト細胞である。具体的な実施態様において、前記造血幹細胞又は前駆細胞は、靈長類細胞である。具体的な実施態様において、前記造血幹細胞又は前駆細胞は、イヌ細胞である。具体的な実施態様において、該造血幹細胞又は前駆細胞は、齧歯動物細胞である。

#### 【0274】

10

20

30

40

50

ある態様において、前記第一の細胞の集団は、はじめに、前記第二の培地中に、 $5 \times 10^4$  ~  $5 \times 10^5$  細胞/mLで接種される。具体的な態様において、該第一の細胞の集団は、はじめに、前記第二の培地中に、約 $1 \times 10^5$  細胞/mLで接種される。

#### 【0275】

ある態様において、前記第二の細胞の集団は、はじめに、前記第三の培地中に、 $1 \times 10^5$  ~  $5 \times 10^6$  細胞/mLで接種される。ある態様において、前記第二の細胞の集団は、はじめに、前記第三の培地中に、 $1 \times 10^5$  ~  $1 \times 10^6$  細胞/mLで接種される。具体的な態様において、前記第二の細胞の集団は、はじめに、前記第三の培地中に、約 $5 \times 10^5$  細胞/mLで接種される。より具体的な態様において、前記第二の細胞の集団は、はじめに、スピナーフラスコ中の前記第三の培地中に、約 $5 \times 10^5$  細胞/mLで接種される。具体的な態様において、前記第二の細胞の集団は、はじめに、前記第三の培地中に、約 $3 \times 10^5$  紆胞/mLで接種される。より具体的な態様において、前記第二の細胞の集団は、はじめに、静置培養で、前記第三の培地中に、約 $3 \times 10^5$  紆胞/mLで接種される。10

#### 【0276】

ある実施態様において、前記3段階法は、造血幹細胞又は前駆細胞、例えば、CD34<sup>+</sup>幹細胞又は前駆細胞を、第一の培地中で、特定の期間、例えば、本明細書に記載されるように、培養して、第一の細胞の集団を製造することを含む第一の段階(「段階1」)を含む。ある実施態様において、前記第一の培地は、幹細胞動員剤及びトロンボポエチン(Tpo)を含む。ある実施態様において、前記第一の培地は、幹細胞動員剤及びTpoに加えて、LMWH、F1t-3L、SCF、IL-6、IL-7、G-CSF、及びGM-CSFのうちの1つ以上を含む。具体的な実施態様において、前記第一の培地は、第一の培地の各々は、幹細胞動員剤及びTpoに加えて、LMWH、F1t-3L、SCF、IL-6、IL-7、G-CSF、及びGM-CSFの各々を含む。20

#### 【0277】

ある実施態様において、それに続き、「段階2」において、前記細胞を、第二の培地中で、特定の期間、例えば、本明細書に記載されるように培養して、第二の細胞の集団を製造する。ある実施態様において、前記第二の培地は、幹細胞動員剤及びインターロイキン-15(IL-15)を含み、かつTpoを欠く。ある実施態様において、前記第二の培地は、幹細胞動員剤及びIL-15に加えて、LMWH、F1t-3、SCF、IL-6、IL-7、G-CSF、及びGM-CSFのうちの1つ以上を含む。ある実施態様において、前記第二の培地は、幹細胞動員剤及びIL-15に加えて、LMWH、F1t-3、SCF、IL-6、IL-7、G-CSF、及びGM-CSFの各々を含む。30

#### 【0278】

ある実施態様において、それに続き、「段階3」において、前記細胞を、例えば、本明細書に記載されるように、第三の培地中で、特定の期間培養して、細胞の第三の集団、例えば、ナチュラルキラー細胞を製造する。ある実施態様において、第三の培地は、IL-2及びIL-15を含み、かつ幹細胞動員剤及びLMWHを欠く。ある実施態様において、第三の培地は、IL-2及びIL-15に加えて、SCF、IL-6、IL-7、G-CSF、及びGM-CSFのうちの1つ以上を含む。ある実施態様において、第三の培地は、IL-2及びIL-15に加えて、SCF、IL-6、IL-7、G-CSF、及びGM-CSFの各々を含む。

#### 【0279】

具体的な実施態様において、前記3段階法を用いて、NK細胞集団を製造する。ある実施態様において、該3段階法は、間質フィーダー細胞支持物の非存在下で実施される。ある実施態様において、前記3段階法は、外因的に添加されるステロイド(例えば、コルチゾン、ヒドロコルチゾン、又はそれらの誘導体)の非存在下で実施される。40

#### 【0280】

ある態様において、前記3段階法において用いられる第一の培地は、幹細胞動員剤及びトロンボポエチン(Tpo)を含む。ある態様において、前記3段階法において用いられる第一の培地は、幹細胞動員剤及びTpoに加えて、低分子量ヘパリン(LMWH)、F1t-3リガンド(F1t-3L)、幹細胞因子(SCF)、IL-6、IL-7、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、又は顆粒球-マクロファージ-刺激因子(GM-CSF)のうちの1つ以上を含む。ある態様において、前記3段階法において用いられる第一の培地は、幹細胞動員剤及びTpoに加えて、LMWH、F1t-3L、SCF50

、IL-6、IL-7、G-CSF、及びGM-CSFの各々を含む。ある態様において、前記Tpoは、前記第一の培地中に、1ng/mL～100ng/mL、1ng/mL～50ng/mL、20ng/mL～30ng/mL、又は約25ng/mLの濃度で存在する。ある態様において、前記第一の培地中に、前記LMWHは、1U/mL～10U/mLの濃度で存在し；前記Flt-3Lは、1ng/mL～50ng/mLの濃度で存在し；前記SCFは、1ng/mL～50ng/mLの濃度で存在し；前記IL-6は、0.01ng/mL～0.1ng/mLの濃度で存在し；前記IL-7は、1ng/mL～50ng/mLの濃度で存在し；前記G-CSFは、0.01ng/mL～0.50ng/mLの濃度で存在し；かつ前記GM-CSFは、0.005ng/mL～0.1ng/mLの濃度で存在する。ある態様において、前記第一の培地中に、前記LMWHは、4U/mL～5U/mLの濃度で存在し；前記Flt-3Lは、20ng/mL～30ng/mLの濃度で存在し；前記SCFは、20ng/mL～30ng/mLの濃度で存在し；前記IL-6は、0.04ng/mL～0.06ng/mLの濃度で存在し；前記IL-7は、20ng/mL～30ng/mLの濃度で存在し；前記G-CSFは、0.20ng/mL～0.30ng/mLの濃度で存在し；かつ前記GM-CSFは、0.005ng/mL～0.5ng/mLの濃度で存在する。ある態様において、前記第一の培地中に、前記LMWHは、約4.5U/mLの濃度で存在し；前記Flt-3Lは、約25ng/mLの濃度で存在し；前記SCFは、約27ng/mLの濃度で存在し；前記IL-6は、約0.05ng/mLの濃度で存在し；前記IL-7は、約25ng/mLの濃度で存在し；前記G-CSFは、約0.25ng/mLの濃度で存在し；かつ前記GM-CSFは、約0.01ng/mLの濃度で存在する。ある実施態様において、該第一の培地は、以下のもの：抗生物質、例えば、ゲンタマイシン；抗酸化剤、例えば、トランスフェリン、インスリン、及び/又は $\alpha$ -メルカプトエタノール；亜セレン酸ナトリウム；アスコルビン酸；エタノールアミン；並びにグルタチオンのうちの1つ以上をさらに含む。ある実施態様において、第一の培地の基剤を提供する培地は、当業者に公知の細胞/組織培養培地、例えば、市販の細胞/組織培養培地、例えばSC GM(商標)、STEMMACS(商標)、GBGM(登録商標)、AIM-V(登録商標)、X-VIVO(商標)10、X-VIVO(商標)15、OPTMIZER、STEMSPAN(登録商標)H3000、CELLGRO COMPLETE(商標)、DMEM:ハムF 12(「F12」)(例えば、2:1比、又は高グルコースもしくは低グルコースDMEM)、Advanced DMEM(Gibco)、EL08-1D2、Myelocult(商標)H5100、IMDM、及び/もしくはRPMI-1640であるか；又は公知の細胞/組織培養培地中に通常含まれる成分、例えば、GBGM(登録商標)、AIM-V(登録商標)、X-VIVO(商標)10、X-VIVO(商標)15、OPTMIZER、STEMSPAN(登録商標)H3000、CELLGRO COMPLETE(商標)、DMEM:ハムF12(「F12」)(例えば、2:1比、又は高グルコースもしくは低グルコースDMEM)、Advanced DMEM(Gibco)、EL08-1D2、Myelocult(商標)H5100、IMDM、及び/もしくはRPMI-1640に含まれる成分を含む培地である。本明細書における実施態様のうちのいずれかの具体的な実施態様において、該培地は、GBGM(登録商標)ではない。

## 【0281】

ある態様において、前記3段階法において用いられる第二の培地は、幹細胞動員剤及びインターロイキン-15(IL-15)を含み、かつTpoを欠く。ある態様において、前記3段階法において用いられる第二の培地は、幹細胞動員剤及びIL-15に加えて、LMWH、Flt-3、SCF、IL-6、IL-7、G-CSF、及びGM-CSFのうちの1つ以上を含む。ある態様において、前記3段階法において用いられる第二の培地は、幹細胞動員剤及びIL-15に加えて、LMWH、Flt-3、SCF、IL-6、IL-7、G-CSF、及びGM-CSFの各々を含む。ある態様において、前記IL-15は、前記第二の培地中に、1ng/mL～50ng/mL、10ng/mL～30ng/mL、又は約20ng/mLの濃度で存在する。ある態様において、前記第二の培地中に、前記LMWHは、1U/mL～10U/mLの濃度で存在し；前記Flt-3Lは、1ng/mL～50ng/mLの濃度で存在し；前記SCFは、1ng/mL～50ng/mLの濃度で存在し；前記IL-6は、0.01ng/mL～0.1ng/mLの濃度で存在し；前記IL-7は、1ng/mL～50ng/mLの濃度で存在し；前記G-CSFは、0.01ng/mL～0.50ng/mLの濃度で存在し；かつ前記GM-CSFは、0.005ng/mL～0.1ng/mLの濃度で存在する。ある態様において、前記第二の培地において、前記LMWHは、4U/mL～5U/mLの濃度で該第二の培地中に存在し；前記Flt-3Lは、20ng/mL～30ng/mLの濃度で存在し；前記SCFは、20ng/mL～30ng/mLの濃度で存在し；前記IL-6は、0.04ng/mL～0.06ng/mLの濃度で存在し；前記IL-7は、20ng/mL～30ng/mLの濃度で存在し；前記G-CSFは、0.20ng/mL～0.30ng/mLの濃度で存在し；かつ前記GM-CSFは、0.005ng/mL～0.5ng/mLの濃度で存在する。ある態様において、前記第二の培地において、前記LMWHは、4U/mL～5U/mLの濃度で該第二の培地中に存在し；前記Flt-3Lは、20ng/mL～30ng/mLの濃度で存在し；前記SCFは、20ng/mL～30ng/mLの濃度で存在し；前記IL-6は、0.04ng/mL～0.06ng/mLの濃度で

存在し；前記IL-7は、20ng/mL～30ng/mLの濃度で存在し；前記G-CSFは、0.20ng/mL～0.30ng/mLの濃度で存在し；かつ前記GM-CSFは、0.005ng/mL～0.5ng/mLの濃度で存在する。ある態様において、前記第二の培地において、前記LMWHは、約4.5U/mLの濃度で該第二の培地中に存在し；前記Flt-3Lは、約25ng/mLの濃度で存在し；前記SCFは、約27ng/mLの濃度で存在し；前記IL-6は、約0.05ng/mLの濃度で存在し；前記IL-7は、約25ng/mLの濃度で存在し；前記G-CSFは、約0.25ng/mLの濃度で存在し；かつ前記GM-CSFは、約0.01ng/mLの濃度で存在する。ある実施態様において、該第二の培地は、以下のもの：抗生物質、例えば、ゲンタマイシン；抗酸化剤、例えば、トランスフェリン、インスリン、及び/又は-メルカプトエタノール；亜セレン酸ナトリウム；アスコルビン酸；エタノールアミン；並びにグルタチオンのうちの1つ以上をさらに含む。ある実施態様において、前記第二の培地の基剤を提供する培地は、当業者に公知の細胞/組織培養培地、例えば、市販の細胞/組織培養培地、例えばSCGM(商標)、STEMMACS(商標)、GBGM(登録商標)、AIM-V(登録商標)、X-VIVO(商標)10、X-VIVO(商標)15、OPTIMIZER、STEMSPAN(登録商標)H3000、CELLGRO COMPLETE(商標)、DMEM：ハムF12(「F12」)(例えば、2:1比、又は高グルコースもしくは低グルコースDMEM)、Advanced DMEM(Gibco)、EL08-1D2、Myelocult(商標)H5100、IMDM、及び/もしくはRPMI-1640であるか；又は公知の細胞/組織培養培地中に通常含まれる成分、例えば、GBGM(登録商標)、AIM-V(登録商標)、X-VIVO(商標)10、X-VIVO(商標)15、OPTIMIZER、STEMSPAN(登録商標)H3000、CELLGRO COMPLETE(商標)、DMEM：ハムF12(「F12」)(例えば、2:1比、又は高グルコースもしくは低グルコースDMEM)、Advanced DMEM(Gibco)、EL08-1D2、Myelocult(商標)H5100、IMDM、及び/もしくはRPMI-1640に含まれる成分を含む培地である。本明細書における実施態様のうちのいずれかの具体的な実施態様において、該培地は、GBGM(登録商標)ではない。  
10  
20

#### 【0282】

ある実施態様において、前記3段階法において用いられる第三の培地は、を含む培地を含む。ある態様において、前記3段階法において用いられる第三の培地は、IL-2及びIL-15を含み、かつ幹細胞動員剤及びLMWHを欠く。ある態様において、前記3段階法において用いられる第三の培地は、IL-2及びIL-15に加えて、SCF、IL-6、IL-7、G-CSF、又はGM-CSFのうちの1つ以上を含む。ある態様において、前記3段階法において用いられる第三の培地は、IL-2及びIL-15に加えて、SCF、IL-6、IL-7、G-CSF、及びGM-CSFの各々を含む。ある態様において、前記IL-2は、10U/mL～10,000U/mLの濃度で前記第三の培地中に存在し、かつ前記IL-15は、1ng/mL～50ng/mLの濃度で前記第三の培地中に存在する。ある態様において、前記IL-2は、100U/mL～10,000U/mLの濃度で前記第三の培地中に存在し、かつ前記IL-15は、1ng/mL～50ng/mLの濃度で前記第三の培地中に存在する。ある態様において、前記IL-2は、300U/mL～3,000U/mLの濃度で前記第三の培地中に存在し、かつ前記IL-15は、10ng/mL～30ng/mLの濃度で前記第三の培地中に存在する。ある態様において、前記IL-2は、約1,000U/mLの濃度で前記第三の培地中に存在し、かつ前記IL-15は、約20ng/mLの濃度で前記第三の培地中に存在する。ある態様において、前記第三の培地中に、前記SCFは、1ng/mL～50ng/mLの濃度で存在し；前記IL-6は、0.01ng/mL～0.1ng/mLの濃度で存在し；前記IL-7は、1ng/mL～50ng/mLの濃度で存在し；前記G-CSFは、0.01ng/mL～0.50ng/mLの濃度で存在し；かつ前記GM-CSFは、0.005ng/mL～0.1ng/mLの濃度で存在する。ある態様において、前記第三の培地中に、前記SCFは、約22ng/mLの濃度で存在し；前記IL-6は、約0.05ng/mLの濃度で存在し；前記IL-7は、約20ng/mLの濃度で存在し；前記G-CSFは、約0.25ng/mLの濃度で存在し；かつ前記GM-CSFは、約0.01ng/mLの濃度で存在する。ある実施態様において、該第三の培地は、以下のもの：抗生物質、例えば、ゲンタマイシン；抗酸化剤、例えば、トランスフェリン、インスリン、及び/又は-メルカプトエタノール；亜セレン酸ナトリウム；アスコルビン酸；エタノールアミン；並びにグルタチオンのうちの1つ以上をさらに含む。ある実施態様において、第三の培地の基剤を提供  
30  
40  
50

する培地は、当業者に公知の細胞/組織培養培地、例えば、市販の細胞/組織培養培地、例えばSCGM(商標)、STEMMACS(商標)、GBGM(登録商標)、AIM-V(登録商標)、X-VIVO(商標)10、X-VIVO(商標)15、OPTIMIZER、STEMSPAN(登録商標)H3000、CELLGRO COMPLETE(商標)、DMEM:ハムF12(「F12」)(例えば、2:1比、又は高グルコースもしくは低グルコースDMEM)、Advanced DMEM(Gibco)、EL08-1D2、Myelocult(商標)H5100、IMDM、及び/もしくはRPMI-1640であるか;又は公知の細胞/組織培養培地中に通常含まれる成分、例えばGBGM(登録商標)、AIM-V(登録商標)、X-VIVO(商標)10、X-VIVO(商標)15、OPTIMIZER、STEMSPAN(登録商標)H3000、CELLGRO COMPLETE(商標)、DMEM:ハムF12(「F12」)(例えば、2:1比、又は高グルコースもしくは低グルコースDMEM)、Advanced DMEM(Gibco)、EL08-1D2、Myelocult(商標)H5100、IMDM、及び/もしくはRPMI-1640に含まれる成分を含む培地である。本明細書における実施態様のうちのいずれかの具体的な実施態様において、該培地は、GBGM(登録商標)ではない。10

#### 【0283】

一般的に、特別に記載された培地成分は、該培地の不確定成分中に存在する可能性のある構成要素を指すものではない。例えば、前記Tpo、IL-2、及びIL-15は、第一の培地、第二の培地、又は第三の培地の不確定成分中に含まれず、例えば、該Tpo、IL-2、及びIL-15は、血清中に含まれない。さらに、前記LMWH、Flt-3、SCF、IL-6、IL-7、G-CSF、及び/又はGM-CSFは、第一の培地、第二の培地、又は第三の培地の不確定成分内に含まれず、例えば、該LMWH、Flt-3、SCF、IL-6、IL-7、G-CSF、及び/又はGM-CSFは、血清中に含まれない。20

#### 【0284】

ある態様において、前記第一の培地、第二の培地、又は第三の培地は、ヒト血清-ABを含む。ある態様において、前記第一の培地、第二の培地、又は第三の培地のいずれかは、1% ~ 20% のヒト血清-AB、5% ~ 15% のヒト血清-AB、又は約2、5、もしくは10% のヒト血清-ABを含む。

#### 【0285】

ある実施態様において、本明細書に記載される前記3段階法において、該造血幹細胞又は前駆細胞を、前記第一の培地中で、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、又は20日間培養する。ある実施態様において、本明細書に記載される前記3段階法において、細胞を、前記第二の培地中で、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、又は20日間培養する。ある実施態様において、本明細書に記載される前記3段階法において、細胞を、前記第三の培地中で、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、又は30日間、又は30日よりも長い間培養する。30

#### 【0286】

具体的な実施態様において、本明細書に記載される前記3段階法において、該造血幹細胞又は前駆細胞を、前記第二の培地中で前記培養することの前に、前記第一の培地中で、7~13日間培養して、第一の細胞の集団を製造し;該第一の細胞の集団を、前記第三の培地中で前記培養することの前に、前記第二の培地中で、2~6日間培養して、第二の細胞の集団を製造し;かつ該第二の細胞の集団を、前記第三の培地中で、10~30日間培養する、すなわち、該細胞を、合計で19~49日間培養する。40

#### 【0287】

具体的な実施態様において、本明細書に記載される前記3段階法において、本明細書に記載される前記3段階法において、前記造血幹細胞又は前駆細胞を、前記第二の培地中で前記培養することの前に、前記第一の培地中で、8~12日間培養して、第一の細胞の集団を製造し;該第一の細胞の集団を、前記第三の培地中で前記培養することの前に、前記第二の培地中で、3~5日間培養して、第二の細胞の集団を製造し;かつ該第二の細胞の集団を、前記第三の培地中で、15~25日間培養する、すなわち、該細胞を、合計で26~42日間培養する。

#### 【0288】

50

具体的な実施態様において、本明細書に記載される前記3段階法において、該造血幹細胞又は前駆細胞を、前記第二の培地中で前記培養することの前に、前記第一の培地中で、約10日間培養して、第一の細胞の集団を製造し；該第一の細胞の集団を、前記第三の培地中で前記培養することの前に、前記第二の培地中で、約4日間培養して、第二の細胞の集団を製造し；かつ該第二の細胞の集団を、前記第三の培地中で、約21日間培養する、すなわち、該細胞を、合計で約35日間培養する。

#### 【0289】

ある態様において、前記第一の培地、第二の培地、及び第三の培地における前記培養することは全て、静置培養条件下、例えば、培養ディッシュ又は培養フラスコ内で行われる。ある態様において、前記第一の培地、第二の培地、又は第三の培地のうちの少なくとも1つにおける前記培養することは、スピナーフラスコ中で行われる。ある態様において、前記第一の培地及び前記第二の培地における前記培養することは、静置培養条件下行われ、かつ前記第三の培地における前記培養することは、スピナーフラスコ中で行われる。10

#### 【0290】

ある態様において、前記培養することは、スピナーフラスコ中で行われる。他の態様において、前記培養することは、G-Rex装置で行われる。さらに他の態様において、前記培養することは、WAVEバイオリアクターで行われる。

#### 【0291】

ある態様において、前記造血幹細胞又は前駆細胞は、はじめに、前記第一の培地中に、 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ 細胞/mLで接種される。具体的な態様において、該造血幹細胞又は前駆細胞は、はじめに、前記第一の培地中に、約 $3 \times 10^4$ 細胞/mLで接種される。20

#### 【0292】

ある態様において、前記第一の細胞の集団は、はじめに、前記第二の培地中に、 $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^5$ 細胞/mLで接種される。具体的な態様において、該第一の細胞の集団は、はじめに、前記第二の培地中に、約 $1 \times 10^5$ 細胞/mLで接種される。

#### 【0293】

ある態様において、前記第二の細胞の集団は、はじめに、前記第三の培地中に、 $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$ 細胞/mLで接種される。ある態様において、該第二の細胞の集団は、はじめに、前記第三の培地中に、 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 細胞/mLで接種される。具体的な態様において、該第二の細胞の集団は、はじめに、該第三の培地中に、約 $5 \times 10^5$ 細胞/mLで接種される。より具体的な態様において、該第二の細胞の集団は、はじめに、スピナーフラスコ中の該第三の培地中に、約 $5 \times 10^5$ 細胞/mLで接種される。具体的な態様において、該第二の細胞の集団は、はじめに、該第三の培地中に、約 $3 \times 10^5$ 細胞/mLで接種される。より具体的な態様において、該第二の細胞の集団は、はじめに、前記第三の培地中に、静置培養で、約 $3 \times 10^5$ 細胞/mLで接種される。30

#### 【0294】

##### (5.2.10. 細胞の単離)

ナチュラルキラー細胞を単離する方法は、当技術分野において公知であり、該方法を用いて、本明細書に記載される3工程プロセスを用いて製造されるナチュラルキラー細胞、例えば、活性化NK細胞又はTSPNK細胞(例えば、NK前駆細胞)を単離することができる。NK細胞は、組織源、例えば、末梢血由来の細胞を、CD56及びCD3に対する抗体で染色し、CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>細胞を選択することによって単離又は濃縮することができる。NK細胞、例えば、活性化NK細胞又はTSPNK細胞は、市販のキット、例えば、NK細胞単離キット(Miltenyi Biotech)を用いて単離することができる。NK細胞、例えば、活性化NK細胞又はTSPNK細胞は、該NK細胞、例えば、活性化NK細胞又はTSPNK細胞を含む細胞の集団内のNK細胞以外の細胞の除去によって単離又は濃縮することもできる。例として、NK細胞、例えば、活性化NK細胞又はTSPNK細胞は、例えば、CD3、CD4、CD14、CD19、CD20、CD36、CD66b、CD123、HLA DR、及び/又はCD235a(グリコフォリンA)のうちの1つ以上に対する抗体を用いた非NK細胞マーカーを示す細胞の除去によって単離又は濃縮してもよい。陰性単離は、市販のキット、例えば、NK細胞陰性単離キット(Dynal Biotech)を用いて実施することができる。これらの4050

方法によって単離される細胞をさらに選別して、例えば、CD16<sup>+</sup>及びCD16<sup>-</sup>細胞を分離することができる。

【0295】

細胞分離は、例えば、フローサイトメトリー、蛍光活性化細胞選別(FACS)、又は好ましくは、特異的抗体とコンジュゲートされたマイクロビーズを用いる磁気細胞選別によって達成することができる。該細胞は、例えば、1以上の特異的抗体、例えば、抗CD56抗体を含む磁気ビーズ(例えば、約0.5~100 μmの直径)に結合するその能力に基づいて粒子を分離する方法である、磁気的活性化細胞選別(MACS)技術を用いて単離してもよい。磁気細胞分離は、例えば、AUTOMACS(商標)セパレーター(Miltenyi)を用いて実施し、自動化することができる。特定の細胞表面分子又はハプテンを特異的に認識する抗体の共有結合的付加を含む、種々の有用な修飾を、磁気マイクロスフェア上で行うことができる。その後、ビーズを該細胞と混合し、結合させる。その後、細胞を磁場に通して、特定の細胞表面マーカーを有する細胞を取り出す。一実施態様において、その後、これらの細胞を単離し、さらなる細胞表面マーカーに対する抗体と結合した磁気ビーズと再び混合することができる。該細胞を再び磁場に通して、両方の抗体に結合した細胞を単離する。その後、そのような細胞を希釈して、別々のディッシュ、例えば、クローン単離用のマイクロタイターディッシュに入れることができる。10

【0296】

いくつかの実施態様において、単離された又は濃縮されたナチュラルキラー細胞の純度は、CD56、CD3、及びCD16のうちの1つ以上を検出することにより確認することができる。20

【0297】

(5.2.11. 細胞/灌流液の保存)

細胞、例えば、本明細書に記載される方法を用いて製造されるNK細胞、例えば、本明細書に記載される3工程プロセスを用いて製造される活性化NK細胞又はTSPNK細胞(例えば、NK前駆細胞)、又は造血幹細胞又は前駆細胞を含む胎盤灌流液細胞、又は胎盤灌流液は、保存すること、即ち、長期保存を可能にする条件下、又は例えば、アポトーシス又は壊死による細胞死を阻害する条件下に置くことができる。

【0298】

胎盤灌流液は、細胞回収組成物を、胎盤の少なくとも一部に、例えば、胎盤脈管構造に通すことによって製造することができる。細胞回収組成物は、灌流液内に含まれている細胞を保存する作用する1以上の化合物を含む。そのような胎盤細胞回収組成物は、その開示が引用により完全に本明細書中に組み込まれる、関連米国特許出願公開第20070190042号に記載されているような、アポトーシス阻害剤、壊死阻害剤、及び/又は酸素運搬ペルフルオロカーボンを含むことができる。30

【0299】

一実施態様において、灌流液又は胎盤細胞の集団は、該灌流液又は該細胞の集団を、アポトーシスの阻害剤及び酸素運搬ペルフルオロカーボンを含む細胞回収組成物と近接させることにより、哺乳動物、例えば、ヒトの分娩後胎盤から回収され、ここで、該アポトーシスの阻害剤は、該アポトーシスの阻害剤と接触も近接もさせていない細胞の集団と比較して、胎盤細胞、例えば、接着性胎盤細胞、例えば、胎盤幹細胞又は胎盤複能性細胞の集団におけるアポトーシスを低下させるか又は防止するのに十分な量及び時間で存在する。例えば、該胎盤を該細胞回収組成物で灌流することができ、胎盤細胞、例えば、全有核胎盤細胞をそれから単離する。具体的な実施態様において、該アポトーシスの阻害剤は、カスパーゼ阻害剤である。別の具体的な実施態様において、該アポトーシスの阻害剤は、JNK阻害剤である。より具体的な実施態様において、該JNK阻害剤は、接着性胎盤細胞、例えば、接着性胎盤幹細胞又は接着性胎盤複能性細胞の分化も増殖も調節しない。別の実施態様において、該細胞回収組成物は、分離相中に該アポトーシスの阻害剤及び該酸素運搬ペルフルオロカーボンを含む。別の実施態様において、該細胞回収組成物は、エマルジョン中に該アポトーシスの阻害剤及び該酸素運搬ペルフルオロカーボンを含む。別の実施態様において、該細胞回収組成物は、乳化剤、例えば、レシチンをさらに含む。別の実施態様40

において、該アポトーシス阻害剤及び該ペルフルオロカーボンは、該胎盤細胞を該細胞回収組成物と近接させるときに、約0 ~ 約25 である。別により具体的な実施態様において、該アポトーシス阻害剤及び該ペルフルオロカーボンは、該胎盤細胞を該細胞回収組成物と近接させるときに、約2 ~ 10 、又は約2 ~ 約5 である。別により具体的な実施態様において、該近接させることは、該細胞の集団の輸送の間に行われる。別により具体的な実施態様において、該近接させることは、該細胞の集団の凍結及び解凍の間に行われる。

### 【 0 3 0 0 】

別の実施態様において、胎盤灌流液及び/又は胎盤細胞を、該灌流液及び/又は細胞をアポトーシスの阻害剤及び臓器保存化合物と近接させることによって回収及び保存することができ、ここで、該アポトーシスの阻害剤は、該アポトーシスの阻害剤と接触も近接もさせていない灌流液又は胎盤細胞と比較したとき、該細胞のアポトーシスを低下させるか又は防止するのに十分な量及び時間で存在する。具体的な実施態様において、臓器保存化合物は、UW溶液(米国特許第4,798,824号に記載されており;VIASPA(商標)としても知られているもの;Southardらの文献、Transplantation 49(2):251-257(1990)も参照のこと)、又はSternらの米国特許第5,552,267号に記載されている溶液であり、これらの文献の開示は、引用により完全に本明細書中に組み込まれる。別の実施態様において、該臓器保存化合物は、ヒドロキシエチルスターチ、ラクトビオン酸、ラフィノース、又はそれらの組合せである。別の実施態様において、胎盤細胞回収組成物は、2相状態にあるか又はエマルジョンとしてかのいずれかの、酸素運搬ペルフルオロカーボンをさらに含む。

10

20

### 【 0 3 0 1 】

別の実施態様において、胎盤細胞を、灌流の間、アポトーシス阻害剤及び酸素運搬ペルフルオロカーボン、臓器保存化合物、又はそれらの組合せを含む細胞回収組成物と近接させる。別の実施態様において、胎盤細胞を、灌流による回収の後に、該細胞回収化合物と近接させる。

### 【 0 3 0 2 】

通常、胎盤細胞の回収、濃縮、及び単離時に、低酸素及び機械的ストレスによる細胞ストレスを最小限に抑えるか、又はそれらを排除することが好ましい。本方法の別の実施態様において、それゆえ、胎盤灌流液、又は胎盤細胞の集団は、回収、濃縮、又は単離時に、該保存時に6時間未満の間、低酸素状態に曝され、ここで、低酸素状態は、正常な血中酸素濃度を下回る酸素濃度である。より具体的な実施態様において、該灌流液又は胎盤細胞の集団は、該保存時に2時間未満の間、該低酸素状態に曝される。別により具体的な実施態様において、該胎盤細胞の集団は、回収、濃縮、又は単離時に、1時間未満、もしくは30分未満の間、該低酸素状態に曝されるか、又は低酸素状態に曝されない。別の実施態様において、該胎盤細胞の集団は、回収、濃縮、又は単離時に、剪断ストレスに曝されない。

30

### 【 0 3 0 3 】

細胞、例えば、胎盤灌流液細胞、造血細胞、例えば、CD34<sup>+</sup>造血幹細胞;本明細書に記載されるプロセスを用いて製造されるNK細胞、例えば、活性化NK細胞又はTSPNK細胞(例えば、NK前駆細胞);本明細書において提供される単離された接着性胎盤細胞を、例えば、小型の容器、例えば、アンプル又はセプタムバイアル中の凍結保存培地に入れて凍結保存することができる。具体的な実施態様において、細胞は、1mlあたり約 $1 \times 10^4 \sim 5 \times 10^8$ 細胞の濃度で凍結保存されているか、されたことがある。具体的な実施態様において、細胞は、1mlあたり約 $1 \times 10^6 \sim 1.5 \times 10^7$ 細胞の濃度で凍結保存されているか、されたことがある。より具体的な実施態様において、本明細書において提供される細胞を、1mlあたり約 $1 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $1.5 \times 10^7$ 細胞の濃度で凍結保存されているか、されたことがある。ある実施態様において、NK細胞は、投与の前に凍結保存されたことがある。ある実施態様において、NK細胞は、投与の前に凍結保存されたことがない。

40

### 【 0 3 0 4 】

50

好適な凍結保存培地としては、標準生理食塩水、例えば、成長培地を含む培養培地、又は細胞凍結培地、例えば、市販の細胞凍結培地、例えば、C2695、C2639、もしくはC6039(Sigma);CryoStor(登録商標)CS2、CryoStor(登録商標)CS5、もしくはCryoStor(登録商標)CS10(BioLife Solutions)が挙げられるが、これらに限定されない。一実施態様において、凍結保存培地は、例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10%(v/v)の濃度のDMSO(ジメチルスルホキシド)を含む。凍結保存培地は、追加の薬剤、例えば、メチルセルロース、デキストラン、アルブミン(例えば、ヒト血清アルブミン)、トレハロース、及び/又はグリセロールを含んでいてもよい。ある実施態様において、凍結保存培地は、約1%~10%のDMSO、約25%~75%のデキストラン、及び/又は約20~60%のヒト血清アルブミン(HSA)を含む。ある実施態様において、凍結保存培地は、約1%~10%のDMSO、約25%~75%のトレハロース、及び/又は約20~60%のヒトHSAを含む。具体的な実施態様において、凍結保存培地は、5%のDMSO、55%のデキストラン、及び40%のHSAを含む。より具体的な実施態様において、凍結保存培地は、5%のDMSO、55%のデキストラン(標準生理食塩水中、10%w/v)、及び40%のHSAを含む。別の具体的な実施態様において、凍結保存培地は、5%のDMSO、55%のトレハロース、及び40%のHSAを含む。より具体的な実施態様において、凍結保存培地は、5%のDMSO、55%のトレハロース(標準生理食塩水中、10%w/v)、及び40%のHSAを含む。別の具体的な実施態様において、凍結保存培地は、CryoStor(登録商標)CS5を含む。別の具体的な実施態様において、凍結保存培地は、CryoStor(登録商標)CS10を含む。

### 【0305】

細胞は、当技術分野において公知の種々の方法のいずれかによって、細胞の培養、増殖、又は分化のいずれかの段階で凍結保存することができる。例えば、本明細書に提供される細胞は、もとの組織もしくは器官、例えば、胎盤灌流液もしくは臍帯血から単離した直後、又は上で概説した方法の第一の工程もしくは第二の工程のいずれかにおいて、又は該第一の工程もしくは第二の工程のいずれかの後に、凍結保存することができる。ある実施態様において、造血細胞、例えば、造血幹細胞又は前駆細胞は、該もとの組織もしくは器官からの単離後、約1、5、10、15、20、30、45分以内に、又は約1、2、4、6、10、12、18、20、もしくは24時間以内に凍結保存される。ある実施態様において、該細胞は、該もとの組織もしくは器官からの単離後、1、2、又は3日以内に凍結保存される。ある実施態様において、該細胞は、上記のように、第一の培地中で培養された後、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、又は28日間、凍結保存される。いくつかの実施態様において、該細胞は、上記のように、第一の培地中で、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、又は28日間、及び上記のように、第二の培地中で、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、又は28日間培養された後、凍結保存される。いくつかの実施態様において、TSPNK細胞(例えば、NK前駆細胞)が、本明細書に記載される3工程プロセスを用いて作製される場合、該細胞は、第一の培地中で、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、又は25日間培養された後;かつ/又は第二の培地中で、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、又は25日間培養された後;かつ/又は第三の培地中で、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、又は25日間培養された後に凍結保存される。具体的な実施態様において、NK前駆細胞は、本明細書に記載される3工程プロセスを用いて作製され、該細胞は、第一の培地中で9日間培養された後;第二の培地中で5日間培養された後;及び第三の培地中で7日間培養された後に凍結保存される。

### 【0306】

一態様において、NK細胞の集団、例えば、活性化NK細胞は:(a)造血幹細胞又は前駆細胞の集団が増殖し、該造血幹細胞又は前駆細胞の集団内の複数の造血幹細胞又は前駆細胞が、該増殖の間にNK細胞に分化するように、該集団を、インターロイキン-15(IL-15)、並び

に任意に、幹細胞因子(SCF)及びインターロイキン-7(IL-7)のうちの1つ以上を含む第一の培地中に播種すること(ここで、該IL-15並びに任意のSCF及びIL-7は、該培地の不確定成分中には含まれない);(b)工程(a)由来の細胞を、インターロイキン-2(IL-2)を含む第二の培地中で増殖させて、活性化NK細胞の集団を製造すること、(c)工程(b)由来のNK細胞を凍結保存培地中で凍結保存すること、を含むプロセスにより製造される。具体的な実施態様において、該工程(c)は、(1)細胞懸濁溶液を調製すること;(2)凍結保存培地を工程(1)由来の細胞懸濁溶液に添加して、凍結保存細胞懸濁液を得ること;(3)工程(3)由来の凍結保存細胞懸濁液を冷却して、凍結保存試料を得ること;及び(4)該凍結保存試料を-80℃未満で保存することをさらに含む。ある実施態様において、該方法は、工程(a)と(b)の間及び工程(b)と(c)の間の中間工程を含まず、かつ/又は工程(a)の前に追加の培養工程を含まない。

### 【0307】

別の実施態様において、NK細胞例えば、活性化NK細胞又はTSPNK細胞(例えば、NK前駆細胞)の集団を凍結保存することは:(a)造血幹細胞又は前駆細胞の集団を、幹細胞因子(SCF)、IL-2、インターロイキン-7(IL-7)、インターロイキン-15(IL-15)、及びヘパリンのうちの1つ以上を含む第一の培地中に増殖させること(ここで、該SCF、IL-2、IL-7、及びIL-15は、該培地の不確定成分中に含まれず、造血幹細胞又は前駆細胞の集団内の複数の造血幹細胞又は前駆細胞は、該増殖の間にNK細胞に分化する);(b)工程(a)由来の細胞を、インターロイキン-2(IL-2)を含む第二の培地中で増殖させて、活性化NK細胞を製造すること;並びに(c)工程(b)由来のNK細胞を凍結保存培地中で凍結保存することを含む。具体的な実施態様において、該工程(c)は、(1)細胞懸濁溶液を調製すること;(2)凍結保存培地を工程(1)由来の細胞懸濁溶液に添加して、凍結保存細胞懸濁液を得ること;(3)工程(3)由来の凍結保存細胞懸濁液を冷却して、凍結保存試料を得ること;及び(4)該凍結保存試料を-80℃未満で保存すること、をさらに含む。ある実施態様において、該方法は、工程(a)と(b)の間及び工程(b)と(c)の間の中間工程を含まない。

### 【0308】

細胞は、好ましくは、速度制御フリーザーで、例えば、凍結保存の間、約0.1、0.3、0.5、1、又は2℃/分で冷却される。好ましい凍結保存温度は、約-80℃～約-180℃、好ましくは約-125℃～約-140℃である。凍結保存した細胞を液体窒素に移した後、使用のために解凍することができる。いくつかの実施態様において、例えば、アンプルが約-90℃に達したら、それを液体窒素保存エリアに移す。凍結保存した細胞を、約25℃～約40℃の温度で、好ましくは約37℃の温度にして解凍することが好ましい。ある実施態様において、凍結保存した細胞を、約1、2、4、6、10、12、18、20、もしくは24時間、又は約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、もしくは28日間凍結保存した後に解凍する。ある実施態様において、凍結保存した細胞を、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、又は28ヶ月間凍結保存した後に解凍する。ある実施態様において、凍結保存した細胞を、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10年間凍結保存した後に解凍する。

### 【0309】

好適な解凍培地としては、標準生理食塩水、例えば、成長培地、例えば、RPMI培地を含む、プラズマライト(plasmalyte)培養培地が挙げられるが、これらに限定されない。好ましい実施態様において、解凍培地は、培地添加物(例えば、栄養素、サイトカイン、及び/又は因子)のうちの1つ又は複数を含む。本明細書に提供される細胞を解凍するのに好適な培地添加物としては、例えば、限定するものではないが、血清、例えば、ヒト血清AB、ウシ胎仔血清(fetal bovine serum)(FBS)、もしくはウシ胎仔血清(fetal calf serum)(FCS)、ビタミン、ヒト血清アルブミン(HSA)、ウシ血清アルブミン(BSA)、アミノ酸(例えば、L-グルタミン)、脂肪酸(例えば、オレイン酸、リノール酸、もしくはパルミチン酸)、インスリン(例えば、組換えヒトインスリン)、トランスフェリン(鉄飽和ヒトトランスフェリン)、-メルカプトエタノール、幹細胞因子(SCF)、Fms様チロシンキナーゼ3リガンド(Fl

10

20

30

40

50

t3-L)、サイトカイン、例えば、インターロイキン-2(IL-2)、インターロイキン-7(IL-7)、インターロイキン-15(IL-15)、トロンボポエチン(Tpo)、又はヘパリンが挙げられる。具体的な実施態様において、本明細書に提供される方法において有用な解凍培地は、RPMIを含む。別の具体的な実施態様において、該解凍培地は、プラズマライトを含む。別の具体的な実施態様において、該解凍培地は、約0.5～20%のFBSを含む。別の具体的な実施態様において、該解凍培地は、約1、2、5、10、15、又は20%のFBSを含む。別の具体的な実施態様において、該解凍培地は、約0.5%～20%のHSAを含む。別の具体的な実施態様において、該解凍培地は、約1、2.5、5、10、15、又は20%のHSAを含む。より具体的な実施態様において、該解凍培地は、RPMI及び約10%のFBSを含む。別により具体的な実施態様において、該解凍培地は、プラズマライト及び約5%のHSAを含む。

10

## 【0310】

本明細書に提供される凍結保存法を、長期保存を可能にするように、又は例えば、アポトーシスもしくは壊死による細胞死を阻害する条件下で最適化することができる。一実施態様において、解凍後細胞は、例えば、自動細胞カウンター又はトリパンブルー法によって測定したとき、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、又は98%超の生細胞を含む。別の実施態様において、解凍後細胞は、約0.5、1、5、10、15、20、又は25%の死細胞を含む。別の実施態様において、解凍後細胞は、約0.5、1、5、10、15、20、又は25%の初期アポトーシス細胞を含む。別の実施態様において、解凍後細胞の約0.5、1、5、10、15、又は20%は、例えば、アポトーシスアッセイ(例えば、T0-PRO3又はAnnV/PIアポトーシスアッセイキット)によって測定したとき、解凍されてから1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、又は28日後に、アポトーシスを起こす。ある実施態様において、解凍後の細胞は、本明細書で提供される方法を用いて培養、増殖、又は分化した後、再び凍結保存される。

20

## 【0311】

## (5.3. 遺伝子改変NK細胞)

別の態様において、NK細胞を遺伝子改変して、標的特異性及び/又はホーミング特異性を強化することができる。

## 【0312】

いくつかの実施態様において、前記遺伝子改変NK細胞は、キメラ抗原受容体(CAR)を含むNK細胞である。CARは、免疫細胞(例えば、Tリンパ球)を抗原へと向かわせ、該免疫細胞を刺激して該抗原を提示する細胞を死滅させる人工の膜結合型タンパク質である。例えば、Eshharの米国特許第7,741,465号;米国特許出願公開第2012/0093842号;国際出願公開第W02014/100385号;及び国際出願公開第W02014/124143号を参照されたい。前記CARは、抗原、例えば、細胞上の抗原に結合する細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、及び一次活性化シグナルを免疫細胞へと伝達する細胞内(細胞質)シグナル伝達ドメイン(すなわち、細胞内刺激ドメイン)を最低限含む。全ての他の条件が満たされると、該CARが、例えば、Tリンパ球、例えば、一次Tリンパ球の表面上に発現されており、かつ該CARの前記細胞外ドメインが、抗原に結合している場合には、前記細胞内シグナル伝達ドメインは、シグナルを、該Tリンパ球へと伝達し、該抗原を発現している細胞を活性化しつゝ又は増殖させ、かつ、細胞表面に該抗原が提示されている場合には、該細胞を死滅させる。ある種の免疫細胞、例えば、Tリンパ球及びNK細胞は、最大限に活性化するためには、2種類のシグナル、一次活性化シグナル及び共刺激シグナルを必要とする。そのために、CARはまた、前記抗原の前記細胞外ドメインへの結合が、一次活性化シグナル及び共刺激シグナル双方の伝達をもたらすように共刺激ドメインを任意に含むことができる。

30

## 【0313】

適応免疫応答は、リンパ節を含む二次リンパ器官で開始される。B細胞及びT細胞は、それぞれ、リンパ節の外皮質、又は濾胞に位置する「B細胞ゾーン」、及び(傍皮質としても知られる)濾胞周囲のエリアにより散在して分布している「T細胞ゾーン」と名付けられた、リンパ節の別個の領域に隔離されている。B細胞及びT細胞は、それらを抗原に曝すことができるように、前記それぞれのゾーンへとホーミングすることを可能とする受容体を

40

50

発現する。インタクトな抗原がB細胞ゾーン内に存在する一方で、T細胞ゾーンでは、抗原は、抗原提示細胞、例えば樹状細胞により提示される。インタクトな抗原、例えば、腫瘍抗原もまた、腫瘍の部位に存在する。

#### 【0314】

いくつかの実施態様において、前記遺伝子改変NK細胞は、該ホーミング受容体を含む細胞を、特定の解剖学的なゾーン、特定の組織、又は特定の型の細胞、例えば、リンパ節のB細胞ゾーン、消化管、又は皮膚へとホーミングさせるホーミング受容体を含むNK細胞である。

#### 【0315】

ある実施態様において、前記遺伝子改変NK細胞は、本明細書に記載されるようなCAR及びホーミング受容体の双方を含むNK細胞である。

10

#### 【0316】

いかなる特定の機構にも理論にも束縛されることは望まないが、本明細書における遺伝子改変細胞が、そのホーミング受容体を発現している細胞を、特定のゾーンへとホーミングさせるホーミング受容体を発現している場合、それらは、ネイティブ抗原に曝される可能性がより高く、そこで、該細胞、例えば、CARを発現している細胞は、活性化されることが可能であると考えられている。

#### 【0317】

前記CAR及び/又はホーミング受容体を含むNK細胞を、当技術分野において公知の任意の方法により作製することができる。いくつかの実施態様において、CAR及び/又はホーミング受容体を含む前記NK細胞は、先ず、セクション5.2で記載されているように(例えば、2工程プロセスによるか、又は3工程プロセスにより)製造され、その後、該NK細胞を、該CAR及び/又は該ホーミング受容体をコードする核酸配列(複数可)を含む1以上のベクターに、(例えば、トランسفエクションにより)導入することにより、該CAR及び/又は該ホーミング受容体を発現するよう操作される。いくつかの実施態様において、それからNK細胞を製造可能な前記細胞(例えば、CD34+造血幹細胞)は、初め、該細胞に、該CAR及び/又は該ホーミング受容体をコードする核酸配列(複数可)を含む1以上のベクターを(例えば、トランسفエクションにより)導入することにより、CAR及び/又はホーミング受容体を発現するよう操作され、その後、セクション5.2に記載されている任意のプロセス(例えば、2工程プロセス又は3工程プロセス)により該CAR及び/又は該ホーミング受容体を含むNK細胞を得るために用いられる。

20

#### 【0318】

(5.3.1.一般的なCAR構造及び細胞内ドメイン)

ある実施態様において、前記CARの細胞内ドメインは、免疫細胞の表面に発現され、前記NK細胞の活性化及び/又は増殖の引き金を引くタンパク質の細胞内ドメイン又はモチーフであるか、又はそれを含む。そのようなドメイン又はモチーフは、抗原がCARの細胞外の部分に結合することに応答して、NK細胞の活性化に必要な一次抗原結合性シグナルを伝達することができる。通常、このドメイン又はモチーフは、ITAM(免疫受容活性化チロシンモチーフ)を含むか、又はそれである。CARに適するITAM含有ポリペプチドは、例えば、ゼータCD3鎖(CD3 $\zeta$ )又はそのITAM含有部分を含む。具体的な実施態様において、前記細胞内ドメインは、CD3 $\zeta$ 細胞内シグナル伝達ドメインである。他の具体的な実施態様において、前記細胞内ドメインは、リンパ球受容体鎖、TCR/CD3複合体タンパク質、Fc受容体サブユニット、又はIL-2受容体サブユニットに由来するものである。

40

#### 【0319】

ある実施態様において、前記CARは、1以上の共刺激ドメイン又はモチーフを、例えば、ポリペプチドの細胞内ドメインの一部としてさらに含む。該1以上の共刺激ドメイン又はモチーフは、共刺激性CD27ポリペプチド配列、共刺激性CD28ポリペプチド配列、共刺激性OX40(CD134)ポリペプチド配列、共刺激性4-1BB(CD137)ポリペプチド配列、共刺激性誘導性T細胞共刺激性(ICOS)ポリペプチド配列、共刺激性PD-1ポリペプチド配列、共刺激性CTL A-4ポリペプチド配列、共刺激性NKp46ポリペプチド配列、共刺激性NKp44ポリペプチド配

50

列、共刺激性NKp30ポリペプチド配列、共刺激性NKG2Dポリペプチド配列、共刺激性DAP10ポリペプチド配列、共刺激性DAP12ポリペプチド配列、又は他の共刺激ドメイン又はモチーフのうちの1つ以上とすることができますか、又はそれを含むことができる。

#### 【0320】

前記膜貫通領域は、機能的CARに組み込むことができる任意の膜貫通領域、典型的には、CD4又はCD8分子由来の膜貫通領域とすることができます。

#### 【0321】

##### (5.3.2.CAR細胞外ドメイン)

前記ポリペプチドの細胞外ドメインは、対象となる抗原に結合する。ある実施態様において、該細胞外ドメインは、該抗原に結合する受容体、又は受容体の一部を含む。前記細胞外ドメインは、例えば、該抗原に結合する受容体、又は受容体の一部であってもよい。ある実施態様において、前記細胞外ドメインは、抗体もしくはその抗原結合性部分を含むか、又はそれである。具体的な実施態様において、前記細胞外ドメインは、単鎖Fvドメインを含むか、又はそれである。該単鎖Fvドメインは、例えば、可動性リンカーによってV<sub>H</sub>に連結されたV<sub>L</sub>を含むことができ、ここで該V<sub>L</sub>及びV<sub>H</sub>は、該抗原に結合する抗体由来のものである。

10

#### 【0322】

前記ポリペプチドの細胞外ドメインが結合する抗原は、任意の対象となる抗原とすることができます、例えば、腫瘍細胞上の抗原又は感染細胞上の抗原とすることができます。該腫瘍細胞は、例えば、固形腫瘍内の細胞又は血液がんの細胞としてもよい。該抗原は、任意の腫瘍型又はがん型の細胞、例えば、リンパ腫、肺がん、乳がん、前立腺がん、副腎皮質癌、甲状腺癌、上咽頭癌、黒色腫、例えば、悪性黒色腫、皮膚癌、結腸直腸癌、類腱腫、線維形成性小円形細胞腫瘍、内分泌腫瘍、ユーディング肉腫、末梢未分化神経外胚葉性腫瘍、固体胚細胞性腫瘍、肝芽腫、神経芽腫、非横紋筋肉腫軟部組織肉腫、骨肉腫、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、ウィルムス腫瘍、膠芽腫、粘液腫、線維腫、脂肪腫などの細胞上に発現される任意の抗原とすることができます。より具体的な実施態様において、前記リンパ腫は、慢性リンパ性白血病(小リンパ球性リンパ腫)、B細胞性前リンパ球性白血病、リンパ形質細胞性リンパ腫、ワルデンストレームマクログロブリン血症、脾辺縁帯リンパ腫、形質細胞性骨髄腫、形質細胞腫、節外性辺縁帯B細胞リンパ腫、MALTリンパ腫、節性辺縁帯B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞性リンパ腫、縦隔(胸腺)大細胞型B細胞性リンパ腫、血管内大細胞型B細胞性リンパ腫、原発性滲出性リンパ腫、バーキットリンパ腫、Tリンパ球性前リンパ球性白血病、Tリンパ球性大顆粒リンパ球性白血病、アグレッシブNK細胞白血病、成人Tリンパ球白血病/リンパ腫、鼻型の節外性NK/Tリンパ球リンパ腫、腸疾患型Tリンパ球リンパ腫、肝脾Tリンパ球リンパ腫、芽細胞性NK細胞リンパ腫、菌状息肉症、セザリー症候群、原発性皮膚未分化大細胞リンパ腫、リンパ腫様丘疹症、血管免疫芽細胞性Tリンパ球リンパ腫、末梢Tリンパ球リンパ腫(不特定)、未分化大細胞リンパ腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、又は多発性骨髄腫とすることができます。

20

#### 【0323】

ある実施態様において、前記抗原は、腫瘍関連抗原(TAA)又は腫瘍特異的抗原(TSA)である。様々な具体的な実施態様において、限定するものではないが、該腫瘍関連抗原又は腫瘍特異的抗原は、Her2、前立腺幹細胞抗原(PSCA)、アルファ-フェトプロテイン(AFP)、癌胎児性抗原(CEA)、がん抗原-125(CA-125)、CA19-9、カルレチニン、MUC-1、上皮膜タンパク質(EMA)、上皮腫瘍抗原(ETA)、チロシナーゼ、黒色腫関連抗原(MAGE)、CD19、CD20、CD34、CD45、CD99、CD117、クロモグラニン、サイトケラチン、デスミン、グリア線維性酸性タンパク質(GFAP)、肉眼の囊胞性疾患液体タンパク質(gross cystic disease fluid protein)(GCDFP-15)、HMB-45抗原、高分子量黒色腫関連抗原(HMW-MAA)、タンパク質メラン-A(MART-1)、myo-D1、筋特異的アクチン(MSA)、ニューロフィラメント、ニューロン特異的エノラーゼ(NSE)、胎盤アルカリホスファターゼ、シナプトフィシス(synaptophysin)、サイログロブリン、甲状腺転写因子-1、ピルビン酸キナーゼアイソエンザイムタイプM2

30

40

50

(腫瘍M2-PK)の二量体形態、異常なRasタンパク質、又は異常なp53タンパク質である。

**【0324】**

ある実施態様において、前記TAA又はTSAは、がん/精巣(CT)抗原、例えば、BAGE、CAGE、CTAGE、FATE、GAGE、HCA661、HOM-TES-85、MAGEA、MAGEB、MAGEC、NA88、NY-ESO-1、NY-SAR-35、OY-TES-1、SPANXB1、SPA17、SSX、SYCP1、又はTPTEである。

**【0325】**

ある他の実施態様において、前記TAA又はTSAは、炭水化物又はガングリオシド、例えば、fuc-GM1、GM2(がん胎児性抗原免疫原性-1;OFA-I-1);GD2(OFA-I-2)、GM3、GD3などである。

**【0326】**

ある他の実施態様において、前記TAA又はTSAは、アルファ-アクチニン-4、Bage-1、BCR-ABL、Bcr-Ab1融合タンパク質、ベータ-カテニン、CA 125、CA 15-3 (CA 27.29 \ BCAA)、CA 195、CA 242、CA-50、CAM43、Casp-8、cdc27、cdk4、cdkn2a、CEA、coa-1、dek-can融合タンパク質、EBNA、EF2、エプスタイン・バーウイルス抗原、ETV6-AML1融合タンパク質、HLA-A2、HLA-A11、hsp70-2、KIAA0205、Mart2、Mum-1、2、及び3、neo-PAP、ミオシンクラスI、OS-9、pml-RAR 融合タンパク質、PTPRK、K-ras、N-ras、トリオースリン酸イソメラーゼ、Gage 3,4,5,6,7、GnTV、Herv-K-mel、Lage-1、NA-88、NY-Eso-1/Lage-2、SP 17、SSX-2、TRP2-Int2、gp100 (Pmel 17)、チロシナーゼ、TRP-1、TRP-2、MAGE-1、MAGE-3、RAGE、GAGE-1、GAGE-2、p15(58)、RAGE、SCP-1、Hom/Mel-40、PRAME、p53、H-Ras、HE R-2/neu、E2A-PRL、H4-RET、IGH-IGK、MYL-RAR、ヒトパピローマウイルス(HPV)抗原E6及びE7、TSP-180、MAGE-4、MAGE-5、MAGE-6、p185erbB2、p180erbB-3、c-met、nm-23H1、PS A、TAG-72-4、CA 19-9、CA 72-4、CAM 17.1、NuMa、K-ras、13-カテニン、Mum-1、p16、T AGE、PSMA、CT7、テロメラーゼ、43-9F、5T4、791Tgp72、13HCG、BCA225、BTAA、CD68 \ K P1、CO-029、FGF-5、G250、Ga733 (EpCAM)、HTgp-175、M344、MA-50、MG7-Ag、MOV18、NB \ 70K、NY-CO-1、RCAS1、SDCCAG16、TA-90、TAAL6、TAG72、TLP、TPS、CD19、CD22、CD27、CD30、CD70、GD2(ガングリオシドG2)、EGFRvIII(上皮増殖因子バリアントIII)、精子タンパク質17(Sp17)、メソテリン、PAP(前立腺酸性ホスファターゼ)、プロステイン、TARP(T細胞受容体 代替リーディングフレームタンパク質)、Trp-p8、STEAP1(前立腺の6回膜貫通型上皮抗原1)、異常なRasタンパク質、又は異常なp53タンパク質である。別の具体的な実施態様において、前記腫瘍関連抗原又は腫瘍特異的抗原は、インテグリン v 3(CD61)、ガラクチン、K-Ras(V-Ki-ras2カーステン・ラット肉腫ウイルスがん遺伝子)、又はRal-Bである。

**【0327】**

具体的な実施態様において、前記TAA又はTSAは、CD20、CD123、CLL-1、CD38、CS-1、CD 138、ROR1、FAP、MUC1、PSCA、EGFRvIII、EPHA2、又はGD2である。さらに具体的な実施態様において、前記TAA又はTSAは、CD123、CLL-1、CD38、又はCS-1である。具体的な実施態様において、前記CARの前記細胞外ドメインは、CS-1に結合する。さらに具体的な実施態様において、前記細胞外ドメインは、エロツズマブの単鎖バージョン及び/又はエロツズマブの抗原結合性断片を含む。具体的な実施態様において、前記CARの前記細胞外ドメインは、CD20に結合する。より具体的な実施態様において、前記CARの前記細胞外ドメインは、CD20に結合するscFv又はその抗原結合性断片である。

**【0328】**

他の腫瘍関連抗原及び腫瘍特異的抗原は、当業者に公知である。

**【0329】**

TSA及びTAAに結合する抗体及びscFvsは、当技術分野において公知であり、それらをコードするスクレオチド配列も当技術分野において公知である。

**【0330】**

具体的なある実施態様において、前記抗原は、TSAやTAAとは考えられていないが、それにもかかわらず腫瘍細胞、又は腫瘍により引き起こされる損傷に関連する抗原である。具体的な実施態様において、該抗原は、腫瘍微小環境関連抗原(TMAA)である。ある実施態様

10

20

30

40

50

において、例えば、該TMAAは、例えば、増殖因子、サイトカイン、又はインターロイキン、例えば、血管形成又は脈管形成に関連する増殖因子、サイトカイン、又はインターロイキンである。そのような増殖因子、サイトカイン、又はインターロイキンは、例えば、血管内皮増殖因子(VEGF)、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)、血小板由来の増殖因子(PDGF)、肝細胞増殖因子(HGF)、インスリン様増殖因子(IGF)、又はインターロイキン-8(IL-8)を含むことができる。腫瘍はまた、該腫瘍に対し局所的な低酸素環境を作り出すことができる。そのため、他の具体的な実施態様において、前記TMAAは、低酸素関連因子、例えば、HIF-1<sub>10</sub>、HIF-1<sub>2</sub>、HIF-2<sub>1</sub>、HIF-2<sub>2</sub>、HIF-3<sub>1</sub>、又はHIF-3<sub>2</sub>である。腫瘍はまた、正常組織に対し局在化した損傷を引き起こし、損傷関連分子パターン分子(DAMP)として公知の(アラーミンとしても知られる)分子の放出を引き起こすことができる。他のある具体的な実施態様において、従って、前記TMAAは、DAMP、例えば、熱ショックタンパク質、クロマチン結合性タンパク質(chromatin-associated protein)高移動度グループボックス1(high mobility group box 1;HMGB1)、S100A8(MRP8、カルグランニュリンA)、S100A9 (MRP14、カルグランニュリンB)、血清アミロイド A(SAA)であるか、又はデオキシリボ核酸、アデノシン三リン酸、尿酸、又はヘパリン硫酸とすることもできる。具体的な実施態様において、前記TMAAは、VEGF-A、EGF、PDGF、IGF、又はbFGFである。

### 【0331】

前記がんが、消化器系(gastrointestinal)がん、例えば、肝臓がん、胃がん、食道がん、胆嚢がん、結腸直腸がん、肛門がん、又は脾臓がんである具体的な実施態様において、前記抗原は、消化器系がんに特異的であるか又はそれに関連する抗原である。具体的な実施態様において、NK細胞は、消化器系ホーミング受容体を含み、かつ消化器系がんに関連する抗原に結合する細胞外ドメインを有するCARも含む。具体的な実施態様において、前記CARの細胞外ドメインは、CEAに結合する。他の具体的な実施態様において、前記CARの前記細胞外ドメインは、Her2、CA242、MUC1、CA125、又はCA19-9に結合する。<sub>20</sub>

### 【0332】

前記がんが、皮膚がん、例えば、黒色腫、扁平上皮癌、又は基底細胞癌である具体的な実施態様において、前記抗原は、皮膚がんに特異的であるか又はそれに関連する抗原である。具体的な実施態様において、NK細胞は、皮膚ホーミング受容体を含み、皮膚がんに関連する抗原に結合する細胞外ドメインを有するCARも含む。具体的な実施態様において、前記CARの細胞外ドメインは、HMW-MAAに結合する。他の具体的な実施態様において、前記CARの細胞外ドメインは、Her2、GD2、GD3、CEA、又はSPAG9に結合する。<sub>30</sub>

### 【0333】

ある実施態様において、前記細胞外ドメインは、リンカー、スペーサー、又はヒンジポリペプチド配列、例えば、CD28由來の配列により、前記膜貫通ドメインに連結されている。<sub>30</sub>

### 【0334】

#### (5.3.3.循環器系ホーミング受容体)

ある実施態様において、前記ホーミング受容体は、該ホーミング受容体を含む細胞を、循環器系へとホーミングさせる。本明細書では、そのような受容体を、「循環器系ホーミング受容体」と称する。様々な実施態様において、該循環器系ホーミング受容体は、走化性受容体である。具体的な実施態様において、該走化性受容体は、CXCR4、VEGFR2、又はCCR7である。<sub>40</sub>

### 【0335】

一実施態様において、前記ホーミング受容体は、該ホーミング受容体を含む細胞を、骨髓へとホーミングさせる。本明細書では、そのような受容体を、「骨髓ホーミング受容体」と称する。具体的な実施態様において、前記骨髓ホーミング受容体は、CXCR4、例えば、ヒトCXCR4である。GenBank(商標)受入番号NM\_001008540.1及びNM\_003467.2は、ヒトCXC R4の例示的なヌクレオチド配列を提供する。GenBank(商標)受入番号NP\_001008540.1及びNP\_003458.1は、ヒトCXCR4の例示的なアミノ酸配列を提供する。ヒトホーミング受容体の例示的なヌクレオチド配列及びアミノ酸配列は、表1に記載されている。<sub>50</sub>

## 【0336】

別の実施態様において、前記ホーミング受容体は、該ホーミング受容体を含む細胞を、二次リンパ器官、例えば、リンパ節へとホーミングさせる。本明細書では、そのような受容体を、「二次リンパ器官ホーミング受容体」と称する。具体的な実施態様において、該二次リンパ器官ホーミング受容体は、CCR7、例えば、ヒトCCR7である。GenBank(商標)受入番号NM\_001301714.1、NM\_001301716.1、NM\_001301717.1、NM\_001301718.1、及びNM\_001838.3は、ヒトCCR7の例示的なヌクレオチド配列を提供する。GenBank(商標)受入番号NP\_001288643.1、NP\_001288645.1 NP\_001288646.1、NP\_001288647.1、及びNP\_001829.1は、ヒトCCR7の例示的なアミノ酸配列を提供する。ヒトホーミング受容体の例示的なヌクレオチド配列及びアミノ酸配列は、表1に記載されている。

10

## 【0337】

別の実施態様において、前記ホーミング受容体は、該ホーミング受容体を含む細胞を、血管内皮へとホーミングさせる。本明細書では、そのような受容体を、「血管内皮ホーミング受容体」と称する。具体的な実施態様において、該血管内皮ホーミング受容体は、VEGFR2、例えば、ヒトVEGFR2である。GenBank(商標)受入番号NM\_002253.2は、ヒトVEGFR2の例示的なヌクレオチド配列を提供する。GenBank(商標)受入番号NP\_002244.1は、ヒトVEGF R2の例示的なアミノ酸配列を提供する。ヒトホーミング受容体の例示的なヌクレオチド配列及びアミノ酸配列は、表1に記載されている。

## 【0338】

別の実施態様において、前記ホーミング受容体は、該ホーミング受容体を含む細胞を、リンパ節のB細胞ゾーン、例えば、リンパ節の濾胞へとホーミングさせる。本明細書では、そのような受容体を、「B細胞ゾーンホーミング受容体」と称する。具体的な実施態様において、該B細胞ゾーンホーミング受容体は、CXCR5、例えば、ヒトCXCR5である。GenBank(商標)受入番号NM\_001716.4及びNM\_032966.2は、ヒトCXCR5の例示的なヌクレオチド配列を提供する。GenBank(商標)受入番号NP\_116743.1及びNP\_001707.1は、ヒトCXCR5の例示的なアミノ酸配列を提供する。ヒトホーミング受容体の例示的なヌクレオチド配列及びアミノ酸配列は、表1に記載されている。

20

## 【0339】

いくつかの実施態様において、NK細胞を、循環器系ホーミング受容体を含むように操作する工程は、受容体核酸配列(複数可)、すなわち、該受容体(複数可)をコードする核酸配列(複数可)を含む1以上のベクターを前記細胞に導入する工程を含む。具体的な実施態様において、該ベクターは、ヒトCXCR4、CCR7、VEGFR2、又はCXCR5の核酸配列を含む。ある実施態様において、前記NK細胞を、循環器系ホーミング受容体を含むように操作する工程は、当業者に公知の任意の方法により行われる。

30

## 【0340】

また、NK細胞を、循環器系ホーミング受容体、例えば、CXCR4、CCR7、VEGFR2、又はCXCR5を含むように操作する工程を含む、循環器系にホーミングする遺伝子操作されたNK細胞を生じさせる方法が本明細書に記載され、ここで、該循環器系ホーミング受容体は、該細胞を、循環器系へとホーミングさせるのに十分なレベル又は十分な量で、該細胞により発現される。いくつかの実施態様において、前記NK細胞を、循環器系ホーミング受容体を含むように操作する工程は、受容体核酸配列(複数可)、すなわち、該受容体(複数可)をコードする核酸配列(複数可)を含む1以上のベクターを、前記細胞に導入する工程を含む。具体的な実施態様において、該ベクターは、ヒトCXCR4、CCR7、VEGFR2、又はCXCR5の核酸配列を含む。ある実施態様において、前記NK細胞を、循環器系ホーミング受容体を含むように操作する工程は、当業者に公知の任意の方法により行われる。

40

## 【0341】

## (5.3.4. 消化器系ホーミング受容体)

一実施態様において、前記ホーミング受容体は、該ホーミング受容体を含む細胞を、消化管、例えば、消化器系の器官、組織、又は細胞へとホーミングさせる。本明細書においては、細胞を消化管へとホーミングさせるそのような受容体を、「消化器系ホーミング受

50

容体」と称する。ある実施態様において、該消化器系ホーミング受容体は、CCR9又はインテグリン 4 7、例えば、ヒトCCR9又はヒトイントグリン 4 7である。GenBank(商標)受入番号NM\_031200.2及びNM001256369.1は、ヒトCCR9の例示的なヌクレオチド配列を提供する。GenBank(商標)受入番号NP\_112477.1、及びNP\_001243298.1は、ヒトCCR9の例示的なアミノ酸配列を提供する。GenBank(商標)受入番号NM\_000885.4及びNM\_000889.2は、それぞれ、ヒト 4及びヒト 7の例示的なヌクレオチド配列を提供する。GenBank(商標)受入番号NP\_000876.3及びNP\_000880.1は、それぞれ、ヒト 4及びヒト 7の例示的なアミノ酸配列を提供する。ヒトホーミング受容体の例示的なヌクレオチド配列及びアミノ酸配列は、表1に記載されている。いくつかの実施態様において、前記NK細胞は、第二の消化器系ホーミング受容体をさらに含む。いくつかの実施態様において、前記NK細胞は、CCR9である第一の消化器系ホーミング受容体を含み、かつイントグリン 4 7である第二の消化器系ホーミング受容体をさらに含む。他の具体的な実施態様において、前記NK細胞は、消化器系ホーミング受容体CXCR3を含む。

#### 【0342】

ある実施態様において、1以上の消化器系ホーミング受容体を含む前記NK細胞は、ビタミンA代謝産物の存在下で、増殖されるか、活性化されるか、又は増殖されかつ活性化される。具体的な実施態様において、該増殖、活性化、又は増殖及び活性化の双方は、インビボ、インビトロ、又はエクスピボで起こる。具体的な実施態様において、前記ビタミンA代謝産物は、レチノイン酸である。ある実施態様において、1以上の消化器系ホーミング受容体を含む前記NK細胞はさらに、B細胞ゾーンホーミング受容体を含む。具体的な実施態様において、該B細胞ゾーンホーミング受容体は、CXCR5である。

#### 【0343】

また、消化管、例えば、消化器系の器官、皮膚、又は組織にホーミングする遺伝子改変NK細胞を生じさせる方法が本明細書に記載される。ある実施態様において、該1以上の受容体を含む細胞を消化管へとホーミングさせる1以上のホーミング受容体、例えば、CCR9又はインテグリン 4 7を含むNK細胞は、NK細胞を、1以上の消化器系ホーミング受容体を発現するように操作する工程を含む方法により生じる。いくつかの実施態様において、該NK細胞を1以上の消化器系ホーミング受容体を含むように操作する工程は、該ホーミング受容体をコードする核酸配列を、1以上のベクターを前記細胞に導入することを含む。具体的な実施態様において、該ベクターは、ヒトCCR9の核酸配列、ヒトイントグリン 4 7の核酸配列、又は双方を含む。

#### 【0344】

ある実施態様において、消化管にホーミングするNK細胞は、該細胞を、1以上の消化器系ホーミング受容体、例えば、CCR9又は 4 7の発現を誘導する分子で処理する工程を含む方法により生じる。具体的な実施態様において、該分子は、ビタミンAである。

#### 【0345】

ある実施態様において、1以上の受容体を含む細胞を消化管へとホーミングさせる該1以上の受容体を含む遺伝子改変NK細胞を生じさせるための方法は、ビタミンA代謝産物の存在下実施される該細胞を増殖させる工程を含む。ある実施態様において、消化管にホーミングする1以上の受容体を含む遺伝子改変NK細胞生じさせるための方法は、ビタミンA代謝産物の存在下実施される該細胞を活性化する工程を含む。ある実施態様において、前記増殖及び活性化工程の双方は、ビタミンA代謝産物の存在下実施される。ある実施態様において、該ビタミンA代謝産物は、レチノイン酸である。ある実施態様において、NK細胞を、消化器系ホーミング受容体を含むように操作する前記工程は、当業者に公知の任意の方法により行われる。

#### 【0346】

##### (5.3.5. 皮膚ホーミング受容体)

一実施態様において、前記ホーミング受容体は、該ホーミング受容体を含む細胞を、皮膚、例えば、皮膚組織又は皮膚細胞へとホーミングさせる。ある実施態様において、前記皮膚ホーミング受容体は、CCR10、CCR8、CCR4、又はCLA、例えば、ヒトCCR10、ヒトCCR8

10

20

30

40

50

、ヒトCCR4、又はヒトCLAである。GenBank(商標)受入番号NM\_016602.2及びAF215981.1は  
、ヒトCCR10の例示的なヌクレオチド配列を提供する。GenBank(商標)受入番号NP\_057686.  
2及びP46092.3は、ヒトCCR10の例示的なアミノ酸配列を提供する。GenBank(商標)受入番  
号NM\_005201.3及びBC107159.1は、ヒトCCR8の例示的なヌクレオチド配列を提供する。Gen  
Bank(商標)受入番号NP\_005192.1及びAAI07160.1は、ヒトCCR8の例示的なアミノ酸配列を  
提供する。GenBank(商標)受入番号NM\_005508.4は、ヒトCCR4の例示的なヌクレオチド配列  
を提供する。GenBank(商標)受入番号P51679.1は、ヒトCCR4の例示的なアミノ酸配列を提  
供する。GenBank(商標)受入番号NM\_001206609.1、及びNM\_003006.4は、ヒトCLAの例示的  
なヌクレオチド配列を提供する。GenBank(商標)受入番号NP\_001193538.1及びNP\_002997.2  
は、ヒトCLAの例示的なアミノ酸配列を提供する。**10** ヒトホーミング受容体の例示的なヌク  
レオチド配列及びアミノ酸配列は、表1に記載されている。いくつかの実施態様において  
、前記NK細胞は、第二の皮膚ホーミング受容体をさらに含む。いくつかの実施態様において  
、前記NK細胞は、CCR10である第一の皮膚ホーミング受容体を含み、かつCLAである第二  
の皮膚ホーミング受容体をさらに含む。いくつかの実施態様において、前記NK細胞は、CC  
R10である第一の皮膚ホーミング受容体を含み、かつCCR4である第二の皮膚ホーミング受  
容体をさらに含む。いくつかの実施態様において、前記NK細胞は、CCR4である第一の皮膚  
ホーミング受容体を含み、かつCLAである第二の皮膚ホーミング受容体をさらに含む。い  
くつかの実施態様において、前記NK細胞は、第三の皮膚ホーミング受容体をさらに含む。  
いくつかの実施態様において、前記NK細胞は、CCR10である第一の皮膚ホーミング受容体  
を含み、CCR4である第二の皮膚ホーミング受容体をさらに含み、かつCLAである第三の皮  
膚ホーミング受容体をさらに含む。いくつかの実施態様において、前記NK細胞は、CCR8で  
ある第一の皮膚ホーミング受容体を含み、かつCLA、CCR4、又はCCR10である第二の皮膚ホ  
ーミング受容体をさらに含む。いくつかの実施態様において、前記NK細胞は、CCR8である  
第一の皮膚ホーミング受容体を含み、かつ前記第二の皮膚ホーミング受容体とは異なり、かつCLA、CCR4  
、及びCCR10からなる群から選択される第三の皮膚ホーミング受容体をさらに含む。い  
くつかの実施態様において、前記NK細胞は、第三の皮膚ホーミング受容体をさらに含む。い  
くつかの実施態様において、前記NK細胞は、CCR10である第一の皮膚ホーミング受容体を  
含み、CCR4である第二の皮膚ホーミング受容体をさらに含み、CLAである第三の皮膚ホー  
ミング受容体をさらに含み、かつCCR8である第四の皮膚ホーミング受容体をさらに含む。  
**20** ある実施態様において、前記NK細胞は、1以上の皮膚ホーミング受容体を含む。他の具  
体的な実施態様において、前記NK細胞は、皮膚ホーミング受容体CCR6を含む。  
**30**

#### 【0347】

ある実施態様において、1以上の皮膚ホーミング受容体を含む前記NK細胞は、ビタミンD  
代謝産物の存在下、増殖されるか、活性化されるか、又は増殖されかつ活性化される。具  
体的な実施態様において、該増殖、活性化、又は増殖及び活性化の双方は、インビボ、イ  
ンビトロ、又はエクスピボで起こる。具体的な実施態様において、該ビタミンD代謝産物  
は、1,25-ジヒドロキシコレカルシフェロール( $1,25(OH)_2D_3$ )である。ある実施態様にお  
いて、1以上の皮膚ホーミング受容体を含む前記NK細胞は、IL-12の存在下、増殖されるか、  
活性化されるか、又は増殖されかつ活性化される。具体的な実施態様において、該増殖、  
活性化、又は増殖及び活性化の双方は、インビボ、インビトロ、又はエクスピボで起こる。  
より具体的な実施態様において、1以上の皮膚ホーミング受容体を含む前記NK細胞は、  
ビタミンD代謝産物及びIL-12の存在下、増殖されるか、活性化されるか、又は増殖され  
かつ活性化される。具体的な実施態様において、該増殖、活性化、又は増殖及び活性化の双  
方は、インビボ、インビトロ、又はエクスピボで起こる。ある実施態様において、1以上  
の皮膚ホーミング受容体を含む前記NK細胞はさらに、B細胞ゾーンホーミング受容体を含  
む。具体的な実施態様において、該B細胞ゾーンホーミング受容体は、CXCR5である。  
**40**

#### 【0348】

また、皮膚、例えば、皮膚組織又は細胞へホーミングする遺伝子改変NK細胞を生じさせ  
る方法が本明細書に記載される。ある実施態様において、皮膚へホーミングするNK細胞は  
**50**

、該NK細胞を、皮膚ホーミング受容体、例えば、CCR4、CCR8、CCR10、又はCLAを含むように操作する工程を含む方法により生じる。いくつかの実施態様において、該NK細胞を皮膚ホーミング受容体を含むように操作する工程は、受容体核酸配列(複数可)、すなわち、該受容体(複数可)をコードする核酸配列(複数可)を含む1以上のベクターを、該細胞内に導入することを含む。具体的な実施態様において、該ベクターは、ヒトCCR10の核酸配列、ヒトCLAの核酸配列、又は双方を含む。具体的な実施態様において、前記ベクターは、ヒトCCR4の核酸配列、及び任意にヒトCLAの核酸配列を含む。具体的な実施態様において、前記ベクターは、ヒトCCR4の核酸配列及びヒトCCR10の核酸配列を含む。具体的な実施態様において、前記ベクターは、ヒトCCR10の核酸配列、ヒトCCR4の核酸配列、及びヒトCLAの核酸配列を含む。具体的な実施態様において、前記ベクターは、ヒトCCR8の核酸配列を含む。具体的な実施態様において、前記ベクターは、ヒトCCR8の核酸配列及び任意にヒトCLAの核酸配列を含む。具体的な実施態様において、前記ベクターは、ヒトCCR8の核酸配列及びヒトCCR10の核酸配列を含む。具体的な実施態様において、前記ベクターは、ヒトCCR8の核酸配列、ヒトCCR4の核酸配列、及びヒトCLAの核酸配列を含む。具体的な実施態様において、前記ベクターは、ヒトCCR8の核酸配列、ヒトCCR4の核酸配列、及びヒトCCR10の核酸配列を含む。具体的な実施態様において、前記ベクターは、ヒトCCR8の核酸配列、ヒトCCR4の核酸配列、CCR10の核酸、及びヒトCLAの核酸配列を含む。

【0349】

ある実施態様において、皮膚にホーミングする細胞、例えば、NK細胞は、該細胞、例えば、NK細胞を、1以上の皮膚ホーミング受容体、例えば、CCR4、CCR10、CCR8、又はCLAの発現を誘導する、例えば、増加させる分子で処理する工程を含む方法により生じる。具体的な実施態様において、該分子は、ビタミンDである。ある実施態様において、皮膚ホーミング受容体の発現の誘導は、該細胞、例えば、NK細胞を、IL-12で処理すること、例えば、該細胞によるCCR4、CCR8、CCR10、又はCLAのうちの1つ以上の発現を増加させるのに十分な量及び期間で、該細胞を、IL-12に接触させることによって補助される。

【0350】

ある実施態様において、1以上の受容体を含む細胞を皮膚へとホーミングさせる該1以上のホーミング受容体を含む前記NK細胞を生じさせるための方法は、ビタミンD代謝産物及び任意にIL-12の存在下実施される該細胞を増殖させる工程を含む。ある実施態様において、1以上の受容体を含む細胞を消化管へとホーミングさせる該1以上の受容体を含むNK細胞を生じさせるための方法は、ビタミンD代謝産物及び任意にIL-12の存在下実施される該細胞を活性化する工程を含む。ある実施態様において、前記増殖及び活性化工程の双方は、ビタミンD代謝産物及び任意にIL-12の存在下実施される。ある実施態様において、該ビタミンD代謝産物は、 $1,25(OH)_2D_3$ である。ある実施態様において、NK細胞を、皮膚ホーミング受容体を含むように操作する工程は、当業者に公知の任意の方法により行われる。

【0351】

(表1.ヒトホーミング受容体の例示的なヌクレオチド配列及びアミノ酸配列)

10

20

30

【表1】

配列番号:	GenBank受入番号及び説明	配列
		<p>541 agctgttggc tgaaaaggtg gtctatgttg ggcgtctggat ccctgccttc ctgctgacta  601 ttcccgactt catcttgc aacgtcagtg aggcatatgc cagatataatc tgtgaccgt  661 tctacccaa tgacttgttgg gtgttgtgt tccagttca gcacatcatg gttggcccta  721 tcctgcctgg tattgtcatac ctgtcctgct attgcattatc catctccaag ctgtcacact  781 ccaaggccca ccagaagcgc aaggccctca agaccacatg ctccttcata ctggcttt  841 tcgcctgtt gctgccttac tacattggga tcagcatcga ctcttcata ctccctggaaa  901 tcataaagca agggtgttag tttgagaaca ctgtgcacaa gtggatttc atcaccgagg  961 ccctagttt ctccactgt tgcgttgaacc coatccctca tgcttcctt ggagccaaat  1021 ttaaaacctc tgcccagcac gcactcacct ctgtgagcag agggccacgc ctcaagatcc  1081 tctccaaagg aaaggcgagg ggacattcat ctgttccac tgagtctgag tcttcaagg  1141 ttcaactccag ctaacacaga tgtaaaagac tttttttt acgataaata acttttttt  1201 aagtacaca tttttcagat ataaaagact gaccaatatt glacagttt tattgttgt  1261 tggatttttgc tcttgtttt cttagttt tgcgttgcattt aattgtactt ttatataaa  1321 tttttttgtt ttcattattga tgcgtgtcta ggcaggact gtggccaaatg tcttagttgc  1381 tgcgtgtctc gtggtaggac tgtagaaaag ggaactgaac attccagagc gtgtgtgaa  1441 tcacgtaaag cttagaatga tccccagctg tttatgcata gataatctct ccattcccg  1501 ggaacgtttt tcctgttctt aagacgtat tttgtgttag aagatggcac ttataaccaa  1561 agccaaagt ggtatagaaa tgctggttt tgcgtttca ggagtgggtt gatttcagca  1621 cctacagtgt acagtctgtt attaagtgtt taataaaaatg acatgttaaa cttaaaaaaa  1681 aaaaaaaaaa a</p>
	NP_001008540.1 ヒトCXCR4アイソフォームaの例示的なアミノ酸配列	<p>1 msiplpllqi ytsdmyteem gsgdydsmke pcfreeenanf nkiflptiys iifltgivgn  61 glvilvmyq kklrsmtdky rhlsvadll fvitlpfwav davanwyfgn flckavhvii  121 tvnlyssvli lafisldryl aivhatnsqr prkllaekvv yvgvwipall ltipdfifan  181 vseaddrivc drfpndlwv vvfqfqhimv glilpgivil scyciiiskl shskghqkrk  241 alkttvivil affacwlppy igisidsfil leiikqgcef entvhkwisi tealaffhcc  301 lnpilyafgl akfktsaqha ltsvsrgssl kilskgkrgg hssvstesesssfhss</p>
3	NP_003458.1 ヒトCXCR4アイソフォームbの例示的なアミノ酸配列	<p>1 megisiytsd nyteemgsgd ydsmekepcfr eenanfnkif lptysiifl tgivnglvi  61 lvmgyqkkkr smtdkyrlhl svadllfvit lpfwadvava nwyfgnflck avhviytvn  121 yssvlilafi sldrylaivh atnsqrprkl laekvvyygv wipalltip dfifanvsea  181 ddryicdrfy pndlwwvvfq fqhimvglil pgivilscyc iiisklshsk ghqkrkalkt  241 tvililaffa cwlpypyigis idsfilleii kgqcefentv hwkwiseal affhcclnpi  301 lyaflgakfk tsaqhaltsv srgsslkilks kgkrgghssv stesesssfh ss</p>
4	NM_001301714.1 ヒトCCR7アイソフォームbをコードする例示的な核酸配列	<p>1 cacttcctcc ccagacagggt gtagtgcgag gccgggcaca gccttcctgt gtgttttac  61 cgcccagaga gcgtcatgga cctgggtatg cctgtgtca gatgagggtca cggacgatta  121 categgagac aacaccacag tggactacac tttgttcagat tctttgtgtt ccaagaaggaa  181 cgtcgccaaac tttaaaggct ggttcctccc tatcatgtac tccatcattt gtttcgtgg  241 cctactggc aatgggtgg tcgtgttgc ctatcatat tcaagaggc tcaagaccat  301 gaccgatacc tacctgtca acctggcggt ggcagacatc ctcttcctcc tgaccctcc  361 ctcttcggcc tacagcgcgg ccaagtcctg ggttcctcggt gtccactttt gcaagctcat  421 ctcttcggcc tacaagatga gcttcttcag tggcatgtc tcaatctttt gcatcagcat  481 tgaccgctac gtggccatcg tccaggctgt ctcaatgtc cggccaccgtg ccccggtcc  541 tctcatcagc aagctgtctt gtgtggcat ctggatacta gccacagtgc tctccatccc  601 agagcttcgt tacagtgacc tccagaggag cagcagttaga caagcgatgc gatgtctct  661 catcacagag catgtggagg cctttatcatac catccaggtg gcccagatgg tgcgtggctt  721 tctggcccc ctgtggccca tgagcttctg ttacattgtc atcatccgca ccctgctcca</p>
5		<p>10 20 30 40</p>

配列番号:	GenBank 受入番号 及び 説明	配列
		781 ggcacgcaac tttgagcgca acaaggccat caaggtgatc atcgctgtgg tcgtggctt 841 catagtcttc cagctgccct acaatggggt ggtcctggcc cagacggtgg ccaactcaa 901 catcaccagt agcacctgtg agctcagtaa gcaactcaac atcgcttacg acgttaccta 961 cagcctggcc tgegtccgtc gtcgtcaaa cccttcttg tacgccttca tcggcgtcaaa 1021 gtcccgcaac gatctcttca agctcttcaa ggacctgggc tgcctcagcc aggagcagct 1081 ccggcagtgg ttttctgtc ggcacatccg ggcgttccccc atgagtgtgg aggccgagac 1141 caccaccacc ttctccccat aggcgactct tctgccttggc cttaggggac ctctcccaagg 1201 gtccctgggg tggggatagg gaggcagatgc aatgactca gacatcccc cgccaaaggc 1261 tgctcaggga aaagcagctc tccctcaga gtgcagccc ctgccttca agatacgatc 1321 accccaatcc cagcttaccc aaccaatgcc aaaaaaagac agggctgata agcttacacc 1381 agacagacaa cactggaaa cagaggctat tgccttccat accaaaaact gaaagtggaa 1441 gtcccgaaac ttttccacc tgcgtggatg aaggggccaa ggagggttag tgcaaggggc 1501 gtgggatgg cctgaagatg cctctgaatg aaccccttgg cctcccccac actcaaatgc 1561 tcagaccaggc ttttccggaa accaggccctt atcttcaaga ccagagatag tggggagact 1621 tcttggctt gttggggaaa gggacatca gctggtaaaa cttttcttgc gaacccctcc 1681 ctccatcggtt ttcttcaactg tcccttcaagc cagcgggaaat ggcagctgccc acggccccc 1741 aaaagcacac tcatcccccc acttgcgcgc tgccttccc aggcttcaaa caggggagag 1801 tgggtgttt ctgcaggccc agggcagatg ccttgcgtg atcaaaagccca cacttggggc 1861 tccagatgg ggtatgacatg cactcagtc ttggcttccac tggatgggg gggagggaca 1921 agggaaatgt caggggggggg gagggtgaca gtggccccc aagggccacg agcttgtt 1981 ttgttctttg tcaacaggac tggaaaacctt tccatgtt ctgttttgc ttgttaaga 2041 gagacaattt ttaacccacac acagataaag ttttcccttg aggaaacaac agctttaaaa 2101 gaaaaagaaa aaaaaagatct ttggtaaaatg gcaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa
6	NM_001301716.1  ヒトCCR7アイソフォームc前駆体をコードする 例示的な 核酸配列	1 ctcttagatga gtcagtgaggg ggcgggtggc gcgttgaacc gtgaagatgt tggttggggc 61 taaaacgttgc cttaaactca ggagcttaagg ggttaatttcaag tggaaaaggaa gaatgagccgg 121 tggggagtc ttttgcacca ggggtccatc gcagcaggac tacaatgc cggcgcagg 181 ctggggacgca gggggacagcg gtcgttgc cccagaatag aaaatgcgc taggaagcccc 241 tttttagtgc gacagcggag gactggactg ccaggccaaat catcaggggc ttcatctca 301 gggccggta gagccccatc ggttttagga ggaaggaaaa ccaatggaaa gcgtgtgtt 361 ggtggcttc ctgttcattt tccaggatgt cctgtgtcaat gatgggtca cggacgatata 421 catcgagac aacaccacag tggactacac tttgttgcag tctttgtgt ccaagaaggg 481 cgtcgaaac tttaaaggct gtttccccc tatcatgtac tccatcattt gtttgcgtgg 541 cctactgggc aatgggtgg tgcgtgttgc ctatatctat ttcaagaggc tcaagaccat 601 gaccgatacc tacctgttca acctggcggt ggcagacatc ctcttccccc tgacccttcc 661 ctcttggcc tacagcgggg ccaagtcccg ggttttgcgtt gtccactttt gcaagtcat 721 ctggccatc tacaatgtt gtttgcgttgc ctatctttt gcatcggat 781 tgaccgttgc tggccatcg tccaggatgt ctgcgttgc cggccacccgtt cccgggttgc 841 tctcatcgc aagctgttgc ttttgcgttgc ctgcgttgc ttttgcgttgc 901 agagcttgc ttttgcgttgc tccaggatgtt cggcgttgc caaggttgc gatgttgc 961 catcaccatc catgtggagg ctttgcgttgc catcggatgtt gcccggatgg tgatcggtt 1021 tcttggccccc ctgttggccca tgatgttgc ttacatccgc ccctgttgc 1081 ggcacgcaac ttttgcgttgc acaaggccat caaggttgc atcgctgtgg tcgtggctt 1141 catagtcttc cagctgccct acaatggggt ggtcctggcc cagacggtgg ccaactcaa 1201 catcaccagt agcacctgtg agctcagtaa gcaactcaac atcgcttacg acgttaccta 1261 cagcctggcc tgcgttgc gtcgtcaaa cccttcttg tacgccttca tcggcgtcaaa 1321 gtcccgcaac gatctcttca agcttcaaa ggacctgggc tgcctcagcc aggagcagct 1381 ccggcagtgg ttttctgtc ggcacatccg ggcgttccccc atgagtgtgg aggccgagac

配列番号:	GenBank受入番号及び説明	配列
		<p>1441 caccaccacc ttctcccat aggcgactct tctgcctgga cttagggac ctctccagg      1501 gtccctgggg tggggatagg gagcagatgc aatgactcg gacatcccc cgccaaaagc      1561 tgctcaggaa aaagcagctc tcccctcaga gtgcaagccc ctgctccaga agatagcttc      1621 accccaatcc cagctaccc aaccaatgcc aaaaaaagac agggctgata agctaacacc      1681 agacagacaa cactggggaa cagaggctat tgcccttaa accaaaaact gaaagtgaaa      1741 gtccagaaac tggccacc tgcgtggatg aaggggcca ggagggtag tgcaaggggc      1801 gtgggagtgg cctgaagatg cctctgaatg aaccttctgg cctccacag actcaaatgc      1861 tcagaccgc tcttcgaaa accaggcctt atctccaaga ccagagatag tggggagact      1921 tcttgcttg tgaggaaaa gcgacatca gctggtaaaa caaactctt gaaccctcc      1981 ctccatcgat ttcttcaactg tccccaagc cagcggaaat ggcagctgcc acggccgcct      2041 aaaagcacac tcatccccctc acttgcggcg tggccctcc aggctctaa caggggagag      2101 tgggtgttt cctgcaggcc agggcactg cctccgctg atcaaagcca cactctggc      2161 tccagagtgg ggalgacatcg cactcagctc ttggcctccat tggtatggga ggagaggaca      2221 agggaaatgt cagggcggg gagggtgaca tggccgccc aaggccacg agttgttct      2281 ttgtctttg tcacaggac tgaaaacctc tccatgtt ctgttttga ttgttaaga      2341 gagcaacatt ttaccacac acagataaag tttcccttg agggaaacaac agcttaaaa      2401 gaaaaagaaaa aaaaaaagtct ttgttaatg gcaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaa</p>
7	NM_001301717.1  ヒトCCR7アイソフォームc前駆体をコードする例示的な核酸配列	<p>1 ctctagatga gtcagtggag ggccgggtgga gcgttgaacc gtgaagagtg tggttggcgc      61 taaaacgtgga cttaaactca ggagctaagg gggaaaccaa tggaaagcgt gctgggtgt      121 gctctccttgc tcatttcca ggtatgcctg tgcgttgc tgcgttgc      181 ggagacaaca ccacagtggaa ctacactttt ttcgagttt tgcgttgc      241 cggaaacttta aagcctgggtt ccccttatac atgtactcca tcattttttt cgtggccctt      301 ctggcaatg ggctggctgtt gtttgcctat atctatttca agaggctaa gaccatgacc      361 gatacttacc tgctcaacctt ggccgtggca gacatccctt tcccttgc      421 tggccatcaca ggcgcggca gtcctgggtt tccgttgc      481 gccatctaca agatgagctt cttcagtgcc atgccttac tccatgttgc      541 cgctacgtgg ccatctgttca ggctgttca gtcacccggcc accgtggcc      601 atcagcaagc tgcgttgc tggcatctgg atactagcca cagtgccttc catccagag      661 ctccatgttca gtcacccggcc gggatcttca gggatcttca      721 acagagatgtt gggatcttca gggatcttca      781 gtcccttgc tggccatgttgc tggccatgttca tggccatgttca      841 cgcaactttt ggcgcggcc gggatcttca gggatcttca      901 gtccatgttca gggatcttca gggatcttca      961 accagtagca ctttgcgttca gggatcttca      1021 ctggccatgttca gggatcttca      1081 cgcaacatgttca gggatcttca      1141 cagtttttgc tggccatgttca gggatcttca      1201 accacccatgttca gggatcttca      1261 ctggggatgttca gggatcttca      1321 cagggaaaatgttca gggatcttca      1381 caatccatgttca gggatcttca      1441 agacaacacttca gggatcttca      1501 agaaactgttca gggatcttca      1561 gagtttttgc tggccatgttca gggatcttca      1621 accagcttca gggatcttca      1681 ggcttgcgttca gggatcttca      1741 atcgatgttca gggatcttca</p>

10

20

30

40

配列番号:	GenBank 受入番号 及び 説明	配列
		1801 gcacactcat cccctcaatt gcccgtcgc cttcccaggc tctcaacagg ggagagtgtg 1861 gtgttccctg cagggcaggc cagctgcctc cgcgtatca aagccacact ctgggctcca 1921 gagtgggat gacatgact cagcttgg ctccactgg atgggaggag aggacaaggg 1981 aaatgtcagg ggcggggagg gtgacagtgg ccgccccagg cccacgagct tgtttttg 2041 tctttgtcac agggactgaa aacctctct catgttctgc ttgcattcg ttaagagagc 2101 aacattttac ccacacacag ataaatgggaa cccttgagga aacaacagct taaaagaaaa 2161 aaaaaaaaaa aagtcttgg taaatggcaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa
8	NM_001301718.1  ヒトCCR7アイソフォームc前駆体をコードする例示的な核酸配列	1 agggagaaggt gccttaaaca ggttcccacg catttcctgg cgctatttag ctggagctg 61 ccaagggcct gccttcaatt gtggcatcgc agttactgac tctccagtgg gccaggccct 121 acctagctgg gaccitgaggg tcaggatacg ggaagagggc tactgccgc ctgacttgta 181 gggaaaccaa tgaaaagcgt gctgggggtg gctctccctg tcttttcca ggtatgcctg 241 tglcaagalg agglacacgga cgattacatc ggagacaaca ccacagtgga ctacacttg 301 ttgcgatctt tgcgtccaa gaaggacgtg cgaacttta aagcctgggtt cctccctatc 361 atgtacttcca tcatttgc tgcgtggccta ctgggcaatg ggctggcgtg ttgcacat 421 atctatttca agggactcaa gaccatgacc gatacctacc tgctcaacct ggccgtggc 481 gacatccctt tcctctgc cctcccttc tgggcctaca ggcggccaa gtccctgggt 541 ttccgggtcc acttttgc gtcatctt gccatctaca agatgagctt cttagtggc 601 atgtccctac ttctttgc t cagatttgc cgtacgtgg ccacgttcca ggctgtctca 661 gtcaccggcc accgtggcccg cgtcccttc atcagcaagc tgcgtgtgtt gggcatctgg 721 atactagcca cagtgcctc catcccagag ctccctgtaca gtgcatttca gaggagcage 781 agtgagcaag cgtgcgtatc ctctctcatc acagagcatg tggaggccct tatcaccatc 841 caggtggccc agatgggtat cggcttctg tggccctgc tggccatgatg ctctgttac 901 ctgtcatca tccgcaccct gtcaccggca cgcacatttgc agcgaacaa ggccatcaag 961 gtgtatcatcg ctgtggcgtg ggttccata gtctccagc tggccctacaa tgggggtggc 1021 ctggcccaaga cggtgccaa cttaacatc accagtagca cctgtgagct cagtaagcaa 1081 cttaacatcg cctacgacgt caccatcagc ctggcctgc tccgctgtg cgtcaaccct 1141 ttcttgc tccatcg cgtcaaggcc cgcacatc tttcaagct cttaaggac 1201 ctgggcgtcc tcagccaggaa gcaagctccgg cagtggctt cctgtcgca catccggcgc 1261 tcctccatga gtgtggggc cggaccacc accaccttcc cccataggc gactcttctg 1321 cctggacttag agggaccctt cccagggtcc ctgggggtgg gatagggagc agatgcaatg 1381 actcaggaca tccccccgc aaaatgtctt caggaaaaaag cagctctccc cttagatgtc 1441 aagccctgc tccagaatg agtttccatcc caatcccagc tacatcaacc aatgcaaaaa 1501 aaagacaggg ctgataatg aacaccagac agacaacact gggaaacaga ggctattgtc 1561 ccctaaacca aaaatgtaaa gtggaaatgtcc agaaactgtt cccacctgtt ggagtgtaaagg 1621 ggccaaaggag ggtgagtgc agggccgtgg gatgtggctt aagagtccctc tgaatgaaacc 1681 ttctggcctc ccacagactc aaatgtcttcc accagcttttcc cggaaaacca ggcccttatct 1741 ccaagaccag agatgtggg gagacttcc ggttgggtga gaaaaagegg acatcagctg 1801 gtcaacacaa ctctctgaac ccctccctcc atcgatccatc tcaatgtcctt ccaagccagc 1861 ggaaatggca gtcggcacgc cgccttaaaa gcaactcat cccctcaattt gcccgtcgc 1921 cctcccaaggc tctcaacagg ggagagtgtg gtgtttctg caggccaggc cagctgcctc 1981 cgcgtatca aagccacact ctgggtccaa gatgtggggat gacatgact cagcttgg 2041 ctccacttggg atgggaggag aggacaaggaa aatgtcagg ggcggggagg gtgacagtgg 2101 ccgccccagg cccacgagct tgcgtttgt tctttgtcac agggactgaa aacctctcc 2161 catgttctgc ttgcattcg ttaagagagc aacattttac ccacacacag ataaatggg 2221 cccttgagga aacaacagct taaaatggaaa aagaaaaaaa aagtcttgg taaatggcaa 2281 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa

10

20

30

40

配列番号:	GenBank 受入番号 及び 説明	配列
9	NM_001838.3  ヒトCCR7アイソフォームa前駆体をコードする 例示的な 核酸配列	<pre> 1 cacttcctcc ccagacaggg gtagtgcgag gccgggcaca gccttcctgt gtggtttac 61 cgcccagaga gcgtcatgga cctggggaaa ccaatgaaaaa gcgtgcttgt gggtggcttc 121 cttgtcattt tccaggatag cctgtgtcaa gatgagggtca cggacgatia catcgagac 181 aacaccacag tggactacac ttgttcgag tctttgtgtc ccaagaagga cgtgcggaaac 241 tttaaaggct ggttcctccc tatcatgtac tccatcattt gtttcgtggg cctactgggc 301 aatgggctgg tctgttgcac ctatatctat ttcaagaggg tcaagaccat gaccgatacc 361 tacctgtcata acctggcggt ggcagacatc ctcttcctcc tgacccttc cttctggggcc 421 tacagcgccg ccaagtcttg ggttcctcggt gtccactttt gcaagctcat ctttgcacatc 481 tacaagatga gtttcttcag tggcatgtc ctacttctt gcatcagcat tgaccgctac 541 gtggccatcg tccaggctgt ctcaagtcac cggcaccgtg cccgcgtctt tctcatcagc 601 aagctgtctt gtgtgggcat ctggataacta gcccacagtgc tctccatccc agagctctt 661 tacagtgacc tccagaggag cagcagtgag caagcgtatc galgtctctt catcacagag 721 catgtggagg cttttatcac calccagggt gcccagatgg tgatcggtt tctgttcccc 781 ctgttggcca ttagttctg ttaccttgc atcatccgca ccctgtcttca ggcacgcaac 841 tttgagcgca acaaggccat caagggtgatc atcgctgtgg tcgtggctt catatgtttt 901 cagctgcctt acaatgggg tggcttggcc cagacgggtt ccaacttcaa catcaccagg 961 agcacctgtg agctcgttca gcaactcaac atcgcttacg acgtcaccta cagcctggcc 1021 tgcgtccgtt gtcgtgttca ccctttcttgc ttcgtgttca gttccggcaac 1081 gatctttca agcttcttca ggacatgggc tgcctcagcc aggaggactt ccggcagtgg 1141 tcttcctgtc ggcacatccg cggcgttccat atgagtgtgg aggccggagac caccaccacc 1201 ttctcccatt aggcgactct tctgttgc gtcagggac ctctcccttgg gtcctgggg 1261 tggggalagg gagcagatgc aatgacttgc gacatcccc cggccaaaagc tgcttgggg 1321 aaagcagctc tcccctcaga gtgcagccccc ctgttccaga agatagcttcc accccaaatcc 1381 cagcttccatc aaccaatgcc aaaaaaaaaagac agggctgtata agctaaccacc agacagacaa 1441 cactggggaa cagaggctat tgcgttccatc accaaaaactt gaaagtggaa gtcggaaaac 1501 tgcgttccacc tgcgtggatgt aaggggccaa ggagggttag tgcaaggggc gttggggatgtt 1561 cctgaagagt cctctgtat aaccttctgg cctccacatc actcaatgc tcagaccaggc 1621 tcttcgttccaa accaggccctt atctccatc gtcagatgtt gttggggact tcttgggttt 1681 gtgaggaaaaa gcccgttcaaa caaaacttctt gaccccttcc ctccatgtt 1741 ttcttcacttgc tccatccatc cagcggttgc ggcgttccatc acggccccc aaaaagcacac 1801 tcatccatc acttgcgcgt tgcgttccatc aggttcttcaaa cagggggatgt tgcgttccatc 1861 cctgcaggcc aggcctgtt cttccgttgc atcaatgc cactctggc tccagatgtt 1921 ggatgtatgc cactcgttgc ttggatccatc tggatgggg gggagggatgtt 1981 cagggggccggg gaggggttgcata gttggccccc aaggcccacg agcttgcgtt tttttttttt 2041 tcaacgggatc tggaaatccatc tccatgtt tgcgttccatc ttcgtttaaga gagcaacatt 2101 ttacccacac acagataaaat ttttttttgc agggaaacaaatc agctttaaaaaaa gaaaaaaa 2161 aaaaaaaaaatc ttggtaaatc gcaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaa </pre>
10	NP_001288643.1  ヒトCCR7アイソフォームbの 例示的な アミノ酸配列	<pre> 1 mysiicfvgl lgngllvltiy iyfkrllktmt dtyllnlava dilfltlpf waysaakswv 61 fgvhfcklif aiykmsffsg mllllcisid ryvaivqavsa hhrhrarvll isklscvgiwi 121 ilatvlsipe llysdllqrss seqamrcsli tehveafiti qvagmvigfl vpllamsfy 181 lviirllqa rnfernkaik viiavvvvfi vfqlpyngvv laqtvfanfni tsstcelskq 241 lniaydvtys lacvrccvnp flyafgvkf rndlfkfkld lgclsqeqlr qwsscrhrr 301 ssmsveaett ttfsp </pre>
11	NP_001288645.1  ヒトCCR7アイソ	<pre> 1 mksvlvall vifqvclcqevtddiygdn ttvdytlfes lcskkdvrfn kawflpimys 61 iicfvglgn glvvltiyf krlktmttdy llnlavadil fltltpfwy saakswvfgv 121 hfcklifaiy kmsffsgmll llcisisdryv aivqavsa hhrarvllisk lscvgiwi </pre>

配列番号:	GenBank受入番号及び説明	配列
	フォームc前駆体の例示的なアミノ酸配列	181 tvlsipelly sdlqrssseq amrcsliteh veafitiqva qmvigflvpl lamsfcylvi 241 irtllqarnf ernkaikvii avvvvfivfq lpyngvvlaq tvanfnitss tcelskqlni 301 aydvtyslac vrccvnpfly afigvkfrnd lfklfkdlgc lsqeqlrqws scrhirrsm 361 sveaetttf sp
12	NP_001288646.1 ヒトCCR7アイソフォームc前駆体の例示的なアミノ酸配列	1 mksvlvvall vifqvclcq d evtdyigdn ttvdtylfes lcskkdvrf kawflpimys 61 iicfvglgn glvvlyiyf krlktmtddy llnlavadil fltlpfway saakswvfgv 121 hfcklifaiy kmsffsgmll llcisisdryv aivqavsaahr hrarvllisk lscvgiwiila 181 tvlsipelly sdlqrssseq amrcsliteh veafitiqva qmvigflvpl lamsfcylvi 241 irtllqarnf ernkaikvii avvvvfivfq lpyngvvlaq tvanfnitss tcelskqlni 301 aydvtyslac vrccvnpfly afigvkfrnd lfklfkdlgc lsqeqlrqws scrhirrsm 361 sveaetttf sp
13	NP_001288647.1 ヒトCCR7アイソフォームc前駆体の例示的なアミノ酸配列	1 mksvlvvall vifqvclcq d evtdyigdn ttvdtylfes lcskkdvrf kawflpimys 61 iicfvglgn glvvlyiyf krlktmtddy llnlavadil fltlpfway saakswvfgv 121 hfcklifaiy kmsffsgmll llcisisdryv aivqavsaahr hrarvllisk lscvgiwiila 181 tvlsipelly sdlqrssseq amrcsliteh veafitiqva qmvigflvpl lamsfcylvi 241 irtllqarnf ernkaikvii avvvvfivfq lpyngvvlaq tvanfnitss tcelskqlni 301 aydvtyslac vrccvnpfly afigvkfrnd lfklfkdlgc lsqeqlrqws scrhirrsm 361 sveaetttf sp
14	NP_001829.1 ヒトCCR7アイソフォームa前駆体の例示的なアミノ酸配列	1 mdlgkpmsv lvallvifq vclcqdevtd dyigdnttv ytlfeslcsk kdvrnfkawf 61 lpimysiicf vgllngnllv ltyiyfkrlk tmtdtyllnl avadilflt lpfwaysaak 121 swvfgvhfck lifaiykmsf fsgmlllci sidryvaivq avsahrhzar vllisklscv 181 giwilatvls ipellysdllq rssseqamrc slitehveaf itiqvaqmvi gflvplllams 241 fcylviirtl lgarnfern k aikviiavvv vfifvfqlpyn gvvlaqtvan fnitsstcel 301 skqlnaiaydv tyslacvrcc vnpflyafig vkfrndlflk fkdlgclsqe qlrqwsscrh 361 irrssmsvea etttfsp
15	NM_002253.2 ヒトVEGFR2前駆体をコードする例示的な核酸配列	1 actgagtcggggccccgg gagagcggtc aatgtgtggg cgctgcgtt cctctgcctg 61 cggccggcat cacttgcgcg ccgcagaaag tccgtctggc agcctggata tcctctccta 121 cccgcaccccg cagacccccg tgca gcccggcg gtcggccgccc gggctcccta gcccgtgcg 181 ctcaactgtc ctgcgcgtcg ggggtccgcg agttccaccc ctgcgcctcc ttctctagac 241 aggcgcgtggg agaaaagaacc ggctcccgag ttctggcat ttgcgcggc tcgagggtgca 301 ggatgcagag caagggtgtc ctggccgtcg ccctgtggct ctgcgtggag acccggggccg 361 cctctgtggg tttgcctagt gttcttttgc atctgcccag gtcagcata caaaaagaca 421 tacttacaat taaggctaat acaaacttcc aaattacttg caggggacag agggacttgg 481 actggctttg gcccaataat cagagiggca gtgagcaaaag ggtggagggtg actgagtgc 541 gcgatggcct cttctgtaa acactcacaa ttccaaaagt gatcgaaat gacactggag 601 ccttacaatgt cttctaccgg gaaactgact tggccctggc cattttatgtc tatgttcaag 661 attacagatc tccatttttgc gtttctgtta gtgaccaaca tggagtcgtg tacattactg 721 agaacaaaaa caaaaactgtg gtgattccat gtctcggtc catttcaaat ctcaacgtgt 781 cactttgtgc aagataccca gaaaagagat ttgttccatgt tggttaacaga atttctggg 841 acagcaagaa gggctttact attcccaatgt acatgtatcg ctatgtggc atggcttt 901 gtgaagcaaa aattaatgtat gaaagtacc agtctattat gtacatagtt gtgtttag 961 ggtataggat ttatgtatgt gttctgtatgc cgtctcatgg aattgaacta tctgttggag 1021 aaaagcttgt cttaaattgt acagcaagaa ctgaactaaa tgtggggatt gacttcaact 1081 gggataaccc ttcttgcag catcagcata agaaacttgt aaaccgagac ctaaaaaccc

10

20

30

40



配列番号:	GenBank 受入番号 及び 説明	配列
		<p>4021 aagatatccc gttagaagaa ccagaagtaa aagtaatccc agatgacaac cagacggaca          4081 gtggtatgg tcttgctca gaagagctga aaactttgga agacagaacc aaattatctc          4141 catctttgg tggaatggc cccagaaaa gcagggactc tgtggcatct gaaggctcaa          4201 accagacaaag cggctaccag tccggatatac actccgatga cacagacacc accgtgtact          4261 ccagtggaga agcagaacctt taaaagctga tagagattgg agtgc当地 ggtggcacag          4321 cccagattct ccagctgac tcggggacca cactgagctc tccctctgtt taaaagggaa          4381 catccacacc cccaaactct ggacatcaca tgagaggc tgc tgcatttttca ttcaagtgtt          4441 gttcttcca ccagcaggaa gtagccgcat ttgatattca ttgc当地 agaaaaaggaa          4501 cctggactg caggagccca gtctttagg catatctgg aagaggctg tgacccaaga          4561 atgtgtctgt gtcttccccc agtgttgacc tgatccctt tttcattcat taaaagggaa          4621 ttatcatgc cccctgctgc gggctccacc atgggtttag aacaaagac ttcaagaaat          4681 ggccccatcc tcaaagaagt agcagttaccc ggggactgta cacttctgtaaactagaag          4741 ataaaccagg caatgtaaatgtt gttcgagggtt tggaaatgttgg aaggatttgg caggactgag          4801 tctatccaag aggcttgg taggacgtgg gtc当地aaagcc aagccttaag tggaaattc          4861 ggattgatag aaaggaaagac taacgttacc ttgc当地ggaa ggtactggaa gcctgcaaaat          4921 gcattgtgtt tgctctgggtaggatggggca tggggctgtt tctgaaatgtt aaagggttca          4981 gacgggggtt ctggggtaggatggggctgtt gttctcggatggggctaaa gtaggttcc          5041 ttgtgtgtt tctgactctt aatgagatgtt cttccagac ctttacgtgtt ctctggccca          5101 agccccagga aggaaatgtt gcaactgttgg ctttctgttcccaggctgatcccttatt          5161 agataaccac aaaggaaaggaa cattcagctc aaggcttccctt gccgtgttga agagttctgt          5221 ctgcacaaac cagttctgg tttttctgg aatgaataacc ctcataatctg tccatgtgtt          5281 atatgtctga gactgaatgc gggagggttca atgtgaatgtt gtgtgtgggtt tcaaagggtt          5341 aggaaggattt ttaccctttt gtttctccccc ctgtcccaaa cccactctca ccccgcaacc          5401 catcgttattttt ggc当地tactt ccagttaaacc ttgtgggtt ttttctgtt          5461 ctgaatgattt attagccaga ctttcaaaattt atttatagcc ctttcaattata acatctattt          5521 tatttttttactttaaca tatagagcttta ttctactgtt tttttgc当地 ttttctgtt          5581 ttttttcaaaaatgttggggtaggatggggctgtt gtttgc当地 ttttgc当地 ttttgc当地          5641 aatgactata agacatgttca tggcacatat atttataatgtt gtttgc当地 gaaaacaaatg          5701 taatataatata aagccttata tataatgttca ttgttactat ttttgc当地 ttttgc当地          5761 atgttagcata acaaaggcttca atatgttca agcaattgtt gtttgc当地 taaagaacat          5821 tgaaaaactt gaaggaaatcc ctttgc当地 ttttgc当地 gtttgc当地 ttttgc当地          5881 ggaagaggggg gtggctgggc acagtggccg acacctaaaa acccagactt ttttgc当地          5941 aaggtggggtagtgc当地 gcccaggatgttca agaggaccatgttca ttggccaaatgtt          6001 tccatctcaaa agaaaaaggaa taaaatgttca agaggaccatgttca ttggccaaatgtt  <span style="float: right;">30</span> </p>
16	NP_002244.1  ヒトVEGFR2前駆体をコードする 例示的な 核酸配列	<p>1 mqskvlava lwlcvetraa svglpsvsl lprlsiqkdi ltikanttlq itcrqqrld          61 wlwpnnqsgs eqrvevtecs dglfcktlci pkvigndtga ykcfyretdl asviyvvvq          121 yrspfiasvs dqhgvyyite nknktvvi pc lgsisnlvns lcarypekr vpdgnriswd          181 skkgftipsy misyagmvfc eakindestyq simyivvvvg yriydvvlp shgielsvge          241 klnlnctart elnvgidfnw eypsskhqhk klnvrndlktq sgsemkflls tltdgvtrs          301 dqglytcaas sglmtkknst fvrvhkpfv afsgsmeslv eatvgervri pakylgyppp          361 eikwykngip lesnhtikag hvltimewse rdtgnytv il tnpiskekqs hvsllvvyvp          421 pqigekslis pvdsvqygtt qtlctvyaipp phihhyw qleeeecanep sqavsvtnpy          481 pceewrsved fqggmnievn knqfaliegk nktvstlviq aanvsalykc eavnkvgrge          541 rvisfhvtrg peitlqpdmg pteqesvslw ctadrstfen ltwyklgpqp lpihvgelpt          601 pvcknltdlw klnatmfsns tndilimelk naslqdqgdy vclaqdrktk krhcvvrqlt          661 vlervaptit gnlenqtsi gesievscta sgnpppqimw fkdnetlved sgivlkdgmr          721 nltirrvrke deglytcqac svlgcakvea ffiiegaqek tnleiiilvg taviamffwl  <span style="float: right;">40</span> </p>

配列番号:	GenBank 受入番号 及び 説明	配列
		<p>781 llviirlrvk ranggelktg ylsivmdpde lpldehcerl pydaskwefp rdlklkgkpl      841 grgafggvie adafgidkta tcrtvavkml kegathsehr almselkili highhlnvvn      901 llgactkpgg plmvivefck fgnlstylrs krnefvpykt kgarfrqgkd yvgaipvdlk      961 rrldsitssq ssassgfvee kslsdveeee apedlykdf1 tlehlicysf qvakgmefla      1021 srkcihrdla arnilsekn vvkicdfgla rdiykdpyv rkgdarlpk wmapetifdr      1081 vtyiqsdvws fgvllweifs lgaspypgvk ideefcrrlk egtrmraptv ttpemyqtm1      1141 dcwhgepsqr ptfselvehl gnllqanaqq dgkdyivlpi setlsmeeds gls1ptspvs      1201 cmeeeeevcdp kfhydntagi sqylqnskrk srpvsvktfe dipleepevk vipddnqtds      1261 gmvlaseelk tledrtklsp sfggmvpks resvasegsn qtsgyqsgyh sdddttvys      1321 seeaellkli eigvqtgstq qilqpdsqtt lssppv</p>
17	NM_001716.4  ヒトCXCR5を コードする 例示的な 核酸配列	<p>1 aaaaaaaaaa agtgatgagt tgtgaggcag gtcgcggccc tactgcctca ggagacgatg      61 cgacgctcat ttgcattaaat ttgcagctga cggctgccc ctctcttagag gcacctggcg      121 gggagccctt caacataaga cagtgaccag tctggact cacagccggc acagccatga      181 actaccggct aacgtggaa atggacctcg agaacctgga ggacctgttc tgggacttgg      241 acagatgga caactataac gacacccccc tggtggaaaa tcatctctgc cctgccacag      301 agggccccc catggccctcc ttcaaggccg tggctgtcc cgtggccctac agcctcatct      361 tcctcttggg cgtgatccgc aacgtctgg tggctgtat cctggagccg caccggcaga      421 cacgcaggatc cacggagacc ttctgttcc acctggccgtt ggccgaccc ctgtggct      481 tcatcttgcc cttingccgtt ggcggaggctt ctgtggctt ggtcttgggg accttcct      541 gcaaaactgtt gattgcctt cacaaggtaa acttctactg cagcagccgtt ctctggct      601 gcatcgccgtt ggaccgtt acgtggccattt tccacggcggtt ccatgcctt cggccaccgg      661 gcctcccttc catccacatc acctgtggga ccattgtggctt ggtggccctt ctcttgc      721 tgccagagat tctttcgcc aaagttagcc aaggccatca caacaactcc ctggcacgtt      781 gcaccccttc ccaagagaac caagcagaaa cgcattgcgtt gttcacccctt cgattccct      841 accatgtggc gggattccgtt ctgccccatgc tgggtatggg tgggtgtt acgtggggtag      901 tgcacaggtt gcccaggccc cagccggcc ctccaggccca gaaggcgtt agggggcc      961 tcctgggtac aagcatcttcc ttccctgtt ggtcacccctt ccacatgtt atttccct      1021 acaccctggc gaggcttggaca atacctgtt gctgaatggc tctctccccc      1081 tggccatcac catgtgttag ttccttggcc tggccactt ctgcctcaac cccatgtct      1141 acacttcgc cggcgatgg ttcctgttcc acctgtcgcc gtcctgttcc aagctgggt      1201 gtacggccc tgcctccctt tgcctgttcc tccctgttcc ggcggaggac agtctct      1261 agtcagagaa tgcctccctt ctcaccatgtt ttcagggttcc agtgccttcc tttattgt      1321 cttttccctt gggcaggccatgttcc tgcctgttcc aacaggatgtt gggatcccaa      1381 gggcttccatgttcc tgcctgttcc tgcctgttcc tgcctgttcc tgcctgttcc tttattgt      1441 aaccccccatt tcttagaactt ccctgccttcc ttccttgcgtt gcccggggcc taggttgt      1501 cccaggggccatgttcc tcaaaaggccatgttcc ttccttgcgtt gcccggggcc taggttgt      1561 cccctggccatgttcc tcaaaaggccatgttcc ttccttgcgtt gcccggggcc taggttgt      1621 ctcttacttcc tgccttgccttcc aacggaggccatgttcc ttccttgcgtt gcccggggcc taggttgt      1681 cttagggccatgttcc tcaaaaggccatgttcc ttccttgcgtt gcccggggcc taggttgt      1741 gccaaggatgttcc tcaaaaggccatgttcc ttccttgcgtt gcccggggcc taggttgt      1801 gcaaggatgttcc tcaaaaggccatgttcc ttccttgcgtt gcccggggcc taggttgt      1861 aaggccatgttcc tcaaaaggccatgttcc ttccttgcgtt gcccggggcc taggttgt      1921 cctggccatgttcc tcaaaaggccatgttcc ttccttgcgtt gcccggggcc taggttgt      1981 caggccatgttcc tcaaaaggccatgttcc ttccttgcgtt gcccggggcc taggttgt      2041 gcccggggccatgttcc tcaaaaggccatgttcc ttccttgcgtt gcccggggcc taggttgt      2101 aggccatgttcc tcaaaaggccatgttcc ttccttgcgtt gcccggggcc taggttgt      2161 tggccatgttcc tcaaaaggccatgttcc ttccttgcgtt gcccggggcc taggttgt</p>

10

20

30

40

配列番号:	GenBank 受入番号 及び 説明	配列
		2221 ggaggctggc ttgtccccctc ctcaactccct tcccataaagc tatagacccg agggaaactca 2281 gagtcggAAC ggagaaaaggT ggactggaAG gggcccgTgg gagtcatCTC aaccatcccc 2341 tccgtggcat caccttaggc agggaaagtG aagaaacaca ctgaggcagg gaagccccca 2401 ggccccagga agccgtGCC tgcccccgTg aggatgtcac tcagatgaa ccgcagagaG 2461 ctgtccgtg ctgtttgtc cacttgggt gtgggaggCC cgtccggcag ttctgggtgc 2521 tccctaccac ctccccagcc ttgtatcagg tggggagtcA gggaccctg cccttgtccc 2581 actcaagcca agcagccaag ctccctggGA ggcccactg gggaaataac agctgtggct 2641 cacgtgagag tgcgttcacg gcaggacaac gaggaaGCC taagacgtcc ctttttctc 2701 ttagtatctc ctcgcaagct ggtaatcga tggggagtc tgaagcagat gcaaagaggc 2761 aagaggctgg attttgaatt ttctttttaa taaaaaggca cctataaaac aggtcaatac 2821 agtacaggca gcacagagac ccccggaaca agcctaaaaaa ttgtttcaaa ataaaaaacca 2881 agaagatgtc ttacatatt gtaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
18	NM_032966.2  ヒトCXCR5をコードする例示的な核酸配列	1 ccactctaag gaatgcggTC cctttgacAG gcggAAAact gaaggTTggAA aagacAAAGT 61 gatttggTCA aaattgaaAT ttagaaACTTG acatttggTC agtgggcCTT atgttaggAA 121 aaacctccAA gagagCTAGG gtccTCTCA gagaggAAAG acaggTCCTT aggtccTCAC 181 cctccCGTCT ccttgcCTT gcaggTCTGG gaactggACA gattggACAA ctataACGAC 241 acctccCTGG tggAAAATCA tcttgcCTT gccacAGAGG ggccCTCAT ggcCTCTTC 301 aaggccGTgt tctgtggcCTT ggcctacAGC ctcatCTTC tcctgggCgt gatcgGCAAC 361 gtctcggTGC tggtgatCCT ggagcggcAC cggcagACAC gcagtTCAC ggagacCTC 421 ctgttccacc tggccgtggc cgacCTCTG ctgttCTCA tcttgcCTT tgccgtggCC 481 gagggtCTG tgggctgggt cctggggACCT ttcttCTGCA aaactgtgt tgccCTGcAC 541 aaagtcaACT tctactgcAG cagcCTGTC ctggcCTGCA tcggcgtggA cgcgtacACTG 601 gccattgtcc acgcccgtcca tgcctaccgc caccggccGC tcctctccat ccacatcacc 661 tggggacca tctggctgggt gggcttccTC cttgccttgc cagagattCT ctgcgcAA 721 gtcagcCAAG gccatcacAA caactccCTG ccacgttGCA cctcttCCCA agagaACCA 781 gcaaaaaACGc atgcctggTT cacctccccGA ttccTCTACt atgtggccggg attcctgtc 841 cccatgtggT tgatgggtG tgctacgtG gggtagtGc acaggTTGcG ccaggcccAG 901 cggcgccCTC agcggcAGAA ggcagtcaGG gtggccatCC tggtagacaAG catcttCTC 961 ctctgtggT cacccTACCA catgtcatC ttctggACCA ccctggcGAG gctgaaggCC 1021 gtggacaATA cctgcaAGCT gaatggctCT ctccCTGTG ccacTACCCAT gtgtgatTC 1081 ctgggcCTGG cccactgtG cctcaACCCt atgtcttaca ctttgcCgg cgtgaatgtC 1141 cgcAGTgacc tgcgcggCT cctgacgAAG ctggcgttGA ccggccCTGC ctccCTGTG 1201 cagcttCCtCtCAGtCTGGCG caggAGCAGT ctctctgtAG cagagaATGc caccTCTCTC 1261 accacgttCT aggtcccAGT gtccccTTT attgtgtCTT ttccTGGGG caggcAGtGA 1321 tgctggatGc ttcttccAAAC aggAGCTGGG atcctaAGGG ctcaccgtgg ctaagatgt 1381 cctaggAGTA ttcttattG gggtagtGAG aggaacAAAC cccctatttCT agaacaATCCC 1441 tgccAGCTCT tctgcggCC ctggggctAG gctggagccc agggagcggA aagcagCTCA 1501 aaggcacAGT gaaggctGTC cttaACCCATC tgccACCCCCC tgggtGAGA gAACCTCAC 1561 cacttCCCAT CTAATCATC caatgtCAA gaaacaACTT ctacttCTGC ccttgcCAAC 1621 ggagAGGcC tggccCTCCC agaacaACTT ccatcAGCTT agggcgtGCT gacCTCCACA 1681 gctccCTCtC tcccttCTG cccacCTGtC aaacaAAAGCC agaagcgtGAG caccaggGGGA 1741 tgagtggagg ttaaggctGA gggaaaggCCa gctggcAGCA gagtgTggCC ttccggacaAC 1801 tcaGtCCtA AAAACACAGA cattctGCCA ggccccCAAG cctgcAGtCA tcttgcACCA 1861 gcaGGAAGCT cAGACTGGT gagttcAGGT agtgcCCCT ggctctGACC gaaacAGCgc 1921 tgggtccacc ccatgtcAcc ggatcctGGG tggtctGcAg gcaaggcgtGA ctcttagtGc 1981 cctggaggc cagccAGtGA cctgaggAAAG cgtGAaggCC gagaAGCAGAA aaaaACCC 2041 gacagaggGA agaaaaAGAGC ttcttCCCG aaccccaAGG agggagatGG atcaatCAA

配列番号:	GenBank受入番号及び説明	配列
		<p>2101 cccggcggtc ccctccgcca ggcgagatgg ggtggggtagt agaactccta gggtggtgg      2161 gtccaggggta tggggagggtt tggttcattga tggggaaaggga ggctggctt tccccctcct      2221 actcccttcc cataagctat agacccgagg aaactcagag tcggAACGGA gaaaggltgg      2281 ctggaaagggg cccgtggag tcatctcaac catcccccc tcggcatcac ctttaggcagg      2341 gaagtgttaag aaacacactg aggccaggaa gtcggccaggc cccaggaagc cggtccctgc      2401 ccccggtgagg atgtcactca gatggaaaccg caggaagctg ctccgtgttt gtttgcac      2461 ctgggggtgtg ggaggcccgt ccggcagttc tgggtgttcc ctaccaccc cccagccctt      2521 gatcagggtgg ggagtcaagg acccctgccc ttgtcccaact caagccaagc agccaagctc      2581 cttgggaggc cccactgggg aaataaacagc tgggtgttcc acggcaggca agccaaagg      2641 ggacaacggag gaagccctaa gacgtccctt ttttctctga gatctccctc gcaagctgg      2701 taatcgatgg gggagtctga agcagatgca aagaggcag aaggctggatt ttgaattttc      2761 tttttataaa aaaggcacct ataaaacagg tcaatacagt acaggcagca cagagacccc      2821 cggacaacagc ctaaaaattt tttcaaaaata aaaaccaaga agatgtctt acatattgt      2881 aaaaaaaaaaaaaaaa</p>
19	NP_116743.1 ヒトCXCR5前駆体の例示的なアミノ酸配列	<p>1 masfkavfvp vayslifllg vignvlvli lerhrqtrss tetflfhlav adlllvfilp      61 favaegsvgw vlgflcktv ialhkvnfycc sslllaiciav drylaivhav hayhrlls      121 ihitcgitiwl vgflalpei lfakvsqghh nnslprctfs qenqaethaw ftsrflyhva      181 gfllpmlvng wcyvgvvhrl rqaqrrpqrq kavrvalvt sifflcwspv hivifldtl      241 rlkavdntck lngslpvait mceflglahc clnpmltyfa gvkfrsdlsr lltklgctgp      301 aslcqlfpsw rrsslsesen atslttf</p>
20	NP_001707.1 ヒトCXCR5前駆体の例示的なアミノ酸配列	<p>1 mnyppltlemd lenledlfwe ldrldnyndt slvenhlcpa tegplmasfk avfvpvaysl      61 ifllgvignv lvlvilerhr qtrsstetfl fhlavadlll vfilpfavae gsvgvvlgtf      121 lcktvialhk vnfycsslll aciavdryla ivhavhayrh rrlslihite gtiwlvgfl      181 alpeilfakv sqghhnnslp rctfsqenqa ethawftsrif lyhvagflp mlvmgwcyvg      241 vvhrlrqaqqr rpqrqkavrv ailvtsiffi cwspvhifid ldtlarlkav dntcklngsl      301 pwaitmcefli glahcclnpm lytfagvkfr sdlsrlltkl gctgpaslcq lfpswrrssl      361 sesenatslt tf</p>
21	NM_031200.2 ヒトCCR9をコードする例示的な核酸配列	<p>1 gttcccttc tcgtgttggt atccggtagc tgcctgtca gaacccacaa agcctgcccc      61 tcatccagg cagagagcaa cccagcttt tccccagaca ctgagagctg gtgggtccct      121 ctgtccagg gagagttgc tcgccctca cagagcaggc ttgcattctca ctgacccacc      181 atgacacacca cagacttcac aagccctatt cctaacatgg ctgatgacta tggctctgaa      241 tccacatctt ccatggaaga ctacgttaac ttcaacttca ctgacttcta ctgtgagaaa      301 aacaatgtca ggcagttgc gagccatttc ctcccaccc ttgtactggct cgtgttcattc      361 gtgggtccct tggcaacag tcttgttact ctgtctact ggtactgcac aagagtgaag      421 accatgaccg acatgttccct ttgaatttg gcaattgtctg acctccctt tcttgtact      481 ctcccttctt gggccattgc tgctgtgac cagtggaaat tccagacccat catgtcaag      541 gtggtaaca gcatgtacaa gatgaacttc tacagctgtg tggtgtgtat catgtgcattc      601 agcgtggaca ggtacattgc cattgcccag gccatgagag cacatactt gaggagaaaa      661 aggctttgtt acagaaaaat ggttgtttt accatctggg tattggcagc tgctctctg      721 atccccaaaaa tcttatacag ccaaatcaag gaggaatccg gcatgtgttat ctgcaccatg      781 gtttacccta gcgatgagag caccacactg aagtcagctg tcttgaccct gaaggtcatt      841 ctggggttct tccttccctt cgtggcatg gttgtctact ataccatcat cattcacacc      901 ctgtatacaag ccaagaagtc ttccaagcac aaagccctaa aagtgaccat cactgtccctg      961 accgtcttttgc tcttgctca gttccctac aactgtcattt tggtgggtca gaccattgac      1021 gcctatgcca tggatcttc caactgtgcc gttccacca acattgacat ctgttccag</p>

10

20

30

40

配列番号:	GenBank受入番号及び説明	配列
		<p>1081 gtcaccaga ccatcgctt cttccacagt tgctgaacc ctgttctcta tgtttttgt      1141 ggtgagagat tccggcggga tctcgtgaaa accctgaaga acttgggttg catcagccag      1201 gcccagtggg ttccattac aaggagagag ggaagcttga agctgtcgta tatgttgc      1261 gagacaacct caggagact ctccctctga ggggtcttct ctgaggtgca tggttcttt      1321 ggaagaatgc agaaatacag aaacagtttc cccactgtat ggaccagaga gagtggaaag      1381 gaaaagaaaa ctcagaaagg gatgaatctg aactatatgaa ttactttag tcagaatttt      1441 ccaaagcaaa tatttcaaaa tcaactgact agtgcaggag gctgttgatt ggcttgc      1501 tgtgatgcc gcaattctca aaggaggact aaggacccgc actgtggagc accctggctt      1561 tgccactcgc cggagcatca atggcgctgc ctctggagga gccttggat ttctccatg      1621 cactgtgaac ttctgtggct tcagttctca tgctgcctt tccaaaaggg gacacagaag      1681 cactggctgc tgctcacagac cgccaaaagca gaaagttcg tgaaaatgtc catcttggg      1741 aaatttctca ccctgtctt gagcctgata accatgtcca ggtttatag attctgtatc      1801 tagaacctt ccaggcaatc tcagacctaa ttccctctg ttctcttgt tctgttctgg      1861 gccagtgaaag tgccttggtc tgatttgaa acgtctgca ggtttggca gtgaaccctt      1921 ggacaactga ccacacccac aaggcatcca aagtctgtt gtttccaatc catttctgt      1981 tcctgtgga ggtttttaacc tagacaagga ttccgttatt tccttggat ggtgacagt      2041 tcttccatg gcctgagcag ggagattata acagctgggt tcgcaggagc cagccttggc      2101 cctgtttagt gcttctctg ttgagttggca ctgtcttgg ttccaccgtc tgcgtctcc      2161 ctagaaaatgc ggctgttctt ttggccctc ttcttctca ggccactt attctgagga      2221 atacagttag cagatatggg caggagccag gttagggcaaa ggggtgaagc gcaggcttgg      2281 ctggaggctt atttacttcc atgttctcc ttcttact ctatagtgcc aacattttaa      2341 aagcttttaa ctttagagatt aggctaaaaaa aaataagtaa tggattcac ctgtgc      2401 ttgtgtctt tcttatcatg atttggcaaa atgcacatc tttgaaaata ttacatcat      2461 tggaaaatgt cttttaatg tgatataatgaa gatcatatc ttgtgcattt tctttaccc      2521 gtcataat ttttaatgtg tgcaattaaa gatcaatag atacatt</p>
22	NM001256369.1 ヒトCCR9をコードする例示的な核酸配列	<p>1 gcttccttc tcgtgttgc atcggttagc tgctgtca gaacccacaa agcctgcccc      61 tcatccagg cagagacaa cccagcttt tccccagaca ctgagagctg gtgggtgc      121 ctgtccagg gagatgtca tccggccatca cagagcaggc ttgcattctga ctgacccacc      181 atgacacccca cagacttcac attcctcca ggcccgctc cagatcacct tccctcgctg      241 gcccaggaaat ccatccctt ccaggacatt agccaggac taacacaagg cctattctca      301 acatggctga tgactatggc tctgaatcca catcttcat ggaagactac gttaaacttca      361 acttcaatgc ttctactgt gaaaaaaca atgtcaggca gtttgcggc catttcttcc      421 caccctgttgc ctggctcgat ttcatctgg gtgccttgg caacagtctt gttatcccttgc      481 tctactggta ctgcacaaga gtgaagacca tgaccat gttcccttgc aatttggca      541 ttgtgtaccc cctcttctt gtcacttcc cttctgggc cattgtgt gctgaccagt      601 ggaagtccca gacccatcgat tgcaagggtgg tcaacacat gtacaagatg aacttctaca      661 gctgtgtgtt gctgtatcgat tgcatcagcg tggacaggta cattgcattt gcccaggcc      721 tgagagcaca tacttggagg gaaaaaggc ttttgcacat caaatggtt tgctttacc      781 tctgggtatt ggcagctgt ctctgcattt cccatgttcc cccatgttcc tccatgttcc      841 aatccggcat tgctatctgc accatgtttt acccttagcgta tgagagcacc aaactgaagt      901 cagctgtctt gaccctgttgc gtcattctgg ggttcttcc tccatgttcc gtcattgttcc      961 gctgtatccat catcatcatt cacaccctgttacaaggccaa gaatgttcc aagcacaagg      1021 ccctaaaatgt gaccatcatc gtctgtaccg tctttgttcc gtcattgttcc ccctacaact      1081 gcatgttgc ggtgcaggacc attgacgcct atgcacatgtt catctccaaat tgcgttcc      1141 ccaccaacat tgacatctgc ttccaggatcc cccagacccat cgccttcttc cacatgttcc      1201 tgaaccctgt tctctatgtt tttgtgggtt agagatccg cccggatctc gtggaaaccc      1261 tgaagaactt ggggtgcattt agccaggccc agtgggttcc attacaagg agagagggaa</p>

10

20

30

40

配列番号:	GenBank 受入番号 及び 説明	配列
		<p>1321 gcttgaagct gtcgtctatg ttgcggaga caacccagg agcaactctcc ctctgagggg      1381 tcttctctga ggtgcattgt tctttggaa gaaatgagaa atacagaaaac agttcccc      1441 ctgatggac cagagagagt gaaagagaaa agaaaactca gaaagggatg aatctgaaact      1501 atatgattac ttgtatcg aatttgc当地 agcaaataatt tcaaatcaa ctgactatgt      1561 caggaggctg ttgtatggct ttgtatcg aatttgc当地 agcaaataatt tcaaatcaa ctgactatgt      1621 accggcactg tggagcaccc tggcttgc当地 actgc当地 gcatcaatgc cgctgc当地      1681 ggaggagccc ttggatttc tccatgc当地 gtgaacttct gtggcttgc当地 ttctcatgt      1741 gcctcttcca aaagggaca cagaagact ggctgtgt acagaccgca aaagcagaaa      1801 gttcgtgaa aatgtccatc tttggaaat ttcttaccct gcttgc当地 ctgataaccc      1861 atgc当地 ttatagatc ctgtatc当地 accttccatc gcaatctc当地 acctaattt      1921 ctctgttct ctttgc当地 ttctggccca gtgaaggatc ttgttctgtat ttgaaacgaa      1981 tctgc当地 ttgc当地 accccggac aactgaccac acccacaagg catccaaagt      2041 ctgttgc当地 ccaatccatt tctgtgttct gctggagggtt ttaacctt当地 caaggatcc      2101 gcttatttct tggatgtgtt acagtgttctc tccatggctt gaggcaggag attataacag      2161 ctgggttgc当地 aggaggccatc ctggccctg ttgtaggctt gttctgtt当地 gtggactt      2221 ctttgggttcc accgttgc当地 tgctcccttag aaaatgggtt ggttctttt当地 gccc当地      2281 ttctgaggcc cacttatttgc当地 tgaggaataac agtgaggc当地 tatggccagg      2341 ggcaaaagggg tgaagc当地 gc当地 ttgtgtt当地 aaggctt当地 acttccatgc ttctcc      2401 cttactatc agtggcaaca tttttaaaatc tttttaactt当地 gagatttaggc tgaaaaaaa      2461 aagtaatggaa attcacctt当地 gcatctttt当地 tgc当地 ttctt当地 atcatgattt当地 ggcaaaaatgc      2521 atcacctttt当地 aaaatattt当地 acatattt当地 aaagtgtttt当地 ttaatgtt当地 tatgaagcat      2581 taattactt当地 tcactt当地 taccctgtt当地 caatattt当地 achtgtt当地 gcaattaaagatc      2641 aaatagatac att</p>
23	NP_112477.1  ヒトCCR9前駆体の例示的なアミノ酸配列	<p>1 mptpdftspi pnmaddyse stssmedyvn fnftdfycekn nnvqrashf lpplywlvi      61 vgalgnslvi lvywyctrkv tmdmflnlai aiadllflvt 1pfwaiaaad qwkfqtfmck      121 vvnsmymknnf yscvllimci svdryiaiaq amrahtwrek rllyskmvcf tiwlaaalc      181 ipeilysqik eesgiaictm vypsdestklks ksavtlkvi lgfflpfvm accytiiht      241 liqakksskh kalkvtitvl tvfvlsqfpv ncillvqtid ayamfisnca vstnidicfq      301 vtqtiaffhs clnpvlyfvf gerfrdlvk tlknlgcisq aqwvsftrre gsklssml      361 ettsgalsl</p>
24	NP_001243298.1  ヒトCCR9前駆体の例示的なアミノ酸配列	<p>1 maddygsest ssmedyvnfn ftdfycekn vrqfashfpli pliywlvfiv algnslvli      61 ywyctrvktm tdmflnlai adllflvtlp fwaiaaadqwf kfqtfmckvv nsmyknnfys      121 cvllimciv dryiaiaqam rahtwrekrl lyskmvcfti wvlaaalcip eilysqikee      181 sgiaictmvy psdestklks avltlkvi lgfflpfvm accytiihtli qakksskhka      241 lkvtitvl tvfvlsqfpync illvqtiday amfisnca vstnidicfqv qtiaffhscl      301 npvlyfvge rfrrdlvk tlnlgcisq aqwvsftrreg lklssmllet tsgalsl</p>
25	NM_000885.4  ヒトα4をコードする例示的な核酸配列	<p>1 ataacgttctt tgc当地 ttttccca gggccctcg gegagtctt ttgtttgg      61 ttttgggg ttttgggg ttttgggg ttttgggg ttttgggg ttttgggg ttttgggg      121 aagacacagt gtttactatc caacgaaaga actggacggc tcccccggc agtcccactc      181 cccgagggtt tggctggcat ttggccacgg ccggggctggg cggccacggc gagggggc      241 cagtttgggg ttttgggg ttttgggg ttttgggg ttttgggg ttttgggg ttttgggg      301 tgccccatca ggtccgctt tgc当地 gagccatcc cgc当地 ctgc当地 gagcc      361 gccccggccca ggacgccc当地 cctgc当地 cggccatcc cgc当地 ctgc当地 gagcc      421 cgtaggccaga gacggagccc ggc当地 ctgc当地 cggccatcc cgc当地 ctgc当地 gagcc      481 gccccgtacc cggagaagca gc当地 cggccatcc cgc当地 ctgc当地 gagcc</p>

10

20

30

40

配列番号:	GenBank 受入番号 及び 説明	配列
		541 gagtagggccc gggcgagtgcc gcgccatccc aggccggccc gaacgctccg cccgcgggtgg 601 gccgacttcc cctcccttc cctctctct tccttttagcc cgctggcgcc ggacacgctg 661 cgccctcatct ctggggcggt tcttccccgt tgccaaccg tgcacatcccg tgcaactttg 721 gggtagtgtgc cgtagtgtgt tgaatgttcc ccaccgagag cgcatggctt gggaaagcgag 781 gcgcgaaccc ggcccccgaa gggccgcgtt cccggagacg gtatgtgt tgctgtgcct 841 gggggtccccg accggccgcc cctacaacgt ggacactgag agcgcgcgtgc ttaccagg 901 cccccacaac acgctgttcg gctactcggt cgtgctgcac agccacacgggg cgaaccgatg 961 gctcttagtg ggtgcggcca ctgccaactg gctgcaccaac gttcagtga tcaatccccgg 1021 ggcgatttac agatgcagga tcgaaaagaa tcccgccag acgtgcac acgtccagat 1081 gggtagccct aatggagaac ctgtggaaa gacttgggtttaa gaagagagag acaatcgtg 1141 gttgggggtc acacttcca gacagccagg agaaaaatggaa tccatcgtga ctgtggcc 1201 tagatggaaa aatatatttt acataaagaa tggaaaataag ctccccactg gtgggtgc 1261 tggagtgcctt cctgatttac gaacagaact gagtaaaaga atagctccgtt gttatcaaga 1321 ttatgtggaaa aaatttggag aaaatttgc atcatgtcaa gctggaaatataat ccagttttt 1381 cacaaaggat ttaattgtga tggggggccc aggtatct tactggactg gctctctt 1441 tgtctacaat ataactacaa ataaataacaa ggttttttt gacaaacaaa atcaagtaaa 1501 atttggaaat tattttggat attcagtccgg agctggatcat ttcggagcc agcataactac 1561 cgaagtatgc ggaggagctc ctcaacatga gcagattgtt aaggcatata tattcagcat 1621 tggatggaaa gaactaaata tcttacatga aatggaaatggg gggatgtt gatcgtact 1681 tggagcttct gctctgtct tggacactcaa tgcagatggc ttctcagatc tgctcgtgg 1741 agcaccatg cagagcacca tcagagagga aggaagatgtt tttgtgtaca tcaactctgg 1801 ctccggagca gtaatgaatg caatggaaac aaacccctgtt ggaagtgaca aatatgcgc 1861 aagatttggg gaatctatag ttaatcttgg cgacatttgc aatgtggct ttgaagatgt 1921 tgctatcgga gtcacaaag aagatgtactt gcaagggtctt atttatattt acaatggcc 1981 tgcagatggg atctcgtaa ccttctcaca gagaattggaa ggacttcaga tcagcaatc 2041 gttaaatgtt tttggacatgtt ctatatcagg acaaatttgcatgtt gcaatgtt atggctatgt 2101 agatgttagca gttttgtctt ttccgtgtca ttctcgtgtc ttgctaaggaa caagacatgt 2161 agtaatgtt gacgttctt taagccaccc tgagtca gtaatggaa aatggatgtt 2221 tggatggaaaat ggatggctt ctgtgtgc gatgttca aatggatgtt catataagg 2281 caaggaatgtt ccaggatgtt tttttttttt ttataacatg agtttggatg tgaacagaaaa 2341 ggcagatgtt ccaccaatgtt tcttatttctt ttctaatggaa acttctgtacg tgattacagg 2401 aagcatatcag gtgtccagca gagaagctaa ctgttagaaca catcaagcat ttatgcgg 2461 agatgtgcgg gacatctca ccccaatttca gattggatgtt gtttaccacc ttggctctca 2521 tgcacatgtt aaacaaatgtt cagaggattt cccaccatctt cagccaaatc ttccatgg 2581 gaaagaaaaa gacataatgtt aaaaaacaaat aaactttgtt gggatgtt cccatgg 2641 ttgttctgtt gatttacagg ttctcttgc gatgttgc gatgttgc gatgttgc 2701 aacatatctt gctgttggaa gatgttgc gatgttgc gatgttgc gatgttgc 2761 tggatgtatgtt gcatatgtt gatgttgc gatgttgc gatgttgc gatgttgc 2821 taagatgtt gggatgtt gatgttgc gatgttgc gatgttgc gatgttgc 2881 ggtacaactt gactgttgc gatgttgc gatgttgc gatgttgc gatgttgc 2941 tagcttctt cttgtgtt gatgttgc gatgttgc gatgttgc gatgttgc 3001 gcatgttgc gatgttgc gatgttgc gatgttgc gatgttgc gatgttgc 3061 agcaatgtt gatgttgc gatgttgc gatgttgc gatgttgc gatgttgc 3121 atttggatgtt gatgttgc gatgttgc gatgttgc gatgttgc gatgttgc 3181 cttaacttccatgtt gatgttgc gatgttgc gatgttgc gatgttgc gatgttgc 3241 aatggatgtt gatgttgc gatgttgc gatgttgc gatgttgc gatgttgc 3301 gactactact ggagaatgtt gatgttgc gatgttgc gatgttgc gatgttgc 3361 aaagatgtt gatgttgc gatgttgc gatgttgc gatgttgc gatgttgc
		10
		20
		30
		40



配列番号:	GenBank 受入番号 及び 説明	配列
	ヒト $\beta$ 7をコードする例示的な核酸配列	<p>121 gcccagagag aaagtctgac ttgccccaca gccagttagt gactgcagca gcaccagaat      181 ctggctgtt tcctgtttgg ctcttctacc actacggctt gggatctcg gcatggtggc      241 ttggccatg gtcctgttt tgctgttgtt cctgagcaga ggtgagatgt aattggacgc      301 caagatccc tccacaggaa atgccacaga atggcgaaat cctcacctgt ccatgctggg      361 gtccctggccag ccagccccct cctgccagaa gtgcattctc tcaacacccca gctgtgcata      421 gtgcacgaa ctgaactca cccgcgtggg agaggcgag ggcggcgct gcgcggcagc      481 agaggagctg ctggctcgag gctgcccgt ggaggagctg gaggagcccc gcggccagca      541 ggagggtctg caggaccagg cgctcagcca gggcggccgc ggagagggtg ccacccagct      601 ggcggccgcag cgggtccggg tcacgtcg gctgtgggag cccacggcgc tccagggtcc      661 cttcccttgt gctgaggat accccgtggg cctgtactac cttatggacc tgagactact      721 catgaaggac gacctggaa acgtgtggca gctcgccac gctctgtgg tccggctgca      781 ggaagtacc cattctgtgc gcattgtttt tggttccctt tggtacaaaa cggtgctgccc      841 ctttgtgagc acaglaccct ccaaactgcg ccacccctgc cccacccggc tggagcgtcg      901 ccagtccacca ttccatgttcc accatgtgct gtcctgtggc ggggacgcac aaggcttcga      961 gcgagggtg gggccgcaga gtgtgtccgg caatctggac tccgcctgaag gtggcttcga      1021 tgccatctg caggctgcac tctgcccgg gcaatggc tggagaaaatg tggccggct      1081 gctgggttcc acttcagacg acacattcca tacagctggg gacggaaatg tggccggcat      1141 tttcatgccc agtgtatggc actgcccattt ggacagacaat ggctctaca gtcgcagcac      1201 agagtttgac tacccttctg tgggtcagg agcccgaggcc ctctctgcag caaatatcca      1261 gcccattttt gctgtccacca gtggccactt gctgtctac caggagctgta gtaaaactgat      1321 tcctaagtct gcaatgggg agctgatgtgaa ggactccagc aacgtggta agctcatcat      1381 ggatgtttat aatacgttgc ttccaccgtt gacccttggaa cactcttacat tccctcttgg      1441 ggtccacattt tcttacaaat cccatgtgtgaa gggccttgcg aagaggagg gtaaggctgaa      1501 ggatcgagga cagtcaacc acgtccgaaat caaccaggacg gtgactttctt gggtttctt      1561 ccaaggccacc cactgcctcc cagagccccca tctccgtggg ctccggggcc ttggcttctt      1621 agaggagctg attgtggagt tgccacatcg gttgtactgt aattgtcgtg acacccaggc      1681 ccaggctccc cactgcgtg atggccaggg acacccatcaa tgggtgttat gcaatgtgc      1741 cccctggccgc ctggatgttgc tctgtgttttgc gatgtgttgc cccctggccgc      1801 ggaatctggg tgccggctt ccaatggcac agggccctgg tggcgtggaa agggctactg      1861 tcaatgtggaa cgtgtcgatc gcaatggaca gagctctggg catctgtcg gttgtgacgaa      1921 tgccatgtgtt gaggcataatc tggatgtggcc tttggatgttgc gcaatgtgg      1981 agatgttgc tggatgtggcc accgcacggg cagagcatgc gaatgtcgtg gggacatgg      2041 cagttgcacatc agtcccgggg gagggtctg cagttggatc ggacgctgca aatgcaccc      2101 ctggccatgtc ttggatgtggcc actatgttgc tctatgtcgac caatggccgg gctgcaccc      2161 accatgtcgatc agacaccggg actgtcgaga gtgtggggcc ttccaggactg gcccactggc      2221 caccaactgc agtacatgtt gtggccatatac caatgtcgacc ctggccctgg cccctatctt      2281 ggatgtatggc tggatgtggcc agggccctt gggccatccat gggccatccat tcttggatgtgg      2341 ggatgtatggc agggccatgg tcgtgtcgatc agtgcgttccca aagaaaagg gggccatccat      2401 cacgcaggcc attgtgttgc gctgtgttgc gggccatgtg gcaatgtggcc tggggatgtgg      2461 cctggccatc cggccatcg tggatgtggcc gggccatccat gggccatccat tggggatgtgg      2521 ggatgtatggc caactcaact ggaatgtggcc cgtatgtggcc ctctacaaaa gggccatccat      2581 gaccacccatc aatcttcgtt ttcacatgtggcc agacatgtggcc actctctgaa gggccatccat      2641 acacttaccc aaggcttccatc tccatgtggcc acatgtggcc tggggatgtggcc agggccatccat      2701 tgggtctgttca agacccatgttggcc gggccatccat ttcacatgtggcc gggccatccat tggggatgtgg      2761 ttcattttca gaggcataatc tggatgtggcc gggccatccat ttcacatgtggcc gggccatccat      2821 tgggtctatcc caccaatgttca tacaatgtggcc gggccatccat ttcacatgtggcc gggccatccat</p>
27	NP_000876.3	1 mawearrepgrrraavretv mlllclgvpt grpynvdtes allyqgphnt lfgysvvvlhs

10

20

30

40

配列番号:	GenBank受入番号及び説明	配列
	ヒト $\alpha$ 4前駆体の例示的なアミノ酸配列	<p>61 hganrwllvg aptanwlana svinpaiyr crigknpgqt ceqlqlgspn gепcгktcle      121 erdnqwlgt lsrqpgengs ivtcghrwkn ifyiknenkl ptggcygvpp dlrtelskri      181 apcyqdyvkk fgenfascqa qissfytkdl ivmgapgssy wtgslfvyni ttnkykaflid      241 kqnqvkgfgy lgysvgaghf rsqhtevvg gapqheqigk ayifsideke lnihemkgs      301 klgsyfgasv cavdlnadgf sdllvgapmq stireegrvf vyinsgsgav mnametnlvg      361 sdkyaarfge sivnlgdidn dgfedvaiga pqeddlqgai yiyngradgi sstfsqrieg      421 lqiskslsmf gqsisqqida dnngyvdvav gafrsdsavl lrtrpvvivid aslshpesvn      481 rtkfdcveng wpsvcidltl cfsykgkevp gyivlfynms ldvnrktaesp prfyfssngt      541 sdvitgsiqv ssreancrth qafmukdvrd iltpiqieaa yhlghphvisk rsteefppplq      601 pilqqkkekdm imkktnfar fcahencsad lqvsakigfl kphenktyla vgsmtkmln      661 vslfnagdda yettlhvklp vglyfikile leekqincev tdnsgvvqld csigiyiyvdh      721 lsridisfll dvsslsraee dlsitvhac eneeemdnlk hrsrvtvaipl kyevkltvhg      781 fvnpptsfvyg sndenepetc mvekmnlthf vintgnsmmap nvsveimvpn sfspqtdklf      841 nildvqttt echfenyqrv caleqqksam qtlkgivrfi sktdkrllyc ikadphclnf      901 lcnfgkmesg keasvhqle grpsilemde tsalkfeira tgfpepnprv ielnkdenva      961 hvlleglhq rpkryftivi issllllgli vlllisyyvw kagffkrqyk silqueenrrd      1021 swsyinsksn dd</p>
28	NP_000880.1 ヒト $\beta$ 7前駆体の例示的なアミノ酸配列	<p>1 mvalpmvlv l1vlsrgese ldakipstgd atewrnphls mlgsccpaps cqkcilshps      61 cawckqlnft asgeaearrc arreellarg cpleeleepr ggqevlqdqp lsqgargega      121 tqlapqrsvr tlrpgepqq qvrlfraegy pvdlyylmdl sysmkddler vrqlghallv      181 rlqevthsvr igfgsfvdkt vlpfvstvps klrhpcptrl ercqspfsfh hvlsltgdaq      241 aferevgrqs vsgnldspesq gfdaillqaal cceqigwrnv srlvvftsdd tfhtagdgkl      301 ggifmpsdgh chldsnnglys rstdfyps vqvaqalsaa niqpfavts aalpvyqels      361 klipksavge lsedssnnvvq limdaynsls stvtlehssl ppgvhisyes qcegpekre      421 kaedrgqcnh vrinqtvtfw vslqathclp ephllrlral gfseelivel htldcdncsd      481 tqpqaphcsd ggghlqcgvc scapgrlgrl cecsvaelss pdlesgcrap ntgplcsgk      541 ghcgcrsc sggssghlce cddascerhe gilcggfgrc qcgvchchan rtgracecsg      601 dmdscispeg glcsghgrck cnrcqclgdy ygalcdqcpq cktpcerhrd caecgafrtg      661 platncstac ahtntlala pilddgwcke rtldnqlfff lveddargtv vlrvrpgekg      721 adhtqaivlg cvggivavgl glvlayrlsv eiydrreysr fekeqqqlnw kqdsnplyks      781 aitttinprf qeadsptl</p>
29	NM_016602.2 ヒトCCR10をコードする例示的な核酸配列	<p>1 agagatgggg acggaggcca cagagcagggt ttcttgggc cattactctg gggatgaaga      61 ggacgcatac tcggctgagc cactgcccga gtttgcatac aaggccgatg tccaggccct      121 cagccggggcc ttccaaacca gtgtctccct gaccgtggct gggctggcc tggccggcaaa      181 tggcctggtc ctggccaccc acctggcagc cgcacgcgc ggcgcgtcgc ccacctctgc      241 ccacctgctc cagctggccc tggccgacct ctgtctggcc ctgactctgc ctttcggggc      301 agcaggggct cttcagggtt ggagtctggg aagtgcacc tgcgcacca tctctggcc      361 ctactcggcc tccttccacg ccgcgttccct ctgcgtggcc tgcgtcgcgc ccgaccgcata      421 cgtggccatc gcgcgagcgc tcccaggccgg ggcgcggcc tccactcccg ggcgcgcaca      481 cttggcttc gtcatcggtt ggctgtgtc actgtctctg ggcgtgcctg cgctgtctt      541 cagccaggat gggcagcggg aaggccaaacg acgcgtgcgc ctcatcttc ccgagggcc      601 cacgcagacg gtgaaggggg cgagcgcgtt ggcgcagggtt ggcgcgtggcc tgcgcgtgcc      661 gctggccgtc atggtagctt gctacgcgtc tctggccgc acgctgcgtt ggcgcagggg      721 gccccagcgc cggcgtgcgc tgcgcgtgtt ggtggctctg gttggccct tgcgtggct      781 gcagctgccc tacagectcg ccctgtgtt ggatactgcc gatctactgg ctgcgcgcga      841 gcccggactgc cctggcagca aacgcagga tgctgcactg ctgggtgacca gcccgttggc</p>

10

20

30

40

配列番号:	GenBank受入番号及び説明	配列
		901 cctcgccgc tggcctca atccgttct ctacgccttc ctgggcctgc gcttccgcca 961 ggacctgcgg aggctgtac ggggtggag ctgcctcga gggctcaac cccgcgcgg 1021 ctgccccgc cggccccgc ttcttcctg cttagctccc acggagaccc acagtctctc 1081 ctgggacaac taggctgca aatctagagg agggggcagg ctgagggtcg tggaaaggg 1141 gagtaggtgg gggaaactg agaaagaggc agggaccta agggactacc tctgtgcctt 1201 gccacattaa attgataaca tgaaaatgag atgcaaccca acaa
30	AF215981.1 ヒトCCR10をコードする例示的な核酸配列	1 agagatgggg acggaggcca cagagcagggt ttccctggggc cattactctg gggatgaaga 61 ggacgcatac tcggctgagc cactgcggga gctttgtac aaggccgtat tccaggcctt 121 cagccggggcc ttccaaccca gtgtctccct gaccgtggct ggcgtgggc tggccggcaa 181 tggcctggtc ctggccaccc acctggcagc cgcacgcgca cgcgcgtcgc ccacctctgc 241 ccacctgtc cagctggccc tggccgaccc ctgtctggcc ctgactctgc ctttcgcggc 301 agcaggggct cttcagggtt ggagctgggg aagtgcaccc tgccgcacca tctctggctt 361 ctactcggcc tccttccacg ccggcttctt ctccctggcc tgcgtatcagcg ccgaccgcata 421 cgtggccatc gcgcgagcgc tcccaaggccgg gccgcggccca tccactcccg gccgcgcaca 481 ctgggtctcc gtcatcgatgtt ggctgtgtc actgtcttgc ggcgtgcctg cgctgtctt 541 cagccaggat gggcagcggg aaggccaaagc acgtgtcgc ctcatcttc ccgaggggctt 601 cacgcagacg gtgaagggggg cgagcgcgtt ggcgcagggtt gcccctgggtt tcgcgtgc 661 gctggcgctc atggtagctt gctacgcgtt tctggccgc acgtgtctgg ccgcagggggg 721 gcccggcgc cggcgtgcgc tgcgcgtcgtt ggtggctctg tgccgcggct tgcgtgtgt 781 gcagctgccc tacagectcg ccctgtgtt ggatactgcc gatctactgg ctgcgcgcga 841 gcggagctgc cctggccagca aacgcacca tgtcgcactg ctgggtgacca gccgcgttggc 901 cctcgccgc tggcctca atccgttct ctacgccttc ctgggcctgc gcttccgcca 961 ggacctgcgg aggctgtac ggggtggag ctgcctcga gggctcaac cccgcgcgg 1021 ctgccccgc cggccccgc ttcttcctg cttagctccc acggagaccc acagtctctc 1081 ctgggacaac taggctgca aatctagagg agggggcagg ctgagggtcg tggaaaggg 1141 gagtaggtgg gggaaactg agaaagaggc agggaccta agggactacc tctgtgcctt 1201 gccacattaa attgataaca tgaaaatgaa aaaaaaaaaaaaaaaa aaaa
31	NP_057686.2 ヒトCCR10前駆体の例示的なアミノ酸配列	1 mgteateqvs wghysgdeed aysaeplpel cykadvqafs rafqpsvslt vaalglagng 61 lvlathlaar raarsptsah llqlaladll laltpfaaa galqgwslgs atcrtisgly 121 sasfhagflf lacisadryv aiaralpagp rpsptgrahl vsvivwllsl llalpallfs 181 qdgqregqrr crlifpeglt qtvkgasava qvalgfalpl gvmvacyall grtlllaargp 241 errralrvvv alvaafvvlq lpyslalld tadllaarer scpaskrkdv allvtsglal 301 arcglnpvly aflglrfrqd lrrllrggsc psgpqprrgc prrprlsscs aptethsllsw 361 dn
32	P46092.3 ヒトCCR10前駆体の例示的なアミノ酸配列	1 mgteateqvs wghysgdeed aysaeplpel cykadvqafs rafqpsvslt vaalglagng 61 lvlathlaar raarsptsah llqlaladll laltpfaaa galqgwslgs atcrtisgly 121 sasfhagflf lacisadryv aiaralpagp rpsptgrahl vsvivwllsl llalpallfs 181 qdgqregqrr crlifpeglt qtvkgasava qvalgfalpl gvmvacyall grtlllaargp 241 errralrvvv alvaafvvlq lpyslalld tadllaarer scpaskrkdv allvtsglal 301 arcglnpvly aflglrfrqd lrrllrggsc psgpqprrgc prrprlsscs aptethsllsw 361 dn
33	NM_005201.3 ヒトCCR8を	1 tttgttagtgg gaggataacct ccagagaggc tgctgtcat tgagctgcac tcacatgagg 61 atacagactt tgtgaagaag gaattggcaa cactgaaacc tccagaacaa aggctgtcac 121 taaggtccccg ctgccttgat ggattataca ctggaccta ctgtgacaac agtgaccgac

10

20

30

40



配列番号:	GenBank受入番号及び説明	配列
35	NP_005192.1 ヒトCCR8前駆体の例示的なアミノ酸配列	<pre> 1 mdytldlsvt tvtdyyypdi fsspcdaeli qtngklllav fycllfvfsl lgnslvilvl 61 vvckklrsit dvylnlals dllfvfsfpf qtyylldqvw fgtvvmckvvs gfyyigfyss 121 mffitlmsvd rylavvhavy alkvrtrimg ttlclavwl aimatipllv fyqvasedgv 181 lqcysfynqq tlkwkiftnf kmnilgllip ftifmfcyik ilhqlkrcqn hnktkairlv 241 livviasllf wvpfnvvlfl tslhsmhild gcsisqqlty athvteiisf thccvnpviy 301 afvgefkhh lseifqkscs qifnylgrqm presceksss cqghssrssss vdyil </pre>
36	AAI07160.1 ヒトCCR8前駆体の例示的なアミノ酸配列	<pre> 1 mdytldlsvt tvtdyyypdi fsspcdaeli qtngklllav fycllfvfsl lgnslvilvl 61 vvckklrsit dvylnlals dllfvfsfpf qtyylldqvw fgtvvmckvvs gfyyigfyss 121 mffitlmsvd rylavvhavy alkvrtrimg ttlclavwl aimatipllv fyqvasedgv 181 lqcysfynqq tlkwkiftnf kmnilgllip ftifmfcyik ilhqlkrcqn hnktkairlv 241 livviasllf wvpfnvvlfl tslhsmhild gcsisqqlty athvteiisf thccvnpviy 301 afvgefkhh lseifqkscs qifnylgrqm presceksss cqghssrssss vdyil </pre>
37	NM_005508.4 ヒトCCR4をコードする例示的な核酸配列	<pre> 1 gctcacagga agccacgcac ccttggaaagg caccgggtcc ttcttagcat cgtgcttcct 61 gagcaagcct ggcattgcct cacagacctt cctcagaccc gctttcagaa aagcaagctg 121 cttctgttg ggccagacc tgccttgagg agcctgtaga gttaaaaat gaaccccacg 181 gatatacgac acaccaccc ctgcataaagc atatacagca attactatct gtatgaaagt 241 atccccaaac cttgcaccaa agaaggcatc aaggcattt gggagctt cctgccccca 301 ctgtatccct tggttttgtt atttggcttg ctggaaatt ctgtgggtt tctggctctg 361 ttcaaataca agcggctcgtt gtcctgtact gatgtgtacc tgctcaaccc tgccatctcg 421 gatctgtct tcgtgtttt cctccctttt tggggctact atgcagcaga ccagtgggtt 481 tttgggctag gtctgtgcaaa gatgatttcc tggatgtact tggggctt ttacagtggc 541 atattcttg tcatgtcat gaggatgtt agataacctt caatttgtca cgggtgttt 601 tccttgaggg caaggacccctt gacttatggg gtcatcacca gttggctac atggtcagtg 661 gctgtgttcg cctcccttcc tggcttctg ttcagcactt gttatactga ggcacccat 721 acctactgca aaaccaagta ctctctcaac tccacgacgtt ggaaggctt cagctccctg 781 gaaatcaaca ttctcgattt ggtatcccc tttaggatca tgctgtttt ctactccatg 841 atcatcagga ccttgcacca ttgtaaaaat gagaagaaga acaaggcgtt gaagatgatc 901 tttggcttgg tggctctt ccttgggttc tggacacccctt acaacatagt gctcttccat 961 gagaccttgg tggagctaga agtcccttcc gactgcaccc ttgaaagata ctggactat 1021 gccatccagg ccacagaaac tctggctttt gttcaactgtt gccttaatcc catcatctac 1081 tttttctgg gggagaaatt tcgcaagtac atcctacagc tcttcaaaac ctgcaggggc 1141 ctttttgtgc tctgccaata ctgtggctc ctccaaattt actctgtga caccggccagc 1201 tcatcttaca cgcgttccac catggatcat gatctccatg atgctgtga gaaaatgaa 1261 atggtaaaat gcagactcaa tgaacttcc acatccagag cttaactttaa attgtatttt 1321 agtaagagat tcctgagcca gtgtcaggag gaaggcttcc acccacagtg gaaagacagc 1381 ttctctatcc tcaggcactt tttctctcc cactagacaa gtcagccctg gcaagggttc 1441 acctgggctg aggcatccctt cctcacacca ggcttgcctg caggcatgag tcagtctgt 1501 gagaactctg agcagtgctt gaatgaagtt gttagtaata ttgcaaggca aagactattc 1561 ccttctaaacc tgaactgtat ggttctcca gagggattt cagagacttg gctgtatggag 1621 taaaatcgcta ccttttgcgtt tggcaaatgg gccctct </pre>
38	P51679.1 ヒトCCR4前駆体の例示的なアミノ酸配列	<pre> 1 mnptdiadtt ldesiysnyy lyesipkpc tkegikafgel flpplyslvf vfgllgnsvv 61 vlvlfkykrl rsmtdvylln laisdllfvf slpfwgyaa dqwvfglgc kmiswmylvg 121 fysgiffvml msidrylaiv havfslrart ltygvitsla twsvavfasl pgflfstcyt 181 ernhytcktk yslnstattkv lssleinilg lviplgimlf cysmiirtlq hcknekknka 241 vkmifavvvl flgfwtptyni vlfletlvel evlqdctfer yldyaiqate tlafvhccln </pre>

10

20

30

40

配列番号:	GenBank受入番号及び説明	配列
		301 piiyfflgek frkyilqlfk tcrglfvlcq ycglqlqysa dtpsssytsq tmdhdlhdal
39	NM_001206609.1 ヒトCLAをコードする例示的な核酸配列	1 aatcatccga gaaccttggaa gggtgacag tgccccc tt acagatgaga aaactgaggc 61 ttgaaggggaa gaagcagctg cctctggcg catggcttc ggctgcggaa tgcccatggaa 121 gtctgttgtg accctaggcc tgggtctcggtt ctcccttgc tgaacttggaa caggaagatg 181 gcagtggggcc ccagtggctt agaaggagat aagatggctg gtgcattgcc tctgcaactc 241 ctccctttgc tggatctact gggccctggc aacagcttgc agctgtggaa cacctggca 301 gatgaagcccg agaaaaggccctt gggccccctt ctgtccccggg accggagaca ggcaccggaa 361 tatgatgttccat tagattatgtt tttccctggcca gaaacggggcc tcccgaaaaat gctgaggaaac 421 agcaactgaca ccactcttgc gactggggctt ggaacccctt agtcttaccat tggggggcc 481 gctgcatttttttgc gttctactgg cctggatgtca ggagggggccat tcaacagatg gaccacgggg 541 ctggccaaaca tggggaaacctt gtcacccggat tcaagcgttca tggagatata gaccactcaa 601 ccacccggccca cggggccaca gaccacttcaaa ccagtgcggca cggggccaca gaccacttca 661 ctggcggccca cggggccaca gaccacttcaaa ctggcggccca cggggccaca gaccacttca 721 ctggcggccca cggggccaca gaccacttcaaa ccacccggccca cggggccaca gaccacttca 781 cccacccggccca cggggccaca gaccacttcaaa ccacccggccca cggggccaca gaccacttca 841 ccacccggccca tggggccaca gaccacttcaaa ccacccggccca cggggccaca gaccacttca 901 accacccggccca tggggccaca gaccacttcaaa ccacccggccca cggggccaca gaccacttca 961 cccacccggccca cggggccaca gaccacttcaaa ctggcggccca tggggccctt gtcacccggaa 1021 cccacccggccca cggggccctt gtcacccggaa cccatccatccaa aacccggat tttccatcc 1081 ttttctgtgtt cctctgttac tcacaaggccat ttttccatgg ctttccatggaa ttttccatgg 1141 aactacccttgc tggggccccc agaccatc ttttccatgg ctttccatggaa ttttccatgg 1201 atcttggccgc tggggccac tatcttccatgg ttttccatgg ctttccatggaa ttttccatgg 1261 tccctggccca cccatccatgg ctttccatgg ctttccatggaa ttttccatgg 1321 tcacccctgtt tccctggccca cccatccatgg ctttccatgg ctttccatggaa ttttccatgg 1381 aaggccaaaga gcccccggccat gacccatccatgg ctttccatgg ctttccatggaa ttttccatgg 1441 accctggccca cccatccatgg ctttccatgg ctttccatgg ctttccatggaa ttttccatgg 1501 cacccggccat cccatccatgg ctttccatgg ctttccatgg ctttccatggaa ttttccatgg 1561 tcggagaccc cccatccatgg ctttccatgg ctttccatgg ctttccatgg ctttccatgg 1621 agacccggccat cccatccatgg ctttccatgg ctttccatgg ctttccatgg ctttccatgg 1681 tggggccat cccatccatgg ctttccatgg ctttccatgg ctttccatgg ctttccatgg 1741 tccctggccca cccatccatgg ctttccatgg ctttccatgg ctttccatgg ctttccatgg 1801 cccatccatgg cccatccatgg ctttccatgg ctttccatgg ctttccatgg ctttccatgg 1861 catccatccatgg cccatccatgg ctttccatgg ctttccatgg ctttccatgg ctttccatgg 1921 ggacatccatgg cccatccatgg ctttccatgg ctttccatgg ctttccatgg ctttccatgg 1981 cccatccatgg cccatccatgg ctttccatgg ctttccatgg ctttccatgg ctttccatgg 2041 gttccatccatgg cccatccatgg ctttccatgg ctttccatgg ctttccatgg ctttccatgg 2101 ctgtgtggac caaggatccat cccatccatgg ctttccatgg ctttccatgg ctttccatgg 2161 tccctggccca cccatccatgg ctttccatgg ctttccatgg ctttccatgg ctttccatgg 2221 aggtccatccatgg cccatccatgg ctttccatgg ctttccatgg ctttccatgg ctttccatgg 2281 caaggatccat cccatccatgg ctttccatgg ctttccatgg ctttccatgg ctttccatgg 2341 gttccatccatgg cccatccatgg ctttccatgg ctttccatgg ctttccatgg ctttccatgg 2401 gttccatccatgg cccatccatgg ctttccatgg ctttccatgg ctttccatgg ctttccatgg 2461 ccacccggccat cccatccatgg ctttccatgg ctttccatgg ctttccatgg ctttccatgg

10

20

30

40

配列番号:	GenBank 受入番号 及び 説明	配列
		2521 cacttatttc cacttcctcc attaccagt ttggcccac agagtttgt cccccccaaa 2581 cctcgacca atatccctct aaacatcaat ctatccctct gttaaagaaa aaaaaaaaa
40	NM_003006.4  ヒトCLAを コードする 例示的な 核酸配列	1 acacacagcc attgggggtt gctcgatcc ggactgccc caggggggtgc cacagcagtg 61 cctggcagcg tggctggga ccttgtact aaacgcagaga agccacttct tctggggcca 121 cgaggcagct gtcccatgtc ctgtcgacca cgggtgtgcc atgcctctgc aactccctcc 181 gttgtgtatc ctactggcc ctggcaacag ctggcagctg tggcacactt gggcagatgt 241 agccgagaaa gccttgggtc ccctgttgc cggggacccgg agacaggcca ccgaatatgt 301 gtacccatgt tatgatttc tgccagaaac ggagccctca gaaatgttg ggaacagcac 361 tgacaccact cctctgtactg ggctctggaaac ccctgtgtct accactgtgg agccctgtgc 421 aaggcggttct actggcctgg atgcaggagg ggcagtcaca gagctgacca cggagctggc 481 caacatgggg aacctgttca cggattcagc agctatggg atacagacca ctcaaccagg 541 agccacggag gcacagacca ctcaaccagg gcccacggag gcacagacca ctccactggc 601 agccacagag gcacagacaa ctgcactgac gcccacggag gcacagacca ctccactggc 661 agccacagag gcacagacca ctccaccaggc agccacggaa gcacagacca ctcaaccac 721 aggcttggag gcacagacca ctgcaccaggc agccatggg gcacagacca ctgcaccaggc 781 agccatggaa gcacagacca ctccaccaggc agccatggg gcacagacca ctcaaccac 841 agccatggag gcacagacca ctgcaccaggc agccacggag gcacagacca ctcaaccac 901 agccacggag gcacagacca ctccactggc agccatggg gcctgttca cagaaccac 961 tgccacagag gcctgttca tggaacctac tacaaaaaaa ggtctgttca taccctttt 1021 tggctctct gttactcaca agggcattcc catggcagcc agcaattttgt ccgtcaacta 1081 cccagttgggg gccccagacc acatctctgt gaagcgtgtc ctgctggcca tcctaatttt 1141 ggcgcttggg gccactatct tctctgtgtc cactgtgttgc ctggcggtcc gcctctccgg 1201 caagggccac atgttccctg tgctgtttaa ctccccacc gatgtgtct gcatctcatc 1261 cctgttgcct gatgggggtt agggggccctc tgccacagcc aatggggcc tggccaaggc 1321 caagagcccg ggcctgtacgc cagagcccg ggaggacccgt gagggggatg accttcacct 1381 gcacagcttc ctccccatgc tcactctgtc atctgttttgc acaagacccc acctccacgg 1441 gctctctgg gccacccctg agtgcggcaga ccccatccca cagctctggg ctccccatgg 1501 gacccctggg gatggggatc ttcaaggaaag gaactctggc cacccaaaca ggacaagagc 1561 agccctggggc caagcagacg ggcaagtggaa gcccacccctt tcctccctcc gcggatgaag 1621 cccagccaca ttccagccgaa ggttcaaggc agggggccat ttacttgaga cagattctct 1681 ctccccatc ttctctgggt ccctcttaaca ttccccatgg ctccccatgg 1741 ttctctctggt cactggatc tcctccccatc gtacccaaagg aagatggagc tccccatgg 1801 cacacgcact gcactgcctt tgcttttgg ttgccatgtt caccaaacag gaagtggagc 1861 ttcttaaggaa ggagactgttga agagtgcggg acttctgttgc ctgtttctt ctgtctctt 1921 gacttggggc agcttgggtc ttcttggca ccctctctggg aaaacccagg gtgagggttca 1981 gcctgtgagg gctggatgg gtttctgttgc cccaaaggc gacccctt tggactgt 2041 tggaccacagg agcttccatc tagtgacaaatg tgacccctgg cttatcccttc ttgccttccc 2101 ctgtggccac ttccagggt ggactctgtc ttgttcaactg cagttccca actgcagggtc 2161 cagtgccaggc aataaatatg tgatggacaa acgtatgcggg aatccctcaaa ggtttcaagg 2221 ctgtctctt caggcaggct tcctggaaatt ctccatccct cagtgccagg tggggcttgg 2281 tcctcaggctg tctggccatc gcccctggcc ccccaggaa gcttccatc gggctgttag 2341 gttgacttca gttttgcctc ttggacaaca gggggcttgc tacatccctt ggtgaccagg 2401 aaaagtctcag gctatgggg gccaaaggaa gggctgcccc ttcccccacca gtgaccactt 2461 tattccactt cctccattac ccagttttgg cccacagatgt ttggcccccc ccaaaccctcg 2521 gaccaatatac cctctaaaca tcaatctatc ctccctgtttaa agaaaaaaaaaaa aaa
41	NP_001193538.1	1 mavgasgleg dkmagamplq lllllillgp gnslqlwdtw adeakalgp llardrrqat

10

20

30

40

配列番号:	GenBank受入番号及び説明	配列
	ヒトCLA前駆体の例示的なアミノ酸配列	61 eyeyldydf1 peteppemlr nstdttpltg pgtpesettve paarrstgld aggavtel11 121 elanmgnlst dsaameiqtt qpaateaqtt qvppteaqtt plaateaqtt rltaeaq12 181 plaateaqtt ppaateaqtt qptgleaqtt apaameaqtt apaameaqtt ppaameaq13 241 qttameaqtt apeateaqtt qptateaqtt plaamealst epsatealsm epttkrgli14 301 pfsvssvthk gipmaasnls vnypvgapdh isvkqcllai lilalvativ fvctvvlavr15 361 lsrkghmypyv rnysspemvc issllpdgge gpsatanggl skakspgltp epredregdd16 421 ltlhsf1p
42	NP_002997.2 ヒトCLA前駆体の例示的なアミノ酸配列	1 mplql1llli llgpgnslql wdtwadeaek algpllardr rgateyeyld ydf1petepp17 61 emlrnstdtt pltgpgtpe ttvepaarrs tgdaggavt elttelanmg nlstdsaame18 121 iqttqaate aqttqvpte aqttplaate aqtrltate aqttplaate aqttppaaate19 181 aqttqptgle aqttapaame aqttapaame aqttppaame aqttqtame aqttapeate20 241 aqttqptate aqttplaame alspeptkr glfipfsvss vthkgipmaa21 301 snlsvnypvg apdhisvkqc llaililalv atiffvctvv lavrlsrkgh mypvrnyspt22 361 emvcissllp dggegpsata nglskaksp gltpepredr egddltlhf1p

## 【0352】

(5.3.6.CAR及び/又はホーミング受容体を生じさせるためのポリヌクレオチド)

本明細書に記載されるものは、前記キメラ受容体及びホーミング受容体をコードするポリヌクレオチド(すなわち、核酸配列)である。ポリヌクレオチドは、免疫細胞、例えば、NK細胞の形質転換に適する任意のポリヌクレオチドベクター内に含有されていてよい。例えば、NK細胞は、前記第一及び第二のポリペプチド(例えば、キメラ受容体)をコードするポリヌクレオチドを含有する合成ベクター、レンチウイルスもしくはレトロウイルスベクター、自己複製プラスミド、又はウイルス(例えば、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、もしくはヘルペスウイルス)などを用いて形質転換されていてよい。NK細胞の形質転換に適するレンチウイルスベクターとしては、例えば、その開示が引用により完全に本明細書に組み込まれる、米国特許第5,994,136号;第6,165,782号;第6,428,953号;第7,083,981号;及び第7,250,299号に記載されているレンチウイルスベクターが挙げられるが、これらに限定されない。NK細胞の形質転換に適するHIVベクターとしては、例えば、その開示が引用により完全に本明細書に組み込まれる、米国特許第5,665,577号に記載されているベクターが挙げられるが、これらに限定されない。

## 【0353】

本明細書に記載されるポリペプチドの、例えば、NK細胞内部での製造において有用な核酸としては、DNA、RNA、又は核酸類縁体が挙げられる。核酸類縁体は、塩基部分、糖部分、又はリン酸骨格で修飾することができ、かつデオキシチミジンに代えてのデオキシリジン置換、デオキシシチジンに代えての5-メチル-2'-デオキシシチジン又は5-ブロモ-2'-デオキシシチジン置換を含むことができる。糖部分の修飾は、リボース糖の2'ヒドロキシルの修飾で、2'-O-メチル又は2'-O-アリル糖類を形成させることを含むことができる。デオキシリボースリン酸骨格を修飾して、各塩基部分が6員のモルホリノ環に連結されているモルホリノ核酸、又はデオキシリシン酸骨格が擬似ペプチド骨格により置き換えられており、かつ4種の塩基は保持されているペプチド核酸を製造することができる。例えば、Summerton 及びWellerの文献(1997)Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 7:187-195;及びHyrupらの文献(1996)Bioorgan. Med. Chain. 4:5-23を参照されたい。加えて、デオキシリシン酸骨格は、例えば、ホスホロチオエートもしくはホスホジチオエート骨格、ホスホロアミダイト、又はアルキルホスホトリエステル骨格と置き換えることができる。

## 【0354】

本明細書に記載されるポリペプチドをコードする核酸を、例えば、発現ベクターなどのベクターの一部として、宿主細胞内へ導入してもよい。加えて、本明細書に記載されるポリペプチドを、宿主細胞を、そのようなポリペプチドをコードする核酸でトランスフェクトすることにより製造してもよく、そのような核酸は、ベクターの一部であってもよい。

10

20

30

40

50

具体的な実施態様において、前記ベクターは、本明細書に記載されるポリペプチドをコードする核酸の発現を導くことができる発現ベクターである。発現ベクターの非限定的な例としては、プラスミド及びウイルスベクター、例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ニューカッスル病ウイルス、ワクシニアウイルス、及びバキュロウイルスが挙げられるが、これらに限定されない。標準的な分子生物学技術を用いて、本明細書に記載されるポリペプチドをコードする核酸を、発現ベクター内に導入してもよい。

#### 【0355】

発現ベクターは、宿主細胞又は非ヒト対象における核酸の発現に適する形態で、本明細書に記載されるポリペプチドをコードする核酸を含む。具体的な実施態様において、発現ベクターは、発現に用いられる宿主細胞に基づいて選択され、発現されるべき核酸に作動可能に連結された1以上の制御性配列を含む。発現ベクターの範囲内では、「作動可能に連結された」とは、対象となる核酸が、制御性配列(複数可)に、該核酸の発現を可能とする様式で(例えば、インピトロ転写/翻訳系内に、又は該ベクターが宿主細胞内に導入される場合には、該宿主細胞内に)連結されていることを意味することが意図される。制御性配列は、プロモーター、エンハンサー、及び他の発現制御エレメント(例えば、ポリアデニル化シグナル)を含む。制御性配列には、多くの型の宿主細胞で核酸の構成的発現を導くもの、ある宿主細胞のみで該核酸の発現を導くもの(例えば、組織特異的制御性配列)、及び特定の薬剤により刺激されると該核酸の発現を導くもの(例えば、誘導性制御性配列)が含まれる。前記発現ベクターの設計は、例えば、形質転換される宿主細胞の選択、所望のタンパク質の発現レベルなどのファクタ次第であり得ることが当業者には分かるであろう。

10

#### 【0356】

発現ベクターは、従来の形質転換技術又はトランスフェクション技術によって宿主細胞内へ導入することができる。そのような技術としては、リン酸カルシウム又は塩化カルシウム共沈、DEAE-デキストラン介在性トランスフェクション、リポフェクション、及び電気穿孔法が挙げられるが、これらに限定されない。宿主細胞を形質転換又はトランスフェクトするのに適当な方法は、Sambrookらの文献1989、「分子のクローニング-実験室マニュアル(Molecular Cloning - A Laboratory Manual)」、第2版、Cold Spring Harbor Press、New York、及び他の実験マニュアルに記載されている。ある実施態様において、宿主細胞は、本明細書に記載されるポリペプチドをコードする核酸を含有する発現ベクターで、一過性にトランスフェクトされる。他の実施態様において、宿主細胞は、本明細書に記載されるポリペプチドをコードする核酸を含有する発現ベクターで安定的にトランスフェクトされる。

20

#### 【0357】

いずれかのポリヌクレオチドを含有する細胞を、1以上の選択マーカーを用いて選択してもよい。

30

#### 【0358】

##### (5.4. 血液障害又は固形腫瘍を治療する方法)

本明細書において提供されるものは、上述のようなNK細胞又は遺伝子改変NK細胞(例えば、CAR及び/又はホーミング受容体を含むNK細胞)を用いて、血液障害又は固形腫瘍を治療する方法である。

40

#### 【0359】

##### (5.4.1.NK組合せ療法)

一態様において、本明細書において提供されるものは、それを必要としている対象において血液障害又は固形腫瘍を治療する方法であって:(a)該対象に、単離されたナチュラルキラー(NK)細胞の集団もしくはその医薬組成物、又は単離された遺伝子改変NK細胞(例えば、CAR及び/又はホーミング受容体を含むNK細胞)の集団もしくはその医薬組成物を投与すること;及び(b)該対象に、第二の薬剤又はその医薬組成物を投与することを含む、前記方法である。前記第二の薬剤は、前記血液障害又は固形腫瘍を治療するために使用するこ

50

とができる任意の医薬として許容し得る薬剤とすることことができ、抗体(例えば、モノクローナル抗体)、二重特異性キラー細胞エンゲージャー(BiKE)、抗炎症剤、免疫調節剤(例えば、セクション5.2.7.1に記載されているような免疫調節性化合物)、細胞傷害性薬剤、がんワクチン、化学療法剤、HDAC阻害剤、又はsiRNAが挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0360】

(5.4.1.1.抗体とのNK組合せ)

ある実施態様において、前記第二の薬剤は、抗体又はその抗原結合性断片である。

#### 【0361】

本明細書で使用されるように、「抗体」及び「免疫グロブリン」及び「Ig」という用語は、技術用語であり、本明細書において互換的に使用されることがあり、抗原に特異的に結合する抗原結合性部位を有する分子を指す。 10

#### 【0362】

抗体としては、例えば、モノクローナル抗体、組換えで製造した抗体、单一特異性抗体、多重特異性抗体(二重特異性抗体を含む)、ヒト抗体、ヒト化抗体、例えば、複合ヒト抗体(composite human antibody)又は脱免疫化抗体など、マウスの抗体(例えば、マウス又はラット抗体)、キメラ抗体、合成抗体、及び2個の重鎖分子及び2個の軽鎖分子を含む四量体抗体を挙げることができる。具体的な実施態様において、抗体としては、抗体軽鎖単量体、抗体重鎖単量体、抗体軽鎖二量体、抗体重鎖二量体、抗体軽鎖-抗体重鎖対、イントラボディ、ヘテロコンジュゲート抗体、單ードメイン抗体、及び一価抗体を挙げることができると、これらに限定されない。具体的な実施態様において、抗体としては、抗原結合性断片又はエピトープ結合性断片、例えば、これらに限定されないが、単鎖抗体又は単鎖Fvs(scFv)(例えば、单一特異性、二重特異性などを含む)、ラクダ化抗体、アフィボディ、Fab断片、 $F(ab')$ 断片、 $F(ab')_2$ 断片、及びジスルフィド連結Fv(sdFv)を挙げることができる。具体的な実施態様において、本明細書に記載される抗体は、モノクローナル抗体を指す。 20

#### 【0363】

抗体は、免疫グロブリン分子の任意のタイプ(例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA、もしくはIgY)、任意のクラス、(例えば、IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>、IgG<sub>4</sub>、IgA<sub>1</sub>、もしくはIgA<sub>2</sub>)、又は任意のサブクラス(例えば、IgG<sub>2a</sub>もしくはIgG<sub>2b</sub>)のものとすることができます。ある実施態様において、本明細書に記載される抗体は、IgG抗体、又はそのクラス(例えば、ヒトIgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、もしくはIgG<sub>4</sub>)もしくはサブクラスである。ある実施態様において、本明細書に記載される抗体は、IgG<sub>2</sub>抗体(例えば、ヒトIgG<sub>2</sub>)又はそのサブクラス(例えば、ヒトIgG<sub>2a</sub>もしくはヒトIgG<sub>2b</sub>、もしくはそれらの混合物)である。ある実施態様において、本明細書に記載される抗体は、IgG<sub>1</sub>抗体(例えば、ヒトIgG<sub>1</sub>)又はそのサブクラスである。ある実施態様において、本明細書に記載されるIgG<sub>1</sub>抗体は、1個以上のアミノ酸置換及び/又は欠失を定常領域に含む。 30

#### 【0364】

本明細書で使用されるように、「モノクローナル抗体」という用語は、均質な又は実質的に均質な抗体の集団から得られる抗体を指す周知の技術用語である。「モノクローナル」という用語は、前記抗体を作製するためのいかなる特定の方法にも限定されない。一般に、モノクローナル抗体の集団は、細胞、細胞の集団、又は細胞株により作製することができる。具体的な実施態様において、本明細書で使用されるように、「モノクローナル抗体」は、单一の細胞又は細胞株によって製造される抗体であり、ここで、該抗体は、例えば、当技術分野において公知のELISA又は他の抗原結合アッセイもしくは競合的結合アッセイによって決定される場合、エピトープに免疫特異的に結合する。特定の実施態様において、モノクローナル抗体は、キメラ抗体又はヒト化抗体とすることができます。ある実施態様において、モノクローナル抗体は、一価抗体又は多価(例えば、二価)抗体である。 40

#### 【0365】

具体的な実施態様において、前記抗体又はその抗原結合性断片は、セクション5.3.2に

記載されている腫瘍関連抗原(TAA)に特異的に結合する。さらに具体的な実施態様において、前記抗体又はその抗原結合性断片は、CS-1に結合する。より具体的な実施態様において、前記抗体又はその抗原結合性断片は、エロツズマブ又はその抗原結合性断片である。さらに具体的な実施態様において、前記抗体又はその抗原結合性断片は、CD20に結合する。

#### 【0366】

具体的な実施態様において、前記抗体又はその抗原結合性断片は、セクション5.3.2に記載されている腫瘍微小環境関連抗原(TMAA)に特異的に結合する。

#### 【0367】

具体的な実施態様において、前記抗体又はその抗原結合性断片は、免疫チェックポイントタンパク質に特異的に結合し、かつ該免疫チェックポイントタンパク質の活性と拮抗する。より具体的な実施態様において、該免疫チェックポイントタンパク質は、CTLA-4、PD-1、PD-L1、PD-L2、又はLAG-3である。より具体的な実施態様において、免疫チェックポイント関連タンパク質は、BTLA、KIR、TIM-3、A2aR、B7-H3、又はB7-H4である。他の具体的な実施態様において、前記抗体又はその抗原結合性断片は、共刺激シグナル伝達タンパク質に特異的に結合し、かつ該共刺激シグナル伝達タンパク質の活性と拮抗する。より具体的な実施態様において、前記共刺激シグナル伝達タンパク質は、ICOS、CD28、4-1BB、OX40、CD27、又はCD40である。

#### 【0368】

(5.4.1.2.二重特異性キラー細胞エンゲージャーとNKの組合せ)

20

ある実施態様において、前記第二の薬剤は、二重特異性キラー細胞エンゲージャー(BiKE)である。

#### 【0369】

BiKEは、2つの单鎖可变断片(scFvs)を含有する試薬であり、かつ標的細胞(例えば、腫瘍細胞又は感染細胞)及びNK細胞の双方に特異的に会合(engage)して、標的細胞の死滅を媒介する。これらを用いて、標的細胞(例えば、腫瘍細胞又は感染細胞)とNK細胞とを共局在化して、それによりNK細胞媒介性抗体依存性細胞傷害(ADCC)の引き金を引く。BiKEは、例えば、Gleason, M. Kらの文献、Mol Cancer Ther, 11: 2674-2684 (2012); Vallera, D. Aらの文献、Cancer Biother Radiopharm, 28: 274-282 (2013); Wiernik, Aらの文献、Clin Cancer Res, 19: 3844-3855 (2013); Reiners, K. Sらの文献、Mol Ther, 21: 895-903 (2013); Singer, Hらの文献、J Immunother, 33: 599-608 (2010); 又はGleason, M. Kらの文献 Blood, 123: 3016-3026 (2014)に記載されているような、当技術分野において公知の任意の方法で作製することができる。BiKEの一方のscFvは、標的細胞(例えば、腫瘍細胞又は感染細胞)の表面の抗原に特異的に結合し、他方のscFvは、NK細胞上の受容体(例えば、CD16などのFc受容体)に特異的に結合する。

30

#### 【0370】

具体的な実施態様において、前記BiKEは、セクション5.3.2に記載されているTAAに特異的に結合する第一のscFvを含む。さらに具体的な実施態様において、前記BiKEは、CD16に特異的に結合する第二のscFvを含む。

#### 【0371】

40

(5.4.1.3.他の抗がん剤とNKとの組合せ)

第二の薬剤として投与することができる他の抗がん剤は、当技術分野において周知であり、抗炎症剤、免疫調節剤(immunomodulatory agent)、細胞傷害性薬剤、がんワクチン、化学療法剤、HDAC阻害剤、及びsiRNAが含まれる。本明細書に記載の方法を用いて製造されるNK細胞、及び任意に灌流液、灌流液細胞、本明細書に記載される方法を用いて製造されるNK細胞以外のナチュラルキラー細胞に加えて、がんを有する個体、例えば、腫瘍細胞を有する個体に投与し得る具体的な抗がん剤としては、限定されないが:アシビシン;アクラルビシン;塩酸アコダゾール;アクロニン;アドゼレシン;アドリアマイシン;アドルシリル;アルデスロイキン;アルトレタミン;アンボマイシン;酢酸アメタントロン;アムサクリン;アナストロゾール;アントラマイシン;アスパラギナーゼ(例えば、エルヴィニア・クリサン(

50

Erwinia chrysanthemum)由来のもの;エルヴィナーゼ(Erwinaze));アスペルリン;アバスチン(ベバシズマブ);アザシチジン;アゼテバ;アゾトマイシン;バチマstattt;ベンゾデバ;ビカルタミド;塩酸ビサントレン;ジメシリ酸ビスナフィド;ビゼレシン;硫酸ブレオマイシン;ブレキナルナトリウム;プロピリミン;ブルファン;カクチノマイシン;カルステロン;カラセミド;カルペチマー;カルボプラチン;カルムスチン;塩酸カルビシン;カルゼレシン;セデフィンゴール;セレコキシブ(COX-2阻害剤);CC-122;CC-486(経口アザシジン(azacacidine));セルビジン(Cerubidine);クロラムブシル;シロレマイシン;シスプラチン;クラドリビン;メシリ酸クリスナトール;シクロホスファミド;シタラビン;ダカルバジン;ダクチノマイシン;塩酸ダウノルビシン;デシタビン;デキソルマプラチン;デザグアニン;メシリ酸デザグアニン;ジアジコン;ドセタキセル;ドキソルビシン;塩酸ドキソルビシン;ドロロキシフェン;クエン酸ドロロキシフェン;プロピオン酸ドロモスタノロン;デュアゾマイシン;エダトレキセート;塩酸エフロミチン(eflomithine);エルサミトルシン;エルスパー(Elspar);エンロプラチン;エンプロメート;エピプロピジン;塩酸エピルビシン;エルプロゾール;塩酸エソルビシン;エストラムスチン;リン酸エストラムスチンナトリウム;エタニダゾール;エトポシド;リン酸エトポシド;エトポフォス(Etopophos);エトプリン;塩酸ファドロゾール;ファザラビン;フェンレチニド;フロクスウリジン;リン酸フルダラビン;フルオロウラシル;フルロシタビン;ホスキドン;ホストリエシンナトリウム;ゲムシタビン;塩酸ゲムシタビン;ヒドロキシ尿素;イダマイシン(Idamycin);塩酸イダルビシン;イホスファミド;イルモホシン;イプロプラチン;イリノテカン;塩酸イリノテカン;酢酸ランレオチド;レナリドミド;レトロゾール;酢酸ロイプロリド;塩酸リアロゾール;ロメトレキソールナトリウム;ロムスチン;塩酸ロソキサントロン;マソプロコール;メイタンシン;塩酸メクロレタミン;酢酸メゲストロール;酢酸メレンゲストロール;メルファラン;メノガリル;メルカプトプリン;メトレキセート;メトレキセートナトリウム;メトプリン;メツレデバ;ミチンドミド;マイタルシン;マイクロミン;マイギリン;マイマルシン;マイトイシン;マイツスペル;ミトタン;塩酸ミトキサントロン;ミコフェノール酸;ノコダゾール;ノガラマイシン;オルマプラチン;オキシスラン;パクリタキセル;ペガスパルガーゼ;ペリオマイシン;ペンタムスチン;硫酸ペプロマイシン;ペルホスファミド;ピポプロマン;ピポスルファン;塩酸ピロキサントロン;プリカマイシン;プロメスタン;ポマリドミド;ポルフィマーナトリウム;ポルフィロマイシン;プレドニムスチン;塩酸プロカルバジン;プロロイキン(Proleukin);ブリネトール(Purinethol);ピューロマイシン;塩酸ピューロマイシン;ピラゾフリン;リューマトレックス(Rheumatrex);リボプリン;サフィンゴール;塩酸サフィンゴール;セムスチン;シムトラゼン;スバルホセートナトリウム;スバルソマイシン;塩酸スピロゲルマニウム;スピロムスチン;スピロプラチン;ストレプトニグリン;ストレプトゾシン;スロフェヌル;タブロイド(Tabloid);タリソマイシン;テコガランナトリウム;タキソテール;テガフル;塩酸テロキサントロン;テモポルフィン;テニポシド;テロキシロン;テストラクトン;サリドマイド;チアミプリン;チオグアニン;チオテバ;チアゾフリン;チラバザミン;トポサル(Toposar);クエン酸トレミフェン;酢酸トレストロン;トレキサル(Trexall);リン酸トリシリビン;トリメトレキセート;グルクロロン酸トリメトレキセート;トリプトレリン;塩酸ツブロゾール;ウラシルマスターD;ウレデバ;バブレオチド;ベルテポルフィン;硫酸ビンプラスチン;硫酸ビンクリスチン;ビンデシン;硫酸ビンデシン;硫酸ビネビジン;硫酸ビングリシネット;硫酸ビンロイロシン;酒石酸ビノレルビン;硫酸ビンロシジン;硫酸ビンゾリジン;ボロゾール;ゼニプラチン;ジノスタチン;及び塩酸ゾルビシンが挙げられる。  
。

## 【0372】

他の抗がん性薬物としては、限定するものではないが:20-エピ-1,25ジヒドロキシビタミンD3;5-エチニルウラシル;アビラテロン;アクラルビシン;アシルフルベン;アデシペノール;アドゼレシン;アルデスロイキン;ALL-TKアンタゴニスト;アルトレタミン;アンバムスチン;アミドックス;アミホスチン;アミノレブリン酸;アムルビシン;アムサクリン;アナグレリド;アナストロゾール;アンドログラフォリド;血管形成阻害剤;アンタゴニストD;アンタゴニストG;アンタレリクス;抗背方化形態形成タンパク質-1;抗アンドロゲン剤、前立

10

20

30

40

50

腺癌;抗エストロゲン剤;アンチネオプラストン;アンチセンスオリゴヌクレオチド;アフィジコリングリシネット;アボトーシス遺伝子調節物質;アボトーシス調節因子;アプリン酸;ara-CDP-DL-PTBA;アルギニンデアミナーゼ;アスラクリン;アタメスタン;アトリムスチン;アキシナスタチン1;アキシナスタチン2;アキシナスタチン3;アザセトロン;アザトキシン;アザチロシン;バッカチンIII誘導体;バラノール;バチマスタッフ;BCR/ABLアンタゴニスト;ベンゾクロリン;ベンゾイルスタウロスボリン;ラクタム誘導体; -アレチン; クラマイシンB;ベツリン酸;bFGF阻害剤;ビカルタミド;ビサントレン;ビスマジリジニルスペルミン;ビスマフィド;ビストラテンA;ビセレシン;ブレフレート;ブロピリミン;ブドチタン;ブチオニンスルホキシミン;カルシポトリオール;カルホスチンC;カンプトサール(カンプトとも呼ばれる;イリノテカン)カンプトテシン誘導体;カペシタビン;カルボキサミド-アミノ-トリアゾール;カルボキシアミドトリアゾール;CaRest M3;CARN700;軟骨由来阻害剤;カルゼレシン;カゼインキナーゼ阻害剤(ICOS);カスタノスペルミン;セクロビンB;セトロレリクス;クロリン(chlorIn);クロロキノキサリンスルホンアミド;シカプロスト;シス-ポルフィリン;クラドリビン;クロミフェン類似体;クロトリマゾール;コリスマイシンA;コリスマイシンB;コンブレタスタチンA4;コンブレタスタチン類似体;コナゲニン;クラムベスジン816;クリスナトール;クリプトフィシン8;クリプトフィシンA誘導体;クラシンA;シクロペニタントラキノン;シクロプラタム;シペマイシン;シタラビンオクホスフェート;細胞溶解因子;サイトスタチン;ダクリキシマブ;デシタビン;デヒドロジデンミンB;デスロレリン;デキサメタゾン;デキシホスファミド;デクスラゾキサン;デクスベラパミル;ジアジコン;ジデムニンB;ジドックス;ジエチルノルスペルミン;ジヒドロ-5-アザシチジン;ジヒドロタキソール、9-;ジオキサマイシン;ジフェニルスピロムスチン;ドセタキセル;ドコサノール;ドラセトロン;ドキシフルリジン;ドキソルビシン;ドロロキシフェン;ドロナビノール;デュオカルマイシンSA;エブセレン;エコムスチン;エデルホシン;エドレコロマブ;エフロルニチン;エレメン;エミテフル;エピルビシン;エプリステリド;エストラムスチン類似体;エストロゲンアゴニスト;エストロゲンアンタゴニスト;エタニダゾール;リン酸エトボシド;エキセメスタン;ファドロゾール;ファザラビン;フェンレチニド;フィルグラスチム;フィナステリド;フラボピリドール;フレゼラスチン;フルアステロン;フルダラビン(例えば、Fludara);塩酸フルオロダウノルニシン;フォルフェニメックス;フォルメスタン;フォストリエシン;フォテムスチン;ガドリニウムテキサフィリン;硝酸ガリウム;ガロシタピン;ガニレリクス;ゼラチナーゼ阻害剤;ゲムシタビン;グルタチオン阻害剤;ヘプスルファム;ヘレグリン;ヘキサメチレンビスアセトアミド;ヒペリシン;イバンドロン酸;イダルビシン;イドキシフェン;イドラマントン;イルモホシン;イロマスタッフ;イマチニブ(例えば、GLEEVEC(登録商標))、イミキモド;免疫刺激性ペプチド;インスリン様成長因子-1受容体阻害剤;インターフェロンアゴニスト;インターフェロン;インターロイキン;イオベングアン;ヨードドキソルビシン;イボメアノール、4-;イロプラクト;イルソグラジン;イソベンガゾール;イソホモハリコンドリンB;イタセトロン;ジャスプラキノリド;カハラリドF;ラメラリン-Nトリアセテート;ランレオチド;レイナマイシン;レノグラスチム;硫酸レンチナン;レプトルスタチン;レトロゾール;白血病阻害因子;白血球 インターフェロン;ロイプロリド+エストロゲン+プロゲステロン;リュープロレリン;レバミゾール;リアロゾール;直鎖ポリアミン類似体;脂溶性二糖ペプチド;脂溶性白金化合物;リツクリナミド;ロバプラチン;ロンブリシン;ロメトレキソール;ロニダミン;ロソキサントロン;ロキソリビン;ルルトテカン;ルテチウムテキサフィリン;リソフィリン; 溶菌性ペプチド;メイタンシン;マンノスタチンA;マリマスタッフ;マソプロコール;マスピン;マトリライシン阻害剤;マトリックスマタロプロティナーゼ阻害剤;メノガリル;メルバロン;メテレリン;メチオニナーゼ;メトクロプラミド;MIF阻害剤;ミフェプリストン;ミルテホシン;ミリモスチム;マイトグアゾン;マイトラクトール;マイトイシン類似体;ミトナフィド;マイトイシン線維芽細胞成長因子-サポリン;ミトキサントロン;モファロテン;モルグラモスチム;抗EGFR抗体(例えば、Erbitux(セツキシマブ));抗CD19抗体;抗CD20抗体(例えば、リツキシマブ);抗ジシアロガングリオシド(GD2)抗体(例えば、モノクローナル抗体3F8又はch14>18);抗ErbB2抗体(例えば、ハーセプチン);ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン;モノホスホリル脂質A+ミオバクテ 10  
20  
30  
40  
50

リウム細胞壁sk; モピダモール; マスターD抗がん剤; ミカペルオキシドB;マイコバクテリア細胞壁抽出物; ミリアポロン; N-アセチルジナリン; N-置換ベンズアミド; ナファレリン; ナグレスチップ; ナロキソン+ペンタゾシン; ナバピン; ナフェルピン; ナルトグラスチム; ネダプラチン; ネモルビシン; ネリドロン酸; ニルタミド; ニサマイシン; 一酸化窒素調節物質; 窒素酸化物酸化防止剤; ニトルリン; オブリメルセン(GENASENSE(登録商標)); O<sup>6</sup>-ベンジルグアニン; オクトレオチド; オキセノン; オリゴヌクレオチド; オナプリストン; オンダンセトロン; オンダンセトロン; オラシン; 経口サイトカイン誘導因子; オルマプラチン; オサテロン; オキサリプラチン(例えば、 Floxatin); オキサウノマイシン; パクリタキセル; パクリタキセル類似体; パクリタキセル誘導体; パラウアミン; パルミトイールリゾキシン; パミドロン酸; パナキシトリオール; パノミフェン; パラバクチン; パゼリプチン; ペガスパルガーゼ; ペルデシン; ペントサンポリ硫酸ナトリウム; ペントスタチン; ペントロゾール; ペルフルブロン; ペルホスファミド; ペリリルアルコール; フェナジノマイシン; フェニルアセテート; ホスファターゼ阻害剤; ピシバニール; 塩酸ピロカルピン; ピラルビシン; ピリトレキシム; プラセチンA; プラセチンB; プラスマノーゲン活性化因子阻害剤; 白金錯体; 白金化合物; 白金トリアミン錯体; ポルフィミーナトリウム; ポルフィロマイシン; プレドニゾン; プロピルビス-アクリドン; プロスタグラニジンJ2; プロテアソーム阻害剤; プロテインAに基づく免疫調節物質; タンパク質キナーゼC阻害剤; タンパク質キナーゼC阻害剤、 微細藻類; タンパク質チロシンホスファター-ゼ阻害剤; ブリンヌクレオシドホスホリラーゼ阻害剤; ブルブリン; ピラゾロアクリジン; ピリドキシリ化ヘモグロビンポリオキシエチレン抱合体; rafアンタゴニスト; ラルチトレキセド; ラモセトロン; rasファルネシルタンパク質トランスフェラー-ゼ阻害剤; ras阻害剤; ras-GAP阻害剤; 脱メチル化レテリブチン; レニウムRe 186エチドロネート; リゾキシン; リボザイム; RIIレチナミド; ロヒツキン; ロムルチド; ロキニメックス; ルビギノンB1; ルボキシル; サフィンゴール; サイントピン; SarCNU; サルコフィトールA; サルグラモスチム; Sdi 1模倣剤; セムスチン; 老化誘導阻害剤1; センスオリゴヌクレオチド; シグナル伝達阻害剤; シゾフィラン; ソブゾキサン; ナトリウムボロカブテイト; フェニル酢酸ナトリウム; ソルベロール; ソマトメジン結合タンパク質; ソネルミン; スバルホス酸; スピカマイシンD; スピロムスチン; スプレノベンチン; スポンギスタチン1; スクアラミン; スチピアミド; ストロメライシン阻害剤; スルフィノシン; 超活性血管作用性小腸ペプチドアンタゴニスト; スラジスタ; スラミン; スワインソニン; タリムスチン; タモキシフェンメチオジド; タウロムスチン; タザロテン; テコガランナトリウム; テガフル; テルラピリリウム; テロメラーゼ阻害剤; テモポルフィン; テニポシド; テトラクロロデカオキシド; テトラゾミン; タリプラスチン; チオコラリン; トロンボポイエチン; トロンボポイエチン模倣剤; チマルファシン; チモポイエチン受容体アゴニスト; チモトリナン; 甲状腺刺激ホルモン; スズエチルエチオブルブリン; チラバザミン; 二塩化チタノセン; トプセンチン; トレミフェン; 翻訳阻害剤; トレチノイン; トリアセチルウリジン; トリシリビン; トリメトレキセート; トリプトレリン; トロピセトロン; ツロステリド; チロシンキナーゼ阻害剤; チルホスチン; UBC阻害剤; ウベニメクス; 尿生殖洞由来成長阻害因子; ウロキナーゼ受容体アンタゴニスト; バブレオチド; バリオリンB; Vectibix(パニツムマブ)ベラレソール; ベラミン; ベルジン; ベルテポルフィン; ビノレルビン; ビンキサルチン; ビタキシン; ボロゾール; Welcovorin(ロイコボリン); Xeloda(カペシタビン); ザノテロン; ゼニプラチン; ジラスコルブ; 及びジノスタチンスチマラマーが挙げられる。

## 【0373】

具体的な実施態様において、前記第二の薬剤として投与される抗がん剤は、 サリドマイド、 レナリドミド、 ポマリドミド、 CC-122、 アザシチジン、 デシタビン、 又はCC-486(経口アザシジン(azacitidine))である。より具体的な実施態様において、 前記第二の薬剤として投与される抗がん剤は、 レナリドミド又はポマリドミドである。具体的な実施態様において、 前記第二の薬剤として投与される抗がん剤は、 免疫調節性化合物(例えば、 セクション5.2.7.1に記載されているような免疫調節性化合物)である。具体的な実施態様において、 前記第二の薬剤として投与される抗がん剤は、 口ミデプシンである。

## 【0374】

10

20

30

40

50

(5.4.2. 遺伝子改変NK細胞を用いる治療)

別の態様において、本明細書において提供されるものは、それを必要としている対象において血液障害又は固体腫瘍を治療する方法であって、該対象に、単離されたNK細胞の集団又はその医薬組成物を投与することを含み、前記NK細胞が、遺伝子改変されている(例えば、キメラ抗原受容体(CAR)及び/又はホーミング受容体を含み、該CARが、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内刺激ドメイン、及び任意に共刺激ドメインを含む)、前記方法である。

【0375】

該遺伝子改変NK細胞(例えば、CAR及び/又はホーミング受容体を含むNK細胞)は、セクション5.3に記載されている。

10

【0376】

(5.4.3. 血液障害及び固体腫瘍)

具体的な実施態様において、前記血液障害は、血液の過剰増殖障害である。具体的な実施態様において、該血液障害は、血液がん、例えば、白血病又はリンパ腫である。より具体的な実施態様において、該血液がんは、急性白血病、例えば、急性T細胞白血病、急性骨髓性白血病(AML)、急性前骨髓球性白血病、急性骨髓芽球性白血病、急性巨核芽球性白血病、前駆B急性リンパ芽球性白血病、前駆T急性リンパ芽球性白血病、バーキット白血病(バーキットリンパ腫)、もしくは急性混合型白血病;慢性白血病、例えば、慢性骨髓リンパ腫、慢性骨髓性白血病(CML)、慢性单球性白血病、慢性リンパ球性白血病(CLL)/小リンパ球性リンパ腫、もしくはB細胞性前リンパ球性白血病;有毛細胞リンパ腫;T細胞前リンパ球性白血病;又はリンパ腫、例えば、組織球性リンパ腫、リンパ形質細胞性リンパ腫(例えば、ワルデンシュトロームマクログロブリン血症)、脾辺縁帯リンパ腫、形質細胞新生物(例えば、形質細胞性骨髓腫、形質細胞腫、单クローン性免疫グロブリン沈着症、もしくは重鎖病)、節外辺縁帯B細胞リンパ腫(MALTリンパ腫)、節辺縁帯B細胞リンパ腫(NMZL)、濾胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、縦隔(胸腺)大細胞型B細胞リンパ腫、血管内大細胞型B細胞リンパ腫、原発性滲出液リンパ腫、T細胞大型顆粒リンパ球性白血病、アグレッシブNK細胞白血病、成人T細胞白血病/リンパ腫、鼻型の節外NK/T細胞リンパ腫、腸症型T細胞リンパ腫、肝脾T細胞リンパ腫、芽球性NK細胞リンパ腫、菌状息肉腫(セザリー症候群)、原発性皮膚CD30陽性T細胞リンパ増殖性障害(例えば、原発性皮膚未分化大細胞リンパ腫もしくはリンパ腫様丘疹症)、血管免疫芽球性T細胞リンパ腫、非特定型の末梢T細胞リンパ腫、未分化大細胞リンパ腫、ホジキンリンパ腫、もしくは結節性リンパ球優位型ホジキンリンパ腫である。別の具体的な実施態様において、前記血液がんは、急性骨髓性白血病(AML)である。別の具体的な実施態様において、前記血液がんは、慢性リンパ性白血病(CLL)である。別の具体的な実施態様において、前記血液がんは、多発性骨髓腫又は骨髓異形成症候群である。

20

【0377】

前記固体腫瘍は、例えば、癌腫、例えば、腺癌、副腎皮質癌、結腸腺癌、結腸直腸腺癌、結腸直腸癌、腺管細胞癌、肺癌、甲状腺癌、上咽頭癌、黒色腫(例えば、悪性黒色腫)、非黒色腫性皮膚癌、又は詳細不明の癌腫;類腫瘍;線維形成性小円形細胞腫瘍;内分泌腫瘍;ユーリング肉腫;胚細胞性腫瘍(例えば、精巣がん、卵巣がん、絨毛癌、内胚葉洞腫瘍、胚細胞腫など);肝芽腫;肝細胞癌;神経芽腫;非横紋筋肉腫軟部組織肉腫;骨肉腫;網膜芽細胞腫;横紋筋肉腫;又はウィルムス腫瘍であってもよいが、これらに限定されない。別の実施態様において、固体腫瘍は、脾臓がん又は乳がんである。他の実施態様において、固体腫瘍は、聴神経腫;星細胞腫(例えば、グレードIの毛様細胞性星細胞腫、グレードIIの低悪性度星細胞腫;グレードIIIの未分化星細胞腫;もしくはグレードIVの多形性膠芽腫);脊索腫;頭蓋咽頭腫;神経膠腫(例えば、脳幹神経膠腫;上衣腫;混合性神経膠腫;視神経神経膠腫;もしくは上衣下腫);膠芽腫;髓芽腫;髓膜腫;転移性脳腫瘍;乏突起膠腫;松果体芽腫;下垂体部腫瘍;未分化神経外胚葉性腫瘍;又はシュワン腫である。別の実施態様において、前記固体腫瘍は、前立腺がんである。

30

【0378】

40

50

ある実施態様において、前記血液がん又は固形腫瘍を有する個体、例えば、ナチュラルキラー細胞の欠乏を有する個体は、前記投与の前に骨髄移植を受けている個体である。ある実施態様において、該骨髄移植は、前記血液がん又は前記固形腫瘍の治療におけるものであった。ある他の実施態様において、前記骨髄移植は、前記血液がん又は前記固形腫瘍以外の状態の治療におけるものであった。ある実施態様において、前記個体は、前記骨髄移植に加えて免疫抑制剤を受けた。ある実施態様において、骨髄移植を受けていた前記個体は、前記投与時に移植片対宿主病(GVHD)の1以上の症状を示す。ある他の実施態様において、骨髄移植を受けていた前記個体は、移植片対宿主病(GVHD)の症状が現れる前に、該細胞の投与を受ける。

【0379】

10

具体的な実施態様において、前記血液がん又は固形腫瘍を有する個体は、前記投与の前に、TNF 阻害剤、例えば、ETANERCEPT(登録商標)(Enbrel)の少なくとも一回の投与を受けている。具体的な実施態様において、該個体は、前記血液がん又は前記固形腫瘍の診断の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、又は12ヶ月以内に、該TNF 阻害剤の投与を受けた。具体的な実施態様において、TNF 阻害剤の投与を受けている前記個体は、急性骨髓性白血病を示す。より具体的な実施態様において、TNF 阻害剤の投与を受けており、かつ急性骨髓性白血病を示している前記個体はさらに、血液細胞中の染色体5の長腕の欠失を示す。別の実施態様において、前記血液がん又は固形腫瘍、例えば、血液がんを有する個体は、フィラデルフィア染色体を示す。

【0380】

20

ある他の実施態様において、前記個体における血液がん又は固形腫瘍は、1以上の抗がん薬に抵抗性である。具体的な実施態様において、前記血液がん又は固形腫瘍は、GLEEVE C(登録商標)(イマチニブメシル酸塩)に抵抗性である。

【0381】

ある実施態様において、前記個体における血液がん又は固形腫瘍は、少なくとも1種の抗がん薬に反応する;本実施態様において、本明細書に記載される胎盤灌流液、単離された胎盤灌流液細胞、単離されたナチュラルキラー細胞、例えば、胎盤ナチュラルキラー細胞、例えば、胎盤由来中間ナチュラルキラー細胞、単離された組み合わされたナチュラルキラー細胞、もしくは活性化NK、もしくはTSPNK細胞、及び/又はそれらの組合せ、並びに任意に免疫調節化合物(例えば、セクション5.2.7.1に記載されているような免疫調節性化合物)は、補助の治療としてか、又は前記抗がん薬との組合せ療法として添加される。ある他の実施態様において、前記血液がん又は固形腫瘍を有する個体は、前記投与の前に、少なくとも1種の抗がん薬により治療されたことがあり、再発した個体である。ある実施態様において、治療される前記個体は、難治性がんを有する。一実施態様において、本明細書に記載される細胞を用いる前記がん治療方法は、がんの再発から保護する(例えば、予防するか又は遅らせる)。一実施態様において、本明細書に記載されるがん治療方法は、1ヶ月間以上、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、又は12ヶ月以上、1年間以上、2年間以上、3年間以上、又は4年間以上のがんの寛解をもたらす。

30

【0382】

40

ある実施態様において、NK細胞は、腫瘍病変から単離されたもの、例えば、腫瘍浸潤リンパ球である;このようなNK細胞は、腫瘍関連抗原(TAA)又は腫瘍微小環境関連抗原(TMAA)に対して特異的であることが期待される。

【0383】

一実施態様において、本明細書において提供されるのは、多発性骨髄腫を有する個体を治療する方法であって、該個体に、(1)レナリドミド又はポマリドミド、及び(2)CAR NK細胞を投与することを含み、該CAR NK細胞が、該個体における多発性骨髄腫を治療するのに効果的なものである、前記方法である。具体的な実施態様において、該CAR NK細胞は、臍帯血NK細胞、又は臍帯血造血細胞から製造されたNK細胞、例えば、造血幹細胞である。別の実施態様において、前記CAR NK細胞は、本明細書に記載されるNK細胞を製造するための2又は3段階法によって製造されたものである。別の実施態様において、前記レナリドミド

50

又はポマリドミド、及びCAR NK細胞は、それぞれ別々に投与される。多発性骨髄腫の個体を治療する方法の具体的なある実施態様において、前記CAR NK細胞は、CAR細胞外ドメインを含み、該細胞外ドメインは、CS-1結合ドメインである。具体的な実施態様において、前記CS-1結合ドメインは、CS-1に結合する抗体のscFv又は抗原結合性断片を含む。具体的なある実施態様において、前記CS-1結合ドメインは、エロツズマブの単鎖バージョン及び/又はエロツズマブの抗原結合性断片を含む。

#### 【0384】

一実施態様において、本明細書において提供されるのは、多発性骨髄腫を有する個体を治療する方法であって、該個体に、(1)レナリドミド又はポマリドミド;(2)エロツズマブ;及び(3)CAR NK細胞を投与することを含み、該CAR NK細胞が、該個体における多発性骨髄腫を治療するのに効果的なものである、前記方法である。具体的な実施態様において、前記CAR NK細胞は、臍帯血NK細胞、又は臍帯血造血細胞、例えば、造血幹細胞から製造されたNK細胞である。別の実施態様において、前記CAR NK細胞は、本明細書に記載されるNK細胞を製造するための2又は3段階法により製造されたものである。別の実施態様において、前記レナリドミド又はポマリドミド、エロツズマブ、及び/又はCAR NK細胞は、それぞれ別々に投与される。多発性骨髄腫の個体を治療する方法の具体的なある実施態様において、前記CAR NK細胞は、CAR細胞外ドメインを含み、該細胞外ドメインは、CS-1結合ドメインである。具体的な実施態様において、前記CS-1結合ドメインは、CS-1に結合する抗体のscFv又は抗原結合性断片を含む。

#### 【0385】

別の実施態様において、本明細書において提供されるのは、血液がん(例えば、バーキットリンパ腫)を有する個体を治療する方法であって、該個体に、(1)ロミデプシン、及び(2)CAR NK細胞を投与することを含み、該CAR NK細胞が、該個体における該血液がん(例えば、バーキットリンパ腫)を治療するのに効果的なものである、前記方法である。血液がん(例えば、バーキットリンパ腫)の個体を治療する方法の具体的なある実施態様において、前記CAR NK細胞は、CAR細胞外ドメインを含み、該細胞外ドメインは、CD20結合ドメインである。具体的な実施態様において、該CD20結合ドメインは、CD20に結合する抗体のscFv又は抗原結合性断片を含む。

#### 【0386】

##### (5.5. 感染性疾患を治療する方法)

本明細書において提供されるものは、上述のようなNK細胞又は遺伝子改変NK細胞(例えば、CAR及び/又はホーミング受容体を含むNK細胞)を用いる、感染性疾患を治療する方法である。

#### 【0387】

##### (5.5.1. NK組合せ療法を用いる感染性疾患の治療)

別の態様において、本明細書において提供されるものは、それを必要としている対象において感染性疾患を治療する方法であって、(a)該対象に、単離されたナチュラルキラー(NK)細胞の集団もしくはその医薬組成物、又は単離された遺伝子改変NK細胞(例えば、CAR及び/又はホーミング受容体を含むNK細胞)の集団もしくはその医薬組成物を投与すること;及び(b)該対象に、第二の薬剤又はその医薬組成物を投与すること、を含む、前記方法である。該第二の薬剤は、前記感染性疾患を治療するために使用することができる任意の医薬として許容し得る薬剤とすることができます、かつ抗体(例えば、モノクローナル抗体)、二重特異性キラー細胞エンゲージャー(BiKE)、又は抗ウイルス剤が挙げられるが、それらに限定されない。

#### 【0388】

##### (5.5.1.1. 免疫チェックポイントタンパク質に結合する抗体)

ある実施態様において、前記第二の薬剤は、抗体又はその抗原結合性断片である(抗体の説明については、セクション5.4.1.1を参照されたい)。具体的な実施態様において、該抗体は、セクション5.4.1.1に記載されているような、免疫チェックポイントタンパク質、免疫チェックポイント関連タンパク質、又は共刺激シグナル伝達タンパク質に特異的に

10

20

30

40

50

結合し、かつその活性と拮抗する。

【0389】

(5.5.1.2.二重特異性キラー細胞エンゲージャー)

ある実施態様において、前記第二の薬剤は、セクション5.4.1.2に記載されているようなBiKEである。

【0390】

(5.5.1.3.抗ウイルス剤)

ある実施態様において、前記第二の薬剤は：イミキモド、ポドフィロックス、ポドフィリン、インターフェロン(IFN)、レチコロス(reticulos)、ノノキシノール-9、アシクロビル、ファムシクロビル、バラシクロビル、ガンシクロビル、シドフォビル；アマンタジン、リマンタジン；リバビリン；ザナマビル(zanamavir)、及びオセルタマビル(oseltamavir)が挙げられるが、これらに限定されない抗ウイルス剤；インジナビル、ネルフィナビル、リトナビル、もしくはサキナビルなどのプロテアーゼ阻害剤；ジダノシン、ラミブジン、スタブジン、ザルシタビン、もしくはジドブジンなどのヌクレオシド逆転写酵素阻害剤；又はネビラピンもしくはエファビレンツなどの非ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤である。10

【0391】

(5.5.2.遺伝子改変NK細胞を用いる感染性疾患の治療)

別の態様において、本明細書において提供されるものは、それを必要としている対象において感染性疾患を治療する方法であって、該対象に、単離されたNK細胞の集団又はその医薬組成物を投与することを含み、該NK細胞が、遺伝子改変されている(例えば、キメラ抗原受容体(CAR)及び/又はホーミング受容体を含むことが、キメラ抗原受容体(CAR)を含み、該CARが、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内刺激ドメイン、及び任意に共刺激ドメインを含む)、前記方法である。20

【0392】

遺伝子改変NK細胞(例えば、CAR及び/又はホーミング受容体を含むNK細胞)は、セクション5.3に記載されている。

【0393】

(5.5.3.感染性疾患)

ある実施態様において、前記感染性疾患は、ウイルス、細菌、真菌、又は蠕虫により引き起こされる感染症である。具体的な実施態様において、前記感染性疾患は、ウイルス感染である。30

【0394】

具体的な実施態様において、ウイルス感染は、アデノウイルス科、ピコルナウイルス科、ヘルペスウイルス科、ヘパドナウイルス科、フラビウイルス科、レトロウイルス科、オルトミクソウイルス科、パラミクソウイルス科、パピローマウイルス科、ラブドウイルス科、又はトガウイルス科のウイルスによる感染である。より具体的な実施態様において、該ウイルスは、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、コクサッキーウィルス、A型肝炎ウイルス(HAV)、ポリオウイルス、エブスタイン・バーウィルス(EBV)、単純ヘルペスウイルス1型(HS V1)、単純ヘルペスウイルス2型(HSV2)、ヒトサイトメガロウイルス(CMV)、ヒトヘルペスウイルス8型(HHV8)、帯状疱疹(herpes zoster)ウイルス(水痘带状疱疹ウイルス(VZV)もしくは帯状疱疹(shingles)ウイルス)、B型肝炎ウイルス(HBV)、C型肝炎ウイルス(HCV)、D型肝炎ウイルス(HDV)、E型肝炎ウイルス(HEV)、インフルエンザウイルス(例えば、A型インフルエンザウイルス、B型インフルエンザウイルス、C型インフルエンザウイルス、もしくはトゴトウイルス)、麻疹ウイルス、流行性耳下腺炎ウイルス、パラインフルエンザウイルス、パピローマウイルス、狂犬病ウイルス、又は風疹ウイルスである。40

【0395】

他のより具体的な実施態様において、該ウイルスは、アデノウイルス種A、血清型12、18、もしくは31；アデノウイルス種B、血清型3、7、11、14、16、34、35、もしくは50；アデノウイルス種C、血清型1、2、5、もしくは6；種D、血清型8、9、10、13、15、17、19、2050

、22、23、24、25、26、27、28、29、30、32、33、36、37、38、39、42、43、44、45、46  
、47、48、49、もしくは51;種E、血清型4;又は種F、血清型40もしくは41である。

### 【0396】

ある他により具体的な実施態様において、該ウイルスは、アポイウイルス(APOIV)、アロアウイルス(AROAV)、バガザウイルス(BAGV)、バンジウイルス(BANV)、ブブイウイルス(BOUV)、カシパコレウイルス(CPCV)、カレイ島ウイルス(CIV)、カウボーンリッジウイルス(CRV)、デングウイルス(DENV)、エッジヒルウイルス(EHV)、ガジェットガリーウイルス(GGYV)、イルヘウスウイルス(ILHV)、イスラエルターキー髄膜脳脊髄炎ウイルス(ITV)、日本脳炎ウイルス(JEV)、ジュグラウイルス(JUGV)、ジュチアパウイルス(JUTV)、カダムウイルス(KADV)、ケドウグウイルス(KEDV)、ココベラウイルス(KOKV)、コウタンゴウイルス(KOUV)、キャサナル森林病ウイルス(KFDV)、ランガトウイルス(LGTV)、メアバンウイルス(MEAV)、モドックウイルス(MODV)、モンタナ筋炎白質脳炎ウイルス(MMLV)、マレー渓谷脳炎ウイルス(MVEV)、ウンタヤウイルス(NTAV)、オムスク出血熱ウイルス(OHFV)、ポワサンウイルス(POWV)、リオプラボーウイルス(RBV)、ロイヤルファームウイルス(RFV)、サボヤウイルス(SABV)、セントルイス脳炎ウイルス(SLEV)、サルビエハウイルス(SVV)、サンペルリタウイルス(SPV)、ソーマレズリーフウイルス(SREV)、セピックウイルス(SEPV)、テンブスウイルス(TMUV)、ダニ媒介型脳炎ウイルス(TBEV)、チュレニーウイルス(TYUV)、ウガンダSウイルス(UGSV)、ウツツウイルス(USUV)、ウェセルスプロンウイルス(WESSV)、西ナイルウイルス(WNV)、ヤウンデウイルス(YAOV)、黄熱病ウイルス(YFV)、ヨコセウイルス(YOKV)、又はジカウイルス(ZIKV)である。10 20

### 【0397】

他の実施態様において、前記NK細胞は、1以上の他の抗ウイルス剤を含む抗ウイルス治療レジメンの一部として、ウイルス感染を有する対象に投与される。ウイルス感染を有する個体に投与し得る具体的な抗ウイルス剤としては:イミキモド、ポドフィロックス、ポドフィリン、インターフェロンアルファ(IFN )、レチコロス、ノノキシノール-9、アシクロビル、ファムシクロビル、バラシクロビル、ガンシクロビル、シドフォビル;アマンタジン、リマンタジン;リバビリン;ザナマビル及びオセルタマビル;プロテアーゼ阻害剤、例えば、インジナビル、ネルフィナビル、リトナビル、もしくはサキナビル;ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤、例えば、ジダノシン、ラミブジン、スタブジン、ザルシタビン;又はジドブジン;並びに非ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤、例えば、ネビラピンもしくはエファビレンツが挙げられるが、これらに限定されない。30

### 【0398】

#### (5.6.投与)

本明細書に記載されるような前記NK細胞、前記遺伝子改変NK細胞、又は前記第二の薬剤は、個体、例えば、腫瘍細胞又は感染細胞を有する個体に対し、生細胞又は前記第二の薬剤の投与に適した当技術分野において公知の医学的に許容し得る任意の経路により投与してもよい。様々な実施態様において、前記細胞は、それを必要としている部位に直接的に又は間接的に、外科的にインプラントしても、例えば、カテーテルもしくはシリンドリを手段として注射しても、輸液しても、又は別のやり方で投与してもよい。様々な実施態様において、前記第二の薬剤は、それを必要としている部位に直接的に又は間接的に、例えば、カテーテルもしくはシリンドリを手段として注射しても、輸液しても、又は別のやり方で投与してもよい。一実施態様において、前記細胞又は前記第二の薬剤は、個体に静脈内投与される。別の実施態様において、前記細胞又は前記第二の薬剤は、腫瘍、例えば、固形腫瘍、又は感染症の部位で、前記個体に投与される。前記個体が1を超える部位に腫瘍又は感染症を有している具体的な実施態様において、前記細胞又は前記第二の薬剤は、少なくとも2つ又は全ての腫瘍/感染症部位に投与される。ある他の実施態様において、前記細胞もしくは前記第二の薬剤、又はその組成物は、経口で、経鼻で、動脈内に、非経口で、点眼で、筋肉内に、皮下に、腹腔内に、脳内に、脳室内に、側脳室内に、くも膜下腔内に、大槽内に、脊髄内に、及び/又は脊髄周辺に(perispinally)投与される。具体的な実施態様において、前記細胞又は前記第二の薬剤、又はその組成物は、注射、輸液、静脈内(40 50)

V)投与、大腿内投与、又は腫瘍内投与によって投与される。具体的な実施態様において、前記細胞又は前記第二の薬剤は、ポンプ装置を伴う又は伴わない頭蓋内針もしくは椎骨内針、及び/又はカテーテルを介して送達される。

#### 【0399】

具体的な実施態様において、前記対象に、単離されたNK細胞の集団又はその医薬組成物を投与する工程は、注射によるものである。具体的な実施態様において、前記NK細胞の注射は、局所注射である。より具体的な実施態様において、前記局所注射は、固体腫瘍(例えば、肉腫)中に直接に行う。具体的な実施態様において、NK細胞の投与は、シリンジによる注射によるものである。具体的な実施態様において、注射によるNK細胞の投与は、腹腔鏡検査、内視鏡検査、超音波、コンピュータ断層撮影、磁気共鳴、又は放射線医学によって補助される。10

#### 【0400】

前記NK細胞、前記遺伝子改変NK細胞、又は前記第二の薬剤は、組成物中、例えば、マトリックス、ヒドロゲル、スキャフォールドなどの中で、個体へと投与することができる。

#### 【0401】

一実施態様において、前記細胞は、天然のマトリックス、例えば、羊膜材料などの胎盤生体材料上に、播種される。そのような羊膜材料は、例えば、哺乳動物胎盤から直接的に切断された羊膜;固定された又は熱処理された羊膜、実質的に乾燥した(すなわち、<20% H<sub>2</sub>Oの)羊膜、絨毛膜、実質的に乾燥した絨毛膜、実質的に乾燥した羊膜及び絨毛膜などとすることができる。その上に胎盤幹細胞を播種することができる好適な胎盤生体材料は、その開示が引用により完全に本明細書に組み込まれる、Haririの米国特許出願公開第2004/0048796号に記載されている。20

#### 【0402】

別の実施態様において、前記細胞は、例えば、注射に適するヒドロゲル溶液中に懸濁される。このような組成物に適したヒドロゲルは、自己集合性ペプチド、例えば、RAD16を含む。一実施態様において、前記細胞を含むヒドロゲル溶液を、例えば、金型中で硬化させて、インプラント術のために、その中に分散された細胞を有するマトリックスを形成させることができる。このようなマトリックス内の前記細胞を、該細胞がインプラント術の前に有糸分裂的に増殖するように培養することもできる。前記ヒドロゲルを、例えば、共有結合、イオン結合、又は水素結合を介して架橋される有機ポリマー(天然又は合成)として、水分子を捕捉してゲルを形成する三次元開格子構造を作製することができる。ヒドロゲル形成材料としては、イオン的に架橋される、ポリサッカライド、例えば、アルギン酸塩及びその塩、ペプチド、ポリホスファジン、並びにポリアクリレート、又はブロックポリマー、例えば、それぞれ温度又はpHにより架橋されるポリエチレンオキシド-ポリプロピレングリコールブロック共重合体が挙げられる。いくつかの実施態様において、前記ヒドロゲル又はマトリックスは、生分解性である。30

#### 【0403】

いくつかの実施態様において、本発明において用いられる製剤は、インサイチュで重合可能なゲルを含む(例えば、米国特許出願公開第2002/0022676号; Ansethらの文献、J. Control Release, 78(1-3):199-209 (2002); Wangらの文献、Biomaterials, 24(22):3969-80 (2003)を参照されたい。40

#### 【0404】

いくつかの実施態様において、電荷を有する側鎖基又はその一価イオン塩を有するポリマーは、水性溶液、例えば、水、緩衝塩溶液、又は水性アルコール溶液に少なくとも部分的に可溶性である。カチオンと反応させることができる酸性の側鎖基を有するポリマーの例は、ポリ(ホスファゼン)、ポリ(アクリル酸)、ポリ(メタクリル酸)、アクリル酸及びメタクリル酸のコポリマー、ポリ(酢酸ビニル)、及びスルホン化ポリマー、例えば、スルホン化ポリスチレンである。アクリル酸又はメタクリル酸とビニルエーテルモノマー又はポリマーとの反応により形成される酸性の側鎖基を有するコポリマーも使用することができる。酸性の基の例は、カルボン酸基、スルホン酸基、ハロゲン化(好ましくはフッ素化)ア50

ルコール基、フェノール性OH基、及び酸性OH基である。

【0405】

前記細胞は、三次元的フレームワーク又はスキャフォールド上に播種して、インビボイントプラントすることができる。そのようなフレームワークは、組織形成を刺激するか、又は別のやり方で本明細書に記載される方法の実践を強化又は向上する任意の1以上の増殖因子、細胞、薬物、又は他の成分と組み合わせてインプラントすることができる。

【0406】

本発明において使用することができるスキャフォールドの例としては、不織マット、多孔質発泡体、又は自己集合性ペプチドが挙げられる。不織マットは、グリコール酸及び乳酸の合成吸収性コポリマー(例えば、PGA/PLA)から構成される繊維(VICRYL, Ethicon, Inc ., Somerville, N.J.)を用いて形成することができる。例えば、ポリ(-カプロラクトン)/ポリ(グリコール酸)(PCL/PGA)コポリマーにより構成され、凍結乾燥又は凍結乾燥などのプロセスによって形成される発泡体(例えば、米国特許第6,355,699号を参照されたい)も、スキャフォールドとして使用することができる。

10

【0407】

前記細胞を、モノ-、ジ-、トリ-、アルファ-トリ-、ベータ-トリ-、及びテトラ-リン酸カルシウム、ヒドロキシアパタイト、フルオロアパタイト、硫酸カルシウム、フッ化カルシウム、酸化カルシウム、炭酸カルシウム、リン酸カルシウムマグネシウム、生物活性ガラス、例えばBIOガラス(登録商標)、及びそれらの混合物を含むが、これらに限定されない生理学的に許容し得るセラミック材料に播種するか、又はそれと接触させることもできる。現在市販されている多孔質生体適合性セラミック材料としては、SURGIBONE(登録商標)(CanMedica Corp., Canada)、ENDOBON(登録商標)(Merck Biomaterial France, France)、CEROS(登録商標)(Mathys, AG, Bettlach, Switzerland)、並びに鉱化コラーゲン骨移植製品、例えば、HEALOS(商標)(DePuy, Inc., Raynham, MA)及びVITOSS(登録商標)、RHAKOS S(商標)、及びCORTOSS(登録商標)(Orthovita, Malvern, Pa.)が挙げられる。前記フレームワークは、天然及び/又は合成材料の混合物、ブレンド、又は複合体とすることができる。

20

【0408】

別の実施態様において、細胞を、例えば、生体吸収性材料、例えば、PGA、PLA、PCLコポリマー、もしくはブレンド、又はヒアルロン酸から作られるマルチフィラメント糸で構成することができるフェルト上に播種するか、又はそれと接触させることができる。

30

【0409】

前記細胞は、別の実施態様において、複合体構造であってもよい発泡体スキャフォールド上に播種することができる。そのような発泡体スキャフォールドは、修復、置き換え、又は増強されるべき身体における具体的な構造の一部の形などの、有用な形状に成型することができる。いくつかの実施態様において、細胞接着を強化するために、前記フレームワークを、例えば、0.1M酢酸で処理して、それに続き、ポリリジン、PBS、及び/又はコラーゲン中でインキュベーションしてから、本明細書に記載される細胞が接種される。マトリックスを血漿コーティングすることにより、又は1以上のタンパク質(例えば、コラーゲン、弾性線維、細網線維)、糖タンパク質、グリコサミノグリカン(例えば、ヘパリン硫酸、コンドロイチン-4-硫酸、コンドロイチン-6-硫酸、デルマタン硫酸、ケラチン硫酸など)、細胞マトリックス、及び/もしくはこれらに限定されないが、ゼラチン、アルギン酸塩、寒天、アガロース、及び植物ガムなどの他の材料を添加することにより、該マトリックスの外部表面を修飾して、細胞の接着又は増殖、及び組織の分化を向上させてもよい。

40

【0410】

いくつかの実施態様において、前記スキャフォールドは、それを非血栓形成性にする材料を含むか、又はそのような材料で処理されている。このような処理及び材料はまた、内皮の成長、遊走、及び細胞外マトリックス析出を促進及び維持する可能性がある。これらの材料及び処理の例としては、天然材料、例えば、ラミニン及びIV型コラーゲンなどの基底膜タンパク質、合成の材料、例えば、EPTFE、及びPURSPAN(商標)(The Polymer Technol

50

ogy Group, Inc., Berkeley, Calif.)などのセグメント化されたポリウレタンウレアシリコーンが挙げられるが、これらに限定されない。前記スキャフォールドは、抗血栓剤、例えば、ヘパリンも含み得る;前記スキャフォールドを処理して、胎盤幹細胞を播種するとの前に表面電荷を変化させることもできる(例えば、血漿によるコーティング)。

[ 0 4 1 1 ]

具体的な実施態様において、前記NK細胞、前記遺伝子改変NK細胞、又は前記第二の薬剤は、医薬担体と投与される。該医薬担体は、当技術分野において公知の任意のものとすることができる。具体的な実施態様において、前記NK細胞又は前記遺伝子改変NK細胞は、細胞表面でフコシル化されている。

【 0 4 1 2 】

NK細胞もしくは遺伝子改変NK細胞(例えば、CAR及び/もしくはホーミング受容体を含むNK細胞)の数、又は前記第二の薬剤の量の決定は、独立して行い得る。そのような決定は、前記対象の状態に基づくことができ、医師によりなすことができる。

〔 0 4 1 3 〕

ある実施態様において、前記NK細胞、前記遺伝子改変NK細胞、又は前記第二の薬剤は、個体に対して、該個体に、検出可能な治療的利益をもたらす任意の量又は数で、例えば、有効量で用いられ、例えば、投与され、ここで、該個体は、ウイルス感染、がん、又は腫瘍細胞を有し、例えば、腫瘍細胞、固体腫瘍又は血液がんを有する個体、例えば、がん患者である。細胞は、細胞の絶対数でそのような個体へ投与することができ、例えば、該個体に、約、少なくとも約、もしくは多くとも約 $1 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$ 、 $5 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^{10}$ 、 $5 \times 10^{10}$ 、又は $1 \times 10^{11}$ 個の細胞を投与することができる。他の実施態様において、細胞は、細胞の相対数でそのような個体へ投与することができ、例えば、該個体に、約、少なくとも約、もしくは多くとも約 $1 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$ 、 $5 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^{10}$ 、 $5 \times 10^{10}$ 、又は $1 \times 10^{11}$ 個の細胞を投与することができる。他の実施態様において、細胞は、細胞の相対数でそのような個体へ投与することができ、例えば、該個体に、約、少なくとも約、もしくは多くとも約 $1 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、又は $5 \times 10^8$ 個の細胞を投与することができる。細胞は、NK細胞又は遺伝子改変NK細胞及び任意に胎盤灌流液細胞の数と、該個体における腫瘍/感染細胞の数(例えば、推定された数)とのおおよその比率により、そのような個体へ投与することができる。例えば、NK細胞又は前記遺伝子改変NK細胞は、前記個体に、約、少なくとも約、もしくは多くとも約1:1、1:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、15:1、20:1、25:1、30:1、35:1、40:1、45:1、50:1、55:1、60:1、65:1、70:1、75:1、80:1、85:1、90:1、95:1又は100:1の該個体における腫瘍/感染細胞の数に対する比率で投与することができる。そのような個体における腫瘍/感染細胞の数は、例えば、該個体由来の組織の試料、例えば、血液試料、生検などにおける腫瘍/感染細胞の数を計数することによって推定することができる。具体的な実施態様において、例えば、固体腫瘍については、前記計数することは、腫瘍(単数又は複数)のイメージングと組み合わせて行われ、おおよその腫瘍体積が得られる。

[ 0 4 1 4 ]

具体的な実施態様において、NK細胞(又は遺伝子改変NK細胞)に、胎盤灌流液細胞又は胎盤灌流液を補充する。具体的な実施態様において、1ミリリットルあたり約 $1 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ 個もしくはそれより多くのNK細胞(又は遺伝子改変NK細胞)、又は1ミリリットルあたり $1 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$ 、 $5 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^{10}$ 、 $5 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{11}$ 個もしくはそれより多くのNK細胞(又は遺伝子改変NK細胞)に、1ミリリットルあたり約もしくは少なくとも約 $1 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ 個もしくはそれより多くの単離された胎盤灌流液細胞を補充するか、又は1ミリリットルあたり $1 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$ 、 $5 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^{10}$ 、 $5 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{11}$ 個もしくはそれより多くの胎盤灌流液細胞を補充する。

$\times 10^{11}$ 個もしくはそれより多くの単離された胎盤灌流液細胞を補充する。他のより具体的な実施態様において、1ミリリットルあたり約 $1 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ 個もしくはそれより多くのNK細胞(又は遺伝子改変NK細胞)、又は1ミリリットルあたり $1 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$ 、 $5 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^{10}$ 、 $5 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{11}$ 個もしくはそれより多くのNK細胞(又は遺伝子改変NK細胞)に、約もしくは少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、もしくは1000mLの灌流液、又は約1ユニットの灌流液を補充する。

10

## 【0415】

別の具体的な実施態様において、NK細胞(又は遺伝子改変NK細胞)に、接着性胎盤細胞、例えば、接着性胎盤幹細胞又は複能性細胞、例えば、CD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>、CD200<sup>+</sup>組織培養プラスチック接着胎盤細胞を補充する。具体的な実施態様において、前記NK細胞に、1ミリリットルあたり約 $1 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ 個、もしくはそれより多くの接着性胎盤幹細胞、又は $1 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$ 、 $5 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^{10}$ 、 $5 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{11}$ 個、もしくはそれより多くの接着性胎盤細胞、例えば、接着性胎盤幹細胞もしくは複能性細胞を補充する。

## 【0416】

20

別の具体的な実施態様において、NK細胞(又は遺伝子改変NK細胞)に、馴化培地、例えば、CD34<sup>-</sup>、CD10<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>、CD200<sup>+</sup>組織培養プラスチック接着性胎盤細胞で馴化された培地、例えば、灌流液1ユニットあたり、又は $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$ 、 $10^9$ 、 $10^{10}$ 、もしくは $10^{11}$ 個のNK細胞(又は遺伝子改変NK細胞)あたり、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.1、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10mLの幹細胞馴化培養培地を補充する。ある実施態様において、前記組織培養プラスチック接着性胎盤細胞は、その開示が引用により完全に本明細書中に組み込まれる、米国特許第7,468,276号及び米国特許出願公開第2007/0275362号に記載されている複能性接着性胎盤細胞である。別の具体的な実施態様において、前記方法は、前記腫瘍細胞を、免疫調節化合物(例えば、セクション5.2.7.1に記載されているような免疫調節性化合物)もしくはサリドマイドと近接させるか、又は前記個体に該免疫調節化合物もしくはサリドマイドを投与することをさらに含む。

30

## 【0417】

別の具体的な実施態様において、NK細胞(又は遺伝子改変NK細胞)に、胎盤灌流液細胞を補充し、該灌流液細胞を、前記近接させることの前のある期間インターロイキン-2(IL-2)と近接させる。ある実施態様において、該期間は、前記近接させることの前の約、少なくとも、又は多くとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、又は48時間である。

## 【0418】

40

前記NK細胞、前記遺伝子改変NK細胞、又は前記第二の薬剤は、ウイルス感染、血液障害、又は固形腫瘍を有する個体に、療法の過程で一回(すなわち、単回投与で)投与することができるか;又は療法の間、複数回(すなわち、複数回投与で)、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、もしくは23時間毎に1回、もしくは1、2、3、4、5、6、もしくは7日毎に1回、もしくは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、24、36週、もしくはそれより多くの週毎に1回投与ができる。NK細胞(又は遺伝子改変NK細胞)及び第二の薬剤の双方が用いられる実施態様において、該第二の薬剤及び該NK細胞(又は遺伝子改変NK細胞)は、前記個体に一緒に、例えば、同じ製剤で投与することができるか;おおよそ同じ時間に、別々に、例えば、別の製剤で投与することができるか;又は別々に、例えば、異なる投薬スケジュールで、もしくはその日の異なる時間に投与することができる。前記第二の薬剤は、前記NK細胞(又は遺伝子改変NK細胞)の前に、その後に、又はそれと同時に投与することができる。NK細胞(もしくは遺伝子

50

改変NK細胞)又は第二の薬剤は、該NK細胞(もしくは遺伝子改変NK細胞)又は該第二の薬剤がそれまでに該個体に投与されたかどうかを問わずに、投与することができる。

#### 【0419】

##### (5.7. 患者)

本件開示でいう患者は、ヒト又は非ヒト脊椎動物、例えば、野生動物、飼育動物、もしくは家畜とすることができますが、これらに限定されない。ある実施態様において、該患者は、哺乳動物、例えば、ヒト、ウシ、イヌ、ネコ、ヤギ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ラット、又はマウスである。一実施態様において、該患者は、ヒト患者である。

#### 【0420】

##### (5.8. キット)

10

本明細書において提供されるのは、上述のNK細胞又は遺伝子改変NK細胞(例えば、CAR及び/もしくはホーミング受容体を含むNK細胞)を含む組成物を充填した1以上の容器、並びに上述の第二の薬剤を含む組成物を充填した1以上の容器を含む医薬パック又はキットである。また、本明細書において提供されるのは、上述のCAR及び/又はホーミング受容体を含むNK細胞を含む組成物を充填した1以上の容器を含む医薬パック又はキットである。そのような容器(複数可)には、医薬品又は生物学的製品の生産、使用、又は販売を規制する政府機関によって定められた形での注意書きと任意に関連付けることができ、該注意書きは、ヒトへの投与のための生産、使用、又は販売の該機関による認可を示すものである。

#### 【0421】

本明細書において包含されるキットは、本明細書において提供されるような治療する方法、例えば、血液がん、固形腫瘍、又はウイルス感染を治療する方法に従い使用することができる。

20

#### 【実施例】

#### 【0422】

##### (6. 実施例)

###### (6.1. 実施例1: リツキシマブを用いる抗体依存性細胞傷害(ADCC))

本明細書において示される本実施例は、NK細胞(ここでは、PiNK細胞)、及び細胞表面抗原(この場合、CD20)、例えば、腫瘍関連抗原に対して特異的な抗体の共投与が、該NK細胞のNK抗体依存性細胞介在性細胞傷害(ADCC)を増加させることを実証する。

#### 【0423】

30

本明細書において示される本実験は、抗CD20抗体、リツキシマブ、及びCD20の高発現細胞であるDaudi細胞(カタログ#: CCL-213、ATCC)を利用する。Daudi細胞を回収し、親油性の脂肪族残基が細胞原形質膜に入り込むPKH26(カタログ#: PKH26GL-1KT、Sigma-Aldrich)(Ferlazzo、G.らの文献、J Immunol, 172: 1455-1462 (2004); Lehmann、D.らの文献、Stem Cells Dev, 21: 2926-2938 (2012))で標識した。該細胞を洗浄し、図1に示したような異なる濃度で、リツキシマブ(及びアイソタイプ対照としてのヒトIgG)と、室温で1時間インキュベートした。3回洗浄後、 $10^4$ 個の標的細胞を、96ウェルU底組織培養プレートに入れ、10% FBSが補充された200 μlのRPMI 1640中、種々のエフェクター対標的(E:T)比率(50:1、20:1、10:1、及び2.5:1)で、培養されたNK細胞とインキュベートした。培養物を、37 °Cで、5% CO<sub>2</sub>中4時間インキュベートした。インキュベーション後、細胞を回収し、膜不透過性DNA染色試薬であるT0-PRO-3(カタログ# T3605、Invitrogen)を0.25 μMの終濃度まで、培養物に加え、それに続き、BD FACSCanto IIを用いるFACS分析を行った。細胞傷害性(図1では「%細胞傷害性」)を、全PKH26<sup>+</sup>標的腫瘍細胞内での、自然細胞死を減じた死細胞(PKH26<sup>+</sup>T0-PRO-3<sup>+</sup>)のパーセンテージとして示した。

40

#### 【0424】

Daudi細胞をリツキシマブとインキュベートすると、ヒトIgG対照と比べて、(PiNK)細胞の細胞傷害性が増加し、それにより、前記抗CD20抗体の共投与を伴う場合のPiNK細胞の強化された細胞溶解活性が示されている(図1)。

#### 【0425】

##### (6.2. 実施例2: 多発性骨髄腫に対する3段階NK細胞の細胞傷害性)

50

MM細胞株及び初代MM試料の表現型キャラクタリゼーション。初代多発性骨髄腫(MM)細胞(組織溶液、ドナーID:MM285、MM293)又はMM腫瘍細胞株:RPMI8226(ATCC、カタログ#CCL-155)、及びOPM2(DSMZ、カタログ#ACC-50)細胞(それぞれ $1 \times 10^6$ 個)を、本アッセイに使用した。細胞を、製造業者のプロトコールに従い抗PD-L1 APC(Biolegend、カタログ#329708)、抗CS1 PE-Cy7(Biolegend、カタログ#331816)、及び7-AAD(BD Bioscience、カタログ#559925)で染色した。データは、BD LSRFortessa(BD Biosciences)で取得し、FLOWJO(登録商標)ソフトウェア(Tree Star)を用いて解析した。データは、7-AAD-単一細胞でゲートをかけた%陽性細胞として表した。該%陽性ゲートの設定は、染色していない試料を対照として用いて行った。

## 【0426】

10

結果。MM細胞株でのPD-L1及びCS-1の発現を、図2に示す。図2のパネル内の最も左のピークは、前記対照を示し、最も右のピークは、試料を示す。PD-L1陽性である細胞のパーセンテージは、以下の通りであった:71.6% MM285、70.7% MM293、66.2% OPM-2、及び94.4% RPMI8226。CS-1陽性である細胞のパーセンテージは、以下の通りであった:31.8% MM285、58.8% MM293、93.4% OPM-2、及び29.5% RPMI8226。

## 【0427】

MM細胞株及び初代MM試料に対する3段階NK細胞の24時間細胞傷害性アッセイ。OPM2細胞を、10 μMのPKH26蛍光色素(Sigma-Aldrich、カタログ#PKH26-GL)で標識してから、48ウエルプレート内で、10% FBS及び抗生物質が補充された1mLのRPMI 1640(基本培地)中で、又は実験的条件:IL-15(5ng/mL)(Invitrogen、カタログ#PHC9153); IL-2(200IU/mL)(Invitrogen、カタログ#PHC0023); 抗PD-L1(10ng/mL)(Affymetrix、カタログ#16-5983-82); 抗IgG(10 ng/mL)(Affymetrix、カタログ#16-4714-82); REVILIMID(登録商標)(レナリドミド;1uM)、もしくはDMSO(0.1%)で、5名の異なるドナー由来の3段階NK細胞と3:1のエフェクター対標的(E:T)比率( $3 \times 10^5$ 個の3段階NK細胞及び $1 \times 10^5$ 個のOPM2細胞)で共培養した。標的細胞のみを、対照としてプレーティングした。37 及び5% CO<sub>2</sub>で24時間のインキュベーション後、細胞を回収し、それに続き、1 μMのTO-PRO-3で染色して、死細胞を特定した。各々の試料中の生標的細胞(PKH26<sup>+</sup>TO-PRO-3<sup>-</sup>)の数は、製造業者により提供されるプロトコールに従い計数用ビーズ(Invitrogen、カタログ#C36950)を用いるフローサイトメトリーにより定量化した。計数用ビーズは、長期の24時間培養の間の腫瘍細胞の増殖の可能性を考慮するために本アッセイに導入した。

20

## 【0428】

30

簡単に言うと、各々の試料中の生標的細胞の数を以下のように計算した:(%PKH26<sup>+</sup>TO-PRO-3<sup>-</sup>生標的)/(%計数用ビーズ) × (該計数用ビーズロットの割り当てビーズ計数値)。試料(3段階NK細胞の共培養物と標的細胞)中のパーセント生存率(%生存率)は、24時間後に3段階NK細胞との共培養物中に残存する生PKH26<sup>+</sup>標的細胞の絶対数を、標的細胞のみの培養物中に残存する生PKH26<sup>+</sup>標的細胞の絶対数で割ることにより計算される。報告した24時間でのパーセント細胞傷害性は:100-%生存率として計算した。結果を、平均値±該平均値の標準偏差として図示した。

## 【0429】

40

結果。3段階NK細胞は、種々のMM細胞株に対して細胞傷害活性を示した。該3段階NK細胞は、3:1のE:T比率で、4つの初代MM試料に対して20~60%の特異的溶解を示した(図3)。異なるドナー由来のMM標的のNK死滅化に対する異なった感受性が観察された。加えて、OPM2に対する3段階NK細胞の細胞傷害性の初期の評価は、これらの実験において利用したサイトカイン、免疫調節化合物、及びモノクローナル抗体の添加による細胞溶解活性の強化を示した(図4)。

## 【0430】

(等価物)

本発明は、本明細書に記載の具体的な実施態様によって範囲が限定されるべきではない。実際に、記載された変更に加えて、本発明の様々な変更が、上の説明及び添付の図面から当業者に明白となるであろう。そのような変更は、添付の特許請求の範囲内に含まれる

50

ことが意図される。

**【0431】**

本明細書で引用された全ての参考文献は、各々の個々の刊行物、特許、又は特許出願が、あらゆる目的のために、その全体として引用により具体的かつ個別に組み込まれることが示される場合と同じ程度に、あらゆる目的のために、引用により完全に本明細書中に組み込まれる。いかなる刊行物の引用も、出願日前のその開示を理由としたものであり、本発明が先行発明を理由としてそのような刊行物に先行する資格がないと認めるものと解釈されるべきではない。

本件出願は、以下の構成の発明を提供する。

(構成1)

10

それを必要としている対象におけるがんを治療する方法であって、

(a)該対象に、単離されたナチュラルキラー(NK)細胞の集団又はその医薬組成物を投与すること;及び

(b)該対象に、該がんを治療するために使用することができる第二の薬剤又はその医薬組成物を投与すること、を含む、前記方法。

(構成2)

前記第二の薬剤が、腫瘍関連抗原(TAA)に特異的に結合する抗体又はその抗原結合性断片である、構成1記載の方法。

(構成3)

20

前記抗体が、モノクローナル抗体である、構成2記載の方法。

(構成4)

前記TAAが、CD123、CLL-1、CD38、CS-1、CD138、ROR1、FAP、MUC1、PSCA、EGFRvIII、EPHA2、及びGD2からなる群から選択される、構成2又は3記載の方法。

(構成5)

前記第二の薬剤が、腫瘍微小環境関連抗原(TMAA)に特異的に結合する抗体又はその抗原結合性断片である、構成1記載の方法。

(構成6)

前記抗体が、モノクローナル抗体である、構成5記載の方法。

(構成7)

30

前記TMAAが、VEGF-A、EGF、PDGF、IGF、及びbFGFからなる群から選択される、構成5又は6記載の方法。

(構成8)

前記第二の薬剤が、免疫チェックポイントタンパク質に特異的に結合し、かつ該免疫チェックポイントタンパク質の活性と拮抗する抗体又はその抗原結合性断片である、構成1記載の方法。

(構成9)

前記抗体が、モノクローナル抗体である、構成8記載の方法。

(構成10)

40

前記免疫チェックポイントタンパク質が、CTLA-4、PD-1、PD-L1、PD-L2、及びLAG-3からなる群から選択される、構成8又は9記載の方法。

(構成11)

前記第二の薬剤が、二重特異性キラー細胞エンゲージャー(BiKE)である、構成1記載の方法。

(構成12)

前記BiKEが、TAAに特異的に結合する第一の单鎖可変断片(scFv)を含む、構成11記載の方法。

(構成13)

前記TAAが、CD123、CLL-1、CD38、CS-1、CD138、ROR1、FAP、MUC1、PSCA、EGFRvIII、EPHA2、及びGD2からなる群から選択される、構成12記載の方法。

(構成14)

50

前記BiKEが、CD16に特異的に結合する第二のscFvを含む、構成11～13のいずれか1記載の方法。

(構成15)

前記第二の薬剤が、抗炎症剤である、構成1記載の方法。

(構成16)

前記第二の薬剤が、免疫調節剤である、構成1記載の方法。

(構成17)

前記第二の薬剤が、細胞傷害性薬剤である、構成1記載の方法。

(構成18)

前記第二の薬剤が、がんワクチンである、構成1記載の方法。

(構成19)

前記第二の薬剤が、化学療法剤である、構成1記載の方法。

(構成20)

前記第二の薬剤が、HDAC阻害剤である、構成1記載の方法。

(構成21)

前記第二の薬剤が、siRNAである、構成1記載の方法。

(構成22)

前記単離されたNK細胞の集団又はその医薬組成物が、前記第二の薬剤又はその医薬組成物の前に投与される、構成1～21のいずれか1記載の方法。

(構成23)

前記単離されたNK細胞の集団又はその医薬組成物が、前記第二の薬剤又はその医薬組成物の後に投与される、構成1～21のいずれか1記載の方法。

(構成24)

前記単離されたNK細胞の集団又はその医薬組成物が、前記第二の薬剤又はその医薬組成物と同時に投与される、構成1～21のいずれか1記載の方法。

(構成25)

前記対象に、単離されたNK細胞の集団又はその医薬組成物を投与する前記工程が、注射、輸液、静脈内(IV)投与、大腿内投与、又は腫瘍内投与によるものである、構成1～24のいずれか1記載の方法。

(構成26)

前記対象に、単離されたNK細胞の集団又はその医薬組成物を投与する前記工程が、デバイズ、マトリックス、又はスキャフォールドを用いて行なわれる、構成1～25のいずれか1記載の方法。

(構成27)

前記対象に、第二の薬剤又はその医薬組成物を投与する前記工程が、注射、輸液、静脈内(IV)投与、大腿内投与、又は腫瘍内投与によるものである、構成1～26のいずれか1記載の方法。

(構成28)

前記対象に、第二の薬剤又はその医薬組成物を投与する前記工程が、デバイズ、マトリックス、又はスキャフォールドを用いて行なわれる、構成1～27のいずれか1記載の方法。

(構成29)

前記NK細胞が、該細胞表面でフコシル化されている、構成1～28のいずれか1記載の方法。

(構成30)

前記単離されたNK細胞の集団又はその医薬組成物が、単回投与で投与される、構成1～29のいずれか1記載の方法。

(構成31)

前記単離されたNK細胞の集団又はその医薬組成物が、複数回投与で投与される、構成1～29のいずれか1記載の方法。

(構成32)

10

20

30

40

50

前記第二の薬剤又はその医薬組成物が、単回投与で投与される、構成1～31のいずれか1記載の方法。

(構成33)

前記第二の薬剤又はその医薬組成物が、複数回投与で投与される、構成1～31のいずれか1記載の方法。

(構成34)

それを必要としている対象におけるがんを治療する方法であって、該対象に、単離されたNK細胞の集団又はその医薬組成物を投与することを含み、該NK細胞が、キメラ抗原受容体(CAR)を含み、該CARが、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内刺激ドメイン、及び任意に共刺激ドメインを含む、前記方法。

10

(構成35)

前記CARが、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内刺激ドメイン、及び共刺激ドメインを含む、構成34記載の方法。

(構成36)

前記CARを含む前記NK細胞が、該CARを発現するよう操作されたCD34+造血幹細胞(HSC)に由来する、構成34又は35記載の方法。

(構成37)

前記細胞外ドメインが、抗原結合性ドメインである、構成34～36のいずれか1記載の方法。

(構成38)

20

前記抗原結合性ドメインが、scFvドメインである、構成37記載の方法。

(構成39)

前記抗原結合性ドメインが、TAAに特異的に結合する、構成37又は38記載の方法。

(構成40)

前記TAAが、CD123、CLL-1、CD38、及びCS-1からなる群から選択される、構成39記載の方法。

(構成41)

前記細胞内刺激ドメインが、CD3ゼータシグナル伝達ドメインである、構成34～40のいずれか1記載の方法。

(構成42)

30

前記共刺激ドメインが、CD28、4-1BB、PD-1、OX40、CTLA-4、NKp46、NKp44、NKp30、DAP10、又はDAP12の細胞内ドメインを含む、構成34～41のいずれか1記載の方法。

(構成43)

それを必要としている対象におけるがんを治療する方法であって、該対象に、単離されたNK細胞の集団又はその医薬組成物を投与することを含み、該NK細胞が、ホーミング受容体を含む、前記方法。

(構成44)

前記ホーミング受容体を含む前記NK細胞が、該ホーミング受容体を発現するよう操作されたCD34+造血幹細胞(HSC)に由来する、構成43記載の方法。

(構成45)

40

前記ホーミング受容体が、走化性受容体である、構成43又は44記載の方法。

(構成46)

前記走化性受容体が、CXCR4、VEGFR2、及びCCR7からなる群から選択される、構成45記載の方法。

(構成47)

それを必要としている対象におけるがんを治療する方法であって、該対象に、単離されたナチュラルキラー(NK)細胞の集団又はその医薬組成物を投与することを含み、該NK細胞が、キメラ抗原受容体(CAR)及びホーミング受容体を含み、該CARが、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内刺激ドメイン、及び任意に共刺激ドメインを含む、前記方法。

(構成48)

50

前記CARが、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内刺激ドメイン、及び共刺激ドメインを含む、構成47記載の方法。

(構成49)

前記CAR及び前記ホーミング受容体を含む前記NK細胞が、該CARを発現するよう操作されたCD34+造血幹細胞(HSC)に由来する、構成47又は48記載の方法。

(構成50)

前記CAR及び前記ホーミング受容体を含む前記NK細胞が、該ホーミング受容体を発現するよう操作されたCD34+造血幹細胞(HSC)に由来する、構成47～49のいずれか1記載の方法。

(構成51)

前記細胞外ドメインが、抗原結合性ドメインである、構成47～50のいずれか1記載の方法。

(構成52)

前記抗原結合性ドメインが、scFvドメインである、構成51記載の方法。

(構成53)

前記抗原結合性ドメインが、TAAに特異的に結合する、構成51又は52記載の方法。

(構成54)

前記TAAが、CD123、CLL-1、CD38、及びCS-1からなる群から選択される、構成53記載の方法。

(構成55)

前記細胞内刺激ドメインが、CD3ゼータシグナル伝達ドメインである、構成47～54のいずれか1記載の方法。

(構成56)

前記共刺激ドメインが、CD28、4-1BB、PD-1、OX40、CTLA-4、NKp46、NKp44、NKp30、DAP10、又はDAP12の細胞内ドメインを含む、構成47～55のいずれか1記載の方法。

(構成57)

前記ホーミング受容体が、走化性受容体である、構成47～56のいずれか1記載の方法。

(構成58)

前記走化性受容体が、CXCR4、VEGFR2、及びCCR7からなる群から選択される、構成57記載の方法。

(構成59)

前記対象に、単離されたNK細胞の集団又はその医薬組成物を投与する前記工程が、注射、輸液、静脈内(IV)投与、大腿内投与、又は腫瘍内投与によるものである、構成34～58のいずれか1記載の方法。

(構成60)

前記対象に、単離されたNK細胞の集団又はその医薬組成物を投与する前記工程が、デバイス、マトリックス、又はスキャフォールドを用いて行なわれる、構成34～59のいずれか1記載の方法。

(構成61)

前記NK細胞が、該細胞表面でフコシル化されている、構成34～60のいずれか1記載の方法。

(構成62)

前記単離されたNK細胞の集団又はその医薬組成物が、単回投与で投与される、構成34～61のいずれか1記載の方法。

(構成63)

前記単離されたNK細胞の集団又はその医薬組成物が、複数回投与で投与される、構成34～61のいずれか1記載の方法。

(構成64)

前記がんが、血液がんである、構成1～63のいずれか1記載の方法。

(構成65)

10

20

30

40

50

前記がんが、 固形腫瘍である、 構成1～63のいずれか1記載の方法。

(構成 6 6 )

それを必要としている対象においてウイルス感染を治療する方法であって、

(a) 該対象に、 単離されたナチュラルキラー(NK)細胞の集団又はその医薬組成物を投与すること; 及び

(b) 該対象に、 該ウイルス感染を治療するために使用することができる第二の薬剤又はその医薬組成物を投与することを含む、 前記方法。

(構成 6 7 )

前記第二の薬剤が、 免疫チェックポイントタンパク質に特異的に結合し、 かつ該免疫チェックポイントタンパク質の活性と拮抗する抗体又はその抗原結合性断片である、 構成66記載の方法。

10

(構成 6 8 )

前記抗体が、 モノクローナル抗体である、 構成67記載の方法。

(構成 6 9 )

前記免疫チェックポイントタンパク質が、 CTLA-4、 PD-1、 PD-L1、 PD-L2、 及びLAG-3からなる群から選択される、 構成67又は68記載の方法。

(構成 7 0 )

前記第二の薬剤が、 二重特異性キラー細胞エンゲージャー(BiKE)である、 構成66記載の方法。

(構成 7 1 )

20

前記単離されたNK細胞の集団又はその医薬組成物が、 前記第二の薬剤又はその医薬組成物の前に投与される、 構成66～70のいずれか1記載の方法。

(構成 7 2 )

前記単離されたNK細胞の集団又はその医薬組成物が、 前記第二の薬剤又はその医薬組成物の後に投与される、 構成66～70のいずれか1記載の方法。

(構成 7 3 )

前記単離されたNK細胞の集団又はその医薬組成物が、 前記第二の薬剤又はその医薬組成物と同時に投与される、 構成66～70のいずれか1記載の方法。

(構成 7 4 )

30

前記対象に、 単離されたNK細胞の集団又はその医薬組成物を投与する前記工程が、 注射、 輸液、 静脈内(IV)投与、 大腿内投与、 又は腫瘍内投与によるものである、 構成66～73のいずれか1記載の方法。

(構成 7 5 )

前記対象に、 単離されたNK細胞の集団又はその医薬組成物を投与する前記工程が、 デバイス、 マトリックス、 又はスキヤフォールドを用いて行なわれる、 構成66～74のいずれか1記載の方法。

(構成 7 6 )

前記対象に、 第二の薬剤又はその医薬組成物を投与する前記工程が、 注射、 輸液、 静脈内(IV)投与、 大腿内投与、 又は腫瘍内投与によるものである、 構成66～75のいずれか1記載の方法。

40

(構成 7 7 )

前記対象に、 第二の薬剤又はその医薬組成物を投与する前記工程が、 デバイス、 マトリックス、 又はスキヤフォールドを用いて行なわれる、 構成66～76のいずれか1記載の方法。

(構成 7 8 )

前記NK細胞が、 該細胞表面でフコシル化されている、 構成66～77のいずれか1記載の方法。

(構成 7 9 )

前記単離されたNK細胞の集団又はその医薬組成物が、 単回投与で投与される、 構成66～78のいずれか1記載の方法。

50

(構成 8 0 )

前記単離されたNK細胞の集団又はその医薬組成物が、複数回投与で投与される、構成66～78のいずれか1記載の方法。

(構成 8 1 )

前記第二の薬剤又はその医薬組成物が、単回投与で投与される、構成66～80のいずれか1記載の方法。

(構成 8 2 )

前記第二の薬剤又はその医薬組成物が、複数回投与で投与される、構成66～80のいずれか1記載の方法。

(構成 8 3 )

それを必要としている対象においてウイルス感染を治療する方法であって、該対象に、単離されたNK細胞の集団又はその医薬組成物を投与することを含み、該NK細胞が、キメラ抗原受容体(CAR)を含み、該CARが、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内刺激ドメイン、及び任意に共刺激ドメインを含む、前記方法。

(構成 8 4 )

前記CARが、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内刺激ドメイン、及び共刺激ドメインを含む、構成83記載の方法。

(構成 8 5 )

前記CARを含む前記NK細胞が、該CARを発現するよう操作されたCD34+造血幹細胞(HSC)に由来する、構成83又は84記載の方法。

10

(構成 8 6 )

前記細胞外ドメインが、抗原結合性ドメインである、構成83～85のいずれか1記載の方法。

(構成 8 7 )

前記抗原結合性ドメインが、scFvドメインである、構成86記載の方法。

(構成 8 8 )

前記細胞内刺激ドメインが、CD3ゼータシグナル伝達ドメインである、構成83～87のいずれか1記載の方法。

(構成 8 9 )

前記共刺激ドメインが、CD28、4-1BB、PD-1、OX40、CTLA-4、NKp46、NKp44、NKp30、DAP10、又はDAP12の細胞内ドメインを含む、構成83～88のいずれか1記載の方法。

30

(構成 9 0 )

それを必要としている対象においてウイルス感染を治療する方法であって、該対象に、単離されたNK細胞の集団又はその医薬組成物を投与することを含み、該NK細胞が、ホーミング受容体を含む、前記方法。

(構成 9 1 )

前記ホーミング受容体を含む前記NK細胞が、該ホーミング受容体を発現するよう操作されたCD34+造血幹細胞(HSC)に由来する、構成90記載の方法。

(構成 9 2 )

前記ホーミング受容体が、走化性受容体である、構成90又は91記載の方法。

40

(構成 9 3 )

前記走化性受容体が、CXCR4、VEGFR2、及びCCR7からなる群から選択される、構成92記載の方法。

(構成 9 4 )

それを必要としている対象においてウイルス感染を治療する方法であって、該対象に、単離されたナチュラルキラー(NK)細胞の集団又はその医薬組成物を投与することを含み、該NK細胞が、キメラ抗原受容体(CAR)及びホーミング受容体を含み、該CARが、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内刺激ドメイン、及び任意に共刺激ドメインを含む、前記方法。

(構成 9 5 )

50

前記CARが、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内刺激ドメイン、及び共刺激ドメインを含む、構成94記載の方法。

(構成 9 6 )

前記CAR及び前記ホーミング受容体を含む前記NK細胞が、該CARを発現するよう操作されたCD34+造血幹細胞(HSC)に由来する、構成94又は95記載の方法。

(構成 9 7 )

前記NK細胞が、前記ホーミング受容体を発現するよう操作されたCD34+造血幹細胞(HSC)から製造される、構成94～96のいずれか1記載の方法。

(構成 9 8 )

前記細胞外ドメインが、抗原結合性ドメインである、構成94～97のいずれか1記載の方法。

10

(構成 9 9 )

前記抗原結合性ドメインが、scFvドメインである、構成98記載の方法。

(構成 1 0 0 )

前記細胞内刺激ドメインが、CD3ゼータシグナル伝達ドメインである、構成94～99のいずれか1記載の方法。

(構成 1 0 1 )

前記共刺激ドメインが、CD28、4-1BB、PD-1、OX40、CTLA-4、NKp46、NKp44、NKp30、DAP10、又はDAP12の細胞内ドメインを含む、構成94～100のいずれか1記載の方法。

(構成 1 0 2 )

20

前記ホーミング受容体が、走化性受容体である、構成94～101のいずれか1記載の方法。

(構成 1 0 3 )

前記走化性受容体が、CXCR4、VEGFR2、及びCCR7からなる群から選択される、構成102記載の方法。

(構成 1 0 4 )

前記対象に、単離されたNK細胞の集団又はその医薬組成物を投与する前記工程が、注射、輸液、静脈内(IV)投与、大腿内投与、又は腫瘍内投与によるものである、構成83～103のいずれか1記載の方法。

(構成 1 0 5 )

30

前記対象に、単離されたNK細胞の集団又はその医薬組成物を投与する前記工程が、デバイス、マトリックス、又はスキヤフォールドを用いて行なわれる、構成83～104のいずれか1記載の方法。

(構成 1 0 6 )

前記NK細胞が、細胞表面でフコシル化されている、構成83～105のいずれか1記載の方法。

(構成 1 0 7 )

前記単離されたNK細胞の集団又はその医薬組成物が、単回投与で投与される、構成83～106のいずれか1記載の方法。

(構成 1 0 8 )

40

前記単離されたNK細胞の集団又はその医薬組成物が、複数回投与で投与される、構成83～106のいずれか1記載の方法。

(構成 1 0 9 )

前記NK細胞が、胎盤中間ナチュラルキラー(PiNK)細胞である、構成1～13及び15～108のいずれか1記載の方法。

(構成 1 1 0 )

前記NK細胞が、活性化NK細胞である、構成1～108のいずれか1記載の方法。

(構成 1 1 1 )

前記NK細胞が、三工程プロセスNK(TSPNK)細胞である、構成1～108のいずれか1記載の方法。

(構成 1 1 2 )

50

前記TSPNK細胞が、NK前駆細胞である、構成111記載の方法。

(構成113)

前記PiNK細胞が、胎盤細胞に由来する、構成108記載の方法。

(構成114)

前記胎盤細胞が、胎盤灌流液から得られる、構成113記載の方法。

(構成115)

前記胎盤細胞が、機械的及び/又は酵素的に破壊されている胎盤組織から得られる、構成113記載の方法。

(構成116)

前記活性化NK細胞が：

10

(a)造血幹細胞又は前駆細胞の集団が増殖し、該造血幹細胞又は前駆細胞の集団内の複数の造血幹細胞又は前駆細胞が、該増殖の間にNK細胞に分化するように、該集団を、インターロイキン-15(IL-15)、並びに任意に、幹細胞因子(SCF)及びインターロイキン-7(IL-7)のうちの1つ以上を含む第一の培地中に播種すること(ここで、該IL-15並びに任意のSCF及びIL-7は、該培地の不確定成分中には含まれない);及び

(b)前記工程(a)由来の細胞を、インターロイキン-2(IL-2)を含む第二の培地の中で増殖させて、活性化NK細胞の集団を製造すること、

を含むプロセスにより製造される、構成110記載の方法。

(構成117)

前記活性化NK細胞が：造血幹細胞又は前駆細胞の集団を、幹細胞因子(SCF)、インターロイキン-7(IL-7)、及びインターロイキン-15(IL-15)のうちの1つ以上を含む第一の培地中で増殖させることを含むプロセスであって、該SCF、IL-7、及びIL-15は、該培地の不確定成分中には含まれず、かつ該造血幹細胞又は前駆細胞の集団内の複数の造血幹細胞又は前駆細胞が、該増殖の間にNK細胞に分化し;かつ該方法の第二の工程が、前記第一の工程由来の細胞を、インターロイキン-2(IL-2)を含む第二の培地の中で増殖させて、活性化NK細胞を製造することを含む、前記プロセスにより製造される、構成110記載の方法。

20

(構成118)

前記第一の培地が、Fms様チロシンキナーゼ3リガンド(Flt3-L)、トロンボポエチン(Tpo)、インターロイキン-2(IL-2)、又はヘパリンのうちの1つ以上をさらに含む、構成116記載の方法。

30

(構成119)

前記第一の培地が、ウシ胎仔血清又はヒト血清をさらに含む、構成118記載の方法。

(構成120)

前記SCFが、前記第一の培地中に、約1～約150ng/mLの濃度で存在する、構成118記載の方法。

(構成121)

前記Flt3-Lが、前記第一の培地中に、約1～約150ng/mLの濃度で存在する、構成118記載の方法。

(構成122)

前記IL-2が、前記第一の培地中に、約50～約1500IU/mLの濃度で存在する、構成118記載の方法。

40

(構成123)

前記IL-7が、前記第一の培地中に、約1～約150ng/mLの濃度で存在する、構成118記載の方法。

(構成124)

前記IL-15が、前記第一の培地中に、1～約150ng/mLの濃度で存在する、構成118記載の方法。

(構成125)

前記Tpoが、前記第一の培地中に、約1～約150ng/mLの濃度で存在する、構成118記載の方法。

50

(構成 1 2 6 )

前記ヘパリンが、前記第一の培地中に、約0.1～約30U/mLの濃度で存在する、構成118記載の方法。

(構成 1 2 7 )

前記第二の工程における前記IL-2が、前記第二の培地中に、50～約1500IU/mLの濃度で存在する、構成116記載の方法。

(構成 1 2 8 )

前記第二の培地が、ウシ胎仔血清(FCS)、トランスフェリン、インスリン、エタノールアミン、オレイン酸、リノール酸、パルミチン酸、ウシ血清アルブミン(BSA)、及びフィトヘマグルチニンのうちの1つ以上をさらに含む、構成116記載の方法。

10

(構成 1 2 9 )

前記造血幹細胞又は前駆細胞が、CD34<sup>+</sup>である、構成116記載の方法。

(構成 1 3 0 )

前記造血幹細胞又は前駆細胞が、ヒト胎盤灌流液由来の造血幹細胞又は前駆細胞、及び臍帯由来の造血幹細胞又は前駆細胞を含み、該胎盤灌流液及び該臍帯血が、同じ胎盤由来のものである、構成116記載の方法。

(構成 1 3 1 )

工程(b)における前記フィーダー細胞が、マイトイシンCで処理された末梢血単核細胞(PBMC)、K562細胞、又は組織培養物接着性幹細胞を含む、構成116記載の方法。

20

(構成 1 3 2 )

前記NK細胞が、CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>である、構成116記載の方法。

(構成 1 3 3 )

前記NK細胞がさらに、CD94<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup>である、構成132記載の方法。

(構成 1 3 4 )

前記NK細胞がさらに、CD161<sup>-</sup>である、構成132記載の方法。

(構成 1 3 5 )

前記NK細胞がさらに、NKG2D<sup>+</sup>である、構成132記載の方法。

(構成 1 3 6 )

前記NK細胞がさらに、NKp46<sup>+</sup>である、構成132記載の方法。

30

(構成 1 3 7 )

前記NK細胞がさらに、CD226<sup>+</sup>である、構成132記載の方法。

(構成 1 3 8 )

前記TSPNK細胞が：

(a)造血幹細胞又は前駆細胞を、Flt3L、TPO、SCF、IL-7、G-CSF、IL-6、及びGM-CSFを含む第一の培地中で培養すること；

(b)それに続き、該細胞を、Flt3L、SCF、IL-15、及びIL-7、IL-17及びIL-15、G-CSF、IL-6、及びGM-CSFを含む第二の培地中で培養すること；及び

(c)それに続き、該細胞を、SCF、IL-15、IL-7、IL-2、G-CSF、IL-6、及びGM-CSFを含む第三の培地中で培養することを含むプロセスにより製造される、構成111又は112記載の方法。

40

(構成 1 3 9 )

培養工程(a)の期間が、7～9日であり、培養工程(b)の期間が、5～7日であり、かつ培養工程(c)の期間が、5～9日である、構成138記載の方法。

(構成 1 4 0 )

培養工程(a)の期間が、7～9日であり、培養工程(b)の期間が、5～7日であり、かつ培養工程(c)の期間が、21～35日である、構成138記載の方法。

(構成 1 4 1 )

前記プロセスにおいて用いられる前記造血幹細胞又は前駆細胞が、CD34<sup>+</sup>である、構成138、139、又は140記載の方法。

(構成 1 4 2 )

50

前記造血幹細胞又は前駆細胞が、ヒト胎盤灌流液由來の造血幹細胞又は前駆細胞、及び臍帯由來の造血幹細胞又は前駆細胞を含み、該胎盤灌流液及び該臍帯血が、同じ胎盤由來のものである、構成138、139、又は140記載の方法。

(構成143)

工程(a)の最後で、CD34-細胞が、80%超の前記TSPNK細胞を含む、構成138～142のいずれか1記載の方法。

(構成144)

前記TSPNK細胞が、40%以下のCD3-CD56+細胞を含む、構成138～143のいずれか1記載の方法。

(構成145)

前記TSPNK細胞が、CD52+CD117+である細胞を含む、構成138～144のいずれか1記載の方法。

(構成146)

前記NK細胞が：

(a)造血幹細胞又は前駆細胞を、幹細胞動員剤及びトロンボポエチン(Tpo)を含む第一の培地中で培養して、第一の細胞の集団を製造すること；

(b)該第一の細胞の集団を、幹細胞動員剤及びインターロイキン-15(IL-15)を含み、Tpoを欠く第二の培地中で培養して、第二の細胞の集団を製造すること；及び

(c)該第二の細胞の集団を、IL-2及びIL-15を含み、幹細胞動員剤及びLMWHを欠く第三の培地中で培養して、第三の細胞の集団を製造すること；

を含むプロセスにより製造され、

該第三の細胞の集団が、CD56+、CD3-、CD16-又はCD16+、及びCD94+又はCD94-であるナチュラルキラー細胞を含み、かつ該ナチュラルキラー細胞の少なくとも80%が、生細胞である、構成1～108のいずれか1記載の方法。

(構成147)

前記対象が、ヒトである、構成1～146のいずれか1記載の方法。

(構成148)

それを必要としている対象におけるがんを治療するためのキットであつて：

(a)単離されたNK細胞の集団又はその医薬組成物；及び

(b)該がんを治療するために使用することができる第二の薬剤又はその医薬組成物を含む、前記キット。

(構成149)

第二の薬剤が、腫瘍関連抗原(TAA)に特異的に結合する抗体又はその抗原結合性断片である、構成148記載のキット。

(構成150)

前記抗体が、モノクローナル抗体である、構成149記載のキット。

(構成151)

前記TAAが、CD123、CLL-1、CD38、CS-1、CD138、ROR1、FAP、MUC1、PSCA、EGFRvIII、EPHA2、及びGD2からなる群から選択される、構成149又は150記載のキット。

(構成152)

前記第二の薬剤が、腫瘍微小環境関連抗原(TMAA)に特異的に結合する抗体又はその抗原結合性断片である、構成148記載のキット。

(構成153)

前記抗体が、モノクローナル抗体である、構成152記載のキット。

(構成154)

前記TMAAが、VEGF-A、EGF、PDGF、IGF、及びbFGFからなる群から選択される、構成152又は153記載のキット。

(構成155)

前記第二の薬剤が、免疫チェックポイントタンパク質に特異的に結合し、かつ該免疫チェックポイントタンパク質の活性と拮抗する抗体又はその抗原結合性断片である、構成14

10

20

30

40

50

8記載のキット。(構成 156 )前記抗体が、モノクローナル抗体である、構成155記載のキット。(構成 157 )前記免疫チェックポイントタンパク質が、CTLA-4、PD-1、PD-L1、PD-L2、及びLAG-3からなる群から選択される、構成155又は156記載のキット。(構成 158 )前記第二の薬剤が、二重特異性キラー細胞エンゲージャー(BiKE)である、構成148記載の方法。(構成 159 )前記BiKEが、TAAに特異的に結合する第一の単鎖可変断片(scFv)を含む、構成158記載のキット。

10

(構成 160 )前記TAAが、CD123、CLL-1、CD38、CS-1、CD138、ROR1、FAP、MUC1、PSCA、EGFRvIII、EPHA2、及びGD2からなる群から選択される、構成159記載のキット。(構成 161 )前記BiKEが、CD16に特異的に結合する第二のscFvを含む、構成158～160のいずれか1記載のキット。(構成 162 )前記第二の薬剤が、抗炎症剤である、構成148記載のキット。

20

(構成 163 )前記第二の薬剤が、免疫調節剤である、構成148記載のキット。(構成 164 )前記第二の薬剤が、細胞傷害性薬剤である、構成148記載のキット。(構成 165 )前記第二の薬剤が、がんワクチンである、構成148記載のキット。(構成 166 )前記第二の薬剤が、化学療法剤である、構成148記載のキット。(構成 167 )前記第二の薬剤が、HDAC阻害剤である、構成148記載のキット。

30

(構成 168 )前記第二の薬剤が、siRNAである、構成148記載のキット。(構成 169 )前記がんが、血液がんである、構成148～168のいずれか1記載のキット。(構成 170 )前記がんが、 固形腫瘍である、構成148～168のいずれか1記載の方法。(構成 171 )それを必要としている対象においてウイルス感染を治療するためのキットであって：(a) 単離されたナチュラルキラー(NK)細胞の集団又はその医薬組成物；及び(b) 該ウイルス感染を治療するために使用することができる第二の薬剤又はその医薬組成物、

40

を含む前記キット。(構成 172 )前記第二の薬剤が、免疫チェックポイントタンパク質に特異的に結合し、かつ該免疫チェックポイントタンパク質の活性と拮抗する抗体又はその抗原結合性断片である、構成171記載のキット。(構成 173 )前記抗体が、モノクローナル抗体である、構成172記載のキット。(構成 174 )前記免疫チェックポイントタンパク質が、CTLA-4、PD-1、PD-L1、PD-L2、及びLAG-3か

50

らなる群から選択される、構成171又は172記載のキット。

(構成175)

前記第二の薬剤が、二重特異性キラー細胞エンゲージャー(BiKE)である、構成171記載の方法。

(構成176)

前記NK細胞が、胎盤中間ナチュラルキラー(PiNK)細胞である、構成148～160及び162～175のいずれか1記載のキット。

(構成177)

前記NK細胞が、活性化NK細胞である、構成148～175のいずれか1記載のキット。

(構成178)

前記NK細胞が、TSPNK細胞である、構成148～175のいずれか1記載のキット。

(構成179)

前記TSPNK細胞が、NK前駆細胞である、構成178記載のキット。

(構成180)

前記PiNK細胞が、胎盤細胞に由来する、構成176記載のキット。

(構成181)

前記胎盤細胞が、胎盤灌流液から得られる、構成180記載のキット。

(構成182)

前記胎盤細胞が、機械的及び/又は酵素的に破壊されている胎盤組織から得られる、構成181記載のキット。

(構成183)

前記活性化NK細胞が：

(a)造血幹細胞又は前駆細胞の集団が増殖し、該造血幹細胞又は前駆細胞の集団内の複数の造血幹細胞又は前駆細胞が、該増殖の間にNK細胞に分化するように、該集団を、インターロイキン-15(IL-15)、並びに任意に、幹細胞因子(SCF)及びインターロイキン-7(IL-7)のうちの1つ以上を含む第一の培地中に播種すること(ここで、該IL-15並びに任意のSCF及びIL-7は、該培地の不確定成分中には含まれない);及び

(b)前記工程(a)由来の細胞を、インターロイキン-2(IL-2)を含む第二の培地中に増殖させて、活性化NK細胞の集団を製造すること、

を含むプロセスにより製造される、構成177記載のキット。

(構成184)

前記活性化NK細胞が：造血幹細胞又は前駆細胞の集団を、幹細胞因子(SCF)、インターロイキン-7(IL-7)、及びインターロイキン-15(IL-15)のうちの1つ以上を含む第一の培地中で増殖させることを含むプロセスであって、該SCF、IL-7、及びIL-15は、該培地の不確定成分中には含まれず、かつ該造血幹細胞又は前駆細胞の集団内の複数の造血幹細胞又は前駆細胞が、該増殖の間にNK細胞に分化し;かつ該方法の第二の工程が、前記第一の工程由來の細胞を、インターロイキン-2(IL-2)を含む第二の培地中で増殖させて、活性化NK細胞を製造することを含む、前記プロセスにより製造される、構成177記載のキット。

(構成185)

前記第一の培地が、Fms様チロシンキナーゼ3リガンド(Flt3-L)、トロンボポエチン(Tpo)、インターロイキン-2(IL-2)、又はヘパリンのうちの1つ以上をさらに含む、構成183記載のキット。

(構成186)

前記第一の培地が、ウシ胎仔血清又はヒト血清をさらに含む、構成185記載のキット。

(構成187)

前記SCFが、前記第一の培地中に、約1～約150ng/mLの濃度で存在する、構成185記載のキット。

(構成188)

前記Flt3-Lが、前記第一の培地中に、約1～約150ng/mLの濃度で存在する、構成185記載のキット。

10

20

30

40

50

(構成 189 )

前記IL-2が、前記第一の培地中に、約50～約1500IU/mLの濃度で存在する、構成185記載のキット。

(構成 190 )

前記IL-7が、前記第一の培地中に、約1～約150ng/mLの濃度で存在する、構成185記載のキット。

(構成 191 )

前記IL-15が、前記第一の培地中に、1～約150ng/mLの濃度で存在する、構成185記載のキット。

(構成 192 )

前記Tpoが、前記第一の培地中に、約1～約150ng/mLの濃度で存在する、構成185記載のキット。

(構成 193 )

前記ヘパリンが、前記第一の培地中に、約0.1～約30U/mLの濃度で存在する、構成185記載のキット。

(構成 194 )

前記第二の工程における前記IL-2が、前記第二の培地中に、50～約1500IU/mLの濃度で存在する、構成183記載のキット。

(構成 195 )

前記第二の培地が、ウシ胎仔血清(FCS)、トランスフェリン、インスリン、エタノールアミン、オレイン酸、リノール酸、パルミチン酸、ウシ血清アルブミン(BSA)、及びフィトヘマグルチニンのうちの1つ以上をさらに含む、構成183記載のキット。

(構成 196 )

前記造血幹細胞又は前駆細胞が、CD34<sup>+</sup>である、構成183記載のキット。

(構成 197 )

前記造血幹細胞又は前駆細胞が、ヒト胎盤灌流液由来の造血幹細胞又は前駆細胞、及び臍帯由来の造血幹細胞又は前駆細胞を含み、該胎盤灌流液及び該臍帯血が、同じ胎盤由来のものである、構成183記載のキット。

(構成 198 )

工程(b)における前記フィーダー細胞が、マイトイシンCで処理された末梢血単核細胞(PBMC)、K562細胞、又は組織培養物接着性幹細胞を含む、構成183記載のキット。

(構成 199 )

前記NK細胞が、CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>である、構成183記載のキット。

(構成 200 )

前記NK細胞がさらに、CD94<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup>である、構成199記載のキット。

(構成 201 )

前記NK細胞がさらに、CD161<sup>-</sup>である、構成199記載のキット。

(構成 202 )

前記NK細胞がさらに、NKG2D<sup>+</sup>である、構成199記載のキット。

(構成 203 )

前記NK細胞がさらに、NKp46<sup>+</sup>である、構成199記載のキット。

(構成 204 )

前記NK細胞がさらに、CD226<sup>+</sup>である、構成199記載のキット。

(構成 205 )

前記TSPNK細胞が：

(a)造血幹細胞又は前駆細胞を、Flt3L、TPO、SCF、IL-7、G-CSF、IL-6、及びGM-CSFを含む第一の培地中で培養すること；

(b)それに続き、該細胞を、Flt3L、SCF、IL-15、及びIL-7、IL-17及びIL-15、G-CSF、IL-6、及びGM-CSFを含む第二の培地中で培養すること；及び

(c)それに続き、該細胞を、SCF、IL-15、IL-7、IL-2、G-CSF、IL-6、及びGM-CSFを含む第

10

20

30

40

50

三の培地中で培養すること

を含むプロセスにより製造される、構成178又は179記載のキット。

(構成206)

培養工程(a)の期間が、7~9日であり、培養工程(b)の期間が、5~7日であり、かつ培養工程(c)の期間が、5~9日である、構成205記載のキット。

(構成207)

培養工程(a)の期間が、7~9日であり、培養工程(b)の期間が、5~7日であり、かつ培養工程(c)の期間が、21~35日である、構成205記載のキット。

(構成208)

前記プロセスにおいて用いられる前記造血幹細胞又は前駆細胞が、CD34+である、構成205、206、又は207記載のキット。

10

(構成209)

前記造血幹細胞又は前駆細胞が、ヒト胎盤灌流液由来の造血幹細胞又は前駆細胞、及び臍帯由来の造血幹細胞又は前駆細胞を含み、該胎盤灌流液及び該臍帯血が、同じ胎盤由来のものである、構成205、206、又は207記載のキット。

(構成210)

工程(a)の最後で、CD34-細胞が80%超の前記TSPNK細胞を含む、構成205~209のいずれか1記載のキット。

(構成211)

前記TSPNK細胞が、40%以下のCD3-CD56+細胞を含む、構成205~210のいずれか1記載のキット。

20

(構成212)

前記TSPNK細胞が、CD52+CD117+である細胞を含む、構成205~211のいずれか1記載のキット。

(構成213)

前記NK細胞が:

(a)造血幹細胞又は前駆細胞を、幹細胞動員剤及びトロンボポエチン(Tpo)を含む第一の培地中で培養して、第一の細胞の集団を製造すること;

(b)該第一の細胞の集団を、幹細胞動員剤及びインターロイキン-15(IL-15)を含み、Tpoを欠く第二の培地中で培養して、第二の細胞の集団を製造すること;及び

30

(c)該第二の細胞の集団を、IL-2及びIL-15を含み、幹細胞動員剤及びLMWHを欠く第三の培地中で培養して、第三の細胞の集団を製造すること;

を含むプロセスにより製造され、該第三の細胞の集団が、CD56+、CD3-、CD16-又はCD16+、かつCD94+又はCD94-であるナチュラルキラー細胞を含み、かつ該ナチュラルキラー細胞の少なくとも80%が、生細胞である、構成148~175のいずれか1記載のキット。

(構成214)

前記対象が、ヒトである、構成147~213のいずれか1記載のキット。

【図1】

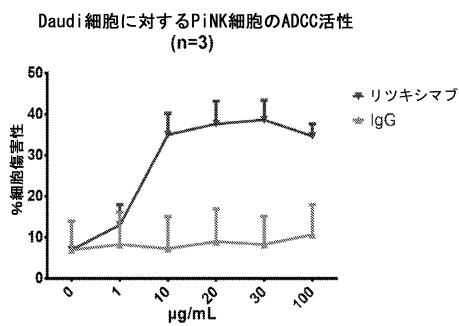
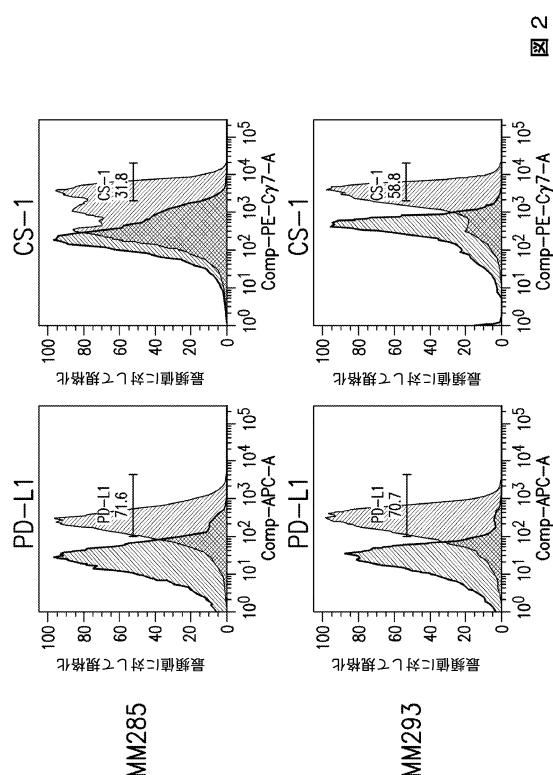
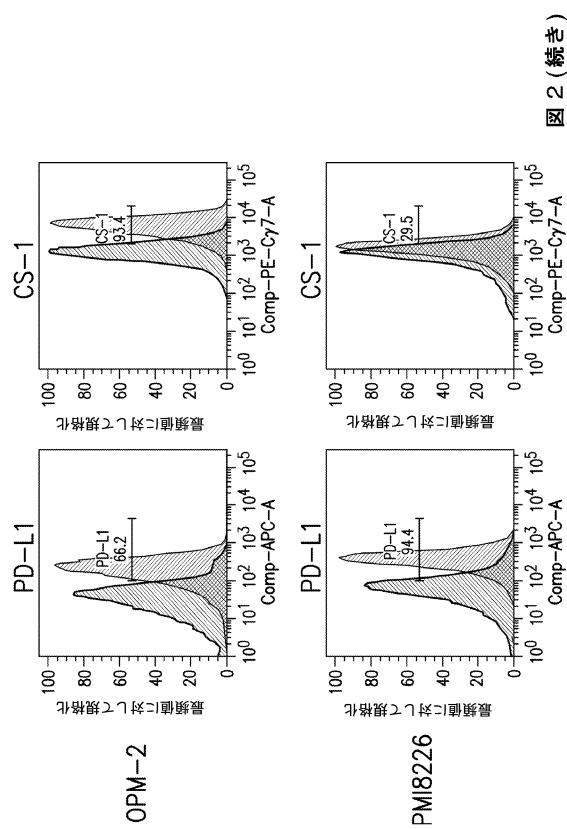


図1

【図2-01】



【図2-02】



【図3】

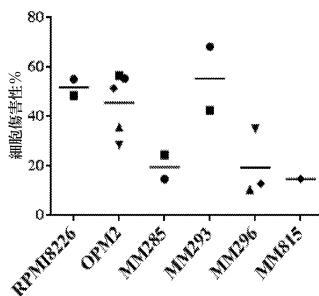


図3

【図4】

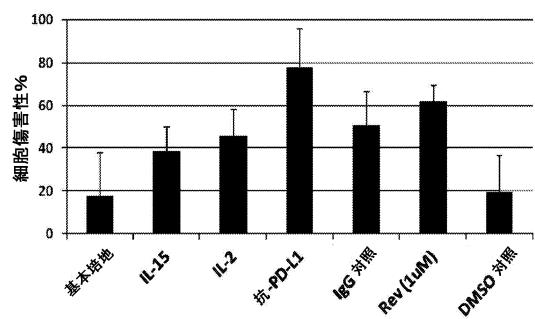


図 4

【配列表】

0006797803000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		
A 6 1 K	39/00	(2006.01)	A 6 1 K	39/395 T
A 6 1 K	31/7105	(2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 0 5
A 6 1 K	31/713	(2006.01)	A 6 1 K	39/00 H
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 1 1
A 6 1 P	35/02	(2006.01)	A 6 1 K	31/7105
C 0 7 K	16/28	(2006.01)	A 6 1 K	31/713
C 1 2 N	5/0783	(2010.01)	A 6 1 K	48/00
C 0 7 K	16/18	(2006.01)	A 6 1 P	35/02
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 0 7 K	16/28 Z N A
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 N	5/0783
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 0 7 K	16/18
			C 1 2 N	5/10
			C 1 2 P	21/08
			C 1 2 N	15/09

(72)発明者 ジェフリー ハリス

アメリカ合衆国 ニュージャージー州 08530 ランバートビル ステーブル ピュー コート 17

(72)発明者 ウラジミール ジャンコビク

アメリカ合衆国 ニューヨーク州 10044 ニューヨーク アブト. 15 ビー リバー ロード 10

審査官 渡部 正博

(56)参考文献 国際公開第2014 / 028453 (WO , A1 )

米国特許出願公開第2014 / 0322183 (US , A1 )

Blood , 2012年 , Vol.119, No.22 , p.5164-5172

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

A 6 1 K 35 / 00 - 35 / 768  
 A 6 1 K 31 / 00 - 31 / 80  
 A 6 1 K 39 / 00 - 39 / 44  
 A 6 1 K 45 / 00 - 45 / 08  
 A 6 1 P 1 / 00 - 43 / 00  
 A 6 1 K 48 / 00  
 C 0 7 K 16 / 00 - 16 / 46  
 C 1 2 N 5 / 00 - 5 / 28  
 C 1 2 N 15 / 00 - 15 / 90  
 C 1 2 P 21 / 00 - 21 / 08  
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )  
 C a p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )