

(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 I

A 6 1 K 35/17 (2015.01)

A 6 1 K 35/17 Z

A 6 1 K 45/00 (2006.01)

A 6 1 K 45/00

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 35/00

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

A 6 1 P 43/00 1 2 1

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K 39/395 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) 国際出願番号 PCT/US2015/068069
 (87) 国際公開番号 W02016/109668
 (87) 国際公開日 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 07
 901, サミット, モリス アベニュー
 86
 (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 0
 8820 エディソン ティンバー オー
 クス ロード 1106
 (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 0
 7039 リビングストン マウントヘブ
 ン ドライブ 10
 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。

【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。

【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、固形腫瘍である、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単鎖可変断片(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】

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る用いて、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】

【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、進行したがんと有する患者のエキ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、骨髓関連疾患、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。

【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。

【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る用いる、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。

【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

10

20

30

40

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、デバイズ(devise)、マトリックス、又はスキャフォールドを

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。

【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。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、又はスキャフォールドを用いて行なわれる。

10

【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に結合する抗体由来の単鎖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、前記抗原結合ドメインは、CD20に結合する抗体由来の単鎖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、パーキットリンパ腫)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、パーキットリンパ腫)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、パーキットリンパ腫)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。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同時に投与される。

【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、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、又はスキャ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、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、単

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る。

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る。

【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

40

【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

50

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⁺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、マイトマイシン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⁻CD56⁺CD16⁺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⁺CD117⁺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⁺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⁺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⁺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⁺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⁺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】

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。

【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る。

【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。

【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に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に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に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。

【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+及びCD16-である。

【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

10

20

30

40

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*TO-PRO-3⁺)の数を、製造業者により提供されるプロトコル(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% CO₂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、標的細胞のみをプレーティングした。37℃及び5% CO₂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。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か、又は遺伝子改変を伴う単離された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⁺CD16⁻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⁻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

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

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⁺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⁺及びCD16⁺である。より具体的な実施態様において、前記CD3⁻、CD56⁺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⁺である。他のより具体的な実施態様において、前記CD3⁻、CD56⁺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⁺である。他のより具体的な実施態様において、前記CD3⁻、CD56⁺活性化NK細胞の少なくとも10%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、又は50%は、CD94⁺である。他のより具体的な実施態様において、前記CD3⁻、CD56⁺活性化NK細胞の少なくとも10%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、又は50%は、CD161⁺である。他のより具体的な実施態様において、前記CD3⁻、CD56⁺活性化NK細胞の少なくとも10%、12%、14%、16%、18%、又は20%は、CD226⁺である。より具体的な実施態様において、前記CD3⁻、CD56⁺活性化NK細胞の少なくとも20%、25%、30%、35%、又は40%は、CD7⁺である。より具体的な実施態様において、前記CD3⁻、CD56⁺活性化NK細胞の少なくとも30%、35%、40%、45%、50%、55%、又は60%は、CD5⁺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。

10

【 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⁺であるCD3⁻CD56⁺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⁺CD117⁺細胞を含む。

20

【 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⁺であるCD3⁻CD56⁺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⁺CD161⁺細胞を含む。

30

【 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⁺であるCD3⁻CD56⁺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⁺NKp46⁺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⁺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⁺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。

40

【 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⁺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

50

0%、75%、80%、85%、又は90%以下のCD117⁺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⁺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⁺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⁺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⁺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⁺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⁺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⁺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⁺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⁺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⁺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⁺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⁺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⁺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⁺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⁺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⁺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⁺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⁺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⁺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⁺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⁺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⁺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⁺細胞はさらに、CD117⁺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⁺細胞の約65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、又は99%は、CD117⁺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⁺細胞の65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、又は99%以上は、CD117⁺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⁺細胞の65%~70%、70%~75%、75%~80%、80%~85%

、85%～90%、90%～95%、又は95%～99%は、CD117⁺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⁻CD56⁺細胞はさらに、CD161⁺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⁺細胞の約40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、又は75%は、CD161⁺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⁺細胞の40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、又は75%以上は、CD161⁺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⁺細胞の40%～45%、45%～50%、50%～55%、55%～60%、60%～65%、65%～70%、又は70%～75%は、CD161⁺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⁻CD56⁺細胞はさらに、NKp46⁺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⁺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⁺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⁻CD56⁺細胞の約25%、30%、35%、40%、45%、50%、又は55%は、NKp46⁺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⁺細胞の25%、30%、35%、40%、45%、50%、又は55%以下は、NKp46⁺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⁺細胞の25%～30%、30%～35%、35%～40%、40%～45%、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⁺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⁻CD56⁺細胞の25%～30%、30%～35%、35%～40%、40%～45%、45%～50%、又は50%～55%は、NKp46⁺である。

【0118】

ある実施態様において、該NK前駆細胞集団は、CD56⁺CD16⁻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⁻CD56⁺細胞は、CD16⁻である。ある実施態様において、該NK前駆細胞集団内のCD3⁻CD56⁺細胞は、CD16⁺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⁺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⁺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⁺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⁻CD56⁺細胞はさらに、CD16⁻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⁻CD56⁺細胞はさらに、CD117⁺及びCD161⁺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⁻CD56⁺細胞はさらに、CD16⁻、CD117⁺及びCD161⁺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⁻CD56⁺細胞はさらに、CD16⁻、CD117⁺、CD161⁺、及びNKp46⁺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⁺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⁺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⁺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⁺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⁺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、CD244⁺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

30

【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。

40

【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

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⁺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⁺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⁺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】

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⁺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⁺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⁺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⁺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⁺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⁺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】

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⁺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⁺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⁺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⁺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⁺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⁺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⁺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⁺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⁺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⁺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⁺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髓(例えば、インビ

10

20

30

40

50

ポ)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、インピボ)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る。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、

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、その通常的环境、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⁺CD16⁺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

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⁺CD16⁺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

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 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 、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/又は組み合わせられたナチュラルキラー細胞と組み合わせる場

40

50

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 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 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、組み合わせられた、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⁺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

例えば、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、30mL、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 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 個もしくはそれより多くの細胞、又は1ユニットあたり 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 5×10^9 、 1×10^{10} 、 5×10^{10} 、 1×10^{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。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 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 もしくはそれより多くのNK細胞、又は1ユニットあたり 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 5×10^9 、 1×10^{10} 、 5×10^{10} 、 1×10^{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。

10

【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)とすることもでき、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、組み合わせら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、前記組み合わせられた胎盤キラー細胞は、 $CD56^+$ 及び $CD16^-$ 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、前記組み合わせられた胎盤キラー細胞は、 $CD56^+$ 及び $CD16^-$ であるNK細胞、及び $CD56^+$ 及び $CD16^+$ であるNK細胞を含む。具体的なある実施態様において、前記組み合わせら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 $CD56^+CD16^-$ 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、前記組み合わせら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、前記組み合わせら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 $CD3^-CD56^+CD16^-$ 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、前記組み合わせら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⁻CD56⁺CD16⁻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⁻CD56⁺KIR2DL2/L3⁺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⁻CD56⁺NKp46⁺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⁻CD56⁺NKp30⁺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⁻CD56⁺2B4⁺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⁻CD56⁺CD94⁺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⁻CD56⁺KIR2DL2/L3⁺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⁻CD56⁺NKp44⁺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⁻CD56⁺NKp30⁺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 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 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せられる。

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 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 もしくはそれより多くの接着性胎盤細胞

50

胞、又は 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 5×10^9 、 1×10^{10} 、 5×10^{10} 、 1×10^{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。

【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、臍帯など)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。

【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。

【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、 $CD34^-$ 、 $CD10^+$ 、及び $CD105^+$ である。より具体的な実施態様において、該単離された $CD34^-$ 、 $CD10^+$ 、 $CD105^+$ 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 $CD34^-$ 、 $CD10^+$ 、 $CD105^+$ 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 $CD34^-$ 、 $CD10^+$ 、 $CD105^+$ 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 $CD34^-$ 、 $CD10^+$ 、 $CD105^+$ 接着性胎盤細胞はさらに、 $CD200^+$ 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 $CD34^-$ 、 $CD10^+$ 、 $CD105^+$ 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、 $CD90^+$ 又は $CD45^-$ 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 $CD34^-$ 、 $CD10^+$ 、 $CD105^+$ 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、 $CD90^+$ 又は $CD45^-$ である。より具体的な実施態様において、該 $CD34^-$ 、 $CD10^+$ 、 $CD10$

5⁺、CD200⁺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⁺又はCD45⁻である。別のより具体的な実施態様において、該CD34⁻、CD10⁺、CD105⁺、CD200⁺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⁺及びCD45⁻である。別のより具体的な実施態様において、該CD34⁻、CD10⁺、CD105⁺、CD200⁺、CD90⁺、CD45⁻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⁻及びCD86⁻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⁺、HLA-G⁺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⁺及びCD105⁺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⁻、CD38⁻又はCD45⁻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⁻、CD38⁻、CD45⁻、CD73⁺、及びCD105⁺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以上の胚様体を産生する。

【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⁺、CD105⁺、CD200⁺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⁺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⁻、CD38⁻又はCD45⁻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⁻、CD38⁻、及びCD45⁻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⁻、CD38⁻、CD45⁻、及びHLA-G⁺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以上の胚様体を産生する。

【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⁺、OCT-4⁺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⁺及びCD105⁺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⁺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⁻、CD38⁻、及びCD45⁻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⁻、CD38⁻、CD45⁻、CD73⁺、CD105⁺、及びHLA-G⁺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以上の胚様体を産生する。

【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⁺、CD105⁺、及びHLA-G⁺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⁻、CD38⁻、又はCD45⁻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⁻、CD38⁻、及びCD45⁻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⁺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⁺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⁻、CD38⁻、CD45⁻、OCT-4⁺、及びCD200⁺である。

【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⁺、CD105⁺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以上の胚様体を産生する。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⁻、CD38⁻又はCD45⁻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⁻、CD38⁻、及びCD45⁻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⁺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⁺、CD34⁻、CD38⁻、及びCD45⁻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⁺幹細胞であり、ここで、該接着性

10

20

30

40

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以上の胚様体を産生し、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。

【0164】

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⁺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⁺及びCD105⁺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⁻、CD38⁻、又はCD45⁻である。別の具体的な実施態様において、該幹細胞は、CD200⁺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⁺、CD105⁺、CD200⁺、CD34⁻、CD38⁻、及びCD45⁻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

【0165】

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。

【0166】

別の実施態様において、単離された接着性胎盤細胞は、CD29⁺、CD44⁺、CD73⁺、CD90⁺、CD105⁺、CD200⁺、CD34⁻、及びCD133⁻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

【0167】

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、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 5×10^9 、 1×10^{10} 、 5×10^{10} 、 1×10^{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

【0168】

(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

【0169】

50

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⁺、CD10⁺、及びCD105⁺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⁺、CD10⁺、及びCD105⁺である。より具体的な実施態様において、該単離されたCD34⁺、CD10⁺、CD105⁺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⁺、CD10⁺、CD105⁺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⁺、CD10⁺、CD105⁺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⁺、CD10⁺、CD105⁺接着性胎盤細胞はさらに、CD200⁺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⁺、CD10⁺、CD105⁺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⁺又はCD45⁺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⁺、CD10⁺、CD105⁺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⁺又はCD45⁺である。別のより具体的な実施態様において、該CD34⁺、CD10⁺、CD105⁺、CD200⁺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⁺及びCD45⁺である。別のより具体的な実施態様において、該CD34⁺、CD10⁺、CD105⁺、CD200⁺、CD90⁺、CD45⁺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⁺及びCD86⁺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⁺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 1×10^5 個の単離された接着性胎盤細胞、約 1×10^6 個の単離された接着性胎盤細胞、約 1×10^7 個の単離された接着性胎盤細胞、もしくは約 1×10^8 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 $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 個の単離された接着性胎盤細胞及び約 1×10^5 個の腫瘍細胞;約 $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 個の単離された接着性胎盤細胞及び約 1×10^6 個の腫瘍細胞;約 $1 \times 10^7 \sim 5 \times 10^7$ 個の単離された接着性胎盤細胞及び約 1×10^7 個の腫瘍細胞;又は約 $1 \times 10^8 \sim 5 \times 10^8$ 個の単離された接着性胎盤細胞及び約 1×10^8 個の腫瘍細胞を含む共培養物から得られる。

【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。

【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。

【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、ニトロプルシドナトリウム、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);壊死阻害剤(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

ルオロオクチル、臭化ペルフルオロデシルなど)とすることができる。

【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・ヒストリチウム(*Clostridium histolyticum*)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ム)、クラリスロマイシン、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、シプロフロキサシン、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50 mM); D-グルコース(約20 mM ~ 約100 mM); マグネシウムイオン(約1 mM ~ 約50 mM); 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25 g/l ~ 約100 g/l、もしくは約40 g/l ~ 約60 g/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グリコール); 酸化防止剤(例えば、約25 μ M ~ 約100 μ M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0.1 mM ~ 約5 mM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 μ M ~ 約25 μ Mで存在するベラパミル); ニトログリセリン(例えば、約0.05 g/L ~ 約0.2 g/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固剤(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 μ M ~ 約5 μ M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】

(5.2.3. 胎盤灌流)

20

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】

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、灌流マニフォールドに接続されている。

30

【0187】

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/又は血管壁を通し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。

40

【0188】

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/又は血管壁を通し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

50

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。「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る。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とすることができる。通常、放血後、胎盤を700~800mLの灌流液で灌流する。

【0195】

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、 β -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 μ g/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 μ g/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プールすることもできる。

【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⁺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⁺CD45⁻幹細胞もしくは前駆細胞、CD34⁺CD45⁺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。

【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る。造血細胞は、例えば、骨髓、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る。造血細胞は、胎盤から得ることができる。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。

【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せられた細胞である。別の具体的な実施態様において、

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、該組み合わせられた細胞は、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、該組み合わせられた細胞を得る。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。

10

【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、該組み合わせられた細胞を得る。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。

20

【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⁺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⁺CD38⁺又はCD34⁺CD38⁻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⁺CD38⁻Lin⁻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⁻、CD3⁻、CD11b⁻、CD11c⁻、CD14⁻、CD16⁻、CD19⁻、CD24⁻、CD56⁻、CD66b⁻及び/又はグリコフォリンA⁻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⁻、CD3⁻、CD11b⁻、CD11c⁻、CD14⁻、CD16⁻、CD19⁻、CD24⁻、CD56⁻、CD66b⁻、及びグリコフォリンA⁻である。別のより具体的な実施態様において、前記造血細胞は、CD34⁺CD38⁻CD33⁻CD117⁻である。別のより具体的な実施態様において、前記造血細胞は、CD34⁺CD38⁻CD33⁻CD117⁻CD235⁻CD36⁻である。

30

【0203】

別の実施態様において、前記造血細胞は、CD45⁺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⁺CD45⁺である。別の実施態様において、前記造血細胞は、Thy-1⁺である。具体的な実施態様において、前記造血細胞は、CD34⁺Thy-1⁺である。別の実施態様において、前記造血細胞は、CD133⁺である。具体的な実施態様において、前記造血細胞は、CD34⁺CD133⁺又はCD133⁺Thy-1⁺である。別の具体的な実施態様において、前記CD34⁺造血細胞は、CXCR4⁺である。別の具体的な実施態様において、前記CD34⁺造血細胞は、CXCR4⁻である。別の実施態様において、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⁺KDR⁺、CD133⁺KDR⁺、又はThy-1⁺KDR⁺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⁺)が陽性であり、例えば、該細胞は、CD34⁺ALDH⁺である。

40

【0204】

50

ある他の実施態様において、前記CD34⁺細胞は、CD45⁻である。具体的な実施態様において、前記CD34⁺細胞、例えば、CD34⁺、CD45⁻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⁻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⁻である。具体的な実施態様において、該造血細胞は、CD34⁺HLA-DR⁻、CD133⁺HLA-DR⁻、Thy-1⁺HLA-DR⁻、又はALDH⁺HLA-DR⁻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。

【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】

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る。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。

【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わ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る。

【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

10

20

30

40

50

帯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⁺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⁺CD38⁻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⁺CD38⁺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。

【0212】

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

10

【0213】

(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。

【0214】

(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⁺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⁺細胞を単離して、CD56⁺細胞の集団を形成することにより回収される。該CD56⁺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⁺細胞を、CD16⁺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⁺細胞を、該CD56⁺細胞の集団から排除する。別の具体的な実施態様において、CD3⁺細胞も、該CD56⁺細胞の集団から排除する。

20

【0215】

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⁺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⁻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⁺、CD16⁻細胞を含む。

30

【0216】

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

【0217】

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。別の具体的な実施態様において、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⁻細胞からCD56⁺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⁺、CD16⁻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⁻又はCD16⁺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⁺、CD16⁻、CD3⁻胎盤細胞を、CD56⁻、CD16⁺、又はCD3⁺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⁺、CD16⁻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。あ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細胞又は末梢血単核細胞を含む。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⁺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⁺又はCD56⁺である細胞を除去して、それにより、実質的にCD56⁺及びCD3⁻、CD56⁺及びCD16⁻、又はCD56⁺、CD3⁻及びCD16⁻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以上の特異的な抗体、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、磁氣的活性化細胞選別(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】

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望まないが、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。

40

【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(ME 10M)、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)、OPTIMIZER(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。

【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)、 β -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。

【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、チアゾピピン、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、NOVA-RS(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

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。

10

【0234】

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 μ g/mLの組換えヒトインスリン、約10～50 μ g/mLの鉄飽和ヒトトランスフェリン、及び約10～50 μ M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。

20

【0235】

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。

30

【0236】

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(Flt3-L)、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Flt3-L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。

【0237】

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。

40

【0238】

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- α 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

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号を参照されたい。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。別の好ましい実施態様において、免疫調節化合物は、ボマリドミド、又はレナリドミドである。

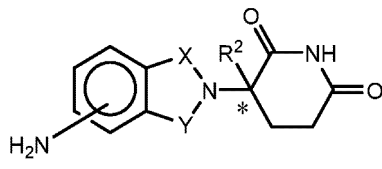
【0239】

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-ジオキソピペリジン(dioxopiperidin)-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CH₂であり、かつR²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;

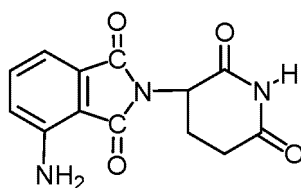
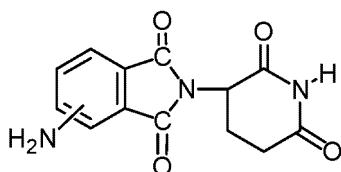
1-オキソ-2-(2,6-ジオキソピペリジン-3-イル)-7-アミノイソインドリン;
 1,3-ジオキソ-2-(2,6-ジオキソピペリジン-3-イル)-4-アミノイソインドリン;及び
 1,3-ジオキソ-2-(2,6-ジオキソピペリジン-3-イル)-5-アミノイソインドリン
 が挙げられるが、これらに限定されない。

【0242】

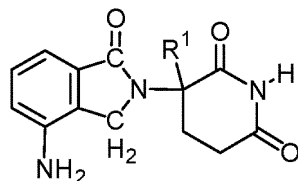
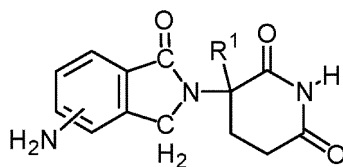
他の具体的な免疫調節化合物は、各々が引用により本明細書中に組み込まれている、米国特許第6,281,230号;第6,316,471号;第6,335,349号;及び第6,476,052号、並びに国際特許出願第PCT/US97/13375号(国際公報第W098/03502号)に記載されているものなどの、置換2-(2,6-ジオキソピペリジン-3-イル)フタルイミド及び置換2-(2,6-ジオキソピペリジン-3-イル)-1-オキソイソインドールのクラスに属する。該クラスを代表する化合物は、以下

10

【化2】



20

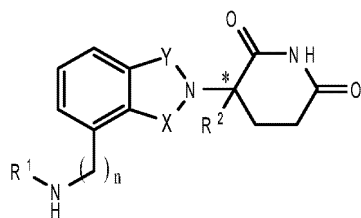


30

(式中、R¹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粋な形態(例えば、光学的に純粋な(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

40

【化3】



50

(式中、X及びYのうちの一方は、C=Oであり、かつ他方は、CH₂又はC=Oであり；
R¹は、H、(C₁-C₈)アルキル、(C₃-C₇)シクロアルキル、(C₂-C₈)アルケニル、(C₂-C₈)アルキニル、ベンジル、アリール、(C₀-C₄)アルキル-(C₁-C₆)ヘテロシクロアルキル、(C₀-C₄)アルキル-(C₂-C₅)ヘテロアリール、C(O)R³、C(S)R³、C(O)OR⁴、(C₁-C₈)アルキル-N(R⁶)₂、(C₁-C₈)アルキル-OR⁵、(C₁-C₈)アルキル-C(O)OR⁵、C(O)NHR³、C(S)NHR³、C(O)NR³R^{3'}、C(S)NR³R^{3'}、又は(C₁-C₈)アルキル-O(CO)R⁵であり；
R²は、H、F、ベンジル、(C₁-C₈)アルキル、(C₂-C₈)アルケニル、又は(C₂-C₈)アルキニルであり；
R³及びR^{3'}は、独立して(C₁-C₈)アルキル、(C₃-C₇)シクロアルキル、(C₂-C₈)アルケニル、(C₂-C₈)アルキニル、ベンジル、アリール、(C₀-C₄)アルキル-(C₁-C₆)ヘテロシクロアルキル、(C₀-C₄)アルキル-(C₂-C₅)ヘテロアリール、(C₀-C₈)アルキル-N(R⁶)₂、(C₁-C₈)アルキル-OR⁵、(C₁-C₈)アルキル-C(O)OR⁵、(C₁-C₈)アルキル-O(CO)R⁵、又はC(O)OR⁵であり；
R⁴は、(C₁-C₈)アルキル、(C₂-C₈)アルケニル、(C₂-C₈)アルキニル、(C₁-C₄)アルキル-OR⁵、ベンジル、アリール、(C₀-C₄)アルキル-(C₁-C₆)ヘテロシクロアルキル、又は(C₀-C₄)アルキル-(C₂-C₅)ヘテロアリールであり；
R⁵は、(C₁-C₈)アルキル、(C₂-C₈)アルケニル、(C₂-C₈)アルキニル、ベンジル、アリール、又は(C₂-C₅)ヘテロアリールであり；
R⁶の各々の出現は、独立してH、(C₁-C₈)アルキル、(C₂-C₈)アルケニル、(C₂-C₈)アルキニル、ベンジル、アリール、(C₂-C₅)ヘテロアリール、もしくは(C₀-C₈)アルキル-C(O)O-R⁵であるか、又はR⁶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、R¹は、(C₃-C₇)シクロアルキル、(C₂-C₈)アルケニル、(C₂-C₈)アルキニル、ベンジル、アリール、(C₀-C₄)アルキル-(C₁-C₆)ヘテロシクロアルキル、(C₀-C₄)アルキル-(C₂-C₅)ヘテロアリール、C(O)R³、C(O)OR⁴、(C₁-C₈)アルキル-N(R⁶)₂、(C₁-C₈)アルキル-OR⁵、(C₁-C₈)アルキル-C(O)OR⁵、C(S)NHR³、又は(C₁-C₈)アルキル-O(CO)R⁵であり；

R²は、H又は(C₁-C₈)アルキルであり；かつ

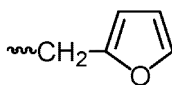
R³は、(C₁-C₈)アルキル、(C₃-C₇)シクロアルキル、(C₂-C₈)アルケニル、(C₂-C₈)アルキニル、ベンジル、アリール、(C₀-C₄)アルキル-(C₁-C₆)ヘテロシクロアルキル、(C₀-C₄)アルキル-(C₂-C₅)ヘテロアリール、(C₅-C₈)アルキル-N(R⁶)₂；(C₀-C₈)アルキル-NH-C(O)O-R⁵；(C₁-C₈)アルキル-OR⁵、(C₁-C₈)アルキル-C(O)OR⁵、(C₁-C₈)アルキル-O(CO)R⁵、又はC(O)OR⁵であり；かつその他の可変部分は、同じ定義を有する。

上記の式の他の具体的な化合物において、R²は、H又は(C₁-C₄)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、R¹は、(C₁-C₈)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、R¹は、H、(C₁-C₈)アルキル、ベンジル、CH₂OCH₃、CH₂CH₂OCH₃、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、R¹は

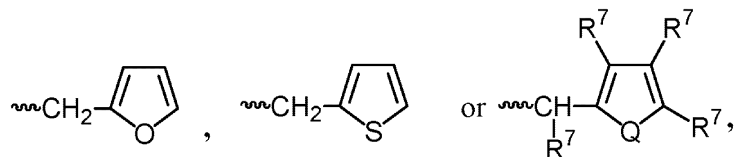
10

20

30

40

【化5】



(式中、Qは、O又はSであり、かつR⁷の各々の出現は、独立して、H、(C₁-C₈)アルキル、ベンジル、CH₂OCH₃、又はCH₂CH₂OCH₃である。

上記の式の他の具体的な化合物において、R¹は、C(O)R³である。

10

上記の式の他の具体的な化合物において、R³は、(C₀-C₄)アルキル-(C₂-C₅)ヘテロアリアル、(C₁-C₈)アルキル、アリアル、又は(C₀-C₄)アルキル-OR⁵である。

上記の式の他の具体的な化合物において、ヘテロアリアルは、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、R¹は、C(O)OR⁴である。

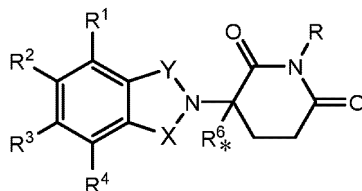
上記の式の他の具体的な化合物において、C(O)NHC(O)のHは、(C₁-C₄)アルキル、アリアル、又はベンジルと置き換えることができる。

【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、CH₂又はC=Oであり;

Rは、H又はCH₂OCOR'であり;

30

(i)R¹、R²、R³、もしくはR⁴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)R¹、R²、R³、もしくはR⁴のうちの1つが、ニトロもしくは-NHR⁵であり、かつR¹、R²、R³、もしくはR⁴のうちの残りは、水素であり;

R⁵は、水素又は炭素1~8個のアルキルであり

R⁶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、R⁷-CHR¹⁰-N(R⁸R⁹)であり;

R⁷は、m-フェニレン又はp-フェニレン又は-(C_nH_{2n})-であり、ここで、nは、0~4の値を有し;

R⁸及びR⁹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R⁸及びR⁹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-CH₂CH₂X₁CH₂CH₂-であり、ここで、X₁は、-O-、-S-、もしくは-NH-であり;

40

R¹⁰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-ピペリジル))-イソインドリン-1,3-ジオン(0.05%DMSO中、10 μM)

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 5×10^7 個の造血細胞、例えば、CD34⁺細胞を、該培地中で、約 5×10^{10} 細胞～約 5×10^{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 2×10^4 ～約 2×10^5 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 1×10^5 細胞以下に維持することを含む。

【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くて、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。

【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、10µg/mL～50µg/mL;インスリン、例えば、5µg/mL～20µg/mL;エタノールアミン、例えば、 5×10^{-4} ～ 5×10^{-5} M;オレイン酸、例えば、0.1µg/mL～5µg/mL;リノール酸、例えば、0.1µg/mL～5µg/mL;パルミチン酸、例えば、0.05µg/mL～2µg/mL;ウシ血清アルブミン(BSA)、例えば、1µg/mL～5µg/mL;及び/又はフィトヘマグルチニン、例えば、0.01µg/mL～1µg/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、35µg/mLトランスフェリン、5µg/mLインスリン、 2×10^{-5} Mエタノールアミン、1µg/mLオレイン酸、1µg/mLリノール酸(Sigma-Aldrich)、0.2µg/mLパルミチン酸(Sigma-Aldrich)、2.5µg/mL BSA(Sigma-Aldrich)、及び0.1µg/mLフィトヘマグルチニンを含む。

【0250】

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)、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。

10

【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、線照射)又は抗有糸分裂剤、例えば、マイトマイシン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ラドの線照射)。

20

【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、ピーカー、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、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もできる。

30

【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。

40

【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もできる。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

50

、CD34⁺、CD45RA⁺、CD10⁺、CD117⁻、及び/又はCD161⁻である。別の実施態様において、プレNK細胞は、CD34⁺、CD45RA⁺、CD10⁻、CD117⁺、及び/又はCD161⁻である。別の実施態様において、未熟なNK細胞は、CD34⁻、CD117⁺、CD161⁺、NKp46⁻、及び/又はCD94/NKG2A⁻である。別の実施態様において、CD56^{bright} NK細胞は、CD117⁺、NKp46⁺、CD94/NKG2A⁺、CD161⁻、及び/又はKIR^{+/+}である。別の実施態様において、CD56^{dim} NK細胞は、CD117⁻、NKp46⁺、CD94/NKG2A^{+/+}、CD16⁺、及び/又はKIR⁺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⁻、CD94⁺及び/又はNKp46⁺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⁺である。別に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⁺である。別に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⁻である。

【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、NKG2D、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。

【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 2×10^4 ~ 約 6×10^6 細胞、例えば、1ミリリットルあたり約 2×10^4 ~ 約 2×10^5 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 1×10^5 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 1×10^5 細胞、1ミリリットルあたり 2×10^5 細胞、1ミリリットルあたり 3×10^5 細胞、1ミリリットルあたり 4×10^5 細胞、1ミリリットルあたり 5×10^5 細胞、1ミリリットルあたり 6×10^5 細胞、1ミリリットルあたり 7×10^5 細胞、1ミリリットルあたり 8×10^5 細胞、1ミリリットルあたり 9×10^5 細胞、1ミリリットルあたり 1×10^6 細胞、1ミリリットルあたり 2×10^6 細胞、1ミリリットルあたり 3×10^6 細胞、1ミリリットルあたり 4×10^6 細胞、1ミリリットルあたり 5×10^6 細胞、1ミリリットルあたり 6×10^6 細胞、1ミリリットルあたり 7×10^6 細胞、1ミリリットルあたり 8×10^6 細胞、又は1ミリリットルあたり 9×10^6 細胞以下で維持することを含む。

【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⁺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

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に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 β -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、 β -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、ニコチンアミド、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、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。

【 0 2 6 5 】

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に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 β -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、 β -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、ニコチンアミド、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、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。

【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に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AB)、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β-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、β-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、ニコチンアミド、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、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。

【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日より長い期間培養する。

【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~

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⁺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⁺、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 2×10^4 ～約 6×10^6 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、 1×10^4 ～ 1×10^5 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 3×10^4 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、霊長類細胞である。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】

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 1×10^5 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、 $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$ 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、 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 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 5×10^5 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 5×10^5 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 3×10^5 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、静置培養で、前記第三の培地中に、約 3×10^5 細胞/mLで接種される。

【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⁺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、Flt-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、Flt-3L、SCF、IL-6、IL-7、G-CSF、及びGM-CSFの各々を含む。

【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、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、Flt-3、SCF、IL-6、IL-7、G-CSF、及びGM-CSFの各々を含む。

【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。

【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)、Flt-3リガンド(Flt-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、Flt-3L、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.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 -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。

【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。

【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、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

10

20

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 3×10^4 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 1×10^5 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 5×10^5 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 5×10^5 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 3×10^5 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 3×10^5 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⁺CD3⁺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 Biotec)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

40

50

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⁺及びCD16⁻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、磁氣的活性化細胞選別(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ように作用する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

50

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、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。別の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、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。別の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。別の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。

【0300】

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;VIASPAN(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。

【0301】

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。

【0302】

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。別の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、剪断ストレスに曝されない。

【0303】

細胞、例えば、胎盤灌流液細胞、造血細胞、例えば、CD34⁺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 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 1.5×10^7 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なかったことがある。

【0304】

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。

10

【0305】

20

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。

30

40

【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

50

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。

10

【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で増殖させること(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。

20

【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、アンブルが約-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カ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。

30

【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)、 β -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(FI

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。別の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、TO-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WO2014/100385号;及び国際出願公開第WO2014/124143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かつ/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

40

【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

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。

【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に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、トランスフェクションにより)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、トランスフェクションにより)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。

【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(免疫受容体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)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 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。

【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CTLA-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

10

20

30

40

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るか、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る。

【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_Hに連結されたV_Lを含むことができ、ここで該V_L及びV_Hは、該抗原に結合する抗体由来のものである。

【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る。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る。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、ユーイング肉腫、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る。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、形質細胞性骨髓腫、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、パーキットリンパ腫、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、又は多発性骨髓腫とすることができる。

【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)、肉眼的嚢胞性疾患液体タンパク質(gross cystic disease fluid protein)(GCDP-15)、HMB-45抗原、高分子量黒色腫関連抗原(HMW-MAA)、タンパク質メラニン-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

10

20

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-Abl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、HER-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、PSA、TAG-72-4、CA 19-9、CA 72-4、CAM 17.1、NuMa、K-ras、13-カテニン、Mum-1、p16、TAG-AGE、PSMA、CT7、テロメラーゼ、43-9F、5T4、791Tgp72、13HCG、BCA225、BTAA、CD68\KP1、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(上皮増殖因子バリエーション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 α 3(CD61)、ガラクトシン、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、CD138、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ヌ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、HIF-1、HIF-2、HIF-2、HIF-3、又はHIF-3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)高移動度グルーブボックス1(high mobility group box 1;HMGB1)、S100A8(MRP8、カルグラニユリンA)、S100A9(MRP14、カルグラニユリン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、又は膵臓がんである具体的な実施態様において、前記抗原は、消化器系がんの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の細胞外ドメインは、Her2、CA242、MUC1、CA125、又はCA19-9に結合する。

【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、皮膚がんの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。

【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、スパーサー、又はヒンジポリペプチド配列、例えば、CD28由来の配列により、前記膜貫通ドメインに連結されている。

【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。

【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、骨髄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、「骨髄ホーミング受容体」と称する。具体的な実施態様において、前記骨髄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CXCR4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。

【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VEGFR2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又はヒトインテグリン 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、かつインテグリン 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。

10

【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。

20

【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、ヒトインテグリン 4 7の核酸配列、又は双方を含む。

30

【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。

40

【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

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。GenBank(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。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、CCR10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む、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、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、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む、CLAである第三の皮膚ホーミング受容体をさらに含む、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。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。

【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($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$)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。

【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

、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CCR10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。

10

【0349】

20

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させる工程を含む。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、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 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。

30

【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)

【表 1】

配列 番号:	GenBank 受入番号 及び 説明	配 列
1	NM_001008540.1 ヒトCXCR4アイソ フォームaをコード する例示的な 核酸配列	1 ttttttttct tccctctagt gggcggggca gaggagttag ccaagatgtg actttgaaac 61 cctcagcgtc tcagtgccct tttgttctaa acaaagaatt ttgtaattgg ttctaccaaa 121 gaaggatata atgaagtcac tatgggaaaa gatggggagg agagtgttag gattctacat 181 taattctctt gtgcccttag cccactactt cagaatttcc tgaagaaagc aagcctgaat 241 tggtttttta aattgcttta aaaatttttt ttaactgggt taatgcttgc tgaattggaa 301 gtgaatgtcc attcctttgc ctcttttgca gatatacact tcagataaact acaccgagga 361 aatgggctca ggggactatg actccatgaa ggaaccctgt ttccgtgaag aaaatgctaa 421 tttcaataaa atcttcctgc ccaccatcta ctccatcatc ttcttaactg gcattgtggg 481 caatggattg gtcaccttg tcatgggtta ccagaagaaa ctgagaagca tgacggacaa 541 gtacaggctg caccctgtcag tggccgacct cctctttgtc atcacgcttc ccttctgggc 601 agttgatgcc gtggcaaaact ggtacttttg gaacttctta tgcaaggcag tccatgtcat 661 ctacacagtc aacctctaca gcagtgtcct catcctggcc ttcatcagtc tggaccgcta 721 cctggccatc gtccacgcca ccaacagtca gaggccaagg aagctgttgg ctgaaaaggt 781 ggtctatgtt ggcgtctgga tccttgccct cctgctgact attcccgact tcacttttgc 841 caacgtcagt gaggcagatg acagatata ctgtgaccgc ttctacccca atgacttgtg 901 ggtggttggtg ttccagtttc agcacatcat ggttggcctt atcctgcctg gtattgtcat 961 cctgtcctgc tattgcatta tcactccaa gctgtcacac tccaagggcc accagaagcg 1021 caagggcctc aagaccacag tcactctcat cctggcttcc ttgcctgtgt ggctgcctta 1081 ctacattggg atcagcatcg actccttcat cctcctggaa atcatcaagc aagggtgtga 1141 gtttgagaac actgtgcaca agtggatttc catcaccgag gccctagctt tcttccactg 1201 ttgtctgaac cccatcctct atgctttcct tggagccaaa tttaaaacct ctgccagca 1261 cgcactcacc tctgtgagca gagggtccag cctcaagatc ctctccaaag gaaagcgagg 1321 tggacattca tctgtttcca ctgagtctga gtcttcaagt ttctactcca gctaacacag 1381 atgtaaaaga ctttttttta tacgataaat aacttttttt taagttacac atttttcaga 1441 tataaaagac tgaccaatat tgtacagttt ttattgcttg ttggattttt gtcttgtgtt 1501 tctttagttt ttgtgaagtt taattgactt atttatataa attttttttg ttctcatattg 1561 atgtgtgtct aggcaggacc tgtggccaag ttcttagttg ctgtatgtct cgtggttagga 1621 ctgtagaaaa gggaaactgaa cattccagag cgtgtagtga atcacgtaaa gctagaaatg 1681 atccccagct gtttatgcat agataatctc tccattcccg tggaaacgtt ttctgttct 1741 taagacgtga ttttgctgta gaagatggca cttataacca aagcccaaag tggtagagaa 1801 atgctgggtt ttcatgtttc aggagtgggt tgatttcagc acctacagtg tacagctctg 1861 tattaagttg ttaataaaaag tacatgttaa acttaaaaaa aaaaaaaaaa aa
2	NM_003467.2 ヒトCXCR4アイソ フォームbをコード する例示的な 核酸配列	1 aacttcagtt tgttggtctg ggcagcaggt agcaaagtga cgccgagggc ctgagtgtct 61 cagtagccac cgcactctga gaaccagcgg ttaccatgga ggggatcagt atatacactt 121 cagataacta caccgaggaa atgggctcag gggactatga ctccatgaag gaacctgtt 181 tccgtgaaga aaatgcta atccaataaaa tcttctctgc caccatctac tccatcatct 241 tcttaactgg cattgtgggc aatggattgg tcatcctggt catgggttac cagaagaaac 301 tgagaagcat gacggacaag tacaggctgc acctgtcagt ggccgacctc ctctttgtca 361 tcacgcttcc cttctgggca gttgatgccg tggcaaacctg gtactttggg aacttcctat 421 gcaaggcagt ccatgtcatc tacacagtca acctctacag cagtgtcttc atcctggcct 481 tcacagctct ggaccgctac ctggccatcg tccacgccac caacagtcag agggcaagga

10

20

30

配列 番号:	GenBank 受入番号 及び 説明	配 列
		541 agctgttggc tgaaaagggtg gtctatgttg gcgtctggat ccttgccttc ctgctgacta 601 ttcccgaactt catcttttgcc aacgtcagtg aggcagatga cagatatatc tgtgaccgct 661 tctaccccaa tgacttgttg gtggttgtgt tccagtttca gcacatcatg gttggcctta 721 tcctgcctgg tattgtcatc ctgtcctgct attgcattat catctccaag ctgtcacact 781 ccaagggcca ccagaagcgc aaggccctca agaccacagt catcctcatc ctggctttct 841 tcgcctgttg gctgccttac tacattggga tcagcatcga ctcttctcat ctctcggaaa 901 tcatcaagca aggggtgtgag tttagaaca ctgtgcacaa gtggatttcc atcaccgagg 961 ccctagcttt cttccactgt tgtctgaacc ccactcctca tgccttctct ggagccaaat 1021 ttaaaacctc tgcccagcac gcactcacct ctgtgagcag aggggtccagc ctcaagatcc 1081 tctccaaagg aaagcgaggt ggacattcat ctgtttccac tgagtctgag tcttcaagtt 1141 ttcactccag ctaacacaga tgtaaaagac ttttttttat acgataaata actttttttt 1201 aagttacaca tttttcagat ataaaagact gaccaatatt gtacagtttt tattgcttgt 1261 tggatttttg tcttgtgttt ctttagtttt tgtgaagttt aattgactta tttatataaa 1321 ttttttttgt ttcatattga tgtgtgtcta ggcaggacct tgggccaagt tcttagttgc 1381 tgtatgtctc gtggtaggac tgtagaaaag ggaactgaac attccagagc gtgtagttaa 1441 tcacgtaaag ctagaatga tcccagctg tttatgcata gataatctct ccattcccg 1501 ggaacgtttt tctgttctt aagacgtgat ttgtctgtag aagatggcacc ttataacca 1561 agcccaaagt ggtatagaaa tgctggtttt tcagttttca ggagtgggtt gatttcagca 1621 cctacagtgt acagtcttgt attaagttgt taataaaagt acatgttaaa cttaaaaaaa 1681 aaaaaaaaaa a
3	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	1 msiplpllqi ytsdnyteem gsgdydsmke pcfreenanf nkiflptiys iifltgivgn 61 glvilvmgyq kklrsmtlky rhlslvadll fvitlpfwav davanwyfqn flckavhviy 121 tvnlyssvli lafislndryl aivhatnsqr prkllaekvv yvgvwipall ltipdfifan 181 vseaddryic drfypndlvw vvfqfghimv glilpgivil scyciiskl shskghqkrk 241 alkttvilil affacwlpvy igisidsfil leiikggcef entvhkwisi tealaffhcc 301 lnpilyaflg akfktsaqha ltsvsrgssl kilskgkrvg hssvsteses ssfhss
4	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	1 megisiytsd nyteemsgsd ydsmkepcfr eenanfknif lptiysiifl tgivnglvi 61 lvmgyqkklr smtdkyrlhl svadllfvit lpfwavdava nwyfngflck avhviytnl 121 yssvlilafi sldrylaivh atnsqrprkl laekvvvvgv wipallltip dfifanvsea 181 ddryicdrfy pndlwwvvfq fqhimvglil pgivilscyc iiisklshsk ghqkrkalkt 241 tvililaffa cwlpyyigis idsfilleii kggcefentv hkwisiteal affhcclnpi 301 lyafllgakfk tsaqhaltsv srgsslkils kgkrghhssv stesesssfh ss
5	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	1 cacttctctc ccagacaggg gtagtgcgag gccgggcaca gccttctctgt gtggttttac 61 cgcccagaga gcgtcatgga cctgggtatg cctgtgtcaa gatgaggtca cggacgatta 121 catcggagac aacaccacag tggactacac tttgttcgag tctttgtgct ccaagaagga 181 cgtgcggaac tttaaagcct ggttctctcc tatcatgtac tccatcattt gtttcgtggg 241 cctactgggc aatgggctgg tcgtgttgac ctatatctat ttcaagaggc tcaagaccat 301 gaccgatacc tacctgctca acctggcggg gccagacatc ctcttctctc tgaccttcc 361 cttctgggcc tacagcgcgg ccaagtctg ggtcttcggg gtccactttt gcaagctcat 421 ctttgccatc tacaagatga gcttcttcag tggcatgctc ctacttcttt gcatcagcat 481 tgaccgctac gtggccatcg tccaggctgt ctacagctac cgccaccgtg cccgcgtcct 541 tctcatcagc aagctgtcct gtgtgggcat ctggatacta gccacagtgc tctccatccc 601 agagctcctg tacagtgaac tccagaggag cagcagtgaag caagcgatgc gatgctctct 661 catcacagag catgtggagg cctttatcac catccagggt gccagatgg tgatcggtct 721 tctggtcccc ctgctggcca tgagcttctg ttaccttctc atcatccgca cctgtctcca

10

20

30

40

配列 番号:	GenBank 受入番号 及び 説明	配 列
		<p>781 ggcacgcaac tttagcgca acaaggccat caaggtgatc atcgctgttg tcgtggtctt 841 catagtcttc cagctgccct acaatggggt ggtcctggcc cagacggttg ccaacttcaa 901 catcaccagt agcacctgtg agctcagtaa gcaactcaac atcgcttacg acgtcaccta 961 cagcctggcc tgcgtccgct gctgcgtcaa ccttttcttg tacgcttca tcggcgtaaa 1021 gtcccgcaac gatctcttca agctcttcaa ggacctgggc tgacctcagc aggagcagct 1081 ccggcagtggt tcttctctgtc ggcacatccg gcgctcctcc atgagtgttg aggccgagac 1141 caccaccacc ttctcccat aggcgactct tctgcctgga cttagaggac ctctcccagg 1201 gtccctgggg tggggatagg gagcagatgc aatgactcag gacatcccc cgccaaaagc 1261 tgctcaggga aaagcagctc tccctcaga gtgcaagccc ctgctccaga agatagcttc 1321 accccaatcc cagctacctc aaccaatgcc aaaaaagac agggctgata agctaacacc 1381 agacagacaa cactgggaaa cagaggctat tgtccctaa accaaaaact gaaagtgaag 1441 gtccagaaac tgttcccacc tgctggagtg aaggggcaa ggagggtgag tgcaaggggc 1501 gtgggagtggt cctgaagagt cctctgaatg aaccttcttg cctccacag actcaaatgc 1561 tcagaccagc tcttccgaaa accaggcctt atctccaaga ccagagatag tggggagact 1621 tcttggttggt gtgaggaaaa gcggacatca gctggtcaaa caaactctct gaaccctcc 1681 ctccatcggt ttcttactg tcctccaagc cagcgggaat ggagctgccc acgcgcctc 1741 aaaagcacac tcattccctc acttgccgct gcgctctcc aggcctcaa cagggagag 1801 tgtggtgttt cctgcaggcc aggcagctg cctccgctg atcaaaagca cactctgggc 1861 tccagagtgg ggtgacatg cactcagctc ttggctccac tgggatggga ggagaggaca 1921 agggaaatgt caggggcggg gagggtgaca gtggccgccc aagggccagc agcttgttct 1981 ttgttctttg tcacaggagc tgaaaaacct tcctcatgtt ctgcttctga ttcgttaaga 2041 gagcaacatt ttaccacac acagataaag ttttcccttg aggaacaac agctttaaaa 2101 gaaaaagaaa aaaaaagtct ttggtaatg gcaaaaaaaa aaaaaaaa</p>
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	<p>1 ctctagatga gtcagtgagg ggcgggtgga gcgttgaacc gtgaagagtg tggttgggag 61 taaacgtgga cttaaaactca ggagctaagg ggtaatcag tgaaaaaggg gaatgagcgg 121 tggggagctc tgttgcaaca gggccaatc gcagcaggac tacaatgcc cgagcgcagg 181 ctgggaacga ggggacagcg gctgcctgtc cccagaatag aaaaagcagc taggaagccc 241 tctttgagtg gacagcggag gactggactg ccaggccaag catcaggggc ttcattcctc 301 gggccgggta gagcccttga ggatttagga ggaagggaaa ccaatgaaaa gcgtgctggt 361 ggtggtctct cttgtcattt tccaggatg cctgtgtcaa gatgaggtca cggacgatta 421 catcgagagc aacaccacag tggactacac ttgttctgag tctttgtgct ccaagaagga 481 cgtgcggaac tttaaagcct ggttctctcc tatcatgtac tccatcattt gtttcgtggg 541 cctactgggc aatgggctgg tcgtgttgac ctatatctat ttcaagaggc tcaagaccat 601 gaccgatacc tacctgctca acctggcggt ggcagacatc ctcttctctc tgacccttcc 661 ctcttgggcc tacagcgagg ccaagtcctg ggtcttcggt gtccactttt gcaagctcat 721 ctttgccatc tacaagatga gcttcttcag tggcatgctc ctacttcttt gcatcagcat 781 tgaccgctac gtggccatcg tccaggctgt ctcagctcac cgccaccgtg cccgcgtcct 841 tctcatcagc aagctgtcct gtgtgggcat ctggatacta gccacagtgc tctccatccc 901 agagctcctg tacagtgacc tccagaggag cagcagtgag caagcgatgc gatgctctct 961 catcacagag catgtggagg cctttatcac catccagggt gccagatgg tgatcggtct 1021 tctggtcccc ctgctggcca tgagcttctg ttacctgtc atcatccgca cctgtctcca 1081 ggcacgcaac tttagcgca acaaggccat caaggtgatc atcgctgttg tcgtggtctt 1141 catagtcttc cagctgccct acaatggggt ggtcctggcc cagacggttg ccaacttcaa 1201 catcaccagt agcacctgtg agctcagtaa gcaactcaac atcgcttacg acgtcaccta 1261 cagcctggcc tgcgtccgct gctgcgtcaa ccttttcttg tacgcttca tcggcgtaaa 1321 gtcccgcaac gatctcttca agctcttcaa ggacctgggc tgacctcagc aggagcagct 1381 ccggcagtggt tcttctctgtc ggcacatccg gcgctcctcc atgagtgttg aggccgagac</p>

10

20

30

40

配列 番号:	GenBank 受入番号 及び 説明	配 列
		<p>1441 caccaccacc ttctcccat aggcgactct tctgcctgga cttagaggac ctctcccagg 1501 gtccctgggg tggggatagg gagcagatgc aatgactcag gacatcccc cgccaaaagc 1561 tgctcagggg aaagcagctc tccccctcaga gtgcaagccc ctgctccaga agatagcttc 1621 accccaatcc cagctacctc aaccaatgcc aaaaaagac agggctgata agctaaccac 1681 agacagacaa cactgggaaa cagaggctat tgtcccctaa accaaaaact gaaagtgaag 1741 gtccagaaac tgttcccacc tgcctggagtg aaggggcca ggagggtgag tgcaaggggc 1801 gtgggagtgg cctgaagagt cctctgaatg aaccttctgg cctcccacag actcaaatgc 1861 tcagaccagc tcttccgaaa accaggcctt atctccaaga ccagagatag tggggagact 1921 tcttggcttg gtgaggaaaa gcggacatca gctggtcaaa caaactctct gaaccctcc 1981 ctccatcggt ttcttactg tctccaagc cagcgggaat ggcagctgcc acgcgcctc 2041 aaaagcacac tcactccctc acttgccgcg tcgcccctcc aggtctctca caggggagag 2101 tgtggtgttt cctgcaggcc aggcagctg cctccgcgtg atcaaaacca cactctgggc 2161 tccagagtgg ggaatgacatg cactcagctc ttggctccac tgggatggga ggagaggaca 2221 agggaaatgt caggggcggg gaggggtgaca gtggccgcc aaggcccacg agcttgttct 2281 ttgttctttg tcacaggagc tgaaaaacct tctcatgtt ctgctttcga ttcgttaaga 2341 gagcaacatt ttaccacac acagataaag ttttcccttg aggaaacaac agctttaaaa 2401 gaaaaagaaa aaaaagtct ttggtaaatg gcaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaa</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 ggcgggtgga gcgttgaacc gtgaagagtg tggttgggag 61 taaacgtgga cttaaaactca ggagctaagg gggaaaccaa tgaaaagcgt gctggtggtg 121 gctctccttg tcattttcca ggtatgcctg tgtcaagatg aggtcacgga cgattacatc 181 ggagacaaca ccacagtggg ctacactttg ttcgagtctt tgtgtcccaa gaaggacgtg 241 cggaacttta aagcctggtt cctccctatc atgtactcca tcatttgttt cgtgggccta 301 ctgggcaatg ggctgggtcgt gttgacctat atctatttca agaggctcaa gaccatgacc 361 gatacctacc tgctcaacct ggcggtggca gacatcctct tctctctgac ccttcccttc 421 tgggcctaca gcgcggccaa gtctgggtgc ttcggtgtcc acttttgcaa gctcatcttt 481 gccatctaca agatgagctt ctctcagtgc atgtccttac ttttttgcat cagcattgac 541 cgctacgtgg ccactgctca ggctgtctca gctcaccgcc accgtgcccg cgtccttctc 601 atcagcaagc tgtcctgtgt gggcatctgg atactagcca cagtgtcttc catcccagag 661 ctctgttaca gtgacctcca gaggagcagc agtgagcaag cgatgcgatg ctctctcatc 721 acagagcatg tggaggcctt tatcaccatc caggtggccc agatggtgat cggctttctg 781 gtccccctgc tggccatgag ctctctgttac ctgtcatca tccgcaccct gctccaggca 841 cgcaactttg agcgcaacaa ggccatcaag gtgatcatcg ctgtggtcgt ggtcttcata 901 gtcttcacag tgccctacaa tggggtgggc ctggcccaga cggtgggcaa cttcaacatc 961 accagtagca cctgtgagct cagtaagcaa ctcaacatcg cctacgacgt cacctacagc 1021 ctggcctcgc tccgctgctg cgtcaaccct ttcttgtagc ccttcatcgg cgtcaagttc 1081 cgcaacgatc tcttcaagct ctccaaggac ctgggctgcc tcagccaggga gcagctccgg 1141 cagtgggtct cctgtcggca catccggcgc tctccatga gtgtggaggc cgagaccacc 1201 accaccttct ccccataggc gactcttctg cctggactag agggacctct ccagggtcc 1261 ctggggtggg gatagggagc agatgcaatg actcaggaca tccccccgcc aaaagctgct 1321 cagggaaaaa cagctctccc ctccagagtgc aagccctgc tccagaagat agcttcaccc 1381 caatcccagc tacctcaacc aatgccaaaa aaagacaggg ctgataagct aacaccagac 1441 agacaacact gggaaacaga ggctattgtc ccctaaacca aaaactgaaa gtgaaagtcc 1501 agaaactgtt cccacctgct ggagtgaagg ggccaaggag ggtgagtga agggcggtg 1561 gagtggcctg aagagtcctc tgaatgaacc ttctggcctc ccacagactc aaatgctcag 1621 accagctctt ccgaaaacca ggcccttatct ccaagaccag agatagtggg gagacttctt 1681 ggcttgggtg ggaaaagcgg acatcagctg gtcaaacaaa ctctctgaac cctccctcc 1741 atcgttttct tcactgtcct ccaagccagc gggaatggca gctgccacgc cgccctaaaa</p>

10

20

30

40

配列 番号:	GenBank 受入番号 及び 説明	配 列
		1801 gcacactcat cccctcactt gccgcgtcgc cctcccaggc tctcaacagg ggagagtgtg 1861 gtgtttcctg caggccaggc cagctgcctc cgcgtgatca aagccacact ctgggctcca 1921 gagtggggat gacatgcact cagctcttgg ctccactggg atgggaggag aggacaaggg 1981 aaatgtcagg ggcggggagg gtgacagtgg ccgccaagg cccacgagct tgttctttgt 2041 tctttgtcac agggactgaa aacctctcct catgttctgc ttctgattcg ttaagagagc 2101 aacattttac ccacacacag ataaagtttt cccttgagga aacaacagct ttaaaagaaa 2161 aagaaaaaaa aagtctttgg 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 aggagaaggt gccttaacaa ggttcccacg catttcctgg cgctattgag cttggagctg 61 ccaagggcct gccttcactt gtggcatcgc agttactgac tctccagtgg gccaggccct 121 acctagctgg gacctgaggg tcaggatacg ggaagagggc tactgccgcc ctgacttgta 181 gggaaaccaa tgaaaagcgt gctggtgggt gctctccttg tcattttcca ggtatgcctg 241 tgtcaagatg aggtcacgga cgattacatc ggagacaaca ccacagtgga ctacactttg 301 ttcgagtctt tgtgtctcaa gaaggacgtg cggaacttta aagcctggtt cctccctatc 361 atgtactcca tcatttgttt cgtgggccta ctgggcaatg ggctggtcgt gttgacctat 421 atctatttca agaggctcaa gaccatgacc gatacctacc tgctcaacct ggcggtggca 481 gacatcctct tcctcctgac ccttcccttc tgggcctaca gcgcggccaa gctctgggtc 541 ttcggtgtcc acttttgcaa gctcatcttt gccatctaca agatgagctt cttcagtggc 601 atgtccttac ttctttgcat cagcattgac cgctacgtgg ccactgtcca ggctgtctca 661 gctcacgcc accgtgcccg cgctcttctc atcagcaagc tgtcctgtgt gggcatctgg 721 atactagcca cagtgtcttc catcccagag ctctgttaca gtgacctcca gaggagcagc 781 agtgagcaag cgatgcgatg ctctctcatc acagagcatg tggaggcctt tatcaccatc 841 cagggtggcc agatggtgat cggtcttctg gtcccctgc tggccatgag cttctgttac 901 cttgtcatca tccgcacctt gctccaggca cgcaactttg agcgcacaaca ggccatcaag 961 gtgatcatcg ctgtggtcgt ggtcttcata gtcttccagc tgccctacaa tggggtggtc 1021 ctggcccaga cgggtggcaa cttcaacatc accagtagca cctgtgagct cagtaagcaa 1081 ctcaacatcg cctacgacgt cactacagc ctggcctgcg tcgcgtgctg cgtcaacctt 1141 ttcttgtacg ccttcacggt cgtcaagttc cgcaacgata tcttcaagct cttcaaggac 1201 ctgggctgcc tcagccaggga gcagctccgg cagtgggtctt cctgtcggca catccggcgc 1261 tcctccatga gtgtggaggc cgagaccacc accaccttct ccccataggc gactcttctg 1321 cctggactag agggacctct cccagggtcc ctggggtggg gatagggagc agatgcaatg 1381 actcaggaca tccccccgcc aaaagctgct cagggaaaag cagctctccc ctacagagtgc 1441 aagcccctgc tccagaagat agcttcaccc caatcccagc tacctcaacc aatgccaaaa 1501 aaagacaggg ctgataagct aacaccagac agacaacact gggaaacaga ggctattgtc 1561 ccctaaacca aaaactgaaa gtgaaagtcc agaaactgtt cccacctgct ggagtgaagg 1621 ggccaaggag ggtgagtgcg aggggcgtgg gagtggcctg aagagtccct tgaatgaacc 1681 ttctggcctc ccacagactc aaatgctcag accagctctt ccgaaaacca ggccttatct 1741 ccaagaccag agatagtggg gagacttctt ggcttgggtg ggaaaagcgg acatcagctg 1801 gtcaaacaaa ctctctgaac cctccctcc atcgttttct tcaactgtctt ccaagccagc 1861 gggaatggca gctgccacgc cgccctaaaa gcacactcat cccctcactt gccgcgtcgc 1921 cctcccaggc tctcaacagg ggagagtgtg gtgtttcctg caggccaggc cagctgcctc 1981 cgcgtgatca aagccacact ctgggctcca gagtgggatg gacatgcact cagctcttgg 2041 ctccactggg atgggaggag aggacaaggg aaatgtcagg ggcggggagg gtgacagtgg 2101 ccgccaagg cccacgagct tgttctttgt tctttgtcac agggactgaa aacctctcct 2161 catgttctgc ttctgattcg ttaagagagc aacattttac ccacacacag ataaagtttt 2221 cccttgagga aacaacagct ttaaaagaaa aagaaaaaaa aagtctttgg 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 gtggttttac 61 cgcccagaga gcgtcatgga cctggggaaa ccaatgaaaa gcgtgctggt ggtggctctc 121 cttgtcattt tccaggtagt cctgtgtcaa gatgaggtca cggacgatta catcggagac 181 aacaccacag tggactacac ttgtgtcgag tctttgtgct ccaagaagga cgtgcggaac 241 tttaaagcct gggttcctccc tatcatgtac tccatcattt gtttcgtggg cctactgggc 301 aatgggctgg tcgtgttgac ctatatctat ttcaagagge tcaagaccat gaccgatacc 361 tacctgctca acctggcggg ggcagacatc ctcttcctcc tgacccttcc cttctgggcc 421 tacagcgcgg ccaagtcctg ggtcttctgg gtccactttt gcaagctcat ctttgccatc 481 tacaagatga gcttcttcag tggcatgctc ctacttcttt gcatcagcat tgaccgctac 541 gtggccatcg tccaggtgtg ctacgtcac ccgcccggtg cccgcgtcct tctcatcagc 601 aagctgtcct gtgtgggcat ctggatacta gccacagtgc tctccatccc agagctcctg 661 tacagtgacc tccagaggag cagcagttag caagcgatgc gatgctctct catcacagag 721 catgtggagg cctttatcac catccagggt gccagatgg tgatcggctt tctgttcccc 781 ctgctggcca tgagcttctg ttaccttgtc atcatccgca ccctgctcca ggcagccaac 841 tttgagcgca acaaggccat caaggtgatc atcgctgtgg tcgtggtctt catagtcttc 901 cagctgcctt acaatggggg ggtcctggcc cagacgggtg ccaacttcaa catcaccagt 961 agcacctgtg agctcagtaa gcaactcaac atcgctacg acgtcaccta cagctcggcc 1021 tgcctccgct gctgcgtcaa cccttctctg tacgccttca tcggcgctca gtctccgcaac 1081 gatctcttca agctcttcaa ggacctgggc tgcctcagcc aggagcagct ccggcagtggt 1141 tcttctctgc ggcacatccg gcgctcctcc atgagtgtgg aggcgagac caccaccacc 1201 ttctcccatc aggcgactct tctgcctgga cttagaggac ctctcccagg gtcctcgggg 1261 tggggatagg gagcagatgc aatgactcag gacatcccc cgccaaaagc tgctcaggga 1321 aaagcagctc tcccctcaga gtgcaagccc ctgctccaga agatagcttc accccaatcc 1381 cagctacctc aaccaatgcc aaaaaaagac agggctgata agctaaccac agacagacaa 1441 cactgggaaa cagaggctat tgtcccctaa accaaaaact gaaagtgaat gtccagaaac 1501 tgttcccacc tgctggagtg aaggggcca gagggtgag tgcaaggggc gtgggagtgg 1561 cctgaagagt cctctgaatg aaccttctgg cctcccacag actcaaatgc tcagaccagc 1621 tcttccgaaa accaggcctt atctccaaga ccagagatag tggggagact tcttggcttg 1681 gtgaggaaaa gcggacatca gctggtcaaa caaactctct gaacccctcc ctccatcgtt 1741 ttcttccactg tcttccaagc cagcgggaat ggcagctgcc acgcgcctc aaaagcacac 1801 tcatccctc acttgccgcg tcgcccctcc aggcctctca caggggagag tgtggtgttt 1861 cctgcaggcc aggccagctg cctcccgctg atcaaagcca cactctgggc tccagagtgg 1921 ggatgacatg cactcagctc ttggctccac tgggatggga ggagaggaca agggaaatgt 1981 caggggcggg gagggtgaca gtggccgccc aagggccacg agcttgttct ttgttctttg 2041 tcacagggac tgaaaacctc tctcatgtt ctgctttcga ttcgttaaga gagcaacatt 2101 ttaccacac acagataaag ttttcccttg aggaaacaac agctttaaaa gaaaaagaaa 2161 aaaaaagtct ttggtaaatg gcaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa </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 mysiiicfvgl lngnlvvlty iyfkrktmt dtyllnlava dilflltlpf waysaakswv 61 fgvhfcklif aiykmsffsg mllllcisid ryvaivqavs ahrhrarvll isklscvgiw 121 ilatvlsipe llysdqrss seqamrcsli tehveafiti qvaqmvigfl vpllamsfcy 181 lvixrtllqa rnfernkai k viiavvvvfi vfqlpyngvv laqtvanfni tsstcelskq 241 lnaiydvtyt lacvrccvnp flyafigvkf rndlfklfkf lgclsqeqlr qwsscrhrr 301 ssmsveaett ttfsp </pre>
11	NP_001288645.1 ヒトCCR7アイソ	<pre> 1 mksvlvvall vifqvcclqd evtddyigdn ttvdytlfes lcskdvdrnf kawflpimys 61 iicfvglngl glvltiyif krlktmtdty llnlavadil fltlpffway saakswvfgv 121 hfcklifaiy kmsffsgmll llcisidryv aivqavsahr hrarvllisk lscvgiwila </pre>

10

20

30

40

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 sdlqrsseq amrcsliteh veafitiqua qmvigflvpl lamsfcylvi 241 irtllqarnf ernkaikvii avvvvfivfq lpyngvvlaq tvanfnitss tcelskqlni 301 aydvtyslac vrccvnpfly afigvkfrnd lfkflkdldgc lsqeqlrqws scrhrrssm 361 sveaettttf 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 mksvlvval vifqvcclcd evtdyigdn ttvdyltfes lcskdvdrnf kawflpimys 61 iicfvglgn glvvltiyif krlktmtdty llnlavadil fltltlpfway saakswvfgv 121 hfcklifaiy kmsffsgmll llcisidryv aivqavsahr hrarvllisk lscvgiwila 181 tvlsipelly sdlqrsseq amrcsliteh veafitiqua qmvigflvpl lamsfcylvi 241 irtllqarnf ernkaikvii avvvvfivfq lpyngvvlaq tvanfnitss tcelskqlni 301 aydvtyslac vrccvnpfly afigvkfrnd lfkflkdldgc lsqeqlrqws scrhrrssm 361 sveaettttf 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 mksvlvval vifqvcclcd evtdyigdn ttvdyltfes lcskdvdrnf kawflpimys 61 iicfvglgn glvvltiyif krlktmtdty llnlavadil fltltlpfway saakswvfgv 121 hfcklifaiy kmsffsgmll llcisidryv aivqavsahr hrarvllisk lscvgiwila 181 tvlsipelly sdlqrsseq amrcsliteh veafitiqua qmvigflvpl lamsfcylvi 241 irtllqarnf ernkaikvii avvvvfivfq lpyngvvlaq tvanfnitss tcelskqlni 301 aydvtyslac vrccvnpfly afigvkfrnd lfkflkdldgc lsqeqlrqws scrhrrssm 361 sveaettttf 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 mdlgkpmksv lvvallvifq vclcddevtd dyigdnntvd ytlfleslcsk kdvrnfkawf 61 lpimysiicf vgllngnlv ltyiyfkrk tmtdtyllnl avadilfltltpfwaysaak 121 swvfgvhfck lifaiykmsf fsgmllllci sidryvaivq avsahrhrar vllisklscv 181 giwilatvls ipellysdlq rrsseqamrc slitehveaf itiquaqmvi gflvpllams 241 fcylviirtl lqarnfernk aikviiavvv vfivqlpyn gvvaqtvan fnitstcel 301 skqlniaydv tyslacvrcc vnpflyafig vkfrndlfkl fkdldglsqe qlrqwsscrh 361 irrssmsvea ettttfsp
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 actgagtc cccgggaccccg gagagcggc aatgtgtggt cgctgcgttt cctctgcctg 61 cgccgggcat cacttgccg ccgcagaaa tccgtctggc agcctggata tctctccta 121 ccggcaccg cagacgccc tgcagccgc gtcggcgccc gggctcccta gcctgtgctg 181 ctcaactgtc ctgcgctgc ggggtccgc agttccacct ccgcgcctcc tctctagac 241 aggcgctggg agaaagaacc ggtcccgag ttctgggcat ttcgccgcg tcgaggtgca 301 ggatgcagag caaggtgctg ctggccgctg cctgtggct ctgcgtggag acccgggccg 361 cctctgtggg ttgtcctagt gtttctctg atctgcccag gctcagcata caaaaagaca 421 tacttacaa taaggctaata caactcttc aaattacttg caggggacag agggacttgg 481 actggctttg gcccaataat cagagtggc gtgagcaaa ggtggagggt actgagtga 541 gcgatggcct cttctgtaag acactcaca ttccaaaagt gatcggaaat gacactggag 601 cctacaagtg cttctaccgg gaaactgact tggcctcgt catttatgtc tatgttcaag 661 attacagatc tccatttatt gcttctgtta gtgaccaaca tggagtcgt tacattactg 721 agaacaaaa caaaactgtg gtgattccat gtctcgggt catttcaaat ctcaacgtgt 781 cactttgtgc aagataccca gaaaagagat ttgttcctga tggtaacaga atttctctgg 841 acagcaagaa gggctttact attcccagc acatgatcag ctatgctggc atggctctct 901 gtgaagcaaa aattaatgat gaaagtacc agtctattat gtacatagtt gtcgtgtgag 961 ggtataggat ttatgatgtg gttctgagtc cgtctcatgg aattgaacta tctgttggag 1021 aaaagcttgt cttaaatgt acagcaagaa ctgaactaaa tgtggggatt gacttcaact 1081 gggaatacc ttcttcgaag catcagcata agaaacttgt aaaccgagac ctaaaaacc

10

20

30

40

配列 番号:	GenBank 受入番号 及び 説明	配 列
		<p> 1141 agtctgggag tgagatgaag aaatTTTTga gcaccttaac tatagatggt gtaaccggga 1201 gtgaccaagg attgtacacc tgtgcagcat ccagtgggct gatgaccaag aagaacagca 1261 catttgtcag ggtccatgaa aaacctTTtg ttgctTTtg aagtggcatg gaatctctgg 1321 tggaaagccac ggtgggggag cgtgtcagaa tccctgcgaa gtaccttgggt taccaccccc 1381 cagaaataaa atggtataaa aatggaatac cccttgagtc caatcacaca attaaagcgg 1441 ggcattgtact gacgattatg gaagtgaagt aaagagacac aggaaattac actgtcatcc 1501 ttaccaatcc catttcaaaag gagaagcaga gccatgtggt ctctctgggt gtgtatgtcc 1561 caccaccagat tgggtgagaaa tctctaattct ctctgtgga ttccctaccag tacggcacca 1621 ctcaaacgct gacatgtacg gtctatgcca ttctcccc gcatacacatc cactggtatt 1681 ggcagtTgga ggaagagtgc gccaacgagc ccagccaagc tgtctcagtg acaaacccat 1741 acccttTgta agaattggaga agtTggaagg acttccaggg aggaaataaa attgaagtta 1801 ataaaaatca atttTctcta attgaaggaa aaaacaaaac tgtaagtacc ctTgttatcc 1861 aagcggcaaa tgtTcagct ttgtacaaat tggaagcgggt caacaaagtc gggagaggag 1921 agagggTgat ctcttccac gtgaccaggg gtctgaaat tactttgcaa cctgacatgc 1981 agcccactga gcaggagagc gtgtctTgt ggtgcactgc agacagatct acgtttgaga 2041 acctcacatg gtacaagctt ggcccacagc ctctgccaat ccattgtgga gagtTgcca 2101 cacctgtTg caagaactTg gatactcttT ggaaattgaa tgcccactatg ttctctaata 2161 gcacaaatga cattttgatc atggagctta agaattgcac ctTgcaggac caaggagact 2221 atgtctgcct tgctcaagac aggaagacca agaaaagaca ttgcTggtc aggcagctca 2281 cagtcctaga gcgtgtggca cccacgatca caggaaacct ggagaatcag acgacaagta 2341 ttggggaaaag catcgaagtc tcatgcacgg catctgggaa tccccctcca cagatcatgt 2401 ggtTtaaaga taatgagacc ctTgtagaag actcaggcat Tgtattgaag gatgggaacc 2461 ggaacctcac tatccgcaga gtgaggaagg aggacgaagg cctctacacc tgccaggcat 2521 gcagtgtTct tggctgtgca aaagtggagg cattttTcat aatagaaggT gcccaggaaa 2581 agacgaactt ggaaatcatt attctagtag gcacggcgggt gattgccatg ttcttctggc 2641 tacttctTgt catcatccta cggaccgtta agcggggcaa tggaggggaa ctgaagacag 2701 gctactTgtc catcgtcatg gatccagatg aactcccatT ggatgaacat Tgtgaacgac 2761 tgccttatga tgccagcaaa tgggaattcc ccagagaccg cgtgaagatg gTgaagcctc 2821 ttggccgtgg tgccctTggc caagtattg aagcagatgc cttTggaatt gacaagacag 2881 caactTgcag gacagtagca gtcaaaatgt tgaaagaagg agcaacacac agtgagcatc 2941 gagctctcat gtctgaactc aagatcctca ttcatattgg tcaccatctc aatgtggtca 3001 accttctagg tgccgtgacc aagccaggag ggccactcat ggtgatTgt gaattctgca 3061 aattTgaaa cctgtccact tacctgagga gcaagagaaa TgaattTgt cctacaaga 3121 ccaaaggggc acgattccgt caagggaagg actacgtTgg agcaatccct gtggatctga 3181 aacggcgctt ggacagcatc accagtagcc agagctcagc cagctctgga ttTgtggagg 3241 agaagtcctt cagtgatgta gaagaagagg aagctcctga agatctgtat aaggacttcc 3301 tgacctTgga gcatctcatc Tgttacagct tccaagtggc taagggcattg gagtTctTgg 3361 catcgcaaaa gtgtatccac agggacctgg cggcacgaaa tatctctta tcggagaaga 3421 acgtggttaa aatctgtgac ttTgctTgg ccgggatat ttataaagat ccagattatg 3481 tcagaaaagg agatgctcgc ctccctTtga aatggatggc ccagaaaca atttttgaca 3541 gagtgtacac aatccagagt gacgtctggt cttTggtgt ttTgtgtgg gaaatatTt 3601 ccttaggtgc ttctccatat cctggggtaa agattgatga agaattTgt aggcgattga 3661 aagaaggaa tagaatgagg gccctgatt atactacacc agaaatgtac cagaccatgc 3721 tggactgctg gcacggggag cccagtcaga gacctcgtt ttcagagttg gtggaacatt 3781 tgggaaatct ctTgcaagct aatgctcagc aggatggcaa agactacatt gtctctccga 3841 tatcagagac ttTgagcatg gaagaggatt ctggactctc tctgctacc tcacctgtt 3901 cctgtatgga ggaggaggaa gtatgtgacc ccaaattcca ttatgacaac acagcaggaa 3961 tcagtcagta tctgcagaac agtaagcgaa agagccggc tgtgagtga aaaacattg </p>

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 gtggatatggt tcttgccctca gaagagctga aaacttttga agacagaacc aaattatctc 4141 catcttttgg tggaaatggtg cccagcaaaa gcaggagagtc tgtggcatct gaaggctcaa 4201 accagacaag cggtaccag tccggatata actccgatga cacagacacc accgtgtact 4261 ccagtgagga agcagaactt ttaaagctga tagagattgg agtgcaaac ggtagcacag 4321 cccagattct ccagcctgac tcggggacca cactgagctc tcctcctgtt taaaaggaag 4381 catccacacc cccaactcct ggacatcaca tgagagggtgc tgcctcagatt ttcaagtgtt 4441 gttctttcca ccagcaggaa gttagccgat ttgattttca tttcgacaac agaaaaagga 4501 cctcggactg cagggagcca gtcttctagg catatcctgg aagaggcttg tgaccaaga 4561 atgtgtctgt gtcttctccc agtgttgacc tgatcctctt tttcatctat ttaaaaagca 4621 tttatcatgc cccctgctgc ggggtctacc atgggttttag aacaaagacg ttcaagaaat 4681 ggccccatgc tcaaagaagt agcagtacct ggggagctga cacttctgta aaactagaag 4741 ataaaccagg caatgtaagt gttcgagggtg ttgaagatgg gaaggatttg cagggctgag 4801 tctatccaag aggccttgtt taggacgtgg gtccaagcc aagccttaag tgtggaattc 4861 ggattgatag aaaggaagac taacgttacc ttgctttgga gagtactgga gcctgcaa 4921 gcattgtgtt tgctctggtg gaggtgggca tggggtctgt tctgaaatgt aaaggttca 4981 gacgggggtt ctgggttttag aagggtgctg gtctctcgag ttgggtctaa ttaaggttgc 5041 ttgtgctgtt tctgactcct aatgagagtt ccttcagac cgttacgtgt ctcttgcca 5101 agccccagga aggaaatgat gcagctctgg ctcttctgtc cccaggctga tcttttattc 5161 agaataccac aaagaaagga cattcagctc aaggctcctt gccgtgttga agagtctga 5221 ctgcacaaac cagcttctgg tttcttctgg aatgaatacc ctcatatctg tctgtatgtg 5281 atatgtctga gactgaatgc gggaggttca atgtgaagct gtgtgtggtg tcaaagtttc 5341 aggaaggatt ttaccctttt gtctctcccc ctgtcccaa cccactctca ccccgcaacc 5401 catcagtatt ttagttattt ggctctact ccaagtaaac tgattgggtt tgttactct 5461 ctgaatgatt attagccaga cttaaaaatt atttatagc ccaaattata acatctattg 5521 tattattttag acttttaaca tatagagcta tttctactga tttttgccct tgttctgtcc 5581 tttttttcaa aaaagaaaat gtgttttttg tttggtacca tagtgtgaaa tgctgggaac 5641 aatgactata agacatgcta tggcacatat atttatagtc tgtttatgta gaaacaaatg 5701 taatatatta aagccttata tataatgaac tttgtactat tcacattttg tcatcattat 5761 atgtagcata acaaagggtca taatgctttc agcaattgat gtcattttat taaagaacat 5821 tgaaaaactt gaaggaatcc ctttgcaagg ttgcattact gtaccatca tttctaaaat 5881 ggaagagggg gtggctgggc acagtggccg acacctaata acccagcact ttggggggcc 5941 aagggtgggag gatcgcttga gccaggagt tcaagaccag tctggccaac atggctcagat 6001 tccatctcaa agaaaaaagg taaaaataaa ataaaaatga gaagaaggaa tcaga</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 mqskvllava lwlcvetraa svglpsvsld lprlsiqkdi ltikanttlq itcrgqrldd 61 wlwpnnqsgs eqrvevtecs dglfckltli pkvigndtga ykcfyretdl asviyvyvqd 121 yrspfiavsv dqhgvyvite nknktvvipc lgsisnlvns lcarypekrf vpdgnriswd 181 skkgftipsy misyagmvfc eakindesyq simyivvvvg yriydvvlsp shgielsvge 241 klvlntart elnvgidfnw eypsskhqhk klvnrdlktq sgsemkkfls tltidgvtrs 301 dqglytcaas sglmtkknst fvrvehkpfv afgsgmeslv eatvgervri pakylgyppp 361 eikwykngip lesnhtikag hvlttimevse rdtgnytvil tnpiskekqs hvvslvvyvp 421 pqigekslis pvdsgygtt qtlctctvyai ppphhhiwyw qleeeacanep sqavsvtnpy 481 pceewrsved fggnkievn knqfaliegk nktvstlviq aanvsalykc eavnkvggrge 541 rvisfhvtrg peitlqpdmg ptegesvslw ctadrstfen ltwyklgppp lpihvgelpt 601 pvcknldtlw klnatmfsns tndilimelk naslqdgdy vclaqdrktk krhcvvrqlt 661 vlvrvaptit gnlenqttsi gesievscta sgnpppqimw fkdnetlved sgivlkdgnr 721 nltirrvrke deglytcqac svlgcakvea ffiiegaqek tnleiiilvg taviamffwl</p>

10

20

30

40

配列 番号:	GenBank 受入番号 及び 説明	配 列
		781 llviilrtvk ranggelktg ylsivmdpde lpldehcerl pydaskwefp rdrklklgkpl 841 grgafgqvie adafgidkta tcrtvavkml kegathsehr almselkili highhlnvvn 901 llgactkpgg plmvivefck fgnlstylrs krnefvpykt kgarfrgqkd yvgaipvdlk 961 rrlsitsstq ssassgfvee kslsdveeee apedlykdfi tlehlicysf qvakgmefla 1021 srkcihrdla arnillsekn vvkicdfgla rdiykdpdyv rkgdarlpk wmapetifdr 1081 vytiqsdvws fgvlleifls lgaspypgvk ideefcrrlk egtrmrapdy ttpemyqtml 1141 dcwhgepsqr ptfselvehl gnllqanaqq dgkdyivlpi setlsmeede glslptspvs 1201 cmeeeevcdp kfhydntagi sqylqnskrk srpsvktfe dipleepevk vipddnqtds 1261 gmvaseelk tledrtklsp sfggmvpsks resvasegsn qtsqyqsyh sddtdttvys 1321 seeaellkli eigvqtgsta qilqpdsgtt lssppv
17	NM_001716.4 ヒトCXCR5を コードする 例示的な 核酸配列	1 aaaaaaaaaa agtgatgagt tgtgaggcag gtcgcggccc tactgcctca ggagacgatg 61 cgcagctcat ttgcttaaat ttgcagctga cggctgccac ctctctagag gcacctggcg 121 gggagcctct caacataaga cagtgaccag tctggtgact cacagccggc acagccatga 181 actaccgct aacgctggaa atggacctcg agaacctgga ggacctgttc tgggaactgg 241 acagattgga caactataac gacacctccc tggaggaaaa tcatctctgc cctgccacag 301 agggggccct catggcctcc tccaaggccg tgttcgtgcc cgtggcctac agcctcatct 361 tcctcctggg cgtgatcgcc aacgtcctgg tctggtgat cctggagcgg caccggcaga 421 cacgcagttc caccgagacc ttctgttcc acctggcctg ggccgacctc ctgctggtct 481 tcatcttgcc ctttgccgtg gccgagggtc ctgtgggctg ggtcctgggg accttctct 541 gcaaaactgt gattgccctg caaaaagtca acttctactg cagcagcctg ctctggcct 601 gcatcgccgt ggaccgctac ctggccattg tccacgccgt ccatgcttac cgccaccgcc 661 gcctcctctc catccacatc acctgtggga ccatctggct ggtgggcttc ctcttgcct 721 tgccagagat tctcttcgcc aaagtcagcc aaggccatca caacaactcc ctgccacgtt 781 gcaccttctc ccaagagaac caagcagaaa cgcagcctg gttcacctcc cgattcctct 841 accatgtggc gggattcctg ctgcccattg tggatgagg ggtggtctac gtgggggtag 901 tgcacagggt gcgccaggcc cagcggcgcc ctacgggcca gaaggcagtc aggggtggca 961 tcctggtgac aagcatcttc ttctctgct ggtcacccca ccacatcgtc atcttctctg 1021 acaccctggc gaggtgaaag gccgtggaca atacctgcaa gctgaatggc tctctccccg 1081 tggccatcac catgtgtgag ttctggggcc tggccactg ctgcctcaac cccatgctct 1141 acactttcgc cggcgtgaag ttccgcagtg acctgtcgcg gctcctgacg aagctgggct 1201 gtaccggccc tgccctcctg tgccagctct tcctagctg gcgcaggagc agtctctctg 1261 agtcagagaa tgccacctct ctccaccagt tctaggctcc agtgtcccct tttattgctg 1321 cttttccttg gggcaggcag tgatgctgga tgctccttcc aacaggagct gggatcctaa 1381 gggctcaccg tggctaagag tgctctagga gtatcctcat ttggggtagc tagaggaaac 1441 aacccccatt tctagaacat cctgccagc tcttctgccg gccctggggc taggctggag 1501 cccagggagc ggaaagcagc tcaaaggcac agtgaaggct gtcccttacc atctgcaccc 1561 ccctgggctg agagaacctc acgcacctcc catcctaata atccaatgct caagaacaaa 1621 cttctacttc tgcccttgcc aacggagagc gcctgccctc ccagaaacac actccatcag 1681 cttaggggct gctgacctcc acagcttccc ctctctctc ctgcccacct gtcaaacaaa 1741 gccagaagct gagcaccagg ggatgagtgg aggttaaggc tgaggaaagg ccagctggca 1801 gcagagtgtg gccttcggac aactcagtc ctaaaaacac agacattctg ccaggccccc 1861 aagcctgcag tcatcttgac caagcaggaa gctcagactg gttgagttca ggtagctgcc 1921 cctggtcttg accgaaacag cgctgggtcc accccatgtc accggatcct ggggtggtctg 1981 caggcagggc tgactctagg tgcccttgga ggccagccag tgacctgagg aagcgtgaag 2041 gccgagaagc aagaaagaaa cccgacagag ggaagaaaag agctttcttc ccgaacccca 2101 aggagggaga tggatcaatc aaacccggcg gtccctccg ccaggcgaga tggggtgggg 2161 tggagaactc ctagggtggc tgggtccagg ggaaggagg tbtgggcat tgatggggaa

10

20

30

40

配列 番号:	GenBank 受入番号 及び 説明	配 列
		2221 ggaggtctggc ttgtcccctc ctccactccct tcccataagc tatagaccgc aggaaactca 2281 gagtcggaac ggagaaaggt ggactggaag gggcccgtgg gagtcacatc aaccatcccc 2341 tccgtggcat caccttaggc agggaagtgt aagaacaca ctgaggcagg gaagtcccca 2401 gggcccagga agccgtgccc tgccccctgt aggatgtcac tcagatggaa ccgcaggaag 2461 ctgctccgtg cttgtttgct cacctggggg gtgggaggcc cgtccggcag ttctgggtgc 2521 tccctaccac ctccccagcc ttgatcagg tggggagtca gggaccctcg cccttgctcc 2581 actcaagcca agcagccaag ctccctggga gggccactg gggaaataac agctgtggct 2641 cacgtgagag tgtcttcacg gcaggacaac gaggaagccc taagacgtcc cttttttctc 2701 tgagtatctc ctgcgaagct gggtaatcga tgggggagtc tgaagcagat gcaaagaggc 2761 aagaggctgg attttgaatt ttctttttaa taaaaaggca cctataaaac aggtcaatac 2821 agtacaggca gcacagagac ccccggaaca agcctaaaaa ttgtttcaaa ataaaaacca 2881 agaagatgtc ttcacatatt gtaaaaaaaa aaaaaaaa
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 gcgaaaaact gaagtggaa aagacaaagt 61 gatttggtca aaatgaaat ttgaaacttg acatttggtc agtgggccct atgtaggaaa 121 aaacctccaa gagagctagg gtccctctca gagaggaaag acaggctcctt aggtcctcac 181 cctcccgtct ccttgccctt gcagttctgg gaactggaca gattggacaa ctataacgac 241 acctccctgg tggaaaaatca tctctgccct gccacagagg gggccctcat ggcctccttc 301 aaggccgtgt tcgtgccctg ggcctacagc ctcatcttcc tcttgggctg gatcggaac 361 gtctgggtgc tgggtgatct ggagcggcac cggcagacac gcagttccac ggagaccttc 421 ctgttccacc tggcgtgggc cgacctctg ctggtcttca tcttgccctt tgccgtggcc 481 gagggctctg tgggctgggt cctggggacc ttctctgca aaactgtgat tgccctgcac 541 aaagtcaact tctactgcag cagcctgctc ctggcctgca tcggcgtgga ccgctacctg 601 gccattgtcc acgcccgtca tgcctaccgc caccgccgcc tctctcccat ccacatcacc 661 tgtgggacca tctggctggt gggcttcttc ctgacctgac cagagattct cttcgccaaa 721 gtcagccaa gcccacacaa caactccctg ccacgttgca ccttctccca agagaaccaa 781 gcagaaacgc atgcctggtt cacctccga ttctctacc atgtggcggg attcctgctg 841 cccatgctgg tgatgggctg gtgctacgtg ggggtagtgc acaggttgcc ccaggcccag 901 cgggcctctc agcggcagaa ggcagtcagg gtggccatcc tggtgacaag catctcttcc 961 ctctgctggt caccctacca catcgtcatc ttcttggaac ccctggcgag gctgaaggcc 1021 gtggacaata cctgcaagct gaatggctct ctcccctggt ccatcaccat gttgtgagttc 1081 ctgggcctgg cccactgctg cctcaacccc atgctctaca ctttcgccgg cgtgaagttc 1141 cgcagtgaac tgtcgccgct cctgacgaag ctgggctgta ccggccctgc ctccctgtgc 1201 cagctcttcc ctactggtgg caggagcagt ctctctgagt cagagaatgc cacctctctc 1261 accacgttct aggtcccgat gtcccctttt attgctgctt ttcttggggg caggcagtgga 1321 tgctggatgc tccttccaac agggagctggg atcctaaggg ctccacctgg ctaagagtggt 1381 cctaggagta tcctcatttg gggtagctag aggaaccaac cccattttct agaacatccc 1441 tgccagctct tctgcccggc ctggggctag gctggagccc agggagcggg aagcagctca 1501 aaggcacagt gaaggctgtc cttacccatc tgcacccccc tgggctgaga gaacctcacg 1561 cacctcccat cctaatacat caatgctcaa gaaacaactt ctacttctgc ccttgccaac 1621 ggagagcgcc tgccccctcc agaacacact ccatcagctt aggggtgctg gacctccaca 1681 gcttcccctc tctcctcctg cccacctgtc aaacaaagcc agaagctgag caccagggga 1741 tgagtggagg ttaaggctga ggaaaggcca gctggcagca gagtgtggcc ttccgacaac 1801 tcagtcccta aaaacacaga cattctgcca gggcccaag cctgcagtca tcttgacca 1861 gcaggaagct cagactggtt gaggtcaggt agctgcccct ggctctgacc gaaacagcgc 1921 tgggtccacc ccatgtcacc ggaatcctggg tggctgtgag gcagggtgga ctctaggtgc 1981 ccttgagggc cagccagtga cctgaggaag cgtgaaggcc gagaagcaag aaagaaaccc 2041 gacagagggg agaaaagagc ttcttctccc aacccaagg agggagatgg atcaatcaaa

10

20

30

40

配列 番号:	GenBank 受入番号 及び 説明	配 列
		2101 cccggcggtc cctccgccca ggcgagatgg ggtgggggtgg agaactccta ggggtggctgg 2161 gtccagggga tgggaggttg tgggcattga tggggaagga ggctggcttg tccccctctc 2221 actcccttcc cataagctat agaccggagg aaactcagag tcggaacgga gaaaggtgga 2281 ctggaagggg cccgtgggag tcatctcaac catcccctcc gtggcatcac cttaggcagg 2341 gaagtgttaag aaacacactg aggcaggga gtccccaggc cccaggaagc cgtgccctgc 2401 ccccgtagag atgtcactca gatggaaccg caggaagctg ctccgtgctt gtttgctcac 2461 ctgggggtgtg ggaggcccggt ccggcagttc tgggtgctcc ctaccacctc cccagccttt 2521 gatcaggtgg ggagtcaggg acccctgccc ttgtccact caagccaagc agccaagctc 2581 cttgggaggc cccactgggg aaataacagc tgtggctcac gtgagagtgt cttcacggca 2641 ggacaacgag gaagccctaa gacgtccctt ttttctctga gtatctctc gcaagctggg 2701 taatcgatgg gggagtctga agcagatgca aagaggcaag aggctggatt ttgaattttc 2761 tttttaataa aaaggcacct ataaaacagg tcaatacagt acaggcagca cagagacccc 2821 cggaacaagc ctaaaaattg tttcaaaata aaaaccaaga agatgtcttc acatattgta 2881 aaaaaaaaaa aaaaaa
19	NP_116743.1 ヒトCXCR5前駆体 の例示的な アミノ酸配列	1 masfkavfvp vayslifllg vignvlvlvi lerhrqtrss tetflfhlav adlllvfilp 61 favaegsvgw vlgtflcktv ialhkvnfyc sslllaciav drylaivhav hayrhrllls 121 ihitcgtiwl vgflalalpei lfakvsqghh nnsldrctfs qenqaethaw ftsrflyhva 181 gflpmlvmg wcyvgvvhrl rqaqrrpqrq kavrvailvt sifflcwspy hivifldtla 241 rlkavdntck lngslpvait mceflglahe clnpmltfta gvkfrsdlr lltklgctgp 301 aslcqlfsw rrrslsesen atsltttf
20	NP_001707.1 ヒトCXCR5前駆体 の例示的な アミノ酸配列	1 mnypltlemd lenledlwe ldrlndyndt slvenhlcpa tegplmasfk avfvpvaysl 61 ifllgvignv lvlvilerhr qtrsstetfl fhilavadlll vfllpfavae gsvgwvlgtf 121 lcktvialhk vnfycsslll aciavdryla ivhavhayrh rrlslsihitc gtiwlvglfl 181 alpeilfakv sqghhnnslp rctfsqenqa ethawftrsf lyhvagfllp mlvmgwcyyvg 241 vvhrlrqagr rpqrqkavrv ailvtsiffl cwspyhivif ldtlarlkav dntcklngsl 301 pvaitmcefl glahcclnmp lytfagvkfr sdlrlltlkl gctgpaslcq lfpswrrssl 361 sesenatslt tf
21	NM_031200.2 ヒトCCR9を コードする 例示的な 核酸配列	1 gcttcctttc tcgtgttgtt atcgggtagc tgccctgctca gaaccacaaa agcctgcccc 61 tcatcccagg cagagagcaa cccagctctt tccccagaca ctgagagctg gtgggtgctg 121 ctgtcccagg gagagttgca tcgcccctca cagagcaggc ttgcatctga ctgacccacc 181 atgacaccca cagacttcac aagccctatt cctaacatgg ctgatgacta tggctctgaa 241 tccacatctt ccatggaaga ctacgttaac ttcaacttca ctgacttcta ctgtgagaaa 301 aacaatgtca ggcagtttgc gagccatttc ctcccacct tgtactggct cgtgttcac 361 gtgggtgctt tgggcaacag tcttgttatc ctgtgtact ggtactgcac aagagtgaag 421 accatgaccg acatgttctt tttgaatttg gcaattgctg acctcctctt tctgtcact 481 cttcccttct gggccattgc tgctgctgac cagtggaaagt tccagacctt catgtgcaag 541 gtggtcaaca gcatgtacaa gatgaacttc tacagctgtg tgttgctgat catgtgcac 601 agcgtggaca ggtacattgc cattgccag gccatgagag cacatacttg gagggagaaa 661 aggcctttgt acagcaaaat ggtttgcttt accatctggg tattggcagc tgcctctctg 721 atcccagaaa tcttatacag ccaaatcaag gaggaatccg gcattgctat ctgcaccatg 781 gtttacccta gcgatgagag caccaaactg aagtcagctg tcttgaccct gaaggtcatt 841 ctggggttct tccttccctt cgtggctcatg gcttgctgct ataccatcat cattcacacc 901 ctgatacaag ccaagaagtc ttccaagcac aaagccctaa aagtgaccat cactgtcctg 961 accgtctttg tcttgtctca gtttccctac aactgcattt tgttggtgca gaccattgac 1021 gcctatgcca tgttcatctc caactgtgcc gtttccacca acattgacat ctgcttccag

10

20

30

40

配列 番号:	GenBank 受入番号 及び 説明	配 列
		<p>1081 gtcacccaga ccatcgccctt cttccacagt tgcctgaacc ctgttctcta tgtttttgtg 1141 ggtgagagat tccgccggga tctcgtgaaa accctgaaga acttggttg catcagccag 1201 gccagtgagg ttctatttac aaggagagag ggaagcttga agctgtcgtc tatgttgctg 1261 gagacaacct caggagcact ctccctctga ggggtcttct ctgaggtgca tggttctttt 1321 ggaagaaatg agaaatacag aaacagtttc cccactgatg ggaccagaga gagtgaagaa 1381 gaaaagaaaa ctcagaaagg gatgaatctg aactatatga ttacttgtag tcagaatttg 1441 ccaaagcaaa tatttcaaaa tcaactgact agtgcaggag gctgttgatt ggctcttgac 1501 tgtgatgccc gcaattctca aaggaggact aaggaccggc actgtggagc accctggcct 1561 tgccactcgc cggagcatca atgccgctgc ctctggagga gcccttggat tttctccatg 1621 cactgtgaac ttctgtggct tcagttctca tgctgcctct tccaaaagg gacacagaag 1681 cactggctgc tgctacagac cgcaaaagca gaaagtctc tgaaaatgac catctttggg 1741 aaattttcta ccctgctctt gagcctgata acccatgccca ggtcttatag attcctgatc 1801 tagaaccttt ccaggcaatc tcagacctaa ttctctctg ttctccttgt tctgttctgg 1861 gccagtgaag gtccttggtc tgattttgaa acgatctgca ggtcttgcca gtgaacccct 1921 ggacaactga ccacaccac aaggcatcca aagtctgttg gcttccaatc catttctgtg 1981 tcctgctgga ggttttaacc tagacaagga ttccgcttat tccttggtat ggtgacagtg 2041 tctctccatg gcctgagcag ggagattata acagctgggt tcgcaggagc cagccttggc 2101 cctgttgtag gcttgttctg ttgagtggca cttgcttttg gtccaccgtc tgtctgctcc 2161 ctagaaaatg ggctggttct ttggccctc ttctttctga ggcccacttt attctgagga 2221 atacagtga cagatatggg cagcagccag gtagggcaaa ggggtgaagc gcaggccttg 2281 ctggaaggct atttacttcc atgcttctcc ttttcttact ctatagtggc aacattttaa 2341 aagcttttaa cttagagatt aggtgaaaa aaataagtaa tggaattcac ctttgcatct 2401 tttgtgtctt tcttatcatg atttgcaaaa atgcacacc ttgaaaaata ttccacatat 2461 tggaaaagtg ctttttaatg tgtatatgaa gcattaatta cttgtcactt tctttaccct 2521 gtctcaatat tttaagtgtg tgcaattaaa gatcaaatag atacatt</p>
22	NM001256369.1 ヒトCCR9を コードする 例示的な 核酸配列	<p>1 gcttcttttc tcgtgttgtt atcgggtagc tgcctgctca gaaccacaa agcctgcccc 61 tcatccagg cagagagcaa cccagctctt tcccagaca ctgagagctg gtggtgcctg 121 ctgtccagg gagagttgca tcgccctcca cagagcaggc ttgcatctga ctgaccacc 181 atgacacca cagacttcac atctctcca gggcccgctc cagatcacct tccctcgctg 241 gccaggaat ccatctctt ccaggacct agccaggac taacacaagc cctattctta 301 acatggctga tgactatggc tctgaatcca catcttccat ggaagactac gttaacttca 361 acttactga cttctactgt gagaaaaaca atgtcaggca gtttgcgagc catttctctc 421 cacccttgta ctggctcgtg ttcactcgtg gtgccttggg caacagtctt gttatccttg 481 tctactggtg ctgcacaaga gtgaagacca tgaccgacat gttccttttg aatttggcaa 541 ttgtgacct cctctttctt gtcactcttc ccttctgggc cattgtgct gctgaccagt 601 ggaagtcca gaccttcag tgcaagggtg tcaacagcat gtacaagatg aacttctaca 661 gctgtgtgtt gctgatcatg tgcatcagc tggacaggta cattgcaatt gccaggcca 721 tgagagcaca tacttgagg gagaaaaggc ttttgtacag caaaatggtt tgctttacca 781 tctgggtatt ggcagctgct ctctgcatcc cagaaatctt atacagccaa atcaaggagg 841 aatccggcat tgctatctgc accatgggtt accctagcga tgagagcacc aaactgaagt 901 cagctgtctt gacctgaag gtcattctgg ggttcttct tccctctgtg gtcattgctt 961 gctgtatac catcatcatt cacaccctga tacaagccaa gaagtcttcc aagcacaaag 1021 ccctaaaagt gaccatcact gtcctgaccg tctttgtctt gtctcagttt ccctacaact 1081 gcattttgtt ggtgcagacc attgacgcct atgccatgtt catctccaac tgtgccgttt 1141 ccaccaacat tgacatctgc ttccagggtc cccagaccat cgccttcttc cacagttgcc 1201 tgaacctgtt tctctatgtt tttgtgggtg agagattccg ccgggatctc gtgaaaaccc 1261 tgaagaactt ggggtgcatc agccaggccc agtgggtttc atttacaagg agagagggaa</p>

10

20

30

40

配列 番号:	GenBank 受入番号 及び 説明	配 列
		1321 gcttgaagct gtcgtctatg ttgctggaga caacctcagg agcactctcc ctctgagggg 1381 tcttctctga ggtgcatggt tcttttggaa gaaatgagaa atacagaaac agtttcccca 1441 ctgatgggac cagagagagt gaaagagaaa agaaaactca gaaaggatg aatctgaact 1501 atatgattac ttgtagttag aatttgccaa agcaaatatt tcaaaatcaa ctgactagtg 1561 caggaggctg ttgattggct ctgactgtg atgcccgcga tcttcaaagg aggactaagg 1621 accggcactg tggagcacc tggctttgcc actcgccgga gcatcaatgc cgtgcctct 1681 ggaggagccc ttggatttct tccatgcact gtgaacttct gtggcttcag ttctcatgct 1741 gcctcttcca aaaggggaca cagaagcact ggctgctgct acagaccgca aaagcagaaa 1801 gtttcgtgaa aatgtccatc ttggggaaat tttctaccct gctcttgagc ctgataaccc 1861 atgccaggtc ttatagattc ctgactaga acctttccag gcaatctcag acctaatctc 1921 cttctgttct ccttgttctg ttctgggcca gtgaaggctc ttgttctgat ttgaaacga 1981 tctgcaggtc ttgccagtga acccctggac aactgaccac acccacaagg catccaaagt 2041 ctgttggtt ccaatccatt tctgtgtcct gctggagggt ttaacctaga caaggattcc 2101 gcttattctc tggtaggtg acagtgtctc tccatggcct gagcaggag attataacag 2161 ctgggttcgc aggagccagc ctggccctg ttgtaggctt gttctgttga gtggcacttg 2221 ctttgggtcc accgtctgtc tgctccctag aaaatgggct ggttcttttg gccctcttct 2281 ttctgaggcc cactttatct tgaggaatac agtgagcaga tatgggcagc agccaggtag 2341 ggcaaaaggg tgaagcgcag gccttgctgg aaggctattt acttccatgc ttctcctttt 2401 cttactctat agtggaaca ttttaaaagc ttttaactta gagattagc tgaaaaaaat 2461 aagtaatgga attcaccttt gcacttttgg tgtctttctt atcatgattt ggcaaatgc 2521 atcacctttg aaaatatctc acatatgga aaagtgtctt ttaattgtga tatgaagcat 2581 taattacttg tcactttctt taccctgtct caatatatta agtgtgtgca attaaagatc 2641 aaatagatac att
23	NP_112477.1 ヒトCCR9前駆体 の例示的な アミノ酸配列	1 mtpdftspi pnmaddygse stssmedyvn fnftdfycek nnvrqfashf lpplywlvfi 61 vgalgnslvi lvywyctrvk tmdmflnl aiadllflvt lpfwaiaaad qwkqtfmck 121 vvnsmymnfv yscvllimci svdryiaiaq amrahtwrek rlyskmvcf tiwvlaaal 181 ipeilysqik eesgiaictm vypsdestkl ksavltlkvi lgfflpfvvm accytiiht 241 liqakkskh kalkvtitvl tvfvlsqfpy ncillvqtid ayamfisnca vstnidicfq 301 vtqtiaffhs clnpvlyvfv gerfrrdlvk tlknlgcisq aqwvsftrre gsklssmll 361 ettsgalsl
24	NP_001243298.1 ヒトCCR9前駆体 の例示的な アミノ酸配列	1 maddygsest ssmedyvnfn ftdfycekn vrqfashflp plywlvfiwg algnslvilv 61 ywyctrvktm tdmflnlai adllflvtlp fwaiaaadqw kfqtgmckvv nsymkmnfys 121 cvllimciv dryiaiaqam rahtwrekr lyskmvcfti wvlaaalcip eilysqikey 181 sgiaictmvy psdestklks avltlkvilg fflpfvfmac cytiihtli qakkskhka 241 lkvtitvltv fvlsqfpync illvqtiday amfisncav tndicfqvt qtiaffhscl 301 npvlyvfve rfrdlvktl knlgcisqaq wvsftrregs lklssmlllet tsgalsl
25	NM_000885.4 ヒト $\alpha 4$ をコード する例示的な 核酸配列	1 ataacgtctt tgtcactaaa atgttcccca ggggccttcg gcgagctctt ttgtttggtt 61 ttttgtttt aatctgtggc tcttgataat ttatctagt gttgctaca cctgaaaaac 121 aagacacagt gtttaactat caacgaaaga actggacggc tccccgcgc agtccactc 181 cccgagtttg tggctggcat ttgggccacg ccgggctggg cggtcacagc gagggcgcg 241 cagtttggg tcacacagct ccgcttctag gcccaccca ccgttaaaag ggaagcccg 301 tgcccatca ggtccgctct tgcctgagccc agagccatcc cgcgctctgc gggctgggag 361 gcccgggcca ggaacgcagt cctgcgcagc cgaggttccc cagcgcctcc tgcagccgc 421 cgtaggcaga gacggagccc ggccctgcgc ctccgcacca cgcccgggac cccaccagc 481 ggcccgtagc cggagaagca gcgcgagcac ccgaagctcc cggctggcgg cagaaaccgg

10

20

30

40

配列 番号:	GenBank 受入番号 及び 説明	配 列
		<p> 541 gagtggggcc gggcgagtg cgggcacccc agggccggccc gaacgctccg cccgcggtgg 601 gccgacttcc cctcctcttc cctcctctcc tctttagcc cgctggcgcc ggacacgctg 661 cgccctcatc cttagggcgt tcttccccgt tggccaaccg tcgcatcccg tgcaactttg 721 gggtagtgcc cgttttagtg tgaatgttcc ccaccgagag cgcatggctt gggaagcgag 781 gcgcgaaccc ggcccccgaa gggccgcgct ccgggagacg gtgatgctgt tgctgtgcct 841 ggggggtccc accggccgcc cctacaacgt ggacactgag agcgcgctgc ttaccagggg 901 cccccacaac acgctgttcg gctactcggg cgtgctgcac agccacgggg cgaaccgatg 961 gctcctagt ggtgcgccca ctgcccaact gctgcccaac gcttcagtga tcaatcccgg 1021 ggcgatttac agatgcagga tcggaaagaa tcccggccag acgtgcgaac agctccagct 1081 gggtagccct aatggagaac ctgttggaag gacttggttg gaagagagag acaatcagtg 1141 gttgggggtc acactttcca gacagccagg agaaaaatga tccatcgatg ctgtgtggca 1201 tagatggaaa aatatatttt acataaagaa tgaaaaatag ctccccactg gtgggtgcta 1261 tggagtggcc cctgatttac gaacagaact gagtaaaaga atagctccgt gttatcaaga 1321 ttatgtgaaa aaatttgag aaaaattttg atcatgtcaa gctggaatat ccagttttta 1381 cacaaggat ttaattgtga tggggggccc aggatcatct tactggactg gctctctttt 1441 tgtctacaat ataactacaa ataaatacaa ggctttttta gacaacaaa atcaagtaaa 1501 atttgaagt tatctaggat attcagtcgg agctggctat ttccggagcc agcatactac 1561 cgaagtagtc ggaggagctc ctcaacatga gcagattggt aaggcatata tattcagcat 1621 tgatgaaaaa gaactaaata tcttacatga aatgaaaggt aaaaagcttg gatcgtactt 1681 tggagcttct gtctgtgctg tggacctcaa tgcagatggc ttctcagatc tgctcgtggg 1741 agcaccatg cagagcacca tcagagagga aggaagagt tttgtgtaca tcaactctgg 1801 ctccggagca gtaatgaatg caatggaaac aaacctcgtt ggaagtgaac aatatgctgc 1861 aagatttggg gaactctatg ttaatcttgg cgacattgac aatgatggct ttgaagatgt 1921 tgctatcgga gctccacaag aagatgactt gcaaggtgct atttatattt acaatggccg 1981 tgcagatggg atctcgtcaa ccttctcaca gagaattgaa ggacttcaga tcagcaaatc 2041 gttaagtagt tttggacagt ctatatcagg acaaatgat gcagataata atggctatgt 2101 agatgtagca gttggtgctt ttcggtctga ttctgctgtc ttgctaagga caagacctgt 2161 agtaattgtt gacgcttctt taagccacc tgagtcagta aatagaacga aatttgactg 2221 tgttgaaaaa gtagggcctt ctgtgtgat agatctaaca ctgtgttct catataaggg 2281 caaggaaagt ccaggttaca ttgtttgtt ttataacatg agtttggatg tgaacagaaa 2341 ggcagagtct ccaccaagat tctatttctc ttctaattga acttctgacg tgattacagg 2401 aagcatacag gtgtccagca gagaagctaa ctgtagaaca catcaagcat ttatgcggaa 2461 agatgtgcgg gacatcctca cccaattca gattgaagct gcttaccacc ttggtcctca 2521 tgtcatcagt aaacgaagta cagaggaatt cccaccactt cagccaattc ttcagcagaa 2581 gaaagaaaaa gacataatga aaaaaacaat aaactttgca aggttttttg ccatgaaaaa 2641 ttgttctgct gatttacagg tttctgcaaa gattgggttt ttgaagcccc atgaaaaata 2701 aacatattct gctgttggga gtatgaagac attgatgttg aatgtgtcct tgtttaatgc 2761 tggagatgat gcatatgaaa cgactctaca tgtcaacta cccgtgggtc ttattttcat 2821 taagatttta gagctggaag agaagcaaat aaactgtgaa gtcacagata actctggcgt 2881 ggtacaactt gactgcagta ttggctatat atatgtagat catctctcaa ggatagatat 2941 tagctttctc ctggatgtga gctcactcag cagagcggaa gaggacctca gtatcacagt 3001 gcatgctacc tgtgaaaatg aagaggaaat ggacaatcta aagcacagca gagtactgt 3061 agcaatacct ttaaaaatag aggttaagct gactgttcat gggtttgtaa acccaacttc 3121 atttgtgtat ggatcaaatg atgaaaatga gcctgaaacg tgcatgggtg agaaaaatga 3181 cttaactttc catgttatca acactggcaa tagtatggct ccaatgttta gtgtggaaat 3241 aatggtacca aattctttta gccccaaac tgataagctg tcaacattt tggatgtcca 3301 gactactact ggagaatgcc actttgaaaa ttatcaaaag gtgtgtgcat tagagcagca 3361 aaagagtgc atgcagacct tgaaaggcat agtccgggtc ttgtccaaga ctgataagag </p>

10

20

30

40

配列 番号:	GenBank 受入番号 及び 説明	配 列
		<p>3421 gctattgtac tgcataaaaag ctgatccaca ttgttttaaatt ttcttgtgta attttgggaa 3481 aatggaaaagt ggaaaagaag ccagtggttca tatccaactg gaaggccggc catccatttt 3541 agaaatggat gagacttcag cactcaagtt tgaaalaaga gcaacagggt ttccagagcc 3601 aaatccaaga gtaattgaac taaacaagga tgagaatgtt gcgcagtgtt tactggaagg 3661 actacatcat caaagaccga aacgttattt caccatagtg attatttcaa gtagcttgct 3721 acttggactt attgtacttc tgttgatctc atatgttatg tggagggtg gcttctttaa 3781 aagacaatac aaatctatcc tacaagaaga aaacagaaga gacagttgga gttatatcaa 3841 cagtaaaagc aatgatgatt aaggacttct ttcaaatga gagaatggaa aacagactca 3901 ggtttagtagt aagaaattta aaagacactg ttacaagaa aaaatgaatt ttgttggac 3961 ttcttttact catgatcttg tgacatatta tgtcttcagt caaggggaaa atctcagcaa 4021 tgattactct ttgagataga agaactgcaa aggtaataat acagccaaag ataactctc 4081 agctttttaa tgggttagaga aacactaaaag cattcaattt attcaagaaa agtaagccct 4141 tgaagatatc ttgaaatgaa agtataactg agttaaatla tactggagaa gtcttagact 4201 tgaaatacta cttaccatat gtgcttgect cagtaaaatg aacccactg ggtgggcaga 4261 ggttcatttc aaatacatct ttgatacttg ttcaaatat gttctttaa aatataattt 4321 tttagagagc tgttcccaa ttttctaag agtggacct tatctttaa aagccctta 4381 tttataatac atttcctacg ggctgtgttc caacaacct ttttttcag cagacttga 4441 atattatagt attataggcc aaactggcaa acttcagact gaacatgtac actggttga 4501 gcttagtgaa attacttctg gataattatt tttttataat tatggatttc accatcttc 4561 tttctgtata tatacatgtg tttttatgta ggtatatatt taccattctt cctatctatt 4621 ctctcataaa cacaccttta tcaagcatac ccaggagtaa tcttcaaat ttttgttata 4681 ttctgaaaca aaagatttg agtggtgcac ttacctgat acacgtgat ttgaaaaata 4741 cagaaccat acctcactaa taactttaaa atcaaagctg tgcaaagact agggggccta 4801 tacttcata gtattatgta ctatgtaaaa tattgactat cacacaacta ttctcttga 4861 tgtaattctt tgttaccctt tacaagtata agtggtacct tacatggaaa cgaagaaaca 4921 aaattcataa attttaattc ataaatttag ctgaaagata ctgattcaat ttgtatacag 4981 tgaatataaa tgagacgaca gcaaaatttt catgaaatgt aaaatatttt tatagtttgt 5041 tcatactata tgagggttcta ttttaaatga ctttctggat ttttaaaaaa ttctttaaatt 5101 acaatcattt ttgtaattat tttttatgc ttatgatcta gataattgca gaatatcatt 5161 ttatctgat ctgccttcat aagagagctg tggccgaatt ttgaacatct gttataggga 5221 gtgatcaaat tagaaggcaa tgtggaaaaa caattctggg aaagatttct ttatatgaag 5281 tccctgccac tagccagcca tcctaattga tgaaagtat ctgttcacag gcctgcagt 5341 atggtgagga atgttctgag atttgcgaag gcatttgagt agtgaaatgt aagcacaaaa 5401 cctcctgaac ccagagtgtg tatacacagg aataaacttt atgacattta tgtattttta 5461 aaaaactttg tatcgttata aaaaggctag tcatcttctc agggagaacat ctaggatcat 5521 agatgaaaaa tcaagcccg atttagaact gtcttctcca ggtggtctc taaggaaatt 5581 tacatttggg tctttcctac tcagaactac tcagaacaa ctatatattt caggttatct 5641 gagcacagt aaagcagagt actatggtt tccaacacag gcctctcaga tacaaggga 5701 acacaattac atattgggct agattttgcc cagttcaaaa tagtatttgt tatcaactta 5761 ctttgttact tgtatcatga attttaaaac cctaccactt taagaagaca gggatgggtt 5821 attctttttt ggcaggtagg ctatataact atgtgatttt gaaatttaac tgctctggat 5881 tagggagcag tgaatcaagg cagacttatg aaatctgtat tatatttgta acagaatata 5941 ggaaatttaa cataattgat gagctcaaat cctgaaaaat gaaagaatcc aaattatttc 6001 agaattatct aggttaaata ttgatgtatt atgatggtt gaaagtattt ttgtgtgtcc 6061 aataaacaca ttgtaaaaaa aa</p>
26	NM_000889.2	<p>1 aaatcttccc caccctgggg agtgctactt cctcctctgc cgtctcccag atcagtacac 61 aaaggctgct gctgccgcca gaggaaggac tgctctgcac gcacctatgt ggaactaaa</p>

10

20

30

40

配列 番号:	GenBank 受入番号 及び 説明	配 列
	ヒトβ7をコード する例示的な 核酸配列	<div> 121 gccacagagag aaagtctgac ttgccccaca gccagtgagt gactgcagca gcaccagaat 181 ctggtctgtt tcctgtttgg ctctcttacc actacggctt gggatctcgg gcatggtggc 241 tttgccaatg gtccctgttt ttgctgctgg cctgagcaga ggtgagagtg aattggacgc 301 caagatccca tccacagggg atgccacaga atggcggaat cctcacctgt ccatgctggg 361 gtctgcccag ccagcccctt cctgccagaa gtgcatcctc tcacacccca gctgtgcatg 421 gtgcaagcaa ctgaacttca ccgctcggg agaggcggag gcgcggcgct gcgcccgaag 481 agaggagctg ctggctcgag gctgcccgtt ggaggagctg gaggagcccc gcggccagca 541 ggaggtgctg caggaccagc cgctcagcca gggcgccgcg ggagaggggtg cccaccagct 601 ggcgcgcgag cgggtccggg tcacgctgcg gcctggggag cccacagcgc tccaggtccg 661 ctctcttctg gctgagggat acccggttga cctgtactac cttatggacc tgagctactc 721 catgaaggac gacctggaac gcgtgcgcca gctcgggcac gctctgctgg tccggtgca 781 ggaagtccac cattctgtgc gcattgggtt tggttccttt ttggacaaaa cgggtgctgcc 841 ctttctgagc acagtaccct ccaaatcgcg ccaaccctgc cccacccggc tggagcgctg 901 ccagtcacca ttcagctttc accatgtgct gtccctgacg ggggacgcac aagccttcga 961 gcgggaggtg gggcgccaga gtgtgtccgg caatctggac tcgcctgaag gtggcttcga 1021 tgccattctg caggctgcac tctgccagga gcagattggc tggagaaatg tgtccggct 1081 gctggtgttc acttcagacg acacattcca tacagctggg gacgggaagt tgggcggcat 1141 tttcatgccc agtgatgggc actgccactt ggacagcaat ggcctctaca gtgcagcac 1201 agagtttgac tacccttctg tgggtcaggt agcccaggcc ctctctgcag caaatatcca 1261 gcccatcttt gctgtcacca gtgccgact gcctgtctac caggagctga gtaaatgat 1321 tcttaagtct gcagttgggg agctgagtga ggactccagc aacgtggtac agctcatcat 1381 ggatgcttat aatagcctgt ctccaccgtg gacccttgaa cactcttcac tccctcctgg 1441 ggtccacatt tcttacgaat cccagtgtga gggctctgag aagagggagg gtaaggctga 1501 ggatcgagga cagtcaacc acgtccgaat caaccagacg gtgactttct gggtttctct 1561 ccaagccacc cactgcctcc cagagcccca tctctgagg ctccgggccc ttggcttctc 1621 agaggagctg attgtggagt tgcacacgct gtgtgactgt aattgcagtg acaccagcc 1681 ccaggctccc cactgcagtg atggccaggg acacctacaa tgtggtgtat gcagctgtgc 1741 ccttgccgcg ctaggctggc tctgtgagtg ctctgtggca gactgtcct cccagacct 1801 ggaatctggg tgccgggctc ccaatggcac agggcccctg tgcagtggaa agggctactg 1861 tcaatgtgga cgctgcagct gcagtggaac gagctctggg catctgtgcg agtgtgacga 1921 tgccagctgt gagcgacatg agggcactct ctgcggaggc ttgtgtcgtg gccaatgtgg 1981 agtatgtcac tgtcatgcca accgcacggg cagagcatgc gaatgcagtg gggacatgga 2041 cagttgcatc agtcccagag gagggctctg cagtgggcat ggacgctgca aatgcaaccg 2101 ctgccagtg ttggacggct actatgggtc tctatgcgac caatgccag gctgcaagac 2161 accatgcgag agacaccggg actgtgcaga gtgtggggcc ttcaggactg gccactggc 2221 caccaactgc agtacagctt gtgccatac caatgtgacc ctggccttgg cccctatctt 2281 ggatgatggc tgggtgaaa agcggacccct ggacaaccag ctgttcttct tcttggtgga 2341 ggatgacgcc agaggcacgg tcgtgctcag agtgagacc caagaaaagg gagcagacca 2401 caccgaggcc attgtgctgg gctgcgtagg gggcatcgtg gcagtggggc tggggctggg 2461 cctggcttac cggctctcgg tggaaatcta tgaccgcccg gaatacagtc gctttgagaa 2521 ggagcagcaa caactcaact ggaagcagga cagtaatcct ctctacaaaa gtgccatcac 2581 gaccaccatc aatcctcgct ttcaagaggc agacagtccc actctctgaa ggaggagggg 2641 acacttacc aaggctcttc tccttgagg acagtgggaa ctggagggtg agaggagggg 2701 tgggtctgta agaccttgg aggggactaa ttcactggcg aggtgcggcc accaccctac 2761 ttcatcttca gagtgcaccc caagagggtc gcttcccatg cctgcaacct tgcatccatc 2821 tgggtacc cacccaagta tacaataaag tcttacctca gaccacaaaa aaaaaaaa </div>
27	NP_000876.3	1 mawearrepg prraavretv mlllclgvpt grpynvdtcs allyqgphnt lfgysvvlhs

10

20

30

40

配列 番号:	GenBank 受入番号 及び 説明	配列
	ヒト α 4前駆体の 例示的な アミノ酸配列	61 hganrwlvlvg aptanwlana svinpgaiyr crigknpqgt ceqlqlgspn gepcgktcle 121 erdnqwlqvt lsrqpgengs ivtcghrwnk ifyiknenkl ptggcygvvp dlrtelskri 181 apcyqdyvkk fgenfascqa gissfytkdl ivmgapgssy wtgsllfvyni ttnkykafld 241 kqnqvkfgsy lgysvgaghf rsqhttevvg gapqheqigk ayifsideke lnilhemkgk 301 klgsyfgasv cavdlnadgf sdllvgapmq stireegrvf vyinsgsgav mnametnrlvg 361 sdkyaarfge sivnlgdidn dgfedvaiga pqeddlqgai yinynggradgi sstfsgrieg 421 lqiskslsmf gqsisgqida dnngyvvdav gafrrdsavl lrtrpvvivd aslshpesvn 481 rtkfcdcveng wpsvcidltl cfsykgkevp gyivlfnms ldvnркаesp prfyfssngt 541 sdvitgsiqv ssreancrth qafmrkdvrd iltpiqieaa yhlghphvisk rsteefpplq 601 pilqqkkekd imkktinfa fcahencsad lqvsakigfl kphenktyla vgsmtklmln 661 vslnagdda yettlhvkfp vglyfikile leekqincev tdnsgvvqld csigiyiyvdh 721 lsridisfll dvsslsraee dlsitvhatc eneeemdnlk hsrvtvaipk kyevkltvhg 781 fvnptsfvyg sndenepetc mvekmnlftf vintgnsmap nvsveimvpn sfsptdklf 841 niildvqtttg echfenyqrv caleqqksam qtlkgivrf sktdkrlllyc ikadphclnf 901 lcnfgkmesg keasvhiqle grpsilemde tsalkfeira tgfpepnprv ielnkdenva 961 hvllleglhhq rpkryftivi issllllgli vlllisylvmw kagffkrqyk silqeenrrd 1021 swsyinsksn dd
28	NP_000880.1 ヒト β 7前駆体の 例示的な アミノ酸配列	1 mvalpmlvlv llvlrsrgese ldakipstgd atewrnpnhs mlgsccpaps cqkclshps 61 cawckqlnft asgeaearrc arreellarg cpleelepr qqevlqdp lsggargega 121 tqlapqrvrv tlrrgepqql qvrflraegy pvdlylmdl sysmkddler vrqlghallv 181 rlgvthsvr igfgsfvdkl vlpfvstvps klrhpcptrl ercqspsfsf hvlsltgdaq 241 aferevgrqs vsgnldspg gfdailqaal cqeigwrnv srllvftsd tftagdgkl 301 ggifmpsdgh chldsnlgys rstefdypsv gqvaqalsaa niqipfavts aalpvvyqels 361 klipksavge lsdssnvvg limdaynsls stvtlehssl ppgvhisyes qcegpekreg 421 kaedrgqcnh vrinqtvtfw vslqathclp ephllrlral gfseelivel htldcncsd 481 tqppaphcsd qgghlqcgv cscapgrlgrl cecsvaelss pdlesgcrap ngtgplcsgk 541 ghcqcgrcsc sgqssghlce cddascerhe gilcggfgrc qcgvchchan rtgracecsg 601 dmdscispeg glcsgghgrck cnrcqldgy ygaldcdqpg cktpcerhrd caecgafrtg 661 platncstac ahtnvtlala pilddgwcke rtldnqlfff vlddargtv vlrvrpqekg 721 adhtqaivlg cvggivavgl glvlayrlsv eiydreysr fekeqqqlnw kqdsnplyks 781 aitttinprf qeadsptl
29	NM_016602.2 ヒトCCR10を コードする 例示的な 核酸配列	1 agagatgggg acggaggcca cagagcaggt ttctctggggc cattactctg gggatgaaga 61 ggacgcatac tcggtgtagc cactgccgga gctttgctac aaggccgatg tccaggcctt 121 cagccgggcc ttccaaccca gtgtctccct gaccgtggct gcgctgggtc tggccggcaa 181 tggcctggtc ctggccaccc acctggcagc ccgacgcgca gcgcgctcgc ccacctctgc 241 ccacctgctc cagctggccc tggccgacct cttgctggcc ctgactctgc ccttcgcggc 301 agcaggggct cttcagggct ggagctctggg aagtgccacc tgccgcacca tctctggcct 361 ctactcgcc ccttccaacg ccggtctcct cttcctggcc tgatcacgac ccgaccgcta 421 ctgtggccatc gcgcgagcgc tccagccggc gccgcggccc tccactccgc gccgcgcaca 481 cttgggtctcc gtcacgtgtg ggctgctgtc actgctcctg gcgctgcctg cgtgctctct 541 cagccaggat gggcagcggg aaggccaacg acgctgtcgc ctcatcttcc ccgagggcct 601 cacgcagacg gtgaaggggg cgagcgccgt ggcgcagggt gccctgggct tcgcgctgcc 661 gctgggctgc atggtagcct gctacgcgct tctgggccgc acgctgctgg ccgccagggg 721 gcccgagcgc cggcgtgcgc tgcgcgtcgt ggtggtctg gtggcgccct tcgtggtgct 781 gcagctgccc tacagcctcg ccctgctgct ggatactgcc gatctactgg ctgcgcgcga 841 gcggagctgc cctgccagca aacgcaagga tgtcgcactg ctggtagaca gcggcttggc

配列 番号:	GenBank 受入番号 及び 説明	配 列
		901 cctcgccccgc tgtggcctca atcccgtttct ctacgccttc ctgggcctgc gcttccgcca 961 ggacctgcgg aggctgctac ggggtgggag ctgccctca gggcctcaac ccgcgcggg 1021 ctgccccgcg cgccccgcc ttcttctctg ctacagctccc acggagaccc acagtctctc 1081 ctgggacaac tagggctgcg aatctagagg agggggcagg ctgagggtcg tgggaaaggg 1141 gagtaggtgg gggaacactg agaaagaggc agggacctaa agggactacc tctgtgcctt 1201 gccacattaa attgataaca tggaaatgag 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 cagagcaggt ttcctggggc cattactctg gggatgaaga 61 ggacgcatac tcggctgagc cactgccgga gctttgctac aaggccgatg tccaggcctt 121 cagccggggc ttccaaccca gtgtctccct gaccgtggct gcgctgggtc tggccggcaa 181 tggcctggtc ctggccaccc acctggcagc ccgacgcgca gcgcgtcgc ccacctctgc 241 ccacctgctc cagctggccc tggccgacct ctgtctggcc ctgactctgc ccttcgcggc 301 agcaggggct cttcagggtt ggagtcctgg aagtgcacc tcgccacca tctctggcct 361 ctactcggcc tccttcacag ccggcttctt ctctctggcc tgtatcagcg ccgaccgcta 421 cgtggccatc gcgcgagcgc tcccagccgg gccgcggccc tccactcccg gccgcgcaca 481 cttggtctcc gtcatcgtgt ggctgctgtc actgctcctg gcgctgcctg cgctgctctt 541 cagccaggat gggcagcggg aaggccaacg acgctgtcgc ctcatcttcc ccgagggcct 601 caccgagacg gtgaaggggg cgagcgccgt ggcgagggtg gccctgggct tcgcgctgcc 661 gctgggcgtc atggtagcct gctacgcgct tctgggcgc acgctgctgg ccgccagggg 721 gcccagcgc cgccgtgcgc tgcgcgtcgt ggtggctctg gtggcggcct tctgtgtgct 781 gcagctgccc tacagcctcg ccctgctgct ggatactgcc gatctactgg ctgcgcgcga 841 gcggagctgc cctgccagca aacgcaagga tgtcgactg ctgggtacca gcggcttggc 901 cctcgccccgc tgtggcctca atcccgtttct ctacgccttc ctgggcctgc gcttccgcca 961 ggacctgcgg aggctgctac ggggtgggag ctgccctca gggcctcaac ccgcgcggg 1021 ctgccccgcg cgccccgcc ttcttctctg ctacagctccc acggagaccc acagtctctc 1081 ctgggacaac tagggctgcg aatctagagg agggggcagg ctgagggtcg tgggaaaggg 1141 gagtaggtgg gggaacactg agaaagaggc agggacctaa agggactacc tctgtgcctt 1201 gccacattaa attgataaca tggaaatgaa aaaaaaaaaa 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 laltlpfaaa galqgswlgs atcertisgly 121 sasfhagflf lacisadryv aiaraipagp rpstpgrahl vsvivwllsl llalpalfls 181 qdgqregqrr crlifpeglt qtvkgasava qvalgfalpl gvmvacyall grtllaargp 241 errralrvvv alvaafvvlq lpyslallld tadllaarer scpaskrkdv allvtsglal 301 arcglnpvly aflglrfrqd lrrllrggsc psgpprrrgc prrprlsscs aptethslsw 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 laltlpfaaa galqgswlgs atcertisgly 121 sasfhagflf lacisadryv aiaraipagp rpstpgrahl vsvivwllsl llalpalfls 181 qdgqregqrr crlifpeglt qtvkgasava qvalgfalpl gvmvacyall grtllaargp 241 errralrvvv alvaafvvlq lpyslallld tadllaarer scpaskrkdv allvtsglal 301 arcglnpvly aflglrfrqd lrrllrggsc psgpprrrgc prrprlsscs aptethslsw 361 dn
33	NM_005201.3 ヒトCCR8を	1 tttgtagtgg gaggatacct ccagagaggc tgctgctcat tgagctgcac tcacatgagg 61 atacagactt tgtgaagaag gaattggcaa cactgaaacc tccagaacaa aggctgtcac 121 taaggteccg ctgccttgat ggattatata cttgacctga gtgtgacaac agtgaccgac

10

20

30

40

配列 番号:	GenBank 受入番号 及び 説明	配 列
	コードする 例示的な 核酸配列	<div> 181 tactactacc ctgatatctt ctcaagcccc tgtgatgcgg aacttattca gacaaatggc 241 aagttgctcc ttgctgtctt ttattgcctc ctggttgat tcatgtctct gggaaacagc 301 ctggctcatcc tggctccttg ggtctgcaag aagctgagga gcatcacaga tgtatacctc 361 ttgaacctgg ccctgtctga cctgcttttt gtcttctect tcccttttca gacctactat 421 ctgctggacc agtgggtgtt tgggactgta atgtgcaaag tgggtgtctgg cttttattac 481 attggcttct acagcagcat gtttttcatc accctcatga gtgtggacag gtacctggct 541 gttgtccatg ccgtgtatgc cctaaagggt aggacgatca ggatgggcac aacgctgtgc 601 ctggcagtat ggctaaccgc cattatggct accatcccat tgcagtgtgt ttaccaagtg 661 gcctctgaag atgggtgtct acagtgttat tcattttaca atcaacagac tttgaagtgg 721 aagatcttca ccaacttcaa aatgaacatt ttaggcttgt tgatcccat caccatcttt 781 atgttctgct acattaaaat cctgcaccag ctgaagaggt gtcaaaacca caacaagacc 841 aaggccatca ggttggtgct cattgtggtc attgcatctt tacttttctg ggtcccatte 901 aacgtgggtc ttttcttcac ttccttgac agtatgcaca tcttgatgg atgtagcata 961 agccaacagc tgacttatgc caccatgtc acagaaatca tttcctttac tcactgctgt 1021 gtgaacctcg ttatctatgc ttttgttggg gagaagtta agaaacacct ctcaagaata 1081 tttcagaaaa gttgcagcca aatcttcaac tacctaggaa gacaaatgcc tagggagagc 1141 tgtgaaaagt catcatcctg ccagcagcac tctcccgtt cctccagcgt agactacatt 1201 ttgtgaggat caatgaagac taaatataaa aaacattttc ttgaatggca tgcctagtagc 1261 agtgagcaaa ggtgtgggtg tgaagggttt ccaaaaaaag ttcagcatga aggatgccat 1321 atatgttgtt gccaacactt ggaacacaat gactaaagac atagttgtgc atgctgggca 1381 caacatcaag cctgtgattg tgtttattga tgatgttgaa caagtggtaa ctttaaagga 1441 ttctgtatgc caagtgaata aaaaagatgt ctgacctcct tacatat </div>
34	BC107159.1 ヒトCCR8を コードする 例示的な 核酸配列	<div> 1 ctttgtgaag aaggaattgg caacactgaa acctccagaa caaaggctgt cactaagggtc 61 ccgctgcctt gatggattat acacttgacc tcagtgtgac aacagtgacc gactactact 121 accctgatat cttctcaagc ccctgtgatg cggaacttat tcagacaaat ggcaagtgtc 181 tccttgctgt cttttattgc ctctgttttg tattcagctc tctgggaaac agcctgggtca 241 tcctgggtcct tgtggtctgc aagaagctga ggagcatcac agatgtatac ctcttgaacc 301 tggccctgtc tgacctgctt tttgtcttct ctttccctt tcagacctac tatctgctgg 361 accagtgggt gtttgggact gtaatgtgca aagtgggtgc tggcttttat tacattggct 421 tctacagcag catgtttttc atcaccctca tgagtgtgga cagggtacctg gctgttgtcc 481 atgccgtgta tgccctaaag gtgaggacga tcaggatggg cacaacgctg tgccctggcag 541 tatggctaac cgccattatg gctaccatcc cattgctagt gttttaccaa gtggcctctg 601 aagatgggtg tctacagtgt tattcatttt acaatcaaca gactttgaag tgggaagatct 661 tcaccaactt caaaatgaac attttaggct tggttgatccc attcaccatc tttatgttct 721 gctacattaa aatcctgcac cagctgaaga ggtgtcaaaa ccacaacaag accaaggcca 781 tcaggttggg gctcattgtg gtcattgcat ctttactttt ctgggtccca ttcaacgtgg 841 ttcttttctt cacttccctg cacagtatgc acatcttggg tggatgtagc ataagccaac 901 agctgactta tgccacccat gtcacagaaa tcatttccct tactcactgc tgtgtgaacc 961 ctgttatcta tgcttttgtt ggggagaagt tcaagaaaca cctctcagaa atatttcaga 1021 aaagttgcag ccaaatcttc aactacctag gaagacaaat gcctaggag agctgtgaaa 1081 agtcatcatc ctgccagcag cactcctccc gttcctccag cgtagactac attttgtgag 1141 gatcaatgaa gactaaatat aaaaaacatt ttcttgaatg gcatgctagt agcagtgagc 1201 aaagggtgtg gtgtgaaagg ttccaaaaa aagttcagca tgaaggatgc cgtgtgtgtt 1261 gttgccaaca cttggaacac gatgactggg gacgtgggtg tgcatgcctg gcacaacatc 1321 aagcctgtga ttgtgtttat tgatgatgtt gaacaagtgg tggctttgga ggattctgta 1381 tgccaagtga aaggggagat gctcgacctc cttcatatag </div>

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	1 mdytldlsvt tvtdyyypdi fsspcdaeli qtngklllav fycllfvfsl lgnsilvilvl 61 vvckklrsit dvyllynals dllfvfsfpf qtyylldqvw fgtvmckvvs gfyigfyss 121 mffitlmsvd rylavvhavy alkvtirmg ttclclavwt aimatipllv fyqvasedgv 181 lqcysfynqq tlkwkiftnf kmnilgllip ftifmfcyik ilhqlkrcqn hnktkairlv 241 livviasllf wvpfnvvlfl tslhsmhild gcsisqqlty athvteiisf thccvnpviy 301 afvgekfkhh lseifqkscs qifnylgrqm presceksss cqqhssrsss vdyil
36	AAI07160.1 ヒトCCR8前駆体 の例示的な アミノ酸配列	1 mdytldlsvt tvtdyyypdi fsspcdaeli qtngklllav fycllfvfsl lgnsilvilvl 61 vvckklrsit dvyllynals dllfvfsfpf qtyylldqvw fgtvmckvvs gfyigfyss 121 mffitlmsvd rylavvhavy alkvtirmg ttclclavwt aimatipllv fyqvasedgv 181 lqcysfynqq tlkwkiftnf kmnilgllip ftifmfcyik ilhqlkrcqn hnktkairlv 241 livviasllf wvpfnvvlfl tslhsmhild gcsisqqlty athvteiisf thccvnpviy 301 afvgekfkhh lseifqkscs qifnylgrqm presceksss cqqhssrsss vdyil
37	NM_005508.4 ヒトCCR4を コードする 例示的な 核酸配列	1 gctcacagga agccacgcac ccttgaaagg caccgggtcc ttcttagcat cgtgcttctt 61 gagcaagcct ggcatgtcct cacagacatt cctcagagcc gctttcagaa aagcaagctg 121 cttctgggtt ggcccagacc tgccttgagg agcctgtaga gttaaaaaat gaacccccacg 181 gatatagcag acaccacccct cgatgaaagc atatacagca attactatct gtatgaaagt 241 atcccccaagc cttgcaccaa agaaggcatc aaggcatttg gggagctctt cctgccccca 301 ctgtattctt tgggttttgt atttgggtctg cttggaatt ctgtggtggt tctggtcctg 361 ttcaataaca agcggctcag gtccatgact gatgtgtacc tgctcaacct tgccatctcg 421 gatctgctct tctgttttct cctccctttt tggggctact atgcagcaga ccagtgggtt 481 tttgggctag gtctgtgcaa gatgatttcc tggatgtact tgggtgggtt ttacagtggc 541 atattctttg tcatgtctcat gagcattgat agatacctgg caattgtgca cgcggtgttt 601 tccttgaggg caaggacctt gacttatggg gtcacacca gtttggttac atggctcagt 661 gctgtgttct cctcccttcc tgggtttctg ttcagcactt gttatactga gcgcaaccat 721 acctactgca aaaccaagta ctctctcaac tccacgacgt ggaagggtct cagctccctg 781 gaaatcaaca ttctcggatt ggtgatcccc ttagggatca tgctgttttg ctactccatg 841 atcatcagga ccttgagca ttgtaaaaat gagaagaaga acaaggcggg gaagatgatc 901 tttgccgtgg tgggtctctt ccttgggttc tggacacctt acaacatagt gctcttctta 961 gagaccctgg tggagctaga agtccttcag gactgcacct ttgaaagata cttggactat 1021 gccatccagg ccacagaaac tctggctttt gttcactgct gccttaatac catcatctac 1081 ttttttctgg gggagaaatt tgcgaagtac atcctacagc tcttcaaac ctgcaggggc 1141 ctttttctgc tctgccaata ctgtgggtct ctccaaattt actctgctga cccccccagc 1201 tcatcttaca cgcagtcac catggatcat gatctccatg atgctctgta gaaaaatgaa 1261 atggtgaaat gcagagtcaa tgaactttcc acattcagag ctacttaaa attgtatttt 1321 agtaagagat tcctgagcca gtgtcaggag gaaggcttac acccagctg gaaagacagc 1381 ttctcatcct gcaggcagct ttttctctcc cactagacaa gtccagcctg gcaagggttc 1441 acctgggctg aggcctcctt cctcacacca ggcttgcttg caggcatgag tcagtctgat 1501 gagaactctg agcagtgctt gaatgaagtt gtaggtaata ttgcaaggca aagactattc 1561 ccttctaacc tgaactgatg ggtttctcca gagggatttg cagagtactg gctgatggag 1621 taaatcgcta ccttttctg tggcaaatgg gccctctt
38	P51679.1 ヒトCCR4前駆体 の例示的な アミノ酸配列	1 mnptdiadt ldesiysny lyesipkpc kegikafgel flppylslvf vfgllgnsbv 61 vlvlfkykrl rsmtdivylln laisdllfvf slpfwggyaa dqwvfglglc kmiswmylv 121 fysgiffvml msidrylaiv havfslrart ltygvitsla twsavvfasl pgflfstcyt 181 ernhtycktk yslnsttwkv lssleinilg lviplgimlf cysmiirtlq hckneknkna 241 vkmifavvvl flgfwtpyni vlflletlvel evlqdcfer yldyaiqate tlaifvhccln

10

20

30

40

配列 番号:	GenBank 受入番号 及び 説明	配 列
		301 piifyfflgek frkyilqlfk tcrglfvlcq ycgllqiysa 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 gaaccttga ggggtggacag tgcccctttt acagatgaga aaactgagggc 61 ttgaagggga gaagcagctg cctctggcgg catggcttct ggctgcagga tgcccatgga 121 gtctgtgggtg accctaggcc tgtgtctcgg ctctcctttgc tgaacttgaa caggaagatg 181 gcagtggggg ccagtgggtct agaaggagat aagatggctg gtgccatgcc tctgcaactc 241 ctctgtttgc tgatcctact gggccctggc aacagcttgc agctgtggga cacctgggca 301 gatgaagccg agaaagcctt ggggtcccctg ctgtcccggg accggagaca gggcaccgaa 361 tatgagtacc tagattatga ttctctgcca gaaacggagc ctccagaaat gctgaggaac 421 agcactgaca ccactcctct gactgggcct ggaaccctg agtctaccac tgtggagcct 481 gctgcaaggc gttctactgg cctggatgca ggagggcag tcacagagct gaccacggag 541 ctggccaaca tggggaacct gtccacggat tcagcagcta tggagataca gaccactcaa 601 ccagcagcca cggaggcaca gaccactcaa ccagtgccta cggaggcaca gaccactcca 661 ctggcagcca cagaggcaca gacaactcga ctgacggcca cggaggcaca gaccactcca 721 ctggcagcca cagaggcaca gaccactcca ccagcagcca cggagacaca gaccactcaa 781 cccacaggcc tggaggcaca gaccactgca ccagcagcca tggaggcaca gaccactgca 841 ccagcagcca tggaggcaca gaccactcca ccagcagcca tggaggcaca gaccactcaa 901 accacagcca tggaggcaca gaccactgca ccagaagcca cggaggcaca gaccactcaa 961 cccacagcca cggaggcaca gaccactcca ctggcagcca tggaggcctt gtccacagaa 1021 cccagtgcga cagaggcctt gtccatggaa cctactacca aaagaggctt gtccatacc 1081 ttttctgtgt cctctgttac tcacaagggc attcccatgg cagccagcaa ttgtccgtc 1141 aactaccag tggggggccc agaccacatc tctgtgaagc agtgctgtct gggcacccta 1201 atcttggcgc tgggtggccac tatcttcttc gtgtgcaactg tgggtgtggc ggtccgctc 1261 tcccgcagg gccacatgta ccccgctgct aattactccc ccaccgagat ggtctgcac 1321 tcatcctgt tgccctgatgg ggggtgagggg ccctctgcca cagccaatgg gggcctgtcc 1381 aaggccaaga gcccgggctt gacgccagag cccaggagg accgtgaggg ggaatgacct 1441 accctgcaca gcttctctcc ttagctcact ctgccatctg ttttggcaag accccacctc 1501 cacgggctct cctggggccac ccctgagtgcc ccagaccca ttccacagct ctgggcttcc 1561 tcggagaccc ctggggatgg ggaatctcag ggaaggaact ctggccaccc aaacaggaca 1621 agagcagcct ggggccaagc agacgggcaa gtggagccac ctcttctctc cctccgcgga 1681 tgaagccag ccacatttca gccgaggtcc aaggcaggag gccatttact tgagacagat 1741 tctctccttt ttctgtctcc ccatcttctc tgggtccctc taacatctcc catggctctc 1801 cccgcttctc ctgggtcactg gagtctctcc cccatgtacc caaggaagat ggagctcccc 1861 catccacac gcactgcact gccattgtct tttggttgcc atgggtacca aacaggaagt 1921 ggacattcta agggaggagt actgaagagt gacggacttc tgaggctgtt tcctgtgtct 1981 cctctgactt ggggcagctt ggggtcttct gggcacctct ctgggaaaac ccagggtgag 2041 gttcagcctg tgagggtctg gatgggttct gtgggcccac gggcagacct ttctttggga 2101 ctgtgtggac caaggagctt ccatctagtg acaagtgacc cccagctatc gcctcttgcc 2161 ttcccctgtg gccactttcc aggggtggact ctgtcttgtt cactgcagta tcccaactgc 2221 aggtccagtg caggcaataa atatgtgat gacaaacgat agcggaatcc ttcaagggtt 2281 caaggctgtc tccttcaggc agccttcccg gaattctcca tccctcagtg caggatgggg 2341 gctggctctc agctgtctgc cctcagcccc tggccccca ggaagcctct ttcattgggt 2401 gttagggtga cttcagtttt gcctcttggg caacaggggg tcttgtacat ccttgggtga 2461 ccaggaaaag ttcaggctat gggggggccaa agggaggggt gcccttctcc caccagtgc

10

20

30

40

配列 番号:	GenBank 受入番号 及び 説明	配 列
		2521 cacttttattc cacttcctcc attacccagt tttggcccac agagtgttggc cccccccaaa 2581 cctcggacca atatccctct aaacatcaat ctatcctcct gttaaagaaa aaaaaaaa
40	NM_003006.4 ヒトCLAを コードする 例示的な 核酸配列	1 acacacagcc attgggggtt gctcggatcc gggactgccg caggggggtgc cacagcagtg 61 cctggcagcg tgggctggga ccttgctact aaagcagaga agccacttct tctgggcccc 121 cgaggcagct gtcccatgct ctgctgagca cgggtgggccc atgcctctgc aactcctcct 181 gttgctgac ctactgggccc ctggcaacag cttgcagctg tgggacacct gggcagatga 241 agccgagaaa gccttgggtc cctgcttgc cggggaccgg agacaggcca ccgaatatga 301 gtacctagat tatgatattc tgccagaaac ggagcctcca gaaatgctga ggaacagcac 361 tgacaccact cctctgactg ggcttggaa ccttgagtct accactgtgg agcctgctgc 421 aaggcgttct actggcctgg atgcaggagg ggcagtcaca gagctgacca cggagctggc 481 caacatgggg aacctgtcca cggattcagc agctatggag atacagacca ctcaaccagc 541 agccacggag gcacagacca ctcaaccagt gccacggag gcacagacca ctccactggc 601 agccacagag gcacagacaa ctgcactgac ggccacggag gcacagacca ctccactggc 661 agccacagag gcacagacca ctccaccagc agccacggaa gcacagacca ctcaaccac 721 aggcctggag gcacagacca ctgcaccagc agccatggag gcacagacca ctgcaccagc 781 agccatggaa gcacagacca ctccaccagc agccatggag gcacagacca ctcaaacccac 841 agccatggag gcacagacca ctgcaccaga agccacggag gcacagacca ctcaaacccac 901 agccacggag gcacagacca ctccactggc agccatggag gccctgtcca cagaacccag 961 tgccacagag gccctgtcca tggaaacctac taccaaaaga ggtctgttca tacccttttc 1021 tgtgtcctct gttactcaca agggcattcc catggcagcc agcaatttgt ccgtcaacta 1081 cccagtgggg gccccagacc acatctctgt gaagcagtgc ctgctggcca tcctaactt 1141 ggcgctggtg gccactatct tcttcgtgtg cactgtggtg ctggcgggtcc gcctctcccg 1201 caagggccac atgtaccccg tgcgtaatta ctccccacc gagatgggtct gcactcctc 1261 cctgttgctt gatgggggtg agggggccctc tgccacagcc aatggggggc tgtccaaggc 1321 caagagcccg ggcctgacgc cagagcccg ggaggaccgt gagggggatg acctcaccct 1381 gcacagcttc ctcccttagc tcaactctgc atctgttttg gcaagaccc acctccacgg 1441 gctctcctgg gccacccctg agtgcccaga cccattcca cagctctggg ctctcctcga 1501 gaccctcggg gatggggatc ttcagggaag gaactctggc caccacaaac ggacaagagc 1561 agcctggggc caagcagacg ggcaagtggg gccacctctt tcctccctcc gcggatgaag 1621 cccagccaca ttctagccga ggtccaaggc agggagccat ttacttgaga cagattctct 1681 cctttttcct gtcccccata ttctctgggt ccctctaaca tctcccatgg ctctccccgc 1741 ttctcctggt cactggagtc tcctcccat gtacccaagg aagatggagc tcccccatcc 1801 cacacgcact gcactgccat tgtcttttgg ttgccatggt caccacaaac gaagtggaca 1861 ttctaaggga ggagtactga agagtacagg acttctgagg ctgtttcctg ctgctcctct 1921 gacttggggc agcttgggtc ttcttgggca cctctctggg aaaaccagg gtgaggttca 1981 gcctgtgagg gctgggatgg gtttcgtggg cccaaggga gacctttctt tgggactgtg 2041 tggaccaagg agcttccatc tagtgacaag tgacccacag ctatgcctc ttgctctccc 2101 ctgtggccac ttccagggt ggactctgtc ttgttactg cagtatccca actgcaggtc 2161 cagtgcaggc aataaatatg tgatggacaa acgatagcgg aatccttcaa ggtttcaagg 2221 ctgtctcctt caggcagcct tcccgaatt ctccatccct cagtgcagga tgggggctgg 2281 tcctcagctg tctgcctca gccctggcc cccaggaag cctctttcat gggctgttag 2341 gttgacttca gttttgcctc ttggacaaca ggggtctctg tacatccttg ggtgaccagg 2401 aaaagttagc gctatggggg gccaaaggga gggctgcccc tccccacca gtgaccactt 2461 tattccactt cctccattac ccagttttgg cccacagagt ttgggtcccc ccaaacctcg 2521 gaccaatatc cctctaata tcaatctatc ctctgtttaa agaaaaaaaa aaa
41	NP_001193538.1	1 mavgasgleg dkmagamplq llllllillgp gnsllqldtw adeaekalgp llardrrgat

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 nstdtptltg pgtpesttve paarrstgld aggavteltt 121 elanmgnlst dsaameiqtt qpaateagtt qvppteagtt plaateagtt rltateagtt 181 plaateagtt ppaateagtt qptgleagtt apaameagtt apaameagtt ppaameagtt 241 qttameagtt apeateagtt qptateagtt plaamealst epsatealsm epttkrglfi 301 pfsvssvthk gipmaasnls vnypvgapdh isvkqcllai lialvatif fvctvylavr 361 lsrkghmypv rnysptemvc issllpdgge gpsatanggl skakspgltp epredregdd 421 ltlhsflp
42	NP_002997.2 ヒトCLA前駆体の例示的なアミノ酸配列	1 mplqllllli llpggnsllq1 wdtwadeaek algpllardr rqateyeyld ydf1petepp 61 emlrnstdt1 pltgpgtpes ttvepaarrs tglaggavt elttelanmg nlstdsaame 121 iqtqpaate aqttqvppte aqttplaate aqtrltate aqttplaate aqttppaate 181 aqttqptgle aqttapaame aqttapaame aqttppaame aqttqtame aqttapeate 241 aqttqptate aqttplaame alstepsate alsmepttkr glfipfsvss vthkgipmaa 301 snlsvnypvg apdhisvkqc llaililalv atiffvctvv lavrlsrkgh mypvrnyspt 361 emvcissllp dggegspsata ngglskaksp gltpepredr egddlthsf lp

10

【 0 3 5 2 】

(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配列(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もよい。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もよい。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。

20

30

【 0 3 5 3 】

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ウリジン置換、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'-プロモ-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、デオキシリン酸骨格は、例えば、ホスホロチオエートもしくはホスホロジチオエート骨格、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。

40

【 0 3 5 4 】

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。

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、インビトロ転写/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、ポリ阿德ニル化シグナル)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ー次第であり得ることが当業者には分かるであらう。

【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。

【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。

【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。

【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

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、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。

【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、単一特異性抗体、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、単ドメイン抗体、及び一価抗体を挙げることができるが、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、単一特異性、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。

【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、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁、もしくはIgA₂)、又は任意のサブクラス(例えば、IgG_{2a}もしくはIgG_{2b})のものであるとすることができる。ある実施態様において、本明細書に記載される抗体は、IgG抗体、又はそのクラス(例えば、ヒトIgG₁、IgG₂、もしくはIgG₄)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、IgG₂抗体(例えば、ヒトIgG₂)又はそのサブクラス(例えば、ヒトIgG_{2a}もしくはヒトIgG_{2b}、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、IgG₁抗体(例えば、ヒトIgG₁)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IgG₁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。

【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、単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る。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。

【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

10

20

30

40

50

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)

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つの単鎖可変断片(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。

【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】

(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: アシピシン; アクラルピシン; 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、エルウィニア・クリサン(

10

20

30

40

50

Erwinia chrysan)由来のもの;エルウィナーゼ(Erwinaze));アスペルリン;アバスチン(ペバシズマブ);アザシチジン;アゼテパ;アゾトマイシン;パチマスタット;ベンゾデパ;ピカルタミド;塩酸ピサントレン;ジメシル酸ビスナフィド;ピゼレシン;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;プスルファン;カクチノマイシン;カルステロン;カラセミド;カルベチマー;カルボプラチン;カルムスチン;塩酸カルピシン;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(経口アザシジジン(azacididine));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;クラドリピン;メシル酸クリスナトール;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;塩酸ダウノルピシン;デシタピン;デキソルマプラチン;デザグアニン;メシル酸デザグアニン;ジアジコン;ドセタキセル;ドキシソルピシン;塩酸ドキシソルピシン;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;エピプロビジン;塩酸エピルピシン;エルプロゾール;塩酸エソルピシン;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;エトボシド;リン酸エトボシド;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;フルロシタピン;ホスキドン;ホストリエシンナトリウム;ゲムシタピン;塩酸ゲムシタピン;ヒドロキシ尿素;イダマイシン(Idamycin);塩酸イダルピシン;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;メトトレキセート;メトトレキセートナトリウム;メトプリン;メツレデパ;ミチンドミド;マイトカルシン;マイトクロミン;マイトギリン;マイトマルシン;マイトマイシン;マイトスペル;ミトタン;塩酸ミトキサントロン;ニコフェノール酸;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;ペガスバルガーゼ;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;ピボプロマン;ピボスルファン;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);プリネトール(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;リユーマトレックス(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;スパルホセートナトリウム;スパルソマイシン;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;テモボルフィン;テニボシド;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;チオテパ;チアゾフリン;チラパザミン;トポサル(Toposar);クエン酸トレミフェン;酢酸トレストロン;トレキサール(Trexall);リン酸トリシリピン;トリメトレキセート;グルクロン酸トリメトレキセート;トリプトレリン;塩酸ツプロゾール;ウラシルマスタード;ウレデパ;バプレオチド;ベルテボルフィン;硫酸ビンブラスチン;硫酸ピンクリスチン;ピンデシン;硫酸ピンデシン;硫酸ピネピジン;硫酸ピングリシネート;硫酸ピンロイロシン;酒石酸ピノレルピン;硫酸ピンロシジン;硫酸ピンゾリジン;ボロゾール;ゼニプラチン;ジノスタチン;及び塩酸ゾルピシンが挙げられる。

【 0 3 7 2 】

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;アクラルピシン;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;アムルピシン;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
 ジコリングリシネート;アポトーシス遺伝子調節物質;アポトーシス調節因子;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;バチマスタット;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ポリン;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;ピカルタミド;ピサントレン;ビスアジリジニルスベルミ
 ン;ビスナフィド;ピストラテンA;ピセレシン;プレフレート;プロピリミン;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);カスタノスベルミン;セクロピン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-ボル
 フィリン;クラドリピン;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;コンプレタスタチンA4;コンプレタスタチン類似体;コナゲニン;クラムベスシ
 ジン816;クリスナツール;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
 ロペンタントラキノン;シクロブラタム;シベマイシン;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;デクスラゾキサラン;デクスベラパミル;ジアジコ
 ン;ジデムニンB;ジドックス;ジエチルノルスベルミン;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;ドキソルピシン;ドロロキシフェン;ドロナビノー
 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;エピルピシン;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;ガロシタビン
 ;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;イダルピシン
 ;イドキシフェン;イドラマントン;イルモホシン;イロマスタット;イマチニブ(例えば、GL
 EEVEC(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;
 ヨードドキソルピシン;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;レバミソール;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;リッソクリナミド7;ロバブラ
 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;ロキソリピン;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;マリマスタット;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
 クスメタロプロテイナーゼ阻害剤;メノガリル;メルバロン;メテレリン;メチオニナーゼ;
 メトクロブラミド;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;マイトマイシン類似体;ミトナフィド;マイトトキシン線維芽細胞
 成長因子-サボリン;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、Erbix(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;マスタード抗がん剤;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;ナフテルピン;ナルトグラスチム;ネダプラチン;ネモルピシン;ネリドロロン酸;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));O⁶-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體;パラウアミン;パルミトイルリゾキシシン;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;パゼリブチン;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;ピラルピシン;ピリトレキシム;プラセチンA;プラセチンB;プラスミ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;ポルフィマーナトリウム;ポルフィロマイシン;ブレドニゾン;プロピルピス-アクリドン;プロスタグランジン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;プリンヌクレオシドホスホリラーゼ阻害剤;プルプリン;ピラゾロアクリジン;ピリドキシル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;脱メチル化レトリブチン;レニウムRe 186エチドロネート;リゾキシシン;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;ソブゾキサシン;ナトリウムボロカプテイト;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;スパルホス酸;スピカマイシンD;スピロムスチン;スプレノペンチン;スポンギスタチン1;スクアラミン;スチピアミド;ストロメラシシン阻害剤;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;テルラピリウム;テロメラゼ阻害剤;テモボルフィン;テニボシド;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;トロネボポイエチン;トロネ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;スズエチルエチオプルプリン;チラパザミン;二塩化チタノセン;トブセンチン;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;トリシリピン;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)ベラレゾール;ベラミン;ベルジン;ベルテボルフィン;ピノレルピン;ピンキサルチン;ピタキシシン;ボロゾール;Welcovorin(ロイコボリン);Xeloda(カペシタピン);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、ボマリドミド、CC-122、アザシチジン、デシタピン、又はCC-486(経口アザシジジン(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、レナリドミド又はボマリドミドである。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、ロミデプシンである。

【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形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。

【0376】

(5.4.3. 血液障害及び固形腫瘍)

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、急性骨髄性白血病(AML)、急性前骨髄球性白血病、急性骨髄芽球性白血病、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、慢性骨髄リンパ腫、慢性骨髄性白血病(CML)、慢性単球性白血病、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、形質細胞新生物(例えば、形質細胞性骨髄腫、形質細胞腫、単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、急性骨髄性白血病(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、多発性骨髄腫又は骨髄異形成症候群である。

【0377】

前記固形腫瘍は、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;類腱腫;線維形成性小円形細胞腫瘍;内分泌腫瘍;ユーイング肉腫;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、固形腫瘍は、脾臓がん又は乳がんである。他の実施態様において、固形腫瘍は、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;髄芽腫;髄膜腫;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、前記固形腫瘍は、前立腺がんである。

【0378】

10

20

30

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、急性骨髄性白血病を示す。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、かつ急性骨髄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せら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。

【0382】

30

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】

40

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)レナリドミド又はボマリドミド、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。

【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、パーキットリンパ腫)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、パーキットリンパ腫)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、パーキットリンパ腫)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。

【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、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

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(reticolas)、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、ザルシタピン、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。

【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。

【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。

【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)、コクサッキーウイルス、A型肝炎ウイルス(HAV)、ポリオウイルス、エプスタイン・バーウイルス(EBV)、単純ヘルペスウイルス1型(HSV1)、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(水痘帯状疱疹ウイルス(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。

【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、20

、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】

ある他の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)、ガジェッツガリーウイルス(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)、ケドゥグウイルス(KEDV)、ココベラウイルス(KOKV)、コウタンゴウイルス(KOUV)、キャサヌル森林病ウイルス(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)、マレー溪谷脳炎ウイルス(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)、リオブラボーウイルス(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(SV)、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)、ウスツウイルス(USUV)、ウェセルスブロンウイルス(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。

【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、ボドフィロックス、ボドフィリン、インターフェロナルファ(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、ザルシタピン;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

【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ジ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ジ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(1

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

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_2O)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、イオンの架橋される、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(-ε-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。

【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)、ENDO-BON(登録商標)(Merck Biomaterial France, France)、CEROS(登録商標)(Mathys, AG, Bettlach, Switzerland)、並びに鈹化コラーゲン骨移植製品、例えば、HEALOS(商標)(DePuy, Inc., Raynham, MA)及びVITROSS(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。

【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系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。

【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、弾性繊維、細網繊維)、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、デルマトン硫酸、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。

【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

10

20

30

40

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こ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)。

【0411】

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。

【0412】

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。

【0413】

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、固形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 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 5×10^9 、 1×10^{10} 、 5×10^{10} 、又は 1×10^{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 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 5×10^9 、 1×10^{10} 、 5×10^{10} 、又は 1×10^{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 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、又は 5×10^8 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、固形腫瘍については、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。

【0414】

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 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 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 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 5×10^9 、 1×10^{10} 、 5×10^{10} 、 1×10^{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 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 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 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 5×10^9 、 1×10^{10} 、 5×10^{10} 、1

10

20

30

40

50

$\times 10^{11}$ 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 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 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 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 5×10^9 、 1×10^{10} 、 5×10^{10} 、 1×10^{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、 $CD34^-$ 、 $CD10^+$ 、 $CD105^+$ 、 $CD200^+$ 組織培養プラスチック接着性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 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 個、もしくはそれより多くの接着性胎盤幹細胞、又は 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 5×10^9 、 1×10^{10} 、 5×10^{10} 、 1×10^{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、 $CD34^-$ 、 $CD10^+$ 、 $CD105^+$ 、 $CD200^+$ 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】

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回投与することができる。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

40

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)

本件開示という患者は、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るが、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)

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。

【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】

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 μ l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% CO₂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TO-PRO-3(カタログ# T3605、Invitrogen)を0.25 μ M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⁺標的腫瘍細胞内での、自然細胞死を減じた死細胞(PKH26⁺TO-PRO-3⁺)のパーセンテージとして示した。

【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)

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 1×10^6 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#59925)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】

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、 $10 \mu\text{M}$ のPKH26蛍光色素(Sigma-Aldrich、カタログ#PKH26-GL)で標識してから、48ウェルプレート内で、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(10ng/mL)(Affymetrix、カタログ#16-4714-82);REVLIMID(登録商標)(レナリドミド; $1 \mu\text{M}$)、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(3×10^5 個の3段階NK細胞及び 1×10^5 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_2 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、 $1 \mu\text{M}$ 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⁺TO-PRO-3⁻)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。

【0428】

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⁺TO-PRO-3⁻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⁺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⁺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】

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

10

20

30

40

50

ことが意図される。

【 0 4 3 1 】

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)

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)

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、E PHA2、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)

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)

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単鎖可変断片(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、E PHA2、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)

10

20

30

40

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)

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。

20

(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)

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。

30

(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)

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。

40

(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

<u>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。</u>	
<u>(構成66)</u>	
<u>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、</u>	
<u>(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</u>	
<u>(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。</u>	
<u>(構成67)</u>	
<u>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。</u>	10
<u>(構成68)</u>	
<u>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。</u>	
<u>(構成69)</u>	
<u>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。</u>	
<u>(構成70)</u>	
<u>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。</u>	20
<u>(構成71)</u>	
<u>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。</u>	
<u>(構成72)</u>	
<u>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。</u>	
<u>(構成73)</u>	
<u>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。</u>	
<u>(構成74)</u>	
<u>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。</u>	30
<u>(構成75)</u>	
<u>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66～74のいずれか1記載の方法。</u>	
<u>(構成76)</u>	
<u>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。</u>	40
<u>(構成77)</u>	
<u>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、又はスキャ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。</u>	
<u>(構成78)</u>	
<u>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。</u>	
<u>(構成79)</u>	
<u>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。</u>	

(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。

(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。

(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。

(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)

10

20

30

40

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96)

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97)

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98)

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。

(構成99)

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100)

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101)

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102)

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103)

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104)

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105)

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83～104のいずれか1記載の方法。

(構成106)

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107)

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108)

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109)

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110)

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111)

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112)

10

20

30

40

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:

(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。

(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)、トロンプオエチン(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。

(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。

(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。

10

20

30

40

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⁺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、マイトマイシン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。

(構成 1 3 2)

前記NK細胞が、CD3⁻CD56⁺CD16⁻である、構成116記載の方法。

20

(構成 1 3 3)

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

(構成 1 3 7)

前記NK細胞がさらに、CD226⁺である、構成132記載の方法。

30

(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⁺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。

(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。

(構成160)

前記TAAが、CD123、CLL-1、CD38、CS-1、CD138、ROR1、FAP、MUC1、PSCA、EGFRvIII、E

PHA2、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。

(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。

(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、

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

10

20

30

40

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 1 8 9)

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 1 9 0)

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 1 9 1)

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 1 9 2)

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 1 9 3)

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 1 9 4)

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 1 9 5)

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 1 9 6)

前記造血幹細胞又は前駆細胞が、CD34⁺である、構成183記載のキット。

(構成 1 9 7)

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 1 9 8)

工程(b)における前記フィーダー細胞が、マイトマイシン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 1 9 9)

前記NK細胞が、CD3⁻CD56⁺CD16⁻である、構成183記載のキット。

(構成 2 0 0)

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

(構成 2 0 1)

前記NK細胞がさらに、CD161⁻である、構成199記載のキット。

(構成 2 0 2)

前記NK細胞がさらに、NKG2D⁺である、構成199記載のキット。

(構成 2 0 3)

前記NK細胞がさらに、NKp46⁺である、構成199記載のキット。

(構成 2 0 4)

前記NK細胞がさらに、CD226⁺である、構成199記載のキット。

(構成 2 0 5)

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】

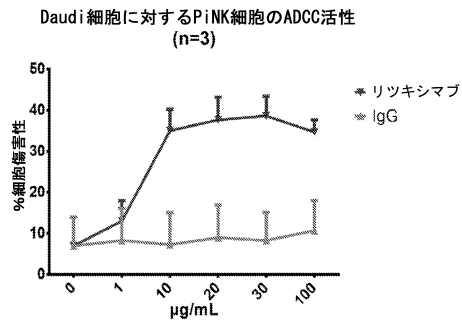


図 1

【図 2 - 0 1】

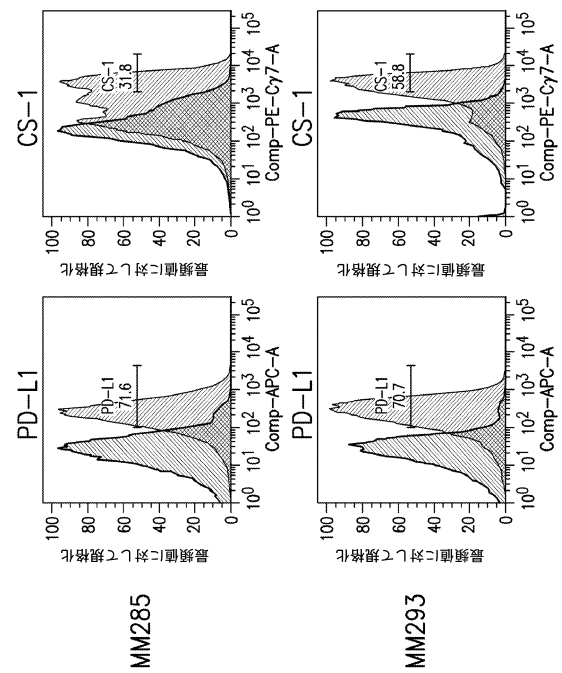


図 2

【図 2 - 0 2】

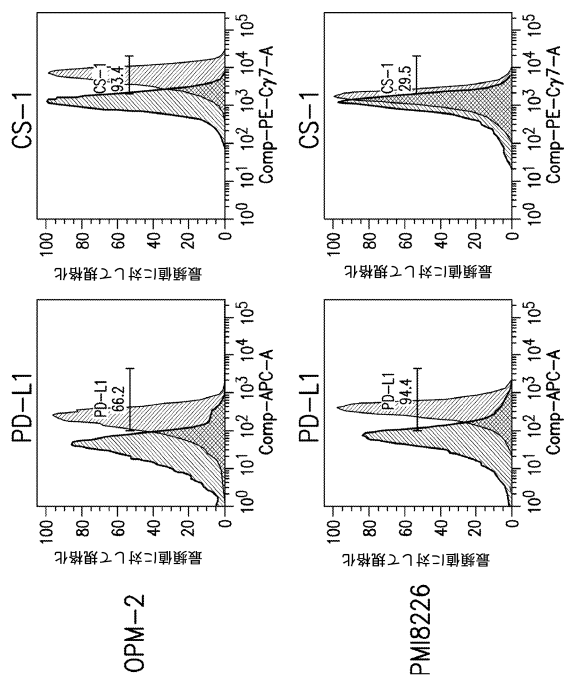


図 2 (続き)

【図 3】

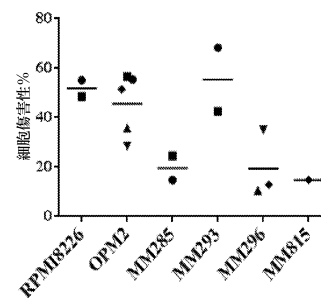


図 3

【 図 4 】

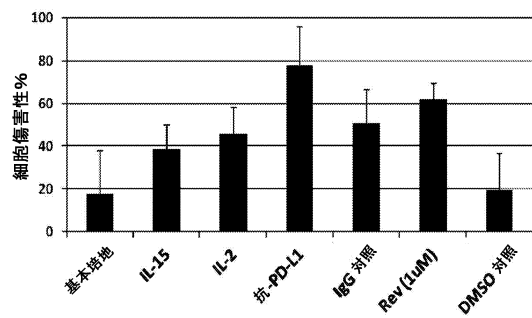


図 4

【 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 0 8 5 3 0 ランバートビル ステープル ビュー コー
 ト 1 7
- (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 1 0 0 4 4 ニューヨーク アプト. 1 5 ビー リバー ロー
 ド 1 0

審査官 渡部 正博

- (56)参考文献 国際公開第 2 0 1 4 / 0 2 8 4 5 3 (W O , A 1)
 米国特許出願公開第 2 0 1 4 / 0 3 2 2 1 8 3 (U S , A 1)
 Blood , 2 0 1 2 年 , Vol.119, No.22 , p.5164-5172

- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
- | | |
|---------|-------------------------|
| A 6 1 K | 3 5 / 0 0 - 3 5 / 7 6 8 |
| A 6 1 K | 3 1 / 0 0 - 3 1 / 8 0 |
| A 6 1 K | 3 9 / 0 0 - 3 9 / 4 4 |
| A 6 1 K | 4 5 / 0 0 - 4 5 / 0 8 |
| A 6 1 P | 1 / 0 0 - 4 3 / 0 0 |
| A 6 1 K | 4 8 / 0 0 |
| C 0 7 K | 1 6 / 0 0 - 1 6 / 4 6 |
| C 1 2 N | 5 / 0 0 - 5 / 2 8 |
| C 1 2 N | 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0 |
| C 1 2 P | 2 1 / 0 0 - 2 1 / 0 8 |
- 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)