

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7674102号
(P7674102)

(45)発行日 令和7年5月9日(2025.5.9)

(24)登録日 令和7年4月28日(2025.4.28)

(51)国際特許分類		F I	
C 1 2 N	5/0789(2010.01)	C 1 2 N	5/0789
C 1 2 N	5/0787(2010.01)	C 1 2 N	5/0787
A 6 1 K	35/15 (2025.01)	A 6 1 K	35/15
A 6 1 K	35/28 (2015.01)	A 6 1 K	35/28
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
請求項の数 15 (全62頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2020-543405(P2020-543405)	(73)特許権者	520141933
(86)(22)出願日	平成30年4月24日(2018.4.24)		リフト バイオサイエンシズ リミテッド
(65)公表番号	特表2021-500081(P2021-500081 A)		イギリス国, ブライトン ビーエヌ1 3
(43)公表日	令和3年1月7日(2021.1.7)	(74)代理人	ティービー, バス ストリート 7
(86)国際出願番号	PCT/GB2018/051073		100079108
(87)国際公開番号	WO2019/081879	(74)代理人	弁理士 稲葉 良幸
(87)国際公開日	令和1年5月2日(2019.5.2)		100109346
審査請求日	令和3年4月9日(2021.4.9)	(74)代理人	弁理士 大貫 敏史
審判番号	不服2023-1501(P2023-1501/J1)		100117189
審判請求日	令和5年1月27日(2023.1.27)	(74)代理人	弁理士 江口 昭彦
(31)優先権主張番号	PCT/GB2017/053222		100134120
(32)優先日	平成29年10月25日(2017.10.25)	(74)代理人	弁理士 内藤 和彦
(33)優先権主張国・地域又は機関	英国(GB)	(72)発明者	ブライス, アレックス
			イギリス国, ブライトン ビーエヌ1 3
			ティービー, バス ストリート 7, リフ
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 がんを殺傷する細胞

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

がんの処置における使用にとって好適な顆粒球に分化させることができる造血細胞を取得するための *in vitro*での方法であって、
前記造血細胞は、造血幹細胞、顆粒球前駆細胞、または前記ドナーの体細胞から得られる人工多能性幹細胞であり、
a. ドナーから取得可能な顆粒球と、がん細胞株とを混合して、混合物を形成すること；
b. 前記混合物をインキュベートすること；
c. 前記混合物中で殺傷されたがん細胞の%を測定すること；および
d. 前記顆粒球が混合物中の少なくとも40%のがん細胞を殺傷する場合、前記ドナー由来試料から造血細胞を取得すること
を含み、

前記a. において、顆粒球とがん細胞との混合比（顆粒球：がん細胞）が10：1である、方法。

【請求項2】

がんの処置における使用にとって好適な顆粒球に分化させることができる造血細胞を取得するための *in vitro*での方法であって、ドナーに由来する試料から造血細胞を選択することを含み、
前記造血細胞は、造血幹細胞、顆粒球前駆細胞、または前記ドナーの体細胞から得られる人工多能性幹細胞であり、

前記ドナーから取得した顆粒球が、がん殺傷アッセイにおいてがん細胞の少なくとも40%を殺傷する能力を有し、

前記がん殺傷アッセイは、

a. 顆粒球をがん細胞株と混合して混合物を形成することと、

b. 前記混合物をインキュベートすることと

c. 前記混合物中で殺傷されたがん細胞の%を測定することと

を含み、

前記a.において、顆粒球とがん細胞との混合比（顆粒球：がん細胞）が10：1である、方法。

【請求項3】

前記造血細胞が、造血幹細胞である、請求項1または2に記載の*in vitro*での方法。

【請求項4】

前記造血細胞が、共通骨髄性前駆細胞、骨髄芽球、N. 前骨髄球 (N. promyelocyte)、N. 骨髄球 (N. myelocyte)、N. 後骨髄球 (N. metamyelocyte)、N. 好中球桿状核球 (N. band)、またはその組合せなどの顆粒球前駆細胞である、請求項1または2に記載の*in vitro*での方法。

【請求項5】

前記造血細胞が、前記ドナーの体細胞から得られる人工多能性幹細胞である、請求項1または2に記載の*in vitro*での方法。

【請求項6】

前記ドナーが、ヒトドナーである、請求項1～5のいずれか一項に記載の*in vitro*での方法。

【請求項7】

前記ドナーが、男性ドナーである、請求項1～6のいずれか一項に記載の*in vitro*での方法。

【請求項8】

前記ドナーが、18～25歳である、請求項1～7のいずれか一項に記載の*in vitro*での方法。

【請求項9】

がん細胞株が、膵がん細胞株、肝臓がん細胞株、食道がん細胞株、胃がん細胞株、子宮頸がん細胞株、卵巣がん細胞株、肺がん細胞株、膀胱がん細胞株、腎臓がん細胞株、脳腫瘍細胞株、前立腺がん細胞株、骨髄腫のがん細胞株、非ホジキンリンパ腫 (NHL) 細胞株、喉頭がん細胞株、子宮がん細胞株、または乳がん細胞株から選択される1つまたは複数である、請求項1～8のいずれか一項に記載の*in vitro*での方法。

【請求項10】

がん細胞株が、膵がん細胞株である、請求項1～9のいずれか一項に記載の*in vitro*での方法。

【請求項11】

がん細胞株が膵管腺癌細胞株である、請求項1～10のいずれか一項に記載の*in vitro*での方法。

【請求項12】

がん細胞株がPANC-1細胞株である、請求項11に記載の*in vitro*での方法。

【請求項13】

顆粒球が好中球である、請求項1～12のいずれか一項に記載の*in vitro*での方法。

【請求項14】

選択された顆粒球が取得可能である前記ドナーに由来する試料から造血細胞を取得することをさらに含む、請求項1～13のいずれか一項に記載の*in vitro*での方法。

10

20

30

40

50

【請求項 15】

造血細胞を顆粒球に分化させることをさらに含む、請求項 1 ～ 14 のいずれか一項に記載の *in vitro* の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、がんを処置するのに好適な細胞に基づく療法に関する。

【背景技術】

【0002】

がんは、世界の罹患および死亡の主因であり、先進国におけるがんの発生率は年々増大している。世界保健機関は、2012年だけで、約1400万人の新しいがん症例（820万人の関連死）があり、次の20年にわたって2200万人の症例に上昇すると推定されると述べた。現在の治療戦略は、外科手術、放射線および細胞傷害性化学療法の組合せを含むが、これらの処置の多くは最終的には無効であり、有害な副作用と関連する。

10

【0003】

安全性および効能が、腎細胞癌などのある特定のがんを処置するための治療技術としての造血幹細胞移植（HSCT）について評価されている。しかしながら、この処置は、潜在的に致命的な安全性の問題のため、依然として主に実験的なものとして見られており、レシピエントは多能性幹細胞の制御できない複製の結果として、移植片対宿主疾患（GVHD）を示す。かくして、改善された代替的ながん療法が必要である。

20

【0004】

がんの発生率の増大にもかかわらず、約50～60%の個体はその生涯においてがんを発症しないことが観察されている。実際、稀な症例では、一部の個体は自然発生的ながんの退縮を示す。この観察は、自然発生的な退縮個体に由来する白血球の研究、および白血球輸注療法（LIFT）における前記白血球の使用をもたらした。

【0005】

従来のLIFTは、ドナーから採取した顆粒球（例えば、好中球）のがん患者への直接移入のためにアフエーシスを使用して行われる。現在の手法は、信頼できるがん治療としての使用にとって実用的または拡張可能ではない。第1に、好中球などの顆粒球は、非常に限られた保存可能期間（典型的には、24時間未満）を有し、その保存を困難にしている。第2に、アフエーシスには、必要な細胞容量を獲得するために約5人の（非常に稀である）ドナーが必要である。第3に、反復曝露に由来する免疫応答を回避するために、同じドナーをその後の投与において使用することができず、かくして、適切なドナーのプールの増加を必要とする。第4に、ドナーが、要求に応じて利用可能であるか、またはLIFT手順のために顆粒球の終わりなき供給源を提供することをいとわないことを現実的に期待することはできない。第5に、ドナー由来顆粒球のがん殺傷効能は、時間と共に変化し、一貫性のない治療結果をもたらす。

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

まだ今のところ、従来のLIFTに対する実行可能な代替手段は提供されておらず、関連する問題に対する解決法も提供されていない。かくして、従来のLIFTは、拡張可能で、安全で、信頼できる治療技術として実行可能ではない。

40

【0007】

本発明は、上記の問題のうちの少なくとも1つに対する解決法を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは驚くべきことに、がん細胞を殺傷する能力を有する顆粒球に分化することができる造血細胞を選択することができることを見出した。そのような造血細胞がドナーから選択されたら、この細胞を、後に治療する目的で保存するか、または例えば、がんの

50

処置において薬剤として直接使用することができる。有利なことに、本発明の方法によって取得可能な造血細胞を不死化し、かくして、保存する、および／または無限に増殖することができる安定な細胞株を提供することができる。かくして、本発明は、複数の稀なドナー、および／またはドナーから収集された顆粒球のがん患者への直接移入の必要性を低減させる。かくして、本発明は、実行可能な、拡張可能な、安全な、および／または信頼できる療法を提供する。

【0009】

初めて、本発明者らは、顆粒球（例えば、好中球）のがん殺傷効能が、エピジェネティックに定義されるよりはむしろ、遺伝的に定義されることを示した。これは、ドナーから単離された造血細胞（例えば、造血幹細胞）に由来する顆粒球が、同じドナーから直接単離された成熟顆粒球と類似するがん殺傷効能を有することを示す実施例19で示される。

10

【0010】

有利なことに、高いがん殺傷活性を示す顆粒球を有することが見出されたドナーを、同様に高いがん殺傷活性を示す顆粒球に分化することができる造血細胞（例えば、造血幹細胞）の供給源として使用することができる。

【0011】

有利なことに、そのような造血細胞を保存し、がんの処置における使用のための大量の顆粒球の生産に使用し、かくして、ドナーから十分な量の新鮮な顆粒球を単離する問題を克服することができる。

【0012】

さらに、造血細胞由来顆粒球は、ドナーから単離された顆粒球よりも迅速にがん細胞を殺傷することが見出された。さらに、造血細胞由来顆粒球は、新鮮なドナー由来顆粒球よりも良好ながん殺傷効能（例えば、膵がん細胞に対する）を有し得る。

20

【0013】

膵がんは、処置が最も難しいがんの1つであることが公知である。しかしながら驚くべきことに、本発明者らは、顆粒球、および膵臓細胞に対する特定の効能を有する顆粒球に分化する造血細胞の単離に成功した。

【0014】

一態様では、本発明は、

a. 少なくとも $2.0 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ （または少なくとも $1.0 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ 、例えば、少なくとも $1.25 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ 、 $1.5 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ 、または $1.75 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ ）の電気泳動移動度によって規定される表面電位；および

30

b. がん細胞を殺傷する能力

を特徴とする顆粒球を形成するように分化する造血細胞の *in vitro* 細胞培養物を提供する。

【0015】

関連する態様では、本発明は、がんの処置における使用にとって好適な造血細胞を選択するための方法であって、

a. ドナーから取得可能な顆粒球の表面電位を測定すること；および

40

b. 測定された表面電位が、少なくとも $2.0 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ （または少なくとも $1.0 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ 、例えば、少なくとも $1.25 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ 、 $1.5 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ 、または $1.75 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ ）の電気泳動移動度によって規定される場合、前記ドナーから造血細胞を選択すること

を含む方法を提供する。

【0016】

本明細書で使用される用語「取得可能」は、用語「取得された」も包含する。

【0017】

本発明は、造血細胞の表面電位を測定すること；およびがんを処置するのに好適である

50

顆粒球に分化させることができる造血細胞を選択することを含む、造血細胞を選択するための方法を提供する。かくして、一態様では、がんの処置における使用にとって好適な造血細胞を選択するための方法であって、

a. 造血細胞の表面電位を測定すること；および

b. $2.0 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ 未満（または $1.0 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ 未満）の電気泳動移動度によって規定される表面電位を有する、および／またはがん細胞を殺傷する能力が低下した顆粒球を形成するように分化する、それ以外は同一の造血細胞よりも高い（例えば、正の）表面電位を有する造血細胞を選択することを含む方法が提供される。

【0018】

関連する態様は、がんを処置するのに好適である顆粒球に分化させることができる細胞を選択するための、造血細胞の表面電位の使用であって、 $2.0 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ 未満（または $1.0 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ 未満）の電気泳動移動度によって規定される表面電位を有する、および／またはがん細胞を殺傷する能力が低下した顆粒球を形成するように分化する、それ以外は同一の造血細胞の表面電位よりも表面電位が高い（例えば、正の）、使用を提供する。

【0019】

本発明は、処置のための対象（例えば、本明細書に記載の薬剤から利益を得る対象）を選択するための *in vitro* の方法であって、

a. 前記対象に由来する顆粒球と、がん細胞株とを混合すること；

b. 前記混合物をインキュベートすること；

c. 前記混合物中で殺傷されたがん細胞の％を測定すること；および

d. 対象に由来する顆粒球が混合物中の5％未満のがん細胞を殺傷する場合（好適には、前記対象に由来する顆粒球が混合物中の60％未満、好ましくは、80％または90％未満のがん細胞を殺傷する場合）、造血細胞の *in vitro* の細胞培養物、または顆粒球、または顆粒球の *in vitro* の細胞培養物、または本発明の医薬組成物を用いた処置のために前記対象を選択することを含む方法を提供する。

【0020】

一部の実施形態では、対象に由来する顆粒球が混合物中の20％または10％未満のがん細胞を殺傷する場合、前記対象は、造血細胞の *in vitro* の細胞培養物、または顆粒球、または顆粒球の *in vitro* の細胞培養物、または本発明の医薬組成物を用いた処置のために選択される。好ましくは、対象に由来する顆粒球が混合物中の5％または1％未満のがん細胞を殺傷する場合、前記対象は、造血細胞の *in vitro* の細胞培養物、または顆粒球、または顆粒球の *in vitro* の細胞培養物、または本発明の医薬組成物を用いた処置のために選択される。

【0021】

in vitro の方法を使用して、がん細胞を殺傷する対象の顆粒球の能力をモニタリングすることもできる。

【0022】

一態様では、本発明は、がんの処置における使用にとって好適な造血細胞を取得するための *in vitro* の方法であって、

a. がん細胞株と、ドナーから取得可能な顆粒球とを接触させて、試験試料を形成し、前記試験試料をインキュベートすること；および

b. 試験試料中で殺傷されたがん細胞の％が、同じ型のがん細胞株および異なるドナーから取得可能な顆粒球を含む対照試料中で殺傷されたがん細胞の％よりも高い場合、前記ドナーに由来する試料から造血細胞を取得することを含む方法を提供する。

【0023】

対照試料中で殺傷されたがん細胞の％を、本発明の方法を実行する前に、または本発明

10

20

30

40

50

の方法を実行すると同時に（好ましくは、同時に）決定することができる。

【0024】

例えば、一実施形態では、前記方法は、

a. がん細胞株と、第1のドナーから取得可能な顆粒球とを接触させて、試験試料を形成すること；

b. 同じ型のがん細胞株と、異なるドナーから取得可能な顆粒球（例えば、対照顆粒球）とを接触させて、対照試料を形成すること；

c. 前記試料をインキュベートすること；および

d. 試験試料中で殺傷されたがん細胞の％が対照試料中で殺傷されたがん細胞の％よりも高い場合、前記第1のドナーに由来する試料から造血細胞を取得することを含む。

10

【0025】

一部の実施形態では、方法は、さらなるドナー（例えば、第2、第3、第4のドナーなど）に由来する顆粒球を含む複数の異なる試験試料の使用を含んでもよい。

【0026】

言及される対照試料は、がん細胞を殺傷しない顆粒球（例えば、本明細書に記載の方法において少なくとも5％のがん細胞を殺傷しない顆粒球）を有するドナーに由来する試料であってもよい。他の実施形態では、言及される対照試料は、がん細胞を殺傷する顆粒球（例えば、本明細書に記載の方法において少なくとも5％のがん細胞を殺傷する顆粒球）を有するドナーに由来する試料であってもよく、その場合、前記方法を使用して、最適ながん殺傷活性を示す顆粒球を有するドナーを検出することができる。一実施形態では、対照試料は、本明細書に記載の方法において最大で50％、40％、30％、20％または10％のがん細胞を殺傷する顆粒球を含む。好ましくは、対照試料は、本明細書に記載の方法において最大で5％のがん細胞を殺傷する顆粒球を含む。

20

【0027】

好ましくは、造血細胞は、試験試料中で殺傷されたがん細胞の％が対照試料中で殺傷されたがん細胞の％よりも少なくとも5％高い場合に取得される。一部の実施形態では、試験試料中で殺傷されたがん細胞の％は、対照試料中で殺傷されたがん細胞の％よりも少なくとも10％、15％、20％、25％、30％、40％、50％、60％、70％または80％高い。より好ましくは、試験試料中で殺傷されたがん細胞の％は、対照試料中で殺傷されたがん細胞の％よりも少なくとも35％高い。

30

【0028】

一実施形態では、方法は、5：1の顆粒球のがん細胞に対する比の使用を含み、造血細胞は、試験試料中で殺傷されたがん細胞の％が、対照試料中で殺傷されたがん細胞の％よりも少なくとも5％、10％、15％、20％、25％、30％、40％、50％、60％、70％または80％高い場合に取得される。より好ましくは、方法は、5：1の顆粒球のがん細胞に対する比の使用を含み、造血細胞は、試験試料中で殺傷されたがん細胞の％が対照試料中で殺傷されたがん細胞の％よりも少なくとも30％高い場合に取得される。

【0029】

一実施形態では、方法は、10：1の顆粒球のがん細胞に対する比の使用を含み、造血細胞は、試験試料中で殺傷されたがん細胞の％が、対照試料中で殺傷されたがん細胞の％よりも少なくとも5％、10％、15％、20％、25％、30％、40％、50％、60％、70％または80％高い場合に取得される。より好ましくは、方法は、10：1の顆粒球のがん細胞に対する比の使用を含み、造血細胞は、試験試料中で殺傷されたがん細胞の％が対照試料中で殺傷されたがん細胞の％よりも少なくとも20％高い場合に取得される。

40

【0030】

一態様では、本発明は、がんの処置における使用にとって好適な造血細胞を取得するための *in vitro* の方法であって、

a. ドナーから取得可能な顆粒球と、がん細胞株とを混合して、混合物を形成すること；

50

- b. 前記混合物をインキュベートすること；
- c. 前記試験試料中で殺傷されたがん細胞の％を測定すること；および
- d. 前記顆粒球が試験試料中の少なくとも５％のがん細胞を殺傷する場合、前記ドナー由来試料から造血細胞を取得することを含む方法を提供する。

【００３１】

顆粒球が混合物中の少なくとも１０％、２０％、３０％、４０％または５０％のがん細胞を殺傷する場合、造血細胞を、前記ドナー由来試料から取得することができる。

【００３２】

一実施形態では、造血細胞は、顆粒球が混合物中の少なくとも６０％のがん細胞を殺傷する場合、前記ドナー由来試料から取得される。

【００３３】

一実施形態では、造血細胞は、顆粒球が混合物中の少なくとも７０％のがん細胞を殺傷する場合、前記ドナー由来試料から取得される。

【００３４】

好ましくは、造血細胞は、顆粒球が混合物中の少なくとも８０％または９０％のがん細胞を殺傷する場合、前記ドナー由来試料から取得される。

【００３５】

一実施形態では、方法は、５：１の顆粒球のがん細胞に対する比の使用を含み、造血細胞は、顆粒球が混合物中の少なくとも３０％のがん細胞を殺傷する場合、前記ドナー由来試料から取得される。好ましくは、方法は、５：１の顆粒球のがん細胞に対する比の使用を含み、造血細胞は、顆粒球が混合物中の少なくとも４０％のがん細胞を殺傷する場合、前記ドナー由来試料から取得される。

【００３６】

一実施形態では、方法は、１０：１の顆粒球のがん細胞に対する比の使用を含み、造血細胞は、顆粒球が混合物中の少なくとも４５％、５０％または６０％（好ましくは、少なくとも６０％）のがん細胞を殺傷する場合、前記ドナー由来試料から取得される。より好ましくは、方法は、１０：１の顆粒球のがん細胞に対する比の使用を含み、造血細胞は、顆粒球が混合物中の少なくとも８０％のがん細胞を殺傷する場合、前記ドナー由来試料から取得される。

【００３７】

一部の実施形態では、がん細胞株は、子宮頸がん細胞株（例えば、HeLa）である。

【００３８】

一実施形態では、方法は、５：１の顆粒球の子宮頸がん細胞に対する比の使用を含み、造血細胞は、顆粒球が混合物中の少なくとも３０％の子宮頸がん細胞を殺傷する場合、前記ドナー由来試料から取得される。好ましくは、方法は、５：１の顆粒球の子宮頸がん細胞に対する比の使用を含み、造血細胞は、顆粒球が混合物中の少なくとも４０％の子宮頸がん細胞を殺傷する場合、前記ドナー由来試料から取得される。

【００３９】

一実施形態では、方法は、１０：１の顆粒球の子宮頸がん細胞に対する比の使用を含み、造血細胞は、顆粒球が混合物中の少なくとも４５％、５０％または６０％（好ましくは、少なくとも６０％）の子宮頸がん細胞を殺傷する場合、前記ドナー由来試料から取得される。より好ましくは、方法は、１０：１の顆粒球の子宮頸がん細胞に対する比の使用を含み、造血細胞は、顆粒球が混合物中の少なくとも８０％の子宮頸がん細胞を殺傷する場合、前記ドナー由来試料から取得される。

【００４０】

一部の実施形態では、がん細胞株は、膵がん細胞株（例えば、PANC-1）である。

【００４１】

一実施形態では、方法は、５：１の顆粒球の膵がん細胞に対する比の使用を含み、造血細胞は、顆粒球が混合物中の少なくとも５０％または６０％の膵がん細胞を殺傷する場合

10

20

30

40

50

、前記ドナー由来試料から取得される。好ましくは、方法は、5：1の顆粒球の脾がん細胞に対する比の使用を含み、造血細胞は、顆粒球が混合物中の少なくとも65%または70%の脾がん細胞を殺傷する場合、前記ドナー由来試料から取得される。

【0042】

一実施形態では、方法は、10：1の顆粒球の脾がん細胞に対する比の使用を含み、造血細胞は、顆粒球が混合物中の少なくとも70%の脾がん細胞を殺傷する場合、前記ドナー由来試料から取得される。好ましくは、方法は、10：1の顆粒球の脾がん細胞に対する比の使用を含み、造血細胞は、顆粒球が混合物中の少なくとも80%または90%の脾がん細胞を殺傷する場合、前記ドナー由来試料から取得される。

【0043】

一態様では、がん細胞を選択的に殺傷する顆粒球を選択するための *in vitro* の方法であって、

a. がん細胞株と、ドナーから取得可能な顆粒球とを接触させて、試験試料を形成し、前記試験試料をインキュベートすること；および

b. 試験試料中で殺傷されたがん細胞の%が、非がん細胞株および同じドナーから取得可能な顆粒球を含む対照試料中で殺傷された非がん細胞の%よりも高い場合、がん細胞について選択的であるとして前記顆粒球を選択することを含む方法が提供される。

【0044】

この方法は、好ましくは、顆粒球が選択された場合、前記ドナーに由来する試料から造血細胞を取得するさらなる工程を含む。

【0045】

対照試料中で殺傷された非がん細胞の%を、本発明の方法を実行する前に、または本発明の方法を実行すると同時に（好ましくは、同時に）決定することができる。

【0046】

例えば、一実施形態では、前記方法は、

a. がん細胞株と、ドナーから取得可能な顆粒球とを接触させて、試験試料を形成すること；

b. 非がん細胞株と、同じドナーから取得可能な顆粒球（例えば、対照顆粒球）とを接触させて、対照試料を形成すること；

c. 前記試料をインキュベートすること；および

d. 試験試料中で殺傷されたがん細胞の%が対照試料中で殺傷された非がん細胞の%よりも高い場合、がん細胞について選択的であるとして前記顆粒球を選択することを含む。

【0047】

一部の実施形態では、方法は、さらなるドナー（例えば、第2、第3、第4のドナーなど）に由来する顆粒球を含む複数の異なる試験試料の使用を含んでもよい。

【0048】

一実施形態では、顆粒球は、試験試料中で殺傷されたがん細胞の%が、試験試料中の非がん細胞の%よりも少なくとも2%、5%、10%、15%、20%、30%、40%または50%高い場合、がん細胞について選択的であると考えられる。

【0049】

一実施形態では、方法は、5：1の顆粒球のがん細胞に対する比の使用を含み、造血細胞は、試験試料中で殺傷されたがん細胞の%が対照試料中で殺傷されたがん細胞の%よりも少なくとも10%、20%または30%高い場合に取得される。

【0050】

一実施形態では、方法は、10：1の顆粒球のがん細胞に対する比の使用を含み、造血細胞は、試験試料中で殺傷されたがん細胞の%が対照試料中で殺傷されたがん細胞の%よりも少なくとも10%または20%高い場合に取得される。

【0051】

10

20

30

40

50

好ましくは、顆粒球は、本明細書に記載の方法において、35%、25%、15%、10%、5%または1%未満の非がん細胞を殺傷する。

【0052】

任意の非がん細胞株を、前記方法において使用することができる。一実施形態では、非がん細胞株は、乳房上皮細胞などの上皮細胞である。好ましくは、非がん細胞株は、MCF-12F非がん細胞株（American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110 USAから、ATCC（登録商標）CRL-10783（商標）として商業的に入手可能）である。

【0053】

一実施形態では、がん細胞を選択的に殺傷する顆粒球を選択するための方法であって、

a. がん細胞株と、ドナーから取得可能な顆粒球とを接触させて、試験試料を形成し、前記試験試料をインキュベートすること；

b. 前記顆粒球を、

i. 試験試料中で殺傷されたがん細胞の%が、同じ型のがん細胞株および異なるドナーから取得可能な顆粒球を含む第1の対照試料中で殺傷されたがん細胞の%よりも高い場合；および

ii. 試験試料中で殺傷されたがん細胞の%が、非がん細胞株および（工程a.におけるドナーと）同じドナーから取得可能な顆粒球（例えば、対照顆粒球）を含む第2の対照試料中で殺傷された非がん細胞の%よりも高い場合

に選択すること

を含む方法が提供される。

【0054】

一実施形態では、方法は、異なるドナーに由来する2つ以上の顆粒球（の培養物）によって殺傷された非がん細胞の%を比較し、かくして、非がん細胞の最も低い%の殺傷を示す顆粒球（およびドナー）の選択を可能にすることを含んでもよい。

【0055】

一態様では、本発明は、膵がんの処置における使用にとって好適な顆粒球を選択するための *in vitro* の方法であって、

a. 顆粒球と、膵がん細胞株とを混合して、混合物を形成すること；

b. 前記混合物をインキュベートすること；

c. 前記混合物中で殺傷された膵がん細胞の%を測定すること；および

d. 混合物中の少なくとも5%の膵がん細胞を殺傷する顆粒球を選択すること

を含む方法を提供する。

【0056】

膵がん細胞株は、膵管腺癌細胞株であってもよい。

【0057】

顆粒球は、混合物中の少なくとも10%、20%、30%、40%または50%の膵がん細胞を殺傷してもよい。

【0058】

一実施形態では、前記顆粒球は、混合物中の少なくとも60%の膵がん細胞を殺傷する。

【0059】

一実施形態では、前記顆粒球は、混合物中の少なくとも70%の膵がん細胞を殺傷する。

【0060】

好ましくは、前記顆粒球は、混合物中の少なくとも80%または90%の膵がん細胞を殺傷する。

【0061】

一実施形態では、方法は、5:1の顆粒球の膵がん細胞に対する比の使用を含み、顆粒球は、混合物中の少なくとも50%または60%の膵がん細胞を殺傷する。好ましくは、方法は、5:1の顆粒球の膵がん細胞に対する比の使用を含み、顆粒球は、混合物中の少なくとも65%または70%の膵がん細胞を殺傷する。

【0062】

一実施形態では、方法は、10：1の顆粒球の膵がん細胞に対する比の使用を含み、顆粒球は、混合物中の少なくとも70%の膵がん細胞を殺傷する。好ましくは、方法は、10：1の顆粒球の膵がん細胞に対する比の使用を含み、顆粒球は、混合物中の少なくとも80%または90%の膵がん細胞を殺傷する。

【0063】

一部の実施形態では、がん細胞株は、膵がん細胞株（例えば、PANC-1）である。

【0064】

関連する態様は、がんの処置における使用にとって好適な顆粒球を選択するための *in vitro* での方法であって、

- a. 顆粒球と、複数の異なるがん細胞株とを混合して、複数の混合物を提供すること；
 - b. 前記混合物をインキュベートすること；
 - c. 前記混合物中で殺傷されたがん細胞の%を測定すること；および
 - d. 顆粒球が混合物中の少なくとも5%のがん細胞を殺傷する場合、がん細胞株と同じ型／サブセットのがんの処置における使用にとって好適であるとして前記顆粒球を選択すること
- を含む方法を提供する。

【0065】

有利なことに、そのような方法は、複数のがん型／サブセットを殺傷する能力についての顆粒球の迅速なスクリーニングを可能にする。一部の実施形態では、その後、顆粒球が処置における使用にとって好適であるがんの型／サブセットに従って、顆粒球を分類する。

【0066】

この文脈で使用される用語「型」は、がん細胞株と同じ臓器または組織のがんを意味する。例えば、がん細胞株が膵管腺癌細胞株である場合、混合物中の少なくとも5%の膵管腺癌細胞を殺傷する顆粒球は、全ての膵がんの処置における使用にとって好適であると考えられる。

【0067】

この文脈で使用される用語「サブセット」は、がんが同じ臓器または組織のものであることだけでなく、がんががん細胞株とさらなる特徴を共有する（例えば、両方とも同じ臓器または組織の癌腫、肉腫などである）ことも意味する。例えば、がん細胞株が膵管腺癌細胞株である場合、混合物中の少なくとも70%の膵管腺癌細胞を殺傷する顆粒球は、全ての膵管腺癌バリエーションの処置における使用にとって好適であると考えられる。

【0068】

前記の *in vitro* での方法は、本明細書に開示される表面電位（例えば、細胞表面電荷）に基づいて顆粒球を測定および／または選択することをさらに含んでもよい。前記の *in vitro* での方法は、本明細書に開示される細胞密度（例えば、少なくとも1.077 g/ml）に基づいて顆粒球を測定および／または選択することをさらに含んでもよい。前記の *in vitro* での方法は、顆粒球上での、*tol* 様受容体の発現もしくは活性；ならびに／またはプログラム細胞死1（PD-1）受容体；CD115；CD224；CXCR1；および／もしくはCXCR2の発現の非存在もしくは不活性に基づいて前記顆粒球を測定および／または選択することをさらに含んでもよい。

【0069】

前記態様による *in vitro* での方法は、がん殺傷活性（CKA）アッセイ（例えば、請求項6）の代表であってもよい。

【0070】

本明細書で使用される用語「混合する」とは、連続的であるにしろ、同時的であるにしろ、任意の順序で1つまたは複数の成分と一緒に混合することを意味する。一実施形態では、「混合する」は、第1の成分と、第2の成分と（例えば、顆粒球と、がん細胞株と）を接触させることを意味する。

【0071】

用語「複数」とは、少なくとも2を意味する。一実施形態では、「複数」は、少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20を意味する。「複数」は、少なくとも30、40、50、60、70、80、90または100を意味してもよい。一実施形態では、「複数」は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20を意味する。別の実施形態では、「複数」は、30、40、50、60、70、80、90または100を意味する。

【0072】

一実施形態では、顆粒球は、ドナー、例えば、ヒトドナーから取得可能である。あるいは、またはさらに、顆粒球は、本発明の方法において使用されるがん細胞株と異なる型／サブセットのがんを有する対象から取得可能である。有利なことに、本発明者らは、ある型／サブセットのがんを有する対象が、異なるがん型／サブセットのがん細胞を殺傷する能力を有する顆粒球を有してもよいことを見出した。特に、対象において、対象が診断されたがんの細胞を殺傷する能力を有する顆粒球が特に低濃度である場合、これは驚くべきことである。

【0073】

本発明の方法における使用のためのがん細胞株は、膵がん細胞株、肝臓がん細胞株、食道がん細胞株、胃がん細胞株、子宮頸がん細胞株、卵巣がん細胞株、肺がん細胞株、膀胱がん細胞株、腎臓がん細胞株、脳腫瘍細胞株、前立腺がん細胞株、骨髄腫のがん細胞株、非ホジキンリンパ腫（NHL）細胞株、喉頭がん細胞株、子宮がん細胞株、または乳がん細胞株から選択される1つまたは複数であってもよい。

【0074】

好適な細胞株は、American Type Culture Collection United Kingdom (U.K.)、Guernsey、Ireland、JerseyおよびLiechtenstein、LGC Standards、Queens Road、Teddington、Middlesex、TW11 0LY、UKから商業的に入手可能である。例えば、膵臓細胞株は、Capan-2、ATCC HTB-80；Panc 10.05、ATCC CRL-2547；CFPAC-1、ATCC CRL-1918；HPAF-II、ATCC CRL-1997；SW 1990、ATCC CRL-2172；BxPC-3、ATCC CRL-1687；AsPC-1、ATCC CRL-1682；ATCC（登録商標）TCP-1026（商標）；SW1990、ATCC CRL-2172；SU.86.86、ATCC CRL-1837；BxPC-3、ATCC CRL-1687；Panc 10.05、ATCC CRL-2547；MIA-PaCa-2、ATCC CRL-1420；PANC-1、ATCC CRL-1469；またはATCC（登録商標）TCP-2060（商標）のうちの1つまたは複数であってもよい。

【0075】

好ましくは、がん細胞株は、PANC-1などの膵がん細胞株である。

【0076】

一実施形態では、がん細胞株は、HeLa細胞などの子宮頸がん細胞株である。

【0077】

インキュベーション工程を、1時間～100時間にわたって行ってもよい。好適には、インキュベーション工程を、5時間～75時間、例えば、10時間～20時間にわたって行ってもよい。

【0078】

インキュベーション工程を、6時間～6日にわたって行ってもよい。好適には、インキュベーション工程を、6時間～2日間、例えば、12時間～36時間、例えば、16～24時間にわたって行ってもよい。一実施形態では、インキュベーション工程を、24時間にわたって行う。インキュベーション工程を、細胞の増殖および生存にとって好適な任意の温度で、例えば、35℃～42℃、好適には、37℃～39℃の温度で行ってもよい

。好ましくは、インキュベーション工程を、 37 または 39°C で 24 時間にわたって行う。
。好ましくは、インキュベーション工程を、 $30 \sim 40^{\circ}\text{C}$ (例えば、 37°C) で $16 \sim 24$ 時間にわたって行う。

【0079】

殺傷されたがん細胞の%を、出発がん細胞の総数を参照することによって測定することができる。殺傷されたがん細胞の数を、任意の好適な手段を使用して、例えば、生存性染色 (例えば、トリパンブルー染色)、および顕微鏡観察によって、または他の自動化された手段を使用して、例えば、ACEA Biosciences, Inc. (11585 Sorrento Valley Rd., Suite 103, San Diego, CA 92121, USA) から入手可能な RT-CES (商標) システムなどの細胞電気検知機器によって測定することができる。一部の実施形態では、殺傷されたがん細胞の%を、 24 時間以内 (例えば、がん細胞株および顆粒球のインキュベーションの) に決定することができる。殺傷されたがん細胞の%は、好ましくは、本発明の方法を実行する場合に殺傷されたがん細胞の最大数である。

10

【0080】

殺傷されたがん細胞の数を、ACEA Biosciences xCELLigence RTCA DP Analyzer システム (登録商標) を使用して測定することもできる。xCELLigence System は、電気インピーダンスを測定することによって連続的に細胞表現型の変化を、標識を使用せずに動的にモニタリングすることができるリアルタイム細胞分析装置である。そのような測定を、実施例 11 に詳述されるように行うことができる。前記システムは、ACEA Biosciences 6779 Mesa Ridge Road #100, San Diego, CA 92121 USA から商業的に入手可能である。

20

【0081】

本発明の方法は、少なくとも $1:1$ 、 $5:1$ または $10:1$ の顆粒球のがん細胞に対する比の使用を含んでもよい。好ましくは、この方法は、 $5:1$ の顆粒球のがん細胞に対する比の使用を含む。より好ましくは、この方法は、 $10:1$ の顆粒球のがん細胞に対する比の使用を含む。

【0082】

当業者であれば、本発明の方法が2つの試料間 (例えば、「試験試料」と「対照試料」の間) の比較工程を含む場合、その条件 (例えば、方法の間のアッセイ条件) が一定に保持されるべきであることを理解できる。例えば、顆粒球のがん細胞に対する濃度比は同じであるべきであり、時間条件なども同じであるべきである。比較が本明細書の2つの試料間で行われる場合、好適には、試料は等価である。例えば、比較される試料は、同じ試料型 (例えば、血液) であり、同じプロセッシング工程にかけてもよい。一部の実施形態では、試料間の唯一の相違は、前記試料を取得するドナーである。例えば、特定の特性を有する細胞の割合が決定される実施形態では、各試料中の細胞の総数は同じであってよく、適切な比較を行うことができる。

30

【0083】

一実施形態では、混合物は、 8×10^5 個の顆粒球および 1.5×10^4 個のがん細胞、または好ましくは、 8×10^5 個の顆粒球および 8×10^4 個のがん細胞を含む。

40

【0084】

一実施形態では、顆粒球は、本明細書に記載の方法において少なくとも 5% のがん細胞を殺傷することができる。顆粒球は、本明細書に記載の方法において、少なくとも 10% 、 20% 、 30% 、 40% または 50% のがん細胞を殺傷することができる。一実施形態では、顆粒球は、本明細書に記載の方法において少なくとも 60% のがん細胞を殺傷することができる。一実施形態では、顆粒球は、本明細書に記載の方法において少なくとも 70% のがん細胞を殺傷することができる。好ましくは、顆粒球は、本明細書に記載の方法において、少なくとも 80% または 90% のがん細胞を殺傷することができる。

【0085】

方法が $5:1$ の顆粒球のがん細胞に対する比の使用を含む実施形態では、顆粒球は、本

50

明細書に記載の方法において少なくとも30%のがん細胞を殺傷することができる。好ましくは、方法が5:1の顆粒球のがん細胞に対する比の使用を含む場合、顆粒球は、本明細書に記載の方法において少なくとも40%のがん細胞を殺傷することができる。方法が10:1の顆粒球のがん細胞に対する比の使用を含む実施形態では、顆粒球は、本明細書に記載の方法において少なくとも45%、50%または60%（好ましくは、少なくとも60%）のがん細胞を殺傷することができる。より好ましくは、方法が10:1の顆粒球のがん細胞に対する比の使用を含む場合、顆粒球は、本明細書に記載の方法において少なくとも80%のがん細胞を殺傷することができる。

【0086】

一部の実施形態では、がん細胞株は、子宮頸がん細胞株（例えば、HeLa）である。方法が5:1の顆粒球の子宮頸がん細胞に対する比の使用を含む実施形態では、顆粒球は、本明細書に記載の方法において少なくとも30%の子宮頸がん細胞を殺傷することができる。好ましくは、方法が5:1の顆粒球の子宮頸がん細胞に対する比の使用を含む場合、顆粒球は、本明細書に記載の方法において少なくとも40%の子宮頸がん細胞を殺傷することができる。方法が10:1の顆粒球の子宮頸がん細胞に対する比の使用を含む実施形態では、顆粒球は、本明細書に記載の方法において少なくとも45%、50%または60%（好ましくは、少なくとも60%）の子宮頸がん細胞を殺傷することができる。より好ましくは、方法が10:1の顆粒球の子宮頸がん細胞に対する比の使用を含む場合、顆粒球は、本明細書に記載の方法において少なくとも80%の子宮頸がん細胞を殺傷することができる。

【0087】

一部の実施形態では、がん細胞株は、膵がん細胞株（例えば、PANC-1）である。方法が5:1の顆粒球の膵がん細胞に対する比の使用を含む実施形態では、顆粒球は、本明細書に記載の方法において少なくとも50%または60%の膵がん細胞を殺傷することができる。好ましくは、方法が5:1の顆粒球の膵がん細胞に対する比の使用を含む場合、顆粒球は、本明細書に記載の方法において少なくとも65%または70%の膵がん細胞を殺傷することができる。方法が10:1の顆粒球の膵がん細胞に対する比の使用を含む実施形態では、顆粒球は、本明細書に記載の方法において少なくとも70%の膵がん細胞を殺傷することができる。好ましくは、方法が10:1の顆粒球の膵がん細胞に対する比の使用を含む場合、顆粒球は、本明細書に記載の方法において少なくとも80%または90%の膵がん細胞を殺傷することができる。

【0088】

5%未満のがん細胞を殺傷する顆粒球は、好ましくは廃棄される。

【0089】

好適には、顆粒球が少なくとも80%、85%、90%または95%のがん細胞を殺傷する場合、その顆粒球を選択することができる。70%未満（好適には、80%、85%、90%または95%未満）のがん細胞を殺傷する顆粒球は、好ましくは廃棄される。

【0090】

一実施形態では、がんの処置における使用にとって好適な顆粒球を選択するための *in vitro* の方法は、

- a. 顆粒球と、がん細胞株（好ましくは、膵がん細胞株または複数の異なるがん細胞株）とを混合して、 8×10^5 個の顆粒球と、 8×10^4 個のがん細胞とをそれぞれ含む混合物（または複数の混合物）を提供すること；
- b. 前記混合物（または複数の混合物）を、39℃で24時間インキュベートすること；
- c. 前記混合物（または複数の混合物）中で殺傷されたがん細胞の%を測定すること；および
- d. 顆粒球が混合物中の少なくとも5%のがん細胞を殺傷する場合、がん細胞株と同じ型／サブセットのがんの処置における使用にとって好適であるとして前記顆粒球を選択することを含む。

【0091】

一実施形態では、前記態様による *in vitro* の方法はまた、処置しようとする対象の顆粒球を同時にアッセイすることを含んでもよい。

【0092】

本発明による *in vitro* の方法は、選択された顆粒球が取得可能であるか、または取得されたドナーから造血細胞を取得することをさらに含んでもよい。かくして、本発明の *in vitro* の方法はまた、がんの処置における使用にとって好適な造血細胞を選択するための方法を構成してもよい。

【0093】

別の実施形態では、がんの処置における使用にとって好適な造血細胞を選択するための *in vitro* の方法は、

a. ドナーから取得可能な顆粒球と、複数の異なるがん細胞株とを混合して、複数の混合物を提供すること；

b. 前記混合物をインキュベートすること；

c. 前記混合物中で殺傷されたがん細胞の％を測定すること；および

d. 顆粒球が混合物中の少なくとも5％のがん細胞を殺傷する場合、前記顆粒球によって殺傷されたがん細胞株と同じ型／サブセットのがんの処置における使用にとって好適であるとして前記ドナーに由来する造血細胞を選択することを含む。

【0094】

in vitro の方法は、本明細書に開示される表面電位に基づいて、および／または造血細胞から分化した顆粒球の表面電位に基づいて、造血細胞を測定および／または選択することをさらに含んでもよい。*in vitro* の方法は、本明細書に開示される細胞密度（例えば、少なくとも1.077 g/ml）に基づいて、および／または造血細胞から分化した顆粒球の細胞密度（例えば、少なくとも1.077 g/ml）に基づいて、造血細胞を測定および／または選択することをさらに含んでもよい。*in vitro* の方法は、造血細胞から分化した顆粒球上での、toll様受容体の発現もしくは活性；ならびに／またはプログラム細胞死1（PD-1）受容体；CD115；CD224；CXCR1；および／もしくはCXCR2の発現の非存在もしくは不活性に基づいて造血細胞を測定および／または選択することをさらに含んでもよい。

【0095】

一態様では、本発明の方法によって取得可能な（例えば、取得された）造血細胞が提供される。

【0096】

一態様では、本発明の方法によって取得可能な（例えば、取得された）顆粒球が提供される。

【0097】

本発明に従って選択された造血細胞を、有利な特性を有する顆粒球（例えば、好中球）に分化させることができる。例えば、前記顆粒球は、ドナーから直接取得された顆粒球よりも迅速にがん細胞を殺傷することができる。一実施形態では、本明細書に記載の造血細胞から取得された顆粒球は、がん細胞との接触の15時間以内に最大半量がん殺傷％を有する。好ましくは、本明細書に記載の造血細胞から取得された前記顆粒球は、がん細胞との接触の10時間以内に最大半量がん殺傷％を有する。

【0098】

好適には、そのような値は、顆粒球の、本明細書に記載の方法において使用されるがん細胞に対する比が10：1である場合に得られる。

【0099】

この文脈で使用される用語「最大半量がん殺傷％」とは、顆粒球によって殺傷され得る全がん細胞の半分を意味する。例えば、顆粒球が本明細書に記載の方法において使用される全がん細胞の50％を殺傷する場合、最大半量がん殺傷％は、アッセイにおいて使用さ

れる全がん細胞の25%であらう。

【0100】

一部の実施形態では、2%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%または65%未満のがん細胞を殺傷する顆粒球を廃棄してもよい。

【0101】

本発明の *in vitro* での方法は、がんを処置するのに好適な細胞の選択を改善するために本明細書に記載の技術の組合せを含んでもよい。例えば、複数の造血細胞または顆粒球が規定された密度閾値を満たすため、それらが選択される場合、細胞表面電位／電気泳動移動度を評価して、高いCKAの顆粒球（例えば、好中球）を産生する造血細胞を同定する、または改善されたCKAを有する顆粒球を選択するのを助けることができる。有利なことに、そのような技術の組合せは、本発明の造血細胞または顆粒球を選択する能力を改善する。さらに、顆粒球（例えば、好中球）にそのような技術の組合せを適用することによって、改善されたCKAを有する細胞を検出し、前記ドナーから造血細胞を取得することができる。

【0102】

本発明はまた、本発明の造血細胞の *in vitro* の細胞培養物、または本発明の方法に従って取得可能な造血細胞を、顆粒球に分化させることを含む分化方法も提供する。関連する態様では、そのような方法によって取得可能な（例えば、取得される）顆粒球の *in vitro* の細胞培養物が提供される。一実施形態では、*in vitro* の細胞培養物は、

a. 少なくとも $2.0 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ （または少なくとも $1.0 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ 、例えば、少なくとも $1.25 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ 、 $1.5 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ 、または $1.75 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ ）の電気泳動移動度によって規定される表面電位；および

b. がん細胞を殺傷する能力
を有する顆粒球に関して富化されている。

【0103】

一態様では、本発明は、造血細胞；および顆粒球－マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、増殖ホルモン；セロトニン、ビタミンC、ビタミンD、グルタミン（Gln）、アラキドン酸、AGE－アルブミン、インターロイキン、TNF－アルファ、FLT－3リガンド、トロンボポエチン、ウシ胎仔血清（FBS）、またはその組合せを含む医薬組成物を提供する。

【0104】

一実施形態では、医薬組成物は、造血細胞；ならびに顆粒球－マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、および顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、および増殖ホルモン、およびセロトニン、およびビタミンC、およびビタミンD、およびグルタミン（Gln）、およびアラキドン酸、およびAGE－アルブミン、およびインターロイキン、およびTNF－アルファ、およびFLT－3リガンド、およびトロンボポエチン、およびウシ胎児血清（FBS）を含む。

【0105】

好適には、増殖ホルモンは、ヒト成長ホルモンであってもよい。組成物中に含まれる造血細胞は、本発明の方法によって取得可能である（例えば、取得される）か、または本発明の造血細胞の *in vitro* の細胞培養物の一部であってもよい。

【0106】

一態様では、本発明は、顆粒球；顆粒球－マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、増殖ホルモン；セロトニン、ビタミンC、ビタミンD、グルタミン（Gln）、アラキドン酸、AGE－アルブミン、インターロイキン、TNF－アルファ（例えば、UniProt受託番号P01375）、FLT－3リガンド、トロンボポエチン（例えば、UniProt受託番号P40225）、ウシ胎仔血清（FBS）、またはその

組合せを含む医薬組成物を提供する。組成物中に含まれる顆粒球は、本発明の方法によって取得可能である（例えば、取得される）。

【0107】

一実施形態では、医薬組成物は、顆粒球；ならびに顆粒球－マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、および顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、および増殖ホルモン、およびセロトニン、およびビタミンC、およびビタミンD、およびグルタミン（Gln）、およびアラキドン酸、およびAGE－アルブミン、およびインターロイキン、およびTNF－アルファ、およびFlt－3リガンド、およびトロンボポエチン、およびウシ胎児血清（FBS）を含む。

【0108】

インターロイキンは、インターロイキン－3（IL-3）（例えば、UniProt受託番号P08700）、インターロイキン8（IL-8）（例えば、UniProt受託番号P10145）、インターロイキン－4（IL-4）（例えば、UniProt受託番号P05112）、インターロイキン－6（IL-6）（例えば、UniProt受託番号P05231）、インターロイキン－18（IL-18）（例えば、UniProt受託番号Q14116）、またはその組合せであってもよい。好適には、インターロイキンは、インターロイキン－3（IL-3）、インターロイキン8（IL-8）、インターロイキン－4（IL-4）、インターロイキン－6（IL-6）、およびインターロイキン－18（IL-18）であってもよい。

【0109】

一実施形態では、顆粒球－マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、増殖ホルモン、セロトニン、AGE－アルブミン、インターロイキン、TNF－アルファ、Flt－3リガンド、またはトロンボポエチンは、ヒト顆粒球－マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、増殖ホルモン、セロトニン、AGE－アルブミン、インターロイキン、TNF－アルファ、Flt－3リガンド、またはトロンボポエチンであってもよい。

【0110】

上記試薬は全て、Sino Biological Inc.（Suite B-310（Suite B-209、B-203も）、14 Zhong He Street, BDA, Beijing 100176, P.R.China）から商業的に入手可能である。

【0111】

本発明はまた、薬剤としての使用のための、本明細書に記載の造血細胞、造血細胞の*in vitro*の細胞培養物、顆粒球、顆粒球の*in vitro*の細胞培養物、医薬組成物またはキットに関する。薬剤は、がんの処置における使用のためののものであってもよく、かくして、関連する態様では、がんの処置における使用のための、造血細胞、造血細胞の*in vitro*の細胞培養物、顆粒球、顆粒球の*in vitro*の細胞培養物、医薬組成物またはキットが提供される。本発明の造血細胞の*in vitro*の細胞培養物、顆粒球、顆粒球の*in vitro*の細胞培養物、医薬組成物またはキットを、それを必要とする対象に投与することを含む、がんを処置するための対応する方法も提供される。

【0112】

別の態様では、本発明は、本発明の造血細胞、造血細胞の*in vitro*の細胞培養物、顆粒球、顆粒球の*in vitro*の細胞培養物、または医薬組成物を含む細胞バンクを提供する。

【0113】

さらなる態様では、

a. 本発明の造血細胞の*in vitro*の細胞培養物、造血細胞、顆粒球、顆粒球の*in vitro*の細胞培養物、または医薬組成物；および

b. 医学におけるその使用のための指示書を含むキットが提供される。

【0114】

本明細書で使用される用語「造血細胞」とは、顆粒球（好ましくは、好中球）に分化す

10

20

30

40

50

ることができる細胞を指す。用語「造血細胞」は、かくして、造血幹細胞、ならびに顆粒球（好ましくは、好中球）に分化することができる前駆細胞（例えば、造血幹細胞から分化した）を包含する。前駆細胞は、本明細書では、「顆粒球前駆細胞」と呼ぶことができる。本発明による造血細胞は、造血幹細胞、顆粒球前駆細胞またはその組合せに関するものであってもよい。好ましくは、本明細書で使用される用語「造血細胞」は、ヒト胚性幹細胞を包含しない。一実施形態では、造血細胞は、造血経路の細胞またはそれと同等の細胞である。一実施形態では、造血細胞は、人工多能性幹細胞（iPSC）またはそれと同等の細胞である。一実施形態では、iPSCは、ドナーの体細胞から取得可能である。iPSCの生成は、当業界で周知の技術であり、Yura（2007）、Science、318：1917-1920（その教示は参照により本明細書に組み込まれる）を参照されたい。

【0115】

10

一実施形態では、造血細胞は、核移植胚性幹細胞（NT-ESC）またはそれと同等の細胞である。一実施形態では、NT-ESCは、ドナー由来細胞の核を、元の核が除去された卵細胞に注入することによって取得可能である。NT-ESCの生成は、当業界で周知の技術であり、Tachibana M、Amato P、Sparman Mら（2013）、Cell、154（2）：465-466（その教示は参照により本明細書に組み込まれる）を参照されたい。

【0116】

造血細胞がドナー由来試料から取得される一実施形態では、前記造血細胞を、前記試料から単離することができる。造血細胞がドナー由来試料から取得される別の実施形態では、前記試料は、体細胞を含む試料であり、造血細胞は、前記試料中の細胞（例えば、体細胞）の多能性を誘導して、iPSCを得ることによって取得される。

20

【0117】

造血細胞がドナー由来試料から取得される別の実施形態では、前記試料は、体細胞を含む試料であり、造血細胞は、前記試料中の細胞（例えば、体細胞）の核を、卵細胞（例えば、元の核が除去された）に注入して、NT-ESCを得ることによって取得される。

【0118】

一実施形態では、造血細胞は、造血幹細胞である。造血幹細胞を、例えば、CD34（例えば、UniProt受託番号P28906）、CD59（例えば、UniProt受託番号P13987）、Thy1（例えば、UniProt受託番号P04216）、CD38（例えば、UniProt受託番号P28907）、C-kit（例えば、UniProt受託番号P10721）、およびlinから選択される細胞表面ポリペプチドマーカに基づいて選択することができる。一実施形態では、造血幹細胞は、細胞表面ポリペプチドマーカCD34⁺、CD59⁺、Thy1⁺、CD38^{low/-}、C-kit^{low/-}、およびlin⁻を含む。好ましくは、造血細胞は、CD34を発現する。前記マーカの存在または非存在を検出するための抗体は、商業的に入手可能であり、例えば、BD Biosciences Europe、ebioscience、Beckman CoulterおよびPharmingenから取得することができる。

30

【0119】

別の実施形態では、造血細胞は、顆粒球前駆細胞である。顆粒球前駆細胞は、共通骨髄性前駆細胞、骨髄芽球、N. 前骨髄球、N. 骨髄球、N. 後骨髄球、N. 好中球桿状核球、またはその組合せから選択される1つまたは複数であってもよい。

40

【0120】

造血細胞（造血幹細胞もしくは顆粒球前駆細胞など）または細胞培養物を、顆粒球に分化させることができる。分化を、Lieberら、Blood、2004 Feb 1；103（3）：852-9、および／またはChoiら、Nat. Protoc.、2011 Mar；6（3）：296-313、および／またはTimminsら、Biotechnology and bioengineering、2009；104（4）：832-40（これらは参照により本明細書に組み込まれる）における開示に基づく方法などの任意の好適な方法を使用して実行することができる。

50

【0121】

一態様では、本発明は、造血細胞と、顆粒球－マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、増殖ホルモン；セロトニン、ビタミンC、ビタミンD、グルタミン（Gln）、アラキドン酸、AGE－アルブミン、インターロイキン、TNF－アルファ、Flt－3リガンド、トロンボポエチン、ウシ胎仔血清（FBS）、またはその組合せとを混合することを含む、前記造血細胞を分化させる方法を提供する。

【0122】

一実施形態では、本発明は、造血細胞と、顆粒球－マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、および顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、および増殖ホルモン、およびセロトニン、およびビタミンC、およびビタミンD、およびグルタミン（Gln）、およびアラキドン酸、およびAGE－アルブミン、およびインターロイキン、およびTNF－アルファ、およびFlt－3リガンド、およびトロンボポエチン、およびウシ胎仔血清（FBS）とを混合することを含む、前記造血細胞を分化させる方法を提供する。

【0123】

前記造血細胞は、造血細胞培養物の一部であってもよい。

【0124】

一実施形態では、造血細胞の分化は、前記造血細胞を、1つまたは複数の支持細胞と共に培養することを含む。好適には、支持細胞は、OP9細胞であってもよい。OP9細胞（ATCC（登録商標）CRL-2749（商標））は、American Type Culture Collection United Kingdom (U.K.)、Guernsey、Ireland、JerseyおよびLiechtenstein、LGC Standards、Queens Road、Teddington、Middlesex、TW11 0LY、UKから商業的に入手可能である。一実施形態では、造血細胞を、1つまたは複数の支持細胞およびFlt－3リガンド、トロンボポエチン、ウシ胎仔血清（FBS）、またはその組合せと共に培養することができる。

【0125】

かくして、一実施形態では、本発明の医薬組成物または細胞培養物は、OP9細胞などの支持細胞をさらに含んでもよい。

【0126】

用語「顆粒球」は、以下の細胞型：好中球、好塩基球、および好酸球を包含する。好ましくは、顆粒球は、好中球である。顆粒球は、細胞表面ポリペプチドマーカーCD11b（例えば、UniProt受託番号P11215）およびCD15を発現してもよい。顆粒球はまた、活性酸素種（ O_2^- ）を産生してもよい。

【0127】

本発明は、がんの処置における使用にとって好適である顆粒球を包含する。好適には、前記顆粒球は、少なくとも $2.0 \mu m \cdot cm/volt \cdot sec$ （好適には、少なくとも $2.25 \mu m \cdot cm/volt \cdot sec$ または少なくとも $2.5 \mu m \cdot cm/volt \cdot sec$ ）の電気泳動移動度によって規定される表面電位を含む。一実施形態では、前記顆粒球は、少なくとも $2.75 \mu m \cdot cm/volt \cdot sec$ 、または少なくとも $3.0 \mu m \cdot cm/volt \cdot sec$ の電気泳動移動度によって規定される表面電位を含む。好適には、前記顆粒球は、少なくとも $3.25 \mu m \cdot cm/volt \cdot sec$ 、または少なくとも $3.5 \mu m \cdot cm/volt \cdot sec$ の電気泳動移動度によって規定される表面電位を含んでもよい。好ましくは、前記顆粒球は、少なくとも $3.75 \mu m \cdot cm/volt \cdot sec$ 、または少なくとも $4.0 \mu m \cdot cm/volt \cdot sec$ の電気泳動移動度によって規定される表面電位を含んでもよい。顆粒球は、がん細胞を殺傷する能力も有する。

【0128】

あるいは、前記顆粒球は、少なくとも $1.0 \mu m \cdot cm/volt \cdot sec$ または少なくとも $1.25 \mu m \cdot cm/volt \cdot sec$ の電気泳動移動度によって規定される表面電位を含んでもよい。例えば、前記顆粒球は、少なくとも $1.5 \mu m \cdot cm/volt \cdot sec$ 、または少なくとも $1.75 \mu m \cdot cm/volt \cdot sec$ の電気泳動移動度によ

って規定される表面電位を含んでもよい。顆粒球は、がん細胞を殺傷する能力も有する。

【0129】

「がん細胞を殺傷する能力」を、細胞（例えば、好中球などの顆粒球）と、がん細胞とを混合すること、および前記がん細胞の生存能力を測定すること（例えば、インキュベーション後）によって決定することができる。がん細胞が最早生存可能でない場合（すなわち、殺傷されている場合）、その細胞はがん細胞を殺傷する能力を示す。一実施形態では、がん細胞を殺傷する能力は、本明細書に記載のがん殺傷活性（CKA）アッセイを使用して決定される。

【0130】

一実施形態では、CKAアッセイは、

a. がん細胞株と、顆粒球とを接触させて、試験試料を形成すること（好ましくは、顆粒球のがん細胞に対する比は10：1）；

b. 前記試験試料をインキュベートすること；および

c. 前記試験試料中で殺傷されたがん細胞の%を測定することを含む。

【0131】

一実施形態では、CKAアッセイは、

a. 顆粒球と、がん細胞株とを混合して、混合物を提供すること（好ましくは、顆粒球のがん細胞に対する比は10：1）；

b. 前記混合物をインキュベートすること；および

c. 前記混合物中で殺傷されたがん細胞の%を測定することを含む。

【0132】

好ましい実施形態では、CKAアッセイは、

a. 顆粒球と、がん細胞株とを混合して、 8×10^5 個の顆粒球と、 8×10^4 個のがん細胞とを含む混合物を提供すること；

b. 前記混合物を、39℃で24時間インキュベートすること；

c. 前記混合物中で殺傷されたがん細胞の%を測定することを含む。

【0133】

好ましい実施形態では、CKAアッセイは、

a. 顆粒球と、がん細胞株とを混合して、少なくとも1：1（例えば、5：1または10：1）の顆粒球のがん細胞に対する比を含む混合物を提供すること；

b. 前記混合物を16～24時間（例えば、30～40℃で）インキュベートすること；

c. 前記混合物中で殺傷されたがん細胞の%を測定することを含む。

【0134】

一実施形態では、顆粒球は、それが本明細書に記載の方法において少なくとも5%のがん細胞を殺傷する場合、がん細胞を殺傷すると考えることができる。顆粒球は、それが少なくとも10%、20%、30%、40%または50%の存在するがん細胞を殺傷する場合、がん細胞を殺傷すると考えることができる。一実施形態では、顆粒球は、それが少なくとも60%の存在するがん細胞を殺傷する場合、がん細胞を殺傷すると考えることができる。一実施形態では、顆粒球は、それが少なくとも70%の存在するがん細胞を殺傷する場合、がん細胞を殺傷すると考えることができる。好ましくは、顆粒球は、それが少なくとも80%または90%の存在するがん細胞を殺傷する場合、がん細胞を殺傷すると考えることができる。

【0135】

方法が5：1の顆粒球のがん細胞に対する比の使用を含む実施形態では、顆粒球は、それが少なくとも30%の存在するがん細胞を殺傷する場合、がん細胞を殺傷と考えることができる。好ましくは、方法が5：1の顆粒球のがん細胞に対する比の使用を含む場

10

20

30

40

50

合、顆粒球は、それが少なくとも40%の存在するがん細胞を殺傷する場合、がん細胞を殺傷すると考えることができる。方法が10:1の顆粒球のがん細胞に対する比の使用を含む実施形態では、顆粒球は、それが少なくとも45%、50%または60%（好ましくは、少なくとも60%）の存在するがん細胞を殺傷する場合、がん細胞を殺傷すると考えることができる。より好ましくは、方法が10:1の顆粒球のがん細胞に対する比の使用を含む場合、顆粒球は、それが少なくとも80%の存在するがん細胞を殺傷する場合、がん細胞を殺傷すると考えることができる。

【0136】

一部の実施形態では、がん細胞株は、子宮頸がん細胞株（例えば、HeLa）である。方法が5:1の顆粒球の子宮頸がん細胞に対する比の使用を含む実施形態では、顆粒球は、それが少なくとも30%の存在する子宮頸がん細胞を殺傷する場合、がん細胞を殺傷すると考えることができる。好ましくは、方法が5:1の顆粒球の子宮頸がん細胞に対する比の使用を含む場合、顆粒球は、それが少なくとも40%の存在する子宮頸がん細胞を殺傷する場合、がん細胞を殺傷すると考えることができる。方法が10:1の顆粒球の子宮頸がん細胞に対する比の使用を含む実施形態では、顆粒球は、それが少なくとも45%、50%または60%（好ましくは、少なくとも60%）の存在する子宮頸がん細胞を殺傷する場合、がん細胞を殺傷すると考えることができる。より好ましくは、方法が10:1の顆粒球の子宮頸がん細胞に対する比の使用を含む場合、顆粒球は、それが少なくとも80%の存在する子宮頸がん細胞を殺傷する場合、がん細胞を殺傷すると考えることができる。

【0137】

一部の実施形態では、がん細胞株は、膵がん細胞株（例えば、PANC-1）である。方法が5:1の顆粒球の膵がん細胞に対する比の使用を含む実施形態では、顆粒球は、それが少なくとも50%または60%の存在する膵がん細胞を殺傷する場合、がん細胞を殺傷すると考えることができる。好ましくは、方法が5:1の顆粒球の膵がん細胞に対する比の使用を含む場合、顆粒球は、それが少なくとも65%または70%の存在する膵がん細胞を殺傷する場合、がん細胞を殺傷すると考えることができる。方法が10:1の顆粒球の膵がん細胞に対する比の使用を含む実施形態では、顆粒球は、それが少なくとも70%の存在する膵がん細胞を殺傷する場合、がん細胞を殺傷すると考えることができる。好ましくは、方法が10:1の顆粒球の膵がん細胞に対する比の使用を含む場合、顆粒球は、それが少なくとも80%または90%の存在する膵がん細胞を殺傷する場合、がん細胞を殺傷すると考えることができる。

【0138】

5%未満のがん細胞を殺傷する顆粒球は、好ましくは廃棄される。

【0139】

前記段落は、本明細書に記載の方法のそれぞれに適用され、前記開示を、本明細書に記載の方法のいずれかと組み合わせることができる。

【0140】

がん細胞を殺傷する能力を有する（「がん細胞を殺傷と考えられる」）細胞を、本明細書におけるCKAアッセイ（例えば、上記のCKAアッセイ）において少なくとも70%または75%のCKAを有する細胞と定義することができる。好適には、前記細胞は、本明細書におけるCKAアッセイ（例えば、上記のCKAアッセイ）において少なくとも80%または90%の活性を有してもよい。

【0141】

「がん細胞を殺傷する能力」を有する（「がん細胞を殺傷と考えられる」）細胞は、がんの処置における使用にとって好適である。「がん細胞を殺傷する能力」を有する細胞に分化させることができる造血細胞も、がんの処置における使用にとって好適であると考えられる。

【0142】

一態様では、本発明は、

a. 少なくとも1.077g/mlの密度；および

10

20

30

40

50

b. がん細胞を殺傷する能力

を特徴とする顆粒球を形成するように分化する造血細胞の *in vitro* の細胞培養物を提供する。

【0143】

一態様では、本発明は、

a. 1.077 g/ml より高い密度；および

b. がん細胞を殺傷する能力

を特徴とする顆粒球を形成するように分化する造血細胞の *in vitro* の細胞培養物を提供する。

【0144】

少なくとも 1.077 g/ml の密度を有する顆粒球は、実施例 21 に記載の方法によって取得可能であってよい。一実施形態では、そのような方法は、

i. 1.077 g/ml の密度に調整されたスクロース溶液を提供すること；

ii. 顆粒球を含む組成物を添加すること；および

iii. 高密度顆粒球（例えば、好中球）を沈降させるために遠心分離することを含む。

【0145】

少なくとも 1.077 g/ml の密度を有する顆粒球は、Histopaque（登録商標）-1077 キット（Sigma-Aldrich から商業的に入手可能であり、カタログ番号 10771-100ML）などの商業的に入手可能なキットを使用して取得可能であってよい。

【0146】

一部の実施形態では、1.077 g/ml の密度を有する顆粒球は、Ficoll-Paque 分離によって得られる。典型的には、そのような顆粒球は、分離後に 1.077 Ficoll-Paque 媒体の底に見出されるが、低密度顆粒球（例えば、1.077 g/ml 未満の密度を有する）は、1.077-血漿境界面に見出される。

【0147】

かくして、本発明による（および本発明における使用のための）顆粒球は、少なくとも 1.077 g/ml の密度を有してもよく、1.077 g/ml 未満の密度を有する顆粒球は、本発明から除外してもよい。一部の実施形態では、本発明による顆粒球は、少なくとも 1.077 g/ml の密度および本明細書に記載の細胞表面電位を有する。したがって、全ての細胞表面電位の実施形態が、前記顆粒球に同等に適用される。

【0148】

好ましくは、顆粒球は、1.077 g/ml より高い密度を有する。

【0149】

一実施形態では、顆粒球は、少なくとも 1.078 g/ml の密度を有する。一実施形態では、顆粒球は、少なくとも 1.079 g/ml の密度を有する。一実施形態では、顆粒球は、少なくとも 1.080 g/ml の密度を有する。一実施形態では、顆粒球は、少なくとも 1.081 g/ml の密度を有する。一実施形態では、顆粒球は、少なくとも 1.082 g/ml の密度を有する。一実施形態では、顆粒球は、少なくとも 1.083 g/ml の密度を有する。好ましくは、顆粒球は、1.082 g/ml の、または 1.082 g/ml より高い密度を有する。

【0150】

一実施形態では、顆粒球は、1.084 g/ml 未満の密度を有する。一実施形態では、顆粒球は、1.083 g/ml 未満の密度を有する。一実施形態では、顆粒球は、1.082 g/ml 未満の密度を有する。一実施形態では、顆粒球は、1.081 g/ml 未満の密度を有する。一実施形態では、顆粒球は、1.080 g/ml 未満の密度を有する。一実施形態では、顆粒球は、1.079 g/ml 未満の密度を有する。一実施形態では、顆粒球は、1.078 g/ml 未満の密度を有する。

【0151】

一実施形態では、顆粒球は、1.077 g/ml ~ 1.084 g/ml の密度（例えば

10

20

30

40

50

、 1.077 g/ml より高いが、 1.084 g/ml 未満の密度)を有する。顆粒球は、 1.079 g/ml ～ 1.084 g/ml の密度、例えば、 1.080 g/ml ～ 1.084 g/ml の密度を有してもよい。顆粒球は、 1.080 g/ml ～ 1.083 g/ml の密度、例えば、 1.080 g/ml ～ 1.082 g/ml の密度を有してもよい。
【0152】

一実施形態では、造血細胞は、少なくとも 1.077 g/ml の密度を有する。好ましくは、造血細胞は、 1.077 g/ml より高い密度を有する。

【0153】

一実施形態では、造血細胞は、少なくとも 1.078 g/ml の密度を有する。一実施形態では、造血細胞は、少なくとも 1.079 g/ml の密度を有する。一実施形態では、造血細胞は、少なくとも 1.080 g/ml の密度を有する。一実施形態では、造血細胞は、少なくとも 1.081 g/ml の密度を有する。一実施形態では、造血細胞は、少なくとも 1.082 g/ml の密度を有する。一実施形態では、造血細胞は、少なくとも 1.083 g/ml の密度を有する。

【0154】

一実施形態では、造血細胞は、 1.084 g/ml 未満の密度を有する。一実施形態では、造血細胞は、 1.083 g/ml 未満の密度を有する。一実施形態では、造血細胞は、 1.082 g/ml 未満の密度を有する。一実施形態では、造血細胞は、 1.081 g/ml 未満の密度を有する。一実施形態では、造血細胞は、 1.080 g/ml 未満の密度を有する。一実施形態では、造血細胞は、 1.079 g/ml 未満の密度を有する。一実施形態では、造血細胞は、 1.078 g/ml 未満の密度を有する。

【0155】

一実施形態では、造血細胞は、 1.077 g/ml ～ 1.084 g/ml の密度(例えば、 1.077 g/ml より高いが、 1.084 g/ml 未満の密度)を有する。造血細胞は、 1.079 g/ml ～ 1.084 g/ml の密度、例えば、 1.080 g/ml ～ 1.084 g/ml の密度を有してもよい。造血細胞は、 1.080 g/ml ～ 1.083 g/ml の密度、例えば、 1.080 g/ml ～ 1.082 g/ml の密度を有してもよい。

【0156】

一態様では、本発明は、がんの処置における使用にとって好適な造血細胞を選択するための方法であって、

- a. ドナーから取得可能な顆粒球の密度を測定すること；および
 - b. 顆粒球の測定された密度が少なくとも 1.077 g/ml である場合、前記ドナーから造血細胞を選択すること
- を含む方法を提供する。

【0157】

本発明はまた、がんの処置における使用にとって好適な造血細胞を選択するための方法であって、

- a. 造血細胞の密度を測定すること；および
 - b. 1.077 g/ml 未満の密度を有する、および／またはがん細胞を殺傷する能力が低下した顆粒球を形成するように分化する、それ以外は同一の造血細胞よりも高い密度を有する造血細胞を選択すること
- を含む方法も提供する。

【0158】

一態様では、造血細胞の *in vitro* の細胞培養物を分化させることを含む方法であって、前記造血細胞が、

- a. 少なくとも 1.077 g/ml の密度；および
 - b. がん細胞を殺傷する能力
- を特徴とする顆粒球を形成するように分化する、方法が提供される。

【0159】

本発明はまた、前記方法によって取得可能な顆粒球の *in vitro* の培養物も提供する。

【0160】

一態様では、本発明は、

a. *t o l l*様受容体の発現もしくは活性；ならびに／またはプログラム細胞死1 (PD-1) 受容体；CD115；CD224；CXCR1；および／もしくはCXCR2の発現の非存在もしくは不活性；ならびに

b. がん細胞を殺傷する能力

を特徴とする顆粒球を形成するように分化する造血細胞の *in vitro* の細胞培養物を提供する。

【0161】

前記受容体の存在または非存在を、当業者には公知の任意の技術を使用して決定することができる。例えば、当業者であれば、前記受容体の存在または非存在を検出するために、任意選択によりFACSと組み合わせて、標識された抗体を使用することができる。

【0162】

受容体の活性／不活性を、任意の公知の技術を使用して決定することもできる。例えば、前記活性／不活性と関連する遺伝子発現の変化を検出することによる。

【0163】

好ましくは、顆粒球は、*t o l l*様受容体を発現する；プログラム細胞死1 (PD-1) 受容体（例えば、UniProt受託番号Q15116）；CD15（例えば、UniProt受託番号P07333）；CD224（例えば、UniProt受託番号P19440）；CXCR1（例えば、UniProt受託番号P25024）；および／またはCXCR2（例えば、UniProt受託番号P25025）を発現しない（好ましくは、プログラム細胞死1 (PD-1) 受容体；CD115；CD224；CXCR1；およびCXCR2を発現しない）。

【0164】

あるいは、またはさらに、PD-1受容体；CD115；CD224；CXCR1；およびCXCR2のうちの1つまたは複数を、不活性形態で発現させるか、または発現後に不活化することができる。

【0165】

*t o l l*様受容体は、TLR1（例えば、UniProt受託番号Q15399）、TLR2（例えば、UniProt受託番号O60603）、TLR3（例えば、UniProt受託番号O15455）、TLR4（例えば、UniProt受託番号O00206）、TLR5（例えば、UniProt受託番号O60602）、TLR6（例えば、UniProt受託番号Q9Y2C9）、TLR7（例えば、UniProt受託番号Q9NYK1）、TLR8（例えば、UniProt受託番号Q9NR97）、TLR9（例えば、UniProt受託番号Q9NR96）、TLR10（例えば、UniProt受託番号Q9BXR5）、および／またはTLR11（例えば、UniProt受託番号Q6R590）のうちの1つまたは複数であってもよい。好ましくは、*t o l l*様受容体は、TLR4である。

【0166】

理論によって束縛されることを望むものではないが、本発明者らは、

PD-L1は、高いCKAを有する顆粒球（例えば、好中球）上でその受容体PD-1と結合しない、および／もしくは高いCKAを有する顆粒球（例えば、好中球）は、PD-L1を産生しない；ならびに／または

高いCKAを有する顆粒球（例えば、好中球）は、その表面上に活性な*t o l l*様受容体を有する；ならびに／または

CD115およびCD224マーカーは、高いCKAを有する顆粒球（例えば、好中球）上で発現されない；

CXCR1およびCXCR2は、低いCKAを有する顆粒球（例えば、好中球）の受容体である、すなわち、高いCKAを有する顆粒球（例えば、好中球）は、CXCR1 & CXCR2を発現しない、もしくはCXCR1およびCXCR2は前記顆粒球（例えば、好中球）中で阻害される

10

20

30

40

50

と考えている。

【0167】

一実施形態では、上記の細胞表面ポリペプチド発現プロファイルを有する顆粒球も、本明細書に記載の細胞表面電位および／または密度を有する。

【0168】

一態様では、本発明は、がんの処置における使用にとって好適な造血細胞を選択するための方法であって、

a. ドナーから取得可能な顆粒球上での *t o l l* 様受容体；プログラム細胞死 1 (PD-1) 受容体；CD 1 1 5；CD 2 2 4；CXCR 1；および／または CXCR 2 の発現または活性を検出すること；ならびに

b. *t o l l* 様受容体が発現されるか、もしくは活性である；ならびに／またはプログラム細胞死 1 (PD-1) 受容体；CD 1 1 5；CD 2 2 4；CXCR 1；および／もしくは CXCR 2 が発現されないか、もしくは不活性である場合、前記ドナーから造血細胞を選択すること

を含む方法を提供する。

【0169】

一態様では、造血細胞の *i n v i t r o* の細胞培養物を分化させることを含む方法であって、前記造血細胞が、

a. *t o l l* 様受容体の発現もしくは活性；ならびに／またはプログラム細胞死 1 (PD-1) 受容体；CD 1 1 5；CD 2 2 4；CXCR 1；および／もしくは CXCR 2 の発現の非存在もしくは不活性；ならびに

b. がん細胞を殺傷する能力

を特徴とする顆粒球を形成するように分化する、方法が提供される。

【0170】

本発明はまた、前記方法によって取得可能な顆粒球の *i n v i t r o* の培養物も提供する。

【0171】

造血細胞を、不死化することができる。当業者であれば、特に、細胞周期を脱調節するウイルス遺伝子（例えば、5 型アデノウイルスの E 1 遺伝子）の導入、およびテロメラーゼの人工的発現を含む不死化技術に精通している。不死化は、有利なことに、*i n v i t r o* で安定に培養することができる細胞株の調製を可能にする。かくして、一態様では、本発明は、選択された造血細胞、ならびに安定な造血細胞培養物から取得可能な（例えば、取得される）不死化細胞株を提供する。好適には、不死化細胞株または安定な造血細胞培養物は、本発明の方法によって取得可能である（例えば、取得される）。

【0172】

造血細胞培養物または細胞株を参照して使用される用語「安定な」とは、細胞培養物または細胞株が、非改変細胞（すなわち、ドナーから取得され、*i n v i t r o* での細胞培養に直接かけられた細胞）よりも、*i n v i t r o* での細胞培養に適するように改変されていることを意味する。したがって、前記「安定な」細胞培養物または細胞株は、非改変細胞と比較した場合、より多い複製回数（好ましくは、長期間にわたる）を受けることができる。

【0173】

造血細胞は、好適には、ドナー、例えば、ヒトドナーから取得可能である（例えば、取得される）。

【0174】

本明細書で使用される用語「ドナー」とは、生体液試料が取得される対象（好適には、ヒト対象）を指す。造血細胞または顆粒球が取得可能である任意の好適な生体液試料を、本発明において使用することができる。

【0175】

かくして、ドナー由来試料を参照して本明細書で使用される用語「試料」は、造血細胞

10

20

30

40

50

を含む、または造血細胞が取得可能である任意の試料であってもよい（例えば、前記造血細胞が i P S C である場合、前記試料は体細胞を含んでもよい）。

【0176】

一実施形態では、生体液試料（または「試料」）は、末梢血試料などの血液試料である。本明細書で使用される用語「血液」は、全血、血清、および血漿を包含する。血液を遠心分離にかけて、赤血球、白血球、および血漿を分離することができる。遠心分離後、単核細胞層を、本発明における使用のために除去することができる。

【0177】

ドナーを、以下の特徴：性別、年齢、病歴、および／または血液型のうちの1つまたは複数に基づいて選択することができる。一実施形態では、ドナーが男性である場合に前記ドナーを選択してもよい。別の実施形態では、ドナーが18～25歳（好適には、18～24歳）である場合に前記ドナーを選択してもよい。好適には、ドナーが18～25歳（好適には、18～24歳）の男性である場合に前記ドナーを選択してもよい。理論によって束縛されることを望むものではないが、成人早期の男性は、がん細胞を殺傷する能力を有する顆粒球（例えば、好中球）を産生する可能性がより高いと考えられる。

【0178】

好適には、ドナーから取得可能な（例えば、取得される）顆粒球は、少なくとも $2.0 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ の電気泳動移動度によって規定される表面電位、およびがん細胞を殺傷する能力を有してもよい。別の実施形態では、ドナーから取得可能な（例えば、取得される）顆粒球は、少なくとも $1.0 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ の電気泳動移動度によって規定される表面電位、およびがん細胞を殺傷する能力を有する。

【0179】

本発明はまた、細胞表面電位の測定にも関する。細胞の表面電位を、当業界で公知の任意の好適な技術を使用して決定することができる。一実施形態では、表面電位は、電気泳動を使用して決定される。電気泳動技術を、好適な電気泳動媒体内に含まれる細胞に電圧を印加し、細胞移動度を測定することによって実行することができる。以下のプロトコールを用いることができる：

i. 電気泳動チャンバー中に含まれる細胞（ 10 mM Tris-HCl および 291 mM グルコース緩衝液中に懸濁される）に、 200 V の直流を印加する；および

ii. 3 mA の電流を印加しながら、前記細胞（例えば、顆粒球または造血細胞）が固定の長さを通過するのにかかった時間を測定する（例えば、任意選択により CCD カメラに接続された顕微鏡の使用による）。

【0180】

電気泳動移動度「 μ 」（単位 $\mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ で表される）を、以下の式：

$$\mu = ugS / I$$

（式中、

「 u 」＝工程 ii. によって測定される電気泳動速度；

「 g 」＝電気泳動媒体の伝導率；

「 S 」＝電気泳動チャンバーの断面積；および

「 I 」＝電流である）

を使用して算出することができる。

【0181】

一実施形態では、電気泳動移動度は、

i. 10 mM Tris-HCl および 291 mM グルコース中に懸濁された造血細胞または顆粒球を電気泳動チャンバーに添加すること；

ii. $200 \text{ V} / 3 \text{ mA}$ の直流を印加すること；ならびに

iii. 前記造血細胞または顆粒球が所与の時間に電極に向かって移動した距離（ mm ）を測定すること；ならびに

iv. 上記の式を使用して電気泳動移動度を算出することによって決定される。

【0182】

電気泳動を、0.9% (等張性) NaCl 溶液中で行ってもよい。好ましくは、一定の電流を使用する (例えば、3mA)。

【0183】

電気泳動移動度アッセイは、Johann Bauer によって編集された「Cell Electrophoresis」(CRC Press, Inc.により発行されたISBN 0-8493-8918-6) (その教示はその全体が本明細書に組み込まれる) に記載されたものであってよい。

【0184】

理論によって束縛されることを望むものではないが、より高いCKAを有する顆粒球 (例えば、好中球) に分化することができる造血細胞 (例えば、CD34を発現する造血幹細胞) は、より正に荷電し、したがって、より低いCKAの顆粒球 (例えば、好中球) に分化する類似するサイズおよび重量/密度の造血細胞 (例えば、CD34を発現する造血幹細胞) よりも、所与の時間で負に荷電した電極に向かってさらに移動すると考えられる。同様に、より高いCKAを有する顆粒球 (例えば、好中球) は、より正に荷電し、したがって、より低いCKAを有する可能性がある類似するサイズおよび重量/密度の顆粒球 (例えば、好中球) よりも、所与の時間で負に荷電した電極に向かってさらに移動すると考えられる。

10

【0185】

好ましくは、細胞表面電位は、電気泳動移動度に等しく、電気泳動中に所与の時間で細胞が移動した距離に比例する。より高い正電荷を有する細胞は、より低く正に荷電した (または負に荷電した) 細胞よりも電気泳動中に電極に向かってさらに移動する。そのような細胞は、したがって、より低く正に荷電した (または負に荷電した) 細胞よりも高い細胞表面電位の値を有するであろう。細胞の表面電位は、少なくとも $2.0 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ または少なくとも $2.25 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ の電気泳動移動度によって規定することができる。好適には、細胞の表面電位は、少なくとも $2.5 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ または少なくとも $2.75 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ の電気泳動移動度によって規定することができる。好適には、細胞の表面電位は、少なくとも $3.0 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ または少なくとも $3.25 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ の電気泳動移動度によって規定することができる。好ましくは、細胞の表面電位は、少なくとも $3.5 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ または少なくとも $3.75 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ の電気泳動移動度によって規定することができる。より好ましくは、細胞の表面電位は、少なくとも $4.0 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ の電気泳動移動度によって規定することができる。細胞は、造血細胞、または顆粒球であってもよい。

20

30

【0186】

一実施形態では、本発明の造血細胞は、少なくとも $1.0 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ または少なくとも $1.25 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ 、例えば、少なくとも $1.5 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ または $1.75 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ (好ましくは、少なくとも $2.0 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$) の電気泳動移動度によって規定される表面電位を有してもよい。一実施形態では、造血細胞は、少なくとも $2.25 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ または少なくとも $2.5 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ の電気泳動移動度によって規定される表面電位を有してもよい。好適には、造血細胞は、少なくとも $2.75 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ または少なくとも $3.0 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ の電気泳動移動度によって規定される表面電位を有してもよい。好適には、造血細胞は、少なくとも $3.25 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ または少なくとも $3.5 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ の電気泳動移動度によって規定される表面電位を有してもよい。より好ましくは、造血細胞は、少なくとも $3.75 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ または少なくとも $4.0 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ の電気泳動移動度によって規定される表面電位を有してもよい。

40

【0187】

50

一実施形態では、本発明の顆粒球は、少なくとも $1.0 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ または少なくとも $1.25 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ 、例えば、少なくとも $1.5 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ または少なくとも $1.75 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ （好ましくは、少なくとも $2.0 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ ）の電気泳動移動度によって規定される表面電位を有してもよい。一実施形態では、顆粒球は、少なくとも $2.25 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ または少なくとも $2.5 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ の電気泳動移動度によって規定される表面電位を有してもよい。好適には、顆粒球は、少なくとも $2.75 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ または少なくとも $3.0 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ の電気泳動移動度によって規定される表面電位を有してもよい。好ましくは、顆粒球は、少なくとも $3.25 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ または少なくとも $3.5 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ の電気泳動移動度によって規定される表面電位を有してもよい。より好ましくは、顆粒球は、少なくとも $3.75 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ または少なくとも $4.0 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ の電気泳動移動度によって規定される表面電位を有してもよい。

【0188】

本発明は、ドナーから取得可能な（例えば、取得される）顆粒球の表面電位を測定することを含んでもよい。表面電位が少なくとも $2.0 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ （またはあるいは、少なくとも $1.0 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ ）の電気泳動移動度によって規定される場合、造血細胞は、ドナーから選択される。有利なことに、これは、がんの処置における使用にとって好適な造血細胞の選択のための単純な、および／または迅速な、および／または信頼できるスクリーニング方法を提供する。用いられる方法による一部の実施形態では、迅速なスクリーニングを使用して、より複雑なアッセイ（例えば、CKAアッセイなど）を必要とすることなく、ドナーが好適であるかどうかを決定することができる。その後、機能的アッセイ（本明細書に記載のCKAアッセイなど）を実施して、例えば、ドナーから選択された造血細胞を顆粒球に分化させること、およびCKAアッセイにおいて前記顆粒球を試験することによって、スクリーニングを検証することができる。必要とされる細胞表面電位および／または必要とされるCKAを有さない細胞を廃棄してもよい。

【0189】

さらに、またはあるいは、造血細胞の表面電位を測定し、それが、 $2.0 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ 未満（好ましくは、 $2.5 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ 未満、より好ましくは、 $3.5 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ または $4.0 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ 未満）の電気泳動移動度によって規定される表面電位を有する；および／またはがん細胞を殺傷する能力が低下した顆粒球（例えば、好中球）を形成するように分化する、それ以外は同一の造血細胞よりも高い表面電位を有する場合、造血細胞を選択することができる。有利なことに、これは、前記細胞ががんの処置における使用にとって好適であるかどうかを決定するための造血細胞の迅速なスクリーニングを可能にする。かくして、本発明は、 $2.0 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ 未満（好ましくは、 $2.5 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ 未満、より好ましくは、 $3.5 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ または $4.0 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ 未満）の電気泳動移動度によって規定される表面電位を有する；および／またはがん細胞を殺傷する能力が低下した顆粒球（例えば、好中球）を形成するように分化する、それ以外は同一の造血細胞よりも高い表面電位を有する造血細胞を包含する。

【0190】

一実施形態では、スクリーニング基準（例えば、より高い表面電位を有さない、および／または $2.0 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ 未満の電気泳動移動度によって規定される表面電位を有する）を満たさない造血細胞は廃棄される。

【0191】

さらに、またはあるいは、造血細胞の表面電位を測定し、それが、 $1.0 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ 未満（好適には、 $1.25 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ 未満、より好

適には、 $1.5 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ または $1.75 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ 未満)の電気泳動移動度によって規定される表面電位を有する;および/またはがん細胞を殺傷する能力が低下した顆粒球(例えば、好中球)を形成するように分化する、それ以外は同一の造血細胞よりも高い表面電位を有する場合、造血細胞を選択することができる。かくして、本発明は、 $1.0 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ 未満(好適には、 $1.25 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ 未満、より好適には、 $1.5 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ または $1.75 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ 未満)の電気泳動移動度によって規定される表面電位を有する;および/またはがん細胞を殺傷する能力が低下した顆粒球(例えば、好中球)を形成するように分化する、それ以外は同一の造血細胞よりも高い表面電位を有する造血細胞を包含する。

10

【0192】

一実施形態では、スクリーニング基準(例えば、より高い表面電位を有さない、および/または $1.0 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ 未満の電気泳動移動度によって規定される表面電位を有する)を満たさない造血細胞は廃棄される。

【0193】

用語「より高い表面電位」とは、より高い正の表面電荷を意味する。

【0194】

「がん細胞を殺傷する能力の低下」を、同じ実験条件下で2つ以上の顆粒球(例えば、好中球)を試験すること、および殺傷されたがん細胞の濃度/量を比較することによって、実験的に決定することができる。「がん細胞を殺傷する能力の低下」を、本明細書に記載の方法またはCKAアッセイを使用して決定することができる。一実施形態では、「がん細胞を殺傷する能力の低下」は、細胞が、本発明の細胞(すなわち、本明細書で定義される「がん細胞を殺傷能力」を有する細胞)よりも10%または20%少ないがん細胞を殺傷することを意味する。好ましくは、「がん細胞を殺傷する能力の低下」は、細胞が本発明の細胞よりも5%少ないがん細胞またはそれより少ないがん細胞を殺傷することを意味する。

20

【0195】

かくして、この方法に従って、適切な造血細胞表面電位の値(がんの処置における使用にとって好適な顆粒球に分化させることができる造血細胞の選択を可能にする)を、それから取得可能な顆粒球の表面電位間の相関に基づいて、および/またはがん細胞を殺傷する能力に基づいて、経験的に決定することができる。

30

【0196】

関連する態様では、本発明は、がんの処置における使用にとって好適な造血細胞を選択するための方法であって、

a. ドナーから取得可能な顆粒球(例えば、好中球)が、

i. 少なくとも $2.0 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ (または少なくとも $1.0 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$)の電気泳動移動度によって規定される表面電位;および

ii. がん細胞を殺傷する能力を特徴とする、前記ドナーから取得可能な造血細胞の表面電位を測定すること;ならびに

b. 造血細胞を選択するための方法において測定された表面電位を使用することを含む方法を提供する。

40

【0197】

「造血細胞を選択するための方法」は、表面電位の測定値が得られたのと同じドナー、または異なるドナーから造血細胞を選択することを指してもよい。

【0198】

一態様では、本発明は、がんの処置における使用にとって好適な造血細胞を取得するためのin vitroでの方法であって、

a. ドナーから取得可能な顆粒球の細胞表面電荷を測定すること;および

b. 前記顆粒球が対照顆粒球と比較した場合、より高い正の細胞表面電荷を有する場合、前記ドナーに由来する試料から造血細胞を取得すること

50

を含む方法を提供する。

【0199】

対照顆粒球は、負、正または中性の電荷を有してもよい。好ましくは、対照顆粒球は、正電荷を有する。好ましくは、対照顆粒球は、がん細胞を殺傷しない（例えば、本明細書に記載の方法において少なくとも5%のがん細胞を殺傷しない）顆粒球である。対照顆粒球は、好ましくは、工程a.のドナーと異なるドナーから取得される。

【0200】

一実施形態では、方法は、前記顆粒球が対照顆粒球と比較した場合、少なくとも1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%または300%高く正に荷電している細胞表面電荷を有する場合、前記ドナーに由来する試料から造血細胞を取得することを含む。

10

【0201】

別の態様では、本発明は、がんの処置における使用にとって好適な造血細胞を選択するための *in vitro* での方法であって、

a. ドナーから取得可能な造血細胞の細胞表面電荷を測定すること；および
b. 前記造血細胞が、対照造血細胞と比較した場合、より高い正の細胞表面電荷を有する場合、前記造血細胞を、がんの処置における使用にとって好適なものとして選択することを含む方法を提供する。

【0202】

対照顆粒球または造血細胞の細胞表面電荷を、本発明の方法を実行する前に、または本発明の方法を実行すると同時に（好ましくは、同時に）決定することができる。

20

【0203】

例えば、一実施形態では、前記方法は、

a. ドナーから取得可能な顆粒球または造血細胞の細胞表面電荷を測定すること；
b. 対照顆粒球または造血細胞の細胞表面電荷を測定すること；および
c. 前記顆粒球が、前記対照顆粒球と比較した場合により高い正の細胞表面電荷を有する場合、前記ドナーに由来する試料から造血細胞を取得すること；または前記造血細胞が、対照造血細胞と比較した場合により高い正の細胞表面電荷を有する場合、がんの処置における使用にとって好適なものとして前記造血細胞を選択することを含む。

30

【0204】

一実施形態では、方法は、さらなるドナー（例えば、第2、第3、第4のドナーなど）に由来する顆粒球を含む複数の異なる試験試料の使用を含んでもよい。

【0205】

対照造血細胞は、負、正または中性の電荷を有してもよい。好ましくは、対照造血細胞は、正電荷を有する。好ましくは、対照造血細胞は、がん細胞を殺傷する顆粒球に分化しない造血細胞である（例えば、前記造血細胞は、本明細書に記載の方法において少なくとも5%のがん細胞を殺傷する顆粒球に分化しない）。対照造血細胞は、好ましくは、工程a.のドナーと異なるドナーから取得される。

【0206】

一実施形態では、方法は、造血細胞が対照造血細胞と比較した場合、少なくとも1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%または300%高く正に荷電している細胞表面電荷を有する場合、前記ドナーに由来する試料から前記造血細胞を取得することを含む。

40

【0207】

一態様では、がんの処置における使用にとって好適な造血細胞を選択するための *in vitro* での方法であって、

a. ドナーから取得可能な試料中の正の細胞表面電荷を有する顆粒球の濃度を測定すること；および

b. 正の細胞表面電荷を有する前記顆粒球の濃度が、異なるドナーに由来するそれ以外

50

は同一の対照試料中の正の細胞表面電荷を有する顆粒球の濃度よりも高い場合、前記ドナーに由来する試料から造血細胞を取得することを含む方法が提供される。

【0208】

言及される対照試料は、がん細胞を殺傷しない顆粒球（例えば、本明細書に記載の方法において少なくとも5%のがん細胞を殺傷しない顆粒球）を有するドナーに由来する試料であってもよい。

【0209】

一実施形態では、方法は、正の細胞表面電荷を有する顆粒球の濃度が、異なるドナーに由来するそれ以外は同一の対照試料中の正の細胞表面電荷を有する顆粒球の濃度よりも少なくとも1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%または300%高い場合、前記ドナーに由来する試料から造血細胞を取得することを含む。好ましくは、正の細胞表面電荷を有する顆粒球の濃度は、異なるドナーに由来するそれ以外は同一の対照試料中の正の細胞表面電荷を有する顆粒球の濃度よりも少なくとも50%高い。

【0210】

別の態様では、がんの処置における使用にとって好適な造血細胞を選択するための *in vitro* での方法であって、

a. ドナーから取得可能な試料中の正の細胞表面電荷を有する造血細胞の濃度を測定すること；および

b. 正の細胞表面電荷を有する造血細胞の濃度が、異なるドナーに由来するそれ以外は同一の対照試料中の正の細胞表面電荷を有する造血細胞の濃度よりも高い場合、がんの処置における使用にとって好適なものとして前記造血細胞を選択することを含む方法が提供される。

【0211】

異なるドナーに由来するそれ以外は同一の対照試料中の正の細胞表面電荷を有する顆粒球または造血細胞の濃度を、本発明の方法を実行する前に、または本発明の方法を実行すると同時に（好ましくは、同時に）決定することができる。

【0212】

例えば、一実施形態では、前記方法は、

a. （第1の）ドナーから取得可能な試料中の正の細胞表面電荷を有する顆粒球または造血細胞の濃度を測定すること；

b. 異なるドナーに由来するそれ以外は同一の対照試料中の正の細胞表面電荷を有する顆粒球または造血細胞の濃度を測定すること；および

c. 正の細胞表面電荷を有する前記顆粒球の濃度が、それ以外は同一の対照試料中の正の細胞表面電荷を有する顆粒球の濃度よりも高い場合、前記（第1の）ドナーに由来する試料から造血細胞を取得すること；または前記（第1の）ドナーに由来する正の細胞表面電荷を有する前記造血細胞の濃度が、それ以外は同一の対照試料中の正の細胞表面電荷を有する造血細胞の濃度よりも高い場合、がんの処置における使用にとって好適なものとして造血細胞を選択することを含む。

【0213】

一部の実施形態では、方法は、さらなるドナー（例えば、第2、第3、第4のドナーなど）に由来する顆粒球を含む複数の異なる試験試料の使用を含んでもよい。

【0214】

言及される対照試料は、がん細胞を殺傷する顆粒球に分化しない造血細胞を有するドナーに由来する試料であってもよい（例えば、前記造血細胞は、本明細書に記載の方法において少なくとも5%のがん細胞を殺傷する顆粒球に分化しない）。

【0215】

一実施形態では、方法は、正の細胞表面電荷を有する造血細胞の濃度が、異なるドナー

に由来するそれ以外は同一の対照試料中の正の細胞表面電荷を有する造血細胞の濃度よりも少なくとも1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%または300%高い場合、前記ドナーに由来する試料から造血細胞を取得することを含む。好ましくは、正の細胞表面電荷を有する造血細胞の濃度は、異なるドナーに由来するそれ以外は同一の対照試料中の正の細胞表面電荷を有する造血細胞の濃度よりも少なくとも50%高い。

【0216】

一態様では、がんの処置における使用にとって好適な造血細胞を選択するための *in vitro* の方法であって、

- a. 第1のドナーから取得可能な顆粒球の細胞表面電荷を測定すること；
- b. 対照顆粒球と比較した場合、より高い正の細胞表面電荷を有する前記第1のドナーから取得可能な顆粒球を同定すること；
- c. 工程b. で同定された顆粒球の濃度を測定すること；
- d. 工程c. で測定された前記顆粒球の濃度と、第2の（またはさらなる）ドナーから取得可能な顆粒球の濃度とを比較することであって、前記第2の（またはさらなる）ドナーに由来する顆粒球が、対照顆粒球と比較した場合、より高い正の細胞表面電荷を有する、比較すること；および
- e. 比較が、前記第2の（またはさらなる）ドナーから取得可能な前記顆粒球の濃度と比較した場合に前記第1のドナーから取得可能な前記顆粒球のより高い濃度を同定する場合、前記第1のドナーに由来する試料から造血細胞を取得することを含む方法が提供される。

【0217】

一実施形態では、工程d. において比較される、第1のドナーから取得可能な顆粒球および第2のドナーから取得可能な顆粒球は、等しい細胞表面電荷を有する。

【0218】

対照顆粒球は、負、正または中性の電荷を有してもよい。好ましくは、対照顆粒球は、正電荷を有する。好ましくは、対照顆粒球は、がん細胞を殺傷しない（例えば、本明細書に記載の方法において少なくとも5%のがん細胞を殺傷しない）顆粒球である。対照顆粒球は、好ましくは、工程a. のドナーと異なるドナーから取得される。

【0219】

一実施形態では、前記第1のドナーから取得可能な顆粒球は、対照顆粒球と比較した場合、少なくとも1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%または300%高く正に荷電している細胞表面電荷を有する。

【0220】

一実施形態では、比較は、前記第2の（またはさらなる）ドナーから取得可能な前記顆粒球の濃度よりも少なくとも1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%または300%高い、前記第1のドナーから取得可能な前記顆粒球の濃度を同定する。好ましくは、少なくとも50%高い。

【0221】

一態様では、がんの処置における使用にとって好適な造血細胞を選択するための *in vitro* の方法であって、

- a. 第1のドナーから取得可能な造血細胞の細胞表面電荷を測定すること；
- b. 対照造血細胞と比較した場合、より高い正の細胞表面電荷を有する前記第1のドナーから取得可能な造血細胞を同定すること；
- c. 工程b. で同定された造血細胞の濃度を測定すること；
- d. 工程c. で測定された前記造血細胞の濃度と、第2の（またはさらなる）ドナーから取得可能な造血細胞の濃度とを比較することであって、前記第2の（またはさらなる）ドナーに由来する造血細胞が、対照造血細胞と比較した場合、より高い正の細胞表面電荷を有する、比較すること；および

e. 比較が、前記第2の（またはさらなる）ドナーから取得可能な前記造血細胞の濃度と比較した場合に前記第1のドナーから取得可能な前記造血細胞のより高い濃度を同定する場合、がんの処置における使用にとって好適なものとして前記第1のドナーから取得可能な造血細胞を選択することを含む方法が提供される。

【0222】

一実施形態では、工程d.において比較される、第1のドナーから取得可能な造血細胞および第2のドナーから取得可能な造血細胞は、等しい細胞表面電荷を有する。

【0223】

対照顆粒球または造血細胞の細胞表面電荷を、本発明の方法を実行する前に、または本発明の方法を実行すると同時に（好ましくは、同時に）決定することができる。

10

【0224】

対照造血細胞は、負、正または中性の電荷を有してもよい。好ましくは、対照造血細胞は、正電荷を有する。好ましくは、対照造血細胞は、がん細胞を殺傷する顆粒球に分化しない造血細胞である（例えば、前記造血細胞は、本明細書に記載の方法において少なくとも5%のがん細胞を殺傷する顆粒球に分化しない）。対照造血細胞は、好ましくは、工程a.のドナーと異なるドナーから取得される。

【0225】

一実施形態では、前記第1のドナーから取得可能な造血細胞は、対照造血細胞と比較した場合、少なくとも1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%または300%高く正に荷電している細胞表面電荷を有する。

20

【0226】

一実施形態では、比較は、前記第2の（またはさらなる）ドナーから取得可能な前記造血細胞の濃度よりも少なくとも1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%または300%高い、前記第1のドナーから取得可能な前記造血細胞の濃度を同定する。好ましくは、少なくとも50%高い。

【0227】

一部の実施形態では、さらなるドナーは、第3、第4、第5または第6のドナーであってもよい。

30

【0228】

一実施形態では、細胞表面電荷の測定は、顆粒球または造血細胞と、正に荷電した手段および負に荷電した手段（例えば、ナノ粒子）とを接触させることを含み、顆粒球または造血細胞の正に荷電した手段への優先的結合は、細胞表面が負に荷電していることを示し、顆粒球または造血細胞の負に荷電した手段への優先的結合は、細胞表面が正に荷電していることを示す。

【0229】

一実施形態では、顆粒球または造血細胞は、それに負に荷電した手段が結合することができ、正に荷電した手段が結合することができない場合、正の細胞表面電荷を有する。一実施形態では、顆粒球または造血細胞は、それに正に荷電した手段が結合することができ、負に荷電した手段が結合することができない場合、負の細胞表面電荷を有する。

40

【0230】

そのような負および／または正に荷電した手段を使用して、試料中の顆粒球または造血細胞の濃度を測定することもできる。

【0231】

正に荷電した手段は、正に荷電した粒子、ナノプローブもしくはナノ粒子、または陽イオン交換媒体であってもよい。

【0232】

一態様では、本発明は、前記電荷を手段として（より高い）正の細胞表面電荷を含む顆

50

粒球または造血細胞を単離することを含む。例えば、前記細胞を、負に荷電した粒子、ナノプローブもしくはナノ粒子、または陰イオン交換媒体などの負に荷電した手段を使用して単離することができる。そのような技術を使用して、前記実施形態において顆粒球の細胞表面電荷または正の細胞表面電荷を有する顆粒球の濃度を測定することができる。

【0233】

細胞を、負に荷電した、中性に荷電した、または弱く正に荷電した顆粒球または造血細胞から単離することができる。

【0234】

一実施形態では、正または負に荷電した手段（例えば、ナノ粒子）は、蛍光によって検出可能であってもよい。別の実施形態では、正または負に荷電した手段（例えば、ナノ粒子）は、磁気によって捕捉され、かくして、前記手段と相互作用する細胞の単離を可能にしてもよい。

10

【0235】

好適なナノ粒子を、超常磁性酸化鉄（II、III）（ Fe_3O_4 ）ナノ粒子（NP）を、（3-アミノプロピル）トリエトキシシラン（APTES）とコンジュゲートさせて、テトラエチルオルトシリケート（TEOS）および水酸化アンモニウム（ NH_4OH ）との反応時にNPの表面上に二酸化ケイ素（ SiO_2 ）殻の薄層を形成することによって調製することができる。イソチオシアン酸フルオレセイン（FITC）を、 SiO_2 殻中に埋め込み、かくして、 Si に結合したヒドロキシル基（ SiO_2-OH ）を露出させ、負の表面電荷を創出することができる。分枝状ポリ（エチレンイミン）（PEI）分子を使用して、非共有的様式で SiO_2-OH 基を被覆するだけでなく、正電荷を担持するさらなるアミン基を露出させることもできる。

20

【0236】

かくして、一実施形態では、負に荷電したナノ粒子は、 Fe_3O_4 ナノ粒子をAPTESとコンジュゲートさせて、テトラエチルオルトシリケート（TEOS）および水酸化アンモニウム（ NH_4OH ）との反応時にナノ粒子表面上に SiO_2 殻の薄層を形成すること、および SiO_2 殻中にFITCを埋め込むこと、かくして、 SiO_2-OH 基を露出させること（負の表面電荷を創出すること）によって調製される。

【0237】

別の実施形態では、正に荷電したナノ粒子は、負に荷電したナノ粒子（本明細書に記載のもの）と、PEI分子（例えば、正電荷を担持するさらなるアミン基を露出させるため）とを接触させることによって調製される。

30

【0238】

一実施形態では、負に荷電した手段（例えば、ナノ粒子）は、少なくとも -5 mV 、 -10 mV 、 -20 mV 、 -30 mV 、または -40 mV の負の表面電荷を有してもよい。好ましくは、負に荷電した手段（例えば、ナノ粒子）は、少なくとも -35 mV の負の表面電荷を有してもよい。

【0239】

一実施形態では、正に荷電した手段（例えば、ナノ粒子）は、少なくとも $+5\text{ mV}$ 、 $+10\text{ mV}$ 、 $+20\text{ mV}$ 、 $+30\text{ mV}$ 、または $+40\text{ mV}$ の正の表面電荷を有してもよい。好ましくは、正に荷電した手段（例えば、ナノ粒子）は、少なくとも $+35\text{ mV}$ の正の表面電荷を有してもよい。

40

【0240】

前記正または負に荷電した手段（例えば、ナノ粒子）の表面電荷は、正または負に荷電した手段（例えば、ナノ粒子）の表面ゼータ電位を指してもよい。表面ゼータ電位を、動的光散乱粒径分析装置（例えば、Zetasizer Nano-ZS90、Malvern、UK）を用いて測定することができる。

【0241】

細胞表面電荷を使用して、顆粒球（高いがん殺傷活性を有する）および関連する造血細胞を選択することができることは驚くべきことである。60年にわたって、全ての哺乳動

50

物細胞は負に荷電しているということ、およびこれは個体間で同じ細胞型について一貫しているということが支持されてきた。理論によって束縛されることを望むものではないが、本発明者らは、顆粒球は正であるという現在受け入れられている理論が、細胞表面電荷を分析するために使用される技術の限界（例えば、 Na^+ 、 Ca^+ などの可溶性イオンが失われている）から生じていると考えている。本発明者らは、顆粒球上の正電荷を、ヒト好中球において最も豊富なタンパク質であるヒト好中球ペプチド（HNP）によって提供することができると考えている。HNPは、アルギニン、リシン、およびシステインに富む20～40個のアミノ酸を含有し、ペプチドを正に荷電させ、「陽イオンペプチド」と呼ばれる。HNPは、一方の側が疎水性であり、他方の側が親水性かつ正に荷電している、両親媒性の折り畳まれた棒状構造を有する。HNPの主な標的は、がん細胞上の負に荷電した脂質二重層膜であると考えられる。HNPの活性化機構は、ペプチド前駆体中の正電荷を中和する負に荷電したリーダーペプチドの切断である。標的細胞上で、成熟両親媒性HNPは、2つの主なエフェクター作用を発揮する。第1に、HNPは、標的細胞の細胞膜上でバレル様小孔を形成する。単量体HNPの疎水性側は、標的細胞の二重層膜の疎水性部分に対して整列し、一方、HNPの親水性側は、他の同様に整列したHNPと共に親水性小孔を形成する。この孔は、標的がん細胞の膨張および破裂（細胞溶解）を引き起こす。第2に、HNPは、ミトコンドリアを含有する標的細胞の細胞質に進入したら、負に荷電したミトコンドリア外膜に結合し、これを中和することができ、急速なアポトーシスを誘発するための周知の機構であるミトコンドリア膜貫通電位の消失をもたらす。本発明者らは、したがって、より高い正の細胞電荷を有する顆粒球（例えば、好中球）は、より多くのHNPを含有し、したがって、より高いがん殺傷活性を有すると考える。

【0242】

一実施形態では、前記方法によって得られた顆粒球を、がん殺傷アッセイまたは本明細書に記載の方法によって機能的にアッセイすることができる。

【0243】

本明細書に記載の細胞は、細胞培養物（例えば、*in vitro*の細胞培養物）の一部であってもよい。細胞培養物は、複数の異なる細胞型（例えば、造血細胞、または顆粒球とは別の）を含んでもよい。

【0244】

一実施形態では、細胞培養物は、造血細胞の*in vitro*の細胞培養物である。細胞培養物は、少なくとも $2.0 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ （または少なくとも $1.0 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ ）の電気泳動移動度によって規定される表面電位；およびがん細胞を殺傷する能力を特徴とする顆粒球を形成するように分化する造血細胞に関して富化されていてもよい。あるいは、またはさらに、細胞培養物は、少なくとも $1.077 \text{g} / \text{ml}$ の密度；およびがん細胞を殺傷する能力を有する顆粒球を形成するように分化する造血細胞に関して富化されていてもよい。あるいは、またはさらに、細胞培養物は、*cd11b*様受容体の発現もしくは活性；ならびに／またはプログラム細胞死1（PD-1）受容体；*CD115*；*CD224*；*CXCR1*；および／もしくは*CXCR2*の発現の非存在もしくは不活性；ならびにがん細胞を殺傷する能力を有する顆粒球を形成するように分化する造血細胞に関して富化されていてもよい。

【0245】

一実施形態では、用語「造血細胞に関して富化される」とは、本明細書に記載の造血細胞（例えば、本発明の方法によって選択される）が、細胞培養物中に含まれる全造血細胞（好ましくは、全細胞）の少なくとも70%、75%、80%、85%、90%または95%を占めることを意味する。

【0246】

一実施形態では、用語「造血細胞に関して富化される」とは、

(i) 少なくとも $2.0 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ （または少なくとも $1.0 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ ）の電気泳動移動度によって規定される表面電位；または

(ii) 少なくとも $1.077 \text{g} / \text{ml}$ の密度；または

(iii) toll様受容体の発現もしくは活性；ならびに／またはプログラム細胞死1 (PD-1) 受容体；CD115；CD224；CXCR1；および／もしくはCXCR2の発現の非存在もしくは不活性；ならびにがん細胞を殺傷する能力を特徴とする顆粒球を形成するように分化する造血細胞が、細胞培養物中に含まれる全造血細胞（好ましくは、全細胞）の少なくとも70%、75%、80%、85%、90%または95%を占めることを意味する。

【0247】

別の実施形態では、細胞培養物は、顆粒球の*in vitro*の細胞培養物である。前記顆粒球は、本発明の造血細胞を分化させることによって取得可能である。顆粒球の*in vitro*の細胞培養物は、少なくとも $2.0\mu\text{m}\cdot\text{cm}/\text{volt}\cdot\text{sec}$ （または少なくとも $1.0\mu\text{m}\cdot\text{cm}/\text{volt}\cdot\text{sec}$ ）の電気泳動移動度によって規定される表面電位；およびがん細胞を殺傷する能力を有する顆粒球に関して富化されていてもよい。あるいは、またはさらに、細胞培養物は、少なくとも $1.077\text{g}/\text{ml}$ の密度；およびがん細胞を殺傷する能力を有する顆粒球に関して富化されていてもよい。あるいは、またはさらに、細胞培養物は、toll様受容体の発現もしくは活性；ならびに／またはプログラム細胞死1 (PD-1) 受容体；CD115；CD224；CXCR1；および／もしくはCXCR2の発現の非存在もしくは不活性；ならびにがん細胞を殺傷する能力を有する顆粒球に関して富化されていてもよい。

【0248】

一実施形態では、用語「顆粒球に関して富化される」とは、本明細書に記載の顆粒球（例えば、本発明の方法によって選択される）が、細胞培養物中に含まれる全顆粒球（好ましくは、全細胞）の少なくとも70%、75%、80%、85%、90%または95%を占めることを意味する。

【0249】

一実施形態では、用語「顆粒球に関して富化される」とは、

(i) 少なくとも $2.0\mu\text{m}\cdot\text{cm}/\text{volt}\cdot\text{sec}$ （または少なくとも $1.0\mu\text{m}\cdot\text{cm}/\text{volt}\cdot\text{sec}$ ）の電気泳動移動度によって規定される表面電位；または

(ii) 少なくとも $1.077\text{g}/\text{ml}$ の密度；または

(iii) toll様受容体の発現もしくは活性；ならびに／またはプログラム細胞死1 (PD-1) 受容体；CD115；CD224；CXCR1；および／もしくはCXCR2の発現の非存在もしくは不活性；ならびにがん細胞を殺傷する能力を有する顆粒球が、細胞培養物中に含まれる全顆粒球（好ましくは、全細胞）の少なくとも70%、75%、80%、85%、90%または95%を占めることを意味する。

【0250】

本発明の細胞、細胞培養物または医薬組成物を、低温凍結などの1つまたは複数のさらなるプロセッシング工程にかけることができる。さらなるプロセッシング工程は、前記細胞、細胞培養物または医薬組成物と、保存媒体、例えば、低温保存媒体とを混合することを含んでもよい。

【0251】

本発明は、細胞バンクに本発明の細胞、細胞培養物、または医薬組成物を預託することをさらに含んでもよく、かくして、関連する態様では、細胞、細胞培養物または医薬組成物を含む細胞バンクを提供する。本明細書で使用される用語「細胞バンク」とは、細胞の生存にとって好適な条件下で細胞を維持する保存設備を指す。例えば、細胞を、代謝的に休眠状態で保存することができる（例えば、低温凍結される）。好適には、細胞バンク内に含まれる細胞は、適切な回復のために分類される（例えば、血液型、および／またはヒト白血球抗原（HLA）型に基づく）。一実施形態では、細胞を、それ（またはそれから分化した細胞）が殺傷するがんの型に基づいて分類することができる。細胞バンクが顆粒球細胞バンクである場合、前記細胞バンクを、本発明の造血細胞を使用して補充することができる。一部の実施形態では、ドナーから取得された造血細胞または顆粒球を保存した後

10

20

30

40

50

、前記ドナーに投与し（例えば、前記ドナーががんと診断された場合）、かくして、オーダーメイド医療を構成することができる。

【0252】

本発明の細胞または細胞培養物を、その下流の適用（例えば、細胞バンク中での保存、または療法における使用）に基づいて、任意の好適な様式で製剤化することができる。

【0253】

かくして、本発明の一態様は、造血細胞の *in vitro* の細胞培養物もしくはその *in vitro* の細胞培養物、顆粒球もしくはその *in vitro* の細胞培養物、または本発明の医薬組成物を含む細胞バンクを提供する。

【0254】

一実施形態では、本発明の細胞または細胞培養物は、本発明の細胞または細胞培養物と、顆粒球－マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、増殖ホルモン；セロトニン、ビタミンC、ビタミンD、グルタミン（Gln）、アラキドン酸、AGE－アルブミン、インターロイキン、TNF－アルファ、Flt－3リガンド、トロンボポエチン、ウシ胎仔血清（FBS）、またはその組合せを含む医薬組成物として製剤化される。

【0255】

一実施形態では、本発明の細胞または細胞培養物は、本発明の細胞または細胞培養物と、顆粒球－マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、および顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、および増殖ホルモン、およびセロトニン、およびビタミンC、およびビタミンD、およびグルタミン（Gln）、およびアラキドン酸、およびAGE－アルブミン、およびインターロイキン、およびTNF－アルファ、およびFlt－3リガンド、およびトロンボポエチン、およびウシ胎仔血清（FBS）とを含む医薬組成物として製剤化される。

【0256】

一実施形態では、細胞、細胞培養物または医薬組成物は、薬学的に許容される担体と共に製剤化される。本明細書で使用される用語「薬学的に許容される担体」とは、対象（例えば、患者）に損害を引き起こすことなく、静脈内、動脈内、腹腔内、腫瘍内、髄腔内またはその組合せ（好ましくは、静脈内）で前記対象に投与することができる担体を意味する。かくして、一実施形態では、薬学的に許容される担体は、滅菌生理食塩溶液などの注入可能な担体である。

【0257】

本発明は、細胞、細胞培養物、医薬組成物、および医学における使用のためのキットを提供する。例えば、薬剤としての使用のための、本発明の造血細胞、造血細胞の *in vitro* の細胞培養物、顆粒球、顆粒球の *in vitro* の細胞培養物、医薬組成物またはキットが提供される。薬剤は、がんの処置において特に有用である。

【0258】

一実施形態では、がんは、固形腫瘍がんである。用語「固形腫瘍がん」とは、嚢胞または液体包有物を含有しない異常な、組織の悪性の塊を指す。固形腫瘍がんの例としては、癌腫、肉腫、およびリンパ腫が挙げられる。

【0259】

固形腫瘍がんは、癌腫であってもよい。癌腫は、腺癌、基底細胞癌、扁平上皮癌、腺扁平上皮癌、腎細胞癌、非浸潤性乳管癌（DCIS）、浸潤性腺管癌、未分化癌、大細胞癌、小細胞癌またはその組合せのうちの1つまたは複数から選択することができる。癌腫はまた、上皮性新生物、扁平上皮性新生物、扁平上皮癌、基底細胞性新生物、基底細胞癌、移行上皮癌、腺癌（特定不能腺癌（NOS）、形成性胃線維炎、ピポーマ、胆管癌、肝細胞癌NOS、腺様嚢胞癌、腎細胞癌、グラビッツ腫瘍）、皮膚付属器新生物（*adnexal and skin appendage neoplasms*）、粘表皮新生物、嚢胞性、粘液性および漿液性新生物、導管性、小葉性および髄様性新生物、腺房細胞新生物、または複合上皮性新生物から選択することもできる。

【0260】

あるいは、固形腫瘍がんは、肉腫であってもよい。肉腫は、アスキ腫瘍、ブドウ状肉腫、軟骨肉腫、ユーイング肉腫、悪性血管内皮腫、悪性神経鞘腫、骨肉腫、または軟部組織肉腫（胞巣状軟部肉腫、血管肉腫、葉状嚢肉腫、隆起性皮膚線維肉腫（DFSP）、類腱腫、線維形成性小円形細胞腫瘍、類上皮肉腫、骨外性軟骨肉腫、骨外性骨肉腫、線維肉腫、消化管間質腫瘍（GIST）、血管周囲細胞腫、血管肉腫、カボジ肉腫、平滑筋肉腫、脂肪肉腫、リンパ管肉腫、悪性線維性組織球腫、未分化多形肉腫、悪性末梢神経鞘腫（MPNST）、神経線維肉腫、横紋筋肉腫、および滑膜肉腫など）から選択することができる。

【0261】

あるいは、固形腫瘍は、B細胞リンパ腫、T細胞リンパ腫、NK細胞リンパ腫、またはホジキンリンパ腫などのリンパ腫であってもよい。

【0262】

一実施形態では、本発明の造血細胞の *in vitro* の細胞培養物、造血細胞、顆粒球の *in vitro* の細胞培養物、顆粒球、医薬組成物またはキットは、膵がん、肝臓がん、食道がん、胃がん、子宮頸がん、卵巣がん、肺がん、膀胱がん、腎臓がん、脳腫瘍、前立腺がん、骨髄腫のがん、非ホジキンリンパ腫（NHL）、喉頭がん、子宮がん、または乳がんのうちの1つまたは複数の処置における使用のためのものである。

【0263】

好ましくは、本発明の造血細胞の *in vitro* の細胞培養物、造血細胞、顆粒球の *in vitro* の細胞培養物、顆粒球、医薬組成物またはキットは、膵がんの処置における使用のためのものである。膵がんは、膵臓腺癌（例えば、膵管腺癌）などの膵臓固形腫瘍がんであってよい。

【0264】

本明細書における「がん細胞」に対する参照（例えば、「がん細胞を殺傷する能力」の文脈における）は、上記のがんのいずれかのがん細胞を指してもよい。好適には、「がん細胞」は、膵がん細胞などの固形腫瘍がん細胞であってよい。

【0265】

一態様では、本発明は、がんを処置する方法であって、

- a. 本明細書に記載の方法によって顆粒球または造血細胞を取得すること；および
 - b. 前記顆粒球または造血細胞を対象に投与すること
- を含む方法を提供する。

【0266】

一部の実施形態では、造血細胞を、投与前に顆粒球に分化させることができる。

【0267】

一実施形態では、本発明の造血細胞の *in vitro* の細胞培養物、造血細胞、顆粒球の *in vitro* の細胞培養物、顆粒球、医薬組成物またはキットを、対象（例えば、がんを有する対象）に投与する。投与前に、薬剤（例えば、本発明の造血細胞の *in vitro* の細胞培養物、顆粒球の *in vitro* の細胞培養物、または医薬組成物を含む）と、処置しようとする対象とのマッチング工程があってもよい。マッチングは、造血細胞、または顆粒球が誘導されるドナーから誘導されるデータ、および処置しようとする対象から取得された同様のデータに基づくものであってもよい。マッチングを、血液型、ヒト白血球抗原（HLA）型類似性、またはその組合せに基づいて達成することができる。

【0268】

典型的な処置レジメンは、 10^6 、 10^7 、 10^8 もしくは 10^9 個の細胞、または最大で 10^{12} 、 10^{13} もしくは 10^{14} 個の細胞を対象に投与することを含んでもよい。一実施形態では、処置レジメンは、少なくとも 1×10^9 個の細胞の用量を対象に投与することを含む。好適には、処置レジメンは、少なくとも 2×10^9 個の細胞または少なくとも 5×10^9 個の細胞の用量を対象に投与することを含んでもよい。一実施形態では、処置レジメンは、少なくとも 1×10^{10} 個の細胞または少なくとも 5×10^{10} 個の細胞の用量を対象に投与することを含んでもよい。少なくとも 1×10^{11} 個または少なくとも

2×10^{11} 個の細胞を対象に投与してもよい。一部の実施形態では、 $1 \times 10^9 \sim 3 \times 10^{11}$ 個または $1 \times 10^{10} \sim 3 \times 10^{11}$ 個の細胞が対象に投与される。好適には、 $5 \times 10^{10} \sim 2.5 \times 10^{11}$ 個の細胞が対象に投与される。

【0269】

処置のための対象に、週に1回、2回、3回、4回、5回、または6回投与することができる。あるいは、対象に毎日（例えば、1日1回または2回）投与してもよい。他の実施形態では、対象に週に、または2週に1回投与してもよい。好ましくは、投与は毎週である。当業者であれば、対象の必要、および薬剤の効能に基づいて、用量を調整することができることを理解するであろう。例えば、薬剤の効能が高い場合、用量を低下させてもよい。

10

【0270】

一実施形態では、処置のための対象は、少なくとも 2×10^9 個の細胞または少なくとも 2×10^{10} 個の細胞を毎週（例えば、週1回）投与される。好適には、処置のための対象に、少なくとも 1×10^{11} 個または少なくとも 2×10^{11} 個の細胞を毎週投与することができる。

【0271】

処置期間は、処置に対する対象の応答、ならびに／またはがんの型および／もしくは重症度に基づいて変化させることができる。例えば、処置のための対象に、少なくとも1または2週間にわたって投与してもよい。好適には、処置のための対象に、少なくとも3または4週間にわたって投与してもよい。一実施形態では、処置のための対象は、少なくとも5または6週間、好適には、少なくとも7または8週間にわたって投与される。

20

【0272】

一実施形態では、処置のための対象は、4～8週間にわたって、少なくとも 2×10^9 個の細胞を投与され、ここで、前記細胞は、週1回投与される。好適には、処置のための対象は、8週間にわたって、少なくとも 2×10^9 個の細胞（好ましくは、少なくとも 2×10^{10} 個または 2×10^{11} 個の細胞）を投与され、ここで、前記細胞は、週1回投与される。

【0273】

投与は、限定されるものではないが、静脈内注射、動脈内注射、腹腔内注射、腫瘍切除腔への注入、髄腔内注射、またはその組合せなどの、任意の好適な技術または経路によるものであってもよい。好適には、薬剤を、静脈内投与することができる。

30

【0274】

白血球増殖因子を、本発明の薬剤と共に投与することができる。投与は、連続的または同時的（好適には、同時的）であってもよい。好適な白血球増殖因子は、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、増殖ホルモン；セロトニン、ビタミンC、ビタミンD、グルタミン（Gln）、アラキドン酸、AGE-アルブミン、インターロイキン、TNF-アルファ、FLT-3リガンド、トロンプオエチン、ウシ胎仔血清（FBS）、またはその組合せを含んでもよい。好適には、白血球増殖因子は、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、および顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、および増殖ホルモン、およびセロトニン、およびビタミンC、およびビタミンD、およびグルタミン（Gln）、およびアラキドン酸、およびAGE-アルブミン、およびインターロイキン、およびTNF-アルファ、およびFLT-3リガンド、およびトロンプオエチン、およびウシ胎児血清（FBS）を含んでもよい。前記の特定の例としては、限定されるものではないが、LEUKINE（登録商標）ブランドのサルグラモスチム、NEUPOGEN（登録商標）ブランドのフィルグラスチム、およびNEULASTA（登録商標）ブランドの5PEG-フィルグラスチムが挙げられる。

40

【0275】

薬剤が造血細胞（例えば、造血細胞培養物）である場合、薬剤を、顆粒球-コロニー刺激因子；および増殖ホルモン；およびセロトニン；およびインターロイキンと共に投与する（例えば、連続的または同時的、好ましくは、同時的に）ことができる。一実施形態で

50

は、顆粒球前駆細胞（例えば、顆粒球前駆細胞培養物）を、顆粒球ーコロニー刺激因子；および増殖ホルモン；およびセロトニン；およびインターロイキンと共に投与する（例えば、連続的または同時的、好ましくは、同時的に）。

【0276】

本発明はまた、本発明の造血細胞の *in vitro* の細胞培養物、顆粒球、顆粒球の *in vitro* の細胞培養物、または医薬組成物；および医薬におけるその使用のための指示書を含むキットも提供する。好適には、指示書は、前記実施形態のいずれか1つに記載されたがんの処置におけるその使用のためのものであってもよい。一部の実施形態では、指示書はまた、適切な投薬レジメン（例えば、前記実施形態に記載されたような）を詳述する。一実施形態では、指示書は、がん、好ましくは、膀胱がんの処置における前記キットの使用のためのものである。

10

【0277】

別途定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語および科学用語は、本開示が属する技術分野の当業者が一般に理解するのと同じ意味を有する。Singletonら、DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY、第20版、John Wiley and Sons、New York（1994）、およびHale & Marham、THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY、Harper Perennial、NY（1991）は、本開示において使用される多くの用語の一般的な辞書を当業者に提供する。

20

【0278】

本開示は、本明細書に開示される例示的な方法および材料によって限定されず、本明細書に記載のものと類似するか、または等価である任意の方法および材料を、本開示の実施形態の実施または試験において使用することができる。数値範囲は、その範囲を規定する数を含む。

【0279】

本明細書で提供される見出しは、本開示の様々な態様または実施形態の限定ではない。

【0280】

他の用語の定義は、本明細書を通じて出現してもよい。例示的な実施形態をより詳細に説明する前に、本開示が記載される特定の実施形態に限定されず、そのようなものとして変化してもよいことが理解されるべきである。また、本開示の範囲は添付の特許請求の範囲によってのみ限定されるであろうため、本明細書で使用される用語は、特定の実施形態のみを記載するためのものであることも理解されるべきである。

30

【0281】

値の範囲が提供される場合、本文が別途明確に示さない限り、その範囲の上限と下限の間の、下限の単位の小数第2位で四捨五入したもまでの、それぞれの介在する値も、具体的に開示されることが理解される。任意の記述される値または記述される範囲中の介在する値と、その記述される範囲中の任意の他の記述される値または介在する値との間のそれぞれの小さい方の範囲は、本開示内に包含される。これらの小さい方の範囲の上限および下限を、独立に範囲中に含有させるか、またはそれから排除してもよく、小さい方の範囲にいずれかの限界が含まれる、いずれの限界も含まれない、または両方の限界が含まれるそれぞれの範囲も、本開示内に包含され、記述される範囲中の任意の限界が明示的に排除され得る。記述される範囲が一方または両方の限界を含む場合、これらの含まれる限界のいずれかまたは両方を除く範囲も、本開示に含まれる。

40

【0282】

本明細書および添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形「a」、「an」および「the」は、本文が別途明確に記述しない限り、複数の指示対象を含むことに留意しなければならない。かくして、例えば、「造血細胞」に対する参照は、複数のそのような候補薬剤を含み、「造血細胞」に対する参照は、1つまたは複数の造血細胞に対する参照および当業者には公知のその等価物などを含む。

50

【0283】

本明細書で考察される刊行物は単に、本出願の出願日より前にその開示について提供されるものである。本明細書に記載のものは、そのような刊行物が本明細書に添付される特許請求の範囲に対する先行技術であることの承認と解釈されるべきではない。

【0284】

ここで、本発明を、ほんの一例として、以下の図面および実施例を参照して説明する。

【0285】

ここで、本発明の実施形態を、ほんの一例として、添付の図面を参照して説明する。

【図面の簡単な説明】

【0286】

【図1】図1は、異なるドナーに由来する、およびエフェクターの標的細胞に対する様々な比でのドナー由来好中球（DDN）の細胞傷害性の結果（MTTアッセイ）を示す。ドナー間のCKAのレベル差は、より高いエフェクター：標的細胞比で維持される。エフェクター：DDN；標的：HeLa細胞。

【図2】図2は、異なるドナーに由来する、およびエフェクターの標的細胞に対する様々な比での3つのCD34+幹細胞由来好中球集団の細胞傷害性の結果を示す。結果は、異なるドナーに由来する幹細胞由来好中球が示差的なCKAを有することを示す。エフェクター：SCDN；標的：HeLa細胞およびPANC-1（膵がん）。

【図3】図3は、異なるドナーに由来する、およびエフェクターの標的細胞に対する様々な比でのドナー由来好中球（DDN）の細胞傷害性の結果（xCELLigenceアッセイ）を示す。ドナー間のCKAのレベル差は、より高いエフェクター：標的細胞比で維持される。エフェクター：DDN；標的：HeLa細胞。

【図4】図4は、異なるがん細胞型に対する、およびエフェクターの標的細胞に対する様々な比での新鮮なドナー由来好中球の細胞傷害性の結果を示す。結果は、異なるドナーに由来するDDNが示差的なCKAを有し、膵がん細胞に対してより高いCKAを有することを示す。エフェクター：DDN；標的：HeLa細胞（子宮頸がん）およびPANC-1細胞（膵がん）。

【図5】図5は、非がん細胞およびエフェクターの標的細胞に対する様々な比と比較した、がん細胞型に関するドナー由来好中球の選択的細胞傷害性を示す。結果は、がん細胞を殺傷するDDNが、非がん細胞に対する最小限の影響を有することを示し、選択性が確認される。エフェクター：DDN；標的：HeLa細胞（子宮頸がん）およびPANC-1細胞（膵がん）およびMCF-12F（非がん細胞、正常な乳房上皮）。

【図6】図6は、5つの異なる培養物に由来する、およびエフェクターの標的細胞に対する様々な比でのCD34+幹細胞由来好中球集団（臍帯血幹細胞由来）の細胞傷害性の結果を示す。結果は、MTTアッセイを用いて生成され、*ex vivo*で生成された好中球が示差的なCKAを有することを示す。エフェクター：SCDN；標的：HeLa細胞。

【図7】図7は、異なるがん細胞型に対する、およびエフェクターの標的細胞に対する様々な比での3つのCD34+幹細胞由来好中球集団の細胞傷害性の結果を示す。結果は、異なるドナーに由来するSCDNが示差的なCKAを有し、膵がん細胞に対してより高いCKAを有することを示す。エフェクター：SCDN；標的：HeLa細胞（子宮頸がん）およびPANC-1細胞（膵がん）。

【図8】図8は、異なるドナーに由来する、およびエフェクターの標的細胞に対する様々な比での3つのCD34+幹細胞由来好中球集団の細胞傷害性の結果を示す。結果は、異なるドナーに由来する幹細胞由来好中球が示差的なCKAを有することを示す。エフェクター：SCDN；標的：HeLa細胞（子宮頸がん）およびPANC-1細胞（膵がん）。

【図9】図9は、異なるドナー（LC267、LC268、LC269）に由来する、およびエフェクターの標的細胞に対する様々な比での3つのCD34+幹細胞由来好中球集団の細胞傷害性の結果を示す。結果は、異なるドナーに由来する幹細胞由来好中球が選択的細胞傷害性を有することを示す。エフェクター：SCDN；標的：HeLa細胞（子宮頸がん）、PANC-1細胞（膵がん）およびMCF-12F細胞（非がん細胞、正常な乳房上皮）。

10

20

30

40

50

【図10】図10は、異なるドナー（LC252、LC253、LC254）に由来する、およびエフェクターの標的細胞に対する様々な比での3つのCD34+幹細胞由来好中球集団の細胞傷害性の結果を示す。結果は、異なるドナーに由来する幹細胞由来好中球が選択的細胞傷害性を有することを示す。エフェクター：SCDN；標的：HeLa細胞（子宮頸がん）、PANC-1細胞（膵がん）およびMCF-12F細胞（非がん細胞、正常な乳房上皮）。

【図11】図11は、同じドナーに由来する、およびエフェクターの標的細胞に対する様々な比でのドナー由来好中球の細胞傷害性の結果と共に、3つのCD34+幹細胞由来好中球培養物の細胞傷害性の結果を示す。同じドナーに由来するSCDNおよびDDNは、類似するCKAレベルを有する。DDNとSCDNとの類似するCKAの関係は、ドナーLC253について、エフェクターの標的細胞に対する様々な比で維持された。エフェクター：SCDNおよびDDN；標的：HeLa細胞（子宮頸がん）。

10

【図12】図12は、同じドナーに由来する、およびエフェクターの標的細胞に対する様々な比での新鮮なドナー由来好中球の細胞傷害性の結果と共に、3つのCD34+幹細胞由来好中球培養物の細胞傷害性の結果を示す。SCDNおよびDDNは、類似するCKAレベルを有する。DDNとSCDNとの同じCKAの関係は、ドナーLC253について、エフェクターの標的細胞に対する様々な比で維持された。エフェクター：SCDNおよびDDN；標的：HeLa細胞（子宮頸がん）。

【図13】図13は、経時的な自然由来好中球と幹細胞由来好中球との細胞傷害性の比較を示す。より高いCKA（ドナーLC269）が、DDNとSCDNとの間で維持される。エフェクター：SCDNおよびDDN（3つの異なるSCDNおよびDDN培養物）；標的：HeLa細胞（子宮頸がん）。

20

【発明を実施するための形態】

【実施例】

【0287】

実施例1

ドナーの採用

ドナーは、実施例2に記載されるCKAアッセイにおいて高レベルのがん殺傷活性（CKA）を示す好中球を有する確率に基づいて予備選択される。予備選択基準は、

- ・同意書に提供または試料採取に影響する重篤な医学的または精神状態にないこと；
 - ・療法のために標的化されるがんの既往歴または家族歴がないこと；
 - ・試料採取日以前の3ヶ月間に化学療法または放射線療法の履歴がないこと；
 - ・18～24歳の年齢であること；
 - ・任意選択により、男性であること（理論によって束縛されることを望むものではないが、男性由来好中球は、CKAアッセイにおいて試験した場合、最も高いレベルのCKAを示すと考えられる）；および
 - ・任意選択により、血液型OまたはRh-であること
- を含む。

30

【0288】

白血球（WBC）を、ドナーから約18mlのヒト血液を引き出すことによって収集する。血液を3つのBD Vacutainer（商標）CPTチューブに分割し、23℃で35分間、175xgで遠心分離する。単核細胞（MN）層を収集し、15mlの円錐チューブに移す。MN細胞を23℃で5分間、420xgで遠心分離し、10mlのDulbecco改変Eagle培地（DMEM）（Invitrogen、Carlsbad、CA）+10%ウシ胎仔血清（FBS）（Sigma.St. Louis、MO）で洗浄する。細胞を計数し、 1.6×10^6 細胞/mlの最終濃度となるように培地中に再懸濁する。

40

【0289】

実施例2

CKAアッセイにおける抽出された顆粒球のCKAの試験

細胞を、T25フラスコ中のDMEM+10%FBS中で80%の集密度になるまで培

50

養する。細胞株を、 75 cm^2 細胞培養フラスコ中の、以下の成分：10%体積／体積のFBS、ペニシリン（Sigma.St. Louis、MO）、ストレプトマイシン（Sigma.St. Louis、MO）、およびL-グルタミン補給物（Sigma.St. Louis、MO）を添加したDMEM中、 37°C 、8% CO_2 で増殖させ、維持する。培養された膵がん細胞（例えば、American Type Culture Collection - United Kingdom (U.K.)、Guernsey、Ireland、Jersey and Liechtenstein、LGC Standards、Queens Road、Teddington、Middlesex TW11 0LY、UKから商業的に入手可能なCapan-2、ATCC HTB-80；Panc 10.05、ATCC CRL-2547；CFPAC-1、ATCC CRL-1918；HPAF-II、ATCC CRL-1997；SW 1990、ATCC CRL-2172；BxPC-3、ATCC CRL-1687；AsPC-1、ATCC CRL-1682；ATCC（登録商標）TCP-1026（商標）；SW1990、ATCC CRL-2172；SU.86.86、ATCC CRL-1837；BxPC-3、ATCC CRL-1687；Panc 10.05、ATCC CRL-2547；MIA-PaCa-2、ATCC CRL-1420；PANC-1、ATCC CRL-1469；またはATCC（登録商標）TCP-2060（商標））を分割し、培養フラスコ中で70%の表面集密度に達するまで継代する。

【0290】

細胞をトリプシン処理し、回収し、Trypan Blueを用いて計数する。アッセイプレート（24ウェル）に、24ウェル平底プレート中、ウェルあたり 8×10^4 個の膵がん細胞（例えば、膵管腺癌細胞）を播種する。プレートを、5% CO_2 中、 37°C で24時間インキュベートする。細胞を、 $2.5\text{ }\mu\text{M}$ のCell Tracker（商標）Greenを用いて45分間標識する。新鮮な培地を細胞に添加し、それらを CO_2 インキュベータに戻す。

【0291】

$500\text{ }\mu\text{L}$ のMN細胞懸濁液（ 8×10^5 個の顆粒球）を、膵がん細胞を24時間増殖させた各ウェルに添加することによって、CKAアッセイを実行する。細胞を混合し、 39°C で24時間、5% CO_2 中のインキュベータに入れる。24時間のインキュベーション後、トリプシン処理によって細胞を回収し、遠心分離する。細胞を、 $100\text{ }\mu\text{L}$ の冷リン酸緩衝生理食塩水（PBS）中に再懸濁した後、 $125\text{ }\mu\text{L}$ の0.4%Trypan Blueを添加する。細胞を、顕微鏡下で計数する（位相差顕微鏡および蛍光顕微鏡を使用する）。

【0292】

このアッセイにおいて少なくとも70%または少なくとも80%のがん細胞を殺傷することができる（すなわち、それぞれ、少なくとも70%のCKAまたは80%のCKAを有する）顆粒球（例えば、好中球）は、がんの処置における使用にとって特に好適であると考えられる。

【0293】

実施例3

造血細胞および好中球の表面電位の試験

電気泳動を使用して、電気泳動移動度を測定することによって造血細胞（例えば、造血幹細胞、および／または前駆細胞）および好中球における表面電位の変化を調査する。機械的剥離および培養基質からの収集によって、懸濁した細胞を培養物から収集する。収集された細胞を、 10 mM Tris-HClおよび 291 mM グルコースを含有する電気泳動緩衝溶液中に再分配し、方形ガラス電気泳動チャンバー中に導入する。電気泳動チャンバーにわたって200VのDCを印加する。CCDカメラを備えた顕微鏡下で、3mAで、細胞が固定した長さを通過するのに必要な時間を記録することによって、細胞の電気泳動速度、 u を測定する。電気泳動移動度、 μ は、 $\mu = u g S / I$ （式中、 g は媒体の電導度であり、 S は電気泳動チャンバーの断面積であり、 I は電流である）によって算出される。それぞれの条件について、典型的には、少なくとも9回の読取りを行って、細胞の電気泳動移動度を算出する。

【0294】

実施例4

末梢血からの造血幹細胞の抽出

同意を与える際に、ドナーは、ドナーに対してあり得る不快感を最小限にしながら、末梢造血幹細胞を回収するのを助けるために、顆粒球-コロニー刺激因子（G-CSF）および／または顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、例えば、Neupogen（登録商標）（Amgen Inc. USAから商業的に入手可能）を与えられる。長期に持続する多能性幹細胞を同定するために、細胞表面ポリペプチドマーカ―を使用する。好適には、マーカ―は、CD34⁺、CD59⁺、Thy1⁺、CD38^{low}／⁻、C-kit⁻／^{low}、およびlin⁻を含んでもよい。

【0295】

実施例5

造血細胞の拡張および分化

造血細胞（例えば、造血幹細胞）を、上清増殖因子懸濁液を使用して刺激して、より多くの幹細胞を発生させるか、または前駆細胞（例えば、骨髄性もしくは顆粒球前駆細胞）または顆粒球に分化させる。好適な好中球合成法は、Lieberら、Blood、2004 Feb 1；103（3）：852-9およびChoiら、Nat. Protoc.、2011 Mar；6（3）：296-313に開示されている。

【0296】

プロトコルは、4つの主な段階：

- ・造血細胞の培養および増殖；
- ・高用量の顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、ヒト成長ホルモン（HGH）；セロトニン、ビタミンC、ビタミンD、グルタミン（Gln）、アラキドン酸、AGE-アルブミン、インターロイキン-3（IL-3）、インターロイキン-8（IL-8）、インターロイキン-4（IL-4）、インターロイキン-6（IL-6）、インターロイキン-18（IL-18）、TNF-アルファ、Flt-3リガンド、トロンボポエチン、ウシ胎仔血清（FBS）、またはその組合せを用いた多能性骨髄性前駆細胞の短期的拡張；ならびに
- ・骨髄性前駆細胞の、好中球、好酸球、樹状細胞（DC）、ランゲルハンス細胞（LC）、マクロファージおよび破骨細胞への指向性分化から構成される。

【0297】

実施例6

細胞バンクの調製

造血幹細胞、それから取得可能な顆粒球前駆細胞および顆粒球を、低温凍結し、適切な細胞バンク中で保存する。

【0298】

実施例7

固形腫瘍の処置のための患者における使用

保存された造血細胞（例えば、造血幹細胞またはそれから取得可能な顆粒球前駆細胞）、およびそれから分化した顆粒球（例えば、好中球）を、患者のがんの型、血液型（ABO、rhおよびHLA）、および／または遺伝学に基づいて、がん患者とマッチングする。また、患者を、ヒト白血球抗原（HLA）類似性に基づいてマッチングしてもよい。

【0299】

患者を、以下を使用して処置する：

- ・患者への、顆粒球-コロニー刺激因子、ヒト成長ホルモン、セロトニン、およびインターロイキンと一緒に造血細胞（造血幹細胞、および顆粒球前駆細胞を含む）のIV輸注；または
- ・患者への、刺激された顆粒球前駆細胞（造血幹細胞から取得可能）のIV輸注。理論によって束縛されることを望むものではないが、前記細胞は、in vivoでのCKAアッセイにおいて高いCKAを有する顆粒球（例えば、好中球）に自然に分化すると考えられる；または
- ・造血細胞（例えば、造血幹細胞）から分化したCKAアッセイにおいて高いCKAを

10

20

30

40

50

有する顆粒球（例えば、好中球）の直接 I V 輸注。

【0300】

典型的には、細胞に、週あたり投与される 2×10^{11} の細胞容量を 8 週間にわたって週 1 回輸注する。療法の進行をモニタリングし、それに応じて投薬を適合させる。

【0301】

実施例 8

膵がんを有する患者の処置

メアリーは、69 歳で転移性膵管腺癌（PDAC）と診断される。外科手術は最早選択肢になく（切除不能）、ゲムシタピンは疾患進行の防止には不十分であり、アブラキサンまたはフォルフィリノックスは、彼女に残された時間を家族と共に楽しむことをできなくさせるであろう副作用のため、彼女の腫瘍学者の推奨によると適切ではない。メアリーの予後は、3～6 ヶ月の生存であり、彼女が、近々生まれると期待されるその孫を見るのに十分なほど長く生きるのは絶望的である。

【0302】

メアリーは、白血球輸注療法（LIFT）を試すよう勧められる。療法の潜在的な好適性を評価するために、病院はメアリーから 20 ml の血液を抽出し、それを、がん殺傷活性アッセイを使用する分析に送り、このアッセイは、彼女の顆粒球の膵がん殺傷活性が 5 % 未満であると同定する。そのような低い読取り値は、彼女の体内の顆粒球の効能が改善されない場合、彼女を殺すであろう彼女のがんを撃退する彼女自身の自然免疫系の不十分性を示す。

【0303】

メアリーの患者ノートおよびアッセイ結果を、好適ながん殺傷顆粒球マッチを見出すために使用する。メアリーの血液型は A 型である。メアリーのプロファイルを、細胞バンクのための細胞データベースを使用して処理し、好適な顆粒球（低温凍結前に、実施例 2 のがん殺傷活性アッセイにおいて 70～90 % のがん殺傷活性（CKA）を示す）を同定する。顆粒球の低温凍結は、CKA の保持に役立ち、したがって、細胞を、さらに試験することなく病院（The Royal Marsden）に直接送付することができる。メアリーは、彼女の最初の処置のためにその週に訪問する予定である。病院は、細胞を適切に保存する。メアリーは、厳重な管理の下、12 月 13 日に CKA を有する 2×10^9 個の顆粒球の 1 回目の輸注を受ける。メアリーは、3 日後に病院に戻るよう勧められ、そこで彼女は超音波走査を受け、有意な腫瘍溶解を示し、腫瘍溶解症候群の兆候を示さない。医療チームは、顆粒球用量が 2×10^{11} に達するまで、3 回の連続する処置セッションにわたって、それを徐々に増加させることを決定する。

【0304】

超音波を、1 月 17 日に実行する；4 回の処置の 4 週間の過程の 1 週後に完了し、完全な腫瘍破壊および瘢痕組織への変換を観察し、良好な治癒が起こる。i) 生検と並行して、メアリーの血液中の転移性がん細胞の存在を評価するため（がんの完全な消失を確認するため）；および ii) メアリーの顆粒球のがん殺傷活性を試験するため（寛解のリスクを示すため）に、メアリーの血液 20 ml を採取する。メアリーは、最初は毎月、次いで、6 ヶ月毎に定期検査を受ける。

【0305】

2 年後、新しい腫瘍がメアリーの膵臓に発見される。彼女の主治医は、放射線療法を用いて腫瘍を処置し、単回高用量の LIFT を投与して、血液中に存在し得る全てのがん細胞が確実に破壊されるようにする。メアリーは、彼女とその家族が取り戻した人生を楽しみ、彼女は成長を見る機会を得る。

【0306】

療法の後、細胞バンクからの造血細胞（例えば、造血幹細胞）を刺激してより多くの顆粒球（実施例 2 のアッセイを使用して試験した場合に所望の CKA を有する）を産生させ、ストックを補充する。かくして、類似する患者状況のために必要な顆粒球の十分なストックが確保される。

【0307】

実施例9

MTT「CKAアッセイ」

MTT (3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド) は、黄色のテトラゾールであり、正に荷電し、生きている真核細胞に容易に浸透する。活発な代謝を示す生細胞は、NAD(P)H依存的オキシドリダクターゼミトコンドリア酵素により、MTTを、紫色のホルマザン生成物(1-(E,Z)-5-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-1,3-ジフェニルホルマザン)に変換し、570nm近くの最大吸光度を示す。細胞が死ぬとき、それらはMTTをホルマザンに変換する能力を失い、かくして、色の形成は生細胞のみの有用かつ便利なマーカーとして役立つ。可溶化溶液を添加して、不溶性の紫色のホルマザン生成物を、着色溶液中に溶解する。この着色溶液の吸光度を、分光光度計によって570nmの波長で測定することによって定量することができる。690nmの参照波長の吸光を、570nm波長の吸光から差し引く。したがって、MTTアッセイを使用して、がん殺傷活性(CKA)、つまり、がん細胞に対する細胞傷害性を決定するための方法としてどれぐらい多くの生細胞が残存するかを測定した。

10

【0308】

HeLa標的細胞を調製するための方法

1日目:

- 1) HeLa細胞(頑強型の子宮頸がん細胞)を培養し、それらが対数増殖期に達した時に回収した。
- 2) 10000個のHeLa細胞(標的細胞)を、最終容量100μLで96ウェル平底プレートの各ウェルに添加した。
- 3) 標的細胞を静置して一晚接着させた後、白血球(エフェクター細胞)を添加し、全ての実験条件を3組設定した。

20

【0309】

2日目:

- 4) エフェクター細胞を、様々な比(例えば、1:1、5:1、10:1、50:1のエフェクターの標的細胞に対する比)で標的細胞に添加した。
- 5) 細胞を静置して37℃で16~24時間インキュベートした。
- 6) 標的細胞のみ、およびTriton Xの存在下の標的細胞も、それぞれ、0%および100%の細胞傷害性に関する対照として3組播種した。

30

【0310】

所望のインキュベーション時間の後:

- 1) ウェルをPBSで2回洗浄して、エフェクター細胞および死滅した標的細胞を除去した。
- 2) 培養培地を用いてキット溶液を10倍に溶解することにより、MTT溶液を調製した、すなわち、100ウェルあたり、1000μL(1mL)のMTTストック(キット中に提供される)を取り、9000μL(9mL)の培養培地(RPMI-1640)を添加した。
- 3) ウェルあたり100μLの工程2で調製されたMTT溶液を添加した。
- 4) これを4時間インキュベートした。
- 5) MTT溶液を全てのウェルから除去し、100μL/ウェルの溶媒を添加した(キット中に提供される)。
- 6) 必要となった場合にピペティングによってホルマザン結晶を溶解し、プレートを570および690nmで読み取った。690nmで測定したバックグラウンド吸光度を、570nmで測定した吸光度から差し引いた。

40

【0311】

ドナー好中球における可変的CKAの証明

匿名の血液ドナーに由来する白血球コーンを選択し、好中球を、Ficol-Hypaque分離(Oh H, Siano B, Diamond S. Neutrophil Isolation Protocol. Journal

50

of Visualized Experiments: JoVE. 2008; (17) 745) によって単離した。これらの好中球を、1 : 1 および 5 : 1 のエフェクターの標的細胞に対する比で上記の M T T アッセイにおいて使用した。

【0312】

図1は、異なるドナーに関して M T T によって記録された細胞傷害性パーセンテージを示す。1 : 1 と 5 : 1 の比でドナー間に差異がある。結論として、M T T アッセイは、異なるドナーに由来する好中球間での C K A における差異を証明することができる。

【0313】

実施例10

幹細胞由来好中球の C K A の証明

CD34+ 幹細胞に由来する好中球の培養

本発明者らは、Timmins NE、Palfreyman E、Marturana F、Dietmair S、Luikenga S、Lopez Gら、Clinical scale ex vivo manufacture of neutrophils from hematopoietic progenitor cells. Biotechnology and bioengineering. 2009;104(4):832-40によって記載されたプロトコルを使用して、CD34タンパク質を発現する臍帯血由来幹細胞に由来する好中球を培養した。

【0314】

得られた培養物を、蛍光活性化細胞選別 (FACS) によって CD11b+ および CD15 マーカーを使用して好中球含量について試験した。本発明者らはまた、ニトロブルーテトラゾリウム (NBT) アッセイ (Sigma-Aldrichから商業的に入手可能なキットおよびプロトコル、カタログ番号840W-1KT) の使用により、活性酸素種 (ROS) の産生、より具体的には、スーパーオキシドアニオン (O_2^-) の産生も測定した。

【0315】

ROS 活性の差異が幹細胞由来好中球の年齢に基づいて見出されたため (データは示されない)、本発明者らは、一貫性/同等性について同じ日に3つの幹細胞バッチを数えた。CD11b+ および CD15+ 細胞の割合の F A C S 由来計数の結果を、表1に列挙する。

【0316】

【表1】

表1:CD11b+/CD15+陽性好中球のパーセンテージ

2017 年 9 月 26 日の FACS	CD11b+ CD15+ (全細胞の%)	CD34+ (全細胞の%)
CD34+ 14.09.2017 batch 008A (培養物中で12日間)	77.8	4.45
CD34+ 14.09.2017 batch 709A (培養物中で12日間)	76.0	5.1
CD34+ 14.09.2017 915 (培養物中で12日間)	69.2	10.0

【0317】

CD34+ 由来好中球の C K A の証明

幹細胞由来好中球 (バッチ008A、709Aおよび915) を、HeLa 標的細胞を使用する C K A M T T アッセイにおいてエフェクター細胞として使用した (実施例9を参照)。エフェクターの標的細胞に対する比は、CD11b+ / CD15+ に基づく。結果を図2にまとめるが、これは、CD34+ 幹細胞由来好中球が、HeLa細胞の C K A アッセイ

において細胞傷害性を示すこと、およびその結果が異なるドナー間で異なるということを示す。バッチ008Aは、他のバッチと同時に調製され、同じように培養されるにもかかわらず、10:1までのエフェクターの標的に対する比でバッチ915および709Aよりも一貫して低い細胞傷害性を示す。

【0318】

この結果は、異なるドナーに由来する幹細胞を、a) がん殺傷能力を示す好中球を産生するように *in vitro* で分化させることができること、およびb) このがん殺傷活性が供給源ドナーによって異なることを示す。

【0319】

この結果は、自然免疫系によるがん殺傷活性 (CKA) が個体によって異なり、白血球コーンによりドナーから直接採取した好中球において見られるのと同じCKAの先天的変動が、ドナーの幹細胞中にも認められるという事実を支持する。自然免疫系の高いがん殺傷活性が示されたドナーを選択し、*ex vivo* での拡張および分化のためにその造血細胞 (すなわち、造血幹細胞) を使用することにより、がんの処置において使用するための高いがん殺傷活性を示す白血球を含む細胞バンクを創出することができる。

【0320】

実施例11

xCELLigence「CKAアッセイ」

ACEA Biosciences xCELLigence RTCA DP Analyzerシステム (登録商標) を使用し、製造業者の指示書に従った。xCELLigence Systemは、電気インピーダンスを測定することによって連続的に細胞表現型の変化を、標識を使用せずに動的にモニタリングすることができるリアルタイム細胞分析装置である。このシステムは、組織培養Eプレートの各ウェルの底部に組み込まれた互いに咬合する金微小電極を使用してインピーダンスを測定する。インピーダンス測定値は、Cell Index (CI) 値として表示され、生存能力を含む、細胞の生物学的状態に関する定量的情報を提供する。細胞生存能力のインピーダンスに基づくモニタリングは、細胞数およびMTTに基づく読出し値と相関する。インピーダンスに基づく細胞生存能力の測定値の動的態様は、好中球を使用して細胞傷害効果を誘導する場合に必要な時間的情報を提供する。特に、xCELLigence Systemはまた、細胞傷害および細胞死アッセイにおいて、最も低いCI値によって示される、好中球がその最大効果を達成する場合 (そのようなデータが望まれる場合) の最適な時点を正確に示すこともできる。典型的には、6,000個のがん細胞 (HeLaもしくはPANC-1) または健康な、非がん性細胞 (MCF-12F) を、16ウェルプレートの底部に入れる (システムは、最大3個のプレートを同時に読み取ることができる)。細胞をウェルに添加した最初の数時間については、インピーダンスが急速に増大する。これは、懸濁液から落下し、電極上に沈着し、接着斑を形成する細胞によって引き起こされる。添加される細胞の初期数が低く、ウェルの底部に空の空間がある場合、細胞は増殖し、CIの徐々にであるが、安定的な増大を引き起こすであろう。細胞が集密に達した時、CI値は、バルク媒体に接近できる電極表面積が最早変化しないという事実を反映して、プラトーに達する。「正規化点」と呼ばれるこの点で、好中球を添加する (典型的には、変化するエフェクター: 標的比で)。細胞溶解のパーセンテージは、簡単な式: 細胞溶解のパーセンテージ = $\left(\frac{\text{細胞指数エフェクターなし} - \text{細胞指数エフェクターあり}}{\text{細胞指数エフェクターなし}} \right) \times 100$ を使用して容易に算出される。

【0321】

典型的には、アッセイを最大70時間実行し、実施例12~20に提示される結果を生成するのに使用した。実施例12~19に提示される結果は、それぞれの細胞型についてアッセイ中に達成された最大細胞溶解%である。

【0322】

図3~13に示される比は、エフェクター (例えば、好中球) の標的 (例えば、がん細胞) に対する比である。典型的には、5:1または10:1の好中球のがん細胞に対する

10

20

30

40

50

比を使用した。

【0323】

実施例12

ドナー由来好中球における可変的CKAの証明

図3は、異なるドナーに関してxCeLLigenceアッセイによって記録された最大細胞傷害性パーセンテージを示す。このアッセイはまた、1:1と5:1の比（好中球のHeLa細胞に対する比）でのドナー間の差異を示す。結論として、xCeLLigenceアッセイも、異なるドナーに由来する好中球間でのCKAの差異を証明することができ、これが、顆粒球のがん細胞に対する様々な比にわたって一貫していたことを証明することができる。

【0324】

このアッセイを、最大40時間にわたって行った。

【0325】

実施例13

異なるがん細胞型上でのドナー由来好中球のCKAの証明

5人の異なるドナーから単離された好中球を、HeLa細胞（子宮頸がん）とPANC-1細胞（膵がん）の両方に対するCKAについて試験した。

【0326】

図4は、それぞれのがん細胞型に対する、および異なるドナーに関するCKAアッセイ（xCeLLigenceアッセイ）により記録された最大細胞傷害性パーセンテージを示す。膵がん細胞に対する細胞傷害性パーセンテージは、より高く、膵がんが典型的には、処置が最も難しいがんの1つであることを考えれば、驚くべきことであった。再度、異なるドナーに由来するドナー由来好中球（DDN）は、示差的なCKAを有することが示された。

【0327】

実施例14

がん細胞に対するドナー由来好中球のCKAの選択性の証明

5人の異なるドナーから単離された好中球を、HeLa細胞（子宮頸がん）、PANC-1細胞（膵がん）ならびに非がんMCF-12F細胞（正常乳房上皮細胞）の両方に対するCKAについて試験した。

【0328】

図5は、HeLaおよびPANC-1がん細胞株と、MCF-12F非がん細胞株に対する各ドナーに由来する好中球に関するCKAアッセイ（xCeLLigenceアッセイ）により記録された最大細胞傷害性パーセンテージを示す。有利なことに、DDNは、がん細胞について高度に選択的であり、非がん細胞に対しては最小限の影響を示した。

【0329】

実施例15

CD34+幹細胞に由来する好中球の培養

臍帯血由来幹細胞に由来する好中球を培養したさらなる結果を、好中球を臍帯血から単離されたCD34+造血幹細胞から生成することができることを示す、表2に提示する。CD34+は、造血幹細胞マーカーである。CD11bおよびCD15は、成熟好中球マーカーである。

【0330】

【表2】

表2:CD11b+/CD15+陽性好中球のパーセンテージ

	培養物中 での日数	FACSの結果		培養物中 での日数	FACSの結果	
		CD34+	CD11b+/CD15+		CD34+	CD11b+/CD15+
バッチ1	14	1.32%	61%	18	0.94%	74.3%
バッチ2	8	4.21%	40.3%	12	3%	60.3%

10

20

30

40

50

【0331】

実施例16

CD34+幹細胞由来好中球（SCDN）のCKAの証明

結果は、CD34+幹細胞由来好中球のさらなる集団を用いるxCeLLigenceアッセイによって得られ（図6）、上記のMTTアッセイによって得られた結果と一致していた。SCDN（ex vivoで生成された）は再度、示差的なCKAを有することが示され、培養物5は低いCKAの好中球を示し、培養物1は高いCKAの好中球を示した。

【0332】

実施例17

異なるがん細胞型上での幹細胞由来好中球のCKAの証明

3人の異なるドナーから単離されたCD34+幹細胞由来好中球を、HeLa細胞（子宮頸がん）とPANC-1細胞（膵がん）の両方に対するCKAについて試験した。

【0333】

図7は、それぞれのがん細胞型に対する、ならびにドナーLC267、LC268およびLC269に関するCKAアッセイ（xCeLLigenceアッセイ）により記録された最大細胞傷害性パーセンテージを示す。DDNについて得られた結果と同様（実施例14を参照）、膵がんに対する細胞傷害性パーセンテージは、HeLa細胞について観察されたものよりも高かった（5:1と10:1の両方の、エフェクターの標的細胞に対する比で）。異なるドナーに由来するSCDNも、示差的なCKAを有することが示された。このアッセイを、最大45時間にわたって行った。

【0334】

同様の結果が、ドナーLC252、LC253およびLC254から得られたSCDNについても得られた（図8）。

【0335】

実施例18

がん細胞に対する幹細胞由来好中球のCKAの選択性の証明

3人の異なるドナーのCD34+幹細胞に由来する好中球を、HeLa細胞（子宮頸がん）、PANC-1細胞（膵がん）ならびに非がんMCF-12F細胞（正常乳房上皮細胞）の両方に対するCKAについて試験した。

【0336】

図9は、ドナーLC267、LC268およびLC269に関するそれぞれのがん細胞型および非がん細胞型に対するCKAアッセイ（xCeLLigenceアッセイー最大45時間にわたって行った）により記録された最大細胞傷害性パーセンテージを示す。有利なことに、SCDNは、がん細胞について高度に選択的であり、非がん細胞に対しては最小限の影響を示した。同じドナーに由来するDDNを示す図3と同様、ドナーLC269に由来するSCDNが、最も高いCKAを有し、LC268は2番目であり、LC267は最も低いCKAを示した。かくして、CKAはエピジェネティックに定義される形質というよりもむしろ、遺伝的に定義されると結論付けることができる。

【0337】

同様の結果が、ドナーLC252、LC253およびLC254のSCDNについても得られた（図10）。

【0338】

実施例19

好中球のCKAが遺伝的にコードされることの証明

3人の異なるドナーから単離された好中球（DDN）、ならびに同じドナーのCD34+幹細胞に由来するSCDNを、CKAについて試験した。

【0339】

図11は、DDNおよびSCDNに関するドナーLC252、LC253およびLC254のHeLa細胞に対するCKAアッセイ（xCeLLigenceアッセイー最大50時間にわたって行った）により記録された最大細胞傷害性パーセンテージを示す。驚くべきことに

10

20

30

40

50

、SCDNは、同じドナーに由来するDDNのものと同様に高いCKAを示したが、これは再度、CKAが遺伝子レベルでコードされることを示している。図10と同様、ドナーLC253は最も高いCKAを有する好中球（およびSCDN）を提供したが、ドナーLC252およびLC254は、より低いCKAを有する好中球（およびSCDN）を提供した。

【0340】

これは、高いCKAを有する好中球（例えば、DDN）を有することがわかったドナーを、同様に高いCKAを有する好中球（例えば、SCDN）に分化させることができるCD34+幹細胞の供給源として使用することもできることを示す。

【0341】

同様の結果が、ドナーLC267、LC268およびLC269のSCDNについても得られた（図12－最大45時間にわたって行った）。

【0342】

実施例20

SCDNがDDNよりも迅速にがん細胞を殺傷することの証明

ドナーLC267、LC268、およびLC269のSCDNおよびDDNのCKAを、最大45時間の期間で決定した。このアッセイを、実施例11に従って行った。

【0343】

驚くべきことに、結果（図13）は、SCDNが同じドナーに由来するDDNよりも迅速にがん細胞を殺傷することを示す。ドナーLC269のSCDNは、特に迅速ながん殺傷効能を示し、約18時間で約50%のがん細胞を殺傷し（DDNについての35%と比較して）、SCDNの最大半量殺傷は10時間以内に起こった（DDNについてはこの時点で無視できるほどの殺傷であったのと比較して）。

【0344】

実施例21

高密度好中球の単離

10mlのヘパリン処理した（20U/ml）ヒト血液を、塩水中の等量の3%デキストランT500と混合し、室温で30分間インキュベートして、赤血球を沈降させる。10mlのスクロース1.077g/mlを用いて50mlの円錐ポリプロピレンチューブを調製し、1.077g/mlのスクロース層の頂部に白血球に富む上清をゆっくりと層化させた後、ブレーキを使用せずに室温で30分間、400xgで遠心分離する。高密度好中球（HDN）がペレット中に出現する。低密度好中球（LDN）は、1.077g/mlのスクロース層と血漿との間の境界面に単球およびリンパ球と共に同時精製される。

【0345】

HDNを、本明細書に記載のCKAアッセイにおいて試験することができる。造血細胞は、HDNを有するドナーから好適に取得される。

【0346】

実施例22

人工多能性幹細胞（iPSC）の高いCKAを有する好中球への分化

高いCKAを有する好中球を含むドナーを同定する。体細胞（例えば、線維芽細胞）をドナーから単離し、iPSCの培養物を確立するために使用する。iPSCを、例えば、Sweeney CL、Merling RK、Choi U、Priel DB、Kuhns DB、Wang HおよびMalech HL、Generation of functionally mature neutrophils from induced pluripotent stem cells. Neutrophil Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology. 2014; 1124: 189-206、およびSweeneyら（2016）、Stem Cells、34（6）、1513-1526（その教示は参照により本明細書に組み込まれる）によって記載されたプロトコールを使用して、成熟好中球に分化させる。

10

20

30

40

50

【0347】

得られる成熟好中球は、同じドナーに由来するHSCに由来するDDNおよびSCDNのものと類似するCKAレベルを有することが示される（MTTアッセイとxCELLigenceアッセイの両方によって試験される場合）。

【0348】

続いて、成熟好中球を、iPSCが元々誘導された、いかなる免疫応答も誘発しないドナーに注入する。

【0349】

上記の明細書に記載された全ての刊行物は、参照により本明細書に組み込まれる。本発明の記載された方法およびシステムの様々な改変および変更が、本発明の範囲および精神から逸脱することなく、当業者には明らかとなるであろう。本発明を特定の好ましい実施形態と関連して記載してきたが、特許請求される発明がそのような特定の実施形態に不当に限定されるべきではないことが理解されるべきである。実際、本発明を実行するための記載された様式の様々な改変は、生化学およびバイオテクノロジーまたは関連する分野の当業者には自明であり、以下の特許請求の範囲内にあることが意図される。

【0350】

節

1. a. 少なくとも $1.0\text{ }\mu\text{m}\cdot\text{cm}/\text{volt}\cdot\text{sec}$ の電気泳動移動度によって規定される表面電位；および
b. がん細胞を殺傷する能力
を特徴とする顆粒球を形成するように分化する造血細胞の*in vitro*の細胞培養物。

【0351】

2. a. 少なくとも $1.077\text{ g}/\text{ml}$ の密度；および
b. がん細胞を殺傷する能力
を特徴とする顆粒球を形成するように分化する造血細胞の*in vitro*の細胞培養物。

【0352】

3. a. toll様受容体の発現もしくは活性；ならびに／またはプログラム細胞死1（PD-1）受容体；CD115；CD224；CXCR1；および／もしくはCXCR2の発現の非存在もしくは不活性；ならびに
b. がん細胞を殺傷する能力
を特徴とする顆粒球を形成するように分化する造血細胞の*in vitro*の細胞培養物。

【0353】

4. 造血細胞が、
a. 少なくとも $1.077\text{ g}/\text{ml}$ の密度；ならびに／または
b. toll様受容体の発現もしくは活性；ならびに／またはプログラム細胞死1（PD-1）受容体；CD115；CD224；CXCR1；および／もしくはCXCR2の発現の非存在もしくは不活性
をさらに特徴とする顆粒球を形成するように分化する、節1に記載の*in vitro*の細胞培養物。

【0354】

5. 顆粒球が、toll様受容体の発現もしくは活性；ならびにプログラム細胞死1（PD-1）受容体；CD115；CD224；CXCR1；およびCXCR2の発現の非存在もしくは不活性を特徴とする、節3または4に記載の*in vitro*の細胞培養物。

【0355】

6. 細胞培養物が造血細胞について富化される、節1～5のいずれか1つに記載の*in vitro*の細胞培養物。

【0356】

7. *in vitro*の細胞培養物中の少なくとも70%の細胞が造血細胞である、節1～6のいずれか1つに記載の*in vitro*の細胞培養物。

【0357】

8. 造血細胞がドナー、好ましくは、ヒトドナーから取得可能である、節1～7のいずれか1つに記載の *in vitro* の細胞培養物。

【0358】

9. ドナーが男性ドナーである、節8に記載の *in vitro* の細胞培養物。

【0359】

10. ドナーが18～25歳の年齢である、節8または9に記載の *in vitro* の細胞培養物。

【0360】

11. 造血細胞が、 $1.0 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ 未満の電気泳動移動度によって規定される表面電位を有する、および／または節1、2もしくは3で定義された特徴bと比較した場合、がん細胞を殺傷する能力が低下した顆粒球を形成するように分化する、それ以外は同一の造血細胞よりも高い表面電位を有する、節1～10のいずれか1つに記載の *in vitro* の細胞培養物。

10

【0361】

12. 造血細胞が、少なくとも $1.0 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ または少なくとも $2.0 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ または少なくとも $2.5 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ または少なくとも $3.0 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ の電気泳動移動度によって規定される表面電位を有する、節1～11のいずれか1つに記載の *in vitro* の細胞培養物。

【0362】

20

13. 顆粒球が、少なくとも $2.0 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ または少なくとも $2.5 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ または少なくとも $3.0 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ の電気泳動移動度によって規定される表面電位を有する、節1～12のいずれか1つに記載の *in vitro* の細胞培養物。

【0363】

14. 顆粒球が好中球である、節1～13のいずれか1つに記載の *in vitro* の細胞培養物。

【0364】

15. がんの処置における使用にとって好適な造血細胞を選択するための方法であって、

30

a. ドナーから取得可能な顆粒球の表面電位を測定すること；および

b. 測定された表面電位が少なくとも $1.0 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ の電気泳動移動度によって規定される場合、前記ドナーから造血細胞を選択することを含む方法。

【0365】

16. がんの処置における使用にとって好適な造血細胞を選択するための方法であって、

a. ドナーから取得可能な顆粒球の密度を測定すること；および

b. 顆粒球の測定された密度が少なくとも $1.077 \text{ g} / \text{ml}$ である場合、前記ドナーから造血細胞を選択することを含む方法。

40

【0366】

17. がんの処置における使用にとって好適な造血細胞を選択するための方法であって、

a. ドナーから取得可能な顆粒球上での *toll* 様受容体；プログラム細胞死1 (PD-1) 受容体；CD115；CD224；CXCR1；および／またはCXCR2の発現または活性を検出すること；ならびに

b. *toll* 様受容体が発現されるか、もしくは活性である；ならびに／またはプログラム細胞死1 (PD-1) 受容体；CD115；CD224；CXCR1；および／もしくはCXCR2が発現されないか、もしくは不活性である場合、前記ドナーから造血細胞を選

50

択すること
を含む方法。

【0367】

18. がんの処置における使用にとって好適な造血細胞を選択するための方法であって、

a. 造血細胞の表面電位を測定すること；および

b. $1.0 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ 未満の電気泳動移動度によって規定される表面電位を有する、および／またはがん細胞を殺傷する能力が低下した顆粒球を形成するように分化する、それ以外は同一の造血細胞よりも高い表面電位を有する造血細胞を選択すること

を含む方法。

【0368】

19. がんの処置における使用にとって好適な造血細胞を選択するための方法であって、

a. 造血細胞の密度を測定すること；および

b. $1.077 \text{ g} / \text{ml}$ 未満の密度を有する、および／またはがん細胞を殺傷する能力が低下した顆粒球を形成するように分化する、それ以外は同一の造血細胞よりも高い密度を有する造血細胞を選択すること

を含む方法。

【0369】

20. 造血細胞が、少なくとも $1.0 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ の電気泳動移動度によって規定される表面電位を有する、節15～19のいずれか1つに記載の方法。

【0370】

21. 造血細胞が、少なくとも $2.0 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ または少なくとも $2.5 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ または少なくとも $3.0 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ の電気泳動移動度によって規定される表面電位を有する、節15～20のいずれか1つに記載の方法。

【0371】

22. 表面電位が電気泳動によって決定される、節15～21のいずれか1つに記載の方法。

【0372】

23. 節15～19のいずれか1つの工程bにおいて選択されない造血細胞を廃棄することをさらに含む、節15～22のいずれか1つに記載の方法。

【0373】

24. 造血細胞が造血幹細胞である、節15～23のいずれか1つに記載の方法。

【0374】

25. 造血細胞が、共通骨髄性前駆細胞、骨髄芽球、N. 前骨髄球、N. 骨髄球、N. 後骨髄球、N. 好中球桿状核球、またはその組合せなどの顆粒球前駆細胞である、節15～24のいずれか1つに記載の方法。

【0375】

26. 顆粒球が好中球である、節15～25のいずれか1つに記載の方法。

【0376】

27. 造血細胞を顆粒球に分化させることをさらに含む、節15～26のいずれか1つに記載の方法。

【0377】

28. 造血細胞がドナー、好ましくは、ヒトドナーから取得可能である、節16～27のいずれか1つに記載の方法。

【0378】

29. ドナーが男性ドナーである、節15～28のいずれか1つに記載の方法。

【0379】

10

20

30

40

50

30. ドナーが18～25歳の年齢である、節15～29のいずれか1つに記載の方法。

【0380】

31. がんの処置における使用にとって好適な造血細胞を選択するための *in vitro* の方法であって、

a. ドナーから取得可能な顆粒球と、細胞株とを混合して、混合物を形成すること；

b. 前記混合物をインキュベートすること；

c. 前記混合物中で殺傷されたがん細胞の%を測定すること；および

d. 前記顆粒球が混合物中の少なくとも70%のがん細胞を殺傷する場合、前記ドナーから造血細胞を選択すること

を含む方法。

【0381】

32. がんを処置するのに好適である顆粒球に分化させることができる細胞を選択するための、造血細胞の表面電位の使用であって、1.0 $\mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ 未満の電気泳動移動度によって規定される表面電位を有する、および／またはがん細胞を殺傷する能力が低下した顆粒球を形成するように分化する、それ以外は同一の造血細胞の表面電位よりも表面電位が高い、使用。

【0382】

33. 造血細胞が、少なくとも1.0 $\mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ 、または少なくとも2.0 $\mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ 、または少なくとも2.5 $\mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ 、または少なくとも3.0 $\mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ の電気泳動移動度によって規定される表面電位を有する、節32に記載の使用。

【0383】

34. 膵がんの処置における使用にとって好適な顆粒球を選択するための *in vitro* の方法であって、

a. 顆粒球と、膵がん細胞株とを混合して、混合物を形成すること；

b. 前記混合物をインキュベートすること；

c. 前記混合物中で殺傷された膵がん細胞の%を測定すること；および

d. 混合物中の少なくとも70%の膵がん細胞を殺傷する顆粒球を選択すること

を含む方法。

【0384】

35. 膵がん細胞株が、膵管腺癌細胞株である、節34に記載の *in vitro* の方法。

【0385】

36. がんの処置における使用にとって好適な顆粒球を選択するための *in vitro* の方法であって、

a. 顆粒球と、複数の異なるがん細胞株とを混合して、複数の混合物を提供すること；

b. 前記混合物をインキュベートすること；

c. 前記混合物中で殺傷されたがん細胞の%を測定すること；および

d. 顆粒球が混合物中の少なくとも70%のがん細胞を殺傷する場合、がん細胞株と同じ型／サブセットのがんの処置における使用にとって好適であるとして顆粒球を選択すること

を含む方法。

【0386】

37. 混合物中の70%未満のがん細胞を殺傷する顆粒球を廃棄することをさらに含む、節34～36のいずれか1つに記載の *in vitro* の方法。

【0387】

38. 顆粒球がドナー、好ましくは、ヒトドナーから取得可能である、節34～37のいずれか1つに記載の *in vitro* の方法。

【0388】

10

20

30

40

50

39. 顆粒球が、前記方法において使用されるがん細胞株と異なる型／サブセットのがんを有する対象から取得可能である、節34～38のいずれか1つに記載の *in vitro* の方法。

【0389】

40. がん細胞株が、膵がん細胞株、肝臓がん細胞株、食道がん細胞株、胃がん細胞株、子宮頸がん細胞株、卵巣がん細胞株、肺がん細胞株、膀胱がん細胞株、腎臓がん細胞株、脳腫瘍細胞株、前立腺がん細胞株、骨髄腫のがん細胞株、非ホジキンリンパ腫（NHL）細胞株、喉頭がん細胞株、子宮がん細胞株、または乳がん細胞株から選択される1つまたは複数である、節34～39のいずれか1つに記載の *in vitro* の方法。

【0390】

41. 選択された顆粒球が取得可能であるドナーから造血細胞を取得することをさらに含む、節38～40のいずれか1つに記載の *in vitro* の方法。

【0391】

42. 節34～41のいずれか1つに記載の方法によって取得可能な顆粒球。

【0392】

43. 節1～14のいずれか1つに記載の造血細胞、または節15～31のいずれか1つに記載の方法に従って取得可能な造血細胞の *in vitro* の細胞培養物を顆粒球に分化させることを含む方法。

【0393】

44. 節43に記載の方法によって取得可能な顆粒球の *in vitro* の細胞培養物であって、

a. 少なくとも $1.0 \mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{volt} \cdot \text{sec}$ の電気泳動移動度によって規定される表面電位；および

b. がん細胞を殺傷する能力
を有する顆粒球に関して富化された細胞培養物。

【0394】

45. 節43に記載の方法によって取得可能な顆粒球の *in vitro* の細胞培養物であって、

a. 少なくとも $1.077 \text{ g} / \text{ml}$ の密度；および

b. がん細胞を殺傷する能力
を有する顆粒球に関して富化された細胞培養物。

【0395】

46. 節43に記載の方法によって取得可能な顆粒球の *in vitro* の細胞培養物であって、

a. toll様受容体の発現もしくは活性；ならびに／またはプログラム細胞死1（PD-1）受容体；CD115；CD224；CXCR1；および／もしくはCXCR2の発現の非存在もしくは不活性；ならびに

b. がん細胞を殺傷する能力
を有する顆粒球に関して富化された細胞培養物。

【0396】

47.

a. 造血細胞または顆粒球；および

b. 顆粒球－マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、増殖ホルモン；セロトニン、ビタミンC、ビタミンD、グルタミン（Gln）、アラキドン酸、AGE－アルブミン、インターロイキン、TNF－アルファ、Fli3リガンド、トロンボポエチン、ウシ胎仔血清（FBS）、またはその組合せを含む医薬組成物。

【0397】

48. がんの処置における使用のための、節1～14のいずれか1つに記載の造血細胞の *in vitro* の細胞培養物、または節42に記載の顆粒球、または節44～46

10

20

30

40

50

に記載の顆粒球の *in vitro* の細胞培養物、または節 47 に記載の医薬組成物。

【0398】

49. がんの処置のための薬剤の製造における、節 1～14 のいずれか 1 つに記載の造血細胞の *in vitro* の細胞培養物、または節 42 に記載の顆粒球、または節 44～46 のいずれか 1 つに記載の顆粒球の *in vitro* の細胞培養物、または節 47 に記載の医薬組成物の使用。

【0399】

50. 節 1～14 のいずれか 1 つに記載の造血細胞の *in vitro* の細胞培養物、または節 42 に記載の顆粒球、または節 44～46 のいずれか 1 つに記載の顆粒球の *in vitro* の細胞培養物、または節 47 に記載の医薬組成物を、それを必要とする対象に投与することを含む、がんを処置するための方法。

【0400】

51. がんが固形腫瘍がんである、節 1～14 のいずれか 1 つに記載の造血細胞の *in vitro* の細胞培養物、または節 42 に記載の顆粒球、または節 44～46 のいずれか 1 つに記載の顆粒球の *in vitro* の細胞培養物、または使用のための節 47 に記載の医薬組成物、節 48～50 のいずれか 1 つに記載の使用または方法。

【0401】

52. がんが膵がん、肝臓がん、食道がん、胃がん、子宮頸がん、卵巣がん、肺がん、膀胱がん、腎臓がん、脳腫瘍、前立腺がん、骨髄腫のがん、非ホジキンリンパ腫 (NHL)、喉頭がん、子宮がん、または乳がんのうちの 1 つまたは複数である、節 1～14 のいずれか 1 つに記載の造血細胞の *in vitro* の細胞培養物、または節 42 に記載の顆粒球、または節 44～46 のいずれか 1 つに記載の顆粒球の *in vitro* の細胞培養物、または使用のための節 47 に記載の医薬組成物、節 48～50 のいずれか 1 つに記載の使用または方法。

【0402】

53. 節 1～14 のいずれか 1 つに記載の造血細胞の *in vitro* の細胞培養物、または節 42 に記載の顆粒球、または節 44～46 のいずれか 1 つに記載の顆粒球の *in vitro* の細胞培養物、または節 47 に記載の医薬組成物を用いた処置のための対象を選択するための *in vitro* の方法であって、

a. 前記対象に由来する顆粒球と、がん細胞株とを混合すること；

b. 前記混合物をインキュベートすること；

c. 前記混合物中で殺傷されたがん細胞の％を測定すること；および

d. 対象に由来する顆粒球が混合物中の 70％未満のがん細胞を殺傷する場合、節 1～14 のいずれか 1 つに記載の造血細胞の *in vitro* の細胞培養物、または節 42 に記載の顆粒球、または節 44～46 のいずれか 1 つに記載の顆粒球の *in vitro* の細胞培養物、または節 47 に記載の医薬組成物を用いた処置のために前記対象を選択することを含む方法。

【0403】

54. 対象に由来する顆粒球が、混合物中の 50％未満または 25％未満（好ましくは、10％または 5％未満）のがん細胞を殺傷する場合、前記対象が処置のために選択される、節 53 に記載の *in vitro* の方法。

【0404】

55. 節 1～14 のいずれか 1 つに記載の造血細胞の *in vitro* の細胞培養物、または節 42 に記載の顆粒球、または節 44～46 のいずれか 1 つに記載の顆粒球の *in vitro* の細胞培養物、または節 47 に記載の医薬組成物を含む細胞バンク。

【0405】

56.

a. 節 1～14 のいずれか 1 つに記載の造血細胞の *in vitro* の細胞培養物、または節 42 に記載の顆粒球、または節 44～46 のいずれか 1 つに記載の顆粒球の *in*

10

20

30

40

50

v i t r o の細胞培養物、または節 4 7 に記載の医薬組成物；および

b . 医学におけるその使用のための指示書
を含むキット。

【 0 4 0 6 】

5 7 . 前記指示書が、がん、好ましくは、膵がんの処置におけるその使用のためのものである、節 5 6 に記載のキット。

10

20

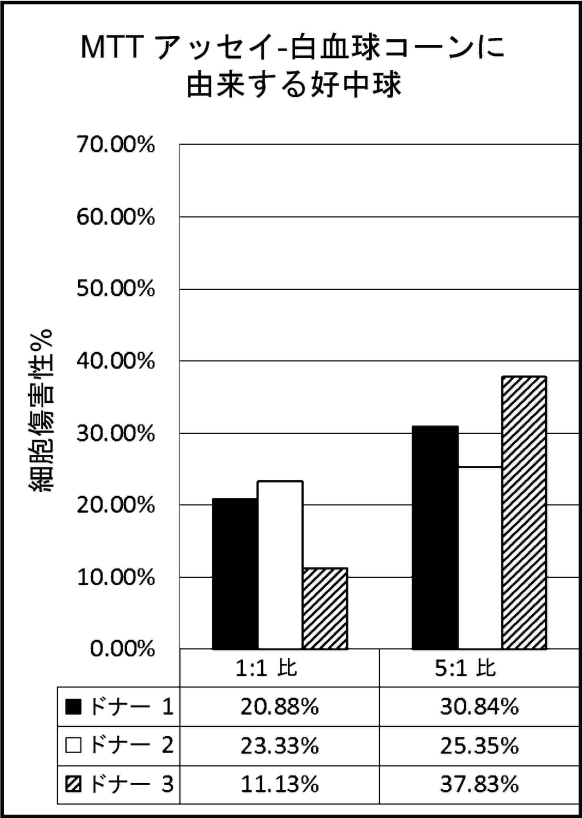
30

40

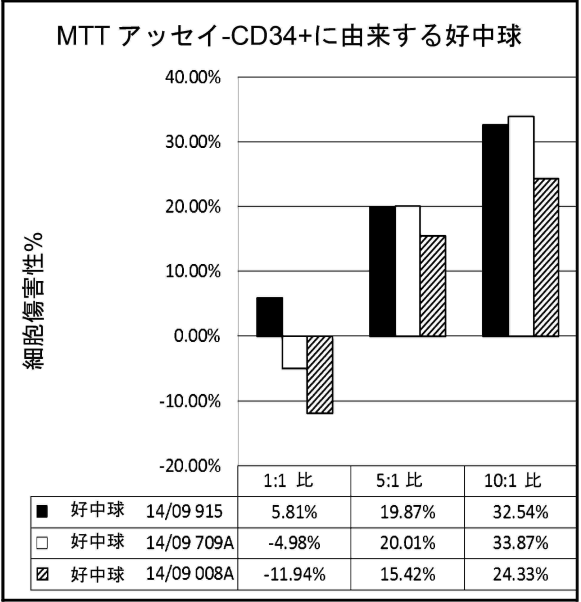
50

【図面】

【図 1】



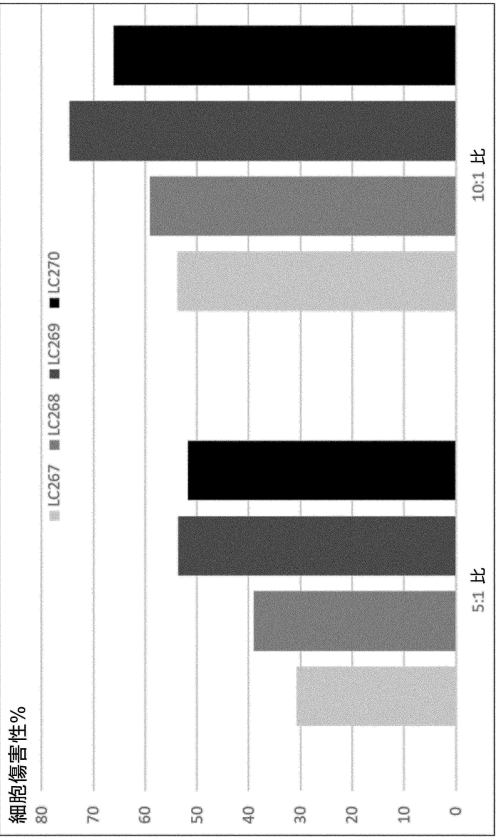
【図 2】



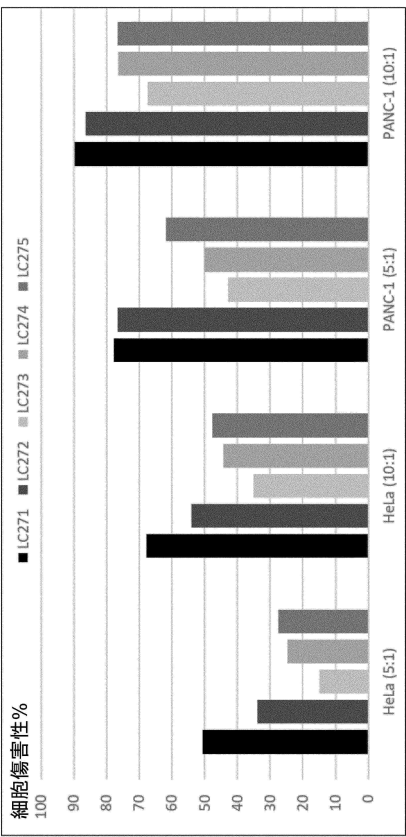
10

20

【図 3】



【図 4】

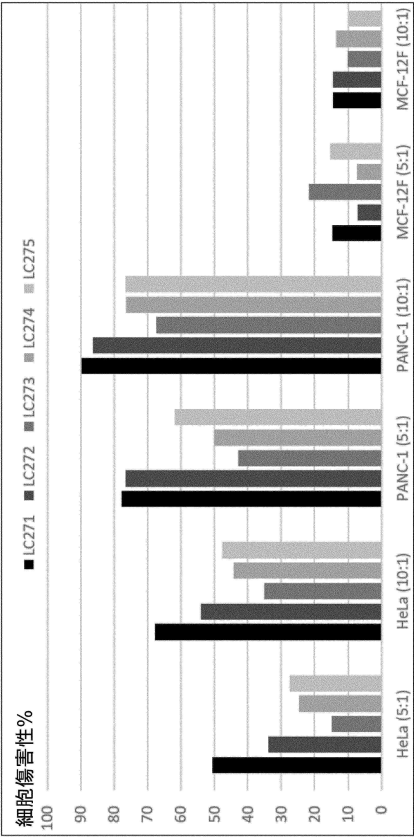


30

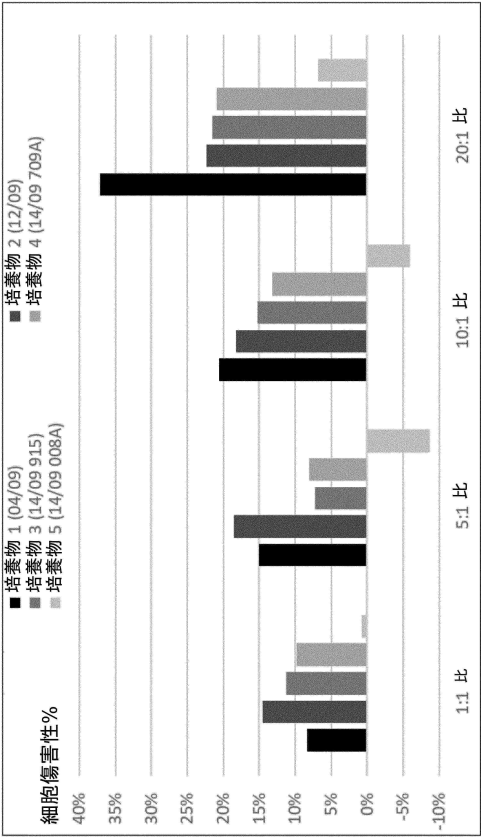
40

50

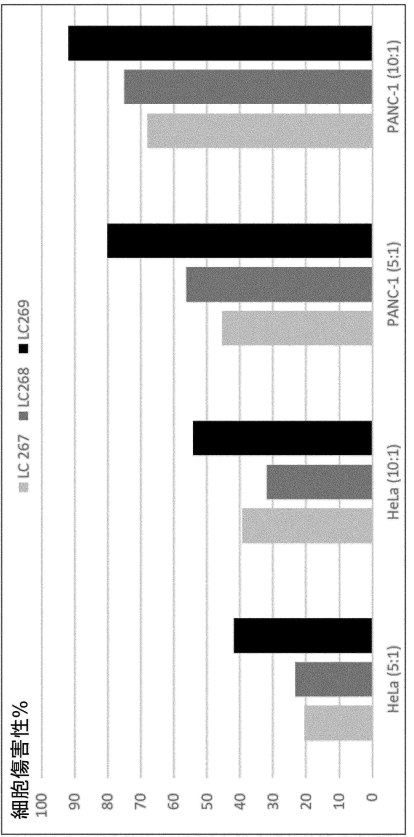
【図 5】



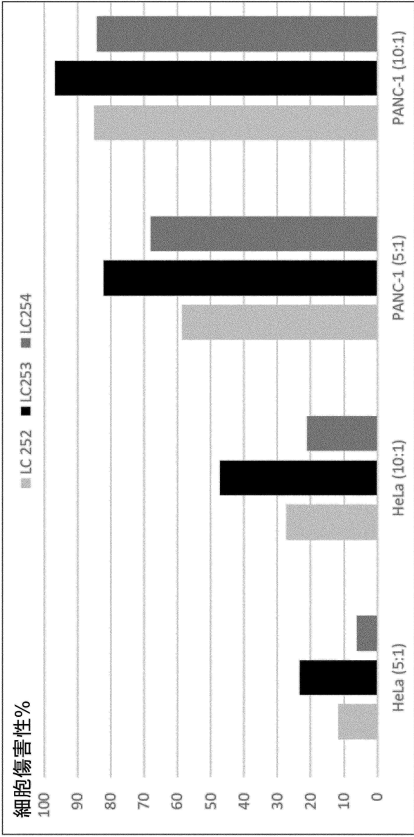
【図 6】



【図 7】



【図 8】



10

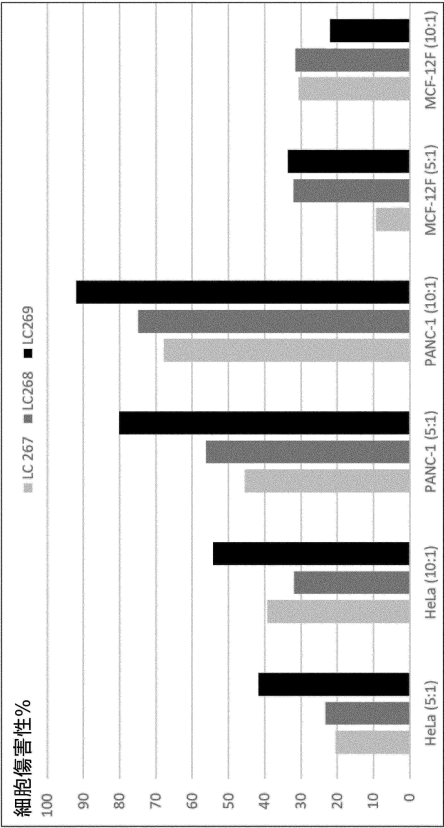
20

30

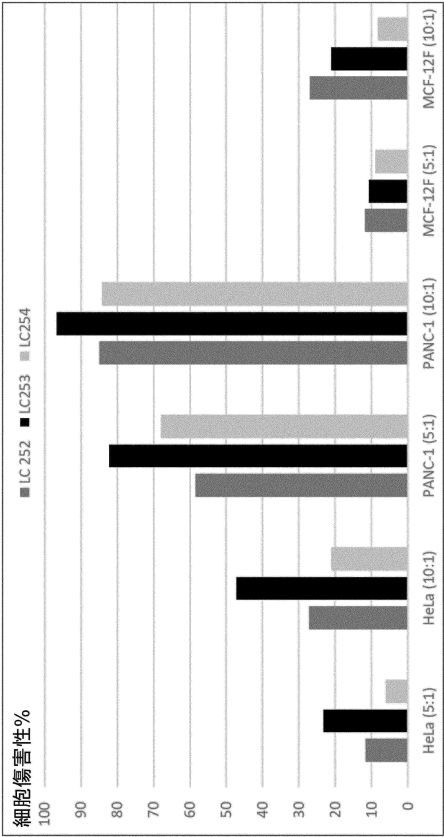
40

50

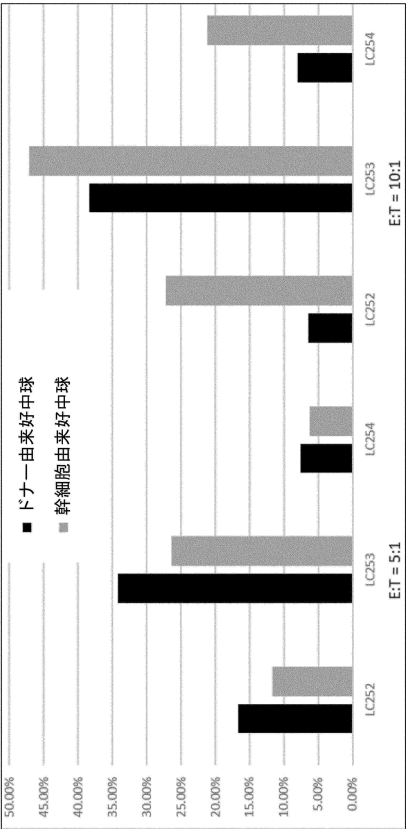
【図 9】



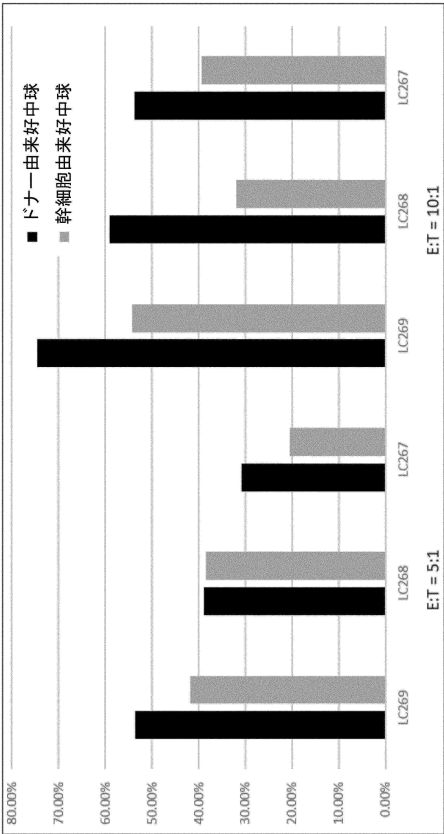
【図 10】



【図 11】



【図 12】



10

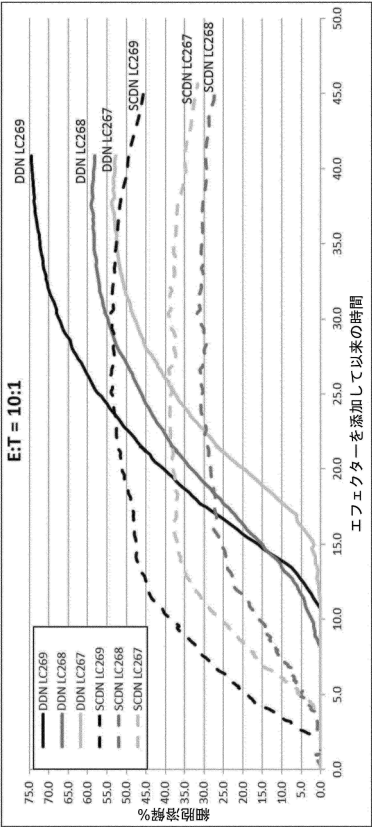
20

30

40

50

【図 13】



10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 1 2 Q 1/06 (2006.01)

F I

C 1 2 Q

1/06

ト バイオサイエンシズ リミテッド内

(72)発明者

ブラニックス, ニコ

イギリス国, ブライトン ビーエヌ1 3ティービー, バス ストリート 7, リフト バイオサイエ
ンシズ リミテッド内

合議体

審判長 上條 肇

審判官 柴原 直司

審判官 小暮 道明

(56)参考文献

国際公開第2017/161001 (WO, A1)

国際公開第2008/45528 (WO, A2)

今堀和友/山川民夫監修, 「生化学辞典」, 第3版, 株式会社東京化学同人, (1998
) , p. 793Biotechnol. Bioeng. , (2009) , 104, [4] , p. 832-
840

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C12N1/00-7/08

C12Q1/00-3/00

CAPlus/BIOSIS/MEDLINE/EMBASE (STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)