

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成25年4月25日(2013.4.25)

【公表番号】特表2012-521215(P2012-521215A)

【公表日】平成24年9月13日(2012.9.13)

【年通号数】公開・登録公報2012-037

【出願番号】特願2012-501965(P2012-501965)

【国際特許分類】

C 12 N 5/0783 (2010.01)

A 61 K 35/14 (2006.01)

A 61 P 35/00 (2006.01)

【F I】

C 12 N 5/00 202 L

A 61 K 35/14 Z

A 61 P 35/00

【手続補正書】

【提出日】平成25年3月7日(2013.3.7)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

増殖および活性化した、表現型 C D 3<sup>-</sup> C D 5 6<sup>+</sup> の N K 細胞および表現型 C D 3<sup>+</sup> C D 5 6<sup>+</sup> の N K T 細胞を得るための方法であって、

- i) 腫瘍を有する対象から末梢血細胞サンプルを得て；
- ii) 該血液サンプルから細胞を単離し、増殖培地に該細胞を再懸濁し；
- iii) 単離した細胞を、1 ml の増殖培地当たり 0.5 × 10<sup>6</sup> ないし 2 × 10<sup>6</sup> の濃度でバイオリアクターに添加し；
- iv) 工程ii)の細胞を、増殖した細胞集団の少なくとも 35 % が活性化 N K 細胞および N K T 細胞を含むまで振盪および加熱しながらインキュベートして増殖させ；そして
- v) 該バイオリアクターから治療的に活性な N K 細胞の増殖した細胞懸濁液を得て、ここで該細胞が、インビトロ細胞傷害性試験により増加した細胞傷害性を示す、方法。

【請求項2】

該増殖培地に、血清、インターロイキン-2 ( I L - 2 ) および抗 C D 3 抗体を添加する、請求項1記載の方法。

【請求項3】

細胞増殖を、全細胞数が少なくとも 10 倍に増殖するまで行う、請求項2記載の方法。

【請求項4】

細胞増殖を、増殖細胞集団の少なくとも 50 % が、活性化 N K 細胞および N K T 細胞それぞれを含むまで行う、請求項2記載の方法。

【請求項5】

細胞サンプルが、サイトカインで刺激した末梢血サンプルである、請求項1-4のいずれか一項記載の方法。

【請求項6】

細胞サンプルが、末梢血単核球細胞 ( P B M C ) である、請求項5記載の方法。

【請求項7】

細胞を少なくとも10日間インキュベートする、請求項1-6のいずれか一項記載の方法。

【請求項8】

血清が、ヒト血清および自家血清からなる群から選択される、請求項2記載の方法。

【請求項9】

培地に、50ないし1500U/m1のIL-2、1ないし50ng/m1の抗CD3抗体および1ないし40%血清を添加する、請求項2記載の方法。

【請求項10】

腫瘍が、血液系腫瘍および固形腫瘍からなる群から選択される、請求項1記載の方法。

【請求項11】

細胞が、主に、表現型CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>のNK細胞からなる、請求項1-10のいずれか一項記載の方法。

【請求項12】

得られた表現型CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>のNK細胞がNKp44も発現する、請求項11記載の方法。

【請求項13】

請求項1-12のいずれか一項記載の方法により得られる、表現型CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>のNK細胞および表現型CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>のNKT細胞の懸濁液。

【請求項14】

インビトロ細胞傷害性試験により決定される通り、該細胞が増加した細胞傷害性を示す、表現型CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>のNK細胞および表現型CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>のNKT細胞の懸濁液。

【請求項15】

増殖した細胞集団の少なくとも35%、好ましくは少なくとも50%が活性化NK細胞を含む、表現型CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>のNK細胞および表現型CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>のNKT細胞の懸濁液。

【請求項16】

表現型CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>のNK細胞および表現型CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>のNKT細胞がNKp44も発現する、懸濁液。

【請求項17】

癌の処置のための、請求項13-16のいずれか一項記載の細胞懸濁液。

【請求項18】

癌の処置のための、請求項13-17のいずれか一項記載の細胞懸濁液を含む、医薬組成物。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0063

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0063】

フラスコと同程度かつ対応する収率をもたらす閉鎖型増殖システムの探索において、発明者らは、5名の健常なドナー由来のPBM Cを用いて、フラスコでの増殖と比較した自動化バイオリアクターシステムの使用を評価した。発明者らは、バルク細胞の増殖を観察し(平均増殖:フラスコ:770倍、バイオリアクター:77倍)、一方で、NK細胞が優先的に増殖し、両条件下で全体に占めるNK細胞の割合を増加させた。NK細胞の増加倍率(図1B)は、5名中4名のドナーでフラスコでの増加よりも低かったが、最終産物中のこれらの亜集団の割合は、フラスコ増殖とより同程度かつ対応していた(図1D)。増殖プロトコールの最終産物は、バイオリアクター内で平均38%のNK細胞を有し、一方、フラスコ中で44%のNK細胞が存在した。