

【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】令和 2 年 8 月 6 日 (2020.8.6)

【公表番号】特表 2019-523001 (P2019-523001A)

【公表日】令和 1 年 8 月 22 日 (2019.8.22)

【年通号数】公開・登録公報 2019-034

【出願番号】特願 2019-503538 (P2019-503538)

【国際特許分類】

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 31/12 (2006.01)

A 6 1 K 35/17 (2015.01)

C 0 7 K 14/52 (2006.01)

C 0 7 K 14/55 (2006.01)

C 1 2 N 1/00 (2006.01)

C 1 2 N 7/01 (2006.01)

C 1 2 N 15/867 (2006.01)

C 1 2 N 5/0783 (2010.01)

C 1 2 N 15/13 (2006.01)

C 1 2 N 15/113 (2010.01)

【F I】

C 1 2 N 5/10 Z N A

A 6 1 P 35/00

A 6 1 P 31/12

A 6 1 K 35/17

C 0 7 K 14/52

C 0 7 K 14/55

C 1 2 N 1/00 G

C 1 2 N 7/01

C 1 2 N 15/867 Z

C 1 2 N 5/0783

C 1 2 N 15/13

C 1 2 N 15/113 Z

【手続補正書】

【提出日】令和 2 年 6 月 26 日 (2020.6.26)

【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】

1 種またはこれより多くの異種核酸を含むナチュラルキラー (NK) 細胞を生成する方法であって、前記方法は、

単離された NK 細胞の集団を、1 種またはこれより多くのサイトカインの存在下で培養して、活性化 NK 細胞の集団を生成する工程；

前記活性化 NK 細胞の集団を、1 種またはこれより多くの異種核酸を含むウイルスベクターで形質導入して、形質導入された NK 細胞の集団を生成する工程；ならびに

前記形質導入されたNK細胞の集団を、1種もしくはこれより多くのサイトカインおよび/または照射されたフィーダー細胞の存在下で培養して、形質導入されたNK細胞の拡大増殖された集団を生成する工程、
を包含する、方法。

【請求項2】

前記単離されたNK細胞の集団を、1種またはこれより多くのサイトカインの存在下で培養する工程は、前記単離されたNK細胞の集団を、インターロイキン-2(IL-2)、インターロイキン-15(IL-15)、およびインターロイキン-21(IL-21)のうちの1種またはこれより多くを含む細胞培養培地中で培養する工程を包含する、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記細胞培養培地は、500 IU/ml IL-2、10 ng/ml IL-15、および20 ng/ml IL-21のうちの1種またはこれより多くを含む、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

前記単離されたNK細胞の集団を、1種またはこれより多くのサイトカインの存在下で培養する工程は、前記単離されたNK細胞の集団を、照射されたフィーダー細胞の存在下で培養する工程を包含する、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】

前記単離されたNK細胞の集団を、1種またはこれより多くのサイトカインの存在下で培養する工程は、前記単離されたNK細胞の集団を、照射されたフィーダー細胞の存在下で培養する工程を包含しない、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】

前記単離されたNK細胞の集団を、1種またはこれより多くのサイトカインの存在下で培養する工程は、前記単離されたNK細胞の集団を、1種またはこれより多くのサイトカインを含む細胞培養培地中で1～14日間培養する工程を包含する、請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7】

前記活性化NK細胞の集団を、1種またはこれより多くの異種核酸を含むウイルスベクターで形質導入する工程は、前記NK細胞の集団と、前記ウイルスベクターを含むウイルス粒子とを接触させる工程を包含する、請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項8】

前記1種またはこれより多くの異種核酸を含むウイルスベクターは、レンチウイルスベクターである、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項9】

前記活性化NK細胞の集団は、前記ウイルスベクターを含むウイルス粒子と約6時間～5日間接触される、請求項7または請求項8に記載の方法。

【請求項10】

前記形質導入されたNK細胞の集団を、1種もしくはこれより多くのサイトカインおよび/または照射されたフィーダー細胞の存在下で培養する工程は、前記形質導入されたNK細胞の集団を、IL-2を含む培養培地中で培養する工程を包含する、請求項1～9のいずれか1項に記載の方法。

【請求項11】

前記培養培地は、500 IU/ml IL-2を含む、請求項10に記載の方法。

【請求項12】

前記形質導入されたNK細胞の集団を、1種もしくはこれより多くのサイトカインおよび/または照射されたフィーダー細胞の存在下で培養する工程は、前記形質導入されたNK細胞の集団を、照射されたフィーダー細胞の存在下で培養する工程を包含する、請求項1～11のいずれか1項に記載の方法。

【請求項13】

前記照射されたフィーダー細胞 対 前記形質導入されたNK細胞の比は、10：1である、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

前記照射されたフィーダー細胞は、エプスタイン・バーウイルスで形質転換されたリンパ芽球系細胞株またはK562細胞を含む、請求項12に記載の方法。

【請求項15】

前記形質導入されたNK細胞の集団を、1種もしくはこれより多くのサイトカインおよび/または照射されたフィーダー細胞の存在下で培養する工程は、前記形質導入されたNK細胞の集団を、前記1種またはこれより多くのサイトカインおよび/または前記照射されたフィーダー細胞の存在下で1～40日間培養する工程を包含する、請求項1～14のいずれか1項に記載の方法。

【請求項16】

前記単離されたNK細胞の集団は、被験体から得られた単核細胞から単離される、請求項1～15のいずれか1項に記載の方法。

【請求項17】

前記異種核酸は、高親和性CD16(CD16-V158)、CXCR4、CCR7、CXCR3、CD34、ダブルネガティブTGF β タイプIIレセプター、VLA-4、LFA-1、または腫瘍細胞上で発現される抗原に特異的に結合するキメラ抗原レセプター(CAR)をコードする、請求項1～16のいずれか1項に記載の方法。

【請求項18】

前記異種核酸は、CD19、CD20、CD33、CD138、CS1、GD2、HER2、erbB2、CEA、EpCAM、NKG2D-L、またはTRAIL-R1に特異的に結合するCARをコードする、請求項17に記載の方法。

【請求項19】

前記異種核酸は、細胞内ドメインを欠く短縮型CD34タンパク質をコードする核酸分子をさらに含む、請求項17または請求項18に記載の方法。

【請求項20】

前記形質導入されたNK細胞の集団は、前記形質導入されたNK細胞の集団を培養して、富化された形質導入されたNK細胞の拡大増殖された集団を生成する工程の前に、CD34発現NK細胞の選択によって富化される、請求項19に記載の方法。

【請求項21】

前記異種核酸は、低分子ヘアピン型RNA(shRNA)、低分子干渉RNA(siRNA)、またはアンチセンス核酸である、請求項1～16のいずれか1項に記載の方法。

【請求項22】

前記異種核酸は、NKG2A shRNAである、請求項21に記載の方法。

【請求項23】

腫瘍、過剰増殖性疾患、またはウイルス感染を有する被験体を処置するための、形質導入されたナチュラルキラー細胞の拡大増殖された集団を含む組成物であって、前記形質導入されたナチュラルキラー細胞の拡大増殖された集団が、請求項1～22のいずれか一項に記載の方法によって生成され、前記単離されたナチュラルキラー(NK)細胞の集団が、前記被験体またはドナーから得られる、組成物。

【請求項24】

前記組成物は、薬学的に受容可能なキャリアをさらに含む、請求項23に記載の組成物。

【請求項25】

前記組成物は、静脈内に、または前記腫瘍への局所注射によって前記被験体に投与される、請求項23または請求項24に記載の組成物。

【請求項26】

前記組成物は、 $10^6 \sim 10^{12}$ 個の形質導入されたNK細胞を含む、請求項23～25のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項 27】

前記被験体は、血液悪性疾患または固形腫瘍を含む腫瘍または過剰増殖性疾患を有する、請求項 23 ~ 26 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 28】

前記被験体は、サイトメガロウイルス、アデノウイルス、RSウイルス、エプスタイン・バーウイルス、またはヒト免疫不全ウイルスでのウイルス感染を有する、請求項 23 ~ 26 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 29】

1 種またはこれより多くの異種核酸を含むナチュラルキラー（NK）細胞を生成する方法であって、前記方法は、

単離されたNK細胞の集団を、500 IU インターロイキン - 2（IL - 2）の存在下で、2 ~ 3 日間培養して、活性化NK細胞の集団を生成する工程；

前記活性化NK細胞の集団を、1 種またはこれより多くの異種核酸を含むレンチウイルスベクターを含むウイルス粒子で1 ~ 5 日間形質導入して、形質導入されたNK細胞の集団を生成する工程；ならびに

前記形質導入されたNK細胞の集団を、500 IU/ml IL - 2および照射されたフィーダー細胞の存在下で14 ~ 28 日間培養して、形質導入されたNK細胞の拡大増殖された集団を生成する工程、
を包含する、方法。

【請求項 30】

腫瘍または過剰増殖性疾患を有する被験体を処置するための、請求項 29 に記載の方法によって生成される形質導入されたナチュラルキラー細胞の拡大増殖された集団を含む組成物であって、前記単離されたナチュラルキラー（NK）細胞の集団が、前記被験体またはドナーから得られ、前記組成物が、 $10^6 \sim 10^{12}$ 個の前記拡大増殖された形質導入されたNK細胞を含む、組成物。

【請求項 31】

請求項 1、3 ~ 22、または29 のいずれか 1 項に記載の方法によって生成される 1 種またはこれより多くの異種核酸を含む、ナチュラルキラー細胞。

【請求項 32】

1 種またはこれより多くの異種核酸を含むナチュラルキラー細胞および薬学的に受容可能なキャリアを含む組成物であって、ここで前記ナチュラルキラー細胞は、請求項 1、3 ~ 22、または29 のいずれか 1 項に記載の方法によって生成される、組成物。

【請求項 33】

前記薬学的に受容可能なキャリアは、平衡塩類溶液またはPlasmaLyteである、請求項 32 に記載の組成物。

【請求項 34】

PGKプロモーターに作動可能に連結されたCXCR4をコードする異種核酸を含む、改変されたNK細胞。

【請求項 35】

PGKプロモーターに作動可能に連結された高親和性CD16をコードする異種核酸を含む、改変されたNK細胞。

【請求項 36】

PGKプロモーターに作動可能に連結されたCXCR4および高親和性CD16をコードする異種核酸を含む、改変されたNK細胞。

【請求項 37】

短縮型CD34レセプターをコードする異種核酸をさらに含む、請求項 34 ~ 36 のいずれか 1 項に記載の改変されたNK細胞。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0008

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0008】

1種またはこれより多くの目的の核酸を含むウイルスベクター（例えば、レンチウイルスベクター）で形質導入されたNK細胞のような、1種またはこれより多くの異種核酸を含む改変されたNK細胞（例えば、改変されたNK細胞の集団）がまた、本明細書で開示される。いくつかの例では、上記異種核酸は、CXCR4、CCR7、CXCR3、またはCD16（例えば、高親和性CD16またはCD16-V158）をコードする。目的のさらなる核酸は、以下の表1に示される。改変されたNK細胞（例えば、改変されたNK細胞の集団）および薬学的に受容可能なキャリアを含む組成物がまた、開示される。いくつかの実施形態において、上記改変されたNK細胞は、本明細書で開示される方法によって生成される。

本発明は、例えば、以下の項目を提供する。

（項目1）

1種またはこれより多くの異種核酸を含むナチュラルキラー（NK）細胞を生成する方法であって、前記方法は、

単離されたNK細胞の集団を、1種またはこれより多くのサイトカインの存在下で培養して、活性化NK細胞の集団を生成する工程；

前記活性化NK細胞の集団を、1種またはこれより多くの異種核酸を含むウイルスベクターで形質導入して、形質導入されたNK細胞の集団を生成する工程；ならびに

前記形質導入されたNK細胞の集団を、1種もしくはこれより多くのサイトカインおよび/または照射されたフィーダー細胞の存在下で培養して、形質導入されたNK細胞の拡大増殖された集団を生成する工程、

を包含する、方法。

（項目2）

腫瘍、過剰増殖性疾患、またはウイルス感染を有する被験体を処置する方法であって、前記方法は、

前記被験体またはドナーから単離されたナチュラルキラー（NK）細胞の集団を得る工程；

前記単離されたNK細胞の集団を、1種またはこれより多くのサイトカインの存在下で培養して、活性化NK細胞の集団を生成する工程；

前記活性化NK細胞の集団を、1種またはこれより多くの異種核酸を含むウイルスベクターで形質導入して、形質導入されたNK細胞の集団を生成する工程；

前記形質導入されたNK細胞の集団を、1種もしくはこれより多くのサイトカインおよび/または照射されたフィーダー細胞の存在下で培養して、形質導入されたNK細胞の拡大増殖された集団を生成する工程；ならびに

前記形質導入されたNK細胞の拡大増殖された集団を含む組成物を、前記被験体に投与する工程、

を包含する、方法。

（項目3）

前記単離されたNK細胞の集団を、1種またはこれより多くのサイトカインの存在下で培養する工程は、前記単離されたNK細胞の集団を、インターロイキン-2（IL-2）、インターロイキン-15（IL-15）、およびインターロイキン-21（IL-21）のうちの1種またはこれより多くを含む細胞培養培地中で培養する工程を包含する、項目1または項目2に記載の方法。

（項目4）

前記細胞培養培地は、500 IU/ml IL-2、10 ng/ml IL-15、および20 ng/ml IL-21のうちの1種またはこれより多くを含む、項目3に記載

載の方法。

(項目5)

前記単離されたNK細胞の集団を、1種またはこれより多くのサイトカインの存在下で培養する工程は、前記単離されたNK細胞の集団を、照射されたフィーダー細胞の存在下で培養する工程を包含する、項目1～4のいずれか1項に記載の方法。

(項目6)

前記単離されたNK細胞の集団を、1種またはこれより多くのサイトカインの存在下で培養する工程は、前記単離されたNK細胞の集団を、照射されたフィーダー細胞の存在下で培養する工程を包含しない、項目1～4のいずれか1項に記載の方法。

(項目7)

前記単離されたNK細胞の集団を、1種またはこれより多くのサイトカインの存在下で培養する工程は、前記単離されたNK細胞の集団を、1種またはこれより多くのサイトカインを含む細胞培養培地中で1～14日間培養する工程を包含する、項目1～6のいずれか1項に記載の方法。

(項目8)

前記活性化NK細胞の集団を、1種またはこれより多くの異種核酸を含むウイルスベクターで形質導入する工程は、前記NK細胞の集団と、前記ウイルスベクターを含むウイルス粒子とを接触させる工程を包含する、項目1～7のいずれか1項に記載の方法。

(項目9)

前記1種またはこれより多くの異種核酸を含むウイルスベクターは、レンチウイルスベクターである、項目1～8のいずれか1項に記載の方法。

(項目10)

前記活性化NK細胞の集団は、前記ウイルスベクターを含むウイルス粒子と1～3日間接触される、項目8または項目9に記載の方法。

(項目11)

前記形質導入されたNK細胞の集団を、1種もしくはこれより多くのサイトカインおよび/または照射されたフィーダー細胞の存在下で培養する工程は、前記形質導入されたNK細胞の集団を、IL-2を含む培養培地中で培養する工程を包含する、項目1～10のいずれか1項に記載の方法。

(項目12)

前記培養培地は、500 IU/ml IL-2を含む、項目11に記載の方法。

(項目13)

前記形質導入されたNK細胞の集団を、1種もしくはこれより多くのサイトカインおよび/または照射されたフィーダー細胞の存在下で培養する工程は、前記形質導入されたNK細胞の集団を、照射されたフィーダー細胞の存在下で培養する工程を包含する、項目1～12のいずれか1項に記載の方法。

(項目14)

前記照射されたフィーダー細胞 対 前記形質導入されたNK細胞の比は、10：1である、項目13に記載の方法。

(項目15)

前記照射されたフィーダー細胞は、エプスタイン・バーウイルスで形質転換されたリンパ芽球系細胞株またはK562細胞を含む、項目13または項目14に記載の方法。

(項目16)

前記形質導入されたNK細胞の集団を、1種もしくはこれより多くのサイトカインおよび/または照射されたフィーダー細胞の存在下で培養する工程は、前記形質導入されたNK細胞の集団を、前記1種またはこれより多くのサイトカインおよび/または前記照射されたフィーダー細胞の存在下で1～40日間培養する工程を包含する、項目1～15のいずれか1項に記載の方法。

(項目17)

前記単離されたNK細胞の集団は、被験体から得られた単核細胞から単離される、項目

1 ～ 16 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 18)

前記異種核酸は、高親和性 CD16 (CD16 - V158)、CXCR4、CCR7、CXCR3、CD34、ダブルネガティブ TGF タイプ II レセプター、VLA-4、LFA-1、または腫瘍細胞上で発現される抗原に特異的に結合するキメラ抗原レセプター (CAR) をコードする、項目 1 ～ 17 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 19)

前記異種核酸は、CD19、CD20、CD33、CD138、CS1、GD2、HER2、erbB2-、CEA、EpCAM、NKG2D-L、または TRAIL-R1 に特異的に結合する CAR をコードする、項目 18 に記載の方法。

(項目 20)

前記異種核酸は、細胞内ドメインを欠く短縮型 CD34 タンパク質をコードする核酸分子をさらに含む、項目 18 または項目 19 に記載の方法。

(項目 21)

前記形質導入された NK 細胞の集団は、前記形質導入された NK 細胞の集団を培養して、富化された形質導入された NK 細胞の拡大増殖された集団を生成する工程の前に、CD34 発現 NK 細胞の選択によって富化される、項目 20 に記載の方法。

(項目 22)

前記異種核酸は、低分子ヘアピン型 RNA (shRNA)、低分子干渉 RNA (siRNA)、またはアンチセンス核酸である、項目 1 ～ 17 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 23)

前記異種核酸は、NKG2A shRNA である、項目 22 に記載の方法。

(項目 24)

前記形質導入された NK 細胞の拡大増殖された集団を含む組成物は、薬学的に受容可能なキャリアをさらに含む、項目 2 ～ 23 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 25)

前記形質導入された NK 細胞の拡大増殖された集団を含む組成物は、静脈内に、または前記腫瘍への局所注射によって前記被験体に投与される、項目 2 ～ 24 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 26)

前記形質導入された NK 細胞の拡大増殖された集団を含む組成物は、 $10^6 \sim 10^{12}$ 個の形質導入された NK 細胞を含む、項目 2 ～ 25 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 27)

前記被験体は、血液悪性疾患または固形腫瘍を含む腫瘍または過剰増殖性疾患を有する、項目 2 ～ 26 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 28)

前記被験体は、サイトメガロウイルス、アデノウイルス、RSウイルス、エプスタイン・バーウイルス、またはヒト免疫不全ウイルスでのウイルス感染を有する、項目 2 ～ 26 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 29)

1 種またはこれより多くの異種核酸を含むナチュラルキラー (NK) 細胞を生成する方法であって、前記方法は、

単離された NK 細胞の集団を、500 IU インターロイキン-2 (IL-2) の存在下で、2 ～ 3 日間培養して、活性化 NK 細胞の集団を生成する工程；

前記活性化 NK 細胞の集団を、1 種またはこれより多くの異種核酸を含むレンチウイルスベクターを含むウイルス粒子で 1 ～ 5 日間形質導入して、形質導入された NK 細胞の集団を生成する工程；ならびに

前記形質導入された NK 細胞の集団を、500 IU/ml IL-2 および照射されたフィーダー細胞の存在下で 14 ～ 28 日間培養して、形質導入された NK 細胞の拡大増殖された集団を生成する工程、

を包含する、方法。

(項目30)

腫瘍または過剰増殖性疾患を有する被験体を処置する方法であって、前記方法は、
単離されたナチュラルキラー(NK)細胞の集団を、前記被験体またはドナーから得る
工程；

前記単離されたNK細胞の集団を、500 IU インターロイキン-2(IL-2)の存在下で2～3日間培養して、活性化NK細胞の集団を生成する工程；

前記活性化NK細胞の集団を、1種またはこれより多くの異種核酸を含むレンチウイルスベクターを含むウイルス粒子で1～5日間形質導入して、形質導入されたNK細胞の集団を生成する工程；

前記形質導入されたNK細胞の集団を、500 IU/ml IL-2および照射されたフィーダー細胞の存在下で14～28日間培養して、拡大増殖された形質導入されたNK細胞を生成する工程；ならびに

$10^6 \sim 10^{12}$ 個の前記拡大増殖された形質導入されたNK細胞を含む組成物を、前記被験体に投与する工程、

を包含する、方法。

(項目31)

項目1、3～23、または29のいずれか1項に記載の方法によって生成される1種またはこれより多くの異種核酸を含む、ナチュラルキラー細胞。

(項目32)

1種またはこれより多くの異種核酸を含むナチュラルキラー細胞および薬学的に受容可能なキャリアを含む組成物であって、ここで前記ナチュラルキラー細胞は、項目1、3～23、または29のいずれか1項に記載の方法によって生成される、組成物。

(項目33)

前記薬学的に受容可能なキャリアは、平衡塩類溶液またはPlasmaLyteである、項目32に記載の組成物。

(項目34)

PGKプロモーターに作動可能に連結されたCXCR4をコードする異種核酸を含む、改変されたNK細胞。

(項目35)

PGKプロモーターに作動可能に連結された高親和性CD16をコードする異種核酸を含む、改変されたNK細胞。

(項目36)

PGKプロモーターに作動可能に連結されたCXCR4および高親和性CD16をコードする異種核酸を含む、改変されたNK細胞。

(項目37)

短縮型CD34レセプターをコードする異種核酸をさらに含む、項目34～36のいずれか1項に記載の改変されたNK細胞。