(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7074358号
(P7074358)

(45)発行日　令和4年5月24日(2022.5.24)

(24)登録日　令和4年5月16日(2022.5.16)

(51)国際特許分類

		FI		
C12N 5/0783(2010.01)		C12N	5/0783	ZNA
A61K 35/17 (2015.01)		A61K	35/17	A
A61K 45/00 (2006.01)		A61K	45/00	
A61P 35/00 (2006.01)		A61P	35/00	
A61P 31/00 (2006.01)		A61P	31/00	

請求項の数　15　（全16頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2019-525738(P2019-525738)
(86)(22)出願日　平成29年11月14日(2017.11.14)
(65)公表番号　特表2019-534029(P2019-534029A)
(43)公表日　令和1年11月28日(2019.11.28)
(86)国際出願番号　PCT/KR2017/012883
(87)国際公開番号　WO2018/088875
(87)国際公開日　平成30年5月17日(2018.5.17)
審査請求日　令和2年11月13日(2020.11.13)
(31)優先権主張番号　10-2016-0151411
(32)優先日　平成28年11月14日(2016.11.14)
(33)優先権主張国・地域又は機関
韓国(KR)

(73)特許権者　515191497
パイアン バイオテクノロジー インコーポレイテッド
大韓民国、３４０２８ テジョン、ユソン－ク、テクノ ２－ロ、１６０、フォース・フロア
(74)代理人　100108855
弁理士　蔵田 昌俊
(74)代理人　100103034
弁理士　野河 信久
(74)代理人　100179062
弁理士　井上 正
(74)代理人　100199565
弁理士　飯野 茂
(74)代理人　100153051

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　外因性ミトコンドリアを含むナチュラルキラー細胞および同細胞を含む医薬組成物

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

単離した外因性ミトコンドリアを含むナチュラルキラー細胞を有効成分として含む、がんまたは感染性疾患を治療するための医薬組成物。

【請求項２】

前記単離した外因性ミトコンドリアが、筋細胞、肝細胞、線維芽細胞、上皮細胞、神経細胞、脂肪細胞、骨細胞、白血球、リンパ球、または粘膜細胞から得られたものである、請求項１に記載の医薬組成物。

【請求項３】

前記単離した外因性ミトコンドリアが、ナチュラルキラー細胞１個当たり１～１０３個の量で含まれる、請求項１に記載の医薬組成物。

【請求項４】

前記単離した外因性ミトコンドリアおよび前記ナチュラルキラー細胞が混合された組成物を遠心分離することにより、前記外因性ミトコンドリアが前記ナチュラルキラー細胞中に送達されている、請求項１に記載の医薬組成物。

【請求項５】

前記がんが、胃がん、肝臓がん、肺がん、結腸直腸がん、乳がん、前立腺がん、卵巣がん、膵臓がん、子宮頸がん、甲状腺がん、喉頭がん、急性骨髄性白血病、脳腫瘍、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫、頭頸部がん、唾液腺がん、およびリンパ腫からなる群から選択される、請求項１に記載の医薬組成物。

【請求項６】
前記感染性疾患が、Ｂ型肝炎、Ｃ型肝炎、ヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）感染症、サイトメガロウイルス感染症、ウイルス性呼吸器疾患、およびインフルエンザからなる群から選択される、請求項１に記載の医薬組成物。
【請求項７】
前記組成物が、液体または冷凍の形態である、請求項１に記載の医薬組成物。
【請求項８】
がんまたは感染性疾患を予防または治療するための医薬組成物の製造のための請求項１に記載のナチュラルキラー細胞の使用。
【請求項９】
前記組成物が、静脈内、皮下、点眼、腹腔内、および筋内経路からなる群から選択される経路により投与される、請求項８に記載の使用。
【請求項１０】
前記組成物が、前記がんまたは感染性疾患を予防または治療する効果を有する別の薬物または生理活性物質と組み合わせて投与される、請求項８に記載の使用。
【請求項１１】
単離した外因性ミトコンドリアを含む末梢血単核細胞を有効成分として含む、がんまたは感染性疾患を治療するための医薬組成物。
【請求項１２】
前記単離した外因性ミトコンドリアが、筋細胞、肝細胞、線維芽細胞、上皮細胞、神経細胞、脂肪細胞、骨細胞、白血球、リンパ球、または粘膜細胞から得られたものである、請求項１１に記載の医薬組成物。
【請求項１３】
前記単離した外因性ミトコンドリアが、末梢血単核細胞１個当たり１～１０３個の量で含まれる、請求項１１に記載の医薬組成物。
【請求項１４】
前記がんが、胃がん、肝臓がん、肺がん、結腸直腸がん、乳がん、前立腺がん、卵巣がん、膵臓がん、子宮頸がん、甲状腺がん、喉頭がん、急性骨髄性白血病、脳腫瘍、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫、頭頸部がん、唾液腺がん、およびリンパ腫からなる群から選択される、請求項１１に記載の医薬組成物。
【請求項１５】
前記感染性疾患が、Ｂ型肝炎、Ｃ型肝炎、ヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）感染症、サイトメガロウイルス感染症、ウイルス性呼吸器疾患、およびインフルエンザからなる群から選択される、請求項１１に記載の医薬組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、細胞療法製品に関し、より詳細には、外因性ミトコンドリアを含むナチュラルキラー（以下、ＮＫと称する）細胞または末梢血単核細胞（以下、ＰＢＭＣと称する）、および同細胞を有効成分として含む医薬組成物に関する。
【背景技術】
【０００２】
最近では、バイオ医薬品が、種々の難病を治療するために開発されている。バイオ医薬品は、タンパク質薬物、抗体薬物および細胞療法製品を含む。ここで、細胞療法製品は、疾患の治療、診断、または予防を目的として使用する医薬を指し、細胞療法製品は、ｅｘｖｉｖｏで単離および増殖を実施すること、または他の方法を用いて細胞の生物学的特性を変更すること等による一連の操作を通じて得ることができる。細胞療法製品は、自家、同種、または異種細胞に由来し得る。細胞療法製品は、細胞型によって、体細胞療法製品および幹細胞療法製品に分類することができる。
【０００３】

一方、患者の免疫機能を使用する免疫療法が、がん療法において注目されている。免疫療法では、多様な機能を有する免疫細胞の特性を利用し、免疫細胞の複合的相互作用によってがん細胞を除去する。ヒト血中のＰＢＭＣは、リンパ球または単球等の円形の核を有する血液細胞であり、Ｂ細胞、Ｔ細胞、マクロファージ、樹状細胞（ＤＣ）、およびＮＫ細胞を含む。これらの中でも、ＮＫおよび細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）細胞は、がん細胞を直接的に除去する。抗原をこれらのエフェクター細胞に提示する抗原提示細胞は、樹状細胞またはＢ細胞を含む。さらに、種々のサイトカインを分泌するヘルパーＴ細胞および制御性Ｔ細胞等は、免疫応答に関与する。これらの中でも、ＮＫ細胞は、免疫細胞療法において新興かつ有望な免疫細胞である。

【０００４】

特に、ＮＫ細胞は、非特異的にがん細胞を殺傷する能力を有することが示されており、ＮＫ細胞について多くの研究が行われている。このような研究に基づいて、がんにおけるＮＫ細胞療法は、がん細胞の治療のための新興手段となっている。特に、宿主またはがんに感染した病原体に対するサイトカイン分泌により達成された自然および獲得免疫応答において、ＮＫ細胞が重要な役割を担うことが報告されている。

【０００５】

したがって、本発明者らは、ＮＫ細胞およびＰＢＭＣの細胞傷害力を向上させる新規方法を見出すことに取り組んだ。結果として、本発明者らは、ＮＫおよびＰＢＭＣの細胞傷害性を上昇させる方法を見出し、したがって、このような細胞傷害性を使用してがんを治療する方法を提供し、これにより本発明を完成させた。

【技術的課題】

【０００６】

本発明の目的は、細胞傷害性が上昇しているＮＫ細胞および同細胞を含む医薬組成物を提供することである。

【０００７】

本発明の別の目的は、細胞傷害性が上昇しているＰＢＭＣおよび同細胞を含む医薬組成物を提供することである。

【課題の解決】

【０００８】

上記の目的を達成するために、本発明は、外因性ミトコンドリアを含むＮＫ細胞、および同細胞を含む、がんまたは感染性疾患の予防または治療のための医薬組成物を提供する。

【０００９】

さらに、本発明は、外因性ミトコンドリアを含むＰＢＭＣ、および同細胞を含む、がんまたは感染性疾患を予防または治療するための医薬組成物を提供する。

【発明の有利な効果】

【００１０】

外因性ミトコンドリアを導入した、ＮＫ細胞およびＰＢＭＣは、がん特異的殺傷効果の上昇をもたらす細胞傷害性の上昇を有するだけでなく、ｉｎ　ｖｉｖｏで存在する免疫細胞としての副作用を示すこともない。さらに、ＮＫ細胞およびＰＢＭＣでは、その細胞自体の能力に関して向上しており、そのため、ＮＫ細胞およびＰＢＭＣが関与する種々の疾患に広範に適用可能である。結果として、ＮＫ細胞およびＰＢＭＣを含む医薬組成物が、大いに商業的適用が可能であることが期待される。

【図面の簡単な説明】

【００１１】

【図１】図１は、ヒト正常肝細胞（ＷＲＬ－６８）由来ミトコンドリアがＮＫ細胞中に送達されたかどうかを検討するために、ＰＣＲ解析法により得られた結果を示す。

【図２】図２は、ヒト正常肝細胞由来ミトコンドリアがＮＫ細胞中に送達されたかどうかを検討するために、ＦＡＣＳ解析により得られた結果を示す。

【図３】図３は、ＮＫ細胞中に送達されたヒト正常肝細胞由来ミトコンドリアの位置を特定するために、蛍光顕微鏡観察により得られた結果を示す。

【図４Ａ】図４Ａは、ＣＤ１０７ａ脱顆粒アッセイによる、外因性ミトコンドリアが送達されたＮＫ細胞の抗がん活性を示す結果を示す。
【図４Ｂ】図４Ｂは、ＣＤ１０７ａ脱顆粒アッセイによる、外因性ミトコンドリアが送達されたＮＫ細胞の抗がん活性を示す結果を示す。
【図５】図５は、Ｋ５６２細胞傷害アッセイによる、外因性ミトコンドリアが送達されたＮＫ細胞の細胞傷害効果を示す結果を示す。
【図６】図６は、臍帯間葉幹細胞（ＵＣ－ＭＳＣ）由来のミトコンドリアがＮＫ細胞中に送達されたかどうかを検討するために、ＦＡＣＳ解析により得られた結果を示す。
【図７】図７は、Ｋ５６２細胞傷害アッセイを使用した、ＵＣ－ＭＳＣ由来ミトコンドリアが送達されたＮＫ細胞の細胞傷害効果を示す結果を示す。
【図８Ａ】図８Ａは、急性骨髄性白血病の動物モデルにおける、ＵＣ－ＭＳＣ由来ミトコンドリアが送達されたＮＫ細胞による、マウスの体重および生存率に関する治療効果を示す結果を示す。
【図８Ｂ】図８Ｂは、急性骨髄性白血病の動物モデルにおける、ＵＣ－ＭＳＣ由来ミトコンドリアが送達されたＮＫ細胞による、マウスの体重および生存率に関する治療効果を示す結果を示す。
【図８Ｃ】図８Ｃは、急性骨髄性白血病の動物モデルにおける、ＵＣ－ＭＳＣ由来ミトコンドリアが送達されたＮＫ細胞による、マウスの体重および生存率に関する治療効果を示す結果を示す。
【図９】図９は、ＵＣ－ＭＳＣ由来ミトコンドリアが送達されたＮＫ細胞を投与した急性骨髄性白血病の動物モデルにおける血中腫瘍マーカーの発現分布の結果を示す。
【図１０】図１０は、Ｋ５６２細胞傷害アッセイによる、外因性ミトコンドリアが送達されたＰＢＭＣの細胞傷害効果を示す結果を示す。
【発明の詳細な説明】
【００１２】
以下、本発明を詳細に記載する。
【００１３】
本発明の一側面では、外因性ミトコンドリアが富化されたＮＫ細胞を提供する。
【００１４】
ここで使用する場合、用語「外因性ミトコンドリア」は、ＮＫ細胞中に存在するミトコンドリアではなく、外因的に導入したミトコンドリアを指す。ここで、外因性ミトコンドリアは、ＮＫ細胞を得た対象と同一の対象から得てもよいが、別の対象から得てもよい。ここで、外因性ミトコンドリアは、哺乳動物から得てもよく、好ましくはヒトから得てもよい。例えば、外因性ミトコンドリアは、筋細胞、肝細胞、線維芽細胞、上皮細胞、神経細胞、脂肪細胞、骨細胞、白血球、リンパ球、または粘膜細胞から得てもよく、好ましくは良好なミトコンドリア活性を有する筋細胞から得てもよい。さらに、ミトコンドリアは、ｅｘ　ｖｉｖｏで培養した細胞から得てもよい。
【００１５】
一方、外因性ミトコンドリアは、細胞を破壊し、遠心分離を実施することにより、または細胞を培養し、細胞を破壊し、遠心分離を実施することにより得てもよい。ミトコンドリアを得る方法では、細胞小器官の採取に使用する従来の方法を使用することができる。
【００１６】
ここで、外因性ミトコンドリアを含むＮＫ細胞はＮＫ細胞10^5個当たり０．０１～５００μｇ、０．１～４５０μｇ、０．５～３００μｇ、１～１００μｇ、または２～１０μｇの量のミトコンドリアを導入することにより得てもよい。ここで、ＮＫ細胞は１～10^3または１０～10^2の外因性ミトコンドリアを含んでもよい。具体的には、外因性ミトコンドリアの数は、約１、１０、１００または５００の外因性ミトコンドリアがＮＫ細胞１個中に含まれるようであってもよい。ここで、ＮＫ細胞中に含まれる外因性ミトコンドリアの数は、外因性ミトコンドリアの量を制御してＮＫ細胞中に導入することにより調節することができる。各対象ＮＫ細胞は、異なる数の外因性ミトコンドリアを含んでもよい。

【００１７】
さらに、ＮＫ細胞は、哺乳動物またはヒトに由来してもよい。好ましくは、ＮＫ細胞は、ＮＫ細胞療法を受けようとする対象から得てもよい。ここで、ＮＫ細胞は、対象の血液から直接単離して使用してもよく、または対象から得た未熟なＮＫ細胞または幹細胞を分化させることにより得て使用してもよい。
【００１８】
一方、外因性ミトコンドリアをＮＫ細胞中に導入するために、外因性ミトコンドリアおよびＮＫ細胞を混合してもよく、次いで、混合物を遠心分離に供して、ミトコンドリアをＮＫ細胞中に効率的に送達してもよい。遠心分離実施時の条件を適切に調節して、細胞を損傷することなく、ミトコンドリアを効率的に導入することができる。ここで、遠心分離は、室温で実施してもよく、温度条件は、細胞安定性のために適切に選択することができる。ここで、外因性ミトコンドリア導入時、ＮＫ細胞および外因性ミトコンドリアを、界面活性物質の存在下で混合して、外因性ミトコンドリアのＮＫ細胞中への膜透過性を高め、これにより、外因性ミトコンドリアの導入効率を高めてもよい。
【００１９】
ここで、遠心分離は１００×ｇ、３００×ｇ、５００×ｇ、８００×ｇ、１，０００×ｇ、１，２００×ｇ、１，５００×ｇ、１，８００×ｇ、２，０００×ｇ、２，４００×ｇ、３，０００×ｇ、５，０００×ｇ、または１０，０００×ｇで実施してもよい。さらに、遠心分離時間は０．１分～６０分であってもよいが、これに限定されない。具体的には、遠心分離時間は１分、２分、３分、５分、１０分、２０分、または３０分であってもよい。さらに、遠心分離は０℃～４０℃、２０℃～３８℃、または３０℃～３７℃の温度で実施してもよい。
【００２０】
このように、ＮＫ細胞と外因性ミトコンドリアの両方に遠心力を適用することにより、ＮＫ細胞に損傷をあまり与えずに、ミトコンドリアをＮＫ細胞中に高効率で送達することができる。
【００２１】
さらに、界面活性物質を使用して、外因性ミトコンドリアのＮＫ細胞中への細胞膜透過性を促進することができる。界面活性物質を添加する時点は、ＮＫ細胞の外因性ミトコンドリアとの混合前、混合中、または混合後であってもよい。さらに、界面活性物質をＮＫ細胞に添加した後、特定の期間、ＮＫ細胞をインキュベートして、外因性ミトコンドリアのＮＫ細胞への細胞膜透過性を高めてもよい。インキュベーション時間は０．１～６０分であってもよい。具体的には、インキュベーション時間は１分、５分、１０分、２０分、または３０分であってもよいが、これに限定されない。
【００２２】
具体的には、界面活性物質は、好ましくは非イオン性界面活性物質であり、ポロキサマーであってもよい。ここで、ポロキサマーは、ポリオキシエチレンの２つの親水性鎖と隣接するポリオキシプロピレンの中央の疎水性鎖からなるトリブロック共重合体である。さらに、混合物中の界面活性物質は、１～１００ｍｇ／ｍｌ、３～８０ｍｇ／ｍｌ、または５～４０ｍｇ／ｍｌの濃度であってもよく、好ましくは１０～３０ｍｇ／ｍｌであってもよい。
【００２３】
さらに、方法は、所定の時間および温度条件下で混合物をインキュベートする工程をさらに含んでもよい。インキュベーションは０℃～４０℃、２０℃～３８℃、または３０℃～３７℃の温度で実施してもよい。さらに、インキュベーションは０．１～４時間、０．５～３．８時間、または０．８～３．５時間実施してもよい。さらに、インキュベーションは、遠心分離を実施した後に所定の時間実施して、外因性ミトコンドリアをＮＫ細胞中に送達してもよい。さらに、インキュベーション時間は、細胞型およびミトコンドリアの量に応じて適切に選択することができる。
【００２４】

本発明の別の側面では、外因性ミトコンドリアを含むＮＫ細胞を有効成分として含む、がんまたは感染性疾患を治療するための医薬組成物を提供する。

【００２５】

ここで、がんは、胃がん、肝臓がん、肺がん、結腸直腸がん、乳がん、前立腺がん、卵巣がん、膵臓がん、子宮頸がん、甲状腺がん、喉頭がん、急性骨髄性白血病、脳腫瘍、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫、頭頸部がん、唾液腺がん、およびリンパ腫からなる群から選択される何れか１つであってもよい。さらに、感染性疾患は、Ｂ型肝炎、Ｃ型肝炎、ヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）感染症、サイトメガロウイルス感染症、ウイルス性呼吸器疾患、およびインフルエンザからなる群から選択される何れか１つであってもよい。

【００２６】

さらに、医薬組成物は、液体または冷凍の形態の調製物に生成してもよい。冷凍後に再び解凍する場合であっても、医薬組成物は、細胞機能障害を呈することなく、高い細胞生存率および細胞殺傷能力を維持することができる。したがって、医薬組成物は、追加処理なしで、液体または冷凍の保存形態に容易に保存および供給することができる。

【００２７】

本発明のさらに別の側面では、外因性ミトコンドリアを含むＮＫ細胞を有効成分として含む医薬組成物を対象に投与する工程を含む、疾患を予防または治療する方法を提供する。

【００２８】

このような方法は、疾患を有する対象または疾患を有する疑いのある対象に有効量の本発明のＮＫ細胞を投与する工程を含む。例えば、外因性ミトコンドリアを導入した細胞は、対象、好ましくは哺乳動物に治療調製物として投与することができる。細胞は、静脈内、または皮下経路により投与することができる。本発明の組成物を、静脈内、皮下、点眼、腹腔内、または筋内経路等により非経口的に投与する場合、組成物は、好ましくは水性の形態であるか、または組成物が、生理学的に適用可能な体液、懸濁液、または溶液を含むことが好ましい。したがって、担体またはビヒクルは、生理学的に許容可能であり、そのため、組成物に添加して患者に送達することができる。このような担体またはビヒクルは、患者の電解液に悪影響を与えない。したがって、生理食塩水を調製物の担体として一般に使用することができる。

【００２９】

本発明の細胞を使用して疾患を予防または治療する方法はまた、本発明の細胞と組み合わせて、疾患を予防または治療する効果を有する別の薬物または生理活性物質を投与することを含んでもよい。この併用投与の経路、時間、および用量は、病型、患者の病状、治療または予防の目的、および組み合わせて使用する他の薬物または生理活性物質に応じて決定することができる。

【００３０】

さらに、疾患は、がんまたは感染性疾患であってもよい。ここで、がんは、胃がん、肝臓がん、肺がん、結腸直腸がん、乳がん、前立腺がん、卵巣がん、膵臓がん、子宮頸がん、甲状腺がん、喉頭がん、急性骨髄性白血病、脳腫瘍、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫、頭頸部がん、唾液腺がん、およびリンパ腫からなる群から選択されてもよい。感染性疾患は、Ｂ型肝炎、Ｃ型肝炎、ヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）感染症、サイトメガロウイルス感染症、ウイルス性呼吸器疾患、およびインフルエンザからなる群から選択される何れか１つであってもよい。

【００３１】

本発明のよりさらなる別の側面では、外因性ミトコンドリアを含むＰＢＭＣを提供する。

【００３２】

ここで使用する場合、用語「末梢血単核細胞」は、末梢血中に存在する球形の核を有する細胞を指し、これは、末梢血単球またはＰＢＭＣと称する。このようなＰＢＭＣは、Ｂ細胞、Ｔ細胞、マクロファージ、樹状細胞、およびＮＫ細胞等の免疫細胞を含んでもよい。ＰＢＭＣは、対象の血液より得ることができる。ここで、外因性ミトコンドリアは、上記のように対象の組織または細胞から得ることができる。

【００３３】
ここで、外因性ミトコンドリアを含むＰＢＭＣは、ＰＢＭＣ10^5個当たり０．０１～５００μｇ、０．１～４５０μｇ、０．５～３００μｇ、１～１００μｇ、または２～１０μｇの量のミトコンドリアを導入することにより得てもよい。ここで、外因性ミトコンドリアは、ＰＢＭＣ１個当たり１～10^3または１０～１００の量で含んでいてもよい。さらに、外因性ミトコンドリアをＰＢＭＣ中に導入する方法は、上記のように遠心分離により行うことができる。本発明のよりさらなる別の側面では、外因性ミトコンドリアを含むＰＢＭＣを有効成分として含む、がんまたは感染性疾患を治療するための医薬組成物を提供する。
【００３４】
ここで、上記のように、がんは、胃がん、肝臓がん、肺がん、結腸直腸がん、乳がん、前立腺がん、卵巣がん、膵臓がん、子宮頸がん、甲状腺がん、喉頭がん、急性骨髄性白血病、脳腫瘍、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫、頭頸部がん、唾液腺がん、およびリンパ腫からなる群から選択されてもよい。さらに、感染性疾患は、Ｂ型肝炎、Ｃ型肝炎、ヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）感染症、サイトメガロウイルス感染症、ウイルス性呼吸器疾患、およびインフルエンザからなる群から選択される何れか１つであってもよい。
【００３５】
これ以降、以下の例を参照して、本発明をより詳細に記載する。ただし、以下の例は、本発明の例示の目的のみに提供し、本発明の範囲は、これのみに限定されない。
【００３６】
Ｉ．外因性ミトコンドリアを導入したＮＫ細胞の生成、およびその機能の確認
例１．外因性ミトコンドリアを導入したＮＫ細胞の生成
ヒト正常肝細胞（ＷＲＬ－６８）（ＣＲＬ１４５８、ＡＴＣＣ）を、１０％のウシ胎仔血清（ＦＢＳ、Ｇｉｂｃｏ製）、１００μｇ／ｍｌのストレプトマイシン、および１００Ｕ／ｍｌのアンピシリンを追加したダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）に播種し、７２時間培養した。培養完了後、ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水（ＤＰＢＳ、Ｇｉｂｃｏ製）で細胞を２回洗浄した。洗浄した細胞を０．２５％のトリプシン－ＥＤＴＡ（ＴＥ、Ｇｉｂｃｏ製）で処理して細胞を得た。得られた細胞について、ミトコンドリアを抽出するために、血球計数器を使用して細胞数を測定し、細胞約３×10^6個／ｍｌの量の細胞を採取した。
【００３７】
その後、約４℃の温度で１０分間、３５０×ｇの速度で細胞株を一次遠心分離に供した。得られたペレットを採取し、１０～１５分間、緩衝液に再懸濁および均質化した。約４℃の温度で３分間、１，１００×ｇの速度でペレットを含む組成物を二次遠心分離に供して上清を得た。次いで、約４℃の温度で１５分間、１２，０００×ｇの速度で上清を三次遠心分離に供してミトコンドリアを細胞株から単離した。
【００３８】
１×10^5の量の単離したミトコンドリアを別個のヒトＮＫ細胞（ＮＫ９２ｍｉ）（ＣＲＬ２４０８、ＡＴＣＣ）を含む試験管内に注入し、約４℃の温度で１５分間、２，５００×ｇの速度で遠心分離を実施した。上清の除去後、ＰＢＳによる洗浄を実施し、約４℃の温度で５分間、遠心分離を実施した。同条件下で２回、洗浄を実施した。ここで、単離したミトコンドリアを受容細胞１×10^5個当たり０．０５、０．０５、０．５および５μｇの重量で送達した。
【００３９】
例２．ヒト正常肝細胞（ＷＲＬ６８）由来ミトコンドリアのＮＫ細胞中への送達の確認（ＰＣＲ解析法）
ＤＮＡ精製キット（ＮｕｃｌｅｏＳｐｉｎ、ＭＡＣＨＥＲＥＹ－ＮＡＧＥＬ　ＧｍｂＨ＆Ｃｏ．ＫＧ製）を使用して、例１で採取したＮＫ細胞から遺伝子全体を抽出した。抽出したＤＮＡをＷＲＬ－６８ミトコンドリア特異的同定プライマー（Ｆ：５’－ＣＴＡ　ＴＴＣ　ＴＣＴ　ＧＴＴ　ＣＴＴ　ＴＣＡ　ＴＧＧ－３’（配列番号１）、Ｒ：５’－ＡＡＧ　ＴＡＴ

ＴＴＡ ＴＧＧ ＴＡＣ ＣＧＴ ＡＣＧ－３’（配列番号２））とそれぞれ混合した。次いで、２Ｘ ＰＣＲ Ｍａｓｔｅｒ Ｍｉｘ（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ製、Ｆｏｓｔｅｒ Ｃｉｔｙ、ＣＡ、ＵＳＡ）および三次蒸留水を添加して、得られた総量を１０μｌとし、Ｖｅｒｉｔｉ９６ウェル型サーマルサイクラー（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ製）を使用して所望のＤＮＡ部分を増幅した。

【００４０】

ＰＣＲ反応を実施して増幅したＤＮＡを得た。増幅したＤＮＡを同定するために、１．５％アガロースゲル上で電気泳動を実施し、次いで、Ｌｏａｄｉｎｇ Ｓｔａｒ（ＤＹＮＥ ＢＩＯ ＩＮＣ．製、Ｓｅｏｎｇｎａｍ、Ｋｏｒｅａ）による染色を実施した。ＵＶ分光計（Ｃｈｅｍｉ－Ｄｏｃ ＸＲＳ、Ｂｉｏ－Ｒａｄ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｉｎｃ．製、Ｈｅｒｃｕｌｅｓ、ＣＡ、ＵＳＡ）を使用して増幅したＤＮＡバンドを同定した。ＧＡＰＤＨをハウスキーピング遺伝子として選択した。このために、ＧＡＤＰＨを増幅可能であるプライマー（Ｆ－５’－ＧＧＡ ＡＧＧ ＴＧＡ ＡＧＧ ＴＣＧ ＧＡＧ－３’（配列番号３）、Ｒ－５’－ＧＧＣ ＡＡＣ ＡＡＴ ＡＴＣ ＣＡＣ ＴＴＴ ＡＣＣ－３’（配列番号４））を使用した。この結果を図１に示す。

【００４１】

図１は、ＮＫ細胞中に送達された外因性ミトコンドリアの量が、ＮＫ細胞と混合するミトコンドリアの量（０．００５、０．０５、０．５および５μｇ）が増加するにつれて増加することを示した。

【００４２】

例３．ヒト正常肝細胞（ＷＲＬ－６８）由来ミトコンドリアのＮＫ細胞中への送達の確認（ＦＡＣＳ解析法）

蛍光活性化セルソーター（ＦＡＣＳ）解析を実施して、肝細胞由来ミトコンドリアがＮＫ細胞中に送達されたかどうかを確認した。ヒト正常肝細胞から単離したミトコンドリアを５００ｎＭのＧｒｅｅｎ ｍｉｔｏｔｒａｃｋｅｒ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ製、Ｗａｌｔｈａｍ、ＵＳＡ）で処理した。５％CO_2のインキュベーター内に３７℃で１０分間、得られたミトコンドリアを反応させ、洗浄した。肝細胞由来の蛍光標識したミトコンドリアを、遠心分離法を使用して免疫細胞中に送達し、次いで、免疫細胞を１ｍＬのＰＢＳ中に再懸濁した。次いで、ミトコンドリア送達を確認し、ＦＡＣＳ Ｃａｌｉｂｕｒフローサイトメーター（ＢＤＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ製、Ｓａｎ Ｊｏｓｅ、ＣＡ、ＵＳＡ）を使用して解析した。結果を図２に示す。

【００４３】

図２から、ＮＫ細胞中に送達されたミトコンドリアの量（０．００５、０．０５、０．５および５μｇ）に応じてＮＫ細胞を識別することが可能であることが確認された。

【００４４】

例４．ヒト正常肝細胞（ＷＲＬ６８）由来ミトコンドリアのＮＫ細胞中への送達の確認（蛍光顕微鏡による観察）

正常肝細胞（ＷＲＬ－６８）由来ミトコンドリアがヒトＮＫ細胞（ＮＫ９２ｍｉ）中に送達されたかどうかを確認するために、ＮＫ細胞のミトコンドリアを５００ｎＭのＧｒｅｅｎ ｍｉｔｏｔｒａｃｋｅｒ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ製、Ｗａｌｔｈａｍ、ＵＳＡ）で処理し、５％CO_2のインキュベーター内に３７℃で１０分間、反応させた。肝細胞の単離したミトコンドリアを５００ｎＭのｒｅｄ ｍｉｔｏｔｒａｃｋｅｒで処理した。５％CO_2のインキュベーター内に３７℃で１０分間、得られたミトコンドリアを反応させ、次いで、ＮＫ細胞中に送達した。５μｇのミトコンドリアを送達した後、得られた細胞を２４ウェルプレートに播種し、５％CO_2のインキュベーター内に３７℃でインキュベートした。次いで、蛍光顕微鏡を使用して、２４時間以内に細胞内送達を確認した。核染色用ＤＡＰＩ試薬を対照染色試薬として使用した。結果を図３に示す。

【００４５】

図３から、外因性ミトコンドリアがＮＫ細胞中に送達されたことが確認された。

【００４６】
例５．ミトコンドリアが送達されたＮＫ細胞の抗がん活性における変化の解析（ＣＤ１０７ａ脱顆粒アッセイ）
例１で採取した、外因性ミトコンドリアを導入したヒトＮＫ細胞（ＮＫ９２ｍｉ）では、ＮＫ細胞活性の指標である脱顆粒によりＣＤ１０７ａの発現を確認するために、ヒトＮＫ細胞および標的細胞（Ｋ５６２）を１０：１の比率で混合し、次いで、混合物を蛍光物質共役抗ＣＤ１０７ａで処理した。得られた混合物を４時間、コインキュベートした。コインキュベートした後、表面染色のために、得られた混合物を抗ＣＤ５６で処理し、３０分間反応させた。次いで、蛍光活性化セルソーター（ＦＡＣＳ）解析を実施した。結果を図４Ａおよび４Ｂに示す。
【００４７】
図４Ａおよび４Ｂから、外因性ミトコンドリアの量（０．０５、０．５および５μｇ）に伴ってＮＫ細胞の抗がん活性が上昇することが確認された。
【００４８】
例６．ミトコンドリアが送達されたＮＫ細胞の抗がん活性における変化の確認（Ｋ５６２細胞傷害アッセイ）
例１で採取したＮＫ細胞の抗がん活性を確認するために、採取したＮＫ細胞を緑色蛍光染色（ＣＦＳＥ、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ製）で標識した標的細胞（Ｋ５６２）と１０：１で混合し、次いで、５％CO_2、３７℃の条件のインキュベーター内で４時間、混合物をコインキュベートした。コインキュベートした後、ＮＫ細胞により殺傷される標的細胞を解析するために、得られた混合物を赤色蛍光染色（７－ＡＡＤ、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ製）で処理し、次いで、１０分間反応させた。殺傷標的細胞の蛍光強度を、蛍光活性化セルソーター（ＦＡＣＳ）により解析した。結果を図５に示す。
【００４９】
図５から、送達された外因性ミトコンドリアの量（０．０５、０．５および５μｇ）に伴ってＫ５６２に対する細胞傷害性が上昇することが確認された。
【００５０】
例７．臍帯由来間葉幹細胞のミトコンドリアを導入したＮＫ細胞の生成
胎盤（ＣＨＡ　ｂｕｎｄａｎｇ医療センターより提供、ＩＲＢ　Ｎｏ．１０４４３０８－２０１５１１－ＢＲ－０２２－０２）由来間葉幹細胞を１０％のウシ胎仔血清（ＦＢＳ、Ｇｉｂｃｏ製）、１００μｇ／ｍｌのストレプトマイシン、および１００Ｕ／ｍｌのアンピシリンを追加したアルファ最小必須培地（アルファＭＥＭ）に播種し、７２時間培養した。
【００５１】
培養完了後、ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水（ＤＰＢＳ、Ｇｉｂｃｏ製）で細胞を２回洗浄した。洗浄した細胞を０．２５％のトリプシン－ＥＤＴＡ（ＴＥ、Ｇｉｂｃｏ製）で処理して細胞を得た。得られた細胞について、ミトコンドリアを抽出するために、血球計数器を使用して細胞数を測定し、細胞約2×10^7個／ｍｌの量の細胞を採取した。
【００５２】
その後、約４℃の温度で１０分間、３５０×ｇの速度で細胞株を一次遠心分離に供した。得られたペレットを採取し、１０～１５分間、緩衝液に再懸濁および均質化した。約４℃の温度で３分間、１，１００×ｇの速度でペレットを含む組成物を二次遠心分離に供して上清を得た。次いで、約４℃の温度で１５分間、１２，０００×ｇの速度で上清を三次遠心分離に供してミトコンドリアを細胞株から単離した。
【００５３】
1×10^5の量の単離したミトコンドリアを別個のヒトＮＫ細胞（ＮＫ９２ｍｉ）（ＣＲＬ２４０８、ＡＴＣＣ）を含む試験管内に注入し、約４℃の温度で１５分間、２，５００×ｇの速度で遠心分離を実施した。上清の除去後、ＰＢＳによる洗浄を実施し、約４℃の温度で５分間、遠心分離を実施した。同条件下で２回、洗浄を実施した。ここで、単離したミトコンドリアを受容細胞1×10^5個当たり０．３、１、３、５および１０μｇの重量で送達した。

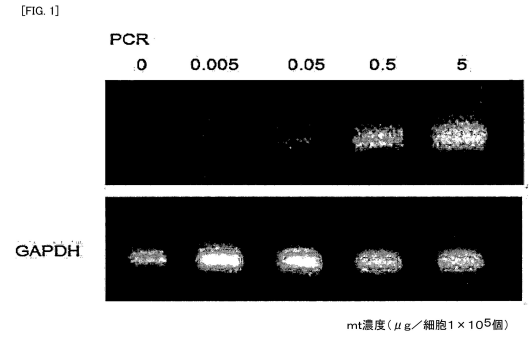
【００５４】
例８．臍帯由来間葉幹細胞（ＵＣ－ＭＳＣ）のミトコンドリアのＮＫ細胞中への送達の確認（ＦＡＣＳ解析法）
蛍光活性化セルソーター（ＦＡＣＳ）解析を実施して、臍帯由来間葉幹細胞由来のミトコンドリアがＮＫ細胞中に送達されたかどうかを確認した。臍帯由来間葉幹細胞から単離したミトコンドリアを５００ｎＭのＲｅｄ ｍｉｔｏｔｒａｃｋｅｒ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ製、Ｗａｌｔｈａｍ、ＵＳＡ）で処理した。５％CO_2のインキュベーター内に３７℃で３０分間、得られたミトコンドリアを反応させ、洗浄した。臍帯由来間葉幹細胞の蛍光標識したミトコンドリアを、遠心分離法を使用して免疫細胞中に送達し、次いで、細胞を１ｍＬのＰＢＳ中に再懸濁した。次いで、ミトコンドリア送達を確認し、ＦＡＣＳ Ｃａｌｉｂｕｒフローサイトメーター（ＢＤＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ製、Ｓａｎ Ｊｏｓｅ、ＣＡ、ＵＳＡ）を使用して解析した。結果を図６に示す。
【００５５】
図６から、ＮＫ細胞中に送達されたＵＣ－ＭＳＣ由来ミトコンドリアの量（０．３、１、３、５および１０μｇ）に伴ってＮＫ細胞を識別することが可能であることが確認された。
【００５６】
例９．臍帯由来間葉幹細胞（ＵＣ－ＭＳＣ）由来のミトコンドリアが送達されたＮＫ細胞の抗がん活性における変化の確認（Ｋ５６２細胞傷害アッセイ）
例７で採取したＮＫ細胞の抗がん活性を確認するために、採取したＮＫ細胞を緑色蛍光染色（ＣＦＳＥ、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ製）で標識した標的細胞（Ｋ５６２）と１０：１で混合し、次いで、５％CO_2、３７℃の条件のインキュベーター内で４時間、混合物をコインキュベートした。コインキュベートした後、ＮＫ細胞により殺傷される標的細胞を解析するために、得られた混合物を赤色蛍光染色（７－ＡＡＤ、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ製）で処理し、１０分間反応させた。殺傷標的細胞の蛍光強度を、蛍光活性化セルソーター（ＦＡＣＳ）により解析した。結果を図７に示す。
【００５７】
図７から、送達された外因性ミトコンドリアの量（０．５、１、３、５および１０μｇ）に伴ってＫ５６２に対する細胞傷害性が上昇することが確認された。
【００５８】
例１０．体重変化および生存率による急性骨髄性白血病に関する治療評価の確認
６～８週齢の雄のＮＯＤ．ｃｇ－Ｐｒｋｄｃｓｃｉｄ ＩＬ２ｒｇｔｍ１Ｓｕｇ／ＪｉｃＫｏａｔマウスをＫｏａｔｅｃｈ Ｃｏ．，Ｌｔｄ．（Ｇｙｅｏｎｇｇｉ－ｄｏ、Ｋｏｒｅａ）から購入した。購入したマウスをＣＨＡ大学にある実験動物センターの清浄域において適応期間に供し、次いで、実験を行った。適応期間中、マウスを保持する環境は、１２時間間隔で昼夜を有し、２３±２℃の室温および４０％～６０％の湿度に維持した。マウスをこのような７日間の適応期間に供し、次いで、実験に投入した。このように準備したマウスに、尾静脈を介して（静脈内（ｉ．ｖ．）注射）Ｋ５６２細胞を細胞2×10^5個／１００μｌの量で投与して、急性骨髄性白血病モデルを作製した。
【００５９】
ここで、急性骨髄性白血病を誘発したマウスに、尾静脈を介して（静脈内（ｉ．ｖ．）注射）例７に従って調製したＮＫ細胞（ＮＫ９２ｍｉ）を細胞2×10^6個／１００μｌの量で投与して、実験群を作製した。同様に、ミトコンドリアを送達しなかった正常ＮＫ細胞（ＮＫ９２ｍｉ）を細胞2×10^6個／１００μｌの量で投与することにより対照群を作製した。実験群および対照群の体重変化および生存率を、急性骨髄性白血病細胞株（Ｋ５６２）を投与した時点から２４日間分析した。結果を図８Ａ～８Ｃに示す。
【００６０】
図８Ａ～８Ｃから、臍帯由来間葉幹細胞のミトコンドリアが送達されたＮＫ細胞を投与した群が、臍帯由来間葉幹細胞のミトコンドリアを送達しなかった正常ＮＫ細胞を投与した群と比較して、体重において約５％の増加および生存率において約４０％以上の増加を示すことが確認された。

【００６１】
例１１．腫瘍関連マーカーの解析による急性骨髄性白血病に関する治療評価の確認
腫瘍関連マーカーであるｐ５３およびｃ－Ｍｙｃの発現分布を確認するために、例１０に従って実験が行われた、実験群および対照群の血液を採取し、次いで、１２，０００×ｇで１５分間遠心分離して血清を単離した。ウエスタンブロットキット（ＷＢ、Ｂｉｏ－Ｒａｄ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｉｎｃ．製）を使用してｐ５３およびｃ－Ｍｙｃの発現分布について単離した血清を解析した。結果を図９に示す。
【００６２】
図９から、臍帯由来間葉幹細胞由来のミトコンドリアが送達されたＮＫ細胞を投与した群が、ｃ－Ｍｙｃの発現の減少およびｐ５３の発現の増加を示すことが確認された。ｃ－Ｍｙｃおよびｐ５３は、血中腫瘍マーカーである。
【００６３】
ＩＩ．外因性ミトコンドリアを導入したＰＢＭＣの生成およびその機能の確認
例１２．外因性ミトコンドリアを導入したＰＢＭＣの生成
臨床医が採取しておいた発明者の末梢血を（ＣＨＡ医療センターにおいて）ファルコン管内でＦｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅ（Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ製）により１：１で処理し、次いで、得られた物を４００×ｇで３５分間、遠心分離に供してＰＢＭＣペレットを採取した。採取したＰＢＭＣをＰＢＳで２回洗浄した。次いで、例１に従って単離したヒト肝細胞（ＷＲＬ－６８）由来ミトコンドリアを受容細胞１×１０^{5}個当たり０．０５、０．０５、０．５および５μｇの重量でＰＢＭＣ中に送達した。
【００６４】
例１３．ミトコンドリアが送達されたＰＢＭＣの抗がん活性における変化の確認（Ｋ５６２細胞傷害アッセイ）
例１２で採取したＰＢＭＣの抗がん活性を確認するために、採取したＰＢＭＣを緑色蛍光染色（ＣＦＳＥ、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ製）で標識した標的細胞（Ｋ５６２）と１０：１で混合し、次いで、５％CO_2、温度３７℃の条件のインキュベーター内で４時間、混合物をコインキュベートした。コインキュベートした後、ＮＫ細胞により殺傷される標的細胞を解析するために、得られた混合物を赤色蛍光染色（７－ＡＡＤ、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ製）で処理し、次いで、１０分間反応させた。殺傷標的細胞の蛍光強度を、蛍光活性化セルソーター（ＦＡＣＳ）により解析した。結果を図１０に示す。
【００６５】
図１０から、Ｋ５６２に対する細胞傷害性が、送達された外因性ミトコンドリアの量（０．００５、０．０５および０．５μｇ）に伴って上昇することが確認された。
以下に、当初の特許請求の範囲に記載していた発明を付記する。
［１］　外因性ミトコンドリアを含むナチュラルキラー細胞。
［２］　前記外因性ミトコンドリアが、筋細胞、肝細胞、線維芽細胞、上皮細胞、神経細胞、脂肪細胞、骨細胞、白血球、リンパ球、または粘膜細胞から得られたものである、［１］に記載のナチュラルキラー細胞。
［３］　前記外因性ミトコンドリアが、ナチュラルキラー細胞１個当たり１～１０３の量で含まれる、［１］に記載のナチュラルキラー細胞。
［４］　前記外因性ミトコンドリアおよび前記ナチュラルキラー細胞が混合された組成物を遠心分離することにより、前記外因性ミトコンドリアが前記ナチュラルキラー細胞中に送達されている、［１］に記載のナチュラルキラー細胞。
［５］　［１］に記載のナチュラルキラー細胞を有効成分として含む、がんまたは感染性疾患を治療するための医薬組成物。
［６］　前記がんが、胃がん、肝臓がん、肺がん、結腸直腸がん、乳がん、前立腺がん、卵巣がん、膵臓がん、子宮頸がん、甲状腺がん、喉頭がん、急性骨髄性白血病、脳腫瘍、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫、頭頸部がん、唾液腺がん、およびリンパ腫からなる群から選択される、［５］に記載の医薬組成物。
［７］　前記感染性疾患が、Ｂ型肝炎、Ｃ型肝炎、ヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）感

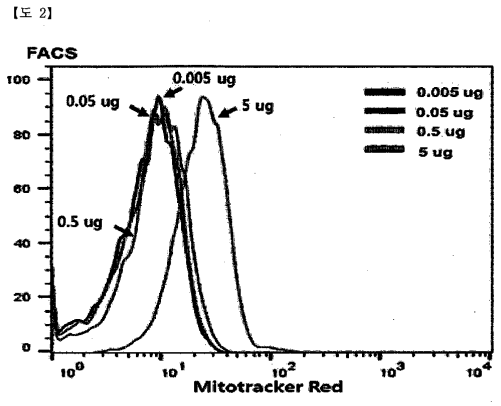
染症、サイトメガロウイルス感染症、ウイルス性呼吸器疾患、およびインフルエンザからなる群から選択される、［５］に記載の医薬組成物。
［８］　前記組成物が、液体または冷凍の形態である、［５］に記載の医薬組成物。
［９］　［１］に記載のナチュラルキラー細胞を有効成分として含む医薬組成物を、それを必要とする対象に投与する工程を含む、疾患を予防または治療する方法。
［１０］　前記組成物が、静脈内、皮下、点眼、腹腔内、および筋内経路からなる群から選択される経路により投与される、［９］に記載の方法。
［１１］　前記方法が、前記細胞と組み合わせて、前記疾患を予防または治療する効果を有する別の薬物または生理活性物質を投与することを含む、［９］に記載の方法。
［１２］　外因性ミトコンドリアを含む末梢血単核細胞。
［１３］　前記外因性ミトコンドリアが、筋細胞、肝細胞、線維芽細胞、上皮細胞、神経細胞、脂肪細胞、骨細胞、白血球、リンパ球、または粘膜細胞から得られたものである、［１２］に記載の末梢血単核細胞。
［１４］　前記外因性ミトコンドリアが、ナチュラルキラー細胞１個当たり１～１０３の量で含まれる、［１２］に記載の末梢血単核細胞。
［１５］　［１２］に記載の末梢血単核細胞を含む、がんまたは感染性疾患を治療するための医薬組成物。
［１６］　前記がんが、胃がん、肝臓がん、肺がん、結腸直腸がん、乳がん、前立腺がん、卵巣がん、膵臓がん、子宮頸がん、甲状腺がん、喉頭がん、急性骨髄性白血病、脳腫瘍、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫、頭頸部がん、唾液腺がん、およびリンパ腫からなる群から選択される、［１５］に記載の医薬組成物。
［１７］　前記感染性疾患が、Ｂ型肝炎、Ｃ型肝炎、ヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）感染症、サイトメガロウイルス感染症、ウイルス性呼吸器疾患、およびインフルエンザからなる群から選択される、［１５］に記載の医薬組成物。

【図面】

【図１】

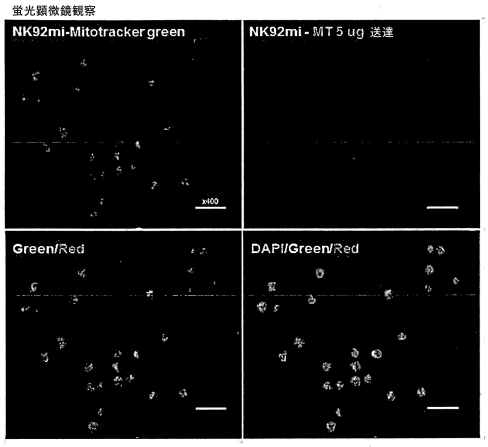


【図２】



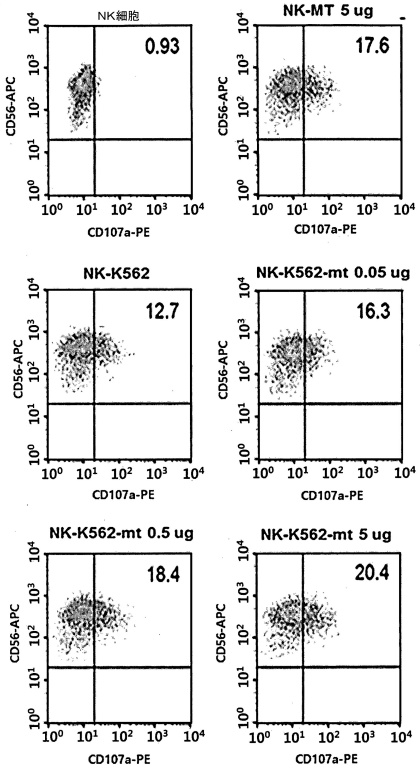
【図３】

[FIG. 3]



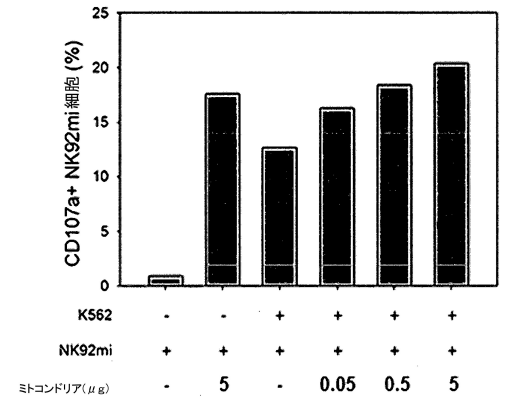
【図４Ａ】

[FIG. 4A]



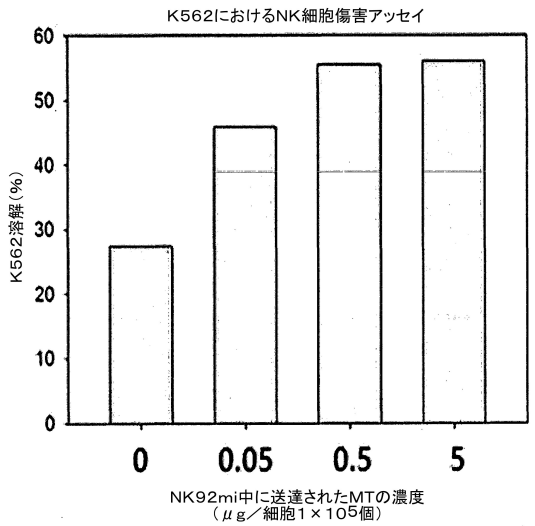
【図４Ｂ】

[FIG. 4B]



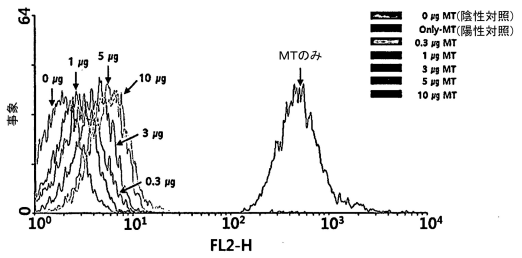
【図５】

[FIG. 5]



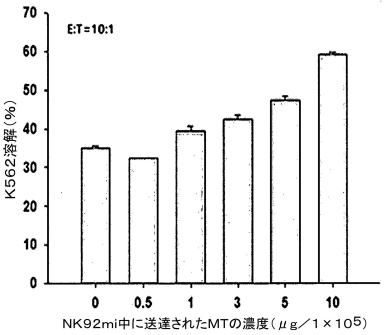
【図６】

[FIG. 6]



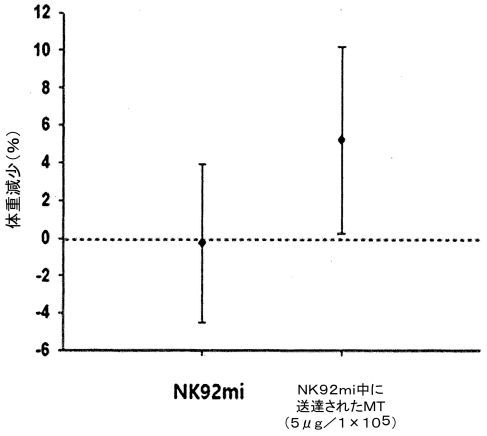
【図７】

[FIG. 7]



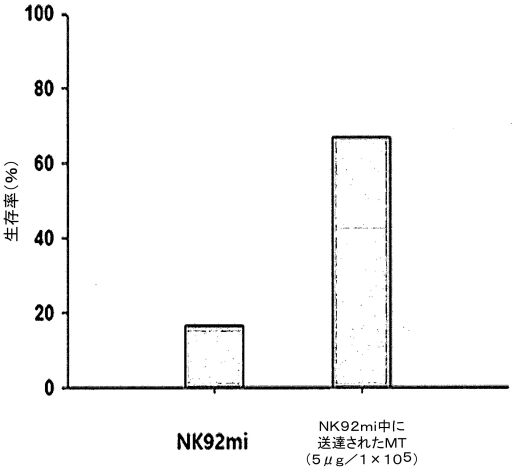
【図８Ａ】

[FIG. 8A]



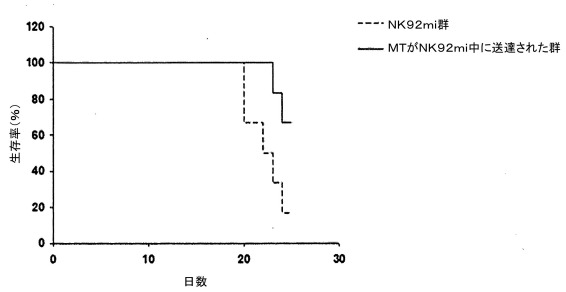
【図８Ｂ】

[FIG. 8B]



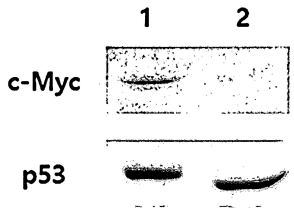
【図８Ｃ】

[FIG. 8C]



【図９】

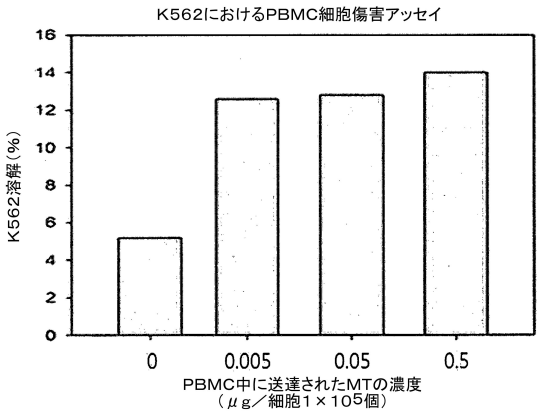
[FIG. 9]



1：NK92mi群
2：MTがNK92mi中に送達された群（5μg／1×10^5）

【図１０】

[FIG. 10]



【配列表】

0007074358000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類			FI		
Ａ６１Ｐ	*35/02*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/02	
Ａ６１Ｐ	*31/14*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/14	
Ａ６１Ｐ	*31/20*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/20	
Ａ６１Ｐ	*31/16*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/16	
Ａ６１Ｐ	*11/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	11/00	
Ａ６１Ｐ	*43/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	43/00	１２１

弁理士　河野 直樹
(74)代理人　100162570
弁理士　金子 早苗
(72)発明者　ハン、キュボム
大韓民国、３４１１９ テジョン、ユソンーク、ガジョンー ロ、６３、１０２－１００２
(72)発明者　リ、ヨンジュン
大韓民国、０５３４８ ソウル、ガンドンーク、チョンホーデロ、１２３９、１０１－１０１
審査官　竹内 祐樹

(56)参考文献
特表２０１５－５０２７５６（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２０１６／１３５７２３（WO，Ａ１）
国際公開第２０１６／００８９３７（WO，Ａ１）
米国特許出願公開第２０１３／００３４５２７（ＵＳ，Ａ１）
Scientific Reports，2015年，Vol.5:9073，p.1-10

(58)調査した分野　(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ　１５／００－１５／９０
Ｃ１２Ｎ　１／００－７／０８
Ａ６１Ｋ
Ａ６１Ｐ
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）