(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2024-540347
(P2024-540347A)
(43)公表日　令和6年10月31日(2024.10.31)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	*35/17 (2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/17		４Ｂ０６５
Ａ６１Ｋ	*39/395 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｔ	４Ｃ０８５
Ａ６１Ｐ	*35/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00		４Ｃ０８７
Ａ６１Ｐ	*43/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	43/00	１２１	４Ｈ０４５
Ｃ１２Ｎ	*5/0783(2010.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｕ	

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全58頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-526794(P2024-526794)
(86)(22)出願日　令和4年11月9日(2022.11.9)
(85)翻訳文提出日　令和6年6月28日(2024.6.28)
(86)国際出願番号　PCT/US2022/079528
(87)国際公開番号　WO2023/086810
(87)国際公開日　令和5年5月19日(2023.5.19)
(31)優先権主張番号　63/277,505
(32)優先日　令和3年11月9日(2021.11.9)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

(71)出願人　524016541
ウーゲン，インコーポレイテッド
アメリカ合衆国，ミズーリ州　６３１０８
セントルイス　フォレスト　パーク　アベ
ニュー　４２６０　スイート　１００
(74)代理人　100079108
弁理士　稲葉　良幸
(74)代理人　100109346
弁理士　大貫　敏史
(74)代理人　100117189
弁理士　江口　昭彦
(74)代理人　100134120
弁理士　内藤　和彦
(72)発明者　カバキビ，アイマン
アメリカ合衆国，ミズーリ州　６３１０８
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　記憶ＮＫ細胞と抗癌性二重特異性分子とによる組み合わせ癌療法

(57)【要約】
本明細書には、癌を治療する方法であって、記憶ＮＫ細胞と、腫瘍抗原結合部分及びＣＤ１６結合部分を含むモノクローナル抗体との投与を含む方法が開示される。また、本明細書には、治療を必要としている患者の卵巣癌を治療する方法であって、卵巣癌細胞又は胃癌細胞に、記憶ＮＫ細胞を抗ＨＥＲ２モノクローナル抗体との組み合わせで接触させることを含む方法も開示される。また、本明細書には、治療を必要としている患者の頭頸部癌又は結腸直腸癌を治療する方法であって、頭頸部癌細胞又は結腸直腸癌細胞に、記憶ＮＫ細胞を抗ＥＧＦＲモノクローナル抗体との組み合わせで接触させることを含む方法も開示される。また、本明細書には、治療を必要としている患者の尿路上皮癌、頭頸部癌、結腸直腸癌、又は胃癌細胞を治療する方法であって、そうした癌細胞に、記憶ＮＫ細胞を抗ＰＤＬ－１モノクローナル抗体との組み合わせで接触させることを含む方法も開示される。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
癌の治療を必要としている対象の癌を治療する方法であって、記憶ＮＫ細胞と腫瘍抗原結合部分及びＣＤ１６結合部分を含むモノクローナル抗体とを投与することを含む方法。
【請求項２】
前記モノクローナル抗体が、ＩｇＧである、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記モノクローナル抗体が、ＩｇＧ１又はＩｇＧ３である、請求項２に記載の方法。
【請求項４】
前記ＩｇＧ１モノクローナル抗体のＦｃ部分が、ＣＤ１６結合親和性が亢進するように突然変異させたものである、請求項３に記載の方法。
【請求項５】
前記ＩｇＧ１又はＩｇＧ３抗体が、抗ＨＥＲ２抗体、抗ＰＤＬ－１抗体、及び抗ＥＧＦＲ抗体から選択される、請求項３又は４に記載の方法。
【請求項６】
前記ＩｇＧ１又はＩｇＧ３抗体が、抗ＨＥＲ２モノクローナル抗体である、請求項５に記載の方法。
【請求項７】
前記癌が、卵巣癌である、請求項６に記載の方法。
【請求項８】
前記卵巣癌が、明細胞癌である、請求項７に記載の方法。
【請求項９】
前記卵巣癌が、類内膜腺癌である、請求項７に記載の方法。
【請求項１０】
前記卵巣癌が、粘液腺癌である、請求項７に記載の方法。
【請求項１１】
前記卵巣癌が、漿液性癌である、請求項７に記載の方法。
【請求項１２】
前記卵巣癌が、間質性腫瘍である、請求項７に記載の方法。
【請求項１３】
前記卵巣癌が、胚細胞腫瘍である、請求項７に記載の方法。
【請求項１４】
前記卵巣癌が、小細胞卵巣癌である、請求項７に記載の方法。
【請求項１５】
前記癌が、胃癌である、請求項６に記載の方法。
【請求項１６】
前記抗ＨＥＲ２モノクローナル抗体が、トラスツズマブ及びマルゲツキシマブから選択される、請求項６～１５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１７】
前記抗ＨＥＲ２モノクローナル抗体が、トラスツズマブである、請求項１６に記載の方法。
【請求項１８】
前記ＩｇＧ１抗体が、抗ＥＧＦＲモノクローナル抗体である、請求項５に記載の方法。
【請求項１９】
前記癌が、頭頸部癌である、請求項１８に記載の方法。
【請求項２０】
前記頭頸部癌が、中咽頭癌である、請求項１９に記載の方法。
【請求項２１】
前記頭頸部癌が、下咽頭癌である、請求項１９に記載の方法。
【請求項２２】

前記頭頸部癌が、喉頭癌である、請求項１９に記載の方法。
【請求項２３】
前記頭頸部癌が、口唇・口腔癌である、請求項１９に記載の方法。
【請求項２４】
前記頭頸部癌が、鼻咽腔癌である、請求項１９に記載の方法。
【請求項２５】
前記頭頸部癌が、副鼻腔癌である、請求項１９に記載の方法。
【請求項２６】
前記頭頸部癌が、唾液腺癌である、請求項１９に記載の方法。
【請求項２７】
前記頭頸部癌が、扁平上皮頸部癌である、請求項１９に記載の方法。
【請求項２８】
前記頭頸部癌が、鼻腔癌である、請求項１９に記載の方法。
【請求項２９】
前記頭頸部癌が、軟部組織肉腫である、請求項１９に記載の方法。
【請求項３０】
前記頭頸部癌が、甲状腺癌である、請求項１９に記載の方法。
【請求項３１】
前記癌が、結腸直腸癌である、請求項１８に記載の方法。
【請求項３２】
前記抗ＥＧＦＲモノクローナル抗体が、セツキシマブ、パニツムマブ、及びネシツムマブから選択される、請求項１９～３１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３３】
前記抗ＥＧＦＲモノクローナル抗体が、セツキシマブである、請求項３３に記載の方法。
【請求項３４】
前記ＩｇＧ１又はＩｇＧ３抗体が、抗免疫チェックポイントタンパク質抗体である、請求項５に記載の方法。
【請求項３５】
前記抗免疫チェックポイントタンパク質抗体が、抗ＰＤ－１モノクローナル抗体、抗ＰＤ－Ｌ１モノクローナル抗体、及び抗ＣＴＬＡ－４モノクローナル抗体から選択される、請求項３４に記載の方法。
【請求項３６】
前記癌が、尿路上皮癌、頭頸部癌、結腸直腸癌、及び胃癌から選択される、請求項３４に記載の方法。
【請求項３７】
前記抗体が、抗ＰＤ－Ｌ１モノクローナル抗体である、請求項３６に記載の方法。
【請求項３８】
前記抗ＰＤ－Ｌ１モノクローナル抗体が、アベルマブである、請求項３７に記載の方法。
【請求項３９】
前記癌が、尿路上皮癌である、請求項３７又は３８に記載の方法。
【請求項４０】
前記癌が、頭頸部癌である、請求項３７又は３８に記載の方法。
【請求項４１】
前記癌が、結腸直腸癌である、請求項３７又は３８に記載の方法。
【請求項４２】
前記癌が、胃癌である、請求項３７又は３８に記載の方法。
【請求項４３】
前記抗体が、抗ＰＤ－１モノクローナル抗体である、請求項３６に記載の方法。

【請求項４４】
前記抗ＰＤ－１抗体が、ニボルマブ、ペンブロリズマブ、セミプリマブ、及びドスタルリマブから選択される、請求項４３に記載の方法。
【請求項４５】
前記抗体が、抗ＣＴＬＡ－４モノクローナル抗体である、請求項３６に記載の方法。
【請求項４６】
前記抗ＣＴＬＡ－４モノクローナルが、抗体イピリムマブである、請求項４５に記載の方法。
【請求項４７】
前記抗ＰＤ－Ｌ１モノクローナル抗体が、アテゾリズマブ、アベルマブ、コシベリマブ、及びデュルバルマブから選択される、請求項３７に記載の方法。
【請求項４８】
前記抗ＰＤ－Ｌ１モノクローナル抗体が、アベルマブである、請求項４７に記載の方法。
【請求項４９】
前記二重特異性分子が、ＮＫ細胞エンゲイジャー又は三重特異性キラー細胞エンゲイジャーである、請求項１に記載の方法。
【請求項５０】
前記記憶ＮＫ細胞が前記抗体の前に投与される、請求項１～４９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５１】
前記記憶ＮＫ細胞が前記抗体と同時に投与される、請求項１～５０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５２】
前記記憶ＮＫ細胞が前記抗体の後に投与される、請求項１～５１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５３】
記憶ＮＫ細胞と、腫瘍抗原結合部分及びＣＤ１６結合部分を含むモノクローナル抗体と、治療的に許容可能な担体とを含む免疫治療組成物。
【請求項５４】
記憶ＮＫ細胞と、腫瘍抗原結合部分及びＣＤ１６結合部分を含むモノクローナル抗体と、任意選択で、癌を患う対象に前記記憶ＮＫ細胞と抗体とを同時的又は逐次的組み合わせで投与するよう指示する説明書とを含む免疫療法キット。
【請求項５５】
前記モノクローナル抗体が、ＩｇＧである、請求項５３又は５４に記載の組成物又はキット。
【請求項５６】
前記モノクローナル抗体が、ＩｇＧ１である、請求項５５に記載の組成物又はキット。
【請求項５７】
前記ＩｇＧ１モノクローナル抗体のＦｃ部分が、ＣＤ１６結合親和性が亢進するように突然変異させたものである、請求項５６に記載の組成物又はキット。
【請求項５８】
前記モノクローナル抗体が、抗ＨＥＲ２モノクローナル抗体、抗ＰＤＬ－１モノクローナル抗体、及び抗ＥＧＦＲモノクローナル抗体から選択される、請求項５５又は５６に記載の組成物又はキット。
【請求項５９】
前記ＩｇＧ１抗体が、抗ＨＥＲ２モノクローナル抗体である、請求項５８に記載の組成物又はキット。
【請求項６０】
前記癌が、卵巣癌である、請求項５９に記載の組成物又はキット。

【請求項６１】
前記卵巣癌が、明細胞癌である、請求項６０に記載の組成物又はキット。
【請求項６２】
前記卵巣癌が、類内膜腺癌である、請求項６０に記載の組成物又はキット。
【請求項６３】
前記卵巣癌が、粘液腺癌である、請求項６０に記載の組成物又はキット。
【請求項６４】
前記卵巣癌が、漿液性癌である、請求項６０に記載の組成物又はキット。
【請求項６５】
前記卵巣癌が、間質性腫瘍である、請求項６０に記載の組成物又はキット。
【請求項６６】
前記卵巣癌が、胚細胞腫瘍である、請求項６０に記載の組成物又はキット。
【請求項６７】
前記卵巣癌が、小細胞卵巣癌である、請求項６０に記載の組成物又はキット。
【請求項６８】
前記癌が、胃癌である、請求項５９に記載の組成物又はキット。
【請求項６９】
前記抗ＨＥＲ２モノクローナル抗体が、トラスツズマブ及びマルゲツキシマブから選択される、請求項５９～６８のいずれか一項に記載の組成物又はキット。
【請求項７０】
前記抗ＨＥＲ２モノクローナル抗体が、トラスツズマブである、請求項６９に記載の組成物又はキット。
【請求項７１】
前記ＩｇＧ１抗体が、抗ＥＧＦＲモノクローナル抗体である、請求項５８に記載の組成物又はキット。
【請求項７２】
前記癌が、頭頸部癌である、請求項７１に記載の組成物又はキット。
【請求項７３】
前記頭頸部癌が、中咽頭癌である、請求項７２に記載の組成物又はキット。
【請求項７４】
前記頭頸部癌が、下咽頭癌である、請求項７２に記載の組成物又はキット。
【請求項７５】
前記頭頸部癌が、喉頭癌である、請求項７２に記載の組成物又はキット。
【請求項７６】
前記頭頸部癌が、口唇・口腔癌である、請求項７２に記載の組成物又はキット。
【請求項７７】
前記頭頸部癌が、鼻咽腔癌である、請求項７２に記載の組成物又はキット。
【請求項７８】
前記頭頸部癌が、副鼻腔癌である、請求項７２に記載の組成物又はキット。
【請求項７９】
前記頭頸部癌が、唾液腺癌である、請求項７２に記載の組成物又はキット。
【請求項８０】
前記頭頸部癌が、扁平上皮頸部癌である、請求項７２に記載の組成物又はキット。
【請求項８１】
前記頭頸部癌が、鼻腔癌である、請求項７２に記載の組成物又はキット。
【請求項８２】
前記頭頸部癌が、軟部組織肉腫である、請求項７２に記載の組成物又はキット。
【請求項８３】
前記頭頸部癌が、甲状腺癌である、請求項７２に記載の組成物又はキット。
【請求項８４】

前記癌が、結腸直腸癌である、請求項７１に記載の組成物又はキット。
【請求項８５】
前記抗ＥＧＦＲモノクローナル抗体が、セツキシマブ、パニツムマブ、及びネシツムマブから選択される、請求項７１～８４のいずれか一項に記載の組成物又はキット。
【請求項８６】
前記抗ＥＧＦＲモノクローナル抗体が、セツキシマブである、請求項８５に記載の組成物又はキット。
【請求項８７】
前記ＩｇＧ１抗体が、抗免疫チェックポイントタンパク質抗体である、請求項５８に記載の組成物又はキット。
【請求項８８】
前記抗免疫チェックポイントタンパク質抗体が、抗ＰＤ－１モノクローナル抗体、抗ＰＤ－Ｌ１モノクローナル抗体、及び抗ＣＴＬＡ－４モノクローナル抗体から選択される、請求項８７に記載の組成物又はキット。
【請求項８９】
前記癌が、尿路上皮癌、頭頸部癌、結腸直腸癌、及び胃癌から選択される、請求項８８に記載の組成物又はキット。
【請求項９０】
前記抗体が、抗ＰＤ－Ｌ１モノクローナル抗体である、請求項８９に記載の組成物又はキット。
【請求項９１】
前記抗ＰＤ－Ｌ１モノクローナル抗体が、アベルマブである、請求項９０に記載の組成物又はキット。
【請求項９２】
前記癌が、尿路上皮癌である、請求項９０又は９１に記載の組成物又はキット。
【請求項９３】
前記癌が、頭頸部癌である、請求項９０又は９１に記載の組成物又はキット。
【請求項９４】
前記癌が、結腸直腸癌である、請求項９０又は９１に記載の組成物又はキット。
【請求項９５】
前記癌が、胃癌である、請求項９０又は９１に記載の組成物又はキット。
【請求項９６】
前記抗体が、抗ＰＤ－１モノクローナル抗体である、請求項８９に記載の組成物又はキット。
【請求項９７】
前記抗ＰＤ－１抗体が、ニボルマブ、ペンブロリズマブ、セミプリマブ、及びドスタルリマブから選択される、請求項９６に記載の組成物又はキット。
【請求項９８】
前記抗体が、抗ＣＴＬＡ－４モノクローナル抗体である、請求項８９に記載の組成物又はキット。
【請求項９９】
前記抗ＣＴＬＡ－４モノクローナルが、抗体イピリムマブである、請求項９８に記載の組成物又はキット。
【請求項１００】
前記抗ＰＤ－Ｌ１モノクローナル抗体が、アテゾリズマブ、アベルマブ、コシベリマブ、及びデュルバルマブから選択される、請求項９０に記載の組成物又はキット。
【請求項１０１】
前記抗ＰＤ－Ｌ１モノクローナル抗体が、アベルマブである、請求項１００に記載の組成物又はキット。
【請求項１０２】

前記記憶ＮＫ細胞が前記抗体の前に投与される、請求項１～１０１のいずれか一項に記載の方法、組成物、又はキット。
【請求項１０３】
前記記憶ＮＫ細胞が前記抗体と同時に投与される、請求項１～１０２のいずれか一項に記載の方法、組成物、又はキット。
【請求項１０４】
前記記憶ＮＫ細胞が前記抗体の後に投与される、請求項１～１０３のいずれか一項に記載の方法、組成物、又はキット。
【請求項１０５】
前記記憶ＮＫ細胞が、正常なＮＫ細胞と比べてＣＤ１６の発現の増加を呈する、請求項１～１０４のいずれか一項に記載の方法、組成物、又はキット。
【請求項１０６】
正常なＮＫ細胞と比べた前記記憶ＮＫ細胞のＣＤ１６発現の増加が少なくとも３０日間持続する、請求項１０６に記載の方法、組成物、又はキット。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本願は、２０２１年１１月９日に出願された米国仮特許出願第６３／２７７，５０５号の優先権の利益を主張するものであり、この開示は、その全体が本明細書に書かれたものとして参照により援用される。
【０００２】
本開示は、概して、とりわけ、記憶／記憶様及びサイトカイン誘導性記憶様（ＣＩＭＬ）ＮＫ細胞、それを作成し及び例えば癌の治療に使用する方法、及び記憶ＮＫ細胞と抗癌性モノクローナル抗体による組み合わせ治療によってＮＫ細胞の抗腫瘍特性を増加させる方法に関する。
【背景技術】
【０００３】
ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞は、グランザイム及びパーフォリンを標的に向けて放出することによって抗体依存性細胞毒性を呈する細胞傷害性リンパ球として特徴付けられることの多い一群の自然免疫細胞を構成する。ほとんどのＮＫ細胞は、様々な活性化型及び抑制型受容体の集まりに加え、特異的な細胞表面マーカープロファイル（例えば、ＣＤ３、ＣＤ５６＋、ＣＤ１６＋、ＣＤ５７＋、ＣＤ８＋）を有する。最近になってＮＫ細胞は、ある種の癌治療の重要な構成要素になりつつあるが、全血中のＮＫ細胞の割合は比較的低いため、多量のＮＫ細胞の生成が大きな障害となっている。
【０００４】
卵巣癌は、毎年世界で推定３０万人が診断され、およそ１８万例の死亡原因となっている。２０２１年には、卵巣癌は米国で約２万１千人が診断され、約１万４千例の死亡原因となることが見込まれ、卵巣癌は婦人科癌による死亡原因の第１位となっている。ＨＥＲ－２受容体を標的とするモノクローナル抗体トラスツズマブ及びポリクローナルＮＫ細胞が、ナイーブＳＫＯＶ－３卵巣癌細胞の相乗的な殺傷性を示している。しかしながら、治療の経過にわたって治療抵抗性の腫瘍細胞クローンが増殖するため、高頻度で再発につながる。従って、卵巣癌に対するより有効性の高い免疫療法を提供することが求められている。
【０００５】
胃癌は、世界の癌特異的死亡率で３番目に多い原因としてランク付けされる。２０１８年には、米国で合計２６，２４０例の新規胃癌症例が記録されており、同年に記録された死亡は１０，８００例であった。ＨＥＲ２は、細胞増殖及び癌発生を促進する上皮成長因子受容体（ＥＧＦＲ）ファミリーに属する癌原遺伝子である。胃癌の約２２～３２％にＨＥＲ２の発現が認められる。ＨＥＲ２を標的とするトラスツズマブが、第一次及び第二次臨床試験において胃癌の治療に関して評価されている。第一次臨床試験で化学療法とトラ

スツズマブとを組み合わせると、化学療法のみの対照と比較して患者のＯＳが１１．１から１３．８ヵ月に増加することが実証された。しかしながら、最近のＴ－ＡＣＴ第二次トラスツズマブ併用試験では、ＯＳ生存期間の有意差は認められなかった。腫瘍におけるＨＥＲ２の消失及び不均一性が依然として課題であり、胃癌適応においてより有効性の高い免疫療法が依然として必要とされている。

【０００６】

結腸直腸癌（ＣＲＣ）は、発生率が全世界で３番目に高く、２０１８年の新規症例数は１８０万例を超える。同年、全世界で８８万１千例の死亡がＣＲＣによるものであったため、この適応は癌関連死亡原因の第２位となった。予後においては、現在分子検査が推奨されているＫＲＡＳ／ＮＲＡＳ、ＢＲＡＦ、ＨＥＲ２、ＮＴＲＫ及びＭＭＲ／ＭＳを含め、幾つかのＣＲＣ突然変異が重要である。現在の治療では、米国でのＣＲＣの５年相対生存率は６４．７％であるが、しかしながら好ましくない遺伝子プロファイルを持つ患者については、予後は更に不良である。ＥＧＦＲは、結腸直腸癌のイニシエーション及びプログレッションにおいて重要な役割を果たす因子であることが公知である。セツキシマブは、１０～２０％の患者で生存及びクオリティ・オブ・ライフを改善するが、多くの患者は、抗体治療が進むにつれ、薬剤耐性を発症する。この耐性機構は、少なくとも一部には、ＡＤＣＣの機能障害であると考えられている。従って、こうした患者のセツキシマブ媒介性ＡＤＣＣを亢進させる戦略の開発が求められている。

【０００７】

頭頸部癌（ＨＮＣ）は、幾つかの異なる種類の癌を含めた総称である。頭頸部癌は、それが始まる場所によって分類される。それには、口（口腔）、喉（咽頭）、発声器（喉頭）、鼻洞及び鼻腔、並びに唾液腺が含まれる。ＨＮＣに対しては、ＥＧＦＲを標的とするモノクローナル抗体が有効であるが、僅か１５～２０％の患者で有効であるに過ぎない。注目すべきことに、セツキシマブ治療では、ＮＫ細胞によるセツキシマブ媒介性ＡＤＣＣを抑制する腫瘍内Ｔｒｅｇ細胞の頻度が増加し、その存在は臨床転帰不良と相関する。従って、ＨＮＣに対するより有効性の高い免疫療法を提供することが求められている。

【０００８】

尿路上皮癌は、最も多く見られる種類の膀胱癌であり、約５０％の患者が転移性疾患を発症する。初期段階の疾患は、通常は外科的に治療されるが、転移リスクが上昇している浸潤性尿路上皮癌については、外科手術と併せて他の治療手法が必要となる。ＰＤ－Ｌ１は、多くの腫瘍に発現するチェックポイントタンパク質であり、チェックポイントとしてＴ細胞機能を障害する働きをすることにより、細胞が免疫系を回避することを可能にする。ＰＤ－Ｌ１標的化チェックポイント阻害薬のアベルマブは、最近になって尿路上皮癌での使用が承認された。第二選択療法としてアベルマブで治療された患者は、転移性尿路上皮癌において約１７％の全奏効率を実証した。アベルマブの作用機序にはまた、腫瘍標的化ＡＤＣＣ並びにチェックポイント阻害に及ぼすその効果も含まれる。注目すべきことに、諸研究では、アベルマブが腫瘍標的に対するＮＫ細胞媒介毒性を亢進させること、及びＰＤ－Ｌ１を高度に発現する腫瘍ほど、アベルマブ媒介性ＡＤＣＣに対する感受性が高かったことが示されている。従って、尿路上皮癌に対する新規の改良された免疫療法を特定することが求められている。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【０００９】

本明細書には、卵巣癌、結腸直腸癌、ＨＮＣ、胃癌及び尿路上皮癌の治療についての、それらの癌に対して向けられるモノクローナル抗体と組み合わせて記憶ＮＫ細胞（時に記憶様又はサイトカイン誘導性記憶様ＮＫ細胞と呼ばれることもある）を利用する新規モダリティが開示される。

【００１０】

配列の簡単な説明

表１の配列番号１及び２は、例示的な拡大融合タンパク質鎖の配列である。

【００１１】
表２の配列番号３～２２は、例示的な抗ＴＦ抗体（「ＡＴＦ１」）の配列である。
【００１２】
表３の配列番号２３及び２４は、例示的なプライミング融合タンパク質鎖の配列である。
【００１３】
配列番号２５～６０は、本明細書で考察される特定の抗体の重鎖及び軽鎖及びＶＨ及びＶＬドメインの配列である。
【図面の簡単な説明】
【００１４】
図面の簡単な説明
【図１】モノクローナル抗体有り若しくは無しで、又は対照ノンターゲティングアイソタイプ抗体と共に記憶ＮＫ細胞を試験する実験計画及びＣＤ１６の関与の概略図である。
【図２】トラスツズマブと併せた記憶ＮＫ細胞の細胞傷害性の結果を示す。トラスツズマブにより、卵巣癌細胞株ＳＫＯＶ－３に対する記憶ＮＫ細胞抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）が亢進した。
【図３】ＨＮＣ細胞株ＳＣＣ－２５に対する記憶ＮＫ細胞ＡＤＣＣを亢進させるセツキシマブと併せた記憶ＮＫ細胞の細胞傷害性の結果を示す。
【図４】ＴＨＰ－１　ＡＭＬ腫瘍モデルにおける注射後少なくとも３５日間にわたるマウス血中での記憶ＮＫ細胞の持続を示す。
【図５】マウスへの注射時点からの記憶ＮＫ細胞表面上でのＣＤ１６発現の増加及びこの研究の経過全体を通じて持続することを示す。
【図６】ＳＣＣ－２５頭頸部癌細胞上でのＰＤ－Ｌ１発現のＩＦＮｇ用量反応を示す。
【図７】ＩＦＮｇによるヒトＬｏＶｏ結腸癌細胞上でのＰＤ－Ｌ１発現の誘導を示す。
【図８】記憶ＮＫ細胞による治療後の結腸直腸癌細胞株におけるＡ）腫瘍細胞生存率及びＢ）ＰＤ－Ｌ１発現を示す。
【図９】ＣＲＣ細胞株ＬｏＶｏ－ＧＦＰに対するセツキシマブ、アベルマブ、及びこれらの組み合わせと併せた記憶ＮＫ細胞の細胞傷害性の結果を示す。上のパネルＡ）は、平均蛍光強度（ＭＦＩ）として実証した、上のチャンバ内のＬｏＶｏ細胞上でのＰＤ－Ｌ１発現を示し、下のパネルＢ）は、ＰＤ－Ｌ１陽性細胞の割合（％）として実証した、上のチャンバ内のＬｏＶｏ細胞上でのＰＤ－Ｌ１発現を示す。
【図１０】記憶ＮＫ細胞とのインキュベーション後のＳＣＣ－２５細胞（頭頸部癌）上でのＰＤ－Ｌ１誘導を、１２時間にわたる一次共培養についてのパーセント細胞傷害率として示す。
【図１１】記憶ＮＫ細胞とのインキュベーション後のＳＣＣ－２５細胞（頭頸部癌）上でのＰＤ－Ｌ１誘導を、２４時間にわたる一次共培養物についてのパーセント細胞傷害率として示す。
【図１２】記憶ＮＫ細胞とのインキュベーション後のＳＣＣ－２５細胞（頭頸部癌）上でのＰＤ－Ｌ１誘導を、４２時間にわたる一次共培養物についてのパーセント細胞傷害率として示す。
【図１３】馴化培地とのインキュベーション後のＳＣＣ－２５細胞（頭頸部癌）上でのＰＤ－Ｌ１誘導を、１２時間にわたる二次馴化共培養物についてのパーセント細胞傷害率として示す。
【図１４】馴化培地とのインキュベーション後のＳＣＣ－２５細胞（頭頸部癌）上でのＰＤ－Ｌ１誘導を、２４時間にわたる二次馴化共培養物についてのパーセント細胞傷害率として示す。
【図１５】馴化培地とのインキュベーション後のＳＣＣ－２５細胞（頭頸部癌）上でのＰＤ－Ｌ１誘導を、４２時間にわたる二次馴化共培養物についてのパーセント細胞傷害率として示す。
【図１６】記憶ＮＫ細胞とのインキュベーション後又は馴化培地とのインキュベーション

後のＳＣＣ－２５細胞（ＨＮＣ）上でのＰＤ－Ｌ１の誘導を示す。
【図１７】ＮＣＩ－Ｎ８７細胞（胃癌細胞）の殺傷に関するアベルマブと記憶ＮＫ細胞との共培養の結果を示す。
【発明を実施するための形態】
【００１５】
詳細な説明
本明細書には、卵巣癌、結腸直腸癌、ＨＮＣ、胃癌及び尿路上皮癌に対するより有効性の高い免疫療法を可能にする組成物及び方法が提供される。本組成物は、プライミングして拡大した記憶ＮＫ細胞と、抗ＨＥＲ２受容体抗体、抗ＥＧＦＲ抗体又は抗ＰＤ－Ｌ１抗体から選択されるモノクローナル抗体とを含む。本方法は、卵巣癌細胞、結腸直腸癌細胞、ＨＮＣ癌細胞、胃癌細胞、又は尿路上皮癌細胞に、プライミングして拡大した記憶ＮＫ細胞を、抗ＨＥＲ２受容体抗体、抗ＥＧＦＲ抗体及び抗ＰＤ－Ｌ１抗体から選択されるモノクローナル抗体と組み合わせて接触させることを含む。記憶ＮＫ細胞は、記憶ＮＫ細胞を形成するためのＮＫ細胞のプライミングと、所望の分量へ拡大とを同時に行うプロセスで生成することができる。或いは、ＮＫ細胞を所望の分量に拡大し、次にプライミングして記憶ＮＫ細胞を形成してもよく、又は逆であってもよい。
【００１６】
本明細書には、増殖性悪性腫瘍を治療する方法であって、上記の実施形態に係る記憶ＮＫ細胞を抗癌性モノクローナル抗体と組み合わせて投与することを含む方法が提供される。
【００１７】
一部の実施形態において、増殖性悪性腫瘍は卵巣癌であり、モノクローナル抗体は抗ＨＥＲ２抗体である。一部の実施形態において抗ＨＥＲ２抗体は、トラスツズマブ及びマルゲツキシマブから選択される。一部の実施形態において抗ＨＥＲ２抗体は、トラスツズマブである。一部の実施形態において、卵巣癌は、明細胞癌、類内膜腺癌、粘液腺癌、漿液性癌、間質性腫瘍、胚細胞腫瘍及び小細胞卵巣癌から選択される。
【００１８】
一部の実施形態において、増殖性悪性腫瘍は頭頸部癌（ＨＮＣ）又は胃癌であり、モノクローナル抗体は抗ＥＧＦＲ抗体である。一部の実施形態において、抗ＥＧＦＲ抗体は、セツキシマブ、パニツムマブ、及びネシツムマブから選択される。一部の実施形態において抗ＥＧＦＲ抗体は、セツキシマブである。一部の実施形態において、ＨＮＣは、中咽頭癌、下咽頭癌、喉頭癌、口唇・口腔癌、鼻咽腔癌、副鼻腔癌（paransal sinus cancer）、唾液腺癌、扁平上皮頸部癌、鼻腔癌、軟部組織肉腫及び甲状腺癌から選択される。一部の実施形態において、胃癌は、胃腺癌、消化管間質腫瘍、消化管神経内分泌（カルチノイド）腫瘍、リンパ腫、扁平上皮細胞癌、小細胞癌及び平滑筋肉腫から選択される。
【００１９】
一部の実施形態において、増殖性悪性腫瘍は尿路上皮癌であり、モノクローナル抗体は抗ＰＤ－Ｌ１抗体である。一部の実施形態において、モノクローナル抗体は、アベルマブ及びコシベリマブ（coseibelimab）から選択される。一部の実施形態において、モノクローナル抗体は、アベルマブである。一部の実施形態において胃癌は、乳頭癌、扁平癌（flat carcinoma）、扁平上皮細胞腺癌、胃肉腫及び小細胞癌から選択される。
【００２０】
本明細書には、癌の治療を必要としている対象の癌を治療する方法であって、記憶ＮＫ細胞と腫瘍抗原結合部分及びＣＤ１６結合部分を含む二重特異性分子（例えば、モノクローナル抗体、ＮＫ細胞エンゲイジャー、又は三重特異性キラー細胞エンゲイジャー）とを投与することを含む方法が提供される。
【００２１】
また、本明細書には、記憶ＮＫ細胞と腫瘍抗原結合部分及びＣＤ１６結合部分を含む二重特異性分子（例えば、モノクローナル抗体、ＮＫ細胞エンゲイジャー、又は三重特異性キラー細胞エンゲイジャー）と、治療的に許容可能な担体とを含む免疫治療組成物も提供

される。
【００２２】
また、本明細書には、記憶ＮＫ細胞と腫瘍抗原結合部分及びＣＤ１６結合部分を含む二重特異性分子（例えば、モノクローナル抗体、ＮＫ細胞エンゲイジャー、又は三重特異性キラー細胞エンゲイジャー）と、任意選択で、癌を患う対象に記憶ＮＫ細胞と抗体とを同時的又は逐次的組み合わせで投与するよう指示する説明書とを含む免疫療法キットも提供される。
【００２３】
一部の実施形態において、二重特異性分子は、ＩｇＧ型のモノクローナル抗体である。一部の実施形態において、モノクローナル抗体は、ＩｇＧ１である。一部の実施形態において、モノクローナル抗体は、ＩｇＧ３である。一部の実施形態において、ＩｇＧ１モノクローナル抗体のＦｃ部分は、ＣＤ１６結合親和性が亢進するように突然変異させたものである。
【００２４】
一部の実施形態において、ＩｇＧ１又はＩｇＧ３抗体は、抗ＨＥＲ２抗体、抗ＰＤＬ－１抗体、及び抗ＥＧＦＲ抗体から選択される。
【００２５】
一部の実施形態において、ＩｇＧ１（又はＩｇＧ３）抗体は、抗ＨＥＲ２モノクローナル抗体である。
【００２６】
一部の実施形態において、癌は、卵巣癌である。一部の実施形態において、卵巣癌は、明細胞癌である。一部の実施形態において、卵巣癌は、類内膜腺癌である。一部の実施形態において、卵巣癌は、粘液腺癌である。一部の実施形態において、卵巣癌は、漿液性癌である。一部の実施形態において、卵巣癌は、間質性腫瘍である。一部の実施形態において、卵巣癌は、胚細胞腫瘍である。一部の実施形態において、卵巣癌は、小細胞卵巣癌である。
【００２７】
一部の実施形態において、癌は、胃癌である。
【００２８】
一部の実施形態において、抗ＨＥＲ２モノクローナル抗体は、トラスツズマブ及びマルゲツキシマブから選択され；及び任意選択で、抗体は、本明細書に開示される又は当該技術分野において公知のこれらの抗体に関連する配列番号と少なくとも９０％の配列同一性（例えば、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％の配列同一性）を有するか、又はそうした配列番号の配列を有する。一部の実施形態において、抗ＨＥＲ２モノクローナル抗体は、トラスツズマブであり；及び任意選択で、抗体は、本明細書に開示される又は当該技術分野において公知のこれらの抗体に関連する配列番号と少なくとも９０％の配列同一性（例えば、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％の配列同一性）を有するか、又はそうした配列番号の配列を有する。
【００２９】
一部の実施形態において、ＩｇＧ１（又はＩｇＧ３）抗体は、抗ＥＧＦＲモノクローナル抗体である。
【００３０】
一部の実施形態において、癌は、頭頸部癌である。一部の実施形態において、頭頸部癌は、中咽頭癌である。一部の実施形態において、頭頸部癌は、下咽頭癌である。一部の実施形態において、頭頸部癌は、喉頭癌である。一部の実施形態において、頭頸部癌は、口唇・口腔癌である。一部の実施形態において、頭頸部癌は、鼻咽腔癌である。一部の実施形態において、頭頸部癌は、副鼻腔癌である。一部の実施形態において、頭頸部癌は、唾

液腺癌である。一部の実施形態において、頭頸部癌は、扁平上皮頸部癌である。一部の実施形態において、頭頸部癌は、鼻腔癌である。一部の実施形態において、頭頸部癌は、軟部組織肉腫である。一部の実施形態において、頭頸部癌は、甲状腺癌である。

【００３１】

一部の実施形態において、癌は、結腸直腸癌である。

【００３２】

一部の実施形態において、抗ＥＧＦＲモノクローナル抗体は、セツキシマブ、パニツムマブ、及びネシツムマブから選択され；及び任意選択で、抗体は、本明細書に開示される又は当該技術分野において公知のこれらの抗体に関連する配列番号と少なくとも９０％の配列同一性（例えば、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％の配列同一性）を有するか、又はそうした配列番号の配列を有する。一部の実施形態において、抗ＥＧＦＲモノクローナル抗体はセツキシマブであり；及び任意選択で、抗体は、本明細書に開示される又は当該技術分野において公知の抗体に関連する配列番号と少なくとも９０％の配列同一性（例えば、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％の配列同一性）を有するか、又はそうした配列番号の配列を有する。

【００３３】

一部の実施形態において、ＩｇＧ１抗体は、抗免疫チェックポイントタンパク質抗体である。一部の実施形態において、抗免疫チェックポイントタンパク質抗体は、抗ＰＤ－１モノクローナル抗体、抗ＰＤ－Ｌ１モノクローナル抗体、及び抗ＣＴＬＡ－４モノクローナル抗体から選択される。一部の実施形態において、癌は、尿路上皮癌、頭頸部癌、結腸直腸癌、及び胃癌から選択される。

【００３４】

一部の実施形態において、抗体は、抗ＰＤ－Ｌ１モノクローナル抗体である。一部の実施形態において、抗ＰＤ－Ｌ１モノクローナル抗体は、アベルマブである。一部の実施形態において、癌は、尿路上皮癌である。一部の実施形態において、癌は、頭頸部癌である。一部の実施形態において、癌は、結腸直腸癌である。一部の実施形態において、癌は、胃癌である。

【００３５】

一部の実施形態において、抗体は、抗ＰＤ－１モノクローナル抗体である。一部の実施形態において、抗ＰＤ－１抗体は、ニボルマブ、ペンブロリズマブ、セミプリマブ、及びドスタルリマブから選択され；及び任意選択で、抗体は、これらの抗体に関連する及び当該技術分野において公知の配列番号と少なくとも９０％の配列同一性（例えば、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％の配列同一性）を有するか、又はそうした配列番号の配列を有する。

【００３６】

一部の実施形態において、抗体は、抗ＣＴＬＡ－４モノクローナル抗体である。一部の実施形態において、抗ＣＴＬＡ－４モノクローナルは、抗体イピリムマブであり；及び任意選択で、抗体は、これらの抗体に関連する及び当該技術分野において公知の配列番号と少なくとも９０％の配列同一性（例えば、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％の配列同一性）を有するか、又はそうした配列番号の配列を有する。

【００３７】

一部の実施形態において、抗ＰＤ－Ｌ１モノクローナル抗体は、アテゾリズマブ、アベルマブ、コシベリマブ（coseibelimab）、及びデュルバルマブから選択され；及び任意選択で、抗体は、本明細書に開示される又は当該技術分野において公知のこれらの抗体

に関連する配列番号と少なくとも９０％の配列同一性（例えば、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％の配列同一性）を有するか、又はそうした配列番号の配列を有する。一部の実施形態において、抗ＰＤ－Ｌ１モノクローナル抗体はアベルマブであり；及び任意選択で、抗体は、本明細書に開示される又は当該技術分野において公知のこれらの抗体に関連する配列番号と少なくとも９０％の配列同一性（例えば、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％の配列同一性）を有するか、又はそうした配列番号の配列を有する。

【００３８】

一部の実施形態において、二重特異性分子は、ＮＫ細胞エンゲイジャー又は三重特異性キラー細胞エンゲイジャーである。

【００３９】

一部の実施形態において、記憶ＮＫ細胞は、抗体（又は他の二重特異性分子）の前に投与される。一部の実施形態において、記憶ＮＫ細胞は、抗体（又は他の二重特異性分子）と同時に投与される。一部の実施形態において、記憶ＮＫ細胞は、抗体（又は他の二重特異性分子）の後に投与される。

【００４０】

一部の実施形態において、記憶ＮＫ細胞は、正常なＮＫ細胞と比べてＣＤ１６発現の増加を呈する。一部の実施形態において、正常なＮＫ細胞と比べた記憶ＮＫ細胞のＣＤ１６発現の増加は少なくとも３０日間持続する。

【００４１】

列挙される実施形態

実施形態１．癌の治療を必要としている対象の癌を治療する方法であって、記憶ＮＫ細胞と腫瘍抗原結合部分及びＣＤ１６結合部分を含む二重特異性分子（例えば、モノクローナル抗体、ＮＫ細胞エンゲイジャー、又は三重特異性キラー細胞エンゲイジャー）とを投与することを含む方法。

【００４２】

実施形態２．二重特異性分子が、ＩｇＧ型のモノクローナル抗体である、実施形態１に記載の方法。

【００４３】

実施形態３．モノクローナル抗体が、ＩｇＧ１である、実施形態２に記載の方法。

【００４４】

実施形態４．ＩｇＧ１モノクローナル抗体のＦｃ部分が、ＣＤ１６結合親和性が亢進するように突然変異させたものである、実施形態３に記載の方法。

【００４５】

実施形態５．ＩｇＧ１抗体が、抗ＨＥＲ２抗体、抗ＰＤＬ－１抗体、及び抗ＥＧＦＲ抗体から選択される、実施形態３又は４に記載の方法。

【００４６】

実施形態６．ＩｇＧ１抗体が、抗ＨＥＲ２モノクローナル抗体である、実施形態５に記載の方法。

【００４７】

実施形態７．癌が、卵巣癌である、実施形態６に記載の方法。

【００４８】

実施形態８．卵巣癌が、明細胞癌である、実施形態７に記載の方法。

【００４９】

実施形態９．卵巣癌が、類内膜腺癌である、実施形態７に記載の方法。

【００５０】

実施形態１０．卵巣癌が、粘液腺癌である、実施形態７に記載の方法。

【００５１】
実施形態１１．卵巣癌が、漿液性癌である、実施形態７に記載の方法。
【００５２】
実施形態１２．卵巣癌が、間質性腫瘍である、実施形態７に記載の方法。
【００５３】
実施形態１３．卵巣癌が、胚細胞腫瘍である、実施形態７に記載の方法。
【００５４】
実施形態１４．卵巣癌が、小細胞卵巣癌である、実施形態７に記載の方法。
【００５５】
実施形態１５．癌が、胃癌である、実施形態６に記載の方法。
【００５６】
実施形態１６．抗ＨＥＲ２モノクローナル抗体が、トラスツズマブ及びマルゲツキシマブから選択され；及び任意選択で、抗体が、本明細書に開示される又は当該技術分野において公知のこれらの抗体に関連する配列番号と少なくとも９０％の配列同一性（例えば、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％の配列同一性）を有するか、又はそうした配列番号の配列を有する、実施形態６～１５のいずれか一つに記載の方法。
【００５７】
実施形態１７．抗ＨＥＲ２モノクローナル抗体が、トラスツズマブであり；及び任意選択で、抗体が、本明細書に開示される又は当該技術分野において公知のこれらの抗体に関連する配列番号と少なくとも９０％の配列同一性（例えば、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％の配列同一性）を有するか、又はそうした配列番号の配列を有する、実施形態１６に記載の方法。
【００５８】
実施形態１８．ＩｇＧ１抗体が、抗ＥＧＦＲモノクローナル抗体である、実施形態５に記載の方法。
【００５９】
実施形態１９．癌が、頭頸部癌である、実施形態１８に記載の方法。
【００６０】
実施形態２０．頭頸部癌が、中咽頭癌である、実施形態１９に記載の方法。
【００６１】
実施形態２１．頭頸部癌が、下咽頭癌である、実施形態１９に記載の方法。
【００６２】
実施形態２２．頭頸部癌が、喉頭癌である、実施形態１９に記載の方法。
【００６３】
実施形態２３．頭頸部癌が、口唇・口腔癌である、実施形態１９に記載の方法。
【００６４】
実施形態２４．頭頸部癌が、鼻咽腔癌である、実施形態１９に記載の方法。
【００６５】
実施形態２５．頭頸部癌が、副鼻腔癌である、実施形態１９に記載の方法。
【００６６】
実施形態２６．頭頸部癌が、唾液腺癌である、実施形態１９に記載の方法。
【００６７】
実施形態２７．頭頸部癌が、扁平上皮頸部癌である、実施形態１９に記載の方法。
【００６８】
実施形態２８．頭頸部癌が、鼻腔癌である、実施形態１９に記載の方法。
【００６９】
実施形態２９．頭頸部癌が、軟部組織肉腫である、実施形態１９に記載の方法。

【００７０】
実施形態３０．頭頸部癌が、甲状腺癌である、実施形態１９に記載の方法。
【００７１】
実施形態３１．癌が、結腸直腸癌である、実施形態１８に記載の方法。
【００７２】
実施形態３２．抗ＥＧＦＲモノクローナル抗体が、セツキシマブ、パニツムマブ、及びネシツムマブから選択され；及び任意選択で、抗体が、本明細書に開示される又は当該技術分野において公知のこれらの抗体に関連する配列番号と少なくとも９０％の配列同一性（例えば、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％の配列同一性）を有するか、又はそうした配列番号の配列を有する、実施形態１９～３１のいずれか一つに記載の方法。
【００７３】
実施形態３３．抗ＥＧＦＲモノクローナル抗体が、セツキシマブであり；及び任意選択で、抗体が、本明細書に開示される又は当該技術分野において公知の抗体に関連する配列番号と少なくとも９０％の配列同一性（例えば、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％の配列同一性）を有するか、又はそうした配列番号の配列を有する、実施形態３３に記載の方法。
【００７４】
実施形態３４．ＩｇＧ１抗体が、抗免疫チェックポイントタンパク質抗体である、実施形態５に記載の方法。
【００７５】
実施形態３５．抗免疫チェックポイントタンパク質抗体が、抗ＰＤ－１モノクローナル抗体、抗ＰＤ－Ｌ１モノクローナル抗体、及び抗ＣＴＬＡ－４モノクローナル抗体から選択される、実施形態３４に記載の方法。
【００７６】
実施形態３６．癌が、尿路上皮癌、頭頸部癌、結腸直腸癌、及び胃癌から選択される、実施形態３４に記載の方法。
【００７７】
実施形態３７．抗体が、抗ＰＤ－Ｌ１モノクローナル抗体である、実施形態３６に記載の方法。
【００７８】
実施形態３８．抗ＰＤ－Ｌ１モノクローナル抗体が、アベルマブである、実施形態３７に記載の方法。
【００７９】
実施形態３９．癌が、尿路上皮癌である、実施形態３７又は３８に記載の方法。
【００８０】
実施形態４０．癌が、頭頸部癌である、実施形態３７又は３８に記載の方法。
【００８１】
実施形態４１．癌が、結腸直腸癌である、実施形態３７又は３８に記載の方法。
【００８２】
実施形態４２．癌が、胃癌である、実施形態３７又は３８に記載の方法。
【００８３】
実施形態４３．抗体が、抗ＰＤ－１モノクローナル抗体である、実施形態３６に記載の方法。
【００８４】
実施形態４４．抗ＰＤ－１抗体が、ニボルマブ、ペンブロリズマブ、セミプリマブ、及びドスタルリマブから選択され；及び任意選択で、抗体が、これらの抗体に関連する及び当該技術分野において公知の配列番号と少なくとも９０％の配列同一性（例えば、少なく

とも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％の配列同一性）を有するか、又はそうした配列番号の配列を有する、実施形態４３に記載の方法。

【００８５】

実施形態４５．抗体が、抗ＣＴＬＡ－４モノクローナル抗体である、実施形態３６に記載の方法。

【００８６】

実施形態４６．抗ＣＴＬＡ－４モノクローナルが、抗体イピリムマブであり；及び任意選択で、抗体が、これらの抗体に関連する及び当該技術分野において公知の配列番号と少なくとも９０％の配列同一性（例えば、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％の配列同一性）を有するか、又はそうした配列番号の配列を有する、実施形態４５に記載の方法。

【００８７】

実施形態４７．抗ＰＤ－Ｌ１モノクローナル抗体が、アテゾリズマブ、アベルマブ、コシベリマブ（coseibelimab）、及びデュルバルマブから選択され；及び任意選択で、抗体は、本明細書に開示される又は当該技術分野において公知のこれらの抗体に関連する配列番号と少なくとも９０％の配列同一性（例えば、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％の配列同一性）を有するか、又はそうした配列番号の配列を有する、実施形態３７に記載の方法。

【００８８】

実施形態４８．抗ＰＤ－Ｌ１モノクローナル抗体が、アベルマブであり；及び任意選択で、抗体が、本明細書に開示される又は当該技術分野において公知のこれらの抗体に関連する配列番号と少なくとも９０％の配列同一性（例えば、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％の配列同一性）を有するか、又はそうした配列番号の配列を有する、実施形態４７に記載の方法。

【００８９】

実施形態４９．二重特異性分子が、ＮＫ細胞エンゲイジャー又は三重特異性キラー細胞エンゲイジャーである、実施形態１に記載の方法。

【００９０】

実施形態５０．記憶ＮＫ細胞が、抗体（又は他の二重特異性分子）の前に投与される、実施形態１～４９のいずれか一つに記載の方法。

【００９１】

実施形態５１．記憶ＮＫ細胞が、抗体（又は他の二重特異性分子）と同時に投与される、実施形態１～５０のいずれか一つに記載の方法。

【００９２】

実施形態５２．記憶ＮＫ細胞が、抗体（又は他の二重特異性分子）の後に投与される、実施形態１～５１のいずれか一つに記載の方法。

【００９３】

実施形態５３．記憶ＮＫ細胞と腫瘍抗原結合部分及びＣＤ１６結合部分を含む二重特異性分子（例えば、モノクローナル抗体、ＮＫ細胞エンゲイジャー、又は三重特異性キラー細胞エンゲイジャー）と、治療的に許容可能な担体とを含む免疫治療組成物。

【００９４】

実施形態５４．記憶ＮＫ細胞と腫瘍抗原結合部分及びＣＤ１６結合部分を含む二重特異性分子（例えば、モノクローナル抗体、ＮＫ細胞エンゲイジャー、又は三重特異性キラー細胞エンゲイジャー）と、任意選択で、癌を患う対象に記憶ＮＫ細胞と抗体とを同時的又は逐次的組み合わせで投与するよう指示する説明書とを含む免疫療法キット。

【００９５】
実施形態５５．二重特異性分子が、ＩｇＧ型のモノクローナル抗体である、実施形態５３又は５４に記載の組成物又はキット。
【００９６】
実施形態５６．モノクローナル抗体が、ＩｇＧ１又はＩｇＧ３である、実施形態５５に記載の組成物又はキット。
【００９７】
実施形態５７．ＩｇＧ１モノクローナル抗体のＦｃ部分が、ＣＤ１６結合親和性が亢進するように突然変異させたものである、実施形態５６に記載の組成物又はキット。
【００９８】
実施形態５８．モノクローナル抗体が、抗ＨＥＲ２モノクローナル抗体、抗ＰＤＬ－１モノクローナル抗体、及び抗ＥＧＦＲモノクローナル抗体から選択される、実施形態５５又は５６に記載の組成物又はキット。
【００９９】
実施形態５９．ＩｇＧ１（又はＩｇＧ３）抗体が、抗ＨＥＲ２モノクローナル抗体である、実施形態５８に記載の組成物又はキット。
【０１００】
実施形態６０．癌が、卵巣癌である、実施形態５９に記載の組成物又はキット。
【０１０１】
実施形態６１．卵巣癌が、明細胞癌である、実施形態６０に記載の組成物又はキット。
【０１０２】
実施形態６２．卵巣癌が、類内膜腺癌である、実施形態６０に記載の組成物又はキット。
【０１０３】
実施形態６３．卵巣癌が、粘液腺癌である、実施形態６０に記載の組成物又はキット。
【０１０４】
実施形態６４．卵巣癌が、漿液性癌である、実施形態６０に記載の組成物又はキット。
【０１０５】
実施形態６５．卵巣癌が、間質性腫瘍である、実施形態６０に記載の組成物又はキット。
【０１０６】
実施形態６６．卵巣癌が、胚細胞腫瘍である、実施形態６０に記載の組成物又はキット。
【０１０７】
実施形態６７．卵巣癌が、小細胞卵巣癌である、実施形態６０に記載の組成物又はキット。
【０１０８】
実施形態６８．癌が、胃癌である、実施形態５９に記載の組成物又はキット。
【０１０９】
実施形態６９．抗ＨＥＲ２モノクローナル抗体が、トラスツズマブ及びマルゲツキシマブから選択され；及び任意選択で、抗体が、本明細書に開示される又は当該技術分野において公知のこれらの抗体に関連する配列番号と少なくとも９０％の配列同一性（例えば、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％の配列同一性）を有するか、又はそうした配列番号の配列を有する、実施形態５９～６８のいずれか一つに記載の組成物又はキット。
【０１１０】
実施形態７０．抗ＨＥＲ２モノクローナル抗体が、トラスツズマブであり；及び任意選択で、抗体が、本明細書に開示される又は当該技術分野において公知の抗体に関連する配列番号と少なくとも９０％の配列同一性（例えば、少なくとも９１％、少なくとも９２％

、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％の配列同一性）を有するか、又はそうした配列番号の配列を有する、実施形態６９に記載の組成物又はキット。

【０１１１】

実施形態７１．ＩｇＧ１（又はＩｇＧ３）抗体が、抗ＥＧＦＲモノクローナル抗体である、実施形態５８に記載の組成物又はキット。

【０１１２】

実施形態７２．癌が、頭頸部癌である、実施形態７１に記載の組成物又はキット。

【０１１３】

実施形態７３．頭頸部癌が、中咽頭癌である、実施形態７２に記載の組成物又はキット。

【０１１４】

実施形態７４．頭頸部癌が、下咽頭癌である、実施形態７２に記載の組成物又はキット。

【０１１５】

実施形態７５．頭頸部癌が、喉頭癌である、実施形態７２に記載の組成物又はキット。

【０１１６】

実施形態７６．頭頸部癌が、口唇・口腔癌である、実施形態７２に記載の組成物又はキット。

【０１１７】

実施形態７７．頭頸部癌が、鼻咽腔癌である、実施形態７２に記載の組成物又はキット。

【０１１８】

実施形態７８．頭頸部癌が、副鼻腔癌である、実施形態７２に記載の組成物又はキット。

【０１１９】

実施形態７９．頭頸部癌が、唾液腺癌である、実施形態７２に記載の組成物又はキット。

【０１２０】

実施形態８０．頭頸部癌が、扁平上皮頸部癌である、実施形態７２に記載の組成物又はキット。

【０１２１】

実施形態８１．頭頸部癌が、鼻腔癌である、実施形態７２に記載の組成物又はキット。

【０１２２】

実施形態８２．頭頸部癌が、軟部組織肉腫である、実施形態７２に記載の組成物又はキット。

【０１２３】

実施形態８３．頭頸部癌が、甲状腺癌である、実施形態７２に記載の組成物又はキット。

【０１２４】

実施形態８４．癌が、結腸直腸癌である、実施形態７１に記載の組成物又はキット。

【０１２５】

実施形態８５．抗ＥＧＦＲモノクローナル抗体が、セツキシマブ、パニツムマブ、及びネシツムマブから選択され；及び任意選択で、抗体が、本明細書に開示される又は当該技術分野において公知のこれらの抗体に関連する配列番号と少なくとも９０％の配列同一性（例えば、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％の配列同一性）を有するか、又はそうした配列番号の配列を有する、実施形態７１～８４のいずれか一つに記載の組成物又はキット。

【０１２６】

実施形態８６．抗ＥＧＦＲモノクローナル抗体が、セツキシマブであり；及び任意選択で、抗体が、本明細書に開示される又は当該技術分野において公知の抗体に関連する配列番号と少なくとも９０％の配列同一性（例えば、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％の配列同一性）を有するか、又はそうした配列番号の配列を有する、実施形態８５に記載の組成物又はキット。

【０１２７】

実施形態８７．ＩｇＧ１（又はＩｇＧ３）抗体が、抗免疫チェックポイントタンパク質抗体である、実施形態５８に記載の組成物又はキット。

【０１２８】

実施形態８８．抗免疫チェックポイントタンパク質抗体が、抗ＰＤ－１モノクローナル抗体、抗ＰＤ－Ｌ１モノクローナル抗体、及び抗ＣＴＬＡ－４モノクローナル抗体から選択される、実施形態８７に記載の組成物又はキット。

【０１２９】

実施形態８９．癌が、尿路上皮癌、頭頸部癌、結腸直腸癌、及び胃癌から選択される、実施形態８８に記載の組成物又はキット。

【０１３０】

実施形態９０．抗体が、抗ＰＤ－Ｌ１モノクローナル抗体である、実施形態８９に記載の組成物又はキット。

【０１３１】

実施形態９１．抗ＰＤ－Ｌ１モノクローナル抗体が、アベルマブであり；及び任意選択で、抗体が、本明細書に開示される又は当該技術分野において公知の抗体に関連する配列番号と少なくとも９０％の配列同一性（例えば、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％の配列同一性）を有するか、又はそうした配列番号の配列を有する、実施形態９０に記載の組成物又はキット。

【０１３２】

実施形態９２．癌が、尿路上皮癌である、実施形態９０又は９１に記載の組成物又はキット。

【０１３３】

実施形態９３．癌が、頭頸部癌である、実施形態９０又は９１に記載の組成物又はキット。

【０１３４】

実施形態９４．癌が、結腸直腸癌である、実施形態９０又は９１に記載の組成物又はキット。

【０１３５】

実施形態９５．癌が、胃癌である、実施形態９０又は９１に記載の組成物又はキット。

【０１３６】

実施形態９６．抗体が、抗ＰＤ－１モノクローナル抗体である、実施形態８９に記載の組成物又はキット。

【０１３７】

実施形態９７．抗ＰＤ－１抗体が、ニボルマブ、ペンブロリズマブ、セミプリマブ、及びドスタルリマブから選択され；及び任意選択で、抗体が、これらの抗体に関連する及び当該技術分野において公知の配列番号と少なくとも９０％の配列同一性（例えば、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％の配列同一性）を有するか、又はそうした配列番号の配列を有する、実施形態９６に記載の組成物又はキット。

【０１３８】

実施形態９８．抗体が、抗ＣＴＬＡ－４モノクローナル抗体である、実施形態８９に記

載の組成物又はキット。
【０１３９】
実施形態９９．抗ＣＴＬＡ－４モノクローナルが、抗体イピリムマブであり；及び任意選択で、抗体が、抗体に関連する配列番号と少なくとも９０％の配列同一性（例えば、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％の配列同一性）を有するか、又はそうした配列番号の配列を有する及び当該技術分野において公知の、実施形態９８に記載の組成物又はキット。
【０１４０】
実施形態１００．抗ＰＤ－Ｌ１モノクローナル抗体が、アテゾリズマブ、アベルマブ、コシベリマブ（coseibelimab）、及びデュルバルマブから選択され；及び任意選択で、抗体が、本明細書に開示される又は当該技術分野において公知のこれらの抗体に関連する配列番号と少なくとも９０％の配列同一性（例えば、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％の配列同一性）を有するか、又はそうした配列番号の配列を有する、実施形態９０に記載の組成物又はキット。
【０１４１】
実施形態１０１．抗ＰＤ－Ｌ１モノクローナル抗体が、アベルマブであり；及び任意選択で、抗体が、本明細書に開示される又は当該技術分野において公知の抗体に関連する配列番号と少なくとも９０％の配列同一性（例えば、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％の配列同一性）を有するか、又はそうした配列番号の配列を有する、実施形態１００に記載の組成物又はキット。
【０１４２】
実施形態１０２．記憶ＮＫ細胞が、抗体の前に投与される、実施形態１～１０１のいずれか一つに記載の方法、組成物、又はキット。
【０１４３】
実施形態１０３．記憶ＮＫ細胞が、抗体と同時に投与される、実施形態１～１０２のいずれか一つに記載の方法、組成物、又はキット。
【０１４４】
実施形態１０４．記憶ＮＫ細胞が、抗体の後に投与される、実施形態１～１０３のいずれか一つに記載の方法、組成物、又はキット。
【０１４５】
実施形態１０５．記憶ＮＫ細胞が、正常なＮＫ細胞と比べてＣＤ１６の発現の増加を呈する、実施形態１～１０４のいずれか一つに記載の方法、組成物又はキット。
【０１４６】
実施形態１０６．正常なＮＫ細胞と比べた記憶ＮＫ細胞のＣＤ１６発現の増加が少なくとも３０日間持続する、実施形態１０６に記載の方法、組成物、又はキット。
【０１４７】
本明細書に開示され、現時点で特許請求されていない実施形態は、公衆に提供することを意図しない。
【０１４８】
免疫エフェクター細胞の拡大及びプライミング方法
ＮＫ細胞のインビトロ拡大は、サイトカイン、又は、好ましくは、サイトカインの機能性断片を含む拡大融合タンパク質、及びその多連鎖複合体を含む拡大剤を使用する濃縮プロセスで実施し得る。例えば、拡大剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－９、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１のうちの１つ以上、又はこれらの組み合わせ、例えば、ＩＬ－７、ＩＬ－２１、及びＩＬ－１５のカクテルを、所望の分量又は拡大倍数のＮＫ細胞を生じさせるのに十分な量で含み得る。かかるサイトカインは、市販品が入手されてもよく、又は当該技術分野において公知の方法により作成されてもよい。又は、例えば、拡大剤は

、ＮＫ細胞を拡大するのに十分な量で１つ以上の拡大融合タンパク質を含んでもよく、例えば、国際公開第２０２００４７２９９号、国際公開第２０２０４７４７３号、又は国際公開第２０２０２５７６３９号に開示される多連鎖融合タンパク質複合体、例えば７ｔ１５－２１ｓの中から選択されてもよい。７ｔ１５－２１ｓの配列を表１に開示する。

【０１４９】

【表１】

表 1: 例示的拡大融合タンパク質鎖の配列

エレメント	WO'299号配列番号	配列番号	配列
成熟7t15	104	配列番号1	DCDIEGKDGKQYESVLMVSIDQLLDSMKEI GSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMFLFRAA RKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTTILLN CTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKE QKKLNDLCFLKRLLQEIKTCWNKILMGTKE HSGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKP VNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDL TDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVESTGSA GEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGT KVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDL IYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDK GENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMG QEKGEFRENWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDA TLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLES GDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGC KECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS
成熟21s	108	配列番号2	QGQDRHMIRMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPE FLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANT GNNERIINVSIKKLKRKPPSTNAGRRQKHRL TCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQH LSSRTHGSEDSITCPPPMSVEHADIWVKSYS LYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKAT NVAHWTTPSLKCIR

【０１５０】

拡大は、加えて、上記に開示される融合タンパク質の連結ドメインを標的化する抗体、例えば抗組織因子抗体など、架橋剤の使用によって容易になる。抗組織因子抗体の例は、当該技術分野において公知である。国際公開第２０２０４７４７３号及び国際公開第２０２０２５７６３９号は、使用されることになるａ－ＴＦ　Ａｂを開示している。また、米国特許第８，００７，７９５号及び国際公開第２００３０３７９１１号、詳細には、Ｈ３６ハイブリドーマのＣＤＲ及びヒト化フレームワーク領域ＬＣ－０８（この出願の図１２）及びＨＣ－０９（この出願の図１３）を取り込むＩｇＧ１ヒト化抗体も参照のこと。以下の表２は、ＷＯ’４７３号及びＷＯ’６３９号において使用されるものと思われる、ＵＳ’７９５号及びＷＯ’９１１号に開示される、HCW Biologicsから入手される、及び特に指定されない限り以下の実験で使用され、本明細書においてＡＴＦ１と称されるａ－ＴＦＡｂの配列を開示する。ＡＴＦ１　ＨＣＤＲ２は、以下の２つの配列のうちの一方である。このように、本明細書に開示されるとおりの拡大剤は、上記に開示されるとおりの１つ以上のサイトカインの組み合わせ又はＥＦＰを、ＡＴＦ１などの架橋剤（その１つ又は複

数の配列を表２に開示する）と一緒に含み得る。更なる抗ＴＦ抗体は、当該技術分野において公知であり、商業的供給元から容易に入手することができる。

【０１５１】

【表２】

表 2: 例示的抗 TF 抗体（「ATF1」）の配列

a-TF抗体エレメント	US'795号配列番号	配列番号	配列
LC-CDR1	116	配列番号3	LASQTIDTWLA
LC-CDR2	6	配列番号4	AATNLAD
LC-CDR3	7	配列番号5	QQVYSSPFT
LC-FR1	109	配列番号6	DIQMTQSPASLSASVGDRVTITC
LC-FR2	108	配列番号7	WYLQKPGKSPQLLIY
LC-FR3	112	配列番号8	GVPSRFSGSGSGTDFSFTISSLQPEDFATYYC
LC-FR4	110	配列番号9	FGQGTKLEIK
VL	n/a	配列番号10	DIQMTQSPASLSASVGDRVTITCLASQTIDTWLAWYLQKPGKSPQLLIYAATNLADGVPSRFSGSGSGTDFSFTISSLQPEDFATYYCQQVYSSPFT GQGTKLEIK
HC-CDR1	134	配列番号11	DYNVY
HC-CDR2 (a)	9	配列番号12	YIDPYNGITIYDQNFKG
HC-CDR2 (b)	101	配列番号13	YIDPYNGITIYDQNLKG
HC-CDR3	10	配列番号14	DVTTALDF
HC-FR1	129	配列番号15	QIQLVQSGGEVKKPGASVRVSCKASGYSFT
HC-FR2	123	配列番号16	WVRQSPGKGLEWIG
HC-FR3	126	配列番号17	KATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCAR

【０１５２】

【表３】

HC-FR4	122	配列番号18	WGQGTTVTVSS
VH-1	n/a	配列番号19	QIQLVQSGGEVKKPGASVRVSCKASGYSFTDYNVYWVRQSPGKGLEWIGYIDPYNGITIYDQNFKGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCARDVTTALDFWGQGTTVTVSS
VH-2	n/a	配列番号20	QIQLVQSGGEVKKPGASVRVSCKASGYSFTDYNVYWVRQSPGKGLEWIGYIDPYNGITIYDQNLKGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCARDVTTALDFWGQGTTVTVSS
IgG1 LC定常領域	97	配列番号21	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
IgG1 HC定常領域	98	配列番号22	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQEFASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG+C7FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【０１５３】

当該技術分野においては代替的な架橋結合方法が公知であり、機能化したマイクロパーティクル（ビーズ）、フィーダー細胞及び細胞膜粒子が挙げられる。多くの場合にフィーダー不要のシステムが好ましい。例えば、抗ＣＤ２及び抗ＮＫｐ４６抗体で機能化された溶解可能なアルギン酸ナトリウムマイクロスフェアを利用するR&D SystemsのCloudzヒトＮＫ細胞拡大キットを本明細書に開示されるとおりの拡大サイトカイン（又はその断片、又はそれを含む融合タンパク質）及びその組み合わせと共に、拡大後にマイクロパーティクルを速やかに溶解させて細胞の回収を容易にするための放出緩衝液に加えて使用し得る。

【０１５４】

記憶様の性質を獲得するためのプライミングは、ＩＬ－１２、ＩＬ－２３、ＩＬ－２７、及びＩＬ－３５のうちの１つ以上；ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－９、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１のうちの１つ以上；及びＩＬ－１８、ＩＬ－１ａ、ＩＬ－１ｂ、ＩＬ－３６ａ、ＩＬ－３６ｂ、及びＩＬ－３６ｇのうちの１つ以上など、刺激性サイトカインの組み合わせを含むプライミング剤で実施される。或いは、プライミング剤は、サイトカインの機能性断片を含むプライミング融合タンパク質、及びその多連鎖複合体を含み得る。例えば、融合タンパク質は、国際公開第２０２００４７２９９号、国際公開第２０２０４７４７３号、又は国際公開第２０２０２５７６３９号に開示される多連鎖融合タンパ

ク質複合体、例えば１８ｔ１５－１２ｓ（ＨＣＷ－９２０１）の中から選択されてもよく、その配列を表３に開示する。

【０１５５】

【表４】

表 3: 例示的プライミング融合タンパク質鎖の配列

エレメント	WO'299号配列番号	配列番号	配列
成熟18t15	70	配列番号23	YFGKLESKLSVIRNLNMTDSDCRDNAPRTI FIISMYKDSQPRGMAVTISVKCEKISTLSCE NKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRSVPGH DNKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILK KEDELGDRSIMFTVQNEDSGTTNTVAAYN LTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTK SGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQT YLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEF TPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDE RTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKS SSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQ AVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFREN WVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDV HPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHD TVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELE EKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS
成熟12s	74	配列番号24	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTC DTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVK EFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKED GIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGR FTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVT CGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSA CPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFF IRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYP DTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDR VFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSS WSEWASVPCSGGGGSGGGGSGGGGSRNL PVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQK ARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEAC LPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKT SFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKL LMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNS ETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIR AVTIDRVMSYLNASITCPPPMSVEHADIWV KSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECV LNKATNVAHWTTPSLKCIR

【０１５６】

このように、本明細書には、順次、

ａ）ＮＫ細胞の集団を精製すること；

ｂ）ＮＫ細胞をプライミングすること；及び

ｃ）ＮＫ細胞を拡大すること

によって作製される記憶ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞が提供される。

【０１５７】
　また、本明細書には、順次、
　ａ）ＮＫ細胞の集団を精製すること；
　ｂ）ＮＫ細胞を拡大すること；及び
　ｃ）ＮＫ細胞をプライミングすること
によって作製される記憶ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞も提供される。
【０１５８】
　また、本明細書には、
　ａ）ＮＫ細胞の集団を精製すること；及び
　ｂ）ＮＫ細胞を同時にプライミング及び拡大すること
によって作製される記憶ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞も提供される。
【０１５９】
　一部の実施形態において、ＮＫ細胞集団は、供血、又は新鮮な若しくは予め凍結保存されていた白血球アフェレーシス産物から出発して精製される。一部の実施形態において、精製は、ポジティブ選択（例えば、Miltenyi CliniMACS Prodigyにて）を経て実施される。一部の実施形態において、精製は、ネガティブ選択（例えば、StemCell Easy SepのＮＫ細胞濃縮キット）を経て実施される。一部の実施形態において、精製は、ポジティブ選択とネガティブ選択との組み合わせを用いて実施される。一部の実施形態において、ＮＫ細胞は、リンパ球前駆細胞から分化させる。
【０１６０】
　一部の実施形態において、ＮＫ細胞は、サイトカインの組み合わせ、又はその機能性断片、及び／又はその機能性断片を含む融合タンパク質、又は前述のいずれかの組み合わせと、任意選択で架橋剤とを含む拡大剤への曝露によって拡大される。
【０１６１】
　一部の実施形態において、ＮＫ細胞は、
　・ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－９、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１のうちの１つ以上、又はその機能性断片；又は
　・ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－９、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１のうちの１つ以上の機能性断片を含む融合タンパク質；
及び任意選択で架橋剤；又は
　・ＮＫ細胞架橋抗体及び拡大サイトカインで機能化したマイクロスフェア；
又は前述のいずれかの組み合わせ
を含む拡大剤への曝露によって拡大される。
【０１６２】
　一部の実施形態において、ＮＫ細胞は、ＩＬ－７、ＩＬ－２１、及びＩＬ－１５の組み合わせ、又はその機能性断片、及び／又はその機能性断片を含む融合タンパク質、又は前述のいずれかの組み合わせを含む拡大剤への曝露によって拡大される。
【０１６３】
　一部の実施形態において、ＮＫ細胞は、ＩＬ－７、ＩＬ－２１、及びＩＬ－１５の機能性断片を含む融合タンパク質を含む拡大剤への曝露によって拡大される。
【０１６４】
　一部の実施形態において、ＮＫ細胞は、７ｔ１５－２１ｓを含む拡大剤への曝露によって拡大される。
【０１６５】
　一部の実施形態において、拡大剤は架橋剤を含む。一部の実施形態において、架橋剤は架橋抗体である。一部の実施形態において、架橋抗体はＡＴＦ１である。
【０１６６】
　一部の実施形態において、ＮＫ細胞は、７ｔ１５－２１ｓとＡＴＦ１とを含む拡大剤への曝露によって拡大される。
【０１６７】

一部の実施形態において、ＮＫ細胞は、１日～４０日間にわたる拡大剤への曝露によって拡大される。一部の実施形態において、ＮＫ細胞は、７日～２１日間にわたる拡大剤への曝露によって拡大される。一部の実施形態において、ＮＫ細胞は、約１４日間にわたる拡大剤への曝露によって拡大される。

【０１６８】

一部の実施形態において、拡大剤は７ｔ１５－２１ｓとＡＴＦ１とを含む。一部の実施形態において、拡大剤は、０．１～３００ｎｍの濃度の７ｔ１５－２１ｓと、０．０１～２００ｎｍの濃度のＡＴＦ１とを含む。一部の実施形態において、拡大剤は、０．２～２００ｎｍの濃度の７ｔ１５－２１ｓと、０．０１～１００ｎｍの濃度のＡＴＦ１とを含む。一部の実施形態において、拡大剤は、約５０ｎｍの濃度の７ｔ１５－２１ｓと、約２５ｎｍの濃度のＡＴＦ１とを含む。

【０１６９】

一部の実施形態において、ＮＫ細胞は、約１４日間にわたる７ｔ１５－２１ｓ及びＡＴＦ１への曝露によって拡大される。一部の実施形態において、ＮＫ細胞は、約１４日間にわたる約５０ｎｍの濃度の７ｔ１５－２１ｓ及び約２５ｎｍの濃度のＡＴＦ１への曝露によって拡大される。

【０１７０】

一部の実施形態において、ＮＫ細胞は、例えば、サイトカインの組み合わせ、又はその機能性断片、及び／又はその機能性断片を含む融合タンパク質、又は前述のいずれかの組み合わせから選択されるプライミング剤への曝露によってプライミングされる。

【０１７１】

一部の実施形態において、ＮＫ細胞は、出発数の１０倍超に拡大される。一部の実施形態において、ＮＫ細胞は、出発数の１００倍超に拡大される。一部の実施形態において、ＮＫ細胞は、出発数の１０００倍超に拡大される。

【０１７２】

一部の実施形態において、ＮＫ細胞は、

・ＩＬ－１２、ＩＬ－２３、ＩＬ－２７、及びＩＬ－３５のうちの１つ以上；

・ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－９、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１のうちの１つ以上；及び

・ＩＬ－１８、ＩＬ－１ａ、ＩＬ－１ｂ、ＩＬ－３６ａ、ＩＬ－３６ｂ、及びＩＬ－３６ｇのうちの１つ以上；

又はその機能性断片、及び／又はその機能性断片を含む融合タンパク質、又は前述のいずれかの組み合わせ

を含むプライミング剤への曝露によってプライミングされる。

【０１７３】

一部の実施形態において、ＮＫ細胞は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－１８の組み合わせを含むプライミング剤への曝露によってプライミングされる。

【０１７４】

一部の実施形態において、ＮＫ細胞は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－１８の機能性断片を含む融合タンパク質を含むプライミング剤への曝露によってプライミングされる。一部の実施形態において、ＮＫ細胞は、融合タンパク質１８ｔ１５－１２ｓを含むプライミング剤への曝露によってプライミングされる。

【０１７５】

一部の実施形態において、ＮＫ細胞は、２００～３００ｎＭの濃度の１８ｔ１５－１２ｓでプライミングされる。一部の実施形態において、ＮＫ細胞は、２５０ｎｍの濃度の１８ｔ１５－１２ｓでプライミングされる。

【０１７６】

一部の実施形態において、ＮＫ細胞は、１分～２４時間にわたってプライミングされる。一部の実施形態において、ＮＫ細胞は、０．５～１６時間にわたってプライミングされる。一部の実施形態において、ＮＫ細胞は、１～３時間にわたってプライミングされる。

【０１７７】
一部の実施形態において、ＮＫ細胞は凍結保存される。
【０１７８】
一部の実施形態において、記憶様表現型は、細胞表面ＣＤ６９、ＣＤ２５、ＣＤ１６、及び／又はＮＫＧ２Ａの発現レベルによって指示される。
【０１７９】
一部の実施形態において、記憶ＮＫ細胞には、プライミングされていないＮＫ細胞と比較して、
ａ）癌細胞に対する細胞傷害性の改善；
ｂ）持続性の改善；
ｃ）抗腫瘍活性の改善；及び／又は
ｄ）サイトカイン産生の増加；
のうちの１つ以上が見られる。
【０１８０】
一部の実施形態において、産生されるサイトカインは、ＩＦＮｇ、ＴＮＦａ、ＧＭ－ＣＳＦ、及びこれらの組み合わせから選択される。
【０１８１】
上記の列挙される実施形態のいずれかにおいて、記憶ＮＫ細胞は、これらの前述の実施形態によって更に限定され得る。
【０１８２】
免疫エフェクター細胞
本明細書に開示されるとおりの免疫エフェクター細胞には、記憶ＮＫ細胞、記憶様（ＭＬ）ＮＫ細胞、及びサイトカイン誘導性記憶様（ＣＩＭＬ）ＮＫ細胞など、ＮＫ細胞及びそのサブタイプ、並びにこれらの変異体が含まれ、そのいずれも、末梢血又は臍帯血細胞、幹細胞、人工多能性幹細胞（ｉＰＳＣ）、及びＮＫ－９２細胞などの不死化ＮＫ細胞を含めた様々な供給源に由来し得る。
【０１８３】
ＮＫ細胞
ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞は、従来、異常な又はストレスを受けている細胞を抗原認識又は事前感作によるのでなく、活性化型及び抑制型受容体からのシグナルの組み込みを通じて標的化し、排除することにより病原体に対する宿主防御及び抗腫瘍免疫応答を媒介する自然免疫エフェクターリンパ球と考えられている。ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞は、それが大きな毒性なく安全に投与されており、移植片対宿主病（ＧｖＨＤ）を引き起こさず、天然で悪性細胞を認識して排除し、及び細胞工学的操作に適しているため、同種異系細胞免疫療法のＴ細胞に代わるものである。
【０１８４】
記憶、記憶様、及びＣＩＭＬ　ＮＫ細胞
その自然の細胞傷害及び免疫刺激活性に加えて、ＮＫ細胞は、場合によっては記憶様又はサイトカイン誘導性記憶様（ＣＩＭＬ）ＮＫ細胞とも呼ばれる、持続性のある記憶ＮＫ集団を含めた、ロバストなリコール反応を生じる異種細胞及び万能細胞サブセットを構成する。記憶ＮＫ細胞は、自然の刺激、又は人工的な刺激（「プライミング」）のいずれであれ、炎症誘発性サイトカイン又は活性化型受容体経路による刺激によって作製することができる。サイトカイン活性化によって作製される記憶ＮＫ細胞は、白血病免疫療法のセッティングで臨床的に使用されている。
【０１８５】
ＣＤ５６、Ｋｉ－６７、ＮＫＧ２Ａの増加、及び活性化型受容体ＮＫＧ２Ｄ、ＮＫｐ３０、及びＮＫｐ４４の増加が、インビボで分化した記憶ＮＫ細胞において観察されている。加えて、インビボ分化では、ＣＤ１６及びＣＤ１１ｂの発現中央値の僅かな低下が示された。ＭＬ　ＮＫ細胞では、ＡＣＴ及びＢＬ　ＮＫ細胞の両方と比べてＴＲＡＩＬ、ＣＤ６９、ＣＤ６２Ｌ、ＮＫＧ２Ａ、及びＮＫｐ３０陽性ＮＫ細胞の頻度の増加が観察された

一方、ＣＤ２７＋及びＣＤ１２７＋　ＮＫ細胞の頻度は減少した。最後に、インビトロで分化したＭＬ　ＮＫ細胞と異なり、インビボで分化したＭＬ　ＮＫ細胞は、ＣＤ２５を発現しなかった。

【０１８６】

サイトカイン誘導性記憶様ナチュラルキラー細胞（ＣＩＭＬ－ＮＫ）

例えば、インターロイキン－１２（ＩＬ－１２）、ＩＬ－１５、及びＩＬ－１８など、サイトカインの組み合わせによるプライミング（事前の活性化）により、ＮＫ細胞を誘導して記憶様表現型を獲得することができる。これらのサイトカイン誘導性記憶様（ＣＩＭＬ）ＮＫ細胞（ＣＩＭＬ－ＮＫ又はＣＩＭＬ）は、サイトカインでの再刺激時又は活性化型受容体による惹起時に反応の亢進を呈する。ＣＩＭＬ　ＮＫ細胞は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－１８などのサイトカイン及び／又はその近縁のファミリーメンバー、又はその機能性断片、又はその機能性断片を含む融合タンパク質による活性化により作製し得る。

【０１８７】

記憶ＮＫ細胞は典型的には、従来のＮＫ細胞と比較したとき、細胞表面タンパク質発現パターンについて差を呈する。かかる発現パターンは当該技術分野において公知であり、例えば、ＣＩＭＬ　ＮＫ細胞におけるＣＤ５６、ＣＤ５６サブセットＣＤ５６ｄｉｍ、ＣＤ５６サブセットＣＤ５６ｂｒｉｇｈｔ、ＣＤ１６、ＣＤ９４、ＮＫＧ２Ａ、ＮＫＧ２Ｄ、ＣＤ６２Ｌ、ＣＤ２５、ＮＫｐ３０、ＮＫｐ４４、及びＮＫｐ４６の（対照ＮＫ細胞と比較した）増加を含み得る（例えば、Romee et al. Sci Transl Med. 2016 Sep 21;8(357):357を参照のこと）。記憶ＮＫ細胞はまた、異種ＮＫ細胞集団と比較したときの、細胞傷害性などのエフェクター機能の亢進、持続性の改善、ＩＦＮ－γ産生の増加など、観察されるインビトロ及びインビボ特性によって同定されてもよい。

【０１８８】

抗体

本明細書には、本明細書に開示されるポリペプチドを含む抗体が提供される。一部の実施形態において抗体は、本明細書に開示される及び／又は当該技術分野において公知の軽鎖及び重鎖、V_H鎖及びV_L鎖、又はＣＤＲのグループ分けを含む。

【０１８９】

本明細書では、開示される様々な形態の抗体が企図される。例えば、抗体は、アイソタイプ、ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ、及びＩｇＭ、より詳細には、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４のヒトフレームワーク及び定常領域であって、場合によっては、Ｆｃ受容体機能を変化させるか、又はＦａｂアーム交換を防ぐような様々な突然変異を含むもの、又は抗体断片、例えば、Ｆ（ａｂ’）２断片、Ｆ（ａｂ）断片、単鎖Ｆｖ断片（ｓｃＦｖ）等を有することができる。

【０１９０】

特定の実施形態において、本明細書に提供される抗体は、ヒト抗体である。ヒト抗体は、当該技術分野において公知の様々な技法を用いて作製することができる。例えば、ヒト抗体はまた、ヒト由来のファージディスプレイライブラリから選択されるＦｖクローン可変ドメイン配列を単離することによっても生成し得る。次にはかかる可変ドメイン配列を所望のヒト定常ドメインと組み合わせ得る。

【０１９１】

本明細書に提供されるとおりの抗体は、例えば非ヒト可変領域（例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、又はサルなどの非ヒト霊長類に由来する可変領域）とヒト定常領域とを含むキメラ抗体、又はクラス若しくはサブクラスが親抗体のものから変化している「クラススイッチを起こした」抗体であってもよい。

【０１９２】

本明細書に提供されるとおりの抗体は、ヒト化抗体であってもよい。典型的には、非ヒト抗体は、親非ヒト抗体の特異性及び親和性は保ちながらも、ヒトに対する免疫原性を低減するためヒト化される。概して、ヒト化抗体は、ＨＶＲ、例えば、ＣＤＲ（又はその一

部分）が非ヒト抗体に由来し、且つＦＲ（又はその一部分）がヒト抗体配列に由来する１つ以上の可変ドメインを含む。ヒト化抗体はまた、任意選択で、ヒト定常領域の少なくとも一部分を含むことになる。一部の実施形態において、ヒト化抗体における一部のＦＲ残基は、例えば、抗体特異性又は親和性を元に戻すため、又は改善するため、非ヒト抗体（例えば、ＨＶＲ残基の由来である抗体）からの対応する残基に置換される。

【０１９３】

本明細書に開示される抗体はまた、二重特異性又は三重特異性－即ち、本明細書に開示されるポリペプチドのうちの１つを含む抗原認識ドメインと、別の抗原に結合する１つ以上の他の抗原認識ドメインとを含むものであってもよい。例えば、抗体の一方のアームが、癌細胞上にある抗原の多型と結合してもよく、他方のアームが、ＥＧＦＲ、ＨＥＲ－２、又はＰＤ－Ｌ１、又は別の癌細胞標的と結合してもよい。三重特異性抗体の一例では、抗体はまた、動員された記憶ＮＫ細胞の活性を亢進するため、ＣＤ１６など、別の標的とも結合することになり得る。

【０１９４】

一部の実施形態において、ヒト化抗体は、可変領域に加えて、ヒトアクセプターフレームワーク、例えばヒト免疫グロブリンフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワークを含む。ヒト化に使用し得るヒトフレームワーク領域としては、限定はされないが、「最良適合」法を用いて選択されるフレームワーク領域、軽鎖又は重鎖可変領域の特定のサブグループのヒト抗体のコンセンサス配列に由来するフレームワーク領域、ヒト成熟（体細胞成熟した）フレームワーク領域又はヒト生殖細胞系列フレームワーク領域、及びＦＲライブラリのスクリーニングに由来するフレームワーク領域が挙げられる。

【０１９５】

特定の実施形態において、本明細書に提供される抗体は、多重特異性抗体、例えば二重特異性抗体である。多重特異性抗体は、少なくとも２つの異なる部位に対する結合特異性を備えているモノクローナル抗体である。例えば、結合特異性の一方は、ＥＧＦＲ、ＨＥＲ－２、又はＰＤ－Ｌ１に対するものであり、他方は、任意の他の抗原に対するものである。特定の実施形態において、二重特異性抗体は、同じ抗原の２つの異なるエピトープに結合し得る。二重特異性抗体はまた、標的抗原を発現する細胞に細胞傷害性薬剤を局在化させるためにも使用し得る。二重特異性抗体は、完全長抗体又は抗体断片として調製することができる。多重特異性抗体の作成技法としては、限定はされないが、異なる特異性を有する２つの免疫グロブリン重鎖－軽鎖対の組換え共発現、「ノブ・イン・ホール」エンジニアリング、静電的ステアリング効果のエンジニアリングによる抗体Ｆｃヘテロ二量体分子の作成、２つ以上の抗体又は断片の架橋、ロイシンジッパーを使用した二重特異性抗体の作製、「ダイアボディ」技術を用いた二重特異性抗体断片の作成、及び単鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）二量体の使用が挙げられる。

【０１９６】

本明細書に提供される抗体のアミノ酸配列変異体が企図される。例えば、抗体の結合親和性及び／又は他の生物学的特性を改良することが望ましい場合もある。抗体のアミノ酸配列変異体は、抗体をコードするヌクレオチド配列に適切な修飾を導入することによるか、又はペプチド合成によって調製し得る。かかる修飾としては、例えば、抗体のアミノ酸配列内にある残基からの欠失、及び／又はそこへの挿入及び／又はその置換が挙げられる。欠失、挿入、及び置換を、最終的なコンストラクトに到達するよう任意に組み合わせることができ、但し、最終的なコンストラクトは、所望の特徴、例えば、抗原結合性を備えているものとする。

【０１９７】

置換突然変異誘発の目的とする部位としては、可変領域及びフレームワーク領域が挙げられる。アミノ酸は、共通の側鎖特性に基づいてグループ化し得る：

（１）疎水性：ノルロイシン、Ｍｅｔ、Ａｌａ、Ｖａｌ、Ｌｅｕ、Ｈｅ；

（２）中性親水性：Ｃｙｓ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ａｓｎ、Ｇｉｎ；

（３）酸性：Ａｓｐ、Ｇｌｕ；

（４）塩基性：Ｈｉｓ、Ｌｙｓ、Ａｒｇ；
（５）鎖配向に影響を与える残基：Ｇｌｙ、Ｐｒｏ；
（６）芳香族：Ｔｒｐ、Ｔｙｒ、Ｐｈｅ。

【０１９８】

目的とする抗体にアミノ酸置換を導入し、所望の活性、例えば、保持されている／向上した抗原結合、免疫原性の低下、ＡＤＣＣ又はＣＤＣの向上、及び／又は半減期の延長などの薬物動態特性の変化に関して産物をスクリーニングし得る。保存的置換は当該技術分野において公知である。かかる置換の例としては、Ｆｃ領域に対するＬＳ及びＹＴＥ突然変異が挙げられる。非保存的置換は、これらのクラスのうちの１つにおけるメンバーを別のクラスのものに交換することを伴うことになる。

【０１９９】

抗体はまた、Ａｓｎ２９７など、特定の残基を置換するグリカン鎖に対する修飾も含み得る。例えば、抗体は、ＡＤＣＣの向上のため非フコシル化するように操作又は処理されてもよい。

【０２００】

本明細書に開示される抗体並びに他のタンパク質及びペプチドは、本明細書に開示される又は当該技術分野において公知のその配列と異なるアミノ酸配列を含み得る、例えば、本明細書に開示される又は当該技術分野において公知の配列と少なくとも９０％の配列同一性（例えば、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％の配列同一性）を有するか、又はそうした配列を有する。一部の実施形態において、重鎖、軽鎖、V_Hドメイン、V_Lドメイン、及び／又はＣＤＲの１つ以上は、記載されるアミノ酸配列のうちの１つと少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％の配列同一性を有する。

【０２０１】

本明細書に開示されるＣＤＲ、可変重鎖及び軽鎖を含む抗体は、当該技術分野において公知の方法により作成し得る。例えば、可変抗体ドメインをＩｇＧ発現ベクターにクローニングし得る（ＩｇＧ変換）。重鎖及び軽鎖Ｖ－ドメインのＰＣＲ増幅したＤＮＡ断片をフレームの、例えば、レシピエント哺乳類発現ベクターを持つヒトＩｇＧ１定常重鎖に挿入し得る。抗体発現はＭＰＳＶプロモーターによってドライブすることができ、転写は、ＣＤＳの下流に位置する合成ポリＡシグナル配列によって終結させることができる。

【０２０２】

抗体は、組換え方法及び組成物を用いて作製し得る。本明細書に記載される抗体をコードする核酸が提供される。かかる核酸は、抗体（例えば、抗体の軽鎖及び／又は重鎖）のV_Lを含むアミノ酸配列及び／又はV_Hを含むアミノ酸配列をコードし得る。かかる核酸を含む（即ち、それで形質転換された）発現ベクターが提供され、かかる核酸を含む宿主細胞もまた提供される。一つのかかる実施形態において、宿主細胞は、（１）V_Lを含むアミノ酸配列とV_Hを含むアミノ酸配列とをコードする核酸を含むベクター、又は（２）抗体のV_Lを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第１のベクター及び抗体のV_Hを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第２のベクターを含む。

【０２０３】

抗体コードベクターのクローニング又は発現に好適な宿主細胞としては、本明細書に記載される他の原核細胞又は真核細胞が挙げられる。例えば、抗体は、詳細にはグリコシル化及びＦｃエフェクター機能が不要であるとき、細菌（例えば、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ））において作製し得る。原核生物に加えて、糸状菌又は酵母など、真核微生物は、グリコシル化経路が「ヒト化」されているため部分的又は完全ヒトグリコシル化パターンを持つ抗体が産生されることになる真菌及び酵母株を含め、抗体コードベクターに好適なクローニング又は発現宿主である。グリコシル化された抗体の発現に好適な更なる宿主細胞はまた、多細胞生物（無脊椎動物及び脊椎動物）にも由来する。無脊椎動物細胞の例としては、植物及び昆虫細胞が挙げられる。昆虫細胞と併せて使用し得る、特にツマジロクサヨト

ウ（Spodoptera frugiperda）細胞のトランスフェクションに使用し得るバキュロウイルス株が数多く同定されている。植物細胞培養物もまた、宿主として利用することができる。一部の実施形態において、宿主細胞は、真核細胞、例えばチャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞又はリンパ系細胞（例えば、Ｙ０、ＮＳ０、Ｓｐ２０細胞）であってもよい。抗体をコードする核酸を含む宿主細胞は、発現に好適な条件下で培養し、宿主細胞又は培養培地から抗体を回収し得る。

【０２０４】

一部の実施形態において、本明細書に提供される抗体は、＜１μＭ、＜１００ｎＭ、＜５０ｎＭ、＜１０ｎＭ、＜５ｎＭ、＜１ｎＭ、＜０．１ｎＭ、＜０．０１ｎＭ、又は＜０．００１ｎＭの解離定数（Ｋｄ）を有し、任意選択で＞１０$^{-13}$Ｍ（例えば１０$^{-8}$Ｍ未満、例えば１０$^{-8}$Ｍ～１０$^{-13}$Ｍ、例えば、１０$^{-9}$Ｍ～１０$^{-13}$Ｍ）である。一実施形態において、Ｋｄは、Ｆａｂバージョンの目的とする抗体及びその抗原で実施される放射性標識抗原結合アッセイ（ＲＩＡ）によるか、又は表面プラズモン共鳴アッセイを用いて測定される（例えば、国際公開第２０１５０８９３４４号）。

【０２０５】

本明細書に開示される方法により投与される、及び／又は医薬組成物若しくはキット、又は免疫療法組成物若しくはキットの一部として投与されることになる抗体としては、抗ＥＧＦＲ抗体、抗ＨＥＲ２抗体、抗ＶＥＧＦＲ２抗体、及び抗ＰＤ－Ｌ１抗体、並びにそれらの１つ以上に、及び任意選択でまたＮＫ細胞抗原にも結合する多重特異性抗体など、関連する化合物が挙げられる。これらの抗体の各々の臨床段階の例を以下に提示する；更に多くの前臨床段階のバイオ薬候補抗体及び関連する化合物が当該技術分野において公知であり、様々な開発段階にある。

【０２０６】

抗ＥＧＦＲ抗体としては、セツキシマブ、パニツムマブ、及びネシツムマブが挙げられる。一部の実施形態において、抗ＥＧＦＲ抗体は、パニツムマブ、ネシツムマブから選択される。

【０２０７】

抗ＨＥＲ２抗体としては、トラスツズマブ（及びその糖鎖工学的に操作されたＦｃ対応物、チミグツズマブ（timigutuzumab））、マルゲツキシマブ、及び定義の仕方によっては、ペルツズマブが挙げられる。一部の実施形態において、抗ＨＥＲ－２抗体は、トラスツズマブ及びマルゲツキシマブから選択される。

【０２０８】

チェックポイント阻害薬は、免疫チェックポイント、例えば、ＰＤ－１、ＰＤ－Ｌ１、及びＣＴＬＡ－４を阻害する化合物である。抗ＰＤ－１抗体としては、ニボルマブ、ペンブロリズマブ、セミプリマブ、及びドスタルリマブが挙げられる。抗ＰＤ－Ｌ１抗体としては、アテゾリズマブ、アベルマブ、及びデュルバルマブが挙げられる。抗ＣＴＬＡ－４抗体としては、イピリムマブが挙げられる。一部の実施形態において、抗体は、これらのうちの１つから選択される。一部の実施形態において、抗体は、抗ＰＤ－Ｌ１抗体、例えばアベルマブである。

【０２０９】

抗ＶＥＧＦＲ２抗体としては、ラムシルマブが挙げられる。一部の実施形態において、抗ＶＥＧＦＲ２抗体は、ラムシルマブである。

【０２１０】

以下には、当該技術分野において公知の、選択された臨床段階の抗体の配列を提供する。

【０２１１】

セツキシマブ

セツキシマブ及びその調製方法については、例えば、国際公開第２０１１０５９７６２Ａ１号（本明細書によって全体として参照により援用される）を参照することができる。

【０２１２】

【表５】

重鎖 CDR - セツキシマブ

HCDR1	HCDR2	HCDR3
NYGVH (配列番号 25)	VIWSGGNTDYNTPFTS (配列番号 26)	ALTYYDYEFAY (配列番号 27)

【０２１３】

【表６】

軽鎖 CDR - セツキシマブ

LCDR1	LCDR2	LCDR3
RASQSIGTNIH (配列番号 28)	YASESIS (配列番号 29)	QQNNNWPTT (配列番号 30)

【０２１４】

【表７】

重鎖 (HC)	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 31)
軽鎖 (LC)	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号 32)

【０２１５】

パニツムマブ

パニツムマブ及びその調製方法については、例えば、米国特許第６，２３５，８８３号及び同第７，８０７，７９８号（これらは本明細書によって全体として参照により援用される）を参照することができる。

【０２１６】

【表８】

重鎖 CDR - パニツムマブ

HCDR1	HCDR2	HCDR3
SGDYYWT (配列番号 33)	HIYYSGNTNYNPSLKS (配列番号 34)	RVTGAFDI (配列番号 35)

【０２１７】

【表９】

軽鎖 CDR - パニツムマブ

LCDR1	LCDR2	LCDR3
QASQDISNYLN (配列番号 36)	DASNLET (配列番号 37)	QHFDHLPLA (配列番号 38)

【０２１８】
【表１０】

重鎖 (HC)	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSVSSGDYYWTWIRQSPGKGLEWIGHIYYSGNTNYNPSLKSRLTISIDTSKTQFSLKLSSVTAADTAIYYCVRDRVTGAFDIWGQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKC (配列番号 39)
軽鎖 (LC)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYFCQHFDHLPLAFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号 40)

【０２１９】
マルゲツキシマブ
マルゲツキシマブ及びその調製方法については、例えば、国際公開第２０２１１３３６５３Ａ１号（本明細書によって全体として参照により援用される）を参照することができる。
【０２２０】
【表１１】

重鎖 CDR - マルゲツキシマブ

HCDR1	HCDR2	HCDR3
DTYIH (配列番号 41)	RIYPTNGYTRYDPKFQD (配列番号 42)	WGGDGFYAMDY (配列番号 43)

【０２２１】
【表１２】

軽鎖 CDR - マルゲツキシマブ

LCDR1	LCDR2	LCDR3
KASQDVNTAVA (配列番号 44)	SASFRYT (配列番号 45)	QQHYTTPPT (配列番号 46)

【０２２２】

【表１３】

重鎖 (HC)	QVQLQQSGPELVKPGASLKLSCTASGFNIKDTYIHWVKQRPEQGLEWIGRIYPTNGYTRYDPKFQDKATITADTSSNTAYLQVSRLTSEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGASVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELVGGPSVFLLPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTLRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPLVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 47)
軽鎖 (LC)	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVNTAVAWYQQKPGHSPKLLIYSASFRYTGVPDRFTGSRSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQQHYTTPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号 48)

【０２２３】

アベルマブ

アベルマブ及びその調製方法については、米国特許第１１，２７４，１５４号（本明細書によって全体として参照により援用される）を参照することができる。

【０２２４】

【表１４】

重鎖 CDR - アベルマブ

HCDR1	HCDR2	HCDR3
SYIMM (配列番号 49)	SIYPSGGITFY (配列番号 50)	IKLGTVTTVDY (配列番号 51)

【０２２５】

【表１５】

軽鎖 CDR - アベルマブ

LCDR1	LCDR2	LCDR3
TGTSSDVGGYNYVS (配列番号 52)	DVSNRPS (配列番号 53)	SSYTSSSTRV (配列番号 54)

【０２２６】

【表１６】

重鎖 (HC)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMMWVRQAPGKGLEWVS SIYPSGGITFYADTVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIK LGTVTTVDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K (配列番号 55)
軽鎖 (LC)	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMI YDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTRVF GTGTKVTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVA WKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVT HEGSTVEKTVAPTECS (配列番号 56)

【０２２７】

ネシツムマブ

ネシツムマブ及びその調製方法については、当該技術分野を参照することができる。

【０２２８】

【表１７】

重鎖 (HC)	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQPPGKGLEWI GYIYYSGSTDYNPSLKSRVTMSVDTSKNQFSLKVNSVTAADTAVYYCAR VSIFGVGTFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVLPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK (配列番号 57)
軽鎖 (LC)	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYD ASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCHQYGSTPLTFGGGT KAEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC (配列番号 58)

【０２２９】

トラスツズマブ

トラスツズマブ及びその調製方法については、当該技術分野を参照することができる。

【０２３０】

【表１８】

重鎖 (HC)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVA RIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR WGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPG (配列番号 59)
軽鎖 (LC)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYS ASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC (配列番号 60)

【０２３１】

更なる抗ＥＧＦＲ抗体、抗ＨＥＲ－２抗体、抗ＶＥＧＦＲ２抗体、及び抗チェックポイント阻害薬抗体（例えば、抗ＰＤ－Ｌ１抗体、抗ＰＤ－１抗体）は、当該技術分野において公知であり、商業的供給元から入手することができる。

【０２３２】

腫瘍ターゲティングｍＡｂと共に投与したときＮＫ細胞応答を亢進させる戦略

当該技術分野には、癌抗原を標的とするｍＡｂと組み合わせて投与したときＮＫ細胞応答を亢進させることが公知の方法が幾つもある。それらとしては、抗体Ｆｃ領域の遺伝子操作又は糖鎖工学によるＦｃγＲファミリーの活性化型及び抑制型メンバーとのそれらの相互作用の調節が挙げられる。例としては、アテゾリズマブに使用されるＡ２９７Ｎ突然変異、ＩｇＧ１重鎖のヒンジ領域（例えば、Ｇ２３７とＧ２３８との間）における（ＧＧＧＳ）などの短い配列の挿入、及び他の変化が挙げられ、又はフコース残基を除去すると、ＣＤ１６に対するＩｇＧ親和性が増加し、ＮＫ細胞媒介性ＡＤＣＣ及び／又はｍＡｂで被覆された複数の標的細胞の連続殺傷が亢進することになる。別の手法には、同じ抗原の２つ以上の異なるエピトープを標的とする多重特異性抗体を利用することが関わる。

【０２３３】

ＮＫ細胞エンゲイジャー及び三重特異性キラー細胞エンゲイジャー（ＴｒｉＫＥ）。ＮＫ細胞エンゲイジャー（ＮＫＣＥ）は、ＮＫ細胞表面抗原、例えば、ＣＤ１６、及び限定なしに、ＨＥＲ２、ＥＧＦＲ、又はＰＤ－Ｌ１を含めた癌細胞抗原に結合してＮＫ細胞の細胞傷害性を誘導する二重特異性ポリペプチドである。一部の実施形態において、ＮＫ細胞エンゲイジャーは、二重特異性モノクローナル抗体である。ＴｒｉＫＥは、ＮＫ細胞表面抗原、例えば、ＣＤ１６、及び限定なしに、ＨＥＲ２、ＥＧＦＲ、ＣＤ３３、又はＰＤ－Ｌ１を含めた２つの異なる癌細胞抗原に結合してＮＫ細胞の細胞傷害性を誘導する三重特異性ポリペプチドである。

【０２３４】

医薬組成物及び治療方法

また、薬学的に許容可能な担体中に本開示の物質組成物を含む医薬組成物、又は免疫療法組成物も開示される。医薬担体については当業者に公知である。それは最も典型的には、生理的ｐＨの滅菌水、生理食塩水、及び緩衝溶液などの溶液を含め、ヒトへの薬物の投与に標準的な担体となるであろう。典型的には、製剤中には、製剤を等張性にするのに適切な量の薬学的に許容可能な塩が使用される。薬学的に許容可能な担体の例としては、限定はされないが、生理食塩水、リンゲル溶液及びデキストロース溶液が挙げられる。溶液のｐＨは、好ましくは約５～約８、及びより好ましくは約７～約７．５である。溶液は、

ＲＮアーゼフリーでなければならない。更なる担体としては、抗体を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスであって、有形の物品、例えば、フィルム、リポソーム又はマイクロパーティクルの形態であるマトリックスなど、徐放製剤が挙げられる。当業者には、例えば、投与される組成物の投与経路及び濃度に応じて、ある種の担体がより好ましいものであり得ることは明らかであろう。

【０２３５】

医薬組成物は、選択の分子に加えて、担体、増粘剤、希釈剤、緩衝液、保存剤、表面活性剤などを含み得る。医薬組成物はまた、抗微生物剤、抗炎症剤、麻酔薬などの１つ以上の活性成分も含み得る。

【０２３６】

非経口投与用の製剤には、滅菌水性又は非水性溶液、懸濁液、及びエマルションが含まれる。非水性溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油などの植物油、及びオレイン酸エチルなどの注射用有機エステル類である。水性担体としては、水、アルコール溶液／水溶液、エマルション又は懸濁液が、生理食塩水及び緩衝媒体を含め、挙げられる。非経口溶媒としては、塩化ナトリウム溶液、リンゲルのデキストロース、デキストロース及び塩化ナトリウム、乳酸加リンゲル液、又は固定油が挙げられる。静脈内溶媒としては、体液及び栄養補充液、電解質補充液（リンゲルのデキストロースをベースとするものなど）などが挙げられる。保存剤及び他の添加剤、例えば、抗微生物薬、抗酸化剤、キレート剤、及び不活性ガスなどもまた存在し得る。

【０２３７】

組成物は、例えば、静脈内注入によるか、又は生細胞及び抗体療法薬の送達（一緒又は個別のいずれでも）に適切な任意の他の方法によって投与されてもよい。

【０２３８】

治療適用

本明細書に開示されるＮＫ細胞は、癌及び骨髄異形成症候群などの増殖性疾患の進行の治療又は予防に使用することができる。癌は、血液学的悪性腫瘍又は固形腫瘍であり得る。

【０２３９】

血液学的悪性腫瘍には、白血病、リンパ腫、多発性骨髄腫、及びこれらの亜型が含まれる。リンパ腫は、様々な方法で、多くの場合に根底にある悪性細胞の種類に基づいて分類することができ、ホジキンリンパ腫（多くの場合にリード・シュテルンベルク細胞の癌であるが、時にまたＢ細胞で発生することもある；他の全てのリンパ腫は、非ホジキンリンパ腫である）、非ホジキンリンパ腫、Ｂ細胞リンパ腫、Ｔ細胞リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、濾胞性リンパ腫、並びに本明細書に定義し及び当該技術分野において公知であるとおりの他のものが挙げられる。骨髄異形成症候群は、未成熟白血球及び／又は造血幹細胞（ＨＳＣ）が冒される一群の疾患を含む；ＭＤＳはＡＭＬに進行し得る。

【０２４０】

Ｂ細胞リンパ腫としては、限定はされないが、びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫（ＤＬＢＣＬ）、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）／小リンパ球性リンパ腫（ＳＬＬ）、並びに本明細書に定義し及び当該技術分野において公知であるとおりの他のものが挙げられる。

【０２４１】

Ｔ細胞リンパ腫としては、Ｔ細胞急性リンパ芽球性白血病／リンパ腫（Ｔ－ＡＬＬ）、末梢性Ｔ細胞リンパ腫（ＰＴＣＬ）、Ｔ細胞慢性リンパ球性白血病（Ｔ－ＣＬＬ）、セザリー症候群、並びに本明細書に定義し及び当該技術分野において公知であるとおりの他のものが挙げられる。

【０２４２】

白血病としては、急性骨髄（又は骨髄性）白血病（ＡＭＬ）、慢性骨髄（又は骨髄性）白血病（ＣＭＬ）、急性リンパ球性（又はリンパ芽球性）白血病（ＡＬＬ）、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）ヘアリー細胞白血病（時にリンパ腫として分類される）、並びに本

明細書に定義し及び当該技術分野において公知であるとおりの他のものが挙げられる。

【０２４３】

形質細胞悪性腫瘍としては、リンパ形質細胞性リンパ腫、形質細胞腫、及び多発性骨髄腫が挙げられる。

【０２４４】

固形腫瘍としては、黒色腫、神経芽細胞腫、神経膠腫又は癌腫、例えば、脳、頭頸部、乳房、肺（例えば、非小細胞肺癌、ＮＳＣＬＣ）、生殖管（例えば、卵巣）、上部消化管、胃食道腺癌（ＧＥＡ、別名、腸癌、結腸癌、又は直腸癌）、膵臓、肝臓、腎臓系（例えば、腎臓）、膀胱、前立腺及び結腸直腸などの腫瘍が挙げられる。

【０２４５】

頭頸部癌としては、頭頸部扁平上皮癌（ＳＣＣＨＮ、上気道消化管から生じる不均一な一群の上皮性新生物）、軟部組織肉腫、鼻咽腔癌、喉頭癌、副鼻腔癌（paransal sinus cancer）、唾液腺癌、及び鼻腔癌が挙げられる。

【０２４６】

本明細書に開示される記憶ＮＫ細胞とｍＡｂとを含む治療並びに療法用（免疫療法用を含む）組成物及びキットは、いかなる順序で投与されてもよく、又は同時に投与されてもよい。

【０２４７】

本明細書に記載される方法は、概してそれを必要としている対象に対して実施される。本明細書に記載される治療方法を必要としている対象は、癌を有するか、それと診断されているか、それを有する疑いがあるか、又はそれを発症するリスクがあるか、又はその後期へと進行するリスクがある対象であり得る。治療の必要性の決定は、典型的には、問題となっている疾患又は病態に整合する病歴、理学的診察、又は診断検査によって判定されることになる。本明細書に記載される方法によって治療可能な様々な病態の診断は、当該分野の技能の範囲内にある。対象は、ウマ、ウシ、イヌ、ネコ、ヒツジ、ブタ、マウス、ラット、サル、ハムスター、モルモット、及びヒトなどの哺乳類、又はニワトリなどの他の動物を含め、動物対象であってもよい。例えば、対象はヒト対象であってもよい。概して、ある療法、例えば抗癌性モノクローナル抗体と組み合わせた記憶ＮＫ細胞の安全且つ有効な量は、例えば、対象において望ましくない副作用は最小限に抑えつつ所望の治療効果を生じるであろう量である。

【０２４８】

本明細書に記載される方法によれば、投与は、非経口、肺内、経口、局所、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、腫瘍内、髄腔内、頭蓋内、脳室内、皮下、鼻腔内、硬膜上、眼内、頬側、又は直腸投与であってもよい。製剤が、例えば、生物製剤又は細胞療法である場合、投与様式は、静脈内注射又は注入によることになる可能性が高いであろう。

【０２４９】

定義

特に定義しない限り、本開示に関連して使用される科学技術用語は、当業者が一般に理解する意味を有するものとする。更に、文脈上特に必要でない限り、単数形の用語は複数形を含むものとし、且つ複数形の用語は単数形を含むものとする。概して、本明細書に記載される細胞及び組織培養、分子生物学、並びにタンパク質及びオリゴ又はポリヌクレオチド化学及びハイブリダイゼーションに関連して利用される命名法、及びそれらの技法は、当該技術分野で周知の、一般的に使用されているものである。

【０２５０】

本明細書で使用されるとき、用語「抗体」は、特異的結合を付与するのに十分な標準的な免疫グロブリン配列エレメントを含むか、又は例えば、ある特定の標的抗原に免疫反応を示す及び／又はそれに向けられるポリペプチドを指す。当該技術分野において公知のとおり、自然界で産生されるとおりのインタクトな抗体は、２つの同一の重鎖ポリペプチド（各約５０ｋＤ）及び２つの同一の軽鎖ポリペプチド（各約２５ｋＤ）が互いに会合して、一般に「Ｙ字型」構造と称されるものとなることで構成される約１５０ｋＤの四量体薬

剤である。各重鎖は、少なくとも４つのドメイン（各約１１０アミノ酸長）－アミノ末端可変（V_H）ドメインと、続く３つの定常ドメイン：C_H1、C_H2、及びカルボキシ末端C_H3で構成される。「スイッチ」として公知の短い領域が、重鎖可変領域と定常領域とを結び付けている。「ヒンジ」がC_H2及びC_H3ドメインを抗体の残りの部分に結び付ける。インタクトな抗体では、このヒンジ領域における２つのジスルフィド結合が２つの重鎖ポリペプチドを互いに結び付けている。各軽鎖は、別の「スイッチ」によって互いに隔てられている２つのドメイン－アミノ末端可変（V_L）ドメインと、続くカルボキシ末端定常（C_L）ドメインで構成される。インタクトな抗体四量体は、２つの重鎖－軽鎖二量体で構成され、ここでは重鎖及び軽鎖が単一のジスルフィド結合によって互いに連結されている；２つの他のジスルフィド結合が重鎖ヒンジ領域を互いに結び付けているため、これらの二量体が互いに結び付けられることになり、四量体が形成される。天然で産生される抗体はまた、典型的にはC_H2ドメイン上で、グリコシル化されている。天然抗体の各ドメインは、扁平な逆平行βバレルに互いに詰め合わされた２つのβシート（例えば、３本鎖、４本鎖、又は５本鎖シート）で形成される「免疫グロブリンフォールド」によって特徴付けられる構造を有する。各可変ドメインは、「相補性決定領域」として知られる３つの超可変ループ（ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３）と、４つの幾らかインバリアントな「フレームワーク」領域（ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３、及びＦＲ４）とを持つ。自然抗体が折り畳まれると、ＦＲ領域がβシートを形成して、それらがドメインの構造的フレームワークを提供し、重鎖及び軽鎖の両方からのＣＤＲループ領域が三次元空間で一体になることにより、Ｙ構造の先端に位置する単一の超可変抗原結合部位が生み出される。天然に存在する抗体のＦｃ領域は補体系のエレメントに結合し、また、例えば細胞傷害性を媒介するエフェクター細胞を含め、エフェクター細胞上の受容体にも結合する。

【０２５１】

「抗体断片」は、インタクトな抗体が結合する抗原に結合するインタクトな抗体の一部分を含むインタクトな抗体以外の分子を指す。抗体断片の幾つかの例としては、限定はされないが、Ｆｖ、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆａｂ’－ＳＨ、Ｆ（ａｂ’）$_2$ダイアボディ、線状抗体、単鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、及び抗体断片で形成される多重特異性抗体が挙げられる。一部の実施形態において、抗体断片は抗原結合断片である。

【０２５２】

現在の抗体工学及び改良方法のレビューについては、R. Kontermann and S. Dubel, (2010) Antibody Engineering Vols.1 and 2, Springer Protocols, 2nd Edition and W. Strohl and L. Strohl (2012) Therapeutic antibody engineering: Current and future advances driving the strongest growth area in the pharmaceutical industry, Woodhead Publishingを参照することができる。抗体及び抗原結合断片の作製及び精製方法は当該技術分野において周知であり、Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, chapters 5-8 and 15を参照することができる。

【０２５３】

用語「抗原」は、可溶性であり得るか、又は細胞膜結合型であり得る分子実体、詳細には、限定はされないが、抗体又はＴＣＲを含むがこれらに限定されない適応免疫系、又はトランスジェニックＴＣＲ、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、ｓｃＦｖ又はその多量体、Ｆａｂ断片又はその多量体、抗体又はその多量体、単鎖抗体又はその多量体、又は構造への結合を高親和性で果たすことのできる任意の他の分子を含むがこれらに限定されない操作された分子による認識を受けることのできる分子実体を指す。

【０２５４】

本明細書で使用されるとき、用語「結合親和性」は、ある一つの分子が、その分子上のある部位で別の分子に結合する強度を指す。ある特定の分子が別の特定の分子に結合する又は特異的に会合することになる場合、それらの２つの分子は互いに結合親和性を呈すると言われる。結合親和性は、一対の分子についての会合定数及び解離定数に関係するが、

これらの定数を測定又は決定することは、本明細書の方法にとって重要でない。むしろ、親和性は、記載される方法の分子間の相互作用を記載するために本明細書で使用されるとき、概して実証的研究で観察される見かけの親和性であり（特に指定されない限り）、これを使用すると、１つの分子（例えば、抗体又は他の特異的結合パートナー）が２つの他の分子（例えば、あるペプチドの２つのバージョン又は変異体）に結合するであろう相対強度を比較することができる。結合親和性、会合定数、及び解離定数の概念は周知である。

【０２５５】

用語「癌」は、医学的には悪性新生物として公知である。癌は、制御されない細胞成長が関わる幅広い一群の疾患である。癌では、細胞（癌性細胞）が無制御に分裂及び成長して悪性腫瘍を形成し、身体の近接した部位に浸潤する。癌はまた、身体の遠隔の部位にもリンパ系又は血流を通じて広がり得る。ヒトに発症する異なる公知の癌は２００種を超える。

【０２５６】

用語「化学療法」は、標準化されたレジメンの一環としての１つ以上の細胞傷害性抗新生物薬（「化学療法剤」又は「化学療法薬」）による癌（癌性細胞）の治療を指す。化学療法は治癒目的で与えられてもよく、又はそれは寿命を延ばすこと若しくは症状を緩和することを目標としてもよい。これは多くの場合に、放射線療法、手術、及び／又はハイパーサーミア療法など、他の癌治療と併せて用いられる。従来の化学療法剤は、ほとんどの癌細胞の主な特性の一つである、急速に分裂する細胞を殺傷することによって働く。これはつまり、化学療法が、骨髄、消化管、及び毛包の細胞など、正常な状況下で急速に分裂する細胞にもまた害を及ぼすということを意味する。その結果、骨髄抑制（血液細胞の産生低下、ひいてはまた免疫抑制も）、粘膜炎（消化管の内膜の炎症）、及び脱毛症（抜け毛）など、化学療法で最もよく見られる副作用が生じる。

【０２５７】

用語「組み合わせ免疫療法」は、２つの療法アプローチ、例えば、当該技術分野において癌などの疾患の治療に公知の療法アプローチの協奏的な適用を指す。用語「組み合わせ免疫療法」はまた、抗原認識受容体による治療などの免疫療法と、ＮＫ細胞、例えば、記憶ＮＫ細胞の移植などの別の療法との協奏的な適用も指し得る。細胞上での抗原の発現とは、抗原が細胞の細胞表面上に十分に存在するため、抗原認識受容体がそれを検出、結合及び／又は認識できることを意味する。

【０２５８】

用語「サイトカイン誘導性記憶様」、又は、等しく「ＣＩＭＬ」は、ＮＫ細胞との関連では、「記憶」又は「記憶様」表現型を有することを意味し、プライミング剤を使用して作製される。

【０２５９】

用語「細胞傷害性」は、本明細書において記憶ＮＫ細胞との関連で使用されるとき、細胞が罹患細胞を標的化して殺傷する能力を指す。

【０２６０】

「罹患細胞」は、細胞、組織又は生物についての正常又は健常な状態から逸脱した、病原体、毒性物質、照射、又は細胞内部調節解除の影響によって生じ得る状態を指す。「罹患細胞」はまた、病原性ウイルスに感染した細胞も指し得る。更に用語「罹患細胞」は、個体の癌を構成し又はそれを生じさせるものであり得る悪性細胞又は新生物細胞を指し得る。

【０２６１】

用語「操作された細胞」及び「遺伝子修飾された細胞」は、本明細書で使用されるとき、同義的に使用することができる。これらの用語は、外来性遺伝子又は核酸配列を持っている、及び／又はそれを発現すること、又はその天然の形態又は機能から外れるように遺伝子修飾されていて（例えば欠失している又はノックアウトされている遺伝子）、次にはそれが細胞又はその子孫の遺伝子型又は表現型を修飾する遺伝子を持っていることを意味

する。細胞は、自然状態ではそうした細胞で発現しないペプチド又はタンパク質を安定に又は一過性に発現するように、当該技術分野において周知の組換え方法により修飾することができる。細胞の遺伝子修飾方法としては、限定されないが、トランスフェクション、電気穿孔、ヌクレオフェクション、形質導入であって、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、非組込み型レトロウイルス又はレンチウイルスベクター、トランスポゾン、デザイナーヌクレアーゼであって、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、ＴＡＬＥＮ又はＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓヌクレアーゼを含めたものを用いる形質導入が挙げられる。

【０２６２】

用語「濃縮する」は、本明細書においてＮＫ細胞との関連で使用されるとき、更なる分析又は使用のために高濃度化し、精製し、又は単離することを意味する。濃縮及び精製された細胞集団は、大多数の所望の細胞と、無視できる割合の他の細胞とを含む。

【０２６３】

用語「倍数選択的」は、本明細書で使用されるとき、ある一つの標的に対して持つ親和性が、別の標的に対するその親和性の少なくともｘ倍高いことを意味し、ここでｘは少なくとも２であり、及びそれより大きい、例えば、１０、２０、５０、１００、又は１０００であってもよい。好ましい実施形態において、倍数選択性は治療的に有意味であり、即ち、ある一つの標的を発現する細胞が殺傷され、且つ他の標的を担持する細胞が生き残ることを可能にするのに十分である。

【０２６４】

用語「遺伝子修飾」又は遺伝子修飾された」は、限定はされないが細胞のゲノムＤＮＡを含め、核酸内容の改変を指す。これには、限定はされないが、核酸配列の単一のヌクレオチド又は断片の交換又は欠失の導入による細胞ゲノムＤＮＡ配列の改変が含まれる。この用語はまた、それによって細胞ゲノムＤＮＡ配列の直接的又は間接的な改変につながるか否かに関係なく、細胞への核酸の任意の導入も指す。

【０２６５】

用語「免疫細胞」又は「免疫エフェクター細胞」は、αβＴ細胞、ＮＫ細胞（記憶ＮＫ、ＭＬ－ＮＫ、及びＣＩＭＬ－ＮＫを含む）、ＮＫＴ細胞（ｉＮＫＴ細胞を含む）、Ｂ細胞、自然リンパ球系細胞（ＩＬＣ）、サイトカイン誘導性キラー（ＣＩＫ）細胞、リンホカイン活性化キラー（ＬＡＫ）細胞、γδＴ細胞、間葉系幹細胞又は間葉系間質細胞（ＭＳＣ）、単球及びマクロファージなど、免疫系の一部であってよい、特定のエフェクター機能を果たす細胞を指す。好ましい免疫細胞は、αβＴ細胞、ＮＫ細胞（記憶ＮＫ、ＭＬ－ＮＫ、及びＣＩＭＬ－ＮＫを含む）、ＮＫＴ細胞（ｉＮＫＴ細胞を含む）、ＩＬＣ、ＣＩＫ細胞、ＬＡＫ細胞又はγδＴ細胞など、細胞傷害性エフェクター機能のある細胞である。「エフェクター機能」は、細胞の特殊化した機能を意味し、例えば、ＮＫ細胞では、エフェクター機能は細胞溶解活性又はサイトカインの分泌を含めたヘルパー活性であり得る。

【０２６６】

用語「免疫療法」は、「免疫応答の誘導、亢進、又は抑制による疾患の治療」として定義される医学用語である。免疫応答を引き出し又は増幅するように設計された免疫療法は、活性化免疫療法に分類され、一方、低減し又は抑制する免疫療法は、抑制免疫療法に分類される。活性化型免疫療法としての癌免疫療法は、免疫系を刺激することにより腫瘍を拒絶し及び破壊しようと試みる。養子細胞移入は、細胞ベースの細胞傷害性反応を用いて癌細胞を攻撃する。患者の癌に対して天然の又は遺伝子操作された反応性を有するＴ細胞などの免疫細胞がインビトロで生成され、次に癌患者に移し戻される。

【０２６７】

本明細書で使用されるとき、用語「個体」は、動物を指す。優先的には、個体は、マウス、ラット、ウシ、ブタ、ヤギ、ニワトリ、イヌ、サル又はヒトなどの哺乳類である。より優先的には、個体はヒトである。個体は、癌などの疾患に罹患している個体（患者）であってもよいが、対象はまた、健常な対象であってもよい。用語「悪性」又は「悪性腫瘍」は、新生物を構成するか、新生物に由来するか、又は新しい新生物細胞の起源となり得

る細胞、細胞群又は組織を表す。この用語は、組織の正常又は健常な細胞との対照での新生物細胞を表して使用される。悪性腫瘍は、非癌性良性腫瘍と比べると、悪性腫瘍がその成長の点で自己限定性でなく、隣接組織に浸潤する能力を有し、及び遠隔の組織に広がる能力を有し得る点で対照をなす。良性腫瘍は、これらの特性のいずれも有しない。悪性腫瘍は、退形成、侵襲性、及び転移並びにゲノム不安定性によって特徴付けられる。用語「前悪性細胞」は、まだ悪性でないが、悪性になろうとしている細胞又は組織を指す。

【０２６８】

用語「記憶」又は「記憶様」は、ＮＫ細胞との関連では、ＮＫ細胞の一般集団と比較して細胞傷害性が改善された、且つ長寿命／持続性である活性化された表現型を有することを意味し、典型的には、ＮＫ細胞の一般集団と比較して、ＣＤ６９、ＣＤ２５、及びＮＫＧ２Ａの細胞表面発現の増加、並びにＣＤ１６の発現の維持を呈する。

【０２６９】

用語「モノクローナル抗体」（ｍＡｂ）は、本開示に記載される抗体に適用されるとき、任意の真核生物、原核生物、又はファージクローンからの単一コピー又はクローンに由来する化合物であり、それが産生される方法ではない。本開示のｍＡｂは、均一な又は実質的に均一な集団で存在し得る。

【０２７０】

用語「持続性」は、本明細書において使用されるとき、細胞、特に対象に養子移入された細胞が生存し続ける能力を指す。

【０２７１】

用語「ポリペプチド」、「ペプチド」及び「タンパク質」は、本明細書では、アミノ酸残基のポリマーを指して同義的に使用される。これらの用語はまた、１つ以上のアミノ酸残基が、対応する天然に存在するアミノ酸の人工の化学的模倣体であるようなアミノ酸ポリマー、並びに天然に存在するアミノ酸ポリマー及び天然に存在しないアミノ酸ポリマーにも適用される。

【０２７２】

用語「プライミングする」は、ＮＫ細胞との関連では、記憶／記憶様表現型となるようにプライミング剤を使用して刺激し又は活性化させることを意味する。「プライミング剤」は、刺激サイトカインの組み合わせ、例えば、

・ＩＬ－１２、ＩＬ－２３、ＩＬ－２７、及びＩＬ－３５のうちの１つ以上；

・ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－９、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１のうちの１つ以上；及び

・ＩＬ－１８、ＩＬ－１ａ、ＩＬ－１ｂ、ＩＬ－３６ａ、ＩＬ－３６ｂ、及びＩＬ－３６ｇのうちの１つ以上、

又はかかるサイトカインの機能性断片を含む１つ以上の「プライミング融合タンパク質」、又はその１つ以上の多連鎖複合体を含む。かかるタンパク質の例は、本明細書に開示される。

【０２７３】

一般に、用語「受容体」は、可溶性であっても又は細胞表面膜に付着していてもよい生体分子であって、細胞表面膜に付着していても又は可溶性であってもよい定義付けられた構造体に特異的に結合する生体分子を指す。受容体としては、限定はされないが、抗体及び抗体様構造、接着分子、トランスジェニックの又は天然に存在するＴＣＲ又はＣＡＲが挙げられる。用語「抗原認識受容体」又は「抗原結合受容体」は、本明細書で使用されるとき、天然ＴＣＲ、トランスジェニックＴＣＲ、ＣＡＲ、ｓｃＦｖ又はその多量体、Ｆａｂ断片又はその多量体、抗体又はその多量体、二重特異性Ｔ細胞エンハンサー（ＢｉＴＥ）、ダイアボディ、又は特異的結合を高親和性で果たすことのできる任意の他の分子など、膜結合型又は可溶性受容体であってもよい。

【０２７４】

抗原認識受容体に関連して用語「特異的に結合する」又は「～に特異的」又は「特異的に認識する」は、抗原の特異的多型変異体を認識してそれに結合するが、他の変異体は実

質的に認識せず又は結合しない抗原認識受容体の抗原結合ドメインを指す。
【０２７５】
用語「副作用」は、所望の治療アウトカムに加えて起こる抗原認識受容体による免疫療法の任意の合併症、望ましくない又は病的なアウトカムを指す。用語「副作用」は、優先的には、抗原を発現する非標的細胞であって、しかし本明細書に記載されるとおりの罹患細胞ではない細胞上に標的抗原が存在する場合に免疫療法の間に起こる可能性のあるオンターゲットオフ腫瘍毒性を指す。免疫療法の副作用は、移植片対宿主病の発症であり得る。
【０２７６】
用語「標的」又は「標的抗原」は、標的細胞の表面上に存在する任意の細胞表面タンパク質、糖タンパク質、糖脂質又は任意の他の構造を指す。この用語はまた、標的細胞上に存在する任意の他の構造、詳細には、限定はされないが、抗体又はＴＣＲを含むがこれらに限定されない適応免疫系、又はトランスジェニックＴＣＲ、ＣＡＲ、ｓｃＦｖ又はその多量体、Ｆａｂ断片又はその多量体、抗体又はその多量体、単鎖抗体又はその多量体、又は構造への結合を高親和性で果たすことのできる任意の他の分子を含むがこれらに限定されない操作された分子による認識を受けることのできる構造も指す。
【０２７７】
用語「標的細胞」は、本明細書で使用されるとき、個体に適用される又は適用されることになる抗原認識受容体によって認識される細胞を指す。
【０２７８】
用語「治療有効量」は、治療利益を提供する量を意味する。
【０２７９】
本明細書で使用されるとき、用語「移植」は、対象にドナー細胞、例えばＮＫ細胞の集団を投与することを意味する。
【０２８０】
用語「治療」は、本明細書で使用されるとき、疾患の少なくとも１つの徴候又は症状の頻度又は重症度を低減することを意味する。
【実施例】
【０２８１】
実施例
以下の例により、本発明が更に例示される。
【０２８２】
実施例１．記憶ＮＫ細胞のインビトロ培養
材料及び方法：記憶ＮＫ細胞は、国際公開第２０２００４７２９９号、国際公開第２０２０４７４７３号、又は国際公開第２０２０２５７６３９号に記載され、それに開示されるとおり、又は当該技術分野において公知の方法により作製し得る。
【０２８３】
或いは、記憶ＮＫ細胞は、以下のとおり作製してもよい。全血からＣＤ３枯渇及びＣＤ５６ポジティブ選択を用いてＮＫ細胞を単離し得る。次に選択されたＮＫ細胞を９６ウェルプレートにてＮＫ　ＭＡＣＳ培地＋サプリメント＋１０％ＨＩ－ＨＡＢで培養し、以下の条件でプライミング／拡大する（ここで、１×７ｔ１５－２１ｓ及びＡＴＦ１は、それぞれ２００ｎＭ及び１００ｎＭであり、１×１８ｔ１５－１２ｓは２５０ｎＭである；全ての希釈はこれらの値から指示どおりに計算する）。
ａ）拡大のみ：＋７ｔ１５－２１ｓ及びＡＴＦ１、指示される濃度において３７度、５％ＣＯ２で２日間、６日間、又は１０日間のいずれか。その後２日毎に、７ｔ１５－２１ｓ及びＡＴＦ１を新鮮培地と共に指示される濃度まで補充する。
ｂ）プライミング及び拡大：＋１８ｔ１５－１２ｓ、指示される濃度において３７度、５％ＣＯ２で２日間、６日間、又は１０日間のいずれか。その後２日毎に、７ｔ１５－２１ｓ及びＡＴＦ１を新鮮培地と共に指示される濃度まで補充する。
【０２８４】

実施例２．記憶ＮＫ細胞の表現型タイピング

上記のプロセスにより生成されたＮＫ細胞の表現型を判定するため、適切な時点でＮＫ細胞を回収し、洗浄し、受容体発現に関して、純度及び／又は活性化マーカー、例えば、抗ＣＤ５６、抗ＣＤ３、Live/Dead Yellow、抗ＮＫＧ２Ａ、抗ＣＤ６９、抗ＣＤ２５、及び抗ＣＤ１６を含むフローパネルで染色することにより判定する。以下のクローンを使用する：

・抗ＣＤ４５（ＨＩ３０クローン）
・抗ＣＤ５６（ＣＭＳＳＢクローン）
・抗ＣＤ３（ＳＫ７クローン）
・Live/Dead Yellow（Thermo Fisher）
・抗ＮＫＧ２Ａ（ＲＥＡ１１０クローン）
・抗ＣＤ６９（ＦＮ５０クローン）
・抗ＣＤ２５（ＣＤ２５－４Ｅ３クローン）
・抗ＣＤ１６（ｅＢｉｏＣＤ１６クローン）

【０２８５】

Attune NXtフローサイトメーターを使用する。次にデータをFlowjo v10.7において、生存ＣＤ５６＋ＣＤ３－細胞をゲーティングし、上述のマーカーの各々の蛍光強度中央値を判定して分析する。ＣＤ６９、ＣＤ２５、及びＮＫＧ２Ａ発現の増加、並びにＣＤ１６発現の維持が、記憶ＮＫ細胞表現型を指し示している。

【０２８６】

実施例３．記憶ＮＫ細胞のＡＤＣＣ

上記のプロセスにより生成されたＮＫ細胞の殺傷活性を判定するため、適切な時点で、培養したＮＫ細胞を回収して洗浄し、次に１０％ヒトＡＢ型血清（Gibco））含有のＮＫＭＡＣＳ培地に再懸濁し、９６ウェルプレートに１０，０００個のルシフェラーゼ発現ヒト腫瘍細胞（ATCC）と共に指示されるエフェクター対標的（Ｅ：Ｔ）比で２４～４８時間、ＩＬ－２（Miltenyi）有り又は無しで加えてもよく、その後ルシフェラーゼ活性（腫瘍生細胞）をルシフェラーゼの読取り（Promega）によって判定する。データは示さず。

【０２８７】

結果：この例を用いることにより、上記のプロセスによって生成されたＮＫ細胞のインビトロ活性及びフローサイトメトリー表現型を実証し得る。表面タンパク質発現の累積変化倍数、細胞サイズ、及び個々の遺伝子についての蛍光強度中央値を追跡し得る。記憶ＮＫ細胞は、正常なＮＫ細胞と比較してＡＤＣＣの増加を呈する。

【０２８８】

実施例４．IncuCyteを使用したインビトロＡＤＣＣ細胞傷害性アッセイ

NucLight Redレンチウイルス試薬（NLR；Essen BioScience）を使用して頭頸部癌細胞株（ＳＣＣ－２５）又は卵巣細胞株（ＳＫＯＶ－３）に赤色蛍光タンパク質を形質導入した。腫瘍細胞死滅の動態解析のため、各NLR形質導入細胞株を個別に９６ウェル平底プレートに各ウェルそれぞれ3×10^3又は4×10^3細胞の濃度で播き、加湿インキュベーターにおいて一晩インキュベートした。翌日、ＮＫ細胞を０．５：１～１０：１の範囲のエフェクター：標的（Ｅ：Ｔ）比で加えた。セツキシマブ及びトラスツズマブもまた、それぞれ1及び３ｕｇ／ｍｌの濃度で加えた。共培養は全て、それぞれの標的細胞培地にて１００Ｕ／ｍｌヒトＩＬ－２で実施した。生細胞数を高頻度の蛍光イメージング（３時間毎）により７２時間にわたってモニタし、IncuCyte S3ソフトウェア（Essen BioScience）により定量化し、標的細胞のみの対照群に残る生細胞数で正規化した。結果は、図１、図２、及び図３に示す。

【０２８９】

実施例５．記憶ＮＫ細胞の持続性及びＣＤ１６表面発現

急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）モデルでＴＨＰ－１細胞モデルを使用して記憶ＮＫ細胞の抗腫瘍活性及び持続性を判定した。緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）及びコメツキムシ赤色

ルシフェラーゼ（ＣＢＲ）を発現するようにＴＨＰ－１細胞（ＡＴＣＣ　ＴＩＢ－２０２）を操作して、IVISイメージャーを使用した全身生物発光（ＢＬＩ）の測定によって腫瘍量をモニタすることを可能にした。雌ＮＳＧマウス（Jackson Labs；Ｎ＝５／群）の尾静脈にＴＨＰ－１－ＣＢＲ－ＧＦＰ細胞（２×１０^{5}細胞／マウス）をｉ．ｖ．注射によって接種した。腫瘍を３日間生着させた後、媒体又は記憶ＮＫ細胞（１×１０^{7}細胞／マウス）で尾静脈注射によって治療した。腫瘍進行をイソフルラン麻酔下での全身生物発光（ＢＬＩ）測定値によって追跡した。ＥＤＴＡ抗凝固薬を使用した顎下腺静脈出血により入手した血液試料を、適切な抗体フルオロフォアコンジュゲート［ＣＤ１６　ＰｅｒＣＰ－ｅＦ７１０（ThermoFisher 46-0168-42）、ＣＤ４５　ＡＰＣ－ｅＦ７８０（ThermoFisher 47-0459-42）、ｍＣＤ４５　ＢＶ４２１（BD Biosciences 563890）、Viability Live/Dead Yellow （ThermoFisher L34968）、ＣＤ３　ＳＢ７８０（ThermoFisher 78-0036-42）、ＣＤ５６　ＰＥ－Ｃｙ７（ThermoFisher 25-0567-42）、マウスCD16/32 Fc Block（BioLegend 156604）］と共に染色緩衝液（ＤＰＢＳ＋２％ＨＩ－ＦＢＳ＋２ｍＭ　ＥＤＴＡ）中で氷上で３０分間インキュベートした。染色血液試料を染色緩衝液で洗浄し、次に固定／透過処理緩衝液（ThermoFisher 00-5123-43）と共にインキュベートすることにより赤血球を溶解させて、試料を固定した。溶解後、試料を染色緩衝液で洗浄し、Attune NxTフローサイトメーター（ThermoFisher）でデータを取得した。FCS Express 7ソフトウェアで分析を実施した。集団密度を試料中のCountBright Absoluteカウントビーズ（ThermoFisher C36950）を使用して血液１ｍＬ当たりの細胞数に定量化した。結果は図４及び図５に示す。

【０２９０】

ＣＤ１６（ＦｃγＲＩＩＩ）は、モノクローナル抗体のＦｃドメインを免疫細胞に結合させて細胞関連抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）活性を可能にするＦｃ受容体であり、腫瘍殺傷の亢進につながる。記憶ＮＫ細胞の表面上のＣＤ１６発現は、マウスへの注射時点から増加し、本研究の経過全体を通じて持続する。これにより、モノクローナル抗体のＦｃドメインが記憶ＮＫ細胞に結合することが可能になり、記憶ＮＫ細胞療法のＡＤＣＣ活性が亢進する。

【０２９１】

実施例６．ＩＦＮｇはＳＣＣ－２５頭頸部癌細胞上のＰＤ－Ｌ１発現を誘導する

１０％ＦＢＳ、１％ＰｅｎＳｔｒｅｐ、１％重炭酸ナトリウム、１％ＨＥＰＥＳ、１％glutamax、１％ピルビン酸ナトリウムを含有するＤＭＥＭ／Ｆ１２培地でＳＣＣ－２５細胞を培養した。細胞を漸増濃度の組換えヒトＩＦＮｇ（R&D Systems；カタログ番号285-IF-100）と共にインキュベートし、３７℃で２４時間インキュベートした。次に細胞を回収し、洗浄して、ＰＥ抗ヒトＣＤ２７４（Ｂ７－Ｈ１、ＰＤ－Ｌ１）抗体（BioLegendカタログ番号393608）及びAttune NxTフローサイトメーター、Life Technologiesを使用したＦＡＣＳ分析によりＰＤ－Ｌ１発現を決定した。ＳＣＣ－２５細胞上のＰＤ－Ｌ１発現は、平均蛍光強度（ＭＦＩ）として表した。結果を図６に示す。

【０２９２】

実施例７．ＩＦＮｇはＬｏＶｏ結腸癌細胞上のＰＤ－Ｌ１発現を誘導する

１０％ＦＢＳ、１％ＰｅｎＳｔｒｅｐを含有するＦ１２Ｋ培地でＬｏＶｏ細胞を培養した。細胞を漸増濃度の組換えヒトＩＦＮｇ（R&D Systems；カタログ番号285-IF-100）で処理し、３７℃で２４時間インキュベートした。細胞を回収し、洗浄して、ＰＥ抗ヒトＣＤ２７４（Ｂ７－Ｈ１、ＰＤ－Ｌ１）抗体（BioLegendカタログ番号393608）及びAttune NxTフローサイトメーター、Life Technologiesを使用したＦＡＣＳ分析によりＰＤ－Ｌ１発現を決定した。フルオロフォア対応及びアイソタイプ対応マウス抗体（BioLegendカタログ番号400113）をＦＡＣＳ分析の陰性対照として使用した。結果を図７に示す。

【０２９３】

実施例８．記憶ＮＫ細胞による腫瘍細胞の殺傷によって表面ＰＤ－Ｌ１発現が増加するこ

とから、チェックポイント阻害薬（ＣＰＩ）を組み合わせる機会が開かれる
本発明者らは、トランズウェルアッセイ（Corning（登録商標）HTS Transwell（登録商標）２４ウェルプレートカタログ番号3422、８ｕｍ細孔径）を用いて、結腸直腸癌細胞株（ＬｏＶｏ）など、固形腫瘍細胞の殺傷性を試験しているが、同じ実験で、本発明者らは、ＬｏＶｏ細胞上でのＰＤ－Ｌ１の発現を測定する。初めに、本発明者らは、下のチャンバでＬｏＶｏ－ＧＦＰを記憶ＮＫ細胞と種々の比（エフェクター：標的（Ｅ：Ｔ）０：１、１：１、２．５：１、５：１、１０：１、標的細胞数は０．６ｍＬ培養培地中２５×１０^{3}個に固定）で共培養した；次に１００ｕＬ中２５×１０^{3}個のＬｏＶｏ細胞が入った上のチャンバをそのウェルの中に入れた。２４時間後、上のチャンバ及び下のチャンバから細胞を回収し、洗浄して、抗ヒトＰＤ－Ｌ１抗体（ＰＥ、カタログ番号393608、クローンＭＩＨ２）及びLive-Dead固定可能近赤外色素（カタログ番号L34974）によって氷上で３０分間染色した。細胞を洗浄し、２００ｕＬ　ＦＡＣＳ緩衝液に再懸濁して、フローサイトメーター（Attune NxTフローサイトメーター、Life Technologies）により分析した。腫瘍細胞の生存能力は、ＬｏＶｏ－ＧＦＰ＋生細胞の％として表す。ＬｏＶｏ細胞上でのＰＤ－Ｌ１発現は平均蛍光強度（ＭＦＩ）として表す。結果は図８に示す。

【０２９４】
これらの知見は、記憶細胞の比率が大きくなると、下のチャンバ内にあるＬｏＶｏ細胞の殺傷が亢進し、インターフェロンγ（ＩＦＮ－γ）などのサイトカインの分泌レベルが高くなり、ひいては上のチャンバ内のＬｏＶｏ細胞におけるＰＤ－Ｌ１の表面発現が刺激されることを示唆している。癌細胞上の記憶ＮＫ媒介性ＰＤ－Ｌ１発現は、抗ＰＤ１及び抗ＰＤＬ１抗体などのチェックポイント阻害薬（ＣＰＩ）との組み合わせ治療の機会を切り開く。

【０２９５】
実施例９．記憶ＮＫ細胞をＡＤＣＣ能のあるｍＡｂと組み合わせると、腫瘍細胞上のＰＤ－Ｌ１発現が更に亢進する
本発明者らは、トランズウェルアッセイを用いて、下のチャンバでＬｏＶｏ－ＧＦＰを記憶ＮＫ細胞とＥ：Ｔ比２：１（０．６ｍＬ完全培養培地中５０×１０^{3}個の記憶ＮＫ細胞：２５×１０^{3}個のＬｏＶｏ細胞）で共培養した；次に本発明者らは、１００ｕＬ中２５×１０^{3}個のＬｏＶｏ細胞が入った上のチャンバをそのウェルの中に入れた。ＡＤＣＣ能のあるｍＡｂがＰＤ－Ｌ１発現に及ぼす影響を判定するため、本発明者らは、１ｕｇ／ｍｌのセツキシマブ（抗ＥＧＦＲ抗体）又はアベルマブ（抗ＰＤ－Ｌ１抗体）、又はセツキシマブとアベルマブとの組み合わせを下側のウェルの培養培地に加えた。４８時間後、本発明者らは上のチャンバからＬｏＶｏ細胞を回収し、洗浄して、抗ヒトＰＤ－Ｌ１抗体（Brilliant Violet 711、カタログ番号329722、クローン２９Ｅ．２Ａ３）によって氷上で３０分間染色した。次に、細胞を洗浄し、２００ｕＬ　ＦＡＣＳ緩衝液に再懸濁して、フローサイトメーター（Attune NxTフローサイトメーター、Life Technologies）により試料を分析した。上のチャンバ内のＬｏＶｏ細胞上でのＰＤ－Ｌ１発現は、ＰＤ－Ｌ１陽性細胞の割合（％）として、及び平均蛍光強度（ＭＦＩ）として実証する。結果を図９に示す。

【０２９６】
これらの知見は、記憶ＮＫ細胞が下のチャンバのＬｏＶｏ細胞を殺傷したことにより、ＩＦＮｇである可能性が最も高い可溶性因子が培養培地中に放出され、それによって上のチャンバ内のＬｏＶｏ細胞上でのＰＤ－Ｌ１の発現が増加したこと、及びセツキシマブ、アベルマブ、又は両方の抗体の組み合わせを加えたことにより、それが亢進したことを実証している。

【０２９７】
実施例１０．記憶ＮＫ細胞とのインキュベーション後又は馴化培地とのインキュベーション後にＳＣＣ－２５細胞（頭頸部癌）上にＰＤ－Ｌ１が誘導される
ＳＣＣ－２５細胞を記憶ＮＫ細胞と３７℃及び０：１、１：１、３：１、又は９：１の

Ｅ：Ｔ比で１２時間、２４時間、又は４２時間共培養した。各時点で上清を収集し、高速でスピンして残留する細胞又は細胞デブリを全て除去し、二次馴化培養のため、新鮮なＳＣＣ－２５細胞が入ったウェルに移し替えた。一次共培養の残りの細胞は酵素的に回収し、フローサイトメトリー分析に使用して、腫瘍細胞死及び表面ＰＤ－Ｌ１発現を、それぞれ、Fixable Aqua死細胞染色（Invitrogenカタログ番号34957A）及びＰＥ抗ヒト抗体（BioLegendカタログ番号393608）で染色することにより判定した。二次馴化培養物を２４時間成長させた後、細胞を回収し、一次共培養物と同じようにして分析した。結果を図１０に示す。

【０２９８】

一次共培養物によれば、記憶ＮＫ細胞が存在した処理は、全てにおいて腫瘍細胞死が起こったことから、ＰＤ－Ｌ１発現との正の関係が示された。細胞死及びＰＤ－Ｌ１発現の両方とも、共培養継続期間及びＥＴ比と正の協調関係にあった。しかしながら、一次培養上清中に存在するＩＦＮｇを含めた可溶性因子で新鮮なＳＣＣ－２５細胞を刺激した馴化培養では、ＰＤ－Ｌ１発現のみが一次共培養物と同様の相関関係を示し、しかし細胞死は示さなかったことから、ＩＦＮｇが腫瘍細胞死を引き起こさなかったことが指摘される。まとめると、これらの結果から、記憶ＮＫ細胞の誘導による細胞死が腫瘍細胞上のＰＤ－Ｌ１発現を誘導することが指摘され、これは、記憶ＮＫと組み合わせてＡＤＣＣにアベルマブなどの抗ＰＤＬ１抗体を使用することの理論的根拠を裏付けており、ここではアベルマブがＴ細胞上のＰＤ１と腫瘍細胞上のＰＤＬ－１との相互作用を更に破壊するため、Ｔ細胞媒介性免疫療法が亢進する。

【０２９９】

実施例１１．ＮＣＩ－Ｎ８７細胞（胃癌細胞）＋記憶ＮＫ細胞の共培養物にアベルマブを加えると、ＡＤＣＣ機構によるＮＣＩ－Ｎ８７細胞の殺傷が亢進する

蛍光標識した胃癌細胞株（ＮＣＩ－Ｎ８７）を３０ｎｇ／ｍｌヒト組換えＩＦＮｇで一晩前処理してＰＤ－Ｌ１を上方制御した後、単独で培養するか、又は記憶ＮＫ細胞と共に（Ｅ：Ｔ＝１：１）培養するかのいずれかで、１ｕｇ／ｍｌのアベルマブの存在下又は非存在下に３７℃で７２時間培養した。蛍光腫瘍生細胞の消失として指示される腫瘍細胞死をIncuCyte S3生細胞分析機器によってモニタした。結果を図１１に示す。

【０３００】

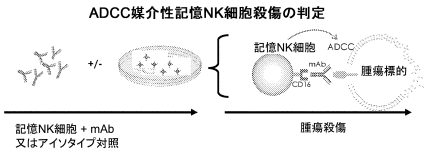
アベルマブ単独では大きい腫瘍細胞死は誘導されなかったが、記憶ＮＫ細胞＋ＮＣＩ－Ｎ８７共培養細胞にアベルマブを加えると、腫瘍細胞死が大きく亢進したことから、ＡＤＣＣ媒介性腫瘍殺傷が指摘される。

【０３０１】

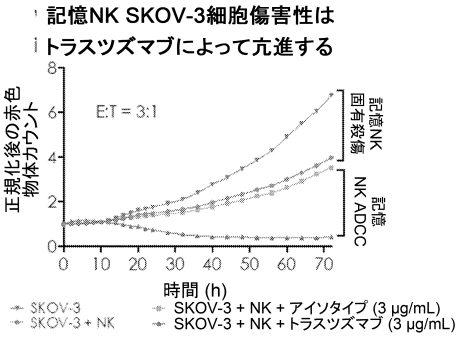
上記に示した詳細な説明は、当業者が本発明を実施するのに役立つよう提供される。しかしながら、本明細書に記載され及び特許請求される本発明は、本明細書に開示される具体的な実施形態によって範囲が限定されるものでなく、なぜならそれらの実施形態は、本発明の幾つかの態様の例示として意図されるためである。任意の均等な実施形態が、本発明の範囲内にあることが意図される。実際、当業者には、前述の記載から、本発明の発見の趣旨又は範囲から逸脱することのない本発明の様々な変形例が、本明細書に図示され及び記載されるものに加えて明らかになるであろう。かかる変形例もまた、添付の特許請求の範囲内に含まれることが意図される。

【図面】

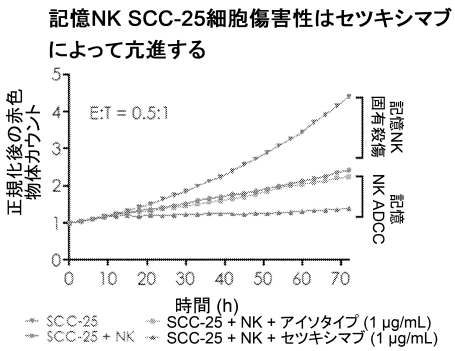
【図１】


ADCC媒介性記憶NK細胞殺傷の判定
+/-
記憶NK細胞
ADCC
mAb
CD16
腫瘍標的
記憶NK細胞 + mAb
又はアイソタイプ対照
腫瘍殺傷

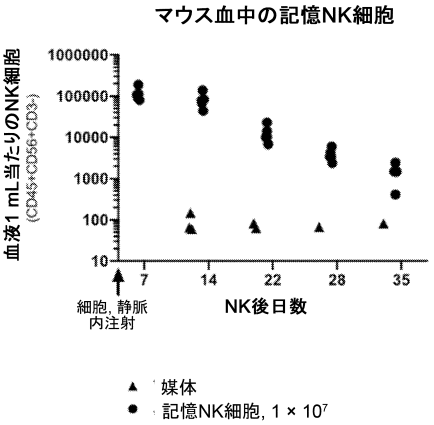
【図２】


記憶NK SKOV-3細胞傷害性は
トラスツズマブによって亢進する
正規化後の赤色
物体カウント
E:T = 3:1
記憶NK
固有殺傷
記憶
NK ADCC
時間 (h)
SKOV-3
SKOV-3 + NK
SKOV-3 + NK + アイソタイプ (3 µg/mL)
SKOV-3 + NK + トラスツズマブ (3 µg/mL)

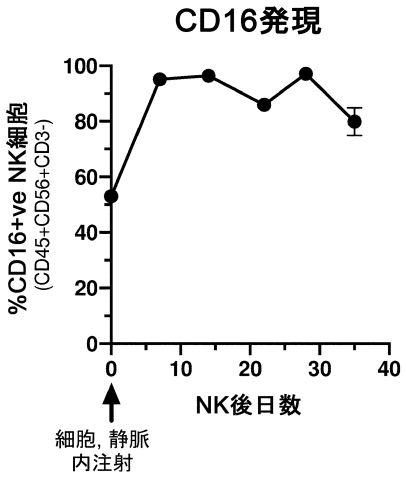
【図３】


記憶NK SCC-25細胞傷害性はセツキシマブ
によって亢進する
正規化後の赤色
物体カウント
E:T = 0.5:1
記憶NK
固有殺傷
記憶
NK ADCC
時間 (h)
SCC-25
SCC-25 + NK
SCC-25 + NK + アイソタイプ (1 µg/mL)
SCC-25 + NK + セツキシマブ (1 µg/mL)

【図４】

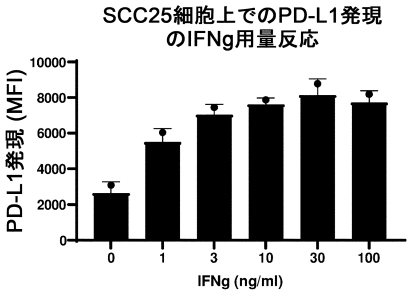

マウス血中の記憶NK細胞
血液1 mL当たりのNK細胞
(CD45+CD56+CD3-)
細胞, 静脈
内注射
NK後日数
媒体
記憶NK細胞, 1 × 10^7

【図５】

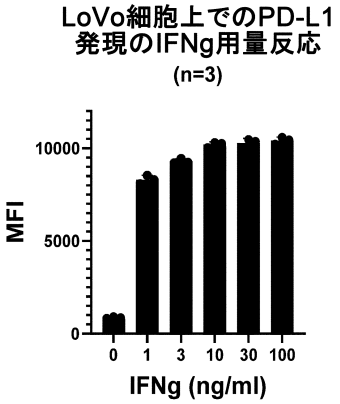


記憶NK細胞, 1×10^7

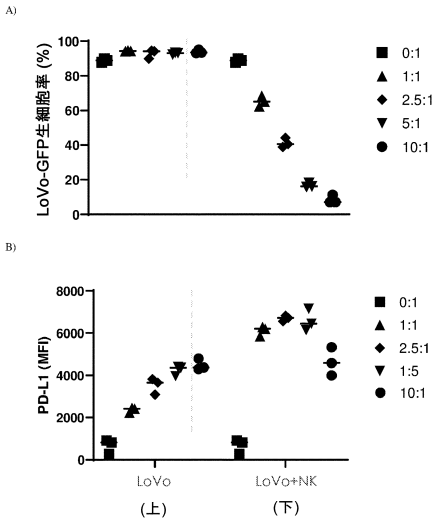
【図６】



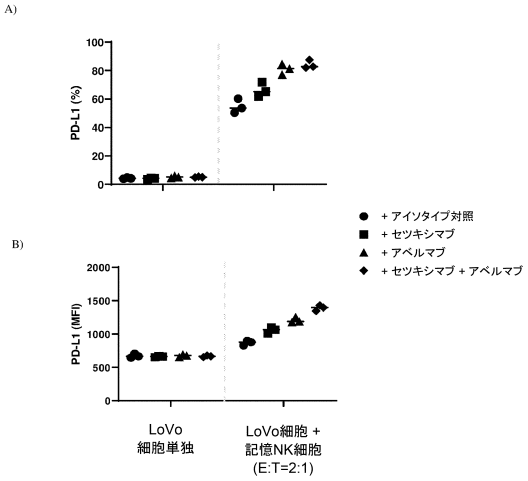
【図７】



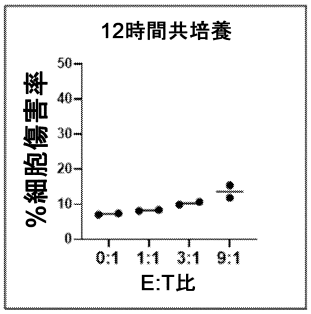
【図８】



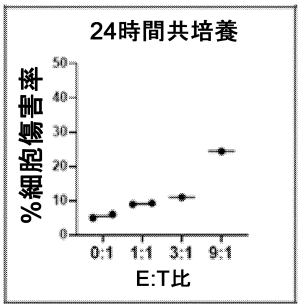
【図９】



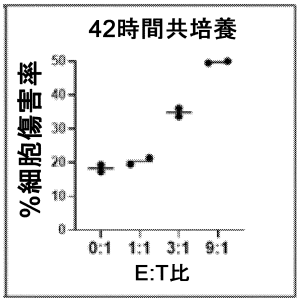
【図１０】



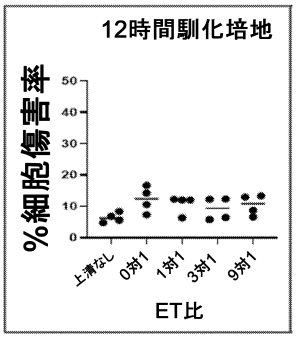
【図１１】



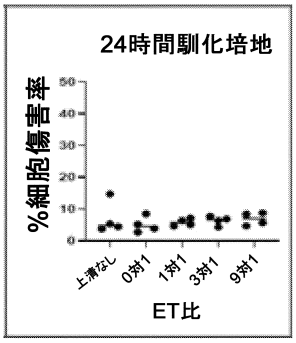
【図１２】



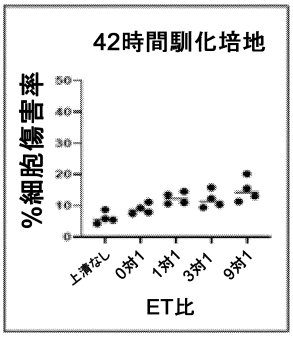
【図１３】



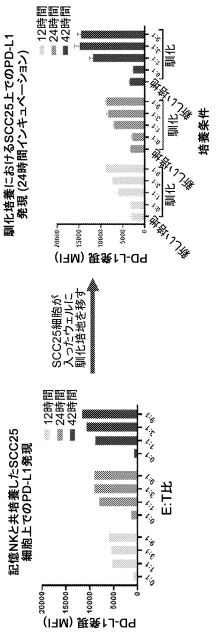
【図１４】



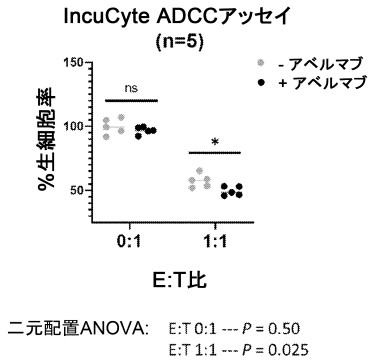
【図１５】



【図１６】



【図１７】



【配列表】

2024540347000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 22/79528

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC - INV. C07K 16/28, G01N 33/574 (2023.01)
ADD. C07K 16/30 (2023.01)
CPC - INV. C07K 16/2803, C07K 16/2887, G01N 33/57449
ADD. C07K 2317/52, G01N 33/57411
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2006/0177454 A1 (RING) 10 August 2006 (10.08.2006) Abstract; Claim 1; para [0002]; para [0006]; para [0014]; para [0030]; para [0057-0058]; para [0069]	1-14, 49
Y	US 2013/0295044 A1 (BOARD OF TRUSTEES OF MICHIGAN STATE UNIVERSITY) 7 November 2013 (07.11.2013) Abstract; para [0023]	1-14, 49
Y	US 2013/0122001 A1 (LAZAR et al.) 16 May 2013 (16.05.2013) Abstract; para [0063]	4, (5-14)/4
Y	GAONA-LUVIANO et al., Epidemiology of ovarian cancer. Chin Clin Oncol. 2020, Vol.9, No.4:47, p1-7. Abstract; p4, col 1, para 2; Figure 3	8-13
Y	AGARWAL et al., Ovarian Small Cell Carcinoma: A Rare Case Report and Review of Literature. Iran J Pathol. 2018 Winter, Vol. 13, No.1, p 99-102. Abstract	14

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
24 February 2023	APR 05 2023
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Kari Rodriquez Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 22/79528

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. ☒ forming part of the international application as filed.

   b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),

      ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 22/79528

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 16-17, 32-33, 39-42, 50-52, 58-106
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
---Please see continuation in first extra sheet ----------

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-14, 49, limited to a method using anti-HER2 antibody for treatment of ovarian cancer

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 22/79528

Continuation of Box No. III. Observations where unity of invention is lacking.

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I+, Claims 1-15, 18-31, 34-38, 43-49, directed to a method of treating cancer in a subject in need thereof. The method will be searched to the extent that the method encompasses wherein the antibody is an anti-HER2 antibody, and wherein the cancer is ovarian cancer (note, this is the first claimed antibody and cancer combination for the inventive method). The first named invention was determined based on the combination of first claimed antibody (anti-HER2 antibody, claim 5) and cancer (ovarian cancer, claim 7) for the inventive method embodiment. This first named invention has been selected based on the guidance set forth in section 10.54 of the PCT International Search and Preliminary Examination Guidelines. It is believed that claims 1-14, 49 encompass this first named invention, and thus these claims will be searched without fee to the extent that the method encompasses wherein the antibody is an anti-HER2 antibody, and wherein the cancer is ovarian cancer. Additional method(s) comprising additional antibody(ies), cancer(s) and/or combination(s) thereof will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected method(s) comprising additional antibody(ies), cancer(s) and/or combination(s) thereof. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. An exemplary election would be a method comprising an anti-HER2 antibody, and wherein the cancer is gastric cancer (claims 1-6, 15, 49).

Group II, claims 53-57, directed to an immunotherapeutic composition and kit.

The inventions listed as Groups I+ and II do not relate to a single special technical feature under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special technical features

Group I+ has the special technical feature of a method of treating cancer in a subject in need thereof, that is not required by Group II. Group II has the special technical feature of an immunotherapeutic composition and kit, that is not required by Group I+.

Common technical features

Groups I+ and II share the technical features of including:
a composition comprising memory NK cells, a monoclonal antibody comprising a tumor antigen binding moiety and a CD16 binding moiety.

However, these shared technical features are previously disclosed by prior art, as discussed below.

Group I+ inventions additionally share the technical features of including:
a method of treating cancer in a subject in need thereof comprising administering memory NK cells and a monoclonal antibody comprising a tumor antigen binding moiety and a CD16 binding moiety.

However, these shared technical features are made obvious by US 2006/0177454 A1 to Ring, (hereinafter 'Ring') in view of US 2013/0295044 A1 to Board of Trustees of Michigan State University (hereinafter 'MSU').

Ring teaches a method of treating cancer in a subject in need thereof comprising administering a monoclonal antibody comprising a tumor antigen binding moiety (Her2) and a CD16 binding moiety (Abstract - 'A method of inducing an immune response in a patient is provided. The method involves administration of bispecific molecules capable of recognizing and binding Fc.gamma.RIII and a second antigen. The second antigen may be a cancer antigen, a viral antigen, a fungal antigen, a bacterial antigen or a toxin. The second antigen may or may not be present at the time the method of the invention is performed.'; para [0002] - 'The invention relates to methods of inducing or enhancing an immune response in a patient using bispecific antibodies in which one arm of the antibody recognizes and binds to Fc.gamma.RIII, also called CD16.'; Claim 1 - 'A method of inducing production of antibodies against a cancer antigen, comprising the step of administering a bispecific antibody to a human patient, said bispecific antibody comprising a first binding site capable of recognizing and binding a first antigen wherein said first antigen is Fc.gamma.RIII and further comprising a second binding site capable of recognizing and binding a second antigen, in an amount sufficient to induce production of antibodies to said second antigen in said patient, wherein said second antigen is a cancer antigen selected from the group consisting of c-erbB-2,'; Note, c-erbB-2 is also known as Her2). Ring fails to expressly teach memory NK cells.

----please see continuation on next extra sheet ----------

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 22/79528

Continuation of Box No. III. Observations where unity of invention is lacking.

----------continued from previous sheet ----------

MSU teaches memory NK cells (Abstract - 'The invention relates to a specialized subpopulation of natural killer cells that have enhanced effector functions and the potential to kill malignant tumor cells or infected cells when the natural killer cells are exposed to an antibody bound to the tumor cells or the infected cells.'; para [0023] - 'FIG. 13 depicts various responses of memory g-NK and conventional NK cells upon their encounter of virus-infected cells during re-infection or chronic infection, or encounter of tumor cells during tumor antigen-specific antibody therapy for cancer treatment.'). Since Ring teaches NK cell effector function in tumor cell lysis (para [0006] - 'Binding of the Fc portions of antibodies to the Fc.gamma.RIII molecule on NK cells, activates the NK cells to lyse the target cell.'), and MSU teaches memory NK cells have enhanced effector functions, it would have been obvious to one of ordinary skill in the art to combine the memory NK cells of MSU with the method of Ring, to provide a more efficacious method for cancer immunotherapy.

As the technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

Therefore, Group I+ and II inventions lack unity under PCT Rule 13 because they do not share the same or corresponding special technical feature.

Continuation of item 4 above: claims 16-17, 32-33, 39-42, 50-52, 58-106 are held unsearchable because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Note, Claim 33 is objected to for being self-dependent. For the purposes of this application, claim 33 is reconstrued as though dependent on claim 32.

フロントページの続き

(51)国際特許分類			FI			テーマコード（参考）
C07K	*16/28*	*(2006.01)*	C12N	5/0783	ZNA	
C07K	*16/46*	*(2006.01)*	C07K	16/28		
C12N	*15/13*	*(2006.01)*	C07K	16/46		
C12N	*15/62*	*(2006.01)*	C12N	15/13		
			C12N	15/62	Z	

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

セントルイス フォレスト パーク アベニュー ４２６０ スイート １００

(72)発明者 サリバン，ライアン ピー．

アメリカ合衆国，ミズーリ州 ６３１０８ セントルイス フォレスト パーク アベニュー ４２６０ スイート １００

Ｆターム（参考） 4B065 AA92X BD39 CA44

4C085 AA14 BB01 BB11 BB12 BB31 DD62

4C087 AA01 AA02 BB37 BB64 CA04 MA02 NA05 NA14 ZB26 ZC75

4H045 AA11 AA30 BA41 CA40 DA76 EA20