

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-517415

(P2018-517415A)

(43) 公表日 平成30年7月5日(2018.7.5)

(51) Int.Cl.	F 1		テーマコード (参考)
C 12 N 5/10 (2006.01)	C 12 N 5/10	Z N A	4 B 0 6 5
A 61 P 35/00 (2006.01)	A 61 P 35/00		4 C 0 8 5
A 61 P 35/02 (2006.01)	A 61 P 35/02		4 C 0 8 7
A 61 K 39/395 (2006.01)	A 61 K 39/395	T	4 H 0 4 5
A 61 K 35/17 (2015.01)	A 61 K 35/17	Z	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 46 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-564059 (P2017-564059)	(71) 出願人	516104043 ナントクエスト インコーポレイテッド アメリカ合衆国 カリフォルニア州 カル バー シティ ジェファーソン ブールバ ード 9920
(86) (22) 出願日	平成28年6月10日 (2016. 6. 10)	(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(85) 翻訳文提出日	平成30年1月22日 (2018. 1. 22)	(74) 代理人	100102118 弁理士 春名 雅夫
(86) 國際出願番号	PCT/US2016/036991	(74) 代理人	100160923 弁理士 山口 裕幸
(87) 國際公開番号	W02016/201304	(74) 代理人	100119507 弁理士 刑部 俊
(87) 國際公開日	平成28年12月15日 (2016. 12. 15)	(74) 代理人	100142929 弁理士 井上 隆一
(31) 優先権主張番号	62/173, 701		
(32) 優先日	平成27年6月10日 (2015. 6. 10)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	62/337, 044		
(32) 優先日	平成28年5月16日 (2016. 5. 16)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】がんを処置するための改変NK-92細胞

(57) 【要約】

少なくとも1種のCARおよび少なくとも1種のFc受容体を発現する、NK-92細胞が、本明細書において提供される。さらに、NK-92細胞を用いて処置可能な疾患、例えばがんを有するかまたは有することが疑われる患者の処置の方法であって、該患者にNK-92-Fc-CARを投与する段階を含む、方法が提供される。

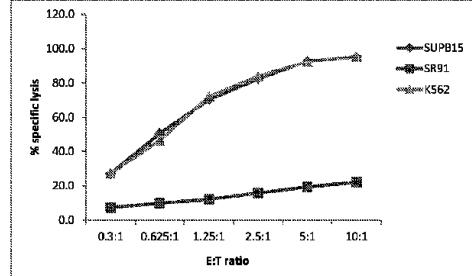
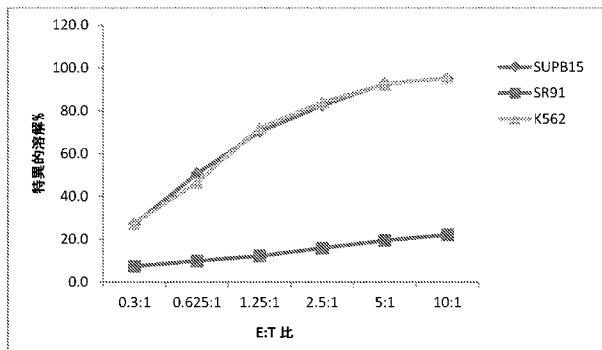


FIG. 1C

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

少なくとも1種のFc受容体および少なくとも1種のキメラ抗原受容体(CAR)をNK-92細胞の細胞表面上に提示するように、該少なくとも1種のFc受容体および該少なくとも1種のCARを発現するよう改変されている、該NK-92細胞。

【請求項 2】

前記Fc受容体が、Fc RIII-A(CD16)であるか、または成熟形態の該CD16の158位にバリンを有するCD16ポリペプチドである、請求項1に記載の細胞。

【請求項 3】

前記Fc受容体が、SEQ ID NO:2のアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含み、かつ158位にバリンを含む、請求項1に記載の細胞。 10

【請求項 4】

前記Fc受容体がSEQ ID NO:2のアミノ酸配列を含む、請求項1に記載の細胞。

【請求項 5】

前記CARが、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、またはSEQ ID NO:13と少なくとも90%の同一性を有する、請求項1~4のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 6】

前記CARが、CD19、CSPG-4、CD20、NKG2Dリガンド、CS1、GD2、CD138、EpCAM、HER-2、EBNA3C、GPA7、CD244、CA-125、MUC-1、ETA、MAGE、CEA、CD52、CD30、MUC5AC、c-Met、EGFR、FAB、WT-1、PSMA、NY-ESO1、およびCD33からなる群より選択される腫瘍関連抗原を標的とする、請求項1~4のいずれか一項に記載の細胞。 20

【請求項 7】

サイトカインをさらに発現する、請求項1~6のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 8】

前記サイトカインがインターロイキン-2またはそのバリエントである、請求項7に記載の細胞。

【請求項 9】

前記サイトカインが小胞体を標的とする、請求項7または8に記載の細胞。

【請求項 10】

前記Fc受容体および前記CARが、異なるベクター上にコードされている、請求項1~9のいずれか一項に記載の細胞。 30

【請求項 11】

Fc受容体およびキメラ抗原受容体(CAR)をNK-92細胞の細胞表面上に提示するように、NK-92細胞株の細胞が、少なくとも1種の該Fc受容体および少なくとも1種の該CARを発現するよう改変されている、該NK-92細胞株。

【請求項 12】

前記Fc受容体が、Fc RIII-A(CD16)であるか、または成熟形態の該CD16の158位にバリンを有するCD16ポリペプチドである、請求項11に記載のNK-92細胞株。

【請求項 13】

前記Fc受容体が、SEQ ID NO:2のアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含み、かつ158位にバリンを含む、請求項11に記載の方法。 40

【請求項 14】

前記Fc受容体がSEQ ID NO:2のアミノ酸配列を含む、請求項11に記載の方法。

【請求項 15】

前記CARが、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、またはSEQ ID NO:13と少なくとも90%の同一性を有する、請求項11~14のいずれか一項に記載のNK-92細胞株。

【請求項 16】

前記CARが、CD19、CD20、NKG2Dリガンド、CS1、GD2、CD138、EpCAM、HER-2、EBNA3C、G 50

PA7、CD244、CA-125、MUC-1、ETA、MAGE、CEA、CD52、CD30、MUC5AC、c-Met、EGFR、FAB、WT-1、PSMA、NY-ESO1、およびCD33からなる群より選択される腫瘍関連抗原を標的とする、請求項11～14のいずれか一項に記載のNK-92細胞株。

【請求項17】

サイトカインをさらに発現する、請求項11～16のいずれか一項に記載のNK-92細胞株。

【請求項18】

前記サイトカインがインターロイキン-2またはそのバリアントである、請求項17に記載のNK-92細胞株。

【請求項19】

前記サイトカインが小胞体を標的とする、請求項17または18に記載のNK-92細胞株。 10

【請求項20】

前記Fc受容体および前記CARが、異なるベクター上にコードされている、請求項11～19のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項21】

前記細胞株の細胞が10回未満の集団倍加を受ける、請求項11～20のいずれか一項に記載の細胞株。

【請求項22】

前記細胞が、10 U/ml未満のIL-2を含有する培地中に培養される、請求項11～20のいずれか一項に記載の細胞株。

【請求項23】

請求項1～10または請求項11～22のいずれか一項からの細胞のある量を含む、組成物。 20

【請求項24】

少なくとも1種のモノクローナル抗体をさらに含む、請求項23に記載の組成物。

【請求項25】

前記少なくとも1種のモノクローナル抗体が、裸のモノクローナル抗体、コンジュゲートされたモノクローナル抗体、または二重特異性モノクローナル抗体である、請求項24に記載の組成物。

【請求項26】

前記モノクローナル抗体が、アレムツズマブ、リツクスマブ(rituxumab)、トラスツズマブ、イブリツモマブ、ブレンツキシマブ、ゲムツズマブ、アドトラスツズマブ(adotuzumab)、ブリナツモマブ、アベルマブ、ダラツムマブ(daratumumab)、およびエロツズマブからなる群より選択される、請求項24に記載の組成物。 30

【請求項27】

それを必要とする患者においてがんを処置する方法であって、請求項1～10のいずれか一項に記載の細胞または請求項11～22のいずれか一項に記載の細胞株のいずれか1つの有効量を、該患者に投与し、それによって該がんを処置する段階を含む、方法。

【請求項28】

前記細胞が、静脈内、腹腔内、および皮下からなる群より選択される経路によって前記患者に投与される、請求項27に記載の方法。

【請求項29】

少なくとも1種のモノクローナル抗体の有効量を前記患者に投与する段階をさらに含む、請求項27に記載の方法。 40

【請求項30】

前記モノクローナル抗体が、裸のモノクローナル抗体、コンジュゲートされたモノクローナル抗体、または二重特異性モノクローナル抗体である、請求項29に記載の方法。

【請求項31】

前記モノクローナル抗体が、アレムツズマブ、リツクスマブ、トラスツズマブ、イブリツモマブ、ブレンツキシマブ、ゲムツズマブ、アドトラスツズマブ、ブリナツモマブ、アベルマブ、ダラツムマブ、およびエロツズマブからなる群より選択される、請求項29に記載の方法。 50

【請求項 3 2】

前記モノクローナル抗体および前記細胞が同時に投与される、請求項29～31のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記モノクローナル抗体および前記細胞が、前記患者へ投与する前に混合される、請求項29～31のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記モノクローナル抗体および前記細胞が連続的に投与される、請求項29～31のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記がんが、白血病、リンパ腫、真性多血症、多発性骨髄腫、ワルデンストレーム高ガンマグロブリン血症、重鎖病、肉腫、およびがん腫からなる群より選択される、請求項27～34のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記患者の体表面積1 m²当たり約1×10⁸個から約1×10¹¹個の細胞が該患者に投与される、請求項27～35のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 7】

(a) 細胞表面上に少なくとも1種のFc受容体および該細胞表面上に少なくとも1種のキメラ抗原受容体(CAR)を発現するよう改変されている、NK-92細胞と、(b)使用のための説明書とを含む、がんを処置するためのキット。

【請求項 3 8】

(c)少なくとも1種のモノクローナル抗体をさらに含む、請求項37に記載のキット。

【請求項 3 9】

前記モノクローナル抗体が、裸のモノクローナル抗体、コンジュゲートされたモノクローナル抗体、または二重特異性モノクローナル抗体である、請求項38に記載のキット。

【請求項 4 0】

前記モノクローナル抗体が、アレムツズマブ、リツクスマブ、トラスツズマブ、イブリツモマブ、ブレンツキシマブ、ゲムツズマブ、アドトラスツズマブ、ブリナツモマブ、アベルマブ、ダラツムマブ、およびエロツズマブからなる群より選択される、請求項38に記載のキット。

【請求項 4 1】

改変NK-92細胞の細胞表面上に少なくとも2種のリガンド結合要素を有するように、1種または複数種のFc受容体および1種または複数種のCARからなる群より選択される多座配位(multidentate)リガンド結合要素を含む、該改変NK-92細胞。

【請求項 4 2】

改変NK-92細胞の細胞表面上の多座配位結合要素を使用する段階を含む、がん細胞に対するNK-92細胞の結合親和性を増強するための方法であって、該改変NK-92細胞が、該NK-2細胞の細胞表面上に少なくとも2種のリガンド結合要素を有するように、1種または複数種のFc受容体および1種または複数種のCARについての多座配位結合要素を含む、方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0 0 0 1】****関連出願の相互参照**

本出願は、2015年6月10日に出願された米国仮特許出願第62/173,701号および2016年5月16日に出願された米国仮特許出願第62/337,044号に対する優先権の恩典を主張するものであり、これらのそれぞれは、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【背景技術】**【0 0 0 2】****背景**

ナチュラルキラー(NK)細胞は、自然免疫系の主要構成要素を成す細胞傷害性リンパ球で

10

20

30

40

50

ある。NK細胞は一般に、循環リンパ球の約10～15%を占め、抗原に関して非特異的にかつ事前の免疫感作なしに、ウイルス感染細胞および多くの悪性細胞を含む標的細胞に結合し、かつそれらを死滅させる。Herberman et al., Science 214:24(1981) (非特許文献1)。標的細胞の死滅は細胞溶解を誘導することによって生じる。この目的で用いられるNK細胞は、対象由来の血液の末梢血リンパ球(「PBL」)画分から単離され、十分な数の細胞を得るために細胞培養中で増大され、次いで、対象内に再注入される。NK細胞は、エクスピボ療法およびインビボ処置の両方においてある程度有効であることが示されている。しかしながら、そのような療法は、全てのNK細胞が細胞溶解性ではなく、療法は処置された患者に特有なものであるという事実によって複雑になる。

【0003】

10

がんでは、腫瘍細胞を同じ組織に由来する正常細胞から区別する表現型の変化は多くの場合、正常細胞表面成分の消失またはそれ以外の成分(すなわち、対応する正常な非がん性組織で検出されない抗原)の獲得を含む、特定の遺伝子産物の発現における1つまたは複数の変化に関連する。新生物性細胞または腫瘍細胞で発現するが、正常細胞ではそうではない抗原、または正常細胞で見られるものを実質的に上回るレベルで新生細胞において発現する抗原は、「腫瘍特異的抗原」または「腫瘍関連抗原」と呼ばれている。そのような腫瘍特異的抗原は腫瘍表現型のマーカーとして役立つ可能性がある。腫瘍特異的抗原は3つの主なグループに割り当てることができる：がん/精巣特異的抗原(例えば、MAGE、BAGE、GAGE、PRAMEおよびNY-ESO-1)、メラニン細胞分化抗原(例えば、チロシナーゼ、Melan-A/MART、gp100、TRP-1およびTRP-2)、ならびに変異したまたは異常に発現した抗原(例えば、MUM-1、CDK4、カテン、gp100-in4、p15およびN-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼV)。

20

【0004】

腫瘍特異的抗原はがん免疫療法の標的として用いられている。そのような療法の一つは、T細胞およびNK細胞を含む免疫細胞の表面上に発現させたキメラ抗原受容体(CAR)を用いて、がん細胞に対する細胞傷害性を改善する。CARは、少なくとも1つの細胞内シグナル伝達ドメインに連結させた一本鎖可変断片(scFv)を含む。scFvは、標的細胞(例えば、がん細胞)上の抗原を認識しあつそれに結合し、エフェクター細胞活性化を引き起こす。

【0005】

30

加えて、モノクローナル抗体(mAb)による抗がん処置は、特に化学療法と組み合わせた場合に、がんを有する患者の臨床転帰を大幅に改善してきた。しかしながら、悪性細胞による抗原の提示および免疫細胞の存在にもかかわらず、がん細胞は免疫媒介性拒絶から免れることができている。がん細胞がそれによって免疫排除を免れる1つの機序は、検出を妨げることによるものである。例えば、腫瘍回避機序には、CAR発現免疫細胞およびmAbなどの単独での標的療法の有効性を低減させる、抗原提示の不全または低下(例えば、腫瘍抗原の変異または下方制御)が含まれる。このように、がん細胞を処置する改良された治療および方法が依然として必要とされる。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

40

【非特許文献1】Herberman et al., Science 214:24(1981)

【発明の概要】

【0007】

簡単な概要

複数のトランスジーンを発現するように操作された、遺伝的に改変されたNK-92細胞または細胞株が、本明細書において提供される。例えば、少なくとも1種のFc受容体および少なくとも1種のキメラ抗原受容体(CAR)がNK-92細胞の細胞表面上に提示されるように、NK-92細胞は少なくとも1種のFc受容体および少なくとも1種のCARを同時に発現するよう改変される。

【0008】

50

よって、本開示は、Fc受容体およびキメラ抗原受容体(CAR)がNK-92細胞の細胞表面上に提示されるように、NK-92細胞株の細胞が、少なくとも1種のFc受容体および少なくとも1種のCARを発現するよう改変されている、NK-92細胞株を提供する。

【0009】

前述の一般的な説明および下記の詳細な説明は、例示的かつ説明的なものであり、本開示のさらなる説明を提供することを意図する。他の目的、利点および新規な特徴は、当業者には容易に明らかである。

【図面の簡単な説明】

【0010】

目的、特徴、および利点は、添付の図面と併せて考慮する際、下記の開示を参照することで、より容易に理解される。

10

【図1A】インビトロ細胞傷害性アッセイを示すグラフである。図1Aは、エレクトロポレーションしていない親NK-92細胞による標的細胞株の死滅を示す。

【図1B】インビトロ細胞傷害性アッセイを示すグラフである。図1Bは、CD19-CARを発現する親NK-92細胞による標的細胞株の死滅を示す。

【図1C】インビトロ細胞傷害性アッセイを示すグラフである。図1Cは、CD19-CARを発現するCD16(158V)-ERIL2 NK-92細胞による標的細胞株の死滅を示す。

20

【発明を実施するための形態】

【0011】

詳細な説明

少なくとも1種のFc受容体および少なくとも1種のキメラ抗原受容体(CAR)をNK-92細胞の細胞表面上に提示するように、少なくとも1種のFc受容体および少なくとも1種のCARを発現するよう改変された、NK-92細胞が、本明細書において提供される。任意で、Fc受容体はFc RIII-A(CD16)を含んでもよい。任意で、NK-92細胞は、SEQ ID NO:1(158位にフェニルアラニンを有するFc RIII-AまたはCD16 (F-158))と少なくとも90%の配列同一性；またはSEQ ID NO:2(158位にバリンを有する(F158V)CD16、より親和性の高い形態)と少なくとも90%の同一性を有するポリペプチドをコードするFc受容体を発現するよう遺伝子改変される。典型的な態様において、CD16ポリペプチドは158位にバリンを有する。任意で、NK-92細胞は、SEQ ID NO:8(CD19)、SEQ ID NO:9(CD19)、SEQ ID NO:10(CD33)、SEQ ID NO:11(CD33)、SEQ ID NO:12(CSPG-4)、またはSEQ ID NO:13(CSPG-4)と少なくとも90%の配列同一性を有するポリペプチドをコードするCARを発現するよう遺伝子改変される。任意で、CARは、腫瘍関連抗原、例えば、CD19、CD20、NKG2Dリガンド、CS1、GD2、CD138、EpCAM、HER-2、EBNA3C、GPA7、CD244、CA-125、MUC-1、ETA、MAGE、CEA、CD52、CD30、MUC5AC、c-Met、EGFR、FAB、WT-1、PSMA、NY-ESO1、およびCD33を標的とする。いくつかの態様において、細胞株のNK-92細胞は10回未満の集団倍加を受ける。

30

【0012】

任意で、NK-92細胞は、サイトカイン、例えば、インターロイキン-2またはそのバリアントをさらに発現する。いくつかの態様において、NK-92細胞は、SEQ ID NO:6またはSEQ ID NO:7の配列を有するポリペプチドを発現するよう改変される。さらなる態様において、サイトカインは小胞体を標的とする。任意で、細胞株のNK-92細胞は10 U/ml未満のIL-2を含有する培地中に培養される。

40

【0013】

本開示は、本明細書に記載されたNK-92細胞のいずれかを含む組成物を提供する。任意で、本開示は、上記態様のNK-92細胞のいずれか、および少なくとも1種の抗体、例えば、アレムツズマブ、リツクスマブ(rituxumab)、トラスツズマブ、イブリツモマブ、ゲムツズマブ、ブレンツキシマブ、アドトラスツズマブ(adotuzumab)、ブリナツモマブ、ダラツムマブ(daratumumab)またはエロツズマブ等、の組成物を提供する。いくつかの態様において、モノクローナル抗体は、裸のモノクローナル抗体、コンジュゲートされたモノクローナル抗体または二重特異性モノクローナル抗体である。

50

【0014】

本開示は、それを必要とする患者においてがんを処置する方法であって、上記態様のいずれかの細胞の有効量を患者に投与する段階を含む、方法を提供する。いくつかの態様において、細胞は、静脈内、腹腔内、および皮下からなる群より選択される経路によって患者に投与される。いくつかの態様において、患者の体表面積1 m²当たり約1×10⁸個から約1×10¹¹個の細胞が患者に投与される。任意で、本開示の方法は、少なくとも1種のモノクローナル抗体、例えば、アレムツズマブ、リツクスマブ、トラスツズマブ、イブリツモマブ、ゲムツズマブ、ブレンツキシマブ、アドトラスツズマブ、ブリナツモマブ、ダラツムマブ、またはエロツズマブの有効量を患者に投与する段階を提供する。いくつかの態様において、モノクローナル抗体は、裸のモノクローナル抗体、コンジュゲートされたモノクローナル抗体または二重特異性モノクローナル抗体である。いくつかの態様において、モノクローナル抗体は、静脈内、腹腔内、および皮下からなる群より選択される経路によって患者に投与される。1つの態様において、モノクローナル抗体および細胞は同時に投与される。いくつかの態様において、モノクローナル抗体および細胞は、患者へ投与する前に一緒に混合される。他の態様において、モノクローナル抗体および細胞は連続的に投与される。他の態様において、対象は、モノクローナル抗体を投与され、引き続き、モノクローナル抗体の投与後、例えば、24時間以内；または24から72時間以内に、改変NK-92細胞を投与される。

10

【0015】

1つの態様において、がんは、例えば、白血病(例えば、慢性B細胞白血病、急性リンパ芽球性白血病(ALL)、慢性リンパ性白血病(CLL))、リンパ腫(例えば、非ホジキンリンパ腫(NHL))、真性多血症、多発性骨髄腫、ワルデンストレーム高ガンマグロブリン血症、重鎖病、肉腫またはがん腫である。

20

【0016】

本開示は、がんを処置する上記方法のいずれかで用いるためのキットを提供し、ここで、該キットは、(a)細胞表面上に少なくとも1種のFc受容体および細胞表面上に少なくとも1種のキメラ抗原受容体(CAR)を発現するよう改変されている、NK-92細胞のある量、および(b)本開示の少なくとも1つの方法を説明する説明書の少なくとも一方を含む。いくつかの態様において、キットは少なくとも1種のモノクローナル抗体をさらに含む。

【0017】

本明細書を読んだ後、様々な別の態様および別の用途を実行する方法が当業者に明らかになるであろう。しかしながら、全ての態様が本明細書で説明されるわけではない。本明細書に示される態様は例示のみを目的として示されており、限定を目的としないことが理解されよう。したがって、この様々な別の態様の詳細な説明は、本明細書に記載の開示の範囲および広がりを限定すると解釈されるべきではない。下記に説明する局面は、特定の組成物、そのような組成物を調製する方法、またはその使用に限定されるものではなく、もちろん変化してよいことが理解されるべきである。

30

【0018】

用語

特に他で定義されない限り、本明細書で用いられる全ての技術用語および科学用語は、当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。

40

【0019】

本明細書および添付の特許請求の範囲において、以下の意味を有すると定義されるものとするいくつかの用語について言及がなされる。

【0020】

本明細書で用いる用語は、特定の態様を説明することのみを目的とし、限定することを意図するものではない。本明細書で用いる場合、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」および「その(the)」は、文脈がそうでないことを明確に示さない限り、複数形も含むことが意図される。よって、例えば、「ナチュラルキラー細胞」への言及には複数のナチュラルキラー細胞が含まれる。

【0021】

50

範囲を含む全ての数値表記、例えば、pH、温度、時間、濃度、量、および分子量などは、必要に応じて、0.1または1.0の増分で(+)または(-)に変化する近似値である。必ずしも明記されないが、全ての数値表記は用語「約」を前に付すことができることを理解すべきである。

【0022】

当業者によって理解されるように、任意のおよび全ての目的について、特に発明の詳細な説明の提供に関して、本明細書に記載の全ての範囲は、任意のおよび全ての可能性のある部分範囲ならびにその部分範囲の組み合わせも包含する。任意の記載された範囲は、少なくとも均等に2分割、3分割、4分割、5分割、10分割などに分解されている同じ範囲を十分に説明および可能にするとして簡単に認識することができる。非限定例として、本明細書に記載の各範囲は、下から3分の1、中央3分の1および上から3分の1などに容易に分解することができる。当業者によってまた理解されるように、「最大で」、「少なくとも」、「上回る」、および「未満」などの全ての語は、記載された数を含み、上述のように続いて部分範囲に分解することができる範囲に言及する。最後に、当業者によって理解されるように、範囲には各個別の要素が含まれる。よって、例えば、1~3個の細胞を有する群は、1、2、または3個の細胞を有する群に言及する。同様に、1~5個の細胞を有する群は、1、2、3、4、または5個の細胞を有する群などに言及する。

10

【0023】

必ずしも明記されないが、本明細書に記載される試薬は単なる例示であり、そのような試薬の同等物が当技術分野で公知であることも理解すべきである。

20

【0024】

「任意の」または「任意で」は、その後に記載される事象または状況が発生してもしなくてよいこと、および該記載が、その事象または状況が起こる場合とそれが起こらない場合を含むことを意味する。

30

【0025】

用語「含む」は、組成物および方法が記載された要素を含むが、他の要素を排除しないことを意味することが意図される。組成物および方法を定義するために用いられる場合の「から本質的になる」は、その組み合わせにとって何らかの本質的に重要な他の要素を排除することを意味するものとする。例えば、本明細書に定義されるような要素から本質的になる組成物は、特許請求の範囲の基本的かつ新規の特徴に実質的に影響を与えない他の要素を排除しない。「からなる」は、微量を上回る量の他の成分および実質的な方法の段階を排除することを意味するものとする。これらの移行語の各々によって定義される態様は本開示の範囲内である。

【0026】

本明細書で用いる場合、「同時の」または「同時に」は、同じ時にまたはおおよそ同じ時に少なくとも2種類の作用物質(例えば、NK-92-Fc-CAR細胞およびモノクローナル抗体)を投与することを指す。

40

【0027】

本明細書で用いる場合、用語「有効量」は、所望の治療効果を達成するのに十分な組成物の量、例えば、がん細胞またはがんに付随する1つまたは複数の徵候の寛解をもたらす量を指す。治療応用の文脈において、対象に投与されるNK-92細胞または抗体の量は、がんの種類および進行、ならびに個体の特徴、例えば、全体的な健康、年齢、性別、体重および薬物に対する耐性などに左右される。疾患の程度、重症度および種類によっても左右される。当業者は、これらおよび他の要因に応じて適切な投薬量を決定することができる。NK-92細胞はまた、1種または複数種の追加の治療化合物(例えば、抗体)と組み合わせて投与することもできる。

【0028】

本明細書で用いる場合、用語「発現」は、それによってポリヌクレオチドがmRNAに転写される工程、および/またはそれによって転写されたmRNAがペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質に引き続き翻訳される工程を指す。ポリヌクレオチドがゲノムDNAに由来

50

する場合、発現は真核細胞におけるmRNAのスプライシングを含む可能性がある。遺伝子の発現レベルは、細胞または組織サンプルにおけるmRNAまたはタンパク質の量を測定することによって決定され得る。1つの局面において、あるサンプルからの遺伝子の発現レベルは、対照または参照サンプルからのその遺伝子の発現レベルと直接比較され得る。別の局面において、あるサンプルからの遺伝子の発現レベルは、NK-92細胞の投与後の同じサンプルからのその遺伝子の発現レベルと直接比較され得る。

【0029】

本明細書で用いる場合、「免疫療法」は、単独であろうと組み合わせであろうと、改変型または非改変型のNK-92細胞、天然に生じるもしくは改変されたNK細胞またはT細胞の使用を指し、それらは標的細胞に接触すると細胞傷害性を誘導することができる。

10

【0030】

本明細書で用いる場合、「ナチュラルキラー(NK)細胞」は、特異的抗原刺激の非存在下で、かつ主要組織適合複合体(MHC)クラスによる制限なしに、標的細胞を死滅させる免疫系の細胞である。標的細胞はがんまたは腫瘍細胞であり得る。NK細胞は、CD56表面マーカーの存在およびCD3表面マーカーの非存在を特徴とする。

【0031】

用語「内因性NK細胞」は、NK-92細胞株とは区別される、ドナー(または患者)に由来するNK細胞を指すために用いられる。内因性NK細胞は、一般的に、その中でNK細胞が富化されている細胞の不均一な集団である。内因性NK細胞は、患者の自家治療用または同種異系治療用のものでありうる。

20

【0032】

「NK-92細胞」は、もともとは非ホジキンリンパ腫を有する患者から得られた、不死NK細胞株、NK-92を指す。用語「NK-92」は、元のNK-92細胞株ならびに(例えば、外因性遺伝子の導入により)改変されているNK-92細胞株を指すことを意図する。NK-92細胞ならびにその例示的かつ非限定的な改変は、米国特許第7,618,817号；同第8,034,332号；および同第8,313,943号に記載されており、これらの全ては、その全体が参考により本明細書に組み入れられる。

【0033】

「改変NK-92細胞」は、Fc受容体、CAR、IL-2、および/または自殺遺伝子を含む、トランシスジーンをコードするベクターをさらに含むNK-92細胞を指す。好ましい態様において、改変NK-92細胞は、少なくとも1種の遺伝子導入タンパク質を発現する。

30

【0034】

本明細書で用いる場合、「非照射NK-92細胞」は、照射されていないNK-92細胞である。照射は、該細胞を成長および増殖できないようにする。最適な活性を維持するためには、照射と注入との間の時間は4時間を超えないようすべきであることから、NK-92細胞は、患者の処置の前に処置施設または別の他の場所で照射されることが想定される。あるいは、NK-92細胞を別の機序によって不活性化することもできる。

【0035】

本明細書で用いる場合、NK-92細胞の「不活性化」はそれらを成長不能にする。不活性化はまたNK-92細胞の死にも関連し得る。NK-92細胞は、それらが治療応用における病理に関連した細胞のエクスピボサンプルを効果的にページした後に、またはそれらが体内に存在する多くのまたは全ての標的細胞を効果的に死滅させるのに十分な時間哺乳動物の体内に存在した後に、不活性化され得ることが想定される。不活性化は、非限定的な例として、NK-92細胞が感受性である不活性化剤を投与することによって誘導することができる。

40

【0036】

本明細書で用いる場合、用語「細胞傷害性」および「細胞溶解性」は、NK細胞などのエフェクター細胞の活性を記述するために用いられる場合、同義であることが意図される。一般に、細胞傷害活性は、様々な生物学的、生化学的、または生物物理学的機序のいずれかによって標的細胞を死滅せることに関係する。細胞溶解は、より具体的には、該エフェクターが標的細胞の原形質膜を溶解し、それによってその物理的完全性を破壊するとい

50

う活性を指す。これは結果的に標的細胞の死滅をもたらす。理論に拘束されることを望むものではないが、NK細胞の細胞傷害作用は細胞溶解によるものであると考えられる。

【0037】

細胞/細胞集団に関して用語「死滅させる」は、その細胞/細胞集団の死につながる任意のタイプの操作を含むように指向されている。

【0038】

用語「Fc受容体」は、Fc領域として知られる抗体の一部に結合することによって免疫細胞の防御機能に寄与する、ある特定の細胞(例えば、ナチュラルキラー細胞)の表面上に見出されるタンパク質を指す。細胞のFc受容体(FcR)への抗体のFc領域の結合は、抗体媒介性食作用または抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)を介して細胞の食作用または細胞傷害活性を刺激する。FcRは、それらが認識する抗体のタイプに基づいて分類される。例えば、Fc-受容体(FcR)はIgGクラスの抗体に結合する。Fc_RIII-A(CD16とも呼ばれる)は、IgG抗体に結合してADCCを活性化する低親和性Fc受容体である。Fc_RIII-Aは典型的にはNK細胞上に見出される。NK-92細胞はFc_RIII-Aを発現しない。CD16の天然形態をコードする代表的なポリヌクレオチド配列をSEQ ID NO:5に示す。

10

【0039】

用語「キメラ抗原受容体」(CAR)は、本明細書で用いる場合、細胞内シグナル伝達ドメインと融合する細胞外抗原結合ドメインを指す。CARはT細胞またはNK細胞で発現し、細胞傷害性を増大させることができる。概して、細胞外抗原結合ドメインは、関心対象の細胞上に見出される抗原に特異的なscFvである。CAR発現NK-92細胞は、scFvドメインの特異性に基づき、ある特定の抗原を細胞表面上に発現する細胞を標的とする。scFvドメインは、腫瘍特異的抗原を含む、任意の抗原を認識するように操作することができる。

20

【0040】

用語「腫瘍特異的抗原」は、本明細書で用いられる場合、がんまたは新生物性細胞上に存在するが、がん細胞と同じ組織または系列に由来する正常な細胞上では検出できない抗原を指す。腫瘍特異的抗原は、本明細書で用いる場合、腫瘍関連抗原、すなわち、がん細胞と同じ組織または系列に由来する正常な細胞と比較してがん細胞上でより高いレベルで発現する抗原も指す。

【0041】

用語「ポリヌクレオチド」、「核酸」、および「オリゴヌクレオチド」は互換的に用いられ、デオキシリボヌクレオチドもしくはリボヌクレオチドまたはその類似体のいずれかのヌクレオチドの任意の長さのポリマー形態を指す。ポリヌクレオチドは、どのような三次元構造をとってもよく、既知または未知の任意の機能を果たしうる。以下は、ポリヌクレオチドの非限定的な例である：遺伝子または遺伝子断片(例えば、プローブ、プライマー、ESTまたはSAGEタグ)、エクソン、イントロン、メッセンジャーRNA(mRNA)、トランスクレアRNA、リボソームRNA、リボザイム、cDNA、組換えポリヌクレオチド、分枝ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意の配列の単離されたDNA、任意の配列の単離されたRNA、核酸プローブおよびプライマー。ポリヌクレオチドは、メチル化ヌクレオチドおよびヌクレオチド類似体などの修飾ヌクレオチドを含むことができる。存在する場合には、ヌクレオチド構造への修飾は、ポリヌクレオチドのアセンブリの前または後に付与することができる。ヌクレオチドの配列は非ヌクレオチド成分で中断されてもよい。ポリヌクレオチドは、重合の後に、例えば標識成分とのコンジュゲーションにより、さらに修飾することができる。該用語はまた、二本鎖分子と一本鎖分子との両方を指す。特に他に指定または要求がない限り、ポリヌクレオチドは、二本鎖形態と、二本鎖形態を構成することが知られるまたは予測される2本の相補的一本鎖形態の各々との両方を包含する

30

40

【0042】

ポリヌクレオチドは、以下の4種のヌクレオチド塩基の特定の配列で構成される：アデニン(A)；シトシン(C)；グアニン(G)；チミン(T)；およびポリヌクレオチドがRNAである場合はチミンに代えてウラシル(U)。したがって、用語「ポリヌクレオチド配列」は、ポリヌクレオチド分子のアルファベット表示である。

50

【0043】

本明細書で用いる場合、「同一性パーセント」とは、2つのペプチド間または2つの核酸分子間の配列同一性を指す。同一性パーセントは、比較を目的としてアライメントされ得る各配列における位置を比較することによって決定することができる。比較した配列中のある位置が同じ塩基またはアミノ酸で占められる場合、該分子はその位置で同一である。本明細書で用いる場合、語句「相同」もしくは「バリアント」ヌクレオチド配列、または「相同」もしくは「バリアント」アミノ酸配列は、ヌクレオチドレベルまたはアミノ酸レベルでの、少なくとも指定のパーセンテージの同一性を特徴とする配列を指す。相同ヌクレオチド配列は、本明細書に記載のヌクレオチド配列の天然に生じる対立遺伝子バリエントおよび突然変異体をコードする配列を含む。相同ヌクレオチド配列は、ヒト以外の哺乳動物種のタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む。相同アミノ酸配列は、保存的アミノ酸置換を含みかつそのポリペプチドが同じ結合および/または活性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、相同ヌクレオチドまたはアミノ酸配列は、比較配列と少なくとも60%またはそれより大きい、例えば少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%またはそれより大きいを有する。いくつかの態様において、相同ヌクレオチドまたはアミノ酸配列は、比較配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の同一性を有する。いくつかの態様において、相同アミノ酸配列は、15個以下、10個以下、5個以下または3個以下の保存的アミノ酸置換を有する。同一性パーセントは、例えば、SmithおよびWatermanのアルゴリズム(Adv. Appl. Math., 1981, 2, 482-489)を使用するGapプログラム(Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for UNIX, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison Wis.)により、デフォルト設定を用いて、決定することができる。

10

20

30

40

【0044】

用語「発現」は、遺伝子産物の產生を指す。発現に言及する場合の用語「一過性」は、ポリヌクレオチドが細胞のゲノムに組み込まれていないことを意味する。

【0045】

用語「サイトカイン」は、免疫系の細胞に作用する生物学的分子の一般的クラスを指す。例示的なサイトカインには、限定するものではないが、インターフェロンおよびインターロイキン(IL)、特にIL-2、IL-12、IL-15、IL-18およびIL-21が含まれる。好ましい態様において、サイトカインはIL-2である。

30

【0046】

本明細書で用いる場合、用語「ベクター」は、例えば形質転換のプロセスによって、ベクターが許容細胞内に配置された場合に複製することができるような、インタクトなレプリコンを含む非染色体性の核酸を指す。ベクターは、細菌などの1つの細胞タイプにおいて複製することができるが、哺乳動物細胞などの別の細胞では複製する能力が限られている。ベクターはウイルス性であっても、非ウイルス性であってもよい。核酸を送達するための例示的な非ウイルスベクターには、以下が含まれる：裸のDNA；単独でまたはカチオン性ポリマーとの組み合わせで、カチオン性脂質と複合体を形成したDNA；アニオン性およびカチオン性リポソーム；一部の場合にはリポソーム内に含まれる、異種ポリリシン、一定の長さのオリゴペプチド、およびポリエチレンイミンなどのカチオン性ポリマーで縮合したDNAを含むDNA-タンパク質複合体および粒子；ならびにウイルスとポリリシン-DNAを含む三元複合体の使用。

40

【0047】

本明細書で用いる場合、用語「標的とする」は、限定するものではないが、細胞内または細胞の外側の適切な目的地にタンパク質またはポリペプチドを方向付けることを含むことを意図する。ターゲティングは、典型的には、ポリペプチド鎖中の一続きのアミノ酸残基であるシグナルペプチドまたはターゲティングペプチドを介して達成される。こうしたシグナルペプチドは、ポリペプチド配列内のどこにでも位置することができるが、多くの場合はN末端に位置する。ポリペプチドは、C末端にシグナルペプチドを有するように操作することもできる。シグナルペプチドは、細胞外の区域、原形質膜への配置、ゴルジ、エ

50

ンドソーム、小胞体、その他の細胞内区画へポリペプチドを方向付けることができる。例えば、そのC末端に特定のアミノ酸配列(例えば、KDEL)を有するポリペプチドは、ER内腔に保留されるか、またはER内腔に送り返される。

【0048】

用語「自殺遺伝子」は、細胞の負の選択を可能にするものである。自殺遺伝子は安全システムとして用いられ、該遺伝子を発現する細胞を選択剤の導入によって死滅させることができる。これは、組換え遺伝子が制御不能な細胞増殖につながる突然変異を引き起こす場合に望ましい。いくつかの自殺遺伝子系が同定されており、それには、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ(TK)遺伝子、シトシンデアミナーゼ遺伝子、水痘帯状疱疹ウイルスチミジンキナーゼ遺伝子、ニトロレダクターゼ遺伝子、大腸菌(*Escherichia coli*)gp t遺伝子、および大腸菌(*E. coli*) Deo遺伝子が含まれる(さらに、例えば、Yazawa K, Fisher W E, Brunicardi F C: Current progress in suicide gene therapy for cancer. World J. Surg. 2002 July; 26(7):783-9を参照)。1つの態様において、自殺遺伝子は誘導性カスパー9(iCas9)である(Di Stasi, (2011) "Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy." N Engl J Med 365: 1673-1683。さらに、Morgan, "Live and Let Die: A New Suicide Gene Therapy Moves to the Clinic" Molecular Therapy(2012); 20: 11-13も参照)。TK遺伝子は、野生型または変異型TK遺伝子(例えば、tk30、tk75、sr39tk)であり得る。TKタンパク質を発現する細胞は、ガンシクロビルを用いて死滅させることができる。

10

20

30

【0049】

用語「患者」、「対象」、および「個体」などは、本明細書では互換的に用いられ、本明細書に記載の方法に適している任意の動物、またはインピトロもしくはインサイチューにかかわらずその細胞を指す。好ましい態様において、患者、対象、または個体は哺乳動物である。特定の好ましい態様において、患者、対象、または個体はヒトである。

20

【0050】

用語「処置する」または「処置」は、ヒトなどの対象における本明細書に記載の疾患または障害の処置に及び、(i)疾患または障害を抑制すること、すなわち、その発達を停止させること；(ii)疾患または障害を緩和すること、すなわち、障害の退縮を引き起こすこと；(iii)障害の進行を遅らせること；および/または(iv)疾患または障害の1つまたは複数の症状を抑制するか、緩和するか、またはその進行を遅らせることを含む。対象にモノクローナル抗体またはナチュラルキラー細胞を「投与する」または「投与」という用語は、意図した機能を果たすために該抗体または細胞を導入または送達する任意の経路を含む。投与は、該細胞または該モノクローナル抗体の送達に適したどのような経路で行ってよい。したがって、送達経路は、静脈内、筋肉内、腹腔内、または皮下送達を含み得る。いくつかの態様において、モノクローナル抗体および/またはNK-92細胞は、例えば腫瘍への注入によって、腫瘍に直接投与される。投与には自己投与および他者による投与が含まれる。

30

【0051】

本明細書で用いられる有効用量または有効量は、所望の作用(例えば、疾患を治療するまたは予防する)を生じる作用物質または該作用物質を含有する組成物の用量を意味する。ナノ粒子の正確な用量および製剤は処置の目的によって左右され、公知の技術を用いて当業者によって確かめられる(例えば、Lieberman, Pharmaceutical Dosage Forms(vols. 1-3, 1992); Lloyd, The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding (1999); Remington(2005); およびPickar, Dosage Calculations(9th edition)(1999)を参照)。例えば、所与のパラメーターに関して、治療的有効量は、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、40%、50%、60%、75%、80%、90%、または少なくとも100%の増大または減少を示す。治療有効性はまた、「-倍」の増大または減少として表すこともできる。例えば、治療的有効量は、標準的な対照に対して少なくとも1.2倍、1.5倍、2倍、5倍、またはそれを上回る効果を有し得る。治療的有効用量または治療的有効量は、疾患の1つまたは複数の症状を寛解させ得る。治療的有効用量または治療的有効量は、それが投与

40

50

される効果が疾患を発症するリスクがある人を処置するものである場合、疾患の発症または疾患の1つもしくは複数の症状を予防するまたは遅らせる可能性がある。

【0052】

本明細書で用いる場合、用語「抗体」は免疫グロブリンまたはその断片を指す。抗体はいずれかのタイプ(例えば、IgG、IgA、IgM、IgE、またはIgD)でありうる。好ましくは、抗体はIgGである。抗体は非ヒト(例えば、マウス、ヤギ、または任意の他の動物に由来)、完全ヒト、ヒト化、またはキメラであり得る。抗体はポリクローナルまたはモノクローナルであり得る。任意で、抗体はモノクローナルである。

【0053】

本明細書で用いる用語「モノクローナル抗体」は、培養中で成長しつゝ無限に増殖する能力がある細胞の单一クローンから産生される、純粋な標的特異的抗体を指す。使用され得るモノクローナル抗体には、がん性細胞上の抗原に付着してそれをブロックする裸の抗体が含まれる。1つの態様において、裸のモノクローナル抗体はアレムツズマブであり、これはリンパ球においてCD52抗原に結合する。また、使用され得るモノクローナル抗体には、タグ付けされた、標識された、または負荷された抗体などのコンジュゲート化モノクローナル抗体も含まれる。具体的には、抗体は、薬物もしくは毒素でタグ付けまたは負荷されるか、または放射性標識され得る。そのような抗体の例としては、限定するものではないが、CD20抗原を標的とするイブリツモマブ、CD30抗原を標的とするブレンツキシマブ、およびHER2タンパク質を標的とするトラスツズマブが挙げられる。使用され得る他のモノクローナル抗体は、リンパ腫細胞のCD19およびT細胞のCD3を標的とするブリナツモマブなどの二重特異性モノクローナル抗体である。

10

20

30

40

【0054】

本明細書で用いる場合、用語「抗体断片」は、エピトープを認識する抗体の任意の部分を指す。抗体断片はグリコシル化され得る。非限定的な例として、抗体断片は、Fab断片、Fab'断片、F(ab')2断片、Fv断片、rIgG断片、機能的抗体断片、前記の一本鎖組換え形態などであってもよい。F(ab')2、Fab、Fab'およびFvは、IgGおよびIgMの可変領域から作製することができる抗原結合断片である。それらはサイズ、原子価、およびFc含量の点で異なる。断片は、1つの細胞もしくは細胞株、または複数の細胞もしくは細胞株による構成物(例えば、重鎖部分および軽鎖部分)の発現を含む、任意の方法によって作製され得る。好ましくは、抗体断片は、エピトープを認識し、Fc受容体に結合する能力を有するような十分なFc領域の部分を含有する。

【0055】

本明細書で用いる場合、用語「がん」は、白血病、がん腫および肉腫を含む、哺乳動物で見出されるがん、新生物、または悪性腫瘍の全てのタイプを指す。例示的ながんとしては、脳、乳房、子宮頸部、結腸、頭頸部、肝臓、腎臓、肺、非小細胞肺、黒色腫、中皮腫、卵巣、肉腫、胃、子宮および髄芽腫のがんが挙げられる。さらなる例としては、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、多発性骨髄腫、神経芽腫、卵巣がん、横紋筋肉腫、原発性血小板増加症、原発性マクログロブリン血症、原発性脳腫瘍、がん、悪性胸膜間皮腫、悪性カルチノイド、膀胱がん、前がん皮膚病変、精巣がん、リンパ腫、甲状腺がん、神経芽腫、食道がん、泌尿生殖器がん、悪性高カルシウム血症、子宮内膜がん、副腎皮質がん、膵内分泌部および膵外分泌部の新生物、ならびに前立腺がんが挙げられる。

【0056】

表題または副題が、読む人の利便性のために本明細書において用いられる可能性があり、それらは本開示の範囲に影響を与えることを意図しない。加えて、本明細書で用いられる一部の用語は下記でより具体的に定義される。

【0057】

NK-92細胞

NK-92細胞株は、インターロイキン2(IL-2)の存在下で増殖することが発見された独特の細胞株である。Gong et al., Leukemia 8:652-658 (1994)。これらの細胞は、様々ながんに対して高い細胞溶解活性を有する。NK-92細胞株は、広範な抗腫瘍細胞傷害性を有する

50

均一ながん性NK細胞集団であり、増大後に予測可能な収量で得られる。第I相臨床試験ではその安全性プロファイルが確認されている。NK-92は非ホジキンリンパ腫に罹患している対象の血液中で発見され、その後、エクスピボで不死化された。NK-92細胞はNK細胞に由来するが、正常なNK細胞によって示される主な阻害性受容体を欠き、活性化受容体の大部分を保持する。しかしながら、NK-92細胞は正常な細胞を攻撃せず、また、ヒトにおいて容認できない免疫拒絶反応を誘発することもない。NK-92細胞株の特性解析は、WO 1998/49268および米国特許出願公開第2002-0068044号に記載されている。

【0058】

NK-92細胞株は、CD56^{bright}、CD2、CD7、CD11a、CD28、CD45、およびCD54表面マーカーを呈することが見出されている。さらに、それはCD1、CD3、CD4、CD5、CD8、CD10、CD14、CD16、CD19、CD20、CD23およびCD34マーカーを提示しない。培養中のNK-92細胞の成長は、組換えインターロイキン2(rIL-2)の存在に依存しており、1 IU/mL程度の低用量でも増殖を維持するのに十分である。IL-7およびIL-12は長期間の成長を支持せず、IL-1、IL-6、腫瘍壊死因子、インターフェロンおよびインターフェロンを含む、試験した他のサイトカイン類も支持しない。NK-92は、1:1の低いエフェクター：標的(E:T)比でさえも高い細胞傷害性を有する。Gong, et al., 前掲。NK-92細胞は、American Type Culture Collection (ATCC)にCRL-2407という名称で寄託されている。

10

【0059】

これまで、内因性NK細胞に関する研究によって、輸送中のNK細胞活性化にとってIL-2(1000 IU/mL)が重要であること、しかし該細胞を37かつ5%二酸化炭素で維持する必要はないことが示されている。Koepsell, et al., Transfusion 53:398-403 (2013)。

20

【0060】

改変NK-92細胞は公知であり、限定するものではないが、例えば、それらの全てが参照によりその全体が本明細書に組み入れられる、米国特許第7,618,817号、同第8,034,332号、および同第8,313,943号、米国特許出願公開第2013/0040386号に記載のもの、例えば、野生型NK-92、NK-92-CD16、NK-92-CD16-、NK-92-CD16-、NK-92-CD16(F157V)、NK-92mⁱおよびNK-92cⁱなどを含む。

【0061】

NK-92細胞は、NK細胞に関連する活性化受容体および細胞溶解経路のほぼ全てを保持するが、その細胞表面上にCD16を発現しない。CD16は、抗体のFc部分を認識してそれに結合し、抗体依存性細胞傷害(ADCC)に対してNK細胞を活性化する、Fc受容体である。CD16受容体が存在しないため、NK-92細胞はADCC機序を介して標的細胞を溶解することができず、したがって、内因性または外因性の抗体(すなわち、リツクスマブおよびハーセプチニン)の抗腫瘍作用を増強することができない。

30

【0062】

内因性NK細胞に関する研究は、輸送中のNK細胞活性化にとってIL-2(1000 IU/mL)が重要であること、しかし該細胞を37かつ5%二酸化炭素で維持する必要はないことを示している。Koepsell, et al., Transfusion 53:398-403 (2013)。しかしながら、主に、NK-92はがん由来細胞株であるのに対し内因性NK細胞はドナー(または患者)から収集され患者内への注入のために加工されているというそれらの細胞の起源の違いのために、内因性NK細胞はNK-92細胞とで著しく異なっている、内因性NK細胞調製物は不均一な細胞集団であるのに対して、NK-92細胞は均一なクローン細胞株である。NK-92細胞は、細胞傷害性を維持しながら培養中で容易に増殖するのに対して、内因性NK細胞はそうではない。加えて、NK細胞の内因性の不均一な集団は高密度で凝集しない。さらに内因性NK細胞は、NK-92細胞によって発現されないCD-16受容体を含む、Fc受容体を発現する。

40

【0063】

Fc受容体

Fc受容体は抗体のFc部分に結合する。いくつかのFc受容体が知られており、それらは、その好ましいリガンド、親和性、発現、および抗体への結合後の効果によって相違する。

【0064】

50

(表1) 例示的なFc受容体

受容体名	主な抗体リガンド	リガンドに対する親和性	細胞分布	抗体への結合後の作用	
Fc γ RI (CD64)	IgG1 および IgG3	高 (Kd 約 10^{-9} M)	マクロファージ 好中球 好酸球 樹状細胞	食作用 細胞活性化 レスピラトリーバーストの活性化 微生物死滅の誘導	10
Fc γ RIIA (CD32)	IgG	低 (Kd > 10^{-7} M)	マクロファージ 好中球 好酸球 血小板 ランゲルハンス細胞	食作用 脱顆粒(好酸球)	
Fc γ RIIB1 (CD32)	IgG	低 (Kd > 10^{-7} M)	B細胞 肥満細胞	食作用なし 細胞活性の阻害	20
Fc γ RIIB2 (CD32)	IgG	低 (Kd > 10^{-7} M)	マクロファージ 好中球 好酸球	食作用 細胞活性の阻害	
Fc γ RIIIA (CD16a)	IgG	低 (Kd > 10^{-6} M)	NK細胞 マクロファージ (ある特定の組織)	抗体依存性細胞媒介性 細胞傷害の誘導 (ADCC) マクロファージによる サイトカイン放出の誘導	30
Fc γ RIIIB (CD16b)	IgG	低 (Kd > 10^{-6} M)	好酸球 マクロファージ 好中球 肥満細胞 濾胞樹状細胞	微生物死滅の誘導	
Fc ϵ RI	IgE	高 (Kd 約 10^{-10} M)	肥満細胞 好酸球 好塩基球 ランゲルハンス細胞 单球	脱顆粒 食作用	40
Fc ϵ RII (CD23)	IgE	低 (Kd > 10^{-7} M)	細胞 好酸球 ランゲルハンス細胞	推定接着分子 ヒト腸上皮を横断する IgE輸送 アレルギー感作を 増強する正の フィードバック機構 (B細胞)	50

FcαRI (CD89)	IgA	低 (Kd > 10^{-6} M)	単球 マクロファージ 好中球 好酸球	食作用 微生物死滅の誘導
Fcα/μR	IgA および IgM	IgMに 対して 高、 IgAに 対して 中	B 細胞 メサンギウム細胞 マクロファージ	エンドサイトーシス 微生物死滅の誘導
FcRn	IgG		単球 マクロファージ 樹状細胞 上皮細胞 内皮細胞 肝細胞	胎盤を通じて母体から 胎児に IgG を移動させる 乳汁において母体から 乳児に IgG を移動させる IgG を分解から保護する

10

20

30

40

50

【 0 0 6 5 】

いくつかの態様において、NK-92細胞は、細胞表面上にFc受容体タンパク質を発現するよう改変される。

【 0 0 6 6 】

いくつかの態様において、Fc受容体はCD16である。本開示の目的において、CD16の特定のアミノ酸残基は、SEQ ID NO:2を基準にして、またはSEQ ID NO:2と比べて1つの位置で異なるSEQ ID NO:1を基準にして指定される。したがって、CD16ポリペプチドの「158位」のアミノ酸残基は、CD16ポリペプチドとSEQ ID NO:2を最大限にアライメントさせた場合の、SEQ ID NO:2(またはSEQ ID NO:1)の158位に対応するアミノ酸残基である。いくつかの態様において、NK-92細胞は、成熟形態のこのタンパク質の158位にフェニルアラニンを有するヒトCD16、例えばSEQ ID NO:1を発現するよう改変される。典型的な態様において、NK-92細胞は、成熟形態のこのタンパク質の158位にバリンを有するヒトCD16の高親和性形態、例えばSEQ ID NO:2を発現するよう改変される。成熟タンパク質の158位は、天然のシグナルペプチドを含むCD16配列の176位に対応する。いくつかの態様において、CD16ポリペプチドは、SEQ ID NO:3またはSEQ ID NO:4の前駆体(すなわち、天然のシグナルペプチドを有する)ポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチドによってコードされる。

【 0 0 6 7 】

いくつかの態様において、CD16ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、完全長CD16の176位(成熟CD16タンパク質の158位に対応する)にフェニルアラニンを有する、シグナルペプチドを含む完全長の天然に生じるCD16をコードするポリヌクレオチド配列と少なくとも約70%のポリヌクレオチド配列同一性を有する。いくつかの態様において、CD16ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、176位(成熟タンパク質の158位に対応する)にバリンを有する、シグナルペプチドを含む完全長の天然に生じるCD16をコードするポリヌクレオチド配列と少なくとも約70%のポリヌクレオチド配列同一性を有する。いくつかの態様において、CD16をコードするポリヌクレオチドは、SEQ ID NO:5と少なくとも70%の同一性を有し、かつシグナルペプチドを含む完全長のCD16ポリペプチドの176位をコードするポリヌクレオチドの位置にバリンをコードするコドンを含む。いくつかの態様において、CD16をコードするポリヌクレオチドは、SEQ ID NO:5と少なくとも90%の同一性を有し、かつ完全長CD16の176位にバリンをコードするコドンを含む。いくつかの態様において、CD16をコードするポリヌクレオチドは、SEQ ID NO:5を含むが、完全長CD16の176位にバリンをコードするコドンを有する。

【 0 0 6 8 】

いくつかの態様において、CD16ポリヌクレオチドは、SEQ ID NO:1またはSEQ ID NO:2に対して少なくとも70%、80%、90%または95%の同一性を有するポリペプチドをコードする。いくつかの態様において、該ポリヌクレオチドは、SEQ ID NO:2に対して少なくとも70%の同一性または少なくとも80%の同一性を有するポリペプチドをコードし、かつSEQ ID NO:2を基準にして決定される158位にバリンを含む。いくつかの態様において、該ポリヌクレオチドは、SEQ ID NO:2に対して少なくとも90%の同一性を有するポリペプチドをコードし、かつSEQ ID NO:2を基準にして決定される158位にバリンを含む。いくつかの態様において、該ポリヌクレオチドは、SEQ ID NO:2に対して少なくとも95%の同一性を有するポリペプチドをコードし、かつSEQ ID NO:2を基準にして決定される2位にバリンを含む。いくつかの態様において、該ポリヌクレオチドはSEQ ID NO:2をコードする。いくつかの態様において、CD16ポリヌクレオチドは、シグナル配列を有するまたは有さないCD16の細胞外ドメイン、または完全長CD16の任意の他の断片、または、別のタンパク質のアミノ酸配列に融合されたCD16の少なくとも部分配列を包含するキメラ受容体をコードする。他の態様において、エピトープタグペプチド、例えば、FLAG、myc、ポリヒスチジンまたはV5などは、成熟ポリペプチドのアミノ末端ドメインに付加され、抗エピトープタグペプチドモノクローナルまたはポリクローナル抗体を用いることによって細胞表面検出を助けることができる。

10

【0069】

いくつかの態様において、700個超から800個のポリヌクレオチドを有するCD16バリアントが本開示の範囲内であるが、相同CD16ポリヌクレオチドは、約150から約700、約750、または約800ポリヌクレオチドの長さであってもよい。

20

【0070】

相同ポリヌクレオチド配列には、CD16のバリアントをコードするポリペプチド配列をコードするものが含まれる。相同ポリヌクレオチド配列には、SEQ ID NO:5に関連した天然に生じる対立遺伝子変種も含まれる。SEQ ID NO:1もしくはSEQ ID NO:2のいずれかに示されるアミノ酸配列、その天然に生じるバリアント、またはSEQ ID NO:1もしくはSEQ ID NO:2と少なくとも70%同一または少なくとも80%、90%、もしくは95%同一である配列を有するポリペプチドをコードする任意のポリヌクレオチドによるNK-92細胞のトランスフェクションは、本開示の範囲内である。いくつかの態様において、相同ポリヌクレオチド配列は、SEQ ID NO:1またはSEQ ID NO:2における保存的アミノ酸置換をコードする。いくつかの態様において、NK-92細胞は、天然のポリヌクレオチド配列とは異なるが同じポリペプチドをコードする、縮重している相同CD16ポリヌクレオチド配列を用いてトランスフェクトされる。

30

【0071】

他の例では、CD16アミノ酸配列を変更する多型を有するcDNA配列が、例えば、CD16遺伝子において遺伝的多型を呈する個体間の対立遺伝子変種などのNK-92細胞を改変するために用いられる。他の例では、SEQ ID NO:5の配列とは異なるポリヌクレオチド配列を有する他の種由来のCD16遺伝子が、NK-92細胞を改変するために用いられる。

【0072】

いくつかの例では、バリアントポリペプチドは、オリゴヌクレオチド媒介性(部位特異的)変異誘発、アラニンスキャニング、およびPCR変異誘発などの当技術分野において公知の方法を用いて作製される。部位特異的変異誘発(Carter, 1986; Zoller and Smith, 1987)、カセット変異導入、制限選択変異誘発(restriction selection mutagenesis)(Wells et al., 1985)または他の公知の技術を、クローニングされたDNAに対して実施して、CD16バリアントを生じさせることができる(Ausubel, 2002; Sambrook and Russell, 2001)。

40

【0073】

いくつかの態様において、CD16をコードするポリヌクレオチドは、CD16の機能を変えることなく、CD16をコードするアミノ酸配列を変更するように変異される。例えば、「非必須」アミノ酸残基でのアミノ酸置換をもたらすポリヌクレオチド置換をSEQ ID NO:1またはSEQ ID NO:2において行うことができる。

50

【0074】

あるクラスのアミノ酸が同じクラスの別のアミノ酸と置換される、SEQ ID NO:1またはSEQ ID NO:2での保存的置換は、該置換がポリペプチドの活性を実質的に変更しない限り、開示されたCD16バリアントの範囲内に入る。保存的置換は当業者に周知である。(1)ポリペプチド骨格の構造、例えば、シートまたはヘリックスコンフォメーション、(2)電荷、(3)疎水性、または(4)標的部位の側鎖の嵩高さ、に影響を及ぼす非保存的置換は、CD16ポリペプチドの機能または免疫学的独自性を変更する可能性がある。非保存的置換は、これらのクラスのうちの1つのあるメンバーを別のクラスに交換することを伴う。置換は、保存的置換部位に、より好ましくは非保存部位に、導入され得る。

【0075】

いくつかの態様において、CD16ポリペプチドバリアントは、少なくとも200アミノ酸長であり、SEQ ID NO:1またはSEQ ID NO:2に対して少なくとも70%のアミノ酸配列同一性、または少なくとも80%、または少なくとも90%の同一性を有する。いくつかの態様において、CD16ポリペプチドバリアントは、少なくとも225アミノ酸長であり、SEQ ID NO:1またはSEQ ID NO:2に対して少なくとも70%のアミノ酸配列同一性、または少なくとも80%、または少なくとも90%の同一性を有する。いくつかの態様において、CD16ポリペプチドバリアントは、SEQ ID NO:2を基準に決定される158位にバリンを有する。

【0076】

いくつかの態様において、CD16ポリペプチドをコードする核酸は、CD16融合タンパク質をコードし得る。CD16融合ポリペプチドは、非CD16ポリペプチドと融合したCD16の任意の部分またはCD16全体を含む。融合ポリペプチドは組換え法を用いて簡便に作製される。例えば、SEQ ID NO:1またはSEQ ID NO:2などのCD16ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、非CD16コードポリヌクレオチド(例えば、異種タンパク質のシグナルペプチドをコードするポリヌクレオチド配列)とインフレームで融合される。いくつかの態様において、異種ポリペプチド配列がCD16のC末端に融合された、またはCD16の内部に位置付けられた、融合ポリペプチドが作製され得る。典型的には、CD16細胞質ドメインの約30%までを置き換えることができる。こうした改変は、発現を増強するか、または細胞傷害性(例えば、ADCC応答性)を高めることができる。他の例では、キメラタンパク質、例えばIg-a、Ig-B、CD3-e、CD3-d、DAP-12およびDAP-10を含むがこれらに限定されない、他のリンパ球活性化受容体由来のドメインが、CD16細胞質ドメインの一部に置き換わる。

【0077】

融合遺伝子は、従来の技術によって合成することができ、従来の技術には、その後にアニーリングおよび再增幅されキメラ遺伝子配列を生成することができる、2つの連続した遺伝子断片の間に相補的オーバーハングを生じるアンカープライマー用いる自動DNA合成装置およびPCR増幅が含まれる(Ausubel, 2002)。融合部分にインフレームでCD16をサブクローニングすることを容易にする、多くのベクターが商業的に入手可能である。

【0078】

キメラ抗原受容体

本明細書に記載される場合、NK-92細胞は、細胞表面上にキメラ抗原受容体(CAR)を発現するようにさらに操作される。任意で、CARは腫瘍特異的抗原に特異的である。腫瘍特異的抗原は、それらのそれぞれが参照によりその全体が本明細書に組み入れられる、US 2013/0189268 ; WO 1999024566 A1 ; US 7098008 ; およびWO 2000020460 A1に、非限定的な例として、記載される。腫瘍特異的抗原には、限定するものではないが、NKG2D、CS1、GD2、CD138、EpCAM、EBNA3C、GPA7、CD244、CA-125、ETA、MAGE、CAGE、BAGE、HAGE、LAGE、PAGE、NY-SEO-1、GAGE、CEA、CD52、CD30、MUC5AC、c-Met、EGFR、FAB、WT-1、PSMA、NY-ESO1、AFP、CEA、CTAG1B、CD19およびCD33が含まれる。さらなる非限定的な腫瘍関連抗原、およびそれに関連する悪性腫瘍は表1に見出すことができる。

【0079】

(表1)腫瘍特異的抗原および関連する悪性腫瘍

10

20

30

40

標的抗原	関連する悪性腫瘍
α 葉酸受容体	卵巣がん
CAIX	腎細胞がん
CD19	B細胞悪性腫瘍 慢性リンパ性白血病 (CLL) B細胞 CLL (B-CLL)
	急性リンパ芽球性白血病 (ALL) ; 造血幹細胞移植 (HSCT) 後の ALL
	リンパ腫；治療抵抗性濾胞性リンパ腫； B細胞非ホジキンリンパ腫 (B-NHL)
	白血病
	HSCT 後の B 細胞悪性腫瘍
	臍帶血移植 (UCBT) 後の B 系統リンパ性悪性腫瘍
CD19/CD20	リンパ芽球性白血病
CD20	リンパ腫
	B細胞悪性腫瘍
	B細胞リンパ腫
	マントル細胞リンパ腫
	低悪性度 B-NHL
	白血病
CD22	B細胞悪性腫瘍

10

20

CD30	リンパ腫；ホジキンリンパ腫
CD33	AML
CD44v7/8	子宮頸がん
CD138	多発性骨髄腫
CD244	神経芽腫
CEA	乳がん
	結腸直腸がん
CS1	多発性骨髄腫
EBNA3C	EBV陽性T細胞
EGP-2	多発性悪性腫瘍
EGP-40	結腸直腸がん
EpCAM	乳がん
Erb-B2	結腸直腸がん
	乳がんなど
	前立腺がん
Erb-B 2,3,4	乳がんなど
FBP	卵巣がん
胎児アセチルコリン受容体	横紋筋肉腫
GD2	神経芽腫
GD3	黒色腫
GPA7	黒色腫
Her2	乳がん
	卵巣がん
	上皮起源の腫瘍
Her2/新規	髓芽腫
	肺悪性腫瘍
	進行骨肉腫
	膠芽腫
IL-13R-a2	神経膠腫
	膠芽腫
	髓芽腫
KDR	腫瘍血管新生
κ 軽鎖	B細胞悪性腫瘍
	B-NHL, CLL
LeY	がん腫
	上皮由来の腫瘍
L1細胞接着分子	神経芽腫
MAGE-A1	黒色腫
メソセリン	種々の腫瘍
MUC1	乳がん；卵巣がん
NKG2Dリガンド	種々の腫瘍
がん胎児性抗原(h5T4)	種々の腫瘍
PSCA	前立腺
PSMA	前立腺/腫瘍血管新生
mAb IgEにより標的とされるTAA	種々の腫瘍
TAG-72	腺がん
VEGF-R2	腫瘍血管新生

10

20

30

40

【 0 0 8 0 】

いくつかの態様において、CARはCD19、CD33、またはCSPG-4を標的とする。CD19、CD33およびCSPG-4 CARの代表的なポリヌクレオチドおよびポリペプチド配列は、SEQ ID NO:8(

50

CD19 CARポリヌクレオチド)、SEQ ID NO:9(CD19 CARポリペプチド)、SEQ ID NO:10(CD33 CARポリヌクレオチド)、SEQ ID NO:11(CD33 CARポリペプチド)、SEQ ID NO:12(CSPG-4 CARポリヌクレオチド)、およびSEQ ID NO:13(CSPG-4 CARポリペプチド)において提供される。いくつかの態様において、CD19 CARポリヌクレオチドはSEQ ID NO:9に対して少なくとも70%、80%、90%、または95%の同一性を有するポリペプチドをコードする。任意で、CD19 CARポリペプチドはSEQ ID NO:9に対して少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、または99%の同一性を有する。いくつかの態様において、CD33 CARポリヌクレオチドはSEQ ID NO:11に対して少なくとも70%、80%、90%、または95%の同一性を有するポリペプチドをコードする。任意で、CD33 CARポリペプチドはSEQ ID NO:11に対して少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、または99%の同一性を有する。いくつかの態様において、CSPG-4 CARポリヌクレオチドはSEQ ID NO:13に対して少なくとも70%、80%、90%、または95%の同一性を有するポリペプチドをコードする。任意で、CSPG-4 CARポリペプチドはSEQ ID NO:13に対して少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、または99%の同一性を有する。いくつかの態様において、エピトープタグペプチド、例えばFLAG、myc、ポリヒスチジン、またはV5等は、ポリペプチドのアミノ末端ドメインに附加され、抗エピトープタグペプチドモノクローナルまたはポリクローナル抗体を用いることによって細胞表面検出を助けることができる。

10

【0081】

いくつかの例では、バリアントポリペプチドは、オリゴヌクレオチド媒介性(部位特異的)変異誘発、アラニンスキャニング、およびPCR変異誘発などの当技術分野において公知の方法を用いて作製される。部位特異的変異誘発(Carter, 1986; Zoller and Smith, 1987)、カセット変異導入、制限選択変異誘発(restriction selection mutagenesis)(Wells et al., 1985)または他の公知の技術を、クローニングされたDNAに対して実施して、CD16バリアントを生じさせることができる(Ausubel, 2002; Sambrook and Russell, 2001)。

20

【0082】

いくつかの態様において、CARをコードするポリヌクレオチドは、CARの機能を変えることなく、CARをコードするアミノ酸配列を変更するように変異される。例えば、「非必須」アミノ酸残基でのアミノ酸置換をもたらすポリヌクレオチド置換をSEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11またはSEQ ID NO:13において行うことができる。

30

【0083】

あるクラスのアミノ酸が同じクラスの別のアミノ酸と置換される、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11またはSEQ ID NO:13での保存的置換は、該置換がポリペプチドの活性を実質的に変更しない限り、開示されたバリアントの範囲内に入る。保存的置換は当業者に周知である。(1)ポリペプチド骨格の構造、例えば、シートまたはヘリックスコンフォメーション、(2)電荷、(3)疎水性、または(4)標的部位の側鎖の嵩高さ、に影響を及ぼす非保存的置換は、ポリペプチドの機能または免疫学的独自性を変更する可能性がある。非保存的置換は、これらのクラスのうちの1つのあるメンバーを別のクラスに交換することを伴う。置換は、保存的置換部位に、より好ましくは非保存部位に、導入され得る。

【0084】

任意で、CARは特定のがんの種類に関連する抗原を標的とする。任意で、がんは、白血病(急性白血病(例えば、急性リンパ性白血病、急性骨髓性白血病(骨髓芽球性、前骨髓球性、骨髓单球性、单球性、および赤白血病を含む)を含む)および慢性白血病(例えば、慢性骨髓性(颗粒球性)白血病および慢性リンパ性白血病)、真性多血症、リンパ腫(例えば、ホジキン病および非ホジキン病)、多発性骨髓腫、ワルデンストレーム高ガンマグロブリン血症、重鎖病、これらに限定されないが、例えば、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫(lymphangioendothelioma)、滑膜種、中皮腫、ユーリング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸がん、肺腺がん、乳がん、卵巣がん、前立腺がん、扁平上皮がん、基底細胞がん、腺がん、汗腺がん、脂腺がん、乳頭がん、乳頭状腺がん、囊胞腺がん、髄様がん、気管支原性肺がん、腎細胞がん、肝細胞がん、胆管がん、絨毛がん、精上皮種、胚性がん腫、ウ

40

50

イルムス腫瘍、子宮頸がん、精巣腫瘍、肺がん、小細胞肺がん、膀胱がん、上皮がん、神経膠腫、星細胞腫、髄芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣腫、松果体腫、血管芽細胞腫、聽神経腫瘍、乏突起神経膠腫、髄膜腫、黒色腫、神経芽腫および網膜芽細胞腫などの肉腫およびがん腫を含む、 固形腫瘍からなる群より選択される。

【0085】

CARは、例えば、それらのそれが参照によりその全体が本明細書に組み入れられる、特許公報番号WO 2014039523; 同US 20140242701; 同US 20140274909; 同US 20130280285; および同WO 2014099671等に記載のように操作することができる。任意で、CARはCD19 CAR、CD33 CARまたはCSPG-4 CARである。

【0086】

さらなる改変 - サイトカイン

NK-92細胞の細胞傷害性は、サイトカイン(例えば、インターロイキン-2 (IL-2))の存在に依存する。商業規模の培養でNK-92細胞を維持しつつ増大させるために必要とされるIL-2を外部から加えて使用するには、かなりのコストがかかる。NK92細胞の活性化を継続するのに十分な量でのヒト対象へのIL-2の投与は有害な副作用を引き起こすおそれがある。

【0087】

いくつかの態様において、FcR発現NK-92細胞は、少なくとも1種のサイトカインおよび自殺遺伝子を発現するようにさらに改変される。特定の態様において、少なくとも1種のサイトカインは、IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21またはそのバリエントである。好ましい態様において、サイトカインはIL-2(SEQ ID NO:6)である。ある特定の態様において、IL-2は小胞体を標的とするバリエントであり、自殺遺伝子はiCas9である。

【0088】

1つの態様において、IL-2は、IL-2を小胞体に指向させるシグナル配列と共に発現される。いくつかの態様において、IL-2をコードするポリヌクレオチドは、SEQ ID NO:7の配列を有するポリペプチドをコードする。理論に拘束されるものではないが、IL-2を小胞体に指向させることによって、細胞外にIL-2を放出することなく、自己分泌活性化に十分なレベルでのIL-2の発現が可能になる。Konstantinidis et al "Targeting IL-2 to the endoplasmic reticulum confines autocrine growth stimulation to NK-92 cells" Exp Hematol. 2005 Feb;33(2):159-64を参照されたい。FcR発現NK-92細胞の連続的な活性化は、例えば自殺遺伝子の存在によって、防止することができる。

【0089】

さらなる改変 - 自殺遺伝子

用語「自殺遺伝子」は、細胞の負の選択を可能にするものである。自殺遺伝子は安全システムとして用いられ、該遺伝子を発現する細胞を選択剤の導入によって死滅させることができる。これは、組換え遺伝子が制御不能な細胞増殖につながる突然変異を引き起こす場合に望ましい。いくつかの自殺遺伝子系が同定されており、それらには、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ(TK)遺伝子、シトシンデアミナーゼ遺伝子、水痘帶状疱疹ウイルスチミジンキナーゼ遺伝子、ニトロレダクターゼ遺伝子、大腸菌gpt遺伝子、および大腸菌Deo遺伝子が含まれる(さらに、例えば、Yazawa K, Fisher W E, Brunnicardi F C: Current progress in suicide gene therapy for cancer. World J. Surg. 2002 July; 26(7):783-9を参照)。本明細書で用いる場合、自殺遺伝子はNK-92細胞において活性がある。典型的には、自殺遺伝子は、細胞に対して悪影響を有さないが、特定の化合物の存在下で細胞を死滅させる、タンパク質をコードする。したがって、自殺遺伝子は典型的には系の一部である。

【0090】

1つの態様において、自殺遺伝子はチミジンキナーゼ(TK)遺伝子である。TK遺伝子は野生型または変異型TK遺伝子(例えば、tk30、tk75、sr39tk)であり得る。TKタンパク質を発現する細胞はガンシクロビルを用いて死滅させることができる。

【0091】

別の態様において、自殺遺伝子はシトシンデアミナーゼであり、これは5-フルオロシト

10

20

30

40

50

シンの存在下で細胞に対して毒性である。Garcia-Sanchez et al. "Cytosine deaminase adenoviral vector and 5-fluorocytosine selectively reduce breast cancer cells 1 million-fold when they contaminate hematopoietic cells: a potential purging method for autologous transplantation." Blood 1998 Jul 15;92(2):672-82。

【0092】

別の態様において、自殺遺伝子は、イホスファミドまたはシクロホスファミドの存在下で毒性であるシトクロムP450である。例えば、Touati et al. "A suicide gene therapy combining the improvement of cyclophosphamide tumor cytotoxicity and the development of an anti-tumor immune response." Curr Gene Ther. 2014;14(3):236-46を参考されたい。

10

【0093】

別の態様において、自殺遺伝子はiCas9である。Di Stasi,(2011) "Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy." N Engl J Med 365: 1673-1683。さらに、Morgen, "Live and Let Die: A New Suicide Gene Therapy Moves to the Clinic" Molecular Therapy(2012); 20: 11-13を参考されたい。iCas9タンパク質は、低分子AP1903の存在下でアポトーシスを誘導する。AP1903は生物学的に不活性な低分子であり、臨床試験において耐容性良好であることが示されており、養子細胞療法の状況において使用されている。

【0094】

1つの態様において、改変NK-92細胞は、患者への投与に先だって照射される。NK-92細胞の照射は、例えば、米国特許第8,034,332号に記載されており、これはその全体が参考により本明細書に組み入れられる。1つの態様において、自殺遺伝子を発現するように操作されていない改変NK-92細胞が照射される。

20

【0095】

トランスジーン発現

トランスジーン(例えば、CD19 CARおよびCD16)は、当業者に公知の任意の機序によって発現ベクター内に操作され得る。トランスジーンは同じ発現ベクターまたは異なる発現ベクター内に操作され得る。好ましい態様において、トランスジーンは同じベクター内に操作される。

30

【0096】

いくつかの態様において、ベクターは、細胞のゲノム内へのトランスジーンの取り込みを可能にする。いくつかの態様において、ベクターは正の選択マーカーを有する。正の選択マーカーには、その遺伝子を発現しない細胞を死滅させる条件下で細胞を成長させることができる任意の遺伝子が含まれる。非限定的な例として、抗生物質耐性、例えば、ジエネテシン(Tn5由来のNeo遺伝子)が含まれる。

【0097】

任意の数のベクターが、Fc受容体および/CARを発現するために用いられる。いくつかの態様において、ベクターはプラスミドである。1つの態様において、ベクターはウイルスベクターである。ウイルスベクターには、限定するものではないが、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、単純ヘルペスウイルスベクター、およびポックスウイルスベクターなどが含まれる。

40

【0098】

トランスジーンは、非限定的な例として、感染、エレクトロポレーション、リポフェクション、ヌクレオフェクション、または「遺伝子銃」を含む、当技術分野において公知の任意のトランスフェクション法を用いて、NK-92細胞内に導入することができる。

【0099】

抗体

任意で、抗体は、がん性細胞またはがん関連マーカーを発現する細胞を標的とするように用いられる。いくつかの抗体は、単独で、がんの処置に承認されている。

【0100】

50

(表2) FDA承認治療用モノクローナル抗体の例

抗体	商標名	会社	標的	適用 (標的疾患)
アレムツズマブ	キャンパス (登録商標)	Genzyme	CD52	慢性リンパ性白血病
ブレンツキシマブ ベドチン	アドセトリス (登録商標)		CD30	未分化大細胞リンパ腫 (ALCL) および ホジキンリンパ腫
セツキシマブ	アービタックス (登録商標)	Bristol-Myers Squibb/Eli Lilly/Merck KGaA	上皮成長因子受容体	結腸直腸がん、 頭頸部がん
ゲムツズマブ	マイロターグ (登録商標)	Wyeth	CD33	急性骨髓性白血病 (カリチアマイシンを 用いる)
イブリツモマブ チウキセタン	ゼヴァリン (登録商標)	Spectrum Pharmaceutical s, Inc.	CD20	非ホジキンリンパ腫 (イットリウム-90または インジウム-111を用いる)
イピリムマブ(MD X-101)	ヤーボイ (登録商標)		CTLA-4をブロックする	黒色腫
オファツムマブ	アーゼラ (登録商標)		CD20	慢性リンパ性白血病
パリビズマブ	シナジス (登録商標)	Modimmune	RSV Fタンパク質 のエピトープ	呼吸器多核体ウイルス
パニツムマブ	ベクティビックス (登録商標)	Agen	上皮成長因子受容体	結腸直腸がん
リツキシマブ	リツキサン (登録商標)、 マブセラ (登録商標)	Biogen Idec/Genentech	CD20	非ホジキンリンパ腫
トシツモマブ	ベキサール (登録商標)	GlaxoSmithKli ne	CD20	非ホジキンリンパ腫
トラスツズマブ	ハセヂ chin(登録商標)	Genentech	ErbB2	乳がん

ブリナツモマブ			二重特異性 CD19指向性CD3 T細胞結合体	フィラデルフィア染色体 陰性の再発性または 難治性B細胞前駆体 急性リンパ芽球性白血病 (ALL)
アベルマブ			抗PD-L1	転移性または局所進行性の 固形腫瘍を含む、 非小細胞肺がん、 転移性メルケル細胞がん、 胃がん、乳がん、 卵巣がん、膀胱がん、 黒色腫、中皮腫
ダラツムマブ			CD38	多発性骨髄腫
エロツズマブ			SLAMF7指向性 (CD319としても公知) 免疫賦活性抗体	多発性骨髄腫

10

20

30

40

50

【0101】

抗体はいくつかの機序を通じてがんを処置し得る。抗体依存性細胞傷害(ADCC)は、NK細胞などの免疫細胞がCD16などのFc受容体を通じて標的細胞に結合する抗体に結合した場合に起こる。

【0102】

したがって、いくつかの態様において、CD16および/またはCARを発現するNK-92細胞は、例えば、アレムツズマブ、ベバシズマブ(bevacizumab)、イブリツモマブ チウキセタン、オファツムマブ(ofatumumab)、リツキシマブ、およびトラスツズマブなどの、特異的がん関連タンパク質に対する少なくとも1種のモノクローナル抗体の有効量と一緒に患者に投与される。いくつかの態様において、モノクローナル抗体は、裸のモノクローナル抗体、コンジュゲートされたモノクローナル抗体または二重特異性モノクローナル抗体である。1つの態様において、がん細胞に結合しさらにはNK-92細胞の表面上に存在する細胞表面タンパク質にも結合する二重特異性抗体を用いることができる。

10

【0103】

がん特異的抗体は、がん細胞の表面上に発現される特定のタンパク質抗原に結合する。NK-92細胞は、該NK-92細胞表面に抗体が会合するよう改変することができる。好ましい態様において、抗体はがんに特異的である。この方法では、NK-92細胞はがんを特異的に標的とすることができます。中和抗体もまた単離され得る。例えば、分泌型糖タンパク質、YKL-40はヒト進行がんの複数の種類で上昇する。YKL-40に対する抗体を用いて腫瘍成長、血管新生および/または転移を抑制できることが考えられる。Faibish et al., (2011) Mol. Cancer Ther. 10(5):742-751。

20

【0104】

抗体は、NK-92細胞の投与と併用して投与することができる。処置すべきがんに特異的な抗体は、NK-92細胞の投与前に、それと同時に、および/またはその後に投与することができる。

【0105】

がんに対する抗体は市販の供給元から購入することができるか、または当技術分野に公知の任意の方法によって产生することができる。例えば、抗体は、以前にがんに罹り回復したまたはサンプル採取時に回復中であった1人または複数人の患者由来のB細胞、骨髄、または他のサンプルを入手することによって产生することができる。これらのサンプルから抗体(例えば、モノクローナル抗体)を同定し、スクリーニングし、かつ増大させる方法は知られている。例えば、ファージディスプレイライブラリが、サンプルまたは関心対象の細胞からRNAを単離すること、単離されたRNAからcDNAを調製すること、cDNAを重鎖および/または軽鎖cDNAについて濃縮すること、およびファージディスプレイベクターを用いてライブラリを作出することによって作製することができる。ライブラリは、例えば、その全体が参照により本明細書に組み入れられる、Maruyama, et al. に記載のように、調製およびスクリーニングすることができる。抗体は、組換え法または任意の他の方法によって作製することができる。ヒトモノクローナル抗体の単離、スクリーニング、特性解析、および产生は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる、Beerli, et al., PNAS (2008) 105(38):14336-14341にも記載されている。

30

【0106】

処置

本明細書に記載された改変NK-92細胞で患者を処置する方法も提供される。1つの態様において、患者はがんを患っていて、NK-92細胞によって発現されたCARはそのがんの表面上に発現された抗原に特異的である。NK-92は、そのがんの表面上に発現された抗原に特異的なCARに加えて、Fc受容体を発現する(すなわち、NK-92-Fc-CAR)。例えば、NK-92細胞は、その細胞表面上にCD16およびMAGEを発現することができる(すなわち、NK-92-CD16-MAGE)。任意で、患者は改変NK92細胞さらには抗体を用いて処置される。

40

【0107】

NK-92細胞は個体に細胞の絶対数で投与することができ、例えば、前記個体は、約1000

50

個の細胞/注入から最大で約100億個の細胞/注入まで、例えば1回の注入につき約、少なくとも約、または多くても約 1×10^8 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^3 、 5×10^3 個(など)のNK-92細胞、またはいずれか2つの数字間の端点を含む任意の範囲を投与され得る。

【0108】

他の態様において、前記個体は、約1000個の細胞/注入/ m^2 から最大で約100億個の細胞/注入/ m^2 まで、例えば1回の注入につき約、少なくとも約、または多くても約 $1 \times 10^8/m^2$ 、 $1 \times 10^7/m^2$ 、 $5 \times 10^7/m^2$ 、 $1 \times 10^6/m^2$ 、 $5 \times 10^6/m^2$ 、 $1 \times 10^5/m^2$ 、 $5 \times 10^5/m^2$ 、 $1 \times 10^4/m^2$ 、 $5 \times 10^4/m^2$ 、 $1 \times 10^3/m^2$ 、 $5 \times 10^3/m^2$ (など)のNK-92細胞、またはいずれか2つの数字間の端点を含む任意の範囲を投与され得る。

10

【0109】

他の態様において、NK-92細胞はそのような個体に細胞の相対数で投与することができ、例えば、前記個体は、個体1キログラムあたり約1000個の細胞から最大で約100億個の細胞まで、例えば個体1キログラムあたり約、少なくとも約、または多くても約 1×10^8 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^3 、 5×10^3 個(など)のNK-92細胞、またはいずれか2つの数字間の端点を含む任意の範囲を投与され得る。

【0110】

他の態様において、総用量は、体表面積の m^2 によって算出することができ、 $1 m^2$ あたり約 1×10^{11} 、 1×10^{10} 、 1×10^9 、 1×10^8 、 1×10^7 、またはいずれか2つの数字間の端点を含む任意の範囲を含む。平均的な人は約 $1.6 m^2$ から約 $1.8 m^2$ である。好ましい態様において、約10億個から約30億個のNK-92細胞が患者に投与される。他の態様において、1用量につき注入されるNK-92細胞の量は体表面積の m^2 によって算出することができ、 $1 m^2$ あたり 1×10^{11} 、 1×10^{10} 、 1×10^9 、 1×10^8 、 1×10^7 を含む。平均的な人は $1.6 \sim 1.8 m^2$ である。

20

【0111】

NK-92細胞、および任意で他の抗がん剤は、がんを有する患者に1回投与することができ、複数回、例えば、治療期間を通して、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22もしくは23時間ごとに1回、または1、2、3、4、5、6もしくは7日ごとに1回、または1、2、3、4、5、6、7、8、9、10週もしくはそれを超える週ごとに1回、またはいずれか2つの数字間の端点を含む任意の範囲ごとに1回、投与することができる。

30

【0112】

いくつかの態様において、NK-92細胞は、NK-92細胞および媒体、例えばヒト血清またはその同等物を含む組成物で投与される。いくつかの態様において、媒体はヒト血清アルブミンを含む。いくつかの態様において、媒体はヒト血漿を含む。いくつかの態様において、媒体は約1%から約15%のヒト血清またはヒト血清同等物を含む。いくつかの態様において、媒体は約1%から約10%のヒト血清またはヒト血清同等物を含む。いくつかの態様において、媒体は約1%から約5%のヒト血清またはヒト血清同等物を含む。好ましい態様において、媒体は約2.5%のヒト血清またはヒト血清同等物を含む。いくつかの態様において、血清はヒトAB血清である。いくつかの態様において、ヒト治療での使用に許容される血清代替物がヒト血清の代わりに用いられる。そのような血清代替物は、当技術分野において公知であるか、または今後開発され得る。15%を超える濃度のヒト血清を用いることができるが、約5%を上回る濃度は費用が高すぎることが考えられる。いくつかの態様において、NK-92細胞は、NK-92細胞と細胞生存性を支持する等張液とを含む組成物で投与される。いくつかの態様において、NK-92細胞は、凍結保存したサンプルから再構成させた組成物で投与される。

40

【0113】

薬学的に許容される組成物には、様々な担体および賦形剤が含まれ得る。様々な水性担体、例えば、緩衝生理食塩水などが用いられうる。これらの溶液は無菌状態であり、かつ一般に望ましくない物体を含まない。適した担体および賦形剤ならびにそれらの処方は、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, David B. Troy, ed

50

., Lippicott Williams & Wilkins(2005)に記載されている。薬学的に許容される担体は、生物学的にまたはその他で望ましくないものではない材料を意味し、すなわち、該材料は、望ましくない生物学的作用を引き起こす、またはそれが含まれる薬学的組成物のその他の成分と有害な形で相互作用することなく、対象に投与される。対象に投与される場合、担体は、活性成分の分解を最小化するおよび対象における有害な副作用を最小化するよう選択されてもよい。本明細書で用いる場合、薬学的に許容されるという用語は、生理学的に許容されるおよび薬理学的に許容されると同義的に用いられる。薬学的組成物は概して、緩衝および保管時の保存性のための作用物質を含み、かつ投与の経路に応じた適切な送達のための緩衝液および担体を含み得る。

【0114】

インビボまたはインビトロでの使用のためのこれらの組成物は、通常の周知の滅菌技術によって滅菌され得る。組成物は、適切な生理学的状態に必要とされる許容可能な補助物質、例えば、pH調整剤および緩衝剤、ならびに毒性調整剤など、例えば、酢酸ナトリウム、塩酸ナトリウム、塩酸カリウム、塩酸カルシウム、および乳酸ナトリウムなどを含有し得る。これらの製剤中の細胞および/または他の作用物質の濃度は異なる可能性があり、選択された特定の投与形態および対象のニーズにしたがって液体量、粘性、および体重などに基づき主に選択される。

【0115】

1つの態様において、NK-92細胞は、処置されるがんに対する1つまたは複数の他の処置と併用して、患者に投与される。理論に拘束されるものではないが、NK-92細胞およびがんに対する別の療法による患者の同時処置によって、NK-92細胞および代替的療法が、これまで内因性作用を抑えていたがんを排除するチャンスをそのような内因性免疫系に与えることを可能にすると考えられる。いくつかの態様において、処置されるがんに対するの2つまたはそれ以上の他の処置には、例えば、抗体、放射線、化学療法、幹細胞移植、またはホルモン療法などが含まれる。

【0116】

1つの態様において、抗体は、NK-92細胞と併用して患者に投与される。1つの態様において、NK-92細胞および抗体は患者と一緒に、例えば、同じ製剤中で；別々に、例えば、別々の製剤で、同時に投与され、または別々に、例えば、異なる投薬スケジュールでまたは一日の異なる時間に投与されうる。別々に投与される場合、抗体は、静脈内または経口投与などの任意の適した経路で投与されうる。

【0117】

理論に拘束されるものではないが、Fc受容体およびCARの組み合わせを発現するNK-92細胞は、モノクローナル抗体と一緒に投与されると、より容易にエスケープ変異体を未然に防ぐと考えられ、さらにはエスケープ変異体を選択することを避けることも考えられる。加えて、患者自身のエフェクター細胞は、モノクローナル抗体によるADCCに関与し、がん細胞を標的としうる。この二重システム(Fc受容体およびCARの両方)はまた、非がん性細胞よりもがん細胞に選択的である可能性がある(off-tumor on-target)。がん細胞上に独占的に発現する腫瘍関連抗原はほとんどないが、非がん性細胞が2種類の腫瘍関連/特異的抗原を過剰発現している可能性は極めてまれである。例えば、リンパ球は通常CD19およびCD20の両方を発現しており、多くの場合一方が上方制御されるともう一方は下方制御され、逆もまた同様である。NK-92-CD16-CD19は、イブリツモマブ チウキセタンまたはリツキシマブとの組み合わせで、ある特定のリンパ腫を処置するのに有効であり得る。

【0118】

キット

また、細胞表面上に少なくとも1種のFc受容体および細胞表面上に少なくとも1種のキメラ抗原受容体(CAR)を発現するよう改変されているNK-92細胞のある量を含む組成物と、がんの処置で使用するための説明書とを用いるがんの処置のためのキットが開示される。いくつかの態様において、本開示のキットは、少なくとも1種のモノクローナル抗体も含み得る。

10

20

30

40

50

【0119】

キットの構成成分は、1つまたは複数のバイアルなど1つまたは異なる容器中に含有される。抗体は、液体または固体形態(例えば、凍結乾燥後)であり、保存期間を向上させる。液体形態の場合、構成成分は、安定剤および/または保存剤などの添加剤、例えば、プロリン、グリシン、もしくはスクロースまたは保存期間を向上させる他の添加剤などを含み得る。

【0120】

ある特定の態様において、キットは、改変NK-92細胞またはNK-92細胞および抗体の投与の前に、それと同時にまたはその後に投与されるべき、治療的活性化合物または薬物などの追加の化合物を含み得る。そのような化合物の例として、ビタミン、ミネラル、フルドロコルチゾン、イブプロフェン、リドカイン、キニジン、化学療法剤などが挙げられる。

10

【0121】

様々な態様において、キットの使用のための説明書には、がんの処置におけるキット構成成分を使用するための指示が含まれる。説明書は、抗体およびNK-92細胞を調製する(凍結乾燥したタンパク質の場合、希釈および再構成する)方法に関する情報(例えば、解凍するおよび/または培養する)をさらに含有し得る。説明書は、投薬量および投与の頻度に関するガイダンスをさらに含み得る。

【0122】

本開示の方法および組成物で使用することができる、それと併用して使用することができる、それらの調製で使用することができる、またはそれらの産物である、材料、組成物、および構成成分が開示される。これらおよび他の材料が本明細書において開示され、これらの材料の組み合わせ、サブセット、相互作用、グループなどが記載される場合、これらの化合物の各種個別のおよび集合的な組み合わせおよび順列の具体的な記載が明確に記載されていない可能性があるが、各々が本明細書において具体的に企図され記載されることが理解される。例えば、方法が開示および議論され、方法を含むいくつかの分子に対して行うことができるいくつかの改変が議論される場合、方法の各々のおよび全ての組み合わせおよび順列、ならびに可能性のある改変は、それとは反対の具体的な指示がない限り、具体的に企図される。同様に、これらの任意のサブセットまたは組み合わせもまた、具体的に企図され開示される。この概念は、限定するものではないが、開示の組成物を用いる方法における工程を含む本開示の全ての局面に適用される。したがって、実施することができる様々な追加的段階が存在する場合、これらの追加的段階の各々が、任意の特定の方法段階または開示の方法の方法段階の組み合わせによって実施できること、およびそのような組み合わせまたは組み合わせのサブセットの各々が具体的に企図されかつ開示されているとみなされるべきことが理解される。

20

【実施例】

【0123】

以下の実施例は、例示のみを目的としたものであり、限定として解釈されるべきではない。当業者に利用可能な様々な代替技術および手法が存在しており、これらは以下の実施例を成功裏に実施することを同様に可能にする。

30

【0124】

実施例1:NK-92-Fc-CARによる処置後の生存期間の延長

40

T系統急性リンパ芽球性白血病(ALL)患者、急性骨髄性白血病(AML)患者、およびプレB-ALL患者に由来するCD19陽性白血病細胞を、S.C.接種によってNSGマウスにおいて養子成長させ、増大させる。該マウスの白血病小結節から回収された白血病細胞(第1継代)を使用する。各群のNSGマウスに、0.2 mL PBS中の第1継代からの 5×10^6 個の白血病細胞をI.P.接種する。全てのヒト白血病はNSGマウスにおいて活発に成長する。24時間後に(a)リツキシマブ、(b) NK-92-CD16-CD19細胞、または(c)リツキシマブおよびNK-92-CD16-CD19細胞のいずれかによる。4ヶ月間毎週マウスに処置をする。NK-92-CD16-CD19細胞またはリツキシマブとNK-92-CD16-CD19細胞との組み合わせのいずれかによる処置が有意に寿命を延ばし、リツキシマブのみによる処置と比較してマウスの生存期間を延長することが考えられる

50

。

【 0 1 2 5 】

実施例2. NK-92細胞はFc受容体およびCARを発現することができる

Fc受容体およびCARを発現するNK-92細胞を分析するために、細胞株K562(NK-92感受性、CD19陰性)、SUP-B15(NK-92耐性、CD19陽性)、およびSR-91(NK-92耐性、CD19陰性)に対してCD19-CARをコードするmRNAをエレクトロポレーションしたNK-92細胞のインビトロでの細胞傷害性アッセイを行った。結果を図1A、1B、および1Cに示す。図1Aは、エレクトロポレーションされていない親NK-92細胞による標的細胞株の死滅を示す。図1Bは、CD19-CARを発現する親NK-92細胞による標的細胞株の死滅を示す。図1Cは、CD19-CARを発現するCD16(158V)-ERIL2 NK-92細胞による標的細胞株の死滅を示す。NK耐性CD19陽性SUP-B15細胞は、CD19-CAR発現NK-92細胞およびCD16(158V)-ERIL2 NK-92細胞に対して感受性になるが、NK耐性CD19陰性SR-91細胞は耐性のままである。K562の死滅はCD19-CARの発現によって影響を受けない。

10

【 0 1 2 6 】

実施例3. ヒトNK細胞株内へのキメラ抗原受容体(CAR)のmRNAのエレクトロポレーションは高いトランスフェクション効率および標的特異的細胞傷害をもたらす

第1世代CAR構築物に基づく3種類の異なるCAR: CD19、CD33、およびCSPG-4のmRNAトランスフェクション、発現および細胞傷害性のデータを提供する。mRNAトランスフェクション用の標的細胞株はaNK(親NK-92細胞)およびhaNK(高親和性FcR発現NK-92)であった。scFv配列をGeneArt(コドン最適化)によってオーダーメイドし、mRNAをMaxCyte GTを用いてトランスクレクトしてtaNK(標的活性化NK細胞)を作製した。対応する抗体を用いる免疫蛍光によって発現を判定し、標準的なフローサイトメトリーアッセイを用いて細胞傷害性を測定した。

20

【 0 1 2 7 】

電気パルスの電圧および時間に関してトランスフェクションプロトコールを最適化した後に、aNKおよびhaNKの両方に3種類全てのmRNA CAR構築物を有効にトランスクレクトすることができると判定した。トランスフェクション後のトランスフェクションされたNK細胞の生存率は一貫して80%を上回り、対応するCARの発現は6時間で55~60%、24時間で80~95%、および48時間で80%を上回るものであった。特異的細胞傷害性をaNK耐性細胞株(CD19についてSUP-B15、CD33についてSR-91、およびCSPG-4についてSK-MEL)に対して判定した。トランスフェクション後、24時間でのaNK耐性細胞株に対する細胞傷害性は一貫して80%を上回った。

30

【 0 1 2 8 】

aNKおよびhaNKの両方に確実にかつ一貫して、トランスフェクションされたNK細胞の高い生存率、CARの優れた発現、ならびに少なくとも48時間の標的細胞特異的細胞傷害を維持する様々なCAR構築物のmRNAをトランスフェクションすることができる。この技術は、CAR発現NK細胞株の臨床グレードでの产生へ容易に規模拡大することができる。haNKが効果的にトランスフェクションできる(t-haNKになる)という事実は、悪性病変の交差反応しない二重受容体ターゲティング(すなわち、CD20抗体を伴うCD19 CAR)の可能性を開く。

30

【 0 1 2 9 】

本明細書に記載された実施例および態様は例示のみを目的としたものであり、それらの観点で様々な修正または変更が当業者には示唆され、本出願の精神および範囲内にかつ添付の特許請求の範囲内に含まれるべきであることが理解されよう。本明細書に引用された全ての刊行物、配列アクセッション番号、特許および特許出願は、あらゆる目的のためにその全体が参照により本明細書に組み入れられる。

40

【 0 1 3 0 】

例示的な配列

SEQ ID NO:1 低親和性免疫グロブリン Fc領域受容体III-Aのアミノ酸配列(成熟形態)。
158位のフェニルアラニンには下線が引かれている。

Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro Gln Trp Tyr Arg Val Leu Glu
Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asn Ser Thr Gln Trp
Phe His Asn Glu Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr Val Asp
Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu
Val His Ile Gly Trp Leu Leu Gln Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Asp Pro Ile His
Leu Arg Cys His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn Gly Lys
Gly Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe Tyr Ile Pro Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly
Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Phe Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile
Thr Gln Gly Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Phe Pro Pro Gly Tyr Gln Val Ser Phe Cys
Leu Val Met Val Leu Leu Phe Ala Val Asp Thr Gly Leu Tyr Phe Ser Val Lys Thr Asn Ile
Arg Ser Ser Thr Arg Asp Trp Lys Asp His Lys Phe Lys Trp Arg Lys Asp Pro Gln Asp Lys

10

SEQ ID NO:2 高親和性バリアントF158V免疫グロブリン Fc領域受容体III-Aのアミノ酸配列(成熟形態)。158位のバリンには下線が引かれている。

Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro Gln Trp Tyr Arg Val Leu Glu
Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asn Ser Thr Gln Trp
Phe His Asn Glu Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr Val Asp
Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu
Val His Ile Gly Trp Leu Leu Gln Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Asp Pro Ile His
Leu Arg Cys His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn Gly Lys
Gly Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe Tyr Ile Pro Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly
Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Val Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile
Thr Gln Gly Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Phe Pro Pro Gly Tyr Gln Val Ser Phe Cys
Leu Val Met Val Leu Leu Phe Ala Val Asp Thr Gly Leu Tyr Phe Ser Val Lys Thr Asn Ile
Arg Ser Ser Thr Arg Asp Trp Lys Asp His Lys Phe Lys Trp Arg Lys Asp Pro Gln Asp Lys

20

30

SEQ ID NO:3 低親和性免疫グロブリン Fc領域受容体III-Aのアミノ酸配列(前駆体形態)。前駆体形態についての176位は成熟形態についての158位に対応する。176位のPheには下線が引かれている。

Met Trp Gln Leu Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu Val Ser Ala Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro Gln Trp Tyr Arg Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr Val Asp Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Gln Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn Gly Lys Gly Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe Tyr Ile Pro Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Phe Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Gln Gly Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Phe Pro Pro Gly Tyr Gln Val Ser Phe Cys Leu Val Met Val Leu Leu Phe Ala Val Asp Thr Gly Leu Tyr Phe Ser Val Lys Thr Asn Ile Arg Ser Ser Thr Arg Asp Trp Lys Asp His Lys Phe Lys Trp Arg Lys Asp Pro Gln Asp Lys

SEQ ID NO:4 高親和性バリエント免疫グロブリン Fc領域受容体III-Aのアミノ酸配列(前駆体形態)。前駆体形態についての176位は成熟形態についての158位に対応する。176位のValには下線が引かれている。

Met Trp Gln Leu Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu Val Ser Ala Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro Gln Trp Tyr Arg Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr Val Asp Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Gln Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn Gly Lys Gly Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe Tyr Ile Pro Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Val Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Gln Gly Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Phe Pro Pro Gly Tyr Gln Val Ser Phe Cys Leu Val Met Val Leu Leu Phe Ala Val Asp Thr Gly Leu Tyr Phe Ser Val Lys Thr Asn Ile Arg Ser Ser Thr Arg Asp Trp Lys Asp His Lys Phe Lys Trp Arg Lys Asp Pro Gln Asp Lys

SEQ ID NO:5 低親和性免疫グロブリン Fc領域受容体III-A(前駆体)をコードするポリヌクレオチド(158位においてフェニルアラニンをコードする)

atgtggcagc tgccctccc aactgctctg ctacttctag tttcagctgg catgcggact gaagatctcc caaaggctgt
 ggtgttcctg gagcctcaat ggtacagggt gctcgagaag gacagtgtga ctctgaagtgc cagggagcc tactccccctg
 aggacaattc cacacagtgg tttcacaatg agagcctcat ctaagccag gcctcgagct acttcattga cgctgccaca
 gtcgacgaca gtggagagta caggtgccag acaaaccctc ccaccctcag tgaccgggt cagctagaag tccatatcgg
 ctggctgttg ctccaggccc ctgggtgggt gttcaaggag gaagacccta ttcacctgag gtgtcacagc tggaagaaca
 ctgctctgca taaggtcaca tatttacaga atggcaaagg caggaagtat ttcatcata attctgactt ctacattcca
 aaagccacac tcaaagacag cggctcctac ttctgcaggg ggcttttgg gactaaaaat gtgtcttcag agactgtgaa
 catcaccatc actcaagggtt tggcagtgtc aaccatctca tcattttc caccggta ccaagtctt ttctgcttgg
 ttaggtact ccttttgcgttca gtggacacag gactatattt ctctgtgaag acaaacattc gaagctcaac aagagactgg
 aaggaccata aatttaaatg gagaaaggac cctcaagaca aatga

10

SEQ ID NO:6 野生型IL-2

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu Val Thr Asn Ser Ala Pro
 Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile
 Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr
 Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Leu Lys Pro Leu
 Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser
 Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp
 Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr
 Leu Thr

20

SEQ ID NO:7 IL-2-ER

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu Val Thr Asn Ser Ala Pro
 Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile
 Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr
 Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Leu Lys Pro Leu
 Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser
 Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp
 Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr
 Leu Thr Gly Ser Glu Lys Asp Glu Leu

30

40

SEQ ID NO:8 CD19-CAR DNA配列

CCCGGGATT CGCCACCATG GACTGGATCT GGCGGATCCT GTTCCTCGTG
GGAGCCGCCA CAGGCGCCA TTCTGCCAG CCCGCCGACA TCCAGATGAC
CCAGACCACC AGCAGCCTGA GCGCCAGCCT GGGCGACAGA GTGACCATCA
GCTGCCGGC CAGCCAGGAC ATCAGCAAGT ACCTGAAC TGATCAGCAG
AAACCCGACG GCACCGTGAA GCTGCTGATC TACCACACCA GCCGGCTGCA
CAGCGCGTG CCCAGCAGAT TTTCTGGCAG CGGCAGCGGC ACCGACTACA
GCCTGACCAT CTCCAACCTG GAACAGGAAG ATATCGCTAC CTACTTCTGT
CAGCAAGGCA ACACCCCTGCC CTACACCTTC GGCGGAGGCA CCAAGCTGGA
ACTGAAGAGA GGCGGCGGAG GCTCTGGTGG AGGCGGATCT GGGGGCGGAG
GAAGTGGCGG GGGAGGATCT GAAGTGCAGC TGCAGCAGAG CGGCCCTGGC
CTGGTGGCCC CTAGCCAGAG CCTGTCCGTG ACCTGTACCG TGTCCGGCGT
GTCCCTGCC GACTACGGCG TGTCCCTGGAT CCGGCAGCCC CCCAGAAAGG
GCCTGGAATG GCTGGCGTG ATCTGGGGCA GCGAGACAAC CTACTACAAC
AGCGCCCTGA AGTCCCAGGCT GACCATCATC AAGGACAACA GCAAGAGCCA
GGTGTTCCTG AAGATGAACA GCCTGCAGAC CGACGACACC GCCATCTACT
ACTGCGCCAA GCACTACTAC TACGGCGGCA GCTACGCCAT GGACTACTGG
GGCCAGGGCA CCACCGTGAC CGTGTCCAGC GCCCTGTCCA ACAGCATCAT
GTACTTCAGC CACTCGTGC CCGTGTTC GCCCCCAAG CCCACCACCA
CCCCCTGCC TAGACCTCCC ACCCCAGCCC CAACAATCGC CAGCCAGCCT
CTGTCCCTGC GGCCCAGAC TAGCAGACCT GCTGCCGGCG GAGCCGTGCA
CACCAAGAGGC CTGGACCCCCA AGCTGTGCTA CCTGCTGGAC GGCATCCTGT
TCATCTATGG CGTGATCCTG ACCGCCCTGT TCCTGAGAGT GAAGTTCAGC
AGAACGCGCCG ACGCCCTGC CTACCAGCAG GGCCAGAAC AGCTGTACAA
CGAGCTGAAC CTGGGCAGAC GGGAAAGAGTA CGACGTGCTG GACAAGCGGA
GAGGCAGGGGA CCCCCGAGATG GGCGGCAAGC CCAGACGGAA GAACCCCCAG
GAAGGCCTGT ATAACGAACT GCAGAAAGAC AAGATGGCCG AGGCCTACAG
CGAGATCGGC ATGAAGGGCG AGCGGCGGAG GGGCAAGGGC CACGATGGAC
TGTACCAGGG CCTGAGCACC GCCACCAAGG ACACCTACGA CGCCCTGCAC
ATGCAGGCC CGCCGCAG ATGACAGCCA GGGCATTCT CCCTCGAGCG
GCCGC

MDWIWRILFL VGAATGAHSA QPADIQMTQT TSSLASLGD RVTISCRASQ
DISKYLNWYQ QKPDGTVKLL IYHTSRLHSG VPSRFSGSGS GTDYSLTISN
LEQEDIATYF CQQGNTLPYT FGGGTKEELK RGGGGSGGGG SGGGGSGGGG
SEVQLQQSGP GLVAPSQSL S VTCTVSGVSL PDYGVSWIRQ PPRKGLEWLG
VIWGSETYY NSALKSRLTI IKDNSKSQVF LKMNSLQTDD TAIYYCAKHY
YYGGSYAMDY WGQGTTVTVS SALNSNSIMYF SHFVPVFLPA KPTTTPAPRP
PTPAPTIASQ PLSLRPEASR PAAGGAVHTR GLDPKLCYLL DGILFIYGVI
LTALFLRVKF SRSADAPAYQ QGQNQLYNEL NLGRREEYDV LDKRRGRDPE
MGGKPRRKNP QEGLYNELQK DKMAEAYSEI GMKGERRRGK GHDGLYQGLS
TATKDTYDAL HMQALPPR

10

SEQ ID NO:10 CD33-CAR DNA配列

CCCGGGATT CGCCACCATG GACTGGATCT GGC GGATCCT GTTCCTCGTG
GGAGCCGCCA CAGGCGCCA TTCTGCCAG CCCGCCGACA TCCAGATGAC
CCAGAGCCCT AGCAGCCTGA GCGCCAGCGT GGGCGACAGA GTGACCATCA
CCTGTCGGGC CAGCGAGAGC GTGGACA ACT ACAGGCATCAG CTTCATGAAC
TGGTTCCAGC AGAAGCCCG CAAGGCCCCC AAGCTGCTGA TCTACGCCGC
CAGCAATCAG GGCAGCGCG TGCCCAGCAG ATTCAGCGGC TCTGGCAGCG
GCACCGACTT CACCCCTGACC ATCAGCAGCC TGCAGCCGA CGACTTCGCC
ACCTACTACT GCCAGCAGAG CAAAGAGGTG CCCTGGACCT TCGGCCAGGG
CACCAAGGTG GAAATCAAGG GCGGAGGCAG CAGCGGAGGT GGAGGAAGTG
GCGGCAGGAGG ATCTCAGGTG CAGCTGGTGC AGTCTGGCGC CGAAGTGAAG
AAACCCGGCA GCAGCGTGAA GGTGTCCCTGC AAGGCCAGCG GCTACACCTT
CACCGACTAC AACATGCACT GGGTCCGCCA GGCCCCAGGC CAGGGACTGG
AATGGATCGG CTACATCTAC CCCTACAACG GCGGCACCGG CTACAACCAG
AAGTTCAAGA GCAAGGCCAC CATCACCGCC GACGAGAGCA CCAACACCGC
CTACATGGAA CTGAGCAGCC TGCGGAGCGA GGACACCGCC GTGTACTACT
GCGCCAGAGG CAGACCCGCC ATGGACTACT GGGGCCAGGG AACCCCTGGTG
ACAGTGTCCA GCGCCCTGAG CAACAGCATC ATGTACTTCA GCCACTTCGT
GCCCGTGTGTT CTGCCCGCCA AGCCCACCAC CACCCCTGCC CCTAGACCTC
CCACCCCAAGC CCCAACAAATC GCCAGCCAGC CTCTGTCCCT GCGGCCCGAA
GCTAGCAGAC CTGCTGCCGG CGGAGCCGTG CACACCAGAG GCCTGGACCC
CAAGCTGTGC TACCTGCTGG ACGGCATCCT GTTCATCTAC GGCGTGATCC
TGACCGCCCT GTTCTGAGA GTGAAGTTCA GCAGAAGCGC CGACGCCCT
GCCTACCAGC AGGGCCAGAA CCAGCTGTAC AACGAGCTGA ACCTGGGCAG
ACGGGAAGAG TACGACGTGC TGGACAAGCG GAGAGGCAGG GACCCCGAGA
TGGGCGGCAA GCCCAGACGG AAGAACCCCC AGGAAGGCCT GTATAACGAA
CTGCAGAAAG ACAAGATGGC CGAGGCCTAC AGCGAGATCG GCATGAAGGG
CGAGCGGCCGG AGGGGCAAGG GCCACGATGG ACTGTACCAG GGCCTGAGCA
CCGCCACCAA GGACACCTAC GACGCCCTGC ACATGCAGGC CCTGCCCG
AGATGACAGC CAGGGCATT CTCCCTCGAG CGGCCGC

MDWIWRILFL VGAATGAHSA QPADIQMTQS PSSL SASVGD RVTITCRASE
SVDNYGISFM NWFQQKPGKA PKLLIYAASN QGSGVPSRFS GSGSGTDFTL
TISSLQPDDF ATYYCQQSKE VPWTFGQGTK VEIKGGGGSG GGGSGGGGSQ
VQLVQSGAEV KKPGSSVKVS CKASGYTFTD YNMHWVRQAP GQGLEWIGYI
YPYNGGTGYN QKFKS KATIT ADESTNTAYM ELSSLRSEDT AVYYCARGRP
AMDYWQGQTL VTVSSALSNS IMYFSHFVPV FLPAKPTTTP APRPPTPAPT
IASQPLSLRP EASRPAAGGA VHTRGLDPKL CYL LDGILFI YGVILTALFL
RVKFSRSADA PAYQQQNQL YNELNLGRRE EYDVLDKRRG RDPEMGGKPR
RKNPQEGLYN ELQKDKMAEA YSEIGMKGER RRGKGHDGLY QGLSTATKDT
YDALHMQALP PR

10

SEQ ID NO:12 CSPG4-CAR DNA配列

CCCGGGAATT CGCCACCATG GACTGGATCT GGCGCATCCT CTTCCCTCGTC
 GGCGCTGCTA CGGGCGCTCA TTCGGCCCAG CCGGCCGATA TCGAGCTCAC
 CCAATCTCCA AAATTCTATGT CCACATCAGT AGGAGACAGG GTCAGCGTCA
 CCTGCAAGGC CAGTCAGAAT GTGGATACTA ATGTAGCGTG GTATCAACAA
 AAACCAGGGC AATCTCCTGA ACCACTGCTT TTCTCGGCAT CCTACCGTTA
 CACTGGAGTC CCTGATCGCT TCACAGGCAG TGGATCTGGG ACAGATTCA
 CTCTCACCAT CAGCAATGTG CAGTCTGAAG ACTTGGCAGA GTATTTCTGT
 CAGCAATATA ACAGCTATCC TCTGACGTTG GGTGGCGGCA CCAAGCTGGA
 AATCAAACGG GCTGCCGCAG AAGGTGGAGG CGGTCAGGT GGCAGGAGGTT
 CCGCGGAGG TGGCTCTGGC GGTGGCGGAT CGGCCATGGC CCAGGTGAAG
 CTGCAGCAGT CAGGAGGGGG CTTGGTGCAA CCTGGAGGAT CCATGAAACT
 CTCCTGTGTT GTCTCTGGAT TCACTTTCAG TAATTACTGG ATGAACTGGG
 TCCGCCAGTC TCCAGAGAAG GGGCTTGAGT GGATTGCAGA AATTAGATTG
 AAATCCAATA ATTTGGAAG ATATTATGCG GAGTCTGTGA AAGGGAGGTT
 CACCATCTCA AGAGATGATT CCAAAAGTAG TGCCTACCTG CAAATGATCA
 ACCTAAGAGC TGAAGATACT GGCATTATT ACTGTACCAAG TTATGGTAAC
 TACGTTGGGC ACTATTTGA CCACTGGGGC CAAGGGACCA CGGTCACCGT
 ATCGAGTGCC GCGGTTCTAG AGCTCTTGAG CAACTCCATC ATGTACTTCA
 GCCACTTCGT GCCGGTCTTC CTGCCAGCGA AGCCCACCAC GACGCCAGCG
 CCGCGACCAC CAACACCAGGC GCCCACCAC GCGTCGCAGC CCCTGTCCCT
 GCGCCAGAG GCGTGCCGGC CAGCGGCGGG GGGCGCAGTG CACACGAGGG
 GGCTGGACCT GCTGGATCCC AAACCTCTGCT ACCTGCTGGA TGGAATCCTC
 TTCATCTATG GTGTCATTCT CACTGCCTTG TTCCTGAGAG TGAAGTTCAG
 CAGGAGCGCA GACGCCCGG CGTACCAAGCA GGGCCAGAAC CAGCTCTATA
 ACGAGCTCAA TCTAGGACGA AGAGAGGAGT ACGATGTTT GGACAAGAGA
 CGTGGCCGGG ACCCTGAGAT GGGGGAAAG CCGCAGAGAA GGAAGAACCC
 TCAGGAAGGC CTGTACAATG AACTGCAGAA AGATAAGATG GCGGAGGCCT
 ACAGTGAGAT TGGGATGAAA GCGGAGCGCC GGAGGGGCAA GGGGCACGAT
 GGCCCTTACC AGGGTCTCAG TACAGCCACC AAGGACACCT ACGACGCCCT
 TCACATGCAG GCCCTGCCCT CTCGCTAACCA GCCAGGGCAT TTCTCCCTCG
 AGCGGCCGC

10

20

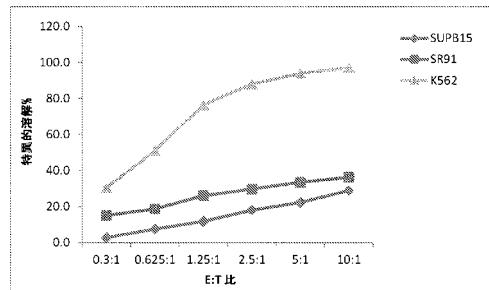
30

40

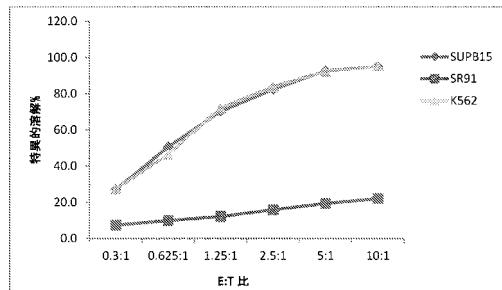
MDWIWRILFL VGAATGAHSA QPADIELTQS PKFMSTVGD RSVTCKASQ
 NVDTNVAWYQ QKPGQSPEPL LFSASYRYTG VPDRFTGSGS GTDFTLTISN
 VQSEDLAEYF CQQYNSYPLT FGGGTKEIK RAAAEGGGGS GGGGSGGGGS
 GGGGSAMAQV KLQQSGGGLV QPGGSMKLSC VVSGFTFSNY WMNWVRQSPE
 KGLEWIAEIR LKSNNFGRYY AESVKGRFTI SRDDSKSSAY LQMINLRAED
 TGIYYCTSYG NYVGHYFDHW QQGTTTVSS AAVLELLSNS IMYFSHFVPV
 FLPAKPTTTP APRPPTPAPT IASQPLSLRP EACRPAAGGA VHTRGLDLLD
 PKLCYLLDG1 LFIYGVLTA LFLRVKFSRS ADAPAYQQGQ NQLYNELNLG
 RREEYDVLDK RRGRDPEMGG KPQRRKNPQE GLYNELQDK MAEAYSEIGM
 KGERRRGKGH DGLYQGLSTA TKDTYDALHM QALPPR

10

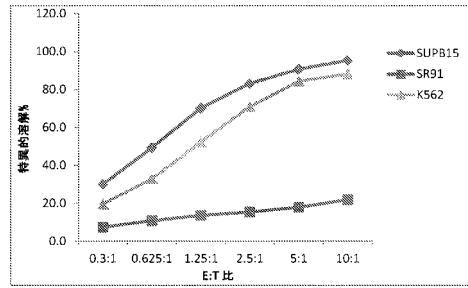
【図1A】



【図1C】



【図1B】



【配列表】

2018517415000001.xml

【手続補正書】

【提出日】平成30年2月19日(2018.2.19)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2018517415000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2016/036991
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N 5/0783(2010.01)i, C07K 14/54(2006.01)i, C07K 14/725(2006.01)i, C07K 14/735(2006.01)i, C07K 16/28(2006.01)i, A61K 35/17(2014.01)i, A61K 39/00(2006.01)i		
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) C12N 5/0783; C12N 15/63; C12N 5/22; C07K 1/00; C12N 15/65; C07K 14/735; A61K 35/14; C07K 14/54; C07K 14/725; C07K 16/28; A61K 35/17; A61K 39/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords:NK-92 cell, Fc receptor, chimeric antigen receptor		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	EP 2161339 A1 (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG et al.) 10 March 2010 See abstract; claim 5; paragraphs [0001], [0011], [0019] and [0037]; figure 4.	1-4, 6, 11-14, 16 , 37-42 5, 15
Y A	HERMANSON, DAVID L. et al., 'Utilizing chimeric antigen receptors to direct natural killer cell activity', Frontiers in Immunology, 28 April 2015, Vol. 6, Article 195, pp. 1-6 See abstract; page 2, right column, 2nd paragraph – page 3, left column, 1st paragraph; table 1.	1-4, 6, 11-14, 16 , 37-42 5, 15
Y A	US 8946385 B2 (KAWAI, SHIGETO) 03 February 2015 See abstract; SEQ ID NO: 6.	4, 14
A	CLEMENCEAU, BEATRICE et al., 'The human natural killer cytotoxic cell line NK-92, once armed with a murine CD16 receptor, represents a convenient cellular tool for the screening of mouse mAbs according to their ADCC potential' Mabs, 2013, Vol. 5, No. 4, pp. 587-594 See the whole document.	1-6, 11-16, 37-42
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
<p>* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "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</p> <p>"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</p>		
Date of the actual completion of the international search 18 November 2016 (18.11.2016)	Date of mailing of the international search report 18 November 2016 (18.11.2016)	
Name and mailing address of the ISA/KR International Application Division Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon, 35208, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578	Authorized officer HEO, Joo Hyung Telephone No. +82-42-481-8150	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/US2016/036991

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item1.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:
 in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/US2016/036991

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.: 27-36
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 27-36 pertain to a method for treatment of the human body by therapy, and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv), to search.
2. Claims Nos.: 8,18,24-26,28-31
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:
Claims 8, 18, 24-26 and 28-31 are referring to the multiple dependent claims which do not comply with PCT Rule 6.4(a).
3. Claims Nos.: 7,9-10,17,19-23,27,32-36
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:

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 an additional fees, this Authority did not invite payment of any 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.:

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/US2016/036991

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GLIENKE, WOLFGANG et al. 'Advantages and applications of CAR-expressing natural killer cells', Frontiers in Pharmacology, February 2015, Vol. 6, Article 21, pp. 1-7 See the whole document.	1-6, 11-16, 37-42
A	US 8906682 B2 (THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA) 09 December 2014 See abstract; SEQ ID NO: 12.	1-6, 11-16, 37-42

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/US2016/036991

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 2161339 A1	10/03/2010	None	
US 8946385 B2	03/02/2015	AT 504647 T EP 2123754 A1 EP 2123754 A4 EP 2123754 B1 JP 5299902 B2 US 2010-0035280 A1 US 2015-0079610 A1 WO 2008-093688 A1	15/04/2011 25/11/2009 27/01/2010 06/04/2011 25/09/2013 11/02/2010 19/03/2015 07/08/2008
US 8906682 B2	09/12/2014	AU 2011-338200 A1 CA 2820681 A1 CN 103492406 A CO 6801633 A2 CR 20130269 A DO P2013000128 A EA 201390847 A1 EP 2649086 A1 EP 2649086 A4 GT 201300150 A JP 2014-507118 A JP 5947311 B2 KR 10-2013-0124521 A MA 34813 B1 MX 2013006570 A NZ 612512 A PE 01782014 A1 SG 10201510092 A SG 190997 A1 US 2013-0287748 A1 US 2013-0288368 A1 US 2013-0309258 A1 US 2014-0106449 A1 US 2014-0370017 A1 US 2015-0050729 A1 US 2015-0093822 A1 US 2015-0099299 A1 US 2015-0118202 A1 US 2016-0130355 A1 US 2016-0159907 A1 US 2016-0194404 A1 US 2016-0208012 A1 US 8911993 B2 US 8916381 B1 US 8975071 B1 US 9101584 B2 US 9102760 B2 US 9102761 B2	04/07/2013 14/06/2012 01/01/2014 29/11/2013 03/09/2013 16/03/2014 30/12/2013 16/10/2013 31/12/2014 10/06/2014 27/03/2014 06/07/2016 14/11/2013 02/01/2014 26/08/2013 27/03/2015 20/02/2014 28/01/2016 31/07/2013 31/10/2013 31/10/2013 21/11/2013 17/04/2014 18/12/2014 19/02/2015 02/04/2015 09/04/2015 30/04/2015 12/05/2016 09/06/2016 07/07/2016 21/07/2016 16/12/2014 23/12/2014 10/03/2015 11/08/2015 11/08/2015 11/08/2015

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family membersInternational application No.
PCT/US2016/036991

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		US 9328156 B2 WO 2012-079000 A1 WO 2012-079000 A4 ZA 201304470 B	03/05/2016 14/06/2012 23/08/2012 27/08/2014

フロントページの続き

(51) Int.CI.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09	Z
C 1 2 N 5/0783 (2010.01)	C 1 2 N 5/0783	
C 0 7 K 14/735 (2006.01)	C 0 7 K 14/735	
C 0 7 K 14/705 (2006.01)	C 0 7 K 14/705	

(81)指定国 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,MK,MT,NL,NO,PL,PT,R0,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,CZ,DE,DK,DM,D0,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,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,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(74)代理人 100148699 弁理士 佐藤 利光
(74)代理人 100128048 弁理士 新見 浩一
(74)代理人 100129506 弁理士 小林 智彦
(74)代理人 100205707 弁理士 小寺 秀紀
(74)代理人 100114340 弁理士 大関 雅人
(74)代理人 100114889 弁理士 五十嵐 義弘
(74)代理人 100121072 弁理士 川本 和弥
(72)発明者 リー ティエン アメリカ合衆国 9 0 2 3 2 カリフォルニア州 カルバー シティ ジェファーソン ブールバ ード 9 9 2 0 ナントクエスト インコーポレイテッド内
F ターム(参考) 4B065 AA94X AA94Y AA99Y AB01 BA02 BA03 CA24 CA44 4C085 AA14 AA16 BB36 CC23 DD62 EE03 GG02 GG04 GG06 4C087 AA01 AA02 BB37 BB64 BB65 MA02 MA66 NA05 NA14 ZB26 ZB27 ZC75 4H045 AA30 BA10 CA40 DA50 EA22 EA28 FA74