

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2022-553292

(P2022-553292A)

(43)公表日 令和4年12月22日(2022.12.22)

| (51)国際特許分類                        | F I             | テーマコード (参考)       |
|-----------------------------------|-----------------|-------------------|
| C 1 2 N 15/62 (2006.01)           | C 1 2 N 15/62   | Z Z N A 4 B 0 6 5 |
| C 1 2 N 5/10 (2006.01)            | C 1 2 N 5/10    | 4 C 0 8 5         |
| A 6 1 K 39/00 (2006.01)           | A 6 1 K 39/00   | H 4 C 0 8 6       |
| A 6 1 K 35/17 (2015.01)           | A 6 1 K 35/17   | Z 4 C 0 8 7       |
| A 6 1 K 31/4706(2006.01)          | A 6 1 K 31/4706 |                   |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全71頁) 最終頁に続く |                 |                   |

|                   |                                                                                                                                                                         |         |                                                                                                                                     |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (21)出願番号          | 特願2022-523383(P2022-523383)                                                                                                                                             | (71)出願人 | 598063203<br>パーデュー・リサーチ・ファウンデーション<br>PURDUE RESEARCH FOUNDATION<br>アメリカ合衆国 47906 インディアナ州, ウェスト ラファイエット, スイート 2500, ファウンドリー ドライブ 101 |
| (86)(22)出願日       | 令和2年10月21日(2020.10.21)                                                                                                                                                  | (74)代理人 | 100092783<br>弁理士 小林 浩                                                                                                               |
| (85)翻訳文提出日        | 令和4年6月20日(2022.6.20)                                                                                                                                                    | (74)代理人 | 100120134<br>弁理士 大森 規雄                                                                                                              |
| (86)国際出願番号        | PCT/US2020/056723                                                                                                                                                       | (74)代理人 | 100153693<br>弁理士 岩田 耕一                                                                                                              |
| (87)国際公開番号        | WO2021/081133                                                                                                                                                           |         |                                                                                                                                     |
| (87)国際公開日         | 令和3年4月29日(2021.4.29)                                                                                                                                                    |         |                                                                                                                                     |
| (31)優先権主張番号       | 62/923,644                                                                                                                                                              |         |                                                                                                                                     |
| (32)優先日           | 令和1年10月21日(2019.10.21)                                                                                                                                                  |         |                                                                                                                                     |
| (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 |         | 最終頁に続く                                                                                                                              |

(54)【発明の名称】 操作されたナチュラルキラー細胞、ならびに免疫療法およびオートファジー阻害技法においてそれを使用するための方法

## (57)【要約】

がん、特に膠芽腫の治療のための、ポリヌクレオチド構築物、およびそのような構築物を発現する多機能性の操作されたナチュラルキラー（NK）細胞が提供される。構築物は、標的細胞上の少なくとも1種のコグネートリガンドを標的にする第1の結合ドメイン、標的細胞のアデノシン産生細胞表面タンパク質または標的細胞のアデノシン中間体産生細胞表面タンパク質に特異的な第2の結合ドメイン、および切断可能なリンカー、ならびにがん関連抗原に特異的な第3の結合ドメインの融合体である。操作されたNK細胞の薬学的組成物、ならびに単独でおよびオートファジー阻害剤に加えて、そのような薬学的組成物を使用して膠芽腫を治療する方法も提供される。

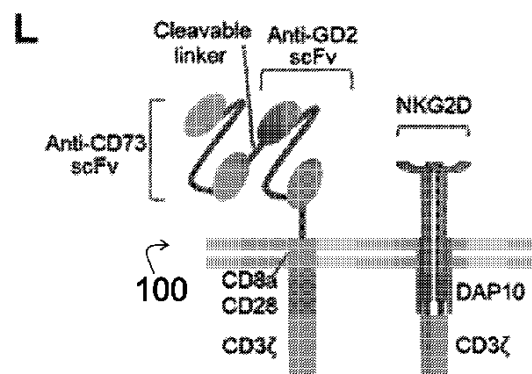


Figure 5 con't.

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ナチュラルキラー（NK）活性化受容体、または第 1 のがん関連抗原に特異的な第 1 のタンパク質を含む少なくとも第 1 の結合ドメインまたはそのフラグメントをコードする第 1 の配列、ならびに

少なくとも第 2 の結合ドメインまたはそのフラグメントおよび切断可能なリンカーをコードする第 2 の配列

を含むヌクレオチド構築物であって、前記第 2 の結合ドメインは、標的細胞のアデノシン産生細胞表面タンパク質または標的細胞のアデノシン中間体産生細胞表面タンパク質に特異的であり、前記切断可能なリンカーは、前記第 1 の結合ドメインに作動的に連結されている、ヌクレオチド構築物。

10

## 【請求項 2】

NK 活性化受容体、または第 2 のがん関連抗原に特異的な第 2 のタンパク質を含む少なくとも第 3 の結合ドメインまたはそのフラグメントをコードする第 3 の配列を含む、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド構築物。

## 【請求項 3】

前記第 1 および第 3 の結合ドメインまたはそのフラグメントの一方は、がん関連抗原に特異的な第 1 のタンパク質を含み、前記第 1 および第 3 の結合ドメインまたはそのフラグメントの他方は NK 活性化受容体を含む、請求項 2 に記載のポリヌクレオチド構築物。

## 【請求項 4】

前記第 2 の結合ドメインは、CD 73、CD 39、または CD 38 に特異的な抗体フラグメントを含む、請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチド構築物。

20

## 【請求項 5】

前記切断可能なリンカーは、前記標的細胞における 1 種または複数のプロテアーゼによって切断可能である、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド構築物。

## 【請求項 6】

前記第 1 の配列は、ナチュラルキラーグループ 2 メンバー D 受容体（NKGD2）、NKGp30、NKGp46、NKGp40、または DNAM-1 を含む細胞外リガンド結合ドメインを含む NK 活性化受容体をコードする、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド構築物。

## 【請求項 7】

前記第 1 のがん関連抗原は、ジシアロガングリオシド（GD2）、ガングリオシド G3（GD3）、Her2（p185）、CD19、CD20、CD56、CD123、CD22、CD30、CD33、CD171、CS-1、C 型レクチン様分子-1；EpCAM、G250、プロテオグリカン、GD3、GD2、MHC II、TAG-72、ミルクムチンコアタンパク質、ルイス A 抗原、チロシントタンパク質キナーゼ膜貫通受容体（ROr1）、c-met、上皮成長因子受容体（EGFR）、EGFR 変種 III、および癌胎児性抗原（CEA）からなる群から選択される、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド構築物。

30

## 【請求項 8】

前記第 2 のがん関連抗原は、ジシアロガングリオシド（GD2）、ガングリオシド G3（GD3）、Her2（p185）、CD19、CD20、CD56、CD123、CD22、CD30、CD33、CD171、CS-1、C 型レクチン様分子-1；EpCAM、G250、プロテオグリカン、GD3、GD2、MHC II、TAG-72、ミルクムチンコアタンパク質、ルイス A 抗原、チロシントタンパク質キナーゼ膜貫通受容体（ROr1）、c-met、上皮成長因子受容体（EGFR）、EGFR 変種 III、および癌胎児性抗原（CEA）からなる群から選択され、前記第 1 のタンパク質および前記第 2 のタンパク質は同じではない、請求項 7 に記載のポリヌクレオチド構築物。

40

## 【請求項 9】

前記第 1 の結合ドメインまたはそのフラグメントは、ナチュラルキラーグループ 2 メンバー D 受容体（NKGD2）を含む細胞外リガンド結合ドメインを含み、前記第 1 の配列

50

は、野生型NK細胞におけるNKGDの発現と比較して、前記NKGDの上方調節された発現をさらにコードする、請求項1に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項10】

前記第2の結合ドメインまたはそのフラグメントは、単鎖抗体フラグメント（scFv）と連結された抗CD73、抗CD39、または抗CD38を含み、前記第3の結合ドメインまたはそのフラグメントは、scFvと連結された抗ジシアロガングリオシド（GD2）を含む、請求項1に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項11】

前記第1の配列は、第1のキメラ抗原受容体（CAR）において発現され、前記第2の配列は、第2のCARにおいて発現される、請求項2に記載のポリヌクレオチド構築物。

10

【請求項12】

前記第1および第3の配列の一方または両方は、活性化があると細胞傷害または細胞溶解活性を促進するための1種または複数のシグナル伝達ドメインをコードする、請求項2に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項13】

前記1種または複数のシグナル伝達ドメインは、それに作動的に連結された前記結合ドメインまたはそのフラグメントが前記標的細胞に結合すると活性化される、請求項12に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項14】

前記標的細胞は、がん細胞または腫瘍微小環境における悪性細胞である、請求項1から13のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド構築物。

20

【請求項15】

前記がん細胞または悪性細胞は、膠芽腫細胞または膠芽腫腫瘍微小環境における悪性細胞である、請求項14に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項16】

1種または複数のシグナル伝達ドメインは、免疫グロブリンγ-Fc領域受容体IIII-A（FcγRIIIA）、分化抗原群28（CD28）、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー9（TNFRSF9または4-1BB）、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー4（TNFRSF4またはOX40）、Fasリガンド（FasL）、TNF関連アポトーシス誘導リガンド（TRAIL）、DNAX活性化タンパク質10（DAP10）、DNAX活性化タンパク質12（DAP12）、天然細胞傷害性受容体NKp46、天然細胞傷害性受容体NKp44、天然細胞傷害性受容体NKp30、リンパ球機能関連抗原1（LFA-1）、分化抗原群244（CD244）、CD137、CD3ゼータ（CD3ζ）、およびNKGD-DAP10受容体複合体からなる群から選択される、請求項8から13のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド構築物。

30

【請求項17】

前記第1の配列によってコードされる前記1種または複数のシグナル伝達ドメインはDAP10であり、前記第2の配列によってコードされる前記1種または複数のシグナル伝達ドメインはCD3ζである、請求項14に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項18】

前記抗体フラグメントはscFvをさらに含む、請求項4に記載のポリヌクレオチド構築物。

40

【請求項19】

前記第1の配列は、ヒンジドメイン、1種もしくは複数の自己切断ペプチド、またはその両方をさらにコードする、請求項1に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項20】

前記自己切断ペプチドは、P2A、E2A、F2A、およびT2Aからなる群から選択される、請求項19に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項21】

前記ヒンジドメインは、リンカーまたはスペーサーを含む、請求項19に記載のポリヌ

50

クレオチド構築物。

【請求項 2 2】

前記第 1 の配列は、配列番号 7 と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する第 1 のアミノ酸をコードし、前記第 3 の配列は、配列番号 6 と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する第 2 のアミノ酸をコードする、請求項 1 7 に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 2 3】

請求項 1 から 2 2 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチド構築物を発現する、操作された細胞または細胞株。

【請求項 2 4】

配列番号 8 と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を発現する、請求項 2 3 に記載の操作された細胞または細胞株。

【請求項 2 5】

前記第 1 の配列は、前記第 1 の配列によってコードされる前記第 1 の結合ドメインまたはそのフラグメントおよびシグナル伝達ドメインに作動的に連結されかつその間に配置されるヒンジドメインをさらにコードする、請求項 2 3 に記載の操作された細胞または細胞株。

【請求項 2 6】

前記 1 種または複数のシグナル伝達ドメインは、それに作動的に連結された前記結合ドメインまたはそのフラグメントが前記標的細胞に結合すると活性化される、請求項 2 3 に記載の操作された細胞の集団を含む薬学的組成物。

【請求項 2 7】

薬学的に許容される担体をさらに含む、請求項 2 6 に記載の薬学的組成物。

【請求項 2 8】

がん罹患している対象を免疫療法治療を使用して治療する方法であって、少なくとも、  
ナチュラルキラー（NK）活性化受容体、または第 1 のがん関連抗原に特異的な第 1 のタンパク質を含む第 1 の結合ドメインまたはそのフラグメント；ならびに  
第 2 の結合ドメインまたはそのフラグメント、および切断可能なリンカー  
をコードするポリヌクレオチド構築物であって、前記第 2 の結合ドメインは、標的細胞のアデノシン産生またはアデノシン中間体産生細胞表面タンパク質に特異的であり、前記切断可能なリンカーは、前記第 1 の結合ドメインに作動的に連結されている、ポリヌクレオチド構築物を発現する操作された NK 細胞の集団を含む薬学的組成物の治療有効量を対象に投与するステップまたは投与しておくステップを含む方法。

【請求項 2 9】

前記ポリヌクレオチド構築物は、NK 活性化受容体、または第 2 のがん関連抗原に特異的な第 2 のタンパク質を含む第 3 の結合ドメインまたはそのフラグメントをさらにコードする、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 0】

前記第 1 および第 3 の結合ドメインまたはそのフラグメントの一方は、がん関連抗原に特異的な第 1 のタンパク質を含み、前記第 1 および第 3 の結合ドメインまたはそのフラグメントの他方は NK 活性化受容体を含む、請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 1】

操作された NK 細胞の前記集団は、配列番号 8 と少なくとも 8 0 %、8 5 %、または 9 0 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を発現する、請求項 2 8 から 3 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 2】

前記ポリヌクレオチド構築物は、活性化があると、前記操作された NK 細胞の細胞傷害または細胞溶解活性を促進するように、前記第 1 の結合ドメインに作動的に連結された 1 種または複数のシグナル伝達ドメインをさらにコードする、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 3】

10

20

30

40

50

前記がんは膠芽腫であり、前記第 1 の結合ドメインまたはそのフラグメントは、ジシアロガングリオシド（G D 2）に特異的な第 1 のタンパク質を含み、前記第 3 の結合ドメインまたはそのフラグメントは、ナチュラルキラーグループ 2 メンバー D 受容体（N K G 2 D）を含む細胞外リガンド結合ドメインを含み、前記第 3 の結合ドメインまたはそのフラグメントは C D 7 3 に特異的である、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 4】

オートファジー阻害剤を含む付加的な治療的処置を前記対象に投与するステップまたは投与しておくステップをさらに含む、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記オートファジー阻害剤は、治療有効量の小分子阻害剤またはオートファジー経路における遺伝子の遺伝的下方調節を含む、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 6】

オートファジー経路における前記遺伝子は、B E C N 1、p 6 2、β - アクチン、A T G 5、A T G 7、L C 3 B、A T G 1 2、A T G 1 6 L 1、P I 3 K - I I I、U L K 1、U L K 2、F I P 2 0 0、および L A M P 2 からなる群から選択される、請求項 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 7】

前記オートファジー阻害剤は、クロロキン、ヒドロキシクロロキン、スパウチン - 1、S A R 4 0 5、およびベルテポルフィンからなる群から選択される小分子阻害剤を含む、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 3 8】

前記クロロキンは 0 . 0 1 μ M ~ 2 0 0 μ M の濃度で投与される、請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記がんは膠芽腫である、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 4 0】

投与するまたは投与しておく前記ステップは、静脈内に、腫瘍内に、非経口的に、または注入により実施される、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 4 1】

治療有効量の薬学的組成物を対象に投与するまたは投与しておく前記ステップは、静脈内に、腫瘍内に、非経口的に、または注入により実施され、付加的な治療的処置を前記対象に投与するまたは投与しておく前記ステップは、全身注射または注入により実施される、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 4 2】

治療有効量の薬学的組成物を対象に投与するまたは投与しておく前記ステップは、養子細胞療法を実施するまたは実施しておくステップを含む、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 4 3】

膠芽腫を経験している対象を治療するためのキットであって、治療有効量の請求項 2 6 に記載の薬学的組成物；および治療有効量のオートファジー阻害剤を含むキット。

【請求項 4 4】

前記オートファジー阻害剤は、クロロキン、ヒドロキシクロロキン、スパウチン - 1、S A R 4 0 5、およびベルテポルフィンからなる群から選択される小分子阻害剤を含む、請求項 4 3 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

優先権

本出願は、2 0 1 9 年 1 0 月 2 1 日に提出された M a t o s e v i c に対する米国仮

10

20

30

40

50

特許出願第 6 2 / 9 2 3 , 6 4 4 号に関連し、その優先権の利益を主張するものである。前述の出願の内容は、参照によりその全体として本明細書によって本開示に組み入れられる。

#### 【 0 0 0 2 】

本開示は、概して、がん療法および治療の分野、より特に、複数の抗腫瘍機能を持ち、かつ療法に対するがん抵抗性、特に膠芽腫抵抗性の主要な推進因子に対処するように操作されたナチュラルキラー（NK）細胞を利用する多機能性免疫療法に関する。

#### 【 背景技術 】

#### 【 0 0 0 3 】

膠芽腫（GBM）は、成人および子どもにおける、飛び抜けて最もよく見られかつ侵襲性の悪性タイプの原発性脳腫瘍であり、治療するのが最も困難なものの 1 つである。GBM 患者は、伝統的治療に応答不良である傾向があり、GBM は、あらゆる中枢神経系悪性腫瘍のうちで最悪の予後を有する。先進の診断様態、ならびに手術、化学療法、放射線技法、小分子阻害剤、および複数種の抗新生物薬の使用等の積極的な単一のおよび多面的な治療選択肢を用いてさえ、生存の割合は、過去数十年にわたってごく穏やかに向上しているだけであり、生存期間中央値はおよそ 1 年間である。実際のところ、これまでに調べられた従来の治療のうち、すべてが、第 III 相臨床試験において GBM 患者全生存期間を向上させることに失敗しており、GBM に対する治療法は存在しない。この失敗の理由は多因子的である。

#### 【 0 0 0 4 】

第一に、GBM は、もともと高度に浸潤性かつ侵襲性であり、GBM に対する療法は、脳におけるその生物学的位置、血液脳関門、および神経実質に起因して困難である。さらに、腫瘍内の種々の細胞ならびに腫瘍を取り囲む細胞の間での複雑な相互作用と合わせて、GBM の不均質性は、治療抵抗性および悪性腫瘍再燃の主因の 1 つとして指定されている。公知の GBM サブタイプ（古典的、間葉性、神経系、および前神経系）のそれぞれは、個別のかつ可変的な細胞可塑性に関連した多様な遺伝的およびエピジェネティック的シグネチャーを呈する。

#### 【 0 0 0 5 】

GBM 細胞の亜集団であるグリオーマ幹様細胞（glioma stem-like cell）（GSC）も治療抵抗性の一因となる。GSC は、自己再生能、複能性、および腫瘍発生の誘導を示し得、グリオーマ発生、療法に対する抵抗性、および侵襲性再発を支持する推進力としてますます認識されている。これは、少なくとも一部には、従来の療法が特異的 GSC 亜集団を排除し得なかったことに起因する。しかしながら、これらの細胞は、従来の GBM モデル細胞株（U87MG を含む）によって再現が乏しく、それが GBM の調査を妨げる。

#### 【 0 0 0 6 】

GBM 進行は、細胞のエネルギーバランスの、高度に制御された異化調節因子であるオートファジーによっても促進される。通常の下条件下で、細胞は、基底レベルのオートファジーを利用して、生物学的機能の維持、恒常性、細胞内容物の品質管理、ならびに古いタンパク質および損傷した細胞小器官の排除を支援する。しかしながら、がん細胞では、オートファジーは、がん細胞増殖および腫瘍成長を促進することによって腫瘍発生を促し得る。実際のところ、オートファジーは、GBM 代謝、低酸素における生存、進行、および療法に対する抵抗性を支持し得る。BECN1 遺伝子によってコードされる Beclin-1 は、オートファジーの促進において中心的役割を有する。

#### 【 0 0 0 7 】

付加的に、GBM は、抗原回避に参加し得るまたは免疫抑制を推進し得る、複数の免疫チェックポイントを発現する。これらのうちの 1 つは、抗炎症性アデノシンへの ATP および ADP の漸進的加水分解を媒介しかつ GBM において上方調節される、複数種の細胞（浸潤免疫細胞および腫瘍細胞の両方を含む）上に発現される表面酵素であるエクトー 5'-ヌクレオチダーゼ（CD73）である。CD73 は、CD39 と共同して、アデノシ

10

20

30

40

50

ン5'-三リン酸 (ATP) からの細胞外アデノシンの産生を誘導する。アデノシンは、今度は、ナチュラルキラー (NK) 細胞上のアデノシン受容体に結合し、NK細胞活性の重大な免疫代謝調節異常をもたらす。このように、免疫系恒常性を維持するために非常に重要である、アデノシン作動性 (adenosinergic) 経路によって媒介される免疫抑制は、GBMにおいてハイジャックされる。

【0008】

前述のものに加えて、GBMによる治療回避は、身体の先天性免疫系の重要なエフェクターを抑制する代謝的および機能的カスケードの両方を引き起こす、極度に免疫抑制性の低酸素腫瘍微小環境 (TME) によっても促進される。不十分な血管新生 (vascularization) に起因して腫瘍のTMEに見い出されるもの等、低酸素および虚血の病態生理学的病状は、ATPおよびアデノシン二リン酸 (ADP) 等のアデニンヌクレオチドの重大な代謝変化も推進する。通常の生理学的条件下で、ATPは細胞内区画に局在する；しかしながら、細胞外ATP (ゆえに、アデノシン) のレベルは、低酸素、虚血、および悪性腫瘍の状況に応答して有意に上がり、腫瘍環境の特質を規定する。例えば、腫瘍内細胞外ATP濃度は、同じ起源の細胞の正常組織におけるものよりも、最高1,000倍高くあり得る。これらの条件は、NK細胞の調節異常、ゆえにNK細胞抗腫瘍監視および免疫の抑制の一因となり、それは腫瘍の侵襲性を促進する。

【0009】

先天性免疫の重要なエフェクターとして、NK細胞は固有であり、癌免疫監視において枢要な機能を果たす。感染細胞表面に提示される主要組織適合性複合体 (MHC) を単に検出するT細胞とは異なり、NK細胞機能は、活性化および阻害性受容体のバランスによって推進され、それを通じて、それらは病原体と相互作用し、がん細胞上のMHCクラスI分子を認識する。NK細胞は、事前の感作なしで多様な異常細胞またはストレスを受けた細胞を排除し得、幹細胞またはがん幹細胞を優先的に殺滅さえし得る。標的細胞との免疫シナプスを形成すると、NK細胞は、細胞溶解を誘導するサイトカインを放出する。しかしながら、GBMは、様々な戦術を採用して免疫抑制経路を遅延させ、変更し、または止めさえして、悪性細胞が危険なまたは外来のものとして認識されるのを阻止する。これらのメカニズムは、がんが免疫系によって排除されるのを阻止し、腫瘍成長の制御の失敗につながり、疾患が、非常に早期の段階から致死的状态に進行することを可能にする。

【0010】

NK細胞応答のGBM誘導性機能阻害と並行して、標的抗原の下方調節または変異がGBMにおいてよく観察され、免疫回避および治療に対する抵抗性の一因ともなる。二重抗原標的化のまたはプログラム可能な腫瘍感知のキメラ抗原受容体 (CAR) を含めた、従来の養子移入T細胞療法戦略は、そのような回避に対抗することが前臨床的に評価されているが、GBMは、抗原逃避を超えるメカニズムを採用して標的化を避ける。抗原逃避は、細胞に基づく抗原特異的な単一療法の効能の減少をもたらす、差示的スプライシング、ミスセンス変異、または系統交代 (lineage switch) を含めたメカニズムによって誘発される。実際のところ、ほとんどのGBM特異的なおよびGBM関連の抗原を用いたこれまでのすべての臨床研究において、抗原逃避変種の増生が観察されている。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

新たなかつ有効なGBM治療選択肢の切迫した必要性がある。複数の複雑なメカニズムに対するNK細胞機能喪失を再現することは、従来の療法に重大な課題を提示するだけでなく、一方でそれは、腫瘍組織内に特異的にNK細胞のより大きな存在も要し、それにより、意味のある臨床応答が始まり得る。従来の方法は、これらのエリアにおいて成功していない。それゆえ、GBM腫瘍標的化の増強、TMEへのNK細胞動員の増加の能力があり、それを通じてNK機能不全が救済され得る、有効なGBM治療選択肢のための商業的に実行可能でかつ安全な方法を開発する必要性が存在する。

【課題を解決するための手段】

## 【0012】

本開示は、GBMにおける複数の免疫回避メカニズムを標的にする新規の免疫療法の開発を記載する。その組成物、システム、および方法は、2種以上のGBM抗原を一度に標的にし、一方でまたCD73活性を遮断する抗体を放出するように設計された遺伝子操作されたナチュラルキラー（NK）細胞を初めて組み合わせる。少なくとも1つの実施形態において、本開示は、この細胞に基づく免疫療法と小分子オートファジー阻害剤、例えば、限定されることなくクロロキンとをさらに組み合わせる。この背景におけるオートファジー阻害剤の使用は、さらなるGBM阻害、ならびにGBMにさらに浸潤しかつ全体的な療法有効性を増強するNK細胞を引き付けるケモカインの分泌をもたらす。このように、本開示の組成物、システム、および方法は、免疫監視からのGBM逃避を制限し得、腫瘍へのNK細胞の動員を促進し得、ゆえに持続的な抗GBM応答をもたらす。

10

## 【0013】

ポリヌクレオチド構築物が本明細書において提供される。少なくとも1つの実施形態において、そのような構築物は、少なくとも第2の結合ドメインまたはそのフラグメントをコードする第2の配列に作動可能に連結された、少なくとも第1の結合ドメインまたはそのフラグメントをコードする第1の配列を含む。第1の結合ドメインまたはそのフラグメントは、NK活性化受容体、または第1のがん関連抗原に特異的な第1のタンパク質を含み、第2の結合ドメインまたはそのフラグメントは、標的細胞のアデノシン産生細胞表面タンパク質または標的細胞のアデノシン中間体産生細胞表面タンパク質に特異的である。第1のドメインは、ヒンジドメイン（例えば、限定されることなく、リンカーまたはスパーサー）、1種もしくは複数の自己切断ペプチド（例えば、限定されることなく、P2A、E2A、F2A、T2A）、またはその両方を任意でさらにコードし得る。第2の結合ドメイン／フラグメントは、第1の結合ドメインに作動的に連結された切断可能なリンカーをさらに含む。ある特定の実施形態において、切断可能なリンカーは、標的細胞および／または腫瘍微小環境（TME）に存在する1種または複数のプロテアーゼによって切断可能であるように構成される（限定されることなく、リソソームシステインプロテアーゼ、セリンプロテアーゼ（トリプシン等）、アスパラギン酸プロテアーゼ、トレオニンプロテアーゼ、およびマトリックスメタロプロテアーゼを含む、そのようなプロテアーゼが当技術分野において広く知られておりかつ理解されている）。少なくとも1つの例示的な実施形態において、第2の結合ドメインは、CD73、CD39、またはCD38に特異的な抗体フラグメントを含み、任意で、単鎖抗体フラグメント（scFv）を含み得る。

20

30

## 【0014】

構築物の例示的な実施形態は、少なくとも第3の結合ドメインまたはそのフラグメントをコードする第3の配列をさらに含む。そのような第3の結合ドメイン／フラグメントは、NK活性化受容体、または第2のがん関連抗原に特異的な第2のタンパク質を含む。例えば、第1の結合ドメインまたはそのフラグメントは、がん関連抗原に特異的な第1のタンパク質を含み得、第3の結合ドメインまたはそのフラグメントは、NK活性化受容体（例えば、限定されることなく、ナチュラルキラーグループ2メンバーD受容体（NKG2D）、Nkp30、Nkp46、Nkp40、またはDNAM-1）を含み得る。少なくとも1つの例示的な実施形態において、第1の配列は、配列番号7と少なくとも90%同一である第1のアミノ酸をコードし、第3の配列は、配列番号6と少なくとも90%同一である第2のアミノ酸をコードする。

40

## 【0015】

本開示のがん関連抗原（それに対して、結合ドメインまたはフラグメントの1つまたは複数の特異的であり得る）は、限定されることなく、ジシアロガングリオシド（isialoganglioside）（GD2）、ガングリオシドG3（GD3）、Her2（p185）、CD19、CD20、CD56、CD123、CD22、CD30、CD33、CD171、CS-1、C型レクチン様分子-1；EpCAM、G250、プロテオグリカン、GD3、GD2、MHC II、TAG-72、ミルクムチンコアタンパク質、ルイスA抗原、チロシントタンパク質キナーゼ膜貫通受容体（ROR1）、c-met、

50

上皮成長因子受容体 (EGFR)、EGFR変種III、および／または癌胎児性抗原 (CEA) のうちの1種または複数を含み得る。さらに、第1のがん関連抗原は、1つのタイプの抗原を含み得、一方で第2のがん関連抗原は、所望のとおり、同じまたは異なるタイプの抗原を含み得る。

#### 【0016】

少なくとも1つの例示的な実施形態において、第1および／または第3の結合ドメインまたはそのフラグメントは、NKGD2を含む細胞外リガンド結合ドメインを含み、それぞれの配列は、野生型NK細胞におけるNKGD2の発現と比較して、NKGD2の上方調節された発現をさらにコードする。付加的にまたは代替的に、第2の結合ドメインまたはそのフラグメントは、scFvと連結された抗CD73、抗CD39、または抗CD38を含み得、第1および／または第3の結合ドメインまたはそのフラグメントは、scFvと連結された抗GD2を含み得る。

10

#### 【0017】

なおさらに、第1の配列は、第1のキメラ抗原受容体 (CAR) において発現され得、第2の配列は、第2のCARにおいて発現される。さらに、標的細胞は、がん細胞、TMEにおける悪性細胞であり得、少なくとも1つの例示的な実施形態において、標的細胞は、膠芽腫細胞または膠芽腫TMEである。

#### 【0018】

少なくとも1つの例示的な実施形態において、第1および第3の配列の一方または両方は、活性化があると細胞傷害または細胞溶解活性を促進するための1種または複数のシグナル伝達ドメインを付加的にコードし得る。そこで、そのようなシグナル伝達ドメインは、それに作動的に連結された結合ドメインまたはそのフラグメントが標的細胞に結合すると活性化される。1種または複数のシグナル伝達ドメインは、免疫グロブリンγ-Fc領域受容体III-A (FcγRIIIA)、分化抗原群 (cluster of differentiation) 28 (CD28)、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー9 (TNFRSF9または4-1BB)、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー4 (TNFRSF4またはOX40)、Fasリガンド (FasL)、TNF関連アポトーシス誘導リガンド (TRAIL)、DNAX活性化タンパク質10 (DAP10)、DNAX活性化タンパク質12 (DAP12)、天然細胞傷害性受容体Nkp46、天然細胞傷害性受容体Nkp44、天然細胞傷害性受容体Nkp30、リンパ球機能関連抗原1 (LFA-1)、分化抗原群244 (CD244)、CD137、CD3ゼータ (CD3ζ)、およびNKGD2-DAP10受容体複合体からなる群から選択され得る。少なくとも1つの例示的な実施形態において、第1の配列によってコードされるシグナル伝達ドメインの1つまたは複数はDAP10であり、第2の配列によってコードされるシグナル伝達ドメインの1つまたは複数はCD3ζである。

20

30

#### 【0019】

操作された細胞または操作された細胞株も本明細書において提供される。少なくとも1つの実施形態において、本明細書に開示されるポリヌクレオチド構築物の任意の1種を発現する、操作された細胞または操作された細胞株が提供される。さらに、操作された細胞または操作された細胞株は、それによってコードされる第1の結合ドメインまたはそのフラグメントおよびシグナル伝達ドメインに作動的に連結されかつその間に配置されるヒンジドメインをさらにコードする第1の配列を含み得る。少なくとも1つの例示的な実施形態において、操作された細胞または細胞株は、配列番号8と少なくとも80%、85%、または90%同一であるアミノ酸配列を発現する。

40

#### 【0020】

他の実施形態は、本開示の操作された細胞の集団を含む薬学的組成物を提供する。そのような実施形態において、1種または複数のシグナル伝達ドメインは、それに作動的に連結された結合ドメインまたはそのフラグメントが、例えば、限定されることなく、がんまたは膠芽腫腫瘍細胞等の標的細胞に結合すると活性化され得る。ここで、薬学的組成物は、薬学的に許容される担体、ならびに／または保存剤、充填剤、崩壊剤、湿潤剤、乳化剤

50

、懸濁化剤、甘味剤、香味剤、芳香剤、抗細菌剤、抗真菌剤、平滑剤、および分配剤 (dispensing agent) 等、任意の薬学的に許容される希釈剤、アジュバント、賦形剤、もしくはビヒクルを含み得る (投与の様態および剤形の性質に応じて)。

#### 【0021】

がん罹患している対象を免疫療法治療を使用して治療するための方法も提供される。少なくとも1つの実施形態において、そのような方法は、少なくとも：NK活性化受容体、または第1のがん関連抗原に特異的な第1のタンパク質を含む第1の結合ドメインまたはそのフラグメント、ならびに第2の結合ドメインまたはそのフラグメント、および切断可能なリンカーをコードするポリヌクレオチド構築物であって、第2の結合ドメインは、標的細胞のアデノシン産生またはアデノシン中間体産生細胞表面タンパク質に特異的であり、切断可能なリンカーは、第1の結合ドメインに作動的に連結されている、ポリヌクレオチド構築物を発現する操作されたNK細胞の集団を含む薬学的組成物の治療有効量を対象に投与するステップまたは投与しておくステップを含む。ある特定の実施形態において、ポリヌクレオチド構築物は、NK活性化受容体、または第2のがん関連抗原に特異的な第2のタンパク質を含む第3の結合ドメインまたはそのフラグメントをさらにコードし得る。そこで、第1の結合ドメインまたはそのフラグメントは、がん関連抗原に特異的な第1のタンパク質を含み得、第3の結合ドメインまたはそのフラグメントは、NK活性化受容体および第3の結合ドメインまたはそのフラグメントを含む (または、逆もまた同様)。ポリヌクレオチド構築物は、活性化があると、操作されたNK細胞の細胞傷害または細胞溶解活性を促進するように、第1および／または第3の結合ドメイン／フラグメントに作動的に連結された1種または複数のシグナル伝達ドメインを付加的にコードし得る。

10

20

#### 【0022】

治療有効量の薬学的組成物を投与する (または投与しておく) ステップは、静脈内に、腫瘍内に、非経口的に、または注入により実施され得る。付加的にまたは代替的に、治療有効量の薬学的組成物を対象に投与するまたは投与しておくステップは、養子細胞療法を実施するまたは実施しておくステップを含み得る。

#### 【0023】

そのような方法は、配列番号8と少なくとも80%、85%、または90%同一であるアミノ酸配列を発現する操作されたNK細胞の集団を採用し得る。

#### 【0024】

少なくとも1つの実施形態において、がんは膠芽腫であり得る。付加的にまたは代替的に、第1の結合ドメインまたはそのフラグメントは、GD2に特異的な第1のタンパク質を含み得、第3の結合ドメインまたはそのフラグメントは、NKGD2を含む細胞外リガンド結合ドメインを含み得、第3の結合ドメインまたはそのフラグメントは、CD73、CD39、またはCD38に特異的であり得る。

30

#### 【0025】

併用治療の他の方法も提供される。少なくとも1つの実施形態において、方法は、オートファジー阻害剤を含む付加的な治療的処置を対象に投与するステップまたは投与しておくステップをさらに含み得る。そのようなオートファジー阻害剤は、例えば、限定されることなく、治療有効量の小分子阻害剤および／またはオートファジー経路における遺伝子の遺伝的下方調節であり得る (例えば、BECN1、p62、 $\beta$ -アクチン、ATG5、ATG7、LC3B、ATG12、ATG16L1、PI3K-II $\beta$ 、ULK1、ULK2、FIP200、および／またはLAMP2等)。そのような小分子阻害剤の非限定的な例は、クロロキン、ヒドロキシクロロキン、スパウチン (spautin) -1、SAR405、ベルテポルフィン (vertopofin)、および現在公知のまたは後に発見される任意の他の薬学的オートファジー阻害剤または下方調節因子を含み得る。少なくとも1つの例示的な実施形態において、オートファジー阻害剤はクロロキンを含み、それは、任意で0.01  $\mu$ M ~ 200  $\mu$ Mの濃度で投与され得る。

40

#### 【0026】

本明細書の方法が併用治療を含む場合、治療有効量の薬学的組成物を対象に投与する (

50

または投与しておく) ステップは、静脈内に、腫瘍内に、非経口的に、または注入により実施され得、付加的な治療的処置を対象に投与するまたは投与しておくステップは、全身注射または注入により実施され得る。

#### 【0027】

膠芽腫を経験している対象を治療するためのキットも提供される。例えば、であり限定されることなく、そのようなキットは、治療有効量の本開示の薬学的組成物；および治療有効量のオートファジー阻害剤（小分子阻害剤等の薬学的阻害剤、または別様のものかどうかにかかわらず）、またはオートファジー経路の遺伝的下方調節を達成する組成物を含み得る。キットにおけるオートファジー阻害剤が小分子阻害剤を含む場合、少なくとも1つの実施形態において、阻害剤は、クロロキン、ヒドロキシクロロキン、スパウチン-1、SAR405、およびベルテポルフィンからなる群から選択され得る。

10

#### 【0028】

開示される実施形態、ならびに本明細書に含有される他の特質、利点、および態様、ならびにそれらを実現することについては、本開示の様々な例示的な実施形態についての以下の詳細な説明を踏まえて明らかになるであろう。そのような詳細な説明は、添付の図面と併せられた場合によりよく理解されるであろう。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0029】

【図1-1】 膠芽腫 (GBM) 患者データにおける遺伝子発現、患者由来GBMにおけるCD73、GD2、およびNKG2DLの表面発現についての相関解析から生じる図、ならびに多機能性のNKに基づくGBM免疫療法の設計を図解した図である；下位区分Aは、156人のGBM患者からのデータを使用した、選択された遺伝子の正規化された発現 (FPKM) の間の相関を示している (ピアソンの相関係数が、連続的な勾配色を用いて示されている)；下位区分Bは、NK遺伝子セット全体および個々の遺伝子の正規化された発現 (FPKM) の間の相関を示している (相関は、正規化されたエンリッチメントスコア (NES) として表現されている)；下位区分Cは、同定された4種の遺伝子：NT5E、B4GALNT1、MICA、およびMICBのうちの少なくとも1種の高発現を有するGBM患者の数を表すベン図を示している；下位区分Dは、下位区分Cにおいて同定された4種の遺伝子に基づく、GBM腫瘍における遺伝子発現の患者分布を表す棒グラフを示している；下位区分Eは、フローサイトメトリーによって判定された、SJ-GBM2 (小児性)、GBM43 (原発性)、およびGBM10 (再発性) を含めた、種々のタイプの患者由来GBM細胞上でのCD73、GD2、およびNKG2DLの表面発現に関するデータを示している (結果は、対照と比べた変化倍率 (FC) として報告されている；データは、平均±SEMとして示されている)；ならびに下位区分Fは、本開示の多機能性の腫瘍応答性の操作されたNK細胞およびそれらの動作メカニズムについての少なくとも1つの実施形態を代表する概略的図解を示している (TAPは腫瘍関連プロテアーゼを表し；αCD73 scFvは抗CD73 scFvを表し；αGD2 scFvは抗GD2 scFvを表す)。

20

30

#### 【図1-2】 (上記の通り。)

#### 【図1-3】 (上記の通り。)

40

#### 【図1-4】 (上記の通り。)

【図2】 pNK細胞生存率および活性化マーカー発現に対するアデノシンの効果に関する図式的データである；下位区分Aは、1000 μMのアデノシンを用いた24時間の処理後の、pNK細胞の細胞生存率 (%) に関する図式的データを示している；および下位区分Bは、1000 μMのアデノシンを用いた24時間の処理後の、pNK細胞上でのNKG2D発現に関する図式的データを示している (データは、平均±SEMとして示されている)。

【図3】 本開示のある特定の構築物の構造のインシリコモデリングを示す図である；下位区分Aは、GSスパーサーおよび切断可能なペプチドリンカー (矢印によって識別される) を介して一緒に連結された、直列の抗GD2および抗CD73 scFv細胞外ドメイン

50

ンの分子モデルを示しており、モデルは、R a p t o r Xを使用してベクター配列に基づいて得られた；ならびに下位区分Bは、細胞外s c F vドメインとG D 2（破線の丸によって示される）とのドッキングを示しており、ドッキングは、P a t c h D o c kを使用して実施され、下位区分Aに示される細胞外領域全体および矢印によって示される切断可能なペプチドのモデルを使用してF i r e D o c kにおいて洗練された（画像は、C h i m e r aにおいて作出された）。

【図4】本開示の少なくとも1つの実施形態に従った多機能性構築物の少なくとも1つの実施形態の概略的表示である。

【図5-1】本開示の多機能性の遺伝子操作されたNK細胞の作出に関する図式的データである；下位区分Aは、N K G 2 Dリガンド（N K G 2 D L）を標的にする、本開示に従ったN K G 2 D . D A P 1 0 . C D 3 ζ - C A R構築物（構築物1 B）に対する導入遺伝子の概略的表示を示している；ならびに下位区分Bは、構築物1 Bの構造の概略的表示を示している；下位区分Cは、トランスフェクションの48時間後の、本開示に従った構築物1 Bを発現するように操作されたNK細胞（N K G 2 D . C A R - N K 9 2）または操作されていない対照（N K 9 2）の細胞生存率（%）に関する図式的データを示している；下位区分Dは、下位区分Cのトランスフェクトされた細胞上での、フローサイトメトリーによって判定されたN K G 2 D発現を示している；下位区分Eは、4時間にわたる5のE / T比での、G B M 4 3細胞に対する下位区分Cの細胞（N K G 2 D . C A R - N K 9 2）およびトランスフェクトされていないN K - 9 2細胞（N K 9 2）のインビトロ細胞傷害に関するデータを示している；下位区分Fは、G D 2を標的にする、本開示に従った抗G D 2 . C D 2 8 . C D 3 ζ - C A R構築物（構築物1 A）を表す導入遺伝子構造の概略的表示を示している；ならびに下位区分Gは、構築物1 A（抗G D 2 . C D 2 8 . C D 3 ζ - C A R）の構造の概略的表示を示している；下位区分Hは、トランスフェクションの48時間後の、構築物1 A（G D 2 . C D 2 8 . C D 3 ζ - C A R）を発現するように操作されたN K - 9 2細胞または操作されていない対照（N K 9 2）の細胞生存率（%）を示している；下位区分Iは、下位区分Hのトランスフェクトされた細胞上での、フローサイトメトリーによって判定された抗G D 2 s c F v発現を示している；下位区分Jは、4時間にわたる5のE / T比での、G B M 4 3細胞に対する下位区分Hの細胞（抗G D 2 . C D 2 8 . C D 3 ζ - C A R - N K 9 2）および操作されていないN K - 9 2対照のインビトロ細胞傷害に関するデータを示している；下位区分Kは、本開示に従った完全な多機能性構築物1を表す導入遺伝子の概略的表示を示しており、構築物1は、P 2 Aによって分離された2つのC A Rを含み、第1のC A Rは、C D 2 8およびC D 3 ζシグナル伝達ドメインを有してG D 2を標的にし、腫瘍関連プロテアーゼ切断可能なリンカーによって抗C D 7 3 s c F vに連結され、それは、局所的に放出されると、G B Mからのアデノシンの産生を阻害しまたは代わりに遮断し、第2のC A R構築物は、N K G 2 D - D A P 1 0 - C D 3 ζを含み、N K G 2 Dリガンドを標的にし、G B M腫瘍応答性である；下位区分Lは、腫瘍応答性抗C D 7 3 s c F v分泌二重特異性C A R（構築物1）の概略的表示を示している；下位区分Mは、トランスフェクションの48時間後の、全体の多機能性構築物1を発現するように操作されたN K - 9 2細胞の細胞生存率（%）に関するデータを示している；下位区分Nは、トランスフェクションの48時間後の、フローサイトメトリーによって判定されたN K G 2 D発現を示している；下位区分Oは、抗C D 7 3 S c F vフラグメントを放出するu P Aでのタンパク質分解的切断後の、フローサイトメトリーによって判定されたNK細胞上での抗C D 7 3 s c F vおよび抗G D 2 s c F vの発現を示している；下位区分Pは、単離された末梢血由来NK（p N K）細胞（C D 5 6 + C D 3 -）の純度を示すフローサイトメトリーデータを含む；下位区分Qは、2ラウンドのレンチウイルス形質導入後の、全体の構築物を発現するように操作されたp N K細胞の細胞生存率（%）に関するデータを示している；下位区分Rは、2ラウンドのレンチウイルス形質導入後の、フローサイトメトリーによって判定された操作されたp N K細胞上でのN K G 2 D発現を示している；下位区分Sは、2ラウンドのレンチウイルス形質導入後の、フローサイトメトリーによって判定されたp N K細胞上での抗C D 7 3 s c

10

20

30

40

50

Fvおよび抗GD2 scFvの発現に関する図式的データを示している；ならびに下位区分Tは、NK MACS（登録商標）培地における形質導入されていないpNKおよびCD73・mCAR-NK細胞の増大倍率を代表するデータを描写している；（下位区分P～Tを通じて示されるデータは、代表的なドナーからの三つ組での単離されたpNK細胞に関するものである；図5におけるデータは、平均±SEMとして示されている。 $*p < 0.05$ 、 $**p < 0.0$ ）。

【図5-2】（上記の通り。）

【図5-3】（上記の通り。）

【図5-4】（上記の通り。）

【図5-5】（上記の通り。）

【図5-6】（上記の通り。）

10

【図6】初代NK細胞に対する調査に関する図式的データを示す図である；下位区分A～DおよびE～Hは、それぞれ2人の別個のドナーから単離されたpNK細胞に関するデータを示しており、特徴付けおよび発現測定は、実施例1に関連して記載されるように検討された（データは、平均±SEMとして示されている。 $*p < 0.05$ 、 $**p < 0.0$ ）。

【図7-1】患者由来GBMに対する、本開示の少なくとも1つの実施形態に従った多機能性の遺伝子操作されたNK細胞のインビトロエフェクター活性に関する図式的データである；下位区分Aは、4時間にわたる表示されるE/T比での、GBM43細胞に対するNK-92（対照）およびCD73・mCAR-NK92細胞（構築物1を発現する）のインビトロ細胞傷害を示している；下位区分Bは、GBM43細胞との4時間の共培養（E/T比、5：1）後の、NK-92およびCD73・mCAR-NK92細胞の脱顆粒[% CD107および(MFI) CD107]を代表する棒グラフを示している（NK細胞を、脱顆粒のマーカーとしての表面CD107a発現についてフローサイトメトリーによって解析した）；下位区分Cは、GBM43細胞との4時間の共培養（E/T比、5：1）後の、NK-92およびCD73・mCAR-NK92細胞によるIFN- $\gamma$ 産生(% IFN- $\gamma$ )を示している；下位区分Dは、4時間にわたる表示されるE/T比での、GBM43細胞に対するCD73・mCAR-NK92およびCD73・mCAR-NK92（aCD73 scFv切断後）細胞のインビトロ細胞傷害を示している；下位区分Eは、uPA処理CD73・mCAR-NK92細胞からの放出後の切断されたaCD73 scFvとのインキュベーション後の、GBM43細胞のCD73活性を示している；下位区分F～Hは、4時間にわたる表示されるE/T比での、SJ-GBM2、GBM43、およびGBM10細胞を含めた、種々のGBM細胞に対するpNKおよびCD73・mCAR-pNK細胞のインビトロ細胞傷害を示している；下位区分Iは、GBM43細胞との4時間の共培養（E/T比、5：1）後の、pNKおよびCD73・mCAR-pNK細胞の脱顆粒(% CD107)を示している（NK細胞を、脱顆粒のマーカーとしての表面CD107a発現についてフローサイトメトリーによって解析した）；下位区分Jは、GBM43細胞との4時間の共培養（E/T比、5：1）後の、pNKおよびCD73・mCAR-pNK細胞のIFN- $\gamma$ 産生(% IFN- $\gamma$ )を示している；下位区分Kは、4時間にわたる表示されるE/T比での、GBM43細胞に対するpNKおよびCD73・mCAR-pNK（aCD73 scFv切断後）細胞のインビトロ細胞傷害を示している；下位区分Lは、uPA処理CD73・mCAR-NK細胞からの切断後の切断されたaCD73 scFvとのインキュベーション後の、GBM43細胞のCD73活性を示している；下位区分Mは、GBM43細胞との12時間の共培養（E/T比、5：1）後の、pNKおよびCD73・mCAR-pNK細胞上でのCD16発現(MFIの%)の相対的減少を示している；下位区分Nは、GBM43細胞との12時間の共培養（E/T比、5：1）後の、pNKおよびCD73・mCAR-pNK細胞上でのNKGA2A発現(MFIの%)の相対的增加を示している；ならびに下位区分OおよびPは、4時間にわたる表示されるE/T比での、非悪性神経細胞株hCMC/D3およびHCN-2に対するpNKおよびCD73・mCAR-pNK細胞のインビトロ細胞傷

20

30

40

50

害を示している（下位区分F～Pを通じて示されるデータは、代表的なドナーからの少なくとも三つ組での単離されたpNK細胞に関するものである；データは、平均±SEMとして示されている；\* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.01$ ）。

【図7-2】（上記の通り。）

【図7-3】（上記の通り。）

【図8】CD73によるリン酸形成を検出するために採用された反応の概略図（下位区分A）、および30分間のインキュベーション後に620nmにおけるOD値を読み取った、96ウェルプレートにおけるリン酸標準曲線（下位区分B）である。

【図9】GBM43細胞とpNKまたはCD73.mCAR-pNK細胞（本開示の構築物1を発現するpNK細胞）との共培養のライブイメージング顕微鏡画像（Incucyte S3を使用して撮影された）であり、画像における小さな不規則な形をした円形の点はNK細胞を表し、大きな紡錘状の細胞はGBM43細胞を表す（スケールバー=200μm）。

【図10】hCMEC/D3およびHCN-2細胞上でのCD73、GD2、およびNKGD2DLの表面発現に関するデータを示す図であり、正常脳細胞株上での3種のマーカーの発現レベルは、フローサイトメトリーによって判定され、対照と比べた変化倍率（FC）として報告されている；データは、平均±SEMとして示されている。

【図11】BECN1遺伝子ノックダウンまたはCQでの薬理的処理のいずれかによる、GBM細胞におけるオートファジーの阻害に関する図式的データである；下位区分Aは、BECN1 shRNA（h）レンチウイルス粒子をトランスフェクトされた、または50μMのCQで24時間処理されたGBM43細胞であって、その後、細胞を溶解し、BECN1、LC3B、およびp62の発現レベルをフローサイトメトリーにより解析した（β-アクチンをローディング対照として使用した）、GBM43細胞からのデータを示している；ならびに下位区分Bは、BECN1（BECN1/β-アクチン）、LC3B（LC3B/β-アクチン）、およびp62（p62/β-アクチン）の相対的発現レベルの定量化を示している（留意すべきは、ベクリン（Beclin）1（BECN1）、LC3-I（LC3B）、およびp62は、オートファジーの3種の主たるマーカーである）。

【図12-1】NK細胞機能およびホーミングに対する、GBMにおけるオートファジーを標的にすることの効果に関するデータを示す図である；下位区分Aは、インビトロで様々な濃度のCQを用いた24時間の処理後の、GBM43細胞の生存率を表す；下位区分Bは、Prism 5（GraphPad Software Inc., California）を使用して算出されたIC<sub>50</sub>に関する、対数[CQ濃度（μM）]に対してプロットされた細胞生存率（%）を示している；下位区分CおよびDは、BECN1 shRNAレンチウイルスをトランスフェクトされたGBM43細胞（BECN1<sup>-</sup> GBM43）におけるまたはCQで処理された細胞における、CCL5およびCXCL10 mRNAの発現を示している（結果は、トランスフェクトされていない対照と比較した変化倍率（FC）として報告されている）；下位区分EおよびFは、LY294002、BAY11-7082、およびSP600125を含めた様々な阻害剤の存在または非存在下での、CQを用いた24時間の処理後の、GBM43細胞の上清におけるCCL5およびCXCL10についてのELISAによる定量化を示している；下位区分Gは、BBBを横断するpNK細胞遊走に対するCCL5またはCXCL10の効果を評価するために使用された実験設定を表すインビトロでの実験的二重層BBBモデルの概略を示している；下位区分Hは、実験的BBBを通したpNK細胞の移行を示している；下位区分Iは、CCK-8アッセイによって判定される、GBM43およびBECN1<sup>-</sup> GBM43細胞のインビトロ生存率に関するデータを示している；下位区分Jは、腫瘍成長およびNK細胞浸潤に対する、BECN1ノックダウンによりオートファジーを標的にすることの効果を評価する実験設計の概略を示している（すなわち、GBM43細胞をRag1<sup>-/-</sup>マウスの右脇腹に注射し、BECN1<sup>-</sup> GBM43細胞を左脇腹に注射した）；下位区分Kは、表示される日にモニターされかつ記録された腫瘍成長からのデータを示している

10

20

30

40

50

；下位区分Lは、それぞれ抗NKp46、抗CCL5、および抗CXCL10抗体を使用して、表示される腫瘍切片に対して実施されたNK細胞（上の行）、CCL5（真ん中の行）、またはCXCL10（下の行）の免疫組織化学（IHC）染色の画像を示している（バー＝50μm；200×倍率）；下位区分Mは、対照およびBECN1<sup>+</sup>腫瘍に浸潤するNK細胞の定量化を示しており、細胞カウントは、4つの連続高倍率視野（HPF）において200×倍率で記録された；下位区分NおよびOは、対照およびBECN1<sup>+</sup>腫瘍におけるCCL5およびCXCL10のIHCスコアをグラフに描いている（注記：下位区分Hに示されるデータは、1人の代表的なドナーからの少なくとも三つ組での単離されたpNK細胞に関するものである）；データは、平均±SEMとして示されている；\*  
p<0.05、\*\* p<0.01。

10

【図12-2】（上記の通り。）

【図12-3】（上記の通り。）

【図13】GBMに対するオートファジーの阻害に応答したケモカイン発現に関する図式的データであり、BECN1<sup>+</sup> GBM43またはCQ処理GBM43細胞におけるCCL2およびCXCL12 mRNAの発現はRT-PCRによって判定され、GAPDHが参照遺伝子（対照）として使用され、結果は、対照と比べたFCとして報告されている；データは、平均±SEMとして示されている；\* p<0.05、\*\* p<0.01。

【図14】GBM43培養培地における種々のタイプのケモカインの濃度を調べるためのELISAアレイの使用に関する図である；下位区分Aは、全実験過程の概略図を示している；および下位区分Bは、調べられた各ケモカインの判定された濃度を示している。

20

【図15】下位区分Aは、表示されるGBM43（対照）皮下異種移植片腫瘍切片に対して実施されたマウス（Rag1<sup>-/-</sup>）NK細胞の免疫組織化学（IHC）染色を示す図である；および下位区分Bは、表示されるBECN1<sup>+</sup> GBM43皮下異種移植片腫瘍切片に対して実施されたマウス（Rag1<sup>-/-</sup>）NK細胞のIHC染色を示す図であり、IHC染色は、BECN1<sup>+</sup> GBM43皮下異種移植片腫瘍の腫瘍組織の末梢および内部領域の両方へのNK細胞の浸潤の増強を示す。

【図16】オートファジーの標的化後の、NK細胞媒介性殺滅に対するGBM細胞の感作に関する図式的データである；下位区分Aは、様々な濃度のCQを用いた24時間の処理後の、GBM43細胞上でのNKG2DL発現（MFIおよび%）を示している；下位区分Bは、様々な濃度のCQを用いた24時間の処理後の、GBM43細胞上でのCD73発現（MFIおよび%）を示している；下位区分Cは、様々な濃度のCQを用いた24時間の処理後の、GBM43細胞のCD73活性を示している；下位区分Dは、様々な濃度のCQを用いた24時間の処理後の、GBM43細胞上でのGD2発現（MFIおよび%）を示している；下位区分Eは、様々な濃度のCQを用いた24時間の処理後の、GBM43細胞に対するpNK細胞の殺滅活性を示している；下位区分Fは、5のE/T比での4時間の共インキュベーション後の、BECN1<sup>+</sup> GBM43細胞に対するNK92細胞およびpNK細胞の殺滅活性を示している；図16におけるすべてのデータは、1人の代表的なドナーから少なくとも三つ組で示されている；データは、平均±SEMとして示されている；\* p<0.05、\*\* p<0.01。

30

【図17-1】GMB43異種移植片モデルにおける、本開示の多機能性の操作されたNK細胞の抗GBM活性に関する図である；下位区分Aは、インビボ処理プログラムを図解する概略図を示している；下位区分Bは、PBS、CQ、pNK細胞、および本開示の構築物1を発現するCD73<sup>+</sup> mCAR<sup>+</sup> pNK細胞を含めた、個々の処理群の腫瘍成長に関する図式的データを示している（腫瘍サイズは、キャリパー測定によって判定された）；下位区分Cは、処理の開始後28日目の剖検後の、各処理群におけるマウスの平均腫瘍重量に関する図式的データを示している；下位区分Dは、処理期間中の、各群におけるマウスの体重の変化をグラフに描いている；下位区分Eは、抗NKp46抗体およびプロテインLを使用した、各処理群における表示される腫瘍切片に対して実施されたNK細胞（明るい点）および切断された抗CD73<sup>+</sup> scFv（矢印によって示される）の免疫蛍光（IF）染色の画像を示している（バー＝50μm；200×倍率）；下位区分Fは、種

40

50

々の処理群における、抗CD73抗体を使用した、表示される腫瘍切片に対して実施されたCD73のIHC染色を示している（バー＝100μm；200×倍率）；下位区分Gは、種々の処理群における、表示される腫瘍切片に対して実施されたCD73発現のIHCスコアをグラフに描いている；下位区分HおよびIは、それぞれ抗CCCL5および抗CXCL10抗体を使用した、種々の処理群における、表示される腫瘍切片に対して実施されたCCCL5（下位区分H）およびCXCL10（下位区分I）のIHC染色を示している（バー＝50μm；200×倍率）；下位区分Jは、種々の処理群における、表示される腫瘍切片に対して実施されたCCCL5またはCXCL10のIHCスコアを示している（注記：この調査において例示されるデータは、1人の代表的なドナーからの少なくとも三つ組での単離されたpNK細胞に関するものである；データは、平均±SEMとして示されている；\* p<0.05、\*\* p<0.01）。

10

【図17-2】（上記の通り。）

【図18】ルシフェラーゼ発現GBM43（GBM43-Luc）細胞の作出に関するデータを示す図であり、GBM43細胞に、誘導性sueCMVプロモーターの下でホタルルシフェラーゼ3遺伝子を発現する商業的ルシフェラーゼ（Luc）レンチウイルス粒子をトランスフェクトし、形質導入後にピューロマイシン抵抗性の細胞を回収し、ルシフェラーゼ発現を、IVISスペクトルを使用した生物発光測定によって検出した；下位区分Aは、ルシフェラーゼを発現するGBM43-Lucの能力を示す代表的な生物発光画像を示している（播種された細胞の関数としてのシグナル強度が示されている）；下位区分Bは、GBM43-Luc細胞数の関数としての蛍光強度を代表する図式的データを示している（全光束（total flux）（光子／秒）を、AURAソフトウェアを使用して定量化した）；下位区分Cは、GBM43-Lucおよび親対照GBM43細胞の成長曲線を示している（データは、平均±SEMとして示されている）。

20

【図19-1】同所性GBM43異種移植片モデルにおける、オートファジーの阻害との組み合わせでのCD73-mCAR-pNK細胞のインビボ活性に関するデータを示す図である；下位区分Aは、インビボ処理プログラムを図解した概略図を示している；下位区分BおよびCは、生物発光イメージングを使用して経時的にモニターされた、各群の個々のマウスにおける腫瘍容積を示している；下位区分Dは、処理の開始後28日目の剖検後の、各処理群におけるマウスの平均腫瘍サイズを描写した折れ線グラフを示している；下位区分Eは、処理期間中の、各群におけるマウスの体重の変化についての折れ線グラフを示している；下位区分Fは、それぞれ抗CCCL5および抗CXCL10抗体を使用して、種々の処理群における表示される腫瘍切片に対して実施されたCCCL5（左の2つのパネル）およびCXCL10（右の2つのパネル）のIHC染色の画像を示している（バー＝50μm；200×倍率）；下位区分Gは、抗Nkp46抗体を使用して、表示される腫瘍切片に対して実施されたNK細胞のIHC染色の画像を示している（バー＝50μm；200×倍率）；下位区分Hは、CD73-mCAR-pNKまたはCQ+CD73-mCAR-pNKで処理された頭蓋内腫瘍へのNK細胞浸潤の定量化を描写した棒グラフを示している（ここでは、細胞カウントは、4つの連続高倍率視野（HPF）において200×倍率で記録された）；下位区分Iは、種々の処理群において、抗CD73抗体を使用して、表示される腫瘍切片に対して実施されたCD73に対するIHC染色の画像を示している（バー＝50μm；200×倍率）；下位区分Jは、種々の処理群において、表示される腫瘍切片に対して実施されたCD73発現のIHCスコアを描写した図式的データを示している；下位区分Kは、GBM-TMEにおける細胞外アデノシン産生を図解した概略図を示している；ならびに下位区分Lは、各処理群におけるマウスの局所的脳組織におけるアデノシン濃度を描写した図式的データを示している（注記：図19に示されるデータは、少なくとも三つ組での単離されたpNK細胞に関するものである；データは、平均±SEMとして示されている；\* p<0.05、\*\* p<0.01）。

30

40

【図19-2】（上記の通り。）

【図19-3】（上記の通り。）

【図19-4】（上記の通り。）

50

【図 19-5】（上記の通り。）

【発明を実施するための形態】

【0030】

本開示は、様々な改変および代替的な形態の影響を受けやすいものの、その例示的な実施形態が、図面において例として示され、本明細書に詳細に記載される。

【0031】

配列表の簡単な説明

配列番号 1 は、以下のとおり、プロテアーゼ感受性リンカーのアミノ酸配列である：G G G S G G G S G G G S；

配列番号 2 は、以下のとおり、切断可能なペプチドフラグメントのアミノ酸配列である：L S G R S D N H；

配列番号 3 は、以下のとおり、「自己切断」P 2 A ペプチドのアミノ酸配列である：G S G A T N F S L L K Q A G D V E E N P G P；

配列番号 4 は、以下のとおり、プライマーの核酸配列である：A C A T C G C T C A G A C A C C A T G；

配列番号 5 は、以下のとおり、プライマーの核酸配列である：T G T A G T T G A G G T C A A T G A A G G G；ならびに、

配列番号 6 は、ナチュラルキラーグループ 2 メンバー D 受容体（NKG2D）を含む、本開示の抗原結合ドメインまたはそのフラグメントの少なくとも 1 つの実施形態の人工アミノ酸配列である（hCD3ゼータ-hNKG2D-P2A-hDAP10／Flag）：

【0032】

【化 1】

MRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPQRRKNP  
QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALP  
PRGWIRGRRSRHSWEMSEFHNYNLDLKKSDFSTRWQKQRCPPVVKSKCRENASPFFCC  
FIAVAMGIRFIIMVTIWSAVFLNSLFNQEVQIPLTESYCGPCPKNWICYKNNCYQFFDESK  
NWEYSQASCMSQNASLLKVYSKEDQDLLKLVKSYHWMGLVHIPTNGSWQWEDGSILS  
PNLLTIEMQKGDCALYASSFKGYIENCSTPNTYICMQRTVGSGATNFSLLKQAGDVEE  
NPGPMIHLGHILFLLLPVAAADYKDDDDKQTTPGERSLPAFYPGTSGSCSGCGSLSLP  
LLAGLVAADAVASLLIVGAVFLCARPRRSPAQDGKVYINMPGRG；

配列番号 7 は、がん関連抗原ジシアロガングリオシド（GD2）に特異的に結合し、scFvを含む、本開示の抗原結合ドメインまたはそのフラグメントの少なくとも 1 つの実施形態の人工アミノ酸配列である（抗GD2 scFv-CD8H-hCD28-hCD3ゼータ）：

【0033】

10

20

30

40

## 【化 2】

EVQLQLQSGPELEKPGASVMISCKASGSSFTGYNMNWVRQNIKGSLEWIGAIDPYYGGTS  
YNQKFKGRATLTVDKSSSTAYMHLKSLTSEDSAVYYCVSGMEYWGQGTSTVTVSSGGG  
GSGGGGSGGGGSDVVMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHRNGNTYLHWYLYKPG  
QSPKLLIHKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPPLTFGA  
GTKLELKTTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIFWVLVVV  
GGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAA  
YRSMRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPQRR  
KNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ  
ALPPR;

10

配列番号 8 は、切断可能なリンカーを介して C D 7 3 に特異的な第 2 の結合ドメインまたはそのフラグメントに作動的に連結されたがん関連抗原 G D 2 に特異的に結合する第 1 の抗原結合ドメインまたはそのフラグメント（配列番号 7）、および N K G 2 D を含む第 3 の抗原結合ドメインまたはそのフラグメント（配列番号 6）を含む、本開示の C A R 構築物の少なくとも 1 つの実施形態の人工アミノ酸配列である（抗 C D 7 3 s c F v - リンカー - 切断可能なペプチド - リンカー - G D 2 . C A R - N K G 2 D . C A R）：

【 0 0 3 4 】

20

30

40

50

## 【化 3】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAYSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGRT  
 YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYGRVDEWGRGTLTV  
 SSGGGGSGGGGSGGGGSGSVLTQPPSASGTPGQRTVISCSSGLSNIGRNPVNWYQQLP  
 TAPKLLIYLDNLRLSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSHPGWTF  
 GGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSLSGRSDNHGSSGTEVQLLQSGPELEKPGASVMIS  
 CKASGSSFTGYNMNWVRQNIGKSLEWIG AIDPYYGGTSYNQKFKGRATLTVDKSSSTA  
 YMHLKSLTSEDSAVYYCVSGMEYW GQGTSVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDVVMQT  
 PLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHRNGNTYLHWY LQKPGQSPKLLIHKVSNRFSGVPDRF  
 SSGSGTDFTLKISRVEAEDLG VYFCSQSTHVPPLTFGAGTKLELKTTPAPRPPTPAPT  
 ASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVR  
 SKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSMRVKFSRSADAPAYQQG  
 QNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDP EMGGKPKRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAY  
 SEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSGATNFSLLKQAGDV  
 EENPGPMRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDP EMGGKPK  
 RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALH  
 MQALPPRGWIRGRSRHSWEMSEFHNYNLDLKKSDFSTRWQKQRCPVVKSKCENAS  
 PFFFCFIAVAMGIRFIIMVTIWSAVFLNSLFNQEVQIPLTESYCGPCPKNWICYKNNCYQ  
 FFDESKNWYESQASCMSQNASLLKVYSKEDQDLLKLKSYHWMGLVHIPTNGSWQW  
 EDGSILSPNLLTIEMQKGD CALYASSFKGYIENCSTPNTYICMQRTVGS GATNFSLLKQ  
 AGDVEENPGPMIHLGHILFLLLPVAAADYKDDDDKQTTPGERSSLPAFYPGTSGSCSG  
 CGSLSLPLLAGLVAADAVASLLIVGAVFLCARPRRSPAQDGKVYINMPGRG

10

20

30

## 【0035】

前述のものに加えて、上記の配列は、本明細書と一緒に提出されたファイルにおいてコードされるコンピューター可読形態で提供され、参照により本明細書に組み入れられる。コンピューター可読形態で記録された情報は、米国特許規則 1.821(f)に従って、上で提供される書面の配列表と同一である。

## 【0036】

## 詳細な説明

本開示の原理についての理解を促進する目的のために、ここで、図面において例示される実施形態に言及がなされ、それを記載するために具体的な言葉が使用されるであろう。それにもかかわらず、これらの実施形態の説明によって、範囲の限定が意図されるわけではないことが理解されるであろう。それどころか、本開示は、添付の特許請求の範囲によって規定される本出願の精神および範囲の内に含まれ得る代替物、改変、および均等物を網羅することを意図される。前に記述されるように、本技術は、1つまたは複数の好ましい実施形態において例示され得かつ記載され得るものの、その組成物、システム、および方法は、多くの異なる構成、形態、材料、および付属物を含み得る。

40

## 【0037】

以下の説明において、本開示についての徹底的な理解を提供するために、数多くの具体的な詳細が記載される。特定の例は、これらの具体的な詳細の一部またはすべてを用いず

50

に実行され得、本開示は、特定の生物学的システムに限定されず、それは当然のことながら変動し得ることが理解されるべきである。

【0038】

別様に定義されない限り、本明細書において使用されるすべての技術的および科学的用語は、関連する技術分野における当業者によって共通に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書に記載されるものと同様のまたは均等の任意の方法および材料が、本出願の主題の実践または試験において使用され得るものの、好ましい方法および材料が本明細書に記載される。付加的に、本明細書および添付の特許請求の範囲において使用するとき、「a」、「an」、および「the」という単数形は、本内容上別様に明確に述べられない限り、複数形の指示対象を含む。さらに、別様に具体的に記されない限り、「約」という用語は、パーセンテージに関して値プラスまたはマイナス10%、および単位値に関してプラスまたはマイナス1.0単位の域を含めた、値または域のある程度の変動性を可能にし得、例えば約1.0とは、0.9~1.1の値の域、または域の記される限度の域を指す。「実質的に」という用語は、同じように値または域のある程度の変動性、例えば記される値または域の記される限度の90%以内、95%以内、または99%以内を可能にし得る。

10

【0039】

「対象」または「患者」とは、該用語が本明細書において使用されるとき、哺乳類、好ましくはヒトであり、雄、雌、成人、および子どもを含む。

【0040】

「核酸」とは、一本鎖または二本鎖形態のいずれかにあるデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドおよびそのポリマー、ならびにその相補体を指す。該用語は、合成の、天然に存在する、および天然に存在しない、参照核酸と同様の結合特性を有する、ならびに参照ヌクレオチドと同様の様式で代謝される、公知のヌクレオチド類似体または改変された骨格残基もしくは連結を含有する核酸を包含する。

20

【0041】

「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」という用語は、アミノ酸残基のポリマー、ポリペプチド、もしくはポリペプチドのフラグメント、ペプチド、または融合ポリペプチドを指すために、（別様に明示的に記されない限り）本明細書において互換可能に使用される。該用語は、1つまたは複数のアミノ酸残基が、相当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アミノ酸ポリマーに、ならびに天然に存在するアミノ酸ポリマーおよび天然に存在しないアミノ酸ポリマーに適用される。

30

【0042】

本明細書において使用するとき、「アデノシン作動性」とは、アデノシンに対して働くことを意味する。

【0043】

本明細書において使用される「抗体フラグメント」とは、無傷抗体の一部分、好ましくは無傷抗体の抗原結合領域または可変領域を意味する。抗体フラグメントの例には、例えば単鎖抗体分子(scfv)、ナノボディ、F(ab')<sub>2</sub>、F(ab)<sub>2</sub>、Fab'、Fab、Fv、またはdAbが含まれる。構造にかかわらず、本明細書において使用される抗体フラグメントは、全長抗体によって認識される同じ抗原と結合する。例えば、抗体フラグメントには、重鎖および軽鎖の可変領域からなる「Fv」フラグメント等、可変領域からなる単離されたフラグメント、または軽鎖および重鎖可変領域がペプチドリンカーによって接続されている組み換え単鎖ポリペプチド分子（「scfvタンパク質」）が含まれる。しばしば「scfv」と略される「単鎖抗体」は、相互作用して抗原結合部位を形成するV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>ドメインの両方を含むポリペプチド鎖からなる。V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>ドメインは、通常、1~25個のアミノ酸残基のペプチドによって連結される。抗体フラグメントには、ダイアボディ、トリアボディ、および単ドメイン抗体(dAb)も含まれる。本開示において、抗体および抗体の様々な特性に言及がなされるものの、それとは反対のことが明示的に記述されない限り、本開示は、機能的抗体フラグメントにも適用され

40

50

る。

#### 【0044】

「キメラ抗原受容体」(CAR、またキメラT細胞受容体としても知られる)とは、宿主T細胞またはNK細胞において発現されるように、ならびに特異的標的抗原(例えば、CD39/CD79)およびその抗原を発現する細胞に対する免疫応答を誘導するように設計された合成構築物である。CARは、典型的に、CD3-ζ、CD28、OX40、4-1BB、Lck、および/またはICOSのエンドドメインを含めた、CD3-ζまたはCD28膜貫通ドメインおよび選択的T細胞活性化部分等の付加的な構成要素も含む融合タンパク質に組み入れられた、単鎖抗体(scFv)またはFabフラグメント等の抗体フラグメントを含む。そのような要素の様々な組み合わせも使用され得る。したがって、CARは、細胞質尾部に存在する免疫受容体活性化モチーフ(ITAM)を利用するもの等、共刺激性ドメインを介して活性化シグナルを変換するようにも設計され得る。抗原結合部分を利用した遺伝子構築物は、それらが、ヒト白血球抗原(HLA)非依存的形で標的細胞表面の天然抗原に結合し、それゆえ患者または特異的HLAがマッチしたドナーから回収される必要がないという点で、「普遍的」であるという付加的な利点を与える。

10

#### 【0045】

本開示の実施形態に従ったCARは、当技術分野において公知の任意の手段によって産生され得るが、とはいえ好ましくは、それは、組み換えDNA技法を使用して産生される。CARのいくつかの領域をコードする核酸配列が、分子クローニングの標準的技法(ゲノムライブラリースクリーニング、PCR、プライマー援用ライゲーション、酵母および細菌由来のscFvライブラリー、部位指定変異導入等)によって調製され得、完全なコード配列に集められ得る。結果として生じるコード領域は、発現ベクターに挿入され得、適切な発現宿主同種または自家NK細胞を形質転換するために使用され得る。言い換えれば、形質導入またはトランスフェクションを実施して、CAR発現構築物をNK細胞に導入し得、次いでそれを使用して、対象における免疫応答を誘導し得る。付加的にまたは代替的に、CRISPR/Cas9ゲノム編集技術等を採用して、特定の遺伝子をノックダウンもし得る。がん免疫療法のためのNK細胞の遺伝子操作のための技法は、当技術分野において一般的に知られている。

20

#### 【0046】

さらに、上で記述されるように、CAR-NK細胞は、疾患関連抗原(TAA)にまたは標的可能な構築物上のハプテンに結合する、scFvまたはFab等の標的化分子を含むし得る。これは、T細胞とは異なり、NK細胞が、殺滅されるべき細胞を標的にするための抗原特異性を欠くという問題を避ける。細胞標的化scFvまたはFabは、膜貫通ドメインを介して1種または複数の細胞内シグナル伝達ドメインに連結して、リンパ球活性化をもたらし得る。CAR-NK細胞とともに使用されるシグナル伝達ドメインには、例えばCD3-ζ、CD28等が含まれ得る。本開示のCAR構築物には、当技術分野において公知の任意のそのような構築物が含まれ得る。多種多様なCAR構築物が報告されており、市販されている。

30

#### 【0047】

関心対象の標的「に結合する」、本開示の「抗原結合ドメインもしくはそのフラグメント」または「結合ドメインもしくはそのフラグメント」とは、タンパク質、結合ドメイン、または操作された細胞が、タンパク質、または抗原を発現する細胞もしくは組織を標的にすることにおいて診断剤および/または治療剤として有用であるような、十分なアフィニティーで抗原/標的に結合するものである。標的分子へのタンパク質、結合ドメイン、および/または操作された細胞の結合に関して、特定のポリペプチドまたは特定のポリペプチド標的上のエピトープ「への特異的結合」または「に特異的に結合する」または「に特異的で」とあるという用語は、非特異的相互作用とは測定可能な程度に異なる結合を意味する。特異的結合は、例えば、標的と類似している対照分子との競合による判定によって測定され得る。少なくとも1つの実施形態において、「特異的に結合する」とは、その指

40

50

定されるアデノシン産生酵素標的受容体（例えば、CD73またはCD39）への抗原結合ドメインの結合を指し、他の指定される非標的受容体への結合を指さない。

【0048】

核酸は、それが別の核酸配列と機能的関係性に置かれる場合、「作動的に連結され」ている。例えば、プレ配列または分泌リーダーに対するDNAは、それがポリペプチドの分泌に参加するプレタンパク質として発現される場合、ポリペプチドに対するDNAに作動的に連結されており；プロモーターまたはエンハンサーは、それが翻訳を促すように配置される場合、コード配列に作動的に連結されている。一般的に、「作動的に連結された」とは、連結されているDNA配列が隣接しており、リーダーの場合には、隣接しておりかつリーディング相にあることを意味する。しかしながら、エンハンサーは、必ずしも隣接している必要はない。連結は、好都合な制限部位でのライゲーションによって遂行され得る。そのような部位が存在しない場合、合成オリゴヌクレオチドアダプターまたはリンカーが、従来の実践に従って使用され得る。

10

【0049】

ポリペプチド配列への言及に関する「アミノ酸配列同一性パーセント(%)」は、配列同一性最大パーセントを達成するように配列をアラインし、必要であればギャップを導入し、いかなる保存的置換も配列同一性の部分として見なさない後に、参照ポリペプチド配列におけるアミノ酸残基と同一である、候補配列におけるアミノ酸残基のパーセンテージとして定義される。アミノ酸配列同一性パーセントを判定する目的のためのアラインメントは、例えば公的に利用可能なコンピューターソフトウェアを使用して、当技術分野における技能の範囲内にある様々なやり方で達成され得る。当業者であれば、比較されている配列の全長にわたる最大アライメントを達成するために必要とされる任意のアルゴリズムを含めて、配列をアラインするための適当なパラメーターを決定し得る。

20

【0050】

「下方調節」または「下方調節された」は、互換可能に使用され得、確立されたレベル（例えば、健常コホートまたは関心対象の対象のもの）と比較した、遺伝子、核酸、代謝産物、転写産物、酵素、タンパク質、またはポリペプチド等のマーカーのレベルの減少を指す。「上方調節」または「上方調節された」または「過剰発現した」も、互換可能に使用され得、確立されたレベル（例えば、健常対照または関心対象の対象のもの）と比較した、遺伝子、核酸、代謝産物、転写産物、タンパク質、酵素、またはポリペプチド等のマーカーのレベルの増加を指す。例えば、本出願における関連で、CD73は、健常対照と比較して、固形腫瘍または他のがんを経験している患者において過剰発現され得る。付加的にまたは代替的に、NK T細胞は、操作されたT細胞のNKGD2Dの発現を上方調節するように操作され得る。

30

【0051】

「マーカー」または「バイオマーカー」とは、該用語が本明細書において使用されるとき、活発な疾患状態を経験している対象における発現のレベルが、対象のもの、または健常対象から採取されたサンプルのものとは有意に異なる場合に、差示的に発現されると記載され得る。差示的に発現されるマーカーは、正常なもしくは対照のサンプルまたは対象のベースラインの発現レベル（すなわち、下方調節された）と比較して、過剰発現され得るまたは低発現され得る。生物学的サンプルにおけるマーカーの増加もしくは減少、または定量化は、遺伝子産物または転写産物の存在および／または相対的存在量を測定するための当技術分野において公知のいくつかの方法のいずれかによって判定され得る。マーカーのレベルは、絶対値として、またはベースラインレベルと比べて、およびカットオフ指標と比較した対象のマーカーのレベルとして判定され得る。代替的に、1種または複数のマーカーの相対的存在量は、臨床的に正常な対象であり得る対照と比べて判定され得る。

40

【0052】

本明細書において使用される「治療」または「療法」という用語（ならびに、「治療する」、「治療すること」、および「治療的」等、その文法的変形）は、治療されている個体の自然経過を変更しようとする試みにおける治療的および／または予防的介入を含む。

50

より特に、治癒的治療とは、特定の障害の、症状の軽減、改善、および／または排除、低下、および／または安定化（例えば、より進んだ段階に進行できないこと）、ならびに症状の進行の遅延のうちのいずれかを指す。予防的治療とは、以下のもの：特定の障害の、発病を食い止めること、発症の危険性を低下させること、発生率を低下させること、発病を遅延させること、発症を低下させること、および症状の発病までの時間を増加させることのうちのいずれかを指す。治療の望ましい効果には、疾患の出現または再発を阻止すること、症状の軽減、疾患の任意の直接的または間接的な病理学的帰結の低減、転移を阻止すること、疾患進行の速度を減少させること、疾患状態の改善または緩和、および寛解または予後の向上が含まれるが、それらに限定されるわけではない。一部の実施形態において、本開示の組成物を使用して、疾患および／もしくは腫瘍の発症を遅延させる、または疾患および／もしくは腫瘍成長の進行を遅らせる（またはさらに食い止める）。

10

#### 【0053】

本明細書において使用するとき、「抗腫瘍有効量」という用語は、がん細胞もしくは腫瘍成長を低下させるための、または対象における腫瘍容積もしくは腫瘍細胞の数を減少させるための、構築物発現NK細胞の有効量を指す。「抗腫瘍有効量」とは、平均余命を増加させるための、または腫瘍もしくはがんに関連した生理学的効果を軽減するための、操作されたNK細胞または操作されたNK細胞株の有効量も指し得る。

#### 【0054】

本明細書において使用するとき、「治療有効用量」、「治療有効量」、および「有効量」という語句は、（別様に具体的に記されない限り）1回または治療サイクルの経過にわたって投与された場合に、対象の健康状態、幸福、または死亡率に影響を及ぼす、本開示のポリペプチドおよび／または操作された細胞の分量を意味する（例えば、限定されることなく、がん性病状と関連した効果の低減または阻止）。本明細書に記載される疾患、病状、または障害（限定されることなく、固形状態腫瘍等のがん性病状を含む）を治療するための、対象に投与されるべきポリペプチド、操作された細胞、または他の化合物の適当な投薬量または量は、治療されている病状のタイプおよび重症度、疾患病理がどのくらい進んでいるか、組成物の製剤化、患者応答、処方医師または医療提供者の判断、1種または複数の構築物が投与されているかどうか、投与の経路、ならびに治療されている患者または対象の特徴（全般的健康状態、年齢、性別、体重、および薬物への耐性等）を含めたいくつかの因子に従って変動するであろう。ゆえに、所与の単位剤形に含まれる操作された細胞の絶対量は、広く変動し得、対象の年齢、重量、および身体的条件、ならびに投与の方法等の因子に依存する。

20

30

#### 【0055】

治療有効量とは、治療剤の任意の毒性のまたは有毒な効果を、治療上有益な効果が上回るものでもある。少なくとも1つの実施形態において、抗腫瘍有効量は治療有効用量であり得る。

#### 【0056】

がん、がん性腫瘍、または他の疾患もしくは障害を治療するための、本明細書に記載される操作された細胞に関する投与される投薬量は、当業者によって実践される投薬量およびスケジュールレジメンに従う。典型的に、 $10^9$ 個細胞／患者を超える用量が、養子細胞移入療法を受けている患者に投与される。有効量または用量を決定することは、とりわけ本明細書において提供される詳細な開示を踏まえて、当業者の能力の十分に範囲内にある。

40

#### 【0057】

「薬学的組成物」という用語は、本明細書に記載される操作された細胞または操作されたNK細胞株の1種または複数、ならびに保存剤、充填剤、崩壊剤、湿潤剤、乳化剤、懸濁化剤、甘味剤、香味剤、芳香剤、抗細菌剤、抗真菌剤、平滑剤、および分配剤等、薬学的に許容される担体、希釈剤、アジュバント、賦形剤、またはビヒクルを含む少なくとも1種の構成要素（投与の様態および剤形の性質に応じて）を含む組成物を意味する。

#### 【0058】

50

「薬学的に許容される」という用語およびその文法的変形は、それらが組成物、担体、希釈剤、試薬等を指すとき、互換可能に使用され、合理的な有益性／危険性の比に見合うように、材料が、過度の毒性、刺激、アレルギー応答、および／または吐き気、目まい、急性胃蠕動（gastric upset）等の望ましくない身体的効果なく、哺乳類へのまたはその上への投与ができることを表す。言い換えれば、それは、生物学的にまたは別様に望ましくない材料であり、すなわち、材料は、いかなる望ましくない生物学的効果も引き起こすことなく、またはそれが含有される薬学的組成物の他の構成要素のいずれかとも重大に有害な様式で相互作用することなく、本開示の構築物を発現するように改変されたNK細胞（および／または幹細胞もしくはiPSC）とともに個体に投与され得る。

【0059】

10

「単離された」という用語は、材料が、その元の環境、例えばそれが天然に存在している場合には天然環境から取り出されることを意味する。例えば、生きた生物内に存在している天然に存在するNK細胞は単離されていないが、天然のシステムにおける共存している材料の一部またはすべてから分離された同じNK細胞は単離されている。

【0060】

限定されることなく、手術、放射線、および化学療法を含む、膠芽腫（GBM）に対する従来の治療は、GBMに特徴的な重度の免疫抑制に大きく起因して効果がないと証明されている。GBMは、様々な分子的、遺伝子的、およびエピジェネティック的特徴を有する細胞が、従来の治療を回避するその能力の一因となる、その腫瘍内不均質性に起因して治療するのが特に難しい腫瘍である。さらに、GBMは、単一抗原を標的にする単一療法に抵抗する抗原逃避変種によって特徴付けられる。

20

【0061】

単一抗原に基づく療法の限界は、腫瘍増生変種を通じて、臨床研究において認識されている。これまで、単一GBM抗原であるEGFR、EGFRvIII、またはErbb2／HER2を標的にするCAR-NK細胞は、NK細胞株の使用に限定されており、全応答率は失望するほどに低くかつ一貫性がない。これらの結果は、GBMに対する単一抗原標的化CAR-T療法の臨床的ハードルを映し出しているようである。

【0062】

標的選択のストリンジェントな要件は、標的化ストラテジーに制約を加える。多標的化CARで操作された細胞を用いた組み合わせ抗原標的化は、GBMにおける抗原逃避に対処するいくつかの能力を示しているものの、主として低酸素GBM TMEによって引き起こされる乏しい免疫細胞浸潤および免疫代謝リプログラミングが、永続的応答を妨害している。さらに、驚きではないが、抗原逃避変種の増生が、これまでほとんどのGBM関連抗原に関して臨床的に記録されており、免疫回避および治療に対する抵抗性をもたらす。持続不能な応答は、第III相試験においてCAR-T療法を用いて治療されたGBM患者の全生存期間（OS）の向上の欠如をもたらしている。

30

【0063】

二重抗原標的化のまたはプログラム可能な腫瘍感知のCARは、養子T細胞療法の背景においてのみ、GBM治療に対して前臨床的に評価されているものの、GBMは、そのような手法が対処しない免疫監視を避ける抗原逃避を超えるメカニズムを採用する。したがって、二重抗原プログラミング単独では、臨床的に有効な治療に十分でない。実際のところ、GBMによる治療回避は、NK細胞エフェクター機能にとって好ましくないニッチを提供する、極度に免疫抑制性の低酸素TMEによって付加的に促進される。さらに、多くの腫瘍（例えば、GBMのような）の極めて低酸素の性質は、エクトヌクレオシド三リン酸ジホスホヒドラーゼ1（CD39）、エクトー5'-ヌクレオチダーゼ（CD73）、および他のアデノシン作動性シグナル伝達変種（例えば、CD38等）の活性も促進して、免疫抑制性の代謝産物アデノシンを産生し、それは、NK細胞活性の重大なプリン作動性シグナル伝達媒介性欠損につながる。

40

【0064】

加えて、GBM細胞は、オートファジーを利用して、それらの成長、進行、および療法

50

に対する抵抗性を促進する。最後に、G B M細胞のサブセットであるグリオーマ幹様細胞（G S C）も治療抵抗性の一因となり、U 8 7 M Gを含めた従来のG B Mモデル細胞株によって再現が乏しい。この複雑性は、協調してまたは相乗的に作用して意味のある臨床応答を始動させ得る、様々な治療的戦略の必要性をもたらす。

#### 【0065】

本開示の発明概念は、概して、1種または複数のがん特異的抗原を標的にするだけでなく、少なくとも1つの実施形態では、オートファジーを阻害もし、それによりG B Mが治療的処置に対して感作される、多機能性の操作されたN K細胞による、がん、特にG B Mの治療のための方法、組成物、および操作されたペプチドに関する。さらに、本開示のある特定の実施形態は、アデノシン作動性シグナル伝達を直接阻害する。したがって、本開示の組成物、システム、および方法は、本明細書に記載される新規の操作されたN K細胞を使用して、例えば抗原逃避、免疫代謝抑制、および／または乏しい腫瘍内N K細胞存在を含めた、G B M進行の複数の臨床的に関連する経路を同時に標的にする、G B Mに対する最初の多機能性の操作されたN K細胞に基づく療法である。本開示のデータは、特にG B Mに関するものの、本明細書の発明概念は、がん関連抗原およびアデノシンまたはアデノシン中間体を発現する任意のがんに関係することが当業者によって理解されるであろう。

10

#### 【0066】

少なくとも1つの例示的な実施形態において、例えば、少なくとも二機能性の構築物（例えば、C A R）、すなわち、がん関連抗原（例えば、限定されることなく、ジシアロガングリオシド（G D 2））に特異的なタンパク質をコードするための少なくとも第1の構築物、およびN K活性化受容体（例えば、限定されることなく、強力な活性化N K細胞受容体ナチュラルキラーグループ2 D（N K G 2 D））にコグネートリガンドを標的化するための少なくとも第2の構築物を含む単一N K細胞構築物が提供される。N K細胞において発現した場合、これら2つの結合ドメインは、膜貫通ドメインおよび／または細胞内ドメインを含み得る、N K細胞の1種または複数の刺激性または共刺激性ドメイン（すなわち、シグナル伝達ドメイン）と共役され得る。そのような構築物の1種または複数は、所望のとおり単一N K細胞において発現され得る。この背景における少なくとも2種の異なるC A Rの使用は、従来の治療に関して見られるがん細胞の抗原逃避を避ける。

20

#### 【0067】

さらに、構築物の少なくとも1種は、切断可能なリンカーを介して構築物と作動的に連結された、例えば、限定されることなく、1種または複数のC D 7 3、C D 3 9、またはC D 3 8遮断抗体フラグメントを含めることを通じて、免疫抑制性プリン作動性／アデノシン作動性シグナル伝達を損なうようにさらに操作され得る。例えば、少なくとも1つの実施形態において、第1のC A Rは、切断可能なリンカーを介して抗C D 7 3 s c F vと共役され得る。このように、操業において、抗体および／またはフラグメントは、C A Rに基づくシグナル伝達および／または活性化から完全に独立して放出される。次いで、放出された抗体／フラグメントは、がん細胞のアデノシン産生細胞表面タンパク質またはアデノシン中間体産生細胞表面タンパク質の活性を阻害するように機能し、それによって細胞外アデノシンの局所濃度は減少し、それが今度は、免疫抑制性プリン作動性シグナル伝達を損なう。少なくとも1つの例示的な実施形態において、リンカーの放出は腫瘍感受性であり、ゆえに、T M Eにおいて上方調節されるプロテアーゼの活性によって切断可能である。これは、T M Eにおけるアデノシン遮断抗体フラグメントの局所的放出をもたらし、ゆえに全身毒性を避ける。

30

40

#### 【0068】

なおさらに、特にG B Mによって引き起こされる腫瘍床へのN K細胞の不十分なホーミングに対処するために、および免疫細胞治療に対してがん細胞を感作するために、本開示の実施形態は、少なくとも1種の付加的な治療的処置の投与によりオートファジーも損ない得かつ／または無効にし得る。少なくとも1つの実施形態において、付加的な治療的処置は、クロロキン（C Q）等の1種または複数の薬理学的オートファジー阻害剤を患者に

50

投与することを含む。付加的にまたは代替的に、少なくとも1種の付加的な治療的処置は、遺伝子ノックダウン患者由来GBM細胞を作出することを通じて、オートファジー経路と関連した患者の1種または複数の遺伝子を標的にすることを含む。とりわけ、本開示の操作されたNK細胞と併せて使用される場合、付加的な治療的処置は、GBM環境の強力な再組織化を達成し得、ゆえに、CCL5およびCXCL10ケモカイン軸の関与を通じて、NK細胞浸潤を実質的に増強し得る。

【0069】

関連する細胞経路およびメカニズムの簡単な説明が、本明細書の発明概念の理解を支援するために提供され、その後、本明細書において提供される本構築物、組成物、および新規の方法の詳細な説明が続くであろう。

【0070】

アデノシン

固形腫瘍の病因の一因となるのは、低酸素固形腫瘍コアにおける嫌氣的解糖の結果であるアデノシンの濃度の上昇である。固形腫瘍において、ATPは、細胞外空間において豊富に放出され、そこでその濃度は、健常組織においてよりも1000倍を上回って高い濃度であるリットルあたり数百マイクロモルに達し得る。この現象は、主に、腫瘍コアにおける細胞死に、ならびにATPの活発なエクスポートを刺激する代謝的または低酸素ストレスおよび炎症促進性シグナルに起因する。TMEにおいて、細胞外ATPは、先天性免疫細胞の動員および抗腫瘍活性のプライミングに関わる危険シグナルとして作用する；しかしながら、それと同時に、細胞外ATPは、少なくともCD39およびCD73ならびにCD38の協調した酵素活性を介して、免疫抑制性アデノシンに分解される。結果として、様々な固形腫瘍において、細胞外アデノシンの蓄積、それに続く腫瘍反応性NK細胞上のアデノシン受容体の関与は、腫瘍成長を推進する高度に免疫抑制性のメカニズムである。

【0071】

CD39およびCD73は、固定された細胞表面タンパク質であり、細胞外空間に面して触媒部位を呈するエクトヌクレオシド三リン酸ジホスホヒドラーゼである。CD38およびCD157も、それらがADPリボシルシクラーゼからなることを除いて、細胞外触媒ドメインを有する表面分子である代替経路である。GBM等の固形腫瘍によるおよびTMEにおけるこれらの外酵素の発現は、細胞外アデノシンの産生をもたらす。

【0072】

CD38およびCD157は、NADase／ADPRシクラーゼ酵素の同じファミリーの一部である。CD38は、触媒部位を持する比較的大きな細胞外ドメインによって特徴付けられる表面糖タンパク質である。一方、CD157は、グリコシルホスファチジルイノシトールアンカーを介して膜に付着している。両分子の細胞外ドメインは、保存された肝要な残基を含有する。それらは両方とも、プリン作動性受容体にも影響を及ぼすニコチンアミドジヌクレオチド(NAD<sup>+</sup>)を代謝し、寛容に向けて免疫エフェクター細胞(例えば、NK細胞)を生成する絶大な効果を有するアデノシン生成に集中する。実際のところ、細胞外NAD<sup>+</sup>は、CD38およびCD157を含めた、エクトヌクレオチダーゼの統合ネットワークによって分解され得、それは、シグナル伝達をモジュレートしかつ免疫調節回路を活性化する中間体を生成する。細胞外アデノシンは、CD38の協調的作用を通じてNAD<sup>+</sup>から生成され得、それは、ADPリボース(ADPR)およびPC-1(エクトヌクレオチドピロホスファターゼ／ホスホジエステラーゼファミリーメンバー1)を生成し、それはAMPを生成する。CD38と同様に、CD157は、NAD<sup>+</sup>とともにインキュベートされた場合、cADPRおよびその後ADPRを生成する。

【0073】

ヒト末梢血において、CD39およびCD73の両方とも、典型的に、非悪性血液細胞内のNK細胞の約2～5%で発現される。そのため、CD39およびCD73の両方の発現は、健常個体における循環ヒトNK細胞には事実上不在である。しかしながら、ヒト腫瘍および浸潤免疫細胞によるCD39の有意な発現が広く記載されており、それは、エフ

10

20

30

40

50

エクター抗腫瘍免疫および炎症促進性サイトカインへの曝露に対して阻害的役割を有するアデノシンの生成、酸化ストレス、ならびに低酸素と関連している。同じように、CD73の発現は、多くのタイプのがん細胞上で構成的に高いレベルでとどまる。高いCD73発現は、好ましくない臨床転帰と相関することが示されており、それは、アデノシンの免疫抑制的役割と整合している。CD38、CD73、および／またはCD157の発現は、とりわけ低酸素であるTMEにおいても上方調節され得る。

#### 【0074】

したがって、CD39およびCD73は、多くの固形腫瘍細胞上で、特にGBMで過剰発現され、細胞外AMPの脱リン酸化後のアデノシンシグナル伝達の上方調節を通じて、がん進行の促進に関わる。本明細書に記載されるように、アデノシン作動性シグナル伝達は、ケモカイン受容体の不均一な脱感作および炎症促進性サイトカインの低下に起因して、NK細胞の輸送および活性に干渉し、細胞傷害性NK顆粒のエキソサイトーシスを阻害する。これは、腫瘍発症を支持する血管新生促進性ニッチを創出する。

#### 【0075】

アデノシン誘導性免疫抑制は、CD73またはその変種の抗体媒介性遮断によって軽減され得る；しかしながら、これは、単独では、低酸素腫瘍ニッチへのNK細胞の動員に依存する。従来の努力は、NKに基づく免疫療法と併せたアデノシン作動性シグナル伝達を標的にしていない。

#### 【0076】

##### NK活性

先天性免疫系の特化したエフェクターであるNK細胞は、病原体由来のまたはストレス誘導性の自己抗原に直接結合し得る、生殖細胞系列によりコードされる活性化受容体の発現に起因して、がん細胞に迅速に応答し得る。NK細胞の活性は、活性化受容体および阻害性受容体のレパートリーからのシグナルのバランスによって制御される。活性化受容体には、限定されることなく、天然細胞傷害性受容体(NCR)、ナチュラルキラーグループ2メンバーD(NKG2D)、CD16(FcγRIIA)、FasL、TRAIL、ならびにLFA-1、CD244(2B4)、およびCD137(41BB)等の共刺激性受容体が含まれる。これらの活性化細胞表面受容体は、細胞溶解プログラム、ならびに2B4、41BB等の細胞質内ITAMを介しておよび／または他の膜貫通シグナル伝達アダプターを介して、サイトカインおよびケモカイン分泌を誘発する能力を有する。本明細書において使用するとき、「シグナル伝達ドメイン」という用語は、別様に指定されない限り、刺激性および共刺激性ドメインを意味しかつ含む。

#### 【0077】

逆に、阻害性NK細胞受容体は、コグネートMHCクラスIタンパク質を主に認識し、健常細胞に対する自己寛容を提供する。形質転換またはウイルス感染の後にしばしば観察される、MHCクラスIタンパク質の発現の不在または低下を有する細胞は、十分な阻害性シグナルを誘発することができず、NK細胞攻撃の影響を受けやすくなる。

#### 【0078】

活性化NK細胞受容体に対するリガンドの上方調節された発現は、NK細胞攻撃に対して細胞を感受性の状態にし得る。そのような活性化受容体は、C型レクチン様受容体NKG2dである。NKG2d受容体は、NK細胞、ならびにNKT細胞、CD8+ T細胞、およびγδ T細胞等の多くのT細胞において発現される。しかしながら、T細胞において、NKG2Dは、通常、共刺激性受容体としてのみ作用し、細胞傷害を直接媒介せず、それはNK細胞とは異なる。

#### 【0079】

NKG2Dリガンドの発現(腫瘍細胞においてしばしば発現される)は、一般的に、免疫攻撃のために細胞に印付けし、NKG2D受容体に結合することによってNK細胞を活性化する「危険シグナル」と見なされる。実際のところ、ヒト細胞を用いたエクスピボ調査、およびマウスにおけるインビボ腫瘍モデルは、腫瘍細胞上でのNKG2Dリガンドの発現が、NK細胞攻撃に対する影響の受けやすさの増加をもたらすことを実証した。免疫

系が適正に機能している場合、NK細胞上のNKGDのライゲーションは、NK細胞活性化を促進しかつ適応免疫応答に影響する働きをする；しかしながら、NKGD受容体／NKGDリガンドの作用を阻害して免疫逃避を可能にする様々なメカニズム（とりわけGBMに関して）がある。

#### 【0080】

本明細書において論じられるように、アデノシンシグナル伝達は、NK細胞上での受容体発現の下方調節をもたらす（例えば、限定されることなく、アデノシンは、サイトカインによりプライムされたヒトNK細胞上のNKGDを下方調節することが確認されている）。細胞外アデノシン濃度に加えて、NK細胞上でのNKGD受容体の発現は、細胞活性因子の変化およびTMEの物理化学的特質（例えば、低酸素等）を含めた、多様な他の因子によって調節され得る。TMEは、腫瘍関連線維芽細胞、腫瘍関連マクロファージ、Treg、免疫調節酵素（例えば、アルギナーゼおよびシクロオキシゲナーゼ-2）、および免疫抑制因子（例えば、インターロイキン-10（IL-10）、トランスフォーミング成長因子-β（TGF-β）、血管内皮成長因子（VEGF）、プロスタグランジンE<sub>2</sub>（PGE<sub>2</sub>）、およびプログラム死リガンド1）を含めた、多様な細胞および分子から構成される。腫瘍細胞（GMB細胞等）および免疫抑制細胞は、TMEにおいて、ポドカリキシン（podocalyxin）様タンパク質1（PCLP<sub>1</sub>）、アクチビン-a、インドールアミン-ピロール2,3-ジオキシゲナーゼ（IDO）、PGE<sub>2</sub>、TGF-β、およびマクロファージ遊走阻害因子（MIF）を発現してまたは分泌して、NKGDの下方調節を媒介する。

10

20

#### 【0081】

さらに、低酸素は、免疫抑制分子の分泌を直接的または間接的に誘導し得るTMEの重要な特質であり、それにより、NK細胞は、IL-2および他のサイトカインを通じてNKGD発現を上方調節する能力を喪失する。低酸素条件下で、腫瘍細胞は、多様なケモカインを分泌して、サイトカインを分泌する免疫抑制細胞を動員し得、それによってNKGD発現を下方調節する。

#### 【0082】

構築物および関連する方法

本開示の発明的構築物、操作されたNK細胞およびNK細胞株、組成物、ならびに方法は、がん抗原および／またはNK活性化受容体の少なくとも1種またはその組み合わせを独自に標的にし、がん／腫瘍細胞のアデノシン産生細胞表面タンパク質またはアデノシン中間体産生細胞表面タンパク質の活性を遮断することによって、免疫抑制性プリン作動性シグナル伝達を損なう放出可能な可溶性抗体フラグメントをさらに提供する。複数種のがん抗原および／または活性化受容体が採用される場合、これは、抗原逃避に対する腫瘍の能力を限定する。さらに、アデノシンを遮断する可溶性抗体フラグメントが空間的に制御される少なくとも1つの実施形態において、それは、TME内にある場合にのみ放出して、その持続的でかつ非毒性の放出を可能にする。したがって、これは、他の従来の療法において見られる全身毒性の問題点を避ける。

30

#### 【0083】

本開示の新規の手法は、操作されたNK細胞の特異性とアデノシン産生酵素の遮断（例えば、抗CD73）によって誘導される免疫関与とを独自に組み合わせる。なおさらに、下で付加的に詳細に記載されるように、そのような治療は、1種または複数のオートファジー阻害剤の投与と組み合わせられて、腫瘍をさらに感作し得、治療効能をさらに促進し得る。したがって、本開示の構築物、操作されたNK細胞、薬学的組成物、および結果として生じる療法は、毒性を避けながら、GBM進行の複数の臨床的に認識されるメカニズムを同時に標的にし得る併用免疫療法様態をもたらす。

40

#### 【0084】

ここで図4に言及すると、合成遺伝子構築物100の少なくとも1つの例示的な実施形態が提供される。遺伝子構築物100は、それを発現する（生物学および他の公知の様態により達成される）NK細胞およびNK細胞株が、天然NK細胞の表面で通常では発現

50

されない少なくとも1種のドメインおよび／または受容体を発現するように操作される。腫瘍／GBM細胞等の標的細胞上のリガンドへの、これらの改変されたNK細胞およびNK細胞株の結合は、天然NK細胞に存在しない新たなドメインを通じたものである。少なくとも1つの実施形態において、構築物100は、1種または複数のCAR構築物を含み得る。少なくとも1つの例示的な実施形態において、構築物100は、第1のCAR構築物および第2のCAR構築物を含む。

#### 【0085】

おそらくその最も簡素な形態において、遺伝子構築物100は、少なくとも第2の結合ドメインまたはそのフラグメントおよび切断可能なリンカー104をコードする第2の配列に作動的に連結された、少なくとも第1の結合ドメインまたはそのフラグメント102をコードする第1の配列を含む、第1の構築物を含む。第1の結合ドメインまたはそのフラグメント102は、NK活性化受容体（例えば、NKGD2；配列番号6）またはがん関連抗原に特異的なタンパク質（例えば、GD2；配列番号7等）を含み得る。図5、下位区分FおよびGは、第1の配列によってコードされる第1の結合ドメインまたはそのフラグメント102の少なくとも1つの実施形態を概略で図解している。

#### 【0086】

少なくとも1つの例示的な実施形態において、第1の構築物は、標的細胞のアデノシンまたはアデノシン中間体産生細胞表面タンパク質に特異的である第2の結合ドメインまたはそのフラグメント104もコードするようにさらに操作される。例えば、そのようなアデノシンまたはアデノシン中間体産生細胞表面タンパク質は、アデノシンまたはその中間体を産生する標的細胞のCD39、CD73、CD38、または任意の他の細胞表面タンパク質を含み得る。少なくとも1つの例示的な実施形態において、アデノシンまたはアデノシン中間体産生細胞表面タンパク質はCD73を含み、第2の結合ドメインまたはそのフラグメント104は、抗CD73 scFv等の抗CD73フラグメントを含む（図5、下位区分Kを参照されたい）。

#### 【0087】

顕著には、第2の結合ドメインまたはそのフラグメント104は、切断可能なリンカーをさらに含む。そのような切断可能なリンカーは、当技術分野において公知の任意のそのようなリンカーを含み得、少なくとも1つの例示的な実施形態では、TME内に存在する1種または複数のプロテアーゼによって切断可能であるリンカーを含む。上で詳細に記載されるように、がん細胞は、CD73および他の表面タンパク質を通じてアデノシンを産生する。第2の結合ドメイン104は、そのようなアデノシンまたはアデノシン中間体産生腫瘍細胞表面タンパク質に特異的であり得ることから、そのリンカーがTMEにおいて切断された場合、結果として生じる可溶性抗体フラグメントは、操作されたNK細胞から放出され、アデノシン（またはアデノシン中間体）産生腫瘍細胞表面タンパク質に結合することが可能となる。

#### 【0088】

遺伝子構築物100は、図5、下位区分KおよびLに示される第2の構築物をさらに含み得る。第1の構築物と同様に、第2の構築物は、NK活性化受容体、またはがん関連抗原に特異的なタンパク質を含む、少なくとも1つの結合ドメイン（またはそのフラグメント）をコードする第2の配列を含み得る。図5、下位区分AおよびBは、第2の配列によってコードされる第3の結合ドメインまたはそのフラグメントの少なくとも1つの実施形態を概略で図解している。

#### 【0089】

第1および第3の配列の一方または両方（適用可能な場合）は、NK細胞のシグナル伝達ドメインをコードし得、それによりそれらは、活性化があると、操作された細胞または細胞株の細胞傷害および／または細胞溶解活性を促進し得る（例えば、限定されることなく、図5、下位区分AおよびFにおけるCD $\zeta$ 、ならびに図5、下位区分AにおけるDAP10を参照されたい）。第1および第3の結合ドメイン102、106は、所望のとり、相補性（complimentary）決定領域、可変領域、および／またはその抗原結合フ

10

20

30

40

50

ラグメントを含み得る。所望の結果を達成するために要され得るように、様々なリンカー、スパーサー、s c F v、ヒンジ、および／またはタンパク質複合体が、第1および第2の配列の一方または両方によって付加的にコードされ得ることが同じように解されるであろう。

#### 【0090】

第1の配列および第3の配列は、それぞれ活性化受容体102およびがん関連抗原に特異的なタンパク質106を含むものとして図5に表されているものの、第1および第3の配列は、両方ともがん関連抗原に対するタンパク質をコードし得る、または両方ともNK細胞活性化受容体をコードし得る（すなわち、必ずしも各タイプ的一方である必要はない）。さらに、第2の結合ドメインまたはそのフラグメント104をコードする第2の配列は、第1のドメイン102のNK細胞活性化受容体に作動可能に連結され得る。第1および第3の配列が、両方とも抗原または受容体102、106をコードする場合、例示的な実施形態において、それらは、2種の異なるがん特異的抗原または2種の異なるNK細胞活性化受容体をコードし得る；しかしながら、しばしば望ましいものの、これは要されるわけではない。

10

#### 【0091】

図5、下位区分KおよびLは、第1、第2、および第3の結合ドメイン（またはそのフラグメント）102、104、106を含む、本開示の遺伝子構築物の少なくとも1つの例示的な実施形態の概略を図解している。そこでは、非限定的な例として、第1の結合ドメイン102は、CD8αヒンジおよび2種のシグナル伝達ドメイン（CD28およびCD3ζ）に作動可能に連結された抗GD2 s c F vフラグメントを含み（集合的に、GD2-CAR；配列番号7）、第2の結合ドメイン104は、切断可能なリンカー（配列番号1）を介して第1の結合ドメイン102に連結された抗CD73 s c F vフラグメントを含み、第3の結合ドメイン106は、NKGD2、2種のシグナル伝達ドメイン（DAP10およびCD3ζ）、および少なくとも1種のP2A自己切断ペプチドを含み（NKGD2-CAR；配列番号6）、GD2-CARは、自己切断P2Aペプチドの1つ（配列番号4）を通じてNKGD2-CARと結び付いている。少なくとも1つの例示的な実施形態において、構築物100は、配列番号8と少なくとも80%、85%、または90%の配列同一性をコードする。

20

#### 【0092】

標的細胞は、がん関連抗原、NKGD2、もしくはNK活性化受容体とコグネートな他のリガンド、および／または細胞表面タンパク質を通じたアデノシンもしくはその中間体を産生する任意の細胞、例えば、限定されることなく、がん細胞または代わりにTME内の悪性の細胞を含み得る。GD2、およびNKGD2に対するリガンドは、特に、ヒトGBM上で広く発現され、そのため、非限定的な例として本開示において言及される。しかしながら、限定されることなく、ガングリオシドGD3（GD3）、Her2（p185）、CD19、CD20、CD56、CD123、CD22、CD30、CD33、CD171、CS-1、C型レクチン様分子-1；EpCAM、G250、プロテオグリカン、GD3、GD2、MHC II、TAG-72、ミルクムチンコアタンパク質、ルイスA抗原、チロシンタンパク質キナーゼ膜貫通受容体（ROR1）、c-met、上皮成長因子受容体（EGFR）、EGFR変種III、および癌胎児性抗原（CEA）等、他のがん関連抗原が本開示の構築物においてコードされ得、ある特定の抗原は、ある特定のタイプのがんと特に関連し得る。

30

40

#### 【0093】

同様に、NKGD2は、代表的なNK細胞活性化受容体として図5に示されているものの、限定されることなく、NKp30、NKp46、NKp40、DNAM-1等を含む、所望の標的細胞上に提示されるコグネートリガンドを有する任意のNK活性化受容体が、構築物100においてコードされ得る。ある特定の実施形態において、構築物および結果として生じるNK細胞は、例えば、関心対象のがんにおいて主に発現される抗原またはコグネートリガンドに特異的なタンパク質をコードする第1の配列102および／または

50

第3の配列106を含むことによって、特定のがんタイプに対して特異的に操作され得る。

#### 【0094】

付加的に、NK活性化受容体をコードする構築物100のある特定の実施形態は、当技術分野において公知の技法を使用して、上方調節された発現のために付加的に操作され得る。例えば、少なくとも1つの例示的な実施形態において、結合ドメインまたはそのフラグメントをコードする配列の1つまたは複数は、野生型NK細胞におけるNKGD2Dの発現（すなわち、それが天然に存在するNK細胞の典型的形態でのそのような受容体の発現）と比較して、NKGD2Dの上方調節された発現をコードするように操作される。そのような操作された上方調節された発現は、それが、利用可能な局所的NKGD2Dを増加させることから、操作されたNK細胞を採用して、GBMおよび低酸素TMEを有する他の腫瘍を治療する場合に特に有用である。

#### 【0095】

がん関連抗原、およびNK活性化受容体のコグネートリガンドの多くは、がん細胞（特にGBM）およびTMEにおいて上方調節されることから、構築物100における結合ドメインまたはそのフラグメント102、106の1つまたは複数におけるそのような抗原に特異的なタンパク質を含めることは、結果として生じる操作されたNK細胞が、がんおよび他のそのような細胞を直接標的にしかつ認識することを可能にする。この目標に向けて、本構築物100は、特異性を増強し、腫瘍、がん、および他の悪性細胞の直接的な標的化および関与を安全に可能にする。

#### 【0096】

結合ドメイン102、104、106は、約10～約25個のアミノ酸のより短いリンカーペプチドを用いて接続された、免疫グロブリンの重（V<sub>H</sub>）および軽（V<sub>L</sub>）鎖の可変領域間の融合タンパク質である、1種または複数の単鎖可変フラグメント（scFv）配列またはナノボディ等の他の抗体フラグメントをさらに含み得る。scFvまたは他の抗体フラグメントの特異的構成は、結果として生じるペプチドの所望の特性（例えば、柔軟性のためのグリシン、ならびに可溶性のためのセリンまたはトレオニンに富む）に基づいて選択され得る。当技術分野において公知であるように、scFvまたは別の抗体フラグメントは、V<sub>H</sub>のN末端とV<sub>L</sub>のC末端とを接続させ得る、または逆もまた同様である。該タンパク質は、定常領域の除去およびscFvまたは他の抗体フラグメントの導入にもかかわらず、元の免疫グロブリンの特異性を保持する。

#### 【0097】

したがって、少なくとも1つの実施形態において、第2の結合領域またはドメイン104、および第1の結合領域またはドメイン102はそれぞれ、特定のマウス、もしくはヒト、もしくはヒト化モノクローナル抗体に由来する、または他の公知の供給源および公知の方法論に従ったscFvフラグメントを含む。フラグメントは、抗原特異的抗体の任意の数の異なる抗原結合ドメインでもあり得る。より具体的な実施形態において、フラグメントは、ヒトNK細胞における発現のためにヒトコドン使用法に対して最適化されている配列によってコードされる抗原特異的scFv（例えば、αCD73 scFvまたはαGD2 scFv）である。少なくとも1つの例示的な実施形態において、第1の配列は、配列番号7と少なくとも80%、85%、または90%の配列同一性を有し、それがCD73 scFvをコードする結合ドメインまたはそのフラグメント102は、配列番号2と少なくとも80%、85%、または90%の配列同一性を有する。

#### 【0098】

構築物100によってコードされ得る1種または複数のシグナル伝達ドメインに戻って言及すると、第1および／または第3の結合領域またはドメイン102、106は、それに作動的に連結され得（直接的に、または下で記載されるヒンジ領域を介して）、実際に、第1の結合ドメインそれ自体が、シグナル伝達ドメイン（例えば、CD28、4-1BB、DAP10）を含み得る。1種または複数のシグナル伝達ドメインは、例えば、結び付いた結合ドメインまたはそのフラグメントが標的細胞に結合すると、NK細胞の細胞溶

解および細胞傷害プログラムを誘発し得るNK活性化因子受容体または受容体複合体を含み得る。例えば、シグナル伝達ドメインは、CD28、CD3 $\zeta$ 、もしくはDAP10シグナル分子、または当技術分野において公知の任意の他のシグナル伝達ドメインを含み得る。ある特定の実施形態において、シグナル伝達ドメインは、Fc $\gamma$ RIIA、FasL、TRAIL、4-1BB、OX40、LFA-1、CD244、CD137、またはNKGD-DAP10受容体複合体を含み得る。さらに、シグナル伝達ドメインは、限定されることなく、DAP12、NKp46、NKp44、NKp30、およびDAP10のうちの1種または複数を含む、付加的な他の共刺激性ドメインも含み得る。

#### 【0099】

適用において、標的細胞との、構築物100の少なくとも第1の、および任意で第3の結合ドメイン102、106の関与は、操作されたNK細胞のシグナル伝達ドメインを通じてシグナル伝達を促進し、CD3 $\zeta$ アダプター鎖上のITAMモチーフの活性化、ならびに固形腫瘍および他のアデノシン産生またはアデノシン中間体産生標的に対するNK細胞媒介性細胞傷害をもたらす。したがって、操作されたNK細胞がGD2産生および／またはNKGDリガンド産生表面細胞タンパク質（例えば、固形腫瘍上の）を直接標的にしかつ結合した場合、シグナルは、シグナル伝達ドメインを介して操作されたNK細胞に送られて、それが結合している標的（がん）細胞の細胞溶解および／または細胞傷害メカニズムを誘発する。

#### 【0100】

任意で、構築物100は、例えば、限定されることなく、第3の結合ドメイン106の $\alpha$ GD2 s c F vとシグナル伝達ドメインCD28およびCD3 $\zeta$ との間の位置で、結合ドメイン102、106内に配置されるヒンジドメイン（「CD8 $\alpha$ ヒンジ」とラベルされた、図5を参照されたい）を付加的に含み得る。ヒンジドメインは、リンカーまたはスペーサーをコードする1種または複数の配列を含みかつ構築物に含まれて、例えば第1／第3の結合ドメイン102、106と膜および／または細胞表面との間に十分な距離を提供し得る。付加的にまたは代替的に、所望の三次構造を促し得、かつ／または改変されたNK細胞の抗原結合もしくはエフェクター機能に悪影響を及ぼし得る考え得る立体障害を軽減するようにヒンジドメインを含め（かつ／または構成し）得る。このように、ヒンジドメインは、ヒト細胞における最適な発現のために使用され得かつ／または操作され得る。

#### 【0101】

付加的にまたは代替的に、付加的な細胞内シグナル伝達ドメインを構築物100に付加して、殺滅刺激を増強し得る（すなわち、結果として生じる操作されたNK細胞のNK媒介性細胞傷害をさらに強化する）。例えば、図5の下位区分Lに示されるように、ヒトCD3 $\zeta$ 細胞内ドメインは、第1および第3の結合ドメイン102、106の両方と作動的に連結され得る。他の細胞質ドメインも、所望の場合には、相加または相乗効果のために一緒に融合されたそのような細胞質ドメインの1つまたは複数とともに、所望のとおり採用され得る。

#### 【0102】

操業において、結合ドメイン102、104、106は、関心対象の細胞を標的にし、結合ドメイン102、106が標的化された細胞に結合した場合、操作されたNK細胞は、シグナル伝達ドメインを介してシグナルを送って、標的細胞の細胞溶解および／または細胞傷害を誘発する。さらに、結合ドメインまたはそのフラグメントの少なくとも1つが、上方調節された活性化受容体（例えば、NKGD）を含む場合、これは、NK細胞の抗腫瘍応答を増強し、細胞外アデノシンの局所濃度だけでなく、NK細胞活性化の免疫抑制も低下させる。これは、第2の結合ドメイン104の放出によってさらに強化される。前に記載されるように、第2の結合ドメイン104はTMEにある場合、その中のプロテアーゼは、第2のドメイン／フラグメント104を第1のドメイン102につなぐリンカーが切断されるようにし、それによってTME内にフラグメントを放出して、標的細胞における局所的なアデノシンまたはアデノシン中間体活性遮断を開始する。特に、NKGD

10

20

30

40

50

D 活性の増加と局所的 C D 7 3 標的遮断との組み合わせは、G B M および他のがんにおける制御されかつ局所的な応答性を達成することにおいて非常に有効である。

【0103】

したがって、構築物 100 は、G B M および他のがん進行を促進する経路の複雑なネットワークに対する多方向からの攻撃を可能にする。単一構築物に 2 種以上（例示的な実施形態では、3 種）の標的を組み入れると、そのうちの 1 種は放出可能であり、本開示の操作された N K 細胞が、抗がん免疫応答を活性化しかつ増強するだけでなく、抗原逃避等の G B M の回避戦術を抑制することを可能にする。

【0104】

これらの発明的技法は、従来手法と比べて独自に有利である。第一に、同種幹細胞および N K 細胞は、移植片対宿主疾患を引き起こさず、それらの幅広い、すぐに使える使用を実現可能にする。成熟 N K 細胞は、比較的限定された寿命を有し、有効な抗腫瘍活性を可能にし、一方で、オンターゲット／オフ腫瘍効果等の長期にわたる有害事象の可能性を低下させる。さらに、本構築物の発現は、それが局所的に放出されるため、C D 7 3 および同様の抗体に関して典型的に見られる全身毒性を阻止し、低酸素等の抑制性 T M E メカニズムによって誘導される活性化受容体の下方調節も救済する。

【0105】

実施形態に従った構築物は、従来技法を使用して調製され得る。大部分は天然配列が採用され得るため、天然遺伝子が単離され得、様々な構成要素の適正な接合を可能にするように必要に応じて操作され得る。例えば、遺伝子の非所望の部分の欠失をもたらす適当なプライマーを使用したポリメラーゼ連鎖反応（P C R）を採用することによって、核酸配列が単離され得る。代替的に、クローニングされた遺伝子の制限消化を使用して、キメラ構築物を作成し得る。いずれの場合にも、平滑末端であるまたは相補的重なり合いを有する制限部位を提供するように、配列が選択され得る。

【0106】

本明細書の構築物を調製するための様々な操作はインビトロで行われ得、特定の実施形態において、構築物は、標準的な形質転換またはトランスフェクション法を使用して、適当な宿主におけるクローニングおよび発現のためにベクターに導入される。ゆえに、各操作の後、D N A 配列の接合により結果として生じた構築物はクローニングされ、ベクターは単離され、配列をスクリーニングして、配列が所望の導入遺伝子および発現制御配列をコードすることを確実にする。配列は、所望のとおり、制限解析、シーケンシング等によってスクリーニングされ得る。

【0107】

本明細書において提示される実施形態のベクターは、当技術分野において公知である真核生物プロモーターをさらに採用し得る。また、ベクターは、他の理由がない場合、インビトロでのそれらの操作を容易にするために、選択可能なマーカーを含有し得る。他の実施形態において、導入遺伝子は、D N A 鋳型からインビトロで転写された m R N A から発現し得る。

【0108】

実施形態に従って採用される例示的な核酸構築物（ポリヌクレオチド）において、プロモーターは、実施形態の導入遺伝子をコードする核酸配列に作動的に連結され、すなわちそれらは、単剤（single-agent）構築物をコードする D N A からのメッセンジャー R N A の転写を促進するように配置される。プロモーターは、ゲノム起源のものであり得るまたは合成で作出され得る。代替的に、いくつかの周知のウイルスプロモーターも適切である。

【0109】

N K 細胞または N K 細胞株における本開示の構築物の発現のために、導入遺伝子をコードする核酸配列の天然に存在するまたは内因性の転写開始領域を使用して、標的宿主における所望の発現を生じさせ得る。代替的に、構成的または誘導性発現を可能にする外因性転写開始領域が使用され得、発現は、標的宿主、所望される発現のレベル、標的宿主の性

10

20

30

40

50

質等に応じて制御され得る。

【0110】

同じように、一部の場合には、導入遺伝子によってコードされる対象となる構築物を細胞表面に向かわせる、ヒトタンパク質発現に特異的な、N末端に付加されるリーダーおよび／またはシグナル配列が使用され得る。

【0111】

本開示の構築物のDNA配列を組み入れた、単離された核酸セグメントおよび発現カセットも提供される。当業者であれば、そのような構築物を、ウイルス形質導入、mRNAまたはDNAエレクトロポレーション、ならびに他のウイルスおよび非ウイルス形質導入、ならびにトランスフェクション技法を含めた公知の遺伝子改変技法とともに採用して、本明細書に記載される構築物を発現する操作されたNK細胞および／または操作されたNK細胞株を達成し得ることを解するであろう。

【0112】

本開示の操作されたNK細胞を作製するおよび／または増大させる方法も提供される。少なくとも1つの実施形態において、本明細書において提供される構築物をコードするポリヌクレオチドは、適切なベクターまたはベクターフリーのいずれかで、従来のトランスフェクションおよび／または形質導入法を使用して、対象自身の細胞に（または、異なるドナー対象由来の細胞に）導入され得る。エレクトロポレーションによってまたは別様にNK細胞に安定に形質導入するまたはトランスフェクトする方法は、当技術分野において公知である。さらなる態様において、本構築物を、トランスポゾンに基づくシステムを使用して細胞に導入して、細胞のゲノムDNA、非ウイルスベクター、またはウイルスベクター（例えば、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、またはレンチウイルスベクター）への構築物の組み込みを媒介し得る。さらに、少なくとも1つの実施形態において、CARは、NK細胞による取り込み、ゆえにNK細胞における構築物由来の融合タンパク質の発現を促すように改変され得る。

【0113】

天然NK細胞の供給源は、同種および自家供給源の両方を含み得る。一部の場合には、NK細胞は、幹細胞または誘導多能性幹細胞（iPSC）から分化し得る。例えば、本明細書に記載される構築物は、幹細胞またはiPSCにおいて発現され得、それは次いで、関連する技術分野における当業者に公知の方法を使用して、NK細胞に分化し得る。ゆえに、本明細書の実施形態に従って操作するための細胞は、臍帯血、末梢血、ヒト胚性幹細胞、またはiPSCから単離され得る。

【0114】

他の実施形態において、NK細胞は、ヒト末梢血単核細胞または臍帯血に由来するNK細胞等の初代ヒトNK（pNK）細胞である。少なくとも1つの例示的な実施形態において、操作されたNK細胞は、当技術分野において公知の方法に従って、再発性および原発性患者由来細胞から産生され得る。代替的に、本開示の構築物を発現する操作されたNK細胞および／または操作されたNK細胞株を、標準化された細胞集団から産生して、臨床的規模に成長し得る均質なNK細胞集団を提供し得る。

【0115】

本明細書に記載される構築物を発現するように改変されたNK細胞、幹細胞、pNK細胞、またはiPSCは、NK細胞障害の標的であり得る細胞によって少なくとも部分的に特徴付けられる病状（例えば、アデノシンを過剰発現する疾患状態）を有する対象への送達のための「担体」とともに、薬学的組成物に製剤化され得る。本明細書において使用するとき、「担体」には、任意の溶媒、分散媒、希釈剤、抗細菌薬、コーティング、ビヒクル、および／または抗真菌剤、等張剤、吸収遅延剤、緩衝剤、担体溶液、懸濁液、コロイド等が含まれる。そのような媒体および／または作用物質の使用は、当技術分野において周知である。任意の従来の媒体または作用物質が活性成分と不適合である限りを除いて、本明細書の薬学的組成物におけるその使用が企図される。補足的な活性成分も、組成物に組み入れられ得る。

## 【0116】

さらに、本開示の薬学的組成物（例えば、本明細書の構築物を発現する操作された細胞を含む）は、単独で、またはがんおよび／もしくは固形腫瘍がんを治療するのに有用な他の十分に確証された作用物質との組み合わせで使用され得る。少なくとも1つの例示的な実施形態において、本開示の1種または複数の薬学的組成物は、1種または複数のオートファジー阻害剤と併せて、単一の患者に投与され得る。

## 【0117】

下の実施例において詳細に論じられるように、本開示の新規の多機能性の操作されたNK細胞のホーミングは、オートファジー阻害剤と併せて投与された場合に有意に増強されたことが新たに見つけ出されている。オートファジー阻害は、CCCL5およびCXCL10勾配の上方調節と並行して重大なNK細胞走化性を誘発し、一方でそれと同時に腫瘍促進性CCCL2およびCXCL12の量を減少させる。言い換えれば、これらケモカインの放出は、操作されたNK細胞をがんTMEに引き付け、疾患と闘うためにそれらが必要とされる場所にそれらを効率的に連れていく。

## 【0118】

さらに、オートファジーを無効にすることにより、NKEフェクター機能の増強に有益に寄与する抗GBM免疫学的応答の洗練されかつ複雑な再組織化も明らかになった。GBM療法にオートファジー阻害剤を付加することの臨床的効能は、一般的なFDA承認のオートファジー阻害剤であるクロロキン（CQ）の慢性投与を用いた、前向きは無作為化比較対照試験（prospective controlled randomized trial）において実証された。結果は、抗新生物療法に対するGBMの有意に増強された応答を実証し、外因性作用物質に対してがん細胞を感作し、そのような治療が臨床的に安全でかつ忍容性良好であることを示す。

## 【0119】

したがって、少なくとも1つの例示的な実施形態において、オートファジー過程の薬理的欠損は、本開示の構築物を発現する操作された細胞を含む組成物（または活性成分）の投与と併せた、それと連続して、またはその前もしくは後の、オートファジー阻害剤を含む治療的処置の投与を通じて達成され得る。そのようなオートファジー阻害剤は、例えば小分子阻害剤の投与を含めた、対象におけるオートファジーを阻害し得るまたは低下させ得る任意の療法を含み得る。少なくとも1つの実施形態において、小分子阻害剤は、CQ、ヒドロキシクロロキン、スパウチン-1、SAR405、ベルテポルフィン、またはオートファジーを阻害するもしくは遮断するために患者への投与に適切である現在公知のもしくは後に開発される任意の他の小分子阻害剤を含み得る。付加的にまたは代替的に、オートファジーは、オートファジーに関連した1種または複数の遺伝子の下方調節を通じて、例えば遺伝子ノックダウン技法を通じて、遺伝子的に阻害され得る。少なくとも1つの例示的な実施形態において、該遺伝子は、以下の遺伝子BECN1、p62、 $\beta$ -アクチン、ATG5、ATG7、LC3B、ATG12、ATG16L1、PI3K-II $\beta$ 、ULK1、ULK2、FIP200、およびLAMP2、またはオートファジー経路と関連した（かつ、下方調節を介してまたは別様に阻害し得る）任意の他の遺伝子のうちの1種または複数を含み得る。

## 【0120】

組成物それ自体が活性成分の組み合わせを含む、あるいはそれは、単独でまたは他の作用物質もしくは療法との組み合わせで送達されるかどうかにかかわらず、本明細書の薬学的組成物は、哺乳類の、好ましくはヒトの身体における様々な経路を介しておよび様々な部位に送達されて、特定の効果を達成し得る。当業者であれば、1つを上回る経路が投与に使用され得るものの、特定の経路は、他の経路よりも即時のかつ／または有効な反応を提供し得ることを認識するであろう。例えば、腫瘍内送達、固形腫瘍がんの治療に使用され得る（かつ、オフターゲット効果を最小限に抑えるという観点から有利であり得る）。局所または全身送達は、薬学的組成物を体腔に投与すること、注入、または非経口的導入によって遂行され得る。本開示の組成物が、オートファジー阻害等の付加的な治療的処置

10

20

30

40

50

に加えて投与される場合、オートファジー阻害は、全身注射もしくは注入を介して、または医療提供者によって別様に所望されたとおりに実施され得る。

【0121】

薬学的組成物は、投与の好ましい経路に適応した多様な形態で製剤化され得る。したがって、組成物は、限定されることなく、非経口的（例えば、皮内、皮下、静脈内、経皮的、筋肉内、腹腔内等）または局部的（例えば、気管内、肺内等）を含む、公知の経路を介して投与され得る。組成物は、持続放出または遅延放出によっても投与され得る。

【0122】

製剤は、単位剤形で好都合に提示され得、薬学の技術分野において周知の方法によって調製され得る。薬学的に許容される担体を用いて組成物を調製する方法は、本開示の構築物を発現するように改変されたNK細胞（および／または幹細胞もしくはiPSC）を、1種または複数の補助的成分を構成する担体と結び付けるステップを含む。一般的に、製剤は、操作された細胞を、例えば液体担体と均一にかつ／または密接に結び付けることによって調製され得る。

【0123】

本明細書の構築物を発現するように改変されたNK細胞（および／または幹細胞もしくはiPSC）を含む薬学的組成物は、溶液、懸濁液、乳濁液、スプレー、エアロゾル、または任意の形態の混合物を含むがそれらに限定されない、任意の適切な形態で提供され得る。組成物は、任意の薬学的に許容される賦形剤、担体、またはビヒクルを有する製剤の状態を送達され得る。対象に投与される本明細書の構築物を発現するように改変されたNK細胞（および／または幹細胞もしくはiPSC）の有効量は、本明細書において論じられる様々な投薬因子に応じて変動し得る。

【0124】

一部の実施形態において、方法は、例えば約 $10^9$ 個細胞／対象でのもしくはそれを上回る、または約 $10^5$ 個細胞／kg～約 $10^{10}$ 個細胞／kgの用量を提供する、本開示の構築物を発現するように改変された操作された細胞の治療上有効量を対象に投与するステップを含み得るが、とはいえ一部の実施形態において、方法は、これらの域から外れる用量における操作された細胞の量を投与することによって実施され得る。

【0125】

一部の実施形態において、本明細書の構築物を発現するように改変された操作された細胞を含む薬学的組成物は、例えば週あたり単回用量から複数回用量投与され得るが、とはいえ一部の実施形態において、方法は、この域から外れる頻度で薬学的組成物を投与することによって実施され得る。

【0126】

いずれにしても、投与される操作された細胞の量は、投与の経路を考慮に入れるべきであり、所望の治療的目的を達成するように、十分な数の操作された細胞が導入されるであろうようなものであるべきである。一般的に、薬学的組成物は、病状の症状または臨床兆候を治療するのに有効な量および投薬レジメンで対象に投与され、それは、（限定されることなく）（任意の程度まで）それを低下させること、その進行を限定すること、それを改善すること、またはそれを解消することを含み得る。

【0127】

本開示の構築物、操作された細胞、およびNK細胞株は、限定されることなく、治療される対象における、腫瘍または他の標的化された細胞のサイズを低下させる、あるいは腫瘍または他のがん性もしくは悪性細胞の成長または再成長を阻止することを通じて、アデノシン過剰発現がんまたは他の疾患状態を有する対象を治療することを含む、多くの適用において使用され得る。したがって、アデノシン過剰発現がんまたは関連する疾患状態を有する対象を治療するための方法の実施形態も提供される。

【0128】

免疫療法治療を使用してがん罹患している対象を治療する方法も提供される。そのような方法は、本明細書に記載される薬学的組成物の治療有効量を対象に投与する（または

10

20

30

40

50

投与しておく) ステップを含み得る。例えば、薬学的組成物は、標的細胞上の少なくとも1種のコグネートリガンドを標的にする少なくとも第1の結合ドメインまたはそのフラグメント(例えば、NKGD2)、GD2に特異的である少なくとも第2の結合ドメインまたはそのフラグメント(例えば、抗GD2、および任意でscFv)、および標的細胞のアデノシン産生またはアデノシン中間体産生細胞表面タンパク質に特異的である少なくとも第3の結合ドメインまたはそのフラグメント(例えば、抗CD73、および任意でscFv)をコードするポリヌクレオチド構築物を発現する操作されたNK細胞(本明細書に記載される)の集団を含み得る。本明細書に記載されるように、結び付いた結合ドメインが標的細胞に結合することによる活性化があると、操作された細胞の細胞傷害または細胞溶解活性を促進することに関わる1種または複数のドメインを含むシグナル伝達ドメインもコードされ得る。標的細胞は、例えばがん細胞(例えば、GBM)またはTMEにおける悪性細胞を含み得る。

10

#### 【0129】

投与ステップは、限定されることなく、静脈内に、腫瘍内に(局所的に)、非経口的に、または注入による(全身的に)を含む、これまでに記載された投与技法のいずれかを使用して実施され得る。さらに、本開示の構築物のうちの1種または複数を経験している対象を治療するためのキットに集められ得る。本開示の新規の薬学的組成物と併せて、そのようなキットは、対象へのそのような組成物の投与を簡素化し、かつ/または容易にするために望ましい1種または複数のツールおよび/またはデバイスをさらに含み得る(例えば、バイアル、シリンジ、チューブ類等)ことが解されるであろう。

20

#### 【0130】

少なくとも1つの例示的な実施形態において、がん罹患している対象を治療する方法は、本明細書に記載される1種または複数のオートファジー阻害剤を含む、対象への付加的な治療的処置を投与する(または投与しておく)ステップをさらに含み得る。例えば、そのようなオートファジー阻害剤は、治療有効量の小分子阻害剤および/またはオートファジー経路における遺伝子の遺伝的下方調節を含み得る。少なくとも1つの例示的な実施形態において、方法は、 $0.01\mu\text{M}$ ~ $200\mu\text{M}$ の濃度で対象にクロロキンを投与する(または投与しておく)ステップを含む。付加的な治療的処置の投与は、限定されることなく全身注射または注入によるものを含めて、必要に応じて実施され得る。

30

#### 【0131】

方法が少なくとも二重手法(すなわち、本開示の薬学的組成物、およびオートファジー阻害剤を含む付加的な治療的処置の投与)を含む場合、両治療様態を投与する手段は同じである必要はない、または同時にもしくは同じ投薬パターンにより生じる必要はない。例えば、薬学的組成物は、静脈内に、腫瘍内に、非経口的に、または注入により投与され得、付加的な治療的処置の投与は、全身注射または注入により実施される。そのため、治療のタイミングおよび投薬量は、具体的な患者および彼のまたは彼女の病状に合わせられ得る。

#### 【0132】

さらに、本明細書の多重治療手法を容易にするキットも提供され得る。少なくとも1つの例示的な実施形態において、キットは、本開示に従った治療有効量の薬学的組成物、および治療有効量のオートファジー阻害剤を含み得る。少なくとも1つの実施形態において、そのような治療構成要素は、キット内に別個に収納される。そのような治療組成物と併せて、キットは、対象へのそのような組成物の投与を簡素化し、かつ/または容易にするために望ましい1種または複数のツールおよび/またはデバイスをさらに含み得る(例えば、バイアル、シリンジ、チューブ類等)ことが解されるであろう。

40

#### 【0133】

任意で、方法は、対象に対する薬学的組成物を調製するステップも含み得る。例えば、任意のステップは、サンプルを取り出すまたは取り出しておくことを含み得、そのような

50

サンプルは、幹細胞、血液細胞、またはiPSCを含む。そのような取り出された細胞は、その後、サンプルから単離され（すなわち、末梢採血を含むサンプルの場合には、1種または複数のNK細胞が単離される）、必要とされるまたは所望される場合には増大される。サンプルは、対象から得られ得（例えば、自家がん免疫療法）、養子細胞療法は、それを用いて実施される。代替的に、サンプルは、対象とは別個のドナーから提供され得る（例えば、同種療法）。少なくとも1つの実施形態において、単離、遺伝子改変、および／または任意の増大ステップは、インビトロで実施される。

【0134】

方法は、単離された細胞に、本開示の構築物を含有する発現ベクターを形質導入するまたはトランスフェクトすることを含む任意のステップも含み得る。その後、所望の構築物を発現する操作された細胞の集団が達成される。次いで、そのような操作された細胞の集団は、前に記載されるように対象に投与され得る。少なくとも1つの実施形態において、そのような投与は養子細胞療法を含む。

【0135】

さらに、方法は、がん、固形腫瘍の治療に対して、および／または症状もしくはそのような療法に関連した副作用を改善するもしくは排除することに関して、現在公知のもしくは後に開発される付加的な療法の投与と組み合わせられ得る（または含み得る）ことが企図される。少なくとも1つの例示的な実施形態において、方法は、前に記載されるオートファジー阻害剤を含む付加的な治療的処置を対象に投与する（または投与しておく）付加的なステップを含み得る。

【0136】

そのような方法の少なくとも1つの実施形態において、本開示の構築物は、対象の単離されたNK細胞に導入され、その後、形質転換されたNK細胞は対象に再導入され、それによって抗腫瘍および／または抗がん応答をもたらして、対象における病状を低下させるまたは排除する。使用され得る適切なNK細胞は、上に書かれており、限定されることなく血液由来NK細胞を含む。本明細書に記載の非NK細胞さえも採用され得る。当業者に周知であるように、白血球除去療法等の様々な方法が、対象からこれらの細胞を単離するために容易に利用可能である。

【0137】

本明細書の構築物、操作された細胞および細胞株、薬学的組成物、ならびに方法についての様々な実施形態がかなり詳細に記載されているものの、実施形態は、単に非限定的な例として与えられる。本明細書に記載される実施形態の多くの変形および改変は、本開示を踏まえて当業者に明らかであろう。それゆえ、本開示の範囲から逸脱することなく、様々な変化および改変がなされ得、均等物がその要素に代わって置換され得ることは当業者によって理解されるであろう。実際のところ、本開示は、包括的であるまたは限定的すぎることを意図されない。本開示の範囲は、添付の特許請求の範囲によっておよびそれらの均等物によって規定されるべきである。

【0138】

さらに、代表的な実施形態を記載する際、本開示は、ステップの特定の配列として方法および／または過程を提示しているかもしれない。しかしながら、方法または過程が、本明細書に記載されるステップの特定の順序に依存しない限り、方法または過程は、記載されるステップの特定の配列に限定されるべきではない。当業者が解するであろうように、ステップの他の配列が可能であり得る。それゆえ、本明細書に開示されるステップの特定の順序は、特許請求の範囲に対する限定として解釈されるべきではない。加えて、方法および／または過程を対称とする請求項は、書かれた順序でのそれらのステップの実施に限定されるべきではなく、当業者であれば、配列が変動し得、なおも本開示の精神および範囲内にとどまり得ることを容易に解し得る。

【0139】

それゆえ、本説明および添付の特許請求の範囲は、本開示に基づいて当業者に明らかなすべての改変および変化を包含するであろうことが意図される。

## 【0140】

## 腫瘍発生促進性抗原および構築物設計考慮事項

本開示の抗原標的選択は、GBM患者サンプルにおける腫瘍発生促進性抗原の組み合わせ存在に基づいた。GBM病理の一因となる個別の役割を有するマーカーであるGD2、NKGD2DL、およびCD73の遺伝子レベル転写発現は、The Cancer Genome Atlas (TCGA) 患者コホートからのGBM RNA-seq患者データセット（156人の患者）の96%超（156人中151人）で個々に存在することが観察され、一方で二重組み合わせは、患者サンプルの68%で検出された。小児性、成人原発性、および成人再発性の患者由来GBM細胞は、この発現パターンをさらに裏付けた。

10

## 【0141】

低量で存在する標的抗原に対する抗原認識の強度をモジュレートすることは、乏しい抗原密度の状況において活性化シグナルを増強し得るが、それは、正常細胞上に存在するそうした抗原に対するオフターゲット毒性も強める。直接的な抗原認識（例えば、CARに基づく活性化による）と可溶性抗体フラグメントの持続的な空間的に制御された放出とを合わせる、抗原の組み合わせを標的にすることは、潜在的オフターゲット効果を抑え、これらの抗原が経時的にまたは個々の腫瘍において発現の変更を示す、患者における標的化組み合わせを提供する。したがって、本開示に従って、少なくとも1つの例示的な実施形態において、局所的にそれらの発現レベルに応答的に抗原の異種組み合わせを標的にし得、一方で健常細胞に危害を加えない三機能性構築物を発現するようにNK細胞を操作した。これらの多機能装備のCAR-NK細胞は、ヒト脳微小血管内皮細胞（hCMEC/D3）およびヒト皮質神経細胞（HCN-2）を含めた、脳における正常細胞に対して明白な毒性を示さなかった（下の実施例を参照されたい）。これは、少なくとも一部には、これらの細胞上での標的化されたマーカーの少なくとも1種の低い発現によって支援される。GBM TAPによるCD73抗体フラグメントの誘発可能な放出は、CAR発現に依存するがその活性化から独立している持続的応答である、局所的TMEにおける低濃度のCD73をもたらし、腫瘍認識の2つの関係するが独立したメカニズムを提供する。

20

## 【0142】

いくつかの調査は、健常ドナーおよびGBM患者の両方からの血液由来NK細胞の間の有意な表現型類似性を実証している。しかしながら、GBM腫瘍常在性NK細胞の表現型および機能は、著しく変更され、活性化受容体CD16、NKGD2D、NKp30、NKp46、DNAM-1、CD2、および2B4の有意により低いレベルによって特徴付けられる。メカニズム的には、GBM患者は、彼ら自身の免疫抑制性TMEを利用して、免疫監視からのGBM逃避を支持した浸潤性NK細胞機能、およびNK媒介性細胞傷害を損なう。これらの免疫逃避メカニズムは、GBMの不均質性に根差し、GBM進行を促進する経路の複雑なネットワークを表す。

30

## 【0143】

NKGD2D-NKGD2DL相互作用は、抗がん免疫応答を活性化することにおいて枢要な役割を果たす。しかしながら、本明細書において前で論じられるように、NK細胞の表面でのNKGD2D発現は、GBM TMEにおける外酵素CD73によって産生されるアデノシンの高い細胞外濃度に応答して有意に減少する。その背景において、本発明者らは、CD73が、GBMに対する重大な予後バイオマーカーであり、GBM患者生存期間の相関因子として使用され得ることを以前に確証している。これに加えて、本開示は、NKGD2Dに基づくCARを発現する発明的な操作されたNK細胞の使用を通じてNKGD2Dの上方調節を誘導し得る組成物、細胞、および方法を達成し、それは、CD73遮断との組み合わせで抗腫瘍応答を増強することが以前に示されている。しかしながら、アデノシン作動性軸を介したNK細胞の免疫抑制は、活性化受容体阻害を超え、NK細胞代謝および様々なエフェクター機能を包含する。CD73の広い発現が理由で、この酵素の標的化された遮断を局在化することが、抗CD73療法の全身投与にとって好ましい可能性がある。

40

50

## 【0144】

制御されかつ局在化した応答性を達成するために、GBM TMEにおける放出の誘発があると局所的CD73活性を遮断し得る、腫瘍応答性の局所的に放出される抗CD73 scFvを有するように、NK細胞を操作した。本明細書において提示されるデータは、本開示の操作されたNK細胞が、細胞外アデノシンの局所濃度を低下させるだけでなく、腫瘍特異的様式でNK細胞活性化の免疫抑制も低下させることを支持する。抗CD73の持続的な低濃度の放出は、邪魔されないCD73酵素活性の状況（すなわち、TME）であったなら喪失されるNK細胞の代謝機能を持続させる。その点で、局所的CD73遮断との組み合わせでのCAR媒介性シグナル伝達は、がん細胞に対する細胞傷害によってだけでなく、それらの損なわれた代謝活性によっても測定可能である抗腫瘍応答をもたらす、今度は、腫瘍におけるNK細胞のより長期にわたる保持を維持させる。

10

## 【0145】

抗原の一時的なモジュレーションは、治療に応答しても生じる。2つのMHCクラスI鎖関連タンパク質（MICAおよびMICB）および6つのUL16結合タンパク質（ULBP1～6）を含むNKG2DLの発現は、化学療法（TMZ）または照射（IR）を用いた標準的治療の後に、GBMにおいて上方調節される。下の実施例において提供されるデータによって支持されるように、NKG2DL発現は、オートファジー阻害剤によっても調節され得、それを用いた治療は、患者由来GBM細胞上でのNKG2DLの有意な増加（MFIおよび%レベルの両方とも）を誘導し得る。NKG2DL発現は、GBM細胞成熟度と逆相関することが以前に見い出され、幹様GBM細胞は、これらのリガンドの発現の不均質であるがより実質的なパターンを発現した。オートファジー阻害剤によって誘導される変化は、NKG2DL-R軸を介したエフェクター機能に対してGBMを感作し、CARを介したNKG2DL発現の誘導によって減じられ得る現象を通じて、エフェクター細胞上のNKG2DLの間接的喪失を促進もする。さらに、オートファジー阻害剤によって誘導されるGBM TMEの再組織化は、GD2発現の減少を含み、それは、GBM上のガングリオシドによって誘導される腫瘍浸潤細胞に課されたアポトーシス負荷を減じる。患者GBM腫瘍におけるグリオーマ幹様細胞に起因した療法に対する抵抗性と関連した幹細胞様特性の一部を再現するために、原発性GBMを有する患者から調達された細胞を用いて作出された患者由来異種移植片を利用した。

20

## 【0146】

抗原標的化は、持続的な抗GBM応答を誘導するのに十分でない可能性がある。臨床データは、腫瘍内NK細胞存在が、患者転帰および生存期間と正に関連することを示している。しかしながら、NK細胞はGBMに低量で存在する。GBMにおける多様な病態生理学的機能を調節することの中で、ケモカイン受容体／リガンド相互作用は、それらのシグナル伝達勾配と並行してNK細胞輸送を推進して、GBMへのCXCR4／CXCL12指向性NK細胞ホーミングに対して実証された応答であるホーミングの向上をもたらす得る。しかしながら、ケモカイン依存的輸送のわずかな証拠は、頭蓋内GBMにおいて示されている。本開示は、オートファジーの薬理的標的化後の、GBMにおけるCCL5およびCXCL10ケモカイン経路の有意な関連性を明らかにしている。メカニズム的には、GBM細胞におけるオートファジーの阻害は、PI3K／NF-κBシグナル伝達経路の活性化を介して、ケモカイン、特にCCL5およびCXCL10の上方調節を誘発することが判定された。これは、その後、重大な走化能をNK細胞に付与し、処理マウスの脳における養子移入されたCD73<sup>+</sup> mCAR-pNK細胞の著明な検出をもたらした。これらケモカインの有意な上方調節が検出されたものの、NK細胞の腫瘍内輸送への他からの寄与は、今のところ決定的には除外され得ない。逆に、腫瘍関連マクロファージ（TAM）等の免疫抑制細胞の動員へのそれらの寄与的役割に関して両方とも認識されているCCL2およびCXCL12の発現は、オートファジー遮断に応答して有意に減少した。本明細書において提示される前臨床的インビボデータは、オートファジーのオートファジー阻害剤媒介性標的化が、抗原レベル発現、およびGBMでのアポトーシス促進性経路の活性化をモジュレートすることによるそれらの殺滅への感作を伴い得るメカニズムを介して

30

40

50

、NK細胞の抗GBM活性を強めることをさらに実証する。これらのデータは、オートファジーの阻害およびCARに基づく抗原標的化によって誘導される新規の実用的な応答を指し示す。本明細書において提示されるデータは、オートファジー阻害剤の投与によって誘導される、GBM TMEの複雑でかつ洗練された再組織化も強調する。GBM病理に対するオートファジー阻害剤の2つに分かれた効果の交絡因子が臨床的に認識されている。アジュバントとして、CQ（オートファジー阻害剤の代表的な例）は、二重盲検第II相研究において、抗GBM療法に対する臨床的応答を増強することが示された。データは、CQがインビボで血液脳関門を横断し得たことを支持し、一方で前臨床研究は、50 mg/kgの濃度が、同所性膠芽腫異種移植片に対する投与レジメンに適切であることを実証している。

10

#### 【0147】

しかしながら、腫瘍負荷のみを制御する限定された能力と共に、インビボでのGBMの表現型シグネチャーおよびケモカインプロファイルに対するオートファジー阻害剤の複数の効果は、CARに基づく養子移入免疫療法をそれにもかかわらず独自に増強し得る組み合わせレジメンにおける微妙な役割を指し示す。CQ等の多くのオートファジー阻害剤の潜在的毒性は、療法投与レジメンに織り込まれるべきであることが理想的である。毒性の低い代謝産物ヒドロキシクロロキンの使用は、特にCQと関連した毒性を和らげる1つの戦略である。ここで、マウスをCQおよびNK細胞の組み合わせで処理する場合、NK細胞は頭蓋内に注入され、一方でCQは全身投与された。重大なことには、処理群における観察可能なCQ依存的毒性は観察されなかった。

20

#### 【0148】

本開示および関連データは、多機能性の遺伝子操作されたヒトNK（CD73、mCAR-pNK）細胞の開発が、GBM TMEの腫瘍不均質性および複数の免疫抑制特質を克服する協調的な手法によって支持される有効な抗GBM活性をもたらし得ることを実証する。本開示は、オートファジーを標的にすることが、免疫モジュレーターとして機能して、GBM腫瘍部位へのエフェクターCAR-NK細胞のホーミングを促進し、一方で、CARに基づく標的化への感作に対してGBM TMEをリプログラミングすることも突き止めた。実際のところ、すべての処理マウスは、腫瘍成長の遅延または完全な停止のいずれかを経験し、オートファジー阻害剤とともにCAR-NK細胞の共投与があると最も有意な応答が得られた。GBMの免疫療法におけるヒトCAR-NK細胞の使用についての実証として、データは、ヒトCAR-NK療法が実行可能な選択肢である一方で、ある特定の実施形態において、最適な応答は、養子移入の投与レジメン（regiment）、投薬量、および頻度に依存し得ることを示している。

30

#### 【実施例】

#### 【0149】

以下の実施例は、本開示のある特定の具体的な実施形態を例示するものであり、決して本発明の範囲を限定することを意図されるものではない。

#### 【0150】

#### マウス

雌の6～8週齢のRag1<sup>-/-</sup>マウスおよびNOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup>IL2rgtm1Wjl/SzJ（NSG）マウスを、パデューがん研究センター（Purdue Center for Cancer Research）で維持した。本明細書に記載されるすべての動物実験は、パデュー大学動物実験委員会によって承認された。

40

#### 【0151】

#### 末梢血NK細胞の単離および細胞培養

血液サンプルを健常成人ドナーから得、pNK細胞を、EasySep（商標）DirectヒトNK細胞単離キット（StemCell Technologies、Canada）を使用して陰性選択によって全血から単離した。次いで、細胞を、メーカーの使用説明書に従ってNK MACS（登録商標）培地システム（130-114-429；Miltenyi Biotec、Germany）を使用して培養しかつ増大させた。

50

NK-92細胞（アメリカ培養細胞系統保存機関（ATCC）から直接購入した）を、10% FBS、100 U/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシン、2 mM L-グルタミン、400 U/mL IL-2、および0.1 mM 2-メルカプトエタノールを補足されたRPMI 1640中で維持した。HCN-2細胞（ATCCから直接購入した）を、10% FBS、100 U/mL ペニシリン、および100 µg/mL ストレプトマイシンを補足されたDMEM中で維持した。hCMC/D3細胞（パデュー大学、Indiana）を、5% FBS、100 U/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシン、1.4 µM ヒドロコルチゾン、5 µg/mL アスコルビン酸、1% 化学的に規定された脂質濃縮液（chemically defined lipid concentrate）、10 mM HEPES、および1 ng/mL bFGFを補足されたEBM-2中で成長させた。SJ-GBM2、GBM43、およびGBM10細胞（Indiana University School of Medicine、Indiana）を、10% FBSおよび1% HEPESを補足されたDMEM中で成長させた。すべての細胞株を、加湿した5% CO<sub>2</sub>環境において37℃でインキュベートした。

10

【0152】

#### 化学試薬

クロロキンニリン酸塩（CQ）（98%）およびアデノシン5'-リン酸ナトリウム塩水和物（AMP）（99%）を、ACROS Organics（商標）（Fair Lawn、New Jersey）から購入した。ヒドロコルチゾン（98%）を、Alfa Aesar（Haverhill、Massachusetts）から購入した。アスコルビン酸、塩化ナトリウム（NaCl）、およびウシ血清アルブミン（BSA）を、Thermo Fisher Scientific（Waltham、Massachusetts）から購入した。塩化カリウム（KCl）、塩化マグネシウム（MgCl<sub>2</sub>）、重炭酸ナトリウム（NaHCO<sub>3</sub>）、アデノシン（99%以上）、DEAE-エキストラン塩酸塩、およびグルコースを、Sigma（St. Louis、Missouri）から購入した。プレフェルジンA溶液1000×およびモネンシン溶液1000×を、BioLegend（San Diego、California）から購入した。D-ルシフェリンカリウム塩（99%超）を、Syd Labs（Natick、Massachusetts）から購入した。LY294002、BAY11-782、およびSP600125を、Cayman Chemical（Ann Arbor、Michigan）から購入した。胎仔ウシ血清（FBS）およびジメチルスルホキシド（DMSO）を、Corning（Corning、New York）から購入した。組み換えヒトインターロイキン-12（IL-2）は、Akron Biotech（Boca Raton、Florida）から譲渡された。組み換えヒトインターロイキン-15（IL-15）および線維芽細胞成長因子-塩基性（bFGF）を、GoldBio（St. Louis、Missouri）から購入した。組み換えヒトRANTES（CCL5）を、PeproTech（Rocky Hill、New Jersey）から購入した。組み換えヒトCXCL10、組み換えヒトu-プラスミノゲン活性化因子／ウロキナーゼ、CF（uPA）、および組み換えヒトNKG2D／CD314 Fcキメラを、Research and Diagnostic Systems, Inc.（Minneapolis、Minnesota）から購入した。ビオチン-プロテインLを、GenScript Biotech（Piscataway、New Jersey）から購入した。BsiWIを、New England Biolabs（Ipswich、Massachusetts）から購入した。RPMI 1640、DMEM、IMDM、ペニシリン／ストレプトマイシン溶液100×（PS）、2-メルカプトエタノール（50 mM）、HEPES（1 M）、化学的に規定された脂質濃縮液、トリパンブルー溶液、およびトリプシン-EDTAを、Gibco（商標）、Thermo Fisher Scientific（Waltham、Massachusetts）から購入した。Opti-MEM 血清低減培地（Reduced Serum Media）を、Invitrogen（Carlsbad、California）から購入した。EBM-2を、Lonza

20

30

40

50

Group AG (Basel, Switzerland) から購入した。ヒトAB血清を、Valley Biomedical (Winchester, Virginia) から購入した。コラーゲンI、ラット尾部を、Enzo Life Sciences, Inc. (Farmingdale, New York) から購入した。RIPA溶解バッファシステム (sc-24948) を、Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, Texas) から購入した。

【0153】

プラスミド構築およびレンチウイルス (Lentivirus) 産生

下の (1) (2) (3) および (4) は、特注でクローニングされ、vector builder.comによって産生された。(5) を Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, Texas) から購入した。(6) を Gen Target Inc. (San Diego, California) から購入した。

(1) pT7 [mRNA] - NKG2D-CAR: このプラスミドにおいて、ヒトNKG2D特異的CAR (NKG2D-DAP10-CD3ζ; 下で構築物1Bとして識別される) を、T7プロモーターの制御下で発現させた。NKG2D配列は、以前の仕事に由来した。

(2) pT7 [mRNA] - GD2-CAR: このプラスミドにおいて、ヒトGD2特異的CAR (抗GD2 scFv-CD8ヒンジ-hCD28-CD3ζ; 下で構築物1Aとして識別される) を、T7プロモーターの制御下で発現させた。抗GD2 scFv配列は、以前の仕事に由来した。

(3) pT7 [mRNA] - CD73-CAR: このプラスミドにおいて、ヒトCD73特異的な切断可能な抗CD73 scFv、ヒトGD2特異的CAR (GD2 scFv-CD8ヒンジ-hCD28-CD3ζ; 構築物1A) およびヒトNKG2D特異的CAR (NKG2D-DAP10-CD3ζ; 構築物1B) を含む構築物全体を、T7プロモーターの制御下で発現させた。ここで、抗CD73 scFvフラグメントを、配列番号1を含むリンカー、切断可能なペプチドフラグメント (配列番号2)、および短いスペーサー (GSSGT) を通じて、GD2-CARと共役させた。GD2-CARを、「自己切断」P2Aペプチド (配列番号4) を通じて、NKG2D-CARと結び付けた。抗CD73 scFv配列は、以前の仕事に由来した。

(4) pLV [Exp] - Puro-EF1A > {CD73-CAR}: (3) に記載される構築物全体 (構築物1) をコードするレンチウイルスベクターを、EF1アルファプロモーターの制御下で発現させた。

(5) ベクリン1 (BECN1) shRNA (h) レンチウイルス粒子 (sc-29797-V): BECN1遺伝子ノックダウンBECN1<sup>-</sup>GBM43細胞を、メーカーのプロトコールに従って、レンチウイルス形質導入によって作出した。

(6) CMV-ルシフェラーゼ (ホタル)、(Puro) レンチウイルス粒子 (LVP325): ホタルルシフェラーゼ標識GBM43: GBM43 (Luc) 細胞を、メーカーのプロトコールに従って、ルシフェラーゼを持つレンチウイルスベクターを用いたレンチウイルス形質導入によって作出した。

【0154】

材料

表1は、本明細書に記載される実験において使用された抗体および染色剤を列挙しており、本開示に記載されるアッセイキットおよびプライマーは下に列挙される。

【0155】

10

20

30

40

50

## 【表 1】

表 1. 抗体および染色剤

| 名前                               | クローン       | 会社                                                    |
|----------------------------------|------------|-------------------------------------------------------|
| APC 抗ヒト NKG2D/CD314              | 1D11 (RUO) | BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ)                   |
| FITC 抗ヒト CD56                    | HCD56      | BioLegend (San Diego, CA)                             |
| PE-Cy7 抗ヒト CD3                   | HIT3       | BioLegend (San Diego, CA)                             |
| APC 抗ヒト CD107a                   | H4A3       | BioLegend (San Diego, CA)                             |
| APC 抗ヒト IFN- $\gamma$            | 4S.B3      | BioLegend (San Diego, CA)                             |
| APC マウス IgG1, $\kappa$ アイソタイプ対照  | MOPC-21    | BioLegend (San Diego, CA)                             |
| APC 抗ヒト GD2                      | 14G2a      | BioLegend (San Diego, CA)                             |
| APC マウス IgG2a, $\kappa$ アイソタイプ対照 | MOPC-173   | BioLegend (San Diego, CA)                             |
| APC 抗ヒト CD73                     | AD2 (RUO)  | BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ)                   |
| APC 抗ヒト IgG Fc                   | M1310G05   | BioLegend (San Diego, CA)                             |
| APC 抗ヒト CD16                     | B73.1      | BioLegend (San Diego, CA)                             |
| APC 抗ヒト NKG2A                    | #131411    | Research & Diagnostic Systems, Inc. (Minneapolis, MN) |
| APC マウス IgG2b, $\kappa$ アイソタイプ対照 | MPC-11     | BioLegend (San Diego, CA)                             |
| PE 抗ヒト HLA-A,B,C                 | W6/32      | BioLegend (San Diego, CA)                             |
| PE マウス IgG2a, $\kappa$ アイソタイプ対照  | MOPC-173   | BioLegend (San Diego, CA)                             |
| APC ストレプトアビジン                    |            | BioLegend (San Diego, CA)                             |
| ヒト NKp46/NCR1 抗体                 |            | Abcam (Cambridge, UK)                                 |
| マウス NKp46/NCR1 抗体                |            | Research & Diagnostic Systems, Inc. (Minneapolis, MN) |
| NT5E/CD73 (D7F9A)ウサギ mAb         |            | Cell Signaling Technology (Danvers, MA)               |
| ヒト CCL5/RANTES 抗体                |            | Research & Diagnostic Systems, Inc. (Minneapolis, MN) |
| ヒト CXCL10 抗体                     |            | Research & Diagnostic Systems, Inc. (Minneapolis, MN) |
| SYTOX(商標)Green Dead Cell Stain   |            | Invitrogen (Carlsbad, CA)                             |
| SYTOX(商標)Blue Dead Cell Stain    |            | Invitrogen (Carlsbad, CA)                             |

## 【0156】

以下のアッセイキットを、本明細書に記載される実施例において使用した：

- (1) TransIT (登録商標) - mRNA トランスフェクションキット (Mirus Bio LLC, Madison, Wisconsin) ;
- (2) EasySep (商標) Direct ヒト NK 細胞単離キット (StemCell Technologies, Vancouver, Canada) ;
- (3) ヒト CCL5 (RANTES) Biolegend-ELISA MAX (商標) Deluxe Set (BioLegend, San Diego, California) ;
- (4) ヒト CXCL10 (IP10) Biolegend-ELISA MAX (商標

) Deluxe Set (BioLegend、San Diego、California) ;

(5) Malachite Greenリン酸アッセイキット (BioAssay Systems、Hayward、California) ;

(6) アデノシンアッセイキット (Cell Biolabs Inc.、San Diego、California) ;

(7) mirVana (商標) miRNA単離キット (Life Technologies、Carlsbad、California) ;

(8) HiScribe (商標) T7 ARCA mRNAキット (テーリングあり) (New England Biolabs、Ipswich、Massachusetts) ;

(9) EZ-10スピンカラムRNA Cleanup & Concentrationキット (Bio Basic Inc.、Ontario、Canada) ;

(10) qScript (商標) One-Step SYBR (登録商標) Green qRT-PCRキット、低ROX (商標) (Quanta BioSciences Inc.、Gaithersburg、Maryland) ;

(11) 固定/透過処理溶液キット (BDBiosciences、San Jose、California) ;

(12) 7-AAD/CFSE細胞媒介性細胞傷害アッセイキット (Cayman Chemical、Ann Arbor、Michigan)

【0157】

以下のRT-PCRプライマーを、本明細書に記載される実施例において使用した：ヒトCCL5 qPCRプライマーペア (HP100784)、ヒトCXCL10 qPCRペア (HP100690)、ヒトCCL2 qPCRプライマーペア (HP104854)、ヒトCXCL9 qPCRプライマーペア (HP100773)、およびヒトCXCL12 qPCRプライマーペア (HP100192)を、Sino Biological US Inc. (Chesterbrook、Pennsylvania) から得た。GAPDHを内因性対照として使用した。そのプライマーであるプライマー1 (配列番号4) およびプライマー2 (配列番号5)を、Integrated DNA Technologies, Inc. (Coralville、Iowa) から得た。RT-PCRアッセイにおいて使用されたプライマーのすべてを、メーカーの使用説明書に従って使用した。

【0158】

統計解析

データは、本明細書において平均±SEMとして提示されている。すべての調査に関する統計解析を、Excel 2007ソフトウェア (Microsoft Office 2007) を使用して実施し、2つの正規分布した試験群間の比較を、両側スチューデントt検定を使用して実施した。3つ以上の群の解析に関しては、一元配置ANOVA解析を使用して比較を実施した。p<0.05を統計的に有意であると見なした。

【0159】

[実施例1]

多機能性の応答性のCARに基づく構築物を用いて操作されたNK細胞は、ヒトGBMに広く存在する複数の抗原を標的にし得る

NK細胞に相当する遺伝子、ならびにGBMにおける様々な腫瘍発生促進性または抗腫瘍発生リガンドおよび標的をコードする一連の機能的遺伝子の発現プロファイルの間の任意の相関を同定するために、遺伝子セット採点法を使用して、Genomic Data Commonsを通じてThe Cancer Genome Atlas (TCGA) からのGBM RNA-seq患者データセット (156人の患者) を検討し、ある特定の機能的遺伝子の発現とNK細胞存在との間の関係性を同定した。そのような機能的遺伝子には、限定されることなく、NK細胞シグネチャー遺伝子セット (例えば、NCR1、

10

20

30

40

50

NCR3、KLRB1、CD160、およびPRF1を含む)、NT5E(CD73をコードする)、B4GALNT1(GD2を産生する酵素をコードする)、MICA/B(NKG2Dに対する共通のリガンドをコードする)、ならびにCCL5およびCXCL10(2種の名を冠したケモカインをコードする)が含まれた。

#### 【0160】

選択された遺伝子の正規化された発現(FPKM)の間の線形相関を、`corrplot` Rパッケージを使用して判定した。GBM患者(N=156)を、高および低発現に対するカットオフとしてそれぞれ上位四分位点および下位四分位点を使用して、それぞれ個々の遺伝子(B4GALNT1、MICA、MICB、およびNT5E)の発現に基づいて高/低群に分類した。高発現群が関心対象であり、4種の遺伝子のうちの少なくとも1種の高発現を有する患者の数を使用して、ベン図を作った(図1、下位区分Cを参照されたい)。

#### 【0161】

NT5EおよびB4GALNT1それぞれは、GBMにおけるNKシグネチャーセットを表した個々の遺伝子との負の相関を有し、これらの遺伝子によってコードされる抗原が、GBMにおいてNK細胞機能および増殖を抑制するように作用することを示唆した。代替的に、MICA/B、CCL5、およびCXCL10をコードする、NKG2Dリガンドを含めた、NKエフェクター応答を推進することが公知である遺伝子は、個々のNKシグネチャー遺伝子との正の相関を示した( $r < 0$ ) (図1、下位区分Aを参照されたい)。

#### 【0162】

50%上位および下位四分位点に基づく高/低群へのGBM患者の分類(TCGA RNA-seqデータを使用した)は、これらの知見をさらに支持し、156人の患者中151人が、4種の標的化された遺伝子NT5E、B4GALNT1、MICA、またはMICBのうちの少なくとも1種を過剰発現することを同定した。特異的遺伝子の高発現を有するGBM患者のデータを使用した、NKシグネチャー遺伝子セットに対するエンリッチメント解析は、NT5EおよびB4GALNT1遺伝子に対して発現の負の相関( $NES < 1$ )、ならびにMICA/MICB、CXCL10、およびCCL5遺伝子に対して正の相関発現( $NES > 1$ )を示した(図1、下位区分B、および表2を参照されたい)。

#### 【0163】

##### 【表2】

表2. TCGA GBM データに基づく、NK の5種の遺伝子セット全体、ならびに個々の遺伝子MICA/MICB、NT5E、B4GALNT1、CXCL10、およびCCL5についての正規化された発現(FPKM)の間の相関(NES:エンリッチメントスコア; ES:正規化されたエンリッチメントスコア)

| 経路              | pval      | padj      | ES         | NES       | 方向 |
|-----------------|-----------|-----------|------------|-----------|----|
| <i>MICAMICB</i> | 0.1374046 | 0.1374046 | 0.7373083  | 1.351678  | 正  |
| <i>NT5E</i>     | 0.26546   | 0.26546   | -0.6885178 | -1.184308 | 負  |
| <i>B4GALNT1</i> | 0.2709677 | 0.2709677 | -0.6425565 | -1.228292 | 負  |
| <i>CXCL10</i>   | 0.0072115 | 0.0072115 | 0.9004993  | 1.752424  | 正  |
| <i>CCL5</i>     | 0.0275424 | 0.0275424 | 0.8680867  | 1.609939  | 正  |

#### 【0164】

患者数の間の遺伝子発現の関連を示したベン図は、複数の遺伝子組み合わせを発現する患者の相当数および予想されるより低い数を示す（図1C～1Dを参照されたい）。

【0165】

2種の腫瘍発生促進性マーカーGD2およびCD73は、患者由来の原発成人性（GBM43）、小児性（SJ-GBM2）、および再発成人性（GBM10）脳腫瘍細胞を含めた、種々のタイプのGBM上で広くかつ不均一に発現される（図1、下位区分Eを参照されたい）。これらの中で、外酵素CD73は、負の予後因子であることが以前に実証された。

【0166】

逆に、強力な活性化NK細胞受容体NKG2Dに対するコグネートリガンドもGBMに高度に存在するが、とはいえNKG2Dは、TMEにおいてしばしば下方調節される。このことを検証するために、pNK細胞を、500μL培地中にて $5 \times 10^5$ 個細胞／ウェルの密度で24ウェルプレートに播種した。次いで、アデノシンを1000μMの最終濃度で添加した。24時間後、細胞を回収し、それらの生存率（%）をCKK-8アッセイにより判定した（図2の下位区分A）。NKG2D発現（%およびMFI）をフローサイトメトリーによって判定した（図2の下位区分B）。図2に示されるように、アデノシンの存在は、細胞生存率に対して明確な負の影響を有し、NKG2Dの発現を同様に減少させた。これらの知見は、操作を通じて、NK細胞上でのNKG2D発現を増加させる必要性があることを支持する。

【0167】

これらのGBM抗原の応答性でかつ組み合わせの標的化を達成するために、2シストロン性ベクターを、まず、2種の個々のCARを同時に発現するように操作し、GD2・CD28・CD3ζ CAR（構築物1A）およびNKG2D・DAP10・CD3ζ CAR（構築物1B）の両方を発現するNK細胞を産出した。次いで、構築物1Aを、抗CD73 scFvとともに、切断可能な腫瘍感受性リンカーの後に縦列でさらに操作して、CD73-GD2・CD28・CD3ζ-CAR（構築物1）を作出し（図3～4を参照されたい）、CAR活性化から独立した、GBM TMEにおけるCD73遮断抗体フラグメントの局在的放出のために構成された構築物をもたらした。

【0168】

次いで、構築物1B（図5、下位区分A）、切断可能な抗CD73 scFvを組み入れた構築物1A（CD73-GD2・CD28・CD3ζ-CAR）（図5、下位区分F）、および全体の構築物を持つ多機能性CAR（構築物1；図5、下位区分K）を含めた、各要素の別個の型を作出することによって、多機能性構築物1の個々の遺伝子構成要素の機能性を評価した。

【0169】

各CARをNK-92細胞に別個に発現させ、相当するCAR構造の発現を検証した（図5、下位区分B、G、およびL）。より具体的には、プラスミド（1）、（2）、および（3）（上で言及された）に個々に由来するmRNAを、HiScribe（商標）T7 ARCA mRNAキット（テーリングあり）（New England Biolabs、Ipswich、Massachusetts）により合成した。すべてのmRNA産物を、EZ-10スピンカラムRNA Cleanup & Concentrationキット（Bio Basic Inc.、Markham、Canada）により濃縮しかつ精製した。その後、それらの濃度を、Qubit 4蛍光光度計（Thermo Fisher Scientific、Waltham、Massachusetts）を使用して測定した。

【0170】

種々のCAR構築物の発現を有する操作されたNK-92細胞を作出するために、メーカーの推奨プロトコールに従って、NK-92細胞に、TransIT（登録商標）-mRNAトランスフェクションキット（Mirus Bio LLC、Madison、Wisconsin）によりmRNAをトランスフェクトした。簡潔には、NK-92細胞

を12ウェルプレートに播いた(1mL完全成長培地中 $5 \times 10^5$ 個細胞/ウェル)。mRNA(1 $\mu$ g)を、滅菌ポリスチレンチューブ中Opti-MEM(100 $\mu$ L)に添加し、ウェルを混合した。その後、mRNA Boost Reagent(3 $\mu$ L)およびTrans Reagent(3 $\mu$ L)を添加し、逐次的に混合した。チューブを室温で5分間インキュベートし、複合体を細胞に液滴で添加した。トランスフェクションの後、細胞を37 $^{\circ}$ Cおよび5% CO<sub>2</sub>で48時間インキュベートし、次いでCAR構造発現判定のために回収した。

#### 【0171】

NKG2D発現(構築物1Bおよび/または構築物1の発現)のレベルによりトランスフェクション効率を測定するために、細胞をAPCコンジュゲートNKG2D抗体で染色し、BD Accuri(商標)C6 Plus(Becton、Dickinson and Company、Franklin Lakes、New Jersey)を使用してフローサイトメトリーによって解析した。

10

#### 【0172】

GD2、CAR発現(構築物1Aおよび/または構築物1の発現)の検出に関しては、細胞を、ビオチン-プロテインLおよびAPC-ストレプトアビジンで逐次的に染色し、GD2、CAR発現のレベルをフローサイトメトリーによって解析した。全体のCAR構築物(構築物1)を発現するCD73、mCAR-NK-92細胞に関しては、細胞を様々な濃度のuPAとともにインキュベートして、細胞表面およびCAR構築物の残部からの抗CD73 scFvの除去を誘発することによって、抗CD73 scFvの発現を判定した。この後、細胞をビオチン-プロテインLおよびAPC-ストレプトアビジンで染色した。次いで、残りの構築物の発現をフローサイトメトリーによって解析した。トランスフェクション後の細胞生存率を、CCK-8アッセイ解析(Dojindo Molecular Technologies, Inc.、Rockville、Maryland)によって測定した。

20

#### 【0173】

図5、下位区分C、H、およびMに示されるように、すべての場合に、CAR発現NK細胞は高い生存率(95%超)を保持した。それと同時に、NK細胞上での堅牢な構築物1B発現を達成し(約44%)(図5、下位区分Dを参照されたい)、構築物1Bを発現する細胞は、トランスフェクトされていない細胞と比較して、GBM43細胞のより高い細胞傷害活性を示した(図5、下位区分E)。構築物1Aに関して同様の発現を達成し(約42%)(図5、下位区分Iを参照されたい)、患者由来GBM標的細胞に対する相応により高い細胞傷害を有した(図5、下位区分Jを参照されたい)。このデータは、構築物1Aが、GD2発現GBM細胞を有効に認識し得かつ排除し得ることを裏付ける。

30

#### 【0174】

完全な多機能性配列(構築物1)を発現するように操作した場合、NK-92細胞は、NKG2D発現(図5、下位区分N)、抗GD2 scFv発現、および抗CD73 scFv発現(図5、下位区分O)の有意な増加を示した。

#### 【0175】

NK-92細胞と比較して、健常ドナーの末梢血に由来する初代NK(pNK)細胞は、一般的に、患者由来GBM標的細胞に対するより高い溶解活性を有する。患者由来GBM43細胞が、複数のドナーから回収されかつその後構築物1を発現するように操作されたpNK細胞によって殺滅され得ることを検証するために、pNK細胞を健常成人ドナーから単離し(図5、下位区分P、および図6)、全体の多機能性構築物1(CD73、mCAR-pNK)を発現するように、DEAE-デキストランの存在下でレンチウイルス形質導入によって操作した。

40

#### 【0176】

サイトカイン活性化pNK細胞(NK-MACS(登録商標)培地中での培養の1週間活性化された)を、デキストランの助けを借りて、2ラウンドのレンチウイルス形質導入にわたって、機能的CARを発現するように操作した(pLVp[Exp]-Puro-

50

EF1A>{CD73-CAR})。簡潔には、pNK細胞を24ウェルプレートに播いた(10% FBSおよび500U/mL IL-2を補足された0.5mL RPMI 1640培地中 $5 \times 10^5$ 個細胞/ウェル)。レンチウイルス上清を10感染多重度(MOI)で添加し、その後、デキストラン水溶液を8 $\mu$ g/mLの最終濃度に添加した。各プレートを1000gで60分間遠心分離し、5% CO<sub>2</sub>を注入された37°Cインキュベーターにて一晚インキュベートした。トランスフェクションの後、CD73.mCAR-pNK細胞を回収し、さらなる使用までNK-MACS(登録商標)培地の下で増大させた。次いで、すべての構築物の発現レベルを、上記のプロトコールに従ってフローサイトメトリーによって測定しかつ解析した。トランスフェクション後の細胞生存率を、トリパンブルー染色によって測定した。

10

【0177】

2ラウンドの形質導入の後、ドナーNK細胞の生存率の予想されるドナー特異的下降(図5、下位区分O、および図6)は、NKGD2、抗GD2 scFv、および抗CD73 scFvの有意に増加した発現を伴った(図5、下位区分RおよびS、ならびに図6)。さらに、構築物1を発現するCD73.mCAR-pNK細胞は、フィーダーの使用なしで商業的NK-MACS(登録商標)培地中で2週間にわたって実質的に増大し得、一方で安定な遺伝子発現を保持した(図5、下位区分Tを参照されたい)。

【0178】

集合的に、これらの結果は、組み合わせGBM標的としてのCD73、GD2、およびNKGD2Lの使用を立証し、NK細胞に基づくGBM免疫療法に対するそれらの使用を検討するための論理的根拠を提供する。

20

【0179】

[実施例2]

多機能性の操作されたNK細胞は、患者由来GBM細胞を標的にし、一方で正常細胞に危害を加えない

殺滅効力を調べるために、殺滅アッセイを、NK-92、NKGD2.CAR-NK92(構築物1B)、GD2.CAR-NK92(構築物1A)、CD73.mCAR-NK92(構築物1)、pNK、またはCD73.mCAR-pNK細胞のいずれかとともに利用し、これらの細胞を、種々の標的細胞(SJ-GBM2、GBM43、GBM10、hCMC/D3、およびHCN-2)とともに様々なE:T比で4時間共培養した。殺滅活性に対する抗CD73 scFv部分の効果を評価するために、構築物全体の発現を有するCD73.mCAR-NK92またはCD73.mCAR-pNK細胞のいずれかをuPAとともにインキュベートして、表面からすべての抗CD73 scFvを除去した。その後、GBM43標的細胞に対するこれらの細胞の殺滅能を測定した。

30

【0180】

脱顆粒を調べるために、CD73.mCAR-NK92またはCD73.mCAR-pNK細胞のいずれかを、公知の技法に従って、APC-CD107a抗体およびモネンシンの存在下でGBM43細胞とともに4時間共培養した(E:T=5:1)。CD107a(%およびMFI)の検出をフローサイトメトリーによって行った。

【0181】

40

IFN- $\gamma$ 産生を調べるために、公知のプロトコールに従い、CD73.mCAR-NK92またはCD73.mCAR-pNK細胞のいずれかを、ブレフェルジンAの存在下でGBM43細胞とともに4時間共培養した(E:T=5:1)。次いで、細胞を回収し、洗浄し、固定し/透過処理し、その後APC-IFN- $\gamma$ 抗体で染色し、フローサイトメトリーによって検出した。

【0182】

CD73活性、およびアデノシンを生成するその能力を調べるために、GBM43細胞を、完全DMEM中にて96ウェルプレートにウェルあたり $2 \times 10^4$ 個細胞で播種した。一晚のインキュベーション後、GBM43細胞を、6時間のインキュベーションの間のCD73.mCAR-NK92またはCD73.mCAR-pNK細胞のいずれかからの

50

uPA (100 nM) 媒介性切断後の抗CD73 scFvとともにインキュベートした。次いで、細胞培地を除去し、細胞をリン酸塩不含バッファー (ddH<sub>2</sub>O中に希釈された117 mM NaCl、5.3 mM KCl、1.8 mM MgCl<sub>2</sub>、26 mM NaHCO<sub>3</sub>、10 mM グルコース、pH 7.4) を用いて3回リンスした。リン酸塩不含バッファー中に希釈されたAMP (250 μM最終) を添加し、37℃で10分間インキュベートした。最後に、AMP加水分解により生じるリン酸 (Pi) 濃度を、メーカーの使用説明書に従って、Malachite Greenリン酸アッセイキットを使用して測定した。

#### 【0183】

GBM細胞に応答した、NK細胞上でのCD16およびNKG2A発現の変化 (すなわち、NK細胞表現型変化) を調べるために、CFSE標識GBM43細胞を、まず、完全DMEM中にて24ウェルプレートにウェルあたり4×10<sup>4</sup>個細胞で播種した。一晚のインキュベーション後、pNKまたはCD73.mCAR-pNK細胞のいずれかを添加し4時間おいた (E:T=5:1)。次いで、細胞を回収し、洗浄し、APC-CD16またはAPC-NKG2A抗体のいずれかで染色し、発現をフローサイトメトリーによって測定した。

#### 【0184】

対照NK-92細胞と比較して、CD73.mCAR-NK92細胞 (構築物1を発現する) は、様々なE/T比で、4時間後にGBM43細胞の有意に向上した殺滅を示した (図7、下位区分A)。さらに、GBM43細胞との共培養は、CD73.mCAR-NK92細胞を刺激して、細胞表面CD107a発現によって測定される脱顆粒を誘導し (図7、下位区分B)、IFN-γ分泌を上方調節した (図7、下位区分C)。

#### 【0185】

CD73.mCAR-NK92細胞をuPA (100 nM) で処理して、抗CD73 scFvを解放した後、殺滅されたGBM43の数は減少した (図7、下位区分D)。付加的に、切断された抗CD73 scFvは、GBM43細胞による細胞外アデノシンの有意に減少した産生をもたらした (図7、下位区分E、および図8)、GBMに対するCD73の酵素的能力が損なわれたことを示した。付加的に、このデータは、抗CD73 scFvが、CD73に対して機能的でかつ特異的であり、アデノシン蓄積を破棄し得ることを裏付ける。

#### 【0186】

付加的に、多機能性構築物1 (CD73.mCAR-pNK) を発現するように遺伝子操作されたヒト末梢血由来NK細胞は、対照の操作されていないNK細胞のものよりも有意に高いレベルまで、SJ-GBM2 (小児性)、GBM43 (成人性)、およびGBM10 (再発性) 細胞の効率的な殺滅を同様にもたらした (図6および図7、下位区分F~Hを参照されたい)。天然または操作されたNK細胞によるGBM標的の殺滅についてのライブイメージングは、この過程の動力学的性質、および天然ヒトNK細胞によるものと比較して、CD73.mCAR-pNK細胞によるGBM細胞のより高い殺滅特異性を実証する (図9を参照されたい; GBM細胞を、4×10<sup>4</sup>個細胞/ウェルの密度で24ウェルプレートに播種した。一晚の培養後、pNKまたはCD73.m.CAR-pNK細胞のいずれかを、5のE/T比に添加した。次いで、共培養物を、Incucyte S3を使用して撮像し、スキャンは4時間の間10分ごとに実施された)。

#### 【0187】

GBM細胞による刺激は、有意に増加したNK細胞脱顆粒、およびCD73.mCAR-pNK細胞によるIFN-γの細胞内産生に寄与した (図7、下位区分IおよびJ)。uPA処理後の抗CD73 scFvを欠くCD73.mCAR-NK細胞は、2.5および5のエフェクター/標的 (E/T) 比で4時間の共培養の後に、標的GBM43細胞の有意に減少した細胞傷害能を呈した (図7、下位区分Kを参照されたい)。加えて、CD73.mCAR-pNK細胞から切断された抗CD73 scFvを用いた処理の後、GBM43細胞は、活性CD73の喪失に起因して、アデノシンを産生する有意に低下し

10

20

30

40

50

た能力を示した（図 7、下位区分 L）。

【0188】

したがって、多機能性構築物の遺伝子発現による、NK細胞に与えられた抗腫瘍特異性は、GBMに応答した、操作されていないヒトNK細胞に関して観察された変化と比較して、GBM細胞との接触後のCD16の喪失に対する抵抗性の増強（図 7、下位区分 M）、ならびにNKGAの上方調節の低下（図 7、下位区分 N）をもたらした。

【0189】

最後に、非腫瘍組織上でのこれらの抗原の任意の潜在的発現の多特異的標的化に起因した任意の潜在的オフターゲット効果に対処するために、健常細胞を標的にするCD73・mCAR-pNK細胞の能力も、本明細書に記載されるプロトコールを使用して評価した。CD73・mCAR-pNK細胞は、正常細胞、具体的にはhCMC/D3およびHCN-2細胞を含めた神経系統に属するものを優先的に殺滅しなかった。その代わりに、CD73・mCAR-pNK細胞は、健常脳細胞に対する対照の操作されていないpNK細胞のものに匹敵するエフェクター活性を呈した（図 7、下位区分 O および P を参照されたい）。

【0190】

例えば阻害性リガンド発現の個別のパターンを含めた複数のメカニズムが、そのような細胞の標的化に関わり得るものの、CD73・mCAR-pNK細胞によって誘導される低い細胞傷害率は、GBM細胞と比較して、これらの細胞上の標的化されたりリガンドに関する相対的に低い発現プロファイルに起因し得た（図 10 を参照されたい）。まとめると、これらの観察結果は、CD73・mCAR-pNK細胞の機能的優位性を示し、正常細胞への観察可能な毒性のない高度に特異的な抗GBM免疫療法に対する有望な道を表す。

【0191】

[実施例 3]

GBMにおけるオートファジーの機能的標的化は、NK活性およびホーミング（Homing）を増強する

オートファジーは、がんの発症および進行につながりかつ推進する肝要な細胞生存メカニズムである。療法に対するGBM抵抗性を推進する、および免疫細胞治療に対するGBMの感作を確立するその能力に手を加えるために、GBMにおけるオートファジーを遮断する効果を、2つの手法により検討した。一方の調査では、ノックダウン患者由来GBM細胞（BECN1-GBM43）の作出によるBECN1遺伝子の標的化を通じて、オートファジーを遺伝子的に遮断した。より具体的には、GBM43細胞を、前に記載されるように成長させた。レンチウイルスBECN1 shRNA粒子を、メーカーの使用説明書に従って使用して、BECN1-GBM43細胞を作出した。BECN1-GBM43のインビトロ成長挙動を、CCK8アッセイ解析により検証した。

【0192】

代替的に、一般的なFDA承認のオートファジー阻害剤であるクロロキン（CQ）を用いた処理により、オートファジーを薬理的に阻害した（図 11 を参照されたい）。これらの標的化手法を、NK細胞浸潤およびエフェクター機能の両方に対して調べた。この手法に関しては、GBM43細胞を、種々の濃度のCQで処理した。CQに応答したインビトロ細胞生存率を判定するために、GBM43細胞を、 $1 \times 10^4$  個細胞/ウェルの密度で96ウェルプレートに播種した。一晩の培養後、細胞を、種々の濃度のCQで処理し、もう24時間インキュベートした。次いで、細胞生存率を、CCK-8アッセイ解析を用いて判定した。

【0193】

細胞溶解物を、メーカーの使用説明書に従って、RIPA溶解バッファースystemを使用して調製した。その後、サンプルをランし、RayBioTech, Inc. から提供されたauto-westernサービスにより解析した。標的オートファジーマーカーには、BECN1、LC3B、p62、およびβ-アクチンが含まれる（ベクリン1（B

10

20

30

40

50

ECN1)、LC3-II(LC3B)、およびp62は、オートファジーの3種の主たるマーカーである)。

【0194】

重大なことには、すべての場合において、CQの投与は、24時間後にGBM43細胞の生存率および増殖を用量依存的様式で損なった( $IC_{50} = 67.10 \mu M$ ; 図12、下位区分AおよびBを参照されたい)。

【0195】

ケモカインとそれらのコグネート受容体との間の勾配は、より高い濃度を有する部位への細胞の指向性移動を開始させて、腫瘍への免疫細胞輸送を最終的に調節する。GBMへのNK細胞のケモカイン媒介性輸送についての洞察が少ないことに刺激されて、腫瘍へのNK細胞輸送と関連していることが公知のいくつかのケモカインの発現レベルに対する、GBMにおけるオートファジーを阻害することの影響を調査した。

10

【0196】

RNA抽出およびRT-PCR

総RNAを、mirVana(商標)miRNA単離キットを使用して抽出し、濃度を、Qubit 4蛍光光度計を用いて判定した。各サンプルからのRNA(80ng)を、ViiA-7 RT-PCRシステムにおけるqScript(商標)One-Step SYBR(登録商標)Green qRT-PCRキット(Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts)を使用して逆転写した。GAPDH遺伝子を内因性対照として使用した。関心対象の遺伝子の比較Ct値を、GAPDHのCt値に対して正規化した。 $2^{-\Delta Ct}$ 法を使用して、遺伝子の相対的発現を判定し、一方で $2^{-\Delta \Delta Ct}$ 法を使用して、対照と比べた遺伝子発現の変化倍率を算出した。

20

【0197】

BECN1-GBM43およびCQ処理GBM43細胞の両方とも、それらのmRNAの有意な増加によって測定される、転写レベルにおけるCCL5およびCXCL10の実質的な上方調節をもたらした(図12、下位区分CおよびD)。それと同時に、ケモカインCCL2およびCXCL12は、オートファジーの阻害があると、GBM43細胞上での転写レベルの減少を示した(図13)。

【0198】

ELISA測定

これらケモカインのタンパク質レベルの変化を評価するために、および根底にある分子メカニズムについてのより多くの洞察を得るために、ケモカイン濃度を、これらケモカインに対するシグナル伝達経路を推進する様々な薬理学的阻害剤の非存在および存在下で、CQ処理GBM43細胞の馴化培地においてELISAを使用して定量化した。これには、PI3K阻害剤のLY294002、NF- $\kappa$ B阻害剤のBAY11-7082、およびJNK阻害剤のSP600125が含まれた。

30

【0199】

より具体的には、分泌されたCCL5およびCXCL10を測定するために、GBM43細胞を、LY294002、BAY11-7082、およびSP600125を含めた様々な小分子阻害剤の存在または非存在下で、 $50 \mu M$ の最終濃度のCQで24時間処理した。上清を回収し、CCL5およびCXCL10のレベルを、メーカーの指示に従ってヒトCCL5およびCXCL10 Biolegend-ELISA MAX(商標)Deluxe Setを使用して定量化した。GBM43細胞からの複数のケモカイン分泌のレベルを見るために、細胞培養上清も回収し、すべての選択された標的を、Eve Technologies(Calgary, Canada)によって提供されるケモカインアレイを用いて判定した。

40

【0200】

対照GBM43細胞の馴化培地は、CCL2( $1324.95 pg/mL$ )およびCXCL12( $69.2 pg/mL$ )のそれらの発現と比較して、CCL5( $12.55 pg$

50

／mL) および C X C L 1 0 ( 2 1 . 0 3 p g / m L ) の両方の相対的に低いレベルを呈した ( 図 1 4 、特にその下位区分 B を参照されたい) 。しかしながら、C Q 処理 G B M 4 3 細胞は、全体にわたって、未処理の対照細胞と比較して有意により高い量の C C L 5 および C X C L 1 0 の両方を分泌した ( 図 1 2 、下位区分 4 E および 4 F を参照されたい) 。これらケモカインの産生の上昇は、L Y 2 9 4 0 0 2 または B A Y 1 1 - 7 0 8 2 によって有意に阻害されたが、S P 6 0 0 1 2 5 によってはそうではなく、それは、G B M に対するオートファジーの阻害後の C C L 5 および C X C L 1 0 の発現の増強と、P I 3 K / N F -  $\kappa$  B 経路の活性化との間のメカニズム的なつながりを示唆する。

#### 【0201】

##### Transwell BBB 遊走アッセイ

NK 細胞の遊走における C C L 5 および C X C L 1 0 の関わりを判定するために、次いで、C C L 5 および C X C L 1 0 勾配に対する活性化 p N K 細胞の遊走を、初代ヒトアストロサイトおよび h M E C / C 3 ヒト脳微小血管内皮細胞の直接接触共培養によって設定されたインビトロ BBB モデルを使用して追尾した ( 図 1 2 、下位区分 G ) 。

#### 【0202】

インビトロ直接接触共培養血液脳関門 ( B B B ) モデルを、以前に記載されるように<sup>5</sup> 確立した。簡潔には、ヒトアストロサイトを、 $2 \mu\text{g} / \text{cm}^2$  のポリ-L-リジンでプレートされた 24 ウェル Transwell (登録商標) インサート (細孔サイズ  $5 \mu\text{m}$ ) に  $4 \times 10^4$  個細胞 /  $\text{cm}^2$  の密度で播種し、培地中で 48 時間増殖 / 分化させた。次いで、培地を除去し、E B M - 2 培地に懸濁された h C M E C / D 3 細胞を、 $1 \times 10^5$  個細胞 /  $\text{cm}^2$  の密度で播種した。

#### 【0203】

共培養物を、付加的な 7 日間 1 日おきに培地交換を有して E B M - 2 中で成長させ、その後調査を行った。 $100 \text{ ng} / \text{mL}$  の組み換え C C L 5 または C X C L 1 0 を含有する、1 % F B S を補足された  $600 \mu\text{L}$  の R P M I 1 6 4 0 培地を、Transwell (登録商標) プレートの下方チャンバーに入れた。1 % F B S を補足された  $100 \mu\text{L}$  R P M I 1 6 4 0 培地中の活性化 p N K 細胞 ( $5 \times 10^5$  個) を、上方チャンバーに入れた ( $5 \mu\text{m}$  の細孔サイズ)。37 °C および 5 % C O <sub>2</sub> で 6 時間のインキュベーションの後、下方チャンバーに遊走した p N K 細胞の数をフローサイトメトリーによって判定した。データは、総細胞インプットに基づく遊走のパーセンテージとして提示されている。

#### 【0204】

図 1 2 、下位区分 H に示されるように、活性化 p N K 細胞は、C C L 5 ( $100 \text{ ng} / \text{mL}$ ) ならびに C X C L 1 0 ( $100 \text{ ng} / \text{mL}$ ) リガンド勾配に沿って遊走するそれらの能力を有意に増加させた。興味深いことには、B E C N 1 - G B M 4 3 細胞の生存率および増殖は、B E C N 1 ノックダウンによって影響を受けなかった ( 図 1 2 、下位区分 I ) 。

#### 【0205】

##### インビボ調査

G B M 腫瘍成長および N K 細胞浸潤に対する B E C N 1 ノックダウンの影響を、成熟 B および T リンパ球を持たないが、その代わりに成熟 N K 細胞区画を有する R a g 1 - / - マウスにおいてインビボでさらに評価した ( 図 1 2 、下位区分 J ) 。

#### 【0206】

G B M 細胞 ( $3 \times 10^6$  個) を、R a g 1 - / - マウスの両脇腹において皮下 ( S C ) 接種した ( 右脇腹において G B M 4 3 対照細胞、および左脇腹において B E C N 1 - G B M 4 3 細胞) 。腫瘍成長をモニターし、腫瘍の長さ ( L ) 、幅 ( W ) 、および高さ ( H ) を、デジタルキャリパーを使用して測定した。腫瘍容積 ( $\text{mm}^3$ ) を、式:  $V = 0.52 \times L \times W \times H$  を使用して算出した。腫瘍成長を、マウスが所定の評価項目基準を満たすまでモニターした。その時点で、腫瘍組織を回収し、組織学的 ( I H C ) 解析のために処理した。

#### 【0207】

10

20

30

40

50

NSGマウスに右脇腹において $3 \times 10^6$ 個のGBM43細胞を接種することによって、皮下GBM異種移植片を確立した。10日後、腫瘍が約 $80\text{mm}^3$ の容積に達した場合、マウスを5つの群 ( $n = 4$  / 群) に無作為に割り振り、以下のプロトコルのうちの1つに従って処理した: (1) PBSのみ; (2)  $5 \times 10^6$  個のpNK細胞単独の静脈内 (IV) 注射; (3)  $5 \times 10^6$  個のCD73.mCAR-pNK細胞単独 (構築物1) の静脈内 (IV) 注射; (4) CQ ( $50\text{mg/kg}$ ) 単独の腹腔内 (IP) 注射。NK細胞を、3週間週1回投与した。養子NK細胞療法 (群2および3) を受けたマウスは、3~4日ごとにIP注射によりIL-15 ( $0.5\mu\text{g}$  / マウス) も受けた。腫瘍成長をキャリパー測定によって追跡し、腫瘍容積を、上で記載される式:  $V = 0.52 \times L \times W \times H$  を使用して算出した。マウスの体重を、処理の全体にわたって記録した。療法の終わりに、マウスを殺し、腫瘍を組織学的 (IHC / IF) 解析のために回収した。

10

#### 【0208】

付加的に、同所性GBM異種移植片を、前に記載されるNSGマウスを使用して作出した。簡潔には、0日目に、GBM43 (Luc) 細胞 ( $1 \times 10^5$  個) を、デジタル化定位送達システムにより右前脳に定位的に埋め込んだ。埋め込みの9日後、マウスを4つの群 ( $n = 4$  / 群) に無作為に割り振り、以下のプロトコルのうちの1つに従って処理した: (1) 未処理 (対照として); (2) CQ ( $50\text{mg/kg}$ ) 単独の腹腔内 (IP) 注射; (3)  $2 \times 10^6$  個のCD73.mCAR-pNK細胞 (構築物1を発現する) 単独の頭蓋内 (IC) 注射; (4) CQ (IP) とCD73.mCAR-pNK細胞 (IC) との組み合わせ。CD73.mCAR-pNK細胞の投与前に、CQを週3回 (1回 / 日) 継続的に注射した。CD73.mCAR-pNK細胞を3週間週1回投与した。腫瘍容積を、Spectral Ami Opticalイメージングシステムを使用してモニターし、かつ記録した。マウスの体重も、処理期間中に記録した。処理の終わりに、マウスを殺し、各マウスからの全脳組織を、アデノシン測定およびIHC / IF解析のために回収した。

20

#### 【0209】

免疫組織化学 (IHC) および免疫蛍光 (IF) 染色は、パデュー大学獣医学部組織学研究所 (Histology Research Laboratory at the Purdue University College of Veterinary Medicine) (West Lafayette, Indiana) で行われた。簡潔には、腫瘍を10%中性緩衝ホルマリン中で固定し、パラフィンに包埋し、3~5 $\mu\text{m}$ 切片に切削した。

30

#### 【0210】

BECN1-GBM43異種移植片に関しては、腫瘍におけるマウスNK細胞を、マウスNKp46 / NCR1抗体を使用した染色により検出した。腫瘍におけるNK細胞の定量化に関しては、染色された細胞を、各スライドの5つの無作為に選択された腫瘍内の視野において200 $\times$ 倍率でカウントした。

#### 【0211】

腫瘍におけるCCL5およびCXCL10発現を、それぞれヒトCCL5 / RANTES抗体およびCXCL10抗体を使用した染色により検出した。染色を、ケモカイン免疫染色の強度 (弱 = 1、中程度 = 2、および高 = 3)、および陽性腫瘍細胞の密度 (0% = 0、1~40% = 1、41~75% = 2、76%超 = 3) に基づいて評価した。各サンプルの最終スコアに強度および密度を掛けた。

40

#### 【0212】

皮下GBM43異種移植片に関しては、NK細胞浸潤を、以下の染色: プロテインL (Alexa 647、遠赤色)、NKp46 (Alexa 488、緑色)、およびDAPI核対比染色を用いて実施されたIF染色によって検討した。CCL5およびCXCL10発現を、上で記載されるようにIHC染色によって評価した。腫瘍におけるCD73発現を、ヒトCD73抗体を使用した染色により検出した。

#### 【0213】

頭蓋内GBM異種移植片に関しては、腫瘍におけるNK細胞を、ヒトNKp46 / NCR1

50

R 1 抗体を使用した染色により検出した。腫瘍における C C L 5 および C X C L 1 0 発現を、それぞれヒト C C L 5 / R A N T E S 抗体および C X C L 1 0 抗体を使用した染色により検出した。腫瘍における C D 7 3 発現を、ヒト C D 7 3 抗体を使用した染色により検出した。

#### 【 0 2 1 4 】

B E C N 1 - G B M 4 3 細胞を移植されたマウスの左脇腹からの腫瘍は、対照 G B M 4 3 細胞から生じたものよりも有意に遅い成長および小さなサイズを呈した（図 1 2、下位区分 K）。C C L 5 および C X C L 1 0 に対する染色と並行して、摘出された腫瘍に対して免疫組織化学染色を実施して、マウス N K 細胞存在の測定として N K p 4 6 の発現を検出した。B E C N 1 を欠く腫瘍において、N K p 4 6 の有意により高い発現が検出され、対照腫瘍と比較してオートファジーを実施する能力を欠く G B M への N K 細胞のより深い浸潤を実証した（図 1 2、下位区分 L および M）。加えて、B E C N 1 - 腫瘍における N K 細胞は、腫瘍周辺および腫瘍内エリアの両方でより高い分布を示した（図 1 5 を参照されたい）。さらに、C C L 5 および C X C L 1 0 の発現は、対照腫瘍における相対的に低いベースラインレベルから、B E C N 1 - 腫瘍における有意により高いレベルまで上方調節された（図 1 2、下位区分 L、N、および O）。

10

#### 【 0 2 1 5 】

N K 細胞腫瘍内浸潤の増加に加えて、様々な濃度の C Q を用いた処理の 2 4 時間後の、G B M 4 3 細胞上での N K 2 G 2 D L 発現（M F I およびパーセンテージ）を評価した。

#### 【 0 2 1 6 】

G B M 4 3 細胞を、まず C Q（様々な濃度）で処理し、次いで回収し、9 6 ウェルに再播種した。一晚の培養後、N K 細胞（B E C N 1 - G B M 4 3 に対して、N K 9 2 対照細胞および p N K 細胞）を、5 の E / T 比で添加し、4 時間共インキュベートした。

20

#### 【 0 2 1 7 】

結果として生じたデータは、オートファジーの C Q 媒介性阻害が、G B M 4 3 細胞上での N K G 2 D L、C D 7 3、および G D 2 の発現に対して測定可能でかつ有意な効果を有することを支持する。具体的には、G B M 4 3 細胞上での N K G 2 D L 発現（% および M F I の両方）は、様々な濃度の C Q を用いた 2 4 時間の処理後に有意に増加した（図 1 6、下位区分 A）。他方で、C D 7 3 の発現（M F I）は、6 . 2 5  $\mu$  M の低い濃度でさえ C Q 処理後に減少した（対照の約 7 0 %）（図 1 6、下位区分 B）。

30

#### 【 0 2 1 8 】

前述のものに加えて、腫瘍内アデノシン濃度も査定した。脳組織を処理後に回収し、冷却 P B S でリンスし、P B S 中でホモジナイズした。その後、懸濁液を 4  $^{\circ}$  C で 1 0 , 0 0 0 g にて 1 0 分間遠心分離し、上清を回収した。アデノシン濃度を、メーカーの指示に従ってアデノシンアッセイキットを使用して判定した。I H C 染色を、上で記載されるように実施した。

#### 【 0 2 1 9 】

C D 7 3 によって媒介されるヒト G B M 細胞におけるアデノシンの産生も、C Q を用いた処理後に有意に低下した（図 1 6、下位区分 C）。G D 2 の発現（M F I）は、5 0  $\mu$  M の濃度またはそれより高い濃度の C Q を用いた処理後に減少した。逆に、G D 2 の発現パーセンテージ（%）は、最高 1 0 0  $\mu$  M の C Q に応答して減少し、その後それは、対照細胞ものと（約 5 8 %）比較して一定のままであった（約 4 6 %）（図 1 6、下位区分 D）。

40

#### 【 0 2 2 0 】

N K 細胞の細胞傷害能に対するオートファジーの阻害の影響をさらに検討するために、C Q 処理 G B M 4 3 細胞または B E C N 1 - G B M 4 3 細胞を、p N K 細胞とともに 5 の E / T 比で 4 時間インキュベートした。結果は、C Q での処理が、ヒト N K 細胞によるより優れた殺滅に対して G B M 細胞を実際に感作したことを支持する（図 1 6、下位区分 E および F を参照されたい）。

#### 【 0 2 2 1 】

50

まとめると、これらの調査から生じたデータは、オートファジーを標的にすることが、GBM腫瘍床へのNK細胞の浸潤を向上させ、より高いレベルのケモカインCCL5およびCXCL10によって支援されることを実証する。加えて、オートファジーを無効にすることは、NKGD2DL発現の増加等のNK細胞機能性の増強を支持したそれらの表現型シグネチャーをリプログラミングすることによって、GBM細胞に対するNK細胞媒介性細胞傷害を強めもし得る。オートファジーを標的にすることによって誘導されるGBMTMEの複雑でかつ独自のリプログラミングは、これらのリプログラミングされた経路を活用するように操作されたNK細胞を用いたGBM腫瘍の処理をさらに増感させ得る。

【0222】

[実施例4]

多機能性の操作されたNK細胞は、患者由来GBM腫瘍をインビボで効率的に標的にする多機能性の操作されたNK細胞のインビボ抗腫瘍活性、ならびにGBMに対する、オートファジーを標的にすることによって誘導される効果を評価するために、患者由来GBM43細胞をNSGマウスに移植することによって、皮下異種移植片モデルを確立した。

【0223】

処理スケジュールが、図17、下位区分Aに要約されている。簡潔には、 $3 \times 10^6$ 個のGBM43細胞を、マウスの右脇腹に皮下に(SC)埋め込んだ(0日目)。10日後(10日目)、CQ群におけるマウスに、 $50 \text{ mg/kg}$ のCQを3週間週1回腹腔内(IP)注射した。1日後(11日目)、pNKおよびCD73.mCAR-pNK群におけるマウスを、 $5 \times 10^6$ 個の養子移入されたpNKまたはCD73.mCAR-pNK細胞で3週間週1回静脈内(IV)処理した。NK細胞の最初の注射の日から開始し、すべてのマウスは、3~4日ごとに1回 $0.5 \mu\text{g}$ のIL-15をIPで受けた。

【0224】

pNK細胞での処理は、PBS対照群におけるマウスと比較して、腫瘍成長を有意に遅延させた(平均腫瘍容積： $815.75 \text{ mm}^3$ 対 $1475 \text{ mm}^3$ 、\*\* $p < 0.01$ ；平均腫瘍重量： $1.13 \text{ g}$ 対 $2.31 \text{ g}$ 、\*\* $p < 0.01$ ；図17、下位区分BおよびC)。pNK細胞処理マウスとCD73.mCAR-pNK細胞処理マウスとの間で、CD73.mCAR-pNK細胞は、より強力な抗腫瘍応答を媒介し、腫瘍成長速度の有意な低下を呈した(平均腫瘍容積： $401.5 \text{ mm}^3$ 対 $815.75 \text{ mm}^3$ 、\*\* $p < 0.01$ ；平均腫瘍重量： $0.59 \text{ g}$ 対 $1.13 \text{ g}$ 、\*\* $p < 0.01$ )。CQ処理も、PBS群と比較して、腫瘍成長の有意な阻害を示した(平均腫瘍容積： $953.25 \text{ mm}^3$ 対 $1475 \text{ mm}^3$ 、\* $p < 0.05$ ；平均腫瘍重量： $1.16 \text{ g}$ 対 $2.31 \text{ g}$ 、\*\* $p < 0.01$ ；図17、下位区分BおよびC)。処理期間全体にわたって、すべての群においてマウスの体重の有意な減少はなかった(図17、下位区分D)。

【0225】

次いで、GBM異種移植片腫瘍へのNK細胞浸潤をIF染色によって検討した。図17、下位区分Eに示されるように、pNK細胞処理マウスからの腫瘍組織において、養子移入されたNK細胞(明るい点)が観察された。比較して、CD73.mCAR-pNK細胞処理マウスからの腫瘍において、より高いNK細胞数が検出された。

【0226】

付加的に、インビボでCD73<sup>+</sup>腫瘍細胞に結合し得る局所的に切断された抗CD73 s c F v (矢印およびより暗い点によって示される)が、CD73.mCAR-pNK細胞処理マウスにおいて腫瘍細胞の近くに検出された。本明細書で報告されるインビトロデータおよび以前のインビボ調査は、リガンド切断を誘発する腫瘍内プロテアーゼ活性の必要性を実証した。その理由で、血中におけるその活性化は予想されず、結果として、循環におけるs c F vの検出可能な存在はないはずであった。それゆえ、IFを使用して、CD73 s c F vの腫瘍特異的存在を検出した。

【0227】

CD73 s c F vの存在は、CD73.mCAR-pNK染色とのみ共局在し、CD73 s c F vの切断に成功したことを示した。さらに、CD73.mCAR-pNK処

10

20

30

40

50

理群における腫瘍上でのCD73の発現の有意な減少が、他の処理群と比較して観察された（図17、下位区分FおよびG）。付加的に、CQ処理マウスからの腫瘍組織は、ケモカインCCL5およびCXCL10の有意により高い存在を明らかにした（図17、下位区分H～J）。これらの腫瘍は、より低いレベルのCD73発現も呈した（図17、下位区分FおよびG）。

【0228】

#### [実施例5]

同所性の患者由来GBM異種移植片に対する、多機能性の遺伝子操作されたNK細胞とCQとの組み合わせの活性

CQとCD73・mCAR-pNK細胞（構築物1を発現する）との組み合わせによって達成される相乗効果をさらに解析するために、NSGマウスにおけるGBM43異種移植片同所性モデルを確立した。まず、GBM43細胞を、ホタルルシフェラーゼを発現するように遺伝子操作して（GBM43-Luc）、インビボ生物発光イメージングによる腫瘍成長のモニタリングを可能にした（図18を参照されたい）。より具体的には、細胞（1000個）を、ピューロマイシンなしの通常（regular）成長培地中で4日間成長させた。経時的な細胞の総生存率を、CCK-8アッセイを使用して測定し、対数尺度でプロットした。両細胞とも、同様の成長パターンおよび倍增時間を示した。

【0229】

本明細書において使用されたインビボ処理プログラムを図解した概略図が、図19、下位区分Aに示されている。簡潔には、NSGマウスに、GBM43-Luc細胞（約 $8 \times 10^4$ 個）を同所的に埋め込み、埋め込みの10日後に、3週間週1回のCQの腹腔内（IP）注射（日あたり50mg/kg、継続的な3日間）および／またはCD73・mCAR-pNK細胞の頭蓋内（IC）注射（ $2 \times 10^4$ 個）で処理した。対照群におけるものと比較した場合、CQ単独で処理されたマウスは、腫瘍成長に対する有意な効果を示さなかった（図19、下位区分B～Dを参照されたい）。逆に、CD73・mCAR-pNK細胞またはCQ+CD73・mCAR-pNK細胞のいずれかで処理されたマウスは、生物発光イメージングによって判定される明白に低下した腫瘍成長を示した（図19、下位区分Bを参照されたい）。CQ+CD73・mCAR-pNK細胞処理マウスに関して、最も強力な抗腫瘍応答が見られた。特に、CQ+CD73・mCAR-pNK細胞で処理されたマウスの半分での腫瘍は、処理期間中に有意な停止を示した。処理期間全体にわたって、すべての群におけるマウスの体重の有意な変化は見い出されなかった（図19、下位区分E）。

【0230】

皮下異種移植片調査と同様に、CQ処理群におけるマウスの腫瘍組織は、CCL5およびCXCL10を含めた、堅牢に上方調節されたケモカイン発現を呈し（図19、下位区分F）、それは、NK細胞浸潤の増加に寄与し得、治療効能の向上につながり得る。図19、下位区分GおよびHに示されるように、CD73・mCAR-pNK細胞単独を受けたマウスと比較して、CQ+CD73・mCAR-pNK細胞処理マウスのGBM腫瘍において、有意により高いNK細胞浸潤が見い出された。対照またはCQ処理群と比較して、CD73・mCAR-pNK細胞およびCQ+CD73・mCAR-pNK細胞処理群の両方におけるマウスの腫瘍は、CD73発現の減少を呈し、後者の群は、CD73発現の最も実質的な喪失を示した（図19、下位区分IおよびJ）。これは、処理マウスの腫瘍において検出された有意に減少したレベルの細胞外アデノシンと関連付けられた。具体的には、局所的脳組織におけるCD73媒介性アデノシン産生は、CQ+CD73・mCAR-pNK細胞で処理されたマウスにおいて最も目立って減少した（図19、下位区分KおよびL）。

【0231】

総合すると、これらのインビボ異種移植片調査は、患者由来成人GBMに対するCD73・mCAR-pNK細胞の強力かつ特異的な活性を実証する。応答は、CQとの共療法後のケモカイン分泌およびGBM上でのCD73発現の有意な変化の誘導と関連し、オ

10

20

30

40

50

ートファジーを無効にすると誘導されるGBM TMEの再組織化を示した。

【符号の説明】

【0232】

- 100 合成遺伝子構築物
- 102 第1の結合ドメインまたはそのフラグメント
- 104 第2の結合ドメインまたはそのフラグメント
- 106 第3の結合ドメインまたはそのフラグメント

【図面】

【図1-1】

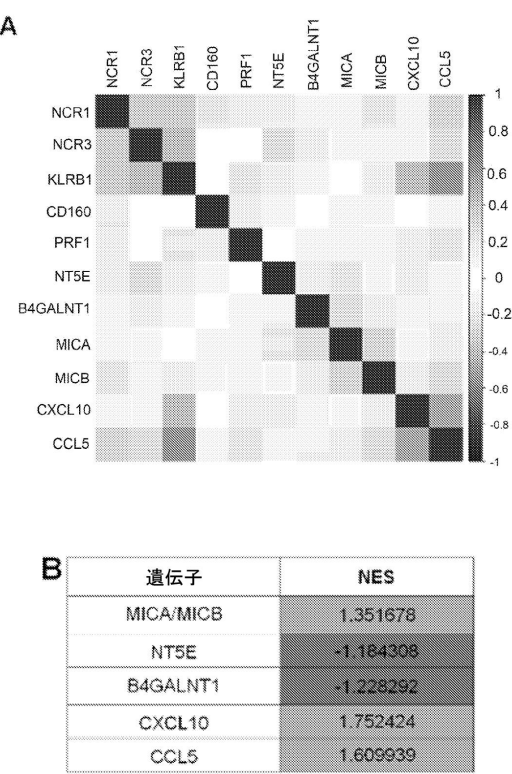


図1

【図1-2】

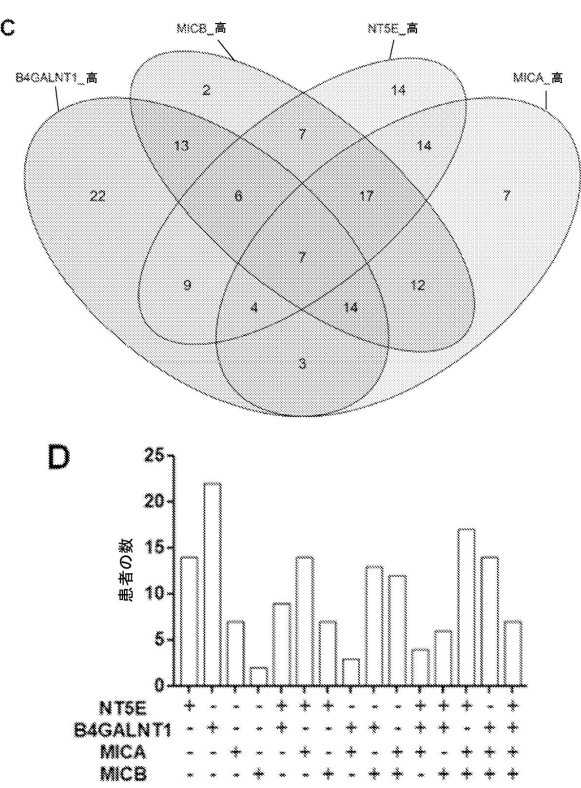


図1 続き

10

20

30

40

50

【図 1 - 3】

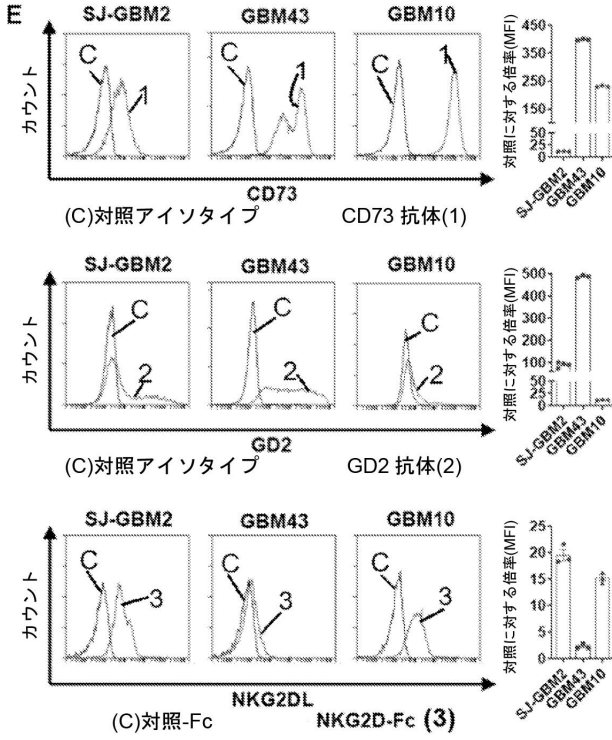


図 1 続き

【図 1 - 4】

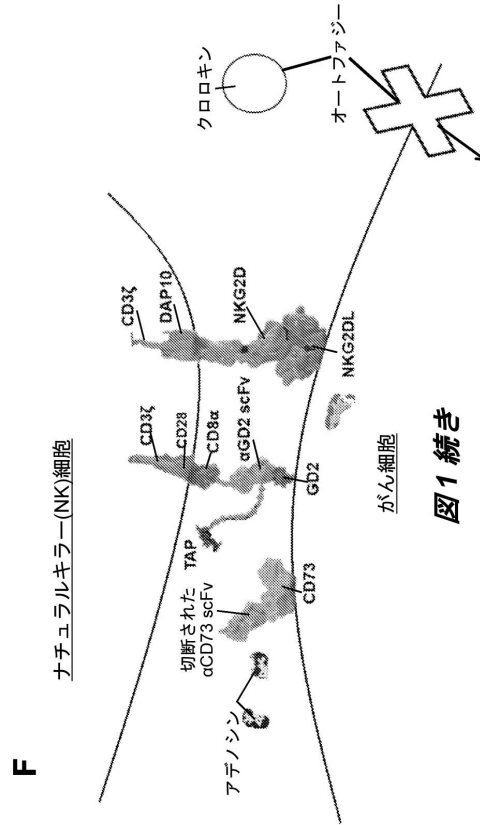


図 1 続き

【図 2】

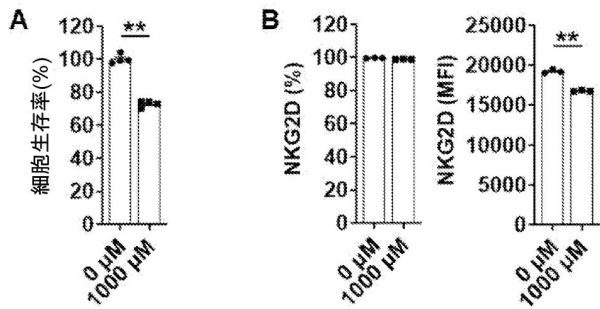


図 2

【図 3】

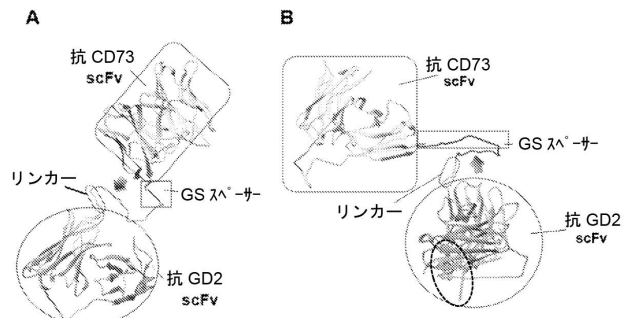


図 3

【図 4】

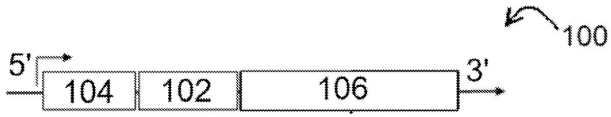


図 4

【図 5 - 1】

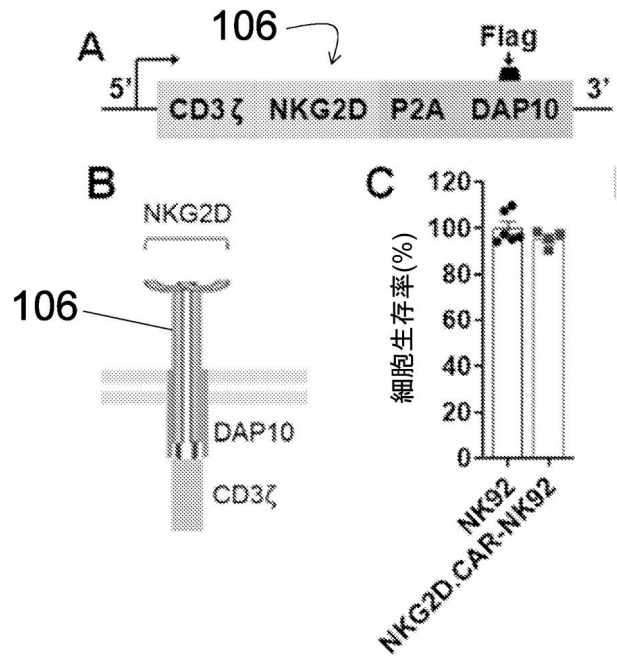


図 5

【図 5 - 2】

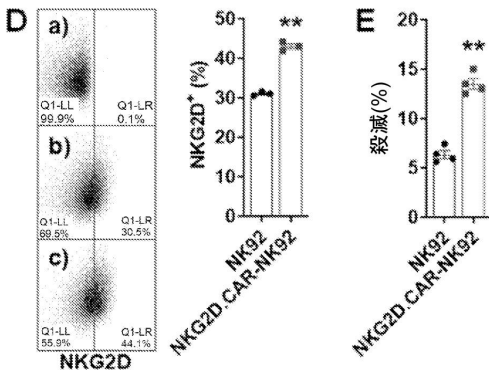


図 5 続き

【図 5 - 3】

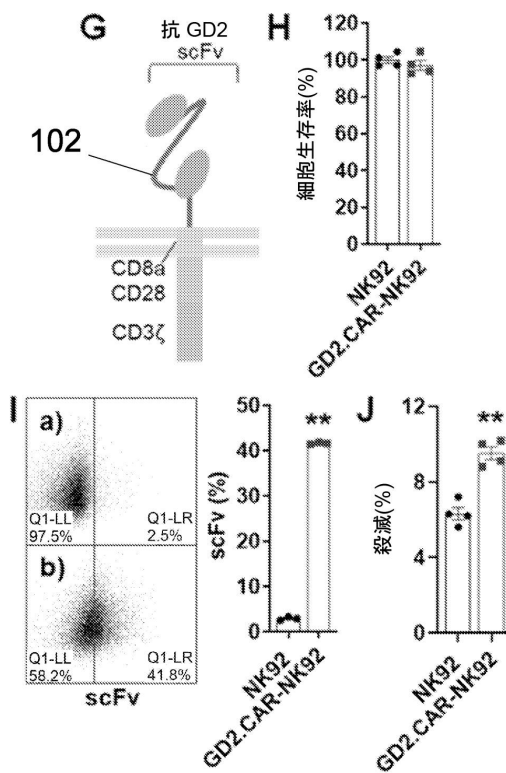


図 5 続き

10

20

30

40

50



【図 7 - 1】

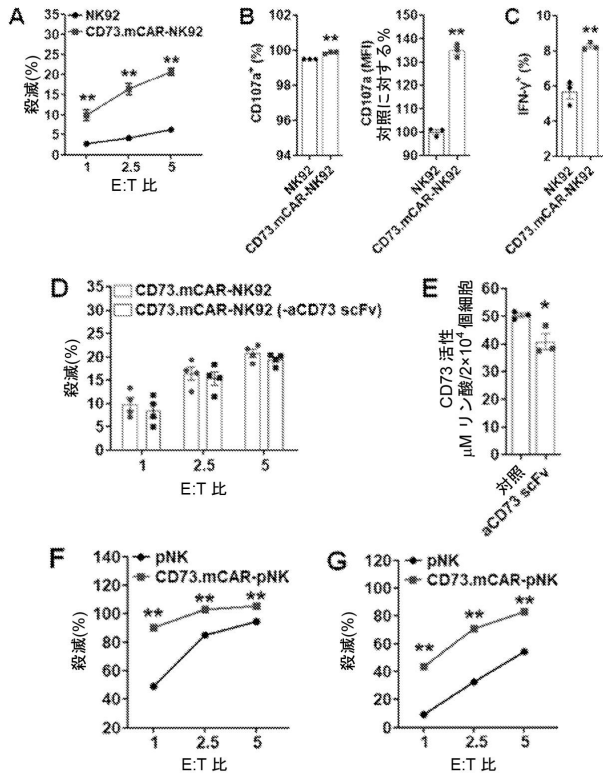


図 7

【図 7 - 2】

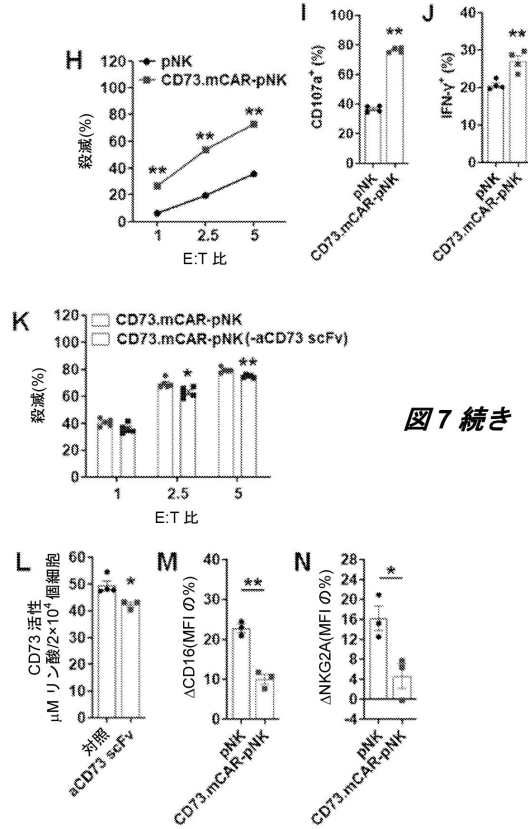


図 7 続き

【図 7 - 3】

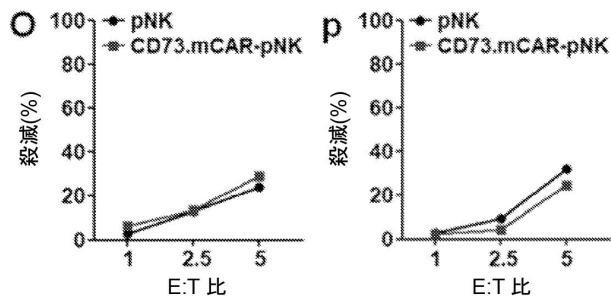


図 7 続き

【図 8】

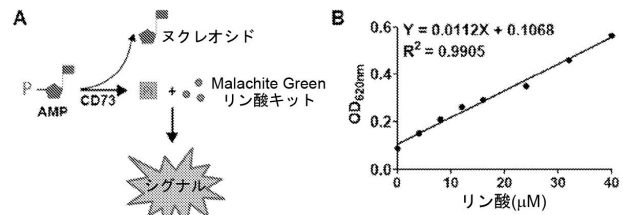


図 8

10

20

30

40

50

【図 9】

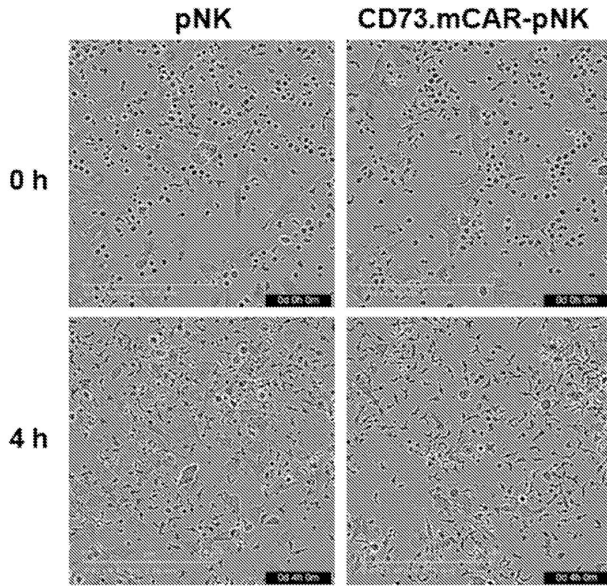


図 9

【図 10】

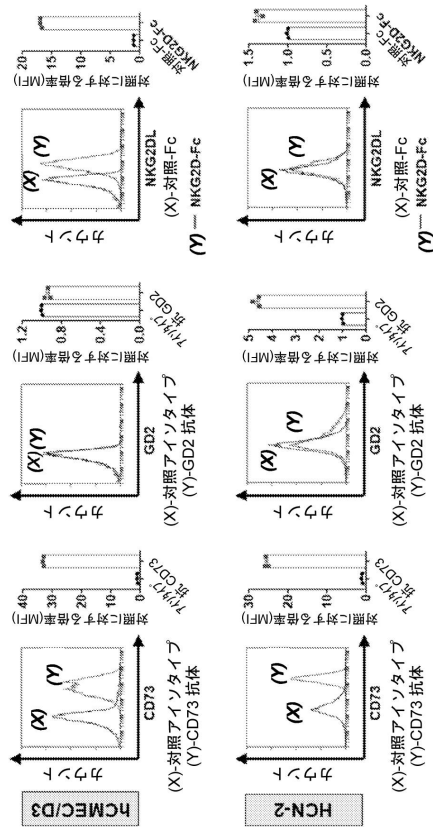


図 10

【図 11】

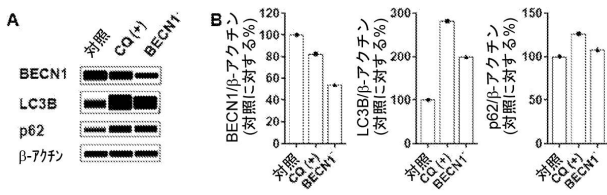


図 11

【図 12-1】

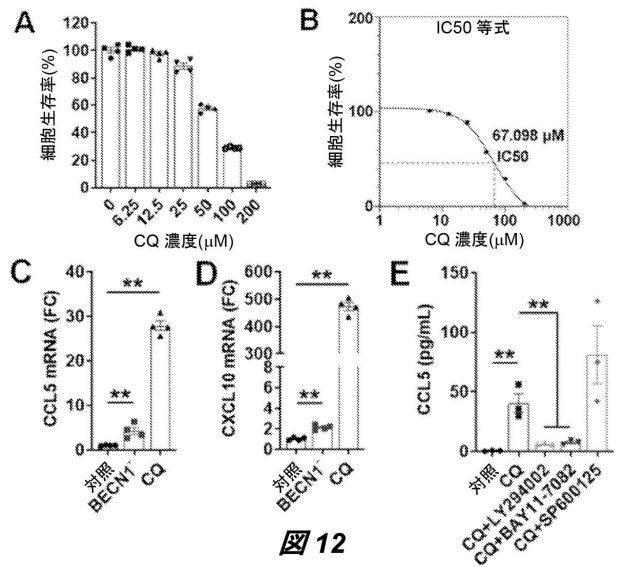


図 12

10

20

30

40

50

【図 12-2】

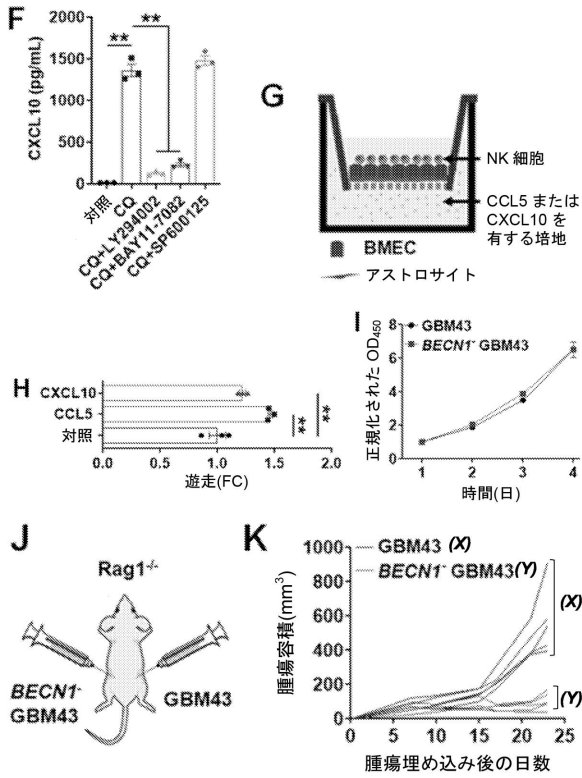


図 12 続き

【図 12-3】

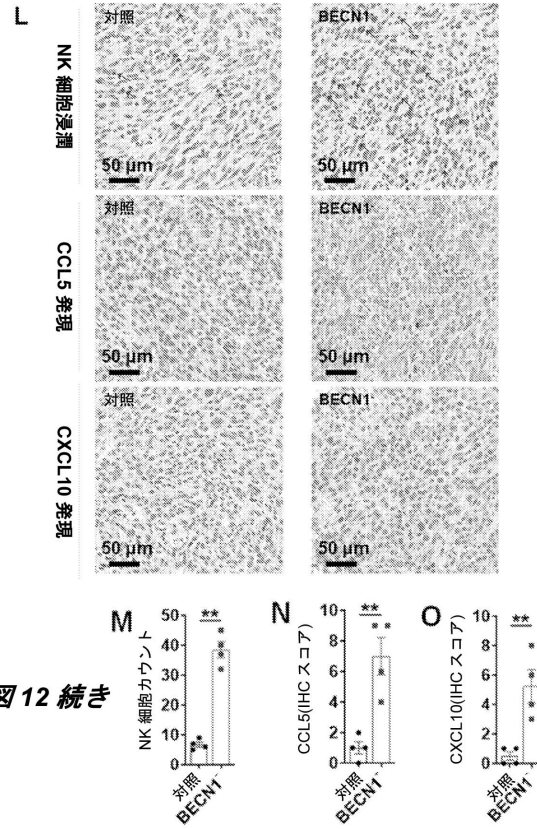


図 12 続き

【図 13】

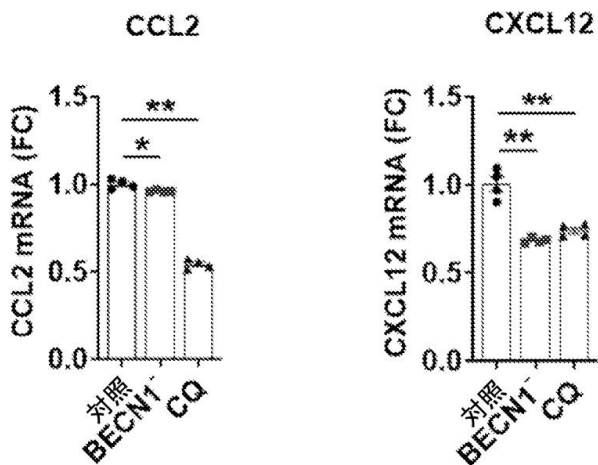


図 13

【図 14】

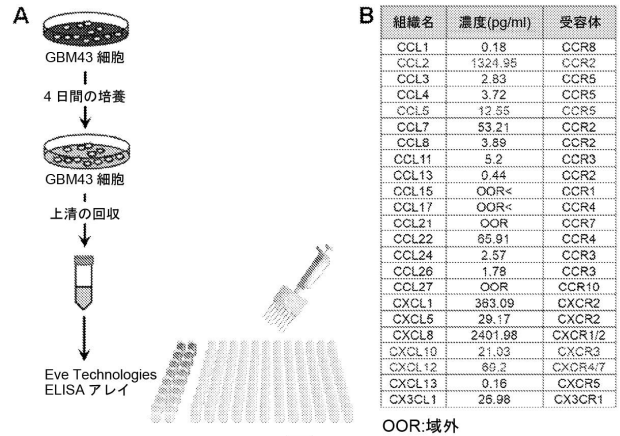


図 14

10

20

30

40

50

【図 15】

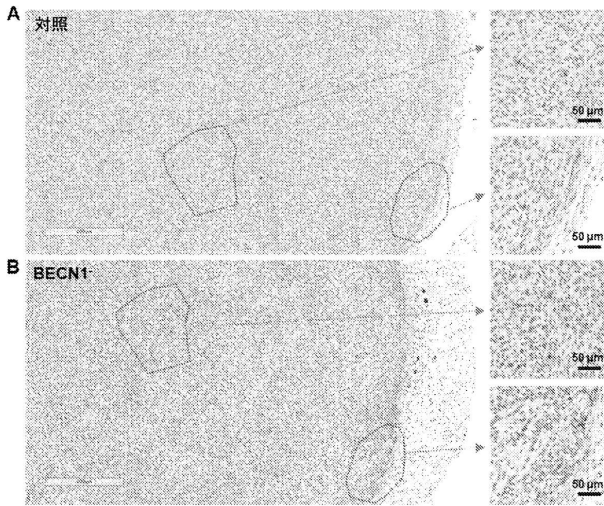


図 15

【図 16】

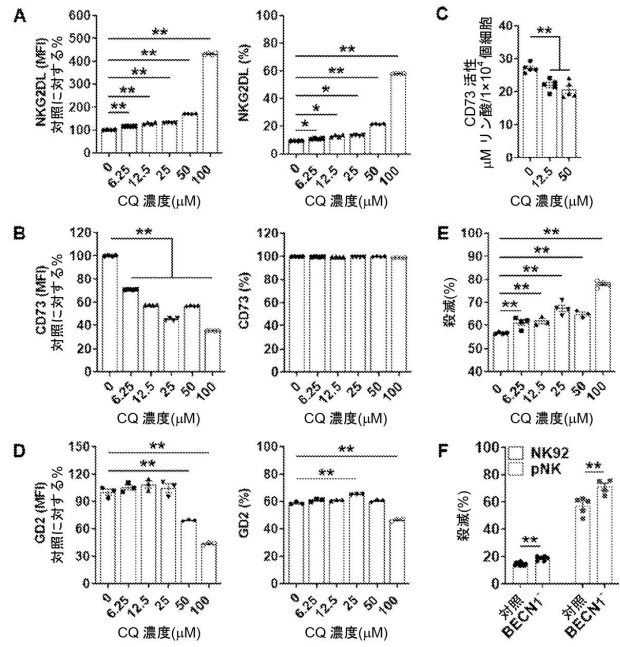
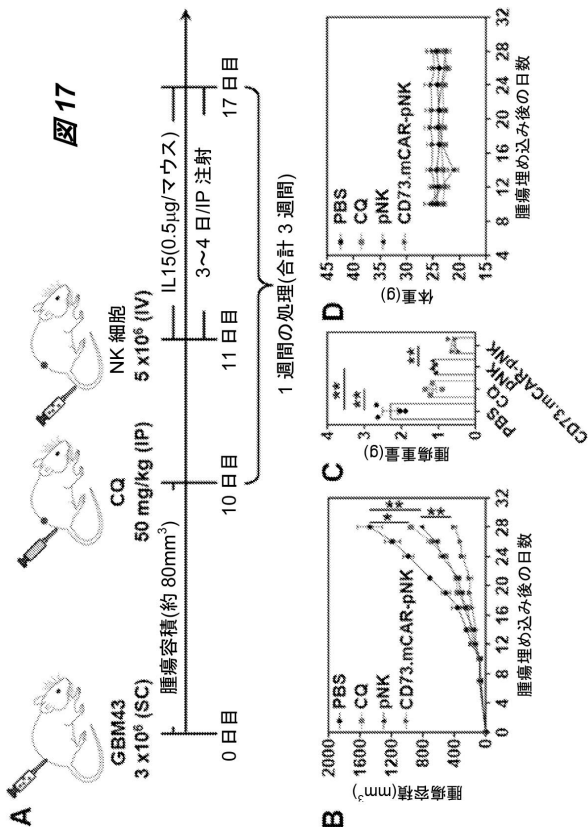


図 16

【図 17 - 1】



【図 17 - 2】

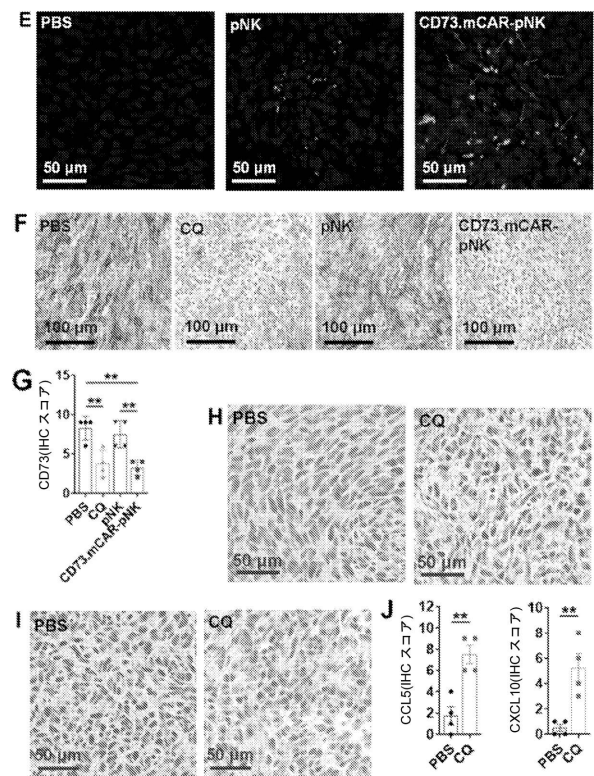


図 17 続き

10

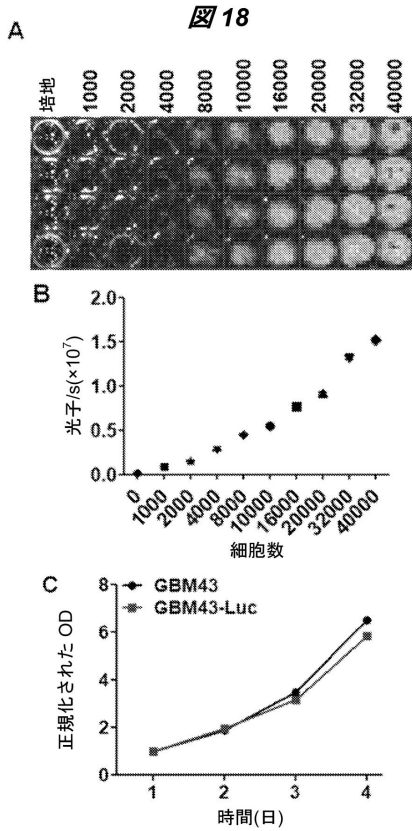
20

30

40

50

【図 18】



【図 19 - 1】

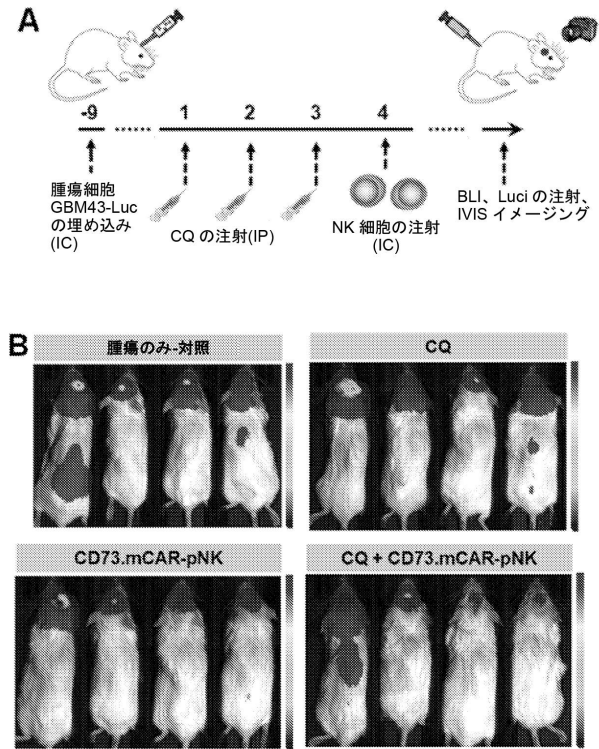


図 19

【図 19 - 2】

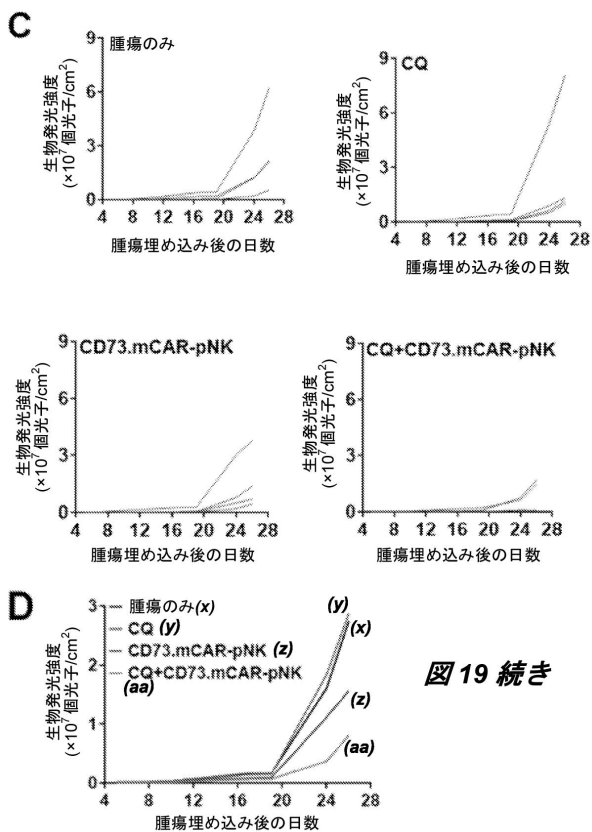


図 19 続き

【図 19 - 3】

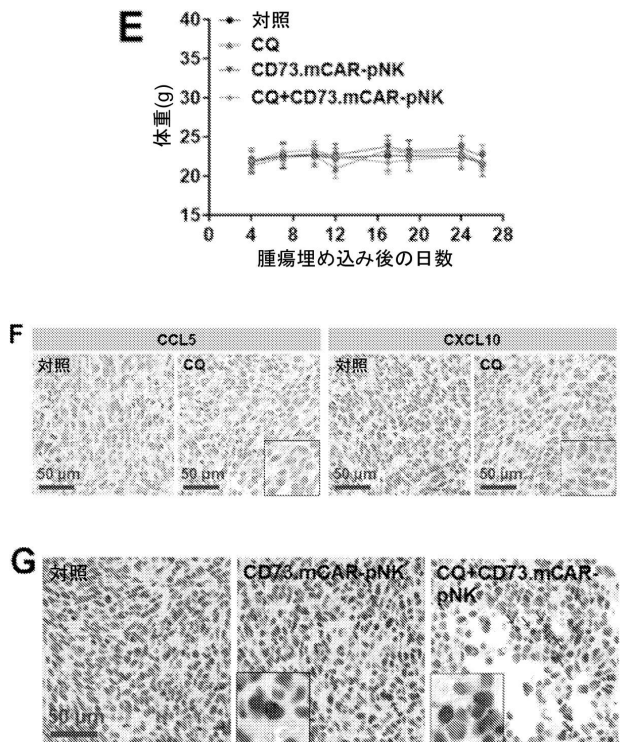


図 19 続き

10

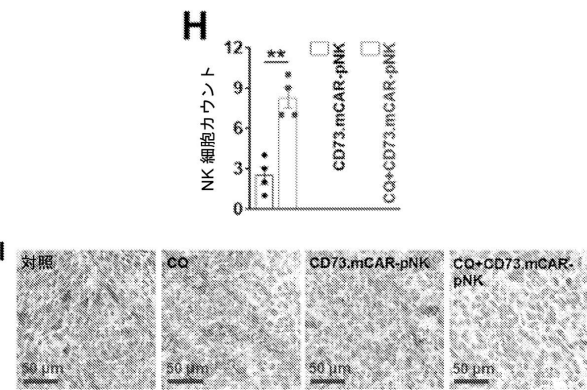
20

30

40

50

【 図 1 9 - 4 】



【 図 1 9 - 5 】

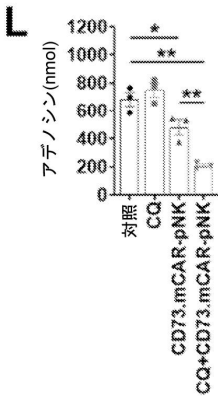
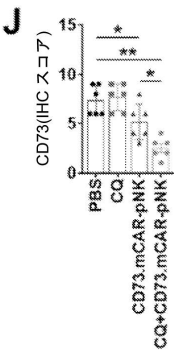
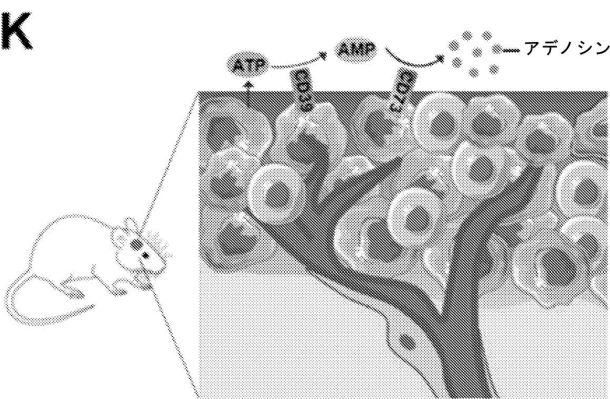


図 19 続き

【 配 列 表 】

2022553292000001.app

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2020/056723

Box No. 1 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:

☒ 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:

SEQ ID NOs: 1-8 were searched.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2020/056723

**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.: 4, 14-18, 22-27, 31, 34-38, 41, 43, 44  
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 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.:

**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/US2020/056723

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - A61K 35/12; A61K 35/17; A61K 39/00; A61P 35/00; C07K 19/00; C12N 5/0783 (2021.01)

CPC - A61K 35/17; A61K 39/0011; A61P 35/00; C07K 14/70578; C07K 2317/622; C07K 2319/00; C07K 2319/03; C12N 2510/00 (2021.01)

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.                       |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| X         | US 2019/0112380 A1 (UNIVERSITY OF SOUTHERN CALIFORNIA) 18 April 2019 (18.04.2019) entire document                                                                                                                                                          | 1-3, 5-13, 19-21, 28-30, 32, 39, 40, 42     |
| --        |                                                                                                                                                                                                                                                            |                                             |
| Y         |                                                                                                                                                                                                                                                            | 33                                          |
| Y         | US 2019/0062456 A1 (BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY) 28 February 2019 (28.02.2019) entire document                                                                                                                                                            | 33                                          |
| A         | US 2018/0230225 A1 (NANJING LEGEND BIOTECH CO., LTD.) 16 August 2018 (16.08.2018) entire document                                                                                                                                                          | 1-3, 5-13, 19-21, 28-30, 32, 33, 39, 40, 42 |
| A         | US 2017/0343550 A1 (SANOFI) 30 November 2017 (30.11.2017) entire document                                                                                                                                                                                  | 1-3, 5-13, 19-21, 28-30, 32, 33, 39, 40, 42 |
| A         | WANG et al. "Purinergic targeting enhances immunotherapy of CD73 + solid tumors with piggyBac-engineered chimeric antigen receptor natural killer cells," J. Immunother Cancer, 04 December 2018 (04.12.2018), Vol. 6, No. 136, Pgs. 1-14, entire document | 1-3, 5-13, 19-21, 28-30, 32, 33, 39, 40, 42 |
| A         | WANG et al. "NT5E/CD73 as Correlative Factor of Patient Survival and Natural Killer Cell Infiltration in Glioblastoma," J. Clin Med, 23 September 2019 (23.09.2019), Vol. 8, No. 1526, Pgs. 1-14, entire document                                          | 1-3, 5-13, 19-21, 28-30, 32, 33, 39, 40, 42 |

☐ 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

08 January 2021

Date of mailing of the international search report

09 FEB 2021

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450  
Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Blaine R. Copenheaver

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

## F I

## テーマコード (参考)

**A 6 1 P 35/00 (2006.01)****A 6 1 P 35/00****A 6 1 P 37/04 (2006.01)****A 6 1 P 37/04****A 6 1 P 43/00 (2006.01)****A 6 1 P 43/00 1 2 1**

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,N  
 E,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,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,K  
 E,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,N  
 G,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

(72)発明者 マトセヴィック, サンドロ

アメリカ合衆国 4 7 9 0 4 インディアナ州, ラファイエット, レイジー コート 2 8 0 7

(72)発明者 ワン, ジャオ

アメリカ合衆国 4 7 9 0 7 インディアナ州, ウェスト ラファイエット, スタジアム モール ド  
 ライブ 5 7 5, ヘイン ファーマシー ビルディング, ルーム ジー 2 2

F ターム (参考)

4B065 AA94X AB01 BA02 CA24 CA44

4C085 AA02 BB01 DD62 EE01 GG01

4C086 AA01 AA02 BC28 MA02 MA04 NA05 ZB26 ZC75

4C087 AA01 AA02 AA03 BB64 BB65 CA04 NA14 ZB02 ZB09 ZB26