

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-511135

(P2017-511135A)

(43) 公表日 平成29年4月20日(2017.4.20)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 5/16 (2006.01)</b>	C 1 2 N 5/16 Z N A	4 B 0 6 5
<b>A 6 1 K 35/17 (2015.01)</b>	A 6 1 K 35/17	4 C 0 8 5
<b>A 6 1 K 39/395 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395 T	4 C 0 8 7
<b>A 6 1 P 35/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 35/00	4 H 0 4 5
<b>A 6 1 P 31/12 (2006.01)</b>	A 6 1 P 31/12	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 23 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-559573 (P2016-559573)  
 (86) (22) 出願日 平成27年3月27日 (2015. 3. 27)  
 (85) 翻訳文提出日 平成28年11月28日 (2016. 11. 28)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2015/022998  
 (87) 国際公開番号 W02015/148926  
 (87) 国際公開日 平成27年10月1日 (2015. 10. 1)  
 (31) 優先権主張番号 61/971, 996  
 (32) 優先日 平成26年3月28日 (2014. 3. 28)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 305023366  
 リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ  
 オブ ミネソタ  
 アメリカ合衆国 ミネソタ 55455-  
 2020 ミネアポリス, オーク スト  
 リート-エス・イー 200, マクナマ  
 ラ アラムナイ センター 600  
 (74) 代理人 100099759  
 弁理士 青木 篤  
 (74) 代理人 100077517  
 弁理士 石田 敬  
 (74) 代理人 100087871  
 弁理士 福本 積  
 (74) 代理人 100087413  
 弁理士 古賀 哲次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 改変CD16が関係するポリペプチド、細胞、及び方法

(57) 【要約】

この開示では概して、CD16の改変型、改変CD16を発現する遺伝子組み換え細胞、及び遺伝子組み換え細胞が関与する方法を説明する。CD16の改変型は、少なくとも一部で、NK細胞刺激時のADAM17媒介型シェディングに対する低い感受性により増強された抗腫瘍及び/又は抗ウイルス活性を示し得る。

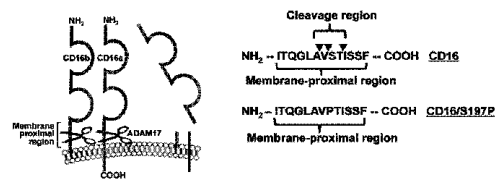


FIG. 2

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

膜近位領域及び該膜近位領域内のアミノ酸修飾を含んでいる C D 1 6 ポリペプチドを発現するように遺伝子組み換えされた細胞。

## 【請求項 2】

膜近位領域及び該膜近位領域内のアミノ酸修飾を含んでいる C D 1 6 ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む細胞。

## 【請求項 3】

前記アミノ酸修飾が、C D 1 6 膜近位領域の野生型アミノ酸配列と比較した 1 若しくは複数のアミノ酸の付加、1 若しくは複数のアミノ酸の欠失、又は 1 若しくは複数のアミノ酸の置換を反映する、請求項 1 又は請求項 2 に記載の細胞。

10

## 【請求項 4】

前記 1 若しくは複数のアミノ酸の置換が配列番号 1 の 1 9 7 位におけるセリン残基の置換を含む、請求項 3 に記載の細胞。

## 【請求項 5】

前記細胞がナチュラルキラー ( N K ) 細胞である、請求項 1 又は請求項 2 に記載の細胞。

## 【請求項 6】

前記細胞が好中球である、請求項 1 又は請求項 2 に記載の細胞。

## 【請求項 7】

前記細胞が単球である、請求項 1 又は請求項 2 に記載の細胞。

20

## 【請求項 8】

前記改変 C D 1 6 ポリペプチドが、野生型 C D 1 6 ポリペプチドと比較して、A D A M 1 7 媒介型シェディングに対して低い感受性を示す、請求項 1 又は請求項 2 に記載の細胞。

## 【請求項 9】

前記改変 C D 1 6 ポリペプチドが、野生型 C D 1 6 ポリペプチドと比較して、N K 細胞刺激時の切断に対して低い感受性を示す、請求項 1 又は請求項 2 に記載の細胞。

## 【請求項 10】

治療を必要としている患者に対して、以下の：  
治療用 N K エフェクターを該患者に投与し；及び  
請求項 1 又は請求項 2 に記載の細胞を該患者に投与すること、  
を含む治療法を施すことを含む方法。

30

## 【請求項 11】

前記治療用 N K エフェクターが治療薬を含む、請求項 10 に記載の方法。

## 【請求項 12】

前記治療薬が特異的に腫瘍抗原を認識する、請求項 11 に記載の方法。

## 【請求項 13】

前記治療薬が、腫瘍抗原を特異的に認識する抗体又は抗体フラグメントを含む、請求項 12 に記載の方法。

40

## 【請求項 14】

前記腫瘍抗原が H E R 2 を含む、請求項 13 に記載の方法。

## 【請求項 15】

前記抗体がトラスツズマブ又はリツキシマブを含む、請求項 13 又は請求項 14 に記載の方法。

## 【請求項 16】

前記治療用 N K エフェクターが、二重特異性キラーエンゲージャー ( B i K E ) を含む、請求項 10 に記載の方法。

## 【請求項 17】

前記 B i K E が、C D 1 6 × C D 3 3 B i K E、C D 1 6 × C D 1 9 B i K E、又は

50

CD16×EP-CAM BiKEを含む、請求項16に記載の方法。

【請求項18】

前記治療用NKエフェクターが三重特異性キラー細胞エンゲージャー(TrIKE)を含む、請求項10に記載の方法。

【請求項19】

前記治療薬がウイルス標的を特異的に認識する、請求項11に記載の方法。

【請求項20】

治療用NKエフェクターを患者に投与することを伴う患者に対する治療法を改善する方法であって、以下の：

請求項1又は請求項2に記載の細胞を該患者に投与すること、  
を含む方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

この出願は、2014年3月28日に提出された米国特許仮出願番号第61/971,996号に対する優先権を請求するものであり、そしてそれを参照により本明細書中に援用する。

【発明の概要】

【0002】

この開示では概して、CD16の改変型、改変CD16を発現する遺伝子組み換え細胞、及び遺伝子組み換え細胞を伴う方法を説明する。CD16の改変型は、少なくとも一部で、NK細胞刺激時のメタロプロテアーゼ媒介型シェディング(shedding)に対する低い感受性により増強された抗腫瘍及び/又は抗ウイルス活性を示し得る。

そのため、一態様において、この開示では、膜近位領域及び該膜近位領域内のアミノ酸修飾を含んでいるCD16ポリペプチドを発現するように遺伝子組み換えされた細胞を説明する。

20

【0003】

別の態様において、この開示では、膜近位領域及び該膜近位領域にアミノ酸修飾を有するCD16ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む細胞を説明する。

30

いずれかの態様において、アミノ酸薬療法は、CD16膜近位領域の野生型アミノ酸配列と比較した1若しくは複数のアミノ酸の付加、1若しくは複数のアミノ酸の欠失、又は1若しくは複数のアミノ酸の置換を反映する。これらの実施形態のいくつかにおいて、1若しくは複数のアミノ酸の置換は配列番号1の197位におけるセリン残基の置換を含む。

【0004】

いずれかの態様において、細胞は、ナチュラルキラー(NK)細胞、好中球、単球、又はT細胞であり得る。

いずれかの態様において、改変CD16ポリペプチドは、野生型CD16ポリペプチドと比較して、ADAM17媒介型シェディングに対して低い感受性を示す。

40

いずれかの態様において、改変CD16ポリペプチドは、野生型CD16ポリペプチドと比較して、NK細胞刺激時の切断に対して低い感受性を示す。

別の態様において、この開示では、斯かる処置を必要としている患者に対して、(a)治療用NKエフェクターを該患者に投与し、そして(b)先に概説した実施形態の遺伝子組み換え細胞のいずれかを該患者に投与することを伴う治療法を施すことを通常伴う方法を説明する。

【0005】

いくつかの実施形態において、該治療用NKエフェクターとしては、治療薬が挙げられる。これらの実施形態のいくつかにおいて、該治療薬としては、抗体又は治療用抗体フラグメントを挙げることができる。これらの実施形態のいくつかにおいて、該抗体又は抗体

50

フラグメントはウイルス抗原に特異的に結合する。他の実施形態において、該抗体又は抗体フラグメントは腫瘍抗原に特異的に結合する。

いくつかの実施形態において、該治療薬としては、二重特異性キラーエンゲージャー ( B i K E ) 又は三重特異性キラー細胞エンゲージャー ( T r i K E ) を挙げることができる。

#### 【 0 0 0 6 】

更に別の態様において、この開示では、患者に対する免疫療法を改善するための方法を説明し、そして該免疫療法では、治療用NKエフェクターを該患者に投与することを伴う。通常、該方法では、先に概説した実施形態の遺伝子組み換え細胞のいずれかを患者に投与することを更に含む。

本発明の先の概要は、開示した実施形態のそれぞれ又は本発明のあらゆる実施を記載することを意図したものではない。後に続く説明が、説明に役立つ実施形態をより具体的に例示する。当該出願中のいくつかの場所に、実施例の一覧によってガイダンスを提供するが、その実施例は様々な組み合わせで使用できる。どの場合であっても、取り上げた一覧は代表的な群としての役割しかなく、排他的な一覧として解釈されるべきではない。

#### 【 図面の簡単な説明 】

#### 【 0 0 0 7 】

【 図 1 A 】 ヒト CD 1 6 のエクトドメイン切断部位の位置。( A ) P M A 活性化ヒト NK 細胞又は好中球の細胞上清から免疫沈降させた可溶性 CD 1 6 のトリプシンペプチドをマスペクトル法分析にかけた。非トリプシン性 C 末端を有する 4 つの高信頼度ペプチド： 1 つのペプチドが NK 細胞 ( ペプチド番号 1、左上 ) によって放出された可溶性 CD 1 6 由来、及び 3 つのペプチドが好中球によって放出された可溶性 CD 1 6 由来 ( ペプチド番号 2、左下；ペプチド番号 3、右上；及びペプチド番号 4、右下 )、を同定した。

【 図 1 B 】 ( B ) ペプチド番号 1 ~ 4 ( 下線 )、並びに CD 1 6 a ( 配列番号 1 ) 及び CD 1 6 b ( 配列番号 2 ) の推定切断部位 ( くさび形 ) の例示。同定されたペプチドでは、第 1 7 6 アミノ酸で CD 1 6 a ( F ) を CD 1 6 b ( V ) と区別する。第 1 ~ 1 6 アミノ酸は、CD 1 6 a 及び CD 1 6 b の予測されたシグナルが配列を示す。第 2 1 0 ~ 2 2 9 アミノ酸は、CD 1 6 a の膜貫通領域を示す。アミノ酸の番号付けはシグナル配列内のメチオニンから始まる。CD 1 6 a 及び CD 1 6 b のアミノ酸配列は、それぞれ N C B I 参照配列 N M \_ 0 0 0 5 6 9 . 6 及び N M \_ 0 0 0 5 7 0 . 4 に基づく。

【 図 2 】 CD 1 6 のエクトドメイン・シェディング、切断領域、及び遺伝子操作したセリン - 1 9 7 からプロリンへの突然変異に関する略図。CD 1 6 a 及び CD 1 6 b は、示してあるように膜近位領域内で A D A M 1 7 によってエクトドメイン・シェディングを受ける。膜近位領域内の CD 1 6 切断領域は、極めて近接した 3 つの異なった切断部位 ( くさび形 ) を明らかにしたマスペクトル法分析に基づいている。部位特異的突然変異誘発を実施して、CD 1 6 のセリン - 1 9 7 ( 配列番号 1 の第 1 9 0 ~ 2 0 2 アミノ酸 ) をプロリンで置換した ( C D 1 6 / S 1 9 7 P ) 。

【 図 3 】 CD 1 6 a 及び CD 1 6 b シェディングに対する遺伝子操作 S 1 9 7 P 突然変異の効果。形質移入 H E K 2 9 3 ( ヒト胚腎臓 ) 細胞は、フローサイトメトリーによって測定した場合に ( 左パネル )、同じレベルで CD 1 6 b と CD 1 6 b / S 1 9 7 P ( A ) 又は CD 1 6 a と CD 1 6 a / S 1 9 7 P ( B ) を別々に発現した。異なった形質移入体を P M A あり ( 1 5 n g / m l、3 7 にて 3 0 分間 ) 又はなしで処理し、そして培地上清の CD 1 6 の可溶化レベルを E L I S A ( 右パネル ) によって定量化した。それぞれの処理条件を各実験について 3 回繰り返し、そしてデータは 3 回の独立した実験を表す。棒グラフは、平均 ± S D を示す。統計的有意性を \*\*\* P < 0 . 0 0 1 として示す。( C ) 形質移入 H E K 2 9 3 細胞は、L - セレクチン ( C D 6 2 L ) 又は L - セレクチンと CD 1 6 b / S 1 9 7 P を発現した。形質移入及びモック形質移入細胞上の L - セレクチン及び CD 1 6 b / S 1 9 7 P の表面レベルを、フローサイトメトリー ( ヒストグラムプロット ) を使用して計測した。L - セレクチン又は L - セレクチンと CD 1 6 b / S 1 9 7 P を発現する形質移入体を、P M A の存在又は不存在下で 3 7 にて 3 0 分間インキュベートし

10

20

30

40

50

、及びL - セレクチン染色の平均蛍光強度 ( M F I ) を決定した ( 棒グラフ ) 。それぞれの処理条件を各実験について3回繰り返し、そしてデータは2回の独立した実験を表す。棒グラフは、平均 ± S D を示す。統計的有意性を \* P < 0 . 0 5 として示す。すべてのヒストグラムプロットに関して、X 軸 = L o g 1 0 蛍光及びY 軸 = 細胞数である。

【図4】NK細胞における遺伝子操作S197P突然変異のCD16aシェディングに対する効果。空のベクター ( ベクターのみ ) 、CD16a、又はCD16a / S197Pで形質導入したNK92細胞を、PMA ( 1 0 0 n g / m l ) で又はそれなしに ( 刺激なし ) 37 にて30分間 ( A ) 、IL - 12及びIL - 18 ( それぞれ100 n g / m l 及び400 n g / m l ) で37 にて24時間 ( B ) 、又はRaji細胞及びリツキシマブで37 にて60分間 ( C ) 処理した。CD16aの細胞表面レベルをフローサイトメトリーによって測定した。アイソタイプ対応陰性対照の抗体染色を点線で示す。 ( D ) 親NK92細胞及びCD16a又はCD16a / S197Pを発現する形質導入細胞を、ADAM17阻害剤BMS566394 ( 5 μ M ) の存在又は不存在下、Raji細胞及びリツキシマブで37 にて60分間処理した。可溶性CD16aレベルをELISAによって測定した。それぞれの処理条件を各実験について3回繰り返し、そしてデータは3回の独立した実験を表す。棒グラフは、平均 ± S D を示す。統計的有意性を\*\*\* P < 0 . 0 0 1として示す。 ( E ) CD16a又はCD16a / S197Pを発現するNK92細胞を、示してあるように抗ADAM17であるmAbs M220、623、633、又はアイソタイプ対応陰性対照抗体で染色した。 ( F ) モック形質導入iPSCs ( 左パネル ) 又は遺伝子組み換えCD16a若しくはCD16a / S197Pを発現するiPSCs ( 右パネル ) 由来のCD56<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>NK細胞を、K562標的細胞と共に又はそれなしに37 にて4時間インキュベートした。すべてのヒストグラムプロットに関して、X 軸 = L o g 1 0 蛍光及びY 軸 = 細胞数であり、並びにデータは少なくとも3回の独立した実験を表す。

【図5】遺伝子操作S197P突然変異のCD16a機能に対する効果。 ( A ) 同等なレベルでCD16a又はCD16a / S197Pを発現するNK92細胞 ( 左のパネル ) を、単量体ヒトIgG ( 0 ~ 2 0 μ g / m l ) で処理した。対照として、細胞を同様に、単量体ヒトIgA ( 2 0 μ g / m l ) で処理し、及びNK92親細胞をIgG ( 2 0 μ g / m l ) で処理した ( 棒グラフ ) 。抗体結合を、材料と方法に記載のとおり、フローサイトメトリーによって測定した。棒グラフは、少なくとも3回の別々の実験の平均 ± S D を示す。統計的有意性を、IgG ( 0 μ g / m l ) 、IgA、又はNK92親細胞 + IgGに対して\* P < 0 . 0 5 として示す。 ( B ) モック形質導入NK92細胞又はCD16a若しくはCD16a / S197Pを発現するNK92細胞を、抗CD20リツキシマブで又はそれなしに処理したRaji細胞の不存在 ( 刺激なし ) 又は存在下、37 にて示してある時点までインキュベートした。NK92細胞活性化を、フローサイトメトリーによってCD107a染色の上方調節によって評価した。ヒストグラムプロットに関して、X 軸 = L o g 1 0 蛍光及びY 軸 = 細胞数である。データは少なくとも3回の独立した実験を表す。

#### 【0008】

例示的实施形態の詳細な説明

この開示では概して、CD16aの改変型、改変CD16aを発現する遺伝子組み換え細胞、及び遺伝子組み換え細胞が関与する方法を説明する。CD16aの改変型は、少なくとも一部で、NK細胞刺激時のメタロプロテアーゼ媒介型シェディングに対する低い感受性により増強された抗腫瘍及び/又は抗ウイルス活性を示し得る。

多くの固形癌型とは対照的に、上皮性卵巣癌に罹患している女性の生存率はここ30年でわずかしか変化していない。そのうえ、再発卵巣癌の現行の標準的治療法は低い (< 20%) 奏功率である。卵巣癌サンプルによるHER2過剰発現にもかかわらず、抗HER2抗体トラスツマブを用いた処置は、進行性卵巣癌に罹患している患者において限定された応答だけしか生じない。トラスツマブに対するこの抵抗性は、機能不全のNK細胞媒介型抗体依存性細胞毒性から生じている可能性がある。よって、革新的な治療戦略が緊

10

20

30

40

50

急に必要である。我々は治療法戦略を提供するための新規アプローチについて記載する。

【0009】

卵巣癌に対する一つの懸念は、腫瘍細胞が進行する環境が高度に炎症誘発性であり、その結果、浸潤性NK細胞に対してCD16a切断を促進し、これにより抗体依存性細胞毒性が減弱される傾向にあるということである。いくつかの抗体がヒト悪性腫瘍を処置するための有効な標的治療法として現れた。それらの有効性は一つには、ナチュラルキラー(NK)細胞のFcRIIIa/CD16aとの抗体相互作用及び抗体依存性細胞毒性による癌細胞殺滅の誘導による。ヒトIgGのFc受容体CD16(FcRIII)は2つのアイソフォーム：CD16a(FcRIIIa)及びCD16b(FcRIIIb)から成る。CD16aはナチュラルキラー(NK)細胞によって発現され、及びCD16bは好中球によって発現される。NK細胞活性化は、エクトドメイン・シェディング-メタロプロテアーゼADAM17が関与し、原形質膜に近い単一の細胞外領域で起こるタンパク分解性事象、と呼ばれるプロセスによるCD16の両アイソフォームの表面レベルの急速な下方調節をもたらす(図1A)。

10

【0010】

先に述べたように、卵巣癌患者はNK細胞媒介型免疫療法に対して抵抗性である - すなわち、腫瘍がNK細胞媒介型治療法に感受性でない、可能性がある。例えば、卵巣癌細胞は上皮成長因子受容体HER2を一般的に発現するが、しかし、治療用抗体トラスツズマブを用いたその標的化は限定された臨床反応しか提供しなかった。この抵抗性は、少なくとも一部には、エクトドメイン・シェディングの結果として生じ得る - すなわち、サイトカインによるNK細胞活性化、標的細胞相互作用、及び/又は腫瘍浸潤はCD16a切断及び欠陥のある抗体依存性細胞毒性をもたらす可能性がある。よって、エクトドメイン・シェディングのプロセスを妨げることは臨床的に意義がある。

20

【0011】

我々は、質量分析法を使用してCD16a及びCD16bの切断部位を決定し、そしてヒト白血球からCD16a及びCD16bのcDNAをクローニングした。各cDNAを定方向様式で変異させて、単一アミノ酸の変化を誘導した。197位のセリンがプロリンに変更された(図1B)。この突然変異はCD16a及びCD16bの切断を妨げ、細胞活性化によるそれらの下方調節を予防する。エクスピボにおける切断抵抗性CD16aの発現は、このIgGFc受容体の高い表面レベルを維持するNK細胞を増加させ、そしてそれがNK細胞刺激、治療用抗体の有効性、及び癌細胞殺滅を促進した。

30

ADAM17は多くの細胞表面基質を有するが、CD16a切断の部位を予測するのに使用できるタンパク質分解のためのコンセンサス配列がない。そのため、我々はLCMS-MSを使用して、活性化ヒト末梢血白血球から放出された可溶性CD16内のC末端切断部位を決定した。

【0012】

我々はCD16の膜近位領域内に極めて近接した3つの推定切断位置を観察し(図2、くさび形)、1つの領域はCD16a及びCD16bの間で同一であった。ADAM17のタンパク質分解はコンセンサス配列を必要としないが、切断領域の二次構造は重要である。CD16a切断を妨げる試みでは、我々はセリン-197をプロリンで置換して(CD16a<sup>197P</sup>)、立体構造の変化を導入した。我々は、活性化されたNK細胞の培地上清から及び、別個に、好中球の培地上清からCD16を免疫沈降させることによってCD16切断の位置を同定した。免疫沈降させたCD16をPNGaseFで処理し、N-グリカンを取り除き、トリプシン消化し、そして生じたペプチドを質量分析にかけた。非トリプシン性C末端を含む高信頼度の4つの異なったペプチドパターンを同定した(図1A)。

40

【0013】

活性化されたNK細胞の培地上清から濃縮されたCD16に関して、我々は1つのペプチドパターンだけ観察し、それは配列番号1のグリシン-174からアラニン-195までのアミノ酸に相当する(ペプチド番号1、図1A)。CD16a及びCD16bの膜近

50

位領域は第176残基を除いて同一のアミノ酸配列を有する。この位置のフェニルアラニンはCD16aを示唆し、それはペプチド番号1に存在した(図1A及びB)。このペプチドはアラニン-195/バリン-196における非トリプシン性P1/P1'切断位置を明らかにした(図1B)。

#### 【0014】

活性化された好中球の培地上清から濃縮されたCD16に関して、我々是非トリプシン性C末端を有する3つの異なったペプチドパターンを検出した(ペプチド番号2~4、図1A及び1B)。ペプチド番号2は配列番号2のグリシン-174からアラニン-195までのアミノ酸に相当し、ペプチド番号3は配列番号2のグリシン-174からバリン-196までのアミノ酸に相当し、及びペプチド番号4は配列番号2のアスパラギン-180からトレオニン-198までのアミノ酸に相当する。

10

#### 【0015】

ペプチド番号2及びペプチド番号3は、CD16bを示唆する、176位にバリンを含み、アラニン-195/バリン-196における及びバリン-196/セリン-197におけるP1/P1'位置が明らかになった(図1B)。ペプチド番号4はトレオニン-198/イソロイシン-199にP1/P1'位置を有していた(図1B)。このペプチドは濃縮された好中球からの可溶性CD16に由来するが、アイソフォームを同定するための176位のアミノ酸を含んでいない(図1B)。それとは関係なく、高信頼度ペプチドはCD16の第三の切断部位を明らかにした。総合すれば、これらの知見は、単一特異的切断部位よりむしろCD16の切断領域の存在を実証する。

20

#### 【0016】

我々は、部位特異的突然変異誘発を使用することによってCD16の切断領域を更に調査して、CD16a及びCD16b切断が細胞ベースのアッセイにおいて妨害され得るか決定した。ADAM17は、その触媒部位と相互作用する基質領域におけるヘリカル構造を選択する傾向がある。そのうえ、ADAM17切断部位特異性に関するプロテオミクス試験は、P1'、P2'、又はP3'位におけるプロリン残基の非常に低い優先度を明らかにした。そのため、我々は、CD16a及びCD16bの切断領域内のセリン-197をプロリンで置換した(S197P、図2に示したとおり)。

#### 【0017】

CD16b及びCD16b/S197Pを別々にヒト腎臓細胞株HEK293で発現させ、そして該HEK293は内因性CD16を発現していない。HEK293形質移入体は、その表面上において同じレベルでCD16b又はCD16b/S197Pを発現した(図3A)。高レベルのCD16bが形質移入HEK293から放出され、そしてそれは、ELISAによって測定されたように、PMAでのそれらの処理によって更に増強された(図3A)。しかしながら、未処理又はPMA処理されたHEK293細胞によって産生されたCD16b/S197Pの可溶性レベルはCD16bのものより顕著に低かった(図3A)。

30

#### 【0018】

我々はまた、同じアプローチを使用してCD16a切断に対するS197P突然変異の効果も調べた。CD16aの表面発現には鎖二量体との結合を必要とする。そのため、我々はヒト鎖を安定して発現するHEK293細胞を使用した。同等な表面レベルのCD16a又はCD16a/S197Pを発現するHEK293形質移入体と比較して(図3B)、我々は未処理及びPMA処理した細胞の培地上清中のそれぞれの受容体の可溶性レベルを測定した。CD16aと比較して、再び、可溶性CD16a/S197Pの有意に低いレベルを観察した(図3B)。

40

#### 【0019】

CD16における遺伝子操作S197P突然変異がADAM17活性を妨げ得るかどうかが評価するために、我々はまた、CD16b/S197Pを発現するか又はそれを欠いているHEK293細胞に、白血球で通常発現される十分に記載されたADAM17基質であるL-セレクチンを用いて形質移入した。両方の形質移入体とも同等なレベルのL-セ

50

レクチンを発現し、そしてそれが、PMAを用いたそれらの活性化を受けて同様に下方調節され(図3C)、S197P突然変異がADAM17活性ではなく、CD16シェディングに影響したことを実証した。

#### 【0020】

NK細胞におけるCD16aシェディングに対するS197P突然変異の効果を評価するために、我々はヒトNK細胞株NK92(Gong et al, 1994, Leukemia 8:652-658)を使用した。これらの細胞は内因性CD16aの発現を欠いているが、遺伝子組み換えCD16aは安定して発現され得る。我々は、CD16a及びCD16a/S197Pを別々に発現するようにNK92細胞に形質導入した。これらの受容体を同等なレベルで発現する細胞を、PMAで活性化し、そして細胞表面CD16レベルをフローサイトメトリーによって調べた。CD16a/S197Pではなく、CD16aが細胞表面発現に顕著な下方調節を受けた(図4A)。IL-12及びIL-18は、個別に又は組み合わせでCD16aシェディングを引き起こし得るNK細胞の生理的刺激である。IL-12及びIL-18で処理されたNK92細胞は、CD16aの細胞表面発現を大きく下方調節するが、CD16a/S197Pではそうではないことを実証した(図4B)。CD16aによる細胞結合IgGの直接的な関与もまたシェディングを引き起こす可能性があり、我々は、CD16a又はCD16a/S197Pを発現するNK92細胞を、抗CD20mAbであるリツキシマブの存在又は不存在下、CD20陽性パーキットリンパ腫細胞株Rajiと共にインキュベートすることによってここでそれを調べた。リツキシマブで処理したRaji細胞は、CD16aの下方調整を誘発したが、CD16a/S197Pではそれがなかった(図4C)。

10

20

#### 【0021】

BMS566394は、他のメタロプロテアーゼよりADAM17に対して桁違いに高度に選択的なADAM17阻害剤である。BMS566394は、S197P突然変異と同様の効率でCD16aシェディングを妨げたが、CD16a/S197Pを発現する活性化されたNK92細胞に対して追加の遮断効果はなかった(図4D)。これらの知見は、ADAM17がその切断領域内でCD16aを切断する主なシェダーゼ(sheddase)であるさらなる証明を提供する。しかしながら、ADAM17発現レベルがCD16a又はCD16a/S197Pを発現するNK92細胞と同等でないため、それらの異なったシェディングの原因になった可能性はある。そのため、我々は、CD16a又はCD16a/S197Pを発現するNK92細胞を複数の抗ADAM17mAbsで染色し、そして同一の細胞表面レベルを観察した(図4E)。

30

#### 【0022】

初代NK細胞によってCD16aシェディングに対するS197P突然変異の効果を確立するために、我々は、ヒトiPSCsを使用して、遺伝子操作したNK細胞を作出した。我々は以前に、iPSCsからの機能的NK細胞の誘導、及び末梢血NK細胞とそれらの類似性について報告した(Knorr et al., 2013 Stem Cells Transl Med. 2:274-283; Ni et al, 2014, Stem Cells 32: 1021-1031)。iPSC細胞における遺伝子挿入と安定発現のためにCD16a及びCD16a/S197P cDNAをSleeping Beautyトランスポゾンプラスミド内にクローニングし、続いて、それを成熟NK細胞に分化させた。

40

#### 【0023】

モック形質導入iPSC細胞から得られたNK細胞は、低レベルの内因性CD16aを発現する一方で、形質導入したCD16a及びCD16a/S197Pはより高いレベルで発現された(図4F)。NK細胞の活性化は、BY55/CD160を含めたK562細胞とそれらの相互作用によって様々な受容体を通して起こり、ADAM17活性化及びCD16aシェディングをもたらした。我々は、K562細胞でiPSC誘導NK細胞を刺激して、CD16aが細胞表面発現の顕著な下方調整を受けた一方で、CD16a/S197Pの発現は安定した状態を保ったことを見出した(図4F)。

#### 【0024】

内因性及び遺伝子組み換えCD16aは、単量体IgGを結合するのに十分な親和性を

50

有する。CD16a機能に対するS197P突然変異の効果を調べるために、我々は、CD16aとCD16a/S197PのIgG結合能を比較した。同等なレベルでCD16a又はCD16a/S197Pを発現するNK92細胞は、同様の用量依存的様式でIgGを結合した(図5A)。対照は、CD16a又はCD16a/S197Pを発現するNK92細胞へのIgA結合、及びNK92親細胞へのIgG結合から成った。両方とも実質的にバックグラウンドレベルで起こった(図5A)。これらの知見は、CD16a及びCD16a/S197Pによる特異的で同等なIgG結合を実証する。

【0025】

CD16aはNK細胞における強力な活性化受容体であるので、我々は、抗体で処理された腫瘍細胞の関与によって細胞活性化を引き起こすCD16aの能力に遺伝子操作S197P突然変異が影響を及ぼすか調べた。NK92細胞の活性化は、脱顆粒によって非常に急速に生じ、且つ、NK細胞活性化に関する高感度指標であるCD107aの上方調節を計測することによって評価された。リツキシマブで又はそれなしに処理にされたRaji細胞と共にインキュベートしたモック形質導入NK92細胞では、CD107aの低レベル且つ同様の上方調節が実証された(図5B)。Raji細胞単体と共にインキュベートした、同等なレベルでCD16a又はCD16a/S197Pを発現するNK92細胞もまたCD107aを限界的に上方調節したが、リツキシマブで処理したRaji細胞を伴ったそれらのインキュベーションもCD107aの大きな上方調節をもたらした(図5B)。総合すれば、先の知見は、CD16aにおける遺伝子操作S197P突然変異がその機能を損なうことはなかったことを示している。

10

20

【0026】

よって、我々は、CD16a及びCD16bにおける遺伝子操作S197P突然変異が天然ADAM17を伴った細胞ベースのアッセイにおいて効果的にそれらのシェディングを妨げたことを示す。CD16aにおけるS197P突然変異はまた、ヒトNK細胞株であるNK92において受容体のシェディングを妨げたが、受容体機能は損なわなかった。同等なレベルでCD16a又はCD16a/S197Pを発現するNK92細胞は、さまざまな抗体濃度範囲にわたって同様の効率で単量体IgGを結合した。加えて、CD16a又はCD16a/S197Pを発現するNK92細胞は、Raji細胞に結合したリツキシマブの関与によって類似した様式で活性化マーカーCD107aを上方調節した。

30

【0027】

多分化能性幹細胞は、遺伝子操作NK細胞を作出するための遺伝操作を可能にする。この開示では、野生型CD16a又はCD16a/S197Pを発現する形質導入iPSCsからの遺伝子操作NK細胞の作出を説明する。NK92細胞を用いた場合、CD16aはiPSCs誘導NK細胞においてシェディングを受け、細胞活性化時の正常なADAM17活性を実証した一方で、CD16a/S197Pはシェディングを受けなかった。

30

【0028】

CD16a及びNK細胞の細胞傷害機能は癌患者において顕著な下方調節を受ける。CD16a/S197PをコードするcDNAsは、安定したヒト誘発多分化能性幹細胞(iPSCs)及び胚幹細胞(ESCs)を作出するのに使用できる。次に、これらの幹細胞はCD16a/S197Pを発現する初代NK細胞に分化させることができる。切断抵抗性CD16a/S197P(例えば、単球)又はCD16b/S197P(例えば、好中球)を発現する他の細胞集団もまた、hESCs/iPSCsから得られる。

40

【0029】

様々な形態の癌又は感染に対してヒト患者で使用されるNK細胞免疫療法を作り出すために、CD16a/S197P発現NK細胞は、増強された抗体依存性細胞毒性(ADCC)活性又は他のCD16a媒介型活性(例えば、IFN及びTNF産生)を媒介し得る。例えば、CD16a/S197P発現NK細胞は、治療用抗体(例えば、トラスツマブ又はリツキシマブ)、二重特異性キラーエンゲージャー(例えば、BiKE、CD16xCD33、CD16xCD19、又はCD16xEP-CAM二重特異性キラー細胞エンゲージャー)又は三重特異性キラー細胞エンゲージャー(TrIKE)と組み合わ

50

せられてもよい。他の治療用細胞集団（例えば、好中球、単球、T細胞など）もまた、増強されたCD16媒介型活性を生じ得る。

【0030】

ヒトiPSCs又はヒトESCsにおけるCD16a/S197Pの発現は、例えばHER2卵巣癌などの腫瘍性病態に対して促進されたADCC活性を有するNK細胞集団を作出し得る。場合によっては、腫瘍性病態は、例えばトラスツズマブなどの治療用抗体で処置されてもよい。成熟NK細胞は、ヒト胚性幹細胞及びiPSCsに由来していてもよい。

【0031】

野生型CD16a及び/又はCD16a/S197Pは、個々のCD16a受容体を発現する安定したiPSC株又は安定したESC株を作出するためにクローニングされ得る。任意の好適なクローニング法が使用され得る。代表的なクローニング法としては、例えばウイルススペースの方法、トランスポゾンベクター（例えばSleeping Beauty）、又はヌクレオフェクション（nucleofection）が挙げられる。

【0032】

一例として、iPSCsは、Sleeping Beautyトランスポゾンベクターを使用して改変され得る。ベクターは、例えばGFP/ゼオシン抵抗性融合タンパク質などの選択系を含んでおり、そしてそれが二元的な選択系（ゼオシン抵抗性及びフローサイトメトリーソーティング）を可能にする。iPSCsは以前に記載されているように成熟NK細胞に分化させる（Ni et al, 2011, J. Virol. 85:43-50; Knorr et al. 2013, Stem Cells Transl Med 2:274-283; Woll et al, 2009, Blood 113:6094-6101）。iPSCsにおけるトランスジェニック受容体の発現は、誘導NK細胞における高い発現レベルにつながり得る。未分化iPSCsにおけるCD16発現は、NK細胞分化を中断し得る。こうした場合、CD16発現は、CD16発現が通常のNK細胞分化と同時に起こるほうが好都合なように、例えばCD56又は天然のCD16aプロモーターを使用して遅らせてもよい。

【0033】

当業者は、野生型CD16aと対比してCD16a/S197Pを同等なレベルで発現するNK細胞を比較する。CD16構築物の発現レベルは、CD16構築物と比例した様式で現れるGFP発現に基づくFACSソーティングで対等にできる。対等にしたCD16aレベルはFACSによって確認できる。HER2発現卵巣癌細胞に対するNK細胞毒性は、例えばトラスツズマブなどの治療用抗体の存在又は不存在下での標準的なクロム遊離試験で評価できる。非クロム標識された卵巣癌細胞を用いた抗体依存性細胞毒性が評価され得る。当業者は、ELISAによってNK細胞のサイトカイン産生（例えば、IFN、TNF）及びCD16aの可溶性レベルを評価でき、及びFACSによってCD16a及び他の活性化マーカー（例えば、CD107a、CD62L）の細胞表面レベルを評価できる。

【0034】

実施例3に記載のヒト腫瘍異種移植モデルは、インビボにおいて切断不可能なCD16aを発現するNK細胞の抗癌活性を評価するのに使用できる。ヒトCD16と異なって、マウスCD16は細胞刺激によってエクトドメイン・シェディングを受けないので、そのため、NK細胞媒介ADCCに対するCD16aシェディングの効果を測定することは、正常なマウスではモデル化できない。表1では、実験の群分けと処置の代表的な組み合わせを提供する。

【0035】

10

20

30

40

【表 1】

表 1. 腫瘍異種移植モデル

群	n	処置 <sup>#</sup>
1	5	処置なし
2	5	OVCAR3 細胞のみ
3	5	OVCAR3 + NK 細胞/WT-CD16a
4	5	OVCAR3 + NK 細胞/ WT-CD16a + トラスツズマブ
5	5	OVCAR3 + NK 細胞/CD16a <sup>197P</sup>
6	5	OVCAR3 + NK 細胞/ CD16a <sup>197P</sup> + トラスツズマブ
7	5	OVCAR3 + NK 細胞/ベクターのみ
8	5	OVCAR3 + NK 細胞/ベクター + トラスツズマブ

<sup>#</sup>処置は少なくとも 2 回実施し、データをプールした

## 【 0 0 3 6 】

腫瘍の増殖及び / 又は退縮は、例えば生物発光造影、超音波、CT、MRI、別の画像技術、及び / 又はマウスの計量を含めた従来の方法によって毎週観察され得る (Woll et al, 2009, Blood 113:6094-6101)。マウスもまた、ヒトNK細胞生存率を定量化するために (例えば毎週) 採血され得る。様々なエフェクター機能マーカー (例えば、IFN、CD16a) の発現及び / 又は細胞表面レベルは、例えばFACSによるなどの従来手法を使用して評価され得る。マウスは、例えば60日間などの任意の好適な期間追跡検査され得る。屠殺時点で、内臓 (例えば脾臓、肝臓、肺、腎臓、及び / 又は卵巣) が、以前に記載されているように (Woll et al, 2009, Blood 113:6094-6101)、(例えば生物発光によって) 転移癌の徴候がないか調査され得る。

## 【 0 0 3 7 】

我々の分析は、当業者が野生型CD16aと対比してCD16a/S197Pを発現するiPSC誘導NK細胞の抗体依存性細胞毒性活性及びインビボにおける効力を規定及び比較することを可能にする。よって、我々は、本明細書中にCD16aの改変型、改変CD16aを発現する遺伝子組み換え細胞、及び遺伝子組み換え細胞 (例えばNK細胞、好中球、単球、T細胞など) を伴う方法を記載する。例えば、CD16aの改変型、CD16a/S197Pを発現するNK細胞は、少なくとも一部で、NK細胞刺激時のADAM17媒介型シェディングに対する低い感受性により増強された抗卵巣癌活性を呈する。これは、同様にして、例えば治療用抗体でタグを付与された癌細胞などの抗体でタグを付与された癌細胞の関与によって抗体依存性細胞毒性活性を増強する。そのうえ、NK細胞による抗体認識は、腫瘍細胞との接触安定性を増強し、NKG2Dなどの他の活性化受容体を通してNK細胞活性を強める。

## 【 0 0 3 8 】

用語「及び / 又は」は、列挙した要素のうちの1若しくはすべて、又は列挙した要素のうちの任意の2以上の組み合わせを意味し; 用語「含む」とその変化形には、これらの用語が明細書及び請求項に現れた場合に、限定的な意味合いはなく; 別段の定めがない限り、「a」、「an」、「the」、及び「少なくとも1つ」は互換的に使用され、1若しくは複数を意味し; そして、終点による数値範囲の詳述は、その範囲内に包括されたすべての数値を含む (例えば1~5は、1、1.5、2、2.75、3、3.80、4、5などを含む)。

## 【 0 0 3 9 】

10

20

30

40

50

先の説明において、特定の実施形態は明確さのために単独で記載され得る。特定の実施形態の特徴が別の実施形態の特徴と両立しないことについて別段の明白な定めがない限り、特定の実施形態は1若しくは複数の実施形態に関して本明細書中に記載した両立し得る特徴の組み合わせを含む。

別個のステップを含んでいる本明細書中に開示されたいずれの方法でも、該ステップは任意の実現可能な順序で実施されてもよい。そして、適宜、2以上のステップの任意の組み合わせが同時に実施されてもよい。

本発明は以下の実施例によって例示される。特定の例、材料、量、及び手順は本明細書中に記載した本発明の範囲及び要旨に従って広く解釈されるべきであることは、理解されるべきである。

#### 【実施例1】

#### 【0040】

##### 実施例1

##### 質量分析法

プロトコール番号9708M00134によりミネソタ大学施設内倫理委員会によって承認されたプロトコールに従って、健常人からの末梢血採血を実施した。ヒト好中球及びNK細胞単離を以前に記載されているように実施した(Wang et al, 2013, Biochim Biophys Acta. 1833:680-685; Long et al, 2010, J Leukoc Biol. 87: 1097-1101; Long et al, 2012, J Leukoc Biol. 92:667-672)。濃縮した好中球又はNK細胞(PBS中に $1 \times 10^7 / ml$ ; Mediatech, Inc. Manassas, VA)をPMA(それぞれ15 ng/ml又は50 ng/ml; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)を用いて37℃にて30分間活性化した。細胞上清を濾過し(0.45 µmの細孔径)、そしてCD16を、製造業者の取扱説明書に従ってmAb 3G8 (BioLegend, Inc., San Diego, CA)及びPierceダイレクト免疫沈降反応キット(Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL)を使用して免疫沈降させた。精製したCD16を、製造業者の取扱説明書に従ってキチン質結合ドメインにタグを付与したRemove-iT PNGase F (New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA)によって脱グリコシル化した。簡単に言えば、10~20 µgの精製CD16を40 mMのDTTの存在下、55℃にて10分間変性させ、次に、3 µlのREMOVE-IT PNGase F (New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA)と一緒に37℃にて1時間インキュベートした。次に、反応物からキチン磁性ビーズを使用してREMOVE-IT PNGase Fを取り除いた。

#### 【0041】

CD16をSDS-PAGEにかけ、可溶性CD16に相当するゲルバンドを、クリプトン蛍光性タンパク染料(Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL)によって検出し、同じゲルの隣接したレーンのCD16イムノプロット分析によって確認し、次に、それを切り出し、トリプシンを用いた標準的なゲル内消化にかけた。ゲルから抽出した消化ペプチドをドライダウンし、液体クロマトグラフィー質量分析のために水:アセトニトリル:ギ酸、98:2:0.01中で再構成し、<1 µgのアリコート、以前に記載されているように、データ依存性走査モードで質量分析(VELOS ORBITRAP, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL)によって分析した(Lin-Moshier et al, 2013, J Biol Chem. 288: 355-367)。データベース検索をProtein Pilot4.5(AB Sciex, Framingham, MA)を用いて実施し、それは、混入物データベース(the gpm.org/cRAP/指数、109のタンパク質)を備えたNCBI参照配列ホモサピエンスタンパク質FASTAデータベースに対してParagonスコアリングアルゴリズム(Shilov et al, 2007, Mol Cell Proteomics 6: 1638-1655)を使用する。検索パラメーターは: システインヨードアセトアミド; トリプシン; 装置Orbi MS(1~3 ppm) Orbi MS/MS; 生物学的改変IDフォーカス(アスパラギン脱アミド化を含む); 検索成果全体; 及び(逆進データベースを用いた)偽発見率分析である。

#### 【0042】

##### cDNA発現構築物の作製

CD16bは、その細胞外領域のN末端部分の4つのアミノ酸が異なるNA1及びNA

10

20

30

40

50

2 と呼ばれる 2 つの対立遺伝子変異体を生じる。C D 1 6 b の両方の対立遺伝子変異体が、同様の効率で A D A M 1 7 によって切断される。この試験について、我々は N A 1 変異体だけを調べた。1 7 6 位にバリン又はフェニルアラニン残基のいずれかを有する C D 1 6 a の 2 つの対立遺伝子変異体も存在する。C D 1 6 a のこれらの 2 つの対立遺伝子変異体は同様の効率で A D A M 1 7 によって切断された。この試験について、我々はバリン対立遺伝子変異体 C D 1 6 a だけを調べた。

#### 【 0 0 4 3 】

C D 1 6 a 及び C D 1 6 b をヒト白血球 c D N A から増幅し、別々に以前に記載されているように (Wang et al, 2013, Biochim Biophys Acta. 1833:680-685; Dong et al, 2014, Arthritis Rheumatol. 66: 1291-1299)、B a m H I 及び E c o R I 制限酵素部位において p c D N A 3 . 1 プラスミド (Invitrogen, Carlsbad, CA) 内にクローニングした。次に、構築物を、製造業者の取扱説明書に従って Quik- Change Site-directed Mutagenesis (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) にかけて、C D 1 6 a 及び C D 1 6 b の 1 9 7 位のセリンをプロリンに変換した。すべての構築物を配列決定して、計画的な突然変異の存在及びいずれかの自然突然変異の不存在を確認した。

10

#### 【 0 0 4 4 】

続いて、C D 1 6 a c D N A を B a m H I 及び E c o R I 制限酵素部位において、Dr. G. Nolan (Stanford University, Stanford, CA) によって提供された 2 シストロン性レトロウイルス発現ベクター p B M N - I R E S - E G F P 内にクローニングした。C D 1 6 a 構築物はまた、以前に記載されているように (Wilber et al, 2007, Stem Cells 25: 2919-2927; Tian et al, 2009, Stem Cells 27:2675-2685)、2 シストロン性 Sleeping Beauty トランスポゾンプラスミド (p K T 2 - I R E S - G F P : z e o) 内にもクローニングした。

20

#### 【 0 0 4 5 】

簡単に言えば、野生型 C D 1 6 a 及び C D 1 6 a / S 1 9 7 P を、プライマー : 5 ' - CCG GAA TTC CAG TGT GGC ATC ATG TGG CAG CTG CTC - 3 ' (センス、配列番号 X X) 及び 5 ' - CCG GAA TTC TCA TTT GTC TTG AGG GTC CTT TCT - 3 ' (アンチセンス、配列番号 Y Y) を使用して P C R 増幅した。E c o R I 部位に下線を引く。E c o R I 消化 C D 1 6 a 及び C D 1 6 a / S 1 9 7 P P C R 断片を、別々に p K T 2 - I R E S - G F P : z e o 内にクローニングした。正しい C D 1 6 a 方向及び配列を P C R 及び配列決定分析によって確認した。我々は、完全長ヒト L - セレクチン (C D 6 2 L) c D N A を以前クローニングし (Feehan et al, 1996, J Biol Chem. 271 :7019-7024; Matala et al, 2001, J Immunol. 167: 1617-1623)、そしてそれを、制限酵素部位 X b a 1 において p c D N A 3 . 1 ベクター内に移した)。完全長ヒト F c R c D N A を、p c D N A 3 . 1 ベクターを使用した修飾を伴って、以前に記載されているようにクローニングした (Dong et al. , 2014, Arthritis Rheumatol. 66: 1291-1299)。

30

#### 【 0 0 4 6 】

遺伝子組み換え L - セレクチン、C D 1 6 a、及び C D 1 6 b を発現する細胞株の作出 H E K 2 9 3 細胞 (ヒト胎児腎臓細胞株) 及び N K 9 2 細胞 (ヒト N K 細胞株) (ATCC, Manassas, VA) を受託所の取扱説明書に従って培養した。H E K 2 9 3 細胞を、製造業者の取扱説明書に従って Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) を使用して、C D 1 6 b、C D 1 6 b / S 1 9 7 P、及び / 又は L - セレクチンを含む又は含まない p c D N A 3 . 1 を用いて一過性に形質移入した。ヒト F c R を安定して発現する H E K 2 9 3 細胞を、同じアプローチによって C D 1 6 a 又は C D 1 6 a / S 1 9 7 P を含む又は含まない p c D N A 3 . 1 を用いて一過性に形質移入した。N K 9 2 細胞を、以前に記載されているレトロウイルス作出及び感染手順 (Matala et al, 2001, J Immunol. 167: 1617-1623; Walcheck et al, 2003, JLeukoc Biol. 74:389-394; Wang et al, 2009, J Immunol. 182:2449-2457) によって C D 1 6 a 又は C D 1 6 a / S 1 9 7 P を含む又は含まない p B M N - I R E S - E G F P を用いて安定的に形質導入した。構築物の発現を、E G F P 蛍光によって、及びフローサイトメトリーによって測定する場合には、C D 1 6

40

50

染色によって評価した。ヒト *iPSCs* (UCB *iPSCs*、臍帯血 CD34 細胞由来) をマウス胎児線維芽細胞 (Knorr et al., 2013, *Stem Cells Transl Med.* 2:274-283; Ni et al., 2014, *Stem Cells* 32: 1021-1031) 上で維持した。CD16a 又は CD16a / S197P の安定発現を、以前に記載されているように Sleeping Beauty トランスポゾンシステム (Wilber et al, 2007, *Stem Cells* 25:2919-2927; Tian et al, 2009, *Stem Cells* 27:2675-2685) を使用して実現した。簡単に言えば、*iPSCs* を、プログラム設定 B16 を使用してヌクレオフェクター溶液 V (Lonza Inc., Gaithersburg, MD) 中でトランスポザーゼ DNA と組み合わせた pKT2 - IRES - GFP : zeo を用いてヌクレオフェクトした。ヌクレオフェクト細胞をすぐにゼオシン (50 µg / ml) を含んでいる *iPSC* 成長培地中に懸濁し、そしてマウス胎児線維芽細胞上に播種した。

10

#### 【0047】

CD16a - hESC 及び CD16a - *iPSC* 細胞からの NK 細胞の誘導

hESCs 及び *iPSCs* の造血細胞分化を以前に記載されているように実施した (Ng et al, 2005, *Blood* 106: 1601-1603; Ng et al, 2008, *Nat Protoc* 3:768-776; Le Garff-Tavernier et al, 2010, *Aging Cell* 9: 527-535)。簡単に言えば、96 ウェル丸底プレートの 1 ウェル当たり 3000 個の単独細胞を、幹細胞因子 (SCF、40 ng / ml)、血管内皮増殖因子 (VEGF、20 ng / ml)、及び骨形態形成タンパク質 4 (BMP4、20 ng / ml) を含んだ BPEL 培地中に播種した。BPEL 培地は、Isco ve 's Modified Dulbecco 's Medium (IMDM、86 ml、Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA)、Glutmax I を含んだ F12 Nutrient Mixture (86 ml、Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA)、10% の脱イオン B ovine Serum Albumin (BSA、5 ml、Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)、5% のポリビニルアルコール (10 ml、Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)、リノレン酸 (20 µl の 1 グラム / ml 溶液、Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)、リノール酸 (20 µl の 1 グラム / ml 溶液、Sigma)、SYNTHECOL 500 × 溶液 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)、a - モノチオグリセロール (3.9 µl / 100 ml、Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)、タンパク質不含ハイブリドーマミックス II (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA)、アスコルビン酸 (5 mg / ml、Sigma)、GLUTAMAX I (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA)、インスリン - トランスフェリン - セレニウム 100 × 溶液 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA)、ペニシリン / ストレプトマイシン (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA) を含んでいた。

20

30

#### 【0048】

造血細胞分化の 11 日目に、サイトカインを供給した NK 培地中で EL08 - 1D2 ストロマ細胞と共に又はそれなしに、スピン胚様体を 24 ウェルプレートにそのまま移した (Le Garff-Tavernier et al, 2010, *Aging Cell* 9:527-535)。4 ~ 5 週間の培養後に、単独細胞懸濁液を、APC -、PE -、FITC - 及び PerCP - cy5.5 結合 IgG 又はヒト血表面抗原に対する特異的抗体: CD45 - PE、CD56 - APC、CD56 - PE、CD16 - PerCP - cy5.5、NKG2D - PE、NKp44 - PE、NKp46 - PE、CD158b - FITC、CD158e1 / 2 - FITC (BD Pharmingen, San Jose, CA)、CD158a / h - PE、及び CD158i - PE (Beckman Coulter, Inc., Pasadena, CA) で染色した。抗体染色をフローサイトメトリーによって評価した。

40

#### 【0049】

細胞刺激

RPMI 1640 培地 (Mediatech, Inc., Manassas, VA) 中の HEK293 及び NK92 細胞を、それぞれ 15 ng / ml 及び 100 ng / ml の PMA を用いて 37 °C にて 30 分間活性化した。NK92 細胞を、それぞれ 100 ng / ml 及び 400 ng / ml の IL - 12 (PeproTech Inc, Rocky Hill, NJ) 及び IL - 18 (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN) を用いて示した時点まで活性化した。CD16a を通じた NK92 細

50

胞活性化は、以前に記載されているように (Romee et al, 2013, Blood 121 :3599-3608)、抗CD20 mAb リツキシマブ (1  $\mu$ g/ml) (Genentech, Inc., South San Francisco, CA) で処理したCD20 陽性パーキットリンパ腫細胞株 Raji (ATCC、受託所の取扱説明書に従って培養) (1:1の比) を伴ったそれらのインキュベーションによって媒介した。余分なリツキシマブを、Raji 細胞を洗浄することによって取り除いた。いくつかの実験では、NK92 細胞を、選択的ADAM17 阻害剤であるBMS566394 (5  $\mu$ ) (Bristol-Myers Squibb Company, Princeton, NJ) と共に30 分間プレインキュベートした。iPSCs 由来のNK 細胞を、以前に記載されているように (Romee et al, 2013, Blood 121 :3599-3608)、ヒト赤白血病細胞株K562 (受託所の取扱説明書に従って育てられたATCC) を用いて刺激した。簡単に言えば、iPSC 誘導NK 細胞を、K562 標的細胞 (2:1の比) と共に37  $^{\circ}$ Cにて4 時間インキュベートした。

#### 【0050】

##### 抗体結合アッセイ

単量体ヒトIgG 及びIgA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) に結合する細胞を、いくつかの修飾を用いて以前に記載されているように実現した (Dong et al, 2014, Arthritis Rheumatol. 66: 1291-1299)。PBS 中、 $5 \times 10^6$ /ml にてCD16a 又はCD16a/S197P を発現するNK92 親細胞又は形質導入細胞を、三連で指示した濃度のIgG 又はIgA と共に4  $^{\circ}$ Cにて1 時間インキュベートした。細胞をしっかりと洗浄し、製造業者の取扱説明書に従ってAPC 抱合型ロバ抗ヒトFc (重鎖及び軽鎖) 抗体 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) と共にインキュベートした。細胞を洗浄し、その後すぐに、フローサイトメトリーによって分析した。

#### 【0051】

##### フローサイトメトリー及びELISA

細胞染色のために、以前に記載されているように (Wang et al, 2013, Biochim Biophys Acta. 1833:680-685; Romee et al, 2013, Blood 121 :3599-3608)、非特異的抗体結合部位をブロックし、細胞を指示した抗体で染色し、そしてフローサイトメトリーによって調べた。フローサイトメトリー分析をFACSCanto 及びLSRII 装置 (BD Biosciences, San Jose, CA) により実施した。ヒトCD16 をmAb s 3G8 (BioLegend, Inc., San Diego, CA) 及びDJ130c (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA) によって検出した。CD107a をmAb H4A3 (Biolegend, Inc., San Diego, CA) によって検出した。ADAM17 をmAb s M220 (Doedens et al, 2000, J Biol Chem. 275:14598-14607)、111633、及び111623 (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN) によって検出した。ヒトL-セレクチンをmAb LAM1-116 (Ansell Corp., Stillwater, MN) によって検出した。アイソタイプ対応陰性対照mAb s を、非特異的染色のレベルを評価するために使用した。CD16 のELISA を、以前に記載されているように (Wang et al, 2013, Biochim Biophys Acta. 1833:680-685) カスタムサイトメトリービーズアッセイによって実施した。

#### 【0052】

##### 統計解析

統計解析を必要に応じて、ANOVA 及びスチューデントt 検定を使用したPrism ソフトウェア (GraphPad, San Diego, CA) を使用して実施した。 $< 0.05$  のp 値を有意とみなした。

#### 【0053】

##### 実施例2

同等なレベルのWT CD16a とCD16a<sup>197P</sup> (CD16a/S197P) を発現するNK 細胞の比較

#### 【0054】

CD16 構築物の発現レベルを、CD16 構築物と比例した様式で生じるGFP 発現 (先に記載のNK92 細胞についておこなったように、図2) に基づくFACSソーティング

グによって対等にした。対等にしたCD16aレベルを、すべてのアッセイについてFACSによって確認する。対照として、空のSleeping Beautyトランスポゾンベクター（GFPだけを発現する）で改変したiPSC誘導NK細胞を評価する。iPSC誘導NK細胞は、低レベルの内因性CD16aを発現する（データ未掲載）。HER2発現卵巣癌細胞に対するNK細胞毒性を、トラスツズマブの存在又は不存在下、標準的なクロム遊離試験によって評価する。非クロム標識卵巣癌細胞を用いた抗体依存性細胞毒性もまた実施する。NK細胞のサイトカイン産生（例えばIFN、TNF）及びCD16aの可溶性レベルをELISAによって評価する。CD16a及び他の活性化マーカー（例えばCD107a、CD62L）の細胞表面レベルをFACSによって評価する。

#### 【0055】

##### 実施例3

CD16a<sup>197P</sup>（CD16a/S197P）を発現するiPSC誘導NK細胞が、トラスツズマブの存在下、インビボにおいて増強された抗卵巣癌活性を有するか試験するためのヒト腫瘍異種移植モデル。

#### 【0056】

生物発光造影（Geller et al., 2013, Cytotherapy 15: 1297-1306）のためにホタルルシフェラーゼを安定的に発現するように設計されたNOD/SCID/ $\gamma$ <sup>-/-</sup>（NSG）マウス及びヒト卵巣癌細胞株を使用した異種移植モデルを、卵巣癌細胞に対するNK細胞活性の腹腔内（ip）送達を試験するのに使用する。HER2を過剰発現するOVCA R3卵巣癌細胞株を、インビボ標的として使用する（Hellstrom et al, 2001, Cancer Res 61: 2420-2423）。亜致死照射（225cGy）を受けたNSG雌マウスに、腫瘍の増殖又は退縮を定量化するための生物発光造影用にルシフェラーゼを発現するように作出したOVCA R3（ $2 \times 10^5$ 細胞）を腹腔内に注射する（Geller et al, 2013, Cytotherapy 15: 1297-1306）。腫瘍を7日間増殖させ、その後、マウスに $20 \times 10^6$ のNK細胞を単回腹腔内注射する。次に、以前に記載されているように（Woll et al, 2009, Blood 113: 6094-6101）マウスに所定のIL-2（5 $\mu$ g/マウス）を一日おきに4週間与え、NK細胞のインビボにおける生存を促す。トラスツズマブを、このモデルで以前に使用されていた用量である、50 $\mu$ gの用量にて毎週、4週間にわたり腹腔内投与する（Warburton et al, 2004, Clinical cancer research 10:2512-2524）。同等なレベルのWT CD16又はCD16a<sup>197P</sup>（CD16a/S197P）を発現するiPSC誘導NK細胞のインビボにおける効力を比較する。対照には、GFPのみを発現するiPSC誘導NK細胞（ベクターのみ）、及び卵巣癌細胞のみを与えられたマウスのコホートが含まれる。すべてのマウスに同じIL-2処置を与える。

#### 【0057】

腫瘍の増殖/退縮を、以前に記載されているように（Woll et al, 2009, Blood 113: 6094-6101）生物発光造影及びマウスの計量によって毎週観察する。マウスはまた、ヒトNK細胞生存率を定量化するために毎週採血される。様々なエフェクター機能マーカー（例えばIFN、CD16a）の発現/細胞表面レベルをFACSによって評価する。マウスを~60日間追跡検査する。屠殺時点で、内臓（脾臓、肝臓、肺、腎臓、及び卵巣）を、以前に記載されているように（Blood 113: Wollら、2009、6094-6101）生物発光によって転移癌の徴候がないか調査する。

#### 【0058】

##### 代表的な実施形態

実施形態1．膜近位領域及び該膜近位領域内のアミノ酸修飾を含んでいるCD16ポリペプチドを発現するように遺伝子組み換えされた細胞。

実施形態2．膜近位領域及び該膜近位領域内のアミノ酸修飾を含んでいるCD16ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む細胞。

実施形態3．アミノ酸薬療法が、CD16膜近位領域の野生型アミノ酸配列と比較した1若しくは複数のアミノ酸の付加、1若しくは複数のアミノ酸の欠失、又は1若しくは複数のアミノ酸の置換を反映する、実施形態1又は実施形態2に記載の細胞。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 5 9 】

実施形態 4 . 前記 1 若しくは複数のアミノ酸の置換が配列番号 1 の 1 9 7 位におけるセリン残基の置換を含む、実施形態 3 に記載の細胞。

実施形態 5 . 前記細胞がナチュラルキラー (NK) 細胞である、実施形態 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の細胞。

実施形態 6 . 前記細胞が好中球である、実施形態 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の細胞。

実施形態 7 . 前記細胞が単球である、実施形態 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の細胞。

実施形態 8 . 前記改変 CD 1 6 ポリペプチドが、野生型 CD 1 6 ポリペプチドと比較して、ADAM 1 7 媒介型シェディングに対して低い感受性を示す、実施形態 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の細胞。

10

## 【 0 0 6 0 】

実施形態 9 . 前記改変 CD 1 6 ポリペプチドが、野生型 CD 1 6 ポリペプチドと比較して、NK 細胞刺激時の切断に対して低い感受性を示す、実施形態 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の細胞。

実施形態 1 0 . 斯かる処理を必要としている患者に対して、以下の：

治療用 NK エフェクターを該患者に投与し；及び

請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の細胞を該患者に投与すること、を含む治療法を施すことを含む方法。

## 【 0 0 6 1 】

実施形態 1 1 . 前記治療用 NK エフェクターが治療薬を含む、実施形態 1 0 に記載の方法。

20

実施形態 1 2 . 前記治療薬が特異的に腫瘍抗原を認識する、実施形態 1 1 に記載の方法。

実施形態 1 3 . 前記治療薬が、腫瘍抗原を特異的に認識する抗体又は抗体フラグメントを含む、実施形態 1 2 に記載の方法。

実施形態 1 4 . 前記腫瘍抗原が HER 2 を含む、実施形態 1 3 に記載の方法。

実施形態 1 5 . 前記抗体がトラスツズマブ又はリツキシマブを含む、実施形態 1 3 又は実施形態 1 4 に記載の方法。

## 【 0 0 6 2 】

実施形態 1 6 . 前記治療用 NK エフェクターが、二重特異性キラーエンゲージャー (BiKE) を含む、実施形態 1 0 に記載の方法。

30

実施形態 1 7 . 前記 BiKE が、CD 1 6 × CD 3 3 BiKE、CD 1 6 × CD 1 9 BiKE、又は CD 1 6 × EP - CAM BiKE を含む、実施形態 1 6 に記載の方法。

実施形態 1 8 . 前記治療用 NK エフェクターが三重特異性キラー細胞エンゲージャー (TriKE) を含む、実施形態 1 0 に記載の方法。

## 【 0 0 6 3 】

実施形態 1 9 . 前記治療薬がウイルス標的を特異的に認識する、実施形態 1 1 又は 1 6 ~ 1 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

実施形態 2 0 . 治療用 NK エフェクターを患者に投与することを伴う患者に対する治療法を改善する方法であって、以下の：

40

請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の細胞を該患者に投与すること、を含む方法。

## 【 0 0 6 4 】

明細書中に記載される全特許、特許出願、及び公報、並びに電子的に利用可能な資料 (例えば、ヌクレオチド配列寄託、例えば、GenBank 及び RefSeq、並びにアミノ酸配列寄託、例えば、SwissProt、PIR、PRF、PDB、並びに、GenBank 及び RefSeq の注釈付翻訳領域からの翻訳など) の全ての開示内容は、参照によりそれら全体が援用される。本出願の開示内容と参照により明細書中に援用された任意の文献の開示内容との間に何らかの矛盾が存在する場合、本出願の開示が優先されるべきである。上述の詳細な説明及び実施例は、単に理解の明確化のために供したものであり、これらから不必要に限定解釈してはならない

50

。本発明は、示され且つ記載される正確且つ詳細な説明に限定されず、特許請求の範囲で特許請求する本発明には当業者にとって明らかである変形が含まれる。

【0065】

特に記載しない限り、明細書及び特許請求の範囲の中で使用される成分、分子量、及びその他の量を表わす数値はいずれも、用語「約」により、全ての場合において修飾されるものと解すべきである。従って、これとは反対の記載が別途ない限り、明細書及び特許請求の範囲中で説明される数値パラメータは概算値であり、本発明によって得ようとする目的の特性に応じて変化し得る。特許請求の範囲に関する均等論を制限するものではないが、最低限でも、各数値パラメータを解釈する際には、少なくとも報告値の有効桁数を考慮し、従来の端数処理の手法 (rounding techniques) を用いるべきである。

10

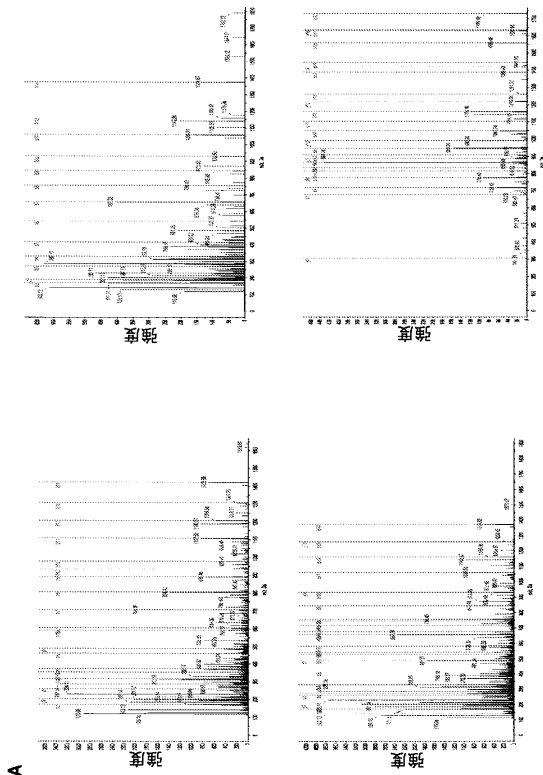
【0066】

発明の広い範囲を規定する数値範囲及びパラメータは概算値であるが、個々の実施例に記載した数値は、可能な限り正確に報告した。しかしながら、何れの数値も、対応する試験の測定値に見られる標準偏差に応じて、必然的にある範囲を内在することになる。

【0067】

見出しは何れも読者の便宜のためのものであり、特に明示した場合を除いて、その見出しに続く本文の意味を限定するために用いるべきではない。

【図1A】



【図1B】

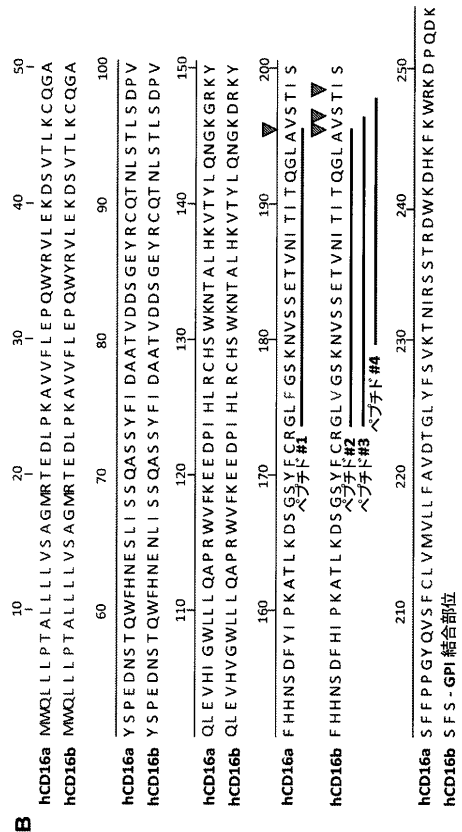


FIG. 1

【 図 2 】

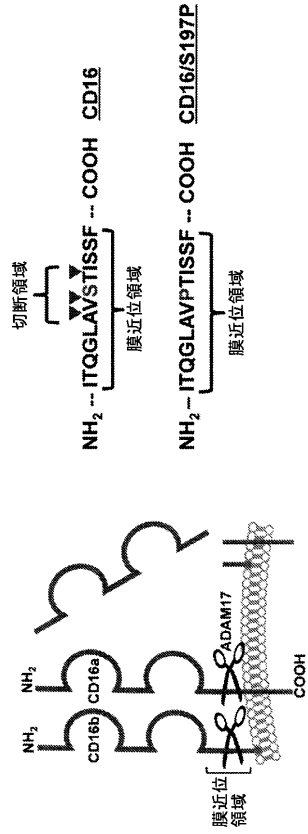


FIG. 2

【 図 3 】

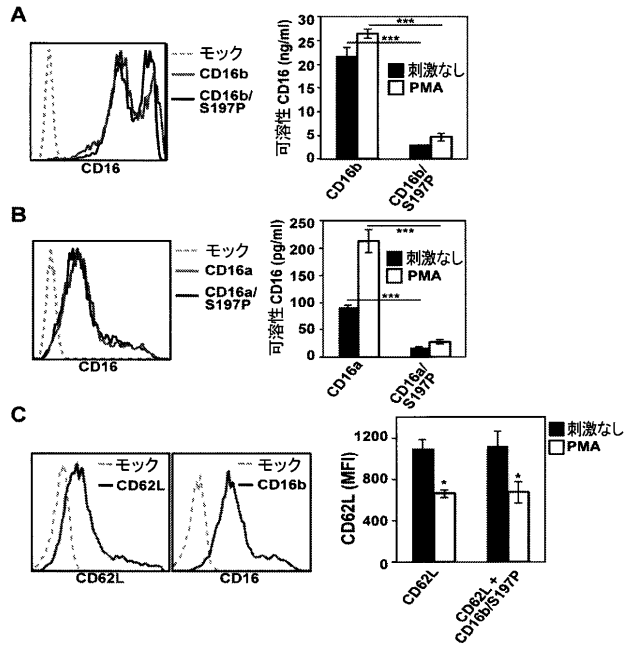


FIG. 3

【 図 4 】

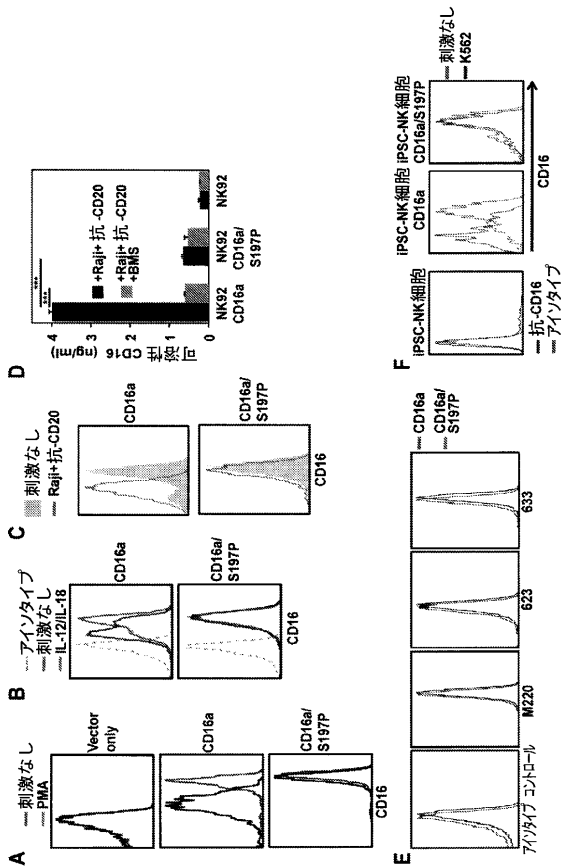


FIG. 4

【 図 5 】

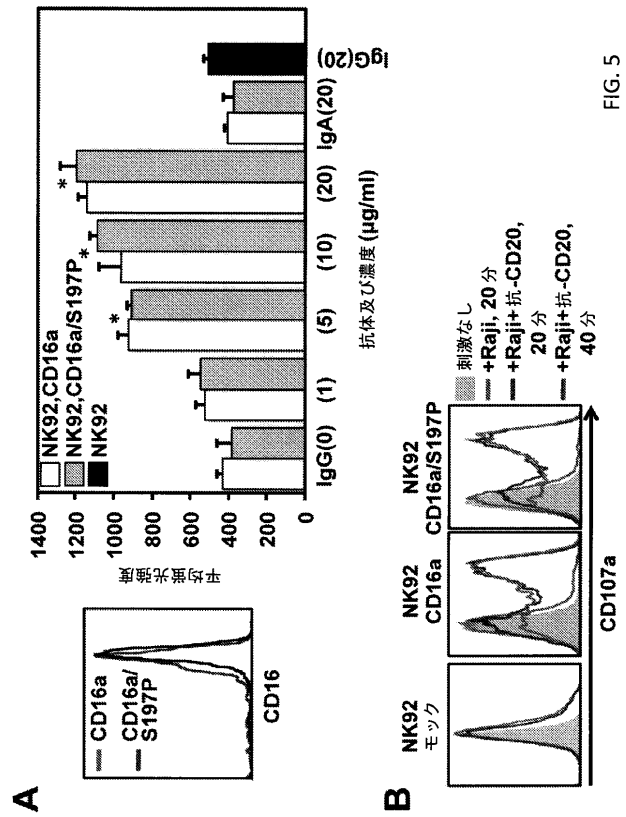


FIG. 5

【配列表】

2017511135000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2015/022998

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. C07K14/735 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2009/196870 A1 (LEDBETTER JEFFREY A [US] ET AL) 6 August 2009 (2009-08-06)	1,2
Y	whole document esp. paragraphs [337,338,381] and seq id no 426 -----	3-20
Y	WO 2010/040091 A1 (UNIV ARIZONA [US]; CHANG YUNG [US]; YAN HAO [US]) 8 April 2010 (2010-04-08) whole document esp. [5,165], seq id no 6, claims 43,50 -----	3-20
X	EP 1 734 119 A2 (APPLIED RESEARCH SYSTEMS [AN] MERCK SERONO SA [CH]) 20 December 2006 (2006-12-20)	1,2
Y	the whole document esp. paragraphs [17,21] -----	3-20
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> 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 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
11 June 2015		02/07/2015
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Brück, Marianne

1

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/US2015/022998

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2009196870	A1	06-08-2009	AT 525399 T 15-10-2011
			AU 2003300092 A1 07-03-2005
			BR 0318417 A 25-07-2006
			CA 2533921 A1 24-02-2005
			CN 1852976 A 25-10-2006
			CN 102643344 A 22-08-2012
			CR 8257 A 02-12-2008
			EA 200600313 A1 27-04-2007
			EP 1654358 A1 10-05-2006
			ES 2376751 T3 16-03-2012
			HK 1091865 A1 18-05-2012
			HR P20060074 A2 31-08-2006
			IS 8305 A 16-02-2006
			JP 4904443 B2 28-03-2012
			JP 2007528194 A 11-10-2007
			JP 2010279389 A 16-12-2010
			KR 20060070530 A 23-06-2006
			NZ 545316 A 27-11-2009
			RS 20060055 A 07-08-2008
			UA 90999 C2 25-06-2010
			US 2005136049 A1 23-06-2005
			US 2009196870 A1 06-08-2009
			US 2010279932 A1 04-11-2010
			WO 2005017148 A1 24-02-2005
			ZA 200601653 A 30-05-2007
-----			
WO 2010040091	A1	08-04-2010	US 2011275702 A1 10-11-2011
			WO 2010040091 A1 08-04-2010
-----			
EP 1734119	A2	20-12-2006	AU 697991 B2 22-10-1998
			AU 5908396 A 21-11-1996
			CA 2219988 A1 07-11-1996
			EP 0954576 A2 10-11-1999
			EP 1734119 A2 20-12-2006
			JP H11511649 A 12-10-1999
			KR 100464923 B1 13-06-2005
			US 5998166 A 07-12-1999
			US 6444789 B1 03-09-2002
			WO 9634953 A2 07-11-1996
-----			

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 35/12 (2015.01)	A 6 1 K 35/12	
A 6 1 K 35/15 (2015.01)	A 6 1 K 35/15	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A
C 0 7 K 14/705 (2006.01)	C 0 7 K 14/705	

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

(74) 代理人 100117019

弁理士 渡辺 陽一

(74) 代理人 100150810

弁理士 武居 良太郎

(74) 代理人 100166165

弁理士 津田 英直

(72) 発明者 ブルース ケネス ウォルチェック

アメリカ合衆国, ミネソタ 5 5 0 1 4, リノ レイクス, ウッドリッジ レーン 2 3 0

(72) 発明者 ダン サミュエル コーフマン

アメリカ合衆国, ミネソタ 5 5 1 2 5, ウッドベリー, ヒドゥン ポンズ アルコーブ 8 3 9  
1

(72) 発明者 ジェンミーヌ ウー

アメリカ合衆国, ミネソタ 5 5 4 4 6, プリマス, アップランド コート ノース 5 1 8 5

(72) 発明者 ジーン ヤーウー

アメリカ合衆国, ミネソタ 5 5 1 2 6, ショアビュー, ポプラ ドライブ 2 7 5

(72) 発明者 ニー ジェンヤー

アメリカ合衆国, ミネソタ 5 5 4 3 9, イーダイナ, ティングデール アベニュー 6 3 2 1

F ターム (参考) 4B065 AA93X AA93Y AB01 AC14 BA01 CA24 CA44

4C085 AA14 BB01 CC23 EE03

4C087 AA01 AA02 BB65 CA04 MA02 NA05 NA14 ZB26 ZB33

4H045 BA10 CA40 DA50 EA20 FA74