

(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2021-512614

(P2021-512614A)

(43) 公表日 令和3年5月20日(2021.5.20)

(51) Int.Cl.	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	4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/867 (2006.01)	C 1 2 N 15/867 Z N A Z	4 C 0 8 4
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	4 C 0 8 6
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 7
A 6 1 P 31/00 (2006.01)	A 6 1 P 31/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 50 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2020-542380 (P2020-542380)
 (86) (22) 出願日 平成31年2月7日 (2019.2.7)
 (85) 翻訳文提出日 令和2年8月25日 (2020.8.25)
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2019/000141
 (87) 国際公開番号 W02019/155286
 (87) 国際公開日 令和1年8月15日 (2019.8.15)
 (31) 優先権主張番号 62/736,965
 (32) 優先日 平成30年9月26日 (2018.9.26)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 62/628,797
 (32) 優先日 平成30年2月9日 (2018.2.9)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(71) 出願人 507335687
 ナショナル ユニヴァーシティー オブ
 シンガポール
 シンガポール・1 1 9 0 7 7 ・シンガポ
 ル・ローワー・ケント・リッジ・ロード・
 2 1
 (74) 代理人 100095832
 弁理士 細田 芳徳
 (74) 代理人 100187850
 弁理士 細田 芳弘

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ナチュラルキラー細胞免疫療法における接着受容体構築物及びその使用

(57) 【要約】

本発明は、標的細胞抗原に結合する細胞外受容体ドメイン及びNK細胞の表面上に細胞外受容体ドメインを固着するための膜貫通ドメインを含む接着受容体を発現する改変ナチュラルキラー(NK)細胞を含む組成物に関する。かかる接着受容体を発現するNK細胞は、特殊化細胞、例えばがん細胞又は感染症に冒された細胞を標的にする増強された能力を有する。いくつかの例示された実施形態は、Her2又はPSMAがん抗原を標的にするscFvを含む接着受容体を発現するNK細胞に関し、NK細胞が標的細胞に結合するとき、NK細胞は細胞傷害性及び/又は細胞溶解性効果を示す。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

接着受容体をコードするポリヌクレオチドであって、前記接着受容体が、

(a) 標的細胞抗原に結合するペプチドを含む細胞外受容体ドメインであって、
ここで前記標的細胞抗原が、健常細胞と標的細胞との間で差次的に発現され；

ここで前記標的細胞が、ナチュラルキラー（NK）細胞による認識及び破壊のために
標的にされ；

ここで標的細胞抗原に結合する前記ペプチドが、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、組換え抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、F a b、F a b'、F (a b')₂、F v、一本鎖 F v (s c F v)、ミニボディ、二重特異性抗体、及び単一ドメイン抗体、それらの機能的誘導体、それらの変異体又はそれらの断片を含む、細胞外受容体ドメイン；並びに

(b) 前記細胞外受容体ドメインを前記NK細胞の表面上に固着する膜貫通ドメインを含む、ポリヌクレオチド。

【請求項 2】

前記標的細胞抗原が、疾患に関連する、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 3】

前記疾患が、新生物、がん、又は腫瘍である、請求項 2 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 4】

前記標的細胞抗原が、腫瘍関連抗原である、請求項 3 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 5】

前記標的細胞抗原が、腫瘍特異抗原である、請求項 3 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 6】

前記疾患が、ウイルス、細菌、真菌及び / 又は寄生虫感染である、請求項 2 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 7】

前記標的細胞抗原が、ウイルス、細菌、真菌又は寄生虫抗原である、請求項 6 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 8】

前記標的細胞抗原が、CD 1 2 3、CD 1 9、4 - 1 B B、アディポフィリン、A F P、A I M - 2、アネキシン I I、A R T - 4、B A G E、b - カテニン、b c r - a b 1、b c r - a b 1 p 1 9 0 (e 1 a 2)、b c r - a b 1 p 2 1 0 (b 2 a 2)、b c r - a b 1 p 2 1 0 (b 3 a 2)、B I N G - 4、C A G - 3、C A I X、C A M E L、カスパーゼ - 8、CD 1 7 1、CD 2 0、CD 2 2、CD 2 3、CD 2 4、CD 3 0、CD 3 3、CD 3 8、CD 4 4 v 7 / 8、C D C 2 7、C D K - 4、C E A、C L C A 2、C y p - B、D A M - 1 0、D A M - 6、D E K - C A N、E G F R v I I I、E G P - 2、E G P - 4 0、E L F 2、E p - C A M、E p h A 2、E p h A 3、e r b - B 2、e r b - B 3、e r b - B 4、E S - E S O - 1 a、E T V 6 / A M L、F B P、胎児アセチルコリン受容体、F G F - 5、F N、G 2 5 0、G A G E - 1、G A G E - 2、G A G E - 3、G A G E - 4、G A G E - 5、G A G E - 6、G A G E - 7 B、G A G E - 8、G D 2、G D 3、G n T - V、G p 1 0 0、g p 7 5、H e r - 2、H L A - A * 0 2 0 1 - R 1 7 0 I、H M W - M A A、H S P 7 0 - 2 M、H S T - 2 (F G F 6)、H S T - 2 / n e u、h T E R T、i C E、I L - 1 1 R I、I L - 1 3 R I 2、K D R、K I A A 0 2 0 5、K - R A S、L 1 - 細胞接着分子、L A G E - 1、L D L R / F U T、ルイス Y、M A G E - 1、M A G E - 1 0、M A G E - 1 2、M A G E - 2、M A G E - 3、M A G E - 4、M A G E - 6、M A G E - A 1、M A G E - A 2、M A G E - A 3、M A G E - A 6、M A G E - B 1、M A G E - B 2、リンゴ酸酵素、マンマグロピン - A、M A R T - 1 / M e l a n - A、M A R T - 2、M C 1 R、M - C S F、メソセリン、M U C 1、M U C 1 6、M U C 2、M U M - 1、M U M - 2、M U M - 3、ミオシン、N A 8 8 - A、N e o - P A P、N K G 2 D、N P M / A L K、N - R A S、N Y - E S O -

10

20

30

40

50

1、O A 1、O G T、がん胎児性抗原 (h 5 T 4)、O S - 9、P ポリペプチド、P 1 5、P 5 3、P R A M E、P S A、P S C A、P S M A、P T P R K、R A G E、R O R 1、R U 1、R U 2、S A R T - 1、S A R T - 2、S A R T - 3、S O X 1 0、S S X - 2、サバイピン、サバイピン - 2 B、S Y T / S S X、T A G - 7 2、T E L / A M L 1、T G F a R I I、T G F b R I I、T P 1、T R A G - 3、T R G、T R P - 1、T R P - 2、T R P - 2 / I N T 2、T R P - 2 - 6 b、チロシナーゼ、V E G F - R 2、及び W T 1 の 1 つ以上を含む、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 9】

前記標的細胞抗原が、H e r 2 である、請求項 3 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 10】

前記標的細胞抗原が、P S M A である、請求項 3 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 11】

前記ポリヌクレオチドによってコードされる前記接着受容体を発現する N K 細胞が、前記接着受容体を発現しない N K 細胞と比べられるとき、より迅速に標的細胞に結合する、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 12】

前記ポリヌクレオチドによってコードされる前記接着受容体を発現する N K 細胞が、前記接着受容体を発現しない N K 細胞と比べられるとき、腫瘍又は感染部位への増強されたホーミングを有する、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 13】

前記ポリヌクレオチドによってコードされる前記接着受容体を発現する N K 細胞が、前記接着受容体を発現しない N K 細胞と比べられるとき、標的細胞抗原を提示する細胞に対して増強された細胞傷害活性を示す、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 14】

前記ポリヌクレオチドによってコードされる前記接着受容体を発現する N K 細胞が、前記接着受容体を発現しない N K 細胞と比べられるとき、低減されたオフターゲット細胞傷害性効果を有する、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 15】

標的細胞抗原に結合する前記ペプチドが、一本鎖可変断片 (s c F v) である、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 16】

前記接着受容体が、抗 H e r 2 s c F v を含む、請求項 15 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 17】

前記 s c F v が、配列番号 5 8 の核酸配列によってコードされる、請求項 16 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 18】

前記 s c F v が、配列番号 5 9 のアミノ酸配列を含む、請求項 16 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 19】

前記接着受容体が、配列番号 6 0 の核酸配列によってコードされる、請求項 16 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 20】

前記接着受容体が、配列番号 6 1 のアミノ酸配列を含む、請求項 16 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 21】

前記接着受容体が、抗 P S M A s c F v を含む、請求項 15 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 22】

前記 s c F v が、配列番号 6 2 の核酸配列によってコードされる、請求項 21 に記載の

10

20

30

40

50

ポリヌクレオチド。

【請求項 23】

前記 s c F v が、配列番号 63 のアミノ酸配列を含む、請求項 21 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 24】

前記接着受容体が、配列番号 64 の核酸配列によってコードされる、請求項 21 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 25】

前記接着受容体が、配列番号 65 のアミノ酸配列を含む、請求項 21 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 26】

前記細胞外受容体ドメインが、前記第 1 のペプチドとは異なる標的細胞抗原に結合する第 2 のペプチドをさらに含む、請求項 1 ~ 25 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 27】

前記細胞外受容体ドメインが、前記第 1 のペプチドと同じ標的細胞抗原に結合する第 2 のペプチドをさらに含む、請求項 1 ~ 25 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 28】

第 2 の接着受容体をコードする、請求項 1 ~ 25 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 29】

前記第 1 及び第 2 の接着受容体が、異なる標的細胞抗原に結合する、請求項 28 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 30】

前記第 1 及び第 2 の接着受容体が、前記同じ標的細胞抗原に結合する、請求項 28 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 31】

前記第 1 及び第 2 の接着受容体が、前記同じ標的細胞抗原の異なるエピトープに結合する、請求項 28 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 32】

前記接着受容体が、二量体化するように形成される、請求項 1 ~ 25 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 33】

前記細胞外受容体ドメインが、シグナルペプチドをさらに含む、請求項 1 ~ 25 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 34】

前記細胞外受容体ドメインが、ヒンジ領域をさらに含む、請求項 1 ~ 25 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 35】

前記ポリヌクレオチドが、(a) ナチュラルキラーグループ 2 メンバー D (N K G 2 D) の天然リガンドに結合するペプチドを含む細胞外受容体ドメイン；及び (b) 膜貫通領域及び細胞内シグナル伝達ドメインを含むエフェクタードメイン、を含むキメラ受容体をさらにコードする、請求項 1 ~ 25 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 36】

膜結合型インターロイキン 15 (m b I L 1 5) をコードする追加的な構築物と同時発現される、請求項 35 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 37】

m R N A である、請求項 1 ~ 36 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 38】

前記接着受容体の発現のため、少なくとも 1 つの調節エレメントに作動可能に連結され

10

20

30

40

50

る、請求項 1 ~ 37 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 39】

前記ポリヌクレオチドが、前記接着受容体の発現のため、少なくとも 1 つの調節エレメントに作動可能に連結される、請求項 1 ~ 38 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 40】

レトロウイルスである、請求項 39 に記載のベクター。

【請求項 41】

請求項 35 に記載のポリヌクレオチドを含む遺伝子改変ナチュラルキラー細胞。

【請求項 42】

患者から単離された自家細胞である、請求項 41 に記載の遺伝子改変ナチュラルキラー細胞。

【請求項 43】

ドナーから単離された同種細胞である、請求項 41 に記載の遺伝子改変ナチュラルキラー細胞。

【請求項 44】

請求項 1 ~ 34 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド、並びに

(i) (a) ナチュラルキラーグループ 2 メンバー D (NKG2D) の天然リガンドに結合するペプチドを含む細胞外受容体ドメイン；及び (b) 膜貫通領域及び細胞内シグナル伝達ドメインを含むエフェクタードメインを含むキメラ受容体をコードするポリヌクレオチド；

(i i) 膜結合型インターロイキン 15 (m b I L 1 5) をコードするポリヌクレオチド；並びに

(i i i) (i) 及び (i i) の組み合わせ

から選択される追加的なポリヌクレオチドを含む、遺伝子改変ナチュラルキラー細胞。

【請求項 45】

患者から単離された自家細胞である、請求項 44 に記載の単離された遺伝子改変ナチュラルキラー細胞。

【請求項 46】

ドナーから単離された同種細胞である、請求項 44 に記載の単離された遺伝子改変ナチュラルキラー細胞。

【請求項 47】

それを必要とする哺乳動物における NK 細胞の細胞傷害性を増強するための方法であって、前記哺乳動物に NK 細胞を投与することを含み、ここで前記 NK 細胞が、請求項 1 ~ 38 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドによってコードされる接着受容体を発現する、方法。

【請求項 48】

前記 NK 細胞は、患者から単離された自家細胞である、請求項 47 に記載の方法。

【請求項 49】

前記 NK 細胞は、ドナーから単離された同種細胞である、請求項 47 に記載の方法。

【請求項 50】

それを必要とする哺乳動物におけるがん又は感染症を治療又は予防するための薬剤の製造における、請求項 1 ~ 38 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドの使用。

【請求項 51】

それを必要とする哺乳動物における NK 細胞の細胞傷害性を増強するための薬剤の製造における、請求項 39 又は 40 に記載のベクターの使用。

【請求項 52】

それを必要とする哺乳動物におけるがん又は感染症を治療又は予防するための薬剤の製造における、請求項 39 又は 40 に記載のベクターの使用。

【請求項 53】

10

20

30

40

50

それを必要とする哺乳動物におけるNK細胞の細胞傷害性を増強するための、請求項4
1～46のいずれか一項に記載の単離された遺伝子改変ナチュラルキラー細胞の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本願は、2018年2月9日に出願された米国仮特許出願第62/628,797号明
細書及び2018年9月26日に出願された米国仮特許出願第62/736,965号明
細書の利益を主張する。これらの出願の各々の全体は、参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0002】

ASCIIテキストファイルでのマテリアルの参照による援用

本願は、本明細書と同時に提出されている以下のASCIIテキストファイル中に含ま
れる配列表を参照により援用する。

a) ファイル名: 4459_1148_002_Seq_List.txt; 86.1
KBのサイズで2019年2月6日に作成

【背景技術】

【0003】

多くの疾患の出現及び持続性は、悪性及びウイルス感染細胞を含む異常細胞に対する不
十分な免疫応答によって特徴付けられる。免疫療法は、様々な疾患を治療するための患者
の免疫系の使用及び操作である。

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

免疫療法は、疾患の治療における新しい技術的進歩を提示し、免疫細胞は、罹患又は損
傷細胞に対して特異的に同定及び反応する特定の標的化及び/又はエフェクター分子を発
現するように操作される。これは、より従来手法、例えば化学療法(すべての細胞が影
響を受ける場合)と異なり、少なくとも部分的に、罹患又は損傷細胞を特異的に標的にす
るという能力に基づく有望な進歩を表し、また所望の結果は、十分な健常細胞が生存する
ことで患者の生存を可能にすることである。1つの免疫療法アプローチは、目的の異常細胞
の標的化された認識及び破壊を達成するための免疫細胞における接着受容体の組換え発
現である。

30

【課題を解決するための手段】

【0005】

罹患又は感染細胞を特異的に標的にする、破壊する、無能化する、又はその他として不
活性化するためのこの必要性に対処するため、本明細書中で、免疫細胞、例えばナチュラル
キラー細胞に増強された標的化、ひいては標的化された細胞傷害性を与える接着受容体
をコードするポリヌクレオチド、アミノ酸、及びペプチドが提供される。さらに、かかる
ポリヌクレオチドによってコードされる接着受容体を発現する免疫細胞を作製するための
方法、及び該細胞を用いて、罹患又は損傷細胞を標的にし、破壊するための方法が提供さ
れる。

40

【0006】

いくつかの実施形態では、細胞外受容体ドメイン及び膜貫通ドメインを含む接着受容体
をコードするポリヌクレオチドが提供され、ここで膜貫通ドメインは、細胞外受容体ドメ
インを免疫細胞、例えばNK細胞の表面上に固着する。

【0007】

いくつかの実施形態では、細胞外受容体ドメインは、細胞外受容体ドメインが標的細胞
抗原に結合することを可能にするペプチドを含む。いくつかの実施形態では、標的抗原は
、標的細胞と比べると、健常細胞上に差次的に発現され、それにより接着受容体を発現す

50

る細胞に対してある程度の特異的標的化をもたらす。それ故、かかる差次的な（例えば増強された）発現を有する細胞は、接着受容体を発現する免疫細胞、例えば、NK細胞、T細胞、又はそれらの組み合わせなどにより、優先的に認識され、破壊される。いくつかの実施形態では、標的細胞抗原は、疾患、例えば、新生物、がん、又は腫瘍に関連する。固形又は浮遊がんは、接着受容体を発現する免疫細胞により標的にされ得る。いくつかの実施形態では、標的細胞抗原は、腫瘍関連抗原である一方で、さらなる実施形態では標的細胞抗原は、腫瘍特異抗原である。本明細書に開示される接着受容体はまた、他の抗原、限定はされないが、ウイルス、細菌、真菌及び/又は寄生虫感染で冒された細胞を標的にするため、用いることができる。かかる場合、標的細胞抗原は、ウイルス、細菌、真菌又は寄生虫抗原である。

10

【0008】

標的細胞抗原の非限定例として、bcr-abl、CD19、GD2、GD3、Her-2、K-RAS、MAGE-1、MAGE-10、MAGE-12、MAGE-2、MAGE-3、MAGE-4、MAGE-6、MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A6、MAGE-B1、MAGE-B2、メソセリン、MUC1、MUC16、MUC2、MUM-1、MUM-2、MUM-3、ミオシン、NY-ESO、P53、PRAME、PSA、PSCA、PSMA、RAGE、SSX-2、サバイピン、サバイピン-2B、TGFArII、TGFBRII、VEGF-R2、及びWT1が挙げられる。一実施形態では、標的細胞抗原は、Her2である。一実施形態では、標的細胞抗原は、PSMAである。一実施形態では、標的細胞抗原は、CD123である。一実施形態では、標的細胞抗原は、GD-2である。一実施形態では、標的細胞抗原は、GD-3である。一実施形態では、標的細胞抗原は、NY-ESOである。一実施形態では、標的細胞抗原は、CD19である。いくつかの実施形態では、接着受容体は、CD123又はCD19を標的にしない。

20

【0009】

実施形態に応じて、標的細胞抗原に結合するため、種々の異なる部分を用いることができる。例えば、一実施形態では、標的細胞抗原に結合するペプチドは、モノクローナル抗体を含む。いくつかの実施形態では、モノクローナル抗体は、ハイブリドーマに由来する。ポリクローナル抗体もまた、実施形態に応じて用いられる。組換え抗体（例えば改変抗体）もまた、いくつかの実施形態では用いられる。例えば、いくつかの実施形態では、開発される抗体は、哺乳類、例えばヒトを治療するために用いられるとき、その活性又は安定性を促進するため、突然変異され得、換言すれば、該抗体は、ヒト化される。さらなる実施形態では、抗体の断片が用いられるが、標的細胞抗原への結合を保持する（又はさらに増強する）。例えば、いくつかの実施形態では、Fab、Fab'、(Fab')₂、Fv、又は一本鎖Fv(scFv)が用いられる。いくつかの実施形態では、免疫細胞を標的細胞に対して標的化するため、ミニボディ、二重特異性抗体、及び/又は単ドメイン抗体もまた用いられる。いくつかの実施形態では、接着受容体は、改変されなくてもよい（例えば、別の細胞型に対して天然であり、NK細胞内で全体として発現される）。いくつかの実施形態では、接着受容体は、scFvでない。いくつかの実施形態では、接着受容体は、目的の標的に特異的に結合する新規結合ドメイン含有ポリペプチド(DBDp)でない。DBDpについてのさらなる情報は、例えば、国際特許出願のPCT/米国特許出願公開第2016/025868号明細書及び/又はPCT/米国特許出願公開第2016/025880号明細書（それら各々の内容全体は参照により本明細書中に援用される）に見出すことができる。

30

40

【0010】

そのようなものとして、いくつかの実施形態では、標的細胞抗原に結合するペプチドは、一本鎖可変断片(scFv)であり、接着受容体は、抗Her2 scFvを含む。いくつかのかかる実施形態では、scFvは、配列番号58の核酸配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、scFvは、配列番号59のアミノ酸配列を含む。一実施形態では、接着受容体は、配列番号60の核酸配列によってコードされる。一実施形態で

50

は、接着受容体は、配列番号 61 のアミノ酸配列を含む。さらなる実施形態では、接着受容体は、抗 P S M A s c F v を含む。いくつかのかかる実施形態では、s c F v は、配列番号 62 の核酸配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、s c F v は、配列番号 63 のアミノ酸配列を含む。一実施形態では、接着受容体は、配列番号 64 の核酸配列によってコードされる。一実施形態では、接着受容体は、配列番号 65 のアミノ酸配列を含む。

【0011】

いくつかの実施形態では、特定のヌクレオチド又はアミノ酸配列が用いられる一方で、本明細書に提供されるさらなる実施形態では、かかる配列に対して約 75%、約 80%、約 85%、約 90%、約 95%、約 98%、又は約 99% の相同性があるヌクレオチド又はアミノ酸が用いられる。いくつかの実施形態では、パーセント相同性は、異なってもよい（例えばより低くてもよい）が、該構築物は、本明細書に具体的に開示される配列によってコードされるか又はそれを有する接着受容体の機能の少なくとも一部を保持する。

10

【0012】

接着受容体の発現は、該受容体を発現する免疫細胞（例えば NK 細胞）に種々の有利な特性を与える。例えば、いくつかの実施形態では、接着受容体を発現する NK 細胞は、接着受容体を発現しない NK 細胞と比べてより迅速に標的細胞に結合する。いくつかの実施形態では、接着受容体を発現する NK 細胞は、腫瘍又は感染部位に対して、接着受容体を発現しない NK 細胞と比べて増強されたホーミングを有する。いくつかの実施形態では、接着受容体を発現する NK 細胞は、標的細胞抗原を提示する細胞に対して、接着受容体を発現しない NK 細胞と比べて増強された細胞傷害活性を示す。いくつかの実施形態では、該ポリヌクレオチドによってコードされる接着受容体を発現する NK 細胞は、接着受容体を発現しない NK 細胞と比べて低減されたオプターゲット細胞傷害性効果を有する。

20

【0013】

いくつかの実施形態では、接着受容体の細胞外受容体ドメインはまた、任意選択的には第 1 のペプチドと異なる標的細胞抗原に結合する第 2 のペプチドを含む。いくつかの実施形態では、細胞外受容体ドメインはまた、任意選択的には、第 1 のペプチドと同じ標的細胞抗原に結合する第 2 のペプチドを含む。

【0014】

いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるポリヌクレオチドは、2 つ以上の接着受容体をコードする。例えば、いくつかの実施形態では、該ポリヌクレオチドは、いくつかのかかる実施形態では異なる標的細胞抗原に結合する、第 1 及び第 2 の接着受容体をコードしてもよい。しかし、いくつかの実施形態では、第 1 及び第 2（又は 2 を超える）の接着受容体は、同じ標的細胞抗原に結合するように設計される。さらにかかる実施形態では、接着受容体は、有利には免疫細胞の標的細胞への標的化の効率を増加させ得る、同じ標的細胞抗原の異なるエピトープに結合するように形成され得る。いくつかの実施形態では、追加的な生化学的相互作用又は特性が提供される。例えば、いくつかの実施形態では、接着受容体は、標的親和性を増強し得るように二量体化する（ホモ又はヘテロ二量体のいずれかの可能性がある）ように形成される。いくつかの実施形態では、細胞外受容体ドメインは、該受容体ドメインの所望される膜配向性を提供するため、シグナルペプチドをさらに含む。いくつかの実施形態では、細胞外受容体ドメインは、細胞外受容体ドメインの有効な標的化効率を場合によって低減し得る立体障害の低減及び/又は除去をもたらし得るヒンジ領域をさらに含む。

30

40

【0015】

いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるポリヌクレオチドはまた、キメラ受容体をコードする。例えば、いくつかの実施形態では、細胞外受容体ドメイン並びに膜貫通領域及び細胞内シグナル伝達ドメインを含むエフェクタードメインを含むキメラ受容体をコードするポリヌクレオチドが提供される。いくつかの実施形態では、キメラ受容体の細胞外受容体ドメインは、ナチュラルキラーグループ 2 メンバー D（NKGD2D）の天然リガンドに結合するペプチドを含む。いくつかの実施形態では、膜結合型インターロイキン

50

15 (m b I L 15) をコードするポリヌクレオチドもまた提供される。いくつかの実施形態では、単一のポリヌクレオチドが、接着受容体、キメラ受容体及び任意選択的には m b I L 15 をコードする。さらなる実施形態では、これらの様々な要素をコードするような 1 つ以上の構築物が用いられる。いくつかの実施形態では、該ポリヌクレオチドは、m R N A である。いくつかの実施形態では、該ポリヌクレオチドは、接着受容体の発現のため、少なくとも 1 つの調節エレメントに作動可能に連結される。

【0016】

ポリヌクレオチドに加えて、該ポリヌクレオチドを含むベクターが本明細書に提供され、該ベクターは、細胞、例えば免疫細胞（例えばNK細胞）においてポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質を送達し、且つその発現を促進するように形成される。いくつかの実施形態では、該ベクターは、レトロウイルス、例えばレンチウイルス又はHIVである。さらなる実施形態は、他のベクター、例えば、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、さらには非ウイルスベクター（例えばリポソーム）が提供される。

10

【0017】

加えて、本明細書に開示されるポリヌクレオチドを含み、且つ接着受容体を発現する遺伝子改変細胞、例えば免疫細胞が本明細書に提供される。様々な免疫細胞が、実施形態に応じて用いられる。いくつかの実施形態では、NK細胞が用いられる。いくつかの実施形態では、接着受容体を発現するように改変された自家細胞（例えばNK細胞）が提供される。さらなる実施形態では、本明細書に開示される接着受容体を発現するように改変された同種細胞（例えばNK細胞）が提供される。

20

【0018】

加えて、本明細書に提供されるポリペプチドによってコードされる接着受容体を発現するNK細胞を改変することによる、哺乳動物におけるNK細胞の細胞傷害性を増強するための方法が本明細書に提供される。さらなる実施形態は、さらにリガンド結合ドメイン及びシグナル伝達ドメインを含むキメラ受容体を発現し且つ/又はm b I L 15 を発現するようにNK細胞を改変することによる、増強されたNK細胞の細胞傷害性のさらなる提供に関する。実施形態に応じて、増強されたNK細胞の細胞傷害性は、がん、感染、又は別の病気を治療する、低減する、又はその他として寛解するために活用され得る。

【0019】

ナチュラルキラー（NK）細胞の細胞傷害性を増強するための細胞に基づく薬剤の製造における接着受容体をコードするポリヌクレオチドの使用もまた提供される。上で考察したように、薬剤の作製において、接着受容体は、標的細胞抗原に結合するように形成された細胞外受容体ドメイン、及び膜貫通ドメインを含み、ここで標的細胞抗原は、健常細胞と標的細胞との間で差次的に発現され、ここで膜貫通ドメインは、細胞外受容体ドメインをNK細胞の表面上に固着する。いくつかの実施形態では、標的細胞抗原は、P S M A、H e r 2、C D 1 2 3、G D - 2、G D - 3、N Y - E S O、及びC D 1 9 から選択される。いくつかの実施形態では、標的細胞抗原に結合する細胞外受容体ドメインは、抗体、F a b、又はs c F vを含む。

30

【0020】

上で概説され、以下でさらに詳細に示される組成物及び関連の方法は、施術者によってとられる特定の行動を説明するが、それらが別の団体によるそれら行動の指示も含み得ることが理解されるべきである。したがって、「接着受容体を発現するNK細胞の集団を投与すること」などの行動は、「接着受容体を発現するNK細胞の集団の投与を指示すること」を含む。

40

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図1】いくつかの実施形態に従う特定の構築物の膜結合抗H e r 2 s c F v (m b a H e r 2) のプラスミド（マウス幹細胞ウイルス（M S C V）プラスミドが図示される）への挿入点を図示するプラスミドマップを表す。E c o R I 及びX h o I 制限部位へのm b a H e r 2 構築物のベクターの挿入が表される。

50

【図2A - 2C】増殖された一次NK細胞の表面上でのmbaHer2の発現に関するフローサイトメトリーデータを表す。(図2A)非形質導入NK細胞、(図2B)GFPのみを有するベクターで形質導入されたNK細胞、及び(図2C)抗Her2 scFv及びGFPを有するベクターで形質導入されたNK細胞、のmbaHer2発現特性が表される。mbaHer2の発現は、アロフィコシアニン(APC)コンジュゲート抗Fab抗体によって検出された(Y軸)。ウイルス形質導入は、緑色蛍光タンパク質(GFP)シグナルにより示される(X軸)。

【図3A - 3B】(図3A)高レベルのHer2(Her2高/中間、SKBR3、SKOV3、LNCap、ZR751及び(図3B)低レベルのHer2(Her2不明瞭/陰性、DU145、PLC/PRF/5)を発現するがん細胞株に対する、モック形質導入NK細胞及びmbaHer2発現NK細胞の2:1のエフェクター:標的(E:T)比での4時間細胞傷害性アッセイに関するデータを表す。

【図4】Incucyte生細胞イメージングシステム(Essen)による測定としての、SKOV3細胞に対する、mbaHer2又はGFPのみを発現するNK細胞の長期細胞傷害性に関するデータを表す。1:1のE:Tで、最初にSKOV3細胞が蒔かれ、24時間後にNK細胞が添加された。3通りの測定値の平均±標準偏差が示される。

【図5A - 5C】1:1のエフェクター:標的比での、(図5A)NK細胞を伴わない培養、(図5B)GFPのみを発現するNK細胞との培養、又は(図5C)mbaHer2を発現するNK細胞との培養の6日後のmCherry標識SKOV3細胞の画像を表す。

【図6A - 6B】(図6A)移動距離及び(図6B)測定速度での、SKOV3細胞上に播種されたモック形質導入NK細胞又はmbaHer2を発現する形質導入NK細胞の追跡に関するデータを表す。

【図7A - 7B】(図7A)フローサイトメーターによるSKOV3細胞とのmbaHer2を発現するNK細胞の凝集、及び(図7B)(図7A)のQ1-UR象限内に存在する凝集体の定量化に関するデータを表す。

【図8A - 8H】GFPのみを有するベクターで形質導入されたNK細胞(図8A~D)、並びに抗Her2 scFv及びGFPを有するベクターで形質導入されたNK細胞(図8E~H)に対するSKOV3細胞の結合に関するデータを表す。データは、NK細胞を接着されたSKOV細胞に通流させ、免疫蛍光共焦点顕微鏡を用いて試験することにより収集された。

【図9A - 9C】図8のデータの6つの顕微鏡視野からの(図9A)ヘキスト染色、(図9B)GFP発現、及び(図9C)ヨウ化プロビジウム染色による、細胞の凝集細胞数に関するデータを表す。データは、NK細胞を接着されたSKOV細胞に通流させ、免疫蛍光共焦点顕微鏡を用いて試験することにより収集された。

【図10】いくつかの実施形態に従う特定の構築物の膜結合抗PSMA ScFv(mbaPSMA)のプラスミド(マウス幹細胞ウイルス(MSCV)プラスミドが図示される)への挿入点を図示するプラスミドマップを表す。ベクターのEcoRI及びXhoI制限部位へのmbaPSMA構築物の挿入が表される。

【図11A - 11C】フローサイトメトリーによる増殖された一次NK細胞の表面上でのmbaPSMAの発現を表す。(図11A)非形質導入NK細胞、(図11B)GFPのみを有するベクターで形質導入されたNK細胞、及び(図11C)抗PSMA scFv及びGFPを有するベクターで形質導入されたNK細胞、のmbaPSMA発現特性が示される。mbaPSMAの発現は、アロフィコシアニン(APC)コンジュゲート抗Fab抗体によって検出された(Y軸)。ウイルス形質導入は、緑色蛍光タンパク質(GFP)シグナルによって示される(X軸)。

【図12】本発明のいくつかの実施形態に従う構築物及びその部分の非限定的実施形態を提供する。

【図13】DU145細胞に対する、本明細書に開示される構築物の非限定例の細胞傷害性効果を評価するために用いられる細胞傷害性アッセイに関するデータを表す。

10

20

30

40

50

【図14】LNCaP細胞に対する、本明細書に開示される構築物の非限定例の細胞傷害性効果を評価するために用いられる細胞傷害性アッセイに関するデータを表す。

【図15】本明細書に開示される構築物の非限定例を用いての注射したSKOV3細胞に対する細胞傷害性のインビボ評価に関するデータを表す。

【発明を実施するための形態】

【0022】

多くの疾患の基礎をなす（ウイルス感染及び悪性細胞を含む）異常細胞の出現及び持続は、前記異常細胞に対する不十分な免疫応答によって可能になる。免疫療法の目標は、患者の免疫系の応答を開始又は増強する例えば免疫細胞、例えばナチュラルキラー（NK）細胞が損傷又は異常細胞を損傷させるか、殺滅するか、又は他に阻害する能力を後押しすることである。1つの免疫療法アプローチは、異常細胞の標的認識（それを原因で生じる可能性があるそれらの破壊）のための免疫細胞における接着受容体の組換え発現である。一般に、本明細書に記載のような接着受容体は、標的細胞上のリガンドを認識する細胞外受容体ドメイン及びアンカー膜貫通ドメインを含む。

10

【0023】

本明細書に開示されるいくつかの実施形態では、その一般構造を有する、又はその一般構造におけるバリエーションを有する接着受容体が用いられる。以下により詳細に考察される通り、実施形態により、免疫細胞（例えばNK細胞）において所望の程度の発現を示し、非標的細胞に対する有害作用を回避する程度の標的結合活性と平衡した、NK細胞から細胞傷害活性を誘導する接着受容体構築物を作製するため、切断、突然変異、追加的なリンカー/スペーサーエレメント、二量体などが用いられる。免疫細胞の表面上での本明細書で開示されるような接着受容体の組換え発現により、目的の異常細胞に対する免疫細胞の標的化が再誘導され、且つ会合時の免疫活性化が増強される可能性がある。

20

【0024】

免疫療法のためのNK細胞

1つの免疫療法アプローチは、受容体を発現するように操作されたT細胞を患者に投与し、陽性免疫応答を誘発することを含む。しかし、この手法の欠点は、患者における移植片対宿主病の誘導を予防するために自家細胞の使用が必要である点である。本明細書に開示されるいくつかの実施形態において提供される通り、改変NK細胞を含む組成物は、いくつかの利点を享受し、かかる利点は、本明細書に開示される標的化方法及び組成物によって増強される。例えば、自家又はドナー由来同種細胞のいずれかは、NK細胞アプローチで用いることができる。加えて、いくつかの実施形態によると、操作されたNK細胞は、正常細胞に対して細胞傷害性を増強することが有意でない。さらに、NK細胞は、活性化されると、有意な細胞傷害性効果を有する。これを考慮すると、本明細書で提供されるような操作されたNK細胞が、その細胞傷害性効果をさらに高めることにより、罹患した標的細胞を選択的に殺滅するといったさらにより有効な手段を提供し得ることは、想定外である。したがって、いくつかの実施形態では、癌又は感染性疾患を治療又は予防する方法であって、治療有効量の、本明細書に記載の接着受容体を発現するNK細胞を投与することを含む方法が提供される。一実施形態では、投与されるNK細胞は、自家細胞である。さらなる実施形態では、投与されるNK細胞は、ドナー由来（同種）細胞である。

30

40

【0025】

いくつかの実施形態では、接着受容体を発現する（例えば、標的細胞上のリガンドに結合することによる）組換えNK細胞の会合及び活性化により、細胞溶解によるストレス及び/又は異常細胞（例えば、腫瘍細胞、ウイルス感染細胞など）の直接的殺滅がもたらされる。したがって、いくつかの実施形態では、NK細胞の細胞傷害性を増強する方法であって、本明細書に記載の接着受容体を発現するように操作されたNK細胞を投与することを含む方法が提供される。一実施形態では、投与されるNK細胞は、自家細胞である。さらなる実施形態では、NK細胞は、ドナー由来（同種）細胞である。いくつかの実施形態では、操作されたNK細胞は、ストレス及び/又は異常細胞（例えば、腫瘍細胞、ウイルス感染細胞など）の間接的破壊又は阻害をもたらす。

50

【0026】

細胞外受容体ドメイン

上述の通り、いくつかの実施形態では、NK細胞は、腫瘍細胞及びウイルス感染細胞を含む異常細胞を認識し、破壊する。NK細胞活性化の第1段階は、形質転換及び/又は感染細胞とNK細胞との間の初期接着であり、そこでは様々な細胞外タンパク質（例えばセレクチン及びインテグリン）が2つの細胞を一緒に連結することが提示されている。一旦界面が形成されると、これらの自然免疫細胞の細胞傷害活性は、細胞表面上に存在する阻害性及び活性化受容体各々からのシグナル伝達の平衡により調節される。前者は、健常細胞の表面上で発現される自己分子に結合する一方で、後者は、異常細胞上に発現されるリガンドに結合する。阻害性受容体と比べての活性化受容体の増強された会合により、NK細胞活性化及び標的細胞溶解がもたらされる。

10

【0027】

NK細胞が腫瘍細胞及びウイルス感染細胞を含む異常細胞を認識し、破壊する能力から、（キメラ受容体に基づく免疫療法アプローチを含む）免疫療法アプローチの構成要素が潜在的に有用になる。しかし、NK細胞の使用を複雑化していることは、NK細胞の標的細胞への不十分な送達、標的細胞でのNK細胞の蓄積速度が遅いこと、健常細胞の会合、及び/又はオフターゲット死滅時のNK細胞による標的細胞の不十分な死滅である。本明細書に開示されるいくつかの実施形態によると、接着受容体をコードするポリヌクレオチドが提供され、ここでかかる受容体を発現する細胞外受容体ドメインは、標的細胞上の抗原に結合する。いくつかの実施形態では、接着受容体は、専ら標的細胞の結合を目的とする（例えば、それはシグナル伝達機能を果たさない）。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される接着受容体を発現するNK細胞は、より迅速に（例えば、より早く、より効率的に）標的細胞に会合する。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される接着受容体を発現するNK細胞は、標的細胞（例えば罹患又は損傷細胞）に対してより強力な細胞傷害性を有する。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される接着受容体を発現するNK細胞は、標的細胞のより多くの部分を殺滅する。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される接着受容体を発現するNK細胞は、殺滅する健常オフターゲット細胞がより少ない。

20

【0028】

いくつかの実施形態では、細胞外受容体ドメインは、膜結合抗原、例えば細胞（例えば標的細胞）の細胞外表面の抗原に結合する。いくつかの実施形態では、抗原は、腫瘍抗原である。いくつかの実施形態では、腫瘍抗原は、腫瘍特異抗原（例えば、腫瘍細胞に特有であり、且つ身体における他の細胞内又は細胞上で生じない抗原）である。いくつかの実施形態では、腫瘍抗原は、腫瘍関連抗原（例えば、腫瘍細胞に特有でなく、且つ抗原に対する免疫応答を誘導しない条件下で正常細胞内又は正常細胞上でも発現される抗原）である。いくつかの実施形態では、細胞外受容体ドメインは、疾患に関連する抗原に結合する。抗原は、ウイルス、細菌、及び/若しくは寄生虫感染；炎症性及び/若しくは自己免疫性疾患；又はがん及び/若しくは腫瘍などの新生物といった疾患に関連し得る。

30

【0029】

いくつかの実施形態では、抗原は、健常細胞と標的細胞との間で差次的に発現される。いくつかの実施形態では、抗原の発現は、健常及び標的細胞において同じであるが、本明細書に開示される接着受容体を発現するNK細胞による健常細胞の殺滅は、健常細胞がNK細胞活性化のリガンド特性を欠くことから最小である。

40

【0030】

いくつかの実施形態では、細胞外受容体ドメインは、抗原に対する内因性受容体を含む。いくつかの実施形態では、接着受容体の細胞外受容体ドメインは、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、組換え抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、又はそれらの機能的誘導体、変異体若しくは断片を含み、限定はされないが、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、一本鎖Fv(scFv)、ミニボディ、二重特異性抗体、及び単ドメイン抗体、例えば、重鎖可変ドメイン(VH)、軽鎖可変ドメイン(VL)、及びラクダ類由来ナノ

50

ボディの可変ドメイン (VHH) を含む。いくつかの実施形態では、細胞外受容体ドメインは、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、及びscFvの少なくとも1つを含む。しかし、いくつかの実施形態では、標的細胞上の目的の標的に特異的に結合するscFvや新規結合ドメイン含有ポリペプチド (DBDP) のいずれも、接着受容体として用いられない。

【0031】

いくつかの実施形態では、細胞外受容体ドメインは、例えば、がん、感染、又は他の疾患に関連した抗原に結合するように形成される。例えば、いくつかの実施形態では、細胞外受容体ドメインは、抗原：NY-ESO、CD19、CD123、GD-2、GD-3、デクチン1、Her2、及びPSMAの1つ以上に結合する。これらの抗原の組み合わせは、いくつかの実施形態では、複数又は組み合わせの細胞外受容体ドメインを発現する免疫細胞、又は様々な抗原に特異的な種々の細胞外ドメインを発現する免疫細胞の集団のいずれかによって標的にされる。いくつかの実施形態では、接着受容体は、CD19やCD123のいずれも標的にしない。

【0032】

細胞外受容体ドメインによって結合され得る抗原の非限定例として、限定はされないが、1-40 - -アミロイド、4-1BB、5AC、5T4、707-AP、Aキナーゼアンカータンパク質4 (AKAP-4)、アクチビン受容体タイプ2B (ACVR2B)、アクチビン受容体様キナーゼ1 (ALK1)、腺がん抗原、アディポフィリン、アドレナリン受容体3 (ADRB3)、AGS-22M6、葉酸受容体、-フェトプロテイン (AFP)、AIM-2、未分化リンパ腫キナーゼ (ALK)、アンドロゲン受容体、アンジオポエチン2、アンジオポエチン3、アンジオポエチン結合細胞表面受容体2 (Tie2)、炭疽菌毒素、AOC3 (VAP-1)、B細胞成熟抗原 (BCMA)、B7-H3 (CD276)、バチルス・アントラシス (*Bacillus anthracis*) 炭疽菌、B細胞活性化因子 (BAFF)、Bリンパ腫細胞、骨髄間質細胞抗原2 (BST2)、Brother of the Regulator of Imprinted Sites (BORIS)、C242抗原、C5、CA-125、がん抗原125 (CA-125又はMUC16)、がん/精巢抗原1 (NY-ESO-1)、がん/精巢抗原2 (LAGE-1a)、炭酸脱水酵素9 (CA-IX)、癌胎児性抗原 (CEA)、心臓ミオシン、CCCTC結合因子 (CTCF)、CCL11 (エオタキシン-1)、CCR4、CCR5、CD11、CD123、CD125、CD140a、CD147 (ペイジジン)、CD15、CD152、CD154 (CD40L)、CD171、CD179a、CD18、CD19、CD2、CD20、CD200、CD22、CD221、CD23 (IgE受容体)、CD24、CD25 (IL-2受容体の鎖)、CD27、CD274、CD28、CD3、CD3I、CD30、CD300分子様ファミリーメンバーf (CD300LF)、CD319、(SLAMF7)、CD33、CD37、CD38、CD4、CD40、CD40リガンド、CD41、CD44v7、CD44v8、CD44v6、CD5、CD51、CD52、CD56、CD6、CD70、CD72、CD74、CD79A、CD79B、CD80、CD97、CEA関連抗原、CFD、ch4D5、染色体Xオープンリーディングフレーム61 (CXORF61)、クローディン18.2 (CLDN18.2)、クローディン6 (CLDN6)、クロストリジウム・ディフィシレ (*Clostridium difficile*)、凝集因子A、CLCA2、コロニー刺激因子1受容体 (CSF1R)、CSF2、CTLA-4、C型レクチンドメインファミリー12メンバーA (CLEC12A)、C型レクチン様分子1 (CCL-1又はCLECL1)、C-X-Cケモカイン受容体タイプ4、サイクリンB1、チトクロムP4501B1 (CYP1B1)、cyp-B、サイトメガロウイルス (cytomegalovirus)、サイトメガロウイルス糖タンパク質B、ダビガトラン、DLL4、DPP4、DR5、大腸菌志賀毒素1型、大腸菌志賀毒素2型、エクト-ADP-リポシルトランスフェラーゼ4 (ART4)、EGF様モジュール含有ムチン様ホルモン受容体様2 (EMR2)、EGF様ドメインマルチプル7 (EGFL7)、伸長因子2突然

10

20

30

40

50

変異 (E L F 2 M)、内毒素、エフリン A 2、エフリン B 2、エフリン A 型受容体 2、上皮成長因子受容体 (E G F R)、上皮成長因子受容体変異体 I I I (E G F R v I I I)、エプシアリン、上皮細胞接着分子 (E p C A M)、上皮糖タンパク質 2 (E G P - 2)、上皮糖タンパク質 4 0 (E G P - 4 0)、E R B B 2、E R B B 3、E R B B 4、E R G (膜貫通プロテアーゼ、セリン 2 (T M P R S S 2) E T S 融合遺伝子)、大腸菌 (E s c h e r i c h i a c o l i)、染色体 1 2 p に位置する E T S 転座変異体遺伝子 6 (E T V 6 - A M L)、呼吸器シンシチウムウイルスの F タンパク質、F A P、I g A 受容体の F c 断片 (F C A R 又は C D 8 9)、F c 受容体様 5 (F C R L 5)、胎児アセチルコリン受容体、フィブリン I I 鎖、線維芽細胞活性化タンパク質 (F A P)、フィブロネクチン外部ドメイン B、F G F - 5、F m s 様チロシンキナーゼ 3 (F L T 3)、葉酸結合タンパク質 (F B P)、葉酸ヒドロラーゼ、葉酸受容体 1、葉酸受容体、葉酸受容体、F o s 関連抗原 1、F r i z z l e d 受容体、フコシル G M 1、G 2 5 0、G タンパク質共役受容体 2 0 (G P R 2 0)、G タンパク質共役受容体クラス C グループ 5、メンバー D (G P R C 5 D)、ガングリオシド G 2 (G D 2)、G D 3 ガングリオシド、糖タンパク質 1 0 0 (g p 1 0 0)、グリピカン 3 (G P C 3)、G M C S F 受容体鎖、G P N M B、G n T - V、増殖分化因子 8、G U C Y 2 C、熱ショックタンパク質 7 0 - 2 突然変異 (m u t h s p 7 0 - 2)、ヘマグルチニン、A 型肝炎ウイルス細胞受容体 1 (H A V C R 1)、B 型肝炎表面抗原、B 型肝炎ウイルス、H E R 1、H E R 2 / n e u、H E R 3、g l o b o H グリコセラミド (G l o b o H) の六糖部分、H G F、H H G F R、高分子量メラノーマ関連抗原 (H M W - M A A)、ヒストン複合体、H I V - 1、H L A - D R、H N G F、H s p 9 0、H S T - 2 (F G F 6)、ヒトパピローマウイルス E 6 (H P V E 6)、ヒトパピローマウイルス E 7 (H P V E 7)、ヒト散乱因子受容体キナーゼ、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (h T E R T)、ヒト T N F、I C A M - 1 (C D 5 4)、i C E、I F N - 、I F N - 、I F N - 、I g E、I g E F c 領域、I G F - 1、I G F - 1 受容体、I G H E、I L - 1 2、I L - 1 3、I L - 1 7、I L - 1 7 A、I L - 1 7 F、I L - 1 、I L - 2 0、I L - 2 2、I L - 2 3、I L - 3 1、I L - 3 1 R A、I L - 4、I L - 5、I L - 6、I L - 6 受容体、I L - 9、免疫グロブリン 様ポリペプチド 1 (I G L L 1)、インフルエンザ A 型ヘマグルチニン、インスリン様増殖因子 1 受容体 (I G F - I 受容体)、インスリン様増殖因子 2 (I L G F 2)、インテグリン 4 7、インテグリン 2、インテグリン 2、インテグリン 4、インテグリン 5 1、インテグリン 7 7、インテグリン I I b 3、インテグリン v 3、インターフェロン / 受容体、インターフェロン 誘導性タンパク質、インターロイキン 1 1 受容体 (I L - 1 1 R)、インターロイキン 1 3 受容体サブユニット - 2 (I L - 1 3 R 2 又は C D 2 1 3 A 2)、腸管カルボキシルエステラーゼ、キナーゼドメイン領域 (K D R)、K I R 2 D、K I T (C D 1 1 7)、L 1 細胞接着分子 (L 1 - C A M)、レグマイン、白血球免疫グロブリン様受容体サブファミリー A メンバー 2 (L I L R A 2)、白血球関連免疫グロブリン様受容体 1 (L A I R 1)、ルイス Y 抗原、L F A - 1 (C D 1 1 a)、L I N G O - 1、リボテイコ酸、L O X L 2、L - セレクチン (C D 6 2 L)、リンパ球抗原 6 複合体、遺伝子座 K 9 (L Y 6 K)、リンパ球抗原 7 5 (L Y 7 5)、リンパ球特異タンパク質チロシンキナーゼ (L C K)、リンホトキシン - (L T -) 又は腫瘍壊死因子 - (T N F -)、マクロファージ遊走阻止因子 (M I F 又は M M I F)、M - C S F、乳腺分化抗原 (N Y - B R - 1)、M C P - 1、黒色腫がん精巢抗原 - 1 (M A D - C T - 1)、黒色腫がん精巢抗原 - 2 (M A D - C T - 2)、アポトーシスの黒色腫阻害剤 (M L - I A P)、黒色腫関連抗原 1 (M A G E - A 1)、メソセリン、ムチン 1、細胞表面関連 (M U C 1)、M U C - 2、ムチン C a n A g、ミエリン関連糖タンパク質、ミオスタチン、N - アセチルグルコサミニル - トランスフェラーゼ V (N A 1 7)、N C A - 9 0 (顆粒球抗原)、神経成長因子 (N G F)、神経アポトーシス調節プロテインナーゼ 1、神経細胞接着分子 (N C A M)、神経突起伸長阻害剤 (例えば、N O G O - A、N O G O - B、N O G O - C)、ニューロピリン - 1 (N R P 1)、N - グリコリルノイラミン酸、N K G 2 D、ノッチ受

容体、o - アセチル - GD2 ガングリオシド (OAcGD2)、嗅覚受容体 51E2 (OR51E2)、がん胎児性抗原 (h5T4)、ブレークポイントクラスター領域 (BCR) 及び Abelson ネズミ白血病ウイルスがん遺伝子ホモログ 1 (Ab1) (bcr-ab1) からなるがん遺伝子融合タンパク質、アナウサギ (*Oryctolagus cuniculus*)、OX-40、oxLDL、p53 突然変異体、ペアードボックスタンパク質 Pax-3 (PAX3)、ペアードボックスタンパク質 Pax-5 (PAX5)、パネキシン 3 (PANX3)、リン酸ナトリウム共輸送体、ホスファチジルセリン、胎盤特異的 1 (PLAC1)、血小板由来増殖因子受容体 (PDGF-R)、血小板由来増殖因子受容体 (PDGFR-)、ポリシアル酸、プロアクロシン結合タンパク質 sp32 (OY-TE51)、プログラム細胞死タンパク質 1 (PD-1)、プロタンパク質転換酵素スプチリシン/ケキシタイプ 9 (PCSK9)、プロスターゼ、前立腺がん腫瘍抗原 - 1 (PCTA-1 又はガレクチン 8)、T 細胞 1 によって認識される黒色腫瘍抗原 (MelanA 又は MART1)、P15、P53、PRAME、前立腺幹細胞抗原 (PSCA)、前立腺特異膜抗原 (PSMA)、前立腺酸性ホスファターゼ (PAP)、前立腺がん細胞、プロステイン、プロテアーゼセリン 21 (テストイシン又は PRSS21)、プロテアソーム (プロソーム、マクロパイン) サブユニット、ue タイプ、9 (LMP2)、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、狂犬病ウイルス糖タンパク質、RAGE、Ras ホモログファミリーメンバー C (RhoC)、核内因子 - B リガンドの受容体 アクチベーター (RANKL)、終末糖化産物受容体 (RAGE-1)、受容体 チロシナーゼ様 オーフアン受容体 1 (ROR1)、腎ユビキタス (renal ubiquitous) 1 (RU1)、腎ユビキタス 2 (RU2)、呼吸器多核体ウイルス (呼吸器シンシチウムウイルス)、Rh 血液群 D 抗原、アカゲザル因子、肉腫転座ブレークポイント、スクレロスチン (SOST)、セレクチン P、シアリルルイス接着分子 (sLe)、精子タンパク質 17 (SPA17)、スフィンゴシン - 1 - リン酸、T 細胞 1、2、及び 3 によって認識される扁平上皮がん抗原 (SART1、SART2、及び SART3)、ステージ特異的胚性抗原 - 4 (SSEA-4)、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)、STEAP1、サバイビング (surviving)、シンデカン 1 (SDC1) + A314、SOX10、サバイピン、サバイビング (surviving) 2B、滑膜肉腫、Xブレークポイント 2 (SSX2)、T 細胞受容体、TCR 選択的リーディングフレームタンパク質 (TARP)、テロメラーゼ、TEM1、テネイシン C、TGF- (例えば、TGF- 1、TGF- 2、TGF- 3)、甲状腺刺激ホルモン受容体 (TSHR)、組織因子経路阻害剤 (TFPI)、Tn 抗原 (Tn Ag) 又は (GalNAcI-Ser/Thr)、TNF 受容体ファミリーメンバー B 細胞成熟 (BCMA)、TNF-I、TRAIL-R1、TRAIL-R2、TRG、トランスグルタミナーゼ 5 (TGS5)、腫瘍抗原 CTA A16.88、腫瘍内皮マーカー 1 (TEM1/CD248)、腫瘍内皮マーカー 7 関連 (TEM7R)、腫瘍タンパク質 p53 (p53)、MUC1 の腫瘍特異的グリコシル化、腫瘍関連カルシウムシグナルトランスデューサー 2、腫瘍関連糖タンパク質 72 (TAG72)、腫瘍関連糖タンパク質 72 (TAG-72) + A327、TWEAK 受容体、チロシナーゼ、チロシナーゼ関連タンパク質 1 (TYRP1 又は糖タンパク質 75)、チロシナーゼ関連タンパク質 2 (TYRP2)、ウロプラキン 2 (UPK2)、血管内皮増殖因子 (例えば、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、PIGF)、血管内皮増殖因子受容体 1 (VEGFR1)、血管内皮増殖因子受容体 2 (VEGFR2)、

ビ

メンチン、v-myctri 骨髄細胞腫瘍ウイルスがん遺伝子神経芽細胞腫由来ホモログ (MYCN)、フォン・ヴィルブランド因子 (VWF)、ウィルムス腫瘍タンパク質 (WT1)、X 抗原ファミリー、メンバー 1A (XAGE1)、707-AP、ピオチン化分子、a-アクチニン - 4、abl-bcr al b-b3 (b2a2)、abl-bcr al b-b4 (b3a2)、アディポフィリン、AFP、AIM-2、アネキシン II、ART-4、BAGE、b-カテニン、bcr-ab1、bcr-ab1 p190 (e

10

20

30

40

50

1 a 2)、bcr-abl p210 (b2a2)、bcr-abl p210 (b3a2)、BING-4、CAG-3、CAIX、CAMEL、カスパーゼ-8、CD171、CD19、CD20、CD22、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44v7/8、CDC27、CDK-4、CEA、CLCA2、Cyp-B、DAM-10、DAM-6、DEK-CAN、EGFRvIII、EGP-2、EGP-40、ELF2、Ep-CAM、EphA2、EphA3、erb-B2、erb-B3、erb-B4、ES-ESO-1a、ETV6/AML、FBP、胎児アセチルコリン受容体、FGF-5、FN、G250、GAGE-1、GAGE-2、GAGE-3、GAGE-4、GAGE-5、GAGE-6、GAGE-7B、GAGE-8、GD2、GD3、GnT-V、Gp100、gp75、Her-2、HLA-A*0201-R170I、HMW-MAA、HSP70-2M、HST-2 (FGF6)、HST-2/neu、hTERT、iCE、IL-11RI、IL-13RI2、KDR、KIAA0205、K-RAS、L1-細胞接着分子、LAGE-1、LDLR/FUT、ルイスY、MAGE-1、MAGE-10、MAGE-12、MAGE-2、MAGE-3、MAGE-4、MAGE-6、MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A6、MAGE-B1、MAGE-B2、リンゴ酸酵素、マンマグロビン-A、MART-1/メラニン-A、MART-2、MC1R、M-CSF、メソセリン、MUC1、MUC16、MUC2、MUM-1、MUM-2、MUM-3、ミオシン、NA88-A、Neo-PAP、NKG2D、NPM/ALK、N-RAS、NY-ESO-1、OA1、OGT、がん胎児性抗原 (h5T4)、OS-9、Pポリペプチド、P15、P53、PRAME、PSA、PSCA、PSMA、PTPRK、RAGE、ROR1、RU1、RU2、SART-1、SART-2、SART-3、SOX10、SSX-2、サバイピン、サバイピン-2B、SYT/SSX、TAG-72、TEL/AML1、TGFaRII、TGFbRII、TP1、TRAG-3、TRG、TRP-1、TRP-2、TRP-2/INT2、TRP-2-6b、チロシナーゼ、VEGF-R2、及びWT1が挙げられる。いくつかの実施形態では、細胞外受容体ドメインは、抗体に結合し、次いで上記の抗原に結合する。いくつかの実施形態では、細胞外受容体ドメインは、上記の抗原に結合する抗体のFcドメインに結合する。

【0033】

いくつかの実施形態では、細胞外受容体ドメインは、20-(74)-(74) (ミラツズマブ;ベルツズマブ)、20-2b-2b、3F8、74-(20)-(20) (ミラツズマブ;ベルツズマブ)、8H9、A33、AB-16B5、アバゴボマブ、アブシキシマブ、アビツズマブ、ABP494 (セツキシマブバイオシミラー)、アブリルマブ (abriolumab)、ABT-700、ABT-806、Actimab-A (アクチニウムAc-225リンツズマブ)、アクトクスマブ、アダリムマブ、ADC-1013、ADCT-301、ADCT-402、アデカツムマブ、アデュカヌマブ、アフエリモマブ、AFM13、アフツズマブ、AGEN1884、AGS15E、AGS-16C3F、AGS67E、アラシズマブペゴール、ALD518、アレムツズマブ、アリロクマブ、アルツモマブペンテテート、アマツキシマブ、AMG228、AMG820、アナツモマブマフェナトクス、アネツマブラブタンシン、アニフロルマブ、アンルキンズマブ、APN301、APN311、アポリズマブ、APX003/SIM-BD0801 (セバシズマブ)、APX005M、アルシツモマブ、ARX788、アスクリンバクマブ、アセリズマブ、ASG-15ME、アテゾリズマブ、アチヌマブ、ATL101、アトリズマブ (トシリズマブとも称される)、アトロリムマブ、アベルマブ、B-701、バピネオズマブ、バシリキシマブ、バビツキシマブ、BAY1129980、BAY1187982、ベクツモマブ、ベゲロマブ、ベリムマブ、ベンラリズマブ、ベルチリムマブ、ベシレソマブ、Beta lutin (177Lu-テトラキセタン-テツロマブ)、ベバシズマブ、BEVZ92 (ベバシズマブバイオシミラー)、ベズロトクスマブ、BGB-A317、BHQ880、BI836880、BI-505、ビシロマブ、ピマゲルマブ、ピメキズマブ、ピバツツマブメルタンシン、BIW-8962、プリナツモマブ、プロ

ソズマブ、BMS - 936559、BMS - 986012、BMS - 986016、BMS - 986148、BMS - 986178、BNC101、ボコシズマブ、ブレンツキシマブベドチン、ブレバレックス (BrevaRex)、プリアキヌマブ、プロダルマブ、プロルシズマブ、ブロンチクツズマブ、C2 - 2b - 2b、カナキヌマブ、カンツズマブメルタンシン、カンツズマブラブタンシン、カブラシズマブ、カプロマブペンデチド、カルルマブ、カツマキソマブ、CBR96 - ドキソルピシン免疫複合体、CBT124 (ベバシズマブ)、CC - 90002、CDX - 014、CDX - 1401、セデリズマブ、セルトリズマブペゴル、セツキシマブ、CGEN - 15001T、CGEN - 15022、CGEN - 15029、CGEN - 15049、CGEN - 15052、CGEN - 15092、Ch. 14. 18、シタツズマブボガトクス、シズツムマブ、クラザキズマブ、クレノリキシマブ、クリバツズマブテトラキセタン、CM - 24、コドリツズマブ、コルツキシマブラブタンシン、コナツムマブ、コンシズマブ、cR6261、クレネズマブ、DA - 3111 (トラスツズマブバイオシミラー)、ダセツズマブ、ダクリズマブ、ダロツズマブ、ダピロリズマブペゴル、ダラツムマブ、Daratumumab Enhance (ダラツムマブ)、Darleukin、デクトレクマブ、デミシズマブ、デニンツズマブマホドチン、デノスマブ、デパツキシズマブ、デパツキシズマブマホドチン、デルロツキシマブピオチン、デツモマブ、DI - B4、ジヌツキシマブ、ジリダブマブ、DKN - 01、DMOT4039A、ドルリモマブアリトクス、ドロジツマブ、DS - 1123、DS - 8895、デュリゴツマブ、デュビルマブ、デュルバルマブ、ドゥシギツマブ、エクロメキシマブ、エクリズマブ、エドバコマブ、エドレコロマブ、エファリズマブ、エフングマブ、エルデルマブ、エルゲムツマブ、エロツズマブ、エルシリモマブ、エマクツマブ、エミベツズマブ、エナバツズマブ、エンホルツマブベドチン、エンリモマブペゴル、エノビリツズマブ、エノキズマブ、エノチクマブ、エンシツキシマブ、エピツモマブシツキセタン、エブラツズマブ、エルリズマブ、エルツマキソマブ、エタラシズマブ、エトロリズマブ、エピナクマブ、エボロクマブ、エキシビビルマブ、ファノレソマブ、ファラリモマブ、ファーレッツズマブ、ファシヌマブ、FBTA05、フェルビズマブ、フェザキヌマブ、FF - 21101、FGFR2抗体薬剤コンジュゲート、フィブロムン (Fibromun)、フィクラツズマブ、フィギツムマブ、フィリブマブ、フランボツマブ、フレクマブ、フォントリズマブ、フォルルマブ、フォルビルマブ、FPA144、フレソリムマブ、FS102、フルラヌマブ、フツキシマブ、ガリキシマブ、ガニツマブ、ガントネルマブ、ガビリモマブ、ゲムツズマブオゾガマイシン、Gerilimumab、ゲボキズマブ、ギレンツキシマブ、グレンバツムマブベドチン、GNR - 006、GNR - 011、ゴリムマブ、ゴミリキシマブ、GSK2849330、GSK2857916、GSK3174998、GSK3359609、グセルクマブ、Hu14. 18K322A MA b、hu3S193、Hu8F4、HuL2G7、HuMab - 5B1、イバリズマブ、イブリツモマブチウキセタン、イクルクマブ、イダルシズマブ、IGN002、IGN523、イゴボマブ、IMAB362、IMAB362 (クローディキシマブ)、イマルマブ、IMC - CS4、IMC - D11、イムシロマブ、イムガツズマブ、IMGN529、IMMU - 102 (イットリウムY - 90エブラツズマブテトラキセタン)、IMMU - 114、Immune Tune IMP701アンタゴニスト抗体、INCAGN1876、インクラクマブ、INCSHR1210、インダツキシマブラブタンシン、インデュサツマブベドチン、インフリキシマブ、イノリモマブ、イノツズマブオゾガマイシン、インテツムマブ、Ipafricept、IPH4102、イビルムマブ、イラツムマブ、イサツキシマブ、イスチラツマブ、イトリズマブ、イキセキズマブ、JNJ - 56022473、JNJ - 61610588、ケリキシマブ、KTN3379、L19IL2 / L19TNF、ラベツズマブ、ラベツズマブゴビテカン、LAG525、ランプロリズマブ、ラムパリズマブ、L - DOS47、レブリキズマブ、レマレソマブ、レンジルマブ、レルデリムマブ、ロイコツキシマブ、レクサツムマブ、リビビルマブ、リファスツズマブベドチン、リゲリズマブ、リロトマブサテトラキセタン、リンツズマブ、リリルマブ、LKZ145、ロデルシズマブ、ロキベトマブ、ロルボツズマブメルタンシン

10

20

30

40

50

、ルカツムマブ、ルリズムマブペゴル、ルミリキシマブ、ルムレッズマブ、LY31645
 30、マパツズマブ、マルゲツキシマブ、マスリモマブ、マツズマブ、マブリリムマブ、
 MB311、MCS-110、MEDI0562、MEDI-0639、MEDI068
 0、MEDI-3617、MEDI-551(イネビリズムマブ)、MEDI-565、M
 EDI6469、メボリズムマブ、メテリムマブ、MGB453、MGD006/S808
 80、MGD007、MGD009、MGD011、ミラツズマブ、ミラツズマブ-SN
 -38、ミンレッズマブ、ミルベツキシマブソラブタンシン、ミツモマブ、MK-416
 6、MM-111、MM-151、MM-302、モガムリズムマブ、MOR202、MO
 R208、MORAb-066、モロリムマブ、モタビズマブ、モキセツモマブシュード
 トクス、ムロモナブ-CD3、ナコロマブタフェナトクス、ナミルマブ、ナブツモマブエ
 スタフェナトクス、ナルナツマブ、ナタリズムマブ、ネバクマブ、ネシツムマブ、ネモリズ
 マブ、ネレリモマブ、ネスバクマブ、ニモツズマブ、ニボルマブ、ノフェツモマブメルペ
 ンタン、NOV-10、オビルトキサキシマブ、オビヌツズマブ、オカラツズマブ、オク
 レリズムマブ、オデュリモマブ、オフアツムマブ、オララツマブ、オロキズマブ、オマリズ
 マブ、OMP-131R10、OMP-305B83、オナルツズマブ、オンツキシズマ
 ブ、オピシヌマブ、オボルツズマブモナトクス、オレゴボマブ、オルチクマブ、オテリキ
 シズマブ、オトレルツズマブ、OX002/MEN1309、オキセルマブ、オザネズマ
 ブ、オゾラリズムマブ、パギバキシマブ、パリビズマブ、パニツムマブ、パンコマブ、Pa
 nkoMab-GEX、パノバクマブ、バルサツズマブ、バスコリズムマブ、バソツキシズ
 マブ、パテクリズマブ、パトリツマブ、PAT-SC1、PAT-SM6、ペンプロリズム
 マブ、ペムツモマブ、ペラキズマブ、ペルツズマブ、パキセリズムマブ、PF-05082
 566(ウトミルマブ)、PF-06647263、PF-06671008、PF-0
 6801591、ピディリズムマブ、ピナツズマブベドチン、ピンツモマブ、ブラクルマブ
 、ポラツズマブベドチン、ポネズマブ、ブリリキシマブ、ブリトキサキシマブ、ブリツム
 マブ、PRO140、Proximum、PSMAADC、キリズムマブ、ラコツモマブ
 、ラドレッズマブ、ラフィビルマブ、ラルバンシズマブ、ラムシルマブ、ラニビズマブ、ラ
 キシバクマブ、レファネズマブ、レガビルマブ、REGN1400、REGN2810/
 SAR439684、レスリズムマブ、RFM-203、RG7356、RG7386、R
 G7802、RG7813、RG7841、RG7876、RG7888、RG7986
 、リロツムマブ、リヌクマブ、リツキシマブ、RM-1929、RO7009789、ロ
 バツムマブ、ロレデュマブ、ロモソズマブ、ロンタリズムマブ、ロベリズムマブ、ルブリズマ
 ブ、サシツズマブゴビテカン、サマリズマブ、SAR408701、SAR566658
 、サリルマブ、SAT012、サツモマブペンデチド、SCT200、SCT400、S
 EA-CD40、セクキヌマブ、セリバンツマブ、セトキサキシマブ、セヴィルマブ、S
 GN-CD19A、SGN-CD19B、SGN-CD33A、SGN-CD70A、S
 GN-LIV1A、シプロツズマブ、シファリムマブ、シルツキシマブ、シムツズマブ、
 シプリズマブ、シルクマブ、ソフィツズマブベドチン、ソラネズマブ、ソリトマブ、ソネ
 ブシズマブ、ソんツズマブ、スタムルマブ、スレソマブ、スピズマブ、SYD985、S
 YM004(フツキシマブ及びモドツキシマブ)、Sym015、TAB08、タバ
 ルマブ、タカツズマブテトラキセタン、タドシズマブ、タリズムマブ、タネズマブ、タニビル
 マブ、タブリツモマブパブトクス、タレクスツマブ、TB-403、テフィバズマブ、テロ
 イキン、テリモマブアイトクス、テナツモマブ、テネリキシマブ、テプリズマブ、テプロ
 ツムマブ、テシドルマブ、テツロマブ、TG-1303、TGN1412、トリウム-2
 27-エブラツズマブコンジュゲート、チシリムマブ、ティガツズマブ、チルドラキズマ
 ブ、チソツマブベドチン、TNX-650、トシリズムマブ、トラリズムマブ、トサトクス
 マブ、トシツモマブ、トベツマブ、トラロキヌマブ、トラスツズマブ、トラスツズマブエム
 タンシン、TRBS07、TRC105、トレガリズムマブ、トレメリムマブ、トレボグル
 マブ、TRPH011、TRX518、TSR-042、TTI-200.7、ツコツズ
 マブセルモロイキン、ツビルマブ、U3-1565、U3-1784、ウブリツキシマブ
 、ウロクブルマブ、ウレルマブ、ウルトキサズマブ、ウステキヌマブ、バダスツキシマブ

10

20

30

40

50

タリリン、バンドルツズマブベドチン、パンチクツマブ、バヌシズマブ、バパリキシマブ、バルリルマブ、パテリズマブ、V B 6 - 8 4 5、ベドリズマブ、ベルツズマブ、ベパリモマブ、ベセンクマブ、ビジリズマブ、ポロシキシマブ、ボルセツズマブマホドチン、ボツムマブ、Y Y B - 1 0 1、ザルツムマブ、ザノリムマブ、ザツキシマブ、ジラリムマブ、及びゾリモマブアイトクスの1つ以上からの抗体又はその機能的誘導体、変異体若しくは断片を含む。いくつかの実施形態では、細胞外受容体ドメインは、上記抗体に結合する。さらなる実施形態では、細胞外受容体ドメインは、上記抗体のFcドメインに結合する。

【0034】

アンカー膜貫通ドメイン

いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、ポリペプチドを含む。接着受容体の細胞外受容体ドメインを固着する膜貫通ドメインは、任意の好適なポリペプチド配列を有し得る。場合によっては、膜貫通ドメインは、内因性又は野生型膜貫通タンパク質の膜貫通部分のポリペプチド配列を含む。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、内因性又は野生型膜貫通タンパク質の膜貫通部分と比べて、アミノ酸の置換、欠失、及び挿入の少なくとも1つ（例えば、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10又はそれ以上）を有するポリペプチド配列を含む。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、非天然ポリペプチド配列、例えばポリペプチドリンカーの配列を含む。ポリペプチドリンカーは、可動性又は剛直性であってもよい。ポリペプチドリンカーは、構造化され得るか又は構造不定であり得る。いくつかの実施形態では、キメラ受容体に、膜貫通ドメインとしてアドレナリン受容体の一部が用いられる。

【0035】

細胞質エフェクタードメイン

いくつかの実施形態では、接着受容体は、細胞質エフェクタードメインをさらに含む。いくつかの実施形態では、細胞質エフェクタードメインは、接着受容体の抗原への結合時にNK細胞の増殖を誘導する細胞質ドメインを含む。いくつかの実施形態では、細胞質エフェクタードメインは、NK細胞の増殖を、細胞傷害性を誘導することなく誘導する。いくつかの実施形態では、細胞質エフェクタードメインは、サイトカイン受容体（例えば、IL-2又はIL-15）の細胞質ドメインである。いくつかの実施形態では、かかる細胞質エフェクタードメインは、ヘテロ二量体化するように改変される。

【0036】

抗Her2接着受容体

Her2は、ヒト上皮成長因子受容体(HER/EGFR/ERBB)ファミリーのメンバーである。このがん遺伝子の増幅又は過剰発現は、乳がんの特定の侵襲性タイプの発生及び進行において重要な役割を担うことが示されている。いくつかの実施形態では、細胞外受容体ドメインは、Her2に結合する。いくつかの実施形態では、抗Her2細胞外受容体ドメインは、抗Her2抗体のトラスツズマブ、ベルツズマブ、及びそれらの機能的誘導体、変異体又は断片を含む。いくつかの実施形態では、抗Her2細胞外受容体は、scFvを含む。いくつかの実施形態では、抗Her2 scFvは、配列番号58によってコードされる。いくつかの実施形態では、抗Her2 scFvは、配列番号59のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、細胞外受容体は、配列番号58からの1つ以上の追加的な突然変異を有してもよいが、Her2結合機能を保持するか、又はいくつかの実施形態では増強している。いくつかの実施形態では、抗Her2細胞外受容体ドメインは、二量体、三量体、又は他のコンカテマー形式として提供され、かかる実施形態では、増強されたりガンド結合活性が提供される。いくつかの実施形態では、抗Her2細胞外受容体ドメインをコードする配列は、任意選択的には完全に又は部分的にコード最適化される。加えて、いくつかの実施形態では、シグナルペプチドが用いられる。シグナルペプチドの種又は配列は、該構築物と異なり得る。しかし、いくつかの実施形態では、CD8のシグナルペプチド、又はその一部若しくは誘導体が用いられる。一実施形態では、シグナルペプチドは、CD8aに由来し、配列番号4の配列を有する。一実施形

10

20

30

40

50

態では、シグナルペプチドは、CD8に由来し、配列番号67のDNA配列を有する。一実施形態では、シグナルペプチドは、CD8に由来し、配列番号68のタンパク質配列を有する。

【0037】

抗PSMA接着受容体

葉酸ヒドロラーゼ1 (FOLH1) としても公知の前立腺特異膜抗原 (PSMA) は、前立腺上皮細胞内で高度に発現され、前立腺がんに対する細胞表面マーカーである非脱落膜内在性の糖タンパク質である。いくつかの実施形態では、細胞外受容体ドメインは、PSMAに結合する。いくつかの実施形態では、抗PSMA細胞外受容体ドメインは、scFv (一本鎖Fv) 抗体、例えば：AS、GO、G1、G2、及びG4、mAbの3/E7、3/F11、3/A12、K7、K12、及びD20；mAbのE99、J591、J533、及びJ415；mAbの7E11-05.3；抗体7E11；並びにChang et al., 1999, Cancer Res., 59:3192；Murphy et al., 1998, J. Urol., 160:2396；Grauer et al., 1998, Cancer Res., 58:4787；及びWang et al., 2001, Int. J. Cancer, 92:871に記載の抗体、及びそれらの機能的誘導体、変異体又は断片を含む。いくつかの実施形態では、抗PSMA細胞外受容体は、scFvを含む。いくつかの実施形態では、抗PSMA scFvは、配列番号62によってコードされる。いくつかの実施形態では、抗PSMA scFvは、配列番号63のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、細胞外受容体は、配列番号62からの1つ以上の追加的な突然変異を有してもよいが、PSMA結合機能を保持する、又はいくつかの実施形態では増強している。いくつかの実施形態では、細胞外受容体ドメインは、二量体、三量体、又は他のコンカテマー形式として提供され、かかる実施形態は、増強されたリガンド結合活性をもたらす。いくつかの実施形態では、抗PSMA細胞外受容体ドメインをコードする配列は、任意選択的には完全に又は部分的にコドン最適化される。加えて、いくつかの実施形態では、シグナルペプチドが用いられる。シグナルペプチドの種又は配列は、該構築物と異なり得る。しかし、いくつかの実施形態では、CD8のシグナルペプチドが用いられる。いくつかの実施形態では、シグナルペプチドは、CD8の部分又は誘導体である。一実施形態では、シグナルペプチドは、CD8aに由来し、配列番号4の配列を有する。いくつかの実施形態では、シグナルペプチドは、配列番号4からの1つ以上の追加的な突然変異を有してもよいが、該受容体ドメインの所望される膜配向性をさらにもたらす。一実施形態では、シグナルペプチドは、CD8に由来し、配列番号67のDNA配列を有する。一実施形態では、シグナルペプチドは、CD8に由来し、配列番号68のタンパク質配列を有する。

【0038】

接着受容体構築物

本明細書に提供される開示内容を考慮して、特定の標的細胞、例えば罹患又はがん細胞を標的にし、破壊するため、NK細胞内で生成され、発現され得る種々の接着受容体が存在する。かかる接着受容体の非限定例が、下記により具体的に考察される。

【0039】

いくつかの実施形態では、細胞外受容体ドメイン及びアンカー膜貫通ドメインを含む接着受容体をコードするポリヌクレオチドが提供される。いくつかの実施形態では、2つ以上の接着受容体をコードするポリヌクレオチドが提供される。いくつかの実施形態では、2つ以上の接着受容体は、リガンドの接着受容体への結合時、NK細胞を活性化する（例えば増殖させる）ように相乗的様式で作用する。いくつかの実施形態では、2つ以上の接着受容体は、異なる抗原に結合する。いくつかの実施形態では、2つ以上の接着受容体は、同じ抗原に結合する。いくつかの実施形態では、2つ以上の接着受容体は、同じ抗原の異なるエピトープに結合する。

【0040】

いくつかの実施形態では、接着受容体の単一タイプ、接着受容体の1つのタイプの複数

10

20

30

40

50

の「繰り返し」及び接着受容体の異なるタイプの組み合わせに加えて、さらなる共活性化分子が提供される。例えば、いくつかの実施形態では、NK細胞は、膜結合性インターロイキン15 (mbIL15) を発現するように操作される。かかる実施形態では、NK細胞上でのmbIL15の存在は、NK細胞の増殖及び寿命を相乗的に高めることにより、NK細胞の細胞傷害性効果をさらに増強するように機能する。いくつかの実施形態では、mbIL15は、配列番号16の核酸配列を有する。いくつかの実施形態では、mbIL15は、配列番号16の配列と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%相同であるように切断又は修飾され得る。いくつかの実施形態では、mbIL15は、配列番号17のアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、mbIL15は、配列番号17の配列と、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%の相同性があるように、切断又は修飾され得る。いくつかの実施形態では、mbIL15は、切断される一方で、mbIL15の機能の少なくとも約50%、約60%約70%、約80%、約90%、又は約95%を保持する。本明細書に開示される接着受容体と併せて、かかる実施形態は、特定の標的細胞を標的にし、破壊するのに特に有効なNK細胞組成物を提供する。

10

20

30

40

50

【0041】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される接着受容体の表面発現及び有効性は、いくつかの実施形態では膜貫通ドメインに隣接した細胞外受容体ドメイン内に位置するスパーサー領域(ヒンジ)内でのバリエーションにより増強される。いくつかの実施形態では、本明細書中の他の箇所に開示されるような特定の目的に役立つドメインは、追加的な機能を果たし得る(例えば、たとえ特定のドメインがシグナル伝達ドメインを開示するセクション内に記載されることがあっても、そのドメインはまた、構築物の異なる部分における別の機能に用いてもよい)。例えば、いくつかの実施形態では、CD8aは、(いくつかの実施形態では配列番号5の核酸配列によってコードされる)ヒンジ領域として機能するように再利用される。さらに別の実施形態では、このヒンジ領域は、CD8aのN末端切頭型及び/又はCD8aのC末端切頭型を含む。実施形態に応じて、これらの切頭は、配列番号5によってコードされるヒンジに対して少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%又は少なくとも約90%相同であり得る。いくつかの追加的な実施形態では、このヒンジは、グリシン残基及びセリン残基のスパン(本明細書では「GSリンカー」と称される)を含み、GS_nは、配列(Gly-Gly-Gly-Ser)_n(配列番号42)を表す。一実施形態では、このヒンジは、CD8a及びGS3の両方を含み、配列番号32のアミノ酸配列によってコードされ、例えばn=3である。追加的な実施形態では、nの値は、実施形態に応じて、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15と等しいか又はそれより高いことができる。いくつかの実施形態では、このヒンジは、GS_n/CD8aとして構成されている可能性もある。代わりに、このGSリンカーは、ヒンジ領域全体を含み得る。そのような一実施形態では、このヒンジ領域は、配列番号33の核酸配列によってコードされる。別のそのような実施形態では、このヒンジ領域は、配列番号34の核酸配列によってコードされる。

【0042】

いくつかの実施形態では、接着受容体は、本明細書中でさらに詳細に考察される通り、二量体化するように形成される。二量体化は、実施形態に応じて、ホモ二量体又はヘテロ二量体を含んでもよい。いくつかの実施形態では、二量体化は、接着受容体(ひいては該受容体を発現するNK細胞)の結合活性の、有害な毒性効果の減少(又は欠如)における協調的平衡を伴う、より優れたリガンド認識への変化をもたらす。さらなる実施形態では、細胞外受容体ドメインは、CD8aシグナルペプチドをさらに含む。いくつかの実施形態では、接着受容体では、内部二量体、又は1つ以上の成分サブユニットの繰り返しが用いられる。

【0043】

任意選択により、実施形態に応じて、本明細書で開示されたポリヌクレオチドのいずれかは、接着受容体の構成サブユニットの1つ又は複数の切頭及び/又はバリエーションもコードし得、NK細胞を標的細胞に向ける能力を依然として保持し得、いくつかの実施形態では、結合時に細胞傷害性を予想外にも増強し得る。加えて、本明細書で開示されたポリヌクレオチドのいずれかは、任意選択により、接着受容体の様々な構成サブユニットをコードするコドン最適化ヌクレオチド配列も含み得る。本明細書で使用される場合、用語「断片」及び「切頭型」は、それらの通常の意味が与えられるものとし、且つタンパク質のN末端欠失バリエーション及びC末端欠失バリエーションも含むものとする。

【0044】

いくつかの実施形態では、抗Her2 scFv及び膜貫通領域を含む、抗Her2接着受容体をコードするポリヌクレオチドが提供される。一実施形態では、この接着受容体は、配列番号60の核酸配列によってコードされる。さらに別の実施形態では、抗Her2接着受容体は、配列番号61のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、この構築物は、NK細胞がmbIL15を同時に発現するとき、特に有効であり、mbIL15は、NK細胞の活性化及び細胞傷害性に関連してさらなる相乗効果をもたらす。いくつかの実施形態では、接着受容体の配列は、配列番号60と異なってもよいが、実施形態に応じて、配列番号60との少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%の相同性を維持する。いくつかの実施形態では、接着受容体が配列番号60と異なってもよい一方で、接着受容体は、NK細胞の標的化、活性化及び/又は細胞傷害性機能を保持するか、又はいくつかの実施形態ではそれらを増強している。

10

20

【0045】

いくつかの実施形態では、抗PSMA scFv及び膜貫通領域を含む、抗PSMA接着受容体をコードするポリヌクレオチドが提供される。一実施形態では、この接着受容体は、配列番号64の核酸配列によってコードされる。さらに別の実施形態では、抗PSMA接着受容体は、配列番号65のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、この構築物は、NK細胞がmbIL15を同時に発現するとき、特に有効であり、mbIL15は、NK細胞の活性化及び細胞傷害性に関連してさらなる相乗効果をもたらす。いくつかの実施形態では、接着受容体の配列は、配列番号64と異なってもよいが、実施形態に応じて、配列番号64との少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%の相同性を維持する。いくつかの実施形態では、接着受容体が配列番号64と異なってもよい一方で、接着受容体は、NK細胞の標的化、活性化及び/又は細胞傷害性機能を保持するか、又はいくつかの実施形態ではそれらを増強している。

30

【0046】

本明細書に記載の接着受容体をコードするポリヌクレオチドは、NK細胞内での組換えタンパク質の発現を達成するため、ベクターに挿入されてもよい。一実施形態では、このポリヌクレオチドは、この接着受容体の発現のための少なくとも1つの調節エレメントに作動可能に連結されている。具体的な実施形態では、本明細書で開示されたペプチドに対して異種の転写調節エレメント(例えば、内部リボソーム侵入部位(IRES)又はエンハンサーエレメント)を利用して、この接着受容体の転写が指示される。実施形態に応じて、接着受容体の様々な構成部分は、単一のベクターで又は代わりに複数のベクターでNK細胞に送達され得る。一部の実施形態では、接着受容体構築物は、単一のベクターで送達されるが、接着受容体の効力を増強する別の因子(例えば、mbIL15)は、別個のベクターで送達される。いくつかの実施形態では、接着受容体及びこの接着受容体の効力を増強する因子(例えば、mbIL15)は、単一のベクターで送達される。使用されるベクターの数に関係なく、任意のポリヌクレオチドは、タグ配列を任意選択により含み得、この構築物を発現するNK細胞の存在の認識を可能にする。例えば、いくつかの実施形態では、FLAGタグ(DYKDDDDK、配列番号55)が使用される。同様に利用可能であるのは、他のタグ配列であり、例えばポリヒスチジンタグ(His-タグ)(HH

40

50

HHHH、配列番号56)、HA-タグ又はmyc-タグ(EQKLISEEDL;配列番号57)である。代わりに、緑色蛍光タンパク質又は他の蛍光部分が使用される。タグのタイプの組み合わせも使用して、接着受容体のサブコンポーネントを個別に認識し得る。

【0047】

いくつかの実施形態では、接着受容体をコードするポリヌクレオチドは、エレクトロポレーションによりNK細胞中に導入され得るmRNAである。別の実施形態では、ベクターは、形質導入によりNK細胞中に導入され得るウイルス(好ましくはレトロウイルス)である。いくつかの実施形態では、このベクターは、マウス幹細胞ウイルス(MSCV)である。追加的な実施形態では、他のベクターが使用され得、例えばレンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス及び同様のものが使用され得る。いくつかの実施形態では、非HIV由来レトロウイルスが使用される。選択されるベクターは、様々な因子(例えば、限定されないが、転写調節エレメントの強度及びタンパク質を発現するために使用される細胞)に依存するであろう。このベクターは、プラスミド、ファージミド、コスミド、ウイルスベクター、ファージ、人工染色体及び同様のものであり得る。追加的な実施形態では、このベクターは、エピソームの非相同的に又は相同的に組み込むベクターであり得、このベクターは、このベクターを形質転換するための任意の適切な手段(形質転換、遺伝子導入、コンジュゲーション、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿、直接マイクロインジェクション等)により、適切な細胞中に導入され得る。いくつかの実施形態では、NK細胞中で接着受容体の発現を誘導するための他のアプローチが使用され、このアプローチとして例えば下記が挙げられる:SV40初期プロモーター領域、ラウス肉腫ウイルスの3'長末端反復に含まれるプロモーター、ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター、メタロチオネイン遺伝子の調節配列、アデノウイルス(ADV)プロモーター、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーター、ウシバピロームウイルス(BPV)プロモーター、パロウイルスB19p6プロモーター、ラクタマーゼプロモーター、tacプロモーター、ノバリンシンターゼプロモーター領域又はカリフラワーモザイクウイルス35S RNAプロモーター、リブローズビスリン酸カルボキシラーゼのプロモーター、Gal4プロモーター、ADC(アルコールデヒドロゲナーゼ)プロモーター、PGK(ホスホグリセロールキナーゼ)プロモーター、骨髄増殖性肉腫ウイルスエンハンサーとともに、操作されたMoMuLVLTRのU3領域を含む合成MNDプロモーター及びアルカリホスファターゼプロモーター。

【0048】

本明細書で開示された接着受容体を発現するようにナチュラルキラー細胞を操作し得る。接着受容体発現構築物は、当業者に既知の技術のいずれかを使用してNK細胞に導入され得る。一実施形態では、この接着受容体は、NK細胞中で一時的に発現される。別の実施形態では、この接着受容体は、NK細胞中で安定的に発現される。追加的な実施形態では、このNK細胞は、自己細胞である。さらに別の実施形態では、このNK細胞は、ドナー由来(同種)細胞である。

【0049】

本明細書でさらに提供されるのは、癌又は感染性疾患を有する対象を処置する方法であって、本明細書で開示された接着受容体を発現するように操作されたNK細胞を含む組成物を対象に投与することを含み、この接着受容体は、損傷又は罹患した細胞又は組織上で差次的に発現される(例えば、正常な細胞又は組織と比較して異なる程度で発現される)マーカー又はリガンドを標的とするように設計されている、方法である。本明細書で使用される場合、用語「発現する」、「発現される」及び「発現」は、それらの通常の意味が与えられ、遺伝子配列又はポリヌクレオチド配列の情報の顕在化を可能にすること又は引き起こすことを指すものとし、例えば対応する遺伝子配列又はDNA配列の転写及び翻訳に關与する細胞機能を活性化させることによるタンパク質の産生を指すものとする。発現産物自体(例えば、結果として生じるタンパク質)が細胞により「発現される」と呼ばれる場合もある。発現産物は、細胞内、細胞外又は膜貫通として特徴付けられ得る。用語「

細胞内」は、その通常の意味が与えられるものとし、且つ細胞の内側を指すものとする。用語「細胞外」は、その通常の意味が与えられるものとし、且つ細胞の外側を指すものとする。用語「膜貫通」は、その通常の意味が与えられるものとし、且つポリペプチドの少なくとも一部が細胞膜に埋め込まれていることを指すものとする。用語「細胞質」は、その通常の意味が与えられるものとし、且つ細胞膜内、核外に存在することを指すものとする。本明細書で使用される場合、対象への治療の投与に関連する用語「処置する」、「処置すること」及び「処置」は、それらの通常の意味が与えられるものとし、且つ対象が治療から得られる有益な効果を指すものとする。いくつかの実施形態では、本明細書で説明された遺伝子改変細胞による対象の処置により、例えば下記で挙げられる効果の1つ、2つ、3つ、4つ又はより多くが達成される：(i) 疾患又はそれに関連する症状の重症度の軽減又は寛解；(ii) 疾患に関連する症状の持続時間の短縮；(iii) 疾患又はそれに関連する症状の進行に対する保護；(iv) 疾患又はそれに関連する症状の退行；(v) 疾患に関連する症状の発生又は発症に対する保護；(vi) 疾患に関連する症状の再発に対する保護；(vii) 対象の入院の減少；(viii) 入院の長さの短縮；(ix) 疾患を有する対象の生存率の増加；(x) 疾患に関連する症状の数の減少；(xi) 別の治療の予防効果又は治療効果の増強、改善、補充、補完又は増大。投与は、様々な経路（例えば、限定されないが、罹患した組織への静脈内送達、動脈内送達、皮下送達、筋肉内送達、肝内送達、腹腔内送達及び/又は局所送達）によるものであり得る。NK細胞の用量は、所定の対象に関して、この対象の体重、疾患の種類及び状態並びに所望の処置の積極性に基づいて用意に決定され得るが、実施形態に応じて、1kg当たり約 10^5 個の細胞～1kg当たり約 10^{12} 個の細胞の範囲（例えば、 $10^5 \sim 10^7$ 個、 $10^7 \sim 10^{10}$ 個、 $10^{10} \sim 10^{12}$ 個及びそれらの重複範囲）である。一実施形態では、用量漸増レジメンを使用する。いくつかの実施形態では、ある範囲のNK細胞（例えば、約 1×10^6 個の細胞/kg～約 1×10^8 個の細胞/kg）を投与する。実施形態に応じて、様々な種類の癌又は感染性疾患を処置し得る。本明細書で提供される様々な実施形態は、下記の癌の非限定的な例の処置又は予防を含む：例えば、限定されないが、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、急性骨髄性白血病（AML）、副腎皮質癌、カボジ肉腫、リンパ腫、胃腸癌、虫垂癌、中枢神経癌、基底細胞癌、胆管癌、膀胱癌、骨癌、脳腫瘍（例えば、限定されないが、星状細胞腫、脊髄腫瘍、脳幹グリオーマ、頭蓋咽頭腫、上衣芽細胞腫、上衣腫、髄芽腫、髄上皮腫）、乳癌、気管支腫瘍、パーキットリンパ腫、子宮頸癌、結腸癌、慢性リンパ性白血病（CLL）、慢性骨髄性白血病（CML）、慢性骨髄増殖性障害、乳管癌、子宮内膜癌、食道癌、胃癌、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、有毛細胞白血病、腎細胞癌、白血病、口腔癌、上咽頭癌、肝癌、肺癌（例えば、限定されないが、非小細胞肺癌（NSCLC）及び小細胞肺癌）、膵癌、腸癌、リンパ腫、黒色腫、眼癌、卵巣癌、膵癌、前立腺癌、下垂体癌、子宮癌並びに腔癌。

【0050】

さらに、本明細書で提供される様々な実施形態は、下記の非限定的な例の感染性疾患の処置又は予防を含み、この感染性疾患として細菌起源の感染が挙げられるが、それに限定されず、例えば下記の属の1つ又は複数からの細菌による感染が含まれ得る：ボルデテラ（*Bordetella*）、ボレリア（*Borrelia*）、ブルセラ（*Bruceella*）、カンピロバクター（*Campylobacter*）、クラミジア（*Chlamydia*）及びクラミドフィラ（*Chlamydophila*）、クロストリジウム（*Clostridium*）、コリネバクテリウム（*Corynebacterium*）、エンテロコッカス（*Enterococcus*）、エシェリキア（*Escherichia*）、フランシセラ（*Francisella*）、ヘモフィルス（*Haemophilus*）、ヘリコバクター（*Helicobacter*）、レジオネラ（*Legionella*）、レプトスピラ（*Leptospira*）、リステリア（*Listeria*）、マイコバクテリウム（*Mycobacterium*）、マイコプラズマ（*Mycoplasma*）、ナイセリア（*Neisseria*）、シュードモナス（*Pseudomonas*）、リケッチア（*Rickettsia*）、サルモネラ（*Salmonella*）、シゲラ（*Sh*

igella)、スタフィロコッカス(Staphylococcus)、ストレプトコッカス(Streptococcus)、トレポネマ(Treponema)、ビブリオ(Vibrio)及びエルシニア(Yersinia)並びにこれらの変異体又は組み合わせ。いくつかの実施形態では、種々の真菌感染症を治療するための方法が提供される。実施形態に応じて、真菌起源の感染は、例えば、アスペルギルス(Aspergillus)属、ブラストミセス(Blastomyces)属、カンジダ(Candida)属、コクシジオイデス(Coccidioides)属、クリプトコッカス(Cryptococcus)属、及びヒストプラズマ(Histoplasma)属、並びにそれらの突然変異体又は組み合わせの1つ以上由来の真菌による感染を含んでもよい。いくつかの実施形態では、ウイルス感染(例えば、1つ又は複数のウイルスにより引き起こされるもの)を処置するために様々なものを処置する方法が提供され、このウイルスとして下記が挙げられる: アデノウイルス、コクサッキーウイルス、エプスタイン-バーウイルス、a型肝炎ウイルス、b型肝炎ウイルス、c型肝炎ウイルス、単純ヘルペスウイルス1型、単純ヘルペスウイルス2型、サイトメガロウイルス、デボラウイルス、ヒトヘルペスウイルス8型、HIV、インフルエンザウイルス、麻疹ウイルス、ムンプスウイルス、ヒトパピローマウイルス、パラインフルエンザウイルス、ポリオウイルス、狂犬病ウイルス、呼吸器合抱体ウイルス、風疹ウイルス及び水痘帯状疱疹ウイルス。

10

【0051】

いくつかの実施形態では、同様に本明細書で提供されるのは、配列番号1~65のそれぞれの核酸配列又はアミノ酸配列と比較して少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%(及びそれらの中の範囲)相同であり、且つそれぞれの配列番号1~65と比較して機能の1つ又は複数も示す核酸配列及びアミノ酸配列であり、この機能として下記が挙げられるが、それらに限定されない: (i)増殖の増強、(ii)活性化の増強、(iii)核酸配列及びアミノ鎖配列によってコードされる受容体を有するNK細胞が結合するリガンドを提示する細胞に対する細胞傷害活性の増強、(iv)腫瘍又は感染部位へのホーミングの増強、(v)オフターゲット細胞傷害効果の減少、(vi)免疫刺激性サイトカイン及びケモカイン(例えば、限定されないが、IFN γ 、TNF α 、IL-22、CCl3、CCl4及びCCl5)の分泌の増強、(vii)さらなる自然免疫応答及び適応免疫応答を刺激する能力の増強、並びに(viii)これらの組み合わせ。

20

30

【0052】

加えて、いくつかの実施形態では、核酸コードの縮重を説明しつつ、本明細書で開示された核酸のいずれかに対応するアミノ鎖配列が提供される。さらに、本明細書で明示的に開示されたものと異なるが、機能の類似性又は均等性を有するこの配列(核酸又はアミノ酸)も本開示の範囲内で企図される。上記には、変異体、切頭、置換又は他の種類の改変が含まれる。

【0053】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の接着受容体は、ナチュラルキラーグループ2メンバーD(NKG2D)の天然リガンドを発現する細胞を標的にし、相乗的に増強されたNK細胞の活性化及び細胞傷害性をもたらすキメラ受容体と同時発現される。したがって、いくつかの実施形態では、天然NKG2Dに結合するペプチドを含む細胞外受容体ドメイン、膜貫通領域、及びエフェクタードメインを含むNKG2Dキメラ受容体をコードするポリヌクレオチドも提供され、ここでNKG2Dの天然リガンドに結合するペプチドはNKG2Dの断片である。いくつかの実施形態では、NKG2Dの断片は、配列番号1の配列の断片を含むポリヌクレオチドによってコードされる。いくつかの実施形態では、NKG2Dの断片は、配列番号2の配列を含む一方で、さらなる実施形態では、NKG2Dをコードする断片は、コドン最適化され、例えば配列番号3の配列を含む。いくつかの実施形態では、エフェクタードメインは、CD16、NCR1、NCR2、NCR3、4-1BB、CD28、NKp80、CD3及び2B4の1つ以上を含む。いくつかの実施形態では、NKG2Dは、完全長ヒトNKG2Dではなく、むしろ1つ以上のNKG2

40

50

Dリガンドに結合するその能力を保持する断片である。いくつかの実施形態では、これらのエフェクタードメインは、CD8 に共役される。本明細書で考察される通り、膜貫通及び細胞内ドメインの組み合わせは、いくつかの実施形態において用いられ、NK G2 Dキメラ受容体の成分間での相乗的相互作用をもたらす。いくつかの実施形態では、NK G2 Dキメラ受容体構築物において、リンカー、ヒンジ、又は他の「スペーシング」エレメントが提供される。例えば、いくつかの実施形態では、エフェクタードメインは、リンカーを含む。いくつかの実施形態では、該ポリヌクレオチドは、NK G2 Dキメラ受容体構築物の部分間、例えば、4 - 1 B B、CD 2 8、CD 1 6、N C R 1、N C R 3、CD 3、D A P 1 0、2 B 4又はNK p 8 0のいずれかの間のGSリンカーをコードする。いくつかの実施形態では、NK G2 Dキメラ受容体のエフェクタードメインは、リンカーを含む。いくつかの実施形態では、該ポリヌクレオチドは、NK G2 Dキメラ受容体構築物の部分間、例えば、4 - 1 B B、CD 2 8、CD 1 6、N C R 1、N C R 3、2 B 4又はNK p 8 0のいずれかの間のGSリンカーをコードする。いくつかの実施形態では、ヒンジ領域を含むキメラ受容体が提供される。いくつかの実施形態では、NK G2 Dキメラ受容体のエフェクタードメインは、1つ以上のヘミITAM配列を含む。加えて、本明細書に開示されるキメラ受容体のいずれもまた、膜結合型インターロイキン15 (mbIL15) と同時発現され得る。いくつかの実施形態では、キメラ受容体は、CD3 シグナル伝達ドメインを使用しない。いくつかの実施形態では、キメラ受容体は、シグナル伝達ドメイン内のITAM又はヘミITAMモチーフを使用しない。いくつかの実施形態では、DAP10は、キメラ受容体中に含まれない。

【0054】

いくつかの実施形態では、提供されるポリヌクレオチドは、mRNAである。一部の実施形態では、このポリヌクレオチドは、接着受容体の発現のための少なくとも1つの調節エレメントに作動可能に連結されている。本明細書で使用される場合、用語「核酸」、「ヌクレオチド」及び「ポリヌクレオチド」は、その通常の意味が与えられるものとし、デオキシリボヌクレオチド、デオキシリボ核酸、リボヌクレオチド及びリボ核酸並びにそれらのポリマー形態を含むものとし、且つ一本鎖形態又は二本鎖形態を含む。核酸は、天然に存在する核酸（例えば、デオキシリボ核酸（「DNA」）及びリボ核酸（「RNA」））並びに核酸類似体を含む。核酸類似体として、天然に存在するホスホジエステル結合以外の他のヌクレオチドと結合するヌクレオチドである、天然に存在しない塩基を含むもの又はホスホジエステル結合以外の結合を介して付着した塩基を含むものが挙げられる。そのため、核酸類似体として、例えば、限定されないが、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロトリエステル、ホスホルアミデート、ボラノホスフェート、メチルホスホネート、キラルメチルホスホネート、2 - O - メチルリボヌクレオチド、ペプチド核酸（PNA）、ロックド核酸（LNA）及び同様のものが挙げられる。本明細書で使用される場合、例えば異種核酸配列に「作動可能に連結されている」調節核酸配列に関連する用語「作動可能に連結されている」は、その通常の意味が与えられるものとし、且つこの調節核酸配列が異種核酸配列と機能的関係に置かれていることを意味するものとする。IRESに関連して、「作動可能に連結されている」は、内部リボソーム侵入部位を含む核酸配列と、異種コード配列が翻訳されるmRNA配列の中央での異種コード配列開始との間の機能的連結を指す。本明細書で使用される場合、用語「ベクター」は、その通常の意味が与えられるものとし、且つDNA配列又はRNA配列（例えば、外来遺伝子）を遺伝子改変細胞中に導入し、遺伝子改変された細胞を形質転換させて、導入された配列の発現（例えば、転写及び/又は翻訳）を促進し得る媒体を指すものとする。ベクターとして、ウイルス、プラスミド、ファージ等が挙げられる。用語「接着受容体」は、本明細書で用いられるとき、その通常の意味が与えられるものとし、標的細胞（例えばウイルス感染及び形質転換細胞）上のリガンドを認識し、それに結合する膜結合型受容体を指すものとする。用語「キメラ受容体」は、本明細書で用いられるとき、その通常の意味が与えられるものとし、単一のタンパク質上に天然には一緒に見出されない少なくとも2つのポリペプチドドメインを含む、細胞表面受容体を指すものとする。用語「キメラ受容体複合体」

は、本明細書で使用される場合、単一タンパク質上で自然界において一緒に見出されない組み合わせで少なくとも2つのポリペプチドドメインを含み得る第1のポリペプチドを指し、この第1のポリペプチドは、第2のポリペプチド（例えば、アダプターポリペプチド）、シグナル伝達分子又は刺激分子と関連している。本明細書で開示された接着受容体の生成及び使用に関する追加的な用語は、当業者により容易に理解され、且つ国際公開第2014/117121号パンフレット及び米国特許第7,994,298号明細書（これらのそれぞれは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）でも見出され得る。

【0055】

いくつかの実施形態に従って追加で提供されるのは、本明細書で提供されたポリヌクレオチドのいずれかをコードするポリヌクレオチドを含むベクターであって、このポリヌクレオチドは、任意選択により、接着受容体の発現のための少なくとも1つの調節エレメントに作動可能に連結されている、ベクターである。いくつかの実施形態では、このベクターは、レトロウイルスである。

10

【0056】

本明細書でさらに提供されるのは、本明細書で開示されたポリヌクレオチド、ベクター又は接着受容体を含む操作されたナチュラルキラー細胞である。いくつかの実施形態では、このNK細胞は、疾患（例えば、癌及び/又は感染性疾患）の予防の処置での使用に適している。

【0057】

いくつかの実施形態によると、それを必要とする哺乳動物におけるがん又は感染症を治療又は予防するための方法であって、NK細胞を治療有効量で前記哺乳動物に投与することを含む方法が本明細書に提供され、ここで前記NK細胞は、本開示に従うポリヌクレオチドによってコードされる接着受容体を発現する。いくつかの実施形態では、NK細胞は、がん又は感染症を有する患者から単離される自家細胞である。いくつかの実施形態では、NK細胞は、ドナーから単離される同種細胞である。それを必要とする哺乳動物におけるNK細胞の細胞傷害性を増強するための薬剤の製造における、本開示に従うポリヌクレオチドの使用も本明細書に提供される。それを必要とする哺乳動物におけるがん又は感染症を治療又は予防するための、本開示に従う単離された遺伝子改変ナチュラルキラー細胞の使用も提供される。

20

【0058】

加えて、いくつかの実施形態では、ナチュラルキラー（NK）細胞の細胞傷害性を増強するための薬剤の製造における接着受容体をコードするポリヌクレオチドの使用が提供され、接着受容体は、標的細胞抗原に結合するように形成された細胞外受容体ドメインと、細胞外受容体ドメインをNK細胞の表面上に固着する膜貫通ドメインとを含み、ここで標的細胞抗原は、健常細胞と標的細胞との間で差次的に発現され、PSMAである。いくつかの実施形態では、標的細胞抗原に結合する細胞外受容体ドメインは、抗体、Fab、又はscFvを含む。

30

【0059】

加えて、いくつかの実施形態では、ナチュラルキラー（NK）細胞の細胞傷害性を増強するための薬剤の製造における接着受容体をコードするポリヌクレオチドの使用が提供され、接着受容体は、標的細胞抗原に結合するように形成された細胞外受容体ドメインと、細胞外受容体ドメインをNK細胞の表面上に固着する膜貫通ドメインとを含み、ここで標的細胞抗原は、健常細胞と標的細胞との間で差次的に発現され、Her2である。いくつかの実施形態では、標的細胞抗原に結合する細胞外受容体ドメインは、抗体、Fab、又はscFvを含む。

40

【0060】

加えて、いくつかの実施形態では、ナチュラルキラー（NK）細胞の細胞傷害性を増強するための薬剤の製造における接着受容体をコードするポリヌクレオチドの使用が提供され、接着受容体は、標的細胞抗原に結合するように形成された細胞外受容体ドメインと、細胞外受容体ドメインをNK細胞の表面上に固着する膜貫通ドメインとを含み、ここで標

50

的細胞抗原は、健常細胞と標的細胞との間で差次的に発現され、CD123である。いくつかの実施形態では、標的細胞抗原に結合する細胞外受容体ドメインは、抗体、Fab、又はscFvを含む。

【0061】

加えて、いくつかの実施形態では、ナチュラルキラー（NK）細胞の細胞傷害性を増強するための薬剤の製造における接着受容体をコードするポリヌクレオチドの使用が提供され、接着受容体は、標的細胞抗原に結合するように形成された細胞外受容体ドメインと、細胞外受容体ドメインをNK細胞の表面上に固着する膜貫通ドメインとを含み、ここで標的細胞抗原は、健常細胞と標的細胞との間で差次的に発現され、GD-2である。いくつかの実施形態では、標的細胞抗原に結合する細胞外受容体ドメインは、抗体、Fab、又はscFvを含む。

10

【0062】

加えて、いくつかの実施形態では、ナチュラルキラー（NK）細胞の細胞傷害性を増強するための薬剤の製造における接着受容体をコードするポリヌクレオチドの使用が提供され、接着受容体は、標的細胞抗原に結合するように形成された細胞外受容体ドメインと、細胞外受容体ドメインをNK細胞の表面上に固着する膜貫通ドメインとを含み、ここで標的細胞抗原は、健常細胞と標的細胞との間で差次的に発現され、GD-3である。いくつかの実施形態では、標的細胞抗原に結合する細胞外受容体ドメインは、抗体、Fab、又はscFvを含む。

20

【0063】

加えて、いくつかの実施形態では、ナチュラルキラー（NK）細胞の細胞傷害性を増強するための薬剤の製造における接着受容体をコードするポリヌクレオチドの使用が提供され、接着受容体は、標的細胞抗原に結合するように形成された細胞外受容体ドメインと、細胞外受容体ドメインをNK細胞の表面上に固着する膜貫通ドメインとを含み、ここで標的細胞抗原は、健常細胞と標的細胞との間で差次的に発現され、NY-ESOである。いくつかの実施形態では、標的細胞抗原に結合する細胞外受容体ドメインは、抗体、Fab、又はscFvを含む。

【0064】

加えて、いくつかの実施形態では、ナチュラルキラー（NK）細胞の細胞傷害性を増強するための薬剤の製造における接着受容体をコードするポリヌクレオチドの使用が提供され、接着受容体は、標的細胞抗原に結合するように形成された細胞外受容体ドメインと、細胞外受容体ドメインをNK細胞の表面上に固着する膜貫通ドメインとを含み、ここで標的細胞抗原は、健常細胞と標的細胞との間で差次的に発現され、CD19である。いくつかの実施形態では、標的細胞抗原に結合する細胞外受容体ドメインは、抗体、Fab、又はscFvを含む。

30

【0065】

いくつかの実施形態では、抗Her2一本鎖可変断片（抗Her2 scFv）をコードするポリヌクレオチドが提供される。いくつかの実施形態では、抗Her2 scFvは、配列番号59を含む。いくつかの実施形態では、抗Her2 scFvは、配列番号58を含む核酸によってコードされる。いくつかの実施形態では、該ポリヌクレオチドは、膜貫通ドメインをさらにコードする。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、CD8膜貫通ドメインを含む。いくつかの実施形態では、CD8膜貫通ドメインは、配列番号70を含む。いくつかの実施形態では、CD8膜貫通ドメインは、配列番号69を含む核酸によってコードされる。いくつかの実施形態では、該ポリヌクレオチドは、シグナルペプチドをさらにコードする。いくつかの実施形態では、該シグナルペプチドは、配列番号68のCD8シグナルペプチドを含む。いくつかの実施形態では、該ポリヌクレオチドは、コザック配列をさらに含む。いくつかの実施形態では、コザック配列は、配列番号66の核酸配列を含む。

40

【0066】

いくつかの実施形態では、抗PSMA一本鎖可変断片（抗PSMA scFv）をコー

50

ドするポリヌクレオチドが提供される。いくつかの実施形態では、抗PSMA scFvは、配列番号63を含む。いくつかの実施形態では、抗PSMA scFvは、配列番号62を含む核酸によってコードされる。いくつかの実施形態では、該ポリヌクレオチドは、膜貫通ドメインをさらにコードする。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、CD8膜貫通ドメインを含む。いくつかの実施形態では、CD8膜貫通ドメインは、配列番号70を含む。いくつかの実施形態では、CD8膜貫通ドメインは、配列番号69を含む核酸によってコードされる。いくつかの実施形態では、該ポリヌクレオチドは、シグナルペプチドをさらにコードする。いくつかの実施形態では、該シグナルペプチドは、配列番号68のCD8シグナルペプチドを含む。いくつかの実施形態では、該ポリヌクレオチドは、コザック配列をさらに含む。いくつかの実施形態では、コザック配列は、配列番号66の核酸配列を含む。

【0067】

いくつかの実施形態では、抗Her2一本鎖可変断片(抗Her2 scFv)をコードするポリヌクレオチドが提供され、ここで抗Her2 scFvは、配列番号59を含む。いくつかの実施形態では、抗Her2 scFvは、膜貫通ドメインをさらに含む。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、CD8膜貫通ドメインを含む。いくつかの実施形態では、CD8膜貫通ドメインは、配列番号70を含む。いくつかの実施形態では、抗Her2 scFvは、シグナルペプチドをさらに含む。いくつかの実施形態では、シグナルペプチドは、配列番号68のCD8シグナルペプチドを含む。

【0068】

いくつかの実施形態では、抗PSMA一本鎖可変断片(抗PSMA scFv)が提供され、ここで抗PSMA scFvは、配列番号63を含む。いくつかの実施形態では、抗PSMA scFvは、膜貫通ドメインをさらに含む。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、CD8膜貫通ドメインを含む。いくつかの実施形態では、CD8膜貫通ドメインは、配列番号70を含む。いくつかの実施形態では、抗PSMA scFvは、シグナルペプチドをさらに含む。いくつかの実施形態では、シグナルペプチドは、配列番号68のCD8シグナルペプチドを含む。

【実施例】

【0069】

方法

以下の実験方法及び材料は、下に開示する非限定的な実験例において用いた。

【0070】

細胞株及び培養条件

ヒト腫瘍細胞株SKBR3、SKOV3、LNCap、ZR751、DU145、及びPLC/PRF/5は、アメリカ合衆国培養細胞系統保存機関(American Type Culture Collection)(ATCC; Rockville, MD)から購入した。細胞株をRPMI-1640(ThermoFisher, Waltham, MA)中で維持し; 培地に10%ウシ胎仔血清(FBS; GE Healthcare, Chicago, IL)及び抗生物質を添加した。細胞株に、緑色蛍光タンパク質(GFP)又はルシフェラーゼ又はmCherryのいずれかを有するマウス幹細胞ウイルス(MSCV)レトロウイルスベクター(St. Jude Children's Research HospitalのVector Development and Production Shared Resource, Memphis, TNから入手)を形質導入した。

【0071】

ヒトNK細胞の増殖

末梢血サンプルは、National University Hospital Blood Bank, Singaporeでの健常成人ドナーからの血小板輸血の匿名扱いの廃棄副生物から得た。

【0072】

10

20

30

40

50

単核性細胞を、Lymphoprep density step (Nycomed, Oslo, Norway)での遠心分離により分離し、RPMI-1640中で2回洗浄した。NK細胞を増殖するため、単核性細胞を遺伝子組換えK562-mb15-41BBL細胞と共培養した。つまり、末梢血単核性細胞(3×10^6 個)を、10% FBS及び40 IU/mLのヒトインターロイキン(IL)-2 (Novartis, Basel, Switzerland)を含有するSCGM培地(CellGenix, Freiburg, Germany)中、 2×10^6 個の照射した(100 Gy)K562-mb15-41BBL細胞を有する6ウェル組織培養プレート内で培養した。2~3日ごとに、新しい組織培地及びIL-2を添加した。共培養の7日後、Dynabeads CD3 (Thermo Fisher)を用いて残留T細胞を除去し、>90%のCD56+CD3-NK細胞を含有する細胞集団を生成した。実験前、増殖したNK細胞を、FBS、抗生物質、及び400 IU/mLのIL2を有するSCGM中で維持した。

【0073】

DNAプラスミド、レトロウイルスの生成及びNK細胞の形質導入

抗Her2-CD8tm及び抗PSMA-CD8tm構築物をコードするプラスミドは、Genescript (Nanjing, China)により合成した。抗Her2-CD8tm及び抗PSMA-CD8tm構築物を有するARD114シュードタイプMSCVレトロウイルスを用いて、NK細胞に形質導入した。レトロウイルスベクター培養上清を、レトロネクチン(Takara、大津、日本)でコーティングしたポリプロピレン管に添加し；遠心分離及び上清の除去後、増殖したNK細胞(5×10^5 個)を該管に添加し、37℃で12時間放置し；新しいウイルス上清を12時間ごとに全部で6回添加した。次に、実験の時期まで、FBS、抗生物質及び400 IU/mLのIL2を有するRPMI中で細胞を維持した。

【0074】

フローサイトメトリーによる接着受容体発現の検出

抗PSMA-CD8tm構築物の表面発現を、ビオチンコンジュゲートヤギ抗マウスIgG F(ab')₂断片特異抗体(Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)を用いて検出した。抗Her2-CD8tmの表面発現を、プロテインL-ビオチン(Genescript)を用いて検出した。いずれかの試薬を、フィコエリトリン(PE)又はAPCコンジュゲートストレプトアビジン(Jackson ImmunoResearch)を用いて可視化した。細胞染色は、Accuri C6フローサイトメーター(Becton Dickinson)において分析した。

【0075】

フローサイトメトリーによる腫瘍細胞を伴うNK細胞の凝集の検出

細胞間凝集を測定するため、mCherryを形質導入したSKOV3細胞をトリプシン処理し、2回洗浄し、1.5 mLのエピンドルフチューブに移した。抗Her2-CD8tm+GFP、又はGFP単独(「モック」)のいずれかを形質導入したNK細胞を1:1の比で添加した。37℃、5%CO₂で30分後、細胞懸濁液を10秒間ボルテックスし、次にダブレットmCherry+GFP+の比をフローサイトメトリーにより計数した。

【0076】

NK細胞と腫瘍細胞との結合の検出

SKOV3細胞をIbidiの1マイクロスライド(Ibidi, Martinsried, Germany)に播種し、コンフルエンスになるまで増殖させた。Hoechst 33342溶液で10分間染色後、細胞をRPMIで2回洗浄した。抗Her2-CD8tm又はGFP単独を発現するNK細胞を各チャンネルに添加した(1×10^5 個)。10分後、接着していないNK細胞をチャンバの両末端から除去し、チャンネルをRPMIで2回洗浄し、ヨウ化プロピジウムを添加し、Olympus Fluoview FV1000共焦点顕微鏡を用いて細胞を試験した。

【0077】

細胞傷害性アッセイ

GFP/ルシフェリンを形質導入した標的細胞を、10% FBSを有するRPMI-1640に懸濁し、96ウェル平底プレート(Costar, Corning, NY)に蒔いた。プレートをインキュベーター内に少なくとも4時間置き、NK細胞を添加する前に細胞接着を可能にした。次に、10% FBSを有するRPMI-1640に懸濁した、抗Her2-CD8tm又はGFP単独を発現する増殖したNK細胞を様々なエフェクター対標的(E:T)比で添加し、標的細胞とともに4時間共培養した。培養の終了時、Flx 800プレートリーダー(BioTek, Winooski, VT)を用いて、BrightGlo(Promega, Fitchburg, WI)をウェルに添加後、生細胞の数を測定した。いくつかの試験では、Incucyte Zoom System(Essen BioScience)を用いて、細胞傷害性を測定した。mCherryを形質導入したSKOV3細胞を、単独で、又は抗Her2-CD8tm又はGFP単独のいずれかを形質導入したNK細胞とともに培養した。各条件における3連培養物中での生存可能標的細胞の数を4時間ごとに160時間測定した。細胞画像もまた、同じ装置を用いて記録した。

10

【0078】

実施例1-抗Her2接着受容体構築物

本明細書に開示の通り、様々な膜貫通ドメインと共役された細胞外受容体ドメインを含む様々な接着受容体構築物を準備する。本実験は、抗Her2接着受容体構築物の発現及び細胞傷害活性を評価するため、実施した。抗Her2接着受容体構築物は、上記の方法及び材料に従って調製し、試験した。構築物に応じて、使用方法は、構築物の作製、発現及び試験にとって必要なパリエーションに対処するように容易に調節することができる。

20

【0079】

図1は、膜結合抗Her2 scFv(mbaHer2)のマウス幹細胞ウイルス(MSCV)プラスミドへの挿入点を図示するプラスミドマップを表す。このプラスミドマップは、mbaHer2構築物のベクターのEcoRI及びXhoI制限部位への挿入を示す。mbaHer2構築物の細胞外受容体ドメインは、抗Her2一本鎖可変断片(抗Her2 scFv)及び受容体ドメインの所望される膜配向性を提供するCD8シグナルペプチドを含む。CD8シグナルペプチドは、配列番号68のアミノ酸配列を含み、配列番号67の核酸配列によってコードされる。抗Her2 scFvは、配列番号59のアミノ酸配列を含み、配列番号58の核酸配列によってコードされる。図1に示す通り、mbaHer2構築物は、細胞外受容体ドメインをNK細胞の表面上に固着する、細胞外受容体ドメインの下流のCD8膜貫通ドメインをさらに含む。CD8膜貫通ドメインは、配列番号70のアミノ酸配列を含み、配列番号69の核酸によってコードされる。図1に示す通り、mbaHer2構築物は、シグナルペプチドの上流に配列番号66のコザック配列をさらに含む。まとめると、mbaHer2構築物は、配列番号61のアミノ酸配列を含み、且つ配列番号60の核酸配列によってコードされる接着受容体をコードする。

30

【0080】

NK細胞がこの構築物を有効に発現する能力をまず評価した。図2は、増殖された一次NK細胞の表面上でのmbaHer2の発現に関するフローサイトメトリーデータを表す。非形質導入NK細胞及びモック形質導入NK細胞(GFPのみを有する空のMSCVベクターで形質導入された)を対照として用いた。mbaHer2の存在及び相対的存在量を、NK細胞のアロフィコシアニン(APC)コンジュゲート抗Fab抗体による染色を通じて判定した。緑色蛍光タンパク質(GFP)の発現をウイルス形質導入の指標として用いた。対照の双方がフローサイトメトリー分析によりmbaHer2の発現を示さなかった(図2A~B)一方で、抗Her2 scFv及びGFPを有するベクターで形質導入されたNK細胞は、強固なmbaHer2の発現を示した(図2C)。まとめると、これらのデータは、本明細書で開示されるいくつかの実施形態によると、操作した接着構築物がNK細胞上で十分に発現され得ることを示す。

40

50

【0081】

いくつかの実施形態では、構築物の増強された発現は、NK細胞への特定構築物の形質導入の反復により達成され得る。いくつかの実施形態では、構築物の成分は、単一のベクターで又は代わりに複数のベクターを用いて細胞に送達され得る。実施形態に応じて、構築物自体が増強された発現をもたらす得、例えば、線状又はヘッドトゥテール構築物は、複数のサブユニット構築物が必要とする細胞内アセンブリの程度減少が理由で、増強された発現をもたらす得る。

【0082】

形質導入NK細胞の集団の効力を評価するため、高レベルのHer2 (SKBR3、SKOV3、LNCap、ZR751)及び低レベルのHer2 (DU145、PLC/PFR/5)を発現するがん細胞株を用いて、細胞傷害性アッセイを実施した。mbaHer2を発現するNK細胞のHer2の会合を介した標的細胞への接着の増強が増強された細胞傷害性を引き起こすという仮説に合致して、mbaHer2を発現するNK細胞で、Her2の発現が低いがん細胞株(図3B)でなく、高レベルのHer2を発現するがん細胞株(図3A)に対して、細胞傷害性における有意な増強が認められた。加えて、mbaHer2を発現するNK細胞は、Incucyte生細胞イメージングシステムによる測定として、SKOV3細胞に対して、対照と比べてより強力な長期細胞傷害性を示した(図4)。さらに、上記の細胞傷害性の結果に合致して、mbaHer2を発現するNK細胞との培養の6日後、対照と比べて、mCherry標識SKOV3細胞の数の減少が認められた(図5)。これらのデータは、NK細胞が接着受容体構築物を発現するように改変され得るだけでなく、接着受容体を発現する細胞が、活性化され、標的細胞に対して増強された細胞傷害性効果を十分にもたらす得るという証拠を提供する。

【0083】

細胞傷害性データに加えて、NK細胞がこれらの効果を果たしている機構を、SKOV3細胞上に播種したモック形質導入NK細胞及びmbaHer2を発現するNK細胞の運動性及び凝集を評価することにより試験した。細胞傷害性アッセイに合致して、mbaHer2を発現するNK細胞は、モック形質導入NK細胞と比べて、移動距離及び平均速度における統計学的に有意な減少を示した(図6)。さらに、図7に示す通り、mbaHer2を発現するNK細胞は、フローサイトメトリー測定によると、SKOV3細胞との凝集を有意に増強していた。重要なことに、これらのデータは、いくつかの実施形態によると、接着構築物が、NK細胞の標的細胞への標的化を増強し、NK細胞が標的細胞に会合するのに必要な時間を低減し、且つNK細胞が標的細胞に会合するために移動するのに必要な距離を減少させることを示す。SKOV3細胞の2つのNK細胞集団への接着をセルフローアッセイにて評価し、ここでGFP(mbaHer2のNK発現を示す)及び(標的細胞死滅を示す)ヨウ化プロピジウム陽性染色を施した標的細胞の実質的共局在化が認められた(図8)。(図9に示す)このアッセイの結果の定量化により、接着受容体の発現が標的細胞死滅に関与したという証拠がさらに得られる。

【0084】

実施例2 - 抗PSMA接着受容体構築物

本明細書に開示の通り、様々な膜貫通ドメインと共役された細胞外受容体ドメインを含む様々な接着受容体構築物を準備する。本実験は、抗PSMA接着受容体構築物の発現及び細胞傷害活性を評価するため、実施した。抗PSMA接着受容体構築物は、上記の方法及び材料に従って調製し、試験した。構築物に応じて、使用方法は、構築物の作製、発現及び試験にとって必要なバリエーションに対処するように容易に調節することができる。

【0085】

図10は、膜結合抗PSMA(mbaPSMA)scFvのマウス幹細胞ウイルス(MSCV)プラスミドへの挿入点を図示するプラスミドマップを表す。このプラスミドマップは、mbaPSMA構築物のベクターのEcoRI及びXhoI制限部位への挿入を示す。mbaPSMA構築物の細胞外受容体ドメインは、抗PSMA一本鎖可変断片(抗PSMA scFv)及び受容体ドメインの所望される膜配向性を提供するCD8シグナル

ペプチドを含む。CD8シグナルペプチドは、配列番号68のアミノ酸配列を含み、配列番号67の核酸配列によってコードされる。抗PSMA scFvは、配列番号63のアミノ酸配列を含み、配列番号62の核酸配列によってコードされる。図10に示す通り、mbaPSMA構築物は、細胞外受容体ドメインをNK細胞の表面上に固着する、細胞外受容体ドメインの下流のCD8膜貫通ドメインをさらに含む。CD8膜貫通ドメインは、配列番号70のアミノ酸配列を含み、配列番号69の核酸によってコードされる。図10に示す通り、mbaPSMA構築物は、シグナルペプチドの上流に配列番号66のコザック配列をさらに含む。まとめると、mbaPSMA構築物は、配列番号65のアミノ酸配列を含み、且つ配列番号64の核酸配列によってコードされる接着受容体をコードする。

【0086】

NK細胞がこの構築物を有効に発現する能力を次に評価した。図11は、増殖された一次NK細胞の表面上でのmbaPSMAの発現に関するフローサイトメトリーデータを表す。非形質導入NK細胞及びモック形質導入NK細胞(GFPのみを有する空のMSCVベクターで形質導入された)を対照として用いた。mbaPSMAの存在及び相対的存在量を、NK細胞のアロフィコシアニン(APC)コンジュゲート抗Fab抗体による染色を通じて判定した。緑色蛍光タンパク質(GFP)の発現をウイルス形質導入の指標として用いた。対照の双方がフローサイトメトリー分析によりmbaPSMAの発現を示さなかった(図11A~B)一方で、抗PSMA scFv及びGFPを有するベクターで形質導入されたNK細胞は、強固なmbaPSMAの発現を示した(図11C)。まとめると、これらのデータは、本明細書に開示されるいくつかの実施形態によると、改変接着構築物がNK細胞上で十分に発現され得ることを実証する。

【0087】

実施例3 - 抗PSMA - NK構築物のインビトロ評価

本明細書に開示されるいくつかの実施形態に従い、NK構築物の長期細胞傷害性を評価するため、さらなる実験を実施した。特に、この実験は、抗PSMA接着受容体を含むNK構築物のインビトロ細胞傷害性を評価するように設計した。前立腺がん細胞株のDU145細胞を標的細胞集団として用いた。DU145細胞は、その天然状態でPSMA陰性である。しかし、ここでDU145細胞は、PSMAを発現するように形質導入した(「DU145-PSMA」)。

【0088】

DU145-PSMAを蒔き、24時間後、膜結合抗PSMA接着受容体を含むNK細胞を添加した。NK細胞は、1:1のエフェクター:標的細胞比で添加した。DU145-PSMA細胞数/ウェルを経時的に評価し、データをNK細胞添加後150時間かけて収集・出力した。データは、対照(NK細胞を添加しない)、NKモック(接着受容体を有しないが、GFPを発現する天然NK細胞)及びNK MbaPSMA(抗PSMA接着受容体を発現するように改変したNK細胞)について収集した。3通りの測定値の平均を図13に示す。Incucyte生細胞イメージングシステム(Essen)により、細胞生存度を評価した。

【0089】

図13に示す通り、NK細胞に曝露していないDU145-PSMA細胞は、実験の持続期間全体を通じて増殖し、培養下で約120時間後に約 1.75×10^8 細胞/ウェルのプラトーに達した(図13中の「NKなし」曲線)。天然NK細胞に曝露されたDU145-PSMA(図13中の「NKモック」曲線)もまた、対照と比べてより遅い速度ではあるが、実験全体を通じて増殖を示し、やはりより少ない全集団数に達した。それに対し、抗PSMA接着受容体を発現するNK細胞と共培養したDU145-PSMAは、主に共培養から最初の数時間以内に非常に限られた増殖を示した(図13中の「NK MbaPSMA」曲線)。約8~10時間後、DU145-PSMA細胞数は、減少し始め、培養下で約100時間後、細胞数/ウェルがゼロに達した。これらのデータは、いくつかの実施形態によると、接着受容体を発現するようにNK細胞を改変し、NK細胞を標的細胞集団により効率的に局在化することにより、長期細胞傷害性の増強がもたらされること

10

20

30

40

50

を実証する。実施形態に応じて、約50時間、約75時間、約100時間、約125時間、約150時間、又はそれ以上の持続期間にわたり、増強された細胞傷害性が示される。いくつかの実施形態では、増強された細胞傷害性は、患者を治療するのに要求されるNK細胞免疫療法構築物の減少した用量（例えば、本明細書に開示されるような接着受容体を発現しないNK細胞で患者を治療するのに要求される用量よりも少ない用量）をもたらす。

【0090】

特に、長期細胞傷害性が、天然に独力で比較的高度な細胞傷害性を示すことが知られる天然NK細胞の場合よりも増強されることは注目すべきである。この非限定例と同様、いくつかの実施形態によると、抗PSMA scFv、例えば先行例にて記載のもの（例えば、配列番号63のアミノ酸配列を含み、且つ配列番号62の核酸配列によってコードされる抗PSMA scFv）を用いる。しかし、本明細書に記載の通り、他の標的細胞集団を標的にし、ひいてはそれらに対するNKに基づく細胞傷害性を増強するため、他の接着受容体をさらに用いてもよい。いくつかの実施形態では、接着受容体の使用は、NKに基づくがん免疫療法レジームの有効性を増強するのに有利である。

10

【0091】

実施例4 - 追加的な抗PSMA - NK構築物のさらなるインビトロ評価

接着構築物が様々な標的細胞に対するNK細胞の細胞傷害性を増強する能力をさらに実証するため、本明細書に開示されるいくつかの実施形態に従うNK構築物の長期細胞傷害性のさらなるインビトロ評価で評価した。この実験は、PSMAを内因性に発現するアンドロゲン依存性LNCaP前立腺がん株に対する、抗PSMA接着受容体を含むNK構築物のインビトロ細胞傷害性を評価するように設計した。

20

【0092】

LNCaP細胞を蒔き、24時間後、膜結合抗PSMA接着受容体を含むNK細胞を添加した。NK細胞は、1:1のエフェクター:標的細胞比で添加した。LNCaP細胞数/ウェルを経時的に評価し、データをNK細胞添加後130時間かけて収集・出力した。データは、対照（NK細胞を添加しない）、NKモック（接着受容体を有しないが、GFPを発現する天然NK細胞）及びNK MbaPSMA（抗PSMA接着受容体を発現するように改変したNK細胞）について収集した。3通りの測定値の平均を図14に示す。Incucyte生細胞イメージングシステム（Essen）により、細胞生存度を評価した。

30

【0093】

図14に示す通り、NK細胞に曝露していないLNCaP細胞は、実験の持続期間全体を通じて増殖し、培養下で130時間後に約50,000細胞/ウェルに達した（図14中の「NKなし」曲線）。天然NK細胞に曝露されたLNCaP細胞（図14中の「NK GFPのみ」曲線）もまた、対照と比べてより遅い速度ではあるが、実験全体を通じて増殖を示し、やはりより少ない全集団数（130時間、約30,000細胞/ウェル）に達した。抗PSMA接着受容体を発現するNK細胞と共培養したLNCaP細胞は、実験の持続期間にわたり限られた増殖を示した（図14中の「NK MbaPSMA」曲線）。共培養から最初の18~20時間、細胞数は（約10,000細胞/ウェルで）比較的一定を維持した。その後、LNCaP細胞数は減少し、共培養の20~90時間、約10,000細胞/ウェルを下回った。約100時間後、LNCaP細胞数は、ベースラインまで戻っていて、約100~120時間、中程度の増加が検出された。LNCaP細胞数におけるわずかな全体的増加が認められた一方で、対照群及び天然NK群と比べて、増殖における明らかな減少が認められる。したがって、これらは、いくつかの実施形態によると、接着受容体を発現するようにNK細胞を改変し、NK細胞を標的細胞集団により効率的に局在化することにより、標的細胞集団に対する長期細胞傷害性の増強をもたらされることを実証する。実施形態に応じて、約10~20時間、約20~30時間、約30~40時間、約40~50時間、又はそれ以上の持続期間にわたり、増強された細胞傷害性が示される。いくつかの実施形態では、増強された細胞傷害性は、患者、特にアンドロゲン

40

50

依存性前立腺がんを有する患者を治療するのに要求されるNK細胞免疫療法構築物の減少した用量（例えば、本明細書に開示されるような接着受容体を発現しないNK細胞で患者を治療するのに要求される用量よりも少ない用量）をもたらす。

【0094】

先行例と同様、長期細胞傷害性が、天然に独力で比較的高度な細胞傷害性を示すことが知られる天然NK細胞の場合よりも増強されることは注目すべきである。いくつかの実施形態によると、抗PSMA scFv、例えば本明細書に記載のものを用いる。しかし、他の標的細胞集団を標的にし、ひいてはそれらに対するNKに基づく細胞傷害性を増強するため、他の接着受容体をさらに用いてもよい。いくつかの実施形態では、接着受容体の使用は、NKに基づくがん免疫療法レジームの有効性を増強するのに有利である。

10

【0095】

実施例5 - 抗HER2 - NK構築物のインビボ評価

本明細書で考察するインビトロ例に基づき、標的細胞集団に対するインビボ細胞傷害性について本明細書に開示されるような接着受容体を用いてNK細胞を標的にする効果を評価するため、追加的な非限定的実験を実施した。この非限定例では、HER2を発現する卵巣がん株SKOV-3を標的細胞集団として用いた。ホタルルシフェラーゼを発現するように、SKOV-3細胞を形質導入した。形質導入SKOV-3細胞を、21NOD.Cg-Prkdc^{scid}IL2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NOD/scid IL2RGnu11) マウスに、 0.2×10^6 細胞/マウスの用量で腹腔内注射した。3つの実験群を次のように設定した（1群あたりマウス7匹）：(i) NK細胞を投与しないものの組織培地を注射した対照、(ii) GFPのみを形質導入したNK細胞を投与したモック、及び(iii) 膜結合抗Her2接着受容体を形質導入したNK細胞を投与したMba-Her2。NK細胞は、SKOV-3細胞の注射後3日目及び7日目に腹腔内注射した。各注射におけるNK細胞用量は、 1×10^7 細胞/マウスであった。各マウスはまた、週3回のIL-2（各注射につき20,000 IU）の腹腔内注射を受けた。Xenogen IVIS-200システム（Caliper Life Sciences）を用いて、腹側及び背側の腫瘍発光を測定した。SKOV-3細胞注射前と注射後22日目に、ベスライン腫瘍発光を記録した。D-ルシフェリンカリウム塩（3mg/マウス、Perkin Elmer）の水溶液の腹腔内注射の5分後、発光イメージングが開始した。Living Image 3.0ソフトウェアプログラムを用いて、光子を定量化した。データを図15に表す。

20

30

【0096】

図15の左カラムは、対照マウスにおけるデータを示す。相対発光は、SKOV-3卵巣がん細胞の注射22日後のこれらのマウスにおける増加した腫瘍量を示す。それに対し、中央パネル（GFPのみを発現するNK細胞の投与）は、（低下した相対発光によって表される）対照と比べて有意に減少した腫瘍量を表すデータを示す。図15の右パネルは、抗Her2接着構築物を発現するNK細胞を投与するマウスの群におけるデータを示す。マウスのこの群における相対発光は、モック群と対照群の双方の場合よりも低く、腫瘍量における有意な減少を示した（モックと比べて、P値は0.004に等しい）。図15における統計分析はt検定による。インビトロ実験と組み合わせて上で考察したように、インビボデータは、特に天然NK細胞の比較的高い天然細胞傷害性を考慮すると、接着受容体を発現するNK細胞の細胞傷害性における想定外の増強を示す。これらのデータは、接着受容体構築物の発現がNK細胞の増強された抗腫瘍活性を促進するという点でインビトロ試験を裏付ける。いくつかの実施形態によると、接着受容体の発現は、NK細胞の標的抗原を有する標的細胞へのホーミングを増強することがある。さらに、いくつかの実施形態によると、接着受容体の発現は、標的細胞におけるNK細胞の間で生じるように高い親和性相互作用を可能にすることがある。同様に、いくつかの実施形態では、接着受容体の発現は、標的細胞上でのNK細胞の滞留持続期間（例えば、NK細胞が標的細胞と相互作用する全期間）を増加させることがある。いくつかの実施形態では、接着受容体の発現は、NKに基づく免疫療法レジームの有効性の全体的増強をもたらし得る、かかる効

40

50

果の1つ以上を有する。いくつかの実施形態では、接着受容体の発現により、全体的ながん免疫療法治療の用量、投与頻度、又は持続期間の1つ以上が低減される。いくつかの実施形態では、接着受容体の発現により、NKに基づく免疫療法治療を受けている患者における患者生存率が改善し得る。上（又は本明細書中の他の箇所）に挙げたかかるすべての比較は、本明細書に開示されるような接着受容体を発現するNK細胞をかかかる接着受容体を発現しないNK細胞と比べた特性比較を説明する。

【0097】

上に開示された実施形態の具体的特徴及び態様の様々な組み合わせ又は部分的組み合わせが本発明の1つ以上の範囲内に設けられ、さらに属し得ることが考慮される。さらに、本明細書で示されるすべての他の実施形態において、実施形態に関連した任意の特定の特色、態様、方法、特性、特徴、品質、属性、要素などに関する本明細書中の開示を用いることができる。したがって、開示される本発明の異なる態様を形成するため、開示される実施形態の様々な特徴及び態様は、相互に組み合わせるか又は置き換えられ得ることが理解されるべきである。したがって、本明細書で開示される本発明の範囲は、上記の特定の開示される実施形態によって限定されるべきでないことが意図される。さらに、本発明は、様々な修飾形態及び代替形態が可能であるが、その具体例は、図面で示されており、本明細書中で詳述される。しかし、本発明が開示される特定の形態又は方法に限定されるべきでなく、逆に、本発明は、記述される様々な実施形態及び添付の特許請求の範囲の趣旨及び範囲内に入るすべての修飾形態、均等物及び代替物を網羅するべきであることが理解されるべきである。本明細書で開示される任意の方法は、列挙される順序で実施される必要はない。本明細書で開示される方法は、施術者によってとられる特定の行動を含むが、それらは、明示的又は暗示的のいずれかでそれらの行動についての任意の第三者の指示も含み得る。例えば、「拡大されたNK細胞の集団を投与すること」などの行動は、「拡大されたNK細胞の集団の投与を指示すること」を含む。さらに、本開示の特色又は態様がマーカッシュグループの観点で説明される場合、当業者は、本開示が、それにより、マーカッシュグループの任意の個々のメンバー又はそのメンバーのサブグループの観点でも説明されることを理解するであろう。

10

20

【0098】

本明細書で開示される範囲は、あらゆる重複、部分範囲及びそれらの組み合わせも包含する。「最大」、「少なくとも」、「～よりも大きい」、「～よりも少ない」、「～の間」などの文言は、列挙される数を含む。「約」又は「概ね」などの用語が先行する数は、列挙される数を含む。例えば、「約10ナノメートル」は、「10ナノメートル」を含む。

30

【 図 1 】

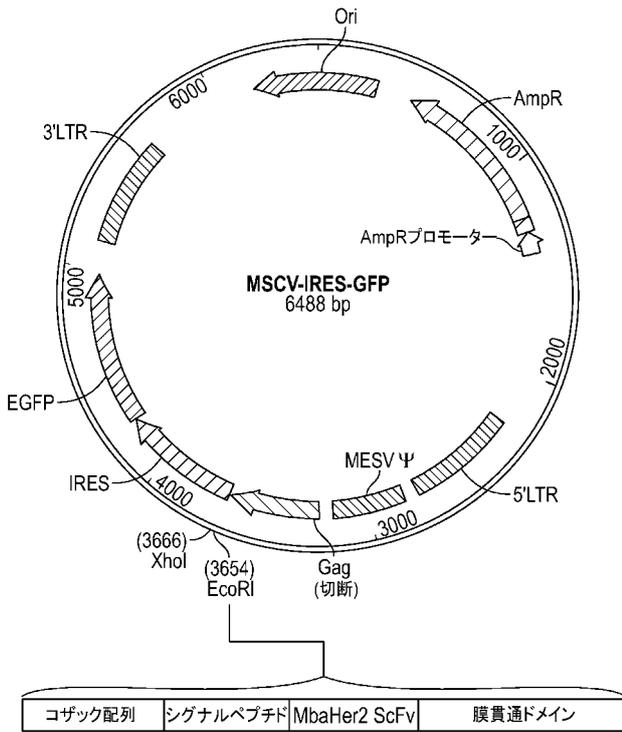


図 1

【 図 2 A 】

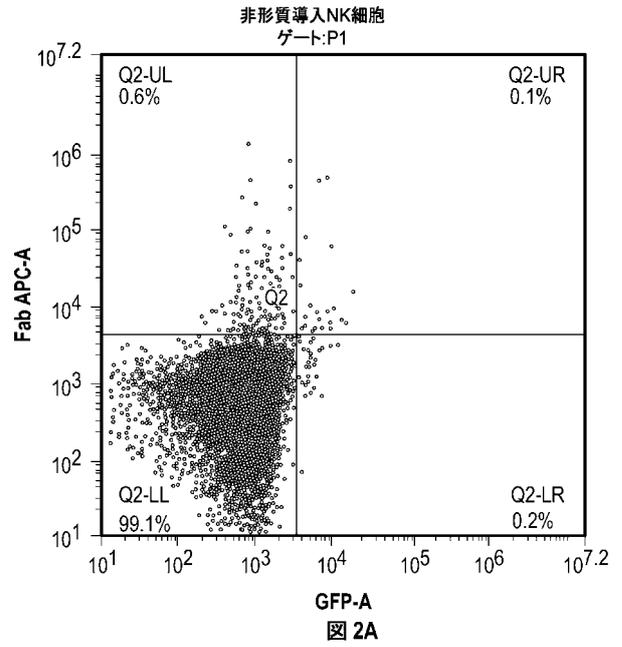


図 2A

【 図 2 B 】

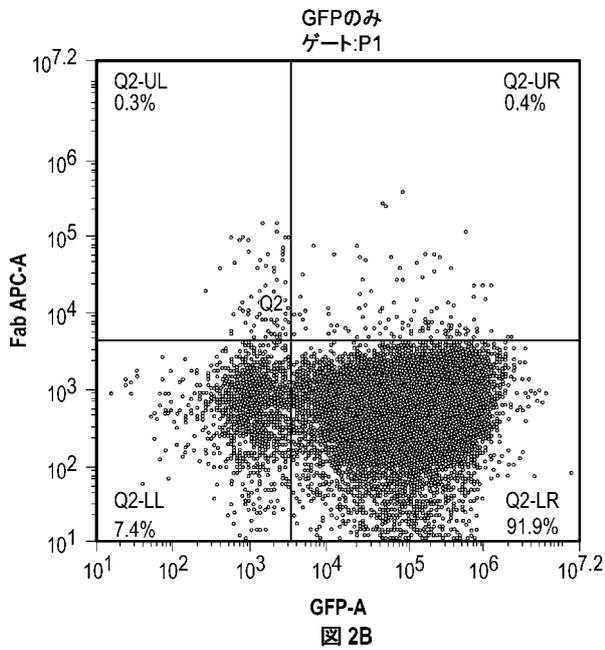


図 2B

【 図 2 C 】

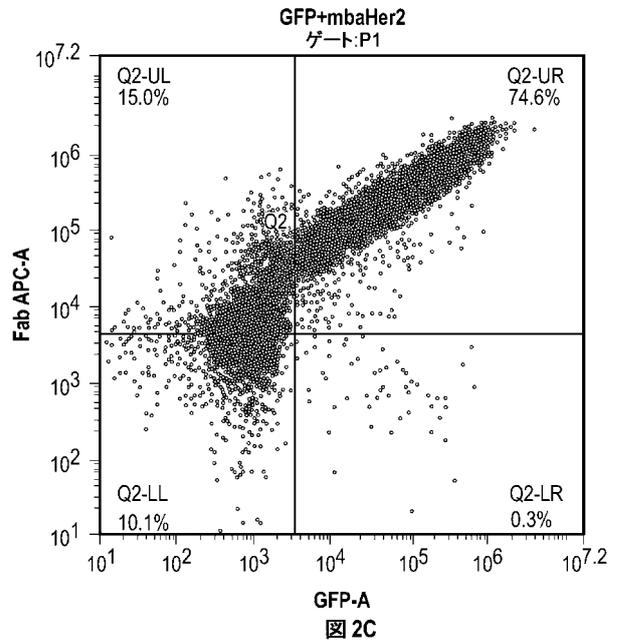


図 2C

【 図 3 A 】

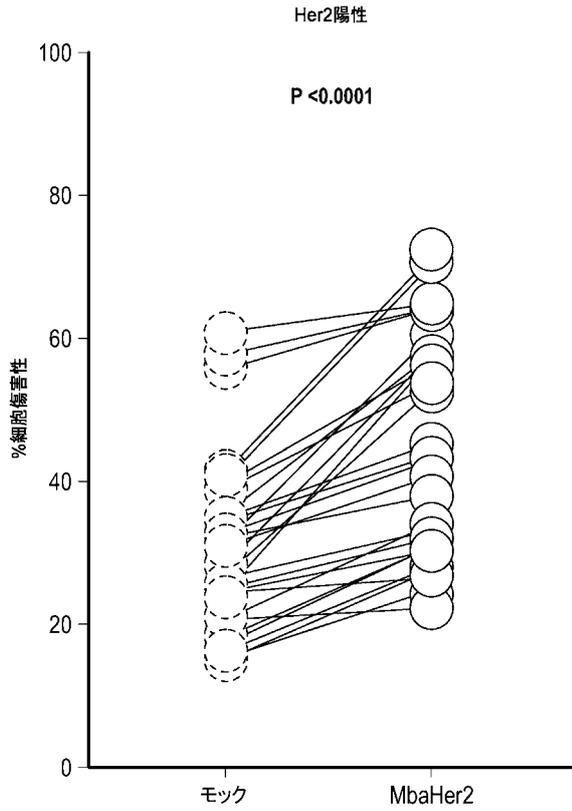


図 3A

【 図 3 B 】

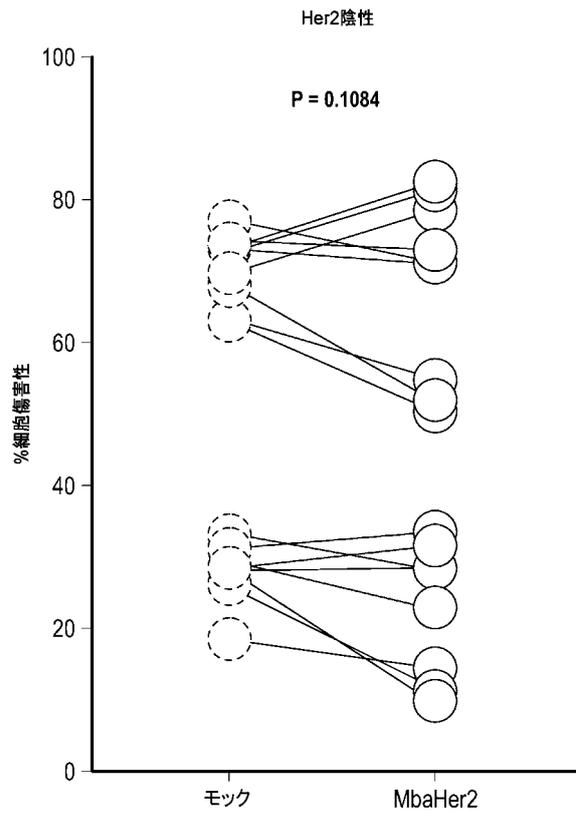


図 3B

【 図 4 】

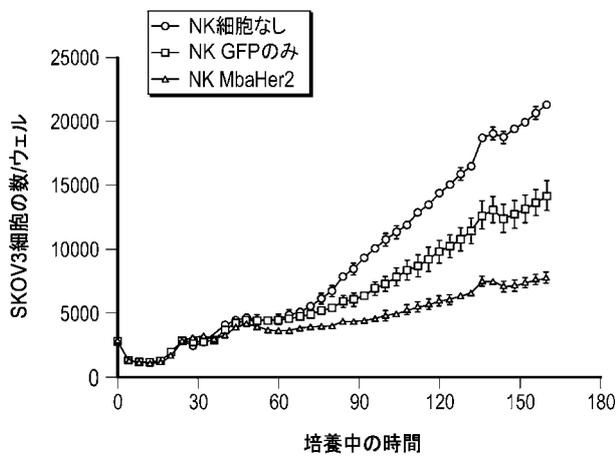


図 4

【 図 5 A 】

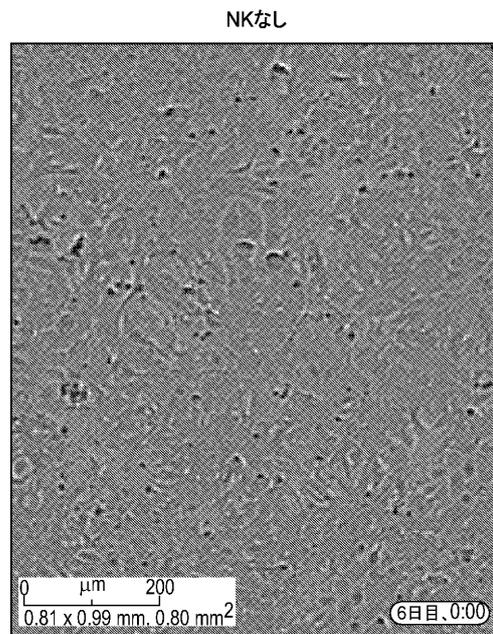


図 5A

【 図 5 B 】

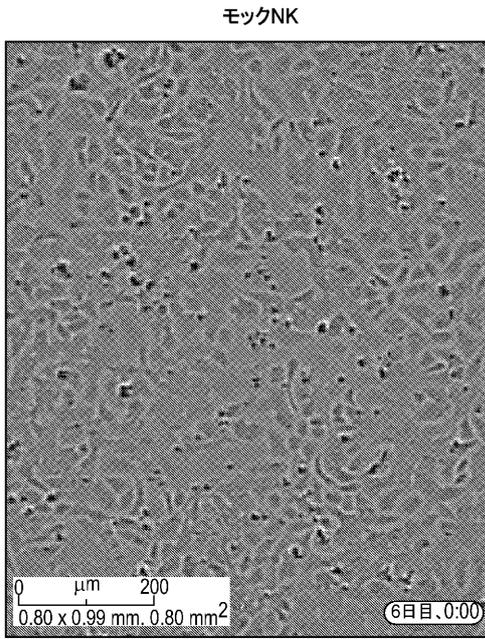


図 5B

【 図 5 C 】

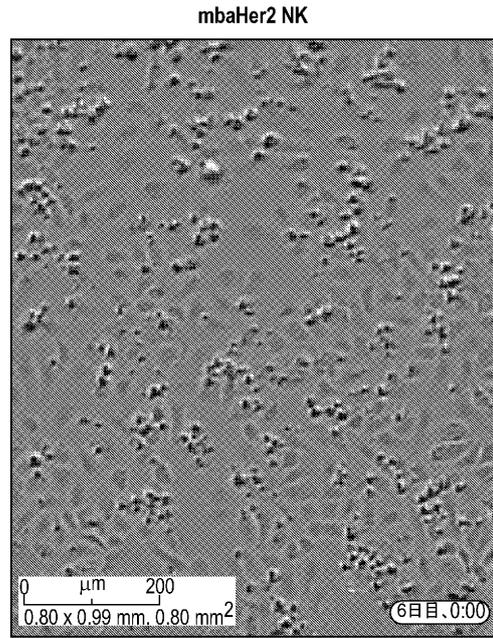


図 5C

【 図 6 A 】

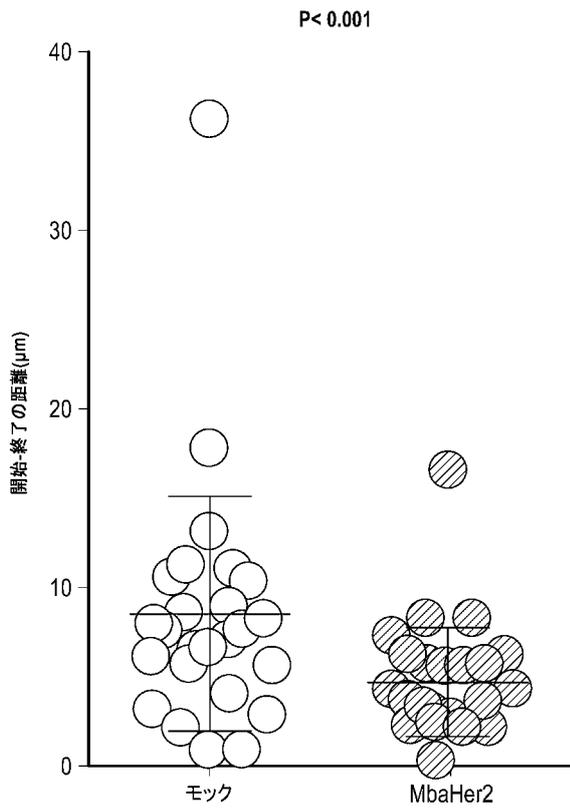


図 6A

【 図 6 B 】

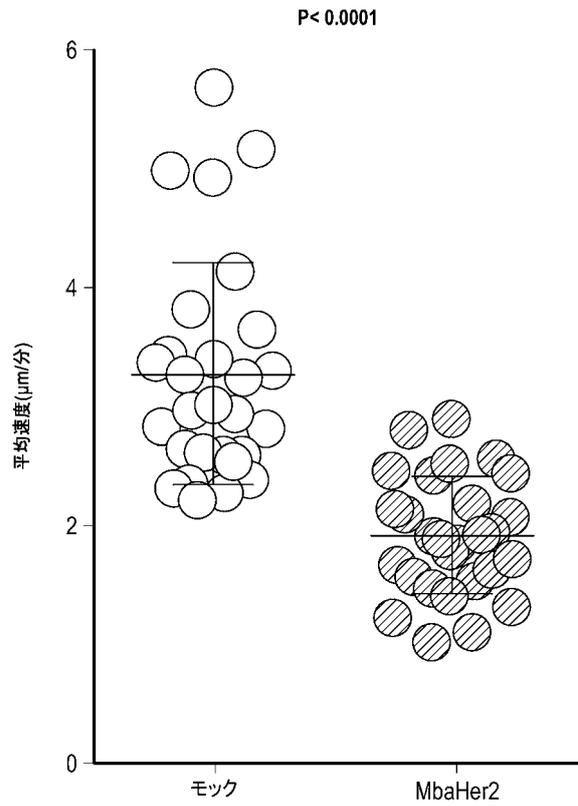
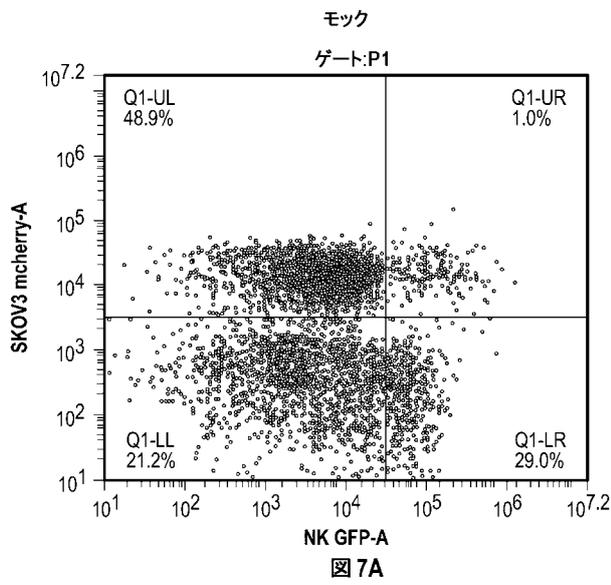
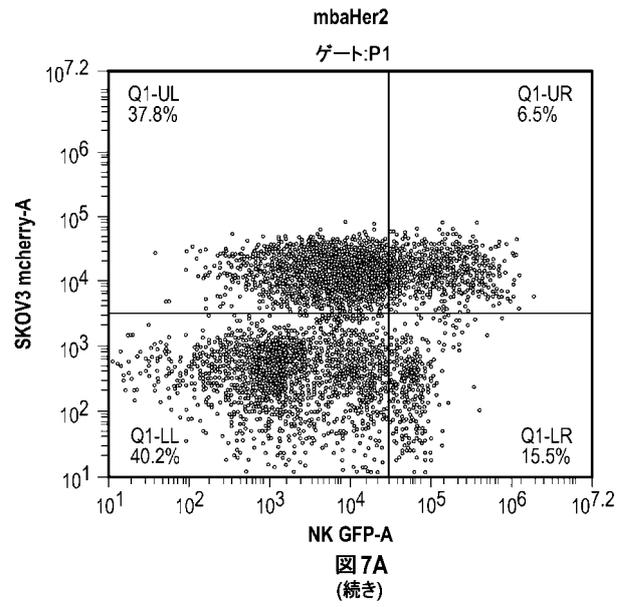


図 6B

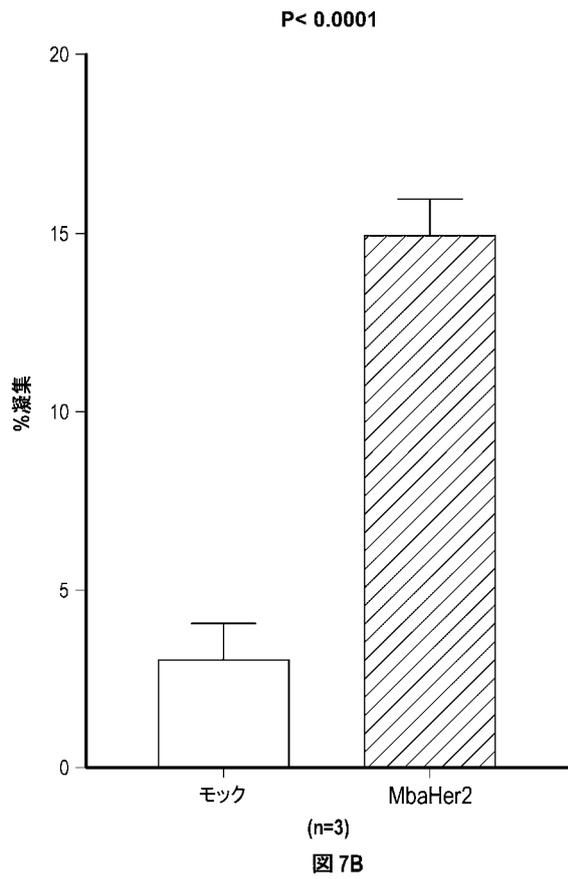
【 図 7 A - 1 】



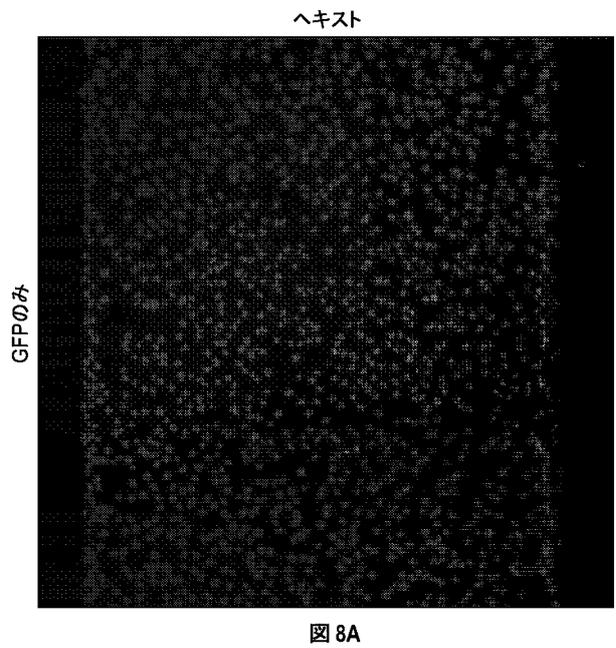
【 図 7 A - 2 】



【 図 7 B 】



【 図 8 A 】



【 図 8 B 】

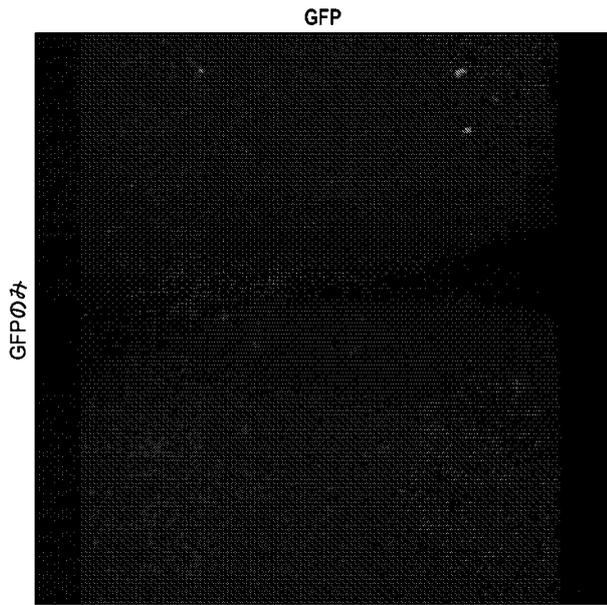


図 8B

【 図 8 C 】

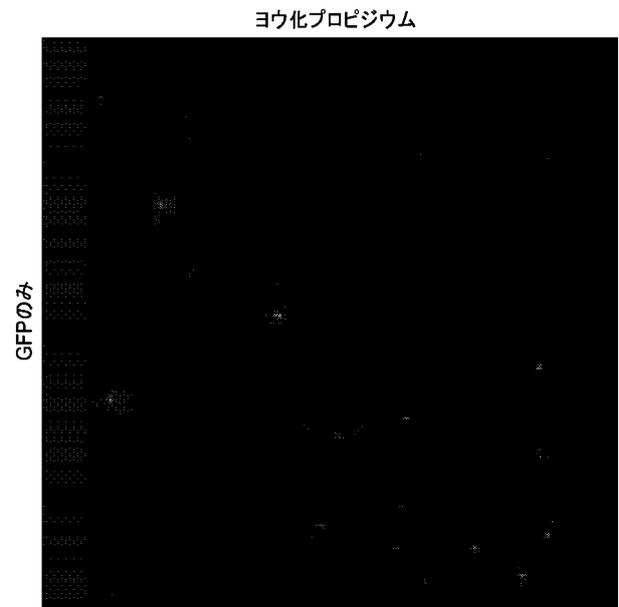


図 8C

【 図 8 D 】

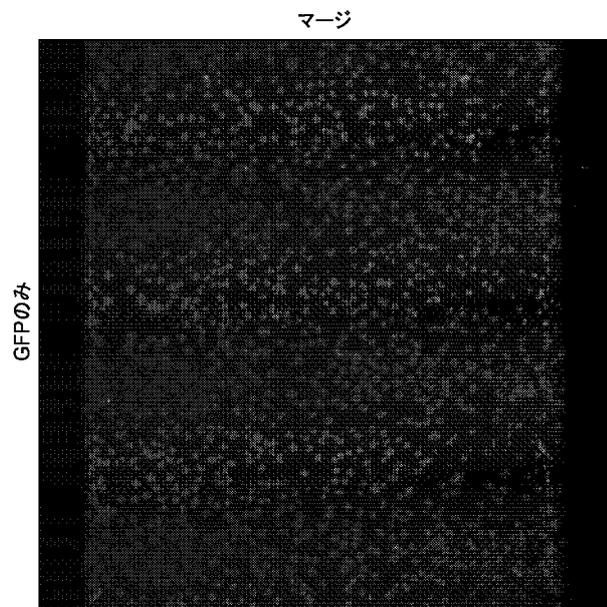


図 8D

【 図 8 E 】

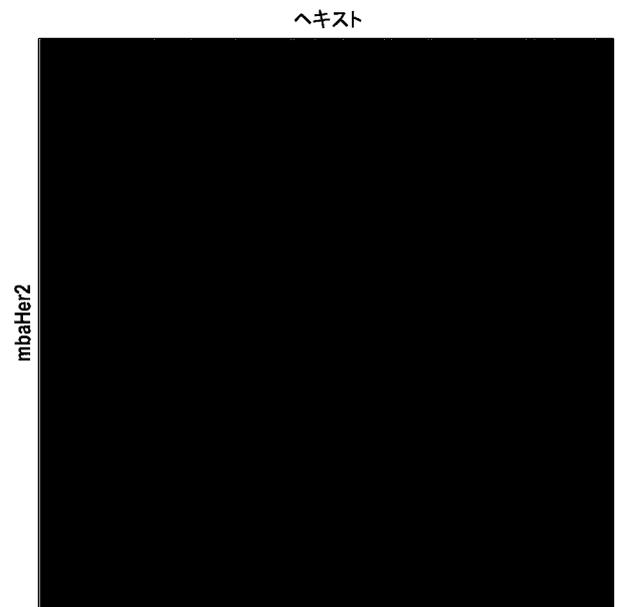


図 8E

【 図 8 F 】

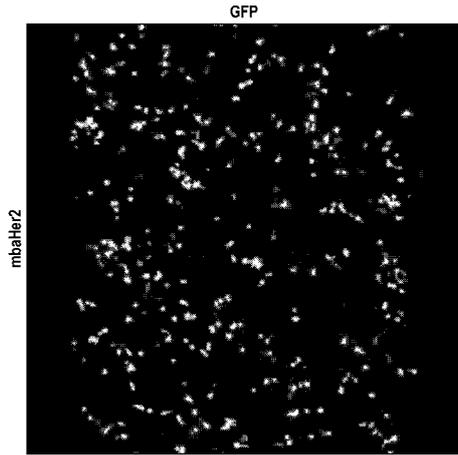


FIG. 8F

【 図 8 G 】

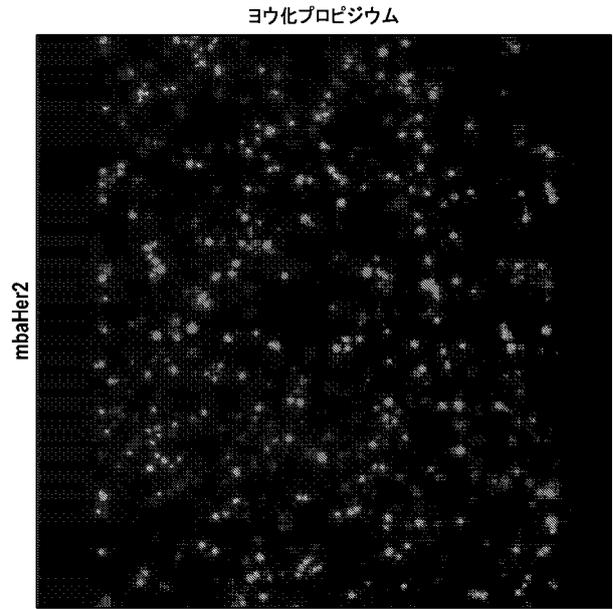


図 8G

【 図 8 H 】

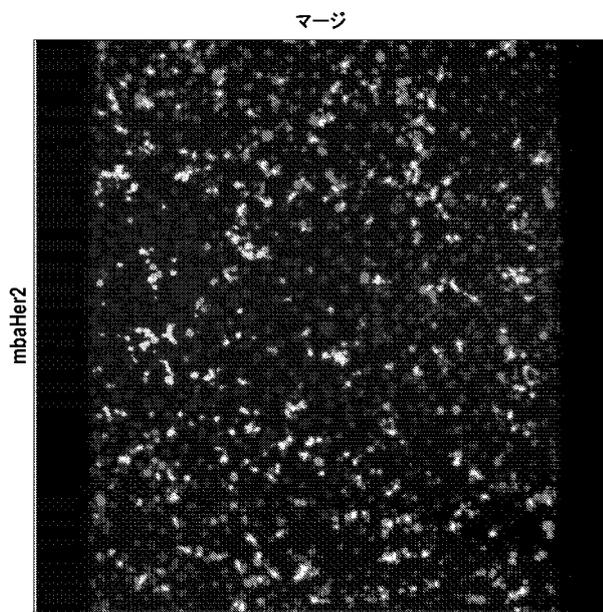


図 8H

【 図 9 A 】

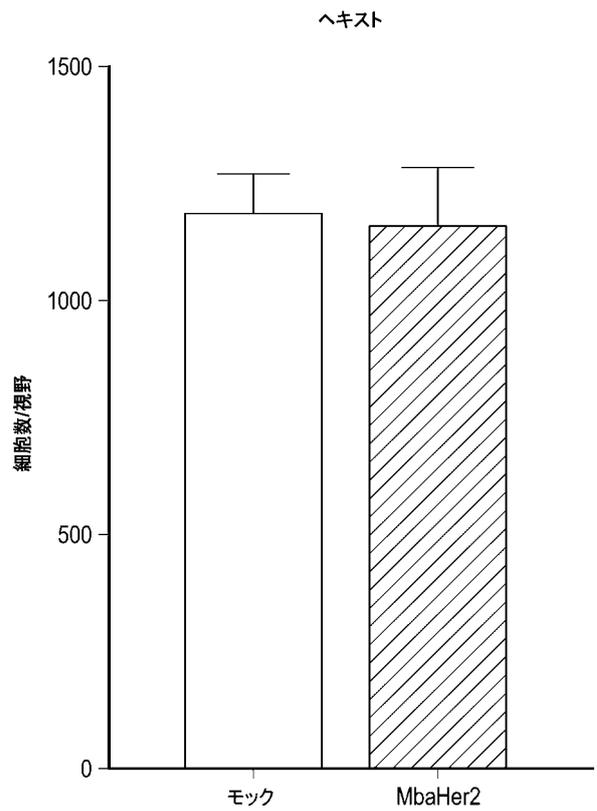


図 9A

【 図 9 B 】

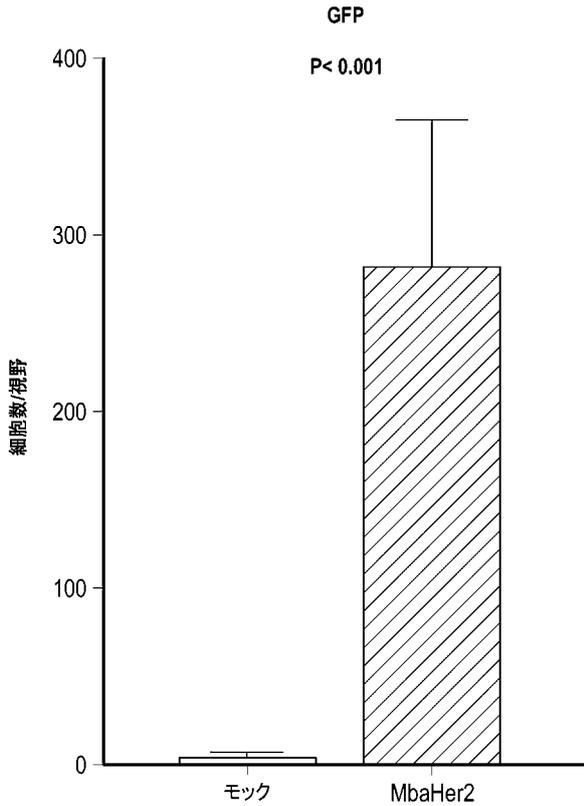


図 9B

【 図 9 C 】

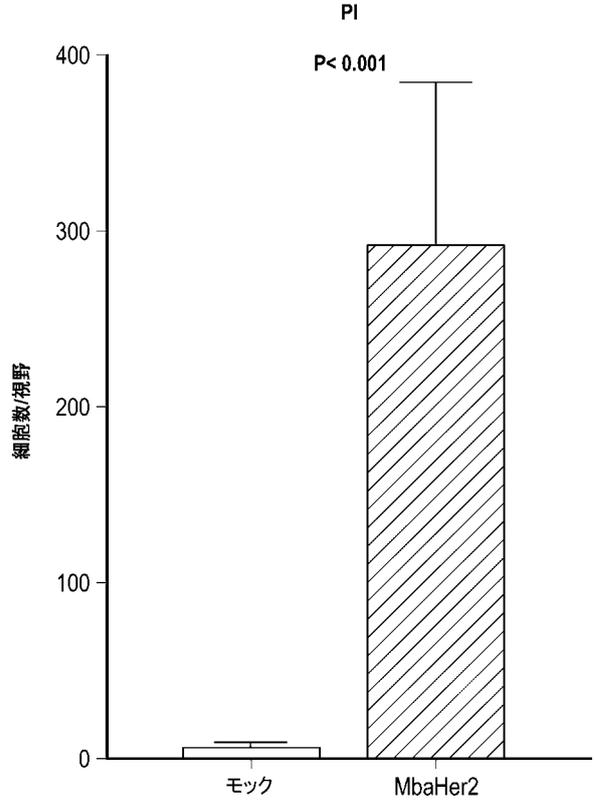


図 9C

【 図 1 0 】

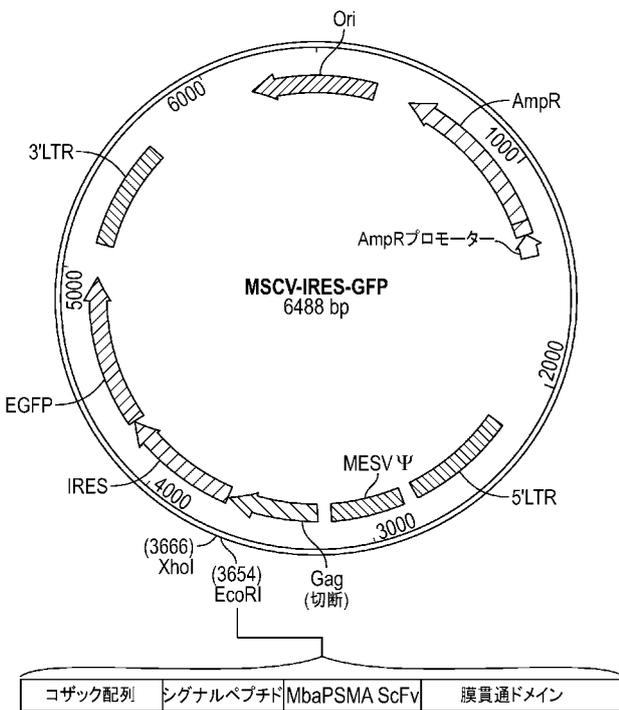
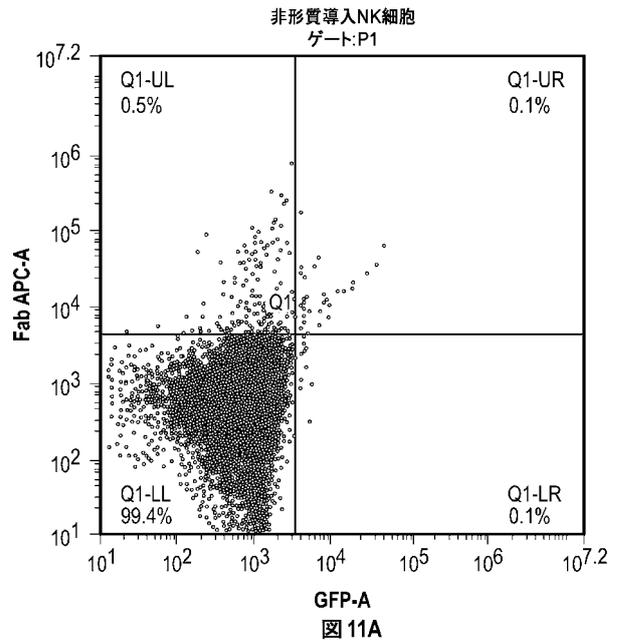


図 10

【 図 1 1 A 】



【 図 1 1 B 】

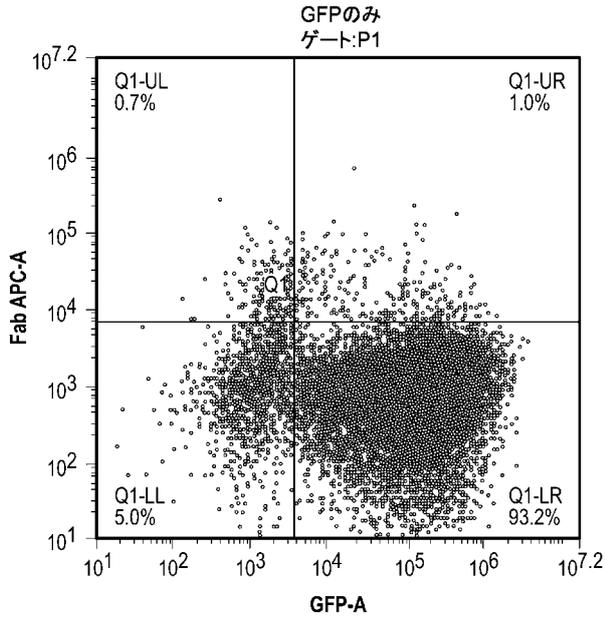


図 11B

【 図 1 1 C 】

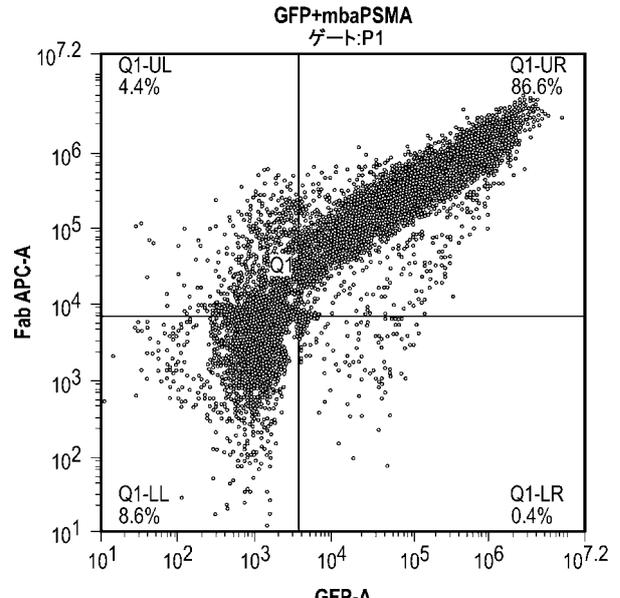


図 11C

【 図 1 2 - 1 】

配列番号1	完全長NKG2D DNA
配列番号2	切断型NKG2D DNA
配列番号3	コドン最適化された切断型NKG2D DNA
配列番号4	CD8シグナル伝達配列DNA
配列番号5	CD8αヒンジDNA
配列番号6	CD8β DNA
配列番号7	CD16α DNA
配列番号8	CD16β DNA
配列番号9	2B4タンパク質
配列番号10	DAP 10 DNA
配列番号11	DAP 12 DNA
配列番号12	4-1BB DNA
配列番号13	CD3ζ DNA
配列番号14	古典的ヘミ-tamタンパク質
配列番号15	ITSMモチーフタンパク質
配列番号16	膜結合型IL15 DNA
配列番号17	膜結合型IL15タンパク質
配列番号18	NKG2D/CD8a/4-1BB/CD3z DNA
配列番号19	NKG2D/CD8a/4-1BB/CD3zタンパク質
配列番号20	NCR1 TM/ICドメインタンパク質
配列番号21	完全長NCR2タンパク質
配列番号22	NCR3 TM/ICドメインタンパク質
配列番号23	NKG2D/CD16 DNA
配列番号24	NKG2D/CD16タンパク質
配列番号25	CD8シグナル配列/NKG2Dコドン最適化ECD/CD8aヒンジ/CD16 Tm/CD16 ICR/4-1BB ICR DNA
配列番号26	CD8シグナル配列/NKG2Dコドン最適化ECD/CD8aヒンジ/CD16 Tm/CD16 ICR/4-1BB ICRタンパク質
配列番号27	NKG2D/NCR1 DNA
配列番号28	NKG2D/NCR1タンパク質
配列番号29	NKG2D/NCR3 DNA
配列番号30	NKG2D/NCR3タンパク質
配列番号31	GSリンカータンパク質用モチーフ
配列番号32	GS/CD8aヒンジタンパク質
配列番号33	GS9タンパク質

図 12

【 図 1 2 - 2 】

配列番号34	GS3タンパク質
配列番号35	2B4 ICRタンパク質
配列番号36	2B4 ICR DNA
配列番号37	NKp80 ICRタンパク質
配列番号38	NKp80 ICR DNA
配列番号39	B2Ad N末端 ECDタンパク質
配列番号40	B2 AdR N末端 ECD DNA
配列番号41	B2 AdR 第1 TM ヘリックスタンパク質
配列番号42	B2 AdR 第1 TM ヘリックスDNA
配列番号43	NK15_1c/CD8aヒンジ増加-CD8aシグナル配列/NKG2Dコドン最適化/GS3/CD8aヒンジ/CD16 Tm/CD16 ICR/4-1BB ICR DNA
配列番号44	NK15_2c/CD8aヒンジ減少-CD8aシグナル配列/NKG2Dコドン最適化/GS3/CD16 Tm/CD16 ICR/4-1BB ICR DNA
配列番号45	NK15_3c/CD8aヒンジ減少-CD8a/NKG2Dコドン最適化/CD16 Tm/CD16 ICR/4-1BB ICR DNA
配列番号46	CD8a/NKG2D/CD8aヒンジ/CD8a Tm/4-1BB ICR/2B4 ICR DNA
配列番号47	CD8a/NKG2D/ADRB2 N末端 ECD/ADRB2 第1 Tm/4-1BB ICR/2B4 ICR DNA
配列番号48	CD8a/NKG2D/CD8aヒンジ/CD8a Tm/4-1BB ICR/2B4 ICR/GS/NKp80 ICR DNA
配列番号49	CD8a/NKG2D/CD8aヒンジ/CD8a Tm/4-1BB ICR/ NKp80 ICR DNA
配列番号50	CD8a/NKG2Dコドン最適化/GS3/NKG2D ECD/ADRB2 EC/ADRB2 Tm/4-1BB ICR/NKp80 ICR DNA
配列番号51	CD8a/NKG2Dコドン最適化/GS3/NKG2D ECD/CD8aヒンジ/CD8a Tm/4-1BB ICR/NKp80 ICR DNA
配列番号52	CD8aシグナル配列/NKG2Dコドン最適化ECD/GS3/NKG2D ECD/CD8aヒンジ/CD16 Tm/CD16 ICR/4-1BB ICR DNA
配列番号53	CD8aシグナル配列/NKG2Dコドン最適化ECD/CD8aヒンジ/CD16 Tm/CD16 ICR/4-1BB ICR/2B4 ICR DNA
配列番号54	CD8aシグナル配列/NKG2Dコドン最適化ECD/CD8aヒンジ/CD16 Tm/CD16 ICR/4-1BB ICR/NKp80 ICR DNA
配列番号55	FLAGタグタンパク質
配列番号56	Hisタグタンパク質
配列番号57	Mycタグタンパク質

図 12 (続き)

【 図 1 3 】

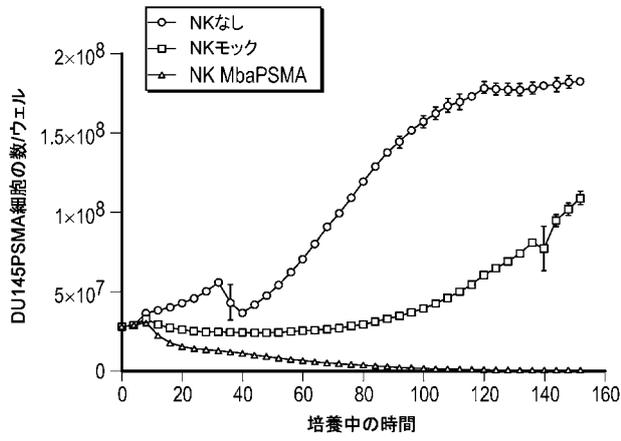


図 13

【 図 1 4 】

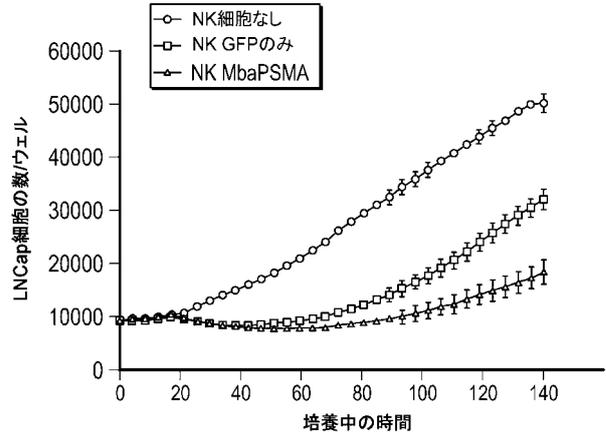


図 14

【 図 1 5 】

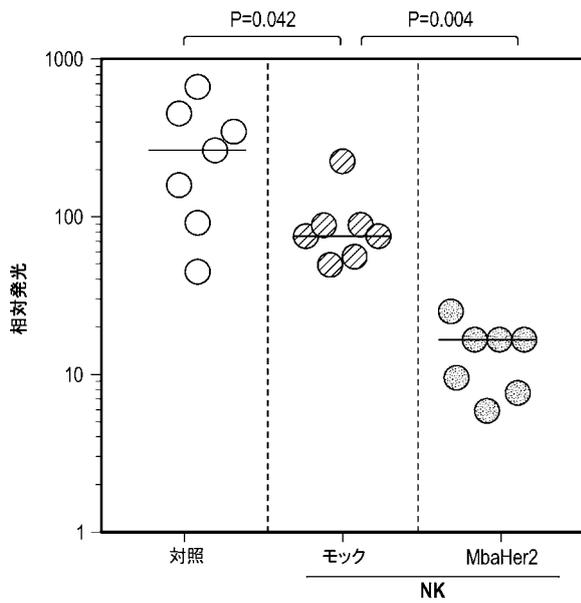


図 15

【配列表】

2021512614000001.app

【 國際調查報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/IB2019/000141
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C07K 14/705 (2006.01) C12N 5/0783 (2010.01) A61K 35/17 (2015.01) A61P 35/00 (2006.01)		
According to International Patent Classification (IPC)		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
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) FAMPAT/EMBASE/BIOSIS/MEDLINE: NK cells, Her2, PSMA, extracellular domain, transmembrane, chimeric antigen receptor, intracellular domain, antibody, and related terms REGISTRY: SEQ ID NOS: 59 and 63		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2015/193411 A1 (CHEMOTHERAPEUTISCHES FORSCHUNGSINSTITUT GEORG-SPEYER-HAUS ET AL.) 23 December 2015 Page 20 paragraphs 2-5, page 21 paragraph 1, page 22 paragraphs 1-5 and page 31 paragraph 1	1-9, 11-20, 22-34, 37-40 and 47-52
Y		35, 41-46 and 53
A		36
X	BRAND L. J. ET AL., Abstract LB-185: A PSMA-directed natural killer cell approach for prostate cancer immunotherapy. <i>Cancer Research</i> , 1 July 2017, Vol. 77, No. 13 Supplement, Abstract No. LB-185	1-8, 10-15, 17-33, 37, 40 and 47-49
Y	[Retrieved on 2019-07-09] <DOI: 10.1158/1538-7445.AM2017-LB-185> Abstract	35, 41-46 and 53
A		36
<input checked="" 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		"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date		"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
"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)		"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
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 23/07/2019 (day/month/year)	Date of mailing of the international search report 05/08/2019 (day/month/year)	
Name and mailing address of the ISA/SG  Intellectual Property Office of Singapore 51 Bras Basah Road #01-01 Manulife Centre Singapore 189554 Email: pct@ipos.gov.sg	Authorized officer Wang Yanyao (Ms) IPOS Customer Service Tel. No.: (+65) 6339 8616	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/B2019/000141
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2011/069019 A2 (HO D. ET AL.) 9 June 2011 SEQ ID NO: 10	22-25
Y	WO 2014/117121 A1 (ST. JUDE CHILDREN'S RESEARCH HOSPITAL, INC. ET AL.) 31 July 2014	35, 41-46 and 53
A	Paragraph [0009]	36
Y	IMAMURA M. ET AL., Autonomous growth and increased cytotoxicity of natural killer cells expressing membrane-bound interleukin-15. <i>Blood</i> , 8 July 2014, Vol. 124, No. 7, pages 1081-1088	44-46
A	[Retrieved on 2019-07-09] <DOI: 10.1182/BLOOD-2014-02-556837> Abstract	36
A	ZAH E. ET AL., T Cells Expressing CD19/CD20 Bispecific Chimeric Antigen Receptors Prevent Antigen Escape by Malignant B Cells. <i>Cancer Immunol Res.</i> , 8 April 2016, Vol. 4, No. 6, pages 498-508	28-31
	[Retrieved on 2019-07-23] <DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0231> Abstract	
A	BRIDGEMAN J. S. ET AL., The Optimal Antigen Response of Chimeric Antigen Receptors Harboring the CD3 ζ Transmembrane Domain Is Dependent upon incorporation of the Receptor into the Endogenous TCR/CD3 Complex. <i>J Immunol.</i> , 17 May 2010, Vol. 184, No. 12, pages 6938-3949	32
	[Retrieved on 2019-07-23] <DOI: 10.4049/JIMMUNOL.0901766> Abstract	
A	GALUSTIAN C. ET AL., MP84-07A tale of tails – A novel approach to immunotherapy of prostate cancer. <i>J Urol.</i> , 10 May 2016, Vol. 195, No. 4S, pages e1092	-
	[Retrieved on 2019-07-09] <DOI: 10.1016/J.JURO.2016.02.2231> Abstract	
A	HOFFMANN S. C. ET AL., 2B4 Engagement Mediates Rapid LFA-1 and Actin- Dependent NK Cell Adhesion to Tumor Cells as Measured by Single Cell Force Spectroscopy. <i>J Immunol.</i> , 26 January 2011, Vol. 186, No. 5, pages 2757-2764	-
	[Retrieved on 2019-07-09] <DOI: 10.4049/JIMMUNOL.1002867> Discussion section	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/IB2019/000141

Note: This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in this International Search Report. This Authority is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2015/193411 A1	23/12/2015	CA 2951355 A1 JP 2017525385 A AU 2015276136 A1 CN 106459916 A US 2017/0283507 A1 US 2017/0129967 A1 KR 20170018450 A US 2018/0282427 A1 EP 3157958 A1	23/12/2015 07/09/2017 22/12/2016 22/02/2017 05/10/2017 11/05/2017 17/02/2017 04/10/2018 26/04/2017
WO 2011/069019 A2	09/06/2011	EP 3511023 A1 MX 2012006301 A CA 2782333 A1 BR 112012012887 A2 CA 3040276 A1 MX 354143 B CN 102753194 A JP 2016094489 A US 2014/0234215 A1 JP 2013512920 A HK 1217957 A1 EP 2506876 A2 EP 3135302 A1 RU 2012123550 A ZA 201204855 B CN 105085681 A AU 2010325969 A1 HK 1177434 A1 US 2011/0268656 A1	17/07/2019 07/09/2012 09/06/2011 02/05/2017 09/06/2011 14/02/2018 24/10/2012 26/05/2016 21/08/2014 18/04/2013 27/01/2017 10/10/2012 01/03/2017 10/01/2014 27/03/2013 25/11/2015 21/06/2012 27/05/2016 03/11/2011
WO 2014/117121 A1	31/07/2014	US 2018/0135015 A1 US 2018/0135014 A1 US 2018/0135013 A1 EP 2948544 A1 US 2018/0135016 A1 US 2017/0107491 A1 US 2016/0000828 A1 SG 11201505858V A	17/05/2018 17/05/2018 17/05/2018 02/12/2015 17/05/2018 20/04/2017 07/01/2016 29/09/2015

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 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 7
A 6 1 K 35/17	(2015.01)	A 6 1 K	35/17	A
A 6 1 K 31/7088	(2006.01)	A 6 1 K	31/7088	
A 6 1 K 48/00	(2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 K 35/76	(2015.01)	A 6 1 K	35/76	

(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, 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(72) 発明者 チュー, ヤンソン
シンガポール国 シンガポール 1 1 9 0 7 7 ローワー ケント リッジ ロード 2 1, ヨ
ルー リン スクール オブ メディシン, シー/オー ナショナル ユニバーシティ オブ
シンガポール

(72) 発明者 カンパナ, ダリオ
シンガポール国 シンガポール 1 1 9 0 7 7 ローワー ケント リッジ ロード 2 1, ヨ
ルー リン スクール オブ メディシン, シー/オー ナショナル ユニバーシティ オブ
シンガポール

F ターム(参考) 4B065 AA90X AA90Y AB01 AC20 BA02 CA24 CA44
4C084 AA13 NA14 ZB221 ZB222 ZB261 ZB262 ZB321 ZB322
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB22 ZB26 ZB32
4C087 AA01 AA02 BB37 BB65 BC83 CA04 CA12 DA31 NA14 ZB22
ZB26 ZB32