

(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2017-525385

(P2017-525385A)

(43) 公表日 平成29年9月7日(2017.9.7)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 5/10 (2006.01)</b>	C 1 2 N 5/10 Z N A	4 B 0 6 3
<b>C 1 2 N 5/0783 (2010.01)</b>	C 1 2 N 5/0783	4 B 0 6 5
<b>C 1 2 Q 1/68 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/68 A	4 C 0 8 7
<b>A 6 1 P 43/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 43/00 1 1 1	4 H 0 4 5
<b>A 6 1 P 35/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 35/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 33 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2017-518595 (P2017-518595)  
 (86) (22) 出願日 平成27年6月18日 (2015.6.18)  
 (85) 翻訳文提出日 平成29年1月19日 (2017.1.19)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2015/063674  
 (87) 国際公開番号 W02015/193411  
 (87) 国際公開日 平成27年12月23日 (2015.12.23)  
 (31) 優先権主張番号 14173020.0  
 (32) 優先日 平成26年6月18日 (2014.6.18)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 516379342  
 ケモセラペウティシエス フォルシュング  
 インスティトゥート ゲオルグーシュパイ  
 ヤーハウス  
 ドイツ連邦共和国 60596 フランク  
 フルト アム マイン パウルーエールリ  
 ヒーシュトラーセ 42-44

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞治療物質としてのCAR発現NK-92細胞

## (57) 【要約】

本発明は、キメラ抗原受容体をコードするレンチウイルスベクターを、好ましくは2つのベクター組み込み遺伝子座をその細胞ゲノム中に含む、ErbB2に特異的なNK-92細胞または細胞株に関する。本発明はさらに、癌、好ましくはErbB2発現癌の予防および/または治療における、ErbB2に特異的なNK-92細胞または細胞株の使用にも関する。本発明はさらに、標的指向化細胞治療物質としての、かつ/または癌養子免疫療法のための、ErbB2に特異的なNK-92細胞または細胞株の使用にも関する。本発明はさらに、ErbB2に特異的なNK-92細胞または細胞株を作製するための方法、およびErbB2に特異的なNK-92細胞または細胞株を同定するための方法、ならびに、これらの方法によって得られるかまたは同定される、ErbB2に特異的なNK-92細胞または細胞株、およびそれらの使用にも関する。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

ErbB2特異的scFv抗体断片、ヒンジ領域、CD28の膜貫通ドメインおよび細胞内ドメイン、ならびにCD3 の細胞内ドメインを含むキメラ抗原受容体をコードするレンチウイルスベクターを含み、該ベクターが、ゲノム中に組み込まれている、ErbB2に特異的なNK-92細胞または細胞株。

**【請求項 2】**

前記ベクターが、ゲノム中、(i) 2番染色体上の遺伝子間領域内におよび (ii) 9番染色体上のTRAF2遺伝子内に組み込まれている、請求項1記載のNK-92細胞または細胞株。

10

**【請求項 3】**

細胞または細胞株のゲノムDNAのPCR解析によって以下の増幅産物のうちの少なくとも一つが得られることを特徴とする、請求項1または2記載のNK-92細胞または細胞株：

- SEQ ID NO: 1 および2のプライマーを用いるPCRは、SEQ ID NO: 9のヌクレオチド配列を有する増幅産物を生じる；

- SEQ ID NO: 3および4のプライマーを用いるPCRは、SEQ ID NO: 10のヌクレオチド配列を有する増幅産物を生じる；

- SEQ ID NO: 5および6のプライマーを用いるPCRは、SEQ ID NO: 11のヌクレオチド配列を有する増幅産物を生じる；

- SEQ ID NO: 7 および8のプライマーを用いるPCRは、SEQ ID NO: 12のヌクレオチド配列を有する増幅産物を生じる。

20

**【請求項 4】**

低減された天然の細胞傷害性を示すかもしくは全く示さず、すなわち、未改変NK-92細胞によって溶解されるErbB2陰性細胞に対して低減された細胞傷害性を示すかもしくは全く示さず、かつ/または

増大した特異的な細胞傷害性を示す、すなわち、未改変NK-92細胞と比べて、ErbB2発現腫瘍細胞に対して増大した細胞傷害性を示す、請求項1～3のいずれか一項記載のNK-92細胞または細胞株。

**【請求項 5】**

ErbB2特異的scFv抗体断片が、SEQ ID NO: 13のアミノ酸配列(scFv FRP5)を含み、かつ/またはSEQ ID NO: 14のヌクレオチド配列によってコードされる、請求項1～4のいずれか一項記載のNK-92細胞または細胞株。

30

**【請求項 6】**

キメラ抗原受容体が、SEQ ID NO: 15のアミノ酸配列(完全長CAR)を含み、かつ/またはSEQ ID NO: 16のヌクレオチド配列によってコードされる、請求項1～5のいずれか一項記載のNK-92細胞または細胞株。

**【請求項 7】**

2014年6月11日にライプニッツ研究所(Leibniz Institute)DSMZ-ドイツ微生物細胞培養コレクション(German Collection of Microorganisms and Cell Cultures)GmbHにアクセス番号DSM ACC3244で寄託された、NK-92細胞または細胞株NK-92/5.28.z。

40

**【請求項 8】**

医薬品で使用するための、請求項1～7のいずれか一項記載のNK-92細胞または細胞株。

**【請求項 9】**

乳癌、卵巣癌、胃癌、前立腺癌、扁平上皮癌、頭頸部癌、結腸癌、膵臓癌、子宮癌、腎細胞癌、神経膠芽腫、髄芽細胞腫、肉腫、および肺癌より、より好ましくは選択される、癌、好ましくはErbB2発現癌の予防および/または治療において使用するための、請求項1～7のいずれか一項記載のNK-92細胞または細胞株。

**【請求項 10】**

標的指向化細胞治療物質としておよび/または癌養子免疫療法用に使用するための、請求項1～7のいずれか一項記載のNK-92細胞または細胞株。

50

## 【請求項 1 1】

放射線照射、好ましくは 線照射による細胞の前処理を含む、請求項9または10記載のNK-92細胞または細胞株。

## 【請求項 1 2】

- (1) NK-92細胞に形質導入するためのベクターを提供する段階、
- (2) 該ベクターを用いてNK-92細胞に形質導入する段階、
- (3) 限界希釈によって、単細胞クローンを得る/作製する段階、
- (4) ErbB2-Fc融合タンパク質を用いるフローサイトメトリー解析によってCAR発現細胞を同定する段階、
- (5) 連続培養期間中にCARの安定した高発現を示す細胞クローンを選択する段階、 10
- (6) 標的変更させた細胞の、ErbB2発現細胞に対する細胞傷害活性を評価する段階、
- (7) 標的変更させた細胞の、ErbB2陰性細胞に対する細胞傷害活性を評価する段階、
- (8) ErbB2発現細胞に対して高い細胞傷害性を示しかつErbB2陰性細胞に対して低い細胞傷害性を示すかまたは全く示さない細胞クローンを選択する段階、ならびに
- (9) ベクター組込みの数および位置を割り出し、かつ2番染色体上の遺伝子間領域内および9番染色体上のTRAF2遺伝子内のベクター組込みを示す細胞クローンを選択する段階を含む、ErbB2に特異的なNK-92細胞または細胞株を作製するための方法。

## 【請求項 1 3】

細胞(クローン)におけるベクター組込みの数および位置を割り出し、かつ2番染色体上の遺伝子間領域内および9番染色体上のTRAF2遺伝子内のベクター組込みを示す細胞(クローン)を選択する段階 20

を含み、

好ましくは該細胞(クローン)が、該細胞(クローン)のゲノムDNAのPCR解析によって以下の増幅産物のうちの少なくとも1つが得られることを特徴とする、ErbB2に特異的なNK-92細胞または細胞株を同定するための方法:

- SEQ ID NO: 1 および2のプライマーを用いるPCRは、SEQ ID NO: 9のヌクレオチド配列を有する増幅産物を生じる;
- SEQ ID NO: 3 および4のプライマーを用いるPCRは、SEQ ID NO: 10のヌクレオチド配列を有する増幅産物を生じる;
- SEQ ID NO: 5 および6のプライマーを用いるPCRは、SEQ ID NO: 11のヌクレオチド配列を有する増幅産物を生じる; 30
- SEQ ID NO: 7 および8のプライマーを用いるPCRは、SEQ ID NO: 12のヌクレオチド配列を有する増幅産物を生じる。

## 【請求項 1 4】

請求項12記載の方法によって得られるかまたは請求項13記載の方法によって同定される、NK-92細胞または細胞株。

## 【請求項 1 5】

放射線照射、より好ましくは 線照射による細胞の前処理を好ましくは含む、乳癌、卵巣癌、胃癌、前立腺癌、扁平上皮癌、頭頸部癌、結腸癌、膵臓癌、子宮癌、腎細胞癌、神経膠芽腫、髄芽細胞腫、肉腫、および肺癌より、より好ましくは選択される、癌 40

、好ましくはErbB2発現癌の予防および/もしくは治療において使用するための、

ならびに/または、

放射線照射、より好ましくは 線照射による細胞の前処理を好ましくは含む、標的指向化細胞治療物質としておよび/または癌養子免疫療法用に使用するための、請求項12~14のいずれか一項記載のNK-92細胞または細胞株。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、キメラ抗原受容体をコードするレンチウイルスベクター、および好ましくは、その細胞ゲノム中に2つのベクター組込み遺伝子座を含む、ErbB2に特異的なNK-92細胞 50

または細胞株に関する。本発明はさらに、癌、好ましくはErbB2発現癌の予防および/または治療における、ErbB2に特異的なNK-92細胞または細胞株の使用にも関する。本発明はさらに、標的指向化細胞治療物質としての、かつ/または癌養子免疫療法のための、ErbB2に特異的なNK-92細胞または細胞株の使用にも関する。本発明はさらに、ErbB2に特異的なNK-92細胞または細胞株を作製するための方法、およびErbB2に特異的なNK-92細胞または細胞株を同定するための方法、ならびに、これらの方法によって得られるかまたは同定される、ErbB2に特異的なNK-92細胞または細胞株、およびそれらの使用にも関する。

#### 【背景技術】

#### 【0002】

発明の背景

ナチュラルキラー(NK)細胞は、癌養子免疫療法のために重要なエフェクター細胞型である。T細胞と同様に、キメラ抗原受容体(CAR)を発現するようにNK細胞を改変して、抗腫瘍活性を増強することができる。

#### 【0003】

CD19陽性悪性腫瘍患者へのCAR改変T細胞の適用が好結果であったことから、癌養子免疫療法に対するこのアプローチの有効性が実証されており(例えば、Grupp et al., 2013を参照されたい)、様々な異なる腫瘍抗原を標的とするCAR T細胞が、活発に臨床開発されている(Kalos et al., 2013)。ナチュラルキラー(NK)細胞のCARを介した標的変更(retargeting)は、それほど頻繁に試みられておらず、これまでのところ、そのようなアプローチに関する臨床データは入手不可能である。NK細胞は、癌免疫監視において重要な役割を果たし、癌養子免疫療法のための重要なエフェクター細胞型である(Geller and Miller, 2011)。T細胞とは対照的に、NK細胞は、事前の感作およびMHC分子との複合体の状態で提示されるペプチド抗原の認識を必要としない。その代わりに、それらの細胞傷害性は、一つにはCD3 を通じてシグナル伝達する、生殖系列にコードされる細胞表面受容体を通じた適切な刺激を受けると、迅速に誘発され得る(Koch et al., 2013)。したがって、CD3 を含むCARは、NK細胞に内在するシグナル伝達経路に容易に結合し、細胞溶解活性を誘発する(例えば、Muller et al., 2008を参照されたい)。これらの進歩にもかかわらず、CAR操作(CAR engineered)NK細胞を用いた経験およびそれらの臨床開発は、依然として限定的である。効率的な抗ウイルス防御機構が原因で、レトロウイルスベクターおよびレンチウイルスベクターならびに物理的トランスフェクション方法を用いるNK細胞への遺伝子移入は、T細胞での場合より効率が低いため、多数のCAR発現細胞の作製は複雑である(Boissel et al., 2009)。この制限は、形質導入されていない大量の細胞からのCAR発現細胞の単離および増殖を可能にするNK-92のような臨床適用可能なNK細胞株を使用することによって克服することができる(Muller et al., 2008)。

#### 【0004】

癌患者での第I相試験により、恒久的な生着を防止するために適用前に放射線照射された未改変NK-92細胞の注入が安全であることが実証された。これに関して、活性の臨床徴候は、一部の患者でしか観察されなかった(Tonn et al., 2013)。これは、腫瘍特異的受容体を欠く未改変NK-92細胞による不十分な腫瘍認識に起因する可能性が高い。

#### 【0005】

本発明は、特に癌の治療において、および標的指向化細胞治療物質として、臨床使用するのに適している、改良されたCAR操作NK細胞を提供することを狙いとする。

#### 【0006】

改良されたCAR操作NK細胞を作製し分子的に同定するための手段および方法を提供することが、本発明のさらに別の目的である。

#### 【発明の概要】

#### 【0007】

本発明によれば、この目的は、ErbB2特異的scFv抗体断片、ヒンジ領域、CD28の膜貫通ドメインおよび細胞内ドメイン、ならびにCD3 の細胞内ドメイン

10

20

30

40

50

を含むキメラ抗原受容体(CAR)をコードするレンチウイルスベクターを含み、

該ベクターが、ゲノム中、(i) 好ましくは、2番染色体上の遺伝子間領域内におよび (i)

i) 9番染色体上のTRAF2遺伝子内に組み込まれている、

ErbB2に特異的なNK-92細胞または細胞株によって達成される。

【0008】

本発明によれば、この目的は、医薬品で使用するための本発明によるNK-92細胞または細胞株を提供することによって、達成される。

【0009】

本発明によれば、この目的は、癌、好ましくはErbB2発現癌の予防および/または治療において使用するための本発明によるNK-92細胞または細胞株を提供することによって、達成される。

10

【0010】

本発明によれば、この目的は、標的指向化細胞治療物質としておよび/または癌養子免疫療法用に使用するための、本発明によるNK-92細胞または細胞株を提供することによって、達成される。

【0011】

本発明によれば、この目的は、以下の段階を含む、ErbB2に特異的なNK-92細胞または細胞株を作製するための方法によって、達成される：

(1) NK-92細胞に形質導入するためのベクターを提供する段階、

(2) 該ベクターを用いてNK-92細胞に形質導入する段階、

(3) 限界希釈によって、単細胞クローンを得る/作製する段階、

(4) ErbB2-Fc融合タンパク質を用いるフローサイトメトリー解析によってCAR発現細胞を同定する段階、

20

(5) 連続培養期間中にCARの安定した高発現を示す細胞クローンを選択する段階、

(6) 標的変更させた細胞の、ErbB2発現細胞に対する細胞傷害活性を評価する段階、

(7) 標的変更させた細胞の、ErbB2陰性細胞に対する細胞傷害活性を評価する段階、

(8) ErbB2発現細胞に対して高い細胞傷害性を示しかつErbB2陰性細胞に対して低い細胞傷害性を示すかまたは全く示さない細胞クローンを選択する段階、ならびに

(9) ベクター組込みの数および位置を割り出し、かつ2番染色体上の遺伝子間領域内および9番染色体上のTRAF2遺伝子内のベクター組込みを示す細胞クローンを選択する段階。

30

【0012】

本発明によれば、この目的は、

細胞(クローン)におけるベクター組込みの数および位置を割り出し、かつ2番染色体上の遺伝子間領域内および9番染色体上のTRAF2遺伝子内のベクター組込みを示す細胞(クローン)を選択する段階

を含む、ErbB2に特異的なNK-92細胞または細胞株を同定するための方法によって、達成される。

【0013】

本発明によれば、この目的は、本発明による方法によって得られるかまたは同定されるNK-92細胞または細胞株によって達成される。

40

【0014】

本発明によれば、この目的は、癌、好ましくはErbB2発現癌の予防および/または治療において使用するための、本発明による方法によって得られるかまたは同定されるNK-92細胞または細胞株を提供することによって、達成される。

【0015】

本発明によれば、この目的は、標的指向化細胞治療物質としておよび/または癌養子免疫療法用に使用するための、本発明による方法によって得られるかまたは同定されるNK-92細胞または細胞株を提供することによって、達成される。

【発明を実施するための形態】

【0016】

50

### 発明の好ましい態様の説明

本発明を下記により詳細に説明する前に、本発明は、本明細書において説明する特定の方法論、プロトコール、および試薬に限定されず、これらは様々であり得ることを理解すべきである。また、本明細書において使用される専門用語は、特定の態様を説明することだけを目的とし、添付の特許請求の範囲によってのみ限定される本発明の範囲を限定することは意図しないことも理解すべきである。他に規定されない限り、本明細書で使用される技術用語および科学用語はすべて、当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有している。本発明のために、本明細書に引用される参考文献はすべて、その全体が参照により組み入れられる。

【0017】

臨床的に使用可能なCAR発現ヒトNK-92細胞

前述したように、本発明は、ErbB2に特異的なNK-92細胞または細胞株を提供する。

【0018】

本発明のErbB2に特異的なNK-92細胞または細胞株は、ErbB2特異的scFv抗体断片、ヒンジ領域、CD28の膜貫通ドメインおよび細胞内ドメイン、ならびにCD3の細胞内ドメインを含むキメラ抗原受容体をコードするレンチウイルスベクターを含む。

【0019】

ErbB2に特異的なNK-92細胞または細胞株は、好ましくは、その細胞ゲノム中に2つのベクター組込み遺伝子座を含む。

【0020】

ErbB2に特異的なNK-92細胞または細胞株は、前記ベクターが、ゲノム中、(i) 好ましくは、2番染色体上の遺伝子間領域内におよび(ii) 9番染色体上のTRAF2遺伝子内に組み込まれていることを特徴とする。

【0021】

未改変のNK-92細胞または細胞株は、当技術分野において公知である。例えば、Gong et al., 1994またはWO 98/49268 A1を参照されたい。NK-92細胞は、アメリカンタイプティッシュコレクション(American Type Tissue Collection)に寄託されている(ATCC番号CRL-2407)。

【0022】

- ベクター組込み

ErbB2に特異的なNK-92細胞または細胞株は、前記2つのベクター組込みに基づいて、分子的に特徴決定し同定することができる。

【0023】

好ましくは、本発明のNK-92細胞または細胞株は、該細胞または細胞株のゲノムDNAのPCR解析によって以下の増幅産物のうちの少なくとも1つが得られることを特徴とする：

- SEQ ID NO: 1および2のプライマーを用いるPCRは、SEQ ID NO: 9のヌクレオチド配列を有する増幅産物を生じる；

- SEQ ID NO: 3および4のプライマーを用いるPCRは、SEQ ID NO: 10のヌクレオチド配列を有する増幅産物を生じる；

- SEQ ID NO: 5および6のプライマーを用いるPCRは、SEQ ID NO: 11のヌクレオチド配列を有する増幅産物を生じる；

- SEQ ID NO: 7および8のプライマーを用いるPCRは、SEQ ID NO: 12のヌクレオチド配列を有する増幅産物を生じる。

【0024】

染色体配列および組み込まれたベクター配列の5'連結部位および3'連結部位に隣接しているゲノム配列およびベクターDNA配列にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプライマー(すなわち、SEQ ID NO: 1および2、3および4、5および6、7および8に明記されたオリゴヌクレオチドプライマー)を用いて本発明の細胞または細胞株のゲノムDNAをPCR解析す

10

20

30

40

50

ると、決まった長さおよび配列の増幅産物(すなわち、SEQ ID NO: 9、10、11、12に明記されたPCR断片)が生じることから、ベクターの組込みが確認され、本発明の細胞(クローン)NK-92が分子的に同定される。

【 0 0 2 5 】

1) 染色体配列および組み込まれたベクター配列の5'連結部位および3'連結部位に隣接しているゲノム配列およびベクター-DNA配列にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプライマー:

a) TRAF2遺伝子内のCARベクター組込み

a-1) ベクター組込みの5'部分

フォワードPCRプライマー-TRAF2-F1:

CTTCAGCAGGGACCAGAAACAA [SEQ ID NO. 1]

リバースPCRプライマー-CAR-R1(ベクター配列に下線を引いている)

CCGCTTAATACTGACGCTCTCG [SEQ ID NO. 2]

a-2) ベクター組込みの3'部分

フォワードPCRプライマー-CAR-F1(ベクター配列に下線を引いている)

ATCGCCACGGCAGAACTCA [SEQ ID NO. 3]

リバースPCRプライマー-TRAF2-R1

GACCCTCACCCAACGCTTAG [SEQ ID NO. 4]

b) 2番染色体の遺伝子間領域内のCARベクター組込み

b-1) ベクター組込みの5'部分

フォワードPCRプライマー-IGCHR2-F1

TCAGTGGAAATGGGCAGCTTCAAGT [SEQ ID NO. 5]

リバースPCRプライマー-CAR-R2(ベクター配列に下線を引いている)

TTCAGCAAGCCGAGTCCTGCGT [SEQ ID NO. 6]

b-2) ベクター組込みの3'部分

フォワードPCRプライマー-CAR-F2(ベクター配列に下線を引いている)

ACTGATAATTCGGTGGTGTGT [SEQ ID NO. 7]

リバースPCRプライマー-IGCHR2\_CAR-R1(ベクター配列に下線を引いている)

CACCTGTGGCTCACTGCTAGA [SEQ ID NO. 8]

【 0 0 2 6 】

2) 決まった長さおよび配列の増幅産物:

a) TRAF2遺伝子内のCARベクター組込みの増幅産物

TRAF2遺伝子内のCARベクター組込み

ベクター組込みの5'部分

NK-92/5-28.z細胞のゲノムDNAに由来するPCR産物TRAF2-CAR(5')

プライマー: TRAF2-F1(SEQ ID NO: 1)、CAR-R1(SEQ ID NO: 2)

小文字: TRAF2遺伝子

大文字: ベクター配列

長さ: 587ヌクレオチド

10

20

30

## SEQ ID NO. 9

cttcagcagggaccagaaacaaaactcacactctttcttctctgagttga 50  
 gactggaaaaatgaaagattggttttaggggaaacttgagggaaacagtctg 100  
 ggcagcctgcagggcatggccctgttcctccagggctgggaaagtca 150  
 ctgctttctggtggcgaACTGGAAGGGCTAATTCACCTCCCAACGAAGACA 200  
 AGATCTGCTTTTTGCTTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAG 250  
 CCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAA 300  
 AGCTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTC 350  
 TGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTA 400  
 GCAGTGGCGCCCGAACAGGGACTTGAAAAGCGAAAAGGGAAACCAGAGGAGC 450  
 TCTCTCGACGCAGGACTCGGCTTGCTGAAGCGCGCACGGCAAGAGGCGAG 500  
 GGGCGGCGACTGGTGAGTACGCCAAAAATTTGACTAGCGGAGGCTAGAA 550  
 GGAGAGAGATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGG 587

10

## b) TRAF2遺伝子内のCARベクター組込みの増幅産物

TRAF2遺伝子内のCARベクター組込み

ベクター組込みの3'部分

NK-92/5-28.z細胞のゲノムDNAに由来するPCR産物CAR-TRAF2(3')

プライマー: CAR-F1(SEQ ID NO: 3)、TRAF2-R1(SEQ ID NO: 4)

小文字: TRAF2遺伝子

大文字: ベクター配列

長さ: 503ヌクレオチド

## SEQ ID NO. 10

ATCGCCACGGCAGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGG 50  
 GGCTAGGTTGCTGGGCACTGATAATTCGGTGGTGTGTCGAATTCGATAC 100  
 TCGAGGTCGAGGCAATTCGAGCTCGGTACCTTTAAGACCAATGACTTACA 150  
 AGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGACTGGAA 200  
 GGGCTAATTCACCTCCCAACGAAGACAAGATCTGCTTTTTGCTTGTACTGG 250  
 GTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAG 300  
 GGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCCTTGAGTGCTTCAAGTA 350  
 GTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACC 400  
 CTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCAccttccctctgcagctgctgg 450  
 ctccagccgattgtatatgctgggagctctgcactaagcgttgggtgaagg 500  
 gtc 503

30

## c) 2番染色体の遺伝子間領域内のCARベクター組込みの増幅産物

2番染色体の遺伝子間領域内のCARベクター組込み

ベクター組込みの5'部分

NK-92/5-28.z細胞のゲノムDNAに由来するPCR産物IGCHR2-CAR(5')

プライマー: IGCHR2-F1(SEQ ID NO: 5)、CAR-R2(SEQ ID NO: 6)

小文字: 2番染色体の遺伝子間領域

大文字: ベクター配列

長さ: 679ヌクレオチド

40



## SEQ ID NO. 11

tcagtggaatgggcagcttcaagttgatgtcatttcaatagtaacttatt 50  
 tcagtctacatacttcccaagaatgcaccatctcttttttatgtatttat 100  
 tattttgagaaagagtctcactctgtcgcccaggctggagtgcaatggca 150  
 tgatcttggctcactgtaacctccgtctcctgggttcaagccattctcct 200  
 gtctcagcctcccgggtagtggggttataggcacacaccaccacgcccgg 250  
 ctaatTTTTGTATTTTTAGTAAAGATGGGGTTTcaccatgTtggccaggc 300  
 tgggctcaaactcttgacttcaggtgatccgcccaccttggcctccaaa 350  
 gtgctgggatgacaggcACTGGAAGGGCTAATTCACCTCCAACGAAGACA 400  
 AGATCTGCTTTTTGCTTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAG 450  
 CCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAA 500  
 AGCTTGCCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTC 550  
 TGGTAAGTACTAGAGATCCCTCAGACCCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTA 600  
 GCAGTGGCGCCCGAACAGGGACTTGAAAGCGAAAAGGAAACCAGAGGAGC 650  
 TCTCTCGACGCAGGACTCGGCTTGCTGAA 679

10

d) 2番染色体の遺伝子間領域内のCARベクター組込みの増幅産物  
 2番染色体の遺伝子間領域内のCARベクター組込み

20

ベクター組込みの3'部分

NK-92/5-28.z細胞のゲノムDNAに由来するPCR産物CAR-1GCHR2(3')

プライマー: CAR-F2(SEQ ID NO: 7)、1GCHR2\_CAR-R1(SEQ ID NO: 8)

小文字: 2番染色体の遺伝子間領域

大文字: ベクター配列

長さ: 376ヌクレオチド

## SEQ ID NO. 12

ACTGATAATTCGGTGGTGTGTCGAATTCGATACTCGAGGTCGAGGCAAT 50  
 TCGAGCTCGGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCT 100  
 TAGCCACTTTTTTAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAATTCACCTCCC 150  
 AACGAAGACAAGATCTGCTTTTTGCTTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGAC 200  
 CAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAA 250  
 GCCTCAATAAAGCTTGCCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGT 300  
 TGTGTGACTCTGGTAAGTACTAGAGATCCCTCAGACCCCTTTTAGTCAGTGTGG 350  
 AAAATCTCTAGCAgtgagccacagtg 376

30

## 【0027】

- 低減した天然の細胞傷害性および高度に特異的な細胞傷害性

好ましくは、本発明のNK-92細胞または細胞株は、以下を特徴とする:

40

- NK-92細胞もしくは細胞株は、低減した天然の細胞傷害性を示すかもしくは全く示さず、すなわち、未改変NK-92細胞によって溶解されるErbB2陰性細胞に対して低減した細胞傷害性を示すかもしくは全く示さず、

かつ/または

- NK-92細胞もしくは細胞株は、増大した特異的な細胞傷害性を示す、すなわち、未改変NK-92細胞と比べて、ErbB2発現腫瘍細胞に対して増大した細胞傷害性を示す。

## 【0028】

前記低減した天然の細胞傷害性は、特に、臨床使用を考慮すると、本発明の細胞または細胞株の重要な安全性特徴となる。本発明のNK-92細胞または細胞株は、未改変NK-92細胞とは対照的に、高効率でErbB2発現腫瘍細胞を溶解するが、ErbB2陰性の非標的細胞を攻撃

50

する可能性は、未改変NK-92細胞より低い。

【0029】

- その他の特徴

1つの態様において、ErbB2特異的scFv抗体断片は、SEQ ID NO: 13のアミノ酸配列(scFv FRP5)を含むか、もしくはそれからなり、かつ/またはSEQ ID NO: 14のヌクレオチド配列によってコードされる。

【0030】

ErbB2特異的scFv FRP5は、EP2164516 B1およびUS7,887,801 B2においてさらに説明されている。

【0031】

キメラ抗原受容体(CAR)は、当技術分野において公知である。本発明において使用されるErbB2特異的CARは、

(i) ErbB2特異的scFv抗体断片、

(ii) ヒンジ領域、

(iii) CD28の膜貫通ドメインおよび細胞内ドメイン、ならびにCD3 の細胞内ドメインを含む。

【0032】

1つの態様において、キメラ抗原受容体(CAR)は、SEQ ID NO: 15のアミノ酸配列を含むか、もしくはそれからなり、かつ/またはSEQ ID NO: 16のヌクレオチド配列によってコードされる。

【0033】

適切なCARは、WO 2012/031744においてさらに説明されている。

【0034】

例えば、免疫グロブリン重鎖シグナルペプチド、ErbB2特異的scFv(FRP5)抗体断片、ヒンジ領域(CD8 )、それに続くCD28の膜貫通ドメインおよび細胞内ドメイン、ならびにCD3 の細胞内ドメインからなるキメラ抗原受容体(CAR)を、脾フォーカス形成ウイルスプロモーター(SFFV)の転写制御下でコードする、レンチウイルストランスファープラスミドpS-5.28.z-W。CARコード配列は、ベクターの5'および3'の末端反復配列(LTR)には含まれている。

【0035】

ナチュラルキラー(NK)細胞は、癌養子免疫療法のために重要なエフェクター細胞型である。T細胞と同様に、キメラ抗原受容体(CAR)を発現するようにNK細胞を改変して、抗腫瘍活性を増強することができるが、CAR操作NK細胞を用いた経験は限られており、臨床開発に関するデータが不足している。本明細書において、本発明者らは、臨床的に使用可能なヒトNK-92細胞を、上皮由来の多くの癌によって高レベルで発現される腫瘍関連ErbB2(HER2)抗原に向け直した。

【0036】

GMPを遵守した手順に従って、本発明者らは、CD28およびCD3 のシグナル伝達ドメインを有するErbB2特異的CARを発現するNK-92/5.28.z単細胞クローンを作製した。

【0037】

確立された手順(Schmidt et al., 2003)に従う線形増幅を介したPCRおよびDNA配列決定によって、NK-92/5.28.z細胞クローンにおけるベクター組込みをマッピングした。これにより、2番染色体上の遺伝子間領域内および9番染色体上のTRAF2遺伝子内のそれぞれに1つのベクター組込みが明らかになった。上述したように、染色体配列および組み込まれたベクター配列の5'連結部位および3'連結部位に隣接しているゲノム配列およびベクターDNA配列にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプライマー(例えば、SEQ ID NO: 1および2、3および4、5および6、7および8に明記されたオリゴヌクレオチドプライマー)を用いてゲノムDNAをPCR解析すると、決まった長さおよび配列の増幅産物(例えば、SEQ ID NO: 9、10、11、12に明記されたPCR断片)が生じることから、ベクターの組込みが確認され、細胞クローンNK-92/5.28.zが分子的に同定される。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 3 8 】

NK-92/5.28.z細胞は、ErbB2を発現し、別の状況ではNK耐性である腫瘍細胞をインビトロで効率的に溶解したが、未改変NK-92に耐性のErbB2陰性細胞は溶解しなかった。予想外に、NK-92/5.28.z細胞はまた、未改変NK-92細胞によって容易に溶解されるErbB2陰性細胞に対しても、低減された細胞傷害性を示した。これは、未改変NK-92細胞とは対照的に、高効率でErbB2発現腫瘍細胞を溶解するが、ErbB2陰性の非標的細胞を攻撃する可能性は未改変NK-92細胞より低い、NK-92/5.28.z細胞の重要な安全性特徴となっている。腫瘍細胞の特異的認識および抗腫瘍活性はインビボで保持され、その結果、NK-92/5.28.z細胞が同所性の乳癌異種移植片に向かって進み(homing)、腎細胞癌細胞の肺転移が減った。臨床応用のための潜在的な安全対策としての線照射は、これらの細胞の複製を防止しつつ、インビトロおよびインビボでの抗腫瘍活性は維持された。

10

## 【 0 0 3 9 】

特に好ましい本発明のErbB2に特異的なNK-92細胞または細胞株は、NK-92/5.28.zと同定されるNK-92細胞または細胞株である。NK-92/5.28.zは、2014年6月11日にライプニッツ研究所(Leibniz Institute)DSMZ-ドイツ微生物細胞培養コレクション(German Collection of Microorganisms and Cell Cultures)GmbH(Inhoffenstr. 7B, 38124 Braunschweig, Germany)にアクセッション番号DSM ACC3244で寄託された。

## 【 0 0 4 0 】

本発明は、分子的小および機能的に明確に定義され、連続的に増殖可能なクローン細胞治療物質として、CAR発現NK細胞を操作することが可能であることを実証し、臨床開発のための有望な候補としてNK-92/5.28.z細胞を提案する。

20

## 【 0 0 4 1 】

医療的用途

前述したように、本発明は、医薬品で使用するための、本発明によるErbB2に特異的なNK-92細胞または細胞株を提供する。

## 【 0 0 4 2 】

前述したように、本発明は、癌、好ましくはErbB2発現癌の予防および/または治療において使用するための本発明によるNK-92細胞または細胞株を提供する。

## 【 0 0 4 3 】

好ましくは、癌、好ましくはErbB2発現癌は、以下より選択される：

30

- 乳癌、
- 卵巣癌、
- 胃癌、
- 前立腺癌、
- 扁平上皮癌、
- 頭頸部癌、
- 結腸癌、
- 膵臓癌、
- 子宮癌、
- 腎細胞癌、
- 神経膠芽腫、
- 髄芽細胞腫、
- 肉腫、
- 肺癌。

40

## 【 0 0 4 4 】

好ましい態様において、細胞は、放射線照射、好ましくは線照射によって前処理される。

## 【 0 0 4 5 】

前記放射線照射は、安全対策として含まれてよい。

## 【 0 0 4 6 】

50

前述したように、本発明は、標的指向化細胞治療物質としておよび/または癌養子免疫療法用に使用するための、本発明によるNK-92細胞または細胞株を提供する。

【0047】

「細胞治療物質」、特に「標的指向化細胞治療物質」、または「標的指向化同種異系細胞治療物質」とは、癌養子免疫療法のために適用するのに適している免疫細胞を意味し、この免疫細胞は、標的腫瘍細胞の表面で発現される所定の抗原を特異的に認識する抗原受容体を発現するように遺伝子改変されている。

【0048】

「標的細胞に特異的な養子免疫療法」または「癌養子免疫療法」または「養子細胞療法(ACT)」とは、腫瘍を有する宿主に免疫細胞が移入される形態の療法を意味する。免疫細胞は、抗腫瘍反応性を有しており、直接的または間接的な抗腫瘍効果をもたらすことができる。

10

【0049】

本発明によって提供されるような、CARを含むNK-92細胞の遺伝子操作は、ACTおよび癌の治療に非常に適している。

【0050】

好ましくは、この使用は、放射線照射、好ましくは 線照射による細胞の前処理を含む。

【0051】

前記放射線照射は、安全対策として含まれてよい。

20

【0052】

ErbB2に特異的なNK-92細胞または細胞株を作製するための方法

前述したように、本発明は、ErbB2に特異的なNK-92細胞または細胞株を作製するための方法を提供する。

【0053】

該方法はさらに、作製されたErbB2に特異的なNK-92細胞または細胞株を分子的に同定することも可能にする。

【0054】

該方法は、

- (1) NK-92細胞に形質導入するためのベクターを提供する段階、
- (2) 該ベクターを用いてNK-92細胞に形質導入する段階、
- (3) 限界希釈によって、単細胞クローンを得る/作製する段階、
- (4) ErbB2-Fc融合タンパク質を用いるフローサイトメトリー解析によってCAR発現細胞を同定する段階、
- (5) 連続培養期間中にCARの安定した高発現を示す細胞クローンを選択する段階、
- (6) 標的変更させた細胞の、ErbB2発現細胞に対する細胞傷害活性を評価する段階、
- (7) 標的変更させた細胞の、ErbB2陰性細胞に対する細胞傷害活性を評価する段階、
- (8) ErbB2発現細胞に対して高い細胞傷害性を示しかつErbB2陰性細胞に対して低い細胞傷害性を示すかまたは全く示さない細胞クローンを選択する段階、ならびに
- (9) ベクター組込みの数および位置を割り出し、かつ2番染色体上の遺伝子間領域内および9番染色体上のTRAF2遺伝子内のベクター組込みを示す細胞クローンを選択する段階を含む。

30

40

【0055】

段階(1)のNK-92細胞に形質導入するためのベクターは、組込みベクター、好ましくはレンチウイルスベクターである。

【0056】

適切なレンチウイルスベクターの例は、レンチウイルストランスファープラスミドpHR' SIN-cPPT-WPREmutベクターである(Schambach et al., 2006)。別の適切なレンチウイルスベクターは、当業者に公知である。

【0057】

50

レンチウイルスベクターは、  
ErbB2特異的scFv抗体断片、  
ヒンジ領域、  
CD28の膜貫通ドメインおよび細胞内ドメイン、ならびに  
CD3 の細胞内ドメイン  
を含むキメラ抗原受容体(CAR)を、コードする。

【0058】

レンチウイルスベクターは、当業者に公知である確立された方法論に従って作製することができる。

【0059】

ErbB2特異的scFv抗体断片の適切な例は、scFv FRP5である。

【0060】

例えば、ErbB2特異的scFv抗体断片は、SEQ ID NO: 13のアミノ酸配列(scFv FRP5)を含むか、もしくはそれからなり、かつ/またはSEQ ID NO: 14のヌクレオチド配列によってコードされる。

【0061】

ErbB2特異的scFv FRP5は、EP2164516 B1およびUS7,887,801 B2においてさらに説明されている。

【0062】

キメラ抗原受容体(CAR)は、当技術分野において公知である。本発明において使用されるErbB2特異的CARは、

- (i) ErbB2特異的scFv抗体断片、
- (ii) ヒンジ領域、
- (iii) CD28の膜貫通ドメインおよび細胞内ドメイン、ならびにCD3 の細胞内ドメインを含む。

【0063】

1つの態様において、キメラ抗原受容体(CAR)は、SEQ ID NO: 15のアミノ酸配列を含むか、もしくはそれからなり、かつ/またはSEQ ID NO: 16のヌクレオチド配列によってコードされる。

【0064】

ErbB2特異的scFv抗体断片を含むキメラ抗原受容体(CAR)の適切な例は、さらに公知であり、例えば、WO2012/031744において説明されている。

【0065】

段階(1)は、好ましくは、VSV-Gシュードタイプ化レンチウイルスベクター粒子を作製する段階を含む。

【0066】

段階(2)は、好ましくは、GMPを遵守した手順に従うことによって実施される。

【0067】

段階(2)のNK-92細胞は、好ましくは、ヒトNK-92細胞である。

【0068】

段階(5)は、好ましくは、連続培養期間中にCARの安定した高発現を示す細胞クローンを選択する段階を含む。

【0069】

段階(6)および(7)は、好ましくは様々なエフェクター対標的比(E/T)で実施される、FACSに基づくアッセイ法のようなインビトロ細胞傷害性アッセイ法を含む。

【0070】

適切なErbB2発現細胞は、ErbB2発現腫瘍細胞、例えば、ヒトErbB2を安定に発現するマウス腎細胞癌細胞(Renca-lacZ/ErbB2)またはMDA-MB453ヒト乳癌細胞(ATCC番号HTB-131)である。

【0071】

10

20

30

40

50

前記ErbB2陰性細胞は、これらの細胞クローンの特異的細胞傷害性を評価または試験するために使用される。

## 【 0 0 7 2 】

適切なErbB2陰性細胞は、NK感受性であるがErbB2陰性である細胞、例えば、ヒトK562赤白血病細胞(ATCC番号CCL-243)である。

## 【 0 0 7 3 】

前記ErbB2陰性細胞は、これらの細胞クローンの天然の細胞傷害性/内因的でCARに依存しない細胞傷害性を評価または試験するために使用される。

## 【 0 0 7 4 】

段階(6)および/または(7)の細胞傷害性アッセイ法はまた、好ましくは、未改変NK-92細胞(ATCC番号CRL-2407)を用いても実施され、それらの結果が、試験された細胞クローンの結果と比較される。

## 【 0 0 7 5 】

段階(8)において、ErbB2発現細胞に対して高い細胞傷害性を示しかつErbB2陰性細胞に対して低い細胞傷害性を示すかまたは全く示さない細胞クローンが、選択される。

## 【 0 0 7 6 】

段階(9)は、好ましくは、線形増幅を介したPCR(LAM-PCR)およびDNA配列決定によってベクター組込みの数および位置を割り出す段階、ならびにゲノムDNAのPCR解析による確認を含む。

## 【 0 0 7 7 】

ゲノムDNAのPCR解析に適しているプライマーおよびそれらの各増幅産物は、例えば、(レンチウイルスベクターを用いる態様において)、以下のものである。

ベクター組込み部位：TRAF2遺伝子内のCARベクター組込み：

	フォワードプライマー	リバースプライマー	増幅産物	
5' 部分	TRAF2-F1: CTTCAGCAGGGACCAGAAACAA [SEQ ID NO. 1]	CAR-R1: CCGCTTAATACTGACGCTCTCG [SEQ ID NO. 2]	TRAF2-CAR (5') 587 bp [SEQ ID NO. 9]	
3' 部分	CAR-F1: ATCGCCACGGCAGAACTCA [SEQ ID NO. 3]	TRAF2-R1: GACCCCTTCACCCAACGCTTAG [SEQ ID NO. 4]	CAR-TRAF2 (3') 503 bp [SEQ ID NO. 10]	30

## 【 0 0 7 8 】

ベクター組込み部位：2番染色体の遺伝子間領域内のCARベクター組込み：

	フォワードプライマー	リバースプライマー	増幅産物	
5' 部分	IGCHR2-F1: TCAGTGGAAATGGGCAGCTTCAAGT [SEQ ID NO. 5]	CAR-R2: TTCAGCAAGCCGAGTCCTGCGT [SEQ ID NO. 6]	IGCHR2-CAR (5') 679 bp [SEQ ID NO. 11]	40
3' 部分	CAR-F2: ACTGATAATFCCGTGGGTGTGT [SEQ ID NO. 7]	IGCHR2_CAR-R1: CACTGTGGCTCACTGCTAGA [SEQ ID NO. 8]	IGCHR2-CAR (3') 376 [SEQ ID NO. 12]	

## 【 0 0 7 9 】

前述したように、本発明は、本発明による方法によって得られるNK-92細胞または細胞株を提供する。

【0080】

ErbB2に特異的なNK-92細胞または細胞株を同定するための方法

前述したように、本発明は、ErbB2に特異的なNK-92細胞または細胞株を同定するための方法を提供する。

【0081】

該方法は、

細胞(クローン)におけるベクター組込みの数および位置を割り出し、かつ2番染色体上の遺伝子間領域内および9番染色体上のTRAF2遺伝子内のベクター組込みを示す細胞(クローン)を選択する段階を含む。

10

【0082】

上述したように、この方法は、好ましくは、線形増幅を介したPCR(LAM-PCR)およびDNA配列決定によってベクター組込みの数および位置を割り出す段階、ならびにゲノムDNAのPCR解析による確認を含む。

【0083】

ゲノムDNAのPCR解析に適しているプライマーおよびそれらの各増幅産物は、例えば、(レンチウイルスベクターを用いる態様において)、前述したとおりである。

【0084】

本明細書において上記に説明したように、好ましくは、細胞(クローン)は、該細胞(クローン)のゲノムDNAのPCR解析によって以下の増幅産物のうちの少なくとも1つが得られることを特徴とする：

20

- SEQ ID NO: 1 および2のプライマーを用いるPCRは、SEQ ID NO: 9のヌクレオチド配列を有する増幅産物を生じる；

- SEQ ID NO: 3 および4のプライマーを用いるPCRは、SEQ ID NO: 10のヌクレオチド配列を有する増幅産物を生じる；

- SEQ ID NO: 5 および6のプライマーを用いるPCRは、SEQ ID NO: 11のヌクレオチド配列を有する増幅産物を生じる；

- SEQ ID NO: 7 および8のプライマーを用いるPCRは、SEQ ID NO: 12のヌクレオチド配列を有する増幅産物を生じる。

30

【0085】

前述したように、本発明は、本発明による方法によって同定されるNK-92細胞または細胞株を提供する。

【0086】

前述したように、本発明は、癌、好ましくはErbB2発現癌の予防および/または治療において使用するための、本発明による方法によって得られるかまたは同定されるNK-92細胞または細胞株を提供する。

【0087】

好ましくは、癌、好ましくはErbB2発現癌は、以下より選択される：

40

- 乳癌、
- 卵巣癌、
- 胃癌、
- 前立腺癌、
- 扁平上皮癌、
- 頭頸部癌、
- 結腸癌、
- 膵臓癌、
- 子宮癌、
- 腎細胞癌、

50

- 神経膠芽腫、
- 髄芽細胞腫、
- 肉腫、および
- 肺癌。

【0088】

好ましい態様において、細胞は、放射線照射、好ましくは 線照射によって前処理される。

【0089】

前記放射線照射は、安全対策として含まれてよい。

【0090】

前述したように、本発明は、標的指向化(同種異系)細胞治療物質としておよび/または癌養子免疫療法用に使用するための、本発明による方法によって得られるかまたは同定されるNK-92細胞または細胞株を提供する。

【0091】

好ましくは、この使用は、放射線照射、好ましくは 線照射による細胞の前処理を含む。

【0092】

前記放射線照射は、安全対策として含まれてよい。

【0093】

予防および/または治療の方法

本発明によれば、この目的は、癌の予防および/または治療のための方法(以下、「治療方法」)によって、達成される。

【0094】

癌は、好ましくはErbB2発現癌であり、ErbB2発現癌は、好ましくは以下より選択される：

- 乳癌、
- 卵巣癌、
- 胃癌、
- 前立腺癌、
- 扁平上皮癌、
- 頭頸部癌、
- 結腸癌、
- 膵臓癌、
- 子宮癌、
- 腎細胞癌、
- 神経膠芽腫、
- 髄芽細胞腫、
- 肉腫、および
- 肺癌。

【0095】

好ましくは、該治療方法は、癌養子免疫療法を含む。

【0096】

該治療方法は、

(a) 本発明によるNK-92細胞または本発明による方法によって得られるNK-92細胞、および

(b) 任意で、各賦形剤

を治療的有効量で対象に投与する段階

を含む。

【0097】

本発明のNK-92細胞の「治療的有効量」とは、各疾患(癌)を治療するのに、または標的

10

20

30

40

50



細胞特異的な養子免疫療法の各成果を実現するのに十分である量を意味する。

【0098】

好ましい態様

本発明によれば、CAR操作NK-92細胞が、標的指向化同種異系細胞治療物質として開発された。本明細書において、本発明者らは、臨床応用に適しているErbB2特異的NK-92クローン細胞株の作製ならびに分子のおよび機能的な特徴決定を説明する。これらのNK-92/5.28.z細胞は、ErbB2(HER2)受容体型チロシンキナーゼ、すなわち、上皮由来の多くのヒト癌によって高レベルで発現される腫瘍関連自己抗原を標的とする第2世代CARをコードするベクターを用いるレンチウイルス形質導入後に、単一の細胞クローンから得た(Hynes and Lane, 2005)。

10

【0099】

GMPを遵守した手順に従って、本発明者らは、CD28およびCD3 のシグナル伝達ドメインを有するErbB2特異的CARを発現するNK-92/5.28.z単細胞クローンを作製した。線形増幅を介したPCRおよびDNA配列決定によって、ベクター組込みをマッピングした。インビボの腫瘍ホーミングおよび転移抑制活性を、NOD-SCID IL2R<sup>null</sup> (NSG) マウスモデルにおいて評価した。

【0100】

ErbB2特異的NK-92/5.28.z細胞は、未改変NK-92細胞には耐性であるErbB2発現腫瘍細胞をインビトロで効率的に溶解した。重要なことには、ErbB2陽性腫瘍細胞の特異的認識および抗腫瘍活性はインビボで保持され、その結果、マウスモデルにおいて、NK-92/5.28.z細胞は同所性乳癌異種移植片に向かって進み、腎細胞癌細胞の肺転移が減った。

20

【0101】

本出願で示すデータは、ヒト化しコドン最適化した第2世代CARの発現によって、ヒトNK-92細胞を腫瘍関連細胞表面抗原ErbB2に首尾よくターゲティングできることを実証している。GMPを遵守した手順に従って、本発明者らは、分子的に明確な単細胞クローンから、臨床開発に適している継続的に増殖するCAR改変細胞株を樹立した。これらのNK-92/5.28.z細胞は、長期培養時の安定なCAR発現、ならびにインビトロおよびインビボでの標的抗原特異的な細胞傷害性を示す。徹底的な分子解析が不可能である、CAR改変された初代NK細胞および初代T細胞からなる異種組成物とは対称的に、この細胞クローンは分子レベルおよび細胞レベルで全面的に特徴決定することが可能であるため、クローンの臨床応用のために重要な安全性(important degree of safety)が加わる。

30

【0102】

マウスにおいて、蛍光色素で標識されたNK-92/5.28.z細胞は、静脈注射後24時間以内にErbB2陽性の同所性乳癌異種移植片内で選択的に増加した(enriched)のに対し、改変されていない未改変NK-92細胞は、腫瘍内に蓄積しなかった。このことから、NK-92/5.28.z細胞はインビボで標的細胞特異性を保持し、組織に入り込んで、遠い腫瘍部位に向かって進めることが実証される。ErbB2発現腎細胞癌細胞に基づく実験的転移モデルにおいて、NK-92/5.28.z細胞を静脈注射すると、様々な実験において50%またはそれ以上、転移形成が減少したのに対し、未改変NK-92細胞は、肺腫瘍結節の増殖に影響を及ぼさなかった。重要なことには、10Gyを放射線照射されたNK-92/5.28.z細胞のインビボでの抗腫瘍活性は、放射線照射されていない細胞のものと同じであった。このことは、未改変NK-92細胞を用いた第一相臨床試験において以前に実施されたように(Arai et al., 2008; Tonn et al., 2013)、細胞の放射線照射が安全対策として含まれる場合があるNK-92/5.28.zの将来の臨床応用にとって、重要であり得る。

40

【0103】

腫瘍患者の免疫細胞は、癌の免疫抑制活性が原因で、機能が損なわれていることが多い。それゆえ、NK細胞を用いる癌養子免疫療法のためには、ドナー由来の同種異系細胞が好ましく、これは、ドナー由来の同種異系細胞は腫瘍細胞を「自己」と認識せず、その結果、阻害シグナルを回避するためである(Geller and Miller, 2011)。本発明者らは、この利点をCAR操作NK-92細胞に拡大適用できることを示した。

50

## 【0104】

本発明者らのデータから、インビトロおよびインビボで選択的かつ著しく増強された抗腫瘍活性を有している、分子的小および機能的に明確に定義され、連続的に増殖可能な既製のクローン細胞治療物質として、同様の様式でCAR操作NK-92細胞を開発することが可能であることが、実証される。このような細胞は、様々なErbB2陽性悪性腫瘍の治療のために臨床的に有用である。その結果、抗腫瘍活性が強力であること、全面的に特徴決定可能な細胞製品として直ちに利用できること、および製造の失敗という明らかなリスクがないことから、これらの細胞は、CAR改変親T細胞の有効かつ費用対効果が大きい代替物となっている。

## 【0105】

以下の実施例および図面は、本発明を例示するが、ただし、本発明をそれらに限定しない。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0106】

【図1A】キメラ抗原受容体(CAR)5.28.zを、脾フォーカス形成ウイルスプロモーター(SFV)の転写制御下でコードする、レンチウイルストランスファープラスミドpS-5.28.z-Wの概略図。CAR5.28.zは、免疫グロブリン重鎖シグナルペプチド(SP)、ErbB2特異的scFv(FRP5)抗体断片(scFv)、ヒンジ領域(CD8 )、それに続くCD28の膜貫通ドメインおよび細胞内ドメイン、ならびにCD3 の細胞内ドメインからなる。CARコード配列は、ベクターの5'および3'の末端反復配列(LTR)には含まれている(図示せず)。

【図1B】NK-92/5.28.zクローン細胞のキメラ抗原受容体発現。レンチウイルスベクターS-5.28.z-Wを用いる形質導入によってGMP条件下で作製したNK-92/5.28.zクローン細胞株によるCAR発現を、ErbB2-Fc融合タンパク質を用いるフローサイトメトリーによって測定した(白抜きの部分)。未改変NK-92細胞は、対照としての機能を果たした(灰色の部分)。

【図1C】NK-92/5.28.zクローン細胞の選択的細胞傷害性。ヒトErbB2(Renca-lacZ/ErbB2)または対照としてのヒトEGFR(Renca-lacZ/EGFR)を安定に発現するマウス腎細胞癌細胞を標的として用いる、様々なエフェクター対標的比(E/T)でのFACSに基づく細胞傷害性アッセイ法において、NK-92/5.28.z細胞による特異的な細胞死滅(黒丸)を調査した。未改変NK-92細胞を比較のために含めた(白丸)。

【図1D】NK-92/5.28.zクローン細胞の選択的細胞傷害性。NK感受性であるがErbB2陰性である標的に対するNK-92/5.28.z細胞の天然の細胞傷害性を、ヒトK562赤白血球細胞を標的として用い、未改変NK-92細胞と比較して、調査した。

【図2A】NK-92/5.28.zクローン細胞の分子的特徴決定。ゲノムDNA(白抜きのボックス)中の5'および3'の末端反復配列(LTR)(黒いボックス)には含まれているレンチウイルスCARベクターS-5.28.z-Wの組込み部位(網掛けのボックス)の概略図。9番染色体上のTRAF2遺伝子内および2番染色体上の遺伝子間領域内の組込み部位をマッピングするためのPCR戦略を示している。

【図2B】NK-92/5.28.zクローン細胞の分子的特徴決定。ベクター組込みのPCR解析。TRAF2遺伝と組み込まれたCARベクターの5'末端との連結部(TRAF2-CAR)および組み込まれたCARベクターの3'末端とTRAF2遺伝子との連結部(CAR-TRAF2)を包含する個々のDNA配列を、NK-92/5.28.z細胞の3つの異なる継代物に由来する鋳型としてのゲノムDNAおよび指定のオリゴヌクレオチドプライマー対を用いるPCRによって増幅して、特徴的な587bpおよび503bpの増幅産物を得た。未改変NK-92細胞のゲノムDNAならびに鋳型DNAを含まない試料(H<sub>2</sub>O)を対照として含めた。M: DNAマーカー(GeneRuler 100bpプラスDNAラダー、Thermo Scientific)。

【図2C】NK-92/5.28.zクローン細胞の分子的特徴決定。ベクター組込みのPCR解析。同様に、2番染色体の遺伝子間領域と組み込まれたCARベクターの5'末端との連結部(IGCHR2-CAR)および3'末端との連結部(CAR-IGCHR2)を包含する個々のDNA配列を増幅して、特徴的な679bpおよび376bpの増幅産物を得た。未改変NK-92細胞のゲノムDNAならびに鋳型DNAを含まない試料(H<sub>2</sub>O)を対照として含めた。M: DNAマーカー(GeneRuler 100bpプラスDNAラダー、

10

20

30

40

50

Thermo Scientific)。

【図3】 線照射をした場合のNK-92/5.28.z細胞の増殖および細胞傷害活性。(A) 生存能力に対する影響を調査するために、NK-92/5.28.z細胞に5Gyまたは10Gyを放射線照射し、最長で72時間、培養した。指定された時点でトリパンブルー排除によって生細胞を計数することによって、分裂増殖を解析した。(B) 10Gyの放射線照射後24時間目のNK-92/5.28.z細胞の、ErbB2陽性MDA-MB453乳癌細胞およびErbB2陰性MDA-MB468乳癌細胞に対する細胞傷害活性を、表示したように様々なエフェクター対標的比(E/T)でのFACSに基づく細胞傷害性アッセイ法において測定した(黒丸)。放射線照射後24時間目の未改変NK-92細胞は、比較のために含めた(白丸)。

【図4】 インビボでのErbB2陽性乳癌へのNK-92/5.28.z細胞のホーミング。未改変NK-92(上のパネル)またはErbB2特異的NK-92/5.28.z細胞(下のパネル)を、蛍光性DiD標識試薬で標識し、定着した同所性MDA-MB453/EGFP乳癌異種移植片を有するNSGマウスに静脈内注射した。注射後24時間目に、腫瘍を摘出し、単細胞懸濁液を調製し、EGFPを発現する細胞およびDiDで標識された細胞の存在について解析した。DiD陽性NK細胞は、濃い灰色で示している(右下の区画)。EGFP陽性乳癌細胞(左上の区画)および二重陰性のマウスストローマ細胞(左下の区画)を、薄い灰色で示している。二重陽性の事象(右上の区画)は、CAR発現NK-92/5.28.z細胞およびMDA-MB453/EGFP標的細胞の結合体に相当する。各群の1匹の動物に由来する代表的なフローサイトメトリーデータを示している(n=3)。

【図5】 NK-92/5.28.z細胞のインビボの抗腫瘍活性。(A) 抗腫瘍活性を調査するために、NSGマウスにRenca-lacZ/ErbB2腎細胞癌細胞を静脈内注射した。次いで、腫瘍細胞注射後1日目および3日目に、未改変NK-92細胞またはNK-92/5.28.zクローン細胞の静脈注射によって、動物を2回処置した。対照マウスにはPBSを与えた。腫瘍接種後4週目に、肺を摘出し、肺表面の腫瘍結節を数えた。(B) 別の実験において、Renca-lacZ/ErbB2細胞を注射したNSGマウスを、放射線照射されていないNK-92細胞もしくはNK-92/5.28.z細胞、または図に示すように10Gyを放射線照射したNK-92/5.28.z細胞を用いて、前述したように処置した。平均値±SEMを示している; n=5。ns、p>0.05; \*、p<0.05; \*\*、p<0.01。

#### 【実施例】

#### 【0107】

##### 実施例1

##### 1.1 方法

##### 細胞および培養条件

ヒトK562赤白血病細胞(ATCC, Manassas, VA)をRPMI 1640培地(Lonza, Köln, Germany)中で維持した。ヒトMDA-MB453乳癌細胞およびヒトMDA-MB468乳癌細胞、ならびにヒトHEK293T細胞(すべてATCC)をDMEM(Lonza)中で培養した。いずれの培地にも、10%の熱失活させたFBS、2mM L-グルタミン、100U/mlペニシリン、100µg/mlストレプトマイシンを添加した。ヒトNK-92細胞(ATCC)を、5%の熱失活させたヒト血漿(German Red Cross Blood Service Baden-Württemberg - Hessen, Frankfurt, Germany)および100IU/mlのIL-2(Proleukin; Novartis Pharma, Nurnberg, Germany)を添加したX-VIVO 10培地(Lonza)中で増殖させた。ヒトのErbB2またはEGFRを発現するマウスRenca-lacZ/ErbB2腎細胞癌細胞およびマウスRenca-lacZ/EGFR腎細胞癌細胞を、10%FBS、2mM L-グルタミン、100U/mlペニシリン、100µg/mlストレプトマイシン、0.25mg/mlゼオシン、および0.48mg/ml G418を添加したRPMI-1640培地中で培養した(Maurer-Gebhard et al., 1998)。

#### 【0108】

##### CAR発現NK-92/5.28.z細胞の作製

免疫グロブリン重鎖シグナルペプチド、ErbB2特異的scFv(FRP5)抗体断片、および改変されたCD8 ヒンジ領域(ヒンジ領域内部の対になっていないシステインが、セリンで置換された)、続いてCD28の膜貫通ドメインおよび細胞内ドメイン、ならびにCD3 細胞内ドメインをコンピューターで組み立てることによって、CAR配列5.28.zを設計した。コドン最適化した融合遺伝子を合成し(GeneArt, Regensburg, Germany)、レンチウイルストランスファープラスミドpHR<sup>+</sup>SIN-cPPT-WPREmutベクターに挿入して(Schambach et al., 2006)、

レンチウイルストランスファープラスミド pS-5.28.z-Wを得た。VSV-Gシュードタイプ化ベクター粒子を作製し、以前に説明されているようにしてNK-92細胞に形質導入し(Sahm et al., 2012)、染色体DNAと組み込まれたベクター配列との連結部にまたがる特徴的なPCR産物を生じるオリゴヌクレオチドプライマーを用いてゲノムDNAをPCR解析することによって、細胞クローンNK-92/5.28.zについて確認した。

#### 【0109】

##### 細胞傷害性アッセイ法

標的細胞に対するNK-92細胞の細胞傷害性を、説明されているような(Sahm et al., 2012)FACSに基づくアッセイ法で解析した。簡単に説明すると、標的細胞をカルセインバイオレットAM(Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe, Germany)で標識し、37℃で2時間、様々なエフェクター対標的(E/T)比で、エフェクター細胞と共に同時培養した。同時培養後、FACSCanto IIフローサイトメーター(BD Biosciences, Heidelberg, Germany)においてフローサイトメトリ解析する5分前に、250 µlの1 µg/mlヨウ化プロピジウム(PI)溶液を各試料に添加した。FACSDivaソフトウェア(BD Biosciences)を用いてデータを解析した。特異的細胞傷害性を計算するために、エフェクター細胞の非存在下で自発的に溶解した標的細胞の数を、測定試料中でカルセインバイオレットAMとPIの二重陽性として測定される死滅した標的細胞の数から引いた。

10

#### 【0110】

##### NK-92細胞の放射線照射

NK-92/5.28.z細胞および未改変NK-92細胞を遠心分離によって回収し、計数し、洗浄し、新鮮な増殖培地中に再懸濁し、Biobeam 2000装置(Gamma Service Medical, Leipzig, Germany)を用いて5Gyまたは10Gyを放射線照射した。インビトロでの分裂増殖アッセイ法および細胞傷害性アッセイ法のために、放射線照射した細胞を洗浄し、新鮮な増殖培地中に再懸濁し、最長で72時間、培養した。様々な時点でトリパンブルー排除によって生細胞を計数することによって、分裂増殖を解析した。インビボ実験のために、細胞に10Gyを放射線照射し、直接使用した。

20

#### 【0111】

##### NK-92細胞の腫瘍ホーミング

EGFPをコードするレンチウイルスベクターを用いてMDA-MB453細胞に形質導入し、フローサイトメトリ細胞選別によって濃縮することによって、EGFPを発現するMDA-MB453乳癌細胞を得た。Matrigel(BD Biosciences)に懸濁した $5 \times 10^6$ 個のMDA-MB453/EGFP細胞を乳腺脂肪パッドに注射することによって、4~6週齢の雌NOD-SCID IL2R<sup>null</sup>(NSG)マウス(Charles River, Sulzfeld, Germany)に同所性乳癌異種移植片を導入した。腫瘍が触知可能になると、説明されているように(Tavri et al., 2009)、DiD(1,1'-ジオクタデシル-3,3,3',3'-テトラメチルインドジカルボシアニン)標識試薬(Molecular Probes/Life Technologies, Darmstadt, Germany)でNK-92/5.28.z細胞または未改変NK-92細胞を標識し、腫瘍を有するマウスの外側尾静脈にそれらを注射した( $1 \times 10^7$ 細胞/動物; 1群当たり3匹の動物)。注射後24時間目に、マウスを屠殺し、腫瘍を摘出し、単細胞懸濁液を調製し、FACSCanto IIフローサイトメーターにおいて、EGFPを発現する細胞およびDiDで標識された細胞の存在について解析した。

30

40

#### 【0112】

##### インビボの抗腫瘍活性

0日目に、4~6週齢の雌NSGマウスの外側尾静脈に $1 \times 10^5$ 個のRenca-lacZ/ErbB2細胞を注射した。次いで、腫瘍細胞注射後1日目および3日目に、 $1 \times 10^7$ 個のNK-92/5.28.z細胞または未改変NK-92細胞を静脈注射することによって、動物を処置した(マウス5匹/群)。対照マウスにはPBSを与えた。別々の実験において、Renca-lacZ/ErbB2細胞を注射したNSGマウスを、放射線照射したNK-92/5.28.z細胞(10Gy)、または放射線照射されていないNK-92/5.28.z細胞、および対照としての未改変NK-92細胞でも処置した(マウス5匹/群)。腫瘍接種後4週目に、すべての動物を屠殺し、肺を摘出し、説明されているようにして肺表面の腫瘍結節を数えた(Maurer-Gebhard et al., 1998)。

50

## 【0113】

## 統計学的解析

対応のないスチューデントの両側t検定を用いて、値の差を評価した。p値<0.05を有意とみなした。Prism 5ソフトウェア(GraphPad Software, La Jolla, CA)を用いて、統計学的計算を実施した。

## 【0114】

## 1.2 結果

## ErbB2特異的NK-92/5.28.z単細胞クローンの作製

キメラ抗原受容体5.28.zを用いて、臨床的に適用可能なErbB2特異的NK-92細胞株を作製した(図1A)。VSV-Gシュードタイプ化レンチウイルスCARベクター粒子を作製し、認定NK-92マスターセルバンクに由来するNK-92細胞(Arai et al., 2008)に形質導入した。限界希釈によって単細胞クローンを得て、ErbB2-Fc融合タンパク質を用いるフローサイトメトリ解析によってCAR発現細胞を同定した。1~4個の間のベクターコピーを有するCAR発現単細胞クローン合計15個を機能的および分子的に特徴決定した。GMP条件下での大規模増殖を反映する設定での連続培養期間中にCARの安定した高発現を示したNK-92/5.28.zと呼ばれる1種の細胞クローンを、さらに解析するために選択した(図1B)。標的変更させた細胞の選択的細胞傷害活性を、ヒトErbB2を安定に発現するRenca-lacZ/ErbB2マウス腎細胞癌細胞を用いて評価した。NK-92/5.28.zクローン細胞は、未改変NK-92に対しては耐性であるこれらのErbB2発現標的細胞に対して高い細胞傷害性を示した(図1C、左のパネル)。一方、ErbB2陰性であるが他の点では同質遺伝子的である、上皮成長因子受容体を発現するRenca-lacZ/EGFR細胞は、エフェクター細胞に対して増強された感受性を示さなかった(図1C、右のパネル)。このことは、細胞死滅が、CAR 5.28.zとその標的抗原ErbB2との相互作用によって実際にもたらされたことを示している。

## 【0115】

NK-92/5.28.z細胞の内因的でCARに依存しない細胞傷害性を、ErbB2陰性であるがNK感受性であるK562ヒト赤白血球細胞を標的として用いて調査した。K562細胞は、CAR陰性の未改変NK-92細胞に対して高度に感受性であったが、ErbB2特異的NK-92/5.28.z細胞によって死滅せられた程度はずっと低かった(図1D)。

## 【0116】

まとめると、これらのデータから、NK-92/5.28.z細胞が高度に選択的であり、ErbB2発現腫瘍細胞を効率的に死滅させるのに対し、ErbB2陰性標的に対するそれらの内因的細胞傷害性は、未改変NK-92細胞と比べた場合、著しく低減していることが実証される。

## 【0117】

## ErbB2特異的NK-92/5.28.z細胞の分子的特徴決定

線形増幅を介したPCR(LAM-PCR)およびDNA配列決定によって、NK-92/5.28.zクローン細胞の2番染色体上の遺伝子間領域内および9番染色体上のTRAF2遺伝子内のそれぞれに1つのベクター組込みが明らかになった(図2A)。数ヶ月にわたる連続培養期間中の3つの異なる継代物に由来するNK-92/5.28.z細胞のゲノムDNAをPCR解析し、それによって、TRAF2遺伝子と組み込まれたCARベクターの5'末端との連結部および組み込まれたCARベクターの3'末端とTRAF2遺伝子との連結部を包含する個々のDNA配列(図2B、上のパネル)、ならびに2番染色体の遺伝子間領域と組み込まれたCARベクターの5'末端との連結部および3'末端との連結部を包含する個々のDNA配列(図2B、下のパネル)を増幅することによって、組込み部位を確認した。それぞれの場合において、NK-92/5.28.z細胞の異なる継代物のゲノムDNAが、決まった長さおよび配列の同じ特徴的な増幅産物を生じたことから、ベクター組込みの長期にわたる安定性が実証された。未改変NK-92細胞に由来するゲノムDNAのPCR解析の際には、同じオリゴヌクレオチドプライマーを用いても増幅産物は得られなかったことから、CARベクター組込みの特異的PCR解析は、NK-92/5.28.z細胞クローンを分子的に同定するための強力な診断ツールにもなることが示唆される。

## 【0118】

(a) 増幅産物TRAF2-CAR(5')

10

20

30

40

50

## TRAF2遺伝子内のCARベクター組込み

ベクター組込みの5'部分

NK-92/5-28.z細胞のゲノムDNAに由来するPCR産物TRAF2-CAR(5')

プライマー:

TRAF2-F1: CTTCAGCAGGGACCAGAAACAA [SEQ ID NO. 1]CAR-R1: CCGCTTAATACTGACGCTCTCG [SEQ ID NO. 2]

小文字: TRAF2遺伝子

大文字: ベクター配列

長さ: 587ヌクレオチド

SEQ ID NO. 9

```

cttcagcagggaccagaaacaaaactcacactctttctctctgagttga      50
gactggaaaaatgaaagattgtttttaggggaaacttgagggaaacagtctg    100
ggcagcctgcagggcatggccctgttcctccagggctgggaaagtcagca     150
ctgctttctggtggcgaACTGGAAGGGCTAATTCCTCCCAACGAAAGACA     200
AGATCTGCTTTTTGCTTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAG     250
CCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAA    300
AGCTTGCCTTGAGTGTCTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTC   350
TGGTAACCTAGAGATCCCTCAGACCCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTA  400
GCAGTGGCGCCCGAACAGGGACTTGAAAGCGAAAGGGAAACCAGAGGAGC    450
TCTCTCGACGCAGGACTCGGCTTGCTGAAGCGCGCACGGCAAGAGGCGAG    500
GGGCGGCGACTGGTGTAGTACGCCAAAAATTTTGACTAGCGGAGGCTAGAA   550
GGAGAGAGATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGG                   587

```

10

20

587

【 0 1 1 9 】

(b) 増幅産物CAR-TRAF2(3')

TRAF2遺伝子内のCARベクター組込み

ベクター組込みの3'部分

NK-92/5-28.z細胞のゲノムDNAに由来するPCR産物CAR-TRAF2(3')

プライマー:

CAR-F1: ATCGCCACGGCAGAACTCA [SEQ ID NO. 3]TRAF2-R1: GACCCTTACCCAACGCTTAG [SEQ ID NO. 4]

小文字: TRAF2遺伝子

大文字: ベクター配列

長さ: 503ヌクレオチド

SEQ ID NO. 10

```

ATCGCCACGGCAGAACTCATCGCCGCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGG     50
GGCTAGGTTGCTGGGCACTGATAATTCGGTGGTGTGTCGAATTCGATAC    100
TCGAGGTCGAGGCAATTCGAGCTCGGTACCTTTAAGACCAATGACTTACA    150
AGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGACTGGAA   200
GGGCTAATTCACTCCCAACGAAGACAAGATCTGCTTTTTGCTTGTACTGG   250
GTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAG   300
GGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCCTTGAGTGTCTCAAGTA  350
GTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACC   400
CTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCAccttcctctgcagctgctgg    450
ctcagccgattgtatatgctgggagctctgcactaagcgttgggtgaagg    500
gtc                                                           503

```

30

40

503

【 0 1 2 0 】

(c) 増幅産物IGCHR2-CAR(5')

2番染色体の遺伝子間領域内のCARベクター組込み

ベクター組込みの5'部分

NK-92/5-28.z細胞のゲノムDNAに由来するPCR産物IGCHR2-CAR(5')

プライマー:

50

IGCHR2-F1: TCAGTGGAAATGGGCAGCTTCAAGT [SEQ ID NO. 5]

CAR-R2: TTCAGCAAGCCGAGTCCTGCGT [SEQ ID NO. 6]

小文字：2番染色体の遺伝子間領域

大文字：ベクター配列

長さ：679ヌクレオチド

SEQ ID NO. 11

```
tcagtggaatgggcagcttcaagttgatgtcatttcaatagtaacttatt 50
tcagtctacatacttcccaagaatgcacatctcttttttatgtatttat 100
tattttgagaaagagtctcactctgtcgcccaggctggagtgcaatggca 150
tgatcttggtcactgtaacctccgtctcctgggttcaagccattctcct 200
gtctcagcctcccgggtagtgggttataggcacacaccacacgcccgg 250
ctaattttttagtaaaagatgggtttcaccatgttggccaggc 300
tgggctcaaactcttgacttcaggtgatccgcccaccttggcctcccaa 350
gtgctgggatgacaggcACTGGAAGGGCTAATTCCTCCCAACGAAGACA 400
AGATCTGCTTTTTTGCTTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAG 450
CCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAA 500
AGCTTGCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTGTGTGACTC 550
TGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTA 600
GCAGTGGCGCCCGAACAGGGACTTGAAAAGCGAAAAGGAAACCAGAGGAGC 650
TCTCTCGACGCAGGACTCGGCTTGCTGAA 679
```

10

【 0 1 2 1 】

20

(d) 増幅産物CAR-IGCHR2(3')

2番染色体の遺伝子間領域内のCARベクター組込み

ベクター組込みの3'部分

NK-92/5-28.z細胞のゲノムDNAに由来するPCR産物CAR-IGCHR2(3')

プライマー：

CAR-F2: ACTGATAATTCGGTGGTGTGT [SEQ ID NO. 7]

IGCHR2\_CAR-R1: CACTGTGGCTCACTGCTAGA [SEQ ID NO. 8]

小文字：2番染色体の遺伝子間領域

大文字：ベクター配列

長さ：376ヌクレオチド

SEQ ID NO. 12

```
ACTGATAATTCGGTGGTGTGTGCGAATTCGATACTCGAGGTCGAGGCAAT 50
TCGAGCTCGGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCT 100
TAGCCACTTTTTTAAAGAAAAGGGGGACTGGAAGGGCTAATTCCTCCC 150
AACGAAGACAAGATCTGCTTTTTGCTTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGAC 200
CAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAA 250
GCCTCAATAAAGCTTGCTTGTAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGT 300
TGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGG 350
AAAATCTCTAGCAgtgagccacagtg 376
```

30

【 0 1 2 2 】

40

放射線照射されたNK-92/5.28.z細胞による標的細胞の死滅

未改変NK-92を用いた第一相臨床試験において、注入前に細胞を10Gyで放射線照射することが、恒久的な生着を防ぐための安全対策として含まれた(Arai et al., 2008; Tonn et al., 2013)。同様の安全対策が、標的変更させたNK-92細胞の臨床使用のために重要である可能性がある。したがって、本発明者らは、NK-92/5.28.zクローン細胞の増殖および細胞傷害活性に対する放射線照射の影響を試験した。5Gyの放射線照射が、それ以上の複製を防ぐのに十分であったのに対し、生存能力があるNK-92/5.28.z細胞の数は、5Gyまたは10Gyへの曝露後24時間、ほぼ一定のままであり、その後、徐々に減少した(図3A)。細胞傷害活性に対する影響を評価するために、10Gyを放射線照射したNK-92/5.28.z細胞を24時間培養し、次いで、標的としてのErbB2発現ヒトMDA-MB453乳癌細胞と共に2時間、同時イン

50

キュベートした。放射線照射されたNK-92/5.28.zは、MDA-MB453細胞に対して高度かつ特異的な細胞傷害性を示したのに対し(10:1のE/T比で65%の特異的溶解)、ErbB2陰性のヒトMDA-MB468乳癌細胞は溶解しなかった(図3B)。MDA-MB453細胞もMDA-MB468細胞も、放射線照射された未変NK-92細胞によっては死滅しなかった。

#### 【 0 1 2 3 】

#### ErbB2陽性乳癌へのNK-92/5.28.z細胞のホーミング

定着した腫瘍に向かってNK-92/5.28.z細胞が進む能力を、同所性乳癌モデルにおいて調査した。EGFPをコードするレンチウイルスベクターを用いて形質導入したMDA-MB453細胞を雌NSGマウスの乳腺脂肪パッドに移植し、腫瘍が触知可能になるまで増殖させた。次いで、NK-92/5.28.z細胞および改変されていない未変NK-92細胞を、蛍光性DiD標識試薬で標識し、腫瘍を有する動物に静脈内注射した。24時間後に、腫瘍を摘出し、単細胞懸濁液を調製し、EGFPを発現する腫瘍細胞およびDiDで標識されたNK細胞の存在について解析した。未変NK-92を注射されたマウスでは、ごく少数のNK細胞しか、腫瘍中に存在しなかった(図4、上のパネル)。一方、NK-92/5.28.z細胞は、MDA-MB453/EGFP異種移植片において著しく増加していた(図4、下のパネル)。重要なことには、本発明者らはまた、これらの腫瘍から調製した細胞懸濁液中にNK-92/5.28.z細胞とMDA-MB453/EGFP細胞の結合体も発見した。これらのデータから、NK-92/5.28.z細胞はインビボで標的細胞特異性を保持し、組織に入り込んで、遠い腫瘍部位に向かって進めることが実証される。

10

#### 【 0 1 2 4 】

#### NK-92/5.28.z細胞のインビボの抗腫瘍活性

インビボの抗腫瘍活性を評価するために、本発明者らは、肺転移実験モデルを選択した。腫瘍細胞接種後1日目および3日目に、Renca-lacZ/ErbB2細胞の静脈注射とそれに続く未変NK-92細胞または標的変更させたNK-92/5.28.z細胞の静脈注射をNSGマウスに施した。対照マウスにはPBSを与えた。腫瘍接種後4週目に、肺を摘出し、肺表面の腫瘍結節を数えた。未変NK-92細胞による処置は、PBSで処置した対照と比較して、転移形成に影響を及ぼさなかったのに対し、標的変更させたNK-92/5.28.z細胞は、この実験において、肺腫瘍結節の数を約50%減少させた(肺表面転移の平均数: PBS:  $37.7 \pm 5.4$ ; NK-92:  $36 \pm 5.1$ ; NK-92/5.28.z:  $19 \pm 2.6$ ;  $p < 0.05$ )(図5A)。線照射後にNK-92/5.28.z細胞がインビボ抗腫瘍活性を保持するかどうかを評価するために、注射前に10Gyを放射線照射されたNK-92/5.28.z細胞を用いて同様の実験を実施した。対照動物は、放射線照射されていないNK-92/5.28.z細胞または放射線照射されていない未変NK-92細胞で処置した。未変NK-92細胞による処置と比較して、放射線照射されていないNK-92/5.28.z細胞と放射線照射されたNK-92/5.28.z細胞の両方とも、肺腫瘍結節の数を著しく減少させた(肺表面転移の平均数: NK-92:  $68.3 \pm 9.1$ ; NK-92/5.28.z:  $21 \pm 4.9$ ; 放射線照射されたNK-92/5.28.z:  $14.4 \pm 5.5$ ;  $p < 0.01$ )(図5B)。これらのデータから、播種性疾患を反映するモデルのErbB2発現腫瘍細胞に対する、全身に適用されたNK-92/5.28.z細胞の特異的抗腫瘍活性が実証される。重要なことには、NK-92/5.28.z細胞の生存能力および機能性は、それ以上エフェクター細胞が複製するのを防ぐ線量の線照射の後に、一時的に維持されたため、インビボでの標的細胞の認識および死滅が可能になった。

20

30

#### 【 0 1 2 5 】

#### 参考文献

Arai S, Meagher R, Swearingen M, *et al.* Infusion of the allogeneic cell line NK-92 in patients with advanced renal cell cancer or melanoma: a phase I trial. *Cytotherapy*. 2008;10(6):625-632.

40



Boissel L, Betancur M, Wels WS, *et al.* Transfection with mRNA for CD19 specific chimeric antigen receptor restores NK cell mediated killing of CLL cells. *Leuk Res.* 2009;33(9):1255-1259.

Geller MA, Miller JS. Use of allogeneic NK cells for cancer immunotherapy. *Immunotherapy* 2011;3:1445-1459.

Gong *et al.*, Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells. *Leukemia.* 1994 Apr;8(4):652-8.

Grupp SA, Kalos M, Barrett D, *et al.* Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N Engl J Med.* 2013;368(16):1509-1518.

Hynes NE, Lane HA. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer.* 2005;5(5):341-354.

Kalos M, June CH. Adoptive T cell transfer for cancer immunotherapy in the era of synthetic biology. *Immunity.* 2013;39(1):49-60.

Koch J, Steinle A, Watzl C, *et al.* Activating natural cytotoxicity receptors of natural killer cells in cancer and infection. *Trends Immunol.* 2013;34(4):182-191.

Maurer-Gebhard M, Schmidt M, Azemar M, *et al.* Systemic treatment with a recombinant erbB-2 receptor-specific tumor toxin efficiently reduces pulmonary metastases in mice injected with genetically modified carcinoma cells. *Cancer Res.* 1998;58(12):2661-2666.

Müller T, Uherek C, Maki G, *et al.* Expression of a CD20-specific chimeric antigen receptor enhances cytotoxic activity of NK cells and overcomes NK-resistance of lymphoma and leukemia cells. *Cancer Immunol Immunother.* 2008;57(3):411-423.

Sahm C, Schönfeld K, Wels WS. Expression of IL-15 in NK cells results in rapid enrichment and selective cytotoxicity of gene-modified effectors that carry a tumor-specific antigen receptor. *Cancer Immunol Immunother.* 2012;61(9):1451-1461.

10

20

30

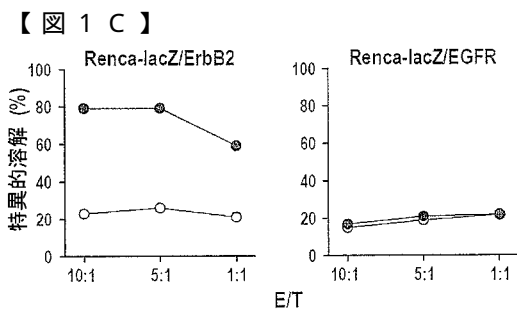
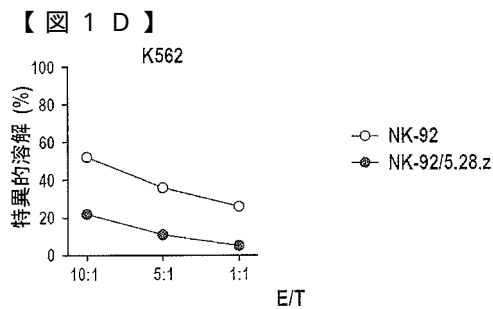
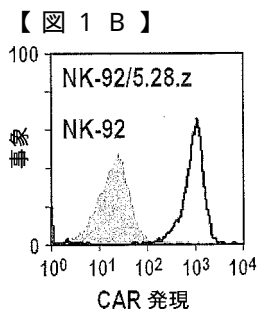
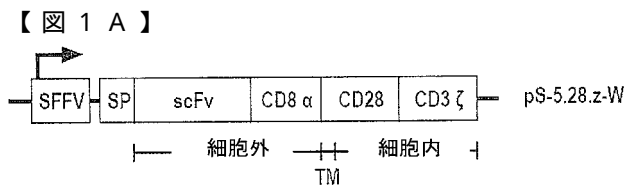
40

Schambach A, Bohne J, Baum C, *et al.* Woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element deleted from X protein and promoter sequences enhances retroviral vector titer and expression. *Gene Ther.* 2006;13(7):641-645.

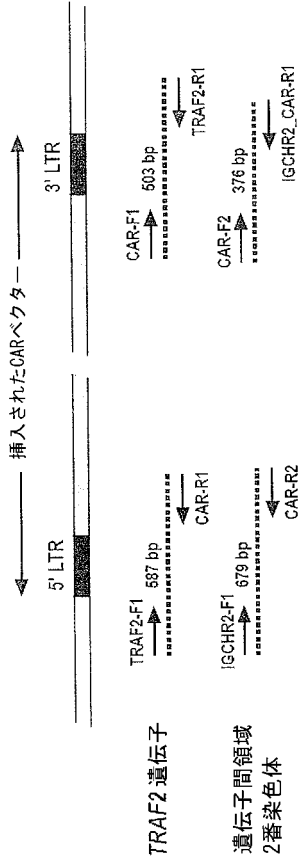
Schmidt M, Carbonaro DA, Speckmann C, *et al.* Clonality analysis after retroviral-mediated gene transfer to CD34+ cells from the cord blood of ADA-deficient SCID neonates. *Nat Med.* 2003;9(4):463-468.

Tavri S, Jha P, Meier R, *et al.* Optical imaging of cellular immunotherapy against prostate cancer. *Mol Imaging.* 2009;8(1):15-26.

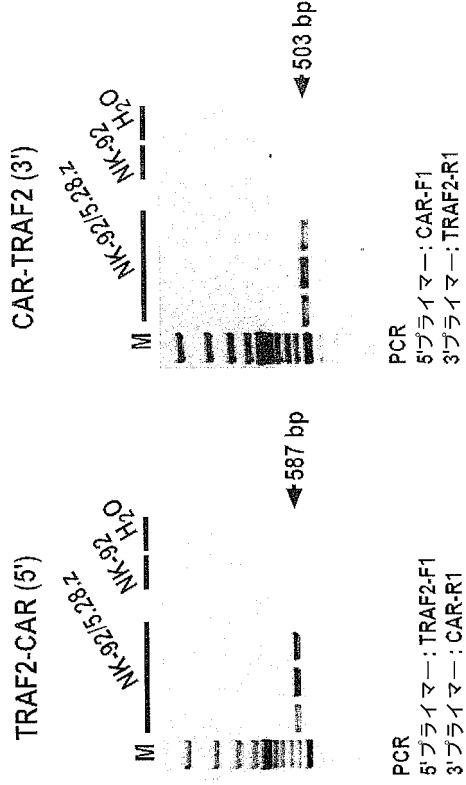
Tonn T, Schwabe D, Klingemann HG, *et al.* Treatment of patients with advanced cancer with the natural killer cell line NK-92. *Cytotherapy.* 2013;15(12):1563-1570.



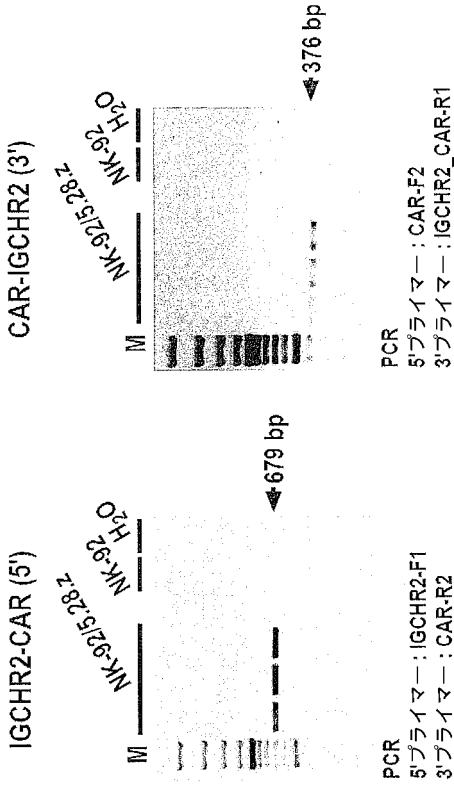
【図 2 A】



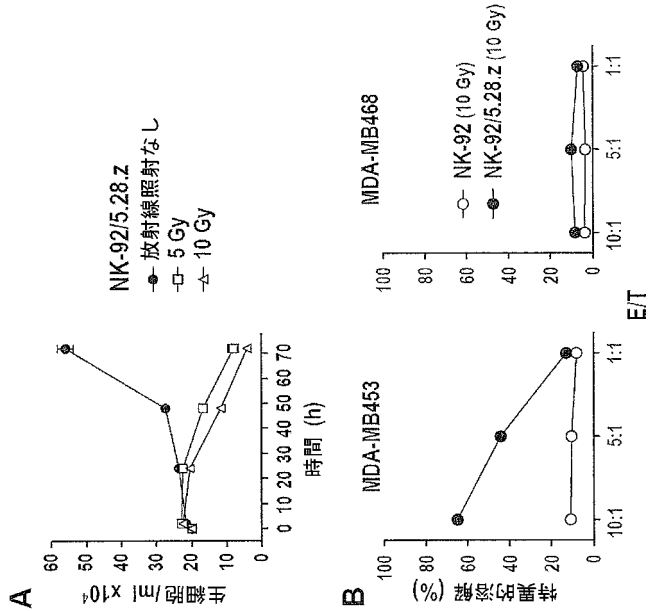
【図 2 B】



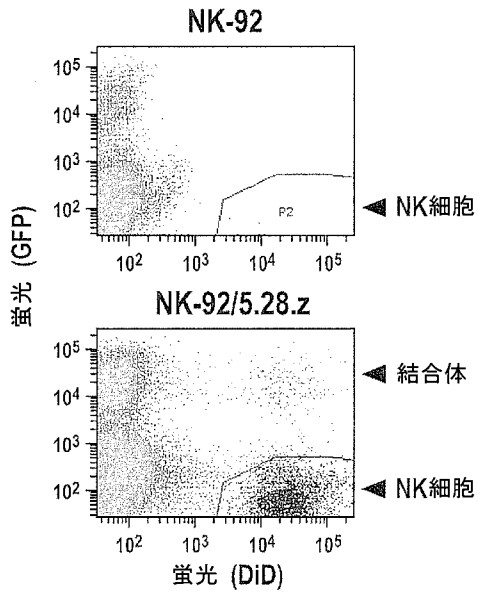
【図 2 C】



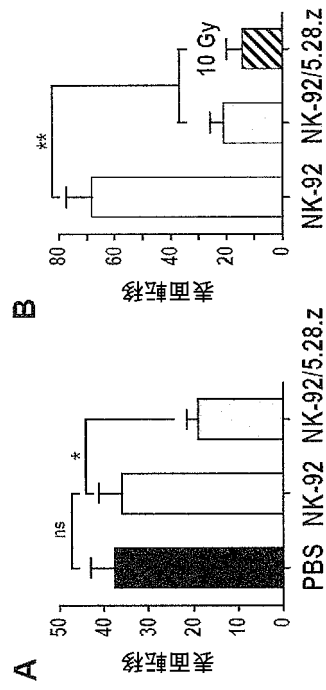
【図 3】



【 図 4 】



【 図 5 】



【 配列表 】

2017525385000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2015/063674
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. C07K16/32 C12N5/0783 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 C12N		
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, BIOSIS, WPI Data		
<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	UHEREK CHRISTOPH ET AL: "Retargeting of natural killer-cell cytolytic activity to ErbB2-expressing cancer cells results in efficient and selective tumor cell destruction", BLOOD,, vol. 100, no. 4, 15 August 2002 (2002-08-15), pages 1265-1273, XP002614962,	14,15
Y	page 1267, paragraph generation of NK-92 cells carrying a CAR; table 1 ----- -/--	1-15
<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 "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
10 August 2015		18/08/2015
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
		Mabit, Hélène

1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2015/063674

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HEIKE E DALDRUP-LINK ET AL: "In vivo tracking of genetically engineered, anti-HER2/neu directed natural killer cells to HER2/neu positive mammary tumors with magnetic resonance imaging", EUROPEAN RADIOLOGY, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 15, no. 1, 1 January 2005 (2005-01-01), pages 4-13, XP019335810, ISSN: 1432-1084, DOI: 10.1007/S00330-004-2526-7	14,15
Y	page 5, column 2, paragraph cells and culture conditions - paragraph In vivo studies	1-15
X	----- NOWAKOWSKA P ET AL: "76: GENERATION AND QUALIFICATION OF A GMP COMPLIANT MASTER CELL STOCK OF CAR EXPRESSING ERBB2-SPECIFIC NK-92 CELLS FOR CLINICAL TRIALS", CYTOTHERAPY; 20TH ANNUAL MEETING OF THE INTERNATIONAL-SOCIETY-FOR-CELLULAR-THERAPY, ISIS MEDICAL MEDIA, OXFORD, GB; PARIS, FRANCE, vol. 16, no. 4, Suppl. S, 1 April 2014 (2014-04-01), page S28, XP009180120, ISSN: 1465-3249, DOI: 10.1016/J.JCYT.2014.01.089 [retrieved on 2014-03-12]	14
Y	the whole document	1-15
Y	----- WO 2012/031744 A1 (CHEMOTHERAPEUTISCHES FORSCHUNGSINSTITUT [DE]; SCHOENFELD KURT [DE]; KN) 15 March 2012 (2012-03-15) cited in the application example 1	1-15
Y	----- DUONG CONNIE P M ET AL: "Engineering T Cell Function Using Chimeric Antigen Receptors Identified Using a DNA Library Approach", PLOS ONE, vol. 8, no. 5, May 2013 (2013-05), XP002729818, page 8, column 2, last paragraph	1-15
Y	----- TONN TORSTEN ET AL: "Treatment of patients with advanced cancer with the natural killer cell line NK-92", CYTOTHERAPY, vol. 15, no. 12, December 2013 (2013-12), pages 1563-1570, XP002729819, cited in the application the whole document	1-15
	-----	

1

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2015/063674

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2012031744 A1	15-03-2012	EP 2614077 A1	17-07-2013
		US 2013280285 A1	24-10-2013
		WO 2012031744 A1	15-03-2012
-----			

## 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 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	
A 6 1 K 35/17 (2015.01)	A 6 1 K 35/17	Z
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 K 35/76	
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	
C 0 7 K 14/705 (2006.01)	C 0 7 K 14/705	
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A

(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

(71) 出願人 511025329  
 デーエルカー - ブルートシュペンデディーンスト・パーデン - ヴェルテンブルク - ヘッセン・ゲー  
 ゲーエムベーハー  
 DRK - BLUTSPENDEDIENST BADEN - WURTTENBERG - HESSEN  
 N G G M B H  
 ドイツ国、6 0 5 2 8 フランクフルト・アム・マイン、ザントホフシュトラッセ 1

(74) 代理人 100102978  
 弁理士 清水 初志

(74) 代理人 100102118  
 弁理士 春名 雅夫

(74) 代理人 100160923  
 弁理士 山口 裕孝

(74) 代理人 100119507  
 弁理士 刑部 俊

(74) 代理人 100142929  
 弁理士 井上 隆一

(74) 代理人 100148699  
 弁理士 佐藤 利光

(74) 代理人 100128048  
 弁理士 新見 浩一

(74) 代理人 100129506  
 弁理士 小林 智彦

(74) 代理人 100205707  
 弁理士 小寺 秀紀

(74) 代理人 100114340  
 弁理士 大関 雅人

(74) 代理人 100114889  
 弁理士 五十嵐 義弘

(74) 代理人 100121072  
 弁理士 川本 和弥

(72) 発明者 ヴェルス ヴィンフリート



(72)発明者 ドイツ連邦共和国 6 0 5 9 9 フランクフルト シュヴァインフルター ヴェーク 7 3  
 シェーンフェルト クルト  
 (72)発明者 ドイツ連邦共和国 6 3 2 2 5 ランゲン ピットラーシュトラッセ 3  
 トン トルステン  
 (72)発明者 ドイツ連邦共和国 0 1 3 0 9 ドレスデン シュトレーゼマンプラッツ 1  
 グレッツ マヌエル  
 (72)発明者 ドイツ連邦共和国 6 9 1 2 1 ハイデルベルク アンドレアス - ホーファー - ヴェーク 2 8  
 チャン コンコン  
 ドイツ連邦共和国 6 0 5 9 8 フランクフルト トゥホルスキーシュトラッセ 8 1 アパート  
 メント 1 0 5

F ターム(参考) 4B063 QA01 QA13 QA18 QQ08 QQ13 QQ42 QR08 QR32 QR62 QS25  
 QX01  
 4B065 AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 BB12 BB25 BB34 BB37 CA24  
 CA25 CA44  
 4C087 AA01 AA02 AA03 BB43 BC83 CA12 MA16 MA66 NA14 ZB09  
 ZB26 ZC20  
 4H045 AA10 AA11 AA30 BA41 CA40 DA50 DA76 EA20 FA74