

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2022-526504

(P2022-526504A)

(43)公表日 令和4年5月25日(2022.5.25)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/0783(2010.01)	C 1 2 N 5/0783	Z N A 4 B 0 6 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	4 C 0 8 7
A 6 1 K 35/17 (2015.01)	A 6 1 K 35/17	Z 4 H 0 4 5
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全32頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号	特願2021-556721(P2021-556721)	(71)出願人	518032498
(86)(22)出願日	令和2年3月20日(2020.3.20)		オーエヌケー セラピューティクス リミテッド
(85)翻訳文提出日	令和3年11月22日(2021.11.22)		アイルランド エイチ91 ヴィ6ケーヴィ カウンティ ゴールウェイ バーナ ヴィレッジ ピア ロード コル アンド カンパニー内
(86)国際出願番号	PCT/EP2020/057879	(74)代理人	110002860
(87)国際公開番号	WO2020/188105		特許業務法人秀和特許事務所
(87)国際公開日	令和2年9月24日(2020.9.24)	(72)発明者	オ'ドワイヤー, マイケル エイモン ピーター
(31)優先権主張番号	19164241.2		アイルランド ゴールウェイ ソルトヒル ポラルーマ ウェスト 11
(32)優先日	平成31年3月21日(2019.3.21)	(72)発明者	サルカール, スプハシス
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)		アイルランド ゴールウェイ ヘッドフォ
(31)優先権主張番号	1917588.4		
(32)優先日	令和1年12月2日(2019.12.2)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	英国(GB)		
(31)優先権主張番号	2001593.9		
	最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 細胞死に対する耐性が増大した改変免疫エフェクター細胞

(57)【要約】

免疫エフェクター細胞および免疫エフェクター細胞株を、T R A I L 受容体のノックアウトもしくは免疫エフェクター細胞共刺激ドメインとT R A I L 受容体との結合、または両方によって、T R A I L 誘導細胞死に対して耐性を増大するように改変する。

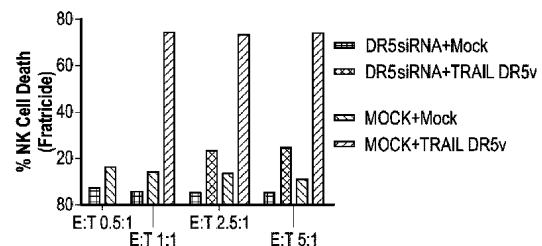


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

T R A I L 誘導細胞死に対する耐性を増大するように改変された免疫エフェクター細胞または免疫エフェクター細胞株であって、

a) 前記改変は、1つ以上の T R A I L 受容体遺伝子の発現をノックダウンまたはノックアウトすることであること；および／または

b) 前記改変は、共刺激ドメインと結合された T R A I L 受容体を発現することであること、

を特徴とする、免疫エフェクター細胞または免疫エフェクター細胞株。

【請求項 2】

前記免疫エフェクター細胞は、N K 細胞である、請求項 1 に記載の免疫エフェクター細胞または免疫エフェクター細胞株。

【請求項 3】

前記免疫エフェクター細胞は、T 細胞である、請求項 1 に記載の免疫エフェクター細胞または免疫エフェクター細胞株。

【請求項 4】

前記 T R A I L 誘導細胞死に対する耐性増大は、野生型免疫エフェクター細胞と比較して少なくとも 10 % の増大である、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の免疫エフェクター細胞または免疫エフェクター細胞株。

【請求項 5】

前記 T R A I L 受容体は、D R 4 および D R 5 から選択される、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の免疫エフェクター細胞または免疫エフェクター細胞株。

【請求項 6】

前記共刺激ドメインは、4 - 1 B B、C D 2 8、2 B 4、D A P - 1 0、D A P - 1 2、C D 2 7 8 (I C O S) および O X 4 0 から選択される、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の免疫エフェクター細胞または免疫エフェクター細胞株。

【請求項 7】

さらに、変異体 T R A I L リガンドを発現するかまたは発現するように改変されている、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の免疫エフェクター細胞または免疫エフェクター細胞株。

【請求項 8】

前記変異体 T R A I L リガンドは、T R A I L 受容体、例えば、D R 4 および／または D R 5 に対して増大された親和性を有する、請求項 7 に記載の免疫エフェクター細胞または免疫エフェクター細胞株。

【請求項 9】

前記細胞株は、N K - 9 2 もしくは K H Y G - 1、またはその誘導体である、請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の免疫エフェクター細胞または免疫エフェクター細胞株。

【請求項 10】

患者のがん治療において使用するための、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の免疫エフェクター細胞または免疫エフェクター細胞株。

【請求項 11】

前記がんは、血液がんである、請求項 10 に記載の免疫エフェクター細胞または免疫エフェクター細胞株。

【請求項 12】

前記血液がんは、急性リンパ性白血病 (A L L)、急性骨髄性白血病 (A M L)、慢性リンパ性白血病 (C L L)、慢性骨髄性白血病 (C M L)、ホジキンリンパ腫、T 細胞リンパ腫および B 細胞リンパ腫を含む非ホジキンリンパ腫、無症候性骨髄腫、くすぶり型多発性骨髄腫 (S M M)、症候性骨髄腫または軽鎖骨髄腫である、請求項 11 に記載の免疫エフェクター細胞または免疫エフェクター細胞株。

【請求項 13】

10

20

30

40

50

NK-92またはKHYG-1細胞であって、共刺激ドメインと結合されたTRAIL受容体を発現するように改変されている、NK-92またはKHYG-1細胞。

【請求項14】

前記TRAIL受容体は、DR4およびDR5から選択される、請求項13に記載のNK-92またはKHYG-1細胞。

【請求項15】

前記共刺激ドメインは、4-1BB、CD28、2B4、DAP-10、DAP-12、CD278（ICOS）およびOX40から選択される、請求項13または14に記載のNK-92またはKHYG-1細胞。

【請求項16】

がんの治療方法であって、請求項1～9のいずれか一項に記載の免疫エフェクター細胞または免疫エフェクター細胞株を患者に投与することによる、がんの治療方法。

【請求項17】

組成物であって、請求項1～9のいずれか一項に記載の免疫エフェクター細胞または免疫エフェクター細胞株を含む、組成物。

【請求項18】

改変免疫エフェクター細胞または免疫エフェクター細胞株の製造方法であって、前記方法は、TRAIL誘導細胞死に対する耐性を増大するように前記細胞を改変することを含み、

a) 前記改変は、1つ以上のTRAIL受容体遺伝子の発現をノックダウンまたはノックアウトすることであること；および／または

b) 前記改変は、共刺激ドメインと結合されたTRAIL受容体を発現することであること、

を特徴とする、方法。

【請求項19】

前記免疫エフェクター細胞は、NK細胞である、請求項18に記載の方法。

【請求項20】

前記免疫エフェクター細胞は、T細胞である、請求項18に記載の方法。

【請求項21】

前記TRAIL誘導細胞死に対する増大された耐性は、野生型免疫エフェクター細胞と比較して少なくとも10%の増大である、請求項18～20のいずれか一項に記載の方法。

【請求項22】

前記TRAIL受容体は、DR4およびDR5から選択される、請求項18～21のいずれか一項に記載の方法。

【請求項23】

前記共刺激ドメインは、4-1BB、CD28、2B4、DAP-10、DAP-12、CD278（ICOS）およびOX40から選択される、請求項18～22のいずれか一項に記載の方法。

【請求項24】

前記免疫エフェクター細胞は、変異体TRAILリガンドを発現するようにさらに改変されている、請求項18～23のいずれか一項に記載の方法。

【請求項25】

前記変異体TRAILリガンドは、TRAIL受容体、例えば、DR4および／またはDR5に対して増大された親和性を有する、請求項24に記載の方法。

【請求項26】

前記細胞株は、NK-92もしくはKHYG-1、またはその誘導体である、請求項18～25のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

10

20

30

40

50

本発明は、その有用な誘導体を産生するための免疫エフェクター細胞および免疫エフェクター細胞株の改変に関する。さらに、本発明は、改変免疫エフェクター細胞および細胞株、該細胞および細胞株を含む組成物の製造方法ならびに前記細胞および該細胞を含む組成物のがん治療における使用に関する。

【背景技術】

【0002】

通常、標的細胞の死をもたらす免疫応答を引き起こす前に、免疫細胞は、主要組織適合複合体（MHC）により抗原を提示する標的細胞を必要とする。これは、MHCクラスIを提示しないがん細胞が大部分の免疫応答を回避することを可能とする。

【0003】

しかしながら、NK細胞は、MHCクラスI発現の非存在下でがん細胞を認識することができる。したがって、NK細胞は、がんに対する生体防御に重要な役割を果たす。

【0004】

他方、特定の実施形態では、がん細胞は、細胞膜上の抑制性受容体と結合するリガンドの発現により、免疫エフェクター細胞、例えば、NK細胞およびT細胞の細胞傷害活性を弱める能力を示す。がんに対する耐性は、これらおよび他の因子間のバランスに関連し得る。

【0005】

これに関連して、細胞傷害性は、例えば、細胞溶解性タンパク質の放出、またはがん細胞膜上の受容体との結合および前記がん細胞のアポトーシスの誘導（直接的であろうと間接的であろうと）によりがん細胞死を誘導する免疫エフェクター細胞、例えば、NK細胞およびT細胞の能力を表す。細胞傷害性は、細胞溶解性タンパク質の放出を誘導するシグナルだけでなく、これらの放出を抑制するシグナルによって影響を受ける。したがって、細胞傷害性増大は、がん細胞のより効率的な死滅をもたらし、上記のように、がん細胞が免疫エフェクター細胞の細胞傷害活性を弱める可能性が少ないだろう。

【0006】

NK細胞上の抑制性受容体機能を除去する遺伝子改変が、MHCクラスI発現を欠くがNK細胞傷害性を弱めることができるがん細胞に対するNK細胞の細胞傷害性の増大方法として示唆された（Bodduluru et al., 2012）。特定のがん細胞はMHCクラスI発現の非存在下でNKG2Aと結合しNK細胞傷害性を抑制するHLA-Eを発現することが分かっているので、NKG2Aは、これらの環境下で発現抑制する価値がある抑制性受容体として確立された（Shook et al., 2011；国際公開第2006/023148号）（Campana D. et al., 2019）。

【0007】

NKG2A発現を下方制御する別の方法は、NK-92細胞において示されており、IL-15をコードする遺伝子を用いたトランスフェクションは、NKG2A発現減少と関連していることが示された（Zhang et al., 2004）。しかしながら、NK細胞の細胞傷害性の増加が観察されたにもかかわらず、この増加は、活性化受容体NKG2Dの発現が同時に増加した結果である可能性がある。これは、NK-92細胞上のNKG2A受容体の遮断が多発性骨髄腫細胞に対する細胞傷害性増大と関連しなかったという観察により支持される（Heidenreich et al., 2012）。それにもかかわらず、NK-92細胞株は、抑制性受容体の非常に低い発現を有する高い細胞傷害性の細胞株であることは注目すべきである。したがって、NKG2A発現減少と関連するいずれもの細胞傷害性増大は、検出するにはあまりにも些細であったかもしれない。

【0008】

同様な試験はマウスにおいて行われた。例えば、マウスはNK細胞上でLy49と呼ばれる受容体を発現し、これはヒト抑制性KIR受容体と類似している。抗体フラグメントでLy49受容体を遮断することにより、NK細胞はより細胞傷害性となり、インビトロおよびインビボでマウス白血病細胞を死滅させることができることが示されている（Koh et al., 2001）。

10

20

30

40

50

【0009】

しかしながら、抑制性受容体機能低下の結果として、改変NK細胞が「正常」細胞とがん細胞間体内とを区別する能力が低くなるため、「正常」細胞は改変NK細胞による攻撃の影響をより受け易くなる。この副作用は、「古典的」抑制性受容体機能低下の重大な欠点である。

【0010】

NK細胞ががん細胞を死滅することが分かっている別の方法は、その表面上のTRAILの発現によるものである。TRAILリガンドは、がん細胞上のTRAIL受容体と結合することができ、前記がん細胞のアポトーシスを誘導する。1つの推測によるアプローチは、この抗がん機序を活用するため、NK細胞上の膜結合型TRAILリガンドの過剰発現を特徴とする（欧州特許出願公開第1621550号）。さらに、IL-12は、NK細胞上のTRAIL発現を上方制御することが報告されている（Smyth et al. 2001）。

10

【0011】

それにもかかわらず、がん細胞は、TRAILを発現するNK細胞に対応するための回避的および保護的機序を発達させている。デコイTRAIL受容体は、がん細胞膜上でしばしば発現され、これらのデコイ受容体（例えば、DcR1およびDcR2）とのTRAILの結合はアポトーシスを誘導することができない；かかる機序の克服方法はまだ探究されていない。

【0012】

がん細胞を標的とするTRAILを発現するNK細胞を用いた別の問題は、特定のNK細胞はTRAIL受容体それ自体を発現することである。したがって、NK細胞上のTRAIL発現は、場合によっては、兄弟殺しに至る可能性がある。

20

【0013】

急性骨髄性白血病（AML）は、骨髄発育に関係した前駆細胞を含む造血器悪性腫瘍であり、成人（90%）および小児（15～20%）の両方における急性白血病のかなりの割合を占める（Hurwitz, Mounce et al. 1995; Lowenberg, Downing et al. 1999）。患者の80%が標準的化学療法を用いて寛解したにもかかわらず（Hurwitz, Mounce et al. 1995; Ribeiro, Razzouk et al. 2005）、微小残存病変（MRD）からの高再発率が理由で生存率は未だに満足ができるものではない。5年生存率は年齢依存性であり；小児で60%（Rubnitz 2012）、65歳未満の成人で40%（Lowenberg, Downing et al. 1999）および65歳以上の成人で10%（Ferrara and Schiffer 2013）である。これらの予後は、患者が適切な造血細胞ドナーを有する場合は改善され得るが、多くは改善されず、治療するための代替アプローチに対する必要性が強調されている。

30

【0014】

ナチュラルキラー（NK）細胞は、例えば、ナチュラルキラーT（NK-T）細胞と異なる別の表現型およびエフェクター機能を有する細胞傷害性リンパ球である。例えば、NK-T細胞はCD3およびT細胞抗原受容体（TCR）の両方を発現するが、NK細胞は発現しない。NK細胞は一般的に、マーカーCD16およびCD56を発現することが分かっており、CD16はFc受容体として機能し、後述される抗体依存性細胞傷害作用（ADCC）を媒介する。KHYG-1は、この点で注目すべき例外である。NK細胞はもともと細胞傷害性であるにもかかわらず、細胞傷害性を増大されたNK細胞株が開発されている。NK-92およびKHYG-1は、広範囲に研究されてきた2つのNK細胞株であり、がん治療における明るい見通しを示す（Swift et al. 2011; Swift et al. 2012）。

40

【0015】

がん治療において使用するための養子細胞免疫治療は、通常、天然および改変T細胞を患者に投与することを含む。特定の標的がん細胞と特異的に結合する受容体および／または

50

リガンドを発現するように、T細胞を、様々な方法、例えば、遺伝子的に改変することができる。高親和性T細胞受容体（TCR）およびがん細胞抗原に対して特異的であるキメラ抗原受容体（CAR）を用いたT細胞のトランスフェクションは、高反応性がん特異的T細胞反応を起こすことができる。この免疫療法的アプローチの主な限界は、患者への細胞の移植直後の免疫根絶または、場合によっては、移植片対宿主病（GVHD）発症を回避するために、T細胞をエクスピボの自己増殖のため患者から得なければならないか、あるいはMHCマッチT細胞を使用しなければならないことである。加えて、うまく移植されたT細胞は、循環系で長期間生存することが多く、治療から生じた持続的副作用の制御を困難にする。

【0016】

ハプロタイプ一致の骨髄移植の状況では、移植片対白血病効果は、KIR抑制性受容体—リガンドミスマッチがある場合、NK細胞により媒介され、AMLの治療生存率向上につながり得ると考えられる（Ruggeri, Capanni et al. 2002; Ruggeri, Mancusi et al. 2005）。さらに、急速なNK回復は、AMLにおいてTリンパ球除去造血細胞移植（HCT）を受けた患者のより良好な予後およびより強力な移植片対白血病（GVL）効果と関連する（Savani, Mielke et al. 2007）。他の試験は、エクスピボで増殖されたハプロタイプ一致のNK細胞を使用し、成人（Miller, Soignier et al. 2005）および小児（Rubnitz, Inaba et al. 2010）のAMLを治療した。

【0017】

いくつかの永久NK細胞株は確立されているが、最も注目すべきはNK-92であり、CD16（Fcγ受容体II）を除く典型的なNK細胞マーカーを発現する非ホジキンリンパ腫の患者から得られた。NK-92は、広範囲な前臨床試験を経て、活性化NK細胞およびリンホカイン活性化キラー（LAK）細胞と比較して、広範囲の腫瘍に対する優れた溶解能を示す（Gong, Maki et al. 1994）。原発性AMLに対するNK-92細胞の細胞傷害性が証明されている（Yan, Steinherz et al. 1998）。

【0018】

別のNK細胞株、KHYG-1は、臨床用途の有望な競争相手として同定された（Suck et al. 2005）が、低い細胞傷害性により、NK-92より注目を集めなかった。KHYG-1細胞は、予め活性化されていることが分かっている。内在性NK細胞と異なり、KHYG-1細胞は常に極性を持ち、これらの細胞傷害性を増大し、外的刺激に対する応答に対してより迅速となる。NK-92細胞は、KHYG-1細胞より高いベースラインの細胞傷害性を有する。

【0019】

したがって、現在の養子免疫療法プロトコールは、エフェクター細胞の量および質におけるドナーのばらつきにより影響を受けることは明白であり、より標準化された治療を提供するために効果的な細胞株が利用できる場合、ばらつきを除くことができる。

【0020】

NK細胞の細胞傷害性の研究のかなりの量は、マウスモデルを用いて行われてきた。その一例は、パーフォリンおよびグランザイムB mRNAはマウスNK細胞において構成的に転写されるが、NK細胞の刺激または活性化までは最小レベルのタンパク質が検出されるという発見である（Fehniger et al. 2007）。マウスNK細胞を用いたこの研究および他の研究は興味深いが、ヒトのNK細胞の細胞傷害性に関する決定的な証拠として信頼され得ない。上記例と対照的に、ヒトNK細胞は、刺激前に、高レベルのパーフォリンおよびグランザイムBタンパク質を発現する（Leong et al. 2011）。結果として、マウスあるいはヒトNK細胞のどちらかが培養液で新たに単離される場合、マウスNK細胞は弱い細胞溶解活性を有するが、ヒト細胞は強力な細胞溶解能を示す。

【0021】

また、マウスおよびヒトNK細胞は、その発現マーカー、シグナル伝達カスケードおよび組織分布において大きく異なる。例えば、CD56はヒトNK細胞のマーカーとして使用されるが、マウスNK細胞はこのマーカーを全く発現しない。さらに、NK細胞の細胞傷害性を調節する確立した機序は、リガンド結合NK活性化および抑制性受容体による。最も顕著なヒトNK活性化受容体の2つは、NKp30およびNKp44であることが知られているが、これらのどちらもマウスNK細胞上で発現されない。NK抑制性受容体に関して、ヒトNK細胞がMHCクラスIを認識し、細胞傷害活性を弱めるKIRを発現する一方で、マウスNK細胞はKIRを全く発現せず、しかし、代わりにLy49を発現する(Trowsdale et al, 2001)。全体として、マウスNK細胞は自然な生理環境においてヒトNK細胞と同じ機能を達成するにもかかわらず、この役割を果たす機序は種間で著しく異なる。

10

【0022】

したがって、例えばより高い細胞傷害性プロファイルを有する、代替の、好ましくは改良された、免疫エフェクター細胞および細胞株に対する必要性が存在する。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0023】

本発明の目的は、TRAIL誘導細胞死を起こしにくく、および／またはより高い細胞傷害性の表現型を有する免疫エフェクター細胞および免疫エフェクター細胞株を提供することである。さらなる目的は、改変免疫エフェクター細胞および細胞株の製造方法、該細胞および細胞株を含む組成物ならびにがん治療における前記組成物の使用を提供することである。より特定の実施形態は、同定されたがん、例えば、固形腫瘍だけでなく、白血病などの血液がんに対する治療を提供することを目標としている。特定の実施形態は、免疫エフェクター細胞および細胞株の2つ以上の改変を組み合わせ、改変細胞の細胞傷害性をさらに増強することを目指す。

20

【課題を解決するための手段】

【0024】

本明細書では、TRAIL誘導細胞死に耐性を有し、好ましいが任意に、細胞傷害性表現型を有する、改変免疫エフェクター細胞および細胞株を提供する。さらになお、該細胞および細胞株の製造方法を提供する。改変免疫エフェクター細胞および細胞株の組成物、ならびにがん治療のための前記細胞および組成物の使用も提供する。

30

【0025】

免疫エフェクター細胞／細胞株は、NK細胞およびT細胞から選択されるのが好ましい。

【0026】

本発明は、例えば、TRAIL受容体、抑制性受容体および／もしくはチェックポイント抑制性受容体をコードする遺伝子、改変TRAIL受容体、TRAILリガンドおよび多様体をコードする発現遺伝子、ならびに／またはキメラ抗原受容体(CAR)および／もしくはFc受容体をコードする発現遺伝子をノックアウトおよび／またはノックダウンする遺伝子工学を用いた、免疫エフェクター細胞の改変方法を提供する。

【0027】

さらに、本発明の組成物は、2つ以上の改変を提供する免疫エフェクター細胞および免疫エフェクター細胞株を含み、複数の改変は、該細胞および細胞株の細胞傷害活性をさらに増強する。

40

【0028】

本発明は、TRAIL誘導細胞死に対する耐性増大するように改変された免疫エフェクター細胞または免疫エフェクター細胞株を提供する。細胞それ自体は、TRAIL誘導細胞死に対する耐性を有する。好ましくは、細胞は、1つ以上のTRAIL受容体の機能を低下するように改変(例えば、遺伝子的に)されている。

【0029】

本発明によれば、改変免疫エフェクター細胞株、例えば、NK-92およびその誘導体を

50

用いた、がん、例えば、血液がんおよび固形腫瘍の治療方法であって、改変免疫エフェクター細胞株はチェックポイント抑制性受容体の発現を欠き、T R A I L リガンド多様体を発現し、ならびに／またはC A R および／もしくはF c 受容体を発現するように必要に応じてさらに操作されている、方法をさらに提供する。

【0030】

特に、本発明により治療可能な疾病としては、がん、血液がん、白血病および詳細には急性骨髄性白血病が挙げられる。特にヒトにおける腫瘍およびがんを治療することができる。本明細書において腫瘍への言及は、新生物への言及を含む。

【図面の簡単な説明】

【0031】

本発明を附属の図面を参照して特定の実施形態で例証する。

【図1】DR5発現をノックダウンすることによるNK細胞兄弟殺しの軽減を示す。

【図2】T細胞におけるDR5発現を示す。

【図3】DR5-41BBキメラを有するT細胞のトランスフェクションを示す。

【図4】DR5-41BBキメラの発現によるT R A I L 誘導T細胞死の軽減を示す。

【図5】NK細胞におけるDR5発現を示す。

【図6】DR5-41BBキメラを有するNK細胞のトランスフェクションを示す。

【発明を実施するための形態】

【0032】

したがって、本発明は、T R A I L 誘導細胞死に耐性を有するように改変された免疫エフェクター細胞または細胞株を提供する。細胞は、結果としてT R A I L 誘導細胞死または兄弟殺しを起こしにくい可能性がある。

【0033】

免疫エフェクター細胞は、好ましくはリンパ球である。

【0034】

好ましい実施形態では、リンパ球は、NK細胞である。NK細胞は、好ましくは初代NK細胞、K H Y G - 1 細胞またはNK-92細胞である。

【0035】

他の好ましい実施形態では、リンパ球は、T細胞である。T細胞は、好ましくは初代T細胞またはジャーカット細胞である。

【0036】

以下詳細に記載されているように、免疫エフェクター細胞は、T R A I L 誘導細胞死に対するその耐性を増大、および必要に応じて、がん細胞に対するその細胞傷害活性を増大するために遺伝子的に改変されている。

【0037】

本発明の免疫エフェクター細胞および細胞株を併せて、免疫エフェクター細胞と呼ぶ（文脈上他の意味を必要としない限り）。同様に、T細胞は、T細胞株を包含するものとし、NK細胞はNK細胞株を包含するものとする（文脈上他の意味を必要としない限り）。

【0038】

好ましい一連の実施形態では、免疫エフェクター細胞は、1つ以上のT R A I L 受容体の機能を低下するように改変されている。細胞小胞体内のT R A I L 受容体の発現の遺伝子ノックアウトもしくはノックダウン（例えば、s i R N A を用いて）または制限を用いて、必要に応じてこれを行う。有利に、改変細胞は、T R A I L シグナル伝達経路で作用された細胞死に対する耐性を有するかまたはより耐性を有する。

【0039】

好ましくは、DR4および／またはDR5機能は、本発明の細胞において低下する。DR4および／またはDR5遺伝子をノックアウトすることは特に好ましい。遺伝子の複数の複製が存在する場合、全てをノックアウトすることは好ましい。

【0040】

T R A I L 誘導細胞死に対する細胞の感受性を低下させる他の手段を使用してよい。必要

10

20

30

40

50

に応じて、T R A I L 誘導細胞死は、免疫エフェクター細胞内でc - F L I Pを過剰発現することおよび／またはカスパーゼ8発現をノックダウンすることによって減少する。したがって、本発明のNK細胞およびT細胞では、c - F L I Pを過剰発現してよい。したがって、また、本発明のNK細胞およびT細胞では、カスパーゼ8発現を減少またはノックダウンもしくはノックアウトする。

【0041】

免疫エフェクター細胞を、細胞のT R A I L 誘導細胞死を減少させるとともに、より高い細胞傷害性表現型を有する細胞を提供する方法で改変してよい。好ましくは、同じ改変がこれらの利点の両方を達成することができる。

【0042】

T R A I L 誘導細胞死に対する本発明による免疫エフェクター細胞の耐性を、好ましくは、野生型免疫エフェクター細胞と比較して、少なくとも5%、より好ましくは少なくとも10%、より好ましくは少なくとも25%、最も好ましくは少なくとも50%増大する。細胞死に対する耐性を、当業者に公知のいくつかの方法で、例えば、細胞生存率アッセイを行うことによって測定することができる。好ましくは、細胞死に対する耐性増大を、フローサイトメトリーによるヨウ化プロピジウム細胞生存率アッセイを用いて測定する。一例では、T R A I L 誘導細胞死に対する耐性の少なくとも10%の増大を示す本発明による改変された免疫エフェクター細胞集団は、(1) 改変細胞および(2) 野生型細胞と共に可溶性T R A I Lをインキュベートし、次いでヨウ化プロピジウムで各細胞集団を染色後に、改変細胞集団が野生型集団より少なくとも10%高い細胞生存率を有することが判明するアッセイにより確認されうる。

【0043】

免疫エフェクター細胞を、共刺激ドメインと結合されたT R A I L 受容体を発現するように改変することは好ましい。細胞は、1つ以上の共刺激ドメインと結合されたT R A I L 受容体を発現し得る。好ましくは、T R A I L 受容体は、D R 4およびD R 5から選択される。好ましくは、共刺激ドメインは、4 - 1 B B、C D 2 8、2 B 4、D A P - 1 0、D A P - 1 2、C D 2 7 8 (I C O S) およびO X 4 0の1つ以上から選択される。より好ましくは、共刺激ドメインは、C D 3 ㄗと結合された4 - 1 B Bである。

【0044】

共刺激ドメインは、抗原受容体(例えば、D R 4またはD R 5)により送られるシグナルに加えて、シグナルを提供し、リンパ球(例えば、NK細胞)の完全活性化誘導の助けとなることができるタンパク質ドメインである。免疫エフェクター細胞の完全活性化は、サイトカイン産生、持続的増殖、抗アポトーシス細胞内シグナル伝達および／または抗原受容体によるさらなる刺激に対する感受性向上をもたらす。全体的に、これは、より高い細胞傷害性の表現型を有する免疫エフェクター細胞を提供する。したがって、共刺激ドメインと結合された受容体とのリガンドの結合は、リガンド結合のこの細胞刺激結果を活性化する。

【0045】

免疫エフェクター細胞の改変から得られた細胞傷害性増大または増強は、かかる改変を有しない野生型細胞の細胞傷害性と比較することにより定義される。野生型細胞は、改変を含む細胞と同じ型だが、改変それ自体を有しない細胞と定義される。例えば、本発明は、共刺激ドメインC D 2 8と結合されたD R 5を発現するように改変されたN K - 9 2細胞を提供し；これらのNK細胞を野生型N K - 9 2細胞(すなわち、C D 2 8と結合されたD R 5を発現するように改変されていないN K - 9 2細胞)と比較してがん細胞に対する細胞傷害性増強を示すように改変する。

【0046】

K H Y G - 1細胞は、休止している場合、低レベルのD R 4およびD R 5を通常発現する。それにもかかわらず、細胞が活性化された場合、または外因性因子の影響／暴露下である場合に、D R 4および／またはD R 5の発現は上方制御し得る。そうであるから、K H Y G - 1細胞も、本発明により適切に改変される。

10

20

30

40

50

【0047】

標的（例えば、がん）細胞に対する本発明による免疫エフェクター細胞の細胞傷害性を、好ましくは、野生型免疫エフェクター細胞と比較して、少なくとも10%、より好ましくは少なくとも20%、より好ましくは少なくとも50%、最も好ましくは少なくとも100%増大する。細胞傷害性は、免疫エフェクター細胞との共インキュベーション中、標的細胞死を決定するための公知の方法を用いて容易に測定される。好ましくは、細胞傷害性増大を、フローサイトメトリーによるヨウ化プロピジウム細胞生存率アッセイを用いて測定する。一例では、がん細胞に対する細胞傷害性の少なくとも10%増大を示すように本発明による改変された免疫エフェクター細胞集団は、（1）本発明の改変細胞あるいは（2）野生型（すなわち、未改変）免疫エフェクター細胞のいずれかと共に標的がん細胞をインキュベートし、次いで各がん細胞集団を染色後に野生型免疫エフェクター細胞と共にインキュベートされたこれらのがん細胞は改変免疫エフェクター細胞集団と共にインキュベートされたがん細胞より少なくとも10%高い細胞生存率を有することが判明するアッセイにより確認されうる。

10

【0048】

有利なことに、1つ以上の共刺激ドメインと結合されたTRAIL受容体は、本発明の免疫エフェクター細胞の表面上の既存のTRAIL受容体と競合し、したがって、これらの細胞死を誘導するTRAIL受容体とのTRAILの結合を限定する。さらになお、共刺激ドメインと結合されたTRAIL受容体を発現する免疫エフェクター細胞は、免疫エフェクター細胞の細胞傷害活性を増大するTRAILの結合により活性化シグナルを産生する。これは、がん治療するために改変免疫エフェクター細胞を使用する場合に特に有利な特徴であり得る。

20

【0049】

本発明の全ての一連の実施形態では、チェックポイント抑制性受容体機能を減少したまたは有しない免疫エフェクター細胞を提供してよい。かかる本発明の免疫エフェクター細胞は、好ましくは、1つ以上のノックアウトされたチェックポイント抑制性受容体遺伝子を有する。好ましくは、これらの受容体は、特異的チェックポイント抑制性受容体である。好ましくは、さらに、これらのチェックポイント抑制性受容体は、CD96（TACTILE）、CD152（CTLA4）、CD223（LAG-3）、CD279（PD-1）、CD328（SIGLEC7）、SIGLEC9、TIGITおよびTIM-3の1つ以上または全てである。

30

【0050】

他の実施形態では、1つ以上の抑制性受容体シグナル伝達経路がノックアウトされているかまたは機能低下を示す免疫エフェクター細胞を提供し—その結果もまた、抑制性受容体機能を減少させる、または有しない。例えば、SHP-1、SHP-2および／またはSHIPにより媒介されるシグナル伝達経路を、細胞の遺伝子改変によってノックアウトする。

【0051】

得られた免疫エフェクター細胞は改良された細胞傷害性を示し、したがって、がん治療、特に血液がん治療、特に白血病および／または多発性骨髄腫の治療においてより大いに役立つ。

40

【0052】

遺伝子改変は、細胞が成熟免疫エフェクター細胞に分化する前に行ってよい。例えば、多能性幹細胞（例えば、iPSC）を、1つ以上のチェックポイント抑制性受容体を発現する能力を失うように遺伝子改変することができる。次いで、改変iPSCは分化して、細胞傷害性が増大した遺伝子改変免疫エフェクター細胞を産生する。

【0053】

免疫エフェクター細胞活性化後にチェックポイント抑制性受容体が発現するため、他の抑制性受容体に対するチェックポイント抑制性受容体の機能を低下させることは好ましい。大多数のKIRファミリー、NKG2AおよびLIR-2などの正常または「古典的」抑

50

制性受容体は、MHCクラスIと結合し、したがって、セルフトargetingの問題の減少に主に関連する。したがって、好ましくは、チェックポイント抑制性受容体をロックアウトする。本発明によるこれらの受容体の機能低下又は機能不全は、がん細胞が免疫エフェクター機能を抑制すること（受容体が完全に機能的である場合起こりうる）を妨げる。したがって、本発明のこれらの実施形態の利点は、がん細胞によるこれらの細胞傷害活性の抑制されにくい免疫エフェクター細胞にあり；結果として、がん治療に有用である。

【0054】

本明細書で使用されるとき、抑制性受容体との言及は、概して、免疫エフェクター細胞の細胞膜上で発現された受容体であって、例えば、NK細胞、その上で、その相補的リガンドとの結合は前記免疫エフェクター細胞の細胞傷害性低下の原因となる細胞内シグナルをもたらす受容体を表す。これらの抑制性受容体は、免疫エフェクター細胞の「休止」状態および「活性化」状態の両方において発現され、身体の細胞および組織に対する細胞傷害性反応を阻害する「自己寛容」機構を有する免疫系の提供に関連することが多い。一例としては、NK細胞で発現され、身体の健常細胞で発現されるMHCクラスIを認識する抑制性受容体ファミリー「KIR」である。

【0055】

本明細書で使用されるとき、チェックポイント抑制性受容体は、通常、上記に一般的に言及されている抑制性受容体のサブセットとされている。しかしながら、他の抑制性受容体と異なり、チェックポイント抑制性受容体は、免疫エフェクター細胞、例えば、NK細胞の持続性活性化および細胞傷害性の間により高レベルで発現される。この現象は、例えば、炎症部位における慢性細胞傷害性を弱めるのに有用である。例としては、チェックポイント抑制性受容体PD-1、CTLA-4およびCD96が挙げられ、これらの全てはNK細胞で発現される。

【0056】

本発明の免疫エフェクター細胞は、CD96（TACTILE）、CD152（CTLA4）、CD223（LAG-3）、CD279（PD-1）、CD328（SIGLEC7）、SIGLEC9、TIGITおよびTIM-3から選択されるチェックポイント抑制性受容体をコードする遺伝子を欠いていてもよい

【0057】

遺伝子を欠く免疫エフェクター細胞とは、発現している機能的な遺伝子産物を実質的にもたらさない、完全もしくは部分的欠失または変異その他のいずれかを表し得る。本発明者らは、KHYG-1細胞内におけるチェックポイント抑制性受容体の発現をロックダウンするsiRNAを使用する細胞傷害性効果を以前に示した。CD96ロックダウン（KD）KHYG-1細胞は、様々なエフェクター：標的（E：T）比における白血病細胞に対する細胞傷害性増強を示した。実施形態では、免疫エフェクター細胞は、抑制性受容体の2つ以上をコードする遺伝子を欠く。

【0058】

より特定の実施形態は、CD96（TACTILE）、CD152（CTLA4）およびCD279（PD-1）から選択されるチェックポイント抑制性受容体をコードする遺伝子を欠く免疫エフェクター細胞を含む。

【0059】

さらに好ましい実施形態では、免疫エフェクター細胞は、初代T細胞、NK細胞またはNK-92 NK細胞の誘導体である。NK細胞は、KHYG-1細胞の誘導体であってもよい。

【0060】

本発明の免疫エフェクター細胞は、変異体（多様体）TRAILリガンドをさらに発現する。したがって、免疫エフェクター細胞の細胞傷害性増強変化は、TRAILリガンドおよび／または変異TRAILリガンド多様体の発現増加も含む。

【0061】

得られた免疫エフェクター細胞は、TRAIL受容体との結合増大および、結果として、

10

20

30

40

50

がん、特に血液がん、特に白血病に対する細胞傷害性増大を示す。しかしながら、本発明の免疫エフェクター細胞は、上記および下記の改変のために T R A I L 誘導細胞死の影響を受けにくい。

【0062】

変異体／多様体は、好ましくは、野生型 T R A I L のデコイ受容体との結合と比較して、「デコイ」受容体に対してより低い親和性を有する（または事実上親和性を有しない）。かかるデコイ受容体は、T R A I L リガンドと結合するが、細胞死を開始する能力を有しない、場合によっては、細胞死のシグナル伝達経路に拮抗する作用をする、T R A I L 受容体のクラスを表す。変異体／多様体 T R A I L リガンドを、国際公開第 2 0 0 9 / 0 7 7 8 5 7 号にしたがって製造してよい。

10

【0063】

変異体／多様体は、T R A I L 受容体、例えば、D R 4 および D R 5 に対する増大された親和性を個別に有してよい。野生型 T R A I L は、通常、D R 4 については $> 2 \text{ nM}$ 、D R 5 については $> 5 \text{ nM}$ およびデコイ受容体 D c R 1 については $> 20 \text{ nM}$ （国際公開第 2 0 0 9 / 0 7 7 8 5 7 号；表面プラズモン共鳴により測定）、または D R 4 については約 $50 \sim 100 \text{ nM}$ 、D R 5 については $1 \sim 10 \text{ nM}$ および D c R 1 については $175 \sim 225 \text{ nM}$ （Truneh, A. et al. 2000；等温滴定熱量計および E L I S A により測定）の K_D を有することが分かっている。したがって、定義されたアッセイに従って、D R 4 に対する親和性増大は、それぞれ、好適には $< 2 \text{ nM}$ または $< 50 \text{ nM}$ の K_D と定義されるが、D R 5 に対する親和性増大は、それぞれ、好適には $< 5 \text{ nM}$ または $< 1 \text{ nM}$ の K_D と定義される。デコイ受容体 D c R 1 に対する親和性低下は、それぞれ、好適には $> 50 \text{ nM}$ または $> 225 \text{ nM}$ の K_D と定義される。いずれの場合でも、T R A I L 多様体／変異体により示された親和性増大または低下は、野生型 T R A I L により示されたベースライン親和性に対するものである。親和性は、好ましくは、野生型 T R A I L により示されたものと比較して、少なくとも 10 %、少なくとも 25 %、少なくとも 50 %、より好ましくは少なくとも 100 % 増大する。

20

【0064】

T R A I L 多様体は、好ましくは、野生型 T R A I L に対するその親和性と比較したとき、D R 4 および D R 5 の片方または両方に対する増大された親和性を有する。好ましくは、親和性は、野生型 T R A I L に対するより、D R 4 および／または D R 5 に対して少なくとも 1.5 倍、2 倍、5 倍、10 倍、100 倍、またはさらに 1,000 倍以上である。

30

【0065】

T R A I L 多様体は、特定の場合、D R 4、D c R 1 および D c R 2 に対するその親和性と比較したとき、D R 5 に対して増大された親和性を有する。好ましくは、親和性は、D R 4、D c R 1 および D c R 2 の 1 つ以上に対するものより、D R 5 に対して少なくとも 1.5 倍、2 倍、5 倍、10 倍、100 倍、またはさらに 1,000 倍以上である。より好ましくは、親和性は、D R 4、D c R 1 および D c R 2 の少なくとも 2 つ、好ましくは全てに対するものより、D R 5 に対して少なくとも 1.5 倍、2 倍、5 倍、10 倍、100 倍、またはさらに 1,000 倍以上である。

40

【0066】

さらに特定の実施形態は、T R A I L デコイ受容体に対して親和性が低下した、または親和性を有しない、変異体 T R A I L リガンドを発現する免疫エフェクター細胞を含む。好ましくは、この免疫エフェクター細胞は、N K - 9 2 の誘導體である。さらに特定の実施形態は、T R A I L デコイ受容体に対して親和性が低下し、または親和性を有さず、D R 4 および／または D R 5 に対して親和性を増大した変異体 T R A I L リガンドを発現する免疫エフェクター細胞を含む。

【0067】

本発明のこれらの実施形態の主要な利点は、野生型細胞と比較して複数の改変を有し、がん細胞を死滅させるのにより強力な能力を有する免疫エフェクター細胞にある。

50

【0068】

特定の実施形態では、TRAIL多様体は、131位、149位、159位、160位、189位、191位、193位、195位、199位、200位、201位、203位、204位、212位、213位、214位、215位、218位、240位、251位、261位、264位、266位、267位、269位、および270位からなる群から選択される位置における少なくとも1つのアミノ酸置換を含む。

【0069】

特定の実施形態では、TRAIL多様体は、G131R、G131K、R149I、R149M、R149N、R149K、S159R、G160E、Y189A、Y189Q、R191K、Q193H、Q193K、Q193S、Q193R、E195R、N199V、N199R、N199H、T200H、K201R、K201H、D203A、K204E、K204D、K204Y、K212R、Y213W、T214R、S215D、S215E、S215H、S215K、S215D、D218H、D218A、Y240A、K251D、K251E、K251Q、T261L、H264R、I266L、D267Q、D269A、D269H、およびH270Dからなる群から選択される少なくとも1つの置換を含む。

【0070】

特定の実施形態では、TRAIL多様体は、G131R、G131K、R149I、R149M、R149N、R149K、S159R、G160E、Y189A、Y189Q、R191K、Q193H、Q193K、Q193S、Q193R、E195R、N199V、N199R、N199H、T200H、K201R、K201H、D203A、K204E、K204D、K204Y、K212R、Y213W、T214R、S215D、S215E、S215H、S215K、S215D、D218H、D218A、Y240A、K251D、K251E、K251Q、T261L、H264R、I266L、D267Q、D269A、D269H、およびH270Dからなる群から選択される少なくとも2つの置換を含む。

【0071】

特定の実施形態では、TRAIL多様体は、G131R、G131K、R149I、R149M、R149N、R149K、S159R、G160E、Y189A、Y189Q、R191K、Q193H、Q193K、Q193S、Q193R、E195R、N199V、N199R、N199H、T200H、K201R、K201H、D203A、K204E、K204D、K204Y、K212R、Y213W、T214R、S215D、S215E、S215H、S215K、S215D、D218H、D218A、Y240A、K251D、K251E、K251Q、T261L、H264R、I266L、D267Q、D269A、D269H、およびH270Dからなる群から選択される少なくとも3つの置換を含む。

【0072】

特定の実施形態では、TRAIL多様体のアミノ酸置換は、G131R、G131K、R149I、R149M、R149N、R149K、S159R、G160E、Y189A、Y189Q、R191K、Q193H、Q193K、Q193S、Q193R、E195R、N199V、N199R、N199H、T200H、K201R、K201H、D203A、K204E、K204D、K204Y、K212R、Y213W、T214R、S215D、S215E、S215H、S215K、S215D、D218H、D218A、Y240A、K251D、K251E、K251Q、T261L、H264R、I266L、D267Q、D269A、D269H、H270D、T214R/E195R、T214R/D269H、Y189A/Q193S/N199V/K201R/Y213W/S215D、Y213W/S215D、N199R/K201H、N199H/K201R、G131R/N199R/K201H、G131R/N199R/K201H/R149I/S159R/S215D、G131R/R149I/S159R/S215D、G131R/N199R/K201H/R149I/S159R/S215D、

10

20

30

40

50

G 1 3 1 R / D 2 1 8 H、Y 1 8 9 Q / R 1 9 1 K / Q 1 9 3 R / H 2 6 4 R / I 2 6 6 L / D 2 6 7 Q、T 2 6 1 L / G 1 6 0 E、T 2 6 1 L / H 2 7 0 D、T 2 6 1 L / G 1 6 0 E / H 2 7 0 D、および T 2 6 1 L / G 1 6 0 E / H 2 7 0 D / T 2 0 0 H (「/」の使用は複数のアミノ酸置換を示す) からなる群から選択される。

【0073】

特定の実施形態では、T R A I L 多様体のアミノ酸置換は、D R 5 に対する増大された親和性を有する多様体に基づいて選択され；この種の置換は、D 2 6 9 H、E 1 9 5 R、T 2 1 4 R、D 2 6 9 H / E 1 9 5 R、T 2 1 4 R / E 1 9 5 R、T 2 1 4 R / D 2 6 9 H、N 1 9 9 V、Y 1 8 9 A / Q 1 9 3 S / N 1 9 9 V / K 2 0 1 R / Y 2 1 3 W / S 2 1 5 D、Y 2 1 3 W / S 2 1 5 D、D 2 6 9 A および Y 2 4 0 A からなる群から選択され得る。

10

【0074】

特定の実施形態では、T R A I L 多様体のアミノ酸置換は、D R 4 に対する増大された親和性を有する多様体に基づいて選択され；この種の置換は、G 1 3 1 R、G 1 3 1 K、R 1 4 9 I、R 1 4 9 M、R 1 4 9 N、R 1 4 9 K、S 1 5 9 R、Q 1 9 3 H、W 1 9 3 K、N 1 9 9 R、N 1 9 9 R / K 2 0 1 H、N 1 9 9 H / K 2 0 1 R、G 1 3 1 R / N 1 9 9 R / K 2 0 1 H、G 1 3 1 R / N 1 9 9 R / K 2 0 1 H、G 1 3 1 R / R 1 4 9 I / S 1 5 9 R / S 2 1 5 D、G 1 3 1 R / R 1 4 9 I / S 1 5 9 R / S 2 1 5 D、G 1 3 1 R / D 2 1 8 H、K 2 0 1 R、K 2 0 1 H、K 2 0 4 E、K 2 0 4 D、K 2 0 4 L、K 2 0 4 Y、K 2 1 2 R、S 2 1 5 E、S 2 1 5 H、S 2 1 5 K、S 2 1 5 D、D 2 1 8 H、K 2 5 1 D、K 2 5 1 E、K 2 5 1 Q および Y 1 8 9 Q / R 1 9 1 K / Q 1 9 3 R / H 2 6 4 R / I 2 6 6 L / D 2 6 7 Q からなる群から選択され得る。

20

【0075】

特定の実施形態では、T R A I L 多様体のアミノ酸置換は、T R A I L デコイ受容体に対する増大された親和性を有する多様体に基づいて選択され；この種の置換は、T 2 6 1 L、H 2 7 0 D、T 2 0 0 H、T 2 6 1 L / G 1 6 0 E、T 2 6 1 L / H 2 7 0 D、T 2 6 1 L / G 1 6 0 E / H 2 7 0 D、T 2 6 1 L / G 1 6 0 E / H 2 7 0 D / T 2 0 0 H、D 2 0 3 A および D 2 1 8 A からなる群から選択され得る。

【0076】

本発明者らは、以前に、変異 T R A I L を発現する N K 細胞を遺伝子改変した。改変 K H Y G - 1 および N K - 9 2 細胞は、変異 T R A I L を発現した。改変 K H Y G - 1 細胞は、インビトロでがん細胞株に対して改良された細胞傷害性を示した。これらの細胞株は、T R A I L 受容体 (例えば、D R 4 および D R 5) を発現する。改変免疫エフェクター細胞の他の好ましい実施形態は、T R A I L 受容体を発現しないかもしくは実質的に発現しない、または低レベルで改変免疫エフェクター細胞の生存率が変異 T R A I L の発現により悪影響を受けない程度に十分に低いレベルでのみ発現する。さらになお、共刺激ドメインと結合された T R A I L 受容体を有する免疫エフェクター細胞を、本明細書に記載されているように使用することができる。

30

【0077】

任意の実施形態では、T R A I L または T R A I L 多様体を発現する改変免疫エフェクター細胞を用いたがん治療を、がん細胞上の T R A I L 細胞死受容体発現を上方制御することができる薬物を患者に投与することによって増強する。この薬物を、改変免疫エフェクター細胞の投与前、投与と併用して、または投与に続いて投与してよい。しかしながら、改変免疫エフェクター細胞を投与する前に薬物を投与することが好ましい。好ましい実施形態では、薬物は、がん細胞上の D R 5 の発現を上方制御する。薬物は、化学療法薬、例えば、ボルテゾミブであってもよく、がんに対して D R 5 発現を上方制御することができる低用量で投与してもよい。本発明は、いかなる特定の、D R 5 発現を上方制御することができる薬物にも限定されないが、D R 5 誘導薬の例としては、ボルテゾミブ、ゲフィチニブ、ピペルロングミン、ドキソルビシン、 α -トコフェリルコハク酸塩および H D A C 阻害薬が挙げられる。

40

50

【0078】

変異体／多様体 T R A I L リガンドは、1つ以上の免疫エフェクター細胞共刺激ドメイン、例えば、41BB／CD137、CD3ζ／CD247、DAP12またはDAP10と結合していてもよい。したがって、標的細胞上のその受容体との多様体の結合は、免疫エフェクター細胞内のさらなる細胞傷害シグナルの刺激だけでなく、標的細胞内のアポトーシスシグナルを促進する。

【0079】

本発明のさらなる好ましい実施形態によれば、これらのそれぞれの免疫エフェクター細胞改変と関連して上記により詳しく記載されているように、さらに、チェックポイント抑制性受容体機能を低下させ、変異体 T R A I L リガンドも発現する改変免疫エフェクター細胞を提供する。

10

【0080】

本発明は、免疫エフェクター細胞および免疫エフェクター細胞株、好ましくは1つ以上のCARを発現するように改変されたNK-92細胞およびその誘導体も提供する。

【0081】

がん治療用途に好適には、CARは、がん細胞上の1つ以上リガンド、例えば、骨髄腫細胞上のCS1 (SLAMF7) と特異的に結合する。特定のがん、例えば、多発性骨髄腫の治療において使用するため、CARはCD38と結合し得る。例えば、CARは、例えば、公知のモノクローナル抗体ダラツムマブから誘導された、これと類似の、またはこれからのものと同じ可変領域の結合特性を含み得る。かかる免疫エフェクター細胞を、血管新生を阻害する薬物、例えば、レナリドミドと併用してがん治療で使用してよい。がん、特に白血病およびAMLの治療において使用するために、特に、CARはCLL-1と結合し得る。

20

【0082】

CAR-NK細胞およびCAR-T細胞は、これらの親和性が2つの別々のリガンド／抗原に対するものである、二重特異的であってよい。がん細胞の潜在的結合部位数の増加のため、あるいは、CARに対して特異的なリガンドを発現する他の免疫エフェクター細胞にがん細胞を局在化させるためのいずれかのために、二重特異的CARを使用することができる。がん治療において使用するために、二重特異的CARは、標的腫瘍細胞およびエフェクター細胞、例えば、T細胞、NK細胞またはマクロファージと結合し得る。したがって、例えば、多発性骨髄腫の場合、二重特異的CARは、T細胞抗原（例えば、CD3、その他）および腫瘍細胞マーカー（例えば、CD38、その他）と結合し得る。あるいは、二重特異的CARは、標的腫瘍細胞に対する免疫エフェクター細胞の全体的結合親和性を増大する2つの別々の腫瘍細胞マーカーと結合し得る。これは、標的抗原の1つを下方制御することにより耐性を獲得したがん細胞のリスクを低減し得る。多発性骨髄腫では、この場合の一例は、CD38およびCS-1／SLAMF7の両方とのCAR結合であろう。CARにより適切に標的化される別の腫瘍細胞マーカーは、CD47により例示される腫瘍の「don't eat me（私を食べないで）」型マーカーである。

30

【0083】

本発明の任意の特徴は、例えば、Fc受容体（サブタイプおよび誘導体を含むCD16、CD32またはCD64であり得る）が細胞表面で発現される上記免疫エフェクター細胞および免疫エフェクター細胞株に対するさらなる改変を提供することを含む。使用において、これらの細胞は、抗体被覆がん細胞の認識増大を示し、細胞傷害性応答の活性化を改良することができる。

40

【0084】

本発明のさらなる任意の特徴は、身体の特異的標的領域により集積するように改変免疫エフェクター細胞および免疫エフェクター細胞株を適応させることを含む。本発明の免疫エフェクター細胞を、特異的ながん細胞位置に標的としてよい。血液がんの治療のための好ましい実施形態では、本発明の免疫エフェクター細胞を骨髄に集積するように適応させる。特異的免疫エフェクター細胞を、骨髄に集積するようにフコシル化および／またはシアリ

50

ル化により改変する。それぞれ、適切なフコシルトランスフェラーゼおよび／またはシアリルトランスフェラーゼを発現するように免疫エフェクター細胞を遺伝子改変することによって、これを行ってよい。腫瘍部位への免疫エフェクター細胞の集積増加を、腫瘍脈管構造の破壊、例えば、メトロノミック化学療法、または血管形成を標的とする薬物を使用（Mellero et al, 2014）してがん血管による免疫エフェクター細胞浸潤を正常化することによっても可能となり得る。

【0085】

本発明のさらに別の任意の特徴は、培養液中の迅速な成長および増殖の固有の能力が増大した改変免疫エフェクター細胞および免疫エフェクター細胞株を提供することである。例えば、1つ以上の成長促進サイトカインを発現または過剰発現するように細胞をトランスフェクトすることによって、これを行うことができる。この目的のための適切なサイトカインの例としては、IL-2およびIL-15が挙げられる。さらに、この任意の代替は、継続的にサイトカインを含む成長培地の補充に代わる対費用効果の高い代替物を提供する。

10

【0086】

IL-2の存在下の初代NK細胞の拡大は、DR5発現を上方制御し、したがって細胞が兄弟殺しをより起こしやすくなり得るので、初代NK細胞はIL-15を用いて拡大することが好ましい。

【0087】

本発明は、TRAIL誘導細胞死に対してより耐性を有するおよび／またはその細胞傷害性を増大するために、本明細書に記載されている細胞または細胞株を遺伝子改変することを含む、改変免疫エフェクター細胞または免疫エフェクター細胞株の製造方法をさらに提供する。この遺伝子改変は、例えば、CRISPRによる遺伝子の安定なノックアウト、または例えば、siRNAによる遺伝子の一過性ノックダウンであり得る。

20

【0088】

好ましい実施形態では、TRAIL誘導細胞死に対する耐性および細胞傷害性が増大した新規免疫エフェクター細胞株（上述）、例えば、NK-92細胞の誘導体を提供するため、安定な遺伝子改変技術、例えば、CRISPRを使用する。

【0089】

実施形態では、本発明の方法は、抑制性受容体機能を低下させるために、改変された免疫エフェクター細胞または免疫エフェクター細胞株を製造するのにさらに有用である。好ましくは、これらの抑制性受容体は、チェックポイント抑制性受容体である。

30

【0090】

より特定の実施形態は、抑制性受容体機能が低下した免疫エフェクター細胞または免疫エフェクター細胞株の製造方法であって、チェックポイント抑制性受容体はCD96（TACTILE）、CD152（CTLA4）、CD223（LAG-3）、CD279（PD-1）、CD328（SIGLEC7）、SIGLEC9、TIGITおよびTIM-3から選択される、方法を含む。

【0091】

好ましい実施形態では、方法は、抑制性受容体の2つ以上の機能を低下させるように免疫エフェクター細胞を改変することを含む。

40

【0092】

本発明はさらにまた、TRAILリガンドまたは変異体TRAIL（多様体）リガンドを発現するように細胞または細胞株を遺伝子改変することを含む改変免疫エフェクター細胞または免疫エフェクター細胞株の製造方法を提供する。

【0093】

実施形態では、本発明の方法は、TRAIL受容体に対する親和性を増大した変異体TRAILリガンドを発現するように免疫エフェクター細胞または免疫エフェクター細胞株を改変することを含む。好ましくは、TRAIL受容体は、DR4および／またはDR5である。好ましい実施形態は、デコイTRAIL受容体に対する親和性を低下した変異体T

50

R A I L リガンドを発現するように免疫エフェクター細胞または免疫エフェクター細胞株の改変方法を提供する。

【0094】

さらなる好ましい実施形態では、本発明の方法は、チェックポイント抑制性受容体の機能を取り除き、さらにデコイ T R A I L 受容体に対する結合親和性が低下したまたは結合親和性を有しない変異体 T R A I L リガンドの発現もするように免疫エフェクター細胞または免疫エフェクター細胞株を改変することを含む。

【0095】

さらなる典型的実施形態は、1つ以上のチェックポイント抑制性受容体の機能が取り除かれた、および／またはデコイ T R A I L 受容体に対する結合親和性が低下したまたは結合親和性を有しない変異体 T R A I L リガンドが発現する、免疫エフェクター細胞または免疫エフェクター細胞株の製造方法であって、C A R または二重特異的 C A R を発現するように細胞をさらに改変する、方法を提供する。C A R の特性は、必要に応じて上記の通りである。

【0096】

実施形態では、本発明の方法は、1つ以上のチェックポイント抑制性受容体の機能が取り除かれた、および／またはデコイ T R A I L 受容体に対する結合親和性が低下したまたは結合親和性を有しない変異体 T R A I L リガンドが発現した、免疫エフェクター細胞または免疫エフェクター細胞株を製造することを含み、C A R または二重特異的 C A R を発現するように細胞を改変し、1つ以上の F c 受容体を発現するように細胞をさらに改変する。適切な F c 受容体は、C D 1 6 (F c R I I I)、C D 3 2 (F c R I I) および C D 6 4 (F c R I) から選択される。

【0097】

上記全ての好ましい実施形態は、N K - 9 2 の誘導体である N K 細胞および N K 細胞株の製造方法を含む。

【0098】

本発明の目的の通り、細胞傷害性が増大された改変免疫エフェクター細胞、免疫エフェクター細胞株またはその組成物は、患者のがん、特に血液がん、特にヒトにおけるがんの治療において使用するためのものである。

【0099】

好ましい実施形態では、改変免疫エフェクター細胞、免疫エフェクター細胞株または組成物は、急性リンパ性白血病 (A L L)、急性骨髄性白血病 (A M L)、慢性リンパ性白血病 (C L L)、慢性骨髄性白血病 (C M L)、ホジキンリンパ腫、T 細胞リンパ腫および B 細胞リンパ腫を含む非ホジキンリンパ腫、無症候性骨髄腫、くすぶり型多発性骨髄腫 (S M M)、症候性骨髄腫または軽鎖骨髄腫を含む血液がんの治療において使用するためのものである。

【0100】

さらにより好ましい実施形態では、血液がんの治療において使用するため、N K - 9 2 細胞におけるチェックポイント抑制性受容体機能の低下もしくは N K - 9 2 細胞における変異体 T R A I L リガンドの発現、または両方により任意に付加的に改変された、本発明に記載されている N K - 9 2 の誘導体としての N K 細胞株を得る。

【0101】

上記および下記に、本明細書に記載されている改変免疫エフェクター細胞、免疫エフェクター細胞株およびその組成物は、がん、特にヒトにおけるがんの治療、例えば、血液細胞のがんまたは固形がんの治療に適している。免疫エフェクター細胞および誘導体は、好ましくは、ヒト免疫エフェクター細胞である。ヒト治療のため、ヒト免疫エフェクター細胞を、好ましく使用する。

【0102】

活性薬およびその組合せをそれを必要とする患者に送達するための様々な投与経路は、当業者に公知であろう。本発明の実施例は、血液がん治療のためのものである。改変免疫エ

10

20

30

40

50

フェクター細胞および／または免疫エフェクター細胞株の投与は、例えば、腹腔内経路など、全身的または局所的であり得る。

【0103】

他の実施形態では、活性薬を、より直接的に投与する。投与は、特に固形腫瘍に適している直接的腫瘍内であり得る。

【0104】

通常、免疫エフェクター細胞は、本発明の方法、使用および組成物に適していると考えられる。本明細書における特定の例で使用される細胞のように、NK細胞／T細胞は、がん細胞株から得られるNK細胞／T細胞であり得る。有利には、例えば、致死および／または分裂不能にすることによるなど、その催腫瘍性を低下させるよう好適に治療されたNK細胞／T細胞を、血液がん細胞株から得て、本発明の方法で使用して血液がんを治療することができる。

10

【0105】

がん誘導細胞を治療用途により許容できるようにするため、一般的にいくつかの方法で処理または前処理して、患者の腫瘍を形成するその性質を低減または除去する。特定の改変NK細胞株、例えば、NK-92細胞は、これらを分裂不能にすることができるので、安全であり；これらを放射線処理してもこれらは殺傷能力を保持するが、約3～4日以内に死滅する。したがって、特定の細胞および細胞株は、例えば、放射線処理の結果として、増殖することができない。本明細書の方法において使用するための可能性を有する免疫エフェクター細胞の処理としては、放射線処理してインビボでの分裂および腫瘍形成を防止すること、および遺伝子改変して催腫瘍性を低下させること、例えば、細胞がインビボでの分裂および腫瘍形成を防止するように活性化することができる自殺遺伝子をコードする配列を挿入することが挙げられる。自殺遺伝子は、外因性の、例えば循環する、薬物により活性化することができ、当該遺伝子を発現するこれらの細胞において細胞死を引き起こす。さらなる代替方法は、治療の特定の免疫エフェクター細胞を標的とするモノクローナル抗体の使用である。例えば、CD52はKHYG-1細胞で発現され、このマーカーとのモノクローナル抗体の結合は、抗体依存性細胞傷害作用（ADCC）およびKHYG-1細胞死をもたらすことができる。

20

【0106】

Suck et al, 2006により発表された論文で述べられているように、がん誘導NK細胞および細胞株を、Gamma cell（登録商標）3000 Elanなどの照射装置を用いて容易に放射線処理する。セシウム137源を使用して放射線の線量を制御し、例えば、1 Gy～50 Gyの線量反応曲線を使用して細胞傷害性増大の効果を維持しながら、細胞の増殖能力を除去するために最適な線量を決定することができる。放射線の各線量を投与した後に細胞傷害性について細胞をアッセイすることによってこれを行う。

30

【0107】

うまく樹立された自己T細胞またはMHCマッチしたT細胞の方法に比べて、養子細胞免疫治療のために照射NK細胞株を利用することは大きな利点がある。第一に、高い増殖性を有する免疫エフェクター細胞株の使用は、改変NK細胞株の増殖を意味し、より容易におよび市販レベルで達成することができる。次いで、改変免疫エフェクター細胞株の放射線照射を、患者への細胞の投与前に行うことができる。これらの有用な細胞傷害性を保持するこれらの照射細胞は、限定的な寿命を有し、改変T細胞と異なり、長期間循環して持続的な副作用を引き起こすことはない。

40

【0108】

加えて、同種改変免疫エフェクター細胞および免疫エフェクター細胞株の使用は、患者におけるMHCクラスI発現細胞が、自己免疫エフェクター細胞の細胞傷害性反応と同じように免疫エフェクター細胞の細胞傷害性反応を阻害することが、できないことを意味する。がん細胞死滅のための同種免疫エフェクター細胞および細胞株の使用は、前述されたGVL効果から恩恵を受け、自己T細胞と異なり、同種免疫エフェクター細胞および細胞株

50

がGVHDの発症を刺激せず、養子細胞免疫治療によるがん治療のための非常に好ましい選択肢となる。

【0109】

実施形態

本発明によれば、以下の実施形態を提供する：

1. TRAIL誘導細胞死に対する耐性を増大するように改変された免疫エフェクター細胞または免疫エフェクター細胞株。
2. 前記免疫エフェクター細胞は、NK細胞である、実施形態1に記載の免疫エフェクター細胞または免疫エフェクター細胞株。
3. 前記免疫エフェクター細胞は、T細胞である、実施形態1に記載の免疫エフェクター細胞または免疫エフェクター細胞株。
4. 前記TRAIL誘導細胞死に対する耐性増大は、野生型免疫エフェクター細胞と比較して少なくとも10%である、実施形態1～3のいずれか一項に記載の免疫エフェクター細胞または免疫エフェクター細胞株。
5. 1つ以上のTRAIL受容体遺伝子の発現をノックダウンまたはノックアウトするように改変された、実施形態1～4のいずれか一項に記載の免疫エフェクター細胞または免疫エフェクター細胞株。
6. 共刺激ドメインと結合されたTRAIL受容体を発現するかまたは発現するように改変された、実施形態1～5のいずれか一項に記載の免疫エフェクター細胞または免疫エフェクター細胞株。
7. 前記TRAIL受容体は、DR4およびDR5から選択される、実施形態5または6に記載の免疫エフェクター細胞または免疫エフェクター細胞株。
8. 前記共刺激ドメインは、4-1BB、CD28、2B4、DAP-10、DAP-12、CD278 (ICOS) およびOX40から選択される、実施形態6または7に記載の免疫エフェクター細胞または免疫エフェクター細胞株。
9. 変異体TRAILリガンドをさらに発現するかまたは発現するように改変されている、実施形態1～8のいずれか一項に記載の免疫エフェクター細胞または免疫エフェクター細胞株。
10. 前記変異体TRAILリガンドは、TRAIL受容体、例えば、DR4および／またはDR5に対して親和性増大した、実施形態9に記載の免疫エフェクター細胞または免疫エフェクター細胞株。
11. 前記細胞株は、NK-92もしくはKHYG-1、またはその誘導体である、実施形態1～10のいずれか一項に記載の免疫エフェクター細胞または免疫エフェクター細胞株。
12. 患者のがん治療において使用するための、実施形態1～11のいずれか一項に記載の免疫エフェクター細胞または免疫エフェクター細胞株。
13. 前記がんは、血液がんである、実施形態12に記載の免疫エフェクター細胞または免疫エフェクター細胞株。
14. 前記血液がんは、急性リンパ性白血病 (ALL)、急性骨髄性白血病 (AML)、慢性リンパ性白血病 (CLL)、慢性骨髄性白血病 (CML)、ホジキンリンパ腫、T細胞リンパ腫およびB細胞リンパ腫を含む非ホジキンリンパ腫、無症候性骨髄腫、くすぶり型多発性骨髄腫 (SMM)、症候性骨髄腫または軽鎖骨髄腫である、実施形態13に記載の使用のための免疫エフェクター細胞または免疫エフェクター細胞株。
15. NK-92またはKHYG-1細胞であって、共刺激ドメインと結合されたTRAIL受容体を発現するように改変されている、NK-92またはKHYG-1細胞。
16. 前記TRAIL受容体は、DR4およびDR5から選択される、実施形態15に記載のNK-92またはKHYG-1細胞。
17. 前記共刺激ドメインは、4-1BB、CD28、2B4、DAP-10、DAP-12、CD278 (ICOS) およびOX40から選択される、実施形態15または16に記載のNK-92またはKHYG-1細胞。

10

20

30

40

50

【0110】

DNA、RNAおよびアミノ酸配列を以下に表す：

配列番号1は、DR5に関する例gRNAである；

配列番号2は、DR4に関する例gRNAである；

配列番号3は、DR4に関する第二例gRNAである；

配列番号4は、DR5-41BBキメラDNA配列である。

【実施例】

【0111】

本発明はここに、TRAIL誘導細胞死に対する低下した感受性および／またはより高い細胞傷害活性ゆえに、ヒトにおけるがん細胞死を引き起こすための改良された能力を示すように改変された免疫エフェクター細胞の製造に関連した詳細をより詳細および具体的に記載する。

10

【0112】

チェックポイント抑制性受容体機能のノックアウト／ノックダウンおよび変異体TRAILのノックインの関連実施例のため、本発明者らは、国際公開第2017／017184号を参照する。

【0113】

実施例1-NK細胞TRAIL受容体DR4およびDR5のノックアウト

細胞死受容体5（DR5）および／または細胞死受容体4（DR4）機能を取り除いたNK細胞を次のように製造する。

20

gRNAは、TRAIL-R2（DR5）およびTRAIL-R1（DR4）を標的とするgRNA構築物を設計し（例えば、

配列番号1：CCCAUCUUGAACAUACCCAG（DR5）、

配列番号2：AACCGGUGCACAGAGGGUGU（DR4）および

配列番号3：AUUUACAAGCUGUACAUGGG（DR4））、

NK細胞内でDR5およびDR4遺伝子をコードする内在性遺伝子を標的とするように製造する。次いで、CRISPR/Cas9ゲノム編集を使用してDR5および／またはDR4標的遺伝子をノックアウトする。

【0114】

3つのgRNA候補の全てをDR5遺伝子のために選択し、RPMI8226細胞におけるこれらの切断有効性を決定する。3つのgRNA候補の全てをDR4遺伝子のために選択し、HL60細胞におけるこれらの切断有効性を決定する。RPMI8226細胞およびHL60を、Maxcyte（登録商標）GTを用いてgRNA：Cas9リボヌクレオタンパク質（RNP）錯体でエレクトロポレートし、その後、DR5をノックアウトし、および／またはフローサイトメトリーにより分析する。gRNAの切断活性も、インビトロミスマッチ検出アッセイを用いて決定する。T7E1エンドヌクレアーゼは、完全にはマッチしていないDNAを認識し切断し、親DR5遺伝子／DR4遺伝子をCRISPR/Cas9トランスフェクションおよび非相同末端結合（NHEJ）後の変異遺伝子と比較することを可能とする。

30

【0115】

最も高いKO効率を有するgRNAをさらなる実験に選択して、初代NK細胞、NK細胞株またはCD34+前駆細胞（NK細胞へのその後の分化および増殖のため）においてDR5／DR4をノックアウトする。DR4／DR5のノックアウトを、フローサイトメトリーをベースとするアッセイにより決定する。

40

【0116】

実施例2-NK細胞におけるTRAIL受容体DR4およびDR5のノックダウン

NK-92細胞、KHYG-1細胞および初代NK細胞におけるDR4および／またはDR5のsiRNAノックダウンを、エレクトロポレーションにより行う。NK細胞との使用に適切であるとき、LonzaのAmaxaヌクレオフェクターIIと併用してヌクレオフェクションキットTを使用することができ、分裂および非分裂細胞の療法をうまくト

50

ランスフェクトすることができ、90%以下のトランスフェクション効率を達成する。

【0117】

ヌクレオフェクター溶液を室温まで温める（サンプル当たり100 μ l）。血清および栄養補助剤を含む培養培地のアリコートも、50mlチューブ中、37℃に予め温める。6ウェルプレートを、4mlの血清および栄養補助剤を含む培養培地の添加により調製する。プレートを、加湿37℃/5%CO₂インキュベーター内でプレインキュベートする。

【0118】

100 μ lヌクレオフェクション溶液中の 2×10^6 細胞を、20 μ MのsiRNA溶液と穏やかに混合して、2 μ Mの最終濃度を得る。混合中、気泡を回避する。混合物を、Amaxa認定キュベット中に移し、ヌクレオフェクターキュベットホルダーに設置する。

10

【0119】

プログラムを実行して終了させ、キュベット中のサンプルを直ぐに取り出す。次いで、500 μ l予備平衡培養培地を、各々のキュベットに添加する。次いで、各キュベット中のサンプルを、ウェル当たり5mlの最終体積を確認するために準備された6ウェルプレートの対応するウェルに穏やかに移す。

【0120】

次いで、細胞を、トランスフェクション分析を行うまで、加湿37℃/5%CO₂インキュベーター内でインキュベートする。DR4および/またはDR5発現レベルを測定するために、フローサイトメトリー分析をエレクトロポレーションの72時間後に行う。このエレクトロポレーションは、KHYG-1細胞、NK-92細胞および初代NK細胞におけるDR4およびDR5ノックダウンを確実にもたらすことが分かっている。

20

【0121】

実施例3-DR4-CD28/DR5-CD28融合タンパク質

免疫調節融合タンパク質（IFP）は、DR4またはDR5の細胞外ドメイン、またはその部分、およびCD28の細胞内シグナル伝達ドメイン、またはその部分を含んでよい。疎水性成分は、DR4/DR5もしくはCD28のいずれかの膜貫通ドメイン、またはその部分からなり得る。いくつかのDR4-CD28またはDR5-CD28融合タンパク質では、疎水性成分は、CD28の膜貫通ドメインを含み、細胞外成分はCD28の細胞外部分、特に、疎水性成分と隣接する細胞外システイン残基をさらに含む。細胞外成分は、DR4またはDR5の細胞外ドメインの全てまたは一部を含んでよい。

30

【0122】

細胞外成分は、DR4/DR5の全細胞外ドメインを含んでよい。したがって、DR4-CD28またはDR5-CD28構築物は、DR4またはDR5のどちらかのTRAILとの結合からの抑制シグナルで通常あるはずのものを、CD28細胞内シグナル伝達ドメインにより生成されたポジティブシグナルへ転換する能力を有する。

【0123】

DR4-CD28融合タンパク質またはDR5-CD28融合タンパク質をコードする例示的核酸分子は、次の要素（5'から3'）を含む：細胞外成分（DR4/DR5）-多量体形成ドメイン（CD28システイン）-疎水性成分（CD28膜貫通）-細胞内成分（CD28細胞内）。

40

【0124】

構築物をコードする核酸を、PCR、次いで、pENTR（商標）/DTOPPO（登録商標）ベクター（Invitrogen）に一方方向性にTOPPOクローン化し、Gateway（登録商標）技術Invitrogen）を用いてレトロウイルスベクターpMP71-attRに導入する。場合によっては、IFPをコードする核酸分子は、pMP71-attRレトロウイルスベクターにクローン化する前に最適化されたコドンである。

【0125】

実施例4-NK細胞における改変TRAIL受容体ノックイン

NK-92細胞、KHYG-1細胞および初代増殖NK細胞を、共刺激ドメインCD28（上記）または4-1BBと結合されたDR5またはDR4をコードする遺伝子でラン

50

スフェクトする。

【0126】

天然死ドメインよりむしろ、4-1BBまたはCD28共刺激ドメインと融合されたDR5またはDR4細胞外結合ドメインを含む免疫調節融合タンパク質（IFP）をコードする遺伝子パネルを製造する。詳細には、最適な遺伝子は、4-1BBまたはCD28およびCD3ζ内部領域を含むDR5主鎖ならびにCD8αの膜貫通領域および茎部領域を含むIFPをコードすることができる。遺伝子構築物を、一過性発現のためのmRNAとして、および安定長期発現を確立するためのSBベクターを用いて送達する。

【0127】

IFPを用いたNK細胞のトランスフェクション（上記使用されたヌクレオフェクションキット）後、うまくトランスフェクトされた細胞を、これらのIFP機能性に基づいて選択する。次いで、選択された細胞を、前述のようにインキュベートし、継代培養する。

【0128】

NK細胞において発現された得られたIFPは、TRAILの結合に対して野生型DR5と競合するが、野生型DR5と異なり、結合により活性化されたシグナルを産生し、より細胞傷害性NK細胞表現型をもたらす。

【0129】

実施例5-TRAIL誘導死滅に対する改変NK細胞の耐性増大

野生型NK細胞を、実施例1、2、3および4の遺伝子改変NK細胞と比較する。

【0130】

実験計画I：

TRAIL誘導細胞死に対する各細胞型の感受性を、RPMI-8226、MM1S、HL60、Panc-1およびBxPC3との共培養液に対するフローサイトメトリーにより評価する。簡潔に、（1）野生型NK細胞、（2）高親和性膜結合型TRAILリガンドDR44C9またはDR5E195R；D269H、（3）DR4KOまたはDR5KOを有するNK細胞および（4）高親和性膜結合型TRAILリガンドDR44C9またはDR5E195R；D269Hを発現するDR4KOまたはDR5KOを有するNK細胞を、各がん標的細胞型に対して試験する。

【0131】

実験計画II：

TRAIL誘導細胞死に対する各細胞型の感受性を、RPMI-8226、MM1S、HL60、Panc-1およびBxPC3との共培養液に対するフローサイトメトリーにより評価する。簡潔に、（1）野生型NK細胞、（2）高親和性膜結合型TRAILリガンドDR44C9またはDR5E195R；D269H、（3）DR4KIE-IFPまたはDR5KIE-IFPを有するNK細胞および（4）高親和性膜結合型TRAILリガンドDR44C9またはDR5E195R；D269Hを発現するDR4KIE-IFPまたはDR5KIE-IFPを有するNK細胞を含むNK細胞を、各がん標的細胞型に対して試験する

【0132】

実験計画III：

TRAIL誘導細胞死に対する各細胞型の感受性を、RPMI-8226、MM1S、HL60、Panc-1およびBxPC3との共培養液に対するフローサイトメトリーにより評価する。簡潔に、（1）野生型NK細胞、（2）高親和性膜結合型TRAILリガンドDR44C9またはDR5E195R；D269H、（3）DR4KOまたはDR5KOを有するNK細胞および（4）DR4KIE-IFPまたはDR5KIE-IFPを有するNK細胞、（5）高親和性膜結合型TRAILリガンドDR44C9またはDR5E195R；D269Hを発現するDR4KOおよびDR4KIE-IFPまたはDR5KOおよびDR5KIE-IFPを有するNK細胞を含むNK細胞を、各がん標的細胞型に対して試験する。

【0133】

10

20

30

40

50

実施例 6 – T 細胞 T R A I L 受容体 D R 4 および D R 5 のノックアウト

細胞死受容体 5 (D R 5) および／または細胞死受容体 4 (D R 4) 機能を取り除いた T 細胞を次のように製造する。

【 0 1 3 4 】

g R N A は、T R A I L – R 2 (D R 5) および T R A I L – R 1 (D R 4) を標的とする g R N A 構築物を設計し (例えば、

配列番号 1 : C C C A U C U U G A A C A U A C C A G (D R 5)、

配列番号 2 : A A C C G G U G C A C A G A G G G U G U (D R 4) および

配列番号 3 : A U U U A C A A G C U G U A C A U G G G (D R 4))、

T 細胞内で D R 5 および D R 4 遺伝子をコードする内在性遺伝子を標的とするように製造する。次いで、C R I S P R / C a s 9 ゲノム編集を使用して D R 5 および／または D R 4 標的遺伝子をノックアウトする。

【 0 1 3 5 】

3 つの g R N A 候補の全てを D R 5 遺伝子のために選択し、R P M I 8 2 2 6 細胞におけるこれらの切断有効性を決定する。3 つの g R N A 候補の全てを D R 4 遺伝子のために選択し、H L 6 0 細胞におけるこれらの切断有効性を決定する。R P M I 8 2 2 6 細胞および H L 6 0 を、M a x c y t e (登録商標) G T を用いて g R N A : C a s 9 リボヌクレオタンパク質 (R N P) 錯体でエレクトロポレートし、その後、D R 5 をノックアウトし、および／またはフローサイトメトリーにより分析する。g R N A の切断活性も、インビトロミスマッチ検出アッセイを用いて決定する。T 7 E 1 エンドヌクレアーゼは、完全にはマッチしていない DNA を認識し切断し、親 D R 5 遺伝子 / D R 4 遺伝子を C R I S P R / C a s 9 トランスフェクションおよび非相同末端結合 (N H E J) 後の変異遺伝子と比較することを可能とする。

【 0 1 3 6 】

最も高い K O 効率を有する g R N A をさらなる実験に選択して、初代 T 細胞、T 細胞株または前駆細胞 (T 細胞へのその後の分化および増殖のため) において D R 5 / D R 4 をノックアウトする。D R 4 / D R 5 のノックアウトを、フローサイトメトリーをベースとするアッセイにより決定する。

【 0 1 3 7 】**実施例 7 – N K 細胞兄弟殺し耐性**

図 1 に示されているように、以下の細胞における N K 細胞兄弟殺しを評価した: (1) 初代 N K 細胞、他ではニセまたは野生型 N K 細胞と呼ぶ、(2) 高親和性膜結合型 T R A I L リガンド D R 5 E 1 9 5 R ; D 2 6 9 H を発現する初代 N K 細胞、(3) s i R N A による D R 5 K D を有する初代 N K 細胞および (4) s i R N A による D R 5 K D を有し、高親和性膜結合型 T R A I L リガンド D R 5 E 1 9 5 R ; D 2 6 9 H も発現する初代 N K 細胞。

【 0 1 3 8 】

D R 5 ノックダウンを受けている初代 N K 細胞を、増殖の 9 日目に D R 5 s i R N A でエレクトロポレートし、一方、D R 5 T R A I L 多様体を受けている初代 N K 細胞を、増殖の 1 2 日目に多様体 m R N A でエレクトロポレートした。

【 0 1 3 9 】

成長培地を含む I L – 2 における初代 N K 細胞の遷延された増殖後、D R 5 発現は上方制御され、その D R 5 T R A I L 多様体が発現される場合兄弟殺しの増加をもたらすことが観察された。

【 0 1 4 0 】

データは、s i R N A を用いた D R 5 発現のノックダウンは、これらの N K 細胞が野生型 T R A I L または高親和性 D R 5 T R A I L 多様体を発現するかどうかにかかわらず、初代増殖 N K 細胞が兄弟殺しをすることから保護することを明白に示している。

【 0 1 4 1 】**実施例 8 – T 細胞における D R 5 発現**

TRAIL細胞死受容体5（DR5）発現を、ジャーカットT細胞で測定した。

【0142】

ジャーカットT細胞を、RPMI-1640、10% FBSおよび1%ペニシリンーストレプトマイシンの存在下で培養した。対数増殖期中に細胞を収穫し、標準操作プロトコールに従ってTRAIL-DR5/CD262細胞表面発現の発現について免疫表現型を決定した。

【0143】

簡潔に、PBS、アジ化ナトリウムおよび2% FBSを含むバッファで細胞を洗浄した。その後、細胞を適切な体積に再懸濁し、抗DR5抗体（クローン：DJR2-4、供給元：Biolegend、カタログ：307406）で染色した。次いで、氷上で20分間、2μlの抗体と共に細胞をインキュベートした。インキュベーション後、細胞を2回洗浄して、PBS、アジ化ナトリウムおよび2% FBSを含むバッファを用いて未結合抗体を除去した。PBS、アジ化ナトリウムおよび2% FBSを含む200μlのバッファに細胞を最後に再懸濁し、488nm青色レーザーを用い585/42帯域通過フィルターを用いて発せられたシグナルを検出してBD FACS Canto IIでのフローサイトメトリーによって測定した。FlowJoソフトウェア（バージョンX）により結果を解析した。

10

【0144】

図2は、FMOコントロールサンプル（1.29%）および抗DR5染色サンプル（86.8%）の両方においてジャーカットT細胞上のDR5の発現を示している。

20

【0145】

ジャーカットT細胞は、その表面上でTRAIL細胞死受容体5（DR5）を高発現することは明白である。

【0146】

実施例9-T細胞上のDR5-41BBキメラの発現

アポトーシスDR5シグナルカスケードを活性刺激性T細胞反応に変換するために、DR5-41BB融合タンパク質（配列番号4）を、ジャーカットT細胞において発現した。

【0147】

ジャーカットT細胞を、RPMI-1640、10% FBSおよび1%ペニシリンーストレプトマイシンの存在下で培養した。対数増殖期中に細胞を収穫し、標準エレクトロポレーションプロトコールの下にmRNAエレクトロポレーションを用いてトランスフェクトした。DR5-41BB mRNAを、クエン酸バッファ中1μg/μlの濃度で使用した。細胞を、バッファ溶液中1回洗浄し、その後、 2×10^6 細胞/100μlの密度に濃縮した。10μg/100μlの最終濃度においてDR5-41BBキメラを用いて、細胞を、モックエレクトロポレーションまたはエレクトロポレーションのどちらかを行った。細胞を、6ウェルプレートにおいてエレクトロポレーション後直ぐに回収し、37℃で20分間回収させた。インキュベーション後、細胞にRPMI-1640および10% FBSを含む培地を補充した。細胞を回収させ、37℃でさらに24時間インキュベートした後、DR5-41BBキメラの発現をフローサイトメトリーにより分析した。

30

【0148】

簡潔に、PBS、アジ化ナトリウムおよび2% FBSを含むバッファで細胞を洗浄した。その後、細胞を適切な体積に再懸濁し、抗DR5抗体（クローン：DJR2-4、供給元：Biolegend、カタログ：307406）で染色した。次いで、氷上で20分間、2μlの抗体と共に細胞をインキュベートした。インキュベーション後、細胞を2回洗浄して、PBS、アジ化ナトリウムおよび2% FBSを含むバッファを用いて未結合抗体を除去した。PBS、アジ化ナトリウムおよび2% FBSを含む500μlのバッファに細胞を最後に再懸濁し、488nm青色レーザーを用い585/42帯域通過フィルターを用いて発せられたシグナルを検出してBD FACS Canto IIでのフローサイトメトリーによって測定した。FlowJo（バージョンX）により結果を解析した。

40

【0149】

50

図3は、ジャーカットT細胞上でのDR5-41BBキメラの発現を示す。モックエレクトロポレートされたジャーカットT細胞におけるDR5発現は、698の平均MFI値を示した。トランスフェクトジャーカットT細胞上のDR5発現およびDR5-41BB発現は、2073の平均MFI値を示した。モックエレクトロポレートされたT細胞をバックグラウンドMFI=0に正規化することにより、DR5-41BB特異的発現は、1375の平均MFI値に等しいことが分かる。

【0150】

したがって、DR5-41BBキメラをT細胞においてうまく発現することができることが分かった。

【0151】

実施例10-DR5-41BBキメラの保護効果

実施例9からDR5-41BBキメラを発現する野生型ジャーカットT細胞およびジャーカットT細胞を、TRAILリガンドに暴露される場合にこれらの脆弱性について評価した。

【0152】

ジャーカットT細胞を、RPMI-1640、10% FBSおよび1%ペニシリン-ストربتマイシンの存在下で培養した。対数増殖期中に細胞を収穫し、標準エレクトロポレーションプロトコールの下にmRNAエレクトロポレーションを用いてトランスフェクトした。DR5-41BB mRNAを、クエン酸バッファ中1μg/μlの濃度で使用した。細胞を、バッファ溶液中1回洗浄し、その後、2×10⁶細胞/100μlの密度に濃縮した。10μg/100μlの最終濃度においてDR5-41BBキメラを用いて、細胞を、モックエレクトロポレーションまたはエレクトロポレーションのどちらかを行った。細胞を、6ウェルプレートにおいてエレクトロポレーション後直ぐに回収し、37℃で20分間回収させた。インキュベーション後、細胞にRPMI-1640および10% FBSを含む培地を補充した。

【0153】

細胞を回収させて、37℃でさらに4時間インキュベートした後、96ウェルプレートにおいて機能アッセイで使用して、(a)モックエレクトロポレートされたまたは(b)DR5-41BB mRNAエレクトロポレートされたジャーカットT細胞上のTRAILリガンドの有害性を評価した。

【0154】

図4で分かるように、100ng/mLの最終濃度において可溶性TRAILリガンドの非存在下または存在下のどちらかで、T細胞を別々に培養した。各プロットは、n=3である。16時間の期間でアッセイを行い、T細胞における細胞死を、BD FACS Canto IIベースアッセイプラットフォームにおけるフローサイトメトリーを用いてヨウ化プロピジウムにより評価した。TRAILリガンドの存在はT細胞に対する有害作用(約37.5%細胞死)を明白に有したが、このTRAIL誘導細胞死は、DR5-41BBキメラ受容体の発現により回避することができた(約15%細胞死)。

【0155】

したがって、DR5-41BBキメラの発現は、TRAIL誘導細胞死に対する耐性を有するT細胞を提供することが分かった。

【0156】

実施例11-NK細胞上のDR5-41BBキメラの発現

アポトーシスDR5シグナルカスケードを活性刺激性NK細胞反応に変換するために、DR5-41BB融合タンパク質(配列番号4)を、初代増殖NK細胞において発現した。

【0157】

初代増殖NK細胞を、10%ヒトAB血清の存在下12日間製造者ガイドラインに従って、Miltenyi BiotecからのNK細胞増殖培地の存在下培養した。対数増殖期中に細胞を収穫し、標準エレクトロポレーションプロトコールの下にmRNAエレクトロポレーションを用いてトランスフェクトした。DR5-41BB mRNAを、クエン

10

20

30

40

50

酸バッファ中 $1 \mu\text{g} / \mu\text{l}$ の濃度で使用した。細胞を、バッファ溶液中 1 回洗浄し、その後、 2×10^6 細胞 / $100 \mu\text{l}$ の密度に濃縮した。 $7.5 \mu\text{g} / 100 \mu\text{l}$ の最終濃度において DR5-41BB キメラを用いて、細胞を、モックエレクトロポレーションまたはエレクトロポレーションのどちらかを行った。

【0158】

細胞を、6 ウェルプレートにおいてエレクトロポレーション後直ぐに回収し、 37°C で 20 分間回収させた。インキュベーション後、10% ヒト AB 血清を含む NK 細胞 MACS 内地 (Miltenyi Biotec) を、細胞に補充した。細胞を回収させ、 37°C でさらに 24 時間インキュベートした後、DR5-41BB キメラの発現をフローサイトメトリーにより分析した。

【0159】

簡潔に、PBS、アジ化ナトリウムおよび 2% FBS を含むバッファで細胞を洗浄した。その後、細胞を適切な体積に再懸濁し、抗 DR5 抗体 (クローン: DJR2-4、供給元: Biolegend、カタログ: 307406) で染色した。次いで、氷上で 20 分間、 $2 \mu\text{l}$ の抗体と共に細胞をインキュベートした。インキュベーション後、細胞を 2 回洗浄して、PBS、アジ化ナトリウムおよび 2% FBS を含むバッファを用いて未結合抗体を除去した。PBS、アジ化ナトリウムおよび 2% FBS を含む $500 \mu\text{l}$ のバッファに細胞を最後に再懸濁し、 488 nm 青色レーザーを用い $585 / 42$ 帯域通過フィルターを用いて発せられたシグナルを検出して BD FACS Canto II でのフローサイトメトリーによって測定した。FlowJo (バージョン X) により結果を解析した。

【0160】

図 5 は、モックエレクトロポレートされた NK 細胞における DR5 受容体発現 (平均 MFI 値: 208) を示し、一方、図 6 は、DR5-41BB キメラ mRNA エレクトロポレートされた NK 細胞における DR5 受容体発現 (平均 MFI 値: 608) を示す。モックエレクトロポレートされた NK 細胞をバックグラウンド MFI = 0 に正規化することにより、DR5-41BB 特異的発現 ($608 - 208$) は、 400 MFI 単位に等しいことが分かる。

【0161】

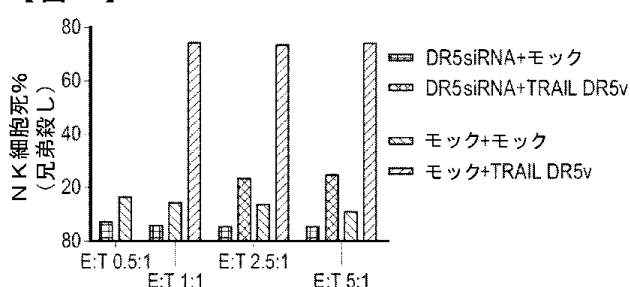
したがって、DR5-41BB 融合タンパク質を、T 細胞だけでなく NK 細胞においてうまく発現することができることが分かった。

【0162】

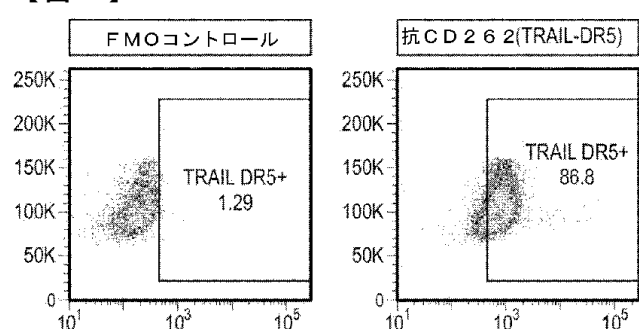
したがって、本発明は、がん治療において使用するための、TRAIL 誘導細胞死に対する耐性を有する免疫エフェクター細胞および細胞株、およびその製造を提供する。このアプローチは、免疫エフェクター細胞上の TRAIL 受容体のノックダウン / ノックアウトを組合せて、高親和性膜結合型 TRAIL リガンドを発現する隣接している遺伝子改変免疫エフェクター細胞により兄弟殺しを防止することを含む。さらに、共刺激ドメインと結合された TRAIL 受容体のノックインは、免疫エフェクター細胞が隣接している免疫エフェクター細胞から極めて強力な免疫エフェクター細胞の細胞傷害性に必要な活性化シグナル伝達にシグナルを導入して兄弟殺しを変更することを可能とする。

【図面】

【図 1】



【図 2】



10

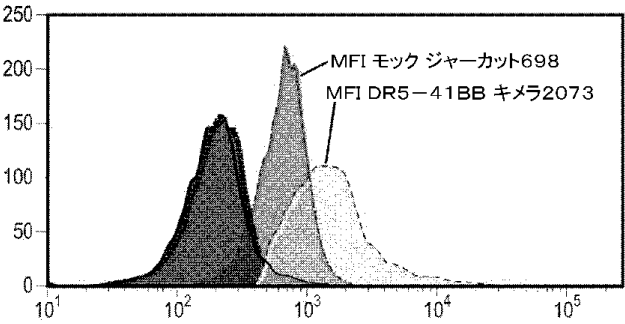
20

30

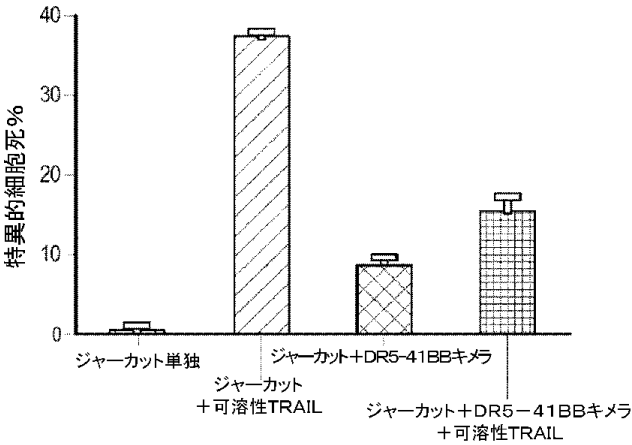
40

50

【図 3】

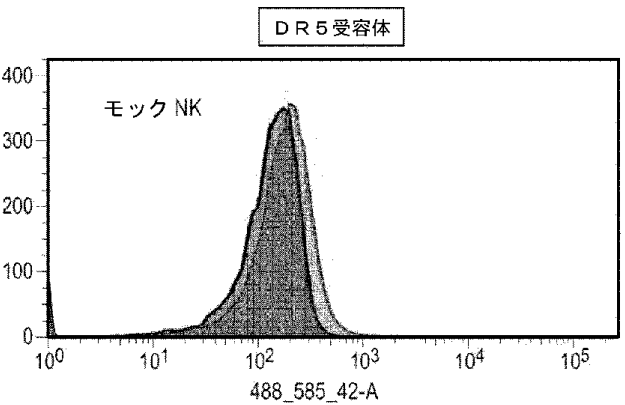


【図 4】

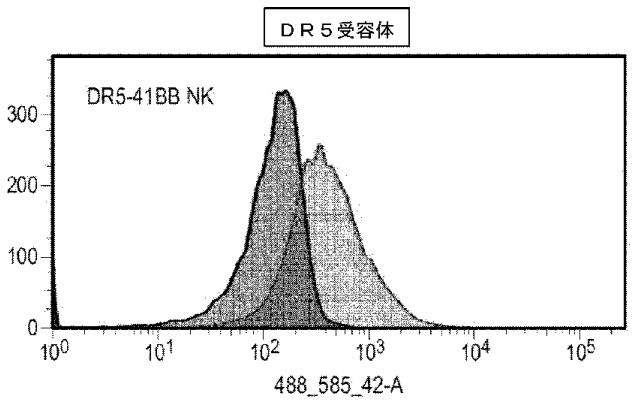


10

【図 5】



【図 6】



20

【配列表】

202252650400001.app

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2020/057879

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N5/0783 C12N5/10 A61K35/17 A61P35/02 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N A61P A61K		
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, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 1 621 550 A1 (DOMPE SPA [IT]) 1 February 2006 (2006-02-01) -----	1-26
A	WO 2017/017184 A1 (ONKIMMUNE LTD [IE]) 2 February 2017 (2017-02-02) cited in the application -----	1,2, 4-19, 21-26
A	WO 2009/077857 A2 (FUNDACIO PRIVADA CT DE REGULAC [ES]; ICREA [ES] ET AL.) 25 June 2009 (2009-06-25) cited in the application -----	1-26
A	US 2018/057795 A1 (CHILDS RICHARD W [US] ET AL) 1 March 2018 (2018-03-01) paragraph [0123]; claim 18 ----- -/-	1,2, 4-19, 21-26
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "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 23 June 2020		Date of mailing of the international search report 24/07/2020
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 Teyssier, Bertrand

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2020/057879

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 2 404 997 A1 (UNIV MIE [JP]; TAKARA BIO INC [JP]) 11 January 2012 (2012-01-11)	1,3-8, 10-12, 16-18, 20-25
X,P	----- CHYUAN I T ET AL: "TRAIL suppresses gut inflammation and inhibits colitogenic T-cell activation in experimental colitis via an apoptosis-independent pathway", MUCOSAL IMMUNOLOGY, vol. 12, no. 4, 11 May 2019 (2019-05-11), pages 980-989, XP036822546, ISSN: 1933-0219, DOI: 10.1038/S41385-019-0168-Y [retrieved on 2019-05-11] the whole document -----	1,3-5, 17,18, 20-22
A	----- GROSSE-WILDE A ET AL: "TRAIL-R deficiency in mice enhances lymph node metastasis without affecting primary tumor development", JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, vol. 118, no. 1, 2 January 2008 (2008-01-02), pages 100-110, XP055707809, ISSN: 0021-9738, DOI: 10.1172/JCI33061 -----	1-26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2020/057879

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1621550	A1	01-02-2006	AT 455847 T 15-02-2010
			AU 2005266543 A1 02-02-2006
			BR PI0513855 A 20-05-2008
			CA 2571426 A1 02-02-2006
			CN 101076540 A 21-11-2007
			DK 1771468 T3 25-05-2010
			EP 1621550 A1 01-02-2006
			EP 1771468 A1 11-04-2007
			ES 2340400 T3 02-06-2010
			HK 1110874 A1 10-05-2013
			HR P20100227 T1 31-07-2010
			IL 180233 A 30-12-2010
			JP 5042826 B2 03-10-2012
			JP 2008507961 A 21-03-2008
			KR 20070047757 A 07-05-2007
			NZ 552223 A 31-01-2009
			PL 1771468 T3 30-07-2010
			PT 1771468 E 20-04-2010
			RS 51381 B 28-02-2011
			SI 1771468 T1 30-07-2010
			US 2007264231 A1 15-11-2007
			WO 2006010558 A1 02-02-2006
			ZA 200701231 B 27-08-2008
WO 2017017184	A1	02-02-2017	AU 2016300128 A1 22-02-2018
			BR 112018001660 A2 18-09-2018
			CA 2993796 A1 02-02-2017
			CN 108026512 A 11-05-2018
			DK 3317401 T3 02-01-2019
			EP 3317401 A1 09-05-2018
			EP 3421590 A1 02-01-2019
			EP 3434762 A1 30-01-2019
			ES 2701338 T3 21-02-2019
			HK 1252582 A1 31-05-2019
			JP 2018522592 A 16-08-2018
			KR 20180028530 A 16-03-2018
			RU 2018104871 A 28-08-2019
			US 2017157230 A1 08-06-2017
			US 2018326029 A1 15-11-2018
			WO 2017017184 A1 02-02-2017
WO 2009077857	A2	25-06-2009	AU 2008337231 A1 25-06-2009
			CA 2709463 A1 25-06-2009
			CN 102388062 A 21-03-2012
			EP 2238161 A2 13-10-2010
			JP 2011506592 A 03-03-2011
			US 2011165265 A1 07-07-2011
			WO 2009077857 A2 25-06-2009
US 2018057795	A1	01-03-2018	CN 109844099 A 04-06-2019
			EP 3487991 A1 29-05-2019
			JP 2019523001 A 22-08-2019
			SG 11201810871W A 30-01-2019
			US 2018057795 A1 01-03-2018
			WO 2018022646 A1 01-02-2018
			WO 2019089955 A1 09-05-2019
EP 2404997	A1	11-01-2012	CN 102428179 A 25-04-2012

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2020/057879

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		CN 107090437 A	25-08-2017
		EP 2404997 A1	11-01-2012
		JP 6452118 B2	16-01-2019
		JP 6709549 B2	17-06-2020
		JP 2017035090 A	16-02-2017
		JP 2018145205 A	20-09-2018
		JP W02010101249 A1	10-09-2012
		US 2011318839 A1	29-12-2011
		US 2016015751 A1	21-01-2016
		WO 2010101249 A1	10-09-2010

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62	Z
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	

(32)優先日 令和2年2月6日(2020.2.6)

(33)優先権主張国・地域又は機関

英国(GB)

(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,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

ード ロード ゴート ナ コリブ 2 0 4

F ターム (参考) 4B065 AA90X AA90Y AB01 AC14 AC20 BA02 CA24 CA44
 4C087 AA01 AA02 BB37 BB65 CA04 CA12 NA05 NA14 ZB26 ZB27
 4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 CA40 DA50 EA20 FA74