

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6974681号
(P6974681)

(45) 発行日 令和3年12月1日(2021.12.1)

(24) 登録日 令和3年11月9日(2021.11.9)

(51) Int.Cl.	F 1		
C 12 N 5/10	(2006.01)	C 12 N	5/10
A 61 K 35/17	(2015.01)	A 61 K	35/17
A 61 P 35/00	(2006.01)	A 61 P	35/00
A 61 P 35/02	(2006.01)	A 61 P	35/02
C 12 N 15/63	(2006.01)	C 12 N	15/63

請求項の数 6 (全 37 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-524548 (P2018-524548)	(73) 特許権者	518032498 オーエヌケー セラピューティクス リミテッド
(86) (22) 出願日	平成28年7月28日 (2016.7.28)	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	
(65) 公表番号	特表2018-522592 (P2018-522592A)	ヴィレッジ ピア ロード コル アンド カンパニー内	
(43) 公表日	平成30年8月16日 (2018.8.16)	(74) 代理人	100126505 弁理士 佐貫 伸一
(86) 國際出願番号	PCT/EP2016/068001	(74) 代理人	100131392 弁理士 丹羽 武司
(87) 國際公開番号	W02017/017184	(72) 発明者	オ'ドワイラー,マイケル エイモン ピーター アイルランド ゴールウェー ソルトヒル ポラルーマ ウエスト 11
(87) 國際公開日	平成29年2月2日 (2017.2.2)		最終頁に続く
審査請求日	令和1年7月29日 (2019.7.29)		
(31) 優先権主張番号	15178899.9		
(32) 優先日	平成27年7月29日 (2015.7.29)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	歐州特許庁 (EP)		
(31) 優先権主張番号	1603655.0		
(32) 優先日	平成28年3月2日 (2016.3.2)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	英國 (GB)		

(54) 【発明の名称】細胞傷害性が増加した改変ナチュラルキラー細胞及びナチュラルキラー細胞株

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

C D 9 6 (T A C T I L E) 及び C D 3 2 8 (S I G L E C 7) から成る群から選択される何れかのチェックポイント阻害受容体の発現をノックアウトする又はノックダウンするように遺伝子改変されたヒト N K 細胞又は N K 細胞株を含む、血液がんを治療するための医薬組成物。

【請求項 2】

前記 N K 細胞又は N K 細胞株が、骨髄を標的とするものである、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 3】

前記 N K 細胞又は N K 細胞株が、フコシル基転移酵素又はシアル基転移酵素を発現する改変をさらに含む、請求項 1 又は 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 4】

前記 N K 細胞株が、K H Y G - 1 の誘導体である細胞株である、請求項 1 ~ 3 の何れか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 5】

前記 N K 細胞又は N K 細胞株が、I L - 2 又は I L - 1 5 の発現をさらに改変されたものである、請求項 1 ~ 4 の何れか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 6】

前記血液がんが、急性リンパ性白血病 (A L L) 、急性骨髓性白血病 (A M L) 、慢性

リンパ性白血病（C L L）、慢性骨髓性白血病（C M L）、ホジキンリンパ腫、T細胞性リンパ腫及びB細胞性リンパ腫を含む非ホジキンリンパ腫、無症候性骨髓腫、くすぶり型骨髓腫（S M M）、活動性骨髓腫、又は軽鎖骨髓腫である、請求項1～5の何れか一項に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、より強い細胞障害性表現型をもつ誘導体を作製するためのナチュラルキラー（N K）細胞及びN K細胞株の改変に関する。さらに、本発明は、改変N K細胞及びN K細胞株を作製する方法、細胞及び細胞株を含む組成物、並びにがん治療における前記組成物の使用に関する。

10

【背景技術】

【0 0 0 2】

免疫細胞は典型的に、標的細胞の死をもたらす免疫応答を誘発する前に、標的細胞が主要組織適合遺伝子複合体（M H C）介して抗原を提示することを必要とする。これはM H CクラスIを提示してい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にする。

【0 0 0 3】

しかし、N K細胞はM H CクラスI発現のないがん細胞を認識することができる。それゆえに、N K細胞はがんに対する生体の防御の非常に重要な役割を果たす。

【0 0 0 4】

20

一方で、ある特定の状況では、がん細胞は、N K細胞膜上の阻害受容体と結合するリガンドの発現を通してN K細胞の細胞傷害性活性を弱める能力を示す。がんに対する耐性はこれらと他の要因との間のバランスを伴う。

【0 0 0 5】

これに関連して、細胞傷害性は、例えば、細胞溶解性合成物を放出すること又はがん細胞膜上の受容体に結合すること、及び前記がん細胞のアポトーシスを誘導することによってがん細胞死を誘導する、免疫エフェクター細胞（例えば、N K細胞）の能力を指す。細胞傷害性は、細胞溶解性合成物の放出を誘導するシグナルによってだけでなく、それらの放出を阻害するシグナルによっても影響される。したがって、細胞傷害性の増加は、上記のように、がん細胞がN K細胞の細胞傷害性活性を弱める可能性を少なくして、より効率的にがん細胞を死滅させることにつながることになる。

30

【0 0 0 6】

N K細胞の阻害受容体機能を除去する遺伝子改変が、M H CクラスI発現を欠いているが、N K細胞傷害性を弱めることができるがん細胞に対するN K細胞の細胞傷害性を増加させる方法として提案されてきた（Bodduluru et al. 2012）。ある特定のがん細胞が、M H CクラスI発現の非存在下において、N K G 2 Aと結合し、且つN K細胞の細胞傷害性を阻害するM I C Aを発現することが知られているので、N K G 2 Aはこの状況下においてサイレンシングに値する阻害受容体として確立されている（Shook et al. 2011；国際公開第2006/023148号）。

【0 0 0 7】

40

N K G 2 A発現を下方制御する別のある方法がN K - 9 2細胞で示されており、I L - 1 5をコードする遺伝子のトランスフェクションがN K G 2 A発現の減少と関連することが示された（Zhang et al. 2004）。しかし、N K細胞の細胞傷害性増加が観察されたにもかかわらず、その増加は、おそらく活性化受容体N K G 2 Dの発現の付随的な増加の結果であった。これは、N K - 9 2細胞上のN K G 2 A受容体をブロックすることが多発性骨髓腫細胞に対する細胞傷害性の増加と関連しなかったという観察によって支持される（Heidenreich et al. 2012）。それでもなお、N K - 9 2細胞株が、阻害受容体の発現が非常に低くて細胞障害性が高い細胞株であることは注目に値する。したがって、N K G 2 A発現の減少を伴った細胞傷害性のいかなる増加も、あまりにも小さすぎて検出できなかつたかもしれない。

50

【0008】

同様の研究がマウスで行われてきた。例えば、マウスはNK細胞上のLy49と呼ばれる受容体を発現する。その受容体はヒト阻害KIR受容体に類似している。抗体断片でLy49受容体をブロックすることによって、NK細胞は細胞障害性がより強くなり、インピトロ及び生体内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)。

【0009】

しかし、改変NK細胞が「正常」細胞とがん細胞を区別する能力が減退するにつれて、体内の「正常」細胞も改変NK細胞による攻撃の影響を受けやすくなることは、阻害受容体機能を下げるものの影響である。これは、「古典的」阻害受容体機能を下げるという大きなデメリットである。10

【0010】

NK細胞のがん細胞を死滅させることができている別の方法は、その表面上にTRA1Lを発現させることによるものである。TRA1Lリガンドはがん細胞上のTRA1L受容体を結合し、前記がん細胞のアポトーシスを誘導することができる。この抗がん機構を利用するため、1つの推測的な方法は、NK細胞上にTRA1Lを過剰発現させることを記述する（欧州特許第1621550号）。さらに、IL-12はNK細胞上のTRA1L発現を上方制御することが報告されている (Smyth et al. 2001)。

【0011】

それでもなお、がん細胞は、TRA1Lを発現するNK細胞に対処するための回避及び防御の機構をもつようになっている。デコイTRA1L受容体はがん細胞膜上に発現していることが多く、これらのデコイ受容体へのTRA1Lの結合はアポトーシスを誘導できなくし、そのような機構を克服する方法は今までのところ追求されていなかった。20

【0012】

急性骨髓性白血病（AML）は、骨髄発達に関与する前駆細胞に関わる造血器悪性腫瘍であり、成人（90%）及び小児（15~20%）の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)。標準的な化学療法を用いて80%の患者が寛解を達成するにもかかわらず (Hurwitz, Mounce et al. 1995; Ribeiro, Razzouk et al. 2005)、微小残存病変（MRD）からの再発率が高いため、生存は依然として満足のいくものではない。5年生存は年齢依存的であり、小児では60% (Rubnitz 2012)、65歳未満の成人では40% (Lowenberg, Downing et al. 1999)、及び65歳以上の成人では10% (Ferrara and Schiffer 2013) である。これらの結果は、患者に適切な造血細胞ドナーがいれば改善できるが、多く患者には適切なドナーがおらず、治療への代替的なアプローチの必要性を際立たせている。30

【0013】

ナチュラルキラー（NK）細胞は、細胞障害性リンパ球であり、例えば、ナチュラルキラーT（NK-T）細胞とは異なる特徴的な表現型及びエフェクター機能をもつ。例えば、NK-T細胞はCD3及びT細胞抗原受容体（TCR）を発現する一方で、NK細胞はそれらを発現しない。NK細胞は一般に、マーカーCD16及びCD56を発現することが見出されており、CD16はFc受容体として機能し、後述する抗体依存性細胞介在性細胞傷害（ADCC）を媒介する。KHYG-1はこの点に関して注目すべき例外である。NK細胞はもともと細胞障害性であるが、細胞傷害性が増加したNK細胞株が開発された。NK-92及びKHYG-1は、広範に研究されてきて、がん治療学において有望である2つのNK細胞株である (Swift et al. 2011; Swift et al. 2012)。40

【0014】

がんの治療に用いられる養子細胞免疫療法は、通常、患者に自然のT細胞及び改変されたT細胞を患者に投与することを含む。T細胞は、ある特定の標的がん細胞に特異的に結合する受容体及び/又はリガンドを発現するように、さまざまな方法で、例えば、遺伝的に改変することができる。がん細胞抗原に特異的な高アフィニティ-T細胞受容体（TCR）及びキメラ抗原受容体（CAR）をT細胞にトランスフェクションすることは、反応50

性が高いがん特異的T細胞応答を生み出すことができる。この免疫療法アプローチの主な制限は、T細胞が自己由来細胞外増殖のために患者から得られなければならないか、又は患者への細胞の移入直後の免疫学的根絶若しくは場合によっては、対宿主性移植片疾患(GVHD)の発症を回避するためにMHCがマッチしたT細胞が用いられなければならないということである。加えて、うまく移入されたT細胞は循環中で長期にわたって生存するが多く、治療から生じる持続的副作用を制御することを困難にする。

【0015】

ハプロタイプ移植において、KIR抑制受容体-リガンドのミスマッチがある場合、移植対白血病効果はNK細胞によって媒介され、AML治療における生存の改善につながりうると考えられている(Ruggeri, Capanni et al. 2002; Ruggeri, Mancusi et al. 2005)。さらに、急速なNK回復は、AMLにおいてハプロタイプT細胞除去造血細胞移植(HCT)を経験する患者における良好な結果及びより強い移植対白血病(GVL)効果と関連する(Savani, Mielke et al. 2007)。他の治験では、成人(Miller, Soignier et al. 2005)及び小児(Rubnitz, Inaba et al. 2010)のAMLを治療するために生体外で増やしたハプロタイプ一致のNK細胞が用いられている。

10

【0016】

いくつかの永久NK細胞株が確立してきた。最も注目に値するものは、CD16(Fc受容体III)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患者に由来するNK-92である。NK-92は広範な臨床前試験を経てきており、活性化NK細胞及びリンホカイン活性化キラー(LAK)細胞と比較して幅広い範囲の腫瘍に対して優れた溶解を示す(Gong, Maki et al. 1994)。初発AMLに対するNK-92細胞の細胞傷害性が確立されている(Yan, Steinherz et al. 1998)。

20

【0017】

別のNK細胞株、KHYG-1が、臨床用途の潜在的な候補として同定されている(Suck et al. 2005)が、細胞傷害性が低いためNK-92に比べて注目を集めていない。KHYG-1細胞は予め活性化されていることが知られている。内在性NK細胞と違って、KHYG-1細胞は常に極性をもち、その細胞傷害性を増加させ、且つ外部の刺激により速く反応する。NK-92細胞は、KHYG-1細胞に比べてベースライン細胞傷害性が高い。

【0018】

30

したがって、現在の養子免疫治療プロトコールが、エフェクター細胞の量及び質のドナー間変動性によって影響を受けることが明らかであり、その変動は、有効な細胞株が利用できてより標準的な治療を提供する場合には解消されうる。

【0019】

相当な量のNK細胞の細胞傷害性研究がマウスモデルを用いて行われてきた。1つの例は、パーフォリン及びグランザイムB mRNAがマウスNK細胞において恒常に転写されているが、検出されるタンパク質のレベルはNK細胞の刺激又は活性化まで最小限であるという発見である(Fehniger et al, 2007)。この研究及びマウスNK細胞を用いた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証拠として依拠することはできない。上記例とは対照的に、ヒトのNK細胞は、刺激前に、パーフォリン及びグランザイムBタンパク質を高いレベルで発現する(Leong et al, 2011)。マウスでもヒトでもNK細胞が培養において単離される場合、結果は、マウスNK細胞は弱い細胞溶解活性をもつ一方でヒトNK細胞は強い細胞溶解能力を示す。

40

【0020】

また、マウスNK細胞とヒトNK細胞は、それらの発現マーカー、シグナルカスケード、及び組織分布において大きく異なる。例えば、CD56はヒトのNK細胞のマーカーとして用いられるが、マウスNK細胞は全くこのマーカーを発現しない。さらに、確立されたNK細胞の細胞傷害性調節機序は、リガンド結合性NK活性化及び阻害受容体を介する。最もよく知られたヒトのNK活性化受容体の2つは、NKP30及びNKP44であり、どちらもマウスNK細胞には発現していないことが知られている。NK阻害受容体に関

50

して、ヒトのNK細胞がMHCクラスIを認識し、細胞傷害性活性を弱めるKIRを発現する一方で、マウスNK細胞は全くKIRを発現せず、その代わりに、Ly49を発現する(Trowsdale et al, 2001)。総じて、マウスNK細胞はその自然の生理的環境においてヒトNK細胞と同じ機能を達成しているにもかかわらず、この役割を成し遂げる機序は種の間で著しく異なる。

【0021】

よって、例えば、より多くの細胞障害性プロフィールを有する、代替となる及び好ましくは改良されたヒトNK細胞及びヒトのNK細胞株が必要とされている。

【0022】

本発明の目的は、より強い細胞障害性表現型を有するNK細胞及びNK細胞株を提供することにある。さらなる目的は、改変NK細胞及びNK細胞株を作製する方法、細胞又は細胞株を含む組成物、並びにがんの治療における前記組成物の使用である。より具体的な実施形態は、特定されたがん、例えば、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的とする。特定の実施形態は、改変細胞の細胞傷害性をさらに増強するようにNK細胞及びNK細胞株の2つ以上の改変を組み合わせることを目的とする。

10

【発明の概要】

【0023】

より強い細胞障害性表現型を有する改変NK細胞及びNK細胞株並びに該細胞及び細胞株を作製する方法が本明細書で提供される。さらに、改変NK細胞及びNK細胞株の組成物及びがんを治療するための前記組成物の使用も提供される。

20

【0024】

本発明は、例えば、阻害受容体をコードする遺伝子をノックアウトし、TRAILリガンド及びバリアントをコードする遺伝子を発現し、キメラ抗原受容体(CAR)及び/又はFc受容体をコードする遺伝子を発現するように遺伝子工学を利用してNK細胞及びNK細胞株を改変する方法を提供する。

【0025】

さらに、本発明の組成物は、2つ以上の改変が施されているNK細胞及びNK細胞株を含み、複数の改変は組成物の細胞傷害性活性をさらに増強する。

【0026】

本発明によれば、改変NK細胞株、例えば、KHYG-1細胞の誘導体を用いてがん、例えば、血液がんを治療する方法がさらに提供され、改変NK細胞株は、チェックポイント阻害受容体の発現が欠き、TRAILリガンドバリアントを発現し、且つ/又はCAR及び/若しくはFc受容体を発現するように遺伝子操作されている。

30

【0027】

本発明によって特に治療可能な疾患は、がん、血液がん、白血病、及び具体的に急性骨髄性白血病を含む。ヒトの腫瘍及びがんが特に治療可能である。本明細書における腫瘍への言及は、新生物への言及を含む。

【発明を実施するための形態】

【0028】

したがって、本発明は、その細胞傷害性を増加させるように遺伝子改変されているナチュラルキラー(NK)細胞又はNK細胞株を提供する。

40

【0029】

後述の例中で詳細に記載されるように、NK細胞及びNK細胞株は、がんに対するその細胞傷害性活性を増加させるように遺伝子改変されている。

【0030】

本発明のNK細胞及びNK細胞株は合わせて、(文脈上別段の解釈が必要でない限り)NK細胞と呼ばれことになる。

【0031】

本発明のあるいくつかの実施形態では、チェックポイント阻害受容体機能が低下又は欠損したNK細胞が提供される。よって下記の例において、1つ以上のチェックポイント阻

50

害受容体遺伝子がノックアウトされたNK細胞が作製される。好ましくは、これらの受容体は特定のチェックポイント阻害受容体である。さらに好ましくは、これらのチェックポイント阻害受容体は、CD96 (TACTILE)、CD152 (CTLA4)、CD223 (LAG-3)、CD279 (PD-1)、CD328 (SIGLEC7)、SIGLEC9、TIGIT、及び/又はTIM-3のうちの1つ以上又はすべてである。

【0032】

他の実施態様では、1つ以上の阻害受容体シグナル伝達経路がノックアウトされるか、低下した機能を呈し、結果としてやはり阻害受容体機能が低下又は欠損するNK細胞が提供される。例えば、SHP-1、SHP-2、及び/又はSHIPによって媒介されるシグナル伝達経路が細胞の遺伝子改変によってノックアウトされる。

10

【0033】

結果として生じるNK細胞は、細胞傷害性が向上し、したがって、がんの治療、とりわけ、血液がんの治療、特に、白血病及び多発性骨髄腫の治療の非常に有用である。

【0034】

ある実施例では、遺伝子改変は、細胞がNK細胞に分化する前に行われる。例えば、多能性幹細胞（例えば、iPSC）は、1つ以上のチェックポイント阻害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。そのあと、改変iPSCは分化して、細胞傷害性が増加した遺伝子改変NK細胞を産生する。

【0035】

NK細胞活性化前のチェックポイント阻害受容体の発現に起因して、他の阻害受容体よりチェックポイント阻害受容体の機能を下げることが好ましい。大部分のKIRファミリー、NKG2A、及びLIR-2などの正常又は「古典的」阻害受容体は、MHCクラスIと結合するので、自己を標的にするという問題を減らすことに主に関わる。したがって、チェックポイント阻害受容体がノックアウトされることが好ましい。本発明による受容体の機能の低下又は欠損は、（受容体が完全に機能的である場合には生じるかもしれない）免疫エフェクター機能をがん細胞が抑制するのを防ぐ。よって、本発明のこれらの実施形態の非常に重要な利点は、がん細胞による細胞傷害性活性の抑制に左右されないNK細胞にあり、結果として、それらのNK細胞はがんの治療に有用である。

20

【0036】

本明細書で使用される場合、阻害受容体への言及は一般に、免疫エフェクター細胞、例えば、NK細胞の細胞膜上に発現する受容体を指し、相補的リガンドと結合して細胞内シグナルをもたらすことが前記免疫エフェクター細胞の細胞傷害性を減らす役割を果たす。これらの阻害受容体は、免疫エフェクター細胞の「休止」状態の間にも、「活性化」状態の間にも発現し、多くの場合、体内的細胞及び組織に対する細胞障害性応答を阻害する「自己寛容」機構を免疫系に提供することに関連している。一例として、NK細胞上に発現し、体内的健康な細胞に発現するMHCクラスIを認識する阻害受容体ファミリー「KIR」がある。

30

【0037】

また、本明細書で使用される場合、チェックポイント阻害受容体は通常、上記の阻害受容体のサブセットとみなされている。しかし、他の阻害受容体と異なり、チェックポイント阻害受容体は、免疫エフェクター細胞、例えば、NK細胞の持続する活性化及び細胞傷害の間に、より高いレベルで発現する。この現象は、例えば、炎症の部位で慢性細胞傷害性を弱めるのに有用である。例としては、チェックポイント阻害受容体PD-1、CTLA-4、及びCD96が挙げられ、それらはすべてNK細胞上に発現する。

40

【0038】

したがって、本発明はさらに、CD96 (TACTILE)、CD152 (CTLA4)、CD223 (LAG-3)、CD279 (PD-1)、CD328 (SIGLEC7)、SIGLEC9、TIGIT、及びTIM-3から選択されるチェックポイント阻害受容体をコードする遺伝子を欠いているNK細胞を提供する。

【0039】

50

遺伝子を欠いているNK細胞は、機能的な遺伝子産物が発現しないという結果をもたらす完全若しくは部分的な消失、変異、又はそれ以外のものに関連することができる。実施形態では、NK細胞は、2つ以上の阻害受容体をコードする遺伝子を欠いている。

【0040】

より具体的な実施例は、CD96 (TACTILE)、CD152 (CTLA4)、及びCD279 (PD-1)から選択されるチェックポイント阻害受容体をコードする遺伝子を欠いているNK細胞を含む。好ましい実施例は、KHYG-1の誘導体であるNK細胞を含む。

【0041】

下記の例において、発明者らは、KHYG-1細胞のチェックポイント阻害受容体CD96の発現をノックダウンするsiRNAを使用する細胞障害効果を確かに示している。CD96ノックダウン (KD) KHYG-1細胞は、さまざまなエフェクター：標的 (E : T) 比で白血病細胞に対する細胞傷害性の増強を示した。 10

【0042】

本発明の他の実施形態では、TRAILリガンド、又は、好ましくは、変異体 (バリアント) TRAILリガンドを発現するNK細胞が提供される。したがって、下記の例でさらに記載されるように、NK細胞の細胞傷害性を増強する改変はまた、TRAILリガンド及び/又は変異TRAILリガンドバリアントの発現の増加を含む。

【0043】

結果として生じるNK細胞は、TRAIL受容体への結合の増加、及び結果として、がん、とりわけ、血液がん、特に、白血病に対する細胞傷害性の増加を呈する。 20

【0044】

好ましくは、変異体/バリアントは、「デコイ」受容体に対するアフィニティーが、野生型TRAILのデコイ受容体との結合と比較して低い(又は事実上アフィニティーがない)。そのようなデコイ受容体は、TRAILリガンドと結合するTRAIL受容体の類を表すが、細胞死を引き起こす能力をもたず、場合によっては、細胞死シグナル伝達経路に拮抗するように作用する。変異体/バリアントTRAILリガンドは、国際公開第2009/077857号に従って作製されうる。

【0045】

変異体/バリアントは個々に、TRAIL受容体、例えば、DR4及びDR5に対するアフィニティーを増加させうる。野生型TRAILは典型的に、 K_D が、DR4に対して $> 2 \text{ nM}$ 、DR5に対して $> 5 \text{ nM}$ 、デコイ受容体DcR1に対して $> 20 \text{ nM}$ (国際公開第2009/077857号;表面プラズモン共鳴によって測定)又はDR4に対して約50~100 nM、DR5に対して1~10 nM、DcR1に対して175~225 nM(Truneh, A. et al. 2000;等温滴定熱量測定及びELISAによって測定)であることが知られている。したがって、DR4に対する増加したアフィニティーは、 K_D がそれぞれ $< 2 \text{ nM}$ 又は $< 50 \text{ nM}$ として適宜定義され、一方でDR5に対する増加したアフィニティーは、 K_D がそれぞれ $< 5 \text{ nM}$ 又は $< 1 \text{ nM}$ として適宜定義される。デコイ受容体DcR1に対する減少したアフィニティーは、 K_D がそれぞれ $> 50 \text{ nM}$ 又は $> 225 \text{ nM}$ の K_D として適宜定義される。いずれの場合も、TRAILバリアント/変異体によって示されるアフィニティーの増加又は減少は、野生型TRAILによって示されるベースラインアフィニティーに相対的なものである。アフィニティーは、野生型TRAILによって示されるものと比較して、好ましくは、少なくとも10%、より好ましくは、少なくとも25%増加する。 30

【0046】

好ましくは、TRAILバリアントは、DR4、DcR1、及びDcR2に対するそのアフィニティーと比較して、DR5に対する増加したアフィニティーを有する。好ましくは、アフィニティーは、DR4、DcR1、及びDcR2のうちの1つ以上と比べて、DR5に対して少なくとも1.5倍、2倍、5倍、10倍、100倍、又はさらに1,000倍以上強い。より好ましくは、アフィニティーは、DR4、DcR1及びDcR2のう 40

ちの少なくとも 2 つ、好ましくは、すべてと比べて、D R 5 に対して少なくとも 1 . 5 倍、2 倍、5 倍、10 倍、100 倍、又はさらに 1 , 000 倍以上強い。

【 0 0 4 7 】

本発明のこれらの実施例の非常に重要な利点は、がん細胞を死滅させる効力がより大きい N K 細胞にある。

【 0 0 4 8 】

さらなる具体的な実施例は、T R A I L デコイ受容体に対するアフィニティーが減少した、又はアフィニティーが無い変異体 T R A I L リガンドを発現する N K 細胞を含む。好ましくは、この N K 細胞は K H Y G - 1 の誘導体である。さらなる具体的な実施例は、T R A I L デコイ受容体に対するアフィニティーが減少し、又はアフィニティーが無く、且つ D R 4 及び / 又は D R 5 に対するアフィニティーが増加した変異体 T R A I L リガンドを発現する N K 細胞を含む。

10

【 0 0 4 9 】

下でより詳細に記載されている発明の例では、N K 細胞は T R A I L 変異体を発現するように遺伝子改変された。改変 K H Y G - 1 細胞は T R A I L 変異体を発現し、N K - 9 2 は T R A I L 変異体を発現した。改変 K H Y G - 1 細胞は、インピトロでがん細胞株に対する向上した細胞傷害性を呈した。K H Y G - 1 細胞は T R A I L 受容体（例えば、D R 4 及び D R 5 ）を発現するが、そのレベルは低い。改変 N K 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、又は実質的に発現しない、又は、十分に低く、改変 N K 細胞の生存が変異体 T R A I L の発現による悪影響を受けない低いレベルでのみで発現する。

20

【 0 0 5 0 】

任意選択の実施形態では、T R A I L 又は T R A I L バリアントを発現する改変 N K 細胞を用いるがんの治療は、がん細胞上の T R A I L デスレセプターの発現を上方制御可能な薬剤を患者に投与することによって増強される。この薬剤は、改変 N K 細胞の投与前、投与と併せて、又は投与後に投与されうる。しかし、薬剤は改変 N K 細胞を投与する前に投与されることが好ましい。

【 0 0 5 1 】

好ましい実施例では、薬剤はがん細胞上の D R 5 の発現を上方制御する。薬剤は任意に、化学療法薬（例えば、ボルテゾミブ）であり、がん上の D R 5 発現を上方制御可能な低い投与量で投与されうる。

30

【 0 0 5 2 】

本発明は、D R 5 発現を上方制御可能な特定の薬品のいずれにも限定されないが、D R 5 誘導剤としては、例えば、ボルテゾミブ、ゲフィチニブ、ピペルロンゲミン、ドキソルビシン、アルファ - トコフェロールコハク酸エステル、及び H D A C 抑制剤が挙げられる。

【 0 0 5 3 】

本発明の好ましい実施形態によれば、変異体 / バリアント T R A I L リガンドは、1 つ以上の N K 細胞共刺激ドメイン、例えば、4 1 B B / C D 1 3 7 、 C D 3 ゼータ / C D 2 4 7 、 D A P 1 2 、又は D A P 1 0 などに結合する。よって、バリアントが標的細胞上のその受容体に結合することは、標的細胞内でのアポトーシスのシグナルを増進し、N K 細胞の細胞障害性シグナルを刺激する。

40

【 0 0 5 4 】

本発明のさらなる好ましい実施形態によれば、チェックポイント阻害受容体機能が低下し、且つ T R A I L リガンド変異体を発現する N K 細胞が提供され、これらの N K 細胞改変に関してはそれぞれ、上でより詳細に記載された通りである。さらにより好ましい実施形態では、T R A I L デコイ受容体に対するアフィニティーが減少した、又はアフィニティーが無く、K H Y G - 1 の誘導体でありうる、T R A I L リガンド変異体を発現する N K 細胞はさらに、C D 9 6 (T A C T I L E) 、 C D 1 5 2 (C T L A 4) 、 C D 2 2 3 (L A G - 3) 、 C D 2 7 9 (P D - 1) 、 C D 3 2 8 (S I G L E C 7) 、 S I G L E

50

C 9、T I G I T、及びT I M - 3 から選択されるチェックポイント阻害受容体をコードする遺伝子を欠いている。

【0055】

本発明はまた、1つ以上のCARを発現するように改変されたNK細胞及びNK細胞株、好ましくは、KHYG-1細胞及びその誘導体を提供する。

【0056】

がん治療に適して、CARは、がん細胞上の1つ以上のリガンド例えば、骨髓腫細胞上のCS1(SLAMF7)と特異的に結合する。特定のがん(例えば、多発性骨髓腫)の治療に使用の場合、CARはCD38と結合しうる。例えば、CARは、例えば、既知のモノクローナル抗体ダラツムマブのものに由来する、類似する、又は同一の可変領域の結合特性を含みうる。そのようなNK細胞は、血管新生を阻害する薬剤、例えば、レナリドマイドと併用してがんの治療に使用されうる。がん、とりわけ、白血病、及び特に、AMLの治療に使用の場合、CARはCLL-1と結合しうる。

10

【0057】

CAR-NKは、そのアフィニティーが2つの異なるリガンド/抗原を対象とする二重特異性であってもよい。二重特異性CAR-NKは、がん細胞上の潜在的な結合部位の数を増加させるために、又は代替的に、がん細胞をNK-CARに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限局するため使用することができる。がんの治療に使用の場合、二重特異性CARは、標的腫瘍細胞及びエフェクター細胞、例えばT細胞、NK細胞、又はマクロファージに結合しうる。よって、例えば、多発性骨髓腫の場合、二重特異性CARは、T細胞抗原(例えば、CD3など)及び腫瘍細胞マーカー(例えば、CD38など)と結合しうる。代替的に、二重特異性CARは2つの別々の腫瘍細胞マーカーと結合し、NK細胞の標的腫瘍細胞に対する総合的な結合アフィニティーを増加させうる。これにより、標的抗原の1つを下方制御することによってがん細胞が耐性をもつようになるリスクを減らしうる。この場合の例は、多発性骨髓腫において、CD38とCS-1/SLAMF7の両方に結合するCARであろう。CARによって好適に標的とされる他の腫瘍細胞マーカーは、腫瘍上の「don't eat me」タイプのマーカーであり、CD47がその例である。

20

【0058】

本発明の任意選択の特徴は、さらなる改変を上記のNK細胞及びNK細胞株に与えることを含み、例えば、Fc受容体(サブタイプ及び誘導剤を含む、CD16、CD32、又はCD64であることができる)を細胞の表面上に発現させる。使用にあたって、これらの細胞は、抗体で被覆されたがん細胞の認識の増加を示し、細胞障害性応答の活性化向上することができる。

30

【0059】

本発明のさらなる任意選択の特徴は、改変NK細胞及びNK細胞株が、身体の特定の標的領域に、より良好にホーミングするように適合されることを含む。本発明のNK細胞は、特定のがん細胞の位置に向けることができる。血液がんの治療に関する好ましい実施例において、本発明のNKエフェクターは骨髓にホーミングするように適合される。特定のNK細胞は、フコシル化及び/又はシアリル化によって改変されて骨髓にホーミングする。これは、それぞれ、適切なフコシル基転移酵素及び/又はシアリル酸転移酵素を発現するようにNK細胞を遺伝的に改変することによって達成することができる。また、腫瘍部位へのNKエフェクター細胞のホーミングの増加は、例えば、メトロノミック化学療法による腫瘍血管系の破壊によって、又は血管新生を標的とする薬(Melero et al, 2014)を用いてがん血管を介するNK細胞浸潤を正常化することによって可能となりうる。

40

【0060】

本発明のさらに別の任意選択の特徴は、培養において速く成長及び増殖する固有の能力が増加した改変NK細胞及びNK細胞株を提供することである。これは、例えば、成長誘導サイトカインIL-2及びIL-15が過剰発現するように細胞にトランスフェクションすることによって達成することができる。さらに、この任意選択の変更は、連続的に成

50

長培地にサイトカインを補充することに代わる費用効果の高い代替手段を提供する。

【0061】

本発明はさらに、改変NK細胞又はNK細胞株を作製する方法を提供し、その方法は、細胞傷害性を増加させるように、本明細書に記載のように細胞又は細胞株を遺伝子改変することを含む。この遺伝子改変は、例えば、CRISPRによる遺伝子の安定的なノックアウト又は例えばsiRNAによる遺伝子の一過性ノックダウンであることができる。

【0062】

好ましい実施形態では、細胞傷害性が増加した新しいNK細胞株、例えば、KHYG-1細胞の誘導体を提供するために、安定的な遺伝子改変技術、例えば、CRISPRが用いられる。

10

【0063】

実施形態では、本発明の方法は、阻害受容体機能を下げるよう改変されているNK細胞又はNK細胞株を作製するためのものである。好ましくは、これらの阻害受容体はチェックポイント阻害受容体である。

【0064】

より具体的な実施形態は、阻害受容体機能が低下したNK細胞又はNK細胞株を作製する方法を含み、そこにおいて、チェックポイント阻害受容体は、CD96 (TACTILE)、CD152 (CTLA4)、CD223 (LAG-3)、CD279 (PD-1)、CD328 (SINGLEC7)、SINGLEC9、TIGIT、及びTIM-3から選択される。

20

【0065】

好ましい実施形態では、本発明の方法は、2つ以上の阻害受容体の機能を下げるようNK細胞を改変することを含む。

【0066】

本発明はさらに、TRA1Lリガンド又は変異体TRA1L(バリエント)リガンドを発現するように細胞又は細胞株を遺伝子改変することを含む改変NK細胞又はNK細胞株を作製する方法を提供する。

【0067】

実施形態では、本発明の方法は、TRA1L受容体に対するアフィニティーが増加したTRA1Lリガンド変異体を発現するようにNK細胞又はNK細胞株を改変することを含む。好ましくは、TRA1L受容体はDR4及び/又はDR5である。好ましい実施形態は、デコイTRA1L受容体に対するアフィニティーが減少したTRA1Lリガンド変異体を発現するようにNK細胞又はNK細胞株を改変する方法を提供する。

30

【0068】

さらなる好ましい実施形態では、本発明の方法は、チェックポイント阻害受容体の機能を除去し、且つさらにデコイTRA1L受容体に対する結合アフィニティーが減少した又は結合アフィニティーが無いTRA1Lリガンド変異体を発現するようにNK細胞又はNK細胞株を改変することを含む。

【0069】

さらなる典型的な実施形態は、1つ以上のチェックポイント阻害受容体の機能が除去され、且つ/又はデコイTRA1L受容体に対するアフィニティーが減少した若しくはアフィニティーが無いTRA1Lリガンド変異体が発現するNK細胞又はNK細胞株を作製する方法を提供し、その細胞はCAR又は二重特異性CARを発現するようにさらに改変される。CARの特性は任意の上記の通りである。

40

【0070】

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阻害受容体の機能が除去され、且つ/又はデコイTRA1L受容体に対するアフィニティーが減少した、又はアフィニティーが無いTRA1Lリガンド変異体が発現するNK細胞又はNK細胞株を作製することを含み、細胞はCAR又は二重特異性CARを発現するように任意に改変され、細胞は1つ以上のFc受容体を発現するようにさらに改変される。適切なFc受容体は、C

50

D 1 6 (F c R I I I) 、 C D 3 2 (F c R I I) 、 及び C D 6 4 (F c R I) から選択される。

【 0 0 7 1 】

上記すべての好ましい実施形態は、 K H Y G - 1 の誘導体である N K 細胞及び N K 細胞株を作製する方法を含む。

【 0 0 7 2 】

本発明の目的のとおり、細胞傷害性が増加した改変 N K 細胞、 N K 細胞株、又はその組成物は、患者のがん、とりわけ、血液がんの治療での使用向けである。

【 0 0 7 3 】

好ましい実施形態では、改変 N K 細胞、 N K 細胞株、又は組成物は、急性リンパ性白血病 (A L L) 、急性骨髓性白血病 (A M L) 、慢性リンパ性白血病 (C L L) 、慢性骨髓性白血病 (C M L) 、ホジキンリンパ腫、 T 細胞性リンパ腫及び B 細胞性リンパ腫を含む非ホジキンリンパ腫、無症候性骨髓腫、くすぶり型骨髓腫 (S M M) 、活動性骨髓腫、又は軽鎖骨髓腫を含む血液がんの治療での使用向けである。10

【 0 0 7 4 】

さらにより好ましい実施形態において、本発明は、血液がんの治療に使用するために、 K H Y G - 1 細胞のチェックポイント阻害受容体機能を下げるか又は K H Y G - 1 細胞又は T R A I L リガンド変異体を発現すること又はそれらの両方によって K Y H G - 1 の誘導体として得られる N K 細胞株である。20

【 0 0 7 5 】

本明細書に上記又は下記の改変 N K 細胞、 N K 細胞株、及びその組成物は、がん、特に、ヒトのがんの治療、例えば、血液細胞のがん又は固形癌の治療に適している。 N K 細胞及び誘導体は好ましくはヒト N K 細胞である。ヒトの治療の場合、ヒト N K 細胞が好ましくは使用される。20

【 0 0 7 6 】

必要としている患者に活性薬剤及びそれらの組み合わせを送達するために、投与のさまざまな経路が当業者に公知であろう。本発明の実施形態は血液がんの治療向けである。改変 N K 細胞及び / 又は N K 細胞株の投与は、全身性であるか、又は例えば、腹膜内経路を介してなど局所的であることができる。30

【 0 0 7 7 】

実施形態では、活性薬剤はより直接的に投与される。よって、投与は直接腫瘍内に施すことができ、とりわけ固形腫瘍に適している。

【 0 0 7 8 】

N K 細胞は一般に、本発明の方法、使用、及び組成物に適していると考えられている。本明細書のある特定の例で用いられる細胞のとおり、 N K 細胞は、がん細胞株から得られる N K 細胞であることができる。有利には、 N K 細胞、好ましくは、その細胞を致死及び / 又は分裂不能にすることによって腫瘍形成能を減らすように処理される N K 細胞は、血液がん細胞株から得ることができ、血液がんを治療するために本発明の方法で使用することができる。

【 0 0 7 9 】

がん由来細胞を治療用途に対してより許容可能にするためには、その細胞は、通常、患者において腫瘍を形成する性質を減らすか又は除去するように何らかの方法で処理又は前処理される。例で用いられる特定の改変 N K 細胞株は分裂不能になっているので安全である。該細胞株は照射されて、殺作用能力を保持するが、約 3 ~ 4 日以内に死滅する。したがって、例えば、照射の結果として、特定の細胞及び細胞株は増殖することができない。本明細書の方法で用いられる潜在的な N K 細胞の処理としては、生体内でそれらが分裂して腫瘍を形成するのを妨げる照射及び腫瘍形成能を減らす、例えば、生体内で細胞が分裂して腫瘍を形成するのを妨げるために活性化できる自殺遺伝子をコードする配列を挿入するような遺伝子改変が挙げられる。自殺遺伝子は、遺伝子を発現する細胞の細胞死をのちに引き起こす外因性作用物質、例えば循環作用物質によって活性化することができる。さ4050

らなる代替手段は、治療の特異的NK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細胞上に発現し、モノクローナル抗体がこの標識に結合することにより、抗体依存性細胞介在性細胞傷害(ADCC)及びKHYG-1細胞死が結果としてもたらされる可能性がある。

【0080】

Suck et al, 2006によって発表された論文で述べられるように、がんに由来するNK細胞及び細胞株は照射装置、例えば、GammaCell 3000 Elanを使用して容易に照射される。セシウム137源が放射線の線量を調節するのに使用され、例えば、1 Gyと50 Gyの間の線量応答曲線を使って、増加した細胞傷害性の利点を維持する一方で細胞の増殖能力を取り除くために最適な線量を決定することができる。これは、放射線の各線量が施された後に細胞を細胞傷害性について分析することによって達成される。

10

【0081】

確立した自己由来T細胞又はMHCがマッチしたT細胞による方法と比べて、養子細胞免疫療法用に照射されたNK細胞株を使用することには大きな利点がある。まず、増殖性が高い性質をもつNK細胞株の使用は、改変NK細胞株の増殖がより容易に且つ商業レベルで達成できることを意味する。次に、改変NK細胞株の照射は患者に細胞を投与する前に行うことができる。これらの照射された細胞は、その有用な細胞傷害性を保持し、寿命が限られ、改変T細胞とは異なり、長期間循環して持続的副作用を生じさせない。

【0082】

加えて、同種異系改変NK細胞及びNK細胞株の使用は、患者のMHCクラスI発現細胞は、自己由来NK細胞傷害性応答に対して阻害できるのと同じ方法で、NK細胞傷害性応答を阻害できないことを意味する。がん細胞を死滅させるための同種異系NK細胞及び細胞株の使用は、前述のGVL効果に利点があり、T細胞と違って、同種異系NK細胞及び細胞株はGVHDの発症を刺激せず、養子細胞免疫療法を介するがん治療のための非常に好ましい選択肢となる。

20

【0083】

請求項及び本明細書の他の箇所に述べられているように、本発明は以下の実施形態を提供する。

1. その細胞傷害性を増加させるために遺伝子改変されているナチュラルキラー(NK)細胞又はNK細胞株。

30

2. 1つ以上の阻害受容体の機能を下げるよう改変された実施形態1に記載のNK細胞又はNK細胞株。

3. 阻害受容体がチェックポイント阻害受容体である実施形態2に記載のNK細胞又はNK細胞株。

4. チェックポイント阻害受容体が、CD96(TACTILE)、CD152(CTLA4)、CD223(LAG-3)、CD279(PD-1)、CD328(SIGLEC7)、SIGLEC9、TIGIT、及びTIM-3から選択される実施形態3に記載のNK細胞又はNK細胞株。

5. 2つ以上の阻害受容体の機能を下げるよう改変された実施形態2~4のいずれかに記載のNK細胞又はNK細胞株。

40

6. TRAILリガンドを発現するよう改変された実施形態1~5のいずれかに記載のNK細胞又はNK細胞株。

7. TRAILリガンドがTRAILリガンド変異体である実施形態6に記載のNK細胞又はNK細胞株。

8. TRAILリガンド変異体が、TRAIL受容体(例えばDR4及び/又はDR5)に対する増加したアフィニティーを有する実施形態7に記載のNK細胞又はNK細胞株。

9. TRAILリガンド変異体が、デコイTRAIL受容体に対する減少したアフィニティーを有する実施形態7~8のいずれかに記載のNK細胞又はNK細胞株。

10. チェックポイント阻害受容体の機能を除去するよう改変され、さらにデコ

50

イ T R A I L 受容体に対する結合アフィニティーが減少した、又は結合アフィニティーが無い T R A I L リガンド変異体を発現するように改変されている前述の実施形態いずれかに記載の N K 細胞又は N K 細胞株。

11. キメラ抗原受容体 (C A R) を発現する前述の実施形態いずれかに記載の N K 細胞又は N K 細胞株。

12. C A R が二重特異性 C A R である実施形態 11 に記載の N K 細胞又は N K 細胞株。

13. 二重特異性 C A R が 1 つの細胞型上の 2 つのリガンドと結合する実施形態 12 に記載の N K 細胞又は N K 細胞株。

14. 二重特異性 C A R が 2 つの異なった細胞型各々の上の 1 つのリガンドと結合する実施形態 12 に記載の N K 細胞又は N K 索胞株。 10

15. C A R 又は二重特異性 C A R に対するリガンドが、がん細胞上に発現する実施形態 11 及び 12 に記載の N K 細胞又は N K 細胞株。

16. 二重特異性 C A R に対するリガンドが両方ともがん細胞上に発現する実施形態 13 に記載の N K 細胞又は N K 細胞株。

17. 二重特異性 C A R に対するリガンドが、がん細胞及び免疫エフェクター細胞上に発現する実施形態 14 に記載の N K 細胞又は N K 細胞株。

18. 1 つ以上の F c 受容体を発現するように改変された前述の実施形態いずれかに記載の N K 細胞又は N K 細胞株。

19. F c 受容体が、 C D 1 6 (F c R I I I) 、 C D 3 2 (F c R I I) 、及び C D 6 4 (F c R I) から選択される実施形態 18 に記載の N K 細胞又は N K 細胞株。 20

20. 細胞株が K H Y G - 1 細胞株の誘導体である前述の実施形態いずれかに記載の N K 細胞又は N K 細胞株。

21. C D 9 6 (T A C T I L E) 、 C D 1 5 2 (C T L A 4) 、 C D 2 2 3 (L A G - 3) 、 C D 2 7 9 (P D - 1) 、 C D 3 2 8 (S I G L E C 7) 、 S I G L E C 9 、 T I G I T 、及び T I M - 3 から選択されるチェックポイント阻害受容体をコードする遺伝子を欠いている N K 細胞。

22. C D 9 6 (T A C T I L E) 、 C D 1 5 2 (C T L A 4) 、 C D 2 2 3 (L A G - 3) 、 C D 2 7 9 (P D - 1) 、 C D 3 2 8 (S I G L E C 7) 、 S I G L E C 9 、 T I G I T 、及び T I M - 3 を選択される 2 つ以上のチェックポイント阻害受容体をコードする遺伝子を欠いている実施形態 21 に記載の N K 細胞。 30

23. チェックポイント阻害受容体が、 C D 9 6 (T A C T I L E) 、 C D 1 5 2 (C T L A 4) 、及び C D 2 7 9 (P D - 1) から選択される実施形態 21 又は 22 に記載の N K 細胞。

24. K H Y G - 1 の誘導体である実施形態 21 ~ 23 のいずれかに記載の N K 細胞。

25. T R A I L デコイ受容体に対するアフィニティーが減少した、又はアフィニティーが無い T R A I L リガンド変異体を発現する N K 細胞。

26. K H Y G - 1 の誘導体である実施形態 25 に記載の N K 紒胞。

27. C D 9 6 (T A C T I L E) 、 C D 1 5 2 (C T L A 4) 、 C D 2 2 3 (L A G - 3) 、 C D 2 7 9 (P D - 1) 、 C D 3 2 8 (S I G L E C 7) 、 S I G L E C 9 、 T I G I T 、及び T I M - 3 から選択されるチェックポイント阻害受容体をコードする遺伝子を欠いている実施形態 25 又は 26 に記載の N K 紒胞。 40

28. 例えば、照射の結果として、増殖ができない前述の実施形態いずれかに記載の N K 紒胞又は細胞株。

29. その細胞傷害性を増加させるように細胞又は細胞株を遺伝的に改変することを含む改変 N K 紒胞又は N K 紒胞株を作製する方法。

30. N K 紒胞又は N K 紒胞株が、阻害受容体機能を下げるよう改変されている実施形態 29 に記載の方法。

31. 阻害受容体がチェックポイント阻害受容体である実施形態 30 に記載の方法 50

。

32. チェックポイント阻害受容体が、CD96 (TACTILE)、CD152 (CTL4)、CD223 (LAG-3)、CD279 (PD-1)、CD328 (SIELE)、SIGLEC9、TIGIT、及びTIM-3 から選択される実施形態31に記載の方法。

33. 2つ以上の阻害受容体の機能を下げるようNK細胞を改変することを含む実施形態29～32のいずれかに記載の方法。

34. TRAILリガンド又はTRAILリガンド変異体を発現するようNK細胞又はNK細胞株を改変することを含む実施形態29～33のいずれかに記載の方法。

35. TRAILリガンド変異体がTRAIL受容体に対する増加したアフィニティーを有する実施形態34に記載の方法。 10

36. TRAIL受容体がDR4及び/又はDR5である実施形態35に記載の方法。

37. TRAILリガンド変異体がデコイTRAIL受容体に対する減少したアフィニティーを有する実施形態34～36のいずれかに記載の方法。

38. NK細胞又はNK細胞株が、チェックポイント阻害受容体の機能を除去するよう改変され、さらにデコイTRAIL受容体に対する結合アフィニティーが減少した、又は結合アフィニティーが無いTRAILリガンド変異体を発現するよう改変されている実施形態29～37のいずれかに記載の方法。

39. NK細胞又はNK細胞株がCAR又は二重特異性CARを発現するよう改変されている実施形態38に記載の方法。 20

40. 二重特異性CARが1つの細胞型上の2つのリガンドと結合する実施形態39に記載の方法。

41. 二重特異性CARが2つの異なった細胞型各々の上の1つのリガンドと結合する実施形態39に記載の方法。

42. CAR又は二重特異性CARに対するリガンドが、がん細胞上に発現する実施形態39に記載の方法。

43. 二重特異性CARに対するリガンド両方が、がん細胞上に発現する実施形態40に記載の方法。

44. 二重特異性CARに対するリガンドが、がん細胞及び免疫エフェクター細胞上に発現する実施形態41に記載の方法。 30

45. NK細胞又はNK細胞株が1つ以上のFc受容体を発現するよう改変されている実施形態29～44のいずれかに記載の方法。

46. Fc受容体が、CD16 (FcRIII)、CD32 (FcRII)、及びCD64 (FcRI) から選択される実施形態45に記載の方法。

47. 細胞株がKHYG-1細胞株の誘導体である実施形態29～46のいずれかに記載の方法。

48. 実施形態29～47のいずれかに記載の方法によって得られたNK細胞又はNK細胞株。

49. 実施形態29～48のいずれかに記載の方法によって得られたKHYG-1誘導体。 40

50. 患者のがんの治療に用いられる細胞傷害性が増加したNK細胞、NK細胞株、又はその組成物。

51. 実施形態50に記載の使用のための、実施形態1～28のいずれか又は実施形態29～49のいずれかに記載のNK細胞又はNK細胞株。

52. がんが血液がんである、実施形態50又は51の記載の使用のための改変NK細胞、NK細胞株、又は組成物。

53. 血液がんが、急性リンパ性白血病(ALL)、急性骨髓性白血病(AML)、慢性リンパ性白血病(CLL)、慢性骨髓性白血病(CML)、ホジキンリンパ腫、T細胞性リンパ腫及びB細胞性リンパ腫を含む非ホジキンリンパ腫、無症候性骨髓腫、くす 50

ぶり型骨髄腫（SMM）、活動性骨髄腫、又は軽鎖骨髄腫である、実施形態52に記載の使用のための改変NK細胞、NK細胞株又は組成物。

54. 血液がんの治療に用いられる、KHYG-1細胞のチェックポイント阻害受容体機能を下げるここと又はKHYG-1細胞のTRAILリガンド変異体を発現させること又は両方によってKHYG-1の誘導体として得られたNK細胞株。

【図面の簡単な説明】

【0084】

以下の添付の図面を参照して、次に本発明を特定の実施形態において説明する。

【図1】LIR2遺伝子標的領域のDNA配列を示し、そのgRNA隣接領域を示す。

【図2】CTL4遺伝子標的領域のDNA配列を示し、そのgRNA隣接領域を示す。

【図3】トランスフェクションに用いたgRNAコンストラクト（発現ベクター）を示す。

【図4】トランスフェクションの前後の親LIR2 DNA及び変異LIR2 DNAのゲル電気泳動バンドを示す。

【図5】トランスフェクションの前後の親CTL4 DNA及び変異CTL4 DNAのゲル電気泳動バンドを示す。

【図6A】エレクトロポレーションを用いたCD96ノックダウンの成功を示すFACSプロットである。

【図6B】エレクトロポレーションを用いたCD96ノックダウンの成功を示すFACSプロットである。

【図7】さまざまなE:T比におけるK562細胞に対するCD96ノックダウンKHYG-1細胞の細胞傷害性の増加を示す棒グラフである。

【図8】NK-92細胞のCD328 (Single-cell-7) のノックダウンを示す。

【図9】CD328 (Single-cell-7) ノックダウンを有するNK細胞の細胞傷害性の増強を示す。

【図10】KHYG-1細胞上のTRAILのベースライン発現のFACSプロットを示す。

【図11】KHYG-1細胞のトランスフェクション後のTRAIL及びTRAILバリアントの発現のFACSプロットを示す。

【図12】KHYG-1細胞のトランスフェクションの後のCD107a発現のFACSプロットを示す。

【図13】TRAIL及びTRAILバリアントをKHYG-1細胞にトランスフェクションすることの細胞生存率に対する効果を示す。

【図14】KHYG-1細胞とNK-92細胞の両方のDR4、DR5、DCR1、及びDCR2のベースライン発現のFACSプロットを示す。

【図15】KHYG-1細胞のTRAIL又はTRAILバリアントの発現の、標的細胞集団、K562のアポトーシスに対する効果を示す。

【図16】KHYG-1細胞のTRAIL又はTRAILバリアントの発現の、標的細胞集団、RPMI8226のアポトーシスに対する効果を示す。

【図17】は、KHYG-1細胞のTRAIL又はTRAILバリアントの発現の、標的細胞集団、MM1.Sのアポトーシスに対する効果を示す。

【図18】RPMI8226細胞及びMM1.S細胞のDR5発現の2つFACSプロットをそれぞれ示し、そこにおいて、DR5発現に対するポルテゾミブ処理の効果が示されている。

【図19】TRAILバリアントを有する/有しないKHYG-1細胞と共に培養した、ポルテゾミブで前処理したMM1.S細胞/未処理MM1.S細胞のアポトーシスのFACSプロットを示す。

【図20】100nM CMAで2時間処理したKHYG-1細胞のパーフォリン発現レベルのFACSプロットを示す。

【図21】100nM CMA又は媒体で処理した後のKHYG-1細胞生存率のFAC

10

20

30

40

50

Sプロットを示す。

【図22】T R A I L バリアントを有する／有しないK H Y G - 1細胞と共に培養し、C M Aで前処理した／しなかったM M 1 . S細胞のアポトーシスのF A C Sプロットを示す。

【図23】C D 9 6 - s i R N A及び／又はT R A I L バリアント発現を有するK H Y G - 1細胞と共に培養したK 5 6 2細胞のアポトーシスのF A C Sプロットを示す。

【図24】C D 9 6 - s i R N A及び／又はT R A I L バリアント発現を有するK H Y G - 1細胞と共に培養したM M 1 . S細胞のアポトーシスのF A C Sプロットを示す。

【実施例】

【0085】

次に、改変されてより強い細胞傷害性活性及びそれ故にヒトの白血病細胞死を引き起こす能力を示すN K細胞株K H Y G - 1誘導体の作製に関して、本発明をさらに詳しく且つ具体的に記載する。

【0086】

D N A配列、R N A配列、及びアミノ酸配列は下記に言及される。

配列番号1は、完全長L I R 2 D N A配列である；

配列番号2は、L I R 2アミノ酸配列である；

配列番号3は、L I R 2 g 9 g R N A配列である；

配列番号4は、L I R 2 g 1 8 g R N A配列である；

配列番号5は、L I R 2 フォワードプライマー配列である；

配列番号6は、L I R 2 リバースプライマー配列である；

配列番号7は、完全長C T L A 4 D N A配列である；

配列番号8は、C T L A 4アミノ酸配列である；

配列番号9は、C T L A 4 g 7 g R N A配列である；

配列番号10は、C T L A 4 g 1 5 g R N A配列である；

配列番号11は、C T L A 4 フォワードプライマー配列である；及び

配列番号12は、C T L A 4 リバースプライマー配列である。

【0087】

実施例1 - 阻害受容体機能のノックアウト

C R I S P R / C a s 9

細胞を以下の通り調製し、阻害受容体機能を除去した。g R N Aコンストラクトを、N K細胞のヒトゲノムにおける「古典的」阻害受容体L I R 2及び「チェックポイント」阻害受容体C T L A 4をコードする遺伝子を標的とするように設計及び調製した。次いで、C R I S P R / C a s 9ゲノム編集を利用して、L I R 2及びC T L A 4標的遺伝子をノックアウトした。

【0088】

各標的遺伝子に対して2つの候補g R N Aを選び、K 5 6 2細胞におけるそれらの切断効率を決定した。候補g R N Aの配列を表1に示す。プロトスペーサー隣接モチーフ(P A M)は配列の最後の3つの塩基に関わる。L I R 2遺伝子(配列番号1)及びC T L A 4遺伝子(配列番号7)のg R N A配列の隣接領域をそれぞれ、図1及び2に示す。

【0089】

10

20

30

40

【表1】

表1 候補gRNA及び配列

遺伝子	プラスミド名	配列
h LIR2	SM682. LIR2. g9	GAGTCACAGGTGGCATT TGGCGG (配列番号3)
	SM682. LIR2. g18	CGAATCGCAGGTGGTCG CACAGG (配列番号4)
h CTLA4	SM683. CTLA4. g7	CACTCACCTTGCAGAA GACAGG (配列番号9)
	SM683. CTLA4. g15	CCTTGTGCCGCTGAAAT CCAAGG (配列番号10)

【0090】

K562細胞に、調製したgRNAコンストラクト(図3)をトランスフェクションした後、PCR増幅のために集めた。GFP発現の有無を利用してgRNAコンストラクトのK562細胞への組み込みの成功が分かるようにした。これにより、Cas9遺伝子の発現、つまり、LIR2遺伝子とCTLA4遺伝子の発現をノックアウトする能力を確認した。

【0091】

gRNAコンストラクトの切断活性は、インビトロミスマッチ検出アッセイを用いて決定した。T7E1エンドヌクレアーゼIは完全にマッチしないDNAを認識して切断し、親LIR2及びCTLA4遺伝子をCRISPR/Cas9トランスフェクション及び非相同末端結合(NHEJ)の後に変異遺伝子と比較することができる。

【0092】

図4は、g9及びg18 gRNA配列をもつLIR2遺伝子をノックアウトした後、アガロースゲル電気泳動して、結果として生じたバンドを示す。各変異に対応する3つのバンドは、トランスフェクションの後のDNA配列のミスマッチの検出に続く、親の遺伝子及び2つの結果として生じた鎖に関する。g9 gRNA配列はトランスフェクションの成功率が11%という結果になった一方でg18 gRNAは10%の結果となった。

【0093】

図5は、g7及びg15 gRNA配列をもつCTLA4遺伝子のノックアウトの後、アガロースゲル電気泳動をして、結果として生じたバンドを示す。g7 gRNA配列はトランスフェクションの成功率が32%という結果になった一方でg15 gRNAは26%の結果となった。

【0094】

K562細胞におけるLIR2とCTLA4のノックダウンが成功した後、KHYG-1細胞にgRNAコンストラクトをトランスフェクションした。

【0095】

ホモ欠失をもつKHYG-1誘導体クローンを選んだ。Cas9/ピューロマイシンアセチルトランスフェラーゼ(PAC)発現ベクターをこの目的のために使用した。抗生物質ピューロマイシンに対するそれらの耐性に基づいて、トランスフェクションが成功した細胞を選んだ。

【0096】

10

20

30

40

50

Cas9 RNP

NK細胞のチェックポイント阻害受容体のノックアウトのために使用した別のプロトコールは、Cas9 RNPトランスフェクションのプロトコールであった。このプロトコールを使用することの利点は、CRISPR/Cas9プロトコールのDNAプラスミドの使用と比較して著しく低い毒性で、同程度のトランスフェクション効率が達成できるということであった。

【0097】

1 × 10⁶ 個のKHYG1細胞をトランスフェクション実験ごとに集めた。細胞をPBSで洗浄し、遠心分離機で遠沈した。次いで、上清を破棄した。次いで、CRISPR RNP (RNA結合タンパク質) 材料を以下のように調製した。

10

(1) 必要な合成c_rRNA及びt_rRNA (ダーマコン社から購入) の20 μM溶液を調製した。

(2) 4 μlのc_rRNA (20 μM) 及び4 μlのt_rRNA (20 μM) を混合した。

(3) 次いで、混合物を2 μlのCas9タンパク質 (5 μg / μl) に加えた。

(4) 構成成分のすべてを混合し、室温で10分間インキュベーションした。

【0098】

Neon (登録商標) トランスフェクションシステムの後、細胞をCas9 RNPと混合し、以下のパラメータでエレクトロポレーションを行った。

20

電圧：1450v

パルス幅：30ms

パルス数：1

【0099】

次いで、(IL-2及びIL-15を含む) 成長培地の入った12ウェルプレートの1ウェルに細胞を移した。

【0100】

細胞を48~72時間後に集めて、遺伝子編集効率をT7エンドヌクレアーゼアッセイ及び/又はサンガー法シークエンシングによって確認した。インデルの存在が確認され、KHYG1細胞のCTLA4、PD1、及びCD96のノックアウトの成功が示された。

30

【0101】

部位特異的ヌクレアーゼ

NK細胞のチェックポイント阻害受容体のノックアウトのために使用した別のプロトコールは、XTN-TALENトランスフェクションのプロトコールであった。このプロトコールを使用することの利点は、野生型CRISPRと比較して、特に高いレベルの特異性が達成できるということであった。

【0102】

ステップ1：試薬の調製

KHYG-1細胞を、トランスフェクション効率、シングルセルクローニング効率、及び核型/コピー数を含む特定の属性について分析した。次いで、細胞を供給社の推奨事項に従って培養した。

40

【0103】

ノックアウトされるチェックポイント阻害受容体に応じて、少なくとも2対のXTN-TALENのカスタムデザインによってヌクレアーゼを調製した。カスタムデザインのステップは、遺伝子座、コピー数、及び機能評価 (すなわちホモログ、オフターゲット評価) の評価を含む。

【0104】

ステップ2：細胞株操作

細胞にステップ1のヌクレアーゼをトランスフェクションした。高いレベルの切断を得るためにこのステップを最高3回繰り返し、各トランスフェクションの前に培養物を分け、中間培養物を維持した。

50

【0105】

各トランسفェクションの数日後に最初のスクリーニングを行った。細胞のプールを C e 1 - 1 アッセイによって切断効率について調べた。トランسفェクションを繰り返して切断のレベルが許容可能なレベル又はプラトーに達した後、細胞はシングルセルクローニングをする状態にあると見なした。

【0106】

プールした細胞を 96 ウェルプレートの 1 つのウェル当たり 1 つの細胞にソートした。各プールのプレート数は、ステップ 1 において決定したシングルセルクローニングの効率に依存した。プレートを 3 ~ 4 週間インキュベーションした。

【0107】

ステップ 3 - スクリーニング及び増殖

10

一旦細胞が 96 ウェルプレートでコンフルエントになると、培養物をまとめ、全く同じ 3 枚の 96 ウェルプレートに分けた。1 枚のプレートはバックアップとして凍らせ、1 枚のプレートは再播種してクローニングの増殖を続け、最後のプレートは遺伝子型確認のために使用した。

【0108】

遺伝子型プレートの各クローニングを q P C R シグナルの損失について分析し、すべての対立遺伝子が改変されたことが示された。ネガティブクローニングを P C R で増幅し、クローニング化してインデルの性質及び野生型又はインフレームのインデルの欠損を決定した。

【0109】

ノックアウトを確認したクローニングを 24 ウェルプレート 1 枚だけにまとめ、さらに増幅させた。典型的には、最大 5 つの個別クローニングに対して 1 本のバイアル当たり 1×10^6 細胞が入っている 5 ~ 10 本の冷凍クライオバイアルを、1 つのノックアウト当たり作製した。

20

【0110】

ステップ 4 - 検証

細胞は無菌条件下で貯蔵した。

【0111】

すべての貯蔵細胞に関する基本的なリリース判定基準には、生細胞数（凍結前及び解凍後）、S T R によるアイデンティティーの確認、基本的な無菌性の保証、及びマイコプラズマ検査が含まれた。必要に応じて、他のリリース判定基準が適用された（核型、表面マーカー発現、高レベル無菌性、転写物又はタンパク質のノックアウト評価など）。

30

【0112】

実施例 2 - R N A i を介したチェックポイント阻害受容体 C D 96 の機能のノックダウン K H Y G - 1 細胞の C D 96 の s i R N A ノックダウンをエレクトロポレーションによって行った。細胞系の用途に適し、分裂細胞及び分裂していない細胞をうまくトランسفェクションすることができ、最高 90 % のトランسفェクション効率が達成されたことから、ロンザ社製のヌクレオフェクションキット T を A m a x a N u c l e o f e c t o r I I とともに使用した。

【0113】

40

対照 s i R N A (カタログ番号: s c - 37007) 及び C D 96 s i R N A (カタログ番号: s c - 45460) は、サンタクルーズバイオテクノロジー社から入手した。10 % F B S 及び 2 m M L - グルタミンを含み、抗生物質を含まない R P M I - 1640 を、ヌクレオフェクション後の培養のために用いた。マウス抗ヒト C D 96 - A P C (カタログ番号: 338409) は、染色のためにバイオレジエンド社から入手した。

【0114】

20 μ M の s i R N A ストック溶液を調製した。凍結乾燥された二本鎖 s i R N A は、F I T C 対照 / 対照 s i R N A については 33 μ l の R N A s e を含まない水 (s i R N A 希釈バッファー: s c - 29527) に再懸濁し、標的遺伝子 s i R N A (s i R N A C D 96) については 165 μ l の R N A s e を含まない水に再懸濁した。チューブを

50

90 に1分間加熱した後、37で60分間インキュベーションした。その後、s i R N A ストックを-20で必要になるまで保存した。

【0115】

K H Y G - 1 細胞は対数増殖期になければならないので、ヌクレオフェクションの1~2日前に細胞を継代した。

【0116】

N u c l e o f e c t o r 溶液を室温に温めた(1試料あたり100u1)。血清及び補助剤を含む培養培地のアリコートも50m1容チューブで37にて予め温めた。1.5m1の血清及び補助剤を含む培養培地を加えることによって6ウェルプレートを準備した。プレートを加湿した37/5%CO₂インキュベーター中で予めインキュベーションした。 10

【0117】

100u1のヌクレオフェクション溶液中の2×10⁶細胞を4u1の20uM s i R N A 溶液(1.5u gのs i R N A)と穏やかに混ぜた。混合中、気泡が生じないようにした。混合物をA m a x a 認定キュベットに移し、N u c l e o f e c t o r キュベットホルダーに置いてプログラムU-001を選択した。

【0118】

プログラムの終了後、キュベットの試料を直ちに取り出した。次いで、500u1の予め平衡化した培養培地を各キュベットに加えた。次いで、1ウェルあたり2m1の最終体積を確立するために、各キュベットの試料を、用意した6ウェルプレートの対応するウェルに穏やかに移した。 20

【0119】

トランスフェクション分析を行うまで、細胞を加湿した37/5%CO₂インキュベーター中でインキュベーションした。CD96発現レベルを測定するために、エレクトロポレーションの16~24時間後にフローサイトメトリー分析を行った。このエレクトロポーレーションプロトコールを複数回実施して、K H Y G - 1 細胞のCD96ノックダウンが確実に生じたことが認められた(例えば、図6A及び6Bを参照されたい)。

【0120】

実施例3 - CD96ノックダウンを有するNK細胞の細胞傷害性の増強

CD96ノックダウンを有する/有しないK H Y G - 1 細胞を、異なるエフェクター: 30 標的(E:T)比でK562細胞と共に培養した。

【0121】

パーキンエルマー社のD E L F I A E u T D A 細胞傷害性キット(カタログ番号: A D 0 1 1 6)を用いて共培養の4時間後に細胞傷害性を測定した。

【0122】

10%F B S、2mM L-グルタミン、及び抗生物質を含有するR P M I - 1 6 4 0 培地で、標的細胞K562を培養した。96ウェルV底プレート(カタログ番号: 83.3926)はザルスタッフ社から購入した。プレートを遠沈するために(プレートローターを備えた)エッペンドルフ遠心分離機5810Rを使用した。溶解したK562細胞によって生じる蛍光信号を測定するためにV A R I O S K A N F L A S H (S c a n I t ソフトウェア2.4.3付属)を使用した。 40

【0123】

K562細胞を培養培地で洗浄し、培養培地を用いて細胞数を1×10⁶細胞/m Lに調節した。2~4m Lの細胞を5u1のB A T D A 試薬に加え、37で10分間インキュベーションした。細胞内でエステル結合が加水分解されて親水性リガンドを形成し、そのリガンドは膜を通れなくなる。細胞を1500R P Mで5分間遠心分離し、ロードしたK562細胞を洗浄した。これを1mM プロベネシド(シグマP 8 7 6 1)を含む培地を用いて3~5回繰り返した。最後の洗浄の後、細胞ペレットを培養培地に再懸濁し、約5×10⁴細胞/m Lに調節した。

【0124】

バックグラウンド、自発的放出、及び最大放出を検出するためにウェルを準備した。100 μ Lのロードした標的細胞（5,000個の細胞）をV底プレートのウェルに移し、エフェクター対標的の比を1:1~20:1の範囲のとするために、100 μ Lのエフェクター細胞（KHYG-1細胞）をさまざまな細胞濃度で加えた。プレートを100 \times gで1分間遠心分離し、加湿した5%CO₂雰囲気で37℃にて4時間インキュベーションした。最大放出ウェルについては、培地を集める15分前に10 μ Lの溶解バッファーを各ウェルに加えた。プレートを500 \times gで5分間遠心分離した。

【0125】

20 μ Lの上清を平底96ウェルプレートに移し、200 μ Lの予め温めたユウロピウム溶液を加えた。これを、プレートシェーカーを用いて室温で15分間インキュベーションした。K562細胞がKHYG-1細胞によって溶解するにつれて、K562細胞は培地にリガンドを放出する。次いで、このリガンドはユウロピウム溶液と反応して、溶解した細胞の量と直接相關する蛍光キレートを形成する。

10

【0126】

次に、蛍光をVARIOSKAN FLASHを用いて時間分解蛍光光度計で測定した。次式を用いて特異的放出を算出した。

【0127】

%特異的放出 = 実験放出 - 自発的放出 / 最大放出 - 自発的放出

【0128】

グラフパッドプリズム6.04ソフトウェアを使用して統計分析を行った。siRNA CD96ノックダウンKHYG-1細胞と対照群（n=3）との違いを比較するために対応のあるt検定を用いた。

20

【0129】

特異的な放出が、CD96ノックダウンKHYG-1細胞を含む共培養において著しく増加することがわかった。E:T比のすべてにおいてこれが当てはまった（図7を参照されたい）。

【0130】

蛍光は細胞溶解と直接相關するので、KHYG-1細胞におけるCD96発現のノックダウンがK562がん標的細胞を死滅させる能力の増加をもたらしたことが確認された。

【0131】

実施例4-CD328(Single-7)ノックダウンを有するNK細胞の細胞傷害性の増加

30

NK-92細胞におけるCD328のsiRNAによって媒介されるノックダウン
材料、試薬、及び機器

対照siRNA（カタログ番号：sc-37007）及びCD328 siRNA（カタログ番号：sc-106757）は、サンタクルーズバイオテクノロジー社から購入した。NK-92細胞において高い細胞生存率（>75%）とともに最高90%のトランسفエクション効率を得るために、Nucleofector（商標）Device（Nucleofector II、ロンザ社）を用いてロンザ社のNucleofector（商標）キットTを使用した。10%FBS、2mM L-グルタミンを含み、抗生物質を含まないRPMI-1640を又クレオフェクション後の培養のために用いた。マウス抗ヒトCD328-APC（カタログ番号：339206）はバイオレジエンド社から購入した。

40

【0132】

プロトコール

10 μ MのsiRNAストック溶液を作製する。

- 凍結乾燥二本鎖siRNAを66 μ lのRNaseを含まない水（siRNA希釈バッファー：sc-29527）に再懸濁してFITC対照/対照siRNAとし、標的遺伝子siRNA（siRNA CD328）はRNaseを含まない水330 μ lに再懸濁する。

50

- ・ チューブを 90 で 1 分間熱する。
- ・ 37 で 60 分間インキュベーションする。
- ・ すぐに使用しない場合は、 siRNA ストックを -20 で保存する。
- ・ 1 つのスクレオフェクション試料 (100 μl 標準キュベット用) は以下を含む。
- ・ 細胞数 : 2×10^6 細胞
- ・ siRNA : 4 μl の 10 μM ストック
- ・ Nucleofector 溶液 : 100 μl

【0133】

スクレオフェクション

- ・ 必要な数の細胞を培養する。(継代数 1 又はスクレオフェクションの 2 日前に細胞は 10 対数増殖期になければならない)。

- ・ 各試料に対して siRNA を調製する。
- ・ Nucleofector 溶液 (1 試料あたり 100 μl) を予め室温に温める。
- ・ 血清及び補助剤を含んでいる培養培地のアリコートを 50 ml 容チューブ中で予め 37 に温める。血清及び補助剤を含む、1.5 ml の培養培地を入れることよって 6 ウェルプレートを調製し、加湿した 37 / 5% CO₂ インキュベーター中でプレートを予めインキュベーションする。
- ・ 細胞培養物のアリコートをとり、細胞をカウントして細胞密度を決定する。
- ・ 必要な数の細胞を 1500 RPM で 5 分間遠心分離する。残留培地が細胞ペレットを覆わないように、完全に上清を捨てる。 20
- ・ 細胞ペレットを、室温の Nucleofector 溶液中に、 2×10^6 細胞 / 100 μl の最終濃度に再懸濁する。細胞生存率及び遺伝子導入効率を低下させるので、細胞懸濁液を 15 ~ 20 分より長く Nucleofector 溶液中に保存することは避ける。
- ・ 100 μl の細胞懸濁液を siRNA と混ぜる。
- ・ 試料を amaxa 認定キュベットに移す。試料がキュベットの底を覆うことを確認し、ピペットで取りながら気泡の発生を防ぐ。キュベットを青いキャップで閉じる。
- ・ 適切な Nucleofector プログラムを選択する (NK - 92 細胞については A - 024)。キュベットをキュベットホルダーに挿入し (Nucleofector II : 回転台を最終位置へ時計回りに回転し)、「x」ボタンを押してプログラムを開始 30 させる。
- ・ 細胞への損傷を避けるために、(ディスプレイが「OK」を示して) プログラムが完了した直後に試料をキュベットから取り出す。500 μl の予め温めた培養培地をキュベットに加えて、試料を準備した 6 ウェルプレートに移す。
- ・ 加湿した 37 / 5% CO₂ インキュベーター中で細胞をインキュベーションする。 16 ~ 24 時間後にフローサイトメトリー分析及び細胞傷害性アッセイを行う。

【0134】

結果 : 我々は上記プロトコールに従って、NK - 92 細胞の CD328 発現レベルのフローサイトメトリー分析を行った。1 つの代表的な実験の結果を図 8 に示し、ノックダウンの成功を裏付けている。 40

【0135】

CD328 をノックダウンすることは細胞傷害性を増強する
材料、試薬、及び機器

蛍光増強リガンド (カタログ番号 : AD0116) に基づく DELFIA EuTDA 細胞傷害性キットはパーキンエルマー社から購入した。標的細胞 K562 を 10% FBS 、 2 mM L - グルタミン、及び抗生物質を含む RPMI - 1640 培地で培養した。 96 ウェル V 底プレート (カタログ番号 : 83.3926) はザルスタット社から購入した。プレートを遠沈するために (プレートローターを備えた) エッペンドルフ遠心分離機 5810R を使用した。溶解した K562 細胞によって生じる蛍光信号を測定するために VARIOSKAN FLASH (ScantSoft ウェア 2.4.3 付属) を使用した 50

。

【0136】

プロトコール

- ・ 標的 K 5 6 2 細胞に蛍光増強リガンド D E L F I A B A T D A 試薬をロードする。
- ・ K 5 6 2 細胞を培地で洗浄し、培養培地で細胞数を 1×10^6 細胞 / mL に調節する。
- ・ 2 ~ 4 mL の細胞を 5 μ L の B A T D A 試薬に加えて、37 度 10 分間インキュベーションをする。
- ・ 1 mM プロベネシド (シグマ P 8761) を含む培地を用いて 3 ~ 5 回、1500 RPM で 5 分間遠心分離してロードした K 5 6 2 細胞を洗浄した。
- ・ 最後の洗浄の後、細胞ペレットを培養培地に再懸濁し、約 5×10^4 細胞 / mL に調節した。 10

【0137】

細胞傷害性アッセイ

- ・ バックグラウンド、自発的放出、及び最大放出を検出するためにウェルを準備した。
- ・ 100 μ L のロードした標的細胞 (5,000 個の細胞) を V 底プレートにピペットで移す。
- ・ 100 μ L のさまざまな細胞濃度のエフェクター細胞 (N K - 92) を加える。エフェクター対標的の比は 1 : 1 ~ 20 : 1 の範囲である。
- ・ プレートを 100 \times g の R C F で 1 分間遠沈する。
- ・ 加湿した 5 % CO₂ 霧囲気で 37 度にて 2 時間インキュベーションする。最大放出ウェルについては、培地を集め 15 分前に 10 μ L の溶解バッファーを各ウェルに加える。 20
- ・ プレートを 500 \times g で 5 分間遠沈する。
- ・ 20 μ L の上清を平底 96 ウェルプレートに移し、200 μ L の予め温めたユウロピウム溶液を加え、プレートシェーカーを用いて室温で 15 分間インキュベーションする。
- ・ 蛍光を V A R I O S K A N F L A S H を用いて時間分解蛍光光度計で測定する。次式を用いて特異的放出を算出する。

【0138】

- ・ % 特異的放出 = 実験放出 - 自発的放出 / 最大放出 - 自発的放出

【0139】

結果：我々は上記に従って、C D 3 2 8 ノックダウンの細胞傷害性に対する効果を決定した。1つの代表的な実験の結果を図 9 に示す。図に示されるように、標的細胞に対する細胞傷害性は、C D 3 2 8 がノックダウンされた細胞において増加した。 30

【0140】

実施例 5 - チェックポイント阻害受容体のノックダウン / ノックアウトによる血液がん治療のためのプロトコール

上記の実施例において示されたように、チェックポイント阻害受容体機能は、さまざまな方法でノックダウン又はノックアウトすることができる。以下のプロトコールは、血液がん患者を治療するために開発された。 40

【0141】

本発明を用いて適切に治療されるがんをもつ患者の診断に統一して、改変 N K 細胞のアリコートを解凍及び培養した後に患者に投与することができる。

【0142】

代替的に、上記のように、一過性の変異は、例えば s i R N A を用いて 1 日又は 2 日以内に作製することができる。M a x C y t e F l o w エレクトロポレーションプラットフォームは、診療所における迅速な大量トランスフェクションを成し遂げるための適切な解決策を提供する。

【0143】

ある特定のチェックポイント阻害受容体の除去は他と比べて有益でありうる。おそらくこれは患者及びがんによると思われる。このために、任意にがんを生検して、がん細胞を 50

生体外で培養して増殖させる。よって、相異なるチェックポイント阻害受容体の改変を有するさまざまなNK細胞を、特異的ながんに対する細胞傷害性について検査することができる。このステップは、治療に最も適したNK細胞又はその誘導体を選択するために用いることができる。

【0144】

改変が成功した後、患者への静脈内注射及び/又は腫瘍内注射のために細胞を適切な担体（例えば、生理食塩水）に再懸濁する。

【0145】

実施例6 - TRAIL / TRAILバリエントのKHYG-1ノックイン

トランスフェクション後にその生存率及びがん細胞を死滅させる能力を評価するために、KHYG-1細胞にTRAILとTRAILバリエントの両方をトランスフェクションした。

【0146】

使用したTRAILバリエントは、国際公開第2009/077857号に記載されているものである。このTRAILバリエントは、D269H/E195R変異を含む野生型TRAIL遺伝子にコードされる。この変異は、TRAILバリエントのDR5に対するアフィニティーを著しく増加させ、一方で両デコイ受容体（DcR1及びDcR2）に対するアフィニティーを減少させる。

【0147】

ベースラインTRAIL発現

KHYG-1細胞のベースラインTRAIL（CD253）発現をフローサイトメトリー用いてアッセイした。

【0148】

マウス抗ヒトCD253-APC（バイオレジエンド社カタログ番号：308210）及びアイソタイプ対照（バイオレジエンド社カタログ番号：400122）を用いて細胞試料を染色し、BD FACS Canto IIフローサイトメーターで分析した。

【0149】

KHYG-1細胞を、10%FBS、2mMのL-グルタミン、ペニシリン（100U/mL）/ストレプトマイシン（100mg/mL）、及びIL-2（10ng/mL）を含むRPMI1640培地で培養した。0.5~1.0×10⁶個の細胞/試験を遠心分離（1500RPM×5分）によって集め、上清を吸引した。細胞（単一細胞懸濁液）を4mLの氷冷したFACSバッファー（PBS、0.5~1%BSA、0.1%NaN₃アジ化ナトリウム）で洗浄した。細胞を100μLの氷冷FACSバッファーに再懸濁し、5uLの抗体を各チューブに加え、氷上で30分間インキュベーションした。1500RPMで5分間の遠心分離で細胞を3回洗浄した。次いで、細胞を500μLの氷冷FACSバッファーに再懸濁して、一時的に暗所で氷上に保った。

【0150】

その後、細胞をフローサイトメーター（BD FACS Canto II）で分析し、生成されたデータを、FlowJo 7.6.2ソフトウェアを用いて処理した。

【0151】

図10に見られるように、FACS分析はKHYG-1細胞表面上のTRAILの弱いベースライン発現を示した。

【0152】

エレクトロポレーションによるTRAIL / TRAILバリエントノックイン

野生型TRAIL mRNA及びTRAILバリエント（D269H/195R）mRNAはTriLink Biotechnologies社によって合成された。分注して-80として保存した。マウス抗ヒトCD253-APC（バイオレジエンド社カタログ番号：308210）及びアイソタイプ対照（バイオレジエンド社カタログ番号：400122）並びにマウス抗ヒトCD107a-PE（eBioscience社カタログ番号：12-1079-42）及びアイソタイプ対照（eBioscience社カタ

10

20

30

40

50

ログ番号：12-4714）抗体を使用して細胞試料を染色し、BD FACS Canto II フローサイトメーターで分析した。DNA染料SYTOX-グリーン（ライフテクノロジーズ社カタログ番号：S7020；DMSO中の5 mM溶液）を用いた。KH YG-1細胞において高い細胞生存率とともに最高90%のトランスフェクション効率を得るために、Nucleofector（商標）Device（Nucleofector II、ロンザ社）を用いてロンザ社のNucleofector（商標）キットTを使用した。10%FBS、L-グルタミン（2 mM）、及びIL-2（10 ng/ml）を含み、抗生物質を含まないRPMI1640をヌクレオフェクション後の培養のために用いた。

【0153】

10

細胞は対数増殖期になければならないので、KH YG-1細胞及びNK-92細胞は又クレオフェクションの1日前又は2日前に継代した。50 mL容チューブ中で、Nucleofector溶液（1試料あたり100 μl）を、37 °Cの血清及び補助剤を含む培養培地のアリコートとともに予め室温に温める。血清及び補助剤を含む1.5 mLの培養培地を入れることによって6ウェルプレートを調製し、加湿した37 °C / 5% CO₂インキュベーター中でプレートを予めインキュベーションした。細胞培養のアリコートを作り、細胞をカウントして細胞密度を決定した。上清を完全に捨てる前に、必要な数の細胞を1500 RPMで5分間遠心分離した。細胞ペレットを、室温のNucleofector溶液中に、2 × 10⁶ 細胞 / 100 μlの最終濃度に再懸濁した（懸濁液中の最長時間 = 20分）。100 μl細胞懸濁液を10 μgのmRNA（RNAの体積 < 10 μL）を混ぜた。試料をAmaxa認定キュベットに（試料がキュベットの底を覆っていることを確認し、気泡の発生を防ぎつつ）移した。適切なNucleofectorプログラムを選択した（すなわち、KH YG-1細胞にはU-001）。次いで、キュベットをキュベットホルダーに挿入した。500 μlの予め温めた培養培地をキュベットに入れ、細胞への損傷を避けるために、プログラムが完了した直後に試料を用意した6ウェルプレートに移した。細胞を加湿した37 °C / 5% CO₂インキュベーター中でインキュベーションした。フローサイトメトリー分析及び細胞傷害性アッセイをエレクトロポレーションの12 ~ 16時間後に行った。フローサイトメトリー染色を上記のように実施した。

【0154】

20

図11及び図12に見られるように、TRAIL / TRAILバリアント及びCD107a（NK活性化標識）の発現はトランスフェクション後に増加し、TRAIL遺伝子のKH YG-1細胞へのノックインが成功したことを裏付けている。

【0155】

30

図13は、エレクトロポレーションを介するトランスフェクションの前後のKH YG-1細胞生存率の証拠を提供する。TRAIL / TRAILバリアントの細胞へのトランスフェクションの後に、細胞生存率の統計的に有意な差が認められないことがわかり、野生型又は変異TRAILの発現が細胞にとって有害であることを裏付けている。この観察結果はNK-92細胞における対応する所見と矛盾し、TRAILバリアント遺伝子ノックインが細胞にとって有害であることを示唆する（データ示さず）。それでもなお、これはおそらくNK-92細胞表面上のTRAIL受容体DR4及びDR5の比較的高い発現レベルによって説明されるであろう（図14を参照されたい）。

40

【0156】

KH YG-1細胞の細胞傷害性に対するTRAIL / TRAILバリアントの効果

マウス抗ヒトCD2-APC抗体（BDファーミンジエン社カタログ番号：560642）を使用した。アネキシンV-FITC抗体（ImmunoTools社カタログ番号：31490013）を使用した。DNA染料SYTOX-グリーン（ライフテクノロジーズ社カタログ番号：S7020）を使用した。24ウェル細胞培養プレート（ザルスタットAG社カタログ番号：83.3922）を使用した。骨髓性白血病細胞株K562、多発性骨髄腫細胞株RPMI8226及びMM1.Sを標的細胞として使用した。K562、RPMI8226、MM1.Sは、10%FBS、2 mM L-グルタミン、及びペ

50

ニシリン (100 U / mL) / ストレプトマイシン (100 mg / mL) を含む RPMI 1640 培地で培養した。

【0157】

上記で説明したように、KHYG-1 細胞に TRAIL / TRAIL バリアントをトランسفェクションした。

【0158】

標的細胞を 1500 RPM で 5 分間遠心分離することによって洗浄し、ペレット化した。トランسفェクションした KHYG-1 細胞を 0.5×10^6 / mL に希釈した。次いで、エフェクター : 標的 (E : T) 比を 1 : 1 にするために、予め温めた RPMI 1640 で標的細胞密度を調節した。

10

【0159】

その後、0.5 mL の KHYG-1 細胞及び 0.5 mL の標的細胞を 24 ウエル培養プレート中で混ぜ、加湿した 37 / 5% CO₂ インキュベーターに 12 時間置いた。次いで、フローサイトメトリー分析を用いて KHYG-1 細胞傷害性を分析した。共培養した細胞を (相異なる時点) 洗浄した後、Annexin V 結合バッファーを用いて、CD 2 - APC 抗体 (5 μL / 試験)、Annexin V - FITC (5 μL / 試験)、及び SYTOX - グリーン (5 μL / 試験) で染色した。

【0160】

データを FlowJo 7.6.2 ソフトウェアを使用してさらに解析した。CD 2 陽性ゲート及び CD 2 陰性ゲートを設定した。それらはそれぞれ KHYG-1 細胞及び標的細胞集団を表わす。次いで、CD 2 陰性集団の Annexin V - FITC 陽性細胞及び SYTOX - グリーン陽性細胞を、TRAIL 誘導アポトーシスについて解析した。

20

【0161】

図 15、図 16、及び図 17 は、3 つの標的細胞株、K562、RPMI 8226、及び MM1.S に対する、TRAIL 又は TRAIL バリアントを発現する両方の KHYG-1 細胞のアポトーシスへの効果を示す。(TRAIL をトランسفェクションしなかつた) 正常 KHYG-1 細胞と比較して、KHYG-1 細胞上の TRAIL 発現がアポトーシスのレベルを増加させたことが、すべての標的細胞集団に関して明らかである。そのうえ、野生型 TRAIL をトランسفェクションした KHYG-1 細胞と比較して、KHYG-1 細胞上の TRAIL バリアント発現は、すべての標的細胞株のアポトーシスをさらに増加させた。

30

【0162】

TRAIL バリアントを発現する本発明の細胞は、デスレセプター DR5 に対するより高いアフィニティーを呈するため、がんの治療において大きな利点を提供する。がん細胞は、本発明のこれらの細胞によって攻撃された場合に、ある特定の経路を介して死を迂回するために防御戦略をもつようになることを妨げられる。よって、本発明の細胞がそれらの環境で細胞傷害性を保つように改変されているので、がんは、TRAIL デコイ受容体を上方制御することによって TRAIL 誘導細胞死を効果的に回避することができない。

【0163】

実施例 7 - TRAIL バリアントがノックインされた NK 細胞を用いる血液がん治療のためのプロトコール

40

実施例 6 で上に記載した通りに、KHYG-1 細胞に TRAIL バリアントをトランسفェクションした。以下のプロトコールは血液がん患者の治療用に開発された。

【0164】

本発明を用いて適切に治療されるがんをもつ患者の診断に統一して、改変 NK 細胞の投与前に、DR5 誘導剤、例えば、ボルテゾミブが投与され、したがって、低投与量で用いられてがん上の DR5 の発現を上方制御し、改変 NK 細胞治療をより効果的にする。

【0165】

次いで、改変 NK 細胞のアリコートを解凍し、培養して、患者に投与した。

【0166】

50

治療で使用するNK細胞が発現するTRAILバリアントは、アフィニティーが野生型よりデコイ受容体に対してのほうが低いので、がん細胞表面上のデスレセプターの結合が増加し、したがってその結果としてより多くのがん細胞アポトーシスが起こる。

【0167】

別の選択肢は、上記プロトコールの実行前に、がんを生検して及びがん細胞を生体外で培養することである。DR5誘導剤が所与の患者に適切かどうかについて決定するのを助けるために、このステップは、特に高いレベルのデコイ受容体及び/又は低いレベルのデスレセプターを発現するがんを同定するために用いることができる。また、所与のがんが順応して、例えばそのDR5発現を減らしうるかもしれない、このステップは上記のプロトコールを含む治療の間に実行されてもよく、したがって、治療の途中でDR5誘導剤での治療に適するようになりうる。

10

【0168】

実施例8-低投与量ボルテゾミブはTRAILバリアントを発現するNK細胞に対するがん細胞の感受性を増加させる

ボルテゾミブ(Bt)は、多発性骨髄腫(MM)の治療に有用なプロテアソーム阻害剤(化学療法様薬)である。ボルテゾミブは、MM細胞を含むいくつかの異なるタイプのがん細胞上のDR5発現を上方制御することが知られている。

【0169】

KHYG-1細胞を、実施例6で上に記載した通りにTRAILバリアントをトランスフェクションした後に、ボルテゾミブへの曝露の有り無しでMM細胞を標的とするのに使用した。

20

【0170】

ボルテゾミブ誘導DR5発現

ボルテゾミブはミレニアム・ファーマシューティカルズ社から購入した。マウス抗ヒトDR5-AF647(カタログ番号:565498)は、BDファーミングエンジン社から購入した。染色した細胞試料はBD FACS Canto IIで分析した。

【0171】

(1) MM細胞株 RPMI 8226 及びMM1.Sを、2 mM L-グルタミン、10 mM HEPES、24 mM 重炭酸ナトリウム、0.01%の抗生物質、及び10%ウシ胎仔血清(シグマ、セントルイス、ミズーリ州、米国)を補充したRPMI 1640培地(シグマ、セントルイス、ミズーリ州、米国)で、37にて5%CO2雰囲気中で培養した。

30

(2) MM細胞を 1×10^6 / mL、2 mL / ウェルで6ウェルプレートに播種した。

(3) 次いで、MM細胞を相異なる投与量のボルテゾミブで24時間処理した。

(4) 次いで、ボルテゾミブ処理/未処理のMM細胞のDR5発現をフローサイトメトリーで分析した(図18)。

【0172】

低投与量ボルテゾミブ処理は両方のMM細胞株においてDR5発現を増加させることができた(図18)。DR5情報制御はアポトーシスの軽微な誘導と関連した(データ示さず)。しかし、DR5発現は、大部分のMM細胞が死滅するという結果をもたらす高い毒性に起因して、高投与量のボルテゾミブによって上方制御することができないことがわかった。

40

【0173】

がん細胞のボルテゾミブによって誘導される感受性の増加

実施例6で上に記載した通りに、KHYG-1細胞にTRAILバリアント(TRAIL-D269H/E195R)をトランスフェクションした。

【0174】

(1) ボルテゾミブ処理/未処理MM1.S細胞を標的細胞として使用した。MM1.S細胞を、2.5 nMのボルテゾミブ又は溶媒(対照)で24時間処理した。

(2) TRAILバリアントmRNAのエレクトロポレーションの6時間後に、KHY

50

G - 1 細胞を MM 細胞と 12 ウェルプレートで培養した。洗浄後、細胞濃度を 1×10^6 / mL に調節した後、 KHYG - 1 と MM1 . S 細胞を 1 : 1 の比で混合し、 12 時間培養した。

(3) KHYG - 1 細胞の細胞傷害性のフローサイトメトリー分析を実施した。共培養した細胞を集めて洗浄した後、 Annexin V 結合バッファーを用いて、 CD2 - APC 抗体 (5 μ L / 試験) 、 Annexin V - FITC (5 μ L / 試験) 、及び SYTOX - グリーン (5 μ L / 試験) で染色した。

(4) データを FlowJo 7.6.2 ソフトウェアを使用してさらに解析した。 CD2 陰性集団は MM1 . S 細胞を表わす。 KHYG - 1 細胞は強い CD2 陽性である。最後に、 CD2 陰性集団の Annexin V - FITC 及び SYTOX - グリーン陽性細胞を分析した。 10

【0175】

TRAIL バリアントの有り無しでエレクトロポレーションした KHYG - 1 細胞と共に培養した、ボルテゾミブで前処理した / 未処理の MM1 . S 細胞において、アポトーシスのフローサイトメトリー分析を行った (図 19)。

【0176】

ボルテゾミブは、 TRAIL バリアントを発現する KHYG - 1 細胞に対する MM 細胞の増感を誘導することがわかった。したがって、データは、 DR5 発現を誘導した薬剤は、がん細胞に対する細胞傷害性を増加させる点で該モデルにおいて効果的で、それゆえに、本発明のがん治療を増強するのに有用でありうることを示した。 20

【0177】

実施例 9 - TRAIL バリアントによる誘導アポトーシスの確認

TRAIL バリアント発現から NK 細胞の細胞傷害性の増加が生じるという前述の実施例における決定的証拠にもかかわらず、我々は、細胞傷害性の増加が、がん細胞アポトーシスを誘導することから生じたのか (可能性が最も高い) 、又は NK 細胞が意図せず活性化されて、より強い細胞障害性表現型を呈し、よってパーフォリン分泌を介してがん細胞を死滅させることによるのかを確認したいと望んだ。

【0178】

コンカナマイシン A (CMA) は、溶解性顆粒の pH の増加によってパーフォリンの分解が加速されることに主に起因して、パーフォリンによって媒介される NK 細胞の細胞傷害性活性を阻害することが示されている。我々は、パーフォリンによって媒介される細胞傷害性が CMA で部分的に消滅するときに、 TRAIL バリアントを発現する KHYG - 1 細胞の細胞傷害性が際立ちうるか否かを調べた。 30

【0179】

パーフォリン発現の CMA 誘導減少

マウス抗ヒトパーフォリン - AF647 (カタログ番号 : 563576) は、 BD pharmingen から購入した。コンカナマイシン A (カタログ番号 : SC - 202111) は、サンタクルーズバイオテクノロジー社から購入した。染色した細胞試料は、 BD FACS Canto II を使用して分析した。 40

【0180】

(1) KHYG - 1 細胞を、培養した。 10% FBS (ウシ胎仔血清) 、 2 mM L - グルタミン、ペニシリン (100 U / mL) / ストレプトマイシン (100 mg / mL) 、及び IL - 2 (10 ng / mL) を含む RPMI 1640 培地で培養した。

(2) KHYG - 1 細胞 (エレクトロポレーション後の 6 時間、ペニシリン / ストレプトマイシンを含まない RPMI 1640 培地で培養) をさらに、 100 nM CMA 又は等量の溶媒 (DMSO) で 2 時間処理した。

(3) 細胞を遠心分離 (1500 RPM × 5 分) によって集め (1×10^6 細胞 / 試験) 、上清を吸引した。

(4) 細胞を PBS 液中の 4% パラホルムアルデヒドで室温にて 15 分間固定した。

(5) 細胞を 4 mL の FACS バッファー (PBS 、 0.5 ~ 1% BSA 、 0.1% ア

50

ジ化ナトリウム)で2回洗浄した。

(6) 細胞を1mLのPBS/0.1%サポニンバッファーで室温にて30分間透過処理した。

(7) 細胞を4mLのPBS/0.1%サポニンバッファーで洗浄した。

(8) 細胞を100μLのPBS/0.1%サポニンバッファーに再懸濁した後、5uLの抗体を各チューブに加えて、氷上で30分間インキュベーションした。

(9) 細胞を1500RPMでの5分間遠心分離によって、PBS/0.1%サポニンバッファーで3回洗浄した。

(10) 細胞を500uLの氷冷FACSバッファーに再懸濁して、分析まで一時的に暗所で氷上又は冷蔵庫内に4℃で置いた。

(11) 細胞をフローサイトメーター(BD FACS Canto II)で分析した。データをFlowJo 7.6.2ソフトウェアを使用して処理した。

【0181】

CMA処理は、著しくKHYG-1細胞におけるパーフォリン発現レベルを減少させ(図20)、KHYG-1細胞の生存率に悪影響を及ぼさなかった(図21)。

【0182】

CMAの存在下におけるNK細胞TRAILバリアントの細胞傷害性

実施例6で上に記載した通り、KHYG-1細胞にTRAILバリアント(TRAIL D269H/E195R)をトランスフェクションした。

【0183】

(1) MM1.S細胞を標的細胞として使用した。

(2) TRAIL mRNAのエレクトロポレーションの6時間後に、KHYG-1細胞を100mM CMA又は等量の溶媒で2時間処理した。

(3) KHYG-1細胞を遠心分離によってRPMI1640培地で洗浄し、IL-2を含むRPMI1640培地に再懸濁し、細胞濃度を 1×10^6 /mLに調節した。

(4) IL-2を含むRPMI1640培地にMM1.S細胞を再懸濁し、細胞濃度を 1×10^6 /mLに調節した。

(5) KHYG-1とMM1.S細胞を1:1の比で混合し、12時間共培養した。

(6) KHYG-1細胞の細胞傷害性のフローサイトメトリー分析を実施した。共培養した細胞を洗浄し、CD2-APC抗体(5uL/試験)で染色した。

(7) 洗浄後、Annexin V結合バッファーを用いてAnnexin V-FITC(5uL/試験)及びSYTOX-グリーン(5uL/試験)でさらなる染色を行った。

(8) さらに、データをFlowJo 7.6.2ソフトウェアを使用して解析した。CD2陰性集団はMM1.S細胞を表す。KHYG-1細胞は強いCD2陽性である。次いで、Annexin V-FITC及びCD2陰性集団中のSYTOX-グリーン陽性細胞を解析した。

【0184】

ここでもやはり、TRAILバリアントを発現するNK細胞は、TRAILバリアントの発現を欠いている対照細胞と比べて高い細胞傷害性を示すことが示された(図22)。しかし、この実施例では、CMAで処理した対照NK細胞の結果とは対照的に、CMAは、TRAILバリアントを発現するNK細胞の細胞傷害性活性を著しく減少できないことがさらに示された。

【0185】

TRAILバリアントのないNK細胞(対照又は擬似NK細胞)は、CMAの非存在下で48%のがん細胞死を誘導し、CMAの存在下で35.9%のがん細胞死を誘導することが示された(図22)。TRAILバリアントを発現するNK細胞は、CMAの存在下でも非存在下でも対照NK細胞と比べて多くのがん細胞死を誘導することが可能であった。実際のところ、CMAが存在しても、TRAILバリアントを発現するNK細胞は、CMAの非存在下での対照NK細胞と比べてより多くのがん細胞死を誘導した。

10

20

30

40

50

【0186】

したがって、このデータは、パーフォリンに関連する下方制御の影響をより少なく受け
る機構を介してがん細胞に対するNK細胞の細胞傷害性を増加させる点でTRAILバリ
アントの重要性を示す。パーフォリンは一般にNK細胞によって利用されて標的細胞を死
滅させ、多くのがん細胞はNK細胞パーフォリン発現を減じるための機構をもつようにな
っているので、細胞障害性攻撃を避けるために、本発明のNK細胞はがん細胞による減衰
の影響をより少なく受ける強力な代替手段を表す。

【0187】

実施例10-KHYG-1細胞における変異TRAILバリアントの発現とチェックポイント
阻害受容体CD96のノックダウンとの組み合わせ

10

チェックポイント阻害受容体CD96発現をノックダウンした場合及びTRAILバリ
アントを発現した場合にNK細胞の細胞傷害性の増加が観察された。我々は2つの遺伝子
変更を組み合わせてNK細胞の細胞傷害性の相乗効果を起こすことをさらに試した。

【0188】

実施例2に記載した通りに、CD96発現をKHYG-1細胞においてノックダウンし
た。

【0189】

実施例6で上に記載した通りに、KHYG-1細胞にTRAILバリアント(TRAIL
L-D269H/E195R)をトランスフェクションした。

【0190】

(1)エレクトロポレーションの12時間後に、KHYG-1細胞を標的細胞(K56
2又はMM1.S)とともに 1×10^6 / mLの濃度にて12ウェルプレート(2mL /
ウェル)で12時間共培養した。E:T比は1:1であった。

(2)共培養の12時間後に、細胞を集め、洗浄し、CD2-APCで染色し、再度洗
浄し、Annexin V結合バッファーを用いてAnnexin V-FITC(5uL / 試験)及びSYTOX-グリーン(5uL / 試験)でさらに染色した。

(3)細胞試料を、BD FACS Canto IIフローサイトメーター)を使用
して分析した。データをFlowJo 7.6.2ソフトウェアを使用してさらに解析し
た。CD2陰性集団はMM1.S細胞を表す。KHYG-1細胞は強いCD2陽性である
。次いで、Annexin V-FITC及びCD2陰性集団中のSYTOX-グリーン陽
性細胞を解析した。

20

【0191】

KHYG-1細胞においてCD96発現のノックダウン及びTRAILバリアントの発
現を同時にすることは、K562標的細胞(図23)及びMM1.S標的細胞(図24)
双方に対する該細胞の細胞傷害性を相乗的に増強することがわかった。このことは、両標
的細胞群において、個々の変更単独から生じた細胞死と比べて、同時遺伝子変更から生じ
た細胞死のほうが多かったという事実によって示された。

【0192】

同時に、TRAIL変異体/バリアントの発現がNK細胞の細胞傷害性を増加させる
というさらなる証拠(図23及び24)に加えて、CD96のノックダウンがNK細胞の細
胞傷害性を増加させるというさらなる証拠(図23及び24)が得られた。

40

【0193】

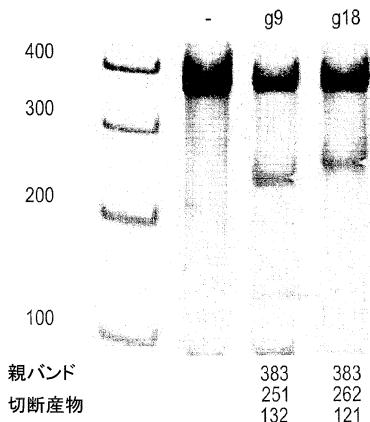
したがって、本発明は、血液がん治療で用いるNK細胞及び細胞株並びにその作製を提
供する。

【図1】

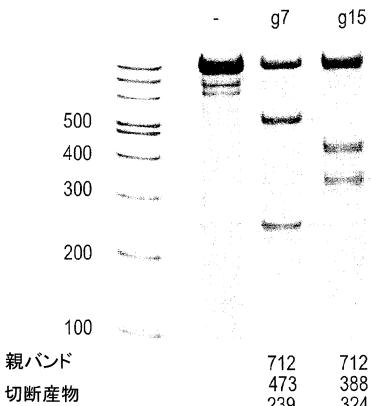
【図2】

(3)

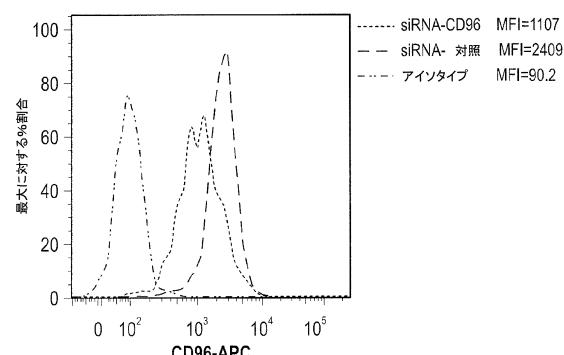
【 図 4 】



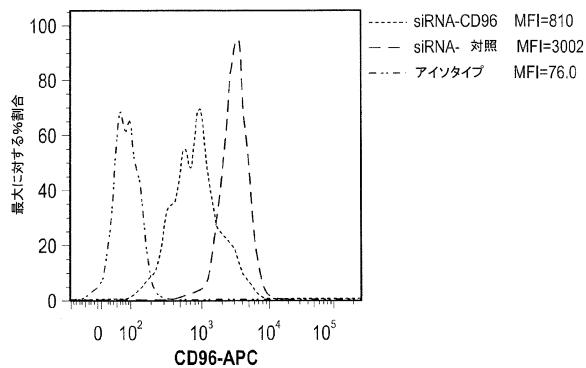
〔 四 5 〕



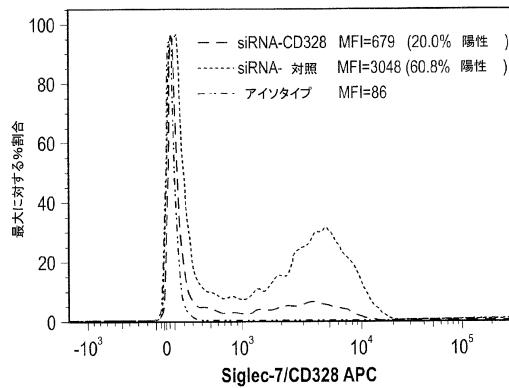
【図 6 A】



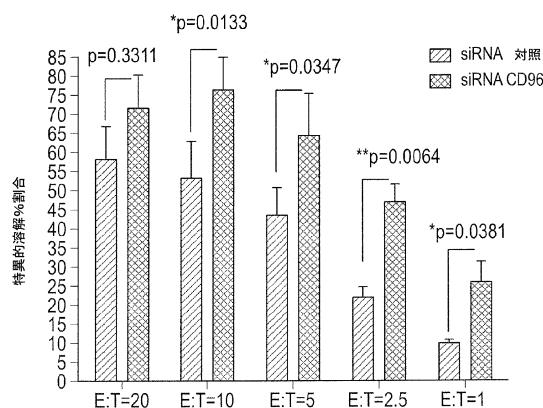
【図 6 B】



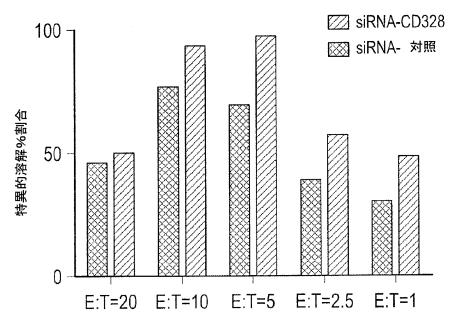
【図 8】



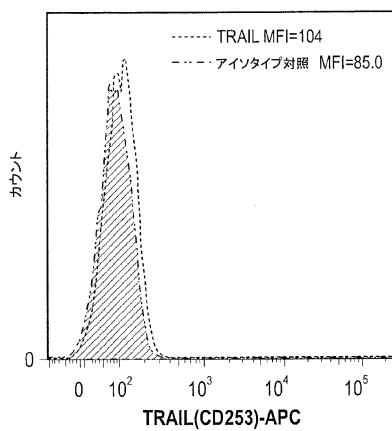
【図 7】



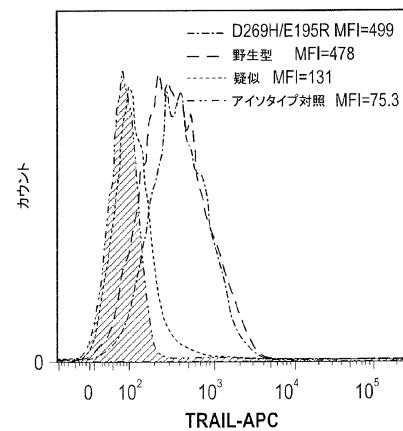
【図 9】



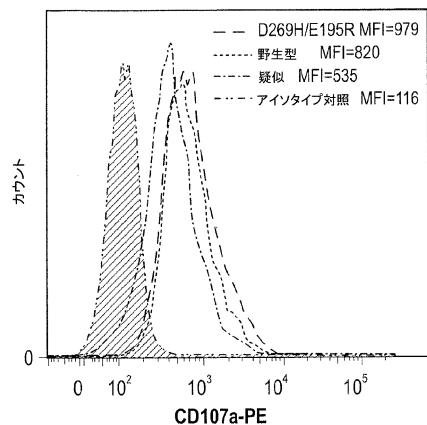
【図 10】



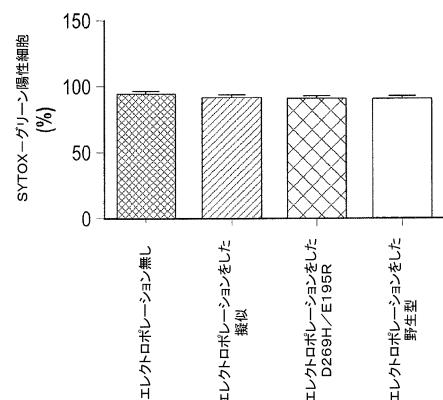
【図 11】



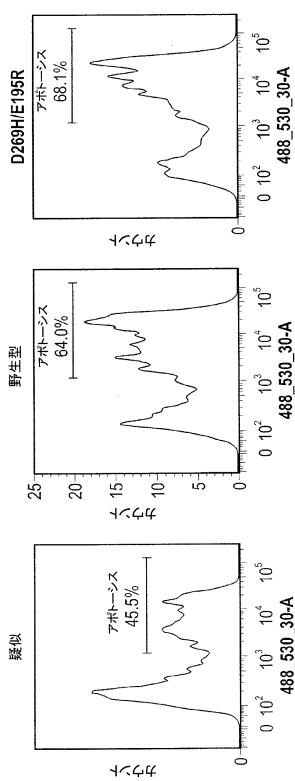
【図12】



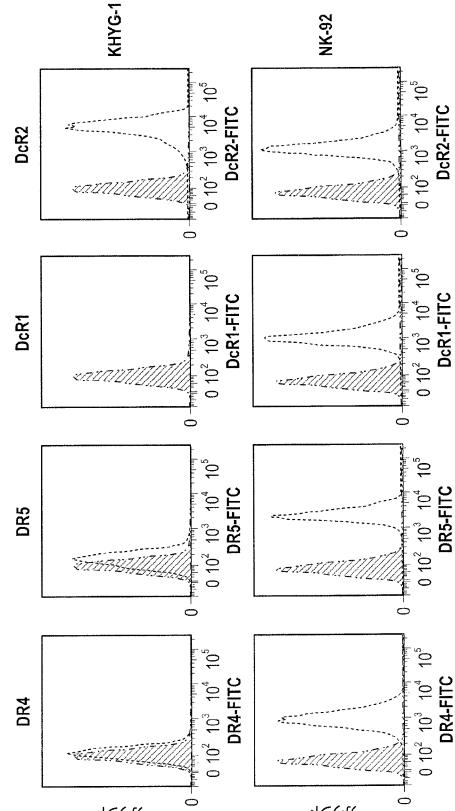
【図13】



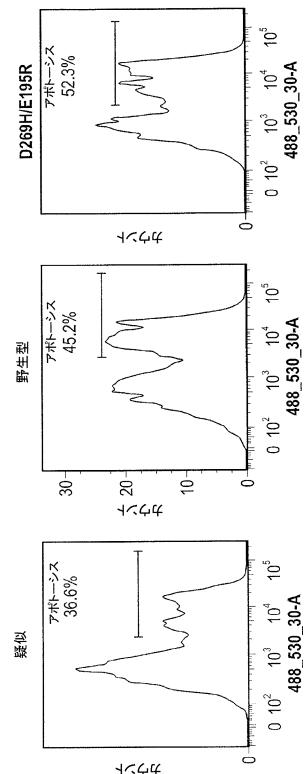
【図15】



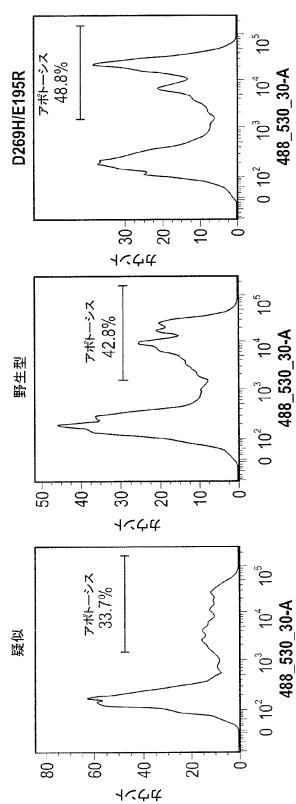
【図14】



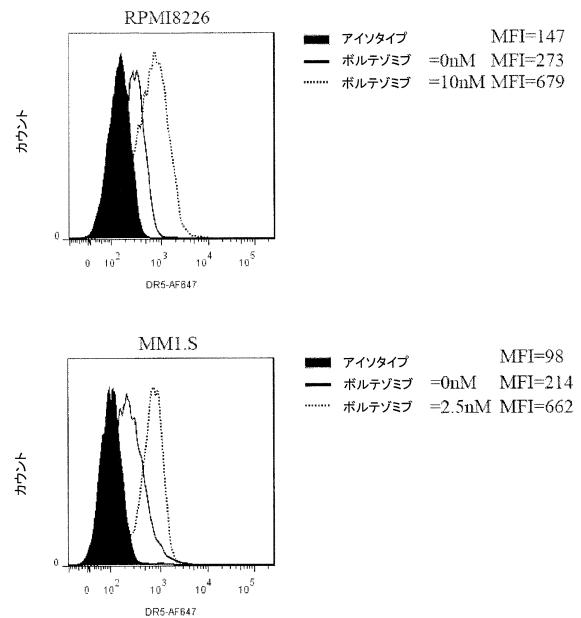
【図16】



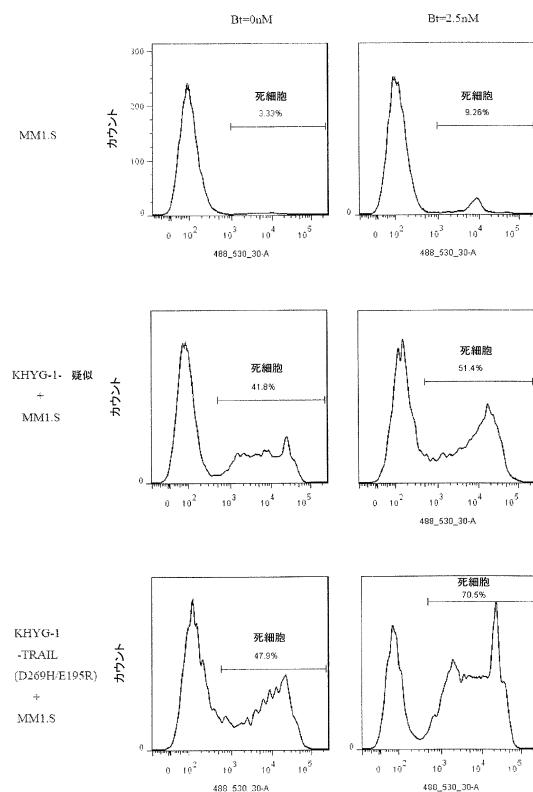
【図17】



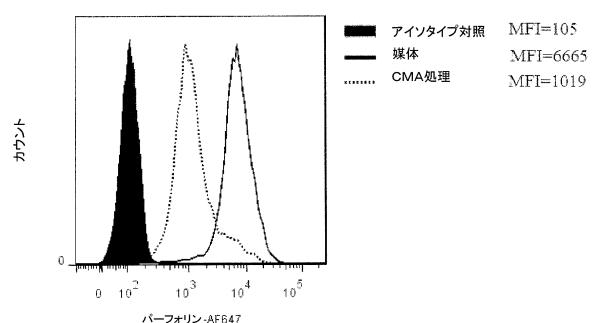
【図18】



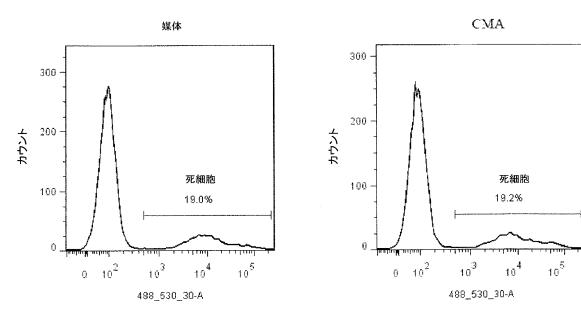
【図19】



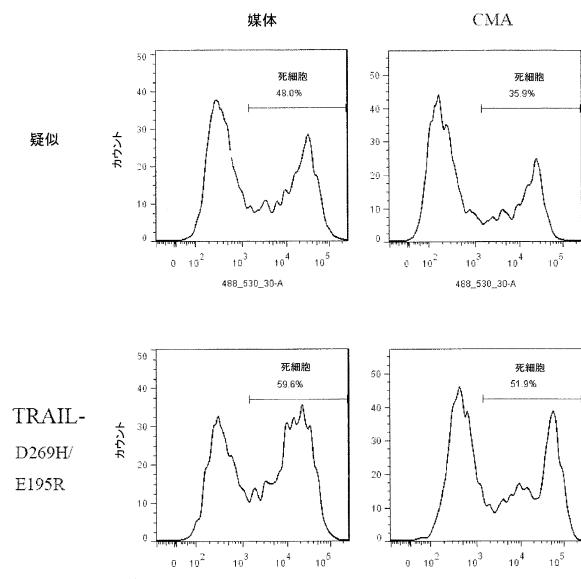
【図20】



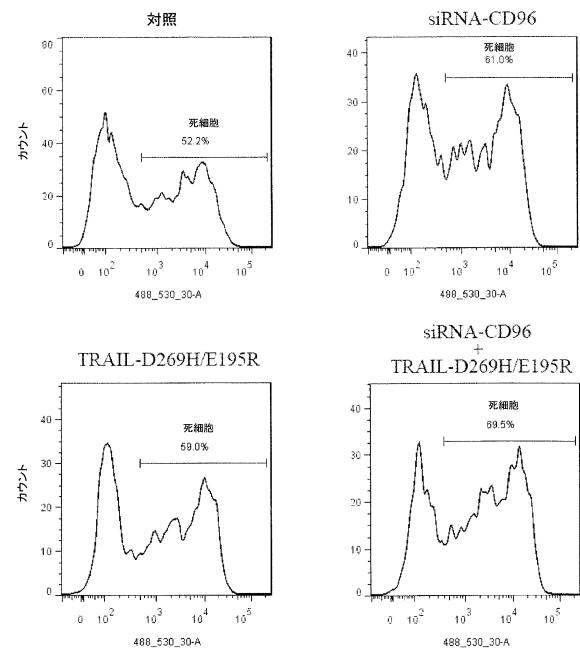
【図21】



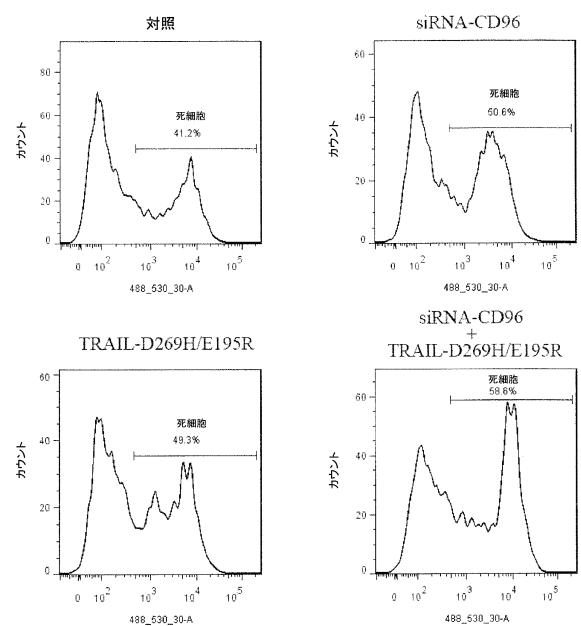
【図22】



【図23】



【図24】



【配列表】

0006974681000001.app

フロントページの続き

(51) Int.CI.		F I	
C 1 2 N	5/0783 (2010.01)	C 1 2 N	5/0783
C 1 2 N	15/54 (2006.01)	C 1 2 N	15/54
C 1 2 N	15/26 (2006.01)	C 1 2 N	15/26
C 1 2 N	15/24 (2006.01)	C 1 2 N	15/24

(31) 優先権主張番号 1605457.9

(32) 優先日 平成28年3月31日(2016.3.31)

(33) 優先権主張国・地域又は機関

英国(GB)

(31) 優先権主張番号 1610164.4

(32) 優先日 平成28年6月10日(2016.6.10)

(33) 優先権主張国・地域又は機関

英国(GB)

前置審査

審査官 鈴木 崇之

(56) 参考文献 特表2008-507961 (JP, A)

特表2011-506592 (JP, A)

特表2008-505071 (JP, A)

Clin. Cancer Res., 2009年, Vol. 15, No. 6, pp. 2048-2057

Nature Immunology, 2014年03月, Vol. 15, pp. 431-438

Cancer Cell, 2005年04月, Vol. 27, No. 4, pp. 450-461

Blood, 2013年, Vol. 122, Abstract 4499

Exp. Hematol., 2005年, Vol. 33, pp. 1160-1171

Haematologica, 2004年, Vol. 89, pp. 338-347

Journal of Cancer, 2011年, Vol. 2, pp. 383-385

(58) 調査した分野(Int.CI., DB名)

C 1 2 N 15 / 00 - 15 / 90

C 1 2 N 1 / 00 - 7 / 08

C 1 2 Q 1 / 00 - 3 / 00

A 6 1 K 35 / 00 - 35 / 768

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C a p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

P u b M e d