



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년07월04일
(11) 등록번호 10-2830462
(24) 등록일자 2025년07월02일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0783 (2010.01) A61K 35/17 (2025.01)
A61P 35/00 (2006.01) C07K 14/52 (2006.01)
C07K 14/54 (2024.01) C07K 16/28 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 5/0636 (2025.01)
A61K 35/17 (2025.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7019665
- (22) 출원일자(국제) 2018년12월19일
심사청구일자 2021년12월08일
- (85) 번역문제출일자 2020년07월07일
- (65) 공개번호 10-2020-0103708
- (43) 공개일자 2020년09월02일
- (86) 국제출원번호 PCT/JP2018/046888
- (87) 국제공개번호 WO 2019/124468
국제공개일자 2019년06월27일
- (30) 우선권주장
JP-P-2017-247109 2017년12월24일 일본(JP)
- (56) 선행기술조사문헌
KR1020170067773 A*
US20140301993 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
노일 이문 바이오테크 가부시킴가이사
일본 도쿄도 미나토쿠 시바다이몬 2초메 12방 10고
- (72) 발명자
다마다 고지
일본 야마구치켄 우베시 미나미코구시 1초메 1-1
고쿠리츠다이가쿠호우진 야마구치 다이가쿠 이가쿠부 나이
사코다 유키미
일본 야마구치켄 우베시 미나미코구시 1초메 1-1
고쿠리츠다이가쿠호우진 야마구치 다이가쿠 이가쿠부 나이
아다치 게이시
일본 야마구치켄 우베시 미나미코구시 1초메 1-1
고쿠리츠다이가쿠호우진 야마구치 다이가쿠 이가쿠부 나이
- (74) 대리인
특허법인코리아나

전체 청구항 수 : 총 19 항

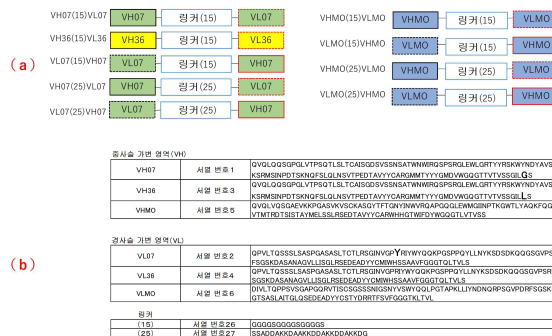
심사관 : 정이든

(54) 발명의 명칭 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 세포 표면 분자, IL-7, 및 CCL19 를 발현하는 면역 담당 세포

(57) 요약

메소텔린을 표적으로 한 면역 담당 세포를 제공하는 것을 목적으로 한다. 인간 메소텔린 (Human Mesothelin) 을 특이적으로 인식하는 세포 표면 분자, 인터류킨 7 (IL-7), 및 케모카인 (C-C motif) 리간드 19 (CCL19) 를 발현하는 면역 담당 세포를 제조한다. 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 세포 표면 분자가 1 본쇄 항체, 세포막 관통 영역, 및 면역 담당 세포의 활성화를 유도하는 시그널 전달 영역을 구비한 키메라 항원 수용체 (CAR) 인 것이나, 중사슬 가변 영역과 경사슬 가변 영역이 2 ~ 30 개의 아미노산 서열로 이루어지는 펩티드 링커를 개재하여 결합하고 있는 것이 바람직하다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

C07K 14/52 (2013.01)

C07K 14/5418 (2013.01)

C07K 16/28 (2013.01)

C12N 2510/00 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

인간 메소텔린 (Human Mesothelin) 을 특이적으로 인식하는 1 본쇄 항체, 세포막 관통 영역, 및 면역 담당 세포의 활성화를 유도하는 시그널 전달 영역을 구비한 키메라 항원 수용체 (CAR), 인터류킨 7 (IL-7), 및 케모카인 (C-C 모티프) 리간드 19 (CCL19) 를 발현하고,

상기 CAR 에 있어서의 1 본쇄 항체가, (1-1) 서열 번호 13 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 CDR1, 서열 번호 14 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 CDR2, 및 서열 번호 15 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 CDR3 을 포함하는 중사슬 가변 영역과, 서열 번호 16 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 CDR1, 서열 번호 17 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 CDR2, 및 서열 번호 18 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 CDR3 을 포함하는 경사슬 가변 영역을 포함하는 1 본쇄 항체인, 면역 담당 세포.

청구항 2

제 1 항에 있어서,
생체로부터 분리된 면역 담당 세포인 것을 특징으로 하는 면역 담당 세포.

청구항 3

제 1 항에 있어서,
외래의 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 CAR 를 코딩하는 핵산, 외래의 IL-7 을 코딩하는 핵산, 및 외래의 CCL19 를 코딩하는 핵산을 함유하는 것을 특징으로 하는, 면역 담당 세포.

청구항 4

제 3 항에 있어서,
외래의 IL-7 을 코딩하는 핵산, 및 외래의 CCL19 를 코딩하는 핵산이, 외래의 인간 IL-7 을 코딩하는 핵산, 및 외래의 인간 CCL19 를 코딩하는 핵산인 것을 특징으로 하는, 면역 담당 세포.

청구항 5

제 3 항에 있어서,
외래의 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 CAR 를 코딩하는 핵산, 외래의 IL-7 을 코딩하는 핵산, 및 외래의 CCL19 를 코딩하는 핵산이 게놈에 삽입되어 있는 것을 특징으로 하는, 면역 담당 세포.

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

제 1 항에 있어서,
CAR 에 있어서의 1 본쇄 항체가 이하인, 면역 담당 세포:
(1-2) 서열 번호 1 에 나타내는 아미노산 서열과 90 % 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 가변 영역과, 서열 번호 2 에 나타내는 아미노산 서열과 90 % 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서

열로 이루어지는 경사슬 가변 영역을 포함하는 1 본쇄 항체.

청구항 9

제 1 항에 있어서,

CAR 에 있어서의 1 본쇄 항체가 이하인, 면역 담당 세포:

(1-3) 서열 번호 1 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 가변 영역과, 서열 번호 2 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 가변 영역을 포함하는 1 본쇄 항체.

청구항 10

제 1 항에 있어서,

CAR 에 있어서의 세포막 관통 영역이, 서열 번호 7 에 나타내는 아미노산 서열과 90 % 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 면역 담당 세포.

청구항 11

제 1 항에 있어서,

CAR 에 있어서의 면역 담당 세포의 활성화를 유도하는 시그널 전달 영역이, 서열 번호 8, 9 및 10 에 나타내는 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 면역 담당 세포.

청구항 12

제 1 항에 있어서,

중사슬 가변 영역과 경사슬 가변 영역이 2 ~ 30 개의 아미노산 서열로 이루어지는 펩티드 링커를 개재하여 결합하고 있는 것을 특징으로 하는, 면역 담당 세포.

청구항 13

제 12 항에 있어서,

펩티드 링커가, 서열 번호 26 또는 서열 번호 27 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 것을 특징으로 하는, 면역 담당 세포.

청구항 14

제 1 항에 있어서,

CAR 에 있어서의 1 본쇄 항체가 이하인, 면역 담당 세포:

(1-4) 서열 번호 1 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 가변 영역, 서열 번호 26 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 펩티드 링커, 및 서열 번호 2 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 가변 영역을 순차 포함하는 1 본쇄 항체.

청구항 15

제 1 항에 있어서,

CAR 에 있어서의 면역 담당 세포의 활성화를 유도하는 시그널 전달 영역이, CD28 의 세포 내 영역의 폴리펩티드, 4-1BB 의 세포 내 영역의 폴리펩티드, 및 CD3 ζ 의 세포 내 영역의 폴리펩티드를 포함하는 것을 특징으로 하는, 면역 담당 세포.

청구항 16

제 1 항에 있어서,

면역 담당 세포가 T 세포인 것을 특징으로 하는, 면역 담당 세포.

청구항 17

제 1 항에 있어서,

면역 담당 세포가 인간 유래 또는 인간으로부터 분리된 T 세포인 것을 특징으로 하는, 면역 담당 세포.

청구항 18

제 1 항 내지 제 5 항 및 제 8 항 내지 제 17 항 중 어느 한 항에 기재된 면역 담당 세포와 약학적으로 허용되는 첨가제를 함유하는 의약 조성물.

청구항 19

제 18 항에 있어서,

암의 치료에 사용하기 위한, 의약 조성물.

청구항 20

인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 1 본쇄 항체, 세포막 관통 영역, 및 면역 담당 세포의 활성화를 유도하는 시그널 전달 영역을 구비한 키메라 항원 수용체 (CAR) 를 코딩하는 핵산, IL-7 을 코딩하는 핵산, 및 CCL19 를 코딩하는 핵산을 함유하는 발현 벡터로서,

상기 CAR 에 있어서의 1 본쇄 항체가, (1-1) 서열 번호 13 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 CDR1, 서열 번호 14 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 CDR2, 및 서열 번호 15 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 CDR3 을 포함하는 중사슬 가변 영역과, 서열 번호 16 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 CDR1, 서열 번호 17 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 CDR2, 및 서열 번호 18 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 CDR3 을 포함하는 경사슬 가변 영역을 포함하는 1 본쇄 항체인, 발현 벡터.

청구항 21

인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 1 본쇄 항체, 세포막 관통 영역, 및 면역 담당 세포의 활성화를 유도하는 시그널 전달 영역을 구비한 키메라 항원 수용체 (CAR) 를 코딩하는 핵산, IL-7 을 코딩하는 핵산, 및 CCL19 를 코딩하는 핵산을 면역 담당 세포에 도입하는 것을 특징으로 하는, 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 CAR, IL-7, 및 CCL19 를 발현하는 면역 담당 세포의 시험관 내 (in vitro) 에서의 제조 방법으로서,

상기 CAR 에 있어서의 1 본쇄 항체가, (1-1) 서열 번호 13 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 CDR1, 서열 번호 14 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 CDR2, 및 서열 번호 15 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 CDR3 을 포함하는 중사슬 가변 영역과, 서열 번호 16 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 CDR1, 서열 번호 17 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 CDR2, 및 서열 번호 18 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 CDR3 을 포함하는 경사슬 가변 영역을 포함하는 1 본쇄 항체인, 면역 담당 세포의 시험관 내 (in vitro) 에서의 제조 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 인간 메소텔린 (Human Mesothelin) 을 특이적으로 인식하는 세포 표면 분자, 인터류킨 7 (Interleukin-7 : IL-7), 및 케모카인 (C-C 모티프) 리간드 19 (chemokine (C-C motif) ligand 19 : CCL19) 를 발현하는 면역 담당 세포나, 이러한 면역 담당 세포를 함유하는 의약 조성물이나, 메소텔린을 특이적으로 인식하는 세포 표면 분자를 코딩하는 핵산, IL-7 을 코딩하는 핵산, 및 CCL19 를 코딩하는 핵산을 포함하는 발현 벡터나, 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 세포 표면 분자를 코딩하는 핵산, IL-7 을 코딩하는 핵산, 및 CCL19 를 코딩하는 핵산을 면역 담당 세포에 도입하는 것을 특징으로 하는, 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 세포 표면 분자, IL-7, 및 CCL19 를 발현하는 면역 담당 세포의 제조 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 악성 종양은 세계적으로 많은 이환자가 있는 질환이고, 일반적으로 화학 요법, 방사선 요법, 또는 외과 요법이 널리 실시되고 있다. 그러나, 부작용이 발생하는 것이나, 일부의 기능이 소실되는 것이나, 재발 혹은 전이

를 치료할 수 없는 것 등, 여러 가지 문제가 있었다. 그래서, 보다 환자의 퀄리티·오브·라이프(QOL)를 높게 유지하기 위하여, 최근, 면역 세포 요법의 개발이 진행되고 있다. 이 면역 세포 요법은, 환자로부터 면역 담당 세포를 채취하고, 이러한 면역 담당 세포의 면역 기능을 높이도록 처치하여 증폭시키고, 다시 환자에게 이입하는 요법이다. 구체적으로는, 환자로부터 T 세포를 채취하고, 이러한 T 세포에 키메라 항원 수용체(constitutive androstane receptor : 이하 「CAR」 이라고도 한다)를 코딩하는 핵산을 도입하여 증폭시키고, 다시 환자에게 이입하는 요법(비특허문헌 1 참조)이 알려져 있다. 이러한 요법은, 현재 세계적으로 임상 시험이 진행되고 있으며, 백혈병이나 림프종 등의 조혈기 악성 종양 등에 있어서 유효성을 나타내는 결과가 얻어지고 있다.

[0003] 한편, 본 발명자들은 IL-7 과 CCL19 를 동시에 발현함으로써, 고형암을 현저하게 억제하는 면역 세포 요법(특허문헌 1, 2 참조)을 제안하였다. 이러한 방법에 의해, 내재성의 면역 담당 세포의 활성화나 종양 세포에 대한 집적능을 높일 수 있다.

[0004] 그런데, 메소텔린은 중피종, 대장암(직장암, 결장암), 췌장암, 난소암, 폐암, 유방암, 두경부암 등의 암세포에 있어서 발현하는 것이 알려져 있다. 이러한 메소텔린을 타겟으로 한 CAR-T 세포가 개시되어 있다(특허문헌 3, 4 참조).

선행기술문헌

특허문헌

- [0005] (특허문헌 0001) 국제 공개 제2016/056228호 팜플렛
- (특허문헌 0002) 국제 공개 제2017/159736호 팜플렛
- (특허문헌 0003) 미국 특허출원공개 제2014/0301993호 명세서
- (특허문헌 0004) 일본 공개특허공보 2017-518053호

비특허문헌

- [0006] (비특허문헌 0001) 나카자와 요조 신슈 의지(醫誌) 61(4) : 197 ~ 203(2013)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 상기와 같이 IL-7 과 CCL19 를 동시에 발현하는 CAR 발현 T 세포나 TCR 발현 T 세포 등을 사용한 면역 세포 요법을 개발하여, 면역 담당 세포의 증식능, 생존능, 또는 숙주의 면역 담당 세포의 집적능을 현저하게 향상시켜, 종래 면역 세포 요법으로 충분한 치료 효과가 관찰되지 않았던 고형암에 적용할 수 있는 기술의 개발이 진행되고 있다. 한편, 중피종, 췌장암 등의 암세포에 고발현하고 있는 메소텔린을 표적으로 한 CAR 발현 면역 담당 세포의 개발에 있어서는, 암 국소에 대한 면역 담당 세포의 집적이 불충분한 것이나, 항종양 효과가 짧아 종양이 재발할 우려가 있는 것 등, 임상 결과에서도 만족스러운 결과가 나와 있지 않은 것이 현상상황이다. 그래서 본 발명의 과제는, 새로운 메소텔린을 표적으로 한 면역 담당 세포를 제공하는 것에 있다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명자들은, 지금까지 스스로가 개발해 온 CAR, IL-7 및 CCL19 를 발현하는 T 세포의 추가적인 가능성을 검토하였다. 그 결과, 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 세포 표면 분자로서 특정한 아미노산 서열을 함유하고, 인간 메소텔린에 특이적으로 결합하는 1 본쇄 항체를 함유하는 CAR 을 선택하여 사용함으로써, 메소텔린을 발현하는 암세포에 대한 세포 상해 활성을 가진과 함께, 메소텔린을 발현하는 암세포에 의해 형성된 종양에 의한 생존을 저하를 억제할 수 있는 것을 알아내어, 본 발명을 완성하였다.

[0009] 즉, 본 발명은 이하와 같다.

[0010] [1] 인간 메소텔린(Human Mesothelin)을 특이적으로 인식하는 세포 표면 분자, 인터류킨 7(IL-7), 및 케모카

인 (C-C 모티프) 리간드 19 (CCL19) 를 발현하는 면역 담당 세포.

- [0011] [2] 생체로부터 분리된 면역 담당 세포인 것을 특징으로 하는 상기 [1] 에 기재된 면역 담당 세포.
- [0012] [3] 외래의 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 세포 표면 분자를 코딩하는 핵산, 외래의 IL-7 을 코딩하는 핵산, 및 외래의 CCL19 를 코딩하는 핵산을 함유하는 것을 특징으로 하는 상기 [1] 또는 [2] 에 기재된 면역 담당 세포.
- [0013] [4] 외래의 IL-7 을 코딩하는 핵산, 및 외래의 CCL19 를 코딩하는 핵산이, 외래의 인간 IL-7 을 코딩하는 핵산, 및 외래의 인간 CCL19 를 코딩하는 핵산인 것을 특징으로 하는 상기 [3] 에 기재된 면역 담당 세포.
- [0014] [5] 외래의 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 세포 표면 분자를 코딩하는 핵산, 외래의 IL-7 을 코딩하는 핵산, 및 외래의 CCL19 를 코딩하는 핵산이 게놈에 삽입되어 있는 것을 특징으로 하는 상기 [3] 또는 [4] 에 기재된 면역 담당 세포.
- [0015] [6] 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 세포 표면 분자가, 1 본쇄 항체, 세포막 관통 영역, 및 면역 담당 세포의 활성화를 유도하는 시그널 전달 영역을 구비한 키메라 항원 수용체 (CAR) 인 것을 특징으로 하는 상기 [1] ~ [5] 중 어느 하나에 기재된 면역 담당 세포.
- [0016] [7] CAR 에 있어서의 1 본쇄 항체가 이하의 어느 것인, 상기 [6] 에 기재된 면역 담당 세포.
- [0017] (1-1) 서열 번호 13 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 CDR1, 서열 번호 14 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 CDR2, 및 서열 번호 15 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 CDR3 을 포함하는 중사슬 가변 영역과, 서열 번호 16 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 CDR1, 서열 번호 17 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 CDR2, 및 서열 번호 18 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 CDR3 을 포함하는 경사슬 가변 영역을 포함하는 1 본쇄 항체 ;
- [0018] (2-1) 서열 번호 13 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 CDR1, 서열 번호 14 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 CDR2, 및 서열 번호 15 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 CDR3 을 포함하는 중사슬 가변 영역과, 서열 번호 19 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 CDR1, 서열 번호 17 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 CDR2, 및 서열 번호 18 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 CDR3 을 포함하는 경사슬 가변 영역을 포함하는 1 본쇄 항체 ;
- [0019] (3-1) 서열 번호 20 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 CDR1, 서열 번호 21 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 CDR2, 및 서열 번호 22 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 CDR3 을 포함하는 중사슬 가변 영역과, 서열 번호 23 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 CDR1, 서열 번호 24 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 CDR2, 및 서열 번호 25 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 CDR3 을 포함하는 경사슬 가변 영역을 포함하는 1 본쇄 항체 ;
- [0020] [8] CAR 에 있어서의 1 본쇄 항체가 이하의 어느 것인, 상기 [6] 또는 [7] 에 기재된 면역 담당 세포.
- [0021] (1-2) 서열 번호 1 에 나타내는 아미노산 서열과 85 % 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 가변 영역과, 서열 번호 2 에 나타내는 아미노산 서열과 85 % 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 가변 영역을 포함하는 1 본쇄 항체 ;
- [0022] (2-2) 서열 번호 3 에 나타내는 아미노산 서열과 85 % 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 가변 영역과, 서열 번호 4 에 나타내는 아미노산 서열과 85 % 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 가변 영역을 포함하는 1 본쇄 항체 ;
- [0023] (3-2) 서열 번호 5 에 나타내는 아미노산 서열과 85 % 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 가변 영역과, 서열 번호 6 에 나타내는 아미노산 서열과 85 % 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 가변 영역을 포함하는 1 본쇄 항체 ;
- [0024] (4-2) 서열 번호 1 에 나타내는 아미노산 서열과 85 % 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 가변 영역과, 서열 번호 4 에 나타내는 아미노산 서열과 85 % 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 가변 영역을 포함하는 1 본쇄 항체 ;
- [0025] (5-2) 서열 번호 3 에 나타내는 아미노산 서열과 85 % 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 가변 영역과, 서열 번호 2 에 나타내는 아미노산 서열과 85 % 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서

열로 이루어지는 경사슬 가변 영역을 포함하는 1 본쇄 항체 ;

- [0026] [9] CAR 에 있어서의 1 본쇄 항체가 이하의 어느 것인, 상기 [6] ~ [8] 중 어느 하나에 기재된 면역 담당 세포.
- [0027] (1-3) 서열 번호 1 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 가변 영역과, 서열 번호 2 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 가변 영역을 포함하는 1 본쇄 항체 ;
- [0028] (2-3) 서열 번호 3 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 가변 영역과, 서열 번호 4 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 가변 영역을 포함하는 1 본쇄 항체 ;
- [0029] (3-3) 서열 번호 5 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 가변 영역과, 서열 번호 6 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 가변 영역을 포함하는 1 본쇄 항체 ;
- [0030] (4-3) 서열 번호 1 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 가변 영역과, 서열 번호 4 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 가변 영역을 포함하는 1 본쇄 항체 ;
- [0031] (5-3) 서열 번호 3 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 가변 영역과, 서열 번호 2 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 가변 영역을 포함하는 1 본쇄 항체 ;
- [0032] [10] CAR 에 있어서의 세포막 관통 영역이, 서열 번호 7 에 나타내는 아미노산 서열과 85 % 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 상기 [6] ~ [9] 중 어느 하나에 기재된 면역 담당 세포.
- [0033] [11] CAR 에 있어서의 면역 담당 세포의 활성화를 유도하는 시그널 전달 영역이, 서열 번호 8, 9 및 10 에 나타내는 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 상기 [6] ~ [10] 중 어느 하나에 기재된 면역 담당 세포.
- [0034] [12] 중사슬 가변 영역과 경사슬 가변 영역이 2 ~ 30 개의 아미노산 서열로 이루어지는 펩티드 링커를 개재하여 결합하고 있는 것을 특징으로 하는, 상기 [7] ~ [11] 중 어느 하나에 기재된 면역 담당 세포.
- [0035] [13] 펩티드 링커가 서열 번호 26 또는 서열 번호 27 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 것을 특징으로 하는 상기 [12] 에 기재된 면역 담당 세포.
- [0036] [14] CAR 에 있어서의 1 본쇄 항체가 이하의 어느 것인, 상기 [6] ~ [13] 중 어느 하나에 기재된 면역 담당 세포.
- [0037] (1-4) 서열 번호 1 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 가변 영역, 서열 번호 26 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 펩티드 링커, 및 서열 번호 2 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 가변 영역을 순차 포함하는 1 본쇄 항체 ;
- [0038] (2-4) 서열 번호 3 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 가변 영역, 서열 번호 26 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 펩티드 링커, 및 서열 번호 4 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 가변 영역을 순차 포함하는 1 본쇄 항체 ;
- [0039] (3-4) 서열 번호 2 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 가변 영역, 서열 번호 26 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 펩티드 링커, 및 서열 번호 1 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 가변 영역을 순차 포함하는 1 본쇄 항체 ;
- [0040] (4-4) 서열 번호 1 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 가변 영역, 서열 번호 27 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 펩티드 링커, 및 서열 번호 2 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 가변 영역을 순차 포함하는 1 본쇄 항체 ;
- [0041] (5-4) 서열 번호 2 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 가변 영역, 서열 번호 27 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 펩티드 링커, 및 서열 번호 1 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 가변 영역을 순차 포함하는 1 본쇄 항체 ;
- [0042] (6-4) 서열 번호 5 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 가변 영역, 서열 번호 26 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 펩티드 링커, 및 서열 번호 6 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 가변 영역을 순차 포함하는 1 본쇄 항체 ;
- [0043] (7-4) 서열 번호 6 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 가변 영역, 서열 번호 26 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 가변 영역, 및 서열 번호 27 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 펩티드 링커를 포함하는 1 본쇄 항체 ;

노산 서열로 이루어지는 펩티드 링커, 및 서열 번호 5 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 가변 영역을 순차 포함하는 1 본쇄 항체 ;

- [0044] (8-4) 서열 번호 5 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 가변 영역, 서열 번호 27 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 펩티드 링커, 및 서열 번호 6 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 가변 영역을 순차 포함하는 1 본쇄 항체 ;
- [0045] (9-4) 서열 번호 6 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 가변 영역, 서열 번호 27 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 펩티드 링커, 및 서열 번호 5 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 가변 영역을 순차 포함하는 1 본쇄 항체 ;
- [0046] [15] CAR 에 있어서의 면역 담당 세포의 활성화를 유도하는 시그널 전달 영역이, CD28 의 세포 내 영역의 폴리펩티드, 4-1BB 의 세포 내 영역의 폴리펩티드, 및 CD3 ζ 의 세포 내 영역의 폴리펩티드를 포함하는 것을 특징으로 하는 상기 [6] ~ [14] 중 어느 하나에 기재된 면역 담당 세포.
- [0047] [16] 면역 담당 세포가 T 세포인 것을 특징으로 하는 상기 [1] ~ [15] 중 어느 하나에 기재된 면역 담당 세포.
- [0048] [17] 면역 담당 세포가 인간 유래 또는 인간으로부터 분리된 T 세포인 것을 특징으로 하는 상기 [1] ~ [16] 중 어느 하나에 기재된 면역 담당 세포.
- [0049] [18] 상기 [1] ~ [17] 중 어느 하나에 기재된 면역 담당 세포와 약학적으로 허용되는 첨가제를 함유하는 의약 조성물.
- [0050] [19] 암의 치료에 사용하기 위한, 상기 [18] 에 기재된 의약 조성물.
- [0051] [20] 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 세포 표면 분자를 코드하는 핵산, IL-7 을 코드하는 핵산, 및 CCL19 를 코드하는 핵산을 함유하는 발현 벡터.
- [0052] [21] 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 세포 표면 분자를 코드하는 핵산, IL-7 을 코드하는 핵산, 및 CCL19 를 코드하는 핵산을 면역 담당 세포에 도입하는 것을 특징으로 하는, 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 세포 표면 분자, IL-7 및 CCL19 를 발현하는 면역 담당 세포의 제조 방법.

발명의 효과

- [0053] 본 발명의 면역 담당 세포는, 인간 메소텔린을 발현하는 암세포 상해 활성을 갖고, 인간 메소텔린을 발현하는 종양 형성을 억제하는 것이 가능해진다. 또, 본 발명의 면역 담당 세포는, 암세포의 재발 억제 효과도 갖는다.

도면의 간단한 설명

- [0054] 도 1 은, 실시예 1 에 있어서, 제조한 9 종류의 항인간 메소텔린 scFv 의 배치 (a) 및 아미노산 서열 (b) 를 나타내는 도면이다.
 도 2 는, 실시예 2 에 있어서, 항인간 메소텔린 CAR-IL-7/CCL19 발현 T 세포에 있어서의 CAR 의 발현을 조사한 결과를 나타내는 도면이다. (a) 는 CAR, IL-7 및 CCL19 비발현-T 세포 (비감염 (Non-infection)), (b) ~ (d) 는 각각 scFv 영역으로서 VH07(15)VL07 (시그널 펩티드 T), VH07(15)VL07 (시그널 펩티드 P), VH36(15)VL36 을 갖는 항인간 메소텔린 CAR-IL-7/CCL19 발현 T 세포의 결과이다.
 도 3 은, 실시예 2 에 있어서, 항인간 메소텔린 CAR-IL-7/CCL19 발현 T 세포에 있어서의 CAR 의 발현을 조사한 결과를 나타내는 도면이다. (a) 는 CAR, IL-7 및 CCL19 비발현-T 세포 (비감염), (b) ~ (e) 는 각각 scFv 영역으로서 VH07(15)VL07, VL07(15)VH07, VH07(25)VL07, VL07(25)VH07 을 갖는 항인간 메소텔린 CAR-IL-7/CCL19 발현 T 세포의 결과이다.
 도 4 는, 실시예 3 에 있어서, 종양 세포주에 있어서의 메소텔린의 발현 레벨을 플로우 사이토메트리에 의해 확인한 도면이다.
 도 5 는, 실시예 4 에 있어서, 항인간 메소텔린 CAR-IL-7/CCL19 발현 T 세포와, 메소텔린 양성 종양 세포주 또는 메소텔린 음성 종양 세포주의 공배양 시험의 설명도이다.
 도 6a 는, 실시예 4 에 있어서, 잔존하고 있는 종양 세포주 ACC-MESO-1 의 플로우 사이토메트리에서의 측정 결

과를 나타내는 도면이다.

도 6b 는, 실시예 4 에 있어서, 잔존하고 있는 종양 세포주 NCI-H2052 의 플로우 사이토메트리에서의 측정 결과를 나타내는 도면이다.

도 6c 는, 실시예 4 에 있어서, 잔존하고 있는 종양 세포주 A498 의 플로우 사이토메트리에서의 측정 결과를 나타내는 도면이다.

도 7a 는, 실시예 4 에 있어서, 항인간 메소텔린 CAR-IL-7/CCL19 발현 T 세포와 메소텔린 양성 종양 세포주 ACC-MESO-1 의 공배양 후의 산생된 IFN- γ 의 측정 결과를 나타내는 도면이다.

도 7b 는, 실시예 4 에 있어서, 항인간 메소텔린 CAR-IL-7/CCL19 발현 T 세포와 메소텔린 양성 종양 세포주 NCI-H2052 의 공배양 후의 산생된 IFN- γ 의 측정 결과를 나타내는 도면이다.

도 7c 는, 실시예 4 에 있어서, 항인간 메소텔린 CAR-IL-7/CCL19 발현 T 세포와 메소텔린 음성 종양 세포주 A498 의 공배양 후의 산생된 IFN- γ 의 측정 결과를 나타내는 도면이다.

도 8 은, 실시예 5 에 있어서, 잔존하고 있는 백혈구 (Lymphocyte number) 또는 PAN02 종양 세포주의 플로우 사이토메트리에서의 측정 결과를 나타내는 도면이다.

도 9 는, 실시예 5 에 있어서, 항메소텔린 CAR-IL-7/CCL19 발현 T 세포와 PAN02 종양 세포주의 공배양 후의 산생된 IFN- γ 의 측정 결과를 나타내는 도면이다.

도 10 은, 실시예 6 에 있어서 종양 모델 마우스에 대한 메소텔린 CAR-마우스 IL-7/마우스 CCL19 발현 마우스 T 세포의 투여에 의한 생존율의 결과를 나타내는 도면이다.

도 11 은, 실시예 6 에 있어서 종양 모델 마우스에 대한 메소텔린 CAR-마우스 IL-7/마우스 CCL19 발현 마우스 T 세포의 투여에 의한 종양의 체적의 측정 결과를 나타내는 도면이다.

도 12a 는, 실시예 7 에 있어서, ACC-MESO-1-GFP-Luc 를 투여한 날을 제 1 일로 하여, 제 1 일, 제 3일, 제 7 일, 제 10 일, 제 14 일, 제 21 일, 제 31 일, 제 38 일의 마우스를 노광 시간 30 초로 촬영한 결과를 나타내는 도면이다.

도 12b 는, 실시예 7 에 있어서, ACC-MESO-1-GFP-Luc 를 투여한 날을 제 1 일로 하여, 제 45 일, 제 59 일, 제 73 일, 제 87 일, 제 101 일, 제 115 일, 제 129 일, 제 143 일의 마우스를 노광 시간 30 초로 촬영한 결과를 나타내는 도면이다. 제 129 일의 왼쪽에서 2 번째의 개체는 사망했기 때문에 사진을 생략한다.

도 13 은, 실시예 7 에 있어서, 투여로부터의 일수와 마우스의 생존율의 관계를 나타낸 그래프이다.

도 14 는, 실시예 7 에 있어서, 투여로부터의 일수와 토탈 형광량의 관계를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0055] 본 발명의 면역 담당 세포는, 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 세포 표면 분자, IL-7 및 CCL19 를 발현하는 면역 담당 세포이면 되지만, 외래의 세포 표면 분자를 코드하는 핵산, 외래의 IL-7 을 코드하는 핵산, 및 외래의 CCL19 를 코드하는 핵산을 함유하는 면역 담당 세포인 것이 바람직하고, 이러한 면역 담당 세포에 의해, 인간 메소텔린을 발현하는 암세포에 의한 종양 형성을 억제하는 것이 가능해진다.

[0056] (인간 메소텔린)

[0057] 인간 메소텔린은, 40 kDa 의 단백질이고, 정상 세포에서는 거의 발현하고 있지 않고, 종피종, 췌장암 등의 암세포에 고발현하고 있다. 인간 메소텔린의 서열 정보는, 공지된 문헌이나 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>) 등의 데이터베이스를 검색하여 적절히 입수할 수 있다. 예를 들어, 인간 메소텔린의 아미노산 서열 정보로는, Genbank 액세스 번호 NP_037536.2, AAV87530.1 이나, 이들의 아이소폼 등을 들 수 있다.

[0058] (세포 표면 분자)

[0059] 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 세포 표면 분자로는, 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 CAR, 인간 메소텔린 유래의 펩티드를 특이적으로 인식하는 T 세포 수용체 (T cell receptor : TCR), 인간 메소텔린에 특이적으로 결합하는 단백질 혹은 핵산 등의, 세포 표면에 발현함으로써 인간 메소텔린에 대해 특이적인 식별능을 부

여하는 분자 또는 인자를 들 수 있다. 또한, CAR 이란, 암세포의 세포 표면 항원을 인식하는 1 본쇄 항체 (single chain Fv : scFv) 와, T 세포의 활성화를 유도하는 시그널 전달 영역을 융합시킨 인공적인 키메라 단백질이다.

[0060] 상기 세포 표면 분자는, 시그널 펩티드 (리더 서열) 에 의해 면역 담당 세포의 세포 표면에 국제되어 있는 것이 바람직하다. 시그널 펩티드로는, 면역 글로블린 중사슬, 이뮤노글로블린 경사슬, CD8, T 세포 수용체의 α , β 사슬, CD3 ζ , CD28, CD3 ϵ , CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, ICOS, CD154, GITR 유래의 시그널 펩티드 (리더 서열) 의 폴리펩티드를 들 수 있다. 구체적으로는, 서열 번호 11 또는 12 에 나타내는 아미노산 서열에 있어서, 85 % 이상, 바람직하게는 90 % 이상, 보다 바람직하게는 95 % 이상, 더욱 바람직하게는 98 % 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지고, 서열 번호 11 또는 12 와 동등한 작용을 갖는 폴리펩티드나, 서열 번호 11 또는 12 에 나타내는 아미노산 서열에 있어서, 1 또는 복수개의 아미노산이 결실, 치환, 삽입, 및/또는 부가된 아미노산 서열로 이루어지고, 서열 번호 11 또는 12 에 나타내는 아미노산 서열과 동등한 작용을 갖는 폴리펩티드를 들 수 있다. 또한, 시그널 펩티드는, 국제화가 완료된 성숙 단백질에서는 제거되어 있다.

[0061] 본 명세서에 있어서, 「1 혹은 몇 개의 아미노산 잔기가 결실, 치환, 삽입, 및/또는 부가된 아미노산 서열」 이란, 예를 들어 1 ~ 30 개의 범위 내, 바람직하게는 1 ~ 20 개의 범위 내, 보다 바람직하게는 1 ~ 15 개의 범위 내, 더욱 바람직하게는 1 ~ 10 개의 범위 내, 더욱 바람직하게는 1 ~ 5 개의 범위 내, 더욱 바람직하게는 1 ~ 3 개의 범위 내, 더욱 바람직하게는 1 ~ 2 개의 범위 내의 수의 아미노산 잔기가 결실, 치환, 삽입, 및/또는 부가된 아미노산 서열도 포함한다. 이들 아미노산 잔기의 변이 처리는, 화학 합성, 유전자 공학적 수법, 돌연 변이 유발 등의 당업자에게 이미 알려진 임의의 방법에 의해 실시할 수 있다.

[0062] 본 명세서에 있어서, 용어 「동일성」 은, 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 서열 근사성의 정도 (이것은, 쿼리 서열과 다른 바람직하게는 동일한 형태의 서열 (핵산 혹은 단백질 서열) 의 매칭에 의해 결정된다) 를 의미한다. 「동일성」 을 계산 및 결정하는 바람직한 컴퓨터 프로그램으로는, 예를 들어, GCG BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul et al., J. Mol. Biol. 1990, 215 : 403 - 410 ; Altschul et al., Nucleic Acids Res. 1997, 25 : 3389 - 3402 ; Devereux et al., Nucleic Acid Res.1984, 12 : 387), 그리고 BLASTN 2.0 (Gish W., <http://blast.Wustl.edu>, 1996 - 2002), 그리고 FASTA (Pearson 및 Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988, 85 : 2444 - 2448), 그리고 가장 길게 중복된 1 쌍의 콘티그를 결정 및 얼라인먼트하는 GCG GelMerge (Wibur 및 Lipman, SIAM J. Appl. Math. 1984, 44 : 557 - 567 ; Needleman 및 Wunsch, J. Mol. Biol. 1970, 48 : 443 - 453) 를 들 수 있다.

[0063] (인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 1 본쇄 항체)

[0064] 세포 표면 분자가 CAR 인 경우에는, 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 분자로서 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 1 본쇄 항체 (scFv) 를 함유하고 있는 것이 바람직하다. 이러한 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 1 본쇄 항체에 있어서는, 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 항체의 중사슬 가변 영역 (VH) 및 경사슬 가변 영역 (VL) 이, 상기 중사슬 가변 영역 및 상기 경사슬 가변 영역을 연결하기 위한 펩티드 링커에 의해 결합되어 있으면 된다. 이러한 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 1 본쇄 항체에 있어서의 중사슬 가변 영역과 경사슬 가변 영역의 조합으로는, 예를 들어, 이하의 조합을 들 수 있다. 또한, 중사슬 가변 영역에 대해 경사슬 가변 영역이 상류 (N 말단측) 에 위치해도 되고 하류 (C 말단측) 에 위치해도 된다.

[0065] (1-1) 서열 번호 13 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 CDR (complementarity determining region) 1, 서열 번호 14 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 CDR2, 및 서열 번호 15 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 CDR3 을 포함하는 중사슬 가변 영역과, 서열 번호 16 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 CDR1, 서열 번호 17 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 CDR2, 및 서열 번호 18 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 CDR3 을 포함하는 경사슬 가변 영역의 조합 ;

[0066] (2-1) 서열 번호 13 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 CDR1, 서열 번호 14 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 CDR2, 및 서열 번호 15 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 CDR3 을 포함하는 중사슬 가변 영역과, 서열 번호 19 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 CDR1, 서열 번호 17 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 CDR2, 및 서열 번호 18 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 CDR3 을 포함하는 경사슬 가변 영역의 조합 ;

[0067] (3-1) 서열 번호 20 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 CDR1, 서열 번호 21 에 나타내는 아미노산

서열로 이루어지는 중사슬 CDR2, 및 서열 번호 22 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 CDR3 을 포함하는 중사슬 가변 영역과, 서열 번호 23 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 CDR1, 서열 번호 24 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 CDR2, 및 서열 번호 25 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 CDR3 을 포함하는 경사슬 가변 영역의 조합 ;

[0068] 이 밖에, 예를 들어 이하의 문헌 (미국 특허 제8,357,783호, 일본 공표특허공보 2017-518053) 등에 기재된 공지된 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 항체의 중사슬 가변 영역 및 경사슬 가변 영역의 아미노산 서열에 기초하여, IMGT, Kabat, Chothia, North, 또는 Contact 등의 번호 부여 시스템에 기초하여 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 중사슬 가변 영역 및 경사슬 가변 영역의 CDR 을 특정하고, 이러한 CDR 을 구비한 중사슬 가변 영역과 경사슬 가변 영역의 조합도 들 수 있다. 또한, CDR 은, 이하의 AbodyBuilder 웹 사이트 (<http://opig.stats.ox.ac.uk/webapps/sabdab-sabpred/Modelling.php>) 에 의해 특정할 수 있다.

[0069] 또, 상기 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 1 본쇄 항체에 있어서의 중사슬 가변 영역과 경사슬 가변 영역의 조합으로서, 이하의 조합도 들 수 있다.

[0070] (1-2) 서열 번호 1 에 나타내는 아미노산 서열과 85 % 이상, 바람직하게는 90 % 이상, 보다 바람직하게는 95 % 이상, 더욱 바람직하게는 98 % 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 가변 영역과, 서열 번호 2 에 나타내는 아미노산 서열과 85 % 이상, 바람직하게는 90 % 이상, 보다 바람직하게는 95 % 이상, 더욱 바람직하게는 98 % 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 가변 영역의 조합 ;

[0071] (2-2) 서열 번호 3 에 나타내는 아미노산 서열과 85 % 이상, 바람직하게는 90 % 이상, 보다 바람직하게는 95 % 이상, 더욱 바람직하게는 98 % 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 가변 영역과, 서열 번호 4 에 나타내는 아미노산 서열과 85 % 이상, 바람직하게는 90 % 이상, 보다 바람직하게는 95 % 이상, 더욱 바람직하게는 98 % 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 가변 영역의 조합 ;

[0072] (3-2) 서열 번호 5 에 나타내는 아미노산 서열과 85 % 이상, 바람직하게는 90 % 이상, 보다 바람직하게는 95 % 이상, 더욱 바람직하게는 98 % 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 가변 영역과, 서열 번호 6 에 나타내는 아미노산 서열과 85 % 이상, 바람직하게는 90 % 이상, 보다 바람직하게는 95 % 이상, 더욱 바람직하게는 98 % 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 가변 영역의 조합 ;

[0073] (4-2) 서열 번호 1 에 나타내는 아미노산 서열과 85 % 이상, 바람직하게는 90 % 이상, 보다 바람직하게는 95 % 이상, 더욱 바람직하게는 98 % 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 가변 영역과, 서열 번호 4 에 나타내는 아미노산 서열과 85 % 이상, 바람직하게는 90 % 이상, 보다 바람직하게는 95 % 이상, 더욱 바람직하게는 98 % 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 가변 영역의 조합 ;

[0074] (5-2) 서열 번호 3 에 나타내는 아미노산 서열과 85 % 이상, 바람직하게는 90 % 이상, 보다 바람직하게는 95 % 이상, 더욱 바람직하게는 98 % 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 가변 영역과, 서열 번호 2 에 나타내는 아미노산 서열과 85 % 이상, 바람직하게는 90 % 이상, 보다 바람직하게는 95 % 이상, 더욱 바람직하게는 98 % 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 가변 영역의 조합 ;

[0075] 이 밖에, 예를 들어 이하의 문헌 (미국 특허 제8,357,783호, 일본 공표특허공보 2017-518053) 등에 기재된 공지된 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 항체의 중사슬 가변 영역과 85 % 이상, 바람직하게는 90 % 이상, 보다 바람직하게는 95 % 이상, 더욱 바람직하게는 98 % 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 가변 영역과, 상기 공지된 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 항체의 경사슬 가변 영역과 85 % 이상, 바람직하게는 90 % 이상, 보다 바람직하게는 95 % 이상, 더욱 바람직하게는 98 % 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 가변 영역의 조합이어도 된다.

[0076] 또한 상기 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 1 본쇄 항체에 있어서의 중사슬 가변 영역과 경사슬 가변 영역의 조합으로서, 이하의 조합도 들 수도 있다.

[0077] (1-3) 서열 번호 1 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 가변 영역과, 서열 번호 2 에 나타내는 아

미노산 서열로 이루어지는 경사슬 가변 영역의 조합 ;

- [0078] (2-3) 서열 번호 3 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 가변 영역과, 서열 번호 4 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 가변 영역의 조합 ;
- [0079] (3-3) 서열 번호 5 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 가변 영역과, 서열 번호 6 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 가변 영역의 조합 ;
- [0080] (4-3) 서열 번호 1 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 가변 영역과, 서열 번호 4 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 가변 영역의 조합 ;
- [0081] (5-3) 서열 번호 3 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 가변 영역과, 서열 번호 2 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 가변 영역의 조합 ;
- [0082] 이 밖에, 예를 들어 이하의 문헌 (미국 특허 제8,357,783호, 일본 공표특허공보 2017-518053) 등에 기재된 공지된 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 항체의 중사슬 가변 영역이나 경사슬 가변 영역의 조합이어도 된다.
- [0083] (펩티드 링커)
- [0084] 중사슬 가변 영역 및 경사슬 가변 영역은 펩티드 링커를 개재하여 결합하고 있다. 이러한 펩티드 링커의 길이는, 2 ~ 30, 바람직하게는 15 ~ 25 이고, 보다 바람직하게는 15, 또는 25 이다. 구체적으로는, 글리신-세린 연속 서열을 포함하는 서열 번호 26 또는 27 에 나타내는 아미노산 서열에 있어서, 85 % 이상, 바람직하게는 90 % 이상, 보다 바람직하게는 95 % 이상, 더욱 바람직하게는 98 % 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지고, 서열 번호 26 또는 27 과 동등한 작용을 갖는 폴리펩티드나, 서열 번호 26 또는 27 에 나타내는 아미노산 서열에 있어서, 1 또는 복수개의 아미노산이 결실, 치환, 삽입, 및/또는 부가된 아미노산 서열로 이루어지고, 서열 번호 26 또는 27 에 나타내는 아미노산 서열과 동등한 작용을 갖는 폴리펩티드를 바람직하게 들 수 있다.
- [0085] 상기 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 1 본쇄 항체에 있어서의 중사슬 가변 영역과 경사슬 가변 영역, 및 펩티드 링커의 조합으로서, 이하의 조합을 들 수도 있다. 또한, 이하의 「순차」란, N 말단측으로부터 순서대로라는 의미이다.
- [0086] (1-4) 서열 번호 1 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 가변 영역, 서열 번호 26 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 펩티드 링커, 및 서열 번호 2 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 가변 영역을 순차 포함하는 조합 ;
- [0087] (2-4) 서열 번호 3 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 가변 영역, 서열 번호 26 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 펩티드 링커, 및 서열 번호 4 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 가변 영역을 순차 포함하는 조합 ;
- [0088] (3-4) 서열 번호 2 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 가변 영역, 서열 번호 26 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 펩티드 링커, 및 서열 번호 1 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 가변 영역을 순차 포함하는 조합 ;
- [0089] (4-4) 서열 번호 1 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 가변 영역, 서열 번호 27 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 펩티드 링커, 및 서열 번호 2 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 가변 영역을 순차 포함하는 조합 ;
- [0090] (5-4) 서열 번호 2 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 가변 영역, 서열 번호 27 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 펩티드 링커, 및 서열 번호 1 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 가변 영역을 순차 포함하는 조합 ;
- [0091] (6-4) 서열 번호 5 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 가변 영역, 서열 번호 26 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 펩티드 링커, 및 서열 번호 6 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 가변 영역을 순차 포함하는 조합 ;
- [0092] (7-4) 서열 번호 6 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 가변 영역, 서열 번호 26 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 펩티드 링커, 및 서열 번호 5 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 가변 영역을 순차 포함하는 조합 ;

- [0093] (8-4) 서열 번호 5 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 가변 영역, 서열 번호 27 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 펩티드 링커, 및 서열 번호 6 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 가변 영역을 순차 포함하는 조합 ;
- [0094] (9-4) 서열 번호 6 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 가변 영역, 서열 번호 27 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 펩티드 링커, 및 서열 번호 5 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 가변 영역을 순차 포함하는 조합 ;
- [0095] (IL-7, CCL19)
- [0096] 상기 IL-7 은 T 세포의 생존에 필수인 사이토카인이고, 골수, 흉선, 림프 기관·조직의 스트로마 세포 등의 비조혈 세포에 의해 생성된다. 한편, T 세포 자체의 산생 능력은 거의 관찰되지 않는다.
- [0097] 또, 상기 CCL19 는 주로 림프절의 수상(樹狀) 세포나 매크로파지로부터 생성되고, 그 수용체인 CCR7 을 개재하여 T 세포나 B 세포, 성숙한 수상 세포의 유주(遊走) 를 야기하는 기능을 갖는다.
- [0098] IL-7 및 CCL19 가 유래하는 생물은, 특별히 한정되지 않지만, 인간인 것이 바람직하다. 또한, 이들 단백질의 아미노산 서열은, GenBank 등의 공지된 서열 데이터베이스로부터 입수 가능하다. 예를 들어, 인간 IL-7 의 아미노산 서열의 예로는, GenBank 액세스 번호 : NM_000880.3 (서열 번호 28) 으로서 등록된 서열이나, 이들의 아이소폼 등을 들 수 있다. 또, 인간 CCL19 의 아미노산 서열의 예로는, GenBank 액세스 번호 : NM_006274.2 (서열 번호 29) 로서 등록된 서열이나, 이들의 아이소폼 등을 들 수 있다. 또한, IL-7 및 CCL19 는, 시그널 펩티드를 가져도 되지만, 성숙 단백질에서는, 시그널 펩티드는 제거된다. 예를 들어, 서열 번호 28 에 기재된 인간 IL-7 의 아미노산 서열에 있어서, 1 ~ 25 위치의 서열은 시그널 펩티드에 해당한다. 또, 예를 들어, 서열 번호 29 에 기재된 인간 CCL19 의 아미노산 서열에 있어서, 1 ~ 21 위치의 서열은 시그널 펩티드에 해당한다.
- [0099] 또, IL-7 및 CCL19 는, 상기와 같은 천연 단백질의 변이체이어도 된다. IL-7 의 변이체의 예로는, 서열 번호 28 에 기재된 인간 IL-7 의 아미노산 서열에 있어서, 85 % 이상, 바람직하게는 90 % 이상, 보다 바람직하게는 95 % 이상, 더욱 바람직하게는 98 % 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지고, IL-7 에 있어서의 세포 증식률 또는 세포 생존율의 향진 작용을 갖는 폴리펩티드나, 서열 번호 28 에 기재된 인간 IL-7 의 아미노산 서열에 있어서, 1 또는 복수개의 아미노산이 결실, 치환, 삽입, 및/또는 부가된 아미노산 서열로 이루어지고, IL-7 에 있어서의 세포 증식률 또는 세포 생존율의 향진 작용을 갖는 폴리펩티드를 들 수 있다. 인간 CCL19 의 변이체의 예로는, 서열 번호 29 에 기재된 인간 CCL19 의 아미노산 서열에 있어서, 85 % 이상, 바람직하게는 90 % 이상, 보다 바람직하게는 95 % 이상, 더욱 바람직하게는 98 % 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지고, CCL19 에 있어서의 세포의 유주 작용을 갖는 폴리펩티드나, 서열 번호 29 에 기재된 인간 CCL19 의 아미노산 서열에 있어서, 1 또는 복수개의 아미노산이 결실, 치환, 삽입, 및/또는 부가된 아미노산 서열로 이루어지고, CCL19 에 있어서의 세포의 유주 작용을 갖는 폴리펩티드를 들 수 있다.
- [0100] (다른 면역 기능 제어 인자)
- [0101] 본 발명의 면역 담당 세포는, 추가로, IL-15, CCL21, IL-2, IL-4, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18, IP-10, Interferon- γ , MIP-1 α , GM-CSF, M-CSF, TGF-beta, TNF-alpha 등의 다른 면역 기능 제어 인자를 발현하고 있어도 되지만, 상기 다른 면역 제어 인자로는, IL-12 이외의 면역 기능 제어 인자인 것이 바람직하다.
- [0102] (세포막 관통 영역)
- [0103] 본 발명에 있어서의 세포막 관통 영역으로는, CD8, T 세포 수용체의 α , β 사슬, CD3 ζ , CD28, CD3 ϵ , CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, ICOS, CD154, GITR 유래의 세포막 관통 영역의 폴리펩티드를 들 수 있고, 서열 번호 7 에 나타내는 인간 CD8 세포막 관통 영역의 아미노산 서열과 85 % 이상, 바람직하게는 90 % 이상, 보다 바람직하게는 95 % 이상, 더욱 바람직하게는 98 % 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 서열 번호 7 에 나타내는 아미노산 서열과 동등한 작용을 갖는 폴리펩티드나, 서열 번호 7 에 나타내는 아미노산 서열에 있어서, 1 또는 복수개의 아미노산이 결실, 치환, 삽입, 및/또는 부가된 아미노산 서열로 이루어지고, 서열 번호 7 에 나타내는 아미노산 서열과 동등한 작용을 갖는 폴리펩티드를 바람직하게 들 수 있다. 이러한 세포막 관통 영역에 의해, CAR 이 T 세포의 세포막에 고정된다.
- [0104] 상기 세포막 관통 영역에는, 임의의 올리고 펩티드 또는 폴리펩티드로 이루어지고, 길이가 1 ~ 100 아미노산,

바람직하게는 10 ~ 70 아미노산인 힌지 영역을 포함해도 된다. 힌지 영역으로는, 인간 CD8 의 힌지 영역을 들 수 있다.

[0105] (면역 담당 세포 활성화 시그널 전달 영역)

[0106] 면역 담당 세포 활성화 시그널 전달 영역은, 상기 세포 표면 분자가 메소텔린을 인식했을 때, 세포 내에 시그널 전달하는 것이 가능한 영역이고, CD28, 4-1BB(CD137), GITR, CD27, OX40, HVEM, CD3 ζ , 또는 Fc Receptor-associated γ chain 의 세포 내 영역의 폴리펩티드에서 선택되는 적어도 1 종 또는 2 종 이상을 포함하는 것이 바람직하고, CD28 의 세포 내 영역의 폴리펩티드, 4-1BB 의 세포 내 영역의 폴리펩티드, 및 CD3 ζ 의 세포 내 영역의 폴리펩티드의 3 종의 폴리펩티드를 포함하는 것이 보다 바람직하다. CD28 의 세포 내 영역의 아미노산 서열로는, 서열 번호 8 에 나타내는 아미노산 서열과 85 % 이상, 바람직하게는 90 % 이상, 보다 바람직하게는 95 % 이상, 더욱 바람직하게는 98 % 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 서열 번호 8 에 나타내는 아미노산 서열과 동등한 작용을 갖는 폴리펩티드나, 서열 번호 8 에 나타내는 아미노산 서열에 있어서, 1 또는 복수개의 아미노산이 결실, 치환, 삽입, 및/또는 부가된 아미노산 서열로 이루어지고, 서열 번호 8 에 나타내는 아미노산 서열과 동등한 작용을 갖는 폴리펩티드를 들 수 있다. 4-1BB 의 세포 내 영역의 아미노산 서열로는, 서열 번호 9 에 나타내는 아미노산 서열과 85 % 이상, 바람직하게는 90 % 이상, 보다 바람직하게는 95 % 이상, 더욱 바람직하게는 98 % 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 서열 번호 9 에 나타내는 아미노산 서열과 동등한 작용을 갖는 폴리펩티드나, 서열 번호 9 에 나타내는 아미노산 서열에 있어서, 1 또는 복수개의 아미노산이 결실, 치환, 삽입, 및/또는 부가된 아미노산 서열로 이루어지고, 서열 번호 9 에 나타내는 아미노산 서열과 동등한 작용을 갖는 폴리펩티드를 들 수 있다. CD3 ζ 의 세포 내 영역의 아미노산 서열로는, 서열 번호 10 에 나타내는 아미노산 서열과 85 % 이상, 바람직하게는 90 % 이상, 보다 바람직하게는 95 % 이상, 더욱 바람직하게는 98 % 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 서열 번호 10 에 나타내는 아미노산 서열과 동등한 작용을 갖는 폴리펩티드나, 서열 번호 10 에 나타내는 아미노산 서열에 있어서, 1 또는 복수개의 아미노산이 결실, 치환, 삽입, 및/또는 부가된 아미노산 서열로 이루어지고, 서열 번호 10 에 나타내는 아미노산 서열과 동등한 작용을 갖는 폴리펩티드를 들 수 있다. 또한, 면역 담당 세포로서 T 세포를 사용할 때에는, T 세포 내에 시그널 전달하는 것이 가능한 폴리펩티드를 선택하면 되고, 다른 면역 담당 세포를 사용할 때에도, 이러한 면역 담당 세포에 시그널 전달하는 것이 가능한 폴리펩티드를 선택하면 된다. 면역 담당 세포로서 T 세포를 사용하는 경우에 있어서의 면역 담당 세포 활성화 시그널 전달 영역으로는, 서열 번호 8, 9 및 10 에 나타내는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 들 수 있고, N 말단측으로부터 순서대로 서열 번호 8, 9 및 10 에 나타내는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 바람직하게 들 수 있다.

[0107] (세포 외 힌지 영역, 스페이서)

[0108] 또, 메소텔린을 인식하는 세포 표면 분자와 세포막 관통 영역 사이에는, 임의의 올리고 펩티드 또는 폴리펩티드로 이루어지는 세포 외 힌지 영역을 형성해도 된다. 세포 외 힌지 영역의 길이로는, 1 ~ 100 아미노산 잔기, 바람직하게는 10 ~ 70 아미노산 잔기를 들 수 있고, 이러한 세포 외 힌지 영역으로서, CD8, CD28, CD4 등 유래의 힌지 영역이나, 면역 글로블린의 힌지 영역을 들 수 있다.

[0109] 또한, 세포막 관통 영역과 면역 담당 세포 활성화 시그널 전달 영역 사이에는, 임의의 올리고 펩티드 또는 폴리펩티드로 이루어지는 스페이서 영역을 형성해도 된다. 스페이서 영역의 길이로는, 1 ~ 100 아미노산 잔기, 바람직하게는 10 ~ 50 아미노산 잔기를 들 수 있고, 이러한 스페이서 영역으로서, 글리신-세린 연속 서열을 들 수 있다.

[0110] (각 영역의 배치)

[0111] 상기 CAR 에 있어서, 상기의 각 영역은, N 말단으로부터, 1 본쇄 항체, 세포막 관통 영역, 면역 담당 세포 활성화 시그널 전달 영역의 순서대로 배치할 수 있다. 구체적으로는, N 말단측으로부터, 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 1 본쇄 항체, 인간 CD8 의 세포 외 힌지 영역, 인간 CD8 의 세포막 관통 영역, 인간 CD28 의 T 세포 활성화 시그널 전달 영역, 인간 4-1BB 의 T 세포 활성화 시그널 전달 영역, 및 인간 CD3 ζ 의 T 세포 활성화 시그널 전달 영역의 순서대로 배치된 CAR 을 들 수 있다.

[0112] (자살 유전자에 의해 발현하는 단백질)

[0113] 또, 본 발명의 면역 담당 세포는, 단순 헤르페스바이러스의 티미딘키나아제 (HSV-TK) 또는 유도성 카스파제 9 (inducible caspase 9) 등의 자신의 세포를 죽음에 이르게 하는 기능을 갖는 단백질 (자살 유전자에 의해 발현

하는 단백질) 을 발현해도 된다. 이들 자살 유전자에 기초하는 단백질이 발현함으로써 직접적으로, 혹은 이차적으로 세포 독성을 갖는 물질을 유도하여, 자신의 세포를 죽음에 이르게 하는 기능을 갖는 것이 가능해진다.

그 때문에, 예를 들어 암의 치료 경과에 따라, 종양이 소실되었을 경우에 상기의 기능을 활성화시키는 약제를 투여하여, 생체 내에 있는 본 발명의 면역 담당 세포를 제어할 수 있다. 즉, 필요에 따라, 본 발명의 면역 담당 세포에 있어서의 사이토카인 방출 증후군이 될 리스크를 확실하게 저감시키는 것이 가능해진다.

[0114] 단순 헤르페스바이러스의 티미딘키나아제 (HSV-TK) 또는 유도성 카스파제 9 (inducible caspase 9) 의 기능을 활성화시키는 약제로는, 전자에 대해서는 간시클로비르, 후자에 대해서는 2 량체 유도 화합물 (chemical induction of dimerization : CID) 인 AP1903 을 들 수 있다 (Cooper LJ., et. al. Cytotherapy. 2006 ; 8(2) : 105 - 17., Jensen M. C. et. al. Biol Blood Marrow Transplant. 2010 Sep ; 16(9) : 1245-56., Jones BS. Front Pharmacol. 2014 Nov 27 ; 5 : 254., Minagawa K., Pharmaceuticals (Basel). 2015 May 8 ; 8(2) : 230 - 49., Bole-Richard E., Front Pharmacol. 2015 Aug 25 ; 6 : 174).

[0115] (면역 담당 세포에 있어서의 세포의 종류)

[0116] 상기 면역 담당 세포에 있어서의 세포의 종류로는, 면역 응답에 관여하고, 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 세포 표면 분자를 코딩하는 핵산, IL-7 을 코딩하는 핵산, 및 CCL19 를 코딩하는 핵산을 도입함으로써 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 세포 표면 분자, IL-7 및 CCL19 를 발현할 수 있는 세포이면 특별히 제한되지 않지만, 생체로부터 분리된 면역 담당 세포인 것이 바람직하고, T 세포, 내추럴 킬러 세포 (NK 세포), B 세포 등의 림프구계 세포나, 단구, 매크로파지, 수상 세포 등의 항원 제시 세포나, 호중구, 호산구, 호염기구, 비만 세포 등의 과립구로서 생체로부터 분리된 것을 들 수 있다. 구체적으로는, 인간, 개, 고양이, 돼지, 마우스 등의 포유 동물 유래 또는 포유 동물로부터 분리된 T 세포, 바람직하게는 인간 유래 또는 인간으로부터 분리된 T 세포를 바람직하게 들 수 있다. 또한, 인간, 개, 고양이, 돼지, 마우스 등의 포유 동물 유래의 T 세포에는, 인간, 개, 고양이, 돼지, 마우스 등의 포유 동물로부터 분리 (채취) 된 T 세포를 인위적으로 생체 외에서 배양한 T 세포, 또는 당해 T 세포로부터 계대 배양된 T 세포가 포함된다. 또, 상기 분리된 T 세포로는, T 세포를 주로 포함하는 세포 집단이어도 되고, T 세포 이외에 다른 세포도 포함하고 있어도 되지만, 50 % 이상, 바람직하게는 60 % 이상, 보다 바람직하게는 70 % 이상, 더욱 바람직하게는 80 % 이상, 가장 바람직하게는 90 % 의 비율로 T 세포를 포함하고 있는 것이 바람직하다. 또, T 세포는, 혈액, 골수액 등의 체액이나, 비장, 흉선, 림프절 등의 조직, 혹은 원발 종양, 전이성 종양, 암성 복수 등의 암 조직에 침윤하는 면역 세포로부터 면역 담당 세포를 포함하는 세포 집단을 분리하여 얻을 수 있다. 상기 세포 집단에 포함되는 T 세포의 비율을 높이기 위해, 분리한 상기 세포 집단을, 필요에 따라 정법에 의해 추가로 단리 또는 정제하여 얻을 수도 있다. 또한 상기 면역 담당 세포에 있어서의 세포로서 ES 세포나 iPS 세포로 제조된 것을 이용해도 된다.

이러한 T 세포로는, 알파·베타 T 세포, 감마·델타 T 세포, CD8⁺ T 세포, CD4⁺ T 세포, 종양 침윤 T 세포, 메모리 T 세포, 나이브 T 세포, NKT 세포를 들 수 있다. 또한, 면역 담당 세포의 유래와 투여 대상은 동일해도 되고 상이해도 된다. 또한 투여 대치가 인간인 경우에 있어서, 면역 담당 세포로는, 투여 대상으로서의 환자 본인으로부터 채취한 자가 세포를 사용해도 되고, 타인으로부터 채취한 타가 세포를 사용해도 된다. 즉, 도너와 레시피언트는 일치해도 되고 불일치이어도 되지만, 일치하는 것이 바람직하다.

[0117] (면역 담당 세포의 제조 방법)

[0118] 본 발명의 면역 담당 세포의 제조 방법으로는, 세포 표면 분자를 코딩하는 핵산, IL-7 을 코딩하는 핵산, 및 CCL19 를 코딩하는 핵산을 면역 담당 세포에 도입하여 제조하는 방법을 들 수 있고, 예를 들어 상기 특허문헌 1 또는 2 에 기재된 방법 등에 의해, 후술하는 본 발명의 발현 벡터를 면역 담당 세포에 도입하여 제조하는 방법을 바람직하게 들 수 있다. 혹은, 수정란에 대해, 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 세포 표면 분자, IL-7, 및/또는 CCL19 를 발현하는 벡터를 주입하여 제조한 트랜스제닉 포유 동물로부터 면역 담당 세포를 정제하여 얻는 방법이나, 이러한 트랜스제닉 포유 동물로부터 정제하여 얻은 면역 담당 세포에, 추가로 필요에 따라 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 세포 표면 분자, IL-7, 및/또는 CCL19 를 발현하는 벡터를 도입하여 제조하는 방법도 들 수 있다.

[0119] 세포 표면 분자를 코딩하는 핵산, IL-7 을 코딩하는 핵산, 및 CCL19 를 코딩하는 핵산이나, 후술하는 본 발명의 벡터를 면역 담당 세포에 도입하는 경우의 핵산 또는 벡터의 도입 방법으로는, 면역 담당 세포에 핵산 또는 벡터를 도입하는 방법이면 되고, 예를 들어, 일렉트로포레이션법 (Cytotechnology, 3, 133 (1990)), 인산칼슘법 (일본 공개특허공보 평2-227075호), 리포펙션법 (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 84, 7413 (1987)), 바이러스 감염법 등의 방법을 들 수 있다. 이러한 바이러스 감염법으로는, 도입하는 벡터와, 패키징 플라스미드를

GP2-293 세포 (다카라 바이오사 제조), Plat-GP 세포 (코스모·바이오사 제조), PG13 세포 (ATCC CRL-10686), PA317 세포 (ATCC CRL-9078) 등의 패키징 세포에 트랜스팩션하여 재조합 바이러스를 제조하고, 이러한 재조합 바이러스를 면역 담당 세포에 감염시키는 방법 (상기 특허문헌 2) 을 들 수 있다.

- [0120] 상기 「인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 세포 표면 분자, IL-7, 및 CCL19 를 발현하는 면역 담당 세포」 를 벡터를 사용하여 제조하는 경우에는, 이하의 어느 방법에 의해 제조할 수 있다.
- [0121] (1) 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 세포 표면 분자를 코드하는 핵산, IL-7 을 코드하는 핵산 및 CCL19 를 코드하는 핵산을 함유하고, 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 세포 표면 분자, IL-7 및 CCL19 를 발현하는 벡터를 면역 담당 세포에 도입하는 방법 ;
- [0122] (2) 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 세포 표면 분자를 코드하는 핵산을 함유하고, 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 세포 표면 분자를 발현하는 벡터, 및 IL-7 을 코드하는 핵산 및 CCL19 를 코드하는 핵산을 함유하고, IL-7 및 CCL19 를 발현하는 벡터의 2 종류의 벡터를 동시에, 또는 단계적으로 면역 담당 세포에 도입하는 방법 ;
- [0123] (3) 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 세포 표면 분자를 코드하는 핵산과 IL-7 을 코드하는 핵산을 함유하고, 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 세포 표면 분자와 IL-7 을 발현하는 벡터, 및 CCL19 를 코드하는 핵산을 함유하고, CCL19 를 발현하는 벡터의 2 종류의 벡터를 동시에, 또는 단계적으로 면역 담당 세포에 도입하는 방법 ;
- [0124] (4) 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 세포 표면 분자를 코드하는 핵산과 CCL19 를 코드하는 핵산을 함유하고, 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 세포 표면 분자와 CCL19 를 발현하는 벡터, 및 IL-7 을 코드하는 핵산을 함유하고, IL-7 을 발현하는 벡터의 2 종류의 벡터를 동시에, 또는 단계적으로 면역 담당 세포에 도입하는 방법 ;
- [0125] (5) 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 세포 표면 분자를 코드하는 핵산과 IL-7 을 코드하는 핵산을 함유하고, 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 세포 표면 분자와 IL-7 을 발현하는 벡터, 및 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 세포 표면 분자를 코드하는 핵산과 CCL19 를 코드하는 핵산을 함유하고, 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 세포 표면 분자와 CCL19 를 발현하는 벡터의 2 종류의 벡터를 동시에, 또는 단계적으로 면역 담당 세포에 도입하는 방법 ;
- [0126] (6) 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 세포 표면 분자를 코드하는 핵산과 IL-7 을 코드하는 핵산을 함유하고, 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 세포 표면 분자와 IL-7 을 발현하는 벡터, 및 IL-7 을 코드하는 핵산과 CCL19 를 코드하는 핵산을 함유하고, IL-7 과 CCL19 를 발현하는 벡터의 2 종류의 벡터를 동시에, 또는 단계적으로 면역 담당 세포에 도입하는 방법 ;
- [0127] (7) 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 세포 표면 분자를 코드하는 핵산과 CCL19 를 코드하는 핵산을 함유하고, 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 세포 표면 분자와 CCL19 를 발현하는 벡터, 및 IL-7 을 코드하는 핵산과 CCL19 를 코드하는 핵산을 함유하고, IL-7 과 CCL19 를 발현하는 벡터의 2 종류의 벡터를 동시에, 또는 단계적으로 면역 담당 세포에 도입하는 방법 ;
- [0128] (8) 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 세포 표면 분자를 코드하는 핵산을 함유하고, 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 세포 표면 분자를 발현하는 벡터, IL-7 을 코드하는 핵산을 함유하고, IL-7 을 발현하는 벡터, 및 CCL19 를 코드하는 핵산을 함유하고, CCL19 를 발현하는 벡터의 3 종류의 벡터를 동시에, 또는 단계적으로 면역 담당 세포에 도입하는 방법 ;
- [0129] 또한 상기 「인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 세포 표면 분자, IL-7, 및 CCL19 를 발현하는 면역 담당 세포」 를 벡터를 사용하여 제조하는 경우에는, 미리 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 세포 표면 분자를 발현하는 면역 담당 세포를 조제하고, 이러한 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 세포 표면 분자를 발현하는 면역 담당 세포를 사용하여 이하의 어느 방법에 의해 제조할 수도 있다.
- [0130] (1) IL-7 을 코드하는 핵산 및 CCL19 를 코드하는 핵산을 함유하고, IL-7 및 CCL19 를 발현하는 벡터를 상기 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 세포 표면 분자를 발현하는 면역 담당 세포에 도입하는 방법 ;
- [0131] (2) IL-7 을 코드하는 핵산을 함유하고, IL-7 을 발현하는 벡터, 및 CCL19 를 코드하는 핵산을 함유하고, CCL19 를 발현하는 벡터의 2 종류를 동시에, 또는 단계적으로 상기 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 세포 표면

분자를 발현하는 면역 담당 세포에 도입하는 방법 ;

[0132] 상기 각각의 면역 담당 세포를 사용하는 경우에는, 당해 면역 담당 세포의 배양물로서, 당해 면역 세포를 함유하는 것을 사용해도 된다. 또, 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 세포 표면 분자를 코딩하는 핵산, IL-7 을 코딩하는 핵산, 및 CCL19 를 코딩하는 핵산이 면역 담당 세포의 게놈에 삽입된 상태이더라도 되고, 게놈에 삽입되지 않은 상태 (예를 들어, 에피소말인 상태) 에서 사용해도 된다. 또한 상기 각각의 면역 담당 세포를 사용하는 경우에는, 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 세포 표면 분자를 코딩하는 핵산, IL-7 을 코딩하는 핵산, 및 CCL19 를 코딩하는 핵산이 면역 담당 세포의 게놈에 삽입된 면역 담당 세포와, 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 세포 표면 분자를 코딩하는 핵산, IL-7 을 코딩하는 핵산, 및 CCL19 를 코딩하는 핵산이 게놈에 삽입되지 않은 면역 담당 세포의 혼합물을 사용해도 된다.

[0133] 또, 상기와 같이 「인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 세포 표면 분자, IL-7, 및 CCL19 를 발현하는 면역 담당 세포」 는, 상기 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 세포 표면 분자, IL-7 을 코딩하는 핵산, 및 CCL19 를 코딩하는 핵산을, 공지된 유전자 편집 기술을 사용하여, 적절한 프로모터의 제어하에서 발현 가능하도록, 세포의 게놈에 삽입함으로써 제조해도 된다. 공지된 유전자 편집술로는, 징크 핑거 뉴클레아제, TALEN (전사 활성화형 이펙터 뉴클레아제), CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat)-Cas 시스템 등의 엔도뉴클레아제를 사용하는 기술을 들 수 있다. 또, 예를 들어, 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 CAR (항인간 메소텔린 CAR) 발현-면역 담당 세포에 다른 외래 단백질을 발현시키는 경우도 동일하게, 유전자 편집 기술을 사용하여, 다른 외래 단백질을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를, 적절한 프로모터의 제어하에서 발현 가능하도록, 세포의 게놈에 삽입해도 된다. 구체적으로는, 적절한 프로모터에 기능적으로 연결된 항인간 메소텔린 CAR (또는 다른 단백질) 을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를, 세포 게놈의 비코드 영역 등에 삽입하는 방법 ; 항인간 메소텔린 CAR (또는 다른 단백질) 을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를, 세포 게놈의 내재성 프로모터의 하류에 삽입하는 방법 등을 들 수 있다. 내재성 프로모터로는, 예를 들어, TCR α , TCR β 의 프로모터 등을 들 수 있다.

[0134] (투여 대상)

[0135] 상기 투여 대상으로는, 포유 동물 또는 포유 동물 세포를 바람직하게 들 수 있고, 이러한 포유 동물 중에서도, 인간, 마우스, 개, 래트, 모르모트, 토끼, 닭, 양, 돼지, 소, 말, 고양이, 원숭이, 침팬지를 보다 바람직하게 들 수 있고, 인간을 특히 바람직하게 들 수 있다.

[0136] (발현 벡터)

[0137] 본 발명의 발현 벡터는, 면역 담당 세포 또는 그 전구 세포와 접촉시켜 세포 내에 도입하고, 거기에 코딩된 소정의 단백질 (폴리펩티드) 을 면역 담당 세포에 있어서 발현시킴으로써, 본 발명의 면역 담당 세포를 제조할 수 있는 것이면 되고, 어떠한 실시형태인지는 특별히 한정되는 것은 아니다. 당업자이면, 원하는 단백질 (폴리펩티드) 을 면역 담당 세포에 있어서 발현시킬 수 있는 발현 벡터를 설계하여, 제조하는 것이 가능하다. 예를 들어, 본 발명의 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 세포 표면 분자를 코딩하는 핵산, IL-7 을 코딩하는 핵산, 및 CCL19 를 코딩하는 핵산을 함유하는 발현 벡터로는, 상기 본 발명의 면역 담당 세포를 제조하기 위한 이하의 (a) ~ (e) 중 어느 발현 벡터 (이하, 「IL-7/CCL19 발현-항인간 메소텔린 벡터」 라고도 한다) 를 들 수 있다. 또한, 이하의 「2 개의 발현 벡터」 란 2 종류의 발현 벡터의 세트를 의미하고, 「3 개의 발현 벡터」 란 3 종류의 발현 벡터의 세트를 의미한다.

[0138] (a) 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 세포 표면 분자를 코딩하는 핵산, IL-7 을 코딩하는 핵산, 및 CCL19 를 코딩하는 핵산을 함유하는 발현 벡터 ;

[0139] (b) 이하의 (b-1) 및 (b-2) 의 2 개의 발현 벡터 ;

[0140] (b-1) 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 세포 표면 분자를 코딩하는 핵산을 함유하는 발현 벡터 ;

[0141] (b-2) IL-7 을 코딩하는 핵산, 및 CCL19 를 코딩하는 핵산을 함유하는 발현 벡터 ;

[0142] (c) 이하의 (c-1) 및 (c-2) 의 2 개의 발현 벡터 ;

[0143] (c-1) 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 세포 표면 분자를 코딩하는 핵산, 및 IL-7 을 코딩하는 핵산을 함유하는 발현 벡터 ;

[0144] (c-2) CCL19 를 코딩하는 핵산을 함유하는 발현 벡터 ;

- [0145] (d) 이하의 (d-1) 및 (d-2) 의 2 개의 발현 벡터 :
- [0146] (d-1) IL-7 을 코딩하는 핵산을 함유하는 발현 벡터 ;
- [0147] (d-2) 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 세포 표면 분자를 코딩하는 핵산, 및 CCL19 를 코딩하는 핵산을 함유하는 발현 벡터 ;
- [0148] (e) 이하의 (e-1) 및 (e-2) 의 2 개의 발현 벡터 :
- [0149] (e-1) 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 세포 표면 분자를 코딩하는 핵산, 및 IL-7 을 코딩하는 핵산을 함유하는 발현 벡터 ;
- [0150] (e-2) 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 세포 표면 분자를 코딩하는 핵산, 및 CCL19 를 코딩하는 핵산을 함유하는 발현 벡터 ;
- [0151] (f) 이하의 (f-1) 및 (f-2) 의 2 개의 발현 벡터 :
- [0152] (f-1) 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 세포 표면 분자를 코딩하는 핵산, 및 IL-7 을 코딩하는 핵산을 함유하는 발현 벡터 ;
- [0153] (f-2) IL-7 을 코딩하는 핵산, 및 CCL19 를 코딩하는 핵산을 함유하는 발현 벡터 ;
- [0154] (g) 이하의 (g-1) 및 (g-2) 의 2 개의 발현 벡터 :
- [0155] (g-1) 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 세포 표면 분자를 코딩하는 핵산, 및 CCL19 를 코딩하는 핵산을 함유하는 발현 벡터 ;
- [0156] (g-2) IL-7 을 코딩하는 핵산, 및 CCL19 를 코딩하는 핵산을 함유하는 발현 벡터 ;
- [0157] (h) 이하의 (h-1), (h-2) 및 (h-3) 의 3 개의 발현 벡터 :
- [0158] (h-1) 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 세포 표면 분자를 코딩하는 핵산을 함유하는 발현 벡터 ;
- [0159] (h-2) IL-7 을 코딩하는 핵산을 함유하는 발현 벡터 ;
- [0160] (h-3) CCL19 를 코딩하는 핵산을 함유하는 발현 벡터 ;
- [0161] 상기 IL-7/CCL19 발현-항인간 메소텔린 벡터는, 추가로 IL-15, CCL21, IL-2, IL-4, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18, IP-10, Interferon- γ , MIP-1 α , GM-CSF, M-CSF, TGF- β , TNF- α , 체크 포인트 저해 항체 혹은 그 단편 등의 다른 면역 기능 제어 인자를 코딩하는 핵산을 함유해도 되지만, 상기 다른 면역 제어 인자를 코딩하는 핵산으로는, IL-12 이외의 면역 기능 제어 인자를 코딩하는 핵산인 것이 바람직하다.
- [0162] (핵산)
- [0163] 본 명세서에 있어서, 「핵산」 이란, 뉴클레오타이드 및 그 뉴클레오타이드와 동등한 기능을 갖는 분자가 중합한 분자이면 어떠한 것이어도 되고, 예를 들어, 리보뉴클레오타이드의 중합체인 RNA, 디옥시리보뉴클레오타이드의 중합체인 DNA, 리보뉴클레오타이드 및 디옥시리보뉴클레오타이드가 혼합한 중합체, 및 뉴클레오타이드 유사체를 포함하는 뉴클레오타이드 중합체를 들 수 있고, 또한 핵산 유도체를 포함하는 뉴클레오타이드 중합체이어도 된다. 또, 핵산은, 1 본쇄 핵산 또는 2 본쇄 핵산이어도 된다. 또 2 본쇄 핵산에는, 일방의 사슬에 대해, 타방의 사슬이 스트린젠트한 조건으로 하이브리다이징하는 2 본쇄 핵산도 포함된다.
- [0164] 상기 뉴클레오타이드 유사체로는, RNA 또는 DNA 와 비교하여, 뉴클레아제 내성의 향상, 혹은 안정화시키기 위해, 상보 사슬 핵산과의 어피니티를 높이기 위해, 혹은 세포 투과성을 높이기 위해, 혹은 가시화시키기 위해서, 리보뉴클레오타이드, 디옥시리보뉴클레오타이드, RNA 또는 DNA 에 수식을 실시한 분자이면 어떠한 분자이어도 된다. 뉴클레오타이드 유사체로는, 천연에 존재하는 분자이어도 되고 비천연의 분자이어도 되고, 예를 들어, 당부(糖部) 수식 뉴클레오타이드 유사체나 인산디에스테르 결합 수식 뉴클레오타이드 유사체 등을 들 수 있다.
- [0165] 상기 당부 수식 뉴클레오타이드 유사체로는, 뉴클레오타이드의 당의 화학 구조의 일부 혹은 모두에 대해, 임의의 화학 구조 물질을 부가 혹은 치환한 것이면 어떠한 것이어도 되고, 그 구체예로는, 2'-O-메틸리보오스로 치환된 뉴클레오타이드 유사체, 2'-O-프로필리보오스로 치환된 뉴클레오타이드 유사체, 2'-메톡시에톡시리보오스로 치환된 뉴클레오타이드 유사체, 2'-O-메톡시에틸리보오스로 치환된 뉴클레오타이드 유사체, 2'-O-[2-(구아니딘)에틸]리보오스로 치환된 뉴클레오타이드 유사체, 2'-플루오로리보오스로 치환된 뉴클레오타이드 유사체, 당부에 가교 구조를 도

입함으로써 2 개의 고리형 구조를 갖는 가교 구조형 인공 핵산 (Bridged Nucleic Acid) (BNA), 보다 구체적으로는, 2' 위치의 산소 원자와 4' 위치의 탄소 원자가 메틸렌을 개재하여 가교한 록드 인공 핵산 (Locked Nucleic Acid) (LNA), 및 에틸렌 가교 구조형 인공 핵산 (Ethylene bridged nucleic acid) (ENA) [Nucleic Acid Research, 32, e175 (2004)] 을 들 수 있고, 또한 펩티드 핵산 (PNA) [Acc. Chem. Res., 32, 624 (1999)], 옥시펩티드 핵산 (OPNA) [J. Am. Chem. Soc., 123, 4653 (2001)], 및 펩티드 리보 핵산 (PRNA) [J. Am. Chem. Soc., 122, 6900 (2000)] 등을 들 수 있다.

- [0166] 상기 인산디에스테르 결합 수식 뉴클레오티드 유사체로는, 뉴클레오티드의 인산디에스테르 결합의 화학 구조의 일부 혹은 모두에 대해, 임의의 화학 물질을 부가 혹은 치환한 것이면 어떠한 것이어도 되고, 그 구체예로는, 포스포로티오에이트 결합으로 치환된 뉴클레오티드 유사체, N3'-P5' 포스포아미데이트 결합으로 치환된 뉴클레오티드 유사체 등을 들 수 있다 [세포 공학, 16, 1463 - 1473 (1997)] [RNAi 법과 안티센스법, 코단샤 (2005)].
- [0167] 상기 핵산 유도체로는, 핵산에 비해, 뉴클레아제 내성을 향상시키기 위해, 안정화시키기 위해, 상보 사슬 핵산과의 어피니티를 높이기 위해, 세포 투과성을 높이기 위해, 혹은 가시화시키기 위해서, 그 핵산에 다른 화학 물질을 부가한 분자이면 어떠한 분자이더라도 되고, 그 구체예로는, 5'-폴리아민 부가 유도체, 콜레스테롤 부가 유도체, 스테로이드 부가 유도체, 담즙산 부가 유도체, 비타민 부가 유도체, Cy5 부가 유도체, Cy3 부가 유도체, 6-FAM 부가 유도체, 및 비오틴 부가 유도체 등을 들 수 있다.
- [0168] (인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 세포 표면 분자, IL-7, CCL19 등을 코드하는 핵산)
- [0169] 상기 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 세포 표면 분자를 코드하는 핵산, IL-7 을 코드하는 핵산, 및 CCL19 를 코드하는 핵산은 각각 포유 동물 유래의 핵산을 들 수 있고, 인간 유래의 핵산을 바람직하게 들 수 있다. 상기 각각의 핵산은, 본 발명의 발현 벡터를 도입하는 세포의 종류에 따라 적절히 선택할 수 있고, 이러한 각각의 핵산의 서열 정보는, 공지된 문헌이나 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>) 등의 데이터베이스를 검색하여 적절히 입수할 수 있다.
- [0170] 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 세포 표면 분자를 코드하는 핵산으로는, 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 CAR 을 코드하는 핵산을 들 수 있다.
- [0171] 상기 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 CAR 에 포함되는 1 본쇄 항체를 코드하는 핵산으로는, 구체적으로는, 이하의 (1-1D) ~ (3-1D) 를 들 수 있다.
- [0172] (1-1D) 서열 번호 13 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 CDR1, 서열 번호 14 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 CDR2, 및 서열 번호 15 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 CDR3 을 포함하는 중사슬 가변 영역과, 서열 번호 16 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 CDR1, 서열 번호 17 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 CDR2, 및 서열 번호 18 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 CDR3 을 포함하는 경사슬 가변 영역을 포함하는 1 본쇄 항체를 코드하는 핵산 ;
- [0173] (2-1D) 서열 번호 13 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 CDR1, 서열 번호 14 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 CDR2, 및 서열 번호 15 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 CDR3 을 포함하는 중사슬 가변 영역과, 서열 번호 19 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 CDR1, 서열 번호 17 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 CDR2, 및 서열 번호 18 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 CDR3 을 포함하는 경사슬 가변 영역을 포함하는 1 본쇄 항체를 코드하는 핵산 ;
- [0174] (3-1D) 서열 번호 20 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 CDR1, 서열 번호 21 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 CDR2, 및 서열 번호 22 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 CDR3 을 포함하는 중사슬 가변 영역과, 서열 번호 23 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 CDR1, 서열 번호 24 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 CDR2, 및 서열 번호 25 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 CDR3 을 포함하는 경사슬 가변 영역을 포함하는 1 본쇄 항체를 코드하는 핵산 ;
- [0175] 상기 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 CAR 에 포함되는 1 본쇄 항체를 코드하는 핵산의 다른 양태 1 로는, 구체적으로는, 이하의 (1-2D) ~ (5-2D) 를 들 수 있다.
- [0176] (1-2D) 서열 번호 1 에 나타내는 아미노산 서열과 85 % 이상, 바람직하게는 90 % 이상, 보다 바람직하게는 95 % 이상, 더욱 바람직하게는 98 % 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 가변 영역과, 서열 번호 2 에 나타내는 아미노산 서열과 85 % 이상, 바람직하게는 90 % 이상, 보다 바람직하게는

95 % 이상, 더욱 바람직하게는 98 % 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 가변 영역을 포함하는 1 본쇄 항체를 코딩하는 핵산 ;

- [0177] (2-2D) 서열 번호 3 에 나타내는 아미노산 서열과 85 % 이상, 바람직하게는 90 % 이상, 보다 바람직하게는 95 % 이상, 더욱 바람직하게는 98 % 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 가변 영역과, 서열 번호 4 에 나타내는 아미노산 서열과 85 % 이상, 바람직하게는 90 % 이상, 보다 바람직하게는 95 % 이상, 더욱 바람직하게는 98 % 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 가변 영역을 포함하는 1 본쇄 항체를 코딩하는 핵산 ;
- [0178] (3-2D) 서열 번호 5 에 나타내는 아미노산 서열과 85 % 이상, 바람직하게는 90 % 이상, 보다 바람직하게는 95 % 이상, 더욱 바람직하게는 98 % 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 가변 영역과, 서열 번호 6 에 나타내는 아미노산 서열과 85 % 이상, 바람직하게는 90 % 이상, 보다 바람직하게는 95 % 이상, 더욱 바람직하게는 98 % 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 가변 영역을 포함하는 1 본쇄 항체를 코딩하는 핵산 ;
- [0179] (4-2D) 서열 번호 1 에 나타내는 아미노산 서열과 85 % 이상, 바람직하게는 90 % 이상, 보다 바람직하게는 95 % 이상, 더욱 바람직하게는 98 % 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 가변 영역과, 서열 번호 4 에 나타내는 아미노산 서열과 85 % 이상, 바람직하게는 90 % 이상, 보다 바람직하게는 95 % 이상, 더욱 바람직하게는 98 % 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 가변 영역을 포함하는 1 본쇄 항체를 코딩하는 핵산 ;
- [0180] (5-2D) 서열 번호 3 에 나타내는 아미노산 서열과 85 % 이상, 바람직하게는 90 % 이상, 보다 바람직하게는 95 % 이상, 더욱 바람직하게는 98 % 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 가변 영역과, 서열 번호 2 에 나타내는 아미노산 서열과 85 % 이상, 바람직하게는 90 % 이상, 보다 바람직하게는 95 % 이상, 더욱 바람직하게는 98 % 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 가변 영역을 포함하는 1 본쇄 항체를 코딩하는 핵산 ;
- [0181] 상기 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 CAR 에 포함되는 1 본쇄 항체를 코딩하는 핵산의 다른 양태 2 로는, 구체적으로는, 이하의 (1-3D) ~ (5-3D) 를 들 수 있다.
- [0182] (1-3D) 서열 번호 1 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 가변 영역과, 서열 번호 2 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 가변 영역을 포함하는 1 본쇄 항체를 코딩하는 핵산 ;
- [0183] (2-3D) 서열 번호 3 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 가변 영역과, 서열 번호 4 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 가변 영역을 포함하는 1 본쇄 항체를 코딩하는 핵산 ;
- [0184] (3-3D) 서열 번호 5 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 가변 영역과, 서열 번호 6 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 가변 영역을 포함하는 1 본쇄 항체를 코딩하는 핵산 ;
- [0185] (4-3D) 서열 번호 1 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 가변 영역과, 서열 번호 4 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 가변 영역을 포함하는 1 본쇄 항체를 코딩하는 핵산 ;
- [0186] (5-3D) 서열 번호 3 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 가변 영역과, 서열 번호 2 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 가변 영역을 포함하는 1 본쇄 항체를 코딩하는 핵산 ;
- [0187] 상기 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 CAR 에 포함되는 1 본쇄 항체를 코딩하는 핵산의 다른 양태 3 으로 는, 구체적으로는, 이하의 (1-4D) ~ (9-4D) 를 들 수 있다.
- [0188] (1-4D) 서열 번호 1 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 가변 영역, 서열 번호 26 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 펩티드 링커, 및 서열 번호 2 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 가변 영역을 순차 포함하는 1 본쇄 항체를 코딩하는 핵산 ;
- [0189] (2-4D) 서열 번호 3 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 가변 영역, 서열 번호 26 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 펩티드 링커, 및 서열 번호 4 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 가변 영역을 순차 포함하는 1 본쇄 항체를 코딩하는 핵산 ;
- [0190] (3-4D) 서열 번호 2 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 가변 영역, 서열 번호 26 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 펩티드 링커, 및 서열 번호 1 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 가변 영역을 순차 포함하는 1 본쇄 항체를 코딩하는 핵산 ;

- [0191] (4-4D) 서열 번호 1 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 가변 영역, 서열 번호 27 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 펩티드 링커, 및 서열 번호 2 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 가변 영역을 순차 포함하는 1 본쇄 항체를 코드하는 핵산 ;
- [0192] (5-4D) 서열 번호 2 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 가변 영역, 서열 번호 27 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 펩티드 링커, 및 서열 번호 1 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 가변 영역을 순차 포함하는 1 본쇄 항체를 코드하는 핵산 ;
- [0193] (6-4D) 서열 번호 5 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 가변 영역, 서열 번호 26 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 펩티드 링커, 및 서열 번호 6 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 가변 영역을 순차 포함하는 1 본쇄 항체를 코드하는 핵산 ;
- [0194] (7-4D) 서열 번호 6 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 가변 영역, 서열 번호 26 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 펩티드 링커, 및 서열 번호 5 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 가변 영역을 순차 포함하는 1 본쇄 항체를 코드하는 핵산 ;
- [0195] (8-4D) 서열 번호 5 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 가변 영역, 서열 번호 27 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 펩티드 링커, 및 서열 번호 6 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 가변 영역을 순차 포함하는 1 본쇄 항체를 코드하는 핵산 ;
- [0196] (9-4D) 서열 번호 6 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 가변 영역, 서열 번호 27 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 펩티드 링커, 및 서열 번호 5 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 가변 영역을 순차 포함하는 1 본쇄 항체를 코드하는 핵산 ;
- [0197] 상기 CAR 에 포함되는 세포막 관통 영역의 폴리펩티드를 코드하는 핵산으로는, 서열 번호 8 에 나타내는 아미노산 서열과 85 % 이상, 바람직하게는 90 % 이상, 보다 바람직하게는 95 % 이상, 더욱 바람직하게는 98 % 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 인간 CD8 세포막 관통 영역의 폴리펩티드를 코드하는 핵산을 들 수 있다. 또, 상기 CAR 에 포함되는 면역 담당 세포 활성화 시그널 전달 영역에 있어서의 CD28, 4-1BB, 및 CD3 ζ 의 세포 내 영역의 폴리펩티드를 코드하는 핵산으로는, 서열 번호 8 에 나타내는 인간 CD28 의 세포 내 영역의 아미노산 서열과 85 % 이상, 바람직하게는 90 % 이상, 보다 바람직하게는 95 % 이상, 더욱 바람직하게는 98 % 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 서열 번호 8 에 나타내는 아미노산 서열과 동등한 작용을 갖는 폴리펩티드를 코드하는 핵산, 서열 번호 9 에 나타내는 인간 4-1BB 의 세포 내 영역의 아미노산 서열과 85 % 이상, 바람직하게는 90 % 이상, 보다 바람직하게는 95 % 이상, 더욱 바람직하게는 98 % 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 서열 번호 9 에 나타내는 아미노산 서열과 동등한 작용을 갖는 폴리펩티드를 코드하는 핵산, 서열 번호 10 에 나타내는 인간 CD3 ζ 의 세포 내 영역의 아미노산 서열과 85 % 이상, 바람직하게는 90 % 이상, 보다 바람직하게는 95 % 이상, 더욱 바람직하게는 98 % 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 서열 번호 10 에 나타내는 아미노산 서열과 동등한 작용을 갖는 폴리펩티드를 코드하는 핵산 또는 그들의 조합, 바람직하게는, 상류 (5' 말단측) 로부터 순서대로 서열 번호 8 에 나타내는 인간 CD28 의 세포 내 영역의 폴리펩티드의 세포 내 영역의 폴리펩티드를 코드하는 핵산, 서열 번호 9 에 나타내는 인간 4-1BB 의 세포 내 영역의 폴리펩티드를 코드하는 핵산, 서열 번호 10 에 나타내는 인간 CD3 ζ 의 세포 내 영역의 폴리펩티드를 코드하는 핵산을 들 수 있다.
- [0198] IL-7 을 코드하는 핵산으로는, 서열 번호 28 에 나타내는 아미노산 서열과 85 % 이상, 바람직하게는 90 % 이상, 보다 바람직하게는 95 % 이상, 더욱 바람직하게는 98 % 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 서열 번호 28 에 나타내는 아미노산 서열과 동등한 작용을 갖는 폴리펩티드를 코드하는 핵산, 구체적으로는 서열 번호 30 에 나타내는 염기 서열로 이루어지는 핵산을 들 수 있고, IL-7 에 있어서의 세포 증식률 또는 세포 생존율의 향진 작용을 갖는 한, 서열 번호 30 에 나타내는 염기 서열로 이루어지는 핵산과 80 % 이상, 바람직하게는 85 % 이상, 보다 바람직하게는 90 % 이상, 더욱 바람직하게는 95 % 이상, 가장 바람직하게는 98 % 이상의 서열 동일성을 갖는 핵산이어도 된다. CCL19 를 코드하는 핵산으로는, 서열 번호 29 에 나타내는 아미노산 서열과 85 % 이상, 바람직하게는 90 % 이상, 보다 바람직하게는 95 % 이상, 더욱 바람직하게는 98 % 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 서열 번호 29 에 나타내는 아미노산 서열과 동등한 작용을 갖는 폴리펩티드를 코드하는 핵산, 구체적으로는 서열 번호 31 에 나타내는 염기 서열로 이루어지는 핵산을 들 수 있고, CCL19 에 있어서의 세포의 유주 작용을 갖는 한, 서열 번호 31 에 나타내는 염기 서열로 이루어지는 핵산과 80 % 이상, 바람직하게는 85 % 이상, 보다 바람직하게는 90 % 이상, 더욱 바람직하게는 95 %

이상, 가장 바람직하게는 98 % 이상의 서열 동일성을 갖는 핵산을 사용해도 된다.

- [0199] (자살 유전자)
- [0200] 또, 본 발명의 발현 벡터에는, 자살 유전자를 코드하는 핵산을 포함하고 있어도 된다. 자살 유전자란, 발현함으로써 직접적으로, 혹은 이차적으로 세포 독성을 갖는 물질을 유도하여, 자신의 세포를 죽음에 이르게 하는 기능을 갖는 유전자를 의미한다. 본 발명의 발현 벡터에 자살 유전자를 코드하는 핵산을 포함시킴으로써, 암의 치료 경과에 따라, 예를 들어 종양이 소실되었을 경우에 자살 유전자의 기능을 활성화하는 약제를 투여하여, 생체 내의 면역 담당 세포를 제어할 수 있다. 또, IL-7 또는 CCL19 는 다른 사이토카인과는 달리, 부작용으로서 사이토카인 방출 증후군이나 유전자 도입 세포의 종양화를 일으킬 가능성은 낮다. 그러나, 본 발명의 발현 벡터를 도입한 면역 담당 세포의 기능이 높아짐으로써, 표적의 암 조직을 공격할 때에 방출하는 사이토카인 등이 예상 외로 주변 조직에 영향을 미치는 경우가 있을 수 있다. 이러한 경우에는, 본 발명의 발현 벡터에 자살 유전자를 코드하는 핵산을 포함시킴으로써, 사이토카인 방출 증후군이 될 리스크를 확실하게 저감시키는 것이 가능해진다.
- [0201] 자살 유전자로는, 이하의 문헌에 기재된 단순 헤르페스바이러스의 티미딘키나아제 (HSV-TK) 나 유도성 카스파제 9 (inducible caspase 9) 를 코드하는 유전자 등을 들 수 있고, 이러한 유전자의 기능을 활성화시키는 약제로는, 전자에 대해서는 간시클로비르, 후자에 대해서는 2 량체 유도 화합물 (chemical induction of dimerization : CID) 인 AP1903 을 들 수 있다.
- [0202] (핵산 서열 정보의 입수 및 핵산의 제조)
- [0203] 본 발명의 발현 벡터에 포함되는 상기 각각의 핵산은, 천연 유래의 핵산이어도 되고 인공 합성의 핵산이어도 되고, 본 발명의 발현 벡터를 도입하는 세포의 종류에 따라 적절히 선택할 수 있고, 서열 정보는, 공지된 문헌이나 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>) 등의 데이터베이스를 검색하여 적절히 입수할 수 있다.
- [0204] 상기 각각의 핵산은, 각각을 코드하는 핵산의 염기 서열의 정보에 기초하여, 화학 합성하는 방법이나, PCR 에 의해 증폭시키는 방법 등의 공지된 기술에 의해 제조할 수 있다. 또한, 아미노산을 코드하기 위한 선택되는 코돈은, 목적으로 하는 숙주 세포에 있어서의 핵산의 발현을 최적화하기 위해서 개변되어도 된다.
- [0205] (각 핵산의 배치)
- [0206] 본 발명의 발현 벡터에 있어서의 (a) 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 세포 표면 분자를 코드하는 핵산, IL-7 을 코드하는 핵산, 및 CCL19 를 코드하는 핵산을 함유하는 발현 벡터는, 어느 핵산이 어느 상류 또는 하류에 배치되어도 된다. 구체적으로는, 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 세포 표면 분자를 코드하는 핵산으로서 항인간 메소텔린 CAR 을 코드하는 핵산을 함유하는 경우를 예로 하면, 상류 (5' 말단측) 로부터 순서대로 항인간 메소텔린 CAR 을 코드하는 핵산, IL-7 을 코드하는 핵산 및 CCL19 를 코드하는 핵산이어도 되고, 항인간 메소텔린 CAR 을 코드하는 핵산, CCL19 를 코드하는 핵산 및 IL-7 을 코드하는 핵산이어도 되고, IL-7 을 코드하는 핵산, CCL19 를 코드하는 핵산 및 항인간 메소텔린 CAR 을 코드하는 핵산이어도 되고, IL-7 을 코드하는 핵산, 항메소텔린 CAR 을 코드하는 핵산 및 CCL19 를 코드하는 핵산이어도 되고, CCL19 를 코드하는 핵산, 항메소텔린 CAR 을 코드하는 핵산, 및 IL-7 을 코드하는 핵산이어도 되고, CCL19 를 코드하는 핵산, IL-7 을 코드하는 핵산 및 항인간 메소텔린 CAR 을 코드하는 핵산이어도 된다.
- [0207] 본 발명의 벡터에 있어서의 (b-2), (f-2), 및 (g-2) 에 있어서의 IL-7 을 코드하는 핵산, 및 CCL19 를 코드하는 핵산을 함유하는 발현 벡터에 있어서, IL-7 을 코드하는 핵산 및 CCL19 를 코드하는 핵산의 배치는 특별히 제한되지 않고, IL-7 을 코드하는 핵산에 대해 CCL19 를 코드하는 핵산이 상류에 배치되어도 되고 하류에 배치되어도 된다.
- [0208] 본 발명의 벡터에 있어서의 (c-1), (e-1) 및 (f-1) 에 있어서의 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 세포 표면 분자를 코드하는 핵산, 및 IL-7 을 코드하는 핵산을 함유하는 발현 벡터에 있어서, 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 세포 표면 분자를 코드하는 핵산 및 IL-7 을 코드하는 핵산의 배치는 특별히 제한되지 않고, 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 세포 표면 분자를 코드하는 핵산에 대해 IL-7 을 코드하는 핵산이 상류에 배치되어도 되고 하류에 배치되어도 된다.
- [0209] 본 발명의 벡터에 있어서의 (d-2), (e-2) 및 (g-1) 에 있어서의 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 세포 표면 분자를 코드하는 핵산, 및 CCL19 를 코드하는 핵산을 함유하는 발현 벡터에 있어서, 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 세포 표면 분자를 코드하는 핵산 및 CCL19 를 코드하는 핵산의 배치는 특별히 제한되지 않고, 인

간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 세포 표면 분자를 코딩하는 핵산에 대해 CCL19 를 코딩하는 핵산이 상류에 배치되어도 되고 하류에 배치되어도 된다.

- [0210] (전사)
- [0211] 또한, 메소텔린을 특이적으로 인식하는 세포 표면 분자를 코딩하는 핵산, IL-7 을 코딩하는 핵산 및 CCL19 를 코딩하는 핵산, 자살 유전자를 코딩하는 핵산은 각각 다른 프로모터에 의해 전사되어도 되고, 내부 리보솜 엔트리 부위 (IRES : internal ribozyme entry site) 또는 자기 절단형 2A 펩티드를 사용하여 하나의 프로모터로 전사되어도 된다.
- [0212] 내부 리보솜 엔트리 부위 (IRES) 또는 자기 절단형 2A 펩티드를 사용하여 하나의 프로모터로 IL-7 을 코딩하는 핵산 및 CCL19 를 코딩하는 핵산을 전사시키는 경우에 있어서의 상기 각 핵산 사이나, 상기 메소텔린을 특이적으로 인식하는 세포 표면 분자를 코딩하는 핵산을 포함하는 경우에 있어서의 당해 핵산과 IL-7 을 코딩하는 핵산 및 CCL19 를 코딩하는 핵산 사이에는, 각각의 핵산을 발현할 수 있는 한, 임의의 핵산을 포함해도 되지만, 자기 절단형 펩티드 (2A 펩티드), 또는 IRES 를 코딩하는 서열, 바람직하게는 2A 펩티드를 코딩하는 서열을 개재하여 연결되어 있는 것이 바람직하다. 이러한 서열을 사용하여 연결함으로써, 각각의 핵산을 효율적으로 발현시키는 것이 가능해진다.
- [0213] 2A 펩티드란, 바이러스 유래의 자기 절단형 펩티드이고, 서열 번호 32 로 나타내는 아미노산 서열 중의 G-P 사이 (C 말단으로부터 1 잔기의 위치) 가 소포체로 절단되는 특징을 갖는다 (Szymczak et al., Expert Opin. Biol. Ther. 5(5) : 627 - 638 (2005)). 그 때문에, 2A 펩티드를 개재하여 그 전후에 삽입된 핵산은, 세포 내에서 서로 독립적으로 발현되게 된다.
- [0214] 상기 2A 펩티드로는, 피코르나바이러스, 로타바이러스, 곤충 바이러스, 아프타바이러스 또는 트리파노소마바이러스 유래의 2A 펩티드인 것이 바람직하고, 서열 번호 33 에 나타내는 피코르나바이러스 유래의 2A 펩티드 (F2A) 인 것이 보다 바람직하다.
- [0215] (백터의 종류)
- [0216] 본 발명의 발현 백터에 있어서의 백터의 종류로는 직사슬형이어도 되고 고리형이어도 되고, 플라스미드 등의 바이러스 백터이어도 되고, 바이러스 백터이어도 되고, 트랜스포손에 의한 백터이어도 된다. 또, 이러한 백터에는, 프로모터나 터미네이터 등의 제어 서열이나, 약제 내성 유전자, 리포터 유전자 등의 선택 마커 서열을 함유하고 있어도 된다. 프로모터 서열의 하류에 작동 가능하게 IL-7 을 코딩하는 핵산 및 CCL19 를 코딩하는 핵산을 배치함으로써, 각각의 핵산을 효율적으로 전사하는 것이 가능해진다.
- [0217] 상기 프로모터로는, 레트로바이러스의 LTR 프로모터, SV40 초기 프로모터, 사이토메갈로바이러스 프로모터, 단순 헤르페스바이러스의 티미딘키나아제 프로모터 등의 바이러스 유래 프로모터, 포스포글리세린산키나아제 (PGK) 프로모터, Xist 프로모터, β -액틴 프로모터, RNA 폴리메라아제 II 프로모터 등의 포유류 유래 프로모터를 들 수 있다. 또, 테트라사이클린에 의해 유도되는 테트라사이클린 응답형 프로모터, 인터페론에 의해 유도되는 Mx1 프로모터 등을 사용해도 된다. 본 발명의 발현 백터에 있어서 상기 특정한 물질에 의해 유도되는 프로모터를 사용함으로써, 예를 들어 본 발명의 백터를 함유하는 면역 담당 세포를 암의 치료에 사용하기 위한 의약 조성물로서 사용하는 경우에, 암의 치료 경과에 따라 IL-7 및 CCL19 의 발현의 유도를 제어하는 것이 가능해진다.
- [0218] 상기 바이러스 백터로는, 레트로바이러스 백터, 렌티바이러스 백터, 아데노바이러스 백터, 아데노 수반 바이러스 백터를 들 수 있고, 레트로바이러스 백터를 바람직하게 들 수 있고, pMSGV 백터 (Tamada k et al., Clin Cancer Res 18 : 6436 - 6445 (2002)) 나 pMSCV 백터 (다카라 바이오사 제조) 를 보다 바람직하게 들 수 있다. 레트로바이러스 백터를 사용하면, 도입 유전자는 호스트 세포의 게놈에 도입되기 때문에, 장기간 또한 안정적으로 발현하는 것이 가능해진다.
- [0219] 면역 담당 세포에 있어서의 본 발명의 발현 백터 함유의 확인은, 예를 들어 CAR 을 코딩하는 핵산을 함유하는 경우에는, 플로우 사이토메트리, 노던 블로팅, 서던 블로팅, RT-PCR 등의 PCR, ELISA, 웨스턴 블로팅에 의해 CAR 의 발현을 조사할 수 있고, 본 발명의 발현 백터에 마커 유전자를 함유하는 경우에는, 당해 발현 백터에 삽입된 마커 유전자의 발현을 조사함으로써 확인할 수 있다.
- [0220] (의약 조성물)
- [0221] 본 발명의 의약 조성물은, 본 발명의 면역 담당 세포와 약학적으로 허용되는 첨가제를 함유하고 있으면 되고,

상기 첨가제로는, 생리 식염수, 완충 생리 식염수, 세포 배양 배지, 텍스트로오스, 주사용수, 글리세롤, 에탄올 및 이들의 조합, 안정제, 가용화제 및 계면 활성제, 완충제 및 방부제, 등장화제, 충전제, 그리고 윤활제를 들 수 있다. 또, 상기 본 발명의 의약 조성물에 있어서의 면역 담당 세포에는, 면역 담당 세포의 활성화를 유도하는 시그널 전달 영역을 구비하고 있으므로, 본 발명의 의약 조성물은 암의 치료에 사용하기 위한 의약 조성물로 해도 된다. 이러한 암의 치료에 사용하기 위한 의약 조성물에는, 암의 치료에 사용하기 위한 사용 방법 등을 기재한 첨부 문서, 라벨, 패키지 등을 포함해도 된다. 또한 상기 본 발명의 의약 조성물에 있어서의 면역 담당 세포에는, 종양의 재발 억제 효과를 가지므로, 본 발명의 의약 조성물은 종양 재발의 억제에 사용하기 위한 의약 조성물로 해도 된다. 이러한 종양 재발의 억제에 사용하기 위한 의약 조성물에는, 종양 재발의 억제에 사용하기 위한 사용 방법 등을 기재한 첨부 문서, 라벨, 패키지 등을 포함해도 된다.

[0222] 본 발명의 의약 조성물은, 당업자에게 이미 알려진 방법을 사용하여, 그것을 필요로 하는 피검체에 투여할 수 있고, 투여 방법으로는, 정맥내, 종양내, 피내, 피하, 근육내, 복강내, 동맥내, 수내 (髓内), 심장내, 관절내, 활액낭내, 두개내, 수강내, 및 지주막하 (수액) 에 대한 주사를 들 수 있다.

[0223] 본 발명의 의약 조성물은, 1 일 4 회, 3 회, 2 회 또는 1 회, 1 일 간격, 2 일 간격, 3 일 간격, 4 일 간격, 5 일 간격, 주 1 회, 7 일 간격, 8 일 간격, 9 일 간격, 주 2 회, 월 1 회 또는 월 2 회 독립적으로, 1 회 또는 수 차례로 나누어 투여하는 방법을 들 수 있다.

[0224] 본 발명의 의약 조성물에 있어서의 암으로는 특별히 한정되지 않지만, 암 조직에 있어서 메소텔린을 발현하는 암종, 또는 메소텔린을 발현하는 암세포 유래의 암종인 것이 바람직하고, 중피종, 대장암 (결장암 또는 직장암), 췌장암, 흉선암, 담관암, 폐암 (선암, 편평상피암, 선편평상피암, 미분화암, 대세포암, 소세포암), 피부암, 유방암, 전립선암, 방광암, 질암, 경부암, 자궁암, 간장암, 신장암, 췌장암, 비장암, 기관암, 기관지암, 결장암, 소장암, 위암, 식도암, 담낭암, 정소암, 난소암 등의 암이나, 골조직, 연골 조직, 지방 조직, 근조직, 혈관 조직 및 조혈 조직의 암 외에, 연골 육종, 유잉 육종, 악성 혈관내피종, 악성 슈반종, 골육종, 연부 조직 육종 등의 육종이나, 간아종, 수아종, 신아종, 신경아종, 췌아종, 흉막폐아종, 망막아종 등의 아종이나, 배세포 종양을 들 수 있다. 투여량으로는, 치료적 유효량을 투여할 수 있고, 예를 들어, 1 회의 투여에 있어서, 투여 세포의 개수로서, $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^{10}$ 개, 바람직하게는 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^9$ 개, 보다 바람직하게는 $5 \times 10^6 \sim 5 \times 10^8$ 개를 들 수 있다.

[0225] 본 발명의 의약 조성물은, 다른 항암제와 병용하여 사용할 수 있다. 다른 항암제로는, 시클로포스파미드, 벤다무스틴, 이포스파미드, 디카바진 등의 알킬화약, 펜토스타틴, 플루다라빈, 클라드리빈, 메토트렉세이트, 5-플루오로우라실, 6-메르캅토프린, 에노시타빈 등의 대사 길항약, 리톡시맙, 세톡시맙, 트라스트주맙 등의 분자 표적약, 이마티닙, 게피티닙, 엘로티닙, 아파티닙, 다사티닙, 수니티닙, 트라메티닙 등의 키나아제 저해제, 보르테오미드 등의 프로테아솜 저해제, 시클로스포린, 타크로리무스 등의 칼시뉴린 저해약, 이다루비신, 독소루비신, 마이토마이신 C 등의 항암성 항생 물질, 이리노테칸, 에토포시드 등의 식물 알칼로이드, 시스플라틴, 옥살리플라틴, 카르보플라틴 등의 플라티나 제제, 타목시펜, 비칼루타마이드 등의 호르몬 요법약, 인터페론, 니볼루맙, 펌브로리주맙 등의 면역 제어약을 들 수 있다.

[0226] 상기 「본 발명의 의약 조성물과 다른 항암제와 병용하여 사용하는」 방법으로는, 다른 항암제를 사용하여 처리하고, 그 후 본 발명의 의약 조성물을 사용하는 방법이나, 본 발명의 의약 조성물과 다른 항암제를 동시에 사용하는 방법이나, 본 발명의 의약 조성물을 사용하여 처리하고, 그 후 다른 항암제를 사용하는 방법을 들 수 있다. 또, 본 발명의 암의 치료에 사용하기 위한 의약 조성물과 다른 항암제와 병용한 경우에는, 암의 치료 효과가 보다 향상됨과 함께, 각각의 항암제의 투여 횟수 또는 투여량을 줄임으로써, 각각의 항암제에 의한 부작용을 저감시키는 것이 가능해진다. 또, 본 발명의 의약 조성물에 상기 다른 항암제를 포함해도 된다.

[0227] (본 발명의 다른 양태)

[0228] 본 발명의 다른 양태 1 로서, 1) 본 발명의 면역 담당 세포를, 암의 치료를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 특징으로 하는 암의 치료 방법이나, 2) 의약 조성물로서 사용하기 위한 본 발명의 면역 담당 세포나, 3) 본 발명의 면역 담당 세포의 의약 조성물의 조제에 있어서의 사용을 들 수 있다.

[0229] 또, 본 발명의 다른 양태 2 로서, 이하의 어느 1 본쇄 항체, 세포막 관통 영역, 및 면역 담당 세포의 활성화를 유도하는 시그널 전달 영역을 구비한 키메라 항원 수용체 (CAR) 를 들 수 있고, 이러한 CAR 을 면역 담당 세포에 발현시킴으로써, 인간 메소텔린에 의한 자극에 의해 면역 담당 세포를 활성화시키는 것이 가능해진다.

- [0230] (1-1) 서열 번호 13 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 CDR1, 서열 번호 14 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 CDR2, 및 서열 번호 15 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 CDR3 을 포함하는 중사슬 가변 영역과, 서열 번호 16 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 CDR1, 서열 번호 17 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 CDR2, 및 서열 번호 18 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 CDR3 을 포함하는 경사슬 가변 영역을 포함하는 1 본쇄 항체 ;
- [0231] (2-1) 서열 번호 13 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 CDR1, 서열 번호 14 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 CDR2, 및 서열 번호 15 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 CDR3 을 포함하는 중사슬 가변 영역과, 서열 번호 19 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 CDR1, 서열 번호 17 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 CDR2, 및 서열 번호 18 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 CDR3 을 포함하는 경사슬 가변 영역을 포함하는 1 본쇄 항체 ;
- [0232] (3-1) 서열 번호 20 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 CDR1, 서열 번호 21 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 CDR2, 및 서열 번호 22 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 CDR3 을 포함하는 중사슬 가변 영역과, 서열 번호 23 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 CDR1, 서열 번호 24 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 CDR2, 및 서열 번호 25 에 나타내는 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 CDR3 을 포함하는 경사슬 가변 영역을 포함하는 1 본쇄 항체 ;
- [0233] 또한, 본 발명의 다른 양태 3 으로서, 본 발명의 발현 벡터를 구비하고 있는, 면역 담당 세포를 제조하기 위한 키트를 들 수 있고, 이러한 키트로는, 본 발명의 발현 벡터를 구비하고 있으면 특별히 제한되지 않고, 본 발명의 면역 담당 세포를 제조하기 위한 설명서나, 본 발명의 발현 벡터를 면역 담당 세포에 도입하기 위해서 사용하는 시약을 포함하고 있어도 된다.
- [0234] 또한, 본 발명의 다른 양태 4 로서, 세포 표면 분자 (바람직하게는, 인간 메소텔린을 특이적으로 인식하는 1 본쇄 항체를 구비한 CAR), IL-7 및 CCL19 를 동시에 발현하는 면역 담당 세포를 대상에 투여하는 암의 재발 억제 방법을 들 수 있다.
- [0235] 이하, 실시예에 의해 본 발명을 보다 구체적으로 설명하지만, 본 발명의 기술적 범위는 이들 예시에 한정되는 것은 아니다.
- [0236] [실시예 1] 항인간 메소텔린 CAR 의 제조
- [0237] (항인간 메소텔린 CAR 의 scFv 서열 및 DNA 단편의 합성)
- [0238] VL 및 VH 의 서열, 순서, 및 적절한 시그널 펩티드의 종류를 비교하기 위해, 도 1 에 나타내는 9 종류의 항인간 메소텔린 scFv 의 서열을 설계하였다.
- [0239] VH07(15)VL07 은 서열 번호 1 에 나타내는 중사슬 가변 영역의 아미노산 서열과 서열 번호 26 에 나타내는 펩티드 링커의 아미노산 서열과 서열 번호 2 에 나타내는 경사슬 가변 영역의 아미노산 서열로 이루어진다.
- [0240] VH36(15)VL36 은 서열 번호 3 에 나타내는 중사슬 가변 영역의 아미노산 서열과 서열 번호 26 에 나타내는 펩티드 링커의 아미노산 서열과 서열 번호 4 에 나타내는 경사슬 가변 영역의 아미노산 서열로 이루어진다.
- [0241] VL07(15)VH07 은 서열 번호 2 에 나타내는 경사슬 가변 영역의 아미노산 서열과 서열 번호 26 에 나타내는 펩티드 링커의 아미노산 서열과 서열 번호 1 에 나타내는 중사슬 가변 영역의 아미노산 서열로 이루어진다.
- [0242] VH07(25)VL07 은 서열 번호 1 에 나타내는 중사슬 가변 영역의 아미노산 서열과 서열 번호 27 에 나타내는 펩티드 링커의 아미노산 서열과 서열 번호 2 에 나타내는 경사슬 가변 영역의 아미노산 서열로 이루어진다.
- [0243] VL07(25)VH07 은 서열 번호 2 에 나타내는 경사슬 가변 영역의 아미노산 서열과 서열 번호 27 에 나타내는 펩티드 링커의 아미노산 서열과 서열 번호 1 에 나타내는 중사슬 가변 영역의 아미노산 서열로 이루어진다.
- [0244] VHMO(15)VLMO 는 서열 번호 5 에 나타내는 중사슬 가변 영역의 아미노산 서열과 서열 번호 26 에 나타내는 펩티드 링커의 아미노산 서열과 서열 번호 6 에 나타내는 경사슬 가변 영역의 아미노산 서열로 이루어진다.
- [0245] VLMO(15)VHMO 는 서열 번호 6 에 나타내는 경사슬 가변 영역의 아미노산 서열과 서열 번호 26 에 나타내는 펩티드 링커의 아미노산 서열과 서열 번호 5 에 나타내는 중사슬 가변 영역의 아미노산 서열로 이루어진다.
- [0246] VHMO(25)VLMO 는 서열 번호 5 에 나타내는 중사슬 가변 영역의 아미노산 서열과 서열 번호 27 에 나타내는 펩티드 링커의 아미노산 서열과 서열 번호 6 에 나타내는 경사슬 가변 영역의 아미노산 서열로 이루어진다.

- [0247] VLMO(25)VHMO 는 서열 번호 6 에 나타내는 경사슬 가변 영역의 아미노산 서열과 서열 번호 27 에 나타내는 펩티드 링커의 아미노산 서열과 서열 번호 5 에 나타내는 중사슬 가변 영역의 아미노산 서열로 이루어진다. 또한, 서열 번호 1 과 서열 번호 3 에 나타내는 아미노산 서열은, 서열 번호 1 에 있어서의 127 번째가 글리신 (G) 인 데에 대해, 서열 번호 3 에 나타내는 아미노산 서열에서는 류신 (L) 인 점이 상이하다. 또, 서열 번호 2 와 서열 번호 4 에 나타내는 아미노산 서열은, 서열 번호 2 에 있어서의 33 번째의 티로신 (Y) 이 서열 번호 4 에 나타내는 아미노산 서열에서는 결실되어 있는 점이 상이하다.
- [0248] 다음으로, 상기 각 항인간 메소텔린 scFv 의 아미노산 서열을 코드하는 DNA 단편을 각각 합성하였다.
- [0249] (IL-7/CCL19 및 HSV-TK 를 발현하는 항인간 메소텔린 IL-7/CCL19 CAR 발현 벡터와, IL-7/CCL19 를 발현하지 않는 컨벤셔널 (Conv.) 항인간 메소텔린 CAR 발현 벡터의 제조)
- [0250] CAR-T 세포 요법에서는, 표적 항원에 대한 강력한 면역 응답에 의해 사이토카인 방출 증후군 등의 전신성의 부작용이 일어나는 경우가 있다. 이 문제에 대응하기 위해 자살 유전자로서 헤르페스바이러스 유래 티미딘키나아제 유전자 HSV-TK 를 도입한 CAR 컨스트럭트를 제조하였다. 이 컨스트럭트를 T 세포에 유전자 도입하고, CAR 발현 T 세포에 HSV-TK 를 발현시키면 사이토메갈로바이러스 치료약인 간시클로비르의 첨가에 의해 CAR-T 세포는 아포토시스를 유도하여 사멸되므로, 간시클로비르 투여에 의해 체내의 CAR-T 세포의 제어가 가능해진다.
- [0251] 상기 특허문헌 2 에 기재된 방법에 준하여, 최초로, N 말단측으로부터 항인간 메소텔린 scFv, 인간 CD8 막관통 영역 및 인간 CD28-4-1BB-CD3 ζ 세포 내 시그널 전달 영역을 순차 구비한 제 3 세대 CAR 컨스트럭트를 제조하였다. 당해 컨스트럭트의 C 말단에 2A 펩티드인 F2A 를 첨가하고, 추가로 그 하류에 인간 IL-7-F2A-인간 CCL19-F2A-HSV-TK 를 첨가하였다. 얻어진 scFv, 인간 CD8 막관통 영역, 인간 CD28-4-1BB-CD3 ζ 세포 내 시그널 전달 영역, 인간 IL-7, 인간 CCL19, HSV-TK 를 순차 구비한 컨스트럭트를 pMSGV1 레트로바이러스 발현 벡터 (Tamada k et al., Clin Cancer Res 18 : 6436 - 6445 (2012)) 에 삽입하여 항인간 메소텔린 scFv, 인간 CD8 막관통 영역, 인간 CD28-4-1BB-CD3 ζ 세포 내 시그널 전달 영역, 인간 IL-7, 인간 CCL19, 및 HSV-TK 를 발현하는 pMSGV 벡터를 제조하였다. 다음으로, 상기 pMSGV 벡터 내의 항인간 메소텔린 scFv 영역을, 상기 「항인간 메소텔린 CAR 의 scFv 서열 및 DNA 단편의 합성」 란에서 기재된 방법으로 합성한 각 항인간 메소텔린 scFv DNA 단편으로, 제한 효소 (NcoI 및 NotI) 처리 및 라이게이션에 의해 치환하여, 각각의 「IL-7/CCL19 발현-항인간 메소텔린 CAR 벡터」 를 제조하였다. 또한, pMSGV1 벡터는 scFv 의 N 말단측에 면역 글로블린 G 유래의 시그널 펩티드 T (서열 번호 11) 를 구비하고 있지만, 상기 scFv 영역을 VH07(15)VL07 DNA 단편으로 치환한 것에 대해서는, 추가로 시그널 펩티드로서, 상기 서열 번호 11 에 나타내는 시그널 펩티드 T 를, 서열 번호 12 에 나타내는 시그널 펩티드 P 로 치환한 것도 제조하였다. 또한 IL-7 및 CCL19 없음의 컨트롤로서, 상기 인간 IL-7-F2A-인간 CCL19-F2A-HSV-TK 대신에 HSV-TK 를 사용한 것 이외에는 상기와 동일한 방법으로 「컨벤셔널 항인간 메소텔린 CAR 벡터」 를 제조하였다.
- [0252] (IL-7/CCL19 발현-항인간 메소텔린 CAR 벡터 또는 컨벤셔널 항인간 메소텔린 CAR 벡터를 도입한 레트로바이러스의 제조)
- [0253] T 세포로의 유전자 도입을 위해 레트로바이러스를 제조하였다. 리포펙타민 3000 (라이프 테크놀로지사 제조) 을 사용하여, 상기의 각각의 IL-7/CCL19 발현-항인간 메소텔린 CAR 벡터 또는 컨벤셔널 항인간 메소텔린 CAR 벡터와 p-Ampho 플라스미드 (다카라 바이오사 제조) 를 GP2-293 패키징 세포주 (다카라 바이오사 제조) 에 트랜스펙션함으로써, IL-7/CCL19 발현-항인간 메소텔린 CAR 벡터 또는 컨벤셔널 항인간 메소텔린 CAR 벡터를 도입한 레트로바이러스를 제조하였다. 트랜스펙션으로부터 48 시간 후에 상기 레트로바이러스를 함유하는 상청을 회수하였다.
- [0254] 상기 GP2-293 세포의 배양액으로는, 10 % FCS, 1 % 페니실린-스트렙토마이신 (와코 순약사 제조) 을 첨가한 DMEM 을 사용하였다. 또, 후술하는 실시예에서 사용하는 T 세포의 배양액으로는, 2.0 % 인간 AB 형 혈청 (Sigma-Aldrich 사 제조), 1 % 페니실린-스트렙토마이신 (와코 순약사 제조), 2.5 μg/ml 의 암포테리신 B (브리스틀·마이어스 스кви브사 제조) 를 포함하는 GT-T551 을 사용하였다.
- [0255] (T 세포의 형질 도입)
- [0256] 정상인 도너의 혈액으로부터 채취한 2×10^6 개의 말초혈 단핵구를, T 세포의 활성화를 위해 항 CD3 모노클로날 항체 (5 μg/ml) 및 레트로벡틴 (등록상표 : 다카라 바이오사 제조, 25 μg/ml) 을 고층화 (固層化) 한 플레인

트 상에서, IL-2 (Peprotech 사 제조) 와 함께, 37 °C, 5 % CO₂ 인큐베이터에서 3 일간 배양하였다. 배양 개시 후 2 일째에, 상기에서 제조한 IL-7/CCL19 발현-항인간 메소텔린 CAR 벡터 또는 컨벤셔널 항인간 메소텔린 CAR 벡터를 도입한 레트로바이러스를 함유하는 상청을, 미리 25 µg/ml 의 레트로벡틴 (다카라 바이오사 제조) 으로 코트한 표면 미처리 24 웰 플레이트에 1 웰당 500 µl 씩 첨가하고, 2000 g, 2 시간의 원심에 의해 레트로 바이러스 프리로드 플레이트를 제조하였다. 플레이트는 합계 2 장 제조하고, 원심 종료 후 1.5 % BSA/PBS 로 세정하고, 사용할 때까지 4 °C 에서 보존하였다. 배양 3 일째에, 활성화시킨 세포를 상기 플레이트로부터 회수하고, 세포 현탁액 (1 × 10⁵ 세포/ml) 으로서 조정하였다. 이 세포 현탁액을 1 웰당 1 ml 씩 레트로 바이러스 프리로드 플레이트에 첨가하고, IL-2 의 존재하에서 37 °C, 5 % CO₂ 인큐베이터에서 24 시간 배양 하고, 1 회째의 레트로바이러스 감염을 실시하였다. 다음날 (배양 4 일째), 각 웰의 세포 용액을, 보존하고 있던 2 장째의 바이러스 프리로드 플레이트로 옮기고, 500 g 으로 1 분간 원심 후, 37 °C 에서 4 시간 배양하여, 2 번째의 감염을 실시하였다. 37 °C 에서 4 시간 배양 후, 각 웰의 세포 현탁액 1 ml 를 새로운 12 웰 세포 배양 플레이트로 옮기고, IL-2 를 함유하는 새로운 배양액 (GT-T551) 으로 4 배로 희석시키고, 37 °C, 5 % CO₂ 인큐베이터로 배양하였다. 말초혈 단핵구의 배양 개시일로부터 세어 7 일째까지 배양하고, IL-7/CCL19 발현-항인간 메소텔린 CAR 벡터를 도입한 T 세포인 「항인간 메소텔린 CAR-IL-7/CCL19 발현 T 세포」 또는 컨벤셔널 항인간 메소텔린 CAR 벡터를 도입한 T 세포인 「항인간 메소텔린 CAR 발현 T 세포」 를 얻었다. 항인간 메소텔린 CAR-IL-7/CCL19 발현 T 세포에는, 외래의 항인간 메소텔린 CAR 을 코드하는 핵산, 외래의 IL-7 을 코드하는 핵산, 및 외래의 CCL19 를 코드하는 핵산을 함유하고 있다. 항인간 메소텔린 CAR 발현 T 세포에는, 항인간 메소텔린 CAR 을 코드하는 핵산을 함유하고 있고, 외래의 IL-7 을 코드하는 핵산, 및 외래의 CCL19 를 코드하는 핵산을 함유하고 있지 않다. 또 동시에, CAR 음성 세포 컨트롤로서, 동일한 정상인 도너로부터 얻은 말초혈 단핵구를 동일한 수법으로 활성화하지만 레트로바이러스 감염을 하고 있지 않은 「CAR, IL-7, 및 CCL19 비발현-T 세포」 (비유전자 도입 세포 : 비감염 (Non-infection)) 를 제조하였다.

[0257] 여기서, 상기와 같이 T 세포에 항인간 메소텔린 CAR 을 코드하는 핵산, IL-7 을 코드하는 핵산, 및 CCL19 를 코드하는 핵산을 도입하기 위해서 레트로바이러스 벡터를 사용하고 있다. 그 때문에, 상기 각각의 핵산을 도입한 T 세포를 배양하여 증식시킨 경우에는, 그 T 세포의 세포질 내에 레트로바이러스 벡터를 포함하고 있는 것도 있지만, 대부분은 T 세포에 있어서, 항인간 메소텔린 CAR 을 코드하는 핵산, IL-7 을 코드하는 핵산, 및 CCL19 를 코드하는 핵산이 게놈에 삽입된다. 그 T 세포에 있어서, 항인간 메소텔린 CAR 을 코드하는 핵산, IL-7 을 코드하는 핵산, 및 CCL19 를 코드하는 핵산이 게놈에 삽입된 경우에는, 항인간 메소텔린 CAR, IL-7, 및 CCL19 는 도입한 외래의 재조합 컨스트럭트로부터 발현되게 된다.

[0258] [실시에 2] 플로우 사이토메트리에 의한 CAR 발현 측정

[0259] (플로우 사이토메트리 해석)

[0260] 메소텔린을 항원으로서 인식하는 CAR 의 발현 레벨 해석을 플로우 사이토메트리 해석에 의해 실시하였다. 제조한 항인간 메소텔린 CAR-IL-7/CCL19 발현 T 세포를, 리컴비넌트 인간 메소텔린 (C 말단에 6-His 를 포함하는 것) (BioLegend 사 제조), 피코에리트린 (PE) 표지 항 6-His 모노클로날 항체 (abcam 사 제조), 및 알로피코시아닌 (APC) 표지 항 CD8 모노클로날 항체 (Affymetrix 사 제조) 와 반응시켜, 염색을 실시하였다. 플로우 사이토미터는 EC800 (소니사 제조) 을 사용하고, 데이터 해석은 FlowJo software (Tree Star 사 제조) 를 사용하였다.

[0261] (결과)

[0262] 먼저, scFv 영역으로서 VH07(15)VL07 (시그널 펩티드 T 에 의해 발현), VH07(15)VL07 (시그널 펩티드 P 에 의해 발현) 또는 VH36(15)VL36 을 갖는 항인간 메소텔린 CAR-IL-7/CCL19 발현 T 세포의 플로우 사이토메트리 해석 결과를 도 2 에 나타낸다. 도 2 중, 각각의 그래프에 있어서 가로축은 CAR 의 발현, 세로축은 CD8 의 발현을 나타낸다. 도 2 에 나타내는 바와 같이, CAR, IL-7 및 CCL19 비발현-T 세포 (비감염) 와 비교하여 3 종류의 항인간 메소텔린 CAR-IL-7/CCL19 발현 T 세포는 모두 CAR 의 발현이 높은 것이 확인되었다.

[0263] 다음으로, scFv 영역으로서 VH07(15)VL07, VL07(15)VH07, VH07(25)VL07, VL07(25)VH07 을 갖는 항인간 메소텔린 CAR-IL-7/CCL19 발현 T 세포의 플로우 사이토메트리 해석 결과를 도 3 에 나타낸다. 도 3 중, 각각의 그래프에 있어서 가로축은 CAR 의 발현, 세로축은 CD8 의 발현을 나타낸다. (a) 는 CAR, IL-7, 및 CCL19 비발현-T 세포 (비감염), (b) ~ (e) 는 각각의 scFv 영역을 갖는 항인간 메소텔린 CAR-IL-7/CCL19 발현 T 세포의 결과이다. 또, 도면 중의 수치는 각각의 포플레이션의 퍼센티지를 나타낸다. 도 3(b) ~ (e) 에 나

타내는 바와 같이, 항인간 메소텔린 CAR-IL-7/CCL19 발현 T 세포에 있어서, CAR 의 발현이 확인되었다.

- [0264] [실시예 3] 각 종양 세포의 메소텔린 발현
- [0265] (플로우 사이토메트리 해석)
- [0266] 메소텔린을 발현하는 종양 세포주를 확인하기 위해, 각 종양 세포주에 있어서의 메소텔린의 발현 레벨을 확인하였다. 양성 중피종의 세포주 ACC-MESO-1, Y-MESO8A, NCI-H2052, NCI-H226, MST0211H, 신장암의 세포주 A498 을, PE 로 표지한 시판되는 메소시린 항체 (Catalog Number FAB32652P : R & D systems 사 제조) 로 염색하고, 플로우 사이토메트리 해석에 의해 각 종양 세포에 있어서의 메소텔린의 발현을 측정하였다. 또한, PE 표지 항인간 메소텔린 항체는, 3 μ g/샘플로 염색을 실시하였다. 플로우 사이토미터는 EC800 (소니사 제조) 을 사용하고, 데이터 해석은 FlowJo software (Tree Star 사 제조) 를 사용하였다.
- [0267] (결과)
- [0268] 결과를 도 4 에 나타낸다. 양성 중피종의 세포주 ACC-MESO-1, Y-MESO8A, NCI-H2052, NCI-H226, MST0211H 에 있어서, 메소텔린의 발현이 확인되었다. 한편, 신장암의 세포주 A498 에 있어서는 메소텔린의 발현은 확인되지 않았다.
- [0269] [실시예 4] 세포 상해성 시험-1
- [0270] (공배양 시험)
- [0271] 항인간 메소텔린 CAR-IL-7/CCL19 발현 T 세포 (scFv 영역은 VH07(15)VL07 또는 VH07(25)VL07) 를 이펙터로 하고, 메소텔린 양성 종양 세포주 (ACC-MESO-1, NCI-H2052) 또는 메소텔린 음성 종양 세포주 (A498) 와 함께 배양 플레이트 상에서 이펙터 : 종양 세포비를 1 : 1, 1 : 3, 1 : 5 (1 : 5 는 IFN- γ 의 측정 해석만) 가 되도록 조정된 후에, 37 $^{\circ}$ C 인큐베이터에서 공배양을 실시하였다. 이러한 공배양의 설명을 도 5 에 나타낸다. 배양액은 10 % 소태아 혈청 (Fetal calf serum : FCS), 1 % 페니실린-스트렙토마이신 (와코 순약사 제조), 50 μ M 의 2-ME (Gibco 사 제조) 및 25 mM 의 HEPES (Sigma-Aldrich 사 제조) 를 포함하는 RPMI 를 사용하였다. 공배양 개시로부터 2 일 후에 잔존하고 있는 종양 세포주를 플로우 사이토메트리로 측정함과 함께 배양 상청 중에 산생된 IFN- γ 를 시판되는 IFN- γ ELISA 키트 (BioLegend 사 제조) 를 사용하여 측정하였다. 공배양 개시로부터 2 일 후에 잔존하고 있는 종양 세포주의 플로우 사이토메트리에서의 측정 결과를 도 6a ~ 6c 에, 공배양 후의 산생된 IFN- γ 의 측정 결과를 도 7a ~ 7c 에 나타낸다. 또한, 항인간 메소텔린 CAR-IL-7/CCL19 발현 T 세포의 컨트롤로서, CAR, IL-7, 및 CCL19 비발현-T 세포 (비감염) 를 사용하였다. 플로우 사이토메트리시에는 사세포를 Zombie Yellow (등록상표 : BioLegend 사 제조) 로 염색하여 구별하고, T 세포를 PE 표지 항 CD45 모노클로날 항체 (BioLegend 사 제조) 로 염색하였다. 플로우 사이토미터는 BD LSRFortessa X-20 (BD Biosciences 사 제조) 을 사용하고, 데이터 해석은 FlowJo software (Tree Star 사 제조) 를 사용하였다.
- [0272] (결과)
- [0273] 도 6a ~ 6c 에 나타내는 바와 같이, 컨트롤의 CAR, IL-7, 및 CCL19 비발현-T 세포 (비감염) 의 각각과 타겟 종양 세포의 공배양에 있어서는, 어느 타겟 종양 세포도 종양만의 웰 (tumor only) 과 동일한 정도로 증식되어 있는 것이 나타났다. 한편, 항인간 메소텔린 CAR-IL-7/CCL19 발현 T 세포에 있어서는, 메소텔린 음성 타겟 세포 (A498 : 도 6c) 와의 공배양에서는, 타겟 종양 세포는, 종양만의 웰과 동일하게 증식하고 있었지만, 메소텔린 양성 종양 세포 (ACC-MESO-1 : 도 6a, NCI-H2052 : 도 6b) 와의 공배양에서는, 메소텔린 양성 종양 세포만의 웰 및 컨트롤 세포와의 공배양의 웰과 비교하여, 분명하게 종양 세포의 수가 감소하고 있는 것이 관찰되었다. 이것으로부터, 항인간 메소텔린 CAR-IL-7/CCL19 발현 T 세포는 항원 특이적으로 종양 세포를 상해하고 있는 것을 확인할 수 있었다.
- [0274] 또한 도 7a ~ c 에 나타내는 바와 같이, 공배양 후의 상청을 사용한 IFN- γ 의 ELISA 해석에 있어서도, 항인간 메소텔린 CAR-IL-7/CCL19 발현 T 세포와 메소텔린 양성 종양 세포 (ACC-MESO-1 : 도 7a, NCI-H2052 : 도 7b) 의 공배양의 상청에 있어서만 현저한 IFN- γ 의 산생이 확인되었다.
- [0275] [실시예 5] 세포 상해성 시험-2
- [0276] (공배양 시험)
- [0277] 실시예 4 와 동일한 방법으로, 항인간 메소텔린 CAR-IL-7/CCL19 발현 T 세포 (scFv 영역은 VHMO(15)VLMO,

VLMO(15)VHMO, VHMO(25)VLMO, 또는 VLMO(25)VHMO), 또는 「CAR, IL-7 및 CCL19 비발현-T 세포」 (비유전자 도입 세포 : 비감염 (Non-infection)) 를, 메소텔린 양성 종양 세포주인 PAN02 종양 세포주 또는 메소텔린 음성 종양 세포주와 함께 배양 플레이트 상에서 이펙터 : 종양 세포비를 1 : 1, 1 : 3 이 되도록 조정 한 후에, 37 °C 인큐베이터에서 공배양을 실시하였다. 공배양 개시로부터 3 일 후 또는 5 일 후에 잔존하고 있는 백혈구 또는 PAN02 종양 세포주의 플로우 사이토메트리에서의 측정 결과를 도 8 에, 공배양 후의 산생된 IFN- γ 의 측정 결과를 도 9 에 나타낸다. 또한, 본 실시예 및 후술하는 실시예 5 의 「종양 모델에서의 치료 효과」 에 있어서 사용한 항인간 메소텔린 CAR, IL-7 및 CCL19 발현하는 T 세포는, pMSGV1 레트로바이러스 발현 벡터로서, 인간 IL-7-F2A-인간 CCL19-F2A-HSV-TK 대신에, 마우스 IL-7-F2A-마우스 CCL19-F2A-HSV-TK, 인간 CD8 막관통 영역 및 인간 CD28-4-1BB-CD3 ζ 세포 내 시그널 전달 영역 대신에 마우스 CD8 막관통 영역 및 마우스 CD28-4-1BB-CD3 ζ 세포 내 시그널 전달 영역이 삽입되도록 조제한 pMSGV1 레트로바이러스 발현 벡터를 사용하고, T 세포로는 비장 및 림프구 유래의 마우스 T 세포를 사용하여 실시예 1 의 방법에 준하여 제조하였다 (이하 「항인간 메소텔린 CAR-마우스 IL-7/마우스 CCL19 발현 마우스 T 세포」 라고 한다). 또, 본 실시예에서 사용한 「CAR, IL-7, 및 CCL19 비발현-T 세포」 (비유전자 도입 세포 : 비감염 (Non-infection)) 는, T 세포로서 비장 및 림프구 유래의 마우스 T 세포를 사용하였다.

[0278] (결과)

[0279] 도 8 에 나타내는 바와 같이, 항인간 메소텔린 CAR-마우스 IL-7/마우스 CCL19 발현 마우스 T 세포는 종양 세포를 상해하고 있는 것을 확인할 수 있었다. 또, 도 9 에 나타내는 바와 같이, 공배양 후의 상청을 사용한 IFN- γ 의 ELISA 에 있어서도, 항인간 메소텔린 CAR-마우스 IL-7/마우스 CCL19 발현 마우스 T 세포와 PAN02 종양 세포주의 공배양의 상청에 있어서만 현저한 IFN- γ 의 산생이 확인되었다.

[0280] [실시예 6] 종양 모델에서의 치료 효과

[0281] (종양 모델 마우스에 대한 항마우스 메소텔린 CAR-IL-7/CCL19 발현 T 세포의 투여)

[0282] 7 - 10 주령의 C57BL/6 마우스 (SLC 사로부터 구입) 에 5×10^5 개의 PAN02 췌암 세포주를 피하 접종하였다. 접종 후 7 일째에 항암제인 시클로포스파미드 (Cyclophosphamide : CPA, 100 mg/kg) 를 복강 내에 투여하고, 10 일째에 1×10^6 개의 상기 실시예 5 에서 제조한 항인간 메소텔린 CAR-마우스 IL-7/마우스 CCL19 발현 마우스 T 세포 (scFv 영역은 VHMO(15)VLMO, VLMO(15)VHMO, VHMO(25)VLMO, 또는 VLMO(25)VHMO) 또는 「항인간 메소텔린 CAR 발현 마우스 T 세포」 를 정맥내에 투여하였다. VHMO(15)VLMO, VHMO(25)VLMO 에 있어서의 마우스의 생존율의 결과를 도 10 에, VHMO(15)VLMO, VLMO(15)VHMO, VHMO(25)VLMO, 또는 VLMO(25)VHMO 에 있어서의 종양의 체적의 결과를 도 11 에 나타낸다. 도 10 중, 가로축은 PAN02 를 피하 접종 후의 일수 (마우스에 PAN02 를 피하 접종한 날을 0 일로 하였다), 세로축은 생존율이다. 또, 도 11 중, 가로축은 PAN02 를 피하 접종 후의 일수, 세로축은 종양 체적 (종양의 장축 \times (종양의 단축)²/2 (mm³)) 이다. 「미처리 (no treatment)」 는 CPA 만 투여한 그룹, 「Conv.」 는 CPA 투여 후에 항인간 메소텔린 CAR 발현 마우스 T 세포를 투여한 그룹, 「7 \times 19」 는 CPA 투여 후에 항인간 메소텔린 CAR-마우스 IL-7/마우스 CCL19 발현 마우스 T 세포를 투여한 그룹을 나타낸다. 또한, 상기 「항인간 메소텔린 CAR 발현 마우스 T 세포」 는, 상기 실시예 1 에 기재된 「항인간 메소텔린 CAR 발현 T 세포」 의 제조 방법에 있어서, pMSGV1 레트로바이러스 발현 벡터로서, 인간 IL-7-F2A-인간 CCL19-F2A-HSV-TK 대신에 HSV-TK, 인간 CD8 막관통 영역 및 인간 CD28-4-1BB-CD3 ζ 세포 내 시그널 전달 영역 대신에 마우스 CD8 막관통 영역 및 마우스 CD28-4-1BB-CD3 ζ 세포 내 시그널 전달 영역이 삽입되도록 조제한 pMSGV1 레트로바이러스 발현 벡터를 사용하여, T 세포로서 비장 및 림프구 유래의 마우스 T 세포를 사용한 것 이외에는 실시예 1 과 동일한 방법으로 제조하였다.

[0283] (결과)

[0284] 도 10 에 나타내는 바와 같이, 본 발명의 항인간 메소텔린 CAR-IL-7/CCL19 발현 T 세포를 투여함으로써, 생존율이 유의하게 높아지는 것이 분명해졌다. 또, 도 11 에 나타내는 바와 같이 본 발명의 항인간 메소텔린 CAR-IL-7/CCL19 발현 T 세포를 투여함으로써, 종양의 증식이 분명하게 억제되는 것이 분명해졌다. 이것으로부터, 종양 모델 마우스에 있어서, 항인간 메소텔린 CAR-IL-7/CCL19 발현 T 세포는 우수한 항종양 활성을 나타내는 것이 분명해졌다.

[0285] [실시예 7] 종양 모델에서의 치료 효과-2

[0286] 항인간 메소텔린 CAR-IL-7/CCL19 발현 T 세포는 우수한 항종양 활성을 나타내는 것이 분명해졌지만, 더욱 장기

적인 항종양 효과 및 체암 이외에서의 항종양 효과를 확인하기 위해서, 인간 악성 흉막 중피종 세포주를 면역 부전 마우스에 투여하여 종양을 형성시키고, 그 후, 항인간 메소텔린 CAR-IL-7/CCL19 발현 T 세포의 투여의 유무에 의한 143 일간의 종양 재발의 유무를 조사하였다. 본 실시예에서 사용하는 「ACC-MESO-1-GFP-Luc 주의 제조 방법」, 「T 세포의 활성화 방법」은 이하와 같다.

- [0287] (ACC-MESO-1-GFP-Luc 주의 제조)
- [0288] 아이치현 암 센터 연구소 세키도 요시타카 선생님으로부터 분여받은 메소텔린 양성 종양 세포주인 인간 악성 중피종 세포주 ACC-MESO-1 에 렌티바이러스를 사용하여 녹색 형광 단백질-루시페라아제 (GFP-Luc) 의 유전자 도입을 실시하였다.
- [0289] 제 0 일에 96 웰 플레이트에 1×10^3 세포/웰로 ACC-MESO-1 을 뿌렸다. 배지는 10 % FBS 첨가 RPMI1640 (Gibco 사 제조) 을 사용하였다. 제 1 일에 발광 세포 제조용 렌티바이러스 입자인 RediFect Red-FLuc-GFP (PerkinElmer 사 제조) 를 MOI 100 으로 첨가하여 형질 도입을 개시하였다. 그 때에 유전자 도입 효율을 높이기 위해, Hexadimethrine Bromide (Sigma-aldrich 사 제조) 를 재중농도 $4 \mu\text{g/ml}$ 가 되도록 배지에 첨가하였다. 바이러스 첨가 24 시간 후 (제 2 일) 에 바이러스를 포함하는 배지를 제거하여 배지의 교환을 실시하였다. 배양 계속 후, GFP 를 발현하는 세포만을 SH800 (SONY 사 제조) 으로 소탕하고, GFP 를 발현하는 ACC-MESO-1, 즉 「ACC-MESO-1-GFP-Luc」 를 얻었다.
- [0290] (항인간 메소텔린 CAR-IL-7-CCL19 발현 T 세포 및 항인간 메소텔린 CAR 발현 T 세포의 제조)
- [0291] 본 실시예 7 에서는, 실시예 1 에 의해 얻어진 IL-7/CCL19 발현-항인간 메소텔린 CAR 벡터 (scFv 영역은 VH07(15)VL07 DNA 단편으로 치환 : 시그널 펩티드는 서열 번호 11 에 나타내는 시그널 펩티드 T) 또는 컨벤셔널 항인간 메소텔린 CAR 벡터 (scFv 영역은 VH07(15)VL07 DNA 단편으로 치환 : 시그널 펩티드는 서열 번호 11 에 나타내는 시그널 펩티드 T) 를 사용하였다.
- [0292] (T 세포의 활성화)
- [0293] 제 0 일에 정상인 도너로부터 채취한 2×10^6 개의 말초혈 단핵구를, 레트로벡틴 $25 \mu\text{l/ml}$ (다카라 바이오사 제조) 와, 항인간 CD3 모노클로날 항체 $5 \mu\text{g/ml}$ (invitrogen 사 제조, $5 \mu\text{g/ml}$) 를 고층화시킨 세포 배양용 6 웰 플레이트에서, IL-2 (Peprotech 사 제조) 와 함께 37°C , 5 % CO_2 인큐베이터에서 배양을 개시하였다. 배양액에는 OpTmizer CTS (Gibco 사 제조) 에 L-글루타민 2 mM (Gibco 사 제조), 1 % 페니실린-스트렙토마이신 (와코 순약 공업사 제조) 및 훈기존 $2.5 \mu\text{g/ml}$ (브리스틀·마이어드 스쿼브사 제조) 를 첨가한 것을 사용하였다. 3 일간 배양하고, 제 3 일에 T 세포가 활성화되어 형태 변화가 일어나 있는 것을 현미경하에서 확인하고 활성화 T 세포를 얻었다.
- [0294] (종양의 재발 관찰)
- [0295] 먼저, 제 0 일에 8 주령의 암컷 NSG 면역 부전 마우스에 대해 2×10^6 세포/마우스로 상기 ACC-MESO-1-GFP-Luc 를 흉강 내 투여하였다. 제 1 일에 In vivo 이미징 시스템 (in vivo imaging system : IVIS) 을 사용하여 흉강 내에 대한 종양 생착을 확인하였다. 제 1 일에 실시예 1 의 방법으로 제조 후에 동결되어 있던 항인간 메소텔린 CAR 발현 T 세포, 항인간 메소텔린 CAR-IL-7-CCL19 발현 T 세포 (scFv 영역은 VH07(15)VL07), 및 상기 방법으로 활성화된 T 세포를 해동하였다. 상기 항인간 메소텔린 CAR 발현 T 세포와 상기 항인간 메소텔린 CAR-IL-7-CCL19 발현 T 세포의 CAR 발현율은 각각 49.6 %, 32.5 % 였기 때문에, 항인간 메소텔린 CAR 발현 T 세포에 상기 활성화 T 세포를 첨가하여 양자의 CAR 발현율을 맞춘 후, 1×10^5 세포의 상기 항인간 메소텔린 CAR 발현 T 세포를 투여하는 군 (N = 5), 1×10^5 세포의 상기 항인간 메소텔린 CAR-IL-7-CCL19 발현 T 세포를 투여하는 군 (N = 5) 을 준비하였다. 항인간 메소텔린 CAR 발현 T 세포 및 항인간 메소텔린 CAR-IL-7-CCL19 발현 T 세포의 투여는 미정맥으로부터 정맥내 투여로 실시하였다. 또한 제 3 일 이후, IVIS 를 사용한 종양 형광 강도의 측정 (발광량 : Total Flux (photons/sec) 를 실시하였다. 결과를 도 12a, b 에 나타낸다. 또, 상기 결과에 있어서의 투여로부터의 일수와 마우스의 생존율의 관계를 그래프화한 것을 도 13 에, 투여로부터의 일수와 토탈 형광량 (photons/second) 의 관계를 그래프화한 것을 도 14 에 나타낸다. 도 12a, b, 도 13, 및 도 14 중, 항인간 메소텔린 CAR-IL-7-CCL19 발현 T 세포를 투여한 것을 「7 × 19 CAR-T」 로 나타내고, 항인간 메소텔린 CAR 발현 T 세포를 투여한 것을 「통상의 CAR-T (Conventional CAR-T)」 로 나타내고 있다. 또한, 본 실시예 7 에서는 내재성 T 세포가 결손되어 있는 NSG 면역 부전 마우스를 레시피언트

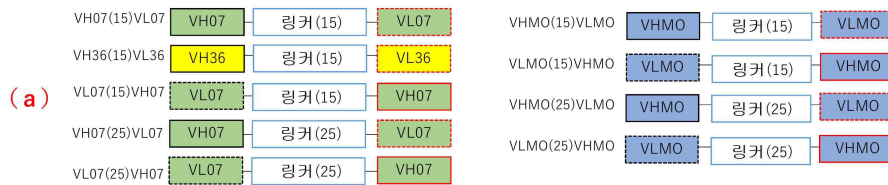
로서 사용하고 있기 때문에, 레시피엔트의 내재성 T 세포의 영향은 제외되고 있으며, 투여한 항인간 메소텔린 CAR-IL-7-CCL19 발현 T 세포 자체의 효과를 평가하고 있게 된다.

[0296] 도 12a, b, 도 13, 및 도 14 에 나타내는 바와 같이, 제 21 일에는 7×19 CAR-T, 통상의 CAR-T 모두 종양 형광 강도가 거의 관찰되어 있지 않다. 7×19 CAR-T 에 있어서는, 그 후 제 143 일 까지 종양 형광이 관찰되지 않고, 재발이 완전히 억제되어 있는 것이 확인되었다. 한편, 통상의 CAR-T 에서는 제 45 일 근처에서 종양 형광이 관찰되기 시작하여, 제 115 일에는 종양 형광 강도가 높아지고, 제 129 일에는 1 마리 사망하고, 제 143 일에는 나머지 4 마리도 사망하였다. 따라서, CAR-IL-7-CCL19 발현 T 세포의 투여에 의해, 체암뿐만 아니라 인간 악성 흉막 중피종 등의 인간 메소텔린을 발현하는 암세포에 대한 세포 상해 활성을 갖는 것, 및 장기적인 항종양 효과를 갖는 것이 분명해졌다.

[0297] 본 출원은 2017년 12월 24일에 출원된 일본 특허출원 2017-247109호를 기초로 하고 있으며, 그 내용은 본 명세서에 모두 포함되는 것이다.

도면

도면1



(b)

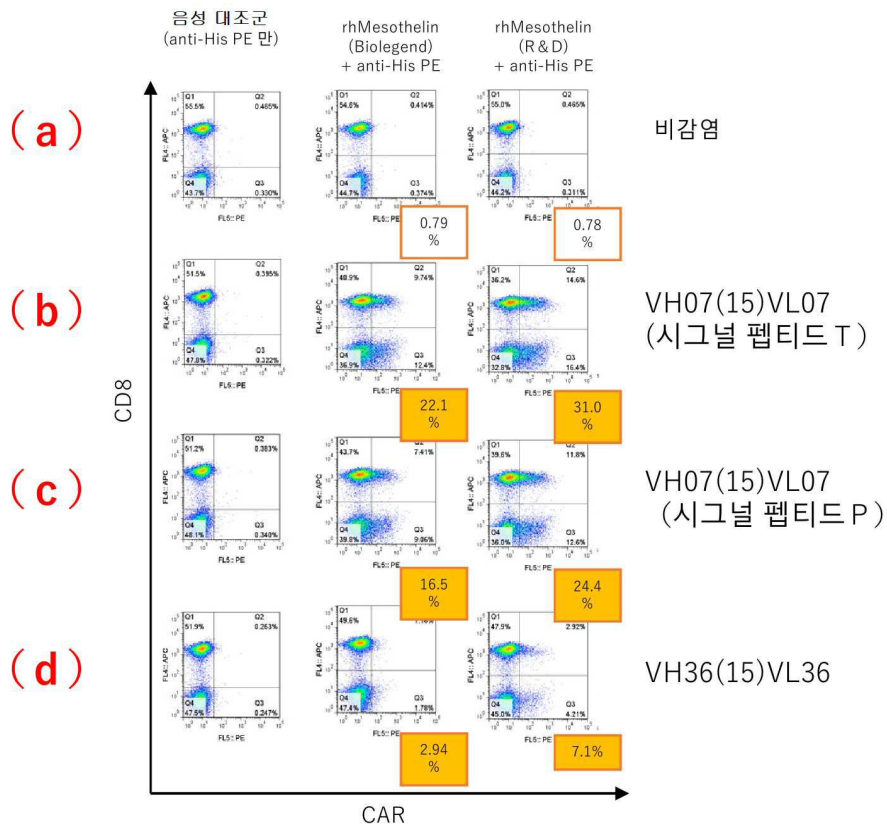
중사슬 가변 영역 (VH)		
VH07	서열 번호 1	QVQLQDSGPGLVTPSQTLTLTCAISGDSVSSNSATWNWIRQSPSRGLEWLRGTYRYSKWYNDYAVSVKSRMSINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARGMMTTYGMDVWGGGTTVTVSSGILG
VH36	서열 번호 3	QVQLQDSGPGLVTPSQTLTLTCAISGDSVSSNSATWNWIRQSPSRGLEWLRGTYRYSKWYNDYAVSVKSRMSINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARGMMTTYGMDVWGGGTTVTVSSGILG
VHMO	서열 번호 5	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTFTGMYNWVRGAPGGGLEWMGMINPTKGTWLYAQKFGQGRVTMTDRTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWHHGTWIFDYWGQGLTVTVSS

경사슬 가변 영역 (VL)		
VL07	서열 번호 2	QPVLQSSSLASPGASASLTCTLRSGINVGPRYRYWYQKPGSPPPQYLLNYKSDSDKQGGSGVPSRFSQSKDASANAGVLLISGLRSEADYYCMVHSSAAVFGGGTQLTVLS
VL36	서열 번호 4	QPVLQSSSLASPGASASLTCTLRSGINVGPRYRYWYQKPGSPPPQYLLNYKSDSDKQGGSGVPSRFSQSKDASANAGVLLISGLRSEADYYCMVHSSAAVFGGGTQLTVLS
VLMO	서열 번호 6	DIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSSNIGSNVSWYQQLPGTAPKLLIYNDNQRPSPVDFRFSQSKSGTASLAITGLQSEADYYCSTYDRRTFSVFGGGTKLTVL

링커		
(15)	서열 번호 26	GGGGSGGGSGGGGS
(25)	서열 번호 27	SSADDAKKDAKKDAKKDAKKD

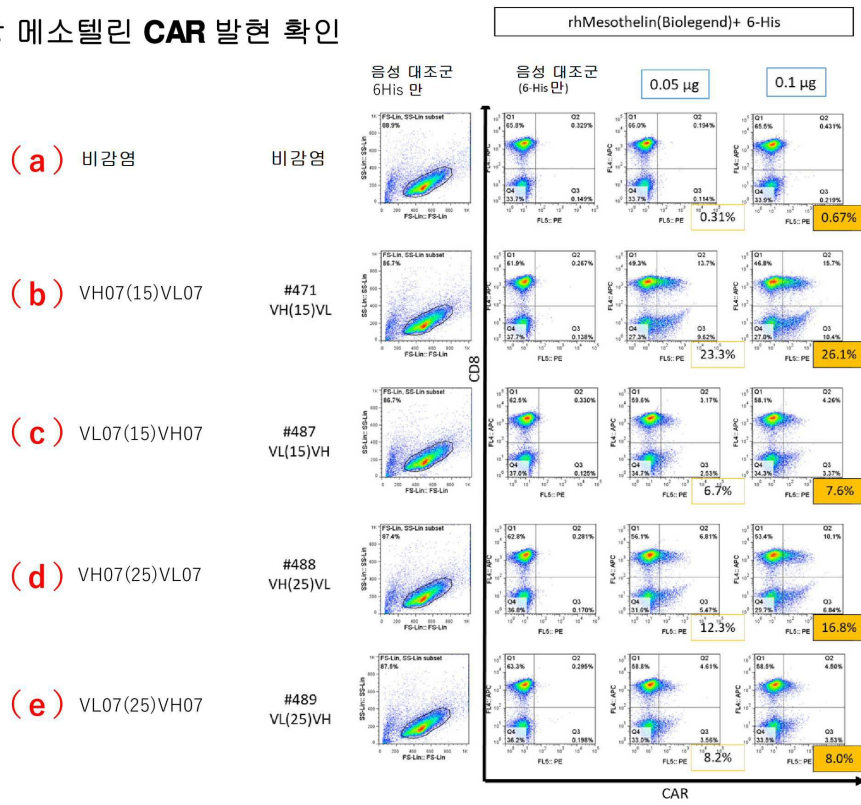
도면2

항 메소텔린 CAR 발현 확인



도면3

항 메소텔린 CAR 발현 확인



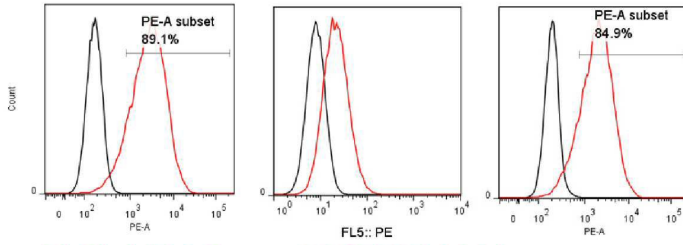
도면4

메소텔린의 발현 레벨

중피종

ACC-MESO1 Y-MESO8A NCI-H2052

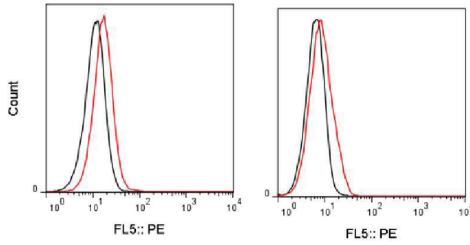
양성



NCI-H226

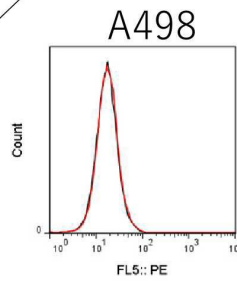
MSTO211H

약양성

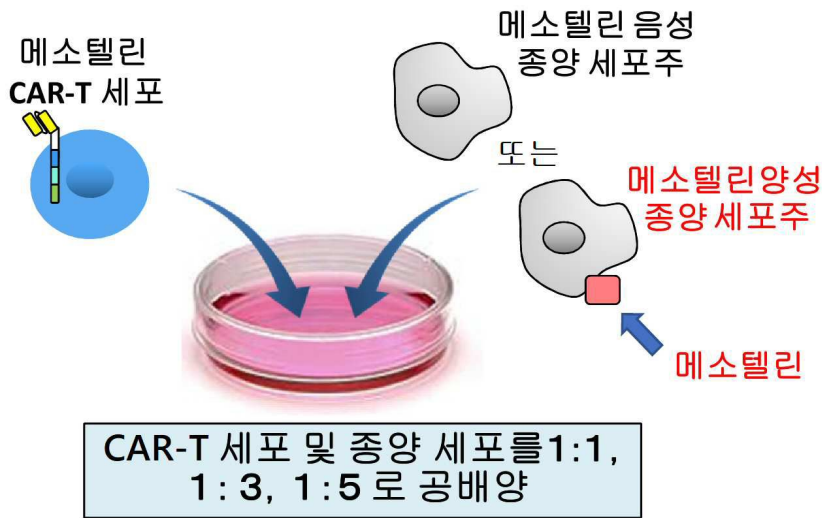


음성

위암

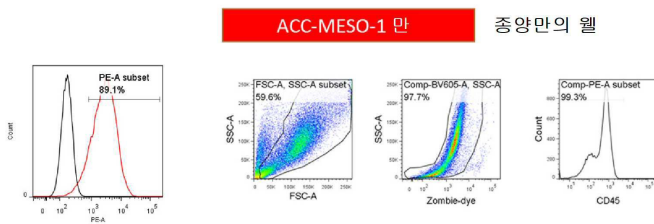


도면5

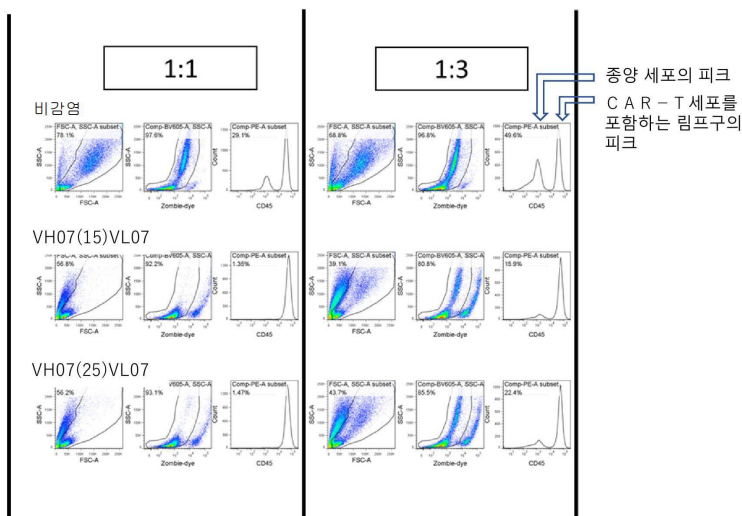


➡ 2일째의 FACS 에 의한 잔존 종양 및 CAR-T 세포의 분석

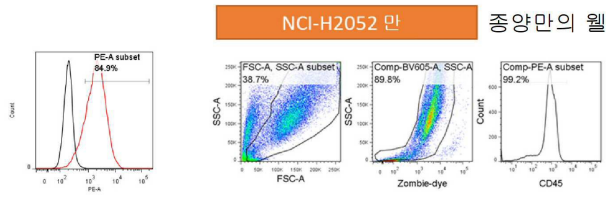
도면6a



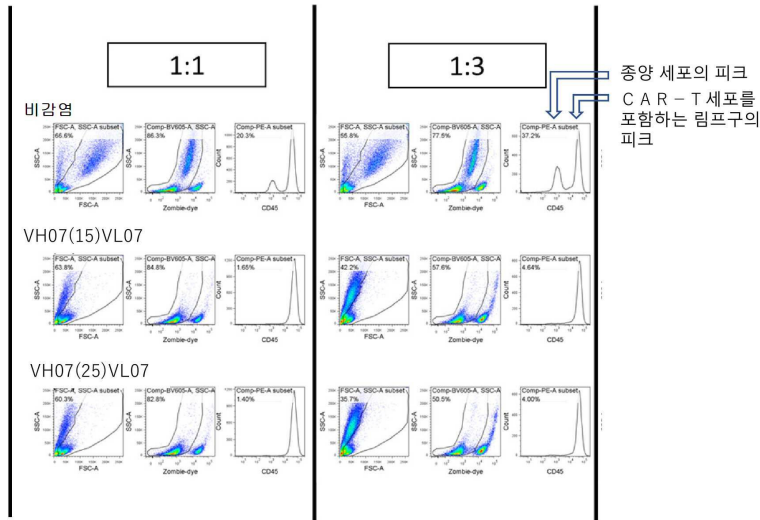
공배양 VS ACC-MESO-1 공배양의 웰



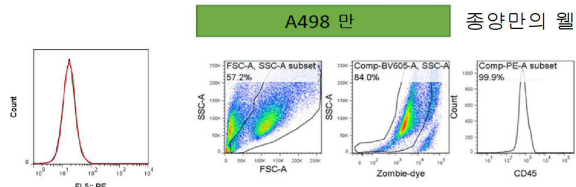
도면6b



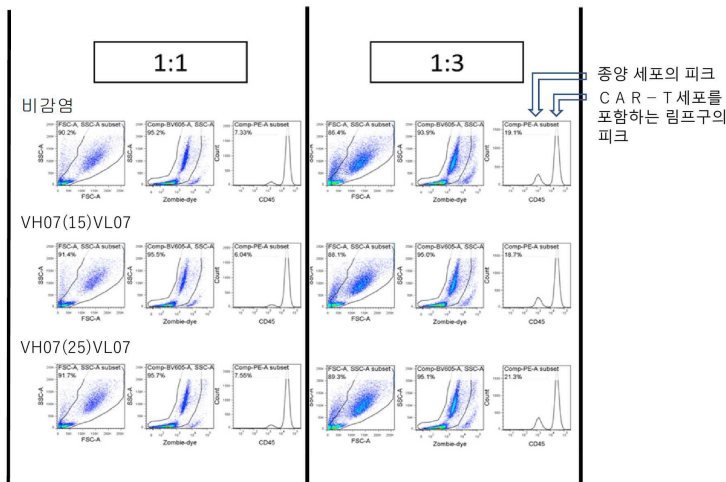
공배양 VS NCI-H2052 공배양의 웰



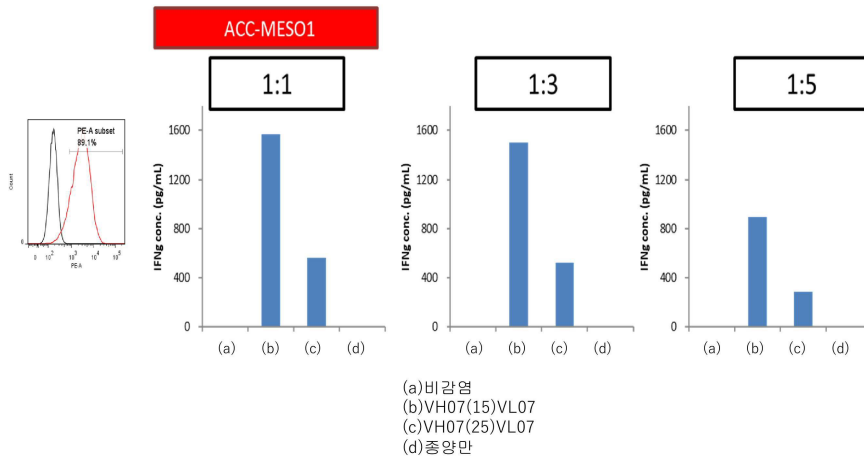
도면6c



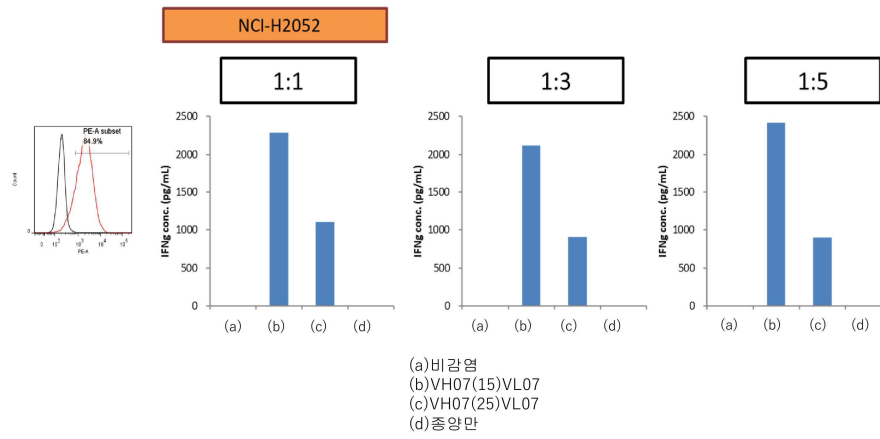
공배양 VS A498 공배양의 웰



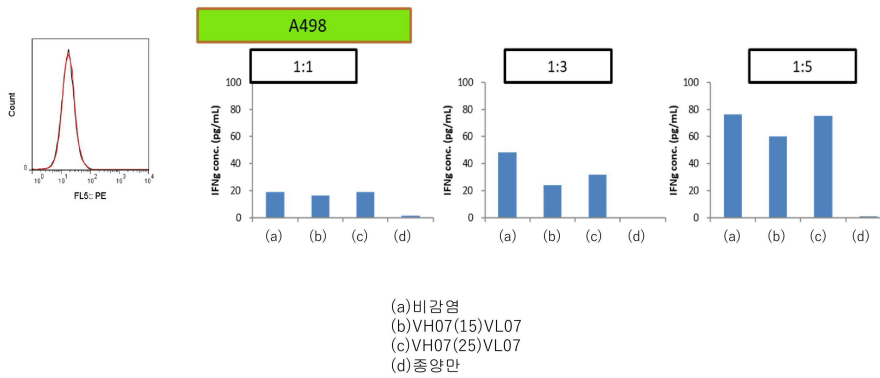
도면7a



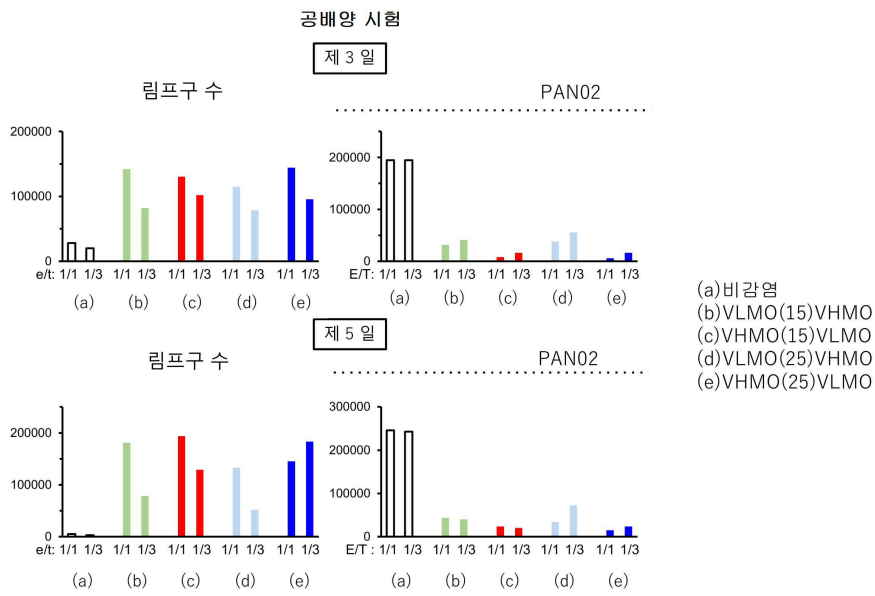
도면7b



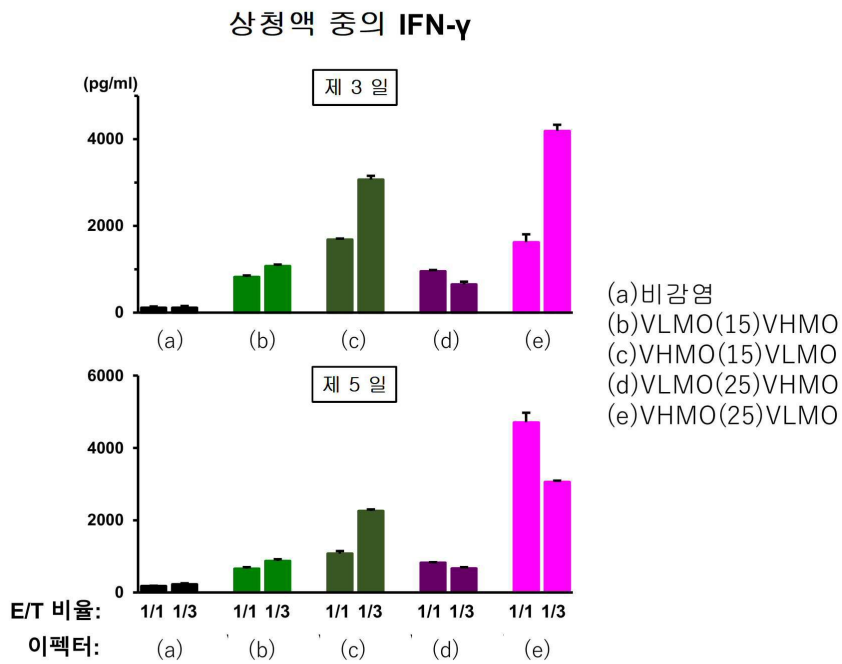
도면7c



도면8

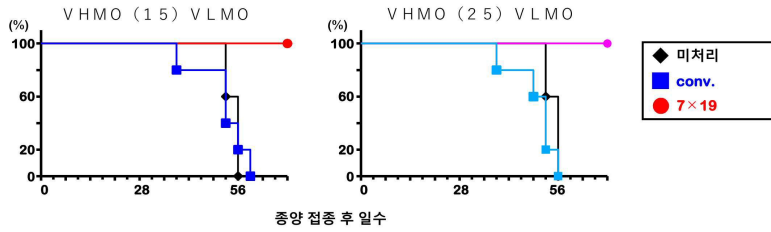


도면9



도면10

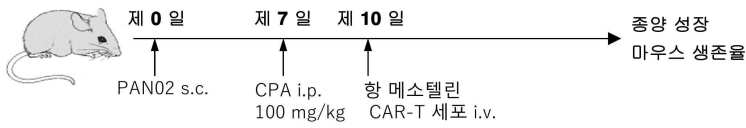
미리 확립된 마우스 고형 종양 모델에 있어서의
7x19 메소텔린 CAR-T 세포의 치료 효과



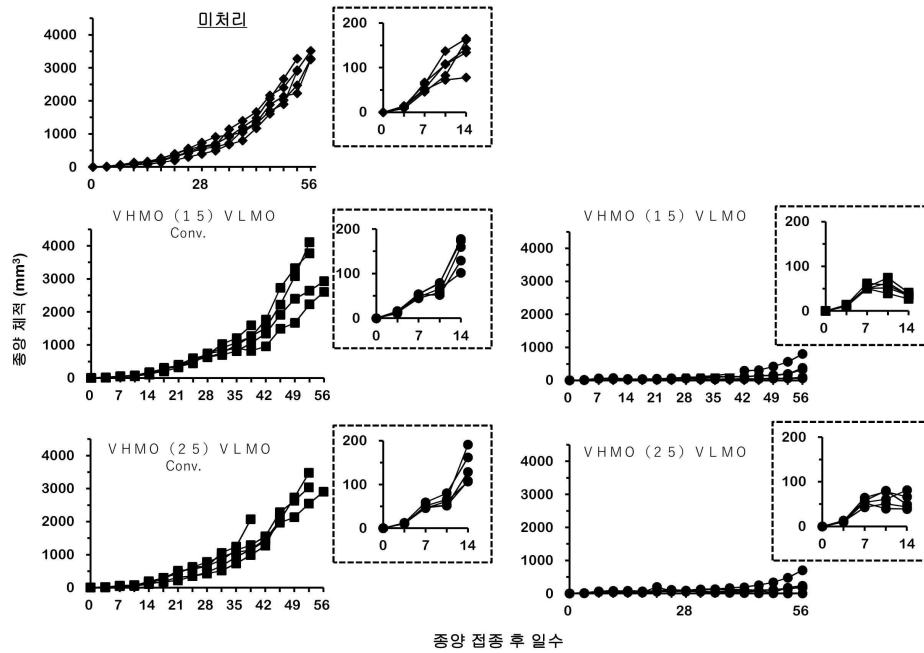
로그 순위법		
conv. vs 7x19	미처리 vs 7x19	conv. vs 미처리
p=0.00181	p=0.00313	p=0.908

로그 순위법		
conv. vs 7x19	미처리 vs 7x19	conv. vs 미처리
p=0.00189	p=0.00313	p=0.126

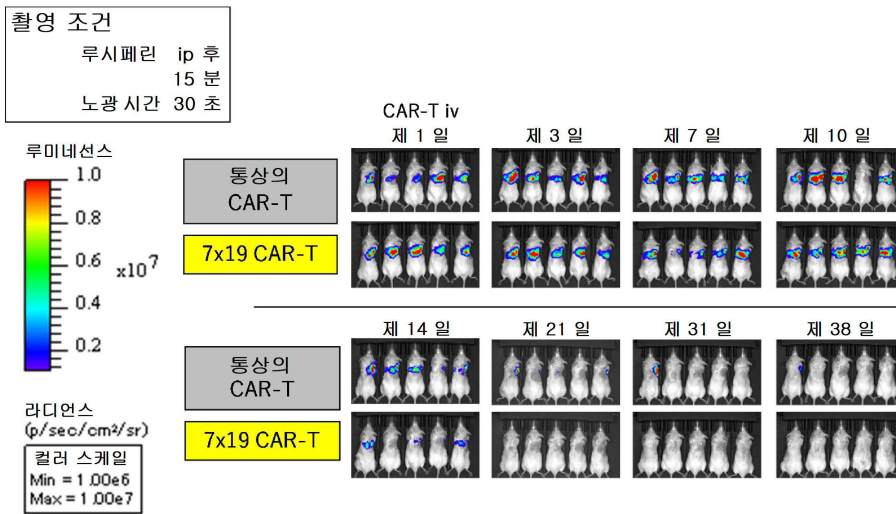
C57bl/6 마우스



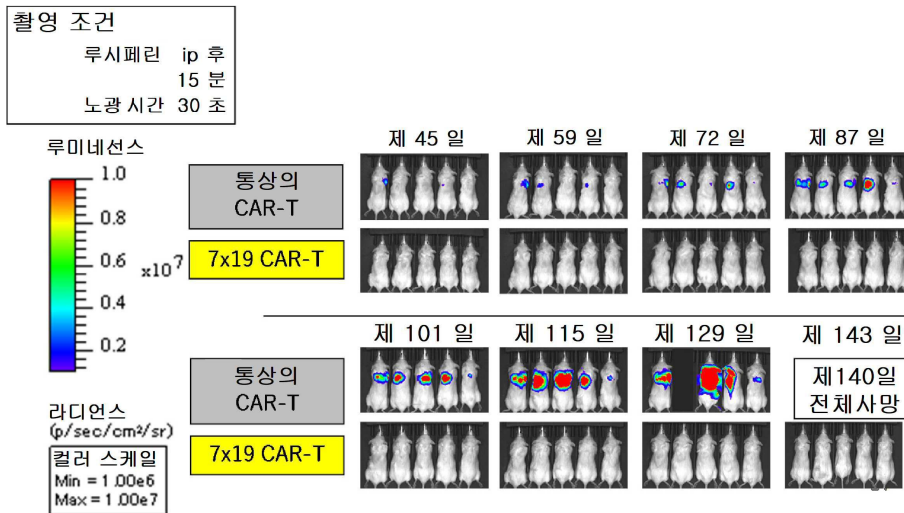
도면11



도면12a

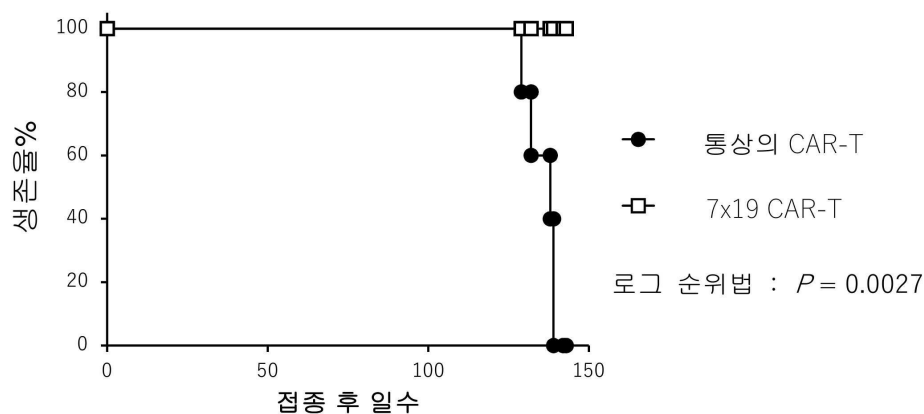


도면12b

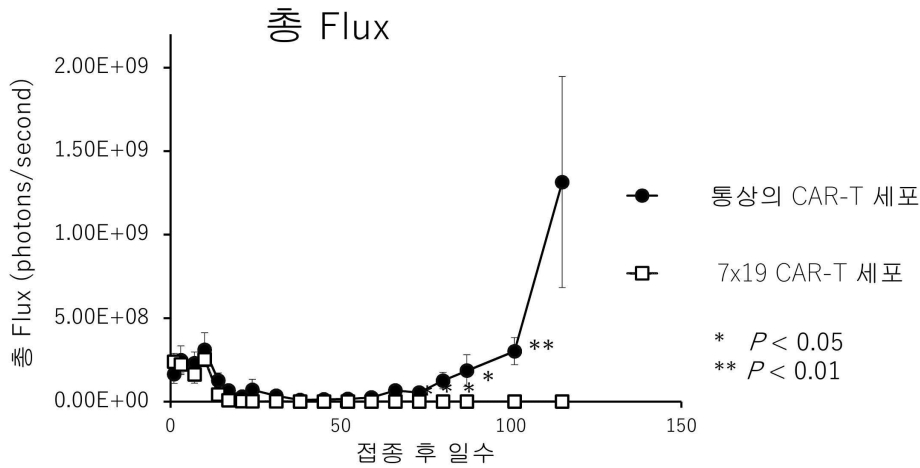


도면13

생존 커브



도면14



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Noile-Immune Biotech, Inc.

<120> Immunocompetent cell that expresses a cell surface molecule specifically recognizing human mesothelin, IL-7 and CCL19

<130> KT-07P

<150> JP2017-247109

<151> 2017-12-24

<160> 33

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 128

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> VH07_aa

<220><223> Inventor: Tamada, Koji; Sakoda, Yukimi; Adachi, Keishi

<400> 1

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Thr Pro Ser Gln

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn

20 25 30

Ser Ala Thr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu

35 40 45

Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala

50 55 60
 Val Ser Val Lys Ser Arg Met Ser Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
 65 70 75 80

Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
 85 90 95
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Met Met Thr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Ile Leu Gly Ser
 115 120 125

<210> 2
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220><223> VL07_aa
 <400> 2

Gln Pro Val Leu Thr Gln Ser Ser Ser Leu Ser Ala Ser Pro Gly Ala

1 5 10 15
 Ser Ala Ser Leu Thr Cys Thr Leu Arg Ser Gly Ile Asn Val Gly Pro
 20 25 30
 Tyr Arg Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Pro Pro Gln Tyr
 35 40 45
 Leu Leu Asn Tyr Lys Ser Asp Ser Asp Lys Gln Gln Gly Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Lys Asp Ala Ser Ala Asn Ala Gly Val

65 70 75 80
 Leu Leu Ile Ser Gly Leu Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Met Ile Trp His Ser Ser Ala Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu
 100 105 110
 Thr Val Leu Ser
 115

<210> 3

<211> 128

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> VH36_aa

<400> 3

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Thr Pro Ser Gln

1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30
 Ser Ala Thr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala
 50 55 60
 Val Ser Val Lys Ser Arg Met Ser Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn

65 70 75 80
 Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
 85 90 95
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Met Met Thr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Ile Leu Leu Ser
 115 120 125

<210> 4

<211> 115

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> VL36_aa

<400> 4

Gln Pro Val Leu Thr Gln Ser Ser Ser Leu Ser Ala Ser Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Ala Ser Leu Thr Cys Thr Leu Arg Ser Gly Ile Asn Val Gly Pro
 20 25 30
 Arg Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Pro Pro Gln Tyr Leu

35 40 45
 Leu Asn Tyr Lys Ser Asp Ser Asp Lys Gln Gln Gly Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Lys Asp Ala Ser Ala Asn Ala Gly Val Leu
 65 70 75 80

Leu Ile Ser Gly Leu Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Met
 85 90 95

Ile Trp His Ser Ser Ala Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr
 100 105 110

Val Leu Ser

115

<210> 5

<211> 119

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> VHMO_aa

<400> 5

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Asn
 20 25 30

Tyr Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Ile Ile Asn Pro Thr Lys Gly Trp Thr Leu Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Trp His His Gly Thr Trp Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 6

<211> 109

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> VLMO_aa

<400> 6

Asp Ile Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln

1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn

 20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu

 35 40 45

Ile Tyr Asn Asp Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

 50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln

65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Thr Tyr Asp Arg Arg Thr

 85 90 95

Phe Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

 100 105

<210> 7

<211> 21

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> CD8 M_aa

<400> 7

Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu

1 5 10 15

Ser Leu Val Ile Thr

 20

<210> 8

<211> 41

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> CD28_A_aa

<400> 8

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
 1 5 10 15
 Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro
 20 25 30
 Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
 35 40

<210> 9

<211> 46

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> 4-1 BB_A_aa

<400> 9

Arg Phe Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe
 1 5 10 15
 Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly
 20 25 30
 Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu
 35 40 45

<210> 10

<211> 113

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> CD3z_A_aa

<400> 10

Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln
 1 5 10 15
 Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu
 20 25 30

Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly
 35 40 45
 Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln
 50 55 60
 Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu
 65 70 75 80
 Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr
 85 90 95
 Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro
 100 105 110
 Arg

<210> 11
 <211> 19
 <212> PRT

<213> artificial
 <220><223> signal peptideT_aa
 <400> 11

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Ala His Ser

<210> 12
 <211> 23
 <212> PRT

<213> artificial
 <220><223> signal peptide P_aa
 <400> 12

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 His Ala Ala Arg Pro Gly Ser
 20

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> VH07_CDR1_aa

<400> 13

Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn Ser Ala Thr

1 5 10

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> VH07_CDR2_aa

<400> 14

Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn

1 5

<210> 15

<211> 13

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> VH07_CDR3_aa

<400> 15

Ala Arg Gly Met Met Thr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val

1 5 10

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> VL07_CDR1_aa

<400> 16

Ser Gly Ile Asn Val Gly Pro Tyr Arg

1 5

<210> 17

<211> 7

<212> PRT
 <213> artificial
 <220><223> VL07_CDR2_aa
 <400> 17
 Tyr Lys Ser Asp Ser Asp Lys
 1 5
 <210> 18
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220><223> VL07_CDR3_aa
 <400> 18
 Met Ile Trp His Ser Ser Ala Ala Val
 1 5
 <210> 19
 <
 211> 8
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220><223> VL36_CDR1_aa
 <400> 19
 Ser Gly Ile Asn Val Gly Pro Arg
 1 5
 <210> 20
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220><223> VHMO_CDR1_aa
 <400> 20
 Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Asn Tyr
 1 5
 <210> 21
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> artificial

<220><223> VHMO_CDR2_aa

<400> 21

Ile Asn Pro Thr Lys Gly Trp Thr

1 5

<210> 22

<211> 12

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> VHMO_CDR3_aa

<400> 22

Ala Arg Trp His His Gly Thr Trp Ile Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 23

<211> 8

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> VLMO_CDR1_aa

<400> 23

Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Tyr

1 5

<210> 24

<211> 3

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> VLMO_CDR2_aa

<400> 24

Asn Asp Asn

1

<210> 25

<211> 10

<212> PRT

<213> artificial

<220><223>

> VLMO_CDR3_aa

<400> 25

Ser Thr Tyr Asp Arg Arg Thr Phe Ser Val

1 5 10

<210> 26

<211> 15

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> linker 15_aa

<400> 26

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 27

<211> 25

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> linker 25_aa

<400> 27

Ser Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Asp Ala

1 5 10 15

Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Gly

20 25

<210> 28

<211> 177

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Met Phe His Val Ser Phe Arg Tyr Ile Phe Gly Leu Pro Pro Leu Ile

1 5 10 15

Leu Val Leu Leu Pro Val Ala Ser Ser Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys

20 25 30

Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu Met Val Ser Ile Asp Gln Leu

35 40 45

Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe

Arg Ile Ile Gln Arg Leu Gln Arg Thr Ser Ala Lys Met Lys Arg Arg

85

90

95

Ser Ser

<210> 30

<211> 531

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 30

atgttccatg tttcttttag gtatatcttt ggacttctc cctgaccc tgttctgttg 60
ccagtagcat catctgattg tgatattgaa ggtaaagatg gcaaacaata tgagagtgtt 120

ctaattggtca gcatcgatca attattggac agcatgaaag aaattggtag caattgcctg 180
aataatgaat ttaacttttt taaaagacat atctgtgatg ctaataagga aggtatgttt 240
ttattccgtg ctgctcgcaa gttgaggcaa tttcttaaaa tgaatagcac tggatgtttt 300
gatctccact tattaaaagt ttcagaaggc acaacaatac tgttgaactg cactggccag 360
gttaaaggaa gaaaaccagc tgcctgggt gaagccaac caacaaagag tttggaagaa 420
aataaatctt taaaggaaca gaaaaaactg aatgacttgt gtttctctaa gagactatta 480
caagagataa aaacttgttg gaataaaatt ttgatgggca ctaaagaaca c 531

<210> 31

<211> 294

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 31

atggcctgc tactggcctt cagcctgctg gttctctgga cttccccagc cccaactctg 60
agtggcacca atgatgctga agactgctgc ctgtctgtga cccagaaacc catccctggg 120
tacatcgtga ggaacttcca ctaccttctc atcaaggatg gctgcagggt gcctgctgta 180
gtgttcacca cactgagggg cgcaccgctc tgtgcacccc cagaccagcc ctgggtagaa 240
cgcatcatcc agagactgca gaggacctca gccaagatga agcgcgcag cagt 294

<210> 32

<211> 8

<212> PRT

<213> artificial

<220><223>

2A peptide cleavage region

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Val or Ile

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> any amino acid

<400> 32

Asp Xaa Glu Xaa Asn Pro Gly Pro

1 5

<210> 33

<211> 25

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> F2A_aa

<400> 33

Gly Ser Gly Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala

1 5 10 15

Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro

 20 25