



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111163758 A

(43)申请公布日 2020.05.15

(21)申请号 201880062891.X

(22)申请日 2018.10.09

(30)优先权数据

2017-196718 2017.10.10 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.03.26

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2018/037608 2018.10.09

(87)PCT国际申请的公布数据

W02019/073973 JA 2019.04.18

(71)申请人 国立大学法人山口大学

地址 日本山口县

申请人 国立大学法人鸟取大学

(72)发明人 玉田耕治 佐古田幸美 安达圭志

中村贵史

(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 杨宏军

(51)Int.Cl.

A61K 9/127(2006.01)

A61K 9/51(2006.01)

A61K 35/17(2015.01)

A61K 35/28(2015.01)

A61K 35/74(2015.01)

A61K 35/768(2015.01)

A61K 48/00(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

C12N 5/0781(2010.01)

C12N 5/0783(2010.01)

C12N 15/24(2006.01)

A61K 38/19(2006.01)

A61K 38/20(2006.01)

权利要求书2页 说明书24页

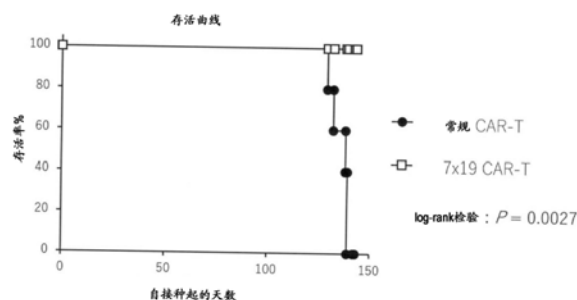
序列表10页 附图26页

(54)发明名称

具有记忆功能的T细胞或B细胞的增强剂、恶性肿瘤复发抑制剂、以及对T细胞或B细胞诱导记忆功能的诱导剂

(57)摘要

本发明的目的在于提供具有记忆功能的内源性的T细胞或B细胞的增强剂以及恶性肿瘤复发抑制剂,以长期地持续排斥恶性肿瘤。制作施予对象中具有记忆功能的T细胞或B细胞的增强剂、对施予对象中的T细胞或B细胞诱导记忆功能的诱导剂,所述增强剂、诱导剂包含核酸递送介质、编码白介素7(IL-7)的核酸、及编码趋化因子(C-C基序)配体19(CCL19)的核酸。另外,制作恶性肿瘤复发抑制剂,其包含核酸递送介质、编码白介素7(IL-7)的核酸、及编码CCL19的核酸。



1. 施予对象中具有记忆功能的T细胞或B细胞的增强剂,其包含核酸递送介质、编码白介素7 (IL-7) 的核酸、及编码趋化因子 (C-C基序) 配体19 (CCL19) 的核酸。

2. 根据权利要求1所述的施予对象中具有记忆功能的T细胞或B细胞的增强剂,其特征在于,核酸递送介质为选自免疫活性细胞、病毒、厌氧菌、脂质体、间质干细胞 (MSC)、以及纳米粒子中的至少1种以上。

3. 根据权利要求1或2所述的施予对象中具有记忆功能的T细胞或B细胞的增强剂,其特征在于,核酸递送介质具有向恶性肿瘤细胞的聚集能力、或在恶性肿瘤细胞中具有特异性的增殖能力。

4. 根据权利要求1~3中任一项所述的施予对象中具有记忆功能的T细胞或B细胞的增强剂,其特征在于,核酸递送介质具有损伤恶性肿瘤细胞的能力。

5. 根据权利要求1~4中任一项所述的施予对象中具有记忆功能的T细胞或B细胞的增强剂,其特征在于,核酸递送介质为免疫活性细胞,所述免疫活性细胞具有识别恶性肿瘤抗原的细胞表面分子。

6. 根据权利要求5所述的施予对象中具有记忆功能的T细胞或B细胞的增强剂,其特征在于,识别恶性肿瘤抗原的细胞表面分子为嵌合抗原受体 (CAR) 或T细胞受体 (TCR)。

7. 根据权利要求5或6所述的施予对象中具有记忆功能的T细胞或B细胞的增强剂,其特征在于,免疫活性细胞为T细胞。

8. 根据权利要求1~7中任一项所述的施予对象中具有记忆功能的T细胞或B细胞的增强剂,其特征在于,具有记忆功能的T细胞或B细胞为中央型记忆T细胞。

9. 医药组合物,其含有权利要求1~8中任一项所述的施予对象中具有记忆功能的T细胞或B细胞的增强剂和药学上可接受的添加剂。

10. 恶性肿瘤复发抑制剂,其包含核酸递送介质、编码白介素7 (IL-7) 的核酸、及编码趋化因子 (C-C基序) 配体19 (CCL19) 的核酸。

11. 根据权利要求10所述的恶性肿瘤复发抑制剂,其特征在于,核酸递送介质为选自免疫活性细胞、病毒、厌氧菌、脂质体、间质干细胞 (MSC)、以及纳米粒子中的至少1种以上。

12. 根据权利要求10或11所述的恶性肿瘤复发抑制剂,其特征在于,核酸递送介质具有向恶性肿瘤细胞的聚集能力、或在恶性肿瘤细胞中具有特异性的增殖能力。

13. 根据权利要求10~12中任一项所述的恶性肿瘤复发抑制剂,其特征在于,核酸递送介质具有损伤恶性肿瘤细胞的能力。

14. 根据权利要求10~13中任一项所述的恶性肿瘤复发抑制剂,其特征在于,核酸递送介质为免疫活性细胞,所述免疫活性细胞具有识别恶性肿瘤抗原的细胞表面分子。

15. 根据权利要求14所述的恶性肿瘤复发抑制剂,其特征在于,核酸递送介质是具有识别恶性肿瘤细胞抗原的细胞表面分子的免疫活性细胞,恶性肿瘤复发是由不具有所述细胞表面分子所特异性识别的恶性肿瘤抗原的恶性肿瘤细胞引起的恶性肿瘤复发。

16. 根据权利要求14或15所述的恶性肿瘤复发抑制剂,其特征在于,识别恶性肿瘤细胞抗原的细胞表面分子为嵌合抗原受体 (CAR) 或T细胞受体 (TCR)。

17. 根据权利要求14~16中任一项所述的恶性肿瘤复发抑制剂,其特征在于,免疫活性细胞为T细胞。

18. 根据权利要求11所述的恶性肿瘤复发抑制剂,其特征在于,核酸递送介质为溶瘤病

毒。

19. 医药组合物, 其含有权利要求10~18中任一项所述的恶性肿瘤复发抑制剂和药学上可接受的添加剂。

20. 对施予对象中的T细胞或B细胞诱导记忆功能的诱导剂, 其包含核酸递送介质、编码白介素7 (IL-7) 的核酸、及编码趋化因子 (C-C基序) 配体19 (CCL19) 的核酸。

具有记忆功能的T细胞或B细胞的增强剂、恶性肿瘤复发抑制剂、以及对T细胞或B细胞诱导记忆功能的诱导剂

技术领域

[0001] 本发明涉及施予对象中具有记忆功能的T细胞或B细胞的增强剂、恶性肿瘤复发抑制剂、以及对施予对象中的T细胞或B细胞诱导记忆功能的诱导剂,上述试剂包含核酸递送介质、编码白介素7 (Interleukin-7:IL-7) 的核酸、及编码趋化因子 (C-C基序) 配体19 (chemokine (C-C motif) ligand 19:CCL19) 的核酸。

背景技术

[0002] 恶性肿瘤是在全世界存在大量患者的疾病,通常广泛地进行化学疗法、放射线疗法、或外科疗法。但存在下述各种问题:产生副作用、丧失一部分的功能、无法治疗复发或者转移,等等。因此,为了更高地维持患者的生存质量 (quality of life、QOL),近年来正在推进免疫细胞疗法的开发。该免疫细胞疗法是下述疗法:从患者采集免疫活性细胞,以提高该免疫活性细胞的免疫功能的方式进行处置、增殖,并再次移入患者。具体而言,从患者采集T细胞,将编码CAR的核酸导入于该T细胞、进行增殖,并再次移入患者的疗法是已知的 (参见非专利文献1)。该疗法目前已在全世界开展临床试验,获得了在白血病、淋巴瘤等造血系统恶性肿瘤等方面呈现有效性的结果。

[0003] 另外,作为T细胞等免疫活性细胞的免疫功能控制因子,已知细胞因子、趋化因子、信号控制蛋白等至少数百种因子。已知,其中的白介素7 (IL-7) 是T细胞存活所必需的细胞因子,是由骨髓、胸腺、淋巴器官・组织的基质细胞 (stromal cell) 等非造血细胞产生的。作为该利用了IL-7的功能的T细胞,公开了下述T细胞,其表达融合了IL-7与IL-7R α 而得的嵌合细胞因子受体 (参见专利文献1)。但是,关于该T细胞的嵌合细胞因子受体,作为一个融合蛋白质而仅限定于在所导入的T细胞的膜表面表达,只不过是配体非依赖性地仅对自身的细胞传递IL-7R等细胞因子信号,无法提高未导入上述受体的T细胞的功能。

[0004] 另外,公开了:CCL19、CCL21、IL-7的表达降低导致在SIRP α 突变小鼠的脾脏中的T细胞区的持续缺失 (参见非专利文献2);CCL19、CCL21、IL-7具有在次级淋巴组织 (脾脏、淋巴结) 中维持T细胞的稳态的作用 (参见非专利文献3)。但是,在上述非专利文献2、3中,显现出针对在次级淋巴组织的T细胞区域恒常存在的非活化T细胞的作用,没有显现出与抗肿瘤免疫应答的直接相关性。此外,上述非专利文献2、3中的CCL19、CCL21、IL-7表达细胞不是T细胞,而是存在于次级淋巴组织的网状内皮系统 (reticuloendothelial system) 的细胞。

[0005] 另一方面,本申请的发明人提出了通过同时地表达IL-7和CCL19从而显著抑制实体癌的免疫细胞疗法 (参见专利文献2、3) 的方案。利用该方法,可提高宿主 (受体 (recipient)) 中的内源性的免疫活性细胞的活化、向肿瘤细胞的聚集能力,但是,尚不明确利用该免疫活性细胞疗法是否能够长期地防止复发等、持续排斥恶性肿瘤。

[0006] 现有技术文献

[0007] 专利文献

[0008] 专利文献1:国际公开第2013/123061号小册子

- [0009] 专利文献2:国际公开第2016/056228号小册子
- [0010] 专利文献3:国际公开第2017/159736号小册子
- [0011] 非专利文献
- [0012] 非专利文献1:中泽洋三信州医志(日文:信州医誌) 61(4):197~203(2013)
- [0013] 非专利文献2:SATO-HASHIMOTO M.等,J.Immunol.,2011,第187卷,第1期,第291-7页
- [0014] 非专利文献3:SIEGERT S.等,Front.Immunol.,2012,第3卷,第285期

发明内容

[0015] 发明所要解决的课题

[0016] 如上所述,正在开发同时表达IL-7和CCL19的CAR表达T细胞、TCR表达T细胞等的免疫细胞疗法,并正在推进下述技术的开发,所述技术显著地提高免疫活性细胞的增殖能力、存活能力、或宿主的免疫活性细胞的聚集能力,能够适用于以往利用免疫细胞疗法未发现充分的治疗效果的实体癌。但是,恶性肿瘤经常复发,即使利用上述免疫细胞疗法能够暂时性地治疗恶性肿瘤,也不明确是否能长期地持续排斥恶性肿瘤,另外,也没有研究针对于复发的预防策略。因此,本发明的课题在于提供具有记忆功能的内源性的T细胞或B细胞的增强剂、恶性肿瘤复发抑制剂、以及对内源性的T细胞或B细胞诱导记忆功能的诱导剂,以长期地持续排斥恶性肿瘤。

[0017] 用于解决课题的手段

[0018] 本申请的发明人对于一直以来自己所开发的表达CAR、IL-7以及CCL19的T细胞,研究了其更进一步的可能性,在研究中发现了:将该T细胞施予给对象时,不仅在经施予的T细胞中而且在对象(宿主)中的内源性T细胞中均诱导记忆功能而使得具有记忆功能的细胞的绝对数量增加;以及在恶性肿瘤的复发模型实验中,针对于不具有CAR识别的抗原的细胞而言抑制恶性肿瘤形成。进一步发现了,在使用了TCR来替代CAR的情况下、在使用了病毒来替代T细胞的情况下均具有同样的效果,从而完成了本发明。

[0019] 即,本发明如下所示。

[0020] (1) 施予对象中具有记忆功能的T细胞或B细胞的增强剂,其包含核酸递送介质、编码白介素7(IL-7)的核酸、及编码趋化因子(C-C基序)配体19(CCL19)的核酸。

[0021] (2) 根据上述(1)所述的施予对象中具有记忆功能的T细胞或B细胞的增强剂,其特征在于,核酸递送介质为选自免疫活性细胞、病毒、厌氧菌、脂质体(liposome)、间质干细胞(Mesenchymal stem cell:MSC)、纳米粒子中的至少1种以上。

[0022] (3) 根据上述(1)或(2)所述的施予对象中具有记忆功能的T细胞或B细胞的增强剂,其特征在于,核酸递送介质具有向恶性肿瘤细胞的聚集能力、或在恶性肿瘤细胞中具有特异性的增殖能力。

[0023] (4) 根据上述(1)~(3)中任一项所述的施予对象中具有记忆功能的T细胞或B细胞的增强剂,其特征在于,核酸递送介质具有损伤恶性肿瘤细胞的能力。

[0024] (5) 根据上述(1)~(4)中任一项所述的施予对象中具有记忆功能的T细胞或B细胞的增强剂,其特征在于,核酸递送介质为免疫活性细胞,该免疫活性细胞具有识别恶性肿瘤抗原的细胞表面分子。

[0025] (6) 根据上述 (5) 所述的施予对象中的具有记忆功能的T细胞或B细胞的增强剂,其特征在于,识别恶性肿瘤抗原的细胞表面分子为嵌合抗原受体 (Chimeric antigen receptor:CAR) 或T细胞受体 (T-Cell Receptor:TCR)。

[0026] (7) 根据上述 (5) 或 (6) 所述的施予对象中具有记忆功能的T细胞或B细胞的增强剂,其特征在于,免疫活性细胞为T细胞。

[0027] (8) 根据上述 (1) ~ (7) 中任一项所述的施予对象中具有记忆功能的T细胞或B细胞的增强剂,其特征在于,具有记忆功能的T细胞或B细胞为中央型记忆T细胞。

[0028] (9) 医药组合物,其含有上述 (1) ~ (8) 中任一项所述的施予对象中具有记忆功能的T细胞或B细胞的增强剂和药学上可接受的添加剂。

[0029] (10) 恶性肿瘤复发抑制剂,其包含核酸递送介质、编码白介素7 (IL-7) 的核酸、及编码趋化因子 (C-C基序) 配体19 (CCL19) 的核酸。

[0030] (11) 根据上述 (10) 所述的恶性肿瘤复发抑制剂,其特征在于,核酸递送介质为选自免疫活性细胞、病毒、厌氧菌、脂质体、间质干细胞 (MSC)、纳米粒子中的至少1种以上。

[0031] (12) 根据上述 (10) 或 (11) 所述的恶性肿瘤复发抑制剂,其特征在于,核酸递送介质具有向恶性肿瘤细胞的聚集能力、或在恶性肿瘤细胞中具有特异性的增殖能力。

[0032] (13) 根据上述 (10) ~ (12) 中任一项所述的恶性肿瘤复发抑制剂,其特征在于,核酸递送介质具有损伤恶性肿瘤细胞的能力。

[0033] (14) 根据上述 (10) ~ (13) 中任一项所述的恶性肿瘤复发抑制剂,其特征在于,核酸递送介质为免疫活性细胞,该免疫活性细胞具有识别恶性肿瘤抗原的细胞表面分子。

[0034] (15) 根据上述 (14) 所述的恶性肿瘤复发抑制剂,其特征在于,核酸递送介质是具有识别恶性肿瘤细胞抗原的细胞表面分子的免疫活性细胞,恶性肿瘤复发是由不具有该细胞表面分子所特异性识别的恶性肿瘤抗原的恶性肿瘤细胞引起的恶性肿瘤复发。

[0035] (16) 根据上述 (14) 或 (15) 所述的恶性肿瘤复发抑制剂,其特征在于,识别恶性肿瘤细胞抗原的细胞表面分子为嵌合抗原受体 (CAR) 或T细胞受体 (TCR)。

[0036] (17) 根据上述 (14) ~ (16) 中任一项所述的恶性肿瘤复发抑制剂,其特征在于,免疫活性细胞为T细胞。

[0037] (18) 根据上述 (11) 所述的恶性肿瘤复发抑制剂,其特征在于,核酸递送介质为溶瘤病毒。

[0038] (19) 医药组合物,其含有上述 (10) ~ (18) 中任一项所述的恶性肿瘤复发抑制剂和药学上可接受的添加剂。

[0039] (20) 对施予对象中的T细胞或B细胞诱导记忆功能的诱导剂,其包含核酸递送介质、编码白介素7 (IL-7) 的核酸、及编码趋化因子 (C-C基序) 配体19 (CCL19) 的核酸。

[0040] 另外,作为本发明的其他实施方式,如下所示。

[0041] 1) 核酸递送介质、编码白介素7 (IL-7) 的核酸、及编码趋化因子 (C-C基序) 配体19 (CCL19) 的核酸的用途,其用于制备施予对象中具有记忆功能的T细胞或B细胞的增强剂;

[0042] 2) 具有记忆功能的T细胞或B细胞的增强方法,其中,将核酸递送介质、编码白介素7 (IL-7) 的核酸、及编码趋化因子 (C-C基序) 配体19 (CCL19) 的核酸施予给对象;

[0043] 3) 核酸递送介质、编码白介素7 (IL-7) 的核酸、及编码趋化因子 (C-C基序) 配体19 (CCL19) 的核酸的用途,其用于制备恶性肿瘤复发抑制剂;

[0044] 4) 恶性肿瘤复发的抑制方法,其中,将核酸递送介质、编码白介素7 (IL-7) 的核酸、及编码趋化因子 (C-C基序) 配体19 (CCL19) 的核酸施予给对象;

[0045] 5) 核酸递送介质、编码白介素7 (IL-7) 的核酸、及编码趋化因子 (C-C基序) 配体19 (CCL19) 的核酸的用途,其用于制备在施予对象中的T细胞或B细胞中诱导记忆功能的诱导剂;

[0046] 6) 针对T细胞或B细胞的记忆功能的诱导方法,其中,将核酸递送介质、编码白介素7 (IL-7) 的核酸、及编码趋化因子 (C-C基序) 配体19 (CCL19) 的核酸施予给对象;

[0047] 7) 根据上述 (20) 所述的对施予对象中的T细胞或B细胞诱导记忆功能的诱导剂,其特征在于,核酸递送介质为选自免疫活性细胞、病毒、厌氧菌、脂质体、间质干细胞 (MSC)、纳米粒子中的至少1种以上。

[0048] 8) 根据上述 (20) 或7) 所述的对施予对象中的T细胞或B细胞诱导记忆功能的诱导剂,其特征在于,核酸递送介质具有向恶性肿瘤细胞的聚集能力、或在恶性肿瘤细胞中具有特异性的增殖能力。

[0049] 9) 根据上述 (20)、7) 或8) 中任一项所述的对施予对象中的T细胞或B细胞诱导记忆功能的诱导剂,其特征在于,核酸递送介质具有损伤恶性肿瘤细胞的能力。

[0050] 10) 根据上述 (20)、7) ~9) 中任一项所述的对施予对象中的T细胞或B细胞诱导记忆功能的诱导剂,其特征在于,核酸递送介质为免疫活性细胞,该免疫活性细胞具有识别恶性肿瘤抗原的细胞表面分子。

[0051] 11) 根据上述10) 所述的对施予对象中的T细胞或B细胞诱导记忆功能的诱导剂,其特征在于,识别恶性肿瘤抗原的细胞表面分子为嵌合抗原受体 (CAR) 或T细胞受体 (TCR)。

[0052] 12) 根据上述10) 或11) 所述的对施予对象中的T细胞或B细胞诱导记忆功能的诱导剂,其特征在于,免疫活性细胞为T细胞。

[0053] 发明的效果

[0054] 若使用本发明的具有记忆功能的T细胞或B细胞的增强剂,则可增强施予对象中具有记忆功能的T细胞或B细胞。此外,若使用本发明的恶性肿瘤复发抑制剂,则可抑制恶性肿瘤治疗后的复发。另外,若使用本发明的对T细胞或B细胞诱导记忆功能的诱导剂,则可对施予对象中的T细胞或B细胞诱导记忆功能。

附图说明

[0055] 图1 (a) 为示出在实施例1中,利用标记抗体将恶性肿瘤组织中的T细胞的局部分布进行染色、并利用显微镜观察而得到的结果的图。(b) 为示出对上述 (a) 中观察到的结果进行图像分析处理而得的经施予的供体T细胞和受体 (recipient) 内源性T细胞的面积 (μm^2) 的图。

[0056] 图2为示出在实施例2中,调查了将抗人CD20 CAR-IL-7/CCL19表达T细胞 (7×19)、或者与该T细胞一同地将抗CD90.2抗体 (anti-CD90.2) 施予给小鼠的情况下的施予后第14天的恶性肿瘤体积 (mm^3) 的图。

[0057] 图3为示出在实施例3中,施予的供体T细胞以及受体 (recipient) 内源性T细胞的记忆化的调查结果的图。

[0058] 图4为示出在实施例3中,利用IFN- γ 的产生而调查了经施予的供体T细胞以及受

体(recipient)内源性T细胞的记忆化功能的结果的图。(a)是CD90.1阳性的供体T细胞中的IFN- γ 阳性细胞的比例,(b)是利用流式细胞仪(flow cytometry)检测了CD90.2阳性的内源性CD8阳性T细胞中的IFN- γ 阳性细胞的结果。

[0059] 图5A为示出在实施例4中,在CAR-IL-7/CCL19表达T细胞的处理之前的T细胞受体(TCR)库(repertory)的变化(α 链:处理前,CAR-阳性)的调查结果的图。

[0060] 图5B为示出在实施例4中,在CAR-IL-7/CCL19表达T细胞的处理之前的T细胞受体(TCR)库的变化(α 链:处理前,CAR-阴性)的调查结果的图。

[0061] 图5C为示出在实施例4中,在CAR-IL-7/CCL19表达T细胞的处理之后的T细胞受体(TCR)库的变化(α 链:处理后,CAR-阳性)的调查结果的图。

[0062] 图5D为示出在实施例4中,在CAR-IL-7/CCL19表达T细胞的处理之后的T细胞受体(TCR)库的变化(α 链:处理后,CAR-阴性)的调查结果的图。

[0063] 图6A为示出在实施例4中,在CAR-IL-7/CCL19表达T细胞的处理之前的T细胞受体(TCR)库的变化(β 链:处理前,CAR-阳性)的调查结果的图。

[0064] 图6B为示出在实施例4中,在CAR-IL-7/CCL19表达T细胞的处理之前的T细胞受体(TCR)库的变化(β 链:处理前,CAR-阴性)的调查结果的图。

[0065] 图6C为示出在实施例4中,在CAR-IL-7/CCL19表达T细胞的处理之后的T细胞受体(TCR)库的变化(β 链:处理后,CAR-阳性)的调查结果的图。

[0066] 图6D为示出在实施例4中,在CAR-IL-7/CCL19表达T细胞的处理之后的T细胞受体(TCR)库的变化(β 链:处理后,CAR-阴性)的调查结果的图。

[0067] 图7A为示出下述肿瘤体积测定结果的图,在实施例5中,在接种P815-hCD20后第140天,针对治疗肿瘤而治愈的小鼠(肿瘤排斥小鼠:tumor-rejected mice)或对照的空白小鼠(naive mice),将P815-hCD20或未表达hCD20的亲株P815分别接种于左右的侧腹,测定肿瘤体积。

[0068] 图7B为示出下述肿瘤体积测定结果的图,在实施例5中,在接种3LL-hCD20后第140天,针对治疗肿瘤而治愈的小鼠(肿瘤排斥小鼠:tumor-rejected mice)或作为对照的空白小鼠(naive mice),将3LL-hCD20或未表达hCD20的亲株3LL分别接种于左右的侧腹,测定肿瘤体积。

[0069] 图8为示出在实施例6中,用于确认肿瘤的复发抑制效果的实验流程图。

[0070] 图9A为示出下述拍摄结果的图,在实施例6中,针对施予了后述的ACC-MES01-GFP-Luc、并且在第1天施予了抗人间皮素CAR-IL-7-CCL19表达T细胞(7×10^6 CAR-T)的组以及施予了常规的抗人间皮素CAR表达T细胞(conventional CAR-T)的组,对第1、3、7、10、14、21、31、38天的小鼠以曝光时间30秒进行拍摄。

[0071] 图9B为示出下述拍摄结果的图,在实施例6中,针对施予了后述的ACC-MES01-GFP-Luc、并在第1天施予了抗人间皮素CAR-IL-7-CCL19表达T细胞(7×10^6 CAR-T)的组以及施予了常规的抗人间皮素CAR表达T细胞(conventional CAR-T)的组中,对第45、59、73、87、101、115、129、143天的小鼠以曝光时间30秒进行拍摄。第129天的左起第2个个体死亡,故而省略照片。

[0072] 图10为示出在实施例6中,从施予后述的ACC-MES01-GFP-Luc起的天数与小鼠存活率的关系的图。

[0073] 图11为示出在实施例6中,从施予后述的ACC-MES01-GFP-Luc起的天数与总荧光量的关系的图。

[0074] 图12为示出在实施例7中,(a)是利用流式细胞仪分析脾脏细胞中的CD8+GFP+细胞的比例而得到的结果,(b)是利用流式细胞仪分析CD8+GFP+细胞绝对数量而得到的结果的图。

[0075] 图13为在实施例7中,(a)是示出经空白BDA/2小鼠的CD8⁺脾脏细胞以及P1A特异性TCR/IL-7/CCL19/eGFP表达T细胞处理的小鼠的CD8⁺GFP⁻或CD8⁺GFP⁺脾脏细胞中的CD44⁺细胞的细胞数量的图,(b)是示出(a)中的CD44⁺细胞的比例的图。

[0076] 图14为示出在实施例7中,与经P815处理的粘膜肥大细胞(Mucosal mast cell: MMC)进行5天左右共培养,利用ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay,酶联免疫吸附测定)检测培养基的上清中的IFN- γ 浓度而得到的结果的图。

[0077] 图15为在实施例8中,(a)是示出基因重组痘苗病毒(vaccinia virus)LC16m0 TK-SP-小鼠IL-7-F2A-小鼠CCL19-F2A-eGFP (TK-ICE)的结构图,(b)是示出基因重组痘苗病毒LC16m0 TK-SP-Luc-F2A-eGFP (TK-LE)的结构图。

[0078] 图16为示出在实施例8中,利用观察图像而示出感染了基因重组痘苗病毒TK-ICE或TK-LE的A549细胞以及CT26细胞中的痘苗病毒的细胞变性效果与eGFP荧光表达的关系的图。

[0079] 图17为示出在实施例8中,感染了基因重组痘苗病毒TK-ICE或TK-LE的A549细胞或CT26细胞中的IL-7以及CCL19的分泌量的调查图。

[0080] 图18为示出在实施例8中,将小鼠大肠癌CT26细胞移植于小鼠的两腹部的皮下的概念的示意图。

[0081] 图19为示出在实施例9中,对于使用了小鼠大肠癌细胞CT26的肿瘤两侧皮下移植BALB/c小鼠模型,将基因重组痘苗病毒TK-ICE或TK-LE在肿瘤内施予后的肿瘤尺寸(mm³)的变化示意图。

具体实施方式

[0082] 作为本说明书中的“具有记忆功能的T细胞或B细胞的增强剂”,只要包含核酸递送介质、编码IL-7的核酸、及编码CCL19的核酸则没有特别限制,能利用该增强剂而增强具有记忆功能的T细胞或B细胞。另外,作为本说明书中的“对T细胞或B细胞诱导记忆功能的诱导剂”,只要包含核酸递送介质、编码IL-7的核酸、及编码CCL19的核酸则没有特别限制,能利用该诱导剂对T细胞或B细胞诱导记忆功能。需要说明的是,以下,在本说明书中,也将上述“具有记忆功能的T细胞或B细胞的增强剂”或上述“对T细胞或B细胞诱导记忆功能的诱导剂”概括而称为“本发明的增强剂或诱导剂”。

[0083] 作为本说明书中的“恶性肿瘤复发抑制剂”,只要包含了核酸递送介质、编码IL-7的核酸、及编码CCL19的核酸则没有特别限制,能利用该恶性肿瘤复发抑制剂而抑制恶性肿瘤复发。需要说明的是,以下,在本说明书中,也将上述“恶性肿瘤复发抑制剂”称为“本发明的恶性肿瘤复发抑制剂”。

[0084] 作为编码IL-7的核酸、及编码CCL19的核酸,可优选地列举源自人的核酸。上述各个核酸可根据导入的细胞的种类而适当选择,关于相关的各个核酸的序列信息,可通过检

索已知的文献、NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>) 等数据库而适当获取。作为编码IL-7的核酸,可列举编码序列号1所示的氨基酸序列的碱基序列,只要具有IL-7的细胞增殖率或细胞存活率的促进作用,则也可以是编码与序列号1所示的氨基酸序列具有80%以上、优选为85%以上、更优选为90%以上、进一步优选为95%以上、最优选为98%以上的序列同一性的氨基酸的碱基序列。作为编码CCL19的核酸,可列举编码序列号2所示的氨基酸序列的碱基序列,只要具有CCL19的细胞的迁移作用,则也可使用编码与序列号2所示的氨基酸序列具有80%以上、优选为85%以上、更优选为90%以上、进一步优选为95%以上、最优选为98%以上的序列同一性的氨基酸的碱基序列。需要说明的是,关于上述IL-7的细胞增殖率或细胞存活率的促进作用、CCL19的细胞的迁移作用,可利用上述专利文献2中记载的方法而确认。

[0085] 在本说明书中,术语“同一性”表示多肽或多核苷酸序列近似性的程度(其利用查询序列(query sequence)与其他的优选为同一型的序列(核酸或者蛋白质序列)之间的匹配来确定)。作为计算以及确定“同一性”的优选的电脑程序方法,例如,可列举GCG BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul等,J.Mol.Biol.1990,215:403-410; Altschul等,Nucleic Acids Res.1997,25:3389-3402;Devereux等,Nucleic Acid Res.1984,12:387)、以及BLASTN 2.0 (Gish W.,<http://blast.Wustl.edu>,1996-2002)、以及FASTA (Pearson以及Lipman,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 1988,85:2444-2448)、以及确定及比对最长重复的成对重叠群(contig)的GCG GelMerge (Wibur以及Lipman,SIAM J.Appl.Math.1984,44:557-567;Needleman以及Wunsch,J.Mol.Biol.1970,48:443-453)。

[0086] 关于上述编码IL-7的核酸、及编码CCL19的核酸,也可整合于含有启动子、终止子等控制序列、耐药性基因、报告基因(reporter gene)等选择标记(marker)序列的载体(vector)。此外,也可在载体内包含编码自杀基因的核酸、编码2A肽或IRES的核酸。关于上述载体、编码自杀基因的核酸、编码2A肽或IRES的核酸,可以参考上述专利文献2、3而获取或制作。作为上述启动子,例如,可列举巨细胞病毒(cytomegalovirus、CMV)的IE (immediate early,即早)基因的启动子、SV40的早期启动子、逆转录病毒(retrovirus)的启动子、金属硫蛋白(metallothionein)启动子、热休克启动子、SR α 启动子、NFAT启动子、HIF启动子等。另外,作为上述载体,例如,可列举pMSGV载体(Tamada k et al.,Clin Cancer Res 18:6436-6445 (2002))、pMSCV载体(Takara Bio Inc.制造)等逆转录病毒载体或源自这些载体的载体。

[0087] 另外,也可一同包含编码IL-7的核酸、及编码CCL19的核酸与编码IL-15、CCL21、IL-2、IL-4、IL-12、IL-13、IL-17、IL-18、IP-10、CCL4、Flt3L、干扰素- γ 、MIP-1 α 、GM-CSF、M-CSF、TGF- β 、TNF- α 、检查点阻断抗体或者其片段等其他的免疫功能控制因子的核酸。但是,就本发明的增强剂或诱导剂、本发明的恶性肿瘤复发抑制剂而言,若至少含有编码IL-7的核酸、及编码CCL19的核酸作为编码免疫功能控制因子的核酸,则即使不含有上述编码其他的免疫功能控制因子的核酸,也可充分地发挥作为本发明的增强剂或诱导剂、本发明的恶性肿瘤复发抑制剂的效果。

[0088] 上述“记忆功能”是指下述功能,即具有过去受到由肿瘤抗原引起的刺激的经验、并再次与恶性肿瘤细胞接触的情况下,与过去未受到由肿瘤抗原引起的刺激的初始T细胞(naive T cell)相比,更快速且强劲地活化,发挥针对恶性肿瘤细胞的高免疫功能。另外,

作为具有记忆功能的T细胞或B细胞,可列举中央型记忆T细胞、记忆B细胞。关于这些具有记忆功能的T细胞或B细胞可如下进行选择:能够通过综合性地评价CD44、CD62L、CD127 (IL-7R) 等各自的阳性/阴性(+/-)、表达强度而进行确认,根据人、小鼠等对象而适当地测定任意的CD即可。需要说明的是,在本申请中,以下,有时也会将阳性记载为“+”,将阴性记载为“-”。

[0089] 上述“具有记忆功能的T细胞或B细胞的增强”是指:在包含具有记忆功能的T细胞或B细胞的细胞群中,增加具有记忆功能的T细胞或B细胞的比例、增加具有记忆功能的T细胞或B细胞的绝对数量、增强具有记忆功能的T细胞或B细胞的单个细胞的记忆功能。

[0090] 上述“对T细胞或B细胞诱导记忆功能”是指:在包含初始T细胞或初始B细胞的细胞群中,以通过使这些初始T细胞或初始B细胞受到由肿瘤抗原引起的刺激而获得免疫记忆从而具有记忆功能的方式进行诱导;在已经具有记忆功能的T细胞或B细胞中以进一步提高其记忆功能的方式进行诱导;增加已经具有记忆功能的T细胞或B细胞在生物体内的数量。具体而言,可列举例如将初始T细胞诱导为中央型记忆T细胞。

[0091] 作为上述施予对象,可优选地列举哺乳动物或哺乳动物细胞,在这些哺乳动物之中,可更加优选地列举人、小鼠、狗、大鼠、豚鼠、兔、鸟、羊、猪、牛、马、猫、猴、黑猩猩,可特别优选地列举人。

[0092] 作为上述“核酸递送介质”,选自免疫活性细胞、病毒、厌氧菌、脂质体、间质干细胞(MSC)、纳米粒子中的至少1种以上即可,也可将多种混合使用。

[0093] 此处,作为上述免疫活性细胞,若参与免疫应答、并且能够通过导入编码IL-7的核酸、及编码CCL19的核酸从而表达IL-7以及CCL19的细胞,则没有特别限制,但优选为从生物体分离(采集)的免疫活性细胞,可列举经分离的T细胞、自然杀伤细胞(NK细胞)、B细胞等淋巴细胞系细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞等抗原呈递细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、肥大细胞等粒细胞,可优选地列举从人、狗、猫、猪、小鼠等哺乳动物分离出的T细胞,优选为从人分离出的T细胞。需要说明的是,关于上述分离出的T细胞,除了T细胞以外也可包含其他的细胞,以50%以上、优选60%以上、更优选70%以上、进一步优选80%以上、最优选90%的比例包含T细胞即可。另外,关于T细胞,可通过从血液、骨髓液等体液,脾脏、胸腺、淋巴结等组织,或者浸润于原发肿瘤、转移性肿瘤、癌性腹水等癌组织的免疫细胞中,将包含免疫活性细胞的细胞群进行分离而获得。为了提高前述细胞群中所含的T细胞的比例,也可根据需要利用常规方法将分离出的前述细胞群进一步进行分离或纯化而获得。另外,也可利用由ES细胞、iPS细胞制备的细胞。作为这些T细胞,可列举 $\alpha \cdot \beta$ T细胞、 $\gamma \cdot \delta$ T细胞、CD8⁺T细胞、CD4⁺T细胞、肿瘤浸润T细胞、记忆T细胞、初始T细胞、NKT细胞。需要说明的是,免疫活性细胞的来源与施予对象可以相同也可不同,但优选为相同。此外,在施予对象为人的情况下,作为免疫活性细胞,可使用从作为施予对象的患者本人采集的自体细胞,也可使用从他人采集的异体细胞。即,供体与受体(recipient)可以一致也可以不一致,但优选为一致。

[0094] 关于上述病毒,若可包装编码IL-7的核酸、及编码CCL19的核酸、并可感染恶性肿瘤细胞的病毒,则没有特别限制,但优选为溶瘤病毒。上述溶瘤病毒(oncolytic virus)是指,即使感染正常细胞也基本上不增殖,但感染恶性肿瘤细胞时则增殖,具有使恶性肿瘤细胞杀灭(损伤恶性肿瘤细胞)的能力的病毒,例如在Molecular Therapy、第18卷、第2号、

2010年2月、233~234页有综述。作为该溶瘤病毒,若具有感染恶性肿瘤细胞而使恶性肿瘤细胞杀灭的能力,就没有特别限定,可列举溶瘤性痘苗病毒、溶瘤性腺病毒、溶瘤性单纯疱疹病毒、溶瘤性呼肠孤病毒、溶瘤性麻疹病毒、溶瘤性新城疫病毒、溶瘤性牛痘病毒、溶瘤性腮腺炎病毒、溶瘤性柯萨奇病毒等。另外,作为上述溶瘤性痘苗病毒,也可使用Kim MK等, Science Translational Medicine.2013 May 15;5(185):185ra63、Heo J, et al. Nature Medicine, 2013 (3):329-36. doi:10.1038/nm.3089. Epub 2013 Feb 10.、国际公开第2012/094386号小册子中记载的病毒,但不限于此。另外,作为上述溶瘤性腺病毒,可使用 Tedcastle A等, Mol Ther. 2016;24:796-804, Marino N, Illingworth S, Kodialbail P, Patel A, Calderon H, Lear R, Fisher KD, Champion BR, Brown ACN. PLoS One 2017;12(5):e0177810、Freedman JD等, EMO Mol Med 9:1067-1087 (2017)、Lang FF等, Journal of Clinical Oncology (2018)、James M.等, The Journal of Oncology, 188(6):2391-7, 2012、日本专利第3867968号公报以及日本专利第5574284号公报中记载的病毒,但不限于此。另外,作为上述溶瘤性单纯疱疹病毒,可使用 Mazzacurati等, Mol Ther, 2015 Jan;23(1):99-107、Hirooka Y等, BMC Cancer 2018, 18, 596、Nakatake R等, Cancer Sci. 2018 Mar, 109(3), 600-610以及 Andtbacka RHI等, J Clin Oncol. 2015;33:2780-2788中记载的病毒,但不限于此。另外,关于上述溶瘤性呼肠孤病毒,可使用 Mahalingam等, Cancers 2018, 10, 160中记载的病毒,但不限于此。另外,关于上述溶瘤性新城疫病毒,可使用 Journal of Virology. 2016 Jun;90(11):5343-5352. 中记载的病毒,但不限于此。另外,关于上述溶瘤性水疱性口炎病毒 (vesicular stomatitis virus) 病毒,可使用 Muik A. 等, Cancer Res;74(13):3567-78. 中记载的病毒,但不限于此。需要说明的是,关于溶瘤病毒,也存在利用基因改造而附加了表达蛋白质的功能的溶瘤病毒,但是也可表达上述IL-7以及CCL19来替代这样的蛋白质,或者也可在这样的蛋白质的基础上进一步表达上述IL-7以及CCL19。

[0095] 作为上述厌氧菌,只要是可通过向细胞内导入编码IL-7的核酸、及编码CCL19的核酸而表达IL-7以及CCL19的厌氧菌,则没有特别限制,但优选为具有聚集于恶性肿瘤细胞的能力的厌氧性革兰氏阳性菌,可列举双歧杆菌 (*bifidus bacteria*) 等双歧杆菌 (*Bifidobacterium*) 属菌、乳杆菌 (*Lactobacillus*) 属菌、李斯特菌 (*Listeria*) 属菌。需要说明的是,已知厌氧菌在氧少的环境下容易生长,因而容易聚集于恶性肿瘤细胞。

[0096] 作为上述脂质体,若为可将编码IL-7的核酸、及编码CCL19的核酸包装到肿瘤细胞中、且由磷脂双分子层构成的脂质纳米胶囊 (*lipid nano-capsule*), 则没有特别限制,该脂质体可使用市售品,或者可通过利用常规方法合成从而获得。

[0097] 作为上述MSC,只要是可通过将编码IL-7的核酸、及编码CCL19的核酸导入细胞内从而表达IL-7以及CCL19、并具有聚集于恶性肿瘤细胞的能力的MSC,则没有特别限制。

[0098] 作为上述纳米粒子,只要是具有可将编码IL-7的核酸、及编码CCL19的核酸递送至肿瘤细胞的能力、并且为纳米级、优选直径为5~800nm的粒子体,则没有特别限制,可列举金纳米粒子等金属纳米粒子、二氧化硅纳米粒子。这些纳米粒子可使用市售品,或者可通过利用常规方法合成从而获得。

[0099] 上述“核酸递送介质具有向恶性肿瘤细胞的聚集能力”是指核酸递送介质特异地聚集于恶性肿瘤细胞的能力。具体而言,可列举:a) 核酸递送介质具有识别恶性肿瘤细胞的

细胞表面分子的物质,在该物质的作用下使得核酸递送介质聚集于恶性肿瘤细胞的能力, b) 肿瘤组织的血管壁打开了比正常组织的血管宽1个数量级以上的数百纳米的间隙,利用基于这一特性的EPR效应(enhanced permeability and retention,高通透性和滞留效应)使得核酸递送介质向恶性肿瘤细胞聚集的能力。作为上述核酸递送介质识别恶性肿瘤细胞的细胞表面分子的物质,可列举嵌合抗原受体(CAR)、T细胞受体(TCR)。该CAR、TCR可利用上述专利文献2、3中记载的CAR、TCR。因此,作为具有向恶性肿瘤细胞的聚集能力的核酸递送介质,可列举CAR表达免疫活性细胞、TCR表达免疫活性细胞。需要说明的是,嵌合抗原受体(CAR)是指,将识别癌细胞的细胞表面抗原的单链抗体(single chain Fv:scFv)与、诱导T细胞的活化的信号传递区域进行融合而得到的人工嵌合蛋白质。

[0100] 上述“在恶性肿瘤细胞中具有特异性的增殖能力”是指,即使感染正常细胞也基本上不增殖,而感染恶性肿瘤细胞时则增殖的能力,例如,可列举溶瘤病毒所具有的、在恶性肿瘤细胞中特异性增殖的能力。因此,作为在恶性肿瘤细胞中具有特异性的增殖能力的核酸递送介质,可列举溶瘤病毒。

[0101] 上述“具有损伤恶性肿瘤细胞的能力”是指,损伤恶性肿瘤细胞而将恶性肿瘤细胞溶解或杀灭的能力。需要说明的是,通过将恶性肿瘤细胞溶解或杀灭,使得恶性肿瘤细胞内的恶性肿瘤抗原被释放到溶解或杀灭的细胞的周边。

[0102] 作为上述“识别恶性肿瘤抗原的细胞表面分子”,是识别恶性肿瘤的细胞表面具有的恶性肿瘤抗原的细胞表面分子即可,可列举嵌合抗原受体(CAR)、T细胞受体(TCR)。该CAR、TCR可利用上述专利文献2、3中记载的CAR、TCR。因此,作为具有识别恶性肿瘤抗原的细胞表面分子的免疫活性细胞,可列举CAR表达免疫活性细胞、TCR表达免疫活性细胞。

[0103] 作为上述恶性肿瘤抗原,是指在恶性肿瘤细胞中相比于正常细胞而言高表达、或者在恶性肿瘤细胞中特异性表达的蛋白质、糖脂等物质;作为该恶性肿瘤抗原,可列举肿瘤相关抗原、癌睾丸抗原、血管生成相关抗原、基于基因突变的恶性肿瘤新生抗原(neoantigen)的表位肽,具体而言,可列举WT1、MART-1、NY-ESO-1、MAGE-A1、MAGE-A3、MAGE-A4、Glypican-3、KIF20A、Survivin、AFP-1、gp100、MUC1、PAP-10、PAP-5、TRP2-1、SART-1、VEGFR1、VEGFR2、NEIL3、MPHOSPH1、DEPDC1、FOXN1、CDH3、TTK、TOMM34、URLC10、KOC1、UBE2T、TOPK、ECT2、MESOTHELIN、NKG2D、P1A、5T4、B7-H6、BCMA、CD123、CD133、CD138、CD171、CD19、CD20、CD22、CD23、CD30、CD33、CD38、CD44、CEA、cMet、CS 1、EGFR、EGFRvIII、EphA2、ErbB2、FAP、FR- α 、HER2、IL13Ra2、MUC1、MUC16、NKG2D、PSCA、PSMA、ROR1、TARP、DLL3、PRSS21、Claudin18.2、Claudin18、CAIX、L1-CAM、FAP- α 、CTAG1B、FR- α 等蛋白质,GD2、GM2等糖脂。

[0104] 在上述“包含核酸递送介质、编码IL-7的核酸、及编码CCL19的核酸”中也包括在核酸递送介质之中包含编码IL-7的核酸、及编码CCL19的核酸的方式。例如,在核酸递送介质为免疫活性细胞的情况下,在免疫活性细胞内包含编码IL-7的核酸、及编码CCL19的核酸即可。另外,编码IL-7的核酸、及编码CCL19的核酸可以是整合于免疫活性细胞的基因组的状态,也可以是未整合于基因组的状态(例如,游离状态)。

[0105] 上述核酸递送介质为免疫活性细胞的情况下,可通过将编码IL-7的核酸、及编码CCL19的核酸导入于该免疫活性细胞,即通过将外源性的编码IL-7的核酸及编码CCL19的核酸(优选为在启动子的下游可操作地连接着的外源性的编码IL-7的核酸及编码CCL19的核酸)导入于免疫活性细胞,从而制作本发明的增强剂或诱导剂、本发明的恶性肿瘤复发抑制

剂。作为导入的方法,是将DNA导入于免疫活性细胞的方法即可,例如,可列举电穿孔法(electroporation method)(Cytotechnology,3,133(1990))、磷酸钙法(日本特开平2-227075号公报)、脂质体转染法(lipofection method)(Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,84,7413(1987))、病毒感染法等方法。作为该病毒感染法,可列举下述方法:通过将包含导入的核酸的载体和包装质粒,转染(transfection)于GP2-293细胞(Takara Bio Inc.制造)、Plat-GP细胞(Cosmo Bio Co.,Ltd.制造)、PG13细胞(ATCC CRL-10686)、PA317细胞(ATCC CRL-9078)等包装细胞而制作重组病毒,使该重组病毒感染T细胞(上述专利文献2)。

[0106] 此外,在上述核酸递送介质为病毒的情况下,可通过将编码IL-7的核酸、及编码CCL19的核酸导入于该病毒,即通过将外源性的编码IL-7的核酸及编码CCL19的核酸(优选为在启动子的下游可操作地连接着的外源性的编码IL-7的核酸及编码CCL19的核酸)导入于病毒,从而制作“具有编码IL-7的核酸、及编码CCL19的核酸并表达IL-7、以及CCL19的病毒”。可使用该制作出的病毒作为本发明的增强剂或诱导剂、本发明的恶性肿瘤复发抑制剂。

[0107] 同样地,上述核酸递送介质为厌氧菌、脂质体、或间质干细胞(MSC)的情况下,也可通过将编码IL-7的核酸、及编码CCL19的核酸导入于该厌氧菌、脂质体、或间质干细胞(MSC),即也可通过将外源性的编码IL-7的核酸及编码CCL19的核酸(优选为在启动子的下游可操作地连接着的外源性的编码IL-7的核酸及编码CCL19的核酸)导入于厌氧菌、脂质体、或间质干细胞(MSC),从而制作“具有编码IL-7的核酸、及编码CCL19的核酸并表达IL-7、以及CCL19的厌氧菌、脂质体、或间质干细胞(MSC)”。可使用该制作出的厌氧菌、脂质体、或间质干细胞(MSC)作为本发明的增强剂或诱导剂、本发明的恶性肿瘤复发抑制剂。另外,也可使用上述“具有编码IL-7的核酸、及编码CCL19的核酸并且表达IL-7、以及CCL19的病毒”、“具有编码IL-7的核酸、及编码CCL19的核酸并表达IL-7、以及CCL19的厌氧菌”、“具有编码IL-7的核酸、及编码CCL19的核酸并表达IL-7、以及CCL19的脂质体”、或“具有编码IL-7的核酸、及编码CCL19的核酸并表达IL-7、以及CCL19的间质干细胞(MSC)”作为恶性肿瘤的增殖抑制剂。

[0108] 另外,作为将上述编码IL-7的核酸、及编码CCL19的核酸导入于免疫活性细胞的其他的方法,也可以是下述方法:使用已知的基因编辑技术,将编码IL-7的核酸、及编码CCL19的核酸以可在适当的启动子的控制下表达的方式整合于免疫活性细胞的基因组。作为已知的基因编辑术,可例示使用锌指核酸酶(zinc finger nuclease)、TALEN(类转录激活因子样效应物核酸酶)、CRISPR(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat,成簇的规律间隔性短回文重复序列)-Cas系统等内切核酸酶(endonuclease)的技术。

[0109] 在制作“含有编码IL-7的核酸、及编码CCL19的核酸、并具有CAR作为识别恶性肿瘤抗原的细胞表面分子的免疫活性细胞,即含有编码CAR、IL-7、以及CCL19的核酸、并表达CAR、IL-7、以及CCL19的免疫活性细胞”作为本发明的增强剂或诱导剂、本发明的恶性肿瘤复发抑制剂的情况下,可利用以下的任意方法而制作。

[0110] (1) 将含有编码IL-7的核酸及编码CCL19的核酸并表达IL-7及CCL19的载体、以及含有编码CAR的核酸并表达CAR的载体这2种载体同时、或阶段性地导入于免疫活性细胞的方法;

[0111] (2) 将含有编码CAR的核酸和编码IL-7的核酸并表达CAR和IL-7的载体、以及含有编码CAR的核酸和编码CCL19的核酸并表达CAR和CCL19的载体这2种载体同时、或阶段性地导入于免疫活性细胞的方法；

[0112] (3) 将含有编码CAR的核酸和编码IL-7的核酸并表达CAR和IL-7的载体、以及含有编码IL-7的核酸和编码CCL19的核酸并表达IL-7和CCL19的载体这2种载体同时、或阶段性地导入于免疫活性细胞的方法；

[0113] (4) 将含有编码CAR的核酸和编码CCL19的核酸并表达CAR和CCL19的载体、以及含有编码IL-7的核酸和编码CCL19的核酸并表达IL-7和CCL19的载体这2种载体同时、或阶段性地导入于免疫活性细胞的方法；

[0114] (5) 将含有编码CAR的核酸和编码IL-7的核酸并表达CAR和IL-7的载体、以及含有编码CCL19的核酸并表达CCL19的载体这2种载体同时、或阶段性地导入于免疫活性细胞的方法；

[0115] (6) 将含有编码CAR的核酸和编码CCL19的核酸并表达CAR和CCL19的载体、以及含有编码IL-7的核酸并表达IL-7的载体这2种载体同时、或阶段性地导入于免疫活性细胞的方法；

[0116] (7) 将含有编码CAR的核酸并表达CAR的载体、含有编码IL-7的核酸并表达IL-7的载体、以及含有编码CCL19的核酸并表达CCL19的载体这3种载体同时、或阶段性地导入于免疫活性细胞的方法；

[0117] 同样地，在制作“含有编码IL-7的核酸、及编码CCL19的核酸、并具有TCR作为识别恶性肿瘤抗原的细胞表面分子的免疫活性细胞，即含有编码TCR、IL-7、以及CCL19的核酸并表达TCR、IL-7、以及CCL19的免疫活性细胞”作为本发明的增强剂或诱导剂、本发明的恶性肿瘤复发抑制剂的情况下，可利用以下的任意方法而制作。

[0118] (1) 将含有编码IL-7的核酸及编码CCL19的核酸并表达IL-7及CCL19的载体、以及含有编码TCR的核酸并表达TCR的载体这2种载体同时、或阶段性地导入于免疫活性细胞的方法；

[0119] (2) 将含有编码TCR的核酸和编码IL-7的核酸并表达TCR和IL-7的载体、以及含有编码TCR的核酸和编码CCL19的核酸并表达TCR和CCL19的载体这2种载体同时、或阶段性地导入于免疫活性细胞的方法；

[0120] (3) 将含有编码TCR的核酸和编码IL-7的核酸并表达TCR和IL-7的载体、以及含有编码IL-7的核酸和编码CCL19的核酸并表达IL-7和CCL19的载体这2种载体同时、或阶段性地导入于免疫活性细胞的方法；

[0121] (4) 将含有编码TCR的核酸和编码CCL19的核酸并表达TCR和CCL19的载体、以及含有编码IL-7的核酸和编码CCL19的核酸并表达IL-7和CCL19的载体这2种载体同时、或阶段性地导入于免疫活性细胞的方法；

[0122] (5) 将含有编码TCR的核酸和编码IL-7的核酸并表达TCR和IL-7的载体、以及含有编码CCL19的核酸并表达CCL19的载体这2种载体同时、或阶段性地导入于免疫活性细胞的方法；

[0123] (6) 将含有编码TCR的核酸和编码CCL19的核酸并表达TCR和CCL19的载体、以及含有编码IL-7的核酸并表达IL-7的载体这2种载体同时、或阶段性地导入于免疫活性细胞的

方法;

[0124] (7) 将含有编码TCR的核酸并表达TCR的载体、含有编码IL-7的核酸并表达IL-7的载体、以及含有编码CCL19的核酸并表达CCL19的载体这3种载体同时、或阶段性地导入于免疫活性细胞的方法;

[0125] 此外,在制作上述“表达TCR、IL-7、及CCL19的免疫活性细胞”的情况下,也可预先制备表达对于所期望的肿瘤抗原特异性的TCR的免疫活性细胞,使用该表达TCR的免疫活性细胞并利用以下的任意方法而制作。

[0126] (1) 将含有编码IL-7的核酸及编码CCL19的核酸并表达IL-7及CCL19的载体导入于上述TCR表达免疫活性细胞的方法;

[0127] (2) 将含有编码IL-7的核酸并表达IL-7的载体、以及含有编码CCL19的核酸并表达CCL19的载体这2种载体同时、或阶段性地导入于上述TCR表达免疫活性细胞的方法;

[0128] 除此之外,作为本发明的增强剂或诱导剂、本发明的恶性肿瘤复发抑制剂,也可制作“表达CAR、TCR、IL-7、及CCL19的免疫活性细胞”。具体而言,可列举:以在上述“制作表达CAR、IL-7、及CCL19的免疫活性细胞的情况下”中记载的各载体中的全部载体或任意载体中,进一步包含编码TCR的核酸从而也表达TCR的方式进行制作的方法;以在上述“制作表达TCR、IL-7、及CCL19的免疫活性细胞的情况下”中记载的各载体中的全部载体或任意载体中,进一步包含编码CAR的核酸从而也表达CAR的方式进行制作的方法;通过向上述“表达TCR的免疫活性细胞”中导入上述“制作表达CAR、IL-7、以及CCL19的免疫活性细胞的情况下”中记载的各载体从而制作的方法。

[0129] 此外,在本发明的增强剂或诱导剂、本发明的恶性肿瘤复发抑制剂中,在免疫活性细胞具有CAR的情况下,也可制作“表达识别不同的恶性肿瘤抗原的多种、优选为2种CAR的免疫活性细胞”。具体而言,可列举:以通过上述“制作表达CAR、IL-7、及CCL19的免疫活性细胞的情况下”中记载的各载体中包含编码识别不同的恶性肿瘤抗原的多种、优选为2种CAR的核酸,从而表达多种、优选为2种CAR的方式进行制作的方法。特别是例如,如果制作含有编码识别恶性肿瘤抗原X的CAR的核酸及编码IL-7的核酸并表达识别恶性肿瘤抗原X的CAR及IL-7的载体、以及含有编码识别恶性肿瘤抗原Y的CAR的核酸及编码CCL19的核酸并表达识别恶性肿瘤抗原Y的CAR及CCL19的载体,而导入于免疫活性细胞,则能够在具有X及Y作为恶性肿瘤抗原的细胞的周边分泌IL-7和CCL19,能够进一步提高肿瘤特异性。

[0130] 需要说明的是,在上述核酸递送介质为免疫活性细胞、病毒、厌氧菌、或间质干细胞的情况下,也可使用培养免疫活性细胞、病毒、厌氧菌、或间质干细胞而获得的、含有该免疫细胞的培养物。

[0131] 上述恶性肿瘤复发抑制剂中的“恶性肿瘤复发”是指:在利用通常的化学疗法、放射线疗法、或外科疗法等而治疗恶性肿瘤后再次产生恶性肿瘤。作为该恶性肿瘤复发,优选为由针对核酸递送介质向恶性肿瘤细胞的聚集能力、或在恶性肿瘤细胞中特异性的增殖能力而言具有抵抗性的恶性肿瘤细胞引起的复发。

[0132] 此处,所谓“由针对向恶性肿瘤细胞的聚集能力而言具有抵抗性的恶性肿瘤细胞引起的复发”,例如,可列举:核酸递送介质是具有识别恶性肿瘤抗原的细胞表面分子的免疫活性细胞,恶性肿瘤复发是:由不具有细胞表面分子所特异性识别的恶性肿瘤抗原、或失去细胞表面分子所特异性识别的恶性肿瘤抗原的恶性肿瘤细胞引起的恶性肿瘤复发。另

外,所谓“由针对核酸递送介质在恶性肿瘤细胞中特异性的增殖能力而言具有抵抗性的恶性肿瘤细胞引起的复发”,例如,可列举:由相对于由恶性溶瘤病毒引起的感染而言不具有敏感性、或相对于由恶性溶瘤病毒引起的感染而言失去敏感性的恶性肿瘤细胞引起的肿瘤复发。关于该“由针对向恶性肿瘤细胞的聚集能力而言具有抵抗性的恶性肿瘤细胞引起的复发”,例如可通过调查复发了的组织的恶性肿瘤细胞中的恶性肿瘤抗原而确认。

[0133] 关于上述恶性肿瘤复发抑制剂,可以用于对进行了免疫治疗的具有恶性肿瘤的对象施予。出于长期抑制复发的目的,也可以用于在进行了免疫治疗之日起100天以后,对进行了免疫治疗的具有恶性肿瘤的对象施予。

[0134] 本发明的增强剂或诱导剂、本发明的恶性肿瘤复发抑制剂也可含有药学上可接受的添加剂。此外,也可包含作为本发明的增强剂或诱导剂、本发明的恶性肿瘤复发抑制剂而使用的说明书。另外,也可通过在本发明的增强剂或诱导剂、本发明的恶性肿瘤复发抑制剂中含有药学上可接受的添加剂而制成医药组合物。以下,也将“含有本发明的增强剂和药学上可接受的添加剂的医药组合物”、“含有本发明的诱导剂和药学上可接受的添加剂的医药组合物”、以及“含有本发明的恶性肿瘤复发抑制剂和药学上可接受的添加剂的医药组合物”概括而称为“本发明的医药组合物”。作为前述添加剂,可列举生理盐水、缓冲生理盐水、细胞培养培养基、葡萄糖、注射用水、丙三醇、乙醇以及它们的组合、稳定剂、增溶剂以及表面活性剂、缓冲剂以及防腐剂、等渗剂、填充剂、以及润滑剂。

[0135] 关于本发明的增强剂或诱导剂、本发明的恶性肿瘤复发抑制剂、或本发明的医药组合物,可通过使用本领域技术人员已知的方法而施予给需要治疗恶性肿瘤或抑制复发的受试者,作为施予方法,可列举向静脉内、肿瘤内、皮内、皮下、肌肉内、腹腔内、动脉内、髓内、心脏内、关节内、滑膜内、颅内、鞘内、以及蛛网膜下腔(脑脊液)的注射。

[0136] 关于本发明的增强剂或诱导剂、本发明的恶性肿瘤复发抑制剂、或本发明的医药组合物,可列举每天4次、3次、2次或1次、每隔1天、每隔2天、每隔3天、每隔4天、每隔5天、每周1次、每隔7天、每隔8天、每隔9天、每周2次、每月1次或每月2次独立施予的方法。

[0137] 关于本发明的增强剂或诱导剂、本发明的恶性肿瘤复发抑制剂、或本发明的医药组合物的施予量,可根据受试者的年龄、性别、健康、以及体重等而适当确定。例如,可列举:在核酸递送介质为免疫活性细胞的情况下,对于人类成人,每1kg体重为 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^9$ 个,优选为 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^8$ 个,更优选为 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ 个。另外,可列举在核酸递送介质为溶瘤病毒的情况下,对于人类成人,每次施予约 $10^2 \sim 10^{10}$ 空斑形成单位(PFU),优选为 $10^5 \sim 10^6$ 空斑形成单位(PFU)。

[0138] 作为本说明书中的恶性肿瘤,可以是实体恶性肿瘤,也可以是血液恶性肿瘤,可列举神经胶质瘤、黑色素瘤、恶性间皮瘤、腺癌、鳞状细胞癌、腺样鳞状细胞癌、未分化癌、大细胞癌、小细胞癌、皮肤癌、甲状腺癌、乳腺癌、前列腺癌、膀胱癌、阴道癌、头颈部癌、颈部癌、子宫癌、肝癌、肾癌、胰腺癌、脾脏癌、肺癌、气管癌、支气管癌、大肠癌、结肠癌、小肠癌、胃癌、食道癌、胆道癌、胆囊癌、睾丸癌、卵巢癌、脑肿瘤等癌,骨组织、软骨组织、脂肪组织、肌肉组织、血管组织及造血组织的癌,以及软骨肉瘤、尤文氏肉瘤、恶性血管内皮瘤、恶性神经鞘瘤、骨肉瘤、软组织肉瘤等肉瘤,肝母细胞瘤、髓母细胞瘤、肾母细胞瘤、神经母细胞瘤、胰母细胞瘤、胸膜肺母细胞瘤、网膜母细胞瘤等母细胞瘤,生殖细胞肿瘤、淋巴瘤、白血病、骨髓瘤。

[0139] 本发明的增强剂或诱导剂、本发明的恶性肿瘤复发抑制剂、或本发明的医药组合物可与其他抗肿瘤剂合并使用。另外,也可将使用本发明的增强剂或诱导剂、本发明的恶性肿瘤复发抑制剂、或本发明的医药组合物的方法与基于放射线的癌治疗法进行组合。作为上述其他的抗肿瘤剂,可列举环磷酰胺、苯达莫司汀、异环磷酰胺、达卡巴嗪等烷基化药物,喷司他丁、氟达拉滨、克拉屈滨、甲氨蝶呤、5-氟尿嘧啶、6-巯基嘌呤、依诺他滨等抗代谢药,利妥昔单抗、西妥昔单抗、曲妥珠单抗等分子靶向药物,伊马替尼、吉非替尼、厄洛替尼、阿法替尼、达沙替尼、舒尼替尼、曲美替尼等激酶抑制剂,硼替佐米等蛋白酶体抑制剂,环孢素、他克莫司等钙调神经磷酸酶抑制剂,伊达比星、多柔比星、丝裂霉素C等抗癌抗生素,伊立替康、依托泊苷等植物生物碱,顺铂、奥沙利铂、卡铂等铂制剂,他莫昔芬、比卡鲁胺等激素疗法药,干扰素、纳武利尤单抗(nivolumab)、派姆单抗(pembrolizumab)等免疫调节剂。

[0140] 作为“合并使用上述本发明的增强剂或诱导剂、本发明的恶性肿瘤复发抑制剂、或本发明的医药组合物与其他的抗癌剂”的方法,可列举:使用其他的抗癌剂进行处理,其后使用本发明的增强剂或诱导剂、本发明的恶性肿瘤复发抑制剂、或本发明的医药组合物的方法;将本发明的增强剂或诱导剂、本发明的恶性肿瘤复发抑制剂、或本发明的医药组合物与其他的抗癌剂同时使用的方法;使用本发明的增强剂或诱导剂、本发明的恶性肿瘤复发抑制剂、或本发明的医药组合物进行处理,其后使用其他的抗癌剂的方法。另外,在将本发明的增强剂或诱导剂、本发明的恶性肿瘤复发抑制剂、或本发明的医药组合物与其他的抗癌剂并用的情况下,可进一步提高癌的治疗效果,并且可通过减少各自的施予次数或施予量,从而减轻各自导致的副作用。

[0141] 将在本说明书中引用的学术文献、专利申请等参考文献的全体,以与其各自具体记载的内容相同的程度作为参考援引于本说明书中。

[0142] 实施例

[0143] 以下,通过实施例来更具体说明本发明,但本发明的技术范围不限于这些例示。

[0144] (抗人CD20 CAR-IL-7/CCL19表达T细胞以及抗人CD20 CAR表达T细胞的制作)

[0145] 关于后述的实施例中使用的“表达抗人CD20 CAR、小鼠IL-7、以及小鼠CCL19的T细胞(抗人CD20 CAR-IL-7/CCL19表达T细胞:在以下的实施例或附图中也称为“7×19”)”以及“抗人CD20 CAR表达T细胞:在以下的实施例或附图中也称为“常规)”,依照上述专利文献3以及Tamada等人的文献(Nature Biotechnology doi:10.1038/nbt.4086)中记载的方法而制作。以下,简洁地记载制作方法。需要说明的是,上述“表达抗人CD20 CAR、小鼠IL-7、以及小鼠CCL19的T细胞”是具有抗人CD20 CAR作为识别恶性肿瘤细胞抗原的细胞表面分子的T细胞,且包含编码IL-7的核酸、及编码CCL19的核酸。

[0146] 关于抗人CD20 CAR-IL-7/CCL19表达T细胞,首先,预先制作出含有编码抗人CD20 CAR的核酸、编码小鼠IL-7的核酸、及编码小鼠CCL19的核酸、并表达抗人CD20 CAR、IL-7和CCL19的pMSGV载体。接着,使用逆转录病毒,将该载体导入于通过使用全T细胞分选试剂盒(Pan T Cell Isolation Kit)II(Miltenyi Biotec公司制)从CD90.1阳性(CD90.1⁺)、CD90.2阴性(CD90.2⁻)的同类系小鼠(congenic mouse、Bar Harbor公司制造)的脾脏以及淋巴结中、小鼠活体分离出的小鼠T细胞中,进行制作。另一方面,关于表达抗人CD20 CAR的T细胞(抗人CD20 CAR表达T细胞),预先制作表达抗人20 CAR的pMSGV载体,使用逆转录病毒将该载体导入于上述分离出的小鼠T细胞从而制作。需要说明的是,在以下的实施例或附图

中也将未导入基因的上述分离出的小鼠T细胞(non-transduced T cells)称为“未转导(non-transduced)”。此处,为了将编码抗人CD20 CAR的核酸、编码IL-7的核酸、及编码CCL19的核酸导入于如上所述分离出的小鼠T细胞中,使用了作为逆转录病毒载体的pMSGV载体。因此,将导入了上述各个核酸的小鼠T细胞培养而增殖的情况下,也存在小鼠T细胞质内包含着逆转录病毒载体的情况,但大多数情况是,在小鼠T细胞中,编码抗人CD20 CAR的核酸、编码IL-7的核酸、及编码CCL19的核酸被整合于基因组。小鼠T细胞中,在编码抗人CD20 CAR的核酸、编码IL-7的核酸、及编码CCL19的核酸被整合于基因组的情况下,抗人CD20CAR、IL-7、以及CCL19由所导入的外源的重组构建体(recombinant construct)表达。

[0147] 在T细胞的培养中,使用添加了10%胎牛血清(Fetal calf serum:FCS)、100U/mL的青霉素、100 μ g/mL的链霉素、50 μ M的2-巯基乙醇、25mM的HEPES、2mM的L-谷氨酰胺而成的RPMI-1640培养基。

[0148] [实施例1]

[0149] <T细胞的局部分布>

[0150] 为了调查CAR-IL-7/CCL19表达T细胞的抗肿瘤效果,从而调查了在肿瘤组织中,与所施予的供体T细胞同样源自宿主(recipient)的内源性T细胞是否浸润于肿瘤组织。首先,对7-10周龄的C57BL/6小鼠(SLC公司制),皮下接种 2.5×10^6 个3LL-hCD20(源自以表达人CD20的方式进行了基因重组的小鼠肺癌的细胞3LL)(第0天)。在其后第7天,将作为抗癌剂的环磷酰胺(CPA:100mg/kg)在腹腔内施予。在第10天,将从CD90.1阳性(CD90.1⁺)、CD90.2阴性(CD90.2⁻)同类系小鼠生成的 1×10^6 个上述抗人CD20 CAR表达T细胞、上述抗人CD20 CAR-IL-7/CCL19表达T细胞、或者未导入基因的上述分离出的小鼠T细胞在静脉内施予。在第19天,从小鼠摘除肿瘤组织。在初次染色中,使用经生物素标记的抗CD90.1抗体(clone OX-7 BioLegend公司制:结合于供体T细胞)以及抗CD3抗体(clone 17A2: Tonbo biosciences公司制:结合于供体T细胞与受体的内源性T细胞这两者)的组合,作为第二次染色,使用了Alexa Fluor488标记链霉亲和素(Thermo Fisher Scientific公司制:绿色)以及Alexa Fluor647标记抗大鼠IgG2b(Abcam公司制:红色)。核利用DAPI(Thermo Fisher Scientific公司制:蓝色)进行了染色。以400倍进行了基于显微镜的观察。将结果示于图1(a)。利用第二次染色,使得结合了经生物素标记的抗CD90.1抗体的细胞以绿色显示,结合了抗CD3抗体的细胞以红色显示,因此作为供体T细胞的抗人CD20 CAR-IL-7/CCL19表达T细胞为黄色(绿色+红色:CD90.1⁺+CD3⁺),受体的内源性T细胞为红色(CD90.1⁻+CD3⁺),但是在图1(a)中由灰度(grayscale)表示。

[0151] 另外,使用Hybrid Cell Count program(KEYENCE公司制),对利用图1(a)所标记的各阳性区域进行了定量,将其结果示于图1(b)。图1(b)中,黑色柱表示受体(宿主)的内源性T细胞(图1(a)右图中的红色)的面积,白色柱表示经施予的供体T细胞(图1(a)右图中的黄色)的面积。根据图1(a)、(b)可知,在施予了抗人CD20CAR-IL-7/CCL19表达T细胞的情况下,不仅仅是经施予的T细胞,而且受体(宿主)的内源性T细胞在肿瘤局部的聚集也增强,换言之,通过在肿瘤局部分泌IL-7以及CCL19,使得内源性T细胞在肿瘤局部的聚集也增强。

[0152] [实施例2]

[0153] <抗肿瘤效果中的T细胞的参与>

[0154] 对C57BL/6小鼠皮下接种 2.5×10^6 个3LL-hCD20(第0天)。在其后第3天,将从

CD90.1阳性(CD90.1⁺)、CD90.2阴性(CD90.2⁻)同类系小鼠生成的 1×10^6 个抗人CD20 CAR表达T细胞(Conventional(常规):Conv.)或者抗人CD20 CAR-IL-7/CCL19表达T细胞(7×19) 在静脉内施予。将针对在内源性T细胞中表达的CD90.2(Thy1.2)的抗体、即抗CD90.2抗体(anti-CD90.2;其是本申请的发明人使用从ATCC购入的杂交瘤(hybridoma)而制作的),从第1天起以2次/周的程度在腹腔内施予。关于施予量,最初的2次设为1mg/小鼠,其后设为0.5mg/小鼠。将各个组(n=5)的第14天肿瘤体积的mean $\pm$ SD示于图2。○表示各个小鼠的值。

[0155] 如图2所示,在施予了抗人CD20 CAR-IL-7/CCL19表达T细胞的情况下,可抑制恶性肿瘤的增殖,抗肿瘤效果极好,肿瘤消失,但通过施予抗CD90.2抗体而使得抗肿瘤效果降低了50%左右。因此可知,在基于抗人CD20 CAR-IL-7/CCL19表达T细胞的抗肿瘤效果中,受体的内源性T细胞也参与了,换言之,表明了基于抗人CD20 CAR-IL-7/CCL19表达T细胞的抗肿瘤效果不仅是抗人CD20 CAR-IL-7/CCL19表达T细胞自身,而且受体的内源性的T细胞也很大程度地参与了。

[0156] [实施例3]

[0157] <受体的内源性T细胞的记忆化>

[0158] 就基于抗人CD20 CAR-IL-7/CCL19表达T细胞的、供体CAR-T细胞以及内源性T细胞的记忆功能的获得、以及具有记忆功能的细胞的增加而言,利用作为记忆细胞的标记的CD44以及CD62L进行了评价。

[0159] 对C57BL/6小鼠皮下接种了 2.5×10^6 个3LL-hCD20(第0天)。在其后第3天,将从CD90.1阳性(CD90.1⁺)、CD90.2阴性(CD90.2⁻)同类系小鼠生成的 1×10^6 个上述抗人CD20 CAR表达T细胞(Conv.)或者上述抗人CD20 CAR-IL-7/CCL19表达T细胞(7×19) 在静脉内施予。在第28天,采集脾脏细胞而用于以下的分析。

[0160] 供体T细胞作为CD90.1阳性细胞(CD90.1⁺)而鉴定,受体(recipient)T细胞作为CD90.2阳性细胞(CD90.2⁺)而鉴定。CD4阳性以及CD8阳性T细胞中的记忆T细胞标记(CD44及CD62L)及CAR的表达利用流式细胞仪而进行。散点图(dot plot)或直方图的数值示出各个门(gate)内的细胞比例。将结果示于图3。

[0161] 另外,利用IFN- γ 的产生而调查了记忆化的功能、即对于刺激的反应性获得。首先,将在第28天采集的脾脏细胞,与由丝裂霉素C(Kyowa Hakko Kirin Co.,Ltd.制造)在37℃处理了90分钟的3LL-hCD20或未表达hCD20的其亲株3LL进行共培养而进行刺激。关于IFN- γ 的产生,利用细胞内细胞因子染色而进行了调查。将结果示于图4。图4中,(a)的直方图中的数值示出CD90.1阳性供体T细胞中的IFN- γ 阳性细胞的比例。图4中,(b)示出利用流式细胞仪检测了CD90.2阳性的内源性CD8阳性T细胞中的IFN- γ 阳性细胞而得到的结果。散点图的数值表示4个象限各自中的细胞比例。

[0162] 如图3所示,在施予了抗人CD20 CAR表达T细胞(Conv.)的情况下,在CD90.2门细胞(受体的内源性T细胞)中,中央型记忆T细胞(作为记忆T细胞标记的CD44阳性及CD62L阳性细胞)在CD4阳性细胞中为5.5%、在CD8阳性细胞中为24.8%。另一方面,在施予了抗人CD20 CAR-IL-7/CCL19表达T细胞(7×19)的情况下,在CD90.2门细胞(受体的内源性T细胞)中,中央型记忆T细胞在CD4阳性细胞中为6.76%、在CD8阳性细胞中为49.2%,中央型记忆T细胞的比例均增加。因此可知,通过施予抗人CD20 CAR-IL-7/CCL19表达T细胞(7×19),即通过

使IL-7与CCL19从一个细胞分泌,可将受体的内源性T细胞活化,并且可将受体的内源性T细胞分化诱导为中央型记忆T细胞,增加中央型记忆T细胞的数量,并且可增加脾脏细胞群中的中央型记忆T细胞的比例。换言之,可知抗人CD20 CAR-IL-7/CCL19表达T细胞可用作施予对象中具有记忆功能的T细胞的诱导剂、施予对象中具有记忆功能的T细胞的增强剂。

[0163] 另一方面,确认了在CD90.1门细胞(供体T细胞)中,中央型记忆T细胞在CD4阳性细胞中为75.8%、在CD8阳性细胞中为90.7%,供体T细胞自身也被诱导为中央型记忆T细胞。需要说明的是,在Conv.中,CD90.1门细胞为0%,未检测到CD90.1阳性细胞(n.d.),其原因在于,在Conv.中未表达IL-7和CCL19,因此CAR表达T细胞的存活率低。

[0164] 此外,如图4所示,利用3LL的刺激,在供体细胞中,在CD4阳性细胞中的90.5%生产了IFN- γ ,在CD8阳性细胞中的93.6%产生了IFN- γ 。另外,在受体的内源性T细胞(未表达CAR-T)中,Conv.中的CD4阳性细胞的0.957%产生了IFN- γ ,与此相对,7 $\times$ 19中的14.9%的细胞产生了IFN- γ 。因此可知,通过使抗人CD20 CAR-IL-7/CCL19表达T细胞分泌IL-7与CCL19,使得供体T细胞以及受体(recipient)细胞均因刺激而产生IFN- γ ,从而获得了记忆功能。

[0165] [实施例4]

[0166] <T细胞受体的基因表达模式的变化>

[0167] 为了调查T细胞的表位(epitope)多样性,调查了CAR-IL-7/CCL19表达T细胞的处理前后的T细胞受体(TCR)库的变化。对DBA/2小鼠(n=5)皮下接种5 $\times$ 10⁵个P815-hCD20(以表达人CD20的方式进行了基因重组的小鼠肥大细胞瘤P815)(第0天)。在其后第10天,将环磷酸胺(CPA:100mg/kg)以及1 $\times$ 10⁶个抗人CD20 CAR-IL-7/CCL19表达T细胞在静脉内施予而治疗肿瘤。在P815肿瘤细胞施予之后第140天,从如上文所述治疗肿瘤从而治愈的小鼠(肿瘤排斥小鼠:tumor-rejected mice)中采集脾脏细胞,为了使利用细胞分选仪(SH800:索尼公司制)而分选出的CAR阳性T细胞或CAR阴性T细胞增殖,与P815-hCD20或未表达hCD20的亲株(hCD20阴性:hCD20⁻)P815共培养了4天。其后,为了进行TCR库分析,由流式细胞仪(flow cytometer)分选了CD8阳性且CAR阳性(CD8⁺CAR⁺)或CD8阳性且CAR阴性(CD8⁺CAR⁻)的群(population)。作为对照,分选了投入于小鼠之前的CD8阳性且CAR阳性、或CD8阳性且CAR阴性的群。TCR库利用第二代测序仪进行分析,以三维图示出 α 及 β 链中的V以及J区域的使用频率。将结果示于图5A-D、图6A-D。图5A-D为 α 链,图6A-D为 β 链,另外,图5A、B、图6A、B是各细胞投入前,图5C、D、图6C、D是各细胞投入后。图中的左上的数值表示利用1-Pielou均匀度指数(数值越高表示多样性越低)算出的多样性指数(diversity indexes),数值越低则表示多样性越高。

[0168] 需要说明的是,T细胞受体是在T细胞的细胞膜上表达的抗原受体分子。已知,以包含 α 链和 β 链、或 γ 链和 δ 链的异二聚物的形式存在,通过识别结合于主要组织相容性复合体(MHC)分子的抗原分子从而将T细胞进行活化。

[0169] 由图5A-D、图6A-D中的多样性指数而可知, α 链、 β 链均因施予抗人CD20 CAR-IL-7/CCL19表达T细胞而多样性指数值增加。因此可知,不仅仅是经施予的抗人CD20 CAR-IL-7/CCL19表达T细胞,而且受体的内源性T细胞中的TCR的多样性也降低,在肿瘤局部分泌IL-7以及CCL19并且破坏肿瘤细胞,从而使得被认为对肿瘤抗原具有记忆功能的T细胞选择性地增加。

[0170] [实施例5]

[0171] <肿瘤的复发抑制-1>

[0172] 利用下述方法进行利用了动物的癌复发模型。首先,在经抗人CD20 CAR-IL-7/CCL19表达T细胞处理的小鼠中,调查了受体(recipient)T细胞的肿瘤特异性记忆应答。对7-10周龄的荷瘤小鼠(DBA/2:n=4:SLC公司制)皮下接种了 5×10^5 个P815-hCD20。在其后第10天,将作为抗癌剂的环磷酰胺(CPA:100mg/kg)在腹腔内施予。在第14天,将 1×10^6 个抗人CD20 CAR-IL-7/CCL19表达T细胞接种于静脉内。在接种P815-hCD20后的第140天,针对治疗肿瘤而治愈的小鼠(肿瘤排斥小鼠:tumor-rejected mice)或作为对照的空白小鼠(naive mice),将P815-hCD20或未表达hCD20的亲株P815分别接种于左右的侧腹。肿瘤的体积以2次/周进行了测定。将结果示于图7A。另外,使用接种了3LL-hCD20或未表达hCD20的亲株3LL来替代上述P815-hCD20的C57BL/6小鼠,进行同样的分析。将结果示于图7B。需要说明的是,由于亲株P815以及3LL不表达人CD20,因而成为不具有抗人CD20 CAR-IL-7/CCL19表达T细胞的细胞表面分子所特异性识别的恶性肿瘤抗原的恶性肿瘤细胞。

[0173] 就图7A中的横轴而言,对于空白小鼠是最初施予了P815-hCD20或P815之日(0天)起的天数,对治疗肿瘤而治愈的小鼠是最初接种P815-hCD20后的第140天再次接种P815-hCD20之日(0天)起的天数。另外,就图7B中的横轴而言,对于空白小鼠是最初接种了3LL-hCD20或3LL之日(0天)起的天数,对于治疗肿瘤而治愈的小鼠是再次接种3LL-hCD20之日(0天)起的天数。图7A、7B中的纵轴是肿瘤的体积(mm^3)。

[0174] 如图7A、7B的下段所示,在治疗肿瘤而治愈的小鼠(肿瘤排斥小鼠:tumor-rejected mice)中,在接种了P815-hCD20或3LL-hCD20的情况下没有形成肿瘤。即,可知通过利用抗人CD20 CAR-IL-7/CCL19表达T细胞治疗肿瘤,从而可抑制由具有CAR所识别的抗原的肿瘤细胞引起的肿瘤的复发。此外,令人吃惊的是,如图7A、7B的上段所示,在治疗肿瘤而治愈的小鼠中,在接种了细胞表面不具有CD20的亲株P815或3LL的情况下,肿瘤的形成与空白小鼠相比被显著地抑制。即,可知通过利用抗人CD20 CAR-IL-7/CCL19表达T细胞进行处理,从而也可抑制由不具有CAR所识别的抗原的肿瘤细胞引起的肿瘤的形成,换言之,也可抑制由不具有CAR所识别的抗原的肿瘤细胞引起的肿瘤复发。这样地,通过施予抗人CD20 CAR-IL-7/CCL19表达T细胞从而对施予对象的免疫功能造成影响,即使对于未表达CAR的靶抗原的亲株的肿瘤,也使得施予对象能长期地持续排斥并抑制复发,对于这一情况,从CAR-T细胞的靶分子特异性反应性这样的观点考虑是预料不到的。与将上述实施例4中的T细胞受体的基因表达模式的变化结果合并时,则可认为通过施予抗人CD20 CAR-IL-7/CCL19表达T细胞,从而引起肿瘤细胞的破坏,作为其结果,受体的内源性T细胞与肿瘤细胞本来具有的肿瘤抗原进行反应,诱导了长期的记忆功能。即,可认为通过施予抗人CD20 CAR-IL-7/CCL19表达T细胞,破坏肿瘤细胞并且在肿瘤局部分泌IL-7以及CCL19,由此极其高效地诱导表位扩展(epitope spreading)现象,通过诱导以及增强记忆功能从而抑制恶性肿瘤的复发。需要说明的是,在上述癌复发模型中,最初在皮下接种P815-hCD20、P815、3LL-hCD20、以及3LL,在第140天,将上述各种细胞分别接种于左右的侧腹。因此,也可认为通过施予抗人CD20 CAR-IL-7/CCL19表达T细胞,不仅仅是单纯地抑制恶性肿瘤的复发,而且抑制恶性肿瘤的转移。因此,可认为抗人CD20 CAR-IL-7/CCL19表达T细胞也可被用作“恶性肿瘤转移抑制剂”。

[0175] [实施例6]

[0176] <肿瘤的复发抑制-2>

[0177] 为了确认肿瘤的复发抑制效果,将人恶性胸膜间皮瘤细胞株对小鼠施予而形成肿瘤,其后,调查了经过施予或不施予抗人间皮素CAR-IL-7/CCL19表达T细胞,在143天内肿瘤有无复发。具体的实验流程示于图8。另外,图8中的“ACC-MES01-GFP-Luc”、“抗间皮素CAR表达T细胞”、“抗间皮素CAR表达T细胞”的制备方法、T细胞的活化方法如下所示。

[0178] (ACC-MES01-GFP-Luc株的制作)

[0179] 对于由爱知县癌症中心研究所的关户好孝老师提供的间皮素阳性肿瘤细胞株、即人恶性间皮瘤细胞株ACC-MES01,使用慢病毒(lentivirus)而进行了绿色荧光蛋白-荧光素酶(GFP-Luc)的基因导入。

[0180] 第0天在96孔板(well plate)上以 1×10^3 细胞/孔接种ACC-MES01。培养基使用添加了10%FBS的RPMI1640(Gibco公司制)。第1天,以MOI 100加入用于制作发光细胞的慢病毒粒子、即RediFect Red-FLuc-GFP(PerkinElmer公司制)而开始转导。此时,为了提高基因导入效率,将海美溴铵(Hexadimethrine Bromide, Sigma-aldrich公司制)以最终浓度成为 $4 \mu\text{g/mL}$ 的方式加入于培养基。在病毒添加24小时后(第2天)将包含病毒的培养基去除而进行了培养基的更换。继续培养后,利用SH800(索尼公司制)仅分选表达GFP的细胞,制成ACC-MES01-GFP-Luc株。

[0181] (抗人间皮素CAR-IL-7-CCL19表达T细胞、及抗人间皮素CAR表达T细胞的制作)

[0182] 关于抗人间皮素CAR-IL-7-CCL19表达T细胞、及抗人间皮素CAR表达T细胞(常规的CAR表达T细胞),基于日本特愿2017-247109号以及国际公开第2016/056228号小册子中记载的方法而制作。简洁地记载时,则是制作出第3代CAR构建体(construct)(序列号6),其依次具备:包含序列号3所示的重链可变区的氨基酸序列、序列号4所示的接头(linker)的氨基酸序列和序列号5所示的轻链可变区的氨基酸序列的抗人间皮素单链抗体、人CD8跨膜区以及人CD28-4-1BB-CD3 ζ 细胞内信号基序。制作在该构建体的C末端依次具备序列号1所示的人IL-7、与其相连接的序列号7所示的源自小核糖核酸病毒的2A肽(F2A)、序列号2所示的人CCL19、以及源自疱疹病毒的胸苷激酶基因(HSV-tk)的构建体,插入于pMSGV1逆转录病毒表达载体(Tamada k et al., Clin Cancer Res 18:6436-6445(2002)),从而制作出表达人IL-7/CCL19以及HSV-tk的pMSGV1逆转录病毒表达载体。利用逆转录病毒将所获得的pMSGV1逆转录病毒表达载体导入于小鼠T细胞,制作抗人间皮素CAR-IL-7-CCL19表达T细胞。同样地,作为上述表达人IL-7/CCL19以及HSV-tk的pMSGV1逆转录病毒表达载体的替代,利用逆转录病毒,将表达依次具备上述抗人间皮素单链抗体、人CD8跨膜区以及人CD28-4-1BB-CD3 ζ 细胞内信号基序的第3代CAR构建体的pMSGV1逆转录病毒表达载体导入于小鼠T细胞,从而制作出抗人间皮素CAR表达T细胞(常规的抗人间皮素CAR表达T细胞)。信号肽使用了序列号8所示的信号肽。

[0183] (T细胞的活化)

[0184] 第0天,将从健康人供体采集的 2×10^6 个外周血单核细胞,在用RetroNectin $25 \mu\text{L/mL}$ (Takara Bio Inc.制造)和抗人CD3单克隆抗体 $5 \mu\text{g/mL}$ (invitrogen公司制, $5 \mu\text{g/mL}$)包被的细胞培养用6孔板中,与IL-2200IU/mL(Peprotech公司制)一同在 37°C 、5% CO_2 培养箱中开始培养。培养液使用在OpTmizer CTS(Gibco公司制)中加入L-谷氨酰胺 2mM (Gibco公司

制)、1%青霉素-链霉素(和光纯药工业株式会社制)以及两性霉素B 2.5 μ g/mL(Bristol-Myers Squibb Company制)而得到的培养液。培养3天,第3天在显微镜下确认到T细胞活化而引起了形态变化。

[0185] (肿瘤的复发观察)

[0186] 首先,在第0天,对8周龄的雌性NSG免疫缺陷小鼠,以 2×10^6 细胞/小鼠,在胸腔内施予上述ACC-MES01-GFP-Luc。在第1天,使用体内成像系统(in vivo imaging system: IVIS),确认肿瘤植入胸腔内。在第1天,将由健康供体的外周血单核细胞(Peripheral Blood Mononuclear Cells:PBMC)制作并且冷冻保存的上述常规的CAR表达T细胞、抗人间皮素CAR-IL-7-CCL19表达T细胞、以及通过上述方法而活化的T细胞进行解冻。上述常规的抗人间皮素CAR表达T细胞和上述抗人间皮素CAR-IL-7-CCL19表达T细胞的CAR表达率分别为49.6%、32.5%,因而在常规的抗人间皮素CAR表达T细胞中加入上述活化T细胞而将两者的CAR表达率合并后,准备了施予 1×10^5 细胞的上述常规的抗人间皮素CAR表达T细胞的组(N=5)、施予 1×10^5 细胞的上述抗人间皮素CAR-IL-7-CCL19表达T细胞的组(N=5)。关于常规的抗人间皮素CAR表达T细胞以及抗人间皮素CAR-IL-7-CCL19表达T细胞的施予,经尾静脉利用静脉内施予而进行。此外,在第3天以后,进行了使用IVIS的肿瘤荧光强度的测定(发光量:Total Flux(光子/秒)。将结果示于图9A、B。另外,将上述结果中的自施予起的天数与小鼠的存活率的关系制图而示于图10,将自施予起的天数与总荧光量(光子/秒)的关系制图而示于图11。图9A、B、图10、以及图11中,将施予了抗人间皮素CAR-IL-7-CCL19表达T细胞的情况由“ 7×19 CAR-T”表示,将施予了常规的抗间皮素CAR表达T细胞的情况由“常规的CAR-T”表示。需要说明的是,本实施例6中,由于使用了内源性T细胞缺失的NSG免疫缺陷小鼠作为受体,因而消除了受体的内源性T细胞的影响,评价了经施予的抗人间皮素CAR-IL-7-CCL19表达T细胞自身的效果。

[0187] 如图9A、B、图10、以及图11所示,在第21天左右, 7×19 CAR-T、常规的CAR-T均基本上没有观察到肿瘤荧光强度。在 7×19 CAR-T中确认到,直至其后的第143天也没有观察到肿瘤荧光,完全抑制了复发。另一方面,在常规的CAR-T中,自第45天左右起,开始观察到肿瘤荧光,在第115天肿瘤荧光强度变高,在第129天1只死亡,在第143天剩余的4只也死亡了。因此,可知通过施予CAR-IL-7-CCL19表达T细胞,即通过在肿瘤局部分泌IL-7以及CCL19并且破坏肿瘤细胞,能够抑制恶性肿瘤的复发。

[0188] [实施例7]

[0189] <受体的内源性T细胞的记忆化>

[0190] 上述中使用了具有CAR作为识别恶性肿瘤抗原的细胞表面分子的T细胞,但作为CAR的替代,使用具有T细胞受体(TCR)作为识别恶性肿瘤抗原的细胞表面分子的T细胞,调查了受体的内源性T细胞的记忆化。

[0191] (P1A特异性TCR/IL-7/CCL19/eGFP表达T细胞的制作)

[0192] 关于表达作为P815肿瘤抗原的P1A特异性TCR、小鼠IL-7、小鼠CCL19、以及GFP的T细胞的制作,依照上述专利文献3中记载的方法进行。若简洁地记载,则如下文所示。

[0193] 人工合成出编码小鼠IL-7(没有终止密码子)、与其相连接的源自小核糖核酸病毒的2A肽(F2A)、小鼠CCL19的IL-7-F2A-CCL19 DNA片段(Life Technologies公司制)。利用限制性内切酶(NCOI以及ECORI)处理以及连接(ligation),将在上述中合成的IL-7-F2A-

CCL19 DNA片段插入于具有F2A-eGFP序列的pMSGV逆转录病毒表达载体(上述专利文献3)的多克隆位点,获得了包含IL-7-F2A-CCL19-F2A-eGFP DNA片段(序列号9)的pMSGV载体(IL-7×CCL19-eGFP表达载体)。另外,作为对照,制作出包含eGFP且不包含IL-7及CCL19的pMSGV载体(eGFP对照载体)。需要说明的是,在序列号9中,第1~462位碱基为编码IL-7的核酸(第1~75位碱基为IL-7的信号序列),第463~537位碱基为编码F2A的核酸,第538~861位碱基为编码CCL19的核酸(第538~612位碱基为CCL19的信号序列),第868~942位碱基为编码F2A的核酸,第946~1662位碱基为编码eGFP的核酸,第1663~1665位碱基为终止密码子。

[0194] 从由Y.Liu获得的、表达对于H-2L^d限制性的P815的肿瘤抗原P1A特异性的TCR的转基因小鼠(Sarma, S., Y. Guo, Y. Guilloux, C. Lee, X.-F. Bai, Y. Liu. 1999. J. Exp. Med. 189: 811.)采集脾脏细胞,获得了源自脾脏细胞的、表达对于P815肿瘤抗原P1A特异性的TCR的小鼠T细胞(P1A特异性TCR-T细胞)。接着,制作导入了IL-7×CCL19-eGFP表达载体以及eGFP对照载体的逆转录病毒,转导于用P1A肽将包含上述P1A特异性TCR-T细胞的脾脏细胞(3×10^6 个/孔)活化48小时后的细胞中,从而获得了P1A特异性TCR/IL-7/CCL19/eGFP表达T细胞(7×10^4 P1A-CTL)或P1A特异性TCR/eGFP表达T细胞(conv. P1A-CTL)。关于各表达载体的转导,利用检测eGFP作为替代标记的流式细胞仪分析进行了确认。关于所获得的各自的T细胞的eGFP的表达水平,在所有的实验中均为70~80%。

[0195] 对于将小鼠分别用P1A特异性TCR/IL-7/CCL19/eGFP表达T细胞或P1A特异性TCR/eGFP表达T细胞进行了处理的情况下的脾脏细胞中的CD8⁺GFP⁺细胞的比例以及CD8⁺GFP⁺细胞绝对数量,利用流式细胞仪进行了分析,将其结果示于图12(a)、(b)。确认到,在脾脏细胞中,在用P1A特异性TCR/IL-7/CCL19/eGFP表达T细胞进行了处理的情况下,CD8⁺GFP⁺细胞的比例以及CD8⁺GFP⁺细胞绝对数量增加。

[0196] 接着,对于用空白BDA/2小鼠的CD8⁺脾脏细胞以及P1A特异性TCR/IL-7/CCL19/eGFP表达T细胞进行了处理的小鼠的CD8⁺GFP⁻或CD8⁺GFP⁺脾脏细胞中的CD44的表达,利用流式细胞仪进行分析,将其结果示于图13(a)、(b)。图13(a)示出代表性的CD44⁺细胞的细胞数量,图13(b)示出CD44⁺细胞的比例。如图13(a)、(b)所示,与初始T细胞相比,不仅经施予的T细胞(GFP⁺ gated),而且受体的内源性T细胞(GFP⁻ gated)的CD44⁺的比例也增加了2倍以上。因此,确认了P1A特异性TCR/IL-7/CCL19/eGFP表达T细胞具有将受体的内源性T细胞记忆化的作用,即具有诱导受体的内源性T细胞的记忆功能,并且增强受体的内源性T细胞的记忆功能的作用。

[0197] 此外,为了确认记忆化的功能、即对于刺激的反应性获得,利用IFN- γ 的产生而进行了调查。从脾脏细胞中利用磁性将T细胞分离,与经P815处理的粘膜肥大细胞(Mucosal mast cell; MMC)共培养5天左右。利用ELISA(酶联免疫吸附测定)检测培养基的上清中的IFN- γ 的浓度,将结果示于图14。如图14所示,确认了P1A特异性TCR/IL-7/CCL19/eGFP表达T细胞中的IFN- γ 的产生量多。因此,确认了P1A特异性TCR/IL-7/CCL19/eGFP表达T细胞提高受体的内源性T细胞的抗肿瘤活性。由此,可认为在受体中诱导了复发抑制效果。

[0198] [实施例8]

[0199] <表达IL-7以及CCL19的病毒>

[0200] 在上述中使用了免疫活性细胞作为核酸递送介质,但若在肿瘤局部分泌IL-7以及CCL19,则即使不使用免疫活性细胞也应该能够增强施予对象中具有记忆功能的T细胞或B

细胞,应该能够抑制恶性肿瘤复发。因此,作为核酸递送介质,使用病毒来替代免疫活性细胞而进行了分析。

[0201] (表达小鼠IL-7及小鼠CCL19的基因重组痘苗病毒的制作)

[0202] 关于表达小鼠IL-7及小鼠CCL19的基因重组痘苗病毒,依照上述专利文献3以及国际公开第2011/125469号小册子中记载的方法,利用以下的方法制作。将pTagBFP-N载体(FP172,Evrogen公司)的DNA作为模板,利用2条引物(5'-ATG GCC GGA CCG GCC ACC GGT CGC CAC CAT GAG CGA G-3':序列号10)和(5'-TCG AAT TCG CTA GCG GCC GCT TAA TTA AGC TTG TGC CCC AG-3':序列号11),扩增蓝色荧光蛋白(Blue Fluorescent Protein:BFP)基因区域。由限制性内切酶SfiI和EcoRI切割其PCR产物,将其克隆于pTK-SP-LG载体(国际公开第2011/125469号小册子)的相同限制性内切酶位点,构建了在合成痘苗病毒启动子(Hammond JM.等,Journal of Virological Methods.1997;66(1):135-138)下连接了BFP而成的pTK-SP-BFP。接着,由限制性内切酶AgeI和NotI切割pAmCyan1-N1载体(Takara Bio Inc.制),将该荧光蛋白AmCyan1片段克隆于pTK-SP-BFP的经相同限制性内切酶进行了处理的位点,构建了pTK-SP-AmCyan1。

[0203] 利用限制性内切酶BamHI,切割包含编码小鼠IL-7、与其相连接的源自小核糖核酸病毒的2A肽(F2A)、小鼠CCL19、F2A、eGFP的DNA片段的pMSGV质粒(上述专利文献3),进行Blunt处理后,由NcoI切割而获得了小鼠IL-7-F2A-小鼠CCL19-F2A-eGFP片段,将该片段克隆到通过由限制性内切酶NheI切割pTK-SP-AmCyan1并进行Blunt处理后、由NcoI切割而得到的位点,构建了转移载体质粒(transfer vector plasmid)pTK-SP-小鼠IL-7-F2A-小鼠CCL19-F2A-eGFP。

[0204] 将pGL4.20(Promega Corporation制)的DNA作为模板,利用2条引物(5'-GCT CCG GAC GCC ACC ATG GAA GAT GCC AAA AAC-3'(序列号12)和5'-GCG AAT TCC ACG GCG ATC TTG CCG CCC TTC T-3'(序列号13)),将萤火虫荧光素酶基因区域进行了扩增。将由限制性内切酶BspEI及EcoRI将其PCR产物切割而获得的Luc片段、以及由限制性内切酶EcoRI和BsrGI将pTK-SP-小鼠IL-7-F2A-小鼠CCL19-F2A-eGFP切割而获得的包含eGFP的一部分的片段,同时向由限制性内切酶BspEI和BsrGI切割pTK-SP-小鼠IL-7-F2A-小鼠CCL19-F2A-eGFP而得到的位点克隆,构建了转移载体质粒pTK-SP-Luc-F2A-eGFP。

[0205] 为了回收图15(a)、(b)中所示的具有病毒基因组的重组痘苗病毒,使痘苗病毒(LC16m0)以MOI=0.02~0.1感染在6孔板中培养成80%汇合的CV1细胞,于室温吸附1小时后,按照操作说明将与FuGENE HD(Promega Corporation制)混合了的转移载体质粒DNA(pTK-SP-小鼠IL-7-F2A-小鼠CCL19-F2A-eGFP或pTK-SP-Luc-F2A-eGFP)添加于细胞而使其整合,于37℃培养2~5天。将细胞回收并且冻融后,进行超声波(sonication)处理,适当地稀释而接种于大致汇合的BSC1细胞,加入包含0.8%甲基纤维素的Eagle MEM、5%FBS培养基,于37℃培养2~5天。将培养基去除,用刮勺尖端刮取BFP表达空斑,悬浮于Opti-MEM培养基(Invitrogen公司制)。利用BSC1细胞而进一步反复进行3次以上的上述操作,进行空斑纯化。将在空斑纯化后采集的空斑的悬浮液进行超声处理后,使用高纯度病毒核酸提取试剂盒(Roche公司制)并按照操作说明从其200μL提取基因组DNA,供给于基于PCR的筛选。利用2条引物(5'-ATT TCT CCG TGA TAG GTA TCG ATG-3'(序列号14)和5'-AAC GGT TTA CGT TGA AAT GTC C-3'序列号15)进行PCR,对于检测出规定大小的PCR产物的克隆(clone),通

过直接测序而确认了PCR产物的碱基序列。选择碱基序列没有问题的病毒克隆,利用A549细胞进行扩增,然后利用RK13细胞而测定病毒效价,作为基因重组痘苗病毒LC16m0 TK-SP-小鼠IL-7-F2A-小鼠CCL19-F2A-eGFP(TK-ICE:图15(a))或LC16m0 TK-SP-Luc-F2A-eGFP(TK-LE:图15(b))而供给于以下的实验。

[0206] 将A549细胞(1×10^5 细胞/孔)或CT26细胞(5×10^4 细胞/孔)接种于24孔板并且于37℃培养后,分别将TK-ICE或TK-LE以MOI=0.1感染A549细胞或以MOI=10感染CT26细胞($n=3$),自感染起24、48、72小时后利用荧光显微镜(奥林巴斯公司制)观察细胞(图16),回收了上清。将各自于24、48、72小时后回收的上清稀释100倍,利用DuoSet ELISA Mouse IL-7(R&D Systems公司制DY407)、DuoSet ELISA Mouse CCL-19(R&D Systems公司制DY440)以及DuoSet Ancillary Reagent Kit2(R&D Systems公司制DY008),测定上清0.5mL中的IL-7以及CCL19的分泌量。测定结果示于图17。

[0207] 如图16、17所示,关于感染24、48、72小时的A549细胞以及CT26细胞中的eGFP荧光表达,在TK-ICE与TK-LE中是同等程度,在A549细胞中感染48小时后基本上在全部的细胞中检测到,在CT26细胞中随着时间的经过而eGFP荧光的表达增加。另外,在A549细胞以及CT26细胞中,感染了TK-ICE的情况下感染24小时后检测到IL-7以及CCL19,在A549细胞中感染48小时后大致达到了平台期(plateau),在CT26细胞中随着时间的经过而升高。另一方面,感染了TK-LE的情况下,IL-7以及CCL19为检测限以下。根据上述结果,确认了TK-ICE破坏肿瘤细胞并且分泌IL-7、CCL19。

[0208] [实施例9]

[0209] <抗肿瘤效果>

[0210] 根据上述实施例8,确认了上述制作的基因重组痘苗病毒TK-ICE感染肿瘤细胞而破坏癌细胞,并且分泌IL-7以及CCL19。因此,调查了基因重组痘苗病毒TK-ICE的抗肿瘤效果。

[0211] 如图18所示,将小鼠大肠癌CT26细胞(5×10^5 细胞)移植于BALB/c小鼠的两腹部的皮下并使其生长。接着,从形成于两腹部的肿瘤之中选择较大的肿瘤,将各基因重组痘苗病毒($3-5 \times 10^7$ 空斑形成单位(PFU))合计3次(0、2、4天)施予所选择的肿瘤内,然后通过测定两腹部的肿瘤直径而研究了病毒的抗肿瘤效果。需要说明的是,第1次施予前的施予侧的肿瘤为 $43 \sim 102\text{mm}^3$,非施予侧的肿瘤为 $24 \sim 82\text{mm}^3$ 。将结果示于图19。

[0212] 根据图19的结果,在不表达IL-7和CCL19的TK-LE施予组($N=7$)中,与PBS施予组($N=8$)相比,对施予侧的肿瘤而言抑制了肿瘤的增殖,但是在非施予组中未发现对肿瘤的抑制效果。与其相对,在表达IL-7以及CCL19的TK-ICE施予组($N=4$)中,与PBS施予组($N=4$)相比,不仅在施予侧的肿瘤而且在非施予侧的肿瘤中也发现了肿瘤增殖的抑制。需要说明的是,虽未图示,但是通过施予底物(荧光素(luciferin)),确认由感染了TK-LE的肿瘤细胞表达的发光酶(荧光素酶)有无发光,从而非侵入性地对病毒进行检测,利用这一检测方法而确认到施予至一侧腹部的肿瘤的基因重组痘苗病毒未移动至另一侧腹部的肿瘤。因此,可认为通过利用TK-ICE破坏肿瘤细胞并且在肿瘤局部分泌IL-7以及CCL19,从而引起施予对象的肿瘤免疫并且增强内源性T细胞的记忆功能,由此不仅确认到施予侧的肿瘤消失而且确认到非施予侧的肿瘤增殖被抑制,抑制该恶性肿瘤的复发。

序列表

<110> 国立大学法人山口大学
国立大学法人鸟取大学

<120> 具有记忆功能的 T 细胞或 B 细胞的增强剂、恶性肿瘤复发抑制剂、以及对 T 细胞或 B 细胞诱导记忆功能的诱导剂

<130> FH29-024

<150> JP2017-196718

<151> 2017-10-10

<160> 15

<170> PatentIn 版本 3.1

<210> 1

<211> 177

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 人 IL-7 AA

[0001]

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 发明人: 玉田 耕治

发明人: 佐古田 幸美

发明人: 安达 圭志

发明人: 中村 贵史

<400> 1

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
50 55 60

Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys Asp Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe

Val Thr Gln Lys Pro Ile Pro Gly Tyr Ile Val Arg Asn Phe His Tyr
35 40 45

Leu Leu Ile Lys Asp Gly Cys Arg Val Pro Ala Val Val Phe Thr Thr
50 55 60

Leu Arg Gly Arg Gln Leu Cys Ala Pro Pro Asp Gln Pro Trp Val Glu
65 70 75 80

Arg Ile Ile Gln Arg Leu Gln Arg Thr Ser Ala Lys Met Lys Arg Arg
85 90 95

Ser Ser

<210> 3
<211> 128
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> VH07_aa

<400> 3

[0003]

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>	4		
<211>	15		
<212>	PRT		
<213>	人工		
<220>			
<223>	接头 15_aa		
<400>	4		
	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser		
	1	5	10 15
<210>	5		
<211>	116		
<212>	PRT		
<213>	人工		
[0004]	<220>		
	<223> VL07_aa		
<400>	5		
	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>	6		
<211>	283		
<212>	PRT		
<213>	人工		
<220>			
<223>	hCD8-hCD28-h4-1BB-hCD3		
<400>	6		
	Phe Val Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro		
	1	5	10 15
[0005]	Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu		
	20	25	30
	Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg		
	35	40	45
	Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly		
	50	55	60
	Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn		
	65	70	75 80
	His Arg Asn Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met		
	85	90	95
	Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro		
	100	105	110
	Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Phe Ser Val		
	115	120	125

	Val	Lys	Arg	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile	Phe	Lys	Gln	Pro	Phe	
	130					135						140					
	Met	Arg	Pro	Val	Gln	Thr	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp	Gly	Cys	Ser	Cys	Arg	
	145				150						155					160	
	Phe	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	Cys	Glu	Leu	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	
				165						170					175		
	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	
			180						185						190		
	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	
		195					200						205				
	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	
	210						215					220					
[0006]	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu	
	225				230						235					240	
	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	
				245						250					255		
	His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	
			260						265					270			
	Asp	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg						
		275						280									
	<210>	7															
	<211>	25															
	<212>	PRT															
	<213>	人工															
	<220>																
	<223>	F2A_aa															
	<400>	7															
	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	
<210> 8			
<211> 19			
<212> PRT			
<213> 人工			
<220>			
<223> 信号肽_aa			
<400> 8			
Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly			
1	5	10	15
Ala His Ser			

[0007] <210> 9

<211> 1665

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 小鼠 I1-7-F2A-小鼠 CCL19-F2A-eGFP

<400> 9

atgttcacg tctccttcag atacatcttc ggcatccccc cctgatcct ggtcctcctg	60
cctgtcacct ccagcgaatg tcataatcaag gacaaagagg gcaaggctta tgagagcgtc	120
ctgatgatct ccattgatga gctggataag atgaccggca ccgacagcaa ctgtcccaac	180
aatgagccca acttcttttag aaagcacgtg tgtgacgata ccaaggaggc tgccttcctg	240
aacagggccg ccagaaagct gaagcagttc ctgaagatga acatttccga ggagttcaac	300
gtgcacctcc tcaccgtgag ccagggcacc cagacactgg tcaattgcac ctccaaggag	360
gagaagaacg tgaaagagca gaaaaagaat gatgcttggt tcctcaagag gctgctgagg	420
gagatcaaga cctgttgga taagatcctg aaaggcagca tcggcagcgg agtcaagcaa	480
accctgaact tcgacctgct gaaactggcc ggagatgtgg agagcaatcc cggccctatg	540

	gccccagag tcacctctt gctggccttc agcctgctcg tgctgtggac cttccccgt	600
	cccaccctgg gcggcgccaa tgatgtgag gactgttgcc tctccgtgac ccagaggccc	660
	atccctggaa acatcgtcaa agccttcagg tacctgctca acgaagacgg atgtagggtg	720
	cctgccgtgg tgttcacaac actgagaggc taccagctct gcgccccctcc tgatcagccc	780
	tgggtcgaca gaatcatcag aaggctgaag aagtccagcg ccaagaacaa aggcaatagc	840
	acaaggagaa gccctgtgag cgaattcgga agcggagtga aacagacttt gaattttgac	900
	cttctcaagt tggcgggaga cgtggagtcc aacctggac catgcatggt gagcaagggc	960
	gaggagctgt tcaccggggt ggtgcccata ctggtcgagc tggacggcga cgtaaacggc	1020
	cacaagttca gcgtgtccgg cgaggcgag ggcgatgcca cctacggcaa gctgacctg	1080
	aagttcatct gcaccaccgg caagctgccc gtgccctggc ccacctcgt gaccacctg	1140
	acctacggcg tgcagtgcct cagccgctac cccgaccaca tgaagcagca cgacttcttc	1200
	aagtccgcca tgcccgaagg ctacgtccag gagcgcacca tcttcttcaa ggacgacggc	1260
	aactacaaga cccgcgccga ggtgaagtgc gagggcgaca ccctggtgaa ccgcatcgag	1320
[0008]	ctgaagggca tcgacttcaa ggaggacggc aacatcctgg ggcacaagct ggagtacaac	1380
	tacaacagcc acaacgtcta tatcatggcc gacaagcaga agaacggcat caagtgaa	1440
	ttcaagatcc gccacaacat cgaggacggc agcgtgcagc tcgccgacca ctaccagcag	1500
	aacaccccca tcggcgacgg ccccgctgtg ctgcccgaca accactacct gagcaccag	1560
	tccgccctga gcaaagaccc caacgagaag cgcgatcaca tggctctgct ggagttcgtg	1620
	accgccgccg ggateactct cggcatggac gagctgtaca agtaa	1665
	<210> 10	
	<211> 37	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 10	
	atggccggac cggccaccgg tcgccaccat gagcgag	37
	<210> 11	

	<211> 41	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 11	
	tcgaattcgc tagcgccgc ttaattaagc ttgtgcccc g	41
	<210> 12	
	<211> 33	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 12	
	gctccggacg ccaccatgga agatgccaaa aac	33
	<210> 13	
	<211> 31	
[0009]	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 13	
	gcgaattcca cgcgatctt gccgcccttc t	31
	<210> 14	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 14	
	atttctccgt gataggtatc gatg	24
	<210> 15	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工	

	<220>	
	<223>	引物
[0010]	<400>	15
	aacggtttac gttgaaatgt cc	22

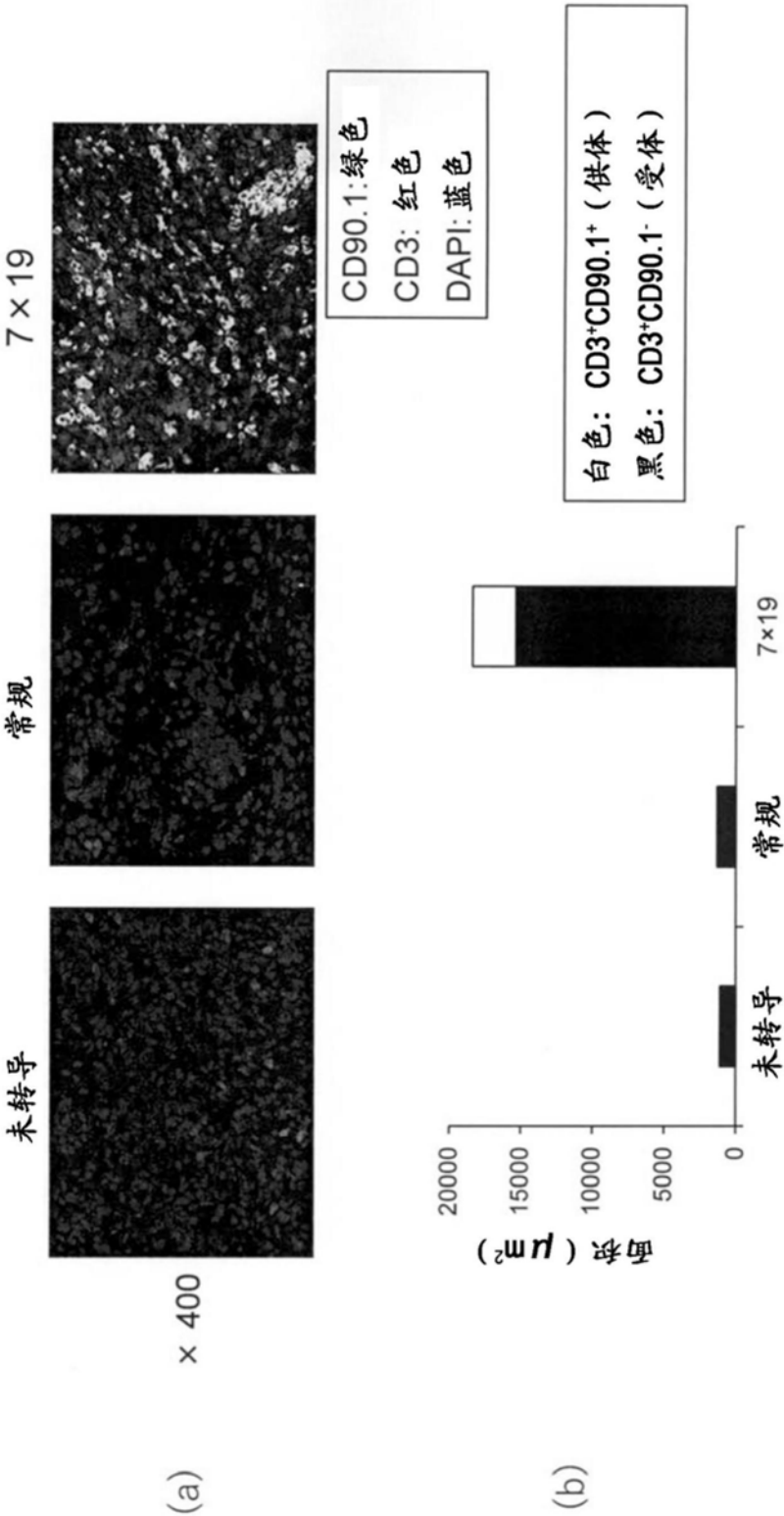
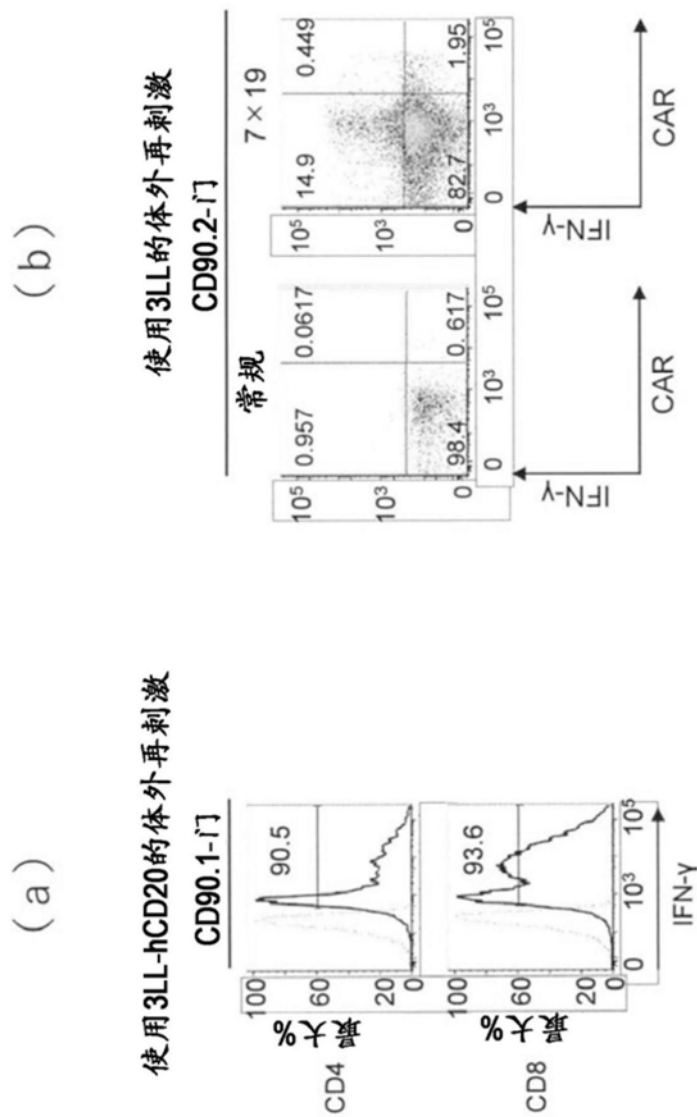


图1



Conv.: 使用常规的CAR-T细胞进行了处理的小鼠。
7 $\times$ 19: 使用7 $\times$ 19 CAR-T细胞进行了处理的小鼠。
示出来自两个独立实验的一份代表性数据。

图4

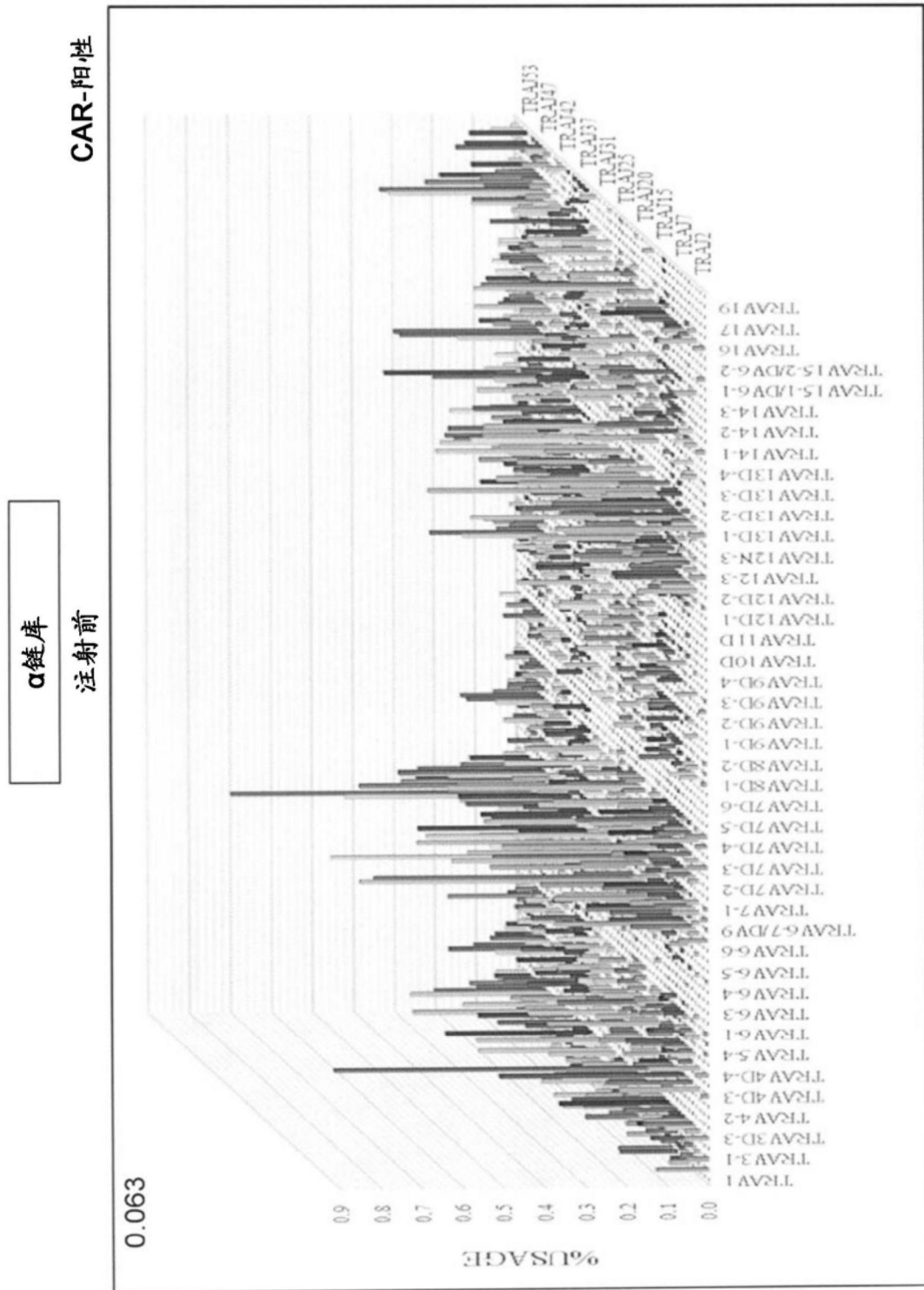


图5A

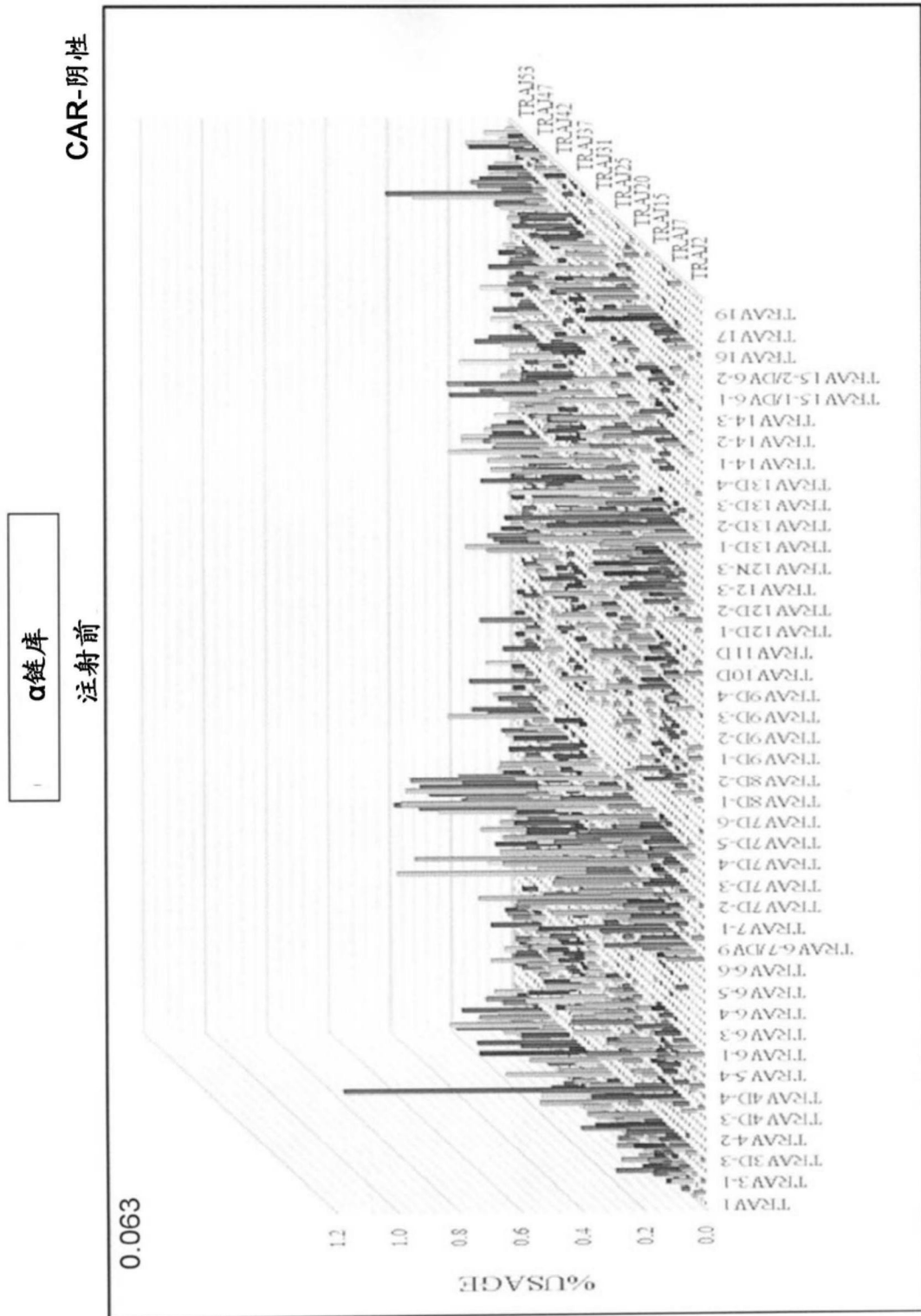


图5B

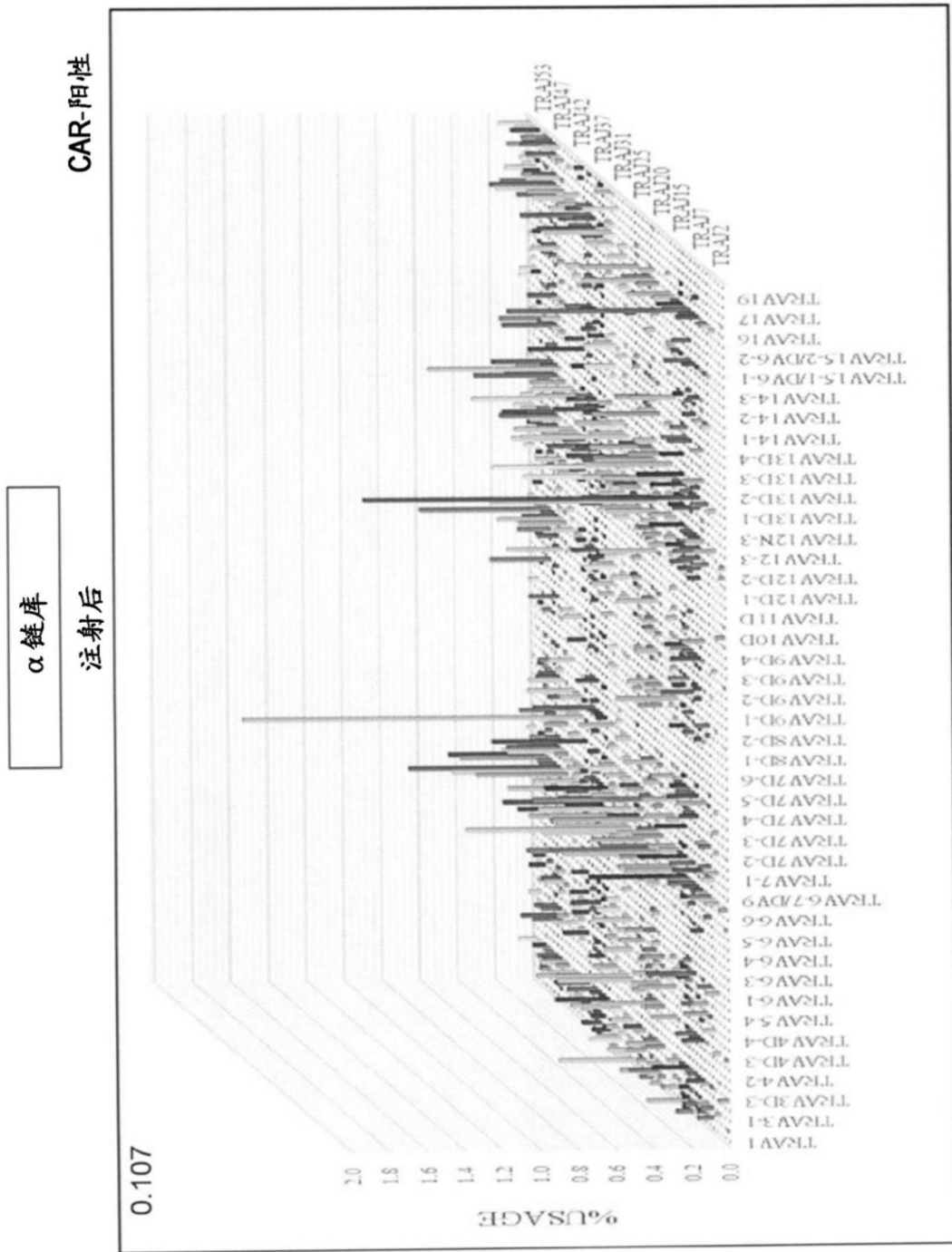


图5C

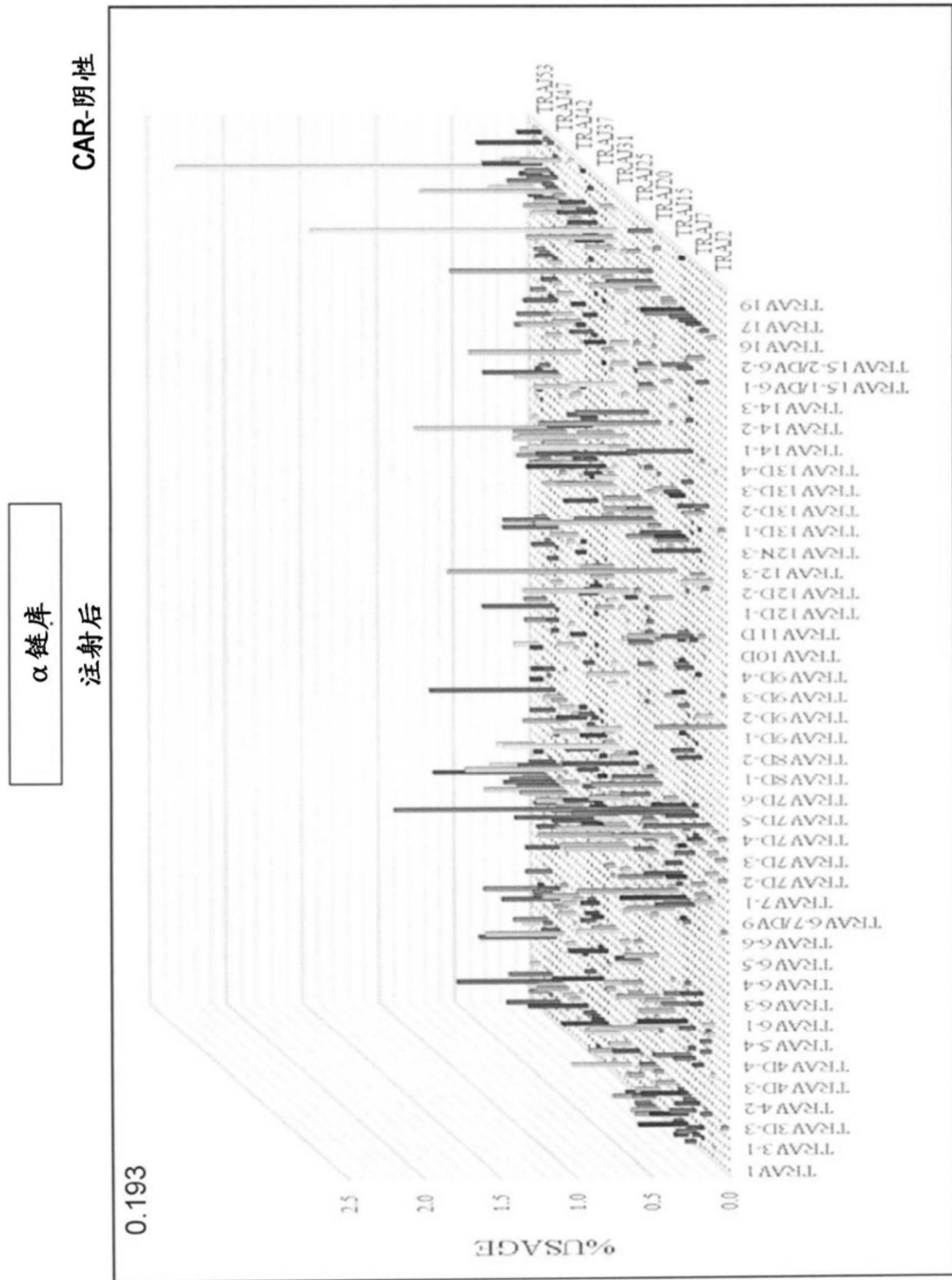


图5D

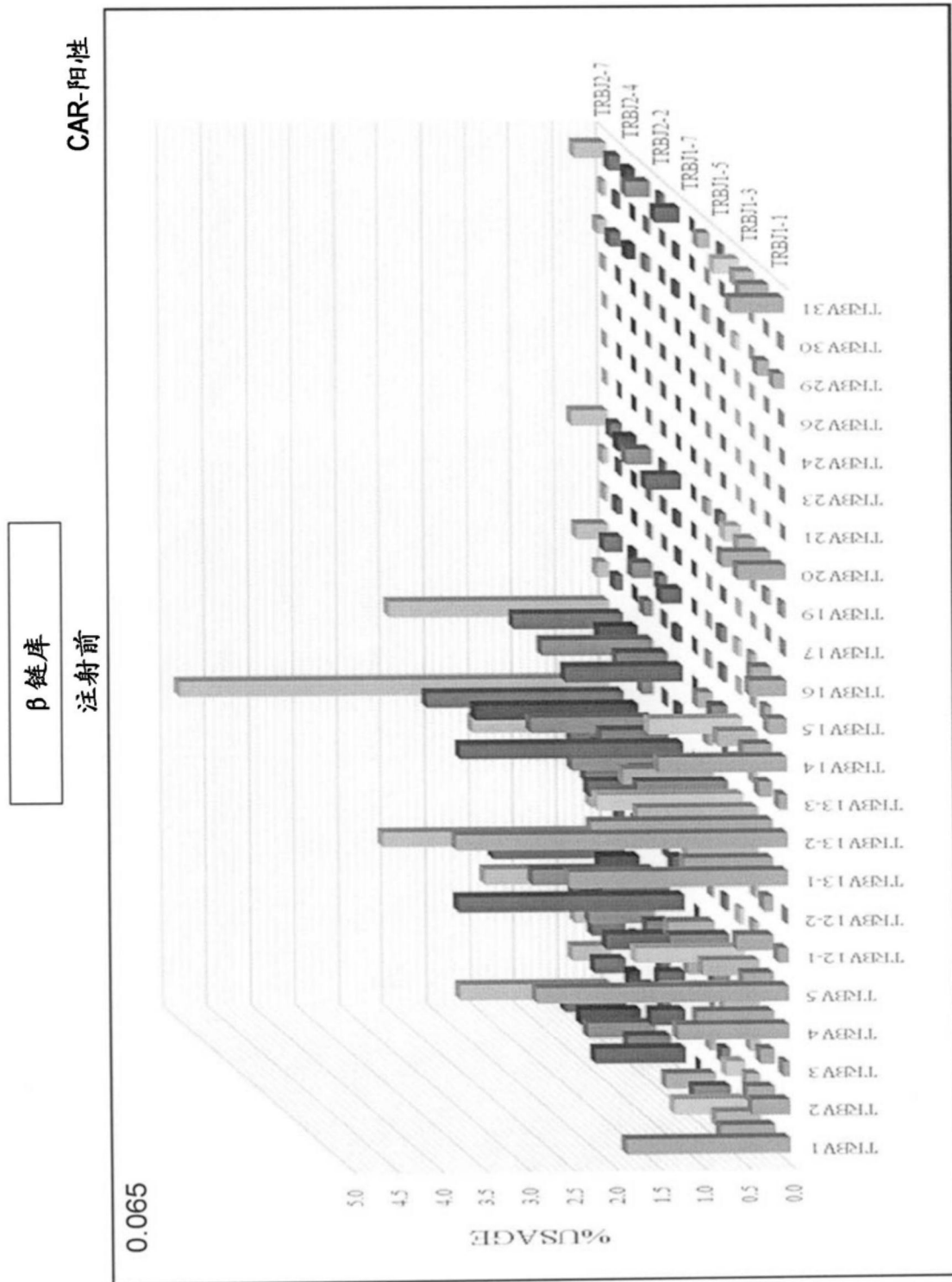


图6A

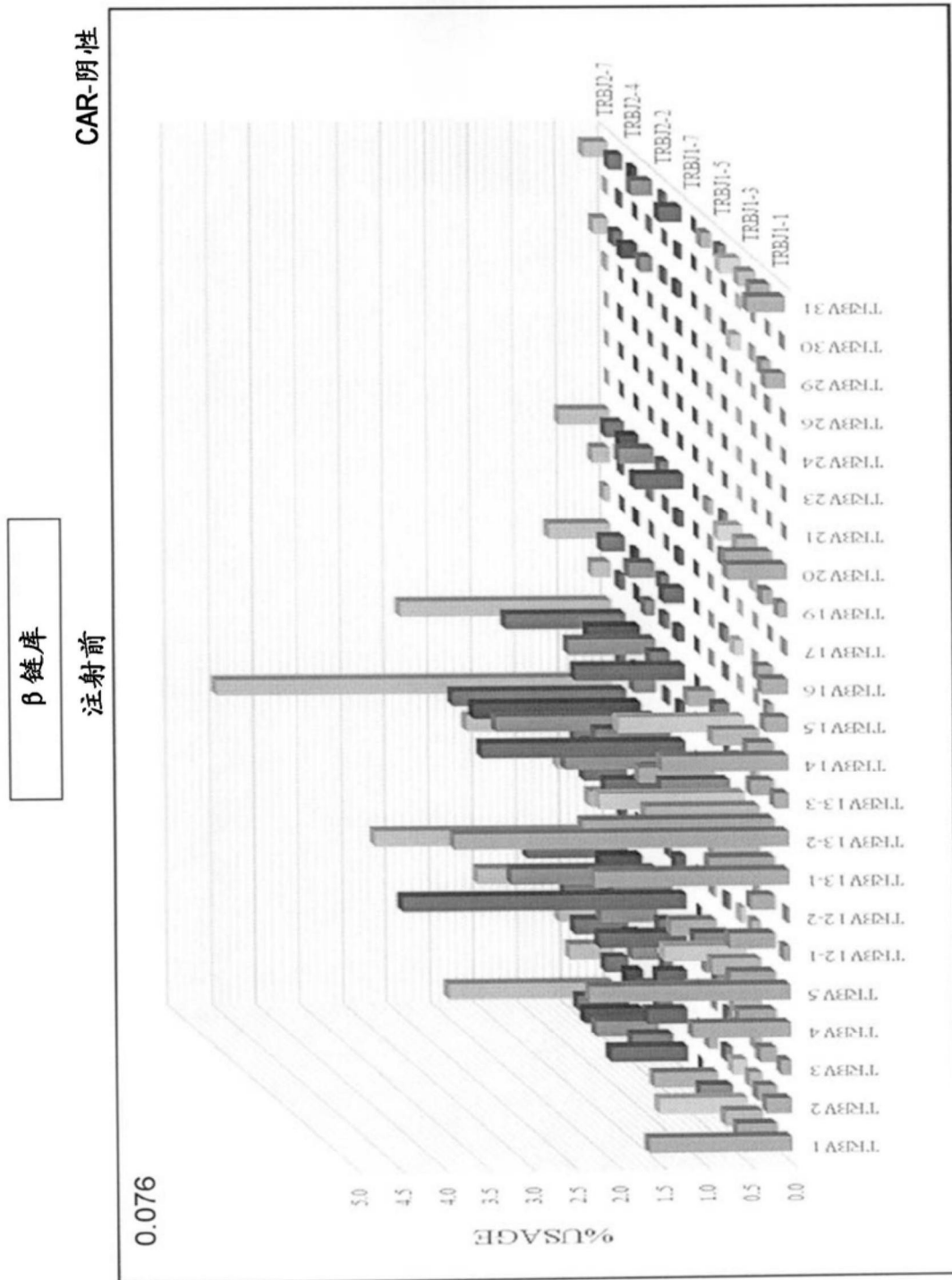


图6B

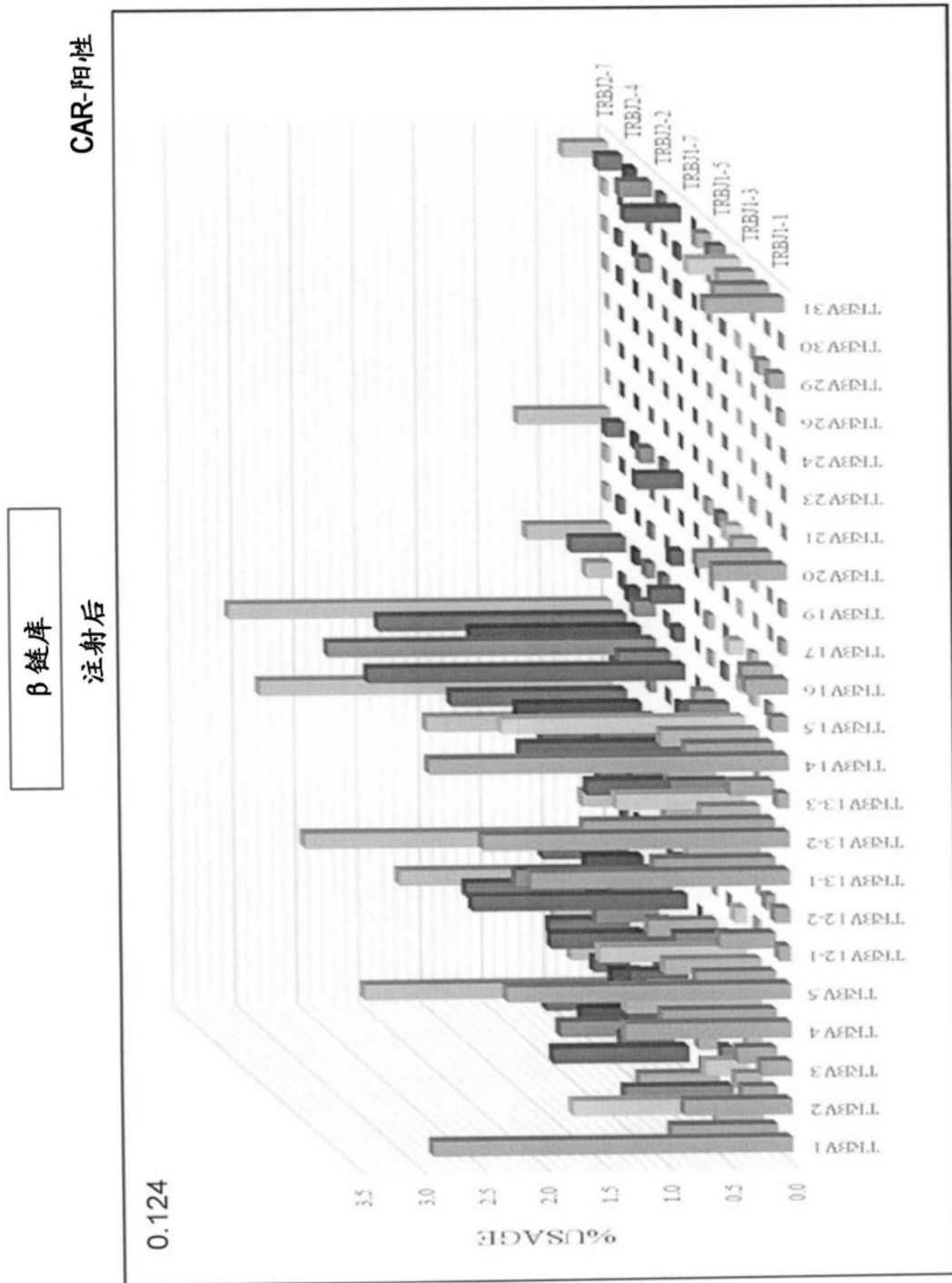


图6C

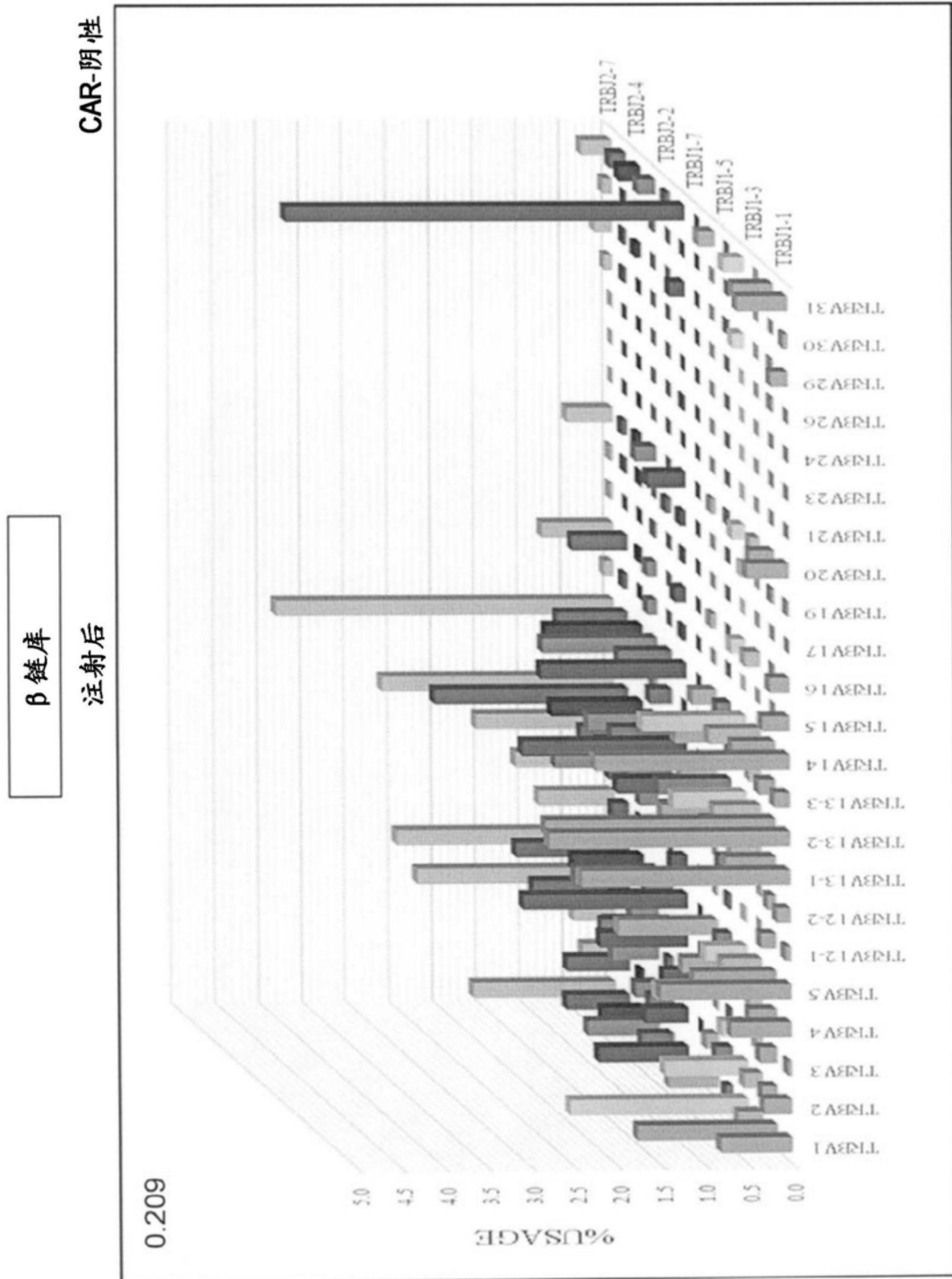


图6D

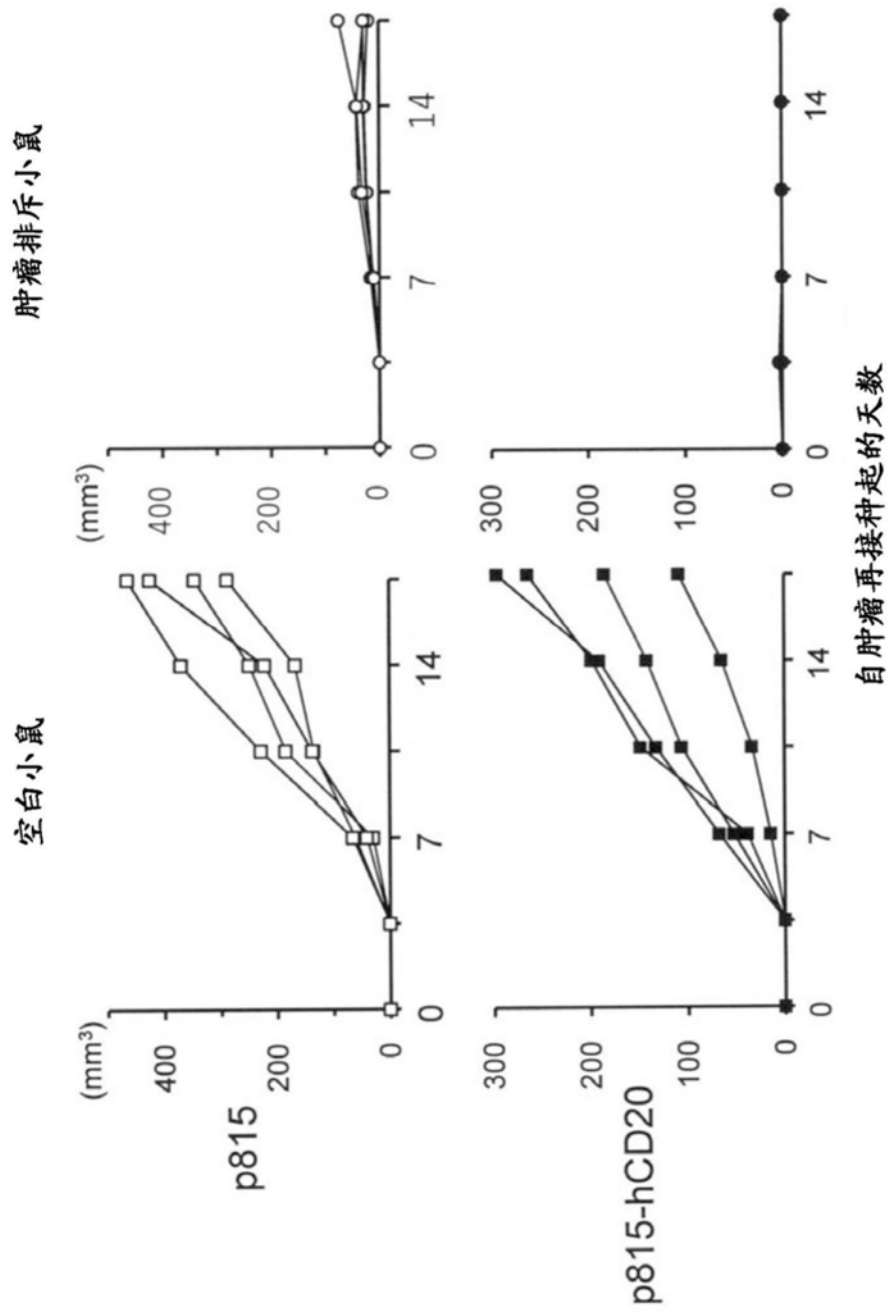


图7A

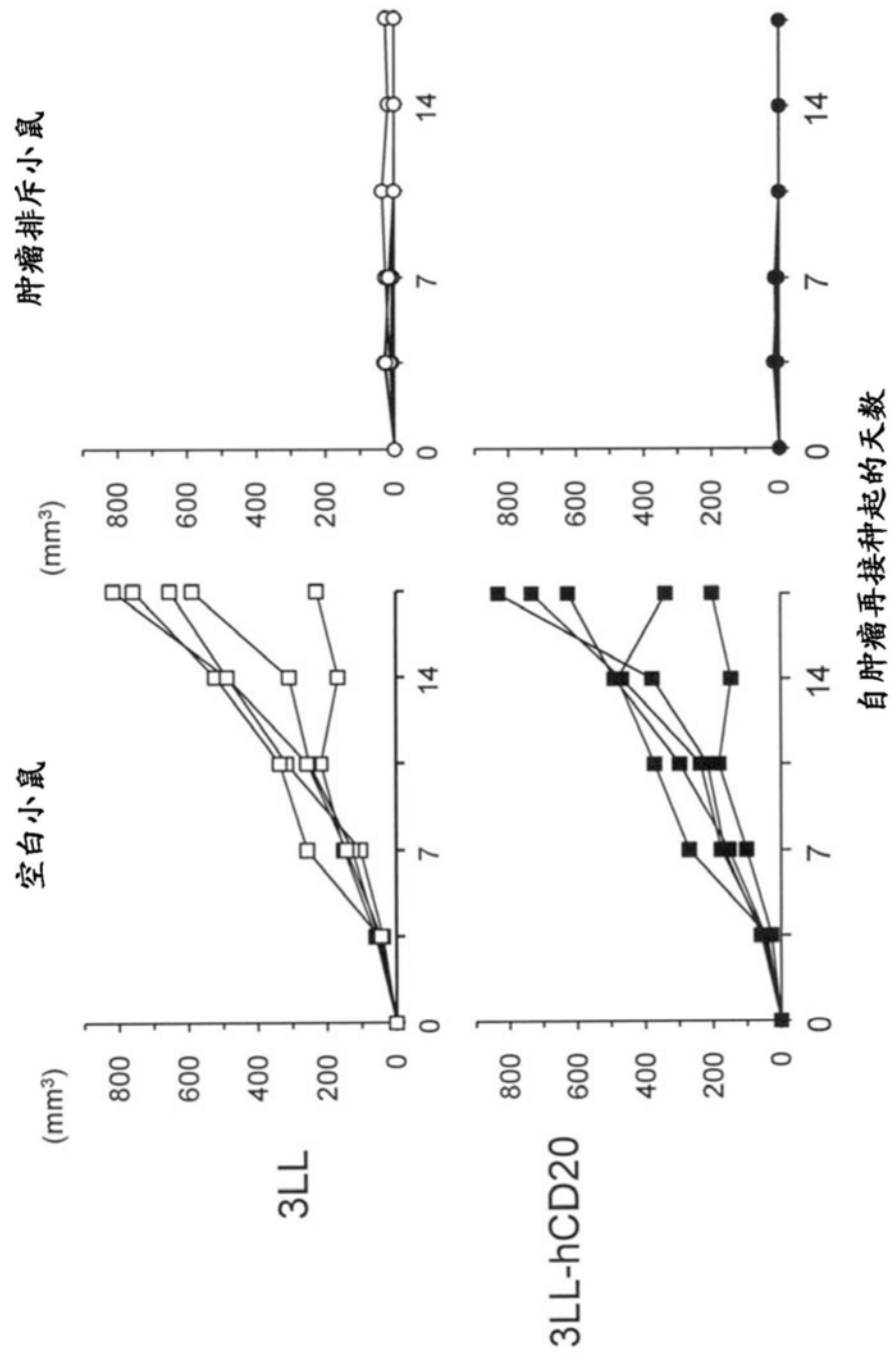


图7B

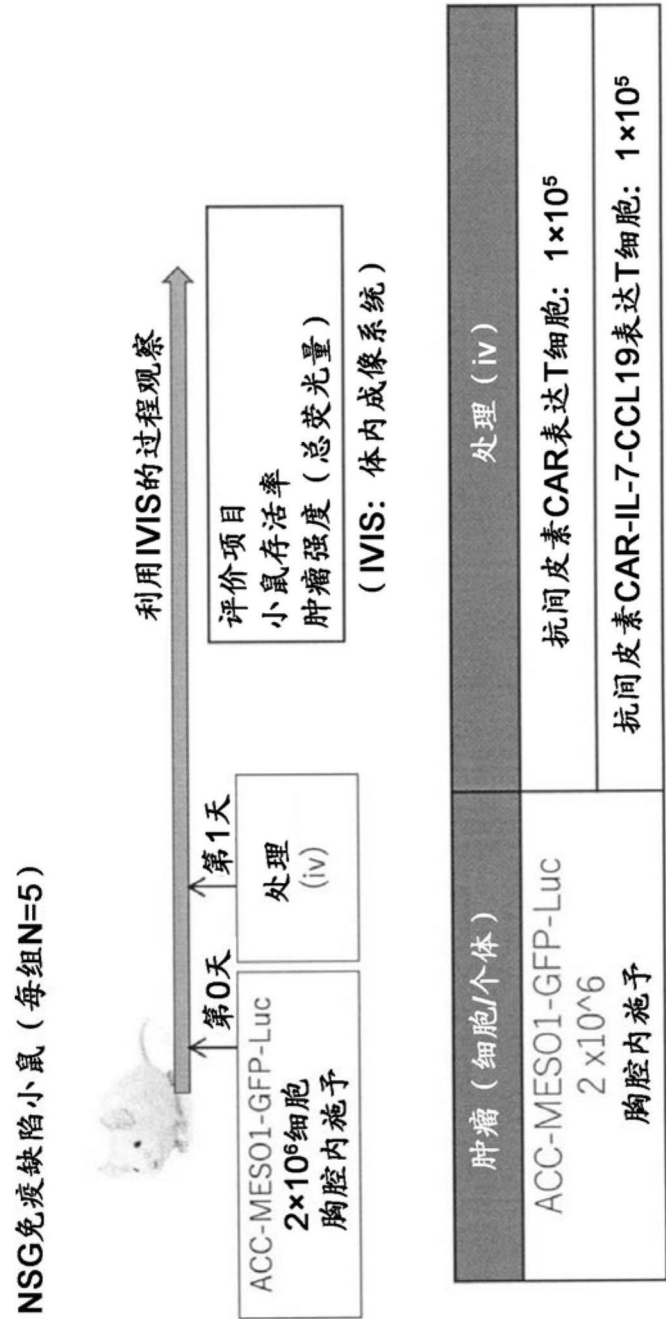


图8

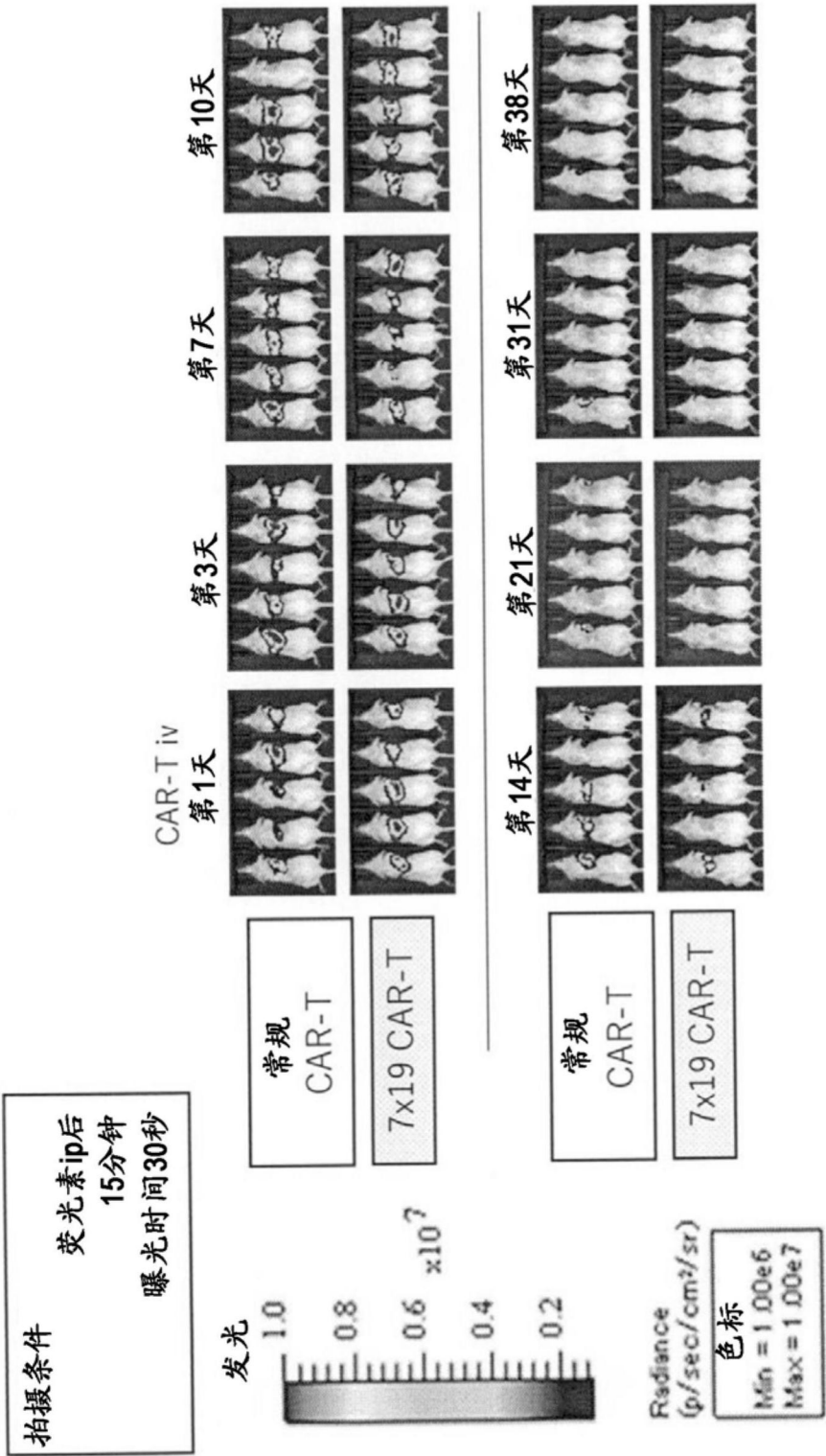


图9A

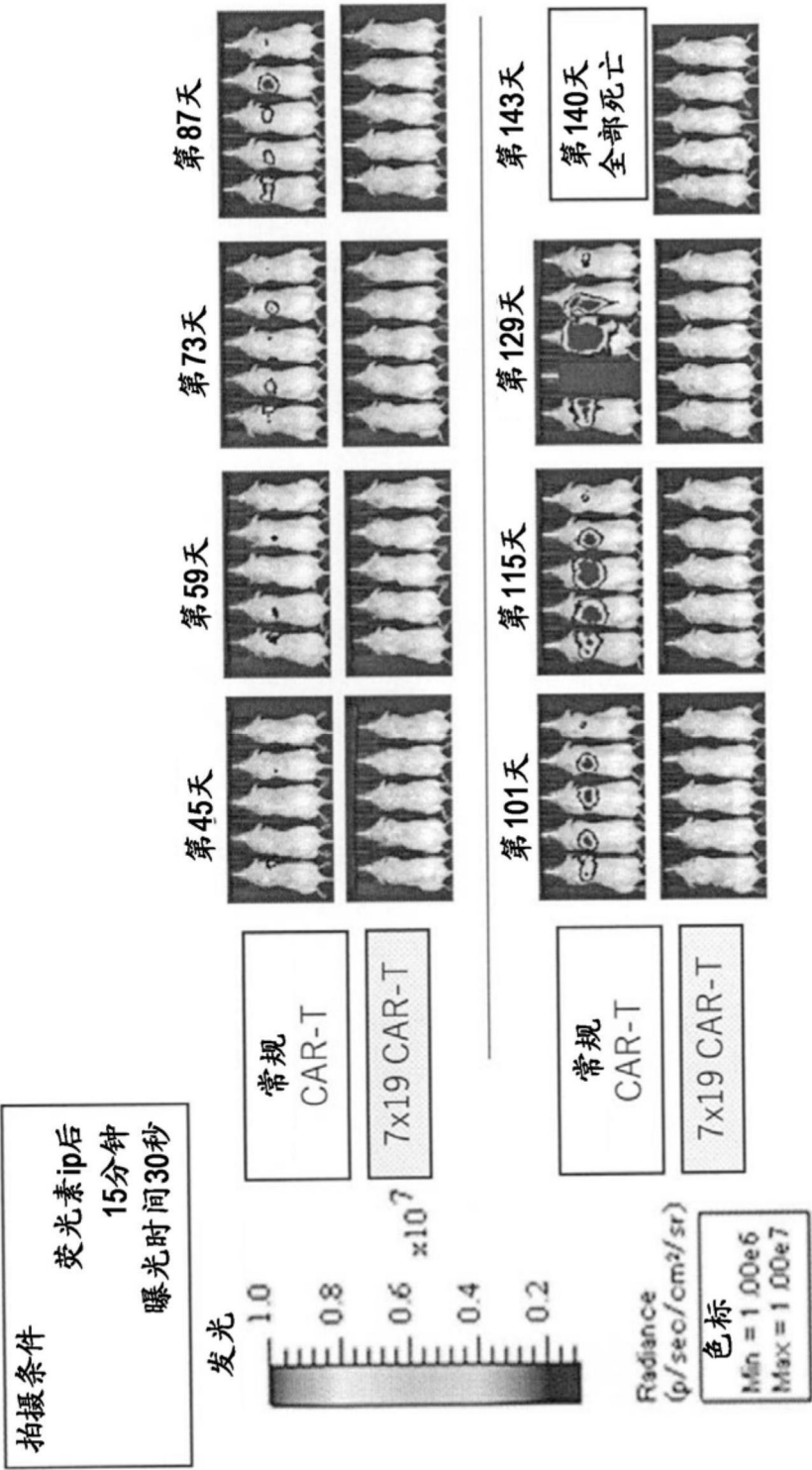


图9B

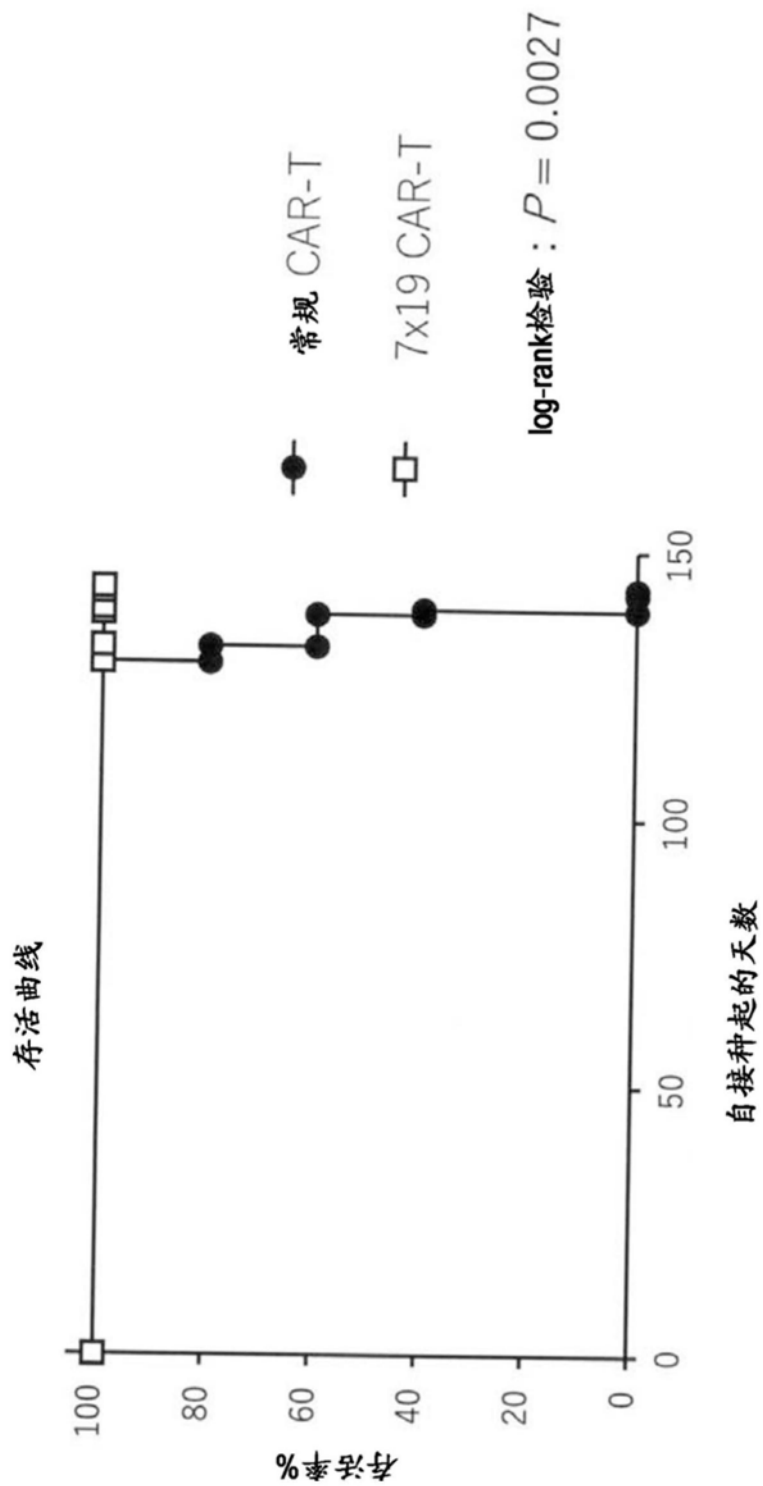


图10

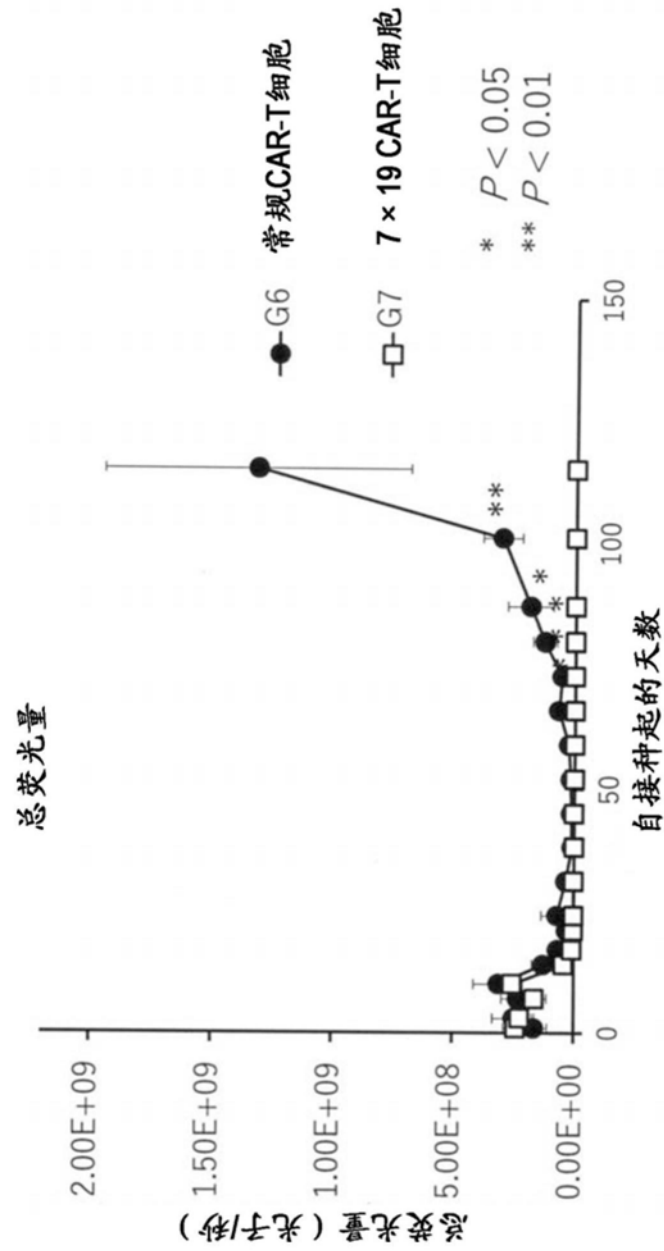


图11

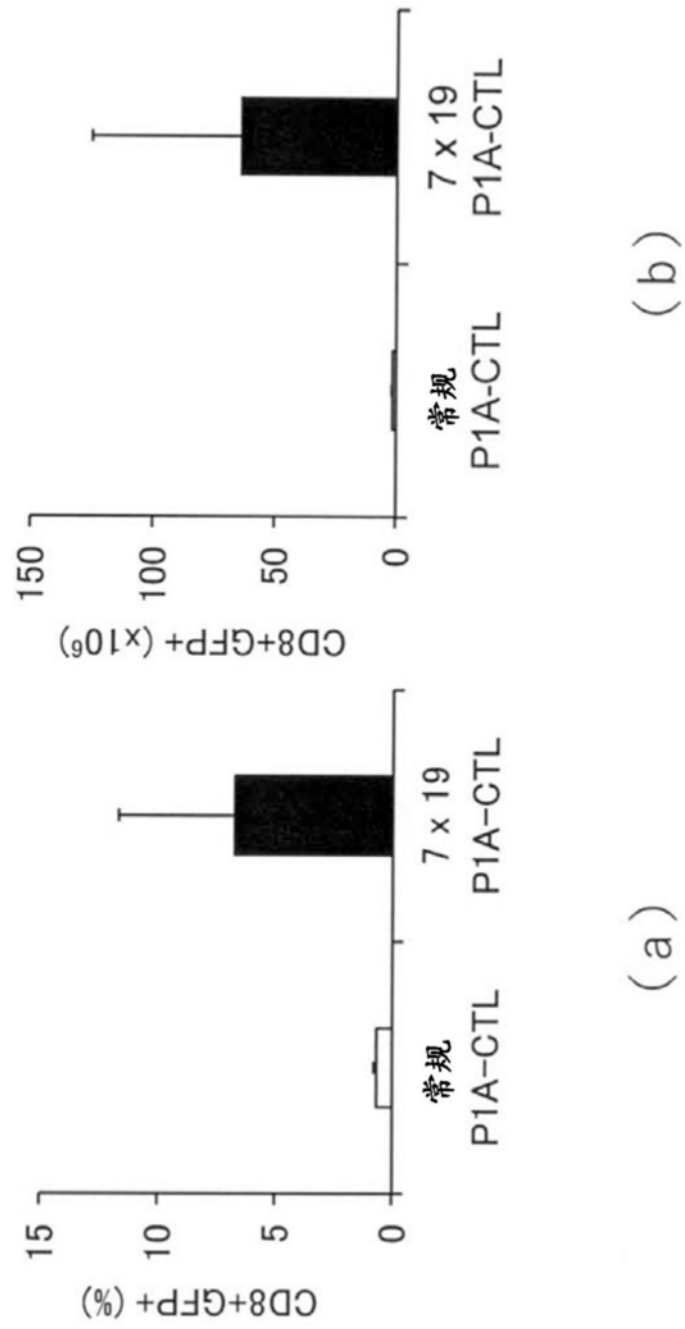


图12

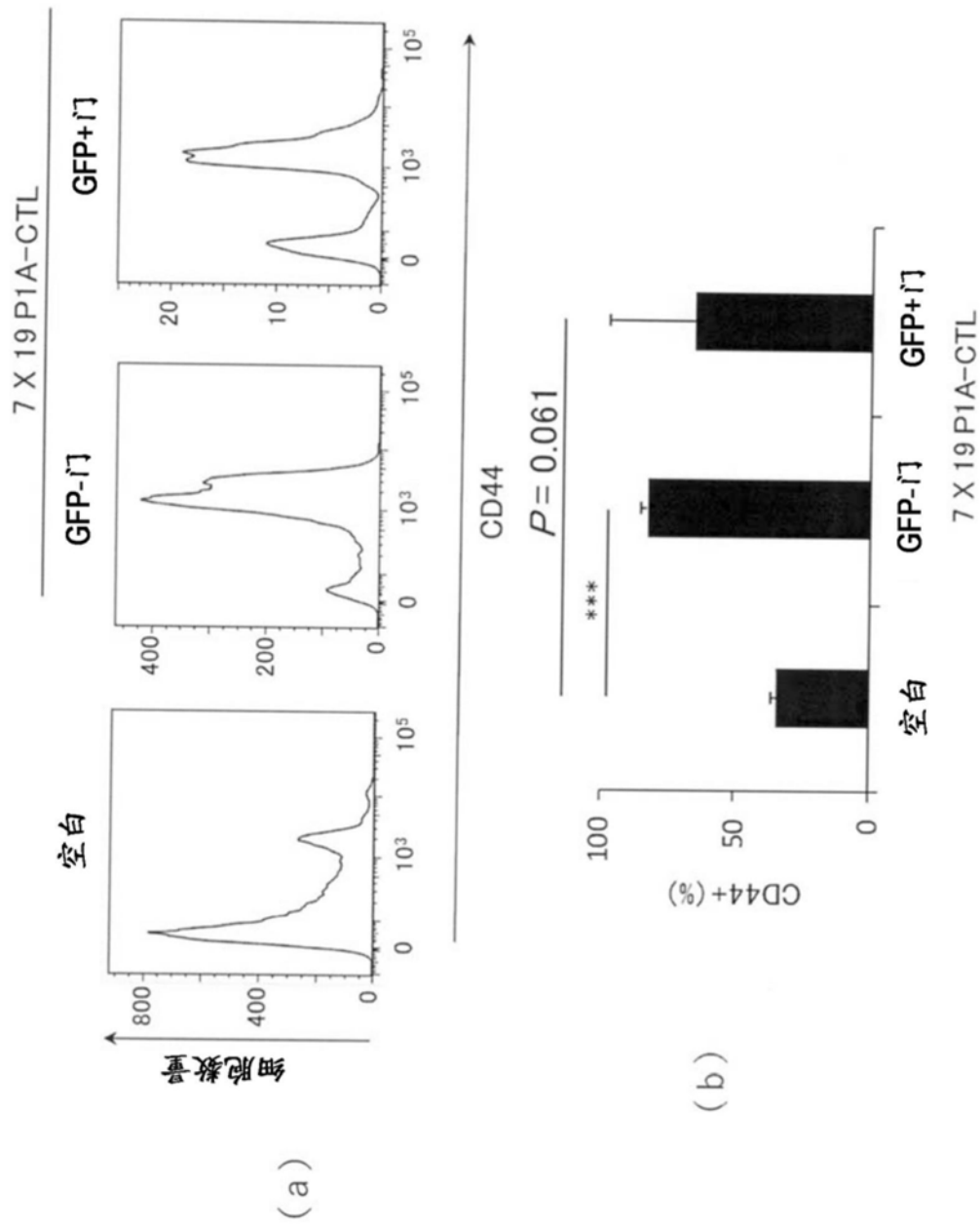


图13

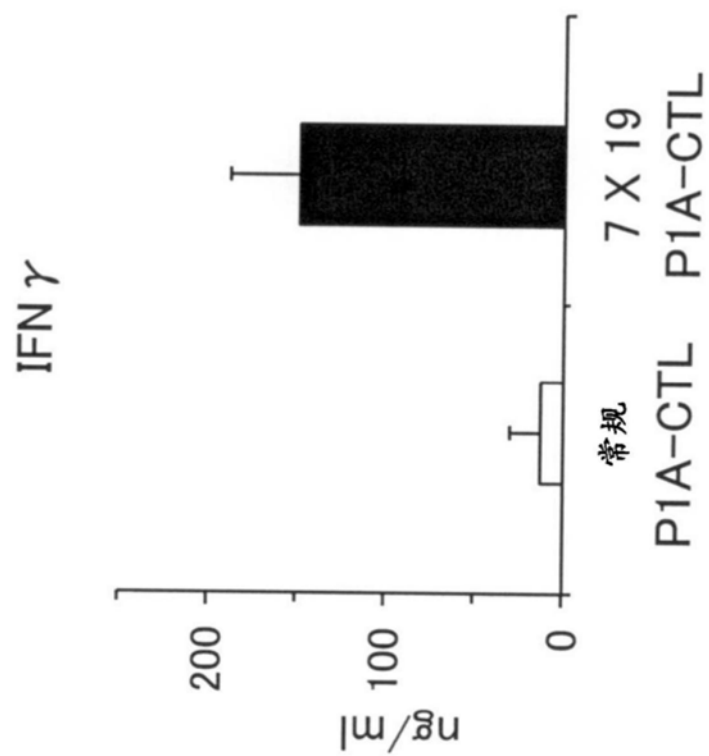


图14

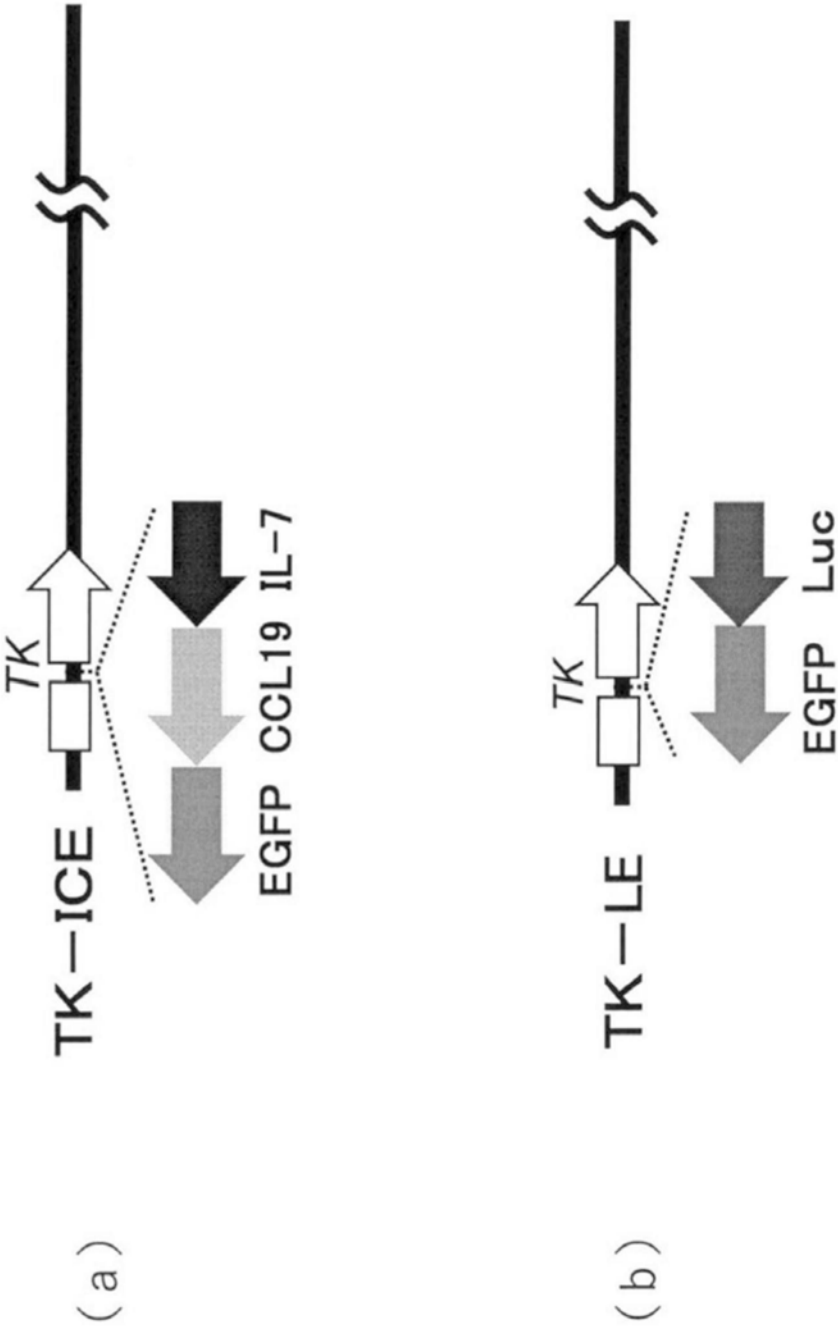


图15

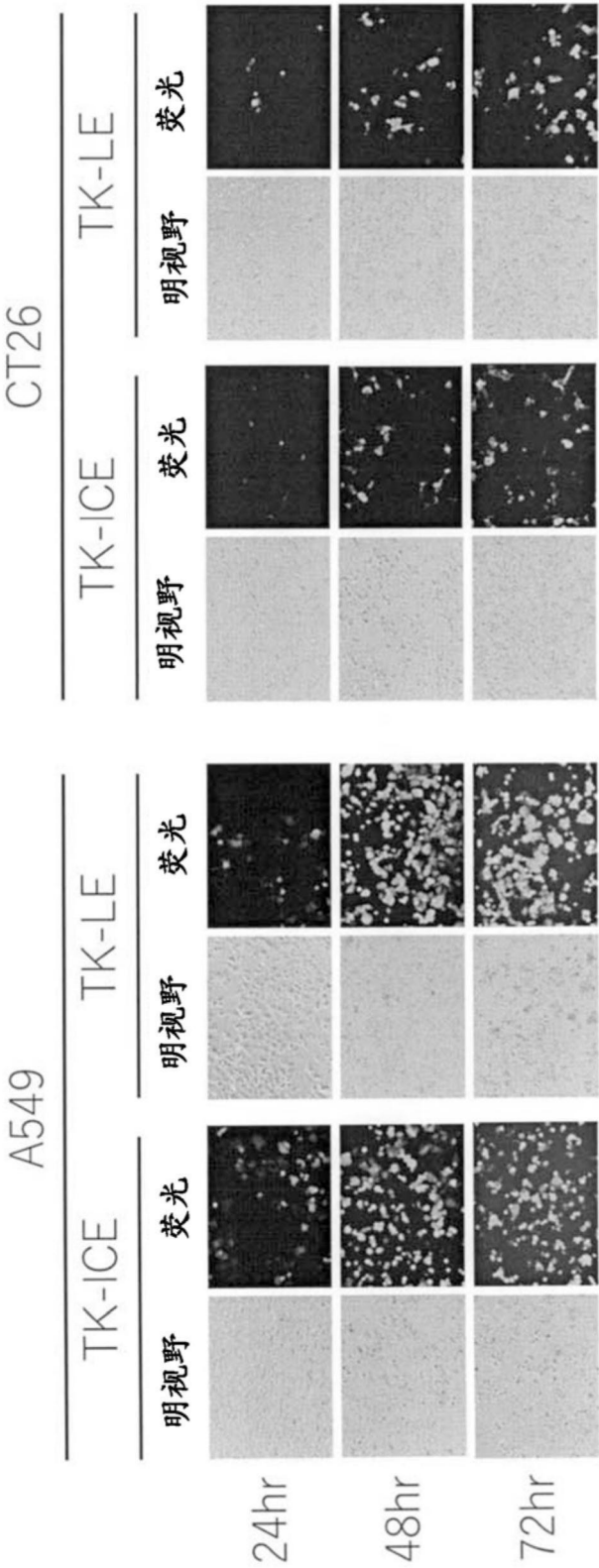


图16

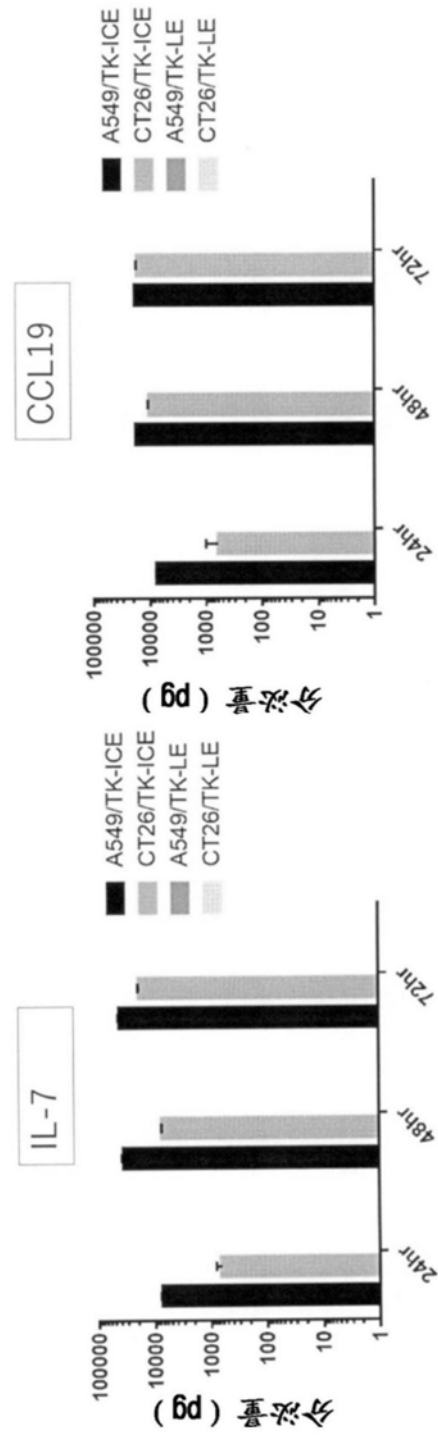


图17

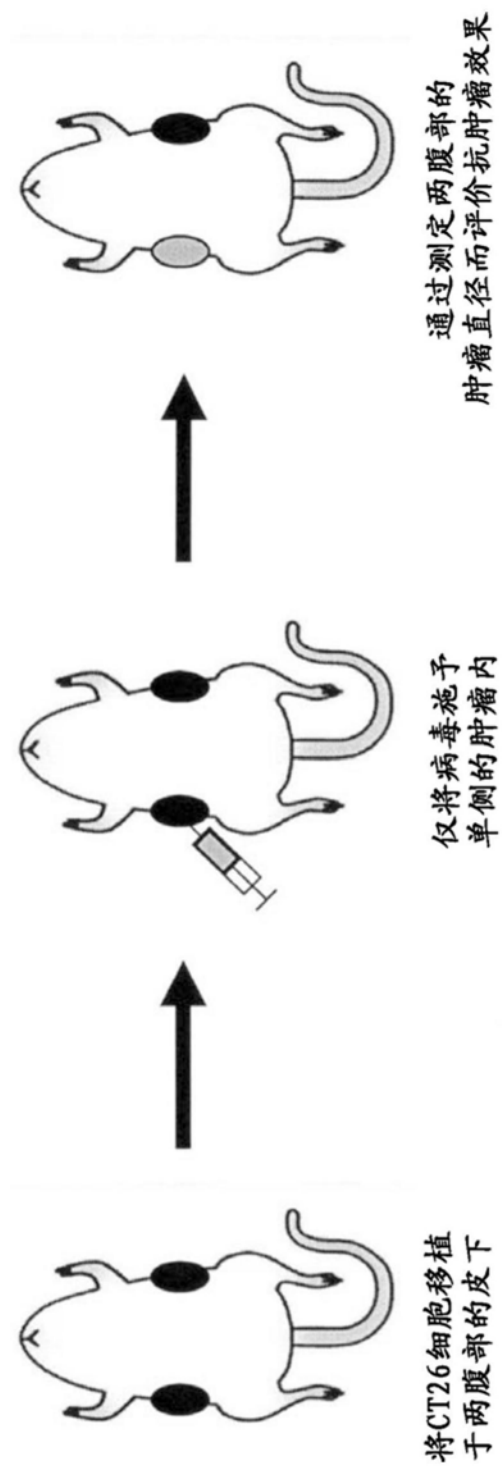


图18

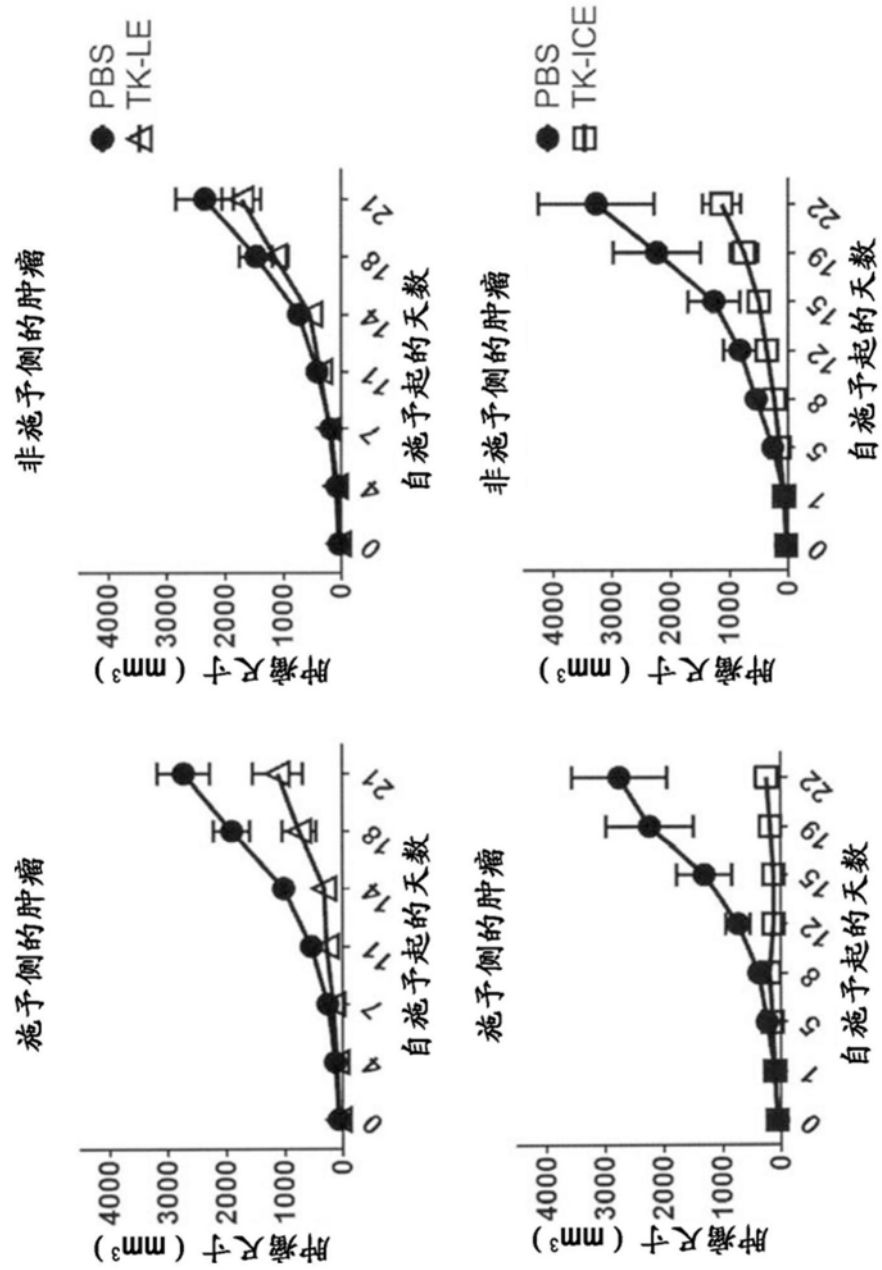


图19