(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119744302 A
(43)申请公布日 2025.04.01

(21)申请号 202380056553.6
(22)申请日 2023.07.14
(30)优先权数据
2022-118674 2022.07.26 JP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2025.01.24
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2023/026123 2023.07.14
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2024/024551 JA 2024.02.01
(71)申请人 国立大学法人京都大学
地址 日本京都府京都市
(72)发明人 金子新 南川淳隆
(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
专利代理师 罗文锋 杨思捷
(51)Int.Cl.
C12N 15/62(2006.01)
A61K 35/15(2006.01)
A61K 35/17(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
C12N 5/0783(2006.01)
C12N 5/10(2006.01)
C12N 15/12(2006.01)
C12N 15/13(2006.01)

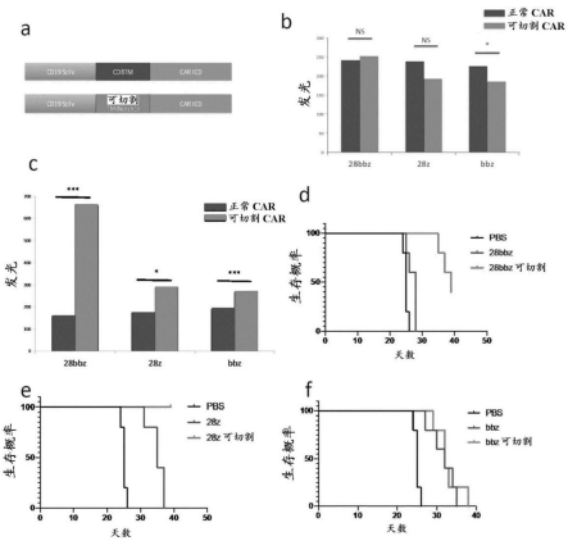
权利要求书1页 说明书23页
序列表（电子公布） 附图8页

(54)发明名称

具有脱落结构的人工受体

(57)摘要

本发明提供包含配体结合位点、具有脱落结构的跨膜结构域和向免疫细胞内的信号转导结构域的人工受体以及编码该人工受体的核酸。



CN 119744302 A

1.人工受体,其包含配体结合位点、具有脱落结构的跨膜结构域和向免疫细胞内的信号转导结构域。

2.根据权利要求1所述的人工受体,其选自嵌合抗原受体、修饰T细胞受体、修饰Fc受体和修饰酪氨酸激酶受体。

3.根据权利要求1或2所述的人工受体,其中所述免疫细胞选自T细胞、自然杀伤细胞和巨噬细胞。

4.根据权利要求3所述的人工受体,其中所述T细胞为细胞毒性T细胞。

5.根据权利要求1～4中任一项所述的人工受体,其中所述脱落结构来自于选自notch蛋白、淀粉样前体蛋白和CD28的蛋白质。

6.根据权利要求1～5中任一项所述的人工受体,其中所述向免疫细胞内的信号转导结构域包含来自于选自CD3ζ链、CD28和4-1BB的至少1种的信号转导结构域。

7.根据权利要求1～6中任一项所述的人工受体,其中具有脱落结构的跨膜结构域包含:

(1)以序列号26表示的氨基酸序列,或

(2)在(1)的氨基酸序列中置换、缺失、插入和/或加成1个或数个氨基酸而成的氨基酸序列。

8.根据权利要求1～7中任一项所述的人工受体,其中在跨膜结构域中不具有γ分泌酶的切割位点。

9.根据权利要求1～8中任一项所述的人工受体,其具有2个以上的相同的信号转导结构域。

10.核酸,其编码根据权利要求1～9中任一项所述的人工受体。

11.免疫细胞,其具有根据权利要求1～9中任一项所述的人工受体或根据权利要求10所述的核酸。

12.药物,其包含根据权利要求11所述的免疫细胞。

13.胞啃作用受调节的受体或编码该受体的核酸的设计方法,其包括:

(1)选择包含配体结合位点、跨膜结构域和向免疫细胞内的信号转导结构域的受体的工序,以及

(2A)调节工序(1)中选择的跨膜结构域对脱落的敏感性的工序,和/或

(2B)使工序(1)中准备的受体的信号转导结构域中加成、插入和/或缺失1个以上的氨基酸残基,和/或用1个以上的氨基酸残基进行置换的工序。

14.胞啃作用受调节的受体或编码该受体的核酸的制造方法,其包括:

(1)准备包含配体结合位点、跨膜结构域和向免疫细胞内的信号转导结构域的受体的工序,以及

(2A)调节工序(1)中准备的跨膜结构域对脱落的敏感性的工序,和/或

(2B)使工序(1)中准备的受体的信号转导结构域中加成、插入和/或缺失1个以上的氨基酸残基,和/或用1个以上的氨基酸残基进行置换的工序。

15.根据权利要求13或14所述的方法,其中所述工序(1)中选择或准备的受体选自嵌合抗原受体、T细胞受体、Fc受体和酪氨酸激酶受体。

具有脱落结构的人工受体

技术领域

[0001] 本发明涉及具有脱落结构的人工受体。更详细地说,涉及包含配体结合位点、具有脱落结构的跨膜结构域和向免疫细胞内的信号转导结构域的人工受体。另外,也涉及胞啃(Trogocytosis)作用受调节的受体或编码该受体的核酸的设计方法。

背景技术

[0002] 若连续输入强刺激,则灵敏度下降的现象广为人知。这种受体的连续信号所致的灵敏度降低被认为是具有生物学意义的,已知脱落作为可预想到防止灵敏度降低的机制之一。脱落是受体的胞外结构域被金属蛋白酶切割的机制。即使仅进行了研究,也已知在半数以上的酪氨酸激酶受体中引起脱落(非专利文献1)。认为在受体与配体反应,引起胞内结构域的磷酸化后,可能通过脱落暂时使反应复位,信号受到调节,但对于脱落以怎样的机制进行信号调节,尚不清楚详细情况。

[0003] 用于癌症免疫疗法的、T细胞识别靶标的T细胞受体(T cell receptor;TCR)也是酪氨酸激酶受体的一种。TCR作为信号控制之一,已知若给予刺激,则TCR-CD3复合体的细胞表面表达量降低。另外,近年来,在免疫细胞疗法中被认为具有划时代的治疗效果的人工嵌合受体(Chimeric antigen receptor;CAR)是通过将抗体与CD3胞内结构域、CD28、4-1BB等辅助受体结合来识别抗原并向T细胞转导TCR信号的结构,但CD3、共刺激分子均为酪氨酸激酶型受体。

[0004] 已知若继续CAR细胞疗法,则治疗效果减弱。已知胞啃作为与这样的CAR细胞疗法的效果减弱或治疗后的复发相关的机制之一(非专利文献2)。胞啃是这样的机制,即,若靶细胞与表达CAR的T细胞反应,则在反应位点以啃咬细胞膜的形式引起膜交换,T细胞夺取靶抗原。因此,在CAR细胞疗法中,癌细胞的抗原表达降低,引起免疫逃避,成为复发的原因。另外,还报道了由于夺取了癌抗原的T细胞在自身的细胞膜上表达所夺取的癌抗原,因此通过成为其它CAR-T细胞的靶标而引起免疫反应的抑制。已知胞啃是作为由免疫反应引起的膜交换现象而被发现的,是保存于阿米巴细胞等原生生物中的生理现象。然而,尚不清楚膜交换的详细机制,并且还不知道抑制CAR-T细胞疗法中的胞啃以解决问题的手段。

[0005] 现有技术文献

[0006] 非专利文献

[0007] 非专利文献1:Merilahti JAM和Elenius K,Oncogene 38(2):151-163(2019),

[0008] 非专利文献2:Hamieh M等人,Nature.568(7750):112-116(2019)。

发明内容

[0009] 发明所要解决的课题

[0010] 因此,本发明的课题在于提供用于建立针对癌症等疾病的不易引起复发且容易维持治疗效果的免疫疗法的抑制细胞间胞啃的方法。

[0011] 解决课题的手段

[0012] 本发明人为了解决上述课题,着眼于CAR的信号控制。首先,对于通过将CAR的跨膜结构域变更为受到脱落的结构(也称为“脱落结构”),使CAR的结构更接近生理上的酪氨酸激酶受体,而关于对免疫细胞疗法产生何种影响进行了验证。具有脱落结构的CAR由于脱落而缺失识别在癌细胞表面上呈递的抗原的位点,认为癌细胞的识别能力降低。实际上,在使CAR表达细胞与癌细胞在3小时的短时间内反应的情况下,具有脱落结构的CAR与不具有该结构的CAR相比,显示反应性轻度降低。但是,令人吃惊的是,如使CAR表达细胞与癌细胞长时间反应,则具有脱落结构的CAR与通常的CAR相比,反应性增强,并且在使用肿瘤移植小鼠的体内模型中也证实了抗肿瘤效果得到增强。基于这样的见解进一步进行了验证,结果明确了具有脱落结构的CAR通过脱落而防止癌细胞中的靶抗原的胞啃。发现了通过抑制胞啃而保持长期的反应性是在具有脱落结构的CAR中抗肿瘤效果提高的原因之一。

[0013] 本发明人进一步着眼于CAR的胞内结构域,提出了以下假设,即,通过调节这样的结构域的尺寸,是否可进一步控制胞啃,并且对于胞啃的调节,是否未必需要信号转导结构域。基于这样的假设进行了研究,结果证实以下情况,即,对于胞啃的发生,信号转导结构域不是必需的,胞啃强度依赖于胞内结构域的尺寸而变化,以及信号转导结构域在尺寸相同的情况下引起比非信号转导结构域更强的胞啃。另外,也证实了通过组合脱落结构的加成和细胞内信号转导结构域的个数或顺序的变更,可进一步抑制胞啃强度。可以说根据这些见解,成功地建立了调整CAR的胞啃水平的技术。本发明人基于这些见解进一步反复研究,结果完成了本发明。

[0014] 即,本发明如下所示。

[0015] [1]人工受体,其包含配体结合位点、具有脱落结构的跨膜结构域和向免疫细胞内的信号转导结构域。

[0016] [2]根据[1]所述的人工受体,其选自嵌合抗原受体、修饰T细胞受体、修饰Fc受体和修饰酪氨酸激酶受体。

[0017] [3]根据[1]或[2]所述的人工受体,其中所述免疫细胞选自T细胞、自然杀伤细胞和巨噬细胞。

[0018] [4]根据[3]所述的人工受体,其中所述T细胞为细胞毒性T细胞。

[0019] [5]根据[1]~[4]中任一项所述的人工受体,其中所述脱落结构来自于选自notch蛋白、淀粉样前体蛋白和CD28的蛋白质。

[0020] [6-1]根据[1]~[5]中任一项所述的人工受体,其中所述向免疫细胞内的信号转导结构域包含来自于选自CD3ζ链、CD28和4-1BB的至少1种的信号转导结构域。

[0021] [6-2]根据[1]~[6-1]中任一项所述的人工受体,其中所述配体结合位点为癌抗原结合位点。

[0022] [7-1]根据[1]~[6-2]中任一项所述的人工受体,其中具有脱落结构的跨膜结构域包含:

[0023] (1)以序列号26表示的氨基酸序列,或

[0024] (2)在(1)的氨基酸序列中置换、缺失、插入和/或加成1个或数个氨基酸而成的氨基酸序列。

[0025] [7-2]根据[1]~[7-1]中任一项所述的人工受体,其包含由29个以下的氨基酸序列构成的胞外铰链结构域。

[0026] [8-1]根据[1]～[7-2]中任一项所述的人工受体,其中在跨膜结构域中不具有γ分泌酶的切割位点。

[0027] [8-2]根据[1]～[8-1]中任一项所述的人工受体,其中在胞内结构域中不具有γ分泌酶的切割位点。

[0028] [9-1]根据[1]～[8-2]中任一项所述的人工受体,其具有2个以上的相同的信号转导结构域。

[0029] [9-2]根据[9-1]所述的人工受体,其中所述信号转导结构域为CD28的信号转导结构域。

[0030] [10-1]核酸,其编码根据[1]～[9-2]中任一项所述的人工受体。

[0031] [10-2]载体,其包含根据[10-1]所述的核酸的载体。

[0032] [11-1]免疫细胞,其具有根据[1]～[9-2]中任一项所述的人工受体、根据[10-1]所述的核酸或根据[10-2]所述的载体。

[0033] [11-2]根据[11-1]所述的免疫细胞,其中所述免疫细胞选自T细胞、自然杀伤细胞和巨噬细胞。

[0034] [12-1]药物,其包含根据[11-1]或[11-2]所述的免疫细胞。

[0035] [12-2]根据[12-1]所述的药物,其用于癌症的治疗或预防。

[0036] [13]胞啃作用受调节的受体或编码该受体的核酸的设计方法,其包括:

[0037] (1)选择包含配体结合位点、跨膜结构域和向免疫细胞内的信号转导结构域的受体的工序,以及

[0038] (2A)调节工序(1)中选择的跨膜结构域对脱落的敏感性的工序,和/或

[0039] (2B)使工序(1)中准备的受体的信号转导结构域中加成、插入和/或缺失1个以上的氨基酸残基,和/或用1个以上的氨基酸残基进行置换的工序。

[0040] [14]胞啃作用受调节的受体或编码该受体的核酸的制造方法,其包括:

[0041] (1)准备包含配体结合位点、跨膜结构域和向免疫细胞内的信号转导结构域的受体的工序,以及

[0042] (2A)调节工序(1)中准备的跨膜结构域对脱落的敏感性的工序,和/或

[0043] (2B)使工序(1)中准备的受体的信号转导结构域中加成、插入和/或缺失1个以上的氨基酸残基,和/或用1个以上的氨基酸残基进行置换的工序。

[0044] [15-1]根据[13]或[14]所述的方法,其中所述工序(1)中选择或准备的受体选自嵌合抗原受体、T细胞受体、Fc受体和酪氨酸激酶受体。

[0045] [15-2]根据[13]～[15-1]中任一项所述的方法,其中所述免疫细胞选自T细胞、自然杀伤细胞和巨噬细胞。

[0046] [16]哺乳动物的癌症的治疗或预防方法,其特征在于,对该哺乳动物施用有效量的根据[11-1]或[11-2]所述的免疫细胞或根据[12-1]或[12-2]所述的药物。

[0047] [17]根据[11-1]或[11-2]所述的免疫细胞或根据[12-1]或[12-2]所述的药物,其用于癌症的治疗或预防。

[0048] [18]根据[11-1]或[11-2]所述的免疫细胞或根据[12-1]或[12-2]所述的药物的用途,其用于癌症的治疗或预防药的制造。

[0049] 发明的效果

[0050] 通过利用本发明,可防止免疫细胞的胞啃,可使CAR或TCR等受体长时间维持反应性,可使现有的T细胞疗法的效果大幅上升。另外,通过改变受体的跨膜结构域或胞内结构域,也可对胞啃进行控制。此外,本发明的见解在阐明关于胞啃在生物体内的作用或酪氨酸激酶受体成为受到脱落(shedding)的结构的原因的普遍生理现象的部分机制中也可为有用的。

附图说明

[0051] [图1]具有脱落结构的CAR(可切割-CAR,Cleavable-CAR)易于长时间保持反应性,即使在体内也更有效。a:可切割-CAR构建体和对照(正常-CAR)构建体的结构。作为脱落结构(也称为“可切割结构”)使用Notch1蛋白的跨膜结构域(Transmembrane domein,TM),作为对照,使用具有一般的CD8 TM的CAR(正常-CAR)。b:向NFAT-Luc jurkat(Promega)中引入各种CAR构建体,以4×10^5个细胞1:1与NALM6细胞共培养3小时(3h)后,添加荧光素,测定发光强度。3h后,28bbz(使针对CD19的(识别CD19的)ScFv(CD19 ScFv)与CD28的信号转导结构域、4-1BB的信号转导结构域和CD3ζ链的信号转导结构域连接而构建的CAR)以及28z(使CD19 ScFv与CD28的信号转导结构域和CD3ζ链的信号转导结构域连接而构建的CAR)显示出相同程度的反应性,bbz(使CD19 ScFv与4-1BB的信号转导结构域和CD3ζ链的信号转导结构域连接而构建的CAR)出现轻度的反应性降低。c:在与b相同的实验系统下,继续共培养4天,对发光强度进行测定的结果。确认了在长期培养后,无论胞内结构域(Intracellular domain,ICD)如何,可切割-CAR的反应性均比正常CAR高。d、e、f:在第0天对6-12周龄NSG小鼠静脉移植5×10^5个NALM6细胞,在第4天和第10天静脉施用各2×10^5个导入各种CAR的末梢血CD8细胞后的生存曲线。d是28bbz与28bbz-可切割的比较,e是28z与28z-可切割的比较,f是bbz与bbz-可切割的比较。在bbz中未发现显著差异,但在28z、28bbz中可切割-CAR明显发现显著的生存延长。

[0052] [图2]可切割-CAR抑制胞啃。ab:导入各种CAR的PBMC对NALM6的细胞毒性测定。改变效应/靶标比,将CAR-T和NALM6共培养,按照细胞毒性测定试剂盒(TECHNO SUZUTA)的方案进行分析。未发现明显的差异。c:将NALM6细胞和导入CAR的jurkata细胞以1:1共培养一夜,采用流式细胞术分析NALM6的CD19表达量。证实了在可切割-CAR中,与正常-CAR相比,CD19的减少(胞啃)得到显著抑制。d、e:在导入了28bbz的正常-CAR或可切割-CAR的jurkat细胞的CAR前端加成Hibit-标签(Promega),与NALM6共培养后,固定,用小鼠抗-Hibit mAb(Promega)、AlexaFluor647山羊抗小鼠igG(Invitrogen)、CD19-FITC抗体染色后,用image-Stream(MKII)进行成像分析的NALM6的照片(d)和模式图(e)。在正常-CAR中,发现CD19-FITC减少和CAR向细胞内摄入,但在可切割-CAR中,CD19没有减少,确认了CAR存在于细胞膜表面。

[0053] [图3]胞外结构域的切割对于抑制胞啃和长期维持信号是重要的。a:将表达可切割-CAR(28bbz)或正常-CAR的Jurkat细胞与NALM6细胞共培养后对NALM6中的CD19表达进行FACS分析的结果。若以各种浓度添加诱发胞外结构域的切割的ADAM抑制剂GI254023X,则在正常-CAR中完全没有变化,但在与可切割-CAR的共培养中,确认到CD19表达浓度依赖性地降低。证实了即使在可切割-CAR中,由于抑制ADAM,也会引起胞啃。b:在表达可切割-CAR(28bbz)的Jurkat与NALM6的共培养培养基中,添加ADAM或γ分泌酶抑制剂时的胞啃水平。

虽然任一种抑制都容易引起胞啃,但ADAM有更强的倾向。c:在各种抑制剂的添加下将表达可切割-CAR(28bbz)的细胞与NALM6以1:1共培养4天后,向NFAT jurkat中添加荧光素进行发光检测的结果。在ADAM抑制剂中,发现信号降低,但在γ分泌酶抑制剂中,未发现降低,虽然没有显著差异,但也存在信号增强的可能性。d:使用淀粉样前体蛋白(APP)的TM的可切割-CAR的胞啃。证实了只要是脱落结构,则不限于Notch,均抑制胞啃。e:显示若使用导入APP的增强胞外结构域脱落的突变(Swe突变(APP695 K595N/M596L的APP双突变体))的结构,则进一步抑制胞啃。确认了脱落的程度控制胞啃水平。f:将表达CD19的细胞株、Raji和正常或可切割28bbz CAR共培养后,分析Raji细胞的CD19表达的结果。在可切割-CAR中,即使在Raji细胞中,也确认到胞啃的抑制。

[0054] [图4]胞啃水平存在因受体的胞内结构域尺寸而变化的可能性。为了调查什么因素对胞啃的程度重要,首先将表达不具有CD3ζ的CAR(仅bb(使CD19 ScFv与4-1BB的信号转导结构域连接而构建的CAR)或28bb(使CD19 ScFv与CD28的信号转导结构域和4-1BB的信号转导结构域连接而构建的CAR))的jurkat与NALM6共培养,分析NALM6的CD19表达。令人吃惊的是,即使没有CD3ζ也发现胞啃。另外,胞啃的强度为28bb>28。与其说是信号的增加,还不如认为胞内结构域的长度或重量对于胞啃是重要的,制作了将GFP加成在C末端的bbGFP和28bbGFP,同样地进行共培养,结果确认了与bb和28bb相比,胞啃显著增强。

[0055] [图5]在CD19ScFv-CD8TM下制作在胞内结构域中加成EGFP蛋白的一部分的CAR,测定与NALM6共培养后的NALM6的CD19表达水平平均值。EGFP由于明显不具有信号转导功能,所以显示出即使没有信号转导结构域,也会引起胞啃。另外,若与加成EGFP的一部分、全长的约1/3(EGFP267)或全长的约2/3(EGFP510)的CAR相比,则证实了胞啃依赖于长度而增强,容易依赖于胞内结构域尺寸而引起胞啃。此外,若比较相同长度的无信号结构域(EGFP267)和酪氨酸激酶结构域(28bb),则明确了酪氨酸激酶结构域引起更强的胞啃,由此提示信号转导结构域即使是相同尺寸也可进一步增强牵引力。

[0056] [图6]如2828(将CD28的信号转导结构域串联连接而成)那样,若将相同尺寸的信号结构域排列在存在切割位点的膜附近,则可更强地抑制胞啃。认为对胞啃更强的抑制是因为信号转导时的牵引力上升。如此,得知在具有脱落结构的CAR中,若使胞内结构域的配置或个数发生变化,则可控制胞啃水平。

[0057] [图7]在来自小鼠notch1的可切割序列中,通过串联连接CD28细胞内信号结构域(可切割-28bbz),与CD28细胞内信号结构域为1个的序列(可切割-2828z)相比,发现体内的抗肿瘤活性显著增强。

[0058] [图8]将NALM6细胞与表达CAR的Jurkat细胞共培养后的NALM6 CD19表达结果。若比较19可切割2828z(具有CD19 ScFv的可切割-2828z)和19可切割突变2828z(通过对19可切割2828z导入缺失突变(缺失序列号28的第329位氨基酸残基~第335位氨基酸残基的区域)而不被γ分泌酶切割的序列),则结果是导入突变者进一步抑制胞啃。由此认为,抑制胞啃的效果是由于胞外结构域的切割。

[0059] [图9]得知在同样的胞啃检测系统中,即使在TM位点使用人CD28的TM及其上部12个氨基酸(CD28的第141位氨基酸残基~第152位氨基酸残基)的CAR中,通过串联连接信号结构域,胞啃也得到抑制。由此推测CD28也是脱落蛋白。

[0060] [图10]Jurkat细胞表达作为T细胞受体的TRBV12。将NFAT-Jurkat细胞与整合有针

对TRBV12的ScFv(aTRBV12 ScFv)的各种CAR-T细胞共培养,检测NFAT-juakat侧的TCR信号强度。使用hCleavable-2828z CAR的CAR确认到信号降低的倾向。提示通过使受体形成可切割序列,有可能导致从免疫细胞等逃逸。UT是指与不表达CAR的细胞共培养的对照样本。

[0061] [图11]使用针对Her2的ScFV(Her2 ScFV)的可切割-CAR与信号结构域的串联效果的测定结果。对将作为表达Her2的肿瘤株的skOV3与各种Her2-CAR共培养一夜后的skOV3侧的Her2表达进行了FACS分析。表明即使在Her2-CAR中,在使用hCleavable的情况下,若增加信号结构域数,则也可抑制胞啃。图左侧的skOV3表示与未导入CAR的细胞共培养时的对照Her2表达水平。

[0062] [图12]人Notch1蛋白长度的研究结果。在图上示出Notch1的结构。制作以人Notch1(NCBI登录号:NP_060087.3)的1447位、1488位、1530位或1560位氨基酸残基为具有脱落结构的跨膜结构域的第1位氨基酸残基的CAR(分别为19hL31447 2828z、19hL31448 2828z、19hL31530 2828z、19hL31560 2828z),并比较将其导入到NFAT-Jurkat中而得的细胞与对照细胞或NALM6共培养所得的细胞,以确认反应性。完全包含LNR的1447位的CAR显示出与hCleavable CAR相同的强反应性,另外,若删除LNR,则反应性降低,但与对照相比发现显著的反应。由此认为,通过改变Notch1的使用序列的长度,可控制反应性。对照(cont)表示没有共培养的发光强度。

具体实施方式

[0063] 1.包含具有脱落结构的跨膜结构域的人工受体

[0064] 本发明提供包含具有脱落结构的跨膜结构域(也称为“跨膜区域”或“跨膜部位”)的人工受体。更具体而言,提供包含配体结合位点、具有脱落结构的跨膜结构域和向免疫细胞内的信号转导结构域的人工受体(以下有时称为“本发明的受体”)。另外,本发明的受体通常包含将配体结合位点和跨膜结构域连接而成的胞外铰链结构域。本发明的受体通过具有脱落结构,与不具有该结构的受体相比,可抑制与表达该受体识别的配体的细胞之间的胞啃。胞啃主要是在免疫细胞中产生的某个细胞将位于其他细胞上的蛋白质连同膜一起啃掉的现象。

[0065] 在本说明书中,“受体”意指包含配体结合位点、跨膜结构域和胞内结构域的构建体,而“人工受体”意指天然型受体以外的受体,换言之,除非外源引入否则不存在于哺乳动物生物体内的受体。作为具体的受体,例如可列举出嵌合抗原受体、T细胞受体、Fc受体、酪氨酸激酶受体等,但并不限定于此。受体有在生物体内以单体发挥功能(至少具有配体结合能力)的受体(例如:CAR等)或以二聚体以上的多聚体发挥功能的受体(例如:TCR等),本说明书中的受体可以是以多聚体发挥功能的受体的各构成要素,通常意指在生物体内发挥功能的形态。例如,TCR受体通常意指由α链β链构成的二聚体或由γ链δ链构成的二聚体,或在这些二聚体上进一步结合CD3而成的复合体。

[0066] 受体的配体结合位点只要构成胞外结构域的一部分,具有与配体的结合能力即可,没有特别限定,例如可列举出抗体的抗原结合位点、用接头肽连接构成该抗原结合位点的重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)而成的单链可变区片段(single-chain variable fragment;scFv)、T细胞受体(TCR)的抗原结合位点、TCR以外的酪氨酸激酶受体的配体结合位点、Fc受体的免疫球蛋白Fc结合位点等。上述配体结合位点例如优选不显示出与上述人

工受体或表达上述人工受体的细胞的结合能力。即,上述人工受体优选在内部不包含上述配体结合位点的配体。上述人工受体可具有1个或多个上述配体结合位点。

[0067] 配体通常为癌细胞的细胞表面抗原,但并不限定于此。作为配体,例如可列举出BCMA、B7-H3、B7-H6、CD7、CD10、CD19、CD20、CD22、CD23、CD24、CD30、CD33、CD34、CD38、CD41、CD44、CD56、CD70、CD74、CD97、CD123、CD133、CD138、CD171、CD248、CAIX、CEA、c-Met、CS1(CD319)、CSPG4、CLDN6、CLD18A2、CYP1B1、DNAM-1、GD2、GD3、GM2、GFRα4、GPC3、GPR20、GPRC5D、globoH、Gp100、GPR20、GPRC5D、EGFR、EGFR变体、EpCAM、EGP2、EGP40、FAP、FITC、HER2、HER3、HPV E6、HPV E7、hTERT、IgGκ链、IL-11Ra、IL-13Ra2、KIT、Lewis A、Lewis Y、Legumain、LMP1、LMP2、Ly6k、LICAM、MAD-CT-1、MAD-CT-2、MAGE-A1、MUC1、MUC16、NA-17、NY-BR-1、NY-ESO-1、O-乙酰-GD2、h5T4、PANX3、PDGRFb、PLAC1、聚唾液酸、PSCA、PSMA、RAGE1、ROR1、sLe、SSEA-4、TARP、TAG-72、TEM7R、Tn抗原、TRAIL受体、TRP2、TSHR、α胎蛋白、间皮蛋白、叶酸受体α(FRα)、叶酸受体β(FRβ)、FBP、UPK2、VEGF-R2、WT-1、TCR(例如:TRBV12等)等。

[0068] 受体的跨膜结构域意指贯穿细胞膜的蛋白质结构域。在本说明书中,跨膜结构域是指贯穿细胞膜的区域,但是包括部分胞外结构域或部分胞内结构域的区域有时也被称为跨膜结构域。跨膜结构域通常采取α螺旋拓扑结构,但也可以是β桶状或其它结构的结构域。另外,“具有脱落结构的跨膜结构域”意指在胞外结构域区域(换言之,胞外结构域的膜附近)或跨膜结构域内具有被细胞内源性的脱落酶(sheddase)切割的区域的跨膜结构域。具有脱落结构的跨膜结构域通常包含胞外铰链结构域的至少一部分和跨膜结构域。脱落酶是对具有脱落结构的跨膜蛋白的一部分具有切割能力的膜结合蛋白。在本发明的受体具有胞外铰链结构域(以下有时也简称为“铰链结构域”)的情况下,被脱落酶切割的区域可存在于铰链结构域,也可存在于跨膜结构域,还可存在于它们以外的部位。另外,胞外铰链结构域意指配体结合位点与跨膜结构域之间的区域。

[0069] 脱落结构是在许多酪氨酸激酶受体的跨膜结构域中发现的结构。如下述实施例所示,显示出无论脱落结构的种类如何,只要是被生物体内的脱落酶切割的结构,均可抑制胞啃。由此推测,这是因为受体与其配体的粘着程度被脱落所抑制,由此抑制胞啃。因此,本发明所使用的脱落结构只要是可被生物体内的脱落酶切割的结构即可,可以是任何结构。作为具有脱落结构的蛋白质,例如可列举出notch蛋白(具体而言,notch1蛋白、notch2蛋白、notch3蛋白、notch4蛋白)(分别以序列号2和1表示小鼠notch1的具有脱落结构的跨膜结构域的氨基酸序列及编码该结构域的碱基序列。另外,分别以序列号28和27表示人notch1的具有脱落结构的跨膜结构域的氨基酸序列及编码该结构域的碱基序列。另外,对于以序列号28表示的氨基酸序列,以序列号33～36表示缺失一部分的氨基酸序列。)、淀粉样前体蛋白(分别以序列号4和3表示具有脱落结构的跨膜结构域的氨基酸序列及编码该结构域的碱基序列)、CD28(分别以序列号22和21表示具有脱落结构的跨膜结构域的氨基酸序列及编码该结构域的碱基序列)、ALCAM(活化白细胞粘附分子,activated leukocyte cell adhesion molecule)、CD44、VEGF受体家族(血管内皮生长因子受体(Vascular Endotherial Growth Factor Receptor)VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3等)、EGF(表皮生长因子,Epidermal growth factor)、EGF受体家族(例如:ErbB1、ErbB2、ErbB3、ErbB4等)等。来自于这些蛋白质的跨膜结构域可以是野生型跨膜结构域(例如包含以序列号2、4、22、28、33～36中的任一个表示的序列的跨膜结构域等),也可以是包含对于野生型氨基酸序列的相

似性或同一性高的氨基酸序列且可被脱落酶切割的突变型跨膜结构域。本发明的受体例如可通过将不具有脱落结构的受体的跨膜结构域(例如CD8的跨膜结构域(分别以序列号6和5表示氨基酸序列及编码该结构域的碱基序列)用具有脱落结构的跨膜结构域置换,或将跨膜结构域的胞外结构域侧或其附近(例如铰链结构域内)用具有脱落结构的跨膜结构域的对应区域置换等来进行设计和制作。另外,也可通过将具有脱落结构的受体的跨膜结构域用具有对脱落的敏感性更高的不同脱落结构的跨膜结构域置换、向跨膜结构域中导入对脱落的敏感性更高的突变(例如:APP的Swe突变等)等来设计和制作本发明的受体。分别以序列号8和7表示来自于APP的Swe突变体的跨膜结构域的氨基酸序列及编码该结构域的碱基序列。

[0070] 对上述脱落结构具有切割能力的脱落酶的大部分属于ADAM(去整合素和金属蛋白酶,a disintegrin and metalloproteinase)或BACE(β位淀粉样前体蛋白裂解酶,beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme)的家族。作为属于ADAM家族的脱落酶,例如可列举出ADAM8、ADAM9、ADAM10、ADAM12、ADAM15、ADAM17、ADAM18、ADAM19、ADAM20、ADAM21、ADAM28、ADAM30、ADAM33、ADAMDEC1,作为属于BACE家族的脱落酶,例如可列举出BACE1等。

[0071] 野生型notch蛋白的跨膜结构域具有被ADAM切割的S2切割位点和被γ分泌酶切割的S3切割位点及S4切割位点。通过S3和S4切割位点被γ分泌酶切割,notch蛋白的胞内结构域被释放到细胞质内,接着向核迁移。从抑制胞啃的观点出发,在本发明的受体中,由于胞内结构域向细胞质内的释放不能说是必需的,所以本发明的受体可以是具有胞内结构域向细胞质的释放功能的受体,也可以是不具有释放功能的受体。这样的胞内结构域的释放功能在notch蛋白的情况下可将突变导入跨膜结构域的S3切割位点来抑制γ分泌酶的切割,也可进一步将突变导入S4切割位点。因此,本发明的受体可以是不具有跨膜结构域γ分泌酶的切割位点的受体,另外,也可以是进一步在胞内结构域中也不具有γ分泌酶的切割位点的受体。在一个实施方式中,从本发明的受体的跨膜结构域中除去野生型notch蛋白的跨膜结构域。

[0072] 在本说明书中,对于特定的氨基酸序列的相似性或同一性高的氨基酸序列意指对于该特定的氨基酸序列80%以上、85%以上、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上或99%以上的相似性或同一性的氨基酸序列,或在该特定的氨基酸中置换、缺失、插入和/或加成1个或数个(例如:2、3、4、5、6、7、8、9、10个)氨基酸而成的氨基酸序列。

[0073] 受体的胞内结构域在通过跨膜结构域将受体固定于细胞膜的情况下是存在于细胞内的结构域,反之将露出于细胞外的结构域称为胞外结构域。胞内结构域通常包含信号转导结构域。如下述实施例所示,由于在使用不具有信号转导结构域的受体的情况下也显示出产生胞啃,所以胞内结构域也可不包含信号转导结构域。

[0074] 信号转导结构域只要是可向免疫细胞内进行信号转导的信号转导结构域即可,没有特别限定,例如可列举出来自于选自MHC I类分子、TNF受体、免疫球蛋白样蛋白、细胞因子受体、整联蛋白、活化NK细胞受体、Toll样受体、B7-H3、BAFFR、BTLA、BY55CD160)、CD2、CD3γ、CD3δ、CD3ε、CD3ζ、CD4、CD5、CD7、CD8α、CD8β、CD11a、CD11b、CD11c、CD11d、CD18、CD19、CD19a、CD22、CD27、CD28、CD29、CD30、CD40、CD49a、CD49D、CD49f、D66d、CD69、CD79a、CD79b、

CD84、CD96(触觉)、CD103、4-1BB(CD137)、CDS、CEACAM1、CRTAM、CNAM1(CD226)、DAP10、Fc受体β链、Fc受体γ链、GADS、GITR、HVEM(LIGHTR)、IA4、ICAM-1、ICOS(CD278)、IL2Rβ、IL2Rγ、IL7Rα、ITGA4、ITGA6、ITGAD、ITGAE、ITGAL、ITGAM、ITGAX、ITGB1、ITGB2、ITGB7、KIRDS2、Ly9(CD229)、LAT、LFA-1(CD11a/CD18)、LIGHT、LTBR、NKG2C、NKG2D、NKp30、NKp44、NKp46、NKp80(KLRF1)、OX40、PAG/Cbp、PSGL1、SELPLG(CD162)、SEMA4D(CD100)、SLAM(SLAMF1、CD150、IPO-3)、SLAMF4(CD244、2B4)、SLAMF6(NTB-A、Ly108)、SLAMF7、SLAMF8(BLAME)、SLP-76、TNFR2、TRANCE/RANKL、VLA1和VLA-6的1种或2种以上蛋白质的胞内区域(有时将这些例示称为典型的信号转导结构域的例示)。或者,也可使用包含对于上述信号转导结构域的天然氨基酸序列的相似性或同一性高的氨基酸序列的突变型信号转导结构域。在本发明的一个实施方式中,信号转导结构域包含选自CD3ζ链、CD28和4-1BB的至少1种蛋白质的信号转导结构域、优选2种蛋白质的信号转导结构域(例如:CD28和CD3ζ链的信号转导结构域)、更优选所有蛋白质的信号转导结构域。分别以序列号10和9表示CD3ζ链的信号转导结构域的氨基酸序列及编码该结构域的碱基序列,分别以序列号12和11表示CD28的信号转导结构域的氨基酸序列及编码该结构域的碱基序列,分别以序列号14和13表示4-1BB的信号转导结构域的氨基酸序列及编码该结构域的碱基序列。

[0075] T细胞被经由TCR的细胞内信号活化(一次活化),进而上述活化被经由共刺激分子的细胞内信号增强(二次活化)。因此,在上述免疫细胞为T细胞的情况下,上述信号转导结构域优选组合使用诱导上述一次活化的信号转导结构域和诱导上述二次活化的信号转导结构域。诱导上述一次活化的信号转导结构域可列举出包含免疫受体酪氨酸基活化基序(ITAM)的信号转导结构域,作为具体实例,可列举出CD3γ、CD3δ、CD3ε、CD3ζ、Fc受体β链、Fc受体γ链、CD5、CD22、CD66d、CD79a、CD79b等,优选为CD3ζ。作为诱导上述二次活化的信号转导结构域,例如可列举出在典型的信号转导结构域的例示中作为诱导上述一次活化的信号转导结构域所列举的信号转导结构域以外的信号转导结构域。在组合使用诱导一次活化的信号转导结构域和诱导二次活化的信号转导结构域的情况下,信号转导结构域包含1个或多个诱导一次活化的信号转导结构域和1个或多个诱导二次活化的信号转导结构域,在优选的实施方式中,包含1个诱导一次活化的信号转导结构域和多个诱导二次活化的信号转导结构域。在诱导一次活化的信号转导结构域和诱导二次活化的信号转导结构域的任一个中,也可使用突变型信号转导结构域。

[0076] 另外,如下述实施例所示,具有将2个相同的(同种的)信号转导结构域串联(tandem)连接而成的胞内结构域的CAR与该信号转导结构域为1个的CAR相比显示出更高的抗肿瘤活性。因此,本发明的受体可具有2个以上(例如2个、3个、4个、5个或更多)的相同的信号转导结构域(例如CD28的信号转导结构域或4-1BB)。在本发明的受体具有2个以上的胞内结构域的情况下,各胞内结构域彼此可直接连接,也可经由接头肽等接头连接。

[0077] 在本说明书中,“相似性”意指使用本技术领域中公知的数学算法比对2个氨基酸序列时最佳比对(优选该算法可考虑向序列之一或两者中导入间隙以用于最佳比对)中同一氨基酸和相似氨基酸相对于重叠的全部氨基酸残基的比例(%)。“相似氨基酸”意指在物理化学性质方面相似的氨基酸,例如可列举出芳族氨基酸(Phe、Trp、Tyr)、脂族氨基酸(Ala、Leu、Ile、Val)、极性氨基酸(Gln、Asn)、碱性氨基酸(Lys、Arg、His)、酸性氨基酸(Glu、Asp)、具有羟基的氨基酸(Ser、Thr)、侧链小的氨基酸(Gly、Ala、Ser、Thr、Met)等分类为相

同组的氨基酸。预想这样的相似氨基酸的置换不会使蛋白质的表达型发生变化(即为保守的氨基酸置换)。保守的氨基酸置换的具体实例在本技术领域是众所周知的,记载于各种文献中(例如参照Bowie等,Science,247:1306-1310(1990))。本说明书中的氨基酸序列的相似性或同一性可使用同源性计算算法NCBI BLAST(美国国家生物技术信息中心基本局部比对搜索工具,National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool),在以下条件(期望值=10,允许间隔,矩阵=BLOSUM62,过滤=OFF)下计算。

[0078] 信号转导结构域是具有向细胞内、特别是免疫细胞内的信号转导功能的结构域。本发明中使用的"免疫细胞"只要是具有可通过某种作用机制损害癌细胞等靶细胞的能力的细胞(所谓的免疫效应细胞)即可,没有特别限制,例如可列举出在后天免疫中担负细胞免疫的T细胞或担负自然免疫的NK细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突细胞、B细胞等。其中,优选T细胞、自然杀伤细胞、巨噬细胞,特别优选T细胞。在本说明书中,"T细胞"意指CD3阳性细胞,例如可列举出作为CD8阳性细胞的细胞毒性T细胞(CTL),作为CD4阳性细胞的辅助性T细胞、调节性T细胞、效应T细胞,大部分细胞为CD8和CD4均阴性的γδT细胞等,优选为细胞毒性T细胞及辅助性T细胞。

[0079] 在本说明书中,修饰T细胞受体、修饰Fc受体和修饰酪氨酸激酶受体等"修饰受体"意指构成天然型受体或公知的人工受体的1个以上的氨基酸被缺失、置换、插入和/或加成的受体。实施修饰的部位没有特别限定,通常在跨膜结构域或其附近(例如铰链结构域内)实施修饰。

[0080] 在本说明书中,"嵌合抗原受体(CAR)"意指包含与T细胞信号转导结构域连接的抗体的抗原结合结构域(例如:scFv)的人工构建的杂交蛋白。作为CAR的特征,可列举出利用单克隆抗体的抗原结合特性,以非MHC限制方式将免疫细胞的特异性和反应性针对所选择的靶标进行转换的能力。非MHC限制性抗原识别赋予表达CAR的免疫细胞独立于抗原加工而识别抗原的能力,由此绕过肿瘤逃逸的主要机制。此外,若在T细胞中表达CAR,则CAR具有不与内源性TCRα链和β链二聚体化的优点。

[0081] 本发明的CAR包含可特异性识别靶细胞的表面抗原(例如:癌细胞的细胞表面抗原等)的抗体的抗原结合结构域、跨膜结构域和信号转导结构域。本发明的CAR也可包含胞外铰链结构域。

[0082] 在本发明的受体或CAR具有胞外铰链结构域的情况下,该胞外铰链结构域例如由1~300个氨基酸、5~100个氨基酸、10~70个氨基酸构成。胞外铰链结构域也可由6~29个氨基酸构成。作为CAR所具有的胞外铰链结构域,例如可列举出来自于CD3、CD8、CD28、KIR2DS2或IgG4、IgD或其它免疫球蛋白的铰链结构域。另外,也可以是来自于与跨膜结构域相同的蛋白质的铰链结构域。或者,也可使用包含对于上述铰链结构域的天然氨基酸序列的相似性或同一性高的氨基酸序列的突变型铰链结构域。在本发明的一个实施方式中,铰链结构域为IgG4的铰链结构域。分别以序列号18和17表示IgG4的铰链结构域的氨基酸序列及编码该结构域的碱基序列。

[0083] 另外,在将CD28的铰链结构域的一部分连接到跨膜结构域的CAR中也可发现抑制胞啃的效果。因此,作为铰链结构域,可列举出CD28的铰链结构域及其一部分。分别以序列号24和23表示CD28的铰链结构域的氨基酸序列及编码该结构域的碱基序列。作为CD28的铰

链结构域的一部分,例如可列举出包含由序列号24的氨基酸序列中第19位～第30位的氨基酸残基构成的部分(序列号26)的铰链结构域,或包含对于序列号26的氨基酸序列的相似性或同一性高的氨基酸序列的突变型铰链结构域。这些CD28的铰链结构域的一部分及其突变型通常由29个以下(例如:25个、24个、23个、22个、21个、20个、19个、18个、17个、16个、15个、14个、13个、12个)的氨基酸构成。另外,优选胞外铰链结构域和跨膜结构域来自于相同的蛋白质(例如两者均来自于CD28)。由此,在本发明的一个实施方式中,本发明的受体含有包含序列号24的氨基酸序列和序列号22的氨基酸序列的序列或对于该序列的相似性或同一性高的氨基酸序列。另外,在又一个实施方式中,本发明的受体的铰链结构域不包含由序列号24的氨基酸序列构成的铰链结构域和/或由与该序列80％以上同一的氨基酸序列构成的区域。

[0084] 在本说明书中,“T细胞受体(TCR)”意指由TCR链(α链、β链、γ链、δ链)的二聚体构成,识别抗原或该抗原-HLA(人白细胞型抗原)(MHC,主要组织相容性复合体)复合体,从而向T细胞转导刺激信号的受体。TCR通常由α链和β链或γ链和δ链的二聚体构成。各种TCR链由可变区和恒定区构成,可变区中存在3个互补决定区(CDR1、CDR2、CDR3)。

[0085] 本发明中使用的TCR链的恒定区优选在天然型TCR链的恒定区中实施规定的修饰。作为该修饰,例如可列举出通过将天然型TCR链的恒定区的特定氨基酸残基置换为半胱氨酸残基来增强TCR链间的二硫键产生的二聚体表达效率等,但并不限定于此。

[0086] Fc受体是对抗体的Fc区具有结合能力的受体。作为Fc受体,例如可列举出作为对IgA有特异性的受体的Fcα受体(例如:FcαRI等)、作为IgG的Fc部分的受体的Fcγ受体(例如:CD64(FCGRI)、CD32(FCGRII)、CD16(FCGRIII)等)、与IgE结合的Fcε受体(例如:FcεRI、FcεRII等)、作为与母亲的IgG结合的受体的新生儿Fc受体、Fc受体样蛋白、与IgM和IgA结合的Fcα/μ受体等。其中,优选Fcγ受体。

[0087] 酪氨酸激酶受体也被称为受体型酪氨酸激酶,具有酪氨酸激酶活性,是对许多多肽型生长因子、细胞因子、激素具有高亲和性的细胞表面受体。虽然TCR也是酪氨酸激酶受体,但在本说明书中,除非另有说明,否则酪氨酸激酶受体都意指TCR以外的酪氨酸激酶受体。作为酪氨酸激酶受体的家族,例如可列举出EGF受体家族(例如:ErbB1、ErbB2、ErbB3、ErbB4等)、胰岛素受体家族(例如:IR-A、IR-B等)、PDGF受体家族(例如:PDGFR-αα、PDGFR-αβ、PDGFR-ββ等)、VEGF受体家族(例如:VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3等)、FGF受体家族(例如:FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4、FGFRL1、FGFR6等)、CCK家族、GF受体家族、HGF受体家族(例如:MET等)、Eph受体家族(例如:EPHA1、EPHA2、EPHA3、EPHA4、EPHA5、EPHA6、EPHA7、EPHA8、EPHA9、EPHA10、EPHB1、EPHB2、EPHB3、EPHB4、EPHB5、EPHB6等)、AXL家族、TIE家族、RYK家族、DDR家族、RET家族(例如:RET51、RET43、RET9等)、ROS家族、LTK家族、ROR家族、MuSK家族、LMR家族、上述以外的家族等。酪氨酸激酶受体可属于这些家族中的任一个。另外,作为酪氨酸激酶受体,也可列举出CD3、共刺激分子(例如:CD28、4-1BB、CD357、CD40、ICOS、OX40等)。

[0088] 本发明中使用的受体的来源没有特别限制,优选来自于哺乳动物(例如:人、大鼠、小鼠、豚鼠、家兔、绵羊、马、猪、牛、狗、猫、猴等)的受体,其中更优选来自于人的受体。

[0089] 本发明的受体可使用下述的本发明的核酸或载体通过基因工程来制作。例如,在受体为CAR等单体的情况下,可通过将编码该受体的核酸导入到细胞中,使受体在细胞内表达,并分离该受体来制作。另外,在受体为TCR等二聚体的情况下,例如可通过将编码构成本

发明的受体的其中一种多肽的核酸和编码另一种多肽的核酸这两者导入到细胞中,使各多肽表达以形成二聚体,并通过本身公知的方法分离该二聚体来制作。在受体为三聚体以上的多聚体的情况下也是相同的。

[0090] 2.编码本发明的受体的核酸及包含该核酸的载体

[0091] 本发明提供编码上述本发明的受体的核酸(以下有时称为“本发明的核酸”)。在受体为二聚体的情况下,作为本发明的核酸,编码构成本发明的受体的其中一种多肽的核酸和编码另一种多肽的核酸可包含在不同的分子中,或者编码两种多肽的核酸可包含在单一分子中。在受体为三聚体以上的多聚体的情况下也是相同的。

[0092] 本发明的核酸可以是DNA或RNA,或者也可以是DNA/RNA嵌合体,优选为DNA。另外,该核酸可以是双链,也可以是单链。在双链的情况下,可以是双链DNA、双链RNA或DNA:RNA的杂交体。在核酸为RNA的情况下,对于RNA的序列,将碱基序列中的T替换读为U。另外,本发明的核酸只要可在体外或在细胞中表达多肽,就可包含天然核苷酸、修饰核苷酸、核苷酸类似物或它们的混合物。

[0093] 本发明的核酸可通过本身公知的方法制作,例如可基于受体的公知的DNA序列信息,合成寡聚DNA引物以覆盖该序列的所期望部分,使用由具有该序列的细胞制备的总RNA或mRNA级分为模板,通过RT-PCR法进行扩增,由此进行克隆。或者,可通过化学合成DNA链或利用PCR法(重叠PCR法)或Gibson Assembly法连接所合成的部分重叠的寡聚DNA短链,由此构建编码其全长或一部分的DNA。另外,也可适当地在序列中导入突变。

[0094] 本发明的核酸可整合到表达载体中。因此,本发明提供包含上述本发明的核酸的表达载体(以下有时称为“本发明的载体”)。

[0095] 作为本发明的载体所使用的启动子,例如可列举出泛素启动子、EF1α启动子、CAG启动子、SRα启动子、SV40启动子、LTR启动子、CMV(巨细胞病毒)启动子、RSV(劳斯肉瘤病毒)启动子、MoMuLV(莫洛尼鼠白血病病毒)LTR、HSV-TK(单纯庖疹病毒胸苷激酶)启动子等。其中,优选泛素启动子、EF1α启动子、CAG启动子、MoMuLV LTR、CMV启动子、SRα启动子。

[0096] 本发明的载体除了上述启动子以外,根据期望,还可包含转录和翻译调控序列、核糖体结合位点、增强子、复制起点、多聚A信号、选择性标记基因等。作为选择性标记基因,例如可列举出二氢叶酸还原酶基因、新霉素抗性基因、嘌呤霉素抗性基因等。

[0097] 在受体为二聚体的情况下,可将包含编码构成上述本发明的受体的其中一种多肽的核酸和编码另一种多肽的核酸的表达载体导入到靶细胞内,在细胞内或细胞表面构成两种多肽的异源二聚体。在这种情况下,可将编码构成本发明的受体的其中一种多肽的核酸和编码另一种多肽的核酸整合到分别的表达载体中,也可整合到1个表达载体中。在整合到1个表达载体中的情况下,这2种核酸优选经由能够进行多顺反子表达的序列进行整合。通过使用能够进行多顺反子表达的序列,使得更有效地表达整合到1种表达载体中的多个基因变为可能。作为能够进行多顺反子表达的序列,例如可列举出2A序列(例如:口蹄疫病毒(FMDV)来源的2A序列(F2A)、马鼻炎A病毒(ERAV)来源的2A序列(E2A)、猪捷申病毒(PTV-1)来源的2A序列(P2A)、明脉扁刺蛾病毒(TaV)来源的2A序列(T2A))(PLoS ONE,3:e2532,2008,Stem Cells 25,1707,2007等)、内部核糖体进入位点(IRES)(美国专利号4,937,190)等,从均匀的表达量的观点出发,优选2A序列。另外,在2A序列中,优选P2A序列和T2A序列。在受体为三聚体以上的多聚体的情况下也是相同的。

[0098] 作为本发明中可使用的表达载体,可列举出病毒载体、质粒载体等。作为病毒载体,可列举出逆转录病毒载体(包含慢病毒载体或假型载体)、腺病毒载体、腺相关病毒载体、疱疹病毒载体、仙台病毒、附加型载体等。另外,也可使用转座子表达系统(例如:PiggyBac系统)。作为质粒载体,可列举出动物细胞表达质粒(例如:pa1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pcDNAI/Neo)等。

[0099] 3.具有本发明的受体的免疫细胞及包含该细胞的药物

[0100] 本发明提供具有本发明的核酸或载体的免疫细胞(以下有时称为“本发明的免疫细胞”)及包含本发明的免疫细胞的药物(以下有时称为“本发明的药物”)。本发明的免疫细胞优选在细胞表面上表达本发明的受体。本发明的免疫细胞可表达1种本发明的受体,也可表达2种以上(例如CAR与TCR的组合等)的本发明的受体。

[0101] 本发明的免疫细胞或药物可对哺乳动物(例如:人、大鼠、小鼠、豚鼠、家兔、绵羊、马、猪、牛、狗、猫、猴等)施用。因此,还提供哺乳动物的癌症的治疗或预防方法,其特征在于,对该哺乳动物施用本发明的免疫细胞或药物。另外,除非另有说明,否则癌症的治疗或预防药也包含能够治疗且能够预防该疾病的药物。关于癌症的治疗或预防方法也是相同的。

[0102] 在本说明书中,“治疗药”不只包含以癌症的根治治疗为目的的药物,还包含例如以抑制癌症的进展为目的的药物、以减轻症状(例如向不影响生活、工作的轻微症状(最小临床表现(minimal manifestations),MM)的改善)为目的或减轻后遗症的药物。例如,由于癌症是长时间(通常以年为单位)进展的疾病,所以通过在早期开始治疗,可预防症状的进展。另外,在本说明书中,“预防药”不只包含以降低未发生癌症的对象发生癌症的风险为目的的药物,还包含以降低已经发生癌症的对象的癌症复发风险为目的的药物。关于癌症的治疗或预防方法也是相同的。

[0103] 作为具有本发明的核酸或载体的免疫细胞,可列举出与上述“1.包含具有脱落结构的跨膜结构域的人工受体”中列举的免疫细胞相同的细胞,优选为T细胞,更优选为细胞毒性T细胞。表达本发明的受体的免疫细胞可通过向由生物体中采集的免疫细胞(例如末梢血T细胞)中或向由该细胞的前体细胞或多能干细胞分化诱导而得的免疫细胞中导入本发明的核酸或载体而得到。或者,也可向目标免疫细胞的前体细胞或多能干细胞中导入本发明的核酸或载体,通过本身公知的分化诱导方法,来分化为目标免疫细胞。

[0104] 免疫细胞例如可从人或非人哺乳动物的例如末梢血、骨髓和脐带血中采集。在将表达本发明的受体的免疫细胞用于癌症的治疗或预防的情况下,该免疫细胞优选从治疗对象本人或与治疗对象的HLA类型一致的供体中采集。

[0105] 作为上述免疫细胞的前体细胞,例如可列举出造血干细胞、淋巴系干细胞、丧失自我复制能力的多能前体细胞(多能祖细胞(multipotent progenitor):MMP)、骨髓-淋巴样共同前体细胞(MLP)、骨髓系前体细胞(MP)、粒细胞单核前体细胞(GMP)、巨噬细胞-树突细胞前体细胞(MDP)、树突细胞前体细胞(DCP)、前T细胞(例如:DN1细胞、DN2细胞、DN3细胞、DN4细胞、DP细胞等)等。

[0106] 作为上述多能干细胞,例如可列举出胚胎干细胞(embryonic stemcell:ES细胞)、人工多能干细胞(诱导多能干细胞(induced pluripotent stemcell):iPS细胞)、胚胎肿瘤细胞(EC细胞)、胚胎生殖干细胞(EG细胞)等。在上述多能干细胞为ES细胞或来自于人胚胎

的任意细胞的情况下,该细胞可以是破坏胚胎而制作的细胞,也可以是不破坏胚胎而制作的细胞,优选为不破坏胚胎而制作的细胞。

[0107] 在本说明书中,“多能干细胞(pluripotent stem cell)”是指胚胎干细胞(ES细胞)以及潜在地具有与胚胎干细胞相同的多能分化性、即分化为生物体的各种组织(内胚层、中胚层、外胚层中的全部)的能力的细胞。作为具有与ES细胞相同的多能分化性的细胞,可列举出“人工多能干细胞(iPS细胞或iPSC)”。

[0108] ES细胞是由人或小鼠等哺乳动物的早期胚胎(例如胚泡)的内部细胞团建立的具有多能性和基于自我复制的增殖能力的干细胞。ES细胞1981年在小鼠中被发现(M.J.Evans和M.H.Kaufman(1981),Nature 292:154-156),此后,在人、猴等灵长类中也建立了ES细胞株(J.A.Thomson等人(1998),Science 282:1145-1147;J.A.Thomson等人(1995),Proc.Natl.Acad.Sci.USA,92:7844-7848;J.A.Thomson等人(1996),Biol.Reprod.,55:254-259;J.A.Thomson和V.S.Marshall(1998),Curr.Top.Dev.Biol.,38:133-165)。ES细胞可通过从对象动物的受精卵的胚泡中取出内部细胞团,并在成纤维细胞饲养物上培养内部细胞团来建立。或者,ES细胞可只使用胚泡期以前的卵裂期的胚胎的单卵裂球来建立(Chung Y.等人(2008),Cell Stem Cell 2:113-117),也可使用停止发生的胚胎来建立(Zhang X.等人(2006),Stem Cells 24:2669-2676.)。

[0109] 作为本发明中使用的ES细胞株,只要是人ES细胞株即可,例如可利用威斯康星大学、NIH、理研、京都大学、国立成育医疗研究中心和Cellartis公司等建立的各种人ES细胞株。具体而言,例如,作为人ES细胞株,可列举出ESI Bio公司销售的CHB-1～CHB-12株、RUES1株、RUES2株、HUES1～HUES28株等,WiCell Research销售的H1株、H9株等,理研销售的KhES-1株、KhES-2株、KhES-3株、KhES-4株、KhES-5株、SSES1株、SSES2株、SSES3株等。

[0110] iPS细胞是通过向哺乳动物体细胞或未分化干细胞中导入特定的因子(核重编程因子)进行重编程而得到的细胞。目前,iPS细胞有多种,也可使用山中等通过向人成纤维细胞中导入Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc这4种因子而建立的人iPSC(Takahashi K,Yamanaka S.等人,Cell,(2007)131:861-872.)、在导入上述4种因子后以Nanog的表达为指标进行筛选而建立的Nanog-iPSC(Okita,K.,Ichisaka,T.和Yamanaka,S.(2007).Nature 448,313-317.)、通过不包含c-Myc的方法制作的iPSC(Nakagawa M,Yamanaka S.等人,Nature Biotechnology,(2008)26,101-106)、通过无病毒法导入6种因子而建立的iPSC(Okita K等人,Nat.Methods 2011May;8(5):409-12,Okita K等人,Stem Cells.31(3):458-66.)等。另外,也可使用Thomson等制作的导入OCT3/4、SOX2、NANOG、LIN28这4种因子而建立的人工多能干细胞(Yu J.,Thomson JA.等人,Science(2007)318:1917-1920.)、Daley等制作的人工多能干细胞(Park IH,Daley GQ.等人,Nature(2007)451:141-146)、樱田等制作的人工多能干细胞(日本特开2008-307007号)等。

[0111] 除此之外,公开的所有论文(例如Shi Y.,Ding S.等人,Cell Stem Cell,(2008)Vol3,Issue 5,568-574;Kim JB.,Scholer HR.等人,Nature,(2008)454,646-650;Huangfu D.,Melton,DA.等人,Nature Biotechnology,(2008)26,No 7,795-797)或专利(例如日本特开2008-307007号、日本特开2008-283972号、US2008-2336610、US2009-047263、WO2007-069666、WO2008-118220、WO2008-124133、WO2008-151058、WO2009-006930、WO2009-006997、WO2009-007852)中记载的本领域公知的人工多能干细胞均可使用。

[0112] 作为人工多能干细胞株,可利用NIH、理研、京都大学等建立的各种iPSC株。例如,只要是人iPSC株即可,可列举出理研的HiPS-RIKEN-1A株、HiPS-RIKEN-2A株、HiPS-RIKEN-12A株、Nips-B2株等,京都大学的253G1株、253G4株、1201C1株、1205D1株、1210B2株、1383D2株、1383D6株、201B7株、409B2株、454E2株、606A1株、610B1株、648A1株、1231A3株、FfI-01s04株等,优选1231A3株。

[0113] 在本说明书中,“造血前体细胞”意指能够分化为血细胞系细胞的多能干细胞(multipotent stem cell)。在人中,主要存在于骨髓中,分化为白细胞(中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞、巨噬细胞)、红细胞、血小板、肥大细胞、树突细胞。另外,在本发明中,“造血前体细胞”意指CD34阳性细胞,优选为CD34/CD43双阳性(DP)细胞。本发明所使用的造血前体细胞的来源没有限制,例如,可以是利用下述方法通过分化诱导多能干细胞而得的造血前体细胞,也可以是通过公知的方法从生物体组织中分离的造血前体细胞。

[0114] 作为使多能干细胞分化为T细胞等免疫细胞的方法,例如可列举出包括(1)使导入了本发明的核酸或载体的多能干细胞分化为造血前体细胞的工序和(2)使该造血前体细胞分化为免疫细胞的工序的方法。上述工序(1)例如可列举出如国际公开第2013/075222号、国际公开第2016/076415号和Liu S.等人,Cytotherapy,17(2015);344-358等所述,在诱导为造血前体细胞的培养基中培养多能干细胞的方法。另外,例如在免疫细胞为T细胞的情况下,上述工序(2)可列举出如国际公开第2016/076415号等所述的包括(2-1)由造血前体细胞诱导CD4CD8双阳性T细胞的工序和(2-2)由CD4CD8双阳性T细胞诱导CD8阳性T细胞的工序的方法。

[0115] 诱导为造血前体细胞的培养基没有特别限定,可将用于培养动物细胞的培养基作为基础培养基来制备。作为基础培养基,例如可列举出Iscove改良杜氏培养基(Iscove's Modified Dulbecco's Medium(IMDM))培养基、Medium 199培养基、Eagle最低基础培养基(Eagle'sMinimum Essential Medium(EMEM))培养基、αMEM培养基、杜氏改良Eagle培养基(Dulbecco's modified Eagle's Medium(DMEM))培养基、Ham's F12培养基、RPMI 1640培养基、Fischer's培养基、Neurobasal培养基(Life Technologies)、它们的混合培养基等。培养基中可含有血清,或者也可以无血清的形式使用。根据需要,基础培养基中可包含例如维生素C类(例如:抗坏血酸)、白蛋白、胰岛素、转铁蛋白、硒、脂肪酸、微量元素、2-巯基乙醇、硫代甘油、脂质、氨基酸、L-谷氨酰胺、非必需氨基酸、维生素、生长因子、低分子化合物、抗生素、抗氧化剂、丙酮酸、缓冲剂、无机盐类、细胞因子等。

[0116] 作为工序(2-1)中使用的分化诱导为CD4CD8双阳性T细胞的培养基,没有特别限制,可将用于培养动物细胞的培养基作为基础培养基来制备。基础培养基可列举出与上述工序(1)中使用的基础培养基相同的基础培养基。培养基中可含有血清,或者也可以无血清的形式使用。根据需要,基础培养基中可包含例如维生素C类、白蛋白、胰岛素、转铁蛋白、硒、脂肪酸、微量元素、2-巯基乙醇、硫代甘油、脂质、氨基酸、L-谷氨酰胺、非必需氨基酸、维生素、生长因子、低分子化合物、抗生素、抗氧化剂、丙酮酸、缓冲剂、无机盐类、细胞因子等。

[0117] 作为工序(2-2)中使用的基础培养基和培养基添加剂,可列举出与工序(1)中记载的基础培养基和培养基添加剂相同的物质。上述培养基可包含肾上腺皮质激素剂。作为肾上腺皮质激素剂,例如可列举出糖皮质激素及其衍生物等,作为该糖皮质激素,例如可列举

出醋酸可的松、氢化可的松、醋酸氟氢可的松、泼尼松龙、曲安西龙、甲基强的松龙、地塞米松、倍他米松、丙酸倍氯米松等。其中,优选地塞米松。

[0118] 将本发明的核酸或载体导入到细胞中的方法没有特别限定,可采用已知的方法。在导入核酸或质粒载体的情况下,例如可通过磷酸钙共沉淀法、PEG法、电穿孔法、显微注射法、脂转染法等来进行。例如,可采用细胞工学别册8新细胞工学实验方案,263-267(1995)(秀润社发行);病毒学(Virology),52卷,456(1973);日药理志(Folia Pharmacol.Jpn.),第119卷(第6期),345-351(2002)等所记载的方法。在使用病毒载体的情况下,可通过将本发明的核酸导入到适当的包装细胞(例如Plat-E细胞)或互补细胞株(例如293细胞)中,回收在培养上清液中产生的病毒载体,并通过与各病毒载体相适应的适当方法,使该载体转染细胞,由此导入到细胞中。例如,在国际公开第2007/69666号;Cell,126,663-676(2006)和Cell,131,861-872(2007)等中公开了使用逆转录病毒载体作为载体的具体方法。另外,在Zufferey R.等人,Nat Biotechnol,15(9):871-895(1997)等中公开了使用慢病毒作为载体的具体方法。特别是在使用逆转录病毒载体的情况下,通过使用作为重组纤维结合蛋白片段的CH-296(Takara Bio公司制),使得对于各种细胞高效率的基因导入变为可能。或者,也可通过基因组编辑(例如CRISPR/Cas系统、TALEN、ZFN等),将本发明的核酸或载体导入到细胞的基因组中。

[0119] 本发明的核酸还可以RNA的形态直接导入到细胞中,用于在细胞内表达本发明的受体。作为RNA的导入方法,可采用已知的方法,例如,可优选使用脂转染法或电穿孔法等。

[0120] 本发明的受体的表达例如可使用识别本发明的受体的一部分(例如:TCR链的恒定区等)的抗体,通过免疫学的方法检测或测定。作为免疫学的方法,例如可列举出抗体阵列、流式细胞术分析、放射性同位素免疫测定法(RIA法)、ELISA、蛋白质印迹、免疫组织染色、酶免疫测定法(EIA法)、荧光免疫测定法(FIA)、免疫色谱法等。

[0121] 本发明还提供包括将本发明的核酸或载体导入到细胞中的工序的细胞的制造方法。导入本发明的核酸或载体的细胞、导入方法如上所述。上述细胞优选表达本发明的受体。本发明的受体的表达可通过上述方法来检测或测定。此外,在另一个实施方式中,还提供通过上述制造方法得到的免疫细胞。

[0122] 作为本发明的药物的靶标,只要是在癌症组织内包含表达本发明的受体以其为靶标的癌症抗原的癌细胞的癌症即可,所有癌症均可成为对象。作为这样的癌症,例如可列举出腺癌、鳞状细胞癌、腺鳞癌、未分化癌、大细胞癌、小细胞癌、皮肤癌(例如黑素瘤、梅克尔细胞癌)、乳腺癌、前列腺癌、膀胱癌、阴道癌、颈癌、头颈癌、子宫癌、宫颈癌、肝癌、肾癌、胰腺癌、脾脏癌、肺癌、非小细胞肺癌、气管癌、支气管癌、结肠癌、直肠癌、小肠癌、大肠癌、胃癌、食道癌、胆囊癌、睾丸癌、卵巢癌、输卵管癌、鼻咽癌等癌症;骨组织、软骨组织、脂肪组织、肌组织、血管组织和造血组织的癌症;软骨肉瘤、尤文氏肉瘤、横纹肌肉瘤、恶性血管内皮瘤、恶性许旺细胞瘤、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、视网膜母细胞瘤等母细胞瘤;生殖细胞瘤;淋巴瘤;白血病、急性髓细胞性白血病、多发性骨髓瘤等。

[0123] 作为本发明的药物中可包含的免疫细胞以外的成分,例如可列举出药学上可容许的添加剂,更具体而言,可列举出生理盐水、缓冲生理盐水、细胞培养培养基、右旋糖、注射用水、甘油、乙醇、稳定剂、增溶剂、表面活性剂、缓冲剂、防腐剂、等张剂、填充剂、润滑剂等。

[0124] 作为本发明的免疫细胞或药物的施用方法,例如可列举出向肿瘤内、静脉内、动脉内、肌肉内、皮下、腹腔内等的注射。

[0125] 本发明的药物所包含的本发明的免疫细胞的量可根据免疫细胞的种类、用途、剂型和目标治疗效果等,在考虑例如癌症的种类、位置、重症度、接受治疗的对象的年龄、体重及状态等的同时,适当地调节。例如,本发明的药物可以以在1次施用中施用通常1×10^4~1×10^{10}个、优选1×10^5~1×10^9个、更优选5×10^6~5×10^8个的本发明的免疫细胞的方式制剂化。

[0126] 本发明的免疫细胞或药物的施用间隔没有特别限定,可在考虑每1次施用的本发明的免疫细胞的量等的同时,适当调整,例如可1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2次独立施用。

[0127] 本发明的免疫细胞或药物可与公知的癌症治疗药并用。作为癌症治疗药,例如可列举出环磷酰胺、苯达莫司汀、异环磷酰胺、达卡巴嗪等烷化药;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、依诺他滨等代谢拮抗药;利妥昔单抗、西妥昔单抗、曲妥珠单抗等分子靶向药;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等抗癌性抗生素;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、纳武单抗、帕博利珠单抗等免疫抑制剂等。

[0128] 4.胞啃作用受调节的受体的设计方法或该受体的制造方法

[0129] 如下述实施例所示,显示可通过受体有无脱落结构或脱落强度、胞内结构域的尺寸和/或有无信号转导结构域来调节受体的胞啃作用。更具体而言,如下述实施例所示,发现通过将脱落结构导入到不具有脱落结构的跨膜结构域中,胞啃得到抑制,通过进一步导入更容易产生脱落的突变,胞啃的抑制效果增强。另外,发现胞啃的发生不需要受体具有信号结构域,胞啃的强度依赖于胞内结构域的尺寸而变化,以及在尺寸相同的情况下,信号转导结构域比非信号转导结构域更强烈地引起胞啃。

[0130] 因此,在又一个实施方式中,本发明提供胞啃作用受调节的受体或编码该受体的核酸的设计方法(以下有时称为“本发明的设计方法”),其包括:

[0131] (1)选择包含配体结合位点、跨膜结构域和向免疫细胞内的信号转导结构域的受体的工序,以及

[0132] (2A)调节工序(1)中选择的跨膜结构域对脱落的敏感性的工序,和/或

[0133] (2B)使工序(1)中准备的受体的信号转导结构域中加成、插入和/或缺失1个以上的氨基酸残基,和/或用1个以上的氨基酸残基进行置换的工序。

[0134] 另外,还提供胞啃作用受调节的受体或编码该受体的核酸的制造方法(以下有时称为“本发明的制法”),其包括:

[0135] (I)准备包含配体结合位点、跨膜结构域和向免疫细胞内的信号转导结构域的受体的工序,以及

[0136] (IIA)调节工序(I)中准备的跨膜结构域对脱落的敏感性的工序,和/或

[0137] (IIB)使工序(I)中准备的受体的信号转导结构域中加成、插入和/或缺失1个以上

的氨基酸残基,和/或用1个以上的氨基酸残基进行置换的工序。在下文中,对于适用于本发明的设计方法和本发明的制法这两者的事项,作为这些方法的统称,有时使用“本发明的方法”这一术语。

[0138] 在本说明书中,“胞啃作用受调节”意指,与将工序(1)或(I)中准备的受体(以下有时称为“对象受体”)导入到免疫细胞中的情况相比,在将实施了本发明的方法的工序(2A)、(2B)、(IIA)和/或(IIB)后的受体(即,所设计或制造的受体)(以下有时称为“本发明实施后的受体”)导入到免疫细胞中的情况下,胞啃的强度发生变化(即,降低或增强),或者预想到胞啃的强度发生变化。

[0139] 本发明的方法的工序(1)或(I)中准备的受体没有特别限定,例如可列举出公知的CAR、TCR、Fc受体、酪氨酸激酶受体等。这些受体的具体实例或结构等可全部引用上述“1.包含具有脱落结构的跨膜结构域的人工受体”中记载的内容。

[0140] 在对象受体的跨膜结构域不具有脱落结构的情况下,本发明的方法的工序(2A)或(IIA)可通过将该跨膜结构域用具有脱落结构的跨膜结构域进行置换,或将跨膜结构域的胞外结构域侧或其附近(例如铰链结构域内)用具有脱落结构的跨膜结构域的对应区域进行置换等来进行。或者,通过加成能够赋予跨膜结构域脱落能力的结构,例如CD28的铰链结构域、其一部分或它们的突变型等,也可引起脱落。另外,在对象受体的跨膜结构域存在脱落的情况下,可通过用不具有脱落结构的跨膜结构域进行置换、缺失铰链结构域或置换为其它的铰链结构域、用具有对脱落的敏感性不同的脱落结构的跨膜结构域进行置换、将对脱落的敏感性不同的突变(例如:APP的Swe突变等)导入到跨膜结构域中等来进行。另外,报道了在被脱落酶切割的序列的胞外结构域侧附近的序列中存在半数左右的带负电荷的氨基酸残基的情况下,或者具有糖链修饰的情况下,可抑制脱落(Iwagishi R等人,J Biol Chem.295(35):12343-12352(2020))。因此,对于被脱落酶切割的序列的胞外结构域侧附近的序列,通过调节电荷或糖修饰的程度,也可调节对脱落的敏感性。

[0141] 本发明的方法的工序(2B)或(IIB)由于在使对象受体的信号转导结构域中加成、插入和/或缺失氨基酸残基的情况下,在这样的改变后也保持信号转导功能,因此通常进行氨基酸加成等,使其成为包含对于改变前的信号转导结构域的氨基酸序列的相似性或同一性高的氨基酸序列的信号转导结构域。另外,在下述实施例中,显示了在含有具有脱落结构的跨膜结构的受体中,通过增加信号转导结构域的个数,胞啃被进一步抑制。因此,本发明的方法的工序(2B)或(IIB)可以是改变对象受体的胞内结构域的顺序或个数的工序。在改变胞内结构域的个数的情况下,优选使相同的胞内结构域串联。此外,在下述实施例中,即使在信号转导结构域中加成约240个氨基酸长的长度的EGFP(序列号20),也发现了胞啃增强。因此,在将对象受体的信号转导结构域置换为非信号转导结构域的情况下,或在信号转导结构域中进一步加成非信号转导结构域的情况下,置换或加成的非信号转导结构域的大小的上限没有特别限定,作为上限,例如可列举出500个氨基酸长、400个氨基酸长、300个氨基酸长、250个氨基酸长、200个氨基酸长、150个氨基酸长、100个氨基酸长等。

[0142] 在本发明的设计方法的工序(2A)和(2B)中,不需要实际制作受体,而是成像于脑中即可。但是,通常该成像的受体在电子计算机上运行的程序(例如:图形设计工具、办公软件等)上或纸面上被具体化。因此,设计预想到胞啃的强度发生变化的受体,并以表的形式整理该受体的行为也相当于本发明的设计方法的实施。另外,在本发明的制法的工序(IIA)

和(IIB)中,也不需要实际制作受体,而是制作以在细胞内表达改变脱落结构和/或改变信号转导结构域的受体的方式设计的编码该受体的核酸即可。

[0143] 对于对象受体,通过实施本发明的方法的工序(2A)、(2B)、(IIA)和/或(IIB),在理论上,在导入到细胞中的情况下,与对象受体相比,设计或制造了胞啃作用受调节的受体。但是,实际上可确认在实施本发明后的受体中胞啃作用受到调节,另外,也可评价实施本发明后的受体中的胞啃强度。胞啃强度例如如下述实施例所述,可通过以下方法评价,但并不限定于此。将表达对象受体或实施本发明后的受体的免疫细胞(1×10^5个)与靶细胞以1:1用48孔板在37℃下共培养一夜,使用针对以该受体为靶标的配体的抗体,用流式细胞仪测定该配体的表达量。比较各细胞中配体的表达量,在存在差异的情况下可评价为胞啃作用受到调节。

[0144] 通过将由本发明的方法设计或制造的受体或编码该受体的核酸导入到与免疫细胞或该细胞之间引起胞啃的细胞(例如癌细胞)中,也可控制该胞啃。例如,通过将编码由本发明的方法设计或制造的受体的核酸通过基因组编辑等与编码细胞中固有的对象受体的核酸中的至少1个(优选为全部)进行置换,或者插入到该细胞的基因组中,利用置换固有的对象受体或竞争性地发挥作用等,也可控制胞啃。

[0145] 以下列举实施例来更具体地说明本发明,但本发明不受这些实施例的任何限定。

[0146] 实施例

[0147] <材料与方法>

[0148] 载体的构建以及病毒的制作

[0149] 使用临床上使用的FCM63 CD19-特异性scFv(序列号15和16),作为正常-TM使用CD8的跨膜结构域(序列号5和6),作为可切割-TM使用Notch1(序列号1和2)或APP蛋白的跨膜结构域(包含各蛋白质的胞外结构域的一部分)(序列号3和4以及序列号7和8),作为胞内结构域使用CD28的胞内结构域(序列号11和12)、4-1BB的胞内结构域(序列号13和14)、CD3ζ链的胞内结构域(序列号9和10)或将这些胞内结构域组合而构成的胞内结构域,通过一般的分子生物学方法构建CAR载体。FCM63 CD19-特异性scFv与CD8的跨膜结构域经由IgG4的铰链结构域(序列号17和18)连接。另一方面,FCM63 CD19-特异性scFv与可切割-TM之间不经由IgG4的铰链结构域。使用293T细胞和包装载体、包膜载体,产生用于导入基因的病毒液。对于其它的CAR,也同样制作。以序列号21和22表示包含由12个氨基酸残基构成的铰链结构域(序列号25和26)的CD28的跨膜结构域的序列,以序列号27和28表示hCleavable(包含人Nothc1的胞外结构域的一部分的跨膜结构域)的序列,以序列号29和30表示aTRBV12 ScFv的序列,以序列号31和32表示Her2ScFV的序列。另外,分别以序列号33~36表示19hL31447 2828z、19hL31448 2828z、19hL31530 2828z、19hL31560 2828z的hCleavable。

[0150] 基于NFAT-jurkat的CAR信号的检测

[0151] 用慢病毒将各种CAR构建体导入到NFAT-Luc jurkat细胞(Promega J1621)中,制作CAR-NFAT-Luc Jurkat细胞。将该细胞与表达CD19靶标的细胞株(NALM6,Raji)以5×10^4个细胞1:1进行共培养,在短期(3h)、长期(4天)的共培养后,向各孔中添加推荐量的荧光素(VivoGlo Promega),使用Nivo™(PerkinElmer Japan)以发光量检测NFAT信号的活性强度。

[0152] T细胞刺激及基因导入

[0153] 健康人来源的末梢血根据通过京都大学伦理委员会的实验计划入手。将末梢血T

细胞(PBMC)通过使用Leucosep™(Greiner)的离心浓度梯度法进行分离。向分离的PBMC中加入推荐量的Dynabeads人T-活化剂CD3/CD28(VERITAS),用在CD15% FBS+a-MEM培养基中添加了IL15、IL-7的培养基培养、刺激。在刺激第2天、第3天添加慢病毒,导入各种CAR基因。在刺激第3天除去Dynabeads,然后追加培养基,使CAR-PBMC增殖。

[0154] 小鼠肿瘤模型

[0155] 根据基于动物伦理获得京都大学动物实验委员会许可的实验计划使用8-12周龄的NSG小鼠(Jackson)。在第0天通过向尾静脉进行静脉注射来给予5×10^5个NALM-6细胞,作为小鼠肿瘤模型。在第4天和第14天静脉给予2×10^5个CAR-T细胞,作为治疗模型。

[0156] 基于流式细胞术的胞啃作用测定

[0157] 将1×10^5个CAR-T细胞或CAR-jurkat细胞与NALM-6细胞以1:1用48孔板在37℃下共培养一夜。用FACS缓冲液回收细胞,添加各种抗体后,经过30min的染色,用FACSAria(BD)进行测定。数据使用Flowjo软件分析。在金属蛋白酶抑制剂实验中,在共培养中以各种浓度添加GI254023X、DAPT(Sigma),进行实验。

[0158] 细胞毒性测定

[0159] 将CAR-T细胞与靶细胞以各种效应/靶标比混合,按照推荐使用N-SPC试剂盒(TECHNO SUZUTA),用Nivo(PerkinElmer)测定细胞毒性。

[0160] 成像分析

[0161] 将NALM6细胞与导入了在各种CAR(19-28bbz或可切割-19-28bbz)的前端添加了Hibit-标签蛋白的CAR的jurkat细胞共培养一夜后,使用Biolegend的细胞内染色试剂盒进行固定和细胞膜透过处理,根据Biolegend细胞内流式细胞术染色方案进行细胞内染色。用小鼠抗-Hibit mAb(Promega)、AlexaFluor647山羊抗小鼠igG(Invitrogen)、CD19-FITC抗体染色后,用image-Stream(MKII)进行成像分析。

[0162] 统计学分析

[0163] 在使用培养细胞的体外实验中,所有的组均以n=3实施多次,确认重现性。数据分析使用Exel,各组平均值的比较使用T检验进行显著差异检验,以*($p<0.05$)、**($p<0.01$)、***($p<0.001$)记载。在体内实验中,以每组5只来进行,使用Prism制作生存率曲线,用log-rank检验进行生存期限差异的检验。

[0164] 实施例1:脱落对CAR效果的影响的验证

[0165] 基于若将制成受到脱落的结构的CAR(可切割-CAR)与具有不受到脱落的CD8跨膜结构域的通常的CAR(正常-CAR)进行比较,则CAR的反应性可能会发生变化的假设,开始了研究。制作了将跨膜结构域变更为作为脱落结构而广为人知的Notch蛋白来源的跨膜结构域的CAR,发现了维持作为CAR的反应性的CAR(图1-a)。在具有各种胞内结构域的CAR中,为了检测短期内与靶细胞的反应性,使NFAT-Jurkat细胞表达各种CAR基因,并与NALM6细胞共培养3h,检测荧光素酶表达。其结果发现,可切割-CAR与通常的CAR相比,显示出相同程度到稍微降低的反应性(图1-b)。若存在脱落结构,则可预想到引起信号的ON/OFF,因此若长期来看,则认为容易维持信号强度,共培养4天,检测反应性,结果显示,无论是哪种结构,可切割-CAR的信号强度均显著较强(图1-c)。长期的信号增强,预想到在生物体内的长期治疗效果提高。为了验证实际的治疗效果,用向对NSG小鼠静脉给予NALM6细胞的血癌模型静脉给予导入CAR的PBMC的实验系统进行了体内验证。其结果得知,胞内结构域为28bbz、28z的CAR

中可切割-CAR明显显著延长生存。Bbz也有延长生存的倾向(图1-def)。另外,在28bbz的CAR中,即使在用皮下肿瘤模型的验证中,可切割-CAR也显示出比通常的CAR更高的效果,表明延长生存期限(图1-g)。

[0166] 实施例2:脱落引起的CAR的高效发生机制的验证

[0167] 为了研究可切割-CAR可发挥更高效果的机制,首先检测表达CAR的$CD8^+$T细胞的细胞毒性,结果在正常-CAR和可切割-CAR中未发现明显的差异(图2-ab)。近年来,有报道称,CAR引起的胞啃的程度在CAR反应性上产生差异,因此用各种CAR验证了在与NALM6细胞的共培养时NALM6细胞表达的CD19分子被胞啃夺去的程度。其结果明确了无论是具有哪种胞内结构域的CAR中,只要制成可切割-CAR,均可显著抑制靶细胞中CD19的表达降低(图2-c)。在正常-CAR与可切割-CAR之间胞啃水平差异最大的28bbz的CAR中,制作在CAR的前端添加了Tag蛋白的CAR,以图像检测与靶标反应后的CAR的胞外结构域。其结果观察到以下情况,即,正常-CAR在免疫突触形成部位被整合到部分靶细胞中,但可切割-CAR成为以覆盖靶细胞周围的方式附着的状态(图2-d、e)。另外,在正常-CAR中,若与靶细胞共培养,则可观察到牵引并咬碎细胞的情况,但在可切割-CAR中可观察到反复接触和分离,如啄食一样活动的情况。可以说以上结果显示,根据受体有无脱落结构,CAR-T细胞的动态发生变化。

[0168] 实施例3:抑制胞啃的机制的验证

[0169] 为了验证可切割-CAR如何抑制胞啃,进行了针对诱发脱落的金属蛋白酶的抑制实验。首先,进行了引起胞外结构域的切割的ADAM抑制剂的添加,结果证实了即使是可切割-CAR中,也浓度依赖性地解除对胞啃的抑制(图3-a)。虽然γ分泌酶(γ-secretaze)抑制剂对胞内结构域的切割抑制中也容易引起胞啃,但与ADAM抑制剂相比,其程度为轻度。另外,在NFAT-jurkat的长期刺激实验中,若添加ADAM抑制剂,则可发现信号显著降低,但在γ分泌酶抑制中未发现变化(图3-bc)。接着,为了验证其它脱落结构是否同样引起对胞啃的抑制,制作了使用淀粉样前体蛋白(APP)的跨膜结构域作为脱落结构的CAR,结果在它们中也观察到对胞啃的抑制。若使用导入了APP的已知引起家族性阿尔茨海默病的胞外结构域的切割增加的突变(Swe突变)的APP-TM,则显示出胞啃被进一步抑制,表明金属蛋白酶对CAR胞外结构域的切割的容易性很大程度上规定了对胞啃的抑制水平。

[0170] 实施例4:胞啃与细胞内信号的相关性的验证

[0171] 验证了胞啃的强度由何种信号规定。首先,为了验证正常-CAR中胞啃是否需要经由CD3ζ的TCR信号,使用没有CD3ζ的构建体检测胞啃。其结果明确了虽然胞啃的水平变为轻度,但即使没有CD3ζ信号,也会引起胞啃。虽然在NFAT信号的强度上未发现显著差异,但与只有4-1BB信号转导结构域或CD28信号转导结构域相比,通过具有28bb作为信号转导结构域的构建体,显示出更强烈地引起胞啃。因此,基于胞内结构域的尺寸比信号强度更重要的假设,用在CAR的N末端附接与信号转导应为明显不相关的GFP的结构,验证了胞啃水平。其结果得知,由于加成GFP的结构域,更强烈地引起胞啃(图4-a)。接着,为了验证胞啃是否需要酪氨酸激酶结构域,制作了在跨膜结构域下将EGFP(序列号19和20)的一部分改变氨基酸长而结合的受体,结果显示即使没有酪氨酸激酶结构域,也引起胞啃,并且其程度依赖于胞内结构域的长度(图5)。此外,若比较相同长度的无信号结构域(EGFP267)和酪氨酸激酶结构域(28bb),则明确了酪氨酸激酶结构域强烈地引起胞啃作用(图5)。另外,明确了若如2828那样将相同尺寸的信号结构域排列在存在切割位点的膜附近,则可更强地抑制胞啃

(图6)。另外,用皮下肿瘤模型对这些CAR进行了验证,结果显示串联插入信号结构域的CAR延长小鼠的生存期限(发挥更高的抗肿瘤活性)(图7)。

[0172] 实施例5:胞啃与胞内结构域的释放的相关性的验证

[0173] 野生型notch蛋白的跨膜结构域具有被γ分泌酶切割的S3切割位点和S4切割位点,通过γ分泌酶切割S3和S4切割位点,由此notch蛋白的胞内结构域被释放到细胞质内。因此,使用因该S3和S4切割位点的部分消失突变而丧失γ分泌酶切割的可切割-CAR(19可切割突变2828z),验证了抑制胞啃的效果。将NALM6细胞与表达CAR的Jurkat细胞共培养后,测到了NALM6 CD19表达,结果明确了19可切割突变2828z与具有野生型notch的跨膜结构域的CAR(19可切割2828z)相比,显著抑制NALM6细胞中CD19的表达降低(即,胞啃被进一步抑制)(图8)。由此认为,抑制可切割-CAR的胞啃的效果主要由于脱落酶引起的胞外结构域的切割,不一定需要γ分泌酶引起的胞内结构域的释放。

[0174] 实施例6:使用不同跨膜结构域的CAR中胞啃的验证

[0175] 用与实施例5相同的胞啃检测系统,验证了将跨膜(TM)位点变更为CD28的TM时的抑制胞啃的效果。具体而言,在使用人CD28的TM及其胞外结构域12个氨基酸作为铰链的CAR中,串联连接信号结构域,结果得知胞啃被进一步抑制(图9)。由此预想到CD28也是脱落蛋白,其胞外结构域的切割位点存在于从TM起的12个氨基酸内。

[0176] 实施例7:使用不同配体结合位点的CAR中胞啃的验证

[0177] 代替CD19 ScFv,使用具有aTRBV12 ScFv或Her2 ScFV的CAR进行了验证。将NFAT-Jurkat细胞与整合有aTRBV12ScFv的各种CAR-T细胞共培养,检测NFAT-juakat侧的TCR信号强度。确认使用hCleavable-2828z CAR的CAR有信号降低的倾向(图10)。另外,对将作为表达Her2的肿瘤株的skOV3与各种Her2-CAR共培养一夜后skOV3侧的Her2表达进行了FACS分析。表明即使在Her2-CAR中,在具有hCleavable的CAR中胞啃也得到抑制,并且即使在4-1BB信号结构域中,若在使用包含脱落结构的跨膜位点时增加信号结构域数,则也可进一步抑制胞啃(图11)。

[0178] 实施例8:Notch1蛋白长度引起的影响的研究

[0179] 研究了在缩短具有人Notch1的脱落结构的跨膜结构域的长度时对CAR的反应性的影响。制作胞外铰链结构域的长度不同的CAR(分别为19hL31447 2828z、19hL31448 2828z、19hL31530 2828z、19hL31560 2828z),并比较将其导入到NFAT-Jurkat中而得的细胞与对照或NALM6共培养所得的细胞,以确认反应性。完全包含LNR的1447位的CAR显示出与hCleavable CAR相同的强反应性,另外,若删除LNR,则反应性降低,但与对照相比发现有显著的反应(图12)。由此认为,通过改变Notch1的使用序列的长度,可控制反应性。

[0180] 产业上的可利用性

[0181] 通过利用本发明,可防止免疫细胞中的胞啃,可长时间维持在医疗临床上作为基因治疗制剂使用的Kymriah(Novartis Pharma)、YESCARTA(Gilead Sciences)等CAR制剂或TCR等受体的反应性,可大幅提升现有的T细胞疗法的效果。另外,由于在原理上不认为有明显的有害性,所以可早期应用于临床。此外,通过改变受体的跨膜结构域或胞内结构域,还使得进行胞啃的控制变为可能。通过推进本发明的胞啃控制技术的研究,将来可能关系到异种移植技术的提高、免疫细胞功能的提高以及经由各种可切割蛋白的信号转导的控制技术的开发。

[0182] 本申请以在日本申请的日本特愿2022-118674(申请日:2022年7月26日)为基础,其内容全部包含在本说明书中。

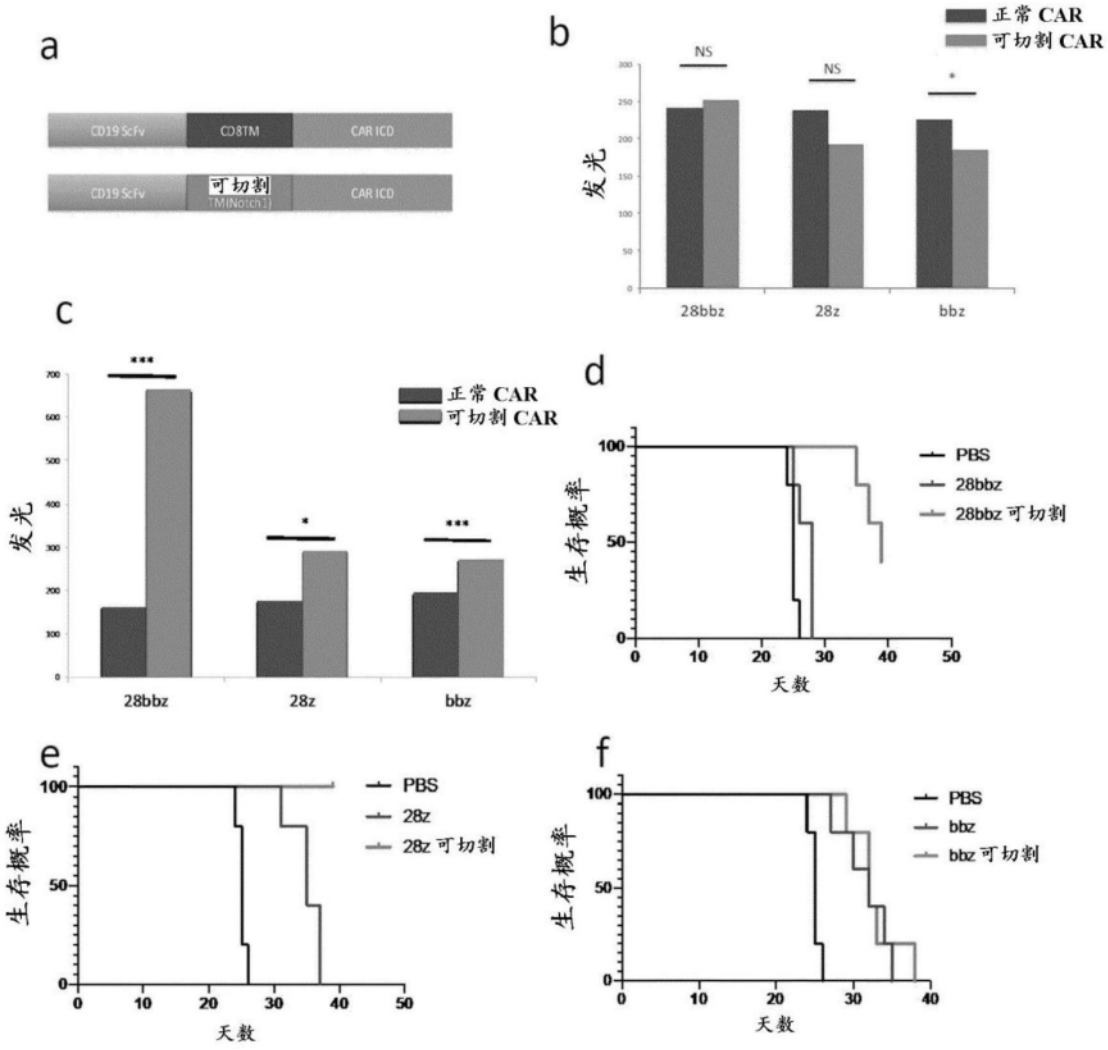

a
CD19 ScFv
CD8TM
CAR ICD
CD19 ScFv
可切割
TM(Notch1)
CAR ICD
b
正常 CAR
可切割 CAR
NS
NS
*
发光
28bbz
28z
bbz
c
正常 CAR
可切割 CAR
***
*
***
发光
28bbz
28z
bbz
d
PBS
28bbz
28bbz 可切割
生存概率
天数
e
PBS
28z
28z 可切割
生存概率
天数
f
PBS
bbz
bbz 可切割
生存概率
天数

图1

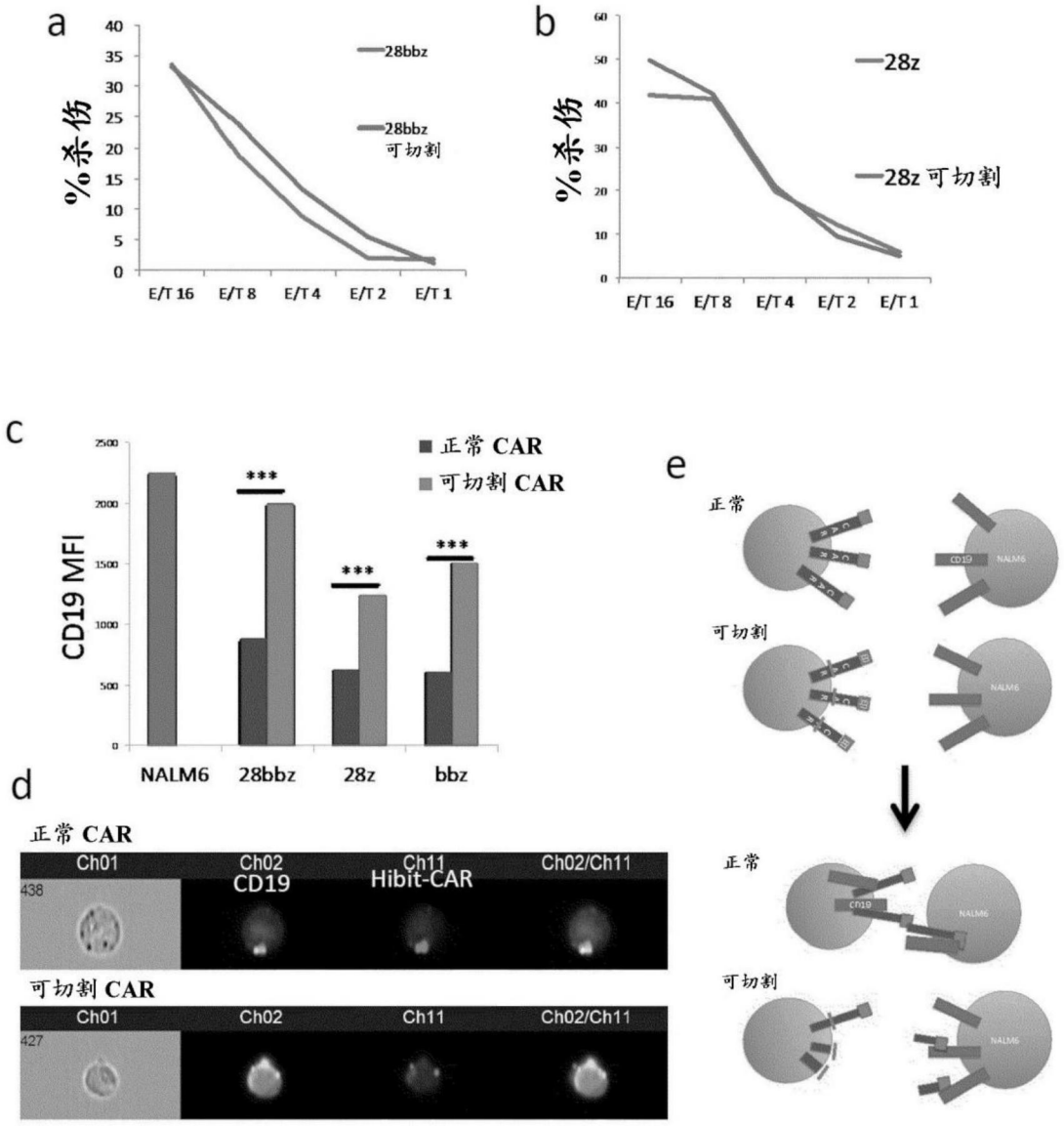

a
%杀伤
28bbz
28bbz 可切割
E/T 16
E/T 8
E/T 4
E/T 2
E/T 1
b
%杀伤
28z
28z 可切割
c
CD19 MFI
正常 CAR
可切割 CAR
***
NALM6
28bbz
28z
bbz
d
正常 CAR
Ch01
Ch02
CD19
Ch11
Hibit-CAR
Ch02/Ch11
可切割 CAR
e
正常
可切割
CD19
NALM6

图2

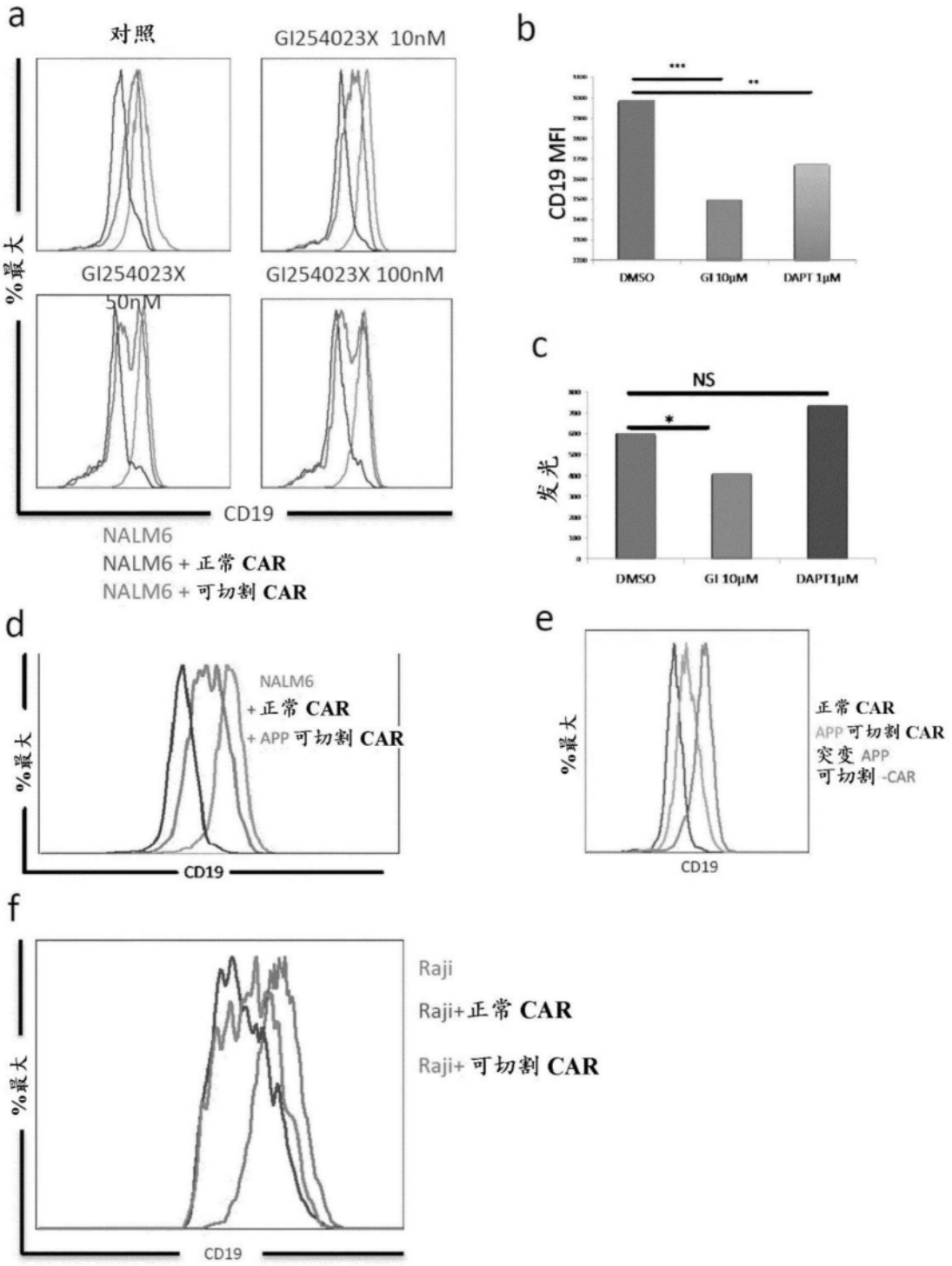

a
对照
GI254023X 10nM
GI254023X 50nM
GI254023X 100nM
%最大
CD19
NALM6
NALM6 + 正常 CAR
NALM6 + 可切割 CAR
b
CD19 MFI
***
**
DMSO
GI 10μM
DAPT 1μM
c
发光
NS
*
DMSO
GI 10μM
DAPT1μM
d
%最大
NALM6
+正常 CAR
+ APP 可切割 CAR
CD19
e
%最大
正常 CAR
APP 可切割 CAR
突变 APP
可切割 -CAR
CD19
f
%最大
Raji
Raji+正常 CAR
Raji+ 可切割 CAR
CD19

图3

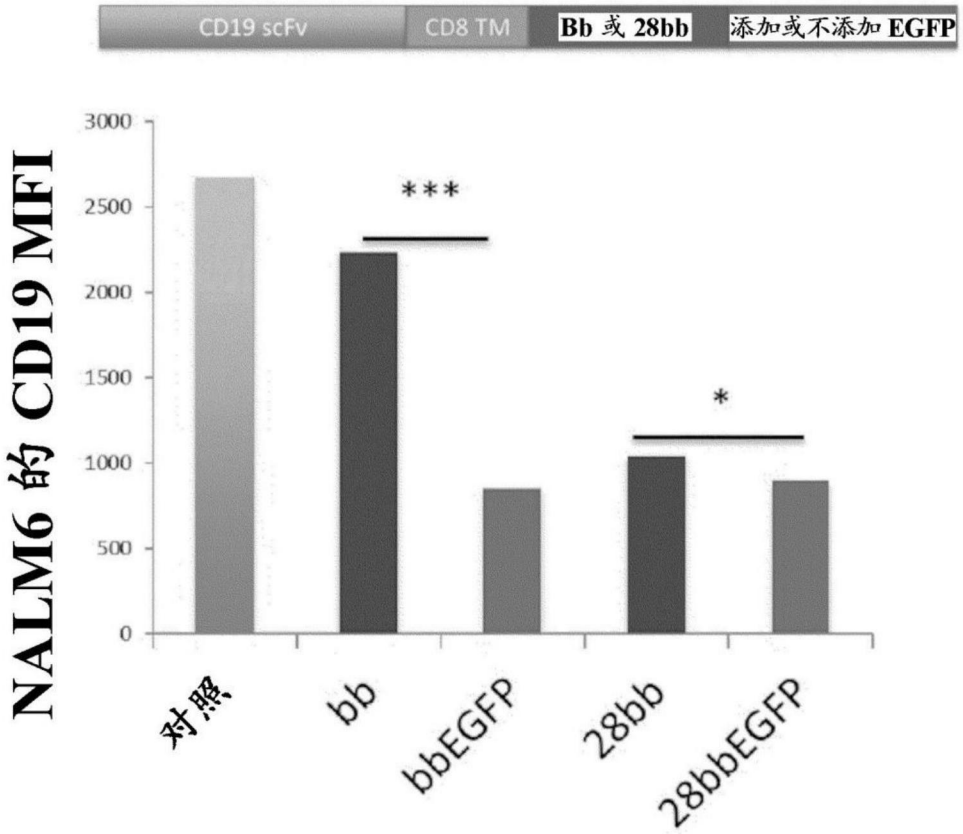

CD19 scFv
CD8 TM
Bb 或 28bb
添加或不添加 EGFP
NALM6 的 CD19 MFI
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
***
*
对照
bb
bbEGFP
28bb
28bbEGFP

图4

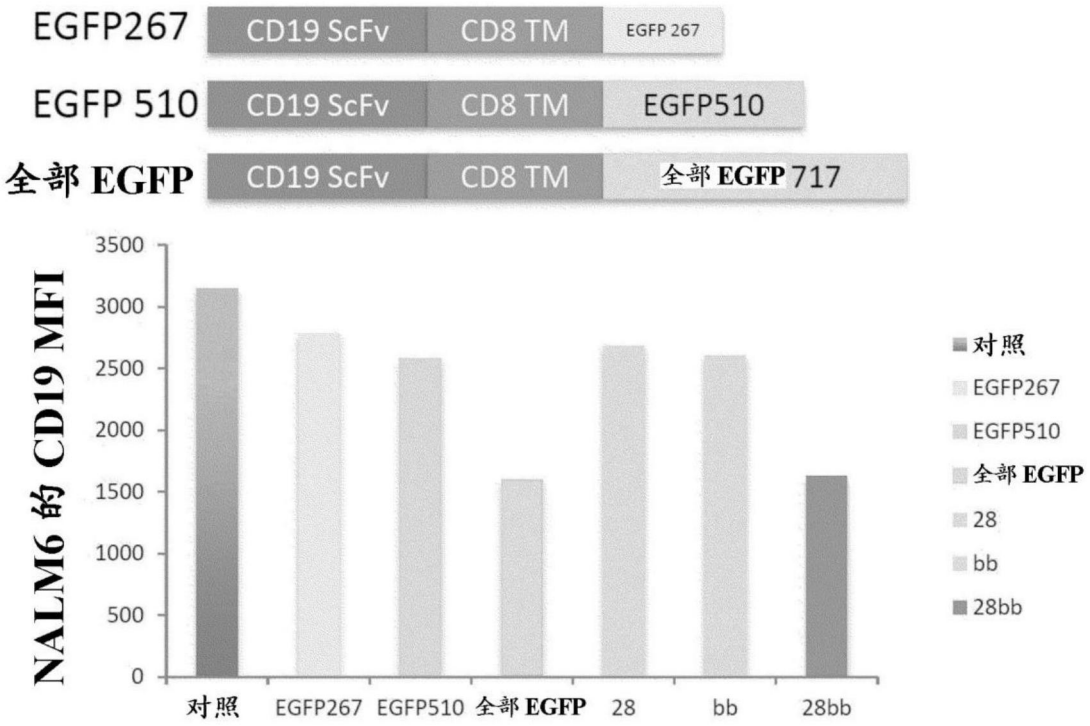

EGFP267
CD19 ScFv
CD8 TM
EGFP 267
EGFP 510
CD19 ScFv
CD8 TM
EGFP510
全部 EGFP
CD19 ScFv
CD8 TM
全部 EGFP 717
NALM6 的 CD19 MFI
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
对照
EGFP267
EGFP510
全部 EGFP
28
bb
28bb
对照
EGFP267
EGFP510
全部 EGFP
28
bb
28bb

图5

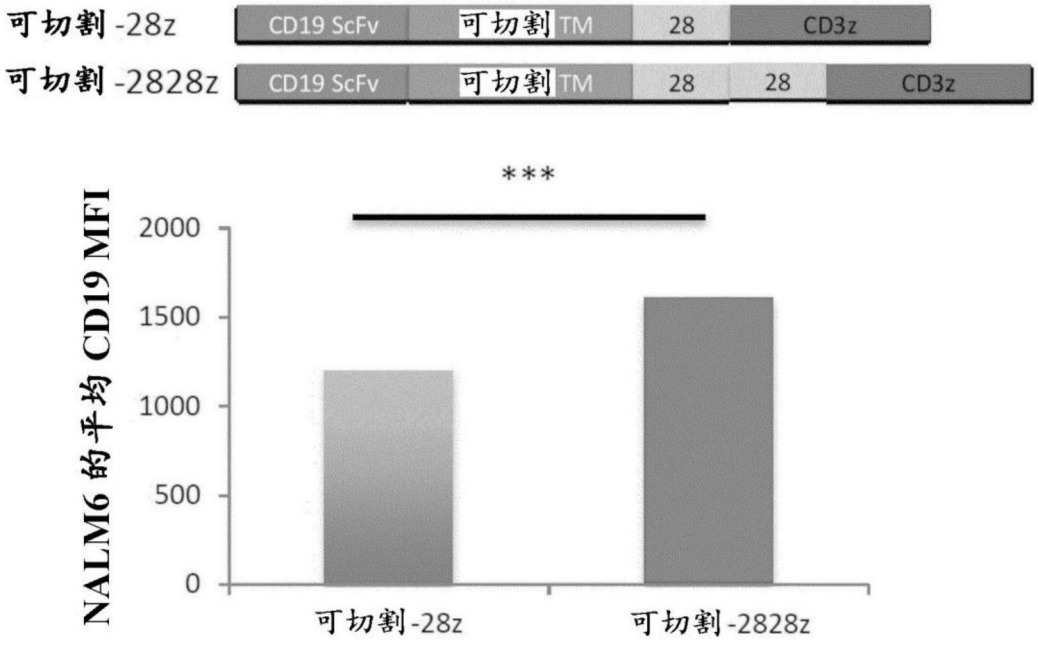

可切割-28z
CD19 ScFv
可切割TM
28
CD3z
可切割-2828z
CD19 ScFv
可切割TM
28
28
CD3z
***
NALM6 的平均 CD19 MFI
2000
1500
1000
500
0
可切割-28z
可切割-2828z

图6

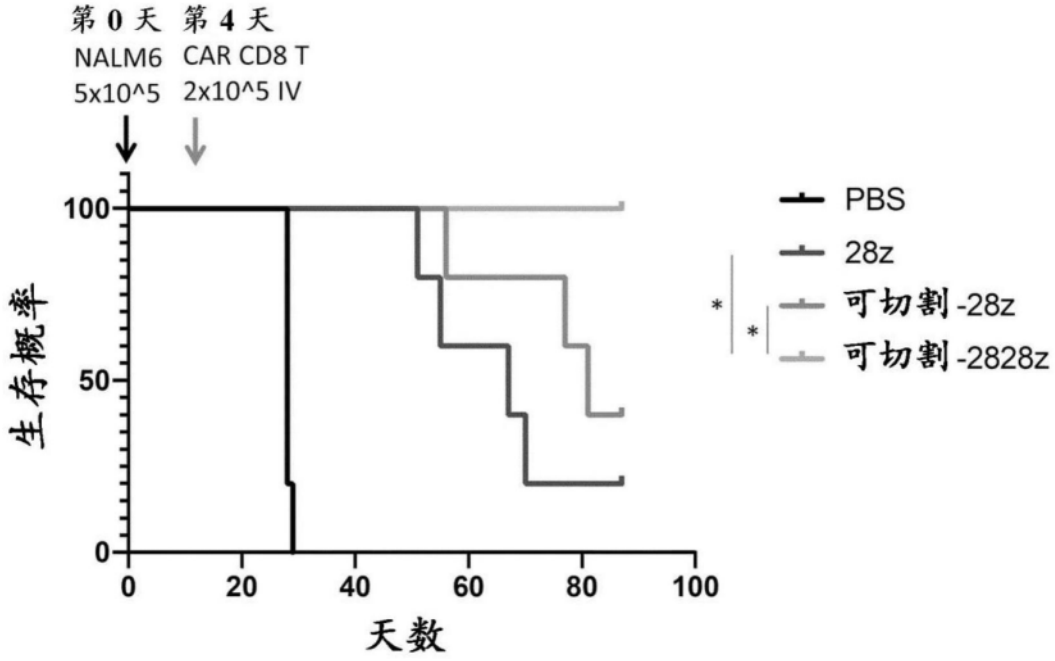

第 0 天
第 4 天
NALM6
5x10^5
CAR CD8 T
2x10^5 IV
生存概率
100
50
0
0
20
40
60
80
100
天数
PBS
28z
可切割-28z
可切割-2828z
*
*

图7

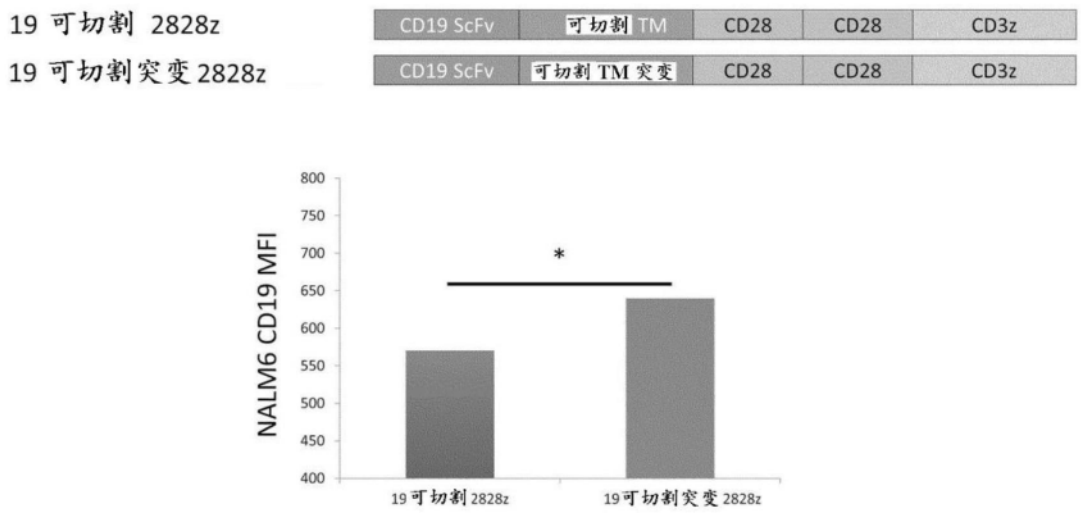

19 可切割 2828z
CD19 ScFv
可切割 TM
CD28
CD28
CD3z
19 可切割突变 2828z
CD19 ScFv
可切割 TM 突变
CD28
CD28
CD3z
NALM6 CD19 MFI
800
750
700
650
600
550
500
450
400
*
19 可切割 2828z
19 可切割突变 2828z

图8

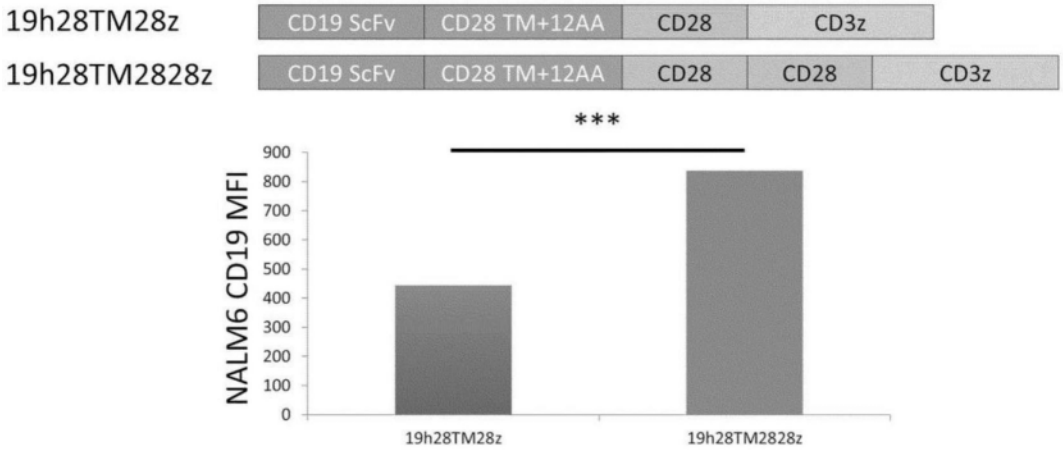

19h28TM28z
CD19 ScFv
CD28 TM+12AA
CD28
CD3z
19h28TM2828z
CD19 ScFv
CD28 TM+12AA
CD28
CD28
CD3z
***
NALM6 CD19 MFI
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
19h28TM28z
19h28TM2828z

图9

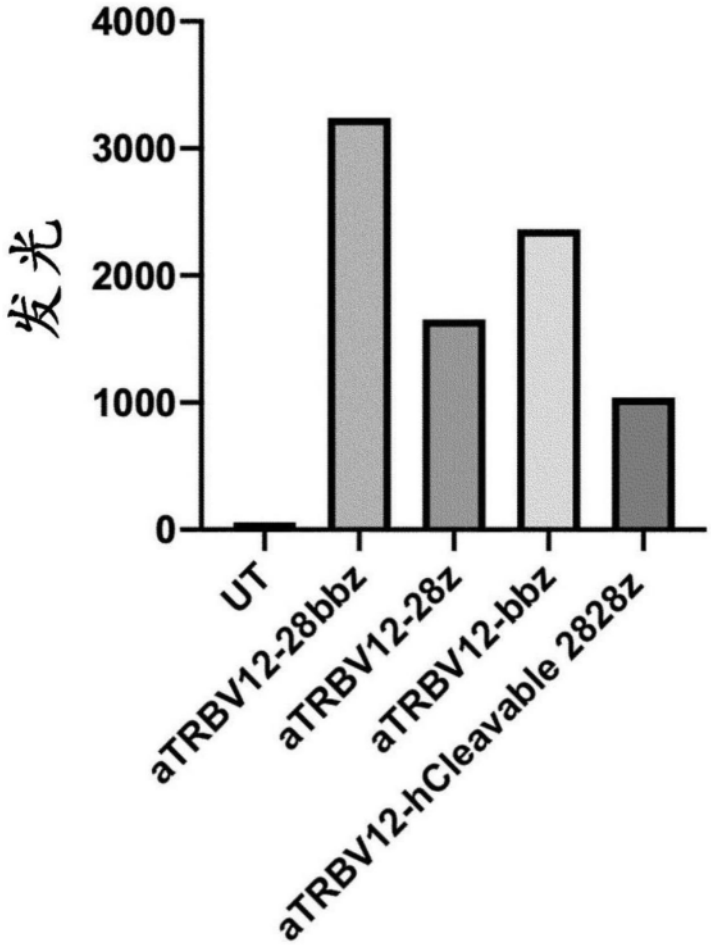

4000
3000
2000
1000
0
发光
UT
aTRBV12-28bbz
aTRBV12-28z
aTRBV12-bbz
aTRBV12-hCleavable 2828z

图10

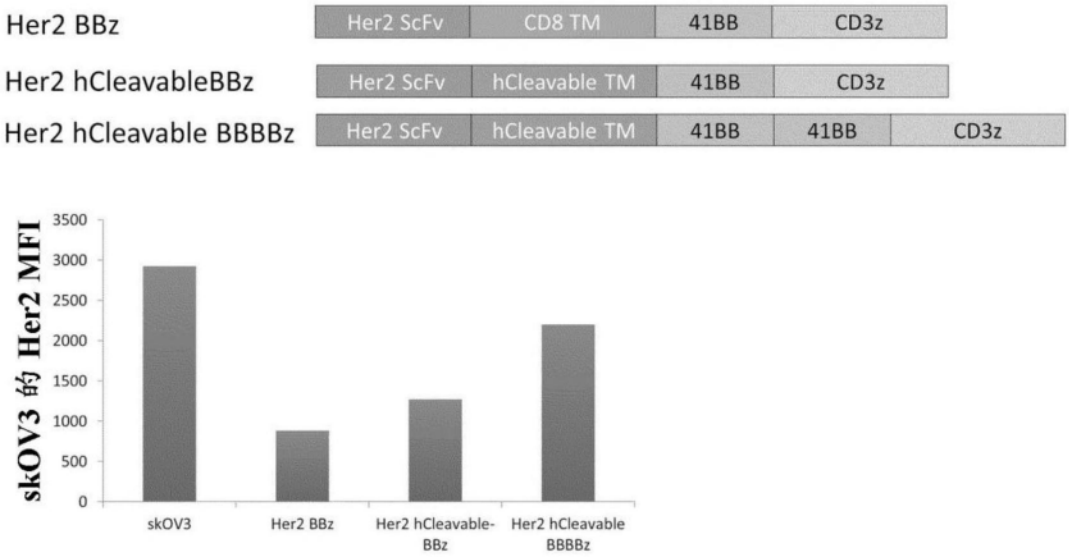

Her2 BBz
Her2 ScFv
CD8 TM
41BB
CD3z
Her2 hCleavableBBz
Her2 ScFv
hCleavable TM
41BB
CD3z
Her2 hCleavable BBBBz
Her2 ScFv
hCleavable TM
41BB
41BB
CD3z
skOV3 的 Her2 MFI
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
skOV3
Her2 BBz
Her2 hCleavable-BBz
Her2 hCleavable BBBBz

图11

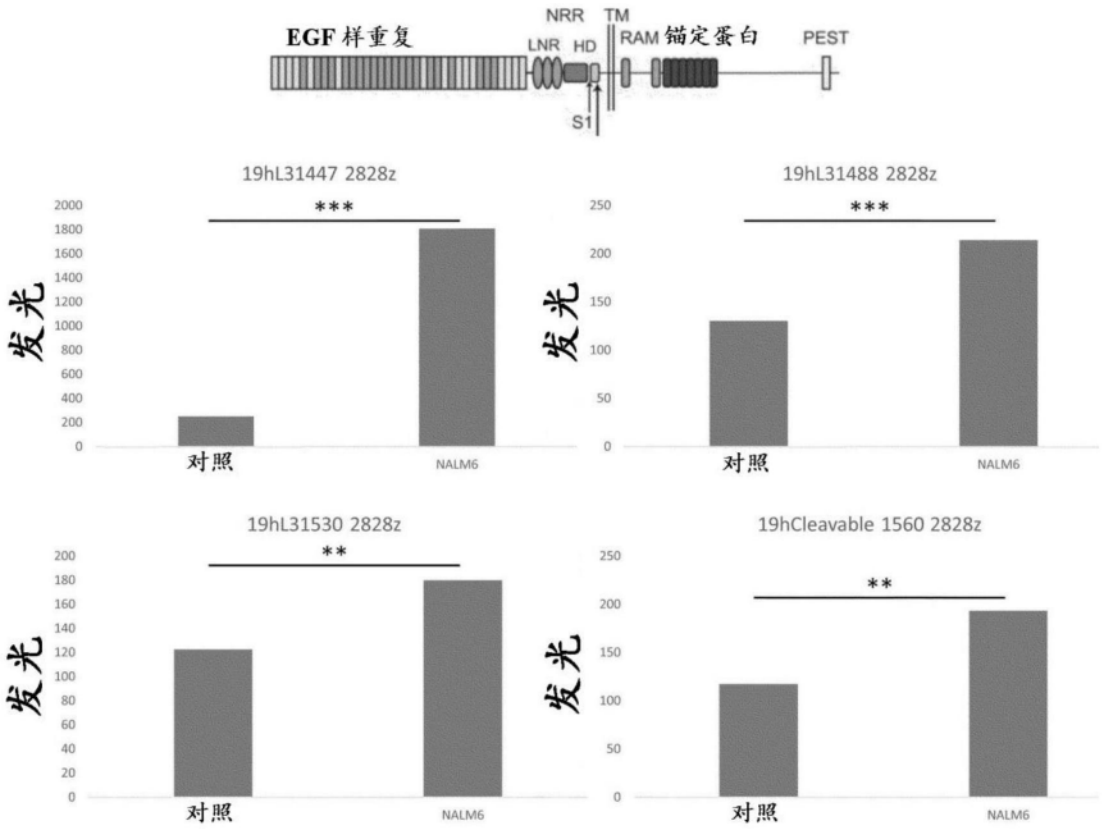

EGF样重复
NRR
TM
LNR
HD
RAM
锚定蛋白
PEST
S1
19hL31447 2828z
***
发光
对照
NALM6
19hL31488 2828z
***
发光
对照
NALM6
19hL31530 2828z
**
发光
对照
NALM6
19hCleavable 1560 2828z
**
发光
对照
NALM6

图12