



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I789348 B

(45)公告日：中華民國 112 (2023) 年 01 月 11 日

(21)申請案號：106108741

(22)申請日：中華民國 106 (2017) 年 03 月 16 日

(51)Int. Cl. : C12N5/0783 (2010.01)

C12N15/63 (2006.01)

A61K35/17 (2015.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2016/03/17 日本

特願 2016-053913

(71)申請人：日商諾伊爾免疫生物科技股份有限公司(日本) NOILE-IMMUNE BIOTECH INC.

(JP)

日本

(72)發明人：玉田耕治 TAMADA, KOJI (JP)；佐古田幸美 SAKODA, YUKIMI (JP)；安達圭志

ADACHI, KEISHI (JP)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

US 2014/255363A1

WO 2011/119773A1

網路文獻 Siegert, Stefanie, and Sanjiv A. Luther. "Positive and negative regulation of T cell responses by fibroblastic reticular cells within paracortical regions of lymph nodes. *Frontiers in immunology* 3 (2012) : 285.

網路文獻 Jones, Benjamin S., et al. "Improving the safety of cell therapy products by suicide gene transfer." *Frontiers in pharmacology* 5 (2014) : 254.

審查人員：余家嫻

申請專利範圍項數：6 項 圖式數：8 共 50 頁

(54)名稱

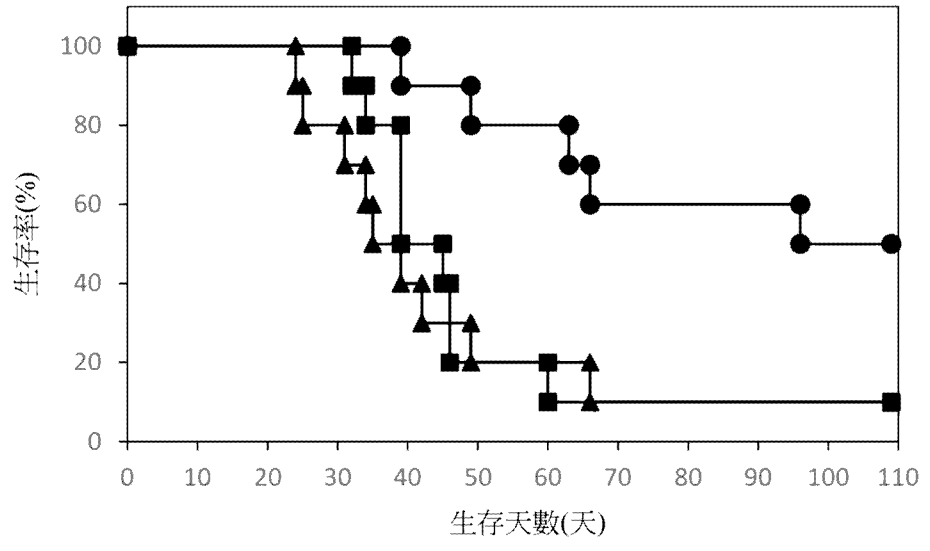
表現免疫機能控制因子之免疫活性細胞及表現載體

(57)摘要

本發明之課題在於提供一種於免疫活性細胞中表現免疫活性細胞之免疫機能控制因子，兼具增生能力、生存能力、及 T 細胞之集聚能力之免疫活性細胞、及用以製作該表現免疫活性細胞之免疫機能控制因子載體。製作免疫活性細胞，該免疫活性細胞表現特異性地識別癌抗原之細胞表面分子、介白素 7(IL-7)、及 CCL19。較佳的是特異性地識別癌抗原之細胞表面分子為特異性地識別癌抗原之 T 細胞受體，或免疫活性細胞為 T 細胞。

指定代表圖：

小鼠生存曲線



【圖7】



公告本

申請日：106/03/16

I789348

【發明摘要】

IPC分類：*C12N 5/0783* (2010.01)
C12N 15/63 (2006.01)
A61K 35/17 (2015.01)
A61P 35/00 (2006.01)

【中文發明名稱】

表現免疫機能控制因子之免疫活性細胞及表現載體

【中文】

本發明之課題在於提供一種於免疫活性細胞中表現免疫活性細胞之免疫機能控制因子，兼具增生能力、生存能力、及T細胞之集聚能力之免疫活性細胞、及用以製作該表現免疫活性細胞之免疫機能控制因子載體。

製作免疫活性細胞，該免疫活性細胞表現特異性地識別癌抗原之細胞表面分子、介白素7(IL-7)、及CCL19。較佳的是特異性地識別癌抗原之細胞表面分子為特異性地識別癌抗原之T細胞受體，或免疫活性細胞為T細胞。

【指定代表圖】

圖7

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

表現免疫機能控制因子之免疫活性細胞及表現載體

【技術領域】

本發明係關於一種表現特異性地識別癌抗原之細胞表面分子、介白素7(IL-7)、及CCL19之免疫活性細胞、及含有該免疫活性細胞之抗癌劑、及用以製作該表現免疫活性細胞之載體。

【先前技術】

癌症係全世界罹患者眾多之疾病，一般而言，業界廣泛採用化學療法、放射線療法、或外科療法。然而，存在產生副作用、或喪失一部分機能、或難以對轉移進行治療等各種問題。

因此，為了進一步將患者之QOL(Quality Of Life，生活品質)維持為較高，近年來進行了免疫療法之開發。於該免疫療法中，免疫細胞療法係從患者採集免疫活性細胞，將該免疫活性細胞以提高其免疫機能之方式加以處置並擴增，再次移入至患者體內之療法。具體而言，已知有從患者採集T細胞，向該T細胞中導入編碼CAR之基因進行擴增，再次移入至患者體內之療法(參照非專利文獻1)。該療法目前正於全世界進行臨床試驗，獲得了於白血病及淋巴瘤等造血器官惡性腫瘤等中顯示出有效性之結果。

又，作為T細胞等免疫活性細胞之免疫機能控制因子，已知有細胞激素、趨化激素、訊息控制蛋白質等至少數百種因子。其中，已知介白素7(IL-7)係T細胞生存所必須之細胞激素，其係由骨髓、胸腺、淋巴器官/組織之基質細胞等非造血細胞所產生。作為該利用IL-7之機能之T細胞，

揭示有表現將IL-7與IL-7R α 融合而成之嵌合體細胞激素受體的T細胞(參照專利文獻1)。然而，該T細胞中之嵌合體細胞激素受體不過是作為一個融合蛋白，限定於所導入之T細胞之膜表面進行表現，僅對自體之細胞不依賴配體而傳遞IL-7R等細胞激素訊息，無法提高未導入上述受體之T細胞之機能。

又，揭示有CCL19或CCL21、IL-7之表現降低會導致SIRP(Signal Regulatory Protein，訊息調節蛋白) α 變異小鼠之脾臟中之T細胞區之維持缺陷(參照非專利文獻2)，及CCL19或CCL21、IL-7具有於二次淋巴組織(脾臟或淋巴結)中維持T細胞之恆常性之作用(參照非專利文獻3)。然而，上述非專利文獻2、3係顯示出對於恆常地存在於二次淋巴組織之T細胞區中之非活化T細胞之作用，並非顯示出與抗腫瘤免疫應答之直接關聯性。進而，上述非專利文獻2、3中之CCL19或CCL21、IL-7表現細胞係存在於二次淋巴組織中之網狀內皮系統之細胞而非T細胞。

另一方面，T細胞受體(T cell receptor，以下，亦稱為「TCR」)係於T細胞之細胞膜上表現之抗原受體分子。已知係以包含 α 鏈與 β 鏈、或 γ 鏈與 δ 鏈之異型二聚物之形式存在，藉由對與主要組織相容性因複合體(MHC)分子結合而成之抗原分子進行識別，而將T細胞活化。

業界不斷進行如下免疫療法之開發，即，應用該TCR之機能，將可識別於癌細胞中進行表現之腫瘤抗原之TCR基因導入至從癌症患者獲得之T細胞中，於擴增後再次移入至患者體內。具體而言，揭示有一種腦膜瘤治療用醫藥組合物，其含有表現特異性地識別WT1表現細胞之TCR之細胞(參照專利文獻2)。

於上述技術之一部分中雖然存在確認到具有針對造血器官惡性腫瘤

之抗腫瘤效果者，但尚無對實體癌顯示出顯著效果之例。考慮到所移入之免疫活性細胞於活體內之生存效率較低、或者由所移入之免疫活性細胞誘導之內源性免疫活性細胞之活化、或向腫瘤局部之集聚不充分之問題，而謀求開發出解決該等之技術。

[先前技術文獻]

[專利文獻]

專利文獻1：國際公開第2013/123061號說明書

專利文獻2：日本專利特開2013-116891號公報

非專利文獻1：中澤洋三 信州醫志 61 (4)： 197～203 (2013)

非專利文獻2：SATO-HASHIMOTO M. et al., J. Immunol., 2011, vol. 187, no. 1, 291-7

非專利文獻3：SIEGERT S. et al., Front. Immunol., 2012, vol. 3, article 285

【發明內容】

[發明所欲解決之問題]

於先前之免疫療法中所使用之免疫活性細胞中，內源性免疫活性細胞之免疫誘導效果、或免疫活性細胞之增生能力、生存能力、或T細胞之集聚能力未得到充分地增強。因此，本發明之課題在於提供一種於免疫活性細胞中表現免疫活性細胞之免疫機能控制因子，兼具增生能力、生存能力、及T細胞之集聚能力之免疫活性細胞、及用以製作該免疫活性細胞之免疫機能控制因子表現載體。

[解決問題之技術手段]

發明者等人為了於利用免疫活性細胞之癌症免疫療法中，達成更優

異之免疫誘導效果或抗腫瘤活性，而嘗試改良表現免疫機能控制因子之細胞。於該過程中，著眼於作為控制免疫活性細胞之免疫機能之因子的細胞激素、趨化激素、訊息控制蛋白質，而構建表現上述控制免疫活性細胞之免疫機能之因子的載體。將該表現載體導入至免疫活性細胞中，結果發現，可製作具有較先前之免疫活性細胞更優異之免疫誘導效果、增生能力、生存能力以及T細胞之集聚能力的免疫活性細胞，從而完成本發明。

即，本發明如以下之(1)至(9)所揭示。

(1)一種免疫活性細胞，其表現特異性地識別癌抗原之細胞表面分子、介白素7(IL-7)、及CCL19。

(2)如上述(1)中所記載之免疫活性細胞，其特徵在於：特異性地識別癌抗原之細胞表面分子為特異性地識別癌抗原之T細胞受體。

(3)如上述(1)或(2)中所記載之免疫活性細胞，其特徵在於：免疫活性細胞為T細胞。

(4)如上述(1)至(3)之任一項中所記載之免疫活性細胞，其特徵在於：癌抗原為WT1、MART-1、NY-ESO-1、MAGE(Melanoma antigen，黑色素瘤抗原)-A1、MAGE-A3、MAGE-A4、磷脂醯肌醇蛋白聚糖(Glypican)-3、KIF20A、存活蛋白(Survivin)、AFP(Alpha Fetal Protein， α -胎蛋白)-1、gp100、MUC1、PAP-10、PAP-5、TRP2-1、SART-1、VEGFR(Vascular Endothelial Growth Facotr Receptor，血管內皮生長因子受體)1、VEGFR2、NEIL3、MPHOSPH1、DEPDC1、FOXMI、CDH3、TTK、TOMM34、URLC10、KOC1、UBE2T、TOPK、ECT2、間皮素(MESOTHELIN)、NKG2D、P1A、GD2、或GM2。

(5)一種表現載體，其係用以製作如上述(1)至(4)之任一項中所記載之免疫活性細胞的以下之(a)至(e)中之任一種：

(a)含有編碼特異性地識別癌抗原之細胞表面分子之核酸、編碼IL-7之核酸、及編碼CCL19之核酸之表現載體；

(b)以下之(b-1)及(b-2)之2種表現載體：

(b-1)含有編碼特異性地識別癌抗原之細胞表面分子之核酸之表現載體；

(b-2)含有編碼IL-7之核酸、及編碼CCL19之核酸之表現載體；

(c)以下之(c-1)及(c-2)之2種表現載體：

(c-1)含有編碼特異性地識別癌抗原之細胞表面分子之核酸、及編碼IL-7之核酸之表現載體；

(c-2)含有編碼CCL19之核酸之表現載體；

(d)以下之(d-1)及(d-2)之2種表現載體：

(d-1)含有編碼IL-7之核酸之表現載體；

(d-2)含有編碼特異性地識別癌抗原之細胞表面分子之核酸、及編碼CCL19之核酸之表現載體；

(e)以下之(e-1)、(e-2)及(e-3)之3種表現載體：

(e-1)含有編碼特異性地識別癌抗原之細胞表面分子之核酸之表現載體；

(e-2)含有編碼IL-7之核酸之表現載體；

(e-3)含有編碼CCL19之核酸之表現載體。

(6)如上述(5)中所記載之表現載體，其特徵在於：特異性地識別癌抗原之細胞表面分子為特異性地識別癌抗原之T細胞受體。

(7)如上述(5)或(6)中所記載之表現載體，其特徵在於：(a)之表現載體中之編碼特異性地識別癌抗原之細胞表面分子之核酸、編碼IL-7之核酸、及編碼CCL19之核酸，

(b-2)之表現載體中之編碼IL-7之核酸、及編碼CCL19之核酸，

(c-1)之表現載體中之編碼特異性地識別癌抗原之細胞表面分子之核酸、及編碼IL-7之核酸，或

(d-2)之表現載體中之編碼特異性地識別癌抗原之細胞表面分子之核酸、及編碼CCL19之核酸係經由自裂解型肽而連結。

(8)如上述(5)至(7)之任一項中所記載之表現載體，其特徵在於：含有編碼自殺基因之核酸。

(9)一種抗癌劑，其含有如上述(1)至(4)之任一項中所記載之免疫活性細胞與藥學上所容許之添加劑。

[發明之效果]

若使用本發明之表現特異性地識別癌抗原之細胞表面分子、IL-7、及CCL19之免疫活性細胞(以下，亦稱為「IL-7×CCL19表現免疫活性細胞」)，則具有抗腫瘤活性，可抑制由具有細胞表面分子特異性地識別之抗原的癌細胞所形成之腫瘤所引起之生存率降低。又，若使用本發明之表現載體，則可製作兼具增生能力、生存能力及T細胞集聚能力之免疫活性細胞。

【圖式簡單說明】

圖1係表示IL-7×CCL19表現載體之遺傳圖的圖。

圖2A係表示調查IL-7/CCL19表現T細胞之細胞數所獲得之結果的圖。

圖2B係表示調查IL-7/CCL19表現T細胞之生存率所獲得之結果的圖。

圖3係表示利用IL-7/CCL19表現T細胞所進行之T細胞遷移試驗之結果的圖。

圖4係表示IL-7×CCL19×HSV-TK表現載體之遺傳圖的圖。

圖5係表示TCR×IL-7×CCL19表現載體之遺傳圖的圖。

圖6係表示IL-7×CCL19×eGFP(enhanced green fluorescent protein, 強化型綠色螢光蛋白)表現載體之遺傳圖的圖。

圖7係表示未處理小鼠、投予有P1A特異性TCR/eGFP表現T細胞之小鼠、及投予有P1A特異性TCR/IL-7/CCL19/eGFP表現T細胞之小鼠之生存率的圖。

圖8係表示調查未處理小鼠、投予有P1A特異性TCR/eGFP表現T細胞之小鼠、及投予有P1A特異性TCR/IL-7/CCL19/eGFP表現T細胞之小鼠之腫瘤體積所獲得之結果的圖。

【實施方式】

本發明之IL-7×CCL19表現免疫活性細胞只要表現特異性地識別癌抗原之細胞表面分子、介白素7(IL-7)、及CCL19, 則無特別限制, 進而亦可表現IL-15、CCL21、IL-2、IL-4、IL-12、IL-13、IL-17、IL-18、IP-10、CCL4、Flt3L、干擾素- γ 、MIP(Macrophage Inflammatory Protein, 巨噬細胞炎性蛋白)-1 α 、GM-CSF(Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor, 顆粒球巨噬細胞群落刺激因子)、M-CSF(Macrophage Colony Stimulating Factor, 巨噬細胞群落刺激因子)、TGF(Transforming Growth Factor, 轉化生長因子)- β 、TNF(Tumor

Necrosis Factor，腫瘤壞死因子)- α 等其他免疫機能控制因子。

所謂癌抗原係指於在癌細胞中較正常細胞更高地進行表現、或者於癌細胞中特異性地進行表現之蛋白質、糖脂質等物質，作為該癌抗原，可列舉：腫瘤相關抗原或癌睪丸抗原、血管新生相關抗原、因基因變異而產生之癌新生抗原(新抗原)之抗原決定肽，具體而言，可列舉：WT1、MART-1、NY-ESO-1、MAGE-A1、MAGE-A3、MAGE-A4、磷脂醯肌醇蛋白聚糖-3、KIF20A、存活蛋白、AFP-1、gp100、MUC1、PAP-10、PAP-5、TRP2-1、SART-1、VEGFR1、VEGFR2、NEIL3、MPHOSPH1、DEPDC1、FOXO1、CDH3、TTK、TOMM34、URLC10、KOC1、UBE2T、TOPK、ECT2、間皮素、NKG2D、P1A等蛋白質、或GD2、GM2等糖脂質，但並不限定於此。

作為特異性地識別癌抗原之細胞表面分子，可列舉特異性地識別癌抗原之細胞表面受體、人工受體、黏著因子，可適宜地列舉特異性地識別癌抗原之T細胞受體或特異性地識別癌抗原之嵌合體抗原受體(CAR)等藉由在細胞表面進行表現而賦予針對癌症之特異性之識別能力之分子，可更適宜地列舉TCR。作為TCR，只要特異性地識別癌抗原，則可為包含 α 鏈及 β 鏈之異型二聚物(α/β -TCR)，亦可為包含 γ 鏈及 δ 鏈之異型二聚物(γ/δ -TCR)。再者，關於特異性地識別癌抗原之細胞表面分子，只要癌抗原之識別為特異性，則可為間接地進行識別者。例如，與本發明之免疫活性細胞同時或連續地向對象投予特異性地識別癌抗原之抗體等分子，對該抗體等分子進行識別、或對抗體等分子上所標記之標籤進行識別，藉此本發明之免疫活性細胞可間接地特異性地識別癌抗原。作為識別抗體之情形之例，作為細胞表面分子，可列舉CD16

等，作為抗體等分子上所標記之標籤之例，可列舉FITC(fluorescein isothiocyanate，螢光異硫氰酸鹽)等。

作為本發明之IL-7×CCL19表現免疫活性細胞中之免疫活性細胞之種類，只要為與免疫應答相關之細胞即可，可列舉：T細胞、自然殺手細胞(NK細胞)、B細胞等淋巴球系細胞、或單核球、巨噬細胞、樹狀細胞等抗原呈現細胞、或嗜中性球、嗜酸性球、嗜鹼性球、肥胖細胞等粒細胞，可適宜地列舉源自人類、狗、貓、豬、小鼠等哺乳動物之T細胞，較佳為源自人類之T細胞。又，T細胞可從浸潤於血液、骨髓液等體液、或脾臟、胸腺、淋巴結等組織、或者原發腫瘤、轉移性腫瘤、癌性腹水等癌組織中之免疫細胞進行單離、精製而獲得，又，亦可利用由ES細胞(embryonic stem cells，胚胎幹細胞)或iPS細胞(induced pluripotent stem cells，誘導性多功能幹細胞)製作而成者。作為該T細胞，可列舉： α/β -T細胞、 γ/Δ -T細胞、CD8⁺T細胞、CD4⁺T細胞、腫瘤浸潤T細胞、記憶T細胞、初始T細胞、NKT細胞。

作為本發明之IL-7×CCL19表現免疫活性細胞之製作方法，可列舉下述將本發明之表現載體導入至免疫活性細胞中而製作之方法。或者，亦可列舉對於受精卵、ES細胞、或iPS細胞，導入表現特異性地識別癌抗原之細胞表面分子、介白素7(IL-7)、及/或CCL19之載體後進行誘導而製作之方法；或從藉由基因導入特異性地識別癌抗原之細胞表面分子而表現之基因轉殖哺乳動物分離得之免疫活性細胞，對該免疫活性細胞進而視需要導入表現特異性地識別癌抗原之細胞表面分子、介白素7(IL-7)、及/或CCL19的載體而製作之方法。

作為將下述本發明之表現載體導入至上述免疫活性細胞中而製作之

方法，並無特別限制，可列舉藉由病毒感染法、磷酸鈣法、脂質體轉染法、顯微注射法、電穿孔法等公知方法進行導入之方法，可適宜地列舉藉由病毒感染法進行導入之方法。

作為病毒感染法，可列舉使本發明之表現載體與包裝質體轉染至GP2-293細胞(TAKARA BIO公司製造)、Plat-GP細胞(Cosmobio公司製造)、PG13細胞(ATCC CRL-10686)、PA317細胞(ATCC CRL-9078)等包裝細胞而製作重組病毒，並使免疫活性細胞感染該重組病毒之方法，可使用Retrovirus packagin Kit Eco(反轉錄病毒包裝套組Eco)(TAKARA BIO公司製造)等市售之套組而進行。

又，本發明之免疫活性細胞可藉由如下方法而製作：使用公知之基因編輯技術，以於適當之啟動子之控制下能夠進行表現之方式將包含編碼特異性地識別癌抗原之細胞表面分子、IL-7、及CCL19之鹼基序列之聚核苷酸組入至細胞之基因組中。作為公知之基因編輯技術，可列舉使用鋅指核酸酶、TALEN(Transcription Activator-like Effector Nuclease，類轉錄活化因子效應物核酸酶)、CRISPR(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat，成簇規律間隔短回文重複)-Cas系統等內核酸酶之技術。於本發明之免疫活性細胞中表現其他外來蛋白質之情形亦同樣地可使用基因編輯技術，以於適當之啟動子之控制下能夠進行表現之方式將包含編碼其他外來蛋白質之鹼基序列之聚核苷酸組入至細胞之基因組中。作為以於適當之啟動子之控制下能夠進行表現之方式將聚核苷酸組入至細胞基因組中之方法，可列舉：將編碼特異性地識別癌抗原之細胞表面分子、IL-7、及CCL19(或其他蛋白質)之鹼基序列機能性地連結於適當之啟動子之下游，將所獲得之聚核苷酸(即，以於該啟動子之控制下能夠進行表現

之方式連結編碼序列之聚核苷酸)組入至細胞基因組之非編碼區等之方法；將包含編碼特異性地識別癌抗原之細胞表面分子、IL-7、及CCL19(或其他蛋白質)之鹼基序列的聚核苷酸組入至細胞基因組之內源性啟動子之下游之方法等。作為內源性啟動子，例如可列舉TCR α 、TCR β 之啟動子等。

又，亦可設法於本發明之IL-7 \times CCL19表現免疫活性細胞中，表現下述單純疱疹病毒之胸苷激酶(HSV-TK)或誘導性半胱天冬酶9(inducible caspase 9)。

本發明之IL-7 \times CCL19表現免疫活性細胞由於表現特異性地識別癌抗原之細胞表面分子、IL-7、及CCL19，故而增生能力、生存能力、及內源性T細胞之集聚能力較高，可應用於使用有各種免疫活性細胞之過繼免疫療法。作為過繼免疫療法之例，可列舉：樹狀細胞療法、NK細胞療法、 γ/Δ -T細胞療法、 α/β -T細胞療法、CTL(Cytotoxic T Lymphocyte，細胞毒性T淋巴細胞)療法、TIL(Tumor Infiltrating Lymphocyte，腫瘤浸潤T淋巴細胞)療法等，但並不限定於此。可列舉向從患者採集之免疫活性細胞中導入下述本發明之表現載體進行擴增，並投予患者之方法。以下，列舉具體之例，但並不限定於此。樹狀細胞療法包括向由從患者採集之單核球分化之樹狀細胞中，導入手術摘取之癌組織或其溶菌產物，並向患者之體內投予之步驟，但亦可包括將本發明之表現載體導入至樹狀細胞中之步驟。此處，亦可人工地合成並利用癌抗原分子之抗原決定肽代替上述癌組織或溶菌產物。NK細胞療法包括對從患者採集之淋巴球，利用IL-2等複數種刺激物質使NK細胞活化並增生，再向患者投予之步驟，但亦可包括將本發明之載體導入至NK細胞中之步驟。再者，藉由將針對癌症之抗體

醫藥與活化之NK細胞併用，可期待高效率地進攻癌細胞之效果。 γ/Δ -T細胞療法包括利用IL-2或唑來膦酸對從患者採集之淋巴球進行培養刺激，使 γ/Δ -T細胞增生，再向患者投予之步驟，但亦可包括將本發明之表現載體導入至 γ/Δ -T細胞中之步驟。 α/β -T細胞療法包括利用抗CD3抗體或IL-2培養從患者採集之淋巴球，並進行活化，向患者投予所獲得之 α/β -T細胞之步驟，但亦可包括將本發明之表現載體導入至 α/β -T細胞中之步驟。CTL療法包括利用從患者採集之癌細胞刺激從患者採集之淋巴球，並添加抗CD3抗體或IL-2進行培養，於癌細胞中使特異性之CTL增生，再向患者投予之步驟，但亦可包括將本發明之表現載體導入至CTL中之步驟。又，亦可利用呈現癌抗原抗原決定肽之抗原呈現細胞代替上述癌細胞。TIL療法包括從自患者採集之癌組織採集淋巴球，利用IL-2等進行刺激、培養，再向患者投予之步驟，但亦可包括將本發明之表現載體導入至淋巴球中之步驟。

本發明之表現載體為用以製作上述本發明之IL-7 \times CCL19表現免疫活性細胞的以下之(a)至(e)中之任一種。

(a)含有編碼特異性地識別癌抗原之細胞表面分子之核酸、編碼IL-7之核酸、及編碼CCL19之核酸之表現載體；

(b)以下之(b-1)及(b-2)之2種表現載體：

(b-1)含有編碼特異性地識別癌抗原之細胞表面分子之核酸之表現載體；

(b-2)含有編碼IL-7之核酸、及編碼CCL19之核酸之表現載體；

(c)以下之(c-1)及(c-2)之2種表現載體：

(c-1)含有編碼特異性地識別癌抗原之細胞表面分子之核酸、及編碼

IL-7之核酸之表現載體；

(c-2)含有編碼CCL19之核酸之表現載體；

(d)以下之(d-1)及(d-2)之2種表現載體；

(d-1)含有編碼IL-7之核酸之表現載體；

(d-2)含有編碼特異性地識別癌抗原之細胞表面分子之核酸、及編碼CCL19之核酸之表現載體；

(e)以下之(e-1)、(e-2)及(e-3)之3種表現載體；

(e-1)含有編碼特異性地識別癌抗原之細胞表面分子之核酸之表現載體；

(e-2)含有編碼IL-7之核酸之表現載體；

(e-3)含有編碼CCL19之核酸之表現載體。

本發明之表現載體亦可進而含有編碼IL-15、CCL21、IL-2、IL-4、IL-12、IL-13、IL-17、IL-18、IP-10、CCL4、Flt3L、干擾素(Interferon)- γ 、MIP-1 α 、GM-CSF、M-CSF、TGF- β 、TNF- α 等其他免疫機能控制因子之核酸。

上述編碼特異性地識別癌抗原之細胞表面分子之核酸、編碼介白素7(IL-7)之核酸、及編碼CCL19之核酸分別可列舉源自哺乳動物之核酸，可適宜地列舉源自人類之核酸。上述各核酸可根據導入本發明之表現載體之細胞之種類而適當加以選擇，該各核酸之序列資訊可檢索公知之文獻或NCBI(National Center of Biotechnology Information，美國國家生物技術信息中心)(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>)等資料庫而適當獲取。

作為上述編碼特異性地識別癌抗原之細胞表面分子之核酸，可適宜

地列舉源自人類之核酸。該編碼特異性地識別癌抗原之細胞表面分子之核酸可列舉編碼T細胞受體(TCR)之核酸或編碼嵌合體抗原受體(CAR)之核酸，可為源自天然之核酸，亦可為人工合成之核酸，可根據導入本發明之表現載體之細胞之種類而適當加以選擇，序列資訊可檢索公知之文獻或NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>)等資料庫而適當獲取。

編碼特異性地識別癌抗原之細胞表面分子之核酸、編碼IL-7之核酸及編碼CCL19之核酸可藉由基於編碼各者之核酸之鹼基序列之資訊進行化學合成之方法、或藉由PCR(Polymerase Chain Reaction，聚合酶鏈反應)進行擴增之方法等公知之技術而製作。再者，用以編碼胺基酸之所選擇之密碼子可為了使目標之宿主細胞中之核酸之表現最佳化而進行改形。

作為上述編碼TCR之核酸中之TCR，可為包含 α 鏈及 β 鏈之異型二聚物(α/β -TCR)，亦可為包含 γ 鏈及 Δ 鏈之異型二聚物(γ/Δ -TCR)。再者，編碼 α/β -TCR之核酸包括編碼TCR之 α 鏈之核酸與編碼 β 鏈之核酸之兩者，編碼 γ/Δ -TCR之核酸包括編碼TCR之 γ 鏈之核酸與編碼 Δ 鏈之核酸之兩者。

上述編碼TCR之核酸之序列資訊可藉由使用該技術領域中之公知方法，根據作為使用特定抗原肽而誘導之CTL之TCR次單元的 α 鏈及 β 鏈之核酸進行鑑定(國際公開第2007/032255號說明書、及Morgan et al., *J Immunol*, 171, 3288 (2003))。例如，為了分析TCR，較佳為PCR法。用於分析之PCR引子例如可為作為5'側引子之5'-R引子(5'-gtctaccagcattcgcttcat-3'：序列編號3)、及作為3'側引子之對TCR α 鏈C區具有特異性之3-TRa-C引子(5'-tcagctggaccacagccgcagcgt-3'：序列編號4)、對TCR β 鏈C1區具有特異性之3-TRb-C1引子(5'-tcagaaatcctttctcttgac-3'：序列編號5)、或對TCR β 鏈C2區具有特異性之3-TR β -C2引子(5'-

ctagcctctggaatcctttctctt-3'：序列編號6)，但並不限定於該等。TCR衍生物可以較高之結合力與呈現抗原肽之靶細胞結合，且可任意地於活體內(in vivo)及活體外(in vitro)介導呈現抗原肽之靶細胞之有效率之殺傷。

作為上述編碼TCR之核酸，例如只要可識別MART1特異性TCR(Cancer Res. 54, 5265-5268 (1994))、MAGE-A3特異性TCR(Anticancer Res., 20, 1793-1799 (2000))、gp100特異性TCR(J. Immunol. 170, 2186-2194 (2003))、NY-ESO-1特異性TCR(J. Immunol., 174, 4415-4423 (2005))、WT1特異性TCR(Blood, 106, 470-476 (2005))、MAGE-A1特異性TCR(Int. Immunol., 8, 1463-1466 (1996))、P1A特異性TCR(Sarma, S., Y. Guo, Y. Guilloux, C. Lee, X. -F. Bai, Y. Liu. 1999. Cytotoxic T lymphocytes to an unmutated tumor antigen P1A : normal development but restrained effector function. J. Exp. Med. 189 : 811.)等編碼TCR之核酸、或結合於MHC分子之抗原分子，且使T細胞活化，則可為與上述文獻中所記載之編碼TCR之鹼基序列具有80%以上、較佳為85%以上、更佳為90%以上、進而較佳為95%以上、最佳為98%以上之同一性的鹼基序列。進而，亦可為於上述文獻中所記載之編碼TCR之鹼基序列中特定出編碼CDR之序列，維持該編碼CDR之序列，且於編碼CDR之序列以外之序列中與上述文獻中所記載之編碼TCR之鹼基序列具有60%以上、較佳為70%以上、更佳為80%以上、進而較佳為90%以上、最佳為95%以上之同一性的鹼基序列。

作為編碼IL-7之核酸，可列舉編碼序列編號1所示之胺基酸序列之鹼基序列，只要具有IL-7之細胞增生率或細胞生存率之亢進作用，則可為與編碼序列編號1所示之胺基酸序列之鹼基序列具有80%以上、較佳為85%

以上、更佳為90%以上、進而較佳為95%以上、最佳為98%以上之同一性的鹼基序列。作為編碼CCL19之核酸，可列舉編碼序列編號2所示之胺基酸序列之鹼基序列，只要具有CCL19之細胞遷移作用，則亦可使用與編碼序列編號2所示之胺基酸序列之鹼基序列具有80%以上、較佳為85%以上、更佳為90%以上、進而較佳為95%以上、最佳為98%以上之同一性的鹼基序列。

又，於本發明之表現載體中亦可含有編碼自殺基因之核酸。所謂自殺基因係指具有如下機能之基因，即，藉由進行表現而直接地、或二次地誘導具有細胞毒性之物質，使自身之細胞死亡。藉由使本發明之表現載體中包含編碼自殺基因之核酸，根據癌症之治療過程，例如於腫瘤消失之情形時投予使自殺基因之機能活化之藥劑，可控制活體內之免疫活性細胞。又，IL-7或CCL19與其他細胞激素不同，引起作為副作用之細胞激素釋出症候群或基因導入細胞之腫瘤化之可能性較低。然而，藉由使導入有本發明之表現載體之免疫活性細胞之機能提高，於進攻目標之癌組織時釋出之細胞激素等有可能會出乎意料地對周邊組織產生影響。於該情形時，藉由使本發明之表現載體中包含編碼自殺基因之核酸，可確實地減少成為細胞激素釋出症候群之風險。

作為自殺基因，可列舉以下之文獻中所記載之編碼單純疱疹病毒之胸苷激酶(HSV-TK)或誘導性半胱天冬酶9(inducible caspase 9)之基因等，作為使該基因之機能活化之藥劑，對於前者可列舉更昔洛韋(Ganciclovir)，對於後者可列舉作為二聚物誘導化合物(CID, chemical induction of dimerization)之AP1903(Cooper LJ., et. al. Cytotherapy. 2006; 8 (2) : 105-17., Jensen M. C. et. al. Biol Blood Marrow

Transplant. 2010 Sep; 16 (9) : 1245-56., Jones BS. Front Pharmacol. 2014 Nov 27; 5 : 254., Minagawa K., Pharmaceuticals (Basel). 2015 May 8; 8 (2) : 230-49., Bole-Richard E., Front Pharmacol. 2015 Aug 25; 6 : 174)。

本發明之載體中之(a)含有編碼特異性地識別癌抗原之細胞表面分子之核酸、編碼IL-7之核酸、及編碼CCL19之核酸的表現載體中，任一種核酸可配置於任一上游或下游。具體而言，若以含有編碼TCR之核酸作為編碼特異性地識別癌抗原之細胞表面分子之核酸之情形為例，則從上游起依序可為編碼TCR之核酸、編碼IL-7之核酸及編碼CCL19之核酸，亦可為編碼TCR之核酸、編碼CCL19之核酸及編碼IL-7之核酸，亦可為編碼IL-7之核酸、編碼CCL19之核酸及編碼TCR之核酸，亦可為編碼IL-7之核酸、編碼TCR之核酸及編碼CCL19之核酸，亦可為編碼CCL19之核酸、編碼TCR之核酸、及編碼IL-7之核酸，亦可為編碼CCL19之核酸、編碼IL-7之核酸及編碼TCR之核酸。

於本發明之載體中之(b-2)含有編碼IL-7之核酸、及編碼CCL19之核酸之表現載體中，編碼IL-7之核酸及編碼CCL19之核酸之配置並無特別限制，相對於編碼IL-7之核酸，編碼CCL19之核酸可配置於上游，亦可配置於下游。

於本發明之載體中之(c-1)含有編碼特異性地識別癌抗原之細胞表面分子之核酸、及編碼IL-7之核酸之表現載體中，編碼特異性地識別癌抗原之細胞表面分子之核酸及編碼IL-7之核酸之配置並無特別限制，相對於編碼特異性地識別癌抗原之細胞表面分子之核酸，編碼IL-7之核酸可配置於上游，亦可配置於下游。

於本發明之載體中之(d-2)含有編碼特異性地識別癌抗原之細胞表面分子之核酸、及編碼CCL19之核酸之表現載體中，編碼特異性地識別癌抗原之細胞表面分子之核酸及編碼CCL19之核酸之配置並無特別限制，相對於編碼特異性地識別癌抗原之細胞表面分子之核酸，編碼CCL19之核酸可配置於上游，亦可配置於下游。

再者，編碼特異性地識別癌抗原之細胞表面分子之核酸、編碼IL-7之核酸及編碼CCL19之核酸可分別利用其他啟動子進行轉錄，亦可使用內部核糖體進入位點(IRES, internal ribozyme entry site)或自裂解型2A肽並利用一個啟動子進行轉錄。

於使用內部核糖體進入位點(IRES)或自裂解型2A肽，利用一個啟動子轉錄編碼IL-7之核酸及編碼CCL19之核酸之情形時之上述各核酸之間、或包含上述編碼特異性地識別癌抗原之細胞表面分子之核酸之情形時之該核酸與編碼IL-7之核酸及編碼CCL19之核酸之間、或包含編碼 α/β -TCR之核酸之情形時之編碼 α 鏈之核酸與編碼 β 鏈之核酸之間、或編碼 γ/Δ -TCR之核酸之情形時之編碼 Δ 鏈之核酸與編碼 Δ 鏈之核酸之間，只要能夠表現各核酸，則可含有任意之核酸，但較佳為經由自裂解型肽(2A肽)、或編碼IRES之序列、較佳為編碼2A肽之序列進行連結。藉由使用該序列進行連結，可高效率地表現各核酸。

又，於含有編碼自殺基因之核酸之情形時，自殺基因之位置並無特別限制，例如可於用以使編碼特異性地識別癌抗原之細胞表面分子之核酸、編碼IL-7之核酸、或編碼CCL19之核酸進行表現之啟動子之下游，經由編碼2A肽或IRES之序列而配置於上述各核酸之上游或下游，亦可配置於其他啟動子之下游。

所謂2A肽係源自病毒之自裂解型肽，具有序列編號7所表示之胺基酸序列中之G-P間(距C末端1個殘基之位置)被內質網切斷之特徵(Szymczak et al., *Expert Opin. Biol. Ther.* 5 (5): 627-638 (2005))。因此，經由2A肽而組入至其前後之核酸於細胞內相互獨立地進行表現。

作為上述2A肽，較佳為源自小核糖核酸病毒、輪狀病毒、昆蟲病毒、鵝口瘡病毒或錐體蟲病毒之2A肽，更佳為序列編號8所示之源自小核糖核酸病毒之2A肽(F2A)。

作為本發明之表現載體中之載體，可為直鏈狀亦可為環狀，可為質體等非病毒載體，可為病毒載體，亦可為轉位子之載體。又，於該載體中可含有啟動子或終止子等控制序列、或耐藥劑性基因、報導基因等選擇標記物序列。藉由在啟動子序列之下游可促效地配置編碼IL-7之核酸及編碼CCL19之核酸，可高效率地轉錄各核酸。

作為上述啟動子，可列舉：反轉錄病毒之LTR(Long Terminal Repeat，長末端重複序列)啟動子、SV40初始啟動子、巨細胞病毒啟動子、單純疱疹病毒之胸苷激酶啟動子等源自病毒之啟動子；磷酸甘油酸激酶(PGK，Phosphoglycerate kinase)啟動子、Xist(X-inactive specific transcript，X染色體失活特異轉錄因子)啟動子、 β -肌動蛋白啟動子、RNA(Ribonucleic Acid，核糖核酸)聚合酶II啟動子等源自哺乳類之啟動子。又，亦可使用由四環素所誘導之四環素應答型啟動子、由干擾素所誘導之Mx1啟動子等。藉由在本發明之表現載體中使用由上述特定之物質所誘導之啟動子，可根據癌症之治療過程而控制IL-7及CCL19之表現之誘導。

作為上述病毒載體，可列舉：反轉錄病毒載體、慢病毒載體、腺病

毒載體、腺相關病毒載體，可適宜地列舉反轉錄病毒載體，可更適宜地列舉 pMSGV 載體 (Tamada k et al., Clin Cancer Res 18 : 6436-6445 (2002))或 pMSCV 載體 (TAKARA BIO 公司製造)。若使用反轉錄病毒載體，則導入基因被取入宿主細胞之基因組中，故而可長期且穩定地進行表現。

確認於免疫活性細胞中含有本發明之表現載體，例如於含有編碼 TCR 之核酸之情形時，可藉由流式細胞儀、北方墨點法 (Northern Blotting)、南方墨點法 (Southern Blotting)、RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction，反轉錄酶-聚合酶鏈反應) 等 PCR、ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay，酶結合免疫吸附分析)、西方墨點法而對 TCR 之表現進行調查，於本發明之表現載體中含有標記物基因之情形時，可藉由調查插入至該表現載體中之標記物基因之表現而加以確認。

於本發明之 IL-7×CCL19 表現免疫活性細胞中所含之表現載體中含有編碼 TCR 之核酸之情形時，進行表現之 TCR 之可變區位於細胞外，藉由具備該 TCR 之可變區，TCR 表現免疫活性細胞可識別結合於 MHC 分子之抗原分子。

本發明之抗癌劑若含有本發明之 IL-7×CCL19 表現免疫活性細胞與藥學上所容許之添加劑，則無特別限制，作為上述添加劑，可列舉：生理鹽水、緩衝生理鹽水、細胞培養培養基、葡萄糖、注射用水、甘油、乙醇及該等之組合、穩定劑、助溶劑及界面活性劑、緩衝劑及防腐劑、等張劑、填充劑、以及潤滑劑。

本發明之抗癌劑可使用本領域業者已知之方法，投予需要癌症之治

療之受驗體，作為投予方法，可列舉向靜脈內、腫瘤內、皮內、皮下、肌內、腹腔內、動脈內、髓內、心臟內、關節內、黏液囊內、顱內、脊椎內、及蛛網膜下(髓液)之注射。

所投予之抗癌劑中所含之本發明之IL-7×CCL19表現免疫活性細胞之量可根據癌症之種類、位置、嚴重程度、接受治療之受驗體之年齡、體重及狀態等而適當加以調整，較佳為於一次之投予中可列舉 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^{10}$ 個、較佳為 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^9$ 個、更佳為 $5 \times 10^6 \sim 5 \times 10^8$ 個。

可列舉所投予之抗癌劑為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、一週1次、每隔7天、每隔8天、每隔9天、一週2次、一月1次或一月2次獨立地投予之方法。

作為本發明之抗癌劑、或下述癌症之治療方法中之癌症，可為實體癌亦可為血液癌，可列舉腺癌、鱗狀細胞癌、腺鱗狀細胞癌、未分化癌、大細胞癌、小細胞癌、皮膚癌、乳癌、攝護腺癌、膀胱癌、陰道癌、子宮頸癌、子宮癌、肝癌、腎癌、胰腺癌、脾臟癌、肺癌、氣管癌、支氣管癌、結腸癌、小腸癌、胃癌、食道癌、膽囊癌、睪丸癌、卵巢癌等癌、或骨組織、軟骨組織、脂肪組織、肌肉組織、血管組織及造血組織之癌，此外亦可列舉軟骨肉瘤、尤因氏肉瘤、惡性血管內皮瘤、惡性神經鞘瘤、骨肉瘤、軟組織肉瘤等肉瘤、或肝胚細胞瘤、神經管胚細胞瘤、腎胚細胞瘤、神經胚細胞瘤、胰胚細胞瘤、胸膜肺胚細胞瘤、視網膜胚細胞瘤等胚細胞瘤、或胚細胞腫瘤、或淋巴瘤、或白血病。

本發明之抗癌劑可與其他抗癌劑併用而使用。作為其他抗癌劑，可列舉：環磷醯胺、苯達莫司汀、異環磷醯胺、達卡巴吡等烷基化藥，噴司他丁、氟達拉濱、克拉屈濱、甲胺喋呤、5-氟尿嘧啶、6-巰基嘌呤、依諾

他濱等代謝拮抗藥，利妥昔單抗、西妥昔單抗、曲妥珠單抗等分子靶向藥，伊馬替尼、吉非替尼、埃羅替尼、阿法替尼、達沙替尼、舒尼替尼、曲美替尼等激酶抑制劑，硼替佐米等蛋白酶體抑制劑，環孢靈、他克莫司等鈣調神經磷酸酶抑制藥，艾達黴素、多柔比星、絲裂黴素C等抗癌性抗生素，伊立替康、依託泊苷等植物生物鹼，順鉑、奧沙利鉑、卡鉑等鉑製劑，他莫昔芬、比卡魯胺等激素療法藥，干擾素、納武單抗、派姆單抗等免疫控制藥，可適宜地列舉烷基化藥或代謝拮抗藥。

作為上述「將本發明之抗癌劑與其他抗癌劑併用而使用」之方法，可列舉：使用其他抗癌劑進行處理，其後使用本發明之抗癌劑之方法；或同時使用本發明之抗癌劑與其他抗癌劑之方法；或使用本發明之抗癌劑進行處理，其後使用其他抗癌劑之方法；可適宜地列舉使用其他抗癌劑進行處理，其後使用本發明之抗癌劑之方法。又，於將本發明之抗癌劑與其他抗癌劑併用之情形時，進一步提高癌症之治療效果，並且減少各抗癌劑之投予次數或投予量，藉此可減少因各抗癌劑引起之副作用。又，於本發明之抗癌劑中亦可包含上述其他抗癌劑。

作為本發明之另一態樣1，可列舉：1)一種癌症之治療方法，其特徵在於向需要癌症之治療之患者投予表現特異性地識別癌抗原之細胞表面分子、介白素7(IL-7)、及CCL19之免疫活性細胞；或2)一種免疫活性細胞，其用作抗癌劑，且表現特異性地識別癌抗原之細胞表面分子、介白素7(IL-7)、及CCL19；或3)一種免疫活性細胞之用途，其用於製備抗癌劑，且該免疫活性細胞表現特異性地識別癌抗原之細胞表面分子、介白素7(IL-7)、及CCL19。

進而，作為本發明之另一態樣2，可列舉一種套組，其係用以製作上

述具備本發明之表現載體之表現特異性地識別癌抗原之細胞表面分子、介白素7(IL-7)、及CCL19之免疫活性細胞，作為該套組，只要具備本發明之表現載體，則無特別限制，亦可包含用以製作本發明之IL-7×CCL19表現免疫活性細胞之說明書、或用以將本發明之表現載體導入至免疫活性細胞中之試劑。

實施例1

(免疫機能控制因子之選擇)

可控制T細胞之機能的分子於生物體內至少存在數百種。發明者等人基於迄今為止之見解及經驗，作為用以進一步提高免疫活性細胞之免疫機能控制效果的控制分子，首先從大量之組合中選擇IL-7與CCL19，且選擇兩者之組合、即IL-7與CCL19之組合而非各自單獨，而製作該表現免疫活性細胞之免疫機能控制因子之載體。

(表現IL-7及CCL19之載體之製作-1)

人工合成編碼包含抗FITC scFv(Single Chain Fragment Variable，單鏈可變區片段)、小鼠CD8跨膜區、小鼠CD28-4-1BB-CD3 ζ細胞內訊息基元之抗FITC CAR的抗FITC CAR DNA(Deoxyribonucleic Acid，去氧核糖核酸)片段(序列編號9)、編碼序列編號8所示之2A肽(F2A)與繼該肽之後之限制酶部位(MCS(Multiple Cloning Site，多選殖位點))之F2A-MCS DNA片段(序列編號10)、編碼小鼠IL-7(無終止密碼子)、與繼其之後之F2A及小鼠CCL19之IL-7-F2A-CCL19 DNA片段(序列編號11)(Life Technology公司製造)。

為了製作表現IL-7及CCL19之載體，將上述抗FITC CAR DNA片段與上述F2A-MCS DNA片段連結而製作抗FITC CAR-F2A-MCS構建物。

其次，將所製作之構建物選殖至pMSGV反轉錄病毒表現載體(Tamada k et al., Clin Cancer Res 18 : 6436-6445 (2002))而製作包含抗FITC CAR-F2A-MCS之pMSGV載體。於該pMSGV載體之MCS上，藉由限制酶(NsiI及Sall)處理及連接而插入上述IL-7-F2A-CCL19 DNA片段，從而獲得包含抗FITC CAR-F2A-IL-7-F2A-CCL19之pMSGV載體(IL-7×CCL19表現載體(1))。將所獲得之載體之基因圖示於圖1。又，作為對照，將上述抗FITC CAR DNA片段選殖至上述pMSGV反轉錄病毒表現載體，而製作不含IL-7及CCL19之pMSGV載體(對照載體(1))。

(導入有IL-7×CCL19表現載體之反轉錄病毒之製作)

為了進行小鼠T細胞之轉導，而製作反轉錄病毒。使用Lipofectamine 2000或3000(Life Technology公司製造)，將上述IL-7×CCL19表現載體(1)或對照載體(1)與pCL-Eco質體(Imgenex公司製造)轉染至GP2-293包裝細胞株(TAKARA BIO公司製造)，藉此製作導入有IL-7×CCL19表現載體(1)或對照載體(1)之反轉錄病毒。

使用添加有10%FCS(Fetal Calf Serum，胎牛血清)、100 U/ml之青黴素、100 mg/ml之鏈黴素的DMEM(Dulbecco Modified Eagle Medium，杜貝可改良伊格爾培養基)作為上述GP2-293細胞之培養液。又，使用添加有10%FCS、100 U/ml之青黴素、100 mg/ml之鏈黴素、50 mM之2-巰基乙醇、2 mM之L-麩醯胺的RPMI-1640作為下述實施例中所使用之T細胞之培養液。

(小鼠T細胞之轉導)

為了進行小鼠T細胞之轉導，利用經固相化之抗CD3mAb(3 µg/ml)及IL-2(100 IU/ml)將源自脾臟及淋巴結之 3×10^6 個精製後之小鼠T細胞活化

48小時。其次，將含有上述中所製作之導入有IL-7×CCL19表現載體(1)或對照載體(1)之反轉錄病毒的上清液與於塗佈有25 µg/ml之RetroNectin(註冊商標：TAKARA BIO公司製造)之培養盤中進行活化之上述小鼠T細胞(1×10^6 cells/ml)加以混合，於1500 rpm下離心2小時後，於IL-2(100 IU/ml)之存在下培養6小時。為了從培養液去除反轉錄病毒，回收小鼠T細胞，並轉移至含有IL-2(100 IU/ml)之新的增生培養液(RPMI)中，進而培養42小時，而獲得導入有IL-7×CCL19表現載體(1)之小鼠T細胞(IL-7/CCL19表現T細胞(1))或導入有對照載體(1)之小鼠T細胞(對照T細胞(1))。

(表現IL-7及CCL19之表現載體之製作-2)

於上述中之IL-7×CCL19表現載體(1)之製作中，將序列編號9所示之序列中所含之抗FITC scFv區之序列置換為Life Technology公司基於利妥昔單抗之序列而合成之抗人類CD20 scFv(序列編號12)之序列，除此以外，藉由與上述「表現IL-7及CCL19之表現載體之製作-1」相同之方法，而製作包含抗人類CD20 CAR-F2A-IL-7-F2A-CCL19之pMSGV載體(IL-7×CCL19表現載體(2))。同樣地，於上述中之對照載體(1)之製作中，將序列編號9所示之序列中所含之抗FITC scFv區之序列置換為上述抗人類CD20 scFv(序列編號12)之序列，除此以外，藉由與上述「表現IL-7及CCL19之表現載體之製作-1」相同之方法，而製作不含IL-7及CCL19之pMSGV載體(對照載體(2))。藉由與上述相同之方法，使用反轉錄病毒，將該IL-7×CCL19表現載體(2)或對照載體(2)導入至小鼠T細胞中，而製作IL-7/CCL19表現T細胞(2)或對照T細胞(2)。

實施例2

(IL-7/CCL19表現T細胞之細胞數及生存率)

對由IL-7/CCL19表現T細胞所產生之IL-7或CCL19是否發揮生物機能而顯示出免疫誘導效果進行研究。將所製作之含有IL-7/CCL19表現T細胞(2)(4×10^5 個)或對照T細胞(2)之樣品培養5天。上述培養係為了於IL-7及CCL19之表現中排除因人類CD20 CAR產生之影響，而於不利用CD20進行抗原刺激之情況下進行。其次，利用台盼藍而調查細胞數與生存率。將結果示於圖2A、圖2B。圖2A為細胞數，圖2B為生存率，黑柱表示IL-7/CCL19表現T細胞，白柱表示對照T細胞。

(結果)

如圖2A、圖2B所示，於IL-7/CCL19表現T細胞(2)中，與對照T細胞(2)相比，細胞數增高約5倍，生存率增高約2倍。因此明確，藉由使用將本發明之表現載體導入至T細胞中而成之IL-7/CCL19表現T細胞，發揮IL-7或CCL19生物機能，而顯示出免疫誘導效果。

實施例3

[T細胞遷移試驗]

(利用IL-7/CCL19表現T細胞所進行之T細胞遷移試驗)

藉由使用有Transwell之細胞遷移試驗，對CCL19之遷移引發效果進行研究。應答側T細胞之遷移性係藉由使用96孔之Transwell(註冊商標)小室(Corning Costar公司製造)，使之通過孔徑5 μm 之聚碳酸酯過濾器進行遷移而加以測定。具體而言，於小室之下層中培養IL-7/CCL19表現T細胞(1)或對照T細胞(1)。上述培養係為了於IL-7及CCL19之表現中排除因FITC CAR產生之影響，而於不利用FITC進行抗體刺激之情況下進行。應答側T細胞係藉由MACS(Magnetic Activated Cell Sorter，磁性激活細胞

分選儀)(Miltenyi Biotec公司製造)之負選擇，由脾臟或淋巴結而製備。應答側T細胞係利用CytoTell blue(AAT Bioquest公司製造)進行標記，並於上層中培養3小時。從小室之上層向下層之遷移係利用流式細胞儀(EC800：Sony公司製造)進行調查，資料分析係使用FlowJo軟體(Tree Star公司製造)。將結果示於圖3。圖3中，黑柱表示IL-7/CCL19表現T細胞(1)，白柱表示對照T細胞(1)，縱軸表示遷移至下層之小室之應答側T細胞之絕對數。又，統計學上之有意義差係藉由學生t檢定(Student's t-test)進行研究。

(結果)

如圖3所示，IL-7/CCL19表現T細胞(1)係使與對照T細胞(1)相比為約1.8倍之T細胞遷移至下層。於T細胞等淋巴球移入療法中，因所投予之T細胞引起之癌細胞傷害當然重要，但此外將原本存在於癌症患者體內之內源性T細胞(=宿主側免疫細胞)活化而動員為進攻癌細胞之細胞亦重要。因此，就免疫治療效果之方面而言，較佳為不僅從外部移入具有抗腫瘤活性之淋巴球，亦利用某些方法，引發所移入之T細胞與內源性T細胞之能動性相互作用，使內源性T細胞集聚於癌局部。由圖3之結果表明，IL-7/CCL19表現T細胞(1)由於具有使內源性T細胞集聚之能力，故而可誘導所移入之T細胞與內源性T細胞之能動性相互作用。

又，由圖2A、圖2B、圖3之結果表明，表現IL-7及CCL19之T細胞藉由IL-7有效地增生，生存率亦較高，且具備藉由CCL19集聚T細胞之對免疫誘導必不可少之重要效果，具有優異之免疫誘導效果。即，表明於免疫活性細胞中，表現「IL-7」與「CCL19」之2種控制分子，藉此可提高該免疫活性細胞之增生能力、生存率、免疫誘導效果。進而，如上所述般表

現IL-7及CCL19之T細胞由於兼具增生能力、生存能力、及T細胞集聚能力，故而提示具有T細胞或樹狀細胞於癌組織中之滲透效果、或腫瘤增生抑制效果之可能性。

實施例4

[IL-7×CCL19×HSV-TK表現載體之製作]

藉由在pMSGV1載體之多選殖位點，選殖如下鹼基序列，可製作表現IL-7、CCL19、及HSV-TK之載體，該鹼基序列係將編碼IL-7、CCL19及作為自殺基因之HSV-TK之各基因的鹼基序列夾著編碼作為自裂解型肽之2A肽之鹼基序列串聯排列而成。將該載體之基因圖示於圖4。

導入有藉由上述方法所製作之IL-7×CCL19×HSV-TK表現載體的免疫活性細胞藉由向投予有上述免疫活性細胞之受驗體投予更昔洛韋，可控制受驗體內之免疫活性細胞。

實施例5

[TCR×IL-7×CCL19表現載體之製作]

藉由在pMSGV1載體之多選殖位點，選殖如下鹼基序列，可製作表現TCR、IL-7及CCL19之載體，該鹼基序列係將編碼TCR、IL-7及CCL19之各基因之鹼基序列夾著編碼作為自裂解型肽之2A肽之鹼基序列串聯排列而成。將該載體之基因圖示於圖5。

導入有藉由上述方法所製作之TCR×IL-7×CCL19表現載體之免疫活性細胞不僅能夠與癌細胞之表面所存在之癌抗原特異性地結合，亦能夠與源自癌細胞內之癌抗原之肽呈現於MHC之複合體特異性地結合，而變得能夠進行針對更廣範圍之腫瘤相關靶分子的特異性T細胞之誘導。

實施例6

[表現IL-7、CCL19及eGFP之表現載體之製作]

人工合成編碼小鼠IL-7(無終止密碼子)、與繼其之後之F2A、小鼠CCL19之IL-7-F2A-CCL19 DNA片段(Life Technology公司製造)。

為了製作表現IL-7、CCL19及eGFP之載體，藉由限制酶(NCOI及ECORI)處理及連接，將上述所合成之IL-7-F2A-CCL19 DNA片段插入至具有F2A-eGFP序列之pMSGV反轉錄病毒表現載體(Tamada k et al., Clin Cancer Res 18 : 6436-6445 (2002))之MCS，而獲得包含IL-7-F2A-CCL19-F2A-eGFP DNA片段(序列編號13)之pMSGV載體(IL-7×CCL19表現載體(3))。將所獲得之載體之基因圖示於圖6。又，作為對照，製作包含eGFP且不含IL-7及CCL19之pMSGV載體(對照載體(3))。再者，於序列編號13中，第1號～第462號鹼基為IL-7(第1號～第75號鹼基為IL-7之訊息序列)，第463號～第537號鹼基為F2A，第538號～第861號鹼基為CCL19(第538號～第612號鹼基為CCL19之訊息序列)，868～942為F2A，第946號～第1662號鹼基為編碼eGFP之核酸，第1663～1665號鹼基為終止密碼子。又，將與上述鹼基序列13對應之胺基酸序列示於序列編號14。再者，為了使用限制酶NcoI，而將序列編號13中之第4號鹼胸腺嘧啶(t)置換為鳥嘌呤(g)(將序列編號14中之第2號胺基酸苯丙胺酸(F)置換為纈胺酸(V))。

[表現P815腫瘤抗原P1A特異性TCR、IL-7、CCL19、及eGFP之T細胞之製作]

從自Y. Liu取得之表現H-2L^d限制性之P815腫瘤抗原P1A特異性TCR的基因轉殖小鼠(Sarma, S., Y. Guo, Y. Guilloux, C. Lee, X. -F. Bai, Y. Liu. 1999. J. Exp. Med. 189 : 811.)採集脾臟細胞，而獲得表現源自脾臟

細胞之P815腫瘤抗原P1A特異性TCR之小鼠T細胞(P1A特異性TCR-T細胞)。其次，藉由與實施例1相同之方法，製作導入有IL-7×CCL19表現載體(3)及對照載體(3)之反轉錄病毒，並轉導至利用P1A肽將包含上述P1A特異性TCR-T細胞之脾臟細胞(3×10^6 個/孔)活化48小時而獲得之細胞中，而獲得P1A特異性TCR/IL-7/CCL19/eGFP表現T細胞或P1A特異性TCR/eGFP表現T細胞。各表現載體之轉導係藉由檢測作為替代標記之eGFP之流式細胞儀分析而確認。所獲得之各T細胞之eGFP之表現量於任一實驗中均為70~80%。

於第0天，對於6~10週齡之雄DBA/2小鼠($n=30$)，將懸浮於0.1 ml之HBSS(Hank's Balanced Salt Solution，漢克平衡鹽溶液)中之 5×10^5 個P815肥胖細胞瘤皮下接種至側腹。於第6天，對小鼠進行進行次致死量(3-5 Gy)之照射，以進行預處理。於第7天，將小鼠($n=10$)分成3個群，分別靜脈投予 1×10^6 個P1A特異性TCR/IL-7/CCL19/eGFP表現T細胞、或P1A特異性TCR/eGFP表現T細胞(任一種細胞均為70~80%eGFP陽性)。其後，分析各小鼠之生存率，並且測定死亡小鼠之腫瘤體積。將各小鼠之生存率之分析結果示於圖7，將測定死亡小鼠之腫瘤體積之結果示於圖8。

於圖7中，▲為未處理小鼠之結果，■為投予有P1A特異性TCR/eGFP表現T細胞之小鼠之結果，●為投予有P1A特異性TCR/IL-7/CCL19/eGFP表現T細胞之小鼠之結果，橫軸為皮下接種P815肥胖細胞瘤後之天數(day)，縱軸為生存率(%)。投予有P1A特異性TCR/IL-7/CCL19/eGFP表現T細胞之小鼠於第60天仍生存80%，即便超過100天仍生存50%。因此表明，藉由使用表現P1A特異性TCR、IL-7及CCL19之免疫活性細胞，發揮出抗腫瘤效果，而抑制因腫瘤引起之生存率降低。

又，於圖8中，橫軸為皮下接種P815肥胖細胞瘤後之天數(day)，縱軸為腫瘤體積(mm³)。由圖8表明，對於投予有P1A特異性TCR/IL-7/CCL19/eGFP表現T細胞之小鼠，腫瘤體積之增加顯著得到抑制，P1A特異性TCR/IL-7/CCL19/eGFP表現T細胞具有優異之抗腫瘤活性，及發揮出針對實體癌之治療效果。

[產業上之可利用性]

本發明之IL-7×CCL19表現免疫活性細胞由於兼具增生能力、生存能力及淋巴球集聚能力，故而能夠利用於免疫療法領域。

【序列表】

<110> 諾伊爾免疫生物科技股份有限公司(NOILE-IMMUNE BIOTECH INC.)

<120> 表現免疫機能控制因子之免疫活性細胞及表現載體

<130> FH28-007W0

<150> JP 2016-053913

<151> 2016-03-17

<160> 14

<170> PatentIn第3.1版

<210> 1

<211> 177

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 人類IL-7

<220>

<223> 發明人：玉田耕治(Tamada, Koji)
發明人：佐古田幸美(Sakoda, Yukimi)
發明人：安達圭志(Adachi, Keishi)

<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
65 70 75 80

Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser
 85 90 95

Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu Leu Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr
 100 105 110

Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln Val Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala
 115 120 125

Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys Ser Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu
 130 135 140

Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu
 145 150 155 160

Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu
 165 170 175

His

<210> 2
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 人類CCL19

<400> 2

Met Ala Leu Leu Leu Ala Leu Ser Leu Leu Val Leu Trp Thr Ser Pro
 1 5 10 15

Ala Pro Thr Leu Ser Gly Thr Asn Asp Ala Glu Asp Cys Cys Leu Ser
 20 25 30

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> 22
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 5'-R引子

<400> 3
 gtctaccagg cattcgcttc at 22

<210> 4
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 3-TRα-C引子

<400> 4
 tcagctggac cacagccgca gcgt 24

<210> 5
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 3-TRb-C1引子

<400> 5
 tcagaaatcc tttctcttga c 21

<210> 6
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 3-TRbeta-C2引子

<400> 6
ctagcctctg gaatcctttc tctt

24

<210> 7
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 2A肽裂解區

<220>
<221> 未歸類特徵
<222> (2)..(2)
<223> Val或Ile

<220>
<221> 未歸類特徵
<222> (4)..(4)
<223> 任意胺基酸

<400> 7

Asp Xaa Glu Xaa Asn Pro Gly Pro
1 5

<210> 8
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 2A肽(F2A)

<400> 8

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> 9
 <211> 1674
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 抗FITC CAR

<400> 9
 atggagtgc ctgtaggtt gttggtgctg atgttctgga ttctgcttc cagcagtgat 60
 gtcgtgatga cccaaactcc actctccctg cctgtcagtc ttggagatca agcctccatc 120
 tcttgcatg ctagtcagag ccttgtagac agtaatggaa acacctattt acgttggtac 180
 ctgcagaagc caggccagtc tccaaaggtc ctgatctaca aagtttcaa ccgattttct 240
 ggggtcccag acaggttcag tggcagtgga tcaggacag atttcacact caagatcagc 300
 agagtggagg ctgaggatct gggagtttat ttctgctctc aaagtacaca tgttccgtgg 360
 acgttcggtg gaggcaccaa gctggaatc aaaagtagtg ctgatgatgc taagaaggat 420
 gctgctaaga aggatgatgc taagaaggat gatgctaaga aggatggtga ggtgaagctg 480
 gatgagactg gaggaggctt ggtgcaacct gggaggccca tgaactctc ctgtgttgcc 540
 tctggattca ctttagtga ctactggatg aactgggtcc gccagtctcc agagaaagga 600
 ctggagtggg tagcacaat tagaaacaaa cttataatt atgaaacata ttattcagat 660
 tctgtgaaag gcagattcac catctcaaga gatgattcca aaagtagtgt ctacctgcaa 720
 atgaacaact taagagttga agacatgggt atctattact gtacgggttc ttactatggt 780
 atggactact ggggtcaagg aacctcagtc accgtctccg cggccgcagt cgtgccagtc 840
 cttcagaaag tgaactctac tactaccaag ccagtgtctg gaactcctc acctgtgcac 900
 cctaccggga catctcagcc ccagagacca gaagattgtc ggccccgtgg ctcagtgaag 960
 gggaccggat tggacttcgc ctgtgatatt tacatctggg cacccttggc cggaatctgc 1020

gtggcccctc tgctgtcctt gatcatcact ctcatctgct accacaggag ccgaaatagt 1080
 agaaggaaca gactccttca aagtgactac atgaacatga ctccccggag gcctgggctc 1140
 actcgaaagc cttaccagcc ctacgccctt gccagagact ttgcagcgta ccgccccaaa 1200
 tggatcagga aaaaattccc ccacatattc aagcaaccat ttaagaagac cactggagca 1260
 gctcaagagg aagatgcttg tagctgccga tgtccacagg aagaagaagg aggaggagga 1320
 ggctatgagc tgagagcaaa attcagcagg agtgcagaga ctgctgcaa cctgcaggac 1380
 cccaaccagc tctacaatga gctcaatcta gggcgaagag aggaatatga cgtcttgag 1440
 aagaagcggg ctcgggatcc agagatggga ggcaaacagc agaggaggag gaacccccag 1500
 gaaggcgtat acaatgcact gcagaaagac aagatggcag aagcctacag tgagatcggc 1560
 acaaaaggcg agaggcggag aggcaagggg cacgatggcc tttaccaggg tctcagcact 1620
 gccaccaagg acacctatga tgccctgcat atgcagaccc tggcccctcg ctaa 1674

<210> 10
 <211> 146
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> F2A-MCS

<400> 10
 ggaagcggag tgaacacagac tttgaatttt gaccttctca agttggcggg agacgtggag 60
 tccaaccctg gaccatgcat aaaaagctta aaccagttaa ctggaaaacg cgtaaagtcg 120
 acaaaggcca aaaaggcca cgtacg 146

<210> 11
 <211> 864
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 小鼠IL-7-F2A-小鼠CCL19

<400> 11
 atgttccatg tttcttttag atatatcttt ggaattcctc cactgatcct tgttctgctg 60

cctgtcacat catctgagtg ccacattaa gacaaagaag gtaaagcata tgagagtgt 120
 ctgatgatca gcatcgatga attggacaaa atgacaggaa ctgatagtaa ttgcccgaat 180
 aatgaaccaa acttttttag aaaacatgta tgtgatgata caaaggaagc tgcttttcta 240
 aatcgtgctg ctcgcaagtt gaagcaattt cttaaaatga atatcagtga agaattcaat 300
 gtccacttac taacagtatc acaaggcaca caaacactgg tgaactgcac aagtaaggaa 360
 gaaaaaacg taaaggaaca gaaaaagaat gacgcatggt tcctaaagag actactgaga 420
 gaataaaaa cttgttgaa taaaattttg aagggcagta taggaagcgg agtgaaacag 480
 actttgaatt ttgaccttct caagttggcg ggagacgtgg agtccaacc tggacctatg 540
 gcccccgctg tgacccact cctggccttc agcctgctgg ttctctggac ctcccagcc 600
 ccaactctgg ggggtgctaa tgatgcggaa gactgctgcc tgtctgtgac ccagcgcgcc 660
 atccctggga acatcgtgaa agccttccgc taccttctta atgaagatgg ctgcagggtg 720
 cctgctgttg tgttcaccac actaaggggc tatcagctct gtgcacctcc agaccagccc 780
 tgggtgatc gcatcatccg aagactgaag aagtcttctg ccaagaacaa aggcaacagc 840
 accagaagga gccctgtgtc ttga 864

<210> 12
 <211> 783
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 抗人類CD20 scFv

<400> 12
 atggactgga cctggcggat cctgttcctg gtggctgctg ctacaggcgc ccacagccag 60
 atcgtgctgt ctcagtctcc cgccatcctg tctgctagcc ctggcgagaa agtgacctg 120
 acctgcagag ccagcagcag cgtgtcctac atccactggt tccagcagaa gcccggcagc 180
 agccccaagc cttgatccta cgccacaagc aacctggcct ctggcgtgcc agtgcggttt 240
 agcggctctg gctctggcac cagctacagc ctgacctca gcagagtgga agccgaggac 300
 gccgccacct actactgtca gcagtggacc agcaaccccc ccacattcgg cggaggcacc 360

aagctgaaa tcaagggcgg aggcggatct ggcggcggag gatctggggg aggcggctct 420
caggtgcagc tgcagcagcc tggcgctgag ctctgtaaac ctggcgctc cgtgaagatg 480
agctgcaagg ccagcggcta caccttcaca agctacaaca tgactgggt caagcagacc 540
cctggcagag gcctggaatg gatcggcgt atctacccc gcaacggcga cacctcctac 600
aaccagaagt tcaagggcaa ggccaccctg accgccgaca agagcagcag cacagcctac 660
atgcagctgt cctccctgac cagcaggac agcgccgtgt actactgcg cagatctacc 720
tactacggcg gcgactggtta cttcaacgtg tggggcgctg gcaccaccgt gaccgtgtct 780
gct 783

<210> 13
<211> 1665
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 小鼠II-7-F2A-小鼠CCL19-F2A-eGFP

<400> 13
atggtccacg tctccttcag atacatcttc ggcaccccc ccctgatcct ggtcctcctg 60
cctgtcacct ccagcgaatg tcatatcaag gacaaagagg gcaaggctta tgagagcgtc 120
ctgatgatct ccattgatga gctggataag atgaccggca ccgacagcaa ctgtcccaac 180
aatgagccca acttctttag aaagcacgtg tgtgacgata ccaaggaggc tgccttcctg 240
aacagggccg ccagaaagct gaagcagttc ctgaagatga acatttccga ggagttcaac 300
gtgcacctcc tcaccgtgag ccagggcacc cagacactgg tcaattgcac ctccaaggag 360
gagaagaacg tgaagagca gaaaagaat gatgcttgtt tcctcaagag gctgctgagg 420
gagatcaaga cctgttgaa taagatcctg aaaggcagca tcggcagcgg agtcaagcaa 480
accctgaact tcgacctgct gaaactggcc ggagatgtgg agagcaatcc cggccctatg 540
gccccagag tcacctctt gctggccttc agcctgctg tgctgtggac cttccccgct 600
cccaccctgg gcgcgccaa tgatgctgag gactgttgcc tctccgtgac ccagaggccc 660
atccctgaa acatcgtcaa agccttcagg tacctgctca acgaagacgg atgtagggtg 720

cctgccgtgg tgttcacaac actgagaggc taccagctct gcgcccctcc tgatcagccc 780
 tgggtcgaca gaatcatcag aaggctgaag aagtccagcg ccaagaacaa aggcaatagc 840
 acaaggagaa gccctgtgag cgaattcggg agcggagtga aacagacttt gaattttgac 900
 cttctcaagt tggcgggaga cgtggagtcc aacctggac catgcatggt gagcaagggc 960
 gaggagctgt tcaccggggt ggtgcccatc ctggtcgagc tggacggcga cgtaaacggc 1020
 cacaagttca gcgtgtccgg cgagggcgag ggcgatgcca cctacggcaa gctgaccctg 1080
 aagttcatct gcaccaccgg caagctgccc gtgccctggc ccaccctcgt gaccaccctg 1140
 acctacggcg tgcagtgctt cagccgctac cccgaccaca tgaagcagca cgacttcttc 1200
 aagtccgcca tgcccgaagg ctacgtccag gagcgcacca ttttcttaa ggacgacggc 1260
 aactacaaga cccgcgccga ggtgaagttc gagggcgaca ccctggtgaa ccgcatcgag 1320
 ctgaagggca tcgacttcaa ggaggacggc aacatcctgg ggcacaagct ggagtacaac 1380
 tacaacagcc acaacgtcta tatcatggcc gacaagcaga agaacggcat caaggtgaac 1440
 ttcaagatcc gccacaacat cgaggacggc agcgtgcagc tcgccgacca ctaccagcag 1500
 aacaccccca tcggcgacgg ccccgctgctg ctgcccgaca accactacct gagcaccag 1560
 tccgccctga gcaaagacc caacgagaag cgcgatcaca tggctctgct ggagttcgtg 1620
 accgccgccg ggatcactct cggcatggac gagctgtaca agtaa 1665

<210> 14
 <211> 554
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 小鼠II-7-F2A-小鼠CCL19-2A-eGFP胺基酸

<400> 14

Met Val His Val Ser Phe Arg Tyr Ile Phe Gly Ile Pro Pro Leu Ile
 1 5 10 15

Leu Val Leu Leu Pro Val Thr Ser Ser Glu Cys His Ile Lys Asp Lys
 20 25 30

Glu Gly Lys Ala Tyr Glu Ser Val Leu Met Ile Ser Ile Asp Glu Leu
 35 40 45

Asp Lys Met Thr Gly Thr Asp Ser Asn Cys Pro Asn Asn Glu Pro Asn
 50 55 60

Phe Phe Arg Lys His Val Cys Asp Asp Thr Lys Glu Ala Ala Phe Leu
 65 70 75 80

Asn Arg Ala Ala Arg Lys Leu Lys Gln Phe Leu Lys Met Asn Ile Ser
 85 90 95

Glu Glu Phe Asn Val His Leu Leu Thr Val Ser Gln Gly Thr Gln Thr
 100 105 110

Leu Val Asn Cys Thr Ser Lys Glu Glu Lys Asn Val Lys Glu Gln Lys
 115 120 125

Lys Asn Asp Ala Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu Arg Glu Ile Lys Thr
 130 135 140

Cys Trp Asn Lys Ile Leu Lys Gly Ser Ile Gly Ser Gly Val Lys Gln
 145 150 155 160

Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn
 165 170 175

Pro Gly Pro Met Ala Pro Arg Val Thr Pro Leu Leu Ala Phe Ser Leu
 180 185 190

Leu Val Leu Trp Thr Phe Pro Ala Pro Thr Leu Gly Gly Ala Asn Asp
 195 200 205

Ala Glu Asp Cys Cys Leu Ser Val Thr Gln Arg Pro Ile Pro Gly Asn
 210 215 220

Ile Val Lys Ala Phe Arg Tyr Leu Leu Asn Glu Asp Gly Cys Arg Val
225 230 235 240

Pro Ala Val Val Phe Thr Thr Leu Arg Gly Tyr Gln Leu Cys Ala Pro
245 250 255

Pro Asp Gln Pro Trp Val Asp Arg Ile Ile Arg Arg Leu Lys Lys Ser
260 265 270

Ser Ala Lys Asn Lys Gly Asn Ser Thr Arg Arg Ser Pro Val Ser Glu
275 280 285

Phe Gly Ser Gly Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu
290 295 300

Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro Cys Met Val Ser Lys Gly
305 310 315 320

Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly
325 330 335

Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp
340 345 350

Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys
355 360 365

Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr Tyr Gly Val
370 375 380

Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe
385 390 395 400

Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe
405 410 415

Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly
420 425 430

Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu
 435 440 445

Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His
 450 455 460

Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn
 465 470 475 480

Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp
 485 490 495

His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro
 500 505 510

Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn
 515 520 525

Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly
 530 535 540

Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
 545 550

【發明申請專利範圍】

【第1項】

一種基因重組免疫活性細胞，其係表現特異性地識別癌抗原之T細胞受體、介白素7(IL-7)、及CCL19的T細胞，且係經導入編碼IL-7之核酸、及編碼CCL19之核酸者。

【第2項】

如請求項1之基因重組免疫活性細胞，其中癌抗原為WT1、MART-1、NY-ESO-1、MAGE-A1、MAGE-A3、MAGE-A4、磷脂醯肌醇蛋白聚糖-3、KIF20A、存活蛋白、AFP-1、gp100、MUC1、PAP-10、PAP-5、TRP2-1、SART-1、VEGFR1、VEGFR2、NEIL3、MPHOSPH1、DEPDC1、FOXO1、CDH3、TTK、TOMM34、URLC10、KOC1、UBE2T、TOPK、ECT2、間皮素、NKG2D、P1A、GD2、或GM2。

【第3項】

一種表現載體，其係用以製作如請求項1或2之基因重組免疫活性細胞的以下之(a)至(e)中之任一種：

(a)含有編碼特異性地識別癌抗原之T細胞受體之核酸、編碼IL-7之核酸、及編碼CCL19之核酸之表現載體；

(b)以下之(b-1)及(b-2)之2種表現載體：

(b-1)含有編碼特異性地識別癌抗原之T細胞受體之核酸之表現載體；

(b-2)含有編碼IL-7之核酸、及編碼CCL19之核酸之表現載體；

(c)以下之(c-1)及(c-2)之2種表現載體：

(c-1)含有編碼特異性地識別癌抗原之T細胞受體之核酸、及編碼IL-7之核酸之表現載體；

(c-2)含有編碼CCL19之核酸之表現載體；

(d)以下之(d-1)及(d-2)之2種表現載體：

(d-1)含有編碼IL-7之核酸之表現載體；

(d-2)含有編碼特異性地識別癌抗原之T細胞受體之核酸、及編碼CCL19之核酸之表現載體；

(e)以下之(e-1)、(e-2)及(e-3)之3種表現載體：

(e-1)含有編碼特異性地識別癌抗原之T細胞受體之核酸之表現載體；

(e-2)含有編碼IL-7之核酸之表現載體；

(e-3)含有編碼CCL19之核酸之表現載體。

【第4項】

如請求項3之表現載體，其中

(a)之表現載體中之編碼特異性地識別癌抗原之T細胞受體之核酸、編碼IL-7之核酸、及編碼CCL19之核酸，

(b-2)之表現載體中之編碼IL-7之核酸、及編碼CCL19之核酸，

(c-1)之表現載體中之編碼特異性地識別癌抗原之T細胞受體之核酸、及編碼IL-7之核酸，或

(d-2)之表現載體中之編碼特異性地識別癌抗原之T細胞受體之核酸、及編碼CCL19之核酸，

係經由自裂解型肽而連結。

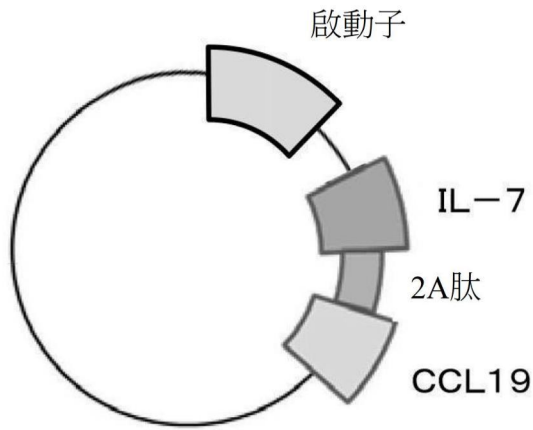
【第5項】

如請求項3之表現載體，其含有編碼自殺基因之核酸。

【第6項】

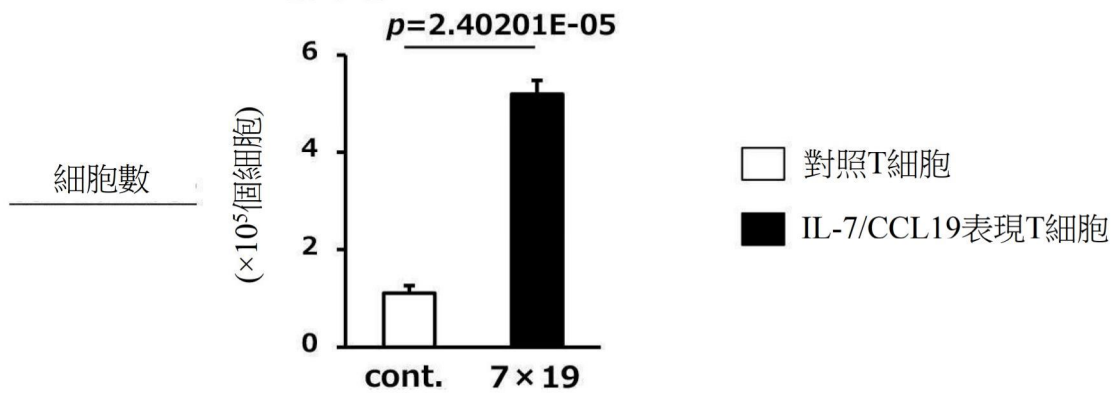
一種抗癌劑，其含有如請求項1或2之基因重組免疫活性細胞與藥學上所容許之添加劑。

【發明圖式】

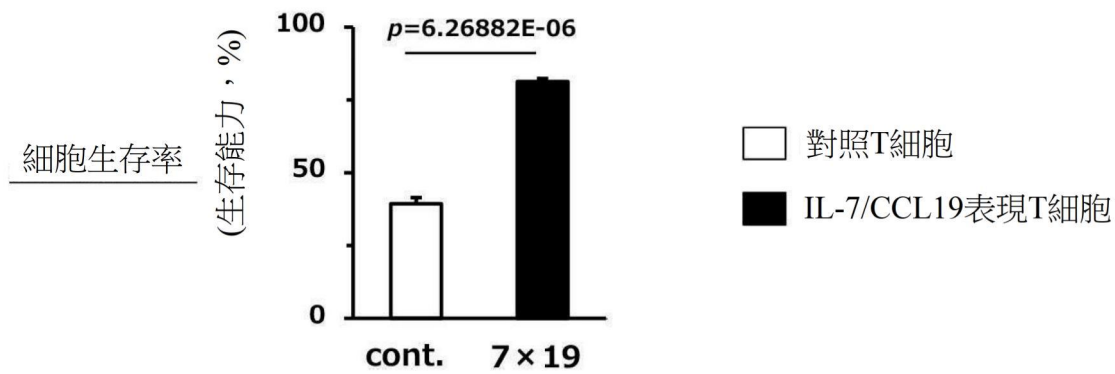


IL-7×CCL19表現載體

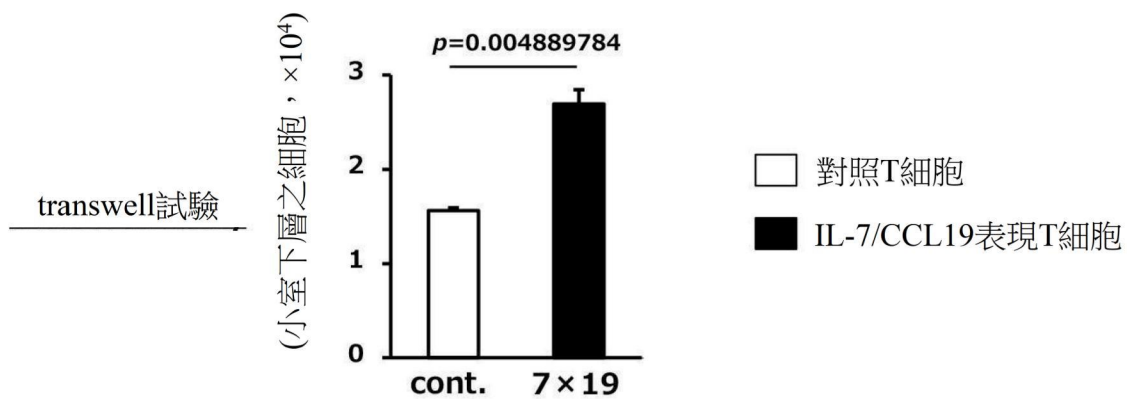
【圖1】



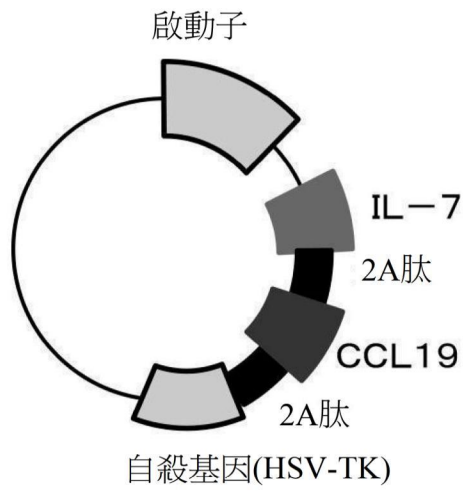
【圖2A】



【圖2B】

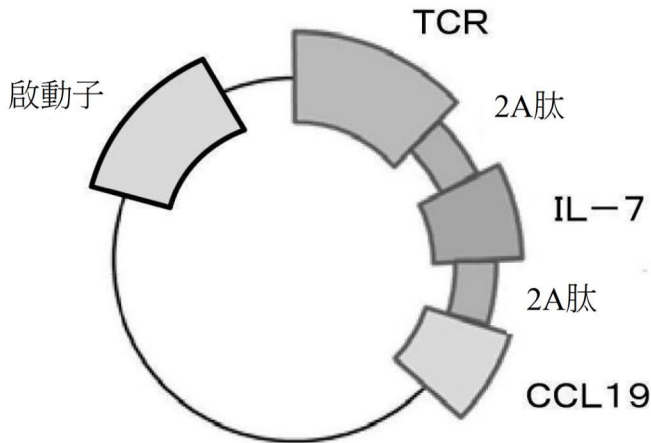


【圖3】



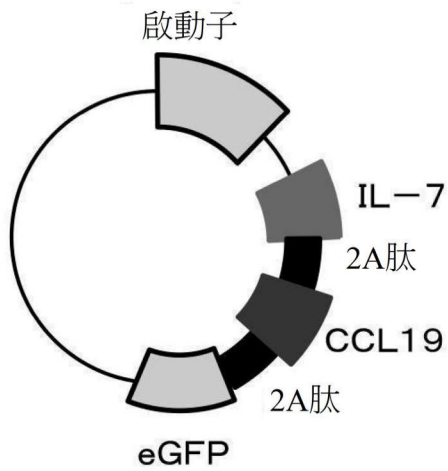
IL-7×CCL19×HSV-TK表現載體

【圖4】



TCR×IL-7×CCL19表現載體

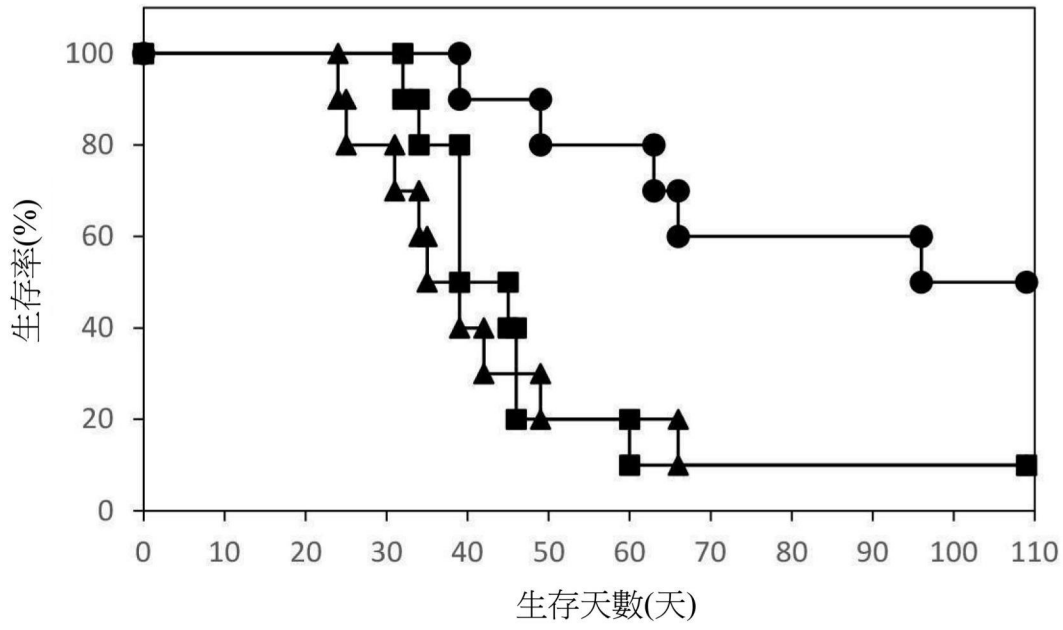
【圖5】



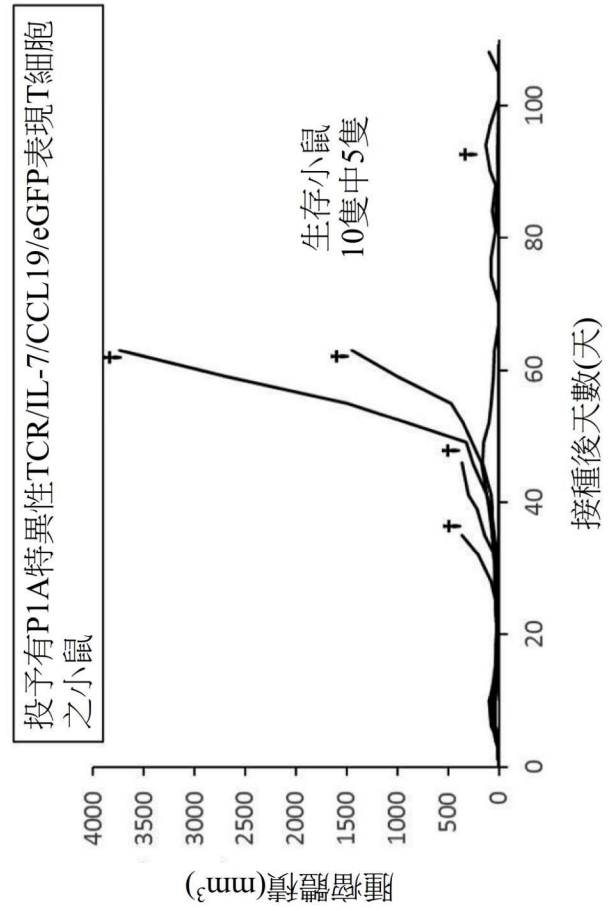
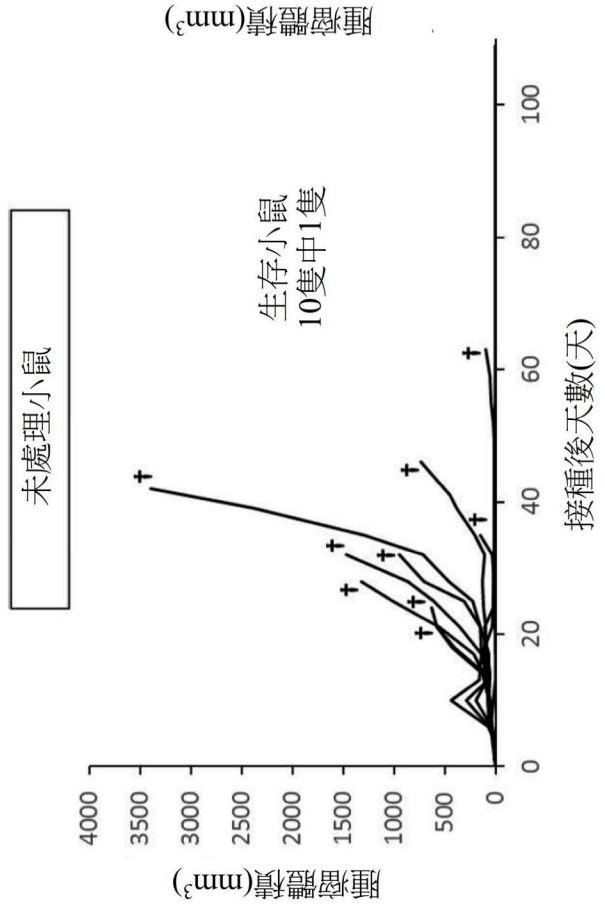
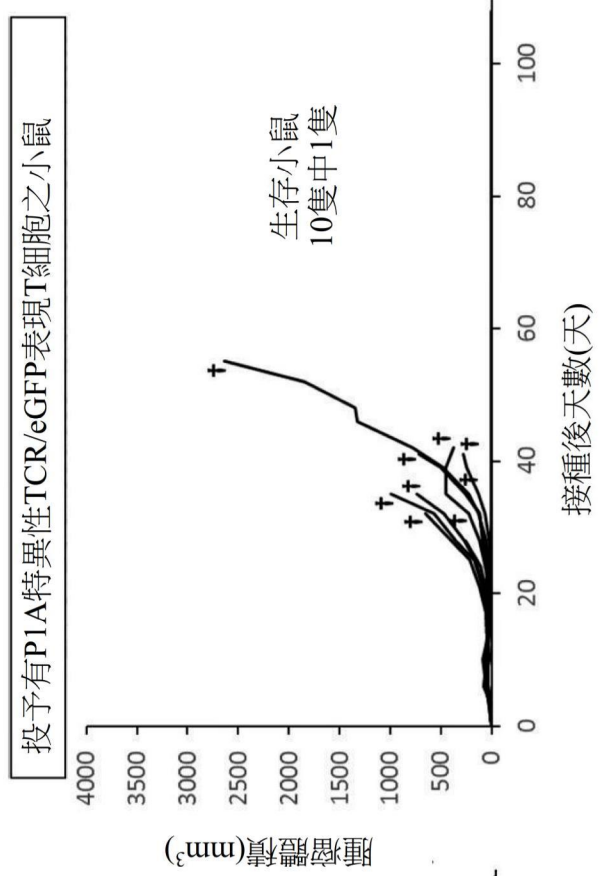
IL-7×CCL19×eGFP表現載體

【圖6】

小鼠生存曲線



【圖7】



【圖8】