

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6930762号
(P6930762)

(45) 発行日 令和3年9月1日(2021.9.1)

(24) 登録日 令和3年8月16日(2021.8.16)

(51) Int.Cl.			F I		
C 1 2 N	15/113	(2010.01)	C 1 2 N	15/113	1 4 O Z
C 1 2 N	15/63	(2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z N A Z
C 1 2 N	15/867	(2006.01)	C 1 2 N	15/867	Z
C 1 2 N	15/62	(2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z
C 1 2 N	15/13	(2006.01)	C 1 2 N	15/13	

請求項の数 15 (全 32 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2019-538555 (P2019-538555)	(73) 特許権者	519118463
(86) (22) 出願日	平成29年11月13日(2017.11.13)		上海優▲か▼迪生物医薬科技有限公司
(65) 公表番号	特表2019-534711 (P2019-534711A)		SHANGHAI UNICAR-THE
(43) 公表日	令和1年12月5日(2019.12.5)		RAPY BIO-MEDICINE T
(86) 国際出願番号	PCT/CN2017/110653		ECHNOLOGY CO., LTD
(87) 国際公開番号	W02018/103501		中国上海市浦東新区哈雷路998号4号楼
(87) 国際公開日	平成30年6月14日(2018.6.14)		202室
審査請求日	平成31年4月2日(2019.4.2)		Room 202, Building N
(31) 優先権主張番号	201611123283.4		o. 4, Halei Road No. 9
(32) 優先日	平成28年12月8日(2016.12.8)		98, Pudong District
(33) 優先権主張国・地域又は機関	中国 (CN)		Shanghai 201203 Chi
			na
		(74) 代理人	110002262
			TRY国際特許業務法人

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒトPD-1をロックダウンしたsiRNA、組換え発現CAR-Tベクターおよびその構築方法と使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヒトPD-1をロックダウンするsiRNAであって、配列番号41および配列番号42で示されるヌクレオチド配列の1対であるsiRNA。

【請求項2】

腫瘍の免疫逃避機序を解消または軽減する薬物の製造における請求項1に記載のsiRNAの使用。

【請求項3】

請求項1に記載のsiRNAをコードする配列を含む組換え発現ベクター。

【請求項4】

前記発現ベクターはレンチウイルス発現ベクター、レトロウイルス発現ベクター、アデノウイルス発現ベクター、アデノ随伴ウイルス発現ベクターまたはプラスミドであることを特徴とする請求項3に記載の組換え発現ベクター。

【請求項5】

前記のレンチウイルス発現ベクターは、配列番号2で示されるプラスミド複製のための原核レプリコンpUC Ori配列、配列番号1で示される目的菌株の大量増幅のためのアンピシリン耐性遺伝子含有AmpR配列、配列番号3で示される真核細胞内における複製を増強するためのウイルスレプリコンSV40 Ori配列、レンチウイルスパッケージングのためのレンチウイルスパッケージングのシスエレメント、配列番号11で示される真核細胞における緑色蛍光タンパク質の発現のためのZsGreen1緑色蛍光タンパク質のコード遺伝子、配列番号12

で示されるタンパク質の共転写発現のためのIRESリボソーム結合配列、配列番号15で示されるキメラ抗原受容体遺伝子の真核転写のためのヒトEF1 プロモーター、認識、伝達、開始が一体化した第二世代CARまたは第三世代CARを組み立てるための抗BCMAキメラ抗原受容体のコード遺伝子、配列番号13で示される遺伝子組換えの発現効率を増強するためのeWPRE増強型ウッドチャックB型肝炎ウイルス転写後調節エレメント、配列番号14で示される細胞内におけるsiRNAの転写のためのヒトRNAポリメラーゼIIIプロモーター-hU6を含むことを特徴とする請求項4に記載の組換え発現ベクター。

【請求項6】

前記レンチウイルスパッケージングのシスエレメントは、第二世代のレンチウイルスベクターを使用し、配列番号5で示されるレンチウイルス5'末端LTR、配列番号6で示されるレンチウイルス3'末端自己不活性化LTR、配列番号7で示されるGagシスエレメント、配列番号8で示されるRREシスエレメント、配列番号9で示されるenvシスエレメント、配列番号10で示されるcPPTシスエレメントを含むことを特徴とする請求項5に記載の組換え発現ベクター。

10

【請求項7】

前記レンチウイルスパッケージングのシスエレメントは、第三世代のレンチウイルスベクターを使用し、配列番号5で示されるレンチウイルス5'末端LTR、配列番号6で示されるレンチウイルス3'末端自己不活性化LTR、配列番号7で示されるGagシスエレメント、配列番号8で示されるRREシスエレメント、配列番号9で示されるenvシスエレメント、配列番号10で示されるcPPTシスエレメント、および配列番号4で示されるRSVプロモーターを含むことを特徴とする請求項5に記載の組換え発現ベクター。

20

【請求項8】

前記eWPRE増強型ウッドチャックB型肝炎ウイルス転写後調節エレメントは、6つのヌクレオチドの増強突然変異g.396G>A、g.397C>T、g.398T>C、g.399G>A、g.400A>T、およびg.411A>Tを有することを特徴とする請求項5に記載の組換え発現ベクター。

【請求項9】

前記抗BCMAキメラ抗原受容体のコード遺伝子は、順に直列に接続する配列番号16で示されるCD8 leaderキメラ受容体シグナルペプチドをコードする配列、配列番号17で示されるBCMAの1本鎖抗体軽鎖VLをコードする配列、配列番号18で示されるOptimal Linker Cをコードする配列、配列番号19で示されるBCMAの1本鎖抗体重鎖VHをコードする配列、配列番号20で示されるCD8 Hingeキメラ受容体ヒンジをコードする配列、配列番号21で示されるCD8 Transmembraneキメラ受容体膜貫通領域をコードする配列、配列番号22で示されるCD137キメラ受容体共刺激因子をコードする配列、および配列番号23で示されるTCRキメラ受容体T細胞活性化ドメインをコードする配列を含むことを特徴とする請求項5に記載の組換え発現ベクター。

30

【請求項10】

前記抗BCMAキメラ抗原受容体のコード遺伝子は、順に直列に接続する配列番号16で示されるCD8 leaderキメラ受容体シグナルペプチドをコードする配列、配列番号17で示されるBCMAの1本鎖抗体軽鎖VLをコードする配列、配列番号18で示されるOptimal Linker Cをコードする配列、配列番号19で示されるBCMAの1本鎖抗体重鎖VHをコードする配列、配列番号20で示されるCD8 Hingeキメラ受容体ヒンジをコードする配列、配列番号21で示されるCD8 Transmembraneキメラ受容体膜貫通領域をコードする配列、配列番号24示されるCD28キメラ受容体共刺激因子をコードする配列、配列番号22で示されるCD137キメラ受容体共刺激因子をコードする配列、および配列番号23で示されるTCRキメラ受容体T細胞活性化ドメインをコードする配列を含むことを特徴とする請求項5に記載の組換え発現ベクター。

40

【請求項11】

請求項1に記載のsiRNAをコードする配列を含むレンチウイルス発現ベクターの構築方法であって、

アンピシリン耐性遺伝子含有AmpR配列（配列番号1で示される）、原核レプリコンpUC Ori配列（配列番号2で示される）、ウイルスレプリコンSV40 Ori配列（配列番号3で示され

50

る)、レンチウイルスパッケージングのためのレンチウイルスパッケージングのシスエレメント、ZsGreen1緑色蛍光タンパク質のコード遺伝子(配列番号11で示される)、IRESリボソーム結合配列(配列番号12で示される)、eWPRE増強型ウッドチャックB型肝炎ウイルス転写後調節エレメント(配列番号13で示される)、ヒトRNAポリメラーゼIIIプロモーターhU6(配列番号14で示される)をレンチウイルス骨格プラスミドに組み込む工程(1)と

、
ヒトEF1プロモーター(配列番号15で示される)、認識、伝達、開始が一体化した第二世代CARまたは第三世代CARを組み立てるための抗BCMAキメラ抗原受容体のコード遺伝子を第二世代CARまたは第三世代CARの設計態様に組み立て、酵素切断、連結、組換え反応を経てレンチウイルス骨格プラスミドにクローニングし、第二世代CARまたは第三世代CARの設計の組換えレンチウイルスプラスミドを得る工程(2)と、

10

上記siRNAをコードする配列および配列番号55と配列番号56で示される陰性対照配列をコードする配列を、それぞれ工程(2)で得られた組換えレンチウイルスプラスミドにクローニングし、IL-1ノックダウン組換えレンチウイルスプラスミドを得る工程(3)と、

工程(3)で得られた組換えレンチウイルスプラスミドをそれぞれレンチウイルスパッケージングプラスミドおよび膜タンパク質プラスミドとHEK293T/17細胞に共形質移入させ、HEK293T/17細胞において遺伝子の転写・発現を行わせた後、パッケージングが成功した組換えレンチウイルスベクターが細胞培養上清に放出され、組換えレンチウイルスベクターを含む上清液を収集する工程(4)と、

得られた組換えレンチウイルス上清は吸引ろ過、吸着、溶離のイオン交換手段によって精製し、それぞれ組換えレンチウイルスベクターを得る工程(5)と、

20

を含む構築方法。

【請求項12】

工程(5)において、前記吸引ろ過ステップは、上清体積を200ml~2000mlに、真空度を-0.5MPa~-0.9MPaに抑え、穴詰まりによるベクターの損失を防ぎ、前記吸着ステップは、溶液のpH値を6~8に抑え、pHの変化によるベクターの不活性化を防止し、前記溶離ステップは溶離液のイオン強度を0.5M~1.0Mに抑え、イオン強度の変化による溶離の不完全またはベクターの不活性化を防ぐことを特徴とする請求項11に記載の構築方法。

【請求項13】

CAR-Tによる腫瘍の治療過程において腫瘍の免疫逃避機序を解消または軽減する薬物の製造における請求項3~10のいずれかに記載の組換え発現ベクターの使用。

30

【請求項14】

請求項3に記載の請求項1に記載のsiRNAをコードする配列を含む組換え発現ベクターにより形質移入されたT細胞である、CAR-T細胞。

【請求項15】

多発性骨髄腫、膵臓腺癌、脳膠細胞腫、骨髄腫の治療薬の製造における請求項14に記載のCAR-T細胞の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

40

本発明は、腫瘍免疫治療の技術分野に属し、具体的には、ヒトプログラム細胞死受容体1(PD-1)をノックダウンしたsiRNA、組換え発現CAR-Tベクター(特にPD-1をノックダウンすることによって腫瘍の免疫逃避機序を解消または軽減するCAR-T遺伝子組換えベクター)およびその構築方法と使用に関する。

【背景技術】

【0002】

腫瘍免疫治療の論理的基礎は、免疫系が腫瘍関連抗原を認識し、生体を調節して腫瘍細胞を攻撃する(高度特異的な細胞溶解)能力を有することである。1950年代、BurnetとThomasは「免疫監視」理論を提出し、生体においてよく現れる突然変異した腫瘍細胞が免疫系によって認識されて排除されると考え、腫瘍免疫治療の論理的基礎を築いた[Burnet FM

50

.Immunological aspects of malignant disease.Lancet,1967;1: 1171-4]。その後、様々な腫瘍免疫療法は、サイトカイン療法、モノクローナル抗体療法、養子免疫療法、ワクチン療法などを含め、次々と臨床に応用されてきた。

【 0 0 0 3 】

2013年、より進んだ腫瘍免疫療法 - CAR-T療法は、臨床への応用に成功し、それまでになかった臨床の治療効果を示した。CAR-Tは、Chimeric Antigen Receptor T-Cell Immunotherapyの略で、キメラ抗原受容体T細胞療法である。CAR-T療法で、臨床において最も進んでいるのがノバルティス社のCLT019で、CLT019によって再発・難治急性リンパ性白血病患者を治療したところ、6か月の腫瘍無進行生存が67%に達し、その中で最も長かった奏効期間は2年超に達した。当社が中国上海にあるSHANGHAI UNICAR-THERAPY BIO-MEDICINE TECHNOLOGY CO., LTDは病院と提携し、計36例の再発・難治急性リンパ性白血病患者を治療したところ、そのうち24例が治癒され、緩和の比率は66.6%に達した。これは抗癌研究における破壊的なブレイクスルーである。CAR-T細胞療法は癌を治癒する可能性が最も高い手段の一つで、「Science」誌によって2013年度の科学技術の10大ブレイクスルーの1位に選ばれた。

10

【 0 0 0 4 】

CAR-T療法は効果が顕著であるが、固形腫瘍を治療する過程において多くの困難に遭遇し、そのうち重要な原因の一つはPD1/PDL1抑制性免疫チェックポイントであり(図1Aに示す)、これらは伝達抑制シグナルに結合し、T細胞の免疫活性を抑制し、免疫耐性では重要な作用を果たし、同時に腫瘍細胞の逃避を促進する要因でもある。

20

【 0 0 0 5 】

PD-1(CD279とも呼ばれる)は、免疫抑制性受容体で、CD28ファミリーのメンバーに属するI型膜貫通タンパク質で、プログラム細胞死1受容体は1992年にIshidaらによって[Ishida Y,Agata Y,Shibahara K,et al. Induced expression of PD-1,a novel member of the immunoglobulin gene superfamily,upon programmed cell death [J].EMBO J,1992,11(11):3887-3895.]サブトラクティブハイブリダイゼーションでアポトーシスのT細胞ハイブリドーム中で得られて命名された。ヒトPD-1遺伝子は2q37.35染色体に位置し、約55kDの膜貫通糖タンパク質をコードする。PD-1は活性化したT細胞、B細胞、単核球や樹状細胞の表面に幅広く発現され、PD-1は構造上CTLA-4と30%の相同性を有し、細胞内領域に2つのチロシン残基があり、それぞれN末端の免疫受容体チロシン依存性抑制モチーフ(immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif、ITIM)とC末端の免疫受容体チロシン依存性スイッチモチーフ(immunoreceptor tyrosin-based switch motif、ITSM)の構成に参与する。細胞外領域は、IgV様ドメインからなり、多くのグリコシル化の部位を含んで重度にグリコシル化され、当該ドメインは配位子と結合することによって、T細胞の活性化を抑制する機能を果たす[李瑛、焦順昌ら。PD-1/PD-L1シグナル経路の腫瘍免疫逃避における作用および臨床的意義[J]. Acad J Chin PLA Med Sch, Jul 2015,36(7).]。

30

【 0 0 0 6 】

PD-L1は多くの癌組織で過剰発現し、NSCLC、メラノーマ、乳癌、膠細胞腫、リンパ腫、白血病および様々な泌尿系腫瘍、消化管腫瘍、生殖系腫瘍などを含む[Intlekofer AM,Thompson CB. At the bench:preclinical rationale for CTLA-4 and PD-1 blockade as cancer immunotherapy[J]. J Leukoc Biol,2013,94(1):25-39.]. Parsaはネズミとヒトの腫瘍細胞においてT細胞によって異常分泌されるIFN- γ を見出し、IFN- γ は腫瘍細胞におけるPD-L1の高発現を誘導することができる[Ding H,Wu X,Wu Jら,Delivering PD-1 inhibitory signal concomitant with blocking ICOS co-stimulation suppresses lupus-like syndrome in autoimmune BXSB mice[J]. Clin Immunol, 2006,118(2/3):258-267.]. PD-L1の高発現は、RASおよびPI3K/AKTシグナル信号通路を抑制することによって、細胞周期のチェックポイントタンパク質および細胞増殖に関連するタンパク質の発現を調節し、最終的にT細胞の増殖の抑制につながる[11]. Dongらは、体外実験およびマウスモデルにおいてさらに、PD-1/PD-L1シグナル経路の活性化は特異的CTLアポトーシスを誘導し、CTLの細胞毒性・殺傷効果の感度が低下し、腫瘍細胞の免疫逃避を促進することを見出した[Dong

40

50

H,Strome SE,Salomao DRら, Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion[J]. Nat Med,2002,8(8):793-800.]。

【 0 0 0 7 】

現在、臨床では、主に商品化されたPD-1モノクローナル抗体が、免疫チェックポイント阻害剤として、腫瘍細胞の免疫逃避を抑制するために使用されている。2014年9月3日、ブリストル・マイヤーズ スクイブ社は抗PD-1薬であるOpdivo (Nivolumab) を日本で正式に上市したが、日本国内ではこの薬物は現在まだメラノーマ患者に限られている。薬物は100mgあたり、729849円(約43000人民元)の価格に設定されている。体重1kgあたり2mgの使用量が必要であるため、体重50kgの人には100mgの使用量が必要である。そして、体重が10kg増えると薬物投与量が20mg(150200円、約8778人民元)増え、3週間を1回の治療コースとする。価格がかなり高く、一般の家庭では負担しにくい。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 8 】

本発明の目的は、既存技術の欠点を克服し、ヒトPD-1をロックダウンしたsiRNA、組換え発現CAR-Tベクターおよびその構築方法と使用を提供することにある。

【 0 0 0 9 】

本発明の目的は、以下の技術案によって実現される。

【 0 0 1 0 】

本発明の第一の目的は、ヒトPD-1をロックダウンしたsiRNAであって、下記のa~gから選ばれる任意の1対であるsiRNAを提供することにある。

20

- a. 配列番号41および配列番号42で示されるヌクレオチド配列、
- b. 配列番号43および配列番号44で示されるヌクレオチド配列、
- c. 配列番号45および配列番号46で示されるヌクレオチド配列、
- d. 配列番号47および配列番号48で示されるヌクレオチド配列、
- e. 配列番号49および配列番号50で示されるヌクレオチド配列、
- f. 配列番号51および配列番号52で示されるヌクレオチド配列、
- g. 配列番号53および配列番号54で示されるヌクレオチド配列。

さらに、a. 配列番号41および配列番号42で示されるヌクレオチド配列が好ましい。

【 0 0 1 1 】

本発明の第二の目的は、腫瘍の免疫逃避機序を解消または軽減する薬物の製造における上記siRNAの使用を提供することにある。

30

【 0 0 1 2 】

本発明の第三の目的は、上記siRNAを含む組換え発現ベクターを提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 1 3 】

さらに、前記発現ベクターはレンチウイルス発現ベクター、レトロウイルス発現ベクター、アデノウイルス発現ベクター、アデノ随伴ウイルス発現ベクターまたはプラスミドであり、好ましくは、上記siRNAを含むレンチウイルス発現ベクターである。

【 0 0 1 4 】

さらに、前記のレンチウイルス発現ベクターは、配列番号2で示されるプラスミド複製のための原核レプリコンpUC Ori配列、配列番号1で示される目的菌株の大量増幅のためのアンピシリン耐性遺伝子含有AmpR配列、配列番号3で示される真核細胞内における複製を増強するためのウイルスレプリコンSV40 Ori配列、レンチウイルスパッケージングのためのレンチウイルスパッケージングのシスエレメント、配列番号11で示される真核細胞における緑色蛍光タンパク質の発現のためのZsGreen1緑色蛍光タンパク質、配列番号12で示されるタンパク質の共転写発現のためのIRESリボソーム結合配列、配列番号15で示されるキメラ抗原受容体遺伝子の真核転写のためのヒトEF1 プロモーター、認識、伝達、開始が一体化した第二世代CARまたは第三世代CARを組み立てるための抗BCMAキメラ抗原受容体のコード遺伝子、配列番号13で示される遺伝子組換えの発現効率を増強するためのeWPRE増

40

50

強型ウッドチャックB型肝炎ウイルス転写後調節エレメント、配列番号14で示される細胞内におけるsiRNAの転写のためのヒトRNAポリメラーゼIIIプロモーターhU6を含む。

【0015】

さらに、前記レンチウイルスパッケージングのシスエレメントは、第二世代のレンチウイルスベクターを使用し、配列番号5で示されるレンチウイルス5'末端LTR、配列番号6で示されるレンチウイルス3'末端自己不活性化LTR、配列番号7で示されるGagシスエレメント、配列番号8で示されるRREシスエレメント、配列番号9で示されるenvシスエレメント、配列番号10で示されるcPPTシスエレメントを含む。

【0016】

さらに、前記レンチウイルスパッケージングのシスエレメントは、第三世代のレンチウイルスベクターを使用し、配列番号5で示されるレンチウイルス5'末端LTR、配列番号6で示されるレンチウイルス3'末端自己不活性化LTR、配列番号7で示されるGagシスエレメント、配列番号8で示されるRREシスエレメント、配列番号9で示されるenvシスエレメント、配列番号10で示されるcPPTシスエレメント、および配列番号4で示されるRSVプロモーターを含む。

【0017】

さらに、前記eWPRE増強型ウッドチャックB型肝炎ウイルス転写後調節エレメントは、6つのヌクレオチドの増強突然変異、具体的には、g.396G>A、g.397C>T、g.398T>C、g.399G>A、g.400A>T、g.411A>Tを有する。

【0018】

さらに、前記抗BCMAキメラ抗原受容体（第二世代CAR）は、順に直列に接続する配列番号16で示されるCD8 leaderキメラ受容体シグナルペプチド、配列番号17で示されるBCMAの1本鎖抗体軽鎖VL、配列番号18で示されるOptimal Linker C、配列番号19で示されるBCMAの1本鎖抗体重鎖VH、配列番号20で示されるCD8 Hingeキメラ受容体ヒンジ、配列番号21で示されるCD8 Transmembraneキメラ受容体膜貫通領域、配列番号22で示されるCD137キメラ受容体共刺激因子、および配列番号23で示されるTCRキメラ受容体T細胞活性化ドメインを含む。

【0019】

さらに、前記抗BCMAキメラ抗原受容体（第三世代CAR）は、順に直列に接続する配列番号16で示されるCD8 leaderキメラ受容体シグナルペプチド、配列番号17で示されるBCMAの1本鎖抗体軽鎖VL、配列番号18で示されるOptimal Linker C、配列番号19で示されるBCMAの1本鎖抗体重鎖VH、配列番号20で示されるCD8 Hingeキメラ受容体ヒンジ、配列番号21で示されるCD8 Transmembraneキメラ受容体膜貫通領域、配列番号24で示されるCD28キメラ受容体共刺激因子、配列番号22で示されるCD137キメラ受容体共刺激因子、および配列番号23で示されるTCRキメラ受容体T細胞活性化ドメインを含む。

【0020】

本発明の第四の目的は、上記siRNAを含むレンチウイルス発現ベクターの構築方法であって、以下の工程を含む方法を提供することにある。

【0021】

(1) アンピシリン耐性遺伝子含有AmpR配列（配列番号1で示される）、原核レプリコンpUC Ori配列（配列番号2で示される）、ウイルスレプリコンSV40 Ori配列（配列番号3で示される）、レンチウイルスパッケージングのためのレンチウイルスパッケージングのシスエレメント、ZsGreen1緑色蛍光タンパク質（配列番号11で示される）、IRESリボソーム結合配列（配列番号12で示される）、eWPRE増強型ウッドチャックB型肝炎ウイルス転写後調節エレメント（配列番号13で示される）、ヒトRNAポリメラーゼIIIプロモーターhU6（配列番号14で示される）をレンチウイルス骨格プラスミド（pLenti-3G silencer）に組み込む。

【0022】

(2) ヒトEF1 プロモーター（配列番号15で示される）、認識、伝達、開始が一体化した第二世代CARまたは第三世代CARを組み立てるための抗BCMAキメラ抗原受容体を第二世代

10

20

30

40

50

CARまたは第三世代CARの設計態様に組み立て、酵素切断、連結、組換え反応を経てレンチウイルス骨格プラスミドにクローニングし、第二世代CARまたは第三世代CARの設計の組換えレンチウイルスプラスミドpCARbcma-silencerを得る。

【 0 0 2 3 】

(3) 上記siRNAおよび配列番号55と配列番号56で示される陰性対照配列を、それぞれ工程(2)で得られた組換えレンチウイルスプラスミドにクローニングし、PD-1ノックダウン組換えレンチウイルスプラスミド(pCARbcma-1453~pCARbcma-1459および陰性対照のpCARbcma-1460)を得る。

【 0 0 2 4 】

(4) 工程(3)で得られた組換えレンチウイルスプラスミド(pCARbcma-1453~pCARbcma-1460)をそれぞれレンチウイルスパッケージングプラスミドpPac-GP、pPac-Rおよび膜タンパク質プラスミドpEnv-GとHEK293T/17細胞に共形質移入させ、HEK293T/17細胞において遺伝子の転写・発現を行わせた後、パッケージングに成功した組換えレンチウイルスベクターが細胞培養上清に放出されるので、組換えレンチウイルスベクターを含む上清液を収集する。

【 0 0 2 5 】

(5) 得られた組換えレンチウイルス上清は吸引ろ過、吸着、溶離のイオン交換手段によって精製し、それぞれ組換えレンチウイルスベクターを得る。

【 0 0 2 6 】

さらに、工程(1)において、前記レンチウイルスパッケージングのシスエレメントは、第二世代のレンチウイルスベクターを使用し、配列番号5で示されるレンチウイルス5'末端LTR、配列番号6で示されるレンチウイルス3'末端自己不活性化LTR、配列番号7で示されるGagシスエレメント、配列番号8で示されるRREシスエレメント、配列番号9で示されるenvシスエレメント、配列番号10で示されるcPPTシスエレメントを含み、前記レンチウイルスパッケージングのシスエレメントは、第三世代のレンチウイルスベクターを使用し、配列番号5で示されるレンチウイルス5'末端LTR、配列番号6で示されるレンチウイルス3'末端自己不活性化LTR、配列番号7で示されるGagシスエレメント、配列番号8で示されるRREシスエレメント、配列番号9で示されるenvシスエレメント、配列番号10で示されるcPPTシスエレメント、前記レンチウイルスパッケージングのシスエレメントおよび配列番号4で示されるRSVプロモーターを含む。

【 0 0 2 7 】

さらに、工程(2)において、前記認識、伝達、開始が一体化した第二世代CARを組み立てるための抗BCMAキメラ抗原受容体は、順に直列に接続する配列番号16で示されるCD8 leaderキメラ受容体シグナルペプチド、配列番号17で示されるBCMAの1本鎖抗体軽鎖VL、配列番号18で示されるOptimal Linker C、配列番号19で示されるBCMAの1本鎖抗体重鎖VH、配列番号20で示されるCD8 Hingeキメラ受容体ヒンジ、配列番号21で示されるCD8 Transmembraneキメラ受容体膜貫通領域、配列番号22で示されるCD137キメラ受容体共刺激因子、および配列番号23で示されるTCRキメラ受容体T細胞活性化ドメインを含み、前記認識、伝達、開始が一体化した第三世代CARを組み立てるための抗BCMAキメラ抗原受容体は、順に直列に接続する配列番号16で示されるCD8 leaderキメラ受容体シグナルペプチド、配列番号17で示されるBCMAの1本鎖抗体軽鎖VL、配列番号18で示されるOptimal Linker C、配列番号19で示されるBCMAの1本鎖抗体重鎖VH、配列番号20で示されるCD8 Hingeキメラ受容体ヒンジ、配列番号21で示されるCD8 Transmembraneキメラ受容体膜貫通領域、配列番号24で示されるCD28キメラ受容体共刺激因子、配列番号22で示されるCD137キメラ受容体共刺激因子、および配列番号23で示されるTCRキメラ受容体T細胞活性化ドメインを含む。

【 0 0 2 8 】

さらに、工程(1)において、前記eWPRE増強型ウッドチャックB型肝炎ウイルス転写後調節エレメントは、6つのヌクレオチドの増強突然変異、具体的には、g.396G>A、g.397C>T、g.398T>C、g.399G>A、g.400A>T、g.411A>Tを有する。

【 0 0 2 9 】

10

20

30

40

50

さらに、工程(2)において、ヒトEF1 プロモーターによってCAR遺伝子全体の発現を開始し、CD8 leaderキメラ受容体シグナルペプチドはCARコード配列のN末端に位置し、CARタンパク質の細胞膜への局在化をガイドするためのものであり、CD19の1本鎖抗体軽鎖VL、Optimal Linker C、CD19の1本鎖抗体重鎖VHはscfv領域を組み立て、CD19抗原を認識するためのものであり、CD8 Hingeキメラ受容体ヒンジはscfvを細胞膜の外側にアンカーさせるためのものであり、CD8 Transmembraneキメラ受容体膜貫通領域はキメラ受容体全体を細胞膜に固定させるためのものであり、CD137キメラ受容体共刺激因子はT細胞の増殖およびサイトカインの分泌を刺激するためのものであり、TCRキメラ受容体T細胞活性化ドメインは下流のシグナル経路の発現を活性化するためのものであり、scfv領域がCD20抗原に結合すると、シグナルがキメラ受容体を介して細胞内に伝達することで、T細胞の増殖、
10 サイトカインの分泌の増加、抗アポトーシスタンパク質の分泌の増加、細胞死亡の遅延、標的細胞の分解を含む一連の生物学的効果が生じる。

【0030】

さらに、工程(4)において、前記レンチウイルスベクターは蛍光タグzsGreen1が付いているバージョンと蛍光タグzsGreen1が付いていないバージョンがあり、蛍光タグzsGreen1が付いているバージョンは体外実験用で、蛍光タグzsGreen1が付いていないバージョンは臨床実験用である。

【0031】

さらに、工程(5)において、前記吸引る過ステップは、上清体積を200ml~2000mlに、真空度を-0.5MPa~-0.9MPaに抑え、穴詰まりによるベクターの損失を防ぎ、前記吸着ステップは、溶液のpH値を6~8に抑え、pHの変化によるベクターの不活性化を防止し、前記溶離ステップは溶離液のイオン強度を0.5M~1.0Mに抑え、イオン強度の変化による溶離の不完全またはベクターの不活性化を防ぐ。
20

【0032】

本発明の第五の目的は、CAR-Tによる腫瘍の治療過程において腫瘍の免疫逃避機序を解消または軽減する薬物の製造における上記siRNAを含む組換え発現ベクターの使用を提供することにある。

【0033】

本発明の第六の目的は、上記siRNAで修飾されたT細胞である、CAR-T細胞を提供することにある。
30

【0034】

本発明のもう一つの目的は、多発性骨髄腫、膵臓腺癌、脳膠細胞腫、骨髄腫を治療する薬物の製造における上記CAR-T細胞の使用を提供することにある。

【0035】

このような干渉は効果が持続し、細胞分裂後も有効である。RNAiは非常に優れた配列特異性を有する(Kisielow, M.ら(2002) Isoform-specific knockdown and expression of adaptor protein ShcA using small interfering RNA, J. of Biochemistry 363: 1-5)。そのため、RNAi系は配列が類似する他のmRNAに影響せずに、特異的に1種類の転写物をノックダウンすることができる。これらの特性のため、siRNA系は遺伝子発現の抑制、遺伝子機能の研究および薬物の標的の検証において将来性と価値を示す。また、siRNA系は、
40 (1) 遺伝子の過剰発現または誤発現による疾患、(2) 遺伝子の突然変異による疾患、を含む関連疾患の治療に使用することができる。

【0036】

本発明は、ヒトRNAポリメラーゼIIIプロモーターhU6、ヒトEF1 プロモーター、CD8 leaderキメラ受容体シグナルペプチド、BCMAの1本鎖抗体軽鎖VL、Optimal Linker C、BCMAの1本鎖抗体重鎖VH、CD8 Hingeキメラ受容体ヒンジ、CD8 Transmembraneキメラ受容体膜貫通領域、CD137キメラ受容体共刺激因子、TCRキメラ受容体T細胞活性化ドメインを組み換えレンチウイルスベクターに組み込み、ヒトEF1 プロモーターによってCAR遺伝子全体の発現を開始させる。CARタンパク質は細胞膜の表面に局在化し、BCMA抗原を認識し、T細胞の増殖およびサイトカインの分泌を刺激し、下流シグナル経路の発現を活性化させる。sc
50

fv領域がBCMA抗原に結合すると、シグナルがキメラ受容体を介して細胞内に伝達することで、T細胞の増殖、サイトカインの分泌の増加、抗アポトーシスタンパク質の分泌の増加、細胞死亡の遅延、標的細胞の分解などの一連の生物学的効果が生じる。ヒトRNAポリメラーゼIIIプロモーターhU6によってPD1siRNAの発現を開始させ、RISC複合体の作用によって、PD-1 mRNAが分解され、PD1のPDL1との結合が遮断されることによって、PD1/PDL1のシグナル経路が遮断され、免疫逃避を抑制する効果を実現させる。

【0037】

本発明で使用される発現ベクターは、プラスミド複製のための原核レプリコン (pUC Ori)、目的菌株の大量増幅のための原核選別マーカー (AmpR)、真核細胞内における複製を増強するためのウイルスレプリコン (SV40 Ori)、レンチウイルスパッケージングのためのレンチウイルスパッケージングのシスエレメント (RSV、5'末端LTR、3'末端自己不活性化LTR、Gag、RRE、env、cPPT)、細胞内におけるsiRNAの転写のためのヒトRNAポリメラーゼIIIプロモーター (hU6)、真核細胞における緑色蛍光タンパク質の発現のための真核緑色蛍光タグタンパク質 (ZsGreen1)、タンパク質の共転写発現のための共発現エレメント (IRES)、キメラ抗原受容体遺伝子の真核転写のための真核プロモーター (EF1)、認識、伝達、開始が一体化した第二世代CARまたは第三世代CARを組み立てるためのキメラ抗原受容体 (CD8 leader、BCMA VL、Optimal Linker C、BCMA VH、CD8 Hinge、CD8 Transmembrane、CD28 (配列番号24)、CD137、TCR)、遺伝子組換えの発現効率を増強するための転写後調節エレメント (eWPRE) を含む。

【0038】

本発明は、ペプチドを含む医薬配合品に関し、具体的には以下のものに関する。

【0039】

一、ヒトRNAポリメラーゼIIIプロモーターhU6、アンピシリン耐性遺伝子含有AmpR配列、原核レプリコンpUC Ori配列、ウイルスレプリコンSV40 Ori配列、RSVプロモーター、ヒトEF1プロモーター、レンチウイルス5'末端LTR、レンチウイルス3'末端自己不活性化LTR、Gagシスエレメント、RREシスエレメント、envシスエレメント、cPPTシスエレメント、IRESリボソーム結合配列、ZsGreen1緑色蛍光タンパク質、WPREウッドチャックB型肝炎ウイルス転写後調節エレメントからなる組換えレンチウイルスベクター骨格で、このような組換えレンチウイルスベクター骨格は異なる治療性遺伝子を担持して幅広く養子細胞治療の分野に使用することができ、また異なるsiRNAを担持して幅広く遺伝子の過剰発現、誤発現および遺伝子の突然変異による疾患に使用することもできる。

【0040】

二、組換えレンチウイルスベクター骨格、PD1-siRNA、CD8 leaderキメラ受容体シグナルペプチド、BCMAの1本鎖抗体軽鎖VL、1本鎖抗体ヒンジLinker C、BCMAの1本鎖抗体重鎖VH、CD8 Hingeキメラ受容体ヒンジ、CD8 Transmembraneキメラ受容体膜貫通領域、CD28キメラ受容体共刺激因子、CD137キメラ受容体共刺激因子、TCRキメラ受容体T細胞活性化ドメインで組換えレンチウイルスベクターを構築し、当該方法で得られる組換えレンチウイルスベクターはヒトT細胞におけるBCMAキメラ抗原受容体の発現を実現させ、T細胞のBCMA陽性細胞に対する殺傷作用を誘導して活性化し、臨床において多発性骨髄腫 (MM) の治療に使用することができる。ヒトTリンパ細胞内でプログラム細胞死受容体1 (PD-1) のsiRNAを発現し、有効にTリンパ細胞の表面におけるプログラム細胞死受容体1の発現レベルを低下させ、PD-1/PD-L1免疫調節シグナル経路を遮断し、臨床において腫瘍の免疫逃避に対する抑制に有用で、CAR-T細胞の免疫治療の効果を向上させる。

【0041】

本発明で使用されるのはPD-1に対するsiRNA遺伝子サイレンシング技術であり、1990年代以来、研究者は2本鎖RNA (「dsRNA」) がタンパク質の発現を抑制することができることを見出した。このような遺伝子を沈黙させる能力は、人類の疾患を治療する上で幅広い将来性があり、多くの研究者や企業は現在かなりの資源をこのような技術に基づいた治療方法の発展に投入している。

【0042】

10

20

30

40

50

機序の面からすると、dsRNAが植物や無脊椎動物の細胞に入ると、III型エンドヌクレアーゼDicerによってsiRNAに分解される。(Sharp, RNA interference-2001, Genes Dev.2001, 15:485)。III型エンドヌクレアーゼDicerによって、dsRNAが2塩基オーバーハングの3'粘着末端を有する19~23bpのsiRNAに分解される。(Bernstein, Caudy, Hammond, & Hannon, Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference, Nature 2001, 409:363)。siRNAはRNA誘導サイレンシング複合体(RISC)に取り込まれ、複合体における一つまたは複数のヘリカーゼによって2本鎖siRNAに解離し、相補アンチセンス鎖をガイドして標的を認識させる。(Nykanen, Haley, & Zamore, ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway, Cell 2001, 107:309)。対応する標的mRNAに結合すると、RISC複合体における一つまたは複数のエンドヌクレアーゼによって標的mRNAが切断されてmRNAを沈黙させる。(Elbashir, Elbashir, Lendeckel, & Tuschl, RNA interference is mediated by 21-and 22-nucleotide RNAs, Genes Dev 2001, 15:188)。

【0043】

本発明で設計されたPD1siRNA配列は21 bpのヌクレオチドを含み、N2[CG]N8[AU]N8[AU]N2のオリゴヌクレオチドの配列パターンを使用し、相補配列の間にステムループ(stem-loop)のヘアピン構造を利用し、siRNA pattern、GC percentage、T or A or G in a row、consecutive GC、3' end nt pattern、thermodynamic value、siRNA target、identity、alignmentなどの条件によるスクリーニングによって、siRNA設計の干渉成功率を大幅に向上させた。

【0044】

本発明で使用されるヒトRNAポリメラーゼIIIプロモーターhU6はPD1siRNAを転写させ、PD-1発現のシステムを抑制し、T細胞殺傷実験において、QPCRによる測定では、有効にPD-1 mRNAの転写レベルを抑制し、有効にT細胞の表面におけるPD-1受容体の発現量を減少させることによって、PD-1/PDL-1のシグナル経路を遮断し、免疫逃避を抑制する効果を実現させることができる。将来、臨床で使用し、CAR-T細胞内におけるPD-1発現レベルを抑制し、CAR-T細胞の体内における腫瘍に対する殺傷効果を増強することができる。

【0045】

本発明では、レンチウイルスベクターの態様によってsiRNAを輸送する(図2に示す)。まず、コストを節約し、PD1siRNAの体外合成の高い費用を避ける。次に、PD1siRNAの体内輸送効率が低いという問題を防ぐ。第三に、ヒトRNAポリメラーゼIIIプロモーターhU6でPD1siRNAを発現させることによって、有効に細胞内におけるRNA転写系を利用し、大量に対応するPD1siRNAを発現させ、一連の酵素触媒作用を経て、優れた遺伝子サイレンシング効果を実現する。

【0046】

本発明で使用されるベクター骨格は第三世代のレンチウイルスベクターで(図3Aに示す)、3' SIN LTRはU3領域を除去し、レンチウイルスベクターが自己複製する可能性を無くし、安全性を大幅に向上させる。cPPTとWPREエレメントを加え、導入効率と遺伝子組換えの発現効率を向上させる。RSVプロモーターによってレンチウイルスベクターのパッケージング時のコアRNAの持続的で効率的な転写を保証する。ヒト自身のEF1プロモーターを利用し、CAR遺伝子が人体内において長時間持続的に発現できるようにさせる。

【0047】

本発明で使用されるsiRNAノックダウン技術案は、同様に第三世代CARの設計案に使用することができる。第三世代CARの設計は第二世代の設計と比べ、CD28キメラ受容体共刺激因子(配列番号24)が加えられている。

【0048】

本発明で使用されるレンチウイルスベクターのカラム精製システム(図8に示す)は、本社で開発されたレンチウイルスの大規模生産プロセスである。通常の超遠心法または高速遠心法は、遠心沈降原理でレンチウイルス粒子を分離するものであり、不可避な沈降係数が近い不純物が多く残り、後続の実験に不利な影響を与える。そして、管への仕込み過

10

20

30

40

50

程が複雑で、操作が煩雑で、数回の容器の入れ替えは多くの汚染の可能性をもたらす。一方、本発明のレンチウイルスベクターのカラム精製プロセスは半自動化操作で、全部の過程がクラス100の実験エリアで完成され、人工的操作の煩雑さおよび汚染の可能性を避け、回収されるレンチウイルスベクターは内毒素、マイコプラズマなどの指標において完全に臨床の標準に達する。後続は全自動精製装置の開発が可能である。

【0049】

本発明で使用されるCAR設計案は、第二世代のレンチウイルスベクターの構造にも使用することができる。第二世代と第三世代のレンチウイルスベクターの構造における違い(図3Bに示す)は、主に第三世代のレンチウイルスベクターでは、第二世代のベクターの5'LTRのU3領域をRSVプロモーターに変えることで、U3転写時のTatタンパク質に対する依存性を無くし、レンチウイルスの構造遺伝子からTat配列を削除するだけでなく、レンチウイルスのゲノムの転写レベルと転写の持続性も向上させることができることである。第二世代と第三世代のレンチウイルスベクターは主にゲノムの転写形態が違うため、本発明で使用されるCAR設計案は、この二つの世代のレンチウイルスベクターに使用することができる。

10

【0050】

本発明の第三世代のレンチウイルス骨格のプラスミドは、増強されたWPREエレメントを使用し、ペンシルベニア大学のCarl H. Juneら(Porter DL, Levine BL, Kalos M, Bagg A, June CH. Chimeric antigen receptormodified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med* 2011;365:725-33.)が使用するWPREエレメントと比べ、6つのヌクレオチドの増強突然変異(g.396G>A, g.397C>T, g.398T>C, g.399G>A, g.400A>T, g.411A>T)を有し、初期転写産物のポリアデノシン化を強化させ、細胞内におけるmRNAの含有量を増加し、遺伝子組換えの発現効率を増強する。

20

【0051】

本発明のLentivalパッケージングシステムは補助ウイルスのない4プラスミドパッケージングシステムで、4種類のプラスミドをHEK293T/17細胞に共形質移入させることによって、組換えレンチウイルスベクターが生成される。組換え後のレンチウイルスベクターは複製欠陥型ベクターで、外来断片を宿主の遺伝子に組み込むことができ、使用が一回きりで、複製と増殖が不可で、安全性が大幅に向上する。

【0052】

本発明で使用されるレンチウイルスベクターは、蛍光タグzsGreen1が付いているバージョンと蛍光タグzsGreen1が付いていないバージョンがあり、蛍光タグzsGreen1が付いているバージョンは体外実験用で、蛍光タグzsGreen1が付いていないバージョンは臨床実験用である。

30

【0053】

本発明で使用されるscfv領域のLinker設計は、顕著にサイトカインの分泌、CAR-T細胞の体外殺傷作用および臨床の治療効果を向上させることができる。

【0054】

このように、本発明に係る組換えレンチウイルスベクターは多発性骨髄腫(MM)のCAR-T治療に信頼できる遺伝子組換えの保証を提供すると同時に、腫瘍の免疫逃避機序を遮断し、患者が負担する医療コストを大幅に低下させることができる。

40

【0055】

本発明に係るPD-1ノックダウンsiRNA発現カセットおよびそのsiRNA発現産物は、CAR-Tの多発性骨髄腫(MM)に対する治療において腫瘍の免疫逃避機序の解消または軽減だけでなく、CAR-T治療によって、例えば、膵臓腺癌、脳膠細胞腫、骨髄腫などの種類の腫瘍を治療する時に生じる免疫逃避機序の抑制にも使用することができる。

【図面の簡単な説明】

【0056】

【図1】本発明のPD-1/PD-L1シグナル経路である。

【図2】本発明のレンチウイルスによるPD1siRNAの輸送態様の概略図である。

50

【図3】本発明のレンチウイルスベクターの構造の概略図である。ここで、図3(A)は本発明で使用される第三世代のレンチウイルスベクターの構造の概略図で、図3(B)は第二世代と第三世代のレンチウイルスベクターの構造の比較である。

【図4】本発明の組換えレンチウイルスベクターの構築のフロー図である。ここで、図(A)はレンチウイルス骨格プラスミドpLenti-3G silencerの構造概略図で、図(B)はpCARbcma-silencerプラスミドの構造概略図で、図(C)はpCARbcma-1453～pCARbcma-1460プラスミド概略図で、図(D)はレンチウイルスパッケージングプラスミドpPac-GPの構造概略図で、図(E)はレンチウイルスパッケージングプラスミドpPac-Rの構造概略図で、図(F)は膜タンパク質pEnv-Gの構造概略図である。

【図5】レンチウイルス骨格プラスミドpLenti-3G silencerの酵素切断の予想および酵素切断のアガロースゲル電気泳動パターンである。ここで、図5Aはレンチウイルス骨格プラスミドpLenti-3G silencerの酵素切断の予想の概略図で、レーン1は1kb DNAラダーマーカーで、バンドは上から下の順に10kb、8kb、6kb、5 kb、4kb、3.5kb、3kb、2.5kb、2kb、1.5kb、1kb、750bp、500bp、250bpで、レーン2はpLenti-3G silencerのCla I+BamH I酵素切断の予想で、バンドは上から下の順に7381bp、23bpである。図5Bはレンチウイルス骨格プラスミドpLenti-3G silencerの酵素切断のアガロースゲル電気泳動パターンで、レーン1は1kb DNAラダーマーカーの電気泳動の結果で、レーン2はpLenti-3G silencerのCla I+BamH I酵素切断の電気泳動の結果である。

【図6】組換えレンチウイルスプラスミドpCARbcma-silencerの酵素切断の予想および酵素切断のアガロースゲル電気泳動パターンである。ここで、図6Aは組換えレンチウイルスプラスミドpCARbcma-silencerの酵素切断の予想の概略図で、レーン1は1kb DNAラダーマーカーで、バンドは上から下の順に10kb、8kb、6kb、5 kb、4kb、3.5kb、3kb、2.5kb、2kb、1.5kb、1kb、750bp、500bp、250bpで、レーン2はpCARbcma-silencerのPvu I酵素切断の予想で、バンドは上から下の順に8898bp、896bp、249bpである。図6Bは組換えレンチウイルスプラスミドpCARbcma-silencerの酵素切断のアガロースゲル電気泳動パターンで、レーン1は1kb DNAラダーマーカーの電気泳動の結果で、レーン2はpCARbcma-silencerのPvu I酵素切断の電気泳動の結果である。

【図7】PD-1ノックダウン組換えレンチウイルスプラスミドpCARbcma-1453～pCARbcma-1460の配列決定比較の結果である。ここで、AはpCARbcma-1453の配列決定比較の結果で、BはpCARbcma-1454の配列決定比較の結果で、CはpCARbcma-1455の配列決定比較の結果で、DはpCARbcma-1456の配列決定比較の結果で、EはpCARbcma-1457の配列決定比較の結果で、FはpCARbcma-1458の配列決定比較の結果で、GはpCARbcma-1459の配列決定比較の結果で、HはpCARbcma-1460の配列決定比較の結果である。

【図8】イオン交換クロマトグラフィーによる組換えレンチウイルスベクターの精製のフロー図である。

【図9】組換えレンチウイルスベクターの力価の測定結果である。

【図10】組換えレンチウイルスベクターの異なる精製手段におけるマイコプラズマの測定結果で、レーン1はDL2000マーカーで、バンドは上から下の順に2kb、1kb、750 bp、500 bp、250 bp、100bpで、レーン2は陽性対照で、レーン3は陰性対照で、レーン4はPBSで、レーン5は水で、レーン6はlvCARbcma-1453で、レーン7はlvCARbcma-1454で、レーン8はlvCARbcma-1455で、レーン9はlvCARbcma-1456で、レーン10はlvCARbcma-1457で、レーン11はlvCARbcma-1458で、レーン12はlvCARbcma-1459で、レーン13はlvCARbcma-1460である。

【図11】mRNA相対発現量の縦棒グラフである。

【図12】CARタンパク質発現量のWB測定図である。ここで、図12Aにおいて、レーン1はP BMC空細胞で、レーン2は対照ウイルスMOCKで、レーン3はlvCARbcma-1453で、レーン4はlvCARbcma-1454で、レーン5はlvCARbcma-1455で、レーン6はlvCARbcma-1456で、レーン7はlvCARbcma-1457で、レーン8はlvCARbcma-1458で、レーン9はlvCARbcma-1459で、レーン10はlvCARbcma-1460である。図12Bは、 α -アクチンの内部参照のバンドである。

【図13】PD-1ノックダウン組換えレンチウイルスlvCARbcma-1453～lvCARbcma-1460で形質移入されたCAR-T細胞が、標的細胞と24hインキュベートした後、RT-QPCRによってPD-1

10

20

30

40

50

のmRNA転写レベルを測定したことを示す図である。

【図14】異なるエフェクター細胞を標的細胞と10:1の比率で共培養する条件において、24h後標的細胞に対する殺傷の状況を測定したことを示す図である。Eはエフェクター細胞で、Tは標的細胞である。

【発明を実施するための形態】

【0057】

以下の実施例は本発明を説明するためのものに過ぎず、本発明の範囲を制限するものではない。実施例において、具体的な条件が記載されていない実験方法は、通常、通常の条件、あるいはメーカー推薦の条件で行われた。

【0058】

実施例1 組換えレンチウイルスベクターの構築

一．材料

1. レンチウイルス骨格プラスミドpLenti-3G silencer、レンチウイルスパッケージングプラスミドpPac-GP、pPac-Rおよび膜タンパク質プラスミドpEnv-G、HEK293T/17細胞、相同組換え酵素、Oligo Annealing BufferはS&E (Shanghai) BIO-PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY CO.,LTD.によって提供された。

【0059】

2. プライマー：プライマーの設計原則によってDNA断片と標的部位の増幅に必要なプライマーは上海生物社によって合成され、具体的には以下の通りである。

EF1 -F : 5' -ATTCAAATTTTATCGATGCTCCGGTGCCCGTCAGT-3' (配列番号25)

EF1 -R : 5' -TCACGACACCTGAAATGGAAGA-3' (配列番号26)

CD8 leader-F : 5' -GGTGTCTGTGAGGATCCGCCACCATGGCCTTACCAGTGACCGC-3' (配列番号27)

CD8 leader-R : 5' -GTGTCATCTGGATGTCCGGCCTGGCGGCGTG-3' (配列番号28)

VL-F : 5' -CACGCCGCCAGGCCGGACATCCAGATGACCCAGAGCC-3' (配列番号29)

VL-R : 5' -ACGCTTGATCTCCAGTTTGGT-3' (配列番号30)

OLC-VH-F : 5' -ACTGGAGATCAAGCGTGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTCGGGTGGCGCGGATCTCAGGTGCAGCTGGTCCAGAG-3' (配列番号31)

VH-R : 5' -GCTGGACACGGTCACTAGTGTG-3' (配列番号32)

CD8 Hinge-F : 5' -AGTGACCGTGTCCAGCACCACGACGCCAGCGCC-3' (配列番号33)

CD8 Hinge-R : 5' -GTAGATATCACAGGCGAAGTCCA-3' (配列番号34)

CD8 Transmembrane-F : 5' -CGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGC-3' (配列番号35)

CD8 Transmembrane-R : 5' -TCTTTCTGCCCGTTTGCAGTAAAGGGTGATAACCAGTG-3' (配列番号36)

CD137-F : 5' -AAACGGGGCAGAAAGAACTC-3' (配列番号37)

CD137-R : 5' -TGCTGAACTTCACTCTCAGTTCACATCCTCCTTCTTCTTC-3' (配列番号38)

TCR-F : 5' -AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCG-3' (配列番号39)

TCR-R : 5' -GGAGAGGGGCGTGCAGTTAGCGAGGGGGCAGGGC-3' (配列番号40)

siRNA1453-F : 5' -CCGCTAAACTGGTACCGCATGAGCCTCGAGTCATGCGGTACCAGTTAGCATTTTTTGG-3' (配列番号41)

siRNA1453-R : 5' -AATTCAAAAAATGCTAACTGGTACCGCATGACTCGAGGCTCATGCGGTACCAGTTTGG-3' (配列番号42)

siRNA1454-F : 5' -CCGCATTGTCTTTCTAGCGGAATCTCGAGTCCGCTAGGAAAGACAATGGTTTTTTTGG-3' (配列番号43)

siRNA1454-R : 5' -AATTCAAAAAACCATTGTCTTTCTAGCGGACTCGAGATTCCGCTAGGAAAGACAATG-3' (配列番号44)

siRNA1455-F : 5' -CCGAGGCGCAGATCAAAGAGAGTTCTCGAGCTCTTTTGTATCTGCCTTGTTTTTTGG-3' (配列番号45)

siRNA1455-R : 5' -AATTCAAAAACAAGGCGCAGATCAAAGAGAGCTCGAGAACTCTCTTTGATCTGCGCCT-3' (配列番号46)

10

20

30

40

50

siRNA1456-F : 5' - CCGGCCCTGTGGTTCTATTATATTACTCGAGATATAATAGAACCACAG
GGAATTTTTTGG -3' (配列番号47)

siRNA1456-R : 5' - AATTCAAAAAATCCCTGTGGTTCTATTATATCTCGAGTAATATAATA
GAACCACAGGG -3' (配列番号48)

siRNA1457-F : 5' - CCGGGAACCCATTCTGAAATTATCTCGAGAATTTTCAGGAATGGGT
CCAATTTTTTGG -3' (配列番号49)

siRNA1457-R : 5' - AATTCAAAAAATTGGAACCCATTCTGAAATTCTCGAGATAATTTCA
GGAATGGGTTCC -3' (配列番号50)

siRNA1458-F : 5' - CCGGCAGGCCTAGAGAAGTTTCAGGCTCGAGTGAACTTCTCTAGG
CCTGCATTTTTTGG -3' (配列番号51)

10

siRNA1458-R : 5' - AATTCAAAAAATGCAGGCCTAGAGAAGTTTCACTCGAGCCTGAAA
CTTCTCTAGGCCTG -3' (配列番号52)

siRNA1459-F : 5' - CCGGCAGGACTCATGTCTCAATGCCCTCGAGCATTGAGACATGAGT
CCTGTGTTTTTTGG -3' (配列番号53)

siRNA1459-R : 5' - AATTCAAAAAACACAGGACTCATGTCTCAATGCTCGAGGGCATTGA
GACATGAGTCTCTG -3' (配列番号54)

siRNA1460-F : 5' - CCGGTTCTCCGAACGTGTACGTCTCGAGACGTGACACGTTCGGAG
AATTTTTTGG -3' (配列番号55)

siRNA1460-R : 5' - AATTCAAAAAATTCTCCGAACGTGTACGTCTCGAGACGTGACACG
TTCGGAGAA -3' (配列番号56)

20

PD-1-QPCR-F : 5' - TGCAGCTTCTCCAACACAT -3' (配列番号57)

PD-1-QPCR-R : 5' - CTTGTCCGTCTGGTTGCT -3' (配列番号58)

WPRE-QPCR-F : 5' -CCTTCCGGGACTTTTCGCTTT-3' (配列番号59)

WPRE-QPCR-R : 5' -GCAGAATCCAGGTGGCAACA-3' (配列番号60)

Actin-QPCR-F : 5' -CATGTACGTTGCTATCCAGGC-3' (配列番号61)

Actin-QPCR-R : 5' -CTCCTTAATGTCACGCACGAT-3' (配列番号62)

CAR-QPCR-F : 5' -GACTTGTGGGGTCCTTCTCCT-3' (配列番号63)

CAR-QPCR-R : 5' -GCAGCTACAGCCATCTTCCTC-3' (配列番号64)

【 0 0 6 0 】

3. 配列番号15～配列番号64で示されるDNA配列は、Generay Biotech Co, Ltd.によって
合成され、かつオリゴヌクレオチドの乾燥粉末またはプラスミドの態様で保存する。

30

【 0 0 6 1 】

4. ツール酵素BspE I、EcoR I、BamH I、Pvu I、Cla I、T4 DNAリガーゼはいずれもNEB
社から購入した。

【 0 0 6 2 】

5. 高忠実度酵素PrimeSTAR、RNはTakara社から購入した。

【 0 0 6 3 】

6. 0.22 μm～0.8 μm PESフィルターはmillipore社から購入した。

【 0 0 6 4 】

7. プラスミド抽出キット、アガロースゲル回収キットはいずれもMN社から購入した。

40

【 0 0 6 5 】

8. 感受性細胞TOP10はtiangen社から購入した。

【 0 0 6 6 】

9. NaCl、KCl、Na₂HPO₄・12H₂O、KH₂PO₄、トリプシン、EDTA、CaCl₂、NaOH、PEG6000は
いずれも上海生工社から購入した。

【 0 0 6 7 】

10. Opti-MEM、FBS、DMEM、1640、Pen-Srep、Hepesはinvitrogen社から購入した。

【 0 0 6 8 】

11. Biotinylated protein LはGeneScript社から購入した。

【 0 0 6 9 】

50

12. 西洋ワサビペルオキシダーゼ標識の二次抗体、DAB使用液はいずれも北京中杉金橋社から購入した。

【0070】

13. ECL+plus™ Western blotting systemはAmersham社から購入した。

【0071】

14. DNeasyキットは上海Generay社から購入した。

【0072】

15. リンパ球分離液は深センDakewe Biotech Co., Ltd. から購入した。

【0073】

16. SA-HRPは上海Yeasen社から購入した。

10

【0074】

17. マイコプラズマ測定キット、内毒素測定キット、BCMA-K562、BCMA-PDL1-K562細胞株はS&E (Shanghai)社によって提供された。

【0075】

18. LDH測定キットはpromega社によって提供された。

【0076】

二. 組換えレンチウイルスベクターIvCARbcma-1453 ~ IvCARbcma-1460の構築方法

図4を参照すると、本発明に係る組換えレンチウイルスベクターの構築方法は以下の通りである。

【0077】

20

1. ヒトEF1 プロモーター、CD8 leaderキメラ受容体シグナルペプチド、BCMAの1本鎖抗体軽鎖VL、Optimal Linker C、BCMAの1本鎖抗体重鎖VH、CD8 Hingeキメラ受容体ヒンジ、CD8 Transmembraneキメラ受容体膜貫通領域、CD137キメラ受容体共刺激因子、TCRキメラ受容体T細胞活性化ドメインをレンチウイルス骨格プラスミドpLenti-3G silencerにクローニングし、組換えレンチウイルスプラスミドpCARbcma-silencerを得た後、siRNA断片をそれぞれpCARbcma-silencerに連結し、PD-1ノックダウン組換えレンチウイルスプラスミドpCARbcma-1453 ~ pCARbcma-1460を得た。

【0078】

(1) レンチウイルス骨格プラスミドpLenti-3G silencerは制限酵素Cla IとBamH Iで二重酵素切断し、産物を1.5%のアガロースゲル電気泳動を行ったところ、7381bpの断片V1が確認され(図5に示す)、ゲルを切断してエッペンドルフ(Eppendorf)管に収集し、MN社のアガロースゲル回収キットによって対応する断片を回収し(表1に示す)、そして産物の純度と濃度を測定した。

30

【0079】

1. ゲルの溶解	200 μl NTI/100 mg ゲルの比率でゲル溶解液を入れ、50°Cの水浴で5~10分間放置した。
2. DNAの結合	11000gで30秒遠心分離し、ろ液を捨てた。
3. 膜の洗浄	700 μlのNT3を入れ、11000gで30秒遠心分離し、ろ液を捨てた。
4. 膜の洗浄	工程3を1回繰り返した。
5. 乾燥	11000gで1分間遠心分離し、新たな収集管に替え、室温で1分間放置した。
6. DNAの溶離	15~30 μlのNEを入れ、室温で1分間放置し、11000gで1分間遠心分離し、ろ液を収集した。

40

表1 アガロースゲルの回収工程

【0080】

(2) プライマーEF1 -FとEF1 -Rで合成された配列番号15を鋳型とし、表2におけるシ

50

システムを使用し、PCRサイクル条件は98 3min、(98 10s、55 15s、72 2min) × 35サイクル、72 10minであった。産物を1.5%のアガロースゲル電気泳動を行ったところ、1208bpの断片aが確認され、ゲルを切断してエッペンドルフ管に収集し、MN社のアガロースゲル回収キットによって対応する断片を回収し(表1に示す)、産物の純度と濃度を測定した。

【0081】

試薬	体積 (μl)
H ₂ O	32.5
5×Buffer (with Mg ²⁺)	10
dNTP (各 2.5mM)	4
プライマー1(10 μM)	1
プライマー2(10 μM)	1
鋳型	1
PrimeSTAR	0.5

表2 50 μl のPCR反応系

【0082】

(3) プライマーCD8 leader-FとCD8 leader-Rで合成された配列番号16を鋳型とし、表2におけるシステムを使用し、PCRサイクル条件は98 3min、(98 10s、55 15s、72 30s) × 35サイクル、72 5minであった。産物を1.5%のアガロースゲル電気泳動を行ったところ、101bpの断片bが確認され、ゲルを切断してエッペンドルフ管に収集し、MN社のアガロースゲル回収キットによって対応する断片を回収し(表1に示す)、産物の純度と濃度を測定した。

【0083】

(4) プライマーVL-FとVL-Rで合成された配列番号17を鋳型とし、表2におけるシステムを使用し、PCRサイクル条件は98 3min、(98 10s、55 15s、72 30s) × 35サイクル、72 5minであった。産物を1.5%のアガロースゲル電気泳動を行ったところ、336bpの断片cが確認され、ゲルを切断してエッペンドルフ管に収集し、MN社のアガロースゲル回収キットによって対応する断片を回収し(表1に示す)、産物の純度と濃度を測定した。

【0084】

(5) プライマーOLC-VH-FとVH-Rで合成された配列番号19を鋳型とし、表2におけるシステムを使用し、PCRサイクル条件は98 3min、(98 10s、55 15s、72 30s) × 35サイクル、72 5minであった。産物を1.5%のアガロースゲル電気泳動を行ったところ、421bpの断片dが確認され、ゲルを切断してエッペンドルフ管に収集し、MN社のアガロースゲル回収キットによって対応する断片を回収し(表1に示す)、産物の純度と濃度を測定した。

【0085】

(6) プライマーCD8 Hinge-FとCD8 Hinge-Rで合成された配列番号20を鋳型とし、表2におけるシステムを使用し、PCRサイクル条件は98 3min、(98 10s、55 15s、72 30s) × 35サイクル、72 5minであった。産物を1.5%のアガロースゲル電気泳動を行ったところ、147bpの断片eが確認され、ゲルを切断してエッペンドルフ管に収集し、MN社のアガロースゲル回収キットによって対応する断片を回収し(表1に示す)、産物の純度と濃度を測定した。

【0086】

(7) プライマー-CD8 Transmembrane-FとCD8 Transmembrane-Rで合成された配列番号21を鋳型とし、表2におけるシステムを使用し、PCRサイクル条件は98 3min、(98 10s、55 15s、72 30s) × 35サイクル、72 5minであった。産物を1.5%のアガロースゲル電気泳動を行ったところ、100bpの断片fが確認され、ゲルを切断してエッペンドルフ管に収集し、MN社のアガロースゲル回収キットによって対応する断片を回収し(表1に示す)、産物の純度と濃度を測定した。

【0087】

(8) プライマー-CD137-FとCD137-Rで合成された配列番号22を鋳型とし、表2におけるシステムを使用し、PCRサイクル条件は98 3min、(98 10s、55 15s、72 30s) × 35サイクル、72 5minであった。産物を1.5%のアガロースゲル電気泳動を行ったところ、142bpの断片gが確認され、ゲルを切断してエッペンドルフ管に収集し、MN社のアガロースゲル回収キットによって対応する断片を回収し(表1に示す)、産物の純度と濃度を測定した。

【0088】

(9) プライマー-TCR-FとTCR-Rで合成された配列番号23を鋳型とし、表2におけるシステムを使用し、PCRサイクル条件は98 3min、(98 10s、55 15s、72 30s) × 35サイクル、72 5minであった。産物を1.5%のアガロースゲル電気泳動を行ったところ、355bpの断片hが確認され、ゲルを切断してエッペンドルフ管に収集し、MN社のアガロースゲル回収キットによって対応する断片を回収し(表1に示す)、産物の純度と濃度を測定した。

【0089】

(10) DNA断片b、c、dを1μlずつ鋳型とし、表3におけるシステムを使用し、プライマー以外のものをエッペンドルフ管に入れ、PCRサイクル条件は98 3min、(98 10s、60 10s、72 30s) × 6サイクルで、プライマー-CD8 leader-F/VH-Rを入れ、サイクル条件は(98 10s、60 10s、72 40s) × 24サイクル、72 5minであった。産物を1.5%のアガロースゲル電気泳動を行ったところ、814bpの断片iが確認され、ゲルを切断してエッペンドルフ管に収集し、MN社のアガロースゲル回収キットによって対応する断片を回収し(表1に示す)、産物の純度と濃度を測定した。

【0090】

試薬	体積 (μl)
H ₂ O	33.5-1×鋳型数
5×Buffer (with Mg ²⁺)	10
dNTP (各 2.5mM)	4
プライマー1(10 μM)	1
プライマー2(10 μM)	1
鋳型	1×鋳型数
PrimeSTAR	0.5

表3 50 μlのオーバーラップPCR反応系

【0091】

(11) DNA断片e、f、g、hを1μlずつ鋳型とし、表3におけるシステムを使用し、プライマー以外のものをエッペンドルフ管に入れ、PCRサイクル条件は98 3min、(98 10s、60 10s、72 30s) × 6サイクルで、プライマー-CD8 Hinge-F/TCR-Rを入れ、サイクル条件は(98 10s、60 10s、72 30s) × 24サイクル、72 5minであった。産物を1.5%のアガロースゲル電気泳動を行ったところ、704bpの断片jが確認され、ゲルを切断してエッペンドルフ管に収集し、MN社のアガロースゲル回収キットによって対応する断片を回収し(表1に示す)、産物の純度と濃度を測定した。

【 0 0 9 2 】

(12) DNA断片V1、a、i、jを総体積5 μ lかつモル比1:1:1:1の比率でエッペンドルフ管に入れ、相同組換え酵素反応液15 μ lを入れ、均一に混合した後42 $^{\circ}$ Cで30分間インキュベートし、氷の上に移して2~3分間放置し、反応液を50 μ lのTOP10に入れ、軽く回転させて均一に内容物を混合し、氷の中に30分間放置し、管を42 $^{\circ}$ Cに加熱しておいた恒温水浴に入れて90秒加熱刺激し、直ちに管を氷浴に移し、細胞を2~3分間冷却し、各管にLB培養液を900 μ lずつ入れた後、管を37 $^{\circ}$ Cのシェーカーに移し、1時間インキュベートして細胞を回復させ、100 μ lの形質転換菌をAmp LB寒天プレートに塗布し、逆さまに置き、恒温インキュベーターで37 $^{\circ}$ Cで16時間培養した。

【 0 0 9 3 】

クローンを選んでコロニーのPCR同定を行い、正確と同定されたクローンは組換えレンチウイルスプラスミドpCARbcma-silencerで、正確なクローンに対して酵素切断の同定を行った(図6に示す)。

【 0 0 9 4 】

(13) 組換えレンチウイルスプラスミドpCARbcma-silencerは制限酵素BspE IとEcoR Iで二重酵素切断し、産物を1.5%のアガロースゲル電気泳動を行ったところ、10035bpの断片V2が確認され、ゲルを切断してエッペンドルフ(Eppendorf)管に収集し、MN社のアガロースゲル回収キットによって対応する断片を回収し(表1に示す)、産物の純度と濃度を測定した。

【 0 0 9 5 】

(14) 合成されたsiRNA1453-F/R~siRNA1460-F/Rをそれぞれoligo annealing bufferで20 μ Mに溶解させ、対応するFとRを30 μ lずつ取って混合した。その後、siRNA1453-F/R~siRNA1460-F/R混合物を水浴で95 $^{\circ}$ Cで5分間加熱した後、水浴を蓋をせずに室温で置いて室温に自然冷却し、2本鎖のオリゴヌクレオチド断片を形成した。1 μ l取って連結反応に使用し(表4に示す)、4 $^{\circ}$ Cで16h連結し氷の上に移して2~3分間放置し、反応液を50 μ lのTOP10に入れ、軽く回転させて均一に内容物を混合し、氷の中に30分間放置し、管を42 $^{\circ}$ Cに加熱しておいた恒温水浴に入れて90秒加熱刺激し、直ちに管を氷浴に移し、細胞を2~3分間冷却し、各管にLB培養液を900 μ lずつ入れた後、管を37 $^{\circ}$ Cのシェーカーに移し、1時間インキュベートして細胞を回復させ、100 μ lの形質転換菌をAmp LB寒天プレートに塗布し、逆さまに置き、恒温インキュベーターで37 $^{\circ}$ Cで16時間培養した。

【 0 0 9 6 】

クローンを選んでコロニーのPCR同定を行い、正確と同定されたクローンはPD-1ノックダウン組換えレンチウイルスプラスミドpCARbcma-1453~pCARbcma-1460で、正確なクローンに対して配列決定の同定を行った(図7に示す)。

【 0 0 9 7 】

試薬	体積 (μ l)
H ₂ O	13
V2	3
10 \times T4 DNA リガーゼ緩衝液	2
T4 DNA リガーゼ	1
アニーリングされた2本鎖オリゴヌクレオチド	1

表4 20 μ lの連結反応系

【 0 0 9 8 】

2. 組換えレンチウイルスベクターlvCARbcma-1453~lvCARbcma-1460のパッケージング

(1) 完全培地: 予熱した新鮮な培地を取り、10%FBS +5ml Pen-Srepを入れ、上下反転

10

20

30

40

50

して均一に混合した。

【0099】

(2) 1XPBS溶液：NaCl 8g、KCl 0.2、Na₂HPO₄・12H₂O 3.58g、KH₂PO₄ 0.24gを量って1000mlビーカーに入れ、900mlのMilli-Qグレードの超純水を加えて溶解させ、完全に溶解した後、1000mlメスシリンダーで容積を1000mlにし、121 °Cの高温で20min湿熱滅菌した。

【0100】

(3) 0.25%トリプシン溶液：トリプシン 2.5g、EDTA 0.19729gを量って1000mlビーカーに入れ、900mlの1×PBSを加えて溶解させ、完全に溶解した後、メスシリンダーで容積を1000mlにし、0.22 μMのろ過除菌を行い、長期的な使用の場合-20 °Cの冷蔵庫で保存する。

10

【0101】

(4) 0.5M CaCl₂溶液：36.75g CaCl₂を量って400mlのMilli-Qグレードの超純水に溶解させた。Milli-Qグレードの超純水で総体積を500mlにし、均一に混合した。0.22 μMのろ過除菌を行い、分けて50ml遠心管に保存し、各管に45mlずつ、4 °Cで保存した。

【0102】

(5) 2×HBS溶液：4.09g NaCl、0.269g Na₂HPO₄、5.96g HEPESを量って、400ml Milli-Qグレードの超純水に溶解させた。pH計を校正した後、2M NaOH溶液でHBS溶液のpHを7.05に調整した。各瓶のHBSのpHの調整に消費した2M NaOHは3ml程度であった。

【0103】

(6) 液体窒素タンクから冷凍保存したHEK293T/17細胞を取り出し、直ちに37 °Cの水浴に移し、1~2min後クリーンベンチに移し、無菌操作で冷凍保存管における液体を全部10cm²培養シャーレに移し、8mL/10cm²シャーレまで10%FBS含有DMEMを追加し、24h後顕微鏡で細胞を観察し、細胞が80%コンフルエントを超えたら継代を行った。

20

【0104】

(7) 細胞状態が良く、汚染のないHEK293T/17細胞を選び、2~6個の培養シャーレを一組として、細胞をトリプシンで消化した後、電動ピペットで4~12mlの完全培地を吸い取り、培養シャーレが乾燥しないように消化された各培養シャーレに2ml入れた。1mlピペットですべての細胞を吹き混ぜて単細胞懸濁液にし、培地瓶に移した。

【0105】

(8) 上記2~6個の培養シャーレにおける残留細胞を培地瓶に移し、培地でもう一回培養シャーレを洗った。

30

【0106】

(9) 培地瓶の蓋をし、上下反転を10回程度して細胞懸濁液を十分に混合し、細胞を8~24個の10cm²培養シャーレに継代し、各シャーレの細胞密度は約4 × 10⁶個/10ml完全培地程度であった。細胞密度が予想と大きく違ったら、細胞をカウントした後、4 × 10⁶個/シャーレの量で接種した。

【0107】

(10) 6個の培養シャーレをひと重ねにし、上下のシャーレの間のマッチングを維持するように注意した。培養シャーレを左右、前後に数回振とうし、細胞を十分に分散させた後、5% CO₂インキュベーターに入れた。残留細胞に対して同様の処理を行った。

40

【0108】

(11) 継代された細胞をチェックしたところ、細胞は70~80%コンフルエントで、輪郭がふっくらとし、付着が良く、細胞培養シャーレに均一に分布していた。

【0109】

(12) 細胞の液置換を行い、培地を新鮮な完全培地に替え、各シャーレに9mlずつであり、インキュベーターのCO₂濃度設定値を8%に上げた。

【0110】

(13) N+0.5になるようにDNA/CaCl₂溶液を調製した。各シャーレのHEK293T/17細胞のプラスミド形質移入量は、組換えレンチウイルスプラスミド(20 μg)、pPac-GP(15 μg)、pPac-R(10 μg)、pEnv-G(7.5 μg)のような比率とした。新たな5ml遠心管を取り、0.5M CaCl₂

50

: 0.25ml、組換えレンチウイルスプラスミド20 µg : pPac-GP 15 µg : pPac-R 10 µg : pEnv-G 7.5 µgを入れ、超純水を追加して0.5mlにして蓋をし、十分に混合した。

【 0 1 1 1 】

(14) 5ml遠心管をもう1本取り、0.5mlのDNA/CaCl₂溶液を入れた。ボルテックス振とう機を開け、片手で5ml遠心管の上端を持ち、管底を振とうヘッドに当て、液体を管壁に分散させて流動させ、もう一方の手で1mlピペットを持ち、0.5mlの2×HBS溶液を吸い取り、ゆっくり遠心管に滴下し、30秒間で滴下が完了するように流速をコントロールした。2×HBSを入れた後、続けて5秒振とうし、振とうを止め、そのまま形質移入しようとする細胞に入れた。

【 0 1 1 2 】

(15) 一つのシャーレの細胞を取り、カルシウム形質移入試薬がシャーレ全体に分布するように、遠心管における1mlのカルシウム形質移入液をそれに滴下した。

【 0 1 1 3 】

(16) カルシウム形質移入液を入れた後、シャーレの蓋に印をつけ、培養シャーレをもう一台の5% CO₂インキュベーターに置いた。培養シャーレを水平に置き、重ねたシャーレが6個を超えないようにした。5% CO₂インキュベーターに置いた(6~8 h)。

【 0 1 1 4 】

(17) 一台目のインキュベーターのCO₂濃度設定値を5%に戻した。

【 0 1 1 5 】

(18) 24時間後、細胞の状態をチェックした。細胞は80~85%コンフルエント程度で、状態が良かった。培地を吸い取り、10 mLの新鮮なDMEM完全培地に替えた。

【 0 1 1 6 】

(19) 48時間後、形質移入の効率を観察した。ほとんどの細胞はまだ付着していた。95%超の細胞に緑色蛍光がついたことがわかった。同一のウイルスパッケージング上清液を合わせ、培養シャーレに続けて10 mLの新鮮な培地を添加した。

【 0 1 1 7 】

(20) 72時間後、もう一回同一のウイルス上清液を合わせ、2回収集されたウイルスを合わせてもよく、培養シャーレを捨てた。この時収集された上清に組換えレンチウイルスベクターlvCARbcma-1453~lvCARbcma-1460が含まれていた。

【 0 1 1 8 】

実施例2 組換えレンチウイルスベクターの濃縮と測定

一、イオン交換クロマトグラフィーによって組換えレンチウイルスベクターを精製した(図8に示す)。

【 0 1 1 9 】

(1) 収集された上清液をThermo真空ポンプで、0.22 µm~0.8 µmのPESフィルターで吸引ろ過し、不純物を除去した。

【 0 1 2 0 】

(2) 1:1~1:10の比率で上清に1.5M NaCl 250 mM Tris-HCl (pH 6-8)を入れた。

【 0 1 2 1 】

(3) 2本のイオン交換カラムを直列に設置し、4ml 1M NaOH、4ml 1M NaCl、5ml 0.15M NaCl 25 mM Tris-HCl (pH 6~8) 溶液を順にカラムに通過させた。

【 0 1 2 2 】

(4) 工程2で得られた溶液をペリスタポンプで1~10ml/minの速度でイオン交換カラムに仕込んだ。

【 0 1 2 3 】

(5) 上清液が全部カラムを通過した後、10ml 0.15M NaCl 25 mM Tris-HCl (pH 6~8) 溶液で1回洗浄した。

【 0 1 2 4 】

(6) 仕込み量に応じて1~5ml 1.5M NaCl 25 mM Tris-HCl (pH 6~8) で溶離させ、溶離液を収集した。

10

20

30

40

50

【 0 1 2 5 】

(7) 溶離液を25～50 μ l/管で分け、-80 の冷蔵庫で冷凍保存し、長期間保存した。

【 0 1 2 6 】

二．力価の測定

(1) 24ウェルプレートを取って293T細胞を接種した。各ウェルの細胞は 5×10^4 個で、加えられた培地の体積は500 μ lで、異なる種類の細胞の生長速度は異なり、ウイルス感染時の細胞融合率は40%～60%であった。

【 0 1 2 7 】

(2) 3本の無菌エッペンドルフ管を準備し、各管に90 μ lずつ新鮮な完全培地（高糖DME M+10%FBS）を加えて細胞を接種してから24時間後、2つのウェルの細胞を血球計算板でカ

10

【 0 1 2 8 】

ウントし、感染時の細胞の実際の数を確認し、Nと記録した。

(3) 測定されるウイルス原液10 μ lを1本目の管に入れ、軽く均一に混合した後、10 μ l取って2本目の管に入れ、さらに順に最後の管まで操作した。最終体積が500 μ lになるように、各管に410 μ lの完全培地（高糖DMEM+10%FBS）を入れた。

【 0 1 2 9 】

(4) 感染開始から20時間で、培養上清を除去し、500 μ lの完全培地（高糖DMEM+10%FBS）に替え、5%CO₂で続けて48時間培養した。

【 0 1 3 0 】

(5) 72時間後、蛍光発現状況を観察し、正常の場合、蛍光細胞数が希釈倍率の増加につれて減少したので、そして写真撮影した。

20

【 0 1 3 1 】

(6) 0.2mlの0.25%トリプシン-EDTA溶液で細胞を消化し、37 で1分間放置した。培地で細胞の面全体をパージし、遠心分離で細胞を収集した。DNeasyキットの説明に従ってゲノムDNAを抽出した。各サンプル管に200 μ lの溶離液を加えてDNAを洗い落として定量した。

【 0 1 3 2 】

(7) 目的DNAを準備しqPCRmix総管Iを測定した（QPCRプライマー配列は配列番号59 - 配列番号60）。

30

2× TaqMan Master Mix	25 μ l × n
フォワードプライマー(100 pmol ml ⁻¹)	0.1 μ l × n
リバースプライマー(100 pmol ml ⁻¹)	0.1 μ l × n
プローブ(100 pmol ml ⁻¹)	0.1 μ l × n
H ₂ O	19.7 μ l × n

【 0 1 3 3 】

n = 反応数である。例えば、総反応数が40の場合、1ml 2× TaqMan Universal PCR Master Mix、4 μ l フォワードプライマー、4 μ l リバースプライマー、4 μ l プローブおよび788 μ l H₂Oを混合する。振とう後、氷の上に置いた。

40

【 0 1 3 4 】

(8) 内部参照DNAを準備しqPCRmix管IIを測定した（QPCRプライマー配列は配列番号61 - 配列番号62）。

2× TaqMan Master Mix	25 μ l × n
10×RNaseP プライマー/プローブミック ス	2.5 μ l × n
H ₂ O	17.5 μ l × n

【0135】

n = 反応数である。例えば、総反応数が40の場合、1ml 2× TaqMan Universal PCR Master Mix、100 μ l 10×RNasePプライマー/プローブミックスおよび700 μ l H₂Oを混合する。振とう後、氷の上に置いた。 10

【0136】

(9) 冷却しておいた96ウェルPCRプレートにPCR系を構築した。総管Iからそれぞれ45 μ l取ってA~Dの各列のウェルに加え、総管IIからそれぞれ45 μ l取ってE~Gの各列のウェルに加えた。

【0137】

(10) それぞれ5 μ lのプラスミド標準品および被験サンプルのゲノムDNAをA~Dの列に加え、各サンプルは1回繰り返した。別に1つのウェルに5 μ lの水を加えて無鋳型対照 (no-template control) とした。

【0138】

(11) それぞれ5 μ lのゲノム標準品および被験サンプルのゲノムDNAをE~Gの列に加え、各サンプルは1回繰り返した。別に1つのウェルに5 μ lの水を加えて無鋳型対照 (no-template control) とした。 20

【0139】

(12) 使用された定量PCR装置はABI PRISM 7500定量システムであった。サイクル条件は、50 2分、95 10分、さらに95 15秒、60 1分の40サイクルとした。

【0140】

データ分析：測定されたDNAサンプルに組み込まれたレンチウイルスベクターのコピー数をゲノム数で表記し、各ゲノムに組み込まれたウイルスのコピー数を得た。

【0141】

力価 (integration units per ml, IU ml⁻¹) の計算式は以下の通りである。

$$\text{IU ml}^{-1} = (\text{C} \times \text{N} \times \text{D} \times 1000) / \text{V}$$

ここで、

C = 1ゲノムあたり組み込まれたウイルスのコピー数

N = 感染時の細胞数 (約1 × 10⁵)

D = ウイルスベクターの希釈倍率

V = 入れた希釈ウイルスの体積 40

【0142】

(13) 組換えレンチウイルスベクターlvCARbcma-1453 ~ lvCARbcma-1460の力価の結果 (図9に示す)。

【0143】

三．内毒素の測定

(1) 内毒素使用標準品は15EU/本であった。

【0144】

(2) ライセート試薬の感度は = 0.25EU/ml、0.5ml/管であった。

【0145】

(3) 内毒素標準品の希釈：内毒素標準品1本を取り、それぞれBET水で比率に従って4 50

と2 の溶解に希釈し、密封膜で封じ、15min振とうして溶解させた。希釈時、毎回の希釈はボルテックスミキサーで30s均一に混合した。

【0146】

(4) 仕込み：ライセート試薬を数本取り、1本あたりBET水0.5mlを加えて溶解させ、それぞれ数本の内毒素試験管に0.1ml/管で加えた。そのうち、2本は陰性対照管であり、BET水0.1mlを加えた。

【0147】

2本は陽性対照管であり、濃度2 の内毒素使用標準品溶液0.1mlを加えた。

【0148】

2本はサンプル陽性対照管であり、0.1mlの2 内毒素標準品を含有するサンプル溶液(20倍に希釈された被験サンプル1ml + 4 の内毒素標準品溶液1ml=2mlの2 内毒素標準品を含有する40倍に希釈されたサンプル)を加えた。

サンプル管に0.1mlのサンプルを加え、表5に示す希釈比率で、37±1 の水浴(またはインキュベーター)で60±1min保温した。

【0149】

希釈倍率	原液	5	10	20	40	80	160
対応EU/ml	0.25	1.25	2.5	5	10	20	40
結果							

表5 内毒素希釈比率および対応する内毒素含有量

【0150】

(5) 組換えレンチウイルスベクターlvCARbcma-1453~lvCARbcma-1460の内毒素の測定結果(表6に示す)であり、内毒素は0~2.5 EU/mLの間で、以下の要求に合うものであった。

【0151】

希釈倍率	原液	5	10	20	40	80	160
対応EU/ml	0.25	1.25	2.5	5	10	20	40
lvCARbcma-1453	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
lvCARbcma-1454	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
lvCARbcma-1455	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
lvCARbcma-1456	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
lvCARbcma-1457	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
lvCARbcma-1458	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
lvCARbcma-1459	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
lvCARbcma-1460	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

表6 内毒素の測定結果

【0152】

四．マイコプラズマの測定と比較

(1) 実験前の3日は、細胞サンプルを無抗生物質培地で培養した。

【0153】

- (2) 1mlの細胞懸濁液(細胞数は 1×10^5 よりも多い)を収集し、1.5ml遠心管に入れた。
- 【0154】
- (3) 13000 × gで1min遠心分離し、沈殿を収集し、培地を捨てた。
- 【0155】
- (4) 500 μlのPBSをピペットチップで吹き吸いをするかボルテックス振とうし、沈殿を再懸濁させた。13000 × gで5min遠心分離した。
- 【0156】
- (5) 工程4を1回繰り返した。
- 【0157】
- (6) 50 μlの細胞分解緩衝液を入れ、ピペットチップで吹き吸いをし、十分に混合した後、55 °Cの水浴で20minインキュベートした。
- 【0158】
- (7) サンプルを95 °Cで5min加熱した。
- 【0159】
- (8) 13000 × gで5min遠心分離した後、5 μl上清を鋳型とし、25 μl PCR反応系は、ddH₂O 6.5 μl、Myco Mix 1 μl、2x Taq Plus Mix Master (Dye Plus) 12.5 μl、鋳型5 μlで、PCRサイクル条件は、95 °C 30s、(95 °C 30s、56 °C 30s、72 °C 30s) × 30サイクル、72 °C 5 minであった。
- 【0160】
- (9) マイコプラズマの測定結果(図10と表7に示す)から、組換えレンチウイルスベクターIvCARbcma-1453 ~ IvCARbcma-1460がいずれもマイコプラズマを含まなかったことが示された。

10

20

PCR 鋳型	PCR 産物	判定説明
陽性対照	280bp と 150bp のバンド	陽性成立
	無しまたはバンド 1 本のみ	陽性不成立
陰性対照	150bp のバンド	陰性成立
	無しまたはバンド 2 本以上	陰性不成立
サンプル	280 と 150 のバンド	マイコプラズマ汚染
	280 のバンドのみ	マイコプラズマ重度汚染
	150bp のみ	マイコプラズマ汚染無し
	バンド無し	細胞量が少なすぎるか PCR 反応が抑制される

30

表7 マイコプラズマの測定結果

【0161】

40

実施例3 組換えレンチウイルスベクターIvCARbcma-1453 ~ IvCARbcma-1460の機能測定
一、CAR遺伝子の細胞レベルの発現測定：

(1) 組換えレンチウイルスベクターIvCARbcma-1453 ~ IvCARbcma-1460および対照ウイルスMOCKでPBMC細胞に感染させた後、細胞を収集してRT-PCRによってCARのmRNA転写レベルの測定を行い、CAR遺伝子の発現を検証したが、CARのmRNA転写レベルが向上すると、CAR遺伝子の転写レベルの発現に成功したことになる。

【0162】

(2) 組換えレンチウイルスベクターIvCARbcma-1453 ~ IvCARbcma-1460および対照ウイルスMOCKでPBMC細胞に感染させた後、細胞を収集してウエスタンブロットによってCARのタンパク質発現レベルの測定を行い、CAR遺伝子の発現を検証したが、CARのタンパク質発

50

現レベルが向上すると、CAR遺伝子の翻訳レベルの発現に成功したことになる。

【0163】

(3) それぞれMOI=15のIvCARbcma-1453～IvCARbcma-1460および対照ウイルスMOCKで細胞に感染させ、48h後6ウェルプレートにおける細胞の全RNAおよび全タンパク質を抽出してそれぞれ蛍光定量PCR実験とイムノプロット実験を行った。具体的な工程：6ウェルプレートの4つのウェルをコーティングし、各ウェルに対応するPSBとRNを入れ、4 で一晩放置した。12時間後MOI=15でウイルスをコーティングし、37 のインキュベーターで5h放置した。6ウェルプレートを取り出し、ウイルス上清を捨て、PBSで2回洗浄し、 1×10^6 /ウェルでPBMc (リンパ球分離液でヒト血から分離されたもの) をコーティングし、500 μ lの培地 (10%血清、20U/ml IL-2、ポリブレン 8 μ g/mlを含有する) を加えた。20min静置し、1000g、20 で30min遠心分離し、37 で48h培養した。

10

【0164】

(4) Trizol法によって6ウェルプレートにおけるPBMc細胞の全RNAを抽出し、逆転写でcDNAを増幅し、QPCRプライマー (配列は配列番号63 - 配列番号64) で蛍光定量PCR実験を行い、反応系を表8に示す。内部参照のアクチンを対照群とし、そのmRNAの転写状況を検証した。

試薬	体積 (μ l)
SYBR premix ex taq:	10 μ l
ROX Reverse Dye (50 \times)	0.4 μ l
上流プライマー (2.5 μ M) :	0.5 μ l
下流プライマー (2.5 μ M) :	0.5 μ l
cDNA	1.0 μ l
ddH ₂ O	7.6 μ l

20

表8 20 μ l qPCR 反応系

【0165】

(5) ウェスタンブロット (Western Blot) : ポリアクリルアミドゲル電気泳動によってPBMcから抽出された全タンパク質を相対的な分子質量によって分離させた。湿式転写 (4、400 mA、120min) によって、タンパク質をPVDF膜に移した。ブロッキング液 (5%脱脂牛乳含有TBST溶液) で室温でPVDF膜を1hブロッキングし、ブロッキング液で1:1000でBiotinylated protein Lを希釈した後、ブロッキングされたPVDF膜を室温でインキュベートして4 で一晩放置した。TBSで膜を10 minずつ3回洗浄した。ブロッキング液で1:500に対応するSA-HRPを希釈し、室温でPVDF膜を2hインキュベートし、TBSTで膜を10minずつ3回洗浄した。Amersham社のECL+plusTM Western blotting systemキットによって呈色させた。X線で現像してバンドを示すフィルムを得た。

30

【0166】

(6) RT-QPCR測定から、組換えレンチウイルスベクターでPBMcを感染させた後のCAR遺伝子の転写レベルは対照ウイルスMOCKと空細胞よりも顕著に向上した (図11と表9に示す) ことがわかり、CAR遺伝子の転写レベルの発現に成功したことが示された。

40

サンプル名	アクチン (CT)	CAR (CT)	-ΔCt	-ΔΔCt	2 ^{-ΔΔCt}
IvCARbcma-1453	18.94781	27.9884	-9.04059	5.74813	53.74756
IvCARbcma-1454	19.63172	28.76517	-9.13345	5.65526	50.39696
IvCARbcma-1455	19.20012	28.48228	-9.28216	5.50655	45.46091
IvCARbcma-1456	18.34099	27.44321	-9.10222	5.6865	51.49997
IvCARbcma-1457	18.2057	27.45988	-9.25419	5.53453	46.35104
IvCARbcma-1458	18.31527	27.42907	-9.11379	5.67492	51.08833
IvCARbcma-1459	18.69971	27.8403	-9.1406	5.64812	50.14799
IvCARbcma-1460	19.56607	28.77406	-9.20799	5.58073	47.85924
MOCK	19.75225	34.55302	-14.8008	-0.01206	0.991675
ブランク	19.72942	34.51814	-14.7887	0	1

表 9

【 0 1 6 7 】

(7) ウエスタンブロット(Western Blot)の結果から、組換えレンチウイルスベクターでPBMCを感染させた後のCARタンパク質の発現レベルは対照ウイルスMOCKと空細胞よりも顕著に向上した(図12に示す)ことがわかり、CAR遺伝子の翻訳レベルの発現に成功したことが示された。

二. PD-1ノックダウン効果の評価(PD-1 mRNA転写レベル)

(1) それぞれBCMA-K562細胞とPBMC細胞を培養した。

【 0 1 6 8 】

(2) 実験開始前の4日は、MOI=15のIvCARbcma-1453~IvCARbcma-1460のウイルスでPBMC細胞に感染させ、72-96h培養した後、実験を開始した。

【 0 1 6 9 】

(3) 標的細胞(BCMA-K562) 4×10^5 細胞とエフェクター細胞(IvCARbcma-1453-PBMC~IvCARbcma-1460-PBMC細胞) 2.8×10^6 細胞を収集し、800gで6min遠心分離し、上清を捨てた。

【 0 1 7 0 】

(4) 1mlの1×PBS溶液でそれぞれ標的細胞とエフェクター細胞を再懸濁させ、800gで6min遠心分離し、上清を捨てた。

【 0 1 7 1 】

(5) 工程(4)を1回繰り返した。

【 0 1 7 2 】

(6) 700 μlの培地(1640培地+10% FBS)でエフェクター細胞を再懸濁させ、2mlの培地(1640培地+10% FBS)で標的細胞を再懸濁させた。

【 0 1 7 3 】

(7) エフェクター細胞対標的細胞比が10:1の実験ウェルを設け、そしてブランク群を設けた。

【 0 1 7 4 】

(8) 250×gで5minプレート遠心分離した。

【 0 1 7 5 】

(9) 37℃、5%CO₂インキュベーターで24時間まで共培養し、1000×gで2minプレート遠心分離し、細胞を収集してPD-1 mRNA転写レベルを測定した。

【 0 1 7 6 】

(10) Trizol法によって上記混合細胞の全RNAを抽出し、逆転写でcDNAを増幅し、QPCRプライマー(配列は配列番号57-配列番号58)で蛍光定量PCR実験を行い、反応系を表6に示す。内部参照のアクチンを対照群とし、そのmRNAの転写状況を検証した。

【 0 1 7 7 】

(11) RT-QPCR測定結果から、一部のPD-1ノックダウン組み換えレンチウイルスベクター

ーで形質移入されたPBMCを標的細胞とインキュベートした後、PD-1遺伝子のmRNAは対照ウイルスIvCARbcma-1460よりも顕著に低下した（図10と表10に示す）ことがわかり、PD1siRNAがPD-1遺伝子の転写レベルに対してノックダウン作用があり、中でも、IvCARbcma-1453のノックダウン効果が最も良く、70%以上に達したことが示された。ブランク群は標的細胞に活性化されなかったため、PD-1の転写レベルが上方調節しなかった。

【 0 1 7 8 】

サンプル名	アクチン (CT)	PD-1 (CT)	-ΔCt	-ΔΔCt	2 ^{-ΔΔCt}
ブランク	13.27986	35.211302	-21.9314	-7.01064	0.007755
IvCARbcma-1453	13.06856	30.328141	-17.2596	-2.33878	0.197677
IvCARbcma-1454	14.11226	30.347056	-16.2348	-1.314	0.402205
IvCARbcma-1455	13.23032	28.158707	-14.9284	-0.00759	0.994752
IvCARbcma-1456	14.93184	30.045561	-15.1137	-0.19293	0.874829
IvCARbcma-1457	14.74173	29.710368	-14.9686	-0.04784	0.967382
IvCARbcma-1458	14.89117	29.821291	-14.9301	-0.00933	0.993557
IvCARbcma-1459	13.08795	28.050568	-14.9626	-0.04182	0.971426
IvCARbcma-1460	14.17941	29.100206	-14.9208	0	1

表 10

【 0 1 7 9 】

三．細胞殺傷実験の効果の評価

(1) それぞれBCMA-PDL1-K562細胞とPBMC細胞を培養した。

(2) 実験開始前の4日は、MOI=15のIvCARbcma-1453～IvCARbcma-1460のウイルスでPBMC細胞に感染させ、72-96h培養した後、実験を開始した。

(3) 標的細胞（BCMA-PDL1-K562） 4×10^5 細胞とエフェクター細胞（CART細胞） 2.8×10^6 細胞を収集し、800gで6min遠心分離し、上清を捨てた。

【 0 1 8 0 】

(4) 1mlの1×PBS溶液でそれぞれ標的細胞とエフェクター細胞を再懸濁させ、800gで6min遠心分離し、上清を捨てた。

(5) 工程（4）を1回繰り返した。

(6) 700 μlの培地（1640培地+10% FBS）でエフェクター細胞を再懸濁させ、2mlの培地（1640培地+10% FBS）で標的細胞を再懸濁させた。

【 0 1 8 1 】

(7) エフェクター細胞対標的細胞比が10:1の実験ウェルを設け、そして対照群を設け、各群に3つの重複ウェルを設けた。

(8) 250 × gで5minプレート遠心分離した。

【 0 1 8 2 】

(9) 37 °C、5%CO₂インキュベーターで24時間培養した。

(10) 250 × gで5minプレート遠心分離した。

(11) 各ウェルの50 μl上清を取って新たな96ウェルプレートに加え、そして各ウェルに50 μlの基質溶液を加えた（光を避けた操作）。

【 0 1 8 3 】

(12) 光を避けて25分間インキュベートした。

(13) 各ウェルに50uLの停止液を加えた。

(14) マイクロプレートによって490nmにおける吸光度を測定した。

【 0 1 8 4 】

(15) 3つの重複ウェルの平均値を取った。すべての実験ウェル、標的細胞ウェルおよ

びエフェクター細胞ウェルの吸光値から培地の背景吸光値の平均値を引いた。標的細胞の最大値の吸光値から体積で較正された対照吸光値の平均値を引いた。

【 0 1 8 5 】

(16) 工程15で得られた較正された値を以下の式に代入し、各エフェクター細胞対標的細胞比による細胞毒性百分率を計算した結果から、図14に示すように、PD-1ノックダウン組み換えレンチウイルスベクターで形質移入されたPBMC細胞はエフェクター細胞対標的細胞比10:1の条件で殺傷効率がPBMC空細胞よりも顕著に高く、中でも、IvCAR19-1453-PBMCの標的細胞に対する殺傷効率が最も高く、40%超であったことが示された。IvCARbcma-1454-PBMC細胞の標的細胞に対する殺傷効率がそれに次ぐ。ほかのIvCARbcma-1455-PBMC ~ IvCARbcma-1458-PBMC細胞の標的細胞に対する殺傷効率が対照IvCARbcma-1460-PBMC細胞と大きく違わず、図13の結果と比べると、標的細胞にPD-L1が存在するため、PD-1が結合した後抑制シグナルが伝達し、T細胞の免疫活性を抑制し、T細胞の標的細胞に対する殺傷効率の大幅な低下につながるということがわかる。一方、PD-1分子の発現レベルが大幅に低下した場合、有効にPD-1/PDL-1のシグナル経路の活性化を遮断し、T細胞が正常に標的細胞に対する殺傷作用を発揮するようにさせることができた。将来、IvCARbcma-1453ベクターおよびそれで形質移入されたT細胞は臨床で使用し、CAR-T細胞内におけるPD-1発現レベルを抑制し、CAR-T細胞の体内における腫瘍に対する殺傷効果を増強し、免疫逃避を抑制する効果を実現させることができる。

10

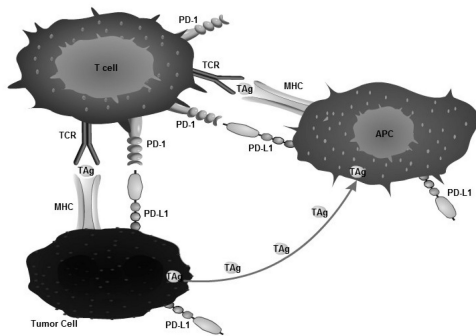
殺傷効率= (実験ウェル - エフェクター細胞ウェル - 標的細胞ウェル) / (標的細胞最大ウェル - 標的細胞ウェル) × 100%

20

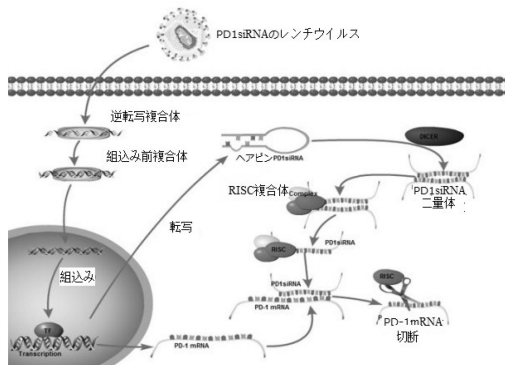
【 0 1 8 6 】

本発明で創造された好適な実施例を具体的に説明したが、本発明の創造は前記実施例だけでなく、本分野を熟知する技術者は本発明の創造の趣旨に反さない前提で様々な同等の変形または置換を行ってもよく、これらの同等の変形または置換はいずれも本願の請求項によって限定される範囲に含まれる。

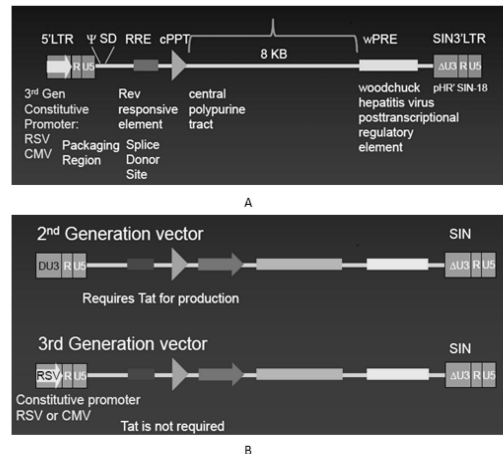
【 図 1 】



【 図 2 】

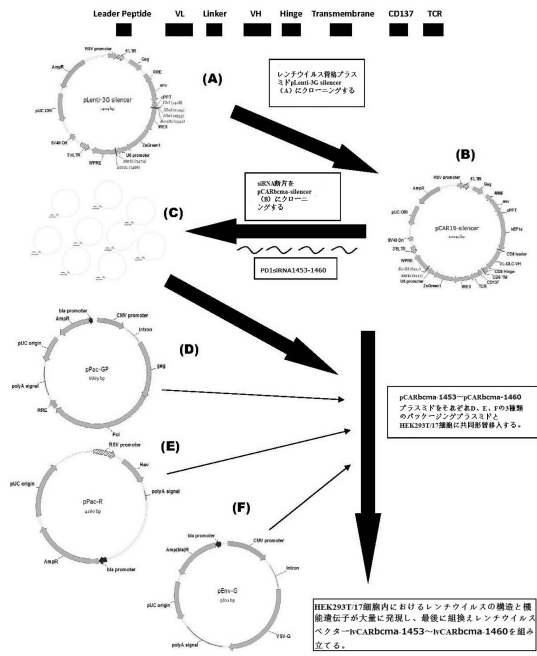


【 図 3 】

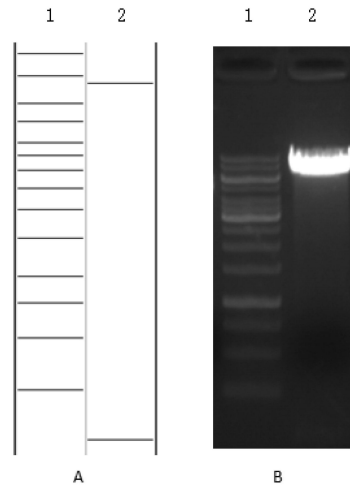


B

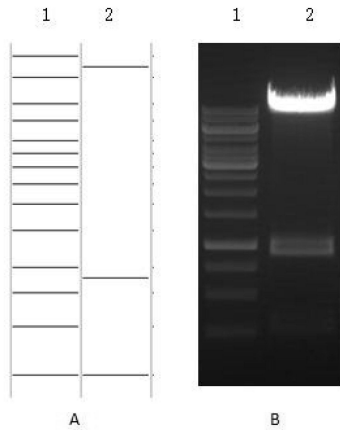
【 図 4 】



【 図 5 】



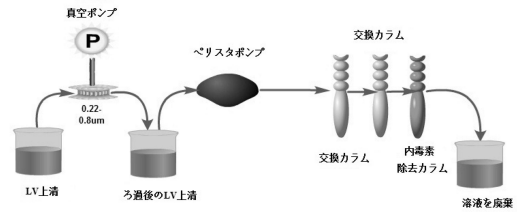
【 図 6 】



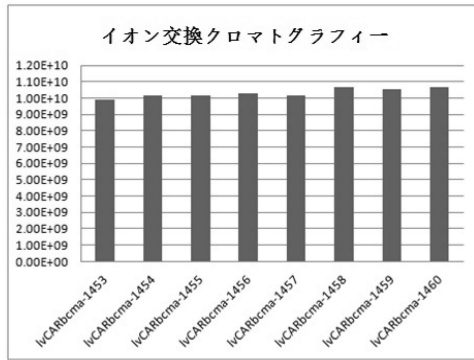
【 図 7 】

	311	110	220	230	240	250	260	270	280	
A	pCARbma-1453	1	-----CGGGCTAACTGGTACCGCATGAGCCTCGAGTCACTCGGTACCAAGTTTAGCAATTTTTFG-----							
	iCARbma-1453_1-HU6_F_H08	211	CGAAACTCGGGCTAACTGGTACCGCATGAGCCTCGAGTCACTCGGTACCAAGTTTAGCAATTTTTFG-----							
B	pCARbma-1454	210	215	220	230	240	250	260	270	280
	iCARbma-1454_1-HU6_F_A09	210	CGAAACTCGGGCATGTCTTCTAGCGAATCTCGAGTCCGTAGGAAGCAATGGTTTTTGAATCGF-----							
C	pCARbma-1455	211	215	220	230	240	250	260	270	280
	iCARbma-1455_1-HU6_F_B09	210	CGAACTCGGGCCGAGATCAAGAGAGTTCTCGAGTCTCTTGTATCGGCGTGTFTTTTFG-----							
D	pCARbma-1456	211	215	220	230	240	250	260	270	280
	iCARbma-1456_1-HU6_F_D09	210	CGAACTCGGGCCGAGATCAAGAGAGTTCTCGAGTCTCTTGTATCGGCGTGTFTTTTFG-----							
E	pCARbma-1457	211	215	220	230	240	250	260	270	280
	iCARbma-1457_1-HU6_F_E09	210	CGAACTCGGGGAGCCCATCTCTGAAATTAATCTCGAGAATTCAGGAATGGTTCGAATTTTTFG-----							
F	pCARbma-1458	211	215	220	230	240	250	260	270	280
	iCARbma-1458_1-HU6_F_F09	211	CGAACTCGGGCAGGCTAGAGAGTTTCAGGCTCGAGTGAATCTCTGAGGCTGATTTTGAATCGF-----							
G	pCARbma-1459	211	215	220	230	240	250	260	270	280
	iCARbma-1459_1-HU6_F_G09	210	CGAACTCGGGCAGGCTAGAGAGTTTCAGGCTCGAGTGAATCTCTGAGGCTGATTTTGAATCGF-----							
H	pCARbma-1460	211	110	220	230	240	250	260	270	
	iCARbma-1460_1-HU6_F_C09	211	CGAAACTCGGGTCTCGAAGTGTCACTCTCGAGAAGTGCAGAGTTTTCGGAATTTTTFG-----							

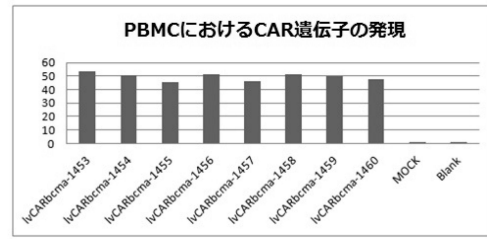
【 図 8 】



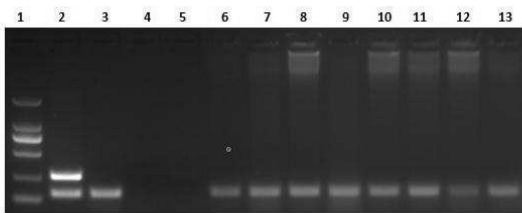
【図9】



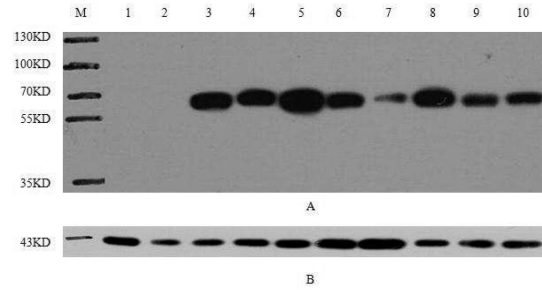
【図11】



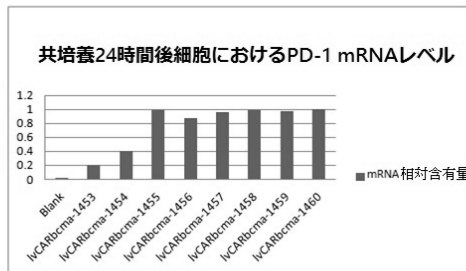
【図10】



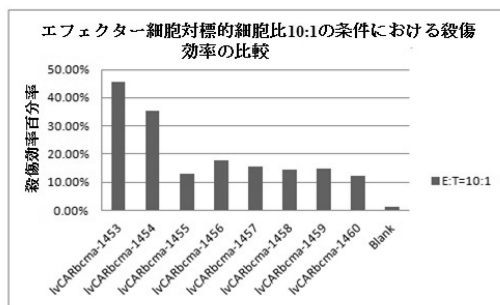
【図12】



【図13】



【図14】



【配列表】

0006930762000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10
C 1 2 N	5/0783 (2010.01)	C 1 2 N	5/0783
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00
A 6 1 K	31/713 (2006.01)	A 6 1 K	31/713
A 6 1 K	35/17 (2015.01)	A 6 1 K	35/17
A 6 1 K	35/76 (2015.01)	A 6 1 K	35/76
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00

Z

- (72)発明者 祁 偉
中国上海市浦東新区哈雷路998号4号楼202室
- (72)発明者 俞 磊
中国上海市浦東新区哈雷路998号4号楼202室
- (72)発明者 康 立清
中国上海市浦東新区哈雷路998号4号楼202室
- (72)発明者 余 宙
中国上海市浦東新区哈雷路998号4号楼202室

審査官 西 賢二

- (56)参考文献 国際公開第2016/014565(WO, A2)
国際公開第2015/090230(WO, A1)
国際公開第2015/084897(WO, A2)
国際公開第2016/177343(WO, A1)
中国特許出願公開第105949317(CN, A)
中国特許出願公開第106191062(CN, A)
国際公開第2015/023553(WO, A2)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N
A 6 1 K
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS
(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
PubMed