202031679

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本　(11)公開編號：TW 202031679 A

(43)公開日： 中華民國 109 (2020) 年 09 月 01 日

(21)申請案號：108138689　(22)申請日： 中華民國 108 (2019) 年 10 月 25 日

(51)Int. Cl.：　*C07K14/705 (2006.01)*　*C12N15/12 (2006.01)*

C12N15/63 (2006.01)　*C12N5/0783 (2010.01)*

C12N5/10 (2006.01)

(30)優先權：2018/10/26　日本　2018-202336

(71)申請人：日商橘生藥品工業股份有限公司 (日本) KISSEI PHARMACEUTICAL CO., LTD. (JP)

日本

國立大學法人信州大學 (日本) SHINSHU UNIVERSITY　(JP)

日本

(72)發明人：中沢洋三 NAKAZAWA, YOZO (JP) ；田中美幸 TANAKA, MIYUKI (JP) ；師川紘一 MOROKAWA, HIROKAZU (JP) ；成松翔伍 NARIMATSU, SHOGO (JP)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無　申請專利範圍項數：9 項　圖式數：11　共 61 頁

(54)名稱

高效率之基因改造細胞之製作方法

(57)摘要

本發明謀求嵌合抗原受體(CAR)表現細胞之製作方法之效率之提高。

本發明提供一種哺乳動物基因改造細胞之製作方法，其包括如下步驟：a)藉由轉位子法向來自哺乳動物之包含 T 細胞之細胞群導入編碼嵌合抗原受體(chimeric antigen receptor：CAR)蛋白質之多核苷酸而獲得基因改造細胞群；b)準備表現與上述 CAR 結合之蛋白質之來自該哺乳動物之內源性細胞群；及 c)對步驟 a)之基因改造細胞群與步驟 b)之內源性細胞群進行共培養。

202031679

【發明摘要】

【中文發明名稱】

高效率之基因改造細胞之製作方法

【中文】

本發明謀求嵌合抗原受體(CAR)表現細胞之製作方法之效率之提高。

本發明提供一種哺乳動物基因改造細胞之製作方法，其包括如下步驟：a)藉由轉位子法向來自哺乳動物之包含T細胞之細胞群導入編碼嵌合抗原受體(chimeric antigen receptor：CAR)蛋白質之多核苷酸而獲得基因改造細胞群；b)準備表現與上述CAR結合之蛋白質之來自該哺乳動物之內源性細胞群；及c)對步驟a)之基因改造細胞群與步驟b)之內源性細胞群進行共培養。

【指定代表圖】

無

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

高效率之基因改造細胞之製作方法

【技術領域】

【0001】 本發明係關於一種於過繼免疫療法之領域中有用之表現嵌合抗原受體之基因改造細胞之製作方法。

【先前技術】

【0002】 報告有使用表現以腫瘤相關抗原為靶之嵌合抗原受體(chimeric antigen receptor：CAR)之T細胞(CAR-T)的過繼免疫療法其抗腫瘤效果強勁，近年來急速推進開發。尤其是推進以治療B細胞腫瘤為目的之CAR之開發，已發展至臨床應用(非專利文獻1、2)。於CAR-T技術之研究開發進展中，於作為細胞醫藥品之CAR-T細胞之臨床應用中，認識到以臨床級製造CAR-T細胞之步驟之重要性。

【0003】 先前，CAR-T細胞係使用病毒載體而製作，但使用病毒載體之製作方法被指出存在安全方面或設備方面之課題(非專利文獻3、4)。為了解決利用病毒載體之先前之CAR療法中之問題點，研究使用非病毒載體之基因改造技術之一的轉位子法之應用。另一方面，轉位子法與病毒載體法相比基因導入效率較低，於臨床應用中大多需要選擇CAR表現細胞之步驟或長期之培養時間(非專利文獻5)。又，被指出隨著利用電穿孔法之基因導入(electroporation)，細胞受到傷害，細胞存活率或細胞增生率降低等問題。T細胞治療之臨床應用需要CAR陽性細胞數至少1×10^6細胞數/kg左右之T細胞數，故而CAR-T細胞之較低之表現率使臨床應用變得困難(非專利文獻6)。

為了解決該等問題，於使用轉位子法之CAR-T細胞之製作步驟中，進行有以CAR表現細胞之增大為目的之各種研究。

【0004】 於先前之病毒肽法中，利用：包含來自末梢血單核細胞(PBMC)之照射餵養細胞與抗CD3抗體之迅速擴大培養(REP法)(專利文獻1)、或藉由將抗CD3抗體或抗CD28抗體固定於輔助細胞(accessory cell)、珠粒或固體表面而非特異性地刺激T細胞之方法(非專利文獻4、非專利文獻7)等。

【0005】 於使用作為轉位子之一種的piggyBac之CD19.CAR-T細胞之製作中，除了先前之方法以外，還開發有如下方法：另外製備使K562等腫瘤細胞株強制性地表現CD19或共刺激因子而成之人工抗原呈現細胞(aAPCs)，與導入有CAR基因之細胞進行共培養，藉此CAR特異性地使CAR-T細胞活化(非專利文獻8)。又，開發有如下方法：以使用抗CD3抗體或抗CD28抗體將經照射處理之末梢血單核球(PBMC)活化而成之細胞(ATCs法)、或進而照射了病毒肽脈衝之細胞(ACE法)作為餵養細胞並與導入有CAR基因之細胞進行共培養；且確認到效果(專利文獻2、非專利文獻9)。

【0006】 然而，該等方法依然需要繁雜之步驟。又，另外產生用於使用腫瘤細胞株製作aAPCs或利用病毒肽製作餵養細胞的複雜之步驟。進而，該等方法有可能於面向臨床應用之監管(regulation)上產生複雜之問題。此外，亦存在因利用複數種抗CD3抗體或抗CD28抗體等而引起之費用方面之課題。因此，於轉位子法中，期待開發以更簡便之步驟有效地有助於CAR表現細胞之增大之製作方法。

先前技術文獻

專利文獻

【0007】 專利文獻1：美國專利5,827,642號說明書

專利文獻2：WO2017/061615

非專利文獻

【0008】 非專利文獻1：N. Engl. J. Med. (2017), 377, 2531-2544

非專利文獻2：N. Engl. J. Med. (2018), 378, 439-448

非專利文獻3：J Immunotherapy (2013), 36(1), 1-2

非專利文獻4：Current Opinion in Biotechnology (2018) 53: 164-181

非專利文獻5：Cytotherapy (2014) 16, 1257-1269

非專利文獻6：Lancet (2015), 385, 517-528

非專利文獻7：J Immunol Methods (2003) Apr 1; 275 (1-2): 251-5

非專利文獻8：Human Gene Therapy (2010) 21: 427-437

非專利文獻9：Molecular Therapy: Methods & Clinical Development (2018) 3: 131-140

【發明內容】

[發明所欲解決之問題]

【0009】 如上所述，期待一種使用轉位子法之簡便且有效地實現CAR表現細胞之增大的CAR-T細胞之製作方法。

[解決問題之技術手段]

【0010】 本發明者等人為了解決上述課題而銳意研究。其結果，發現一種CAR-T細胞之製作方法，其藉由利用表現與人初代培養細胞(Primary Cell)所含之CAR結合之物質的細胞，而以與先前之製作方法相

比極為簡便之步驟實現CAR表現細胞之增大。

【0011】 即，本發明如下所述。

[1]一種哺乳動物基因改造細胞之製作方法，其包括以下之步驟：

a)藉由轉位子法向來自哺乳動物之包含T細胞之細胞群導入編碼嵌合抗原受體(chimeric antigen receptor：CAR)蛋白質之多核苷酸而獲得基因改造細胞群；

b)準備表現與上述CAR結合之蛋白質之來自該哺乳動物之內源性細胞群；及

c)對步驟a)之基因改造細胞群與步驟b)之內源性細胞群進行共培養。

[2]如上述[1]中記載之製作方法，其中於上述步驟b)中，於1種或複數種細胞激素之存在下培養內源性細胞群。

[3]如上述[2]中記載之製作方法，其中上述步驟b)中之細胞激素為GM-CSF及/或IL-4。

[4]如上述[1]～[3]中任一項記載之製作方法，其係於1種或複數種細胞激素之存在下進行上述步驟c)。

[5]如上述[4]中記載之製作方法，其中上述步驟c)中之細胞激素為IL-7及/或IL-15。

[6]如上述[1]～[5]中任一項記載之製作方法，其中上述內源性細胞群為來自未接受不活化處理之PBMCs之細胞群。

[7]如上述[1]～[6]中任一項記載之製作方法，其中轉位子法為piggyBac法。

[8]如上述[1]～[7]中任一項記載之製作方法，其中基因改造細胞群與內源性細胞群來自同一個體。

[9]如上述[1]～[8]中任一項記載之製作方法，其中上述CAR蛋白質係包含對人顆粒細胞-巨噬細胞群落刺激因子(GM-CSF)受體具有特異性之結合域之蛋白質，且上述內源性細胞群係GM-CSF受體表現細胞。

本說明書包含成為本案之優先權之基礎的日本專利申請編號2018-202336號之揭示內容。

[發明之效果]

【0012】 本發明之基因改造細胞之製作方法可以與先前之製作方法相比極為簡便之步驟實現CAR表現細胞之增大，進而利用本方法所製作之CAR-T細胞顯示與先前之製作方法相比同等以上之有效性。

【圖式簡單說明】

【0013】

圖1表示CAR001之載體圖。

圖2表示對間隔域進行了改造之CAR002(CH2CH3部分缺失-(G4S)3插入體、GMR.CAR dCH2CH3+(G4S)3)之載體圖之例。

圖3表示對間隔域進行了改造之CAR003(CH2CH3部分缺失體、E21KGMR.CAR dCH2CH3)之載體圖之例。

圖4表示對間隔域進行了改造之CAR004(CH2CH3部分缺失體、E21KGMR.CAR dCH2CH3)之載體圖之例。

圖5表示CAR-T 004之第14天之表現分析結果。

圖6表示CAR-T 004-A之第13天之表現分析結果。

圖7表示CAR-T 004-B之第10天之表現分析結果。

圖8表示CAR-T 004-B對THP-1細胞之第4天(d4)、第8天(d8)、第12天(d12)、第15天(d15)、第19天(d19)、及第23天(d23)之抗腫瘤細胞活性

評價之結果。

圖9表示CAR-T 004-C之第11天之表現分析結果。

圖10表示CAR-T 004-A及CAR-T 004-B之第14天之PD-1陽性率(疲勞率)。

圖11表示CAR-T 004-A及CAR-T 004-B之第14天之幹細胞記憶成分之比率。

【實施方式】

【0014】 以下對本發明之實施形態進行詳細說明。再者，於本說明書中，「細胞群」之用語係為了明確地表示包含複數個細胞或複數種細胞而使用者，請理解根據上下文可與「細胞」互換使用。

本發明提供一種基因改造細胞之製作方法，其包括以下之步驟：

a)藉由轉位子法向來自哺乳動物之包含T細胞之細胞群導入編碼嵌合抗原受體(chimeric antigen receptor：CAR)蛋白質之多核苷酸而獲得基因改造細胞群；

b)準備表現與上述CAR結合之蛋白質之來自該哺乳動物之內源性細胞群；及

c)對步驟a)之基因改造細胞群與步驟b)之內源性細胞群進行共培養。

【0015】 本發明之方法可應用於哺乳動物，例如可對人、猴、小鼠、大鼠、豬、牛、狗等哺乳動物良好地實施。本發明之方法係包括於試管內(in vitro)對自哺乳動物取得之細胞導入多核苷酸之步驟、及進行培養之步驟等的方法，且係意在將所得之基因改造細胞以過繼免疫療法投予至該哺乳動物的離體(ex vivo)之方法。

【0016】

[步驟a)]

作為本發明中之「包含T細胞之細胞群」，例如可使用自血液(末梢血、臍帶血等)、骨髓等體液、組織或器官採取、單離、純化、誘導之細胞群。較佳為可使用末梢血單核細胞(PBMC)。

【0017】 作為本發明之較佳之實施態樣之一，例如可使用釋出細胞毒殺性蛋白質(穿孔蛋白、顆粒酶等)之細胞。具體而言，例如可使用含有T細胞、T細胞之前驅細胞(造血幹細胞、淋巴球前驅細胞等)、NK-T細胞之細胞群。進而，作為可分化為該等細胞之細胞，包含ES細胞、iPS細胞等各種幹細胞。T細胞包含CD8陽性T細胞、CD4陽性T細胞、控制性T細胞、細胞毒殺性T細胞、或腫瘤浸潤淋巴球。含有T細胞及T細胞之前驅細胞之細胞群包含PBMC。上述細胞可為自生物體採取者、對其進行擴大培養而成者或確立為細胞株者之任一者。於將製造之表現CAR之細胞或自該細胞分化之細胞移植至生物體之情形時，較理想為向自該生物體自身或同種之生物體採取之細胞導入核酸。

【0018】 作為為了獲得本發明之基因改造細胞而被導入多核苷酸且用於過繼免疫療法之T細胞，可使用期待持續之抗腫瘤效果之T細胞、例如幹細胞記憶型T細胞。幹細胞記憶型T細胞之分析可依照慣例，例如依照(Yang Xu, et al. blood. 2014; 123: 3750-3759)等之記載而容易地確認。

【0019】 作為上述被導入多核苷酸之細胞，例如可使用CD45R0-、CD62L+、CD45RA+及CCR7+之細胞。更佳為可將CD45RA+、CCR7+之細胞至少為20%以上之細胞群用作上述被導入多核苷酸之細胞。

【0020】 於本說明書中，所謂「嵌合抗原受體(CAR)」，係指可將靶

特異性移植至T細胞(例如初始T細胞、幹細胞記憶型T細胞、中央記憶型T細胞、效應記憶型T細胞、或其等之組合等T細胞)等細胞之改造受體。CAR又作為人工T細胞受體、嵌合T細胞受體、或嵌合免疫受體而為人所知。

【0021】 本發明之方法中使用之CAR具有與靶分子特異性地結合之靶結合域、跨膜域、及細胞內訊息傳遞域。此處，所謂「域」，表示與其他區域獨立地摺疊為特定之結構的多肽內之區域。

【0022】 本發明之方法可應用於過繼免疫療法中使用之表現CAR之基因改造細胞之製備全部。因此，CAR作為靶之分子典型而言係於腫瘤細胞中與其他細胞相比確認到有意義或顯著之表現之抗原，可列舉例如CD19、CD20、GD2、CD22、CD30、CD33、CD44、CEA、Her2/neu、MUC1、MUC4、MUC6、EGFR、VEGFR2、GM-CSFR、IL-11Rα、IL-13α2等，但並無限定。

【0023】 CAR蛋白質之靶結合域例如可設為包含與如上所述之靶分子特異性地結合之單株抗體之單鏈抗體(scFv)片段者，該單鏈抗體(scFv)片段包含重鏈(H鏈)可變區及輕鏈(L鏈)可變區。業者可容易地製作針對特定之抗原之單株抗體及可用於CAR之scFv片段，又，亦可利用市售者。例如，作為可於該實施形態中利用之靶結合域，可列舉與CD19特異性地結合之scFv片段。

【0024】 或者，於成為標靶之抗原為於腫瘤細胞表面上表現之受體之情形時，可將與該受體特異性地結合之配體之結構用作靶結合域。例如，作為可於該實施形態中利用之靶結合域，可列舉GM-CSF。

【0025】 本發明之方法除了被導入有編碼CAR蛋白質之多核苷酸之

細胞以外，需要表現與該CAR蛋白質結合之蛋白質之內源性細胞群。該蛋白質只要與CAR蛋白質結合即可，可與上述靶分子相同亦可不同。靶分子較佳為於腫瘤以外之內源性細胞中亦於細胞膜表面表現之靶。

【0026】 進而，亦可將與靶特異性地結合之配體、例如親和體、來自天然型受體之配體結合域、(例如腫瘤細胞上之)受體之溶解性蛋白質/肽配體、肽等用作靶結合域。

【0027】 於以下之詳細之說明中，藉由以人顆粒細胞-巨噬細胞群落刺激因子(GM-CSF)受體為靶之情形對CAR蛋白質之結構進行具體說明。

【0028】 於以人GM-CSF受體為靶之情形時，作為靶結合域，可使用包含人GM-CSF之開放閱讀框架(open reading frame)所編碼之胺基酸序列的多肽。具體而言，可使用包含序列編號1之胺基酸序列之GM-CSF蛋白質。或者，可使用包含相對於序列編號1之胺基酸序列具有90%以上之序列同一性之胺基酸序列且具有對人GM-CSF受體之結合能力的多肽。

【0029】 或者，於以人GM-CSF受體為靶之情形時，靶結合域可為序列編號1所示之胺基酸序列中之第21號之麩胺酸被置換為其他胺基酸、例如離胺酸而成的變異體多肽(序列編號2)。只要保持對人GM-CSF受體之結合能力，則亦可使用其他胺基酸殘基部分亦經置換之變異體、以及該等多肽之片段、即結合性片段。

【0030】 此處，所謂具有「對人GM-CSF受體之結合能力」，意指對人GM-CSF受體之結合常數例如為1-1000 nM以下。該結合能力可為相比抗原與抗體之結合能力相對較弱之結合。

【0031】 或者，於以人GM-CSF受體為靶之情形時，靶結合域亦可使用例如來自具有與人GM-CSF受體之結合能力之單株抗體的單鏈抗體

(scFv)。

【0032】 CAR蛋白質視情形可於存在於細胞外之靶結合域與膜結合域之間包含「細胞外間隔域」。細胞外間隔域較理想為促進CAR與抗原之結合，使向細胞內之訊息傳遞亢進之序列。例如可使用抗體之Fc片段、或者其片段或衍生物、抗體之鉸鏈區、或者其片段或衍生物、抗體之CH2區、抗體之CH3區、人工間隔子序列、或其等之組合。

【0033】 作為本發明之一態樣，細胞外間隔域可使用：(i)IgG4之鉸鏈、CH2、及CH3區、(ii)IgG4之鉸鏈區、(iii)IgG4之鉸鏈及CH2、(iv)CD8a之鉸鏈區、(v)IgG1之鉸鏈、CH2、及CH3區、(vi)IgG1之鉸鏈區、或(vii)IgG1之鉸鏈及CH2、或其等之組合。例如作為IgG1之鉸鏈區，可良好地使用具有藉由序列編號3所示之核苷酸序列所編碼之以下胺基酸序列(序列編號4)者，但不限定於此。

UniProt No.: P01857 (99-110)
EPKSCDKTHTCP PCDPA EPKSPDKTHTCP
鉸鏈 間隔子 鉸鏈

【0034】 又，作為IgG1之CH2區，可良好地使用具有藉由序列編號5所示之核苷酸序列所編碼之胺基酸序列(序列編號6)者，作為CH3區，可良好地使用具有藉由序列編號7所示之核苷酸序列所編碼之胺基酸序列(序列編號8)者。

【0035】 作為較佳之態樣，細胞外間隔域可使用人IgG1之鉸鏈、CH2、及CH3區或其一部分。

【0036】 又，作為較佳之態樣，細胞外間隔域可使用：(i)人IgG1之鉸鏈區單獨(序列編號4)、(ii)人IgG1之鉸鏈區(序列編號4)及CH2區(序列編號6)及CH3區(序列編號8)之組合、(iii)人IgG1之鉸鏈區(序列編號4)及

CH3區(序列編號8)之組合、(iv)CH3區單獨(序列編號8)。

【0037】 作為本發明之一態樣，用於細胞外間隔域之人工間隔子序列可使用式(G4S)n所表示之間隔子序列。式中，n為1～10，較佳為n＝3。例如可良好地使用具有序列編號9者。具有此種間隔子序列之間隔子有時亦被稱為肽連接子。可於本發明中適當地使用該領域中良好地使用之肽連接子。於該情形時，肽連接子之構成及鏈長可於無損所得之CAR蛋白質之功能之範圍內選擇適當者。

【0038】 作為進而較佳之態樣，細胞外間隔域可使用人IgG1之鉸鏈區(序列編號4)及(G4S)3之間隔子序列(序列編號9)之組合。

【0039】 細胞外間隔域可自上述例示者中適當選擇，或基於該領域中之技術常識進一步改造而用於本發明。

細胞外間隔域可以可存在於靶結合域與跨膜域之間之方式將編碼各域之胺基酸序列之鹼基序列連結並插入至載體而使之於宿主細胞中表現。或者，細胞外間隔域亦可以預先製作之編碼質體CAR蛋白質之多核苷酸為模板進行改造。

細胞外間隔域之改造例如於考慮到導入有編碼CAR之多核苷酸之CAR-T細胞對宿主細胞中之CAR基因表現率之提高、訊息傳遞、細胞之老化、於腫瘤中之分佈、抗原識別或體內活性之影響的情形時有用。

【0040】 CAR蛋白質包含：含有靶結合域及任意含有之細胞外間隔域之細胞外域、跨膜域、及含有細胞內訊息傳遞域及任意含有之共刺激域之細胞內域。如該領域中所周知，細胞外域及細胞內域均為親水性域，與此相對，「跨膜域」係具有對構成細胞膜之脂質雙層之親和性之域。

【0041】 跨膜域只要CAR蛋白質可存在於細胞膜上，且無損靶結合

域與細胞內訊息傳遞域之功能，則並無特別限定，亦可能存在與下述共刺激域來自相同之蛋白質之多肽發揮作為跨膜域之功能之情形。跨膜域例如可使用CD28、CD3ε、CD8α、CD3、CD4或4-1BB等跨膜域。例如，跨膜域可使用人CD28(Uniprot No.：P10747(153-179))。具體而言，可良好地使用具有藉由序列編號10所示之核苷酸序列(NCBI Accession No.：NM_006139.3(679-759))所編碼之胺基酸序列(序列編號11)者作為跨膜域。

【0042】CAR蛋白質視情形可包含「共刺激域」。共刺激域係與共刺激配體特異性地結合，藉此介導CAR-T細胞之增生、細胞激素產生、功能分化、靶細胞之細胞死亡之類之細胞之共刺激應答，但並不限定於該等。作為共刺激域，例如可使用CD27、CD28、4-1BB(CD137)、CD134(OX40)、Dap10、CD27、CD2、CD5、CD30、CD40、PD-1、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)、TNFR-1、TNFR-II、Fas、Lck。例如，共刺激域可使用人CD28(Uniprot No.：P10747(180-220))或4-1BB(GenBank：U03397.1)等。具體而言，可良好地使用具有藉由序列編號12所示之核苷酸序列(NCBI Accession No.：NM 006139.3(760-882))所編碼之胺基酸序列(序列編號13)者作為共刺激域。

【0043】CAR蛋白質包含「細胞內訊息傳遞域」。細胞內訊息傳遞域傳遞免疫細胞之效應功能之發揮所必需之訊息。作為細胞內訊息傳遞域，例如可使用人CD3ζ鏈、FcγRIII、FcεRI、Fc受體之細胞質末端、具有免疫受體酪胺酸活化基序(ITAM)之細胞質受體或其等之組合。例如，細胞內訊息傳遞域可使用人CD3ζ鏈(例如NCBI Accession No. NM 000734.3之核苷酸299-637)。具體而言，可良好地使用具有藉由序列編號14所示之核苷酸序列所編碼之胺基酸序列(序列編號15)者作為細胞內訊息

傳遞域。

【0044】目標之多核苷酸可依照慣例而容易地製作。可自顯示各域之胺基酸序列之NCBI RefSeq ID或GenBank之寄存編號取得編碼胺基酸序列之鹼基序列，可使用標準之分子生物學及/或化學之程序製作本發明之多核苷酸。例如，可基於該等鹼基序列而合成核酸，又，可將自cDNA庫(library)使用聚合酶鏈反應(PCR)所得之DNA片段組合而製作本發明之多核苷酸。

【0045】因此，編碼CAR蛋白質之多核苷酸可連結編碼上述各域之多核苷酸而製作，藉由將該多核苷酸導入至適當之細胞中，可製作基因改造細胞。又，CAR蛋白質亦可藉由以編碼除靶結合域以外之構成成分相同之既有CAR蛋白質的多核苷酸為模板，依照慣例，重組靶結合域而製作。

【0046】進而，可根據目的，以編碼既有CAR蛋白質之多核苷酸為模板，使用反向PCR(iPCR)法等，改造1個以上之域、例如細胞外間隔域。關於細胞外間隔域之改造技術，例如記載於Oncoimmunology, 2016, Vol.5, No.12, e1253656等中。

【0047】再者，於本說明書中使用之情形時，「多核苷酸」包含天然或合成之DNA及RNA、例如基因組DNA、cDNA(互補DNA)、mRNA(信使RNA)、rRNA(核糖體RNA)、shRNA(小髮夾RNA)、snRNA(核小RNA)、snoRNA(核仁小RNA)、miRNA(微小RNA)、及/或tRNA，但並不限定於該等。

【0048】又，於本說明書中，所謂「編碼」如該領域中通常所使用般，係指特定之核苷酸序列將特定之蛋白質或(多)肽之胺基酸序列資訊加密，於本說明書中，於「編碼」正義鏈及反義鏈兩者之語境中使用。

【0049】 於本發明之方法中，用以製作基因改造細胞之多核苷酸之導入係藉由利用轉位子法之非病毒性之方法實施。為了進行轉位子法，可使用質體轉位子，可良好地使用：睡美人轉位子系統(例如記載於Huang X, Guo H, et al. Mol Ther. 2008; 16: 580-9；Singh H, Manuri PR, et al. Cancer Res. 2008; 68: 2961-71；Deniger DC, Yu J, et al. PLoS One. 2015; 10: e0128151；Singh H, Moyes JS, et al. Cancer Gene Ther. 2015; 22: 95-100；Hou X, Du Y, et al. Cancer Biol Ther. 2015; 16: 8-16；Singh H, Huls H, et al. Immunol Rev. 2014; 257: 181-90；及Maiti SN, Huls H, et al. J Immunother. 2013; 36: 112-23)或piggyBac轉位子系統(記載於Nakazawa Y, Huye LE, et al. J Immunother. 2009; 32: 826-36；Galvan DL, Nakazawa Y, et al. J Immunother. 2009; 32: 837-44；Nakazawa Y, Huye LE, et al. Mol Ther. 2011; 19: 2133-43；Huye LE, Nakazawa Y, et al. Mol Ther. 2011; 19: 2239-48；Saha S, Nakazawa Y, et al. J Vis Exp. 2012; (69): e4235；Nakazawa Y, Saha S, et al. J Immunother. 2013; 36: 3-10；Saito S, Nakazawa Y, et al. Cytotherapy. 2014; 16: 1257-69；及Nakazawa et al. Journal of Hematology & Oncology (2016) 9: 27)。

【0050】 於使用piggyBac轉位子系統之情形時，典型而言，導入(轉染)保持有編碼piggyBac轉位酶之基因的質體(於本說明書中，記載為piggyBac質體)、與具備編碼CAR蛋白質之多核苷酸被夾於piggyBac反向反覆序列之結構的質體。轉染可利用電穿孔法(electroporation)、核轉染法(nucleofection)、脂轉染法(lipofection)、磷酸鈣法等各種方法。於兩者之質體中可包含PolyA附加訊息序列、報導基因、選擇標記基因、增強

子序列等。

【0051】作為用於電穿孔法之裝置，並無限定，例如可使用4D-Nucleofector(Lonza Japan股份有限公司)、NEPA21(Nepa Gene股份有限公司)等，可依照各自之使用說明書進行操作。

藉由上述方法，可對1×10^6～2×10^7個之範圍之細胞進行基因導入。

【0052】

[步驟b)]

本發明之方法之特徵在於：準備表現與步驟a)中製備之基因改造細胞群所表現之CAR結合之蛋白質的內源性細胞群。因此，本發明之方法必須使內源性細胞群表現與CAR蛋白質結合之蛋白質，只要可取得此種內源性細胞群即可，CAR蛋白質並無特別限定。

【0053】再者，本步驟中之所謂「準備」意指與步驟a)之導入編碼CAR之多核苷酸之細胞群獨立地準備供於步驟c)之共培養之內源性細胞群，於本步驟中，不僅包括將經單離之內源性細胞群直接供於步驟c)之共培養，亦包括為了提高表現目標蛋白質之細胞之比率及/或使之成熟(分化)而進行培養。上述說明中使用之內源性細胞群之「單離」並非意指僅單離表現目標蛋白質之細胞，而意指作為包含表現目標蛋白質之細胞且可於步驟b)中使用之細胞群準備。

【0054】例如如實施例中所記載般，可將來自相同個體之細胞群之一部分用作步驟a)中使用之「包含T細胞之細胞群」，且將剩餘部分用作步驟b)中培養之「內源性細胞群」。然而，應理解重要的是步驟a)中之細胞群必須包含所導入之CAR識別靶時被活化之T細胞，另一方面，步驟b)中之細胞群係可實現作為本發明之方法之特徵之使用內源性細胞之CAR特異

性之刺激而非先前之方法中使用之外源性之刺激的群。

【0055】 於內源性細胞群中表現與CAR結合之蛋白質可藉由慣例容易地確認。例如，於將CAR蛋白質設為與GM-CSF受體特異性地結合者之情形時，可藉由使用針對GM-CSF受體之抗體的流式細胞儀分析確認內源性細胞群中之GM-CSF受體之表現。又，於將CAR蛋白質設為與CD19特異性地結合者之情形時，可藉由使用抗CD19抗體之流式細胞儀分析確認內源性細胞群中之CD19之表現。

【0056】 於本說明書中，所謂「內源性細胞」係指與導入編碼CAR蛋白質之多核苷酸之細胞同種之哺乳動物原本具有之細胞，例如可使用自血液(末梢血、臍帶血等)、骨髓等體液、組織或器官採取、單離、純化、誘導之細胞。可使用末梢血單核細胞(PBMC)、免疫細胞[樹狀細胞、B細胞、造血幹細胞、巨噬細胞、單核球、NK細胞或血球系細胞(嗜中性球、嗜鹼性球)]、臍帶血單核球、纖維母細胞、前驅脂肪細胞、幹細胞、皮膚角化細胞、間質系細胞、脂肪肝細胞、癌細胞或神經幹細胞。

【0057】 作為較佳之態樣，可利用PBMC作為內源性細胞。

【0058】 本發明中之「內源性細胞」表現與步驟a)中製備之基因改造細胞群所表現之CAR結合之蛋白，故而藉由與步驟a)中製備之細胞群進行共培養，能夠實現CAR特異性之刺激，實現有效率之T細胞之活化與擴增。因此，本說明書中之所謂使用內源性細胞之CAR刺激意指不同於例如使用被覆於珠粒等之抗CD3抗體或抗CD28抗體的非特異性之T細胞刺激、藉由使K562等腫瘤細胞株強制性地表現與CAR結合之抗原分子或共刺激因子而成之人工抗原呈現細胞(aAPCs)所實現的人工之CAR特異性刺激等。用於步驟b)之內源性細胞之個數係根據藉由CAR特異性之刺激實現T

細胞之活化及抑制因過度之活化導致之T細胞之早期疲勞之觀點而適當決定。具體例於實施例表示。又，本發明中使用之內源性細胞群可不進行利用紫外線等之照射處理所進行之不活化處理而使用。

【0059】 步驟b)中準備(單離、培養)之內源性細胞群來自與步驟a)中取得之包含T細胞之細胞群所來自之哺乳動物同種的哺乳動物。於較佳之實施形態中，基因改造細胞群與內源性細胞群來自同一個體。

【0060】 例如，於將CAR蛋白質設為與CD19特異性地結合者之情形時，作為內源性細胞群，可利用包含表現CD19之B細胞之細胞群作為內源性細胞。又，例如於將CAR設為與GM-CSF受體特異性地結合者之情形時，作為內源性細胞群，可利用包含表現GM-CSF受體之單核球或來自單核球之細胞之細胞群作為內源性細胞。

【0061】 於本發明之一實施形態中，內源性細胞群包含在培養板上培養末梢血單核細胞(PBMC)之情形時附著於培養板之細胞。作為此種細胞，例如可列舉單核球等。又，於另一實施形態中，內源性細胞群可為於體外培養PBMC所得之細胞群。

【0062】 內源性細胞群較佳為於步驟b)中在1種或複數種細胞激素之存在下進行培養，例如細胞激素可為GM-CSF及/或IL-4。較佳為GM-CSF以例如5～20 ng/mL之範圍之濃度使用，IL-4以例如5～20 ng/mL之範圍之濃度使用。

步驟b)中之培養條件並無特別限定，較佳為例如於37℃下設為0～10天之範圍內。

【0063】

[步驟c)]

本發明之方法包括對步驟a)中所得之基因改造細胞群與步驟b)中所得之內源性細胞群進行共培養之步驟。

可於1種或複數種細胞激素之存在下進行上述步驟c)，例如細胞激素可為IL-7及/或IL-15。較佳為IL-7以例如5～20 ng/mL之範圍之濃度使用，IL-15以例如1～10 ng/mL之範圍之濃度使用。

【0064】 內源性細胞群可1次或分成複數次添加至基因改造細胞群。

步驟c)中之培養條件並無特別限定，較佳為例如於37℃下設為1～14天。

【0065】 於步驟c)中之培養中，可使用添加有血清(人血清、胎牛血清、人工血清等)之培養基。就臨床應用時之安全性之觀點而言，較佳為自體血清或人工血清。作為較佳之態樣，可使用人工血清。人工血清只要依照慣例，於適於培養之條件下添加至培養基即可。例如以10%以下之濃度使用。作為較佳之態樣，可使用1～5%之範圍之濃度。上述血清可容易地獲取(例如自細胞化學研究所股份有限公司提供)。

【0066】 於本發明之較佳之實施形態中，CAR蛋白質係包含對人顆粒細胞-巨噬細胞群落刺激因子(GM-CSF)受體具有特異性之結合域之蛋白質，上述內源性細胞群係GM-CSF受體表現細胞，但並無特別限定。

【0067】 本發明之方法係藉由不使用病毒載體之轉位子法而導入多核苷酸者，又，由於未如先前之方法般利用由病毒肽或腫瘤細胞株、單株抗體、珠粒等產生之外源性刺激，故而無需繁雜之步驟，亦可消除面向臨床應用之安全性之擔憂。進而，藉由本發明之方法所得之基因改造細胞與先前之方法相比表現率較高，亦長時間持續抗腫瘤細胞活性，並且作為疲

勞標記物之PD-1陽性之T細胞之比率亦較少，與先前之方法相比亦未確認到伴隨利用本發明之方法之細胞活化的T細胞之早期疲勞。

實施例

【0068】 以下列舉實施例對本發明進行進而具體之說明，但本發明並不僅限定於以下之實施例。再者，為了方便起見，將以下之實施例中例示之以GM-CSF受體為靶之CAR蛋白質記載為「GMR.CAR」，將包含以表現以GM-CSF受體為靶之CAR蛋白質之方式進行了基因改造之T細胞的細胞群記載為「GMR.CAR-T細胞」。

【0069】

[實施例1 GMR.CAR表現質體(CAR 001)之製作]

於人GM-CSF(NCBI Accession No. : NM_000758之轉譯區(序列編號16、33～464鹼基：終止密碼子前)之5'側將EcoRI位點、於3'側將編碼IgG1之鉸鏈之鹼基序列及附有BclI位點之PCR產物次選殖至pTA2選殖載體(TOYOBO)。利用EcoRI與BclI對次選殖有人GM-CSF與IgG1之鉸鏈序列之pTA2選殖載體進行雙酶切(double digest)，切出人GM-CSF與IgG1之鉸鏈序列。

【0070】 另一方面，對pSL1190載體(Amersham公司)連接藉由利用NcoI與SphI對SFG-CD19.CAR(Savoldo et al. J Clin Invest 2011; 121 (5): 1822-1826)進行雙酶切而獲得之抗CD19 scFv(FMC63; Zola H. et al. Immunol Cell Biol. 1991; 69 (Pt6): 411-412)-CD28-CD3zeta之片段，藉此製作pSL1190-CD19.CAR載體。

【0071】 利用EcoRI與BamHI對pSL1190-CD19.CAR載體進行雙酶切後，使用親和位點(compatible site)，連接上述切出之人GM-CSF與

IgG1之鉸鏈序列，藉此製作pSL1190-GMR.CAR載體。進而，利用EcoRI與NotI對pIRII-CD19.CAR載體(Huye et al. Mol Ther 2011; 19 (12): 2239-2248)進行雙酶切，藉此去除CD19.CAR片段，取而代之連接藉由利用EcoRI與NotI對pSL1190-GMR.CAR載體進行雙酶切所得之片段，藉此取得GMR.CAR表現質體(CAR 001)。圖1中表示所製作之CAR 001之載體圖。

【0072】

[實施例2 間隔子改造GMR.CAR表現質體(CAR 002)之製作]

藉由以實施例1中製作之CAR 001為模板之反向PCR法使CH2CH3部分地缺失，製作插入有(G4S)3之間隔子改造體。用於反向PCR之PCR引子係如以下所示般設計(序列編號17及18)並合成(委託Eurofins Genomics股份有限公司)。

正向引子：

5'-GGTGGTGGTGGATCCGGCGGCGGCGGCTCCGGTGGTGGTGGTTCTAAAGATCCCAAATTTTGGGTGCTGG-3'(序列編號17)

反向引子：

5'-TGGGCATGTGTGAGTTTTGTCAGGAGATTTGGGC-3'(序列編號18)

【0073】將CAR 001製備為50 ng/μL而用作模板，各PCR引子係以反應液中濃度成為0.3 μM之方式製備。反向PCR係使用KOD-Plus-突變誘發套組(東洋紡股份有限公司)，反應組成係依照套組隨附之操作說明(protocol)。關於反應條件，於(i)94℃2分鐘、(ii)98℃10秒、(iii)68℃7分

鐘之條件下將(ii)及(iii)進行10個循環。

【0074】 利用1～1.2%瓊脂糖凝膠電泳將PCR反應後之樣品之一部分分離，確認目標尺寸之直鏈狀之DNA之生成。繼而，依照套組隨附之操作說明，對剩餘之PCR反應後之樣品藉由Dpn I處理進行切斷經甲基化之模板質體CAR 001並排除的反應。其後，藉由套組隨附之Ligation high及T4多核苷酸激酶，使直鏈狀DNA進行自連接而製成環狀質體。藉由所得之環狀質體使大腸桿菌DH5α(東洋紡股份有限公司)進行轉形，於含有50 μg/mL安比西林之LB瓊脂培養基上培養約16小時。

【0075】 將出現之群落進而於含有50 μg/mL安比西林之LB液體培養基中培養約16小時。使用QIAprep Spin Miniprep Kit(Qiagen)，自所培養之大腸桿菌培養液純化質體，進行鹼基序列確認，取得確認到目標鹼基序列之改造之間隔子改造GMR.CAR表現質體：CAR 002(GMR.CAR dCH2CH3+(G4S)3)。圖2中表示所製作之CAR 002之載體圖。

【0076】

[實施例3 變異型間隔子改造GMR.CAR表現質體(CAR 003)之製作]

藉由以實施例2中製作之CAR 002為模板之反向PCR法，製作將GM-CSF多肽(序列編號1)之第21號之E置換為K而成之變異型間隔子改造體。用於反向PCR之PCR引子係如以下所示般設計(序列編號19及20)並合成(委託Eurofins Genomics股份有限公司)。

正向引子：

5'-AAGGCCCGGCGTCTCCTGAACCTG-3'(序列編號19)

反向引子：

5'-CTGGATGGCATTCACATGCTCCCAGGG-3'(序列編號20)

【0077】 將CAR 002製備為50 ng/μL而用作模板，各PCR引子係以反應液中濃度成為0.3 μM之方式製備。反向PCR係使用KOD-Plus-突變誘發套組(東洋紡股份有限公司)，反應組成係依照套組隨附之操作說明。關於反應條件，於(i)94℃2分鐘、(ii)98℃10秒、(iii)68℃7分鐘之條件下將(ii)及(iii)進行10個循環。

【0078】 利用1～1.2%瓊脂糖凝膠電泳將PCR反應後之樣品之一部分分離，確認目標尺寸之直鏈狀之DNA之生成。繼而，依照套組隨附之操作說明，對剩餘之PCR反應後之樣品藉由Dpn I處理進行切斷經甲基化之模板質體並排除的反應。其後，藉由套組隨附之Ligation high及T4多核苷酸激酶，使直鏈狀DNA進行自連接而製成環狀質體。藉由所得之環狀質體使大腸桿菌DH5α(東洋紡股份有限公司)進行轉形，於含有50 μg/mL安比西林之LB瓊脂培養基上培養約16小時。

【0079】 將出現之群落進而於含有50 μg/mL安比西林之LB液體培養基中培養約16小時。使用QIAprep Spin Miniprep Kit(Qiagen)，自所培養之大腸桿菌培養液純化質體，進行鹼基序列確認，取得確認到目標鹼基序列之改造之變異型間隔子改造GMR.CAR表現質體：CAR 003(E21KGMR.CAR dCH2CH3+(G4S)3)。圖3中表示所製作之CAR 003載體圖。

【0080】 將藉由PCR法所製備之康黴素耐性基因之序列藉由無縫選殖插入至CAR 003及pCMV-piggyBac，實施將作為選擇標記物之耐性基因自安比西林變更為康黴素之質體之改造(委託Mediridge股份有限公司)。進行鹼基序列確認，取得確認到目標鹼基序列之改造之GMR.CAR表現質體：CAR 004(E21KGMR.CAR dCH2CH3+(G4S)3kan)及pCMV-

piggyBac(kan)。圖4中表示所製作之CAR 004載體圖。

【0081】

[實施例4 GMR.CAR-T細胞之培養、擴增]

＜4-1 PBMC之純化＞

自健康成人供體採取末梢血，利用D-PBS(FUJIFILM Wako Pure Chemical股份有限公司)稀釋至2倍後，使用SepMate-50(STEMCELL Technologies)對Ficoll-Paque PLUS(GE Healthcare)重疊稀釋末梢血，以1200×g進行15分鐘之離心分離，分取PBMC。將分取之PBMC以D-PBS洗淨2次，藉由離心分離進行純化。將純化之PBMC分別用作ACE餵養細胞(4-2)、電氣導入載體之細胞(4-3)、OKT3 blast製作用之細胞(4-4)。

【0082】

＜4-2 PBMC ACE餵養細胞之製作(第0天)＞

對上述4-1中純化之PBMC進行利用peptivator肽池(註冊商標，Miltenyi Biotec)之病毒肽脈衝。具體而言，於向100 μL之D-PBS中添加有各2 μL之0.05 μg/μL之AdV5 Hexon、CMV pp65、EBV BZLF1及EBV EBNA-1(將4種肽統稱為ACE肽)之肽池中懸浮12×10^6個PBMC，於CO_2培養箱內以37℃施以30分鐘之病毒肽脈衝。30分鐘後，向施加過病毒肽脈衝之PBMC中添加5 mL之D-PBS使之懸浮，其後進行4分鐘之UV照射。回收經UV照射之PBMC(PBMC ACE餵養細胞)，進行離心分離。於離心分離後，以成為2×10^6個/孔/2 mL之方式懸浮於含有10 ng/mL人IL-7(Miltenyi Biotec)、5 ng/mL人IL-15(Miltenyi Biotec)及2%人工血清(無動物源)(細胞科學研究所股份有限公司)之ALyS705(細胞科學研究所股份有限公司)中，再移至24孔細胞培養用平底多孔板(FALCON)。

【0083】

＜4-3 GMR.CAR表現載體與piggyBac載體之電氣導入(第0天)＞

為了對上述4-1中純化之15×10^6個PBMC進行基因導入，分別添加7.5 μg之實施例3中製作之CAR 004質體及pCMV-piggyBac(kan)質體，然後使之懸浮於含有2%人工血清(無動物源)之ALyS705中。將懸浮之細胞設置於NEPA比色管電極2 mm間隙(Nepa Gene股份有限公司)，使用基因導入裝置NEPA21(Nepa Gene股份有限公司)，測定懸浮液之電阻值。此時，以成為製造商推薦之適當範圍內之電阻值(0.038～0.046 kΩ)之方式使用含有2%人工血清(無動物源)之ALyS705進行液量調節。調節後，於NEPA21可設定之範圍內實施電氣導入。

【0084】 將實施過電氣導入之細胞全量添加至預先加入有於上述4-2中製作之PBMC ACE餵養細胞之24孔細胞培養用平底多孔板，於37℃之CO_2培養箱內開始培養。同樣地培養不添加質體且實施過電氣刺激之Mock-T細胞。於24孔細胞培養用平底多孔板培養7天，於該期間適當進行培養基更換、IL-7及IL-15之添加。

【0085】

＜4-4 OKT3 blast之製作(第0～7天)＞

於第0天，將利用D-PBS製備為1 μg/mL之抗人CD3抗體(Miltenyi Biotec)及抗人CD28抗體(Miltenyi Biotec)向24孔未處理平底板(FALCON)中添加500 μL，並放入至37℃之CO_2培養箱中2小時，藉此將抗體固定於培養板。2小時後，去除上清液，藉此製作固定有抗體之培養板。

【0086】 使上述4-1中純化之PBMC懸浮於含有5 ng/mL人IL-15及

2%人工血清(無動物源)之ALyS705中。將懸浮之PBMC以成為1.5×10^6個/孔/2 mL之方式接種於預先固定有抗體之培養板，藉此一面對T細胞實施刺激一面開始培養。

【0087】 於第3天，製作OKT3 blast之再刺激用之抗體固定板。具體而言，將利用D-PBS製備為1 μg/mL之抗人CD3抗體及抗人CD28抗體向24孔未處理平底板添加500 μL，於4℃下進行徹夜保溫，藉此將抗體固定於培養板。

另一方面，自第0天實施刺激之OKT3 blast係藉由移至未固定抗體之24孔細胞培養用平底多孔板而暫時未進行刺激。

【0088】 於第4天，自前一天進行固定之培養板去除上清液，添加OKT3 blast，藉此開始OKT3 blast之利用抗人CD3抗體及抗人CD28抗體之再刺激。再刺激實施至第7天，於該期間適當進行培養基更換及IL-15之添加。

【0089】

＜4-5 OKT3 ACE餵養細胞之製作(第7天)＞

對上述4-4中製作之OKT3 blast進行與上述4-2同樣之利用peptivator肽池之病毒肽脈衝及UV照射，製成OKT3 ACE餵養細胞。回收該OKT3 ACE餵養細胞，使5×10^6個懸浮於30 mL之含有10 ng/mL人IL-7、5 ng/mL人IL-15及2%人工血清(無動物源)之ALyS705中，移至G-Rex 6孔細胞培養板(wilson wolf manufacturing corporation)。

【0090】

＜4-6 CAR-T細胞之培養、擴增(第7～14天)＞

將上述4-3中進行了電氣導入之細胞全量移至上述4-5中接種有OKT3

ACE餵養細胞之G-Rex 6孔細胞培養板中，進行GMR.CAR-T細胞之培養、擴增直至第14天，於該期間適當進行培養基更換、IL-7及IL-15之添加。將使用表現質體CAR 004藉由對PBMC之電氣導入操作及T細胞之培養、擴增所得之GMR.CAR-T細胞設為CAR-T 004。

【0091】

＜4-7 GMR.CAR表現率之評價(第14天)＞

藉由流式細胞儀分析對進行培養、擴增直至第14天之GMR.CAR-T細胞中之GMR.CAR之表現率進行評價。向採取上述4-6之細胞培養懸浮液100 μL且進行離心分離所得之細胞中添加PE抗人GM-CSF抗體(Miltenyi Biotec)5 μL及APC抗人CD3抗體(Miltenyi Biotec)5 μL使之懸浮，於4℃、遮光之條件下進行20分鐘之抗體標記反應。20分鐘後，利用D-PBS洗淨細胞，藉由離心分離使細胞沈澱並去除上清液後，使用FACSCantoII(Becton Dickinson)及FLOWJO(Becton Dickinson)，對再懸浮於適量D-PBS之樣品進行分析，以GM-CSF/CD3陽性為指標測定GMR.CAR之表現率。

將CAR-T 004之第14天之表現分析結果示於圖5。GMR.CAR表現率為11.1%。

【0092】

[實施例5 使用內源性之細胞之GMR.CAR-T細胞之培養、擴增(方法A)]

＜5-1 PBMC之純化(第0天)＞

自與實施例4同一健康成人供體採取末梢血，利用D-PBS(FUJIFILM Wako Pure Chemical股份有限公司)稀釋至2倍後，使用SepMate-50(STEMCELL Technologies)對Ficoll-Paque PLUS(GE Healthcare)重疊

稀釋末梢血，以1200×g進行15分鐘之離心分離，分取PBMC。將分取之PBMC利用D-PBS洗淨2次，藉由離心分離進行純化。將純化之PBMC分別用作電氣導入載體之細胞(5-3)及內源性之CAR刺激用細胞(5-4及5-5)。

【0093】

＜5-2 經純化之PBMC之分離(第0天)＞

利用D-PBS使上述5-1中純化之PBMC以成為20×10^6個/孔/2 mL之方式懸浮、接種於24孔細胞培養用平底多孔板(FALCON)。將接種之細胞靜置於37℃之CO_2培養箱內2小時後，與培養上清液一起回收浮游細胞，實施下述5-3之電氣導入。

另一方面，附著於培養板之細胞係於2 mL之含有10 ng/mL人IL-7(Miltenyi Biotec)、5 ng/mL人IL-15(Miltenyi Biotec)及2%人工血清(無動物源)(細胞科學研究所股份有限公司)之ALyS705(細胞科學研究所股份有限公司)中進行培養，作為內源性之CAR刺激用細胞用於下述5-4之操作。

【0094】

＜5-3 GMR.CAR表現載體與piggyBac載體之電氣導入(第0天)＞

為了對上述5-2中回收之浮游細胞進行基因導入，分別添加7.5 μg之CAR 004質體及pCMV-piggyBac(kan)質體，然後使之懸浮於含有2%人工血清(無動物源)之ALyS705中。將懸浮之細胞設置於NEPA比色管電極2 mm間隙(Nepa Gene股份有限公司)，使用基因導入裝置NEPA21(Nepa Gene股份有限公司)，測定懸浮液之電阻值。此時，以成為製造商推薦之適當範圍內之電阻值(0.038～0.046 kΩ)之方式使用含有2%人工血清(無動物源)之ALyS705進行液量調節。調節後，以與實施例4同樣之設定值實施

電氣導入。

【0095】

＜5-4 對實施了基因導入之細胞之初次CAR刺激與培養(第0～7天)＞

將上述5-3中進行了電氣導入之細胞全量移至預先附著有上述5-2中準備之內源性之CAR刺激用細胞之24孔細胞培養用平底多孔板，於37℃之CO_2培養箱內開始培養。同樣地培養不添加質體且實施了電氣刺激之Mock-T細胞。於7天之培養期間中適當進行培養基更換、IL-7及IL-15之添加。

【0096】

＜5-5 使用PBMC之CAR刺激用細胞之培養(第0～7天)＞

使上述5-1中純化之PBMC以成為5×10^6個/孔/15 mL之方式懸浮於含有10 ng/mL人GM-CSF(Miltenyi Biotec)及10 ng/mL人IL-4(Miltenyi Biotec)之ALyS705中，並接種於G-Rex 6孔細胞培養板(wilson wolf manufacturing corporation)中，於37℃之CO_2培養箱內開始培養。於7天之培養期間中適當進行GM-CSF及IL-4之添加。

【0097】

＜5-6 對實施了基因導入之細胞之第2次CAR刺激與培養、擴增(第7～13天)＞

自上述5-5中培養了7天之G-Rex 6孔細胞培養板去除上清液，添加30 mL之含有10 ng/mL人IL-7、5 ng/mL人IL-15及2%人工血清(無動物源)之ALyS705。進而，將於24孔細胞培養用平底多孔板培養7天之細胞全量移至G-Rex 6孔細胞培養板中，藉此實施對實施了基因導入之細胞之第2次CAR刺激。其後，進而培養、擴增6天，於該期間中適當進行培養基更

換、IL-7及IL-15之添加。利用以下之方法對進行培養、擴增直至第13天之GMR.CAR-T細胞中之GMR.CAR之表現率進行測定。於本實施例中，將藉由使用內源性之細胞實施了CAR刺激之GMR.CAR-T細胞之培養、擴增所得的使用表現質體CAR 004之GMR.CAR-T細胞設為CAR-T 004-A。

【0098】

＜5-7 GMR.CAR表現率之評價(第13天)＞

藉由流式細胞儀分析對進行培養、擴增直至第13天之GMR.CAR-T細胞中之GMR.CAR之表現率進行評價。向採取上述5-6之細胞培養懸浮液100 μL且進行離心分離所得之細胞中添加PE抗人GM-CSF抗體(Miltenyi Biotec)5 μL及APC抗人CD3抗體(Miltenyi Biotec)5 μL使之懸浮，於4℃、遮光之條件下進行20分鐘之抗體標記反應。20分鐘後，利用適量D-PBS洗淨細胞，藉由離心分離使細胞沈澱且去除上清液後，使用FACSCantoII(Becton Dickinson)及FLOWJO(Becton Dickinson)，對再懸浮於適量D-PBS之樣品進行分析，以GM-CSF/CD3陽性為指標測定GMR.CAR之表現率。

【0099】將CAR-T 004-A之第13天之表現分析結果示於圖6。GMR.CAR表現率為43.5%，與Mock-T細胞中之表現率0.88%相比較高，與實施例4之結果相比表現率亦大幅改善。

【0100】

[實施例6 使用內源性之細胞之GMR.CAR-T細胞之培養、擴增(方法B)]

＜6-1 PBMC之純化(第0天)＞

自與實施例4及5同一健康成人供體採取末梢血，利用D-PBS(FUJIFILM Wako Pure Chemical股份有限公司)稀釋至2倍後，使用

SepMate-50(STEMCELL Technologies)對Ficoll-Paque PLUS(GE Healthcare)重疊稀釋末梢血，以1200×g進行15分鐘之離心分離，分取PBMC。將分取之PBMC利用D-PBS洗淨2次，藉由離心分離進行純化。將純化之PBMC分別用作電氣導入載體之細胞(6-2)及內源性之CAR刺激用細胞(6-3)。

【0101】

＜6-2 GMR.CAR表現載體與piggyBac載體之電氣導入與培養(第0～3天)＞

為了對上述6-1中純化之15×10^6個PBMC進行基因導入，分別添加7.5 μg之CAR 004質體及pCMV-piggyBac(kan)質體，然後使之懸浮於含有2%人工血清(無動物源)(細胞科學研究所股份有限公司)之ALyS705(細胞科學研究所股份有限公司)中。將懸浮之細胞設置於NEPA比色管電極2 mm間隙(Nepa Gene股份有限公司)，使用基因導入裝置NEPA21(Nepa Gene股份有限公司)，測定懸浮液之電阻值。此時，以成為製造商推薦之適當範圍內之電阻值(0.038～0.046 kΩ)之方式使用含有2%人工血清(無動物源)之ALyS705進行液量調節。調節後，以與實施例4及5同樣之設定值實施電氣導入。

【0102】使實施過電氣導入之細胞全量懸浮於2 mL之含有10 ng/mL人IL-7(Miltenyi Biotec)、5 ng/mL人IL-15(Miltenyi Biotec)及2%人工血清(無動物源)之ALyS705中，並接種於24孔細胞培養用平底多孔板(FALCON)，於37℃之CO_2培養箱內培養3天。同樣地培養不添加質體且實施了電氣刺激之Mock-T細胞。

【0103】

＜6-3 使用PBMC之CAR刺激用細胞之培養(第0～3天)＞

使上述6-1中純化之PBMC以成為5×10^6個/孔/15 mL之方式懸浮於含有10 ng/mL人GM-CSF(Miltenyi Biotec)及10 ng/mL人IL-4(Miltenyi Biotec)之ALyS705中，並接種於G-Rex 6孔細胞培養板(wilson wolf manufacturing corporation)中，於37℃之CO_2培養箱內培養3天。

【0104】

＜6-4 對實施了基因導入之細胞之CAR初次刺激與培養、擴增(第3～10天)＞

自上述6-3中培養了3天之G-Rex 6孔細胞培養板去除上清液，添加30 mL之含有10 ng/mL人IL-7、5 ng/mL人IL-15及2%人工血清(無動物源)之ALyS705。進而，將於24孔細胞培養用平底多孔板培養3天之上述6-2之基因導入細胞全量移至G-Rex 6孔細胞培養板中，藉此實施對實施了基因導入之細胞之CAR刺激。其後，進而培養7天，於該期間中適當進行培養基更換、IL-7及IL-15之添加。利用以下之方法對進行培養、擴增直至第10天之GMR.CAR-T細胞中之GMR.CAR之表現率進行測定。將藉由使用內源性之細胞且利用較實施例5簡便之方法實施了CAR刺激之GMR.CAR-T細胞之培養、擴增所得的使用表現質體CAR 004之GMR.CAR-T細胞設為CAR-T 004-B。

【0105】

＜6-5 GMR.CAR表現率之評價(第10天)＞

藉由流式細胞儀分析對進行培養、擴增直至第10天之GMR.CAR-T細胞中之GMR.CAR之表現率進行評價。向採取上述6-4之細胞培養懸浮液100 μL且進行離心分離所得之細胞中添加PE抗人GM-CSF抗體(Miltenyi Biotec)5 μL及APC抗人CD3抗體(Miltenyi Biotec)5 μL使之懸浮，於4

℃、遮光之條件下進行20分鐘之抗體標記反應。20分鐘後，利用適量D-PBS洗淨細胞，藉由離心分離使細胞沈澱且去除上清液後，使用FACSCantoII(Becton Dickinson)及FLOWJO(Becton Dickinson)，對再懸浮於適量D-PBS之樣品進行分析，以GM-CSF/CD3陽性為指標測定GMR.CAR之表現率。

【0106】將CAR-T 004-B之第10天之表現分析結果示於圖7。GMR.CAR表現率為37.9%，與Mock-T細胞中之表現率0.45%相比較高，與實施例4之結果相比表現率亦大幅改善。又，較之方法A而言，步驟簡化，培養天數亦縮短，但可獲得同等之表現率。

【0107】

[實施例7 GMR.CAR-T抗腫瘤細胞活性持續性評價]

對過繼免疫療法中期待效果之CAR-T細胞要求具有持續之細胞毒殺活性。因此，使用實施例6中製作之CAR-T 004-B評價抗腫瘤細胞活性之持續性。

【0108】為了對進行培養、擴增直至第10天之CAR-T 004-B之腫瘤細胞毒殺活性之持續性進行評價，進行長時間之與腫瘤細胞之共培養試驗。具體而言，使AML腫瘤細胞株THP-1細胞(美國標準生物品收藏中心)以成為2.5×10^5個/mL之方式懸浮於含有10%FBS(CORNING)之RPMI 1640培養基GlutaMAX補充劑(Thermo Fisher Scientific)中，並以1 mL/孔接種於24孔處理培養板。同樣地，使CAR-T 004-B以成為2.5×10^5個/mL之方式懸浮於含有10%FBS之RPMI 1640培養基GlutaMAX補充劑中，以1 mL/孔自上接種於預先接種有THP-1細胞之24孔處理培養板。準備複數個此種孔，開始與腫瘤細胞之共培養。

【0109】 開始共培養4天後，將複數個孔中僅1孔之孔內之細胞全部回收，進行離心分離。向離心分離後之細胞中添加APC抗人CD3抗體(Miltenyi Biotec)5 μL及PE抗人CD33抗體(Miltenyi Biotec)5 μL使之懸浮，於4℃、遮光之條件下進行20分鐘之抗體標記反應。20分鐘後，利用適量D-PBS洗淨細胞，藉由離心分離使細胞沈澱且完全去除上清液後，利用450 μL之D-PBS進行再懸浮，進而使用FACS Canto II(Becton Dickinson)及FLOWJO(Becton Dickinson)，對添加有CountBright絕對計數微球(Invitrogen)50 μL之樣品進行分析，基於計數微球對CD3陽性(CAR-T 004-B)細胞數與CD33陽性(腫瘤)細胞數進行評價。

【0110】 與共培養開始時相比腫瘤細胞被殺傷(腫瘤細胞數減少)之情形時，自剩餘之孔分別去除上清液1 mL，以1 mL/孔添加利用含有10%FBS之RPMI 1640培養基GlutaMAX補充劑製備為2.5×10^5個/mL之THP-1細胞，藉此開始與新的腫瘤細胞之共培養。以培養時間4天或3天重複該一系列操作，於與共培養開始時相比腫瘤細胞數增加之時點結束共培養。

【0111】 圖8表示開始共培養後第4天、8天、12天、15天、19天、及23天之抗腫瘤細胞活性評價之結果。本結果表示CAR-T 004-B將THP-1細胞殺傷複數次，確認持續性地具有殺傷效果。

【0112】

[實施例8 使用內源性之細胞之GMR.CAR-T細胞之培養、擴增(方法C)]

＜8-1 PBMC之純化(第0天)＞

自與實施例4、5及6同一健康成人供體採取末梢血，利用D-PBS(FUJIFILM Wako Pure Chemical股份有限公司)稀釋至2倍後，使用

SepMate-50(STEMCELL Technologies)對Ficoll-Paque PLUS(GE Healthcare)重疊稀釋末梢血，以1200×g進行15分鐘之離心分離，分取PBMC。將所分取之PBMC利用D-PBS洗淨2次，藉由離心分離進行純化。將純化之PBMC分別用作電氣導入載體之細胞(8-2)及內源性之CAR刺激用細胞(8-3)。

【0113】

＜8-2 GMR.CAR表現載體與piggyBac載體之電氣導入與培養(第0～3天)＞

為了對上述8-1中純化之20×10^6個PBMC進行基因導入，分別添加7.5 μg之CAR 004質體及pCMV-piggyBac(kan)質體，然後使之懸浮於含有5%人工血清(無動物源)(細胞科學研究所股份有限公司)之ALyS705(細胞科學研究所股份有限公司)中。將懸浮之細胞設置於NEPA比色管電極2 mm間隙(Nepa Gene股份有限公司)，使用基因導入裝置NEPA21(Nepa Gene股份有限公司)測定懸浮液之電阻值。此時，以成為製造商推薦之適當範圍內之電阻值(0.038～0.046 kΩ)之方式使用含有5%人工血清(無動物源)之ALyS705進行液量調節。調節後，以與實施例4、5及6同樣之設定值實施電氣導入。

【0114】使實施過電氣導入之細胞全量懸浮於2 mL之含有10 ng/mL人IL-7(Miltenyi Biotec)、5 ng/mL人IL-15(Miltenyi Biotec)及5%人工血清(無動物源)之ALyS705中，並接種於24孔細胞培養用平底多孔板(FALCON)，於37℃之CO_2培養箱內培養3天。同樣地培養不添加質體且實施了電氣刺激之Mock-T細胞。

【0115】

＜8-3 使用PBMC之CAR刺激用細胞之培養(第0～3天)＞

使上述8-1中純化之PBMC以成為5×10^6個/孔/15 mL之方式懸浮於ALyS705中，並接種於G-Rex 6孔細胞培養板(wilson wolf manufacturing corporation)中，於37℃之CO_2培養箱內培養3天。

【0116】

＜8-4 對實施過基因導入之細胞之初次CAR刺激與培養、擴增(第3～11天)＞

自上述8-3中培養3天之G-Rex 6孔細胞培養板去除上清液，添加30 mL之含有10 ng/mL人IL-7、5 ng/mL人IL-15及5%人工血清(無動物源)之ALyS705。進而，將於24孔細胞培養用平底多孔板培養3天之上述8-2之基因導入細胞全量移至G-Rex 6孔細胞培養板中，藉此實施對實施過基因導入之細胞之CAR刺激。其後，進而培養8天，於該期間中適當進行培養基更換、IL-7及IL-15之添加。利用以下之方法對進行培養、擴增直至第11天之GMR.CAR-T細胞中之GMR.CAR之表現率進行測定。不同於實施例6，將藉由不添加IL-4或GM-CSF等細胞激素而培養內源性之細胞且利用較實施例5簡便之方法實施了CAR刺激之GMR.CAR-T細胞之培養、擴增所得的使用表現質體CAR 004之GMR.CAR-T細胞設為CAR-T 004-C。

【0117】

＜8-5 GMR.CAR表現率之評價(第11天)＞

藉由流式細胞儀分析對進行培養、擴增直至第11天之GMR.CAR-T細胞中之GMR.CAR之表現率進行評價。向採取上述8-4之細胞培養懸浮液100 μL且進行離心分離所得之細胞中添加PE抗人GM-CSF抗體(Miltenyi Biotec)5 μL及APC抗人CD3抗體(Miltenyi Biotec)5 μL使之懸浮，於4℃、遮光之條件下進行20分鐘之抗體標記反應。20分鐘後，利用適量D-

PBS洗淨細胞，藉由離心分離使細胞沈澱且去除上清液後，使用FACSCantoII(Becton Dickinson)及FLOWJO(Becton Dickinson)，對再懸浮於適量D-PBS之樣品進行分析，以GM-CSF/CD3陽性為指標測定GMR.CAR之表現率。

【0118】將CAR-T 004-C之第11天之表現分析結果示於圖9。GMR.CAR表現率為23.6%，與Mock-T細胞中之表現率0.81%相比較高，且與實施例4之結果相比表現率亦大幅改善。

【0119】

[實施例9 GMR.CAR表現T細胞之表現型(phenotype)分析]

將實施例5中製作之CAR-T 004-A及實施例6中製作之CAR-T 004-B培養至第14天，分析GMR.CAR-T細胞之表現型。藉由進行表現型分析，算出以PD-1陽性率為指標之疲勞率、及以CD45RA/CCR7陽性率為指標之幹細胞記憶成分之比率。

【0120】採取1×10^6個細胞，使經離心分離之細胞懸浮於含有3%FBS(CORNING)之D-PBS(FUJIFILM Wako Pure Chemical股份有限公司)100 μL中。其後，添加5 μL之人BD Fc封閉物(Becton Dickinson)，於冰上培育10分鐘，藉此實施Fc受體之封閉處理。進而，添加至對向Brilliant染色緩衝液(Becton Dickinson)50 μL中添加各5 μL之PE-Cy7抗人CD45RA抗體(Becton Dickinson)、BV421抗人CCR7抗體(BioLegend)、AF647抗人PD-1抗體(Becton Dickinson)、及PE抗人GM-CSF抗體(Miltenyi Biotec)所得者進行封閉處理所得之細胞懸浮液中，於4℃、遮光之條件下進行20分鐘之抗體標記反應。

將以與上述同樣之要領使1×10^6個細胞與PE-Cy7同型對照抗體

(Becton Dickinson)、AF647同型對照抗體(Becton Dickinson)、BV421同型對照抗體(Becton Dickinson)進行反應所得者設為同型對照。

【0121】 20分鐘後，利用適量含有3%FBS之D-PBS洗淨細胞，藉由離心分離使細胞沈澱且去除上清液後，使用FACSCelesta(Becton Dickinson)及FLOWJO(Becton Dickinson)，對再懸浮於適量含有3%FBS之D-PBS之樣品進行測定、分析，評價PD-1陽性率(疲勞率)及CD45RA/CCR7陽性率(幹細胞記憶成分之比率)。

其結果，如圖10所示，CAR-T 004-A及CAR-T 004-B之PD-1陽性率分別為4.2%、1.82%，即便進行CAR刺激，疲勞之細胞之比率亦較少。又，如圖11所示，CAR-T 004-A及CAR-T 004-B之CD45RA/CCR7陽性率分別為34.0%及30.7%。

[產業上之可利用性]

【0122】 藉由本發明，提供一種基因改造細胞之製作方法，其可不使用病毒且以簡便之方法製作可用於過繼免疫治療之表現CAR蛋白質之基因改造細胞，且與先前之方法相比更加安全且成本降低。

本說明書中引用之所有出版物、專利及專利申請直接藉由引用而併入至本說明書。

【序列表】

<110> 日商橘生藥品工業股份有限公司(KISSEI PHARMACEUTICAL CO., LTD.)
國立大學法人信州大學(SHINSHU UNIVERSITY)

<120> 高效率之基因改造細胞之製作方法

<130> PH-8174-PCT

<150> JP 2018-202336
<151> 2018-10-26

<160> 20

<170> PatentIn第3.5版

<210> 1
<211> 127
<212> PRT
<213> 智人

<400> 1

Ala Pro Ala Arg Ser Pro Ser Pro Ser Thr Gln Pro Trp Glu His Val
1 5 10 15

Asn Ala Ile Gln Glu Ala Arg Arg Leu Leu Asn Leu Ser Arg Asp Thr
20 25 30

Ala Ala Glu Met Asn Glu Thr Val Glu Val Ile Ser Glu Met Phe Asp
35 40 45

Leu Gln Glu Pro Thr Cys Leu Gln Thr Arg Leu Glu Leu Tyr Lys Gln
50 55 60

Gly Leu Arg Gly Ser Leu Thr Lys Leu Lys Gly Pro Leu Thr Met Met
65 70 75 80

Ala Ser His Tyr Lys Gln His Cys Pro Pro Thr Pro Glu Thr Ser Cys
85 90 95

Ala Thr Gln Ile Ile Thr Phe Glu Ser Phe Lys Glu Asn Leu Lys Asp
100 105 110

Phe Leu Leu Val Ile Pro Phe Asp Cys Trp Glu Pro Val Gln Glu
115 120 125

<210> 2
<211> 127
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> GM-CSF E21K變異體多肽

<400> 2

Ala Pro Ala Arg Ser Pro Ser Pro Ser Thr Gln Pro Trp Glu His Val
1 5 10 15

Asn Ala Ile Gln Lys Ala Arg Arg Leu Leu Asn Leu Ser Arg Asp Thr
20 25 30

Ala Ala Glu Met Asn Glu Thr Val Glu Val Ile Ser Glu Met Phe Asp
35 40 45

Leu Gln Glu Pro Thr Cys Leu Gln Thr Arg Leu Glu Leu Tyr Lys Gln
50 55 60

Gly Leu Arg Gly Ser Leu Thr Lys Leu Lys Gly Pro Leu Thr Met Met
65 70 75 80

Ala Ser His Tyr Lys Gln His Cys Pro Pro Thr Pro Glu Thr Ser Cys
85 90 95

Ala Thr Gln Ile Ile Thr Phe Glu Ser Phe Lys Glu Asn Leu Lys Asp
100 105 110

Phe Leu Leu Val Ile Pro Phe Asp Cys Trp Glu Pro Val Gln Glu
115 120 125

<210> 3
<211> 87

<212> DNA
<213> 智人

<400> 3
gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gtgatcccgc cgagcccaaa 60

tctcctgaca aaactcacac atgccca 87

<210> 4
<211> 29
<212> PRT
<213> 智人

<400> 4

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Asp Pro
1 5 10 15

Ala Glu Pro Lys Ser Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
20 25

<210> 5
<211> 339
<212> DNA
<213> 智人

<400> 5
ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc 60

aaggacaccc tcatgatctc ccggaccctt gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc 120

cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc 180

aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc 240

gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc 300

ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc aaagccaaa 339

<210> 6
<211> 113
<212> PRT
<213> 智人

<400> 6

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
1 5 10 15

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
20 25 30

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
35 40 45

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
50 55 60

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
65 70 75 80

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
85 90 95

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
100 105 110

Lys

<210> 7
<211> 321
<212> DNA
<213> 智人

<400> 7
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cccgggatga gctgaccaag 60

aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 120

tgggagagca atgggcaacc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 180

gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 240

aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 300

ctctccctgt ctccgggtaa a 321

<210> 8
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<400> 8

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
1 5 10 15

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
20 25 30

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
50 55 60

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
65 70 75 80

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
100 105

<210> 9
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> (G4S)3序列

<400> 9

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 10
<211> 81
<212> DNA
<213> 智人

<400> 10
ttttgggtgc tggtggtggt tggtggagtc ctggcttgct atagcttgct agtaacagtg 60

gcctttatta ttttctgggt g 81

<210> 11
<211> 27
<212> PRT
<213> 智人

<400> 11

Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu
1 5 10 15

Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val
20 25

<210> 12
<211> 123
<212> DNA
<213> 智人

<400> 12
aggagtaaga ggagcaggct cctgcacagt gactacatga acatgactcc ccgccgcccc 60

gggcccaccc gcaagcatta ccagccctat gccccaccac gcgacttcgc agcctatcgc 120

tcc 123

<210> 13
<211> 41
<212> PRT
<213> 智人

<400> 13

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
1 5 10 15

Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro
20 25 30

Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
35 40

<210> 14
<211> 339
<212> DNA
<213> 智人

<400> 14
agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtacc agcagggcca gaaccagctc 60

tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gagtacgatg ttttggacaa gagacgtggc 120

cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat 180

gaactgcaga aagataagat ggcggaggcc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc 240

cggaggggca aggggcacga tggcctttac cagggtctca gtacagccac caaggacacc 300

tacgacgccc ttcacatgca ggccctgccc cctcgctaa 339

<210> 15
<211> 112
<212> PRT
<213> 智人

<400> 15

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
1 5 10 15

Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
20 25 30

Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
35 40 45

Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
50 55 60

Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
65 70 75 80

Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
85 90 95

Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
100 105 110

<210> 16
<211> 800
<212> DNA
<213> 智人

<220>
<221> CDS
<222> (33)..(467)

<220>
<221> 訊息肽
<222> (33)..(83)

<220>
<221> 成熟肽
<222> (84)..(464)

<400> 16
acacagagag aaaggctaaa gttctctgga gg atg tgg ctg cag agc ctg ctg 53
Met Trp Leu Gln Ser Leu Leu
-15

ctc ttg ggc act gtg gcc tgc agc atc tct gca ccc gcc cgc tcg ccc 101
Leu Leu Gly Thr Val Ala Cys Ser Ile Ser Ala Pro Ala Arg Ser Pro
-10 -5 -1 1 5

agc ccc agc acg cag ccc tgg gag cat gtg aat gcc atc cag gag gcc 149
Ser Pro Ser Thr Gln Pro Trp Glu His Val Asn Ala Ile Gln Glu Ala
10 15 20

cgg cgt ctc ctg aac ctg agt aga gac act gct gct gag atg aat gaa 197
Arg Arg Leu Leu Asn Leu Ser Arg Asp Thr Ala Ala Glu Met Asn Glu
25 30 35

aca gta gaa gtc atc tca gaa atg ttt gac ctc cag gag ccg acc tgc 245
Thr Val Glu Val Ile Ser Glu Met Phe Asp Leu Gln Glu Pro Thr Cys
40 45 50

cta cag acc cgc ctg gag ctg tac aag cag ggc ctg cgg ggc agc ctc 293
Leu Gln Thr Arg Leu Glu Leu Tyr Lys Gln Gly Leu Arg Gly Ser Leu
55 60 65 70

acc aag ctc aag ggc ccc ttg acc atg atg gcc agc cac tac aag cag 341
Thr Lys Leu Lys Gly Pro Leu Thr Met Met Ala Ser His Tyr Lys Gln
75 80 85

cac tgc cct cca acc ccg gaa act tcc tgt gca acc cag att atc acc 389
His Cys Pro Pro Thr Pro Glu Thr Ser Cys Ala Thr Gln Ile Ile Thr
90 95 100

ttt gaa agt ttc aaa gag aac ctg aag gac ttt ctg ctt gtc atc ccc 437
Phe Glu Ser Phe Lys Glu Asn Leu Lys Asp Phe Leu Leu Val Ile Pro
105 110 115

ttt gac tgc tgg gag cca gtc cag gag tgagaccggc cagatgaggc 484
Phe Asp Cys Trp Glu Pro Val Gln Glu
120 125

tggccaagcc ggggagctgc tctctcatga aacaagagct agaaactcag gatggtcatc 544

ttggagggac caaggggtgg gccacagcca tggtgggagt ggcctggacc tgccctgggc 604

cacactgacc ctgatacagg catggcagaa gaatgggaat attttatact gacagaaatc 664

agtaatattt atatatttat atttttaaaa tatttattta tttatttatt taagttcata 724

ttccatattt attcaagatg ttttaccgta ataattatta ttaaaaatat gcttctactt 784

gaaaaaaaaa aaaaaa 800

<210> 17
<211> 70
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 用於構建GMR.CAR dCH2+G4S3之正向引子

<400> 17
ggtggtggtg gatccggcgg cggcggctcc ggtggtggtg gttctaaaga tcccaaattt 60

tgggtgctgg 70

<210> 18
<211> 34

<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 用於構建GMR.CAR dCH2+G4S3之反向引子

<400> 18
tgggcatgtg tgagttttgt caggagattt gggc 34

<210> 19
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 用於製作E21K之正向引子

<400> 19
aaggcccggc gtctcctgaa cctg 24

<210> 20
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 用於製作E21K之反向引子

<400> 20
ctggatggca ttcacatgct cccaggg 27

【發明申請專利範圍】

【第1項】

一種哺乳動物基因改造細胞之製作方法，其包括以下之步驟：

a)藉由轉位子法向來自哺乳動物之包含T細胞之細胞群導入編碼嵌合抗原受體(chimeric antigen receptor：CAR)蛋白質之多核苷酸而獲得基因改造細胞群；

b)準備表現與上述CAR結合之蛋白質之來自該哺乳動物之內源性細胞群；及

c)對步驟a)之基因改造細胞群與步驟b)之內源性細胞群進行共培養。

【第2項】

如請求項1之製作方法，其中於上述步驟b)中，於1種或複數種細胞激素之存在下培養內源性細胞群。

【第3項】

如請求項2之製作方法，其中上述步驟b)中之細胞激素為GM-CSF及/或IL-4。

【第4項】

如請求項1至3中任一項之製作方法，其係於1種或複數種細胞激素之存在下進行上述步驟c)。

【第5項】

如請求項4之製作方法，其中上述步驟c)中之細胞激素為IL-7及/或IL-15。

【第6項】

如請求項1至5中任一項之製作方法，其中上述內源性細胞群為來自

未接受不活化處理之PBMC之細胞群。

【第7項】

如請求項1至6中任一項之製作方法，其中轉位子法為piggyBac法。

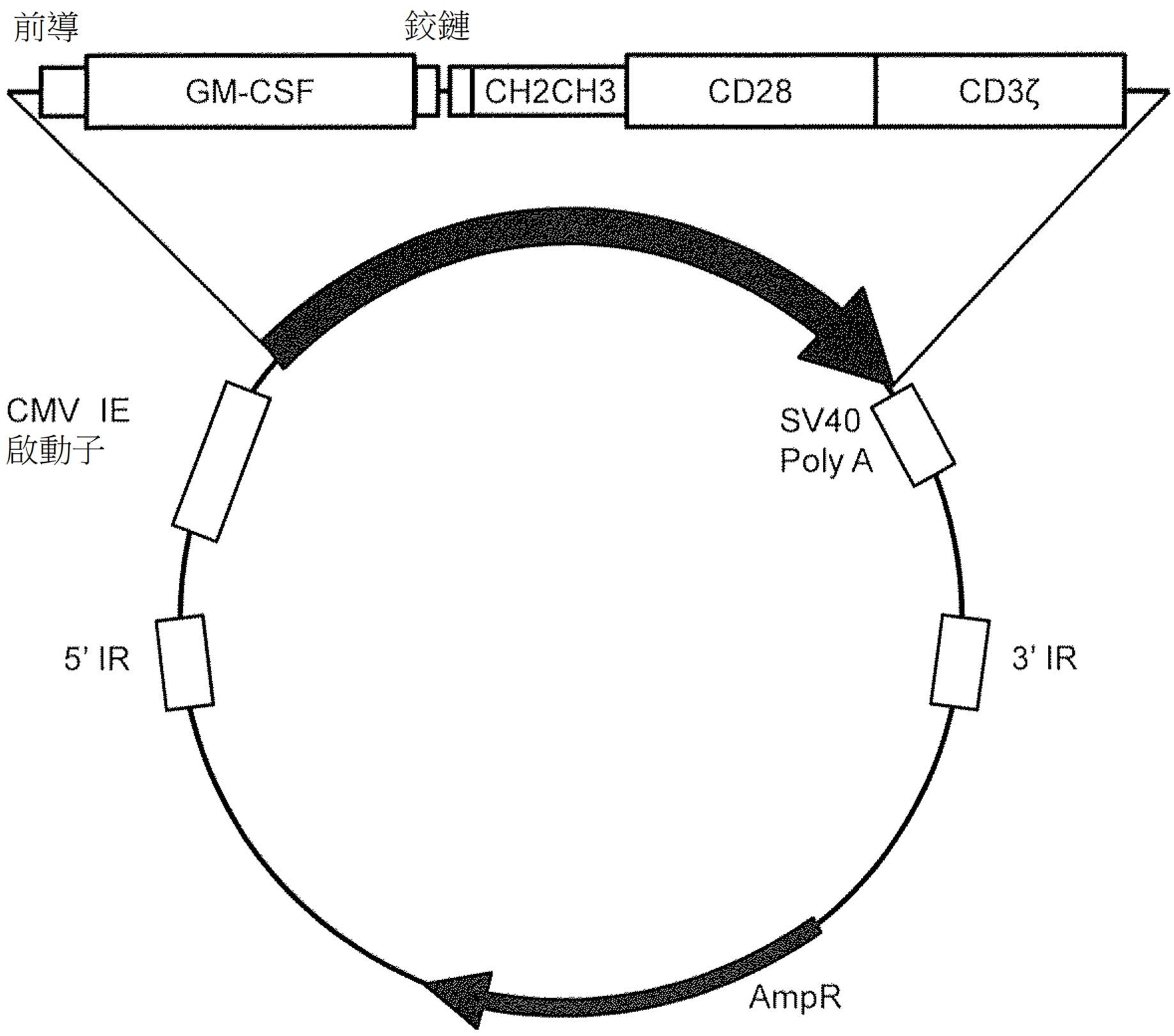
【第8項】

如請求項1至7中任一項之製作方法，其中基因改造細胞群與內源性細胞群來自同一個體。

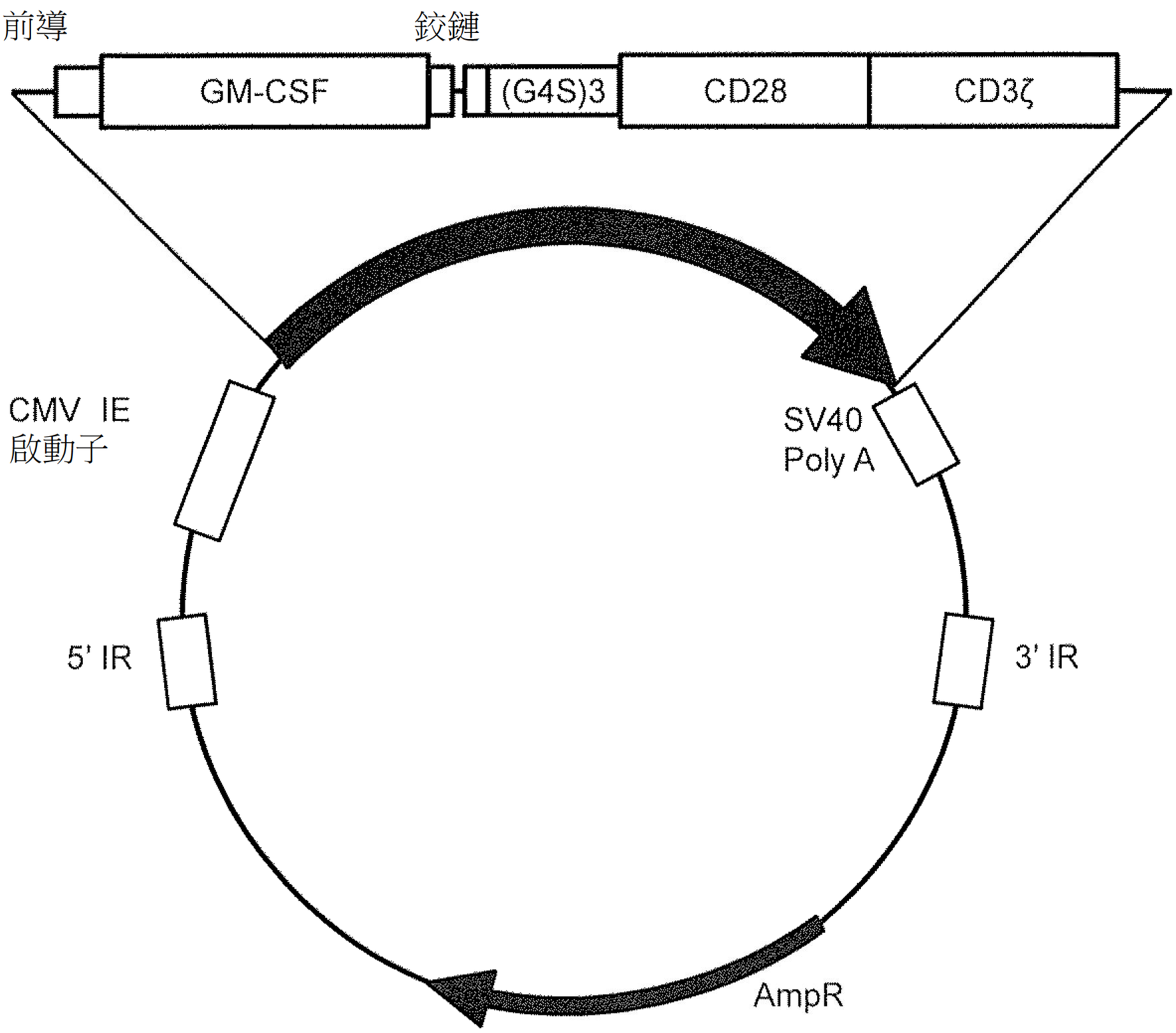
【第9項】

如請求項1至8中任一項之製作方法，其中上述CAR蛋白質係包含對人顆粒細胞-巨噬細胞群落刺激因子(GM-CSF)受體具有特異性之結合域之蛋白質，且上述內源性細胞群係GM-CSF受體表現細胞。

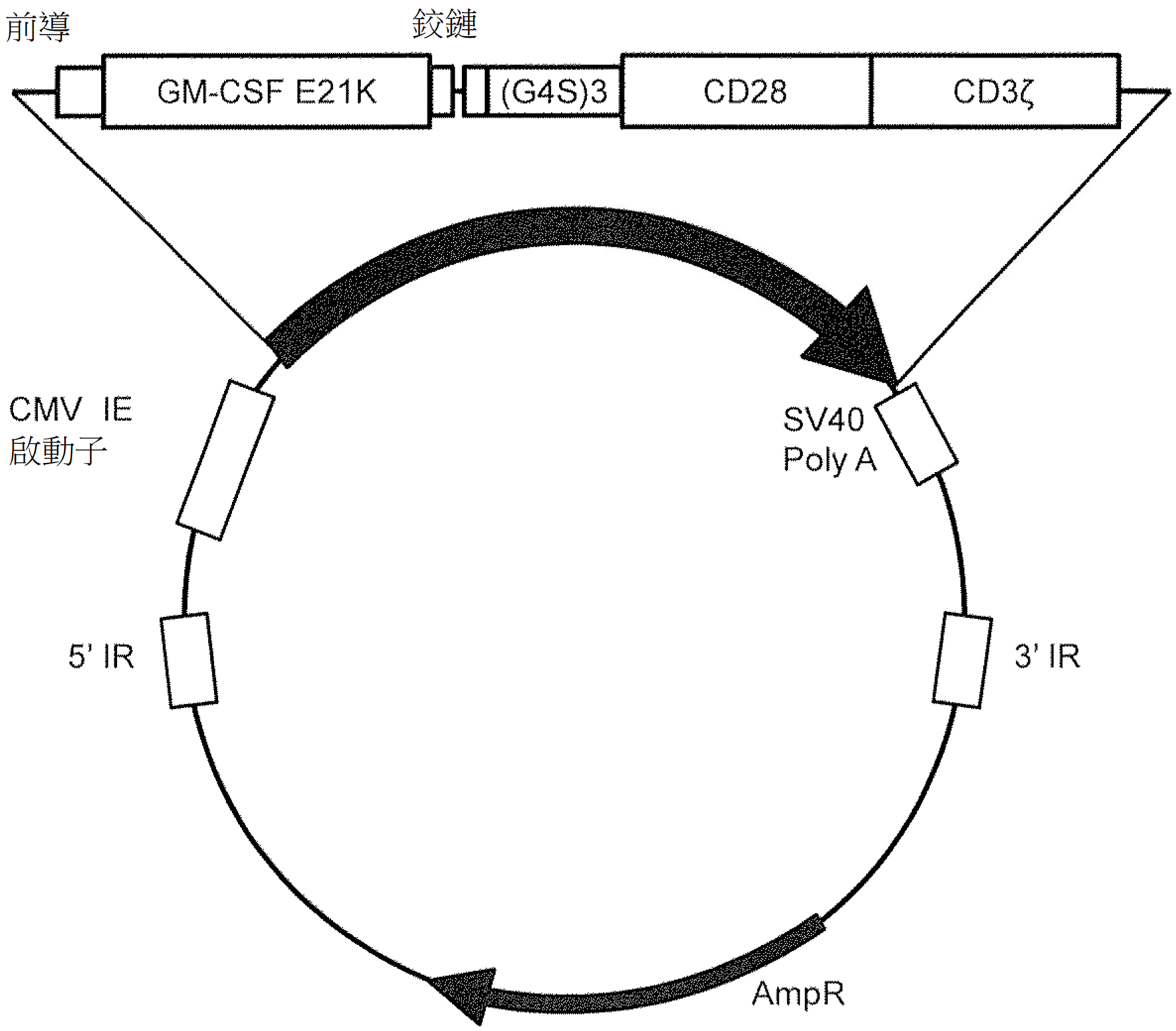
【發明圖式】


前導
鉸鏈
GM-CSF
CH2CH3
CD28
CD3ζ
CMV IE
啟動子
5' IR
SV40
Poly A
3' IR
AmpR

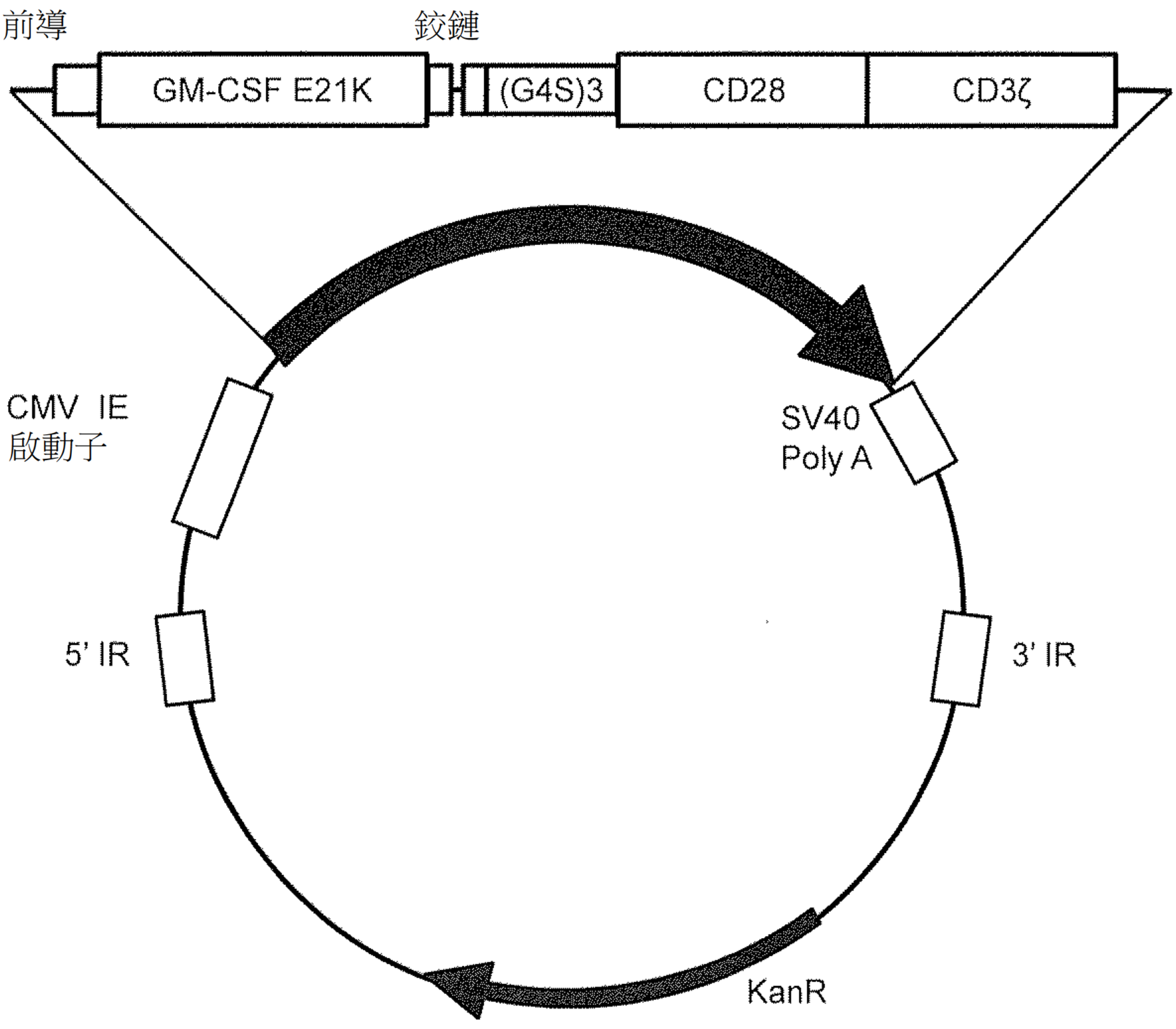
【圖1】



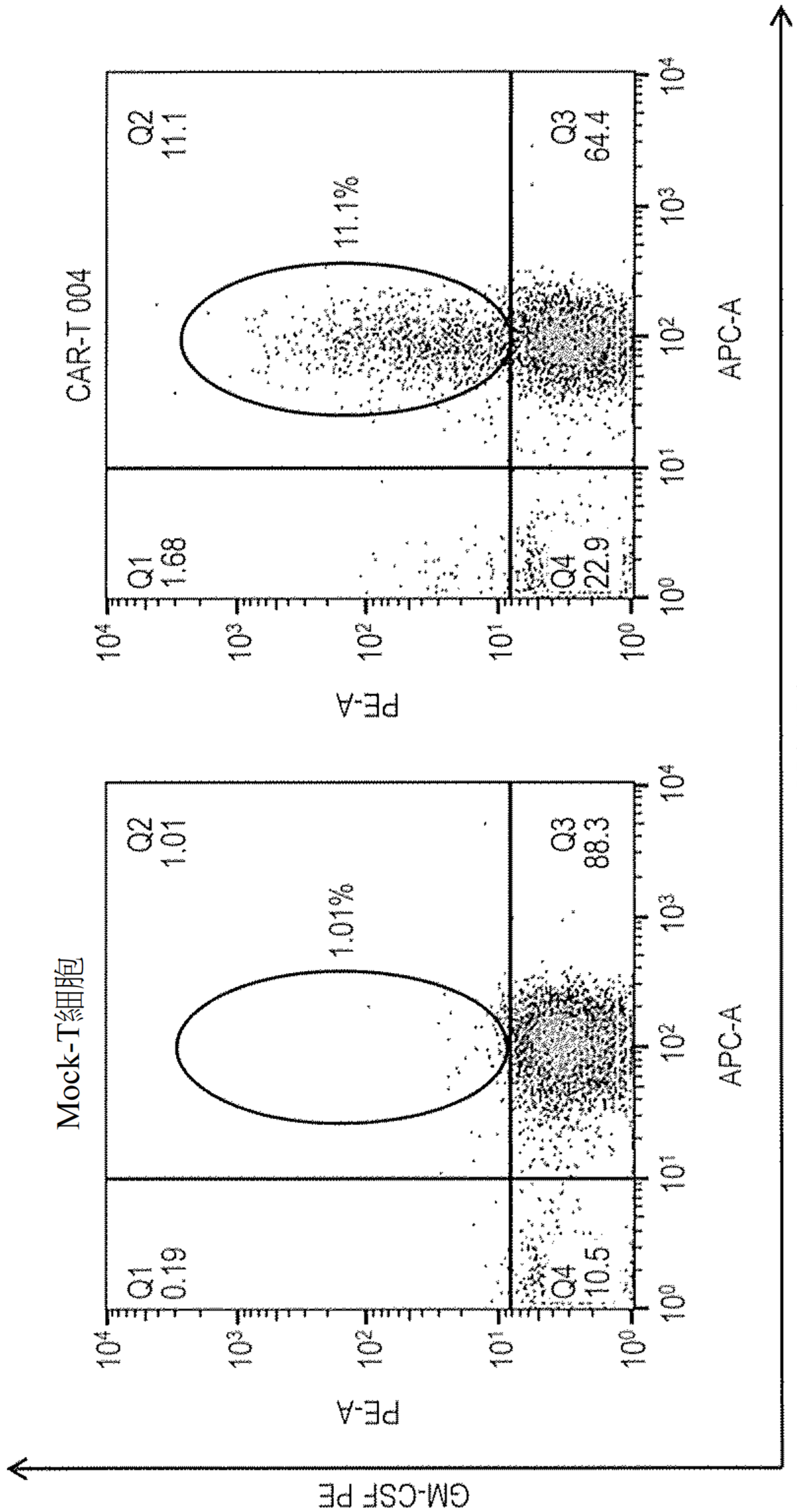
【圖2】


前導
鉸鏈
GM-CSF E21K
(G4S)3
CD28
CD3ζ
CMV IE
啟動子
SV40
Poly A
5' IR
3' IR
AmpR

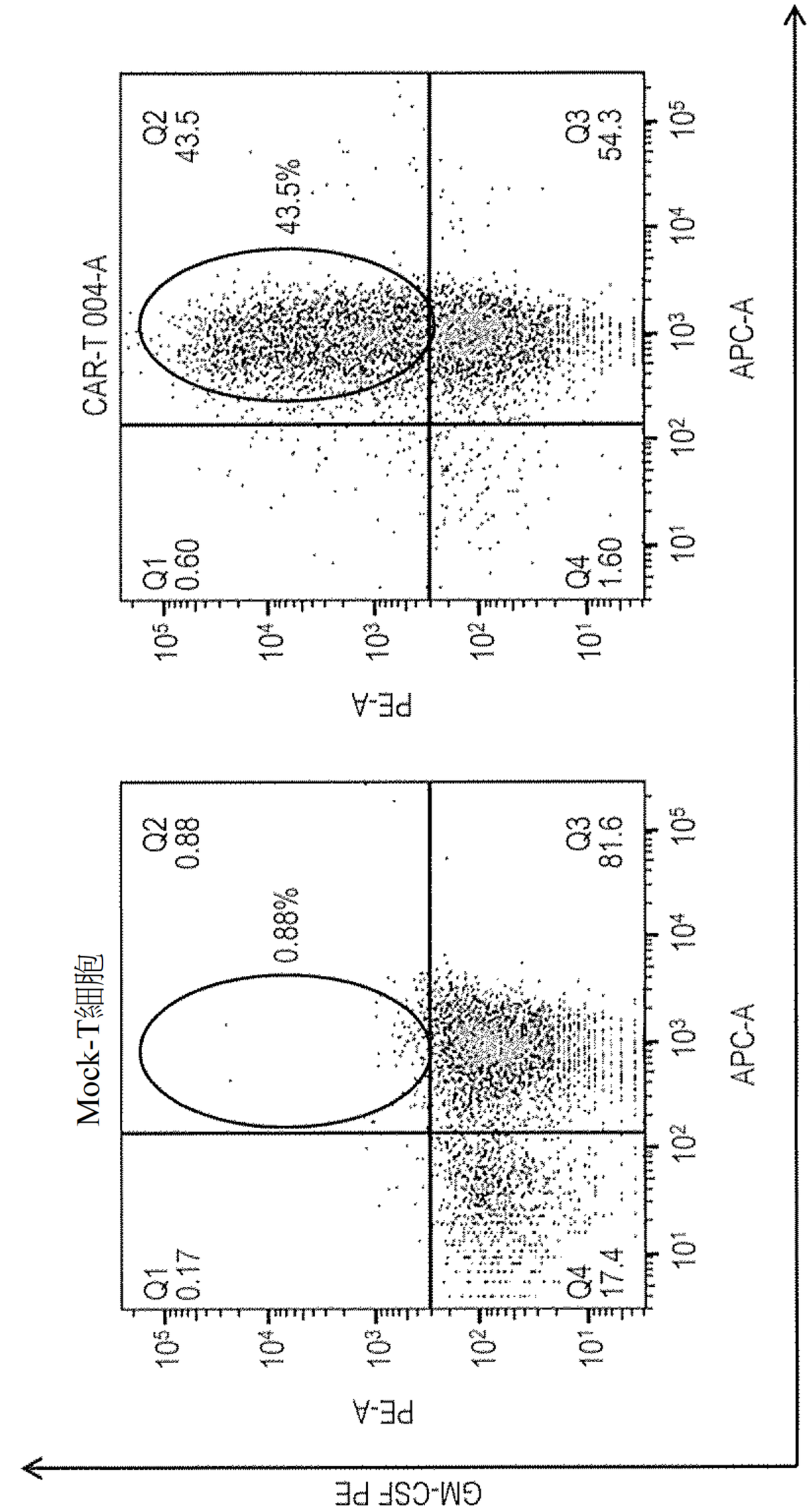
【圖3】


前導
鉸鏈
GM-CSF E21K
(G4S)3
CD28
CD3ζ
CMV IE
啟動子
5' IR
SV40
Poly A
3' IR
KanR

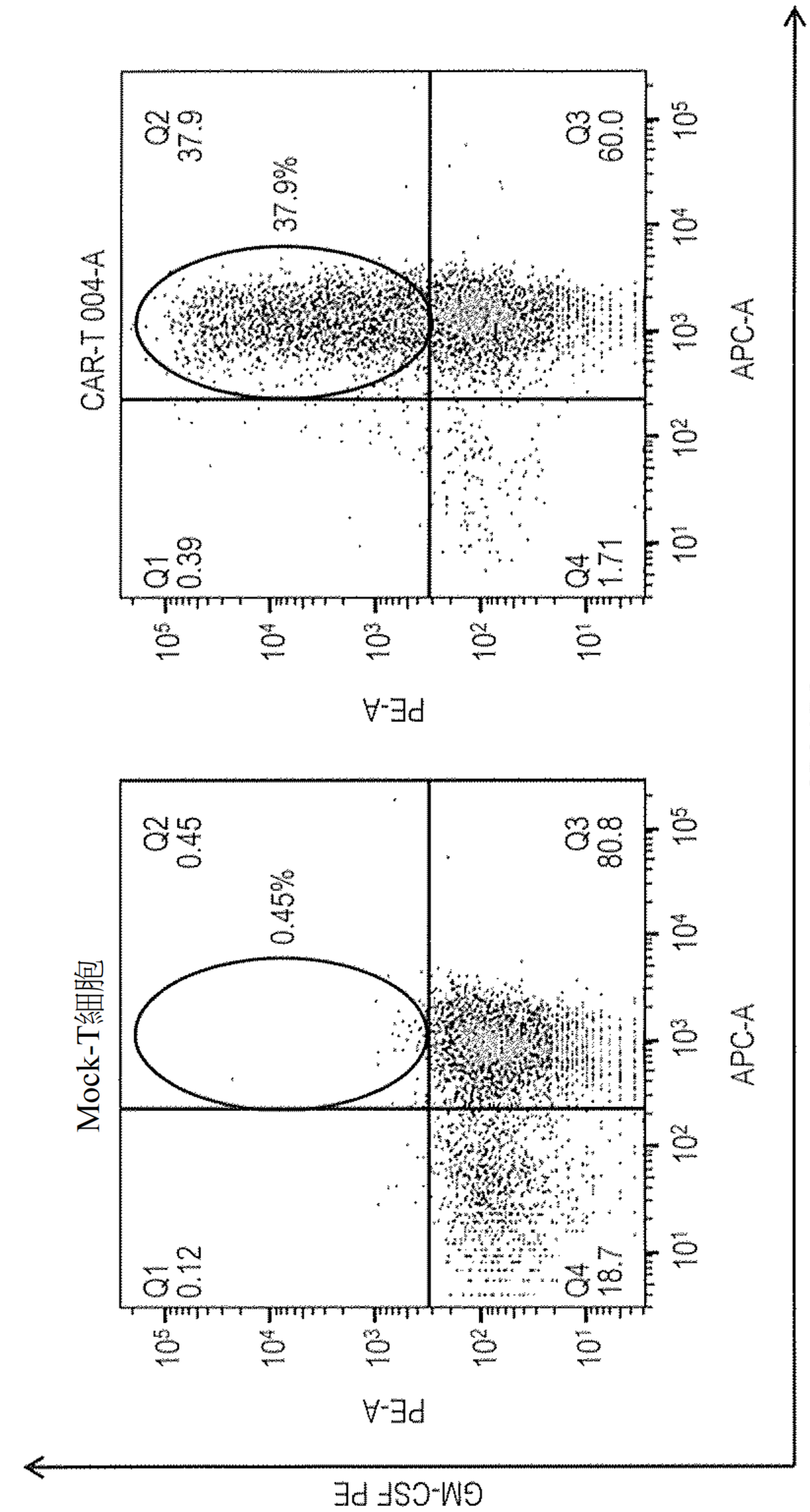
【圖4】


Q2
11.1
11.1%
Q3
64.4
CAR-T 004
Q1
1.68
Q4
22.9
PE-A
APC-A
Mock-T細胞
Q2
1.01
1.01%
Q3
88.3
Q1
0.19
Q4
10.5
CD3 APC
GM-CSF PE

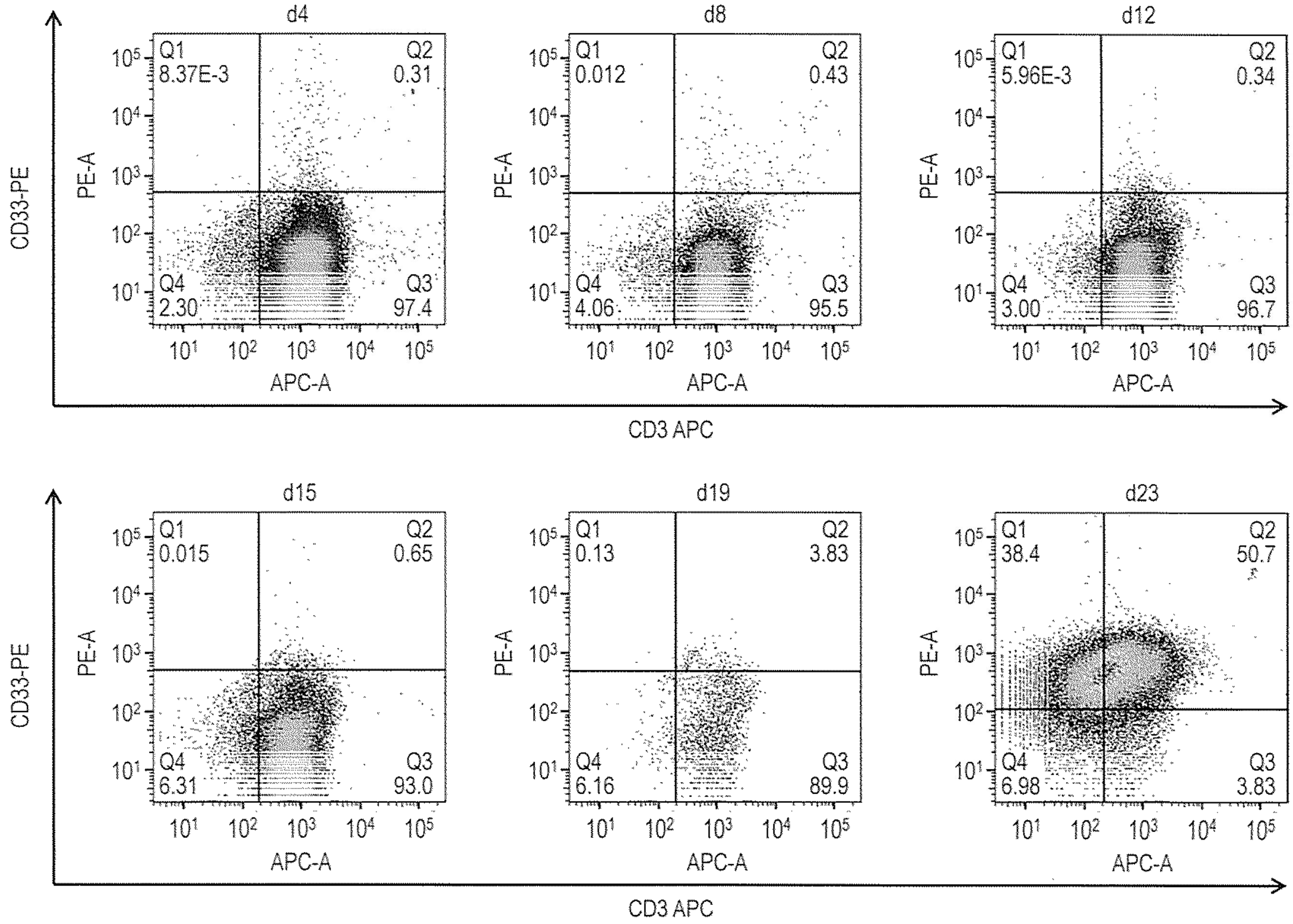
【圖5】


Mock-T細胞
CAR-T 004-A
Q1
0.17
Q2
0.88
Q3
81.6
Q4
17.4
0.88%
81.6%
PE-A
APC-A
CD3 APC
GM-CSF PE

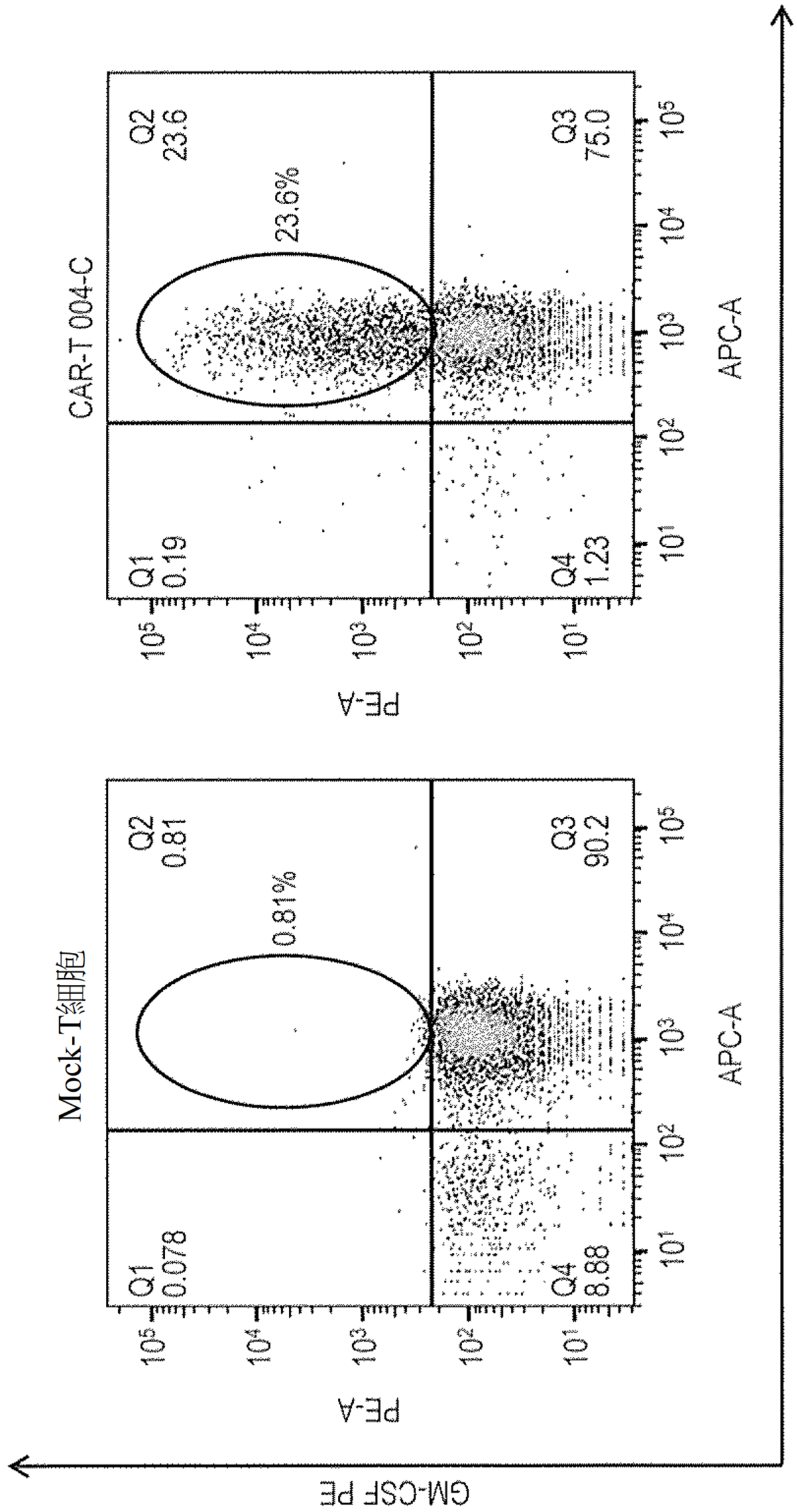
【圖6】


Mock-T細胞
CAR-T 004-A
GM-CSF PE
CD3 APC
PE-A
APC-A
Q1 0.12
Q2 0.45
Q3 80.8
Q4 18.7
0.45%
Q1 0.39
Q2 37.9
Q3 60.0
Q4 1.71
37.9%
10^1
10^2
10^3
10^4
10^5

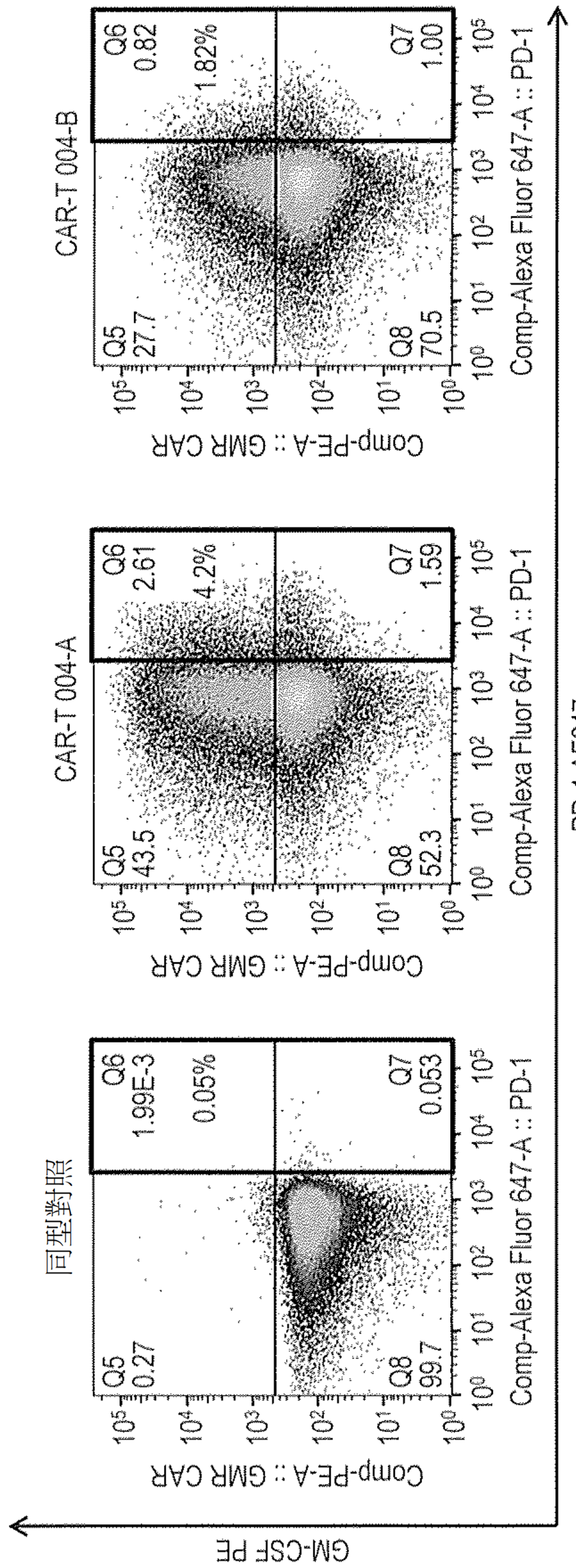
【圖7】


d4
Q1
8.37E-3
Q2
0.31
Q4
2.30
Q3
97.4
d8
Q1
0.012
Q2
0.43
Q4
4.06
Q3
95.5
d12
Q1
5.96E-3
Q2
0.34
Q4
3.00
Q3
96.7
d15
Q1
0.015
Q2
0.65
Q4
6.31
Q3
93.0
d19
Q1
0.13
Q2
3.83
Q4
6.16
Q3
89.9
d23
Q1
38.4
Q2
50.7
Q4
6.98
Q3
3.83
PE-A
APC-A
CD33-PE
CD3 APC

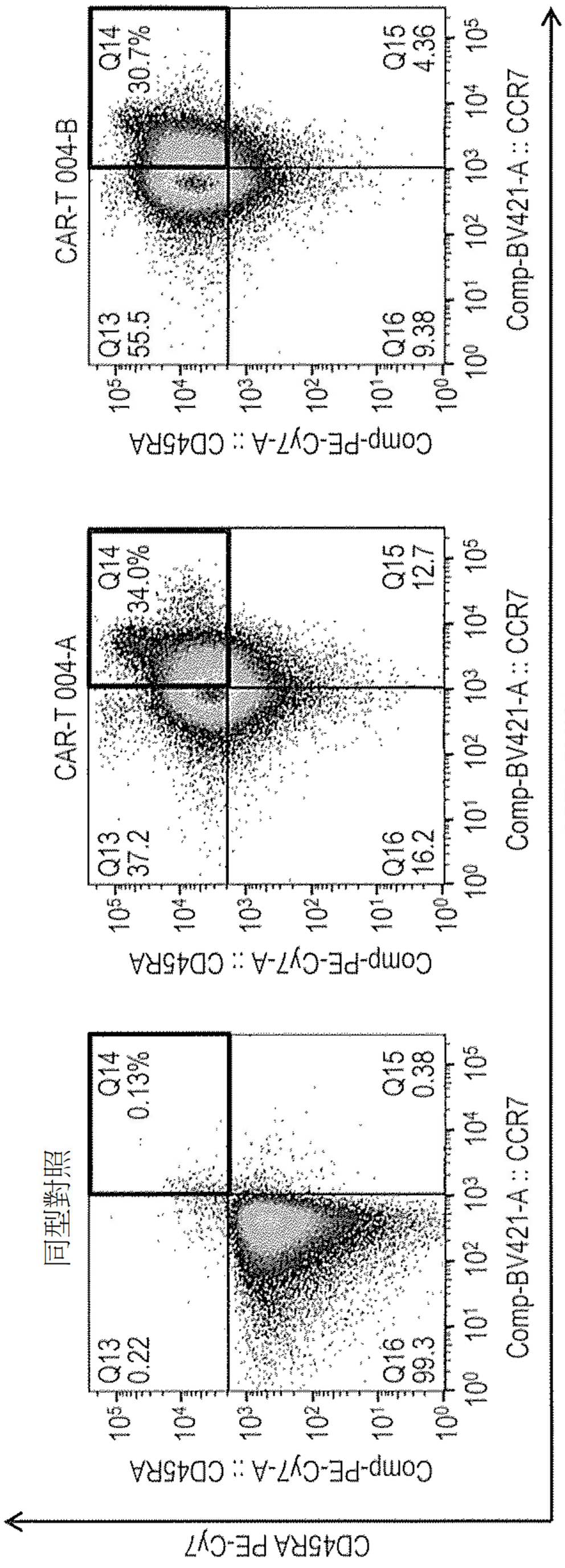
【圖8】


Mock-T細胞
CAR-T 004-C
Q1
0.078
Q2
0.81
Q3
90.2
Q4
8.88
0.81%
23.6%
Q1
0.19
Q2
23.6
Q3
75.0
Q4
1.23
PE-A
APC-A
CD3 APC
GM-CSF PE

【圖9】


同型對照
CAR-T 004-B
Q5
27.7
Q6
0.82
1.82%
Q8
70.5
Q7
1.00
CAR-T 004-A
Q5
43.5
Q6
2.61
4.2%
Q8
52.3
Q7
1.59
Q5
0.27
Q6
1.99E-3
0.05%
Q8
99.7
Q7
0.053
Comp-PE-A :: GMR CAR
Comp-Alexa Fluor 647-A :: PD-1
GM-CSF PE
PD-1 AF647

【圖10】


同型對照
CAR-T 004-A
CD45RA PE-Cy7
CCR7 BV421
Comp-PE-Cy7-A :: CD45RA
Comp-BV421-A :: CCR7
Q13
0.22
Q14
0.13%
Q15
0.38
Q16
99.3
Q13
37.2
Q14
34.0%
Q15
12.7
Q16
16.2
Q13
55.5
Q14
30.7%
Q15
4.36
Q16
9.38
10⁰
10¹
10²
10³
10⁴
10⁵

【圖11】