



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119998452 A

(43) 申请公布日 2025. 05. 13

(21) 申请号 202380073124.X

(22) 申请日 2023.09.07

(30) 优先权数据

2022-168686 2022.10.20 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2025.04.15

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2023/032627 2023.09.07

(87) PCT国际申请的公布数据

W02024/084852 JA 2024.04.25

(71) 申请人 国立大学法人三重大学

地址 日本国三重县津市栗真町屋町1577

申请人 希森美康株式会社

(72) 发明人 珠玖洋 赤堀泰 前田真吾

福永淳

(74) 专利代理机构 北京市立方律师事务所

11330

专利代理师 杨剑

(51) Int.Cl.

C12N 15/62 (2006.01)

A61K 35/17 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

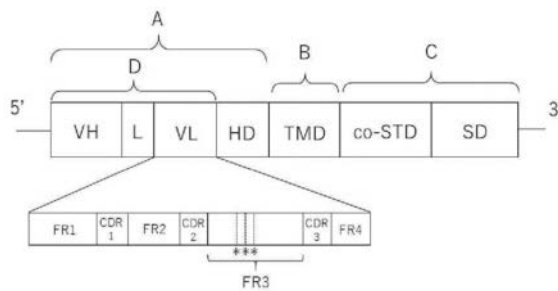
权利要求书2页 说明书37页  
序列表(电子公布) 附图2页

(54) 发明名称

编码CAR的核酸分子和包含其的载体、CAR、包含CAR的免疫细胞和包含该细胞的药物组合物及包含CAR的免疫细胞的制备方法

(57) 摘要

本发明涉及具有编码嵌合抗原受体(CAR)的核苷酸序列的核酸分子。本发明涉及包含该核酸分子的载体。本发明涉及CAR。本发明涉及包含CAR的免疫细胞。本发明涉及包括包含CAR的免疫细胞的药物组合物。本发明涉及制备包含CAR的免疫细胞的方法。



1. 一种核酸分子,其具有编码嵌合抗原受体的核苷酸序列,  
所述核酸分子包含编码细胞外结构域的区段、编码跨膜结构域的区段和编码细胞内结构域的区段,

编码所述细胞外结构域的区段包含编码包含轻链可变区和重链可变区的抗原结合区的核苷酸序列,

在编码通过Kabat法定义的所述轻链可变区的框架区3的核苷酸序列中,至少3个密码子为编码碱性氨基酸残基的密码子。

2. 根据权利要求1所述的核酸分子,其中,所述至少3个密码子包含选自自由编码所述轻链可变区的第60位的氨基酸残基的密码子、编码第63位的氨基酸残基的密码子、编码第65位的氨基酸残基的密码子、编码第67位的氨基酸残基的密码子、编码第70位的氨基酸残基的密码子、编码第72位的氨基酸残基的密码子、编码第74位的氨基酸残基的密码子、编码第76位的氨基酸残基的密码子、编码第77位的氨基酸残基的密码子、编码第79位的氨基酸残基的密码子和编码第81位的氨基酸残基的密码子组成的组中的至少3个。

3. 根据权利要求1所述的核酸分子,其中,选自自由编码通过Kabat法定义的所述轻链可变区的第60位的氨基酸残基的密码子、编码第63位的氨基酸残基的密码子、编码第65位的氨基酸残基的密码子、编码第67位的氨基酸残基的密码子、编码第70位的氨基酸残基的密码子、编码第72位的氨基酸残基的密码子、编码第74位的氨基酸残基的密码子、编码第76位的氨基酸残基的密码子、编码第77位的氨基酸残基的密码子、编码第79位的氨基酸残基的密码子和编码第81位的氨基酸残基的密码子组成的组中的3个以上且5个以下的密码子为编码碱性氨基酸残基的密码子。

4. 根据权利要求1所述的核酸分子,其中,所述抗原结合区包含单链抗体,所述单链抗体为与来自MAGE-A4的肽与HLA-A2的复合物、来自PRAME的肽与HLA-A24的复合物、CD19、BCMA或CEA结合的单链抗体。

5. 根据权利要求1所述的核酸分子,其中,所述跨膜结构域包含选自自由T细胞受体的 $\alpha$ 链、T细胞受体的 $\beta$ 链、CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\zeta$ 、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD28、CD33、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD134、CD154、4-1BB、ICOS和GITR组成的组中的任一种蛋白质的跨膜区。

6. 根据权利要求1所述的核酸分子,其中,所述细胞内结构域包含选自自由CD3 $\zeta$ 、CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 、CD3 $\epsilon$ 、CD5、CD22、CD66d、CD79a、CD79b、FcR $\gamma$ 和FcR $\beta$ 组成的组中的至少一种蛋白质的信号转导结构域。

7. 根据权利要求6所述的核酸分子,其中,编码所述细胞内结构域的区段还包含编码共刺激结构域的核苷酸序列,

所述共刺激结构域为选自自由4-1BB、CD28、GITR、CD2、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD154和ICOS组成的组中的至少一种蛋白质的共刺激结构域。

8. 根据权利要求1所述的核酸分子,其中,在编码所述抗原结合区的核苷酸序列与编码所述跨膜结构域的区段之间还包含编码铰链结构域的区段。

9. 根据权利要求1所述的核酸分子,其中,所述核酸分子为DNA或RNA。

10. 一种载体,其包含权利要求1-9中任一项所述的核酸分子。

11. 一种嵌合抗原受体,其包含细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域,其中,

所述细胞外结构域包括包含轻链可变区和重链可变区的抗原结合区，

在通过Kabat法定义的所述轻链可变区的框架区3中，至少3个氨基酸残基为碱性氨基酸残基。

12. 根据权利要求11所述的嵌合抗原受体，其中，所述至少3位的氨基酸残基包含选自所述轻链可变区的第60位的氨基酸残基、第63位的氨基酸残基、第65位的氨基酸残基、第67位的氨基酸残基、第70位的氨基酸残基、第72位的氨基酸残基、第74位的氨基酸残基、第76位的氨基酸残基、第77位的氨基酸残基、第79位的氨基酸残基和第81位的氨基酸残基组成的组中的至少3个。

13. 根据权利要求11所述的嵌合抗原受体，其中，选自通过Kabat法定义的所述轻链可变区的第60位的氨基酸残基、第63位的氨基酸残基、第65位的氨基酸残基、第67位的氨基酸残基、第70位的氨基酸残基、第72位的氨基酸残基、第74位的氨基酸残基、第76位的氨基酸残基、第77位的氨基酸残基、第79位的氨基酸残基和第81位的氨基酸残基组成的组中的3个以上且5个以下的氨基酸残基为碱性氨基酸残基。

14. 根据权利要求11所述的嵌合抗原受体，其中，所述抗原结合区包含单链抗体，所述单链抗体为与来自MAGE-A4的肽与HLA-A2的复合物、来自PRAME的肽与HLA-A24的复合物、CD19、BCMA或CEA结合的单链抗体。

15. 根据权利要求11所述的嵌合抗原受体，其中，所述跨膜结构域包含选自T细胞受体的 $\alpha$ 链、T细胞受体的 $\beta$ 链、CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\zeta$ 、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD28、CD33、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD134、CD154、4-1BB、ICOS和GITR组成的组中的任一种蛋白质的跨膜区。

16. 根据权利要求11所述的嵌合抗原受体，其中，所述细胞内结构域包含选自CD3 $\zeta$ 、CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 、CD3 $\epsilon$ 、CD5、CD22、CD66d、CD79a、CD79b、FcR $\gamma$ 和FcR $\beta$ 组成的组中的至少一种蛋白质的信号转导结构域。

17. 根据权利要求16所述的嵌合抗原受体，其中，所述细胞内结构域还包含共刺激结构域，

所述共刺激结构域为选自4-1BB、CD28、GITR、CD2、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD154和ICOS组成的组中的至少一种蛋白质的共刺激结构域。

18. 根据权利要求11所述的嵌合抗原受体，其中，在所述抗原结合区与所述跨膜结构域之间还包含铰链结构域。

19. 一种免疫细胞，其包含权利要求11-18中任一项所述的嵌合抗原受体。

20. 一种用于治疗恶性肿瘤的药物组合物，其包含权利要求19所述的免疫细胞。

21. 一种制备包含嵌合抗原受体的免疫细胞的方法，其包括：将权利要求1-9中任一项所述的核酸分子导入免疫细胞，使所述免疫细胞表达嵌合抗原受体。

22. 一种制备包含嵌合抗原受体的免疫细胞的方法，其包括：将权利要求10所述的载体导入免疫细胞，使所述免疫细胞表达嵌合抗原受体。

# 编码CAR的核酸分子和包含其的载体、CAR、包含CAR的免疫细胞和包含该细胞的药物组合物及包含CAR的免疫细胞的制备方法

## 技术领域

[0001] 本发明涉及具有编码嵌合抗原受体(以下,也称为“CAR”)的核苷酸序列的核酸分子。本发明涉及包含该核酸分子的载体。本发明涉及CAR。本发明涉及包含CAR的免疫细胞。本发明涉及包括包含CAR的免疫细胞的用于治疗恶性肿瘤的药物组合物。本发明涉及制备包含CAR的免疫细胞的方法。

## 背景技术

[0002] CAR是指将包含抗原结合区的细胞外结构域、跨膜结构域和传递免疫细胞的活化信号的细胞内结构域在基因工程上融合而制作的受体蛋白。例如,如专利文献1所记载,CAR的抗原结合区使用识别肿瘤细胞中表达的抗原的单链抗体。近年来,将编码CAR的基因导入免疫细胞,并将在细胞表面表达CAR的免疫细胞移植到患者来治疗癌症的癌症免疫疗法受到关注。表达CAR的免疫细胞在活体内识别肿瘤细胞的抗原时被活化,表达Fas配体、穿孔素、颗粒酶等细胞杀伤性分子或细胞因子,发挥抗肿瘤效果。另一方面,已知由表达CAR的免疫细胞产生细胞因子可能会引起细胞因子释放综合征(CRS)。

[0003] 现有技术文献

专利文献

专利文献1:美国专利第7,741,465号说明书

## 发明内容

发明所要解决的课题

本发明的目的在于提供一种在表达于免疫细胞的情况下能够抑制该免疫细胞产生细胞因子的CAR。另外,本发明的目的在于提供编码这样的CAR的核酸分子及其核酸分子的载体。进而,本发明的目的在于提供包含这样的CAR的免疫细胞、包含该免疫细胞的医药组合物、以及制备该免疫细胞的方法。

[0004] 用于解决课题的手段

本发明人发现,通过使CAR具有的抗原结合区的轻链可变区的框架区3(FR3)的规定氨基酸残基成为碱性氨基酸残基,可以抑制包含CAR的免疫细胞产生细胞因子,从而完成了本发明。因此,提供以下的[1]~[21]所述的发明。

[0005] [1]一种核酸分子,其具有编码CAR的核苷酸序列,其中,核酸分子包含编码细胞外结构域的区段、编码跨膜结构域的区段和编码细胞内结构域的区段,编码细胞外结构域的区段包含编码包含轻链可变区和重链可变区的抗原结合区的核苷酸序列,在编码通过Kabat法定义的轻链可变区的FR3的核苷酸序列中,至少3个密码子为编码碱性氨基酸残基的密码子。

[0006] [2]根据上述[1]所述的核酸分子,其中,至少3个密码子包含选自由编码轻链可变

区的第60位的氨基酸残基的密码子、编码第63位的氨基酸残基的密码子、编码第65位的氨基酸残基的密码子、编码第67位的氨基酸残基的密码子、编码第70位的氨基酸残基的密码子、编码第72位的氨基酸残基的密码子、编码第74位的氨基酸残基的密码子、编码第76位的氨基酸残基的密码子、编码第77位的氨基酸残基的密码子、编码第79位的氨基酸残基的密码子和编码第81位的氨基酸残基的密码子组成的组中的至少3个。

[0007] [3]根据上述[1]或[2]所述的核酸分子,其中,选自由编码通过Kabat法定义的轻链可变区的第60位的氨基酸残基的密码子、编码第63位的氨基酸残基的密码子、编码第65位的氨基酸残基的密码子、编码第67位的氨基酸残基的密码子、编码第70位的氨基酸残基的密码子、编码第72位的氨基酸残基的密码子、编码第74位的氨基酸残基的密码子、编码第76位的氨基酸残基的密码子、编码第77位的氨基酸残基的密码子、编码第79位的氨基酸残基的密码子和编码第81位的氨基酸残基的密码子组成的组中的3个以上且5个以下的密码子为编码碱性氨基酸残基的密码子。

[0008] [4]根据上述[1]~[3]中任一项所述的核酸分子,其中,抗原结合区包含单链抗体,单链抗体为与来自MAGE-A4的肽与HLA-A2的复合物、来自PRAME的肽与HLA-A24的复合物、CD19、BCMA或CEA结合的单链抗体。

[0009] [5]根据上述[1]~[4]中任一项所述的核酸分子,其中,跨膜结构域包含选自由T细胞受体的 $\alpha$ 链、T细胞受体的 $\beta$ 链、CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\zeta$ 、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD28、CD33、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD134、CD154、4-1BB、ICOS和GITR组成的组中的任一种蛋白质的跨膜区。

[0010] [6]根据上述[1]~[5]中任一项所述的核酸分子,其中,细胞内结构域包含选自由CD3 $\zeta$ 、CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 、CD3 $\epsilon$ 、CD5、CD22、CD66d、CD79a、CD79b、FcR $\gamma$ 和FcR $\beta$ 组成的组中的至少一种蛋白质的信号转导结构域。

[0011] [7]根据上述[6]所述的核酸分子,其中,编码细胞内结构域的区域还包含编码共刺激结构域的核苷酸序列,共刺激结构域为选自由4-1BB、CD28、GITR、CD2、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD154和ICOS组成的组中的至少一种蛋白质的共刺激结构域。

[0012] [8]根据上述[1]~[7]中任一项所述的核酸分子,其中,在编码抗原结合区的核苷酸序列与编码跨膜结构域的区域之间还包含编码铰链结构域的区域。

[0013] [9]根据上述[1]~[8]中任一项所述的核酸分子,其中,核酸分子为DNA或RNA。

[0014] [10]一种载体,其包含上述[1]~[9]中任一项所述的核酸分子。

[0015] [11]一种CAR,其包含细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域,其中,细胞外结构域包括包含轻链可变区和重链可变区的抗原结合区,在通过Kabat法定义的轻链可变区的FR3中,至少3个氨基酸残基为碱性氨基酸残基。

[0016] [12]根据上述[11]所述的CAR,其中,所述至少3个氨基酸残基包含选自由轻链可变区的第60位的氨基酸残基、第63位的氨基酸残基、第65位的氨基酸残基、第67位的氨基酸残基、第70位的氨基酸残基、第72位的氨基酸残基、第74位的氨基酸残基、第76位的氨基酸残基、第77位的氨基酸残基、第79位的氨基酸残基和第81位的氨基酸残基组成的组中的至少3种。

[0017] [13]根据上述[11]或[12]所述的CAR,其中,选自由通过Kabat法定义的轻链可变

区的第60位的氨基酸残基、第63位的氨基酸残基、第65位的氨基酸残基、第67位的氨基酸残基、第70位的氨基酸残基、第72位的氨基酸残基、第74位的氨基酸残基、第76位的氨基酸残基、第77位的氨基酸残基、第79位的氨基酸残基和第81位的氨基酸残基组成的组中的3个以上且5个以下的氨基酸残基为碱性氨基酸残基。

[0018] [14]根据上述[11]~[13]中任一项所述的CAR,其中,抗原结合区包含单链抗体,单链抗体是与来自MAGE-A4的肽与HLA-A2的复合物、来自PRAME的肽与HLA-A24的复合物、CD19、BCMA或CEA结合的单链抗体。

[0019] [15]根据上述[11]~[14]中任一项所述的CAR,其中,跨膜结构域包含选自由T细胞受体的 $\alpha$ 链、T细胞受体的 $\beta$ 链、CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\zeta$ 、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD28、CD33、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD134、CD154、4-1BB、ICOS和GITR组成的组中的任一种蛋白质的跨膜区。

[0020] [16]根据上述[11]~[15]中任一项所述的CAR,其中,细胞内结构域包含选自由CD3 $\zeta$ 、CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 、CD3 $\epsilon$ 、CD5、CD22、CD66d、CD79a、CD79b、FcR $\gamma$ 和FcR $\beta$ 组成的组中的至少一种蛋白质的信号转导结构域。

[0021] [17]根据上述[16]所述的CAR,其中,细胞内结构域还包含共刺激结构域,共刺激结构域为选自由4-1BB、CD28、GITR、CD2、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD154和ICOS组成的组中的至少一种蛋白质的共刺激结构域。

[0022] [18]根据上述[11]~[17]中任一项所述的CAR,其中,在抗原结合区和跨膜区之间还包含铰链结构域。

[0023] [19]一种免疫细胞,其包含上述[11]~[18]中任一项所述的嵌合抗原受体。

[0024] [20]一种用于治疗恶性肿瘤的药物组合物,其包含上述[19]所述的免疫细胞。

[0025] [21]一种制备免疫细胞的方法,包括:将上述[1]~[9]中任一项所述的核酸分子或上述[10]所述的载体导入免疫细胞,使免疫细胞表达嵌合抗原受体。

[0026] 发明效果

根据本发明,能够得到包含抑制了细胞因子产生的CAR的免疫细胞。

## 附图说明

[0027] 图1A是示意性地表示本实施方式的核酸分子的示例的图。该图也示出将编码核酸分子中的轻链可变区的区段(VL)放大的图。图中,A示出编码细胞外结构域的区段,B示出编码跨膜结构域的区段,C示出编码细胞内结构域的区段。D示出编码细胞外结构域中包含的抗原结合区的区段。这些区段中,VH示出编码重链可变区的区段,L示出编码接头的区段,HD示出编码铰链结构域的区段,TMD示出编码跨膜结构域的区段,co-STD示出编码共刺激结构域的区段,SD示出编码信号转导结构域的区段。在VL的放大图中,带有\*的虚线示出编码碱性氨基酸残基的密码子。在图1A中,在编码FR3的区段中,编码碱性氨基酸残基的密码子为3个,但本发明不限于于此。

[0028] 图1B是示意性地表示本实施方式的CAR的示例的图。图中,VH示出重链可变区,VL示出轻链可变区,HD示出铰链结构域,TMD示出跨膜结构域,co-STD示出共刺激结构域,SD示出信号转导结构域。连接VH和VL的曲线示出接头。在VL中,带有\*的虚线示出碱性氨基酸残基。在图1B中,FR3中碱性氨基酸残基为3个,但本发明不限于于此。

[0029] 图2A是示意性地表示编码实施例1-3的CAR的核酸分子的图。

[0030] 图2B是示意性地表示编码实施例4的CAR的核酸分子的图。

[0031] 图3是对移植有肿瘤细胞的小鼠施用PBS或CAR-T细胞后,记录各小鼠的肿瘤面积(平均值)的图。

## 具体实施方式

### [0032] 1. 核酸分子

本实施方式的核酸分子具有编码CAR的核苷酸序列。在本说明书中,“核苷酸序列”与“碱基序列”、“核酸序列”同义。核苷酸序列是指核苷酸在核酸分子内的一维排列方式(序列)。因此,编码多肽的核酸分子具有编码该多肽的核苷酸序列。在本说明书中,“具有核苷酸序列”的表达是指由该核苷酸序列构成、以及包含该核苷酸序列这两者。在本说明书中,术语“多肽”包括蛋白质分子、蛋白质分子中的部分区域和蛋白质分子的片段。在本说明书中,也将核酸分子内的一部分区域称为“区段”,将蛋白质分子内的一部分区域称为“结构域”。

[0033] 如图1A所例示,本实施方式的核酸分子从5'侧依次包含编码细胞外结构域的区段、编码跨膜结构域的区段和编码细胞内结构域的区段。编码细胞外结构域的区段包括编码包含轻链可变区和重链可变区的抗原结合区的核苷酸序列。在本说明书中,“包含轻链可变区和重链可变区的抗原结合区”是指包含至少1个轻链可变区和至少1个重链可变区并能够经由它们与规定的抗原结合的结构域。作为抗原结合区,例如可举出单链抗体。单链抗体又称scFv,轻链可变区和重链可变区通过肽接头连接,是本实施方式的CAR构建体的一部分区域。在图1A的核酸分子中,编码抗原结合区的区段包含编码由VH、L和VL构成的单链抗体的核苷酸序列。本实施方式的核酸分子的各区段和由该核酸分子编码的CAR的详细情况见后述。

[0034] 如图1A所示,本实施方式的核酸分子具有如下特征:在编码轻链可变区的FR3(以下,也称为“轻链FR3”)的核苷酸序列中,至少3个密码子为编码碱性氨基酸残基的密码子。即,由本实施方式的核酸分子编码的CAR具有轻链FR3的至少3个氨基酸残基为碱性氨基酸残基的抗原结合区。以下,也将该抗原结合区称为“经改变的抗原结合区”。另外,以下也将具有经改变的抗原结合区的CAR称为“改变后的CAR”。本实施方式的核酸分子可以说是编码改变后的CAR的核酸分子。在本说明书中,“密码子”是指DNA或RNA连续的3个核苷酸。

[0035] 编码经改变的抗原结合区的核酸分子可以通过对编码原抗原结合区的核酸分子进行后述的密码子的改变而得到。在本说明书中,“原抗原结合区”是指改变前的抗原结合区,是轻链FR3中的碱性氨基酸残基的数量为2个以下的抗原结合区。即,在编码原抗原结合区的核苷酸序列中,编码轻链FR3的核苷酸序列中,编码碱性氨基酸残基的密码子的数量为2个以下。以下,也将具有原抗原结合区的CAR称为“改变前的CAR”。

[0036] 框架区(FR)是指分别存在于抗体的轻链可变区和重链可变区的、除互补决定区(CDR)以外的区域。FR起到连接3个CDR的支架的作用,有助于CDR的结构稳定性。因此,FR的氨基酸序列在相同种类(species)的抗体间高度保存。重链和轻链各自的可变区有CDR1、CDR2和CDR3这3个CDR,以及FR1、FR2、FR3和FR4这4个FR。它们从可变区的N端侧按照FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4的顺序排列。以下,也将重链的CDR称为“HCDR”,将轻链的

CDR称为“LCDR”。

[0037] 在该技术领域,已知有用于定义CDR的边界和长度的对CDR的氨基酸残基进行编号的方法(以下,也称为“编号法”)。通过编号法对CDR的氨基酸残基赋予编号时,对FR的氨基酸残基也赋予编号。通过编号法赋予氨基酸残基的编号表示轻链或重链的氨基酸序列中的该氨基酸残基的位置。作为编号法,例如可举出Kabat法(Kabat EA.等,Sequences of Proteins of Immunological Interest.,NIH publication No.91-3242)、Chothia法(Chothia C.和Lesk AM.,Canonical Structures for the Hypervariable Regions of Immunoglobulins.,J Mol Biol.,vol.196,p.901-917,1987)、IMGT法(Lefranc MP.等,Developmental and Comparative Immunology 29(2005)185-203)、Honerger法(Honegger A.等,Yet Another Numbering Scheme for Immunoglobulin Variable Domains: An Automatic Modeling and Analysis Tool.,J Mol Biol.,vol.309,p.657-670,2001)、ABM法、Contact法等。

[0038] 关于抗原结合区,轻链和重链的各可变区中的CDR和FR的边界和长度可以用任意的编号法定义。在本说明书中,通过Kabat法定义CDR和FR的边界和长度。例如,在抗原结合区包含单链抗体或由其构成的情况下,根据Kabat法,单链抗体的轻链FR1被定义为由轻链可变区的第1-23位的氨基酸残基构成的区域。单链抗体的轻链FR2被定义为由轻链可变区的第35-49位的氨基酸残基构成的区域。单链抗体的轻链FR3被定义为由轻链可变区的第57-88位的氨基酸残基组成的区域。单链抗体的轻链FR4定义为轻链可变区的第98-109位的氨基酸残基组成的区域。在本说明书中,在记载了抗原结合区的轻链可变区中的氨基酸残基的位置的情况下,只要没有特别说明,则该氨基酸残基的位置表示通过Kabat法定义的位置。

[0039] 本实施方式的核酸分子可以通过从5'侧依次连接编码细胞外结构域的核酸分子、编码跨膜结构域的核酸分子和编码细胞内结构域的核酸分子而得到。这些核酸分子的连接可以通过公知的基因重组技术及其他分子生物学技术来进行。编码细胞外结构域的核酸分子可以由编码经改变的抗原结合区的核酸分子构成。优选地,编码细胞外结构域的核酸分子通过利用上述技术将编码经改变的抗原结合区的核酸分子与编码铰链结构域的核酸分子连接而取得。

[0040] 以下,在编码原抗原结合区的轻链FR3的核苷酸序列中,使编码非碱性氨基酸残基的氨基酸残基的3个以上密码子成为编码碱性氨基酸残基的密码子,也称为“改变密码子”或“密码子的改变”。编码经改变的抗原结合区的核酸分子可以通过对编码原抗原结合区的核酸分子进行密码子的改变而取得。非碱性氨基酸残基的氨基酸残基是指中性氨基酸残基和/或酸性氨基酸残基,优选为中性氨基酸残基。编码经改变的抗原结合区的核苷酸序列和编码原抗原结合区的核苷酸序列除了改变密码子的位置以外优选相同。

[0041] 通过这样的密码子的改变,在编码原抗原结合区的轻链FR3的核苷酸序列中,至少3个密码子成为编码碱性氨基酸残基的密码子,能够取得编码经改变的抗原结合区的核酸分子。密码子的改变可以通过在编码原抗原结合区的核酸分子中取代或插入密码子来进行。

[0042] 碱性氨基酸残基是指赖氨酸残基、精氨酸残基和组氨酸残基。其中,优选精氨酸残基和赖氨酸残基。中性氨基酸残基是指丙氨酸残基、天冬酰胺残基、半胱氨酸残基、甘氨酸

残基、谷氨酰胺残基、异亮氨酸残基、亮氨酸残基、甲硫氨酸残基、苯丙氨酸残基、脯氨酸残基、丝氨酸残基、苏氨酸残基、色氨酸残基、酪氨酸残基和缬氨酸残基。酸性氨基酸残基是指天冬氨酸残基和谷氨酸残基。

[0043] 在编码轻链FR3的核苷酸序列中,通过密码子的改变而导入的至少3个密码子可以全部为编码精氨酸残基的密码子,或者也可以全部为编码赖氨酸残基的密码子。或者,在编码轻链FR3的核苷酸序列中,通过密码子的改变而导入的至少3个密码子可以是其一部分为编码精氨酸残基的密码子,其余为编码赖氨酸残基的密码子。

[0044] 本实施方式的核酸分子可以是DNA,也可以是RNA。在编码轻链FR3的核苷酸序列中,通过密码子的改变而导入的密码子的种类只要是编码碱性氨基酸残基,就没有特别限定。本实施方式的核酸分子为DNA时,作为编码碱性氨基酸残基的密码子,可举出编码精氨酸残基的AGA、AGG、CGA、CGC、CGG和CGT,编码赖氨酸残基的AAA和AAG,编码组氨酸残基的CAC和CAT。本实施方式的核酸分子为RNA时,作为编码碱性氨基酸残基的密码子,可举出编码精氨酸残基的AGA、AGG、CGA、CGC、CGG和CGU,编码赖氨酸残基的AAA和AAG,编码组氨酸残基的CAC和CAU。

[0045] 在本实施方式的核酸分子中,编码轻链FR3的核苷酸序列中的编码碱性氨基酸残基的密码子的数量例如为3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14。编码轻链FR3的核苷酸序列中的编码碱性氨基酸残基的密码子的数量优选为3以上且6以下,更优选为3以上且5以下。

[0046] 在经改变的抗原结合区的轻链FR3中,来自密码子的改变的至少3个碱性氨基酸残基优选位于从轻链FR3的氨基酸序列中除去了游标区残基和非暴露残基的氨基酸残基的位置。“游标区残基”是指在FR的氨基酸序列中有助于CDR的结构稳定性的氨基酸残基。“非暴露残基”是指在分子内部折叠而不在表面暴露的氨基酸残基。预想即使改变非暴露残基,改变的效果也小或没有。例如,从轻链FR3的氨基酸序列中除去游标区残基和非暴露残基后的氨基酸残基是轻链可变区的第57、58、59、60、61、62、63、65、67、70、72、74、76、77、79、80和81位的氨基酸残基。

[0047] 编码经改变的抗原结合区的核苷酸序列中,优选自由编码轻链可变区的第60位的氨基酸残基的密码子、编码第63位的氨基酸残基的密码子、编码第65位的氨基酸残基的密码子、编码第67位的氨基酸残基的密码子、编码第70位的氨基酸残基的密码子、编码第72位的氨基酸残基的密码子、编码第74位的氨基酸残基的密码子、编码第76位的氨基酸残基的密码子、编码第77位的氨基酸残基的密码子、编码第79位的氨基酸残基的密码子和编码第81位的氨基酸残基的密码子组成的组中的至少3个密码子为编码碱性氨基酸残基的密码子。更优选地,选自上述组中的3个以上且6个以下的密码子为编码碱性氨基酸残基的密码子。特别优选地,选自上述组中的3个以上且5个以下的密码子为编码碱性氨基酸残基的密码子。例如,以下的1)~21)中任一项所述的各密码子为编码碱性氨基酸残基的密码子。

[0048] 1) 编码轻链可变区的第60位的氨基酸残基的密码子、编码第63位的氨基酸残基的密码子和编码第65位的氨基酸残基的密码子;

2) 编码轻链可变区的第60位的氨基酸残基的密码子、编码第63位的氨基酸残基的密码子和编码第76位的氨基酸残基的密码子;

3) 编码轻链可变区的第60位的氨基酸残基的密码子、编码第74位的氨基酸残基的密码子和编码第76位的氨基酸残基的密码子;

4) 编码轻链可变区的第63位的氨基酸残基的密码子、编码第65位的氨基酸残基的密码子和编码第67位的氨基酸残基的密码子；

5) 编码轻链可变区的第63位的氨基酸残基的密码子、编码第65位的氨基酸残基的密码子和编码第70位的氨基酸残基的密码子；

6) 编码轻链可变区的第63位的氨基酸残基的密码子、编码第65位的氨基酸残基的密码子和编码第72位的氨基酸残基的密码子；

7) 编码轻链可变区的第63位的氨基酸残基的密码子、编码第67位的氨基酸残基的密码子和编码第70位的氨基酸残基的密码子；

8) 编码轻链可变区的第63位的氨基酸残基的密码子、编码第67位的氨基酸残基的密码子和编码第72位的氨基酸残基的密码子；

9) 编码轻链可变区的第63位的氨基酸残基的密码子、编码第70位的氨基酸残基的密码子和编码第72位的氨基酸残基的密码子；

10) 编码轻链可变区的第65位的氨基酸残基的密码子、编码第67位的氨基酸残基的密码子和编码第70位的氨基酸残基的密码子；

11) 编码轻链可变区的第65位的氨基酸残基的密码子、编码第67位的氨基酸残基的密码子和编码第72位的氨基酸残基的密码子；

12) 编码轻链可变区的第65位的氨基酸残基的密码子、编码第70位的氨基酸残基的密码子和编码第72位的氨基酸残基的密码子；

13) 编码轻链可变区的第67位的氨基酸残基的密码子、编码第70位的氨基酸残基的密码子和编码第72位的氨基酸残基的密码子；

14) 编码轻链可变区的第70位的氨基酸残基的密码子、编码第72位的氨基酸残基的密码子和编码第74位的氨基酸残基的密码子；

15) 编码轻链可变区的第77位的氨基酸残基的密码子、编码第79位的氨基酸残基的密码子和编码第81位的氨基酸残基的密码子；

16) 编码轻链可变区的第63位的氨基酸残基的密码子、编码第65位的氨基酸残基的密码子、编码第67位的氨基酸残基的密码子和编码第70位的氨基酸残基的密码子；

17) 编码轻链可变区的第63位的氨基酸残基的密码子、编码第65位的氨基酸残基的密码子、编码第67位的氨基酸残基的密码子和编码第72位的氨基酸残基的密码子；

18) 编码轻链可变区的第63位的氨基酸残基的密码子、编码第65位的氨基酸残基的密码子、编码第70位的氨基酸残基的密码子和编码第72位的氨基酸残基的密码子；

19) 编码轻链可变区的第63位的氨基酸残基的密码子、编码第67位的氨基酸残基的密码子、编码第70位的氨基酸残基的密码子和编码第72位的氨基酸残基的密码子；

20) 编码轻链可变区的第65位的氨基酸残基的密码子、编码第67位的氨基酸残基的密码子、编码第70位的氨基酸残基的密码子和编码第72位的氨基酸残基的密码子；和

21) 编码轻链可变区的第63位的氨基酸残基的密码子、编码第65位的氨基酸残基的密码子、编码第67位的氨基酸残基的密码子、编码第70位的氨基酸残基的密码子和编码第72位的氨基酸残基的密码子。

[0049] 在编码经改变的抗原结合区的核苷酸序列中, 优选编码选自由轻链可变区的第63、65、67、70和72位组成的组中的至少3个位置的氨基酸残基的密码子以及编码选自由轻

链可变区的第60、74、76、77、79和81位组成的组中的至少1个位置的氨基酸残基的密码子为编码碱性氨基酸残基的密码子。

[0050] 在编码经改变的抗原结合区的轻链FR3的核苷酸序列中,3个以上且6个以下的密码子为编码碱性氨基酸残基的密码子时,该3个以上且6个以下的密码子优选包含:编码选自由轻链可变区的第63、65、67、70和72位组成的组中的3、4或5个位置的氨基酸残基的密码子,以及编码选自由轻链可变区的第60、74、76、77、79和81位组成的组中的1、2或3个位置的氨基酸残基的密码子。

[0051] 在编码经改变的抗原结合区的轻链FR3的核苷酸序列中,3个以上且5个以下的密码子为编码碱性氨基酸残基的密码子时,该3个以上且5个以下的密码子优选包含:编码选自由轻链可变区的第63、65、67、70和72位组成的组中的3或4个位置的氨基酸残基的密码子,以及编码选自由轻链可变区的第60、74、76、77、79和81位组成的组中的1个或2个位置的氨基酸残基的密码子。

[0052] 在编码经改变的抗原结合区的核苷酸序列中,优选编码选自由轻链可变区的第60、74、76、77、79和81位组成的组中的至少3个位置的氨基酸残基的密码子以及编码选自由轻链可变区的第63、65、67、70和72位组成的组中的至少1个位置的氨基酸残基的密码子为编码碱性氨基酸残基的密码子。

[0053] 在编码经改变的抗原结合区的轻链FR3的核苷酸序列中,3个以上且6个以下的密码子为编码碱性氨基酸残基的密码子时,该3个以上且6个以下的密码子优选包含:编码选自由轻链可变区的第60、74、76、77、79和81位组成的组中的3、4或5个位置的氨基酸残基的密码子,以及编码选自由轻链可变区的第63、65、67、70和72位组成的组中的1、2或3个位置的氨基酸残基的密码子。

[0054] 在编码经改变的抗原结合区的轻链FR3的核苷酸序列中,3个以上且5个以下的密码子为编码碱性氨基酸残基的密码子时,该3个以上且5个以下的密码子优选包含:编码选自由轻链可变区的第60、74、76、77、79和81位组成的组中的3或4个位置的氨基酸残基的密码子,以及编码选自由轻链可变区的第63、65、67、70和72位组成的组中的1或2个位置的氨基酸残基的密码子。

[0055] 在编码经改变的抗原结合区的核苷酸序列中,在对轻链可变区的第60、63、65、67、70、72、74、76、77、79和81位的氨基酸残基进行编码的密码子以外的密码子被改变的情况下,该经改变的密码子优选为编码选自第57、58、59、61和62位组成的组中的位置的氨基酸残基的密码子。

[0056] CDR参与抗原结合区对抗原的亲合性,因此在本实施方式的核酸分子中,编码抗原结合区的CDR的核苷酸序列优选不变更。即,优选经改变的抗原结合区的CDR的氨基酸序列和编码其的核苷酸序列与原抗原结合区的CDR的氨基酸序列和编码其的核苷酸序列相同。

[0057] 以下,也将包含改变前的CAR的免疫细胞称为“改变前的免疫细胞”,将包含改变后的CAR的免疫细胞称为“改变后的免疫细胞”。改变后的CAR的氨基酸序列除轻链FR3的至少3个氨基酸残基为碱性氨基酸残基外,与改变前的CAR的氨基酸序列相同时,对于细胞因子的产生和细胞杀伤效应,可以将改变后的免疫细胞与改变前的免疫细胞进行比较。在改变后的免疫细胞中,与改变前的免疫细胞相比,细胞因子的产生被抑制。细胞因子的种类没有特别限定,例如可举出IFN  $\gamma$ 、肿瘤坏死因子(TNF)  $-\alpha$ 、白细胞介素(IL)  $-6$ 等。在本说明书中,

“细胞因子的产生被抑制”是指,以规定的比率混合肿瘤细胞和免疫细胞,在从混合起经过了规定的期间的的时间点,由改变后的免疫细胞释放的细胞因子的量比由改变前的免疫细胞释放的量少。例如,由改变后的免疫细胞释放的细胞因子的量是由改变前的免疫细胞释放的量的93%以下、92%以下、91%以下、90%以下、80%以下、70%以下、60%以下、50%以下、40%以下、30%以下或20%以下。由包含CAR的免疫细胞释放的细胞因子的量例如可以通过在将该免疫细胞和肿瘤细胞共培养后,通过酶联免疫吸附法(ELISA)等公知的方法测定培养上清液中的细胞因子而进行调查。具体而言,例示后述的实施例1的方法。

[0058] 优选在改变后的免疫细胞中,与改变前的免疫细胞相比,对肿瘤细胞的细胞杀伤效应维持,进一步优选该细胞杀伤效应提高。在本说明书中,“细胞杀伤效应维持”是指,以规定的比率混合肿瘤细胞和免疫细胞,在从混合起经过了规定的期间的的时间点,改变前的免疫细胞和改变后的免疫细胞的细胞杀伤效应实质上相同。在优选的实施方式中,“细胞杀伤效应维持”是指改变后的免疫细胞的细胞杀伤效应为改变前的免疫细胞的细胞杀伤效应的95%以上且105%以下。即使改变后的免疫细胞的细胞杀伤效应比改变前的免疫细胞的细胞杀伤效应降低,只要细胞因子的量大幅降低,就可以认为得到更好的治疗效果。在将这样的免疫细胞施用给患者的情况下,若增加免疫细胞的施用量,则对肿瘤细胞的细胞杀伤效应提高,细胞因子依然可以为低水平。即,只要能够将细胞因子维持在低水平,就能够为了维持或提高细胞杀伤效应而适当调整免疫细胞的施用量。“细胞杀伤效应”可以在体外进行评价。例如,可以通过对包含CAR的免疫细胞和肿瘤细胞进行共培养时的肿瘤细胞的生存数、存活率等指标来评价细胞杀伤效应。具体而言,例示后述的实施例1的方法。另外,在以实体癌作为对象的情况下,也可以在将肿瘤细胞移植到小鼠等非人动物后,施用包含CAR的免疫细胞,测定肿瘤的尺寸,由此进行评价。具体而言,可例示后述的实施例5的方法。在以血液癌为对象的情况下,也可以在将肿瘤细胞移植到小鼠等非人动物后,施用包含CAR的免疫细胞,通过显微镜或流式细胞仪等测定血中的肿瘤细胞的数量来进行评价。

[0059] 如上所述,编码经改变的抗原结合区的核酸分子可以通过公知的基因重组技术及其他分子生物学技术从编码原抗原结合区的核酸分子中取得。首先,基于编码原抗原结合区的核酸分子的核苷酸序列,制作用于改变密码子的引物组。例如,密码子的改变为密码子的取代的情况下,制作以在编码轻链FR3的核苷酸序列中至少3个密码子被编码碱性氨基酸残基的密码子取代的方式设计的引物组。然后,通过使用该引物组的PCR法,将编码原抗原结合区的核酸分子作为模板进行扩增,由此能够得到编码轻链FR3的至少3个氨基酸残基被碱性氨基酸残基取代的抗原结合区的核酸分子。或者,密码子的改变为密码子的插入的情况下,制作以在编码轻链FR3的核苷酸序列中至少3个位置插入编码碱性氨基酸残基的密码子的方式设计的引物组。然后,通过使用该引物组的PCR法,将编码原抗原结合区的核酸分子作为模板进行扩增,从而能够得到编码在轻链FR3的至少3个位置插入有碱性氨基酸残基的抗原结合区的核酸分子。

[0060] 如上所述,编码经改变的抗原结合区的核酸分子基于编码原抗原结合区的核酸分子而取得,因此优选能够获得原抗原结合区包含编码其核苷酸序列的核酸分子。例如,在能够获得具有编码原抗原结合区的质粒DNA的大肠杆菌克隆的情况下,通过从大肠杆菌克隆中提取该质粒DNA,能够获得包含编码原抗原结合区的核苷酸序列的核酸分子。另外,为了制作上述引物组,编码原抗原结合区的核苷酸序列优选为公知的或能够确认的。在抗原结

合区包含单链抗体或其构成的情况下,编码单链抗体的核苷酸序列例如可以从PDB、GeneBank、abYsis、IMGT等公知的数据库中进行调查。在拥有包含编码原抗原结合区的核苷酸序列的核酸分子的情况下,通过对该核酸分子进行测序,能够调查编码原抗原结合区的核苷酸序列。

[0061] 优选经改变的抗原结合区和原抗原结合区至少与肿瘤细胞中表达的抗原结合。该抗原可以是在正常细胞中也表达的抗原,也可以是在肿瘤细胞特异性表达的抗原。该抗原不仅包含全长的抗原,还包含该抗原的片段、以及该抗原的片段和MHC(主要组织相容性复合体)蛋白质的复合物。作为抗原的片段,例如可举出由抗原呈递细胞或肿瘤细胞自身呈递的该抗原的一部分、由该抗原的氨基酸序列的一部分构成的合成肽等。MHC蛋白质在人类中被称为HLA(人白细胞抗原),可举出HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DR、HLA-DQ、HAL-DP等。例如,在该抗原是在肿瘤细胞内表达的蛋白质的情况下,经改变的抗原结合区和原抗原结合区能够与该抗原的片段与MHC蛋白质的复合物结合。

[0062] 作为抗原结合区识别的抗原的种类,优选存在于肿瘤细胞的表面的抗原、以及存在于肿瘤细胞内的抗原。作为这样的抗原,例如可举出CD19、CD20、CD30、CD44、CD133、MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、PRAME、NY-ESO-1、SSX2、GP100、MART-1、HER2、癌胚抗原(CEA)、MUC-1、CA125、Glypican(GPC3)、B细胞成熟抗原(BCMA)、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、神经节苷脂GM2等。另外,抗原结合区识别的抗原也可以是抗原的片段与MHC蛋白质的复合物。该复合物是抗原在肿瘤细胞内片段化,其片段与该肿瘤细胞的MHC结合而形成。并且,所形成的复合物被呈递至该肿瘤细胞的表面。作为这样的复合物,例如可举出来自MAGE-A4的肽与HLA-A2的复合物(以下,也称为“MAGE-A4/HLA-A2复合物”)、来自PRAME的肽与HLA-A24的复合物(以下,也称为“PRAME/HLA-A24复合物”)等。与来自MAGE-A4的肽形成复合物的HLA-A2例如可举出HLA-A\*02:01、HLA-A\*02:02、HLA-A\*02:03、HLA-A\*02:05、HLA-A\*02:06、HLA-A\*02:07、HLA-A\*02:11等。其中,优选HLA-A\*02:01。与来自PRAME的肽形成复合物的HLA-A24例如可举出HLA-A\*24:02、HLA-A\*24:03等。其中,优选HLA-A\*24:02。来自MAGE-A4的肽和来自PRAME的肽根据片段化的肽的序列也形成与上述不同的与HLA的复合物。来自MAGE-A4的肽和来自PRAME的肽分别是由MAGE-A4和PRAME的各氨基酸序列的一部分(例如8~20个氨基酸)构成的寡肽。作为来自MAGE-A4的肽,例如可举出由GVYDGREHTV(序列编号1)的氨基酸序列构成的寡肽。作为来自PRAME的肽,例如可举出由LYVDSLFFL(序列编号2)的氨基酸序列构成的寡肽。

[0063] 编码原抗原结合区的核酸分子本身可以通过公知的基因重组技术及其他分子生物学技术取得。在抗原结合区包含单链抗体或其构成的情况下,例如,通过使用抗体噬菌体文库的噬菌体展示法,能够分离编码与肿瘤细胞的抗原结合的单链抗体的核酸分子。或者,可以制作产生与肿瘤细胞的抗原结合的抗体的杂交瘤,使用从该杂交瘤提取的RNA,通过逆转录反应和PCR法,制作编码单链抗体的核酸分子。杂交瘤可以通过例如Kohler G.和Milstein C.,Nature,vol.256,p.495-497,1975中记载的方法等公知的方法制作。

[0064] 在编码细胞外结构域的区域(以下,也称为“细胞外区段”)中,编码抗原结合区的核苷酸序列包含编码轻链可变区的核苷酸序列和编码重链可变区的核苷酸序列。编码抗原结合区的核苷酸序列可以包含编码恒定区的一部分或全部的核苷酸序列。恒定区可以是重链和轻链中的任一者的恒定区,优选为轻链恒定区。在编码抗原结合区的核苷酸序列中,编

码轻链可变区的核苷酸序列和编码重链可变区的核苷酸序列的顺序没有特别限定。例如，编码抗原结合区的核苷酸序列可以从5'侧依次包含编码轻链可变区的核苷酸序列和编码重链可变区的核苷酸序列。或者，编码抗原结合区的核苷酸序列也可以从5'侧依次包含编码重链可变区的核苷酸序列和编码轻链可变区的核苷酸序列。在包含编码轻链恒定区的一部分或全部的核苷酸序列的情况下，优选该核苷酸序列接续在编码轻链可变区的核苷酸序列之后。在包含编码重链恒定区的一部分或全部的核苷酸序列的情况下，优选该核苷酸序列接续在编码重链可变区的核苷酸序列之后。

[0065] 编码抗原结合区的区段包含编码与上述肿瘤细胞的任一抗原结合的单链抗体的核苷酸序列或由其核苷酸序列构成。优选地，编码抗原结合区的区段包含编码来自MAGE-A4的肽与HLA-A2的复合物、来自PRAME的肽与HLA-A24的复合物、与CD19或CEA结合的单链抗体的核苷酸序列或由其核苷酸序列构成。

[0066] 优选地，编码来自MAGE-A4的肽与HLA-A2的复合物的单链抗体的核苷酸序列包含序列编号153-158所示的核苷酸序列。序列编号153示出编码HCDR1的核苷酸序列，序列编号154示出编码HCDR2的核苷酸序列，序列编号155示出编码HCDR3的核苷酸序列，序列编号156示出编码LCDR1的核苷酸序列，序列编号157示出编码LCDR2的核苷酸序列，序列编号158示出编码LCDR3的核苷酸序列。编码包含序列编号153-158的单链抗体的核苷酸序列的具体例子示于序列编号159。基于该序列编号159，编码改变FR3后的单链抗体的核苷酸序列如序列编号160-169所示。

[0067] 优选地，编码与来自PRAME的肽与HLA-A24的复合物结合的单链抗体的核苷酸序列包含序列编号170-175所示的核苷酸序列。序列编号170为编码HCDR1的核苷酸序列，序列编号171为编码HCDR2的核苷酸序列，序列编号172为编码HCDR3的核苷酸序列，序列编号173为编码LCDR1的核苷酸序列，序列编号174为编码LCDR2的核苷酸序列，序列编号175为编码LCDR3的核苷酸序列。编码包含序列编号170-175的单链抗体的核苷酸序列的具体例子示于序列编号176。基于该序列编号176，编码改变FR3后的单链抗体的核苷酸序列如序列编号177-179所示。

[0068] 优选地，编码与CD19结合的单链抗体的核苷酸序列包括序列编号180-185所示的核苷酸序列。序列编号180为编码HCDR1的核苷酸序列，序列编号181为编码HCDR2的核苷酸序列，序列编号182为编码HCDR3的核苷酸序列，序列编号183为编码LCDR1的核苷酸序列，序列编号184为编码LCDR2的核苷酸序列，序列编号185为编码LCDR3的核苷酸序列。编码包含序列编号180-185的单链抗体的核苷酸序列的具体例子示于序列编号186。基于该序列编号186，编码改变FR3后的单链抗体的核苷酸序列如序列编号187-205所示。

[0069] 编码单链抗体的核苷酸序列优选在编码轻链可变区的核苷酸序列与编码重链可变区的核苷酸序列之间包含编码肽接头的核苷酸序列。在单链抗体中，肽接头为与轻链可变区和重链可变区连接的部分。肽接头的氨基酸序列没有特别限定，通常使用包含由甘氨酸残基和丝氨酸残基构成的氨基酸序列（例如GGGS：序列编号206）的重复的长度15-20个氨基酸的序列。例如，编码单链抗体的核苷酸序列可以从5'侧依次包含编码轻链可变区的核苷酸序列、编码肽接头的核苷酸序列和编码重链可变区的核苷酸序列。或者，编码单链抗体的核苷酸序列也可以从5'侧依次包含编码重链可变区的核苷酸序列、编码肽接头的核苷酸序列和编码轻链可变区的核苷酸序列。

[0070] 在CAR中,跨膜结构域是用于在免疫细胞的细胞膜上固定CAR的位点。CAR的跨膜结构域来自跨膜蛋白。例如,在本实施方式的核酸分子中,具有编码跨膜结构域的核苷酸序列的区段(以下,也称为“跨膜区段”)可以包含编码跨膜蛋白的全长的核苷酸序列。或者,跨膜区段只要维持作为跨膜结构域的功能,也可以包含编码跨膜蛋白的一部分的核苷酸序列。跨膜蛋白的一部分优选包含该蛋白质的跨膜区的全部或一部分。跨膜蛋白没有特别限定,例如可举出T细胞受体的 $\alpha$ 链、T细胞受体的 $\beta$ 链、CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\zeta$ 、CD4、CD5、CD8 $\alpha$ 、CD9、CD16、CD22、CD28、CD33、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD134、CD154、4-1BB(也称为CD137)、ICOS(Inducible T-cell co-stimulator)和GITR(Glucocorticoid-induced TNF receptor)等。优选地,跨膜区段包含编码选自这些跨膜蛋白的组中的任一蛋白的跨膜区的核苷酸序列。其中,特别优选编码CD8 $\alpha$ 或CD28的跨膜区的核苷酸序列。编码CD28的跨膜区的核苷酸序列的具体例子示于序列编号207。

[0071] 本实施方式的核酸分子优选在编码抗原结合区的核苷酸序列与跨膜区段之间包含编码铰链结构域的区段(以下,也称为“铰链区段”)。在CAR中,所述铰链结构域可以为细胞外结构域赋予用于抗原结合区接近抗原的长度和用于避免立体障碍的灵活性。铰链结构域也被称为间隔区。CAR的铰链结构域例如可以来自例如跨膜蛋白或IgG。具体而言,在本实施方式的核酸分子中,铰链区段可以包含编码跨膜蛋白的胞外区的全部或IgG的恒定区域的全部的核苷酸序列。或者,铰链区段只要维持作为铰链结构域的功能,也可以包含编码跨膜蛋白的胞外区的一部分或IgG的恒定区的一部分的核苷酸序列。以下,也将膜蛋白的胞外区中能够用作铰链结构域的部分称为“铰链区”。优选地,铰链区段包括编码选自IgG的轻链恒定区、CD8 $\alpha$ 铰链区和CD28铰链区组成的组中的任一个区的核苷酸序列。IgG优选为IgG4。编码IgG轻链恒定区的核苷酸序列的具体例子示于序列编号208。编码CD28铰链结构域的核苷酸序列的具体例子示于序列编号209。

[0072] 在CAR中,细胞内结构域包含信号转导结构域。CAR的信号转导结构域是在抗原结合区与抗原结合时,用于诱导使表达该CAR的免疫细胞活化的信号转导的部位。在本实施方式的核酸分子中,编码细胞内结构域的区段(以下,也称为“细胞内区段”)可包含编码信号转导结构域的核苷酸序列。CAR的信号转导结构域可来自细胞膜受体、跨膜蛋白等具有胞内区的膜蛋白。在该膜蛋白的胞内区可存在信号转导结构域。即,CAR的细胞内结构域可包含膜蛋白的信号转导结构域。因此,细胞内区段可以包含编码该膜蛋白的全长的核苷酸序列。或者,细胞内区段只要维持作为信号转导结构域的功能,也可以包含编码上述膜蛋白的一部分的核苷酸序列。膜蛋白的一部分优选包含该蛋白质的信号转导结构域的全部或一部分。膜蛋白没有特别限定,例如可举出CD3 $\zeta$ 、CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 、CD3 $\epsilon$ 、CD5、CD22、CD66d、CD79a、CD79b、FcR $\gamma$ 和FcR $\beta$ 等。优选地,细胞内区段包含编码选自这些膜蛋白的组中的至少一种蛋白质的信号转导结构域的核苷酸序列。其中,优选CD3 $\zeta$ 。编码CD3 $\zeta$ 的信号转导结构域的核苷酸序列的具体例子示于序列编号210。

[0073] 细胞内区段优选除了编码上述信号转导结构域的核苷酸序列以外,还具有编码共刺激结构域的核苷酸序列。已知来自共刺激结构域的信号与来自上述信号转导结构域的信号一起被传递到免疫细胞(特别是T细胞),由此该免疫细胞的增殖能力、细胞毒性活性、存活率等提高。CAR的共刺激结构域可以来自细胞膜受体、跨膜蛋白等具有胞内区的膜蛋白。在该膜蛋白的胞内区可能存在共刺激结构域。即,CAR的细胞内结构域可包含膜蛋白的共刺

激结构域。因此,细胞内区段可以包含编码该膜蛋白的全长的核苷酸序列。或者,细胞内区段只要维持作为共刺激结构域的功能,也可以包含编码上述膜蛋白的一部分的核苷酸序列。膜蛋白的一部分优选包含该蛋白质的共刺激结构域的全部或一部分。膜蛋白没有特别限定,例如可举出4-1BB(也称为CD137)、CD28、GITR、CD2、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD154和ICOS等。优选地,细胞内区段包含编码选自这些膜蛋白的组中的至少一种蛋白质的共刺激结构域的核苷酸序列。其中,优选选自由4-1BB、CD28和GITR组成的组中的至少一种。编码CD28的共刺激结构域的核苷酸序列的具体例子示于序列编号211。编码GITR的共刺激结构域的核苷酸序列的具体例子示于序列编号212。

[0074] 在细胞内结构域区段中,编码信号转导结构域的核苷酸序列和编码共刺激结构域的核苷酸序列的顺序没有特别限定。例如,编码细胞内结构域的核苷酸序列可以从5'侧依次包含编码信号转导结构域的核苷酸序列和编码共刺激结构域的核苷酸序列。或者,编码细胞内结构域的核苷酸序列也可以从5'侧起依次包含编码共刺激结构域的核苷酸序列和编码信号转导结构域的核苷酸序列。

[0075] 本实施方式的核酸分子根据需要,除了编码CAR的核苷酸序列以外,还可以包含各种核苷酸序列。作为这样的核苷酸序列,例如可举出前导序列、限制酶的识别序列、编码肽标签的核苷酸序列、终止密码子等。肽标签可以从例如组氨酸标签、谷胱甘肽-S-转移酶(GST)标签、FLAG(注册商标)标签等公知的肽标签中适当选择。

[0076] 本发明的另一实施方式涉及包含上述1.的核酸分子的载体。具体而言,本实施方式的载体可以为将本实施方式的核酸分子整合于公知的载体中的形态。载体的种类没有特别限定,例如可举出质粒载体、病毒载体等。载体可以为线状,也可以为环状。质粒载体的种类没有特别限定,例如可举出表达载体、病毒载体、作用载体、转座子载体、克隆载体等。表达载体是在哺乳动物细胞、昆虫细胞、酵母、大肠杆菌等适当的宿主细胞中,能够表达整合于该载体的核酸分子的核苷酸序列编码的蛋白质的载体。转座子载体是通过与整合有编码转座酶的基因的表达式一起被导入适当的宿主,能够将整合于转座子载体的核酸分子整合入宿主细胞的基因组的载体。

[0077] 病毒载体的种类没有特别限定,例如可举出逆转录病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒(AAV)载体、痘苗病毒载体、Epstein-Barr病毒(EBV)载体等。为了使在感染的细胞内病毒不自复制,病毒载体优选复制能力缺损。

[0078] 载体可以根据需要包含适当的控制序列。作为这样的控制序列,例如可举出启动子序列、操作子序列、增强子序列、编码耐药标志物的核苷酸序列、多克隆位点等。

[0079] 如上所述,本实施方式的核酸分子可以是DNA和RNA中的任一种。与RNA相比,DNA是稳定的物质,另外,市售有各种DNA载体。因此,作为DNA的本实施方式的核酸分子在保存和处理容易方面是有利的。已知编码蛋白质的RNA在被导入细胞时,不受转录调节过程的影响而能够表达该蛋白质。因此,作为RNA的本实施方式的核酸分子在免疫细胞中能够表达迅速的CAR方面是有利的。

## [0080] 2. CAR

本发明的另一实施例涉及CAR。本实施方式的CAR是由上述1.中说明的核酸分子具有的核苷酸序列编码的蛋白质分子。本实施方式的CAR是从N端侧依次包含细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域的、通过基因工程方法制作的蛋白质。细胞外结构域包括包含

轻链可变区和重链可变区的抗原结合区。本实施方式的CAR的特征在于,在抗原结合区的轻链FR3中,至少3个氨基酸残基为碱性氨基酸残基。即,本实施方式的CAR包含轻链FR3的至少3个氨基酸残基为碱性氨基酸残基的抗原结合区。该抗原结合区与上述经改变的抗原结合区相同。以下,将本实施方式的CAR具有的抗原结合区也称为“经改变的抗原结合区”。本实施方式的CAR也可以说是具有原抗原结合区的CAR的突变体。本实施方式的CAR优选为在免疫细胞中表达并固定于免疫细胞的细胞膜的状态。在表达该CAR的免疫细胞中,与表达包含原抗原结合区的CAR的免疫细胞相比,细胞因子的产生得到抑制。另外,优选维持对该免疫细胞的肿瘤细胞的细胞杀伤效应,进一步优选该细胞杀伤效应提高。

[0081] 在本实施方式的CAR中,轻链FR3的至少3个碱性氨基酸残基来自上述密码子的改变。在经改变的抗原结合区的轻链FR3中,来自密码子的改变的至少3个碱性氨基酸残基可以全部为精氨酸残基,或者也可以全部为赖氨酸残基。或者,来自密码子的改变的至少3个碱性氨基酸残基可以是其一部分为精氨酸残基,其余为赖氨酸残基。

[0082] 轻链FR3中的至少3个氨基酸残基成为碱性氨基酸残基之前的氨基酸残基为中性氨基酸残基或酸性氨基酸残基,优选为中性氨基酸残基。即,经改变的抗原结合区的轻链FR3中的至少3个碱性氨基酸残基是从原抗原结合区的轻链FR3中的中性氨基酸残基和/或酸性氨基酸残基中选择的至少3个残基所变更的残基。

[0083] 在经改变的抗原结合区的轻链FR3中,来自密码子的改变的至少3个碱性氨基酸残基的数量例如为3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14。经改变的抗原结合区的轻链FR3中的、来自密码子的改变的至少3个碱性氨基酸残基的数量优选为3以上且6以下,更优选为3以上且5以下。如上所述,经改变的抗原结合区的轻链FR3中的至少3个碱性氨基酸残基优选位于选自轻链可变区的第57、58、59、60、61、62、63、65、67、70、72、74、76、77、79、80和81位的氨基酸残基的位置。

[0084] 在经改变的抗原结合区中,选自由轻链可变区的第60、63、65、67、70、72、74、76、77、79和81位的氨基酸残基组成的组中的至少3个氨基酸残基优选为来自密码子的改变的碱性氨基酸残基。更优选地,选自上述组中的3个以上且6个以下的氨基酸残基为碱性氨基酸残基。特别优选地,选自上述组中的3个以上且5个以下的氨基酸残基为碱性氨基酸残基。例如,以下的1)~21)中任一项所述的氨基酸残基是来自密码子的改变的碱性氨基酸残基。

- [0085] 1) 轻链可变区的第60、63和65位的氨基酸残基;  
2) 轻链可变区的第60、63和76位的氨基酸残基;  
3) 轻链可变区的第60、74和76位的氨基酸残基;  
4) 轻链可变区的第63、65和67位的氨基酸残基;  
5) 轻链可变区的第63、65和70位的氨基酸残基;  
6) 轻链可变区的第63、65和72位的氨基酸残基;  
7) 轻链可变区的第63、67和70位的氨基酸残基;  
8) 轻链可变区的第63、67和72位的氨基酸残基;  
9) 轻链可变区的第63、70和72位的氨基酸残基;  
10) 轻链可变区的第65、67和70位的氨基酸残基;  
11) 轻链可变区的第65、67和72位的氨基酸残基;  
12) 轻链可变区的第65、70和72位的氨基酸残基;

- 13) 轻链可变区的第67、70和72位的氨基酸残基;
- 14) 轻链可变区的第70、72和74位的氨基酸残基;
- 15) 轻链可变区的第77、79和81位的氨基酸残基;
- 16) 轻链可变区的第63、65、67和70位的氨基酸残基;
- 17) 轻链可变区的第63、65、67和72位的氨基酸残基;
- 18) 轻链可变区的第63、65、70和72位的氨基酸残基;
- 19) 轻链可变区的第63、67、70和72位的氨基酸残基;
- 20) 轻链可变区的第65、67、70和72位的氨基酸残基;和
- 21) 轻链可变区的第63、65、67、70和72位的氨基酸残基。

[0086] 在经改变的抗原结合区中,优选选自由轻链可变区的第63、65、67、70和72位组成的组中的至少3个位置的氨基酸残基以及选自由轻链可变区的第60、74、76、77、79和81位组成的组中的至少1个位置的氨基酸残基为碱性氨基酸残基。

[0087] 在经改变的抗原结合区的轻链FR3中,3个以上且6个以下的氨基酸残基为碱性氨基酸残基时,该3个以上且6个以下的氨基酸残基优选包含:选自由轻链可变区的第63、65、67、70和72位组成的组中的3、4或5个位置的氨基酸残基,以及选自由轻链可变区的第60、74、76、77、79和81位组成的组中的1、2或3个位置的氨基酸残基。

[0088] 在经改变的抗原结合区的轻链FR3中,3个以上且5个以下的氨基酸残基为碱性氨基酸残基时,该3个以上且5个以下的氨基酸残基优选包含:选自由轻链可变区的第63、65、67、70和72位组成的组中的3或4个位置的氨基酸残基,以及选自由轻链可变区的第60、74、76、77、79和81位组成的组中的1或2个位置的氨基酸残基。

[0089] 在经改变的抗原结合区中,优选选自由轻链可变区的第60、74、76、77、79和81位组成的组中的至少3个位置的氨基酸残基以及选自由轻链可变区的第63、65、67、70和72位组成的组中的至少1个位置的氨基酸残基为碱性氨基酸残基。

[0090] 在经改变的抗原结合区的轻链FR3中,3个以上且6个以下的氨基酸残基为碱性氨基酸残基时,该3个以上且6个以下的氨基酸残基优选包含:选自由轻链可变区的第60、74、76、77、79和81位组成的组中的3、4或5个位置的氨基酸残基,以及选自由轻链可变区的第63、65、67、70和72位组成的组中的1、2或3个位置的氨基酸残基。

[0091] 在经改变的抗原结合区的轻链FR3中,3个以上且5个以下的氨基酸残基为碱性氨基酸残基时,该3个以上且5个以下的氨基酸残基优选包含:选自由轻链可变区的第60、74、76、77、79和81位组成的组中的3或4个位置的氨基酸残基,以及选自由轻链可变区的第63、65、67、70和72位组成的组中的1或2个位置的氨基酸残基。

[0092] 在经改变的抗原结合区中,轻链可变区的第60、63、65、67、70、72、74、76、77、79和81位的氨基酸残基以外的氨基酸残基被改变的情况下,该经改变的氨基酸残基优选为选自第57、58、59、61和62位组成的组中的位置的氨基酸残基。

[0093] 在本实施方式的CAR中,细胞外结构域包括包含轻链可变区和重链可变区的抗原结合区。作为抗原结合区,例如可举出单链抗体。抗原结合区可以包含抗体的恒定区的一部分或全部。恒定区可以是重链和轻链中的任一恒定区,优选为轻链恒定区。在抗原结合区中,轻链可变区和重链可变区的顺序没有特别限定。例如,抗原结合区可以从N端侧依次包含轻链可变区和重链可变区。或者,抗原结合区也可以从N端侧依次包含重链可变区和轻链

可变区。在抗原结合区中,轻链恒定区的一部分或全部优选包含在轻链可变区之后。在抗原结合区中,重链恒定区的一部分或全部优选包含在重链可变区之后。

[0094] 在本实施方式的CAR中,抗原结合区可以包含与存在于上述肿瘤细胞的表面的抗原以及存在于肿瘤细胞内的抗原中的任一者结合的单链抗体或由其单链抗体构成。优选地,抗原结合区包含由与来自MAGE-A4的肽与HLA-A2的复合物、来自PRAME的肽与HLA-A24的复合物、CD19或CEA结合的单链抗体或由该单链抗体构成。

[0095] 优选地,与来自MAGE-A4的肽与HLA-A2的复合物结合的单链抗体的氨基酸序列包含序列编号213-218所示的氨基酸序列。序列编号213为HCDR1的氨基酸序列,序列编号214为HCDR2的氨基酸序列,序列编号215为HCDR3的氨基酸序列,序列编号216为LCDR1的氨基酸序列,序列编号217为LCDR2的氨基酸序列,序列编号218为LCDR3的氨基酸序列。包含序列编号213-218的单链抗体的氨基酸序列的具体例子示于序列编号219。基于该序列编号219改变FR3的单链抗体的氨基酸序列例如示于序列编号220-229。

[0096] 优选地,与来自PRAME的肽与HLA-A24的复合物结合的单链抗体的氨基酸序列包含序列编号230-235所示的氨基酸序列。序列编号230为HCDR1的氨基酸序列,序列编号231为HCDR2的氨基酸序列,序列编号232为HCDR3的氨基酸序列,序列编号233为LCDR1的氨基酸序列,序列编号234为LCDR2的氨基酸序列,序列编号235为LCDR3的氨基酸序列。包含序列编号230-235的单链抗体的氨基酸序列的具体例子示于序列编号236。基于该序列编号236改变FR3的单链抗体的氨基酸序列例如示于序列编号237-239。

[0097] 优选地,与CD19结合的单链抗体的氨基酸序列包含序列编号240-245所示的氨基酸序列。序列编号240为HCDR1的氨基酸序列,序列编号241为HCDR2的氨基酸序列,序列编号242为HCDR3的氨基酸序列,序列编号243为LCDR1的氨基酸序列,序列编号244为LCDR2的氨基酸序列,序列编号245为LCDR3的氨基酸序列。包含序列编号240-245的单链抗体的氨基酸序列的具体例子示于序列编号246。基于该序列编号246改变FR3的单链抗体的氨基酸序列例如示于序列编号247-265。

[0098] 优选单链抗体在轻链可变区与重链可变区之间包含肽接头。肽接头如上所述。例如,单链抗体可以从N端侧依次包含轻链可变区、肽接头和重链可变区。或者,单链抗体也可以从N端侧依次包含重链可变区、肽接头和轻链可变区。

[0099] 在本实施方式的CAR中,跨膜结构域可以包含跨膜蛋白的全长。或者,只要维持其功能,跨膜结构域也可以包含跨膜蛋白的一部分。跨膜蛋白的一部分优选包含该蛋白质的跨膜区的全部或一部分。作为能够在跨膜结构域中利用的跨膜蛋白,可举出上述1.中例示的蛋白质。优选地,跨膜结构域例如为选自T细胞受体的 $\alpha$ 链、T细胞受体的 $\beta$ 链、CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\zeta$ 、CD4、CD5、CD8 $\alpha$ 、CD9、CD16、CD22、CD28、CD33、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD134、CD154、4-1BB(也称为CD137)、ICOS和GITR组成的组中的任一种蛋白的跨膜区。其中,优选CD8 $\alpha$ 或CD28的跨膜区。CD28的跨膜区的氨基酸序列的具体例子示于序列编号266。

[0100] 本实施方式的CAR优选在抗原结合区与跨膜结构域之间包含铰链结构域。铰链结构域可以包含跨膜蛋白的胞外区的全部或IgG的恒定区的全部。或者,只要维持其功能,铰链结构域也可以包含跨膜蛋白的胞外区的一部分或IgG的恒定区的一部分。作为能够在铰链结构域中利用的蛋白质,可举出上述1.中例示的蛋白质。优选地,铰链结构域例如为选自IgG的轻链恒定区、CD8 $\alpha$ 的铰链结构域和CD28的铰链结构域组成的组中的任意一个区域。

IgG优选为IgG4。IgG轻链恒定区的氨基酸序列的具体例子示于序列编号267。CD28铰链结构域的氨基酸序列的具体例子示于序列编号268。

[0101] 在本实施方式的CAR中,细胞内结构域可以包含具有胞内区的膜蛋白的全长。或者,只要维持作为信号转导结构域的功能,细胞内结构域也可以包含上述膜蛋白的一部分。信号转导结构域可存在于膜蛋白的胞内区。优选具有胞内区的膜蛋白的一部分包含该蛋白质的信号转导结构域的全部或一部分。作为能够在细胞内结构域中利用的膜蛋白,可举出上述1.中例示的蛋白质。优选地,细胞内结构域例如包含选自由CD3 $\zeta$ 、CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 、CD3 $\epsilon$ 、CD5、CD22、CD66d、CD79a、CD79b、FcR $\gamma$ 和FcR $\beta$ 组成的组中的至少一种蛋白质的信号转导结构域。其中,优选CD3 $\zeta$ 的信号转导结构域。CD3 $\zeta$ 的信号转导结构域的氨基酸序列的具体例子示于序列编号269。

[0102] 在本实施方式的CAR中,细胞内结构域优选除上述信号转导结构域以外还具有共刺激结构域。细胞内结构域可以包含具有胞内区的膜蛋白的全长。或者,只要维持作为共刺激域的功能,细胞内结构域也可以包含上述膜蛋白的一部分。共刺激结构域可存在于上述各蛋白质的胞内区。优选具有胞内区的膜蛋白的一部分包含该蛋白质的共刺激结构域的全部或一部分。作为能够在共刺激结构域中利用的膜蛋白,可举出上述1.中例示的蛋白质。优选地,共刺激结构域例如包含选自由4-1BB(也称为CD137)、CD28、GITR、CD2、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD154和ICOS组成的组中的至少一种蛋白质的共刺激结构域。其中,优选4-1BB、CD28和GITR的共刺激域。CD28的共刺激结构域的氨基酸序列的具体例子示于序列编号270。GITR的共刺激结构域的氨基酸序列的具体例子示于序列编号271。

[0103] 在细胞内结构域中,信号转导结构域和共刺激域的顺序没有特别限定。例如,细胞内结构域可以从N端侧依次包含信号转导结构域和共刺激结构域。或者,细胞内结构域也可以从N端侧依次包含共刺激结构域和信号转导结构域。

[0104] 本实施方式的CAR根据需要可以包含附加的寡肽或多肽。作为这样的寡肽和多肽,可举出信号肽、肽标签等。肽标签可以从例如组氨酸标签、GST标签、FLAG(注册商标)标签等公知的肽标签中适当选择。

[0105] 本实施方式的CAR可以使用本实施方式的核酸分子,通过蛋白质表达系统生成。蛋白质表达系统可以是使用宿主细胞的表达系统,也可以是无细胞蛋白质合成系统。在使用宿主细胞的表达系统的生成中,例如,通过将整合至适合于使用的宿主细胞的表达载体的本实施方式的核酸分子导入该宿主细胞,能够表达本实施方式的CAR。作为无细胞蛋白质合成系统,例如可举出来自小麦胚芽的合成系统、来自大肠杆菌的合成系统、重组型无细胞蛋白质合成系统等。在宿主细胞内生成CAR的情况下,可以将该宿主细胞用包含适当的增溶剂的溶液溶解,使CAR在该溶液中游离。在非细胞蛋白质合成系统中,合成的CAR包含在反应液中。游离在液体中的CAR可以通过柱层析等公知的方法回收。例如,在所生成的CAR具有组氨酸标签或GST标签作为肽标签的情况下,可以通过使用包含Ni-NTA(与镍离子形成螯合物的氨基三乙酸)或谷胱甘肽的载体的亲和层析来回收。根据需要,可以通过凝胶过滤、透析等公知的方法对回收的CAR进行精制。

### [0106] 3. 包含CAR的免疫细胞

本发明的另一实施方案涉及包含CAR的免疫细胞。本实施方式的包含CAR的免疫细

胞是通过向免疫细胞中导入上述1.的核酸分子而表达上述2.的CAR的免疫细胞。CAR和核酸分子的细节如上所述。作为导入上述1.的核酸分子前的免疫细胞,例如可举出从包含人的哺乳动物采集的免疫细胞、从干细胞调制的免疫细胞和作为细胞株建立的免疫细胞。具体而言,可例示通过白细胞成分采血取得的免疫细胞、从血液分离的免疫细胞等。

[0107] 作为从生物试样分离或离析的免疫细胞,例如可举出外周血单个核细胞(PBMC)、T细胞和自然杀伤(NK)细胞等。其中,优选T细胞和NK细胞。T细胞包括CD8阳性T细胞、CD4阳性T细胞、细胞毒性T细胞、辅助性T细胞、调节性T细胞和肿瘤浸润淋巴细胞。优选的T细胞为CD8阳性T细胞和细胞毒性T细胞。作为免疫细胞的细胞株,优选来自淋巴细胞的细胞株,例如可举出Jurkat细胞、MOLT-4细胞、U-937细胞等。以下,也将表达CAR的T细胞称为“CAR-T细胞”。

[0108] 将上述1.的核酸分子导入免疫细胞的方法本身没有特别限定,可以从公知的基因导入法适当选择。作为基因导入法,例如可举出脂质体转染法、电穿孔法、磷酸钙法、基于阳离子性聚合物的基因导入、基于病毒载体的基因导入、基于转座子的基因导入等。在脂质体转染法和基于阳离子性聚合物的基因导入中,可以使用FuGENE(注册商标)、JetPEI(注册商标)等市售的转染试剂。

[0109] 包含本实施方式的CAR的免疫细胞可以与导入本实施方式的核酸分子前的免疫细胞同样地培养。培养基、血清、添加物等可以根据所使用的免疫细胞的种类适当决定。作为培养基,例如可举出MEM、DMEM、RPMI-1640等。在免疫细胞为淋巴细胞的情况下,例如可以使用GT-T502、GT-T503、GT-T551(Takara Bio株式会社)等市售的淋巴细胞用培养基。作为血清,例如可举出胎牛血清(FBS)、人AB型血清等。作为添加物,例如可举出L-谷氨酰胺、胰岛素、IL-2等。作为免疫细胞的培养条件,例如可举出37°C下5%CO<sub>2</sub>气氛下的条件。

[0110] 在本实施方式的包含CAR的免疫细胞中,CAR作为跨膜型蛋白质表达。当该CAR的细胞外结构域与肿瘤细胞的抗原结合时,通过来自该CAR的细胞内结构域的信号,免疫细胞被活化。并且,经活化的本实施方式的包含CAR的免疫细胞通过细胞毒性蛋白(例如穿孔素、颗粒酶等)以及抗肿瘤性细胞因子(例如肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$ 、淋巴因子等)的释放、诱导Fas配体等细胞死亡的细胞表面分子的表达,发挥细胞杀伤效应。优选地,本实施方式的包含CAR的免疫细胞与包含具有原抗原结合区的CAR的免疫细胞相比,维持细胞杀伤效应,更优选细胞杀伤效应提高。基于包含CAR的免疫细胞的细胞杀伤效应可以通过细胞毒性测定等公知的方法来调查。具体而言,可例示后述的实施例3的方法。另外,如后述的实施例4那样,也可以对移植有肿瘤细胞的非人动物施用包含CAR的免疫细胞,测定肿瘤的尺寸,由此评价细胞杀伤效应。另一方面,本实施方式的包含CAR的免疫细胞与包含具有原抗原结合区的CAR的免疫细胞相比,成为CRS的原因的细胞因子(例如IFN  $\gamma$ 、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)等)的释放量减少。包含CAR的免疫细胞的细胞因子的释放量可以通过酶联免疫吸附法(ELISA)等公知的方法来调查。具体而言,可例示后述的实施例5的方法。

#### [0111] 4. 包含CAR免疫细胞的制备方法

本发明的另一实施方式涉及包含CAR的免疫细胞的制备方法(以下,也称为“本实施方式的制备方法”)。在本实施方式的制备方法中,将上述1.的核酸分子导入免疫细胞,使该免疫细胞表达上述2.的CAR,由此制备包含上述3.的CAR的免疫细胞。CAR和核酸分子的细节如上所述。另外,导入上述1.的核酸分子前的免疫细胞的细节如上所述。优选为PBMC、T细

胞和NK细胞。在将通过本实施方式的制备方法得到的包含CAR的免疫细胞移植到生物体的情况下,优选使用从该生物体自身或从与该生物体同种的其他生物体采集的生物体试样分离或离析的免疫细胞。

[0112] 将上述1.的核酸分子导入免疫细胞的方法如上所述。优选在将核酸分子导入免疫细胞后,在规定的期间培养该免疫细胞。免疫细胞的培养方法如上所述。规定的期间可以是至少在免疫细胞中表达CAR的期间。直至CAR表达为止的期间根据核酸分子的导入方法来决定,例如为3小时以上且72小时以下,优选为6小时以上且48小时以下。在核酸分子的导入方法是可在免疫细胞中稳定表达CAR的方法的情况下,规定的期间可以是足以使表达CAR的免疫细胞增殖的期间。这样的期间没有特别限定,例如为48小时以上且20天以下,优选为72小时以上且14天以下。

[0113] 通过将上述1.的核酸分子导入免疫细胞,在该免疫细胞中表达上述2.的CAR。根据需要,可以确认免疫细胞表达CAR。免疫细胞中的CAR的表达例如可以通过ELISA法、流式细胞术法、免疫沉降法、聚丙烯酰胺凝胶电泳法和蛋白质印迹法等公知的蛋白质的检测方法来确认。

#### [0114] 5. 医药组合物

本发明的另一实施方式涉及包括包含CAR的免疫细胞的用于治疗恶性肿瘤的药物组合物(以下,也称为“本实施方式的药物组合物”)。本实施方式的医药组合物中,作为有效成分,包括包含上述3.的CAR的免疫细胞。CAR和包含其的免疫细胞的细节如上所述。本实施方式的药物组合物还可包含药学上可接受的添加物。作为这样的添加物,可举出用于稳定地保存免疫细胞的水性介质、D-葡萄糖、葡聚糖、血清白蛋白、二甲基亚砜(DMSO)等。作为上述水性介质,例如可举出生理盐水、磷酸缓冲生理盐水(PBS)、复合电解质液等。本实施方式的药物组合物优选非经口施用至患者。即,该药物组合物优选为适于非口服施用的形态,例如注射剂、输液等形态。

[0115] 作为本实施方式的药物组合物治疗对象的恶性肿瘤是包含具有CAR识别的抗原的肿瘤细胞的肿瘤。恶性肿瘤可以是血液癌,也可以是实体癌。例如急性白血病(急性髓性白血病、B细胞性急性淋巴细胞性白血病、急性单核细胞性白血病、急性红白血病、急性巨核细胞性白血病等)、慢性白血病(慢性髓性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、慢性单核细胞性白血病等)、淋巴瘤(弥漫性大细胞型B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、伯基特氏淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、淋巴浆细胞性淋巴瘤、边缘区淋巴瘤等)、多发性骨髓瘤、黑色素瘤、乳腺癌、前列腺癌、膀胱癌、子宫癌、肝癌、肾癌、胰脏癌、脾脏癌、肺癌、胃癌、食管癌、卵巢癌、骨肉瘤、神经母细胞瘤等。

#### [0116] 6. 治疗方法

本发明的另一实施方式涉及使用包含上述3.的CAR的免疫细胞的恶性肿瘤的治疗方法(以下,也称为“本实施方式的治疗方法”)。包括将上述药物组合物施用至恶性肿瘤患者的工序。作为治疗对象的恶性肿瘤如上所述。

[0117] 在施用工序中,优选免疫细胞非经口施用至患者。作为非经口施用,例如可举出静脉内、动脉内、肌肉内、腹腔内、皮下的施用。其中,优选静脉内施用。

[0118] 本实施方式的药物组合物的施用可以根据癌的种类、患者的病状、年龄、体重等适当决定。施用量例如相对于体重50 kg以上的成人,每1次,作为包含CAR的免疫细胞为 $1 \times$

$10^4$  cells以上且 $1 \times 10^{10}$  cells以下,优选为 $1 \times 10^5$  cells以上且 $1 \times 10^9$  cells以下,更优选为 $1 \times 10^6$  cells以上且 $5 \times 10^8$  cells以下。施用次数可以为仅1次施用,也可以为多次施用。施用后,包含CAR的免疫细胞在患者体内存活并增殖,通常施用次数为1次。但是,在判断免疫细胞的存活和增殖不充分的情况下,可多次施用。施用间隔例如可以为1天1-4次,每1周、每10-30天、每1个月、每3-6个月、每1年等。

[0119] 本实施方式的医药组合物可以与其他抗癌剂并用。其他抗癌剂的施用与上述5.的医药组合物的施用可以为同日,也可以为其他日。作为其他抗癌剂,可举出环磷酰胺等烷化药、喷司他丁等代谢拮抗剂、利妥昔单抗等分子靶向药、伊马替尼等激酶抑制剂、硼替佐米等蛋白酶体抑制剂、环孢菌素等钙调磷酸酶抑制剂、伊达比星等抗癌性抗生素、伊立替康等植物生物碱、顺铂等铂制剂、他莫昔芬等激素治疗剂、Nivolumab、Pembrolizumab等免疫抑制药等,但并不限于这些。

[0120] 作为本实施方式的药物组合物的施用前的处置,可以通过进行淋巴细胞除去化疗来减少患者的白细胞的数量。在淋巴细胞除去化疗中,例如使用氟达拉滨、环磷酰胺、苯达莫司汀等。

#### [0121] 7.减少免疫细胞的细胞因子产生的方法

本发明的另一实施方式涉及降低包含CAR的免疫细胞的细胞因子产生的方法(以下,也称为“本实施方式的降低方法”)。在本实施方式的降低方法中,包括:制作上述1.的核酸分子的工序;以及将上述1.的核酸分子导入免疫细胞,使该免疫细胞表达上述2.的CAR的工序。取得的包含CAR的免疫细胞表达包含经改变的抗原结合区的CAR。与表达了包含原抗原结合区的CAR的免疫细胞相比,表达了该CAR的免疫细胞细胞因子的产生减少。另一方面,与表达了包含原抗原结合区的CAR的免疫细胞相比,表达了包含经改变的抗原结合区的CAR的免疫细胞的细胞杀伤效应被维持或提高。本实施方式的降低方法在利用表达CAR的免疫细胞的治疗方法中,能够有助于进一步降低以细胞因子为原因的副作用。核酸分子和CAR的细节如上所述。向免疫细胞导入核酸分子的方法和包含CAR的免疫细胞产生的细胞因子的测定方法如上所述。

[0122] 以下,通过实施例对本发明进行详细说明,但本发明并不限于这些实施例。

#### [0123] 实施例

实施例1:与MAGE-A4/HLA-A2复合物结合的CAR-T细胞的制作及其效果确认(1)

##### (1) 编码成为模板的CAR的核酸分子的取得

与US2020/0276237(该文献作为参考并入本说明书)的实施例同样地,取得2个包含编码具有与MAGE-A4/HLA-A2复合物结合的单链抗体的CAR的基因的病毒载体作用质粒DNA。该单链抗体识别的复合物为MAGE-A4与HLA-A\*02:01的复合物。以下,将由一个质粒DNA中的基因编码的CAR称为“MAGE-A4-zG”,将由另一个质粒DNA中的基因编码的CAR称为“MAGE-A4-zG-s1”。上述MAGE-A4/HLA-A2复合物中的来自MAGE-A4的肽的氨基酸序列为GVYDGREHTV(序列编号1)。为了通过PCR法制作编码MAGE-A4-zG和MAGE-A4-zG-s1的突变体的核酸分子,使用上述各质粒DNA作为模板。

[0124] 参照图2A,编码MAGE-A4-zG的基因从5'侧依次连接有:前导序列(Leader)、编码重链可变区(VH)的核苷酸序列、编码接头(L)的核苷酸序列、编码轻链可变区(VL)的核苷酸序列、编码轻链恒定区(CL)的核苷酸序列、编码CD28的跨膜区(CD28TM)的核苷酸序列、编码

CD3 $\zeta$ 的核苷酸序列和编码GITR的胞内区(GITRICD)的核苷酸序列。VH、L、VL和CL构成具有编码CAR的细胞外结构域的核苷酸序列的区段。VH、L和VL构成具有编码与MAGE-A4/HLA-A2复合物特异性结合的单链抗体的核苷酸序列的区段。CD3 $\zeta$ 和GITRICD构成具有编码CAR的细胞内结构域的核苷酸序列的区段。CL为具有编码CAR铰链结构域的核苷酸序列的区段。

[0125] 编码MAGE-A4-zG-s1的基因除了在编码MAGE-A4-zG的基因的3'端(GITRICD的3'侧)附加了剩余的核苷酸序列以外,为与编码MAGE-A4-zG的基因相同的构成。确认了该剩余的核苷酸序列在公知的数据库中的检索结果与编码任意蛋白质的核苷酸序列都不一致。另外,计算机分析的结果,预测与该剩余的核苷酸序列对应的氨基酸序列形成不具有任何二级结构的直链多肽。

[0126] MAGE-A4-zG和MAGE-A4-zG-s1为包含由VH、VL和连接它们的接头构成的单链抗体和CL作为细胞内结构域、包含CD28TM作为细胞外结构域、包含CD3 $\zeta$ 和GITRICD作为跨膜结构域的CAR。

[0127] (2) 编码MAGE-A4-zG和MAGE-A4-zG-s1的突变体的核酸分子的取得

[试剂]

QIAprep Spin Miniprep试剂盒(QIAGEN公司)

PrimeSTAR(注册商标)Max Premix(Takara Bio株式会社)

Ligation high ver.2(东洋纺株式会社)

T4 Polynucleotide Kinase(东洋纺株式会社)

Dpn I(东洋纺株式会社)

Competent high DH5 $\alpha$ (东洋纺株式会社)

(2.1) 引物的设计和PCR

基于序列编号3的核苷酸序列,设计用于得到编码CAR的多核苷酸的引物组,所述CAR包含MAGE-A4-zG中的下述a)或b)所示的氨基酸残基被精氨酸残基取代的单链抗体。另外,基于序列编号9的核苷酸序列,设计用于得到编码CAR的多核苷酸的引物组,所述CAR包含MAGE-A4-zG-s1中的下述a)所示的氨基酸残基被精氨酸残基取代的单链抗体。

[0128] a) 由Kabat定义的VL的第63、65、67和70位的氨基酸残基;和

b) 由Kabat定义的VL的第63、65、67和72位的氨基酸残基

将包含分别编码MAGE-A4-zG和MAGE-A4-zG-s1的基因的上述各质粒DNA用作模板DNA。调制包含模板DNA、引物组(序列编号77和78)和PrimeSTAR(注册商标)Max Premix的PCR反应液,进行PCR反应。由此,得到在5'端和3'端附加了限制酶的识别位点(以下,称为限制位点)的PCR产物。在得到的PCR产物中添加DpnI,将模板质粒DNA片段化。使用DpnI处理后的PCR产物作为模板,调制包含突变体制作用引物组和PrimeSTAR(注册商标)Max Premix的PCR反应液,进行PCR反应。将得到的PCR产物、限制酶处理完成的病毒载体作用质粒DNA(空载体)、Ligation high ver.2和T4多聚核苷酸激酶混合,在16°C下孵育1小时,进行连接反应。

[0129] 以下,将具有MAGE-A4-zG中的上述a)和b)所示的氨基酸残基用精氨酸残基取代的单链抗体的CAR分别称为“MAGE-A4-zG-m1”和“MAGE-A4-zG-m2”。以下,将包含MAGE-A4-zG-s1中的上述a)所示的氨基酸残基为精氨酸残基的单链抗体的CAR称为“MAGE-A4-zG-m1-s1”。表1中示出各突变体与其制作用引物组的序列编号的对应关系。表中,“F”表示正向引

物的核苷酸序列的序列编号,“R”表示反向引物的核苷酸序列的序列编号。关于表的说明对于下文的实施例的表也相同。

[0130] [表1]

CAR 的名称	F	R
MAGE-A4-zG-m1	79	80
MAGE-A4-zG-m2	81	82
MAGE-A4-zG-m1-s1	79	80

[0131] (2.2) 转化、质粒DNA的提取和测序

使用连接反应后的溶液和DH5 $\alpha$ ,通过热休克法得到大肠杆菌的转化体。琼脂培养基上的单菌落用含氨苄青霉素的LB液体培养基培养。使用QIAprep Spin Miniprep试剂盒从得到的大肠杆菌中提取质粒DNA。对得到的各质粒DNA进行测序。测序结果确认取得了编码MAGE-A4-zG和MAGE-A4-zG-s1突变体的核酸分子。

[0132] (3) MAGE-A4-zG、MAGE-A4-zG-s1和表达它们的突变体的T细胞的制作

(3.1) 人淋巴细胞的调制

使用Ficoll-Paque (商标) PLUS (GE Healthcare公司) 从由健康供体提供的血液中分离PBMC。将得到的PBMC用作人淋巴细胞。此外,本研究中使用的人外周血等样本的采集和分析按照赫尔辛基宣言进行,全部按照由三重大学医学部研究伦理委员会批准的协议,得到基于受试者本人的书面的同意书而实施。将采集的样本进行了本人无法确定的加密,并保存在实施了防盗处置的冰箱和液氮罐中。受试者的个人信息匿名化,以个人的隐私和基因分析的结果不泄漏到外部的的方式实施严格的注意和处置。

[0133] (3.2) PBMC的分离和培养

将抗CD3抗体OKT-3 (eBioscience公司) 和RetroNectin (注册商标) (Takara Bio株式会社) 分别以终浓度为5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的方式添加到ACD-A液 (泰尔茂株式会社) 中。将得到的液体每400  $\mu\text{L}$ 加入12孔板 (Nunc公司) 的各孔中,在4 $^{\circ}\text{C}$ 下静置过夜。除去各孔中的液体,用PBS清洗3次,准备PBMC培养用板。在淋巴细胞用培养基GT-T503 (50mL、Takara Bio株式会社) 中添加AB血清 (300  $\mu\text{L}$ 、veritastk公司),进一步添加人IL-2 (NIPRO公司),使终浓度为300 IU/mL,调制PBMC培养培养基。将上述(3.1)中取得的PBMC以 $2.5 \times 10^5 \sim 3.0 \times 10^5 \text{ cells}/\text{mL}$ 的方式悬浮于所调制的培养基中。在PBMC培养板的各孔中加入细胞悬浮液2 mL,在CO<sub>2</sub>培养箱中37 $^{\circ}\text{C}$ 培养3天。第3天更换1 mL培养基,再培养1天。

[0134] (3.3) 利用逆转录病毒向免疫细胞导入CAR基因

(i) 利用包装细胞plat-A制作逆转录病毒

使用FuGENE (注册商标) (Promega公司) 将上述(2)中取得的包含MAGE-A4-zG、MAGE-A4-zG-s1及编码这些突变体的基因的各病毒载体作用质粒DNA导入包装细胞plat-A,培养2天。然后,回收培养上清液,得到包含病毒载体的液体(以下,也称为“病毒液”)。

[0135] (ii) 逆转录病毒稀释液和清洗液的调制

在PBS (40 mL) 与ACD-A液 (2.4 mL) 的混合液中,以终浓度2.5%的方式添加Albuminar (注册商标) 25% (CSL Behring株式会社),调制逆转录病毒稀释液。另外,在PBS

(39 mL)中以终浓度1.5%的方式添加Albuminar(注册商标)25%,调制逆转录病毒清洗液。

[0136] (iii) 逆转录病毒感染用板的准备

将RetroNectin(注册商标)(Takara Bio株式会社)以终浓度为20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的方式用逆转录病毒稀释液稀释。在24孔板的各孔中分别加入RetroNectin(注册商标)的稀释液250  $\mu\text{L}$ ,在4 $^{\circ}\text{C}$ 下静置过夜。除去各孔中的液体,用逆转录病毒清洗液清洗2次。将上述(3.1)中制作的病毒液分别加入各孔中,在2000 $\times g$ 、2小时、32 $^{\circ}\text{C}$ 下离心,将逆转录病毒涂布在各孔内。除去各孔中的病毒液,用逆转录病毒清洗液清洗2次,准备逆转录病毒感染用板。

[0137] (iv) 利用逆转录病毒感染制作CAR-T细胞

回收上述(3.2)中培养的PBMC,以 $1.3 \times 10^5$  cells/mL的方式悬浮于PBMC培养基。在逆转录病毒感染用板的各孔中分别加入细胞悬浮液1.5 mL,在1000 $\times g$ 、10分钟、32 $^{\circ}\text{C}$ 下离心。然后,将板在CO<sub>2</sub>培养箱内静置,在37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养细胞。由此,得到表达包含MAGE-A4-zG、MAGE-A4-zG-s1及它们的突变体的各种CAR的T细胞(CAR-T细胞)。CAR-T细胞在从PBMC分离计数的12天后用于各种测定。

[0138] (4) CAR-T细胞的细胞杀伤效应和细胞因子分泌量的确认

(4.1) 细胞毒性测定

使用上述(3)中制作的各种CAR-T细胞作为效应细胞,利用N-SPC(注册商标)非RI细胞毒性测定试剂盒(株式会社Techno Suzuta)测定其细胞杀伤效应。作为靶细胞,使用人黑色素瘤细胞株SK-MEL-37或NW-MEL-38。这些靶细胞为A2阳性MAGE-A4阳性肿瘤细胞。

[0139] 上述测定试剂盒的测定原理如下。当将上述测定试剂盒中附带的BM-HT Reagent添加至靶细胞时,通过细胞内酯酶将BM-HT Reagent水解,在靶细胞内生成HT螯合物。若靶细胞被效应细胞杀伤,则HT螯合物泄漏到培养上清液中。当在包含HT螯合物的培养上清液中添加上述测定试剂盒中附带的Eu Solution时,形成Eu/HT复合物。用激光激发该复合物时,产生时间分辨荧光。HT螯合物的泄漏依赖于效应细胞的细胞毒性活性,因此通过时间分辨荧光的测定,能够定量地测定细胞杀伤效应。

[0140] 将靶细胞以 $1 \times 10^4$  cells/mL的方式悬浮于培养基中,添加BM-HT Reagent。将效应细胞(CAR-T细胞)和靶细胞按照细胞数的比例为3:1或1:1混合,加入96孔板的各孔中在37 $^{\circ}\text{C}$ 下共培养2小时。为了进行比较,准备两个添加了未混合效应细胞的靶细胞的孔(对照孔),同样地培养。在从培养开始起1.5小时的时间点,向对照孔中的一个添加上述试剂盒附带的Detergent,将从该对照孔检测出的荧光作为最大荧光。另外,对照孔的另一个为未处理,将从该对照孔检测出的荧光作为最小荧光。在共培养物的培养上清液(12  $\mu\text{L}$ )中添加Eu Solution(120  $\mu\text{L}$ ),在室温下静置15分钟后,测定时间分辨荧光。

[0141] (4.2) IFN  $\gamma$  的测定

(i) 样品的调制

作为效应细胞,使用上述(3)中制作的包含MAGE-A4-zG-s1的CAR-T细胞和包含MAGE-A4-zG-m1-s1的CAR-T细胞。为了进行比较,还使用了上述(3)中制作的对照细胞。作为靶细胞,使用A2阳性MAGE-A4阳性肿瘤细胞的SK-MEL-37和NW-MEL-38。以效应细胞和靶细胞分别为 $1 \times 10^5$  cells/mL的方式悬浮于培养基中,加入96孔板的各孔中,在37 $^{\circ}\text{C}$ 下共培养12小时。回收培养上清液,作为样品使用。

[0142] (ii) 试剂的调制

各样品中的IFN  $\gamma$  的测定中,使用invitrogen(注册商标)Human IFN gamma Uncoated ELISA with Plates(Thermo Fisher Scientific公司)。用纯化水将10 $\times$  Coating Buffer稀释10倍,调制Coating Buffer。将捕获抗体(抗人IFN  $\gamma$  抗体)(48  $\mu$ L)添加到Coating buffer(12 mL)中,调制捕获抗体的稀释溶液。在96孔平底板Costar(注册商标)9018(Corning公司)的各孔中分别添加该捕获抗体的稀释溶液100  $\mu$ L。将该板在4 $^{\circ}$ C下静置过夜。除去孔中的溶液,将孔用0.05% PBS-T(PBS,0.05% Tween(商标)-20)清洗5次。用纯化水将5 $\times$  Assay Diluent稀释5倍,调制Assay Diluent。在各孔中分别添加Assay Diluent 200 $\mu$ L,在室温下封闭1小时。除去孔内的Assay Diluent,将孔用0.05%PBS-T清洗5次,得到涂布有捕获抗体的板。将重组型人IFN-  $\gamma$  溶解于Assay Diluent,调制终浓度为1000 pg/mL的溶液。将该溶液分7阶段各稀释2倍,调制标准品。将检测抗体(生物素标记抗人IFN  $\gamma$  抗体)(48  $\mu$ L)加入到Coating buffer(12 mL)中,调制检测抗体的稀释溶液。将酶(链霉亲和素-HRP)(48  $\mu$ L)添加到Coating buffer(12 mL)中,调制酶的稀释溶液。

[0143] (iii) IFN  $\gamma$  的测定

将样品和标准品分别添加到板的孔中,在室温下培养2小时。将孔用0.05% PBS-T清洗5次。在各孔中分别添加检测抗体的稀释液100 $\mu$ L。将该板在室温下孵育1小时。除去孔内的溶液,将孔用0.05% PBS-T清洗5次。在各孔中各添加100 $\mu$ L的酶的稀释液。将该板在室温下培养30分钟。除去孔中的溶液,将孔用0.05% PBS-T清洗7次。在各孔中分别添加TMB底物溶液100  $\mu$ L。将该板在暗处在室温下孵育15分钟。在各孔中分别添加0.18M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50 $\mu$ L, 停止反应,立即使用酶标仪Model 680(Bio-Rad公司)测定波长450nm的吸光度。根据标准品的测定结果绘制标准曲线。将各样品的吸光度代入标准曲线,取得各样品中的IFN  $\gamma$  的浓度。将所取得的值作为各效应细胞和对照细胞的IFN  $\gamma$  分泌量。

[0144] (2) 结果

表2中示出了使用SK-MEL-37作为靶细胞、使用包含MAGE-A4-zG或其突变体的T细胞作为效应细胞时的细胞毒性活性和IFN  $\gamma$  产生的结果。另外,表3中示出了使用SK-MEL-37作为靶细胞、使用包含MAGE-A4-zG-s1或其突变体的T细胞作为效应细胞时的细胞毒性活性和IFN  $\gamma$  产生的结果。表中,“CAR的种类”是本发明人等对各CAR标注的符号,包含与CAR的变异有关的信息。“WT”示出未被改变的CAR(以下,也将WT的CAR称为“野生型”)。“CAR的种类”中包含“R”的符号示出将表中的“变异位置”所示的氨基酸残基用精氨酸残基取代的CAR。“序列编号”栏的“NA”示出编码CAR的核苷酸序列的序列编号,“AA”示出CAR的氨基酸序列的序列编号。“细胞毒性活性”的数值以将CAR的种类为WT的CAR-T细胞杀伤的靶细胞的比例设为1.00时的比示出。“3:1”和“1:1”示出效应细胞与靶细胞的细胞数的比(以下,也将该比称为“细胞混合比”)。“IFN  $\gamma$  产生”的数值以将CAR的种类为WT的CAR-T细胞的IFN  $\gamma$  产生量设为1.00时的比示出。关于表的说明对于下文的实施例的表也同样。

[0145] 如表2所示,将包含MAGE-A4-zG的T细胞的细胞毒性活性设为1.00时的各突变体的细胞毒性活性如下。

[0146] 包含MAGE-A4-zG-m1的T细胞的细胞毒性活性,在细胞混合比3:1的情况下为1.59,在细胞混合比1:1的情况下为1.14,

包含MAGE-A4-zG-m2的T细胞的细胞毒性活性,在细胞混合比3:1的情况下为1.41,在细胞混合比1:1的情况下为1.60。

[0147] 关于细胞毒性活性,包含MAGE-A4-zG-m1或MAGE-A4-zG-m2的T细胞比包含MAGE-A4-zG的T细胞高。

[0148] 另一方面,将包含MAGE-A4-zG的T细胞的IFN  $\gamma$  产生量设为1.00时的各突变体的IFN  $\gamma$  产生量如下。

[0149] 包含MAGE-A4-zG-m1的T细胞的IFN  $\gamma$  产生量为0.67,

包含MAGE-A4-zG-m2的T细胞的IFN  $\gamma$  产生量为0.47。

[0150] 关于IFN  $\gamma$  产生量,包含MAGE-A4-zG-m1或MAGE-A4-zG-m2的T细胞比包含MAGE-A4-zG的T细胞低。

[0151] 如表3所示,将包含MAGE-A4-zG-s1的T细胞的细胞毒性活性设为1.00时的包含MAGE-A4-zG-m1-s1的T细胞的细胞毒性活性,在细胞混合比3:1的情况下为2.34,在细胞混合比1:1的情况下为2.25。另一方面,将包含MAGE-A4-zG-s1的T细胞的IFN  $\gamma$  产生量设为1.00时的包含MAGE-A4-zG-m1-s1的T细胞的IFN  $\gamma$  产生量为0.66。关于细胞毒性活性,包含MAGE-A4-zG-m1-s1的T细胞比包含MAGE-A4-zG-s1的T细胞高,但关于IFN  $\gamma$  产生量,比包含MAGE-A4-zG-s1的T细胞低。

[0152] [表2]

CAR 的种类	CAR 的名称	序列编号		变异位置	细胞毒性活性		IFN $\gamma$ 产生
		NA	AA		3:1	1:1	
WT	MAGE-A4-zG	3	4	无	1.00	1.00	1.00
R1234	MAGE-A4-zG-m1	5	6	63, 65, 67, 70	1.59	1.14	0.67
R1235	MAGE-A4-zG-m2	7	8	63, 65, 67, 72	1.41	1.60	0.47

[0153] [表3]

CAR 的种类	CAR 的名称	序列编号		变异位置	细胞毒性活性		IFN $\gamma$ 产生
		NA	AA		3:1	1:1	
WT	MAGE-A4-zG-s1	9	10	无	1.00	1.00	1.00
R1234	MAGE-A4-zG-m1-s1	11	12	63, 65, 67, 70	2.34	2.25	0.66

[0154] 表4中示出了使用NW-MEL-38作为靶细胞、使用包含MAGE-A4-zG-s1或MAGE-A4-zG-m1-s1的T细胞作为效应细胞时的细胞毒性活性和IFN  $\gamma$  产生。如表4所示,将包含MAGE-A4-zG-s1的T细胞的细胞毒性活性设为1.00时的包含MAGE-A4-zG-m1-s1的T细胞的细胞毒性活性,在细胞混合比3:1的情况下为1.35,在细胞混合比1:1的情况下为1.65。关于细胞毒性活性,包含MAGE-A4-zG-m1-s1的T细胞高于包含MAGE-A4-zG-s1的T细胞。另一方面,将包含MAGE-A4-zG-s1的T细胞的IFN  $\gamma$  产生量设为1.00时的包含MAGE-A4-zG-m1-s1的T细胞的IFN  $\gamma$  产生量为0.40。包含MAGE-A4-zG-m1-s1的T细胞低于包含MAGE-A4-zG-s1的T细胞。

[0155] [表4]

CAR 的种类	CAR 的名称	序列编号		变异位置	细胞毒性活性		IFN $\gamma$ 产生
		NA	AA		3:1	1:1	
WT	MAGE-A4-zG-s1	9	10	无	1.00	1.00	1.00
R1234	MAGE-A4-zG-m1-s1	11	12	63, 65, 67, 70	1.35	1.65	0.40

[0156] 启示了本实施例的免疫细胞是抑制了细胞因子产生的CAR-T细胞。进而,该CAR-T

细胞的细胞杀伤效应提高。

[0157] 实施例2:与MAGE-A4/HLA-A2复合物结合的CAR-T细胞的制作及其效果的确认(2)

(1) 编码MAGE-A4-zG突变体的核酸分子的取得

使用编码实施例1中制作的MAGE-A4-zG的核酸分子作为模板DNA,通过PCR法,制作编码与实施例1不同的突变体的核酸分子。具体而言,如下所述。

[0158] (1.1) 引物的设计、PCR和连接反应

基于序列编号3的核苷酸序列,设计用于得到编码CAR的多核苷酸的引物组,所述CAR包含MAGE-A4-zG中的下述a)、c)、e)、f)或h)所示的氨基酸残基被精氨酸残基取代的单链抗体。另外,基于序列编号3的核苷酸序列,设计用于得到编码CAR的多核苷酸的引物组,所述CAR包含MAGE-A4-zG中的下述b)、d)或g)所示的氨基酸残基被赖氨酸残基取代的单链抗体。使用这些引物组和模板DNA,与实施例1同样地进行PCR和连接反应。

- [0159] a) 由Kabat定义的VL的第63、65和72位的氨基酸残基;  
b) 由Kabat定义的VL的第63、67和70位的氨基酸残基;  
c) 由Kabat定义的VL的第63、70和72位的氨基酸残基;  
d) 由Kabat定义的VL的第65、67和70位的氨基酸残基;  
e) 由Kabat定义的VL的第65、70和72位的氨基酸残基;  
f) 由Kabat定义的VL的第67、70和72位的氨基酸残基;  
g) 由Kabat定义的VL的第63、65、67、70和72位的氨基酸残基;和  
h) 由Kabat定义的VL的第60、74和76位的氨基酸残基

(1.2) 转化、质粒DNA的提取和测序

与实施例1同样地,使用连接反应后的溶液和DH5 $\alpha$ ,得到大肠杆菌的转化体。然后,与实施例1同样地从在液体培养基中培养的大肠杆菌中提取质粒DNA,进行测序。测序的结果确认取得了编码MAGE-A4-zG的突变体的核酸分子。

[0160] 以下,将具有将MAGE-A4-zG中的上述a)、c)、e)、f)或h)所示的氨基酸残基用精氨酸残基取代的单链抗体的CAR分别称为“MAGE-A4-zG-m5”、“MAGE-A4-zG-m7”、“MAGE-A4-zG-m9”、“MAGE-A4-zG-m10”和“MAGE-A4-zG-m12”。另外,将具有将上述b)、d)或g)所示的氨基酸残基用赖氨酸残基取代的单链抗体的CAR分别称为“MAGE-A4-zG-Km6”、“MAGE-A4-zG-Km8”和“MAGE-A4-zG-Km11”。

[0161] 在表5和6中示出各突变体与其制作用引物组的序列编号的对应关系。表6中,“第1次”表示用于取代VL的第74和76位的氨基酸残基的引物组,“第2次”表示用于取代VL的第60位的氨基酸残基的引物组。

[0162] [表5]

CAR 的名称	F	R
MAGE-A4-zG-m5	83	84
MAGE-A4-zG-Km6	85	86
MAGE-A4-zG-m7	87	88
MAGE-A4-zG-Km8	89	90
MAGE-A4-zG-m9	91	92
MAGE-A4-zG-m10	93	94
MAGE-A4-zG-Km11	95	96

[0163] [表6]

CAR 的名称	第1次		第2次	
	F	R	F	R
MAGE-A4-zG-m12	97	98	99	100

[0164] (2) 表达MAGE-A4-zG及其突变体的CAR-T细胞的制作

与实施例1同样地,在从健康供体的血液中分离培养的PBMC中,使用逆转录病毒导入编码MAGE-A4-zG及其突变体的基因,取得各CAR-T细胞。

[0165] (3) CAR-T细胞的细胞杀伤效应和细胞因子分泌量的确认

与实施例1同样地测定各CAR-T细胞的细胞毒性活性和IFN  $\gamma$  产生。靶细胞使用SK-MEL-37。MAGE-A4-zG-m5、MAGE-A4-zG-Km6、MAGE-A4-zG-m7、MAGE-A4-zG-Km8、MAGE-A4-zG-m9和MAGE-A4-zG-m10的测定,与MAGE-A4-zG-Km11和MAGE-A4-zG-m12的测定在不同的日期进行。将结果示于表7和8。表中的“CAR的种类”中包含“K”的符号示出将表中的“变异位置”所示的氨基酸残基用赖氨酸残基取代的CAR。这对于下文的实施例的表也同样。

[0166] [表7]

CAR 的种类	CAR 的名称	序列编号		变异位置	细胞毒性活性		IFN $\gamma$ 产生
		NA	AA		3:1	1:1	
WT	MAGE-A4-zG	3	4	无	1.00	1.00	1.00
R125	MAGE-A4-zG-m5	13	14	63, 65, 72	1.62	1.05	0.43
K134	MAGE-A4-zG-Km6	15	16	63, 67, 70	1.52	1.61	0.93
R145	MAGE-A4-zG-m7	17	18	63, 70, 72	1.77	0.99	0.22
K234	MAGE-A4-zG-Km8	19	20	65, 67, 70	1.47	1.36	0.91
R245	MAGE-A4-zG-m9	21	22	65, 70, 72	1.61	1.23	0.29
R345	MAGE-A4-zG-m10	23	24	67, 70, 72	1.77	0.99	0.32

[0167] [表8]

CAR 的种类	CAR 的名称	序列编号		变异位置	细胞毒性活性		IFN $\gamma$ 产生
		NA	AA		3:1	1:1	
WT	MAGE-A4-zG	3	4	无	1.00	1.00	1.00
K5	MAGE-A4-zG-Km11	25	26	63, 65, 67, 70, 72	2.33	1.68	0.89
R60_74_76	MAGE-A4-zG-m12	27	28	60, 74, 76	1.23	0.90	0.40

[0168] 如表7所示,将包含MAGE-A4-zG的T细胞的细胞毒性活性设为1.00时的各突变体的

细胞毒性活性如下。

[0169] 包含MAGE-A4-zG-m5的T细胞的细胞毒性活性,在细胞混合比为3:1的情况下为1.62,在细胞混合比为1:1的情况下为1.05,

包含MAGE-A4-zG-Km6的T细胞的细胞毒性活性,在细胞混合比为3:1的情况下为1.52,在细胞混合比为1:1的情况下为1.61,

包含MAGE-A4-zG-m7的T细胞的细胞毒性活性,在细胞混合比为3:1的情况下为1.77,在细胞混合比为1:1的情况下为0.99,

包含MAGE-A4-zG-Km8的T细胞的细胞毒性活性,在细胞混合比为3:1的情况下为1.47,在细胞混合比为1:1的情况下为1.36,

包含MAGE-A4-zG-m9的T细胞的细胞毒性活性,在细胞混合比为3:1的情况下为1.61,在细胞混合比为1:1的情况下为1.23,

包含MAGE-A4-zG-m10的T细胞的细胞毒性活性,在细胞混合比为3:1的情况下为1.77,在细胞混合比为1:1的情况下为0.99。

[0170] 另一方面,将包含MAGE-A4-zG的T细胞的IFN  $\gamma$  产生量设为1.00时的各突变体的IFN  $\gamma$  产生量如下。

[0171] 包含MAGE-A4-zG-m5的T细胞的IFN  $\gamma$  产生量为0.43,

包含MAGE-A4-zG-Km6的T细胞的IFN  $\gamma$  产生量为0.93,

包含MAGE-A4-zG-m7的T细胞的IFN  $\gamma$  产生量为0.22,

包含MAGE-A4-zG-mK8的T细胞的IFN  $\gamma$  产生量为0.91,

包含MAGE-A4-zG-m9的T细胞的IFN  $\gamma$  产生量为0.29,

包含MAGE-A4-zG-m10的T细胞的IFN  $\gamma$  产生量为0.32。

[0172] 如表8所示,将包含MAGE-A4-zG的T细胞的细胞毒性活性设为1.00时的各突变体的细胞毒性活性如下。

[0173] 包含MAGE-A4-zG-Km11的T细胞的细胞毒性活性,在细胞混合比3:1的情况下为2.33,在细胞混合比1:1的情况下为1.68,

包含MAGE-A4-zG-m12的T细胞的细胞毒性活性,在细胞混合比3:1的情况下为1.23,在细胞混合比1:1的情况下为0.90。

[0174] 另一方面,将包含MAGE-A4-zG的T细胞的IFN  $\gamma$  产生量设为1.00时的各突变体的IFN  $\gamma$  产生量如下。

[0175] 包含MAGE-A4-zG-Km11的T细胞的IFN  $\gamma$  产生量为0.89,

包含MAGE-A4-zG-m12的T细胞的IFN  $\gamma$  产生量为0.40。

[0176] 启示了本实施例的免疫细胞是抑制了细胞因子产生的CAR-T细胞。进而,在多数克隆中细胞杀伤效应提高。在MAGE-A4-zG-m12中,与野生型相比细胞杀伤效应稍微降低,但细胞因子产生被大幅抑制。该克隆可通过增加施用量而将细胞杀伤效应维持在高于野生型或同等程度,并且能够将细胞因子产生比野生型得到更好的抑制。

[0177] 实施例3:与PRAME/HLA-A24复合物结合的CAR-T细胞的制作及其效果的确认

(1) 编码成为模板的CAR的核酸分子的取得

与实施例1同样地,取得包含编码具有与PRAME/HLA-A24复合物结合的单链抗体的CAR的基因的病毒载体作用质粒DNA。该单链抗体识别的复合物为PRAME与HLA-A\*24:02的

复合物。以下,将由该质粒DNA中的基因编码的CAR称为“PRAME-zG”。上述PRAME/HLA-A24复合物中的来自PRAME的肽的氨基酸序列为LYVDSLFFL(序列编号2)。为了通过PCR法制作编码PRAME-zG的突变体的核酸分子,使用上述质粒DNA作为模板。

[0178] 编码PRAME-zG的基因的结构本身与编码实施例1的MAGE-A4-zG的基因相同。即,编码PRAME-zG的基因从5'侧依次连接有前导序列、编码VH的核苷酸序列、编码接头的核苷酸序列、编码VL的核苷酸序列、编码CL的核苷酸序列、编码CD28TM的核苷酸序列、编码CD3 $\zeta$ 的核苷酸序列和编码GITRICD的核苷酸序列(参照图2A)。PRAME-zG是包含由VH、VL和将它们连接的接头构成的单链抗体及CL作为细胞外结构域、包含CD28TM作为跨膜结构域、且包含CD3 $\zeta$ 及GITRICD作为细胞内结构域的CAR。

[0179] (2) 编码PRAME-zG突变体的核酸分子的取得

将上述质粒DNA用作模板。调制包含模板DNA、引物组(序列编号101和102)和PrimeSTAR(注册商标)Max Premix的PCR反应液,进行PCR反应。由此,得到在5'端和3'端附加了限制位点的PCR产物。在得到的PCR产物中添加DpnI,将模板质粒DNA片段化。使用DpnI处理后的PCR产物作为模板,通过PCR法,制作编码PRAME-zG的突变体的核酸分子。具体而言,如下所述。

[0180] (2.1) 引物的设计、PCR和连接反应

基于序列编号29的核苷酸序列,设计用于得到编码CAR的多核苷酸的引物组,所述CAR包含PRAME-zG中的下述a)或b)所示的氨基酸残基被精氨酸残基取代的单链抗体。另外,基于序列编号29的核苷酸序列,设计用于得到编码CAR的多核苷酸的引物组,所述CAR包含PRAME-zG中的下述c)所示的氨基酸残基被赖氨酸残基取代的单链抗体。使用这些突变体制作用引物组和上述DpnI处理后的PCR产物,与实施例1同样地进行PCR和连接反应。

- [0181] a) 由Kabat定义的VL的第63、65和72位的氨基酸残基;  
b) 由Kabat定义的VL的第63、70和72位的氨基酸残基;和  
c) 由Kabat定义的VL的第65、70和72位的氨基酸残基

(2.2) 转化、质粒DNA的提取和测序

与实施例1同样地,使用连接反应后的溶液和DH5 $\alpha$ ,得到大肠杆菌的转化体。然后,与实施例1同样地从在液体培养基中培养的大肠杆菌中提取质粒DNA,进行测序。测序的结果确认取得了编码PRAME-zG的突变体的核酸分子。

[0182] 以下,将具有将PRAME-zG中的上述a)或b)所示的氨基酸残基用精氨酸残基取代的单链抗体的CAR分别称为“PRAME-zG-m1”和“PRAME-zG-m2”。另外,将具有将上述c)所示的氨基酸残基用赖氨酸残基取代的单链抗体的CAR称为“PRAME-zG-Km3”。表9中示出各突变体与其制作用引物组的序列编号的对应关系。

[0183] [表9]

CAR的名称	F	R
PRAME-zG-m1	103	104
PRAME-zG-m2	105	106
PRAME-zG-Km3	107	108

[0184] (3) PRAME-zG及其突变体CAR-T细胞的制作

与实施例1同样地,在从健康供体的血液中分离培养的PBMC中,使用逆转录病毒导入编码PRAME-zG及其突变体的基因,取得各CAR-T细胞。

[0185] (4) CAR-T细胞的细胞杀伤效应和细胞因子分泌量的确认

与实施例1同样地测定各CAR-T细胞的细胞毒性活性和IFN  $\gamma$  产生。靶细胞使用人黑色素瘤细胞株SK-MEL-124。SK-MEL-124为PRAME阳性肿瘤细胞。在不同的日期进行PRAME-zG-m1和PRAME-zG-m2的测定,以及PRAME-zG-Km3的测定。将结果示于表10和11。

[0186] [表10]

CAR的种类	CAR的名称	序列编号		变异位置	细胞毒性活性		IFN $\gamma$ 产生
		NA	AA		3:1	1:1	
WT	PRAME-zG	29	30	无	1.00	1.00	1.00
R125	PRAME-zG-m1	31	32	63, 65, 72	2.96	2.37	0.49
R145	PRAME-zG-m2	33	34	63, 70, 72	1.84	1.54	0.56

[0187] [表11]

CAR的种类	CAR的名称	序列编号		变异位置	细胞毒性活性		IFN $\gamma$ 产生
		NA	AA		3:1	1:1	
WT	PRAME-zG	29	30	无	1.00	1.00	1.00
K245	PRAME-zG-Km3	35	36	65, 70, 72	1.16	1.71	0.87

[0188] 如表10所示,将包含PRAME-zG的T细胞的细胞毒性活性设为1.00时的各突变体的细胞毒性活性如下。

[0189] 包含PRAME-zG-m1的T细胞的细胞毒性活性,在细胞混合比3:1的情况下为2.96,在细胞混合比1:1的情况下为2.37,

包含PRAME-zG-m2的T细胞的细胞毒性活性,在细胞混合比3:1的情况下为1.84,在细胞混合比1:1的情况下为1.54。

[0190] 另一方面,将包含PRAME-zG的T细胞的IFN  $\gamma$  产生量设为1.00时的各突变体的IFN  $\gamma$  产生量如下。

[0191] 包含PRAME-zG-m1的T细胞的IFN  $\gamma$  产生量为0.49,

包含PRAME-zG-m2的T细胞的IFN  $\gamma$  产生量为0.56。

[0192] 如表11所示,将包含PRAME-zG的T细胞的细胞毒性活性设为1.00时的包含PRAME-zG-Km3的T细胞的细胞毒性活性,在细胞混合比3:1的情况下为1.16,在细胞混合比1:1的情况下为1.71。另一方面,将包含PRAME-zG的T细胞的IFN  $\gamma$  产生量设为1.00时的包含PRAME-zG-Km3的T细胞的IFN  $\gamma$  产生量为0.87。

[0193] 启示了本实施例的免疫细胞是抑制了细胞因子产生的CAR-T细胞。进而,该CAR-T细胞的细胞杀伤效应提高。

[0194] 实施例4:与CD19结合的CAR-T细胞的制作及其效果的确认

(1) 编码成为模板的CAR的核酸分子的取得

通过基因合成,取得编码与CD19结合的单链抗体(以下,也称为“抗CD19-WT”)的多核苷酸(序列编号186)。另外,作为抗CD19-WT的突变体,合成了编码抗CD19-WT中的下述a)~c)中的任一项所示的氨基酸残基被精氨酸残基取代的单链抗体的多核苷酸(序列编号

187、188和190)。

[0195] 以下,将改变了下述的a)~c)所示的氨基酸残基的单链抗体分别称为“抗CD19-m1”、“抗CD19-m2”和“抗CD19-m4”。

- [0196] a) 由Kabat定义的VL的第63、65、67和70位的氨基酸残基;  
b) 由Kabat定义的VL的第63、65、67和72位的氨基酸残基;和  
c) 由Kabat定义的VL的第65、67、70和72位的氨基酸残基

(2) 编码CD19-28z突变体的核酸分子的取得

(2.1) 第一插入物和第二插入物的制作

将分别编码上述抗CD19-WT、抗CD19-m1、抗CD19-m2和抗CD19-m4的多核苷酸用作模板,调制包含引物组(序列编号109和110)及PrimeSTAR(注册商标)Max Premix的PCR反应液,进行PCR反应。由此,得到分别编码抗CD19-WT、抗CD19-m1、抗CD19-m2和抗CD19-m4的第一插入物。通过基因合成,取得编码CD28的铰链域、跨膜结构域和细胞内结构域的多核苷酸(序列编号111)。将该多核苷酸用作模板,调制包含引物组(序列编号112和113)和PrimeSTAR(注册商标)Max Premix的PCR反应液,进行PCR反应。由此,得到编码由CD28的铰链域、跨膜结构域和细胞内结构域构成的区域的第二插入物。

[0197] (2.2) 线性化载体的制作及与插入物的融合

将包含编码CD28的跨膜结构域和细胞内结构域的多核苷酸的病毒载体作用质粒DNA(序列编号114)用作模板,调制包含引物组(序列编号115和116)和PrimeSTAR(注册商标)Max Premix的PCR反应液,进行PCR反应。在得到的PCR产物中添加DpnI,将模板质粒DNA片段化。由此,得到线状化载体。使用In-Fusion(注册商标)HD Enzyme Premix(Takara Bio株式会社)使该线状化载体与上述的第一插入物和第二插入物融合。由此,得到包含编码分别包含抗CD19-WT、抗CD19-m1、抗CD19-m2和抗CD19-m4的CAR的基因的质粒DNA。以下,将具有抗CD19-WT、抗CD19-m1、抗CD19-m2和抗CD19-m4的各单链抗体的CAR分别称为“CD19-28z”、“CD19-28z-m1”、“CD19-28z-m2”和“CD19-28z-m4”。

[0198] 作为示例,对编码CD19-28z的基因的结构进行说明。参照图2B,编码CD19-28z的基因从5'侧依次连接有前导序列、编码VL的核苷酸序列、编码接头的核苷酸序列、编码VH的核苷酸序列、编码CD28的铰链域(CD28 hinge)的核苷酸序列、编码CD28TM的核苷酸序列、编码CD28的细胞内结构域(CD28ICD)的核苷酸序列和编码CD3 $\zeta$ 的核苷酸序列。CD19-28z是包含由VH、VL和将它们连接的接头构成的单链抗体及CD28的铰链域作为细胞外结构域、包含CD28TM作为跨膜结构域、且包含CD28ICD及CD3 $\zeta$ 作为细胞内结构域的CAR。

[0199] (2.3) 引物的设计、PCR和连接反应

根据序列编号37的核苷酸序列,设计用于得到编码CAR的多核苷酸的引物组,该CAR包含CD19-28z中的下述d)、e)、g)~k)和m)~q)中的任一项所示的氨基酸残基被精氨酸残基取代的单链抗体。另外,基于序列编号37的核苷酸序列,设计用于得到编码CAR的多核苷酸的引物组,该CAR包含CD19-28z中的下述d)、f)、l)或m)所示的氨基酸残基被赖氨酸残基取代的单链抗体。使用这些引物组和模板DNA,与实施例1同样地进行PCR和连接反应。

- [0200] d) 由Kabat定义的VL的第63、65、70和72位的氨基酸残基;  
e) 由Kabat定义的VL的第60、63和65位的氨基酸残基;  
f) 由Kabat定义的VL的第63、65和70位的氨基酸残基;

- g) 由Kabat定义的VL的第63、65和72位的氨基酸残基;
- h) 由Kabat定义的VL的第63、67和70位的氨基酸残基;
- i) 由Kabat定义的VL的第63、70和72位的氨基酸残基;
- j) 由Kabat定义的VL的第65、67和70位的氨基酸残基;
- k) 由Kabat定义的VL的第65、67和72位的氨基酸残基;
- l) 由Kabat定义的VL的第65、67、70和72位的氨基酸残基;
- m) 由Kabat定义的VL的第63、65、67、70和72位的氨基酸残基;
- n) 由Kabat定义的VL的第70、72和74位的氨基酸残基;
- o) 由Kabat定义的VL的第60、63和76位的氨基酸残基;
- p) 由Kabat定义的VL的第60、74和76位的氨基酸残基;和
- q) 由Kabat定义的VL的第77、79和81位的氨基酸残基

## (2.2) 转化、质粒DNA的提取和测序

与实施例1同样地,使用连接反应后的溶液和DH5 $\alpha$ ,得到大肠杆菌的转化体。然后,与实施例1同样地从在液体培养基中培养的大肠杆菌中提取质粒DNA,进行测序。测序的结果确认取得了编码CD19-28z的突变体的核酸分子。

[0201] 以下,将具有将CD19-28z中的上述d)、e)、g)~k)及m)~q)中的任一项所示的氨基酸残基用精氨酸残基取代的单链抗体的CAR分别称为“CD19-28z-m3”、“CD19-28z-m5”、“CD19-28z-m7”、“CD19-28z-m8”、“CD19-28z-m10”、“CD19-28z-m11”、“CD19-28z-m12”、“CD19-28z-m16”、“CD19-28z-m17”、“CD19-28z-m18”、“CD19-28z-m19”和“CD19-28z-m20”。另外,将具有将上述d)、f)、l)或m)所示的氨基酸残基用赖氨酸残基取代的单链抗体的CAR分别称为“CD19-28z-Km13”、“CD19-28z-Km6”、“CD19-28z-Km14”和“CD19-28z-Km15”。在表12和13中示出各突变体与其制作用引物组的序列编号的对应关系。关于表13的CD19-CD28z-m18,“第1次”表示用于取代VL的第60和63位的氨基酸残基的引物组,“第2次”表示用于取代VL的第76位的氨基酸残基的引物组。关于CD19-28z-m19,“第1次”表示用于取代VL的第74和76位的氨基酸残基的引物组,“第2次”表示用于取代VL的第60位的氨基酸残基的引物组。

[0202] [表12]

CAR 的名称	F	R
CD19-28z-m3	117	118
CD19-28z-m5	119	120
CD19-28z-Km6	121	122
CD19-28z-m7	123	124
CD19-28z-m8	125	126
CD19-28z-m10	127	128
CD19-28z-m11	129	130
CD19-28z-m12	131	132
CD19-28z-Km13	133	134
CD19-28z-Km14	135	136
CD19-28z-Km15	137	138
CD19-28z-m16	139	140
CD19-28z-m17	141	142
CD19-28z-m20	151	152

[0203] [表13]

CAR 的名称	第1次		第2次	
	F	R	F	R
CD19-28z-m18	143	144	145	146
CD19-28z-m19	147	148	149	150

[0204] (3) CD19-28z及表达其突变体的CAR-T细胞的制作

与实施例1同样地,在从健康供体的血液中分离培养的PBMC中,使用逆转录病毒导入编码CD19-28z及其突变体的基因,取得各CAR-T细胞。

[0205] (4) CAR-T细胞的细胞杀伤效应和细胞因子分泌量的确认

与实施例1同样地测定各CAR-T细胞的细胞毒性活性和IFN  $\gamma$  产生。此外,在一部分实验中,效应细胞与靶细胞的细胞数的比率为2:1(参照表16)。靶细胞使用人B前体细胞白血病细胞株Na1m-6。Na1m-6是CD19阳性肿瘤细胞。将测定的结果示于表14-17。各表的结果基于在相互不同的日期进行的测定。

[0206] [表14]

CAR 的种类	CAR 的名称	序列编号		变异位置	细胞毒性活性		IFN $\gamma$ 产生
		NA	AA		3:1	1:1	
WT	CD19-28z	37	38	无	1.00	1.00	1.00
R1234	CD19-28z-m1	39	40	63, 65, 67, 70	1.03	1.30	0.25
R1235	CD19-28z-m2	41	42	63, 65, 67, 72	0.90	1.19	0.24
R1245	CD19-28z-m3	43	44	63, 65, 70, 72	0.91	1.26	0.26

[0207] [表15]

CAR 的种类	CAR 的名称	序列编号		变异位置	细胞毒性活性		IFN $\gamma$ 产生
		NA	AA		3:1	1:1	
WT	CD19-28z	37	38	无	1.00	1.00	1.00
R1234	CD19-28z-m1	39	40	63, 65, 67, 70	1.00	1.56	0.31
R1245	CD19-28z-m3	43	44	63, 65, 70, 72	1.09	1.37	0.27
R2345	CD19-28z-m4	45	46	65, 67, 70, 72	1.17	1.49	0.29

[0208] [表16]

CAR 的种类	CAR 的名称	序列编号		变异位置	细胞毒性活性		IFN $\gamma$ 产生
		NA	AA		2:1	1:1	
WT	CD19-28z	37	38	无	1.00	1.00	1.00
R60_63_65	CD19-28z-m5	47	48	60, 63, 65	1.09	0.95	0.34
K124	CD19-28z-Km6	49	50	63, 65, 70	1.50	1.13	0.20
R125	CD19-28z-m7	51	52	63, 65, 72	1.58	1.11	0.13
R134	CD19-28z-m8	53	54	63, 67, 70	1.61	1.19	0.08
R145	CD19-28z-m10	55	56	63, 70, 72	1.59	0.98	0.21
R234	CD19-28z-m11	57	58	65, 67, 70	1.40	1.06	0.17
R235	CD19-28z-m12	59	60	65, 67, 72	1.47	1.39	0.16
K1245	CD19-28z-Km13	61	62	63, 65, 70, 72	1.68	1.37	0.13
K2345	CD19-28z-Km14	63	64	65, 67, 70, 72	1.72	1.34	0.13
K5	CD19-28z-Km15	65	66	63, 65, 67, 70, 72	1.29	1.23	0.14
R5	CD19-28z-m16	67	68	63, 65, 67, 70, 72	1.93	1.32	0.15

[0209] [表17]

CAR 的种类	CAR 的名称	序列编号		变异位置	细胞毒性活性		IFN $\gamma$ 产生
		NA	AA		3:1	1:1	
WT	CD19-28z	37	38	无	1.00	1.00	1.00
R70_72_74	CD19-28z-m17	69	70	70, 72, 74	1.43	2.43	0.34
R60_63_76	CD19-28z-m18	71	72	60, 63, 76	1.27	1.42	0.28
R60_74_76	CD19-28z-m19	73	74	60, 74, 76	1.38	1.76	0.68
R77_79_81	CD19-28z-m20	75	76	77, 79, 81	1.57	1.90	0.39

[0210] 如表14所示,将包含CD19-28z的T细胞的细胞毒性活性设为1.00时的各突变体的细胞毒性活性如下。

[0211] 包含CD19-28z-m1的T细胞的细胞毒性活性,在细胞混合比3:1的情况下为1.03,在细胞混合比1:1的情况下为1.30,

包含CD19-28z-m2的T细胞的细胞毒性活性,在细胞混合比3:1的情况下为0.90,在细胞混合比1:1的情况下为1.19,

包含CD19-28z-m3的T细胞的细胞毒性活性,在细胞混合比3:1的情况下为0.91,在细胞混合比1:1的情况下为1.26。

[0212] 另一方面,将包含CD19-28z的T细胞的IFN  $\gamma$  产生量设为1.00时的各突变体的IFN  $\gamma$  产生量如下。

[0213] 包含CD19-28z-m1的T细胞的IFN  $\gamma$  产生量为0.25,  
包含CD19-28z-m2的T细胞的IFN  $\gamma$  产生量为0.24,  
包含CD19-28z-m3的T细胞的IFN  $\gamma$  产生量为0.26。

[0214] 如表15所示,将包含CD19-28z的T细胞的细胞毒性活性设为1.00时的各突变体的细胞毒性活性如下。

[0215] 包含CD19-28z-m1的T细胞的细胞毒性活性,在细胞混合比3:1的情况下为1.00,在细胞混合比1:1的情况下为1.56,

包含CD19-28z-m3的T细胞的细胞毒性活性,在细胞混合比3:1的情况下为1.09,在细胞混合比1:1的情况下为1.37,

包含CD19-28z-m4的T细胞的细胞毒性活性,在细胞混合比3:1的情况下为1.17,在细胞混合比1:1的情况下为1.49。

[0216] 另一方面,将包含CD19-28z的T细胞的IFN  $\gamma$  产生量设为1.00时的各突变体的IFN  $\gamma$  产生量如下。

[0217] 包含CD19-28z-m1的T细胞的IFN  $\gamma$  产生量为0.31,

包含CD19-28z-m3的T细胞的IFN  $\gamma$  产生量为0.27,

包含CD19-28z-m4的T细胞的IFN  $\gamma$  产生量为0.29。

[0218] 如表16所示,将包含CD19-28z的T细胞的细胞毒性活性设为1.00时的各突变体的细胞毒性活性如下。

[0219] 包含CD19-28z-m5的T细胞的细胞毒性活性,在细胞混合比2:1的情况下为1.09,在细胞混合比1:1的情况下为0.95,

包含CD19-28z-Km6的T细胞的细胞毒性活性,在细胞混合比2:1的情况下为1.50,在细胞混合比1:1的情况下为1.13,

包含CD19-28z-m7的T细胞的细胞毒性活性,在细胞混合比2:1的情况下为1.58,在细胞混合比1:1的情况下为1.11,

包含CD19-28z-m8的T细胞的细胞毒性活性,在细胞混合比2:1的情况下为1.61,在细胞混合比1:1的情况下为1.19,

包含CD19-28z-m10的T细胞的细胞毒性活性,在细胞混合比2:1的情况下为1.59,在细胞混合比1:1的情况下为0.98,

包含CD19-28z-m11的T细胞的细胞毒性活性,在细胞混合比1:1的情况下为1.40,在细胞混合比1:1的情况下为1.06,

包含CD19-28z-m12的T细胞的细胞毒性活性,在细胞混合比2:1的情况下为1.47,在细胞混合比1:1的情况下为1.39,

包含CD19-28z-Km13的T细胞的细胞毒性活性,在细胞混合比2:1的情况下为1.68,在细胞混合比1:1的情况下为1.37,

包含CD19-28z-Km14的T细胞的细胞毒性活性,在细胞混合比2:1的情况下为1.72,在细胞混合比1:1的情况下为1.34,

包含CD19-28z-Km15的T细胞的细胞毒性活性,在细胞混合比2:1的情况下为1.29,在细胞混合比1:1的情况下为1.23,

包含CD19-28z-m16的T细胞的细胞毒性活性,在细胞混合比2:1的情况下为1.93,

在细胞混合比1:1的情况下为1.32。

[0220] 另一方面,将包含CD19-28z的T细胞的IFN  $\gamma$  产生量设为1.00时的各突变体的IFN  $\gamma$  产生量如下。

[0221] 包含CD19-28z-m5的T细胞的IFN  $\gamma$  产生量为0.34,  
包含CD19-28z-m6的T细胞的IFN  $\gamma$  产生量为0.20,  
包含CD19-28z-m7的T细胞的IFN  $\gamma$  产生量为0.13,  
包含CD19-28z-m8的T细胞的IFN  $\gamma$  产生量为0.08,  
包含CD19-28z-m10的T细胞的IFN  $\gamma$  产生量为0.21,  
包含CD19-28z-m11的T细胞的IFN  $\gamma$  产生量为0.17,  
包含CD19-28z-m12的T细胞的IFN  $\gamma$  产生量为0.16,  
包含CD19-28z-Km13的T细胞的IFN  $\gamma$  产生量为0.13,  
包含CD19-28z-Km14的T细胞的IFN  $\gamma$  产生量为0.13,  
包含CD19-28z-Km15的T细胞的IFN  $\gamma$  产生量为0.14,  
包含CD19-28z-m16的T细胞的IFN  $\gamma$  产生量为0.15。

[0222] 如表17所示,将包含CD19-28z的T细胞的细胞毒性活性设为1.00时的各突变体的细胞毒性活性如下。

[0223] 包含CD19-28z-m17的T细胞的细胞毒性活性,在细胞混合比3:1的情况下为1.43,在细胞混合比1:1的情况下为2.43,

包含CD19-28z-m18的T细胞的细胞毒性活性,在细胞混合比3:1的情况下为1.27,在细胞混合比1:1的情况下为1.42,

包含CD19-28z-m19的T细胞的细胞毒性活性,在细胞混合比3:1的情况下为1.38,在细胞混合比1:1的情况下为1.76,

包含CD19-28z-m20的T细胞的细胞毒性活性,在细胞混合比3:1的情况下为1.57,在细胞混合比1:1的情况下为1.90。

[0224] 另一方面,将包含CD19-28z的T细胞的IFN  $\gamma$  产生量设为1.00时的各突变体的IFN  $\gamma$  产生量如下。

[0225] 包含CD19-28z-m17的T细胞的IFN  $\gamma$  产生量为0.34,  
包含CD19-28z-m18的T细胞的IFN  $\gamma$  产生量为0.28,  
包含CD19-28z-m19的T细胞的IFN  $\gamma$  产生量为0.68,  
包含CD19-28z-m20的T细胞的IFN  $\gamma$  产生量为0.39。

[0226] 如实施例1-4所示,本发明的免疫细胞的IFN  $\gamma$  产生量在将野生型设为1.00时示出0.08-0.93的值,与野生型相比均降低。该CAR-T细胞的细胞毒性活性在野生型为1.00时示出0.90-2.96的值,与野生型相比,在多数克隆中维持或提高细胞毒性活性。

[0227] 实施例5:基于CAR-T细胞施用的体内癌症治疗模型实验

(1) 材料和方法

(1.1) 实验动物

NOG小鼠(NOD/Shi-scid,IL-2R  $\gamma$  KO Jic)购自日本CLEA株式会社。实验使用7-8周龄的雌性小鼠。

[0228] (1.2) 人肿瘤的移植和CAR-T细胞的施用

使用NW-MEL-38作为肿瘤细胞。作为效应细胞,使用实施例1中制作的包含MAGE-A4-zG-s1的CAR-T细胞和包含MAGE-A4-zG-m1-s1的CAR-T细胞。在12只NOG小鼠体侧以 $5 \times 10^6$  cells/只皮下注射NW-MEL-38。在肿瘤细胞移植4天后,以 $5 \times 10^6$  cells/只从尾静脉输注PBS、包含MAGE-A4-zG-s1的T细胞、或包含MAGE-A4-zG-m1-s1的CAR-T细胞。施用PBS的组、施用包含MAGE-A4-zG-s1的CAR-T细胞的组和施用包含MAGE-A4-zG-m1-s1的CAR-T细胞组均为n=4。每隔2天或3天测定肿瘤直径。

[0229] (2) 结果

记录各组肿瘤面积平均值的图如图3所示。从图3可以看出,与施用PBS的组相比,施用包含MAGE-A4-zG-s1的CAR-T细胞的组和施用包含MAGE-A4-zG-m1-s1的CAR-T细胞的组中,肿瘤直径缩小。另外,施用包含MAGE-A4-zG-m1-s1的CAR-T细胞的组中,与施用包含MAGE-A4-zG-s1的CAR-T细胞的组相比,肿瘤直径缩小。因此,启示通过将CAR所含的单链抗体的轻链FR3的至少3个氨基酸残基改变为碱性氨基酸残基,能够提高包含CAR的免疫细胞的抗肿瘤活性。

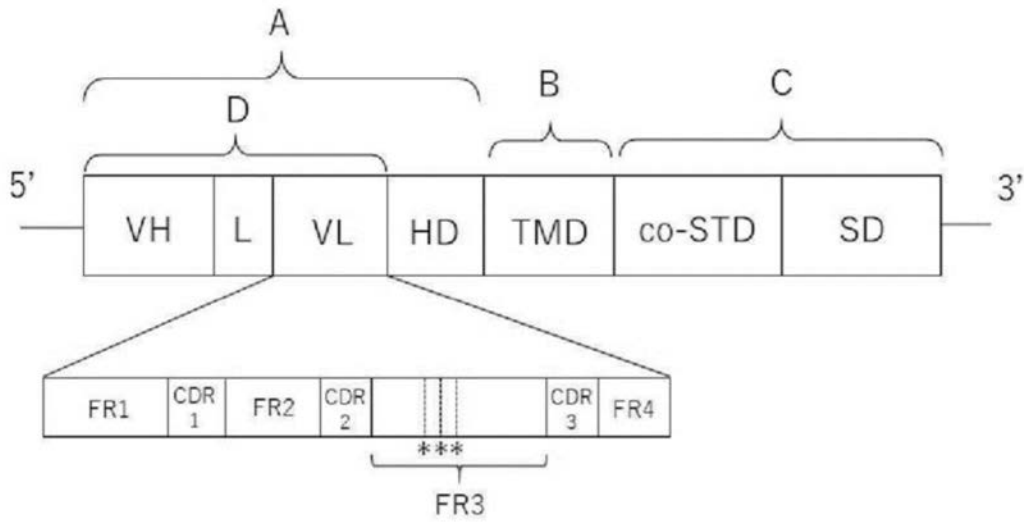


图1A

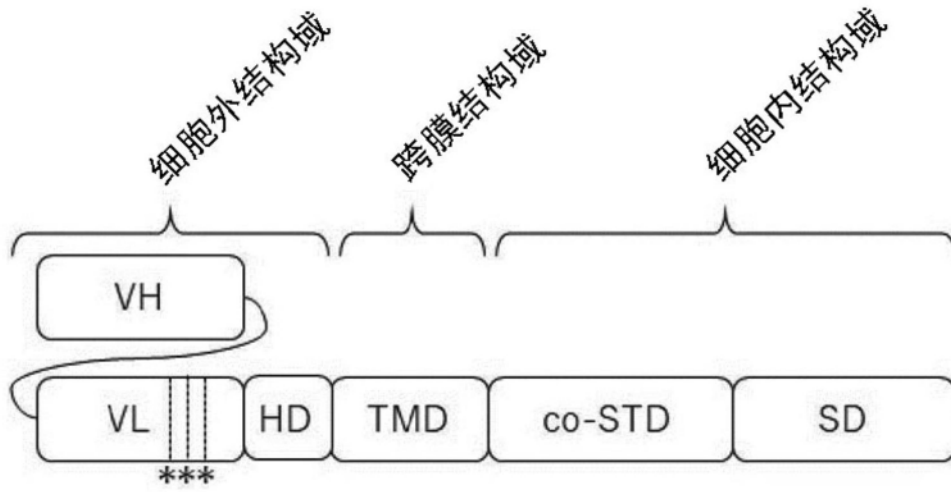


图1B

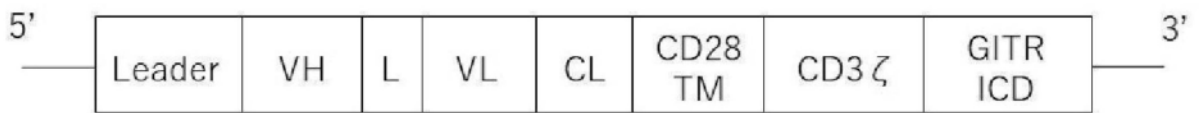


图2A



图2B

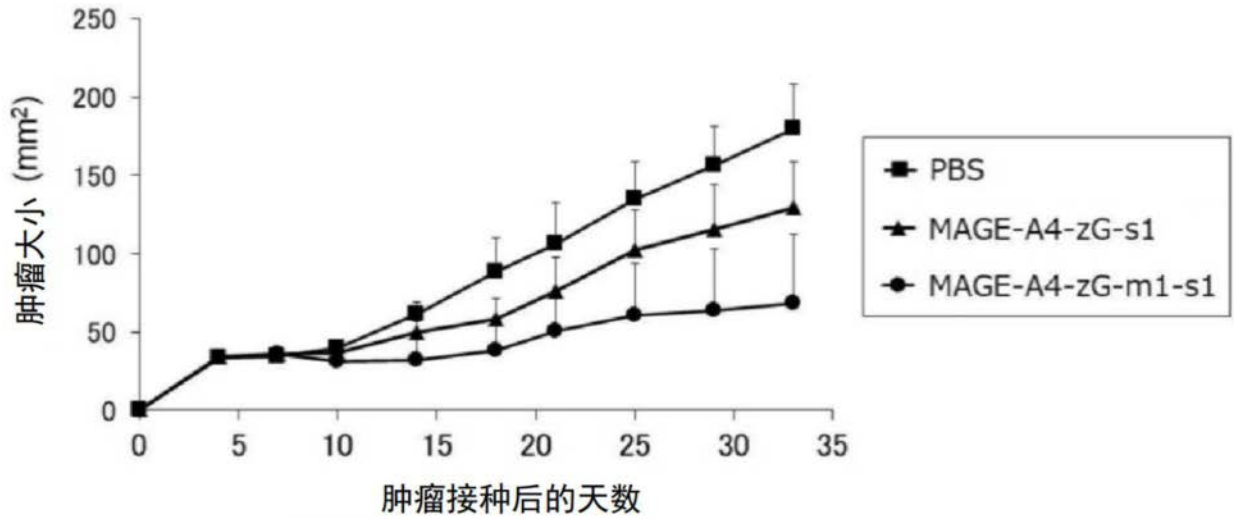


图3