



- (21)申請案號：108108890 (22)申請日：中華民國 108 (2019) 年 03 月 15 日
- (51)Int. Cl. : *C12N15/62 (2006.01)* *A61K35/12 (2015.01)*  
*A61P35/02 (2006.01)* *C12N5/10 (2006.01)*  
*C12N15/12 (2006.01)* *C12N15/13 (2006.01)*  
*C12N15/27 (2006.01)* *C12N15/85 (2006.01)*
- (30)優先權：2018/03/16 日本 2018-050266
- (71)申請人：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)；長谷川藍子 HASEGAWA, AIKO (JP)；田中美幸 TANAKA, MIYUKI (JP)；中野茂 NAKANO, SHIGERU (JP)；成松翔伍 NARIMATSU, SHOGO (JP)
- (74)代理人：陳長文
- (56)參考文獻：
- CN 106543288A
- 期刊 Nakazawa Y, et al., "Anti-proliferative effects of T cells expressing a ligand-based chimeric antigen receptor against CD116 on CD34(+) cells of juvenile myelomonocytic leukemia", Journal of Hematology & Oncology, Vol.9, No.27, 無, 16 March 2016, <https://doi.org/10.1186/s13045-016-0256-3>
- 期刊 TIMOTHY R. HERCUS, et al., "Specific human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor antagonists", Proc. Natl. Acad. Sci., Vol.91, No.13, 無, 21 June 1994, Pages 5838-5842
- 審查人員：吳思瑩
- 申請專利範圍項數：12 項 圖式數：31 共 97 頁

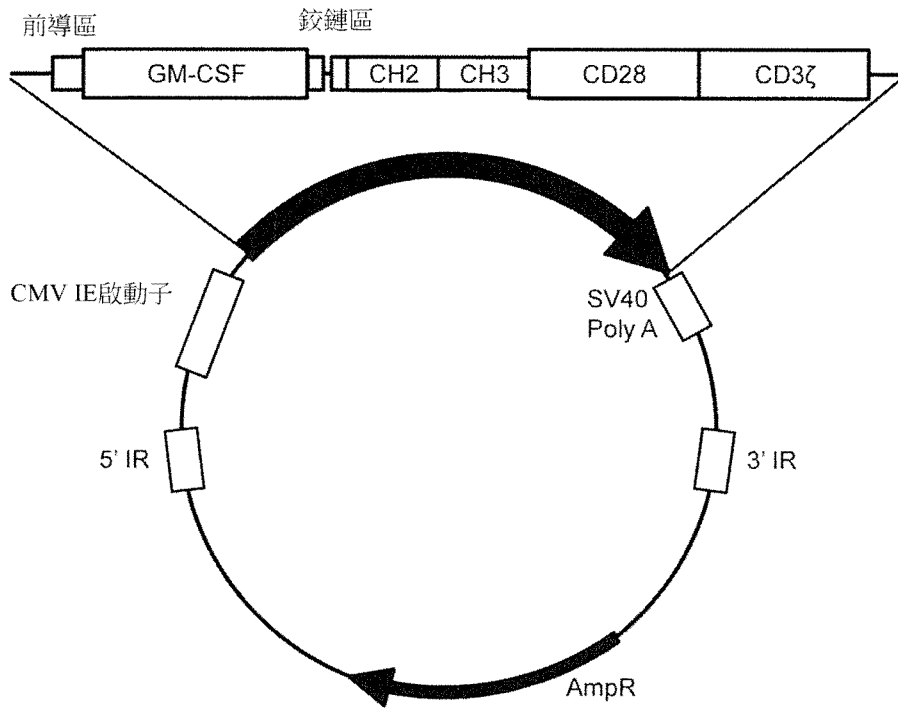
## (54)名稱

基因修飾細胞及其製備方法

## (57)摘要

本發明係關於一種具有優異之靶細胞毒殺性之變異型嵌合抗原受體(CAR)表現細胞之製備。本發明提供一種基因修飾細胞，其係導入有編碼具有與人類粒細胞-巨噬細胞菌落刺激因子(GM-CSF)受體特異性地結合之標靶結合區、跨膜區、及細胞內訊號傳遞區之嵌合抗原受體(CAR)蛋白質之聚核苷酸者，且上述標靶結合區為序列編號 1 所表示之胺基酸序列中之第 21 號麩胺酸被置換為其他胺基酸之變異體。

指定代表圖：



【圖1】



I817994

## 【發明摘要】

### 【中文發明名稱】

基因修飾細胞及其製備方法

### 【中文】

本發明係關於一種具有優異之靶細胞毒殺性之變異型嵌合抗原受體(CAR)表現細胞之製備。

本發明提供一種基因修飾細胞，其係導入有編碼具有與人類粒細胞-巨噬細胞菌落刺激因子(GM-CSF)受體特異性地結合之標靶結合區、跨膜區、及細胞內訊號傳遞區之嵌合抗原受體(CAR)蛋白質之聚核苷酸者，且上述標靶結合區為序列編號1所表示之胺基酸序列中之第21號麩胺酸被置換為其他胺基酸之變異體。

### 【指定代表圖】

圖1

### 【代表圖之符號簡單說明】

無

## 【發明說明書】

### 【中文發明名稱】

基因修飾細胞及其製備方法

### 【技術領域】

【0001】 本發明係關於一種於過繼免疫療法之領域中較有用之表現嵌合抗原受體之基因修飾細胞及其製備方法。

【0002】 若更詳細地進行說明，則本發明係關於一種基因修飾細胞及該等之製備方法及醫藥用途等，該基因修飾細胞具有優異之靶細胞毒殺性，且導入有編碼人類粒細胞-巨噬細胞菌落刺激因子(GM-CSF)受體特異性變異型嵌合抗原受體之聚核苷酸。

### 【先前技術】

【0003】 業界報告稱使用有表現以腫瘤相關抗原作為標靶之嵌合抗原受體(CAR, chimeric antigen receptor)之T細胞(CAR-T)之過繼免疫療法之抗腫瘤效果較強，且近年來急速地進行開發。尤其是於B細胞上表現之CD19未於造血幹細胞中表現，而於B系列腫瘤細胞中表現，故而為過繼免疫療法之理想標靶。因此，業界不斷進行以對B細胞腫瘤之治療作為目標之CAR之開發，且於臨床試驗中亦表現出顯著效果，而受到較高之關注。

【0004】 另一方面，業界正在開發對其他腫瘤細胞之CAR-T療法。例如，幼年型骨髓單核細胞性白血病(JMML)或急性骨髓性白血病(AML)係作為預後不良之白血病而為人所知，且期待開發CAR-T療法。迄今為止，業界將CD33、CD123等作為標靶而進行臨床試驗。又，報告有著眼於GM-CSF受體於幼年型骨髓單核細胞性白血病(JMML)或急性骨髓性白

血病(AML)之腫瘤細胞表面進行高表現之GM-CSF受體特異性嵌合抗原受體(以下，稱為GMR.CAR)(非專利文獻1、2)。然而，針對AML之CAR-T療法尚未發現於臨床上有效者，且於使腫瘤細胞植活於生物體內之動物實驗中亦未確認到充分之效果(非專利文獻3、4)。作為未開發針對JMML或AML之CAR-T療法之原因，例如可列舉難以進行標靶抗原之選擇之方面。

**【0005】** 已知於將骨髓系抗原作為CAR-T療法之標靶抗原情形時，不僅於腫瘤細胞中表現，亦於正常之骨髓系細胞或樹狀細胞等中表現，且有可能產生由脫靶效應(on-target/off-tumor)反應所引起之問題(非專利文獻3、4、5)。因此，要求探索針對上述疾病之新穎標靶抗原並且提供安全且於生物體內具有優異效果之CAR。

[先前技術文獻]

[非專利文獻]

**【0006】**

非專利文獻1：Journal of Hematology & Oncology, 2016, 9: 27,  
DOI 10.1186/s13045-016-0256-3

非專利文獻2：The 22nd Annual Meeting JSGCT2016: Japan Society of Gene and Cell Therapy Program and Abstracts, 2016. 07. 13,  
P0-70

非專利文獻3：Journal of Hematology & Oncology, 2017, 10: 151,  
DOI 10.1186/s13045-017-0519-7

非專利文獻4：Blood, 2013, 122 (18), 3138-3148

非專利文獻5：Blood Cancer Journal, 2016, 6, e458; doi:

10.1038/bcj. 2016. 61

**【發明內容】**

[發明所欲解決之問題]

**【0007】** 如上所述，將骨髓系抗原等作為標靶之CAR-T技術尚在開發中，期待開發出安全性較高且發揮於生物體內之優異效果之CAR。

[解決問題之技術手段]

**【0008】** 本發明者等人為了解決上述課題而進行努力研究。其結果為，發現對使用GM-CSF多肽之胺基酸殘基第21號麩胺酸被置換為其他胺基酸之變異型GM-CSF作為標靶結合區之GM-CSF受體特異性變異型嵌合抗原受體(以下，記載為「變異型GMR.CAR」)進行基因導入所得之T細胞(以下，記載為「變異型GMR.CAR-T細胞」)於AML等之治療中兼具優異之細胞毒殺活性與安全性。

**【0009】** 即，本發明如下所述。

[1]一種基因修飾細胞，其係導入有編碼具有與人類粒細胞-巨噬細胞菌落刺激因子(GM-CSF)受體特異性地結合之標靶結合區、跨膜區、及細胞內訊號傳遞區之嵌合抗原受體(CAR, chimeric antigen receptor)蛋白質之聚核苷酸者，且上述標靶結合區係具有序列編號1所表示之胺基酸序列中之第21號麩胺酸被置換為其他胺基酸之序列之變異體多肽。

[2]如上述[1]中所記載之細胞，其於細胞膜上表現與GM-CSF受體結合之CAR蛋白質。

[3]如上述[1]或[2]中所記載之細胞，其中CAR蛋白質進而包含共刺激區及/或細胞外間隔區。

[4]如上述[1]至[3]中任一項所記載之細胞，其中細胞內訊號傳遞區

為人類CD3 $\zeta$ 。

[5]如上述[3]或[4]中所記載之細胞，其中共刺激區為人類CD28或人類4-1BB。

[6]如上述[3]至[5]中任一項所記載之細胞，其中細胞外間隔區包含人類IgG1之鉸鏈、CH2、及/或CH3區或其一部分、及/或人工間隔序列。

[7]如上述[1]至[6]中任一項所記載之細胞，其中標靶結合區係具有序列編號1所表示之胺基酸序列中之第21號麩胺酸被置換為精胺酸或離胺酸之序列之變異體多肽。

[8]一種CAR蛋白質表現細胞之製備方法，其包含使用載體將編碼與人類GM-CSF受體特異性地結合之嵌合抗原受體(CAR)蛋白質之聚核苷酸導入至細胞之操作，且上述蛋白質包含序列編號1所表示之胺基酸序列中之第21號麩胺酸被置換為其他胺基酸之胺基酸序列。

[9]一種載體，其係包含編碼與人類GM-CSF受體特異性地結合之嵌合抗原受體(CAR)蛋白質之聚核苷酸者，且上述蛋白質包含序列編號1所表示之胺基酸序列中之第21號麩胺酸被置換為其他胺基酸之胺基酸序列。

[10]一種針對與GM-CSF受體表現細胞相關之疾病之治療劑，其包含如上述[1]至[7]中任一項所記載之細胞。

[11]一種醫藥組合物，其包含如上述[10]中所記載之治療劑及醫藥上所容許之載體。

[12]如上述[10]中所記載之治療劑或如上述[11]中所記載之組合物，其中與GM-CSF受體表現細胞相關之疾病係選自幼年型骨髓單核細胞性白血病(JMML)、急性骨髓性白血病(AML)、神經膠質瘤(glioma)、神經母細胞瘤、神經膠母細胞瘤、腦腫瘤、直腸結腸腺癌、前列腺癌、腎癌、黑

色素瘤及肺小細胞癌。

本說明書包含成為本案之優先權之基礎之日本專利申請編號2018-050266號之揭示內容。

[發明之效果]

**【0010】** 本發明之 GMR.CAR-T 細胞於將以急性骨髓性白血病 (AML) 為代表之於細胞表面表現 GM-CSF 受體之各種細胞作為標靶之過繼免疫療法中，安全性優異，且顯示出較強之腫瘤細胞毒殺作用。

**【圖式簡單說明】**

**【0011】** 圖1表示CAR001之載體圖。

圖2表示間隔區經修飾之 GMR.CAR(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> 部分缺失體、GMR.CAR dCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)之載體圖之例。

圖3表示間隔區經修飾之 GMR.CAR(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> 部分缺失-(G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub> 插入體、GMR.CAR dCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>+(G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>)之載體圖之例。

圖4表示間隔區經修飾之 (E<sub>21</sub>R)GMR.CAR(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> 部分缺失體、E<sub>21</sub>RGMR.CAR dCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)之載體圖之例。

圖5表示間隔區經修飾之 (E<sub>21</sub>K)GMR.CAR(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> 部分缺失體、E<sub>21</sub>KGMR.CAR dCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)之載體圖之例。

圖6表示間隔區經修飾之 (E<sub>21</sub>R)GMR.CAR(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> 部分缺失-(G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub> 插入體、E<sub>21</sub>RGMR.CAR dCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>+(G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>)之載體圖之例。

圖7表示間隔區經修飾之 (E<sub>21</sub>K)GMR.CAR(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> 部分缺失-(G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub> 插入體、E<sub>21</sub>KGMR.CAR dCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>+(G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>)之載體圖之例。

圖8表示導入有編碼CAR之聚核苷酸之CAR-T細胞(CAR-T 001~CAR-T 008)於第14天之GM-CSF表現分析之結果。



圖9表示CAR-T 001~CAR-T 008對於THP-1細胞之抗腫瘤細胞活性%。

圖10表示導入有編碼CAR之聚核苷酸之CAR-T細胞(CAR-T 001-A、CAR-T 009~CAR-T 014)於第14天之GM-CSF表現分析之結果。

圖11表示CAR-T 001-A及CAR-T 009~CAR-T 014對於THP-1細胞之抗腫瘤細胞活性%。

圖12表示導入有編碼CAR之聚核苷酸之CAR-T細胞(CAR-T 010-A~CAR-T 014-A)於第14天之GM-CSF表現分析之結果。

圖13表示CAR-T 010-A~CAR-T 014-A對於THP-1細胞之於E:T比=1:1下之持續性腫瘤細胞殺傷能力。

圖14表示CAR-T 010-A~CAR-T 014-A對於MV4-11細胞之於E:T比=1:1下之持續性腫瘤細胞殺傷能力。

圖15表示CAR-T 010-A~CAR-T 014-A對於Kasumi-1細胞之於E:T比=1:1下之持續性腫瘤細胞殺傷能力。

圖16表示CAR-T 010-A~CAR-T 014-A對於shinAML-1細胞之於E:T比=1:1下之持續性腫瘤細胞殺傷能力。

圖17表示圖13~16中之孔內之腫瘤細胞數。

圖18表示導入有編碼CAR之聚核苷酸之CAR-T細胞(CAR-T 001-B及CAR-T 009-B~CAR-T 014-B)於第14天之GM-CSF表現分析之結果。

圖19表示E:T比1:1及1:10下之相對於MV4-11細胞之腫瘤存活細胞數相對比與相對於末梢血細胞之存活細胞數相對比。

圖20表示相對於源自健康人之骨髓細胞之自以各E:T比繪製之點描繪之S型曲線。

圖21表示相對於MV4-11細胞之自以各E：T比繪製之點描繪之S型曲線。

圖22表示基於根據圖20算出之IC50值、根據圖21算出之EC50值而算出之安全範圍。

圖23表示導入有編碼CAR之聚核苷酸之CAR-T細胞(CAR-T 009-C、CAR-T 011-C及CAR-T 012-C)於第14天之GM-CSF表現分析之結果。

圖24表示CAR-T 009-C、CAR-T 011-C及CAR-T 012-C於THP-1帶癌小鼠模型中之實驗結果。

圖25表示導入有編碼CAR之聚核苷酸之CAR-T細胞(CAR-T 009-D~CAR-T 014-D)於第14天之GM-CSF表現分析之結果。

圖26表示CAR-T 009-D、CAR-T 011-D及CAR-T 012-D於MV4-11帶癌小鼠模型中之實驗結果。

圖27表示CAR-T 010-D、CAR-T 013-D及CAR-T 014-D於MV4-11帶癌小鼠模型中之實驗結果。

圖28表示CAR-T 009-D~CAR-T 014-D於第52天之末梢血中腫瘤之定量PCR之結果。(ND表示無法檢測)

圖29表示導入有編碼CAR之聚核苷酸之CAR-T細胞(CAR-T 001-C、CAR-T 014-F、及比較對照之CD19 T細胞)於第14天之GM-CSF表現分析之結果。

圖30表示CAR-T 001-C及CAR-T 014-F於MV4-11帶癌小鼠模型中之實驗結果。

圖31表示導入有編碼CAR之聚核苷酸之CAR-T細胞(CAR-T 014-E)於第14天之GM-CSF表現分析之結果。

**【實施方式】**

**【0012】** 以下對本發明之實施形態詳細地進行說明。

於本說明書中，所謂「嵌合抗原受體(CAR)」係指可將標靶特異性移植至T細胞(例如初始T細胞、幹細胞記憶T細胞、中央記憶T細胞、效應細胞記憶T細胞、或該等之組合等T細胞)等細胞之修飾受體。又，CAR亦作為人工T細胞受體、嵌合T細胞受體、或嵌合免疫受體而為人所知。

**【0013】** 於本說明書中，所謂「區」為多肽內之區域，表示獨立於其他區域而摺疊為特定結構之區域。

**【0014】** 於在本說明書中使用之情形時，於「聚核苷酸」中包含天然或合成之DNA(Deoxyribonucleic Acid，去氧核糖核酸)及RNA(Ribonucleic Acid，核糖核酸)、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(核內小分子RNA)、snoRNA(核仁小分子RNA)、miRNA(微小RNA)、及/或tRNA，但並不限定於該等。

**【0015】** 於本說明書中，所謂「編碼」係指如該領域中通常所使用般，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」之上下文中使用正義鏈及反義鏈之兩者。

**【0016】** 如上所述，本發明提供一種基因修飾細胞，其係導入有編碼具有與人類粒細胞-巨噬細胞菌落刺激因子(GM-CSF)受體特異性地結合之標靶結合區、跨膜區、及細胞內訊號傳遞區之嵌合抗原受體(CAR)蛋白質之聚核苷酸者，且上述標靶結合區係具有序列編號1所表示之胺基酸序列中之第21號麩胺酸被置換為其他胺基酸之序列之變異體多肽。

於本說明書中，所謂「具有～序列」包含含有所記載之序列以外之

序列之情形，又，亦可包含僅含有所記載之序列之情形(即「由～序列構成」)。

**【0017】** 本發明之CAR蛋白質包含與人類GM-CSF受體特異性地結合之「標靶結合區」。標靶(GM-CSF受體)結合區對GM-CSF受體顯示出特異性之結合性，能夠對在細胞表面上表現GM-CSF受體之靶細胞進行特異性免疫應答。

**【0018】** 因此，作為GM-CSF受體結合區，可使用作為與具有序列編號1之胺基酸序列之GM-CSF受體結合之細胞激素之GM-CSF之胺基酸殘基第21號麩胺酸被置換為其他胺基酸之多肽。或者，只要保持對於GM-CSF受體之結合能力，則亦可使用於其他胺基酸殘基部分亦被置換之變異體。進而，只要保持對於GM-CSF受體之結合能力，則亦可使用該等多肽之片段、即結合性片段。

**【0019】** 作為GM-CSF之胺基酸殘基第21號胺基酸被置換為其他胺基酸之多肽，只要為保持對GM-CSF受體之結合活性者，則並無特別限定，例如可使用置換為精胺酸(序列編號2之胺基酸序列)、置換為離胺酸(序列編號3之胺基酸序列)、置換為組胺酸(序列編號4之胺基酸序列)、置換為天冬胺酸(序列編號5之胺基酸序列)、置換為絲胺酸(序列編號6之胺基酸序列)、置換為丙胺酸(序列編號7之胺基酸序列)、置換為苯丙胺酸(序列編號8之胺基酸序列)等。

**【0020】** 作為較佳之態樣，可使用GM-CSF之胺基酸殘基第21號胺基酸被置換為作為鹼性胺基酸之精胺酸、離胺酸、或組胺酸之多肽。

**【0021】** 作為更佳之態樣，可使用GM-CSF之胺基酸殘基第21號胺基酸被置換為精胺酸或離胺酸之多肽。

【0022】 此處，所謂具有「對於人類GM-CSF受體之結合能力」意指對於人類GM-CSF受體之結合常數例如為1-1000 nM以下。該結合能力可為和抗原與抗體之結合能力相比相對較弱之結合。

【0023】 再者，標靶結合區只要為保持對於人類GM-CSF受體之結合能力者，則可代替上述多肽而使用。例如可使用作為源自保持與GM-CSF受體之結合能力之抗體之單鏈多肽的單鏈抗體(scFv)，可使用連結有免疫球蛋白重鏈(H鏈)及輕鏈(L鏈)片段之Fv區之抗體多肽作為標靶結合區。

【0024】 進而，亦可使用與靶細胞上表現之受體蛋白質特異性地結合之配體、例如親和抗體(affibody)、源自天然型受體之配體結合區、(例如腫瘤細胞上之)受體之溶解性蛋白質/肽配體、肽、及用以促進免疫應答之疫苗等。

【0025】 本說明書之CAR蛋白質視情形可包含「細胞外間隔區」。細胞外間隔區較理想為促進CAR與抗原之結合，使向細胞內之訊號傳遞亢進之序列。例如可使用抗體之Fc片段、或其片段或者衍生物、抗體之鉸鏈區、或其片段或者衍生物、抗體之CH2區、抗體之CH3區、人工間隔序列、或該等之組合。

【0026】 作為本發明之一態樣，作為細胞外間隔區，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、或者(vii)IgG1之鉸鏈及CH2、或該等之組合。例如，作為IgG1之鉸鏈區，可適宜地使用具有由序列編號9所表示之核苷酸序列編碼之以下之胺基酸序列(序列編號10)者，但並不限定於此。

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

【0027】 又，作為IgG1之CH2區，可適宜地使用具有由序列編號11所表示之核苷酸序列編碼之胺基酸序列(序列編號12)者，作為CH3區，可適宜地使用具有由序列編號13所表示之核苷酸序列編碼之胺基酸序列(序列編號14)者。

【0028】 作為較佳之態樣，細胞外間隔區可使用人類IgG1之鉸鏈、CH2、及CH3區或其一部分。

【0029】 又，作為較佳之態樣，細胞外間隔區能夠以(i)單獨為人類IgG1之鉸鏈區(序列編號10)、(ii)人類IgG1之鉸鏈區(序列編號10)及CH2區(序列編號12)及CH3區(序列編號14)之組合、(iii)人類IgG1之鉸鏈區(序列編號10)及CH3區(序列編號14)之組合、(iv)單獨為CH3區(序列編號14)使用。

【0030】 作為本發明之一態樣，作為細胞外間隔區所使用之人工間隔序列，可使用式(G4S)<sub>n</sub>所表示之間隔序列。式中，n為1~10，較佳為n=3。例如可適宜地使用具有序列編號15者。具有此種間隔序列之間隔有時亦被稱為肽連結子。於本發明中可適宜地使用於該領域中適宜地使用之肽連結子。於該情形時，肽連結子之構成及鏈長可於不損及所獲得之CAR蛋白質之功能之範圍內選擇適當者。

【0031】 作為進而較佳之態樣，細胞外間隔區可使用人類IgG1之鉸鏈區(序列編號10)及(G4S)<sub>3</sub>之間隔序列(序列編號15)之組合。

【0032】 細胞外間隔區可自上述所例示者中適當加以選擇，或基於該領域中之技術常識而進一步進行修飾，而用於本發明。

細胞外間隔區能夠以可存在於標靶結合區與跨膜區之間之方式，連

結編碼各區域之胺基酸序列之鹼基序列而插入至載體，並於宿主細胞中表現。或者，細胞外間隔區亦可修飾編碼預先製備之質體CAR蛋白質之聚核苷酸作為模板。

細胞外間隔區之修飾例如於考慮導入有編碼CAR之聚核苷酸之CAR-T細胞於宿主細胞中之CAR基因表現率之提高、訊號傳遞、細胞之老化、腫瘤中之分佈、抗原識別或對活體內(in vivo)活性之影響之情形時較有用。

**【0033】** 本發明之CAR蛋白質包含：細胞外區，其存在於細胞膜上，且包含標靶結合區及任意之細胞外間隔區；跨膜區；及細胞內區，其包含細胞內訊號傳遞區及任意之共刺激區。如於該領域中所周知般，相對於細胞外區及細胞內區均為親水性區，「跨膜區」係具有對於構成細胞膜之脂質雙層之親和性之區域。關於本發明之GMR.CAR中之跨膜區，CAR蛋白質可存在於細胞膜上，只要不損及標靶結合區與細胞內訊號傳遞區之功能，則並無特別限定，亦有可能存在源自與下述共刺激區相同之蛋白質之多肽發揮作為跨膜區之功能之情形。

**【0034】** 作為本發明之一態樣，跨膜區例如可使用CD28、CD3 $\epsilon$ 、CD8 $\alpha$ 、CD3、CD4或4-1BB等跨膜區。

**【0035】** 作為較佳之態樣，跨膜區可使用人類CD28(Uniprot No.: P10747 (153-179))。具體而言，可適宜地使用具有由序列編號16所表示之核苷酸序列(NCBI Accession No.: NM\_006139.3 (679-759))編碼之胺基酸序列(序列編號17)者作為跨膜區。

**【0036】** 本發明之CAR蛋白質視情形可包含「共刺激區」。共刺激區與共刺激配體特異性地結合，藉此傳導CAR-T細胞之增殖、細胞激素

產生、功能分化、靶細胞之細胞死亡之類的由細胞引起之共刺激應答，但並不限定於該等。

【0037】 作為本發明之一態樣，共刺激區例如可使用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。

【0038】 作為較佳之態樣，共刺激區可使用人類CD28(Uniprot No.: P10747(180-220))或4-1BB(GenBank: U03397.1)等。具體而言，可適宜地使用具有由序列編號18所表示之核苷酸序列(NCBI Accession No.: NM\_006139.3 (760-882))編碼之胺基酸序列(序列編號19)者作為共刺激區。

【0039】 本發明之CAR蛋白質包含「細胞內訊號傳遞區」。細胞內訊號傳遞區傳遞免疫細胞之效應功能之發揮所需之訊號。

【0040】 作為本發明之一態樣，作為細胞內訊號傳遞區，例如可使用人類CD3 $\zeta$ 鏈、Fc $\gamma$ RIII、Fc $\epsilon$ RI、Fc受體之細胞質末端、具有免疫受體酪胺酸活化基元(ITAM)之細胞質受體或該等之組合。

【0041】 作為較佳之態樣，細胞內訊號傳遞區可使用人類CD3 $\zeta$ 鏈(例如NCBI Accession No. NM\_\_000734.3之核苷酸299-637)。具體而言，可適宜地使用具有由序列編號20所表示之核苷酸序列編碼之胺基酸序列(序列編號21)者作為細胞內訊號傳遞區。

【0042】 目標之聚核苷酸可依據常法而容易地製備。可根據表示各區域之胺基酸序列之NCBI(National Center of Biotechnology Information，美國國家生物技術信息中心)參考序列識別符(RefSeq ID)或



基因庫(GenBank)之登記編號取得編碼胺基酸序列之鹼基序列，可使用標準分子生物學及/或化學程序製備本發明之聚核苷酸。例如可基於該等鹼基序列合成核酸，又，可組合自cDNA基因庫使用聚合酶連鎖反應(PCR)所獲得之DNA片段而製備本發明之聚核苷酸。

【0043】 因此，本發明之編碼GMR.CAR之聚核苷酸可連結編碼上述各區域之聚核苷酸而製備，可藉由將該聚核苷酸導入至適當之細胞中而製備GMR.CAR-T細胞。又，GMR.CAR亦可藉由將編碼標靶結合區以外之構成成分相同之現有之CAR蛋白質之聚核苷酸作為模板，依據常法將標靶結合區進行重組而製備。

【0044】 進而，視目的可將編碼現有之CAR蛋白質之聚核苷酸作為模板，使用反向PCR(iPCR)法等而修飾1個以上之區域、例如細胞外間隔區。關於細胞外間隔區之修飾技術，例如係記載於Oncoimmunology, 2016, Vol. 5, No. 12, e1253656等中。

【0045】 作為本發明之一實施形態，

可使用如下基因修飾細胞，其導入有編碼嵌合抗原受體(CAR)蛋白質之聚核苷酸，該嵌合抗原受體(CAR)蛋白質具有：包含序列編號2或序列編號3之胺基酸序列，且與人類粒細胞-巨噬細胞菌落刺激因子(GM-CSF)受體特異性地結合之標靶結合區；包含序列編號17之胺基酸序列之跨膜區；及包含序列編號21之胺基酸序列之細胞內訊號傳遞區。

【0046】 作為本發明之一實施形態，

可使用如下基因修飾細胞，其導入有編碼嵌合抗原受體(CAR)蛋白質之聚核苷酸，該嵌合抗原受體(CAR)蛋白質具有：包含序列編號2或序列編號3之胺基酸序列，且與人類粒細胞-巨噬細胞菌落刺激因子(GM-

CSF)受體特異性地結合之標靶結合區；包含序列編號10、序列編號12、序列編號14及/或序列編號15之胺基酸序列之細胞外間隔區；包含序列編號17之胺基酸序列之跨膜區；及包含序列編號21之胺基酸序列之細胞內訊號傳遞區。

【0047】再者，上述所謂「包含序列編號10、序列編號12、序列編號14及/或序列編號15之胺基酸序列」係指包含序列編號10、序列編號12、序列編號14及序列編號15之胺基酸序列中之任意1個或2個以上之組合中之任一種。以下，於本說明書中同樣。

【0048】作為待導入上述聚核苷酸之細胞，可使用包含源自哺乳動物、例如人類之細胞或源自猴、小鼠、大鼠、豬、牛、狗等非人類哺乳動物之T細胞或T細胞之細胞群。例如可使用利用血液(末梢血、臍帶血等)、骨髓等體液、組織或器官所採集、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、單核細胞、NK(Natural Killer，自然殺手)細胞或血細胞(嗜中性球、嗜鹼性球)]、臍帶血單核細胞、纖維母細胞、前驅脂肪細胞、幹細胞、皮膚角化細胞、間質細胞、脂肪肝細胞、各種癌細胞株或神經幹細胞。

【0049】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(穿孔素(perforin)、顆粒酶(granzyme)等)之細胞。具體而言，例如可使用T細胞、T細胞之前驅細胞(造血幹細胞、淋巴細胞前驅細胞等)、NK細胞、NK-T細胞或含有該等之細胞群。進而，作為可分化成該等細胞之細胞，包含ES細胞(embryonic stem cells，胚胎幹細胞)、iPS細胞(induced pluripotent stem cells，誘導性多功能幹細胞)等各種幹細胞。於T細胞中包含CD8陽性T細胞、CD4陽性T細胞、抑制性T細胞、細

胞毒殺性T細胞、或腫瘤浸潤淋巴細胞。於含有T細胞及T細胞之前驅細胞之細胞群中包含PBMC。上述細胞為自生物體採集者、將其擴大培養所得者或建立為細胞株者均可。於將表現所製造之CAR之細胞或自該細胞分化之細胞移植至生物體之情形時，較理想為向該生物體本身或自同種之生物體採集之細胞中導入核酸。

**【0050】** 作為用以實現本發明之基因修飾細胞而導入聚核苷酸並用於過繼免疫療法中之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T細胞。幹細胞記憶T細胞之分析可依據常法，例如依據(Yang Xu, et al. blood. 2014; 123: 3750-3759)等記載而容易地確認。

**【0051】** 作為本發明之實施態樣之一，由CAR表現質體所轉導之T細胞為CD45R0<sup>-</sup>、CD62L<sup>+</sup>、CD45RA<sup>+</sup>及CCR7<sup>+</sup>之細胞可作為待導入上述聚核苷酸之細胞使用。

**【0052】** 作為本發明之更佳之實施態樣之一，為CD8<sup>+</sup>、CD45RA<sup>+</sup>、CCR7<sup>+</sup>、CD62L<sup>+</sup>之細胞可作為至少50%以上之細胞待導入上述聚核苷酸之細胞使用。

**【0053】** 用以製備基因修飾細胞之聚核苷酸之導入方法只要係通常使用者則可為任一種，並無特別限定。於使用載體進行導入之情形時，作為可使用之載體，並無特別限定，例如可列舉：慢病毒載體、反轉錄病毒載體、泡沫病毒載體、腺相關病毒載體等。又，作為非病毒性之態樣，可使用質體轉位子，可適宜地使用sleeping beauty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中)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 ; 及Saito S, Nakazawa Y, et al. Cytotherapy. 2014; 16: 1257-69中)。

**【0054】** 作為本發明之較佳之態樣之一，可使用非病毒性之態樣、尤其是piggybac轉位子系統。具體例係示於實施例。

**【0055】** 本發明之細胞藉由對在表面表現GM-CSF受體之靶細胞引起受體特異性免疫應答，而於細胞內傳遞訊號並活化。表現CAR之細胞之活化根據宿主細胞之種類或CAR之細胞內區域而有所不同，例如可根據將細胞激素之釋出、細胞增殖率之提高、細胞表面分子之變化等作為指標而加以確認。細胞毒殺性蛋白質之釋出(穿孔素、顆粒酶等)帶來表現受體之細胞之破壞。

**【0056】** 本發明進而提供一種包含編碼與人類GM-CSF受體特異性地結合之嵌合抗原受體(CAR)蛋白質之聚核苷酸之載體。本發明之載體可適宜地用於製備上述本發明之基因修飾細胞。

**【0057】** 本發明之表現GMR.CAR之細胞較理想為安全性優異之細胞。由於為安全性優異之細胞，故而並無特別限定，例如，較理想為可對

靶細胞進行特異性免疫應答，另一方面，例如不會對正常之造血幹細胞帶來影響。於與骨髓相關抗原相關之疾病中，作為嚴重之副作用，例如已知有骨髓抑制。

**【0058】** 因此，作為本發明之表現GMR.CAR之細胞，較理想為於表現GMR.CAR之細胞殺傷靶細胞之投予量下，完全不驅逐骨髓細胞之細胞。

作為本發明之一態樣，作為本發明之表現GMR.CAR之細胞，可適宜地使用不會對正常細胞帶來影響之表現GMR.CAR之細胞。作為安全性之指標，並無特別限定，例如可將於以IC50值比較對於帶來影響之末梢細胞及/或骨髓細胞之殺傷能力、與對腫瘤細胞之殺傷能力之情形時該比足夠大作為指標而加以確認。

**【0059】** 本發明之表現GMR.CAR之細胞可用作疾病之治療劑。因此，本發明提供一種包含上述本發明之細胞之針對與GM-CSF受體表現細胞相關之疾病之治療劑。該治療劑包含表現CAR蛋白質之細胞作為活性成分，進而亦可包含適當之賦形劑。作為期待利用本發明之治療劑所治療之疾病，只要為對該細胞顯示出敏感性之疾病即可，並無特別限定，例如可列舉與表現、尤其是高表現GM-CSF受體之細胞相關之疾病、例如血癌(白血病)，具體而言，例如可列舉幼年型骨髓單核細胞性白血病(JMML)、急性骨髓性白血病(AML)。進而可列舉實體癌，具體而言，例如可列舉：神經膠質瘤、神經母細胞瘤、神經膠母細胞瘤、腦腫瘤、直腸結腸腺癌、前列腺癌、腎癌、黑色素瘤及肺小細胞癌等。

**【0060】** 於對實體癌應用上述治療劑之情形時，包含於GM-CSF受體形成靶細胞之微小環境之細胞、例如源自骨髓之免疫抑制細胞(MDSCs)

等中表現之疾病。關於該疾病，即便於在靶細胞中未表現GM-CSF受體之情形時，例如為了提高腫瘤細胞毒殺活性，亦可與其他治療劑並用而使用。

**【0061】** 此處，所謂「表現、尤其是高表現GM-CSF受體」有可能存在意指表現強度較高(例如平均螢光強度(MFI)較高)之情形與意指表現率(陽性率)較高之情形。於意指表現率較高之細胞之情形時，例如係指CD33/CD116表現率(陽性率)至少為40%以上之細胞。就於腫瘤細胞中均質地表現之觀點而言，較佳為該表現率為80%以上之細胞。更佳為係指該表現率為90%以上之細胞。

**【0062】** 本發明之治療劑之一態樣為針對表現GM-CSF受體之腫瘤細胞之抗癌劑。本發明之治療劑或抗癌劑可單獨使用，亦可與不同機制之藥劑及/或治療組合而使用。

**【0063】** 因此，本發明之治療劑可單獨設為醫藥組合物之形態，或與其他有效成分組合而設為醫藥組合物之形態。本發明之治療劑或醫藥組合物可局部投予或全身投予，並未限定投予形態，例如於治療白血病之情形時，較佳為設為靜脈內投予。於醫藥組合物中，除本發明之治療劑及其他有效成分以外，根據投予形態，可包含於該領域中通常所使用之載體、賦形劑、緩衝劑、穩定劑等。本發明之治療劑之投予量係根據患者之體重、年齡、疾病之嚴重程度等而有所變動者，並無特別限定，例如可於0.0001~1 mg/kg體重之範圍內1天1次~數次、每2天、每3天、每1週、每2週、每月、每2個月、每3個月進行投予。

**【0064】** 本發明之治療劑之一態樣係關於一種於細胞移植前對患者進行調節之方法，其包括對患者投予有效量之作為本發明之基因修飾細胞

之包含CAR蛋白質之細胞。於某一態樣中，細胞移植為幹細胞移植。幹細胞移植係適宜地使用造血幹細胞移植(骨髓移植、臍帶血移植、末梢血幹細胞移植)。

**【0065】** 本發明之治療劑之一態樣包括：減少患者體內之GM-CSF受體表現細胞之數量作為細胞移植前之患者之調節。患者體內之GM-CSF受體表現細胞為GM-CSF受體表現正常細胞或GM-CSF受體表現癌細胞。對上述患者之調節亦可為於細胞移植前減少GM-CSF受體表現正常及癌細胞之兩者。

[實施例]

**【0066】** 以下列舉實施例更具體地說明本發明，但本發明並不僅限定於以下之實施例。

**【0067】** [實施例1 GMR.CAR表現質體(CAR 001)之製備]

將於人類GM-CSF(NCBI Accession No.: NM\_000758之轉譯區(序列編號22、33~464個鹼基：終止密碼子前)之5'側附有EcoRI部位、於3'側附有編碼IgG1之鉸鏈之鹼基序列及BclI部位之PCR產物次選殖至pTA2選殖載體(TOYOBO)。對次選殖人類GM-CSF與IgG1之鉸鏈序列所得之pTA2選殖載體進行EcoRI與BclI雙酶消化，並切割出人類GM-CSF與IgG1之鉸鏈序列。另一方面，於pSL1190載體(Amersham公司)上，連接藉由將SFG-CD19.CAR(Savoldo et al. J Clin Invest 2011; 121 (5): 1822-1826)以NcoI與SphI進行雙酶消化所獲得之抗CD19 scFv(FMC63; Zola H. et al. Immunol Cell Biol. 1991; 69 (Pt6): 411-412)-CD28-CD3 $\zeta$ 之片段，藉此製備pSL1190-CD19.CAR載體。

**【0068】** 於將pSL1190-CD19.CAR載體以EcoRI與BamHI進行雙酶

消化後，使用相容位點(compatible site)連接上述所切割之人類GM-CSF與IgG1之鉸鏈序列，藉此製備pSL1190-GMR.CAR載體。進而，藉由以EcoRI與NotI將pIRII-CD19.CAR載體(Huye et al. Mol Ther 2011; 19(12): 2239-2248)進行雙酶消化，去除CD19.CAR片段，取而代之，連接藉由以EcoRI與NotI將pSL1190-GMR.CAR載體雙酶消化所獲得之片段，藉此獲取GMR.CAR表現質體(CAR 001)。圖1中表示所製備之CAR 001之載體圖。

**【0069】** [實施例2 變異型GMR.CAR表現質體之製備(E21R、E21H、E21S、E21A)]

將CAR 001作為模板，藉由反向PCR法製備變異型GMR.CAR之表現質體。

反向PCR中所使用之5'側PCR引子係設計為將GM-CSF多肽(序列編號1)之第21號麩胺酸(E)分別置換為精胺酸(R)、組胺酸(H)、絲胺酸(S)或丙胺酸(A)而進行合成(序列編號23~26，委託EUROFINS GENOMICS股份有限公司)。3'側引子係合成對所有變異型共通之設計者(序列編號27)(委託EUROFINS GENOMICS股份有限公司)。

**【0070】** E21R 製 備 用 前 置 引 子 ：  
AGAGCCCGGCGTCTCCTGAACCTGAGTA(序列編號23)

E21H 製 備 用 前 置 引 子 ：  
CACGCCCGGCGTCTCCTGAACCTGAGTA(序列編號24)

E21S 製 備 用 前 置 引 子 ：  
AGCGCCCGGCGTCTCCTGAACCTGAGTA(序列編號25)

E21A 製 備 用 前 置 引 子 ：



GCCGCCCCGGCGTCTCCTGAACCTGAGTAGA(序列編號26)

反置引子：CTGGATGGCATTACATCGAGGGTC(序列編號27)

【0071】 將CAR 001調整為50 ng/ $\mu$ L而用作模板，各PCR引子係以反應液中濃度成為0.2或0.3  $\mu$ M之方式進行調整。反向PCR係使用KOD-Plus-Mutagenesis Kit(東洋紡織股份有限公司)，反應組成係依據套組所隨附之操作說明。反應條件係於(i)94 $^{\circ}$ C 2分鐘、(ii)98 $^{\circ}$ C 10秒、(iii)68 $^{\circ}$ C 7分鐘下進行10個循環之(ii)及(iii)。

【0072】 利用1~1.2%瓊脂糖凝膠電泳，分離PCR反應後之樣品之一部分，並確認目標尺寸之直鏈狀之質體之生成。依據套組所隨附之操作說明，對剩餘之PCR反應後之樣品進行Dpn I處理，藉此進行將經甲基化之模板質體CAR 001切割並排除之反應。其後，利用套組所隨附之T4聚核苷酸激酶 (Polynucleotide Kinase)使直鏈狀質體自連接 (Self-Ligation)，而製成環狀質體。其後，利用環狀質體將大腸桿菌DH5 $\alpha$ (東洋紡織股份有限公司)轉形，並於含50  $\mu$ g/mL安比西林之LB瓊脂培養基上培養約16小時。

【0073】 將所出現之菌落進而於含50  $\mu$ g/mL安比西林之LB液體培養基中培養約16小時。自所培養之大腸桿菌培養液，使用QIAprep Spin Miniprep Kit(Qiagen)將各質體純化，並進行鹼基序列確認，將確認到目標之鹼基序列之置換之質體分別設為CAR 002(E21R GMR.CAR)、CAR 004(E21H GMR.CAR)、CAR 006(E21S GMR.CAR)或CAR 008(E21A GMR.CAR)。

【0074】 [實施例3 變異型GMR.CAR表現質體之製備(E21K, E21D, E21F)]

以與實施例2同樣之方式製備GM-CSF多肽(序列編號1)之第21號麩胺酸(E)被置換為離胺酸(K)、天冬胺酸(D)或苯丙胺酸(F)之質體。具體而言，人工合成附加有於5'側經限制酶XhoI切割之序列、與於3'側經限制酶DraIII切割之序列的XhoI-分泌訊號序列-GM-CSF變異體-鉸鏈序列-DraIII之片段(委託EUROFINS GENOMICS股份有限公司)。使該片段與利用XhoI與DraIII對CAR 001進行處理所得之片段結合，並分別設為CAR 003(E21K GMR.CAR)、CAR 005(E21D GMR.CAR)或CAR 007(E21F GMR.CAR)。

**【0075】 [實施例4 變異型間隔修飾GMR.CAR表現質體之製備]**

變異型間隔修飾GMR.CAR表現質體係藉由在製備間隔修飾GMR.CAR表現質體後，將該等作為模板並組入變異而製備。

將CAR 001作為模板，藉由反向PCR法製備對細胞外間隔區部分進行了修飾之GMR.CAR表現質體。具體而言，製備於圖2~3中分別示出載體圖之CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>部分缺失體(圖2)及CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>部分缺失與(G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>之插入體(圖3)。

**【0076】** 反向PCR中所使用之PCR引子係如下所示，分別設計CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>部分缺失體用引子(序列編號28及29)及CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>部分缺失與(G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>之插入體用引子(序列編號30及31)，並進合成(委託EUROFINS GENOMICS股份有限公司)。

**【0077】**

<CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>部分缺失體用引子>

前置引子：5'-TTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTC-3'(序列編號28)

反置引子：5'-TGGGCATGTGTGAGTTTTGTCAGGAGAT-3'(序列編號29)

**【0078】**

<CH2CH3部分缺失與(G4S)3之插入體用引子>

前置引子：

5'-

GGTGGTGGTGGATCCGGCGGGCGGGCTCCGGTGGTGGTGGTTCT  
AAAGATCCCAAATTTTGGGTGCTGG-3'(序列編號30)

反 置 引 子 ； 5'-

TGGGCATGTGTGAGTTTTGTCAGGAGATTTGGGC-3'(序列編號31)

**【0079】** 將CAR 001調整為50 ng/μL而用作模板，各PCR引子係以反應液中濃度成為0.2或0.3 μM之方式進行調整。反向PCR係使用KOD-Plus-Mutagenesis Kit(東洋紡織股份有限公司)，反應組成係依據套組所隨附之操作說明。反應條件係於(i)94°C 2分鐘、(ii)98°C 10秒、(iii)68°C 7分鐘下，進行10個循環之(ii)及(iii)。

**【0080】** 利用1~1.2%瓊脂糖凝膠電泳，分離PCR反應後之樣品之一部分，並確認目標尺寸之直鏈狀之質體之生成。繼而，藉由依據套組所隨附之操作說明，對剩餘之PCR反應後之樣品進行Dpn I處理，藉此進行將經甲基化之模板質體CAR 001切割並排除之反應。其後，利用套組所隨附之T4聚核苷酸激酶使直鏈狀質體自連接，而製成環狀質體。利用所獲得之各環狀質體將大腸桿菌DH5α(東洋紡織股份有限公司)轉形，並於含50 μg/mL安比西林之LB瓊脂培養基上培養約16小時。

**【0081】** 將所出現之菌落進而於含50 μg/mL安比西林之LB液體培

養基中培養約16小時。自所培養之大腸桿菌培養液，使用QIAprep Spin Miniprep Kit(Qiagen)將各質體純化，並進行鹼基序列確認，而獲取確認到目標之鹼基序列之修飾之變異型間隔修飾GMR.CAR表現質體：CAR 009(GMR.CAR dCH2CH3)及CAR 010(GMR.CAR dCH2CH3+(G4S)3)。

**【0082】** 將所製備之CAR 009及CAR 010作為模板，藉由反向PCR法製備變異型間隔修飾GMR.CAR表現質體。分別將所製備之質體之載體圖示於圖4~7。製備將GM-CSF多肽(序列編號1)之第21號之E置換為R之CH2CH3部分缺失體(圖4)、將第21號之E置換為K之CH2CH3部分缺失體(圖5)、將第21號之E置換為R之CH2CH3部分缺失與(G4S)3之插入體(圖6)及將21號之E置換為K之CH2CH3部分缺失與(G4S)3之插入體(圖7)。

**【0083】** 於本實施例中，反向PCR中所使用之PCR引子係如下所示，分別設計將E置換為R之引子(序列編號32及33)及將E置換為K之引子(序列編號34及33)，並進行合成(委託EUROFINS GENOMICS股份有限公司)。

**【0084】**

<將E置換為R之引子>

前置引子：5'-AGAGCCCGGCGTCTCCTGAACCTG-3'(序列編號32)

反置引子：5'-CTGGATGGCATTACATGCTCCCAGGG-3'(序列編號33)

**【0085】**

<將E置換為K之引子>

前置引子：5'-AAGGCCCGGCGTCTCCTGAACCTG-3'(序列編號

34)

反置引子：5'-CTGGATGGCATTTCACATGCTCCCAGGG-3'(序列編號33)

【0086】 將CAR 009及CAR 010調整為50 ng/ $\mu$ L而用作模板，各PCR引子係以反應液中濃度成為0.2或0.3  $\mu$ M之方式進行調整。反向PCR係使用KOD-Plus-Mutagenesis Kit(東洋紡織股份有限公司)，反應組成係依據套組所隨附之操作說明。反應條件係於(i)94 $^{\circ}$ C 2分鐘、(ii)98 $^{\circ}$ C 10秒、(iii)68 $^{\circ}$ C 7分鐘下，進行10個循環之(ii)及(iii)。

【0087】 利用1~1.2%瓊脂糖凝膠電泳，分離PCR反應後之樣品之一部分，並確認目標尺寸之直鏈狀之質體之生成。繼而，藉由依據套組所隨附之操作說明，對剩餘之PCR反應後之樣品進行Dpn I處理，藉此進行將經甲基化之模板質體切割並排除之反應。其後，利用套組所隨附之T4聚核苷酸激酶使直鏈狀質體自連接，而製成環狀質體。利用所獲得之各環狀質體將大腸桿菌DH5 $\alpha$ (東洋紡織股份有限公司)轉形，並於含50  $\mu$ g/mL安比西林之LB瓊脂培養基上培養約16小時。

【0088】 將所出現之菌落進而於含50  $\mu$ g/mL安比西林之LB液體培養基中培養約16小時。自所培養之大腸桿菌培養液，使用QIAprep Spin Miniprep Kit(Qiagen)將各質體純化，並進行鹼基序列確認，而獲取確認到目標之鹼基序列之修飾之變異型間隔修飾GMR.CAR表現質體：CAR 011(E21R GMR.CAR dCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)、CAR 012(E21KGMR.CAR E dCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)、CAR 013(E21RGMR.CAR dCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>+(G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>)及CAR 014(E21KGMR.CAR dCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>+(G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>)。

【0089】 [實施例5 GMR.CAR-T細胞之培養、擴增]

<PBMC之分離與非特異性刺激OKT3 blast之製備(第0天)>

自健康成人供體採集末梢血，利用D-PBS(Phosphate Buffer Solution，磷酸鹽緩衝液)(和光純藥工業股份有限公司)稀釋為2倍後，於Ficoll-Paque PLUS中使稀釋末梢血成為多層，並進行400×g、30分鐘之離心分離，而分取PBMC。利用D-PBS將所分取之PBMC洗淨2次，並藉由離心分離進行單離。使單離之PBMC以成為 $2\sim 4\times 10^6$ 個/well/2 mL之方式懸浮於含5 ng/mL IL(interleukin，介白素)-15之TexMACS培養基中。準備利用含有抗人類CD3抗體及抗人類CD28抗體之D-PBS對24孔未處理培養板於37°C、2小時下進行抗體塗覆所得之培養板，以2 mL/well接種細胞懸浮液並進行T細胞之特異性刺激，而開始製備OKT3 blast。

**【0090】** 於第3天製備OKT3 blast之再刺激用抗體固相培養板。具體而言，以500  $\mu$ L/well將利用D-PBS製備為1  $\mu$ g/mL之抗人類CD3抗體及抗人類CD28抗體添加至24孔未處理培養板平底，並於4°C下徹夜培養，藉此將抗體固相於培養板上。

**【0091】** 另一方面，自第0天起受到刺激之OKT3 blast藉由轉移至未對抗體進行固相之24孔細胞培養用平底多孔培養板，而暫時不進行刺激。

**【0092】** 於第4天，自前一天經固相之培養板去除上清液，並添加OKT3 blast，藉此開始OKT3 blast之利用抗人類CD3抗體及抗人類CD28抗體之再刺激。再刺激係實施至第7天，但於該期間，適當地進行培養基更換及IL-15之添加。

**【0093】**

<PBMC之病毒肽脈衝(第0天)>

對所單離之PBMC利用peptivator肽庫(註冊商標、Miltenyi Biotec)進行病毒肽刺激。具體而言，於向D-PBS 50  $\mu\text{L}$ 中分別添加有0.05  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 之AdV5 Hexon、CMV pp65、EBV BZLF1及EBV EBNA-1之肽庫中使PBMC懸浮，並於37 $^{\circ}\text{C}$ 下實施30分鐘病毒肽刺激。30分鐘後，向PBMC中添加適量之D-PBS並使之懸浮，其後進行4分鐘之UV(Ultra Violet，紫外線)照射。UV照射結束後將PBMC回收，於對細胞數進行計數後，以成為0.5~6 $\times 10^6$ 個/well/2 mL之方式懸浮於含10 ng/mL IL-7及5 ng/mL IL-15之TexMACS培養基中，並轉移至24孔處理培養板作為飼養細胞。

**【0094】 <GMR.CAR表現載體之電導入(第0天)>**

為了向PBMC導入變異型GMR.CAR表現質體CAR 002(E21R GMR.CAR)、CAR 003(E21K GMR.CAR)、CAR 004(E21H GMR.CAR)、CAR 005(E21D GMR.CAR)、CAR 006(E21S GMR.CAR)、CAR 007(E21F GMR.CAR)或CAR 008(E21A GMR.CAR)，分別將CAR 5  $\mu\text{g}$ 、pCMV-piggyBac質體5  $\mu\text{g}$ 、附屬於P3 Primary Cell 4D-Nucleofector<sup>TM</sup>×Kit(LonzaJapan股份有限公司)之P3初生細胞溶液(Primary Cell solution)100  $\mu\text{L}$ 進行混合，並添加至10 $\times 10^6$ 個之PBMC中。

**【0095】** 繼而，將全部量之細胞移至Nucleocuvette中，並利用4D-Nucleofection(Program No: FI-115)進行電基因導入。將經電基因導入之細胞於室溫下放置10分鐘，將全部量添加至裝有飼養細胞之24孔處理培養板中而開始培養。同樣地培養1~15 $\times 10^6$ 個細胞作為未實施基因導入操作之Mock-T細胞。適當地進行廢棄培養中之培養基之一半，並添加一半含2倍量即20 ng/mL IL-7及10 ng/mL IL-15之TexMACS培養基之培養基

更換作業。Mock-T細胞係於24孔處理培養板上繼續培養，並根據細胞之增殖程度進行培養基更換與擴增。

**【0096】 < CAR-T細胞之擴增(第7天)>**

將全部量之細胞懸浮液移至填充有於含10 ng/mL IL-7及5 ng/mL IL-15之TexMACS培養基30 mL中對上述製備之OKT3 blast進行肽脈衝與UV照射所得之飼養細胞 $2 \times 10^6$ 個的G-Rex10中，進行GMR.CAR-T細胞之擴增直至第14天。藉由以下之方法測定在第14天為止所擴增之GMR.CAR-T細胞之表現率。

**【0097】 < GMR.CAR表現率之評價(第14天)>**

對細胞數進行計數，並對 $1 \sim 2 \times 10^5$ 個細胞藉由流式細胞儀分析，評價GMR.CAR-T之表現率。採集 $1 \sim 2 \times 10^5$ 個細胞，添加PE大鼠抗人類GM-CSF抗體(BD Pharmingen)2.5  $\mu$ L及APC抗人類CD3抗體(Miltenyi Biotec)5  $\mu$ L並使該等懸浮，於4°C下、遮光下進行抗體標記反應20分鐘。20分鐘後，利用適量之D-PBS洗淨細胞，藉由離心分離使細胞沈澱並去除上清液，其後再懸浮於適量之D-PBS中，對所得之樣品使用FACSCalibur(Becton Dickinson股份有限公司)進行分析，以IgG1/CD3陽性或GM-CSF/CD3陽性作為指標而測定GMR.CAR之表現率。

**【0098】** 使用GMR.CAR表現質體(CAR 001)，藉由對PBMC之電導入操作及T細胞之培養、擴增操作而獲得GMR.CAR-T細胞，將所獲得之GMR.CAR-T細胞設為CAR-T 001，同樣地，將藉由使用CAR 002(E21R GMR.CAR)、CAR 003(E21K GMR.CAR)、CAR 004(E21H GMR.CAR)、CAR 005(E21D GMR.CAR)、CAR 006(E21S GMR.CAR)、CAR 007(E21F GMR.CAR)或CAR 008(E21A GMR.CAR)



質體之操作而獲得之GMR.CAR-T細胞分別設為CAR-T 002(E21R)、CAR-T 003(E21K)、CAR-T 004(E21H)、CAR-T 005(E21D)、CAR-T 006(E21S)、CAR-T 007(E21F)、及CAR-T 008(E21A)。

【0099】 將CAR-T 001~008於第14天之表現分析結果示於圖8。於各細胞群中之GMR.CAR表現率分別為CAR-T 001：20.89%、CAR-T 002(E21R)：16.68%、CAR-T 003(E21K)：15.94%、CAR-T 004(E21H)：17.89%、CAR-T 005(E21D)：19.83%、CAR-T 006(E21S)：21.00%、CAR-T 007(E21F)：20.47%、CAR-T 008(E21A)：20.01%，與Mock-T細胞中之表現率(5.66%)相比均較高，成功製備變異型GMR.CAR表現T細胞。

【0100】 [實施例6 GMR.CAR-T之抗腫瘤細胞活性]

為了評價於實施例5中所獲得之CAR-T 001~008之腫瘤細胞毒殺活性，進行與腫瘤細胞之共培養試驗。具體而言，使用THP-1細胞(ATCC(American Type Culture Collection，美國菌種保存中心))，以成為 $5 \times 10^5$ 個/mL之方式利用含10%FBS(Fetal Bovine Serum，胎牛血清)之RPMI 1640培養基(Thermo Fisher Scientific)製備腫瘤細胞[靶細胞(T)]，並以500  $\mu$ L/well接種至48孔處理培養板。於實施例5中所獲取之CAR-T 001~CAR-T 008[效應細胞(E)]係以E：T比成為1：5~1：100之方式利用含10%FBS之RPMI 1640培養基加以稀釋。

【0101】 即，於E：T比=1：5之情形時，GMR.CAR-T細胞係以成為 $1 \times 10^5$ 個/mL之方式製備，並以500  $\mu$ L/well添加至接種有腫瘤細胞之48孔處理培養板。同樣地，於E：T比=1：50、1：100之情形時，GMR.CAR-T細胞分別係以成為 $0.1 \times 10^5$ 個/mL或 $0.05 \times 10^5$ 個/mL之方式製

備，並以500 μL/well添加至接種有腫瘤細胞之48孔處理培養板。共培養試驗係進行5天。對Mock-T細胞亦進行同樣之共培養試驗，亦設定以相同細胞數僅培養腫瘤細胞所得之群(CAR-T未添加群)作為對照群。

【0102】於共培養試驗第5天回收各孔之細胞，向經離心分離之細胞中添加APC抗人類CD3抗體(Miltenyi Biotec)5 μL及PE抗人類CD33抗體(Miltenyi Biotec)5 μL並使該等懸浮，於4°C下、遮光下進行抗體標記反應20分鐘。20分鐘後，利用適量之D-PBS洗淨細胞，藉由離心分離使細胞沈澱並完全去除上清液，其後，利用450 μL之D-PBS進行再懸浮，進而添加50 μL之CountBright absolute counting beads(Invitrogen)，對所獲得之樣品使用FACSCanto II(Becton Dickinson股份有限公司)及FLOWJO(Becton Dickinson股份有限公司)進行分析，基於計數珠算出CD33之陽性細胞數。利用以下之計算式算出CAR-T 001~CAR-T 008及Mock-T細胞之抗腫瘤細胞活性%。

【0103】

<抗腫瘤細胞活性%之算出>

計算式：

· 抗腫瘤細胞活性% =  $100 - (\text{CAR-T 添加群之 CD33 陽性細胞數}) / (\text{CAR-T 未添加群之 CD33 陽性細胞數}) \times 100$

【0104】圖9中表示CAR-T 001~CAR-T 008對於THP-1細胞之抗腫瘤細胞活性%之結果。與CAR-T 001相比，CAR-T 002~CAR-T 008均被確認到同等以上之對於THP-1細胞之抗腫瘤細胞活性。

【0105】[實施例7 變異型間隔修飾GMR.CAR-T細胞之培養、擴增]

<PBMC之分離與非特異性刺激OKT3 blast之製備(第0天)>

自健康成人供體採集末梢血，利用D-PBS(和光純藥工業股份有限公司)稀釋為2倍後，於Ficoll-Paque PLUS中使稀釋末梢血成為多層，並進行400×g、30分鐘之離心分離，而分取PBMC。利用D-PBS將所分取之PBMC洗淨2次，並藉由離心分離進行單離。使單離之PBMC以成為 $2\sim 4\times 10^6$ 個/well/2 mL之方式懸浮於含5 ng/mL IL-15之TexMACS培養基中。準備利用含有抗人類CD3抗體及抗人類CD28抗體之D-PBS對24孔未處理培養板於37°C、2小時下進行抗體塗覆所得之培養板，以2 mL/well接種細胞懸浮液並進行T細胞之特異性刺激，而開始製備OKT3 blast。

**【0106】** 於第3天製備OKT3 blast之再刺激用抗體固相培養板。具體而言，以500  $\mu$ L/well將利用D-PBS製備為1  $\mu$ g/mL之抗人類CD3抗體及抗人類CD28抗體添加至24孔未處理培養板平底，並於4°C下徹夜進行培養，藉此將抗體固相於培養板上。

另一方面，自第0天起受到刺激之OKT3 blast藉由轉移至未對抗體進行固相之24孔細胞培養用平底多孔培養板，而暫時不進行刺激。

**【0107】** 於第4天，自前一天經固相之培養板去除上清液，並添加OKT3 blast，藉此開始OKT3 blast之利用抗人類CD3抗體及抗人類CD28抗體之再刺激。再刺激係實施至第7天，但於該期間，適當地進行培養基更換及IL-15之添加。

**【0108】** <PBMC之病毒肽脈衝(第0天)>

對所單離之PBMC利用peptivator肽庫(註冊商標、Miltenyi Biotec)進行病毒肽刺激。具體而言，於向D-PBS 50  $\mu$ L中分別添加有0.05  $\mu$ g/ $\mu$ L之AdV5 Hexon、CMV pp65、EBV BZLF1及EBV EBNA-1之肽庫中使PBMC懸浮，並於37°C下實施30分鐘病毒肽刺激。30分鐘後，向PBMC中

添加適量之D-PBS並使之懸浮，其後進行4分鐘之UV照射。UV照射結束後將PBMC回收，於對細胞數進行計數後，以成為 $0.5 \sim 6 \times 10^6$ 個/well/2 mL之方式懸浮於含10 ng/mL IL-7及5 ng/mL IL-15之TexMACS培養基中，並轉移至24孔處理培養板作為飼養細胞。

**【0109】** <基因導入操作(第0天)>

為了向PBMC導入GMR.CAR表現質體，將CAR 001及CAR 009～CAR 014中之任一種5  $\mu$ g、pCMV-piggyBac質體5  $\mu$ g、附屬於P3 Primary Cell 4D-Nucleofector™ $\times$ Kit(LonzaJapan股份有限公司)之P3初生細胞溶液(Primary Cell solution)100  $\mu$ L進行混合，並添加至 $10 \sim 15 \times 10^6$ 個之PBMC中。

**【0110】** 繼而，將全部量之細胞移至Nucleocuvette中，並利用4D-Nucleofection(Program No: FI-115)進行電基因導入。將經電基因導入之細胞於室溫下放置10分鐘，將全部量添加至裝有飼養細胞之24孔處理培養板中而開始培養。同樣地培養 $1 \sim 15 \times 10^6$ 個細胞作為未實施基因導入操作之Mock-T細胞。適當地進行廢棄培養中之培養基之一半，並添加一半含2倍量即20 ng/mL IL-7及10 ng/mL IL-15之TexMACS培養基之培養基更換作業。Mock-T細胞係於24孔處理培養板上繼續培養，並根據細胞之增殖程度進行培養基更換與擴增。

**【0111】** <CAR-T細胞之擴增(第7天)>

將全部量之細胞懸浮液移至填充有於含10 ng/mL IL-7及5 ng/mL IL-15之TexMACS培養基30 mL中對上述製備之OKT3 blast進行肽脈衝與UV照射所得之飼養細胞 $2 \sim 10 \times 10^6$ 個的G-Rex10中，進行GMR.CAR-T細胞之擴增直至第14天。藉由以下之方法測定在第14天為止所擴增之

GMR.CAR-T細胞之表現率。

**【0112】** <GMR.CAR表現率之評價(第14天)>

對細胞數進行計數，並對 $1\sim 2\times 10^5$ 個細胞藉由流式細胞儀分析，評價GMR.CAR-T之表現率。採集 $1\sim 2\times 10^5$ 個細胞，向經離心分離之細胞中添加PE大鼠抗人類GM-CSF抗體(Miltenyi Biotec)5  $\mu$ L及APC小鼠抗人類CD3抗體(Miltenyi Biotec)5  $\mu$ L並使該等懸浮，於4 $^{\circ}$ C下、遮光下進行抗體標記反應20分鐘。20分鐘後，利用適量之D-PBS洗淨細胞，藉由離心分離使細胞沈澱並去除上清液，其後再懸浮於適量之D-PBS中，對所得之樣品使用FACSCantoII(Becton Dickinson股份有限公司)及FLOWJO(Becton Dickinson股份有限公司)進行分析，以GM-CSF/CD3陽性作為指標而測定GMR.CAR之表現率。

**【0113】** 於本實施例中，使用表現質體(CAR 001及CAR 009～CAR 014)，藉由對PBMC之電導入操作及T細胞之培養、擴增操作而獲得GMR.CAR-T細胞，將所獲得之GMR.CAR-T細胞分別設為CAR-T 001-A、CAR-T 009、CAR-T 010、CAR-T 011、CAR-T 012、CAR-T 013及CAR-T 014。

**【0114】** 將CAR-T 001-A及CAR-T 009～CAR-T 014於第14天之表現分析結果示於圖10。GMR.CAR表現率分別為CAR-T 001-A：28.0%、CAR-T 009：31.7%、CAR-T 010：31.0%、CAR-T 011：30.1%、CAR-T 012：31.7%、CAR-T 013：35.4%、CAR-T 014：30.7%，與Mock-T細胞中之表現率0.54%相比均較高，成功製備間隔部位不同之GMR.CAR表現T細胞。藉由利用Mock-T細胞稀釋所製備之GMR.CAR表現T細胞，而將表現率統一為28.0%，並於以下之實施例中評價抗腫瘤細胞活性及安

全性。

**【0115】 [實施例8 變異型間隔修飾GMR.CAR-T之抗腫瘤細胞活性]**

為了評價實施例7中所獲得之CAR-T 001-A及CAR-T 009～CAR-T 014之腫瘤細胞毒殺活性，而進行與腫瘤細胞之共培養試驗。具體而言，使用THP-1細胞(American Type Culture Collection(ATCC))，以成為 $4 \times 10^5$ 個/mL之方式利用含10%FBS之RPMI 1640培養基(Thermo Fisher Scientific)製備THP-1細胞[靶細胞(T)]，並以500  $\mu$ L/well接種至48孔處理培養板(孔內之細胞數成為 $2.0 \times 10^5$ 個)。

**【0116】 CAR-T 001-A及CAR-T 009～CAR-T 014[效應細胞(E)]係**

以E：T比成為1：25及1：125之方式利用含10%FBS之RPMI 1640培養基加以稀釋。即，於E：T比1：25之情形時，CAR-T係以成為 $0.16 \times 10^5$ 個/mL之方式製備，並以500  $\mu$ L/well添加至接種有腫瘤細胞之48孔處理培養板(孔內之CAR-T細胞數成為 $0.08 \times 10^5$ 個)。同樣地，於E：T比1：125之情形時，係以成為 $0.032 \times 10^5$ 個/mL之方式製備，並以500  $\mu$ L/well添加至接種有腫瘤細胞之48孔處理培養板(孔內之CAR-T細胞數成為 $0.016 \times 10^5$ 個)。

**【0117】 抗腫瘤細胞活性%之算出係以與實施例6同樣之方式進行。**

圖11中表示CAR-T 001-A、CAR-T 009～CAR-T 014及Mock-T細胞對於THP-1細胞之抗腫瘤細胞活性%之結果。CAR-T 009～CAR-T 014均被確認到與CAR-T 001-A相比同等以上之對於THP-1細胞之抗腫瘤細胞活性。

**【0118】 [實施例9 變異型間隔修飾GMR.CAR-T抗腫瘤細胞活性持**

續性評價]

於過繼免疫療法中期待效果之CAR-T細胞要求持續之細胞毒殺活

性。因此，為了評價GMR.CAR-T之抗腫瘤細胞活性之持續性而進行下述實驗。

【0119】 以與實施例7同樣之方式，使用表現質體(CAR 010~CAR 014)進行對PBMC之電導入操作及T細胞之培養、擴增操作，而新製備GMR.CAR-T細胞(CAR-T 010-A~CAR-T 014-A)。

【0120】 將於本實施例中所使用之CAR-T 010-A~014-A於第14天之表現分析結果示於圖12。GMR.CAR表現率分別為CAR-T 010-A：26.2%、CAR-T 011-A：27.6%、CAR-T 012-A：18.5%、CAR-T 013-A：29.8%、CAR-T 014-A：26.9%，與Mock-T細胞中之表現率(0.50%)相比均較高，成功製備間隔部位不同之GMR.CAR表現T細胞。

繼而，藉由利用Mock-T細胞稀釋所製備之GMR.CAR表現T細胞，而將表現率統一為18.5%，並評價連續之抗腫瘤細胞活性。

【0121】 為了評價CAR-T 010-A~CAR-T 014-A之腫瘤細胞毒殺活性之持續性，而進行長時間之與腫瘤細胞之共培養試驗。具體而言，使用THP-1、MV4-11、Kasumi-1細胞(American Type Culture Collection(ATCC))及shinAML-1細胞(於信州大學附屬醫院自AML患者建立之細胞株)，以成為 $5 \times 10^5$ 個/mL之方式利用含10%FBS之RPMI 1640培養基(Thermo Fisher Scientific)製備各腫瘤細胞[靶細胞(T)]，並以500  $\mu$ L/well接種至48孔處理培養板(孔內之腫瘤細胞數成為 $2.5 \times 10^5$ 個)。

【0122】 CAR-T 010-A~014-A[效應細胞(E)]係以E:T比成為1:1之方式利用含10%FBS之RPMI 1640培養基加以稀釋。即，CAR-T係以成為 $5 \times 10^5$ 個/mL之方式製備，並以500  $\mu$ L/well添加至接種有各腫瘤細胞之48孔處理培養板(孔內之CAR-T細胞數成為 $2.5 \times 10^5$ 個)。再者，各群分別

準備2孔，1孔係用作利用FACSCanto II(Becton Dickinson股份有限公司)之「分析用」，另1孔係用作於以下之期間中用以向新腫瘤細胞進行添加之「繼續用」。

**【0123】** 作為期間1之共培養試驗係進行4天。亦對未進行基因導入之Mock-T細胞進行同樣之共培養試驗，又，亦設定以相同細胞數僅培養腫瘤細胞所得之群(CAR-T未添加群)作為對照群。

**【0124】** 於共培養試驗第4天回收「分析用」之孔之細胞，向經離心分離之細胞中添加APC抗人類CD3抗體(Miltenyi Biotec)5  $\mu$ L及PE抗人類CD33抗體(Miltenyi Biotec)5  $\mu$ L並使該等懸浮，於4 $^{\circ}$ C下、遮光下進行抗體標記反應20分鐘。20分鐘後，利用適量之D-PBS洗淨細胞，藉由離心分離使細胞沈澱並完全去除上清液，其後，利用450  $\mu$ L之D-PBS進行再懸浮，進而添加50  $\mu$ L之CountBright absolute counting beads(Invitrogen)，對所獲得之樣品使用FACSCanto II、FLOWJO(Becton Dickinson股份有限公司)進行分析，並基於計數珠算出CD33之陽性細胞數。至此設為期間1。

**【0125】** 關於與共培養開始時相比腫瘤細胞被殺傷(腫瘤細胞數減少)之群，進入下述之期間2。具體而言，準備2孔預先以 $2.5 \times 10^5$ 個/500  $\mu$ L/well接種之腫瘤細胞，向其中分別以500  $\mu$ L/well均分地添加於期間1中作為「繼續用」而預先共培養之培養液，進而進行共培養4天。於培養期間4天或3天內重複進行該作業。再者，關於與共培養開始時相比腫瘤細胞數增加之群，不進入以下之期間。

**【0126】** 圖13～圖17中表示將各腫瘤細胞設為標靶時之分別於第4天、8天、12天、15天、19天、22天之抗腫瘤細胞活性評價之結果。確認



到CAR-T 010-A ~ CAR-T 014-A對任一腫瘤細胞株持續地具有殺傷效果。

**【0127】** [實施例10 GMR.CAR-T之與末梢細胞相關之作用]

於本實施例中所使用之GMR.CAR-T細胞(CAR-T 001-B及CAR-T 009-B ~ CAR-T 014-B)係藉由下述方法而新製備。

**【0128】** <基因導入操作(第0天)>

以與實施例7同樣之方式製備OKT3 blast後，為了向PBMC導入GMR.CAR表現質體，將CAR 001及CAR 009 ~ 014中之任一種5  $\mu\text{g}$ 、pCMV-piggyBac 質體 5  $\mu\text{g}$ 、附屬於P3 Primary Cell 4D-Nucleofector™ Kit(LonzaJapan 股份有限公司)之P3初生細胞溶液(Primary Cell solution)100  $\mu\text{L}$ 進行混合，並添加至 $15 \sim 20 \times 10^6$ 個之PBMC中。

**【0129】** 將全部量之細胞移至Nucleocuvette中，並利用4D-Nucleofection(Program No: FI-115)進行電基因導入。將經電基因導入之細胞於室溫下放置10分鐘，利用含有抗CD28抗體之D-PBS於 $37^\circ\text{C}$ 、2小時下進行抗體塗覆後，添加至裝有飼養細胞之24孔未處理培養板而開始培養。同樣地培養 $1 \sim 20 \times 10^6$ 個細胞作為未實施基因導入操作之Mock-T細胞。於第3天將細胞自24孔未處理培養板移至24孔處理培養板而繼續培養。

**【0130】** 適當地進行廢棄培養中之培養基之一半，並添加一半含2倍量即20 ng/mL IL-7及10 ng/mL IL-15之TexMACS培養基之培養基更換作業。Mock-T細胞係於24孔處理培養板上繼續培養，並根據細胞之增殖程度進行培養基更換與擴增。

【0131】 繼而，以與實施例7同樣之方式進行CAR-T細胞之擴增及GMR.CAR表現率之評價。

將本實施例中所使用之CAR-T 001-B及CAR-T 009-B~CAR-T 014-B於第14天之表現分析結果示於圖18。GMR.CAR表現率分別為CAR-T 001-B：45.9%、CAR-T 009-B：37.2%、CAR-T 010-B：42.4%、CAR-T 011-B：46.4%、CAR-T 012-B：41.1%、CAR-T 013-B：48.3%、CAR-T 014-B：51.2%，與Mock-T細胞中之表現率0.56%相比均較高，成功製備GMR.CAR表現T細胞。

【0132】 其次，藉由利用Mock-T細胞稀釋所製備之GMR.CAR表現T細胞，而將表現率統一為37.2%，並確認對於末梢血細胞之影響。為了確認CAR-T 001-B及CAR-T 009-B~CAR-T 014-B對於末梢血細胞之影響，而實施與末梢血細胞之共培養試驗。

【0133】 <多形核白血球(PMN)、PBMC之分離>

自健康成人供體採集末梢血，利用D-PBS稀釋為2倍後，於polymorph prep(AXS)中使稀釋末梢血成為多層，並進行450×g、35分鐘之離心分離，而分取PMN及PBMC。利用D-PBS將所分取之PMN與PBMC洗淨2次，並藉由離心分離進行單離。

【0134】 使用CAR-T 001-B及CAR-T 009-B~CAR-T 014-B，進行與所單離之PMN、PBMC、腫瘤細胞株MV4-11之共培養試驗。具體而言，以成為 $2 \times 10^5$ 個/mL之方式，利用含10%FBS之RPMI 1640培養基(Thermo Fisher Scientific)製備PMN、PBMC、MV4-11[靶細胞(T)]，並以500  $\mu$ L/well接種至48孔處理培養板(孔內之細胞數成為 $1 \times 10^5$ 個)。

【0135】 CAR-T 001-B及CAR-T 009-B~CAR-T 014-B[效應細胞

(E)]係以E:T比成為1:1與1:10之方式利用含10%FBS之RPMI 1640培養基加以稀釋。即，用於E:T比=1:1之樣品之CAR-T係以成為 $2 \times 10^5$ 個/mL之方式製備，並以500  $\mu$ L/well添加至接種有PMN或PBMC、MV4-11之48孔處理培養板(孔內之CAR-T細胞數為 $1 \times 10^5$ 個)。

**【0136】** 同樣地，於E:T比=1:10之情形時，CAR-T係以成為 $0.2 \times 10^5$ 個/mL之方式製備，並以500  $\mu$ L/well添加至接種有PMN或PBMC、MV4-11之48孔處理培養板(孔內之CAR-T細胞數成為 $0.1 \times 10^5$ 個)。

**【0137】** <與PMN之共培養試驗>

共培養試驗係進行3天。對Mock-T細胞亦進行同樣之共培養試驗，亦設定以相同細胞數培養PMN所得之群作為對照群(CAR-T未添加群)。

於共培養試驗第3天回收各孔之細胞，向經離心分離之細胞中添加FITC抗人類CD3抗體(BioLegend)0.1  $\mu$ L、PE抗人類GM-CSF抗體(Miltenyi Biotec)5  $\mu$ L、APC抗人類CD11b抗體(BioLegend)0.1  $\mu$ L並使該等懸浮，於4°C下、遮光下進行抗體標記反應20分鐘。20分鐘後，利用適量之D-PBS洗淨細胞，藉由離心分離使細胞沈澱並去除上清液，其後使之再懸浮於D-PBS 450  $\mu$ L中，並添加counting beads 50  $\mu$ L，對所獲得之樣品使用FACSCantoII進行分析，將CD3-CD11b+設為嗜中性球而測定活細胞數，算出測得之細胞數成為10倍所得之數值作為存活細胞數，並算出與僅利用PMN進行培養所得之值之相對比。

**【0138】** <與PBMC之共培養試驗>

共培養試驗係進行3天。對Mock-T細胞亦進行同樣之共培養試驗，亦設定以相同細胞數培養PBMC所得之群作為對照群(CAR-T未添加群)。

於共培養試驗第3天回收各孔之細胞，向經離心分離之細胞中添加 FITC 抗人類 CD3 抗體 0.1  $\mu$ L、PE 抗人類 GM-CSF 抗體 5  $\mu$ L、APC 抗人類 CD11b 抗體 0.1  $\mu$ L、Pacific blue 抗人類 CD16 抗體 (BioLegend) 0.1  $\mu$ L、APC-cy7 抗人類 CD19 抗體 (BioLegend) 0.1  $\mu$ L 並使該等懸浮，於 4°C 下、遮光下進行抗體標記反應 20 分鐘。20 分鐘後，利用適量之 D-PBS 洗淨細胞，藉由離心分離使細胞沈澱並去除上清液，其後使之再懸浮於 D-PBS 450  $\mu$ L 中，並添加 counting beads 50  $\mu$ L，對所獲得之樣品使用 FACSCantoII 進行分析，將 CD3-CD11b+ 作為單核細胞，將 CD3-CD16+ 作為 NK 細胞，將 CD3-CD19+ 作為 B 細胞而測定活細胞數，算出測得之細胞數成為 10 倍所得之數值作為存活細胞數，並算出與僅利用 PBMC 進行培養所得之值之相對比。

**【0139】** <與 MV4-11 之共培養試驗>

共培養試驗係進行 3 天。對 Mock-T 細胞亦進行同樣之共培養試驗，亦設定以相同細胞數培養 MV4-11 所得之群作為對照群 (CAR-T 未添加群)。

於共培養試驗第 3 天回收各孔之細胞，向經離心分離之細胞中添加 APC 抗人類 CD33 5  $\mu$ L、FITC 抗人類 CD3 0.2  $\mu$ L、PE 抗人類 GM-CSF 5  $\mu$ L 並使該等懸浮，於 4°C 下、遮光下進行抗體標記反應 20 分鐘。20 分鐘後，利用適量之 D-PBS 洗淨細胞，藉由離心分離使細胞沈澱並去除上清液，其後使之再懸浮於 D-PBS 450  $\mu$ L 中，並添加 counting beads 50  $\mu$ L，對所獲得之樣品使用 FACSCantoII 進行分析，測定 CD33+ 腫瘤活細胞，將使所測定之細胞數成為 10 倍所得之數值算出為腫瘤存活細胞數，並算出與僅利用 MV4-11 進行培養所得之值之相對比。

【0140】圖19中表示以E:T比1:1及1:10將MV4-11設為標靶時之腫瘤存活細胞數相對比、與將末梢血細胞PMN、PBMC設為標靶時之存活細胞數相對比。CAR-T 001-B及CAR-T009-B~CAR-T014-B均於E:T比1:1下殺傷幾乎全部之腫瘤，另一方面，未對B細胞、NK細胞、嗜中性球(neutrophil)等末梢血細胞帶來影響。於E:T比1:10下，CAR-T 001-B及CAR-T 009-B~CAR-T 014-B均未殺傷腫瘤及末梢血細胞。根據該結果顯示，CAR-T 001-B及CAR-T 009-B~CAR-T 014-B若為具有腫瘤殺傷能力之細胞數，則不會對B細胞、NK細胞、嗜中性球等末梢血細胞帶來影響。

【0141】[實施例11 GMR.CAR-T之與骨髓細胞相關之作用]

為了評價實施例7中所製備之CAR-T 001-A及CAR-T 009~CAR-T 014對於正常骨髓細胞之影響，而進行源自骨髓細胞之菌落形成試驗。

具體而言，以成為 $1 \times 10^4$ 個/mL之方式利用含10%FBS、20 ng/mL之IL-3、SCF(Stem Cell Factor，幹細胞因子)及TPO(Thrombopoietin，血小板生成素)之RPMI 1640培養基(Thermo Fisher Scientific)製備源自健康人之骨髓細胞之CD34陽性組分(Veritas)[靶細胞(T)]。同樣地，以成為 $6 \times 10^3$ 個/mL之方式利用含10%FBS、20 ng/mL之IL-3、SCF及TPO之RPMI 1640培養基(Thermo Fisher Scientific)製備MV4-11[靶細胞(T)]。

【0142】以50  $\mu$ L/well將所製備之各靶細胞接種至96孔圓底培養板上。向其中以50  $\mu$ L/well接種CAR-T 001-A及CAR-T 009~CAR-T 014[效應細胞(E)]，以相對於源自健康人之骨髓細胞之CD34陽性組分E:T比成為20:1、6:1、2:1、0.6:1、0.2:1之方式，利用含10%FBS之RPMI 1640培養基加以稀釋，以相對於MV4-11 E:T比成為1:1、0.5:

1、0.25：1、0.125：1之方式，利用含10%FBS之RPMI 1640培養基加以稀釋。即，於96孔圓底培養板中，以100  $\mu$ L/well利用含有10%FBS、10 ng/mL之IL-3、SCF及TPO之RPMI 1640培養基以上述E：T比共培養效應細胞與靶細胞。

【0143】 共培養係進行2天。亦對未經基因導入之Mock-T細胞進行同樣之共培養試驗，又，亦設定以相同細胞數僅培養源自健康人之骨髓細胞之CD34陽性組分、或僅培養MV4-11所得之群作為對照群(CAR-T未添加群)。

【0144】 2天後，混合共培養液100  $\mu$ L與MethoCult Classic(Veritas)1 mL，並接種至SmartDish 6孔板(Veritas)。接種第7天後確認到菌落形成，其後進行計數。再者，於CD34陽性組分之情形時，觀察到複數種菌落，由於難以進行菌落之判別，故而使用自動菌落計數裝置之STEMvision(Veritas)，分成紅血球系細胞菌落與骨髓系細胞菌落而進行計數。另一方面，MV4-11之菌落由於僅為1種，故而無需判別，使用顯微鏡手動進行計數。

【0145】 圖20中示出於將源自健康人之骨髓細胞之CD34陽性組分設為標靶時，自以各E：T比繪製之點所描繪之S型曲線。對照群以外係使用3孔平均值繪製，對照群係使用6孔平均值繪製。S型曲線係使用GraphPad Prism 4 ver. 4.03(GraphPad)輸出，將參數設定為TOP = 100、BOTTOM  $\neq$  0後，藉由以下之式實施擬合。

【0146】

[數1]

式： $Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\log EC50 - X) * \text{HillSlope}))}$

【0147】 圖21中示出於將MV4-11設為標靶時，自以各E：T比繪製之點所描繪之S型曲線。繪製係使用2孔平均值。S型曲線係於將參數設定為TOP=100、BOTTOM=0後，藉由上述式實施擬合。

圖22中表示根據圖20算出之IC50值、根據圖21算出之EC50值、進而根據該等算出之安全範圍。其結果為，對於影響較大之骨髓系，安全範圍最大者為CAR-T 014。

【0148】 [實施例12 GMR.CAR-T於體內之效果1]

以與實施例10同樣之方式，使用表現質體(CAR 009、CAR 011及CAR 012)進行對PBMC之電導入操作及T細胞之培養、擴增操作，而新製備GMR.CAR-T細胞(CAR-T 009-C、CAR-T 011-C及CAR-T 012-C)。將於本實施例中所使用之CAR-T 009-C、CAR-T 011-C及CAR-T 012-C於第14天之表現分析結果示於圖23。GMR.CAR表現率分別為CAR-T 009-C：25.7%、CAR-T 011-C：32.1%、CAR-T 012-C：25.2%。

【0149】 為了確認該等GMR.CAR-T細胞於THP-1帶癌小鼠模型中之效果，而進行下述活體內實驗。小鼠係使用7週齡之雌性NSG小鼠NOD.Cg-Prkdc<scid>Il2rg<tm1Wjl>/SzJ(日本Charles River)，以6週齡交付後，進行6天適應，其後用於實驗中。

於第0天使THP-1細胞株以成為 $1 \times 10^6$ 個/小鼠之方式利用150  $\mu$ L之D-PBS懸浮，並對NSG小鼠於異氟烷麻醉下進行頸靜脈內投予。

於第3天使培養第16天之CAR-T細胞以總T細胞成為 $5 \times 10^6$ 個/小鼠之方式利用150  $\mu$ L之D-PBS懸浮，並對NSG小鼠於異氟烷麻醉下自頸靜脈投予。

【0150】 每隔1~2天觀察小鼠之狀態直至第148天，進行卡普蘭-邁

耶 (Kaplan-Meier) 分析，並藉由對數等級 (Log-rank)(Cochran-Mantel-Haenszel) 實驗進行統計分析。

又，觀察小鼠之狀態，對判斷達到以下所設定之人道終點之小鼠進行安樂死而使小鼠死亡。

人道終點：

- 跛行
- 腫瘤之直徑達到20 mm
- 體重於7天內減少25%以上。

【0151】其結果為，如圖 24 所示，顯示 CAR-T 009-C(P 值 = 0.0086)、CAR-T 011-C(P 值 = 0.0011)及 CAR-T 012-C(P 值 = 0.0011)與 PBS 投予群相比，顯著地延長小鼠之存活期間。

【0152】進而，於 CAR-T 011-C 及 CAR-T 012-C 投予小鼠與 CAR-T 009-C 投予小鼠間之統計分析中，顯示 CAR-T 011-C(P 值 = 0.0042)及 CAR-T 012-C(P 值 = 0.0136)與 CAR-T 009-C 相比，顯著地延長小鼠之存活期間。

根據該等結果顯示，於 THP-1 帶癌小鼠模型中，CAR-T 011-C 及 CAR-T 012-C 與 CAR-T 009-C 相比，具有較強之抗腫瘤效果。

【0153】 [實施例13 GMR.CAR-T於活體內之效果2]

以與實施例10同樣之方式，使用表現質體(CAR 009~CAR 014)進行對PBMC之電導入操作及T細胞之培養、擴增操作，而新製備GMR.CAR-T細胞(CAR-T 009-D~CAR-T 014-D)。將本實施例中所使用之CAR-T 009-D~CAR-T 014-D於第14天之表現分析結果示於圖25。GMR.CAR表現率分別為CAR-T 009-D：33.3%、CAR-T 010-D：39.6%、CAR-T 011-



D：35.1%、CAR-T 012-D：37.4%、CAR-T 013-D：43.0%、CAR-T 014-D：40.9%。

【0154】根據所獲得之表現率與細胞數算出CAR陽性細胞數，使投予至各群之CAR陽性細胞成為 $1.2 \times 10^6$ 。為了確認於MV4-11帶癌小鼠模型中之效果，而與實施例12同樣地進行下述活體內實驗。使用8週齡之雌性NSG小鼠，以6週齡交付後進行13天適應，其後用於實驗中。

【0155】於第0天使MV4-11細胞株以成為 $1 \times 10^6$ 個/小鼠之方式利用150  $\mu$ L之D-PBS懸浮，並對NSG小鼠於異氟烷麻醉下自頸靜脈投予。

於第3天以成為CAR陽性細胞 $1.2 \times 10^6$ 個/小鼠之方式，利用150  $\mu$ L之D-PBS使培養第16天之CAR-T細胞懸浮，並對NSG小鼠於異氟烷麻醉下自頸靜脈投予。

【0156】每隔1~2天觀察小鼠之狀態直至第116天，進行卡普蘭-邁耶分析，並藉由對數等級(Cochran-Mantel-Haenszel)實驗進行統計分析。又，觀察小鼠之狀態，對與實施例12同樣地判斷到達人道終點之小鼠進行安樂死而使小鼠死亡。

又，於第52天使用塗佈有EDTA (Ethylenediamine Tetraacetic Acid，乙二胺四乙酸)-2K之血細胞比容毛細管(TOKYO GLASS KIKAI)，採血100  $\mu$ L左右，藉由委託業務之定量PCR(MLL-AF4嵌合mRNA定量(SRL))對血液中之腫瘤細胞之殘留量進行定量。

【0157】其結果為，如圖26及27所示，顯示CAR-T 009-D(P值=0.0042)、CAR-T 011-D(P值=0.0216)、CAR-T 012-D(P值=0.0042)、CAR-T 010-D(P值=0.0042)、CAR-T 013-D(P值=0.0042)及CAR-T 014-D(P值=0.0042)與PBS投予群相比，顯著地延長小鼠之存活期間。

【0158】 進而，根據第116天之卡普蘭邁耶分析、及圖28所示之第52天之末梢血中腫瘤之定量PCR之結果顯示，於MV4-11帶癌小鼠模型中，CAR-T 010-D及CAR-T 014-D與CAR-T 013-D相比，具有較強之抗腫瘤效果。

【0159】 [實施例14 GMR.CAR-T於活體內之效果3]

以與實施例10同樣之方式，使用表現質體(CAR 001及CAR 014)進行對PBMC之電導入操作及T細胞之培養、擴增操作，而新製備GMR.CAR-T細胞(CAR-T 001-C及CAR-T 014-F)。又，作為用於表現率算出之比較對照用，使用於Morita. et. al. Molecular Therapy: Methods & Clinical Development Vol. 8 March 2018中所記載之無CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>之CD19.CAR質體同樣地製備CD19.CAR-T。

【0160】 將於本實施例中所使用之CAR-T 001-C及CAR-T 014-F於第14天之表現分析結果示於圖29。GMR.CAR表現率分別為CAR-T 001-C：32.3%與CAR-T 014-F：14.1%。

根據所獲得之表現率與細胞數算出CAR陽性細胞數，使投予至各群之CAR陽性細胞成為 $0.7 \times 10^6$ 個。為了確認於MV4-11帶癌小鼠模型中之效果，而與實施例12同樣地進行下述活體內實驗。使用7週齡之雌性NSG小鼠，以6週齡交付後，進行6天適應，其後用於實驗中。

【0161】 於第0天使MV4-11細胞株以成為 $1 \times 10^6$ 個/小鼠之方式利用150  $\mu$ L之D-PBS懸浮，並對NSG小鼠於無麻醉下自尾靜脈投予。

於第3天使培養第16天之CAR-T細胞以成為CAR陽性細胞 $0.7 \times 10^6$ 個/小鼠之方式利用150  $\mu$ L之D-PBS懸浮，並對NSG小鼠於無麻醉下自尾靜脈投予。

每隔1~2天觀察小鼠之狀態直至第105天，進行卡普蘭-邁耶分析，並藉由對數等級(Cochoran-Mantel-Haenszel)實驗進行統計分析。又，觀察小鼠之狀態，對與實施例12同樣地判斷到達人道終點之小鼠進行安樂死而使小鼠死亡。

【0162】其結果為，如圖30所示，顯示CAR-T 014-F(P值=0.0050)與PBS投予群相比，顯著地延長小鼠之存活期間，顯示CAR-T 014-F(P值=0.0081)與CAR-T 001-C相比，亦顯著地延長小鼠之存活期間。

【0163】[實施例15 於腫瘤細胞表面之GMR $\alpha$ (CD116)之表現分析]

利用流式細胞儀，對上述實施例之抗腫瘤細胞活性評價中所使用之腫瘤細胞株之細胞表面之GMR $\alpha$ (CD116)之表現率進行分析。對作為急性骨髓性白血病(AML)之細胞株之THP-1、Kasumi-1、shinAML-1、MV4-11株進行分析。具體而言，採集 $1\sim 2\times 10^5$ 個細胞，添加APC抗人類CD116抗體(Miltenyi Biotec)5  $\mu$ L及PE抗人類CD33抗體(Miltenyi Biotec)5  $\mu$ L並使該等懸浮，於4°C下、遮光下進行抗體標記反應20分鐘。20分鐘後，利用適量之D-PBS洗淨細胞，藉由離心分離使細胞沈澱並去除上清液，其後再懸浮於適量之D-PBS中，對所得之樣品使用FACSCalibur進行分析，並測定CD33/CD116之表現率。

【0164】表1中表示各腫瘤細胞表面之CD33/CD116表現率。於THP-1、Kasumi-1、shinAML-1及MV4-11之全部中，CD33/CD116陽性率為90%以上。

## 【0165】

[表1]

細胞株	CD33 陽性/CD116 陽性(%)
THP-1	99.21
Kasumi-1	94.24
shinAML-1	98.93
MV4-11	99.84

## 【0166】

## [實施例16 GMR.CAR表現T細胞之表現型分析]

以與實施例7同樣之方式，使用表現質體CAR 014進行對PBMC之電導入操作及T細胞之培養、擴增操作，而新製備GMR.CAR-T細胞(CAR-T 014-E)。將CAR-T 014-E於第14天之表現分析結果示於圖31。GMR.CAR表現率為9.75%，高於在Mock-T細胞中之表現率(1.75%)，成功製備GMR.CAR表現T細胞。

【0167】 對所製備之GMR.CAR表現T細胞之細胞數進行計數，並藉由流式細胞儀分析，對 $1 \times 10^6$ 個細胞評價GMR.CAR-T細胞之表現型。採集 $1 \times 10^6$ 個細胞，向經離心分離之細胞中添加人類BD Fc Block(Becton Dickinson股份有限公司)，藉此進行Fc受體之封閉處理，其後適量添加BB515小鼠抗人類CD197抗體(Becton Dickinson股份有限公司)、PE小鼠抗人類CD27抗體(Becton Dickinson股份有限公司)、APC小鼠抗人類CD62L抗體(Becton Dickinson股份有限公司)、APC-H7小鼠抗人類CD45RO抗體(Becton Dickinson股份有限公司)、Brilliant Violet421小鼠抗人類CD56抗體(Becton Dickinson股份有限公司)、BV510小鼠抗人類CD8抗體(Becton Dickinson股份有限公司)、BV605小鼠抗人類CD45RA抗體(Becton Dickinson股份有限公司)、BV650小鼠抗人類CD3抗體

(Becton Dickinson股份有限公司)及BV786小鼠抗人類CD4抗體(Becton Dickinson股份有限公司)並使該等懸浮，於4°C下、遮光下進行20分鐘抗體標記反應。

【0168】 20分鐘後，利用適量之含3%FBS之D-PBS洗淨細胞，藉由離心分離使細胞沈澱並去除上清液，其後再懸浮於適量之含3%FBS之D-PBS中，對所獲得之樣品使用FACSCelesta(Becton Dickinson股份有限公司)及FLOWJO(Becton Dickinson股份有限公司)進行分析，將CD3陽性且CD45RA/CD62L陽性或CD3陽性且CD45RA/CD197陽性作為指標，分析GMR.CAR之表現型。其結果為，所製備之GMR.CAR表現T細胞之六成以上為幹細胞記憶T細胞。

[產業上之可利用性]

【0169】 根據本發明，提供一種與在細胞表面表現人類粒細胞-巨噬細胞菌落刺激因子(GM-CSF)受體之靶細胞特異性地結合而賦予優異之細胞毒殺活性之CAR-T細胞。本發明之細胞可用於針對AML等疾病之過繼免疫治療。

於本說明書中所引用之所有刊物、日本專利及專利申請係直接藉由引用而編入至本說明書中。

## 【序列表】

<110> 國立大學法人信州大學(SHINSHU UNIVERSITY)

<120> 基因修飾細胞及其製備方法

<130> PH-7741-PCT

<140> 108108890

<141> 2019-03-15

<150> JP 2018-050266

<151> 2018-03-16

<160> 34

<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 E21R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 Arg 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> 127

<212> PRT  
<213> 人工

<220>  
<223> GM-CSF E21K變異體多肽

<400> 3

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> 4  
<211> 127  
<212> PRT  
<213> 人工

<220>  
<223> GM-CSF E21H變異體多肽

<400> 4



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

Asn Ala Ile Gln His 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> 5  
<211> 127  
<212> PRT  
<213> 人工

<220>  
<223> GM-CSF E21D變異體多肽

<400> 5

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

Asn Ala Ile Gln Asp 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> 6  
 <211> 127  
 <212> PRT  
 <213> 人工

<220>  
 <223> GM-CSF E21S變異體多肽

<400> 6

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

Asn Ala Ile Gln Ser 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> 7

<211> 127

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> GM-CSF E21A變異體多肽

<400> 7

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

Asn Ala Ile Gln Ala 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> 8  
 <211> 127  
 <212> PRT  
 <213> 人工

<220>  
 <223> GM-CSF E21F變異體多肽

<400> 8

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

Asn Ala Ile Gln Phe 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> 9  
 <211> 87  
 <212> DNA  
 <213> 智人

<400> 9  
 gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gtgatcccg c gagcccaaa 60  
 tctcctgaca aaactcacac atgcca 87

<210> 10  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 10  
 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> 11  
 <211> 339  
 <212> DNA  
 <213> 智人

<400> 11  
 ccgtgccag cacctgaact cctgggggga ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaacct 60  
 aaggacacc tcatgatctc ccggaccct gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc 120  
 cacgaagacc ctgaggtaa gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc 180  
 aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc 240  
 gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag gagtacaagt gcaaggcttc caacaaagcc 300  
 ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc aaagccaaa 339

<210> 12  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> 智人

&lt;400&gt; 12

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

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 321

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 13

gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag 60

aaccagggtca gcctgacctg cctgggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 120

tgggagagca atgggcaacc ggagaacaac tacaagacca cgctcccgt gctggactcc 180

gacggctcct tcttctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 240

aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 300

ctctccctgt ctccgggtaa a

321

<210> 14  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 14

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> 15  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> 人工

<220>  
<223> (G4S)3序列

<400> 15

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

<210> 16  
 <211> 81  
 <212> DNA  
 <213> 智人

<400> 16  
 ttttgggtgc tgggtggtgt tgggtggagtc ctggcttgct atagcttgct agtaacagtg 60  
 gcctttatta ttttctgggt g 81

<210> 17  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 17  
 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> 18  
 <211> 123  
 <212> DNA  
 <213> 智人

<400> 18  
 aggagtaaga ggagcaggct cctgcacagt gactacatga acatgactcc ccgccgcccc 60  
 gggcccaccc gcaagcatta ccagccctat gccccaccac gcgacttcgc agcctatcgc 120  
 tcc 123

<210> 19  
 <211> 41  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 19  
 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> 20

<211> 339

<212> DNA

<213> 智人

<400> 20

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

tacgacgcc ttcacatgca ggcctgccc cctcgctaa 339

<210> 21

<211> 112

<212> PRT

<213> 智人

<400> 21

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> 22  
<211> 800  
<212> DNA  
<213> 智人

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

<220>  
<221> 信號肽  
<222> (33)..(83)

<220>  
<221> 成熟肽  
<222> (84)..(464)

<400> 22  
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 Leu Gln Thr Arg Leu Glu Leu Tyr Lys Gln Gly Leu Arg Gly Ser Leu 55 60 65 70	293
acc aag ctc aag ggc ccc ttg acc atg atg gcc agc cac tac aag cag Thr Lys Leu Lys Gly Pro Leu Thr Met Met Ala Ser His Tyr Lys Gln 75 80 85	341
cac tgc cct cca acc ccg gaa act tcc tgt gca acc cag att atc acc His Cys Pro Pro Thr Pro Glu Thr Ser Cys Ala Thr Gln Ile Ile Thr 90 95 100	389
ttt gaa agt ttc aaa gag aac ctg aag gac ttt ctg ctt gtc atc ccc Phe Glu Ser Phe Lys Glu Asn Leu Lys Asp Phe Leu Leu Val Ile Pro 105 110 115	437
ttt gac tgc tgg gag cca gtc cag gag tgagaccggc cagatgaggc Phe Asp Cys Trp Glu Pro Val Gln Glu 120 125	484
tgccaagcc ggggagctgc tctctcatga aacaagagct agaaactcag gatggtcatc	544
ttggaggac caaggggtgg gccacagcca tgggtggagt ggcctggacc tgcctgggc	604
cacactgacc ctgatacagg catggcagaa gaatgggaat attttatact gacagaaatc	664
agtaatattt atatatttat atttttaaaa tatttattta tttatttatt taagttcata	724
ttccatattt attcaagatg ttttaccgta ataattatta ttaaaaatat gcttctactt	784
gaaaaaaaa aaaaaa	800
<210> 23	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 用於製備E21R之前置引子	
<400> 23	
agagcccggc gtctcctgaa cctgagta	28
<210> 24	
<211> 28	

<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 用於製備E21H之前置引子	
<400> 24	
cacgcccggc gtctcctgaa cctgagta	28
<210> 25	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 用於製備E21S之前置引子	
<400> 25	
agcgcccggc gtctcctgaa cctgagta	28
<210> 26	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 用於製備E21A之前置引子	
<400> 26	
gccgcccggc gtctcctgaa cctgagtaga	30
<210> 27	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 用於突變之反置引子	
<400> 27	
ctggatggca ttcacatcga gggtc	25
<210> 28	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工	

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 用於構建GMR.CAR dCH2CH3之前置引子

&lt;400&gt; 28

ttttgggtgc tgggtggtgt tgggtggagtc

30

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 用於構建GMR.CAR dCH2CH3之反置引子

&lt;400&gt; 29

tgggcatgtg tgagttttgt caggagat

28

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 70

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 用於構建GMR.CAR dCH2+G4S3之前置引子

&lt;400&gt; 30

ggtggtggtg gatccggcgg cggcggctcc ggtggtggtg gttctaaaga tcccaaattt

60

tgggtgctgg

70

&lt;210&gt; 31

&lt;211&gt; 34

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 用於構建GMR.CAR dCH2+G4S3之反置引子

&lt;400&gt; 31

tgggcatgtg tgagttttgt caggagattt gggc

34

&lt;210&gt; 32

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工

<220>

<223> 用於製備E21R之前置引子

<400> 32

agagcccggc gtctcctgaa cctg

24

<210> 33

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 用於製備E21R/E21K之反置引子

<400> 33

ctggatggca ttcacatgct cccaggg

27

<210> 34

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 用於製備E21K之前置引子

<400> 34

aagcccggc gtctcctgaa cctg

24

## 【發明申請專利範圍】

### 【第1項】

一種基因修飾細胞，其係導入有編碼具有與人類粒細胞-巨噬細胞菌落刺激因子(GM-CSF)受體特異性地結合之標靶結合區、跨膜區、及細胞內訊號傳遞區之嵌合抗原受體(CAR, chimeric antigen receptor)蛋白質之聚核苷酸者，且上述標靶結合區係具有序列編號1所表示之胺基酸序列中之第21號麩胺酸被置換為選自由精胺酸、離胺酸、組胺酸、天冬胺酸、絲胺酸、丙胺酸、苯丙胺酸所組成之群中之一者之胺基酸之序列之變異體多肽。

### 【第2項】

如請求項1之細胞，其於細胞膜上表現與GM-CSF受體結合之CAR蛋白質。

### 【第3項】

如請求項1或2之細胞，其中CAR蛋白質進而包含共刺激區及/或細胞外間隔區。

### 【第4項】

如請求項1或2之細胞，其中細胞內訊號傳遞區為人類CD3 $\zeta$ 。

### 【第5項】

如請求項3之細胞，其中共刺激區為人類CD28或人類4-1BB。

### 【第6項】

如請求項3之細胞，其中細胞外間隔區包含人類IgG1之鉸鏈、CH2、及/或CH3區或其一部分、及/或人工間隔序列。

### 【第7項】

如請求項1或2之細胞，其中標靶結合區係具有序列編號1所表示之胺基酸序列中之第21號麩胺酸被置換為精胺酸或離胺酸之序列之變異體多肽。

**【第8項】**

一種CAR蛋白質表現細胞之製備方法，其包含使用載體將編碼與人類GM-CSF受體特異性地結合之嵌合抗原受體(CAR)蛋白質之聚核苷酸導入至細胞之操作，且上述蛋白質包含序列編號1所表示之胺基酸序列中之第21號麩胺酸被置換為選自由精胺酸、離胺酸、組胺酸、天冬胺酸、絲胺酸、丙胺酸、苯丙胺酸所組成之群中之一者之胺基酸之胺基酸序列。

**【第9項】**

一種載體，其係包含編碼與人類GM-CSF受體特異性地結合之嵌合抗原受體(CAR)蛋白質之聚核苷酸者，且上述蛋白質包含序列編號1所表示之胺基酸序列中之第21號麩胺酸被置換為選自由精胺酸、離胺酸、組胺酸、天冬胺酸、絲胺酸、丙胺酸、苯丙胺酸所組成之群中之一者之胺基酸之胺基酸序列。

**【第10項】**

一種針對與GM-CSF受體表現細胞相關之疾病之治療劑，其包含如請求項1至7中任一項之細胞。

**【第11項】**

一種醫藥組合物，其包含如請求項10之治療劑及醫藥上所容許之載體。

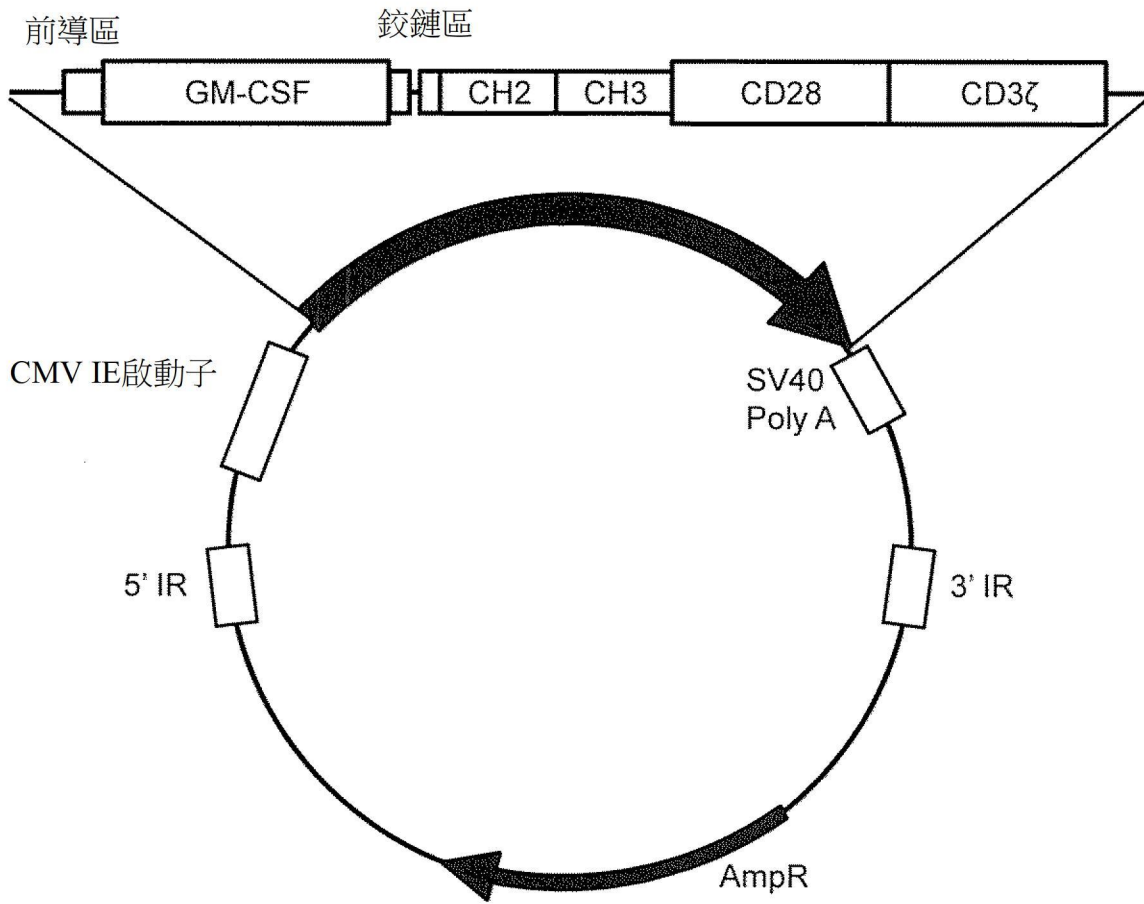
**【第12項】**

如請求項10之治療劑或如請求項11之組合物，其中與GM-CSF受體

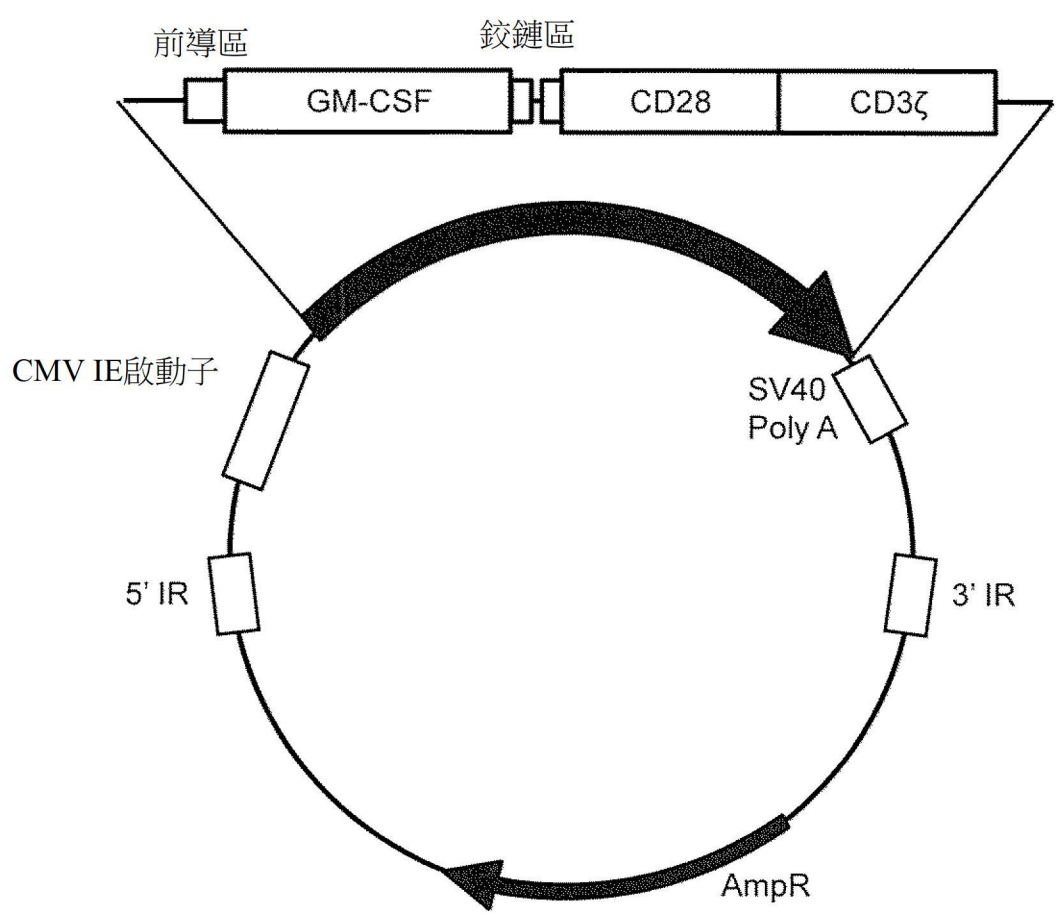


表現細胞相關之疾病係選自幼年型骨髓單核細胞性白血病(JMML)、急性骨髓性白血病(AML)、神經膠質瘤、神經母細胞瘤、神經膠母細胞瘤、腦腫瘤、直腸結腸腺癌、前列腺癌、腎癌、黑色素瘤及肺小細胞癌。

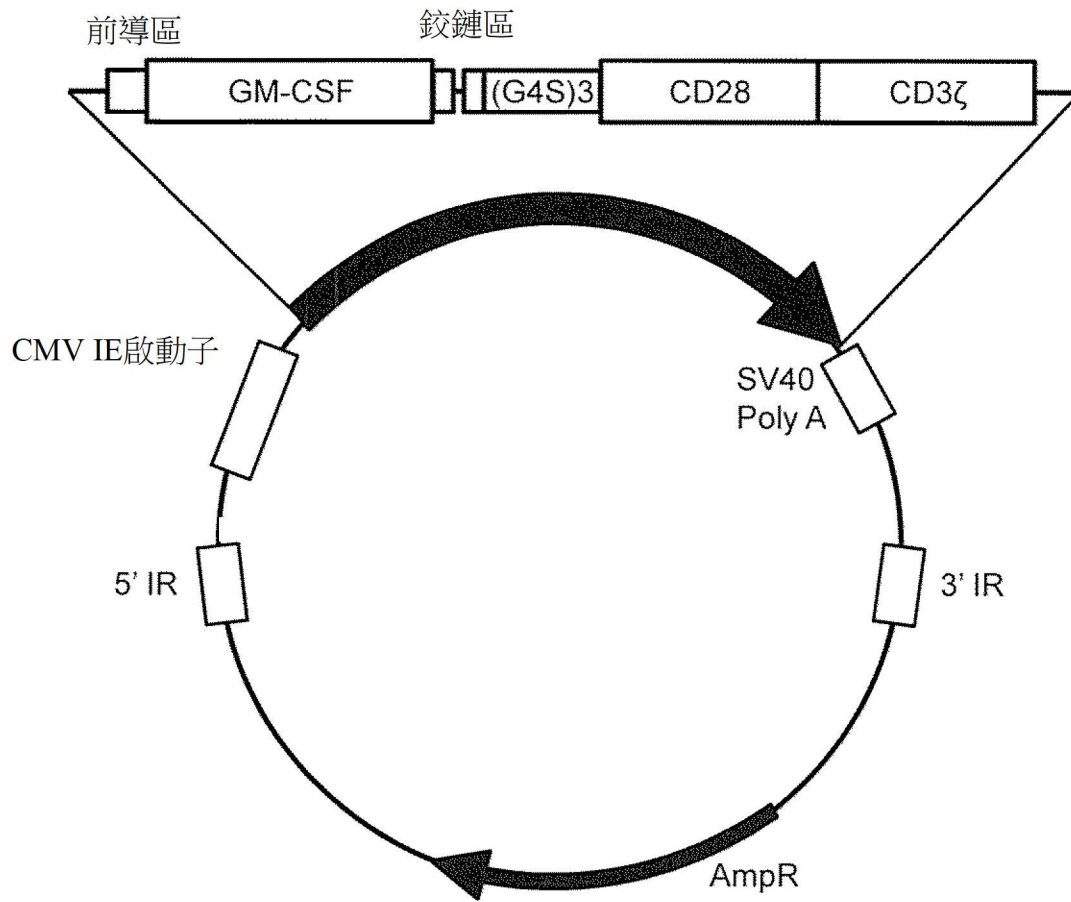
【發明圖式】



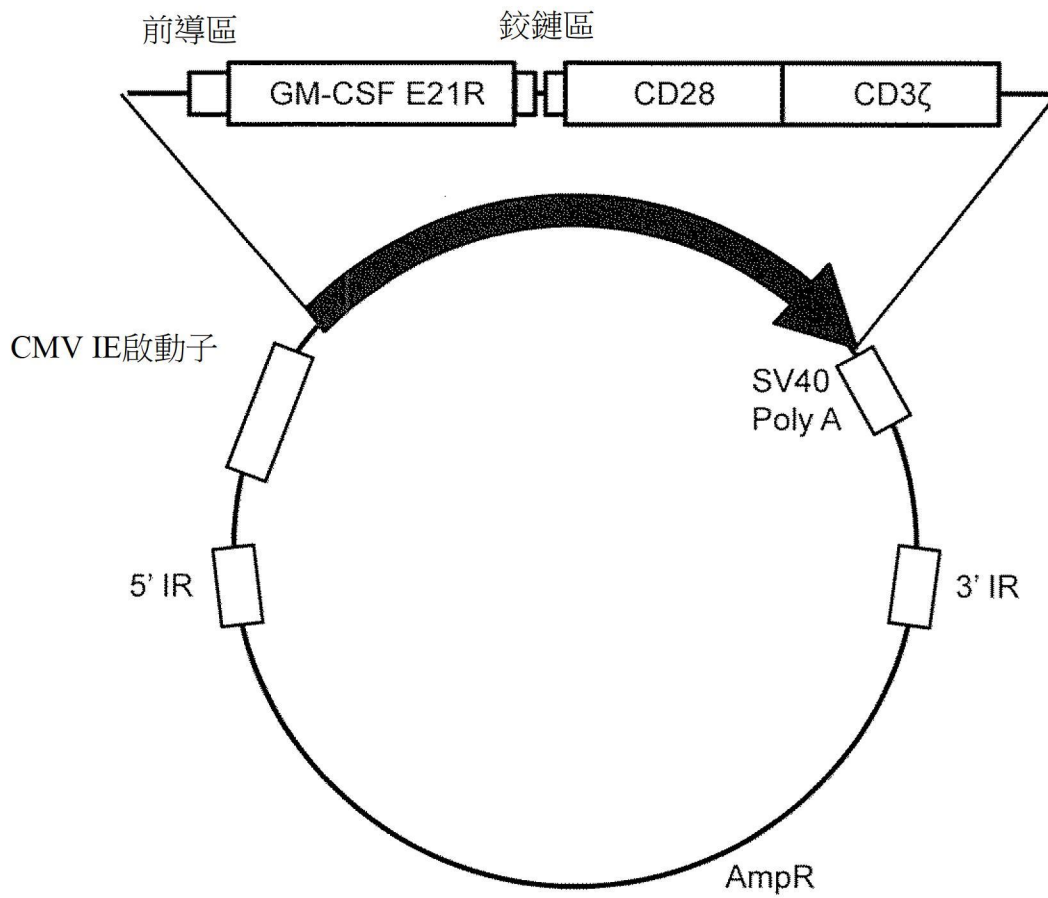
【圖1】



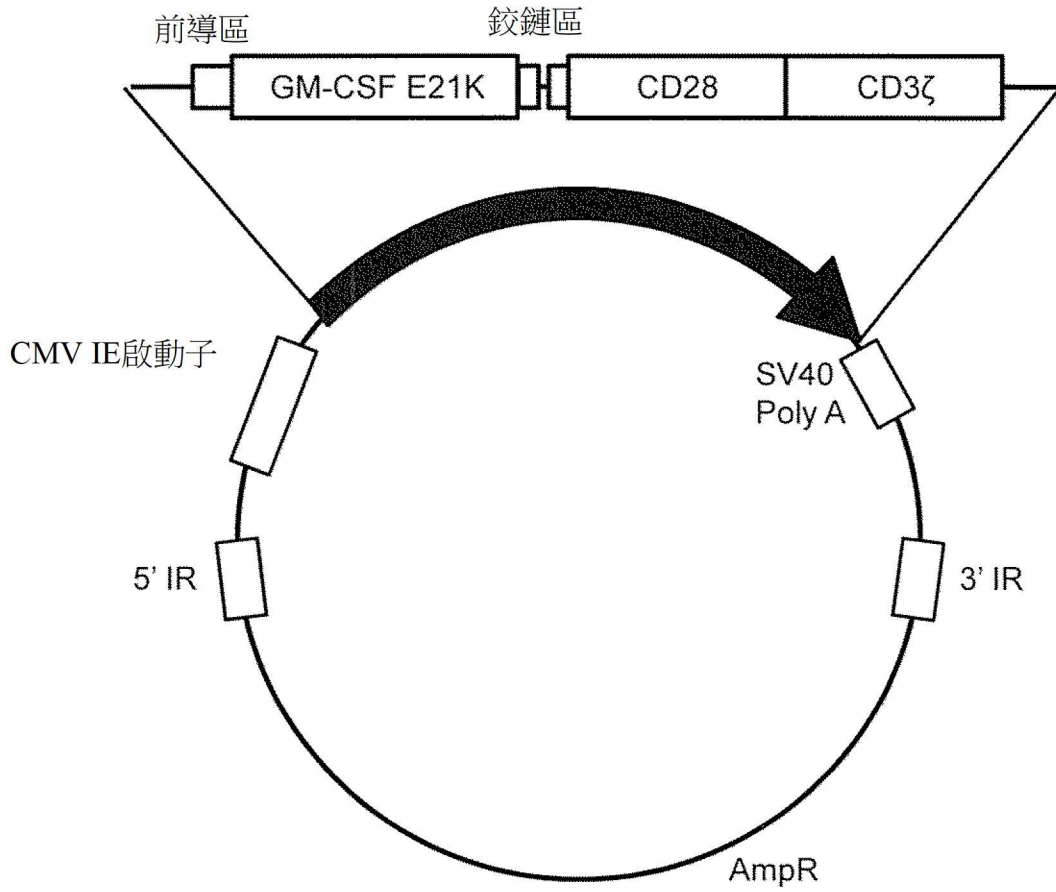
【圖2】



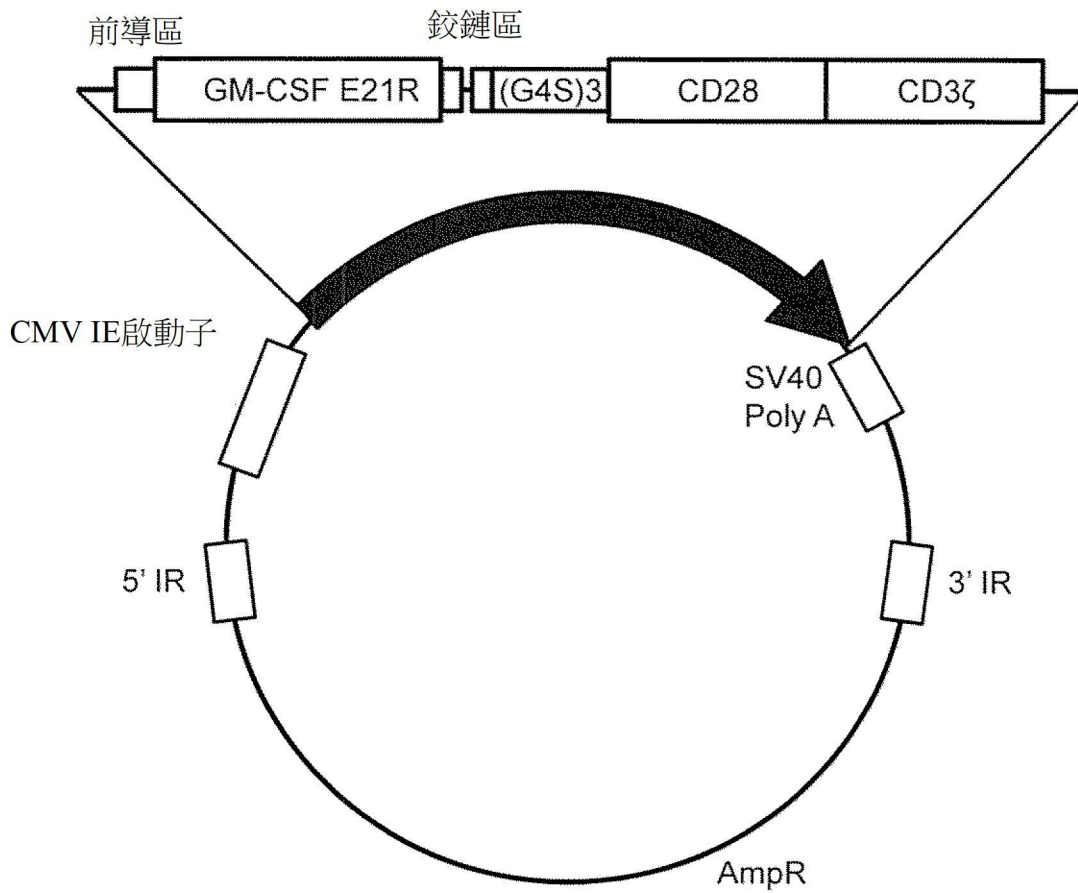
【圖3】



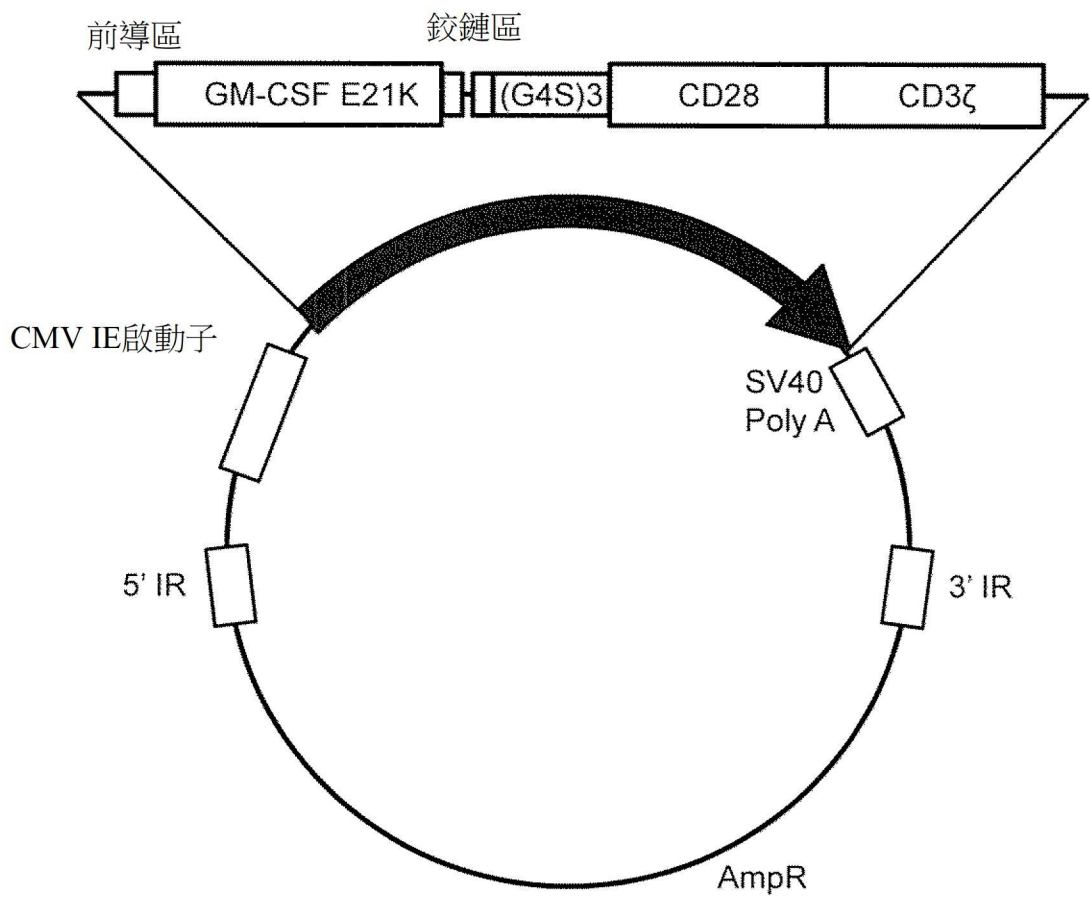
【圖4】



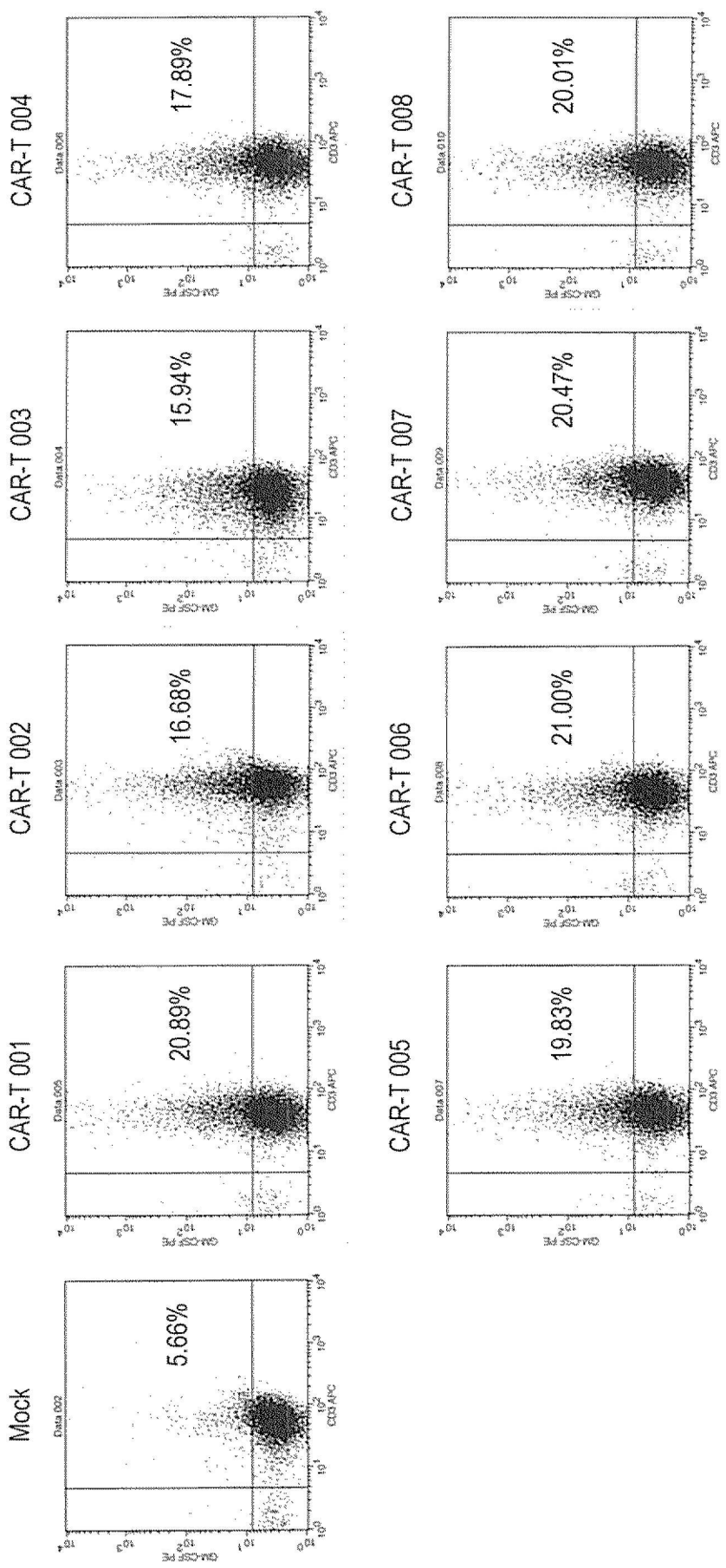
【圖5】



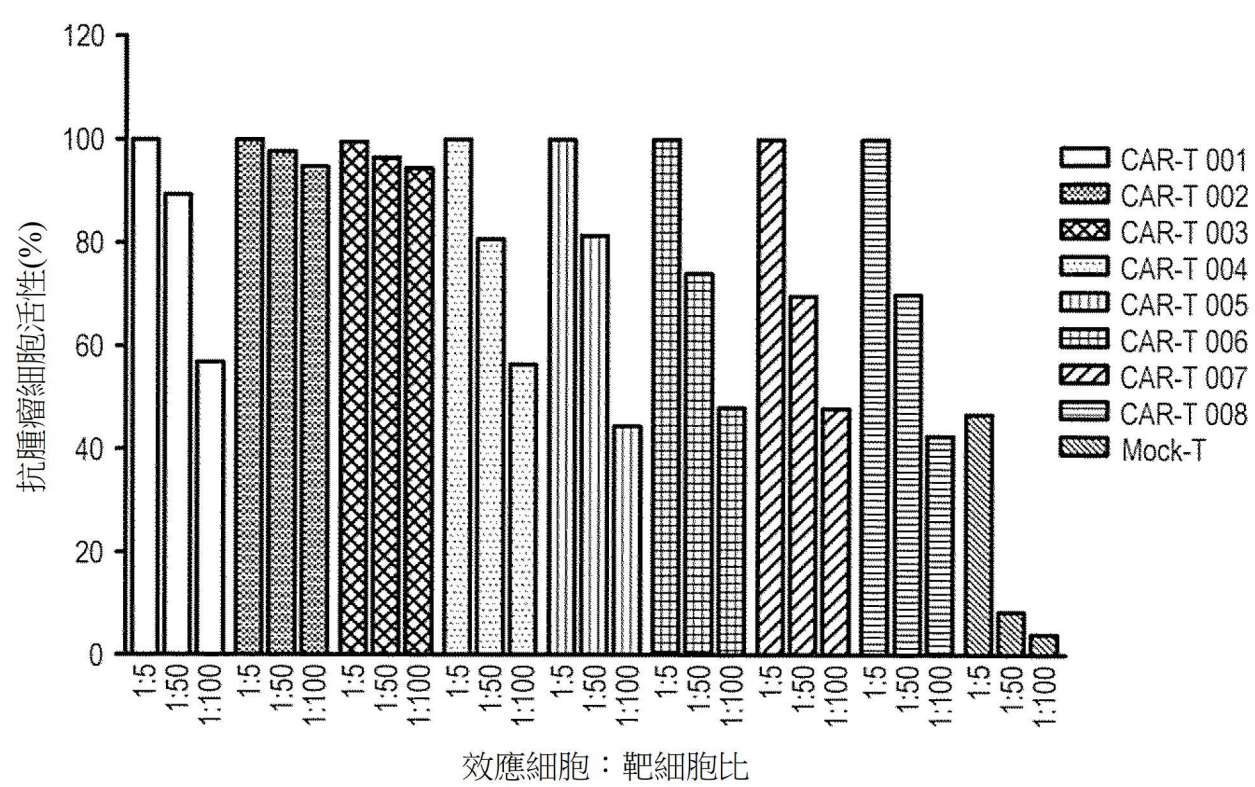
【圖6】



【圖7】

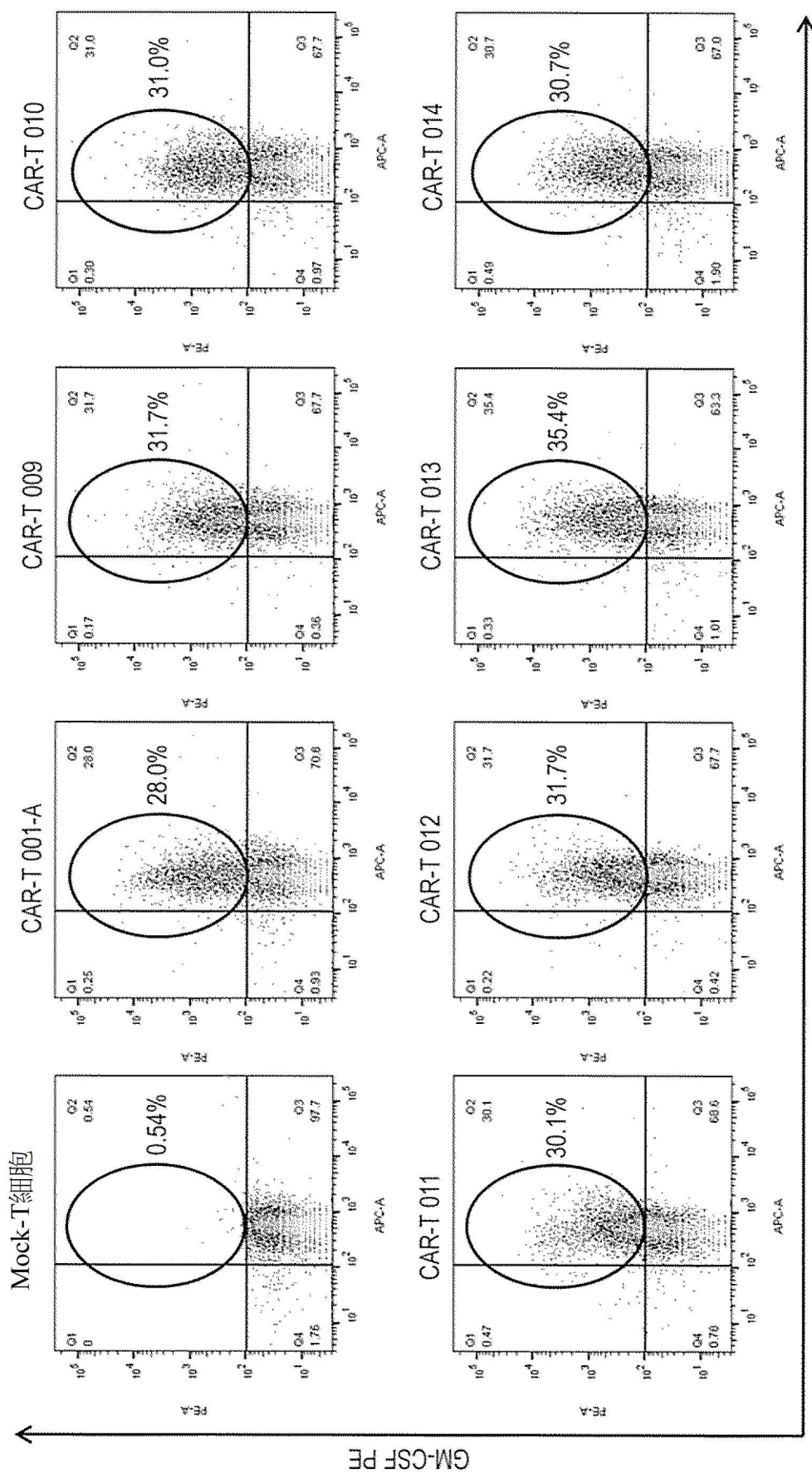


【圖8】



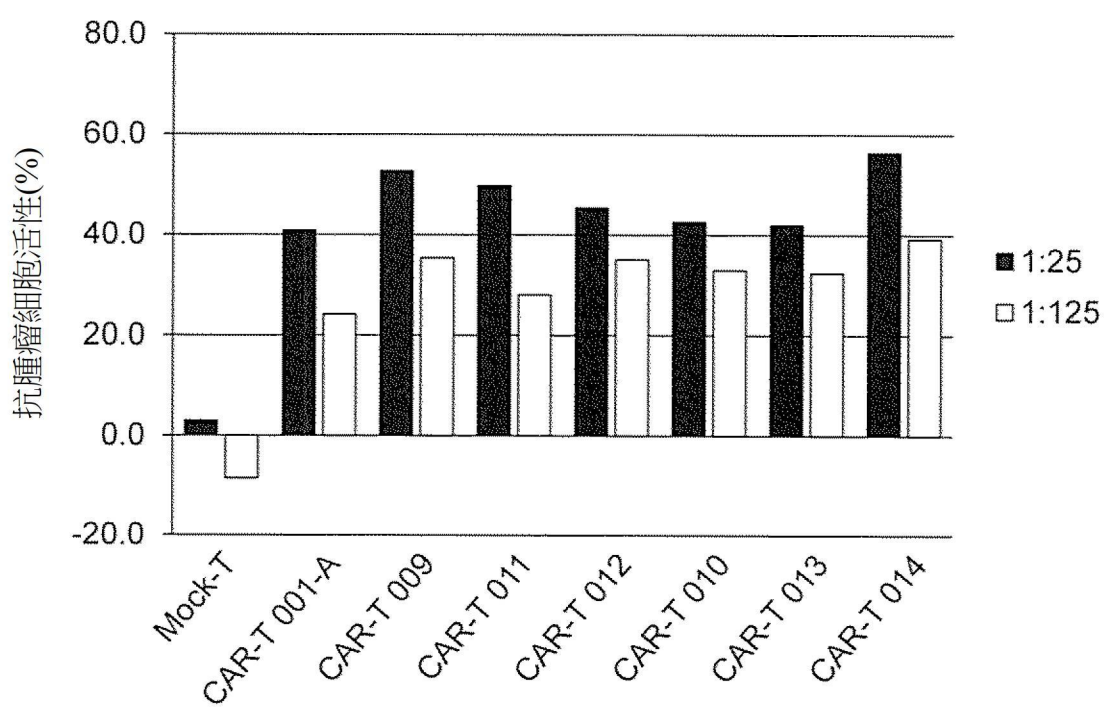
【圖9】



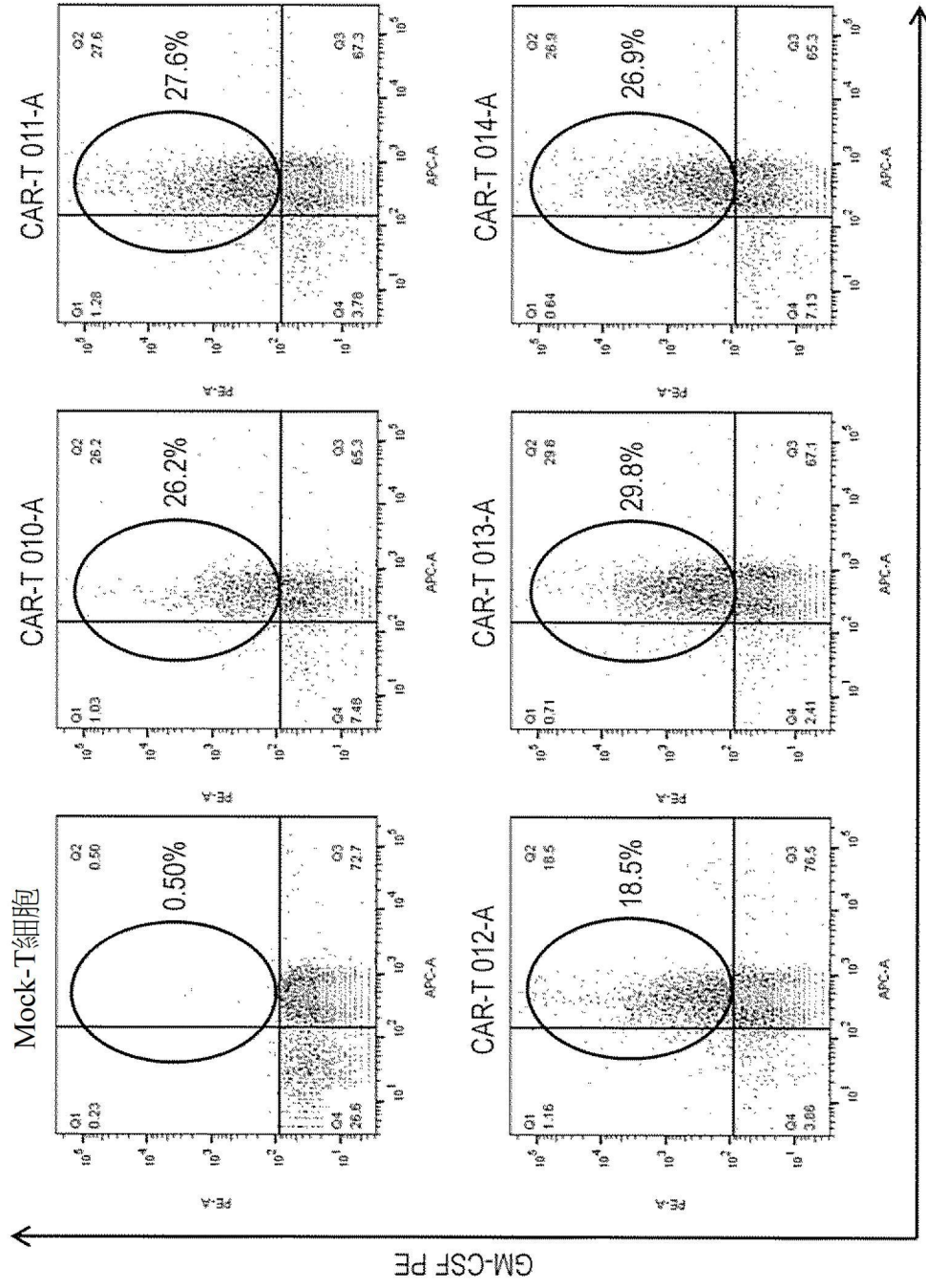


CD3 APC

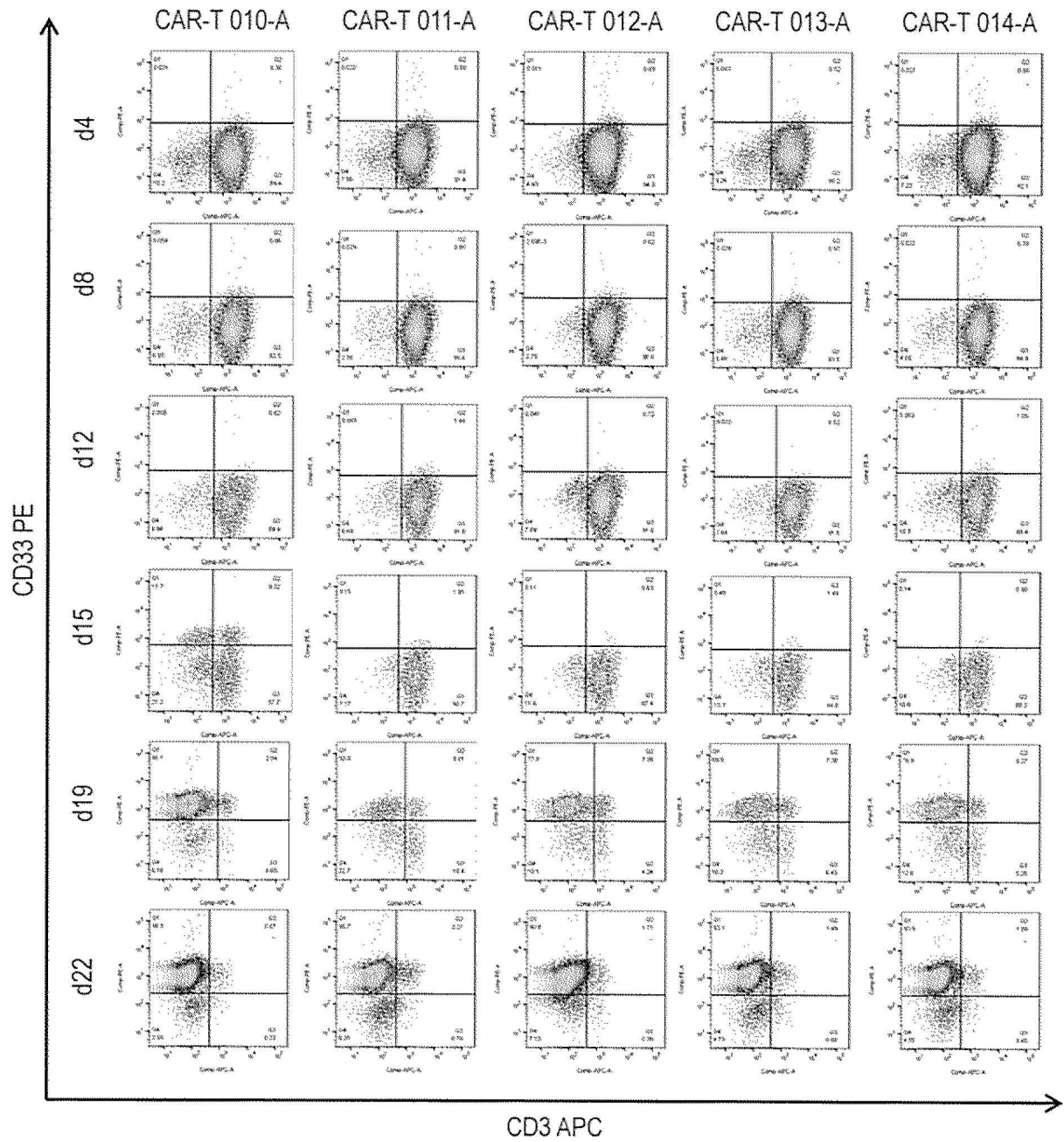
【圖10】



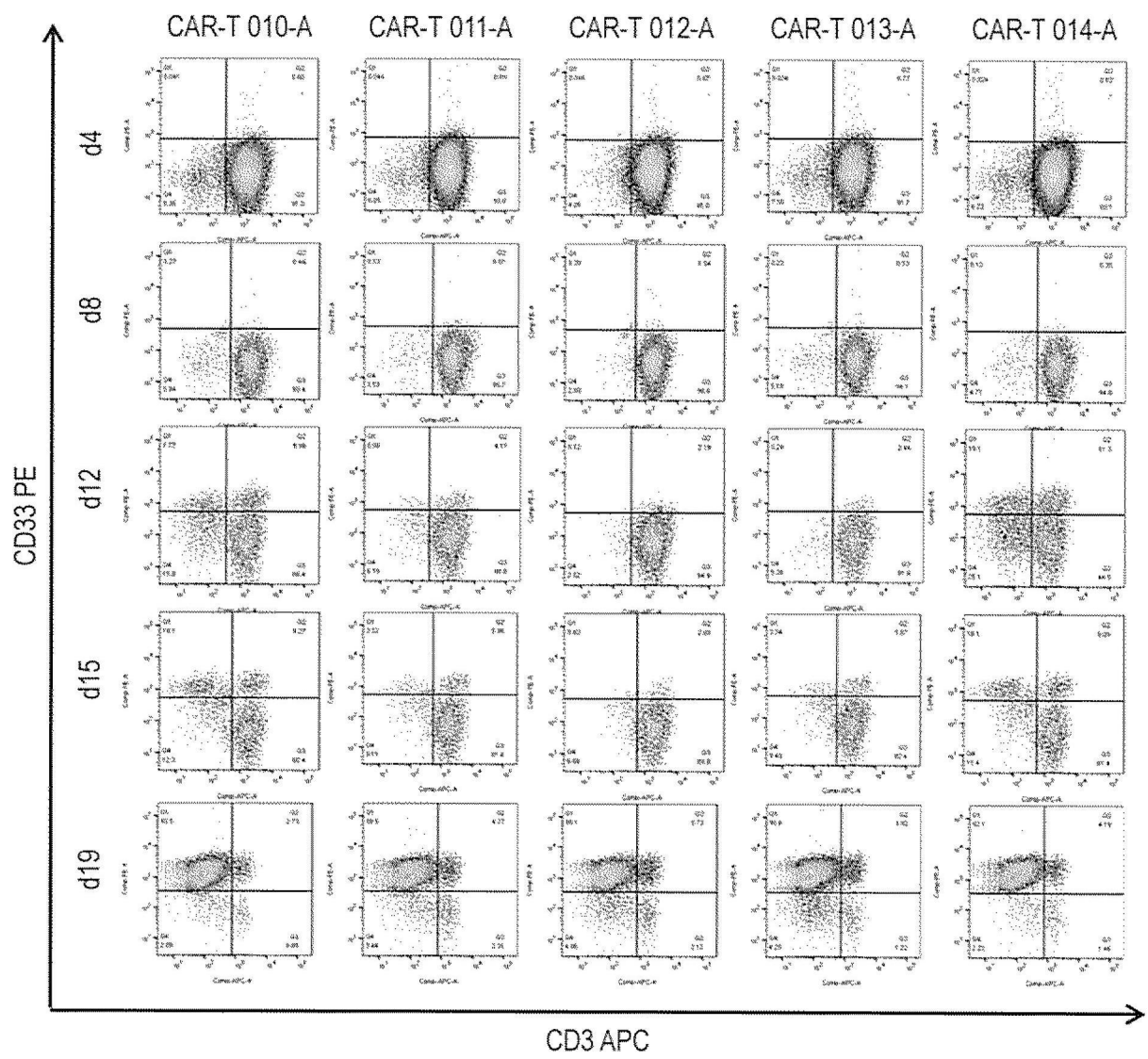
【圖11】



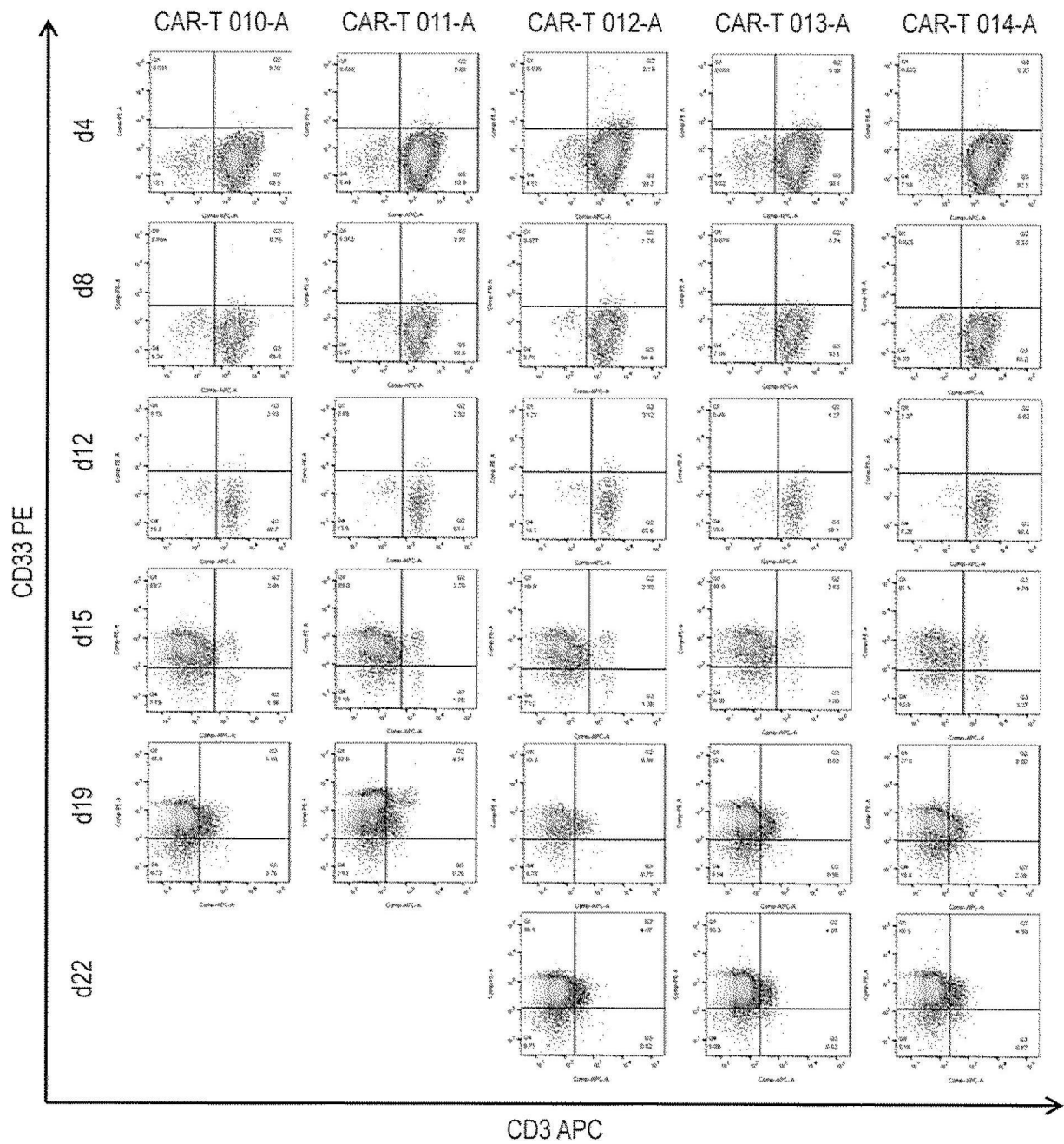
CD3 APC  
【圖12】



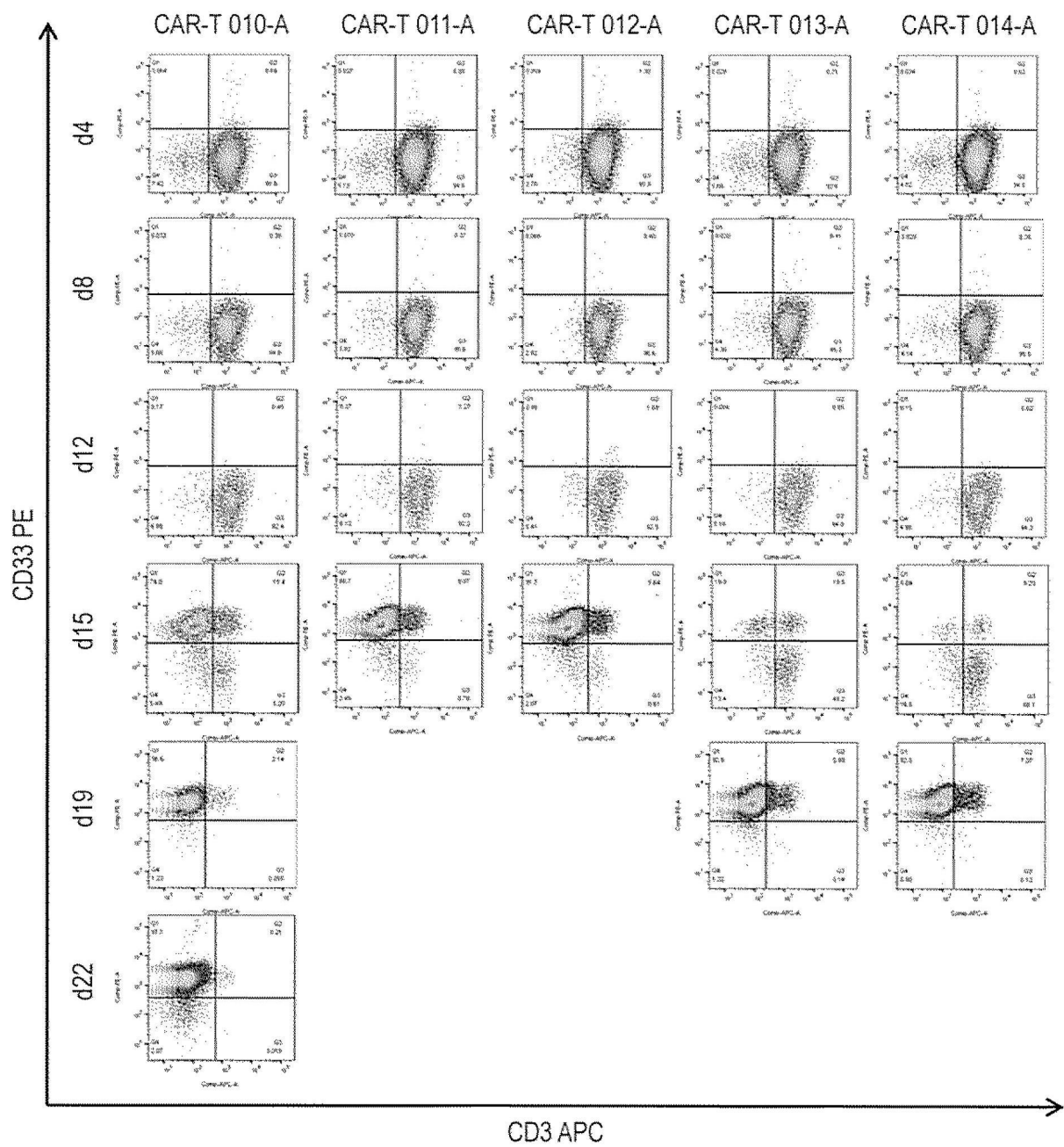
【圖13】



【圖14】



【圖15】



【圖16】

THP-1	期間1		期間2		期間3		期間4		期間5		期間6	
	0	4	4	8	8	12	12	15	15	19	19	22
天												
無效應細胞	250000	1345650	250000	1103630	250000	1039230	250000	982760	250000	1090100	250000	852460
CAR-T 010-A	250000	1640	250820	2850	251425	820	250410	18660	259330	249670	374835	698910
CAR-T 011-A	250000	2790	251395	3060	251530	2420	251210	1670	250835	28450	264225	482070
CAR-T 012-A	250000	3820	251910	2300	251150	1850	250925	840	250420	111920	305960	649930
CAR-T 013-A	250000	2380	251190	3480	251740	1020	250510	1450	250725	64530	282265	508120
CAR-T 014-A	250000	4290	252145	1350	250675	1940	250970	840	250420	103320	301660	589420

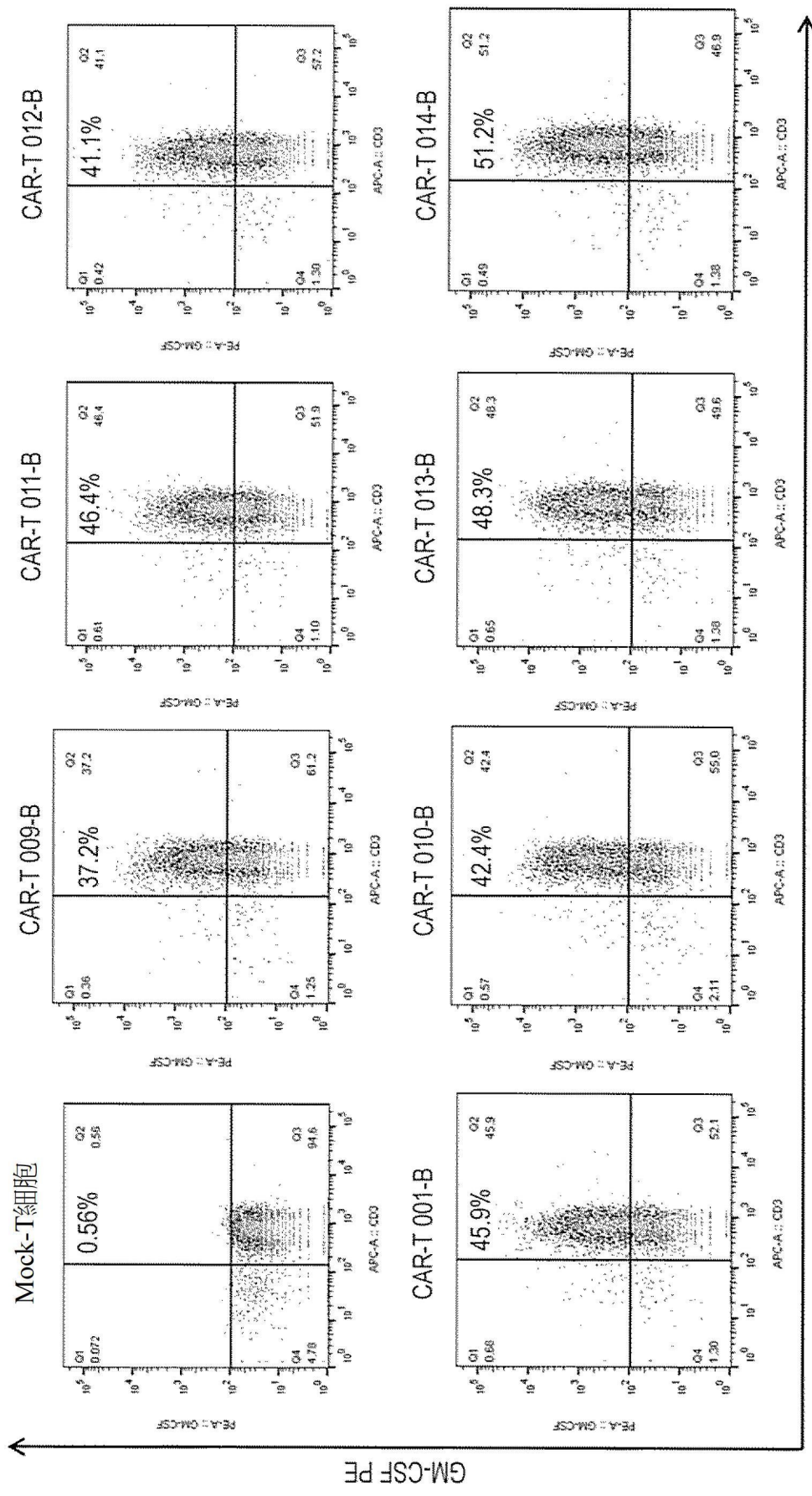
MV4-11	期間1		期間2		期間3		期間4		期間5	
	0	4	4	8	8	12	12	15	15	19
天										
無效應細胞	250000	1264350	250000	702720	250000	637010	250000	911130	250000	900690
CAR-T 010-A	250000	3900	251950	1340	250670	22030	261015	26440	263220	321520
CAR-T 011-A	250000	5940	252970	1380	250690	6080	253040	8830	254415	312460
CAR-T 012-A	250000	6330	253165	2050	251025	3490	251745	3260	251630	367020
CAR-T 013-A	250000	4780	252390	1450	250725	2340	251170	6630	253315	485380
CAR-T 014-A	250000	5500	252750	810	250405	56490	278245	26140	263070	281690

Kasumi-1	期間1		期間2		期間3		期間4		期間5		期間6	
	0	4	4	8	8	12	12	15	15	19	19	22
天												
無效應細胞	250000	463440	250000	422670	250000	395600	250000	349860	250000	467130	250000	443720
CAR-T 010-A	250000	960	250480	830	250415	970	250485	193650	346825	374300		
CAR-T 011-A	250000	2250	251125	1250	250625	880	250440	175410	337705	507240		
CAR-T 012-A	250000	6940	253470	2170	251085	1250	250625	137370	318685	98790	299395	476690
CAR-T 013-A	250000	2580	251290	920	250460	470	250235	122040	311020	301750	400875	427070
CAR-T 014-A	250000	1240	250620	870	250435	420	250210	81520	290760	238280	369140	427700

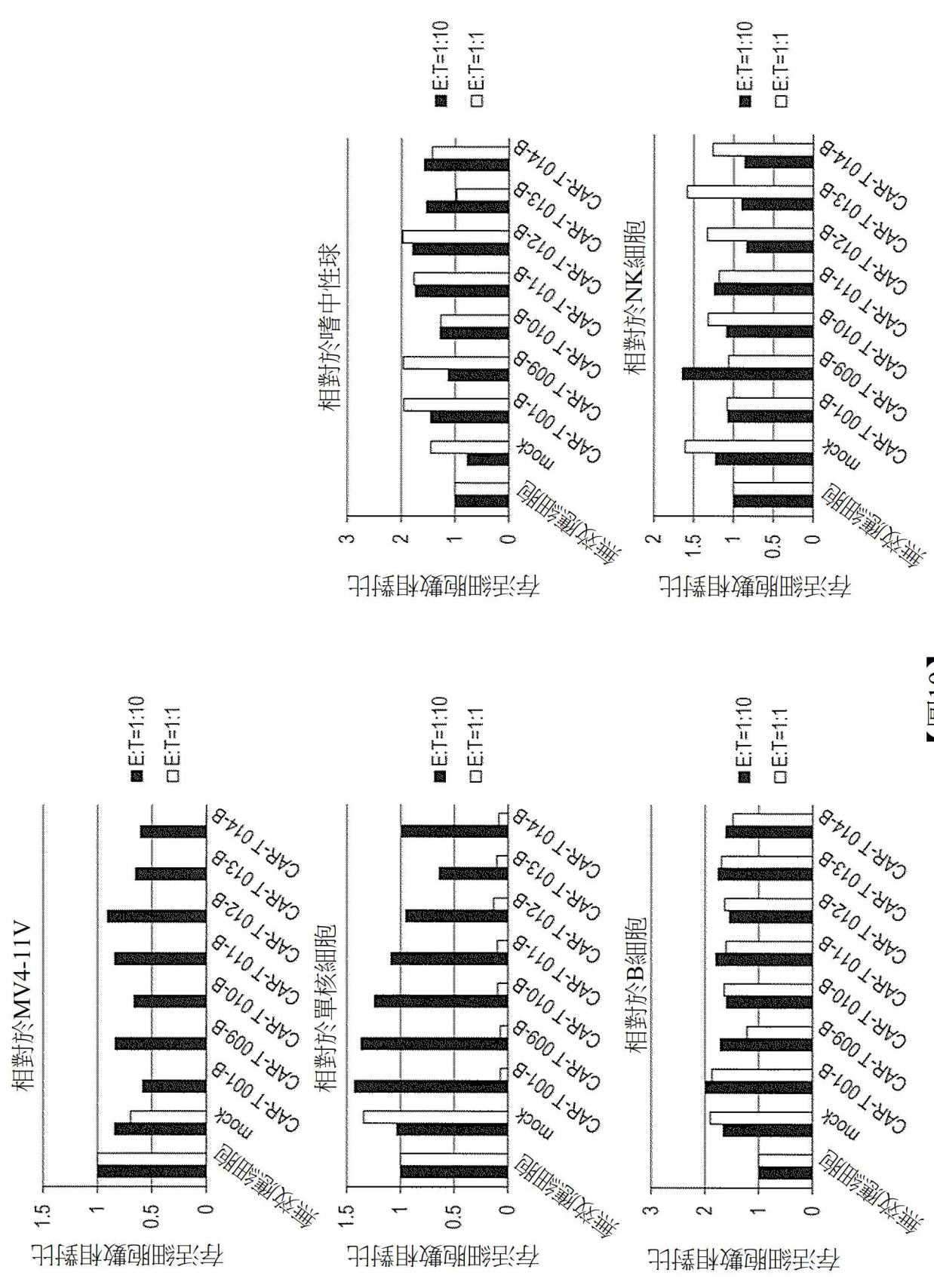
shinAML-1	期間1		期間2		期間3		期間4		期間5		期間6	
	0	4	4	8	8	12	12	15	15	19	19	22
天												
無效應細胞	250000	1100600	250000	1082550	250000	1355330	250000	1451470	250000	1339470	250000	1159230
CAR-T 010-A	250000	2840	251420	730	250365	540	250270	150920	325460	270650	385325	968690
CAR-T 011-A	250000	4490	252245	890	250445	1120	250560	369220				
CAR-T 012-A	250000	6700	253350	840	250420	1450	250725	539190				
CAR-T 013-A	250000	3210	251605	1060	250530	780	250390	16930	258465	613270		
CAR-T 014-A	250000	4080	252040	1080	250540	830	250415	6170	253085	539910		

【圖17】

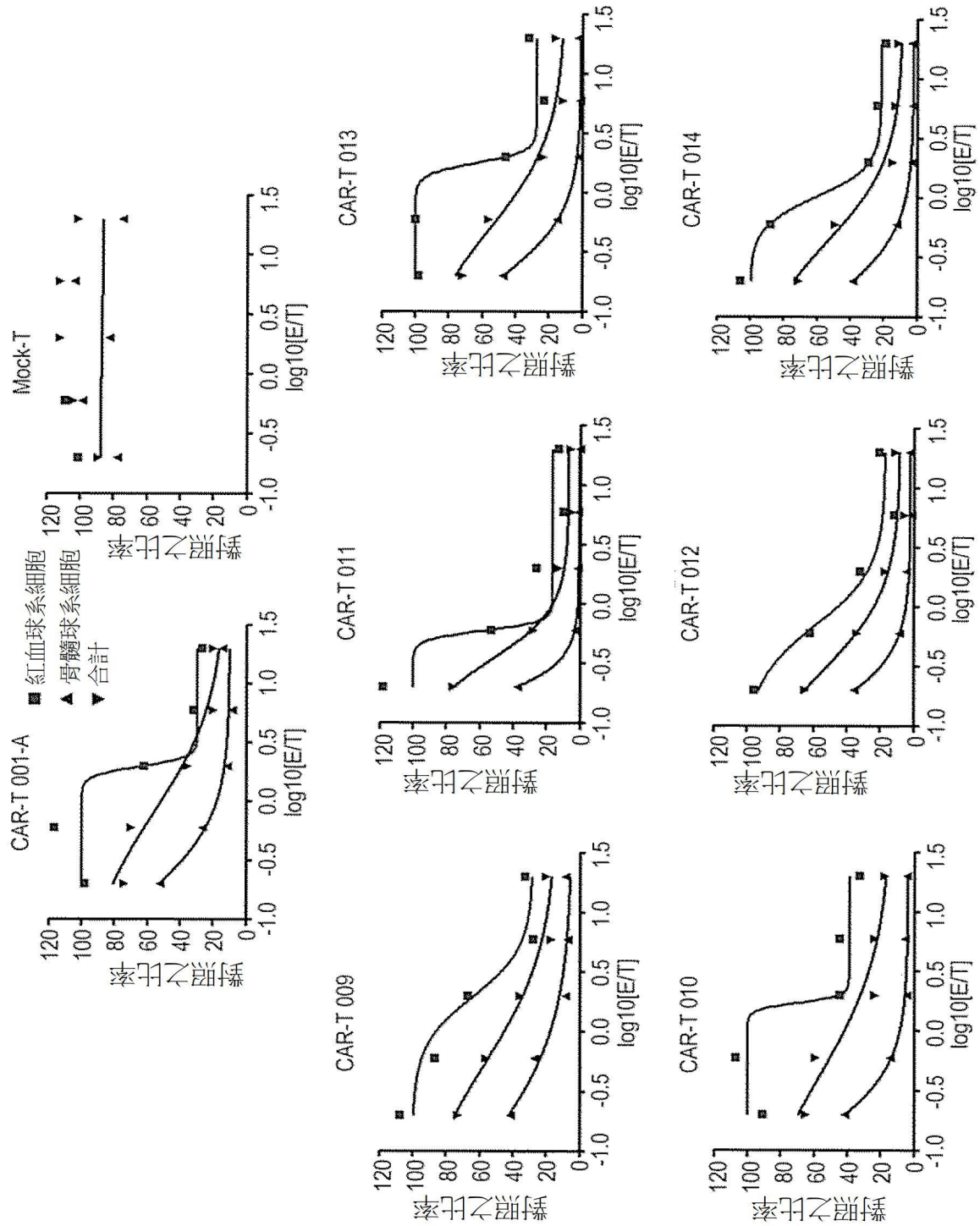




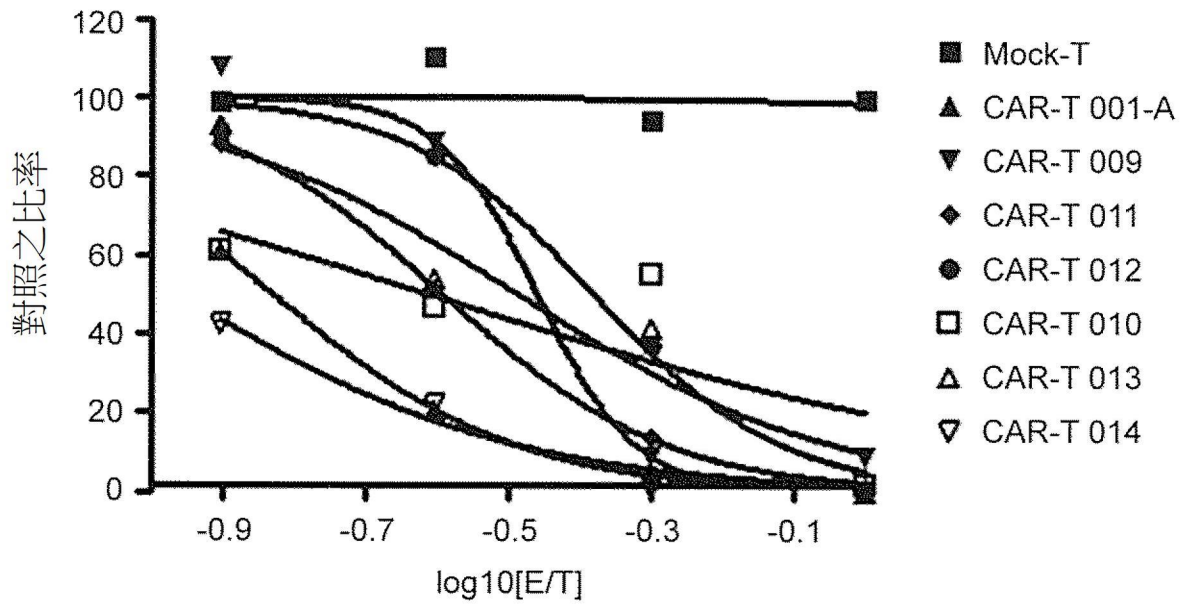
CD3 APC  
【圖18】



【圖19】



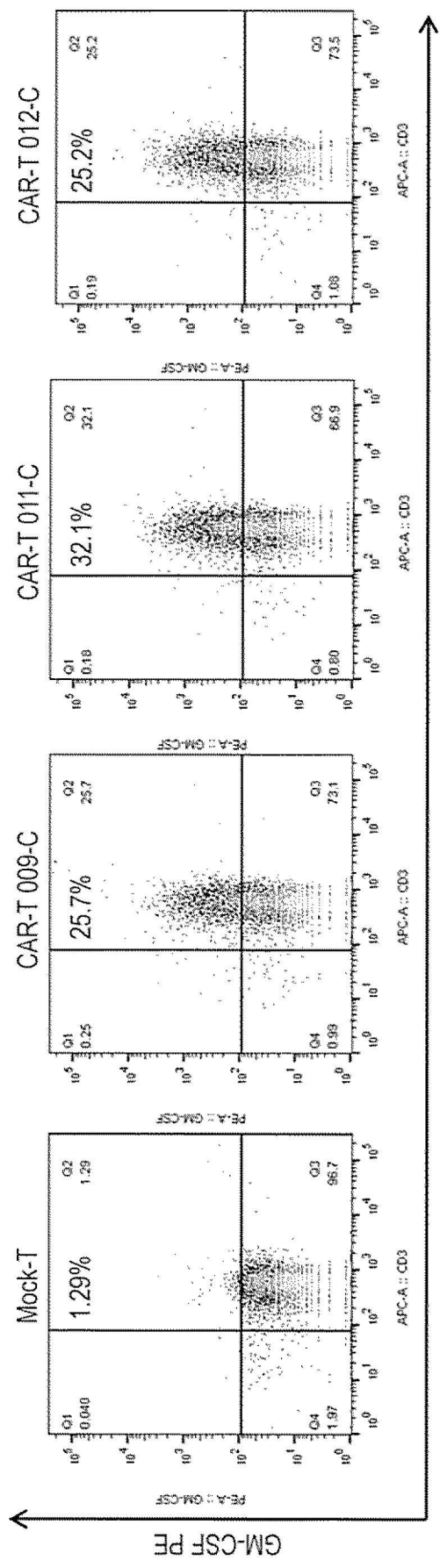
【圖20】



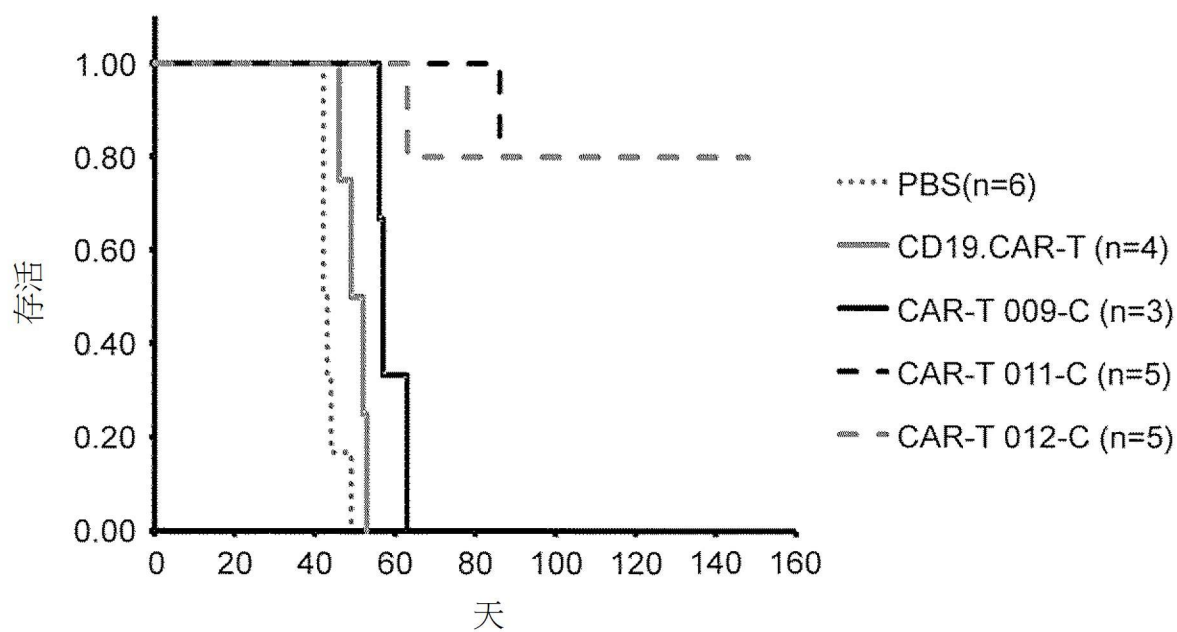
【圖21】

名稱	IC50			EC50	安全範圍 (=LC50/EC50)		
	紅血球系 細胞	骨髓球系 細胞	合計		紅血球系 細胞	骨髓球系 細胞	合計
CAR-T 001-A	1.97	0.18	0.80	0.15	13.31	1.24	5.42
CAR-T 009	1.96	0.12	0.54	0.35	5.65	0.35	1.55
CAR-T 011	0.59	0.17	0.34	0.26	2.29	0.65	1.31
CAR-T 012	1.77	0.18	0.50	0.42	4.25	0.44	1.20
CAR-T 010	1.71	0.15	0.42	0.24	7.03	0.61	1.71
CAR-T 013	0.70	0.14	0.29	0.33	2.16	0.42	0.90
CAR-T 014	1.01	0.14	0.42	0.11	9.33	1.29	3.86

【圖22】



CD3APC 【圖23】



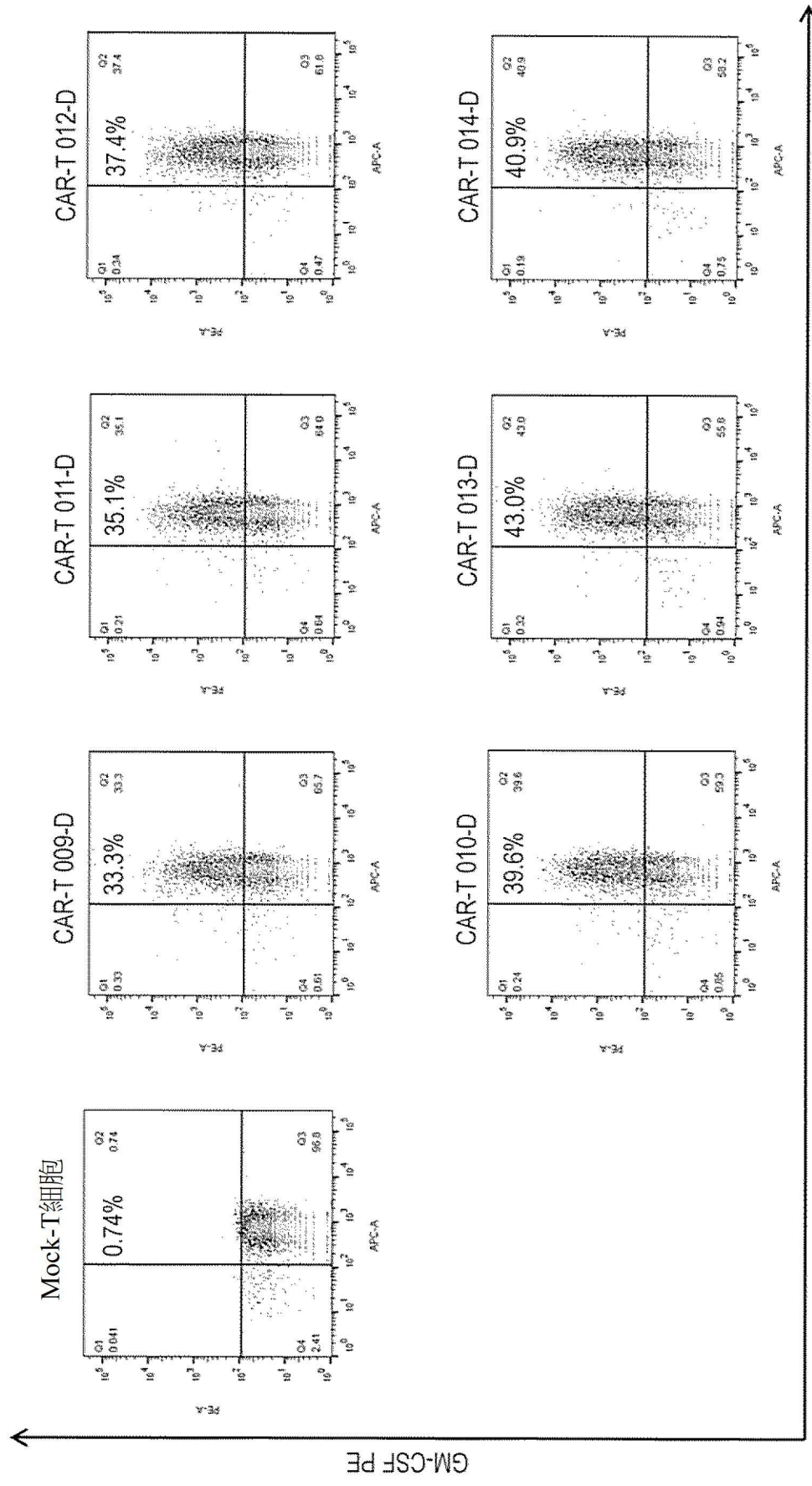
P值

	CAR-T 009-C	CAR-T 011-C	CAR-T 012-C
CD19	0.0086(**)	0.0011(**)	0.0011(**)
PBS	0.0177(*)	0.0027(**)	0.0027(**)

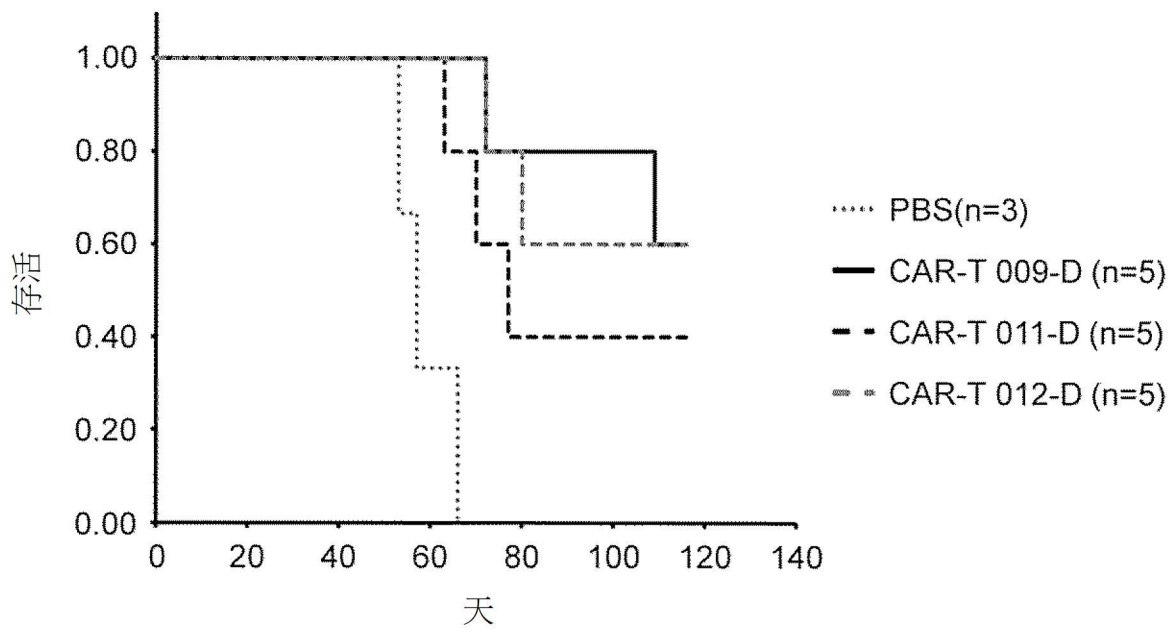
P值

	CAR-T 011-C	CAR-T 012-C
CAR-T 009-C	0.0042(**)	0.0136(*)

【圖24】



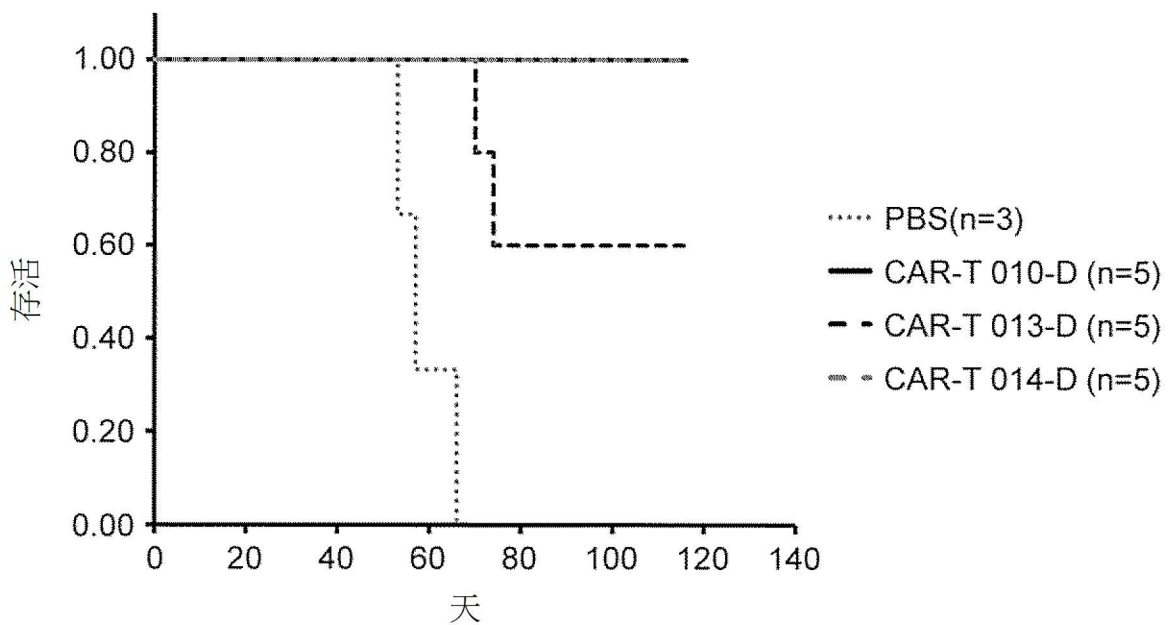
【圖25】



P值

	CAR-T 009-D	CAR-T 011-D	CAR-T 012-D
PBS	** (0.0042)	* (0.0216)	** (0.0042)

【圖26】

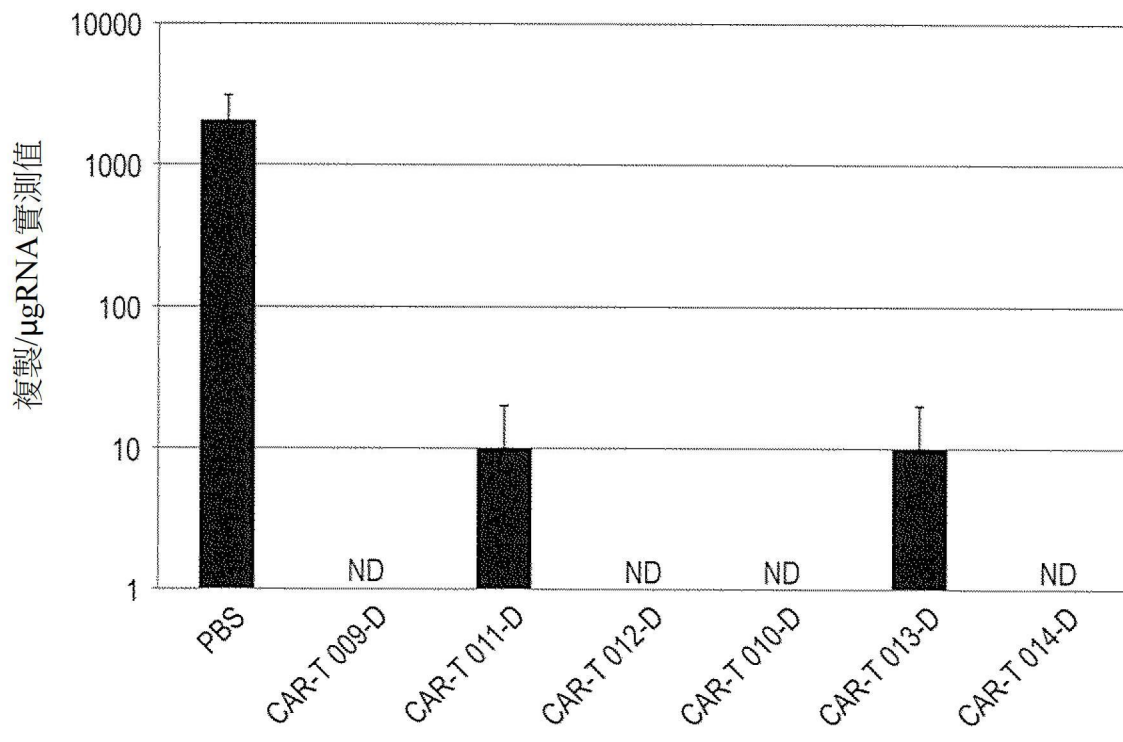


P值

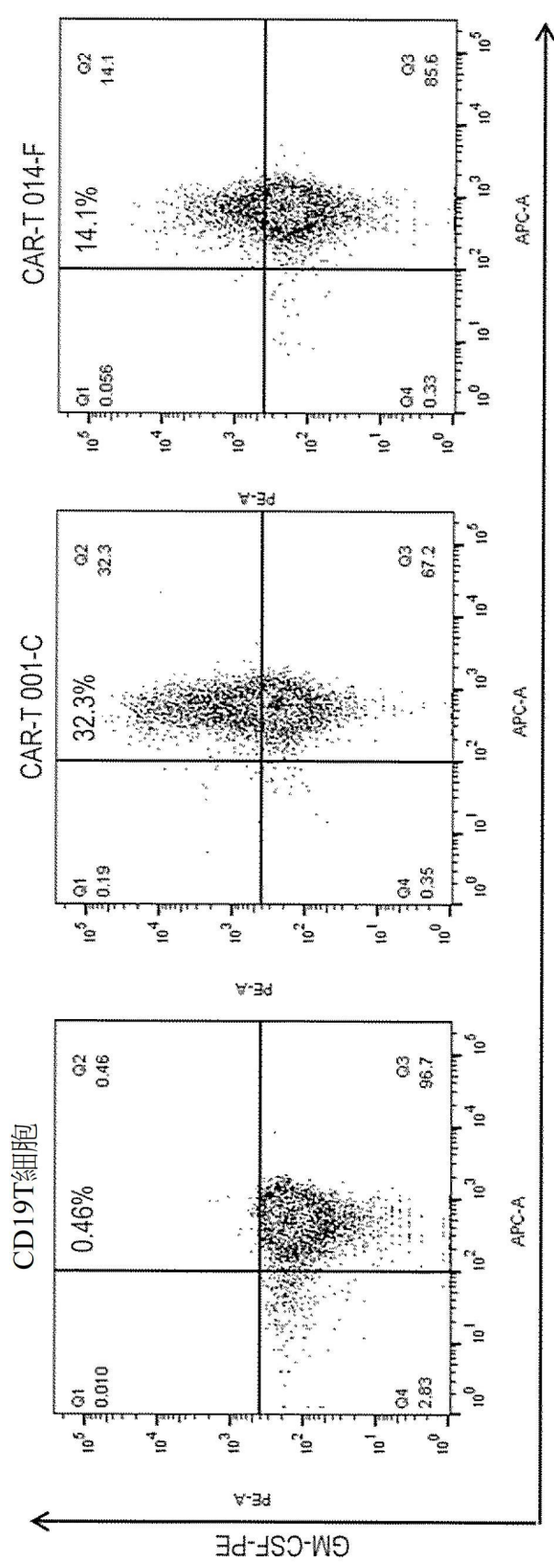
	CAR-T 010-D	CAR-T 013-D	CAR-T 014-D
PBS	** (0.0042)	** (0.0042)	** (0.0042)

【圖27】



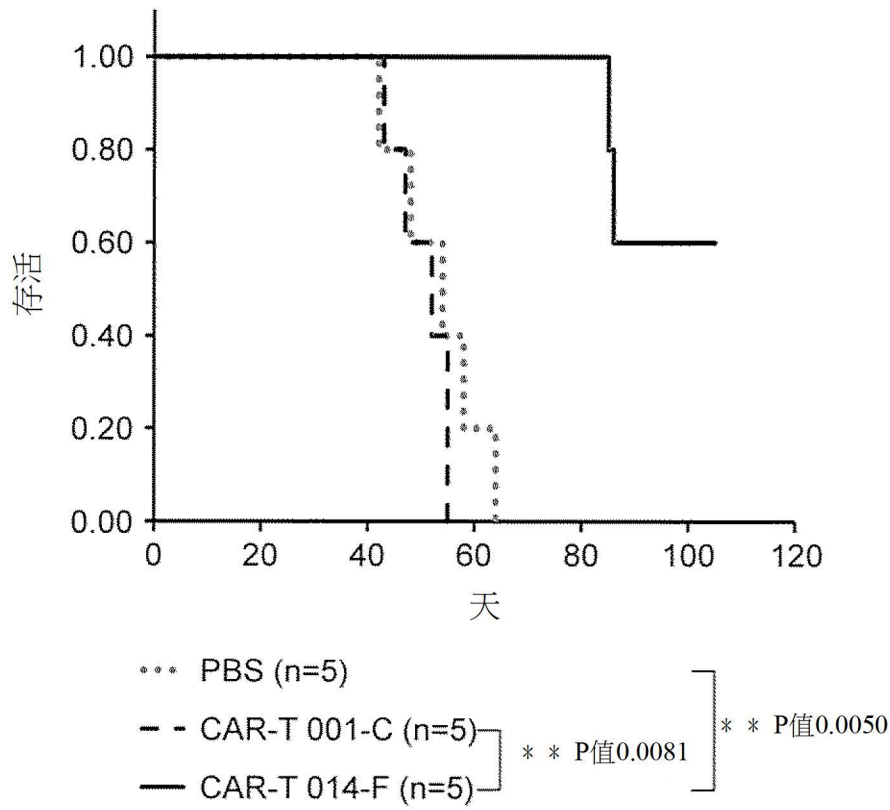


【圖28】

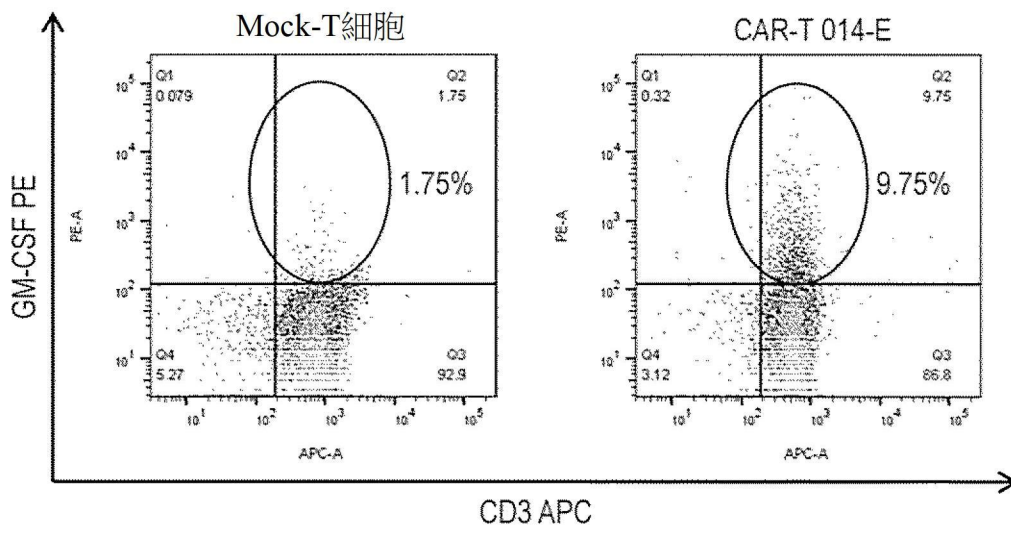


CD3-APC

【圖29】



【圖30】



【圖31】