

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6821568号
(P6821568)

(45) 発行日 令和3年1月27日 (2021.1.27)

(24) 登録日 令和3年1月8日 (2021.1.8)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62 Z N A Z
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10

請求項の数 14 (全 283 頁)

(21) 出願番号	特願2017-531672 (P2017-531672)	(73) 特許権者	510274452
(86) (22) 出願日	平成27年12月14日 (2015.12.14)		ベリカム ファーマシューティカルズ、
(65) 公表番号	特表2018-501786 (P2018-501786A)		インコーポレイテッド
(43) 公表日	平成30年1月25日 (2018.1.25)		アメリカ合衆国 テキサス 77030、
(86) 国際出願番号	PCT/US2015/065629		ヒューストン、 ウェスト ホルコム
(87) 国際公開番号	W02016/100236		ブルバード 2130、 スイート 8
(87) 国際公開日	平成28年6月23日 (2016.6.23)		00
審査請求日	平成30年12月5日 (2018.12.5)	(74) 代理人	100078282
(31) 優先権主張番号	62/092, 149		弁理士 山本 秀策
(32) 優先日	平成26年12月15日 (2014.12.15)	(74) 代理人	100113413
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		弁理士 森下 夏樹
前置審査		(74) 代理人	100181674
			弁理士 飯田 貴敏
		(74) 代理人	100181641
			弁理士 石川 大輔

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 治療用細胞のコントロールされた排除方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

a) 第1のキメラポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチドであって、ここで該第1のキメラポリペプチドは、膜会合ポリペプチド領域および第1の多量体化領域を含み、該膜会合ポリペプチド領域がキメラ抗原レセプターを含む、第1のポリヌクレオチド；ならびに

b) 第2のキメラポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチドであって、ここで該第2のキメラポリペプチドは、カスパーゼ-9ポリペプチドおよび第2の多量体化領域を含み、ここで該第2の多量体化領域は、該第1の多量体化領域とは異なるアミノ酸配列を有する、第2のポリヌクレオチド；

を含む改変された細胞であって、

ここで該第1の多量体化領域および第2の多量体化領域は、第1の多量体リガンドに結合し、

該第2の多量体化領域は、該第1の多量体化領域に有意に結合しない第2の多量体リガンドに結合し、

該第1の多量体化領域は、FKBP12-ラパマイシン結合 (FRB) 領域またはFRBバリエーション領域を含み、そして、

該第2の多量体化領域は、FKBP12v36領域を含む、改変された細胞。

【請求項 2】

a) 第1のキメラポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチドであって、ここで

該第 1 のキメラポリペプチドは、膜会合ポリペプチド領域および第 1 の多量体化領域を含み、該膜会合ポリペプチド領域がキメラ抗原レセプターを含む、第 1 のポリヌクレオチド；ならびに

b) 第 2 のキメラポリペプチドをコードする第 2 のポリヌクレオチドであって、ここで該第 2 のキメラポリペプチドは、カスパーゼ 9 ポリペプチドおよび第 2 の多量体化領域を含み、ここで該第 2 の多量体化領域は、該第 1 の多量体化領域とは異なるアミノ酸配列を有する、第 2 のポリヌクレオチド；

に作用的に連結されたプロモーターを含む核酸であって、ここで該第 1 の多量体化領域および第 2 の多量体化領域は、第 1 の多量体リガンドに結合し、

10

該第 2 の多量体化領域は、該第 1 の多量体化領域に有意に結合しない第 2 の多量体リガンドに結合し、

該第 1 の多量体化領域は、F K B P 1 2 ラパマイシン結合 (F R B) 領域または F R B バリエーション領域を含み、そして、

該第 2 の多量体化領域は、F K B P 1 2 v 3 6 領域を含む、核酸。

【請求項 3】

前記第 1 のリガンドは、第 1 の部分を含み、

前記第 1 の多量体化領域は、該第 1 の部分に結合し、そして

前記第 2 の多量体化領域は、該第 1 の部分に有意に結合しない、

請求項 1 に記載の改変された細胞。

20

【請求項 4】

前記第 1 の多量体化領域は、前記第 2 の多量体リガンドに結合できない、請求項 1 または 3 のいずれか 1 項に記載の改変された細胞。

【請求項 5】

前記第 1 の多量体化領域および第 2 の多量体化領域は、ラパマイシンまたはラパログに結合する、請求項 1 または 3～4 のいずれか 1 項に記載の改変された細胞。

【請求項 6】

前記第 1 の多量体化領域は、F R B_L を含む、請求項 1 に記載の改変された細胞。

【請求項 7】

前記第 1 の多量体化領域は、少なくとも 2 個の F R B 領域または F R B バリエーション領域を含む、請求項 1、または 3～6 のいずれか 1 項に記載の改変された細胞。

30

【請求項 8】

a) 前記第 1 のキメラポリペプチドが、キメラ抗原レセプターを含み、前記第 1 の多量体化領域は、2 個の F R B バリエーション領域を含む；および

b) 前記第 2 のキメラポリペプチドは、カスパーゼ 9 ポリペプチドおよび F K B P 1 2 v 3 6 領域を含む、請求項 1、もしくは 3～7 のいずれか 1 項に記載の改変された細胞、または請求項 2 に記載の核酸。

【請求項 9】

前記第 1 の多量体化領域は、2 個の F R B 領域または F R B バリエーション領域を含む、請求項 2、または 8 に記載の核酸。

40

【請求項 10】

前記カスパーゼ 9 ポリペプチドは、C A R D ドメインを欠いている短縮型カスパーゼ 9 ポリペプチドである、請求項 2、8 または 9 のいずれか 1 項に記載の核酸。

【請求項 11】

請求項 2、または 8～10 のいずれか 1 項に記載の核酸で形質導入またはトランスフェクトされた、改変された細胞。

【請求項 12】

前記核酸は、表 7 の中に提供される d カスパーゼ 9 アミノ酸配列をコードする、請求項 1、3～8 もしくは 11 のいずれか 1 項に記載の改変された細胞、または請求項 2、もし

50

くは 8 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の核酸。

【請求項 13】

前記核酸は、表 7 の中に提供される F K B P 1 2 v 3 6 アミノ酸配列をコードする、請求項 1、3 ~ 8、もしくは 11 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の改変された細胞、または請求項 2、8 ~ 10、もしくは 12 のいずれか 1 項に記載の核酸。

【請求項 14】

前記核酸は、表 7 の中に提供される F R B I または F R B I ^ ^ アミノ酸配列をコードする、請求項 1、3 ~ 8、もしくは 11 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の改変された細胞、または請求項 2、8 ~ 10、もしくは 12 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の核酸。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

(関連出願)

2014年12月15日に出願された「Methods for Controlled Elimination of Therapeutic Cells」とのタイトルの米国仮特許出願第62/092,149号に対する優先権を主張する。この出願はすべて、その全体が参照され、その参照により援用される。

【0002】

(分野)

本技術は一部、治療用細胞、例えば、キメラ抗原レセプターを発現する細胞の排除をコントロールするための方法に関する。本技術はさらに、有害事象後に患者において治療用細胞の破壊をコントロールするための 2 工程方法に関する。この 2 工程システムは、ラパマイシンまたはラパマイシンアナログベースのコントロールレベル、および第 2 のリミジシドのコントロールレベルを含み得る。本技術はまた、一部、誘導性カスパーゼポリペプチドおよびラパマイシン感受性ポリペプチドを発現する細胞を使用する細胞治療のための方法に関し、ここでアポトーシスによって排除される治療用細胞の割合は、投与されるリガンドの選択および量に関連する。

20

【背景技術】

【0003】

(背景)

T 細胞活性化は、病原性微生物（例えば、ウイルス、細菌、および寄生生物）、外来タンパク質、および環境中の有害化学物質に対する防御免疫において、ならびにがんおよび他の過剰増殖性疾患に対する免疫としても、重要な工程である。T 細胞は、細胞の表面上に呈示される抗原を認識するレセプター（すなわち、T 細胞レセプター）をそれらの表面上で発現する。通常、免疫応答の間に、上記 T 細胞レセプターへのこれら抗原の結合は、MHC 抗原提示の状況では、T 細胞活性化をもたらす細胞内変化を開始する。

30

【0004】

改変されたまたは改変されていない細胞（例えば、T 細胞）が患者に投与される細胞治療の使用がますます増加しつつある。いくつかの例では、細胞は、異種遺伝子を発現するように遺伝子操作され、次いで、患者へと投与される。異種遺伝子は、キメラ抗原レセプター（CAR）を発現させるために使用され得る。このキメラ抗原レセプターは、MHC 抗原提示の必要なく T 細胞に抗原特異性を伝えるためにデザインされた人工レセプターである。それらは、T 細胞を活性化し、特異免疫をもたらすように選択された、抗原特異的構成成分、膜貫通構成成分および細胞内構成成分を含む。キメラ抗原レセプター発現 T 細胞は、がん治療をはじめとした様々な治療において使用され得る。これら処置は、例えば、腫瘍を排除のために標的化するために、ならびにがんおよび血液障害を処置するために使用されるが、これら治療は、負の副作用を有し得る。治療用細胞誘発性有害事象のいくつかの場合には、治療用細胞の迅速かつほぼ完全な排除の必要性がある。過度のオンターゲット効果（例えば、大きな腫瘍塊に対して指向されるもの）は、腫瘍崩壊症候群（TLS）、サイトカイン放出症候群（CRS）またはマクロファージ活性化症候群（MAS）と関連するサイトカインストームをもたらし得る。結果として、それらが重大有害事象（

40

50

SAE)を引き起こす事象において移入されたT細胞または幹細胞を排除し得るか、または処置後にもはや用いられなくなり得る安定な、信頼性のある「自殺遺伝子」の開発は非常に重要である。なお場合によっては、治療の必要性は残り得、十分な治療レベルを維持しながら、負の効果を減少するための方法が存在し得る。

【0005】

従って、治療の有益な効果のうちの一部またはすべてを保持しながら、細胞治療において使用されるドナー細胞の考えられる負の効果を迅速に除去するために、治療用細胞のコントロールされた排除の必要性がある。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

10

【0006】

(要旨)

腫瘍関連抗原(TAA)に対して指向されるキメラ抗原レセプター(CAR)を発現する自家T細胞は、90%に近づく客観的奏効(OR)率を伴って、ある種のタイプの白血病(「液性腫瘍」)およびリンパ腫の処置に関する初期の臨床試験において形質転換効果を有していた。それらの臨床的有望性が大きいことにも関わらず、この成功は、サイトカイン放出症候群(CRS)に代表的なその観察される高レベルのオンターゲット、オフ腫瘍有害事象(high level of on-target, off-tumor adverse event)によって抑えられる。リスクを最小にしながらこれらの画期的な処置の利益を維持するために、CAR発現T細胞の活性レベルをコントロールするために整調可能な安全スイッチが開発された。誘導性共刺激キメラポリペプチドは、細胞において共発現されるキメラ抗原レセプター(CAR)の持続的で調節されたコントロールを可能にする。リガンド誘導物質は、誘導性キメラシグナル伝達分子を多量体化することによってCAR発現細胞を活性化し、これは翻って、NF-κBシグナル伝達経路および他の細胞内シグナル伝達経路を誘導し、標的細胞、例えば、T細胞、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)、ナチュラルキラー(NK)細胞またはナチュラルキラーT(NK-T)細胞の活性化をもたらす。リガンド誘導物質の非存在下では、T細胞は、静止状態であるか、または基底レベルの活性を有する。

20

【0007】

小分子での二量体化の化学的誘導(CID)は、タンパク質機能のスイッチを生成して、細胞生理を変化させるために使用される有効な技術である。高い特異性の効率的二量体化剤は、リミズシド(AP1903)であり、これは、テールトゥーテール(tail-to-tail)に配置された2個の同一のタンパク質結合表面を有し、各々は、FKBP12の変異体:FKBP12(F36V)(FKBP12v36、F_{v36}またはF_v)に対して高い親和性および特異性を有する。ホモ二量体化に通常は依拠する1個またはこれより多くの細胞シグナル伝達分子上への1個またはこれより多くのF_vドメインの結合は、そのタンパク質をリミズシドコントロールへと変換し得る。リミズシドでのホモ二量体化は、誘導性カスパーゼ安全スイッチの状況で使用される。別個の二量体化剤リガンドによってコントロールされるこの分子スイッチは、ヘテロ二量体化小分子、ラパマイシン、またはラパマイシンアナログ(「ラパログ」)に基づいた。ラパマイシンは、FKBP12およびそのバリエーションに結合し、FKBP12およびmTORのFKBP-ラパマイシン結合(FRB)ドメインを含むポリペプチドの両方に結合することによって、FKBP12に融合されるシグナル伝達ドメインのヘテロ二量体化を誘導し得る。本出願のいくつかの実施形態において提供されるのは、治療適用のための薬剤として、ラパマイシン、ラパログおよびリミズシドの使用を大いに増大させる分子スイッチである。

30

40

【0008】

二重スイッチ技術の一実施形態において、ホモ二量体化剤(例えば、AP1903(リミズシド))は、FKBP12多量体化領域を含むキメラカスパーゼポリペプチド(これは、改変された細胞において発現される)の二量体化または多量体化を直接誘導し、アポトーシスをもたらす。他の実施形態において、FKBP12多量体化を含むキメラカスパーゼポリペプチドは、多量体化されるか、またはヘテロ二量体化剤(例えば、ラパマイシ

50

ンまたはラパログ)に結合することによって凝集される。このヘテロ二量体化剤はまた、例えば、キメラ抗原レセプターなどの、上記改変された細胞においても発現されるキメラポリペプチド上のFRBまたはFRBバリエーション多量体化領域にも結合する。両方のキメラポリペプチドへのこの結合は、改変された細胞のアポトーシスを引き起こす。

【0009】

ラパマイシンは、高親和性 (<1 nM) でFKBP12に結合する天然生成物マクロライドであり、mTORのFKBP-ラパマイシン結合 (FKBP-Rapamycin Binding (FRB)) ドメインとの高親和性の阻害性相互作用と一緒に開始する。FRBは、小さく (89アミノ酸)、それによって、多くのタンパク質に付加される場合に、タンパク質「タグ」または「ハンドル」として使用され得る。FRB融合タンパク質と第2のFKBP12融合タンパク質との共発現は、それらの近似をラパマイシン誘導性にする (12-16)。これおよび続く実施例は、FRB結合カスパーゼ9とFKBP結合カスパーゼ9 (iC9) との発現はまたアポトーシスを指向し得るかどうかを試験し、経口的に利用可能なりガンド、ラパマイシン、または低い治療用量でmTORを阻害しないが、代わりに、選択されたカスパーゼ9融合変異体FRBドメインと結合するラパマイシンの誘導体 (ラパログ) によって制御される細胞安全スイッチの基本として働くようにデザインされた実験および結果を提供する (Sabatini DM, ら, Cell. 1994; 78 (1): 35-43; Brown EJ, ら, Nature. 1994; 369 (6483): 756-8; Chen J, ら, Proc Natl Acad Sci U S A. 1995; 92 (11): 4947-51; およびChoi J, Science. 1996; 273 (5272): 239-42を参照のこと)。

【0010】

一例では、2つのコントロールレベルが、治療用細胞において提供される。この例では、その第1のコントロールレベルは、「整調可能」であり得る。すなわち、上記治療用細胞の除去レベルは、上記治療用細胞の部分的除去を生じるようにコントロールされ得る。いくつかの例では、キメラ抗原ポリペプチドは、ラパマイシン、またはラパマイシンアナログの結合部位を含む; 自殺遺伝子 (例えば、カスパーゼポリペプチドをコードするものなど) は、上記治療用細胞にも存在する。このコントロール可能な第1のレベルを使用して、継続した治療の必要性は、負の副作用を排除またはそのレベルを減少させる必要とバランスがとられ得る。いくつかの実施形態において、ラパマイシンアナログ、ラパログは、患者に投与され、次いで、それは、カスパーゼポリペプチドおよびキメラ抗原レセプターの両方に結合し、従って、カスパーゼポリペプチドをCARの場所へと動員し、カスパーゼポリペプチドを凝集させる。凝集の際に、カスパーゼポリペプチドは、アポトーシスを誘導する。患者に投与されるラパマイシンまたはラパマイシンアナログの量は、変動し得る; アポトーシスによるより低い細胞レベルの除去が、副作用を減少させ、CAR治療を継続するために望ましい場合、より低いレベルのラパマイシンまたはラパマイシン (rapamycin or rapamycin) が、患者に投与され得る。この例では、第2のコントロールレベルは、細胞排除の最大レベルを達成するために設計され得る。この第2のレベルは、例えば、リミズシド、またはAP1903の使用に基づき得る。上記治療用細胞の100%までを迅速に排除する必要がある場合、上記AP1903は、患者に投与され得る。多量体AP1903は、カスパーゼポリペプチドに結合し、カスパーゼポリペプチドの多量体化およびアポトーシスをもたらす。ある種の例では、第2のレベルはまた、上記被験体に投与されるAP1903のレベルによって整調可能であり得るかまたはコントロールされ得る。

【0011】

上記第2の治療用細胞排除レベルでは、選択的アポトーシスは、リミズシド (AP1903) を投与することによって、二量体リガンド結合ポリペプチド (例えば、AP1903結合ポリペプチドFKBP12v36など) に融合されたキメラカスパーゼ9ポリペプチドを発現する細胞において誘導され得る。いくつかの例では、上記カスパーゼ9ポリ

ペプチドは、誘導性キメラポリペプチドの一部として、野生型カスパーゼ-9ポリペプチドより低い基底アポトーシス活性レベルを生じるアミノ酸置換を含む。

【0012】

従って、いくつかの実施形態において、第1のキメラポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチドであって、ここで上記第1のキメラポリペプチドは、膜会合ポリペプチド領域および第1の多量体化領域を含む、第1のポリヌクレオチド；ならびに第2のキメラポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチドであって、ここで上記第2のキメラポリペプチドは、アポトーシス促進ポリペプチド領域および第2の多量体化領域を含み、ここで上記第2の多量体化領域は、上記第1の多量体化領域とは異なるアミノ酸配列を有する、第2のポリヌクレオチドを含む改変された細胞であって；ここで上記第1の多量体化領域および第2の多量体化領域は、第1の多量体リガンドに結合する、細胞が提供される。いくつかの実施形態において、上記第2の多量体化領域は、第1の多量体リガンドに結合し、前記第1の多量体化領域に有意に結合しない第2の多量体リガンドに結合する。いくつかの実施形態において、上記第1のリガンドは、第1の部分を含み、上記第1の多量体化領域は、上記第1の部分に結合し、上記第2の多量体化領域は、上記第1の部分に有意に結合しない。いくつかの実施形態において、上記第1の多量体化領域は、上記第2の多量体リガンドに結合できない。いくつかの実施形態において、上記第1の多量体化領域および第2の多量体化領域は、ラパマイシンまたはラパログに結合する。

10

【0013】

第1のキメラポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチドであって、ここで上記第1のキメラポリペプチドは、膜会合ポリペプチド領域および第1の多量体化領域を含む、第1のポリヌクレオチド；ならびに第2のキメラポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチドであって、ここで上記第2のキメラポリペプチドは、アポトーシス促進ポリペプチド領域および第2の多量体化領域を含み、ここで上記第2の多量体化領域は、上記第1の多量体化領域とは異なるアミノ酸配列を有する、第2のポリヌクレオチドに作用的に連結されたプロモーターを含む核酸もまた、いくつかの実施形態において提供され、ここで上記第1の多量体化領域および第2の多量体化領域は、第1の多量体リガンドに結合する。いくつかの実施形態において、キメラ抗原レセプターをコードする第1のポリヌクレオチドであって、ここで上記キメラ抗原レセプターは、(i) 膜貫通領域、(ii) T細胞活性化分子、(iii) 抗原認識部分、および(iv) FRB領域またはFRBバリエーション領域を含む第1のポリヌクレオチド；ならびにキメラカスパーゼポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチドであって、ここで上記キメラカスパーゼポリペプチドは、(i) FKBP12領域またはFKBP12バリエーション領域、および(ii) カスパーゼポリペプチドを含む、第2のポリヌクレオチドを含む核酸もまた、提供される。

20

30

【0014】

被験体において移植された改変された細胞の生存をコントロールするための方法もまた、いくつかの実施形態において提供され、上記方法は、本出願の改変された細胞を上記被験体に移植すること；およびb) (a)の後に、上記被験体に、ラパマイシンまたはラパログを、上記アポトーシス促進ポリペプチド領域を含む第2のキメラポリペプチドを発現する改変された細胞のうちの30%まで、または少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、もしくは95%を殺滅するために有効な量で投与することを包含する。いくつかの実施形態において、上記第2の多量体化領域は、FKBP12領域またはFKBP12バリエーション領域であり、上記アポトーシス促進ポリペプチド領域を含む第2のキメラポリペプチド上のFKBP12領域またはFKBP12バリエーション領域に結合するリガンドを、上記第2のキメラポリペプチドを発現する改変された細胞のうちの少なくとも90%を殺滅するために有効な量で投与することをさらに包含する。

40

【0015】

被験体において移植された改変された細胞の生存をコントロールする方法もまた、いくつかの実施形態において提供され、上記方法は、a) 本出願の改変された細胞を上記被験体に移植すること；およびb) (a)の後に、上記被験体に、上記アポトーシス促進ポ

50

リペプチド領域を含む第2のキメラポリペプチド上のFKBP12領域またはFKBP12バリエーション領域に結合するリガンドを、上記第2のキメラポリペプチドを発現する改変された細胞のうちの少なくとも60%、70%、80%、90%、または95%を殺滅するために有効な量で投与することを包含する。いくつかの実施形態において、同種反応性の改変された細胞は、上記被験体に存在し、同種反応性の改変された細胞の数は、ラパマイシン、ラパログの投与後に、少なくとも90%減少する。

【0016】

標的細胞によって発現される標的抗原の上昇した発現と関連する疾患または状態を有する被験体を処置するための方法もまた、いくつかの実施形態において提供され、上記方法は、(a) 上記被験体に、有効量の本出願の改変された細胞を投与することであって、ここで上記改変された細胞は、上記標的抗原に結合するキメラ抗原レセプターまたはT細胞レセプターをコードするポリヌクレオチドを含む、投与すること；および(b) a)の後に、有効量のラパマイシンまたはラパログを投与することを包含する。いくつかの実施形態において、被験体において移植された改変された細胞の生存をコントロールするための方法であって、ここで本出願の改変された細胞は、上記被験体に移植されている方法が提供され、上記方法は、上記改変された細胞を上記被験体から除去することを要する上記被験体における状態の有無を同定すること、および上記患者において同定された状態の有無に基づいて、ラパマイシンもしくはラパログ、または上記FKBP12領域もしくはFKBP12バリエーション領域に結合するリガンドを投与するか、上記患者へのその後の投与量を維持するか、またはその後の投与量を調整することを包含する。

【0017】

本出願のいくつかの実施形態において、上記第1の多量体化領域は、FKBP12ーラパマイシン結合(FRB)領域またはFRBバリエーション領域を含む。いくつかの実施形態において、上記第1の多量体化領域は、FRB_Lを含む。いくつかの実施形態において、上記第1の多量体化領域は、少なくとも2個のFRB領域またはFRBバリエーション領域を含む。いくつかの実施形態において、上記第2の多量体化領域は、FKBP12領域またはFKBP12バリエーション領域を含む。いくつかの実施形態において、上記第2の多量体化領域は、FKBPv36領域を含む。いくつかの実施形態において、上記第2のリガンドは、AP1903、AP20187、およびAP1510からなる群より選択される。

【0018】

いくつかの実施形態において、上記膜会合ポリペプチドは、T細胞レセプターを含む。いくつかの実施形態において、上記膜会合ポリペプチドは、キメラ抗原レセプターを含む。いくつかの実施形態において、上記アポトーシス促進ポリペプチドは、カスパーゼ9ポリペプチドである。

【0019】

いくつかの実施形態において、第1のキメラポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチドであって、ここで上記第1のキメラポリペプチドは、膜会合ポリペプチド領域および第1のリガンド結合領域を含む、第1のポリヌクレオチド；ならびに第2のキメラポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチドであって、ここで上記第2のキメラポリペプチドは、アポトーシス促進ポリペプチド領域および第2のリガンド結合領域を含み、ここで上記第2のリガンド結合領域は、上記第1のリガンド結合領域とは異なるアミノ酸配列を有する、第2のポリヌクレオチドを含む改変された細胞であって；ここで上記第1のリガンド結合領域および第2のリガンド結合領域は、第1の多量体リガンドに結合できる、細胞が提供される。

【0020】

ある種の実施形態において、キメラ抗原レセプターをコードする第1のポリヌクレオチドであって、ここで上記キメラ抗原レセプターは、FKBP12ーラパマイシン結合ドメイン(FRB)を含む、第1のポリヌクレオチド；ならびにキメラカスパーゼポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチドであって、ここで上記キメラカスパーゼポリペプチドは、(i) FKBP12多量体化領域および(ii) カスパーゼポリペプチドを含む

、第2のポリヌクレオチドを含む改変された細胞が提供される。キメラ抗原レセプターをコードする第1のポリヌクレオチドであって、ここで上記キメラ抗原レセプターは、(i)膜貫通領域、(ii)T細胞活性化分子、(iii)抗原認識部分、および(iv)FKBP12ーラパマイシン結合ドメイン(FRB)を含む、第1のポリヌクレオチド；ならびにキメラカスパーゼポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチドであって、ここで上記キメラカスパーゼポリペプチドは、(i)FKBP12多量体化領域および(ii)カスパーゼポリペプチドを含む、第2のポリヌクレオチドを含む改変された細胞がまた、提供される。キメラ抗原レセプターをコードする第1のポリヌクレオチドであって、ここで上記キメラ抗原レセプターは、(i)膜貫通領域、(ii)MyD88ポリペプチドまたはTIRドメインを欠く短縮型MyD88ポリペプチド、(iii)CD40細胞外ドメインを欠くCD40細胞質ポリペプチド領域、(iv)T細胞活性化分子、(v)抗原認識部分、およびFKBP12ーラパマイシン結合ドメイン(FRB)を含む、第1のポリヌクレオチド；ならびにキメラカスパーゼポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチドであって、ここで上記キメラカスパーゼポリペプチドは、(i)FKBP12多量体化領域および(ii)カスパーゼポリペプチドを含む、第2のポリヌクレオチドを含む改変された細胞もまた、提供される。

【0021】

いくつかの実施形態において、上記キメラポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、最適化したコドンを含む。いくつかの実施形態において、上記細胞は、ヒト細胞である。本出願の細胞は、真核生物細胞、例えば、哺乳動物細胞、例えば、ウマ、イヌ、ネコ、ウシ、またはヒトの細胞の任意のタイプであり得る。いくつかの実施形態において、上記細胞は、前駆体細胞である。いくつかの実施形態において、上記細胞は、造血前駆体細胞である。いくつかの実施形態において、上記細胞は、間葉系ストローマ細胞、胚性幹細胞、および人工多能性幹細胞からなる群より選択される。いくつかの実施形態において、上記細胞は、T細胞である。いくつかの実施形態において、上記細胞は、骨髓から得られるかまたは骨髓から調製される。いくつかの実施形態において、上記細胞は、臍帯血から得られるかまたは臍帯血から調製される。いくつかの実施形態において、上記細胞は、末梢血から得られるかまたは末梢血から調製される。いくつかの実施形態において、上記細胞は、末梢血単核球から得られるかまたは末梢血単核球から調製される。

【0022】

いくつかの局面において、上記キメラポリペプチドまたは改変されたカスパーゼ9ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの実施形態において、上記プロモーターは、発生的に制御され、上記カスパーゼ9ポリペプチドは、発生的に分化した細胞において発現される。いくつかの実施形態において、上記プロモーターは、組織特異的であり、上記カスパーゼ9ポリペプチドは、特異的組織において発現される。いくつかの実施形態において、上記プロモーターは、活性化T細胞において活性化される。いくつかの実施形態において、上記プロモーターは、5'LTR配列を含む。いくつかの実施形態において、上記キメラタンパク質は、マーカーポリペプチド(例えば、ΔCD19ポリペプチドが挙げられるが、これに限定されない)をさらに含む。いくつかの実施形態において、上記カスパーゼ9ポリペプチドは、短縮型カスパーゼ9ポリペプチドである。いくつかの実施形態において、上記カスパーゼ9ポリペプチドは、カスパーゼ動員ドメインを欠いている。

【0023】

いくつかの実施形態において、上記多量体化領域は、FKBP12、シクロフィリンレセプター、ステロイドレセプター、テトラサイクリンレセプター、重鎖抗体サブユニット、軽鎖抗体サブユニット、フレキシブルリンカードメインによって隔てられた重鎖可変領域と軽鎖可変領域とをタンデムで含む一本鎖抗体、およびこれらの変異された配列からなる群より選択される。いくつかの実施形態において、上記多量体化領域は、FKBP12領域である。いくつかの実施形態において、上記FKBP12領域は、FKB12v₃₆領域である。いくつかの実施形態において、上記多量体化領域は、Fv'Fvlsである。

いくつかの実施形態において、上記多量体化領域は、FK506二量体および二量体FK506アナログリガンドからなる群より選択されるリガンドを結合する。いくつかの実施形態において、上記リガンドは、AP1903であり、他の実施形態において、上記リガンドは、AP20187である。いくつかの実施形態において、上記多量体化領域は、配列番号29のアミノ酸配列またはその機能的フラグメントを有する。いくつかの実施形態において、上記多量体化領域は、配列番号30のヌクレオチド配列またはその機能的フラグメントによってコードされる。いくつかの実施形態において、上記多量体化領域は、配列番号32のアミノ酸配列を有するポリペプチド、またはその機能的フラグメントをさらに含む。いくつかの実施形態において、上記多量体化領域は、配列番号31のヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドまたはその機能的フラグメントをさらに含む。いくつかの実施形態において、上記多量体化領域は、配列番号32のアミノ酸配列を有するポリペプチド、またはその機能的フラグメントをさらに含む。いくつかの実施形態において、上記多量体化領域は、配列番号31のヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドまたはその機能的フラグメントをさらに含む。いくつかの実施形態において、上記多量体化領域は、配列番号29もしくは配列番号32のアミノ酸配列を有するポリペプチド、またはその機能的フラグメントをさらに含む。いくつかの実施形態において、上記多量体化領域は、配列番号30もしくは配列番号31のヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチド、またはその機能的フラグメントをさらに含む。

10

【0024】

本出願のいくつかの局面において、上記細胞は、ウイルスベクターで形質導入またはトランスフェクトされる。上記ウイルスベクターは、例えば、レトロウイルスベクター（例えば、マウス白血病ウイルスベクターが挙げられるが、これに限定されない）；SFGベクター；およびアデノウイルスベクター、またはレンチウイルスベクターであり得るが、これらに限定されない。

20

【0025】

いくつかの実施形態において、上記細胞は、単離される。いくつかの実施形態において、上記細胞は、ヒト被験体の中にある。いくつかの実施形態において、上記細胞は、ヒト被験体において移植される。

【0026】

いくつかの実施形態において、個別化された処置が提供され、ここで上記疾患または状態のステージまたはレベルは、上記多量体リガンドを投与する前に、上記多量体リガンドのさらなる用量を投与する前に、または上記多量体リガンド投与に関与する方法および投与量を決定するにあたって、決定される。これら方法は、本出願の疾患または状態のうちのいずれかに対する上記方法のうちのいずれかにおいて使用され得る。上記リガンドを投与する前に上記患者を評価するためのこれらの方法が、移植片対宿主病の状況において論じられる場合、これらの方法が、他の状態および疾患の処置にも同様に適用され得ることは、理解される。従って、例えば、本出願のいくつかの実施形態において、上記方法は、治療用細胞を患者に投与することを包含し、そしてトランスフェクトまたは形質導入された治療用細胞を上記患者から除去することを要する該患者における状態の有無を同定すること；および上記患者において同定された状態の有無に基づいて、上記多量体化領域に結合する多量体リガンドを投与するか、上記患者に対する上記多量体リガンドのその後の投与量を維持するか、または上記多量体リガンドのその後の投与量を調整することをさらに包含する。そして、例えば、本出願の他の実施形態において、上記方法は、上記患者における移植片対宿主病の症状の出現に基づいて、上記多量体リガンドのさらなる単一用量またはさらなる複数用量を上記患者に投与するかどうかを決定することをさらに包含する。いくつかの実施形態において、上記方法は、上記患者において移植片対宿主病の有無またはステージを同定すること、および上記患者において同定された移植片対宿主病の有無またはステージに基づいて、上記多量体化領域に結合する多量体リガンドを投与するか、上記患者に対する上記多量体リガンドのその後の投与量を維持するか、または上記多量体リガンドのその後の投与量を調整することをさらに包含する。いくつかの実施形態において

30

40

50

、上記方法は、上記患者において移植片対宿主病の有無またはステージを同定すること、および上記患者において同定された移植片対宿主病の有無またはステージに基づいて、上記多量体化領域に結合する多量体リガンドが上記患者に投与されるべきか、または上記患者にその後投与される上記多量体リガンドの投与量が、または調整されるかを決定することをさらに包含する。いくつかの実施形態において、上記方法は、上記患者において移植片対宿主病の有無またはステージを含む情報を受け取ること；および上記患者において同定された移植片対宿主病の有無またはステージに基づいて、上記多量体化領域に結合する多量体リガンドを投与するか、上記患者への上記多量体リガンドのその後の投与量を維持するか、または多量体リガンドのその後の投与量を調整することをさらに包含する。いくつかの実施形態において、上記方法は、上記患者において移植片対宿主病の有無またはステージを同定すること、および上記被験体において同定された移植片対宿主病の有無またはステージに基づいて上記多量体化領域に結合する多量体リガンドを投与するか、上記患者に投与される上記多量体リガンドのその後の投与量を維持するか、または上記多量体リガンドのその後の投与量を調整する意思決定者に、上記移植片対宿主病の有無またはステージを伝達することをさらに包含する。いくつかの実施形態において、上記方法は、上記患者において移植片対宿主病の有無またはステージを同定すること、ならびに上記被験体において同定された移植片対宿主病の有無またはステージに基づいて、上記多量体結合領域に結合する多量体リガンドを投与するか、上記患者に投与される上記多量体リガンドのその後の投与量を維持するか、または上記多量体リガンドのその後の投与量を調整する指示を伝達することをさらに包含する。

10

20

【0027】

ドナーT細胞をヒト患者に投与するための方法もまた提供され、上記方法は、本出願の形質導入またはトランスフェクトされたT細胞をヒト患者に投与することを包含し、ここで上記細胞は、非同種枯渇 (non-allodepleted) ヒトドナーT細胞である。

【0028】

いくつかの実施形態において、上記治療用細胞は、非悪性障害を有する被験体に投与され、またはここで上記被験体は、例えば、原発性免疫不全障害（例えば、重症複合免疫不全症 (SCID)、複合免疫不全症 (CID)、先天性T細胞欠損／欠損症、分類不能型免疫不全症 (CVID)、慢性肉芽腫症、IPEX（免疫不全、多腺性内分泌障害、腸症、X連鎖）またはIPEX様、ウィスコット・オールドリッチ症候群、CD40リガンド欠損症、白血球接着不全、DOCK8欠損症、IL-10欠損症／IL-10レセプター欠損症、GATA2欠損症、X連鎖リンパ増殖性疾患 (XLP)、軟骨毛髪形成不全などが挙げられるが、これらに限定されない）、血球貪食性リンパ組織球症 (HLH) または他の血球貪食障害、遺伝性骨髄不全障害 (Inherited Marrow Failure Disorder)（例えば、シュバハマン・ダイヤモンド症候群、ダイヤモンドブラックファン貧血、先天性角化異常症、ファンコニー貧血、先天性好中球減少症などが挙げられるが、これらに限定されない）、ヘモグロビン異常症（例えば、鎌状赤血球症、サラセミアなどが挙げられるが、これらに限定されない）、代謝障害（例えば、ムコ多糖症、スフィンゴリピドーシスなどが挙げられるが、これらに限定されない）、または破骨細胞障害（例えば、大理石骨病が挙げられるが、これらに限定されない）などの非悪性障害と診断されている。

30

40

【0029】

上記治療用細胞は、例えば、所望の治療結果のために患者に投与される任意の細胞であり得る。上記細胞は、例えば、胚性幹細胞 (ESC)、人工多能性幹細胞 (iPSC)、T細胞、ナチュラルキラー細胞、B細胞、マクロファージ、末梢血細胞、造血前駆体細胞、骨髄細胞、または腫瘍細胞であり得る。上記改変されたカスパーゼ-9ポリペプチドはまた、腫瘍細胞を直接殺滅するために使用され得る。1つの適用において、上記誘導性の改変されたカスパーゼ-9ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むベクターは、腫瘍へと注射され、10～24時間後に（タンパク質発現を可能にするために）、上記リガンド誘導物質（例えば、AP1903など）は、アポトーシスを引き起こすために投与され、腫瘍抗原の微小環境への放出を引き起こす。腫瘍微小環境をさらに改善してより

50

免疫原性にするために、処置は、1種またはこれより多くのアジュバント（例えば、IL-12、TLR、IDO阻害剤など）と組み合わせられ得る。いくつかの実施形態において、上記細胞は、固形腫瘍を処置するために送達され得る（例えば、腫瘍床への上記細胞の送達など）。いくつかの実施形態において、上記キメラカスパーゼ9ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、ワクチンの一部として、または腫瘍床への直接送達によって投与され得、上記腫瘍細胞におけるキメラカスパーゼ9ポリペプチドの発現を生じ、続いて、上記リガンド誘導物質の投与後に腫瘍細胞のアポトーシスが生じる。従って、いくつかの実施形態において、核酸ワクチン（例えば、DNAワクチン）もまた提供され、ここで上記ワクチンは、本出願の誘導性、または改変された誘導性カスパーゼ9ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む核酸を含む。上記ワクチンは、被験体へと投与され得、それによって標的細胞をインビボで形質転換または形質導入し得る。上記リガンド誘導物質は、次いで、本出願の方法に従って投与され得る。

10

【0030】

いくつかの実施形態において、上記改変されたカスパーゼ9ポリペプチドは、短縮型の改変されたカスパーゼ9ポリペプチドである。いくつかの実施形態において、上記改変されたカスパーゼ9ポリペプチドは、カスパーゼ動員ドメインを欠いている。いくつかの実施形態において、上記カスパーゼ9ポリペプチドは、配列番号9のアミノ酸配列もしくはそのフラグメントを含むか、または配列番号8のヌクレオチド配列もしくはそのフラグメントによってコードされる。

【0031】

20

いくつかの実施形態において、上記方法は、上記多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与することをさらに包含する。いくつかの実施形態において、上記多量体リガンド結合領域は、FKBP12、シクロフィリンレセプター、ステロイドレセプター、テトラサイクリンレセプター、重鎖抗体サブユニット、軽鎖抗体サブユニット、フレキシブルリンカードメインによって隔てられた、タンデムの重鎖可変領域と重鎖可変領域とからなる一本鎖抗体、およびこれらの変異した配列からなる群より選択される。いくつかの実施形態において、上記多量体リガンド結合領域は、FKBP12領域である。いくつかの実施形態において、上記多量体リガンドは、FK506二量体または二量体FK506様アナログリガンドである。いくつかの実施形態において、上記多量体リガンドは、AP1903である。いくつかの実施形態において、治療用細胞の数は、上記多量体リガンドの投与後に約60%~99%、約70%~95%、80%~90%または約90%もしくはこれ超低減する。いくつかの実施形態において、上記多量体リガンドの投与後に、ドナーT細胞は、上記患者の中で生存し、拡大することができかつウイルスおよび真菌に反応性である。いくつかの実施形態において、上記多量体リガンドの投与後に、ドナーT細胞は、上記患者の中で生存し、拡大することができかつ上記患者において腫瘍細胞に反応性である。

30

【0032】

いくつかの実施形態において、上記第2のレベルのコントロールにおいて使用される自殺遺伝子は、カスパーゼポリペプチド、例えば、カスパーゼ1、カスパーゼ2、カスパーゼ3、カスパーゼ4、カスパーゼ5、カスパーゼ6、カスパーゼ7、カスパーゼ8、カスパーゼ9、カスパーゼ10、カスパーゼ11、カスパーゼ12、カスパーゼ13、またはカスパーゼ14である。ある種の実施形態において、上記カスパーゼポリペプチドは、カスパーゼ9ポリペプチドである。ある種の実施形態において、上記カスパーゼ9ポリペプチドは、本明細書中の表5または表6の中に提供される触媒として活性な（触媒として死んでいない）カスパーゼバリエーションポリペプチドのアミノ酸配列を含む。他の実施形態において、上記カスパーゼ9ポリペプチドは、本明細書中の表5または表6の中に提供される触媒として活性な（触媒として死んでいない）カスパーゼバリエーションポリペプチドのアミノ酸配列からなる。他の実施形態において、上記リガンド誘導物質の非存在下でより低い基底活性を有するカスパーゼポリペプチドが、使用され得る。例えば、誘導性キメラカスパーゼポリペプチドの一部として含まれる場合、ある種の改変されたカスパーゼ

40

50

ー 9 ポリペプチドは、キメラ構築物の中の野生型カスパーゼー 9 と比較して、より低い基底活性を有し得る。例えば、上記改変されたカスパーゼー 9 ポリペプチドは、配列番号 9 と少なくとも 90 % 配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得、少なくとも 1 個のアミノ酸置換を含み得る。

【0033】

ある特定の実施形態は、以下の説明、実施例、請求項および図面においてさらに論じられる。

特定の実施形態では、例えば、以下が提供される：

(項目 1)

a) 第 1 のキメラポリペプチドをコードする第 1 のポリヌクレオチドであって、ここで該第 1 のキメラポリペプチドは、膜会合ポリペプチド領域および第 1 の多量体化領域を含む、第 1 のポリヌクレオチド；ならびに

b) 第 2 のキメラポリペプチドをコードする第 2 のポリヌクレオチドであって、ここで該第 2 のキメラポリペプチドは、アポトーシス促進ポリペプチド領域および第 2 の多量体化領域を含み、ここで該第 2 の多量体化領域は、該第 1 の多量体化領域とは異なるアミノ酸配列を有する、第 2 のポリヌクレオチド；

を含む改変された細胞であって、
ここで該第 1 の多量体化領域および第 2 の多量体化領域は、第 1 の多量体リガンドに結合する、

改変された細胞。

(項目 2)

前記第 2 の多量体化領域は、前記第 1 の多量体リガンドに結合し、前記第 1 の多量体化領域に有意に結合しない第 2 の多量体リガンドに結合する、項目 1 に記載の改変された細胞。

(項目 3)

前記第 1 のリガンドは、第 1 の部分を含み、

前記第 1 の多量体化領域は、該第 1 の部分に結合し、そして

前記第 2 の多量体化領域は、該第 1 の部分に有意に結合しない、

項目 1 または項目 2 に記載の改変された細胞。

(項目 4)

前記第 1 のリガンドは、第 1 の単量体を含み、

前記第 1 の多量体化領域は、該第 1 の単量体に結合し、そして

前記第 2 の多量体化領域は、該第 1 の単量体に有意に結合しない、

項目 1 または項目 2 に記載の改変された細胞。

(項目 5)

前記第 1 の多量体化領域は、前記第 2 の多量体リガンドに結合できない、項目 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の改変された細胞。

(項目 6)

前記第 1 の多量体化領域および第 2 の多量体化領域は、ラパマイシンまたはラパログに結合する、項目 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の改変された細胞。

(項目 7)

前記ラパログは、S-o, p-ジメトキシフェニル (DMOP) -ラパマイシン、R-イソプロポキシラパマイシン、および S-ブタンスルホンアミドラブからなる群より選択される、項目 6 に記載の改変された細胞。

(項目 8)

前記第 1 の多量体化領域は、FKBP12-ラパマイシン結合 (FRB) 領域または FRB バリエーション領域を含む、項目 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の改変された細胞。

(項目 9)

前記第 1 の多量体化領域は、KLW (T2098L)、KTF (W2101F)、および KLF (T2098L、W2101F) からなる群より選択される FRB バリエーション領域

10

20

30

40

50

を含む、項目 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の改変された細胞。

(項目 1 0)

前記第 1 の多量体化領域は、F R B_L を含む、項目 1 ～ 9 のいずれか 1 項に記載の改変された細胞。

(項目 1 1)

前記第 1 の多量体化領域は、少なくとも 2 個の F R B 領域または F R B バリエーション領域を含む、項目 1 ～ 1 0 のいずれか 1 項に記載の改変された細胞。

(項目 1 2)

前記第 1 の多量体化領域は、少なくとも 3 個の F R B 領域または F R B バリエーション領域を含む、項目 1 ～ 1 0 のいずれか 1 項に記載の改変された細胞。

10

(項目 1 3)

前記第 2 の多量体化領域は、F K B P 1 2 領域または F K B P 1 2 バリエーション領域を含む、項目 1 ～ 1 2 のいずれか 1 項に記載の改変された細胞。

(項目 1 4)

前記第 2 の多量体化領域は、バリン、ロイシン、イソロイシンおよびアラニンからなる群より選択される 3 6 位でのアミノ酸置換を有する F K B P 1 2 バリエーション領域である、項目 1 ～ 1 3 のいずれか 1 項に記載の改変された細胞。

(項目 1 5)

前記第 2 の多量体化領域は、F K B P v 3 6 領域を含む、項目 1 3 に記載の改変された細胞。

20

(項目 1 6)

前記第 2 のリガンドは、A P 1 9 0 3、A P 2 0 1 8 7、および A P 1 5 1 0 からなる群より選択される、項目 1 ～ 1 5 のいずれか 1 項に記載の改変された細胞。

(項目 1 7)

前記膜会合ポリペプチドは、抗原認識部分を含む、項目 1 ～ 1 6 のいずれか 1 項に記載の改変された細胞。

(項目 1 8)

前記膜会合ポリペプチドは、T 細胞レセプターを含む、項目 1 ～ 1 6 のいずれか 1 項に記載の改変された細胞。

(項目 1 9)

前記膜会合ポリペプチドは、キメラ抗原レセプターを含む、項目 1 ～ 1 6 のいずれか 1 項に記載の改変された細胞。

30

(項目 2 0)

前記キメラ抗原レセプターは、(i) 膜貫通領域、(i i) T 細胞活性化分子、および (i i i) 抗原認識部分を含む、項目 1 9 に記載の改変された細胞。

(項目 2 1)

前記キメラ抗原レセプターは、(i) 膜貫通領域、(i i) M y D 8 8 ポリペプチドまたは T I R ドメインを欠く短縮型 M y D 8 8 ポリペプチド、(i i i) C D 4 0 細胞外ドメインを欠く C D 4 0 細胞質ポリペプチド領域および (i v) T 細胞活性化分子、ならびに (v) 抗原認識部分を含む、項目 1 9 に記載の改変された細胞。

40

(項目 2 2)

前記キメラ抗原レセプターは、(i) 膜貫通領域、(i i) 4 - 1 B B、O X 4 0、および C D 2 8 からなる群より選択される共刺激ポリペプチド、(i i i) T 細胞活性化分子、ならびに (i v) 抗原認識部分を含む、項目 1 9 に記載の改変された細胞。

(項目 2 3)

前記膜会合ポリペプチド領域は、膜貫通ポリペプチドまたは膜標的化領域である、項目 1 ～ 2 2 のいずれか 1 項に記載の改変された細胞。

(項目 2 4)

前記膜標的化領域は、ミリスチル化領域、パルミトイル化領域、プレニル化領域、N K G 2 D レセプター、およびレセプターの膜貫通配列からなる群より選択される、項目 2 3

50

に記載の改変された細胞。

(項目 2 5)

前記第 1 のリガンドは、S-o, p-ジメトキシフェニル (DMOP) -ラパマイシン、R-イソプロポキシラパマイシン、および S-ブタンスルホンアミドラプからなる群より選択されるラパログである、項目 1 ~ 2 4 のいずれか 1 項に記載の改変された細胞。

(項目 2 6)

前記アポトーシス促進ポリペプチドは、カスパーゼ 1、カスパーゼ 2、カスパーゼ 3、カスパーゼ 4、カスパーゼ 5、カスパーゼ 6、カスパーゼ 7、カスパーゼ 8、カスパーゼ 9、カスパーゼ 10、カスパーゼ 11、カスパーゼ 12、カスパーゼ 13、またはカスパーゼ 14、FADD (DED)、APAF1 (CARD)、CRADD/RAIDD (CARD)、ASC (CARD)、Bax、Bak、Bcl-xL、Bcl-2、RIPK3、および RIPK1-RHIM からなる群より選択される、項目 1 ~ 2 5 のいずれか 1 項に記載の改変された細胞。

(項目 2 7)

前記アポトーシス促進ポリペプチドは、カスパーゼポリペプチドである、項目 1 ~ 2 6 のいずれか 1 項に記載の改変された細胞。

(項目 2 8)

前記アポトーシス促進ポリペプチドは、カスパーゼ 9 ポリペプチドである、項目 2 7 に記載の改変された細胞。

(項目 2 9)

前記カスパーゼポリペプチドは、配列番号 300 のアミノ酸配列を含む、項目 2 8 に記載の改変された細胞。

(項目 3 0)

前記カスパーゼポリペプチドは、表 5 または表 6 中の触媒として活性なカスパーゼバリエントからなる群より選択されるアミノ酸置換を含む改変されたカスパーゼ 9 ポリペプチドである、項目 2 8 に記載の改変された細胞。

(項目 3 1)

前記カスパーゼポリペプチドは、D330A、D330E、および N405Q からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む改変されたカスパーゼ 9 ポリペプチドである、項目 2 8 に記載の改変された細胞。

(項目 3 2)

a) キメラ抗原レセプターをコードする第 1 のポリヌクレオチドであって、ここで該キメラ抗原レセプターは、(i) 膜貫通領域、(ii) T細胞活性化分子、(iii) 抗原認識部分、および (iv) FRB 領域または FRB バリエント領域を含む、第 1 のポリヌクレオチド；ならびに

b) キメラカスパーゼポリペプチドをコードする第 2 のポリヌクレオチドであって、ここで該キメラカスパーゼポリペプチドは、(i) FKBP12 領域または FKBP12 バリエント領域および (ii) カスパーゼポリペプチドを含む、第 2 のポリヌクレオチド、を含む改変された細胞。

(項目 3 3)

前記キメラ抗原レセプターは、共刺激ポリペプチドをさらに含む、項目 3 2 に記載の改変された細胞。

(項目 3 4)

前記共刺激ポリペプチドは、CD28、OX40 および 4-1BB からなる群より選択される、項目 3 3 に記載の改変された細胞。

(項目 3 5)

a) キメラ抗原レセプターをコードする第 1 のポリヌクレオチドであって、ここで該キメラ抗原レセプターは、(i) 膜貫通領域、(ii) MyD88 ポリペプチドまたは TIR ドメインを欠く短縮型 MyD88 ポリペプチド、(iii) CD40 細胞外ドメインを欠く CD40 細胞質ポリペプチド領域、(iv) T細胞活性化分子、(v) 抗原認識部分

10

20

30

40

50

、および (v i) F R B 領域または F R B バリエーション領域を含む、第 1 のポリヌクレオチド；ならびに

b) キメラカスパーゼポリペプチドをコードする第 2 のポリヌクレオチドであって、ここで該キメラカスパーゼポリペプチドは、(i) F K B P 1 2 領域または F K B P 1 2 バリエーション領域および (i i) カスパーゼポリペプチドを含む、第 2 のポリヌクレオチド、を含む改変された細胞。

(項目 3 6)

F R B 領域または F R B バリエーション領域は、K L W (T 2 0 9 8 L)、K T F (W 2 1 0 1 F)、および K L F (T 2 0 9 8 L、W 2 1 0 1 F) からなる群より選択される、項目 3 2 ~ 3 5 のいずれか 1 項に記載の改変された細胞。

(項目 3 7)

前記 F R B バリエーション領域は、F R B_L である、項目 3 2 ~ 3 5 のいずれか 1 項に記載の改変された細胞。

(項目 3 8)

前記第 1 の多量体化領域は、F R B_L であり、前記第 2 の多量体化領域は、F K B P v 3 6 である、項目 1 ~ 3 7 のいずれか 1 項に記載の改変された細胞。

(項目 3 9)

前記 T 細胞活性化分子は、I T A M を含みシグナル 1 を与える分子、C D 3 ζ ポリペプチド、および F c イブシロンレセプターガンマ (F c ε R 1 γ) サブユニットポリペプチドからなる群より選択される、項目 2 0、または 3 2 ~ 3 8 のいずれか 1 項に記載の改変された細胞。

(項目 4 0)

a) 第 1 のキメラポリペプチドであって、ここで該第 1 のキメラポリペプチドは、膜会合ポリペプチド領域および第 1 の多量体化領域を含む、第 1 のキメラポリペプチド；ならびに

b) 第 2 のキメラポリペプチドであって、ここで該第 2 のキメラポリペプチドは、アポトーシス促進ポリペプチド領域および第 2 の多量体化領域を含み、ここで該第 2 の多量体化領域は、該第 1 の多量体化領域とは異なるアミノ酸配列を有する、第 2 のキメラポリペプチド；

を含む改変された細胞であって、

ここで該第 1 の多量体化領域および第 2 の多量体化領域は、第 1 の多量体リガンドに結合する、

改変された細胞。

(項目 4 1)

前記第 1 のキメラポリペプチドをコードする第 1 のポリヌクレオチドおよび前記第 2 のポリペプチドをコードする第 2 のポリヌクレオチドを含む、項目 4 0 に記載の改変された細胞。

(項目 4 2)

a) キメラ抗原レセプターをコードする第 1 のポリヌクレオチドであって、ここで該キメラ抗原レセプターは、(i) 膜貫通領域、(i i) T 細胞活性化分子、(i i i) 抗原認識部分、(i v) F R B_L 領域を含む、第 1 のポリヌクレオチド；ならびに

b) キメラカスパーゼポリペプチドをコードする第 2 のポリヌクレオチドであって、ここで該キメラカスパーゼポリペプチドは、(i) F K B P 1 2 v 3 6 領域および (i i) C A R D ドメインを欠くカスパーゼ 9 ポリペプチドを含む、第 2 のポリヌクレオチド、を含む改変された細胞。

(項目 4 3)

a) キメラ抗原レセプターをコードする第 1 のポリヌクレオチドであって、ここで該キメラ抗原レセプターは、(i) 膜貫通領域、(i i) T I R ドメインを欠く短縮型 M y D 8 8 ポリペプチド、(i i i) C D 4 0 細胞外ドメインを欠く C D 4 0 細胞質ポリペプチド領域、(i v) T 細胞活性化分子、(v) 抗原認識部分、(v) F R B_L 領域を含む、

10

20

30

40

50

第1のポリヌクレオチド；ならびに

b) キメラカスパーゼポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチドであって、ここで該キメラカスパーゼポリペプチドは、(i) FKBP12v36領域および(ii) CARDドメインを欠くカスパーゼ9ポリペプチドを含む、第2のポリヌクレオチド、を含む改変された細胞。

(項目44)

前記抗原認識部分は、腫瘍細胞上の抗原、過剰増殖性疾患に関与する細胞上の抗原、ウイルス抗原、細菌抗原、CD19、PSCA、Her2/Neu、PSMA、Muc1、ROR1、メソテリン、GD2、CD123、Muc16、CD33、CD38、およびCD44v6からなる群より選択される抗原に結合する、項目17、20～22、32～39、または42～43のいずれか1項に記載の改変された細胞。

10

(項目45)

前記抗原認識部分は、一本鎖可変フラグメントである、項目17、20～22、32～39、または42～44のいずれか1項に記載の改変された細胞。

(項目46)

前記膜貫通領域は、CD8膜貫通領域である、項目20～22、23、32～39、または42～45のいずれか1項に記載の改変された細胞。

(項目47)

a) 少なくとも1個のFRB領域またはFRBバリエーション領域を含むキメラT細胞レセプターをコードする第1のポリヌクレオチド；および

20

b) キメラカスパーゼポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチドであって、ここで該キメラカスパーゼポリペプチドは、(i) FKBP12領域またはFKBP12バリエーション領域、および(ii) カスパーゼポリペプチドを含む、第2のポリヌクレオチド、

を含む改変された細胞。

(項目48)

前記T細胞レセプターは、PRAME、Bob-1、およびNY-ESO-1からなる群より選択される抗原性ポリペプチドに結合する、項目18または47のいずれか1項に記載の改変された細胞。

(項目49)

30

前記短縮型MyD88ポリペプチドは、配列番号214のアミノ酸配列またはその機能的フラグメントを有する、項目21、35～39、または46～47のいずれか1項に記載の改変された細胞。

(項目50)

前記細胞質CD40ポリペプチドは、配列番号216のアミノ酸配列またはその機能的フラグメントを有する、項目21、35～39、または46～49のいずれか1項に記載の改変された細胞。

(項目51)

前記膜会合ポリペプチドは、NKG2Dレセプターである、項目1～16、25～39、または42～50のいずれか1項に記載の改変された細胞。

40

(項目52)

前記細胞は、T細胞、腫瘍浸潤リンパ球、NK-T細胞、またはNK細胞である、項目1～51のいずれか1項に記載の改変された細胞。

(項目53)

前記細胞は、T細胞である、項目1～51のいずれか1項に記載の改変された細胞。

(項目54)

前記細胞は、初代T細胞である、項目1～51のいずれか1項に記載の改変された細胞。

(項目55)

前記細胞は、細胞傷害性T細胞である、項目1～51のいずれか1項に記載の改変された細胞。

50

(項目 5 6)

前記細胞は、胚性幹細胞（E S C）、人工多能性幹細胞（i P S C）、非リンパ球性造血細胞、非造血細胞、マクロファージ、ケラチノサイト、線維芽細胞、メラノーマ細胞、腫瘍浸潤リンパ球、ナチュラルキラー細胞、ナチュラルキラー T 細胞、または T 細胞からなる群より選択される、項目 1 ～ 5 1 のいずれか 1 項に記載の改変された細胞。

(項目 5 7)

前記 T 細胞は、ヘルパー T 細胞である、項目 1 ～ 5 1 のいずれか 1 項に記載の改変された細胞。

(項目 5 8)

前記細胞は、骨髄から得られるかまたは骨髄から調製される、項目 1 ～ 5 1 のいずれか 1 項に記載の改変された細胞。

10

(項目 5 9)

前記細胞は、臍帯血から得られるかまたは臍帯血から調製される、項目 1 ～ 5 8 のいずれか 1 項に記載の改変された細胞。

(項目 6 0)

前記細胞は、末梢血から得られるかまたは末梢血から調製される、項目 1 ～ 5 8 のいずれか 1 項に記載の改変された細胞。

(項目 6 1)

前記細胞は、末梢血単核細胞から得られるかまたは末梢血単核細胞から調製される、項目 1 ～ 5 8 のいずれか 1 項に記載の改変された細胞。

20

(項目 6 2)

前記細胞は、ヒト細胞である、項目 1 ～ 6 1 のいずれか 1 項に記載の改変された細胞。

(項目 6 3)

前記改変された細胞は、インビボで形質導入またはトランスフェクトされる、項目 1 ～ 6 2 のいずれか 1 項に記載の改変された細胞。

(項目 6 4)

前記細胞は、エレクトロポレーション、ソノポレーション、バイオリスティック（例えば、A u 粒子での遺伝子銃）、脂質トランスフェクション、ポリマートランスフェクション、ナノ粒子、またはポリプレックスからなる群より選択される方法を使用して、核酸ベクターによってトランスフェクトまたは形質導入される、項目 1 ～ 6 3 のいずれか 1 項に記載の改変された細胞。

30

(項目 6 5)

前記第 1 のリガンドまたは前記第 2 のリガンドを含む、項目 1 ～ 6 4 のいずれか 1 項に記載の改変された細胞。

(項目 6 6)

第 1 のポリヌクレオチドおよび第 2 のポリヌクレオチドを含む核酸を含むキットまたは組成物であって、ここで

a) 該第 1 のポリヌクレオチドは、第 1 のキメラポリペプチドをコードし、ここで該第 1 のキメラポリペプチドは、膜会合ポリペプチド領域および第 1 の多量体化領域を含み；そして

40

b) 該第 2 のポリヌクレオチドは、第 2 のキメラポリペプチドをコードし、ここで該第 2 のキメラポリペプチドは、アポトーシス促進ポリペプチド領域および第 2 の多量体化領域を含み、ここで該第 2 の多量体化領域は、該第 1 の多量体化領域とは異なるアミノ酸配列を有し；

ここで該第 1 の多量体化領域および第 2 の多量体化領域は、第 1 の多量体リガンドに結合する、キットまたは組成物。

(項目 6 7)

前記第 2 の多量体化領域は、前記第 1 の多量体リガンドに結合し、前記第 1 の多量体化領域に有意に結合しない第 2 の多量体リガンドに結合する、項目 6 6 に記載のキットまたは組成物。

50

(項目 68)

前記第1のリガンドは、第1の部分を含み、

前記第1の多量体化領域は、該第1の部分に結合し、そして

前記第2の多量体化領域は、該第1の部分に有意に結合しない、

項目66または67のいずれか1項に記載のキットまたは組成物。

(項目 69)

前記第1のリガンドは、第1の単量体を含み、

前記第1の多量体化領域は、該第1の単量体に結合し、そして

前記第2の多量体化領域は、該第1の単量体に有意に結合しない、

項目66または67のいずれか1項に記載のキットまたは組成物。

10

(項目 70)

前記第1の多量体化領域は、前記第2の多量体リガンドに結合できない、項目66～69のいずれか1項に記載のキットまたは組成物。

(項目 71)

前記第1の多量体化領域および第2の多量体化領域は、ラパマイシンまたはラパログに結合する、項目66～70のいずれか1項に記載のキットまたは組成物。

(項目 72)

前記核酸は、前記第1のポリヌクレオチドおよび前記第2のポリヌクレオチドを含む、項目66～71のいずれか1項に記載のキットまたは組成物。

20

(項目 73)

前記第1のポリヌクレオチドを含む第1の核酸種および前記第2のポリヌクレオチドを含む第2の核酸種を含む、項目66～72のいずれか1項に記載のキットまたは組成物。

(項目 74)

キメラ膜会合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む核酸であって、ここで該キメラ膜会合ポリペプチドは、

a) 膜会合ポリペプチド；および

b) 1個またはこれより多くの多量体化領域、

を含み、ここで

該多量体化領域は、第1の部分および第2の部分を含む多量体リガンドに結合し、

該多量体化領域は、該多量体リガンドの該第1の部分に結合するが、該多量体リガンドの該第2の部分に結合しない、

核酸。

30

(項目 75)

前記膜会合ポリペプチドは、キメラ抗原レセプターまたはキメラT細胞レセプターである、項目74に記載の核酸。

(項目 76)

前記多量体化領域は、FRBまたはFRBバリエーションである、項目74または75のいずれか1項に記載の核酸。

(項目 77)

前記多量体リガンドは、ラパマイシンまたはラパログである、項目74～76のいずれか1項に記載の核酸。

40

(項目 78)

少なくとも2個の多量体化領域を含む、項目74～77のいずれか1項に記載の核酸。

(項目 79)

a) 第1のキメラポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチドであって、ここで該第1のキメラポリペプチドは、膜会合ポリペプチド領域および第1の多量体化領域を含む、第1のポリヌクレオチド；ならびに

b) 第2のキメラポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチドであって、ここで該第2のキメラポリペプチドは、アポトーシス促進ポリペプチド領域および第2の多量体化領域を含み、ここで該第2の多量体化領域は、該第1の多量体化領域とは異なるアミノ

50

酸配列を有する、第 2 のポリヌクレオチド；
 に作用的に連結されたプロモーターを含む核酸であって、
 ここで該第 1 の多量体化領域および第 2 の多量体化領域は、第 1 の多量体リガンドに結合する、
 核酸。

(項目 8 0)

前記第 2 の多量体化領域は、前記第 1 の多量体リガンドに結合し、該第 1 の多量体化領域に有意に結合しない第 2 の多量体リガンドに結合する、項目 7 9 に記載の核酸。

(項目 8 1)

前記第 1 のリガンドは、第 1 の部分を含み、
 前記第 1 の多量体化領域は、該第 1 の部分に結合し、そして
 前記第 2 の多量体化領域は、該第 1 の部分に有意に結合しない、
 項目 7 9 または 8 0 に記載の核酸。

(項目 8 2)

前記第 1 のリガンドは、第 1 の単量体を含み、
 前記第 1 の多量体化領域は、該第 1 の単量体に結合し、そして
 前記第 2 の多量体化領域は、該第 1 の単量体に有意に結合しない、
 項目 7 9 または項目 8 0 に記載の核酸。

(項目 8 3)

前記第 1 の多量体化領域は、前記第 2 の多量体リガンドに結合できない、項目 7 9 ～ 8 2 のいずれか 1 項に記載の核酸。

(項目 8 4)

前記第 1 の多量体化領域および第 2 の多量体化領域は、ラパマイシンまたはラパログに結合する、項目 7 9 ～ 8 3 のいずれか 1 項に記載の核酸。

(項目 8 5)

前記ラパログは、S-o, p-ジメトキシフェニル (DMOP) -ラパマイシン、R-イソプロポキシラパマイシン、および S-ブタンスルホンアミドラブからなる群より選択される、項目 8 4 に記載の核酸。

(項目 8 6)

前記第 1 の多量体化領域は、FRB 領域または FRB バリエント領域を含む、項目 7 9 ～ 8 5 のいずれか 1 項に記載の核酸。

(項目 8 7)

前記第 1 の多量体化領域は、KLW (T2098L)、KTF (W2101F)、および KLF (T2098L、W2101F) からなる群より選択される FRB バリエント領域である、項目 7 9 ～ 8 6 のいずれか 1 項に記載の核酸。

(項目 8 8)

前記第 1 の多量体化領域は、FRB_Lを含む、項目 7 9 ～ 8 7 のいずれか 1 項に記載の核酸。

(項目 8 9)

前記第 1 の多量体化領域は、少なくとも 2 個の FRB 領域または FRB バリエント領域を含む、項目 8 6 ～ 8 8 のいずれか 1 項に記載の核酸。

(項目 9 0)

前記第 2 の多量体化領域は、FKBP12 領域を含む、項目 7 9 ～ 8 9 のいずれか 1 項に記載の核酸。

(項目 9 1)

前記第 2 の多量体化領域は、バリン、ロイシン、イソロイシンおよびアラニンからなる群より選択される 36 位でのアミノ酸置換を有する FKBP12 バリエント領域である、項目 7 9 ～ 9 0 のいずれか 1 項に記載の核酸。

(項目 9 2)

前記第 2 の多量体化領域は、FKBPv36 多量体化領域を含む、項目 9 1 に記載の核酸

10

20

30

40

50

。

（項目 9 3）

前記第 2 のリガンドは、A P 1 9 0 3、A P 2 0 1 8 7、および A P 1 5 1 0 からなる群より選択される、項目 7 9 ～ 9 2 のいずれか 1 項に記載の核酸。

（項目 9 4）

前記膜会合ポリペプチドは、抗原認識部分をさらに含む、項目 7 9 ～ 9 3 のいずれか 1 項に記載の核酸。

（項目 9 5）

前記膜会合ポリペプチドは、T 細胞レセプターを含む、項目 7 9 ～ 9 4 のいずれか 1 項に記載の核酸。

（項目 9 6）

前記膜会合ポリペプチドは、N K G 2 D レセプターを含む、項目 7 9 ～ 9 4 のいずれか 1 項に記載の核酸。

（項目 9 7）

前記膜会合ポリペプチドは、キメラ抗原レセプターを含む、項目 7 9 ～ 9 4 のいずれか 1 項に記載の核酸。

（項目 9 8）

前記キメラ抗原レセプターは、（i）膜貫通領域、（i i）T 細胞活性化分子、および（i i i）抗原認識部分を含む、項目 9 7 に記載の核酸。

（項目 9 9）

前記キメラ抗原レセプターは、膜貫通領域、（i i）M y D 8 8 ポリペプチドまたは T I R ドメインを欠く短縮型 M y D 8 8 ポリペプチド、（i i i）C D 4 0 細胞外ドメインを欠く C D 4 0 細胞質ポリペプチド領域、（i v）T 細胞活性化分子、および（v）抗原認識部分を含む、項目 9 8 に記載の核酸。

（項目 1 0 0）

前記キメラ抗原レセプターは、（i）膜貫通領域、（i i）4-1 B B、O X 4 0、および C D 2 8 からなる群より選択される共刺激ポリペプチド、（i i i）T 細胞活性化分子、ならびに（i v）抗原認識部分を含む、項目 9 7 に記載の核酸。

（項目 1 0 1）

前記膜会合領域は、膜貫通領域である、項目 7 9 ～ 9 4 のいずれか 1 項に記載の核酸。

（項目 1 0 2）

前記膜会合領域は、膜標的化領域である、項目 7 9 ～ 9 4 のいずれか 1 項に記載の核酸。

（項目 1 0 3）

前記膜標的化領域は、ミリスチル化領域、パルミトイル化領域、プレニル化領域、N K G 2 D レセプター、およびレセプターの膜貫通配列からなる群より選択される、項目 1 0 2 に記載の核酸。

（項目 1 0 4）

前記アポトーシス促進ポリペプチドは、カスパーゼ 1、カスパーゼ 2、カスパーゼ 3、カスパーゼ 4、カスパーゼ 5、カスパーゼ 6、カスパーゼ 7、カスパーゼ 8、カスパーゼ 9、カスパーゼ 1 0、カスパーゼ 1 1、カスパーゼ 1 2、カスパーゼ 1 3、またはカスパーゼ 1 4、F A D D（D E D）、A P A F 1（C A R D）、C R A D D／R A I D D C A R D）、A S C（C A R D）、B a x、B a k、B c l-x L、B c l-2、R I P K 3、および R I P K 1-R H I M からなる群より選択される、項目 7 9 ～ 1 0 3 のいずれか 1 項に記載の核酸。

（項目 1 0 5）

前記アポトーシス促進ポリペプチドは、カスパーゼポリペプチドである、項目 7 9 ～ 1 0 3 のいずれか 1 項に記載の核酸。

（項目 1 0 6）

前記アポトーシス促進ポリペプチドは、カスパーゼ 9 ポリペプチドである、項目 1 0 5 に記載の核酸。

10

20

30

40

50

(項目 1 0 7)

前記カスパーゼポリペプチドは、配列番号 3 0 0 のアミノ酸配列を含む、項目 1 0 6 に記載の核酸。

(項目 1 0 8)

前記カスパーゼポリペプチドは、表 5 または表 6 中の触媒として活性なカスパーゼバリエーションからなる群より選択されるアミノ酸置換を含む改変されたカスパーゼ 9 ポリペプチドである、項目 1 0 6 に記載の核酸。

(項目 1 0 9)

前記カスパーゼポリペプチドは、D 3 3 0 A、D 3 3 0 E、および N 4 0 5 Q からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む改変されたカスパーゼ 9 ポリペプチドである、項目 1 0 6 に記載の核酸。

(項目 1 1 0)

a) キメラ抗原レセプターをコードする第 1 のポリヌクレオチドであって、ここで該キメラ抗原レセプターは、(i) 膜貫通領域、(i i) T 細胞活性化分子、(i i i) 抗原認識部分、および (i v) F R B 領域または F R B バリエーション領域を含む、第 1 のポリヌクレオチド；ならびに

b) キメラカスパーゼポリペプチドをコードする第 2 のポリヌクレオチドであって、ここで該キメラカスパーゼポリペプチドは、(i) F K B P 1 2 領域または F K B P 1 2 バリエーション領域、および (i i) カスパーゼポリペプチドを含む、第 2 のポリヌクレオチドを含む核酸。

(項目 1 1 1)

前記キメラ抗原レセプターは、共刺激ポリペプチドをさらに含む、項目 1 1 0 に記載の核酸。

(項目 1 1 2)

前記共刺激ポリペプチドは、C D 2 8、O X 4 0 および 4 - 1 B B からなる群より選択される、項目 1 1 1 に記載の核酸。

(項目 1 1 3)

a) キメラ抗原レセプターをコードする第 1 のポリヌクレオチドであって、ここで該キメラ抗原レセプターは、(i) 膜貫通領域、(i i) M y D 8 8 ポリペプチドまたは T I R ドメインを欠く短縮型 M y D 8 8 ポリペプチド、(i i i) C D 4 0 細胞外ドメインを欠く C D 4 0 細胞質ポリペプチド領域、(i v) T 細胞活性化分子、(v) 抗原認識部分、および (v i) F R B_L 領域を含む、第 1 のポリヌクレオチド；ならびに

b) キメラカスパーゼポリペプチドをコードする第 2 のポリヌクレオチドであって、ここで該キメラカスパーゼポリペプチドは、(i) F K B P 1 2 領域または F K B P 1 2 バリエーション領域および (i i) カスパーゼポリペプチドを含む、第 2 のポリヌクレオチド、を含む核酸。

(項目 1 1 4)

前記 F R B 領域または F R B バリエーション領域は、K L W (T 2 0 9 8 L)、K T F (W 2 1 0 1 F)、および K L F (T 2 0 9 8 L、W 2 1 0 1 F) からなる群より選択される、項目 1 1 0 ~ 1 1 3 のいずれか 1 項に記載の核酸。

(項目 1 1 5)

前記 F R B バリエーション領域は、F R B_L である、項目 1 1 4 に記載の核酸。

(項目 1 1 6)

前記第 1 の多量体化領域は、F R B_L であり、前記第 2 の多量体化領域は、F K B P v 3 6 である、項目 7 9 ~ 1 1 5 のいずれか 1 項に記載の核酸。

(項目 1 1 7)

a) キメラ抗原レセプターをコードする第 1 のポリヌクレオチドであって、ここで該キメラ抗原レセプターは、(i) 膜貫通領域、(i i) T 細胞活性化分子、(i i i) 抗原認識部分、(i v) F R B_L 領域を含む、第 1 のポリヌクレオチド；ならびに

b) キメラカスパーゼポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチドであって、ここで該キメラカスパーゼポリペプチドは、(i) FKBP12v36領域および(ii) CARDドメインを欠くカスパーゼ9ポリペプチドを含む、第2のポリヌクレオチド、を含む改変された細胞。

(項目118)

a) キメラ抗原レセプターをコードする第1のポリヌクレオチドであって、ここで該キメラ抗原レセプターは、(i) 膜貫通領域、(ii) TIRドメインを欠く短縮型MyD88ポリペプチド、(iii) CD40細胞外ドメインを欠くCD40細胞質ポリペプチド領域、(iv) T細胞活性化分子、(v) 抗原認識部分、(vi) FRBL領域を含む、第1のポリヌクレオチド；ならびに

10

b) キメラカスパーゼポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチドであって、ここで該キメラカスパーゼポリペプチドは、(i) FKBP12v36領域および(ii) CARDドメインを欠くカスパーゼ9ポリペプチドを含む、第2のポリヌクレオチド、を含む改変された細胞。

(項目119)

前記T細胞活性化分子は、ITAMを含みシグナル1を与える分子、CD3ζポリペプチド、およびFcεR1γサブユニットポリペプチドからなる群より選択される、項目98～118のいずれか1項に記載の核酸。

(項目120)

前記抗原認識部分は、腫瘍細胞上の抗原、過剰増殖性疾患に関与する細胞上の抗原、ウイルス抗原、細菌抗原、CD19、PSCA、Her2/Neu、PSMA、Muc1、ROR1、メソテリン、GD2、CD123、Muc16、CD33、CD38、およびCD44v6からなる群より選択される抗原に結合する、項目98～119のいずれか1項に記載の核酸。

20

(項目121)

前記抗原認識部分は、一本鎖可変フラグメントである、項目98～120のいずれか1項に記載の核酸。

(項目122)

前記膜貫通領域は、CD8膜貫通領域である、項目98～120のいずれか1項に記載の核酸。

30

(項目123)

前記短縮型MyD88ポリペプチドは、配列番号214のアミノ酸配列またはその機能的フラグメントを有する、項目99または101～122のいずれか1項に記載の核酸。

(項目124)

前記細胞質CD40ポリペプチドは、配列番号216のアミノ酸配列またはその機能的フラグメントを有する、項目99～101～122のいずれか1項に記載の核酸。

(項目125)

前記CD3ζポリペプチドは、配列番号161のアミノ酸配列またはその機能的フラグメントを有する、項目119～124のいずれか1項に記載の核酸。

(項目126)

前記膜貫通領域のポリペプチドは、配列番号17のアミノ酸配列またはその機能的フラグメントを含む、項目98～125のいずれか1項に記載の核酸。

40

(項目127)

前記核酸は、ウイルスベクター内に含まれる、項目79～126のいずれか1項に記載の核酸。

(項目128)

前記ウイルスベクターは、レトロウイルスベクターである、項目127に記載の核酸。

(項目129)

前記ウイルスベクターは、マウス白血病ウイルスベクター、SFGベクター、アデノウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス(AAV)、ヘルペスウイ

50

ルス、およびワクシニアウイルスからなる群より選択される、項目 1 2 7 に記載の核酸。

(項目 1 3 0)

前記核酸は、エレクトロポレーション、ソノポレーション、もしくはバイオリスティックのために調製されるかまたはそのためにデザインされたベクターの中に存在するか、あるいは化学的脂質、ポリマー、無機ナノ粒子、もしくはポリプレックスに結合されるかまたはその中に組み込まれる、項目 7 9 ～ 1 2 6 のいずれか 1 項に記載の核酸。

(項目 1 3 1)

前記核酸は、プラスミド内に含まれる、項目 7 9 ～ 1 2 6 のいずれか 1 項に記載の核酸。

(項目 1 3 2)

少なくとも 2 個のプロモーターを含む、項目 7 9 ～ 1 3 1 のいずれか 1 項に記載の核酸。

(項目 1 3 3)

1 個のプロモーターは、前記第 1 のポリヌクレオチドおよび第 2 のポリヌクレオチドの両方に作動可能に連結される、項目 7 9 ～ 1 3 2 のいずれか 1 項に記載の核酸。

(項目 1 3 4)

前記第 1 のポリヌクレオチドと第 2 のポリヌクレオチドとの間にリンカーポリペプチドをコードする第 3 のポリヌクレオチドをさらに含み、ここで該リンカーポリペプチドは、翻訳中または翻訳後に、該第 1 のポリヌクレオチドおよび第 2 のポリヌクレオチドの翻訳生成物を分断する、項目 7 9 ～ 1 3 2 に記載の核酸。

(項目 1 3 5)

前記リンカーポリペプチドは、2 A ポリペプチドである、項目 1 3 4 に記載の核酸。

(項目 1 3 6)

前記核酸は、キメラ抗原レセプター、2 A ポリペプチド、およびカスパーゼポリペプチドを含むポリペプチドをコードする、項目 1 3 5 に記載の核酸。

(項目 1 3 7)

前記第 1 のポリヌクレオチドは、第 1 のプロモーターに作動可能に連結され、前記第 2 のポリヌクレオチドは、第 2 のプロモーターに作動可能に連結される、項目 1 3 2 に記載の核酸。

(項目 1 3 8)

表 7 に提供されるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含み、ここで該ポリペプチドは、FKBP 1 2 v 3 6、d カスパーゼ 9、T 2 A、シグナルペプチド、FMC 6 3 - V L、FMC 6 3 - V H、CD 3 4 エピトープ、CD 8 a ストック、CD 8 t m、My D 8 8、d C D 4 0、C D 3 z、FRBI ^ ^、FRBI、およびリンカーポリペプチドを含む、項目 7 9 ～ 1 3 7 のいずれか 1 項に記載の核酸。

(項目 1 3 9)

項目 7 9 ～ 1 3 8 のいずれか 1 項に記載の核酸でトランスフェクトされた、改変された細胞。

(項目 1 4 0)

前記細胞は、T 細胞、腫瘍浸潤リンパ球、NK-T 細胞、または NK 細胞である、項目 1 3 9 に記載の改変された細胞。

(項目 1 4 1)

前記細胞は、T 細胞である、項目 1 3 9 に記載の改変された細胞。

(項目 1 4 2)

前記細胞は、初代 T 細胞である、項目 1 3 9 に記載の改変された細胞。

(項目 1 4 3)

前記細胞は、細胞傷害性 T 細胞である、項目 1 3 9 に記載の改変された細胞。

(項目 1 4 4)

前記細胞は、胚性幹細胞 (ESC)、人工多能性幹細胞 (iPSC)、非リンパ球性造血細胞、非造血細胞、マクロファージ、ケラチノサイト、線維芽細胞、メラノーマ細胞、腫瘍浸潤リンパ球、ナチュラルキラー細胞、ナチュラルキラー T 細胞、または T 細胞からなる群より選択される、項目 1 3 9 に記載の改変された細胞。

10

20

30

40

50

(項目 1 4 5)

前記 T 細胞は、ヘルパー T 細胞である、項目 1 3 9 に記載の改変された細胞。

(項目 1 4 6)

前記細胞は、骨髓から得られるかまたは骨髓から調製される、項目 1 3 9 ～ 1 4 5 のいずれか 1 項に記載の改変された細胞。

(項目 1 4 7)

前記細胞は、臍帯血から得られるかまたは臍帯血から調製される、項目 1 3 9 ～ 1 4 5 のいずれか 1 項に記載の改変された細胞。

(項目 1 4 8)

前記細胞は、末梢血から得られるかまたは末梢血から調製される、項目 1 3 9 ～ 1 4 5 のいずれか 1 項に記載の改変された細胞。

10

(項目 1 4 9)

前記細胞は、末梢血単核細胞から得られるかまたは末梢血単核細胞から調製される、項目 1 3 9 ～ 1 4 5 のいずれか 1 項に記載の改変された細胞。

(項目 1 5 0)

前記細胞は、ヒト細胞である、項目 1 3 9 ～ 1 4 9 のいずれか 1 項に記載の改変された細胞。

(項目 1 5 1)

前記改変された細胞は、インビボで形質導入またはトランスフェクトされる、項目 1 3 9 ～ 1 5 0 のいずれか 1 項に記載の改変された細胞。

20

(項目 1 5 2)

前記細胞は、エレクトロポレーション、ソノポレーション、バイオリスティック（例えば、A u 粒子での遺伝子銃）、脂質トランスフェクション、ポリマートランスフェクション、ナノ粒子、またはポリプレックスからなる群より選択される方法を使用して、核酸ベクターによってトランスフェクトまたは形質導入される、項目 1 3 9 ～ 1 5 1 のいずれか 1 項に記載の改変された細胞。

(項目 1 5 3)

膜会合ポリペプチド領域と第 1 の多量体化領域とを含む第 1 のキメラポリペプチドおよびアポトーシス促進ポリペプチド領域と第 2 の多量体化領域とを含む第 2 のキメラポリペプチドであって、ここで該第 2 の多量体化領域は、該第 1 の多量体化領域とは異なるアミノ酸配列を有し；ここで該第 1 の多量体化領域および第 2 の多量体化領域は、第 1 の多量体リガンドに結合し、そして該第 1 の多量体化領域は、第 2 の多量体リガンドに結合できない、第 1 のキメラポリペプチドおよび第 2 のキメラポリペプチドを発現させるための方法であって、該方法は、項目 7 9 ～ 1 3 8 のいずれか 1 項に記載の核酸と細胞とを、該核酸が該細胞に組み込まれる条件下で接触させることを含み、それによって、該細胞は、該第 1 のキメラポリペプチドおよび第 2 のキメラポリペプチドを該組み込まれた核酸から発現する、方法。

30

(項目 1 5 4)

少なくとも 2 個の F R B 領域または F R B バリエーション領域を含むキメラ抗原レセプターを含む第 1 のキメラポリペプチド、および F K B P 1 2 ポリペプチド領域または F K B P 1 2 バリエーションポリペプチド領域とカスパーゼポリペプチド領域とを含む第 2 のキメラポリペプチドを発現させるための方法であって、該方法は、項目 7 9 ～ 1 3 8 のいずれか 1 項に記載の核酸と細胞とを、該核酸が該細胞に組み込まれる条件下で接触させることを含み、それによって該細胞は、該第 1 のキメラポリペプチドおよび第 2 のキメラポリペプチドを該組み込まれた核酸から発現する、方法。

40

(項目 1 5 5)

F R B_L 領域およびキメラ抗原レセプターを含むキメラポリペプチドを発現させるための方法であって、該方法は、項目 7 9 ～ 1 3 8 のいずれか 1 項に記載の核酸と細胞とを、該核酸が該細胞に組み込まれる条件下で接触させることを含み、それによって該細胞は、該キメラポリペプチドを該組み込まれた核酸から発現する、方法。

50

(項目 1 5 6)

前記核酸は、前記細胞とエキソビボで接触させられる、項目 1 5 3～1 5 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 1 5 7)

前記核酸は、前記細胞とインビボで接触させられる、項目 1 5 3～1 5 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 1 5 8)

被験体において移植された改変された細胞の生存をコントロールするための方法であって、該方法は、

a) 項目 1～6 5 または 1 3 9～1 5 2 のいずれか 1 項に記載の改変された細胞を、該被験体に移植すること；および

b) (a) の後に、該被験体に、前記アポトーシス促進ポリペプチド領域を含む前記第 2 のキメラポリペプチドを発現する該改変された細胞のうちの 3 0 % 未満を殺滅するために有効な量のラパマイシンまたはラパログを投与すること
を包含する、方法。

(項目 1 5 9)

ラパマイシンまたはラパログを、改変された細胞を使用する細胞治療を受けたことがあるヒト被験体に投与するための方法であって、該方法は、ラパマイシンまたはラパログを該ヒト被験体に投与することを包含し、ここで該改変された細胞は、項目 1～6 5 または 1 3 9～1 5 2 のいずれか 1 項に記載の核酸を含み、ここで該ラパマイシンまたはラパログは、F R B 領域または F R B バリエーション領域に結合する、方法。

(項目 1 6 0)

前記ラパマイシンまたはラパログは、前記キメラカスパーゼポリペプチドを発現する前記改変された細胞のうちの 4 0 % 未満を殺滅するために有効な量で投与される、項目 1 5 8～1 5 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 1 6 1)

前記ラパマイシンまたはラパログは、前記キメラカスパーゼポリペプチドを発現する前記改変された細胞のうちの 5 0 % 未満を殺滅するために有効な量で投与される、項目 1 5 8～1 5 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 1 6 2)

前記ラパマイシンまたはラパログは、前記キメラカスパーゼポリペプチドを発現する前記改変された細胞のうちの 6 0 % 未満を殺滅するために有効な量で投与される、項目 1 5 8～1 5 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 1 6 3)

前記ラパマイシンまたはラパログは、前記キメラカスパーゼポリペプチドを発現する前記改変された細胞のうちの 7 0 % 未満を殺滅するために有効な量で投与される、項目 1 5 8～1 5 9 に記載の方法。

(項目 1 6 4)

前記第 1 のリガンドは、前記第 2 のキメラポリペプチドを発現する前記改変された細胞のうちの 9 0 % 未満を殺滅するために有効な量で投与される、項目 1 5 8～1 5 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 1 6 5)

前記第 1 のリガンドは、前記第 2 のキメラポリペプチドを発現する前記改変された細胞のうちの少なくとも 9 0 % を殺滅するために有効な量で投与される、項目 1 5 8～1 5 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 1 6 6)

前記第 1 のリガンドは、前記第 2 のキメラポリペプチドを発現する前記改変された細胞のうちの少なくとも 9 5 % を殺滅するために有効な量で投与される、項目 1 5 8～1 5 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 1 6 7)

10

20

30

40

50

1 より多くの用量の前記第 1 のリガンドは、前記被験体に投与される、項目 1 5 8 ～ 1 6 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 1 6 8)

1 より多くの用量のラパマイシンまたは前記ラパログは、投与される、項目 1 5 8 ～ 1 6 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 1 6 9)

前記第 2 の多量体化領域は、F K B P 1 2 領域または F K B P 1 2 バリエーション領域であり、前記アポトーシス促進ポリペプチド領域を含む前記第 2 のキメラポリペプチド上の該 F K B P 1 2 領域または F K B P 1 2 バリエーション領域に結合するリガンドを、該第 2 のキメラポリペプチドを発現する前記改変された細胞のうちの少なくとも 9 0 % を殺滅するために有効な量で投与することをさらに包含する、項目 1 5 8 ～ 1 6 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

(項目 1 7 0)

リガンドを、改変された細胞を使用する細胞治療を受けたことがあるヒト被験体に投与するための方法であって、該方法は、該リガンドを該ヒト被験体に投与することを包含し、ここで該改変された細胞は、項目 1 ～ 6 5 または 1 3 9 ～ 1 5 2 のいずれか 1 項に記載の改変された細胞を含み、ここで該リガンドは、F K B P 1 2 領域または F K B P 1 2 バリエーション領域に結合する、方法。

(項目 1 7 1)

被験体において移植された改変された細胞の生存をコントロールするための方法であって、該方法は、

20

a) 項目 1 ～ 6 5 または 1 3 9 ～ 1 5 2 のいずれか 1 項に記載の改変された細胞を該被験体に移植すること；および

b) (a) の後に、該被験体に、前記アポトーシス促進ポリペプチド領域を含む前記第 2 のキメラポリペプチド上の前記 F K B P 1 2 領域または F K B P 1 2 バリエーション領域に結合するリガンドを、該第 2 のキメラポリペプチドを発現する該改変された細胞のうちの少なくとも 9 0 % を殺滅するために有効な量で投与すること、を包含する、方法。

(項目 1 7 2)

1 より多くの用量の前記リガンド、ラパマイシン、または前記ラパログは、投与される、項目 1 7 1 に記載の方法。

30

(項目 1 7 3)

トランスフェクトまたは形質導入された改変された細胞を前記被験体から除去することを要する該被験体における状態の有無を同定すること；ならびに

該被験体において同定された該状態の有無に基づいて、ラパマイシンもしくはラパログ、または前記 F K B P 1 2 領域もしくは F K B P 1 2 バリエーション領域に結合するリガンドを投与するか、該被験体へのその後の投与量を維持するか、あるいはその後の投与量を調整すること

をさらに包含する、

項目 1 5 8 ～ 1 7 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

(項目 1 7 4)

トランスフェクトまたは形質導入された治療用細胞を前記被験体から除去することを要する該被験体における状態の有無を同定すること；ならびに

該被験体において同定された該状態の有無に基づいて、前記 F K B P 1 2 領域もしくは F K B P 1 2 バリエーション領域に結合するリガンド、またはラパマイシンもしくはラパログが、該被験体に投与されるべきかどうか、あるいは該被験体にその後投与される該リガンドの投与量が調整されるかを決定すること、

をさらに包含する、項目 1 5 8 ～ 1 7 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 1 7 5)

トランスフェクトまたは形質導入された改変された細胞を前記被験体から除去すること

50

を要する該被験体における状態の有無を含む情報を受け取ること；および

該被験体において同定された該状態の有無に基づいて、ラパマイシンもしくはラパログ、または前記FKBP12領域もしくはFKBP12バリエーション領域に結合するリガンドを投与するか、該被験体へのその後の投与量を維持するか、あるいはその後の投与量を調整すること、

をさらに包含する、項目158～174のいずれか1項に記載の方法。

(項目176)

トランスフェクトまたは形質導入された改変された細胞を前記被験体から除去することを要する該被験体における状態の有無を同定すること；および

該被験体において同定された該状態の有無またはステージを、該被験体において同定された該状態の有無またはステージに基づいて、ラパマイシン、ラパログまたは前記FKBP12領域もしくはFKBP12バリエーション領域に結合するリガンドを投与するか、該被験体に投与されるその後の投与量を維持するか、あるいはその後の投与量を調整する意思決定者に伝達すること、

をさらに包含する、項目158～174のいずれか1項に記載の方法。

(項目177)

トランスフェクトまたは形質導入された改変された細胞を前記被験体から除去することを要する該被験体における状態の有無を同定すること；ならびに

該被験体において同定された該状態の有無またはステージに基づいて、ラパマイシン、ラパログ、または前記FKBP12領域もしくはFKBP12バリエーション領域に結合するリガンドを投与するか、該被験体に投与されるその後の投与量を維持するか、あるいはその後の投与量を調整する指示を伝達すること、

をさらに包含する、項目158～174のいずれか1項に記載の方法。

(項目178)

同種反応性の改変された細胞は、前記被験体に存在し、同種反応性の改変された細胞の数は、ラパマイシン、前記ラパログ、または前記リガンドの投与後に少なくとも90%減少する、項目158～174のいずれか1項に記載の方法。

(項目179)

少なくとも 1×10^6 個の形質導入またはトランスフェクトされた改変された細胞が、前記被験体に投与される、項目158～178のいずれか1項に記載の方法。

(項目180)

少なくとも 1×10^7 個の形質導入またはトランスフェクトされた改変された細胞が、前記被験体に投与される、項目158～178のいずれか1項に記載の方法。

(項目181)

少なくとも 1×10^8 個の形質導入またはトランスフェクトされた改変された細胞が、前記被験体に投与される、項目158～178のいずれか1項に記載の方法。

(項目182)

前記被験体における移植片対宿主病の有無またはステージを同定すること、および

該被験体において同定された移植片対宿主病の有無またはステージに基づいて、ラパマイシン、ラパログ、または前記FKBP12領域もしくはFKBP12バリエーション領域に結合するリガンドを投与するか、該被験体へのその後の投与量を維持するか、またはその後の投与量を調整すること、

をさらに包含する、項目158～178のいずれか1項に記載の方法。

(項目183)

改変された細胞を使用する細胞治療を受けたことがあるヒト被験体にリガンドを投与するための方法であって、該方法は、該リガンドを該ヒト被験体に投与することを包含し、ここで該改変された細胞は、項目1～65または139～152のいずれか1項に記載の改変された細胞を含み、ここで該リガンドは、FKBP12領域またはFKBP12バリエーション領域に結合する、方法。

(項目184)

10

20

30

40

50

ラパマイシンまたはラパログを、改変された細胞を使用する細胞治療を受けたことがあるヒト被験体に投与するための方法であって、該方法は、ラパマイシンまたはラパログを該ヒト被験体に投与することを包含し、ここで該改変された細胞は、項目1～65または139～152のいずれか1項に記載の改変された細胞を含み、ここで該ラパマイシンまたはラパログは、FRB領域またはFRBバリエーション領域に結合する、方法。

(項目185)

改変された細胞は、FKBP12領域またはFKBP12バリエーション領域を含むキメラポリペプチドを含み、該FKBP12領域またはFKBP12バリエーション領域に結合する前記リガンドは、AP1903、AP20187、およびAP1510からなる群より選択される、項目184に記載の方法。

10

(項目186)

標的細胞によって発現される標的抗原の上昇した発現と関連する疾患または状態を有する被験体を処置するための方法であって、該方法は、(a)該被験体に、有効量の項目1～65または139～152のいずれか1項に記載の改変された細胞を投与することであって、ここで該改変された細胞は、該標的抗原に結合するキメラ抗原レセプターまたはT細胞レセプターをコードするポリヌクレオチドを含む投与すること；ならびに(b) a)の後に、有効量のリガンド、ラパマイシン、またはラパログを投与すること、を包含する方法。

(項目187)

前記標的抗原は、腫瘍抗原である、項目186に記載の方法。

20

(項目188)

前記被験体はがんを有する、項目158～187のいずれか1項に記載の方法。

(項目189)

前記改変された細胞は、腫瘍床に送達される、項目158～187のいずれか1項に記載の方法。

(項目190)

前記がんは、前記被験体の血液または骨髄に存在する、項目189に記載の方法。

(項目191)

前記被験体は、血液または骨髄の疾患を有する、項目158～190のいずれか1項に記載の方法。

30

(項目192)

前記被験体は、鎌状赤血球貧血または異染色性白質ジストロフィーと診断されている、項目158～190のいずれか1項に記載の方法。

(項目193)

前記被験体は、原発性免疫不全状態、血球貪食性リンパ組織球症(HLH)または他の血球貪食状態、遺伝性骨髄不全状態、ヘモグロビン異常症、代謝状態、および破骨細胞状態からなる群より選択される状態と診断されている、項目158～190のいずれか1項に記載の方法。

(項目194)

前記被験体は、重症複合免疫不全症(SCID)、複合免疫不全症(CID)、先天性T細胞欠損／欠損症、分類不能型免疫不全症(CVID)、慢性肉芽腫症、IPEX(免疫不全、多腺性内分泌障害、腸症、X連鎖)またはIPEX様、ウィスコット・オールドリッチ症候群、CD40リガンド欠損症、白血球接着不全、DOCA8欠損症、IL-10欠損症／IL-10レセプター欠損症、GATA2欠損症、X連鎖リンパ増殖性疾患(XLP)、軟骨毛髪形成不全、シュバツハマン・ダイヤモンド症候群、ダイヤモンド・ブラックファン貧血、先天性角化異常症、ファンコーニ貧血、先天性好中球減少症、鎌状赤血球症、サラセミア、ムコ多糖症、スフィンゴリビドーシス、および大理石骨病からなる群より選択される疾患または状態と診断されている、項目158～190のいずれか1項に記載の方法。

40

(項目195)

50

項目 1～65 または 139～152 のいずれか 1 項に記載の改変された細胞が被験体へと移植されている、該被験体において移植された改変された細胞の生存をコントロールするための方法であって、該方法は、

該改変された細胞を該被験体から除去することを要する該被験体における状態の有無を同定すること；ならびに

該被験体において同定された該状態の有無に基づいて、ラパマイシン、もしくはラパログ、または前記 FKBP12 領域もしくは FKBP12 バリエント領域に結合するリガンドを投与するか、該被験へのその後の投与量を維持するか、あるいはその後の投与量を調整すること、

を包含する、方法。

10

【0034】

図面は、本技術の実施形態を図示するものであって、限定するものではない。図示を明確にするためおよび容易にするために、図面は、一定の割合で拡大縮小して作成されておらず、場合によっては、特定の実施形態の理解を容易にするために、様々な態様が、誇張または拡大されて示されていることがある。

【図面の簡単な説明】

【0035】

【図1A】図1Aは、本明細書で論じられるとおりの種々の iCasp9 発現ベクターを図示する。

【図1B】図1Bは、図1Aに示される発現ベクターによって生成される全長および短縮型のカスパーゼ9タンパク質の代表的ウェスタンブロットを図示する。

20

【図2】図2は、アポトーシスを引き起こすための自殺遺伝子生成物およびCIDの相互作用の模式図である。

【図3】図3は、アポトーシスの二段構造の制御を示す模式図である。左の部分は、FRBI 改変CARへの誘導性カスパーゼポリペプチドのラパログ媒介性動員を示す。右の部分は、リミズシド (AP1903) 媒介性誘導性カスパーゼポリペプチドを示す。

【図4】図4は、FRBL 改変CD19-MC-CARおよび誘導性カスパーゼ9をコードするベクターのプラスミドマップである。pSFG-iCasp9-2A-CD19-Q-CD28stm-MCz-FRBL2。

【図5】図5は、FRBL 改変Her2-MC-CARおよび誘導性カスパーゼ9ポリペプチドをコードするベクターのプラスミドマップである。pSFG-iCasp9-2A-aHer2-Q-CD28stm-mMCz-FRBL2。

30

【図6】図6Aおよび6Bは、アポトーシスの二段構造の活性化のアッセイの結果を提供する。図6Aは、ラパマイシンでの誘導性カスパーゼ9ポリペプチド (iC9) の動員を示し、より段階的なアポトーシス漸増 (apoptosis titration) をもたらす。図6Bは、リミズシド (AP1903) を使用する完全なアポトーシスを示す。

【図7】図7は、pBP0545ベクター、pBP0545. pSFG. iCasp9. 2A. Her2scFv. Q. CD8stm. MC-ゼータ. のプラスミドマップである。

【発明を実施するための形態】

40

【0036】

(詳細な説明)

外部環境からの情報を細胞の内部へと移すための機構として、制御されるタンパク質-タンパク質相互作用は、大部分の (全てではないものの) シグナル伝達経路をコントロールするように進化した。シグナル伝達は、酵素プロセス (例えば、アミノ酸側鎖リン酸化、アセチル化、または固有の特異性を欠くタンパク質分解性切断) によって左右される。さらに、多くのタンパク質または因子は、十分な基質/生成物関係の自発的な生成を排除してシグナル伝達を活性化もしくは伝播する細胞濃度でまたは細胞下位置で、存在する。活性化されたシグナル伝達の重要な構成成分は、適切な上流シグナルを介して経路を効率的に伝達する (または弱める) シグナル伝達「ノード」または空間的シグナル伝達センタ

50

一へのこれら構成成分の動員である。

【0037】

個々のタンパク質-タンパク質相互作用および従って、個々のシグナル伝達タンパク質を人工的に単離および操作するためのツールとして、化学的に誘導される二量体化（CID）技術を開発して、標的タンパク質に対するホモタイプまたはヘテロタイプの相互作用を課して、天然の生物学的制御を再現した。その最も単純な形態では、単一のタンパク質を、1またはこれより多くの構造的に同一なリガンド結合ドメインを含むように改変する。次いで、これは、コグネイトホモ二量体リガンドの存在下で、それぞれ、ホモ二量体化またはオリゴマー化の基本となる（Spencer DMら（93） Science 262, 1019-24）。この概念のわずかにより複雑なバージョンは、1またはこれより多くの別個のリガンド結合ドメインを2個の異なるタンパク質に配置して、小分子、両方の別個のドメインに同時に結合するヘテロ二量体リガンドを使用してこれらシグナル伝達分子のヘテロ二量体化を可能にすることを包含する（Ho SNら（96） Nature 382, 822-6）。この薬物媒介性二量体化は、それらの誘導性のまたは自発的なアセンブリおよび制御を可能にするために「十分なりガンド結合ドメインタグ化構成成分の非常に高い局所濃度を生じる。

10

【0038】

本明細書中で使用されるとき、請求項および／または明細書において用語「含む（comprising）」とともに使用されるとき、単語「a」または「an」の使用は、「1つの」を意味し得るが、「1つ以上の」、「少なくとも1つの」および「1つもしくは1つより多くの」の意味とも一致する。なおもさらに、用語「有する」、「含む（including）」、「含む（containing）」および「含む（comprising）」は、相互交換可能であり、当業者は、これらの用語がオープンエンドな（open ended）用語であると認識している。

20

【0039】

本明細書中で使用される用語「同種異系」は、抗原的に異なるHLA遺伝子座またはMHC遺伝子座のことを指す。

【0040】

したがって、同じ種から移植される細胞または組織は、抗原的に異なり得る。同系マウスは、1つ以上の遺伝子座が異なり得（コンジェニック）、同種異系マウスは、同じバックグラウンドを有し得る。

30

【0041】

用語「抗原」は、本明細書で使用される場合、免疫応答を引き起こす分子として定義される。この免疫応答は、抗体産生、または特異的な免疫学的に能力のある細胞の活性化のいずれか、または両方に関連し得る。

【0042】

「抗原認識部分」は、抗原に結合する任意のポリペプチドまたはそのフラグメント、例えば、天然に由来するかまたは合成の抗体フラグメント可変ドメインなどであり得る。抗原認識部分の例としては、抗体に由来するポリペプチド、例えば、一本鎖可変フラグメント（scFv）、Fab、Fab'、F(ab')₂およびFvフラグメント；T細胞レセプターに由来するポリペプチド、例えば、TCR可変ドメインなど；ならびに細胞外と同種タンパク質に結合する任意のリガンドまたはレセプターフラグメントが挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0043】

本明細書中で使用される用語「がん」は、そのユニークな特質である正常なコントロールの喪失が、制御されない成長、分化の欠如、局所的な組織浸潤および転移をもたらす、細胞の過剰増殖として定義される。例としては、メラノーマ、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、肺癌、肝細胞癌、白血病、網膜芽細胞腫、星状細胞腫、神経膠芽腫、骨肉がん、舌がん、神経芽細胞腫、頭部がん、頸部がん、乳がん、膵がん、前立腺がん、腎がん、骨がん、精巣がん、卵巣がん、中皮腫、子宮頸がん、消化器がん、リンパ腫、脳がん、結腸

50

がん、肉腫または膀胱がんが挙げられるが、これらに限定されない。

【0044】

ドナー：用語「ドナー」は、患者レシピエントではない哺乳動物（例えば、ヒト）を指す。上記ドナーは、例えば、上記レシピエントとHLA同一性を有し得るか、または上記レシピエントと部分的またはより大きなHLA不一致を有し得る。

【0045】

ハプロタイプ一致：用語「ハプロタイプ一致」は、細胞を参照して使用される場合、本明細書での細胞タイプおよび／または細胞系統は、ハプロタイプを共有する細胞または1つの染色体上に密接に連鎖した遺伝子のセットにおいて実質的に同じ対立遺伝子を有する細胞を指す。ハプロタイプ一致ドナーは、上記レシピエントと完全なHLA同一性は有さず、部分的HLA不一致が存在する。

10

【0046】

血液疾患：本明細書中で使用される用語「血液疾患」、「血液疾患」および／または「血液の疾患」は、血液およびその成分（血液細胞、ヘモグロビン、血液タンパク質を含むが、これらに限定されない）の産生、凝固のメカニズム、血液の産生、血液タンパク質の産生などおよびそれらの組み合わせに影響する状態のことを指す。血液疾患の非限定的な例としては、貧血、白血病、リンパ腫、血液学的新生物、アルブミン血症（albuminemia）、血友病などが挙げられる。

【0047】

骨髄疾患：本明細書中で使用される用語「骨髄疾患」は、血液細胞および血小板の産生の減少をもたらす状態のことを指す。いくつかの骨髄疾患では、正常な骨髄の構造が、感染症（例えば、結核）または悪性疾患によって取って代わられ得、その後、血液細胞および血小板の産生の減少に至り得る。骨髄疾患の非限定的な例としては、白血病、細菌感染症（例えば、結核）、放射線宿酔または放射線中毒、汎血球減少症（apnocytopenia）、貧血、多発性骨髄腫などが挙げられる。

20

【0048】

T細胞および活性化T細胞（これがCD3+細胞を意味するものを包含する）：T細胞（Tリンパ球とも称される）は、リンパ球と称される白血球の一群に属する。リンパ球は、一般に、細胞性免疫に関わる。「T細胞」における「T」とは、胸腺に由来する細胞またはその成熟が胸腺に影響される細胞のことを指す。T細胞は、T細胞レセプターとして知られる細胞表面タンパク質の存在によって、他のリンパ球のタイプ（例えば、B細胞およびナチュラルキラー（NK）細胞）と区別され得る。本明細書中で使用される用語「活性化T細胞」は、クラスII主要組織適合性（MHC）マーカーにおいて提示された抗原決定基の認識によって免疫応答（例えば、活性化T細胞のクローン性増殖）をもたらすように刺激されたT細胞のことを指す。T細胞は、抗原決定基、サイトカインおよび／またはリンフォカインならびに分化クラスター細胞表面タンパク質（例えば、CD3、CD4、CD8などおよびそれらの組み合わせ）の存在によって活性化される。差次的なタンパク質のクラスターを発現する細胞は、しばしば、T細胞表面上のそのタンパク質の発現について「陽性」とであると言われる（例えば、CD3またはCD4の発現について陽性の細胞は、CD3⁺またはCD4⁺と称される）。CD3およびCD4タンパク質は、T細胞におけるシグナル伝達に直接的および／または間接的に関わり得る細胞表面レセプターまたはコレセプターである。

30

40

【0049】

末梢血：本明細書中で使用される用語「末梢血」は、血液の循環プールから得られるかまたは調製され、リンパ系、脾臓、肝臓もしくは骨髄内に隔絶されない、血液の細胞成分（例えば、赤血球、白血球および血小板）のことを指す。

【0050】

臍帯血：臍帯血は、末梢血、およびリンパ系、脾臓、肝臓または骨髄内に隔絶された血液とは異なる。交換可能に使用され得る用語「臍帯血（umbilical blood）」、「臍帯血（umbilical blood）」または「臍帯血（cord bl

50

ood)」は、胎盤および出産後のつながったままの臍帯に残存する血液のことを指す。臍帯血は、造血細胞をはじめとした幹細胞を含むことが多い。

【0051】

「細胞質CD40」または「CD40細胞外ドメインを欠いているCD40」とは、CD40細胞外ドメインを欠いているCD40ポリペプチドを意味する。いくつかの例では、この用語はまた、CD40細胞外ドメインおよびCD40膜貫通ドメインのうちの一部または全ての両方を欠いているCD40ポリペプチドを指す。

【0052】

例えば、細胞の場合におけるような「得られるかまたは調製される」は、細胞または細胞培養物が、その供給源から単離されること、精製されることまたは部分的に精製されることを意味し、ここで、その供給源は、例えば、臍帯血、骨髄または末梢血であり得る。これらの用語は、元の供給源または細胞培養物が培養され、細胞が複製される場合、および子孫細胞がその元の供給源に由来する場合にも適用され得る。

【0053】

あるパーセントの細胞が殺傷される場合におけるような「殺滅する(kill)」または「殺滅する(killing)」は、アポトーシスを計測するための公知の任意の方法を使用して、および例えば、本明細書で論じられるアッセイ(例えば、本明細書で論じられるSEAPアッセイまたはT細胞アッセイなど)を使用して計測されるとき、アポトーシスによる細胞の死を意味する。この用語はまた、細胞除去を指し得る。

【0054】

同種枯渇：用語「同種枯渇」とは、本明細書で使用される場合、同種反応性T細胞の選択的枯渇を指す。用語「同種反応性T細胞」とは、本明細書で使用される場合、外来細胞(例えば、移植された同種移植片におけるものなど)への曝露に対する反応において、免疫応答を生じるように活性化されたT細胞を指す。選択的枯渇は、一般に、免疫磁力を使用する除去、免疫毒素、フローソーティング、アポトーシスの誘導、光枯渇技術などまたはこれらの組み合わせのために、種々の細胞表面で発現されるマーカーまたはタンパク質(例えば、ときおり、分化クラスタータンパク質(CDタンパク質)、CD19など)を標的化することに関与する。本方法において、上記細胞は、同種枯渇の前または後に、キメラタンパク質コードベクターで形質導入またはトランスフェクトされ得る。また、上記細胞は、同種枯渇工程なしで、キメラタンパク質コードベクターで形質導入またはトランスフェクトされ得、非同種枯渇細胞は、患者に投与され得る。付加された「安全スイッチ」が原因で、例えば、非同種枯渇(または部分的にのみ同種枯渇された)T細胞を投与することは可能である。なぜなら有害事象、例えば、移植片対宿主病などは、上記多量体リガンドの投与の際に緩和され得るからである。

【0055】

移植片対宿主病：用語「移植片対宿主病」または「GVHD」とは、同種骨髄移植としばしば関連し、そしてときおり、免疫不全患者への非照射血液の輸血と関連する合併症を指す。移植片対宿主病はときおり、移植された骨髄中の機能的免疫細胞が、レシピエントを「外来」として認識し、免疫応答を上昇させる場合に起こり得る。GVHDは、急性形態および慢性形態へと分けられ得る。急性GVHD(aGVHD)はしばしば、移植または輸血後の最初の100日以内に観察され、肝臓、皮膚、粘膜、免疫系(例えば、造血系、骨髄、胸腺など)、肺および消化管に影響を及ぼし得る。慢性GVHD(cGVHD)はしばしば、移植または輸血後100日またはそれより後に始まり、急性GVHDと同じ器官を攻撃し得るが、結合組織および外分泌腺にも影響を及ぼし得る。皮膚の急性GVHDは、びまん性斑丘疹状皮疹を、ときおり、レース模様で生じ得る。

【0056】

ドナーT細胞：ここで使用される用語「ドナーT細胞」は、同種異系の幹細胞移植の後に抗ウイルス免疫および/または抗腫瘍免疫をもたらすためにレシピエントにしばしば投与されるT細胞のことを指す。ドナーT細胞は、骨髄移植片拒絶反応を阻害するためおよび同種異系生着(allograftment)の成功を増加させるために利用され

10

20

30

40

50

ることが多いが、しかしながら、同じドナーT細胞は、宿主抗原に対する同種異系攻撃反応（alloaggressive response）を引き起こし得、それはその後、移植片対宿主病（GvHD）をもたらし得る。ある特定の活性化ドナーT細胞は、他の活性化T細胞よりも高いまたは低いGvHD反応を引き起こし得る。ドナーT細胞は、レシピエントの腫瘍細胞に対しても反応性であり得、有益な移植片対腫瘍効果を引き起こす。

【0057】

間葉系ストローマ細胞：本明細書中で使用される用語「間葉系ストローマ細胞」または「骨髄由来間葉系ストローマ細胞」は、エキソビボ、インビトロおよびインビボにおいて脂肪細胞、骨芽細胞および軟骨芽細胞に分化し得、標準的な培養条件においてプラスチック培養皿に接着する単核骨髄細胞の一部としてさらに定義され得る、多分化能幹細胞のことを指し、造血系マーカーが陰性であり、CD73、CD90およびCD105が陽性である。

10

【0058】

胚性幹細胞：本明細書中で使用される用語「胚性幹細胞」は、50～150個の細胞の初期胚である、胚盤胞の内部細胞塊に由来する、多能性幹細胞のことを指す。胚性幹細胞は、それ自体を無限に再生する能力、ならびに3つの一次胚葉である外胚葉、内胚葉および中胚葉のすべての誘導体に変化する能力を特徴とする。多能性細胞は、すべての細胞型を生み出せるが、多分化能細胞（例えば、成体幹細胞）は、限られた数の細胞型しか生み出せないという点で、多能性（pluripotent）は、多分化能（multipotent）と区別される。

20

【0059】

誘導性多能性幹細胞：本明細書中で使用される用語「誘導性多能性幹細胞」または「人工多能性幹細胞」は、胚性幹細胞などの、すべての細胞型ではないが多くの細胞型に分化できる細胞を作製するように、遺伝的操作（例えば、後に多能性を活性化する遺伝子の発現）、生物学的操作（例えば、ウイルスまたはレトロウイルスによる処理）および／または化学的操作（例えば、小分子、ペプチドなど）によって「再プログラムされた」または誘導された、成体の細胞または分化細胞のことを指す。誘導性多能性幹細胞は、それらが、中間に分化したまたは最終分化した状況（例えば、皮膚細胞、骨細胞、線維芽細胞など）を達成し、次いで、脱分化するように誘導され、それにより、多分化能細胞または多能性細胞を作製する能力の一部または全部を回復するという点で胚性幹細胞と区別される。

30

【0060】

CD34⁺細胞：本明細書中で使用される用語「CD34⁺細胞」は、その細胞表面上にCD34タンパク質を発現している細胞のことを指す。本明細書中で使用される「CD34」は、細胞間接着因子としてしばしば働き、リンパ節にT細胞が入ることに関与し、「分化クラスター」遺伝子ファミリーのメンバーである、細胞表面糖タンパク質（例えば、シアロムチンタンパク質）のことを指す。CD34は、骨髄、細胞外マトリックスに、またはストローマ細胞に直接、幹細胞が付着することも媒介し得る。CD34⁺細胞は、臍帯および骨髄において造血細胞として、間葉系幹細胞のサブセット、内皮前駆体細胞、リンパ管（胸膜のリンパ管を除く）ではなく血管の内皮細胞、マスト細胞、皮膚の真皮の間質におよび付属器周辺における樹状細胞の部分集団（XIIa因子が陰性である）、ならびにある特定の軟部組織の腫瘍（例えば、胞状軟部肉腫、プレB急性リンパ芽球性白血病（Pre-B-ALL）、急性骨髄性白血病（AML）、AML-M7、隆起性皮膚線維肉腫、消化管間質腫瘍、巨細胞線維芽腫、顆粒球性肉腫、カポジ肉腫、脂肪肉腫、悪性線維性組織球腫、悪性末梢神経鞘腫瘍、髄膜（meningeal）血管周囲細胞腫、髄膜腫、神経線維腫、神経鞘腫および甲状腺乳頭癌）における細胞に見られることが多い。

40

【0061】

遺伝子発現ベクター：本文書全体を通じて交換可能に使用され得る、本明細書中で使用される用語「遺伝子発現ベクター」、「核酸発現ベクター」または「発現ベクター」は、

50

宿主細胞内で複製され得、単数または複数の遺伝子を宿主細胞に導入するために利用され得る、核酸分子（例えば、プラスミド、ファージ、自律複製配列（A R S）、人工染色体、酵母人工染色体（例えば、Y A C））のことを広く指す。発現ベクター上に導入された遺伝子は、内在性遺伝子（例えば、宿主細胞または宿主生物に通常見られる遺伝子）または異種遺伝子（例えば、ゲノムに通常見られない遺伝子または宿主細胞もしくは宿主生物の染色体外核酸上の遺伝子）であり得る。発現ベクターによって細胞に導入される遺伝子は、天然の遺伝子、または改変されたもしくは操作された遺伝子であり得る。遺伝子発現ベクターは、発現ベクター上に保有された単数または複数の遺伝子の効率的な転写を促進し得るかまたは増強し得る、エンハンサー配列、プロモーター領域および／またはターミネーター配列として時折、機能し得る、5'および3'非翻訳制御配列を含むようにも操作され得る。遺伝子発現ベクターは時折、特定の細胞型、細胞位置または組織タイプにおける複製および／または発現の機能性（例えば、転写および翻訳）について操作される。発現ベクターは時折、宿主細胞またはレシピエント細胞においてベクターを維持するための選択マーカーを含む。

10

【0062】

発生的に制御されるプロモーター：本明細書中で使用される用語「発生的に制御されるプロモーター」は、発生のプログラムまたは経路によってコントロールされるか、開始されるか、または影響されるある特定の条件下で発現される遺伝子を転写するRNAポリメラーゼに対する最初の結合部位として作用するプロモーターのことを指す。発生的に制御されるプロモーターは、発生のプログラムまたは経路の一部である遺伝子の転写に影響し得る転写のアクチベーターまたはリプレッサーに結合するためのさらなる調節領域をプロモーター領域にまたはプロモーター領域付近に有することが多い。発生的に制御されるプロモーターは、時折、遺伝子産物が細胞の発生分化に影響する遺伝子の転写に関与する。

20

【0063】

発生的に分化した細胞：本明細書中で使用される用語「発生的に分化した細胞」は、発生的に制御される特定の遺伝子の発現を伴うことが多く、特定の機能を果たすために、その細胞がそれほど特殊化されていない形態からより特殊化された形態に発展するプロセスを経た細胞のことを指す。発生的に分化した細胞の非限定的な例は、肝臓細胞、肺細胞、皮膚細胞、神経細胞、血液細胞などである。発生分化の変化は、通常、遺伝子発現の変化（例えば、遺伝子発現のパターンの変化）、遺伝子の再編成（例えば、サイレンシングされるかまたは発現される遺伝子をそれぞれ隠すかまたは曝すリモデリングまたはクロマチン）を含み、時々、DNA配列の変化（例えば、免疫多様性の分化）を含む。発生中の細胞分化は、遺伝子制御ネットワークの結果として理解され得る。制御遺伝子およびそのシス制御のモジュールは、インプット（例えば、発生の経路またはプログラムの上流で発現されるタンパク質）を受け取り、そのネットワークの別の箇所でアウトプットをもたらす、遺伝子制御ネットワークにおける分岐点（node）である（例えば、発現された遺伝子産物は、その発生の経路またはプログラムの下流の他の遺伝子に対して作用する）。

30

【0064】

本明細書中で使用される用語「細胞」、「細胞株」および「細胞培養物」は、交換可能に使用され得る。これらの用語のすべてには、任意およびすべてのその後の世代のそれらの子孫も含まれる。故意または偶然の変異に起因して、すべての子孫が同一でない可能性があることが理解される。

40

【0065】

本明細書で使用される場合、用語「ラパログ」または「ラパマイシンアナログ」とは、天然の抗生物質ラパマイシンのアナログを意味する。本実施形態におけるある種のラパログは、血清中での安定性、野生型FRB（および従って、親タンパク質mTOR）に対する不十分な親和性（mTORへのラパマイシンの結合によって通常引き起こされる免疫抑制を回避する）、および変異体FRBドメインに対する比較的高い親和性などの特性を有する。商業目的で、ある種の実施形態において、上記ラパログは、有用なメモリおよび生成特性を有する。ラパログの例としては、S-o, p-ジメトキシフェニル（DMOP）

50

ーラパマイシン：EC₅₀ (wt FRB (K2095 T2098 W2101) 約1000nM)、EC₅₀ (FRB-KLW 約5nM) Luengo JI (95) Chem & Biol 2:471-81; Luengo JI (94) J. Org Chem 59:6512-6513; 米国特許第6187757号; R-イソプロポキシラパマイシン：EC₅₀ (wt FRB (K2095 T2098 W2101) 約300nM)、EC₅₀ (FRB-PLF 約8.5nM); Liberles S (97) PNAS 94:7825-30; およびS-ブタンスルホンアミドラプ (S-Butanesulfonamidrap) (AP23050): EC₅₀ (wt FRB (K2095 T2098 W2101) 約2.7nM), EC₅₀ (FRB-KTF 約>200nM) Bayle (06) Chem & Bio. 13:99-107が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0066】

用語「FRB」とは、FKBP12-ラパマイシン結合 (FRB) ドメイン (mTOR内にコードされる残基2015~2114) およびそのアナログを指す。ある種の実施形態において、FRBバリエーションが提供される。FRBバリエーションの特性は、安定性 (いくつかのバリエーションは、他のものより不安定である) および種々のラパログに結合する能力である。ラパマイシンに結合体化した結晶構造に基づいて、最も分析された3個の重要なラパマイシン相互作用残基が存在する (K2095、T2098、およびW2101)。全3個の変異は、ラパマイシンまたはいくつかのラパログの存在下で安定化され得る不安定なタンパク質をもたらす。この特徴は、いくつかの適用において、シグナル：ノイズ比

20

Chem & Bio 13:99-107; Stankunasら (07) Chembiochem 8:1162-1169; および Liberles S (97) PNAS 94:7825-30) において論じられる。本実施形態のFRB領域の例としては、KLW (L2098を有する); KTF (F2101を有する); およびKLF (L2098、F2101) が挙げられるが、これらに限定されない。

【0067】

各リガンドは、2個またはこれより多くの部分 (例えば、定義された部分、別個の部分) を含み得、およびときおり、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、またはこれより多くの部分を含む。上記第1のリガンドおよび第2のリガンドは各々独立して、2個の部分 (すなわち、二量体) からなり得るか、3個の部分 (すなわち、三量体) からなり得るか、または4個の部分 (すなわち、四量体) からなり得る。上記第1のリガンドはときおり、第1の部分および第2の部分を含み、上記第2のリガンドはときおり、第3の部分および第4の部分を含む。上記第1の部分および上記第2の部分はしばしば、異なり (すなわち、異種 (例えば、ヘテロ二量体))、上記第1の部分および上記第3の部分はときおり異なり、そしてときおり同じであり、上記第3の部分および上記第4の部分はしばしば同じである (すなわち、同種 (homogeneous)) (例えば、ホモ二量体))。異なる部分はときおり、異なる機能を有する (例えば、上記第1の多量体化領域に結合する、上記第2の多量体化領域に結合する、上記第1の多量体化領域に有意に結合しない、上記第2の多量体化領域に有意に結合しない (例えば、上記第1の部分は、上記第1の多量体化領域に結合するが、上記第2の多量体化領域に有意に結合しない))、そしてときおり、異なる化学構造を有する。異なる部分はときおり、異なる化学構造を有するが、同じ多量体化領域に結合し得る (例えば、上記第2の部分および上記第3の部分は、上記第2の多量体化領域に結合し得るが、異なる構造を有し得る)。上記第1の部分はときおり、上記第1の多量体化領域に結合し、ときおり上記第2の多量体化領域に有意に結合しない。各部分はときおり、「単量体」 (例えば、上記第1の部分、第2の部分、第3の部分および第4の部分、それぞれを追跡する (track) 第1の単量体、第2の単量体、第3の単量体および第4の単量体) といわれる。各部分はときおり、「側面」といわれる。リガンドの側面はときおり、互いに隣接し得、ときおり、リガンド上の反対側の位置に位置し得る。

30

40

50

【0068】

「結合できる」とは、多量体化領域またはリガンド結合領域に結合する多量体リガンドまたはヘテロ二量体リガンドの例におけるように、上記リガンドが上記リガンド結合領域に結合し、例えば、上記リガンドの単数または複数の部分は、上記多量体化領域に結合すること、およびこの結合は、アッセイ方法（生物学的アッセイ、化学的アッセイ、または物理的検出手段（例えば、x線結晶学など）が挙げられるが、これらに限定されない）によって検出され得ることが意味される。さらに、リガンドが「有意に結合しない」と考えられる場合は、上記リガンド結合領域へのリガンドの結合のわずかな検出があり得るが、この結合量または結合の安定性は、有意に検出可能ではないこと、および本実施形態の細胞において起こる場合、上記改変された細胞を活性化しないかまたはアポトーシスを引き起こさないことを意味する。ある種の例では、上記リガンドが上記リガンドの投与の際に「有意に結合」しない場合、アポトーシスを受ける細胞の量は、10%、5%、4%、3%、2%、または1%未満である。

10

【0069】

本明細書で使用される場合、用語「iカスパーゼ9」分子、ポリペプチド、またはタンパク質は、誘導性カスパーゼ9として定義される。用語「iカスパーゼ9」は、iカスパーゼ9核酸、iカスパーゼ9ポリペプチドおよび／またはiカスパーゼ9発現ベクターを包含する。この用語はまた、天然のiカスパーゼ9ヌクレオチドもしくはアミノ酸配列、またはCARDドメインを欠いている短縮型配列のいずれかを包含する。

【0070】

20

本明細書で使用される場合、用語「iカスパーゼ1分子」、「iカスパーゼ3分子」、または「iカスパーゼ8分子」は、それぞれ、誘導性カスパーゼ1、3、または8として定義される。用語iカスパーゼ1、iカスパーゼ3、またはiカスパーゼ8は、それぞれ、iカスパーゼ1、3、もしくは8核酸、iカスパーゼ1、3、もしくは8ポリペプチドおよび／またはiカスパーゼ1、3、もしくは8発現ベクターを包含する。この用語はまた、それぞれ、天然のカスパーゼiカスパーゼ1、-3、もしくは-8ヌクレオチド配列またはアミノ酸配列、またはCARDドメインを欠いている短縮型配列のいずれかを包含する。本明細書で提供される実験詳細の状況において「野生型」カスパーゼ9は、CARDドメインを欠いているカスパーゼ9分子を意味する。

【0071】

30

改変されたカスパーゼ9ポリペプチドは、改変されたカスパーゼ9ポリペプチドを含むキメラポリペプチドにおいて、基底活性またはIC₅₀に影響を及ぼす少なくとも1個のアミノ酸置換を含む。基底活性およびIC₅₀を試験するための方法は、本明細書で論じられる。非改変カスパーゼ9ポリペプチドは、このタイプのアミノ酸置換を含まない。改変されたおよび非改変カスパーゼ9ポリペプチドの両方は、例えば、CARDドメインを除去するために、切断され得る。

【0072】

「機能保存的バリエーション」は、タンパク質または酵素の全体的な立体構造および機能を変化させずに所与のアミノ酸残基が変更されたタンパク質または酵素であり、それには、あるアミノ酸を、極性または非極性の性質、サイズ、形状および電荷を含む類似の特性を有するアミノ酸で置き換えたものが含まれるが、これらに限定されない。一般に公知の遺伝的にコードされないアミノ酸の多くに対する保存的アミノ酸置換は、当該分野で周知である。他のコードされないアミノ酸に対する保存的置換は、遺伝的にコードされるアミノ酸の特性と比べたときの物理的特性に基づいて決定され得る。

40

【0073】

保存アミノ酸と示されるアミノ酸以外のアミノ酸は、タンパク質または酵素において異なり得、機能が類似した任意の2つのタンパク質の間のタンパク質配列またはアミノ酸配列の類似性のパーセントは、変動し得、アラインメントスキームに従って決定されるとき、例えば、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、または少なくとも95%であり得る。本明細書中で言及されるとき、「配列類似性」は、ヌクレオチド配列

50

またはタンパク質配列が関係する程度を意味する。2つの配列間の類似性の程度は、配列同一性および／または保存のパーセントに基づき得る。本明細書中の「配列同一性」は、2つのヌクレオチド配列またはアミノ酸配列が不変である程度を意味する。「配列アライメント」は、類似性の程度を評価する目的のために最大の同一性（およびアミノ酸配列の場合、保存）レベルを達成するように2つ以上の配列を並べるプロセスを意味する。配列をアライメントするためおよび類似性／同一性を評価するための数多くの方法（例えば、類似性がMEGALIGNアルゴリズムに基づくCluster法ならびにBLASTN、BLASTPおよびFASTAなど）が、当該分野で公知である。これらのプログラムのうちのいずれかを使用するとき、好ましい設定は、最も高い配列類似性をもたらすものである。

10

【0074】

本明細書で言及されるアミノ酸残基番号は、非短縮型および非改変カスパーゼ9ポリペプチド（例えば、配列番号9のもの）におけるアミノ酸位置を反映する。配列番号9は、短縮型カスパーゼ9ポリペプチドのアミノ酸配列を提供し、これは、CARDドメインを含まない。従って、配列番号9は、全長カスパーゼ9アミノ酸配列を参照して、アミノ酸残基番号135において始まり、アミノ酸残基番号416で終わる。当業者は、配列をカスパーゼ9ポリペプチドの他の配列と整列させて、望ましい場合には、アミノ酸残基番号を、例えば、本明細書で論じられる配列アライメント法を使用して関連させ得る。

【0075】

20

本明細書中で使用されるとき、用語「cDNA」は、鋳型としてメッセンジャーRNA（mRNA）を使用して調製されたDNAのことを指すと意図されている。ゲノムDNA、またはゲノムRNA鋳型、プロセシングされていないRNA鋳型もしくは部分的にプロセシングされたRNA鋳型から重合されたDNAに対立するものとしてcDNAを使用することの利点は、cDNAが、主に、対応するタンパク質のコード配列を含む点である。完全または部分的なゲノム配列が使用されるときがあり、例えば、最適な発現のために非コード領域を必要とする場合、またはイントロンなどの非コード領域がアンチセンスストラテジーにおいて標的化される場合が存在する。

【0076】

本明細書中で使用されるとき、用語「発現構築物」または「導入遺伝子」は、遺伝子産物をコードする核酸を含む任意のタイプの遺伝的構築物として定義され、ここで、核酸コード配列の一部または全部が転写されることが可能であり、該構築物は、ベクターに挿入され得る。転写産物は、タンパク質に翻訳されるが、必ずしも翻訳されるわけではない。ある特定の実施形態において、発現は、遺伝子の転写とmRNAから遺伝子産物への翻訳の両方を含む。他の実施形態において、発現は、目的の遺伝子をコードする核酸の転写だけを含む。用語「治療的な構築物」は、発現構築物または導入遺伝子のことを指すためにも使用され得る。発現構築物または導入遺伝子は、例えば、過剰増殖性疾患または過剰増殖性障害（例えば、がん）を処置する治療として、使用され得、ゆえに、発現構築物または導入遺伝子は、治療的な構築物または予防的な構築物である。

30

【0077】

40

本明細書中で使用されるとき、用語「発現ベクター」は、転写されることが可能な遺伝子産物の少なくとも一部をコードする核酸配列を含むベクターのことを指す。場合によっては、RNA分子は、その後、タンパク質、ポリペプチドまたはペプチドに翻訳される。他の場合、例えば、アンチセンス分子またはリボザイムの生成では、これらの配列は、翻訳されない。発現ベクターは、種々の調節配列を含み得、それらの調節配列は、特定の宿主生物において、作動可能に連結されたコード配列を転写するためおよびおそらく翻訳するために必要な核酸配列のことを指す。ベクターおよび発現ベクターは、転写および翻訳を支配する調節配列に加えて、同様に他の機能を果たす核酸配列を含み得、それらは、下で論じられる。

【0078】

50

本明細書中で使用されるとき、用語「エキソビボ」は、身体の「外側」のことを指す。用語「エキソビボ」および「インビトロ」は、本明細書中で交換可能に使用され得る。

【0079】

本明細書で使用される場合、用語「機能的に等価な」とは、カスパーゼー9または短縮型カスパーゼー9に関する場合、例えば、カスパーゼー9核酸フラグメント、バリエーション、またはアナログを指し、カスパーゼー9ポリペプチド、またはアポトーシス応答を刺激するカスパーゼー9ポリペプチドをコードする核酸を指す。「機能的に等価な」とは、例えば、CARDドメインを欠くが、アポトーシス細胞応答を誘導できるカスパーゼー9ポリペプチドを指す。用語「機能的に等価な」が、他の核酸またはポリペプチド（例えば、CD19、5'LTR、多量体リガンド結合領域、またはCD3など）に適用される場合、それは、本明細書中の方法の参照ポリペプチドと同じまたは類似の活性を有するフラグメント、バリエーションなどを指す。

10

【0080】

本明細書中で使用されるとき、用語「遺伝子」は、機能的なタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドをコードする単位として定義される。理解されるように、この機能的な用語には、ゲノム配列、cDNA配列、ならびにタンパク質、ポリペプチド、ドメイン、ペプチド、融合タンパク質および変異体を発現するかまたは発現するように適合された、より小さい操作された遺伝子セグメントが含まれる。

【0081】

用語「過剰増殖性疾患」は、細胞の過剰増殖に起因する疾患として定義される。例示的な過剰増殖性疾患としては、がんまたは自己免疫疾患が挙げられるが、これらに限定されない。他の過剰増殖性疾患としては、血管閉塞、再狭窄、アテローム性動脈硬化症または炎症性腸疾患が挙げられ得る。

20

【0082】

用語「免疫原性組成物」または「免疫原」は、免疫応答を引き起こすことができる物質のことを指す。免疫原の例としては、例えば、抗原、自己免疫疾患の誘導において役割を果たす自己抗原、およびがん細胞上に発現された腫瘍関連抗原が挙げられる。

【0083】

本明細書中で使用される用語「免疫無防備状態」は、免疫系が衰えているかまたは弱くなっている被験体として定義される。免疫無防備状態の状態は、免疫系の欠損もしくは機能不全または感染および／もしくは疾患への感受性を高める他の要因に起因し得る。そのような分類は、評価に対して概念的基礎を与えるが、免疫無防備状態の個体は、一方の群または他方の群に完全に当てはまらないことが多い。身体の防御機構における2つ以上の欠損が、影響され得る。例えば、HIVによって引き起こされる特定のTリンパ球欠損を有する個体は、抗ウイルス治療のために使用される薬物によって引き起こされる好中球減少症も有し得るか、または皮膚および粘膜の完全性が破られたために免疫無防備状態であり得る。免疫無防備状態の状況は、留置中心ライン(indwelling central lines)もしくは静脈内薬物乱用に起因する他のタイプの機能障害に起因し得るか；または続発性悪性疾患、栄養失調によって引き起こされ得るか、または他の感染病原体(例えば、結核)もしくは性行為感染症、例えば、梅毒もしくは肝炎に感染している

30

40

【0084】

本明細書中で使用されるとき、用語「薬学的または薬理学的に許容され得る」は、動物またはヒトに投与されたとき、有害(adverse)反応、アレルギー反応または他の有害(untoward)反応をもたらしえない分子実体および組成物のことを指す。

【0085】

本明細書中で使用されるとき、「薬学的に許容され得るキャリア」は、任意およびすべての溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤ならびに吸収遅延剤などを含む。薬学的に活性な物質に対するそのような媒質および作用物質の使用は、当該分野で周知である。任意の従来の媒質または作用物質が、本明細書中に提示されるベクター

50

または細胞と不適合性である場合を除いては、治療的な組成物におけるその使用が企図される。補助的な活性成分もまた、その組成物に組み込まれ得る。

【0086】

本明細書中で使用されるとき、用語「ポリヌクレオチド」は、ヌクレオチドの鎖として定義される。さらに、核酸は、ヌクレオチドのポリマーである。したがって、本明細書中で使用される核酸およびポリヌクレオチドは、相互交換可能である。核酸は、モノマーの「ヌクレオチド」に加水分解され得るポリヌクレオチドである。モノマーのヌクレオチドは、ヌクレオシドに加水分解され得る。本明細書中で使用されるとき、ポリヌクレオチドには、当該分野において利用可能な任意の手段によって得られるすべての核酸配列が含まれるが、これらに限定されず、そのような手段としては、組換え手段、すなわち、通常のクローニング技術およびPCRTMなどを使用する組換えライブラリーまたは細胞ゲノムからの核酸配列のクローニング、ならびに合成手段が挙げられるが、これらに限定されない。さらに、ポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチドの変異を含み、当該分野で周知の方法によるヌクレオチドまたはヌクレオシドの変異を含むが、これらに限定されない。核酸は、1つ以上のポリヌクレオチドを含み得る。

10

【0087】

本明細書中で使用されるとき、用語「ポリペプチド」は、通常、規定の配列を有する、アミノ酸残基の鎖として定義される。本明細書中で使用されるとき、ポリペプチドという用語は、「ペプチド」および「タンパク質」という用語と相互交換可能である。

【0088】

本明細書中で使用されるとき、用語「プロモーター」は、遺伝子の特異的な転写を開始するために必要とされる、細胞の合成機構または導入された合成機構によって認識されるDNA配列として定義される。

20

【0089】

用語「トランスフェクション」および「形質導入」は、相互交換可能であり、外来性DNA配列が真核生物宿主細胞に導入されるプロセスのことを指す。トランスフェクション（または形質導入）は、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、遺伝子銃送達、レトロウイルス感染、リポフェクション、スーパーフェクション（superfection）などを含むいくつかの手段のうちのいずれか1つによって達成され得る。

【0090】

本明細書中で使用されるとき、用語「同系」とは、同一の遺伝子型、または組織移植が可能であるのに十分密接な関係がある遺伝子型、または免疫学的に適合性の遺伝子型を有する細胞、組織または動物のことを指す。例えば、同じ近交系の一卵性双生児または動物。同系および同遺伝子系は、交換可能に使用され得る。

30

【0091】

用語「患者」または「被験体」は、相互交換可能であり、本明細書中で使用されるとき、生物または動物；哺乳動物（例えば、ヒト、非ヒト霊長類（例えば、サル）、マウス、ブタ、ウシ、ヤギ、ウサギ、ラット、モルモット、ハムスター、ウマ、サル、ヒツジまたは他の非ヒト哺乳動物を含む）；非哺乳動物（例えば、非哺乳動物の脊椎動物、例えば、鳥類（例えば、ニワトリまたはアヒル）または魚類、および非哺乳動物の無脊椎動物を含む）を含むが、これらに限定されない。

40

【0092】

「T細胞活性化分子」とは、キメラ抗原レセプターを発現するT細胞へと組み込まれる場合、T細胞の活性化を高めるポリペプチドを意味する。例としては、ITAMを含みシグナル1を与える分子（例えば、CD3ζポリペプチドなど）、およびFcレセプターガンマ（例えば、Fcイプシロンレセプターガンマ（FcεR1γ）サブユニットなど）（Haynes, N. M. ら J. Immunol. 166:182-7 (2001)）。J. Immunology）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0093】

本明細書中で使用されるとき、用語「転写支配下」または「作動可能に連結された」は

50

、プロモーターが、RNAポリメラーゼの開始および遺伝子の発現をコントロールする核酸に対して正しい位置および方向で存在することとして定義される。

【0094】

本明細書中で使用されるとき、用語「処置」、「処置する (treat)」、「処置される」または「処置する (treating)」とは、予防法および／または治療のことを指す。

【0095】

本明細書中で使用されるとき、用語「ワクチン」とは、動物に投与することができる形態で存在する、本明細書中に提示される組成物を含む製剤のことを指す。代表的には、ワクチンは、組成物が懸濁されるかまたは溶解される従来の食塩水または緩衝水溶液媒質を含む。この形態において、組成物は、ある状態を予防するか、回復させるか、または別途処置するために都合よく使用され得る。ワクチンは、被験体に導入されたとき、抗体、サイトカインおよび／または他の細胞応答の産生を含むがこれらに限定されない免疫応答を引き起こすことができる。

【0096】

いくつかの実施形態において、核酸は、ウイルスベクター内に含まれている。ある特定の実施形態において、ウイルスベクターは、レトロウイルスベクターである。ある特定の実施形態において、ウイルスベクターは、アデノウイルスベクターまたはレンチウイルスベクターである。いくつかの実施形態において、抗原提示細胞は、エキソビボにおいてウイルスベクターと接触され、いくつかの実施形態において、抗原提示細胞は、インビボにおいてウイルスベクターと接触されることが理解される。

【0097】

造血幹細胞および細胞治療

造血幹細胞としては、造血前駆体細胞、成熟した血球タイプへと分化し得る未成熟の多分化能細胞が挙げられる。これら幹細胞および前駆体細胞は、骨髄および臍帯血から、およびいくつかの場合では、末梢血から単離され得る。他の幹細胞および前駆体細胞としては、例えば、間葉系ストローマ細胞、胚性幹細胞、および人工多能性幹細胞が挙げられる。

【0098】

骨髄由来間葉系ストローマ細胞 (MSC) は、標準的培養条件においてプラスチック培養ディッシュに接着し、造血系統マーカーに関して陰性であり、CD73、CD90およびCD105に関して陽性であり、そして脂肪細胞、骨芽細胞、および軟骨芽細胞へとインビトロで分化し得る単核骨髄細胞の画分として定義されている。1つの生理学的役割が、造血の支持であると推定される一方で、MSCが活発な成長の領域 (例えば、瘢痕性組織および新生物組織) に組み込まれ得、おそらく増殖し得る、およびそれらの天然の微小環境にホーミングし得、病的細胞の機能を置き換え得るといういくつかの報告もまた、確立された。それらの分化潜在能およびホーミング能力は、それらの天然の形態での再生医療への適用 (regenerative application) のための、または特定の微小環境 (例えば、病的な骨髄または転移性の沈着物) への活性な生物学的因子の送達のためのそれらの遺伝子改変を通じてかのいずれかで、MSCを細胞治療のための魅力的なビヒクルにする。さらに、MSCは、強力な本質的免疫抑制活性を有し、今日までに、移植片対宿主病および自己免疫障害の実験的処置においてそれらの最も頻繁な適用が見出されている (Pittenger, M. F. ら (1999). Science 284: 143-147; Dominici, M. ら (2006). Cytotherapy 8: 315-317; Prockop, D. J. (1997). Science 276: 71-74; Lee, R. H. ら (2006). Proc Natl Acad Sci U S A 103: 17438-17443; Staudy, M. ら, (2002). Cancer Res 62: 3603-3608; Staudy, M. ら (2004). J Natl Cancer Inst 96: 1593-1603; Horwitz, E. M. ら

(1999). Nat Med 5: 309-313; Chamberlain, G. ら, (2007). Stem Cells 25: 2739-2749; Phinney, D. G., および Prockop, D. J. (2007). Stem Cells 25: 2896-2902; Horwitz, E. M. ら (2002). Proc Natl Acad Sci U S A 99: 8932-8937; Hall, B. ら, (2007). Int J Hematol 86: 8-16; Nauta, A. J., および Fibbe, W. E. (2007). Blood 110: 3499-3506; Le Blanc, K. ら (2008). Lancet 371: 1579-1586; Tyndall, A., および Uccelli, A. (2009). Bone Marrow Transplant). 10

【0099】

MSCは、最小の報告された副作用を伴って、数百名の患者において注入された。しかし、追跡調査は限定的であって、長期間の副作用は未知であり、MSCのインビボ分化（例えば、軟骨もしくは骨への）を誘導する、またはMSCの機能性を高めるためにMSCを遺伝子改変することは今後の取り組みと関連するという帰結については、ほとんど未知である。いくつかの動物モデルは、安全性の懸念を引き起こした。例えば、培養物中の自発的な骨肉腫形成は、マウス由来MSCにおいて観察された。さらに、心筋梗塞のマウスモデルおよびラットモデルにおける、MSCの局所注射後の異所性骨化および石灰化病変が論じられており、それらの催不整脈潜在性はまた、新生仔ラットの心室の筋細胞との共培養実験において明らかであった。さらに、両側性のびまん性肺骨形成は、イヌにおける骨髓移植後に観察されており、それはおそらく移植されたストローマ構成成分に起因している(Horwitz, E. M. ら, (2007). Biol Blood Marrow Transplant 13: 53-57; Tolar, J. ら (2007). Stem Cells 25: 371-379; Yoon, Y. -S. ら, (2004). Circulation 109: 3154-3157; Breitbach, M. ら (2007). Blood 110: 1362-1369; Chang, M. G. ら (2006). Circulation 113: 1832-1841; Sale, G. E., および Storb, R. (1983). Exp Hematol 11: 961-966)。 20 30

【0100】

細胞治療の別の例では、キメラ抗原レセプターをコードする核酸で形質導入されたT細胞は、がんを処置するために患者に投与されてきた(Zhong, X. -S., (2010) Molecular Therapy 18: 413-420)。キメラ抗原レセプター(CAR)は、MHC抗原提示を必要とすることなしに、T細胞に抗原特異性を伝達するようにデザインされた人工レセプターである。それらは、抗原特異的構成成分、膜貫通構成成分、およびT細胞を活性化しかつ特異的免疫を提供するために選択される細胞内構成成分を含む。キメラ抗原レセプター発現T細胞は、種々の治療（がん治療を含む）において使用され得る。共刺激ポリペプチドは、標的抗原に対するCAR発現T細胞の活性化、増殖または持続性(persistence)を高めるために、従って、養子免疫療法の 40 効能を増大するために使用され得る。

【0101】

例えば、ヒト化モノクローナル抗体トラスツズマブ（ハーセプチン）に基づくキメラ抗原レセプターを発現するT細胞は、がん患者を処置するために使用されてきた。有害事象は考えられるが、少なくとも1つの報告された症例では、この治療は、患者にとって致命的結果になった(Morgan, R. A. ら, (2010) Molecular Therapy 18: 843-851)。細胞を、本明細書で示されるとおりのキメラカスパーゼ9ベースの安全スイッチで形質導入すると、有害事象が進行することを停止させ得る安全スイッチが提供される。従って、いくつかの実施形態において、その改変されたT細胞がまた誘導性カスパーゼ9ポリペプチドを発現する、核酸、細胞、および方 50

法が提供される。例えば、キメラ抗原レセプター改変T細胞の数を減少する必要性がある場合、誘導性リガンドが上記患者に投与され得、それによって、その改変されたT細胞のアポトーシスを誘導し得る。

【0102】

キメラ抗原レセプター (CAR) 分子の効力を高めるためにCAR分子にさらなるシグナル伝達ドメインを組み込んだとき、CARを発現するように操作されたT細胞による免疫療法の抗腫瘍の効能は、着実に改善した。腫瘍細胞は、完全なT細胞活性化にとって必要な必須の共刺激分子を欠くことが多いので、CD3 ζ 細胞内シグナル伝達分子だけを含む第1世代CARを形質導入されたT細胞は、養子移入後にインビボにおいて不良な存続および増殖 (expansion) を明らかに示した (Till BG, Jensen MC, Wang Jら: CD20-specific adoptive immunotherapy for lymphoma using a chimeric antigen receptor with both CD28 and 4-1BB domains: pilot clinical trial results. *Blood* 119:3940-50, 2012; Pule MA, Savoldo B, Myers GDら: Virus-specific T cells engineered to coexpress tumor-specific receptors: persistence and antitumor activity in individuals with neuroblastoma. *Nat Med* 14:1264-70, 2008; Kershaw MH, Westwood JA, Parker L Lら: A phase I study on adoptive immunotherapy using gene-modified T cells for ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 12:6106-15, 2006)。第2世代CAR T細胞は、それらの細胞の増殖 (proliferation) および生存を改善するようにデザインされた。CD28または4-1BB由来の細胞内の共刺激ドメインを組み込んでいる第2世代CAR T細胞 (Carpenito C, Milone MC, Hassan Rら: Control of large, established tumor xenografts with genetically retargeted human T cells containing CD28 and CD137 domains. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:3360-5, 2009; Song DG, Ye Q, Poussin Mら: CD27 costimulation augments the survival and antitumor activity of redirected human T cells in vivo. *Blood* 119:696-706, 2012) は、養子移入後に、改善された生存およびインビボでの増殖を示し、これらの共刺激分子を含む、抗CD19 CARによって改変されたT細胞を用いたより最近の臨床試験では、CD19⁺白血病の処置に対して顕著な効能が示された (Kalos M, Levine BL, Porter DLら: T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. *Sci Transl Med* 3:95ra73, 2011; Porter DL, Levine BL, Kalos Mら: Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med* 365:725-33, 2011; Brentjens RJ, Davila ML, Riviere Iら: CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med* 5:177ra38, 2013)。

10

20

30

40

50

【0103】

他の研究者らは、「第3世代」CAR T細胞と呼ばれる、腫瘍壊死因子（TNF）ファミリータンパク質（例えば、OX40および4-1BB）由来のさらなるシグナル伝達分子を探索した（Finney HM, Akbar AN, Lawson AD: Activation of resting human primary T cells with chimeric receptors: costimulation from CD28, inducible costimulator, CD134, and CD137 in series with signals from the TCR zeta chain. J Immunol 172:104-13, 2004; Guedan S, Chen X, Madar Aら: ICOS-based chimeric antigen receptors program bipolar TH17/TH1 cells. Blood, 2014）が、活性化T細胞のCD3ζ核因子（NFAT）経路と異なるT細胞シグナル伝達を誘導する他の分子が、T細胞の生存および増殖に必要な共刺激を提供する可能性があり、おそらく、従来の共刺激分子によって供給されない、価値のあるさらなる機能をCAR T細胞に与える。いくつかの第2および第3世代CAR T細胞は、高度に活性化されたT細胞によって引き起こされるサイトカインストームおよび腫瘍崩壊症候群に起因する患者の死に関係していた。

10

【0104】

「キメラ抗原レセプター」または「CAR」は、例えば、T細胞を活性化し、特異免疫をもたらすように選択された、膜貫通ポリペプチドおよび細胞内ドメインポリペプチドに連結された、標的抗原を認識するポリペプチド配列（抗原認識ドメイン）を含むキメラポリペプチドのことを意味する。その抗原認識ドメインは、一本鎖可変フラグメント（ScFv）であり得るか、または例えば、他の分子（例えば、T細胞レセプターまたはパターン認識レセプターなど）に由来し得る。細胞内ドメインは、T細胞の活性化を引き起こす少なくとも1つのポリペプチド（例えば、例えば、CD3ゼータであるがこれに限定されない、および、例えば、共刺激分子、例えば、CD28、OX40および4-1BBであるがこれらに限定されない）を含む。用語「キメラ抗原レセプター」とは、抗体に由来するのではなくキメラT細胞レセプターに由来するキメラレセプターのことにも指すことがある。これらのキメラT細胞レセプターは、標的抗原を認識するポリペプチド配列を含み得、ここで、その認識配列は、例えば、T細胞レセプターまたはscFvに由来する認識配列であり得るがこれらに限定されない。細胞内ドメインポリペプチドは、T細胞を活性化するように作用するポリペプチドである。キメラT細胞レセプターは、例えば、Gross, G., and Eshar, Z., FASEB Journal 6:3370-3378 (1992) および Zhang, Y. ら、PLOS Pathogens 6:1-13 (2010) において論じられている。

20

30

【0105】

キメラ抗原レセプター（CAR）の1タイプにおいて、腫瘍特異的モノクローナル抗体の可変重（VH）鎖および軽（VL）鎖は、T細胞複合体に由来するCD3ゼータ鎖（ζ）とインフレームで融合される。そのVHおよびVLは、通常、グリシン-セリンフレキシブルリンカーを使用して互いに接続され、次いで、スペーサー（CH2CH3）によって膜貫通ドメインに結合されることにより、腫瘍抗原と相互作用できるようにscFvが細胞表面から離れて伸長する。形質導入の後、T細胞は、この時点で、その表面上にCARを発現し、腫瘍抗原と接触し、ライゲーションすると、CD3ゼータ鎖を介してシグナル伝達し、細胞傷害および細胞活性化を誘導する。

40

【0106】

研究者らは、CD3ゼータを介したT細胞の活性化が、腫瘍特異的殺滅を誘導するのに十分であるが、T細胞の増殖および生存を誘導するには不十分であることを述べている。ゼータ鎖のみを発現している第1世代CARによって改変されたT細胞を使用した初期の臨床試験は、遺伝子が改変されたT細胞が、インビボにおいて不良な生存および増殖を示すことを示した。

50

【0107】

B7軸を介した共刺激が、完全なT細胞活性化にとって必要であるので、研究者らは、共刺激ポリペプチドCD28シグナル伝達ドメインをCAR構築物に付加した。この領域は、通常、膜貫通領域（CD3ゼータバージョンの代わりに）、ならびにPI3KおよびLckに結合するためのYMN motifsを含む。ゼータだけを有するCARまたはゼータとCD28の両方を有するCARを発現しているT細胞の間のインビボでの比較から、活性化後のIL-2産生の増加に部分的に起因して、CD28がインビボにおいて増殖を促進することが実証された。CD28を含んでいるものは、第2世代CARと呼ばれる。最もよく使用される共刺激分子としては、CD28および4-1BBが挙げられ、これらは、腫瘍認識後に、NF-κBの活性化をもたらすシグナル伝達カスケードを惹起し得、T細胞の増殖と細胞生存の両方を促進する。

10

【0108】

CARのデザインにおいて共刺激ポリペプチド4-1BBまたはOX40を使用することにより、T細胞の生存および効力がさらに改善された。4-1BBは、特に、T細胞の増殖および生存を大幅に増強するとみられる。この第3世代のデザイン（3つのシグナル伝達ドメインを有する）は、PSMA CAR（Zhong XSら、Mol Ther. 2010 Feb; 18(2): 413-20）およびCD19 CARにおいて、最も著しくはCLLの処置のために、使用されている（Milone, M. C. ら（2009）Mol. Ther. 17: 1453-1464; Kalos, M. ら、Sci. Transl. Med. (2011) 3: 95ra73; Porter, D. ら（2011）N. Engl. J. Med. 365: 725-533）。これらの細胞は、インビボにおいて1000倍超増殖して、3人の患者において目覚ましい機能を示し、3人の患者すべてにおいて持続的な緩解をもたらした。

20

【0109】

「由来する」が、ヌクレオチド配列またはアミノ酸配列が、分子の配列に由来し得ることを意味することは、理解される。細胞内ドメインは、T細胞の活性化を引き起こす少なくとも1種のポリペプチド（例えば、CD3ゼータなどが挙げられるが、これらに限定されない）および例えば、共刺激分子（例えば、CD28、OX40および4-1BBが挙げられるが、これらに限定されない）を含む。

【0110】

30

T細胞レセプターは、T細胞の表面に存在する2種の異なるポリペプチドから構成される分子である。それらは、主要組織適合遺伝子複合体分子に結合した抗原を認識する；上記抗原での認識の際に、上記T細胞は活性化される。「認識する」は、例えば、T細胞レセプターまたはそのフラグメント（単数または複数）、例えば、TCRαポリペプチドおよびTCRβと一緒に、上記抗原と接触し、これを標的として同定することができることを意味する。TCRは、αおよびβポリペプチド、または鎖を含み得る。このαポリペプチドおよびβポリペプチドは、2つの細胞外ドメイン、可変ドメインおよび定常ドメインを含む。このαおよびβポリペプチドの可変ドメインは、3つの相補性決定領域（CDR）を有する；CDR3は、エピトープの認識を担う主要なCDRであると考えられる。そのαポリペプチドは、VJ組換えによって生成される、V領域およびJ領域を含み、そのβポリペプチドは、VDJ組換えによって生成される、V領域、D領域、およびJ領域を含む。VJ領域およびVDJ領域の交差は、CDR3領域に相当する。TCRはしばしば、International Immunogenetics (IMGT) TCR命名を使用して命名される（IMGTデータベース、www.IMGT.org; Giudice, V. ら、IMGT/LIGM-DB、免疫グロブリンおよびT細胞レセプターヌクレオチド配列のIMGT（登録商標）包括的データベース、Nucleic Acids Res., 34, D781-D784 (2006). PMID: 16381979; T細胞レセプター Factsbook, LeFranc and LeFranc, Academic Press ISBN 0-12-441352-8）。

40

50

【0111】

キメラT細胞レセプターは、例えば、抗原性ポリペプチド（例えば、Bob-1、PRAME、およびNY-ESO-1）に結合し得る（米国特許出願第14/930,572号（2015年11月2日出願、標題「T Cell Receptors Directed Against Bob1 and Uses Thereof」、および米国仮特許出願第62/130,884号（2015年3月10日出願、標題「T Cell Receptors Directed Against the Preferentially-Expressed Antigen of Melanoma and Uses Thereof」）（これらの各々は、その全体において本明細書に参考として援用される）。 10

【0112】

細胞治療の別の例では、T細胞は、非機能的TGF-βレセプターを発現し、それらをTGF-βに対して耐性にするように改変される。これは、その改変されたT細胞がTGF-βによって引き起こされる細胞毒性を回避することを可能にし、上記細胞が細胞治療において使用されることを可能にする（Bollard, C. J. ら, (2002) Blood 99:3179-3187; Bollard, C. M. ら, (2004) J. Exptl. Med. 200:1623-1633）。しかし、それはまた、T細胞リンパ腫または他の有害作用を生じ得る。なぜなら上記改変されたT細胞は、いまや正常な細胞コントロールの一部を欠いているからである；これら治療用T細胞は、それら自体が悪性になり得る。これら改変されたT細胞を、本明細書で示されるとおりのキメラカスパーゼ9ベースの安全スイッチで形質導入すると、この結果を回避し得る安全スイッチが提供される。 20

【0113】

他の例では、ナチュラルキラー細胞は、膜会合ポリペプチドを発現するように改変される。キメラ抗原レセプターの代わりに、ある種の実施形態において、異種膜結合ポリペプチドは、NKG2Dレセプターである。NKG2Dレセプターは、腫瘍細胞上のストレスタンパク質（例えば、MICA/B）に結合し得、それによってNK細胞を活性化し得る。細胞外結合ドメインはまた、シグナル伝達ドメインに融合され得る（Barber, A. ら, Cancer Res 2007; 67: 5003-8; Barber A ら, Exp Hematol. 2008; 36:1318-28; Zhang T. ら, Cancer Res. 2007; 67:11029-36.）、そしてこれは、翻って、FRB連結（linkered）CARに類似のFRBドメインに連結され得る。さらに、他の細胞表面レセプター（例えば、VEGF-R）は、多くの腫瘍内で、高レベルで見出される、低酸素症誘発性VEGFの存在下で腫瘍依存性クラスター化を高めるために、FRBドメインのドッキング部位として使用され得る。 30

【0114】

異種遺伝子（例えば、改変されたレセプター、またはキメラレセプター）を発現する、細胞治療において使用される細胞は、細胞が異種遺伝子で形質導入される前に、その後に、またはそれと同時にキメラカスパーゼ9ベースの安全スイッチをコードする核酸で形質導入され得る。 40

【0115】

（ハプロタイプ一致幹細胞移植）

幹細胞移植は、造血幹細胞およびそれらの子孫が関わる広く種々の疾患を処置する有効な手段と判明した一方で、組織適合性ドナーの不足は、このアプローチの最も広い適用に対する主な障害であると判明した。血縁のない幹細胞ドナーおよび／または臍帯血バンクの大きな一団の導入は、その問題を緩和する一助となったが、多くの患者は、いずれの供給源とも適合しないままである。マッチしたドナーが見出され得る場合ですら、検索の開始と幹細胞の収集との間に経過した時間は、通常、最も必要な患者のうちの多くを運命付け得る遅れである3ヶ月を超える。従って、HLAハプロタイプ一致の家族ドナーを利用するにあたっては、かなりの重要性が存在している。かかるドナーは、親、同胞（siblin 50

g)、もしくは第2度近親者であり得る。移植拒絶という問題は、幹細胞の適切な馴化および大きな用量の組み合わせによって克服され得る一方で、移植片対宿主病 (GvHD) は、ドナー移植片の広範なT細胞枯渇によって防止され得る。このような手順の即座の結果は、移植後免疫抑制の非存在ですら、成人および小児の両方に関して生着率>90%および重症GvHD率<10%ゆえに満足させるものである。不運なことに、広範なT細胞枯渇およびドナーとレシピエントとの間のHLAミスマッチと結びつけられた移植手順の十分な免疫抑制は、極めて高率の移植後感染性合併症をもたらし、疾患再発の高い発生率に寄与する。

【0116】

ドナーT細胞注入は、同種幹細胞移植後の抗ウイルス免疫および抗腫瘍免疫を付与するための有効な戦略である。しかし、ハプロタイプ一致移植後に患者にT細胞を単純に追加戻し (addback) しても、機能させられない; 同種反応性T細胞の頻度は、例えば、ウイルス特異的Tリンパ球の頻度より数桁高い。同種反応性細胞を最初に枯渇させたドナーT細胞を投与することによって、免疫再形成を促進するための方法が開発されつつある。これを達成するための1つの方法は、ドナーT細胞をレシピエントのEBVで形質転換したBリンパ芽球細胞株 (LCL) で刺激することである。同種反応性T細胞は、CD25発現をアップレギュレートし、CD25 Mab免疫毒素結合体、RFT5-SMPT-dgAによって排除される。この化合物は、化学的に脱グリコシル化されたリシンA鎖 (dgA) へとヘテロ二官能性架橋剤 [N-スクシンイミジルオキシカルボニル- α -メチル-L- (2-ピリジルチオ) トルエン] を介して結合体化したマウスIgG1抗CD25 (IL-2レセプター α 鎖) からなる。

【0117】

LCL刺激後のCD25免疫毒素での処置は、同種反応性細胞のうちの>90%を枯渇させる。フェーズI臨床研究において、CD25免疫毒素を使用して同種反応性リンパ球を枯渇させ、同種枯渇させた後の免疫再形成ドナーT細胞を2用量レベルで、T細胞枯渇ハプロタイプ一致SCTのレシピエントへと注入した。8名の患者を、 10^4 細胞/kg/用量で処置し、8名の患者に、 10^5 細胞/kg/用量を与えた。 10^5 細胞/kg/用量を受ける患者は、 10^4 細胞/kg/用量を受ける患者と比較して、SCT後の3ヶ月、4ヶ月、および5ヶ月で、有意に改善されたT細胞回復を示した ($P<0.05$)。促進されたT細胞回復は、エフェクター記憶 (CD45RA (-)CCR-7 (-)) 集団の拡大の結果として起こった ($P<0.05$)。このことは、防御T細胞応答が長く生存するようであることを示唆する。T細胞レセプターシグナルジョイント除去サークル (T cell receptor signal joint excision circle) (TREC) は、用量レベル2の患者においてT細胞の再構築において検出されなかった。このことは、それらがその注入された同種枯渇した細胞に由来するようであることを示す。4ヶ月でのT細胞のスペクトルタイピング (spectratyping) は、ポリクローナルV β レパートリーを示した。四量体および酵素結合イムノスポット (ELISPOT) アッセイを使用すると、用量レベル2では6名の評価可能な患者のうちの4名において、サイトメガロウイルス (CMV) 特異的およびエプスタインバーウイルス (EBV) 特異的応答が移植後2~4ヶ月程度の早さで観察されたが、このような応答は、用量レベル1の患者において6~12ヶ月まで観察されなかった。有意な急性の移植片対宿主病 (16名のうちの2名) および慢性の移植片対宿主病 (GvHD; 15名のうちの2名) の発生率は、低かった。これらのデータは、同種枯渇したドナーT細胞が、ハプロタイプ一致SCT後にT細胞回復を改善するために安全に使用され得ることを示す。注入される細胞の量を、その後、GvHDの証拠なしに 10^6 細胞/kgへと上昇させた。

【0118】

このアプローチは、抗ウイルス免疫を再構築したが、再発は主要な問題のままであり、6名の患者は、高リスクの白血病再発のために移植し疾患で死亡した。従って、より高いT細胞用量は、抗腫瘍免疫を再構築するために、および待ち望まれた抗腫瘍効果を提供す

るために有用である。なぜなら腫瘍反応性前駆体のその推測される頻度は、ウイルス反応性前駆体の頻度より1～2対数低いからである。しかし、いくらかの患者では、細胞のこれら用量は、同種枯渇の後ですらGvHDを引き起こすために十分である（Hurley CKら, Biol Blood Marrow Transplant 2003; 9:610-615; Dey BRら, Br. J Haematol. 2006; 135:423-437; Aversa Fら, N Engl J Med 1998; 339:1186-1193; Aversa Fら, J Clin. Oncol. 2005; 23:3447-3454; Lang P, Mol. Dis. 2004; 33:281-287; Kolb HJら, Blood 2004; 103:767-776; Gottschalk Sら, Annu. Rev. Med 2005; 56:29-44; Bleakley Mら, Nat. Rev. Cancer 2004; 4:371-380; Andre-Schmutz Iら, Lancet 2002; 360:130-137; Solomon SRら, Blood 2005; 106:1123-1129; Amrolia PJら, Blood 2006; 108:1797-1808; Amrolia PJら, Blood 2003; Ghetie Vら, J Immunol Methods 1991; 142:223-230; Mollidrem JJら, Cancer Res 1999; 59:2675-2681; Rezvani Kら, Clin. Cancer Res. 2005; 11:8799-8807; Rezvani Kら, Blood 2003; 102:2892-2900)。

【0119】

(移植片対宿主病 (GvHD))

移植片対宿主病は、ドナーの免疫担当細胞（例えば、T細胞）をレシピエントへと移植した後にときおり起こる状態である。上記移植した細胞は、そのレシピエントの細胞を外来物質として認識し、それらを攻撃および破壊する。この状態は、T細胞移植の、特に、ハプロタイプ一致幹細胞移植と関連する場合に、危険な効果であり得る。十分なT細胞が、有益な効果（例えば、免疫系の再形成および移植片の抗腫瘍効果など）を提供するために注入されるべきである。しかし、移植され得るT細胞の数は、移植が重症の移植片対宿主病を生じるという懸念によって制限され得る。

【0120】

移植片対宿主病は、以下の表に示されるように病期分類され得る：

【表10】

病期分類

	ステージ0	ステージ1	ステージ2	ステージ3	ステージ4
皮膚	皮疹なし	皮疹<25% BSA	25-50%	>50% 全身性 紅皮症	プラス水疱および落屑
腸 (小児患者に 関して)	<500 mL 下 痢/日	501~1000 mL/日 5cc/kg~10 cc/kg/日	1001~1500 mL/日 10cc/kg~ 15cc/kg/日	>1500 mL/日 >15 cc/kg/日	重症の腹痛 およびイレウス
UGI		重症の悪心/ 嘔吐			
肝臓	ビリルビン s 2mg/dl	2.1-3 mg/dl	3.1-6mg/dl	6.1-15 mg/dl	>15 mg/dl

【0121】

急性GvHDグレード判定は、コンセンサス会議基準によって行われ得る（Przepioraka Dら., 1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading. Bone Marrow Transplant 1995; 15: 825-828）。

【0122】

【表11】

急性GvHDのグレード判定インデックス

	皮膚	肝臓	腸	上部GI
0	なしおよび	なしおよび	なしおよび	なし
I	ステージ1～2 および	なしおよび	なし	なし
II	ステージ3およ び/または	ステージ1およ び/または	ステージ1およ び/または	ステージ1
III	なし～ステージ3 とともに	ステージ2～3 または	ステージ2～4	N/A
IV	ステージ4また は	ステージ4	N/A	N/A

10

20

【0123】

（細胞治療および遺伝子操作された細胞移植の「安全スイッチ」としての誘導性カスパーゼー9）

移植片対宿主病の作用を低減するとは、例えば、患者がより低いレベルのステージに割り当てられ得るように、GvHDの症状における減少、または例えば、移植片対宿主病の症状を少なくとも20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、または99%減少させることを意味する。移植片対宿主病の効果の減少はまた、GvHD反応に関与する活性化T細胞の減少（例えば、マーカータンパク質（例えば、CD19）を発現し、そしてCD3を発現する細胞（例えば、CD3⁺CD19⁺細胞）の少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または99%減少など）の検出によって測定され得る。

30

【0124】

本明細書で提供されるのは、二量体化の化学的誘導物質（CID）を結合するために最適化されるFKBPバリエーションと融合されるヒトアポトーシス促進分子に基づく代替の自殺遺伝子ストラテジーである。バリエーションとしては、例えば、バリン、ロイシン、イソロイシンおよびアラニンからなる群より選択される36位でのアミノ酸置換を有するFKBP領域を含み得る（Clackson Tら, Proc Natl Acad Sci U S A. 1998, 95: 10437-10442）。

AP1903は、健康志願者において安全であると判明している合成分子である（Iulivucci JDら, J Clin Pharmacol. 2001, 41: 870-879）。この小分子の投与は、アポトーシス促進標的分子の架橋および活性化を生じる。ヒトTリンパ球におけるこの誘導性システムの適用を、Fasまたはアポトーシス促進分子としてのFas関連デスドメイン含有タンパク質（FADD）のデスエフェクタードメイン（DED）を使用して探索した。これら誘導性死分子で形質導入されたT細胞の90%までが、CIDの投与後にアポトーシスを受けた（Thomasis DCら, Blood. 2001, 97: 1249-1257; Spencer DMら, Curr Biol. 1996, 6: 839-847; Fan Lら, Hum Gene Ther. 1999, 10: 2273-2285; Berger Cら, Blood. 2004, 103: 1261-1269; Junker Kら, Gene The

40

50

r. 2003, 10:1189-197)。この自殺遺伝子ストラテジーは、細胞治療のために使用される任意の適切な細胞（例えば、造血幹細胞、および他の前駆体細胞（例えば、間葉系ストローマ細胞、胚性幹細胞、および人工多能性幹細胞が挙げられる）が挙げられる）において使用され得る。AP20187およびAP1950（AP1903の合成バージョン）はまた、リガンド誘導物質として使用され得る（Amaral JF (97) PNAS 94:10618-23; Clontech Laboratories-Takara Bio）。

【0125】

従って、この安全スイッチ（カスパーゼ-9によって触媒される）は、トランスフェクトまたは形質導入された治療用細胞の除去を要する細胞治療患者における状態が存在する場合に使用され得る。上記細胞が除去される必要があり得る状態としては、例えば、GVHD、上記細胞が誤った組織または細胞タイプのより成熟した細胞へ不適切に分化すること、および他の毒性が挙げられる。不適切な分化の場合にカスパーゼ-9スイッチを活性化するために、組織特異的プロモーターを使用することは可能である。例えば、前駆体細胞が骨および脂肪細胞へと分化する、および脂肪細胞が望ましくない場合、上記前駆体細胞をトランスフェクトまたは形質導入するために使用されるベクターは、カスパーゼ-9ヌクレオチド配列に作動可能に連結された脂肪細胞特異的プロモーターを有し得る。このように、多量体リガンドの投与の際に、上記細胞が脂肪細胞へと分化するのであれば、その不適切に分化した脂肪細胞のアポトーシスが生じるはずである。

【0126】

上記方法は、例えば、細胞治療によって緩和され得る任意の障害（がん、血液または骨髄におけるがん、他の血液または骨髄由来の疾患（例えば、鎌状赤血球貧血および異染色性白質ジストロフィー（metachromic leukodystrophy））、および幹細胞移植によって緩和され得る任意の障害（例えば、鎌状赤血球貧血または異染色性白質ジストロフィー（metachromal leukodystrophy）などの血液または骨髄障害）が挙げられる）のために使用され得る。

【0127】

養子免疫療法の効力は、治療用T細胞を腫瘍細胞によって使用される免疫回避ストラテジーに耐性にすることによって高められ得る。インビトロ研究は、これがドミナントネガティブレセプターまたは免疫調節性サイトカインでの形質導入によって達成され得ることを示した（Bollard CMら, Blood. 2002, 99:3179-3187; Wagner HJら, Cancer Gene Ther. 2004, 11:81-91）。さらに、抗原特異的T細胞レセプターの移入は、T細胞治療をより広い範囲の腫瘍へと適用することを可能にする（Pule Mら, Cytotherapy. 2003, 5:211-226; Schumacher TN, Nat Rev Immunol. 2002, 2:512-519）。操作されたヒトT細胞の自殺システムを、臨床研究における該T細胞のその後の使用を可能にするために開発および試験した。カスパーゼ-9を改変したところ、ヒトTリンパ球において、それらの機能的および表現型特性を損なうことなく、アップレギュレートされた抗アポトーシス分子を有するT細胞ですら、CIDへの感受性を示す一方で安定して発現されることが示された（Straathof, K. C. ら, 2005, Blood 105:4248-54）。

【0128】

遺伝子治療のために使用される遺伝子改変された細胞において、その遺伝子は、その遺伝子を発現するために使用される細胞以外の供給源に由来する異種ポリヌクレオチド配列であり得る。上記遺伝子は、細菌、ウイルス、酵母、寄生生物、植物、またはさらには動物などの原核生物または真核生物供給源に由来する。この異種DNAはまた、1つより多くの供給源に由来する（すなわち、マルチ遺伝子構築物または融合タンパク質）。この異種DNAはまた、1つの供給源に由来する制御配列および異なる供給源に由来する遺伝子を含み得る。または、この異種DNAは、細胞内因性遺伝子の通常の変現を変更させるた

めに使用される制御配列を含み得る。

【0129】

(他のカスパーゼ分子)

最新技術のキメラポリペプチド (polypeptide) によってコードされ得るカスパーゼー9以外のカスパーゼポリペプチドとしては、例えば、カスパーゼー1、カスパーゼー3、およびカスパーゼー8が挙げられる。これらカスパーゼポリペプチドの考察は、例えば、MacCorkle, R. A. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (1998) 95:3655-3660; および Fan, L. ら (1999) Human Gene Therapy 10:2273-2285) に見出され得る。

10

【0130】

(発現構築物の操作)

発現構築物は、多量体リガンド結合領域およびカスパーゼー9ポリペプチド、またはある種の実施形態では、多量体リガンド結合領域およびマーカーポリペプチドに連結されたカスパーゼー9ポリペプチド (全て作用的に連結される) をコードする。一般に、用語「作動可能に連結される」とは、プロモーター配列が第2の配列に機能的に連結される (ここで例えば、上記プロモーター配列は、上記第2の配列に相当するDNAの転写を開始および媒介すること) を示すことを意味する。このカスパーゼー9ポリペプチドは、全長であってもよいし、短縮型であってもよい。ある種の実施形態において、上記マーカーポリペプチドは、上記カスパーゼー9ポリペプチドに連結される。例えば、上記マーカーポリペプチドは、ポリペプチド配列 (例えば、切断可能な2A様配列など) を介して上記カスパーゼー9ポリペプチドに連結され得る。上記マーカーポリペプチドは、例えば、CD19であり得るか、または例えば、異種タンパク質であり得、キメラカスパーゼポリペプチドの活性に影響を及ぼさないように選択され得る。

20

【0131】

いくつかの実施形態において、上記ポリヌクレオチドは、カスパーゼー9ポリペプチドおよび異種タンパク質 (これは、例えば、マーカーポリペプチドであり得、例えば、キメラ抗原レセプターであり得る) をコードし得る。上記異種ポリペプチド、例えば、上記キメラ抗原レセプターは、ポリペプチド配列 (例えば、切断可能な2A様配列など) を介して上記カスパーゼー9ポリペプチドに連結され得る。

30

【0132】

ある種の例では、キメラ抗原レセプターをコードするポリヌクレオチドを含む核酸は、第2のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと同じベクター (例えば、ウイルスベクターまたはプラスミドベクターなど) の中に含まれる。この第2のポリペプチドは、例えば、カスパーゼポリペプチド (本明細書で論じられるとおり) またはマーカーポリペプチドであり得る。これらの例では、上記構築物は、切断可能な2Aポリペプチドによって連結される上記2種のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む核酸に作動可能に連結された1個のプロモーターとともにデザインされ得る。この例では、上記第1のおよび第2のポリペプチドは、翻訳の間に分断され、キメラ抗原レセプターポリペプチド、および上記第2のポリペプチドを生じる。他の例では、上記2種のポリペプチドは、同じベクターから別個に発現され得、ここで上記ポリペプチドのうちの一方をコードするポリヌクレオチドを含む各核酸が、別個のプロモーターに作動可能に連結される。なお他の例では、1個のプロモーターは、上記2個の核酸に作動可能に連結され得、2個の別個のRNA転写物、従って2種のポリペプチドの生成を指向し得る。従って、本明細書で論じられる発現構築物は、少なくとも1個、または少なくとも2個のプロモーターを含み得る。

40

【0133】

2A様配列、または「切断可能な」2A配列は、例えば、多くの異なるウイルス (例えば、Those as a signaが挙げられる) に由来する。これらの配列はときおり、「ペプチドスキッピング配列 (peptide skipping sequence)」としても公知である。このタイプの配列は、分断されることが意図される2個のペプチドの間でシストロン内に

50

配置される場合、リボソームは、ペプチド結合をスキップするようであり、Those assigna配列の場合、Glyアミノ酸とProアミノ酸との間の結合は省かれる。これは、2種のポリペプチド、この場合には、上記カスパーゼ9ポリペプチドおよび上記マーカーポリペプチドを残す。この配列が使用される場合、2A配列の5'側にコードされるペプチドは、カルボキシ末端におけるさらなるアミノ酸（Gly残基が挙げられる）および2A配列における任意の上流で終わり得る。2A配列の3'側にコードされる上記ペプチドは、アミノ末端におけるさらなるアミノ酸（Pro残基が挙げられる）および2A配列における任意の下流で終わり得る。「2A」または「2A様」配列は、ペプチド結合スキッピングを引き起こし得るペプチドの大きなファミリーの一部である。種々の2A配列が特徴付けられており（例えば、F2A、P2A、T2A）、本出願のポリペプチドにおいて使用され得る2A様配列の例である。

10

【0134】

発現構築物は、ベクター（例えば、ウイルスベクターまたはプラスミドベクター）へと挿入され得る。提供される方法のことは、任意の適切な方法を使用して行われ得る；これら方法としては、抗原提示細胞（本明細書で示される）へと核酸を形質導入、形質転換、またはさもなければ提供するための方法が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、短縮型カスパーゼ9ポリペプチドは、DNAリンカーありもしくはなしで、配列番号8、配列番号23、配列番号25、配列番号27のヌクレオチド配列、もしくはこれらの機能的に等価なフラグメントによってコードされるか、あるいは配列番号9、配列番号24、配列番号26、もしくは配列番号28のアミノ酸配列またはこれらの機能的に等価なフラグメントを有する。いくつかの実施形態において、CD19ポリペプチドは、DNAリンカーありもしくはなしで、配列番号14のヌクレオチド配列もしくはその機能的に等価なフラグメントによってコードされるか、または配列番号15のアミノ酸配列もしくはその機能的に等価なフラグメントを有する。カスパーゼ9ポリペプチドの機能的に等価なフラグメントは、配列番号9のポリペプチドと実質的に同じアポトーシスを誘導する能力を有し、配列番号9のポリペプチドの能力のうちの少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、または95%を有する。CD19ポリペプチドの機能的に等価なフラグメントは、標準的検出技術を使用して、配列番号15のポリペプチドと比較される場合、形質導入またはトランスフェクトされた細胞を同定および選択するために使用されるべきマーカーとして作用する、検出されているマーカーポリペプチドのうちの少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、または95%を有して、配列番号15のポリペプチドと実質的に同じ能力を有する。

20

30

【0135】

より詳細には、1個より多くのリガンド結合ドメインまたは多量体化領域は、発現構築物の中で使用され得る。なおさらには、上記発現構築物は、膜標的化配列を含む。適切な発現構築物は、上記のFKBP12多量体化領域のいずれかの側に、共刺激ポリペプチドエレメントを含み得る。

【0136】

ある種の例では、誘導性カスパーゼポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、キメラ抗原レセプターをコードするポリヌクレオチドと同じベクター（例えば、ウイルスベクターまたはプラスミドベクターなど）の中に含まれる。これらの例では、上記構築物は、切断可能な2Aポリペプチドによって連結される2種のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸に作動可能に連結された1個のプロモーターでデザインされ得る。この例では、上記第1のおよび第2のポリペプチドは、発現後に切断され、キメラ抗原レセプターポリペプチドおよび誘導性カスパーゼ9ポリペプチドを生じる。他の例では、上記2種のポリペプチドは、同じベクターから別個に発現され得、ここで上記ポリペプチドのうちの一方をコードするヌクレオチド配列を含む各核酸が、別個のプロモーターに作動可能に連結される。なお他の例では、1個のプロモーターは、2個の核酸に作動可能に連結され得、2個の別個のRNA転写物、従って、2種のポリペプチドの生成を指向し得る。従って、本明細書で論じられる発現構築物は、少なくとも1個、または少なくとも

40

50

2 個のプロモーターを含み得る。

【0137】

なお他の例では、2 種のポリペプチドは、2 個の別個のベクターを使用して、細胞において発現され得る。上記細胞は、上記ベクターで共トランスフェクトまたは共形質転換され得るか、または上記ベクターは、種々の時間で上記細胞へと導入され得る。

【0138】

(リガンド結合領域)

発現構築物のリガンド結合（「二量体化」）ドメインまたは多量体化領域は、天然または非天然のリガンド、例えば、非天然の合成リガンドを使用して誘導を可能にし得る任意の好都合なドメインであり得る。多量体化領域は、構築物の性質およびリガンドの選択に応じて、細胞膜に対して内側または外側であり得る。上に示された細胞質領域と会合されるリガンド結合タンパク質を含むレセプターをはじめとした多種多様のリガンド結合タンパク質が公知である。本明細書中で使用されるとき、用語「リガンド結合ドメイン」は、用語「レセプター」と相互交換可能であり得る。リガンド（例えば、小さい有機リガンド）が公知であるかまたは容易に生成され得るリガンド結合タンパク質が、特に興味深い。これらのリガンド結合ドメインまたはレセプターには、FKBP およびシクロフィリンレセプター、ステロイドレセプター、テトラサイクリンレセプター、上に示された他のレセプターなど、ならびに抗体から得ることができる「非天然の」レセプター、特に、重鎖または軽鎖サブユニット、その変異された配列、確率論的手順、コンビナトリアル合成などによって得られるランダムアミノ酸配列が含まれる。ある特定の実施形態において、リガンド結合領域は、FKBP 12 多量体化領域、シクロフィリンレセプターリガンド結合領域、ステロイドレセプターリガンド結合領域、シクロフィリンレセプターリガンド結合領域およびテトラサイクリンレセプターリガンド結合領域からなる群より選択される。しばしば、リガンド結合領域は、 $F_v F_{v1s}$ 配列を含む。時折、 $F_v \cdot F_{v1s}$ 配列は、さらなる F_v' 配列をさらに含む。例としては、例えば、Kopytek, S. J. ら、Chemistry & Biology 7:313-321 (2000) および Gestwicki, J. E. ら、Combinatorial Chem. & High Throughput Screening 10:667-675 (2007); Clackson T (2006) Chem Biol Drug Des 67:440-2; Clackson, T., in Chemical Biology: From Small Molecules to Systems Biology and Drug Design (Schreiber, S. ら、eds., Wiley, 2007)) において論じられているものが挙げられる。

【0139】

おおむね、リガンド結合ドメインまたはレセプタードメインは、天然のドメインまたはその切断された活性な一部として、少なくとも約 50 アミノ酸、および約 350 アミノ酸未満、通常、200 アミノ酸未満であり得る。結合ドメインは、例えば、低分子（ウイルスベクターでの効率的なトランスフェクションを可能にする < 25 kDa）であり得、モノマーであり得、非免疫原性であり得、二量体化のために形成され得る、合成的に入手可能な細胞透過性の無毒性リガンドを有し得る。

【0140】

レセプタードメインは、発現構築物のデザインおよび適切なリガンドの利用可能性に応じて、細胞内または細胞外であり得る。疎水性リガンドの場合、結合ドメインは、膜のいずれの側であってもよいが、親水性リガンド、特に、タンパク質リガンドの場合、リガンドを結合にとって利用可能な形態で内部移行させるための輸送系が存在しない場合、結合ドメインは、通常、細胞膜に対して外側であり得る。細胞内レセプターの場合、構築物は、レセプタードメイン配列の 5' または 3' においてシグナルペプチドおよび膜貫通ドメインをコードし得るか、またはレセプタードメイン配列の 5' に脂質付着シグナル配列を有し得る。レセプタードメインが、シグナルペプチドと膜貫通ドメインとの間に存在する場合、レセプタードメインは、細胞外であり得る。

【0141】

レセプターをコードする発現構築物の一部は、種々の理由のために変異誘発に供され得る。変異誘発されたタンパク質は、より高い結合親和性を提供し得、天然に存在するレセプターと変異誘発されたレセプターとのリガンドによる区別を可能にし得、レセプターーリガンド対などをデザインする機会を提供し得る。レセプターの変更は、結合部位におけるコンビナトリアル法を使用したランダム変異誘発と知られているアミノ酸の変更を含み得、ここで、結合部位に関連するアミノ酸または立体構造変化に関連する他のアミノ酸に対するコドンが、特定のアミノ酸に対するコドン（複数可）を公知の変化によってまたはランダムに変更し、得られるタンパク質を適切な原核生物宿主において発現し、次いで、得られたタンパク質を結合についてスクリーニングすることによって、変異誘発に供され得る。

10

【0142】

抗体および抗体サブユニット、例えば、重鎖もしくは軽鎖、特にフラグメント、より詳細には、可変領域の全部もしくは一部、または高親和性結合をもたらす重鎖と軽鎖との融合物が、結合ドメインとして使用され得る。企図される抗体には、免疫応答を引き起こさず、一般に末梢（すなわち、CNS／脳領域の外側）では発現されない細胞外ドメインなどの異所的に発現されたヒト生成物であるものが含まれる。そのような例としては、低親和性神経成長因子レセプター（LNGFR）および胚表面タンパク質（すなわち、癌胎児抗原）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0143】

20

なおもさらに、抗体は、生理的に許容され得るハプテン分子、および結合親和性についてスクリーニングされる個別の抗体サブユニットに対して調製され得る。そのサブユニットをコードするcDNAは、単離され、定常領域、可変領域の一部の欠失、可変領域の変異誘発などによって改変されることにより、リガンドに対して適切な親和性を有する結合タンパク質ドメインを得ることができる。このように、ほとんどの生理的に許容され得る任意のハプテン化合物が、リガンドとして使用され得るか、またはリガンドに対するエピトープを提供するために使用され得る。抗体単位の代わりに、結合ドメインが公知であって、結合のための有用なリガンドが存在する、天然のレセプターが使用され得る。

【0144】

（オリゴマー化）

30

形質導入されるシグナルは、通常、キメラタンパク質分子のリガンド媒介性のオリゴマー化によって、すなわち、リガンドが結合した後のオリゴマー化の結果として、生じ得るが、他の結合事象、例えば、アロステリックな活性化が、シグナルを惹起するために使用され得る。キメラタンパク質の構築物は、様々なドメインの順序および個々のドメインの反復の数に関して、変動し得る。

【0145】

レセプターを多量体化する場合、キメラ表面膜タンパク質のリガンド結合ドメイン／レセプタードメインに対するリガンドは、通常、少なくとも2つの結合部位を有し、それらの結合部位の各々がリガンドレセプタードメインに結合することができるという意味において、多量体であり得る。「多量体リガンド結合領域」または「多量体化領域」とは、多量体リガンドに結合するリガンド結合領域のことを意味する。用語「多量体リガンド」には、二量体のリガンドが含まれる。二量体のリガンドは、リガンドレセプタードメインに結合することができる2つの結合部位を有し得る。望ましくは、対象のリガンドは、二量体またはそれより高次のオリゴマー、通常、約四量体以下の、小さい合成有機分子であり得、個々の分子は、代表的には、少なくとも約150Daおよび約5kDa未満、通常、約3kDa未満であり得る。合成リガンドとレセプターとの種々の対が、使用され得る。例えば、天然のレセプターを含む実施形態において、二量体のFK506は、FKBP12レセプターとともに使用され得、二量体化されたシクロスポリンAは、シクロフィリンレセプターとともに使用され得、二量体化されたエストロゲンは、エストロゲンレセプターとともに使用され得、二量体化された糖質コルチコイドは、糖質コルチコイドレセプター

40

50

ーとともに使用され得、二量体化されたテトラサイクリンは、テトラサイクリンレセプターとともに使用され得、二量体化されたビタミンDは、ビタミンDレセプターとともに使用され得るなど。あるいは、それより高次のリガンド、例えば、三量体が、使用され得る。非天然のレセプター、例えば、抗体サブユニット、改変された抗体サブユニット、フレキシブルリンカードメインによって分断された重鎖可変領域および軽鎖可変領域をタンデムで含む一本鎖抗体、または改変されたレセプターならびにその変異された配列などを含む実施形態の場合、多種多様な化合物のうちのいずれかが使用され得る。これらのリガンド単位の有意な特色は、各結合部位が、高親和性でレセプターに結合することができる点、およびそれらのリガンド単位が、化学的に二量体化されることができる点である。また、リガンドが、機能的なレベルで血清に溶解することができ、なおもほとんどの用途のために原形質膜を横断して拡散することができるように、それらのリガンドの疎水性／親水性のバランスをとる方法も利用可能である。

10

【0146】

ある特定の実施形態において、本方法は、条件的にコントロールされるタンパク質またはポリペプチドを生成するために、化学的に誘導される二量体化（CID）の手法を利用する。この手法は、誘導可能であることに加えて、不安定な二量体化剤の分解またはモノマーの競合的阻害剤の投与に起因して、可逆的である。

【0147】

CIDシステムは、合成二価リガンドを使用して、リガンド結合ドメインに融合されたシグナル伝達分子を迅速に架橋する。このシステムは、細胞表面タンパク質（Spencer, D. M. ら、Science, 1993, 262: p. 1019-1024; Spencer D. M. ら、Curr Biol 1996, 6: 839-847; Blau, C. A. ら、Proc Natl Acad. Sci. USA 1997, 94: 3076-3081）またはサイトゾルタンパク質（Luo, Z. ら、Nature 1996, 383: 181-185; MacCorkle, R. A. ら、Proc Natl Acad. Sci. USA 1998, 95: 3655-3660）のオリゴマー化および活性化、転写を調節するDNAエレメントへの転写因子のリクルートメント（Ho, S. N. ら、Nature 1996, 382: 822-826; Rivera, V. M. ら、Nat. Med. 1996, 2: 1028-1032）またはシグナル伝達を刺激する原形質膜へのシグナル伝達分子のリクルートメント（Spencer D. M. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1995, 92: 9805-9809; Holsinger, L. J. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1995, 95: 9810-9814）を引き起こすために使用されている。

20

30

【0148】

CIDシステムは、表面レセプターの凝集が、下流のシグナル伝達カスケードを効率的に活性化するという概念に基づく。最も単純な実施形態において、CIDシステムは、脂質透過性免疫抑制薬FK506の二量体アナログを使用し、その二量体アナログは、その正常な生物活性を失っているが、FK506結合タンパク質であるFKBP12に遺伝的に融合された分子を架橋する能力を獲得している。1つ以上のFKBP12を、カスパーゼ-9に融合することによって、二量体化薬物に依存的であるがリガンドおよび外部ドメインに非依存的な様式でカスパーゼ-9活性を刺激することができる。これにより、時間的なコントロール、モノマー薬物アナログを使用して可逆性、および高い特異性を備えたシステムが提供される。第3世代のAP20187/AP1903 CIDの、それらの結合ドメインであるFKBP12に対する高親和性は、インビボにおいて、内在性のFKBP12による非特異的な副作用を誘導することなく、組換えレセプターの特異的な活性化を可能にする。二量体化薬物に結合する、アミノ酸の置換および欠失を有するFKBP12バリエーション（例えば、FKBP12_{v.36}）もまた使用され得る。FKBP12バリエーションとしては、バリン、ロイシン、イソロイシン、およびアラニンからなる群より選択される36位でアミノ酸置換を有するものが挙げられるが、これらに限定されない。さらに、合成リガンドは、プロテアーゼ分解に対して抵抗性であり、それにより、インビボに

40

50

おけるレセプターの活性化において、送達されるほとんどのタンパク質剤よりも効率的になる。

【0149】

使用されるリガンドは、リガンド結合ドメインの2つ以上に結合することができる。キメラタンパク質は、2つ以上のリガンド結合ドメインを含むとき、2つ以上のリガンドに結合することができる場合がある。そのリガンドは、代表的には、非タンパク質または化学物質である。例示的なリガンドとしては、FK506（例えば、FK1012）が挙げられるが、これに限定されない。

【0150】

他のリガンド結合領域は、例えば、二量体の領域、またはゆらぎ置換によって改変されたリガンド結合領域、例えば、FKBP12（V36）などであり得る：F36がVに置換されたヒト12kDa FK506結合タンパク質、完全に成熟したコード配列（アミノ酸1～107）は、合成二量体化薬物AP1903に対する結合部位を提供する（Jemal, A. ら、CA Cancer J. Clin. 58, 71-96（2008）；Scher, H. I. and Kelly, W. K., Journal of Clinical Oncology 11, 1566-72（1993））。上記タンパク質の2つのタンデムなコピーは、より高次のオリゴマーが、AP1903による架橋の際に誘導されるようにその構築物においても使用され得る。

【0151】

上記多量体化領域（例えば、上記FRB多量体化領域またはFKBP12多量体化領域）は、上記アポトーシス促進ポリペプチドに対してアミノ末端に位置してもよいし、上記アポトーシス促進ポリペプチドに対してカルボキシル末端に位置してもよい。さらなるポリペプチド（例えば、リンカーポリペプチド、ステムポリペプチド、スパーサーポリペプチド、またはいくつかの例では、マーカーポリペプチドなど）は、上記多量体化領域と上記アポトーシス促進ポリペプチドとの間に位置してもよい。

【0152】

「領域」または「ドメイン」は、それが本出願のキメラポリペプチドに関する場合、上記ポリペプチドの機能を維持するポリペプチドまたはそのフラグメントを意味する。すなわち、例えば、FKBP12結合ドメイン、FKBP12ドメイン、FKBP12領域、FKBP12多量体化領域などとは、キメラポリペプチドの二量体化または多量体化を引き起こすかまたはそれを可能にするための、CIDリガンド（例えば、リミズシドまたはラパマイシンなど）に結合するFKBP12ポリペプチドを指す。アポトーシス促進ポリペプチド、例えば、本出願のカスパーゼー9ポリペプチドまたは短縮型カスパーゼー9ポリペプチドの「領域」または「ドメイン」は、上記キメラポリペプチド、またはキメラアポトーシス促進ポリペプチドの一部としてのカスパーゼー9領域の二量体化または多量体化の際に、その二量体化または多量体化したキメラポリペプチドは、カスパーゼカスケードに関与し得、アポトーシスを可能にし得るかまたは引き起こし得ることを意味する。

【0153】

FKBP12バリエントはまた、上記FKBP12多量体化領域またはFRB多量体化領域において使用され得る。FKBP12バリエントの例は、多くの種（例えば、酵母が挙げられる）からのものが挙げられる。一実施形態において、上記FKBP12バリエントは、FKBP12.6（calstabin）である。

【0154】

他のヘテロ二量体は、本出願において企図されている。一実施形態において、カルシニューリンAポリペプチドまたは領域は、FRB多量体化領域の代わりに使用され得る。これら実施形態において、上記第1のリガンドは、例えば、シクロスポリンを含む。

【0155】

F36V'-FKBP：F36V'-FKBPは、F36V-FKBP12のコードゆらぎバージョンである。それは、F36V-FKBPと同一のポリペプチド配列をコードするが、ヌクレオチドレベルでは62%の相同性しか有しない。F36V'-FKBPは

、レトロウイルスベクターにおける組換えを減少させるようにデザインされた (Schellhammer, P. F. ら、J. Urol. 157, 1731-5 (1997))。F36V'-FKBPは、PCRアセンブリ手順によって構築された。その導入遺伝子は、1コピーのF36V-FKBPに直接連結された1コピーのF36V'-FKBP12を含む。

【0156】

いくつかの実施形態において、リガンドは、小分子である。選択されたリガンド結合領域に対する適切なリガンドが、選択され得る。しばしば、リガンドは、二量体であり、時折、リガンドは、二量体のFK506または二量体のFK506様アナログである。ある特定の実施形態において、リガンドは、AP1903 (CAS索引名: 2-ピペリジニカルボン酸、1-[(2S)-1-オキソ-2-(3, 4, 5-トリメトキシフェニル)ブチル]-, 1, 2-エタンジイルビス[イミノ(2-オキソ-2, 1-エタンジイル)オキシ-3, 1-フェニレン[(1R)-3-(3, 4-ジメトキシフェニル)プロピリデン]]エステル、[2S-[1(R*), 2R*[S*[S*[1(R*), 2R*]]]]-(9CI) CAS登録番号: 195514-63-7; 分子式: C78H98N4O20 分子量: 1411.65)である。ある特定の実施形態において、リガンドは、AP20187である。

【0157】

ある特定の実施形態において、リガンドは、AP20187アナログ、例えば、AP1510などである。いくつかの実施形態において、ある特定のアナログは、FKBP12に対して適切であり得、ある特定のアナログは、FKBP12のゆらぎバージョンに対して適切であり得る。ある特定の実施形態において、1つのリガンド結合領域が、キメラタンパク質に含められる。他の実施形態において、2つ以上のリガンド結合領域が、含められる。例えば、リガンド結合領域が、FKBP12である場合、これらの領域の2つが含められる場合、一方は、例えば、ゆらぎバージョンであり得る。

【0158】

企図される他の二量体化システムは、クーマイシン/DNAジャイレースBシステムを含む。クーマイシン誘導性二量体化は、改変されたRafタンパク質を活性化し、MAPキナーゼカスケードを刺激する。Farrar, M. A., ら、(1996)

Nature 383, 178-181を参照のこと。他の実施形態において、GR Crabtreeおよび共同研究者らによって開発されたアブシシン酸(ABA)システム(Liang FSら、Sci Signal. 2011 Mar 15; 4(164):rs2)が使用され得るが、DNAジャイレースBのように、これは、免疫原性である外来タンパク質に依拠する。

【0159】

AP1903 for Injection

AP1903 APIは、Alphora Research Inc. によって製造されており、AP1903 Drug Product for Injectionは、Formatech Inc. によって作製されている。それは、非イオン性可溶化剤Solutol HS 15 (250mg/mL, BASF)の25%溶液中のAP1903の5mg/mL溶液として製剤化されている。室温において、この製剤は、わずかに黄色の透明の溶液である。冷蔵されると、この製剤は、可逆的な相転移を起こし、乳白色の溶液になる。この相転移は、室温に再度温めると、元に戻る。1本分(the fill)は、3mLのガラスバイアルにおける2.33mLである(バイアル1本あたり合計約10mgのAP1903 for Injection)。

【0160】

AP1903は、患者に投与する前の夜に冷蔵庫から取り出され、およそ21℃の温度で一晩保管され、その結果、その溶液は、希釈前に透明になる。その溶液は、注入開始の30分以内にガラスボトルもしくはポリエチレンボトルまたは非DEHPバッグにおいて調製され、投与するまでおよそ21℃で保管される。

【0161】

すべての試験薬が、2℃～8℃の温度で維持され、過剰な光および熱から保護され、アクセスが制限された鍵が掛かった区域で保管される。

【0162】

AP1903を投与し、誘導性カスパーゼ9ポリペプチドを誘導する必要性を決定する際に、患者は、例えば、非DEHP、非エチレンオキシド滅菌注入セットを使用して2時間にわたるIV注入を介して単一の固定された用量の注射用AP1903(0.4mg/kg)を投与され得る。AP1903の用量は、全ての患者のために個々に計算され、体重が $\geq 10\%$ 変動しなければ、再計算されるべきではない。その計算された用量は、注入前に0.9%ノーマルセーライン100mL中に希釈される。

10

【0163】

AP1903の以前の第I相研究では、24人の健常志願者を、2時間にわたって、IV注入される0.01、0.05、0.1、0.5および1.0mg/kgという用量レベルにおいて、単一用量のAP1903 for Injectionで処置した。AP1903血漿レベルは、用量に正比例し、平均 C_{max} 値は、0.01～1.0mg/kgの用量の範囲にわたって、およそ10～1275ng/mLの範囲だった。最初の注入期間の後、血中濃度は、急速な分布相を示し、血漿レベルは、投与の0.5、2および10時間後にそれぞれ最高濃度のおよそ18、7および1%に減少した。AP1903 for Injectionは、すべての用量レベルにおいて安全であり、耐容性がよいことが示され、好ましい薬物動態プロファイルを示した。Iulivucci JDら、J Clin Pharmacol. 41:870-9, 2001。

20

【0164】

使用されるAP1903 for injectionの固定された用量は、例えば、2時間にわたって静脈内に注入される0.4mg/kgであり得る。細胞の有効なシグナル伝達にインビトロで必要とされるAP1903の量は、10～100nM(1600Da MW)である。これは、16～160 μ g/Lまたは約0.016～1.6mg/kg(1.6～160 μ g/kg)に等しい。1mg/kgまでの用量は、上記で論じられるAP1903のフェーズI研究において十分に許容された。従って、0.4mg/kgは、治療用細胞と組み合わせた、このフェーズI研究のための安全かつ有効なAP1903の用量であり得る。

30

【0165】

(選択マーカー)

ある特定の実施形態において、発現構築物は、その発現構築物にマーカーを含めることによってその発現がインビトロまたはインビボにおいて識別される核酸構築物を含む。そのようなマーカーは、その発現構築物を含む細胞の容易な識別を可能にする識別可能な変化を細胞にもたらし得る。通常、薬物選択マーカーを含めることが、クローニングおよび形質転換体の選択に役立つ。例えば、ネオマイシン、ピューロマイシン、ハイグロマイシン、DHFR、GPT、ゼオシンおよびヒスチジノールに対する抵抗性を付与する遺伝子は、有用な選択マーカーである。あるいは、単純ヘルペスウイルスIのチミジンキナーゼ(tk)などの酵素が使用される。免疫学的表面マーカーを含む細胞外の非シグナル伝達ドメインまたは様々なタンパク質(例えば、CD34、CD19、LNGFR)もまた使用され得、それにより、磁性抗体または蛍光抗体によって媒介される選別のための直接的方法が可能になる。使用される選択マーカーは、遺伝子産物をコードする核酸と同時に発現されることができ、重要であると考えられない。選択マーカーのさらなる例としては、例えば、レポーター(例えば、GFP、EGFP、ベクターgalまたはクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT))が挙げられる。ある特定の実施形態において、マーカータンパク質、例えば、CD19などは、例えば、免疫磁気選択などにおいて、移入するための細胞の選択のために使用される。本明細書中で論じられるように、CD19マーカーは、抗CD19抗体、すなわち、例えば、CD19に結合するscFv、TCRまたは他の抗原認識部分と区別される。

40

50

【0166】

いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、細胞をソートする一助とするために、発現ベクターの中に含まれ得る。例えば、CD34最小エピトープは、ベクターの中に組み込まれ得る。いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるキメラ抗原レセプターまたはキメラ刺激分子を発現させるために使用される発現ベクターは、16アミノ酸のCD34最小エピトープをコードするポリヌクレオチドをさらに含む。本明細書中の例において提供されるある特定の実施形態などのいくつかの実施形態において、CD34最小エピトープは、CD8ストークのアミノ末端位置において組み込まれる。

【0167】

(膜会合ポリペプチド領域)

膜会合ポリペプチドは、例えば、細胞膜と会合するポリペプチドまたはそのフラグメントを含み得る。膜会合ポリペプチドの例としては、細胞レセプター、キメラ抗原レセプター、およびキメラT細胞レセプターが挙げられるが、これらに限定されない。膜会合ポリペプチド領域は、例えば、膜貫通領域、または膜標的化領域であり得る。

【0168】

(膜標的化)

膜標的化配列または膜標的化領域は、細胞表面膜へのキメラタンパク質の輸送を提供し、ここで、同じ配列または他の配列が、細胞表面膜へのキメラタンパク質の結合をコードし得る。細胞膜と会合した分子は、膜会合を容易にするある特定の領域を含み、そのような領域は、キメラタンパク質分子に組み込まれることにより、膜標的化分子をもたらし得る。例えば、いくつかのタンパク質は、アシル化される配列をN末端またはC末端に含み、これらのアシル部分は、膜会合を容易にする。そのような配列は、アシルトランスフェラーゼによって認識され、特定の配列モチーフに一致することが多い。ある特定のアシル化モチーフは、単一のアシル部分（その後に、陰イオン性脂質頭部基との会合を改善するいくつかの正に帯電した残基（例えば、ヒトc-Src: M-G-S-N-K-S-K-P-K-D-A-S-Q-R-R-R）が続くことが多い）によって修飾されることができ、他のものは、複数のアシル部分によって修飾されることができる。例えば、タンパク質チロシンキナーゼSrcのN末端配列は、単一のミリストイル部分を含み得る。二重アシル化領域は、ある特定のタンパク質キナーゼ（例えば、Srcファミリーメンバーのサブセット（例えば、Yes、Fyn、Lck）およびGタンパク質アルファサブユニット）のN末端領域内に配置されている。そのような二重アシル化領域は、そのようなタンパク質の最初の18アミノ酸の中に配置されることが多く、それは、配列モチーフMet-Gly-Cys-Xaa-Cysに一致し、ここで、Metは、切断され、Glyは、N-アシル化され、Cys残基のうちの1つは、S-アシル化される。Glyは、ミリストイル化されることが多く、Cysは、パルミトイル化され得る。配列モチーフCys-Ala-Ala-Xaa（いわゆる「CAAXボックス」）に一致するアシル化領域は、Gタンパク質ガンマサブユニットのC末端由来のC15またはC10イソプレニル部分によって修飾され得、他のタンパク質（例えば、ワールドワイドウェブアドレスebi.ac.uk/interpro/DisplayIproEntry?ac=IPR001230）もまた使用され得る。これらのおよび他のアシル化モチーフとしては、例えば、Gauthier-Campbellら、Molecular Biology of the Cell 15:2205-2217 (2004); Glabatiら、Biochem. J. 303:697-700 (1994) およびZlachineら、J. Cell Science 110:673-679 (1997) において論じられているものが挙げられ、そのモチーフは、膜局在化を誘導するためにキメラ分子に組み込まれ得る。ある特定の実施形態において、アシル化モチーフを含むタンパク質由来の天然の配列が、キメラタンパク質に組み込まれる。例えば、いくつかの実施形態において、Lck、FynもしくはYesまたはGタンパク質アルファサブユニットのN末端部分（例えば、そのようなタンパク質由来の最初の25個のN末端アミノ酸またはそれより少ないアミノ酸（例えば、随意の変異を有する、その天然の配列の約5〜約20アミノ酸、約10〜約19

10

20

30

40

50

アミノ酸または約15～約19アミノ酸)が、キメラタンパク質のN末端の中に組み込まれ得る。ある特定の実施形態において、CAA Xボックスモチーフ配列を含むGタンパク質ガンマサブユニット由来の約25アミノ酸以下のC末端配列(例えば、随意の変異を有する、天然の配列の約5～約20アミノ酸、約10～約18アミノ酸または約15～約18アミノ酸)が、キメラタンパク質のC末端に連結され得る。

【0169】

いくつかの実施形態において、アシル部分は、+1から+6というlog p値を有し、時折、+3から+4.5というlog p値を有する。Log p値は、疎水性の尺度であり、オクタノール/水の分配研究に由来することが多く、ここで、より高い疎水性を有する分子は、より高い頻度でオクタノールに分配し、より高いlog p値を有すると特徴付けられる。Log p値は、いくつかの親油性分子に対して公表されており、log p値は、公知の分配プロセスを使用して計算され得る(例えば、Chemical Reviews, Vol. 71, Issue 6, page 599、エントリー4493は、4.2というlog p値を有するラウリン酸を示している)。任意のアシル部分が、上で論じられたペプチド組成物に連結され得、公知の方法および本明細書中以後に論じられる方法を用いて抗菌活性について試験され得る。アシル部分は、時折、例えば、C1-C20アルキル、C2-C20アルケニル、C2-C20アルキニル、C3-C6シクロアルキル、C1-C4ハロアルキル、C4-C12シクロアルキルアルキル(cyclalkylalkyl)、アリール、置換アリールまたはアリール(C1-C4)アルキルである。任意のアシル含有部分は、時折、脂肪酸であり、脂肪酸部分の例は、プロピル(C3)、ブチル(C4)、ペンチル(C5)、ヘキシル(C6)、ヘプチル(C7)、オクチル(C8)、ノニル(C9)、デシル(C10)、ウンデシル(C11)、ラウリル(C12)、ミリスチル(C14)、パルミチル(C16)、ステアリル(C18)、アラキジル(C20)、ベヘニル(C22)およびリグノセリル部分(C24)であり、各部分は、0、1、2、3、4、5、6、7または8つの不飽和(すなわち、二重結合)を含み得る。アシル部分は、時折、脂質分子(例えば、ホスファチジル脂質(例えば、ホスファチジルセリン、ホスファチジイルイノシトール、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルコリン)、スフィンゴ脂質(例えば、スフィンゴミエリン(shingomyelin)、スフィンゴシン、セラミド、ガングリオシド、セレブロシド))またはそれらの改変バージョンである。ある特定の実施形態において、1、2、3、4もしくは5個またはそれより多くのアシル部分が、膜会合領域に連結される。

【0170】

本明細書中のキメラタンパク質はまた、一回貫通型(single-pass)または複数回貫通型(multiple-pass)の膜貫通配列を含み得る(例えば、キメラタンパク質のN末端またはC末端に)。一回貫通型膜貫通領域は、ある特定のCD分子、チロシinkinaseレセプター、セリン/トレオニンkinaseレセプター、TGFベータ、BMP、アクチビンおよびホスファターゼに見出される。一回貫通型膜貫通領域は、シグナルペプチド領域および約20～約25アミノ酸(それらの多くは、疎水性アミノ酸であり、アルファヘリックスを形成し得る)の膜貫通領域を含むことが多い。短いトラックの正に帯電したアミノ酸が、タンパク質を膜に繋ぎ止めるために膜貫通の範囲の後に続くことが多い。複数回貫通型タンパク質には、イオンポンプ、イオンチャネルおよびトランスポーターが含まれ、膜を複数回またぐ2つまたはそれを超えるらせんを含む。複数回貫通型タンパク質のすべてまたは実質的にすべてが、時折、キメラタンパク質に組み込まれる。一回貫通型および複数回貫通型膜貫通領域に対する配列は、公知であり、キメラタンパク質分子に組み込むために選択され得る。

【0171】

宿主において機能性であり、キメラタンパク質の他のドメインのうちの1つと会合されていることもあるし会合されていないこともある、任意の膜標的化配列が、使用され得る。いくつかの実施形態において、そのような配列としては、ミリストイル化標的化配列、パルミトイル化標的化配列、プレニル化配列(すなわち、ファルネシル化、ゲラニルゲ

ラニル化、CAAXボックス）、タンパク質間相互作用モチーフ、またはレセプター由来の膜貫通配列（シグナルペプチドを利用する）が挙げられるが、これらに限定されない。例としては、例えば、ten Klooster JPら、Biology of the Cell（2007）99，1-12，Vincent，S. ら、Nature Biotechnology 21：936-40，1098（2003）において論じられているものが挙げられる。

【0172】

様々な膜におけるタンパク質の保持を高め得るさらなるタンパク質ドメインが存在する。例えば、約120アミノ酸のプレクストリン相同（PH）ドメインが、代表的には細胞内のシグナル伝達に参与する200個を超えるヒトタンパク質において見られる。PHドメインは、膜内の様々なホスファチジルイノシトール（PI）脂質（例えば、PI（3，4，5）-P3、PI（3，4）-P2、PI（4，5）-P2）に結合し得るので、種々の膜コンパートメントまたは細胞内コンパートメントにタンパク質をリクルートする際に重要な役割を果たし得る。しばしば、PI脂質のリン酸化状態は、例えば、PI-3キナーゼまたはPTENによって制御されるので、膜とPHドメインとの相互作用は、アシル脂質による相互作用ほど安定でない。

【0173】

（膜貫通領域）

本明細書中のキメラ抗原レセプターは、一回貫通型（single-pass）または複数回貫通型（multiple-pass）の膜貫通配列を含み得る（例えば、キメラタンパク質のN末端またはC末端に）。一回貫通型膜貫通領域は、ある特定のCD分子、チロシンキナーゼレセプター、セリン／トレオニンキナーゼレセプター、TGFβ、BMP、アクチビンおよびホスファターゼに見出される。一回貫通型膜貫通領域は、シグナルペプチド領域および約20～約25アミノ酸（それらの多くは、疎水性アミノ酸であり、アルファヘリックスを形成し得る）の膜貫通領域を含むことが多い。短いトラックの正に帯電したアミノ酸が、タンパク質を膜に繋ぎ止めるために膜貫通の範囲の後に続くことが多い。複数回貫通型タンパク質には、イオンポンプ、イオンチャネルおよびトランスポーターが含まれ、膜を複数回またぐ2つまたはそれを超えるらせんを含む。複数回貫通型タンパク質のすべてまたは実質的にすべてが、時折、キメラタンパク質に組み込まれる。一回貫通型および複数回貫通型膜貫通領域に対する配列は、公知であり、キメラタンパク質分子に組み込むために選択され得る。

【0174】

いくつかの実施形態において、膜貫通ドメインは、CARの細胞外ドメインに融合される。1つの実施形態において、CARにおけるドメインのうちの1つと天然に会合する膜貫通ドメインが使用される。他の実施形態において、CARにおけるドメインのうちの1つと天然に会合しない膜貫通ドメインが使用される。場合によっては、そのレセプター複合体の他のメンバーとの相互作用を最小限に抑えるために、同じまたは異なる表面膜タンパク質の膜貫通ドメインにそのようなドメインが結合するのを回避するために膜貫通ドメインは、選択され得るか、またはアミノ酸置換によって改変され得る（例えば、代表的には、疎水性残基に変更される（charged））。

【0175】

膜貫通ドメインは、例えば、T細胞レセプターのアルファ、ベータもしくはゼータ鎖、CD3-ε、CD3ζ、CD4、CD5、CD8、CD8α、CD9、CD16、CD22、CD28、CD33、CD38、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137またはCD154に由来し得る。または、いくつかの例では、主に疎水性残基、例えば、ロイシンおよびバリンなどを含む膜貫通ドメインが、新規に合成され得る。ある特定の実施形態において、短いポリペプチドリンカーは、キメラ抗原レセプターの膜貫通ドメインと細胞内ドメインとの間に結合を形成し得る。それらのキメラ抗原レセプターは、ストーク、すなわち、細胞外領域のアミノ酸を細胞外ドメインと膜貫通ドメインとの間にさらに含み得る。例えば、そのストークは、選択された膜貫通ドメインに天然に会合する

アミノ酸の配列であり得る。いくつかの実施形態において、キメラ抗原レセプターは、CD8膜貫通ドメインを含み、ある特定の実施形態において、キメラ抗原レセプターは、CD8膜貫通ドメインおよびその膜貫通ドメインの細胞外部分におけるさらなるアミノ酸を含み、ある特定の実施形態において、キメラ抗原レセプターは、CD8膜貫通ドメインおよびCD8ストークを含む。キメラ抗原レセプターは、膜貫通ドメインと細胞質ドメインとの間にアミノ酸の領域をさらに含み得、それらのアミノ酸は、その膜貫通ドメインが由来するポリペプチドと天然に会合するものである。

【0176】

(調節領域)

(1. プロモーター)

目的のポリヌクレオチド配列の発現をコントロールするために使用される特定のプロモーターは、標的化された細胞においてそのポリヌクレオチドの発現を指示することができる限り、重要であると考えられない。したがって、ヒト細胞が標的化される場合、ポリヌクレオチド配列コード領域は、例えば、ヒト細胞において発現されることができるプロモーターに隣接しておよびそのプロモーターの支配下に配置され得る。一般的に言えば、そのようなプロモーターは、ヒトプロモーターまたはウイルスプロモーターを含み得る。

【0177】

様々な実施形態において、ヒトサイトメガロウイルス (CMV) 前初期遺伝子プロモーター、SV40初期プロモーター、ラウス肉腫ウイルスの長い末端反復配列、 β -アクチン、ラットインスリンプロモーターおよびグリセルアルデヒド3リン酸脱水素酵素が、目的のコード配列の高レベル発現を得るために使用され得る。発現レベルが所与の目的にとって十分であるならば、目的のコード配列の発現を達成すると当該分野で周知である他のウイルスプロモーターまたは哺乳動物細胞プロモーターまたは細菌ファージプロモーターの使用も同様に企図される。周知の特性を有するプロモーターを使用することによって、トランスフェクション後または形質転換後の目的のタンパク質の発現のレベルおよびパターンが、最適化され得る。

【0178】

特異的な生理学的シグナルまたは合成シグナルに応答して制御されるプロモーターの選択は、遺伝子産物の誘導性発現を可能にし得る。例えば、1つの導入遺伝子の発現、またはマルチシストロニックなベクターが使用されるときは複数の導入遺伝子の発現が、ベクターが生成される細胞にとって有毒である場合、それらの導入遺伝子のうちの1つ以上の発現を妨げるかまたは減少させることが望ましい。産生細胞株にとって有毒である導入遺伝子の例は、アポトーシス促進遺伝子およびサイトカイン遺伝子である。いくつかの誘導性プロモーターシステムが、導入遺伝子産物が有毒である場合のウイルスベクターの作製に利用可能である (より誘導性のプロモーターを付加する)。

【0179】

エクジソンシステム (Invitrogen, Carlsbad, CA) は、1つのそのようなシステムである。このシステムは、哺乳動物細胞において目的の遺伝子の制御された発現を可能にするようにデザインされる。そのシステムは、導入遺伝子の基底レベルの発現ではなく200倍超の誘導能を実質的に可能にする厳しく制御された発現機構からなる。そのシステムは、ショウジョウバエのヘテロ二量体エクジソンレセプターに基づき、エクジソンまたはムリストロンAなどのアナログが、そのレセプターに結合すると、そのレセプターは、プロモーターを活性化して、下流の導入遺伝子の発現をオンにし、高レベルのmRNA転写産物がもたらされる。このシステムでは、ヘテロ二量体レセプターの両方のモノマーが、1つのベクターから構成的に発現されるのに対し、目的の遺伝子の発現を駆動するエクジソン応答性プロモーターは、別のプラスミド上に存在する。ゆえに、このタイプのシステムを目的の遺伝子トランスファーベクターに遺伝子操作して導入することが、有用であり得る。次いで、産生細胞株において目的の遺伝子を含むプラスミドとレセプターモノマーを含むプラスミドとをコトランスフェクションすることにより、潜在的に有毒な導入遺伝子を発現させずに、遺伝子トランスファーベクターの作製が可能にな

10

20

30

40

50

り得る。適切な時点において、導入遺伝子の発現が、エクジソンまたはムリステロンAによって活性化され得る。

【0180】

有用であり得る別の誘導性システムは、もともとはGossenおよびBujardによって開発された(Gossen and Bujard, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5547-5551, 1992; Gossenら, Science, 268:1766-1769, 1995)、Tet-OffTMまたはTet-OnTMシステム(Clontech, Palo Alto, CA)である。このシステムもまた、テトラサイクリンまたはテトラサイクリン誘導体(例えば、ドキシサイクリン)にตอบสนองして高レベルの遺伝子発現を制御することが可能である。Tet-OnTMシステムでは、ドキシサイクリンの存在下において遺伝子発現がオンになるのに対し、Tet-OffTMシステムでは、ドキシサイクリンの非存在下において遺伝子発現がオンになる。これらのシステムは、大腸菌のテトラサイクリン抵抗性オペロンに由来する2つの制御エレメント(テトラサイクリンリプレッサーが結合するテトラサイクリンオペレーター配列、およびテトラサイクリンリプレッサータンパク質)に基づく。目的の遺伝子は、プラスミドの中に存在するテトラサイクリン応答性エレメントを有するプロモーターの後ろでプラスミド中にクローニングされる。第2のプラスミドは、テトラサイクリンによってコントロールされるトランス活性化因子と呼ばれる制御エレメントを含み、その制御エレメントは、Tet-OffTMシステムでは、単純ヘルペスウイルス由来のVP16ドメインおよび野生型テトラサイクリン(tertracycline)リプレッサーから構成される。したがって、ドキシサイクリンの非存在下において、転写は、恒常的にオンである。Tet-OnTMシステムでは、テトラサイクリンリプレッサーは、野生型でなく、ドキシサイクリンの存在下において転写を活性化する。遺伝子治療ベクターを作製する場合、テトラサイクリンまたはドキシサイクリンの存在下において産生細胞が生育され得、潜在的に有毒な導入遺伝子の発現を妨げ得るように、Tet-OffTMシステムが使用され得るが、そのベクターが患者に導入されると、遺伝子発現は恒常的にオンになり得る。

【0181】

いくつかの状況において、遺伝子治療ベクターにおける導入遺伝子の発現を制御することが望ましい。例えば、様々な活性強度を有する種々のウイルスプロモーターが、所望の発現レベルに応じて使用される。哺乳動物細胞では、CMV前初期プロモーターが、強力な転写活性化をもたらすために使用されることが多い。CMVプロモーターは、Donnelly, J. J. ら, 1997, Annu. Rev. Immunol. 15:617-48において概説されている。導入遺伝子の低い発現レベルが望まれるとき、それほど強力でないCMVプロモーターの改変バージョンもまた、使用されている。造血細胞における導入遺伝子の発現が望まれるとき、MLVまたはMMTV由来のLTRなどのレトロウイルスプロモーターが使用されることが多い。所望の効果に応じて使用される他のウイルスプロモーターとしては、SV40、RSV LTR、HIV-1およびHIV-2 LTR、アデノウイルスプロモーター(例えば、E1A、E2AまたはMLP領域由来のもの)、AAV LTR、HSV-TKおよびトリ肉腫ウイルスが挙げられる。

【0182】

他の例では、特定の分化した細胞において発生的に制御されかつ活性であるプロモーターが、選択され得る。従って、例えば、プロモーターは、多能性幹細胞において活性でなくともよいが、例えば、多能性幹細胞がより成熟した細胞へと分化する場合、上記プロモーターは、次いで、活性化され得る。

【0183】

同様に、組織特異的プロモーターは、標的化されていない組織に対する潜在的な毒性または望ましくない効果を減少させるように、特定の組織または細胞において転写をもたらすために使用される。これらのプロモーターは、CMVプロモーターなどのより強力なプロモーターと比べて低い発現をもたらし得るが、より限定された発現および免疫原性もも

たらし得る (Bojak, A. ら、2002. Vaccine 20:1975-79; Cazeaux, N. ら、2002. Vaccine 20:3322-31)。例えば、組織特異的プロモーター (例えば、PSA関連プロモーター) または前立腺特異的腺性カリクレインまたは筋肉クレアチンキナーゼ遺伝子が、適切な場合に使用され得る。

【0184】

組織特異的プロモーターまたは分化特異的プロモーターの例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない: B29 (B細胞); CD14 (単球性細胞); CD43 (白血球および血小板); CD45 (造血細胞); CD68 (マクロファージ); デスミン (筋肉); エラスターゼ-1 (膵腺房細胞); エンドグリン (内皮細胞); フィブロネクチン (分化中の細胞、治癒中の組織); および Flt-1 (内皮細胞); GFAP (アストロサイト)。

10

【0185】

ある特定の適応症では、遺伝子治療ベクターを投与した後の特定の時点において転写を活性化することが望ましい。これは、ホルモンまたはサイトカインによって制御可能であるようなプロモーターを用いて行われる。使用され得るサイトカイン応答性プロモーターおよび炎症性タンパク質応答性プロモーターとしては、KキニノーゲンおよびTキニノーゲン (Kageyama ら (1987) J. Biol. Chem., 262, 2345-2351)、c-fos、TNF- α 、C反応性タンパク質 (Arcone ら (1988) Nucl. Acids Res., 16 (8), 3195-3207)、ハプトグロビン (Oliviero ら (1987) EMBO J., 6, 1905-1912)、血清アミロイドA2、C/EBP α 、IL-1、IL-6 (Poli and Cortese, (1989) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 86, 8202-8206)、補体C3 (Wilson ら (1990) Mol. Cell. Biol., 6181-6191)、IL-8、 α 1酸性糖タンパク質 (Prowse and Baumann, (1988) Mol Cell Biol, 8, 42-51)、 α 1抗トリプシン、リポタンパク質リパーゼ (Zechner ら、Mol. Cell. Biol., 2394-2401, 1988)、アンジオテンシノーゲン (Ron ら (1991) Mol. Cell. Biol., 2887-2895)、フィブリノゲン、c-jun (ホルボールエステル、TNF- α 、UV照射、レチノイン酸および過酸化水素によって誘導可能)、コラゲナーゼ (ホルボールエステルおよびレチノイン酸によって誘導される)、メタロチオネイン (重金属および糖質コルチコイド誘導性)、ストロメライン (ホルボールエステル、インターロイキン-1およびEGFによって誘導可能)、 α 2マクログロブリンおよび α 1抗キモトリプシンが挙げられる。他のプロモーターとしては、例えば、SV40、MMTV、ヒト免疫不全ウイルス (MV)、モロニーウイルス、ALV、エプスタイン・バーウイルス、ラウス肉腫ウイルス、ヒトアクチン、ミオシン、ヘモグロビンおよびクレアチンが挙げられる。

20

30

【0186】

上記プロモーターのいずれか単独または別のプロモーターとの併用が、所望の作用に応じて有用であり得ることが想定される。プロモーターおよび他の制御エレメントは、それらが所望の細胞または組織において機能的であるように選択される。さらに、このプロモーターのリストは、網羅的または限定的であると解釈されるべきでなく; 他のプロモーターが、本明細書中に開示されるプロモーターおよび方法とともに使用される。

40

【0187】

(2. エンハンサー)

エンハンサーは、同じDNA分子上の離れた位置に配置されたプロモーターからの転写を増加させる遺伝的エレメントである。初期の例としては、コード配列に隣接し、かついくつかのイントロンの中に存在する、免疫グロブリンおよびT細胞レセプターに関連するエンハンサーが挙げられる。多くのウイルスプロモーター (例えば、CMV、SV40およびレトロウイルスLTR) は、エンハンサーの活性と密接に関連し、単一エレメントのように扱われることが多い。エンハンサーは、ほぼプロモーターのように組織化される。

50

すなわち、エンハンサーは、多くの個々のエレメントから構成され、その各々が、1つ以上の転写性タンパク質に結合する。エンハンサーとプロモーターとの基本的な区別は、操作上のものである。エンハンサー領域は概して、少し離れて、しばしば向きに関係なく、転写を刺激する；これは、プロモーター領域またはその成分エレメントには必ずしも当てはまらない。他方で、プロモーターは、特定の部位において特定の向きでRNA合成の開始を指示する1つ以上のエレメントを有するのに対し、エンハンサーは、これらの特異性を欠く。プロモーターおよびエンハンサーは、しばしば重複し、近接することから、しばしば非常によく似たモジュール構成を有するようである。エンハンサーのサブセットは、転写活性を増加させ得るだけでなく、ゲノムにインテグレートされたとき、隣接する配列から転写性エレメントを（インスレーターエレメントとともに）隔離するのを助け得る、

10

【0188】

任意のプロモーター／エンハンサーの組み合わせ（Eukaryotic Promoter Data Base EPDBのように）が、遺伝子の発現を駆動するために使用され得るが、多くは、特定の組織タイプまたは組織のサブセットに発現を限定し得る（例えば、Kut z l e r, M. A., and W e i n e r, D. B., 2008. Nature Reviews Genetics 9: 776-88に概説されている）。例としては、ヒトアクチン、ミオシン、ヘモグロビン、筋肉クレアチンキナーゼ由来のエンハンサー、ならびにウイルスCMV、RSVおよびEBV由来の配列が挙げられるが、これらに限定されない。適切なエンハンサーが、特定の用途に対して選択され得る。適切な細菌ポリメラーゼが、送達複合体の一部としてまたは追加の遺伝的発現構築物として提供される場合、真核細胞は、ある特定の細菌プロモーターからの細胞質内転写を支持し得る。

20

【0189】

（3. ポリアデニル化シグナル）

cDNAインサートが使用される場合、遺伝子転写産物の適切なポリアデニル化をもたらすためにポリアデニル化シグナルを含めることが通常望ましい。ポリアデニル化シグナルの性質は、本方法の実施の成功にとって重大であるとは考えられておらず、任意のそのような配列（例えば、ヒトまたはウシの成長ホルモンおよびSV40のポリアデニル化シグナルならびにLTRポリアデニル化シグナル）が、使用される。1つの非限定的な例は、pCEP3プラスミド（Invitrogen, Carlsbad, California）に存在するSV40ポリアデニル化シグナルである。ターミネーターもまた、発現カセットのエレメントとして企図される。これらのエレメントは、メッセージレベルを高めるため、およびそのカセットから他の配列への読み過ぎしを最小限にするために役立ち得る。終止シグナル配列またはポリ（A）シグナル配列は、例えば、mRNAの3'末端における保存配列（AAUAAA）から約11～30ヌクレオチド下流に位置し得る（Montgomery, D. L. ら、1993. DNA Cell Biol. 12: 777-83; Kut z l e r, M. A., and W e i n e r, D. B., 2008. Nature Rev. Gen. 9: 776-88）。

30

【0190】

（4. 開始シグナルおよび内部リボソーム結合部位）

特定の開始シグナルもまた、コード配列の効率的な翻訳に必要とされることがある。これらのシグナルは、ATG開始コドンまたは隣接する配列を含む。ATG開始コドンをはじめとした外来性翻訳調節シグナルが、提供される必要があり得る。開始コドンは、インサート全体の翻訳を確実にするために、所望のコード配列の読み枠とインフレームで配置される。外来性翻訳調節シグナルおよび開始コドンは、天然または合成であり得る。発現の効率は、適切な転写エンハンサーエレメントを含めることによって上昇し得る。

40

【0191】

ある特定の実施形態において、配列内リボソーム進入部位（IRES）エレメントの使用は、多重遺伝子すなわちポリシストロニックなメッセージを作製するために使用される

50

。IRESエレメントは、5'メチル化cap依存性翻訳のリボソームスキヤニングモデルを迂回することができ、内部部位において翻訳を開始することができる（Pelletier and Sonenberg, Nature, 334:320-325, 1988）。ピコルナウイルスファミリーの2つのメンバー（ポリオおよび脳筋炎）由来のIRESエレメントが、論じられており（Pelletier and Sonenberg, 1988）、ならびに哺乳動物メッセージ由来のIRESも論じられている（Maciejak and Sarnow, Nature, 353:90-94, 1991）。IRESエレメントは、異種のオープンリーディングフレームに連結され得る。各々がIRESによって分断されている複数のオープンリーディングフレームが、共に転写され得、ポリシストロニックなメッセージを作製する。IRESエレメントのおかげで、各オープンリーディングフレームは、効率的な翻訳のためにリボソームに接近可能である。複数の遺伝子が、単一のメッセージを転写するために単一のプロモーター／エンハンサーを使用して効率的に発現され得る（米国特許第5,925,565号および同第5,935,819号（各々が参照により本明細書中に援用される）を参照のこと）。

【0192】

（配列の最適化）

タンパク質産生は、導入遺伝子におけるコドンをも最適化することによっても増加され得る。タンパク質産生を増加させるために、種特異的コドンの変更が用いられ得る。また、コドンが最適化されることにより、最適化されたRNAが生成され得、それにより、より効率的な翻訳がもたらされ得る。RNAに組み込まれるコドンをも最適化することによって、不安定性を引き起こす二次構造をもたらし得るエレメント、例えばリボソーム結合を阻害し得るmRNA二次構造、またはmRNAの核外輸送を阻害し得るクリプティック（cryptic）配列などのエレメントが、除去され得る（Kutzler, M. A., and Weiner, D. B., 2008. Nature Rev. Gen. 9:776-88; Yan, J. ら、2007. Mol. Ther. 15:411-21; Cheung, Y. K. ら、2004. Vaccine 23:629-38; Narum, D. L. ら、2001. 69:7250-55; Yadava, A., and Ockenhouse, C. F., 2003. Infect. Immun. 71:4962-69; Smith, J. M. ら、2004. AIDS Res. Hum. Retroviruses 20:1335-47; Zhou, W. ら、2002. Vet. Microbiol. 88:127-51; Wu, X. ら、2004. Biochem. Biophys. Res. Commun. 313:89-96; Zhang, W. ら、2006. Biochem. Biophys. Res. Commun. 349:69-78; Deml, L. A. ら、2001. J. Virol. 75:1099-11001; Schneider, R. M. ら、1997. J. Virol. 71:4892-4903; Wang, S. D. ら、2006. Vaccine 24:4531-40; zur Megede, J. ら、2000. J. Virol. 74:2628-2635）。例えば、FBP12、カスパーゼポリペプチド、およびCD19配列が、コドンの変更によって最適化され得る。

【0193】

（リーダー配列）

リーダー配列は、mRNAの安定性を高めるためおよびより効率的な翻訳をもたらし得るために付加され得る。リーダー配列は、通常、mRNAを小胞体に標的化することに関与する。例としては、自身の切断を遅延させる、HIV-1エンベロープ糖タンパク質（Env）に対するシグナル配列、およびIgE遺伝子リーダー配列が挙げられる（Kutzler, M. A., and Weiner, D. B., 2008. Nature Rev. Gen. 9:776-88; Li, V. ら、2000. Virology 272:417-28; Xu, Z. L. ら、2001. Gene 272:149-56; Malin, A. S. ら、2000. Microbes Infect. 2:1677-85; Kutzler, M. A. ら、2005. J. Immunol. 175:112-125; Yang, J. S. ら、2002. Emerg. Infect. Dis. 8:1379-

84; Kumar, S. ら、2006. DNA Cell Biol. 25:383-92; Wang, S. ら、2006. Vaccine 24:4531-40)。IgE リーダーは、小胞体への挿入を高めるために使用され得る (Tepler, I ら (1989) J. Biol. Chem. 264:5912)。

【0194】

導入遺伝子の発現は、発現を最適化するための適切な方法を選択することによって、最適化され得るおよび／またはコントロールされ得る。これらの方法は、例えば、プロモーター、送達方法および遺伝子配列を最適化することを含む (例えば、Laddy, D. J. ら、2008. PLoS ONE 3:e2517; Kutzler, M. A., and Weiner, D. B., 2008. Nature Rev. Gen. 9:776-88に提示されているような)。

【0195】

(核酸)

本明細書中で使用される「核酸」は、一般に、核酸塩基を含む、DNA、RNAまたはその誘導体もしくはアナログの分子 (1本、2本またはそれより多くの鎖) のことを指す。核酸塩基には、例えば、DNA (例えば、アデニン「A」、グアニン「G」、チミン「T」またはシトシン「C」) またはRNA (例えば、A、G、ウラシル「U」またはC) に見られる天然に存在するプリンまたはピリミジン塩基が含まれる。用語「核酸」は、用語「オリゴヌクレオチド」および「ポリヌクレオチド」を包含し、その各々は、用語「核酸」の垂属として包含される。核酸は、少なくとも、多くとも、または約3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、441、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990もしくは1000ヌクレオチド長、またはこの中の導き出せる任意の範囲の長さであり得る。

【0196】

本明細書中に提供される核酸は、別の核酸に対して同一または相補的である領域を有し得る。その相補的または同一である領域は、少なくとも5つ連続した残基であり得ることが企図されるが、その領域は、少なくとも、多くとも、または約6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、2

30、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、441、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990または1000個連続したヌクレオチドであることが特に企図される。

【0197】

10

本明細書中で使用されるとき、「ハイブリダイゼーション」、「ハイブリダイズする」または「ハイブリダイズすることができる」は、二本鎖分子もしくは三本鎖分子、または部分的な二本鎖もしくは三本鎖の性質を有する分子を形成することを意味すると理解される。本明細書中で使用される用語「アニールする」は、「ハイブリダイズする」と同義である。用語「ハイブリダイゼーション」、「ハイブリダイズする」または「ハイブリダイズすることができる」は、用語「ストリンジェントな条件（複数可）」または「高ストリンジェンシー」および用語「低ストリンジェンシー」または「低ストリンジェンシー条件（複数可）」を包含する。

【0198】

20

本明細書中で使用されるとき、「ストリンジェントな条件（複数可）」または「高ストリンジェンシー」は、相補的な配列（複数可）を含む1つ以上の核酸鎖の間のまたはその1つ以上の核酸鎖内のハイブリダイゼーションを可能にするが、ランダム配列のハイブリダイゼーションを妨げる条件である。ストリンジェントな条件は、核酸と標的鎖との間のミスマッチを、たとえあったにしてもほとんど許容しない。そのような条件は、公知であり、高選択性が要求される用途のために使用されることが多い。非限定的な用途としては、核酸（例えば、遺伝子またはその核酸セグメント）の単離、または少なくとも1つの特異的なmRNA転写産物もしくはその核酸セグメントの検出などが挙げられる。

【0199】

30

ストリンジェントな条件は、約42℃～約70℃の温度における約0.02M～約0.5M NaClによって提供されるような、低塩および／または高温の条件を含み得る。所望のストリンジェンシーの温度およびイオン強度は、特定の核酸（複数可）の長さ、標的配列（複数可）の長さおよび核酸塩基含有量、核酸（複数可）の電荷組成、ならびにハイブリダイゼーション混合物中のホルムアミド、塩化テトラメチルアンモニウムまたは他の溶媒（複数可）の存在または濃度によって部分的に決定されることが理解される。

【0200】

40

ハイブリダイゼーションのためのこれらの範囲、組成および条件は、単なる非限定的な例という目的で言及されていること、特定のハイブリダイゼーション反応に対する所望のストリンジェンシーは、1つ以上のポジティブコントロールまたはネガティブコントロールとの比較によって経験的に決定されることが多いことが理解される。想定される用途に応じて、標的配列に対する様々な程度の核酸選択性を達成するために、様々なハイブリダイゼーション条件が使用され得る。非限定的な例では、ストリンジェントな条件下において核酸にハイブリダイズしない関係する標的核酸の同定または単離は、低温および／または高イオン強度におけるハイブリダイゼーションによって達成され得る。そのような条件は、「低ストリンジェンシー」または「低ストリンジェンシー条件」と呼ばれ、低ストリンジェンシーの非限定的な例としては、約20℃～約50℃の温度範囲における約0.15M～約0.9M NaClで行われるハイブリダイゼーションが挙げられる。低または高ストリンジェンシー条件は、特定の用途に適合させるためにさらに改変され得る。

【0201】

（核酸修飾）

下記で論じられる修飾のいずれかが、核酸に適用され得る。修飾の例としては、RNA

50

もしくはDNAの骨格、糖または塩基、およびそれらの様々な組み合わせに対する変更が挙げられる。核酸における任意の好適な数の骨格結合、糖および／または塩基が、修飾され得る（例えば、独立して、約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、最大100%）。修飾されていないヌクレオシドは、ベータ-D-リボフラノースの1'炭素に結合された塩基アデニン、シトシン、グアニン、チミンまたはウラシルのうちのいずれか1つである。

【0202】

修飾塩基は、1'位におけるアデニン、グアニン、シトシンおよびウラシル以外のヌクレオチド塩基である。修飾塩基の非限定的な例としては、イノシン、プリン、ピリジン-4-オン、ピリジン-2-オン、フェニル、シュドウラシル、2, 4, 6-トリメトキシベンゼン、3-メチルウラシル、ジヒドロウリジン、ナフチル、アミノフェニル、5-アルキルシチジン（例えば、5-メチルシチジン）、5-アルキルウリジン（例えば、リボチミジン）、5-ハロウリジン（例えば、5-ブロモウリジン）または6-アザピリミジンまたは6-アルキルピリミジン（例えば、6-メチルウリジン）、プロピンなどが挙げられる。修飾塩基の他の非限定的な例としては、ニトロピロリル（例えば、3-ニトロピロリル）、ニトロインドリル（例えば、4-, 5-, 6-ニトロインドリル）、ヒポキサンチニル、イソイノシニル、2-アザイノシニル、7-デアザイノシニル、ニトロイミダゾリル、ニトロピラゾリル、ニトロベンゾイミダゾリル、ニトロインダゾリル、アミノインドリル、ピロロピリミジニル、ジフルオロトリル、4-フルオロ-6-メチルベンゾイミダゾール、4-メチルベンゾイミダゾール、3-メチルイソカルボスチリル、5-メチルイソカルボスチリル、3-メチル-7-プロピニルイソカルボスチリル、7-アザインドリル、6-メチル-7-アザインドリル、イミジゾピリジニル、9-メチル-イミジゾピリジニル、ピロロピリジニル、イソカルボスチリル、7-プロピニルイソカルボスチリル、プロピニル-7-アザインドリル、2, 4, 5-トリメチルフェニル、4-メチルインドリル、4, 6-ジメチルインドリル、フェニル、ナフタレニル（naphthalenyl）、アントラセニル、フェナントラセニル、ピレニル、スチルベニル、テトラセニル、ペンタセニルなどが挙げられる。

【0203】

いくつかの実施形態において、例えば、核酸は、リン酸骨格修飾を有する修飾された核酸分子を含み得る。骨格修飾の非限定的な例としては、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、モルホリノ、アミデート、カルバメート、カルボキシメチル、アセトアミデート、ポリアミド、スルホネート、スルホンアミド、スルファメート、ホルムアセタール、チオホルムアセタールおよび／またはアルキルシリル修飾が挙げられる。ある特定の場合において、ヌクレオシドに天然に存在するリボース糖部分は、ヘキソース糖、多環式ヘテロアルキル環またはシクロヘキセニル基で置き換えられる。ある特定の場合において、ヘキソース糖は、アロース、アルトロース、グルコース、マンノース、グロース、イドース、ガラクトース、タロースまたはそれらの誘導体である。ヘキソースは、D-ヘキソース、グルコースまたはマンノースであり得る。ある特定の場合において、多環式ヘテロアルキル基は、環内に1つの酸素原子を含む二環式環であり得る。ある特定の場合において、多環式ヘテロアルキル基は、ビスクロ[2.2.1]ヘプタン、ビスクロ[3.2.1]オクタンまたはビスクロ[3.3.1]ノナンである。

【0204】

ニトロピロリル核酸塩基およびニトロインドリル核酸塩基は、ユニバーサル塩基として公知の化合物のクラスのメンバーである。ユニバーサル塩基は、オリゴヌクレオチド二重鎖の融解挙動または活性に実質的に影響せずに4つの天然に存在する塩基のいずれかを置き換え得る化合物である。天然に存在する核酸塩基に関連する安定化する水素結合相互作用とは対照的に、3-ニトロピロリル核酸塩基を含むオリゴヌクレオチド二重鎖は、スタッキング相互作用によって単独で安定化され得る。ニトロピロリル核酸塩基との有意な水

10

20

30

40

50

素結合相互作用が無いことにより、特定の相補性塩基に対する特異性は不必要になる。さらに、4-、5-および6-ニトロインドリルは、4つの天然塩基に対して非常に低い特異性しか示さない。1-(2'-O-メチル-ベータ-D-リボフラノシル)-5-ニトロインドールを調製するための手順は、Gaubert, G.; Wengel, J. *Tetrahedron Letters* 2004, 45, 5629に論じられている。他のユニバーサル塩基としては、ヒポキサンチニル、イソイノシニル、2-アザイノシニル、7-デアザイノシニル、ニトロイミダゾリル、ニトロピラゾリル、ニトロベンゾイミダゾリル、ニトロインダゾリル、アミノインドリル、ピロロピリミジニルおよびそれらの構造的誘導体が挙げられる。

【0205】

ジフルオロトリルは、ユニバーサル塩基として機能する非天然の核酸塩基である。ジフルオロトリルは、天然の核酸塩基チミンの同配体である。しかしながら、チミンとは異なり、ジフルオロトリルは、天然塩基のいずれに対しても、顕著な選択性を示さない。ユニバーサル塩基として機能する他の芳香族化合物は、4-フルオロ-6-メチルベンゾイミダゾールおよび4-メチルベンゾイミダゾールである。さらに、比較的疎水性のイソカルボスチリル誘導体である3-メチルイソカルボスチリル、5-メチルイソカルボスチリルおよび3-メチル-7-プロピニルイソカルボスチリルは、天然塩基だけを含むオリゴヌクレオチド配列と比べてオリゴヌクレオチド二重鎖の不安定化をわずかにしか引き起こさないユニバーサル塩基である。他の非天然の核酸塩基としては、7-アザインドリル、6-メチル-7-アザインドリル、イミジゾピリジニル、9-メチル-イミジゾピリジニル、ピロロピリジニル、イソカルボスチリル、7-プロピニルイソカルボスチリル、プロピニル-7-アザインドリル、2, 4, 5-トリメチルフェニル、4-メチルインドリル、4, 6-ジメチルインドリル、フェニル、ナフタレニル、アントラセニル、フェナントラセニル、ピレニル、スチルベニル、テトラセニル、ペンタセニルおよびそれらの構造的誘導体が挙げられる。ジフルオロトリル、4-フルオロ-6-メチルベンゾイミダゾール、4-メチルベンゾイミダゾールおよび上で言及された他の非天然塩基の合成手順を含むより詳細な考察については、Schweitzerら、*J. Org. Chem.*, 59: 7238-7242 (1994)を参照のこと。さらに、化学的置換基、例えば、架橋剤が、反応物に対して安定性または不可逆性をさらに付加するために使用される。架橋剤の非限定的な例としては、例えば、1, 1-ビス(ジアゾアセチル)-2-フェニルエタン、グルタルアルデヒド、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、例えば、4-アジドサリチル酸とのエステル、ホモ二官能性イミドエステル(ジスクシンイミジルエステル、例えば、3, 3'-ジチオビス(スクシンイミジルプロピオネート)を含む)、二官能性マレイミド(例えば、ビス-N-マレイミド-1, 8-オクタン)およびメチル-3-[(p-アジドフェニル) ジチオ] プロピオイミデートなどの作用物質が挙げられる。

【0206】

ヌクレオチドアナログは、「ロックド(locked)」核酸も含み得る。ある特定の組成物は、内因性の核酸を特定の構造に本質的に「繋ぎ止める」または「ロックする」ために使用され得る。配列を繋ぎ止めることは、核酸複合体の解離を防ぐために役立ち、ゆえに、複製を防ぎ得るだけでなく、内在性(endogeneous)配列の標識、修飾および/またはクローニングも可能にし得る。ロックされた構造は、遺伝子発現を制御し得る(すなわち、転写または複製を阻害し得るかまたは増強し得る)か、または内在性の核酸配列を標識するためもしくはその他の方法で修飾するために使用され得る安定した構造として使用され得るか、またはその内在性配列を単離するために、すなわちクローニングのために使用され得る。

【0207】

核酸分子は、RNAまたはDNAだけを含む分子に必ずしも限定されず、化学的に修飾されたヌクレオチドおよび非ヌクレオチドをさらに包含する。非ヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチドのパーセントは、1%~100%(例えば、約5、10、15、20、25

10

20

30

40

50

、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90または95%)であり得る。

【0208】

(核酸調製物)

いくつかの実施形態において、例えば、アッセイにおけるコントロールまたは標準物質として、または治療薬として使用するための核酸が、提供される。核酸は、当該分野で公知の任意の手法(例えば、化学合成、酵素的生成または生物学的生成など)によって作製され得る。核酸は、生物学的サンプルから回収され得るかまたは単離され得る。核酸は、組換えであり得るか、または天然であり得るかもしくは細胞にとって内因性であり得る(細胞のゲノムから産生され得る)。生物学的サンプルは、小さい核酸分子の回収率を高めるような方法で処理され得ることが企図される。一般に、方法は、グアニジニウムおよび界面活性剤を有する溶液で細胞を溶解することを含み得る。

10

【0209】

核酸合成はまた、標準的な方法に従って行われ得る。合成核酸(例えば、合成オリゴヌクレオチド)の非限定的な例としては、ホスホトリエステル、ホスファイトもしくはホスホルアミダイト化学を使用するインビトロ化学合成および固相法によってまたはデオキシヌクレオシドH-ホスホネート中間体を介して作製された核酸が挙げられる。様々な異なるオリゴヌクレオチド合成機構が、他の箇所に開示されている。

【0210】

核酸は、公知の手法を用いて単離され得る。特定の実施形態において、小さい核酸分子を単離するためおよび/またはRNA分子を単離するための方法が、使用され得る。クロマトグラフィーは、タンパク質または他の核酸から核酸を分離するためまたは単離するために使用されるプロセスである。そのような方法は、ゲルマトリックスを用いる電気泳動、フィルターカラム、アルコール沈殿および/または他のクロマトグラフィーを含み得る。細胞からの核酸が、使用されるかまたは評価される場合、方法は、一般に、特定のRNA集団を単離するためのプロセスを実行する前に、細胞をカオトロピック(例えば、グアニジニウムイソチオシアネート)および/または界面活性剤(例えば、N-ラウロイルサルコシン)で溶解することを含む。

20

【0211】

方法は、核酸を単離するための有機溶媒および/またはアルコールの使用を含み得る。いくつかの実施形態において、細胞溶解産物に加えられるアルコールの量は、約55%~60%というアルコール濃度に達する。種々のアルコールを使用できるが、エタノールがうまく機能する。固体支持体は、任意の構造であってよく、それには、電気陰性基を有する無機物またはポリマー支持体を含み得る、ビーズ、フィルターおよびカラムが含まれる。ガラス繊維のフィルターまたはカラムは、そのような単離手順にとって有効である。

30

【0212】

核酸単離プロセスは、時折、a) サンプル中の細胞を、グアニジニウムを含む溶解液で溶解すること(ここで、少なくとも約1Mグアニジニウムの濃度を有する溶解産物が生成される); b) その溶解産物から核酸分子を、フェノールを含む抽出液を用いて抽出すること; c) その溶解産物にアルコール溶液を加えることにより、溶解産物/アルコール混合物を形成すること(ここで、その混合物中のアルコールの濃度は、約35%~約70%である); d) その溶解産物/アルコール混合物を固体支持体に適用すること; e) イオン性溶液を用いてその固体支持体から核酸分子を溶出すること; および f) その核酸分子を捕捉することを含み得る。サンプルは、乾燥され得、その後の操作にとって適切な液体および体積で再懸濁され得る。

40

【0213】

本明細書で提供されるのは、本出願のポリヌクレオチドを含む核酸を含む組成物またはキットである。従って、組成物またはキットは、例えば、上記第1のおよび第2のキメラポリペプチドをコードする上記第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドの両方を含み得る。上記核酸は、1個より多くの核酸種を含み得、すなわち、例えば、上記

50

第1の核酸種は、上記第1のポリヌクレオチドを含み、上記第2の核酸種は、上記第2のポリヌクレオチドを含む。他の例では、上記核酸は、上記第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドの両方を含み得る。上記キットは、さらに、上記第1のもしくは第2のリガンド、または両方を含み得る。

【0214】

(遺伝子移入の方法)

細胞内での導入遺伝子発現の効果を媒介するために、発現構築物を細胞に移行させる必要があり得る。そのような移行は、ウイルスによる遺伝子移入方法またはウイルスによらない遺伝子移入方法を使用し得る。この項では、遺伝子移入の方法および組成物の考察が提供される。

10

【0215】

発現ベクターを含む形質転換された細胞は、その細胞に発現ベクターを導入することによって作製される。本方法とともに使用するための細胞小器官、細胞、組織または生物の形質転換のためのポリヌクレオチド送達に適した方法は、ポリヌクレオチド（例えば、DNA）を細胞小器官、細胞、組織または生物に導入し得る実質的に任意の方法を含む。

【0216】

宿主細胞は、ベクターに対するレシピエントとして使用され得るし、使用されてきた。宿主細胞は、所望の結果が、ベクターの複製であるかまたはベクターによってコードされるポリヌクレオチド配列の一部もしくは全部の発現であるかに応じて、原核生物または真核生物に由来し得る。数多くの細胞株および細胞培養物が、宿主細胞として使用するために利用可能であり、それらは、生存している培養物および遺伝物質に対する保管所としての機能を果たす組織であるAmerican Type Culture Collection (ATCC)を通じて入手することができる。

20

【0217】

適切な宿主は、決定され得る。一般に、これは、ベクターの骨格および所望の結果に基づく。例えば、プラスミドまたはコスミドは、多くのベクターの複製のために、原核生物宿主細胞に導入され得る。ベクターの複製および／または発現のための宿主細胞として使用される細菌細胞としては、DH5アルファ、JM109およびKC8、ならびにいくつかの商業的に入手可能な細菌宿主（例えば、SURE（登録商標）Competent CellsおよびSOLOPACK Gold Cells（STRATAGENE（登録商標）、La Jolla, CA））が挙げられる。あるいは、大腸菌LE392などの細菌細胞が、ファージウイルスに対する宿主細胞として使用され得る。宿主細胞として使用され得る真核細胞としては、酵母、昆虫および哺乳動物が挙げられるが、これらに限定されない。ベクターの複製および／または発現のための哺乳動物真核生物宿主細胞の例としては、HeLa、NIH3T3、Jurkat、293、COS、CHO、SaosおよびPC12が挙げられるが、これらに限定されない。酵母株の例としては、YPH499、YPH500およびYPH501が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0218】

核酸ワクチンは、例えば、非ウイルスDNAベクター、「裸の」DNAおよびRNA、ならびにウイルスベクターを含み得る。細胞をこれらのワクチンで形質転換する方法およびこれらのワクチンに含まれる遺伝子の発現を最適化するための方法は公知であり、それらの方法も本明細書中で論じられる。

40

【0219】

(核酸またはウイルスベクターを移入する方法の例)

細胞をトランスフェクトするためもしくは形質転換するため、または本方法のヌクレオチド配列もしくは組成物を投与するために、任意の適切な方法が使用され得る。ある特定の例が、本明細書中に提示され、それらの例としてはさらに、カチオン性ポリマー、脂質様分子およびある特定の市販品、例えば、IN-VIVO-JET PEIなどを使用した送達などの方法が挙げられる。

【0220】

50

(1. エキソビボ形質転換)

生物から取り出された血管細胞および血管組織をエキソビボの環境においてトランスフェクトするために、様々な方法が利用可能である。例えば、イヌ内皮細胞は、インビトロにおけるレトロウイルス遺伝子移入によって遺伝的に変更され、イヌに移植された (Wilsonら、Science, 244:1344-1346, 1989)。別の例では、ユカタンミニブタ内皮細胞を、インビトロにおいてレトロウイルスでトランスフェクトし、ダブルバルーンカテーテルを使用して動脈に移植した (Nabelら、Science, 244(4910):1342-1344, 1989)。したがって、細胞または組織が、取り出され、本明細書中に提示されるポリヌクレオチドを使用してエキソビボにおいてトランスフェクトされ得ることが企図される。特定の態様において、移植された細胞または組織は、生物の中に配置され得る。

10

【0221】

(2. 注射)

ある特定の実施形態において、抗原提示細胞または核酸ベクターもしくはウイルスベクターは、1つ以上の注射（すなわち、針による注射）、例えば、例えば、皮下、皮内、筋肉内、静脈内、前立腺内 (intraprostatic)、腫瘍内、腹腔内などを介して、細胞小器官、細胞、組織または生物に送達され得る。注射の方法としては、例えば、食塩水溶液を含む組成物の注射が挙げられる。さらなる実施形態は、直接マイクロインジェクションによるポリヌクレオチドの導入を含む。使用される発現ベクターの量は、抗原の性質、ならびに使用される細胞小器官、細胞、組織または生物に応じて変動し得る。

20

【0222】

皮内注射、結節内注射またはリンパ管内注射は、DC投与のより一般的に使用される方法の一部である。皮内注射は、血流への吸収が低速度であるがリンパ系への取り込みが迅速であることを特徴とする。真皮に多数のランゲルハンス樹状細胞が存在することにより、インタクトな抗原ならびにプロセッシングされた抗原が流入領域リンパ節に輸送され得る。これを正しく行うためには、適切な部位の準備が必要である（すなわち、適切な針の留置を観察するために、毛を刈り込む）。結節内注射は、リンパ系組織への抗原の直接的な送達を可能にする。リンパ管内注射は、DCの直接投与を可能にする。

【0223】

(3. エレクトロポレーション)

ある特定の実施形態において、ポリヌクレオチドは、エレクトロポレーションを介して細胞小器官、細胞、組織または生物に導入される。エレクトロポレーションは、細胞およびDNAの懸濁液を高圧放電に曝露することを含む。この方法のいくつかの変法では、ある特定の細胞壁分解酵素（例えば、ペクチン分解酵素）を使用して、標的レシピエント細胞を、未処理の細胞よりもエレクトロポレーションによる形質転換に対してより感受性にする（参照により本明細書中に援用される米国特許第5,384,253号）。

30

【0224】

エレクトロポレーションを使用した真核細胞のトランスフェクションは、かなり成功している。この様式で、マウスプレBリンパ球がヒトカップ免疫グロブリン遺伝子でトランスフェクトされ (Potterら (1984) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 81, 7161-7165)、ラット肝細胞がクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子でトランスフェクトされた (Tur-Kaspaら (1986) Mol. Cell Biol., 6, 716-718)。

40

【0225】

インビボにおけるワクチン用エレクトロポレーション (electroporation for vaccines)、すなわちeVacは、単純な注射法を介して臨床で実行されている。ポリペプチドをコードするDNAベクターが、患者の皮内に注射される。次いで、電極によって皮内の空間に電氣的パルスが適用されることにより、そこに局在化している細胞、特に、常在の皮膚樹状細胞が、DNAベクターを取り込み、コードされるポリペプチドを発現するようになる。次いで、局所炎症によって活性化された、これらの

50

ポリペプチドを発現している細胞が、例えば、リンパ節に遊走し、抗原を提示し得る。核酸が、エレクトロポレーションによって細胞に送達され得る場合、その核酸は、例えば、限定されないが、核酸の注射または他の任意の投与手段の後で、エレクトロポレーションを使用して投与されるとき、電気穿孔的に (electroporetically) 投与される。

【0226】

エレクトロポレーションの方法は、例えば、Sardesai, N. Y., and Weiner, D. B., Current Opinion in Immunotherapy 23:421-9 (2011) および Ferraro, B. ら、Human Vaccines 7:120-127 (2011) (これらの全体が本明細書中で参照により援用される) に論じられている。

10

【0227】

(4. リン酸カルシウム)

他の実施形態では、リン酸カルシウム沈殿を用いて、ポリヌクレオチドが細胞に導入される。この手法を用いて、ヒトKB細胞が、アデノウイルス5 DNAでトランスフェクトされた (Graham and van der Eb, (1973) Virology, 52, 456-467)。また、この様式において、マウスL (A9)、マウスC127、CHO、CV-1、BHK、NIH3T3およびHeLa細胞が、ネオマイシンマーカ遺伝子でトランスフェクトされ (Chen and Okayama, Mol. Cell Biol., 7 (8): 2745-2752, 1987)、ラット肝細胞が、種々のマーカー遺伝子でトランスフェクトされた (Rippeら、Mol. Cell Biol., 10: 689-695, 1990)。

20

【0228】

(5. DEAE-デキストラン)

別の実施形態では、DEAE-デキストランの後にポリエチレングリコールを使用して、ポリヌクレオチドが細胞に送達される。この様式において、レポータープラスミドが、マウス骨髓腫細胞および赤白血病細胞に導入された (Gopal, T. V., Mol Cell Biol. 1985 May; 5 (5): 1188-90)。

【0229】

(6. 音波処理負荷 (Sonication Loading))

さらなる実施形態は、直接音波負荷 (direct sonic loading) によるポリヌクレオチドの導入を含む。LTK線維芽細胞が、音波処理負荷によってチミンキナーゼ遺伝子でトランスフェクトされた (Fechheimerら (1987) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 84, 8463-8467)。

30

【0230】

(7. リポソーム媒介性トランスフェクション)

さらなる実施形態において、ポリヌクレオチドは、脂質複合体、例えば、リポソームなどの中に閉じ込められ得る。リポソームは、リン脂質二重層膜および内側の水性媒質を特徴とする小胞構造である。多重膜リポソームは、水性媒質によって隔てられた複数の脂質層を有する。それらは、リン脂質が過剰量の水溶液に懸濁されると、自発的に形成する。それらの脂質成分は、自己再配列を起こした後、閉鎖構造を形成し、水および溶解した溶質を脂質二重層の間に閉じ込める (Ghosh and Bachhawat, (1991) In: Liver Diseases, Targeted Diagnosis and Therapy Using Specific Receptors and Ligands. pp. 87-104)。Lipofectamine (Gibco BRL) または Superfect (Qiagen) と複合体化されたポリヌクレオチドも企図される。

40

【0231】

(8. レセプター媒介性トランスフェクション)

なおもさらに、ポリヌクレオチドは、レセプター媒介性送達ビヒクルを介して標的細胞

50

に送達され得る。これらは、標的細胞において生じているレセプター媒介性エンドサイトーシスによる高分子の選択的取り込みを利用する。様々なレセプターの細胞型特異的分布に照らして、この送達方法は、別の特異性の程度を付加する。

【0232】

ある特定のレセプター媒介性遺伝子標的化ビヒクルは、細胞レセプター特異的リガンドおよびポリヌクレオチド結合剤を含む。他のものは、送達されるべきポリヌクレオチドに作動可能に付着された細胞レセプター特異的リガンドを含む。いくつかのリガンドは、レセプター媒介性遺伝子移入のために使用され（Wu and Wu, (1987) J. Biol. Chem., 262, 4429-4432; Wagnerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87(9):3410-3414, 1990; Peralesら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:4086-4090, 1994; Myers, EPO 0273085）、これにより、この手法の実施可能性が確立される。別の哺乳動物細胞型における特異的送達も論じられている（Wu and Wu, Adv. Drug Delivery Rev., 12:159-167, 1993; 参照により本明細書中に援用される）。ある特定の態様では、標的細胞の集団上に特異的に発現されるレセプターに対応するリガンドが、選択される。

【0233】

他の実施形態において、細胞特異的ポリヌクレオチド標的化ビヒクルのポリヌクレオチド送達ビヒクル成分は、リポソームとともに特異的結合リガンドを含み得る。送達されるべきポリヌクレオチド（複数可）は、そのリポソーム内に収容され、特異的結合リガンドは、リポソーム膜に機能的に組み込まれる。このようにして、そのリポソームは、標的細胞のレセプター（複数可）に特異的に結合し、細胞にその内容物を送達し得る。そのようなシステムは、例えば、上皮成長因子（EGF）が、EGFレセプターのアップレギュレーションを示す細胞へのポリヌクレオチドのレセプター媒介性送達において使用されるシステムを使用して機能的であると示された。

【0234】

なおもさらなる実施形態において、標的化された送達ビヒクルのポリヌクレオチド送達ビヒクル成分は、リポソーム自体であり得、そのリポソームは、例えば、細胞特異的結合を指示する1つ以上の脂質または糖タンパク質を含み得る。例えば、ガラクトース末端のアシアロガングリオシドであるラクトシルセラミドが、リポソームに組み込まれ、肝細胞によるインスリン遺伝子の取り込みの増加が観察された（Nicolaouら（1987）Methods Enzymol., 149, 157-176）。組織特異的な形質転換構築物が、類似の様式で標的細胞に特異的に送達され得ることが企図される。

【0235】

（微粒子銃（microparticle bombardment））

微粒子銃法は、ポリヌクレオチドを少なくとも1つの細胞小器官、細胞、組織または生物に導入するために使用され得る（米国特許第5,550,318号；米国特許第5,538,880号；米国特許第5,610,042号；およびPCT出願WO94/09699；これらの各々は、参照により本明細書中に援用される）。この方法は、DNAでコーティングされた微小発射体が高速度に加速して、それらが細胞膜を貫通し、細胞を殺滅せず、それらの細胞に入ることを可能にする能力に依存する（Kleinら（1987）Nature, 327, 70-73）。当該分野で公知の多種多様の微粒子銃法が存在し、それらの多くは、本方法に適用可能である。

【0236】

この微粒子銃では、1つ以上の粒子が、少なくとも1つのポリヌクレオチドでコーティングされ、推進力によって細胞に送達され得る。小粒子を加速するためのいくつかのデバイスが、開発された。1つのそのようなデバイスは、電流を発生させ、その後その電流が輸送力を提供する高圧放電に依存する（Yangら（1990）Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 9568-9572）。使用される微小発射体は、生物学的に不活性な物質（例えば、タングステンまたは金の粒子またはビーズ）からなった

。例示的な粒子としては、タングステン、白金、およびある特定の例では、金から構成された粒子（例えば、ナノ粒子を含む）が挙げられる。場合によっては、金属粒子上へのDNA沈殿が、微粒子銃を使用したレシピエント細胞へのDNA送達に必要なとしないことが企図される。しかしながら、粒子は、DNAでコーティングされるのではなく、DNAを含み得ることが企図される。DNAでコーティングされた粒子は、粒子銃を介したDNA送達のレベルを上昇させ得るが、本質的に必要ない。

【0237】

（ウイルスベクター媒介性移入方法の例）

被験体内の単数または複数の細胞がヌクレオチド配列によってコードされる遺伝子を発現し得るようにそのヌクレオチド配列またはそのヌクレオチド配列を含む組成物をその細胞またはその被験体に投与するのに適した任意のウイルスベクターが、本方法において使用され得る。ある特定の実施形態において、導入遺伝子は、細胞への遺伝子移入を媒介するウイルス粒子に組み込まれる。代表的には、そのウイルスは、単純に、適切な宿主細胞に生理学的条件下で曝露されることにより、ウイルスの取り込みが可能になり得る。本方法は、下記で論じられるように、種々のウイルスベクターを使用して都合よく使用される。

10

【0238】

（1. アデノウイルス）

アデノウイルスは、その中程度のサイズのDNAゲノム、操作の容易性、高力価、広範囲な標的細胞および高感染力を理由に、遺伝子トランスファーベクターとして使用するのに特に適している。およそ36 kbのウイルスゲノムは、ウイルスDNAの複製およびパッケージングに必要なシス作用性エレメントを含む100～200塩基対（bp）の末端逆位配列（ITR）が境を接している。異なる転写単位を含む、ゲノムの初期（E）領域および後期（L）領域は、ウイルスDNA複製の開始によって分割される。

20

【0239】

E1領域（E1AおよびE1B）は、ウイルスゲノムおよびいくつかの細胞遺伝子の転写の制御に関与するタンパク質をコードする。E2領域（E2AおよびE2B）の発現により、ウイルスDNA複製のためのタンパク質が合成される。これらのタンパク質は、DNAの複製、後期遺伝子の発現および宿主細胞の切り離しに関与する（Renan, M. J. (1990) *Radiother Oncol.*, 19, 197-218）。ウイルスキャプシドタンパク質の大部分を含む後期遺伝子（L1、L2、L3、L4およびL5）の産物は、主要後期プロモーター（MLP）によってもたらされる単一の一次転写産物の有意なプロセッシングの後だけに、発現される。MLP（16.8マップ単位に位置する）は、感染の後期において特に有効であり、このプロモーターからもたらされたすべてのmRNAは、それらを翻訳にとって有用にする5'トリパータイトリーダー（tripartite leader）（TL）配列を有する。

30

【0240】

アデノウイルスが遺伝子治療に対して最適化されるために、大きなDNAセグメントを含むことができるように運搬能を最大にする必要がある。ある特定のアデノウイルス産物に関連する毒性および免疫学的反応を減少させることも非常に望ましい。これらの2つの目標は、アデノウイルス遺伝子の除去が両方の目的にかなうという点で、ある程度重なっている。本方法の実施によって、治療的な構築物を比較的容易にマニピュレートする能力を保持しつつ、これらの両方の目標を達成することができる。

40

【0241】

ウイルスDNAの複製に必要とされるシスエレメントがすべて、直鎖状のウイルスゲノムのいずれかの末端の末端逆位反復配列（ITR）（100～200 bp）に局在化するので、DNAの大きな置き換えが可能である。ITRを含むプラスミドは、非欠陥アデノウイルスの存在下において複製し得る（Hay, R. T. ら、*J Mol Biol.* 1984 Jun 5; 175 (4): 493-510）。ゆえに、これらのエレメントをアデノウイルスベクターに含めることにより、複製が可能になり得る。

50

【0242】

さらに、ウイルス封入のためのパッケージングシグナルは、ウイルスゲノムの左端の194～385bp(0.5～1.1マップ単位)に局在する(Hearingら、J. (1987) Virol., 67, 2555-2558)。このシグナルは、左端に近いが付着末端配列の外側の特異的配列が、頭部構造へのDNAの挿入に必要とされるタンパク質への結合を媒介する、バクテリオファージラムダDNAにおけるタンパク質認識部位を模倣している。AdのE1置換ベクターは、ウイルスゲノムの左端の450bp(0～1.25マップ単位)フラグメントが293細胞においてパッケージングを指示し得ることを実証した(Levreroら、Gene, 101:195-202, 1991)。

【0243】

以前に、アデノウイルスゲノムのある特定の領域が、哺乳動物細胞のゲノムに組み込まれ得、それにより、コードされている遺伝子が発現され得ることが示された。これらの細胞株は、その細胞株によってコードされる、アデノウイルス機能を欠いたアデノウイルスベクターの複製を支持することができる。「補助」ベクター、例えば、野生型ウイルスまたは条件欠陥性変異体による複製欠損性アデノウイルスベクターの補完の報告も存在する。

【0244】

複製欠損性アデノウイルスベクターは、ヘルパーウイルスによってトランスで補完され得る。しかしながら、複製機能を提供するのに必要なヘルパーウイルスが存在するせいで、いずれの調製物も汚染され得るので、この知見だけでは、複製欠損性ベクターの単離が可能にならない。したがって、複製欠損性ベクターの複製および／またはパッケージングに特異性を付加し得るさらなるエレメントが必要だった。そのエレメントは、アデノウイルスのパッケージング機能に由来する。

【0245】

アデノウイルスに対するパッケージングシグナルは、従来のアデノウイルスマップの左端に存在することが示されている(Tibbetsら(1977) Cell, 12, 243-249)。後の研究から、ゲノムのE1A(194～358bp)領域に欠失を有する変異体が、初期(E1A)機能を補完した細胞株においてさえ不十分にしか成長しないことが示された(Hearing and Shenk, (1983) J. Mol. Biol. 167, 809-822)。代償的な(compensating)アデノウイルスDNA(0～353bp)が、その変異体の右端に組み換えられたとき、そのウイルスは、正常にパッケージングされた。さらなる変異解析から、Ad5ゲノムの左端に、短い反復性の位置依存性エレメントが同定された。その反復は、ゲノムのいずれかの末端に存在する場合、効率的なパッケージングには1コピーで十分であるが、Ad5 DNA分子の内側に向かって移動した場合は、そうではないことが見出された(Hearingら、J. (1987) Virol., 67, 2555-2558)。

【0246】

パッケージングシグナルの変異バージョンを使用することによって、様々な効率でパッケージングされるヘルパーウイルスを作製することが可能である。代表的には、変異は、点変異または欠失である。パッケージングが低効率であるヘルパーウイルスをヘルパー細胞内で生育させるとき、そのウイルスは、野生型ウイルスと比べて低い速度であったとしてもパッケージングされ、それにより、ヘルパーの繁殖が可能となる。しかしながら、これらのヘルパーウイルスを、野生型パッケージングシグナルを含むウイルスとともに細胞内で生育させるとき、その野生型パッケージングシグナルは、変異バージョンよりも優先的に認識される。パッケージング因子の量が限られていることを考慮すると、野生型シグナルを含むウイルスは、ヘルパーと比べて選択的にパッケージングされる。優先性が十分大きい場合、均質に近い系統(stock)が達成され得る。

【0247】

特定の組織または種に対するADV構築物の向性を改善するために、レセプター結合ファイバー配列は、しばしばアデノウイルス分離株の間で置換され得る。例えば、アデノウ

10

20

30

40

50

イルス5において見出されたコクサッキーアデノウイルスレセプター（CAR）リガンドは、アデノウイルス35由来のCD46結合ファイバー配列の代わりに用いられ、ヒト造血細胞に対する結合親和性が大幅に改善されたウイルスが作製され得る。得られた「シェードタイプ化された」ウイルスであるAd5f35は、いくつかの臨床的に開発されたウイルス分離株の基礎となった。さらに、標的細胞に対してウイルスを再標的化することを可能にするファイバーを改変する様々な生化学的方法が存在する。方法は、二機能性抗体（一方の末端はCARリガンドに結合し、もう一方の末端は標的配列に結合する）の使用、およびカスタマイズされたアビジンベースのキメラリガンドとの会合を可能にするファイバーの代謝性のビオチン化を含む。あるいは、リガンド（例えば、抗CD205）をヘテロ二機能性リンカー（例えば、PEG含有）によってアデノウイルス粒子に付着することができる。

10

【0248】

（2. レトロウイルス）

レトロウイルスは、そのRNAを逆転写のプロセスによって感染細胞において二本鎖DNAに変換する能力を特徴とする一本鎖RNAウイルスの群である（Coffin, (1990) In: Virology, ed., New York: Raven Press, pp. 1437-1500）。次いで、得られたDNAは、プロウイルスとして細胞染色体内に安定に組み込み、ウイルスタンパク質の合成を指示する。その組み込みにより、レシピエント細胞およびその子孫においてウイルス遺伝子配列が保持される。レトロウイルスゲノムは、3つの遺伝子、それぞれキャプシドタンパク質、ポリメラーゼ酵素およびエンベロープ成分をコードするgag、polおよびenvを含む。psiと呼ばれる、gag遺伝子から上流に見られる配列は、ゲノムをビリオンにパッケージングするためのシグナルとして機能する。2つの長い末端反復（LTR）配列が、ウイルスゲノムの5'および3'末端に存在する。これらは、強力なプロモーター配列およびエンハンサー配列を含み、宿主細胞ゲノムへの組み込みにも必要である（Coffin, 1990）。したがって、例えば、本技術は、例えば、細胞を形質導入するために使用されるポリヌクレオチドがその細胞のゲノムに組み込まれた細胞を含む。

20

【0249】

レトロウイルスベクターを構築するために、プロモーターをコードする核酸を、ウイルスゲノム内のある特定のウイルス配列の位置に挿入することにより、複製欠損であるウイルスが作製される。ビリオンを生成するために、gag、polおよびenv遺伝子を含むがLTRおよびpsi成分を含まないパッケージング細胞株を構築する（Mannら（1983）Cell, 33, 153-159）。レトロウイルスのLTR配列およびpsi配列とともにヒトcDNAを含む組換えプラスミドをこの細胞株に導入するとき（例えば、リン酸カルシウム沈殿によって）、そのpsi配列は、その組換えプラスミドのRNA転写産物をウイルス粒子内にパッケージングさせ、次いでそれを培養培地中に分泌させる（Nicolas, J. F., and Rubenstein, J. L. R., (1988) In: Vectors: a Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, Rodriguez and Denhardt, Eds.）。Nicolas and Rubenstein; Teminら（1986）In: Gene Transfer, Kucherlapati (ed.), New York: Plenum Press, pp. 149-188; Mannら, 1983）。組換えレトロウイルスを含む培地を捕集し、必要に応じて濃縮し、遺伝子移入のために使用する。レトロウイルスベクターは、幅広い種類の細胞型に感染することができる。しかしながら、多くのタイプのレトロウイルスの組み込みおよび安定な発現は、宿主細胞の分裂を必要とする（Paskindら（1975）Virology, 67, 242-248）。

30

40

【0250】

レトロウイルスベクターの特異的標的化を可能にするようにデザインされたアプローチは、ウイルスエンベロープへのガラクトース残基の化学的付加によるレトロウイルスの化

50

学修飾に基づいて最近開発された。アシアロ糖タンパク質レセプターを介した肝細胞などの細胞の特異的感染を可能にし得るこの修飾が望まれる場合がある。

【0251】

組換えレトロウイルスの標的化に対する異なるアプローチがデザインされており、そのアプローチは、レトロウイルスエンベロープタンパク質に対するビオチン化抗体および特異的な細胞レセプターに対するビオチン化抗体を使用した。それらの抗体は、ストレプトアビジンを使用することによってビオチン成分を介して結合された (Rouxら (1989) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 86, 9079-9083)。主要組織適合遺伝子複合体クラス I およびクラス II 抗原に対する抗体を使用して、それらの表面抗原を有する種々のヒト細胞がインビトロにおいてエクトロピックウイルスに感染することが実証された (Rouxら、1989)。

10

【0252】

(3. アデノ随伴ウイルス)

AAVは、約4700塩基対の直鎖状の一本鎖DNAを使用する。末端逆位反復配列は、ゲノムに隣接している。2つの遺伝子が、ゲノム内に存在し、いくつかの異なる遺伝子産物を生じる。第1に、cap遺伝子は、VP-1、VP-2およびVP-3と命名された3つの異なるビリオンタンパク質 (VP) を生成する。第2に、rep遺伝子は、4つの非構造タンパク質 (NS) をコードする。これらのrep遺伝子産物の1つ以上は、AAV転写のトランス活性化に関与する。

【0253】

AAVにおける3つのプロモーターは、ゲノム内のそれらの位置によって、マップ単位で命名されている。これらは、左から右へ、p5、p19およびp40である。転写によって、6つの転写産物が生じ、2つは、3つの各プロモーターにおいて開始され、各対の一方がスプライシングされる。マップ単位42~46に由来するスプライス部位は、各転写産物にとって同じである。4つの非構造タンパク質は、より長い転写産物に由来するとみられ、3つのビリオンタンパク質のすべてが、最も小さい転写産物から生じる。

20

【0254】

AAVは、ヒトにおけるいかなる病的状態にも関連しない。興味深いことに、効率的な複製のために、AAVは、単純ヘルペスウイルスIおよびII、サイトメガロウイルス、仮性狂犬病ウイルス、ならびに当然のことながらアデノウイルスなどのウイルスからの「補助」機能を必要とする。それらのヘルパーのうち最も特徴付けられたものは、アデノウイルスであり、このウイルスに対する多くの「初期」機能は、AAVの複製を支援すると示された。AAV構造発現を抑制すると考えられているAAV repタンパク質の低レベルの発現、およびヘルパーウイルス感染は、この阻止を取り消すと考えられている。

30

【0255】

AAVベクターの末端反復配列は、AAVまたは改変されたAAVゲノムを含むp201などのプラスミドの制限エンドヌクレアーゼ消化によって (Samulskiら、J. Virol., 61:3096-3101 (1987)) またはAAVの公開配列に基づく末端反復配列の化学的合成もしくは酵素的合成を含むがこれらに限定されない他の方法によって得ることができる。それは、例えば、機能、すなわち安定した部位特異的な組み込みを可能にするために必要とされるAAV-ITRの最小の配列または一部を、欠失分析によって決定することができる。また、安定した部位特異的な組み込みを指示する末端反復配列の能力を維持しつつ、配列のどの軽微な改変が許容され得るかを決定することもできる。

40

【0256】

AAVベースのベクターは、インビトロにおいて遺伝子送達するための安全で有効なビヒクルであることが証明されており、これらのベクターは、開発されており、エキソビポとインビポの両方における潜在的な遺伝子治療において広範囲に適用するために前臨床段階および臨床段階において試験されている (Carter and Flotte, (1995) Ann. N. Y. Acad. Sci., 770:79-90; Chatteij

50

eer (1995) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 770, 79-90; Ferrarir (1996) *J. Virol.*, 70, 3227-3234; Fisher (1996) *J. Virol.*, 70, 520-532; Flotte, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 90, 10613-10617, (1993); Goodman (1994), *Blood*, 84, 1492-1500; Kaplitt (1994) *Nat'l Genet.*, 8, 148-153; Kaplitt, M. G. (1996) *Ann Thorac Surg.* 1996 Dec; 62 (6): 1669-76; Kessler (1996) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 93, 14082-14087; Koerberl (1997) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 94, 1426-1431; Mizukami (1996) *Virology*, 217, 124-130).

10

【0257】

肺におけるAAV媒介性の効率的な遺伝子移入および遺伝子発現は、嚢胞性線維症の処置のための臨床試験に至っている (Carter and Flotte, 1995; Flotte, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 90, 10613-10617, (1993)). 同様に、骨格筋へのジストロフィン遺伝子のAAV媒介性の遺伝子送達による筋ジストロフィーの処置、脳へのチロシンヒドロキシラーゼ遺伝子送達によるパーキンソン病の処置、肝臓への第IX因子遺伝子送達による血友病Bの処置、および潜在的に、心臓への血管内皮成長因子遺伝子による心筋梗塞の処置の見込みは、これらの器官におけるAAV媒介性の導入遺伝子発現が高度に効率的であると最近示されたので、有望であるとみられる (Fisher (1996) *J. Virol.*, 70, 520-532; Flotte, 1993; Kaplitt, 1994; 1996; Koerberl, 1997; McCown (1996) *Brain Res.*, 713, 99-107; Ping (1996) *Microcirculation*, 3, 225-228; Xiao (1996) *J. Virol.*, 70, 8098-8108).

20

【0258】

(4. 他のウイルスベクター)

他のウイルスベクターも、本発明の方法および組成物において発現構築物として用いられる。ワクシニアウイルス (Ridgeway, (1988) *In: Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*, pp. 467-492; Baichwal and Sugden, (1986) *In: Gene Transfer*, pp. 117-148; Coupar, *Gene*, 68: 1-10, 1988) カナリアポックスウイルスおよびヘルペスウイルスなどのウイルスに由来するベクターが使用される。これらのウイルスは、様々な哺乳動物細胞への遺伝子移入において使用するためのいくつかの特徴を提供する。

30

【0259】

いったん、構築物が細胞内に送達されたら、導入遺伝子をコードする核酸は、種々の部位に位置づけられ、発現される。ある実施形態において、導入遺伝子をコードする核酸は、細胞のゲノムに安定に組み込まれる。この組み込みは、相同組換えを介して同種の (cognate) 位置および向きである (遺伝子置換) かまたはランダムで非特異的な位置に組み込まれる (遺伝子増強)。なおもさらなる実施形態において、核酸は、DNAの別個のエピソームセグメントとして細胞において安定に維持される。そのような核酸セグメントまたは「エピソーム」は、宿主細胞周期と無関係のまたはそれと同期した維持および複製を可能にするのに十分な配列をコードする。発現構築物がどのように細胞に送達され、その核酸が細胞のどこにとどまるかは、使用される発現構築物のタイプに依存する。

40

【0260】

(疾患を処置するための方法)

本方法は、疾患を処置するかまたは予防する方法も包含し、ここで、例えば注入による細胞の投与が、有益であり得る。

【0261】

50

細胞、例えば、T細胞、腫瘍浸潤リンパ球、ナチュラルキラー細胞、ナチュラルキラーT細胞、または前駆体細胞など、例えば、造血幹細胞、間葉系ストローマ細胞、幹細胞、多能性幹細胞および胚性幹細胞などが、細胞治療のために使用され得る。それらの細胞は、ドナーに由来し得るか、または患者から得られた細胞であり得る。それらの細胞は、例えば、病的な細胞の機能を置き換えるための、例えば、再生において使用され得る。それらの細胞は、生物学的作用物質が、特定の微小環境、例えば、病的な骨髄または転移性の沈着物 (metastatic deposit) などに送達され得るように、異種遺伝子を発現するようにも改変され得る。間葉系ストローマ細胞は、例えば、免疫抑制活性を提供するためにも使用されており、移植片対宿主病および自己免疫障害の処置において使用され得る。本願において提供される細胞は、細胞治療後に治療用細胞の活性が増加されるか、または減少される必要がある状況において価値のあるものであり得る安全スイッチを含む。例えば、キメラ抗原レセプターを発現するT細胞が患者に提供される場合、場合によっては、またはオフターゲット毒性などの有害事象が存在し得る。リガンドの投与を終了すると、治療用T細胞は非活性化状態に戻り、無毒性の低い発現レベルで残存し得る。または、例えば、その治療用細胞は、腫瘍細胞または腫瘍サイズを減少させるように働き得、もはや必要とされなくなることがある。この状況では、リガンドの投与は、終了してもよく、治療用細胞は、もはや活性化されない。最初の治療後に腫瘍細胞が再発する (return) かまたは腫瘍サイズが増加する場合、キメラ抗原レセプターを発現しているT細胞を活性化させ、患者を再処置するために、リガンドが再度投与され得る。

【0262】

「治療用細胞」とは、細胞治療のために使用される細胞、すなわち、状態または疾患を処置するためまたは予防するために被験体に投与される細胞のことを意味する。上記細胞が負の効果を有するこのような場合、本方法は、選択的アポトーシスを介して上記治療用細胞を除去するために使用され得る。

【0263】

他の例では、T細胞は、種々の疾患および状態を処置するために、ならびに幹細胞移植の一部として使用される。ハプロタイプ一致T細胞移植後に起こり得る有害事象は、移植片対宿主病 (GVHD) である。GVHDが起こる可能性は、移植されるT細胞の数が増大するとともに増大する。これは、注入され得るT細胞の数を制限する。患者におけるGVHDの事象において、その注入されたT細胞を選択的に除去する能力を有することによって、より多数のT細胞が注入され得、その数を 10^6 より多い、 10^7 より多い、 10^8 より多い、または 10^9 より多い細胞へと、増大させ得る。投与され得る 1 kg 体重あたりのT細胞の数は、例えば、約 1×10^4 T細胞/ kg 体重～約 9×10^7 T細胞/ kg 体重、例えば、約 1×10^4 、 2×10^4 、 3×10^4 、 4×10^4 、 5×10^4 、 6×10^4 、 7×10^4 、 8×10^4 、もしくは 9×10^4 ；約 1×10^5 、 2×10^5 、 3×10^5 、 4×10^5 、 5×10^5 、 6×10^5 、 7×10^5 、 8×10^5 、もしくは 9×10^5 ；約 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、もしくは 9×10^6 ；または約 1×10^7 、 2×10^7 、 3×10^7 、 4×10^7 、 5×10^7 、 6×10^7 、 7×10^7 、 8×10^7 、もしくは 9×10^7 T細胞/ kg 体重であり得る。他の例では、T細胞以外の治療用細胞が使用され得る。投与され得る 1 kg 体重あたりの治療用細胞の数は、例えば、約 1×10^4 T細胞/ kg 体重～約 9×10^7 T細胞/ kg 体重、例えば、約 1×10^4 、 2×10^4 、 3×10^4 、 4×10^4 、 5×10^4 、 6×10^4 、 7×10^4 、 8×10^4 、もしくは 9×10^4 ；約 1×10^5 、 2×10^5 、 3×10^5 、 4×10^5 、 5×10^5 、 6×10^5 、 7×10^5 、 8×10^5 、もしくは 9×10^5 ；約 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、もしくは 9×10^6 ；または約 1×10^7 、 2×10^7 、 3×10^7 、 4×10^7 、 5×10^7 、 6×10^7 、 7×10^7 、 8×10^7 、もしくは 9×10^7 治療用細胞/ kg 体重であり得る。

【0264】

用語「単位用量」は、それが接種材料に関するとき、哺乳動物に対する単位投与量として好適な物理的に分離した単位のことを指し、各単位は、必要とされる希釈剤と共同して、所望の免疫原性効果をもたらすと計算された所定の量の薬学的組成物を含む。接種材料の単位用量についての規格 (specification) は、薬学的組成物のユニークな特色および達成されるべき特定の免疫学的効果によって規定され、その特色に依存する。

【0265】

本明細書で示される多量体リガンドなどの薬学的組成物の有効量は、カスパーゼー9ベクターを含む細胞を選択的に除去するというこの選択された結果を達成する量である。その結果、カスパーゼー9発現細胞のうちの60%超、70%超、80%超、85%超、90%超、95%超、または97%超が殺滅される。用語は、「十分な量」とも同義である。

10

【0266】

任意の特定の用途に対する有効量は、処置されている疾患もしくは状態、投与される特定の組成物、被験体のサイズおよび／または疾患もしくは状態の重症度などの因子に応じて変動し得る。本明細書中に提示される特定の組成物の有効量は、過度の実験を必要とせずに、経験的に決定され得る。

【0267】

用語「接触される」および「曝露される」は、細胞、組織または生物に適用されるとき、薬学的組成物および／もしくは別の作用物質、例えば、化学療法剤または放射線治療薬などが標的細胞、組織もしくは生物に送達されるプロセスを論ずるために本明細書中で使用されるか、または標的細胞、組織もしくは生物のすぐ近位に配置されるプロセスを考察するために本明細書中で使用される。細胞の殺滅または静止を達成するために、薬学的組成物および／またはさらなる作用物質 (複数可) が、細胞 (複数可) を殺滅するのに有効または細胞の分裂を防ぐのに有効な合計量で1つ以上の細胞に送達される。

20

【0268】

薬学的組成物の投与は、数分から数週間の範囲の間隔だけ、他の作用物質 (複数可) より先に行われ得る、他の作用物質 (複数可) と並行して (co-current) であり得る、および／または他の作用物質 (複数可) の後に行われ得る。薬学的組成物および他の作用物質 (複数可) が別々に細胞、組織または生物に適用される実施形態では、その薬学的組成物および作用物質 (複数可) がなおも、都合よく組み合わせられた効果をその細胞、組織または生物に対して発揮することができ得るように、各送達の時点の間に有効時間が満了しないことが通常、保証され得る。例えば、そういった場合には、2、3、4つまたはそれより多くの様式を用いて、細胞、組織または生物を実質的に同時に (すなわち、約1分未満以内に) 薬学的組成物と接触させ得ることが企図される。他の態様において、1つ以上の作用物質が、発現ベクターを投与する前および／または投与した後に、実質的に同時、約1分以内から、約24時間、約7日間、約1～約8週間またはそれより長くまで、およびそれらの中の任意の導き出せる範囲で投与され得る。なおもさらに、本明細書中に提示される薬学的組成物と1つ以上の作用物質との様々な併用レジメンが、使用され得る。

30

【0269】

(最適化されたおよび個別化された治療的処置)

40

二量体の投与後のアポトーシスの誘導は、移植片対宿主病のステージ、または患者の中に残っている望ましくない治療用細胞の数を決定することによって最適化され得る。

【0270】

例えば、患者がGvHDを有すること、およびそのGvHDのステージを決定することは、多量体リガンドを投与することによって、カスパーゼー9関連アポトーシスを誘導することは必要であり得るという臨床医への指示を提供する。別の例では、患者が多量体リガンドでの処置後にGvHDのレベルの低下を有することの決定は、さらなる用量の多量体リガンドが必要とされないことを臨床医に示し得る。同様に、多量体リガンドでの処置後に、上記患者がGvHD症状を示し続けるか、またはGvHDの再発に苦しむことの決定は、多量体リガンドの少なくともさらなる1用量を投与することが必要であり得ること

50

を臨床医に示し得る。用語「投与量」は、投薬量および投与頻度（例えば、次の用量のタイミングなど）の両方を含むことを意味する。

【0271】

他の実施形態において、改変された細胞またはインビボで改変された細胞の数を減少することが必要な事象において、誘導性カスパーゼ9ポリペプチドに加えて、キメラ抗原レセプターを発現する治療用細胞のような治療用細胞の投与後に、多量体リガンドは、上記患者に投与され得る。これら実施形態において、上記方法は、有害な症状または状態（例えば、移植片対宿主病、またはオフターゲット毒性）の有無を決定すること、および上記多量体リガンドのある用量を投与することを包含する。上記方法は、上記症状または状態をモニターすること、および上記症状もしくは状態が持続する事象において、さらなる用量の上記多量体リガンドを投与することをさらに包含し得る。このモニタリングおよび処置スケジュールは、キメラ抗原レセプターまたはキメラシグナル伝達分子を発現する治療用細胞が上記患者の中に残っている間は継続し得る。

10

【0272】

その後の薬物の用量、例えば、例えば、その後の多量体リガンドの用量、および／またはその後の薬物投与量を調整するまたは維持する指示は、任意の好都合な様式で提供され得る。指示は、いくつかの実施形態において、表形式で（例えば、物理的媒体または電子媒体において）提供され得る。例えば、観察される移植片対宿主病の症状が、表として提供され得、臨床医は、疾患のステージのリストまたは表とその症状を比較し得る。次いで、その臨床医は、その表から、その後の薬物用量に対する指示を確認し得る。ある特定の実施形態において、指示は、それらの症状またはGvHDステージがコンピュータに提供された後（例えば、コンピュータ上のメモリに入れられた後）、コンピュータによって提示され得る（例えば、表示され得る）。例えば、この情報は、コンピュータに提供され得（例えば、ユーザーによってコンピュータメモリに入れられ得るか、またはコンピュータネットワーク内のリモートデバイスを介してコンピュータに送信され得）、コンピュータ内のソフトウェアが、その後の薬物用量を調整するかもしくは維持することについての指示を生成し得、および／またはその後の薬物用量の量を提供し得る。

20

【0273】

その後の用量が、指示に基づいて決定されたら、臨床医は、決定されたその後の用量を投与し得るか、または別の人もしくは実体に対してその用量を調整する指示を提供し得る。本明細書中で使用される用語「臨床医」は、意思決定者のことを指し、ある特定の実施形態において、臨床医は、医療専門家である。意思決定者は、いくつかの実施形態において、コンピュータまたは表示されたコンピュータプログラムのアウトプットであり得、そのコンピュータによって表示される指示またはその後の薬物用量に基づいて、保健サービス提供者が行動し得る。意思決定者は、その後の用量を直接投与し得る（例えば、その後の用量を被験体に注入し得る）か、または遠隔的に投与し得る（例えば、ポンプパラメータが、意思決定者によって遠隔的に変更され得る）。

30

【0274】

いくつかの例では、上記リガンドの1用量または複数用量は、GvHD、または他の症状（例えば、CRS症状）の臨床的出現が明らかになる前に投与され得る。この例では、細胞治療は、負の症状の出現の前に終了される。例えば、遺伝的疾患の処置のための造血細胞移植などの他の実施形態において、上記治療は、移植片が生着に向かって進行した後であるが、しかし臨床的に観察可能なGvHDまたは他の負の症状が起こり得る前に、終了され得る。他の例では、上記リガンドは、オンターゲット／オフ腫瘍細胞（例えば、B細胞関連標的抗原を共発現する健康なB細胞など）を排除するための、改変された細胞を排除するために投与され得る。

40

【0275】

本明細書で示されるとおりの方法は、限定なしに、活性化された細胞、核酸またはこれをコードする発現構築物の有効量の送達を含む。薬学的組成物の「有効量」は、一般に、検出可能にかつ反復して、述べられる所望の結果を達成するために、例えば、上記疾患ま

50

たはその症候を回復するか、減少するか、最小にするか、またはその程度を制限するために、十分な量として定義される。疾患の排除、根絶または治癒を含む他のより厳密な定義が、適用されることもある。いくつかの実施形態において、処置の有効性を評価するためおよび毒性をコントロールするためにバイオマーカーをモニターすることが存在してもよい。

【0276】

(患者に投与するための製剤および経路)

臨床適用が企図される場合、薬学的組成物(発現構築物、発現ベクター、融合タンパク質、トランスフェクトまたは形質導入された細胞)を、意図される用途にとって適切な形態で調製する必要がある。一般に、これは、発熱物質ならびにヒトまたは動物にとって有害であり得る他の不純物を本質的に含まない組成物を調製することを伴い得る。

10

【0277】

多量体リガンド、例えば、AP1903(INNリミズシド)などは、例えば、約0.1~10mg/kg被験体体重、約0.1~5mg/kg被験体体重、約0.2~4mg/kg被験体体重、約0.3~3mg/kg被験体体重、約0.3~2mg/kg被験体体重または約0.3~1mg/kg被験体体重、例えば、約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、6、7、8、9もしくは10mg/kg被験体体重の用量で送達され得る。いくつかの実施形態において、リガンドは、1用量あたり0.4mg/kg、例えば、5mg/mLの濃度で提供される。リガンドを、例えば、バイアル1本あたり約0.25mL~約10mL、例えば、約0.25、0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5または10mL、例えば、約2mLの体積で含むバイアルまたは他の容器が提供され得る。

20

【0278】

送達ベクターを安定にするためおよび標的細胞による取り込みを可能にするために適切な塩および緩衝剤を使用することが一般に望ましい場合がある。緩衝剤は、組換え細胞が患者に導入されるときにも使用され得る。水性組成物は、薬学的に許容され得るキャリアまたは水性媒質に溶解されたまたは分散された、細胞に対して有効量のベクターを含む。そのような組成物は、接種材料とも称される。薬学的に許容され得るキャリアは、任意およびすべての溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤ならびに吸収遅延剤などを含む。薬学的に活性な物質に対するそのような媒質および作用物質の使用は、公知である。任意の従来の媒質または作用物質が、ベクターまたは細胞と不適合性である場合を除いては、治療的な組成物におけるその使用が企図される。補助的な活性成分もまた、その組成物に組み込まれ得る。

30

【0279】

活性な組成物は、従来の医薬品を含み得る。これらの組成物の投与は、標的組織がその経路を介して利用可能である限り、任意の通常経路を介し得る。これには、例えば、経口、経鼻、頬側、直腸、膣または局所的が含まれる。あるいは、投与は、同所性、皮内、皮下、筋肉内、腹腔内または静脈内注射による投与であり得る。そのような組成物は、通常、本明細書中で論じられる薬学的に許容され得る組成物として投与され得る。

40

【0280】

注射可能な使用に適した薬学的な形態としては、滅菌された水溶液または分散液、および滅菌された注射可能な溶液または分散液の即時調製用の滅菌された粉末が挙げられる。すべての場合において、その形態は、滅菌されており、容易に注射できる程度に流動性である。それは、製造および貯蔵の条件下で安定であり、細菌および真菌などの微生物の汚染作用から保護される。キャリアは、例えば、水、エタノール、ポリオール(例えば、グリセロール、プロピレングリコールおよび液体ポリエチレングリコールなど)、それらの好適な混合物、および植物油を含む溶媒または分散媒であり得る。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングを使用すること、分散液の場合、必要とされる粒径を維

50

持すること、および界面活性物質を使用することによって、維持され得る。微生物の作用の防止は、様々な抗菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサルなどによってもたらされ得る。ある特定の例では、等張剤、例えば、糖または塩化ナトリウムが、含められ得る。注射可能な組成物の持続性の吸収は、吸収を遅延させる作用物質、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを組成物において使用することによってもたらされ得る。

【0281】

経口投与の場合、組成物は、賦形剤とともに組み込まれ得、摂取不可能なうがい薬および歯磨剤の形態で使用され得る。必要とされる量で活性成分をホウ酸ナトリウム溶液（ドーベル液）などの適切な溶媒に組み込んでいるうがい薬が、調製され得る。あるいは、活性成分は、ホウ酸ナトリウム、グリセリンおよび重炭酸カリウムを含む殺菌洗浄液に組み込まれ得る。活性成分は、例えば、ゲル、ペースト、粉末およびスラリーを含む、歯磨剤にも分散され得る。活性成分は、例えば、水、結合剤、研磨剤、香味料、起泡剤および湿潤剤を含み得るペースト歯磨剤に治療有効量で加えられ得る。

【0282】

組成物は、中性または塩の形態で製剤化され得る。薬学的に許容され得る塩としては、例えば、無機酸、例えば、塩酸もしくはリン酸など、または酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸などのような有機酸とともに形成される酸付加塩（タンパク質の遊離アミノ基とともに形成される）が挙げられる。遊離カルボキシル基とともに形成される塩は、無機塩基、例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウムまたは水酸化第二鉄など、およびイソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、プロカインなどのような有機塩基からも得ることができる。

【0283】

製剤化されると、溶液は、投与製剤（dosage formulation）に適合した様式で、および治療的に有効であるような量で、投与され得る。それらの製剤は、種々の剤形（例えば、注射可能な液剤、薬物放出カプセル剤など）で容易に投与される。例えば、水性液剤での非経口投与の場合、その液剤は、必要であれば適切に緩衝され得、最初に、液体希釈剤が、十分な食塩水またはグルコースで等張性にされ得る。これらの特定の水性液剤は、静脈内、筋肉内、皮下および腹腔内投与に特に適している。この文脈では、滅菌された水性媒質が使用され得る。例えば、1投与量が、1mlの等張性NaCl溶液に溶解され得、1000mlの皮下注入液に加えられるか、または提案される注入部位に注射され得る（例えば、“Remington’s Pharmaceutical Sciences” 15th Edition, 1035-1038および1570-1580頁を参照のこと）。処置されている被験体の状態に応じて、投与量のいくつかのバリエーションが必然的に生じる。いずれにしても、投与に関与する者が、個々の被験体に対する適切な用量を決定し得る。さらに、ヒトに投与する場合、調製物は、FDA Office of Biologicsの基準が要求するような、無菌性、発熱性ならびに一般的な安全性および純度の基準を満たし得る。

【0284】

治療は、CAR-T細胞または他の治療用細胞の数を減少させ、CAR-T細胞の活性化レベルを低下させ得る、ラパマイシンもしくはラパログ、またはAP1903を投与することによってモジュレートされ得る。CAR-T細胞治療を中止するために、安全スイッチキメラカスパーゼ9ポリペプチドは、適切なりガンド：AP1903、ラパマイシン、またはラパログを投与することによって活性化され得る。上記りガンドの量および投与スケジュールは、必要とされるCAR-T細胞治療のレベルに基づいて決定され得る。安全スイッチとして、上記りガンドの用量は、投与された改変された細胞のうちの少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、97%、98%、または99%を除去するために有効な量である。他の例では、上記用量は、CAR-T細胞治療のレベルを減少させるが、上記治療を完全には中止しない必要がある場合、上記キメラカスパーゼ9ポリペプチドを発現する細胞のうちの30%、40%、50%、

60%、70%、80%、90、95%、または100%までを除去するために有効な量である。これは、例えば、安全スイッチを誘導する前に、上記リガンドを投与する前に被験体からサンプルを得、そして上記リガンドを投与した後に、投与後例えば、0.5時間、1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、または1日、2日、3日、4日、5日でサンプルを得、そして例えば、利用可能な任意の方法（例えば、マーカーの存在を検出することを含む）によって、上記2個のサンプル間のキメラカスパーゼ発現細胞の数または濃度を比較することによって、測定され得る。

【実施例】

【0285】

以下で示される実施例は、ある種の実施形態を例証し、本技術を限定しない。

【0286】

ドナー細胞を選択的に除去するための機構を、細胞治療のための安全スイッチとして研究してきたが、合併症があった。今日までの安全スイッチ遺伝子でのいくつかの経験は、Tリンパ球におけるものであった。なぜならこれら細胞での免疫療法は、ウイルス感染症および悪性腫瘍の処置として有効であると判明したからである（Walter, E. A. ら, N. Engl. J. Med. 1995, 333:1038-44; Rooney, C. M. ら, Blood. 1998, 92:1549-55; Dudley, M. E. ら, Science 2002, 298:850-54; Marjitt, W. A. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 2003, 100:2742-47）。単純ヘルペスウイルスI由来チミジンキナーゼ（HSVTK）遺伝子を、造血幹細胞移植後の再発性悪性腫瘍およびエプスタインバーウイルス（EBV）リンパ増殖を処置するために、ドナーT細胞注入におけるインビボ自殺スイッチとして使用されてきた（Bonini C ら, Science. 1997, 276:1719-1724; Tiberghien P ら, Blood. 2001, 97:63-72）。しかし、移植片対宿主病を引き起こすT細胞の破壊は不完全であり、HSV-TKを活性化するためのプロドラッグとしてのガンシクロビル（またはアナログ）の使用は、サイトメガロウイルス感染症のための抗ウイルス薬としてのガンシクロビルの投与を排除する。この作用機構はまた、細胞分裂に依拠してDNA合成の干渉を要し、その結果、細胞殺滅は、数日間にわたって長引かされ得、不完全であり得、临床上の利益に長い遅れを生じ得る（Ciceri, F. ら, Lancet Oncol. 2009, 262:1019-24）。さらに、HSV-TK誘導免疫応答は、免疫抑制されたヒト免疫不全ウイルスおよび骨髄移植患者においてすら、HSV-TK形質導入細胞の排除を生じ、持続性、および従ってその注入されたT細胞の有効性を損なった。HSV-TKはまたウイルス由来であり、従って、潜在的に免疫原性である（Bonini C ら, Science. 1997, 276:1719-1724; Riddell SR ら, Nat Med. 1996, 2:216-23）。E coli由来シトシンデアミナーゼ遺伝子はまた、临床上は使用されてきた（Freytag SO ら, Cancer Res. 2002, 62:4968-4976）が、異種抗原としてそれは免疫原性であり得、従って、長期間の持続性を要するT細胞ベースの治療とは不適合であり得る。トランスジェニックヒトCD20は、モノクローナルキメラ抗CD20抗体によって活性化され得、非免疫原性安全システムとして提唱されている（Introna M ら, Hum Gene Ther. 2000, 11:611-620）。

【0287】

以下の節は、カスパーゼ-9キメラタンパク質を使用して、細胞治療のために使用される細胞において安全スイッチを提供するための方法の例を提供する。

【0288】

（実施例1：カスパーゼ-9自殺スイッチ発現ベクターの構築および評価）

（ベクター構築および発現の確認）

10

20

30

40

50

ヒトT細胞において安定してかつ効率的に発現され得る安全スイッチは、本明細書で示される。上記システムは、改変された遺伝子を発現する形質導入されたT細胞の選択的排除を引き起こすことができる小分子二量体化薬物と相互作用するように改変された潜在的に低い免疫原性を有するヒト遺伝子生成物を含む。さらに、上記誘導性カスパーゼ-9は、抗アポトーシス分子を過剰発現するT細胞において機能を維持する。

【0289】

ヒトFK506結合タンパク質(FKBP)(例えば、FKBP12v36などの)に融合された改変されたヒトカスパーゼ-9活性を含む、治療剤としての使用に適した発現ベクターを構築した。このカスパーゼ-9/FK506ハイブリッド活性は、小分子医薬を使用して二量体化され得る。カスパーゼ-9活性の全長、短縮型、および改変されたバージョンを、リガンド結合ドメイン、または多量体化する(multimerizing)領域に融合し、蛍光マーカーGFPの発現も可能にするレトロウイルスベクターMSCV、IRES、GRPへと挿入した。図1Aは、アポトーシスの誘導のための自殺スイッチとして構築および評価される全長、短縮型および改変されたカスパーゼ-9発現ベクターを図示する。

10

【0290】

全長誘導性カスパーゼ-9分子(F'-F-C-Casp9)は、Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Serリンカーで、カスパーゼ分子の小および大サブユニットへと連結される2個、3個、またはこれより多くのFK506結合タンパク質(FKBP(例えば、FKBP12、FKBPバリエーションまたはFKBP12v36))を含む(図1Aを参照のこと)。全長誘導性カスパーゼ-9(F'-F-C-Casp9、I、GFP)は、全長カスパーゼ-9を有し、F36V変異を含む2個の12kDaヒトFK506結合タンパク質(FKBP12; GenBank AH002818)に連結されたカスパーゼリクルートメントドメイン(CARD; GenBank NM001229)をも含む(図1A)。FKBP(F')のうちの1種もしくは複数種のアミノ酸配列は、レトロウイルスにおいて発現される場合、相同組換えを防止するために、コドンゆらぎにした(codon-wobbled)(例えば、各アミノ酸コドンの3番目のヌクレオチドを、本来コードされたアミノ酸を維持するサイレント変異によって変化させた)。F'-F-C-Casp9C3Sは、その活性部位を破壊する287位でのシステインからセリンへの変異を含む。構築物F'-F-Casp9、F-C-Casp9、およびF'-Casp9において、カスパーゼ活性化ドメイン(CARD)、1個のFKBP12、またはその両方のいずれかを、それぞれ欠失させた。全ての構築物を、EcoRI-XhoIフラグメントとしてMSCV、IRES、GFPへとクローニングした。

20

30

【0291】

293T細胞を、これら構築物の各々でトランスフェクトし、形質導入の48時間後、そのマーカー遺伝子GFPの発現を、フローサイトメトリーによって分析した。さらに、トランスフェクションの24時間後、293T細胞を、100nM CIDとともに一晩インキュベートし、その後、アポトーシスマーカーアネキシンVで染色した。4回の別個の実験からの、二量体化の化学的誘導物質(CID)への曝露前および後の導入遺伝子発現レベル(平均GFP)の平均および標準偏差ならびにアポトーシス細胞の数(GFP~細胞内の%アネキシンV)を、図1A中の表の第2列~第5列において示す。GFP発現のレベルおよびアネキシンVに関する染色に加えて、全長、短縮型および改変されたカスパーゼ-9の発現された遺伝子生成物をまた、カスパーゼ-9遺伝子が発現されて、その発現された生成物が予測されたサイズであったことを確認するためにウェスタンブロットによって分析した。ウェスタンブロットの結果を、図1Bに示す。

40

【0292】

トランスフェクトした293T細胞における予測されるサイズの誘導性カスパーゼ-9構築物とマーカー遺伝子GFPとの共発現を、全長および短縮型両方のカスパーゼ分子に存在するアミノ酸残基299~318に特異的なカスパーゼ-9抗体、ならびにGFP特異的抗体を使用して、ウェスタンブロットによって実証した。ウェスタンブロットを、本

50

明細書で示されるとおりに行った。

【0293】

トランスフェクトされた293T細胞を、溶解緩衝液（アプロチニン、ロイペプチン、およびフェニルメチルスルホニルフルオリド（Boehringer, Ingelheim, Germany）を0.5%で含む50% Tris/Gly、10% ドデシル硫酸ナトリウム [SDS]、4% β-メルカプトエタノール、10% グリセロール、12% 水、4% ブロモフェノールブルー）中で再懸濁し、氷上で30分間インキュベートした。30分間遠心分離した後、上清を採取した；Laemmli緩衝液（Bio-Rad, Hercules, CA）と1:2で混合し、煮沸し、10% SDS-ポリアクリルアミドゲルに負荷した。その膜を、ウサギ抗カスパーゼ9（アミノ酸残基299~318）免疫グロブリンG（IgG; Affinity BioReagents, Golden, CO; 1:500希釈）でおよびマウス抗GFP IgG（Covance, Berkeley, CA; 1:25,000希釈）でプローブした。次いで、プロットを、適切なペルオキシダーゼ結合二次抗体に曝し、タンパク質発現を、増強化学発光（ECL; Amersham, Arlington Heights, IL）で検出した。次いで、上記膜を小片にし、ヤギポリクローナル抗アクチン（Santa Cruz Biotechnology; 1:500希釈）で再プローブして、負荷の品質をチェックした。

10

【0294】

さらにより小さなサイズのバンド（図1Bに見られる）は、分解生成物を表すようである。F'F-Casp9およびF'F-Casp9構築物の分解生成物は、これらの構築物のより低い発現レベルに起因して、それらの基底活性の結果として検出されない可能性がある。各サンプルの等しいローディングを、ウェスタンブロットの各レーンの下に示されるアクチンの実質的に等しい量によって確認したところ、タンパク質の実質的に類似の量が各レーンにおいて負荷されたことが示された。

20

【0295】

改変された細胞において発現され得るキメラポリペプチドの例は、本明細書で提供される。この例では、単一のポリペプチドが、核酸ベクターによってコードされる。誘導性カスパーゼ9ポリペプチドは、ペプチド結合のスキッピングに起因して、翻訳中にCARポリペプチドから分離される（Donnelly, ML 2001, J. Gen. Virol. 82:1013-25）。

30

【0296】

（カスパーゼ9自殺スイッチ発現構築物の評価）
（細胞株）

B 95-8 EBV形質転換B細胞株（LCL）、Jurkat、およびMT-2細胞（Dr S. Marriott (Baylor College of Medicine, Houston, TX) による贈呈）を、10% ウシ胎児血清（FBS; Hyclone）を含むRPMI 1640（Hyclone, Logan, UT）中で培養した。ポリクローナルEBV特異的T細胞株を、45% RPMI/45% Clicks（Irvine Scientific, Santa Ana, CA）/10% FBS中で培養し、以前報告されたように生成した。簡潔には、末梢血単核細胞（24ウェルプレートのウェルあたり 2×10^6 個）を、レスポンダー対-刺激物質（stimulator）（R/S）比40:1において、4000ラドで照射した自家LCLで刺激した。9~12日後、生細胞を、R/S比4:1で、照射したLCLで再刺激した。その後、細胞傷害性T細胞（CTL）を、40U/mL~100U/mL 組換えヒトインターロイキン-2（rhIL-2; Proleukin; Chiron, Emeryville, CA）の存在下で、LCLで毎週再刺激することによって拡大した。

40

【0297】

（レトロウイルス形質導入）

レトロウイルスの一過性の生成のために、293T細胞を、Gene Juiceトラン

50

スフェクション試薬 (Novagen, Madison, WI) を使用して、gag-pol および RD 114 エンベロープをコードするプラスミドとともに iCasp9/iFas 構築物でトランスフェクトした。ウイルスを、トランスフェクションの 48~72 時間後に採取し、急速凍結し、使用するまで -80℃ で貯蔵した。安定な FL YRD 18 由来のレトロウイルスプロデューサー株を、VSV-G 偽型一過性レトロウイルス上清での多重形質導入によって生成した。最高の導入遺伝子発現を有する FL YRD 18 細胞を、単一細胞ソートし、最高のウイルス力価を生じたクローンを拡大し、リンパ球を形質導入するためのウイルスを生成するために使用した。このクローンの導入遺伝子発現、機能、およびレトロウイルス力価を、8 週間超にわたる連続培養の間に維持した。ヒトリンパ球の形質導入のために、非組織培養処理した 24 ウェルプレート (Becton Dickinson, San Jose, CA) を、組換えフィブロネクチンフラグメント (FN CH-296; レトロネクチン; Takara Shuzo, Otsu, Japan; PBS 中 4 µg/mL、4℃ で一晩) でコーティングし、37℃ において 30 分間にわたって、0.5 mL レトロウイルス/ウェルで 2 回インキュベートした。その後、 $3 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ T 細胞/ウェルを、1 mL ウイルス/ウェルを使用して、100 U/mL IL-2 の存在下で 48~72 時間にわたって形質導入した。形質導入効率を、FACSscan フローサイトメーター (Becton Dickinson) で、共発現されたマーカー遺伝子緑色蛍光タンパク質 (GFP) の発現の分析によって決定した。機能研究のために、形質導入した CTL を、示されるように MoFlo サイトメーター (Dako Cytomation, Ft Collins, CO) を使用して、選択しないか、または低い、中間、もしくは高い GFP 発現を有する集団へと分離するかのいずれかであった。

【0298】

(アポトーシスの誘導および分析)

示された濃度の CID (AP20187; ARIAD Pharmaceuticals) を、トランスフェクトした 293T 細胞または形質導入した CTL へと添加した。接着細胞および非接着細胞を採取し、アネキシン結合緩衝液 (BD Pharmingen, San Jose, CA) で洗浄した。細胞を、製造業者の指示 (BD Pharmingen) に従って、アネキシン V および 7-アミノ-アクチノマイシン D (7-AAD) で 15 分間染色した。染色後 1 時間以内に、細胞を、Cell Quest ソフトウェア (Becton Dickinson) を使用してフローサイトメトリーによって分析した。

【0299】

(細胞傷害アッセイ)

各 CTL 株の細胞傷害活性を、以前に示されたように、標準的な 4 時間 ^{51}Cr 放出アッセイにおいて評価した。標的細胞は、自家 LCL、ヒト白血球抗原 (HLA) クラス I-ミスマッチ LCL およびリン補カイン活性化キラー細胞感受性 T 細胞リンパ腫株 HS B-2 を含んだ。完全培地または 1% Triton X-100 (Sigma, St Louis, MO) 中でインキュベートした標的細胞を、それぞれ、自発的および最大 ^{51}Cr 放出を決定するために使用した。三連のウェルの特異的溶解の平均パーセンテージを、 $100 \times (\text{実験放出} - \text{自発的放出}) / (\text{最大放出} - \text{自発的放出})$ として計算した。

【0300】

(表現型決定)

細胞表面表現型を、以下のモノクローナル抗体を使用して調査した: CD3、CD4、CD8 (Becton Dickinson) および CD56 ならびに TCR- α/β (Immunotech, Miami, FL)。 $\Delta\text{NGFR-iFas}$ を、抗 NGFR 抗体 (Chromaprobe, Aptos, CA) を使用して検出した。適切なマッチしたアイソタイプコントロール (Becton Dickinson) を、各実験において使用した。細胞を、FACSscan フローサイトメーター (Becton Dickinson) で分析した。

【0301】

(サイトカイン生成の分析)

CTL培養上清中のインターフェロン- γ (IFN- γ)、IL-2、IL-4、IL-5、IL-10、および腫瘍壊死因子- α (TNF α) の濃度を、ヒトTh1/Th2 サイトカインサイトメトリックビーズアッセイ (BD Pharmingen) を使用して測定し、培養上清中のIL-12の濃度を、製造業者の指示に従って、酵素結合免疫ソルベントアッセイ (ELISA; R&D Systems, Minneapolis, MN) によって測定した。

【0302】

(インビボ実験)

非肥満糖尿病重症複合免疫不全症 (NOD/SCID) マウス (6~8週齢) を、照射し (250ラド)、マトリゲル (BD Bioscience) 中に再懸濁された $1.0 \times 10^6 \sim 1.5 \times 10^6$ LCL を右側腹部の皮下に注射した。2週間後、直径約0.5cmの腫瘍を有するマウスに、非形質導入EBV CTLおよびiCasp9.1.GFP high形質導入EBV CTLの1:1混合物 (合計 1.5×10^6 個) を尾静脈へと注射した。CTL注入の4~6時間前および3日後に、マウスに、組換えhIL-2 (2000U; Proleukin; Chiron) を腹腔内注射した。4日目に、上記マウスを、2群に無作為に分離した: 1群は、CID (50 μ g AP20187、腹腔内) を受け、1群は、キャリアのみ (16.7% プロパンジオール、22.5% PEG 400、および1.25% Tween 80、腹腔内) を受けた。7日目に、全てのマウスを殺滅した。腫瘍をホモジナイズし、抗ヒトCD3 (BD Pharmingen) で染色した。FACS分析によって、ゲーティングしたCD3⁺集団内のGFP⁺細胞の数を、評価した。非形質導入CTLのみ (合計 1.5×10^6 個) を受けたマウスのコントロール群の腫瘍を、CD3⁺/GFP⁺ 細胞の分析において陰性コントロールとして使用した。

【0303】

(誘導性カスパーゼ9の発現および機能の最適化)

カスパーゼ3、7、および9を、トランスフェクトした293T細胞および形質導入ヒトT細胞の両方において、誘導性安全スイッチ分子としてのそれらの適切性についてスクリーニングした。誘導性カスパーゼ9 (iCasp9) のみが、選択したCID (例えば、二量体化の化学的誘導物質) に対する感受性を付与するために十分なレベルで発現された。最初の検査では、全長iCasp9が、おそらく形質導入された細胞が導入遺伝子の基底活性によって排除されていることに起因して、T細胞において安定して高レベルで維持できないことが示された。CARDドメインは、アポトーシスプロテアーゼ活性化因子1 (Apaf-1) とのシトクロムCおよびアデノシン三リン酸 (ATP) 駆動の相互作用によって、カスパーゼ9分子の生理学的な二量体化に関与する。二量体化および自殺スイッチの活性化を誘導するためにCIDを使用することが原因で、CARDドメインの機能は、この状況では不必要であり、CARDドメインの除去を、基底活性を減少するための方法として調査した。カスパーゼ9の活性化のために、多量体化よりむしろ二量体化のみが必要とされることを考慮すると、単一のFKBP12v36ドメインをまた、活性化をもたらすための方法として調査した。

【0304】

カスパーゼ9の得られる短縮型および/または改変された形態 (例えば、CARDドメイン、または2個のFKBP12ドメインのうちの一方、または両方が除去される) の活性を比較した。破壊された活性化部位を有する構築物F'F-C-Casp9_{C->S} は、非機能的コントロールを提供した (図1Aを参照のこと)。全ての構築物を、レトロウイルス長末端反復 (LTR) が導入遺伝子発現を誘導し、増強GFPが内部リボソーム侵入部位 (IRES) の使用によって同じmRNAから共発現されるレトロウイルスベクターMSCV²⁶ へとクローニングした。トランスフェクトした293T細胞において、予測されたサイズでの全ての誘導性カスパーゼ9構築物の発現、ならびにGFPの共

10

20

30

40

50

発現は、ウェスタンブロットによって示された（図1Bを参照のこと）。タンパク質発現（GFPの平均蛍光によって予測し、ウェスタンブロットで可視化される）は、非機能的構築物 $F'F-C-Casp9_{C \rightarrow S}$ において最高であり、全長構築物 $F'F-C-Casp9$ において大きく減少した。CARD ($F'F-Casp9$)、1個のFKBP12 ($F-C-Casp9$)、または両方 ($F-Casp9$) の除去は、誘導性カスパーゼ-9およびGFPの両方の次第により高い発現を生じ、対応してCIDに対する感受性を高めた（図1Aを参照のこと）。これらの結果に基づいて、 $F-Casp9$ 構築物（以降、 $iCasp9_M$ といわれる）を、ヒトTリンパ球におけるさらなる研究のために使用した。

【0305】

（ヒトTリンパ球における $iCasp9_M$ の安定な発現）

自殺遺伝子発現の長期の安定性は、最も重要である。なぜなら自殺遺伝子は、遺伝子操作された細胞が存続する限りにおいて、発現されなければならないからである。T細胞形質導入に関しては、高力価RD114偽型ウイルスを生成するFLYRD18由来レトロウイルスプロデューサークロンを、T細胞の形質導入を促進するために生成した。EBV特異的CTL株（EBV-CTL）における $iCasp9_M$ 発現を評価した。なぜならEBV特異的CTL株は、十分に特徴付けられた機能および特異性を有し、EBV関連悪性腫瘍の防止および処置のためのインビボ治療として既に使用されつつあるからである。70%より高いEBV-CTLの一貫した形質導入効率（5名の異なるドナーにおいて平均75.3%；範囲、71.4%～83.0%）を、レトロウイルスでの単一の形質導入後に得た。EBV-CTLにおける $iCasp9_M$ の発現は、導入遺伝子機能の選択または喪失なしに、形質導入後の少なくとも4週間にわたって安定であった。

【0306】

（ $iCasp9_M$ は、形質導入したT細胞特性を変化させない）

$iCasp9_M$ の発現がT細胞特性を変化させないことを確実にするために、非形質導入または非機能的 $iCasp9_{C \rightarrow S}$ 形質導入EBV-CTLの表現型、抗原特異性、増殖潜在性、および機能を、 $iCasp9_M$ 形質導入EBV-CTLのものと比較した。4名の別個のドナーにおいて、形質導入したおよび非形質導入CTLは、等数のCD4⁺、CD8⁺、CD56⁺、およびTCR α/β ⁺ 細胞からなった。同様に、IFN- γ 、TNF α 、IL-10、IL-4、IL-5、およびIL-2を含むサイトカインの生成は、 $iCasp9_M$ 発現によって変化しなかった。 $iCasp9_M$ 形質導入EBV-CTLは、非形質導入CTLおよびコントロールの形質導入したCTLに匹敵する自家LCLを特異的に溶解した。 $iCasp9_M$ の発現は、指数関数的に増殖するCTLの成長特性に影響を及ぼさず、重要なことには、抗原に対する独立性および増殖のためのIL-2を保った。形質導入後21日目に、自家LCLおよびIL-2での通常の毎週の抗原性の刺激は、継続したかまたは中止した。抗原刺激の中止は、T細胞の一樣の下降を生じた。

【0307】

（インビトロでの高い導入遺伝子発現のために選択されたTリンパ球のうちの99%超の排除）

CTLにおいて誘導性 $iCasp9_M$ 能力（proficiency）を、CIDの投与後のGFP発現細胞の喪失をモニターすることによって試験した；GFP⁺ 細胞の91.3%（範囲、5名の異なるドナーにおいて89.5%～92.6%）を、単一の10nM用量のCID後に排除した。CIDへの曝露時間に拘わらず、同様の結果を得た（範囲、1時間継続）。全ての実験において、CID処置を生き残ったCTLは、CID後のGFPの平均蛍光強度において70%（範囲、55%～82%）減少とともに、低い導入遺伝子発現を有した。生存しているGFP⁺ T細胞のさらなる排除は、抗原刺激、続いて第2の10nM 用量のCIDによって得られなかった。従って、上記非応答CTLは、CIDによる機能的活性化に関して、不十分な $iCasp9_M$ を発現する可能性が最も高かった。低レベルの発現とCIDに対するCTL非応答との間の相関関係を調査するために、CTLを、連結したマーカー遺伝子GFPの低、中、および高発現に関してソートし

10

20

30

40

50

、同じドナーに由来する非形質導入CTLと1:1で混合して、CID誘導アポトーシスに応答する形質導入したT細胞の数の正確な定量を可能にした。

【0308】

排除された形質導入したT細胞の数は、GFP導入遺伝子発現のレベルとともに増大した(図4A、4Bおよび4Cを参照のこと)。導入遺伝子発現とiCasp9_Mの機能との間の相関関係を決定するために、iCasp9_M IRES-GFP形質導入EBV-CTLを、低GFP発現(平均21)、中GFP発現(平均80)および高GFP発現(平均189)について選択した。選択したT細胞を10nM CIDとともに一晩インキュベートし、その後、アネキシンVおよび7-AADで染色した。アネキシンV+/7-AAD-およびアネキシンV+/7-AAD+ T-のパーセンテージが示される。選択されたT細胞を、非形質導入T細胞と1:1で混合し、抗原刺激後に10nM CIDとともにインキュベートした。7日目の残余GFP陽性T細胞のパーセンテージが示される。

10

【0309】

GFP_{high}選択細胞に関しては、10nM CIDは、形質導入した細胞のうちの99.1%(範囲、98.7%~99.4%)の枯渇をもたらした。抗原刺激の日に、F-Casp9_M I-GFP形質導入CTLを、処理しなかったか、または10nM CIDで処理したかのいずれかであった。7日後に、CIDへの応答を、GFPに関するフローサイトメトリーによって測定した。形質導入したT細胞のパーセンテージを50%に調整して、CID処理後の残余GFP⁺細胞の正確な測定を可能にした。選択していないCTL(上の行)およびGFP_{high}選択CTL(下の行)におけるCIDへの応答を比較した。残余GFP⁺細胞のパーセンテージを示す。

20

【0310】

GFP_{high}選択細胞におけるアポトーシスの迅速な誘導は、CID投与の14日以内に、細胞収縮およびフラグメント化などのアポトーシス特性によって示される(参照)。10nM CIDとの一晩のインキュベーション後に、F-Casp9_M I-GFP_{high}形質導入T細胞を、顕微的評価によって、細胞収縮およびフラグメント化などのアポトーシス特性を有した。高い発現について選択されたT細胞のうち、64%(範囲、59%~69%)はアポトーシス(アネキシンV⁺/7-AAD⁻)表現型を有し、30%(範囲、26%~32%)は、壊死(アネキシンV⁺/7-AAD⁺)表現型を有した。アポトーシスのマーカーで染色すると、T細胞のうちの64%がアポトーシス表現型(アネキシンV⁺、7-AAD⁻、右下象限)を有し、32%が壊死表現型(アネキシンV⁺、7-AAD⁺、右上象限)を有することが示された。3回の別個の実験の代表例を示す。

30

【0311】

対照的に、アポトーシスの誘導は、中間または低いGFP発現に関して選択したT細胞では有意に低かった(図4A、4Bおよび4Cを参照のこと)。従って、臨床適用のために、高コピー数、高レベルの発現、または抗コピー数および高レベルの発現の両方の選択を可能にする選択マーカーを有する発現構築物のバージョンは、望ましいものであり得る。CID誘導アポトーシスを、汎カスパーゼ阻害剤zVAD-fmk(CIDを添加する前に1時間にわたって100μM)によって阻害した。CIDの力価は、1nM CIDが最大欠失効果を得るために十分であることが示された。示される量のCID(AP20187)を使用する用量応答曲線は、CIDに対するF-Casp9_M I-GFP_{high}の感受性を示す。GFP⁺細胞の生存を、示される量のCIDの投与後7日目に測定する。各点の平均および標準偏差を与える。別の二量体化の化学的誘導物質(CID)であるAP1903を使用しても同様の結果を得た。上記誘導物質は、健常志願者に投与される場合、有害作用を実質的に有しないことが臨床的に示された。その用量応答は、形質導入後少なくとも4週間にわたって変化しないままであった。

40

【0312】

(iCasp9_Mは抗アポトーシス分子を発現する悪性細胞において機能する)

50

カスパーゼー9を、以前に示された*i Fas*および*i FADD*よりむしろ臨床使用のために誘導性アポトーシス促進分子として選択した。なぜならカスパーゼー9は、アポトーシスシグナル伝達において比較的遅く作用し、従って、アポトーシス阻害剤による阻害に余り感受性でないと予測されるからである。従って、自殺機能は、抗アポトーシス分子を発現する悪性の形質転換されたT細胞株においてのみならず、記憶細胞の長期保存を確実にするために、上記プロセスの一部として上昇した抗アポトーシス分子を発現する通常のT細胞の亜集団においても保存されるべきである。この仮説をさらに調査するために、*i Casp9_M*および*i Fas*の機能を、EBV-CTLにおいてまず比較した。任意の潜在的ベクターベースの差異を排除するために、誘導性*Fas*はまた、*i Casp9*のように、MSCV、IRES、GFPベクターにおいて発現された。これらの実験のために、 Δ NGFR、*i Fas*、I、GFPおよび*i Casp9_M*、I、GFP形質導入CTLの両方を、GFP_{high}発現についてソートし、非形質導入CTLと1:1比で混合して、等しい割合でかつ類似のレベルで*i Fas*または*i Casp9_M*のいずれかを発現する細胞集団を得た。上記EBV-CTLを、高いGFP発現についてソートし、示されるとおりに非形質導入CTLと1:1で混合した。 Δ NGFR⁺/GFP⁺およびGFP⁺T細胞のパーセンテージを示す。

10

【0313】

10nM CIDの投与後のGFP⁺細胞の排除は、*i Fas*形質導入CTLにおいてより*i Casp9_M*において、より迅速かつより効率的であった（CID後の7日目において、*i Casp9_M*形質導入細胞の99.2%±0.14%を*i Fas*形質導入細胞の89.3%±4.9%と比較した； $P < 0.05$ ）。LCL刺激の日に、10nM CIDを投与し、示される時点でGFPを測定して、CIDへの応答を決定した。黒菱形は、 Δ NGFR-*i Fas*、I、GFPについてのデータを示し；黒四角は、*i Casp9_M*、I、GFPについてのデータを示す。3回の実験の平均および標準偏差を示す。

20

【0314】

c-FLIPおよびbcl-xL発現に起因する、*i Casp9_M*および*i Fas*の機能もまた2種の悪性T細胞株：Jurkat（アポトーシス感受性T細胞白血病株）およびMT-2（アポトーシス耐性T細胞株）において比較した。Jurkat細胞およびMT-2細胞を、類似の効率（Jurkatでは92% 対 84%、MT-2では76% 対 70%）で、*i Fas*および*i Casp9_M*で形質転換し、10nM CIDの存在下で8時間培養した。アネキシンV染色は、*i Fas*および*i Casp9_M*が等数のJurkat細胞においてアポトーシスを誘導した（それぞれ、56.4%±15.6%および57.2%±18.9%）が、*i Casp9_M*の活性化のみがMT-2細胞のアポトーシスを生じた（*i Fas*および*i Casp9_M*に関して、それぞれ19.3%±8.4%および57.9%±11.9%）ことを示した。

30

【0315】

ヒトT細胞株Jurkat（左）およびMT-2（右）を、 Δ NGFR-*i Fas*、I、GFPまたは*i Casp9_M*、I、GFPで形質導入した。T細胞の等しいパーセンテージを、自殺遺伝子の各々で形質導入した：Jurkatでは、 Δ NGFR-*i Fas*、I、GFPに関して92% 対 *i Casp9_M*、I、GFPに関して84%、およびMT-2では、 Δ NGFR-*i Fas*、I、GFPに関しては76% 対 *i Casp9_M*、I、GFPに関しては70%。T細胞は、非処理であったかまたは10nM CIDとともにインキュベートしたかのいずれかであった。CIDへの曝露の8時間後、アポトーシスを、アネキシンVおよび7-AADに関して染色することによって測定した。3回の実験の代表例を示す。PEは、フィコエリトリンを示す。これら結果は、アポトーシス阻害分子を過剰発現するT細胞において、*i Fas*の機能がブロックされ得る一方で、*i Casp9_M*がアポトーシスをなお効率的に誘導し得ることを示す。

40

【0316】

（免疫調節性導入遺伝子を発現するT細胞の*i Casp9_M*媒介性排除）

*i Casp9_M*が活性な導入遺伝子生成物を発現するように遺伝子改変された細胞を効

50

率的に破壊し得るかどうかを決定するために、IL-12を安定して発現するEBV-CTLを排除するiCasp9_Mの能力を測定した。IL-12が、非形質導入CTLおよびiCasp9_M・IRES・GFP形質導入CTLの上清中で検出不能であった一方で、iCasp9_M・IRES・IL-12形質導入細胞の上清は、324 pg/mL〜762 pg/mL IL-12を含んだ。しかし、10 nM CIDの投与後に、上記上清中のIL-12は、検出不能なレベルに低下した(<7.8 pg/mL)。従って、高い導入遺伝子発現細胞に関する事前のソートなしですら、iCasp9_Mの活性化は、IL-12の生物学的に関連するレベルを生成する全てのT細胞を完全に排除するために十分である。iCasp9_M・I・GFP構築物中のマーカー遺伝子GFPを、ヒトIL-12のp40およびp35サブユニットをコードするflexi IL-12によって置き換えた。iCasp9_M・I・GFP形質導入EBV-CTLおよびiCasp9_M・I・IL-12形質導入EBV-CTLを、LCLで刺激し、次いで、未処置のままにするかまたは10 nM CIDに曝露した。第2の抗原性刺激の3日後に、培養上清中のIL-12のレベルは、IL-12 ELISAによって測定した(このアッセイの検出限界は、7.8 pg/mLである)。三連のウェルの平均および標準偏差を、示す。2名の異なるドナーのCTLでの2回の実験のうちの1回の結果を示す。

【0317】

(インビボでの高い導入遺伝子発現について選択したT細胞のうちの99%超の排除)

iCasp9_Mの機能をまた、インビボで形質導入されたEBV-CTLにおいて評価した。SCIDマウス-ヒト異種移植モデルを、養子免疫療法のために使用した。自家LCL異種移植片を有するSCIDマウスへの、非形質導入CTLおよびiCasp9_M・IRES・GFP_{high}形質導入CTLの1:1混合物の静脈内注入後に、マウスを、単一用量のCIDまたはキャリアのみのいずれかで処置した。CID/キャリア投与の3日後に、腫瘍を、ヒトCD3⁺/GFP⁺細胞について分析した。ヒト抗CD3抗体を使用する上記注入生成物のうちの非形質導入構成成分の検出から、CIDを受けたマウスにおける尾静脈注入の成功を確認した。CIDで処置したマウスにおいて、キャリアのみで処置した注入したマウスと比較して、ヒトCD3⁺/GFP⁺T細胞の数が99%超減少した。これは、インビボおよびインビトロで、iCasp9_M形質導入T細胞の等しく高い感受性を示す。

【0318】

インビボでのiCasp9_Mの機能をアッセイした。NOD/SCIDマウスを照射し、 $1.0 \times 10^6 \sim 1.5 \times 10^6$ LCLを皮下注射した。14日後、直径0.5 cmの腫瘍を有するマウスに、合計 1.5×10^6 EBV-CTLを与えた(これら細胞のうちの50%は非形質導入であり、50%はiCasp9_M・I・GFPで形質導入され、高GFP発現に関してソートした)。CTL投与後の3日目に、マウスに、CID(50 μg AP20187; (黒菱形、n=6) またはキャリアのみ(黒四角、n=5)のいずれかを与え、6日目に、腫瘍中のヒトCD3⁺/GFP⁺T細胞の存在を分析した。非形質導入CTL(1.5×10^6 CTL; n=4)のみを与えたマウスのコントロール群の腫瘍から単離したヒトCD3⁺T細胞を、腫瘍内のCD3⁺/GFP⁺T細胞の分析のための陰性コントロールとして使用した。

【0319】

(考察)

いくつかの実施形態において、遺伝子改変されたT細胞をインビボで排除するために適した自殺遺伝子を発現する発現ベクターが、本明細書で示される。本明細書で示される自殺遺伝子発現ベクターは、細胞死、低い基底活性、高比活性、および内因性抗アポトーシス分子に対する最小の感受性を惹起するために十分高いレベルでの発現である、改変している遺伝子を有する全ての細胞において安定した共発現を含む、ある種非限定的な有利な特性を有する。本明細書で示されるのは、ある種の実施形態において、誘導性カスパーゼ-9、iCasp9_M(これは低い基底活性を有する)であり、ヒトT細胞において4週間超にわたって安定な発現を可能にする。小分子の二量体化の化学的誘導物質(CID)

の単一の10 nM 用量は、インビトロおよびインビボの両方で、高い導入遺伝子発現について選択されたiCasp9_M形質導入細胞のうちの99%超を殺滅するために十分である。さらに、Th1サイトカインIL-12と共発現される場合、iCasp9_Mの活性化は、高い導入遺伝子発現に関する選択なしですら、全ての検出可能なIL-12生成細胞を排除した。カスパーゼ9は、大部分の抗アポトーシス分子の下流で作用し、従って、CIDへの高感受性は、bcl-2ファミリーの抗アポトーシス分子の増大したレベルの存在に拘わらず保存される。従って、iCasp9_Mはまた、アポトーシスに比較的耐性である形質転換されたT細胞および記憶T細胞すらも破壊を誘導するために有用であると判明し得る。

【0320】

10

他のカスパーゼ分子とは異なり、タンパク質分解は、カスパーゼ9の活性化に十分でないようである。結晶学データおよび機能データは、不活性カスパーゼ9単量体の二量体化は、コンホメーション変化誘導活性化をもたらすことを示す。プロカスパーゼ9の濃度は、生理学的状況において、二量体化のために必要とされる閾値を十分下回る約20 nMの範囲にある。

【0321】

理論によって限定されることなく、二量体化へのエネルギー的障壁は、シトクロムCおよびATPによって駆動される、Apaf-1のCARDドメインとカスパーゼ9との間の同種親和性相互作用(homophilic interaction)によって克服され得ると考えられる。2個のFKBP12に結合されるカスパーゼ9の過剰発現は、自発的二量体化が起こることを可能にし得、最初の全長カスパーゼ9構築物の観察された毒性を説明し得る。毒性の減少および遺伝子発現の増大が1個のFKBP12の除去後に観察された、それは、自発的二量体化と関連する毒性の減少に起因する可能性が最も高い。多量体化はしばしば、表面死レセプターの活性化に関与する一方で、カスパーゼ9の二量体化は、活性化を媒介するために十分であるはずである。本明細書で示されるデータは、単一のFKBP12を有するiCasp9構築物が、2個のFKBP12を有するものと同程度に効率的に機能することを示す。CARDドメインの除去によるCIDへの増大した感受性は、CID結合の際に、二量体化のエネルギー的閾値の減少を表し得る。

20

【0322】

30

ウイルス由来または細菌由来の致死遺伝子(例えば、HSV-TKおよびシトシンデアミナーゼ)の持続性および機能は、ウイルス由来または細菌由来の致死遺伝子を発現する細胞に対する望ましくない免疫応答によって損なわれ得る。iCasp9_Mの構成成分を形成するFKBP12およびアポトーシス促進分子は、ヒト由来分子であり、従って、免疫応答を誘導する可能性は低い。FKBP12とカスパーゼ9との間のリンカーおよびFKBP12ドメイン中の単一の点変異は、新規アミノ酸配列をもたらすが、その配列は、iFas形質導入T細胞のマカクレシピエントによって免疫学的に認識されなかった。さらに、iCasp9_Mの構成成分はヒト由来分子であるので、接合部配列に特異的な記憶T細胞は、ウイルス由来タンパク質(例えば、HSV-TK)とは異なり、レシピエントに存在するべきではなく、それによって、iCasp9_M形質導入T細胞の免疫応答媒介性排除のリスクを減少させる。

40

【0323】

誘導性FasまたはFas関連死ドメインタンパク質(FADD)の死エフェクタードメイン(DEDD)を使用する以前の研究は、形質導入された細胞のうちのおよそ10%が、破壊性遺伝子の活性化に非応答性であることを示した。ここで示される実験において観察されるように、CIDへの非応答性の考えられる説明は、導入遺伝子の低い発現である。CID投与後に生き残った、本発明者らの研究におけるiCasp9_M形質導入T細胞および他者による研究におけるiFas形質導入T細胞は、低レベルの導入遺伝子発現を有した。認められるレトロウイルス「位置効果(positional effect)」を克服する試みにおいて、導入遺伝子の均質な発現の増大したレベルは、レトロウイル

50

ス組み込み体とニワトリβ-グロビンクロマチンインスレーター (insulator) とを隣接させることによって達成された。このクロマチンインスレーターの付加は、形質導入された293T細胞における発現の均質さを劇的に増大させたが、形質導入された初代T細胞において有意な効果を有しなかった。高発現レベルを有するT細胞の選択は、二量体化剤への応答の変動性を最小限にした。高GFP発現に関してソートされた形質導入されたT細胞のうちの99%超は、単一の10nM CID用量後に排除された。この実証は、高レベルの自殺遺伝子を発現する細胞が選択マーカーを使用して単離され得るという仮説を裏付ける。

【0324】

非常に少数の耐性残余細胞は、毒性の再起を引き起こし得る。2 logまでの欠失効率は、この可能性を有意に減少させる。臨床使用のために、非免疫原性選択マーカー（例えば、短縮型ヒトNGFR、CD20、またはCD34（例えば、GFPの代わりに））との共発現は、高い導入遺伝子発現T細胞の選択を可能にする。自殺スイッチ（例えば、iCASP9_M）および適切な選択マーカー（例えば、短縮型ヒトNGFR、CD20、CD34などおよびこれらの組み合わせ）の共発現は、内部リボソーム侵入部位 (IRES) または自己切断配列（例えば、2A）を含む融合タンパク質の翻訳後修飾のいずれかを使用して得られ得る。対照的に、唯一の安全性の懸念が導入遺伝子媒介性毒性（例えば、人工T細胞レセプター、サイトカインなどまたはこれらの組み合わせ）である状況では、この選択工程は不必要であり得る。なぜならiCasp9_Mと導入遺伝子発現との間の厳密な連鎖は、治療用導入遺伝子の生物学的に関連するレベルを発現する実質的に全ての細胞の排除を可能にするからである。これは、iCasp9_MとIL-12とを共発現することによって示された。iCasp9_Mの活性化は、任意の測定可能なIL-12生成を実質的に排除した。導入遺伝子発現の成功および「自殺スイッチ」のその後の活性化は、導入遺伝子の機能および活性に依存し得る。

【0325】

CIDへの非応答性の別の考えられる説明は、高レベルのアポトーシス阻害剤がCID媒介性アポトーシスを減弱し得ることである。アポトーシス阻害剤の例としては、c-FLIP、bc1-2ファミリーメンバーおよびアポトーシスタンパク質の阻害剤 (IAP) が挙げられ、これらは、通常、アポトーシスと生存との間のバランスを制御する。例えば、c-FLIPおよびbc1-2のアプレギュレーションは、記憶プールを確立するように運命付けられたT細胞の亜集団を、コグネイト標的または抗原提示細胞に応じて活性化誘導細胞死に対して耐性にする。いくつかのTリンパ系腫瘍では、アポトーシスと生存との間の生理学的バランスは、細胞生存の利益となるように破壊される。自殺遺伝子は、記憶細胞および悪性に形質転換された細胞を含む実質的に全ての形質導入されたT細胞を欠失させるはずである。従って、その選択された誘導性自殺遺伝子は、抗アポトーシス分子の増大したレベルの存在下でその活性の実質的に全てではないにしても有意な部分を保持するはずである。

【0326】

アポトーシスシグナル伝達経路におけるiFas（またはiFADD）の頂端位置は、このiFas（またはiFADD）をアポトーシスの阻害剤に対して特に脆弱なままにさせ得、従って、これら分子をアポトーシス安全スイッチの重要な構成成分であることに、あまりよく適さないものにし得る。カスパーゼ3または7は、終末エフェクター (terminal effector) 分子として十分に適しているようである；しかし、初代ヒトT細胞において機能レベルで発現され得ない。従って、カスパーゼ9はアポトーシス経路において十分遅く機能し、c-FLIPおよび抗アポトーシスbc1-2ファミリーメンバーの阻害効果を回避するので、カスパーゼ9を自殺遺伝子として選択した。そしてカスパーゼ9をまた、機能レベルで安定して発現できた。アポトーシスのX連鎖阻害剤 (XIAP) は、理論では、自発的カスパーゼ9活性化を減少できたが、FKBP12_{v36}に対するAP20187（またはAP1903）の高親和性は、この非共有結合的に会合したXIAPを置き換え得る。iFasとは対照的に、iCasp9_Mは、b

c1-xLを含む抗アポトーシス分子を過剰発現する形質転換されたT細胞株において機能的なままであった。

【0327】

ヒトT細胞によってオンコレトロウイルスベクターからの発現に対して特異的にデザインされた誘導性安全スイッチが、本明細書で示される。iCasp9_Mは、最適な欠失効果に関する必要用量において安全であると判明した小さな、二量体化の化学的誘導物質であるAP1903（またはアナログ）によって活性化され得、ガンシクロビルまたはリツキシマブとは異なり、インビボで他の生物学的効果を有しない。従って、養子移入のためのT細胞におけるこの自殺遺伝子の発現は、安全性を増大させ得、また、臨床適用の範囲を拡げ得る。

10

【0328】

（実施例2）

（半合致（Haploidentical）幹細胞移植後の同種枯渇T細胞（Allo depleting T Cell）の安全性を改善するためのiCasp9自殺遺伝子の使用）

この例では、発現構築物を使用して、半合致幹細胞移植後に同種枯渇T細胞の安全性を改善するための発現構築物および該発現構築物を使用する方法が示される。iCasp9および選択マーカー（短縮型CD19）をコードするレトロウイルスベクターを、ドナーT細胞のための安全スイッチとして生成した。（抗CD25免疫毒素を使用する）同種枯渇の後ですら、ドナーT細胞は、効率的に形質導入でき、増殖でき、およびその後CD19免疫磁性選択によって>90%純度へと富化できた。その操作された細胞は、抗ウイルス特異性および機能性を保持し、調節性の表現型および機能を有するサブセットを含んだ。iCasp9を小分子二量体化剤（small-molecule dimerizer）で活性化すると、>90%アポトーシスが迅速に生じた。導入遺伝子発現は、静止しているT細胞においてダウンレギュレートされたが、iCasp9は、活性化（同種反応性）T細胞において迅速に発現がアップレギュレートされたので、効率的な自殺遺伝子を保持した。

20

【0329】

（材料および方法）

（同種枯渇T細胞の生成）

同種枯渇細胞を、以前に示されたように、健常志願者から生成した。簡潔には、健常ドナーに由来する末梢血単核球（PBMC）を、無血清培地（AIM-V; Invitrogen, Carlsbad, CA）中で40:1のレスポネー対刺激物質比で、照射レシピエントエプスタイン・バーウイルス（EBV）形質転換リンパ芽球様細胞株（LCL）とともに共培養した。72時間後、CD25を発現する活性化T細胞は、RFT5-SMPT-dgA免疫毒素中での一晚のインキュベーションによる共培養物から枯渇された。同種枯渇を、残っているCD3⁺CD25⁺集団が<1%であり、3H-チミジン取り込みによる残りの増殖が<10%であった場合に適切であるとみなした。

30

【0330】

（プラスミドおよびレトロウイルス）

SFG.iCasp9.2A.CD19は、切断可能な2A様配列を介して短縮型ヒトCD19へと連結された誘導性カスパーゼ9（iCasp9）からなる。iCasp9は、Ser-Gly-Gly-Gly-Serリンカーを介してヒトカスパーゼ9（CASP9; GenBank NM_001229）へと接続された、F36V変異を有するヒトFKBP12結合タンパク質（FKBP12; GenBank AH002818）からなる。このF36V変異は、合成ホモ二量体化剤AP20187またはAP1903へのFKBP12の結合親和性を増大させる。カスパーゼリクルートメントドメイン（CARD）を、ヒトカスパーゼ9配列から欠失させた。なぜならその生理学的機能は、FKBP12によって置き換えられており、その除去は、導入遺伝子の発現および機能を増大させるからである。この2A様配列は、Thosea signa昆虫ウイルス由来の20アミノ酸のペプチドをコードし、このペプチドは、グリシンと末端プロリン

40

50

残基との間で>99%切断を媒介し、iCasp9のC末端において19個の余分なアミノ酸およびCD19のN末端において1個の余分なプロリン残基を生じる。CD19は、アミノ酸333(TDPTRRF)で短縮された全長CD19(GenBank NM001770)からなり、これは、細胞質内ドメインを242から19アミノ酸に短縮し、リン酸化の潜在的部位である全ての保存されたチロシン残基を除去する。

【0331】

テナガザル白血病ウイルス(Gal-V)偽型レトロウイルスを生成する安定なPG13クローンを、Phoenix Eco細胞株(ATCC製品#SD3444; ATCC, Manassas, VA)をSFG.iCasp9.2A.CD19で一過性にトランスフェクトすることによって作製した。これは、Eco偽型レトロウイルスを生成した。PG13パッケージング細胞株(ATCC)を、Eco偽型もしくはレトロウイルスで3回形質導入して、1細胞あたり複数のSFG.iCasp9.2A.CD19プロウイルス組み込み体を含むプロデューサー株を生成した。単一細胞クローニングを行い、最高力価を生じたPG13クローンを増殖させ、ベクター生成のために使用した。

【0332】

(レトロウイルス形質導入)

T細胞活性化および増殖のための培養培地は、45% RPMI 1640(Hyclone, Logan, UT)、45% クリック(Irvine Scientific, Santa Ana, CA)および10% ウシ胎仔血清(FBS; Hyclone)からなる。同種枯渇細胞を、固定化抗CD3(OKT3; Ortho Biotech, Bridgewater, NJ)によって48時間にわたって活性化し、その後、レトロウイルスベクター選択的同種枯渇での形質導入を、ドナーPBMCとレシピエントEBV-LCLとを共培養することによって行って、同種反応性細胞を活性化した：活性化した細胞は、CD25を発現し、その後、抗CD25免疫毒素によって排除した。この同種枯渇細胞を、OKT3によって活性化し、レトロウイルスベクターで48時間後に形質導入した。免疫磁性選択を、形質導入の4日目に行った；陽性画分を、さらに4日間増殖させ、凍結保存した。

【0333】

小規模実験では、非組織培養処理24ウェルプレート(Becton Dickinson, San Jose, CA)を、OKT3 1g/mlで2~4時間、37℃においてコーティングした。同種枯渇細胞を、 1×10^6 細胞/ウェルで添加した。24時間において、100U/mlの組換えヒトインターロイキン-2(IL-2)(Proleukin; Chiron, Emeryville, CA)を添加した。レトロウイルス形質導入を、活性化の48時間後に行った。非組織培養処理24ウェルプレートを、 3.5 g/cm^2 組換えフィブロネクチンフラグメント(CH-296; Retronectin; Takara Mirus Bio, Madison, WI)でコーティングし、そのウェルに、0.5ml/ウェルのレトロウイルスベクター含有上清を、30分間、37℃において2回負荷した。その後、OKT3活性化細胞を、3:1の比の新鮮なレトロウイルスベクター含有上清およびT細胞培養培地(100U/ml IL-2を補充)中に、 5×10^5 細胞/ウェル蒔いた。細胞を2~3日後に採取し、50U/ml IL-2の存在下で増殖させた。

【0334】

(遺伝子改変同種枯渇細胞のスケールアップ生成)

臨床適用のための形質導入プロセスのスケールアップは、非組織培養処理T75フラスコ(Nunc, Rochester, NY)を使用し、これを、一晩4℃において、10mlのOKT3 1μg/mlまたは10mlのフィブロネクチン 7μg/mlでコーティングした。増大した細胞接着のためのコロナ放電処理したフッ化エチレンプロピレンバッグ(2PF-0072AC, American Fluoroseal Corporation, Gaithersburg, MD)も使用した。同種枯渇細胞を、 1×10^6 細胞/mlで、OKT3でコーティングしたフラスコの中に播種した。

100 U/ml IL-2を翌日添加した。レトロウイルス形質導入のために、レトロネクチンでコーティングしたフラスコまたはバッグに、10 mlのレトロウイルス含有上清を2～3時間にわたって1回負荷した。OKT3活性化T細胞を、3：1の比の新鮮なレトロウイルスベクター含有培地およびT細胞培養培地（100 U/ml IL-2を補充）の中で、 1×10^6 細胞/mlで播種した。翌朝に細胞を採取し、 5×10^5 細胞/ml～ 8×10^5 細胞/mlの播種密度で、組織培養処理T75またはT175フラスコ中の、IL-2 約50～100 U/mlを補充した培養培地中で増殖させた。

【0335】

（CD19免疫磁性選択）

CD19に関する免疫磁性選択を、形質導入の4日後に行った。細胞を、モノクローナルマウス抗ヒトCD19抗体に結合体化した常磁性マイクロビーズ（Miltenyi Biotech, Auburn, CA）で標識し、小規模実験ではMSもしくはLSカラム上で、および大規模実験ではCliniMac s Plus自動化選択デバイスで選択した。CD19選択細胞を、さらに4日間増殖させ、形質導入後の8日目に凍結保存した。それらの細胞を、「遺伝子改変同種枯渇細胞」と呼んだ。

【0336】

（免疫表現型決定およびペンタマー分析）

フローサイトメトリー分析（FACSCaliburおよびCellQuestソフトウェア；Becton Dickinson）を、以下の抗体を使用して行った：CD3、CD4、CD8、CD19、CD25、CD27、CD28、CD45RA、CD45RO、CD56およびCD62L。CD19-PE（Clone 4G7；Becton Dickinson）は、最適な染色を与えることが見出されたので、その後の全ての実験において使用した。非形質導入コントロールを使用して、CD19に関する陰性ゲートを設定した。HLA-ペンタマー、HLA-B8-RAKFQQL（Proimmune, Springfield, VA）を使用して、EBV溶解抗原（BZLF1）のエピトープを認識するT細胞を検出した。HLA-A2-NLVPMVATVペンタマーを使用して、CMV-p p65抗原のエピトープを認識するT細胞を検出した。

【0337】

（抗ウイルス応答に関するインターフェロン-ELISpotアッセイ）

EBV、CMVおよびアデノウイルス抗原への応答の評価に関するインターフェロン-ELISpotを、公知の方法を使用して行った。形質導入後8日間の低温貯蔵した遺伝子改変された同種枯渇させた細胞を解凍し、レスポンダー細胞として使用する前に、IL-2なしの完全培地中で一晩静置した。同じドナーに由来する低温貯蔵したPBMCを、比較物質（comparator）として使用した。レスポンダー細胞を、1ウェルあたり 2×10^5 、 1×10^5 、 5×10^4 および 2.5×10^4 細胞の連続希釈物として二連または三連でプレーティングした。刺激物質細胞を、 1×10^5 /ウェルでプレーティングした。EBVへの応答に関しては、40 Gyで照射したドナー由来EBV-LCLを、刺激物質として使用した。アデノウイルスへの応答に関しては、Ad5f35アデノウイルスに感染させたドナー由来活性化単球を使用した。

【0338】

簡潔には、ドナーPBMCを、24ウェルプレートにおいて一晩、X-Vivo 15（Cambrex, Walkersville, MD）中にプレーティングし、翌朝採取し、Ad5f35を多重感染度（MOI）200で2時間感染させ、洗浄し、30 Gyで照射し、刺激物質として使用した。抗CMV応答に関しては、MOI 5000でCMV p p65導入遺伝子をコードするAd5f35アデノウイルス（Ad5f35-p p65）を使用する類似のプロセスを使用した。特異的スポット形成単位（SFU）を、試験ウェルのレスポンダーのみおよび刺激物質のみのウェルからSFUを差し引くことによって計算した。CMVへの応答は、Ad5f35-p p65ウェルとAd5f35ウェルとの間でのSFUの差異であった。

【0339】

(EBV特異的細胞傷害)

遺伝子改変された同種枯渇した細胞を、レスポンドー：刺激物質比 40：1において、40 Gy 照射ドナー由来 EBV-LCL で刺激した。9 日後、その培養物を、レスポンドー：刺激物質比 4：1 において再刺激した。再刺激を、示されるとおり毎週行った。2 ラウンドまたは 3 ラウンドの刺激後に、細胞傷害を、標的細胞としてドナー EBV-LCL を、および自家コントロールとしてドナー OKT3 芽細胞 (blast) を使用して、4 時間 ^{51}Cr -放出アッセイにおいて測定した。NK 活性を、30 倍過剰の非放射能の K562 細胞を添加することによって阻害した。

【0340】

(二量体化の化学的誘導物質、AP20187 でのアポトーシスの誘導)

自殺遺伝子機能性を、小分子合成ホモ二量体化剤、AP20187 (Ariad Pharmaceuticals; Cambridge, MA) を CD19 免疫磁性選択の翌日に 10 nM 終濃度で添加することによって評価した。細胞を、24 時間においてアネキシン V および 7-アミノアクチノマイシン (7-AAD) (BD Pharmingen) で染色し、フローサイトメトリーによって分析した。アネキシン V および 7-AAD の両方に関して陰性の細胞を、生存しているとみなし、アネキシン V 陽性の細胞をアポトーシスとみなし、アネキシン V および 7-AAD の両方が陽性の細胞を壊死とみなした。二量体化によって誘導される殺滅率を、以下のとおり、基底生存率に関して校正した：殺滅率 = $100\% - (\text{AP20187 処理細胞の}\% \text{生存率} \div \text{非処理細胞の}\% \text{生存率})$ 。

【0341】

(長期培養および再活性化後の導入遺伝子発現の評価)

細胞を、形質導入の 22 日後まで、50 U/ml IL-2 を含む T 細胞培地中で維持した。細胞の一部を、1 g/ml OKT3 および 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 抗 CD28 (Clone CD28.2, BD Pharmingen, San Jose, CA) で 48~72 時間コーティングした 24 ウェルプレート上で再活性化した。再活性化細胞および非再活性化細胞の両方での CD19 発現および自殺遺伝子機能を、形質導入後の 24 日目または 25 日目に測定した。

【0342】

いくつかの実験では、細胞をまた、形質導入後 3 週間培養し、1：1 のレスポンドー：刺激物質比において、30 G 照射同種異系 PBMC で刺激した。共培養の 4 日後、細胞の一部を、10 nM AP20187 で処理した。殺滅を、24 時間においてアネキシン V / 7-AAD 染色によって測定し、バイスタンダーウイルス特異的 T 細胞に対する二量体化剤の効果を、AP20187 処理細胞および未処理細胞に対するペンタマー分析によって評価した。

【0343】

(制御 T 細胞)

CD4、CD25 および Foxp3 の発現を、フローサイトメトリーを使用して、遺伝子改変された同種枯渇された細胞において分析した。ヒト Foxp3 染色に関して、eBioscience (San Diego, CA) 染色セットを、適切なラット IgG 2a アイソタイプコントロールとともに使用した。これら細胞を、表面 CD25-FITC および CD4-PE で共染色した。機能分析を、同種枯渇および遺伝子改変後に選択された $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+$ 細胞と、カルボキシフルオレセインジアセテート N-スクシンイミドエステル (CFSE) 標識自家 PBMC とを共培養することによって行った。 $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+$ 選択を、抗 CD8 マイクロビーズ (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) を使用して CD8^+ 細胞をまず枯渇させ、続いて、抗 CD25 マイクロビーズ (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) を使用して陽性選択を行った。CFSE 標識を、1.5 μM CFSE を含むリン酸緩衝食塩水中 $2 \times 10^7 / \text{ml}$ の自家 PBMC を 10 分間インキュベートすることによって行った。上記反応を、等容積の FBS を添加し、10 分間、37 °C でインキュベートすることによって停止した。細胞を、使用前に 2 回洗浄した。CFSE 標識 PBMC を、OKT3 500 ng/ml

1 および 40 G 照射同種 P B M C フィーダーで、P B M C：同種フィーダー比 5：1 において刺激した。次いで、細胞を、等数の自家 C D 4⁺ 2 5⁺ 遺伝子改変された同種枯渇された細胞ありまたはなしで培養した。培養の 5 日後に、細胞分裂を、フローサイトメトリーによって分析した；C D 1 9 を使用して、非 C F S E 標識の C D 4⁺ C D 2 5⁺ 遺伝子改変された T 細胞をゲートアウトした。

【0344】

(統計分析)

対応のある両側スチューデント t 検定を使用して、サンプル間の統計的有意差を決定した。全てのデータを、平均 ± 1 標準偏差として表す。

【0345】

(結果)

選択的に同種枯渇した T 細胞を、i C a s p 9 で効率的に形質導入し、拡大し得る。

選択的同種枯渇を、臨床プロトコル手順に従って行った。簡潔には、3 / 6 ~ 5 / 6 の H L A ミスマッチ P B M C およびリンパ芽球細胞株 (L C L) を共培養した。R F T 5 - S M P T - d g A 免疫毒素を、72 時間の共培養後に適用し、< 10 % 残余増殖 (平均 4 . 5 ± 2 . 8 % ; 範囲 0 . 7 4 ~ 9 . 1 % ; 10 回の実験) を有し、< 1 % 残余 C D 3⁺ C D 2 5⁺ 細胞 (平均 0 . 2 3 ± 0 . 2 0 % ; 範囲 0 . 0 6 ~ 0 . 7 3 % ; 10 回の実験) を含む同種枯渇細胞を確実に生成した。それによって、選択的同種枯渇のための放出基準を満たしかつその後の操作のための出発材料として働いた。

【0346】

固定化 O K T 3 上で 48 時間にわたって活性化した同種枯渇された細胞は、S F G . i C a s p 9 . 2 A . C D 1 9 をコードする G a l - V 偽型レトロウイルスベクターで効率的に形質導入できた。形質導入の 2 ~ 4 日後に C D 1 9 発現に関して F A C S 分析によって評価した形質導入効率は、約 53 % ± 8 % であり、小規模 (24 ウェルプレート) および大規模 (T 75 フラスコ) での形質導入についての結果 (それぞれ、6 回および 4 回の実験において約 55 ± 8 % 対 約 50 % ± 10 %) と匹敵していた。細胞数は、O K T 3 活性化後の最初の 2 日間において縮小し、その結果、同種枯渇された細胞のうちのわずかに約 61 % ± 12 % (約 45 % ~ 80 % の範囲) が、形質導入の日に回収された (図 9 を参照のこと)。同種枯渇された細胞が形質導入後に成功裡に拡大し得るかどうかを決定するために行った実験のグラフ結果を図 9 に図示する。黒菱形は、フラスコおよびバッグの中で行った大規模実験を示す。白丸は、24 ウェルプレートの中で行った小規模実験を示す。その後、上記細胞は、その後の 8 日間にわたって約 94 ± 46 倍の範囲 (約 40 ~ 約 153 の範囲) の平均拡大で有意な拡大を示し、正味 58 ± 33 倍の拡大を生じた。細胞拡大は、小規模および大規模実験の両方において、5 回の小規模実験において正味の拡大約 45 ± 29 倍 (約 25 ~ 約 90 の範囲) および 3 回の大規模実験において約 79 ± 34 倍 (約 50 ~ 約 116 の範囲) と類似していた。

【0347】

(Δ C D 1 9 は、免疫磁性カラム上で、形質導入された細胞の効率的かつ選択的富化を可能にする)

自殺遺伝子活性化の効率は、ときおり、自殺遺伝子自体の機能性に依存し、ときおり、遺伝子改変された細胞を富化するために使用される選択システムに依存する。選択マーカーとしての C D 1 9 の使用を、C D 1 9 選択が十分な純度および収量で遺伝子改変された細胞の選択を可能にするかどうか、および選択がその後の細胞成長に対して任意の有害作用を有するかどうかを決定するために調査した。小規模選択を、製造業者の指示に従って行った；しかし、大規模選択は、10 リットルの C D 1 9 マイクロビーズを 1.3×10^7 細胞につき使用する場合に最適であることが判明した。F A C S 分析を、免疫磁性選択の 24 時間後に行って、抗 C D 1 9 マイクロビーズからの干渉を最小にした。免疫磁性選択後の細胞の純度は、一貫して 90 % より高かった：C D 1 9⁺ 細胞の平均パーセンテージは、小規模選択で約 98 . 3 % ± 0 . 5 % (n = 5) の範囲にあり、大規模 C l i n i M a c s 選択で約 97 . 4 % ± 0 . 9 % (n = 3) の範囲にあった。

【0348】

小規模および大規模での選択の絶対収量は、形質導入効率の校正後に；それぞれ、約31%±11%および約28%±6%であった。形質導入された細胞の平均回収率は、小規模選択で約54%±14%および大規模選択で約72%±18%であった。選択プロセスは、その後の細胞拡大に対して何ら識別可能な有害作用を有しなかった。4回の実験において、CD19免疫磁性選択後3日間にわたる平均細胞拡大は、CD19陽性画分に関して約3.5倍 対 選択されていない形質導入された細胞に関して約4.1倍 ($p=0.34$) および非形質導入細胞に関して約3.7倍 ($p=0.75$) であった。

【0349】

(遺伝子改変された同種枯渇された細胞の免疫表現型)

10

最終細胞生成物（形質導入の8日後に低温貯蔵された、遺伝子改変された同種枯渇された細胞）を、免疫表現型決定したところ、CD4細胞およびCD8細胞の両方を含むことが見出され、以下の表で示されるとおり、62%±11% CD8⁺ 対 23%±8% CD4⁺でCD8細胞が優勢であった。NS = 有意でない、SD = 標準偏差。

【0350】

【表 1】

表1

	非操作 PBMC (平均% ± SD)	遺伝子改変された同種 枯渇細胞 (平均% ± SD)	
T 細胞: 全 CD3 ⁺	82 ± 6	95 ± 6	NS
CD3 ⁺ 4 ⁺	54 ± 5	23 ± 8	p < 0.01
CD3 ⁺ 8 ⁺	26 ± 9	62 ± 11	p < 0.001
NK 細胞: CD3 ⁻ 56 ⁺	6 ± 3	2 ± 1	NS
記憶表現型			
CD45RA ⁺	66 ± 3	10 ± 5	p<0.001
CD45RO ⁺	26 ± 2	78 ± 7	p<0.001
CD45RA ⁻ CD62L ⁺	19 ± 1	24 ± 7	NS
CD45RA ⁻ CD62L ⁻	9 ± 1	64 ± 7	p<0.001
CD27 ⁺ CD28 ⁺	67 ± 7	19 ± 9	p<0.001
CD27 ⁺ CD28 ⁻	7 ± 3	9 ± 4	NS
CD27 ⁻ CD28 ⁺	4 ± 1	19 ± 8	p<0.05
CD27 ⁻ CD28 ⁻	22 ± 8	53 ± 18	p<0.05

【0351】

細胞の大部分は、CD45RO⁺であり、エフェクター記憶T細胞の表面免疫表現型を有した。記憶マーカー（CD62L、CD27およびCD28を含む）の発現は、不均一であった。細胞のうちのおよそ24%は、CD62L（中枢記憶細胞上で主に発現されるリンパ節ホーミング分子）を発現した。

【0352】

（遺伝子改変された同種枯渇された細胞は、抗ウイルスレパートリーおよび機能を保持した）

最終生成物の細胞が抗ウイルス免疫を媒介する能力を、インターフェロン-ELISPOT、細胞傷害アッセイ、およびペンタマー分析によって評価した。低温貯蔵された遺伝

10

20

30

40

50

子改変された同種枯渇された細胞を、全ての分析において使用した。なぜならそれらは、臨床試験における使用のために現在評価されている生成物の代表であったからである。ドナー細胞によって提示されるアデノウイルス抗原、CMV抗原またはEBV抗原に応答したインターフェロン- γ 分泌は保存されたが、非操作PBMCに対して遺伝子改変された同種枯渇された細胞において抗EBV応答は低下する傾向にあった。ウイルス抗原に対する応答は、4対の非操作PBMCおよび遺伝子改変された同種枯渇された細胞(GMAC)においてELISPOTによって評価した。アデノウイルス抗原およびCMV抗原は、それぞれ、Ad5f35ヌルベクターおよびAd5f35-pp65ベクターでの感染を通じて、ドナー由来活性化単球によって提示された。EBV抗原は、ドナーEBV-LCLによって提示された。スポット形成単位(SFU)の数字を、刺激物質のみのウェルおよびレスポンダーのみのウェルに対して校正した。4名のドナーのうちの3名のみが、CMV応答について評価可能であり、1名のセロネガティブドナーを除外した。

10

【0353】

細胞傷害を、ドナー由来EBV-LCLを標的として使用して評価した。ドナー由来EBV-LCLで2ラウンドまたは3ラウンドの刺激を受けた、遺伝子改変された同種枯渇された細胞は、ウイルス感染した自家標的細胞を効率的に溶解できた。遺伝子改変された同種枯渇された細胞を、ドナーEBV-LCLで2サイクルまたは3サイクルにわたって刺激した。⁵¹Cr放出アッセイを、ドナー由来EBV-LCLおよびドナーOKT3芽細胞を標的として使用して行った。NK活性を、30倍過剰の非放射能K562でブロックした。左パネルは、全体的にまたは部分的にミスマッチのドナー-レシピエント対を使用する5回の独立した実験からの結果を示す。右のパネルは、血縁のないHLAハプロタイプ一致ドナー-レシピエント対を使用する3回の実験からの結果を示す。エラーバーは、標準偏差を示す。

20

【0354】

EBV-LCLを、選択的同種枯渇の間の抗原提示細胞として使用した。従って、ドナーおよびレシピエントがハプロタイプ一致である場合に、EBV特異的T細胞が有意に枯渇され得ることは可能であった。この仮説を調査するために、血縁のないHLAハプロタイプ一致のドナー-レシピエント対を使用する3回の実験が含まれ、その結果は、ドナー由来EBV-LCLに対する細胞傷害性が保持されることを示した。その結果は、HLA-B8陰性ハプロタイプ一致レシピエントに対する同種枯渇後の2名の有益なドナーにおいて、HLA-B8-RAKF KQLL(EBV溶解抗原(BZLF1)エпитープ)を認識するT細胞に関するペンタマー分析によって実証された。非操作PBMCを、比較物質として使用した。このRAK-ペンタマー陽性集団は、遺伝子改変された同種枯渇された細胞において保持され、ドナー由来EBV-LCLでの数ラウンドのインビトロ刺激後に拡大できた。まとめると、これら結果は、遺伝子改変された同種枯渇された細胞が有意な抗ウイルス機能性を保持したことを示す。

30

【0355】

(遺伝子改変された同種枯渇された細胞集団における制御T細胞)

フローサイトメトリーおよび機能分析を使用して、制御性T細胞が、本発明者らの同種枯渇された、遺伝子改変されたT細胞生成物において保持されるかどうかを決定した。Foxp3⁺CD4⁺25⁺集団を見出した。免疫磁性分離後に、CD4⁺CD25⁺富化された画分は、CFSE標識自家PBMCとともにOKT3および同種フィーダーの存在下で共培養した場合に、サプレッサー機能を示した(12B)。ドナー由来PBMCをCFSEで標識し、OKT3および同種フィーダーで刺激した。CD4⁺CD25⁺細胞を、遺伝子改変された細胞集団から免疫磁性選択し、1:1比で試験ウェルに添加した。フローサイトメトリーを5日後に行った。遺伝子改変されたT細胞を、CD19発現によってゲートアウトした。CD4⁺CD25⁺遺伝子改変された細胞の添加(下のパネル)は、細胞増殖を有意に減少させた。従って、同種枯渇されたT細胞は、CD25枯渇免疫毒素への曝露後にすら、制御性の表現型を再獲得し得る。

40

【0356】

50

(遺伝子改変された同種枯渇された細胞は、二量体化の化学的誘導物質の添加によって効率的にかつ迅速に排除された)

免疫磁性選択の翌日に、10 nMの二量体化の化学的誘導物質であるAP20187を添加して、アポトーシスを誘導した。アポトーシスは、24時間以内に出現した。24時間においてアネキシンVおよび7-AAD染色によるFACS分析は、AP20187処理細胞のうちの約5.5%±2.5%のみが生存可能なままであるのに対して、非処理細胞のうちの約81.0%±9.0%が生存可能であることを示した(以下を参照のこと: ベースラインの生存率に対する校正後の殺滅効率は、約92.9%±3.8%であった。大規模CD19選択は、小規模選択と類似の効率で殺滅された細胞を生じた: 大規模および小規模において、AP20187ありおよびなしの平均生存率、ならびにパーセンテージ殺滅は、それぞれ、約3.9%、約84.0%、約95.4%(n=3)ならびに約6.6%、約79.3%、約91.4%(n=5)であった。AP20187は、非形質導入細胞に対して非毒性であった: AP20187ありおよびなしでの生存率は、それぞれ、約86%±9%および87%±8%(n=6)であった。

【0357】

(導入遺伝子発現および機能は、長期の培養とともに減少したが、細胞再活性化の際に回復した)

導入遺伝子発現および機能の安定性を評価するために、細胞を、形質導入後24日まで、T細胞培養培地および低用量IL-2(50 U/ml)中で維持した。次いで、細胞の一部を、OKT3/抗CD28で再活性化した。CD19発現を、48~72時間後にフローサイトメトリーによって分析し、自殺遺伝子機能を、10 nM AP20187での処理によって評価した。48~72時間の活性化ありまたはなし(5回の実験)で、形質導入後5日目(すなわち、CD19選択の1日後)および形質導入後24日目の細胞を得る。2回の実験では、CD25選択を、OKT3/aCD28活性化後に行って、活性化した細胞をさらに富化した。エラーバーは、標準偏差を表す。*は、形質導入後5日目の細胞と比較した場合に、 $p < 0.05$ を示す。24日目までに、表面CD19発現は、 79.3 ± 12.8 から 47.8 ± 10.7 への平均蛍光強度(MFI)の並行した低下($p < 0.05$)とともに、約98%±1%から約88%±4%へと低下した($p < 0.05$)(図13Bを参照のこと)。同様に、自殺遺伝子機能は有意に減少した: 残余生存率は、AP20187での処理後に $19.6 \pm 5.6\%$ であった; ベースラインの生存率 $54.8 \pm 20.9\%$ に対する校正後に、これは、わずか $63.1 \pm 6.2\%$ という殺滅効率に等しかった。

【0358】

導入遺伝子発現における経時的減少がT細胞静止後の低下した転写にまたは形質導入した細胞の排除に起因したかどうかを決定するために、細胞の一部を、OKT3および抗CD28抗体での形質導入後22日目に再活性化した。48~72時間で(形質導入後24日目または25日目)において、OKT3/aCD28再活性化した細胞は、非再活性化細胞より有意に高い導入遺伝子発現を有した。CD19発現は、約88%±4%から約93%±4%へと増大し($p < 0.01$)、CD19 MFIは、 47.8 ± 10.7 から 64.3 ± 17.4 へと増大した($p < 0.01$)。さらに、自殺遺伝子機能はまた、約63.1%±6.2%殺滅効率から約84.6%±8.0%($p < 0.01$)殺滅効率へと有意に増大した。さらに、殺滅効率は、細胞が活性化マーカーCD25に関して免疫磁性的にソートされた場合に完全に回復した: CD25陽性細胞の殺滅効率は、約93.2%±1.2%であった。これは、形質導入後5日目の殺滅効率(93.1±3.5%)と同じであった。CD25陰性画分の殺滅は、 $78.6 \pm 9.1\%$ であった。

【0359】

注意すべき観察は、二量体化剤が、非特異的マイトジェン刺激によるよりむしろ、同種PBMCで再活性化された遺伝子改変された細胞を枯渇させるために使用された場合、多くのウイルス特異的T細胞が残された(spare)ことであった。同種細胞での4日間の再活性化後に、図14Aおよび14Bに示されるように、AP20187での処理は、

EBVおよびCMVに由来するペプチドに対して特異的なHLAペントマーと反応性のT細胞の割合によって測定される場合、ウイルス反応性亜集団を残す（およびそれによって富化する）。遺伝子改変された同種枯渇された細胞を、形質導入後3週間にわたって培養物中で維持して、導入遺伝子ダウンモジュレーションを可能にした。細胞を、同種PBM Cで4日間刺激し、その後、一部を10nM AP20187で処理した。EBV特異的T細胞およびCMV特異的T細胞の頻度は、同種刺激前に、同種刺激後に、および二量体化剤での同種刺激細胞の処理後に、ペントマー分析によって定量した。ウイルス特異的T細胞のパーセンテージは、同種刺激後に減少した。二量体化剤での処理後に、ウイルス特異的T細胞は、部分的におよび優先的に保持された。

【0360】

（考察）

同種T細胞を2種の別個の安全機構、選択的同種枯渇および自殺遺伝子改変で操作するという実施可能性は、本明細書で示されてきた。組み合わせると、これら改変は、ハプロタイプ一致移植後ですら、抗ウイルス活性および抗腫瘍活性を有する実質的な数のT細胞の追加戻しを高め得るおよび／または可能にし得る。本明細書で示されるデータは、自殺遺伝子iCasp9が効率的に機能すること（二量体化剤での処置後に>90% アポトーシス）および同種反応性T細胞がそれらの標的と遭遇した場合に起こるように、経時的に起こる導入遺伝子発現のダウンモジュレーションがT細胞活性化の際に迅速に逆にされたことを示す。本明細書で示されるデータはまた、CD19が、形質導入された細胞の>90% 純度への効率的かつ選択的富化を可能にした適切な選択マーカーであることを示す。さらに、本明細書で示されるデータは、これら操作が、抗ウイルス活性の保持を伴うその操作されたT細胞の免疫学的能力に対する認識できる効果、およびTreg活性を有するCD4⁺CD25⁺Foxp3⁺集団の再生を有しなかったことを示す。

【0361】

自殺遺伝子の全体的な機能性が、自殺遺伝子自体および形質導入された細胞を選択するために使用されるマーカーの両方に依存するならば、臨床的使用への変換は、両方の構成成分の最適化、および2種の遺伝子の発現を結びつけるために使用される方法の最適化を必要とする。この2種の最も広く（現在では臨床診療において）使用される選択マーカーは、各々欠点を有する。ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ（neo）は、潜在的に免疫原性の外来タンパク質をコードし、選択培地中での7日間の培養を要し、これは、系の複雑さを増大させるのみならず、ウイルス特異的T細胞に対して潜在的に損傷をも与える。広く使用される表面選択マーカーLNGFRは、その明らかな臨床的安全性にもかかわらず、マウスモデルでは、その腫瘍形成潜在能および白血病との潜在的な相関性に関して近年懸念が高まっている。さらに、LNGFR選択は、広く利用可能ではない。なぜならそれは、遺伝子治療においてほぼ独占的に使用されるからである。多くの代替の選択マーカーが示唆されている。CD34は、インビトロで十分に研究されているが、希な造血前駆体の選択のために主に構成された系を最適化するために必要とされる工程、およびより重大なことには、変化したインビボでのT細胞ホーミングの潜在性は、CD34を、自殺スイッチ発現構築物に関する選択マーカーとしての使用に対して最適以下にする。CD19は、代替の選択マーカーとして選択された。なぜなら臨床グレードのCD19選択は、幹細胞自己移植のB細胞枯渇のための方法として容易に利用可能であるからである。本明細書で示される結果は、CD19富化が高純度かつ高収量で行われ得、さらに、選択プロセスがその後の細胞成長および機能性に対して認識できる効果を有しないことを示した。

【0362】

CD19選択iCasp9細胞における自殺遺伝子活性化の有効性は、HSVtk遺伝子を発現するように形質導入したneo選択細胞またはLNGFR選択細胞の活性化に対して非常に都合良く比較した。HSVtk構築物のより前の世代は、³H-チミジン取り込みの80~90%抑制を提供し、長期のインビトロ培養の際に殺滅効率において同様の減少を示したが、それでもなお臨床的に有効であった。急性および慢性両方のGVHDの

完全な消散は、循環する遺伝子改変された細胞におけるインビボでの減少が僅か80%であると報告された。これらデータは、インビトロで見られる導入遺伝子ダウンモジュレーションが問題となりそうにないという仮説を支持する。なぜならGVHDの原因である活性化T細胞が、自殺遺伝子発現をアップレギュレートし、従って、インビボで選択的に排除されるからである。この効果が、インビボでのウイルス特異的T細胞および白血病特異的T細胞の保持を可能にするために十分であるかどうかは、臨床状況で試験される。自殺遺伝子改変前にインビトロ選択的同種枯渇を組み合わせることによって、自殺遺伝子機構を活性化する必要性は、有意に減少し得、それによって、追加戻しT細胞ベースの治療の利益を最大化し得る。

【0363】

インビトロで見られるiCasp9媒介性自殺の高効率性は、インビボでも繰り返された。SCIDマウスーヒト異種移植モデルにおいて、iCasp9改変T細胞のうちの99%超が、二量体化剤の単一用量後に排除された。AP1903（これは、AP20187に極めて近い機能的かつ化学的等価性を有し、臨床適用における使用が現在提唱されている）は、健常ヒト志願者に対して安全性が試験され、安全であると示された。約10ng/ml～約1275ng/ml AP1903（約7nM～約892nMの間で等価）との間の最大血漿レベルは、2時間の静脈内注入として投与される、0.01mg/kg～1.0mg/kg用量範囲にわたって達した。実質的に有意な有害作用はなかった。迅速な血漿再分布を可能にした後、インビトロで使用される二量体化剤の濃度は、インビボで容易に達成可能なままである。

【0364】

自殺遺伝子改変T細胞の免疫学的能力を維持するために最適な培養条件を、安全スイッチ、選択マーカーおよび細胞タイプの各組み合わせに関して決定して定義しなければならない。なぜなら表現型、レパートリーおよび機能性は、全て、ポリクローナルT細胞活性化のために使用される刺激、形質導入細胞の選択のための方法、および培養の継続時間によって影響を及ぼされ得るからである。CD28共刺激の付加およびCD4:CD8比に関して非操作PBMCにより密接に似ている遺伝子改変された細胞を生成するための細胞サイズの常磁性ビーズの使用、ならびにリンパ節ホーミング分子CD62LおよびCCR7を含む記憶サブセットマーカーの発現は、遺伝子改変されたT細胞のインビボ機能性を改善し得る。CD28共刺激はまた、レトロウイルス形質導入および拡大の効率を増大し得る。しかし、興味深いことには、CD28共刺激の付加は、同種枯渇された細胞の形質導入に何ら影響を有しないことが見出され、示された細胞拡大の程度は、他の研究において抗CD3単独アームと比較した場合に、より高かった。さらに、iCasp9改変同種枯渇された細胞は、有意な抗ウイルス機能性を保持し、およそ1/4は、CD62L発現を保持した。CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺制御性T細胞の再生もまた、見られた。T細胞活性化および形質導入のための出発材料として使用される同種枯渇された細胞は、共刺激としての抗CD28抗体の添加にあまり感受性を有しない可能性がある。CD25枯渇されたPBMC/EBV-LCL共培養物は、非操作PBMCより有意に高いレベルでCD86を既に発現しかつ共刺激を提供し得るT細胞およびB細胞を含んだ。抗CD3でのポリクローナルT細胞活性化の前にCD25⁺制御性T細胞を枯渇させると、最終T細胞生成物の免疫学的能力を高めることが報告された。機能的能力に対するインビトロ培養および拡大の効果を最小にするために、本明細書で示されるいくつかの実験では、比較的短時間の培養期間を使用した。それによって細胞は、4日目に行われるCD19選択を伴う形質導入後合計8日間にわたって拡大された。

【0365】

最後に、スケールアップした生成が示され、その結果、十分な細胞生成物が、10⁷細胞/kgまでの用量で成人患者を処置するために生成され得る：同種枯渇された細胞は、4×10⁷細胞/フラスコで活性化および形質転換され得、CD19選択された最終細胞生成物の最小で8倍の回復が、元のフラスコ1個あたり少なくとも3×10⁸同種枯渇された遺伝子改変された細胞を生成するために、形質導入後8日目に得られ得る。増大

した培養容積は、さらなるフラスコまたはバッグに容易に収容され得る。

【0366】

本明細書で示される同種枯渇および *i C a s p 9* 改変は、特にハプロタイプ一致幹細胞同種移植後に、T細胞を添加し戻す安全性を有意に改善し得る。これは、翻って、抗白血病効果を生じるといふより高い見込みとともに、より大きな用量漸増を可能にするはずである。

【0367】

(実施例3)

(CASPALLO - ハプロタイプ一致幹細胞移植後の誘導性カスパーゼ9自殺遺伝子で形質導入した同種枯渇T細胞のフェーズI臨床試験)

10

この例は、図2において例示した代替の自殺遺伝子ストラテジーを使用するフェーズI臨床試験の結果を示す。簡潔には、ドナー末梢血単核球を、レシピエントの照射EBV形質転換リンパ芽球様細胞とともに(40:1)72時間共培養し、CD25免疫毒素で同種枯渇させ、次いで、*i C a s p 9*自殺遺伝子および選択マーカー($\Delta C D 1 9$)を有するレトロウイルス上清で形質導入した； $\Delta C D 1 9$ は、免疫磁性選択を介して>90%純度への富化を可能にした。

【0368】

細胞治療製品の生成のためのプロトコルの一例を、本明細書で提供する。

【0369】

(原材料)

20

末梢血の240mlまで(2回の収集にて)を、確立されたプロトコルに従って移植ドナーから得た。場合によっては、ドナーおよびレシピエントのサイズに依存して、白血球除去を行って、十分なT細胞を単離した。10cc~30ccの血液をまた、レシピエントから採血し、それを使用して刺激細胞(stimulator cell)として使用されるエプスタイン・バーウイルス(EBV)形質転換リンパ芽球様細胞株を生成した。場合によっては、医療履歴および/またはB細胞数が低いという表示に依存して、LCLを、適切な第1度近親者(例えば、親、きょうだい、もしくは子孫)の末梢血単核球を使用して生成した。

【0370】

(同種枯渇細胞の生成)

30

同種枯渇細胞を、本明細書で示されるように移植ドナーから生成した。健常ドナーの末梢血単核球(PBMC)を、無血清培地(AIM V; Invitrogen, Carlsbad, CA)中40:1のレスポンド対刺激物質比において、照射したレシピエントのエプスタイン・バーウイルス(EBV)形質転換リンパ芽球様細胞株(LCL)とともに共培養した。72時間後、CD25を発現する活性化T細胞を、RFT5-SMPT-dgA免疫毒素中での一晚のインキュベーションによって、共培養物から枯渇させた。同種枯渇を、その残りのCD3⁺CD25⁺集団が<1%であり、³H-チミジン取り込みによる残りの増殖が<10%であった場合に、適切であるとみなす。

【0371】

(レトロウイルス生成)

40

【0372】

レトロウイルスプロデューサー株クローンを、*i C a s p 9*-CD19構築物のために生成した。このプロデューサーのマスター細胞バンクもまた、生成した。このマスター細胞バンクの試験を行って、複製能のあるレトロウイルスの生成およびMycoplasma、HIV、HBV、HCVなどによる感染を除外した。このプロデューサー株を、コンフルエントになるまで成長させ、上清を採取し、濾過し、アリコートに分け、急速凍結し、-80℃で貯蔵した。さらなる試験を、レトロウイルス上清の全てのバッチに対して行って、プロトコルに従って、複製能のあるレトロウイルス(RCR)を除外し、分析証明書を発行した。

【0373】

50

(同種枯渴細胞の形質導入)

同種枯渴 T リンパ球を、フィブロネクチンを使用して形質導入した。プレートまたはバッグを、組換えフィブロネクチンフラグメント CH-296 (Retronection M, Takara Shuzo, Otsu, Japan) でコーティングした。ウイルスを、コーティングしたプレートまたはバッグ中でプロデューサー上清をインキュベートすることによってレトロネクチンに結合させた。次いで、細胞を、ウイルスコーティングしたプレートまたはバッグに移した。形質導入後、同種枯渴 T 細胞を、プロトコルに従って、これらに IL-2 を 1 週間に 2 回供給して増殖させて十分な細胞数に到達させた。

【0374】

10

(CD19 免疫磁性選択)

CD19 に関する免疫磁性選択を、形質導入の 4 日後に行った。細胞を、モノクローナルマウス抗ヒト CD19 抗体に結合体化した常磁性マイクロビーズ (Miltenyi Biotech, Auburn, CA) で標識し、CliniMac Plus 自動化選択デバイスで選択する。臨床での注入に必要とされる細胞数に依存して、細胞を、CliniMac 選択後に凍結保存するか、または IL-2 でさらに増殖させて形質導入後の 6 日目または 8 日目に凍結保存するかのいずれかを行った。

【0375】

(凍結)

細胞のアリコート、FDA による最終リリース試験のために必要とされたとおりの形質導入効率、同一性、表現型および微生物学的培養を試験するために取り出した。この細胞を、プロトコルに従って投与する前に、凍結保存した。

20

【0376】

(研究薬)

(RFT5-SMPT-dgA)

RFT5-SMPT-dgA は、ヘテロー二官能性架橋剤 [N-スクシンイミジルオキシカルボニル- α -メチル-L- (2-ピリジルチオ) トルエン] (SMPT) を介して化学的に脱グリコシル化したリシン A 鎖 (dgA) に結合体化したマウス IgG1 抗 CD25 (IL-2 レセプター α 鎖) である。RFT5-SMPT-dgA を、0.5 mg/mL の滅菌溶液として製剤化する。

30

【0377】

(合成ホモ二量体化剤 AP1903)

作用機構：AP1903 誘導性細胞死は、ヒト FK506 結合タンパク質 (FKBP) 由来の薬物結合ドメインに融合されたヒト (カスパーゼ-9 プロテイン) レセプター (これは、アポトーシス細胞死をシグナル伝達する) の細胞内部分を含むキメラタンパク質を発現させることによって達成される。このキメラタンパク質は、FKBP ドメインを架橋し、カスパーゼシグナル伝達およびアポトーシスを開始する AP1903 の投与まで細胞内で静止状態のままである。

【0378】

毒物学：AP1903 は、FDA によって臨床試験用の新医薬品 (IND) として評価されており、フェーズ I 臨床安全性研究を成功裡に終えた。AP1903 を 0.01 mg/kg ~ 1.0 mg/kg 用量範囲にわたって投与した場合に、有意な有害作用は注記されなかった。

40

【0379】

薬理学/薬物動態：患者に、0.4 mg/kg の AP1903 を、2 時間注入として (0.01 mg/kg ~ 1.0 mg/kg 用量範囲にわたって 10 ng/mL ~ 1275 ng/mL の血漿濃度を示し、血漿レベルは、投与後 0.5 時間および 2 時間で最大から 18% および 7% へと低下するという、公開された PK データに基づいて) 与えた。

【0380】

ヒトにおける副作用プロファイル：志願者でのフェーズ I 研究の間には、重篤な有害事

50

象は起こらなかった。有害事象の発生率は、各処置後に非常に低く、全ての有害事象は、重症度が軽度であった。唯一の有害事象は、おそらくA P I 9 0 3に関連していると考えられた。これは、1. 0 m g / k g A P I 9 0 3投与量で1名の志願者について「顔面紅潮」として示された血管拡張というエピソードであった。この事象は、注入の開始後3分で起こり、32分の継続後に消散した(resolved)。この研究の間に報告された全ての他の有害事象は、研究者によって研究薬には関連しないかまたは関連性がありそうもない(improbable)と考えられた。これらの事象は、胸痛、インフルエンザ症候群、口臭、頭痛、注射部位疼痛、血管拡張、咳の増加、鼻炎、発疹、歯肉出血、および斑状出血を含んだ。

【0381】

10

グレード1 GVHDを発症している患者を、2時間注入として、0. 4 m g / k g A P I 9 0 3で処置した。患者グレード1 GVHDへのA P I 9 0 3の投与プロトコルを、以下のとおり確立した。同種枯渴T細胞の注入後にGVHDを発症している患者を生検して診断を確定し、0. 4 m g / k gのA P I 9 0 3を2時間の注入として与える。グレード1 GVHDを有する患者は、他の治療を最初に何も受けなかったが、彼らがGVHDの進行を示した場合、従来のGVHD治療を、施設のガイドラインに従って投与した。グレード2～4 GVHDを発症している患者に、施設のガイドラインに従って、A P I 9 0 3二量体化薬物に加えて、標準的な全身免疫抑制治療を施した。

【0382】

調製および注入の指示：注射用A P I 9 0 3を、3 m l バイアル中、5 m g / m lの濃度で2. 33 m lの濃縮溶液（すなわち、10. 66 m g / バイアル）として得る。投与前に、その計算した用量を、注入用0. 9% 生理食塩水中で100 m Lへと希釈した。100 m l容積中の注射用A P I 9 0 3（0. 4 m g / k g）を、非DEHP、非エチレンオキシド滅菌注入セットおよび注入ポンプを使用して、2時間かけてIV注入を介して投与した。

20

【0383】

i C a s p 9自殺遺伝子発現構築物（例えば、S F G. i C a s p 9. 2 A. A C D 1 9）は、切断可能な2 A様配列を介して短縮型ヒトC D 1 9（A C D 1 9）へと連結した誘導性カスパーゼ9（i C a s p 9）からなる。i C a s p 9は、S e r - G l y - G l y - G l y - S e r - G l yリンカーを介してヒトカスパーゼ9（C A S P 9； G e n B a n k N M 0 0 1 2 2 9）へと接続された、F 3 6 V変異を有するヒトF K 5 0 6結合タンパク質（F K B P 1 2； G e n B a n k A H 0 0 2 8 1 8）を含む。このF 3 6 V変異は、合成ホモ二量体化剤A P 2 0 1 8 7またはA P I 9 0 3に対するF K B P 1 2の結合親和性を増大させ得る。カスパーゼリクルートメントドメイン（C A R D）は、ヒトカスパーゼ9配列から欠失されており、その生理学的機能は、F K B P 1 2によって置き換えられている。C A R DをF K B P 1 2で置き換えると、導入遺伝子発現および機能が増大する。上記2 A様配列は、T h o s e a A s i g n a昆虫ウイルス由来の18アミノ酸のペプチドをコードし、それはグリシンと末端プロリン残基との間で>99%切断を媒介し、i C a s p 9のC末端において17個の余分なアミノ酸およびC D 1 9のN末端において1個の余分なプロリン残基を生じる。Δ C D 1 9は、アミノ酸333（T D P T R R F）で短縮された全長C D 1 9（G e n B a n k N M 0 0 1 7 7 0）からなり、これは、細胞質内ドメインを242から19アミノ酸に短縮し、リン酸化の潜在的部位である全ての保存されたチロシン残基を除去する。

30

40

【0384】

（インビボ研究）

3名の患者に、ハプロ-C D 3 4⁺幹細胞移植（S C T）後に、約1 × 10⁶ 細胞 / k g ~ 約3 × 10⁶ 細胞 / k gの間の用量レベルでi C a s p 9 + T細胞を与えた。

【0385】

【表 2】

表2: 患者の特性および臨床転帰

患者番号	性別 (年齢 (歳))	診断	SCT での 疾患状態	SCT か ら T 細 胞 注 入 ま での 日 数	1kg あた りに注 入 した細胞 の 数	急性 GvHD	臨床転帰
P1	M(3)	MDS/AML	CR2	63	1×10^6	グレード 1/2 (皮膚, 肝 臓)	CR>12 ヶ 月で生存 GvHD な し
P2	F(17)	B-ALL	CR2	80 およ び 112	$(1 \times 10^6)2$	グレード 1 (皮膚)	CR>12 ヶ 月で生存 GvHD な し
P3	M(8)	T-ALL	PIF/CR1	93	3×10^6	なし	CR で生 存>12 GvHD な し
P4	F(4)	T-ALL	活動性疾 患	30	3×10^6	グレード 1 (皮膚)	CR >12 で生存 GvHD な し

【0386】

注入したT細胞を、図27、28および29において図示したように、注入後7日目の早さで、フローサイトメトリー（CD3+ ΔCD19+）またはqPCRによってインビボで検出し、最大倍数増殖は 170 ± 5 （注入後 29 ± 9 日目）であった。2名の患者は、グレードI/II aGVHDを発症し（図31～32を参照のこと）、AP1903投与は、注入の30分以内に、CD3+ ΔCD19+細胞の>90%除去（図30、33および34を参照のこと）（24時間以内にさらなる対数減少を伴う）、および24時間以内の皮膚および肝臓のaGVHDの消散を引き起こし、iCasp9導入遺伝子がインビボで機能することを示した。患者2に関しては、処置後24時間以内での皮膚発疹の消失が観察された。

【0387】

【表 3】

表3: GvHDを有する患者(用量レベル1)

患者	SCT から GvHD まで (日数)	T 細胞から GvHD ま で(日数)	GvHD (グレード/部 位)
1	77	14	2 (肝臓, 皮膚)
2	124	45/13	2 (皮膚)

10

20

30

40

50

【0388】

エキソピボ実験は、このデータを確認した。さらに、残っている同種枯渇T細胞は、増殖でき、ウイルス（CMV）および真菌（*Aspergillus fumigatus*）に対して反応性であった（IFN- γ 生成）。これらのインピボ研究は、二量体化薬物の単一用量が、GVHDを引き起こすT細胞の部分集団を減少または排除し得るが、ウイルス特異的CTL（これは、次いで、再増殖し得る）を残し得ることを見出した。

【0389】

（免疫再形成）

患者細胞および試薬の利用可能性に依存して、免疫再形成研究（免疫表現型決定、T細胞およびB細胞機能）は、移植後一連の間隔で得られ得る。iカスパーゼ形質導入同種枯渇T細胞から生じる免疫再形成を測定するいくつかのパラメータを分析する。この分析は、全リンパ球カウント、T細胞およびCD19⁺B細胞の数の反復測定、ならびにT細胞サブセット（CD3、CD4、CD8、CD16、CD19、CD27、CD28、CD44、CD62L、CCR7、CD56、CD45RA、CD45RO、アルファ／ベータおよびガンマ／デルタT細胞レセプター）のFACS分析を含む。患者T細胞の利用可能性に依存して、調節性T細胞マーカー（例えば、CD41CD251FoxP3）もまた分析する。可能な場合には、注入の4時間後、1ヶ月の間週に1回、月に1回×9ヶ月間、および次に1年でおおよそ2年で、およそ10～60mlの患者血液を採取する。採取される血液量は、レシピエントのサイズに依存し、いずれの1回の採血時にも（臨床上的ケアおよび研究評価のために血液採取は可能である）合計で1～2cc/kgを超えない。

10

20

【0390】

（形質導入された同種枯渇されたT細胞の持続性および安全性）

以下の分析もまた末梢血サンプルに対して行って、研究予定表に示された時点で形質導入されたT細胞の機能、持続性および安全性をモニターした：

- ・トランスジェニック細胞の存在を検出するための表現型決定。
- ・PCRによるRCR試験。
- ・レトロウイルス組み込み体を検出するための定量的リアルタイムPCR。

【0391】

PCRによるRCR試験は、研究前、3ヶ月、6ヶ月、および12ヶ月で行われ、その後、合計15年間にわたって毎年行われる。組織、細胞および血清サンプルを、FDAによって要求されるように、RCRの将来的な研究における使用のために保管する。

30

【0392】

（統計分析および停止規則）

MTDを、適切な症例のうちの多くても25%においてグレードIII／IVの急性GVHDを引き起こす用量であると定義する。その決定は、サイズ2のコホートを有するロジスティックモデルを使用する改変連続再評価法（CRM）に基づく。3つの用量群（すなわち、 1×10^6 、 3×10^6 、 1×10^7 ）が評価され、毒性の事前確率が、それぞれ、10%、15%、および30%と予測されている。提唱されるCRMデザインは、各コホートにおいて1名より多くの被験体を集め、用量漸増を1用量レベル以下にまで制限し、非形質導入細胞に関して安全であると示された最低用量レベルで患者登録を開始することによって、元のCRMに対する改変を使用する。最低用量コホートでの毒性転帰は、用量－毒性曲線を更新するために使用される。次の患者コホートを、25%という目標確率に最も近い毒性の関連する確率（associated probability）を有する用量レベルへと割り当てる。このプロセスは、少なくとも10名の患者がこの用量漸増研究へと集められるまで継続する。患者の利用可能性に依存して、18名以下の患者がフェーズI試験へと登録され得るか、または6名の患者が最新MTDにおいて処理されるまで登録され得る。最終MTDは、これら終結点において目標毒性率に最も近い確率を有する用量である。

40

【0393】

50

シミュレーションを行って、その提唱されるデザインの操作特性を決定し、これと、標準的な3+3用量漸増デザインとを比較した。提唱されるデザインは、MTDとして適切な用量レベルを宣言するより高い確率に基づいてMTDのよりよい推定値 (estimate) を提供し、より低いかつおそらく無効な用量レベルで集められたより少数の患者を提供し、治験に必要とされる患者平均総数がより低く維持された。低い用量-毒性曲線 (shallow dose-toxicity curve) は、本明細書で提唱される用量の範囲にわたって予測され、従って、促進される用量漸増は、患者の安全を含むことなく行われ得る。行われるシミュレーションは、改変CRMデザインが、標準的デザインと比較した場合に、総毒性のより大きな平均数を招かないことを示す (総毒性は、それぞれ、1.9および2.1に等しい)。

10

【0394】

同種枯渇されたT細胞の最初の注入後の45日以内に起こるグレードIII/IV GVHDは、その後のコホートに関して推奨される用量を決定するために、CRM計算へと考慮される。患者の毒性転帰のリアルタイムモニタリングを、用量-毒性曲線の推定を実行し、予め指定された用量レベルのうちの1つを使用して次の患者コホートのための用量レベルを決定するために研究の間に行う。

【0395】

処置を制限する毒性としては以下が挙げられる：

- a) 注入に関連するグレード4の反応、
- b) TC-Tの注入後30日以内に起こる移植不全 (少なくとも14日間にわたって持続する成長因子治療に不応性の、異なる日での3回連続測定に関して $<5001\text{ mm}^3$ へのANCのその後の減少として定義される)、
- c) 注入後30日以内に起こるグレード4非造血および非感染性の有害事象、
- d) TC-Tの注入後45日までのグレード3~4の急性GVHD、
- e) 注入後30日以内に起こる処置関連死。

20

【0396】

GVHD率を、安全性および毒性の他の尺度とともに、記述統計を使用してまとめる。同様に、記述統計を、グレード1より大きいGVHDに起因してAP1903を受ける患者における臨床的応答および生物学的応答をまとめるために計算する。

【0397】

iカスパーゼ形質導入同種枯渇T細胞から生じる免疫再形成を測定するいくつかのパラメーターを、分析する。これらは、全リンパ球数、TおよびCD19⁺B細胞数の反復測定、ならびにT細胞サブセット (CD3、CD4、CD5、CD16、CD19、CD27、CD44、CD62L、CCR7、CD56、CD45RA、CD45RO、 α/β および γ/δ T細胞レセプター) のFACS分析を含む。十分なT細胞が分析用に残っている場合、T制御性細胞マーカー (例えば、CD4/CD25/FoxP3) もまた分析する。各被験体を、上記で示されるように注入前および注入後の複数の時点で測定する。

30

【0398】

患者群全体における、および用量群による、ならびに測定時間によるこれらパラメーターの記述要約を示す。患者内の経時的な測定を表す成長曲線を作成して、免疫再形成の一般的パターンを可視化する。iCasp9陽性細胞の割合もまた、各時点でまとめる。注入前と比較して経時的なこれらエンドポイントでの変化のペアワイズ比較を、対応のあるt検定またはウィルコクソンの符号順位検定を使用して行う。

40

【0399】

ランダム係数モデルを使用する各反復測定した免疫再形成パラメーターの縦断的分析を行う。縦断的分析は、患者1名あたりの免疫再形成のモデルパターンの構築を可能にしながら、患者内の種々の切片および傾きを可能にする。上記患者が受ける異なる用量レベルを説明するためにモデルにおいて独立変数としての用量レベルもまた、使用する。免疫機能において経時的に有意な改善があるかどうかの検定、および傾きの推定値およびその標準誤差に基づくこれら改善の大きさの推定は、本明細書で示されるモデルを使用して可能

50

である。CTLの異なる用量レベルにわたる免疫再形成の率における差異の任意の指標の評価はまた、行われる。同一性リンクを有する正規分布は、これらモデルにおいて利用され、SAS MIXED手順を使用して実装される。免疫再形成パラメーターの正規性の仮定を評価し、正規性を達成するために必要であれば、変換（例えば、対数、平方根）を行い得る。

【0400】

上記に示されるものに類似のストラテジーを使用して、T細胞生存、拡大および持続性の速度論を評価することができる。絶対T細胞数とマーカー遺伝子陽性細胞数との比を決定し、縦断的に経時的にモデル化する。その傾きの正の推定値は、免疫回復のためのT細胞の寄与が増大していることを示す。iCasp9 T細胞のウイルス特異的免疫を、縦断的モデルを使用してエキソビボ刺激ウイルス特異的CTLに基づいて、IFN γ を放出するT細胞数の分析によって評価する。EBV、CMVおよびアデノウイルスの免疫評価の分析のために別個のモデルを作成する。

10

【0401】

最後に、患者コホート全体において、全体的および疾患なしの生存を、カプラン・マイヤーの積・極限法（Kaplan-Meier product-limit method）を使用してまとめる。移植後100日間および1年間で生存しかつ疾患のない患者の割合を、カプラン・マイヤー曲線から概算し得る。

【0402】

結論として、ハプロCD34⁺ SCT後のiCasp9⁺ 同種枯渇T細胞の追加戻しは、機能的ドナーリンパ球のインビボでの有意な拡大およびaGvHDの消散とともに同種反応性T細胞の迅速なクリアランスを可能にする。

20

【0403】

（実施例4：インビボでのT細胞同種枯渇）

実施例1～3において提供されるプロトコルはまた、インビボでのT細胞同種枯渇を提供するために改変され得る。このアプローチを急性（acute）GvHDなしの免疫再形成から利益を受け得る被験体のより大きな群へと広げるために、T細胞枯渇のインビボ方法を提供することによってこのプロトコルを単純化し得る。処置前の同種枯渇方法では、本明細書で論じられるように、EBV形質転換リンパ芽球様細胞株を、レシピエントからまず調製する。次いで、これは、同種抗原提示細胞として作用する。この手順は8週間かかり得、広範囲に前処置した悪性腫瘍を有する被験体では、特に、彼らの最初の治療の構成成分としてリツジシマブを彼らが受けた場合には、失敗する可能性がある。その後、ドナーT細胞を、レシピエントEBV-LCLと共培養し、その同種反応性T細胞（これは活性化抗原CD25を発現する）を、その後、CD25-リシン結合体化モノクローナル抗体で処理する。この手順は、各被験体に関する実験室作業にさらに多くの日数がかかり得る。

30

【0404】

上記プロセスは、同種枯渇のインビボ方法を使用し、二量体化薬物による同種反応性T細胞の観察された迅速なインビボ枯渇を利用し、非刺激であるが、ウイルス／真菌反応性T細胞を残しておくことによって、単純化され得る。

40

【0405】

グレードIまたはこれより高い急性GvHDの発生がある場合、単一用量の二量体化薬物が投与される（例えば、2時間の静脈内注入として0.4mg/kgのAP1903という用量で）。急性GvHDが持続する場合、さらに3用量までの二量体化薬物が48時間の間隔で投与され得る。グレードIIまたはこれより高い急性GvHDを有する被験体では、これらのさらなる用量の二量体化薬物がステロイドと組み合わせられ得る。二量体化剤に対してグレードIIIまたはIVの反応に起因して二量体化剤のさらなる用量を受けることができない持続性のGvHDを有する患者に関しては、この患者は、0または1用量いずれかの二量体化剤の後に、ステロイドのみで処置され得る。

【0406】

50

(治療用T細胞の生成)

240ml (2回の収集で)までの末梢血を、獲得した同意に従って移植ドナーから得る。必要であれば、白血球除去療法 (leukapheresis) を使用して、十分なT細胞を得る; (幹細胞動員前または最後のG-CSF投与の7日後のいずれかに)。10~30mlの余分の血液をまた集めて、肝炎およびHIVなどの感染性疾患について試験し得る。

【0407】

末梢血単核細胞を、抗ヒトCD3抗体 (例えば、OrthotechまたはMiltenyi製) を使用して0日目に活性化し、2日目に組換えヒトインターロイキン-2 (rhIL-2) の存在下で拡大する。CD3抗体活性化T細胞を、組換えフィブロネクチンフラグメントCH-296 (RetronectionTM, Takara Shuzo, Otsu, Japan) でコーティングしたフラスコまたはプレートでiカスパーゼ-9レトロウイルスベクターによって形質導入する。ウイルスを、レトロネクチンコーティングしたプレートまたはフラスコ中でプロデューサー上清をインキュベートすることによって、レトロネクチンへと結合させる。次いで、細胞を、ウイルスコーティングした組織培養デバイスへと移す。形質導入後、T細胞を、プロトコルに従って、これらにrhIL-2を1週間に2回供給することによって拡大して十分数の細胞に到達させる。

【0408】

注入されたT細胞の大部分が自殺遺伝子を有することを確実にするために、選択マーカー、短縮型ヒトCD19 (Δ CD19) および市販の選択デバイスを使用して、その形質導入された細胞を>90%純度になるように選択し得る。CD19に関する免疫磁性選択を、形質導入の4日後に行い得る。細胞を、モノクローナルマウス抗-ヒトCD19抗体 (Miltenyi Biotech, Auburn, CA) に結合体化した常磁性マイクロビーズで標識し、CliniMac Plus 自動化選択デバイスで選択する。臨床的注入に必要とされる細胞数に依存して、細胞は、CliniMac 選択後に低温貯蔵されるかまたはIL-2でさらに拡大されて十分な細胞が拡大されたらすぐに低温貯蔵される (生成物開始から14日目まで) かのいずれかであり得る。

【0409】

細胞のアリコート、FDAによる最終リリース試験のために必要とされる場合、形質導入効率、同一性、表現型、自律的成長および微生物学的検査の試験のために取り出し得る。上記細胞を、投与前に低温貯蔵する。

【0410】

(T細胞の投与)

形質導入されたT細胞を、幹細胞移植後から、例えば、30日~120日の間に患者に投与する。上記低温貯蔵したT細胞を解凍し、ノーマルセーラインを用いカテーテルラインを通して注入する。小児に関しては、体重によっては前投薬の薬が投与される。細胞の用量は、例えば、約 1×10^4 細胞/kg ~ 1×10^8 細胞/kg、例えば、約 1×10^5 細胞/kg ~ 1×10^7 細胞/kg、約 1×10^6 細胞/kg ~ 5×10^6 細胞/kg、約 1×10^4 細胞/kg ~ 5×10^6 細胞/kg、例えば、約 1×10^4 、約 1×10^5 、約 2×10^5 、約 3×10^5 、約 5×10^5 、 6×10^5 、約 7×10^5 、約 8×10^5 、約 9×10^5 、約 1×10^6 、約 2×10^6 、約 3×10^6 、約 4×10^6 、または約 5×10^6 細胞/kgの範囲に及び得る。

【0411】

(GVHDの処置)

グレード ≥ 1 の急性GVHDを発生させる患者を、2時間の注入として0.4mg/kg AP1903で処置する。注入用AP1903は、例えば、3mlバイアル中2.33mlの濃縮溶液として、5mg/mlの濃度 (すなわち、10.66mg/バイアル) で提供され得る。投与前に、計算された用量を、注入用の0.9% ノーマルセーラインで100mlへと希釈する。100ml体積での注入用AP1903 (0.4mg/kg) を、非DEHP、非エチレンオキシド滅菌注入セットおよび注入ポンプを使用して、2

10

20

30

40

50

時間にわたる I V 注入を介して投与し得る。

【0412】

【表4】

表4: サンプル処理スケジュール

時間	ドナー	レシピエント
移植前	骨髓移植ドナーから非刺激白血球除去療法により 240 までの血液を得る。後の免疫再形成研究のために T 細胞およびドナー LCL を調製する	
0 日目	PBMC の抗 CD3 活性化	
2 日目	IL-2 供給	
3 日目	形質導入	
4 日目	拡大	
6 日目	CD19 選択。低温貯蔵(*必要とされる用量が満たされていれば)	
8 日目	形質導入効率および表現型による i カスパーゼ 9 導入遺伝子機能性を評価する。低温貯蔵 (*未だ行われていなければ)	
10 日目または 12 日目から 14 日目	低温貯蔵 (未だ行われていなければ)	
移植後 30~120 日		幹細胞注入の 30~120 日後、T 細胞を解凍し、注入する

【0413】

他の方法は、例えば、本明細書中の実施例 1~3 において提供されるとおりの臨床的治療および評価に従い得る。

【0414】

(実施例 5: i C a s p 9 自殺遺伝子を使用して、間葉系ストローマ細胞治療の安全性を改善する)

間葉系ストローマ細胞 (MSC) は、数百名の患者に注入され、今日まで報告された有害副作用は最小限である。MSC は、疾患の処置において使用されてきたために、追跡調査が限定されたものであり比較的短期間であることに起因して、長期間の副作用は知られていない。なぜなら MSC は、疾患の処置において使用されてきたからである。いくつかの動物モデルは、副作用が潜在的に存在し、従って、使用される MSC の成長および生存にわたってコントロールを可能にするシステムが治療上望ましいことを示した。本明細書で示される誘導性カスパーゼ 9 自殺スイッチ発現ベクター構築物を、インビボおよびインビトロで MSC を排除するための方法として調査した。

【0415】

(材料および方法)

(MSC単離)

MSCを、健常ドナーから単離した。簡潔には、注入後廃棄される健常ドナー骨髓収集バッグおよびフィルターを、RPMI 1640 (HyClone, Logan, UT) で洗浄し、10% ウシ胎仔血清 (FBS)、2mM アラニルグルタミン (Glutamax, Invitrogen)、100ユニット/mL ペニシリンおよび100μg/mL ストレプトマイシン (Invitrogen) を有するDMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA) が入った組織培養フラスコにプレーティングした。48時間後、その上清を廃棄し、その細胞を、完全培養培地 (CCM): 16.5% FBS、2mM アラニルグルタミン、100ユニット/mL ペニシリンおよび100μg/mL ストレプトマイシンを有するα-MEM (Invitrogen) 中で培養した。細胞を、80% コンフルエント未満になるように成長させ、適切であれば低密度で再プレーティングした。

10

【0416】

(免疫表現型決定)

フィコエリトリン (PE)、フルオレセインイソチオシアネート (FITC)、ペリジニクロロフィルタンパク質 (PerCP) またはアロフィコシアニン (APC) 結合体化CD14、CD34、CD45、CD73、CD90、CD105およびCD133モノクローナル抗体を使用して、MSCを染色した。全ての抗体は、示されたものを除いてBecton Dickinson-Pharmingen (San Diego, CA) 製であった。適切なアイソタイプ適合抗体で標識したコントロールサンプルを、各実験に含めた。細胞を、4種の蛍光シグナルについて設定されたフィルタを備えた蛍光活性化セルソーティングFACSscan (Becton Dickinson) によって分析した。

20

【0417】

(インビトロでの分化研究)

脂肪細胞分化。MSC (7.5×10^4 細胞) を、NH AdipoDiff Medium (Miltenyi Biotech, Auburn, CA) が入った、6ウェルプレートのウェルにプレーティングした。培地を、21日間にわたって3日毎に交換した。細胞を、リン酸緩衝食塩水 (PBS) 中4% ホルムアルデヒドで固定した後、Oil Red O溶液 (3:2比のイソプロパノールと水とで0.5% w/v Oil Red Oを希釈することによって得た) で染色した。

30

【0418】

骨形成分化。MSC (4.5×10^4 細胞) を、NH OsteoDiff Medium (Miltenyi Biotech) が入った、6ウェルプレートにプレーティングした。培地を、10日間にわたって3日毎に交換した。細胞を、冷メタノールでの固定後に、製造業者の指示に従って、Sigma Fast BCIP/NBT基質 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を使用してアルカリホスファターゼ活性に関して染色した。

【0419】

軟骨芽細胞分化。 $2.5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 細胞を含むMSCペレットを、15mLまたは1.5mL ポリプロピレンコニカルチューブの中で遠心分離することによって得、NH ChondroDiff Medium (Miltenyi Biotech) 中で培養した。培地を、合計24日間にわたって3日毎に交換した。細胞ペレットを、PBS中の4% ホルマリン中で固定し、慣用的パラフィン切片化のために処理した。切片をアルシアンブルーで、またはペプシン (Thermo Scientific, Fremont, CA) での抗原回復後にII型コラーゲンに関する間接免疫蛍光 (マウス抗II型コラーゲンモノクローナル抗体MAB8887, Millipore, Billerica, MA) を使用して染色した。

40

【0420】

50

(iCasp9- Δ CD19レトロウイルス生成およびMSCの形質導入)

SFG. iCasp9. 2A. Δ CD19 (iCasp- Δ CD19) レトロウイルスは、切断可能な2A様配列を介して、短縮型ヒトCD19 (Δ CD19) に連結されたiCasp9からなる。上記のように、iCasp9は、Ser-Gly-Gly-Gly-Ser-Glyリンカーを介してヒトカスパーゼ9 (その動員ドメイン (CARD) は欠失されており、その機能は、FKBP12によって置き換わっている) に接続されたF36V変異を有するヒトFK506結合タンパク質 (FKBP12) (その変異は、合成ホモ二量体化剤 (AP20187またはAP1903) に対するそのタンパク質の結合親和性を増大させる) である。

【0421】

2A様配列は、Thosea Asigna昆虫ウイルス由来の20アミノ酸ペプチドをコードし、グリシンと末端プロリン残基との間で99%超の切断を媒介して、翻訳の際のiCasp9と Δ CD19との間の分離を確実にする。 Δ CD19は、アミノ酸333で短縮され、リン酸化のための潜在的部位である全ての保存された細胞質内チロシン残基を除去したヒトCD19からなる。テナガザル白血病ウイルス (Gal-V) 偽型レトロウイルスを生成する安定なPG13クローンを、Phoenix Eco細胞株 (ATCC製品 #SD3444; ATCC, Manassas, VA) をSFG. iCasp9. 2A. Δ CD19で一過性にトランスフェクトすることによって作製し、これによってEco偽型レトロウイルスを得た。このPG13パッケージング細胞株 (ATCC) を、Eco偽型レトロウイルスで3回形質導入して、1細胞あたり複数のSFG. iCasp9. 2A. Δ CD19プロウイルス組み込み体を含むプロデューサー株を生成した。単一細胞クローニングを行い、最高力価を生成するPG13クローンを拡大し、ベクター生成のために使用した。レトロウイルス上清を、10% FBS、2mM アラニルグルタミン、100ユニット/mL ペニシリンおよび100 μ g/mL ストレプトマイシンを有するIMDM (Invitrogen) 中、プロデューサー細胞株の培養を介して得た。レトロウイルスを含む上清を、最初の培養の48時間後および72時間後に集めた。形質導入のために、およそ 2×10^4 MSC/cm²を、6ウェルプレート、T75またはT175フラスコの中のCM中にプレーティングした。24時間後、培地を、ポリブレン (最終濃度5 μ g/mL) と一緒に10倍希釈したウイルス上清に置き換え、その細胞を、37 $^{\circ}$ Cで5% CO₂ 中で48時間にわたってインキュベートし、その後、細胞を完全培地中で維持した。

【0422】

(細胞富化)

インビトロ実験のための誘導性iCasp9- Δ CD19陽性MSC選択のために、レトロウイルスで形質導入したMSCを、製造業者の指示に従って、抗CD19 (クローン4G7) で結合体化した磁性ビーズ (Miltenyi Biotec) を使用して、CD19陽性細胞について富化した。細胞サンプルを、PE結合体化またはAPC結合体化CD19 (クローンSJ25C1) 抗体で染色して、細胞画分の純度を評価した。

【0423】

(インビトロでのアポトーシス研究)

未分化MSC。二量体化の化学的誘導物質 (CID) (AP20187; ARIA D Pharmaceuticals, Cambridge, MA) を、完全培地中のiCasp9形質導入MSC培養物へと50nMで添加した。アポトーシスを、細胞採取ならびにアネキシンV結合緩衝液 (BD Biosciences, San Diego, CA) 中でのアネキシンV-PEおよび7-AADでの染色後に、FACS分析によって24時間後に評価した。コントロールiCasp9形質導入MSCを、CIDへの曝露なしで、培養物中で維持した。

【0424】

分化MSC。形質導入したMSCを、上記で示されるように分化させた。分化期間の最後に、CIDを、50nMで分化培地へと添加した。細胞を、上記で示されるように、

10

20

30

40

50

研究されている組織に対して適切に染色し、対比染色（メチレンアズールまたはメチレンブルー）を使用して、核および細胞質形態を評価した。並行して、組織を、末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ dUTP ニック末端標識（TUNEL）アッセイのために、製造業者の指示に従って処理した（In Situ Cell Death Detection Kit, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany）。各時点について、4つの無作為の視野を、最終倍率40×で撮影し、ImageJソフトウェアバージョン1.43o（NIH, Bethesda, MD）で画像を分析した。細胞密度を、表面積の単位（mm²）あたりの核の数（DAPI陽性）として計算した。アポトーシス細胞のパーセンテージを、陽性TUNELシグナル（FITC陽性）を有する核の数 対 核の総数の比として決定した。コントロールを、CIDなしの培養物中で維持した。

10

【0425】

（マウスモデルでのインビボ殺滅研究）

全てのマウス実験を、Baylor College of Medicine動物飼養ガイドラインに従って行った。改変MSCのインビボでの持続性を評価するために、SCIDマウスモデルを、インビボ画像化システムとともに使用した。MSCを、高感度緑色蛍光タンパク質-ホタルルシフェラーゼ（eGFP-FFLuc）遺伝子のみをまたはiCasp9-ΔCD19遺伝子と一緒にコードするレトロウイルスで形質導入した。細胞を、MoFloフローサイトメーター（Beckman Coulter, Fullerton, CA）を使用する蛍光活性化セルソーティングによって、eGFP陽性に関してソートした。二重形質導入細胞もまた、PE結合体化抗CD19で染色し、PE陽性に関してソートした。SCIDマウス（8～10週齢）に、反対側の側腹部にiCasp9-ΔCD19ありおよびなしで、 5×10^5 MSCを皮下注射した。マウスに、1週間後に開始して、24時間間隔を空けて、50μgのCIDの2回の腹腔内注射を与えた。eGFP-FFLucを発現するMSCのインビボ画像化のために、マウスに、ドールシフェリン（150mg/kg）を腹腔内注射し、Xenogen-IVIS Imaging Systemを使用して分析した。各時点での総ルミネッセンス（沈着した総標識MSCに比例した測定値）を、MSC移植部位にわたる関心領域（ROI）を自動的に定義することによって計算した。これらROIは、バックグラウンドを少なくとも5%上回るルミネッセンスシグナルを有する全ての領域を含んだ。総光子数を各ROIに関して積分し、平均値を計算した。結果を、時間ゼロが100%シグナルに相当するように正規化した。

20

30

【0426】

第2の実験セットにおいて、 2.5×10^6 eGFP-FFLuc標識MSCおよび 2.5×10^6 eGFP-FFLuc標識iCasp9-ΔCD19形質導入MSCの混合物を、右側腹部に皮下注射し、そのマウスに、7日後に開始して24時間空けて50μgのCIDの2回の腹腔内注射を与えた。CID注射後のいくつかの時点で、MSCの皮下ペレットを、組織ルミネッセンスを使用して採取し、全ヒト標本を同定し、収集し、マウス組織の夾雑を最小にした。次いで、ゲノムDNAを、QIAmp（登録商標）DNA Mini（Qiagen, Valencia, CA）を使用して単離した。100ngのDNAのアリコート、定量的PCR（qPCR）において使用して、特異的プライマーおよびプローブ（eGFP-FFLuc構築物に関して：順方向プライマー 5'-TCCGCCCTGAGCAAAGAC-3'、逆方向、5'-ACGAACATC CAGCAGGACCAT-3'、プローブ 5'-FAM, 6-カルボキシフルオレセイン-ACGAGAAGCGCGATC-3' MGBNFQ、副溝結合非蛍光クエンチャー；iCasp9-ΔCD19：順方向 5'-CTGGAATCTGGCGGTGGAAT-3'、逆方向 5'-CAAACCTCTCAAGAGCACCGACAT-3'、プローブ 5'-FAM-CGGAGTCGACGGATT-3' MGBNFQ）を使用して、各導入遺伝子のコピー数を決定した。各導入遺伝子の単一コピーを含む既知数のプラスミドを使用して、標準曲線を確認した。単一eGFP-FFLuc形質導入MSCま

40

50

たは二重 eGFP-FFLuc 形質導入 MSC および iCasp9 形質導入 MSC の「純粋」集団から単離されたおよそ 100 ng の DNA は、それぞれ、類似した数の eGFP-FFLuc 遺伝子コピー（およそ 3.0×10^4 ）、ならびにゼロおよび 1.7×10^3 の iCasp9-ΔCD19 遺伝子コピーを有すると決定された。

【0427】

非形質導入ヒト細胞およびマウス組織は、100 ng のゲノム DNA 中でいずれの遺伝子のコピーもゼロであった。eGFP 遺伝子のコピー数は、MSC のいずれの集団（iCasp9 陰性または陽性）から単離された同一量の DNA に対しても同じである。細胞の任意の混合物から単離された DNA 中のこの遺伝子のコピー数は、eGFP-FFLuc 陽性細胞の総数（iCasp9 陽性+陰性 MSC）に比例する。さらに、iCasp9 陰性組織は、iCasp9 コピー数に寄与しないので、任意の DNA サンプル中の iCasp9 遺伝子のコピー数は、iCasp9 陽性細胞の総数に比例する。従って、任意の DNA サンプルに関して、G が GFP 陽性および iCasp9 陰性細胞の総数であり、C が GFP 陽性および iCasp9 陽性細胞の総数である場合、 $N_{eGFP} = g \cdot (C + G)$ および $N_{iCasp9} = k \cdot C$ である（ここで N は、遺伝子コピー数を表し、g および k は、それぞれ、eGFP 遺伝子および iCasp9 遺伝子についてのコピー数および細胞数に関する定数である）。従って、 $N_{iCasp9} / N_{eGFP} = (k / g) \cdot [C / (C + G)]$ 、すなわち、iCasp9 コピー数と eGFP コピー数との間の比は、全ての eGFP 陽性細胞の中での二重形質導入（iCasp9 陽性）細胞の画分に比例する。 N_{iCasp9} および N_{eGFP} の絶対値は、各 MSC 外植片中のマウス細胞による汚染の増大とともに減少するが、各時点に関して、含まれるマウス組織の量に拘わらずその比は一定である。なぜならヒト細胞の両方のタイプが物理的に混合されるからである。（インビトロ培養によって示されるように）両方の集団における自発的アポトーシスの類似の比を想定すると、任意の時点における N_{iCasp9} / N_{eGFP} と時間ゼロでのそれとの間の商は、CID への曝露後に生存している iCasp9 陽性細胞のパーセンテージを表す。全てのコピー数決定を、三連で行った。

【0428】

（統計分析）

対応のある両側スチューデント t 検定を使用して、サンプル間の統計的有意差を決定した。全ての数値データを、平均 ± 1 標準偏差として表す。

【0429】

（結果）

（MSC は、iCasp9-ΔCD19 で容易に形質導入され、それらの基本表現型を維持する）

3 名の健常ドナー由来の MSC のフローサイトメトリ分析は、それらが一様に、CD73、CD90 および CD105 に関して陽性であり、造血マーカー CD45、CD14、CD133 および CD34 に関して陰性であることを示した。骨髓から単離された単核性接着画分は均質に（homogenously）、CD73、CD90 および CD105 に関して陽性であり、造血マーカーに関して陰性であった。単離された MSC の、脂肪細胞、骨芽細胞および軟骨芽細胞への分化潜在能を特異的アッセイにおいて確認したところ、これら細胞が真正の MSC であることが示された。

【0430】

早期継代の MSC を、カスパーゼ 9 の誘導性形態をコードする iCasp9-ΔCD19 レトロウイルスベクターで形質導入した。最適なシグナル伝達条件（single transduction condition）下で、この細胞のうちの $47 \pm 6\%$ が CD19（その短縮型形態は、iCasp9 とともにシスで転写される）を発現し、成功裡の形質導入のための代用物として働き、形質導入された細胞の選択を可能にする。CD19 に関して陽性の細胞のパーセンテージは、培養物中で 2 週間より長く安定であり、MSC に対してその構築物の有害な作用も成長に有利な効果も示唆しなかった。CD19 陽性細胞（iCasp9 で成功裡の形質導入の代用物）のパーセンテージは、2 週間より長く一定なままである。その

構築物の安定性にさらに対処するために、蛍光活性化セルソーター（FACS）によって精製した iCasp9 陽性細胞の集団を、培養物中で維持した：CD19 陽性細胞のパーセンテージの有意差は、6 週間を超えても観察されなかった（ベースラインで $96.5 \pm 1.1\%$ 対 43 日後に $97.4 \pm 0.8\%$ 、 $P=0.46$ ）。iCasp9-CD19 陽性細胞の表現型は、非形質導入細胞の表現型と他の点では実質的に同一であった（実質的に全ての細胞が CD73、CD90 および CD105 に関して陽性、造血マーカーに関して陰性）。これは、MSC の遺伝子操作がそれらの基本特性を改変しないことを確認した。

【0431】

(iCasp9- Δ CD19 形質導入 MSC は、インビトロでの CID への曝露後に選択的アポトーシスを受ける)

アポトーシス促進遺伝子生成物 iCasp9 は、小さな二量体化の化学的誘導物質 (CID)、AP20187 (iCasp9 生成物に存在する FK506-結合ドメインに結合するタクロリムスのアナログ) によって活性化され得る。非形質導入 MSC は、ベースラインにおいて iCasp9 陽性細胞が有する ($15 \pm 6\%$ 、 $P=0.47$) ように、およそ 18% ($\pm 7\%$) という培養物中での自発的アポトーシス率を有する。iCasp9- Δ CD19 での形質導入後の MSC 培養物への CID (50 nM) の添加は、24 時間以内に iCasp9 陽性細胞の 90% 超 ($93 \pm 1\%$ 、 $P<0.0001$) のアポトーシス死を生じる一方で、iCasp9 陰性細胞は、非形質導入コントロールに類似のアポトーシス指数を保持する ($20 \pm 7\%$ 、CID ありまたはなしでの非形質導入コントロールに対してそれぞれ $P=0.99$ および $P=0.69$) (図 17A および 70B を参照のこと)。iCasp9 での MSC の形質導入後、その二量体化の化学的誘導物質 (CID) を、 50 nM で完全培地中の培養物に添加した。アポトーシスを、細胞採取ならびにアネキシン V-PE および 7-AAD での染色後に、FACS 分析によって 24 時間後に評価した。同じ化合物に曝露された非形質導入コントロール MSC (コントロール/CID、 15%) および CID に曝露されなかった iCasp9-CD19 陽性細胞 (iCasp 陽性/CID なし、 13%) に匹敵し、非形質導入 MSC のベースラインアポトーシス率 (コントロール/CID なし、 16%) に類似した割合である、陰性集団 (iCasp 陰性/CID) のわずかに 19% に対して、iCasp9-CD19 陽性細胞 (iCasp 陽性/CID) のうちの 93% がアネキシン陽性になった。iCasp9-CD19 陽性細胞の磁性免疫選択は、高純度に到達させ得る。その選択された細胞のうちの 95% 超が、CID への曝露後にアポトーシス性になる。

【0432】

CID への単一曝露後の後の時点での高度に精製された iCasp9 陽性集団の分析は、iCasp9 陰性細胞の小さな画分が拡大し、iCasp9 陽性細胞の集団が残存するが、iCasp9 陽性細胞の集団は CID への再曝露によって殺滅され得ることを示す。従って、CID によるさらなる殺滅に耐性の iCasp9 陽性集団は検出されなかった。iCasp9-CD19 陰性 MSC の集団は、CID 導入後 24 時間程度の速さで出現する。iCasp9-CD19 陰性 MSC の集団が予測される。なぜなら 100% 純度を有する集団の達成は非現実的であり、かつその MSC は、それらのインビトロでの迅速な拡大に有利な条件において培養されている最中であるからである。iCasp9-CD19 陽性集団の画分は、殺滅が 100% 効率ではないという事実によって推測されるように、持続する (例えば、 99% 純粋集団の 99% 殺滅を仮定すると、得られる集団は、 49.7% iCasp9 陽性細胞および 50.3% iCasp9 陰性細胞を有する)。しかし、生存している細胞は、CID への再曝露によって後の時点で殺滅され得る。

【0433】

(iCasp9- Δ CD19 形質導入 MSC は、非改変 MSC の分化潜在能を維持し、それらの子孫は、CID への曝露によって殺滅される)

上記 CID が、iCasp9 陽性 MSC の分化した子孫を選択的に殺滅し得るかどうかを決定するために、CD19 に関する免疫磁性選択を使用して、改変された集団の純度を

10

20

30

40

50

増大させた（1ラウンドの選択後に＞90％）。このようにして選択された i C a s p 9 陽性細胞は、インビボで、研究した全ての結合組織系統へと分化できた（図19A～19Qを参照のこと）。ヒトMSCをCD19（従って、i C a s p 9）発現に関して免疫磁性選択したところ、純度は91％より高かった。特異的分化培地中での培養後に、i C a s p 9 陽性細胞は、脂肪細胞系統（A、オイルレッドおよびメチレンアズール）、骨芽細胞系統（B、アルカリホスファターゼBCIP／NBTおよびメチレンブルー）および軟骨芽細胞系統（C、アルシアンブルーおよびヌクレアレッド）を生じることができた。これらの分化した組織は、50nM CIDへの曝露によってアポトーシスへと駆動される（D～N）。未処理 i C a s p 9 形質導入コントロールに見られるものとは対照的に、多くのアポトーシス小体（矢印）、細胞質膜ブレブ形成（挿入図）および細胞構造の喪失（DおよびE）；軟骨細胞小結節（chondrocytic nodule）（F～H）、および脂肪生成培養物（I～K）および骨形成培養物（L～N）における広範囲のTUNEL陽性に注意のこと（脂肪生成条件が示される、O～Q）（F、I、L、O、DAPI；G、J、M、P、TUNEL-FITC；H、K、N、Q、重ね合わせ）。

【0434】

50nMのCIDへの曝露の24時間後、アポトーシスの顕微鏡での証拠を、脂肪生成培養物および骨形成培養物全体にわたる膜ブレブ形成、細胞収縮および剥離、ならびにアポトーシス小体の存在とともに観察した。TUNELアッセイは、脂肪生成培養物および骨形成培養物ならびに軟骨小結節において広範囲に陽性を示し（図19A～19Qを参照のこと）、これは経時的に増大した。脂肪細胞分化培地中での培養後に、i C a s p 9 陽性細胞は、脂肪細胞を生じた。50nM CIDへの曝露後に、TUNEL陽性細胞の増大しつつある割合によって証明されるように、進行性のアポトーシスが観察された。24時間後、細胞密度の有意な減少が存在した（584細胞/mm²から＜14細胞/mm²へ）。ほぼ全てのアポトーシス細胞が、スライドから剥がれてしまい、アポトーシス細胞の割合のさらに信頼に足る計算が妨げられた。従って、i C a s p 9 は、MSC分化後にすら機能的なままであった。その活性化は、分化した子孫の死滅を生じる。

【0435】

（i C a s p 9-ΔCD19形質導入MSCは、CIDへのインビボでの曝露後に選択的アポトーシスを受ける）

静脈内注射したMSCは、短いインビボ生存時間を既に有するようであるが、局所注射した細胞は、より長く生存し得、相当してより多くの顕著な有害作用を生じ得る。このような状況でのi C a s p 9自殺システムのインビボ機能性を評価するために、SCIDマウスに、MSCを皮下注射した。MSCを、eGFP-FFLuc遺伝子（先に示された）およびi C a s p 9-ΔCD19遺伝子で二重形質導入した。MSCをまた、eGFP-FFLucで単一に形質導入した。このeGFP陽性（および適用可能である場合には、CD19陽性）画分を、純度＞95％で蛍光活性化セルソーティングによって単離した。各動物に、i C a s p 9陽性MSCおよびコントロールMSC（ともにeGFP-FFLuc陽性）を反対側の側腹部に皮下注射した。MSCの局在を、Xenogen-IVIS Imaging Systemを使用して評価した。別の実験セットでは、単一形質導入および二重形質導入されたMSCの1：1混合物を、右側腹部に皮下注射し、上記のようにマウスにCIDを与えた。MSCの皮下ペレットを、種々の時点で採取し、ゲノムDNAを単離し、qPCRを使用して、上記eGFP-FFLuc遺伝子およびi C a s p 9-ΔCD19遺伝子のコピー数を決定した。これら条件下では、i C a s p 9 対

eGFPの遺伝子コピー数の比は、全ヒト細胞の間でのi C a s p 9陽性細胞の画分に比例する（詳細については上記の方法を参照のこと）。その比を、時間ゼロがi C a s p 9陽性細胞の100％に相当するように正規化した。MSCの皮下接種後（CID注射前）の一連の動物実験は、両方の細胞集団において自発的アポトーシスの証拠を示す（ベースラインの約20％への全体的なルミネッセンスシグナルにおける低下によって示されるとおり）。これは以前から、異種モデル（xenogeneic model）におけるMSCの全身送達および局所送達後に観察された。

10

20

30

40

50

【0436】

ルミネッセンスデータは、CIDの投与前ですら、MSCの局所送達後最初の96時間にわたってヒトMSCの実質的喪失を示し、1週間後には、およそ20% 細胞のみが生存していた。しかし、その時点から進むと、二量体化薬物ありとなしとのicasp9陽性MSCの生存の間には、有意差があった。MSC移植の7日後に、動物に、24時間空けて、50 μ gのCIDの2回の注射を与えた。icasp9で形質導入したMSCを、それらのルミネッセンスシグナルの消失によって示されるように、上記薬物によって迅速に殺滅した。icasp9に関して陰性の細胞は、上記薬物によって影響を受けなかった。上記薬物を注射しなかった動物は、MSC移植後1ヶ月まで両方の集団においてシグナルの持続を示した。細胞殺滅をさらに定量するために、qPCRアッセイを開発して、eGFP-FFLuc遺伝子およびicasp9- Δ CD19遺伝子のコピー数を測定した。マウスに、二重形質導入MSCおよび単一形質導入MSCの1:1混合物を皮下注射し、MSC移植の1週間後に上記のようにCIDを投与した。MSC外植片を、いくつかの時点で集め、ゲノムDNAをそのサンプルから単離し、実質的に同一量のDNAに対してqPCRアッセイを行った。これらの条件下で（方法を参照のこと）、任意の時点で、icasp9- Δ CD19 対 eGFP-FFLucのコピー数の比は、生存能力のあるicasp9陽性細胞の画分に比例する。icasp9陽性細胞の連続的な殺滅が観察され(>99%)、その結果、生存しているicasp9陽性細胞の割合は、1週間後に、元の集団の0.7%へと減少した。従って、icasp9で形質導入されたMSCは、CIDへの曝露後にインビボで選択的に殺滅され得るが、さもなければ持続する。

【0437】

(考察)

誘導性自殺タンパク質を使用して安全機構を発現するようにヒトMSCを操作する実施可能性は、本明細書で示される。本明細書で示される日付(date)は、MSCが、選択可能な表面マーカーCD19にカップルした自殺遺伝子icasp9で容易に形質導入され得ることを示す。共形質導入された遺伝子の発現は、MSCおよびそれらの分化した子孫の両方において安定であり、それらの表現型も分化潜在能も明らかに変化させない。これらの形質導入された細胞は、icasp9に結合する、適切な二量体化の小分子化学的誘導物質に曝される場合に、インビトロおよびインビボで殺滅され得る。

【0438】

細胞ベースの治療が成功するためには、移植された細胞は、それらの採取とそれらの最終的なインビボ臨床適用の間の期間を生き延びなければならない。さらに、安全な細胞ベースの治療はまた、成功裡に移植された細胞の望ましくない成長および活性をコントロールする能力を含むべきである。MSCは、顕著な副作用なしに多くの患者に投与されてきたが、近年の報告によれば、移植されたMSCがそれらの機能性を高めるように、ならびに骨および軟骨を含む系統へと分化するように遺伝的にかつ後成的に改変される潜在性は、さらに調査および利用されるにつれて、さらなる保護（例えば、本明細書で示される安全スイッチ）が、細胞ベースの治療にわたるさらなるコントロール方法を提供し得ることが示される。生物学的に活性なタンパク質を放出するように遺伝子改変されたMSCを受ける被験体は、自殺遺伝子によって提供される付加された安全性から特に利益を受け得る。

【0439】

本明細書で示される自殺システムは、他の公知の自殺システムを超えるいくつかの潜在的利点を提供する。ヌクレオシドアナログが関わる戦略（例えば、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ(HSV-tk)とガンシクロビル(GCV)とを、および細菌もしくは酵母シトシンデアミナーゼ(CD)と5-フルオロシトシン(5-FU)とを組み合わせるもの)は、細胞周期依存性であり、再生医療へのMSCの適用の間に形成され得る有糸分裂後組織において有効である見込みはない。さらに、増殖しつつある組織においてすら、有糸分裂画分は、全ての細胞を含む訳ではなく、移植片の有意な部分は、生存しかつ機能不全のままであり得る。ある場合には、自殺に必要とされるプロドラッ

グそれ自体が治療用途を有し得、従って、これらは、非標的器官によるそれらの代謝の結果として（例えば、多くのシトクロム P 4 5 0 基質）、または標的細胞による活性化後の隣接する組織への拡散に起因して（例えば、C B 1 9 5 4、細菌ニトロレダクターゼの基質）のいずれかで、排除される（例えば、G C V）か、または毒性であり得る（例えば、5 - F C）。

【0 4 4 0】

対照的に、本明細書で示される二量体化の小分子化学的誘導物質は、i C a s p 9 を活性化するために必要とされるものより 1 0 倍高い用量ですら、毒性の証拠を示さなかった。さらに、非ヒト酵素システム（例えば、H S V - t k および D C）は、形質導入された細胞に対して破壊的な免疫応答という高いリスクを有する。i C a s p 9 自殺遺伝子および選択マーカー C D 1 9 は両方ともヒト起源のものであり、従って、望ましくない免疫応答を導入する可能性はより低いはずである。選択マーカーの発現を、非ヒト起源の 2 A 様切断可能ペプチドによって自殺遺伝子へ連結すること（linkage）は問題を提起し得るが、この 2 A 様リンカーは、2 0 アミノ酸長であり、非ヒトタンパク質より免疫原性が低いようである。最後に、i C a s p 9 陽性細胞における自殺遺伝子活性化の有効性を、有利なことには、他の自殺システムを発現する細胞の殺滅と比較すると、i C a s p 9 改変 T 細胞のうちの 9 0 % またはこれより多くが、臨床上おそらく有効であるレベルである、単一用量の二量体化剤の後に排除される。

【0 4 4 1】

本明細書で示される i C a s p 9 システムはまた、他の細胞ベースのおよび／または自殺スイッチベースの治療で見られるさらなる制限を回避し得る。形質導入された構築物のサイレンシングに起因する発現の喪失は、哺乳動物細胞のレトロウイルス形質導入後に頻繁に観察される。本明細書で示される発現構築物は、このような効果の証拠を示さなかった。培養物中で 1 ヶ月後ですら、発現または誘導死の減少は明らかではなかった。

【0 4 4 2】

他の細胞ベースのおよび／または自殺スイッチベースの治療においてときおり観察される別の潜在的問題は、制御されない抗アポトーシス遺伝子を有する細胞における耐性の発生である。この効果は、プログラム細胞死経路の異なるエレメント（例えば、F a s）が関わる他の自殺システムにおいて観察されてきた。i C a s p 9 は、この制限を有する可能性がより低いことから、本明細書で示される発現構築物のための自殺遺伝子として選択された。アポトーシスカスケードの他のメンバーと比較すると、カスパーゼ 9 の活性化は、アポトーシス経路において後期で起こり、従って、多くの（全てではないにしても）抗アポトーシス制御因子（例えば、c - F L I P および b c l - 2 ファミリーメンバー）の影響を回避するはずである。

【0 4 4 3】

本明細書で示されるシステムに特異的な潜在的制限は、i C a s p 9 の自発的二量体化であり得る。これは翻って、望ましくない細胞死および不十分な持続性を引き起こし得る。この効果は、F a s を利用するある種の他の誘導性システムにおいて観察されてきた。形質導入された細胞における低い自発的死の率およびトランスジェニック細胞のインビボでの長期の持続性という観察は、この可能性が、i C a s p 9 ベースの発現構築物を使用する場合に重大な考慮事項ではないことを示す。

【0 4 4 4】

M S C のレトロウイルス形質導入に由来する組み込み事象は、特に、レトロウイルスベクターの複数の挿入がある場合に、有害な変異誘発を潜在的に駆動し得、望ましくないコピー数効果および／または他の望ましくない効果を引き起こす。これら望ましくない効果は、レトロウイルス形質導入自殺システムの利益を相殺し得る。これら効果はしばしば、T リンパ球を形質導入するために、安定なプロデューサー細胞株および類似の培養条件から得られる臨床グレードのレトロウイルス上清を使用して最小化され得る。本明細書で形質導入されかつ評価された T 細胞は、約 1 ~ 3 の範囲の組み込み体を含む（その上清は、約 1×10^6 ウイルス粒子 / m L の範囲で含む）。レトロウイルスベクターの代わりに

10

20

30

40

50

レンチウイルスベクターを使用すると、特に、高い自己再生および分化潜在能を有する細胞では、遺伝毒性のリスクがさらに減少し得る。

【0445】

少ない割合の *iCasp9* 陽性 MSC が、CID への単一の曝露後に持続する一方で、これらの生き残っている細胞は、その後、CID への再曝露後に殺滅され得る。インビボでは、2 用量で > 99 % が枯渇されるが、CID の反復用量は、臨床状況では最大の枯渇のために必要とされるようである。誘導性自殺スイッチシステムを使用する場合に特別な安全性を提供するためのさらなる非限定的方法としては、投与される細胞集団の純度をさらに増大させるためのさらなるラウンドのセルソーティングおよび殺滅の効率を高めるための 1 より多くの自殺遺伝子システムの使用が挙げられる。

10

【0446】

上記 CD19 分子（これは、B リンパ球によって生理学的に発現される）を、他の利用可能な選択系（例えば、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ（neo）および短縮型低親和性神経成長因子レセプター（ΔLNGFR））を超えるその潜在的利点から、形質導入細胞の選択マーカーとして選択した。「neo」は、潜在的に免疫原性の外来タンパク質をコードし、選択培地中での 7 日間の培養を要し、システムの複雑さを増大させ、その選択された細胞に潜在的に損傷を与える。ΔLNGFR 発現は、他の表面マーカーに類似の単離ストラテジーを可能にするはずであるが、これらは、臨床用途に広く利用可能ではなく、ΔLNGFR の腫瘍形成潜在能に関するなかなか消えない懸念が残る。対照的に、臨床グレードのデバイスを使用して CD19 発現によって *iCasp9* 陽性細胞を磁性選択することは、容易に利用可能であり、その後の細胞成長または分化に対して顕著な影響を示していない。

20

【0447】

カスパーゼ 9 安全スイッチを含む間葉系ストローマ細胞の調製および投与のために使用される手順は、胚性幹細胞および人工多能性幹細胞の調製のためにも使用され得る。従って、本実施例において概説される手順に関しては、胚性幹細胞または人工多能性幹細胞のいずれかが、この実施例で提供される間葉系ストローマ細胞の代わりに使用され得る。これら細胞では、レトロウイルスベクターおよびレンチウイルスベクターは、例えば、CMV プロモーターまたはロニン（ronin）プロモーターとともに使用され得る。

【0448】

30

（実施例 6）

（より低い基底活性およびリガンド IC50 の最小の損失を有する改変カスパーゼ 9 ポリペプチド）

基底シグナル伝達（アゴニストまたは活性化剤の非存在下でのシグナル伝達）は、多くの生体分子で一般的である。例えば、複数のサブファミリーに由来する 60 を超える野生型 G プロテイン共役レセプター（GPCR）[1]、キナーゼ（例えば、ERK および *ab1*）[2]、表面免疫グロブリン [3]、およびプロテアーゼにおいて観察されている。基底シグナル伝達は、胚性幹細胞多能性の維持、B 細胞発生および分化 [4~6]、T 細胞分化 [2, 7]、胸腺細胞発生 [8]、エンドサイトーシスおよび薬物耐性 [9]、自己免疫 [10] から、植物生長および発生 [11] まで、非常に種々の生物学的事象に寄与すると仮定されている。その生物学的重要性は常に完全に理解されているわけでも明らかでもないが、欠陥のある基底シグナル伝達は、重大な帰結をもたらし得る。欠陥のある基底 G_s プロテインシグナル伝達は、網膜色素変性、色盲、腎性尿崩症、家族性 ACTH 抵抗性（familial ACTH resistance）、および家族性低カルシウム尿性高カルシウム血症 [12, 13]）などの疾患をもたらした。

40

【0449】

野生型イニシエーターカスパーゼ 9 のホモ二量体化がエネルギー的にたとえ不利であり、野生型イニシエーターカスパーゼ 9 を溶液中で大部分をモノマーにしても [14~16]、プロセッシングされていないカスパーゼ 9 の低レベルの生来の基底活性 [15, 17] は、Apaf-1 ベースの「アポトソーム」（その天然のアロステリック調節因

50

子〔6〕〕の存在下で増強される。さらに、超生理学的発現レベルおよび／または共局在は、近位にあることで駆動される二量体化（proximity-driven dimerization）をもたらす得、さらには、基底活性化を増強し得る。

【0450】

キメラ非改変カスパーゼ-9ポリペプチドでは、本質的なカスパーゼ-9基底活性は、カスパーゼ動員プロドメイン（Caspase-Recruitment pro-Domain）（CARD）〔18〕を除去し、これをコグネイト高親和性AP1903-結合ドメイン、FKBP12-F36Vで置き換えることによって有意に減少した。細胞治療のためのアポトーシス促進性「安全スイッチ」としてのその有用性は、複数の研究において十分に示されてきた〔18～20〕。上記安全スイッチの高い特異的かつ低い基底活性は、これを細胞治療において強力なツールにした一方で、Gタンパク質共役レセプターとは対照的に、基底シグナル伝達を排除するための「逆作動薬」は現在存在しない〔21〕。これは、製造には、おおよびいくつかの適用においては望ましいことであり得る。マスター細胞バンクを準備することは、キメラポリペプチドの低レベル基底活性の高い増幅に起因して、困難であることは判明している。さらに、いくつかの細胞は、カスパーゼ-9の低レベル基底活性に対して他のものより感受性が高く、形質導入された細胞の意図しないアポトーシスをもたらす〔18〕。

【0451】

キメラカスパーゼ-9ポリペプチドの基底活性を改変するために、「妥当なデザイン」ベースの方法を、ランダムに生成される変異体に対する選択圧として複数サイクルのスクリーニングを使用する「定向進化」〔22〕よりむしろ、ホモ二量体化、XIAP媒介性阻害、またはリン酸化（以下の表）において決定的な役割を果たすことが公知の残基に基づいて75i Casp9変異体を操作するために使用した。カスパーゼ-9の二量体化駆動活性化は、イニシエーターカスパーゼ活性化の優性モデルを熟考した〔15、23、24〕。自発的二量体化を減少させるために、部位特異的変異誘発を、ホモ二量体化、および従って、基底カスパーゼ-9シグナル伝達にとって決定的な残基で行った。β6鎖（カスパーゼ-9の重要な二量体化界面）における5個の重要な残基（G402-C-F-N-F406）の、構成的二量体エフェクターカスパーゼ-3のそれ（C264-I-V-S-M268）での置き換えは、カスパーゼ-9を、有意な構造的再配列（rearrangement）なしに、Apaf-1活性化に非応答性の構成的二量体タンパク質に変換した〔25〕。自発的ホモ二量体化を改変するために、上記5個の残基の体系的変異誘発を、アミノ酸化学に基づいて、ならびに溶液中で主に単量体として存在するイニシエーターカスパーゼ-2、-8、-9、および-10の相当する残基に対して行った〔14、15〕。分泌型アルカリホスファターゼ（SEAP）ベースの代用物殺滅アッセイ（surrogate killing assay）（表、下記）によって28種のiCasp9変異体を作製および試験した後、N405Q変異が、AP1903に対するより高いIC₅₀を適度な（＜10倍）コストで、基底シグナル伝達を下げることで判明した。

【0452】

タンパク質分解（代表的には、カスパーゼ活性化のために必要とされる）は、カスパーゼ-9活性化のために絶対的に必要とされるわけではない〔26〕ので、熱力学的な「ハードル」を、自己タンパク質分解を阻害するために増大させた。さらに、XIAP媒介性カスパーゼ-9結合は、単量体状態においてカスパーゼ-9を捕捉して、その触媒活性および基底活性を減弱する〔14〕ので、XIAPとの相互作用にとって重要なテトラペプチド（A316-T-P-F319、D330-A-I-S-S334）を変異誘発することによって、XIAPとカスパーゼ-9との間の相互作用を強化しようと試みた。これらiCasp-9変異体のうちの17種から、D330A変異が、最小（＜5倍）のAP1903 IC₅₀コストで基底シグナル伝達を低下させると決定した。

【0453】

第3のアプローチは、カスパーゼ-9が、PKC-ζによるS144〔27〕、プロテインキナーゼAによるS183〔28〕、Akt1によるS196〔29〕のリン酸化の

10

20

30

40

50

際にキナーゼによって阻害される、およびc-a b lによるY153のリン酸化の際に活性化される[30]という以前に報告された知見に基づいた。これらの「ブレーキ」は、IC₅₀を改善し得るか、またはリン酸化模倣（「ホスホ模倣（phosphomimetic）」）残基での置換は、これらの「ブレーキ」を増やして、基底活性を低下させる。しかし、これら残基に基づく15個の単一残基変異体のうちのいずれも、AP1903に対するIC₅₀を成功裡に低下させなかった。

【0454】

例えば、実施例1～5においておよび本出願全体を通じて論じられる方法などの方法は、適切な改変とともに、必要であれば、改変されたキメラカスパーゼ-9ポリペプチドに、および種々の治療用細胞に対して適用され得る。

【0455】

（実施例7：材料および方法）

カスパーゼ-9のPCR部位特異的変異誘発：

カスパーゼ-9の基底シグナル伝達を改変するために、PCRベースの部位特異的変異誘発[31]を、変異含有オリゴおよびKapa（Kapa Biosystems, Woburn, MA）で行った。18サイクルの増幅後、親プラスミドを、PCR生成物を無傷なままにするメチル化依存性DpnI制限酵素で除去した。得られた反応物のうちの2μlを、XL1-blueまたはDH5αを化学的に形質転換するために使用した。陽性変異体を、配列決定（SeqWright, Houston, TX）を介してその後同定した。

【0456】

細胞株維持およびトランスフェクション：

早期継代HEK293T/16細胞（ATCC, Manassas, VA）を、加湿した37℃、5% CO₂/95% 空気雰囲気中でのトランスフェクションまで、10% FBS、100 U/mL ペニシリン、および100 U/mL ストレプトマイシンを補充したIMDM、GlutaMAXTM（Life Technologies, Carlsbad, CA）中で維持した。対数増殖期にある細胞を、15mLコニカルチューブ中で100万個の細胞あたり、iCasp9変異体をコードする発現プラスミドの800ng～2μgおよびSRαプロモーター駆動性SEAPをコードする発現プラスミド500ngで一過性にトランスフェクトした。触媒として不活性なカスパーゼ-9（C285A）（FKBPドメインなし）または「空の」発現プラスミド（「pSH1ヌル」）を使用して、トランスフェクション間の全プラスミドレベルを一定に維持した。3μl/μgのプラスミドDNAの比のGeneJammer（登録商標）Transfection Reagentを使用して、抗生物質の非存在下でHEK293T/16細胞を一過性にトランスフェクトした。トランスフェクション混合物のうちの100μlまたは2mLを、それぞれ、96ウェルプレートまたは6ウェルプレートの各ウェルに添加した。SEAPアッセイのために、トランスフェクション後の最短3時間のインキュベーション後に、AP1903の対数希釈物を添加した。ウェスタンブロットのために、細胞を、採取する前にAP1903（10nM）とともに20分間インキュベートした。

【0457】

分泌型アルカリホスファターゼ（SEAP）アッセイ：

AP1903処理の24～48時間後に、約100μlの上清を96ウェルプレートに採取し、SEAP活性についてアッセイした[19, 32]。簡潔には、熱に感受性の内因性（および血清由来）アルカリホスファターゼによって引き起こされるバックグラウンドを減少させるために、45分間の65℃熱変性の後に、5μlの上清を95μlのPBSに添加し、2M ジエタノールアミン中に再懸濁した1μlの100mM 4-メチルウンベリフェリルホスフェート（4-MUP; Sigma, St. Louis, MO）を含む100μlの基質緩衝液に添加した。SEAPによる4-MUPの加水分解は、励起/発光（355/460nm）を有する蛍光基質を生成し、この蛍光基質は容易に測定され得る。黒色不透明96ウェルプレートの中でアッセイを行って、ウェル間の蛍

10

20

30

40

50

光漏出を最小にした。基底シグナル伝達およびAP1903誘導活性の両方を試験するために、 10^6 早期継代HEK293T/16細胞を、種々の量の野生型カスパーゼおよびSRαプロモーターを使用してSEAP（細胞生存性のマーカー）を駆動する500 ngの発現プラスミドで共トランスフェクトした。製造業者の示唆に従って、抗生物質なしの1 mLのIMDM+10% FBSを、各混合物に添加した。上記混合物のうちの1000 μ lを、96ウェルプレートの各ウェルに播種した。100 μ lのAP1903を、トランスフェクションの少なくとも3時間後に添加した。少なくとも24時間にわたるAP1903の添加後に、100 μ lの上清を、96ウェルプレートに移し、68℃で30分間熱変性させて、内因性アルカリホスファターゼを不活化した。このアッセイのために、4-メチルウンベリフェリルホスフェート基質を、SEAPによって4-メチルウンベリフェロン（364 nmで励起され得、448 nmの発光フィルタで検出され得る代謝産物）へと加水分解した。SEAPは、細胞生存性のマーカーとして使用されるので、還元型SEAP読み取りは、増大したiカスパーゼ9活性と一致する。従って、AP1903の非存在下でのより高いSEAP読み取りは、より低い基底活性を示す。望ましいカスパーゼ変異体は、低下した基底シグナル伝達とともにAP1903に対する増大した感受性（すなわち、より低いIC₅₀）を有する。この研究の目的は、IC₅₀を有意に損なうことなく基底シグナル伝達を低下させることである。

【0458】

ウェスタンブロット分析：

2 μ gのプラスミドで48～72時間にわたって一過性にトランスフェクトしたHEK293T/16細胞を、37℃でAP1903で7.5～20分間処理し（示されるとおり）、その後、HaltTM Protease Inhibitor Cocktailを含む500 μ lのRIPA緩衝液（0.01M Tris・HCl、pH 8.0/140mM NaCl/1% Triton X-100/1mM フェニルメチルスルホニルフルオリド/1% デオキシコール酸ナトリウム/0.1% SDS）中で溶解した。この溶解物を集め、氷上で30分間溶解した。細胞デブリをペレット化した後、重層する上清に由来するタンパク質濃度を、製造業者によって推奨されるように、BCATM Protein Assayを用いて、96ウェルプレート中で測定した。30 μ gのタンパク質を、2.5% 2-メルカプトエタノールを含むLaemmliサンプル緩衝液（Bio-Rad, Hercules, CA）中で5分間、95℃で煮沸し、その後、Criterion TGX 10% Tris/グリシンタンパク質ゲルによって分離した。膜を、1/1000 ウサギ抗ヒトカスパーゼ9ポリクローナル抗体、続いて、1/10,000 HRP結合体化ヤギ抗ウサギIgG F(ab')₂二次抗体（Bio-Rad）でプローブした。タンパク質バンドを、Supersignal West Femtoケミルミネッセント基質を使用して検出した。等しいサンプル負荷を確実にするために、ブロットを、Restore PLUS Western Blot Stripping Bufferで65℃で1時間にわたってストリッピングし、その後、1/10,000 ウサギ抗アクチンポリクローナル抗体で標識した。別段述べられなければ、全ての試薬を、Thermo Scientificから購入した。

【0459】

実施例1～5においておよび本明細書全体を通じて論じられる方法および構築物は、改変されたカスパーゼ9ポリペプチドをアッセイおよび使用するためにも使用され得る。

【0460】

（実施例8：改変されたキメラカスパーゼ9ポリペプチドの評価および活性）

基底活性およびAP1903誘導活性の比較：

改変されたキメラカスパーゼ9ポリペプチドの基底活性およびAP1903誘導活性の両方を試験するために、SEAPおよび種々の量のiCasp9変異体で共トランスフェクトされたHEK293T/16細胞のSEAP活性を試験した。iCasp9 D330A、N405Q、およびD330A-N405Qは、1 μ g iCasp9/100万個細胞（相対的SEAP活性単位 148928、179081、205772 対

10

20

30

40

50

114518) または $2\text{ }\mu\text{g}$ iCasp9/100万個細胞(136863、175529、174366 対 98889)のいずれかでトランスフェクトした細胞に関して、非改変iCasp9より有意に低い基底活性を示した。 $2\text{ }\mu\text{g}$ /100万個細胞でトランスフェクトした場合に、全3種の改変されたキメラカスパーゼ9ポリペプチドの基底シグナル伝達は、有意に高かった(p 値 <0.05)。iCasp9 D330A、N405Q、およびD330A-N405Qはまた、AP1903に関する増大した推定IC₅₀を示したが、それらは全て、WTに関して1pMと比較して6pMよりさらに低く(SEA Pアッセイに基づいて)、それらを潜在的に有用なアポトーシススイッチにする。

【0461】

タンパク質発現レベルおよびタンパク質分解の評価:

改変されたキメラカスパーゼ9ポリペプチドの基底活性における観察された減少が、低下したタンパク質安定性またはトランスフェクション効率の変動に起因するという可能性を排除するために、およびiCasp9の自己タンパク質分解を試験するために、トランスフェクトしたHEK293T/16細胞におけるカスパーゼ9バリエーションのタンパク質発現レベルをアッセイした。非改変キメラカスパーゼ9ポリペプチド、iCasp9 D330A、およびiCasp9 D330A-N405Qのタンパク質レベルは全て、この研究で使用するトランスフェクション条件下で類似のタンパク質レベルを示した。対照的に、iCasp9 N405Qバンドは、特に $2\text{ }\mu\text{g}$ の発現プラスミドを使用した場合に、他のものより濃いようであった。自己タンパク質分解は、上記使用したトランスフェクション条件では、おそらく生細胞のみが集められたことが原因で容易に検出可能でなかった。抗アクチンタンパク質再ブロッティングは、匹敵する溶解物量が、各レーンへと負荷されることを確認した。これらの結果は、SEA Pアッセイによって観察される、iCasp9 D330A、N405Q、およびD330A-N405Q変異体における観察されたより低い基底シグナル伝達を支持する。

【0462】

考察:

SEA Pスクリーニングアッセイに基づいて、これら3種の改変されたキメラカスパーゼ9ポリペプチドは、iCasp9 WTトランスフェクト体と比較して、より高いAP1903非依存性SEA P活性、従って、より低い基底シグナル伝達を示した。しかし、二重変異(D330-N405Q)は、単一アミノ酸変異体に対して、基底活性もIC₅₀(0.05nM)もいずれもさらに低下させなかった。観察された差異は、タンパク質不安定性にもトランスフェクションの間に使用されるプラスミドの異なる量(differential amount)にも起因しないようであった。

【0463】

(実施例9:改変されたキメラカスパーゼ9ポリペプチドの評価および活性)

誘導性カスパーゼ9は、AP1903依存性様式において、迅速な細胞周期非依存性の細胞自律性の殺滅を提供する。この誘導性カスパーゼ9ポリペプチドの特性の改善は、さらにより広い適用性を可能にする。タンパク質のリガンド非依存性細胞傷害を減少させ、低い発現レベルでその殺滅を増大させることは、望ましい。リガンド非依存性細胞傷害は、比較的低い発現レベルでは懸念ではないが、発現のレベルが、ベクター生成の間などの、初代標的細胞におけるよりも1桁以上高いレベルに達し得る場合には、実質的な影響を有し得る。また、細胞は、XIAPおよびBcl-2のような、細胞が発現するアポトーシスインヒビターのレベルに起因して、低いカスパーゼ発現レベルに差次的に感受性(differentially sensitive)であり得る。従って、より低い基底活性およびAP1903リガンドに対しておそらくより高い感受性を有するようにカスパーゼポリペプチドを再操作するために、4つの変異誘発ストラテジーを考案した。

【0464】

二量体化ドメイン: カスパーゼ9は、生理学的レベルでは溶液中で単量体であるが、アポトーシス促進Apaf駆動性「アポトソーム」において起こるような高い発現レベルでは、カスパーゼ9は、二量体化し得、D315での自己タンパク質分解および触

10

20

30

40

50

媒活性の大きな増大をもたらす。C 2 8 5 は活性部位の一部であるので、変異 C 2 8 5 A は、触媒としては不活性であり、陰性コントロール構築物として使用される。二量体化は、特に 5 個の残基、すなわち、G 4 0 2、C 4 0 3、F 4 0 4、N 4 0 5、および F 4 0 6 の非常に密な相互作用を要する。各残基に関して、アミノ酸の異なるクラス（例えば、疎水性、極性など）を表す種々のアミノ酸置換を構築した。興味深いことに、G 4 0 2 での全ての変異体（すなわち、G 4 0 2 A、G 4 0 2 I、G 4 0 2 Q、G 4 0 2 Y）および C 4 0 3 P は、触媒として不活性なカスパーゼポリペプチドをもたらした。さらなる C 4 0 3 変異（すなわち、C 4 0 3 A、C 4 0 3 S、および C 4 0 3 T）は、野生型カスパーゼに類似であったので、さらに追求しなかった。F 4 0 4 での変異は全て、基底活性を減少させたが、それはまた、約 1 log から測定不能までの、IC₅₀ に対する感受性の低下を反映した。効力の順序では、それらは、以下のとおりである：F 4 0 4 Y > F 4 0 4 T、F 4 0 4 W >> F 4 0 4 A、F 4 0 4 S。N 4 0 5 での変異は、それぞれ、N 4 0 5 A の場合のように何ら効果を有さないか、N 4 0 5 T におけるように増大した基底活性を有するか、または N 4 0 5 Q および N 4 0 5 F の場合のように IC₅₀ に対して小さな（約 5 倍）またはより大きな有害作用に付随して低下した基底活性を有するかのいずれかであった。最後に、F 4 0 4 のように、F 4 0 6 での変異は全て基底活性を低下させ、それは、約 1 log から測定不能までの、IC₅₀ に対する感受性の低下を反映した。効力の順序では、それらは以下のとおりである：F 4 0 6 A、F 4 0 6 W、F 4 0 6 Y > F 4 0 6 T >> F 4 0 6 L。

【0 4 6 5】

溶液中で単量体（例えば、カスパーゼ 2、- 8、- 1 0）または二量体（例えば、カスパーゼ 3）であることが公知の他のカスパーゼに由来する類似の 5 残基を置換することを出いて、二量体化ドメイン内で複合変異（compound mutation）を有するいくつかのポリペプチドを構築し、試験した。A A A A A アラニン置換とともに、カスパーゼ 2、- 3、および - 8 から 5 残基の変化を含むカスパーゼ 9 ポリペプチドは全て、触媒として不活性であった一方で、カスパーゼ 1 0 由来の等価な残基（I S A Q T）は、IC₅₀ がより高いことを除いて低下した基底活性をもたらした。

【0 4 6 6】

全体としては、一貫してより低い基底活性の組み合わせに基づいて、IC₅₀ に関してごく軽度の影響と組み合わせ、N 4 0 5 Q をさらなる実験のために選択した。効力を改善するために、N 4 0 5 Q 置換を有する改変されたカスパーゼ 9 ポリペプチドのコード最適化したバージョン（N 4 0 5 Q c o と称する）を試験した。このポリペプチドは、野生型 N 4 0 5 Q 置換されたカスパーゼ 9 ポリペプチドより A P 1 9 0 3 に対して感受性が僅かに高いようであった。

【0 4 6 7】

切断部位変異体： アポトソーム内でのまたは A P 1 9 0 3 強制ホモ二量体化を介するカスパーゼ 9 の凝集後に、D 3 1 5 での自己タンパク質分解が起こる。これは、A 3 1 6 において、少なくとも一過性に、新たなアミノ末端を作り出す。興味深いことに、新たに現れたテトラペプチドである^{3 1 6} A T P F^{3 1 9} は、カスパーゼ 9 阻害剤、X I A P（これは、二量体化について、カスパーゼ 9 自体と、その二量体化モチーフ G C F N F（上記で論じられる）において競合する）に結合する。従って、D 3 1 5 切断の最初の結果は、X I A P 結合であり、さらなるカスパーゼ 9 活性化を減弱する。しかし、第 2 のカスパーゼ切断部位は、D 3 3 0 に存在し、この部位は、下流のエフェクターカスパーゼであるカスパーゼ 3 の標的である。アポトシス促進圧（pro-apoptotic pressure）が増えるにつれて、D 3 3 0 はますます切断され、残基 3 1 6 ~ 3 3 0 内の X I A P 結合小ペプチドを放出し、従って、この軽減するカスパーゼ 9 阻害剤（mitigating Caspase-9 inhibitor）を取り除く。D 3 3 0 A 変異体を構築した。この変異体は、基底活性を低下させたが、N 4 0 5 Q ほど低くはなかった。高コピー数での S E A P アッセイによって、IC₅₀ において僅かな増大が明らかになったが、初代 T 細胞での低コピー数では、実際には、標的細胞の改善された殺滅とともに、IC₅₀ のわずかな増大があった

。自己タンパク質分解部位 D 3 1 5 での変異はまた、基底活性を低下させたが、これは、I C₅₀ において大きな増大をもたらした。なぜならおそらく D 3 3 0 切断は、次にカスパーゼ活性化のために必要であったからである。D 3 1 5 A および D 3 3 0 A での二重変異は、正確にはプロセシングされ得ない不活性な「ロックされた (locked)」カスパーゼ-9 をもたらした。

【0468】

他の D 3 3 0 変異体を作った (D 3 3 0 E、D 3 3 0 G、D 3 3 0 N、D 3 3 0 S、および D 3 3 0 V を含む)。D 3 2 7 での変異はまた、コンセンサスカスパーゼ-3 切断部位が D x x D であるので、D 3 3 0 での切断を妨げたが、いくつかの D 3 2 7 変異 (すなわち、D 3 2 7 G、D 3 2 7 K、および D 3 2 7 R) は、F 3 2 6 K、Q 3 2 8 K、Q 3 2 8 R、L 3 2 9 K、L 3 2 9 G、および A 3 3 1 K とともに (D 3 3 0 変異とは異なっ

10

【0469】

X I A P 結合変異体： 上記で論じられるように、D 3 1 5 での自己タンパク質分解は、X I A P 結合テトラペプチドである ³¹⁶ A T P F ³¹⁹ を明らかにし、これは、X I A P をカスパーゼ-9 複合体へと「誘い出す」。A T P F を、ミトコンドリア由来抗 X I A P インヒビターである S M A C / D I A B L O からの類似の X I A P 結合テトラペプチド A V P I で置換すると、X I A P へとより密に結合し得、基底活性を低下させ得る。しかし、この 4 残基置換は、効果を有しなかった。A T P F モチーフ内での他の置換は、効果なし (すなわち、T 3 1 7 C、P 3 1 8 A、F 3 1 9 A) から、I C₅₀ において非常

20

【0470】

リン酸化変異体： 少数のカスパーゼ-9 残基が、リン酸化の阻害性 (例えば、S 1 4 4、S 1 8 3、S 1 9 5、S 1 9 6、S 3 0 7、T 3 1 7) または活性化 (すなわち、Y 1 5 3) のいずれかの標的であると報告された。従って、酸性残基 (例えば、A s p) での置換によってリン酸化を模倣する (「ホスホ模倣物」) かまたはリン酸化を排除するかのいずれかの変異を試験した。一般に、大部分の変異は、ホスホ模倣物が試行されたか否かに拘わらず、基底活性を低下させた。低い基底活性を有する変異体の中で、S 1 4 4 での変異 (すなわち、S 1 4 4 A および S 1 4 4 D) および S 1 4 9 6 D は、I C₅₀ に対して識別できる効果を有さず、変異体 S 1 8 3 A、S 1 9 5 A、および S 1 9 6 A は、I C₅₀ を軽度

30

【0471】

二重変異体： D 3 3 0 A バリエーションの僅かに改善した効力と、基底活性をさらに低下させ得る考えられる残基とを組み合わせるために、多くの D 3 3 0 A 二重変異体を構築および試験した。代表的には、それらは、I C₅₀ においてごく僅かな増大はあったが低い基底活性を維持した (N 4 0 5 Q、S 1 4 4 A、S 1 4 4 D、S 1 8 3 A、および S 1 9 6 A における第 2 の変異を含む)。二重変異体 D 3 3 0 A - N 4 0 5 T は、より高い基底活性を有し、D 3 3 0 A と、Y 1 5 3 A、Y 1 5 3 F、および T 3 1 7 E とでの二重変異体は、触媒として不活性であった。効力を改善するかまたは I C₅₀ を減少させることが意図された低い基底活性を有する一連の二重変異体 N 4 0 5 Q を、試験した。これらの全ては、C a s p a C I D e - 1. 0 に対して低い基底活性および僅かに増大した I C₅₀ の観点から、N 4 0 5 Q に類似であるようであり、N 4 0 5 Q と、S 1 4 4 A、S 1 4 4 D、S 1 9 6 D、および T 3 1 7 S とを含んだ。

40

50

【0472】

SEAPアッセイを行って、二量体化ドメイン変異体のうちのいくつかの基底活性およびCID感受性を研究した。N405Qは、AP1903独立性シグナル伝達の上方のシフトによって決定されるように、WTカスパーゼ-9より低い基底活性を有する試験した変異体の中で最もAP1903感受性であった。F406Tは、この群からの最も低いCID感受性であった。

【0473】

変異体カスパーゼポリペプチドD330AおよびN405Qの二量体非依存性SEAP活性を、二重変異体D330A-N405Qとともにアッセイした。複数のトランスフェクションの結果(N=7~13)は、N405QがD330Aより低い基底活性を有し、この二重変異体は中間であることを見出した。

10

【0474】

変異体カスパーゼポリペプチドD330AおよびN405Qの平均(+標準偏差、n=5)IC₅₀を、二重変異体D330A-N405Qとともに得ると、一過性のトランスフェクション活性において、D330Aは、N405Q変異体よりAP1903に対して幾分感受性が高いが、WTカスパーゼ-9より約2倍感受性が低いことが示される。

【0475】

SEAPアッセイを、野生型(WT)カスパーゼ-9、N405Q、不活性C285A、およびXIAP結合ドメイン内のいくつかのT317変異体を使用して行った。その結果は、T317SおよびT317Aが、AP1903に対してIC₅₀の大きなシフトなしに、基底活性を減少し得ることを示す。従って、T317Sを、N405Qとの二重変異体を作製するために選択した。

20

【0476】

上記のSEAPアッセイからのIC₅₀は、T317AおよびT317Sが、より低い基底活性を有するにも拘わらず、野生型カスパーゼ-9ポリペプチドに類似のIC₅₀を有することを示した。

【0477】

いくつかのD330変異体に由来する二量体非依存性SEAP活性は、試験したことクラスの全てのメンバー(D330A、D330E、D330N、D330V、D330G、およびD330Sを含む)が、野生型カスパーゼ-9より低い基底活性を有することを示した。D330Aバリエーションの基底およびAP1903誘導活性化をアッセイした。100万個のHEK293細胞あたり1または2μgの変異体カスパーゼポリペプチドおよび0.5μgのpSH1-kSEAPで一過性にトランスフェクトしたHEK293/16細胞のSEAPアッセイを、トランスフェクションの72時間後に行った。2μgの各発現プラスミド(WTを含む)に基づいて正規化したデータを、1μgベースのトランスフェクションからの正規化したデータと混合した。iCasp9-D330A、-D330E、および-D330Sは、野生型カスパーゼ-9より統計的に低い基底シグナル伝達を示した。

30

【0478】

ウェスタンブロットの結果は、D330変異が、D330での切断をブロックし、僅かに大きく(より遅く移動する)小さなバンド(<20kDaマーカー)をもたらすことを示した。他のブロットは、D327変異がまた、切断をブロックすることを示す。

40

【0479】

示されたカスパーゼ-9ポリペプチドをコードするレトロウイルスで5回形質導入されたPG13の複数のクローンの平均蛍光強度を、測定した。基底活性が低いほど、代表的には、遺伝子連結されたレポーターCD19とともに、カスパーゼ-9遺伝子のより高い発現レベルへと変換される。その結果は、平均して、N405Q変異体を発現するクローンが、より高いレベルのCD19を発現し、D330変異体またはWTカスパーゼ-9を超えて、N405Qのより低い基底活性を反映することを示す。VSV-Gエンベロープベースのレトロウイルス上清で交差形質導入した(cross-transduced)

50

PG13パッケージング細胞から得られるウイルス力価に対する種々のカスパーゼ変異の効果をアッセイした。レトロウイルスマスター細胞株生成に対するCaspaCIDE由来基底シグナル伝達の効果を試験するために、レトロウイルスパッケージング細胞株PG13を、 $4\mu\text{g}/\text{ml}$ トランスフェクション増強因子ポリブレンの存在下で、VSV-Gベースのレトロウイルス上清で5回交差形質導入した。CaspaCIDE形質導入PG13細胞をその後、形質導入の指標としてPE結合体化抗ヒトCD19抗体で染色した。CaspaCIDE-D330A、-D330E、および-N405Q形質導入PG13細胞は、増強されたCD19平均蛍光強度(MFI)を示した。これは、より高いレトロウイルスコピー数を示し、より低い基底活性を意味した。PG13形質導入体のウイルス力価をより直接的に試験するために、HT1080細胞を、ウイルス上清および $8\mu\text{g}/\text{ml}$ ポリブレンで処理した。PG13細胞において、WT iCasp9に対してiCasp9-D330A、-N405Q、および-D330E形質導入体の増強されたCD19 MFIは、HT1080細胞において観察されるように、より高いウイルス力価と正に相関する。最初に低いウイルス力価(およそ1E5形質導入単位(TU)/ml)に起因して、ウイルス力価における差異は、ウイルス収量を増大させるためのHAT処理の非存在下で観察されなかった。HAT培地処理の際に、CaspaCIDE-D330A、-N405Q、または-D330Eで形質導入したPG13細胞は、より高いウイルス力価を示した。ウイルス力価(形質導入単位)を、以下の式で計算する: ウイルス力価 = (形質導入の日の細胞数) * (% CD19⁺) / 上清の容積(ml)。より低い基底活性を有するCaspaCIDE変異体の効果をさらに調査するために、CaspaCIDE形質導入PG13細胞の個々のクローン(コロニー)を、選択および拡大した。他のコホートより高いCD19 MFIを有するCaspaCIDE-N405Qクローンを、観察した。

【0480】

初代T細胞において主に単一コピーでの種々のカスパーゼポリペプチドの効果を、アッセイした。これは、これら自殺遺伝子が治療上どのように使用されるかをより正確に反映し得る。驚くべきことに、そのデータは、D330A変異体が、低力価でAP1903に対して実際にはより感受性が高く、24時間アッセイで試験した場合にWTカスパーゼ9と少なくとも同程度に殺滅することを示す。このN405Q変異体は、AP1903に対して感受性がより低く、24時間以内にそれほど効率的に標的細胞を殺滅できない。

【0481】

別個の健常ドナーに由来する6種の非独立性のT細胞サンプルを形質導入した結果は、D330A変異体(mut)が、野生型カスパーゼ9ポリペプチドよりAP1903に対して感受性がより高いことを示した。

【0482】

iCasp9-D330A変異体は、形質導入されたT細胞において改善されたAP1903依存性細胞傷害を示した。健常ドナー(n=6)由来の初代T細胞を、変異または野生型iCasp9またはiCasp9-D330A、およびΔCD19細胞表面マーカーをコードするレトロウイルスで形質導入した。形質導入後、iCasp9形質導入T細胞を、CD19マイクロビーズおよび磁性カラムを使用して精製した。次いで、T細胞をAP1903(0~100nM)に曝し、CD3+CD19+T細胞に関して、フローサイトメトリーによって24時間後に測定した。iCasp9-D330AのIC₅₀は、野生型iCasp9より有意に低かった(p=0.002)。

【0483】

いくつかのD330変異体の結果は、試験した全6種のD330変異体(D330A、E、N、V、G、およびS)が、野生型カスパーゼ9ポリペプチドよりAP1903に対して感受性が高いことを明らかにした。

【0484】

N405Q変異体は、他の二量体化ドメイン変異体(N404YおよびN406Yを含む)とともに、10日以内に野生型カスパーゼ9ポリペプチドまたはD330Aとは区

10

20

30

40

50

別できない、標的T細胞を殺滅し得る。0日目にAP1903を受けた細胞に、4日目に第2の用量のAP1903を与えた。このデータは、制御される効力スイッチの一部としてN405Qのように、低下した感受性カスパーゼ9変異体の使用を支持する。

【0485】

N405Qカスパーゼポリペプチドのコドン最適化（「N405Qco」といわれる）の結果は、コドン最適化が、おそらく発現においてのみ増大をもたらし、誘導性カスパーゼ機能に対して非常に僅かな効果を有することを明らかにした。これは、元のカスパーゼ9遺伝子における共通コドンの使用を反映するようである。

【0486】

カスパーゼ9ポリペプチドは、インビボで用量応答曲線を有し、これは、カスパーゼ9ポリペプチドを発現するT細胞の種々の画分を排除するために使用され得る。このデータはまた、0.5mg/kg AP1903の用量が、大部分の改変されたT細胞をインビボで排除するために十分であることを示す。

【0487】

D330E iCasp9で形質導入したT細胞のインビボでのAP1903用量依存性排除をアッセイした。T細胞を、SFG-iCasp9-D330E-2A-ΔCD19レトロウイルスで形質導入し、免疫不全マウス（NSG）へとi.v.注射した。24時間後に、マウスに、AP1903（0～5mg/kg）をi.p.注射した。さらに24時間後、マウスを屠殺し、脾臓由来のリンパ球（A）を単離し、ヒトCD3+CD19+T細胞の頻度に関してフローサイトメトリーによって分析した。これは、iCasp9-D330Eが、AP1903に応答して野生型iCasp9と類似のインビボ細胞傷害プロファイルを示すことを示す

【0488】

結論： 論じられるように、これまでのところ78個の変異体のこの分析から、単一の変異体の変異（single mutant mutations）のうち、D330変異は、幾分改善された効力と僅かに減少した基底活性とを合わせもつ。N405Q変異体は魅力的でもある。なぜならそれらは、非常に低い基底活性と、IC₅₀において4～5倍の増大を反映するごく僅かに減少した効力とを有するからである。初代T細胞での実験は、N405Q変異体が、標的細胞を効率的に、しかしD330変異体より幾分遅い動力学で殺滅し得るということを示した。これは、N405Q変異体を、AP1903の最初の投与後に部分的に殺滅し、AP1903の2回目の投与で完全な殺滅まで達成され得る段階的自殺スイッチとして潜在的に非常に有用にする。

【0489】

以下の表は、本明細書で論じられる方法に従って調製およびアッセイされた種々の改変されたキメラカスパーゼ9ポリペプチドに関する基底活性およびIC₅₀のまとめを提供する。この結果は、一度試験したサブセット（すなわち、A316G、T317E、F326K、D327G、D327K、D327R、Q328K、Q328R、L329G、L329K、A331K、S196A、S196D、および以下の二重変異体：D330AとS144A、S144D、またはS183A；およびN405QとS144A、S144D、S196D、またはT317S）を除いて、最低2回の独立したSEAPアッセイに基づく。4回の多面的アプローチを採用して、試験される改変されたキメラカスパーゼ9ポリペプチドを生成した。「機能しない（dead）」改変されたカスパーゼ9ポリペプチドは、もはやAP1903に応答しなかった。二重変異体は、ハイフンによって示される。例えば、D330A-N405Qは、330位での置換および405位での置換を有する改変されたカスパーゼ9ポリペプチドを示す。

【0490】

【表 5 - 1】

表5 カスパーゼ変異クラス

基底活性	ホモ二量体化ドメイン	切断部位& XIAP 相互作用	リン酸化	二重変異体, Misc.	全変異体
減少した 基底および類似の IC ₅₀			S144A		80
			S144D		*, 推定
		T317S	S196D		
減少した 基底しかし より高い IC ₅₀	N405Q	D330A	S183A	D330A- N405Q	太字, T 細胞において試験
	⁴⁰² GCFNF ⁴⁰⁶ ISAQT (Casp-10)	D330E	S195A	D330A- S144A	
	F404Y	D330G	S196A	D330A- S144D	
	F406A	D330N		D330A- S183A	
	F406W	D330S		D330A- S196A	
	F406Y	D330V		N405Q- S144A	
	N405Q _{co}	L329E		N405Q- S144D	
		T317A		N405Q- S196D	
				N405Q-	

10

20

30

【表 5 - 2】

				T317S
				<i>*N405Q-S144Aco</i>
				<i>*N405Q-T317Sco</i>
減少した 基底しかし 遙かにより 高い IC ₅₀	F404T	D315A	Y153A	
	F404W	A316G	Y153F	
	N405F	F319W	S307A	
	F406T			
類似の基 底および IC ₅₀	C403A	³¹⁶ ATPF ³¹⁹ AV PI (SMAC/Diablo)		
	C403S	T317C		
	C403T	P318A		
	N405A	F319A		
増大した 基底	N405T	T317E		D330A- N405T
		F326K		
		D327G		
		D327K		
		D327R		
		Q328K		
		Q328R		
		L329G		
		L329K		
		A331K		
触媒として 機能しない	⁴⁰² GCFNF ⁴⁰⁶ AAAAA			C285A
	⁴⁰² GCFNF ⁴⁰⁶ YCSTL (Casp-2)			D315A- D330A
	⁴⁰² GCFNF ⁴⁰⁶ CIVSM (Casp-3)			D330A- Y153A
	⁴⁰² GCFNF ⁴⁰⁶ QPTFT			D330A-

10

20

30

40

【表 5 - 3】

	(Casp-8)			Y153F
	G402A			D330A- T317E
	G402I			
	G402Q			
	G402Y			
	C403P			
	F404A			
	F404S			
	F406L			

10

【 0 4 9 1】

実施例 6 ～ 9 において引用された参考文献

1. Seifert, R. and K. Wenzel-Seifert, Constitutive activity of G-protein-coupled receptors: cause of disease and common property of wild-type receptors. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2002. 366(5): p. 381-416. 20
2. Roose, J.P., et al., T cell receptor-independent basal signaling via Erk and Abl kinases suppresses RAG gene expression. PLoS Biol, 2003. 1(2): p. E53.
3. Tze, L.E., et al., Basal immunoglobulin signaling actively maintains developmental stage in immature B cells. PLoS Biol, 2005. 3(3): p. e82.
4. Schram, B.R., et al., B cell receptor basal signaling regulates antigen-induced Ig light chain rearrangements. J Immunol, 2008. 180(7): p. 4728-41. 30
5. Randall, K.L., et al., Dock8 mutations cripple B cell immunological synapses, germinal centers and long-lived antibody production. Nat Immunol, 2009. 10(12): p. 1283-91.
6. Kouskoff, V., et al., B cell receptor expression level determines the fate of developing B lymphocytes: receptor editing versus selection. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. 97(13): p. 7435-9.
7. Hong, T., et al., A simple theoretical framework for understanding heterogeneous differentiation of CD4+ T cells. BMC Syst Biol, 2012. 6: p. 66. 40
8. Rudd, M.L., A. Tua-Smith, and D.B. Straus, Lck SH3 domain function is required for T-cell receptor signals regulating thymocyte development. Mol Cell Biol, 2006. 26(21): p. 7892-900.
9. Sorkin, A. and M. von Zastrow, Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. 10(9): p. 609-22.
10. Luning Prak, E.T., M. Monestier, and R.A. Eisenberg, B cell receptor editing in tolerance and autoimmunity. Ann N Y Acad Sci, 2011. 1217: p. 96-121.
11. Boss, W.F., et al., Basal signaling regulates plant growth and 50

development. *Plant Physiol*, 2010. 154(2): p. 439-43.

12. Tao, Y.X., Constitutive activation of G protein-coupled receptors and diseases: insights into mechanisms of activation and therapeutics. *Pharmacol Ther*, 2008. 120(2): p. 129-48.
13. Spiegel, A.M., Defects in G protein-coupled signal transduction in human disease. *Annu Rev Physiol*, 1996. 58: p. 143-70.
14. Shiozaki, E.N., et al., Mechanism of XIAP-mediated inhibition of Caspase-9. *Mol Cell*, 2003. 11(2): p. 519-27.
15. Renatus, M., et al., Dimer formation drives the activation of the cell death protease Caspase-9. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(25): p. 14250-5. 10
16. Shi, Y., Mechanisms of Caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell*, 2002. 9(3): p. 459-70.
17. Shiozaki, E.N., J. Chai, and Y. Shi, Oligomerization and activation of Caspase-9, induced by Apaf-1 CARD. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(7): p. 4197-202.
18. Straathof, K.C., et al., An inducible Caspase-9 safety switch for T-cell therapy. *Blood*, 2005. 105(11): p. 4247-54.
19. MacCorkle, R.A., K.W. Freeman, and D.M. Spencer, Synthetic activation of Caspases: artificial death switches. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95(7): p. 3655-60. 20
20. Di Stasi, A., et al., Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy. *N Engl J Med*, 2011. 365(18): p. 1673-83.
21. Chang, W.C., et al., Modifying ligand-induced and constitutive signaling of the human 5-HT4 receptor. *PLoS One*, 2007. 2(12): p. e1317.
22. Bloom, J.D. and F.H. Arnold, In the light of directed evolution: pathways of adaptive protein evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. 106 Suppl 1: p. 9995-10000.
23. Boatright, K.M. and G.S. Salvesen, Mechanisms of Caspase activation. *Curr Opin Cell Biol*, 2003. 15(6): p. 725-31. 30
24. Boatright, K.M., et al., A unified model for apical Caspase activation. *Mol Cell*, 2003. 11(2): p. 529-41.
25. Chao, Y., et al., Engineering a dimeric Caspase-9: a re-evaluation of the induced proximity model for Caspase activation. *PLoS Biol*, 2005. 3(6): p. e183.
26. Stennicke, H.R., et al., Caspase-9 can be activated without proteolytic processing. *J Biol Chem*, 1999. 274(13): p. 8359-62.
27. Brady, S.C., L.A. Allan, and P.R. Clarke, Regulation of Caspase-9 through phosphorylation by protein kinase C zeta in response to hyperosmotic stress. *Mol Cell Biol*, 2005. 25(23): p. 10543-55. 40
28. Martin, M.C., et al., Protein kinase A regulates Caspase-9 activation by Apaf-1 downstream of cytochrome c. *J Biol Chem*, 2005. 280(15): p. 15449-55.
29. Cardone, M.H., et al., Regulation of cell death protease Caspase-9 by phosphorylation. *Science*, 1998. 282(5392): p. 1318-21.
30. Raina, D., et al., c-Abl tyrosine kinase regulates Caspase-9 autocleavage in the apoptotic response to DNA damage. *J Biol Chem*, 2005. 280(12): p. 11147-51.
31. Papworth, C., Bauer, J. C., Braman, J. and Wright, D. A., Site-directed mutagenesis in one day with >80% efficiency. *Strategies*, 19 50

96. 9(3): p. 3-4.

32. Spencer, D.M., et al., Functional analysis of Fas signaling in vivo using synthetic inducers of dimerization. *Curr Biol*, 1996. 6(7): p. 839-47.

33. Hsiao, E.C., et al., Constitutive Gs activation using a single-construct tetracycline-inducible expression system in embryonic stem cells and mice. *Stem Cell Res Ther*, 2011. 2(2): p. 11.

34. Waldner, C., et al., Double conditional human embryonic kidney cell line based on FLP and PhiC31 mediated transgene integration. *BMC Res Notes*, 2011. 4: p. 420.

10

【0492】

キメラカスパーゼポリペプチドは、アミノ酸置換（より低い基底活性を有するカスパーゼポリペプチドを生じるアミノ酸置換を含む）を含み得る。これらは、例えば、iCasp9 D330A、iCasp9 N405Q、およびiCasp9 D330A N405Qを含み得、SEAPレポーターベースの代用物殺滅アッセイにおいてそれらのAP1903 IC₅₀に対して最小の有害な作用とともに、それぞれ、低いから検出不能までの基底活性を示した。

【0493】

（実施例10：特定の核酸配列およびアミノ酸配列の例）

以下は、キメラタンパク質およびCD19マーカーの発現のために使用され得る構築物の例を提供するヌクレオチド配列である。この図は、SFG.iC9.2A.²CD19.gcs構築物を示す。

20

【0494】

【化 1】

配列番号 1, 5' LTR配列のヌクレオチド配列

TGAAAGACCCACCTGTAGGTTTGGCAAGCTAGCTTAAGTAACGCCATTTTGCAAGGCATG
GAAAAATACATAACTGAGAATAGAAAAGTTCAGATCAAGGTCAGGAACAGATGGAACAGCT
GAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGA
ACAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCC
GGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCCCCAGATGCGGTCCAGCCCTCAGCAGTTTCTAGA
GAACCATCAGATGTTTCCAGGGTGGCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGTGCCTTATTTGAA
CTAACCAATCAGTTCGCTTCTCGCTTCTGTTTCGCGCGCTTATGCTCCCCGAGCTCAATAAA
AGAGCCCAACAACCCCTCACTCGGGGCGCCAGTCCTCCGATTGACTGAGTCGCCCCGGGTA
CCCGTGTATCCAATAAACCCCTCTTGCAAGTTGCATCCGACTTGTGGTCTCGCTGTTTCCTTGG
GAGGGTCTCCTCTGAGTGATTGACTACCCGTCAGCGGGGGTCTTTCA

10

配列番号 2, Fvのヌクレオチド配列 (ヒト FKBP12v36)

GGAGTGCAGGTGGAAACCATCTCCCCAGGAGACGGGCGCACCTTCCCCAAGCGCGGCCA
GACCTGCGTGGTGCCTACACCGGGATGCTTGAAGATGGAAAGAAAGTTGATTCCCTCCCG
GGACAGAAACAAGCCCTTTAAGTTTATGCTAGGCAAGCAGGAGGTGATCCGAGGCTGGGA
AGAAGGGGTTGCCCAGATGAGTGTGGGTGAGAGAGCCAACTGACTATATCTCCAGATTA
TGCCTATGGTGCCACTGGGCACCCAGGCATCATCCACCACATGCCACTCTCGTCTTCGA
TGTGGAGCTTCTAAAACTGGAA

20

配列番号 3 Fvのアミノ酸配列 (ヒト FKBP12v36)

G V Q V E T I S P G D G R T F P K R G Q T C V V H Y T G M L E D G K
K V D S S R D R N K P F K F M L G K Q E V I R G W E E G V A Q M S V
G Q R A K L T I S P D Y A Y G A T G H P G I I P P H A T L V F D V E L
L K L E

30

配列番号 4, GSリンカーヌクレオチド配列

TCTGGCGGTGGATCCGGA

【化 2】

配列番号 5, GSリンカーアミノ酸配列

S G G G S G

配列番号 6, リンカーヌクレオチド配列 (GSリンカーとCasp 9との間)

GTCGAC

10

配列番号 7, リンカーアミノ酸配列 (GSリンカーとCasp 9との間)

VD

配列番号 8, Casp 9 (短縮型) ヌクレオチド配列

GGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTTACATCC
TGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAACCTCTGCCGTGAGT
CCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCAACATCGACTGTGAGAAAGTTGCGGCGTCGCTTC
TCCTCGCTGCATTTTCATGGTGGAGGTGAAGGGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTG
GCTTTGCTGGAGCTGGCGCAGCAGGACCACGGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCAT
TCTCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCAGTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGA
TGGATGCCCTGTGTGCGTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAG
CCTGGGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGAGCAGAAAGACC
ATGGGTTTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGC
CAGATGCCACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGACCAGCTGGACGCCATATCTA
GTTTGCCCACACCCAGTGACATCTTTGTGTCTACTCTACTTTCCAGGTTTTGTTTCCTGG
AGGGACCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTG
GGCTCACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAA
AGGGATTTATAAACAGATGCCTGGTTGCTTTAATTCCTCCGAAAAAACTTTTCTTTAAAA
CATCA

20

30

配列番号 9, カスパーゼ-9 (短縮型) アミノ酸配列-CARDドメイン欠失

G F G D V G A L E S L R G N A D L A Y I L S M E P C G H C L I I N N V
N F C R E S G L R T R T G S N I D C E K L R R R F S S L H F M V E V K
G D L T A K K M V L A L L E L A Q Q D H G A L D C C V V V I L S H G C
Q A S H L Q F P G A V Y G T D G C P V S V E K I V N I F N G T S C P S
L G G K P K L F F I Q A C G G E Q K D H G F E V A S T S P E D E S P

40

【化 3】

G S N P E P D A T P F Q E G L R T F D Q L D A I S S L P T P S D I F V
 S Y S T F P G F V S W R D P K S G S W Y V E T L D D I F E Q W A H S
 E D L Q S L L L R V A N A V S V K G I Y K Q M P G C F N F L R K K L F
 F K T S

配列番号 10, リンカーヌクレオチド配列(カスパーゼ-9と2Aとの間)

GCTAGCAGA

10

配列番号 11, リンカーアミノ酸配列(カスパーゼ-9と2Aとの間)

ASR

配列番号 12, Thosea asignaウイルス-カプシドタンパク質前駆体由来の2Aヌクレオチド配列

GCCGAGGGCAGGGGAAGTCTTCTAACATGCGGGGACGTGGAGGAAAATCCCGGGCCC

20

配列番号 13, Thosea asignaウイルス-カプシドタンパク質前駆体由来の2A アミノ酸配列

A E G R G S L L T C G D V E E N P G P

配列番号 14, ヒトCD19(Δ細胞質ドメイン)ヌクレオチド配列(太字は膜貫通ドメイン)

ATGCCACCTCCTCGCCTCCTCTTCTTCCTCCTCCTCACCCCCATGGAAGTCAGGCCCG
 AGGAACCTCTAGTGGTGAAGGTGGAAGAGGGAGATAACGCTGTGCTGCAGTGCCTCAAG
 GGGACCTCAGATGGCCCCACTCAGCAGCTGACCTGGTCTCGGGAGTCCCCGCTTAAACC
 CTTCTTAAACTCAGCCTGGGGCTGCCAGGCCTGGGAATCCACATGAGGCCCTGGCCAT
 CTGGCTTTTCATCTTCAACGTCTCTCAACAGATGGGGGGCTTCTACCTGTGCCAGCCGGG
 GCCCCCTCTGAGAAGGCCTGGCAGCCTGGCTGGACAGTCAATGTGGAGGGCAGCGGG
 GAGCTGTTCCGGTGGAATGTTTCGGACCTAGGTGGCCTGGGCTGTGGCCTGAAGAACAG
 GTCCTCAGAGGGCCCCAGCTCCCCTTCCGGGAAGCTCATGAGCCCCAAGCTGTATGTGT
 GGGCCAAAGACCGCCCTGAGATCTGGGAGGGAGAGCCTCCGTGTCTCCACCGAGGGAC
 AGCCTGAACCAGAGCCTCAGCCAGGACCTCACCATGGCCCCCTGGCTCCACACTCTGGCT
 GTCCTGTGGGGTACCCCTGACTCTGTGTCCAGGGGCCCTCTCCTGGACCCATGTGC
 ACCCAAGGGGCCTAAGTCATTGCTGAGCCTAGAGCTGAAGGACGATCGCCCGGCCAGA
 GATATGTGGGTAATGGAGACGGGTCTGTTGTTGCCCCGGGCCACAGCTCAAGACGCTGG

30

40

【化 4】

AAAGTATTATTGTCACCGTGGCAACCTGACCATGTCATTCCACCTGGAGATCACTGCTCGG
 CCAGTACTATGGCACTGGCTGCTGAGGACTGGTGGCTGGAAGGTCTCAGCTGTGACTTTG
GCTTATCTGATCTTCTGCCTGTGTTCCCTTGTGGGCATTCTTCATCTTCAAAGAGCCCTGG
 TCCTGAGGAGGAAAAGAAAGCGAATGACTGACCCACCAGGAGATTC

配列番号 15, ヒトCD19(Δ細胞質ドメイン)アミノ酸配列

M P P P R L L F F L L F L T P M E V R P E E P L V V K V E E G D N A V
 L Q C L K G T S D G P T Q Q L T W S R E S P L K P F L K L S L G L P
 G L G I H M R P L A I W L F I F N V S Q Q M G G F Y L C Q P G P P S E
 K A W Q P G W T V N V E G S G E L F R W N V S D L G G L G C G L K
 N R S S E G P S S P S G K L M S P K L Y V W A K D R P E I W E G E P
 P C L P P R D S L N Q S L S Q D L T M A P G S T L W L S C G V P P D
 S V S R G P L S W T H V H P K G P K S L L S L E L K D D R P A R D M
 W V M E T G L L L P R A T A Q D A G K Y Y C H R G N L T M S F H L E
 I T A R P V L W H W L L R T G G W K V S A V T L A Y L I F C L C S L V
 G I L H L Q R A L V L R R K R K R M T D P T R R F

10

20

配列番号 16, 3' LTRヌクレオチド配列

TGAAAGACCCACCTGTAGGTTTGGCAAGCTAGCTTAAGTAACGCCATTTTGCAAGGCATG
 GAAAAATACATAACTGAGAATAGAGAAGTTCAGATCAAGGTCAGGAACAGATGGAACAGCT
 GAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGA
 ACAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCC
 GGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCCCCAGATGCGGTCCAGCCCTCAGCAGTTTCTAGA
 GAACCATCAGATGTTTCCAGGGTGCCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGTGCCTTATTTGAA
 CTAACCAATCAGTTCGCTTCTCGCTTCTGTTTCGCGCGCTTCTGCTCCCCGAGCTCAATAAA
 AGAGCCCACAACCCCTCACTCGGGGCGCCAGTCCTCCGATTGACTGAGTCGCCCCGGGTA
 CCCGTGTATCCAATAAACCCCTCTTGCAAGTTGCATCCGACTTGTGGTCTCGCTGTTCTTGG
 GAGGGTCTCCTCTGAGTGATTGACTACCCGTCAGCGGGGGTCTTTCA

30

配列番号 17, 発現ベクター構築物ヌクレオチド配列ーキメラタンパク質ならびに

5' および3' LTR配列をコードするヌクレオチド配列、ならびにさらなるベクター配列。

TGAAAGACCCACCTGTAGGTTTGGCAAGCTAGCTTAAGTAACGCCATTTTGCAAGGCATG
 GAAAAATACATAACTGAGAATAGAAAAGTTCAGATCAAGGTCAGGAACAGATGGAACAGCT
 GAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGA

40

【化 5】

ACAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCC
GGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCCCCAGATGCGGTCCAGCCCTCAGCAGTTTCTAGA
GAACCATCAGATGTTTCCAGGGTGCCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGTGCCTTATTTGAA
CTAACCAATCAGTTCGCTTCTCGCTTCTGTTCGCGCGCTTATGCTCCCCGAGCTCAATAAA
AGAGCCCACAACCCCTCACTCGGGGCGCCAGTCCTCCGATTGACTGAGTCGCCCCGGTA
CCCGTGTATCCAATAAACCCCTCTTGCAAGTTGCATCCGACTTGTGGTCTCGCTGTTCCCTGG
GAGGGTCTCCTCTGAGTGATTGACTACCCGTCAGCGGGGGTCTTTTCAATTTGGGGGCTCGT
CCGGGATCGGGAGACCCCTGCCAGGGACCACCGACCCACCACCGGGAGGTAAGCTGG
CCAGCAACTTATCTGTGTCTGTCCGATTGTCTAGTGTCTATGACTGATTTTATGCGCCTGC
GTCGGTACTAGTTAGCTAACTAGCTCTGTATCTGGCGGACCCGTGGTGGAAGTACGAGT
TCGGAACACCCGGCCGCAACCCCTGGGAGACGTCCCAGGGACTTCGGGGGGCCGTTTTGT
GGCCCGACCTGAGTCCTAAAATCCCGATCGTTTAGGACTCTTTGGTGCACCCCCCTTAGA
GGAGGGATATGTGGTTCTGGTAGGAGACGAGAACCTAAAACAGTTCCCGCCTCCGTCTGA
ATTTTTGCTTTCGGTTTGGGACCGAAGCCGCGCCGCGCGTCTTGTCTGCTGCAGCATCGT
TCTGTGTTGTCTCTGTCTGACTGTGTTTCTGTATTTGTCTGAAAATATGGGCCCGGGCTAG
CCTGTTACCACTCCCTTAAGTTTGACCTTAGGTCACTGGAAAGATGTCGAGCGGATCGCTC
ACAACAGTCGGTAGATGTCAAGAAGAGACGTTGGGTTACCTTCTGCTCTGCAGAAATGGC
CAACCTTTAACGTCGGATGGCCGCGAGACGGCACCTTTAACCGAGACCTCATCACCCAGG
TTAAGATCAAGGTCTTTTACCTGGCCCGCATGGACACCCAGACCAGGTGGGGTACATCG
TGACCTGGGAAGCCTTGGCTTTTGACCCCCCTCCCTGGGTCAAGCCCTTTGTACACCCTA
AGCCTCCGCCTCCTCTTCCATCCGCCCCGTCTCTCCCCCTTGAACCTCCTCGTTCGA
CCCCGCCTCGATCCTCCCTTATCCAGCCCTCACTCCTTCTCTAGGCGCCCCCATATGGC
CATATGAGATCTTATATGGGGCACCCCCGCCCCCTTGTAAGTTCCTGACCCTGACATGAC
AAGAGTTACTAACAGCCCCTCTCTCCAAGCTCACTTACAGGCTCTCTACTTAGTCCAGCAC
GAAGTCTGGAGACCTCTGGCGGCAGCCTACCAAGAACAAGTGGACCGACCGGTGGTACC
TCACCCTTACCGAGTCGGCGACACAGTGTGGGTCCGCCGACACCAGACTAAGAACCTAGA
ACCTCGCTGGAAAGGACCTTACACAGTCCTGCTGACCACCCCCACCGCCCTCAAAGTAGA
CGGCATCGCAGCTTGGATACACGCCGCCACGTGAAGGCTGCCGACCCCGGGGGTGA
CCATCCTCTAGACTGCCATGCTCGAGGGAGTGCAGGTGGAAACCATCTCCCCAGGAGAC
GGGCGCACCTTCCCCAAGCGCGGCCAGACCTGCGTGGTGCCTACACCGGGATGCTTGA
AGATGGAAAGAAAGTTGATTCTCCCGGGACAGAAACAAGCCCTTTAAGTTTATGCTAGGC
AAGCAGGAGGTGATCCGAGGCTGGGAAGAAGGGGTTGCCAGATGAGTGTGGGTGAGAG
AGCCAACTGACTATATCTCCAGATTATGCCTATGGTGCCACTGGGCACCCAGGCATCATC
CCACCACATGCCACTCTCGTCTTCGATGTGGAGCTTCTAAAAGTGAATCTGGCGGTGGA
TCCGGAGTCGACGGATTTGGTGTGTCGGTGTCTTTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGAT
TTGGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAACT
TCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCAACATCGACTGTGAGAAGTTG

10

20

30

40

【化 6】

CGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTTCATGGTGGAGGTGAAGGGCGACCTGACTGCCAA
GAAAATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCTGGCGCAGCAGGACCACGGTGCTCTGGACTGCT
GCGTGGTGGTCATTCTCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCAGTTCACAGGGGCT
GTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGTGTCGGTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCAATGGG
ACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGG
GGAGCAGAAAGACCATGGGTTTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTG
GCAGTAACCCCGAGCCAGATGCCACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGACCAG
CTGGACGCCATATCTAGTTTGCCACACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTTTCC
CAGGTTTTGTTTTCTGGAGGGACCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGACG
ACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTA
ATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTATATAACAGATGCCTGGTTGCTTTAATTTCTCCGGAA
AAAACTTTTCTTTAAAACATCAGCTAGCAGAGCCGAGGGCAGGGGAAGTCTTCTAACATGC
GGGGACGTGGAGGAAAATCCCGGGCCCATGCCACCTCCTCGCCTCCTCTTCTCCTCCTC
TTCCTCACCCCATGGAAGTCAGGCCCCGAGGAACCTCTAGTGGTGAAGGTGGAAGAGGG
AGATAACGCTGTGCTGCAGTGCCTCAAGGGGACCTCAGATGGCCCCACTCAGCAGCTGA
CCTGGTCTCGGGAGTCCCCGCTTAAACCCTTCTTAAACTCAGCCTGGGGCTGCCAGGCC
TGGGAATCCACATGAGGCCCTGGCCATCTGGCTTTTCATCTTCAACGTCTCTCAACAGAT
GGGGGGCTTCTACCTGTGCCAGCCGGGGCCCCCTCTGAGAAGGCCTGGCAGCCTGGC
TGGACAGTCAATGTGGAGGGCAGCGGGGAGCTGTTCCGGTGGAATGTTTCGGACCTAGG
TGGCCTGGGCTGTGGCCTGAAGAACAGGTCTCAGAGGGCCCCAGCTCCCCTTCCGGGA
AGCTCATGAGCCCCAAGCTGTATGTGTGGGCCAAAGACCGCCCTGAGATCTGGGAGGGA
GAGCCTCCGTGTCTCCACCGAGGGACAGCCTGAACCAGAGCCTCAGCCAGGACCTCAC
CATGGCCCCCTGGCTCCACACTCTGGCTGTCCTGTGGGGTACCCCTGACTCTGTGTCCAG
GGGCCCCCTCTCCTGGACCCATGTGCACCCCAAGGGGCCTAAGTCATTGCTGAGCCTAG
AGCTGAAGGACGATCGCCCGCCAGAGATATGTGGGTAAATGGAGACGGGTCTGTTGTTG
CCCCGGGCCACAGCTCAAGACGCTGGAAAGTATTATTGTCACCGTGGCAACCTGACCATG
TCATTCCACCTGGAGATCACTGCTCGGCCAGTACTATGGCACTGGCTGCTGAGGACTGGT
GGCTGGAAGGTCTCAGCTGTGACTTTGGCTTATCTGATCTTCTGCCTGTGTTCCCTTGTGG
GCATTCTTCATCTTCAAAGAGCCCTGGTCCTGAGGAGGAAAAGAAAGCGAATGACTGACC
CCACCAGGAGATTCTAACGCGTCATCATCGATCCGGATTAGTCCAATTTGTTAAAGACAGG
ATATCAGTGGTCCAGGCTCTAGTTTTGACTCAACAATATCACCAGCTGAAGCCTATAGAGT
ACGAGCCATAGATAAAATAAAAGATTTTATTTAGTCTCCAGAAAAAGGGGGGAATGAAAGA
CCCCACCTGTAGGTTTGCAAGCTAGCTTAAGTAACGCCATTTTGCAAGGCATGAAAAAT
ACATAACTGAGAATAGAGAAGTTCAGATCAAGGTCAGGAACAGATGGAACAGCTGAATATG
GGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATG
GAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCAG
GGCCAAGAACAGATGGTCCCCAGATGCGGTCCAGCCCTCAGCAGTTTCTAGAGAACCATC

10

20

30

40

【化 7】

AGATGTTTCCAGGGTGCCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGTGCCTTATTTGAACTAACC
TCAGTTCGCTTCTCGCTTCTGTTTCGCGCGCTTCTGCTCCCCGAGCTCAATAAAAGAGCCCA
CAACCCCTCACTCGGGGCGCCAGTCCCTCCGATTGACTGAGTCGCCCCGGGTACCCGTGTA
TCCAATAAACCTCTTGCAGTTGCATCCGACTTGTGGTCTCGCTGTTCTTGGGAGGGTCT
CCTCTGAGTGATTGACTACCCGTCAGCGGGGGTCTTTCACACATGCAGCATGTATCAAAAT
TAATTTGGTTTTTTTTCTTAAGTATTTACATTAAATGGCCATAGTACTTAAAGTTACATTGGC
TTCCTTGAAATAACATGGAGTATTCAGAATGTGTCATAAATATTTCTAATTTTAAGATAGTA
TCTCCATTGGCTTTCTACTTTTTCTTTATTTTTTTTTGTCTCTGTCTTCCATTTGTTGTTGT
TGTTGTTTGTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTAATTTTTTTTTAAAGATCCTACACTATA
GTTCAAGCTAGACTATTAGCTACTCTGTAACCCAGGGTGACCTGAAGTCATGGGTAGCCT
GCTGTTTTAGCCTTCCCACATCTAAGATTACAGGTATGAGCTATCATTTTTGGTATATTGAT
TGATTGATTGATTGATGTGTGTGTGTGTGATTGTGTTTGTGTGTGTGACTGTGAAAATGTGT
GTATGGGTGTGTGTGAATGTGTGTATGTATGTGTGTGTGTGAGTGTGTGTGTGTGTGTGTG
CATGTGTGTGTGTGACTGTGTCTATGTGTATGACTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
GTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGAAAAAATATTCTATGGTAGTGAGAGCCAACGCTCC
GGCTCAGGTGTCAGGTTGGTTTTGAGACAGAGTCTTTCAGTTAGCTTGGAATCACTGGC
CGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCA
GCACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTC
CCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCA
TCTGTGCGGTATTTACACCCGCATATGGTGCATCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCA
TAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCT
GCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGA
GGTTTTACCGTCATCACCGAAACGCGCGATGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTT
TTATAGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAA
TGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGA
GACAATAACCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACAT
TTCCGTGTCGCCCTTATCCCTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGTCTACCCAGA
AACGCTGGTGAAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGA
ACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATG
ATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAG
AGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTACCCAGTCAC
AGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATG
AGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACC
GCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTG
AATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACG
TTGCGCAAACTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAAGACT
GGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGG

10

20

30

40

【化 8】

TTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTG
 GGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACT
 ATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAAC
 TGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTTAATTTAAAAG
 GATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCTG
 TCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCT
 GCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGGCC
 GGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACC
 AAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCG
 CCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGT
 GTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGGCTGA
 ACGGGGGGTTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATA
 CCTACAGCGTGAGCATTGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGT
 ATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCAGGGGGGAAA
 CGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTG
 TGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACG
 GTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCTGCGTTATCCCCTGATTCTG
 TGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGAGCCGAACGACCG
 AGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTC
 CCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCG
 GGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTTA
 CACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAG
 GAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTTTGCTCTTAGGAGTTTCCTAATACATCCCA
 AACTCAAATATATAAAGCATTGTGACTTGTTCTATGCCCTAGGGGGCGGGGGGAAGCTAAGC
 CAGCTTTTTTTAACATTTAAATGTTAATTCCATTTTAAATGCACAGATGTTTTATTTTCATAA
 GGGTTTCAATGTGCATGAATGCTGCAATATTCCTGTTACCAAAGCTAGTATAAATAAAAAA
 GATAACGTGGAAATTACTTAGAGTTTCTGTCATTAACGTTTCCTTCCTCAGTTGACAACAT
 AAATGCGCTGCTGAGCAAGCCAGTTTGCATCTGTCAGGATCAATTTCCCATATGCCAGTC
 ATATTAATTACTAGTCAATTAGTTGATTTTTATTTTTGACATATACATGTGAA

10

20

30

配列番号 18, (XhoI/SalIリンカーを有するF_vF_{vis} のヌクレオチド配列 (ゆらぎのあるコドン
 は、F_vにおいて小文字))

ctcgagGGcGTcCAaGTcGAaACcATtagtCCcGGcGAiGGcaGaACaTTiCCtAAaGgGGaCAaACa
 TGtGTcGTcCAiTAiACaGGcATGtTgGAgGAcGGcAAaAAgGTgGAcagtagtaGaGAtcGcAAaAAc
 CtTTcAAaTTcATGtTgGGaAAaCAaGAaGTcATtaGgGGaTGGGAgGAGGGcGTgGcTCaAaATGtc
 cGTcGGcCAacGcGCIaAgCTcACcATcagcCCcGAcTAcGCaTAcGGcGcTACcGGaCAiCCcGGa

40

【化 9】

ATtAtTCCcCCtCAcGcTACcTgGTgTTtGAcGTcGAaCTgtTgAAgCTcGAagtcgagggagtcaggtgga
 aaccatctcccaggagacgggcgccaccttccccaagcgcgccagacctgcgtggtgcactacaccgggatgctgaagatgga
 aagaaagttgattccctccgggacagaaacaagcccttaagtattgctaggcaagcaggaggtgatccgaggctgggaagaag
 gggttgccagatgagtggtggtcagagagccaaactgactatatctcagattatgcctatggtgccactgggcacccaggcatcat
 cccaccacatgccactctcgtcttcgatgtggagcttctaaaactggaatctggcggtggatccggagtcgag

10

配列番号 19, (F_VF_{VLS}アミノ酸配列)

GlyValGlnValGluThrIleSerProGlyAspGlyArgThrPheProLysArgGlyGlnThrCysValValHisTyrThrGly
 yMetLeuGluAspGlyLysLysValAspSerSerArgAspArgAsnLysProPheLysPheMetLeuGlyLysGlnGlu
 VallleArgGlyTrpGluGluGlyValAlaGlnMetSerValGlyGlnArgAlaLysLeuThrIleSerProAspTyrAlaTyr
 GlyAlaThrGlyHisProGlyIlelleProProHisAlaThrLeuValPheAspValGluLeuLeuLysLeuGlu (ValGlu)

GlyValGlnValGluThrIleSerProGlyAspGlyArgThrPheProLysArgGlyGlnThrCysValValHisTyrThrGly
 yMetLeuGluAspGlyLysLysValAspSerSerArgAspArgAsnLysProPheLysPheMetLeuGlyLysGlnGlu
 VallleArgGlyTrpGluGluGlyValAlaGlnMetSerValGlyGlnArgAlaLysLeuThrIleSerProAspTyrAlaTyr
 GlyAlaThrGlyHisProGlyIlelleProProHisAlaThrLeuValPheAspValGluLeuLeuLysLeuGlu-
 SerGlyGlyGlySerGly

20

配列番号 20, FKBP12v36 (res. 2—108)

SGGSG リンカー (6 aa)

ΔCasp9 (res. 135—416)

ATGCTCGAGGGAGTGCAGGTGGAgACTATCTCCCCAGGAGACGGGCGCACCTTCCCCAAG
 CGCGGCCAGACCTGCGTGGTGCCTACACCGGGATGCTTGAAGATGGAAAGAAAGTTGAT
 TCCTCCCGGGACAGAAACAAGCCCTTTAAGTTTATGCTAGGCAAGCAGGAGGTGATCCGA
 GGCTGGGAAGAAGGGGTTGCCAGATGAGTGTGGGTCAGAGAGCCAAACTGACTATATCT
 CCAGATTATGCCTATGGTGCCACTGGGCACCCAGGCATCATCCCACCACATGCCACTCTC
 GTCTTCGATGTGGAGCTTCTAAAACTGGAATCTGGCGGTGGATCCGGAGTCGACGGATTT
 GGTGATGTCGGTGTCTTTGAGAGTTTGGGGGAAATGCAGATTGGCTTACATCCTGAGC
 ATGGAGCCCTGTGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAACCTTCTGCCGTGAGTCCGGG
 CTCCGCACCCGCACTGGCTCCAACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTTCTCCTCG
 CTGCATTTTCATGGTGGAGGTGAAGGGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTGGCTTTG
 CTGGAGCTGGCGCGcGCAGGACCACGGTGTCTGACTGCTGCGTGGTGGTCATTCTCTCT
 CACGGCTGTGAGGCCAGCCACCTGCAGTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGGATG
 CCCTGTGTGCGTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGG
 AGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGTT
 TGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATG
 CCACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGGAGACCTTCGACCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGC
 CCACACCCAGTGACATCTTTGTCTCTACTCTACTTTCCCAGGTTTGTTCCTGGAGGGA
 CCCCAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCA

30

40

【化 10】

CTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAAAGGGAT
TTATAACAGATGCCTGGTTGCTTTAATTCCTCCGGAACCTTTCTTTAAACATCA

配列番号 21, FKBP12v36 (res. 2—108)

G V Q V E T I S P G D G R T F P K R G Q T C V V H Y T G M L E D G K
K V D S S R D R N K P F K F M L G K Q E V I R G W E E G V A Q M S V
G Q R A K L T I S P D Y A Y G A T G H P G I I P P H A T L V F D V E L
L K L E

10

配列番号 22, ΔCasp9 (res. 135—416)

G F G D V G A L E S L R G N A D L A Y I L S M E P C G H C L I I N N V
N F C R E S G L R T R T G S N I D C E K L R R R F S S L H F M V E V K
G D L T A K K M V L A L L E L A R Q D H G A L D C C V V V I L S H G C
Q A S H L Q F P G A V Y G T D G C P V S V E K I V N I F N G T S C P S
L G G K P K L F F I Q A C G G E Q K D H G F E V A S T S P E D E S P
G S N P E P D A T P F Q E G L R T F D Q L D A I S S L P T P S D I F V
S Y S T F P G F V S W R D P K S G S W Y V E T L D D I F E Q W A H S
E D L Q S L L L R V A N A V S V K G I Y K Q M P G C F N F L R K K L F
F K T S

配列番号 23, ΔCasp9 (res. 135—416) D330A, ヌクレオチド配列

20

GGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTTACATCC
TGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAACCTCTGCCGTGAGT
CCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCAACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTTC
TCCTCGCTGCATTTTCATGGTGGAGGTGAAGGGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTG
GCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCACGGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCAT
TCTCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCAGTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGA
TGGATGCCCTGTGTGCGGTGCGAGAAGATTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAG
CCTGGGAGGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACC
ATGGGTTTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGC
CAGATGCCACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGACCAGCTGGCCGCCATATCTA
GTTTGCCACACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTTTCCCAGGTTTGTTCCTG
AGGGACCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTG
GGCTCACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAA
AGGGATTTATAACAGATGCCTGGTTGCTTTAATTCCTCCGGAACCTTTCTTTAAAA
CATCA

30

配列番号 24, ΔCasp9 (res. 135—416) D330A, アミノ酸配列

G F G D V G A L E S L R G N A D L A Y I L S M E P C G H C L I I N N V
N F C R E S G L R T R T G S N I D C E K L R R R F S S L H F M V E V K
G D L T A K K M V L A L L E L A R Q D H G A L D C C V V V I L S H G C
Q A S H L Q F P G A V Y G T D G C P V S V E K I V N I F N G T S C P S
L G G K P K L F F I Q A C G G E Q K D H G F E V A S T S P E D E S P
G S N P E P D A T P F Q E G L R T F D Q L A A I S S L P T P S D I F V
S Y S T F P G F V S W R D P K S G S W Y V E T L D D I F E Q W A H S
E D L Q S L L L R V A N A V S V K G I Y K Q M P G C F N F L R K K L F
F K T S

40

配列番号 25, ΔCasp9 (res. 135—416) N405Q ヌクレオチド配列

【化 1 1】

GGATTGGTGATGTCGGTGCTCTTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTGGCTTACATCC
 TGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAACCTCTGCCGTGAGT
 CCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCAACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTTC
 TCCTCGCTGCATTTTCATGGTGGAGGTGAAGGGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTG
 GCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCACGGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCAT
 TCTCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCAGTTCCCAGGGGGCTGTCTACGGCACAGA
 TGGATGCCCTGTGTGGTTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAG
 CCTGGGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACC
 ATGGGTTTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGC
 CAGATGCCACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGACCAGCTGGAGGCCATATCTA
 GTTTGCCACACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTTTCCCAGGTTTTGTTTCCTGG
 AGGGACCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTG
 GGCTCACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAA
 AGGGATTATAAACAGATGCCTGGTTGCTTTCAGTTCCTCCGGAAAAAACTTTTCTTTAAAA
 CATCA

10

配列番号 26, ΔCasp9 (res. 135—416) N405Q アミノ酸配列

G F G D V G A L E S L R G N A D L A Y I L S M E P C G H C L I N N V
 N F C R E S G L R T R T G S N I D C E K L R R R F S S L H F M V E V K
 G D L T A K K M V L A L L E L A R Q D H G A L D C C V V V I L S H G C
 Q A S H L Q F P G A V Y G T D G C P V S V E K I V N I F N G T S C P S
 L G G K P K L F F I Q A C G G E Q K D H G F E V A S T S P E D E S P
 G S N P E P D A T P F Q E G L R T F D Q L D A I S S L P T P S D I F V
 S Y S T F P G F V S W R D P K S G S W Y V E T L D D I F E Q W A H S
 E D L Q S L L L R V A N A V S V K G I Y K Q M P G C F Q F L R K K L F
 F K T S

20

配列番号 27, ΔCasp9 (res. 135—416) D330A N405Q ヌクレオチド配列

GGATTGGTGATGTCGGTGCTCTTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTGGCTTACATCC
 TGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAACCTCTGCCGTGAGT
 CCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCAACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTTC
 TCCTCGCTGCATTTTCATGGTGGAGGTGAAGGGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTG
 GCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCACGGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCAT
 TCTCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCAGTTCCCAGGGGGCTGTCTACGGCACAGA
 TGGATGCCCTGTGTGGTTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAG
 CCTGGGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACC
 ATGGGTTTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGC
 CAGATGCCACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGACCAGCTGGCCGCCATATCTA
 GTTTGCCACACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTTTCCCAGGTTTTGTTTCCTGG
 AGGGACCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTG
 GGCTCACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAA
 AGGGATTATAAACAGATGCCTGGTTGCTTTCAGTTCCTCCGGAAAAAACTTTTCTTTAAAA
 CATCA

30

配列番号 28, ΔCasp9 (res. 135—416) D330A N405Q アミノ酸配列

G F G D V G A L E S L R G N A D L A Y I L S M E P C G H C L I N N V
 N F C R E S G L R T R T G S N I D C E K L R R R F S S L H F M V E V K
 G D L T A K K M V L A L L E L A R Q D H G A L D C C V V V I L S H G C
 Q A S H L Q F P G A V Y G T D G C P V S V E K I V N I F N G T S C P S
 L G G K P K L F F I Q A C G G E Q K D H G F E V A S T S P E D E S P
 G S N P E P D A T P F Q E G L R T F D Q L A A I S S L P T P S D I F V
 S Y S T F P G F V S W R D P K S G S W Y V E T L D D I F E Q W A H S

40

【化 1 2】

E D L Q S L L L R V A N A V S V K G I Y K Q M P G C F Q F L R K K L F
F K T S

配列番号 29, FKBPv36 (Fv1) ヌクレオチド配列

GGCGTTCAAGTAGAAACAATCAGCCCAGGAGACGGAAGGACTTTCCCCAAACGAGGCCAA
ACATGCGTAGTTCAATTATACTGGGATGCTCGAAGATGGAAAAAAGTAGATAGTAGAG
ACCGAAACAAACCATTATAATTTATGTTGGGAAAAACAAGAAGTAATAAGGGGCTGGGAAGA
AGGTGTAGCACAAATGTCTGTTGGCCAGCGCGCAAACTCACAATTTCTCCTGATTATGCT
TACGGAGCTACCGGCCACCCCGGCATCATACCCCTCATGCCACACTGGTGTGTTGACGTC
GAATTGCTCAAACCTGGAA

10

配列番号 30, FKBPv36 (Fv1) アミノ酸配列

GVQVETISPGDGRFTPKRGQTCVVHYTGMLDGGKVDSSRDRNKPFFKMLGKQEVIRGWEE
GVAQMSVGGRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLE

配列番号 31, FKBPv36 (Fv2) ヌクレオチド配列

GGaGTgCAgGTgGAGACgATtAGtCCtGGgGAtGGgAGaACcTTtCCaAAGCGcGGtCAgACcTgTg
TtGTcCAcTAcAcCGtATGCTgGAgGAcGGgAAGAGTgGActTtcacGcGAtCGcAAtAAGCCT
TcAAGTTcATGcTcGGcAAGcAGgAGGTgATccGGGGgTGGGAgGAgGGcGTgGCTcAGATGTCg
GTcGGgCAaCGaGCgAAGCTtACcATcTcACcCGAcTAcGCgTAtGGgGCaACgGGgCAIcCGGG
aATtATcCCtCCcCAcGCTcACgCTcGTaTTcGAtGtGAGcTctgAAGcTtGag

20

配列番号 32, FKBPv36 (Fv2) アミノ酸配列

GVQVETISPGDGRFTPKRGQTCVVHYTGMLDGGKVDSSRDRNKPFFKMLGKQEVIRGWEE
GVAQMSVGGRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLE

配列番号 33, ΔCD19 ヌクレオチド配列

ATGCCCCCTCCTAGACTGCTGTTTTCTGCTCTTTCTCACCCCAATGGAAGTTAGACCTG
AGGAACCACTGGTCGTTAAAGTGGAAGAAGGTGATAATGCTGTCTCCAATGCCTTAAAG
GGACCAGCGACGGACCAACGCAGCAACTGACTTGGAGCCGGGAGTCCCCCTCTCAAGCCG
TTTCTCAAGCTGTCACTTGGCCTGCCAGGTCTTGGTATTACATGCGCCCCCTTGCCATTT
GGCTCTTCATATTCAATGTGTCTCAACAAATGGGTGGATTCTACCTTTGCCAGCCCGGCC
CCCTTCTGAGAAAGCTTGGCAGCCTGGATGGACCGTCAATGTTGAAGGCTCCGGTGAGCT
GTTTAGATGGAATGTGAGCGACCTTGGCGGACTCGGTTGCGGACTGAAAAATAGGAGCTC
TGAAGGACCCTCTTCTCCCTCCGTAAGTTGATGTCACCTAAGCTGTACGTGTGGGCCAA
GGACCGCCCCGAAATCTGGGAGGGCGAGCCTCCATGCCTGCCGCCTCGCGATTCACTGA
ACCACTCTCTGTCCAGGATCTCACTATGGCGCCCGGATCTACTCTTTGGCTGTCTTGCG
GCGTTCCCCCAGATAGCGTGTCAAGAGGACCTCTGAGCTGGACCCACGTACACCCTAAGG
GCCCTAAGAGCTTGTGAGCCTGGAAGTGAAGGACGACAGACCCGACGCGATATGTGG
GTAATGGAGACCGGCCTTCTGCTCCCTCGCGCTACCGCACAGGATGCAGGGAAATACTAC
TGTCATAGAGGGAATCTGACTATGAGCTTTCTCATCTCGAAATTACAGCACGGCCCGTTCTTT
GGCATTGGCTCCTCCGACTGGAGGCTGGAAGGTGTCTGCCGTAACACTCGCTTACTTGA
TTTTTTGCCTGTGTAGCCTGTTGGGATCCTGCATCTTCAGCGAGCCCTTGATTGCGCCG
AAAAAGAAAACGAATGACTGACCCTACACGACGATTCTGA

30

配列番号 34, ΔCD19 アミノ酸配列

MPPPRLLFFLLFLTPMEVRPEEPLVVKVEEGDNAVLQCLKGTSDGPTQQLTWSRESPLKPFLK
LSLGLPLGLIHMRPLAIWLFIFNVSQMGGFYLCQPGPPSEKAWQPWTVNVEGSGELFRWN

40

【化 1 3】

VSDLGGLGCGLNRSSEGPSSPSGKLMSPKLYVWAKDRPEIWEGEPCLPPRDSLNLQSLSQ
DLTMAPGSTLWLSGCVPPDSVSRGPLSWTHVHPKGPKSLLSLELKDDRPARDMWMETGLL
LPRATAQDAGKYCHRGNTMSFHLEITARPVLWHWLLRTGGWKVSAVTLAYLIFCLCSLVGIL
HLQRALVLRKRKRMTDPTRRF*

コドン最適化iCasp9-N405Q-2A-ΔCD19配列: (ヌクレオチド配列名称に続く. coは、
それがコドン最適化されていること(またはコドン最適化されたヌクレオチド配列によって
コードされるアミノ酸)を示す。

配列番号 35, FKBPv36.co (Fv3) ヌクレオチド配列

10

ATGCTGGAGGGAGTGCAGGTGGAGACTATTAGCCCCGGAGATGGCAGAACATTCCCCAA
AAGAGGACAGACTTGCGTCGTGCATTATACTGGAATGCTGGAAGACGGCAAGAAGGTGGA
CAGCAGCCGGGACCGAAACAAGCCCTTCAAGTTTCATGCTGGGGAAGCAGGAAGTGATCC
GGGGCTGGGAGGAAGGAGTGCACAGATGTCAGTGGGACAGAGGGCCAACTGACTATT
AGCCCAGACTACGCTTATGGAGCAACCGGCCACCCCGGGATCATTCCCCCTCATGCTACA
CTGGTCTTCGATGTGGAGCTGCTGAAGCTGGAA

配列番号 36, FKBPv36.co (Fv3) アミノ酸配列

MLEGVQVETISPGDGRTPKRGQTCVWHYTGMLDGGKVDSSRDRNKPFFKMLGKQEVIRG
WEEGVAQMSVGQRAKLITSPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLE

配列番号 37, リンカー.co ヌクレオチド配列

AGCGGAGGAGGATCCGGA

20

配列番号 38, リンカー.co アミノ酸配列

SGGGSG

配列番号 39, カスパーゼ-9.co ヌクレオチド配列

GTGGACGGGTTTGGAGATGTGGGAGCCCTGGAATCCCTGCGGGGCAATGCCGATCTGGC
TTACATCCTGTCTATGGAGCCTTGCGGCCACTGTCTGATCATTAAACAATGTGAACCTTCTGC
AGAGAGAGCGGGCTGCGGACCAGAACAGGATCCAATATTGACTGTGAAAAGCTGCGGAG
AAGGTTCTCTAGTCTGCACTTTATGTCGAGGTGAAAGGCGATCTGACCGCTAAGAAAATG
GTGCTGGCCCTGCTGGAAGTGGCTCGGCAGGACCATGGGGCACTGGATTGCTGCGTGGT
CGTGATCCTGAGTCACGGCTGCCAGGCTTCACATCTGCAGTTCCCTGGGGCAGTCTATGG
AACTGACGGCTGTCCAGTCAGCGTGGAGAAGATCGTGAACATCTTCAACGGCACCTCTTG
CCCAAGTCTGGGCGGGAAGCCCAAAGTGTCTTTATTTCAGGCCTGTGGAGGCGAGCAGAA
AGATCACGGCTTCGAAGTGGCTAGCACCTCCCCCGAGGACGAATCACCTGGAAGCAACC
CTGAGCCAGATGCAACCCCTTCCAGGAAGGCCTGAGGACATTTGACCAGCTGGATGCCA
TCTCAAGCCTGCCCACACCTTCTGACATTTTCGTCTCTTACAGTACTTTCCCTGGATTTGTG
AGCTGGCGCGATCCAAAGTCAGGCAGCTGGTACGTGGAGACACTGGACGATATCTTTGAG
CAGTGGGCCCATCTGAAAGACCTGCAGAGTCTGCTGCTGCGAGTGGCCAATGCTGTCTCT
GTGAAGGGGATCTACAAACAGATGCCAGGATGCTTCCAGTTTCTGAGAAAGAACTGTTCT
TTAAGACCTCCGCATCTAGGGCC

30

配列番号 40, カスパーゼ-9.co アミノ酸配列

VDGFGDVGALES LRGNADLAYILSMEPCGHCLINNVNFCRESGLRTRTGSNIDCEKLRRRFSS
LHFMVEVKGDLTAKKMLLALLELARQDHGALDCCVVILSHGCGASHLQFPGAVYGTGCPV
SVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGEQKDHGFVASTSPEDESPGSNPEPDATPFQE
GLRTFDQLDAISSLPSPDIFVSYSTFGFVSWRDPKSGSWYVETLDDIFEQWAHSEDLQSLLL
RVANAVSVKGIYKQMPGCFQFLRKKLFFKTSASRA

40

【化 1 4】

配列番号 41, リンカー .co スクレオチド配列

CCGCGG

配列番号 42, リンカー .co アミノ酸配列

PR

配列番号 42: T2A.co スクレオチド配列

GAAGGCCGAGGGAGCCTGCTGACATGTGGCGATGTGGAGGAAAACCCAGGACCA

10

配列番号 43: T2A.co アミノ酸配列

EGRGSLLTCGDVEENPGP

配列番号 43: Δ CD19.co スクレオチド配列

ATGCCACCACCTCGCCTGCTGTTCTTTCTGCTGTTCTGACACCTATGGAGGTGCGACCT
GAGGAACCACTGGTCGTGAAGGTGAGGAAGGCGACAATGCCGTGCTGCAGTGCCTGAA
AGGCACTTCTGATGGGCCAACTCAGCAGCTGACCTGGTCCAGGGAGTCTCCCCTGAAGC
CTTTTCTGAACTGAGCCTGGGACTGCCAGGACTGGGAATCCACATGCGCCCTCTGGCTA
TCTGGCTGTTTCATCTTCAACGTGAGCCAGCAGATGGGAGGATTCTACCTGTGCCAGCCAG
GACCACCATCCGAGAAGGCCTGGCAGCCTGGATGGACCGTCAACGTGGAGGGGTCTGGA
GAACTGTTTAGGTGGAATGTGAGTGACCTGGGAGGACTGGGATGTGGGCTGAAGAACCG
CTCCTCTGAAGGCCCAAGTTCACCCTCAGGGAAGCTGATGAGCCCAAACTGTACGTGTG
GGCCAAAGATCGGCCCGAGATCTGGGAGGGAGAACCTCCATGCCTGCCACCTAGAGACA
GCCTGAATCAGAGTCTGTACAGGATCTGACAATGGCCCCCGGGTCCACTCTGTGGCTGT
CTTGTTGGAGTCCCACCCGACAGCGTGTCCAGAGGCCCTCTGTCCTGGACCCACGTGCAT
CCTAAGGGGCCAAAAAGTCTGCTGTCACTGGAAGTGAAGGACGATCGGCCTGCCAGAGA
CATGTGGGTGATGGAGACTGGACTGCTGCTGCCACGAGCAACCGCACAGGATGCTGGAA
AATACTATTGCCACCGGGGCAATCTGACAATGTCCTTCCATCTGGAGATCACTGCAAGGCC
CGTGCTGTGGCACTGGCTGCTGCGAACCAGGAGGATGGAAGGTCAGTGCTGTGACACTGG
CATATCTGATCTTTTGCCTGTGCTCCCTGGTGGGCATTCTGCATCTGCAGAGAGCCCTGGT
GCTGCGGAGAAAGAGAAAGAGAATGACTGACCCAACAAGAAGGTTTTGA

20

30

配列番号 43: Δ CD19.co アミノ酸配列

MPPPRLLFFLLFLTPMEVRPEEPLVVKVEEGDNAVLQCLKGTSDGPTQQLTWSRESPLKPFLK
LSLGLPGLGIHMRPLAIWLFIFNVSQQMGGFYLCQPGPPSEKAWQPGWTVNVEGSGELFRWN
VSDLGGLGCGLKNRSSEGPSSPSGKLMSPKLYVWAKDRPEIWEGEPPCLPPRDSLNLQSLSQ
DLTMAPGSTLWLSGCVPPDSVSRGPLSWTHVHPKGPKSLLSLELKDDRPARDMWVWVETGLL
LPRATAQDAGKYYCHRGNTMSFHLEITARPVLWHWLLRTGGWKVSAVTLAYLIFCLCSLVGIL
HLQRALVLRKRKRMTDPTRRF*

【 0 4 9 5 】

【表 6 - 1】

表6:カスパーゼ-9バリエーションのさらなる例

iCasp9 バリエーション	DNA 配列	アミノ酸配列
Fv-L-カスパーゼ 9 WT-2A	配列番号 44 (Fv)ATGCTCGAGGGAGTGCAGGTGGA _g A CtATCTCCCCAGGAGACGGGCGCACCTT CCCCAGCGCGGCCAGACCTGCGTGCT GCACTACACCGGGATGCTTGAAGATGGA AAGAAAGTTGATTCTCCCGGGACAGAA ACAAGCCCTTTAAGTTTATGCTAGGCAA GCAGGAGGTGATCCGAGGCTGGGAAGA AGGGGTTGCCAGATGAGTGTGGGTCAG AGAGCCAACTGACTATATCTCCAGATT ATGCCTATGGTGCCACTGGGCACCCAGG CATCATCCCACCATGCCACTCTCGTC TTCGATGTGGAGCTTCTAAACTGGA-(リ ンカー)TCTGGCGGTGGATCCGGA- (iCasp9)GTCGACGGATTTGGTGATGTCCG TGCTCTTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCA GATTTGGCTTACATCCTGAGCATGGAGC CCTGTGGCCACTGCCTCATTATCAACAA TGTGAACTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTC CGCACCCGCACTGGCTCCAACATCGACT GTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTTCTCCTC GCTGCATTTTCATGGTGGAGGTGAAGGGC GACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTGG CTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACC	配列番号 45 (Fv)MLEGVQVETISPGDGRTFPKR GQTCVVHYTGMLDGGKKVDSSRD RNKPFKFMGLGKQEVIR GWEEGVAQMSVGRRAKLTISPDIYA YGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKL E-(リンカー)SGGGSG- (iCasp9)VDGF GDVGALESRLGNADLAYILSMEPC GHCLIIINNVNFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRRRFSS LHFMEVKGDLTAKKMLALLELA RQDHGALDCCVVVILSHGCQASHL QFPGAVYGTGDC PVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKL FFIQACGGEQKDHGFVASTSPED ESPGSNPEPDA TPFQEGLRTFDQLDAISSLPTPSDI FVSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVE TLDDIFEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQM PGCFNFLRKKLFFKTSASRA- EGRGSLLTGCDVEENP GP-

10

20

30

【表 6-2】

ACGGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGT	
CATTCTCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGC	
CACCTGCAGTTCACAGGGGCTGTCTACG	
GCACAGATGGATGCCCTGTGTGGTCTGA	
GAAGATTGTGAACATCTTCAATGGGACC	
AGCTGCCCCAGCCTGGGAGGGAAGCCC	
AAGCTCTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTG	10
GGGAGCAGAAAGACCATGGGTTTGAGGT	
GGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAGTCC	
CCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCC	
ACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCT	
TCGACCAGCTGGACGCCATATCTAGTTT	
GCCCACACCCAGTGACATCTTTGTGTCC	
TACTCTACTTTCCAGGTTTTGTTTCCTG	20
GAGGGACCCCAAGAGTGGCTCCTGGTA	
CGTTGAGACCCTGGACGACATCTTTGAG	
CAGTGGGCTCACTCTGAAGACCTGCAGT	
CCCTCCTGCTTAGGGTCGCTAATGCTGT	
TTCGGTGAAAGGGATTTATAAACAGATG	
CCTGGTTGCTTTAATTTCTCCGAAAA	
AACTTTTCTTTAAACATCAGCTAGCAG	
AGCC-	
(T2A)GAGGGCAGGGGAAGTCTTCTAACA	30
TGCGGGGACGTGGAGGAAAATCCCGGG	
CCC	

【表 6 - 3】

Fv-L-i カスパーゼ 9 WT コドン最適化-T2A コドン最適化	配列番号 46	配列番号 47
	(Fv)- GGAGTGCAGGTGGAGACTATTAGCCCCG GAGATGGCAGAACATTCCCCAAAAGAGG ACAGACTTGCCTCGTGCATTATACTGGA ATGCTGGAAGACGGCAAGAAGGTGGACA GCAGCCGGGACCGAAACAAGCCCTTCA AGTTCATGCTGGGGAAGCAGGAAGTGAT CCGGGGCTGGGAGGAAGGAGTCGCACA GATGTCAGTGGGACAGAGGGCCAACTG ACTATTAGCCCAGACTACGCTTATGGAG CAACCGGCCACCCCGGATCATTCCCC CTCATGCTACACTGGTCTTCGATGTGGA GCTGCTGAAGCTGGAA-(L)- AGCGGAGGAGGATCCGGA-(iCasp9)- GTGGACGGGTTTGGAGATGTGGGAGCCC TGGAATCCCTGCGGGGCAATGCCGATCT GGCTTACATCCTGTCTATGGAGCCTTGC GGCCACTGTCTGATCATTAAACAATGTGA ACTTCTGCAGAGAGAGCGGGCTGCGGA CCAGAACAGGATCCAATATTGACTGTGA AAAGCTGCGGAGAAGGTTCTCTAGTCTG CACTTTATGGTCGAGGTGAAAGGCGATC TGACCGCTAAGAAAATGGTGCTGGCCCT GCTGGAAGTGGCTCGGCAGGACCATGG GGCACTGGATTGCTGCGTGGTCGTGATC CTGAGTCACGGCTGCCAGGCTTCACATC TGCAGTTCCTGGGGCAGTCTATGGAAC TGACGGCTGTCCAGTCAGCGTGGAGAAG ATCGTGAACATCTTCAACGGCACCTCTT GCCCAAGTCTGGGCGGGAAGCCCAAAC TGTCTTTATTACAGCCTGTGGAGGCGA GCAGAAAGATCACGGCTTCGAAGTGGCT	(Fv-L)- VDGFGDVGALES LRGNADLAYILS MEPCGHCLII NNVNFCRESGLRTRT GSNIDCEKLRRRFSS LHFMEVVKGDLTAKKMLALLELA RQDHGALDCCVVVILSHGCQASHL QFPGAVYGTGGC PVSVEKIVNIFNGTSCPSLGKPKL FFIQACGGEQKDHGFEVASTSPED ESPGSNPEPDA TPFQEGRLRTFDQLDAISSLPTPSDI FVSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVE TLDDIFEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQM PGCNFRKRLFFKTSASRA- EGRGSLTTCGDVEENP GP-(T2A)

10

20

30

40

	AGCACCTCCCCGAGGACGAATCACCTG GAAGCAACCCTGAGCCAGATGCAACCC CCTTCCAGGAAGGCCTGAGGACATTGTA CCAGCTGGATGCCATCTCAAGCCTGCCC ACACCTTCTGACATTTTCGTCTCTTACA GTACTTTCCCTGGATTTGTGAGCTGGCG CGATCCAAAGTCAGGCAGCTGGTACGTG GAGACACTGGACGATATCTTTGAGCAGT GGGCCCCATTCTGAAGACCTGCAGAGTCT GCTGCTGCGAGTGGCCAATGCTGTCTCT GTGAAGGGGATCTACAAACAGATGCCAG GATGCTTCAACTTTCTGAGAAAGAACT GTTCTTTAAGACCTCCGCATCTAGGGCC -(T2A)- CCGCGGGAAGGCCGAGGGAGCCTGCTG ACATGTGGCGATGTGGAGGAAAACCCAG GACCA	
Fv-iCASP9 S144A-T2A	配列番号 48 (Fv-L)- GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTC TTGAGgcTTTGAGGGGAAATGCAGATTG GCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTG GCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAA CTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACC CGCACTGGCTCCAACATCGACTGTGAGA AGTTGCGGCGTGCTTCTCCTCGCTGCA TTTCATGGTGAGGTGAAGGGCGACCTG ACTGCCAAGAAAATGGTGCTGGCTTTGC TGGAGCTGGCGCGGCAGGACCACGGTG CTCTGGA CTGCTGCGTGGTGGTCATTCT CTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTG CAGTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAG ATGGATGCCCTGTGTGGTTCGAGAAGAT	配列番号 49 (Fv-L)- VDGFGDVGALe _a LRGNADLAYILS MEPCGHCLINNVNFCRESGLRTRT GSNIDCEKLRRRFSSLHFMVEVKG DLTAKKMVLALLELARQDHGALDC CVVVILSHGCQASHLQFP GAVYGT DGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGK PKLFFIQACGGEQKD HGFVASTS PEDESPGSNPEPDATPFQEGLRTF DQLDAISSLPTPSDIFVSYSTFPGF VSWRDPKSGSWYVETLDDIFEQWA HSEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQ MPGCFNFLRKKLFFKTSASRA

20

30

40

【表 6 - 5】

	TGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTGC CCCAGCCTGGGAGGGAAGCCCAAGCTC TTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAGC AGAAAGACCATGGGTTTGAGGTGGCCTC CACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGGC AGTAACCCCGAGCCAGATGCCACCCCGT TCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGACCA GCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCACA CCCAGTGACATCTTTGTGTCTACTCTA CTTTCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGA CCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAG ACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGG CTCACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCT GCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTG AAAGGGATTTATAAACAGATGCCTGGTT GCTTTAATTCCTCCGAAAAAACTTTTC TTTAAACATCAGCTAGCAGAGCC-(T2A)	
Fv-iCASP9 S144D-T2A	配列番号 50 (Fv-L)- GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTC TTGAG gac TTGAGGGGAAATGCAGATTTG GCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTG GCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAA CTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACC CGCACTGGCTCCAACATCGACTGTGAGA AGTTGCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGCA TTTCATGGTGGAGGTGAAGGGCGACCTG ACTGCCAAGAAAATGGTGCTGGCTTTGC TGGAGCTGGCGCGGCAGGACCACGGTG CTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTCT CTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTG CAGTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAG ATGGATGCCCTGTGTCGGTCGAGAAGAT	配列番号 51 (Fv-L)- VDGFGDVGALEdLRGNADLAYILS MEPCGHCLIIINNVNFCRESGLRTRT GSNIDCEKLRRRFSSLHFMVEVKG DLTAKKMVLALLELARQDHGALDC CVVVILSHGCQASHLQFPGAVYGT DGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGK PKLFFIQACGGEQKDHGFEVASTS PEDESPGSNPEPDATPFQEGLRTF DQLDAISSLPTPSDIFVSYSTFPGF VSWRDPKSGSWYVETLDDIFEQWA HSEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQ MPGCFNFLRKKLFFKTSASRA

【表 6 - 6】

	TGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTGC CCCAGCCTGGGAGGGAAGCCCAAGCTC TTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAGC AGAAAGACCATGGGTTTGAGGTGGCCTC CACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGGC AGTAACCCCGAGCCAGATGCCACCCCGT TCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGACCA GCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCACACA CCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTA CTTTCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGA CCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAG ACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGG CTCACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCT GCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTG AAAGGGATTTATAAACAGATGCCTGGTT GCTTTAATTTCTCCGAAAAAACTTTTC TTTAAAACATCAGCTAGCAGAGCC-(T2A)		10
Fv-iCASP9 S183A-T2A	配列番号 52 (Fv-L)- GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTC TTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTT GGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTGT GGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGA ACTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCAC CCGCACTGGC g CCAACATCGACTGTGAG AAGTTGCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGC ATTTTCATGGTGGAGGTGAAGGGCGACCT GACTGCCAAGAAAATGGTGCTGGCTTTG CTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCACGGT GCTCTGGAAGTGTGCGTGGTGGTCATTC TCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCT GCAGTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACA GATGGATGCCCTGTGTCGGTCGAGAAGA	配列番号 53 (Fv-L)- VDGFGDVGALES LRGNADLAYILS MEPCGHCLIIINN VFCRESGLRTRT Ga NIDCEKLRRRFSSLHFMVEVKG DLTAKKMVLALLELARQDHGALDC CVVVILSHGCQASHLQFPGAVYGT DGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGK PKLFFIQACGGEQKDHGFEVASTS PEDESPGSNPEPDATPFQEGLRTF DQLDAISSLPTPSDIFVSYSTFPGF VSWRDPKSGSWYVETLDDIFEQWA HSEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQ MPGCFNFLRKKLFFKTSASRA- (T2A)	30 40

【表 6 - 7】

	TTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTG CCCCAGCCTGGGAGGGAAGCCCAAGCT CTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAG CAGAAAGACCATGGGTTTGAGGTGGCCT CCACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGG CAGTAACCCCGAGCCAGATGCCACCCC GTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGAC CAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCCA CACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTC TACTTTCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGG GACCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTG AGACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTG GGCTCACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTC CTGCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGG TGAAAGGGATTTATAAACAGATGCCTGG TTGCTTTAATTTCTCCGAAAAAACTTT TCTTTAAAACATCAGCTAGCAGAGCC- (T2A)		10 <
--	---	--	---

【表 6 - 8】

	GATGGATGCCCTGTGTCTGGTCGAGAAGA TTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTG CCCCAGCCTGGGAGGGAAGCCCAAGCT CTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAG CAGAAAGACCATGGGTTTGAGGTGGCCT CCACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGG CAGTAACCCCGAGCCAGATGCCACCCC GTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGAC CAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCCA CACCCAGTGACATCTTTGTGTCTACTC TACTTTCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGG GACCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTG AGACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTG GGCTCACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTC CTGCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGG TGAAAGGGATTTATAAACAGATGCCTGG TTGCTTTAATTTCTCCGAAAAAACTTT TCTTTAAACATCAGCTAGCAGAGCC- (T2A)		10
Fv-iCASP9 S196D-T2A	配列番号 56 (Fv-L)- GTCGACGGATTTGGTGATGTCTGGTGCTC TTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTT GGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTGT GGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGA ACTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCAC CCGCACTGGCTCCAACATCGACTGTGAG AAGTTGCGGCGTCGCTTCTCCgacCTGCA TTTCATGGTGAGGTGAAGGGCGACCTG ACTGCCAAGAAAATGGTGCTGGCTTTGC TGGAGCTGGCGCGGCAGGACCACGGTG CTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTCT CTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTG	配列番号 57 (Fv-L)- VDGFGDVGALESLRGNADLAYILS MEPCGHCLIIINNVNFCRESGLRTRT GSNIDCEKLRRRFSdLHFMVEVKG DLTAKKMLLALLELARQDHGALDC CVVVILSHGCQASHLQFPGAVYGT DGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGK PKLFFIQACGGEQKDHGFEVASTS PEDESPGSNPEPDATPFQEGLRTF DQLDAISSLPTPSDIFVSYSTFPGF VSWRDPKSGSWYVETLDDIFEQWA HSEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQ MPGCFNFLRKKLFFKTSASRA-	30

【表 6 - 9】

	CAGTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAG ATGGATGCCCTGTGTCGGTCGAGAAGAT TGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTGC CCCAGCCTGGGAGGGAAGCCCAAGCTC TTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAGC AGAAAGACCATGGGTTTGAGGTGGCCTC CACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGGC AGTAACCCCGAGCCAGATGCCACCCCGT TCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGACCA GCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCCACA CCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTA CTTTCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGA CCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAG ACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGG CTCACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCT GCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTG AAAGGGATTTATAAACAGATGCCTGGTT GCTTTAATTTCCCTCCGAAAAAACTTTTC TTTAAACATCAGCTAGCAGAGCC-(T2A)	(T2A)
Fv-iCASP9 C285A-T2A	配列番号 58 (Fv-L)- GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTC TTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTT GGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTGT GGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGA ACTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCAC CCGCACTGGCTCCAACATCGACTGTGAG AAGTTGCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGC ATTTTCATGGTGGAGGTGAAGGGCGACCT GACTGCCAAGAAAATGGTGCTGGCTTTG CTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCACGGT GCTCTGGAAGTGTGCGTGGTGGTCATTC TCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCT	配列番号 59 (Fv-L)- VDGFGDVGALESRLGNADLAYILS MEPCGHCLIIINNVNFCRESGLRTRT GSNIDCEKLRRRFSSLHFMVEVKG DLTAKKMVLALLELARQDHGALDC CVVILSHGCQASHLQFPGAVYGT DGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGK PKLFFIQAaGGEQKDHGFEVASTSP EDES PGSNPEPDATPFQEGLRTFD QLDAISSLPTSDIFVSYSTFPGFV SWRDPKSGSWYVETLDDIFEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQM PGCFNFLRKKLFFKTSASRA-(T2A)

10

20

30

40

【表 6 - 1 1】

	GCAGTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACA GATGGATGCCCTGTGTCCGTCGAGAAGA TTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTG CCCCAGCCTGGGAGGGAAGCCCAAGCT CTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAG CAGAAAGACCATGGGTTTGAGGTGGCCT CCACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGG CAGTAACCCCGAGCCAGATGgCACCCCG TTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGACC AGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCAC ACCCAGTGACATCTTTGTGCCTACTCT ACTTTCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGG ACCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGA GACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGG GCTCACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCC TGCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGT GAAAGGGATTTATAAACAGATGCCTGGT TGCTTTAATTTCTCCGAAAAAACTTTT CTTTAAACATCAGCTAGCAGAGCC- (T2A)	(T2A)
Fv-iCASP9 T317A-T2A	配列番号 62 (Fv-L)- GTCGACGGATTTGGTGATGTCCGTGCTC TTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTT GGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTGT GGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGA ACTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCAC CCGCACTGGCTCCAACATCGACTGTGAG AAGTTGCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGC ATTTTCATGGTGGAGGTGAAGGGCGACCT GACTGCCAAGAAAATGGTGCTGGCTTTG CTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCACGGT GCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTC	配列番号 63 (Fv-L)- VDGFGDVGALES LRGNADLAYILS MEPCGHCLINNVNFCRESGLRTRT GSNIDCEKLRRRFSS LHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELA RQDHGALDCCVVVILSHGCQASHL QFPGAVYGTGDC PVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKL FFIQACGGEQKDHGFEVASTSPED ESPGSNPEPDA aPFQEGLRTFDQLDAISSLPTPSDI FVSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVE

【表 6 - 1 2】

	TCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCT GCAGTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACA GATGGATGCCCTGTGTCGGTCGAGAAGA TTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTG CCCCAGCCTGGGAGGGAAGCCCAAGCT CTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAG CAGAAAGACCATGGGTTTGAGGTGGCCT CCACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGG CAGTAACCCCGAGCCAGATGCCgCCCCG TTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGACC AGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCAC ACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCT ACTTTCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGG ACCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGA GACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGG GCTCACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCC TGCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGT GAAAGGGATTTATAAACAGATGCCTGGT TGCTTTAATTTCTCCGAAAAAACTTTT CTTTAAAACATCAGCTAGCAGAGCC- (T2A)	TLDDIFEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYQM PGCFNFLRKKLFFKTSASRA -(T2A)	10
Fv-iCASP9 T317C- T2A	配列番号 64 (Fv-L)- GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTC TTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTT GGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTGT GGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGA ACTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCAC CCGCACTGGCTCCAACATCGACTGTGAG AAGTTGCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGC ATTTTCATGGTGGAGGTGAAGGGCGACCT GACTGCCAAGAAAATGGTGTGGCTTTG CTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCAACGGT	配列番号 65 (Fv-L)- VDGFGDVGALESRLGNADLAYILS MEPCGHCLIIINNVCRESGLRTRT GSNIDCEKLRRRFSS LHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELA RQDHGALDCCVVVILSHGCQASHL QFPGAVYGTGDC PVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKL FFIQACGGGEQKDGHGEVASTSPED ESPGSNPEPDA ePFQEGLRFTDQLDAISSLPTPSDI	30
			40

【表 6 - 1 3】

	GCTCTGGA CTGCTGCGTGGTGGTCATTC TCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCT GCAGTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACA GATGGATGCCCTGTGTCCGTCGAGAAGA TTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTG CCCCAGCCTGGGAGGGAAGCCCAAGCT CTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAG CAGAAAGACCATGGGTTTGAGGTGGCCT CCTTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGG CAGTAACCCCGAGCCAGATGCCGCCCCG TTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGACC AGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCAC ACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCT ACTTTCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGG ACCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGA GACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGG GCTCACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCC TGCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGT GAAAGGGATTTATAAACAGATGCCTGGT TGCTTTAATTTCTCCGAAAAAACTTTT CTTTAAAACATCAGCTAGCAGAGCC- (T2A)	FVSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVE TLDDIFEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQM PGCFNFLRKKLFFKTSASRA -(T2A)
Fv-iCASP9 T317S- T2A	配列番号 66 (Fv-L)- GTCGACGGATTTGGTGATGTCCGTGCTC TTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTT GGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTGT GGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGA ACTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCAC CCGCACTGGCTCCAACATCGACTGTGAG AAGTTGCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGC ATTTTCATGGTGGAGGTGAAGGGCGACCT GACTGCCAAGAAAATGGTGCTGGCTTTG	配列番号 67 (Fv-L)- VDGFGDVGALES LRGNADLAYILS MEPCGHCLII NNVNFCRESGLRTRT GSNIDCEKLRRRFSS LHFMVEVKGDLTAKKMLALLELA RQDHGALDCCVVVILSHGCQASHL QFPGAVYGT DGC PVSVEKIVNIFNGTSCPSLGKPKL FFIQACGGEQKDHGFEVASTSPED ESPGSNPEPDA

10

20

30

40

【表 6 - 1 4】

	CTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCACGGT GCTCTGGA CTGCTGCGTGGTGGTCATTC TCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCT GCAGTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACA GATGGATGCCCTGTGTGGTTCGAGAAGA TTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTG CCCCAGCCTGGGAGGGAAGCCCAAGCT CTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAG CAGAAAGACCATGGGTTTGAGGTGGCCT CCACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGG CAGTAACCCCGAGCCAGATGCCtCCCCG TTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGACC AGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCAC ACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCT ACTTTCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGG ACCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGA GACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGG GCTCACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCC TGCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGT GAAAGGGATTTATAAACAGATGCCTGGT TGCTTTAATTTCTCCGAAAAAACTTTT CTTTAAAACATCAGCTAGCAGAGCC- (T2A)	sPFQEGLRTFDQLDAISSLTPSDI FVSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVE TLDDIFEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQM PGCFNFLRKKLFFKTSASRA -(T2A)	10
			20
			30
Fv-iCASP9 F326K-T2A	配列番号 68 (Fv-L)- GTCGACGGATTTGGTGTATGTCGGTGCTC TTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTT GGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTGT GGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGA ACTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCAC CCGCACTGGCTCCAACATCGACTGTGAG AAGTTGCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGC ATTCATGGTGGAGGTGAAGGGCGACCT	配列番号 69 (Fv-L)- VDGFGDVGALES LRGNADLAYILS MEPCGHCLINN VNF CRESGLRTRT GSNIDCEKLRRRFSSLHFMVEVKG DLTAKKMYLALLE LARQDHGALDC CVVVILSHGCQASHLQFPGAVYGT DGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGK PKLFFIQACGGGEQKDHGFEVASTS PEDESPGSNPEPDATPFQEGLRTk	40

【表 6 - 1 5】

	GACTGCCAAGAAAATGGTGCTGGCTTTG CTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCACGGT GCTCTGGAAGCTGCTGCGTGGTGGTCATTC TCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCT GCAGTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACA GATGGATGCCCTGTGTCGGTCGAGAAGA TTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTG CCCCAGCCTGGGAGGGAAGCCCAAGCT CTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAG CAGAAAGACCATGGGTTTGAGGTGGCCT CCACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGG CAGTAACCCCGAGCCAGATGCCACCCC GTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCaagGAC CAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCCA CAGCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTC TACTTTCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGG GACCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTG AGACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTG GGCTCACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTC CTGCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGG TGAAAGGGATTTATAAACAGATGCCTGG TTGCTTTAATTTCTCCGAAAAAACTTT TCTTTAAACATCAGCTAGCAGAGCC	DQLDAISSLPTSPDIFVSYSTFPGF VSWRDPKSGSWYVETLDDIFEQWA HSEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQ MPGCFNFLRKKLFFKTSASRA
		10
		20
		30
Fv-iCASP9 D327K-T2A	配列番号 70 (Fv-L)- GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTC TTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTT GGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTGT GGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGA ACTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCAC CCGCACTGGCTCCAACATCGACTGTGAG AAGTTGCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGC ATTCATGGTGGAGGTGAAGGGCGACCT	配列番号 71 (Fv-L)- VDGFGDVGALES LRGNADLAYILS MEPCGHCLINN VNF CRESGLRTRT GSNIDCEKLRRRFSSLHFMVEVKG DLTAKKMLLALLELARQDHGALDC CVVVILSHGCQASHLQFPGAVYGT DGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGK PKLFFIQACGGGEQKDHGFEVASTS PEDESPGSNPEPDATPFQEGLRTF
		40

10

20

30

40

【表 6 - 1 7】

	GACTGCCAAGAAAATGGTGCTGGCTTTG CTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCACGGT GCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATT TCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCT GCAGTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACA GATGGATGCCCTGTGTCGGTCGAGAAGA TTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTG CCCCAGCCTGGGAGGGAAGCCCAAGCT CTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAG CAGAAAGACCATGGGTTTGAGGTGGCCT CCACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGG CAGTAACCCCGAGCCAGATGCCACCCC GTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCaggC AGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCAC ACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCT ACTTTCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGG ACCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGA GACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGG GCTCACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCC TGCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGT GAAAGGGATTTATAAACAGATGCCTGGT TGCTTTAATTTCTCCGAAAAAACTTTT CTTTAAAACATCAGCTAGCAGAGCC- (T2A)	PEDESPGSNPEPDATPFQEGLRTF rQLDAISSLPTPSDIFVSYSTFPGFV SWRDPKSGSWYVETLDDIFEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQM PGCFNFLRKKLFFKTSASRA-(T2A)
		10
		20
		30
Fv-iCASP9 D327G-T2A	配列番号 74 GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTC TTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTT GGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTGT GGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGA ACTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCAC CCGCACTGGCTCCAACATCGACTGTGAG AAGTTGCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGC ATTCATGGTGGAGGTGAAGGGCGACCT	配列番号 75 (Fv-L)- VDGFGDVGALES LRGNADLAYILS MEPCGHCLIIINNVNFCRESGLRTRT GSNIDCEKLRRRFSSLHFMVEVKG DLTAKKMVLALLELARQDHGALDC CVVVILSHGCQASHLQFPGAVYGT DGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGK PKLFFIQACGGEQKDHGFEVASTS
		40

【表 6 - 1 8】

	GACTGCCAAGAAAATGGTGCTGGCTTTG CTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCACGGT GCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTG TCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCT GCAGTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACA GATGGATGCCCTGTGTCCGTGCGAGAAGA TTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTG CCCCAGCCTGGGAGGGAAGCCCAAGCT CTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGAG CAGAAAGACCATGGGTTTGAGGTGGCCT CCACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGG CAGTAACCCCGAGCCAGATGCCACCCC GTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCgC CAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCCA CACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTC TACTTTCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGG GACCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTG AGACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTG GGCTCACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTC CTGCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGG TGAAAGGGATTTATAAACAGATGCCTGG TTGCTTTAATTTCTCCGGAaaaaactTT TCTTTAAACATCAGCTAGCAGAGCC- (T2A)	PEDESPGSNPEPDATPFQEGLRTF gQLDAISSLPTPSDIFVSYSTFPGFV SWRDPKSGSWYVETLDDIFEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQM PGCNFKLRKKLFFKTSASRA-(T2A)
		10
		20
		30
Fv-iCASP9 Q328K-T2A	配列番号 76 (Fv-L)- GTCGACGATTTGGTGATGTCCGTGCTC TTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTT GGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTGT GGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGA ACTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCAC CCGCACTGGCTCCAACATCGACTGTGAG AAGTTGCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGC	配列番号 77 VDGFGDVGALESRLGNADLAYILS MEPCGHCLIIINNVNFCRESGLRTRT GSNIDCEKLRRRFSSLHFMVEVKG DLTAKKMVLALLELARQDHGALDC CVVVILSHGCQASHLQFPGAVYGT DGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGK PKLFFIQACGGGEQKDHGFEVASTS PEDESPGSNPEPDATPFQEGLRTF
		40

【表 6 - 1 9】

	ATTTTCATGGTGGAGGTGAAGGGCGACCT GACTGCCAAGAAAATGGTGGCTGGCTTTG CTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCAACGGT GCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTC TCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCT GCAGTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACA GATGGATGCCCTGTGTCGGTCGAGAAGA TTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTG CCCCAGCCTGGGAGGGAAGCCCAAGCT CTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAG CAGAAAGACCATGGGTTTGAGGTGGCCT CCACCTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGG CAGTAACCCCGAGCCAGATGCCACCCC GTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGAC a AGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCCA CACCCAGTGACATCTTGTGTCCTACTC TACTTTCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGG GACCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTG AGACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTG GGCTCACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTC CTGCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGG TGAAAGGGATTTATAAACAGATGCCTGG TTGCTTTAATTTCTCCGAAAAAACTTT TCTTTAAACATCAGCTAGCAGAGCC- (T2A)	DKLDAISSLTPSDIFVSYSTFPGFV SWRDPKSGSWYVETLDDIFEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQM PGCNFNLRKKLFFKTSASRA-(T2A)
Fv-iCASP9 Q328R- T2A	配列番号 78 (Fv-L)- GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTC TTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTT GGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTGT GGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGA ACTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCAC CCGCACTGGCTCCAACATCGACTGTGAG	配列番号 79 (Fv-L)- VDGFGDVGALES LRGNADLAYILS MEPCGHCLII NNVNFCRESGLRTRT GSNIDCEKLRRRFSSLHFMVEVKG DLTAKKMVLALLELARQDHGALDC CVVVILSHGCQASHLQFPGAVYGT DGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGK

10

20

30

40

【表 6 - 2 0】

	AAGTTGCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGC ATTCATGGTGGAGGTGAAGGGCGACCT GACTGCCAAGAAAATGGTGCTGGCTTTG CTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCACGGT GCTCTGGA CTGCTGCGTGGTGGTCATTG TCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCT GCAGTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACA GATGGATGCCCTGTGTGCGGTCGAGAAGA TTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTG CCCCAGCCTGGGAGGGAAGCCCAAGCT CTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAG CAGAAAGACCATGGGTTTGAGGTGGCCT CCACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGG CAGTAACCCCGAGCCAGATGCCACCCC GTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGAC agGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCCA CACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTC TACTTTCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGG GACCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTG AGACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTG GGCTCACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTC CTGCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGG TGAAAGGGATTTATAAACAGATGCCTGG TTGCTTTAATTTCTCCGGAAAAAACTTT TCTTTAAACATCAGCTAGCAGAGCC- (T2A)	PKLFFIQACGGEQKDHGFEVASTS PEDESPGSNPEPDATPFQEGLRTF DrLDAISSLPTPSDIFVSYSTFPGFV SWRDPKSGSWYVETLDDIFEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQM PGCFNFLRKKLFFKTSASRA-(T2A)
		10
		20
		30

【表 6 - 2 1】

Fv-iCASP9 L329K-T2A	配列番号 80	配列番号 81
	(Fv-L)- GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTC TTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTT GGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTGT GGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGA ACTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCAC CCGCACTGGCTCCAACATCGACTGTGAG AAGTTGCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGC ATTCATGGTGGAGGTGAAGGGCGACCT GACTGCCAAGAAAATGGTGCTGGCTTTG CTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCAAGGT GCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTC TCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCT GCAGTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACA GATGGATGCCCTGTGTCGGTCGAGAAGA TTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTG CCCCAGCCTGGGAGGGAAGCCCAAGCT CTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAG CAGAAAGACCATGGGTTTGAGGTGGCCT CCACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGG CAGTAACCCCGAGCCAGATGCCACCCC GTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGAC CAGaaGGACGCCATATCTAGTTTGCCCA CACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTC TACTTTCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGG GACCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTG AGACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTG GGCTCACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTC CTGCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGG TGAAAGGGATTTATAAACAGATGCCTGG TTGCTTTAATTTCTCCGGAAAAAATTT TCTTTAAACATCAGCTAGCAGAGCC	(Fv-L)- VDGFQDVGALESIRGNADLAYILS MEPCGHCLIIINNVCRESGLRTRT GSNIDCEKLRRRFSSLHFMVEVKG DLTAKKMVLALLELARQDHGALDC CVVVILSHGCQASHLQFPGAVYGT DGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGK PKLFFIQACGGEQKDHGFVASTS PEDESPGSNPEPDATPFQEGLRTF DQKDAISSLPTPSDIFVSYSTFPGF VSWRDPKSGSWYVETLDDIFEQWA HSEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQ MPGCFNFLRKKLFFKTSASRA

10

20

30

40

【表 6 - 2 2】

Fv-iCASP9 L329E-T2A	配列番号 82	配列番号 83
	(Fv-L)- GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTC TTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTT GGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTGT GGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGA ACTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCAC CCGCACTGGCTCCAACATCGACTGTGAG AAGTTGCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGC ATTTTCATGGTGGAGGTGAAGGGCGACCT GACTGCCAAGAAAATGGTGCTGGCTTTG CTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCACGGT GCTCTGGAAGTGTGCGTGGTGGTCATTC TCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCT GCAGTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACA GATGGATGCCCTGTGTGGTTCGAGAAGA TTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTG CCCCAGCCTGGGAGGGAAGCCCAAGCT CTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAG CAGAAAGACCATGGGTTTGAGGTGGCCT CCACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGG CAGTAACCCCGAGCCAGATGCCACCCC GTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGAC CAGgaGGACGCCATATCTAGTTTGCCCA CACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTC TACTTTCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGG GACCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTG AGACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTG GGCTCACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTC CTGCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGG TGAAAGGGATTTATAAACAGATGCCTGG TTGCTTTAATTTCCCTCCGAAAAAACTTT TCTTTAAAACATCAGCTAGCAGAGCC-	(Fv-L)- VDGFQDVGALESRLGNADLAYILS MEPCGHCLINNVNFCRESGLRTRT GSNIDCEKLRRRFSSLHFMVEVKG DLTAKKMLALLELARQDHGALDC CVVVILSHGCQASHLQFPGAVYGT DGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGK PKLFFIQACGGEQKDHGFEVASTS PEDESPGSNPEPDATPFQEGLRTF DQeDAISSLPTPSDIFVSYSTFPGF VSWRDPKSGSWYVETLDDIFEQWA HSEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQ MPGCFNFLRKKLFFKTSASRA- (T2A)

10

20

30

40

【表 6 - 2 3】

	(T2A)		
Fv-iCASP9 L329G-T2A	配列番号 84 GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTC TTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTT GGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTGT GGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGA ACTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCAC CCGCACTGGCTCCAACATCGACTGTGAG AAGTTGCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGC ATTTTCATGGTGAGGTGAAGGGCGACCT GACTGCCAAGAAAATGGTGCTGGCTTTG CTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCACGGT GCTCTGGA CTGCTGCGTGGTGGTCATTC TCTCTACGGCTGTCAGGCCAGCCACCT GCAGTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACA GATGGATGCCCTGTGTCGGTCGAGAAGA TTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTG CCCCAGCCTGGGAGGGAAGCCCAAGCT CTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAG CAGAAAGACCATGGGTTTGAGGTGGCCT CCACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGG CAGTAACCCCGAGCCAGATGCCACCCC GTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGAC CAGggcGACGCCATATCTAGTTTGCCCAC ACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCT	配列番号 85 VDGF GDVGALES LRGNADLAYILS MEPCGHCLII NNVNFCRESGLRTRT GSNIDCEKLRRRFSSLHFMVEVKG DLTAKKMLALLELARQDHGALDC CVVVILSHGCQASHLQFPGAVYGT DGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGK PKLFFIQACGGEQKDHGFEVASTS PEDESPGSNPEPDATPFQEGLRTF DQgDAISSLPTPSDIFVSYSTFPGF VSWRDPKSGSWYVETLDDIFEQWA HSEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQ MPGCFNFLRKKLFFKTSASRA	

10

20

30

40

【表 6 - 2 4】

	ACTTTCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGG ACCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGA GACCCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGG GCTCACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCC TGCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGT GAAAGGGATTTATAAACAGATGCCTGGT TGCTTTAATTTCTCCGGAAAAAACTTTT CTTTAAAACATCAGCTAGCAGAGCC	
Fv-L-カスパーゼ 9 D330A-T2A	配列番号 86 (Fv-L)- GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTC TTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTT GGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTGT GGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGA ACTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCAC CCGCACTGGCTCCAACATCGACTGTGAG AAGTTGCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGC ATTTTCATGGTGGAGGTGAAGGGCGACCT GACTGCCAAGAAAATGGTGCTGGCTTTG CTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCACGGT GCTCTGGAAGTGTGCGTGGTGGTCATTC TCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCT GCAGTTCCAGGGGCTGTCTACGGCACA GATGGATGCCCTGTGTCGGTCGAGAAGA TTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTG CCCCAGCCTGGGAGGGAAGCCCAAGCT CTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAG CAGAAAGACCATGGGTTTGAGGTGGCCT CCACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGG CAGTAACCCCGAGCCAGATGCCACCCC GTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGAC CAGCTGGC C CGCCATATCTAGTTTGCCCA	配列番号 87 (Fv-L)- VDGFGDVGALESRLGNADLAYILS MEPCGHCLIIINNVNFCRESGLRTRT GSNIDCEKLRRRFSS LHFMEVVKGDLTAKKMVLALLELA RQDHGALDCCVVVILSHGCQASHL QFPGAVYGT DGC PVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKL FFIQACGGEGQKDHGFEVASTSPED ESPGSNPEPDA TPFQEGRLRTFDQL a AISSLPTPSDIF VSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVET LDDIFEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQM PGCNLFRLKKLFFKTSASRA-(T2A)

10

20

30

40

10

40

【表 6 - 2 6】

	CAGCTGGcCGCCATATCTAGTTTGCCCA CACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTC TACTTTCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGG GACCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTG AGACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTG GGCTCACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTC CTGCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGG TGAAAGGGATTTATAAACAGATGCCTGG TTGCTTTAATTTCTCCGGAAAAAATTT TCTTTAAACATCAGCTAGCAGAGCC- (T2A)		10
Fv-L-カスパーゼ 9 D330N-T2A	配列番号 90 (Fv-L)- GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTC TTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTT GGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTGT GGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGA ACTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCAC CCGCACTGGCTCCAACATCGACTGTGAG AAGTTGCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGC ATTTTCATGGTGAGGTGAAGGGCGACCT GACTGCCAAGAAAATGGTGCTGGCTTTG CTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCACGGT GCTCTGGACTGCTGCGTGCTGGTCATTC TCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCT GCAGTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACA GATGGATGCCCTGTGTCGGTCGAGAAGA TTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTG CCCCAGCCTGGGAGGGAAGCCCAAGCT CTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAG CAGAAAGACCATGGGTTTGAGGTGGCCT CCACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGG CAGTAACCCCGAGCCAGATGCCACCCC	配列番号 91 (Fv-L)- VDGFGDVGALESRLGNADLAYILS MEPCGHCLINNVNFCRESGLRTRT GSNIDCEKLRRRFSS LHFMVEVKGDLTAKKMLALLELA RQDHGALDCCVVVILSHGCQASHL QFPGAVYGTGDC PVSVEKIVNIFNGTSCPSLGKPKL FFIQACGGGEQKDHGFEVASTSPED ESPGSNPEPDA TPFQEGLRTFDQLnAISSLPTPSDIF VSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVET LDDIFEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQM PGCFNFLRKKLFFKTSASRA-(T2A)	20 30 40

【表 6-27】

	GTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGAC CAGCTGGcCGCCATATCTAGTTTGCCCA CACCCAGTGACATCTTTGTGTCTACTC TACTTTCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGG GACCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTG AGACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTG GGCTCACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTC CTGCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGG TGAAAGGGATTTATAAACAGATGCCTGG TTGCTTTAATTTCTCCGAAAAAACTTT TCTTTAAACATCAGCTAGCAGAGCC- (T2A)	
Fv-L-カスパーゼ 9 D330V-T2A	配列番号 92 (Fv-L)- GTCGACGATTTGGTGATGTCGGTGCTC TTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTT GGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTGT GGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGA ACTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCAC CCGCACTGGCTCCAACATCGACTGTGAG AAGTTGCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGC ATTCATGGTGGAGGTGAAGGGCGACCT GACTGCCAAGAAAATGGTGCTGGCTTTG CTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCACGGT GCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTC TCTCTACGGCTGTCAGGCCAGCCACCT GCAGTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACA GATGGATGCCCTGTGTCGGTCGAGAAGA TTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTG CCCCAGCCTGGGAGGGAAGCCCAAGCT CTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAG CAGAAAGACCATGGGTTTGAGGTGGCCT CCACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGG	配列番号 93 (Fv-L)- VDGFQDVGALSLRGNADLAYILS MEPCGHCLINNVNFCRESGLRTRT GSNIDCEKLRRRFSS LHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELA RQDHGALDCCVVVILSHGCQASHL QFPGAVYGTGDC PVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKL FFIQACGGEQKDHGFEVASTSPED ESPGSNPEPDA TPFQEGLRTFDQLvAISSLPTPSDIF VSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVET LDDIFEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYQKM PGCNFNLRKKLFFKTSASRA-(T2A)

【表 6 - 2 8】

	CAGTAACCCCGAGCCAGATGCCACCCC GTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGAC CAGCTG Gc CGCCATATCTAGTTTGCCCA CACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTC TACTTTCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGG GACCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTG AGACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTG GGCTCACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTC CTGCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGG TGAAAGGGATTTATAAACAGATGCCTGG TTGCTTTAATTTCTCCGAAAAAACTTT TCTTTAAACATCAGCTAGCAGAGCC- (T2A)	
Fv-L-カスパーゼ 9 D330G-T2A	配列番号 94 (Fv-L)- GTGACCGGATTTGGTGATGTCGGTGCTC TTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTT GGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTGT GGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGA ACTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCAC CCGCACTGGCTCCAACATCGACTGTGAG AAGTTGCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGC ATTCATGGTGGAGGTGAAGGGCGACCT GACTGCCAAGAAAATGGTGCTGGCTTTG CTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCACGGT GCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTG TCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCT GCAGTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACA GATGGATGCCCTGTGTCGGTCGAGAAGA TTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTG CCCCAGCCTGGGAGGGAAGCCCAAGCT CTTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAG CAGAAAGACCATGGGTTTGAGGTGGCCT	配列番号 95 (Fv-L)- VDGFGDVGALESLRGNADLAYILS MEPCGHCLIIINNVNFCRESGLRTRT GSNIDCEKLRRRFSS LHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELA RQDHGALDCCVVVILSHGCQASHL QFPGAVYGTGDC PVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKL FFIQACGGEQKDHGFEVASTSPED ESPGSNPEPDA TPFQEGLRTFDQL g AISSLPTPSDIF VSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVET LDDIFEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQM PGCFNFLRKKLFFKTSASRA-(T2A)

【表 6 - 2 9】

	CCACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGG CAGTAACCCCGAGCCAGATGCCACCCC GTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGAC CAGCTGGcCGCCATATCTAGTTTGCCCA CACCCAGTGACATCTTTGTGTCTACTC TACTTTCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGG GACCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTG AGACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTG GGCTCACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTC CTGCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGG TGAAAGGGATTTATAAACAGATGCCTGG TTGCTTTAATTTCTCCGAAAAAACTTT TCTTTAAAACATCAGCTAGCAGAGCC- (T2A)	
Fv-L-カスパーゼ 9 D330S-T2A	配列番号 96 (Fv-L)- GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTC TTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTT GGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTGT GGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGA ACTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCAC CCGCACTGGCTCCAACATCGACTGTGAG AAGTTGCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGC ATTTTCATGGTGAGGTGAAGGGCGACCT GACTGCCAAGAAAATGGTGCTGGCTTTG CTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCACGGT GCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTC TCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCT GCAGTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACA GATGGATGCCCTGTGTCGGTCGAGAAGA TTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTG CCCCAGCCTGGGAGGGAAGCCCAAGCT CTTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAG	配列番号 97 (Fv-L)- VDGFGDVGALES LRGNADLAYILS MEPCGHCLIIINNVCRESGLRTRT GSNIDCEKLRRRFSS LHFMEVKGDLTAKKMVLALLELA RQDHGALDCCVVVILSHGCQASHL QFPGAVYGT DGC PVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKL FFIQACGGEQKDHGFEVASTSPED ESPGSNPEPDA TPFQEGLRTFDQLsAISSLPTPSDIF VSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVET LDDIFEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYQM PGCFNFLRKKLFFKTSASRA-(T2A)

【表 6 - 3 0】

	CAGAAAGACCATGGGTTTGAGGTGGCCT CCACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGG CAGTAACCCCGAGCCAGATGCCACCCC GTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGAC CAGCTGGcCGCCATATCTAGTTTGCCCA CACCCAGTGACATCTTTGTGTCTACTC TACTTTCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGG GACCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTG AGACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTG GGCTCACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTC CTGCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGG TGAAAGGGATTTATAAACAGATGCCTGG TTGCTTTAATTCCTCCGAAAAAATTT TCTTTAAACATCAGCTAGCAGAGCC- (T2A)		10
Fv-iCASP9 A331K-T2A	配列番号 98 (Fv-L)- GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTC TTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTT GGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTGT GGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGA ACTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCAC CCGCACTGGCTCCAACATCGACTGTGAG AAGTTGCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGC ATTTTCATGGTGGAGGTGAAGGGCGACCT GACTGCCAAGAAAATGGTGCTGGCTTTG CTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCACGGT GCTCTGGAAGTGTGCGTGGTGGTCATTC TCTCTACGGCTGTCAGGCCAGCCACCT GCAGTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACA GATGGATGCCCTGTGTCGGTCGAGAAGA TTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTG CCCCAGCCTGGGAGGGAAGCCCAAGCT	配列番号 99 (Fv-L)- VDGFGDVGALESLRGNADLAYILS MEPCGHCLIIINNVCRESGLRTRT GSNIDCEKLRRRFSSLHFMVEVKG DLTAKKMVLALLELARQDHGALDC CVVVILSHGCQASHLQFPGAVYGT DGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGK PKLFFIQACGGEQKDHGFEVASTS PEDESPGSNPEPDATPFQEGLRTF DQLDKISSLPTPSDIFVSYSTFPGFV SWRDPKSGSWYVETLDDIFEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQM PGCFNFLRKKLFFKTSASRA-(T2A)	20 <

10

20

30

40

10

20

30

40

【表 6 - 3 3】

	TTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTG CCCCAGCCTGGGAGGGAAGCCCAAGCT CTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAG CAGAAAGACCATGGGTTTGAGGTGGCCT CCACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGG CAGTAACCCCGAGCCAGATGCCACCCC GTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGAC CAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCCA CACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTC TACTTTCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGG GACCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTG AGACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTG GGCTCACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTC CTGCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGG TGAAAGGGATTTATAAACAGATGCCTGG TTGCT ~~gg~~ AATTTCTCCGGAACAACTTT TCTTTAAACATCAGCTAGCAGAGCC- (T2A)	(T2A)
Fv-L-i カスパーゼ 9 N405Q-T2A	配列番号 104 (Fv-L)- GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTC TTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTT GGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTGT GGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGA ACTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCAC CCGCACTGGCTCCAACATCGACTGTGAG AAGTTGCGGCGTGCCTTCTCCTCGCTGC ATTTTCATGGTGGAGGTGAAGGGCGACCT GACTGCCAAGAAAATGGTGCTGGCTTTG CTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCACGGT GCTCTGGAAGTGTGCGTGGTGGTCATTC TCTCTCAGCGCTGTCAGGCCAGCCACCT GCAGTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACA	配列番号 105 (Fv-L)- VDGFGDVGALES LRGNADLAYILS MEPCGHCLIIINN VFCRESGLRTRT GSNIDCEKLRRRFSS LHFMEVKGDLTAKKMLALLELA RQDHGALDCCVVVILSHGCQASHL QFPGAVYGT DGC PVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKL FFIQACGGEGKDHGFEVASTSPED ESPGSNPEPDA TPFQEGLRTFDQLDAISSLPTPSDI FVSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVE TLDDIFEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQM

10

20

30

40

【表 6-34】

	GATGGATGCCCTGTGTCGGTCGAGAAGA TTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTG CCCCAGCCTGGGAGGGAAGCCCCAAGCT CTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAG CAGAAAGACCATGGGTTTGAGGTGGCCT CCACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGG CAGTAACCCCGAGCCAGATGCCACCCC GTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGAC CAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCCA CACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTC TACTTTCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGG GACCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTG AGACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTG GGCTCACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTC CTGCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGG TGAAAGGGATTTATAAACAGATGCCTGG TTGCTTTcagTTTCCTCCGAAAAAATTT TCTTTAAACATCAGCTAGCAGAGCC- (T2A)	PGCF q FLRKLFKTSASRA-(T2A)
Fv-L-i カスパーゼ 9 N405Q コドン最適化- T2A	配列番号 106 -(Fv-L)- GTGGACGGGTTTGGAGATGTGGGAGCCC TGGAATCCCTGCGGGGCAATGCCGATCT GGCTTACATCCTGTCTATGGAGCCTTGC GGCCACTGTCTGATCATTAACAATGTGA ACTTCTGCAGAGAGAGCGGGCTGCGGA CCAGAACAGGATCCAATATTGACTGTGA AAAGCTGCGGAGAAGGTTCTCTAGTCTG CACTTTATGGTCGAGGTGAAAGGCGATC TGACCGCTAAGAAAATGGTGCTGGCCCT GCTGGAAGTGGCTCGGCAGGACCATGG GGCACTGGATTGCTGCGTGGTCTGATC CTGAGTCACGGCTGCCAGGCTTCACATC	配列番号 107 (Fv-L)- VDGFGDVGALSLRGNADLAYILS MEPCGHCLIIINNVCRESGLRTRT GSNIDCEKLRRRFSS LHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELA RQDHGALDCCVVVILSHGCQASHL QFPGAVYGTGDC PVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKL FFIQACGGGEQKDHGFVASTSPED ESPGSNPEPDA TPFQEGLRTFDQLDAISSLPTPSDI FVSYSTFPFGVSWRDPKSGSWYVE TLDDIFEQWAH

【表 6 - 3 5】

	TGCAGTTCCTGGGGCAGTCTATGGAAC TGACGGCTGTCCAGTCAGCGTGGAGAAG ATCGTGAACATCTTCAACGGCACCTCTT GCCCAAGTCTGGGCGGGAAGCCCCAAC TGTTCTTTATTAGGCCTGTGGAGGCGA GCAGAAAGATCACGGCTTCGAAGTGGCT AGCACCTCCCCGAGGACGAATCACCTG GAAGCAACCCTGAGCCAGATGCAACCC CCTTCCAGGAAGGCCTGAGGACATTTGA CCAGCTGGATGCCATCTCAAGCCTGCCC ACACCTTCTGACATTTTCGTCTCTTACA GTACTTTCCTGGATTTGTGAGCTGGCG CGATCCAAAGTCAGGCAGCTGGTACGTG GAGACACTGGACGATATCTTTGAGCAGT GGGCCCATTCTGAAGACCTGCAGAGTCT GCTGCTGCGAGTGGCCAATGCTGTCTCT GTGAAGGGGATCTACAAACAGATGCCAG GATGCTTcagTTTCTGAGAAAGAACTG TTCTTTAAGACCTCCGCATCTAGGGCC- (T2A)	SEDLSLLLLRVANAVSVKGIYKQM PGCFqFLRKKLFFKTSASRA-(T2A)
Fv-iCASP9 F406L-T2A	配列番号 108 (Fv-L)- GTCGACGGATTTGGTGATGTCCGTGCTC TTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTT GGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTGT GGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGA ACTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCAC CCGCACTGGCTCCAACATCGACTGTGAG AAGTTGCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGC ATTCATGGTGGAGGTGAAGGGCGACCT GACTGCCAAGAAAATGGTGCTGGCTTTG CTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCACGGT GCTCTGGAAGTGTGCGTGGTGGTCATTC	配列番号 109 (Fv-L)- VDGFGDVGALESIRGNADLAYILS MEPCGHCLIIINNVNFCRESGLRTRT GSNIDCEKLRRRFSSLHFMVEVKG DLTAKKMVLALLELARQDHGALDC CVVVILSHGCQASHLQFPGAVYGT DGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGK PKLFFIQACGGEQKDHGFVASTS PEDESPGSNPEPDATPFQEGRLTF DQLDAISSLPTPSDIFVSYSTFPGF VSWRDPKSGSWYVETLDDIFEQWA HSEDLSLLLLRVANAVSVKGIYKQ

10

20

30

40

【表 6 - 3 6】

	TCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCT GCAGTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACA GATGGATGCCCTGTGTGCGTCGAGAAGA TTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTG CCCCAGCCTGGGAGGGAAGCCCAAGCT CTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAG CAGAAAGACCATGGGTTTGAGGTGGCCT CCACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGG CAGTAACCCCGAGCCAGATGCCACCCC GTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGAC CAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCCA CACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTC TACTTTCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGG GACCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTG AGACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTG GGCTCACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTC CTGCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGG TGAAAGGGATTTATAAACAGATGCCTGG TTGCTTTAATcTCCTCCGGAAAAAACTTT TCTTTAAAACATCAGCTAGCAGAGCC- (T2A)	MPGCFNLLRKKLFFKTSASRA- (T2A)
Fv-iCASP9 F406T- T2A	配列番号 110 (Fv-L)- GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTC TTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTT GGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTGT GGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGA ACTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCAC CCGCACTGGCTCCAACATCGACTGTGAG AAGTTGCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGC ATTTTCATGGTGGAGGTGAAGGGCGACCT GACTGCCAAGAAAATGGTGCTGGCTTTG CTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCACGGT	配列番号 111 (Fv-L)- VDGFGDVGALES LRGNADLAYILS MEPCGHCLIIINNVNFCRESGLRTRT GSNIDCEKLRRRFSSLHFMVEVKG DLTAKKMYLALLELARQDHGALDC CVVVILSHGCQASHLQFPGAVYGT DGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGK PKLFFIQACGGEQKDHGFEVASTS PEDESPGSNPEPDATPFQEGLRFTF DQLDAISSLPTPSDIFVSYSTFPGF VSWRDPKSGSWYVETLDDIFEQWA

10

20

30

40

10

20

30

40

【表 6 - 3 8】

	GCTGGAAGTGGCTCGGCAGGACCATGG GGCACTGGATTGCTGCGTGGTCGTGATC CTGAGTCACGGCTGCCAGGCTTCACATC TGCAGTTCCTGGGGCAGTCTATGGAAC TGACGGCTGTCCAGTCAGCGTGGAGAAG ATCGTGAACATCTTCAACGGCACCTCTT GCCCAAGTCTGGGCGGGAAGCCCAAAC TGTTCTTTATTCAGGCCTGTGGAGGCGA GCAGAAAGATCACGGCTTCGAAGTGGCT AGCACCTCCCCGAGGACGAATCACCTG GAAGCAACCCTGAGCCAGATGCAACCC CCTTCAGGAAGGCCTGAGGACATTTGA CCAGCTGGATGCCATCTCAAGCCTGCCC ACACCTTCTGACATTTTCGTCTCTTACA GTACTTTCCTGGATTTGTGAGCTGGCG CGATCCAAAGTCAGGCAGCTGGTACGTG GAGACACTGGACGATATCTTTGAGCAGT GGGCCCATCTGAAGACCTGCAGAGTCT GCTGCTGCGAGTGGCCAATGCTGTCTCT GTGAAGGGGATCTACAAACAGATGCCAG GATGCTTCcagTTTCTGAGAAAGAACTG TTCTTTAAGACCTCCGCATCTAGGGCC- (T2A)	TPFQEGLRTFDQLDAISSLPTPSDI FVSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVE TLDDIFEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQM PGCFqFLRKKLFFKTSASRA-(T2A)	10
			20
			30
Fv-iCASP9 S144A D330A-T2A	配列番号 114 (Fv-L)- GTGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTC TTGAGgcTTTGAGGGGAAATGCAGATTTG GCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTG GCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAA CTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACC CGCACTGGCTCCAACATCGACTGTGAGA AGTTGCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGCA TTTCATGGTGGAGGTGAAGGGCGACCTG	配列番号 115 (Fv-L)- VDGFGDVGALaL RGNADLAYILS MEPCGHCLIIINNVCRESGLRTRT GSNIDCEKLRRRFSSLHFMVEVKG DLTAKKMVLALLELARQDHGALDC CVVVILSHGCQASHLQFPGAVYGT DGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGK PKLFFIQACGGEQKDHGFEVASTS PEDESPGSNPEPDATPFQEGLRTF	40

【表 6 - 3 9】

	ACTGCCAAGAAAATGGTGGCTGGCTTTGC TGGAGCTGGCGCGGCAGGACCACGGTG CTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTCT CTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTG CAGTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAG ATGGATGCCCTGTGTCGGTCGAGAAGAT TGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTGC CCCAGCCTGGGAGGGAAGCCCAAGCTC TTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAGC AGAAAGACCATGGGTTTGAGGTGGCCTC CACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGGC AGTAACCCCGAGCCAGATGCCACCCCGT TCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGACCA GCTGGcCGCCATATCTAGTTTGCCACACA CCCAGTGACATCTTTGTGTCTACTCTA CTTTCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGA CCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAG ACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGG CTCACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCT GCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTG AAAGGGATTTATAAACAGATGCCTGGTT GCTTTAATTTCTCCGAAAAAACTTTTC TTTAAACATCAGCTAGCAGAGCC-(T2A)	DQLaAISSLPTPSDIFVSYSTFPGFV SWRDPKSGSWYVETLDDIFEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQM PGCFNFLRKKLFFKTSASRA	10
			20
			30
Fv-iCASP9 S144D D330A-T2A	配列番号 116 (Fv-L)- GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTC TTGAGgacTTGAGGGGAAATGCAGATTTG GCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTG GCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAA CTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACC CGCACTGGCTCCAACATCGACTGTGAGA AGTTGCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGCA TTTCATGGTGGAGGTGAAGGGCGACCTG	配列番号 117 (Fv-L)- VDGFGDVGALEdLRGNADLAYILS MEPCGHCLIINNPNFVRESGLRTRT GSNIDCEKLRRRFSSLHFMVEVKG DLTAKKMLLALLELARQDHGALDC CVVVILSHGCQASHLQFPGAVYGT DGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGK PKLFFIQACGGGEQKDHGFEVASTS PEDESPGSNPEPDATPFQEGLRTF	40

【表 6 - 4 0】

	ACTGCCAAGAAAATGGTGCTGGCTTTGC TGGAGCTGGCGCGGCAGGACCACGGTG CTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTCT CTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTG CAGTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAG ATGGATGCCCTGTGTCTGGTCGAGAAGAT TGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTGC CCCAGCCTGGGAGGGAAGCCCAAGCTC TTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAGC AGAAAGACCATGGGTTTGAGGTGGCCTC CACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGGC AGTAACCCCGAGCCAGATGCCACCCCGT TCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGACCA GCTGGCCGCCATATCTAGTTTGCCACA CCCAGTGACATCTTTGTGTCTACTCTA CTTTCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGA CCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAG ACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGG CTCACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCT GCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTG AAAGGGATTTATAAACAGATGCCTGGTT GCTTTAATTTCTCCGAAAAAACTTTTC TTTAAACATCAGCTAGCAGAGCC-(T2A)	DQLaAISSLPTPSDIFVSYSTFPGFV SWRDPKSGSWYVETLDDIFEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQM PGCFNFLRKKLFFKTSASRA	10
			20
			30
Fv-iCASP9 S196A D330A-T2A	配列番号 118 (Fv-L)- GTCGACGGATTTGGTGATGTGGTGCTC TTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTT GGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTGT GGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGA ACTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCAC CCGCACTGGCTCCAACATCGACTGTGAG AAGTTGCGGCGTGGCTTCTCCgCGCTGC ATTCATGGTGGAGGTGAAGGGCGACCT	配列番号 119 (Fv-L)- VDGFGDVGALESRLGNADLAYILS MEPCGHCLIINNPNFCRESGLRTRT GSNIDCEKLRRRFSaLHFMVEVKG DLTAKKMLVALLLELARQDHGALDC CVVVILSHGCQASHLQFPGAVYGT DGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGK PKLFFIQACGGGEQKDHGFEVASTS PEDESPGSNPEPDATPFQEGLRTF	40

【表 6 - 4 1】

	GACTGCCAAGAAAATGGTGCTGGCTTTG CTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCACGGT GCTCTGGAAGCTGCTGCGTGCTGGTCATTC TCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCT GCAGTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACA GATGGATGCCCTGTGTGCGGTCGAGAAGA TTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTG CCCCAGCCTGGGAGGGAAGCCCAAGCT CTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAG CAGAAAGACCATGGGTTTGAGGTGGCCT CCTTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGG CAGTAACCCCGAGCCAGATGCCACCCC GTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGAC CAGCTGGCCCGCCATATCTAGTTTGCCCA CAGCCAGTGACATCTTTGTGTCTACTC TACTTTCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGG GACCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTG AGACCCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTG GGCTCACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTC CTGCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGG TGAAAGGGATTTATAAACAGATGCCTGG TTGCTTTAATTTCTCCGAAAAAACTTT TCTTTAAAACATCAGCTAGCAGAGCC- (T2A)	DQLaAISSLPTPSDIFVSYSTFPGFV SWRDPKSGSWYVETLDDIFEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQM PGCFNFLRKKLFFKTSASRA-(T2A)	10
			20
			30
Fv-iCASP9 S196D D330A-T2A	配列番号 120 (Fv-L)- GTGACGGATTTGGTGATGTGCGGTGCTC TTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTT GGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTGT GGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGA ACTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCAC CCGCACTGGCTCCAACATCGACTGTGAG AAGTTGCGGCGTCGCTTCTCCgacCTGCA	配列番号 121 (Fv-L)- VDGFGDVGALESRLGNADLAYILS MEPCGHCLIIINNVCRESGLRTRT GSNIDCEKLRRRFSdLHFMVEVKG DLTAKKMVLALLELARQDHGALDC CVVVILSHGCQASHLQFPGAVYGT DGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGK PKLFFIQACGGGEQKDHGFEVASTS	40

【表 6 - 4 2】

	TTTCATGGTGGAGGTGAAGGGCGACCTG ACTGCCAAGAAAAATGGTGCTGGCTTTGC TGGAGCTGGCGCGGCAGGACCACGGTG CTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTCT CTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTG CAGTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAG ATGGATGCCCTGTGTCGGTCGAGAAGAT TGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTGC CCCAGCCTGGGAGGGAAGCCCAAGCTC TTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAGC AGAAAGACCATGGGTTTGAGGTGGCCTC CACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGGC AGTAACCCCGAGCCAGATGCCACCCCGT TCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGACCA GCTGGCCCGCCATATCTAGTTTGCCACACA CCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTA CTTTCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGA CCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAG ACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGG CTCACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCT GCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTG AAAGGGATTTATAAACAGATGCCTGGTT GCTTTAATTTCTCCGGAACAACTTTTC TTTAAACATCAGCTAGCAGAGCC-(T2A)	PEDESPGSNPEPDATPFQEGLRTF DQLaAISSLPTPSDIFVSYSTFPGFV SWRDPKSGSWYVETLDDIFEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQM PGCFNFLRKKLFFKTSASRA-(T2A)	10
			20
			30
Fv-L-i カスパーゼ 9 T317S N405Q-T2A コード最適化	配列番号 122 (Fv-L)- GTGGACGGGTTTGGAGATGTGGGAGCCC TGGAATCCCTGCGGGGCAATGCCGATCT GGCTTACATCCTGTCTATGGAGCCTTGC GGCCACTGTCTGATCATTAAACAATGTGA ACTTCTGCAGAGAGAGCGGGCTGCGGA CCAGAACAGGATCCAATATTGACTGTGA AAAGCTGCGGAGAAGGTTCTCTAGTCTG	配列番号 123 (Fv-L)- VDGFGDVGALES LRGNADLAYILS MEPCGHCLINNVNFCRESGLRTRT GSNIDCEKLRRRFSS LHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELA RQDHGALDCCVVVILSHGCQASHL QFPGAVYGTGDC PVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKL	40

【表 6 - 4 3】

	CACTTTATGGTCGAGGTGAAAGGCGATC TGACCGCTAAGAAAATGGTGCTGGCCCT GCTGGAAGTGGCTCGGCAGGACCATGG GGCACTGGATTGCTGCGTGGTCGTGATC CTGAGTCACGGCTGCCAGGCTTCACATC TGCAGTTCCTGGGGCAGTCTATGGAAC TGACGGCTGTCCAGTCAGCGTGGAGAAG ATCGTGAACATCTTCAACGGCACCTCTT GCCCAAGTCTGGGCGGGAAGCCCAAAC TGTTCTTTATTAGGCCTGTGGAGGCGA GCAGAAAGATCACGGCTTCGAAGTGGCT AGCACCTCCCCGAGGACGAATCACCTG GAAGCAACCCTGAGCCAGATGCAAgCCC CTTCCAGGAAGGCCTGAGGACATTTGAC CAGCTGGATGCCATCTCAAGCCTGCCCA CACCTTCTGACATTTTCGTCTCTTACAG TACTTTCCCTGGATTTGTGAGCTGGCGC GATCCAAAGTCAGGCAGCTGGTACGTGG AGACACTGGACGATATCTTTGAGCAGTG GGCCCATTCTGAAGACCTGCAGAGTCTG CTGCTGCGAGTGGCCAATGCTGTCTCTG TGAAGGGGATCTACAAACAGATGCCAGG ATGCTTCcagTTTCTGAGAAAGAAACTGT TCTTTAAGACCTCCGCATCTAGGGCC- (T2A)	FFIQACGGEQKDHGFEVASTSPED ESPGSNPEPDA sPFQEGLRTFDQLDAISSLPTPSDI FVSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVE TLDDIFEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQM PGCFqFLRKKLFFKTSASRA-(T2A)	10
Fv-L-カスパーゼ 9 D330A N405Q-T2A	配列番号 124 (Fv-L)- GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTC TTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTT GGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTGT GGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGA ACTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCAC CCGCACTGGCTCCAACATCGACTGTGAG	配列番号 125 (Fv-L)- VDGFGDVGALES LRGNADLAYILS MEPCGHCLIIINNVNFCRESGLRTRT GSNIDCEKLRRRFSS LHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELA RQDHGALDCCVVVILSHGCQASHL QFPGAVYGTGDC	20 30 40

【表 6 - 4 4】

	AAGTTGCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGC ATTTCATGGTGGAGGTGAAGGGCGACCT GACTGCCAAGAAAATGGTGCTGGCTTTG CTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCACGGT GCTCTGGAAGTCTGCGTGGTGGTCATTC TCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCT GCAGTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACA GATGGATGCCCTGTGTGGTTCGAGAAGA TTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTG CCCCAGCCTGGGAGGGAAGCCCCAAGCT CTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAG CAGAAAGACCATGGGTTTGAGGTGGCCT CCACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGG CAGTAACCCCGAGCCAGATGCCACCCC GTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGAC CAGCTGGcCGCCATATCTAGTTTGCCCA CACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTC TACTTTCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGG GACCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTG AGACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTG GGCTCACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTC CTGCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGG TGAAAGGGATTTATAAACAGATGCCTGG TTGCTTcagTTTCCTCCGAAAAAACTTT TCTTTAAAACATCAGCTAGCAGAGCC- (T2A)	PVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKL FFIQACGGEQKDHGFEVASTSPED ESPGSNPEPDA TPFQEGLRFTDQLaAISSLPTPSDIF VSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVET LDDIFEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQM PGCFqFLRKKLFFKTSASRA-(T2A)
--	---	---

10

20

30

【表 6 - 4 5】

Fv-iCASP9 ATPF316AVPI -T2A	配列番号 126	配列番号 127
	(Fv-L)- GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTC TTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTT GGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTGT GGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGA ACTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCAC CCGCACTGGCTCCAACATCGACTGTGAG AAGTTGCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGC ATTTTCATGGTGGAGGTGAAGGGCGACCT GACTGCCAAGAAAATGGTGCTGGCTTTG CTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCACGGT GCTCTGGAAGTGTGCGTGGTGGTCATTC TCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCT GCAGTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACA GATGGATGCCCTGTGTCGGTCGAGAAGA TTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTG CCCCAGCCTGGGAGGGAAGCCCAAGCT CTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAG CAGAAAGACCATGGGTTTGAGGTGGCCT CCACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGG CAGTAACCCCGAGCCAGATGCCgtGCCa TCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGACCA GCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCACACA CCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTA CTTTCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGA CCCCAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAG ACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGG CTCACCTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCT GCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTG AAAGGGATTTATAAACAGATGCCTGGTT GCTTTAATTTCTCCGGAATAAACTTTTC TTTAAACATCAGCTAGCAGAGCC-(T2A)	(Fv-L)- VDGFGDVGALSLRGNADLAYILS MEPCGHCLIIINNVNFCRESGLRTRT GSNIDCEKLRRRFSSLHFMVEVKG DLTAKKMVLALLELARQDHGALDC CVVVILSHGCQASHLQFPGAVYGT DGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGK PKLFFIQACGGGEQKDHGFEVASTS PEDESPGSNPEPDAvPiQEGRLRTFD QLDAISSLPTPSDIFVSYSTFPGFV SWRDPKSGSWYVETLDDIFEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQM PGCFNFLRKKLFFKTSASRA-(T2A)

10

20

30

40

【表 6 - 4 6】

Fv-iCASP9 isaqt-T2A	配列番号 128	配列番号 129
	(Fv-L)-	(Fv-L)-
	GTGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTC	VDGFGDVGALES LRGNADLAYILS
	TTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTT	MEPCGHCLIIINNVNFCRESGLRTRT
	GGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTGT	GSNIDCEKLRRRFSS
	GGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGA	LHFMVEVKGDLTAKKMLALLELA
	ACTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCAC	RQDHGALDCCVVVILSHGCQASHL
	CCGCACTGGCTCCAACATCGACTGTGAG	QFPGAVYGT DGC
	AAGTTGCGGCGTGCCTTCTCCTCGCTGC	PVSVEKIVNIFNGTSCPSLGKPKL
	ATTCATGGTGGAGGTGAAGGGCGACCT	FFIQACGGEGKDHGFEVASTSPED
	GACTGCCAAGAAAATGGTGCTGGCTTTG	ESPGSNPEPDA
	CTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCACGGT	TPFQEGLRTFDQLDAISSLPTPSDI
	GCTCTGGA CTGCTGCGTGGTGGTCATTC	FVSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVE
	TCTCTCAGGCTGTCAGGCCAGCCACCT	TLDDIFEQWAH
	GCAGTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACA	SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQM
	GATGGATGCCCTGTGTCGGTCGAGAAGA	PisaqtLRKKLFFKTSASRA-(T2A)
	TTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTG	
	CCCCAGCCTGGGAGGGAAGCCCAAGCT	
	CTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAG	
	CAGAAAGACCATGGGTTTGAGGTGGCCT	
	CCACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGG	
	CAGTAACCCCGAGCCAGATGCCACCCC	
	GTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGAC	
	CAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCCA	
	CACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTC	
	TACTTTCCCAGTTTTGTTTCCTGGAGG	
	GACCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTG	
	AGACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTG	
	GGCTCACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTC	
	CTGCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGG	
	TGAAAGGGATTTATAAACAGATGCCgatat	
	ccgcacagacaCTCCGGAAAAAATTTTCTT	
	TAAACATCAGCTAGCAGAGCC-(T2A)	

【0 4 9 6】

ポリペプチドをコードするプラスミド挿入物の部分的配列は、2 A リンカーによって隔てられた、誘導性カスパーゼー 9 ポリペプチドおよび C D 1 9 に結合するキメラ抗原レセプターをコードする（ここでこの 2 つのカスパーゼー 9 ポリペプチドおよびキメラ抗原レセプターは翻訳の間に分断される）。本明細書で提供されるキメラ抗原レセプターの例は

10

20

30

40

50

、共刺激ポリペプチド（例えば、CD28、4-1BBおよびOX40などが挙げられるが、これらに限定されない）を含めることによってさらに改変され得る。本明細書で提供される誘導性カスパーゼ-9ポリペプチドは、誘導性改変されたカスパーゼ-9ポリペプチド（例えば、本明細書で提供されるものなど）によって置換され得る。

【0497】

【化15】

配列番号 130 FKBPv36

ATGCTGGAGGGAGTGCAGGTGGAGACTATTAGCCCCGGAGATGGCAGAACATTCCCCAA
AAGAGGACAGACTTGCGTCGTGCATTATACTGGAATGCTGGAAGACGGCAAGAAGGTGGA
CAGCAGCCGGGACCGAAACAAGCCCTTCAAGTTCATGCTGGGGAAGCAGGAAGTGATCC
GGGGCTGGGAGGAAGGAGTCGCACAGATGTCAGTGGGACAGAGGGCCAAACTGACTATT
AGCCCAGACTACGCTTATGGAGCAACCGGCCACCCCGGGATCATTCCCCCTCATGCTACA
CTGGTCTTCGATGTGGAGCTGCTGAAGCTGGAA

10

配列番号 131 FKBPv36

MLEGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLDGKKVDSSRDRNKPFKFMLGKQEVIRG
WEEGVAQMSVGQRAKLITSPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLE

20

配列番号 132 リンカー

AGCGGAGGAGGATCCGGA

配列番号 133 リンカー

SGGGSG

配列番号 134 カスパーゼ-9

【化 1 6】

GTGGACGGGTTTGGAGATGTGGGAGCCCTGGAATCCCTGCGGGGCAATGCCGATCTGGC
TTACATCCTGTCTATGGAGCCTTGCGGCCACTGTCTGATCATTAAACAATGTGAACTTCTGC
AGAGAGAGCGGGCTGCGGACCAGAACAGGATCCAATATTGACTGTGAAAAGCTGCGGAG
AAGGTTCTCTAGTCTGCACTTTATGGTCGAGGTGAAAGGCGATCTGACCGCTAAGAAAATG
GTGCTGGCCCTGCTGGAAGTGGCTCGGCAGGACCATGGGGCACTGGATTGCTGCGTGGT
CGTGATCCTGAGTCACGGCTGCCAGGCTTCACATCTGCAGTTCCTGGGGCAGTCTATGG
AACTGACGGCTGTCCAGTCAGCGTGGAGAAGATCGTGAACATCTTCAACGGCACCTCTTG
CCCAAGTCTGGGCGGGAAGCCCAAAGTGTCTTTATTCAGGCCTGTGGAGGCGAGCAGAA
AGATCACGGCTTCGAAGTGGCTAGCACCTCCCCGAGGACGAATCACCTGGAAGCAACC
CTGAGCCAGATGCAACCCCCCTTCCAGGAAGGCCTGAGGACATTTGACCAGCTGGATGCCA
TCTCAAGCCTGCCCACACCTTCTGACATTTTCGTCTCTTACAGTACTTTCCCTGGATTTGTG
AGCTGGCGCGATCCAAAGTCAGGCAGCTGGTACGTGGAGACACTGGACGATATCTTTGAG
CAGTGGGCCCATTCTGAAGACCTGCAGAGTCTGCTGCTGCGAGTGGCCAATGCTGTCTCT
GTGAAGGGGATCTACAAACAGATGCCAGGATGCTTCAACTTTCTGAGAAAGAACTGTTCT
TTAAGACCTCCGCATCTAGGGCC

10

配列番号 135 カスパーゼ-9

VDGFGDVGALSLRGNADLAYILSMEPCGHCLINNVNFCRESGLRTRTGSNIDCEKLRRRFSS
LHFMVEVKGDLTAKKMLALLELARQDHGALDCCVWILSHGCQASHLQFPGAVYGTGCPV
SVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGEQKDHGFEVASTSPEDESPGSNPEPDATPFQE
GLRTFDQLDAISSLPTPSDIFVSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDIFEQWAHSEDLQSLLL
RVANAVSVKGIYKQMPGCFNFLRKKLFFKTSASRA

20

配列番号 136 リンカー

CCGCGG

30

配列番号 137 リンカー

PR

配列番号 138 T2A

GAAGGCCGAGGGAGCCTGCTGACATGTGGCGATGTGGAGGAAAACCCAGGACCA

配列番号 139 T2A

EGRGSLLTCGDVEENPGP

40

配列番号 140 リンカー

CCATGG

【化 17】

配列番号 141 リンカー

PW

配列番号 142 シグナルペプチド

ATGGAGTTTGGACTTTCTTGGTTGTTTTGGTGGCAATTCTGAAGGGTGTCCAGTGTAGCA
GG

配列番号 143 シグナルペプチド

MEFGLSWLFLVAILKGVQCSR

10

配列番号 144 FMC63 可変軽鎖 (抗 CD19)

GACATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCACC
ATCAGTTGCAGGGCAAGTCAGGACATTAGTAAATATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAG
ATGGAAGTGTAAACTCCTGATCTACCATACATCAAGATTACACTCAGGAGTCCCATCAAG
GTTCACTGGCAGTGGGTCTGGAACAGATTATTCTCTCACCATTAGCAACCTGGAGCAAGAA
GATATTGCCACTTACTTTTGCCAACAGGGTAATACGCTTCCGTACACGTTCCGAGGGGGG
ACTAAGTTGGAATAACA

20

配列番号 145 FMC63 可変軽鎖 (抗 CD19)

DIQMTQTTSSLASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSG
SGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEIT

配列番号 146 フレキシブルリンカー

GGCGGAGGAAGCGGAGGTGGGGGC

配列番号 147 フレキシブルリンカー

GGGSGGGG

30

配列番号 148 FMC63 可変重鎖 (抗 CD19)

GAGGTGAAACTGCAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCCTGTCCGT
CACATGCACTGTCTCAGGGGTCTCATTACCCGACTATGGTGTAAGCTGGATTCGCCAGCC
TCCACGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTAATATGGGGTAGTGAAACCACATACTATAA
TTCAGCTCTCAAATCCAGACTGACCATCATCAAGGACAACTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTA
AAAATGAACAGTCTGCAAACTGATGACACAGCCATTTACTACTGTGCCAAACATTATTACTA
CGGTGGTAGCTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

40

【化 1 8】

配列番号 149 FMC63 可変重鎖 (抗 CD19)

EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVWGETTYNSA
LKSRLLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVTVSS

配列番号 150 リンカー

GGATCC

10

配列番号 151 リンカー

GS

配列番号 152 CD34 最小エピトープ

GAACTTCCTACTCAGGGGACTTTCTCAAACGTTAGCACAAACGTAAGT

配列番号 153 CD34 最小エピトープ

ELPTQGTFSNVSTNVS

20

配列番号 154 CD8 α ストリークドメイン

CCCGCCCCAAGACCCCCACACCTGCGCCGACCATTGCTTCTCAACCCCTGAGTTTGAGA
CCCGAGGCCTGCCGGCCAGCTGCCGGCGGGGCCGTGCATACAAGAGGACTCGATTTCG
CTTGCGAC

配列番号 155 CD8 α ストリークドメイン

PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD

30

配列番号 156 CD8 α 膜貫通ドメイン

ATCTATATCTGGGCACCTCTCGCTGGCACCTGTGGAGTCCTTCTGCTCAGCCTGGTTATTA
CTCTGTACTGTAATCACCGGAATCGCCGCCGCGTTTGTAAGTGTCCCAGG

配列番号 157 CD8 α 膜貫通ドメイン

IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRRRVCKCPR

配列番号 158 リンカー

GTCGAC

配列番号 159 リンカー

40

【化 19】

VD

配列番号 160 CD3 ゼータ

AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCT
CTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGG
CCGGGACCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACA
ATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAG
CGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGA
CACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC

10

配列番号 161 CD3 ゼータ

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYN
ELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

Her2/Neuに結合するキメラ抗原レセプターをコードするプラスミド挿入物の例が、以下に提供される。
上記キメラ抗原レセプターは、共刺激ポリペプチド(例えば、CD28、OX40、および4-1BBが
挙げられるが、これらに限定されない)を含めることによってさらに改変され得る。

20

配列番号 162 シグナルペプチド

ATGGAGTTTGGACTTTCTTGTTGTTTTGGTGGCAATTCTGAAGGGTGTCCAGTGTAGCA
GG

配列番号 163 シグナルペプチド

MEFGLSWLFLVAILKGVQCSR

配列番号 164 FRP5 可変軽鎖 (抗 Her2)

GACATCCAATTGACACAATCACACAAATTTCTCTCAACTTCTGTAGGAGACAGAGTGAGCA
TAACCTGCAAAGCATCCCAGGACGTGTACAATGCTGTGGCTTGGTACCAACAGAAGCCTG
GACAATCCCCAAAATTGCTGATTTATTCTGCCTCTAGTAGGTACACTGGGGTACCTTCTCG
GTTTACGGGCTCTGGGTCCGGACCAGATTTACGTTTACAATCAGTTCCGTTCAAGCTGAA
GACCTCGCTGTTTATTTTGGCCAGCAGCACTTCCGAACCCCTTTTACTTTTGGCTCAGGCA
CTAAGTTGGAAATCAAGGCTTTG

30

配列番号 165 FRP5 可変軽鎖 (抗 Her2)

DIQLTQSHKFLSTSVGDRVSITCKASQDVYNAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASSRYTGVPSRFT
GSGSGPDFTFTISSVQAEDLAVYFCQQHFRTPTFGSGTKLEIKAL

40

【化 2 0】

配列番号 166 フレキシブルリンカー

GGCGGAGGAAGCGGAGGTGGGGGC

配列番号 167 フレキシブルリンカー

GGGSGGGG

配列番号 168 FRP5 可変重鎖 (抗 Her2/Neu)

GAAGTCCAATTGCAACAGTCAGGCCCCGAATTGAAAAAGCCCGGCGAAACAGTGAAGATA
TCTTGTAAGCCTCCGGTTACCCTTTTACGAACTATGGAATGAACTGGGTCAAACAAGCCC
CTGGACAGGGATTGAAGTGGATGGGATGGATCAATACATCAACAGGCGAGTCTACCTTCG
CAGATGATTTCAAAGGTCGCTTTGACTTCTCACTGGAGACCAGTGCAAATACCGCCTACCT
TCAGATTAACAATCTTAAAAGCGAGGATATGGCAACCTACTTTTGCGCAAGATGGGAAGTT
TATCACGGGTACGTGCCATACTGGGGACAAGGAACGACAGTGACAGTTAGTAGC

10

配列番号 169 FRP5 可変重鎖 (抗 Her2/Neu)

EVQLQQSGPELKKPGETVKISKASGYPTNYGMNWWKQAPGQGLKWMGWINTSTGESTFA
DDFKGRFDFSLETSANTAYLQINNLSKSEDMATYFCARWEVYHGYVPYWGQGTITVTVSS

20

配列番号 170 リンカー

GGATCC

配列番号 171 リンカー

GS

配列番号 172 CD34 最小エピトープ

GAACTTCCTACTCAGGGGACTTTCTCAAACGTTAGCACAAACGTAAGT

30

配列番号 173 CD34 最小エピトープ

ELPTQGTFSNVSTNVS

配列番号 174 CD8 アルファストーク

CCCGCCCCAAGACCCCCACACCTGCGCCGACCATTGCTTCTCAACCCCTGAGTTTGAGA
CCCGAGGCCTGCCGGCCAGCTGCCGGCGGGGCCGTGCATACAAGAGGACTCGATTTGCG
CTTGCGAC

40

配列番号 175 CD8 アルファストーク

【化 2 1】

PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD

配列番号 176 CD8 アルファ膜貫通領域

ATCTATATCTGGGCACCTCTCGCTGGCACCTGTGGAGTCCTTCTGCTCAGCCTGGTTATTA
CTCTGTACTGTAATCACCGGAATCGCCGCCGCGTTTGTAAGTGCCCAGG

配列番号 177 CD8 アルファ膜貫通領域

IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRRRVCKCPR

10

配列番号 178 リンカー

Ctcgag

配列番号 179 リンカー

LE

配列番号 180 CD3 ゼータ細胞質ドメイン

AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCT
CTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGG
CCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACA
ATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAG
CGCCGGAGGGGCAAGGGGACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGA
CACCTACGACGCCCTTACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC

20

配列番号 181 CD3 ゼータ細胞質ドメイン

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYN
ELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

30

さらなる配列

配列番号 182, CD28 nt

TTCTGGGTACTGGTTGTAGTCGGTGGCGTACTTGCTTGTTATTCTCTTCTTGTTACCGTAG
CCTTCATTATATTCTGGGTCCGATCAAAGCGCTCAAGACTCCTCCATTCCGATTATATGAAC
ATGACACCTCGCCGACCTGGTCCTACACGCAAACATTATCAACCCTACGCACCCCCCGA
GACTTCGCTGCTTATCGATCC

40

配列番号 183, CD28 aa

【化 2 2】

FWLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDF
AAYRS

配列番号 184, OX40 nt

GTTGCCGCCATCCTGGGCCTGGGCCTGGTGTCTGGGGCTGCTGGGCCCCCTGGCCATCCT
GCTGGCCCTGTACCTGCTCCGGGACCAGAGGCTGCCCCCGATGCCACAAAGCCCCCTG
GGGGAGGCAGTTTCCGGACCCCCATCCAAGAGGAGCAGGCCGACGCCCACTCCACCCTG
GCCAAGATC

10

配列番号 185, OX40 aa

VAAILGLGLVLGLLGPLAILLALYLLRRDQRLPPDAHKKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI

配列番号 186, 4-1BB nt

AGTGTAGTTAAAAGAGGAAGAAAAAAGTTGCTGTATATATTTAAACAACCATTTATGAGACC
AGTGCAAACCAACCAAGAAGAAGACGGATGTTTCATGCAGATTCCCAGAAGAAGAAGAAGG
AGGATGTGAATTG

20

配列番号 187, 4-1BB aa

SVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL

【0 4 9 8】

(MyD88 / CD40 キメラ抗原レセプターおよびキメラ刺激分子の発現)

以下の実施例は、本願において提供されるように、MyD88 / CD40 キメラ抗原レセプターおよびキメラ刺激分子に関する組成物および方法を論じる。カスパーゼ-9 ベースの安全スイッチ、およびMyD88 / CD40 キメラ抗原レセプターまたはキメラ刺激分子を発現する細胞におけるその使用に関する組成物および方法もまた、含まれる。

【0 4 9 9】

30

(実施例 11 : MyD88 / CD40 キメラ抗原レセプターのデザインおよび活性)

(MC-CAR 構築物のデザイン)

誘導性MyD88 / CD40 実験からの活性化データに基づいて、従来の内部ドメイン (例えば、CD28 および 4-1BB) の代わりに、CAR 分子におけるMCシグナル伝達の潜在性を試験した。MC (AP1903 結合FKBP12v36 領域なし) を、PSCA. ζの中にサブクローニングして、CD28 内部ドメインの位置を模倣した。レトロウイルスを、3つの構築物の各々に関して生成し、ヒトT細胞を形質導入し、その後、形質導入効率を測定して、PSCA. MC. ζが発現され得ることを実証した。これらCAR 構築物の各々を有するT細胞が、PSCA⁺腫瘍細胞を認識するそれらの能力を保持することを確認するために、6時間の細胞傷害アッセイを行った。これは、Capan-1 標的細胞の溶解を示した。従って、CAR 分子の細胞質領域へのMCの付加は、CAR 発現または標的細胞上の抗原の認識に影響を及ぼさない。

40

【0 5 0 0】

MC共刺激は、CAR改変T細胞におけるT細胞殺滅、増殖および生存を増強する。短期間細胞傷害アッセイにおいて実証されるように、上記3種のCARデザインの各々は、Capan-1 腫瘍細胞を認識および溶解する能力を示した。エフェクターT細胞における細胞溶解エフェクター機能は、腫瘍認識後に予め形成されたグランザイムおよびパーフォリンの放出によって媒介され、CD3 ζを介する活性化は、共刺激の必要性なしにこのプロセスを誘導するために十分である。第1世代CAR⁺T細胞 (例えば、CD3 ζ細胞質領域のみで構築されたCAR) は、腫瘍細胞を溶解し得る ; しかし、生存および増殖は

50

、共刺激の欠如に起因して損なわれる。よって、CD28もしくは4-1BB共刺激ドメイン構築物の付加は、CAR T細胞の生存および増殖の能力を有意に改善した。

【0501】

MCが生存および増殖に影響を及ぼす共刺激シグナルを同様に提供し得るかどうかを試験するために、共培養アッセイを、高い腫瘍：T細胞比（1：1、1：5、1：10 T細胞 対 腫瘍細胞）の下で、PSCA⁺ Capan-1腫瘍細胞で行った。T細胞および腫瘍細胞の数が等しかった（1：1）場合、非形質導入コントロールT細胞と比べて全3種の構築物からCapan-1-GFP細胞の効率的な殺滅が存在した。しかし、CAR T細胞を、多数の腫瘍細胞（1：10）でチャレンジした場合、CAR分子がMCもしくはCD28のいずれかを含んだ場合のみ、Capan-1-GFP腫瘍細胞の有意な減少が存在した。

10

【0502】

これら2種のCARによる共刺激の機構をさらに試験するために、細胞の生存率および増殖をアッセイした。MCもしくはCD28を含むPSCA CARは、非形質導入T細胞およびCD3ζのみCARと比べて改善された生存率を示し、PSCA、MC、ζおよびPSCA、28、ζによるT細胞増殖は、有意に増強された。他の群は、共刺激シグナル伝達領域を含むCARがT細胞の重要な生存および成長分子であるIL-2（4）を生成することを示したので、ELISAを、Capan-1腫瘍細胞でチャレンジしたCAR T細胞に由来する上清に対して行った。PSCA、28、ζは、高レベルのIL-2を生成したが、PSCA、MC、ζシグナル伝達はまた、有意なレベルのIL-2（これは、これらアッセイにおいて観察されたT細胞生存および増殖に寄与するようである）を生成した。さらに、CAR改変T細胞によるIL-6生成を試験した。なぜならIL-6は、CAR改変T細胞の効力および有効性において重要なサイトカインとして関与している（15）からである。IL-2とは対照的に、PSCA、MC、ζは、初代T細胞におけるiMC活性化がIL-6を誘導するという観察と一致して、PSCA、28、ζと比べてより高レベルのIL-6を生成した。まとめると、これらデータは、MCを介する共刺激が、CD28のものに類似の効果を生じ、それによって、腫瘍細胞認識後に、CAR改変T細胞がIL-2およびIL-6を生成する（これは、T細胞生存を増強する）ことを示唆する。

20

【0503】

CAR改変T細胞を使用する免疫療法は、種々の悪性腫瘍の処置に関して大いに有望である。CARは、最初に単一のシグナル伝達ドメイン（例えば、CD3ζ）を用いてデザインされた（16～19）一方で、CAR免疫療法の実施可能性を評価する臨床試験は、限られた臨床上の利益を示した（1, 2, 20, 21）。これは、腫瘍認識後にT細胞の不完全な活性化（これは、インビボで制限された持続性および増殖をもたらす）に主に起因した（22）。この欠陥に対処するために、CARを、別の刺激ドメイン（しばしば、CD28、4-1BB、OX40、ICOSおよびDAP10を含むT細胞共刺激分子の細胞質部分に由来した）（4, 23～30）を含むように操作した。これは、CAR T細胞が、標的抗原の結合の際に適切な共刺激を受けることを可能にする。実際に、難治性急性リンパ芽球性白血病（ALL）の処置ための、CD28または4-1BBシグナル伝達ドメインを有する抗CD19 CARで行った臨床試験は、養子移入の後に、印象的なT細胞持続性、増殖および一連の腫瘍殺滅を実証した（6～8）。

30

40

【0504】

CD28共刺激は、CD19⁺リンパ腫の処置に関して明確な臨床上の利点を提供する。Savoldoおよび共同研究者らは、第1世代CAR（CD19、ζ）および第2世代CAR（CD19、28、ζ）を比較するCAR-T細胞臨床試験を行ったところ、養子移入後にCD28がT細胞持続性および増殖を増強することを見出した（31）。第2世代CARの主な機能のうちの1つは、CD3ζによるNFAT転写因子の活性化（シグナル1）、およびCD28または4-1BBによるNF-κBの活性化（シグナル2）を介してT細胞の生存および成長を支持するIL-2を生成する能力である（32）。これ

50

は、NF- κ Bを同様に活性化した他の分子が、CAR分子内のCD3 ζ 鎖と対になり得ることを示唆した。本発明者らのアプローチは、樹状細胞(DC)ワクチンのアジュバントとして本来は開発されたT細胞共刺激分子を使用した(12, 33)。DCの完全な活性化またはライセンス供与のために、TLRシグナル伝達は、TNFファミリーメンバー、CD40(これは、抗原でプライミングされたCD4⁺T細胞上のCD40Lと相互作用する)のアップレギュレーションに通常は関与する。iMCは、DCにおいてNF- κ Bの強力なアクチベーターであったので、MyD88およびCD40を組み込んだCARでのT細胞の形質導入は、T細胞への必要とされた共刺激(シグナル2)を提供し得、それらの生存および増殖を増強し得る。

【0505】

一連の実験を行って、MyD88、CD40または両方の成分が、iMC分子を使用する最適なT細胞刺激に必要とされるかどうかを試験した。顕著なことには、MyD88もCD40も、サイトカイン生成(IL-2およびIL-6)によって測定される場合にはT細胞活性化を十分に誘導できないが、単一の融合タンパク質として組み合わされた場合には、強力なT細胞活性化を誘導し得ることが見出された。MCを組み込むPSCA-CARを構築し、その後、第1世代(PSCA- ζ)CARおよび第2世代(PSCA-28- ζ)CARに対してその機能を比較した。ここでMCは、CAR-T細胞の生存および増殖を、CD28内部ドメインと匹敵するレベルへと増強することが見出された。このことは、共刺激が十分であったことを示唆した。PSCA-MC- ζ CAR形質導入T細胞は、PSCA-28- ζ より低レベルのIL-2を生成した一方で、分泌レベルは、非形質導入T細胞およびPSCA- ζ CARで形質導入したT細胞より有意に高かった。他方で、PSCA-MC- ζ CAR形質導入T細胞は、PSCA-28- ζ 形質導入T細胞より有意に高いレベルのIL-6(T細胞活性化と関連する重要なサイトカイン)を分泌した。このことは、MCが、インビボで改善された腫瘍細胞殺滅へと翻訳され得るCAR機能に特有の特性を付与することを示した。関連するシグナル伝達経路の分子分析がなお行われる必要はある一方で、これら実験は、MCが、細胞外CARドメインによる抗原認識後にNF- κ B(シグナル2)を活性化し得ることを示す。

【0506】

MC-CARのデザインおよび機能検証。CD3 ζ のみ、またはCD28とともにもしくはMC内部ドメインとともに組み込む3種のPSCA-CAR構築物をデザインした。形質導入効率(パーセンテージ)を、抗CAR-APC(IgG1-CH₂CH₃ドメインを認識する)によって測定した。C)PSCA-MC- ζ CARでのT細胞の高い形質導入効率を実証するフローサイトメトリー分析。D)1:1T細胞対腫瘍細胞の比での6時間のLDH放出アッセイにおける、CAR改変T細胞によるPSCA⁺Capan-1腫瘍細胞の特異的溶解の分析。*は0.05未満のp値を示す。

【0507】

MC-CAR改変T細胞は、長期間共培養アッセイにおいてCapan-1腫瘍細胞を殺滅する。1:1比において培養して7日後の、Capan-1-GFP腫瘍細胞とともに培養したCAR改変T細胞および非形質導入T細胞のフローサイトメトリー分析。1:1および1:10のT細胞対腫瘍細胞比での共培養アッセイにおけるフローサイトメトリーによる生存性GFP⁺細胞の定量。

【0508】

MCおよびCD28共刺激は、T細胞生存、増殖およびサイトカイン生成を高める。1:10のT細胞対腫瘍細胞共培養アッセイから単離されたT細胞を、細胞生存率および細胞数に関してアッセイして、腫瘍細胞曝露に応じた生存および増殖を評価した。共培養アッセイからの上清を、ELISAによってIL-2およびIL-6生成に関してその後測定した。

【0509】

誘導性共刺激分子のデザインおよびT細胞活性化に対する効果。FKBPv36-AP1903-結合ドメイン(Fv', Fv)のみ、またはMyD88、CD40もしくはM

10

20

30

40

50

MyD88/CD40融合タンパク質とともに組み込む4種のベクターを、デザインした。CD3⁺CD19⁺フローサイトメトリー分析を使用する初代活性化T細胞の形質導入効率。10nM AP1903ありおよびなしでの活性化後の改変されたT細胞のIFN- γ 生成の分析。10nM AP1903ありおよびなしでの活性化後の改変されたT細胞のIL-6生成の分析。*は0.05未満のp値を示す。

【0510】

生存および成長の利点とは別に、MC誘導共刺激はまた、CAR改変T細胞にさらなる機能を提供し得る。Medzhitovおよび共同研究者らは近年、MyD88シグナル伝達が、Th1およびTh17の両方の応答にとって必須であり、それがIL-1を介して作用して、CD4⁺T細胞を調節性T細胞(Treg)駆動阻害に対して不応性にすることを実証した(34)。iMCでの実験は、IL-1 α および β が、AP1903活性化後に分泌されることを示す。さらに、Martinらは、Ras、PI3KおよびプロテインキナーゼCを介するCD8⁺T細胞におけるCD40シグナル伝達が、CD4⁺CD25⁺Treg細胞を溶解する細胞傷害性メディエーターであるグランザイムおよびパーフォリンのNF- κ B依存性誘導を生じることを実証した(35)。従って、MyD88およびCD40共活性化は、CAR-T細胞をTreg細胞の免疫抑制効果(固形腫瘍および他のタイプのがんの処置において決定的に重要であり得る機能)に抵抗性にし得る。

【0511】

まとめると、MCは、CAR分子へと組み込まれ得、レトロウイルスで形質導入された初代T細胞は、明確な毒性またはCAR安定性の問題なしに、PSCA-MC- ζ を発現し得る。さらに、MCは、類似の共刺激をCD28の共刺激に提供するのである。ここで形質導入されたT細胞は、第1世代CARで形質導入されたT細胞と比べて改善された生存率、増殖および腫瘍殺滅を示す。MCが、CARにさらなる利益(例えば、Treg細胞の阻害性効果に対する耐性)を付加するかどうかを決定するためのさらなる実験は、考慮され得る。

【0512】

(実施例12:参考文献)

以下の参考文献は、例えば、実施例11におけるものを含め、引用されるか、または関連し得るさらなる情報を提供する。

【0513】

1. Till BG, Jensen MC, Wang J, et al: CD20-specific adoptive immunotherapy for lymphoma using a chimeric antigen receptor with both CD28 and 4-1BB domains: pilot clinical trial results. Blood 119:3940-50, 2012.
2. Pule MA, Savoldo B, Myers GD, et al: Virus-specific T cells engineered to coexpress tumor-specific receptors: persistence and antitumor activity in individuals with neuroblastoma. Nat Med 14:1264-70, 2008.
3. Kershaw MH, Westwood JA, Parker LL, et al: A phase I study on adoptive immunotherapy using gene-modified T cells for ovarian cancer. Clin Cancer Res 12:6106-15, 2006.
4. Carpenito C, Milone MC, Hassan R, et al: Control of large, established tumor xenografts with genetically retargeted human T cells containing CD28 and CD137 domains. Proc Natl Acad Sci U S A 106:3360-5, 2009.
5. Song DG, Ye Q, Poussin M, et al: CD27 costimulation augments the survival and antitumor activity of redirected human T cells in vivo. Blood 119:696-706, 2012.
6. Kalos M, Levine BL, Porter DL, et al: T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory

10

20

30

40

50

- in patients with advanced leukemia. *Sci Transl Med* 3:95ra73, 2011.
7. Porter DL, Levine BL, Kalos M, et al: Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med* 365:725-33, 2011.
 8. Brentjens RJ, Davila ML, Riviere I, et al: CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med* 5:177ra38, 2013.
 9. Pule MA, Straathof KC, Dotti G, et al: A chimeric T cell antigen receptor that augments cytokine release and supports clonal expansion of primary human T cells. *Mol Ther* 12:933-41, 2005. 10
 10. Finney HM, Akbar AN, Lawson AD: Activation of resting human primary T cells with chimeric receptors: costimulation from CD28, inducible costimulator, CD134, and CD137 in series with signals from the TCR zeta chain. *J Immunol* 172:104-13, 2004.
 11. Guedan S, Chen X, Madar A, et al: ICOS-based chimeric antigen receptors program bipolar TH17/TH1 cells. *Blood*, 2014.
 12. Narayanan P, Lapteva N, Seethammagari M, et al: A composite MyD88/CD40 switch synergistically activates mouse and human dendritic cells for enhanced antitumor efficacy. *J Clin Invest* 121:1524-34, 2011.
 13. Anurathapan U, Chan RC, Hindi HF, et al: Kinetics of tumor destruction by chimeric antigen receptor-modified T cells. *Mol Ther* 22:623-33, 2014. 20
 14. Craddock JA, Lu A, Bear A, et al: Enhanced tumor trafficking of GD2 chimeric antigen receptor T cells by expression of the chemokine receptor CCR2b. *J Immunother* 33:780-8, 2010.
 15. Lee DW, Gardner R, Porter DL, et al: Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome. *Blood* 124:188-95, 2014.
 16. Becker ML, Near R, Mudgett-Hunter M, et al: Expression of a hybrid immunoglobulin-T cell receptor protein in transgenic mice. *Cell* 58:911-21, 1989. 30
 17. Gorman J, Gomez SM, Segesman KD, et al: Chimeric immunoglobulin-T cell receptor proteins form functional receptors: implications for T cell receptor complex formation and activation. *Cell* 60:929-39, 1990.
 18. Gross G, Waks T, Eshhar Z: Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:10024-8, 1989.
 19. Kuwana Y, Asakura Y, Utsunomiya N, et al: Expression of chimeric receptor composed of immunoglobulin-derived V regions and T-cell receptor-derived C regions. *Biochem Biophys Res Commun* 149:960-8, 1987. 40
 20. Jensen MC, Popplewell L, Cooper LJ, et al: Antitransgene rejection responses contribute to attenuated persistence of adoptively transferred CD20/CD19-specific chimeric antigen receptor redirected T cells in humans. *Biol Blood Marrow Transplant* 16:1245-56, 2010.
 21. Park JR, Digiusto DL, Slovak M, et al: Adoptive transfer of chimeric antigen receptor re-directed cytolytic T lymphocyte clones in patients with neuroblastoma. *Mol Ther* 15:825-33, 2007.
 22. Ramos CA, Dotti G: Chimeric antigen receptor (CAR)-engineered lymphocytes for cancer therapy. *Expert Opin Biol Ther* 11:855-73, 2011.
 23. Finney HM, Lawson AD, Bebbington CR, et al: Chimeric receptors 50

providing both primary and costimulatory signaling in T cells from a single gene product. *J Immunol* 161:2791-7, 1998.

24. Hombach A, Wieczarkowicz A, Marquardt T, et al: Tumor-specific T cell activation by recombinant immunoreceptors: CD3 zeta signaling and CD28 costimulation are simultaneously required for efficient IL-2 secretion and can be integrated into one combined CD28/CD3 zeta signaling receptor molecule. *J Immunol* 167:6123-31, 2001.

25. Maher J, Brentjens RJ, Gunset G, et al: Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCRzeta /CD28 receptor. *Nat Biotechnol* 20:70-5, 2002. 10

26. Imai C, Mihara K, Andreansky M, et al: Chimeric receptors with 4-1BB signaling capacity provoke potent cytotoxicity against acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 18:676-84, 2004.

27. Wang J, Jensen M, Lin Y, et al: Optimizing adoptive polyclonal T cell immunotherapy of lymphomas, using a chimeric T cell receptor possessing CD28 and CD137 costimulatory domains. *Hum Gene Ther* 18:712-25, 2007.

28. Zhao Y, Wang QJ, Yang S, et al: A herceptin-based chimeric antigen receptor with modified signaling domains leads to enhanced survival of transduced T lymphocytes and antitumor activity. *J Immunol* 183:5563-74, 2009. 20

29. Milone MC, Fish JD, Carpenito C, et al: Chimeric receptors containing CD137 signal transduction domains mediate enhanced survival of T cells and increased antileukemic efficacy in vivo. *Mol Ther* 17:1453-64, 2009.

30. Yvon E, Del Vecchio M, Savoldo B, et al: Immunotherapy of metastatic melanoma using genetically engineered GD2-specific T cells. *Clin Cancer Res* 15:5852-60, 2009.

31. Savoldo B, Ramos CA, Liu E, et al: CD28 costimulation improves expansion and persistence of chimeric antigen receptor-modified T cells in lymphoma patients. *J Clin Invest* 121:1822-6, 2011. 30

32. Kalinski P, Hilkens CM, Wierenga EA, et al: T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol Today* 20:561-7, 1999.

33. Kemnade JO, Seethammagari M, Narayanan P, et al: Off-the-shelf Adenoviral-mediated Immunotherapy via Bicistronic Expression of Tumor Antigen and iMyD88/CD40 Adjuvant. *Mol Ther*, 2012.

34. Schenten D, Nish SA, Yu S, et al: Signaling through the adaptor molecule MyD88 in CD4⁺ T cells is required to overcome suppression by regulatory T cells. *Immunity* 40:78-90, 2014. 40

35. Martin S, Pahari S, Sudan R, et al: CD40 signaling in CD8⁺CD40⁺ T cells turns on contra-T regulatory cell functions. *J Immunol* 184:5510-8, 2010

【0514】

(実施例13: MC共刺激は、CD19 CARの機能および増殖を増強する)

CD19抗原を認識する抗原認識部分を使用する、本明細書で論じられるものに類似の実験が提供される。本明細書で提供されるベクターは、CD19⁺腫瘍細胞を標的化するMyD88/CD40 CAR構築物(これは、誘導性カスパーゼ9安全スイッチも組み込む)を構築するために改変され得ることは、理解される。

【0515】

MC共刺激が、他の抗原を標的化するCARにおいて機能するかどうかを試験するために、T細胞を、CD19. ζまたはCD19. MC. ζのいずれかで改変した。改変された細胞のCD19+ バーキットリンパ腫細胞株 (RajiおよびDaudi) に対する細胞傷害、活性化および生存をアッセイした。共培養アッセイにおいて、いずれかのCARで形質導入したT細胞は、1:1程度の低さのエフェクター対標的比でCD19+ Raji細胞の殺滅を示した。しかし、共培養アッセイからのサイトカイン生成の分析は、CD19. MC. ζ形質導入T細胞が、CD19. ζと比べてより高レベルのIL-2およびIL-6を生成することを示した。これは、iMCおよびMCシグナル伝達ドメインを含むPSCA CARで観察された共刺激効果と一致する。さらに、CD19. MC. ζで形質導入したT細胞は、Raji腫瘍細胞による活性化後に増強された増殖を示した。これらデータは、CAR分子におけるMCシグナル伝達が、腫瘍細胞上で発現される標的抗原へのライゲーション後に、T細胞活性化、生存および増殖を改善することを実証する先の実験を裏付ける。

10

【0516】

pBP0526-SFG. iCasp9wt. 2A. CD19scFv. CD34e. CD8stm. MC. ゼータ

【化23】

配列番号 116 FKBPv36

ATGCTGGAGGGAGTGCAGGTGGAGACTATTAGCCCCGGAGATGGCAGAACATTCCCCAA
AAGAGGACAGACTTGCCTCGTGCATTATACTGGAATGCTGGAAGACGGCAAGAAGGTGGA
CAGCAGCCGGGACCGAAACAAGCCCTTCAAGTTCATGCTGGGGAAGCAGGAAGTGATCC
GGGGCTGGGAGGAAGGAGTCGCACAGATGTCACTGGGACAGAGGGCCAACTGACTATT

20

【化 2 4】

AGCCCAGACTACGCTTATGGAGCAACCGGCCACCCCGGGATCATTCCCCCTCATGCTACA
CTGGTCTTCGATGTGGAGCTGCTGAAGCTGGAA

配列番号 117 FKBPv36

MLEGVQVETISPGDGRTFPRGQTCVVHYTGMLDGGKKVDSSDRNKPFFKMLGKQEVIRG
WEEGVAQMSVGQRAKLITSPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKE

配列番号 118 リンカー

AGCGGAGGAGGATCCGGA

10

配列番号 119 リンカー

SGGGSG

配列番号 120 カスパーゼ-9

GTGGACGGGTTTGGAGATGTGGGAGCCCTGGAATCCCTGCGGGGCAATGCCGATCTGGC
TTACATCCTGTCTATGGAGCCTTGCGGCCACTGTCTGATCATTAAACAATGTGAACTTCTGC
AGAGAGAGCGGGCTGCGGACCAGAACAGGATCCAATATTGACTGTGAAAAGCTGCGGAG
AAGGTTCTCTAGTCTGCACTTTATGGTCGAGGTGAAAGGCGATCTGACCGCTAAGAAAATG
GTGCTGGCCCTGCTGGAAGTGGCTCGGCAGGACCATGGGGCACTGGATTGCTGCGTGGT
CGTGATCCTGAGTCACGGCTGCCAGGCTTCACATCTGCAGTTCCTGGGGCAGTCTATGG
AACTGACGGCTGTCCAGTCAGCGTGGAGAAGATCGTGAACATCTTCAACGGCACCTCTTG
CCCAAGTCTGGGCGGGAAGCCCAAAGTGTCTTTATTTCAGGCCTGTGGAGGCGAGCAGAA
AGATCACGGCTTCGAAGTGGCTAGCACCTCCCCGAGGACGAATCACCTGGAAGCAACC
CTGAGCCAGATGCAACCCCTTCCAGGAAGGCCTGAGGACATTTGACCAGCTGGATGCCA
TCTCAAGCCTGCCACACCTTCTGACATTTTCGTCTCTTACAGTACTTTCCCTGGATTTGTG
AGCTGGCGCGATCCAAAGTCAGGCAGCTGGTACGTGGAGACACTGGACGATATCTTTGAG
CAGTGGGCCCATTCTGAAGACCTGCAGAGTCTGCTGCTGCGAGTGGCCAATGCTGTCTCT
GTGAAGGGGATCTACAAACAGATGCCAGGATGCTTCAACTTTCTGAGAAAGAACTGTTCT
TTAAGACCTCCGCATCTAGGGCC

20

30

配列番号 121 カスパーゼ-9

VDGFGDVGALES LRGNADLAYILSMEPCGHCLINN VNF CRESGLRTRTGSNIDCEKLRRRFSS
LHFMVEVKGDLTAKKMLALLELARQDHGALDCCVWILSHGCQASHLQFPGAVYGTGCPV
SVEKIVNIFNGTSCPSLGKPKLFFIQACGGEQKDHGFEVASTPEDESPGSNPEPDATPFQE
GLRTFDQLDAISSLPTPSDIFVSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDIFEQWAHSEDLQSLLL
RVANAVSVKGIYKQMPGCFNFLRKKLFFKTSASRA

40

【化 2 5】

配列番号 122 リンカー
CCGCGG

配列番号 123 リンカー
PR

配列番号 124 T2A
GAAGGCCGAGGGAGCCTGCTGACATGTGGCGATGTGGAGGAAAACCCAGGACCA

10

配列番号 125 T2A
EGRGSLLTCGDVEENPGP

配列番号 126 リンカー
CCATGG

配列番号 127 リンカー
PW

20

配列番号 128 シグナルペプチド
ATGGAGTTTGGACTTTCTTGGTTGTTTTGGTGGCAATTCTGAAGGGTGTCCAGTGTAGCA
GG

配列番号 129 シグナルペプチド
MEFGLSWLFLVAILKGVQCSR

配列番号 130 FMC63 可変軽鎖 (抗 CD19)
GACATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCACC
ATCAGTTGCAGGGCAAGTCAGGACATTAGTAAATATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAG
ATGGAAGTGTAAACTCCTGATCTACCATACATCAAGATTACACTCAGGAGTCCCATCAAG
GTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGATTATTCTCTCACCATTAGCAACCTGGAGCAAGAA
GATATTGCCACTTACTTTTGCCAACAGGGTAATACGCTTCCGTACACGTTCCGAGGGGGG
ACTAAGTTGGAAATAACA

30

配列番号 131 FMC63 可変軽鎖 (抗 CD19)
DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSG
SGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEIT

40

【化 2 6】

配列番号 132 フレキシブルリンカー

GGCGGAGGAAGCGGAGGTGGGGGC

配列番号 133 フレキシブルリンカー

GGGSGGGG

配列番号 134 FMC63 可変重鎖 (抗 CD19)

GAGGTGAACTGCAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCCTGTCCGT
CACATGCACTGTCTCAGGGGTCTCATTACCCGACTATGGTGTAAAGCTGGATTCGCCAGCC
TCCACGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTAATATGGGGTAGTGAAACCACATACTATAA
TTCAGCTCTCAAATCCAGACTGACCATCATCAAGGACAACTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTA
AAAATGAACAGTCTGCAAACTGATGACACAGCCATTTACTACTGTGCCAAACATTATTACTA
CGGTGGTAGCTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

10

配列番号 135 FMC63 可変重鎖 (抗 CD19)

EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVWLGSETTYYN
LSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVTVSS

20

配列番号 136 リンカー

GGATCC

配列番号 137 リンカー

GS

配列番号 138 CD34 最小エピトープ

GAACTTCCTACTCAGGGGACTTTCTCAAACGTTAGCACAAACGTAAGT

30

配列番号 139 CD34 最小エピトープ

ELPTQGTFSNVSTNVS

配列番号 140 CD8 α ストックドメイン

CCCGCCCCAAGACCCCCACACCTGCGCCGACCATTGCTTCTCAACCCCTGAGTTTGAGA
CCCGAGGCCTGCCGGCCAGCTGCCGGCGGGGCCGTGCATACAAGAGGACTCGATTTGCG
CTTGCGAC

40

配列番号 141 CD8 α ストックドメイン

PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD

【化 27】

配列番号 142 CD8 α 膜貫通ドメイン

ATCTATATCTGGGCACCTCTCGCTGGCACCTGTGGAGTCCTTCTGCTCAGCCTGGTTATTA
CTCTGTACTGTAATCACCGGAATCGCCGCCGCGTTTGTAAAGTGTCCCAGG

配列番号 143 CD8 α 膜貫通ドメイン

IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRRRVCKCPR

配列番号 144 リンカー

GTCGAC

配列番号 145 リンカー

VD

配列番号 146 TIRドメインを欠いている短縮型MyD88

ATGGCCGCTGGGGGCCCCAGGCGCCGGATCAGCTGCTCCCGTATCTTCTACTTCTTCTTTG
CCGCTGGCTGCTCTGAACATGCGCGTGAGAAGACGCCTCTCCCTGTTCTTAACGTTTCGC
ACACAAGTCGCTGCCGATTGGACCGCCCTTGCCGAAGAAATGGACTTTGAATACCTGGAA
ATTAGACAACCTTGAAACACAGGCCGACCCCACTGGCAGACTCCTGGACGCATGGCAGGGA
AGACCTGGTGCAAGCGTTGGACGGCTCCTGGATCTCCTGACAAAACCTGGGACGCGACGA
CGTACTGCTTGAACCTCGGACCTAGCATTGAAGAAGACTGCCAAAAATATATCCTGAAACAA
CAACAAGAAGAAGCCGAAAAACCTCTCCAAGTCGCAGCAGTGGACTCATCAGTACCCCGA
ACAGCTGAGCTTGCTGGGATTACTACACTCGACGACCCACTCGGACATATGCCTGAAAGA
TTCGACGCTTTCATTTGCTATTGCCCCTCTGACATA

配列番号 147 TIRドメインを欠いている短縮型MyD88

MAAGGPGAGSAAPVSSSSLPLAALNMRVRRRLSLFLNVRTQVAADWTALAEEMDFEYLEIR
QLETQADPTGRLLDAWQGRPGASVGRLLDLLTKLGRDDVLLELGPSIEEDCQKYILKQQQEEA
EKPLQVAAVDSSVPRTAELAGITTLDDPLGHMPERFDFICYCPSDI

配列番号 148 細胞外ドメインなしのCD40

AAGAAAGTTGCAAAGAAACCCACAAATAAAGCCCCACACCCTAAACAGGAACCCCAAGAA
ATCAATTTCCCAGATGATCTCCCTGGATCTAATACTGCCGCCCGGTCCAAGAAACCCTGC
ATGGTTGCCAGCCTGTCACCCAAGAGGACGGAAAAGAATCACGGATTAGCGTACAAGAGA
GACAA

配列番号 149 細胞外ドメインなしのCD40

10

20

30

40

【化 2 8】

KKVAKKPTNKAPHPKQEPQEINFPDDLPGSNTAAPVQETLHGCQPVTQEDGKESRISVQERQ

配列番号 150 CD3 ゼータ

AGAGTGAAGTTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCT
CTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGG
CCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCCTCAGGAAGGCCTGTACA
ATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAG
CGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGA
CACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC

10

配列番号 151 CD3 ゼータ

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYN
ELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

【0 5 1 7】

(実施例 1 4 : M y D 8 8 / C D 4 0 キメラ抗原レセプターおよび誘導性カスパーゼー 9 ポリペプチドを共発現する T 細胞のサイトカイン生成)

20

種々のキメラ抗原レセプター構築物を作製して、抗原への曝露後の形質導入 T 細胞のサイトカイン生成を比較した。上記キメラ抗原レセプター構築物は全て、C D 1 9 に結合される抗原認識領域を有した。本明細書で提供されるベクターが、誘導性カスパーゼー 9 安全スイッチをも組み込む C A R 構築物を構築するために改変され得ることは、理解される。この C A R 構築物が F R B ドメインをさらに含み得ることは、さらに理解される。

【0 5 1 8】

(実施例 1 5 : H e r 2 + 腫瘍細胞を標的化するための M y D 8 8 / C D 4 0 C A R 構築物の例)

本明細書で提供されるベクターが H e r 2 + 腫瘍細胞を標的とする M y D 8 8 / C D 4 0 C A R 構築物 (これは、誘導性カスパーゼー 9 安全スイッチをも組み込む) を構築するために改変され得ることは、理解される。上記 C A R 構築物が F R B ドメインをさらに含み得ることは、さらに理解される。

30

SFG-Her2scFv.CD34e.CD8stm.MC.ゼータ配列

【化 2 9】

配列番号 152 シグナルペプチド

ATGGAGTTTGGACTTTCTTGTTGTTTTTGGTGGCAATTCTGAAGGGTGTCCAGTGTAGCA
GG

40

配列番号 153 シグナルペプチド

【化 3 0】

MEFGLSWLFLVAILKGVQCSR

配列番号 154 FRP5 可変軽鎖 (抗 Her2)

GACATCCAATTGACACAATCACACAAATTTCTCTCAACTTCTGTAGGAGACAGAGTGAGCA
TAACCTGCAAAGCATCCCAGGACGTGTACAATGCTGTGGCTTGGTACCAACAGAAGCCTG
GACAATCCCCAAAATTGCTGATTTATTCTGCCTCTAGTAGGTACACTGGGGTACCTTCTCG
GTTTACGGGCTCTGGGTCCGGACCAGATTTACGTTTACAATCAGTTCCGTTCAAGCTGAA
GACCTCGCTGTTTATTTTTGCCAGCAGCACTTCCGAACCCCTTTTACTTTTGGCTCAGGCA
CTAAGTTGGAATCAAGGCTTTG

10

配列番号 155 FRP5 可変軽鎖 (抗 Her2)

DIQLTQSHKFLSTSVGDRVSITCKASQDVYNAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASSRYTGVP SRFT
GSGSGPDFFTFTISSVQAEDLAVYFCQQHFRTPFTFGSGTKLEIKAL

配列番号 156 フレキシブルリンカー

GGCGGAGGAAGCGGAGGTGGGGGC

20

配列番号 157 フレキシブルリンカー

GGGSGGGG

配列番号 158 FRP5 可変重鎖 (抗 Her2/Neu)

GAAGTCCAATTGCAACAGTCAGGCCCGAATTGAAAAAGCCCGCGAAACAGTGAAGATA
TCTTGTAAGCCTCCGGTTACCCTTTTACGAACTATGGAATGAACTGGGTCAAACAAGCCC
CTGGACAGGGATTGAAGTGGATGGGATGGATCAATACATCAACAGGCGAGTCTACCTTCG
CAGATGATTTCAAAGGTCGCTTTGACTTCTCACTGGAGACCAGTGCAAATACCGCCTACCT
TCAGATTAACAATCTTAAAAGCGAGGATATGGCAACCTACTTTTGC GCAAGATGGGAAGTT
TATCACGGGTACGTGCCATACTGGGGACAAGGAACGACAGTGACAGTTAGTAGC

30

配列番号 159 FRP5 可変重鎖 (抗 Her2/Neu)

EVQLQQSGPELKKPGETVKISCKASGYPFTNYGMNWKQAPGQGLKWMGWINTSTGESTFA
DDFKGRFDFSLETSANTAYLQINNLSKSEDMATYFCARWEVYHGYVPYWGQGTTTVTVSS

配列番号 160 リンカー

GGATCC

40

配列番号 161 リンカー

GS

【化 3 1】

配列番号 162 CD34 最小エピトープ

GAACTTCCTACTCAGGGGACTTTCTCAAACGTTAGCACAAACGTAAGT

配列番号 163 CD34 最小エピトープ

ELPTQGTFSTNVSTNVS

配列番号 164 CD8 アルファストーク

CCCGCCCCAAGACCCCCACACCTGCGCCGACCATTGCTTCTCAACCCCTGAGTTTGAGA
CCCGAGGCCTGCCGCGCAGCTGCCGCGCGGGCCGTGCATACAAGAGGACTCGATTTGCG
CTTGCGAC

10

配列番号 165 CD8 アルファストーク

PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD

配列番号 166 CD8 アルファ膜貫通領域

ATCTATATCTGGGCACCTCTCGCTGGCACCTGTGGAGTCCTTCTGCTCAGCCTGGTTATTA
CTCTGTACTGTAATCACCGGAATCGCCGCCGCGTTTGTAAGTGTCCCAGG

20

配列番号 167 CD8 アルファ膜貫通領域

IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRRRVCKCPR

配列番号 168 リンカー

Ctcgag

配列番号 169 リンカー

LE

30

配列番号 170 短縮型 MyD88

ATGGCCGCTGGGGGCCAGGCGCCGGATCAGCTGCTCCCGTATCTTCTACTTCTTCTTTG
CCGCTGGCTGCTCTGAACATGCGCGTGAGAAGACGCCTCTCCCTGTTCCCTTAACGTTGCG
ACACAAGTCGCTGCCGATTGGACCGCCCTTGCCGAAGAAATGGACTTTGAATACCTGGAA
ATTAGACAACTTGAAACACAGGCCGACCCCACTGGCAGACTCCTGGACGCATGGCAGGGA
AGACCTGGTGCAAGCGTTGGACGGCTCCTGGATCTCCTGACAAAATGGGACGCGACGA
CGTACTGCTTGAACCTCGGACCTAGCATTGAAGAAGACTGCCAAAAATATATCCTGAAACAA
CAACAAGAAGAAGCCGAAAAACCTCTCCAAGTCGCAGCAGTGGACTCATCAGTACCCCGA

40

【化 3 2】

ACAGCTGAGCTTGCTGGGATTACTACACTCGACGACCCACTCGGACATATGCCTGAAAGA
TTCGACGCTTTCATTTGCTATTGCCCCCTCTGACATA

配列番号 171 短縮型 MyD88

MAAGGPGAGSAAPVSSTSSLPLAALNMRVRRRLSLFLNVRTQVAADWTALAEEMDFEYLEIR
QLETQADPTGRLLDAWQGRPGASVGRLLDLLTKLGRDDVLLELGPSIEEDCQKYILKQQQEEA
EKPLQVAAVDSSVPRTAELAGITTLDPLGHMPERFDFICYCPDI

10

配列番号 172 CD40 細胞質ドメイン

AAGAAAGTTGCAAAGAAACCCACAAATAAAGCCCCACACCCTAAACAGGAACCCCAAGAA
ATCAATTTCCAGATGATCTCCCTGGATCTAATACTGCCGCCCCGGTCCAAGAAACCCTGC
ATGGTTGCCAGCCTGTCACCCAAGAGGACGGAAAAGAATCACGGATTAGCGTACAAGAGA
GACAA

配列番号 173 CD40 細胞質ドメイン

KKVAKKPTNKAPHPKQEPQEINFDDLPGSNTAAPVQETLHGCQPVQTQEDGKESRISVQERQ

20

配列番号 174 リンカー

gcggccgcagtcgag

配列番号 175 リンカー

AAAVE

配列番号 176 CD3 ゼータ細胞質ドメイン

AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCT
CTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGG
CCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACA
ATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAG
CGCCGGAGGGGCAAGGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGA
CACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC

30

配列番号 177 CD3 ゼータ細胞質ドメイン

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYN
ELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

40

【0 5 1 9】

(さらなる配列)

【化 3 3】

配列番号 178, ΔCasp9 (res. 135—416)

G F G D V G A L E S L R G N A D L A Y I L S M E P C G H C L I I N N V
N F C R E S G L R T R T G S N I D C E K L R R R F S S L H F M V E V K
G D L T A K K M V L A L L E L A R Q D H G A L D C C V V V I L S H G C
Q A S H L Q F P G A V Y G T D G C P V S V E K I V N I F N G T S C P S
L G G K P K L F F I Q A C G G E Q K D H G F E V A S T S P E D E S P
G S N P E P D A T P F Q E G L R T F D Q L D A I S S L P T P S D I F V
S Y S T F P G F V S W R D P K S G S W Y V E T L D D I F E Q W A H S
E D L Q S L L L R V A N A V S V K G I Y K Q M P G C F N F L R K K L F
F K T S

10

配列番号 179, ΔCasp9 (res. 135—416) D330A, ヌクレオチド配列

GGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTTACATCC
TGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAATTCTGCCGTGAGT
CCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCAACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTTC
TCCTCGCTGCATTTTCATGGTGGAGGTGAAGGGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTG
GCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCACGGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCAT
TCTCTCTACGGCTGTGAGGCCAGCCACCTGCAGTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGA
TGGATGCCCTGTGTGCGTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAG
CCTGGGAGGGAAGCCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACC
ATGGGTTTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGC
CAGATGCCACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGACCAGCTGGCCGCCATATCTA
GTTTGCCACACCCAGTGACATCTTTGTGTCTACTCTACTTTCCAGGTTTTGTTTCCTGG
AGGGACCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTG
GGCTCACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAA
AGGGATTTATAAACAGATGCCTGGTTGCTTTAATTTCTCCGAAAAAACTTTTCTTTAAAA
CATCA

20

30

配列番号 180, ΔCasp9 (res. 135—416) D330A, アミノ酸配列

G F G D V G A L E S L R G N A D L A Y I L S M E P C G H C L I I N N V
N F C R E S G L R T R T G S N I D C E K L R R R F S S L H F M V E V K
G D L T A K K M V L A L L E L A R Q D H G A L D C C V V V I L S H G C
Q A S H L Q F P G A V Y G T D G C P V S V E K I V N I F N G T S C P S
L G G K P K L F F I Q A C G G E Q K D H G F E V A S T S P E D E S P

40

【化 3 4】

G S N P E P D A T P F Q E G L R T F D Q L A A I S S L P T P S D I F V
S Y S T F P G F V S W R D P K S G S W Y V E T L D D I F E Q W A H S
E D L Q S L L L R V A N A V S V K G I Y K Q M P G C F N F L R K K L F
F K T S

配列番号 181, ΔCasp9 (res. 135—416) N405Q ヌクレオチド配列

GGATTGTTGGTGATGTCGGTGCTCTTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTTACATCC
TGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAACTTCTGCCGTGAGT
CCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCAACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTTC
TCCTCGCTGCATTTTCATGGTGGAGGTGAAGGGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTG
GCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCACGGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCAT
TCTCTCTACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCAGTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGA
TGGATGCCCTGTGTGGTTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAG
CCTGGGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACC
ATGGGTTTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGC
CAGATGCCACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGACCAGCTGGACGCCATATCTA
GTTTGCCACACCCAGTGACATCTTTGTGTCTACTCTACTTTCCCAGGTTTTGTTTCCTGG
AGGGACCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTG
GGCTCACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAA
AGGGATTTATAAACAGATGCCTGGTTGCTTTCAGTTCCTCCGGAATAAACTTTTCTTTAAAA
CATCA

配列番号 182, ΔCasp9 (res. 135—416) N405Q アミノ酸配列

G F G D V G A L E S L R G N A D L A Y I L S M E P C G H C L I I N N V
N F C R E S G L R T R T G S N I D C E K L R R R F S S L H F M V E V K
G D L T A K K M V L A L L E L A R Q D H G A L D C C V V V I L S H G C
Q A S H L Q F P G A V Y G T D G C P V S V E K I V N I F N G T S C P S
L G G K P K L F F I Q A C G G E Q K D H G F E V A S T S P E D E S P
G S N P E P D A T P F Q E G L R T F D Q L D A I S S L P T P S D I F V
S Y S T F P G F V S W R D P K S G S W Y V E T L D D I F E Q W A H S
E D L Q S L L L R V A N A V S V K G I Y K Q M P G C F Q F L R K K L F
F K T S

配列番号 183, ΔCasp9 (res. 135—416) D330A N405Q ヌクレオチド配列

【化 3 5】

GGATTGGTGATGTCGGTGCTCTTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTGGCTTACATCC
TGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAACTTCTGCCGTGAGT
CCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCAACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTTC
TCCTCGCTGCATTTTCATGGTGGAGGTGAAGGGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTG
GCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCACGGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCAT
TCTCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCAGTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGA
TGGATGCCCTGTGTCGGTCGAGAAGATTGTGAACATCTCAATGGGACCAGCTGCCCCAG
CCTGGGAGGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACC
ATGGGTTTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGC
CAGATGCCACCCCGTTCCAGGAAGTTTGAGGACCTTCGACCAGCTGGCCGCCATATCTA
GTTTGCCACACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTTTCCCAGGTTTTGTTTCCTGG
AGGGACCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTG
GGCTCACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAA
AGGGATTATAAACAGATGCCTGGTTGCTTTCAGTTCCTCCGGAAAAAACTTTTCTTAAAA
CATCA

10

配列番号 184, ΔCasp9 (res. 135—416) D330A N405Q アミノ酸配列

20

G F G D V G A L E S L R G N A D L A Y I L S M E P C G H C L I I N N V
N F C R E S G L R T R T G S N I D C E K L R R R F S S L H F M V E V K
G D L T A K K M V L A L L E L A R Q D H G A L D C C V V V I L S H G C
Q A S H L Q F P G A V Y G T D G C P V S V E K I V N I F N G T S C P S
L G G K P K L F F I Q A C G G E Q K D H G F E V A S T S P E D E S P
G S N P E P D A T P F Q E G L R T F D Q L A A I S S L P T P S D I F V
S Y S T F P G F V S W R D P K S G S W Y V E T L D D I F E Q W A H S
E D L Q S L L L R V A N A V S V K G I Y K Q M P G C F Q F L R K K L F
F K T S

30

配列番号 185, カスパーゼ -9.co ヌクレオチド配列

GTGGACGGGTTTGGAGATGTGGGAGCCCTGGAATCCCTGCGGGGCAATGCCGATCTGGC
TTACATCCTGTCTATGGAGCCTTGCGGCCACTGTCTGATCATTAACAATGTGAACTTCTGC
AGAGAGAGCGGGCTGCGGACCAGAACAGGATCCAATATTGACTGTGAAAAGCTGCGGAG
AAGGTTCTCTAGTCTGCACTTTATGGTCGAGGTGAAAGGCGATCTGACCGCTAAGAAAATG
GTGCTGGCCCTGCTGGAAGTGGCTCGGCAGGACCATGGGGCACTGGATTGCTGCGTGGT

40

【化 3 6】

CGTGATCCTGAGTCACGGCTGCCAGGCTTCACATCTGCAGTTCCTGGGGCAGTCTATGG
AACTGACGGCTGTCCAGTCAGCGTGGAGAAGATCGTGAACATCTTCAACGGCACCTCTTG
CCCAAGTCTGGGCGGGAAGCCCAAAGTGTCTTTATTTCAGGCCTGTGGAGGCGAGCAGAA
AGATCACGGCTTCGAAGTGGCTAGCACCTCCCCGAGGACGAATCACCTGGAAGCAACC
CTGAGCCAGATGCAACCCCTTCCAGGAAGGCCTGAGGACATTTGACCAGCTGGATGCCA
TCTCAAGCCTGCCACACCTTCTGACATTTTCGTCTCTTACAGTACTTTCCCTGGATTTGTG
AGCTGGCGCGATCCAAAGTCAGGCAGCTGGTACGTGGAGACACTGGACGATATCTTTGAG
CAGTGGGCCCCATTCTGAAGACCTGCAGAGTCTGCTGCTGCGAGTGGCCAATGCTGTCTCT
GTGAAGGGGATCTACAAACAGATGCCAGGATGCTTCCAGTTTCTGAGAAAGAACTGTTCT
TTAAGACCTCCGCATCTAGGGCC

10

配列番号 186, カスパーゼ-9.co アミノ酸配列

VDGFGDVGALESRLGNADLAYILSMEPCGHCLINNVNFCRESGLRTRTGSNIDCEKLRRRFSS
LHFMVEVKGDLTAKKMLALLELARQDHGALDCCVVILSHGCQASHLQFPGAVYGTGCPV
SVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGEQKDHGFEVASTSPEDESPGSNPEPDATPFQE
GLRTFDQLDAISSLPTPSDIFVSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDIFEQWAHSEDLQSLLL
RVANAVSVKGIYKQMPGCFQFLRKKLFFKTSASRA

20

配列番号 187: カスパーゼ 9 D330E ヌクレオチド配列

GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCT
TACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAACTTCTGCC
GTGAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCAACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGT
CGCTTCTCCTCGCTGCATTTTCATGGTGGAGGTGAAGGGCGACCTGACTGCCAAGAAAATG
GTGCTGGCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCACGGTGTCTGGAAGTGTGCGTGGT
GGTCATTCTCTCTCACGGCTGTGAGGCCAGCCACCTGCAGTTCCTCAGGGGCTGTCTACGG
CACAGATGGATGCCCTGTGTCGGTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTG
CCCCAGCCTGGGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAGCAGA
AAGACCATGGGTTTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGGCAGTAACC
CCGAGCCAGATGCCACCCCGTTCCAGGAAGTTTGAGGACCTTCGACCAGCTGGCGGCC
ATATCTAGTTTGCCACACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTTTCCAGGTTTGT
TTCCTGGAGGGACCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGACGACATCTTTGA
GCAGTGGGCTCACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTC
GGTGAAAGGGATTTATAAACAGATGCCTGGTTGCTTTAATTTCTCCGAAAAAACTTTTCT
TTAAACATCAGCTAGCAGAGCC

30

40

配列番号 188: カスパーゼ 9 D330E アミノ酸配列

【化 3 7】

VDGFGDVGALSLRGNADLAYILSMEPCGHCLINNPNFCRESGLRTRTGSNIDCEKLRRRFSS
LHFMVEVKGDLTAKKMLLALLELARQDHGALDCCVWILSHGCQASHLQFPGAVYGTGDC
PVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGEQKDHGFEVASTSPEDESPGSNPEPDA
TPFQEGRLRTFDQLAIAISSLPSPDIFVSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDIFEQWAH
SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCFNFLRKKLFFKTSASRA

pBPO509 の配列

pBP0509-SFG-PSCAscFv.CH2CH3.CD28tm.ゼータ.MyD88/CD40 配列

10

配列番号 189 シグナルペプチド

ATGGAGTTTGGACTTTCTTGGTTGTTTTTGGTGGCAATTCTGAAGGGTGTCCAGTGTAGCA
GG

配列番号 190 シグナルペプチド

MEFGLSWLFLVAILKGVQCSR

配列番号 191 bm2B3 可変軽鎖

GACATCCAGCTGACACAAAGTCCCAGTAGCCTGTCAGCCAGTGTGCGCGATAGGGTGACA
ATTACATGCTCCGCAAGTAGTAGCGTCAGATTCATACACTGGTACCAGCAGAAGCCTGGG
AAGGCCCCAAAGAGGCTTATCTACGATACCAGTAACTCGCCTCTGGAGTTCCTAGCCGG
TTTTCTGGATCTGGCAGCGGAAGTAGCTACACCCTCACAATCTCCAGTCTGCAACCAGAG
GACTTTGCAACCTACTACTGCCAGCAATGGAGCAGCTCCCCTTTCACCTTTGGGCAGGGT
ACTAAGGTGGAGATCAAG

20

配列番号 192 bm2B3 可変軽鎖

DIQLTQSPSSLSASVGDRVITCSASSSVRFIHWYQQKPGKAPKRLIYDTSKLAGVPSRFSGS
GSGTSYTLTISSLQPEDFATYYCQQWSSSPFTFGQGTKVEIK

30

配列番号 193 フレキシブルリンカー

GGCGGAGGAAGCGGAGGTGGGGGC

配列番号 194 フレキシブルリンカー

GGGSGGGG

配列番号 195 bm2B3 可変重鎖

GAGGTGCAGCTTGTAGAGAGCGGGGAGGCCTCGTACAGCCAGGGGGCTCTCTGCGCC
TGTCATGTGCAGCTTCAGGATTCAATATAAAGGACTATTACATTCACTGGGTACGGCAAGC

40

【化 3 8】

TCCCGGTAAGGGCCTGGAATGGATCGGTTGGATCGACCCTGAAAACGGAGATACAGAATT
TGTGCCCAAGTTCCAGGGAAAGGCTACCATGTCTGCCGATACTTCTAAGAATACAGCATAC
CTTCAGATGAATTCTCTCCGCGCCGAGGACACAGCCGTGTATTATTGTAAAACGGGAGGG
TTCTGGGGTCAGGGTACCCTTGTGACTGTGTCTTCC

配列番号 196 bm2B3 可変重鎖

EVQLVESGGGLVQPQGSRLRLSCAASGFNIKDYIHWWRQAPGKGLEWIGWIDPENGDTFVP
KFQ GKATMSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCKTGGFWGQGLVTVSS

10

配列番号 197 リンカー

GGGGATCCCGCC

配列番号 198 リンカー

GDPA

配列番号 199 IgG1 ヒンジ領域

GAGCCCAAATCTCCTGACAAAACACACATGCCCA

20

配列番号 200 IgG1 ヒンジ領域

EPKSPDKTHTCP

配列番号 201 IgG1 CH2 領域

CCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCC
AAAGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAG
CCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTATGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGC
AAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCTCA
CCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAG
CCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAA

30

配列番号 202 IgG1 CH2 領域

PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

配列番号 203 IgG1 CH3 領域

GGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAA
GAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGA
GTGGGAGAGCAATGGGCAACCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACT

40

【化 3 9】

CCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG
GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAG
AGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

配列番号 204 IgG1 CH3 領域

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

配列番号 205 リンカー

AAAGATCCCAA

配列番号 206 リンカー

KDPK

配列番号 207 CD28 膜貫通領域

TTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTG
GCCTTTATTATT

20

配列番号 208 CD28 膜貫通領域

FWVLVVGGVLACYSLLVTVAFII

配列番号 209 リンカー

gccggc

配列番号 210 リンカー

AG

30

配列番号 211 CD3 ゼータ

AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCT
CTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGG
CCGGGACCCCTGAGATGGGGGGAAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACA
ATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAG
CGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGA
CACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC

40

配列番号 212 CD3 ゼータ

【化 4 0】

RVKFSSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYN
ELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

配列番号 213 MyD88

GCCGCTGGGGGCCAGGCGCCGGATCAGCTGCTCCCGTATCTTCTACTTCTTCTTTGCCG
CTGGCTGCTCTGAACATGCGCGTGAGAAGACGCCTCTCCCTGTTCTTAACGTTGCGACA
CAAGTCGCTGCCGATTGGACCGCCCTTGCCGAAGAAATGGACTTTGAATACCTGGAAT
AGACAATTGAAACACAGGCCGACCCCACTGGCAGACTCCTGGACGCATGGCAGGGAAG
ACCTGGTGCAAGCGTTGGACGGCTCCTGGATCTCCTGACAAAATATATCCTGAAACAACA
TACTGCTTGAACCTCGGACCTAGCATTGAAGAAGACTGCCAAAAATATATCCTGAAACAACA
ACAAGAAGAAGCCGAAAAACCTCTCCAAGTCGCAGCAGTGGACTCATCAGTACCCCGAAC
AGCTGAGCTTGCTGGGATTACTACACTCGACGACCCACTCGGACATATGCCTGAAAGATT
CGACGCTTTCATTTGCTATTGCCCTCTGACATA

10

配列番号 214 MyD88

AAGGPGAGSAAPVSSTSSLPLAALNMRVRRRLSLFLNVRTQVAADWTALAEEMDFEYLEIRQL
ETQADPTGRLLDAWQGRPGASVGRLLDLLTKLGRDDVLELGPSIEEDCQKYILKQQEEAEK
PLQVAAVDSSVPRTAELAGITTLDDPLGHMPERFDFICYCPSDI

20

配列番号 215 CD40

AAGAAAGTTGCAAAGAAACCCACAAATAAAGCCCCACACCCTAACAGGAACCCCAAGAA
ATCAATTTCCAGATGATCTCCCTGGATCTAATACTGCCGCCCGGTCCAAGAAACCTGC
ATGGTTGCCAGCCTGTCACCCAAGAGGACGGAAAAGAATCACGGATTAGCGTACAAGAGA
GACAATAG

配列番号 216 CD40

KKVAKKPTNKAPHPKQEPQEINFPDDLPGSNTAAPVQETLHGCQPVTQEDGKESRISVQERQ*

30

pBPO425 の配列

pBP0521-SFG-CD19scFv.CH2CH3.CD28tm.MyD88/CD40.ゼータ配列

配列番号 217 シグナルペプチド

ATGGAGTTTGGACTTTCTTGTTGTTTTTGGTGGCAATTCTGAAGGGTGTCCAGTGTAGCA
GG

40

配列番号 218 シグナルペプチド

【化 4 1】

MEFGLSWLFLVAILKGVQCSR

配列番号 219 FMC63 可変軽鎖

GACATCCAGAT

GACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGCAG
GGCAAGTCAGGACATTAGTAAATATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAAGTGT
AAACTCCTGATCTACCATACATCAAGATTACACTCAGGAGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCA
GTGGGTCTGGAACAGATTATTCTCTCACCATTAGCAACCTGGAGCAAGAAGATATTGCCAC
TTACTTTTGCCAACAGGGTAATACGCTTCCGTACACGTTCCGAGGGGGGACTAAGTTGGA
AATAACA

10

配列番号 220 FMC63 可変軽鎖

DIQMTQTTSSLASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSG
SGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEIT

配列番号 221 フレキシブルリンカー

GGCGGAGGAAGCGGAGGTGGGGGC

20

配列番号 222 フレキシブルリンカー

GGGSGGGG

配列番号 223 FMC63 可変重鎖

GAGGTGAAACTGCAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCCTGTCCGT
CACATGCACTGTCTCAGGGGTCTCATTACCCGACTATGGTGTAAGCTGGATTCGCCAGCC
TCCACGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTAATATGGGGTAGTGAAACCACATACTATAA
TTCAGCTCTCAAATCCAGACTGACCATCATCAAGGACAACTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTA
AAAATGAACAGTCTGCAAAGTATGACACAGCCATTTACTACTGTGCCAAACATTATTACTA
CGGTGGTAGCTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

30

配列番号 224 FMC63 可変重鎖

EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVWGSSETTYNSA
LKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVTVSS

配列番号 225 リンカー

GGGGATCCCGCC

40

配列番号 226 リンカー

【化 4 2】

GDPA

配列番号 227 IgG1 ヒンジ

GAGCCCAAATCTCCTGACAAACTCACACATGCCCA

配列番号 228 IgG1 ヒンジ

EPKSPDKTHTCP

10

配列番号 229 IgG1 CH2 領域

CCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCC AAAACCC
AAAGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAG
CCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTATGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGC
AAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCA
CCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAG
CCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAA

配列番号 230 IgG1 CH2 領域

PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

20

配列番号 231 IgG1 CH3 領域

GGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAA
GAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGA
GTGGGAGAGCAATGGGCAACCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACT
CCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG
GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAG
AGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

30

配列番号 232 IgG1 CH3 領域

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

配列番号 233 リンカー

AAAGATCCCAAA

40

配列番号 234 リンカー

KDPK

【化 4 3】

配列番号 235 CD28 膜貫通領域

TTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTG
GCCTTTATTATT

配列番号 236 CD28 膜貫通領域

FWLWVGVLACYSLLVTVAFII

配列番号 237 リンカー

Ctcgag

10

配列番号 238 リンカー

LE

配列番号 239 MyD88

ATGGCCGCTGGGGGCCAGGCGCCGGATCAGCTGCTCCCGTATCTTCTACTTCTTCTTTG
CCGCTGGCTGCTCTGAACATGCGCGTGAGAAGACGCCTCTCCCTGTTCCCTAACGTTTCGC
ACACAAGTCGCTGCCGATTGGACCGCCCTTGCCGAAGAAATGGACTTTGAATACCTGGAA
ATTAGACAACTTGAAACACAGGCCGACCCCACTGGCAGACTCCTGGACGCATGGCAGGGA
AGACCTGGTGCAAGCGTTGGACGGCTCCTGGATCTCCTGACAAAATGGGACGCGACGA
CGTACTGCTTGAACTCGGACCTAGCATTGAAGAAGACTGCCAAAAATATATCCTGAAACAA
CAACAAGAAGAAGCCGAAAAACCTCTCCAAGTCGCAGCAGTGGACTCATCAGTACCCCGA
ACAGCTGAGCTTGCTGGGATTACTACACTCGACGACCCCACTCGGACATATGCCTGAAAGA
TTCGACGCTTTCATTTGCTATTGCCCTCTGACATA

20

配列番号 240 MyD88

MAAGGPGAGSAAPVSSTSSLPLAALNMRVRRRLSLFLNVRTQVAADWTALAEEMDFEYLEIR
QLETQADPTGRLLDAWQGRPGASVGRLLDLLTKLGRDDVLLELGPSIEEDCQKYILKQQQEEA
EKPLQVAAVDSSVPRTAELAGITTLDDPLGHMPERFDFICYCPSDI

30

配列番号 241 CD40

AAGAAAGTTGCAAAGAAACCCACAAATAAAGCCCCACACCCTAACAGGAACCCCAAGAA
ATCAATTTCCAGATGATCTCCCTGGATCTAATACTGCCGCCCCGGTCCAAGAAACCCTGC
ATGGTTGCCAGCCTGTCACCCAAGAGGACGGAAAAGAATCACGGATTAGCGTACAAGAGA
GACAA

40

【化 4 4】

配列番号 242 CD40

KKVAKKPTNKAPHPKQEPQEINFPDDLPGSNTAAPVQETLHGCQPVTQEDGKESRISVQERQ

配列番号 243 リンカー

gcggccgcagTCGAG

配列番号 244 リンカー

AAAVE

10

配列番号 245 CD3 ゼータ鎖

AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCT
 CTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGG
 CCGGGACCCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACA
 ATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAG
 CGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGA
 CACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAA

20

配列番号 246 CD3 ゼータ鎖

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYN
 ELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR*

SFG-Myr.MC-2A-CD19.scfv.CD34e.CD8stm. ゼータ配列

SFG-Myr.MC.2A.CD19scFv.CD34e.CD8stm. ゼータ配列

30

配列番号 247 ミリストイル化

atggggagtagcaagagcaagcctaaggacccagccagcgc

配列番号 248 ミリストイル化

MGSSKSKPKDPSQR

配列番号 249 リンカー

ctcgac

40

配列番号 250 リンカー

LD

【化 4 5】

配列番号 251 MyD88

atggctgcaggaggtcccgcgcggtctgcggccccggtctcctccacatcctccctcccctggctgctctcaacatgcgagtg
ggcgccgctgtctgttctgaacgtgcggacacaggtggcgccgactggaccgcgtggcggaggagatggactttgagtact
tggagatccggcaactggagacacaagcggacccccactggcaggctgtgtagcctggcaggagcgcctggcgctctgtag
gccgactgctcgatctgcttaccagctgggcccgcgacgagctgctgtagctgggacccagcattgaggaggattgccaaaag
tatatctgaagcagcagcaggaggaggtgagaagcctttacaggtggcgctgtagacagcagtgcccacggacagcagagc
tggcgggcatcaccacacttgatgacccccctggggcatatgcctgagcgtttcgatgccttcctctgctattgcccagcgacatc

10

配列番号 252 MyD88

MAAGGPGAGSAAPVSSTSSLPLAALNMRVRRRLSLFLNVRTQVAADWTALAEEMDFEYLEIR
QLETQADPTGRLLDAWQGRPGASVGRLLDLLTKLGRDDVLELGPSIEEDCQKYILKQQQEEA
EKPLQVAVDSSVPRTAELAGITTLDDPLGHMPERFDAFICYCPSDI

配列番号 253 リンカー

gtcgag

配列番号 254 リンカー

VE

20

配列番号 255 CD40

aaaaagggtggccaagaagccaaccaataaggccccccaccccaagcaggagccccaggagatcaattttcccgacgatcttct
ggctccaacactgctgctccagtgaggagactttacatggatgccaaccggtcacccaggaggatggcaaagagagtcgcatctc
agtcaggagagacag

配列番号 256 CD40

KKVAKKPTNKAPHPKQEPQEINFPDDLPGSNTAAPVQETLHGCQPVTQEDGKESRISVQERQ

30

配列番号 257 リンカー

CCGCGG

配列番号 258 リンカー

PR

配列番号 259 T2A 配列

GAAGGCCGAGGGAGCCTGCTGACATGTGGCGATGTGGAGGAAAACCCAGGACCA

40

【化 4 6】

配列番号 260 T2A 配列

EGRGSLTTCGDVEENPGP

配列番号 261 シグナルペプチド

ATGGAGTTTGGACTTTCTTGTTGTTTTGGTGGCAATTCTGAAGGGTGTCCAGTGTAGCA
GG

配列番号 262 シグナルペプチド

MEFGLSWLFLVAILKGVQCSR

10

配列番号 263 FMC63 可変軽鎖

GACATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCACC
ATCAGTTGCAGGGCAAGTCAGGACATTAGTAAATATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAG
ATGGAAGTGTAACTCCTGATCTACCATACATCAAGATTACACTCAGGAGTCCCATCAAG
GTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGATTATTCTCTCACCATTAGCAACCTGGAGCAAGAA
GATATTGCCACTTACTTTTGCCAACAGGGTAATACGCTTCCGTACACGTTCCGAGGGGGG
ACTAAGTTGGAAATAACA

20

配列番号 264 FMC63 可変軽鎖

DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSG
SGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEIT

配列番号 265 フレキシブルリンカー

GGCGGAGGAAGCGGAGGTGGGGGC

配列番号 266 フレキシブルリンカー

GGGSGGGG

30

配列番号 267 FMC63 可変重鎖

GAGGTGAAACTGCAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCCTGTCCGT
CACATGCACTGTCTCAGGGGTCTCATTACCCGACTATGGTGTAAGCTGGATTGCGCAGCC
TCCACGAAAGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTAATATGGGGTAGTGAAACCACATACTATAA
TTCAGCTCTCAAATCCAGACTGACCATCATCAAGGACAACTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTA
AAAATGAACAGTCTGCAAACTGATGACACAGCCATTTACTACTGTGCCAAACATTATTACTA
CGGTGGTAGCTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

40

配列番号 268 FMC63 可変重鎖

【化 4 7】

EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSA
LKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS

配列番号 269 リンカー
GGATCC

配列番号 270 リンカー
GS

10

配列番号 271 CD34 最小エピトープ
GAACTTCCTACTCAGGGGACTTTCTCAAACGTTAGCACAAACGTAAGT

配列番号 272 CD34 最小エピトープ
ELPTQGTFSNVSTNVS

配列番号 273 CD8 アルファストークドメイン
CCCCCCCCAAGACCCCCACACCTGCGCCGACCATTGCTTCTCAACCCCTGAGTTTGAGA
CCCAGAGCCTGCCGGCCAGCTGCCGGCGGGGCCGTGCATACAAGAGGACTCGATTTCG
CTTGCGAC

20

配列番号 274 CD8 アルファストークドメイン
PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD

配列番号 275 CD8 アルファ膜貫通ドメイン
ATCTATATCTGGGCACCTCTCGCTGGCACCTGTGGAGTCCTTCTGCTCAGCCTGGTTATTA
CTCTGTACTGTAATCACCGGAATCGCCGCCGCGTTTGTAAAGTGTCACAGG

30

配列番号 276 CD8 アルファ膜貫通ドメイン
IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRRRVCKCPR

配列番号 277 リンカー
GTCGAC

配列番号 278 リンカー
VD

40

配列番号 279 CD3 ゼータ

【化 4 8】

AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCT
CTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGG
CCGGGACCCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACA
ATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAG
CGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGA
CACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC

配列番号 280 CD3 ゼータ

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYN
ELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

10

配列番号 281 (MyD88 スクレオチド配列)

atggctgcaggaggctccggcgcggggtctcgccccggctcctccacatcctccctcccctggctgctcaacatgcgagtg
ggcgccgctgtctgttctgaacgtgaggacacaggtggcgccgactggaccgctggcgaggagatggactttgagtact
tggagatccggcaactggagacacaagcggacccactggcaggctgctggacgctggcaggagacgcccctggcgctctgag
gcccactgctcgagctgcttaccagctggcgccgacgacgtgctgctggagctgggacccagcattgaggaggattgcaaaa
gtatatctgaagcagcagcaggaggaggtgagaagccttacaggtggccgctgtagacagcagtgctccacggacagcagag
ctggcgggcatcaccacacttgatgacccccctggggcatatgctgagcgtttcgatgccttcctgctattgccccagcgacatcca
gtttgtgcaggagatgatccggcaactggaacagacaaactatcgactgaagttgtgtgtgtgacccgcatgctcctggcacct
gtgtctggtctattgctagtgcctcatgaaaagaggtgccgcccgtggtggtgtgtctgtatgattacgtgcagagcaaggaat
gtgactccagaccaaatttcactcagcctctctccaggtgcccatcagaagcgactgatcccatcaagtacaaggcaatgaaga
aagagttcccagcatcctgaggttcactgctgctgactacaccaacccctgcaccaaattgtgtgtgactgccttgccaag
gcctgtccctgccc

20

配列番号 282 (MyD88 アミノ酸配列)

MAAGGPGAGSAAPVSSTSSLPLAALNMRVRRRLSLFLNVRTQVA
ADWTALAEEMDFEYLEIRQLETQADPTGRLLDAWQGRPGASVGR
LLELLTKLGRDDVLLELGPSIEEDCQKYILKQQQEEAEKPLQVAA
VDSSVPRTAELAGITTLDPLGHMPERFD AFICYCPSDIQFVQEM
IRQLEQTNYRLKLCVSDRDVLPGTCVWSIASELIEKRCRRMVVVV
SDDYLQSKECDFQTKFALSLSPGAHQKRLIPIKYKAMKKEFPSIL
RFITVCDYTNPCTKSWFWTRLAKALSLP

30

【0 5 2 0】

(実施例 1 6 : 改善された治療用細胞二量体スイッチの開発)

腫瘍関連抗原 (TAA) に対して指向されるキメラ抗原レセプター (CAR) を発現する自家 T 細胞を使用する治療は、客観的奏効 (OR) 率が 90% に達するある種のタイプの白血病 (「液性腫瘍」) およびリンパ腫の処置に対して形質転換効果を有する。それらが臨床上大いに有望であることおよびそれに伴う強い関心が予測できるにも関わらず、この成功は、サイトカイン放出症候群 (CRS) に典型的な、観察される高レベルのオンターゲット、オフ腫瘍有害事象によって抑えられる。これらの革命的な処置のリスクを最小にしながら、その利益を維持するために、キメラカスパーゼポリペプチドベースの自殺遺伝子システムは開発された (これは、リガンド結合ドメイン (FKBP12 v36 と称さ

40

50

れる)に融合された、改変されたカスパーゼ-9タンパク質の合成リガンド媒介性二量体化に基づく)。FKBP12v36に結合する小分子二量体化剤であるリミズシド(AP1903)の存在下で、カスパーゼ-9は活性化され、標的細胞の迅速なアポトーシスがもたらされる。低減したレベルのリミズシドの添加は、抑えられた殺滅率をもたらし得、T細胞排除の量が、キメラカスパーゼ改変T細胞のほぼなしからほぼ完全な排除まで制御されることを可能にし得る。この「二量体」スイッチの利用性を最大にするために、用量応答曲線の傾きは、可能な限りゆるやかであるべきである；さもなければ、正確な用量の投与は、困難である。最新の、第1世代の、臨床的iカスパーゼ-9構築物を用いると、約1.5~2logを網羅する用量応答曲線が観察された。

【0521】

治療用細胞二量体機能に対して改善するために、第2のレベルのコントロールは、カスパーゼ-9凝集物に添加され得、ラパマイシン駆動性の低い凝集レベルを、リミズシド駆動性の高い二量体化レベルから分離する。第1のコントロールレベルにおいて、キメラカスパーゼポリペプチドは、ラパマイシン/シロリムス(または非免疫抑制アナログ)によって、そのカルボキシ末端に89-アミノ酸FKBP12-ラパマイシン結合(FRB)ドメイン(mTOR内にコードされる)の1またはこれより多くのコピーを含むように改変されるキメラ抗原レセプター(CAR)へと動員される(図3、左パネル)。iカスパーゼ-9のリミズシド駆動性ホモ二量体化に対して、リミズシド結合したFKBP12v36(約0.1nM)に対して、FRBに対するラパマイシン結合したFKBP12v36の相対的親和性(K_d 約4nM)および架橋されたタンパク質の「千鳥状(staggered)」の幾何的配置の両方に起因して、カスパーゼ-9オリゴマー化のレベルは減少されると推定される。「微調整(fine-tuning)」のさらなるレベルが、各CARに融合されるFRBドメインの数を変化させることによってCARDocking部位において提供され得る。それに対して、標的依存の特異性は、通常の標的駆動性CARクラスター化によって提供され、これは翻って、ラパマイシンの存在下でキメラカスパーゼポリペプチドクラスター化に変換されるべきである。最大の細胞排除レベルが必要とされる場合、リミズシドはまた、最新のプロトコル(すなわち、現在は、0.4mg/kgの2時間の注入で)の下で投与され得る(図3、右パネル)。

【0522】

方法：

ラパログ制御されるキメラカスパーゼポリペプチドのベクター：Schreiber研究室は、mTOR/FRAPから最小FKBP12-ラパマイシン結合(FRB)ドメイン(残基2025~2114)を最初に同定し、それをラパマイシン解離定数(K_d)約4nMを有すると決定した(Chen Jら(95)PNAS 92, 4947-51)。その後の研究から、非免疫抑制性「隆起した(bumped)」ラパマイシンアナログ(「ラパログ」)に対して比較的高い親和性で結合するFRBの直交(orthogonal)変異体(例えば、FRB1(L2098)が同定された(Liberles SD(97)PNAS 94, 7825-30; Bayle JH(06)Chem & Biol 13, 99-107)。CaspaCIDEを動員し得る改変されたMC-CARを開発するために、カルボキシ末端CD3ζドメイン(pBP0526由来)および(pBP0545、図7)を、1または2個のタンデムFRB1ドメインに、MyD88、CD40、およびCD3ζドメインを含む市販の合成SalI-MluIフラグメントを使用して融合して、それぞれ、ベクターpBP0612およびpBP0611を得る(図4および5、ならび表7および8)。このアプローチはまた、標準の「非MyD88/CD40」構築物(例えば、CD28、OX40、および/または4-1BB、ならびにCD3ζを含む構築物)を含むいかなるCAR構築物にも適用可能であるはずである。

【0523】

結果：

2個のタンデムFRB1ドメインを、第1世代Her2-CARまたは誘導性iカスパ

10

20

30

40

50

ーゼー9を共発現する第1世代CD19-CARのいずれかに融合した。293細胞を、構成的レポータープラスミド、SRα-SEAPで、Her2-CAR-FRB₁2、iカスパーゼ9、Her2-CAR-FRB₁2+iCasp9、iC9-CAR(19)・FRB₁2(CD19-CAR-FRB₁2およびiカスパーゼ9の両方を共発現する)をコードする正規化したレベルの発現プラスミド、またはコントロールベクターとともに一過性にトランスフェクトした。24時間後に、細胞を洗浄し、ラパマイシンまたはリミズシドの半対数希釈物とともに二連のウェルへと分けた。薬物とともに一晩インキュベーションした後、SEAP活性を決定した。興味深いことに、ラパマイシン添加は、約50%減少までのSEAP活性の広い減少をもたらした(図6)。この用量依存性減少は、FRBタグ化CARおよびFKBP12タグ化カスパーゼ9の両方の存在を必要とした。対照的に、AP1903は、遙かに低い薬物レベルで、SEAP活性を正常レベルの約20%(以前の経験に匹敵)へと減少させた。細胞生存性をラパマイシンで減少させ、必要であればインビボでより効率的な殺滅のためにリミズシドへと切り替えることは可能であるようである。さらに、オンターゲットまたはオフターゲット媒介性CARクラスター化は、主にscFv結合の部位において殺滅の感受性を増大させるはずである。

10

【0524】

ヘテロスイッチのさらなる入れ替え(permutation)：

誘導性カスパーゼ9は、開発した中で最速かつ最もCID感受性の自殺遺伝子であることが分かったが、アポトーシス(または関連する壊死、細胞死の手段としての炎症および壊死の誘発)をもたらす多くの他のタンパク質またはタンパク質ドメインは、このアプローチを使用してホモ二量体またはヘテロ二量体ベースの殺滅に適合させ得る。

20

【0525】

ラパマイシン(またはラパログ)媒介性膜動員によって活性化され得るタンパク質の部分的リストとしては、以下が挙げられる：

- ・他のカスパーゼ(すなわち、カスパーゼ1~14、これは、哺乳動物において同定されている)

- ・天然のカスパーゼ二量体化剤として機能する他のカスパーゼ関連アダプター分子(例えば、FADD(DEDD)、APAF1(CARD)、CRADD/RAIDD(CARD)、およびASC(CARD)(括弧の中は二量体化ドメイン)。

- ・アポトーシス促進性Bcl-2ファミリーメンバー(例えば、BaxおよびBak、これは、ミトコンドリア脱分極(またはBcl-xLまたはBcl-2などの抗アポトーシス阻抑制促進ファミリーメンバーの誤った局在化)を引き起こし得る)。

30

- ・MLKL媒介性膜溶解に起因して、炎症促進性細胞死(壊死と称される)の関連形態を引き起こし得るRIPK3またはRIPK1-RHIMドメイン。

【0526】

その標的依存性凝集レベルに起因して、CARレセプターは、アポトーシス促進分子のラパマイシン媒介性動員のための理想的なドッキング部位を提供するはずである。にもかかわらず、共発現された誘導性キメラカスパーゼ様分子の存在下でラパログ媒介性細胞死を潜在的に提供し得るFRBドメインを含む多価のドッキング部位の多くの例が存在する。

40

【0527】

【表 7 - 1】

表7: iCasp9-2A-aCD19-Q-CD28stm-MCz-FRBI2

フラグメント ヌクレオチド		ポリペプチド
FKBP12v36	ATGGGAGTGCAGGTGGAGACTATTAGCCCCGAGATGGCAGAACATTC CCCAAAAGAGGACAGACTTGCCTGCTGCTTACTGGAATGCTGGAA GACGGCAAGAAGGTGGACAGCAGCCGGGACCGAAACAAGCCCTTCAA GTTTCATGCTGGGGAAGCAGGAAGTGATCCGGGGCTGGGAGGAAGGAG TCGCACAGATGTCAGTGGGACAGAGGGCCAAACTGACTATTAGCCAG ACTACGCTTATGGAGCAACCGGCCACCCCGGGATCATTCGCCCTCATG CTACACTGGTCTTCGATGTGGAGCTGCTGAAGCTGGAA	MGVQVETISPGDGRTPFKRGQTC VVHYTGMLEDGKKVDSSDRNKP FKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSV GQRAKLTPDYAYGATGHPGIIPP HATLVDFVELLKLE
リンカー	AGCGGAGGAGGATCCGGA	SGGGSG
dカスパーゼ-9	GTGGACGGGTTTGGAGATGTGGGAGCCCTGGAATCCCTGCGGGGCAA TGCCGATCTGGCTTACATCCTGTCTATGGAGCCTTGGCGCCACTGTCT GATCATTAAATGTGAACCTTTCGACAGAGAGAGCGGGCTGCGGACAG AACAGGATCCAATATTGACTGTGAAAAGCTGCGGAGAAAGGTTCTTAGT CTGCACCTTTATGGTCGAGGTGAAAGGCGATCTGACCGCTAAGAAAAATG GTGCTGGCCCTGCTGGAACGGCTCGGACGAGCATGGGGCACTGGA TTGCTGCGTGGTCTGATCCTGAGTCACGGCTGCCAGGCTTCACATCT GCAGTTCCCTGGGGCAGTCTATGGAAGTACGGCTGTCCAGTCAGCGT GGAGAAGATCGTGAACATCTTCAACGGCAGCTCTTGGCCAAAGTCTGGG CGGGAAGCCCAAACTGTTCTTTTACGGCCTGTGGAGCGAGCAGAA AGATCACGGCTTCGAAGTGGCTAGCACCTCCCCGAGGACGAATCACC TGGAGCAACCTGAGCCAGATGCAACCCCTTCCAGGAAGGCGCTGAG GACATTTGACCGAGCTGGATGCCATCTCAAGCCTGCCACACCTTCTGAC ATTTTCGTCTCTTACAGTACTTTCCCTGGATTGTGAGCTGGCGCGATC CAAAGTCAGGCAGCTGGTACGTGGAGACACTGGACGATATCTTTGAGC AGTGGGCCCTTCTGAAGACCTGCAAGTCTGCTGCTGCGAGTGGCCA ATGCTGTCTCTGTGAAGGGGATCTACAACAGATGCCAGGATGCTTCAA CTTTCTGAGAAAGAACTGTTCTTTAAGACCTCCGCATCTAGGGCC	配列番号 300 VDGFGDVGALSLRGNADLAYILS MEPCGHCLINNPNFCRESGLRTR TGSNIDCEKLRRRFSLLHFMVEVK GDLTAKKMLVALLLRLARQDHGALD CCVVVILSHGCGASHLQFPFQAVY GTDGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSL GGKPKLFFIQACGGEQKDHGFV ASTSPEDSPGSNPEPDATPFQES GLRTFDQLDAISSLPTPSDIFVSYS TFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDD IFEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSV KGIYKQMPGCFNFLRKLFFKTS SRA
リンカー	CCGCGG	PR
T2A	GAAGGCCGAGGGAGCCTGCTGACATGTGGCGATGTGGAGGAAAACCC AGGACCA	EGRGSLTTCGDVEENPGP
リンカー (NcoI)	Ccatgg	PW
シグナル ペプチド	ATGGAGTTTGGACTTCTTGGTTGTTTTTGGTGGCAATTCTGAAGGGTG TCCAGTGTAGCAGG	MEFGLSWLFLVAILKGVQCSR
FMC63-VL	GACATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGA GACAGAGTCACCATCAGTTGCAGGGCAAGTCAGGACATTAGTAAATATT TAAATTGGTATCAGCAGAAACAGATGGAACCTGTTAACTCCTGATCTA CCATACATCAAGATTACATCAGGAGTCCCATCAAGGTTCACTGGCAGT GGGTCTGGAACAGATTATCTCTCACCATTAGCAACCTGGAGCAAGAAG ATATTGCCACTTACTTTGCCAACAGGGTAATACGCTTCCGTACACGTT CGGAGGGGGGACTAAGTTGGAATAACA	DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCR ASQDISKYLNWYQKQPDGTVKLLI YHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDY SLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPY TFGGGTKEIT
フレキシブル リンカー	GGCGGAGGAAGCGGAGGTGGGGGC	GGSGGGGG
FMC63-VH	GAGGTGAAACTGCAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACA GAGCCTGTCCGTACATGCACTGTCTCAGGGGTCTCATTACCCGACTAT GGTGTAAAGCTGGATTCCGCCAGCCTCCACGAAAGGGTCTGGAGTGGCTG GGAGTAATATGGGGTAGTGAACACATATAATTACGCTCTCAAAT CCAGACTGACCATCATCAAGGACAACTCCAAGAGCCAAAGTTTCTTAAA AATGAACAGTCTGCAAACTGATGACACAGCCATTTACTACTGTGCCAAA CATTATTACTACGGTGGTAGCTATGCTATGGACTACTGGGTCAAGGAA CCTCAGTACCCGTCTCCTCA	EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTV SGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEW LGVIWGSSETTYNSALKSRLTIKD NSKSQVFLKMNSLQTDITAIYYCA KHYYGGSYAMDYWGQGSTVT SS
リンカー (BamH I)	GGATCC	GS
CD34 エピトープ	GAATCTCTACTCAGGGGACTTTCTCAAACGTTAGACAAACGTAAGT	ELPTQGTFSNVSTNV
CD8a ストーク	CCCGCCCCAAGACCCCCACACCTGCGCCGACCATTGCTTCTCAACCC	PAPRPPTPAPTASQPLSLRPEAC

10

20

30

40

【表 7 - 2】

	CTGAGTTTGAGACCCGAGGCGCTGCCGGCCAGCTGCCGGCGGGGCCGT GCATACAAGAGGACTCGATTTCGCTTGCAGC	RPAAGGAVHTRGLDFACD
CD8tm + stop tf	ATCTATATCTGGGCACCTCTCGCTGGCACCTGTGGAGTCTTCTGCTCA GCCTGGTTATTACTCTGTACTGTAATCACCGGAATCGCCGCCGCGTTTG TAAGTGTCACAGG	IYIWAPLAGTCGVLVSLVITLYCN HRNRRRVCKCPR
リンカー (Sall)	gtcgac	VD
MyD88	ATGGCCGCTGGGGGCCAGGCGCCGGATCAGCTGCTCCCGTATCTTC TACTTCTTCTTTGCCGCTGGCTGCTCTGAACATCGCGGTGAGAAGACG CCTCTCCCTGTTCTTAACGTTTCGCACACAAAGTCGCTGCCGATTGGACC GCCCTTGCCGAAGAAATGGACTTTGAATACCTGGAAATTAGACAACCTG AAACACAGGCCGACCCCACTGGCAGACTCCTGGACGCATGGCAGGGA AGACCTGGTGCAAGCGTTGGACGGCTCCTGGATCTCCTGACAAAACCTG GGACGCGACGACGTACTGCTTGAACCTCGGACCTAGCATTGAAGAAGAC TGCCAAAATATATCCTGAAACAACAAGAAGAAGCCGAAAAACCTC TCCAAGTCGCAGCAGTGGACTCATCAGTACCCCGAACAGCTGAGCTTG CTGGGATTACTACACTCGACGACCCACTCGGACATATGCCGAAAGATT CGACGCTTTCATTTGCTATTGCCCTCTGACATA	MAAGGPGAGSAAPVSSTSLPLA ALNMRVRRRLSLFLNVRTQVAAD WTALAEEMDFEYLEIRQLETQADP TGRLLDAWQGRPGASVGRLLDLL TKLGRDDVLELGPSIEEDCQKYIL KQQQEEAEKPLQVAADVSSVPRT AELAGITLDDPLGHMPPERFDALIC YCPDI
dCD40	AAGAAAGTTGCAAGAAACCCACAATAAAGCCCCACACCCTAAACAGG AACCCCAAGAAATCAATTTCCAGATGATCTCCCTGGATCTAATACTGC CGCCCCGGTCCAAGAAACCTGCATGGTTGCCAGCCTGTCACCCAAGA GGACGAAAAGAATCACGGATTAGCGTACAAGAGAGACAA	KKVAKKPTNKAPHPKQEPQEIFP DDLPGSNTAAPVQETLHGCQPVT QEDGKESRISVQERQ
CD3z	AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGGTACCAGCAGGG CCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTA CGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCTGAGATGGGGGGAA AGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCCTGTACAATGAATGTCAGA AAGATAAGATGGCGGAGGCCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGC GCCGGAGGGGCAAGGGGACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACA GCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTACATGCAAGCTCTTCCACCT CGT	RVKFSRSADAPAYQQGQNLQYNE LNLGRREEYDVLDRGRDPEMG GKPRRNKPNQEGLYNELQDKMAE AYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQG LSTATKDTYDALHMQALPPR
リンカー	Aag	T
FRBI ^{AA}	TGGCAGGAAGGCCCTGGAAGAGGCCCTCAAGACTTTACTTTGGTGAACGC AACGTTAAAGGCATGTTTCGAGGTGCTGGAACCCCTGCATGCAATGATG GACCGAGGTCTCAGACACTCAAAGAGACATCTTTTAACGAGGCGTAT GGACGGGACCTCATGGAGGCTCAGGAATGGTGCCGCAAGTACATGAAA AGTGGGAATGTGAAGGATCTGCTGCAAGCATGGGATCTGTATTACCAC GTGTTTAGACGGATCAGCAAA	WHEGLEEASRLYFGERNVKGMFE VLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQ AYGRDLMEAGQWCRKYMKSGNV KDLLQAWDLYYHVFRISK
リンカー (BsiWI)	Cgtacg	RT
FRBI	TGGCATGAAGGGTTGGAAGAAGCTTCAAGGCTGACTTCGGAGAGAGG AACGTGAAGGGCATGTTTGAGGTTCTTGAACCTCTGCACGCCATGATG GAACGGGGACCGCAGACACTGAAAGAAACCTCTTTAATCAGGCCTAC GGCAGAGACCTGATGGAGGCCCAAGAATGGTGAGAAAGTATATGAAA TCCGGTAACGTGAAAGACCTGCTCCAGGCCTGGGACCTTTATTACCAT GTGTTACGGCGGATCAGTAAGTAA	WHEGLEEASRLYFGERNVKGMFE VLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQ AYGRDLMEAGQWCRKYMKSGNV KDLLQAWDLYYHVFRISK*

【 0 5 2 8 】

【表 8 - 1】

表 8

フラグメント	ヌクレオチド	ポリペプチド
FKBP12v36	ATGGGAGTGACAGGTGGAGACTATTAGCCCCGAGATGGCAGAACATTC CCCAAAAGAGGACAGACTTGCCTGCTGATTACTGGAATGCTGGAA GACGGCAAGAGGTGGACAGCAGCCGGGACCGAAACAAGCCCTTCAA GTTTCATGCTGGGGAAGCAGGAAGTGATCCGGGGCTGGGAGGAAGGAG TCGCACAGATGTCAAGTGGACAGAGGGCCAACTGACTATTAGCCAG ACTACGCTTATGGAGCAACCGGCCACCCCGGGATCATCCCCCTCATG CTACACTGGTCTTCGATGTGGAGCTGTGAAGCTGGAA	MGVQVETISPGDGRTPKRGQTC VVHYTGMLEDGKKVDSSRDNRKP FKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSV GQRAKLTIPODYAYGATGHPGIIPP HATLVFDVELLKE
リンカー	AGCGGAGGAGGATCCGGA	SGGGSG
dカスパーゼ9	GTGGACGGGTTTGGAGATGTGGGAGCCCTGGAATCCCTGCGGGGCAA TGCCGATCTGGCTTACATCCTGTCTATGGAGCCTTGGCGCCACTGTCT	VDGFGDVGALESRLGNADLAYILS MEPCGHCLINNPNVFCRESGLRTR

【表 8 - 2】

	GATCATTAAACAATGTGAACCTTCTGCAGAGAGAGCGGGCTGCGGACCAG AACAGGATCCAATATTGACTGTGAAAAGCTGCGGAGAAGGTTCTCTAGT CTGCACCTTTATGGTCGAGGTGAAAGGCGATCTGACCGCTAAGAAAAATG GTGCTGCGCCTGCTGGAAGTGGCTCGGCAGGACCATGGGGCACTGGA TTGCTGCGTGGTCTGATCCTGAGTCACGGCTGCCAGGCTTCACATCT GCAGTTCCCTGGGGCAGTCTATGGAAGTACGGCTGTCCAGTCAGCGT GGAGAAGATCGTGAACATCTTCAACGGCACCTCTTGCCCAAGCTGCGG CGGGAAGCCCAAACTGTTCTTTATTCAGGCCTGTGGAGGCGAGCAGAA AGATCACGGCTTCGAAGTGGCTAGCACCTCCCCGAGGACGAATCACC TGGAAGCAACCTGAGCCAGATGCAACCCCTTCCAGGAAGGCCTGAG GACATTTGACCAGCTGGATGCCATCTCAAGCCTGCCACACCTTCTGAC ATTTTCGCTCTTTACAGTACTTTCCCTGGATTGTGAGCTGGCGCATC CAAGATCAGGCAGCTGGTACGTGGAGACACTGGACGATATCTTTGAGC AGTGGGCCCATCTGTAAGACCTGCAGAGTCTGCTGCTGCGAGTGGCCA ATGCTGTCTCTGTGAAGGGGATCTACAAACAGATGCCAGGATGCTTCAA CTTTCTGAGAAAGAACTGTTCTTTAAGACCTCCGCATCTAGGGCC	TGSNIDCEKLRRRFFSLHFMVEVK GDLTAKKMLALLELARQDHGALD CCVVVILSHGCQASHLQFPQAVY GTDGCPVSVKEKIVNIFNGTSCPSL GGKPKLFFIQACGGEQKDHGFEV ASTSPEDSPGSNPEPDATPFQE GLRTFDQLDAISSLPSPDIFVSYS TFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDD IFEQWAHSEDLSLLLRVANAVSV KGIYKQMPGCFNFRKKLFFKTSASRA
リンカー (Sacl)	CCGCGG	PR
T2A	GAGGGCAGGGGAAGTCTTCTAACATGCGGGGACGTGGAGGAAAATCC CGGGCCC	EGRGSLTTCGDVEENPGP
リンカー (NcoI)	GCATGCGCCACC	ACAT
シグナル ペプチド	ATGGAGTTTGGGTTGTCATGTTGTTTCTCGTCGCTATTCTCAAAGGTG TACAATGCTCCCGC	MEFGLSWLFLVAILKGVCQSR
FRP5-VH	GAAGTCCAATTGCAACAGTCAGGCCCGAATTGAAAAGCCCGGCGAA ACAGTGAAGATATCTTGTAAGCCCTCCGGTTACCTTTTACGAACATG GAATGAAGTGGTCAACAAAGCCCTGGACAGGAGATTGAAGTGGATGG GATGGATCAATACATCAACAGGCGAGTCTACCTTCGAGATGATTTCAA AGGTCGCTTTGACTTCTCACTGGAGACCAAGTCAAATACCGCCTACCTT CAGATTAACAATCTTAAAGCGAGGATATGGCAACCTACTTTTGCAGAA GATGGGAAGTTTATCACGGGTACGTGCCATACTGGGACAAGGAACGA CAGTGACAGTTAGTAGC	EVQLQQSGPELKKPGETVKISCKA SGYPFTNYGMNWWKQAPGQGLK WMGWINTSTGESTFADDFKGRFD FSLETSANTAYLQINNLKSEDMAT YFCARWEVYHGYVPYWGQGTTV TVSS
フレキシブル リンカー	GGCGGTGGAGGCTCCGGTGGAGGCGGCTCTGGAGGAGGAGGTTCA	GGGGSGGGSGGGGS
FRP5VL	GACATCCAATTGACACAATCACACAAATTTCTCTCAACTTCTGTAGGAGA CAGAGTGAGCATAACCTGCAAGCATCCAGGACGTGTACAATGCTGT GGCTTGGTACCAACAGAAGCCTGGACAATCCCCAAATTTGCTGATTTAT TCTCGCTCTAGTAGGTACACTGGGGTACTTCTCGGTTTACGGGCTCTG GGTCCGGACAGATTTACGTTCAACATCAGTTCGTTCAAGCTGAAGA CCTCGCTGTTTATTTTCCAGCAGCACTTCCGAACCCCTTTTACTTTTG GCTCAGGCACTAAGTTGGAATCAAGGCTTTG	DIQLTQSHKFLSTSVGDRVSITCKA SQDVYNAVAWYQQKPGQSPKLLI YSASSRYTGVPSTFSGSGPDF TFTISSVQAEDLAVYFCQHQHFRTP FTFGSGTKLEIKAL
リンカー (NsiI)	Atgcat	MH
CD34 エピトープ	GAACCTCCTACTCAGGGGACTTTCTCAAACGTTAGCACAAACGTAAGT	ELPTQGTFSNVSTNVS
CD8a ストーク	CCCGCCCCAAGACCCCCACACCTGCGCCGACCATTGCTTCTCAACCC CTGAGTTTGAGACCCGAGGCTGCGGCGCAGCTGCGGCGGGGCGCGT GCATACAAGAGGACTCGATTTGCTTGCAGC	PAPRPPTPAPTASQPLSLRPEAC RPAAGGAVHTRGLDFACD
CD8tm + stop tf	ATCTATATCTGGGCACCTCTCGCTGGCACCTGTGGAGTCTTCTGCTCA GCCTGGTTATTACTCTGTACTGTAATCACCAGAAATCGCCGCCGCTTTG TAAGTGTCACAGG	IYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCN HRNRRRVCKCPR
リンカー (Sall)	gtcgac	VD
MyD88	ATGGCCGCTGGGGGCCAGGCGCCGGATCAGTGTCTCCGTATCTTC TACTTCTTCTTTGCCGCTGGCTGCTCTGAACATGCGCGTGAGAAGACG CCTCTCCCTGTTCTTAACGTTCCGACACAAAGTCGCTGCCGATTGGACC GCCCTTGCCGAAGAAATGGACTTTGAATACCTGGAATTAGACAACCTTG AAACACAGGCCGACCCCACTGGCAGACTCCTGGACGCATGGCAGGGA AGACCTGGTGCAAGCGTTGGACGGCTCCTGGATCTCCTGACAAAATG GGACGCGACGACGTAAGTCTGTTGAACCTGGACCTAGCATTGAAGAAGAC TGCCAAAAATATATCTGAAACAACAACAAGAAGAGCCGAAAAACCTC TCCAAGTCGACGAGTGGACTCATCAGTACCCCGAACAGCTGAGCTTG	MAAGGPGAGSAPVSSSTSLPLA ALNMRVRRRLSLFLNVRTQVAAD WTALAEEMDFEYLEIRQLETQADP TGRLLDAWQGRPGASVGRLLDLL TKLGRDDVLELGPSEEDCQKYIL KQQQEEAEKPLQVAADVSSVPRT AELAGITLDDPLGHMPEFADFIC YCPSDI

10

20

30

40

【表 8 - 3】

	CTGGGATTACTACACTCGACGACCCACTCGGACATATGCCTGAAAGATT CGACGCTTTTCATTGCTATTGCCCTCTGACATA	
dCD40	AAGAAAGTTGCAAAGAAACCCACAAATAAGCCCCACACCTAAACAGG AACCCCAAGAAATCAATTTCCCAGATGATCTCCCTGGATCTAATACTGC CGCCCCGGTCCAAGAAACCTGCATGGTTGCCAGCCTGTCACCCAAGA GGACGGAAAAGAAATCACGGATTAGCGTACAAGAGAGACAA	KKVAKKPTNKAPHPKQEPQEINF DDLPGSNTAAPVQETLHGCQPV QEDGKESRISVQERQ
CD3z	AGAGTGAAGTTGACGAGGAGCGCAGACGCCCGCGTACCAGCAGGG CCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTA CGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCTGAGATGGGGGGAA AGCCGAGAAGGAAGAACCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAAGTCGAGA AAGATAAGATGGCGGAGGCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGC GCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCTTTACCAGGGTCTCAGTACA GCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAAGCTCTTCCACCT CGT	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNE LNLGRREEYDVLDRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQDKMAE AYSEIGMKGERRRGKGDGLYQ LSTATKDTYDALHMQALPPR
リンカー	Acg	T
FRBI ^{AA}	TGGCACGAAGGCCTGGAAGAGGCCTCAAGACTTTACTTTGGTGAACGC AACGTTAAAGGCATGTTTCGAGGTGCTGGAACCTTGCATGCAATGATG GAGCGAGGTCTCAGACACTCAAAGAGACATCTTTAACCAGGCGTAT GGACGGGACCTCATGGAGGCTCAGGAATGGTGGCGCAAGTACATGAAA AGTGGGAATGTGAAGGATCTGCTGCAAGCATGGGATCTGTATTACCAC GTGTTTAGACGGATCAGCAAA	WHEGLEEASRLYFGERNVKGME VLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQ AYGRDLMEAGQEWCRKYMKSGNV KDLLQAWDLYYHVFRISK
リンカー (BsiVI)	Cgtacg	RT
FRBI	TGGCATGAAGGGTTGGAAGAAGCTTCAAGGCTGTACTTCGGAGAGAGG AACGTGAAGGGCATGTTTGAGGTCTTGAACCTCTGCACGCCATGATG GAACGGGGACCGCAGACACTGAAAGAAACCTCTTTAATCAGGCCTAC GGCAGAGACCTGATGGAGGCCCAAGAATGGTGTAGAAAGTATATGAAA TCCGGTAACGTGAAAGACCTGCTCCAGGCGCTGGGACCTTTATTACCAT GTGTTACGGCGGATCAGTAAGTAA	WHEGLEEASRLYFGERNVKGME VLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQ AYGRDLMEAGQEWCRKYMKSGNV KDLLQAWDLYYHVFRISK*

10

20

【0 5 2 9】

【表 9 - 1】

表9 pBP0545.pSFG.iCasp9.2A.Her2scFv.Q.CD8stm.MC-ゼータ

フラグメント	ヌクレオチド	ポリペプチド
コザック (リボソーム 結合配列)	GCCACC	N/A
FKBP12v36	ATGGGAGTGCAGGTGGAGACTATTAGCCCCGAGATGGCAGAACATTC CCCAAAAGAGGACAGACTTGCCTCGTGCTATTACTGGAATGCTGGAA GACGGCAAGAAGGTGGACAGCAGCCGGGACCGAAACAAGCCCTTCAA GTTTCATGCTGGGGAAGCAGGAAGTGATCCGGGGCTGGGAGGAAGGAG TCGCACAGATGTCAGTGGGACAGAGGGCCAAACTGACTATTAGCCAG ACTACGCTTATGGAGCAACCGGCCACCCGGGATCATTCCCCCTCATG CTACACTGGTCTTCGATGTGGAGCTGCTGAAGCTGGAA	MGVQVETISPGDGRTPKRGQTC VVHYTGMLEDGKKVDSSRDNRKP FKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSV GQRAKLTIAPDYAYGATGHPGIIP HATLVFDVELLKE
リンカー	AGCGGAGGAGGATCCGGA	SGGGSG
Aカスパーゼ9	GTGGACGGGTTTGGAGATGTGGGAGCCCTGGAATCCCTGCGGGGCAA TGCCGATCTGGCTTACATCCTGTCTATGGAGCCTTGCAGGCACTGTCT GATCATTAAACATGTGAACCTTCTGCAGAGAGAGCGGGCTGCGGACCAG AACAGGATCCAATATTGACTGTGAAAGCTGCGGAGAAGGTTCTCTAGT CTGCACCTTATGGTCGAGGTGAAAGCGATCTGACCGCTAAGAAAAATG GTGCTGGCCCTGCTGGAACCTGGCTCGGCAGGACCATGGGGCACTGGA TTGCTGCGTGGTCTGTATCCTGAGTCACGGCTGCCAGGCTTCACATCT GCAGTTCCCTGGGGCAGTCTATGGAACGTACGGCTGTCCAGTCAGCGT GGAGAAGATCGTGAACATCTTCAACGGCACCTCTTCCCAAGTCTGGG CGGGAAGCCCAACTGTCTTTATTCAGGCCTGTGGAGGCGAGCAGAA	VDGFGDVGALSLRGNADLAYLS MEPCGHCLINNVCRESGLRTR TGSNIDCEKLRRRFFSLHFMVEVK GDLTAKKMYLALLELARQDHGALD CCVVVILSHGCQASHLQFPGAVY GTDGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSL GGKPKLFFIQACGGEGQKDHGFEV ASTSPEDESPGSNPEPDATPFQE GLRTFDQLDAISSLFTPSDIFVSYS TFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDD

30

40

【表 9 - 2】

	AGATCAGCGCTTCGAAGTGGCTAGCACCTCCCCGAGGACGAATCACC TGGGAAGCAACCCTGAGCCAGATGCAACCCCTTCCAGGAAGGCCTGAG GACATTTTGACAGCTGGATGCCATCTCAAGCCTGCCACACCTTCTGAC ATTTTCGTCTTACAGTACTTTCCCTGGATTGTGAGCTGGCGCGATC CAAAGTCAGGCAGCTGGTACGTGGAGACACTGGACGATATCTTTGAGC AGTGGGCCCCATTCTGAAGACCTGCAGAGTCTGCTGCTGCGAGTGGCCA ATGCTGTCTCTGTGAAGGGGATCTACAAACAGATGCCAGGATGCTTCAA CTTTCTGAGAAAGAACTGTTCTTTAAGACCTCCGCATCTAGGGCC	IFEQWAHSEDLQSLLRVANAVSV KGIYKQMPGCFNFKLFFKTS SRA
リンカー (SaclI)	CCGCGG	PR
T2A	GAGGGCAGGGGAAGTCTTCTAACATGCGGGGACGTGGAGGAAATCC CGGGCCC	EGRGSLTTCGDVEENPGP
リンカー (NcoI)	GCATGCGCCACC	ACAT
シグナル ペプチド	ATGGAGTTTGGGTTGTCATGGTTGTTTCTCGTCGCTATTCTCAAAGGTG TACAATGCTCCCGC	MEFGLSWLFLVAILKGVCSSR
FRP5-VH (抗-Her2)	GAAGTCCAATTGCAACAGTCAGGCCCCGAATTGAAAAAGCCCGGCGAA ACAGTGAAGATATCTTGTAAAGCCTCCGGTTACCCCTTTACGAACTATG GAATGAAGTGGGTCAAACAAGCCCTGGACAGGGATTGAAGTGGATGG GATGGATCAATACATCAACAGGCGAGTCTACCTTCGCGAGATGATTTCAA AGGTCGCTTTGACTTCTCACTGGAGACAGTGCAAATACCGCCTACCTT CAGATTAACAATCTTAAAGCGAGGATATGGCAACCTACTTTTTCGCGAA GATGGGAAGTTTATCACGGGTACGTGCCATCTGGGGACAAGGAACGA CAGTGACAGTTAGTAGC	EVQLQQSGPELKKPGETVKISCKA SGYPFTNYGMNWKQAPGQGLK VMGWINTSTGESTFADDFKGRFD FSLETSANTAYLQINNLKSEDMAT YFCARWEVYHGYVPYWGQGTTV TVSS
フレキシブル リンカー	GGCGGTGGAGGCTCCGGTGGAGGCGGCTCTGGAGGAGGAGGTTCA	GGGGSGGGSGGGGS
FRP5VL (抗-Her2)	GACATCCAATTGACACAATCACACAAATTTCTCTCAACTTCTGTAGGAGA CAGAGTGAGCATAACCTGCAAAGCATCCAGGACGTGTACAATGCTGT GGCTTGGTACCAACAGAGCCTGGACAATCCCCAAAATTGCTGATTTAT TCTGCCTCTAGTAGGTACACTGGGGTACCTTCTCGTTTACGGGCTCTG GGTCCGGACCAAGATTTACGTTTCAACATCAGTTCCGTTCAAGCTGAAGA CCTCGCTGTTATTTTGGCAGCAGCACTCCGAACCCCTTTTACTTTTG GCTCAGGCACTAAGTTGGAATCAAGGCTTTG	DIQLTQSHKFLSTSVGDRVSIKCA SQDVYNNAVWYQKPGQSPKLLI YSASSRYTGVPSTFTGSGSGPDF TFTISSVQAEDLAVYFCQGHFRTP FTFGSGTKLEIKAL
リンカー (NsiI)	Atgcat	MH
CD34 エピトープ	GAATTCCTACTCAGGGGACTTTCTCAAACGTTAGCACAAACGTAAGT	ELPTQGTFSNVSTNVS
CD8a ストーク	CCCGCCCCAAGACCCCCACACCTGCGCCGACCATTTGCTTCTCAACCC CTGAGTTTGAGACCCGAGGCTGCGCGCCAGCTGCCGCGGGGCGCT GCATACAAGAGGACTCGATTTCGCTTGCAGC	PAPRPPTPAPTASQPLSLRPEAC RPAAGGAVHTRGLDFACD
CD8tm + stop tf	ATCTATATCTGGGCACCTCTCGCTGGCACCTGTGGAGTCTTCTGCTCA GCCTGGTTATTACTCTGTACTGTAATCACCGGAATCGCGCGCGCTTTG TAAGTGTCACAGG	IYWAPLAGTCGVLLSLVITLYCN HRNRRRVCKCPR
リンカー (Sall)	gtcgac	VD
MyD88	ATGGCCGCTGGGGGCCAGGCGCCGATCAGCTGCTCCCGTATCTTC TACTTCTTCTTGGCGCTGGCTGCTCTGAACATGCGCGTGAGAAGACG CCTCTCCCTGTTCTTAACGTTTCGCACACAAGTCTGCTGCCGATTGGACC GCCCTTGGCGAAGAAATGGACTTTGAATACCTGGAAATTAGACAATTG AAACACAGGCCGACCCCACTGGCAGACTCCTGGACGCATGGCAGGGA AGACCTGGTGCAAGCGTTGGACGGCTCCTGGATCTCCTGACAAAACG GGACGCGACGACGTAAGTCTTGAAGTGGACCTAGCATTGAAGAAGAC TGCCAAAAATATATCTGAAACAACAAGAAGAAGCCGAAAAACCTC TCCAAGTCGACGAGTGGACTCATCAGTACCCCGAACAGCTGAGCTTG CTGGGATTACTACACTCGACGACCCACTCGGACATATGCTGAAAGATT CGACGCTTTCATTGCTATTGCCCTCTGACATA	MAAGGPGAGSAAPVSSTSSPLA ALNMRVRRRLSFLNVRTQVAAD WTALAEEMDFEYLEIRQLETQADP TGRLLDAWQGRPGASVGRLLDLL TKLGRDDVLELGPSEEDCQKYL KQQQEEAEKPLQVAADVSSVPR AELAGITLDDPLGHMPERFDAFIC YCPDSI
dCD40	AAGAAAGTTGCAAGAAACCCACAAATAAGCCCCACACCCTAAACAGG AACCCCAAGAAATCAATTTCCAGATGATCTCCCTGGATCTAATACTGC	KKVAKKPTNKAPHKQEPQINF DDLPGSNTAAPVQETLHGCPVT

10

20

30

40

【表 9 - 3】

	CGCCCCGGTCCAAGAAACCCCTGCATGGTTGCCAGCCTGTACCCCAAGA GGACGGAAGAATCACGGATTAGCGTACAAGAGAGACAA	QEDGKESRISVQERQ
CD3z	AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCGCGTACCAGCAGGG CCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTA CGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCGTAGATGGGGGGAA AGCCGAGAAGGAAGAACCCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAAGTGCAGA AAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGC GCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACA GCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAAGCTCTTCCACCT CGTga	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNE LNLGRREEYDVLDRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQDKMAE AYSEIGMKGERRRGKGDGLYQG LSTATKDTYDALHMQALPPR*

【0530】

(材料および方法)

以下のセットの材料および方法は、本出願のある種の実施形態を整えるまたはアッセイするために参照され得る。

【0531】

レトロウイルスの生成および末梢血単核細胞 (PBMC) の形質導入

HEK 293T細胞 (1.5×10^5) を、10 mL DMEM4500) (グルタミン、ペニシリン/ストレプトマイシンおよび10% ウシ胎仔血清を補充) の入った、100 mm組織培養ディッシュに播種する。16~30時間のインキュベーション後、細胞を、Novagen's Gene Juice (登録商標) プロトコルを使用してトランスフェクトする。簡潔には、各トランスフェクションに関して、0.5 mL OptiMEM (Life Technologies) を、1.5 mL微量遠心チューブの中へとピペットで入れ、30 μ l Gene Juice 試薬を添加し、続いて5秒間ボルテックスする。サンプルを5分間静置して、Gene Juice 懸濁物を沈殿させる。DNA (合計15 μ g) を各チューブに添加し、ピペットで4回上下させることによって混合する。サンプルを、Gene Juice-DNA複合体形成のために5分間静置させ、懸濁物を、293T細胞の1つのディッシュに滴下する。代表的なトランスフェクションは、複製不能性レトロウイルスを生成するために、これらプラスミドを含んだ: 3.75 μ g の、gag-polを含むプラスミド (pEQ-PAM3 (-E))、2.5 μ g の、ウイルスエンベロープ (例えば、RD114) を含むプラスミド、目的の遺伝子を含むレトロウイルス=3=3.75 μ g。

【0532】

PBMCを、組織培養プレートのウェルに予めコーティングされた抗CD3抗体および抗CD28抗体で刺激する。プレーティングして24時間後、100 U/ml IL-2を上記培養物に添加する。2日目または3日目に、トランスフェクトされた293T細胞に由来するレトロウイルスを含む上清を、0.45 μ mで濾過し、レトロネクチン (1 cm² 表面あたり、1 mlのPBS中10 μ l/ウェル) で予め被覆した非TC処理プレート上で遠心分離する。プレートを、2000 gで2時間、室温で遠心分離する。CD3/CD28芽細胞を、100 U/ml IL-2を補充した完全培地中で 2.5×10^5 細胞/mlで再懸濁し、1000 $\times$ gで10分間、室温で、プレート上で遠心分離する。3~4日間のインキュベーション後、細胞を計数し、形質導入効率を、フローサイトメトリーによって、適切なマーカー抗体 (代表的には、CD34またはCD19) を使用して測定する。細胞を、100 U/ml IL-2を補充した完全培地中で維持し、細胞に、2~3日ごとに新鮮培地およびIL-2を再供給し、細胞を必要に応じて分けて、拡大する。

【0533】

培養細胞におけるT細胞カスパーゼアッセイ

適切なレトロウイルスでの形質導入の後、50,000個のTを、IL-2なしのCTL培地中、自殺薬物 (リミズシドまたはラパマイシン) の存在下または非存在下で、96ウェルプレートの1ウェルあたりに播種する。Incucyte機器を使用するアポトーシスの検出を可能にするために、2 μ MのIncucyteTM Kinetic Ca

10

20

30

40

50

spase-3/7 Apoptosis 試薬 (Essen Bioscience, 4440) を各ウェルに添加して、総容積 200 μ l にする。そのプレートを、5 分間、400 $\times$ g で遠心分離し、Incucyte (Dual Color Model 4459) の中に入れ、緑色蛍光を 2~3 時間ごとに合計 48 時間にわたって 10 $\times$ 対物レンズでモニターする。画像分析を、「TCells_caspase_agent_phase_green_10x_MLD」処理定義を使用して行う。「Total Green Object Integrated Intensity」測定法を使用して、カスパーゼ活性化を定量する。各条件を二連で行い、各ウェルを 4 個の異なる位置で画像化する。

【0534】

T 細胞抗腫瘍アッセイ

HPAC PSCA⁺ 腫瘍細胞を、NucLightTM Red Lentiviral Reagent (Essen Bioscience, 4625) を使用して、核局在化 RFP タンパク質で安定して標識する。共培養を設定するために、4000 HPAC-RFP 細胞を、100 μ l の IL-2 なしの CTL 培地中、少なくとも 4 時間にわたって 96 ウェルプレートの各ウェルに播種して、腫瘍細胞を接着させる。適切なレトロウイルスで形質導入し、培養物中で少なくとも 7 日間静置させた後、T を、種々の E:T 比に従って、HPAC-RFP 含有 96 ウェルプレートへと播種する。リミズシドもまた上記培養物に添加して、300 μ l 総容積/ウェルにする。各プレートを二連で、一方のプレートを Incucyte でモニターするため、一方のプレートを 2 日目に ELISA アッセイ用に上清収集するために設定する。プレートを 5 分間、400 $\times$ g で遠心分離し、Incucyte (Dual Color Model 4459) の中に入れて、赤色蛍光（および T 細胞が GFP-Fluc で標識される場合には緑色蛍光）を 2~3 時間ごとに合計 7 日間にわたって 10 $\times$ 対物レンズでモニターする。画像分析を、「HPAC-RFP_TcellsGFP_10x_MLD」処理定義を使用して行う。7 日目に、HPAC-RFP 細胞を、「Red Object Count (1/ウェル)」測定法を使用して分析する。また、7 日目に、0 nM または 10 nM の自殺薬物を共培養物の各ウェルに添加し、Incucyte の中に戻して、T 細胞排除をモニターする。8 日目に、T 細胞-GFP 細胞を、「Total Green Object Integrated Intensity」測定法を使用して分析する。各条件を、少なくとも 2 連で行い、各ウェルを 4 個の異なる位置で画像化する。

【0535】

Raji 細胞抗腫瘍活性を測定するために、細胞集団を、incucyte よりむしろフローサイトメトリーによって決定する。なぜならこの細胞はプレートに接着しないからである。緑色蛍光タンパク質の安定な発現によって標識した Raji 細胞 (ATCC) (Raji-GFP) は、その細胞表面上に CD19 を発現しかつ抗 CD19 CAR にとっての標的である、パーキットリンパ腫細胞株である。50000 Raji-GFP 細胞を、10000 CAR-T 細胞を有する 24 ウェルプレートに播種する (1:5 E:T 比)。培地上清を、活性化された CAR-T 細胞によるサイトカイン放出を決定するために、48 時間で採取する。腫瘍殺滅の程度を、7 日および 14 日で、GFP 標識腫瘍細胞および CD3 標識 T 細胞の割合によってフローサイトメトリー (Galeos, Beckman-Coulter) によって決定する。

【0536】

I V I S 画像化

標識された T 細胞を有する NSG マウスをイソフルランで麻酔し、100 μ l D-シフェリン (PBS 中 15 mg/ml ストック溶液) を下腹部の腹腔内 (i.p.) 経路によって注射する。10 分後、その動物を、麻酔チャンバから I V I S プラットフォームへと移す。I V I S イメージャー (Perkin-Elmer) で背側および腹側から画像を得、Living Image ソフトウェア (I V I S Imaging Systems) で BLI を定量および記録する。

【0537】

ウェスタンブロット

適切なレトロウイルスでの形質導入後、6,000,000 T細胞を、3ml CTL培地中、6ウェルプレートの1ウェルあたりに播種する。24時間後、細胞を収集し、冷PBS中で洗浄し、プレートの中で(in the plated) 1×Halt Protease Inhibitor Cocktail (Thermo, 87786)を含むRIPA Lysis and Extraction Buffer (Thermo, 89901)中、氷上で30分間溶解する。その溶解物を、16,000×gで20分間、4℃で遠心分離し、その上清を新しいエッペンドルフチューブに移す。タンパク質アッセイを、製造業者の推奨に従って、Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo, 23227)を使用して行う。SDS-PAGE用のサンプルを調製するために、50 µgの溶解物を4×Laemmliサンプル緩衝液(Bio Rad, 1610747)と混合し、95℃で10分間加熱する。その間に、10% SDSゲルを、Bio Radキャスティング装置および30% アクリルアミド/ビス溶液(Bio Rad, 160158)を使用して調製する。上記サンプルを、Precision Plus Protein Dual Color Standards (Bio Rad, 1610374)とともに負荷し、1×Tris/グリシン泳動緩衝液(Bio Rad, 1610771)中、140Vで90分間泳動する(ran)。タンパク質分離後、そのゲルを、iBlot 2デバイス(Thermo, IB21001)においてプログラム0を使用してPVDF膜に転写する(合計7分)。その膜を、iBind Flex Western Device (Thermo, SLF2000)を使用して、製造業者の推奨に従って一次抗体および二次抗体でプローブする。抗MyD88抗体(Sigma, SAB1406154)を、1:200希釈で使用し、二次HRP結合体化ヤギ抗マウスIgG抗体(Thermo, A16072)を、1:500希釈で使用。カスパーゼ-9抗体(Thermo, PA1-12506)を、1:200希釈で使用し、二次HRP結合体化ヤギ抗ウサギIgG抗体(Thermo, A16104)を、1:500希釈で使用。β-アクチン抗体(Thermo, PA1-16889)を、1:1000希釈で使用し、二次HRP結合体化ヤギ抗ウサギIgG抗体(Thermo, A16104)を、1:1000希釈で使用する。その膜を、SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate Kit (Thermo, 34096)で発色させ、Gel Logic 6000 ProカメラおよびCareStream MIソフトウェア(v. 5.3.1.16369)を使用して画像化する。

【0538】

レポーターアッセイのための細胞のトランスフェクション

HEK 293T細胞(1.5×10^5)を、10mL DMEM4500(グルタミン、ペニシリン/ストレプトマイシンおよび10% ウシ胎仔血清を補充)が入った、100mm組織培養ディッシュに播種する。16~30時間インキュベーション後、細胞を、Novagen's Gene Juice(登録商標)プロトコルを使用してトランスフェクトする。簡潔には、各トランスフェクションについて、0.5mL OptiME Mを、1.5mL微量遠心チューブにピペットで入れ、15 µl Gene Juice試薬を添加し、続いて5秒間ボルテックスする。サンプルを5分間静置して、Gene Juice懸濁物を沈殿させる。DNA(合計5 µg)を各チューブに添加し、ピペットで4回上下させることによって混合する。サンプルを、Gene Juice-DNA複合体形成のために5分間静置させ、その懸濁液を、293T細胞の1つのディッシュに滴下する。代表的なトランスフェクションは、1 µg NFκB-SEAP(5)、4 µg Go-CAR(pBP0774)または4 µg MC-Rap-CAR(pBP1440)(1)を含む。

【0539】

二量体化薬物での細胞の刺激

10

20

30

40

50

トランスフェクションの24時間後(4.1)、293T細胞を96ウェルプレートへと分け、二量体化薬物の希釈物と共にインキュベートする。簡潔には、100 μ l 培地を、96ウェル平底プレートの各ウェルに添加する。薬物を、プレート上に置かれるべき濃度勾配の最高濃度の4倍の濃度へとチューブ中で希釈する。100 μ lの二量体化リガンド(リミズシド、ラパマイシン、イソプロポキシラパマイシン)を、プレートの最も右側にある3個のウェルの各々に添加する(アッセイは、それによって三連で行われる)。次いで、各薬物含有ウェルからの100 μ lを、隣のウェルへと移し、そのサイクルを10回反復して、連続2倍段階勾配を生成する。最後のウェルは未処理にし、基底レポーター活性のコントロールとして働く。次いで、トランスフェクトした293細胞を、トリプシン処理し、完全培地で洗浄し、培地中に懸濁し、薬物を含む(または薬物なし)各ウェルへと100 μ lをアリコートする。細胞を24時間インキュベートする。

10

【0540】

レポーター活性のアッセイ

SR α プロモーターは、SV40初期領域(これは、T抗原転写を駆動する)およびヒトT細胞リンパ向性ウイルス(HTLV-1)の長末端反復(LTR)の一部(RおよびU5)を含むハイブリッド転写エレメントである。このプロモーターは、高い構成的なレベルの分泌型アルカリホスファターゼ(SeAP)レポーター遺伝子を駆動する。二量体化によるカスパーゼ-9の活性化は、細胞死を迅速にもたらし、細胞が死んでいるの割合は、薬物の量の増大と共に増大する。細胞が死ぬ場合、レポーターの転写および翻訳は停止するが、既に分泌されたレポータータンパク質は培地の中に残る。構成的SeAP活性の喪失は、それによって、細胞死の薬物依存性活性化の有効な代用である。

20

【0541】

薬物刺激の24時間後に、96ウェルプレートを包んで蒸発を妨げ、65 $^{\circ}$ Cで2時間インキュベートして、内因性および血清ホスファターゼを不活化するが、その一方で、熱安定性SeAPレポーターは残る(3、12、14)。各ウェルからの100 μ l サンプルを、側面が黒い96ウェルアッセイプレートの個々のウェルへと負荷する。サンプルを、4~16時間にわたって0.5M ジエタノールアミン(pH10.0)中の0.5mM 4-メチルウンベリフェリルホスフェート(4-MUP)とともにインキュベートする。ホスファターゼ活性を、355nmでの励起および460nmでの発光を有する蛍光によって測定する。データを、表作成のためにMicrosoft Excelのスプレッドシートに移し、GraphPad Prismでグラフ化する。

30

【0542】

イソプロピルオキシラパマイシンの生成

Luengoらの方法((J. Org. Chem 59:6512, (1994)), (17, 18))を使用する。簡潔には、20mgのラパマイシンを、3mL イソプロパノール中に溶解し、22.1mgのp-トルエンスルホン酸を添加し、室温で4~12時間攪拌しながらインキュベートする。終了時に、5mL 酢酸エチルを添加し、生成物を、飽和炭酸水素ナトリウムで5回、ブライン(飽和塩化ナトリウム)で3回抽出する。その有機相を乾燥させ、酢酸エチル:ヘキサン(3:1)中に再溶解する。立体異性体および微量の生成物を、3~4 KPa圧下で、3:1 酢酸エチル:ヘキサンを用いる10~15mL シリカゲルカラムでのFLASHクロマトグラフィーによって分離し、画分を乾燥させる。画分を、237nM、267nM、278nMおよび290nMでの分光測光法によってアッセイし、FRB対立遺伝子特異的転写スイッチにおける結合特異性に関して試験する。

40

【0543】

本明細書で論じられる方法(ベクターを構築するための方法、患者への投与、細胞をトランスフェクトまたは形質転換する、アッセイ、および患者をモニターするための方法が挙げられるが、これらに限定されない)はまた、以下の特許および特許出願において見出され得、それらの全体において本明細書に参考として援用される。

【0544】

50

米国特許出願第14/210,034号(標題METHODS FOR CONTROLLING T CELL PROLIFERATION、2014年3月13日出願) ; 米国特許出願第13/112,739号(2011年5月20日出願、米国特許第9,089,520号として2015年7月28日発行、および標題METHODS FOR INDUCING SELECTIVE APOPTOSIS) ; 米国特許出願第14/622,018号(2014年2月13日出願、標題METHODS FOR ACTIVATING T CELLS USING AN INDUCIBLE CHIMERIC POLYPEPTIDE) ; 米国特許出願第13/112,739号(2011年5月20日出願、標題METHODS FOR INDUCING SELECTIVE APOPTOSIS) ; 米国特許出願第13/792,135号(2013年3月10日出願、標題MODIFIED CASPASE POLYPEPTIDES AND USES THEREOF) ; 米国特許出願第14/296,404号(2014年6月4日出願、標題METHODS FOR INDUCING PARTIAL APOPTOSIS USING CASPASE POLYPEPTIDES) ; 米国仮特許出願第62/044,885号(2014年9月2日出願)、および米国特許出願第14/842,710号(2015年9月1日出願、各々は標題COSTIMULATION OF CHIMERIC ANTIGEN RECEPTORS BY MyD88 AND CD40 POLYPEPTIDES) ; 米国特許出願第14/640,554号(2015年3月6日出願、標題CASPASE POLYPEPTIDES HAVING MODIFIED ACTIVITY AND USES THEREOF) ; 米国特許第7,404,950号(Spencer, D. らへ2008年6月29日発行)、Spencer, D. らによる米国特許出願第12/445,939号(2010年10月26日出願) ; Spencer, D. らによる米国特許出願第12/563,991号(2009年9月21日出願) ; Slawin, K. らによる米国特許出願第13/087,329号(2011年4月14日出願) ; Spencer, D. らによる米国特許出願第13/763,591号(2013年2月8日出願) ; ならびに国際特許出願番号PCT/US2014/022004(2014年3月7日出願、2014年10月9日にPCT/US2014/022004として公開、標題MODIFIED CASPASE POLYPEPTIDES AND USES THEREOF)。

【0545】

(実施例17：代表的実施形態)

以降で提供されるのは、本技術のある種の実施形態の例である。

【0546】

実施形態A1.

a) 第1のキメラポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチドであって、ここで該第1のキメラポリペプチドは、膜会合ポリペプチド領域および第1のリガンド結合領域を含む、第1のポリヌクレオチド ; ならびに

b) 第2のキメラポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチドであって、ここで該第2のキメラポリペプチドは、アポトーシス促進ポリペプチド領域および第2のリガンド結合領域を含み、ここで該第2のリガンド結合領域は、該第1のリガンド結合領域とは異なるアミノ酸配列を有する、第2のポリヌクレオチド ;

を含む改変された細胞であって、ここで該第1のリガンド結合領域および第2のリガンド結合領域は、第1の多量体リガンドに結合できる、改変された細胞。

【0547】

実施形態A1. 1. 前記第2のリガンド結合領域は、前記第1の多量体リガンドに結合でき、前記第1のリガンド結合領域に有意に結合しない第2の多量体リガンドに結合できる、実施形態A1に記載の改変された細胞。

【0548】

実施形態A1. 2. 前記第1のリガンド結合領域は、前記第2の多量体リガンドに結合できない、実施形態A1~A1.1のいずれか1つに記載の改変された細胞。

【0549】

実施形態A2. 前記膜会合ポリペプチドは、抗原認識部分をさらに含む、実施形態A1～A1.2のいずれか1つに記載の改変された細胞。

【0550】

実施形態A3. 前記膜会合ポリペプチドは、T細胞レセプターを含む、実施形態A1～A1.2のいずれか1つに記載の改変された細胞。

【0551】

実施形態A4. 前記膜会合ポリペプチドは、キメラ抗原レセプターを含む、実施形態A1～A1.2のいずれか1つに記載の改変された細胞。

【0552】

実施形態A5. 前記キメラ抗原レセプターは、(i)膜貫通領域、(ii)T細胞活性化分子、および(iii)抗原認識部分を含む、実施形態A4に記載の改変された細胞。

【0553】

実施形態A6. 前記キメラ抗原レセプターは、(i)膜貫通領域、(ii)MyD88ポリペプチドまたはTIRドメインを欠く短縮型MyD88ポリペプチド、(iii)CD40細胞外ドメインを欠くCD40細胞質ポリペプチド領域および(iv)T細胞活性化分子、(v)抗原認識部分を含む、実施形態A4に記載の改変された細胞。

【0554】

実施形態A7～A8. 留保。

【0555】

実施形態A9. 前記第1のリガンド結合領域および第2のリガンド結合領域は、ラパログに結合する、実施形態A1～A8のいずれか1つに記載の改変された細胞。

【0556】

実施形態A9.1. 前記ラパログは、S-o, p-ジメトキシフェニル(DMOP)-ラパマイシン、R-イソプロポキシラパマイシン、およびS-ブタンスルホンアミドランプからなる群より選択される、実施形態A9に記載の改変された細胞。

【0557】

実施形態A10. 前記第1のリガンド結合領域は、FKBP12-ラパマイシン結合ドメインFRB_Lを含む、実施形態A1～A9.1のいずれか1つに記載の改変された細胞。

【0558】

実施形態A10.1. 前記第1のリガンド結合領域は、少なくとも2個のFRB_Lドメインを含む、実施形態A10に記載の改変された細胞。

【0559】

実施形態A10.2. 前記第1のリガンド結合領域は、少なくとも3個のFRB_Lドメインを含む、実施形態A10に記載の改変された細胞。

【0560】

実施形態A10.3. 前記第1のリガンド結合領域は、KLW(T2098L)、KTF(W2101F)、およびKLF(T2098L、W2101F)からなる群より選択されるFRBドメインである、実施形態A1～A10のいずれか1つに記載の改変された細胞。

【0561】

実施形態A11. 前記第2のリガンド結合領域は、FKBP12多量体化領域を含む、実施形態A1～A10.3のいずれか1つに記載の改変された細胞。

【0562】

実施形態A11.1. 前記第2のリガンド結合領域は、FKBPv36リガンド結合領域を含む、実施形態A11に記載の改変された細胞。

【0563】

実施形態A12. 前記アポトーシス促進ポリペプチドは、カスパーゼ1、カスパーゼ

10

20

30

40

50

2、カスパーゼ3、カスパーゼ4、カスパーゼ5、カスパーゼ6、カスパーゼ7、カスパーゼ8、カスパーゼ9、カスパーゼ10、カスパーゼ11、カスパーゼ12、カスパーゼ13、またはカスパーゼ14、FADD (DED)、APAF1 (CARD)、CRADD/RAIDD (CARD)、ASC (CARD)、Bax、Bak、Bcl-xL、Bcl-2、RIPK3、およびRIPK1-RHIMからなる群より選択される、実施形態A1～A11のいずれか1つに記載の改変された細胞。

【0564】

実施形態A13. 前記アポトーシス促進ポリペプチドは、カスパーゼポリペプチドである、実施形態A1～A11のいずれか1つに記載の改変された細胞。

【0565】

実施形態A14. 前記アポトーシス促進ポリペプチドは、カスパーゼ9ポリペプチドである、実施形態A1～A12のいずれか1つに記載の改変された細胞。

【0566】

実施形態A15.

a) キメラ抗原レセプターをコードする第1のポリヌクレオチドであって、ここで該キメラ抗原レセプターは、(i) 膜貫通領域、(ii) T細胞活性化分子、(iii) 抗原認識部分、および(iv) FKBP12-ラバマイシン結合ドメイン(FRBL)を含む、第1のポリヌクレオチド；ならびに

b) キメラカスパーゼポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチドであって、ここで該キメラカスパーゼポリペプチドは、(i) FKBP多量体化領域および(ii) カスパーゼポリペプチドを含む、第2のポリヌクレオチド、を含む改変された細胞。

【0567】

実施形態A16.

a) キメラ抗原レセプターをコードする第1のポリヌクレオチドであって、ここで該キメラ抗原レセプターは、(i) 膜貫通領域、(ii) MyD88ポリペプチドまたはTIRドメインを欠く短縮型MyD88ポリペプチド、(iii) CD40細胞外ドメインを欠くCD40細胞質ポリペプチド領域、(iv) T細胞活性化分子、(v) 抗原認識部分、およびFKBP12-ラバマイシン結合ドメイン(FRBL)を含む、第1のポリヌクレオチド；ならびに

b) キメラカスパーゼポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチドであって、ここで該キメラカスパーゼポリペプチドは、(i) FKBP多量体化領域および(ii) カスパーゼポリペプチドを含む、第2のポリヌクレオチド、を含む改変された細胞。

【0568】

実施形態A17. 前記第1のリガンド結合領域は、FRBLであり、前記第2のリガンド結合領域は、FKBPv36である、実施形態A1～A6のいずれか1つに記載の改変された細胞。

【0569】

実施形態A18. 前記T細胞活性化分子は、ITAMを含みシグナル1を与える分子である、実施形態A15～A17のいずれか1つに記載の改変された細胞。

【0570】

実施形態A19. 前記T細胞活性化分子は、CD3ζポリペプチドである、実施形態A15～A17のいずれか1つに記載の改変された細胞。

【0571】

実施形態A20. 前記T細胞活性化分子は、Fcイプシロンレセプターガンマ(FcεR1γ)サブユニットポリペプチドである、実施形態A15～A17のいずれか1つに記載の改変された細胞。

【0572】

実施形態A21. 前記抗原認識部分は、腫瘍細胞上の抗原に結合する、実施形態A2

10

20

30

40

50

～A 2 0 のいずれか 1 つに記載の改変された細胞。

【0 5 7 3】

実施形態 A 2 2 . 前記抗原認識部分は、過剰増殖性疾患に関与する細胞上の抗原に結合する、実施形態 A 2 ～A 2 0 のいずれか 1 つに記載の改変された細胞。

【0 5 7 4】

実施形態 A 2 3 . 前記抗原認識部分は、P S M A、P S C A、M U C 1、C D 1 9、R O R 1、メソテリン、G D 2、C D 1 2 3、M U C 1 6、および H e r 2 / N e u からなる群より選択される抗原に結合する、実施形態 A 2 ～A 2 0 のいずれか 1 つに記載の改変された細胞。

【0 5 7 5】

実施形態 A 2 4 . 前記抗原認識部分は、ウイルス抗原または細菌抗原に結合する、実施形態 A 2 ～A 2 0 のいずれか 1 つに記載の改変された細胞。

【0 5 7 6】

実施形態 A 2 5 . 前記抗原認識部分は、一本鎖可変フラグメントである、実施形態 A 2 ～A 2 0 のいずれか 1 つに記載の改変された細胞。

【0 5 7 7】

実施形態 A 2 6 . 前記膜貫通領域は、C D 8 膜貫通領域である、実施形態 A 5 ～A 2 5 のいずれか 1 つに記載の改変された細胞。

【0 5 7 8】

実施形態 A 2 7 . 前記カスパーゼポリペプチドは、カスパーゼ 9 ポリペプチドである、実施形態 A 1 3 ～A 2 6 のいずれか 1 つに記載の改変された細胞。

【0 5 7 9】

実施形態 A 2 8 . 前記カスパーゼポリペプチドは、配列番号 3 0 0 のアミノ酸配列を含む、実施形態 A 1 3 ～A 2 6 のいずれか 1 つに記載の改変された細胞。

【0 5 8 0】

実施形態 A 2 9 . 前記カスパーゼポリペプチドは、表 5 または表 6 中のカスパーゼバリエーションからなる群より選択されるアミノ酸置換を含む改変されたカスパーゼ 9 ポリペプチドである、実施形態 A 1 3 ～A 2 6 のいずれか 1 つに記載の改変された細胞。

【0 5 8 1】

実施形態 A 3 0 . 前記カスパーゼポリペプチドは、D 3 3 0 A、D 3 3 0 E、および N 4 0 5 Q からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む改変されたカスパーゼ 9 ポリペプチドである、実施形態 A 3 ～A 2 6 のいずれか 1 つに記載の改変された細胞。

【0 5 8 2】

実施形態 A 3 1 . 前記短縮型 M y D 8 8 ポリペプチドは、配列番号 2 1 4 のアミノ酸配列、またはその機能的フラグメントを有する、実施形態 A 6 ～A 3 0 のいずれか 1 つに記載の改変された細胞。

【0 5 8 3】

実施形態 A 3 2 . 前記細胞質 C D 4 0 ポリペプチドは、配列番号 2 1 6 のアミノ酸配列、またはその機能的フラグメントを有する、実施形態 A 6 ～A 3 1 のいずれか 1 つに記載の改変された細胞。

【0 5 8 4】

実施形態 A 3 3 . 前記抗原認識部分は、C D 1 9 に結合する一本鎖可変フラグメントである、実施形態 A 2 ～A 3 3 のいずれか 1 つに記載の改変された細胞。

【0 5 8 5】

実施形態 A 3 4 . 前記抗原認識部分は、P S C A に結合する一本鎖可変フラグメントである、実施形態 A 2 ～A 3 2 のいずれか 1 つに記載の改変された細胞。

【0 5 8 6】

実施形態 A 3 5 . 前記抗原認識部分は、H e r 2 / N e u に結合する一本鎖可変フラグメントである、実施形態 A 2 ～A 3 2 のいずれか 1 つに記載の改変された細胞。

【0 5 8 7】

10

20

30

40

50

実施形態 A 3 6. 前記細胞は、T 細胞である、実施形態 A 1 ～ A 3 5 のいずれか 1 つに記載の改変された細胞。

【0 5 8 8】

実施形態 A 3 7. 前記細胞は、ナチュラルキラー細胞である、実施形態 A 1 ～ A 3 5 のいずれか 1 つに記載の改変された細胞。

【0 5 8 9】

実施形態 A 3 8. 前記膜結合タンパク質は、NKG2D レセプターである、実施形態 A 3 7 に記載の改変された細胞。

【0 5 9 0】

実施形態 B 1.

10

a) 第 1 のキメラポリペプチドをコードする第 1 のポリヌクレオチドであって、ここで該第 1 のキメラポリペプチドは、膜会合ポリペプチド領域および第 1 のリガンド結合領域を含む、第 1 のポリヌクレオチド；ならびに

b) 第 2 のキメラポリペプチドをコードする第 2 のポリヌクレオチドであって、ここで該第 2 のキメラポリペプチドは、アポトーシス促進ポリペプチド領域および第 2 のリガンド結合領域を含み、ここで該第 2 のリガンド結合領域は、該第 1 のリガンド結合領域とは異なるアミノ酸配列を有する、第 2 のポリヌクレオチド；

を含む核酸であって、ここで該第 1 のリガンド結合領域および第 2 のリガンド結合領域は、第 1 の多量体リガンドに結合できる、核酸。

【0 5 9 1】

20

実施形態 B 1. 1. 前記第 2 のリガンド結合領域は、前記第 1 の多量体リガンドに結合でき、前記第 1 のリガンド結合領域に有意に結合しない第 2 の多量体リガンドに結合できる、実施形態 B 1 に記載の核酸。

【0 5 9 2】

実施形態 B 1. 2 前記第 1 のリガンド結合領域は、前記第 2 の多量体リガンドに結合できない、実施形態 B 1 ～ B 1. 1 のいずれか 1 つに記載の核酸。

【0 5 9 3】

実施形態 B 2. 前記膜会合ポリペプチドは、抗原認識部分をさらに含む、実施形態 B 1 ～ B 1. 2 のいずれか 1 つに記載の核酸。

【0 5 9 4】

30

実施形態 B 3. 前記膜会合ポリペプチドは、T 細胞レセプターを含む、実施形態 B 1 ～ B 1. 2 のいずれか 1 つに記載の核酸。

【0 5 9 5】

実施形態 B 3. 1. 前記膜会合ポリペプチドは、NKG2D レセプターを含む、実施形態 B 1 ～ B 1. 2 のいずれか 1 つに記載の核酸。

【0 5 9 6】

実施形態 B 4. 前記膜会合ポリペプチドは、キメラ抗原レセプターを含む、実施形態 B 1 ～ B 1. 2 のいずれか 1 つに記載の核酸。

【0 5 9 7】

実施形態 B 4. 1. 前記キメラ抗原レセプターは、(i) 膜貫通領域、(ii) T 細胞活性化分子、および (iii) 抗原認識部分を含む、実施形態 B 4 に記載の核酸。

40

【0 5 9 8】

実施形態 B 4. 2. 前記キメラ抗原は、膜貫通領域、(ii) MyD88 ポリペプチドまたは TIR ドメインを欠く短縮型 MyD88 ポリペプチド、(iii) CD40 細胞外ドメインを欠く CD40 細胞質ポリペプチド領域、(iv) T 細胞活性化分子、および (v) 抗原認識部分を含む、実施形態 B 4 に記載の核酸。

【0 5 9 9】

実施形態 B 4. 3 ～ 4. 4. 留保。

【0 6 0 0】

実施形態 B 4. 5. 前記第 1 のリガンド結合領域および第 2 のリガンド結合領域は、

50

ラパログに結合する、実施形態 B 1 ～ B 4. 4 のいずれか 1 つに記載の核酸。

【0601】

実施形態 B 4. 6. 前記ラパログは、S-o, p-ジメトキシフェニル (DMOP)ーラパマイシン、R-イソプロポキシラパマイシン、および S-ブタンスルホンアミドラプからなる群より選択される、実施形態 B 4. 5 に記載の核酸。

【0602】

実施形態 B 4. 7. 前記第 1 のリガンド結合領域は、FKBP 12ーラパマイシン結合ドメイン FRB_Lを含む、実施形態 B 1 ～ B 4. 6 のいずれか 1 つに記載の核酸。

【0603】

実施形態 B 4. 8. 前記第 1 のリガンド結合領域は、少なくとも 2 個の FRB_Lドメインを含む、実施形態 B 4. 7 に記載の核酸。

10

【0604】

実施形態 B 4. 9. 前記第 1 のリガンド結合領域は、少なくとも 3 個の FRB_Lドメインを含む、実施形態 B 4. 7 に記載の核酸。

【0605】

実施形態 B 4. 10. 前記第 1 のリガンド結合領域は、KLW (T2098L)、KTF (W2101F)、および KLF (T2098L、W2101F) からなる群より選択される FRBドメインである、実施形態 B 1 ～ B 4. 9 のいずれか 1 つに記載の核酸。

【0606】

20

実施形態 B 4. 11. 前記第 2 のリガンド結合領域は、FKBP 多量体化領域を含む、実施形態 B 1 ～ B 4. 10 のいずれか 1 つに記載の核酸。

【0607】

実施形態 B 4. 12. 前記第 2 のリガンド結合領域は、FKBP v36 リガンド結合領域を含む、実施形態 B 4. 11 に記載の核酸。

【0608】

実施形態 B 4. 13. 前記アポトーシス促進ポリペプチドは、カスパーゼ 1、カスパーゼ 2、カスパーゼ 3、カスパーゼ 4、カスパーゼ 5、カスパーゼ 6、カスパーゼ 7、カスパーゼ 8、カスパーゼ 9、カスパーゼ 10、カスパーゼ 11、カスパーゼ 12、カスパーゼ 13、またはカスパーゼ 14、FADD (DED)、APAF1 (CARD)、CRADD/RAIDD (CARD)、ASC (CARD)、Bax、Bak、Bcl-xL、Bcl-2、RIPK3、および RIPK1-RHIM からなる群より選択される、実施形態 B 1 ～ B 4. 12 のいずれか 1 つに記載の核酸。

30

【0609】

実施形態 B 4. 14. 前記アポトーシス促進ポリペプチドは、カスパーゼポリペプチドである、実施形態 B 1 ～ B 4. 13 のいずれか 1 つに記載の核酸。

【0610】

実施形態 B 4. 15. 前記アポトーシス促進ポリペプチドは、カスパーゼ 9 ポリペプチドである、実施形態 B 1 ～ B 4. 14 のいずれか 1 つに記載の核酸。

【0611】

40

実施形態 B 4. 16.

a) キメラ抗原レセプターをコードする第 1 のポリヌクレオチドであって、ここで該キメラ抗原レセプターは、(i) 膜貫通領域、(ii) T細胞活性化分子、(iii) 抗原認識部分、および (iv) FKBP 12ーラパマイシン結合ドメイン (FRB_L)を含む、第 1 のポリヌクレオチド；ならびに

b) キメラカスパーゼポリペプチドをコードする第 2 のポリヌクレオチドであって、ここで該キメラカスパーゼポリペプチドは、(i) FKBP 多量体化領域および (ii) カスパーゼポリペプチドを含む、第 2 のポリヌクレオチド、を含む核酸。

【0612】

50

実施形態B4. 17.

a) キメラ抗原レセプターをコードする第1のポリヌクレオチドであって、ここで該キメラ抗原レセプターは、(i) 膜貫通領域、(ii) MyD88ポリペプチドまたはTIRドメインを欠く短縮型MyD88ポリペプチド、(iii) CD40細胞外ドメインを欠くCD40細胞質ポリペプチド領域、(iv) T細胞活性化分子、(v) 抗原認識部分、およびFKBP12-ラパマイシン結合ドメイン(FRBL)を含む、第1のポリヌクレオチド；ならびに

b) キメラカスパーゼポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチドであって、ここで該キメラカスパーゼポリペプチドは、(i) FKBP多量体化領域および(ii) カスパーゼポリペプチドを含む、第2のポリヌクレオチド、
を含む核酸。

10

【0613】

実施形態B4. 18. 前記第1のリガンド結合領域は、FRBLであり、前記第2のリガンド結合領域は、FKBPv36である、実施形態B1～B4. 17のいずれか1つに記載の核酸。

【0614】

実施形態B5. 前記T細胞活性化分子は、ITAMを含みシグナル1を与える分子である、実施形態B4. 1～B4. 18のいずれか1つに記載の核酸。

【0615】

実施形態B6. 前記T細胞活性化分子は、CD3ζポリペプチドである、実施形態B4. 1～B4. 18のいずれか1つに記載の核酸。

20

【0616】

実施形態B7. 前記T細胞活性化分子は、Fcイプシロンレセプターガンマ(FcεR1γ)サブユニットポリペプチドである、実施形態B4. 1～B4. 18のいずれか1つに記載の核酸。

【0617】

実施形態B8. 前記抗原認識部分は、腫瘍細胞上の抗原に結合する、実施形態B2～B7のいずれか1つに記載の核酸。

【0618】

実施形態B9. 前記抗原認識部分は、過剰増殖性疾患に関与する細胞上の抗原に結合する、実施形態B2～B7のいずれか1つに記載の核酸。

30

【0619】

実施形態B10. 前記抗原認識部分は、PSMA、PSCA、MUC1、CD19、ROR1、メソテリン、GD2、CD123、MUC16、およびHer2/Neuからなる群より選択される抗原に結合する、実施形態B2～B7のいずれか1つに記載の核酸。

【0620】

実施形態B11. 前記抗原認識部分は、PSCAに結合する、実施形態B2～B7のいずれか1つに記載の核酸。

【0621】

実施形態B12. 前記抗原認識部分は、CD19に結合する、実施形態B2～B7のいずれか1つに記載の核酸。

40

【0622】

実施形態B13. 前記抗原認識部分は、Her2/Neuに結合する、実施形態B2～B7のいずれか1つに記載の核酸。

【0623】

実施形態B14. 前記抗原認識部分は、ウイルス抗原または細菌抗原に結合する、実施形態B2～B7のいずれか1つに記載の核酸。

【0624】

実施形態B15. 前記抗原認識部分は、一本鎖可変フラグメントである、実施形態B

50

2～B 1 4 のいずれか 1 項に記載の核酸。

【0 6 2 5】

実施形態B 1 6. 前記膜貫通領域は、C D 8 膜貫通領域である、実施形態 B 2 ～B 1 5 のいずれか 1 つに記載の核酸。

【0 6 2 6】

実施形態B 1 7. 前記短縮型M y D 8 8 ポリペプチドは、配列番号 2 1 4 のアミノ酸配列またはその機能的フラグメントを有する、実施形態 B 4. 2 ～B 1 6 のいずれか 1 つに記載の核酸。

【0 6 2 7】

実施形態B 1 8. 前記細胞質C D 4 0 ポリペプチドは、配列番号 2 1 6 のアミノ酸配列またはその機能的フラグメントを有する、実施形態 B 4. 2 ～B 1 7 のいずれか 1 つに記載の核酸。

10

【0 6 2 8】

実施形態B 1 9. 留保。

【0 6 2 9】

実施形態B 2 0. 前記C D 3 7 ポリペプチドは、配列番号 1 6 1 のアミノ酸配列またはその機能的フラグメントを有する、実施形態 B 6 ～B 1 8 のいずれか 1 つに記載の核酸。

【0 6 3 0】

実施形態B 2 1. 前記膜貫通領域のポリペプチドは、配列番号 1 7 のアミノ酸配列またはその機能的フラグメントを含む、実施形態 B 4. 1 ～B 2 0 のいずれか 1 つに記載の核酸。

20

【0 6 3 1】

実施形態B 2 1. 1. 前記カスパーゼポリペプチドは、カスパーゼ 9 ポリペプチドである、実施形態 B 4. 1 4 ～B 2 1 のいずれか 1 つに記載の核酸。

【0 6 3 2】

実施形態B 2 1. 2. 前記カスパーゼポリペプチドは、D 3 3 0 E、D 3 3 0 AまたはN 4 0 5 Qを含む、実施形態 B 4. 1 4 ～B 2 1 のいずれか 1 つに記載の核酸。

【0 6 3 3】

実施形態B 2 1. 3. 前記カスパーゼポリペプチドは、表 5 または表 6 中のカスパーゼバリエーションからなる群より選択されるアミノ酸置換を含む改変されたカスパーゼ 9 ポリペプチドである、実施形態 B 4. 1 4 ～B 2 1 のいずれか 1 つに記載の核酸。

30

【0 6 3 4】

実施形態B 2 1. 4. 前記カスパーゼポリペプチドは、D 3 3 0 E、D 3 3 0 A、およびN 4 0 5 Qからなる群より選択されるアミノ酸配列を含む改変されたカスパーゼ 9 ポリペプチドである、実施形態 B 4. 1 4 ～B 2 1 のいずれか 1 つに記載の核酸。

【0 6 3 5】

実施形態B 2 2. 前記核酸は、前記ポリヌクレオチドに作動可能に連結されたプロモーター配列を含む、実施形態 B 1 4 ～B 2 1. 4 のいずれか 1 つに記載の核酸。

【0 6 3 6】

40

実施形態B 2 3. 前記核酸は、ウイルスベクター内に含まれる、実施形態 B 1 ～B 2 2 のいずれか 1 つに記載の核酸。

【0 6 3 7】

実施形態B 2 4. 前記ウイルスベクターは、レトロウイルスベクターである、実施形態 B 2 3 に記載の核酸。

【0 6 3 8】

実施形態B 2 5. 前記レトロウイルスベクターは、マウス白血病ウイルスベクターである、実施形態 B 2 4 に記載の核酸。

【0 6 3 9】

実施形態B 2 6. 前記レトロウイルスベクターは、S F G ベクターである、実施形態

50

B 2 4 に記載の核酸。

【0 6 4 0】

実施形態B 2 7. 前記ウイルスベクターは、アデノウイルスベクターである、実施形態B 2 3 に記載の核酸。

【0 6 4 1】

実施形態B 2 8. 前記ウイルスベクターは、レンチウイルスベクターである、実施形態B 2 3 に記載の核酸。

【0 6 4 2】

実施形態B 2 9. 前記ウイルスベクターは、アデノ随伴ウイルス (A A V)、ヘルペスウイルス、およびワクシニアウイルスからなる群より選択される、実施形態B 2 3 に記載の核酸。

10

【0 6 4 3】

実施形態B 3 0. 前記核酸は、エレクトロポレーション、ソノポレーション、もしくはバイオリスティックのために調製されるかまたはそのためにデザインされたベクターの中に存在するか、あるいは化学的脂質、ポリマー、無機ナノ粒子、もしくはポリプレックスに結合されるかまたはその中に組み込まれる、実施形態B 1 ~ B 2 9 のいずれか1つに記載の核酸。

【0 6 4 4】

実施形態B 3 1. 前記核酸は、プラスミド内に含まれる、実施形態B 1 ~ B 2 2 またはB 3 0 のいずれか1つに記載の核酸。

20

【0 6 4 5】

実施形態B 3 2. 少なくとも2個のプロモーターを含む、実施形態B 1 ~ B 3 1 のいずれか1つに記載の核酸。

【0 6 4 6】

実施形態B 3 3. 1個のプロモーターは、前記第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドの両方に作動可能に連結される、実施形態B 1 ~ B 3 1 のいずれか1つに記載の核酸。

【0 6 4 7】

実施形態B 3 4. 前記第1のポリヌクレオチドと第2のポリヌクレオチドとの間にリンカーポリペプチドをコードする第3のポリヌクレオチドをさらに含み、ここで該リンカーポリペプチドは、翻訳中または翻訳後に、該第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドの翻訳生成物を分断する、実施形態B 3 3 に記載の核酸。

30

【0 6 4 8】

実施形態B 3 5. 前記リンカーポリペプチドは、2 A ポリペプチドである、実施形態B 3 4 に記載の核酸。

【0 6 4 9】

実施形態B 3 6. 前記核酸は、キメラ抗原レセプター、2 A ポリペプチド、およびカスパーゼポリペプチドを含むポリペプチドをコードする、実施形態B 3 5 に記載の核酸。

【0 6 5 0】

実施形態B 3 7. 前記第1のポリヌクレオチドは、第1のプロモーターに作動可能に連結され、前記第2のポリヌクレオチドは、第2のプロモーターに作動可能に連結される、実施形態B 3 2 に記載の核酸。

40

【0 6 5 1】

実施形態B 3 8. 前記2個のRNA転写物は、前記2個のポリヌクレオチドに相補的に生成される、実施形態B 3 7 に記載の核酸。

【0 6 5 2】

実施形態B 3 9. 表7に提供されるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含み、ここで該ポリペプチドは、FKBP 1 2 v 3 6、dカスパーゼ9、T 2 A、シグナルペプチド、FMC 6 3 - V L、FMC 6 3 - V H、C D 3 4 エピトープ、C D 8 a ストリーク、C D 8 t m、M y D 8 8、d C D 4 0、C D 3 z、F R B I ^ ^、F R B I、および

50

リンカーポリペプチドを含む、実施形態 B 1 ～ B 3 のいずれか 1 つに記載の核酸。

【0653】

実施形態 B 4 0. 前記ポリヌクレオチドは、表 7 の中に提供されるヌクレオチド配列を有する、実施形態 B 3 9 に記載の核酸。

【0654】

実施形態 B 4 1. 表 7 の中に提供される F K B P 1 2 v 3 6 アミノ酸配列をコードする、実施形態 B 1 ～ B 3 8 のいずれか 1 つに記載の核酸。

【0655】

実施形態 B 4 2. 表 7 の中に提供される F K B P 1 2 v 3 6 ヌクレオチド配列を含む、実施形態 B 1 ～ B 3 8 のいずれか 1 つに記載の核酸。

10

【0656】

実施形態 B 4 3. 表 7 の中に提供される d カスパーゼ 9 アミノ酸配列をコードする、実施形態 B 1 ～ B 3 8 のいずれか 1 つに記載の核酸。

【0657】

実施形態 B 4 4. 表 7 の中に提供される d カスパーゼ 9 ヌクレオチド配列を含む、実施形態 B 1 ～ B 3 8 のいずれか 1 つに記載の核酸。

【0658】

実施形態 B 4 5. 表 7 の中に提供される T 2 A アミノ酸配列をコードする、実施形態 B 1 ～ B 3 8 のいずれか 1 つに記載の核酸。

【0659】

実施形態 B 4 6. 表 7 の中に提供される T 2 A ヌクレオチド配列を含む、実施形態 B 1 ～ B 3 8 のいずれか 1 つに記載の核酸。

20

【0660】

実施形態 B 4 7. 表 7 の中に提供されるシグナルペプチドアミノ酸配列をコードする、実施形態 B 1 ～ B 3 8 のいずれか 1 つに記載の核酸。

【0661】

実施形態 B 4 8. 表 7 の中に提供されるシグナルペプチドヌクレオチド配列を含む、実施形態 B 1 ～ B 3 8 のいずれか 1 つに記載の核酸。

【0662】

実施形態 B 4 9. 表 7 の中に提供される F M C 6 3 - V L アミノ酸配列をコードする、実施形態 B 1 ～ B 3 8 のいずれか 1 つに記載の核酸。

30

【0663】

実施形態 B 5 0. 表 7 の中に提供される F M C 6 3 - V L ヌクレオチド配列を含む、実施形態 B 1 ～ B 3 8 のいずれか 1 つに記載の核酸。

【0664】

実施形態 B 5 1. 表 7 の中に提供される F M C 6 3 - V H アミノ酸配列をコードする、実施形態 B 1 ～ B 3 8 のいずれか 1 つに記載の核酸。

【0665】

実施形態 B 5 2. 表 7 の中に提供される F M C 6 3 - V H ヌクレオチド配列を含む、実施形態 B 1 ～ B 3 8 のいずれか 1 つに記載の核酸。

40

【0666】

実施形態 B 5 3. 表 7 の中に提供される C D 3 4 エピトープアミノ酸配列をコードする、実施形態 B 1 ～ B 3 8 のいずれか 1 つに記載の核酸。

【0667】

実施形態 B 5 4. 表 7 の中に提供される C D 3 4 エピトープヌクレオチド配列を含む、実施形態 B 1 ～ B 3 8 のいずれか 1 つに記載の核酸。

【0668】

実施形態 B 5 5. 表 7 の中に提供される C D 8 a ストックアミノ酸配列をコードする、実施形態 B 1 ～ B 3 8 のいずれか 1 つに記載の核酸。

【0669】

50

実施形態B56. 表7の中に提供されるCD8aストークヌクレオチド配列を含む、実施形態B1～B38のいずれか1つに記載の核酸。

【0670】

実施形態B57. 表7の中に提供されるCD8膜貫通ヌクレオチド配列を含む、実施形態B1～B38のいずれか1つに記載の核酸。

【0671】

実施形態B58. 表7の中に提供されるCD8膜貫通アミノ酸配列をコードする、実施形態B1～B38のいずれか1つに記載の核酸。

【0672】

実施形態B59. 表7の中に提供されるMyD88ヌクレオチド配列を含む、実施形態B1～B38のいずれか1つに記載の核酸。

10

【0673】

実施形態B60. 表7の中に提供されるMyD88アミノ酸配列をコードする、実施形態B1～B38のいずれか1つに記載の核酸。

【0674】

実施形態B61. 表7の中に提供されるdCD40ヌクレオチド配列を含む、実施形態B1～B38のいずれか1つに記載の核酸。

【0675】

実施形態B62. 表7の中に提供されるdCD40アミノ酸配列をコードする、実施形態B1～B38のいずれか1つに記載の核酸。

20

【0676】

実施形態B63. 表7の中に提供されるCD3zヌクレオチド配列を含む、実施形態B1～B38のいずれか1つに記載の核酸。

【0677】

実施形態B64. 表7の中に提供されるCD3zアミノ酸配列をコードする、実施形態B1～B38のいずれか1つに記載の核酸。

【0678】

実施形態B65. 表7の中に提供されるFRBI^{hh}ヌクレオチド配列を含む、実施形態B1～B38のいずれか1つに記載の核酸。

【0679】

30

実施形態B66. 表7の中に提供されるFRBI^{hh}アミノ酸配列をコードする、実施形態B1～B38のいずれか1つに記載の核酸。

【0680】

実施形態B67. 表7の中に提供されるFRBIヌクレオチド配列を含む、実施形態B1～B38のいずれか1つに記載の核酸。

【0681】

実施形態B68. 表7の中に提供されるFRBIアミノ酸配列をコードする、実施形態B1～B38のいずれか1つに記載の核酸。

【0682】

実施形態B69. 表8の中に提供されるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含み、ここで該ポリペプチドは、FKBP12v36、dカスパーゼ9、T2A、シグナルペプチド、FRP5-VHL、FRP%VL、CD34エピトープ、CD8aストーク、CD8tm、MyD88、dCD40、CD3z、FRBI^{hh}、FRBI、およびリンカーポリペプチドを含む、実施形態B1～B3のいずれか1つに記載の核酸。

40

【0683】

実施形態B70. 前記ポリヌクレオチドは、表8の中に提供されるヌクレオチド配列を有する、実施形態B69に記載の核酸。

【0684】

実施形態B71. 表8の中に提供されるFRP5-VHアミノ酸配列をコードする、実施形態B1～B38のいずれか1つに記載の核酸。

50

【0685】

実施形態B72. 表8の中に提供されるFRP5-VHヌクレオチド配列を含む、実施形態B1～B38のいずれか1つに記載の核酸。

【0686】

実施形態B73. 表8の中に提供されるFRP5VLアミノ酸配列をコードする、実施形態B1～B38のいずれか1つに記載の核酸。

【0687】

実施形態B74. 表8の中に提供されるFRP5VLヌクレオチド配列を含む、実施形態B1～B38のいずれか1つに記載の核酸。

【0688】

実施形態B75. 表9の中に提供されるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む、実施形態B1～B3のいずれか1つに記載の核酸。

【0689】

実施形態B76. 前記ポリヌクレオチドは、表9の中に提供されるヌクレオチド配列を有する、実施形態B75に記載の核酸。

【0690】

実施形態B77. 表9の中に提供されるFRP5-VHアミノ酸配列をコードする、実施形態B1～B38のいずれか1つに記載の核酸。

【0691】

実施形態B78. 表9の中に提供されるFRP5-VHヌクレオチド配列を含む、実施形態B1～B38のいずれか1つに記載の核酸。

【0692】

実施形態B79. 表9の中に提供されるFRP5VLアミノ酸配列をコードする、実施形態B1～B38のいずれか1つに記載の核酸。

【0693】

実施形態B80. 表9の中に提供されるFRP5VLヌクレオチド配列を含む、実施形態B1～B38のいずれか1つに記載の核酸。

【0694】

実施形態C1. 実施形態B1～B80のいずれか1つに記載の核酸でトランスフェクトされた、改変された細胞。

【0695】

実施形態C2. 前記細胞は、T細胞、腫瘍浸潤リンパ球、NK-T細胞、またはNK細胞である、実施形態A1～A17またはC1のいずれか1つに記載の改変された細胞。

【0696】

実施形態C3. 前記細胞は、T細胞である、実施形態A1～A17またはC1のいずれか1つに記載の改変された細胞。

【0697】

実施形態C4. 前記細胞は、初代T細胞である、実施形態A1～A17またはC1のいずれか1つに記載の改変された細胞。

【0698】

実施形態C5. 前記細胞は、細胞傷害性T細胞である、実施形態A1～A17またはC1のいずれか1つに記載の改変された細胞。

【0699】

実施形態C6. 前記細胞は、胚性幹細胞(ESC)、人工多能性幹細胞(iPSC)、非リンパ球性造血細胞、非造血細胞、マクロファージ、ケラチノサイト、線維芽細胞、メラノーマ細胞、腫瘍浸潤リンパ球、ナチュラルキラー細胞、ナチュラルキラーT細胞、またはT細胞からなる群より選択される、実施形態A1～A17またはC1のいずれか1つに記載の改変された細胞。

【0700】

実施形態C7. 前記T細胞は、ヘルパーT細胞である、実施形態A1～A17または

10

20

30

40

50

C 1 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0701】

実施形態C 8. 前記細胞は、骨髓から得られるかまたは骨髓から調製される、実施形態C 1～C 7 のいずれか 1 つに記載の改変された細胞。

【0702】

実施形態C 9. 前記細胞は、臍帯血から得られるかまたは臍帯血から調製される、実施形態C 1～C 7 のいずれか 1 つに記載の改変された細胞。

【0703】

実施形態C 10. 前記細胞は、末梢血から得られるかまたは末梢血から調製される、実施形態C 1～C 7 のいずれか 1 つに記載の改変された細胞。

10

【0704】

実施形態C 11. 前記細胞は、末梢血単核細胞から得られるかまたは末梢血単核細胞から調製される、実施形態C 1～C 7 のいずれか 1 つに記載の改変された細胞。

【0705】

実施形態C 12. 前記細胞は、ヒト細胞である、実施形態C 1～C 7 のいずれか 1 つに記載の改変された細胞。

【0706】

実施形態C 12. 1. 前記改変された細胞は、インビボで形質導入またはトランスフェクトされる、実施形態C 1～C 12 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0707】

20

実施形態C 13. 前記細胞は、エレクトロポレーション、ソノポレーション、バイオリスティック（例えば、Au 粒子での遺伝子銃）、脂質トランスフェクション、ポリマートランスフェクション、ナノ粒子、またはポリプレックスからなる群より選択される方法を使用して、核酸ベクターによってトランスフェクトまたは形質転換される、実施形態C 1～C 7 のいずれか 1 つに記載の改変された細胞。

【0708】

実施形態D 1. 被験体において移植された改変された細胞の生存をコントロールするための方法であって、該方法は、

a) 実施形態A 1～A 38 またはC 1～C 13 のいずれか 1 つに記載の改変された細胞を該被験体に移植すること；および

30

b) (a) の後に、該被験体に、前記キメラカスパーゼポリペプチドを発現する該改変された細胞のうちの 30 %未満を殺滅するために有効な量でラパログを投与すること、を包含する、方法。

【0709】

実施形態D 2. 前記ラパマイシンまたはラパマイシンアナログは、前記キメラカスパーゼポリペプチドを発現する前記改変された細胞のうちの 40 %未満を殺滅するために有効な量で投与される、実施形態D 1 に記載の方法。

【0710】

実施形態D 3. 前記ラパマイシンまたはラパマイシンアナログは、前記キメラカスパーゼポリペプチドを発現する前記改変された細胞のうちの 50 %未満を殺滅するために有効な量で投与される、実施形態D 1 に記載の方法。

40

【0711】

実施形態D 4. 前記ラパマイシンまたはラパマイシンアナログは、前記キメラカスパーゼポリペプチドを発現する前記改変された細胞のうちの 60 %未満を殺滅するために有効な量で投与される、実施形態D 1 に記載の方法。

【0712】

実施形態D 5. 前記ラパマイシンまたはラパマイシンアナログは、前記キメラカスパーゼポリペプチドを発現する前記改変された細胞のうちの 70 %未満を殺滅するために有効な量で投与される、実施形態D 1 に記載の方法。

【0713】

50

実施形態D6. 前記キメラカスパーゼポリペプチド上の前記FKBP多量体化領域に結合する多量体リガンドを、前記ラパマイシンまたはラパマイシンアナログの投与後に残っている、該キメラカスパーゼポリペプチドを発現する前記改変された細胞のうちの少なくとも90%を殺滅するために有効な量で投与することをさらに包含する、実施形態D1～D5のいずれか1つに記載の方法。

【0714】

実施形態D7. 前記キメラカスパーゼポリペプチド上の前記FKBP多量体化領域に結合する多量体リガンドを、前記ラパマイシンまたはラパマイシンアナログの投与後に残っている、該キメラカスパーゼポリペプチドを発現する前記改変された細胞のうちの少なくとも95%を殺滅するために有効な量で投与することをさらに包含する、実施形態D1～D5のいずれか1つに記載の方法。

10

【0715】

実施形態D8. 前記多量体リガンドは、AP1903またはAP20187である、実施形態D6またはD7のいずれか1つに記載の方法。

【0716】

実施形態D9. 被験体において移植された改変された細胞の生存をコントロールするための方法であって、該方法は、

a) 実施形態A1～A17またはC1～C13のいずれか1つに記載の改変された細胞を該被験体に移植すること；および

b) (a)の後に、該被験体において該移植された改変された細胞から生じる状態の有無またはステージを含む情報を受け取ること、および

20

c) 該被験体において同定された該状態の有無またはステージに基づいて、ラパマイシンもしくはラパマイシンアナログを投与するか、該ラパマイシンもしくはラパマイシンリガンドの該被験体へのその後の投与量を維持するか、または該ラパマイシンまたはラパマイシンアナログのその後の投与量を調整すること、を包含する、方法。

【0717】

実施形態D10. 被験体において移植された改変された細胞の生存をコントロールするための方法であって、該方法は、

a) 実施形態A1～A17またはC1～C13のいずれか1つに記載の改変された細胞を該被験体に移植すること；

30

b) (a)の後に、該被験体において該移植された改変された細胞から生じる状態の有無またはステージを含む情報を受け取ること；および

c) 該被験体において同定された該状態の有無またはステージに基づいて、前記キメラカスパーゼポリペプチド上のFKBP12v36多量体化領域に結合する多量体リガンドを投与するか、該被験体への該多量体リガンドのその後の投与量を維持するか、または該多量体リガンドのその後の投与量を調整すること、を包含する、方法。

【0718】

実施形態D11. (c)の後に、前記被験体において同定された前記状態の有無またはステージに基づいて、前記キメラカスパーゼポリペプチド上のFKBP12v36多量体化領域に結合する多量体リガンドを投与するか、該被験体への該多量体リガンドのその後の投与量を維持するか、または該多量体リガンドのその後の投与量を調整することをさらに包含する、実施形態D9に記載の方法。

40

【0719】

実施形態D12. 被験体において移植された改変された細胞の生存をコントロールするための方法であって、該方法は、

a) 実施形態A1～A17またはC1～C13のいずれか1つに記載の改変された細胞を該被験体に移植すること；

b) 該被験体において該移植された改変された細胞から生じる状態の有無またはステー

50

ジを同定すること、および

c) 該被験体において同定された該状態の有無またはステージに基づいて、

(i) ラパマイシンまたはラパマイシンアナログを投与するか、該被験体に投与される該ラパマイシンまたはラパマイシンアナログのその後の投与量を維持するか、または該ラパマイシンまたはラパマイシンアナログのその後の投与量を調整するか；あるいは

(ii) 前記キメラカスパーゼポリペプチド上のFKBP12v36多量体化領域に結合する多量体リガンドを投与するか、該被験体への該多量体リガンドのその後の投与量を維持するか、または該多量体リガンドのその後の投与量を調整する

意思決定者に、該状態の有無またはステージを伝達すること、
を包含する、方法。

10

【0720】

実施形態D13. 被験体において移植された改変された細胞の生存をコントロールするための方法であって、該方法は、

a) 実施形態A1～A17またはC1～C13のいずれか1つに記載の改変された細胞を該被験体に移植すること；

b) 該被験体において該移植された治療用細胞から生じる状態の有無またはステージを同定すること、および

c) 該被験体において同定された該状態の有無またはステージに基づいて、

(i) ラパマイシンまたはラパマイシンアナログを投与するか、該被験体に投与される該ラパマイシンまたはラパマイシンアナログのその後の投与量を維持するか、または該ラパマイシンまたはラパマイシンアナログのその後の投与量を調整するか；あるいは

(ii) 前記キメラカスパーゼポリペプチド上のFKBP12v36多量体化領域に結合する多量体リガンドを投与するか、該被験体への該多量体リガンドのその後の投与量を維持するか、または該多量体リガンドのその後の投与量を調整する

指示を伝達すること、
を包含する、方法。

20

【0721】

実施形態D14. 前記状態は、移植片対宿主病、オンターゲットオフ腫瘍反応性、またはサイトカイン放出症候群である、実施形態D1～D13のいずれか1つに記載の方法。

30

【0722】

実施形態E1. 標的細胞によって発現される標的抗原の上昇した発現と関連する疾患または状態を有する被験体を処置するための方法であって、該方法は、該被験体に、有効量の、実施形態A1～A38、またはC1～C13のいずれか1つに記載の改変された細胞を投与することを包含する、方法。

【0723】

実施形態E2. 前記標的抗原は、腫瘍抗原である、実施形態E1に記載の方法。

【0724】

実施形態E3. 被験体において腫瘍のサイズを減少させるための方法であって、該方法は、実施形態A1～A17、またはC1～C13のいずれか1つに記載の改変された細胞を該被験体に投与することを包含し、ここでその抗原認識部分は、該腫瘍上の抗原に結合する、方法。

40

【0725】

実施形態E4. 前記被験体は、腫瘍を有すると診断されている、実施形態E1～E3のいずれか1つに記載の方法。

【0726】

実施形態E5. 前記被験体はがんを有する、実施形態E1～E4のいずれか1つに記載の方法。

【0727】

実施形態E6. 前記被験体は固形腫瘍を有する、実施形態E1～E5のいずれか1つ

50

に記載の方法。

【0728】

実施形態E7. 前記改変された細胞は、腫瘍床に送達される、実施形態E1～E6のいずれか1つに記載の方法。

【0729】

実施形態E8. 前記がんは、前記被験体の血液または骨髄に存在する、実施形態E5に記載の方法。

【0730】

実施形態E9. 前記被験体は、血液または骨髄の疾患を有する、実施形態E1～E3のいずれか1つに記載の方法。

10

【0731】

実施形態E10. 前記被験体は、鎌状赤血球貧血または異染性白質ジストロフィーと診断されている、実施形態E1～E2のいずれか1つに記載の方法。

【0732】

実施形態E11. 前記患者は、原発性免疫不全状態、血球貪食性リンパ組織球症（HLH）または他の血球貪食状態、遺伝性骨髄不全状態、ヘモグロビン異常症、代謝状態、および破骨細胞状態からなる群より選択される状態と診断されている、実施形態E1～E2のいずれか1つに記載の方法。

【0733】

実施形態E12. 前記疾患または状態は、重症複合免疫不全症（SCID）、複合免疫不全症（CID）、先天性T細胞欠損／欠損症、分類不能型免疫不全症（CVID）、慢性肉芽腫症、IPEX（免疫不全、多腺性内分泌障害、腸症、X連鎖）またはIPEX様、ウィスコット・オールドリッチ症候群、CD40リガンド欠損症、白血球接着不全、DOCA8欠損症、IL-10欠損症／IL-10レセプター欠損症、GATA2欠損症、X連鎖リンパ増殖性疾患（XLP）、軟骨毛髪形成不全、シュバッハマン・ダイヤモンド症候群、ダイヤモンド・ブラックファン貧血、先天性角化異常症、ファンコーニ貧血、先天性好中球減少症、鎌状赤血球症、サラセミア、ムコ多糖症、スフィンゴリピドーシス、および大理石骨病からなる群より選択される、実施形態E1～E2のいずれか1つに記載の方法。

20

【0734】

実施形態E13. 前記標的細胞は、腫瘍細胞である、実施形態E1～E12のいずれか1つに記載の方法。

30

【0735】

実施形態E14. 前記被験体における標的細胞の数または濃度は、前記改変された細胞の投与後に減少する、実施形態E1～E13のいずれか1つに記載の方法。

【0736】

実施形態E15. 前記改変された細胞の投与前に前記被験体から得られる第1のサンプル中の標的細胞の数または濃度を測定すること、該改変された細胞の投与後に該被験体から得られる第2のサンプル中の標的細胞の数 濃度を測定すること、および該第1のサンプル中の標的細胞の数または濃度と比較して、該第2のサンプル中の標的細胞の数または濃度の増大または減少を決定することを包含する、実施形態E1～E14のいずれか1つに記載の方法。

40

【0737】

実施形態E16. 前記第2のサンプル中の標的細胞の濃度は、前記第1のサンプル中の標的細胞の濃度と比較して減少している、実施形態E15に記載の方法。

【0738】

実施形態E17. 前記第2のサンプル中の標的細胞の濃度は、前記第1のサンプル中の標的細胞の濃度と比較して増大している、実施形態E15に記載の方法。

【0739】

実施形態F1. 細胞においてキメラ抗原レセプターを発現させるための方法であって

50

、該方法は、実施形態 B 1～B 8 0 のいずれか 1 つに記載の核酸と細胞とを、該核酸が該細胞に組み込まれる条件下で接触させることを含み、それによって、該細胞は、前記キメラ抗原レセプターおよび該キメラカスパーゼポリペプチドを該組み込まれた核酸から発現する、方法。

【0740】

実施形態 F 2. 前記核酸は、前記細胞とエキソビボで接触させられる、実施形態 F 1 に記載の方法。

【0741】

実施形態 F 3. 前記核酸は、前記細胞とインビボで接触させられる、実施形態 F 1 に記載の方法。

【0742】

本技術は、1 またはこれより多くの具体的実施形態を参照しながら実質的に詳細に論じられてきたものの、当業者は、本出願において具体的に開示される実施形態に変更がなされ得るが、これらの改変および改善が本技術の範囲および趣旨内にあることを認識する。

【0743】

例証として論じられる本技術またはその一部は、特許請求される本技術の範囲内で種々の改変が可能である。

【0744】

(実施例 2 5 : さらなる代表的実施形態)

以降で提供されるのは、本技術のある種の実施形態の例である。

実施形態 A 1.

a) 第 1 のキメラポリペプチドをコードする第 1 のポリヌクレオチドであって、ここで該第 1 のキメラポリペプチドは、少なくとも 2 個の第 1 のリガンド結合領域を含む足場領域を含む、第 1 のポリヌクレオチド ; ならびに

b) 第 2 のキメラポリペプチドをコードする第 2 のポリヌクレオチドであって、ここで該第 2 のキメラポリペプチドは、アポトーシス促進ポリペプチド領域および第 2 のリガンド結合領域を含む、第 2 のポリヌクレオチド ;

を含む改変された細胞であって、

ここで該第 2 のリガンド結合領域は、該第 1 のリガンド結合領域とは異なるアミノ酸配列を有し、

ここで該第 1 のリガンド結合領域および第 2 のリガンド結合領域は、第 1 のリガンドに結合できる、

改変された細胞。

【0745】

実施形態 A 2. 前記第 2 のリガンド結合領域は、前記第 1 のリガンドに結合でき、かつ第 2 のリガンドに結合できる、実施形態 A 1 に記載の改変された細胞。

【0746】

実施形態 A 3. 前記第 2 のリガンドは、前記第 1 のリガンド結合領域に有意に結合しない、実施形態 A 2 に記載の改変された細胞。

【0747】

実施形態 A 4. 前記第 1 のリガンド結合領域は、前記第 2 のリガンドに結合できない、実施形態 A 1～A 2 のいずれか 1 つに記載の改変された細胞。

【0748】

実施形態 A 5. 前記第 1 のリガンド結合領域は、前記第 1 のリガンドに結合でき、かつ第 2 のリガンドに結合できる、実施形態 A 1 に記載の改変された細胞。

【0749】

実施形態 A 6. 前記第 2 のリガンドは、前記第 2 のリガンド結合領域に有意に結合しない、実施形態 A 5 に記載の改変された細胞。

【0750】

実施形態 A 7. 前記第 2 のリガンド結合領域は、前記第 2 のリガンドに結合できない

10

20

30

40

50

、実施形態 A 5 に記載の改変された細胞。

【0751】

実施形態 A 8. 前記第 1 のキメラポリペプチドは、膜標的化ポリペプチド領域をさらに含む、実施形態 A 1 ～ A 7 のいずれか 1 つに記載の改変された細胞。

【0752】

実施形態 A 9. 前記第 1 のキメラポリペプチドは、抗原認識部分をさらに含む、実施形態 A 1 ～ A 8 のいずれか 1 つに記載の改変された細胞。

【0753】

実施形態 A 10. 前記第 1 のキメラポリペプチドは、マーカーポリペプチドをさらに含む、実施形態 A 1 ～ A 9 のいずれか 1 つに記載の改変された細胞。

10

【0754】

実施形態 A 11. 前記第 1 のキメラポリペプチドは、T 細胞レセプターをさらに含む、実施形態 A 1 ～ A 9 のいずれか 1 つに記載の改変された細胞。

【0755】

実施形態 A 12. 前記第 1 のキメラポリペプチドは、キメラ抗原レセプターをさらに含む、実施形態 A 1 ～ A 9 のいずれか 1 つに記載の改変された細胞。

【0756】

実施形態 A 13. 前記キメラ抗原レセプターは、(i) 膜貫通領域、(ii) T 細胞活性化分子、および (iii) 抗原認識部分を含む、実施形態 A 12 に記載の改変された細胞。

20

【0757】

実施形態 A 14. 前記キメラ抗原レセプターは、(i) 膜貫通領域、(ii) My D 88 ポリペプチドまたは T I R ドメインを欠く短縮型 My D 88 ポリペプチド、(iii) C D 40 細胞外ドメインを欠く C D 40 細胞質ポリペプチド領域および (iv) T 細胞活性化分子、(v) 抗原認識部分を含む、実施形態 A 12 に記載の改変された細胞。

【0758】

実施形態 A 15. 前記第 1 のキメラポリペプチドは、(i) My D 88 ポリペプチドまたは T I R ドメインを欠く短縮型 My D 88 ポリペプチド、および (ii) C D 40 細胞外ドメインを欠く C D 40 細胞質ポリペプチド領域をさらに含む、実施形態 A 1 ～ A 9 のいずれか 1 つに記載の改変された細胞。

30

【0759】

実施形態 A 16. 前記第 1 のキメラポリペプチドは、My D 88 ポリペプチドまたは T I R ドメインを欠く短縮型 My D 88 ポリペプチドをさらに含む、実施形態 A 1 ～ A 9 のいずれか 1 つに記載の改変された細胞。

【0760】

実施形態 A 17. 前記第 1 のキメラポリペプチドは、C D 40 細胞外ドメインを欠く C D 40 細胞質ポリペプチド領域をさらに含む、実施形態 A 1 ～ A 9 のいずれか 1 つに記載の改変された細胞。

【0761】

実施形態 A 18. 前記第 1 のリガンドは、ラパマイシンまたはラパログである、実施形態 A 1 ～ A 17 のいずれか 1 つに記載の改変された細胞。

40

【0762】

実施形態 A 19. 前記第 2 のリガンドは、A P 1 9 0 3、A P 2 0 1 8 7、および A P 1 5 1 0 からなる群より選択される、実施形態 A 1 ～ A 1 8 のいずれか 1 つに記載の改変された細胞。

【0763】

実施形態 A 20. 前記第 1 のリガンド結合領域は、F R B 領域である、実施形態 A 1 ～ A 4 または A 8 ～ A 1 9 のいずれか 1 つに記載の改変された細胞。

【0764】

実施形態 A 21. 前記第 2 のリガンド結合領域は、F K B P 1 2 領域である、実施形

50

態 A 1 ～ A 4 または A 8 ～ A 2 0 のいずれか 1 つに記載の改変された細胞。

【0765】

実施形態 A 2 2 . 前記第 1 のリガンド結合領域は、FKBP12 領域である、実施形態 A 5 ～ A 1 9 のいずれか 1 つに記載の改変された細胞。

【0766】

実施形態 A 2 3 . 前記第 2 のリガンド結合領域は、FRB 領域である、実施形態 A 5 ～ A 1 9 または A 2 2 のいずれか 1 つに記載の改変された細胞。

【0767】

実施形態 A 2 4 . 前記細胞は、キメラ抗原レセプターをコードする核酸をさらに含む、実施形態 A 1 ～ A 1 3 または A 1 5 ～ A 2 3 のいずれか 1 つに記載の改変された細胞。

10

【0768】

実施形態 A 2 5 . 前記足場領域は、少なくとも 3 個の第 1 のリガンド結合領域を含む、実施形態 A 1 ～ A 2 4 のいずれか 1 つに記載の改変された細胞。

【0769】

実施形態 A 2 6 . 前記足場領域は、少なくとも 4 個の第 1 のリガンド結合領域を含む、実施形態 A 1 ～ A 2 4 のいずれか 1 つに記載の改変された細胞。

【0770】

実施形態 A 2 7 . 前記足場領域は、少なくとも 5 個の第 1 のリガンド結合領域を含む、実施形態 A 1 ～ A 2 4 のいずれか 1 つに記載の改変された細胞。

【0771】

20

実施形態 A 2 8 . 前記足場領域は、少なくとも 6 ～ 1 0 個の第 1 のリガンド結合領域を含む、実施形態 A 1 ～ A 2 4 のいずれか 1 つに記載の改変された細胞。

【0772】

実施形態 A 2 9 . 前記ラパログは、S-o, p-ジメトキシフェニル (DMOP) - ラパマイシン、R-イソプロポキシラパマイシン、および S-ブタンスルホンアミドラプからなる群より選択される、実施形態 A 1 8 ～ A 2 8 のいずれか 1 つに記載の改変された細胞。

【0773】

実施形態 A 3 0 . 前記足場は、少なくとも 2 個の FKBP12 - ラパマイシン結合ドメイン (FRB_L) を含む、実施形態 A 1 ～ A 2 0、または A 2 4 ～ A 2 9 のいずれか 1

30

【0774】

実施形態 A 3 1 . 前記足場は、少なくとも 3 個の FRB_L ドメインを含む、実施形態 A 3 0 に記載の改変された細胞。

【0775】

実施形態 A 3 2 . 前記第 1 のリガンド結合領域は、少なくとも 4 個の FRB_L ドメインを含む、実施形態 A 3 0 に記載の改変された細胞。

【0776】

実施形態 A 3 3 . 前記 FRB 領域は、KLW (T2098L)、KTF (W2101F)、および KLF (T2098L、W2101F) からなる群より選択される、実施形態 A 2 0 ～ A 3 2 のいずれか 1 つに記載の改変された細胞。

40

【0777】

実施形態 A 3 4 . 前記 FKBP12 領域は、FKBPv36 リガンド結合領域を含む、実施形態 A 2 1 ～ A 3 3 のいずれか 1 つに記載の改変された細胞。

【0778】

実施形態 A 3 5 . 前記 FKBP12 領域は、バリン、ロイシン、イソロイシンおよびアラニンからなる群より選択される 36 位でのアミノ酸置換を有する、実施形態 A 2 1 ～ A 3 3 のいずれか 1 つに記載の改変された細胞。

【0779】

実施形態 A 3 6 . 前記細胞は、T 細胞、腫瘍浸潤リンパ球、NK-T 細胞、TCR 発

50

現細胞、またはNK細胞である、実施形態A1～A35のいずれか1つに記載の改変された細胞。

【0780】

実施形態A37. 前記細胞は、骨髓から得られるかまたは骨髓から調製される、実施形態A1～A36のいずれか1つに記載の改変された細胞。

【0781】

実施形態A38. 前記細胞は、臍帯血から得られるかまたは臍帯血から調製される、実施形態A1～A36のいずれか1つに記載の改変された細胞。

【0782】

実施形態A39. 前記細胞は、末梢血から得られるかまたは末梢血から調製される、実施形態A1～A36のいずれか1つに記載の改変された細胞。

10

【0783】

実施形態A40. 前記細胞は、末梢血単核細胞から得られるかまたは末梢血単核細胞から調製される、実施形態A1～A36のいずれか1つに記載の改変された細胞。

【0784】

実施形態A41. 前記細胞は、前記第1のポリヌクレオチドに作動可能に連結されたプロモーターをさらに含む、実施形態A1～A36のいずれか1つに記載の改変された細胞。

【0785】

実施形態A42. 前記プロモーターは、前記第2のポリヌクレオチドに作動可能に連結される、実施形態A41に記載の改変された細胞。

20

【0786】

実施形態A43. 前記プロモーターは、発生的に制御され、前記カスパーゼ9ポリペプチドは、発生的に分化した細胞において発現される、実施形態A41～A42のいずれか1つに記載の改変された細胞。

【0787】

実施形態A44. 前記プロモーターは、組織特異的であり、前記カスパーゼ9ポリペプチドは、特異的組織において発現される、実施形態A41～A42のいずれか1つに記載の改変された細胞。

【0788】

30

実施形態A45. 前記プロモーターは、活性化T細胞において活性化される、実施形態A41～A42のいずれか1つに記載の改変された細胞。

【0789】

実施形態A46. 前記アポトーシス促進ポリペプチドは、カスパーゼ1、カスパーゼ2、カスパーゼ3、カスパーゼ4、カスパーゼ5、カスパーゼ6、カスパーゼ7、カスパーゼ8、カスパーゼ9、カスパーゼ10、カスパーゼ11、カスパーゼ12、カスパーゼ13、またはカスパーゼ14、FADD(DED)、APAF1(CARD)、CRADD/RAIDD(CARD)、ASC(CARD)、Bax、Bak、Bcl-xL、Bcl-2、RIPK3、およびRIPK1-RHIMからなる群より選択される、実施形態A1～A45のいずれか1つに記載の改変された細胞。

40

【0790】

実施形態A47. 前記アポトーシス促進ポリペプチドは、カスパーゼポリペプチドである、実施形態A1～A45のいずれか1つに記載の改変された細胞。

【0791】

実施形態A48. 前記アポトーシス促進ポリペプチドは、カスパーゼ9ポリペプチドである、実施形態A1～A45のいずれか1つに記載の改変された細胞。

【0792】

実施形態A49. 前記カスパーゼポリペプチドは、配列番号300のアミノ酸配列を含む、実施形態A47～A48のいずれか1つに記載の改変された細胞。

【0793】

50

実施形態 A 5 0. 前記カスパーゼポリペプチドは、表 5 または表 6 中のカスパーゼバリエーションからなる群より選択されるアミノ酸置換を含む改変されたカスパーゼ 9 ポリペプチドである、実施形態 A 4 7 ~ A 4 8 のいずれか 1 つに記載の改変された細胞。

【0794】

実施形態 A 5 1. 前記カスパーゼポリペプチドは、D 3 3 0 A、D 3 3 0 E、および N 4 0 5 Q からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む改変されたカスパーゼ 9 ポリペプチドである、実施形態 A 4 7 ~ A 4 8 のいずれか 1 つに記載の改変された細胞。

【0795】

実施形態 A 5 2. 前記短縮型 M y D 8 8 ポリペプチドは、配列番号 2 1 4 のアミノ酸配列、またはその機能的フラグメントを有する、実施形態 A 1 4 ~ A 5 0 のいずれか 1 つに記載の改変された細胞。

10

【0796】

実施形態 A 5 3. 前記細胞質 C D 4 0 ポリペプチドは、配列番号 2 1 6 のアミノ酸配列、またはその機能的フラグメントを有する、実施形態 A 1 4 ~ A 5 2 のいずれか 1 つに記載の改変された細胞。

【0797】

実施形態 A 5 4. 前記抗原認識部分は、C D 1 9 に結合する一本鎖可変フラグメントである、実施形態 A 9 ~ A 5 2 のいずれか 1 つに記載の改変された細胞。

【0798】

実施形態 A 5 5. 前記抗原認識部分は、P S C A に結合する一本鎖可変フラグメントである、実施形態 A 9 ~ A 5 2 のいずれか 1 つに記載の改変された細胞。

20

【0799】

実施形態 A 5 6. 前記抗原認識部分は、H e r 2 / N e u に結合する一本鎖可変フラグメントである、実施形態 A 9 ~ A 5 2 のいずれか 1 つに記載の改変された細胞。

【0800】

実施形態 A 5 7. 前記細胞は、T 細胞である、実施形態 A 1 ~ A 5 6 のいずれか 1 つに記載の改変された細胞。

【0801】

実施形態 A 5 8. 前記細胞は、ナチュラルキラー細胞である、実施形態 A 1 ~ A 5 6 のいずれか 1 つに記載の改変された細胞。

30

【0802】

実施形態 A 5 9. 膜会合ポリペプチド領域は、N K G 2 D レセプターである、実施形態 A 8 ~ A 5 8 のいずれか 1 つに記載の改変された細胞。

【0803】

実施形態 A 6 0. 前記膜標的化ポリペプチド領域は、ミリスチル化領域、パルミトイル化領域、プレニル化領域、およびレセプターの膜貫通配列からなる群より選択される、実施形態 A 8 ~ A 5 8 のいずれか 1 つに記載の改変された細胞。

【0804】

実施形態 A 6 1. 前記膜標的化ポリペプチド領域は、ミリスチル化領域である、実施形態 A 8 ~ A 5 8 のいずれか 1 つに記載の改変された細胞。

40

【0805】

実施形態 A 6 2. 前記ミリスチル化領域は、配列番号 3 のアミノ酸配列またはその機能的フラグメントを有する、実施形態 A 6 1 に記載の改変された細胞。

【0806】

実施形態 A 6 3. 前記 T 細胞活性化分子は、I T A M を含みシグナル 1 を与える分子である、実施形態 A 1 3 ~ A 6 2 のいずれか 1 つに記載の改変された細胞。

【0807】

実施形態 A 6 4. 前記 T 細胞活性化分子は、C D 3 ζ ポリペプチドである、実施形態 A 1 3 ~ A 6 2 のいずれか 1 つに記載の改変された細胞。

【0808】

50

実施形態 A 6 5. 前記 T 細胞活性化分子は、F c イプシロンレセプターガンマ (F c ϵ R 1 γ) サブユニットポリペプチドである、実施形態 A 1 3 ~ A 6 2 のいずれか 1 つに記載の改変された細胞。

【0809】

実施形態 A 6 6. 前記抗原認識部分は、腫瘍細胞上の抗原に結合する、実施形態 A 9 ~ A 6 5 のいずれか 1 つに記載の改変された細胞。

【0810】

実施形態 A 6 7. 前記抗原認識部分は、過剰増殖性疾患に関与する細胞上の抗原に結合する、実施形態 A 9 ~ A 6 5 のいずれか 1 つに記載の改変された細胞。

【0811】

実施形態 A 6 8. 前記抗原認識部分は、P S M A、P S C A、M U C 1、C D 1 9、R O R 1、メソテリン、G D 2、C D 1 2 3、M U C 1 6、および H e r 2 / N e u からなる群より選択される抗原に結合する、実施形態 A 9 ~ A 6 5 のいずれか 1 つに記載の改変された細胞。

【0812】

実施形態 A 6 9. 前記抗原認識部分は、ウイルス抗原または細菌抗原に結合する、実施形態 A 9 ~ A 6 5 のいずれか 1 つに記載の改変された細胞。

【0813】

実施形態 A 7 0. 前記抗原認識部分は、一本鎖可変フラグメントである、実施形態 A 9 ~ A 6 5 のいずれか 1 つに記載の改変された細胞。

【0814】

実施形態 A 7 1. 前記膜貫通領域は、C D 8 膜貫通領域である、実施形態 A 1 3 ~ A 7 0 のいずれか 1 つに記載の改変された細胞。

【0815】

実施形態 B 1. 第 1 のキメラポリペプチドをコードするポリヌクレオチドであって、ここで該第 1 のキメラポリペプチドは、少なくとも 2 個の第 1 のリガンド結合領域を含む足場領域を含む、ポリヌクレオチドに作動可能に連結されたプロモーターを含む核酸。

【0816】

実施形態 B 2. 第 2 のキメラポリペプチドをコードする第 2 のポリヌクレオチドであって、ここで該第 2 のキメラポリペプチドは、アポトーシス促進ポリペプチド領域および第 2 のリガンド結合領域を含む、第 2 のポリヌクレオチドをさらに含む、実施形態 B 1 に記載の核酸であって、ここで該第 2 のリガンド結合領域は、該第 1 のリガンド結合領域とは異なるアミノ酸配列を有し、ここで該第 1 のリガンド結合領域および第 2 のリガンド結合領域は、第 1 のリガンドに結合できる、核酸。

【0817】

実施形態 B 3. 前記第 2 のポリヌクレオチドに作動可能に連結されたプロモーターをさらに含む、実施形態 B 2 に記載の核酸。

【0818】

実施形態 B 4. 前記プロモーターは、前記第 1 のポリヌクレオチドおよび前記第 2 のポリヌクレオチドに作動可能に連結される、実施形態 B 2 に記載の核酸。

【0819】

実施形態 B 8. 前記第 2 のリガンドは、前記第 1 のリガンド結合領域に有意に結合しない、実施形態 B 7 に記載の核酸。

【0820】

実施形態 B 9. 前記第 1 のリガンド結合領域は、前記第 2 のリガンドに結合できない、実施形態 B 2 ~ B 7 のいずれか 1 つに記載の改変された細胞。

【0821】

実施形態 B 1 0. 前記第 1 のリガンド結合領域は、前記第 1 のリガンドに結合でき、かつ第 2 のリガンドに結合できる、実施形態 B 2 ~ B 6 のいずれか 1 つに記載の核酸。

【0822】

10

20

30

40

50

実施形態B11. 前記第2のリガンドは、前記第2のリガンド結合領域に有意に結合しない、実施形態B10に記載の核酸。

【0823】

実施形態B12. 前記第2のリガンド結合領域は、前記第2のリガンドに結合できない、実施形態B10に記載の核酸。

【0824】

実施形態B13. 前記第1のキメラポリペプチドは、膜標的化ポリペプチド領域をさらに含む、実施形態B1～B12のいずれか1つに記載の核酸。

【0825】

実施形態B14. 前記第1のキメラポリペプチドは、抗原認識部分をさらに含む、実施形態B1～B14のいずれか1つに記載の核酸。

10

【0826】

実施形態B15. 前記第1のキメラポリペプチドは、マーカーポリペプチドをさらに含む、実施形態B1～B14のいずれか1つに記載の核酸。

【0827】

実施形態B16. 前記第1のキメラポリペプチドは、T細胞レセプターをさらに含む、実施形態B1～B14のいずれか1つに記載の核酸。

【0828】

実施形態B17. 前記第1のキメラポリペプチドは、キメラ抗原レセプターをさらに含む、実施形態B1～B14のいずれか1つに記載の核酸。

20

【0829】

実施形態B18. 前記キメラ抗原レセプターは、(i)膜貫通領域、(ii)T細胞活性化分子、および(iii)抗原認識部分を含む、実施形態B17に記載の核酸。

【0830】

実施形態B19. 前記キメラ抗原レセプターは、(i)膜貫通領域、(ii)MyD88ポリペプチドまたはTIRドメインを欠く短縮型MyD88ポリペプチド、(iii)CD40細胞外ドメインを欠くCD40細胞質ポリペプチド領域および(iv)T細胞活性化分子、(v)抗原認識部分を含む、実施形態B17に記載の核酸。

【0831】

実施形態B20. 前記第1のキメラポリペプチドは、(i)MyD88ポリペプチドまたはTIRドメインを欠く短縮型MyD88ポリペプチド、および(ii)CD40細胞外ドメインを欠くCD40細胞質ポリペプチド領域をさらに含む、実施形態B1～B14のいずれか1つに記載の核酸。

30

【0832】

実施形態B21. 前記第1のキメラポリペプチドは、MyD88ポリペプチドまたはTIRドメインを欠く短縮型MyD88ポリペプチドをさらに含む、実施形態B1～B14のいずれか1つに記載の核酸。

【0833】

実施形態B22. 前記第1のキメラポリペプチドは、CD40細胞外ドメインを欠くCD40細胞質ポリペプチド領域をさらに含む、実施形態B1～B14のいずれか1つに記載の核酸。

40

【0834】

実施形態B23. 前記第1のリガンドは、ラパマイシンまたはラパログである、実施形態B1～B22のいずれか1つに記載の核酸。

【0835】

実施形態B24. 前記第2のリガンドは、AP1903、AP20187、およびAP1510からなる群より選択される、実施形態B1～B23のいずれか1つに記載の核酸。

【0836】

実施形態B25. 前記第1のリガンド結合領域は、FRB領域である、実施形態B1

50

～B 9 または B 1 3 ～B 2 4 のいずれか 1 つに記載の核酸。

【0 8 3 7】

実施形態B 2 6. 前記第 2 のリガンド結合領域は、F K B P 1 2 領域である、実施形態 B 1 ～B 9 または B 1 3 ～B 2 4 のいずれか 1 つに記載の核酸。

【0 8 3 8】

実施形態B 2 7. 前記第 1 のリガンド結合領域は、F K B P 1 2 領域である、実施形態 B 1 0 ～B 2 4 のいずれか 1 つに記載の核酸。

【0 8 3 9】

実施形態B 2 8. 前記第 2 のリガンド結合領域は、F R B 領域である、実施形態 B 1 0 ～B 2 4 または B 2 7 のいずれか 1 つに記載の核酸。

10

【0 8 4 0】

実施形態B 2 9. 前記足場領域は、少なくとも 3 個の第 1 のリガンド結合領域を含む、実施形態 B 1 ～B 2 8 のいずれか 1 つに記載の核酸。

【0 8 4 1】

実施形態B 3 0. 前記足場領域は、少なくとも 4 個の第 1 のリガンド結合領域を含む、実施形態 B 1 ～B 2 8 のいずれか 1 つに記載の核酸。

【0 8 4 2】

実施形態B 3 1. 前記足場領域は、少なくとも 5 個の第 1 のリガンド結合領域を含む、実施形態 B 1 ～B 2 4 のいずれか 1 つに記載の核酸。

【0 8 4 3】

実施形態B 3 2. 前記足場領域は、少なくとも 6 ～1 0 個の第 1 のリガンド結合領域を含む、実施形態 B 1 ～B 2 4 のいずれか 1 つに記載の核酸。

20

【0 8 4 4】

実施形態B 3 3. 前記ラパログは、S - o, p - ジメトキシフェニル (DMOP) - ラパマイシン、R - イソプロポキシラパマイシン、および S - ブタンスルホンアミドラブからなる群より選択される、実施形態 B 2 3 ～B 3 2 のいずれか 1 つに記載の核酸。

【0 8 4 5】

実施形態B 3 4. 前記足場は、少なくとも 2 個の F K B P 1 2 - ラパマイシン結合ドメイン (F R B_L) を含む、実施形態 B 1 ～B 3 3 のいずれか 1 つに記載の核酸。

【0 8 4 6】

実施形態B 3 5. 前記足場は、少なくとも 3 個の F R B_L ドメインを含む、実施形態 B 3 4 に記載の核酸。

30

【0 8 4 7】

実施形態B 3 6. 前記第 1 のリガンド結合領域は、少なくとも 4 個の F R B_L ドメインを含む、実施形態 B 3 4 に記載の核酸。

【0 8 4 8】

実施形態B 3 7. 前記 F R B 領域は、K L W (T 2 0 9 8 L)、K T F (W 2 1 0 1 F)、および K L F (T 2 0 9 8 L、W 2 1 0 1 F) からなる群より選択される、実施形態 B 2 5 ～B 3 6 のいずれか 1 つに記載の核酸。

【0 8 4 9】

実施形態B 3 8. 前記 F K B P 1 2 領域は、F K B P v 3 6 リガンド結合領域を含む、実施形態 B 2 6 ～B 3 7 のいずれか 1 つに記載の核酸。

40

【0 8 5 0】

実施形態B 3 9. 前記プロモーターは、発生的に制御され、前記カスパーゼ-9 ポリペプチドは、発生的に分化した細胞において発現される、実施形態 B 1 ～B 3 8 のいずれか 1 つに記載の核酸。

【0 8 5 1】

実施形態B 4 0. 前記プロモーターは、組織特異的であり、前記カスパーゼ-9 ポリペプチドは、特異的組織において発現される、実施形態 B 1 ～B 3 8 のいずれか 1 つに記載の核酸。

50

【0852】

実施形態B41. 前記プロモーターは、活性化T細胞において活性化される、実施形態B1～B38のいずれか1つに記載の核酸。

【0853】

実施形態B42. 前記アポトーシス促進ポリペプチドは、カスパーゼ1、カスパーゼ2、カスパーゼ3、カスパーゼ4、カスパーゼ5、カスパーゼ6、カスパーゼ7、カスパーゼ8、カスパーゼ9、カスパーゼ10、カスパーゼ11、カスパーゼ12、カスパーゼ13、またはカスパーゼ14、FADD(DED)、APAF1(CARD)、CRADD/RAIDD(CARD)、ASC(CARD)、Bax、Bak、Bcl-xL、Bcl-2、RIPK3、およびRIPK1-RHIMからなる群より選択される、実施形態B2～B41のいずれか1つに記載の核酸。

10

【0854】

実施形態B43. 前記アポトーシス促進ポリペプチドは、カスパーゼポリペプチドである、実施形態B1～B42のいずれか1つに記載の核酸。

【0855】

実施形態B44. 前記アポトーシス促進ポリペプチドは、カスパーゼ9ポリペプチドである、実施形態B1～B43のいずれか1つに記載の核酸。

【0856】

実施形態B45. 前記カスパーゼポリペプチドは、配列番号300のアミノ酸配列を含む、実施形態B43～B44のいずれか1つに記載の核酸。

20

【0857】

実施形態B46. 前記カスパーゼポリペプチドは、表5または表6中のカスパーゼバリエーションからなる群より選択されるアミノ酸置換を含む改変されたカスパーゼ9ポリペプチドである、実施形態B43～B44のいずれか1つに記載の核酸。

【0858】

実施形態B47. 前記カスパーゼポリペプチドは、D330A、D330E、およびN405Qからなる群より選択されるアミノ酸配列を含む改変されたカスパーゼ9ポリペプチドである、実施形態B43～B44のいずれか1つに記載の核酸。

【0859】

実施形態B48. 前記短縮型MyD88ポリペプチドは、配列番号214のアミノ酸配列、またはその機能的フラグメントを有する、実施形態B19～B47のいずれか1つに記載の核酸。

30

【0860】

実施形態B49. 前記細胞質CD40ポリペプチドは、配列番号216のアミノ酸配列、またはその機能的フラグメントを有する、実施形態B19～B48のいずれか1つに記載の核酸。

【0861】

実施形態B50. 前記抗原認識部分は、CD19に結合する一本鎖可変フラグメントである、実施形態B14～B49のいずれか1つに記載の核酸。

【0862】

実施形態B51. 前記抗原認識部分は、PSCAに結合する一本鎖可変フラグメントである、実施形態B14～B49のいずれか1つに記載の核酸。

40

【0863】

実施形態B52. 前記抗原認識部分は、Her2/Neuに結合する一本鎖可変フラグメントである、実施形態B14～B49のいずれか1つに記載の核酸。

【0864】

実施形態B53. 前記細胞は、T細胞である、実施形態B1～B56のいずれか1つに記載の核酸。

【0865】

実施形態B54. 前記細胞は、ナチュラルキラー細胞である、実施形態B1～B56

50

のいずれか 1 つに記載の核酸。

【0866】

実施形態B55. 膜標的化ポリペプチド領域は、NKG2Dレセプターである、実施形態B13～B54のいずれか1つに記載の核酸。

【0867】

実施形態B56. 前記膜標的化ポリペプチド領域は、ミリストイル化領域、パルミトイル化領域、プレニル化領域、およびレセプターの膜貫通配列からなる群より選択される、実施形態B13～B54のいずれか1つに記載の核酸。

【0868】

実施形態B57. 前記膜標的化ポリペプチド領域は、ミリストイル化領域である、実施形態B13～B54のいずれか1つに記載の核酸。

10

【0869】

実施形態B58. 前記ミリストイル化領域は、配列番号3のアミノ酸配列またはその機能的フラグメントを有する、実施形態B57に記載の核酸。

【0870】

実施形態B59. 前記T細胞活性化分子は、ITAMを含みシグナル1を与える分子である、実施形態B18～B58のいずれか1つに記載の核酸。

【0871】

実施形態B60. 前記T細胞活性化分子は、CD3ζポリペプチドである、実施形態B18～B58のいずれか1つに記載の核酸。

20

【0872】

実施形態B61. 前記T細胞活性化分子は、Fcイプシロンレセプターガンマ (FcεR1γ) サブユニットポリペプチドである、実施形態B18～B58のいずれか1つに記載の核酸。

【0873】

実施形態B62. 前記抗原認識部分は、腫瘍細胞上の抗原に結合する、実施形態B14～B59のいずれか1つに記載の核酸。

【0874】

実施形態B63. 前記抗原認識部分は、過剰増殖性疾患に関与する細胞上の抗原に結合する、実施形態B14～B59のいずれか1つに記載の核酸。

30

【0875】

実施形態B64. 前記抗原認識部分は、PSMA、PSCA、MUC1、CD19、ROR1、メソテリン、GD2、CD123、MUC16、およびHer2/Neuからなる群より選択される抗原に結合する、実施形態B14～B59のいずれか1つに記載の核酸。

【0876】

実施形態B65. 前記抗原認識部分は、ウイルス抗原または細菌抗原に結合する、実施形態B14～B59のいずれか1つに記載の核酸。

【0877】

実施形態B66. 前記抗原認識部分は、一本鎖可変フラグメントである、実施形態B14～B59のいずれか1つに記載の核酸。

40

【0878】

実施形態B67. 前記膜貫通領域は、CD8膜貫通領域である、実施形態B18～B70のいずれか1つに記載の核酸。

【0879】

実施形態B68. 前記核酸は、ウイルスベクター内に含まれる、実施形態B1～B67のいずれか1つに記載の核酸。

【0880】

実施形態B69. 前記ウイルスベクターは、レトロウイルスベクターである、実施形態B68に記載の核酸。

50

【0881】

実施形態B70. 前記レトロウイルスベクターは、マウス白血病ウイルスベクターである、実施形態B69に記載の核酸。

【0882】

実施形態B71. 前記レトロウイルスベクターは、SFGベクターである、実施形態B69に記載の核酸。

【0883】

実施形態B72. 前記ウイルスベクターは、アデノウイルスベクターである、実施形態B68に記載の核酸。

【0884】

実施形態B73. 前記ウイルスベクターは、レンチウイルスベクターである、実施形態B68に記載の核酸。

【0885】

実施形態B74. 前記ウイルスベクターは、アデノ随伴ウイルス(AAV)、ヘルペスウイルス、およびワクシニアウイルスからなる群より選択される、実施形態B68に記載の核酸。

【0886】

実施形態B75. 前記核酸は、エレクトロポレーション、ソノポレーション、もしくはバイオリスティックのために調製されるかまたはそのためにデザインされたベクターの中に存在するか、あるいは化学的脂質(chemical lipid)、ポリマー、無機ナノ粒子、もしくはポリプレックスに結合されるかまたはその中に組み込まれる、実施形態B1～B74のいずれか1項に記載の核酸。

【0887】

実施形態B76. 前記核酸は、プラスミド内に含まれる、実施形態B1～B66、またはB75のいずれか1つに記載の核酸。

【0888】

実施形態B77. 実施例16の表の中に提供されるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む、実施形態B1～B76のいずれか1つに記載の核酸。

【0889】

実施形態B78. FKBpv36、FpK'、FpK、Fv、Fv'、FKBppK'、FKBppK''、およびFKBppK'''からなる群より選択される、実施例16の表の中に提供されるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む、実施形態B1～B76のいずれか1つに記載の核酸。

【0890】

実施形態B79. FKBpv36、FpK'、FpK、Fv、Fv'、FKBppK'、FKBppK''、およびFKBppK'''からなる群より選択される、実施例16の表の中に提供されるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む、実施形態B1～B76のいずれか1つに記載の核酸。

【0891】

実施形態B80. FKBpv36、FpK'、FpK、Fv、Fv'、FKBppK'、FKBppK''、およびFKBppK'''からなる群より選択される、実施例16の表の中に提供されるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む、実施形態B1～B76のいずれか1つに記載の核酸。

【0892】

実施形態B81. FRP5-VL、FRP5-VH、FMC63-VL、およびFMC63-VHからなる群より選択される、実施例16の表の中に提供されるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む、実施形態B1～B80のいずれか1つに記載の核酸。

【0893】

実施形態B82. FRP5-VLおよびFRP5-VHをコードするポリヌクレオチ

10

20

30

40

50

ドを含む、実施形態 B 8 1 に記載の核酸。

【0894】

実施形態 B 8 3. F M C 6 3 - V L および F M C 6 3 - V H をコードするポリヌクレオチドを含む、実施形態 B 8 1 に記載の核酸。

【0895】

実施形態 B 8 4. M y D 8 8 L および M y D 8 8 からなる群より選択される、実施例 1 6 の表の中に提供されるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む、実施形態 B 1 ~ B 8 3 のいずれか 1 つに記載の核酸。

【0896】

実施形態 B 8 5. 実施例 1 6 の表の中に提供される Δ カスパーゼ 9 ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む、実施形態 B 1 ~ B 8 4 のいずれか 1 つに記載の核酸。

10

【0897】

実施形態 B 8 6. 実施例 1 6 の表の中に提供される Δ C D 1 9 ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む、実施形態 B 1 ~ B 8 5 のいずれか 1 つに記載の核酸。

【0898】

実施形態 B 8 7. 実施例 1 6 の表の中に提供される h C D 4 0 ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む、実施形態 B 1 ~ B 8 6 のいずれか 1 つに記載の核酸。

【0899】

実施形態 B 8 8. 実施例 1 6 の表の中に提供される C D 3 ζ ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む、実施形態 B 1 ~ B 8 7 のいずれか 1 つに記載の核酸。

20

【0900】

実施形態 C 1. 実施形態 B 1 ~ B 8 8 のいずれか 1 つに記載の核酸でトランスフェクトまたは形質導入された、改変された細胞。

【0901】

実施形態 C 2. 前記細胞は、T 細胞、腫瘍浸潤リンパ球、N K - T 細胞、または N K 細胞である、実施形態 A 1 ~ A 7 1、または C 1 のいずれか 1 つに記載の改変された細胞。

【0902】

実施形態 C 3. 前記細胞は、T 細胞である、実施形態 A 1 ~ A 7 1 または C 1 のいずれか 1 つに記載の改変された細胞。

30

【0903】

実施形態 C 4. 前記細胞は、初代 T 細胞である、実施形態 A 1 ~ A 7 1、または C 1 のいずれか 1 つに記載の改変された細胞。

【0904】

実施形態 C 5. 前記細胞は、細胞傷害性 T 細胞である、実施形態 A 1 ~ A 7 1、または C 1 のいずれか 1 つに記載の改変された細胞。

【0905】

実施形態 C 6. 前記細胞は、胚性幹細胞 (E S C)、人工多能性幹細胞 (inducible pluripotent stem cell; i P S C)、非リンパ球性造血細胞、非造血細胞、マクロファージ、ケラチノサイト、線維芽細胞、メラノーマ細胞、腫瘍浸潤リンパ球、ナチュラルキラー細胞、ナチュラルキラー T 細胞、または T 細胞からなる群より選択される、実施形態 A 1 ~ A 7 1、または C 1 のいずれか 1 つに記載の改変された細胞。

40

【0906】

実施形態 C 7. 前記 T 細胞は、ヘルパー T 細胞である、実施形態 A 1 ~ A 7 1、または C 1 のいずれか一つに記載の方法。

【0907】

実施形態 C 8. 前記細胞は、骨髄から得られるかまたは骨髄から調製される、実施形態 C 1 ~ C 7 のいずれか 1 つに記載の改変された細胞。

【0908】

50

実施形態C9. 前記細胞は、臍帯血から得られるかまたは臍帯血から調製される、実施形態C1～C7のいずれか1つに記載の改変された細胞。

【0909】

実施形態C10. 前記細胞は、末梢血から得られるかまたは末梢血から調製される、実施形態C1～C7のいずれか1つに記載の改変された細胞。

【0910】

実施形態C11. 前記細胞は、末梢血単核細胞から得られるかまたは末梢血単核細胞から調製される、実施形態C1～C7のいずれか1項に記載の改変された細胞。

【0911】

実施形態C12. 前記細胞は、ヒト細胞である、実施形態C1～C7のいずれか1つに記載の改変された細胞。

10

【0912】

実施形態C13. 前記改変された細胞は、インビボで形質導入またはトランスフェクトされる、実施形態C1～C12のいずれか1つに記載の方法。

【0913】

実施形態C14. 前記細胞は、エレクトロポレーション、ソノポレーション、バイオリスティック（例えば、Au粒子での遺伝子銃）、脂質トランスフェクション、ポリマートランスフェクション、ナノ粒子、またはポリプレックスからなる群より選択される方法を使用して、核酸ベクターによってトランスフェクトまたは形質導入される、実施形態C1～C7のいずれか1つに記載の改変された細胞。

20

【0914】

実施形態D1. 被験体において移植された改変された細胞の生存をコントロールするための方法であって、該方法は、

a) 実施形態A1～A71、またはC1～C14のいずれか1つに記載の改変された細胞を該被験体に移植すること；および

b) (a)の後に、該被験体にラパマイシンまたはラパログを、前記アポトーシス促進ポリペプチド領域を含む前記第2のキメラポリペプチドを発現する前記改変された細胞のうちの30%未満を殺滅するために有効な量で投与すること、を包含する方法。

【0915】

30

実施形態D1. 1. ラパマイシンまたはラパログを、改変された細胞を使用する細胞治療を受けたことがあるヒト被験体に投与するための方法であって、該方法は、ラパマイシンまたはラパログを、該ヒト被験体に投与することを包含し、ここで該改変された細胞は、実施形態B1～B88のいずれか1つに記載の核酸を含み、ここで該ラパマイシンまたはラパログは、FRB領域に結合する、方法。

【0916】

実施形態D2. 前記ラパマイシンまたはラパログは、前記キメラカスパーゼポリペプチドを発現する前記改変された細胞のうちの40%未満を殺滅するために有効な量で投与される、実施形態D1またはD1. 1のいずれか1つに記載の方法。

【0917】

40

実施形態D3. 前記ラパマイシンまたはラパログは、前記キメラカスパーゼポリペプチドを発現する前記改変された細胞のうちの50%未満を殺滅するために有効な量で投与される、実施形態D1またはD1. 1のいずれか1つに記載の方法。

【0918】

実施形態D4. 前記ラパマイシンまたはラパログは、前記キメラカスパーゼポリペプチドを発現する前記改変された細胞のうちの60%未満を殺滅するために有効な量で投与される、実施形態D1またはD1. 1のいずれか1つに記載の方法。

【0919】

実施形態D5. 前記ラパマイシンまたはラパログは、前記キメラカスパーゼポリペプチドを発現する前記改変された細胞のうちの70%未満を殺滅するために有効な量で投与

50

される、実施形態 D 1 または D 1 . 1 に記載の方法。

【0920】

実施形態 D 6 . 第 2 のリガンド結合領域は、F K B P 1 2 領域であり、前記アポトーシス促進ポリペプチド領域を含む前記第 2 のキメラポリペプチド上の該 F K B P 1 2 領域に結合するリガンドを、該第 2 のキメラポリペプチドを発現する前記改変された細胞のうちの少なくとも 9 0 % を殺滅するために有効な量で投与することをさらに包含する、実施形態 D 1 ~ D 5 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0921】

実施形態 D 7 . 被験体において移植された改変された細胞の生存をコントロールするための方法であって、該方法は、

10

a) 実施形態 A 1 ~ A 7 1 または C 1 ~ C 1 4 のいずれか 1 つに記載の改変された細胞を、該被験体に移植すること；および

b) (a) の後に、該被験体に、前記アポトーシス促進ポリペプチド領域を含む前記第 2 のキメラポリペプチド上の前記 F K B P 1 2 領域に結合するリガンドを、該第 2 のキメラポリペプチドを発現する前記改変された細胞のうちの少なくとも 9 0 % を殺滅するために有効な量で投与すること
を包含する方法。

【0922】

実施形態 D 8 . 前記リガンド、ラパマイシン、または前記ラパログの 1 より多くの用量が投与される、実施形態 D 1 ~ D 7 のいずれか 1 つに記載の方法。

20

【0923】

実施形態 D 9 . トランスフェクトまたは形質導入された、改変された細胞を前記被験体から除去することを要する該被験体における状態の有無を同定すること；ならびに

該被験体において同定された該状態の有無に基づいて、ラパマイシンもしくはラパログ、または前記 F K B P 1 2 領域に結合するリガンドを投与するか、該被験体へのその後の投与量を維持するか、あるいはその後の投与量を調整すること
をさらに包含する、実施形態 D 1 ~ D 8 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0924】

実施形態 D 1 0 . トランスフェクトまたは形質導入された治療用細胞を前記被験体から除去することを要する該被験体における状態の有無を同定すること；および

30

該被験体において同定された該状態の有無に基づいて、前記 F K B P 1 2 領域に結合するリガンド、またはラパマイシンもしくはラパログが、該被験体に投与されるべきどうか、あるいは該被験体にその後投与される該リガンドの投与量が調整されることを決定すること、
をさらに包含する、実施形態 D 1 ~ D 9 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0925】

実施形態 D 1 1 . トランスフェクトまたは形質導入された、改変された細胞を前記被験体から除去することを要する該被験体における状態の有無を含む情報を受け取ること；および

該被験体において同定された該状態の有無に基づいて、ラパマイシンもしくはラパログ、または前記 F K B P 1 2 領域に結合するリガンドを投与するか、該被験体へのその後の投与量を維持するか、あるいはその後の投与量を調整すること、
をさらに包含する、実施形態 D 1 ~ D 9 のいずれか 1 つに記載の方法。

40

【0926】

実施形態 D 1 2 . トランスフェクトまたは形質導入された、改変された細胞を前記被験体から除去することを要する該被験体における状態の有無を同定すること；および

該被験体において同定された該状態の有無またはステージを、該被験体において同定された該状態の有無またはステージに基づいて、ラパマイシン、ラパログまたは前記 F K B P 1 2 領域に結合するリガンドを投与するか、該被験体に投与されるその後の投与量を維持するか、あるいはその後の投与量を調整する意思決定者に伝達すること、

50

をさらに包含する、実施形態 D 1 ～ D 9 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0927】

実施形態 D 1 3. トランスフェクトまたは形質導入された、改変された細胞を該被験体から除去することを要する該被験体における状態の有無を同定すること；ならびに

該被験体において同定された該状態の有無またはステージに基づいて、ラパマイシン、ラパログ、または前記 F K B P 1 2 領域に結合するリガンドを投与するか、該被験体に投与されるその後の投与量を維持するか、あるいはその後の投与量を調整する指示を伝達すること、

をさらに包含する、実施形態 D 1 ～ D 9 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0928】

実施形態 D 1 4. 前記リガンドの投与後に、前記被験体細胞において移植片対宿主病またはサイトカイン放出症候群を引き起こす改変された細胞の数は、減少する、実施形態 D 1 3 に記載の方法。

【0929】

実施形態 D 1 5. 前記改変された細胞は、トランスフェクションまたは形質導入前に同種枯渇される、実施形態 D 1 ～ D 1 4 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0930】

実施形態 D 1 6. 前記改変された細胞は、トランスフェクションまたは形質導入前に同種枯渇されない、実施形態 D 1 ～ D 1 4 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0931】

実施形態 D 1 7. 前記改変された細胞は、前記被験体に対して同種である、実施形態 D 1 ～ D 1 6 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0932】

実施形態 D 1 8. 前記改変された細胞は、前記被験体に対して自家である、実施形態 D 1 ～ D 1 6 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0933】

実施形態 D 1 9. 前記形質導入またはトランスフェクトされた改変された細胞は、前記被験体への投与前に、I L - 2 の存在下で培養される、実施形態 D 1 ～ D 1 8 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0934】

実施形態 D 2 0. 同種反応性の改変された細胞は、前記被験体に存在し、同種反応性の改変された細胞の数は、ラパマイシン、前記ラパログ、または前記リガンドの投与後に少なくとも 9 0 % 減少する、実施形態 D 1 9 に記載の方法。

【0935】

実施形態 D 2 1. ラパマイシン、前記ラパログ、または前記リガンドの投与後に、改変された細胞は、前記被験体の中で生き残り、拡大できかつウイルスおよび真菌に対して反応性である、実施形態 D 7 ～ D 2 0 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0936】

実施形態 D 2 2. ラパマイシン、前記ラパログ、または前記リガンドの投与後に、改変された細胞は、前記被験体の中で生き残り、拡大できかつ該被験体中の腫瘍細胞に対して反応性である、実施形態 D 7 ～ D 2 0 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0937】

実施形態 D 2 3. 前記被験体は、前記改変された細胞の投与前または投与と同時に幹細胞移植を受けたことがある、実施形態 D 7 ～ D 2 0 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0938】

実施形態 D 2 4. 前記被験体における移植片対宿主病症状の出現に基づいて、該被験体へのラパマイシン、前記ラパログ、または前記リガンドのさらなる単一用量またはさらなる複数用量を投与するかどうかを決定することをさらに包含する、実施形態 D 7 ～ D 2 0 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0939】

10

20

30

40

50

実施形態D25. 少なくとも 1×10^6 個の形質導入またはトランスフェクトされた改変された細胞が、前記被験体に投与される、実施形態D1～D24のいずれか1つに記載の方法。

【0940】

実施形態D26. 少なくとも 1×10^7 個の形質導入またはトランスフェクトされた改変された細胞が、前記被験体に投与される、実施形態D1～D24のいずれか1つに記載の方法。

【0941】

実施形態D27. 少なくとも 1×10^8 個の形質導入またはトランスフェクトされた改変された細胞が、前記被験体に投与される、実施形態D1～D24のいずれか1つに記載の方法。

10

【0942】

実施形態D28. 前記被験体における移植片対宿主病の有無またはステージを同定すること、および

該被験体において同定された該移植片対宿主病の有無またはステージに基づいて、ラパマイシン、ラパログ、もしくは前記FKBP12領域に結合するリガンドを投与するか、該被験体へのその後の投与量を維持するか、またはその後の投与量を調整すること、をさらに包含する、実施形態D1～D25のいずれか1つに記載の方法。

【0943】

実施形態E1. 細胞においてキメラ抗原レセプターを発現させるための方法であって、該方法は、実施形態A1～A71のいずれか1つに記載の核酸と細胞とを、該核酸が該細胞へと組み込まれる条件下で接触させ、それによって該細胞は、該キメラ抗原レセプターおよびキメラカスパーゼポリペプチドを該組み込まれた核酸から発現することを包含する、方法。

20

【0944】

実施形態E2. 前記核酸は、前記細胞とエキソビボで接触させられる、実施形態E1に記載の方法。

【0945】

実施形態E3. 前記核酸は、前記細胞とインビボで接触させられる、実施形態E1に記載の方法。

30

* * *

【0946】

本明細書中で参照された特許、特許出願、刊行物および文書の各々の全体が、参照により本明細書によって援用される。上記特許、特許出願、刊行物および文書の引用は、前述のいずれかが、関連する従来技術であることを自認するものでもないし、これらの刊行物または文書の内容または日付に関して何ら自認するものでもない。

【0947】

本技術の基本的な態様から逸脱することなく、前述のものに対して改変が行われ得る。本技術は、1つ以上の特定の実施形態に照らして実質的に詳細に説明されてきたが、当業者は、本願において具体的に開示された実施形態に対して変更が行われ得るが、これらの改変および改善が本技術の範囲内および精神内であることを認識する。

40

【0948】

本明細書中に例証的に記載された技術は、本明細書中に具体的に開示されていない任意の要素（複数可）の非存在下において、適切に実施され得る。したがって、例えば、本明細書中の各場合において、用語「～を含む」、「～から本質的になる」および「～からなる」のいずれかは、他の2つの用語のいずれかと置き換えられてもよい。使用されてきた用語および表現は、限定の用語ではなく説明の用語として使用され、そのような用語および表現の使用は、示されたおよび記載された特徴またはそれらの一部のいかなる等価物も排除せず、特許請求される本技術の範囲内で様々な改変が可能である。要素のうちの1つまたは要素のうちの2つ以上が記載されていることが文脈から明らか

50

でない限り、用語「a」または「an」は、それが修飾するエレメントのうちの1つまたは複数のことを指し得る（例えば、「試薬（a reagent）」は、1つ以上の試薬を意味し得る）。本明細書中で使用される用語「約」は、基となるパラメータの10%以内の値（すなわち、プラスまたはマイナス10%）のことを指し、一続きの値の始めに用語「約」を使用することにより、それらの値の各々が修飾される（すなわち、「約1、2および3」は、約1、約2および約3のことを指す）。例えば、「約100グラム」という重量は、90グラム～110グラムの重量を含み得る。さらに、値のリストが、本明細書中に記載されるとき（例えば、約50%、60%、70%、80%、85%または86%）、そのリストには、それらのすべての中間値および分数値（例えば、54%、85.4%）が含まれる。したがって、本技術は、代表的な実施形態および随意の特徴によって具体的に開示されてきたが、本明細書中に開示された概念の改変およびバリエーションが、当業者によって用いられることがあり、そのような改変およびバリエーションは、本技術の範囲内であるとみなされると理解されるべきである。

【 0 9 4 9 】

この技術のある特定の実施形態は、以下に続く特許請求の範囲に示される。

10

【图 1 A】

略語 iCasp9 構築物	ψ U3 RU5 IRES NotI eGFP XhoI EcoRI NotI コザックGCCACC Ser-Gly-Gly-Ser	平均 GFP (SD)	GFP + 内での% アネキ シン+ (SD)
FF-C- Casp9	小	551 (55.8)	13.5 (3.3)
FF-C- Casp9C→S	C→S	1288.5 (59.1)	2.6 (0.6)
FF- Casp9		719 (60.2)	27.3 (4.5)
F-C- Casp9		788.5 (57.8)	26.5 (5.6)
F-Casp9		854 (61.1)	40.2 (9.4)

FIG. 1A

【图 1 B】

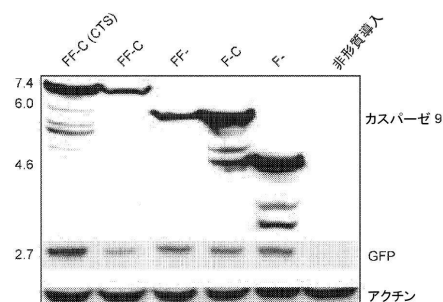


FIG. 1B

【図 7】

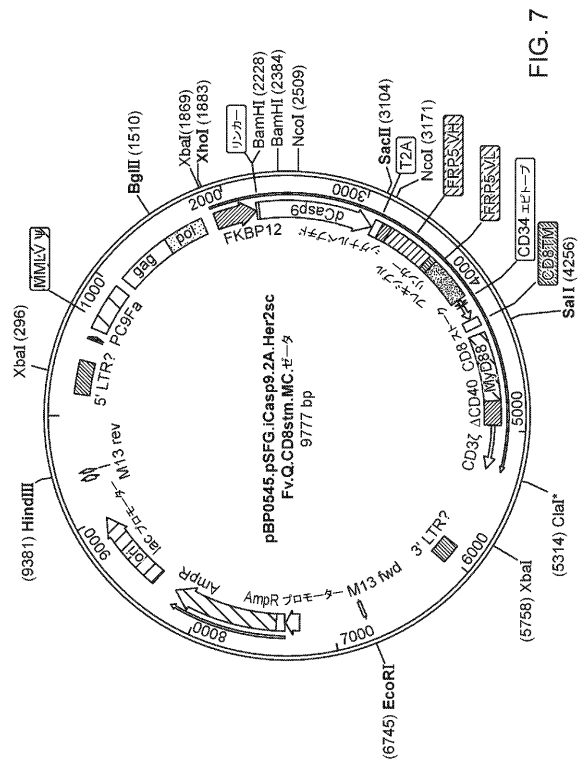


FIG. 7

0006821568000001.app

フロントページの続き

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 スペンサー, デイビッド エム.

アメリカ合衆国 テキサス 77025, ヒューストン, プレスコット ストリート 2811

(72)発明者 フォスター, アーロン エドワード

アメリカ合衆国 テキサス 77030, ヒューストン, スウィフト ブールバード 2244

(72)発明者 ベイル, ジョセフ ヘンリ

アメリカ合衆国 テキサス 77005, ヒューストン, ラスキン ストリート 4116

(72)発明者 スローウィン, ケビン エム.

アメリカ合衆国 テキサス 77030, ヒューストン, アンダーウッド ブールバード 2336

(72)発明者 コリンソン-パウツ, マシュー アール.

アメリカ合衆国 テキサス 77098, ヒューストン, グリーンプライアー ストリート 2828, アパートメント 2202

審査官 福間 信子

(56)参考文献 国際公開第2014/197638 (WO, A1)

米国特許出願公開第2010/0196336 (US, A1)

特表2002-514893 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-90

Caplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)