

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2018-188475

(P2018-188475A)

(43) 公開日 平成30年11月29日(2018.11.29)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 35/12 (2015.01)	A 6 1 K 35/12 Z N A	4 B 0 5 0
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	4 B 0 6 5
C 1 2 N 5/0783 (2010.01)	C 1 2 N 5/0783	4 C 0 7 6
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	4 C 0 8 4
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62	4 C 0 8 6
審査請求 有 請求項の数 1 O L 外国語出願 (全 250 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2018-152650 (P2018-152650)	(71) 出願人	510274452
(22) 出願日	平成30年8月14日 (2018. 8. 14)		ベリカム ファーマシューティカルズ、
(62) 分割の表示	特願2016-517976 (P2016-517976)		インコーポレイテッド
原出願日	平成26年6月4日 (2014. 6. 4)		アメリカ合衆国 テキサス 77030,
(31) 優先権主張番号	61/831, 428		ヒューストン, ウェスト ホルコム
(32) 優先日	平成25年6月5日 (2013. 6. 5)		ブルバード 2130, スイート 8
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100078282
(31) 優先権主張番号	61/949, 847		弁理士 山本 秀策
(32) 優先日	平成26年3月7日 (2014. 3. 7)	(74) 代理人	100113413
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 森下 夏樹
(特許庁注: 以下のものは登録商標)		(74) 代理人	100181674
1. T W E E N			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】 カスパーゼポリペプチドを使用して部分的なアポトーシスを誘導するための方法

(57) 【要約】

【課題】誘導性カスパーゼポリペプチドを発現する細胞の部分的なアポトーシスを誘導するための方法を提供すること。

【解決手段】当該技術は、さらに、一部において、多量体リガンド誘導因子に対する用量反応曲線が改変された誘導性改変カスパーゼポリペプチドを発現する細胞の部分的なアポトーシスを誘導するための方法に関する。当該技術はまた、一部において、誘導性カスパーゼポリペプチドまたは誘導性改変カスパーゼポリペプチドを発現する細胞を使用する細胞療法の方法にも関し、ここで、アポトーシスによって排除されるカスパーゼポリペプチド発現細胞の割合は、多量体リガンド誘導因子の投与量に関連する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項1】

本明細書に記載の発明。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

分野

本技術は一部において、誘導性カスパーゼポリペプチドを発現する細胞の部分的なアポトーシスを誘導するための方法に関する。本技術は一部において、多量体リガンド誘導因子に対して改変された用量反応曲線を有する誘導性改変カスパーゼポリペプチドを発現する細胞の部分的なアポトーシスを誘導するための方法にさらに関する。本技術は一部において、誘導性カスパーゼポリペプチドまたは誘導性改変カスパーゼポリペプチドを発現する細胞を使用する細胞療法のための方法であって、アポトーシスによって排除されたカスパーゼポリペプチド発現細胞の割合が、多量体リガンド誘導因子の投与量に関連する方法にもまた関する。

10

【0002】

関連出願

その全体が参考として本明細書に参照され、援用される、2013年6月5日出願の米国仮特許出願第61/831,428号、表題「METHODS FOR INDUCING PARTIAL APOPTOSIS USING MODIFIED CASPASE POLYPEPTIDES」および2014年3月7日出願の米国特許出願第61/949,847号、表題「METHODS FOR INDUCING PARTIAL APOPTOSIS USING MODIFIED CASPASE POLYPEPTIDES」に対して優先権を主張する。

20

【0003】

本出願は、その全体が参考として本明細書に援用される、2014年3月7日出願の国際出願PCT/US2014/022004、表題MODIFIED CASPASE POLYPEPTIDES AND USES THEREOFに関連する。

【背景技術】

30

【0004】

キメラ抗原受容体発現T細胞(CAR)、ドナーリンパ球輸注(DLI)、または造血幹細胞移植後のT細胞追加輸注(T cell add-back following hematopoietic stem cell transplants)(HSCT)を使用する療法などの大多数のT細胞療法では、実証された腫瘍に対する有効性の臨床的妥当性は、オフターゲットまたはオフオーガン(off-organ)の有害作用のリスクによっていくらか弱まる。さらに、大きな腫瘍塊を対象とするものなどの過度なオンターゲット効果により、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)に関連するサイトカインストームが生じる恐れがある。結果として、移入されたT細胞または幹細胞により重篤な有害事象(SAE)が誘発された、または移入されたT細胞または幹細胞が処置後に陳旧になった場合にそれらを排除することができる、安定な信頼できる「自殺遺伝子」の開発に大きな関心が寄せられている。

40

【0005】

選択的なアポトーシスを誘導することによって治療用細胞を選択的に死滅させるための方法では有害事象が起こるはずであり、2011年5月20日出願の米国特許出願第13/112,739号、表題「METHODS FOR INDUCING SELECTIVE APOPTOSIS」、発明者名Malcolm K. Brennerにおいて考察されている。改変カスパーゼ9ポリペプチドは、2013年3月10日出願の米国特許出願第13/792,135号、表題「MODIFIED CASPASE PO

50

LYPEPTIDES AND USES THEREOF」、発明者名David Spencerらにおいて考察されている。各特許出願はその全体がこれによって参照により本明細書に組み込まれる。

【0006】

細胞療法において使用するドナー細胞の可能性のある負の影響を迅速に取り除きながら当該療法の有益な影響の一部または全部を保持する能力の釣り合いをとるための方法が必要とされている。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0007】

要約

細胞療法後の有害事象の際、細胞の別個の画分を部分的なアポトーシスによって排除することができ、それにより細胞療法の有益な影響を残すことが可能になる。細胞療法の一例は、CD34⁺幹細胞移植後の養子T細胞移入である。幹細胞移入後にT細胞を投与することは、患者レシピエントにおける免疫系の再構成を加速する助けになる。T細胞は、例えば、適合血縁ドナーまたは適合非血縁ドナーから得ることができる。適合血縁ドナーもしくは適合非血縁ドナーが得られない場合、または広範囲にわたるドナー検索を行うには疾患が侵襲性でありすぎる場合、HLAハプロタイプ一致家族ドナーの使用が有効であり得る。そのようなドナーは、親、同胞、または第二度近親者であってよい。そのような注入により、免疫の回復を増強させ、それにより、ウイルス感染を減少させ、再発性白血病細胞を排除することができる。しかし、ドナー幹細胞移植片にアロ反応性T細胞が共存することにより、ドナー細胞がレシピエントに対して反応する移植片対宿主病（GVHD）が引き起こされる可能性があり、これにより、レシピエントの皮膚、腸、肝臓、および他の器官が次第に損傷を受ける可能性があり、致死的结果が伴うことも多い。誘導性カスパーゼ9系をヒトT細胞に適用することができ、次いでこれを幹細胞移植患者に投与する。移植片対宿主病の症状が見られたら、多量体リガンドを投与し、その後カスパーゼ9が活性化され、これにより、当該タンパク質の二量体化および同種異系活性化T細胞のアポトーシスの誘導が引き起こされる。

【0008】

カスパーゼ9に基づくアポトーシス安全スイッチは、抗原特異性をT細胞に伝達するために設計された人工受容体を発現する治療用キメラ抗原受容体発現細胞にも適用することができる。当該細胞は、T細胞が活性化され、特異免疫がもたらされるように選択された抗原特異的成分、膜貫通成分、および細胞内成分を含む。キメラ抗原受容体発現T細胞は、がん療法を含めた種々の療法に使用することができる。これらの療法は腫瘍に対して有効であるが、その一方で、一部の場合には、健康な組織に対する非特異的攻撃に一部起因する副作用が導かれている。これらの治療用細胞を患者に投与する前に誘導性カスパーゼ9系をこれらの細胞にもたらして、患者に、例えば、間違った器官がキメラ抗原受容体の標的になる、オンターゲットであるがオフオーガンの毒性などの負の副作用が生じた場合に治療用細胞を選択的に死滅させる能力をもたらしすることができる。

【0009】

他の実施形態では、カスパーゼ9に基づくアポトーシス安全スイッチを、組織幹細胞およびそれらの後代を排除するため、ならびに、あまりに完全な死滅により腫瘍溶解作用が限定される可能性がある、腫瘍溶解性ウイルスに媒介される腫瘍の死滅を増強するために使用することができる。

【0010】

一部の実施形態において特色とされる方法は、カスパーゼ9発現細胞の別個の画分においてアポトーシスを誘導する方法を含む。例えば、移植片対宿主病が生じた際に、これらの方法を使用することにより、患者の免疫系の再構成に役立つ十分な数の治療用細胞を残しながら、一定の百分率の、移植片対宿主病を引き起こす治療用細胞を排除することができる。別の例では、移植後のオフターゲットの毒性に際して、治療用細胞の治療効果を

10

20

30

40

50

継続させるために十分な数の細胞を残しながら、一定の百分率の、キメラ抗原受容体を発現する治療用細胞を排除することができる。さらに別の例では、キメラ抗原受容体発現細胞および幹細胞移植後の治療用T細胞などの治療用細胞の両方を患者に輸注する場合、有害事象が生じた際には、治療用細胞の集団の1つを治療用T細胞の他の集団の割合に有意に影響を及ぼすことなく排除することができる。

【0011】

したがって、一部の実施形態では、対象における移植された治療用細胞の生存を制御するための方法であって、治療用細胞を調製するまたは得るステップ；治療用細胞に、多量体リガンド結合性領域およびカスパーゼ-9ポリペプチドまたは改変カスパーゼ-9ポリペプチドを含むキメラタンパク質をコードする核酸をトランスフェクトまたは形質導入するステップであって、カスパーゼ-9ポリペプチドまたは改変カスパーゼ-9ポリペプチドが配列番号9に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むステップ；形質導入またはトランスフェクトされた治療用細胞を対象に移植するステップ；および移植後に、多量体リガンド結合性領域に結合する多量体リガンドを対象に有効量で投与するステップであって、カスパーゼ-9ポリペプチドまたは改変カスパーゼ-9ポリペプチドを発現する移植された治療用細胞の80%未満が多量体リガンドの投与後に死滅するステップを含み、改変カスパーゼ-9ポリペプチドが、改変されていないカスパーゼ-9ポリペプチドと比較して、多量体リガンドに対する応答において低下したIC₅₀、および／または伸長した用量反応曲線を有する、方法が特色とされる。一部の実施形態では、治療用細胞は、造血幹細胞、誘導性前駆細胞(iPS)、胚性幹(ES)細胞、間葉系幹細胞、形質(B)細胞、筋細胞、腫瘍浸潤リンパ球、およびT細胞からなる群から選択される。一部の実施形態では、対象は幹細胞移植、例えば、ハプロタイプ一致移植、適合非血縁移植または適合血縁移植を受けた対象である。ある特定の実施形態では、対象は過剰増殖性疾患と診断されている。他の実施形態では、対象は免疫疾患と診断されている。

【0012】

一部の実施形態では、改変カスパーゼ-9ポリペプチドは、表3のカスパーゼバリエーションからなる群から選択されるアミノ酸置換を含む。一部の実施形態では、改変カスパーゼ-9ポリペプチドは、N405Q、F404Y、F406L、F406T、F404Wからなる群から選択されるアミノ酸置換、およびカスパーゼ-9由来の二量体化ドメインアミノ酸残基402~406(GCFNF)の、カスパーゼ10の等価位置の残基による置換(GCFNF⁴⁰²ISAQ T)を含有するカスパーゼ-9ポリペプチドを含む。一部の実施形態では、改変カスパーゼ-9ポリペプチドは、D330AおよびT317Aからなる群から選択されるアミノ酸置換を含む。一部の実施形態では、改変カスパーゼ-9ポリペプチドは、T317S、S144A、S144D、S196A、S183A、およびS195Aからなる群から選択されるアミノ酸置換を含む、改変カスパーゼ-9ポリペプチドは、D330A-N405Q、D330A-S144A、D330A-S144D、D330A-S196A、D330A-T317A、およびD330A-S183Aからなる群から選択されるアミノ酸置換を含む、改変カスパーゼ-9ポリペプチドは、F404T、F404W、N405F、およびF406Tからなる群から選択されるアミノ酸置換を含む、改変カスパーゼ-9ポリペプチドは、D315A、A316G、T317S、F319W、およびS307Aからなる群から選択されるアミノ酸置換を含む、改変カスパーゼ-9ポリペプチドは、Y153AおよびY153Fからなる群から選択されるアミノ酸置換を含む、改変カスパーゼ-9ポリペプチドは、C403S、C403T、C403、N405A、N406A、N406Y、およびF406Wからなる群から選択されるアミノ酸置換を含む、改変カスパーゼ-9ポリペプチドは、T317A、T317C、F318A、F319Aからなる群から選択されるアミノ酸置換を含み、かつカスパーゼ-9由来のアミノ酸残基の、カスパーゼ10の等価位置の残基(⁴⁰²ISAQ T)による置換を含有するカスパーゼ-9ポリペプチド、およびカスパーゼ-9由来のアミノ酸残基の、等価位置Smac/DIABLO(ATPF³¹⁶AVPI)での置換を含有するカスパーゼ-9ポリペプチドを含む、改変カスパーゼ-9ポリペプチドは、N405T、S

10

20

30

40

50

317E、およびD330A-N405Tからなる群から選択されるアミノ酸置換を含む、改変カスパーゼ-9ポリペプチドは、F319W、F404Y、A316G、Y153A、F406L、C403A、N405Q、F406Tからなる群から選択されるアミノ酸置換、およびカスパーゼ由来の二量体化ドメインアミノ酸残基402~406（GCFNF）の、カスパーゼ10の等価位置の残基（ISAQ T）での置換を含有するカスパーゼ-9ポリペプチドを含む、または、改変カスパーゼ-9ポリペプチドは、N405Q、F404W、F404Y、およびF406Tからなる群から選択されるアミノ酸置換を含む。

【 0 0 1 3 】

対象における移植された治療用細胞の生存を制御するための方法であって、治療用細胞を調製するまたは得るステップ；治療用細胞の第１のサブセットに、多量体リガンド結合性領域および第１のカスパーゼー９ポリペプチドを含むキメラタンパク質をコードする核酸をトランスフェクトまたは形質導入するステップであって、第１のカスパーゼー９ポリペプチドが配列番号９に対して少なくとも９０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むステップ；治療用細胞の第２のサブセットに、多量体リガンド結合性領域および第２のカスパーゼー９ポリペプチドを含むキメラタンパク質をコードする核酸をトランスフェクトまたは形質導入するステップであって、第２のカスパーゼー９ポリペプチドが配列番号９に対して少なくとも９０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むステップ；形質導入またはトランスフェクトされた第１の治療用細胞および第２の治療用細胞を対象に移植するステップ；および、移植後に、多量体リガンド結合性領域に結合する多量体リガンドを対象に有効量で投与するステップであって、多量体リガンドの投与後に、第１のカスパーゼー９ポリペプチドを発現する治療用細胞が第２のカスパーゼー９ポリペプチドを発現する治療用細胞よりも多く死滅するステップを含む方法も提供される。

【 0 0 1 4 】

一部の実施形態では、第1のカスパーゼー9ポリペプチドは、第2のカスパーゼー9ポリペプチドと比較して、多量体リガンドに対する応答において低下したIC₅₀、および伸長した用量反応曲線を有する。一部の実施形態では、治療用細胞は、造血幹細胞、誘導性前駆細胞(iPS)、胚性幹(ES)細胞、間葉系幹細胞、形質(B)細胞、筋細胞およびT細胞からなる群から選択される。一部の実施形態では、対象は過剰増殖性疾患と診断されている。一部の実施形態では、対象は免疫疾患と診断されている。一部の実施形態では、第1のカスパーゼー9ポリペプチドまたは第2のカスパーゼー9ポリペプチドは、F319W、F404Y、A316G、Y153A、F406L、C403A、N405Q、C285A、F406Tからなる群から選択されるアミノ酸置換を含む、またはカスパーゼー9ポリペプチドは、カスパーゼ10の二量体化ドメインの対応するアミノ酸配列であるISAQ Tを含む、または第1のカスパーゼー9ポリペプチドもしくは第2のカスパーゼー9ポリペプチドは、N405Q、C285A、およびF406Tからなる群から選択されるアミノ酸置換を含む。一部の実施形態では、第2のカスパーゼー9ポリペプチドの多量体リガンドに対するIC₅₀は0.01pM超、0.05pM超、0.1pM超、0.5pM超、0.01nM超、0.05nM超、0.1nM超、0.5nM超、または1nM超である。

【 0 0 1 5 】

一部の実施形態では、多量体リガンドの投与後に、キメラ抗原受容体を含む第1の治療用細胞が治療有効レベルで対象において活性なままである。一部の実施形態では、第2の治療用細胞は、T細胞、例えば、幹細胞移植後の対象に投与されるT細胞である。一部の実施形態では、対象に投与する前にT細胞をアロ枯渇（allodeplete）させる。一部の実施形態では、対象に投与する前にT細胞をアロ枯渇させない。一部の実施形態では、第2の治療用細胞は、キメラ抗原受容体を含む。一部の実施形態では、第1の治療用細胞はT細胞である。一部の実施形態では、第2の治療用細胞は、幹細胞移植後の対象に投与されるT細胞である。一部の実施形態では、対象に投与する前にT細胞をアロ枯渇させる。他の実施形態では、対象に投与する前にT細胞をアロ枯渇させない。

【0016】

ある特定の実施形態では、カスパーゼー9ポリペプチドまたは改変カスパーゼー9ポリペプチドを発現する移植された治療用細胞の80%未満、70%未満、60%未満、50%未満、40%未満、30%未満、20%未満、10%未満、または5%未満が多量体リガンドの投与後に死滅する。一部の実施形態では、改変カスパーゼー9ポリペプチドの多量体リガンドに対するIC₅₀は0.01pM超、0.05pM超、0.1pM超、0.5pM超、0.01nM超、0.05nM超、0.1nM超、0.5nM超、または1nM超である。一部の実施形態では、多量体リガンド結合性領域は、FKBPリガンド結合性領域、シクロフィリン受容体リガンド結合性領域、ステロイド受容体リガンド結合性領域、シクロフィリン受容体リガンド結合性領域、およびテトラサイクリン受容体リガンド結合性領域からなる群から選択される。一部の実施形態では、リガンド結合性領域は、F_v・F_{v1s}アミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、リガンドは小分子である。一部の実施形態では、リガンドは二量体である。一部の実施形態では、リガンドは二量体FK506または二量体FK506様類似体である。ある特定の実施形態では、多量体リガンドはAP1903である。一部の実施形態では、多量体リガンドはAP20187である。一部の実施形態では、細胞はT細胞である。一部の実施形態では、キメラタンパク質はマーカーポリペプチドをさらに含む。一部の実施形態では、方法は、マーカーを発現する細胞を対象への投与のために選択する選択ステップをさらに含む。一部の実施形態では、方法は、対象に多量体リガンドの2回目の用量を投与するステップをさらに含み、2回目の用量は1回目の用量よりも多くの多量体リガンドを含む。

10

20

【0017】

一部の実施形態では、複数回用量の多量体リガンドを複数回用量の間で投薬量レベルを漸増させながら対象に対して投与する。一部の実施形態では、投薬量レベルの漸増により、死滅する治療用細胞の数が増加する。一部の実施形態では、用量を0.01mg/kgから1mg/kgまで漸増させる。一部の実施形態では、約15～30分きざみで用量を投与する。一部の実施形態では、持続注入ポンプを使用して多量体リガンドを投与し、注入の間に多量体リガンドの濃度を上昇させる。一部の実施形態では、所望の百分率の治療用細胞が死滅するまで多量体リガンドの濃度を上昇させる。一部の実施形態では、対象は移植片対宿主病を有し、多量体リガンドの投与により、疾患が緩和される。一部の実施形態では、対象はヒトである。一部の実施形態では、治療用細胞は、キメラ抗原受容体を含む。一部の実施形態では、対象は、多量体リガンドの投与前にオフターゲットの毒性の症状を示している。他の実施形態では、対象は、多量体リガンドの投与前に腫瘍崩壊症候群(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)の症状を示している。一部の実施形態では、多量体リガンドの投与によりオフターゲットまたはオフオーガンの毒性が緩和される。オフターゲットの毒性の考察は、例えば、Heslop, H. E, Blood 122巻: 853～854頁(2013年)において提供される。

30

【0018】

他の実施形態では、多量体リガンドの投与により腫瘍崩壊症候群(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)が緩和される。一部の実施形態では、治療有効レベルの、キメラ抗原受容体を含む治療用細胞が、多量体リガンドの投与後に対象において活性なままである。

40

【0019】

一部の実施形態では、患者はがんを有する。一部の実施形態では、患者は固形腫瘍を有する。一部の実施形態では、がんは患者の血液または骨髄に存在する。一部の実施形態では、患者は血液疾患または骨髄疾患を有する。一部の実施形態では、患者は幹細胞移植によって緩和することができる任意の状態または障害と診断された患者である。一部の実施形態では、患者は、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た患者である。一部の実施形態では、プロモーターが活性化T細胞において活性化される。ある特定の実施形態では、カスパーゼー9ポリペプチドは短縮型カスパーゼー9ポリペプチドであ

50

る、またはカスパーゼー9ポリペプチドはカスパーゼ動員ドメインを欠く。一部の実施形態では、患者はステージ1、2、3、または4移植片対宿主病の1つまたは複数の症状を示す。

【0020】

一部の実施形態では、多量体リガンドの投与後にアロ反応性T細胞の数が減少する。一部の実施形態では、アロ反応性T細胞はマーカーおよびCD3を発現する。一部の実施形態では、多量体リガンドの投与後にアロ反応性T細胞の数が約90%またはそれ超減少する。一部の実施形態では、多量体リガンドの投与後に、患者において、増大することができ、かつウイルスおよび真菌に対して反応性であるドナーT細胞が生存する。一部の実施形態では、多量体リガンドの投与後に、患者において、増大することができ、かつ患者における腫瘍細胞に対して反応性であるドナーT細胞が生存する。一部の実施形態では、患者は、ハプロCD34⁺幹細胞移植をドナーT細胞の投与前に受けている、またはドナーT細胞の投与と同時に受ける。

10

【0021】

一部の実施形態では、誘導性キメラカスパーゼー9ポリペプチドは、野生型カスパーゼー9ポリペプチド、またはCARDドメインが除去されるように短縮された野生型カスパーゼー9ポリペプチドと比較して、リガンド誘導因子に対する感受性が異なるように、または形質導入またはトランスフェクトされた細胞における基底の活性が異なるように改変されている。

【0022】

したがって、ある特定の実施形態では、本出願の方法では、例えば、SEAPレポーターに基づく代理死滅アッセイにおいて、それぞれ、基底の活性が検出不可能までに低く、それらのAP1903 IC₅₀に対する悪影響が最小であることが実証されているiCasp9 D330A、iCasp9 N405Q、およびiCasp9 D330A N405Qを含めた改変カスパーゼー9ポリペプチドを含むキメラポリペプチドを使用する。

20

【0023】

一部の実施形態では、多量体化領域および改変カスパーゼー9ポリペプチドを含むキメラタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む細胞であって、改変カスパーゼー9ポリペプチドが、配列番号9に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、S144A、S144D、Y153A、Y153F、S183A、S195A、S196A、S196D、S307A、D315A、A316G、T317A、T317C、T317E、T317S、P318A、F319A、F319W、F326K、D327G、D327K、D327R、Q328K、Q328R、L329E、L329G、L329K、D330A、D330E、D330G、D330N、D330S、D330V、A331K、C403A、C403S、C403T、F404T、F404W、F404Y、N405A、N405F、N405Q、N405T、F406A、F406T、F406W、F406Y、G402A、G402I、G402Q、G402Y、C403P、F404A、F404S、およびF406Lからなる群から選択されるアミノ酸置換を少なくとも1つ含む細胞が提供される。一部の実施形態では、少なくとも1つのアミノ酸置換は、S144A、S144D、Y153A、Y153F、S183A、S195A、S196A、S196D、S307A、D315A、A316G、T317A、T317C、T317E、T317S、P318A、F319A、F319W、F326K、D327G、D327K、D327R、Q328K、Q328R、L329E、L329G、L329K、D330A、D330E、D330G、D330N、D330S、D330V、A331K、C403A、C403S、C403T、F404T、F404W、F404Y、N405A、N405F、N405Q、N405T、F406A、F406T、F406W、およびF406Yからなる群から選択される。一部の実施形態では、少なくとも1つのアミノ酸置換は、S144A、S144D、Y153A、Y153F、S183A、S195A、S196A、S196D、S307A、D315A、A316G、

30

40

50

T 3 1 7 A、T 3 1 7 C、T 3 1 7 S、P 3 1 8 A、F 3 1 9 A、F 3 1 9 W、L 3 2 9 E、D 3 3 0 A、D 3 3 0 E、D 3 3 0 G、D 3 3 0 N、D 3 3 0 S、D 3 3 0 V、C 4 0 3 A、C 4 0 3 S、C 4 0 3 T、F 4 0 4 T、F 4 0 4 W、F 4 0 4 Y、N 4 0 5 A、N 4 0 5 F、N 4 0 5 Q、F 4 0 6 A、F 4 0 6 T、F 4 0 6 W、および F 4 0 6 Y からなる群から選択される。一部の実施形態では、少なくとも1つのアミノ酸置換は、S 1 4 4 A、S 1 4 4 D、Y 1 5 3 A、Y 1 5 3 F、S 1 8 3 A、S 1 9 5 A、S 1 9 6 A、S 1 9 6 D、S 3 0 7 A、D 3 1 5 A、A 3 1 6 G、T 3 1 7 A、T 3 1 7 S、F 3 1 9 W、L 3 2 9 E、D 3 3 0 A、D 3 3 0 E、D 3 3 0 G、D 3 3 0 N、D 3 3 0 S、D 3 3 0 V、F 4 0 4 T、F 4 0 4 W、F 4 0 4 Y、N 4 0 5 F、N 4 0 5 Q、F 4 0 6 A、F 4 0 6 T、F 4 0 6 W、および F 4 0 6 Y である。一部の実施形態では、少なくとも1つのアミノ酸置換は、S 1 4 4 A、S 1 4 4 D、S 1 8 3 A、S 1 9 5 A、S 1 9 6 A、S 1 9 6 D、T 3 1 7 A、T 3 1 7 S、L 3 2 9 E、D 3 3 0 A、D 3 3 0 E、D 3 3 0 G、D 3 3 0 N、D 3 3 0 S、D 3 3 0 V、F 4 0 4 Y、N 4 0 5 Q、F 4 0 6 A、F 4 0 6 W、および F 4 0 6 Y である。一部の実施形態では、少なくとも1つのアミノ酸置換は、T 3 1 7 S、S 1 4 4 A、S 1 3 3、および S 1 9 6 D からなる群から選択される。一部の実施形態では、少なくとも1つのアミノ酸置換は、S 1 8 3 A、S 1 9 5 A、S 1 9 6 A、S 1 9 6 D、T 3 1 7 A、L 3 2 9 E、D 3 3 0 A、D 3 3 0 E、D 3 3 0 G、D 3 3 0 N、D 3 3 0 S、D 3 3 0 V、F 4 0 4 Y、N 4 0 5 Q、F 4 0 6 A、F 4 0 6 W、および F 4 0 6 Y からなる群から選択される。一部の実施形態では、少なくとも1つのアミノ酸置換は D 3 3 0 A である。一部の実施形態では、少なくとも1つのアミノ酸置換は D 3 3 0 E である。一部の実施形態では、少なくとも1つのアミノ酸置換は N 4 0 5 Q である。一部の実施形態では、改変カスパーゼ-9ポリペプチドは、D 3 3 0 A-N 4 0 5 Q、D 3 3 0 A-S 1 4 4 A、D 3 3 0 A-S 1 4 4 D、D 3 3 0 A-S 1 8 3 A、D 3 3 0 A-S 1 9 6 A、N 4 0 5 Q-S 1 4 4 A、N 4 0 5 Q-S 1 4 4 D、N 4 0 5 Q-S 1 9 6 D、N 4 0 5 Q-T 3 1 7 S、N 4 0 5 Q-S 1 4 4 A c o、N 4 0 5 Q-T 3 1 7 S c o、^{4 0 2}G C F N F ^{4 0 6}I S A Q T (C A S P-1 0)、^{3 1 6}A T P F ^{3 1 9}A V P I (S M A C / D i a b l o)、D 3 3 0 A-N 4 0 5 T、D 3 1 5 A-D 3 3 0 A、D 3 3 0 A-Y 1 5 3 A、D 3 3 0 A-Y 1 5 3 F、D 3 3 0 A-T 3 1 7 E、^{4 0 2}G C F N F ^{4 0 6}C I V S M (C A S P-3)、^{4 0 2}G C F N F ^{4 0 6}A A A A A、^{4 0 2}G C F N F ^{4 0 6}Y C S T L (C A S P-2)、および ^{4 0 2}G F N F ^{4 0 6}Q P T F T (C A S P-8) からなる群から選択されるアミノ酸置換を少なくとも2つ含む。一部の実施形態では、改変カスパーゼ-9ポリペプチドは、D 3 3 0 A-N 4 0 5 Q、D 3 3 0 A-S 1 4 4 A、D 3 3 0 A-S 1 4 4 D、D 3 3 0 A-S 1 8 3 A、D 3 3 0 A-S 1 9 6 A、N 4 0 5 Q-S 1 4 4 A、N 4 0 5 Q-S 1 4 4 D、N 4 0 5 Q-S 1 9 6 D、N 4 0 5 Q-T 3 1 7 S、N 4 0 5 Q-S 1 4 4 A c o、N 4 0 5 Q-T 3 1 7 S c o、^{4 0 2}G C F N F ^{4 0 6}I S A Q T (C A S P-1 0)、^{3 1 6}A T P F ^{3 1 9}A V P I (S M A C / D i a b l o)、および D 3 3 0 A-N 4 0 5 T からなる群から選択されるアミノ酸置換を少なくとも2つ含む。一部の実施形態では、改変カスパーゼ-9ポリペプチドは、D 3 3 0 A-N 4 0 5 Q、D 3 3 0 A-S 1 4 4 A、D 3 3 0 A-S 1 4 4 D、D 3 3 0 A-S 1 8 3 A、D 3 3 0 A-S 1 9 6 A、N 4 0 5 Q-S 1 4 4 A、N 4 0 5 Q-S 1 4 4 D、N 4 0 5 Q-S 1 9 6 D、N 4 0 5 Q-T 3 1 7 S、N 4 0 5 Q-S 1 4 4 A c o、N 4 0 5 Q-T 3 1 7 S c o、および ^{4 0 2}G C F N F ^{4 0 6}I S A Q T (C A S P-1 0) からなる群から選択されるアミノ酸置換を少なくとも2つ含む。一部の実施形態では、改変カスパーゼ-9ポリペプチドは、N 4

10

20

30

40

50

05Q-S144AcoおよびN405Q-T317Scoからなる群から選択されるアミノ酸置換を少なくとも2つ含む。一部の実施形態では、少なくとも1つのアミノ酸置換は、S144A、S144D、Y153A、Y153F、S183A、S195A、S196A、S307A、D315A、A316G、T317A、T317C、T317E、T317S、P318A、F319A、F319W、F326K、D327G、D327K、D327R、Q328K、Q328R、L329E、L329G、L329K、D330A、D330E、D330G、D330N、D330S、D330V、A331K、F404T、F404W、F404YN405F、N405Q、およびF406Tからなる群から選択される。一部の実施形態では、少なくとも1つのアミノ酸置換は、S144A、S144D、Y153A、Y153F、S183A、S195A、S196A、S307A、D315A、A316G、T317A、T317C、T317E、T317S、P318A、F319A、F319W、F326K、D327G、D327K、D327R、Q328K、Q328R、L329E、L329G、L329K、D330A、D330E、D330G、D330N、D330S、D330V、A331K、F404T、F404W、F404Y、N405F、N405Q、およびF406Tからなる群から選択される。一部の実施形態では、少なくとも1つのアミノ酸置換は、S144A、S144D、Y153A、Y153F、S183A、S195A、S196A、S307A、D315A、A316G、T317A、T317C、T317S、P318A、F319A、F319W、L329E、D330A、D330E、D330G、D330N、D330S、D330V、F404T、F404W、F404Y、N405F、N405Q、およびF406Tからなる群から選択される。一部の実施形態では、少なくとも1つのアミノ酸置換は、S144A、S144D、S183A、S195A、S196A、T317A、T317S、D330A、F404Y、およびN405Qからなる群から選択される。一部の実施形態では、少なくとも1つのアミノ酸置換は、S196D、T317C、T317E、P318A、F319A、F326K、D327G、D327K、D327R、Q328K、Q328R、L329E、L329G、L329K、D330E、D330G、D330N、D330S、D330V、A331K、C403A、C403S、C403T、N405A、N405T、F406A、F406W、F406Y、G402A、G402I、G402Q、G402Y、C403P、F404A、F404S、およびF406Lからなる群から選択される。一部の実施形態では、少なくとも1つのアミノ酸置換は、S196D、T317C、P318A、F319A、L329E、D330E、D330G、D330N、D330S、D330V、C403A、C403S、C403T、N405A、F406A、F406T、F406W、およびF406Yからなる群から選択される。一部の実施形態では、少なくとも1つのアミノ酸置換は、S196D、L329E、D330E、D330G、D330N、D330S、D330V、F406A、F406T、F406W、およびF406Yからなる群から選択される。一部の実施形態では、少なくとも1つのアミノ酸置換は、S196D、L329E、D330E、D330G、D330N、D330S、D330V、F406A、F406T、F406W、およびF406Yからなる群から選択される。47. 少なくとも1つのアミノ酸置換が、N405Q、F404Y、F406A、F406W、F406Y、F404T、F404W、N405F、F406T、C403A、C403S、C403T、N405

A、およびN405Tからなる群から選択される、請求項1に記載の細胞。一部の実施形態では、少なくとも1つのアミノ酸置換は、N405Q、F404Y、F406A、F4

06W、およびF406Yからなる群から選択される。一部の実施形態では、少なくとも1つのアミノ酸置換は、T317S、D330A、D330E、D330G、D330N、D330S、D330V、L329E、T317A、D315A、A316G、T317C、P318A、F319A、T317E、F326K、D327G、D327K、D327R、Q328K、Q328R、L329G、L329K、およびA331Kからなる群から選択される。一部の実施形態では、少なくとも1つのアミノ酸置換は、T317S、D330A、D330E、D330G、D330N、D330S、D330V、L329E、およびT317Aからなる群から選択される。一部の実施形態では、少なくとも1つのアミノ酸置換は、S144A、S144D、S196D、S183A、S195A、S196A、Y153A、Y153F、およびS307Aからなる群から選択される。

【0024】

一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、カスパーゼ9ポリペプチドをコードする最適化されたコドンを含み、一部の実施形態では、改変カスパーゼ9ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、N405Qのアミノ酸置換を含み、かつ、最適化されたコドンを含む。一部の実施形態では、改変カスパーゼ9ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、配列番号39の核酸配列を含む。

【0025】

キメラ改変カスパーゼ9ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む細胞の一部としての、本明細書で考察されているアミノ酸配列を含む改変カスパーゼポリペプチドも提供される。改変カスパーゼ9ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドおよびキメラ改変カスパーゼ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も提供される。改変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およびキメラ改変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を含むベクターも提供される。

【0026】

一部の実施形態では、細胞は、ヒト細胞である。本出願の細胞は、任意の型の真核細胞、例えば、哺乳動物細胞、例えば、ウマ細胞、イヌ細胞、ネコ細胞、ウシ細胞、またはヒト細胞であってよい。一部の実施形態では、細胞は前駆細胞である。一部の実施形態では、細胞は造血前駆細胞である。一部の実施形態では、細胞は、間葉系間質細胞、胚性幹細胞、および誘導性多能性幹細胞からなる群から選択される。一部の実施形態では、細胞はT細胞である。一部の実施形態では、細胞を骨髓から得るまたは調製する。一部の実施形態では、細胞を臍帯血から得るまたは調製する。一部の実施形態では、細胞を末梢血から得るまたは調製する。一部の実施形態では、細胞を末梢血単核細胞から得るまたは調製する。

【0027】

一部の態様では、キメラポリペプチドまたは改変カスパーゼ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している。一部の実施形態では、プロモーターは発生的に調節されるものであり、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する。一部の実施形態では、プロモーターは組織特異的なものであり、カスパーゼ9ポリペプチドは特異的な組織において発現する。一部の実施形態では、プロモーターは活性化T細胞において活性化される。一部の実施形態では、プロモーターは5'LTR配列を含む。一部の実施形態では、キメラタンパク質はマーカーポリペプチド、例えば、これだけに限定されないが、ΔCD19ポリペプチドをさらに含む。一部の実施形態では、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。一部の実施形態では、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く。

【0028】

一部の実施形態では、多量体化領域は、FKBP、シクロフィリン受容体、ステロイド

受容体、テトラサイクリン受容体、重鎖抗体サブユニット、軽鎖抗体サブユニット、柔軟なリンカードメインによって分離されたタンデムな重鎖可変領域および軽鎖可変領域で構成される単鎖抗体、およびその変異配列からなる群から選択される。一部の実施形態では、多量体化領域はFKBP12領域である。一部の実施形態では、FKB12領域はFKB12v₃₆領域である。一部の実施形態では、多量体化領域はFv'Fvlsである。一部の実施形態では、多量体化領域は、FK506二量体および二量体FK506類似体リガンドからなる群から選択されるリガンドと結合する。一部の実施形態では、リガンドはAP1903である、他の実施形態では、リガンドはAP20187である。一部の実施形態では、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性断片を有する。一部の実施形態では、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性断片によりコードされる。一部の実施形態では、多量体化領域は、配列番号32のアミノ酸配列またはその機能性断片を有するポリペプチドをさらに含む。一部の実施形態では、多量体化領域は、配列番号31のヌクレオチド配列またはその機能性断片によりコードされるポリペプチドをさらに含む。一部の実施形態では、多量体化領域は、配列番号32のアミノ酸配列またはその機能性断片を有するポリペプチドをさらに含む。一部の実施形態では、多量体化領域は、配列番号31のヌクレオチド配列またはその機能性断片によりコードされるポリペプチドをさらに含む。一部の実施形態では、多量体化領域は、配列番号29または配列番号32のアミノ酸配列またはその機能性断片を有するポリペプチドをさらに含む。一部の実施形態では、多量体化領域は、配列番号30または配列番号31のヌクレオチド配列またはその機能性断片によりコードされるポリペプチドをさらに含む。

10

20

【0029】

本出願の一部の態様では、細胞にウイルスベクターを形質導入またはトランスフェクトする。ウイルスベクターは、例えば、これだけに限定されないが、レトロウイルスベクター、例えば、これだけに限定されないが、マウス白血病ウイルスベクター；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などであってよい。

【0030】

一部の態様では、細胞に、遺伝子発現ベクターをさらにトランスフェクトまたは形質導入する。一部の実施形態では、細胞は、改変カスパーゼ9ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをさらに含み、異種ポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチドをさらに含む。一部の実施形態では、異種ポリペプチドは、キメラ抗原受容体である。一部の実施形態では、細胞は、多量体化領域およびカスパーゼ9ポリペプチドまたは第2の改変カスパーゼ9ポリペプチドを含むキメラタンパク質をコードするポリヌクレオチドをさらに含み、第1のカスパーゼ9ポリペプチドと第2のカスパーゼ9ポリペプチドは、異なるアミノ酸配列を含み、異なる基底の活性または異なるIC₅₀を有する。一部の態様では、改変カスパーゼ9ポリペプチドとカスパーゼ9ポリペプチド；または改変カスパーゼ9ポリペプチドと第2の改変カスパーゼ9ポリペプチドが多量体リガンドに対して異なるIC₅₀もしくは異なる伸長した用量反応曲線、または異なるIC₅₀および異なる伸長した用量反応曲線を有する細胞が提供される。

30

【0031】

一部の実施形態では、細胞は単離されたものである。一部の実施形態では、細胞はヒト対象内にあるものである。一部の実施形態では、細胞はヒト対象に移植されるものである。

40

【0032】

ドナーT細胞をヒト患者に投与する方法であって、本出願の細胞のいずれかをヒト患者を投与するステップを含み、細胞がヒトドナーT細胞である方法も提供される。一部の実施形態では、細胞をドナー細胞培養物に形質導入またはトランスフェクトする。一部の実施形態では、方法は、細胞を患者に投与した後に患者における移植片対宿主病の存在を検出するステップ；および移植片対宿主病の存在が検出された患者に、多量体化領域に結合する多量体リガンドを投与するステップをさらに含む。一部の実施形態では、多量体リガ

50

ンドの投与後に移植片対宿主病の影響が低減する。

【0033】

幹細胞移植をヒト患者に施行するステップ；および本出願の細胞を患者に投与するステップであって、細胞が患者に対するドナーT細胞であるステップを含む幹細胞移植の方法も提供される。一部の実施形態では、幹細胞移植は、適合移植、部分適合移植、ハプロタイプ一致移植、およびCD34⁺ハプロタイプ一致幹細胞移植からなる群から選択される。一部の実施形態では、ヒトドナーT細胞は、患者のT細胞と適合する、部分適合する、またはハプロタイプが一致するものである。

【0034】

ある特定の態様では、患者における移植された治療用細胞の生存を制御するための方法であって、本出願の細胞をヒト患者に投与するステップ、および多量体リガンドを患者に投与するステップを含み、多量体リガンドが多量体化領域に結合し、投与された、カスパーゼ9ポリペプチドを発現する細胞が、多量体リガンドの投与後に死滅する方法も提供される。一部の実施形態では、方法は、本出願の細胞を移植のために調製するステップ、および治療用細胞をヒト患者に移植するステップを含む。

【0035】

一部の実施形態では、患者はがんを有する。一部の実施形態では、患者は固形腫瘍を有する。一部の実施形態では、がんは患者の血液または骨髄に存在する。一部の実施形態では、患者は血液疾患または骨髄疾患を有する。一部の実施形態では、患者は幹細胞移植によって緩和することができる任意の状態または障害と診断された患者である。

【0036】

本出願の方法は、マーカーを発現する細胞を患者への投与のために選択する選択ステップをさらに含んでよい。マーカーは、例えば、これだけに限定されないが、ΔCD19であってよい。一部の実施形態では、骨髄試料から調製したドナー細胞培養物において細胞をトランスフェクトする。一部の実施形態では、末梢血から調製したドナー細胞培養物において細胞をトランスフェクトする。一部の実施形態では、ドナー細胞培養物はドナー末梢血単核細胞から調製したものである。一部の実施形態では、トランスフェクトまたは形質導入する前にドナー細胞培養物からドナーT細胞をアロ枯渇させる。一部の実施形態では、トランスフェクトまたは形質導入する前にドナー細胞培養物からドナーT細胞をアロ枯渇させない。一部の実施形態では、形質導入またはトランスフェクトされたT細胞を患者に投与する前にIL-2の存在下で培養する。

【0037】

ある特定の実施形態では、本出願の方法は、例えばAP1903またはAP20187などの、多量体化領域に結合する多量体リガンドを投与するステップをさらに含む。一部の実施形態では、移植片対宿主病を治療するために多量体リガンドを投与する。一部の実施形態では、患者は、多量体リガンドを投与する前に移植片対宿主病の症状を示している。一部の実施形態では、患者は、ステージ0、ステージ1、ステージ2、ステージ3、またはステージ4移植片対宿主病の1つまたは複数の症状を示している。

【0038】

方法のある特定の実施形態では、1回より多くの用量の多量体リガンドを投与する。一部の実施形態では、多量体リガンドの投与後にアロ反応性T細胞の数が減少する。一部の実施形態では、アロ反応性T細胞は、マーカーおよびCD3を発現する。一部の実施形態では、多量体リガンドの投与後にアロ反応性T細胞の数が約90%またはそれ超減少する。一部の実施形態では、多量体リガンドの投与後に、患者において、増大することができ、かつウイルスおよび真菌に対して反応性であるドナーT細胞が生存する。一部の実施形態では、多量体リガンドの投与後に、患者において、増大することができ、かつ患者における腫瘍細胞に対して反応性であるドナーT細胞が生存する。

【0039】

一部の実施形態では、患者は、幹細胞移植をドナーT細胞の投与前に受けている、または投与と同時に受ける。一部の実施形態では、幹細胞移植はハプロタイプ一致幹細胞移植

10

20

30

40

50

である。一部の実施形態では、ドナー T 細胞はハプロタイプが一致するものであり、患者に投与する前にアロ枯渇させない。

【0040】

一部の実施形態では、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ドナー T 細胞を患者に投与する。一部の実施形態では、少なくとも 1×10^7 の形質導入またはトランスフェクトされたドナー T 細胞を患者に投与する。一部の実施形態では、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ドナー T 細胞を患者に投与する。

【0041】

10 一部の実施形態では、多量体リガンドの投与前、多量体リガンドの追加用量前、または多量体リガンドの投与に必要な方法および投薬量の決定時に疾患または状態のステージまたはレベルを決定する、個人向けの処置が提供される。これらの方法は、本出願の疾患または状態のいずれに対する方法のいずれにおいても使用することができる。リガンドを投与する前に患者を評価するこれらの方法は、移植片対宿主病に関して考察されているが、これらの方法を他の状態および疾患の処置に同様に適用できることが理解される。したがって、例えば、本出願の一部の実施形態では、方法は、治療用細胞を患者に投与するステップを含み、患者における、トランスフェクトまたは形質導入した治療用細胞を患者から除去することが必要な状態の存在または不在を同定するステップ、および、患者において同定された状態の存在または不在に基づいて、患者に対して、多量体化領域に結合する多量体リガンドを投与するか、その後の多量体リガンドの投薬量を維持するか、またはその
20 後の多量体リガンドの投薬量を調整するステップをさらに含む。また、例えば、本出願の他の実施形態では、方法は、患者における移植片対宿主病の症状の出現に基づいて、患者に追加用量（複数可）の多量体リガンドを投与するかどうかを決定するステップをさらに含む。一部の実施形態では、方法は、患者における移植片対宿主病の存在、不在またはステージを同定するステップ、および、患者において同定された移植片対宿主病の存在、不在またはステージに基づいて、多量体化領域に結合する多量体リガンドを患者に投与すべきかどうか、またはその後患者に投与する多量体リガンドの投薬量を調整するかどうかを決定するステップをさらに含む。一部の実施形態では、方法は、患者における移植片対宿主病の存在、不在またはステージを含む情報を受け取るステップ、および、患者において同定された移植片対宿主病の存在、不在またはステージに基づいて、患者に対して、多量体化領域に結合する多量体リガンドを投与するか、その後の多量体リガンドの投薬量を維持するか、またはその後の多量体リガンドの投薬量を調整するステップをさらに含む。一部の実施形態では、方法は、患者における移植片対宿主病の存在、不在またはステージを同定するステップ、および、対象において同定された移植片対宿主病の存在、不在またはステージに基づいて、多量体結合性領域に結合する多量体リガンドを投与するか、患者に投与するその後の多量体リガンドの投薬量を維持するか、またはその後の多量体リガンドの投薬量を調整するかの指示を伝達するステップをさらに含む。
30
40

【0042】

一部の態様では、細胞療法を受けた患者における移植片対宿主病を処置するための方法であって、療法のために導入された細胞の 1 つまたは複数が本出願の細胞であり、多量体
50

化領域に結合する多量体リガンドを患者に投与するステップを含む方法が提供される。一部の実施形態では、多量体結合性領域に結合する多量体リガンドの投与後に、アロ反応性T細胞の数が減少する。一部の実施形態では、細胞分裂していないアロ反応性T細胞が除去される。一部の実施形態では、多量体リガンドを投与してから2時間以内に、CD3⁺ΔCD19⁺細胞の少なくとも90%が除去される。一部の実施形態では、多量体リガンドを投与してから1時間以内に、CD3⁺ΔCD19⁺細胞の少なくとも90%が除去される。一部の実施形態では、多量体リガンドを投与してから30分以内に、CD3⁺ΔCD19⁺細胞の少なくとも90%が除去される。一部の実施形態では、多量体リガンドを投与してから24時間以内に、CD3⁺ΔCD19⁺細胞が、多量体リガンドの投与後30分の時点のCD3⁺ΔCD19⁺細胞の量と比較して対数的に減少する。一部の実施形態では、方法は、多量体リガンドの投与後24時間以内の皮膚GvHDおよび肝臓GvHDの消散をさらに含む。

10

【0043】

一部の実施形態では、細胞は治療用細胞であり、それに第2の異種タンパク質をコードする第2の核酸を形質導入またはトランスフェクトする。一部の実施形態では、治療用細胞にキメラ抗原受容体を発現する異種遺伝子を形質導入する。一部の実施形態では、治療用細胞に改変TGF-β受容体を発現する異種遺伝子を形質導入する。一部の実施形態では、治療用細胞への異種遺伝子の形質導入は、多量体化領域およびカスパーゼ9ポリペプチドを含むキメラタンパク質をコードする核酸を形質導入する前、それと同時に、またはその後に行う。

20

【0044】

ドナーT細胞をヒト患者に投与するための方法であって、形質導入またはトランスフェクトされた本出願のT細胞をヒト患者に投与するステップを含み、細胞がアロ枯渇させていないヒトドナーT細胞である方法も提供される。

【0045】

一部の実施形態では、例えば、原発性免疫不全障害（例えば、これだけに限定されないが、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／欠乏症（Congenital T-cell Defect/Deficiency）、分類不能型免疫不全症（CVID）、慢性肉芽腫性疾患、IPEX（免疫不全、多腺性内分泌障害、腸疾患、X連鎖）またはIPEX様、ウィスコット・アルドリッチ症候群、CD40リガンド欠乏症（CD40 Ligand Deficiency）、白血球接着不全症、DOCK8欠乏症（DOCK8 Deficiency）、IL-10欠乏／IL-10受容体欠乏症（IL-10 Deficiency/IL-10 Receptor Deficiency）、GATA2欠乏症（GATA2 deficiency）、X連鎖リンパ増殖性疾患（XLP）、軟骨毛髪形成不全症など）、血球貪食リンパ組織球増多症（HLH）または他の血球貪食障害、遺伝性骨髄不全障害（例えば、これだけに限定されないが、シュワヒマン・ダイアモンド症候群、ダイアモンド・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）、異常ヘモグロビン症（例えば、これだけに限定されないが、鎌状赤血球症、サラセミアなど）、代謝障害（例えば、これだけに限定されないが、ムコ多糖症、スフィンゴリピドーシスなど）、または破骨細胞障害（例えば、これだけに限定されないが、大理石骨病など）などの非悪性障害を有する対象に、または対象が非悪性障害と診断されている場合に、治療用細胞を投与する。

30

40

【0046】

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ってよい。細胞は、例えば、T細胞、ナチュラルキラー細胞、B細胞、マクロファージ、末梢血液細胞、造血前駆細胞、骨髄細胞、または腫瘍細胞であってよい。腫瘍細胞を直接死滅させるために改変カスパーゼ9ポリペプチドを使用することもできる。1つの適用では、誘導性改変カスパーゼ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を腫瘍に注射し、10〜24時間後に（タンパク質を発現させるため）、例えばAP19

50

03などのリガンド誘導因子を投与してアポトーシスを誘発し、それにより、微小環境への腫瘍抗原の放出を引き起こす。腫瘍微小環境を免疫原性が増すようにさらに改善するために、処置を、1つまたは複数のアジュバント（例えば、IL-12、TLR、IDO阻害剤など）と組み合わせることができる。一部の実施形態では、固形腫瘍を処置するために細胞を送達すること、例えば、細胞を腫瘍床に送達することができる。一部の実施形態では、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をワクチンの一部として、または腫瘍床に直接送達することによって投与し、それにより、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もたらす。その後、リガンド誘導因子を投与した後に腫瘍細胞のアポトーシスをもたらすことができる。DNA療法および腫瘍内ワクチンを使用して腫瘍細胞を*in vivo*で死滅させる方法は、例えば、Xie X.ら、Cancer Res 61巻、6795～6804頁（2001年）およびNikitina, E.ら、Cancer Res 65巻：4309～4319頁（2005年）において考察されている。したがって、一部の実施形態では、本出願の誘導性または改変誘導性カスパーゼ-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核酸ワクチン、例えばDNAワクチンなども提供される。ワクチンを対象に投与し、それにより、*in vivo*において標的細胞を形質転換または形質導入することができる。次いで、リガンド誘導因子を本出願の方法に従って投与する。

【0047】

一部の実施形態では、改変カスパーゼ-9ポリペプチドは、短縮型改変カスパーゼ-9ポリペプチドである。一部の実施形態では、改変カスパーゼ-9ポリペプチドはカスパーゼ動員ドメインを欠く。一部の実施形態では、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断片を含む、または配列番号8のヌクレオチド配列もしくはその断片によりコードされる。

【0048】

一部の実施形態では、方法は、多量体リガンド結合性領域に結合する多量体リガンドを投与するステップをさらに含む。一部の実施形態では、多量体リガンド結合性領域は、FKBP、シクロフィリン受容体、ステロイド受容体、テトラサイクリン受容体、重鎖抗体サブユニット、軽鎖抗体サブユニット、柔軟なリンカードメインによって分離されたタンデムな重鎖可変領域および軽鎖可変領域で構成される単鎖抗体、およびその変異配列からなる群から選択される。一部の実施形態では、多量体リガンド結合性領域は、FKBP12領域である。一部の実施形態では、多量体リガンドは、FK506二量体または二量体FK506様類似体リガンドである。一部の実施形態では、多量体リガンドはAP1903である。一部の実施形態では、移植片対宿主病を処置するために多量体リガンドを投与する。一部の実施形態では、患者は、多量体リガンドを投与する前に移植片対宿主病の症状を示している。一部の実施形態では、患者は、ステージ0移植片対宿主病の1つまたは複数の症状を示している。一部の実施形態では、患者は、ステージ1移植片対宿主病の1つまたは複数の症状を示している。一部の実施形態では、患者は、ステージ2移植片対宿主病の1つまたは複数の症状を示している。一部の実施形態では、患者は、ステージ3移植片対宿主病の1つまたは複数の症状を示している。一部の実施形態では、患者は、ステージ4移植片対宿主病の1つまたは複数の症状を示している。一部の実施形態では、1回より多くの用量の多量体リガンドを投与する。一部の実施形態では、多量体リガンドの投与後にアロ反応性T細胞の数が減少する。一部の実施形態では、多量体リガンドの投与後にアロ反応性T細胞の数が約60～99%、約70%～95%、80%～90%または約90%またはそれ超減少する。一部の実施形態では、多量体リガンドの投与後に、患者において、増大することができ、かつウイルスおよび真菌に対して反応性であるドナーT細胞が生存する。一部の実施形態では、多量体リガンドの投与後に、患者において、増大することができ、かつ患者における腫瘍細胞に対して反応性であるドナーT細胞が生存する。

【0049】

ある特定の実施形態が以下の説明、実施例、特許請求の範囲および図面にさらに記載さ

れている。

本発明の実施形態において、例えば以下の項目が提供される。

(項目 1)

対象における移植された治療用細胞の生存を制御する方法であって、

a) 治療用細胞を調製するまたは得るステップ、

b) 該治療用細胞に、多量体化領域と、カスパーゼー 9 ポリペプチドまたは改変カスパーゼー 9 ポリペプチドとを含むキメラポリペプチドをコードする核酸をトランスフェクトまたは形質導入するステップであって、該カスパーゼー 9 ポリペプチドまたは該改変カスパーゼー 9 ポリペプチドが、配列番号 9 に対して少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むステップ、

c) 該形質導入またはトランスフェクトされた治療用細胞を該対象に移植するステップ、および

d) (c) の後に、該対象に、該多量体化領域に結合する多量体リガンドを、該カスパーゼー 9 ポリペプチドまたは該改変カスパーゼー 9 ポリペプチドを発現する移植された治療用細胞の 80% 未満を死滅させるために有効な量で投与するステップを含み、

該改変カスパーゼー 9 ポリペプチドが、改変されていないカスパーゼー 9 ポリペプチドと比較して、該多量体リガンドに対する応答において低下した IC_{50} および伸長した用量反応曲線を有する、

方法。

(項目 2)

前記カスパーゼー 9 ポリペプチドまたは前記改変カスパーゼー 9 ポリペプチドを発現する移植された治療用細胞の 70% 未満が、前記多量体リガンドの投与後に死滅する、項目 1 に記載の方法。

(項目 3)

前記カスパーゼー 9 ポリペプチドまたは前記改変カスパーゼー 9 ポリペプチドを発現する移植された治療用細胞の 60% 未満が、前記多量体リガンドの投与後に死滅する、項目 1 または 2 に記載の方法。

(項目 4)

前記カスパーゼー 9 ポリペプチドまたは前記改変カスパーゼー 9 ポリペプチドを発現する移植された治療用細胞の 50% 未満が、前記多量体リガンドの投与後に死滅する、項目 1 から 3 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 5)

前記カスパーゼー 9 ポリペプチドまたは前記改変カスパーゼー 9 ポリペプチドを発現する移植された治療用細胞の 40% 未満が、前記多量体リガンドの投与後に死滅する、項目 1 から 4 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 6)

前記カスパーゼー 9 ポリペプチドまたは前記改変カスパーゼー 9 ポリペプチドを発現する移植された治療用細胞の 30% 未満が、前記多量体リガンドの投与後に死滅する、項目 1 から 5 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 7)

前記治療用細胞が、異種タンパク質をさらに発現する、項目 1 から 6 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 8)

前記異種タンパク質がキメラ抗原受容体である、項目 7 に記載の方法。

(項目 9)

前記改変カスパーゼー 9 ポリペプチドの前記多量体リガンドに対する IC_{50} が $0.01 \mu M$ 超である、項目 1 から 8 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 10)

前記改変カスパーゼー 9 ポリペプチドの前記多量体リガンドに対する IC_{50} が 0.1

10

20

30

40

50

pM超である、項目1から8のいずれか一項に記載の方法。

(項目11)

前記改変カスパーゼ-9ポリペプチドの前記多量体リガンドに対する IC_{50} が0.01nM超である、項目1から8のいずれか一項に記載の方法。

(項目12)

前記改変カスパーゼ-9ポリペプチドの前記多量体リガンドに対する IC_{50} が0.1nM超である、項目1から8のいずれか一項に記載の方法。

(項目13)

対象における移植された治療用細胞の生存を制御する方法であって、

a) 治療用細胞を調製するまたは得るステップ、

10

b) 該治療用細胞の第1のサブセットに、多量体化領域および第1のカスパーゼ-9ポリペプチドを含むキメラポリペプチドをコードする核酸をトランスフェクトまたは形質導入するステップであって、該第1のカスパーゼ-9ポリペプチドが、配列番号9に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むステップ、

c) 該治療用細胞の第2のサブセットに、多量体化領域および第2のカスパーゼ-9ポリペプチドを含むキメラポリペプチドをコードする核酸をトランスフェクトまたは形質導入するステップであって、該第2のカスパーゼ-9ポリペプチドが、配列番号9に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むステップ、

d) 該形質導入またはトランスフェクトされた治療用細胞の第1のサブセットおよび治療用細胞の該第2のサブセットを該対象に移植するステップ、および

20

e) (d)の後に、該対象に、該多量体化領域に結合する多量体リガンドを、治療用細胞の該第1のサブセットを治療用細胞の該第2のサブセットよりも多く死滅させるために有効な量で投与するステップ

を含む方法。

(項目14)

前記第1のカスパーゼ-9ポリペプチドが、前記第2のカスパーゼ-9ポリペプチドと比較して、前記多量体リガンドに対する応答において低下した IC_{50} および伸長した用量反応曲線を有する、項目12から14のいずれか一項に記載の方法。

(項目15)

治療用細胞の前記第1のサブセットまたは前記第2のサブセットがT細胞である、項目13または14に記載の方法。

30

(項目16)

治療用細胞の前記第1のサブセットまたは前記第2のサブセットがキメラ抗原受容体をさらに発現する、項目13から15のいずれか一項に記載の方法。

(項目17)

前記治療用細胞が、造血幹細胞、誘導性前駆細胞(iPS)、胚性幹(ES)細胞、間葉系幹細胞(MSC)、形質(B)細胞、筋細胞、ナチュラルキラー(NK)細胞、マクロファージ、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)、およびT細胞からなる群から選択される、項目13から16のいずれか一項に記載の方法。

(項目18)

40

前記対象に投与する前に前記T細胞をアロ枯渇させない、項目15に記載の方法。

(項目19)

対象における移植された治療用細胞の生存を制御する方法であって、

a) 治療用細胞を該対象に移植するステップであって、該治療用細胞が、多量体化領域と、カスパーゼ-9ポリペプチドまたは改変カスパーゼ-9ポリペプチドとを含むキメラポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含み、該カスパーゼ-9ポリペプチドまたは該改変カスパーゼ-9ポリペプチドが、配列番号9に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むステップ、および

b) (a)の後に、該対象に、該多量体化領域に結合する多量体リガンドを、該カスパーゼ-9ポリペプチドまたは該改変カスパーゼ-9ポリペプチドを発現する移植された治

50

療用細胞の最大 70 % を死滅させるために有効な量で投与するステップを含み、

該改変カスパーゼ-9 ポリペプチドが、改変されていないカスパーゼ-9 ポリペプチドと比較して、該多量体リガンドに対する応答において低下した IC_{50} および伸長した用量反応曲線を有する、

方法。

(項目 20)

前記細胞に、前記キメラポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが形質導入またはトランスフェクトされている、項目 19 に記載の方法。

(項目 21)

前記治療用細胞が、造血幹細胞、誘導性前駆細胞 (iPS)、胚性幹 (ES) 細胞、間葉系幹細胞、形質 (B) 細胞、筋細胞、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、腫瘍浸潤リンパ球、および T 細胞からなる群から選択される、項目 19 または 20 に記載の方法。

(項目 22)

前記カスパーゼ-9 ポリペプチドまたは前記改変カスパーゼ-9 ポリペプチドを発現する移植された治療用細胞の 70 % 未満が、前記多量体リガンドの投与後に死滅する、項目 19 から 21 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 23)

前記カスパーゼ-9 ポリペプチドまたは前記改変カスパーゼ-9 ポリペプチドを発現する移植された治療用細胞の 60 % 未満が、前記多量体リガンドの投与後に死滅する、項目 19 から 22 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 24)

前記カスパーゼ-9 ポリペプチドまたは前記改変カスパーゼ-9 ポリペプチドを発現する移植された治療用細胞の 50 % 未満が、前記多量体リガンドの投与後に死滅する、項目 19 から 23 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 25)

前記カスパーゼ-9 ポリペプチドまたは前記改変カスパーゼ-9 ポリペプチドを発現する移植された治療用細胞の 40 % 未満が、前記多量体リガンドの投与後に死滅する、項目 19 から 24 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 26)

前記カスパーゼ-9 ポリペプチドまたは前記改変カスパーゼ-9 ポリペプチドを発現する移植された治療用細胞の 30 % 未満が、前記多量体リガンドの投与後に死滅する、項目 19 から 25 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 27)

前記改変カスパーゼ-9 ポリペプチドの前記多量体リガンドに対する IC_{50} が 0.01 pM 超である、項目 19 から 26 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 28)

前記改変カスパーゼ-9 ポリペプチドの前記多量体リガンドに対する IC_{50} が 0.1 pM 超である、項目 19 から 26 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 29)

前記改変カスパーゼ-9 ポリペプチドの前記多量体リガンドに対する IC_{50} が 0.01 nM 超である、項目 19 から 26 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 30)

前記改変カスパーゼ-9 ポリペプチドの前記多量体リガンドに対する IC_{50} が 0.1 nM 超である、項目 19 から 26 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 31)

前記治療用細胞がキメラ抗原受容体を含む、項目 19 から 30 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 32)

治療有効レベルの治療用細胞であって、前記キメラ抗原受容体を含む細胞が、前記多量体リガンドの投与後に前記対象において活性なままである、項目 19 から 31 までのいずれかに記載の方法。

(項目 33)

対象における移植された治療用細胞の生存を制御する方法であって、

a) 治療用細胞の第 1 のセットを該対象に移植するステップであって、治療用細胞の該第 1 のセットが、多量体化領域と、第 1 のカスパーゼ-9 ポリペプチドまたは第 1 の改変カスパーゼ-9 ポリペプチドとを含むキメラポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含み、該カスパーゼ-9 ポリペプチドまたは該改変カスパーゼ-9 ポリペプチドが、配列番号 9 に対して少なくとも 90 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むステップ、

b) 治療用細胞の第 2 のセットを該対象に移植するステップであって、治療用細胞の該第 2 のセットが、多量体化領域と、第 2 のカスパーゼ-9 ポリペプチドまたは第 2 の改変カスパーゼ-9 ポリペプチドとを含むキメラポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含み、該カスパーゼ-9 ポリペプチドまたは該改変カスパーゼ-9 ポリペプチドが、配列番号 9 に対して少なくとも 90 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むステップ、および

c) 該対象に、該多量体化領域に結合する多量体リガンドを、該治療用細胞の該第 1 のサブセットを治療用細胞の該第 2 のサブセットよりも多く死滅させるために有効な量で投与するステップを含む方法。

(項目 34)

前記第 1 のカスパーゼ-9 ポリペプチドおよび前記第 2 のカスパーゼ-9 ポリペプチドが、異なるアミノ酸配列を含み、異なる基底の活性または異なる IC_{50} を有する、項目 33 に記載の方法。

(項目 35)

前記第 1 のカスパーゼ-9 ポリペプチドが、前記第 2 のカスパーゼ-9 ポリペプチドと比較して、前記多量体リガンドに対する応答において低下した IC_{50} および伸長した用量反応曲線を有する、項目 33 から 34 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 36)

治療用細胞の前記第 1 のサブセットと治療用細胞の前記第 2 のサブセットとが異なる型の細胞である、項目 33 から 35 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 37)

前記治療用細胞が、造血幹細胞、誘導性前駆細胞 (iPS)、胚性幹 (ES) 細胞、間葉系幹細胞、形質 (B) 細胞、筋細胞、腫瘍浸潤リンパ球、および T 細胞からなる群から選択される、項目 33 から 36 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 38)

前記第 2 のカスパーゼ-9 ポリペプチドの前記多量体リガンドに対する IC_{50} が 0.01 pM 超である、項目 33 から 37 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 39)

前記第 2 のカスパーゼ-9 ポリペプチドの前記多量体リガンドに対する IC_{50} が 0.1 pM 超である、項目 33 から 37 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 40)

前記第 2 のカスパーゼ-9 ポリペプチドの前記多量体リガンドに対する IC_{50} が 0.01 nM 超である、項目 33 から 37 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 41)

前記第 2 のカスパーゼ-9 ポリペプチドの前記多量体リガンドに対する IC_{50} が 0.1 nM 超である、項目 33 から 37 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 42)

追加用量の前記多量体リガンドを前記対象に投与するステップをさらに含み、該追加用量の該多量体リガンドを投与した後に、前記第 1 のカスパーゼ-9 ポリペプチドまたは前

10

20

30

40

50

記第2のカスパーゼー9ポリペプチドを発現する前記移植された治療用細胞の少なくとも10%が、該追加用量前の該移植された細胞の数と比較して死滅する、項目33から41のいずれか一項に記載の方法。

(項目43)

追加用量の前記多量体リガンドを前記対象に投与するステップをさらに含み、該追加用量の該多量体リガンドを投与した後に、前記第1のカスパーゼー9ポリペプチドまたは前記第2のカスパーゼー9ポリペプチドを発現する前記移植された治療用細胞の少なくとも10%が、該追加用量前の該移植された細胞の数と比較して死滅する、項目33から41のいずれか一項に記載の方法。

(項目44)

2回用量の前記多量体リガンドを前記対象に投与し、該多量体リガンドの2回目の用量を該多量体リガンドの1回目の用量の24時間より後に投与する、項目33から43のいずれか一項に記載の方法。

(項目45)

前記多量体リガンドの2回目の用量を該多量体リガンドの1回目の用量の少なくとも1週間後に前記対象に投与する、項目43または44に記載の方法。

(項目46)

前記患者における前記移植された治療用細胞によって生じる状態の存在、不在またはステージを含む情報を受け取るステップ、および

該患者において同定された該状態の存在、不在またはステージに基づいて、該患者に対して前記多量体リガンドに結合する多量体リガンドを投与するか、その後の該多量体リガンドの投薬量を維持するか、またはその後の該多量体リガンドの投薬量を調整するステップをさらに含む、項目33から45のいずれか一項に記載の方法。

(項目47)

前記状態が移植片対宿主病である、項目33から45のいずれか一項に記載の方法。

(項目48)

前記第1の治療用細胞または前記第2の治療用細胞がT細胞である、項目33から47のいずれか一項に記載の方法。

(項目49)

所望の百分率の第1の治療用細胞が死滅するまで多量体リガンドの濃度を上昇させる、項目33から48のいずれか一項に記載の方法。

(項目50)

前記第1の治療用細胞がキメラ抗原受容体を含む、項目33から49のいずれか一項に記載の方法。

(項目51)

治療有効レベルの前記第1の治療用細胞であって、前記キメラ抗原受容体を含む細胞が、前記多量体リガンドの投与後に前記対象において活性なままである、項目33から50のいずれか一項に記載の方法。

(項目52)

前記第2の治療用細胞がキメラ抗原受容体を含む、項目33から51のいずれか一項に記載の方法。

(項目53)

前記第1の治療用細胞がT細胞である、項目52に記載の方法。

(項目54)

前記第2の治療用細胞が、幹細胞移植後の対象に投与されるT細胞である、項目53に記載の方法。

(項目55)

前記対象ががんを有する、項目1から54のいずれか一項に記載の方法。

(項目56)

前記対象が固形腫瘍を有する、項目1から54のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

(項目 5 7)

前記がんが、前記対象の血液または骨髄に存在する、項目 5 5 に記載の方法。

(項目 5 8)

前記対象が血液疾患または骨髄疾患を有する、項目 1 から 5 4 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 5 9)

前記対象が、幹細胞移植によって緩和することができるいずれかの状態または障害と診断されている、項目 1 から 5 4 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 6 0)

前記対象が、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、項目 1 から 5 4 のいずれか一項に記載の方法。

10

(項目 6 1)

患者が、原発性免疫不全障害、血球貪食リンパ組織球増多症 (H L H) または他の血球貪食障害、遺伝性骨髄不全障害、異常ヘモグロビン症、代謝障害、および破骨細胞障害からなる群から選択される状態と診断されている、項目 1 から 5 4 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 6 2)

前記状態が、重症複合免疫不全症 (S C I D)、複合免疫不全症 (C I D)、先天性 T 細胞欠損／欠乏症、分類不能型免疫不全症 (C V I D)、慢性肉芽腫性疾患、I P E X (免疫不全、多腺性内分泌障害、腸疾患、X 連鎖) または I P E X 様、ウィスコット・アルドリッチ症候群、C D 4 0 リガンド欠乏症、白血球接着不全症、D O C K 8 欠乏症、I L - 1 0 欠乏／I L - 1 0 受容体欠乏症、G A T A 2 欠乏症、X 連鎖リンパ増殖性疾患 (X L P)、軟骨毛髪形成不全症、シュワヒマン・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、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から選択される、項目 1 から 5 4 のいずれか一項に記載の方法。

20

(項目 6 3)

前記対象が、1 つまたは複数のステージ 1 移植片対宿主病の症状を示している、項目 1 から 5 4 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 6 4)

前記対象が、1 つまたは複数のステージ 2 移植片対宿主病の症状を示している、項目 1 から 5 4 のいずれか一項に記載の方法。

30

(項目 6 5)

前記対象が、1 つまたは複数のステージ 3 移植片対宿主病の症状を示している、項目 1 から 5 4 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 6 6)

前記対象が、1 つまたは複数のステージ 4 移植片対宿主病の症状を示している、項目 1 から 5 4 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 6 7)

前記多量体リガンドの投与後にアロ反応性 T 細胞の数が減少する、項目 1 から 6 6 のいずれか一項に記載の方法。

40

(項目 6 8)

前記アロ反応性 T 細胞がマーカーおよび C D 3 を発現する、項目 1 から 6 7 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 6 9)

アロ反応性 T 細胞の数が前記多量体リガンドの投与後に約 9 0 % またはそれより多く減少する、項目 1 から 6 8 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 7 0)

前記多量体リガンドの投与後に、前記対象において、増大することができ、かつウイルスおよび真菌に対して反応性であるドナー T 細胞が生存する、項目 1 から 6 9 のいずれか

50

一項に記載の方法。

(項目 7 1)

前記多量体リガンドの投与後に、前記対象において、増大することができ、かつ該対象における腫瘍細胞に対して反応性であるドナー T 細胞が生存する、項目 1 から 6 9 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 7 2)

少なくとも 1 つのアミノ酸置換が、S 1 4 4 A、S 1 4 4 D、Y 1 5 3 A、Y 1 5 3 F、S 1 8 3 A、S 1 9 5 A、S 1 9 6 A、S 1 9 6 D、S 3 0 7 A、D 3 1 5 A、A 3 1 6 G、T 3 1 7 A、T 3 1 7 C、T 3 1 7 E、T 3 1 7 S、P 3 1 8 A、F 3 1 9 A、F 3 1 9 W、F 3 2 6 K、D 3 2 7 G、D 3 2 7 K、D 3 2 7 R、Q 3 2 8 K、Q 3 2 8 R、L 3 2 9 E、L 3 2 9 G、L 3 2 9 K、D 3 3 0 A、D 3 3 0 E、D 3 3 0 G、D 3 3 0 N、D 3 3 0 S、D 3 3 0 V、A 3 3 1 K、C 4 0 3 A、C 4 0 3 S、C 4 0 3 T、F 4 0 4 T、F 4 0 4 W、F 4 0 4 Y、N 4 0 5 A、N 4 0 5 F、N 4 0 5 Q、N 4 0 5 T、F 4 0 6 A、F 4 0 6 T、F 4 0 6 W、F 4 0 6 Y、G 4 0 2 A、G 4 0 2 I、G 4 0 2 Q、G 4 0 2 Y、C 4 0 3 P、F 4 0 4 A、F 4 0 4 S、および F 4 0 6 L からなる群から選択される、項目 1 から 7 1 のいずれか一項に記載の方法。

10

(項目 7 3)

少なくとも 1 つのアミノ酸置換が D 3 3 0 A である、項目 1 から 7 1 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 7 4)

少なくとも 1 つのアミノ酸置換が D 3 3 0 E である、項目 1 から 7 1 のいずれか一項に記載の方法。

20

(項目 7 5)

少なくとも 1 つのアミノ酸置換が N 4 0 5 Q である、項目 1 から 7 1 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 7 6)

前記改変カスパーゼ 9 ポリペプチドが、D 3 3 0 A-N 4 0 5 Q、D 3 3 0 A-S 1 4 4 A、D 3 3 0 A-S 1 4 4 D、D 3 3 0 A-S 1 8 3 A、D 3 3 0 A-S 1 9 6 A、N 4 0 5 Q-S 1 4 4 A、N 4 0 5 Q-S 1 4 4 D、N 4 0 5 Q-S 1 9 6 D、N 4 0 5 Q-T 3 1 7 S、N 4 0 5 Q-S 1 4 4 A c o、N 4 0 5 Q-T 3 1 7 S c o、^{4 0 2}G C F N F ^{4 0 6}I S A Q T (C A S P-1 0)、^{3 1 6}A T P F ^{3 1 9}A V P I (S M A C / D i a b l o)、D 3 3 0 A-N 4 0 5 T、D 3 1 5 A-D 3 3 0 A、D 3 3 0 A-Y 1 5 3 A、D 3 3 0 A-Y 1 5 3 F、D 3 3 0 A-T 3 1 7 E、^{4 0 2}G C F N F ^{4 0 6}C I V S M (C A S P-3)、^{4 0 2}G C F N F ^{4 0 6}A A A A A、^{4 0 2}G C F N F ^{4 0 6}Y C S T L (C A S P-2)、および ^{4 0 2}G F N F ^{4 0 6}Q P T F T (C A S P-8) からなる群から選択されるアミノ酸置換を少なくとも 2 つ含む、項目 1 から 7 1 のいずれか一項に記載の方法。

30

(項目 7 7)

前記ポリヌクレオチドが、前記カスパーゼ 9 ポリペプチドをコードする最適化されたコドンを含む、項目 1 から 7 6 のいずれか一項に記載の方法。

40

(項目 7 8)

前記改変カスパーゼ 9 ポリペプチドが、配列番号 3 9 の核酸配列によりコードされる、または配列番号 8 8 の改変カスパーゼ 9 ポリペプチド D 3 3 0 E の核酸配列によりコードされる、項目 1 から 7 7 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 7 9)

前記改変カスパーゼ 9 ポリペプチドが、表 5 または表 6 のカスパーゼバリエーションからなる群から選択されるアミノ酸置換を含む、項目 1 から 7 8 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 8 0)

前記細胞がヒト細胞である、項目 1 から 7 9 のいずれか一項に記載の方法。

50

(項目 8 1)

前記細胞が、間葉系間質細胞、胚性幹細胞、腫瘍浸潤リンパ球、および誘導性多能性幹細胞、前駆細胞、または造血前駆細胞からなる群から選択される、項目 1 から 8 0 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 8 2)

前記細胞が T 細胞である、項目 1 から 8 0 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 8 3)

前記細胞を骨髓、臍帯血、末梢血、または末梢血単核細胞から得るまたは調製する、項目 1 から 8 2 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 8 4)

前記ポリヌクレオチドがプロモーターに作動可能に連結している、項目 1 から 8 3 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 8 5)

前記キメラタンパク質がマーカーポリペプチドをさらに含む、項目 8 4 に記載の方法。

(項目 8 6)

前記マーカーポリペプチドが Δ C D 1 9 ポリペプチドである、項目 8 5 に記載の方法。

(項目 8 7)

前記マーカーを発現する細胞を前記対象への投与のために選択する選択ステップをさらに含む、項目 8 5 または 8 6 に記載の方法。

(項目 8 8)

前記カスパーゼ 9 ポリペプチドがカスパーゼ動員ドメイン (CARD) を欠く、項目 1 から 8 7 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 8 9)

前記多量体化領域が、FKBP、シクロフィリン受容体、ステロイド受容体、テトラサイクリン受容体、重鎖抗体サブユニット、軽鎖抗体サブユニット、柔軟なリンカードメインによって分離されたタンデムな重鎖可変領域および軽鎖可変領域で構成される単鎖抗体、ならびにその変異配列からなる群から選択される、項目 1 から 8 8 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 9 0)

前記多量体化領域が FKBP 1 2 領域である、項目 1 から 8 8 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 9 1)

前記 FKBP 1 2 領域が FKBP 1 2 v_{3 6} 領域である、項目 9 0 に記載の方法。

(項目 9 2)

前記多量体化領域が Fv' Fv1s である、項目 1 から 9 1 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 9 3)

前記多量体化領域が、FK506 二量体および二量体 FK506 類似体リガンドからなる群から選択されるリガンドと結合する、項目 1 から 9 2 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 9 4)

前記リガンドが AP1903 または AP20187 である、項目 1 から 9 3 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 9 5)

前記多量体化領域が配列番号 29 のアミノ酸配列またはその機能性断片を有する、項目 1 から 9 4 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 9 6)

前記多量体化領域が配列番号 30 のヌクレオチド配列またはその機能性断片によりコードされる、項目 1 から 9 4 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 9 7)

前記多量体化領域が配列番号 32 のアミノ酸配列またはその機能性断片を有するポリペ

10

20

30

40

50

プチドをさらに含む、項目 95 に記載の方法。

(項目 98)

前記多量体化領域が配列番号 31 のヌクレオチド配列またはその機能性断片によりコードされるポリペプチドをさらに含む、項目 96 に記載の方法。

(項目 99)

前記多量体化領域が配列番号 32 のアミノ酸配列またはその機能性断片を有するポリペプチドをさらに含む、項目 95 または 97 に記載の方法。

(項目 100)

前記多量体化領域が配列番号 31 のヌクレオチド配列またはその機能性断片によりコードされるポリペプチドをさらに含む、項目 96 または 98 に記載の方法。

10

(項目 101)

前記多量体化領域が配列番号 29 または配列番号 32 のアミノ酸配列あるいはその機能性断片を有するポリペプチドをさらに含む、項目 95、97 または 99 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 102)

前記多量体化領域が配列番号 30 または配列番号 31 のヌクレオチド配列あるいはその機能性断片によりコードされるポリペプチドをさらに含む、項目 96、98 または 100 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 103)

前記細胞に、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、レンチウイルスベクター、または遺伝子発現ベクターを形質導入またはトランスフェクトする、項目 1 から 102 のいずれか一項に記載の方法。

20

(項目 104)

前記細胞が、前記改変カスパーゼ-9 ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含み、異種ポリペプチドをコードする第 2 のポリヌクレオチドをさらに含む、項目 1 から 103 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 105)

前記異種ポリペプチドがキメラ抗原受容体 (CAR) である、項目 104 に記載の方法。

(項目 106)

前記細胞が、前記改変カスパーゼ-9 ポリペプチドをコードし、異種ポリペプチドをさらにコードするポリヌクレオチド、および該改変カスパーゼ-9 ポリペプチドと該異種ポリペプチドとを連結する切断可能なリンカーポリペプチドを含む、項目 1 から 103 のいずれか一項に記載の方法。

30

(項目 107)

前記異種ポリペプチドがキメラ抗原受容体 (CAR) である、項目 106 に記載の方法。

(項目 108)

前記切断可能なリンカーポリペプチドが 2A または 2A 様ポリペプチドである、項目 106 または 107 に記載の方法。

40

(項目 109)

前記対象がヒトである、項目 1 から 108 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 110)

複数回用量の多量体リガンドを、該複数回用量の間で投薬量レベルを漸増させながら前記対象に対して投与する、項目 1 から 109 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 111)

投薬量レベルの前記漸増により、死滅する治療用細胞の数が増加する、項目 110 に記載の方法。

(項目 112)

前記対象が移植片対宿主病を有し、前記多量体リガンドの投与により該移植片対宿主病

50

が緩和される、項目 1 から 1 1 1 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 1 3)

前記対象がヒトである、項目 1 から 1 1 2 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 1 4)

前記治療用細胞がキメラ抗原受容体を含む、項目 1 から 1 1 3 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 1 5)

前記対象が、前記多量体リガンドの投与前にオフターゲットまたはオフオーガンの毒性の症状を示している、項目 1 から 1 1 4 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 1 6)

前記対象が、前記多量体リガンドの投与前に腫瘍崩壊症候群 (T L S)、サイトカイン放出症候群 (C R S) またはマクロファージ活性化症候群 (M A S) の症状を示している、項目 1 から 1 1 5 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 1 7)

前記多量体リガンドの投与により前記オフターゲットまたはオフオーガンの毒性が緩和される、項目 1 1 6 に記載の方法。

(項目 1 1 8)

前記多量体リガンドの投与により前記腫瘍崩壊症候群 (T L S)、サイトカイン放出症候群 (C R S) またはマクロファージ活性化症候群 (M A S) が緩和される、項目 1 1 6 に記載の方法。

(項目 1 1 9)

治療有効レベルの治療用細胞であって、前記キメラ抗原受容体を含む細胞が、前記多量体リガンドの投与後に前記対象において活性なままである、項目 1 1 4 から 1 1 8 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 2 0)

追加用量の前記多量体リガンドを前記対象に投与すべきかどうかを決定するステップをさらに含む、項目 1 から 1 1 9 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 2 1)

追加用量の前記多量体リガンドを前記対象に投与するステップをさらに含み、該追加用量の該多量体リガンドを投与後に、前記カスパーゼ 9 ポリペプチドまたは前記改変カスパーゼ 9 ポリペプチドを発現する前記移植された治療用細胞の少なくとも 1 0 % が、該追加用量前の該移植された細胞の数と比較して死滅する、項目 1 から 1 2 0 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 2 2)

2 回用量の前記多量体リガンドを前記対象に投与し、該多量体リガンドの 2 回目の用量を前記多量体リガンドの 1 回目の用量の 2 4 時間より後に投与する、項目 1 から 1 2 1 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 2 3)

前記多量体リガンドの 2 回目の用量を該多量体リガンドの 1 回目の用量の少なくとも 1 週間後に前記対象に投与する、項目 1 から 1 2 2 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 2 4)

前記患者における前記移植された治療用細胞によって生じる状態の存在、不在またはステージを含む情報を受け取るステップ、および

該患者において同定された該状態の存在、不在またはステージに基づいて、該患者に対して前記多量体リガンドに結合する多量体リガンドを投与するか、その後の該多量体リガンドの投薬量を維持するか、またはその後の該多量体リガンドの投薬量を調整するステップをさらに含む、項目 1 から 1 2 3 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 2 5)

前記キメラ抗原受容体がキメラ T 細胞受容体である、項目 1 から 1 2 4 までのいずれかに記載の方法。

10

20

30

40

50

(項目 1 2 6)

前記キメラ抗原受容体が s c F v ドメインを含む、項目 1 から 1 2 4 までのいずれかに記載の方法。

【0050】

図面は、技術の実施形態を例示するものであり、限定するものではない。例示を明白かつ容易にするために、図面は一定の縮尺で作成されておらず、一部の場合には、種々の態様は、特定の実施形態の理解を容易にするために誇張または拡大して示されていることがある。

【図面の簡単な説明】

【0051】

【図 1 A】図 1 A は、本明細書で考察されている種々の i C a s p 9 発現ベクターを例示する図である。図 1 B は、図 1 A に示されている発現ベクターによって産生される全長カスパーゼ-9 タンパク質および短縮型カスパーゼ-9 タンパク質の代表的なウエスタンブロットを例示する図である。

【図 1 B】図 1 A は、本明細書で考察されている種々の i C a s p 9 発現ベクターを例示する図である。図 1 B は、図 1 A に示されている発現ベクターによって産生される全長カスパーゼ-9 タンパク質および短縮型カスパーゼ-9 タンパク質の代表的なウエスタンブロットを例示する図である。

【0052】

【図 2 A B】図 2 A ~ 2 D は、種々の i C a s p 9 発現ベクターを形質導入した細胞の表現型に対する i C a s p 9 発現構築物の発現の影響を評価するために実施した実験の結果を示すグラフである。図 2 A は、形質導入された細胞および形質導入されていない細胞における細胞表面マーカーのレベルを例示するグラフである。図 2 B は、形質導入された細胞および形質導入されていない細胞における、抗原刺激時の T h 1 型サイトカインおよび T h 2 型サイトカインの分泌のレベルを例示するグラフである。図 2 C は、形質導入された細胞および形質導入されていない細胞における、自己由来 E V B で形質転換したリンパ芽球様 B 細胞株 (L C L)、H L A 不適合 L C L、および H S B - 2 に対する細胞溶解活性のレベルを例示するグラフである。図 2 D は、i C a s p 9 を形質導入した細胞株への抗原依存の持続を例示するグラフである。抗原刺激を中止した後の T 細胞の一定の減退に注目されたい。実験条件および結果に関するさらなる考察は実施例において示されている。

【図 2 C D】図 2 A ~ 2 D は、種々の i C a s p 9 発現ベクターを形質導入した細胞の表現型に対する i C a s p 9 発現構築物の発現の影響を評価するために実施した実験の結果を示すグラフである。図 2 A は、形質導入された細胞および形質導入されていない細胞における細胞表面マーカーのレベルを例示するグラフである。図 2 B は、形質導入された細胞および形質導入されていない細胞における、抗原刺激時の T h 1 型サイトカインおよび T h 2 型サイトカインの分泌のレベルを例示するグラフである。図 2 C は、形質導入された細胞および形質導入されていない細胞における、自己由来 E V B で形質転換したリンパ芽球様 B 細胞株 (L C L)、H L A 不適合 L C L、および H S B - 2 に対する細胞溶解活性のレベルを例示するグラフである。図 2 D は、i C a s p 9 を形質導入した細胞株への抗原依存の持続を例示するグラフである。抗原刺激を中止した後の T 細胞の一定の減退に注目されたい。実験条件および結果に関するさらなる考察は実施例において示されている。

【0053】

【図 3 A】図 3 A ~ 3 D は、i C a s p 9 発現構築物を発現する細胞における、二量体化の化学的誘導因子 (C I D) の有効性を決定するために実施した種々の実験の結果を例示する図である。図 3 A は、C I D または担体を用いて処理した後の細胞の F A C S プロットを例示するグラフである。選択していない細胞 (図 3 A の上の段) および高 G F P 発現について選択した細胞 (図 3 A の下の段) についての F A C S プロットが示されている。図 3 B は、i C a s p 9 を形質導入した細胞を C I D で一晩処理した結果を例示する図で

ある。処理パネルは、アポトーシスの特性を示す細胞を示す。図 3 C は、C I D 処理した細胞および無処理の細胞をアネキシン-V および 7-A A D について染色した結果を例示するグラフである。図 3 D は、C I D A P 2 0 1 8 7 についての用量反応曲線を示すグラフである。実験条件および結果に関するさらなる考察は実施例において示されている。

【図 3 B】同上。

【図 3 C】同上。

【図 3 D】同上。

【0 0 5 4】

【図 4】図 4 A ~ 4 C は、導入遺伝子の発現レベルと i C a s p 9 の機能の間の相関を測定するために実施した種々の実験の結果を例示するグラフである。図 4 A は、G F P 発現に基づく細胞集団の選択の結果を示すグラフである。図 4 B は、C I D で一晚処理し、アネキシン-V および 7-A A D について染色した細胞の結果を例示するグラフである。図 4 C は、選択された T 細胞を形質導入されていない T 細胞と 1 : 1 で混合し、抗原による刺激後に 1 0 n M の C I D と一緒にインキュベートした結果を示すグラフである。7 日目に残留 G F P 陽性 T 細胞の百分率が示されている。実験条件および結果に関するさらなる考察は実施例において示されている。

【0 0 5 5】

【図 5 A】図 5 A ~ 5 C は、T 細胞における i F a s と i C a s p 9 の機能性を比較する種々の実験の結果を例示するグラフである。図 5 A は、i F a s 発現構築物または i C a s p 9 発現構築物を形質導入し、G F P 発現に応じて選別した細胞の結果を例示するグラフである。図 5 B は、C I D を用いた処理後の G F P 発現測定の結果を例示するグラフである。図 5 C は、ヒト由来細胞株である J u r k a t および M T - 2 において実施した発現試験の結果を示すグラフである。細胞株をアネキシン-V および 7-A A D で染色した。実験条件および結果に関するさらなる考察は実施例において示されている。

【図 5 B】同上。

【図 5 C】同上。

【0 0 5 6】

【図 6】図 6 は、I 1 - 2 と同時発現させた際の i C a s p 9 の機能を例示するグラフである。

【0 0 5 7】

【図 7】図 7 は、i n v i v o における i C a s p 9 の機能を例示するグラフである。実験条件および結果に関するさらなる考察は実施例において示されている。

【0 0 5 8】

【図 8】図 8 A は、i C a s p 9 発現構築物 S F G , i C a s p 9 , 2 A , Δ C D 1 9 の構造を例示する図である。図 8 B は、アロ枯渴細胞において細胞産物発現 i C a s p 9 を作製するために使用するプロトコルを例示する図である。実験条件および結果に関するさらなる考察は実施例において示されている。

【0 0 5 9】

【図 9】図 9 は、アロ枯渴細胞が形質導入後に首尾よく増大することができたことを例示するグラフである。

【0 0 6 0】

【図 1 0】図 1 0 は、自殺遺伝子構築物を形質導入した細胞を、C D 1 9 免疫磁気選択によって富化して高純度に行うことを示すグラフである。実験条件および結果に関するさらなる考察は実施例において示されている。

【0 0 6 1】

【図 1 1 A B】図 1 1 A ~ 1 1 C は、遺伝子改変アロ枯渴細胞がそれらの抗ウイルスレパートリーおよび機能性を保持することを示すために実施した種々の実験の結果を例示するグラフである。図 1 1 A は、E L I S p o t によって評価した、ウイルス抗原に応答したインターフェロン-γ 分泌を示すグラフである。図 1 1 B は、アロ枯渴細胞を E B V - L C L で刺激した後の細胞毒性アッセイの結果を示すグラフである。図 1 1 C は、E B V 溶

10

20

30

40

50

解性抗原（B Z L F 1）由来のエピトープであるH L A－B 8－R A K F K Q L Lに特異的なT細胞の頻度を例示するグラフである。

【図11C】図11A～11Cは、遺伝子改変アロ枯渴細胞がそれらの抗ウイルスレパー トリーおよび機能性を保持することを示すために実施した種々の実験の結果を例示する グラフである。図11Aは、E L I S p o tによって評価した、ウイルス抗原に応答したイ ンターフェロン- γ 分泌を示すグラフである。図11Bは、アロ枯渴細胞をE B V－L C Lで刺激した後の細胞毒性アッセイの結果を示すグラフである。図11Cは、E B V溶解 性抗原（B Z L F 1）由来のエピトープであるH L A－B 8－R A K F K Q L Lに特異的 なT細胞の頻度を例示するグラフである。

【0062】

【図12】図12Aおよび12Bは、C D 2 5免疫毒素を使用した最初のアロ枯渴（a l l o d e p l e t i o n）にもかかわらず、遺伝子改変した最終産物細胞から調節性T細胞を単離できることを示すために実施した種々の実験の結果を例示するグラフである。図 12AはF o x p 3発現のレベルを示すグラフである。図12Bは、C D 4⁺/C D 2 5⁺ 遺伝子改変枯渴細胞を添加することにより細胞増殖が有意に低下することを示すために 実施した機能アッセイの結果を例示する。実験条件および結果に関するさらなる考察は実 施例において示されている。

【0063】

【図13A】図13A～13CAおよび13CBは、遺伝子改変アロ枯渴細胞がA P 2 0 1 8 7によって急速かつ効率的に排除されること、ならびに導入遺伝子の発現および死滅 の効率は培養が延長されるにつれ低下し、T細胞を再活性化すると回復し得ることを示す ために実施した種々の実験の結果を例示するグラフである。図13Aは、アネキシン-V および7-A A Dを用いて染色した細胞の代表的なF A C S分析を示すグラフである。図 13Bは、A P 2 0 1 8 7を投与した際の死滅に対するT細胞の再活性化の結果を例示す るグラフである。図13CAおよび13CBは、自殺遺伝子の機能に対する培養の延長およ びT細胞活性化の影響を示す代表的なF A C Sプロットを示す。実験条件および結果に 関するさらなる考察は実施例において示されている。

【図13B】同上。

【図13CA】同上。

【図13CB】同上。

【0064】

【図14】図14Aおよび14Bは、アロ刺激（a l l o s t i m u l a t e）した細胞 を二量体化剤で処理した後にウイルス特異的T細胞が部分的に保持されることを示すた めに実施した種々の実験の結果を例示するグラフである。図14Aは、E B V特異的T細胞 についての結果を示すグラフである。図14Bは、C M V特異的T細胞についての結果を 示すグラフである。アロ刺激（a l l o s t i m u l a t i o n）前、アロ刺激後、およ びアロ刺激した細胞を二量体化剤で処理した後に、五量体分析によって細胞を数量化した 。実験条件および結果に関するさらなる考察は実施例において示されている。

【0065】

【図15】図15Aおよび15Bは、健康な個体由来の間葉系間質細胞（M S C）の分析 を例示する図である。図15Aは、骨髓から単離した単核接着性画分がC D 7 3、C D 9 0およびC D 1 0 5については均一に陽性であり、造血マーカーについては陰性であった ことを示すグラフである。図15Bは、細胞が他の細胞系列に分化することができたことを 示す分析を例示する図である。実験条件および結果に関するさらなる考察は実施例におい て示されている。

【0066】

【図16】図16Aおよび16Bは、ヒトM S Cをi C a s p 9－ Δ C D 1 9で容易に形 質転換し、それらの表現型を維持できることを示すために実施した実験の結果を例示する グラフである。図16Aは、C D 1 9陽性細胞の百分率（例えば、i C a s p 9の上首尾 の形質導入の指標）が2週間超にわたって実質的に一定のままであることを例示するグラ

10

20

30

40

50

フである。図16Bは、首尾よく形質導入された細胞および形質導入されていない細胞が特徴的なMSC表面表現型を保持することを示すグラフである。実験条件および結果に関するさらなる考察は実施例において示されている。

【0067】

【図17】図17Aおよび17Bは、*in vitro*において、iCasp9を発現するヒトMSCがCIDに曝露した後にアポトーシスに選択的に駆動されることを示すために実施した実験の結果を例示するグラフである。図17Aは、CIDを用いて24時間処理した細胞のFACS分析の結果を示すグラフである。図17Bは、iCasp9⁺/CD19⁺細胞の磁気精製の結果を示すグラフである。実験条件および結果に関するさらなる考察は実施例において示されている。

10

【0068】

【図18】図18は、アポトーシスの有効性を決定し、およびアポトーシス抵抗性集団を同定するために実施した実験の結果を例示するグラフである。

【0069】

【図19】図19のパネルA～Qは、特定の細胞系列が強調されるように染色したiCasp9を発現するヒトMSCを例示する図である。形質導入された細胞が改変されていないMSCの分化潜在性を保持することが示されている。実験条件および結果に関するさらなる考察は実施例において示されている。

【0070】

【図20】図20は、iCasp9を発現するヒトMSCの分化した後代が*in vitro*においてCIDに曝露することによって死滅することを例示するグラフである。

20

【図21】図21A～21Cは、iCasp9を発現するヒトMSCが、*in vivo*においてCIDに曝露した後に選択的に死滅することを示すために実施した実験の結果を例示する図である。図21Aは、動物全身イメージングの結果を示す図である。図21Bは、CIDに曝露した後のiCasp9⁺細胞の死滅の時間経過を示すグラフである。図21Cは、MSCを皮下接種した後の動物の段階的な調査の結果を示す。実験条件および結果に関するさらなる考察は実施例において示されている。

【0071】

【図22】図22は、自殺遺伝子産物とCIDがどのように相互作用してアポトーシスを引き起こすかを示す図である。

30

【0072】

【図23】図23は、自殺遺伝子改変アロ枯渴細胞を作製するために使用するプロトコールの概要を例示する図である。

【0073】

【図24】図24は、iCasp9を発現するアロ枯渴T細胞の免疫磁気による富化の使用を示す図である。

【0074】

【図25】図25は、iCasp9-ΔCD19発現構築物および細胞が発現構築物を有するように形質導入する方法を例示する図である。実験条件および結果に関するさらなる考察は実施例において示されている。

40

【0075】

【図26】図26は、遺伝子改変T細胞（例えば、iCasp9発現細胞）に対するCID処理の影響を示す図である。

【図27】図27Aおよび27Bは、患者の末梢血中のiCasp9を形質導入したT細胞の検出を示すグラフである。再発した白血病に対するHLA-ハプロタイプ一致幹細胞移植後の細胞療法を受けている患者4名由来のiCasp9を形質導入したT細胞（CD3⁺CD19⁺、CD4⁺CD19⁺、またはCD8⁺CD19⁺）についての、図27A：FACS分析および図27B：DNA分析。患者1、2、および4では皮膚／肝臓GVHDが発生し、単回用量の二量体化薬AP1903を投与した。

【0076】

50

【図28】図28は、細胞表面マーカーによって示される、形質導入した i C a s p 9 T細胞の細胞系列増大を例示するグラフである。

【図29】図29は、細胞表面マーカーによって示される、形質導入した i C a s p 9 T細胞の細胞系列増大を例示するグラフである。

【0077】

【図30】図30は、二量体化薬 A P 1 9 0 3 を用いた処置後の G v H D の急速な逆転のグラフおよび写真である。(A)は、患者1における処置後24時間以内のビリルビン濃度の正規化を示すグラフである。(B)は、患者2における処置後24時間以内の皮膚発疹消失を示す写真である。

【0078】

【図31】図31は、i C a s p 9 T細胞増大後の急性肝臓 G v H D (グレード2)の発症を例示するグラフである。

【図32】図32は、i C a s p 9 T細胞増大後の急性肝臓 G v H D (グレード2)の発症を例示するグラフである。G v H D の症状を示す患者の写真も示す。

【0079】

【図33】図33は、A P 1 9 0 3 (例えば C I D) を患者に投与した後の i C a s p 9 T細胞の急速かつ効率的な排除を示す図である。

【図34】図34は、A P 1 9 0 3 (例えば C I D) を患者に投与した後の i C a s p 9 T細胞の急速かつ効率的な排除を示す図である。

【0080】

【図35】図35A~35Cは、i n v i v o において A P 1 9 0 3 を用いて処置した後の C D 3 + / C D 1 9 + 前駆体の薬物感受性および抗ウイルス機能の持続を示すグラフである。(A) C D 3 + C D 1 9 + T細胞は A P 1 9 0 3 を用いて処置した5カ月後の末梢血中の C D 3 + 集団内に残る(患者2)。これらの C D 3 + C D 1 9 + 細胞は、F A C S 分析における C D 3 + C D 1 9 + 細胞数の減少によって、および(B)二量体化薬への曝露の前後の i c a s p 9 遺伝子の定量的 P C R 分析によっての両方で評価される通り、i n v i t r o において A P 1 9 0 3 に対する感受性を保持する。(C)患者2から採取した C D 3 + C D 1 9 + 遺伝子改変 T細胞は、C M V で刺激した培養物中の I F N - γ 陽性 C D 3 + C D 1 9 + T細胞の存在によって示される通り、A P 1 9 0 3 の6日前に C M V ペプチド混合物に反応したが、ペプチド混合物中に生存している陰性対照には反

【0081】

【図36】図36は、i C a s p 9 アロ枯渴細胞が A P 1 9 0 3 処置後に G v H D の徴候を伴わずに増大できることを例示するグラフである。

【0082】

【図37】図37は、i C a s p 9 アロ枯渴細胞が A P 1 9 0 3 処置後に G v H D の徴候を伴わずに増大できることを例示するグラフである。A P 1 9 0 3 処置後のナイーブ記憶 T細胞、中心記憶 T細胞およびエフェクター記憶 T細胞の再構成を示すグラフである。

【図38】図38は、i C a s p 9 アロ枯渴細胞が A P 1 9 0 3 処置後に G v H D の徴候を伴わずに増大できることを例示するグラフである。

【0083】

【図39】図39は、i C a s p 9 アロ枯渴 T細胞増大およびドナーキメラ現象の回復を例示するグラフである。実験条件および結果に関するさらなる考察は実施例において示されている。

【0084】

【図40】図40は、T細胞注入前後のウイルス特異的 T細胞を例示するグラフである。

【0085】

【図41】図41は、a s p e r g i l l u s 抗原に応答した患者 P B M C による細胞内

10

20

30

40

50

I F N- γ 産生のレベルを例示するグラフである。

【0086】

【図42】図42は、i C a s p 9 T細胞増大を例示するグラフである。実験条件および結果に関するさらなる考察は実施例において示されている。

【0087】

【図43】図43は、キメラiカスパーゼ9およびCD19ポリペプチドをコードする発現構築物の一部を例示するグラフである。

【0088】

【図44】図44は、カスパーゼ9ポリペプチドのタンパク質構造を例示する図である。基底のシグナル伝達を改変するために、ホモ二量体化 (G 4 0 2 - C - F - N - F 4 0 6)、タンパク質分解およびX I A P - B I R 3ドメインとの相互作用 (淡紅色) において極めて重要であることが以前に報告されている残基、カスパーゼ9の阻害因子 (灰色) (D 3 1 5 - A - P - F 3 1 9、D 3 3 0 - A - I - S - S 3 3 4)、およびカスパーゼ9上のリン酸化部位に対して部位特異的変異誘発を行った。結晶学的構造は1 n w 9 (R C S B P r o t e i n D a t a B a n k) に基づく。65種のi C a s p 9変異体を試験し、基底の活性が低い有望な候補にはS 1 8 3 A、S 1 9 6 D、D 3 3 0 A、およびN 4 0 5 Qが含まれた。

【0089】

【図45】図45は、S E A Pアッセイの分析について提示する図である。基底のシグナル伝達とA P 1 9 0 3に誘導された活性の両方を検討するために、初期継代H E K 2 9 3 T / 1 6細胞106個に種々の量の野生型カスパーゼおよび細胞の生存能力についてのマーカーであるS E A Pを駆動するためにS R α プロモーターを使用する発現プラスミド500 n gを同時トランスフェクトした。製造者の提案に従って、各混合物に抗生物質を伴わないI M D M + 1 0 % F B Sを1 m L添加した。混合物1000 μ lを96ウェルプレートの各ウェルに播種した。トランスフェクションの少なくとも3時間後にA P 1 9 0 3を100 μ l添加した。A P 1 9 0 3を少なくとも24時間にわたって添加した後、上清100 μ lを96ウェルプレートに移し、68℃で30分熱変性させて内在性アルカリホスファターゼを不活化した。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S E A Pによって加水分解して、364 nmで励起させ、448 nmの放出フィルターで検出することができる代謝産物である4-メチルウンベリフェロンにした。S E A Pを細胞の生存能力についてのマーカーとして使用するの、S E A P読み取りの減少がiカスパーゼ9活性の増加に対応する。したがって、A P 1 9 0 3の不在下で、S E A P読み取りがより高いことにより、基底の活性がより低いことが示される。所望のカスパーゼ変異体は、基底のシグナル伝達が減弱しており、A P 1 9 0 3に対する感受性が高い (すなわち、I C₅₀が低い) ものである。この試験の目的は、I C₅₀を有意に損なうことなく基底のシグナル伝達を低下させることである。

【0090】

【図46】図46A~46Cは、種々のキメラ改変カスパーゼ9ポリペプチドの基底のシグナル伝達およびA P 1 9 0 3に誘導されたシグナル伝達に関するデータを例示するグラフである。(46A) H E K 2 9 3細胞百万個当たり1 μ gのキメラ改変カスパーゼ9ポリペプチドをコードするDNAおよび0.5 μ gのp S H 1 - k S E A Pを一過性にトランスフェクトしたH E K 2 9 3 / 1 6細胞のS E A Pアッセイ、トランスフェクションの72時間後。i C a s p 9 D 3 3 0 A、N 4 0 5 Q、およびD 3 3 0 A - N 4 0 5 Q二重変異体の全てで低い基底のシグナル伝達を示された。(46B) H E K 2 9 3細胞百万個当たり0.5 μ gのp S H 1 - k S E A Pと2 μ gのキメラ改変カスパーゼ9ポリペプチドをコードするDNAと一緒にトランスフェクトしたH E K 2 9 3 / 1 6細胞。(46C) キメラ改変カスパーゼ9ポリペプチドの推定A P 1 9 0 3 I C₅₀の要約。全ての変異でA P 1 9 0 3に対するI C₅₀が反対に増加した。データ点は2つのウェルの平均であり、示されているデータは2つの独立した実験を代表するものである。

【0091】

10

20

30

40

50

【図 47】図 47 A～47 B は、キメラ野生型（修飾されていない）カスパーゼ 9 ポリペプチドおよびキメラ改変カスパーゼ 9 ポリペプチドのタンパク質の発現およびタンパク質分解を分析したウエスタンブロットの写真を含む。（47 A）pSH1-iCasp9 WT、D330A、N405Q、または D330A-N405Q 二重変異体 1 μ g または 2 μ g を一過性にトランスフェクトした HEK293T/16 細胞の、トランスフェクションの 72 時間後のウエスタンブロット。どちらのブロットもレーン当たり 33 μ g のタンパク質溶解物をローディングした。ブロットを、1:1000 で希釈し、ヒトカスパーゼ 9 の残基 299～318 を標的とするウサギ抗ヒトカスパーゼ 9 ポリクローナル抗体で標識し、プロセッシングされていない産物と p30 切断産物の両方を検出した。iCasp9 D330A、N405Q、および D330A-N405Q は野生型 iCasp9 と同様のレベルまたはそれよりも高いレベルで発現した。（47 B）ストリッピングしたブロットを抗アクチンポリクローナル抗体で標識することにより、4 A への等量のタンパク質のローディングが示された。

10

【0092】

【図 48】図 48 は、弱毒化した力価測定可能な改変カスパーゼポリペプチドの理論的な用量反応曲線のグラフを提供する。左側は、改変されていないカスパーゼ 9 ポリペプチドの典型的な用量反応曲線に近いものであり、 IC_{50} は約 10 pM である。右側は、仮定上の改変カスパーゼ 9 ポリペプチドを示し、 IC_{50} が低下し、かつ用量反応曲線が伸長する。仮定上の次世代誘導性 CaspaCIDE の用量反応曲線が伸長するにもかかわらず、どちらのポリペプチドによっても調節された力価測定可能な細胞の排除が可能になり得、それにより、医師が、投薬量範囲が異なるにもかかわらず細胞死を定方向に調整することが可能になる。

20

【0093】

【図 49】図 49（A～B）は、健康な男性志願者における用量漸増試験の結果を提供する図である。健康な志願者に示されている用量の AP1903 を注入し、様々な時点で HPLC 分析を使用して AP1903 の血清中レベルを測定した。データにより、AP1903 のピークレベルが約 2 log にわたって確実に力価測定を行うことができるものであり、各用量のほぼ Cmax レベルに 30 分以内に到達することが示されている。

【0094】

【図 50 A】図 50 A～50 B は、カスパーゼ 9 二量体境界面の改変により用量反応曲線がシフトすることを例示する用量反応曲線のグラフを提供する。（50 A）基底のシグナル伝達と AP1903 に誘導された CaspaCIDE 活性の両方を調査するために、初期継代 HEK293T/17 細胞 10⁶ 個に、細胞の生存能力についての代理マーカーである SEAP の転写を調節するために SR α プロモーターを使用して、誘導性カスパーゼバリエーション 2 μ g と発現プラスミド 500 ng を同時トランスフェクトした。IMDM+10% FBS（抗生物質を伴わない）中プラスミド、GeneJammer および HEK293T/17 細胞を含有するトランスフェクション混合物 200 μ l を 96 ウェルプレートの各ウェルに播種した。カスパーゼ活性を誘導するために、トランスフェクションの 24 時間後に、段階希釈した AP1903 を 22 μ l 添加した。（50 B）基底のシグナル伝達および AP1903 に誘導されたシグナル伝達を調査するために、処理の 48 時間後に上清 100 μ l を回収し、68℃で 1 時間熱変性させて内在性アルカリホスファターゼを不活化した。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（4-MUP）基質を SEAP によって加水分解して、ピーク励起が 364 nm でありピーク放出が 448 nm である代謝産物である 4-メチルウンベリフェロンにした。SEAP を細胞の生存能力についての代理マーカーとして使用するの、SEAP 読み取りの減少がカスパーゼ 9 活性の増加に対応する。示されているカスパーゼ変異体の全てで、基底のシグナル伝達の減弱および AP1903 に対するより高い IC_{50} が明らかになった。カスパーゼ F406T で最も高い IC_{50} が示され、その後、F404Y、F404W、およびカスパーゼ 10（ISAQT）、そして N405Q が続いた。

30

40

【図 50 B】同上。

50

【0095】

【図50C】(50C) CaspaCIDE-2. 0候補のAP1903に対する推定IC₅₀の要約である。全ての変異体でSEAP活性およびAP1903に対するIC₅₀の増加が示された。データ点は、2つのウェルの平均を示す。IC₅₀値はGraphPad Prism6で4パラメータ非線形回帰曲線当てはめによって決定した。

【0096】

【図51】図51は、種々の改変カスパーゼ9ポリペプチドに対応するAP1903投薬量に対するIC₅₀チャートである。

【0097】

【図52】図52Aおよび52Bは、上位の改変カスパーゼ変異体の基底のシグナル伝達およびAP1903に誘導されたシグナル伝達を示す図である。(52A) HEK293百万個当たり2μgの変異体カスパーゼポリペプチドおよび0.5μgのpSH1-kSEAPを一過性にトランスフェクトしたHEK293/16の、トランスフェクションの72時間後のSEAPアッセイ。iCASP-9 F404Y、F404W、N405Q、およびF406Tの全てで、WT iカスパーゼ9よりも低い基底のシグナル伝達を示された。(52B) カスパーゼ変異体の基底の活性およびAP1903に対する推定IC₅₀の要約。全ての変異により、AP1903に対するIC₅₀がシフトした。データ点は2つのウェルの平均を反映し、示されているデータは2回の実験を代表するものである。

10

【0098】

【図53A】図53A～53Bは、上位の改変カスパーゼ変異体の基底のシグナル伝達およびAP1903に誘導されたシグナル伝達を示す図である。(53A) HEK293百万個当たり1μg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を一過性にトランスフェクトしたHEK293/16の、トランスフェクションの72時間後のSEAPアッセイ。iCASP-9 D330A、N405Q、およびD330A-N405Q二重変異体の全てで野生型カスパーゼ9と比較して低い基底のシグナル伝達を示された(破線)。(53B) カスパーゼ変異体ポリペプチドのAP1903に対する推定IC₅₀の要約。N405Qでは、AP1903に対するIC₅₀が反対に増加した。D330AとN405Qを組み合わせることではIC₅₀を改善することはできなかった。データ点は3連の平均であり、示されているデータは7回の実験を代表するものである。

20

【図53B】同上。

【0099】

【図54】図54は、T317A変異体およびT317S変異体で観察された基底の活性の低下を示すSEAPアッセイのグラフである。T317A変異およびT317S変異によりXIAP結合が低下する可能性があり、これにより基底のシグナル伝達が増加することが予測され、それと逆のことが観察された。

【0100】

【図55】図55は、T317A変異体およびT317S変異体のSEAPアッセイに関する棒グラフである。T317AおよびT317Sは基底の活性が低いがAP1903に対する感受性は野生型カスパーゼ9とほぼ同等であり、それによりこれらが新しい変異体の良い候補になる。

40

【0101】

【図56】図56は、D330Aバリエーションの基底の活性化およびAP1903に誘導された活性化を示すグラフである。HEK293細胞百万個当たり1μg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を一過性にトランスフェクトしたHEK293/16細胞の、トランスフェクションの72時間後のSEAPアッセイ。各発現プラスミド(WTを含む)2μgに基づいて正規化したデータを1μgに基づく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、iCasp9-D330E、およびiCasp9-D330Sでは野生型カス

50

パーゼー 9 よりも統計学的に低い基底のシグナル伝達を示された。

【0102】

【図 57】図 57 は、 $2\mu\text{g}$ の、pSH1-iCasp9WT、D330A、D330E、D330N、D330V、D330G、および D330S を一過性にトランスフェクトした HEK293T/16 細胞の、トランスフェクションの 72 時間後のウェスタンブロットを示す図である。ブロットを、いくつかのピコルナウイルスに由来する 2A 配列を認識するウサギポリクローナル抗「2A」ペプチドの 1:1000 希釈物で標識した。iCasp9-D330A、iCasp9-D330E、および iCasp9-D330G は野生型 iCasp9 と同様のレベルまたはそれよりも高いレベルで発現した。AP1903 に応答して切断の低下が観察された。* は、SuperSignal MW Protein Ladder (Thermo-Fisher Scientific) の注釈であり、

10

【化 A】



は Precision Plus Protein Dual Color Standard (Bio-Rad) の注釈である。

【0103】

【図 58】図 58 は、VSV-G エンベロープに基づくレトロウイルス上清を用いて交差形質導入した PG13 パッケージング細胞に由来するウイルス力価に対する種々のカスパーゼ変異の影響を示すグラフである。レトロウイルスマスター細胞株産生に対する CaspaCIDE 由来の基底のシグナル伝達の影響を調査するために、レトロウイルスパッケージング細胞株である PG13 に、トランスフェクション-エンハンサーであるポリブレン、 $4\mu\text{g}/\text{ml}$ の存在下、VSV-G に基づくレトロウイルス上清を用いて 5 回交差形質導入した。その後、CaspaCIDE を形質導入した PG13 細胞を、PE とコンジュゲートした抗ヒト CD19 抗体を形質導入の指標として用いて染色した。CaspaCIDE-D330A を形質導入した PG13 細胞、CaspaCIDE-D330E を形質導入した PG13 細胞、および CaspaCIDE-N405Q を形質導入した PG13 細胞では CD19 平均蛍光強度 (MFI) の増強が示され、これにより、レトロウイルスコピー数がより多いことが示され、これは、基底の活性がより低いことを意味する。PG13 形質導入体のウイルス力価をより直接的に調査するために、HT1080 細胞をウイルス上清および $8\mu\text{g}/\text{ml}$ のポリブレンで処理した。PG13 細胞における iCasp9-D330A 形質導入体、iCasp9-N405Q 形質導入体、および iCasp9-D330E 形質導入体の WT iCasp9 に対する CD19 の MFI の増強は、HT1080 細胞において観察された通り、ウイルス力価がより高いことと正に相関する。最初にウイルス力価が低いこと（およそ $1\text{E}5$ 形質導入単位 (TU)/ ml ）に起因して、ウイルス収率を上昇させるための HAT 処理の不在でウイルス力価に差異は観察されなかった。HAT 培地処理を行うと、CaspaCIDE-D330A、CaspaCIDE-N405Q、または CaspaCIDE-D330E を形質導入した PG13 細胞では、より高いウイルス力価が実証された。ウイルス力価（形質導入単位）は、下式で算出される：ウイルス力価 = (形質導入日の細胞数) * (%CD19⁺) / 上清の体積 (ml)。基底の活性が低い CaspaCIDE 変異体の影響をさらに調査するために、CaspaCIDE の個々のクローン（コロニー）を形質導入した PG13 細胞を選択し、増大させた。他のコホートよりも CD19 の MFI が高い CaspaCIDE-N405Q クローンが観察された。

20

30

40

【0104】

【図 59】図 59 は、iCasp9 変異体を形質導入した T 細胞の AP1903 による用量依存的排除を示すグラフである。健康なドナー (n=6) 由来の初代 T 細胞に、変異体または野生型 iCasp9 および $\Delta\text{CD}19$ 細胞表面マーカーをコードするレトロウイル

50

スを形質導入した。形質導入後、iCasp9を形質導入したT細胞を、CD19-マイクロビーズおよび磁気カラムを使用して精製した。次いで、T細胞をAP1903（0～10nM）に曝露し、24時間後に、フローサイトメトリーによってCD3⁺CD19⁺T細胞について測定した。

【0105】

【図60】図60は、iCasp9-D330A変異体により、形質導入されたT細胞におけるAP1903依存性細胞毒性の改善が実証されることを示すグラフである。健康なドナー（n=6）由来の初代T細胞に、変異体または野生型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を形質導入した。形質導入後、iCasp9を形質導入したT細胞を、CD19-マイクロビーズおよび磁気カラムを使用して精製した。次いで、T細胞をAP1903（0～100nM）に曝露し、24時間後に、フローサイトメトリーによってCD3⁺CD19⁺T細胞について測定した。

10

【0106】

【図61】図61は、iCasp9-D330A変異体により、形質導入されたT細胞におけるAP1903依存性細胞毒性の改善が実証されることを示すグラフである。健康なドナー（n=6）由来の初代T細胞に、変異体または野生型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を形質導入した。形質導入後、iCasp9を形質導入したT細胞を、CD19-マイクロビーズおよび磁気カラムを使用して精製した。次いで、T細胞をAP1903（0～100nM）に曝露し、24時間後に、フローサイトメトリーによってCD3⁺CD19⁺T細胞について測定した。iCasp9-D330AのIC₅₀は野生型iCasp9よりも有意に低かった（p=0.002）。

20

【0107】

【図62】図62は、D330ファミリーメンバーにより、形質導入されたT細胞においてD330Aと同様のAP1903依存性細胞毒性が実証されることを示すグラフである。健康なドナー（n=2）由来の初代T細胞に、D330変異体または野生型iCasp9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を形質導入した。形質導入後、iCasp9を形質導入したT細胞を、CD19-マイクロビーズおよび磁気カラムを使用して精製した。次いで、T細胞をAP1903（0～100nM）に曝露し、24時間後に、フローサイトメトリーによってCD3⁺CD19⁺T細胞について測定した。

30

【0108】

【図63】図63は、AP1903に対する感受性が低いiCasp9変異体により、それでも*in vitro*におけるT細胞増殖が制御されることを示すグラフである。活性化T細胞にiCasp9変異体を含有するレトロウイルスを形質導入し、0日目および4日目、その後10日目まで列挙されている日にAP1903で処理した（矢印）。野生型、D330Aおよび他のiCasp9変異体のどちらによっても10日後にT細胞増殖が停止し、T細胞の生存が減少した。

【0109】

【図64】図64は、N405Q変異体の導入遺伝子の発現の改善により形質導入されたT細胞におけるAP1903依存性細胞毒性が改善されることを示すグラフである。T細胞にiCasp9野生型、N405Q、コドン最適化N405QおよびF_v・F_v'・N405QをコードするRD114にシュドタイプされたレトロウイルスを形質導入し、次いで、用量を変動させたAP1903（0～100nM）を用いて処理した。24時間後に、CD3⁺CD19⁺T細胞をフローサイトメトリーによって測定した。パーセント残存を、AP1903を用いない場合のCD3⁺CD19⁺T細胞の頻度に対して正規化した。

40

【0110】

【図65】図65は、野生型iCasp9を形質導入したT細胞の*in vivo*におけ

50

るAP1903による用量依存的排除を示すグラフである。T細胞にSFG-iCasp9-2A-ΔCD19レトロウイルスを形質導入し、免疫不全マウス（NSG）に静脈内注射した。24時間後に、マウスにAP1903（0～5mg/kg）を腹腔内注射した。さらに24時間後、マウスを屠殺し、脾臓（A）および末梢血（B）からリンパ球を単離し、ヒトCD3⁺CD19⁺T細胞の頻度についてフローサイトメトリーによって分析した。

【0111】

【図66】図66は、D330E-iCasp9を形質導入したT細胞のin vivoにおけるAP1903による用量依存的排除を示すグラフである。T細胞にSFG-iCasp9-D330E-2A-ΔCD19レトロウイルスを形質導入し、免疫不全マウス（NSG）に静脈内注射した。24時間後に、マウスにAP1903（0～5mg/kg）を腹腔内注射した。さらに24時間後、マウスを屠殺し、脾臓（A）からリンパ球を単離し、ヒトCD3⁺CD19⁺T細胞の頻度についてフローサイトメトリーによって分析した。これにより、iCasp9-D330EによりAP1903に応答して野生型iCasp9と同様のin vivo細胞毒性プロファイルが実証されることが示される。

10

【発明を実施するための形態】

【0112】

本明細書で使用される場合、「a（1つの）」または「an（1つの）」という単語の使用は、特許請求の範囲および／または本明細書において「含む（comprising）」という用語と同時に使用される場合、「one（1つの）」を意味し得るが、「1つまたは複数の（one or more）」、「少なくとも1つの（at least one）」、および「1つまたは1つ超の（one or more than one）」の意味とも一致する。さらに、「有する（having）」、「含む（including）」、含有する（containing）および「含む（comprising）」という用語は互換的であり、これらの用語が制限のない用語であることは当業者には理解される。

20

【0113】

「同種異系」という用語は、本明細書で使用される場合、抗原性が別個であるHLAまたはMHC遺伝子座を指す。

【0114】

したがって、同じ種から移入された細胞または組織は抗原性が別個であり得る。同系マウスは1つまたは複数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

【0115】

「抗原」という用語は、本明細書で使用される場合、免疫応答を惹起する分子と定義される。この免疫応答には、抗体産生もしくは特定の免疫学的に適格な細胞の活性化のいずれか、またはその両方が伴い得る。

【0116】

「がん」という用語は、本明細書で使用される場合、正常な制御の喪失という独特の形質により、調節されていない成長、分化の欠乏、局所的な組織浸潤、および転移が生じる、細胞の過剰増殖と定義される。例として、これだけに限定されないが、黒色腫、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、脾臓がん、前立腺がん、腎臓がん、骨がん、精巣がん、卵巣がん、中皮腫、子宮頸部がん、胃腸がん、リンパ腫、脳がん、結腸がん、肉腫または膀胱がんが挙げられる。

40

【0117】

ドナー：「ドナー」という用語は、患者レシピエントではない哺乳動物、例えばヒトを指す。ドナーは、例えば、レシピエントとHLA同一であってもよく、レシピエントと部分的またはそれ超のHLA不一致であってもよい。

【0118】

50

ハプロタイプ一致：「ハプロタイプ一致」という用語は、細胞、細胞型および／または細胞系列に関して使用される場合、本明細書では、ハプロタイプを共有する細胞または1つの染色体上で密接に連鎖した遺伝子のセットに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、レシピエントと完全にHLA同一ではなく、部分的なHLA不一致がある。

【0119】

血液疾患：「血液疾患 (blood disease)」、「血液疾患 (blood disease)」および／または「血液の疾患 (diseases of the blood)」という用語は、本明細書で使用される場合、これだけに限定されないが、血液細胞、ヘモグロビン、血液タンパク質、凝固の機構、血液の産生、血液タンパク質の産生など、およびこれらの組合せを含めた、血液およびその成分の産生に影響を及ぼす状態を指す。血液疾患の非限定的な例としては、貧血、白血病、リンパ腫、血液腫瘍、アルブミン血症、血友病などが挙げられる。

10

【0120】

骨髄疾患：「骨髄疾患」という用語は、本明細書で使用される場合、血液細胞および血小板の産生の減少が導かれる状態を指す。いくつかの骨髄疾患では、正常な骨髄構造が感染症（例えば、結核）または悪性腫瘍によって失われる可能性があり、今度はそれにより血液細胞および血小板の産生の減少が導かれる可能性がある。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）、放射能宿酔または中毒、汎血球減少症 (apnocytopenia)、貧血、多発性骨髄腫などが挙げられる。

20

【0121】

T細胞および活性化T細胞 (CD3⁺細胞を意味することも含む)：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グループに属する。リンパ球は、一般に、細胞媒介性免疫に関与する。「T細胞」の「T」は、胸腺に由来するまたはその成熟化が胸腺の影響を受ける細胞であることを指す。T細胞は、B細胞およびナチュラルキラー (NK) 細胞などの他のリンパ球の型とは、T細胞受容体として公知の細胞表面タンパク質が存在することによって区別することができる。「活性化T細胞」という用語は、本明細書で使用される場合、クラスII主要組織適合性 (MHC) マーカーに関して存在する抗原性決定因子を認識することによって免疫応答（例えば、活性化T細胞のクローン増大）を生じるように刺激されたT細胞を指す。T細胞は、抗原性決定因子、サイトカインおよび／またはリンフォカインおよび表面抗原分類細胞表面タンパク質（例えば、CD3、CD4、CD8など、およびこれらの組合せ）の存在によって活性化される。示差的なタンパク質のクラスターを発現する細胞は、多くの場合、T細胞の表面でのそのタンパク質の発現に関して「陽性」とであると言える（例えば、CD3またはCD4の発現に関して陽性である細胞はCD3⁺またはCD4⁺と称される）。CD3タンパク質およびCD4タンパク質は、T細胞におけるシグナル伝達に直接かつ／または間接的に関与し得る細胞表面受容体または補助受容体である。

30

【0122】

末梢血：「末梢血」という用語は、本明細書で使用される場合、血液の循環プールから得られまたは調製され、リンパ系、脾臓、肝臓または骨髄内には隔離されない血液の細胞性成分（例えば、赤血球、白血球および血小板）を指す。

40

【0123】

臍帯血 (umbilical cord blood)：臍帯血 (umbilical cord blood) は、末梢血とは別個のものであり、リンパ系、脾臓、肝臓または骨髄内に隔離される血液である。「臍帯血 (umbilical cord blood)」、「臍帯血 (umbilical blood)」または「臍帯血 (cord blood)」という用語は互換的に使用することができ、胎盤内および出産後の付着した臍帯内に残っている血液を指す。臍帯血 (cord blood) は多くの場合、造血細胞を含めた幹細胞を含有する。

【0124】

50

「得るまたは調製する」とは、例えば、細胞の場合では、細胞または細胞培養物を供給源から単離、精製、または部分的に精製することを意味し、供給源は、例えば、臍帯血、骨髓、または末梢血であってよい。この用語は、供給源または細胞培養物を培養し、細胞を複製した場合、および後代細胞を供給源から目下得ようとしている場合にも当てはめることができる。

【0125】

死滅した細胞のパーセント単位での「死滅させる」または「死滅」とは、アポトーシスを測定するための任意の公知の方法を使用して、例えば、本明細書で考察されているアッセイ、例えば本明細書で考察されているS E A PアッセイまたはT細胞アッセイを使用して測定される、アポトーシスによる細胞の死を意味する。この用語は、細胞の除去も指し得る。

10

【0126】

アロ枯渇：「アロ枯渇」という用語は、本明細書で使用される場合、アロ反応性T細胞の選択的な枯渇を指す。「アロ反応性T細胞」という用語は、本明細書で使用される場合、例えば、移植された同種異系移植片などの外来細胞への曝露に反応して免疫応答を生じるように活性化されたT細胞を指す。選択的な枯渇は、一般に、免疫磁気ビーズ、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（*photodepletion*）技法など、またはこれらの組合せを使用して除去するための種々の細胞表面に発現するマーカーまたはタンパク質（例えば、時には表面抗原分類タンパク質（CDタンパク質）、CD19などをターゲティングすることを伴う。本方法では、アロ枯渇の前またはその後、細胞にキメラタンパク質をコードするベクターを形質導入またはトランスフェクトすることができる。また、アロ枯渇ステップを伴わずに、細胞にキメラタンパク質をコードするベクターを形質導入またはトランスフェクトし、アロ枯渇させていない細胞を患者に投与することができる。このことができる。「安全スイッチ」の付加により、多量体リガンドを投与した際に例えば移植片対宿主病などの有害事象が緩和され得るので、例えば、アロ枯渇させていないT細胞を投与することが可能である。

20

【0127】

移植片対宿主病：「移植片対宿主病」または「G v H D」という用語は、多くの場合に同種異系骨髓移植に付随し、時には免疫無防備の患者への非放射線照射血液の輸注に付随する合併症を指す。移植片対宿主病は、時には、移植された骨髓中の機能的な免疫細胞によりレシピエントが「外来」と認識され、免疫学的応答が開始された場合に起こり得る。G v H Dは、急性型と慢性型に分けることができる。急性G V H D（a G V H D）は、多くの場合、移植または輸注後の最初の100日以内に観察され、肝臓、皮膚、粘膜、免疫系（例えば、造血系、骨髓、胸腺など）、肺および胃腸管に影響を及ぼし得る。慢性G V H D（c G V H D）は多くの場合、移植または輸注後100日またはそれ以降に始まり、急性G v H D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G v H Dは、時にはレース状のびまん性斑状丘疹状皮疹を生じ得る。移植片対宿主病は、特定のステージを有すると診断することができる。疾患の緩和は、例えば、疾患のステージを低下させることを含み得る。例えば、処置後には、ステージ4の症状を示していた患者がステージ3、ステージ2、もしくはステージ1の症状を示す、またはG v H Dの症状を示さない可能性がある。

30

40

【0128】

ドナーT細胞：「ドナーT細胞」という用語は、本明細書で使用される場合、多くの場合、同種異系幹細胞移植後に抗ウイルス免疫および／または抗腫瘍免疫を付与するためにレシピエントに投与されるT細胞を指す。ドナーT細胞は、多くの場合、骨髓移植片拒絶を阻害し、アロ生着（*alloengraftment*）の成功を増加させるために利用されるが、同じドナーT細胞により、宿主抗原に対するアロ攻撃性（*alloaggressive*）応答が引き起こされ、今度はそれにより移植片対宿主病（G V H D）が生じる恐れがある。ある特定の活性化されたドナーT細胞により、他の活性化T細胞よりも高いまたは低いG v H D応答が引き起こされ得る。ドナーT細胞は、レシピエント腫瘍細胞

50

に対しても反応性であり得、それにより、有益な移植片対腫瘍効果が引き起こされる。

【0129】

間葉系間質細胞：「間葉系間質細胞」または「骨髄由来間葉系間質細胞」という用語は、本明細書で使用される場合、*ex vivo*、*in vitro*および*in vivo*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る多分化能幹細胞を指し、さらに、標準の培養条件でプラスチック培養皿に接着し、造血系列マーカーについて陰性であり、CD73、CD90およびCD105について陽性である単核骨髄細胞の画分として定義することもできる。

【0130】

胚性幹細胞：「胚性幹細胞」という用語は、本明細書で使用される場合、細胞50～150個の初期段階の胚である胚盤胞の内部細胞塊に由来する多能性幹細胞を指す。胚性幹細胞は、無制限に再生できること、および3つの一次胚葉、外胚葉、内胚葉および中胚葉の全ての誘導体に分化的分化できることを特徴とする。多能性と多分化能は、多能性細胞からは全ての細胞型が生成し得るが、多分化能細胞（例えば、成体幹細胞）からは限られた数の細胞型のみが産生され得るという点で区別される。

【0131】

誘導性多能性幹細胞：「誘導性多能性幹細胞」または「人工多能性幹細胞」という用語は、本明細書で使用される場合、「再プログラミング」された、または、胚性幹細胞のような、全てではないにしろ多くの細胞型に分化することが可能な細胞を生成するための遺伝学的操作（例えば、順に多能性を活性化させる遺伝子の発現）、生物学的操作（例えば、処置ウイルスまたはレトロウイルス）および／もしくは化学的操作（例えば、小分子、ペプチドなど）によって誘導される成体細胞、または分化細胞を指す。誘導性多能性幹細胞は、中間または最終分化した状態（例えば、皮膚細胞、骨細胞、線維芽細胞など）を実現し、次いで、脱分化するように誘導し、それにより、多分化能または多能性細胞を生成する能力の一部または全部を再度獲得することができるという点で胚性幹細胞と区別される。

【0132】

CD34⁺細胞：「CD34⁺細胞」という用語は、本明細書で使用される場合、細胞表面にCD34タンパク質を発現する細胞を指す。「CD34」とは、本明細書で使用される場合、多くの場合に細胞間接着因子として作用し、リンパ節へのT細胞の進入に関与する、「表面抗原分類」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）を指す。CD34はまた、幹細胞の骨髄、細胞外マトリックスまたは直接間質細胞への付着を媒介し得る。CD34⁺細胞は、多くの場合、臍帯および骨髄において、造血細胞、間葉系幹細胞のサブセット、内皮前駆細胞、血管の内皮細胞（しかしリンパ管の内皮細胞ではない（胸膜リンパ管以外））、肥満細胞、間質および皮膚の真皮の付属器周辺の樹状細胞の亜集団（第XIII因子陰性である）、ならびにある特定の軟部組織腫瘍（例えば、胞巣状軟部肉腫、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、巨細胞線維芽細胞腫、顆粒球性肉腫、カボジ肉腫、脂肪肉腫、悪性線維性組織球腫、悪性末梢神経鞘腫瘍、髄膜血管外皮腫（*meningeal hemangiopericytoma*）、髄膜腫、神経線維腫、神経鞘腫、および甲状腺乳頭癌）内の細胞として見出される。

【0133】

腫瘍浸潤リンパ球（TIL）とは、標的化様式で腫瘍に浸潤し、腫瘍細胞を死滅させる種々の受容体を有するT細胞を指す。本出願の方法を使用してTILの活性を調節することにより、腫瘍細胞の排除をより直接的に制御することが可能になる。

【0134】

遺伝子発現ベクター：「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」という用語は、本明細書で使用される場合、文書全体を通して互換的に使用することができ、一般に、宿主細胞において複製させることができ、遺伝子（複数可）を宿

10

20

30

40

50

主細胞に導入するために利用することができる核酸分子（例えば、プラスミド、ファージ、自己複製配列（A R S）、人工染色体、酵母人工染色体（例えば、Y A C））を指す。発現ベクターに導入される遺伝子は、内在性遺伝子（例えば、宿主細胞または生物体において通常見出される遺伝子）であっても異種遺伝子（例えば、宿主細胞または生物体のゲノムまたは染色体外核酸において通常は見出されない遺伝子）であってもよい。発現ベクターによって細胞に導入される遺伝子は、ネイティブな遺伝子（複数可）であっても改変または工学的に操作された遺伝子であってもよい。遺伝子発現ベクターを、時には発現ベクターに保有される遺伝子（複数可）の効率的な転写を容易にするまたは増強することができ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機能し得る 5' 非翻訳調節配列および 3' 非翻訳調節配列を含有するように工学的に操作することもできる。時には、遺伝子発現ベクターを特定の細胞型、細胞の場所、または組織型における複製および／または発現機能（例えば、転写および翻訳）について工学的に操作することもできる。発現ベクターは、時には、ベクターを宿主またはレシピエント細胞内に維持するための選択マーカーを含む。

10

【0135】

発生的に調節されるプロモーター：「発生的に調節されるプロモーター」という用語は、本明細書で使用される場合、発生のプログラムまたは経路によって制御、開始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ための R N A 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を指す。発生的に調節されるプロモーターは、多くの場合、プロモーター領域またはその近くに、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を及ぼし得る転写の活性化因子またはリプレッサーとの結合のための追加的な制御領域を有する。発生的に調節されるプロモーターは、時には、遺伝子産物が細胞の発生的分化に影響を及ぼす遺伝子の転写に関与する。

20

【0136】

発生的に分化した細胞：「発生的に分化した細胞」という用語は、本明細書で使用される場合、特定の機能を果たすために細胞が特殊化の程度が低い形態から特殊化の程度が高い形態に進化する、特定の発生的に調節される遺伝子の発現を伴うことも多いプロセスを受けた細胞を指す。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。発生的分化の変化は、一般に、遺伝子発現の変化（例えば、遺伝子発現のパターンの変化）、遺伝子再組織化（例えば、それぞれサイレンシングする遺伝子または発現させる遺伝子を隠すまたは露出させるためのリモデリングまたはクロマチン）を含み、D N A 配列（例えば、免疫多様性分化）の変化を含む時もある。発生の間の細胞の分化は、遺伝子調節ネットワークの結果と理解することができる。調節性遺伝子およびそのシス調節性モジュールは、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するタンパク質）を受け、ネットワークの他の箇所にアウトプット（例えば、発生の経路またはプログラムの下流の他の遺伝子に作用する発現した遺伝子産物）を生じる遺伝子調節ネットワークにおけるノードである。

30

【0137】

「細胞」、「細胞株」および「細胞培養物」という用語は、本明細書で使用される場合、互換的に使用することができる。これらの用語は全て、任意のかつ全てのその後の世代である、それらの後代も含む。意図的なまたは偶発的な変異に起因して、全ての後代が同一なのではない可能性があることが理解される。

40

【0138】

本明細書で使用される場合、「i カスパーゼ-9 分子」、ポリペプチド、またはタンパク質という用語は、誘導性カスパーゼ-9 と定義される。「i カスパーゼ-9」という用語は、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、天然の i カスパーゼ-9 のヌクレオチド配列もしくはアミノ酸配列のいずれか、または C A R D ドメインを欠く短縮型配列も包含する。ポリペプチドが「改変された」ものであることが、この用語を使用することまたは他の手段によって示されていない場合、「カスパーゼ-9 ポリペプチド」は、「野生型」で

50

あるとみなされる。「野生型」カスパーゼー9ポリペプチドとは、本明細書において提供される実験の詳細に関しては、CARDドメインを欠くカスパーゼー9ポリペプチドを意味する。

【0139】

本明細書で使用される場合、「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」という用語は、それぞれ誘導性カスパーゼ1、誘導性カスパーゼ3、または誘導性カスパーゼ8と定義される。iカスパーゼ1、iカスパーゼ3、またはiカスパーゼ8という用語は、それぞれ、iカスパーゼ1、iカスパーゼ3、もしくはiカスパーゼ8の核酸、iカスパーゼ1、iカスパーゼ3、もしくはiカスパーゼ8のポリペプチドおよび／またはiカスパーゼ1、iカスパーゼ3、もしくはiカスパーゼ8の発現ベクターを包含する。この用語は、それぞれ天然のiカスパーゼー1、iカスパーゼー3、もしくはiカスパーゼー8のヌクレオチド配列もしくはアミノ酸配列、またはCARDドメインを欠く短縮型配列のいずれかも包含する。

10

【0140】

改変カスパーゼー9ポリペプチドは、改変カスパーゼー9ポリペプチドを含むキメラポリペプチドでの基底の活性またはIC₅₀に影響を及ぼす少なくとも1つのアミノ酸置換を含む。基底の活性およびIC₅₀を試験するための方法は本明細書で考察されている。改変されていないカスパーゼー9ポリペプチドは、この種のアミノ酸置換を含まない。改変カスパーゼー9ポリペプチドと改変されていないカスパーゼー9ポリペプチドはどちらも、例えばCARDドメインを除去するために短縮されたものであってよい。

20

【0141】

「機能保存的バリエーション」とは、これだけに限定されないが、アミノ酸の、極性または非極性、サイズ、形状および電荷を含めた性質が類似したアミノ酸での置き換えを含め、タンパク質または酵素の全体的なコンフォメーションおよび機能を変更することなく所与のアミノ酸残基を変化させたタンパク質または酵素である。一般に公知の遺伝子によってコードされていないアミノ酸の多くに対する保存的アミノ酸置換は当技術分野で周知である。他のコードされていないアミノ酸に対する保存的置換は、それらの物理特性に基づいて、遺伝子によってコードされているアミノ酸の性質と比較して決定することができる。

【0142】

保存的であることが示されているアミノ酸以外のアミノ酸がタンパク質または酵素において異なる可能性があり、したがって、機能が類似した任意の2つのタンパク質間のパーセントタンパク質配列類似性またはパーセントアミノ酸配列類似性は変動し得、例えば、アラインメントスキームに従って決定して、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは少なくとも95%であり得る。本明細書で言及される場合、「配列類似性」とは、ヌクレオチド配列またはタンパク質配列が関連する程度を意味する。2つの配列間の類似性の程度は、パーセント配列同一性および／または保存に基づくものであってよい。「配列同一性」とは、本明細書では、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。「配列アラインメント」とは、類似性の程度を評価する目的で2つまたはそれ超の配列を整列させて最大レベルの同一性（および、アミノ酸配列の場合では、保存）を実現するプロセスを意味する。例えば、類似性がMEGALIGNアルゴリズムに基づくものであるCluster Method、ならびにBLASTN、BLASTP、およびFASTAなどの、配列をアラインメントし、類似性／同一性を評価するための多数の方法が当技術分野で公知である。これらのプログラムのいずれかを使用する場合にも、最も高い配列類似性がもたらされる設定が好ましい。

30

40

【0143】

本明細書で言及されるアミノ酸残基数は、短縮されておらず改変されていないカスパーゼー9ポリペプチドにおけるアミノ酸位、例えば、配列番号9のアミノ酸位を反映する。配列番号9には、CARDドメインを含まない短縮型カスパーゼー9ポリペプチドのアミノ酸配列が提示されている。したがって、配列番号9は、全長カスパーゼー9アミノ酸配

50

列に関してアミノ酸残基番号135で始まり、アミノ酸残基番号416で終わる。当業者は、所望であれば、例えば、本明細書で考察されている配列アラインメント方法を使用してアミノ酸残基数を相関させるために、配列をカスパーゼー9ポリペプチドの他の配列とアラインメントすることができる。

【0144】

本明細書で使用される場合、「cDNA」という用語は、メッセンジャーRNA (mRNA) を鋳型として使用して調製されたDNAを指すものとする。ゲノムDNAまたはゲノムのプロセッシングされていないまたは部分的にプロセッシングされたRNA鋳型から重合させたDNAとは対照的にcDNAを使用することの利点は、cDNAが対応するタンパク質のコード配列を主に含有することである。最適な発現のために非コード領域が必要である場合、またはイントロンなどの非コード領域をアンチセンス戦略の標的とする場合など、完全なまたは部分的なゲノム配列を使用する時がある。

10

【0145】

本明細書で使用される場合、「発現構築物」または「導入遺伝子」という用語は、遺伝子産物をコードする核酸を含有し、転写することができる配列をコードする核酸の一部または全部をベクターに挿入することができる、任意の型の遺伝子構築物と定義される。転写物はタンパク質に翻訳されるが、これは必要ない。ある特定の実施形態では、発現は、遺伝子の転写とmRNAの遺伝子産物への翻訳の両方を含む。他の実施形態では、発現は、目的の遺伝子をコードする核酸の転写のみを含む。「治療用構築物」という用語は、発現構築物または導入遺伝子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、がんなどの過剰増殖性疾患または障害を処置するための療法として使用することができ、したがって、発現構築物または導入遺伝子は、治療用構築物または予防用構築物である。

20

【0146】

本明細書で使用される場合、「発現ベクター」という用語は、転写することができる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有するベクターを指す。いくつかの場合には、次いで、RNA分子をタンパク質、ポリペプチド、またはペプチドに翻訳する。他の場合、例えばアンチセンス分子またはリボザイムの作製においては、これらの配列を翻訳しない。発現ベクターは、種々の制御配列を含有してよく、制御配列とは、特定の宿主生物体における作動可能に連結したコード配列の転写および場合によって翻訳に必要な核酸配列を指す。転写および翻訳を支配する制御配列に加えて、ベクターおよび発現ベクターは、他の機能も果たす、下で考察されている核酸配列も含有してよい。

30

【0147】

本明細書で使用される場合、「ex vivo」という用語は、体の「外」を指す。「ex vivo」および「in vitro」という用語は、本明細書では互換的に使用することができる。

【0148】

本明細書で使用される場合、「機能的に同等」という用語は、カスパーゼー9、または短縮型カスパーゼー9に関しては、例えば、アポトーシス性の応答を刺激する、カスパーゼー9の核酸断片、バリエーション、もしくは類似体を指し、カスパーゼー9ポリペプチドをコードする核酸、またはカスパーゼー9ポリペプチドを指す。「機能的に同等」とは、例えば、CARDドメインを欠くが、アポトーシス性細胞応答を誘導することができるカスパーゼー9ポリペプチドを指す。「機能的に同等」という用語は、例えば、CD19、5'LTR、多量体リガンド結合性領域、またはCD3などの他の核酸またはポリペプチドに適用する場合、本発明の方法の参照ポリペプチドを同じまたは同様の活性を有する断片、バリエーションなどを指す。

40

【0149】

本明細書で使用される場合、「遺伝子」という用語は、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定義される。理解される通り、この機能用語は、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

50

現する、または発現するように適合させたゲノム配列、cDNA配列、およびより小さな工学的に操作された遺伝子セグメントを含む。

【0150】

「過剰増殖性疾患」という用語は、細胞の過剰増殖から生じる疾患と定義される。例示的な過剰増殖性疾患としては、これだけに限定されないが、がんまたは自己免疫疾患が挙げられる。他の過剰増殖性疾患として、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を挙げることができる。

【0151】

「免疫原性組成物」または「免疫原」という用語は、免疫応答を惹起することが可能な物質を指す。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、およびがん細胞で発現する腫瘍関連抗原が挙げられる。

10

【0152】

「免疫無防備」という用語は、本明細書で使用される場合、免疫系が低下しているまたは弱まっている対象と定義される。免疫無防備の状態は、免疫系の欠損もしくは機能不全、または感染症および／または疾患に対する易罹患性を高める他の因子に起因し得る。そのようなカテゴリー化により、評価するための概念的な基礎がもたらされるが、免疫無防備の個体は、多くの場合、1つの群または他の群に完全には当てはまらない。体内の防御機構における2つ以上の欠損が影響を受け得る。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、抗ウイルス療法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も有し得る、または皮膚および粘膜の完全性が破られることが原因で免疫無防備であり得る。免疫無防備の状態は、静脈内薬物乱用に起因する留置中心線もしくは他の型の機能障害によって生じ得る、または、二次性悪性腫瘍、栄養不良、または結核もしくは性感染する疾患、例えば、梅毒もしくは肝炎などの他の感染因子に感染していることによって引き起こされる。

20

【0153】

本明細書で使用される場合、「薬学的にまたは薬理学的に許容される」という用語は、動物またはヒトに投与した際に有害な反応、アレルギー性反応、または他の不都合な反応を生じさせない分子実体および組成物を指す。

【0154】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される担体」とは、任意のかつ全ての溶媒、分散媒、コーティング、抗細菌剤および抗真菌剤、等張化剤および吸収遅延剤などを含む。そのような媒体および薬剤の薬学的に活性な物質への使用は当技術分野において周知である。本明細書で提示されているベクターまたは細胞と適合しない場合を除き、任意の従来の培地または薬剤の治療用組成物への使用が意図されている。補足的な活性成分も組成物中に組み入れることができる。

30

【0155】

本明細書で使用される場合、「ポリヌクレオチド」という用語は、ヌクレオチドの鎖と定義される。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、核酸とポリヌクレオチドは、本明細書で使用される場合、互換的である。核酸はポリヌクレオチドであり、単量体「ヌクレオチド」に加水分解することができる。単量体ヌクレオチドはヌクレオシドに加水分解するすることができる。本明細書で使用される場合、ポリヌクレオチドは、これだけに限定することなく、組換え手段、すなわち、通常のコローニング技術およびPCR（商標）などを使用した組換えライブラリーまたは細胞ゲノム由来の核酸配列のコローニングを含めた、当技術分野において利用可能な任意の手段によって、および合成手段によって得られる全ての核酸配列を含むが、これだけに限定されない。さらに、ポリヌクレオチドは、これだけに限定されないが、当技術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ポリヌクレオチドの変異を含む。核酸は、1つまたは複数のポリヌクレオチドを含み得る。

40

【0156】

本明細書で使用される場合、「ポリペプチド」という用語は、通常は定義済みの配列を

50

有するアミノ酸残基の鎖と定義される。本明細書で使用される場合、ポリペプチドという用語は、「ペプチド」および「タンパク質」という用語と交換することができる。

【0157】

本明細書で使用される場合、「プロモーター」という用語は、遺伝子の特異的な転写を開始するために必要な、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配列と定義される。

【0158】

「トランスフェクション」および「形質導入」という用語は互換的であり、外因性DNA配列を真核宿主細胞に導入するプロセスを指す。トランスフェクション（または形質導入）は、電気穿孔、微量注射、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などを含めたいくつもの手段の任意の1つによって実現することができる。

10

【0159】

本明細書で使用される場合、「同系 (syngeneic)」という用語は、同一であるまたは組織移植を可能にするのに十分に密接に関連する、または免疫学的に適合性である遺伝子型を有する細胞、組織または動物を指す。例えば、一卵性双生児または同じ近交系の動物。同系 (syngeneic) と同系 (isogeneic) は互換的に使用することができる。

【0160】

「患者」または「対象」という用語は互換的であり、本明細書で使用される場合、これだけに限定されないが、生物体または動物；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めた哺乳動物；例えば、鳥類（例えば、ニワトリまたはアヒル）または魚などの哺乳動物ではない脊椎動物、および哺乳動物ではない無脊椎動物を含めた非哺乳動物を含む。

20

【0161】

本明細書で使用される場合、「転写制御下で」または「作動可能に連結した」という用語は、プロモーターが、RNAポリメラーゼによる開始および遺伝子の発現を制御するために核酸との関連で正しい位置および方向にあると定義される。

【0162】

本明細書で使用される場合、「処置」、「処置する」、「処置された」、または「処置すること」という用語は、予防法および／または療法を指す。

30

【0163】

本明細書で使用される場合、「ワクチン」という用語は、動物に投与することができる形態にある、本明細書で提示されている組成物を含有する製剤を指す。一般には、ワクチンは、組成物が懸濁または溶解している従来の生理食塩水または緩衝水溶液媒体を含む。この形態では、組成物を、状態を予防する、好転させる、または他の点で処置するために都合よく使用することができる。対象に導入されたら、ワクチンは、これだけに限定されないが、抗体の産生、サイトカインおよび／または他の細胞応答を含めた免疫応答を惹起することができる。

40

【0164】

一部の実施形態では、核酸はウイルスベクター中に含有される。ある特定の実施形態では、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では、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。一部の実施形態では、抗原提示細胞をウイルスベクターと *ex vivo* で接触させ、一部の実施形態では、抗原提示細胞をウイルスベクターと *in vivo* で接触させることが理解される。

造血幹細胞および細胞療法

【0165】

造血幹細胞は、成熟血液細胞型に分化することができる造血前駆細胞、未成熟、多分化

50

能細胞を含む。これらの幹細胞および前駆細胞は、骨髄および臍帯血から単離することができ、一部の場合には末梢血から単離することができる。他の幹細胞および前駆細胞としては、例えば、間葉系間質細胞、胚性幹細胞、および誘導性多能性幹細胞が挙げられる。

【0166】

標準の培養条件でプラスチック培養皿に接着する単核骨髄細胞の画分と定義されている骨髄由来間葉系間質細胞 (MSC) は、造血系列マーカーについて陰性であり、CD73、CD90およびCD105について陽性であり、また、*in vitro*において脂肪細胞、骨芽細胞、および軟骨芽細胞に分化することができる。生理的役割の1つは造血の支持であると推定されるが、いくつかの報告により、MSCが瘢痕組織および新生物組織などの活動的に成長している領域に組み入れられ、場合によって増殖することができること、およびそれらのネイティブな微小環境に向かい、疾患細胞の機能に取って代わることができることも確立されている。MSCは、それらの分化潜在性およびホーミング能力により、再生適用のためにそれらのネイティブな形態で、または活性な生物学的薬剤を疾患のある骨髄または転移性沈着などの特定の微小環境に送達するためにそれらの遺伝子改変によってのいずれかで、細胞療法のための魅力的なビヒクルになっている。さらに、MSCは、強力な内因性免疫抑制性活性を有し、現在まで、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度の高い適用が見出されている (Pittenger, M. F. ら (1999年)。Science 284巻: 143~147頁; Dominici, M. ら (2006年)。Cytotherapy 8巻: 315~317頁; Prockop, D. J. (1997年)。Science 276巻: 71~74頁; Lee, R. H. ら (2006年)。Proc Natl Acad Sci U S A 103巻: 17438~17443頁; Studeny, M. ら (2002年)。Cancer Res 62巻: 3603~3608頁; Studeny, M. ら (2004年)。J Natl Cancer Inst 96巻: 1593~1603頁; Horwitz, E. M. ら (1999年)。Nat Med 5巻: 309~313頁; Chamberlain, G. ら (2007年)。Stem Cells 25巻: 2739~2749頁; Phinney, D. G. および Prockop, D. J. (2007年)。Stem Cells 25巻: 2896~2902頁; Horwitz, E. M. ら (2002年)。Proc Natl Acad Sci U S A 99巻: 8932~8937頁; Hall, B. ら (2007年)。Int J Hematol 86巻: 8~16頁; Nauta, A. J. および Fibbe, W. E. (2007年)。Blood 110巻: 3499~3506頁; Le Blanc, K. ら (2008年)。Lancet 371巻: 1579~1586頁; Tyndall, A. および Uccelli, A. (2009年)。Bone Marrow Transplant)。

【0167】

MSCは数百名の患者に注入されており、報告された副作用は最小限である。しかし、経過観察は限定されており、長期の副作用は未知であり、それらの*in vivo*における、例えば軟骨もしくは骨への分化を誘導するため、またはそれらを遺伝子改変してそれらの機能性を増強するための今後の試みを伴うような結果はわずかしかなかった。いくつかの動物モデルには安全性の懸念が生じている。例えば、マウス由来MSCでは培養物における自然骨肉腫形成が観察された。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いてMSCの局所注射後の異所性骨化および石灰化病巣が記載されており、また、それらの催不整脈の潜在性も新生児ラット心室筋細胞との共培養実験において明らかになっている。さらに、イヌにおける骨髄移植後に、おそらく移植された間質成分に起因する両側性びまん性肺骨化症が観察された (Horwitz, E. M. ら (2007年)。Biol Blood Marrow Transplant 13巻: 53~57頁; Tolar, J. ら (2007年)。Stem Cells 25巻: 371~379頁; Yoon, Y.-S. ら (2004年)。Circulation 109巻: 3154~3157頁; Breitbach, M. ら (2007年)。Bl

ood 110 巻：1362～1369 頁；Chang, M. G. ら（2006 年）。Circulation 113 巻：1832～1841 頁；Sale, G. E、および Storb, R.（1983 年）。Exp Hematol 11 巻：961～966 頁）。

【0168】

細胞療法の別の例では、がんを処置するために、キメラ抗原受容体をコードする核酸で形質導入された T 細胞が患者に投与されている（Zhong, X. -S、（2010 年）Molecular Therapy 18 巻：413～420 頁）。例えば、ヒト化モノクローナル抗体であるトラスツズマブ（Herceptin）に基づくキメラ抗原受容体を発現する T 細胞ががん患者を処置するために使用されている。しかし、有害事象の可能性があり、少なくとも 1 つの報告された症例では、当該療法には患者に対する致死的な結果があった（Morgan, R. A. ら、（2010 年）Molecular Therapy 18 巻：843～851 頁）。本明細書で提示されているキメラカスパーゼ-9 に基づく安全スイッチを有する細胞を形質導入することにより、有害事象が進行するのを止めることができる安全スイッチがもたらされる。「キメラ抗原受容体」または「CAR」とは、例えば、膜貫通ポリペプチドと連結し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）と、T 細胞が活性化され、特異免疫がもたらされるように選択された細胞内ドメインポリペプチドとを含むキメラポリペプチドを意味する。抗原認識ドメインは、単鎖可変断片（ScFv）であってもよく、例えば、T 細胞受容体またはパターン認識受容体などの他の分子に由来するものであってもよい。細胞内ドメインは、T 細胞の活性化を引き起こすポリペプチド、例えば、これだけに限定されないが、CD3 ゼータなど、および、例えば、同時刺激分子、例えば、これだけに限定されないが、CD28、OX40 および 4-1BB を少なくとも 1 つ含む。「キメラ抗原受容体」という用語は、抗体に由来するものではないが、キメラ T 細胞受容体であるキメラ受容体も指し得る。これらのキメラ T 細胞受容体は、標的抗原を認識するポリペプチド配列を含んでよく、認識配列は、例えば、これだけに限定されないが、T 細胞受容体または scFv に由来する認識配列であってよい。細胞内ドメインポリペプチドは、T 細胞が活性化されるように作用するものである。キメラ T 細胞受容体は、例えば、Gross, G、および Eshar, Z、FASEB Journal 6 巻：3370～3378 頁（1992 年）、ならびに Zhang, Y. ら、PLOS Pathogens 6 巻：1～13 頁（2010 年）において考察されている。

【0169】

「由来」とは、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が理解される。細胞内ドメインは、T 細胞の活性化を引き起こすポリペプチド、例えば、これだけに限定されないが、CD3 ゼータなど、および、例えば、同時刺激分子、例えば、これだけに限定されないが、CD28、OX40 および 4-1BB などの少なくとも 1 つを含む。

【0170】

細胞療法の別の例では、T 細胞を、非機能性 TGF-β 受容体を発現し、それにより、それらが TGF-β に対して抵抗性になるように改変する。これにより、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が可能になり、細胞を細胞療法において使用することが可能になる（Bollard, C. J. ら、（2002 年）Blood 99 巻：3179～3187 頁；Bollard, C. M. ら、（2004 年）J. Exptl. Med. 200 巻：1623～1633 頁）。しかし、改変された T 細胞はいまや正常な細胞制御の一部を欠き、これらの治療用 T 細胞自体が悪性になる可能性があるので、T 細胞リンパ腫、または他の有害作用も生じる可能性がある。本明細書で提示されているキメラカスパーゼ-9 に基づく安全スイッチを有するこれらの改変された T 細胞を形質導入することにより、この結果を回避することができる安全スイッチがもたらされる。

【0171】

細胞療法において使用される、改変された受容体、またはキメラ受容体などの異種遺伝子を発現する細胞に、細胞に異種遺伝子を形質導入する前、その後、またはそれと同時にキメラカスパーゼ-9に基づく安全スイッチをコードする核酸を形質導入することができる。

ハプロタイプ一致幹細胞移植

【0172】

幹細胞移植は、造血幹細胞およびそれらの後代を伴う多種多様な疾患を処置する有効な手段であることが証明されているが、組織適合ドナーの不足が、当該手法の最も広い適用に対する主要な妨害であることが証明されている。非血縁の幹細胞ドナーの大きなパネルおよび／または臍帯血バンクを導入することが問題の緩和に役立っているが、多くの患者がいずれの供給源にも適さないままになっている。適合ドナーが見つかった場合でさえ、検索の開始から幹細胞の採取までの経過時間は通常3カ月を超え、これは、貧困患者の多くを運命付け得る遅延である。したがって、HLAハプロタイプ一致家族ドナーを使用することによりかなりの関心が寄せられている。そのようなドナーは親、同胞または第二度近親者であり得る。移植片拒絶の問題は、適切な条件付けと大きな用量の幹細胞を組み合わせることによって克服することができ、同時に、移植片対宿主病（GvHD）を、広範囲にわたるドナー移植片のT細胞枯渇によって予防することができる。そのような手順の即時の転帰は、移植後免疫抑制の不在でさえ、成体および小児のどちらにおいても生着率は90%超であり、重症GvHD率は10%未満であるという満足のいくものになっている。残念ながら、広範囲にわたるT細胞枯渇およびドナーとレシピエントの間のHLA不一致と併せて移植手順のきわめて大きな免疫抑制により、非常に高率の移植後感染性合併症が生じ、疾患再発の発生率が高くなった。

【0173】

ドナーT細胞注入は、同種異系幹細胞移植後に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の患者へのT細胞の単純な追加輸注ではうまくいかない可能性があり、アロ反応性T細胞の頻度が、例えばウイルス特異的Tリンパ球の頻度よりも何桁も多い。まずアロ反応性細胞を枯渇させたドナーT細胞を投与することによって免疫再構成を加速する方法が開発中である。これを実現する1つの方法は、ドナーT細胞を、レシピエントEBVで形質転換したBリンパ芽球様細胞株（LCL）を用いて刺激することである。アロ反応性T細胞は、CD25発現を上方制御するものであり、CD25 Mab免疫毒素コンジュゲート、RFIT5-SMPT-dgAによって排除される。この化合物は、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-アルファ-メチル-L-（2-ピリジルチオ）トルエン]を介して化学的に脱グリコシル化したリシンA鎖（dgA）とコンジュゲートしたマウスIgG1抗CD25（IL-2受容体アルファ鎖）からなる。

【0174】

LCL刺激後にCD25免疫毒素を用いて処理することにより、アロ反応性細胞の90%超が枯渇する。第I相臨床試験では、アロ枯渇させたドナーT細胞をT細胞枯渇ハプロタイプ一致SCTのレシピエントを2つの用量レベルで注入した後に、CD25免疫毒素を使用してアロ反応性リンパ球の免疫再構成を枯渇させた。8名の患者を用量当たり1kg当たり細胞 10^4 個で処置し、8名の患者は用量当たり1kg当たり細胞 10^5 個を受けた。用量当たり1kg当たり細胞 10^5 個を受けた患者では、SCTの3カ月後、4カ月後、および5カ月後に、用量当たり1kg当たり細胞 10^4 個を受けた患者と比較してT細胞の回復の有意な改善が示された（ $P < 0.05$ ）。エフェクター記憶（CD45RA（-）CCR-7（-））集団が増大した結果としてT細胞の回復の加速が起こり（ $P < 0.05$ ）、これにより、防御的なT細胞応答の寿命が長くなる可能性がある。T細胞受容体シグナル接合部切除サークル（T-cell-receptor signal joint excision circles）（TREC）は用量レベル2の患者における再構成しているT細胞では検出されず、これにより、これらのT細胞が注入されたアロ枯渇細胞に由来する可能性があることが示される。4カ月の時点でのT細胞のスペク

トルタイピングにより、ポリクローナルVベータレパートリーが実証された。四量体および酵素連結immunospot (ELISPOT) アッセイを使用して、用量レベル2の評価可能な患者6名のうち4名では早ければ移植の2～4カ月後にサイトメガロウイルス (CMV) 特異的応答およびエプスタイン・バーウイルス (EBV) 特異的応答が見られたが、用量レベル1の患者ではそのような応答は6～12カ月まで認められなかった。著しい急性移植片対宿主病 (2/16) および慢性移植片対宿主病 (GvHD; 2/15) の発生率は低かった。これらのデータにより、ハプロタイプ一致SCT後のT細胞の回復を改善するために、アロ枯渇させたドナーT細胞を安全に使用できることが実証される。その後、注入する細胞の量を1kg当たり細胞 10^6 個まで漸増させ、GvHDの証拠は伴わなかった。

10

【0175】

この手法により抗ウイルス免疫が再構成されたが、再発が主要な問題として残っており、移植を受けた患者の6名が白血病再発のリスクが高く、疾患により死亡した。したがって、腫瘍反応性前駆体の推定頻度はウイルス反応性前駆体の頻度よりも1～2log低いので、抗腫瘍免疫を再構成するため、および期待される抗腫瘍効果をもたらすためには、より高用量のT細胞が有用である。しかし、一部の患者では、これらの細胞の用量はアロ枯渇後でさえもGvHDを誘発するのに十分なものになる (Hurley CKら、*Biol Blood Marrow Transplant* 2003年; 9巻: 610～615頁; Dey BRら、*Br. J Haematol.* 2006年; 135巻: 423～437頁; Aversa Fら、*N Engl J Med* 1998年; 339巻: 1186～1193頁; Aversa Fら、*J Clin. Oncol.* 2005年; 23巻: 3447～3454頁; Lang P、*Mol. Dis.* 2004年; 33巻: 281～287頁; Kolb HJら、*Blood* 2004年; 103巻: 767～776頁; Gottschalk Sら、*Annu. Rev. Med* 2005年; 56巻: 29～44頁; Bleakley Mら、*Nat. Rev. Cancer* 2004年; 4巻: 371～380頁; Andre-Schmutz Iら、*Lancet* 2002年; 360巻: 130～137頁; Solomon SRら、*Blood* 2005年; 106巻: 1123～1129頁; Amrolia PJら、*Blood* 2006年; 108巻: 1797～1808頁; Amrolia PJら、*Blood* 2003年; Ghetie Vら、*J Immunol Methods* 1991年; 142巻: 223～230頁; Mollnre J Jら、*Cancer Res* 1999年; 59巻: 2675～2681頁; Rezvani Kら、*Clin. Cancer Res.* 2005年; 11巻: 8799～8807頁; Rezvani Kら、*Blood* 2003年; 102巻: 2892～2900頁)。

20

30

移植片対宿主病 (GvHD)

【0176】

移植片対宿主病は、ドナー免疫適格性の細胞、例えばT細胞をレシピエントに移植した後、時々起こる状態である。移植された細胞はレシピエントの細胞を外来と認識し、それらを攻撃し破壊する。この状態は、T細胞移植、特にハプロタイプ一致幹細胞移植に関連する場合に危険な影響になり得る。例えば、免疫系の再構成および移植片抗腫瘍効果などの有益な影響をもたらすために十分なT細胞を注入すべきである。しかし、移植することができるT細胞の数は、移植により重症の移植片対宿主病が生じるという懸念により限定される。

40

移植片対宿主病は、以下の表に示されている通りステージ分類することができる：

【表 1 A】

表1

ステージ分類

	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	発疹なし	発疹<25% BSA	25-50%	>50% 全身性紅皮症	加えて水疱および剥離
腸 (小児患者)	1日当たり<50 0mLの下痢	1日当たり501 ~1000mL 1日当たり5cc /kg~10cc/kg	1日当たり100 1~1500mL 1日当たり10c c/kg~15cc/k g	1日当たり>15 00mL 1日当たり>15 cc/kg	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

10

20

【0177】

急性GVHD悪性度分類は、コンセンサスカンファレンス基準によって実施することができる (Przepiorka Dら、1994年、Consensus Conference on Acute GVHD Grading. Bone Marrow Transplant 1995年; 15巻: 825~828頁)。

30

【表 A】

急性GvHDの分類指標

	皮膚	肝臓	腸	上部消化管
0	なし、かつ	なし、かつ	なし、かつ	なし
I	ステージ1～2、 かつ	なし、かつ	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、それと共に	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

【0178】

細胞療法に対する「安全スイッチ」および遺伝子操作された細胞移植に対する「安全スイッチ」としての誘導性カスパーゼー9

【0179】

移植片対宿主病の影響を低減させることとは、例えば、患者をより低レベルのステージに割り当てることができるようにGvHDの症状を減少させること、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%低減させることを意味する。移植片対宿主病の影響の低減は、例えば、マーカータンパク質、例えばCD19を発現し、かつ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%の減少などの、GvHD反応に参与する活性化T細胞の減少を検出することによって測定することができる。

30

【0180】

本発明では、化学的二量体化誘導物質（CID）（Clackson Tら、Proc Natl Acad Sci U S A. 1998年、95巻：10437～10442頁）であり、健康な志願者において安全であることが証明されている合成薬物であるmAP1903（Iulivucci JDら、J Clin Pharmacol. 2001年、41巻：870～879頁）と結合するように最適化されたFKBPバリアントと融合したヒトアポトーシス促進分子に基づく代替自殺遺伝子戦略が提供される。この小分子を投与することにより、アポトーシス促進性標的分子の架橋および活性化がもたらされる。この誘導性系のヒトTリンパ球への適用が、Fas関連デスドメイン含有タンパク質（FADD）のFasまたはデスエフェクタードメイン（DED）をアポトーシス促進分子として使用して探究されてきた。これらの誘導性死亡分子で形質導入されたT細胞の90%に至るまでが、CIDの投与後にアポトーシスを受けた（Thomiss DCら、Blood. 2001年、97巻：1249～1257頁；Spencer DMら、Curr Biol. 1996年、6巻：839～847頁；Fan Lら、Hum Gene Ther. 1999年、10巻：2273～2285頁；Berger Cら、Blood. 2004年、103巻：1261～1269頁；Junker

40

50

Kら、Gene Ther. 2003年、10巻：1189～197頁）。この自殺遺伝子戦略は、例えば、造血幹細胞、ならびに、例えば間葉系間質細胞、胚性幹細胞、および誘導性多能性幹細胞を含めた他の前駆細胞を含めた、細胞療法のために使用される任意の適切な細胞に使用することができる。

【0181】

したがって、カスパーゼー9によって触媒されるこの安全スイッチは、細胞療法の患者において、トランスフェクトまたは形質導入した治療用細胞の除去が必要な状態が存在する場合に使用することができる。治療用細胞は、例えば、疾患または状態の治療的処置のために使用される任意の細胞を含み、また、例えば、造血幹細胞、誘導性前駆細胞（iPS）、胚性幹（ES）細胞、間葉系幹細胞、形質（B）細胞、筋細胞およびT細胞からなる群から選択される治療用細胞を含む。細胞を除去する必要がある状態としては、例えば、GvHD、細胞が間違った組織型または細胞型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。カスパーゼー9スイッチを活性化するために、不適切な分化の場合では、組織特異的プロモーターを使用することが可能である。例えば、前駆細胞が骨および脂肪細胞に分化し、脂肪細胞が所望ではない場合、前駆細胞へのトランスフェクトまたは形質導入に使用するベクターにカスパーゼー9ヌクレオチド配列に作動可能に連結した脂肪細胞特異的プロモーターを持たせることができる。このように、細胞が脂肪細胞に分化するのであれば、多量体リガンドを投与すると、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。

【0182】

方法は、例えば、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）などを含めた、細胞療法によって緩和することができる任意の障害、ならびに、幹細胞移植によって緩和することができる任意の障害、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に対して使用することができる。

【0183】

治療用T細胞を腫瘍細胞が使用する免疫回避戦略に対して抵抗性にするにより、養子免疫療法の有効性を増強することができる。in vitro試験により、優性陰性受容体または免疫調節性サイトカインを用いた形質導入によってこれを実現できることが示されている（Bollard CMら、Blood. 2002年、99巻：3179～3187頁；Wagner HJら、Cancer Gene Ther. 2004年、11巻：81～91頁）。さらに、抗原特異的T細胞受容体を移入することにより、より広範囲の腫瘍に対してT細胞療法を適用することが可能になる（Pule Mら、Cytotherapy. 2003年、5巻：211～226頁；Schumacher TN、Nat Rev Immunol. 2002年、2巻：512～519頁）。工学的に操作したヒトT細胞に対する自殺系が開発され、それらのその後の臨床試験における使用を可能にするために試験された。カスパーゼー9は改変されており、ヒトTリンパ球においてそれらの機能特性および表現型特性を損なうことなく安定に発現することが示されており、一方、抗アポトーシス分子が上方制御されているT細胞においてさえもCIDに対する感受性が実証されている（Straathof, K. C. ら、2005年、Blood 105巻：4248～54頁）。

【0184】

遺伝子療法のために使用する遺伝子改変細胞において、遺伝子は、遺伝子を発現させるために使用してい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ってよい。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である供給源に由来する。異種DNAはまた、2つ以上の供給源に由来するもの、すなわち、多重遺伝子構築物または融合タンパク質である。異種DNAは、1つの供給源に由来する調節配列と異なる供給源由来の遺伝子を含んでもよい。または、異種DNAは、細胞の内在性遺伝子の正常な発現を変化させるために使用する調節配列を

含んでよい。

他のカスパーゼ分子

【0185】

現行の技術のキメラポリペプチドにより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。これらのカスパーゼポリペプチドに関する考察は、例えば、MacCorkle, R. A. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (1998年) 95巻: 3655~3660頁; およびFan, L. ら (1999年) Human Gene Therapy 10巻: 2273~2285頁) において見出すことができる。

10

発現構築物の工学的作製

【0186】

発現構築物は、全て作動可能に連結した、多量体リガンド結合性領域およびカスパーゼー9ポリペプチド、または、ある特定の実施形態では、多量体リガンド結合性領域およびマーカーポリペプチドに連結したカスパーゼー9ポリペプチドをコードする。この考察、およびカスパーゼー9ポリペプチドへの一般参照に関して、「カスパーゼー9ポリペプチド」という用語は、改変カスパーゼー9ポリペプチドに対する一般参照を含むものとする。

【0187】

一般に、「作動可能に連結した」という用語は、プロモーター配列が第2の配列に機能的に連結しており、例えば、プロモーター配列により、第2の配列に対応するDNAの転写が開始および媒介されることを示すものとする。カスパーゼー9ポリペプチドは全長であっても短縮型であってもよい。ある特定の実施形態では、マーカーポリペプチドがカスパーゼー9ポリペプチドに連結している。例えば、マーカーポリペプチドは、例えば、切断可能な2A様配列などのポリペプチド配列を介してカスパーゼー9ポリペプチドに連結することができる。マーカーポリペプチドは、例えば、CD19、ΔCD19であってもよく、例えば、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た異種タンパク質であってもよい。

20

【0188】

一部の実施形態では、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、例えばマーカーポリペプチドであってもよく、例えばキメラ抗原受容体であってもよい異種タンパク質をコードする。異種ポリペプチド、例えばキメラ抗原受容体は、例えば、切断可能な2A様配列などのポリペプチド配列を介してカスパーゼー9ポリペプチドに連結することができる。

30

【0189】

2A様配列、または「切断可能な」2A配列は、例えば、例えばThosea asignaに由来するものを含めた、多くの異なるウイルスに由来するものである。これらの配列は、時には、「ペプチドスキッピング配列 (peptide skipping sequence)」としても公知である。この型の配列をシストロン内の分離することが意図されている2つのペプチド間に置くと、リボソームはペプチド結合をスキップすると思われ、Thosea asigna配列の場合では、Glyアミノ酸とProアミノ酸の間の結合が省かれる。これにより2つのポリペプチド、この場合はカスパーゼー9ポリペプチドとマーカーポリペプチドが残される。この配列を使用する場合、2A配列に対して5'側にコードされるペプチドはGly残基および2A配列の上流のすべてを含めてカルボキシ末端の付加的なアミノ酸で終了し得る。2A配列に対して3'側にコードされるペプチドは、Pro残基および2A配列の下流のすべてを含めてアミノ末端の付加的なアミノ酸で終了し得る。「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)、これらは本出願のポリペプチドに使用することができる2A様配列の例である。

40

50

【0190】

発現構築物をベクター、例えばウイルスベクターまたはプラスミドに挿入することができる。提供される方法のステップは、任意の適切な方法を使用して実施することができ、これらの方法としては、限定することなく、本明細書で提示されている抗原提示細胞に核酸を形質導入する、形質転換する、または他のやり方でもたらず方法が挙げられる。一部の実施形態では、短縮型カスパーゼ9ポリペプチドは、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、またはDNAリンカーを伴うまたは伴わない機能的に同等なその断片によりコードされる、または配列番号9、配列番号24、配列番号26、または配列番号28のアミノ酸配列または機能的に同等なその断片を有する。一部の実施形態では、CD19ポリペプチドは、配列番号14のヌクレオチド配列、またはDNAリンカーを伴うまたは伴わない機能的に同等なその断片によりコードされる、または配列番号15のアミノ酸配列、または機能的に同等なその断片を有する。カスパーゼ9ポリペプチドの機能的に同等な断片は、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のポリペプチドの活性の少なくとも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同等な断片は、配列番号15のポリペプチドと実質的に同じ、形質導入またはトランスフェクトされた細胞を同定し、選択するために使用するマーカーとしての機能を果たす能力を有し、標準の検出技法を使用して、配列番号15のポリペプチドと比較して、少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、または95%のマーカーポリペプチドが検出される。

10

20

【0191】

より具体的には、2つ以上のリガンド結合性ドメインまたは多量体化領域を発現構築物に使用することができる。さらに、発現構築物は、膜ターゲティング配列を含有する。適切な発現構築物は、上記のFKBPリガンド結合性エレメントのどちら側に共刺激ポリペプチドエレメントを含んでもよい。

リガンド結合性領域

【0192】

発現構築物のリガンド結合性（「二量体化」）ドメイン、または多量体化領域は、天然または天然でないリガンド、例えば、天然でない合成リガンドを使用した誘導が可能になる任意の都合のよいドメインであってよい。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の内側にあっても外側にあってもよい。上記の細胞質内領域に付随するリガンド結合性タンパク質を含めた、受容体を含めた多種多様なリガンド結合性タンパク質が公知である。本明細書で使用される場合、「リガンド結合性ドメイン」は、「受容体」という用語と交換することができる。リガンド（例えば、小有機リガンド）が公知であるまたは容易に作製することができるリガンド結合性タンパク質が特に興味深い。これらのリガンド結合性ドメインまたは受容体としては、FKBPおよびシクロフィリン受容体、ステロイド受容体、テトラサイクリン受容体、上記の他の受容体など、ならびに抗体、特に重鎖または軽鎖サブユニットから得ることができる「天然でない」受容体、その変異配列、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なアミノ酸配列が挙げられる。ある特定の実施形態では、リガンド結合性領域は、FKBPリガンド結合性領域、シクロフィリン受容体リガンド結合性領域、ステロイド受容体リガンド結合性領域、シクロフィリン受容体リガンド結合性領域、およびテトラサイクリン受容体リガンド結合性領域からなる群から選択される。多くの場合、リガンド結合性領域は、F_v、F_{v1s}配列を含む。時には、F_v、F_{v1s}配列は、追加的な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巻：313～321頁（2000年）において考察されているもの、およびGestwicki, J. E. ら、Combinatorial Chem. & High Throughput Screening 10巻：667～675頁（2007年）；Clackson T（2006年）Chem Biol Drug Des 67巻：440～2頁；Clackson, T.、Chemical Biol

30

40

50

ogy: From Small Molecules to Systems Biology and Drug Design (Schreiber, S. 編、Wiley、2007年)) において考察されているものが挙げられる。

【0193】

ほとんどの場合、リガンド結合性ドメインまたは受容体ドメインは、天然ドメインまたはその短縮型活性部分のいずれかとして、少なくとも約50アミノ酸、かつ約350アミノ酸未満であり、通常は200アミノ酸未満である。結合性ドメインは、例えば、小さくてよく (<25 kDa、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ため)、単量体であってよく、非免疫原性であってよく、合成的に入手可能であってよく、細胞浸透性であってよく、二量体を形成することができる非毒性リガンドであってよい。

10

【0194】

受容体ドメインは、発現構築物の設計および適切なリガンドの利用可能性に応じて細胞内であっても細胞外であってもよい。疎水性リガンドに対しては、結合性ドメインは膜のどちら側にあってもよいが、親水性リガンド、特にタンパク質リガンドに対しては、リガンドを結合に利用可能な形態で内部移行させるための輸送系がある場合を除いて、結合性ドメインは通常は細胞膜の外側にする。細胞内受容体に対しては、構築物は、受容体ドメイン配列の5'または3'側のシグナルペプチドおよび膜貫通ドメインをコードしてもよく、受容体ドメイン配列の5'側の脂質付着シグナル配列を有してもよい。受容体ドメインがシグナルペプチドと膜貫通ドメインの間にある場合には、受容体ドメインは細胞外になる。

20

【0195】

受容体をコードする発現構築物の一部を種々の理由で変異誘発に供することができる。変異誘発されたタンパク質により、より高い結合親和性をもたらすことができる、天然に存在する受容体および変異誘発された受容体のリガンドによる識別が可能になる、受容体-リガンド対を設計する機会がもたらされる、などである。受容体の変化は、結合部位にあることが公知のアミノ酸の変化、結合部位に関連するアミノ酸またはコンフォメーションの変化に関連する他のアミノ酸のコドン、特定のアミノ酸のコドン(複数可)を既知の変化を用いてまたはランダムに変化させることによって変異誘発に供することができるコンビナトリアル技法を使用したランダム変異誘発、生じたタンパク質を適切な原核生物宿主で発現させ、次いで、生じたタンパク質を結合についてスクリーニングすることを伴う。

30

【0196】

抗体および抗体サブユニット、例えば、重鎖または軽鎖、具体的には断片、より具体的には可変領域の全部もしくは一部、または高親和性の結合を創出するための重鎖と軽鎖の融合物を結合性ドメインとして使用することができる。意図されている抗体としては、免疫応答を誘発せず、一般に末梢(すなわち、CNS/脳領域の外)では発現しない細胞外ドメインなどの、異所発現させたヒト産物である抗体が挙げられる。そのような例としては、これだけに限定されないが、低親和性神経増殖因子受容体(LNGFR)、および胚表面タンパク質(すなわち、癌胎児性抗原)が挙げられる。

40

【0197】

さらに、抗体を生理的に許容されるハプテン分子に対して調製し、個々の抗体サブユニットを結合親和性についてスクリーニングすることができる。サブユニットをコードするcDNAを単離し、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して、リガンドに対する適切な親和性を有する結合性タンパク質ドメインを得ることができる。このように、生理的に許容されるハプテン化合物のほぼすべてをリガンドとして、またはリガンドに対するエピトープをもたらすために使用することができる。抗体ユニットの代わりに、結合性ドメインが公知であり、結合させるために有用なリガンドが存在する天然の受容体を使用することができる。

オリゴマー形成

50

【0198】

形質導入したシグナルは、通常、キメラタンパク質分子のリガンド媒介性オリゴマー形成により生じる、すなわち、リガンド結合後のオリゴマー形成の結果として生じるが、他の結合事象、例えばアロステリック活性化を使用してシグナル伝達を開始することができる。キメラタンパク質の構築物は、種々の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する。

【0199】

受容体の多量体化に関しては、キメラ表面膜タンパク質のリガンド結合性ドメイン／受容体ドメインのリガンドは、通常、少なくとも2つの結合部位を有し、結合部位のそれぞれがリガンド受容体ドメインに結合することができるという意味で多量体である。「多量体リガンド結合性領域」とは、多量体リガンドに結合するリガンド結合性領域を意味する。「多量体リガンド」という用語は二量体リガンドを含む。二量体リガンドは、リガンド受容体ドメインに結合することができる2つの結合部位を有する。対象のリガンドは、小さな合成有機分子の二量体または通常は約四量体未満の高次オリゴマーであることが望ましく、個々の分子は、一般には少なくとも約150Daであり、かつ約5kDa未満、通常約3kDa未満である。合成リガンドと受容体の種々の対を使用することができる。例えば、天然の受容体が関与する複数の実施形態では、二量体FK506をFKBP12受容体と一緒に使用することができ、二量体化シクロスポリンAをシクロフィリン受容体と一緒に使用することができ、二量体化エストロゲンをエストロゲン受容体と一緒に使用することができ、二量体化グルココルチコイドをグルココルチコイド受容体と一緒に使用することができ、二量体化テトラサイクリンをテトラサイクリン受容体と一緒に使用することができ、二量体化ビタミンDをビタミンD受容体と一緒に使用することができる、などである。あるいは、高次のリガンド、例えば、三量体リガンドを使用することができる。天然でない受容体、例えば、抗体サブユニット、改変抗体サブユニット、重鎖可変領域および軽鎖可変領域で構成されるタンデムな単鎖抗体、柔軟なリンカードメインによって分離されたまたは改変された受容体、およびその変異配列などが関与する実施形態では、多種多様な化合物のいずれも使用することができる。これらのリガンド単位の重要な特性は、各結合部位が受容体と高親和性で結合することができること、および、これらを化学的に二量体化することができることである。また、大多数の適用のためにリガンドの疎水性／親水性を平衡化し、したがって、これらを血清中に機能的なレベルで溶解させることができ、それでも原形質膜にわたって拡散する方法が利用可能である。

【0200】

ある特定の実施形態では、本方法では、条件的に制御されたタンパク質またはポリペプチドを作製するために、化学的誘導二量体化(CID)技法を利用する。この技法は、誘導性であることに加えて、不安定な二量体化剤の分解または単量体競合阻害剤の投与に起因して可逆的でもある。

【0201】

CID系では、合成二価リガンドを使用して、リガンド結合性ドメインに融合したシグナル伝達分子を急速に架橋結合させる。この系は、オリゴマー形成および細胞表面の活性化を誘発するため(Spencer, D. M. ら、Science、1993年、262巻：1019～1024頁；Spencer D. M. ら、Curr Biol 1996年、6巻：839～847頁；Blau, C. A. ら、Proc Natl Acad Sci USA 1997年、94巻：3076～3081頁)、または細胞質タンパク質(Luo, Z. ら、Nature 1996年、383巻：181～185頁；MacCorkle, R. A. ら、Proc Natl Acad Sci USA 1998年、95巻：3655～3660頁)、転写因子をDNAエレメントに動員して転写を調節するため(Ho, S. N. ら、Nature 1996年、382巻：822～826頁；Rivera, V. M. ら、Nat. Med. 1996年、2巻：1028～1032頁)、またはシグナル伝達分子を原形質膜に動員してシグナル伝達を刺激すること(Spencer D. M. ら、Proc. Natl. A

cad. Sci. USA 1995年、92巻：9805～9809頁；Holsinger, L. J. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1995年、95巻：9810～9814頁）に使用されている。

【0202】

CID系は、表面受容体の凝集により、下流のシグナル伝達カスケードが有効に活性化されるという概念に基づく。最も単純な実施形態では、CID系では、脂質浸透性免疫抑制薬の二量体類似体、FK506を使用し、これは、正常な生物活性が失われているが、FK506結合性タンパク質、FKBP12と遺伝子融合した分子を架橋させる能力を獲得させたものである。1つまたは複数のFKBPをカスパーゼ9と融合することにより、二量体化薬依存的であるが、リガンドおよび外部ドメイン非依存的にカスパーゼ9活性を刺激することができる。これにより、時間的に制御され、単量体薬物類似体を使用して可逆性であり、特異性が増強された系がもたらされる。第3世代AP20187/AP1903 CIDのそれらの結合性ドメイン、FKBP12に対する高親和性により、内在性FKBP12による非特異的な副作用の誘導を伴うことなく組換え受容体をin vivoで特異的に活性化することが可能になる。二量体化薬に結合する、アミノ酸置換および欠失を有するFKBP12バリエーション、例えばFKBP12v36なども使用することができる。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、受容体をin vivoで活性化する際に合成リガンドが大多数の送達されたタンパク質薬剤よりも効率的なものになる。

【0203】

使用するリガンドは、2つまたはそれ超のリガンド結合性ドメイン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性ドメインを含有する場合に2つ以上のリガンドに結合することができ得る。リガンドは、一般には、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、これだけに限定されないが、FK506（例えば、FK1012）が挙げられる。

【0204】

他のリガンド結合性領域は、例えば、二量体領域、または、例えば、FKBP12（V36）などのゆらぎ置換を伴う改変リガンド結合性領域であってよい。F36からVへの置換を伴うヒト12kDa FK506結合性タンパク質は、完全な成熟コード配列（アミノ酸1～107）であり、合成二量体化薬AP1903の結合部位をもたらず（Jemal, A. ら、CA Cancer J. Clin. 58巻、71～96頁（2008年）；Scher, H. I. およびKelly, W. K、Journal of Clinical Oncology 11巻、1566～72頁（1993年））。当該タンパク質の2つのタンデムなコピーも構築物に使用することができ、したがって、AP1903により架橋すると高次オリゴマーが誘導される。

F36V'-FKBP：F36V'-FKBPは、F36V-FKBPのコドンゆらぎ型である。

【0205】

これは、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の相同性はたった62%である。F36V'-FKBPは、レトロウイルスベクターにおける組換えを低下させるために設計した（Schellhammer, P. F. ら、J. Urol. 157巻、1731～5頁（1997年））。F36V'-FKBPをPCR集合手順によって構築した。導入遺伝子は、1コピーのF36V-FKBPと直接連結した1コピーのF36V'-FKBPを含有する。

一部の実施形態では、リガンドは小分子である。選択されたリガンド結合性領域に対して適切なリガンドを選択することができる。多くの場合、リガンドは二量体であり、時にはリガンドは二量体FK506または二量体FK506様類似体である。ある特定の実施形態では、リガンドはAP1903である（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: C₇H₉N₄O₂ 【0206】

分子量: 1411.65)。ある特定の実施形態では、リガンドはAP20187である。ある特定の実施形態では、リガンドは、例えば、AP1510などのAP20187類似体である。一部の実施形態では、ある特定の類似体がFKBP12に適し、ある特定の類似体がゆらぎ型のFKBP12に適する。ある特定の実施形態では、1つのリガンド結合性領域がキメラタンパク質内に含まれる。他の実施形態では、2つまたはそれ超のリガンド結合性領域が含まれる。例えば、リガンド結合性領域がFKBP12である場合、これらの領域の2つが含まれる場合、その1つは、例えば、ゆらぎ型であってよい。

10

【0207】

意図されている他の二量体化系としては、クーママイシン/DNAジャイレースB系が挙げられる。クーママイシンに誘導される二量体化により、改変Rafタンパク質が活性化され、MAPキナーゼカスケードが刺激される。Farrarら、1996年を参照されたい。

注射用のAP1903

【0208】

AP1903はAlphora Research Inc.により製造されており、注射用のAP1903薬品はFormatech Incにより製造されている。これは、非イオン性可溶化剤Solutol HS 15の25%溶液(250mg/mL、BASF)中AP1903の5mg/mL溶液として製剤化されている。室温で、この製剤は、透明な、わずかに黄色の溶液である。冷蔵すると、この製剤は可逆的な相転移を受け、乳状溶液が生じる。この相転移は室温まで再加温すると逆転する。1容量は3mLのガラスバイアル中2.33mL(バイアル当たり注射全体で約10mgのAP1903)である。

20

【0209】

AP1903を患者に投薬する前夜に冷蔵庫から取り出し、およそ21℃の温度で一晩保管し、したがって、溶液は希釈前に透明になる。溶液を注入の開始の30分以内にガラスまたはポリエチレンビンまたは非DEHPバッグ中に調製し、およそ21℃で投薬前まで保管する。

30

【0210】

全ての試験薬を2℃から8℃の間の温度で維持し、過剰な光および熱から保護し、立ち入りが制限された鍵のかかった区域で保管する。

【0211】

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が決定されたら、患者に、例えば、単一の固定用量の注射用AP1903(0.4mg/kg)を、非DEHP、非エチレンオキシド滅菌済注入セットを使用して、2時間かけてIV注入によって投与する。AP1903の用量は、全患者について個別に算出し、体重が10%以上増減しない限り再算出は行わない。算出された用量を、注入前に通常生理食塩水100mL中0.9%中に希釈する。

40

【0212】

以前のAP1903の第I相試験では、健康な志願者24名に、単回用量の注射用AP1903を0.01mg/kg、0.05mg/kg、0.1mg/kg、0.5mg/kgおよび1.0mg/kgの用量レベルで、2時間かけてIV注入により処置した。AP1903の血漿中レベルは用量に正比例し、平均C_{max}値は、0.01~1.0mg/kgの用量範囲にわたって、およそ10~1275ng/mLの範囲であった。最初の注入期間の後、血中濃度は急速な分布相が実証され、血漿中レベルが投薬の0.5時間後、2時間後および10時間後に、それぞれ最大濃度のおよそ18%、7%、および1%まで低下した。注射用AP1903は全用量レベルで安全であり、耐受性がよいことが示さ

50

れ、好都合な薬物動態プロファイルが実証された。Iulivucci JDら、J Clin Pharmacol. 41巻：870～9頁、2001年。

【0213】

使用する固定用量の注射用AP1903は、例えば、0.4mg/kgを2時間かけて静脈内注入するものであってよい。in vitroにおける細胞の有効なシグナル伝達に必要なAP1903の量は10～100nM(1600Da MW)である。これは、16～160μg/Lまたは約0.016～1.6mg/kg(1.6～160μg/kg)と等しい。上記のAP1903の第I相試験では最大1mg/kgの用量の忍容性が良好であった。

選択マーカー

10

【0214】

ある特定の実施形態では、発現構築物は核酸構築物を含有し、その発現は、マーカーを発現構築物に含めることによってin vitroまたはin vivoにおいて同定される。そのようなマーカーにより、発現構築物を含有する細胞を容易に同定することを可能にする同定可能な変化が細胞に付与される。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。有用な選択マーカーは、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耐性を付与する遺伝子である。あるいは、単純ヘルペスウイルスIチミジンキナーゼ(tk)などの酵素を使用する。細胞外非シグナル伝達ドメインを含有する免疫学的表面マーカーまたは種々のタンパク質(例えば、CD34、CD19、LNGFR)も使用することができ、それにより、磁気または蛍光抗体に媒介される選別の簡単な方法が可能になる。使用する選択マーカーは、それが遺伝子産物をコードする核酸と同時に発現させることができるものである限りは、重要であるとは見られない。選択マーカーのさらなる例としては、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)などのレポーターが挙げられる。ある特定の実施形態では、輸注用の細胞を選択するために、例えば、免疫磁気選択においてなどで、例えば、CD19などのマーカータンパク質を使用する。

20

制御領域

プロモーター

【0215】

目的のポリヌクレオチド配列の発現を制御するために使用する特定のプロモーターは、それが標的細胞におけるポリヌクレオチドの発現を導くことができるものである限りは、重要であるとは見られない。したがって、ヒト細胞を標的とする場合、ポリヌクレオチド配列コード領域を、例えば、ヒト細胞において発現させることが可能なプロモーターに隣接させ、その制御下に置くことができる。一般的に言うと、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のいずれかを含み得る。

30

【0216】

種々の実施形態では、ヒトサイトメガロウイルス(CMV)最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、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リン酸デヒドロゲナーゼを使用して、目的のコード配列の高レベルの発現を得ることができる。目的のコード配列の発現を実現するための、当技術分野で周知の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、発現のレベルが所与の目的に十分であれば意図される。周知の性質を有するプロモーターを使用することにより、トランスフェクションまたは形質転換後の目的のタンパク質のレベルおよび発現パターンを最適化することができる。

40

【0217】

特定の生理的シグナルまたは合成シグナルに応答して調節されるプロモーターを選択することにより、遺伝子産物の誘導性発現が可能になる。例えば、導入遺伝子または多シストロン性ベクターを利用する場合の導入遺伝子の発現が、ベクターが産生される細胞に対

50

して毒性である場合、導入遺伝子のうちの1つまたは複数の発現を妨げるまたは低下させることが望ましい。産生細胞株に対して毒性である導入遺伝子の例は、アポトーシス促進性遺伝子およびサイトカイン遺伝子である。導入遺伝子産物が毒性である場合にウイルスベクターを作製するために、いくつかの誘導性プロモーター系が利用可能である（より多くの誘導性プロモーターを追加する）。

【0218】

エクジソン系（Invitrogen、Carlsbad、CA）がそのような系の1つである。この系は、哺乳動物細胞における、調節される目的の遺伝子の発現が可能になるように設計されたものである。この系は、事実上、導入遺伝子の基礎レベルの発現がないが200倍を超える誘導能を可能にするしっかりと調節された発現機構からなる。この系は、ショウジョウバエのヘテロ二量体エクジソン受容体に基づき、エクジソンまたはムリステロンAなどの類似体が受容体に結合すると、受容体によりプロモーターが活性化されて、高レベルのmRNA転写物が達成される下流の導入遺伝子の発現がオンになる。この系では、ヘテロ二量体受容体の単量体がどちらも1つのベクターから構成的に発現されるが、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ある。したがって、この型の系を目的の遺伝子移入ベクター内に工学的操作によって含めることが有用である。次いで、目的の遺伝子を含有するプラスミドおよび受容体単量体を含有するプラスミドを産生細胞株に同時トランスフェクションすることにより、潜在的に毒性の導入遺伝子を発現させることなく遺伝子移入ベクターを産生することが可能になる。適切な時間に、エクジソンまたはムリステロンAを用いて導入遺伝子の発現を活性化することができる。

【0219】

有用であり得る別の誘導性系は、GossenおよびBujard（GossenおよびBujard、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、89巻：5547～5551頁、1992年；Gossenら、Science、268巻：1766～1769頁、1995年）により最初に開発されたTet-Off（商標）またはTet-On（商標）系（Clontech、Palo Alto、CA）である。この系により、テトラサイクリンまたはドキシサイクリンなどのテトラサイクリン誘導体に応答して調節される遺伝子の高レベルの発現も可能になる。Tet-On（商標）系では、ドキシサイクリンの存在下で遺伝子発現がオンになるが、Tet-Off（商標）系では、ドキシサイクリンの不在下で遺伝子発現がオンになる。これらの系は、E. coliのテトラサイクリン耐性オペロンに由来する2つの調節エレメント、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。目的の遺伝子をプラスミドの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にクローニングする。第2のプラスミドは、Tet-Off（商標）系では、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リプレッサーで構成されるテトラサイクリンにより制御されるトランス活性化因子と称される調節エレメントを含有する。したがって、ドキシサイクリンの不在下で、転写は構成的にオンになる。Tet-On（商標）系では、テトラサイクリンリプレッサーは野生型ではなく、ドキシサイクリンの存在下で転写を活性化する。遺伝子療法ベクターを作製するために、Tet-Off（商標）系を使用することができ、したがって、産生細胞をテトラサイクリンまたはドキシサイクリンの存在下で成長させ、潜在的に毒性の導入遺伝子の発現を防止することができるが、ベクターを患者に導入する際に、遺伝子発現が構成的にオンになる。

【0220】

一部の場合では、遺伝子療法ベクターにおいて導入遺伝子の発現を調節することが望ましい。例えば、所望の発現レベルに応じて、活性の強度が変動する異なるウイルスプロモーターを利用する。哺乳動物細胞では、多くの場合、強力な転写活性化をもたらすためにCMV最初期プロモーターが使用される。CMVプロモーターは、Donnelly, J. J. ら、1997年。Annu. Rev. Immunol. 15巻：617～4

10

20

30

40

50

8頁に概説されている。導入遺伝子の発現を低下させることが望まれる場合には、効力の弱い改変型のCMVプロモーターが使用されている。造血細胞における導入遺伝子の発現が望まれる場合には、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も多い。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、E1A、E2A、またはMLP領域に由来するものなどのアデノウイルスプロモーター、AAV LTR、HSV-TK、およびトリ肉腫ウイルスが挙げられる。

【0221】

他の例では、発生的に調節され、特定の分化細胞において活性なプロモーターを選択することができる。したがって、例えば、プロモーターは、多能性幹細胞においては活性でない可能性があるが、例えば、多能性幹細胞がより成熟した細胞に分化すると、そのプロモーターが活性化され得る。

【0222】

同様に、非標的組織に対する潜在的な毒性または望ましくない影響が低下するように、組織特異的プロモーターを使用して特異的な組織または細胞における転写をもたらす。これらのプロモーターにより、CMVプロモーターなどのより強力なプロモーターと比較して発現の低下をもたらされるが、より限定された発現、および免疫原性ももたらされる (Bojak, A. ら、2002年、Vaccine, 20巻: 1975~79頁; Cazeaux, N. ら、2002年、Vaccine 20巻: 3322~31頁)。例えば、適切な場合には、PSA関連プロモーターもしくは前立腺特異的腺性カリクレインなどの組織特異的プロモーター、または筋肉クレアチンキナーゼ遺伝子を使用することができる。

【0223】

組織特異的または分化特異的プロモーターの例としては、これだけに限定されないが、以下が挙げられる: B29 (B細胞); CD14 (単核球細胞); 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 (分化細胞、治癒組織); およびFlt-1 (内皮細胞); GFAP (星状膠細胞)。

【0224】

ある特定の適用では、遺伝子療法ベクターを投与した後の特定の時間に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り調節可能なプロモーターなどのプロモーターを用いて行う。使用することができるサイトカインおよび炎症性タンパク質応答性の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年) J. Biol. Chem, 262巻、2345~2351頁)、c-fos、TNF-α、C反応性タンパク質 (Arcone ら、(1988年) Nucl. Acids Res, 16巻 (8号)、3195~3207頁)、ハプトグロビン (Oliviero ら、(1987年) EMBO J, 6巻、1905~1912頁)、血清アミロイドA2、C/EBPα、IL-1、IL-6 (Poli および Cortese、(1989年) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 86巻、8202~8206頁)、補体C3 (Wilson ら、(1990年) Mol. Cell. Biol, 6181~6191頁)、IL-8、アルファ-1酸性糖タンパク質 (Prowse および Baumann、(1988年) Mol Cell Biol, 8巻、42~51頁)、アルファ-1抗トリプシン、リボタンパク質リパーゼ (Zechner ら、Mol. Cell. Biol, 2394~2401頁、1988年)、アンジオテンシノーゲン (Ron ら、(1991年) Mol. Cell Biol, 2887~2895頁)、フィブリノーゲン、c-jun (ホルボールエステル、TNF-α、UV放射、レチノイン酸、および過酸化水素により誘導可能)、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 (重金属およびグルココルチコイド誘導性)、ストロメライシン (ホルボールエステル、インターロイキン-1およびEGFにより誘導可能)、アルファ-2マクロ

10

20

30

40

50

グロブリンおよびアルファ-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）、Moloney ウィルス、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。

【0225】

上記のプロモーターはいずれも、単独で、または別のプロモーターと組み合わせて、所望の作用に応じて有用であり得ることが構想される。プロモーター、および他の調節エレメントは、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する。さらに、このプロモーターの一覧は、網羅的または限定的なものであると解釈されるべきではなく、他のプロモーターが本明細書に開示されているプロモーターおよび方法と併せて使用される。

10

エンハンサー

【0226】

エンハンサーは、同じDNAの分子上の遠位に位置するプロモーターからの転写を増加させる遺伝エレメントである。初期の例としては、どちらもコード配列に隣接し、いくつかのイントロン内に存在する免疫グロブリンおよびT細胞受容体に関連するエンハンサーが挙げられる。CMV、SV40、およびレトロウイルスLTRなどの多くのウイルスプロモーターがエンハンサー活性と密接に関連し、多くの場合、単一のエレメントのように扱われる。エンハンサーは、プロモーターに酷似して組織化される。すなわち、エンハンサーは多くの個体エレメントで構成され、そのそれぞれが1つまたは複数の転写タンパク質と結合する。エンハンサーとプロモーターの基本的な違いは操作上のものである。エンハンサー領域は全体として、離れて、および多くの場合方向は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当てはまる必要はない。他方では、プロモーターは、特定の部位において、かつ特定の方向にRNA合成を直接開始させる1つまたは複数のエレメントを有するが、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多くの場合、重複しており、連続しており、多くの場合、非常に類似したモジュラー組織化を有すると思われる。エンハンサーのサブセットは、転写活性を増大させることができるだけでなく、（インスレーターエレメントと一緒に）ゲノムに組み込む際の転写エレメントの近接配列からの隔離を補助することもできる遺伝子座制御領域（LCR）である。

20

【0227】

任意のプロモーター／エンハンサーの組合せ（Eukaryotic Promoter Data Base EPDBの通り）を使用して遺伝子の発現を駆動することができるが、多くが、特定の組織型または組織のサブセットに対して発現を制限するものである（例えば、Kutzbler, M. A.、およびWeiner, D. B.、2008年。Nature Reviews Genetics 9巻：776～88頁に概説されている）。例としては、これだけに限定されないが、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、配列由来のエンハンサー、およびウイルスCMV、RSV、およびEBV由来のエンハンサーが挙げられる。特定の適用のために適切なエンハンサーを選択することができる。真核細胞では、送達複合体の一部として、または追加的な遺伝子発現構築物として適切な細菌ポリメラーゼがもたらされる場合、ある特定の細菌のプロモーターからの細胞質での転写が支持され得る。

30

40

ポリアデニル化シグナル

【0228】

cDNA挿入断片を使用する場合、一般には、遺伝子転写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望ましい。ポリアデニル化シグナルの性質は、本方法の上首尾の実施に対して重大なものではないと考えられ、ヒトまたはウシ成長ホルモンおよびSV40ポリアデニル化シグナルおよびLTRポリアデニル化シグナルなどの、そのような配列のいずれも使用される。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。また、ターミネーターも発現カセットの

50

エレメントとして意図されている。これらのエレメントは、メッセージレベルを増強するため、およびカセットから他の配列へのリードスルーを最小限にするために役立ち得る。終結またはポリ(A)シグナル配列を、例えば、mRNAの3'末端にある保存された配列(AAUA A)から約11~30ヌクレオチド下流に位置づけることができる(Montgomery, D. L. ら、1993年。DNA Cell Biol. 12巻: 777~83頁; Kutzler, M. A、およびWeiner, D. B、2008年 Nature Rev. Gen. 9巻: 776~88頁)。

シグナルの開始および内部リボソーム結合部位

【0229】

コード配列の効率的な翻訳のために、特定のシグナルの開始も必要になり得る。これらのシグナルは、ATG開始コドンまたは近接配列を含む。ATG開始コドンを含む外因性翻訳制御シグナルをもたらす必要があり得る。開始コドンを所望のコード配列の読み枠とインフレームで位置づけて、挿入断片全体が翻訳されることを確実にする。外因性翻訳制御シグナルおよび開始コドンは天然のものであっても合成のものであってもよい。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発現の効率を増強することができる。

【0230】

ある特定の実施形態では、配列内リボソーム進入部位(IRES)エレメントの使用を用いて、多重遺伝子、またはポリシストロニックメッセージを創出する。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ャンモデルを迂回し、内部で翻訳を開始させることができる(PelletierおよびSonenberg、Nature、334巻: 320~325頁、1988年)。ピコルナウイルスファミリーの2つのメンバー(ポリオおよび脳心筋炎)由来のIRESエレメント(PelletierおよびSonenberg、1988年)、ならびに哺乳動物メッセージ由来のIRESが考察されている(MacejakおよびSarnow、Nature、353巻: 90~94頁、1991年)。IRESエレメントを異種性オープンリーディングフレームに連結することができる。それぞれがIRESによって分離された多数のオープンリーディングフレームと一緒に転写し、ポリシストロニックメッセージを創出することができる。IRESエレメントによって、各オープンリーディングフレームが効率的な翻訳のためにリボソームに到達することができる。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、多数の遺伝子を効率的に発現させることができる(米国特許第5,925,565号および同第5,935,819号を参照されたい、それぞれが参照により本明細書に組み込まれる)。

配列最適化

【0231】

タンパク質産生は、導入遺伝子内のコドンを最適化することによっても増加させることができる。種特異的コドン変化を使用して、タンパク質産生を増加させることができる。また、コドンを最適化して、最適化RNAを作製することもでき、これにより、より効率的な翻訳がもたらされ得る。RNAに組み入れられるコドンを最適化することにより、不安定性引き起こす二次構造を生じるものなどのエレメント、例えばリボソームの結合を阻害し得る二次mRNA構造、またはmRNAの核外移行を阻害し得る潜在的な配列を除去することができる(Kutzler, M. A、およびWeiner, D. B、2008年 Nature Rev. Gen. 9巻: 776~88頁; Yan, J. ら、2007年、Mol. Ther. 15巻: 411~21頁; Cheung, Y. K. ら、2004年、Vaccine 23巻: 629~38頁; Narum, D. L. ら、2001年、69巻: 7250~55頁; Yadava, A、およびOckenhouse, C. F、2003年、Infect. Immun. 71巻: 4962~69頁; Smith, J. M. ら、2004年、AIDS Res. Hum. Retroviruses 20巻: 1335~47頁; Zhou, W. ら、2002年、Vet. Microbiol. 88巻: 127~51頁; Wu, X. ら、2004年、Biochem. Biophys. Res. Commun. 313巻: 89

～96頁；Zhang, W. ら、2006年、Biochem. Biophys. Res. Commun. 349巻：69～78頁；Deml, L. A. ら、2001年、J. Virol. 75巻：1099～11001頁；Schneider, R. M. ら、1997年、J. Virol. 71巻：4892～4903頁；Wang, S. D. ら、2006年、Vaccine 24巻：4531～40頁；zur Megede, J. ら、2000年、J. Virol. 74巻：2628～2635頁）。例えば、FBP12、カスパーゼポリペプチド、およびCD19配列をコドンの変化によって最適化することができる。

リーダー配列

【0232】

mRNAの安定性を増強し、より効率的な翻訳をもたらすためにリーダー配列を加えることができる。リーダー配列は、通常、mRNAの小胞体へのターゲティングに参与する。例としては、それ自体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(Kutzbler, M. A. およびWeiner, D. B. 2008年、Nature Rev. Gen. 9巻：776～88頁；Li, V. ら、2000年、Virology 272巻：417～28頁；Xu, Z. L. ら、2001年、Gene 272巻：149～56頁；Malin, A. S. ら、2000年、Microbes Infect. 2巻：1677～85頁；Kutzbler, M. A. ら、2005年、J. Immunol. 175巻：112～125頁；Yang, J. S. ら、2002年、Emerg. Infect. Dis. 8巻：1379～84頁；Kumar, S. ら、2006年、DNA Cell Biol. 25巻：383～92頁；Wang, S. ら、2006年、Vaccine 24巻：4531～40頁）。IgEリーダーを使用して、小胞体への挿入を増強することができる(Tepler, I. ら(1989年) J. Biol. Chem. 264巻：5912頁)。

【0233】

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、導入遺伝子の発現を最適化および／または制御することができる。これらの方法としては、例えば、プロモーター、送達方法、および遺伝子配列の最適化が挙げられる(例えば、Laddy, D. J. ら、2008年、PLOS ONE 3巻、e2517頁；Kutzbler, M. A. およびWeiner, D. B. 2008年、Nature Rev. Gen. 9巻：776～88頁に示されている通り)。

核酸

【0234】

「核酸」とは、本明細書で使用される場合、一般に、DNA、RNAもしくは誘導体、または核酸塩基を含むその類似体の分子(1つ、2つまたはそれ超の鎖)を指す。核酸塩基としては、例えば、DNAに見出される、天然に存在するプリン塩基またはピリミジン塩基(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に見出される、天然に存在するプリン塩基またはピリミジン塩基(例えば、A、G、ウラシル「U」またはC)が挙げられる。「核酸」という用語は、「オリゴヌクレオチド」および「ポリヌクレオチド」という用語を包含し、これらはそれぞれ「核酸」という用語の亜属である。核酸は、少なくとも、最大で、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、12

10

20

30

40

50

0、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、または1000ヌクレオチドまたはその中で導き出せる任意の範囲の長さであってよい。

10

【0235】

本発明で提供される核酸は、別の核酸と同一または相補的な領域を有し得る。相補的または同一な領域は少なくとも5個の連続した残基であってよいことが意図されているが、具体的には、この領域は、少なくとも、最大で、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、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、または1000個の連続したヌクレオチドであることが意図されている。

20

30

本明細書で使用される場合、「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」とは、二重鎖または三重鎖を成した分子または部分的な二重鎖または三重鎖を成した性質を有する分子を形成することを意味するものと理解される。「アニーリングする」という用語は、本明細書で使用される場合、「ハイブリダイズする」と同義である。「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」という用語は、「ストリンジェントな条件」または「高ストリンジェンシー」という用語、および「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」という用語を包含する。

40

【0236】

本明細書で使用される場合、「ストリンジェントな条件」または「高ストリンジェンシー」とは、相補配列（複数可）を含有する1つまたは複数の核酸鎖の間またはその内部でのハイブリダイゼーションを可能にするが、ランダムな配列のハイブリダイゼーションは妨げる条件である。ストリンジェントな条件では、もしあれば、核酸と標的鎖の間の不一致が少わずかに容認される。そのような条件は公知であり、多くの場合、高い選択性を必要とする適用に使用される。非限定的な適用として、遺伝子またはその核酸セグメントなどの核酸の単離、または少なくとも1つの特異的なmRNA転写物またはその核酸セグメントの検出などが挙げられる。

【0237】

ストリンジェントな条件は、約42℃～約70℃の温度で約0.02M～約0.5Mの

50

NaClによってもたらされるものなどの低塩および／または高温条件を含み得る。所望のストリンジェンシーの温度およびイオン強度は、一部において、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量、核酸（複数可）の電荷組成、および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決定されることが理解される。

【0238】

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に非限定的な例として記載されていること、および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多くの場合、1つまたは複数の陽性対照または陰性対照と比較することによって経験的に決定されることが理解される。ハイブリダイゼーションの様々な条件を構想される適用に応じて使用して、標的配列に対する核酸の選択性の様々な程度を実現することができる。非限定的な例では、ストリンジェントな条件下では核酸とハイブリダイズしない関連する標的核酸の同定または単離を、低温かつ／または高イオン強度でのハイブリダイゼーションによって実現することができる。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」と称され、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℃の範囲の温度において約0.15M～約0.9MのNaClで実施されるハイブリダイゼーションが挙げられる。低ストリンジェンシー条件または高ストリンジェンシー条件をさらに改変して特定の適用に合わせることができる。

10

核酸の改変

20

【0239】

以下で考察する任意の改変を核酸に適用することができる。改変の例としては、RNA骨格またはDNA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。核酸内の任意の適切な数の骨格連結、糖および／または塩基を改変することができる（例えば、それぞれ独立に、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'炭素とつながった塩基アデニン、シトシン、グアニン、チミン、またはウラシルのうちの任意の1種である。

【0240】

30

改変された塩基は、1'位にあるアデニン、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。他の修飾塩基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リル、5-メチルイソカルボスチリリル、3-メチル-7-プロピニルイソカルボスチリリル、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、イソカルボスチリリル、7-プロピニルイソカルボスチリリル、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、ナプタレニル、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、ペンタセニルなどが挙げられる。

40

50

【0241】

一部の実施形態では、例えば、核酸は、リン酸骨格が改変された改変核酸分子を含んでよい。骨格改変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、アミド化カルバミン酸、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、スルファミン酸、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の改変が挙げられる。ある特定の例では、ヌクレオシドに天然に存在するリボース糖部分がヘキソース糖、多環ヘテロアルキル環、またはシクロヘキセニル基で置き換えられている。ある特定の例では、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ってよい。ある特定の例では、多環ヘテロアルキル基は、環内に酸素原子を1つ含有する二環であってよい。ある特定の例では、多環ヘテロアルキル基は、ビシクロ〔2. 2. 1〕ヘプタン、ビシクロ〔3. 2. 1〕オクタン、またはビシクロ〔3. 3. 1〕ノナンである。

10

【0242】

ニトロピロリルおよびニトロインドリル核酸塩基は、普遍的な塩基として公知の化合物のクラスのメンバーである。普遍的な塩基とは、4種の天然に存在する塩基のいずれかと、オリゴヌクレオチド二重鎖の挙動または活性の融解に実質的に影響を及ぼすことなく置き換えることができる化合物である。天然に存在する核酸塩基に付随する水素結合相互作用の安定化とは対照的に、3-ニトロピロリル核酸塩基を含有するオリゴヌクレオチド二重鎖は、単にスタッキング相互作用によって安定化することができる。ニトロピロリル核酸塩基との著しい水素結合相互作用がなければ、特異的な相補塩基に対する特異性がなくなる。さらに、4-、5-および6-ニトロインドリルは4種の天然の塩基に対して非常にわずかな特異性を示す。1-(2'-O-メチル-β-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年、45巻、5629頁において考察されている。他の普遍的な塩基としては、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、ニトロベンズイミダゾリル、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誘導体が挙げられる。

20

30

ジフルオロトリルは、普遍的な塩基として機能する非天然核酸塩基である。ジフルオロトリルは、天然の核酸塩基であるチミンのアイソスターである。しかし、チミンとは異なり、ジフルオロトリルは、天然の塩基のいずれに対しても明らかな選択性を示さない。普遍的な塩基として機能する他の芳香族化合物は、4-フルオロ-6-メチルベンズイミダゾールおよび4-メチルベンズ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、天然の塩基のみを含有するオリゴヌクレオチド配列と比較してわずかな不安定化しか引き起こさない普遍的な塩基である。他の非天然核酸塩基としては、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、およびその構造誘導体が挙げられる。ジフルオロトリル、4-フルオロ-6-メチルベンズイミダゾール、4-メチルベンズイミダゾール、および上記の他の非天然塩基の合成手順を含めたより詳細な考察については、Schweitzerら、J. *Org. Chem.*、59巻：7238～7242頁(1994年)を参照されたい。

40

さらに、化学的置換基、例えば架橋剤を使用して反応にさらなる安定性または不可逆性を付加することができる。架橋剤としての非限定的な例は、例えば、1, 1-ビス(ジア

50

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、3, 3' - ジチオビス(スクシンイミジルプロピオン酸)などのジスクシンイミジルエステルを含めた同種二官能性イミドエステル、ビス-N - マレイミド-1, 8 - オクタンなどの二官能性マレイミドおよびメチル-3 - [(p - アジドフェニル)ジチオ]プロピオイミデートなどの薬剤が挙げられる。

【0243】

ヌクレオチド類似体は、「ロックド」核酸も含み得る。ある特定の組成物を使用して、内在性核酸を特定の構造に基本的に「アンカー」または「ロック」することができる。アンカー配列は核酸複合体の解離を予防する機能を果たし、したがって、コピーを予防することができるだけでなく、内在性の配列を標識、修飾、および/またはクローニングすることもできる。ロックされた構造により、遺伝子発現を調節する(すなわち、転写または複製を阻害または増強する)こともでき、内在性核酸配列を標識または他のやり方で修飾するために使用することができる安定な構造としてこれを使用することもでき、内在性の配列を単離するため、すなわち、クローニングのためにこれを使用することもできる。

10

【0244】

核酸分子は、RNAまたはDNAのみを含有する分子に限定する必要はなく、化学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されたヌクレオチドのパーセントは、1%から100%まで(例えば、約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%または95%)であってよい。

20

核酸調製物

【0245】

一部の実施形態では、例えば、アッセイ、または治療において対照または標準のとして使用するための核酸が提供される。核酸は、例えば、化学合成、酵素による産生または生物学的産生などの当技術分野で公知の任意の技法によって作出することができる。核酸は、生体試料から回収または単離することができる。核酸は組換え型であってもよく、細胞に対して天然または内在性(細胞のゲノムから産生されるもの)であってもよい。小さな核酸分子の回収が増強されるように生体試料を処理できることが意図されている。一般に、方法は、グアニジニウムおよび界面活性剤を伴う溶液を用いて細胞を溶解することを含む。

30

【0246】

核酸合成を標準の方法に従って実施することもできる。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、または、ホスホラミダイト化学および固相技法を使用して、もしくはデオキシヌクレオシドH - ホスホン酸中間体を經由する*in vitro*化学合成によって作出された核酸が挙げられる。オリゴヌクレオチド合成の種々の異なる機構が他の箇所に開示されている。

【0247】

核酸は、公知の技法を使用して単離することができる。特定の実施形態では、小さな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を使用することができる。クロマトグラフィーは、核酸をタンパク質から、または他の核酸から分離または単離するために使用するプロセスである。そのような方法は、ゲルマトリックスを用いた電気泳動、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伴い得る。細胞由来の核酸を使用または評価する場合、方法は、一般に、RNAの特定の集団を単離するプロセスを行う前に、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)で溶解させることを伴う。

40

【0248】

方法は、核酸を単離するために有機溶媒および/またはアルコールの使用を伴い得る。一部の実施形態では、細胞溶解物に添加するアルコールの量により、約55%~60%の

50

アルコール濃度が実現される。異なるアルコールを使用することができるが、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、固体支持体としては、電気陰性基を伴う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、およびカラムが挙げられる。そのような単離手順にはガラス繊維フィルターまたはカラムが有効である。

【0249】

核酸単離プロセスは、時には、a) グアニジニウムを含む溶解溶液を用いて試料中の細胞を溶解するステップであって、少なくとも約1 Mのグアニジニウムの濃度の溶解物が生じるステップ；b) フェノールを含む抽出溶液を用いて溶解物から核酸分子を抽出するステップ；c) 溶解物にアルコール溶液を添加して溶解物／アルコール混合物を形成するステップであって、混合物中のアルコールの濃度が約35%～約70%であるステップ；d) 溶解物／アルコール混合物を固体支持体に塗布するステップ；e) イオン溶液を用いて固体支持体から核酸分子を溶出させるステップ；および、f) 核酸分子を捕捉するステップを含み得る。試料を乾燥させ、その後の操作に適した液体および体積に再懸濁させることができる。

10

遺伝子移入の方法

【0250】

細胞における導入遺伝子の発現の達成を媒介するために、発現構築物を細胞に移入することが必要になる。そのような移入には、ウイルスによるまたはウイルスによらない遺伝子移入の方法を使用することができる。この節では、遺伝子移入の方法および組成物に関する考察が提供される。

20

【0251】

細胞に発現ベクターを導入することによって、発現ベクターを含む形質転換された細胞を生成する。現行の方法で使用するための細胞小器官、細胞、組織または生物体を形質転換するためのポリヌクレオチド送達の適切な方法は、事実上、ポリヌクレオチド（例えば、DNA）を細胞小器官、細胞、組織または生物体に導入することができるあらゆる方法を含む。

【0252】

宿主細胞はベクターのレシピエントとして使用することができ、そのように使用されている。宿主細胞は、所望の結果がベクターの複製であるかベクターにコードされるポリヌクレオチド配列の一部または全部の発現であるかに応じて、原核生物由来であっても真核生物由来であってもよい。多数の細胞株および培養物が宿主細胞として使用するために入手可能であり、これらは、生きている培養物および遺伝物質のアーカイブとしての機能を果たす組織であり、American Type Culture Collection (ATCC) を通じて得ることができる。

30

【0253】

適切な宿主を決定することができる。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、多くのベクターを複製するために、プラスミドまたはコスミドを原核宿主細胞に導入することができる。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市販の細菌宿主、例えば、SURE（登録商標）Competent Cells および SOLOPACK Gold Cells（STRATAGENE（登録商標）、La Jolla、CA）などが挙げられる。あるいは、E. coli LE392などの細菌細胞をファージウイルスの宿主細胞として使用することができる。宿主細胞として使用することができる真核細胞としては、これだけに限定されないが、酵母、昆虫および哺乳動物が挙げられる。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宿主細胞の例としては、これだけに限定されないが、HeLa、NIH3T3、Jurkat、293、COS、CHO、Saos、およびPC12が挙げられる。酵母株の例としては、これだけに限定されないが、YPH499、YPH500およびYPH501が挙げられる。

40

【0254】

50

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、およびウイルスベクターを含み得る。これらのワクチンを用いて細胞を形質転換する方法、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、本明細書においても考察されている。

核酸またはウイルスベクターを移入する方法の例

【0255】

任意の適切な方法を使用して細胞にトランスフェクトまたは形質転換すること、または本方法のヌクレオチド配列または組成物を投与することができる。ある特定の例は本明細書で提示されており、これは、陽イオン性ポリマー、脂質様分子、および、例えば、IN-VIVO-JET PEIなどのある特定の市販品を使用した送達などの方法をさらに含む。

10

ex vivoにおける形質転換

【0256】

ex vivoの状況において生物体から取り出された血管細胞および組織をトランスフェクトするために種々の方法が利用可能である。例えば、イヌ内皮細胞がレトロウイルスによる遺伝子移入によってin vitroで遺伝的に変更され、イヌに移植されている(Wilsonら、Science、244巻：1344～1346頁、1989年)。別の例では、Yucatanミニブタ内皮細胞がレトロウイルスによってin vitroでトランスフェクトされ、ダブルバルーンカテーテルを使用して動脈内に移植された(Nabelら、Science、244巻(4910号)：1342～1344頁、1989年)。したがって、細胞または組織を取り出し、本明細書で提示されているポリヌクレオチドを使用してex vivoでトランスフェクトすることができることが意図されている。特定の態様では、移植された細胞または組織を生物体に入れることができる。

20

注射

【0257】

ある特定の実施形態では、抗原提示細胞または核酸またはウイルスベクターを細胞小器官、細胞、組織または生物体に、例えば、皮下、皮内、筋肉内、静脈内、前立腺内、腫瘍内、腹腔内などの1回または複数回の注射(すなわち、針による注射)によって送達することができる。注射の方法としては、例えば、生理食塩水溶液を含む組成物の注射が挙げられる。別の実施形態は、ポリヌクレオチドを直接マイクロインジェクションによって導入することを含む。使用する発現ベクターの量は、抗原の性質ならびに使用する細胞小器官、細胞、組織または生物体に応じて変動し得る。

30

【0258】

皮内注射、結節内(intranodal)注射、またはリンパ内注射は、より一般に使用されるDC投与の方法のいくつかである。皮内注射は、血流中への吸収率が低い、リンパ系に急速に取り込まれることを特徴とする。真皮内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る。これを正確に実施するには適切な部位調製が必要である(すなわち、適切な針の配置を観察するために毛髪を刈る)。結節内注射により、抗原をリンパ組織に直接送達することが可能になる。リンパ内注射により、DCの直接投与が可能になる。

40

電気穿孔

【0259】

ある特定の実施形態では、ポリヌクレオチドを電気穿孔によって細胞小器官、細胞、組織または生物体に導入する。電気穿孔には、細胞およびDNAの懸濁液を高電圧の放電に曝露することが伴う。この方法のいくつかの変形では、ペクチン分解酵素などのある特定の細胞壁分解酵素を使用して、標的レシピエント細胞を無処理の細胞よりも電気穿孔によって形質転換されやすいものにする(米国特許第5,384,253号、参照により本明細書に組み込まれる)。

【0260】

50

電気穿孔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。このようにして、マウスプレBリンパ球にヒト銅ー免疫グロブリン遺伝子がトランスフェクトされており (Potterら、(1984年) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA、81巻、7161~7165頁)、ラット肝細胞に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がトランスフェクトされている (Tur-Kasp aら、(1986年) Mol. Cell Biol、6巻、716~718頁)。

ワクチン、またはeVacに対するin vivoにおける電気穿孔が単純な注射技法によって臨床的に実行されている。ポリペプチドをコードするDNAベクターを患者の皮内に注射する。次いで、電極から電気パルスが皮内空間に印加され、それにより、そこに局在している細胞、特に常在皮膚樹状細胞によるDNAベクターの取り込み、およびコードされるポリペプチドの発現が引き起こされる。次いで、局所的な炎症によって活性化されたこれらのポリペプチド発現細胞は、例えば、リンパ節に移動し、抗原を提示し得る。例えば、これだけに限定されないが、核酸の注射または任意の他の核酸を電気穿孔によって細胞に送達することができる投与の手段に従って電気穿孔を使用して核酸を投与する場合、核酸は電気穿孔により投与される。

【0261】

電気穿孔の方法は、例えば、それらの全体がこれによって参照により本明細書に組み込まれる、Sardesai, N. Y、およびWeiner, D. B、Current Opinion in Immunotherapy 23巻: 421~9頁 (2011年) およびFerraro, B. ら、Human Vaccines 7巻: 120~127頁 (2011年) において考察されている。

リン酸カルシウム

【0262】

他の実施形態では、リン酸カルシウム沈殿を使用してポリヌクレオチドを細胞に導入する。この技法を使用して、ヒトKB細胞にアデノウイルス5 DNAがトランスフェクトされている (Grahamおよびvan der Eb、(1973年) Virology、52巻、456~467頁)。同様に、このようにして、マウスL (A9) 細胞、マウスC127細胞、CHO細胞、CV-1細胞、BHK細胞、NIH3T3細胞およびHeLa細胞に、ネオマイシンマーカー遺伝子がトランスフェクトされ (ChenおよびOkayama、Mol. Cell Biol、7巻 (8号): 2745~2752頁、1987年)、ラット肝細胞に種々のマーカー遺伝子がトランスフェクトされた (Ripperら、Mol. Cell Biol、10巻: 689~695頁、1990年)。

DEAE-デキストラン

【0263】

別の実施形態では、DEAE-デキストラン、そ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を細胞に送達する。このように、レポータープラスミドがマウス骨髄腫および赤白血病細胞に導入された (Gopal, T. V、Mol Cell Biol、1985年5月; 5巻 (5号): 1188~90頁)。

超音波ローディング (sonication loading)

【0264】

さらなる実施形態は、直接音波ローディングによってポリヌクレオチドを導入することを含む。超音波ローディングにより、LTK-線維芽細胞にチミジンキナーゼ遺伝子がトランスフェクトされている (Fechheimerら、(1987年) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA、84巻、8463~8467頁)。

リボソーム媒介トランスフェクション

【0265】

さらなる実施形態では、例えばリボソームなどの脂質複合体にポリヌクレオチドを封入することができる。リボソームは、リン脂質二分子膜と内部の水性媒体を特徴とする小胞構造である。多重膜リボソームは水性媒体によって分離された多数の脂質層を有する。リボソームは、リン脂質を過剰な水溶液に懸濁させると自然に形成される。脂質成分は、閉

10

20

30

40

50

じた構造が形成される前に自己再編成を受け、脂質二重層の間に水を封入し、溶質を溶解させる（GhoshおよびBachhawat、（1991年）、Liver Diseases、Targeted Diagnosis and Therapy Using Specific Receptors and Ligands、87～104頁）。リポフェクタミン（Gibco BRL）またはSuperfect（Qiagen）と複合体を形成したポリヌクレオチドも意図されている。

受容体媒介トランスフェクション

【0266】

さらに、受容体媒介性送達ビヒクルによってポリヌクレオチドを標的細胞に送達することができる。これらは、標的細胞において起こる、受容体媒介性エンドサイトーシスによる巨大分子の選択的な取り込みを活用するものである。種々の受容体の細胞型特異的分布を考慮すると、この送達方法により、また別の程度の特異性が付加される。

10

【0267】

ある特定の受容体媒介性遺伝子ターゲティングビヒクルは、細胞受容体特異的リガンドおよびポリヌクレオチド結合物質を含む。他の受容体媒介性遺伝子ターゲティングビヒクルは、送達されるポリヌクレオチドが作動可能に付着した細胞受容体特異的リガンドを含む。いくつかのリガンドが受容体媒介性遺伝子移入のために使用されており（WuおよびWu、（1987年）J. Biol. Chem、262巻、4429～4432頁；Wagnerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、87巻（9号）：3410～3414頁、1990年；Peralesら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、91巻：4086～4090頁、1994年；Meyers、EPO0273085）、これにより、この技法の作動性が確立されている。別の哺乳動物細胞型に関する特異的な送達が考察されている（WuおよびWu、Adv. Drug Delivery Rev、12巻：159～167頁、1993年；参照により本明細書に組み込まれる）。ある特定の態様では、リガンドを、標的細胞集団で特異的に発現する受容体に対応するように選択する。

20

【0268】

他の実施形態では、細胞特異的ポリヌクレオチドターゲティングビヒクルのポリヌクレオチド送達ビヒクル成分は、特異的な結合性リガンドをリボソームと組み合わせて含んでよい。送達するポリヌクレオチド（複数可）をリボソーム中に収め、特異的な結合性リガンドをリボソーム膜に機能的に組み入れる。したがって、リボソームが標的細胞の受容体（複数可）に特異的に結合し、内容物が細胞に送達される。そのような系は、例えば、EGF受容体の上方制御を示す細胞にポリヌクレオチドを受容体媒介性送達するために上皮増殖因子（EGF）を使用する系を使用すると機能的であることが示されている。

30

【0269】

さらに別の実施形態では、標的化送達ビヒクルのポリヌクレオチド送達ビヒクル成分は、リボソーム自体であってよく、それは、例えば、細胞特異的結合を導く1つまたは複数の脂質または糖タンパク質を含んでよい。例えば、ラクトシルセラミド、ガラクトース末端アシアロガングリオシドがリボソームに組み入れられ、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ている（Nicolaouら、（1987年）Methods Enzymol、149巻、157～176頁）。同様に組織特異的な形質転換用構築物を標的細胞に特異的に送達することができることが意図されている。

40

微粒子銃

【0270】

微粒子銃技法を使用して、ポリヌクレオチドを少なくとも1つの細胞小器官、細胞、組織または生物体に導入することができる（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；そのそれぞれが参照により本明細書に組み込まれる）。この方法は、DNAをコーティングした微粒子銃を高速度に加速し、それにより、細胞膜に穴を開け細胞を死滅させることなく細胞に進入させることを可能にできることによる（Kleinら、（1

50

987年) Nature、327巻、70～73頁)。多種多様な微粒子銃技法が当技術分野で公知であり、その多くが本方法に適用可能である。

【0271】

この微粒子銃では、1つまたは複数の粒子に少なくとも1つのポリヌクレオチドをコーティングし、推進力によって細胞内に送達することができる。小粒子を加速させるためのいくつかのデバイスが開発されてきた。そのようなデバイスの1つは、高圧放電に依拠して電流を生じさせ、今度はそれにより原動力をもたらすものである(Yangら、(1990年) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA、87巻、9568～9572頁)。使用する微粒子銃は、タングステンまたは金の粒子またはビーズなどの生物学的に不活性な物質からならなければならない。例示的な粒子としては、タングステン、プラチナで構成される粒子、および、特定の例では、例えばナノ粒子を含めた金で構成される粒子が挙げられる。一部の場合には、微粒子銃を使用してDNAをレシピエント細胞に送達するために金属粒子上にDNAを沈殿させる必要がないことが意図されている。しかし、粒子は、DNAをコーティングしたものではなく、DNAを含有するものであってよいことが意図されている。DNAをコーティングした粒子により、粒子衝撃によるDNA送達のレベルが上昇し得るが、それ自体は必要ない。

ウイルスベクター媒介性移入の方法の例

【0272】

ヌクレオチド配列、またはヌクレオチド配列を含む組成物を細胞または対象に投与し、したがって、対象の細胞(複数可)によってヌクレオチド配列によりコードされる遺伝子が発現され得るようにするために適した任意のウイルスベクターを本方法において使用することができる。ある特定の実施形態では、導入遺伝子をウイルス粒子に組み入れて、細胞への遺伝子移入を媒介させる。一般には、ウイルスを単に生理的条件下で適切な宿主細胞に曝露し、それにより、ウイルスの取り込みを可能にする。本方法は、以下に考察する種々のウイルスベクターを使用して有利に利用される。

アデノウイルス

【0273】

アデノウイルスは、DNAゲノムのサイズが中程度であること、操作が容易であること、力価が高いこと、標的細胞の範囲が広いこと、および感染性が高いことから、遺伝子移入ベクターとして使用するために特に適している。およそ36kbのウイルスゲノムに、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有する100～200塩基対(bp)の末端逆位配列(ITR)を結合させる。異なる転写ユニットを含有するゲノムの初期(E)領域および後期(L)領域がウイルスDNA複製の開始によって分割される。

【0274】

E1領域(E1AおよびE1B)は、ウイルスゲノムの転写の調節に関与するタンパク質および数種の細胞遺伝子をコードする。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の合成がもたらされる。これらのタンパク質はDNA複製、後期遺伝子発現、および宿主細胞の遮断に関与する(Renan, M. J. (1990年) Radiother Oncol、19巻、197～218頁)。大多数のウイルスカプシドタンパク質を含めた後期遺伝子(L1、L2、L3、L4およびL5)の産物は、主要な後期プロモーター(MLP)によって発せられる単一の一次転写物の重要なプロセッシングの後にのみ発現する。MLP(16.8マップ単位に位置する)は、感染の後期に特に効率的であり、このプロモーターから発せられるmRNAの全てが5'三部分リーダー(TL)配列を有し、これにより、それらのmRNAが翻訳に有用なものになる。

【0275】

アデノウイルスを遺伝子療法に対して最適化するために、DNAの大きなセグメントを含めることができるように保有能力を最大にすることが必要である。ある特定のアデノウイルスによる産物に付随する毒性および免疫学的反応を低下させることも非常に望ましい

。2つの目標は、アデノウイルスの遺伝子の排除によりどちらの目的も果たされるという点で、ある程度境界を共にする。本方法を実施することにより、治療用構築物を相対的に容易に操作することができるままにしながら、これらの目標の両方を実現することが可能である。

【0276】

ウイルスDNA複製に必要なシスエレメントは全て直鎖状ウイルスゲノムの両末端にある末端逆位配列 (ITR) (100~200bp) 内に局在するので、DNAを大幅に置き換えることが可能である。ITRを含有するプラスミドは欠陥のないアデノウイルスの存在下で複製し得る (Hay, R. T. ら、J Mol Biol. 1984年6月5日; 175巻 (4号): 493~510頁)。したがって、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、複製が可能になる。

10

【0277】

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側の末端にある194~385bp (0.5~1.1マップ単位) の間に局在する (Hearin g ら、J. (1987年) Virol、67巻、2555~2558頁)。このシグナルは、特異的な配列が左側の末端の近くであるが、頭部構造へのDNAの挿入のために必要なタンパク質への結合を媒介する付着末端配列の外側にあるバクテリオファージラムダDNAのタンパク質認識部位を模倣する。AdのE1置換ベクターにより、ウイルスゲノムの左側の末端にある450bp (0~1.25マップ単位) の断片を293細胞に直接パッケージングできることが実証された (Levrero ら、Gene、101巻: 195~202頁、1991年)。

20

【0278】

アデノウイルスゲノムのある特定の領域を哺乳動物細胞のゲノムに組み入れ、それにより、コードされる遺伝子を発現させることができることが以前に示されている。これらの細胞株は、その細胞株によりコードされる、アデノウイルスの機能が欠損し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ものである。「ヘルプ」ベクター、例えば、野生型ウイルスまたは条件的に欠陥のある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なされている。

【0279】

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に補完され得る。しかし、複製に関わる機能をもたらしするために必要なヘルパーウイルスの存在があらゆる調製物を汚染するので、この知見単独では複製欠損性ベクターの単離は可能にならない。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する追加的なエレメントが必要であった。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ものである。

30

【0280】

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側の末端に存在することが示されている (Tibbetts ら (1977年) Cell、12巻、243~249頁)。後の試験により、ゲノムのE1A (194~358bp) 領域が欠失した変異体は、初期 (E1A) 機能が補完された細胞株においてさえ成長が不十分であることが示された (Hearin g および Shenk、(1983年) J. Mol. Biol. 167巻、809~822頁)。補償性アデノウイルスDNA (0~353bp) を変異体の右側の末端に再結合させると、ウイルスは正常にパッケージングされた。さらなる変異性分析により、Ad5ゲノムの左側の末端に、短い、繰り返される位置依存性エレメントが同定された。ゲノムのいずれかの末端に存在する場合、1コピーの反復が効率的なパッケージングのために十分であるが、Ad5 DNA分子の内部に移動する場合にはそうではないことが見いだされた (Hearin g ら、J. (1987年) Virol、67巻、2555~2558頁)。

40

【0281】

変異型のパッケージングシグナルを使用することによって、変動する効率でパッケージ

50

ングされるヘルパーウイルスを創出することが可能である。一般には、変異は点変異または欠失である。パッケージングの効率が低いヘルパーウイルスをヘルパー細胞において成長させる場合、たとえ野生型ウイルスと比較して速度が低下しても、ウイルスをパッケージングし、それにより、ヘルパーの繁殖を可能にする。しかし、これらのヘルパーウイルスを細胞において野生型パッケージングシグナルを含有するウイルスと一緒に成長させると、野生型パッケージングシグナルが変異型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定されていることを考慮すると、野生型シグナルを含有するウイルスがヘルパーと比較して選択的にパッケージングされる。この嗜好が十分に大きければ、ストック手法の均一性を実現することができる。

【0282】

特定の組織または種に対するADV構築物のトロピズムを改善するために、多くの場合、受容体結合性線維配列をアデノウイルス分離株間で置換することができる。例えば、アデノウイルス5に見出されるコクサッキーウイルス・アデノウイルス受容体(CAR)リガンドでアデノウイルス35由来のCD46結合性線維配列を置換し、それによりウイルスのヒト造血細胞に対する結合親和性を著しく改善することができる。生じた「シュードタイプされた」ウイルス、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ている。さらに、ウイルスの標的細胞への再ターゲティングが可能になるように線維を改変するための種々の生化学的方法が存在する。方法は、二機能性抗体(一方の末端がCARリガンドに結合し、一方の末端が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に基づくキメラリガンドとの会合を可能にするための線維の代謝的ビオチン化を含む。あるいは、リガンド(例えば、抗CD205、異種二官能性リンカー(例えば、PEGを含有する)によって)、アデノウイルス粒子に付着させることができる。

レトロウイルス

【0283】

レトロウイルスは、感染細胞において、逆転写のプロセスによってそれらのRNAを二本鎖DNAに変換できることを特徴とする一本鎖RNAウイルスのグループである(Coffin、(1990年)、Virology, ed.、New York: Raven Press、1437~1500頁)。次いで、生じたDNAを細胞の染色体にプロウイルスとして安定に組み込み、ウイルスタンパク質の合成を導く。組み込みにより、ウイルス遺伝子配列がレシピエント細胞およびその後裔に保持される。レトロウイルスゲノムは、それぞれカプシドタンパク質、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の3つの遺伝子を含有する。gag遺伝子から上流に見出される、psiと称される配列は、ゲノムのビリオンへのパッケージング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'末端および3'末端に存在する。これらは強力なプロモーターおよびエンハンサー配列を含有し、同様に、宿主細胞のゲノムへの組み込みのために必要である(Coffin、1990年)。したがって、例えば、本技術は、例えば、細胞に形質導入するために使用するポリヌクレオチドを細胞のゲノムに組み込むための細胞を含む。

【0284】

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、ある特定のウイルス配列の代わりにウイルスゲノムに挿入して、複製欠損性のウイルスを作製する。ビリオンを作製するために、gag遺伝子、pol遺伝子およびenv遺伝子を含有するがLTRおよびpsi成分を伴わないパッケージング細胞株を構築する(Mannら、(1983年)Cell、33巻、153~159頁)。ヒトcDNAをレトロウイルスLTRおよびpsi配列と一緒に含有する組換えプラスミドをこの細胞株に導入すると(例えばリン酸カルシウム沈殿によって)、psi配列により、組換えプラスミドのRNA転写物がウイルス粒子にパッケージングされ、次いで、これが培養培地中に分泌される(Nicolas、J. F、およびRubenstein、J. L. R、(1988年)、Vectors: a Survey of Molecular Clonin

10

20

30

40

50

g Vectors and Their Uses、RodriguezおよびDenhardt編）。NicolasおよびRubenstein; Teminら、(1986年)、Gene Transfer、Kucherlapati(編)、New York: Plenum Press、149～188頁; Mannら、1983年)。組換えレトロウイルスを含有する培地を採取し、場合によって濃縮し、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広範な細胞型に感染することができる。しかし、多くの型のレトロウイルスの組み込みおよび安定発現には、宿主細胞の分裂が必要である(Paskindら、(1975年) Virology、67巻、242～248頁)。

【0285】

最近開発された、レトロウイルスベクターの特異的なターゲティングが可能になるように設計された手法は、ガラクトース残基をウイルスエンベロープに化学的に付加することによるレトロウイルスの化学修飾に基づく。この修飾により、所望であり得る、肝細胞などの細胞へのアシアロ糖タンパク質受容体を介した特異的な感染が可能になり得る。

【0286】

組換えレトロウイルスをターゲティングするための異なる手法が設計されており、これは、レトロウイルスのエンベロープタンパクを質に対するビオチン化抗体および特異的な細胞受容体に対するビオチン化抗体を使用するものである。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抗体がカップリングされた(Rouxら、(1989年) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA、86巻、9079～9083頁)。主要組織適合性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、*in vitro*において狭宿主性ウイルスを用いて、これらの表面抗原を有する種々のヒト細胞の感染が実証された(Rouxら、1989年)。

アデノ随伴ウイルス

【0287】

AAVは、約4700塩基対の直鎖状の一本鎖DNAを利用する。末端逆位配列がゲノムに隣接する。2つの遺伝子がゲノム内に存在し、いくつもの別個の遺伝子産物を生じさせる。第1のcap遺伝子は、VP-1、VP-2およびVP-3と名付けられた3つの異なるポリオンタンパク質(VP)を産生する。第2の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遺伝子産物のうちの1つまたは複数は、AAV転写におけるトランス活性化に関与する。

【0288】

AAVの3つのプロモーターは、マップ単位でのそれらのゲノム内の位置によって名付けられている。これらは、左から右に、p5、p19およびp40である。転写により、6つの転写物が生じ、3つのプロモーターのそれぞれで2つが開始され、各対のうちの1つがスプライスされる。マップ単位42～46に由来するスプライス部位は各転写物について同じである。4つの非構造タンパク質は、見たところではより長い転写物に由来し、3つのポリオンタンパク質は全て最小の転写物から生じる。

【0289】

AAVはヒトにおいていかなる病理的状态にも関連しない。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、および、当然アデノウイルスなどのウイルスからの「ヘルプ」機能を必要とする。最もよく特徴付けられているヘルパーはアデノウイルスであり、このウイルスの多くの「初期」機能によりAAV複製が補助されることが示されている。AAV repタンパク質の低レベル発現によりAAVの構造的な発現が抑えられると考えられており、ヘルパーウイルス感染によりこの妨害が取り除かれると考えられている。

【0290】

AAVベクターの末端反復は、AAVまたは改変AAVゲノムを含有するp201などのプラスミド制限エンドヌクレアーゼ消化によって(Samulskiら、J. Virol、61巻: 3096～3101頁(1987年))、または、これだけに限定されないが、公開されたAAVの配列に基づいて末端反復を化学的または酵素的に合成すること

を含めた他の方法によって得ることができる。例えば、欠失分析により、機能すること、すなわち、安定かつ部位特異的に組み込まれることを可能にするために必要なAAV ITRの最小の配列またはその一部を決定することができる。どの配列の軽微な改変が、末端反復の安定かつ部位特異的な組み込みを導く能力を維持しながら許容され得るかも決定することができる。

【0291】

AAVに基づくベクターは、*in vitro*における遺伝子送達のための安全かつ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、前臨床段階および臨床段階で、*ex vivo*と*in vivo*の両方で潜在的な遺伝子療法において広範囲に適用するために開発され、試験されている（CarterおよびFlotte、（1995年）Ann. N. Y. Acad. Sci、770巻；79～90頁；Chatt e i j e e ら、（1995年）Ann. N. Y. Acad. Sci、770巻、79～90頁；Ferrari ら、（1996年）J. Virol、70巻、3227～3234頁；Fisher ら、（1996年）J. Virol、70巻、520～532頁；Flotte ら、Proc. Nat'l Acad. Sci. USA、90巻、10613～10617頁、（1993年）；Goodman ら、（1994年）、Blood、84巻、1492～1500頁；Kaplit t ら、（1994年）Nat'l Genet、8巻、148～153頁；Kaplit t、M. G. ら、Ann Thorac Surg. 1996年12月；62巻（6号）：1669～76頁；Kessler ら、（1996年）Proc. Nat'l Acad. Sci. US A、93巻、14082～14087頁；Koeberl ら、（1997年）Proc. Nat'l Acad. Sci. USA、94巻、1426～1431頁；Miz ukami ら、（1996年）Virology、217巻、124～130頁）。

【0292】

肺におけるAAV媒介性の効率的な遺伝子移入および発現が、嚢胞性線維症を処置するための臨床試験に至っている（CarterおよびFlotte、1995年；Flotte ら、Proc. Nat'l Acad. Sci. USA、90巻、10613～10617頁、（1993年））。同様に、ジストロフィン遺伝子の骨格筋へのAAV媒介性遺伝子送達による筋ジストロフィーの治療の見込み、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の見込み、肝臓の第IX因子遺伝子送達による血友病Bの処置の見込み、および潜在的に、心臓への血管内皮増殖因子遺伝子による心筋梗塞の処置の見込みが、これらの器官におけるAAV媒介性導入遺伝子発現が非常に効率的であることが最近示されているので、有望であると思われる（Fisher ら、（1996年）J. Virol、70巻、520～532頁；Flotte ら、1993年；Kaplit t ら、1994年；1996年；Koeberl ら、1997年；McC own ら、（1996年）Brain Res、713巻、99～107頁；Ping ら、（1996年）Microcirculation、3巻、225～228頁；Xia o ら、（1996年）J. Virol、70巻、8098～8108頁）。

他のウイルスベクター

【0293】

他のウイルスベクターも本方法および組成物において発現構築物として使用される。ワクシニアウイルス（Ridgeway、（1988年）Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses、467～492頁；Baichwal および Sugden、（1986年）Gene Transfer、117～148頁；Coupar ら、Gene、68巻：1～10頁、1988年）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。これらのウイルスにより、種々の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がもたらされる。

【0294】

構築物を細胞内に送達したら、導入遺伝子をコードする核酸が異なる部位に位置づけ、

そこで発現させる。ある特定の実施形態では、導入遺伝子をコードする核酸を安定に細胞のゲノムに組み込む。この組み込みは相同組換え（遺伝子置換）によるコグネイトな位置および方向のものである、またはランダムな、非特異的な位置に組み込む（遺伝子増大）。さらに別の実施形態では、核酸を細胞内で別々のエピソームDNAセグメントとして安定に維持する。そのような核酸セグメントまたは「エピソーム」は、宿主細胞周期とは独立したまたはそれと同期した維持および複製を可能にするために十分な配列をコードする。発現構築物をどのように細胞に送達するか、および細胞内のどこに核酸が留まるかは使用する発現構築物の種類に左右される。

疾患を治療するための方法

【0295】

本方法は、細胞を例えば注入によって投与することが有益であり得る疾患を治療または予防する方法も包含する。

【0296】

細胞、例えば、前駆細胞など、例えば、造血幹細胞、間葉系間質細胞、幹細胞、多能性幹細胞、および胚性幹細胞などを細胞療法に使用することができる。細胞はドナーに由来するものであってもよく、患者から得た細胞であってもよい。細胞は、例えば、再生、例えば、疾患細胞の機能を置き換えるために使用され得る。異種遺伝子を発現するように細胞を改変することができ、したがって、生物学的薬剤を特定の微小環境、例えば、疾患のある骨髄または転移性沈着などに送達することができる。また、例えば、間葉系間質細胞が免疫抑制性活性をもたらすために使用されており、移植片対宿主病および自己免疫障害の治療において使用することができる。本出願で提供される細胞は、細胞療法後に、細胞を除去する必要がある状況で有益であり得る安全スイッチを含有する。例えば、いくつかの状況において、前駆細胞を患者にもたらし場合には、細胞がより成熟した細胞型に不適切に分化すること、または、例えば治療用細胞を除去することが必要である別の組織への望ましくない誘引などの有害事象が生じ得る。「治療用細胞」とは、細胞療法のために使用される細胞、すなわち、状態または疾患を治療または予防するために対象に投与される細胞を意味する。細胞が負の影響を有する場合には、本方法を使用して、部分的なアポトーシスによって治療用細胞を除去することができる。

【0297】

他の例では、種々の疾患および状態を処置するため、および幹細胞移植の一部として、T細胞を使用する。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である（GvHD）。GvHDが生じる可能性は移植されるT細胞の数が増加するほど高まる。これにより、注入することができるT細胞の数が限定される。患者におけるGvHDの事象に際して、注入されたT細胞を選択的に除去選択的に除去することにより、より多数のT細胞を注入することができ、細胞 10^6 個超、 10^7 個超、 10^8 個超、または 10^9 個超まで数を増加させることができる。投与することができる体重1kg当たりのT細胞の数は、例えば、体重1kg当たりT細胞約 1×10^4 個～体重1kg当たりT細胞約 9×10^7 個、例えば、体重1kg当たりT細胞約1、2、3、4、5、6、7、8、または 9×10^4 個；約1、2、3、4、5、6、7、8、または 9×10^5 ；約1、2、3、4、5、6、7、8、または 9×10^6 個；または約1、2、3、4、5、6、7、8、または 9×10^7 個であり得る。他の例では、T細胞以外の治療用細胞を使用することができる。投与することができる体重1kg当たりの治療用細胞の数は、例えば、体重1kg当たりT細胞約 1×10^4 個～体重1kg当たりT細胞約 9×10^7 個、例えば、体重1kg当たり治療用細胞約1、2、3、4、5、6、7、8、または 9×10^4 ；約1、2、3、4、5、6、7、8、または 9×10^5 ；約1、2、3、4、5、6、7、8、または 9×10^6 ；または約1、2、3、4、5、6、7、8、または 9×10^7 個である。

【0298】

「単位用量」という用語は、種菌に関しては、哺乳動物に対する単位投薬量として適切な物理的に別個の単位を指し、各単位が、所望の免疫原性効果が生じるように算出された

10

20

30

40

50

所定の数量の医薬組成物を必要な希釈剤と共に含有する。種菌の単位用量の仕様は医薬組成物の独特の特性および実現される特定の免疫学的効果によって規定され、それに左右される。

本明細書で提示されている多量体リガンドなどの医薬組成物の有効量は、カスパーゼー9発現細胞の60%超、70%超、80%超、85%超、90%超、95%超、または97%超、または80%未満、70%未満、60%未満、50%未満、40%未満、30%未満、20%未満、または10%未満が死滅するような、所望の数または濃度の、カスパーゼー9ペクターを含む細胞の選択的除去のこの選択された結果が実現される量になる。この用語は、「十分な量」とも同義である。

【0299】

任意の特定の適用に対する有効量は、処置される疾患または状態、投与される特定の組成物、対象のサイズ、および／または疾患の重症度または状態などの因子に応じて変動し得る。特定の明細書で提示されている組成物有効量は、過度な実験を必要とせず経験的に決定することができる。

【0300】

「接触させる」および「曝露する」という用語は、細胞、組織または生物体に適用する場合、本明細書では、例えば化学療法剤もしくは放射線療法剤などの医薬組成物および／もしくは別の薬剤を標的細胞、組織もしくは生物体に送達する、または標的細胞、組織もしくは生物体の近くに直接置くプロセスを記載するために使用される。細胞の死滅または静止を実現するために、医薬組成物および／または追加的な薬剤（複数可）を1つまたは複数の細胞に細胞（複数可）を死滅させるまたは細胞が分裂するのを妨げるために有効な総量で送達する。

【0301】

医薬組成物の投与は、数分から数週間までにわたる間隔で、他の薬剤（複数可）よりも先に、それと並行して、かつ／またはそれに続いて行うことができる。医薬組成物および他の薬剤（複数可）を別々に細胞、組織または生物体に適用する実施形態では、一般に、医薬組成物および薬剤（複数可）が細胞、組織または生物体に対して有利に組み合わせられた効果をなお発揮することができるように、各送達の時間の間に著しい期間が過ぎないことを確実にする。例えば、そのような例では、細胞、組織または生物体を2つ、3つ、4つまたはそれ超のモダリティを用いて実質的に同時に（すなわち、約1分未満以内に）医薬組成物と接触させることができることが意図されている。他の態様では、1つまたは複数の薬剤を、発現ペクターを投与する前および／またはその後、実質的に同時に、約1分から、約24時間まで、約7日まで、約1～約8週間またはそれ超まで、およびその中で導き出せる任意の範囲までの範囲内で投与することができる。さらに、本明細書で提示されている医薬組成物および1つまたは複数の薬剤の種々の併用レジメンを使用することができる。

最適化された個人向けの治療的処置

【0302】

移植片対宿主病のステージ、または患者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、二量体を投与した後のアポトーシスの誘導を最適化することができる。

【0303】

例えば、患者がGvHDを有することおよびGvHDのステージが決定されることにより、多量体リガンドを投与することによりカスパーゼー9関連アポトーシスを誘導する必要があるという指標が臨床医にもたらされる。別の例では、多量体リガンドを用いた処置後に患者のGvHDのレベルが低下したことが決定されることにより、追加用量の多量体リガンドが必要ないことが臨床医に示され得る。同様に、多量体リガンドを用いた処置後に、患者がGvHDの症状をし続けていること、またはGvHDの再発が生じたことが決定されることにより、少なくとも1回の追加用量の多量体リガンドを投与する必要があることが臨床医に示され得る。「投薬量」という用語は、投薬の量と、例えば次の

10

20

30

40

50

用量のタイミングなどの投与の頻度の両方を包含するものとする。「投薬量レベル」という用語は、対象の体重との関連で投与される多量体リガンドの量を指す。したがって、投薬量レベルを上昇させることは、対象の体重に対して投与するリガンドの量を増加させることを意味する。さらに、例えば、持続注入ポンプを使用して多量体リガンドを投与する場合などに投与する用量の濃度を上昇させることは、1分ごとまたは1秒ごとに投与する濃度（したがって、投与する量）を上昇させることを意味する。

【0304】

例えば続きの用量の多量体リガンドなどのその後の薬物用量、および／またはその後の薬物の投薬量の調整または維持の指標は、任意の都合のよい様式で提供することができる。一部の実施形態では、指標は、表の形態で（例えば、物理的な媒体または電子媒体で）提供することができる。例えば、移植片対宿主病で観察される症状を表で提供することができ、臨床医が症状を疾患のステージの一覧または表と比較することができる。次いで、臨床医は、表からその後の薬物用量についての指標を同定することができる。ある特定の実施形態では、症状またはG v H Dのステージがコンピュータにもたらされた後に（例えば、コンピュータのメモリに入力された後に）指標をコンピュータによって提示する（例えば、表示する）ことができる。例えば、この情報をコンピュータにもたらすこと（例えば、使用者がコンピュータメモリに入力することまたはコンピュータネットワーク内の遠隔デバイスによってコンピュータに送ること）ができ、コンピュータ内のソフトウェアにより、その後の薬物用量の調整または維持についての指標を生成し、かつ／またはその後の薬物用量の量をもたらすことができる。

【0305】

指標に基づいてその後の用量が決定されたら、臨床医は、その後の用量を投与することまたは別の人または実体に用量を調整するよう指示することができる。「臨床医」という用語は、本明細書で使用される場合、意思決定者を指し、ある特定の実施形態では、臨床医は医療専門家である。一部の実施形態では、意思決定者は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出力であってよく、健康サービス提供者はコンピュータに表示された指標またはその後の薬物用量に従って行動することができる。意思決定者は、その後の用を直接投与する（例えば、その後の用量を対象に注入する）こともでき、遠隔操作で投与する（例えば、意思決定者がポンプのパラメータを遠隔操作で変化させる）こともできる。

【0306】

本明細書で提示されている方法は、これだけに限定することなく、活性化された細胞、核酸、またはそれをコードする発現構築物を有効量で送達することを含む。医薬組成物の「有効量」は、一般には、規定された所望の結果を検出可能に、かつ繰り返し実現する、例えば、疾患またはその症状の程度を好転させる、低下させる、最小限にするまたは限定するために十分な量と定義される。疾患の排除、根絶または治癒を含めた、他のより厳しい定義が適用され得る。一部の実施形態では、処置の効果を評価するためおよび毒性を制御するためにバイオマーカーをモニタリングするステップが存在してよい。

製剤および患者への投与経路

【0307】

臨床的適用が意図されている場合、医薬組成物—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た適用に適した形態で調製することが必要になる。一般に、これには、発熱物質、ならびにヒトまたは動物に対して有害であり得る他の不純物を基本的に含まない組成物を調製することが伴う。

【0308】

例えばA P 1 9 0 3などの多量体リガンドを、例えば、対象の体重1 k g当たり約0.1 ~ 1 0 m g、対象の体重1 k g当たり約0.1 ~ 5 m g、対象の体重1 k g当たり約0.2 ~ 4 m g、対象の体重1 k g当たり約0.3 ~ 3 m g、対象の体重1 k g当たり約0.3 ~ 2 m g、または対象の体重1 k g当たり約0.3 ~ 1 m g、例えば、対象の体重1 k g当たり約0.1 m g、0.2 m g、0.3 m g、0.4 m g、0.5 m g、0.6 m

g、0.7mg、0.8mg、0.9mg、1.0mg、1.5mg、2mg、2.5mg、3mg、3.5mg、4mg、4.5mg、5mg、6mg、7mg、8mg、9mg、または10mgの用量で送達することができる。一部の実施形態では、リガンドを用量当たり0.4mg/kg、例えば、5mg/mLの濃度で提供する。例えば、リガンドをバイアル当たり約0.25mL～約10mL、例えば、約0.25mL、0.5mL、1mL、1.5mL、2mL、2.5mL、3mL、3.5mL、4mL、4.5mL、5mL、5.5mL、6mL、6.5mL、7mL、7.5mL、8mL、8.5mL、9mL、9.5mL、または10mL、例えば、約2mLの体積で含有するバイアルまたは他の容器を提供することができる。

【0309】

一般に、送達ベクターを安定なものにし、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液を使用することが望まれ得る。組換え細胞を患者に導入する際にも緩衝液を使用することができる。水性組成物は、薬学的に許容される担体または水性媒体に溶解または分散させた有効量の細胞に対するベクターを含む。そのような組成物は接種材料とも称される。薬学的に許容される担体としては、任意のかつ全ての溶媒、分散媒、コーティング、抗細菌剤および抗真菌剤、等張化剤および吸収遅延剤などが挙げられる。薬学的に活性な物質に対するそのような媒体および薬剤の使用は公知である。任意の従来の培地または薬剤がベクターまたは細胞と適合しない場合を除く限りでは、治療用組成物へのその使用が意図されている。補足的な活性成分も組成物中に組み入れることができる。

【0310】

活性な組成物は、典型的な医薬調製物を含み得る。これらの組成物の投与は、その経路によって標的組織に到達可能な限りは、任意の一般的な経路を経由する。これらの経路としては、例えば、経口、経鼻、頬側、直腸内、口腔内または局部が挙げられる。あるいは、投与は、同所注射、皮内注射、皮下注射、筋肉内注射、腹腔内注射または静脈内注射によるものであってよい。そのような組成物は通常、本明細書で考察されている薬学的に許容される組成物として投与される。

【0311】

注射による使用に適した医薬形態としては、滅菌水溶液または分散液および滅菌注射用溶液または分散を即時調製するための滅菌粉末が挙げられる。全ての場合において、容易に注射可能である限りでは、当該形態は滅菌されたものであり、流体である。当該形態は製造および保管の条件下では安定であり、細菌および真菌などの微生物の混入作用に対して保護されている。担体は、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）、適切なそれらの混合物、ならびに植物油を含有する溶媒または分散媒であってよい。妥当な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングを使用することによって、分散の場合では必要な粒子サイズを維持することによって、および界面活性物質を使用することによって維持することができる。微生物の作用の予防は、種々の抗細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しことができる。特定の例では、等張化剤、例えば、糖または塩化ナトリウムを含めることができる。注射用組成物の持続的吸収は、組成物に吸収を遅延させる薬剤、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使用することによってもたらしことができる。

【0312】

経口投与のためには、組成物に賦形剤を組み入れ、非摂取用洗口剤および歯磨剤の形態でを使用することができる。洗口剤は、ホウ酸ナトリウム溶液（ドーベル液）などの適切な溶媒中に必要量の活性成分を組み入れて調製することができる。あるいは、ホウ酸ナトリウム、グリセリンおよび炭酸水素カリウムを含有する消毒洗浄剤に活性成分を組み入れることができる。例えば、ゲル剤、ペースト剤、散剤およびスラリー剤を含めた歯磨剤中に活性成分を分散させることもできる。例えば水、結合物質、研磨剤、香味剤、発泡剤、および保湿剤を含み得るペースト歯磨剤に活性成分を治療有効量で添加することができる。

【0313】

組成物は、中性または塩の形態に製剤化することができる。薬学的に許容される塩としては、例えば、酸付加塩（タンパク質の遊離のアミノ基と形成される）および、例えば塩酸もしくはリン酸などの無機酸、または例えば酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸などの有機酸と形成される塩が挙げられる。遊離のカルボキシル基と形成される塩は、例えばナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、または水酸化第二鉄などの無機塩基、および例えばイソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、プロカインなどの有機塩基に由来するものであってもよい。

【0314】

製剤化されたら、溶液を投薬製剤と適合する様式で、治療的に有効な量で投与する。製剤は、例えば注射用溶液、薬物放出カプセル剤などの種々の剤形で容易に投与される。水溶液中で非経口投与するためには、例えば、必要であれば溶液を適切に緩衝させ、液体希釈剤をまず十分な生理食塩水またはグルコースを用いて等張性にする。これらの特定の水溶液は静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与および腹腔内投与に特に適している。これに関連して、滅菌水性媒体を使用することができる。例えば、1投薬量を等張性NaCl溶液1mlに溶解させ、皮下注入用液1000mlに添加するか、または提案された注入部位に注射する（例えば、「Remington's Pharmaceutical Sciences」、第15版、1035～1038頁および1570～1580頁を参照されたい）。投薬量には、処置される対象の状態に応じていくらかの変動必ず生じる。いずれにしても、投与に関与する人が個々の対象に対して適切な用量を決定する。さらに、ヒトへの投与に関しては、調製物を、必要に応じてFDA Office of Biologics standardsによる滅菌、発熱性、および一般的な安全性および純度の基準に適合させることができる。

【実施例】

【0315】

下記の実施例は、ある特定の実施形態を例示し、当該技術を限定しない。

【0316】

ドナー細胞を選択的に除去するための機構が細胞療法に対する安全スイッチとして試験されてきたが、合併症が生じている。現在までの安全スイッチ遺伝子を用いたいくつかの実施はTリンパ球において成されており、これは、これらの細胞を用いた免疫療法がウイルス感染および悪性腫瘍に対して処置として効果的であることが証明されているからである（Walter, E. A. ら、N. Engl. J. Med. 1995年、333巻：1038～44頁；Rooney, C. M. ら、Blood. 1998年、92巻：1549～55頁；Dudley, M. E. ら、Science 2002年、298巻：850～54頁；Marjitt, W. A. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2003年、100巻：2742～47頁）。再発性悪性腫瘍および造血幹細胞移植後のエプスタイン・バーウイルス（EBV）リンパ球増殖を処置するためのドナーT細胞注入におけるin vivo自殺スイッチとして単純ヘルペスウイルスI由来のチミジンキナーゼ（HSVTK）遺伝子が使用されてきた（Bonini C ら、Science. 1997年、276巻：1719～1724頁；Tiberghien P ら、Blood. 2001年、97巻：63～72頁）。しかし、移植片対宿主病を引き起こすT細胞の破壊が不完全であり、HSV-TKを活性化するためにガンシクロビル（または類似体）をプロドラッグとして使用することにより、サイトメガロウイルス感染に対する抗ウイルス薬としてガンシクロビルを投与することが妨げられる。この作用機構には細胞分裂に依拠するDNA合成の干渉も必要であり、したがって、細胞死滅が数日に長引き、不完全になり、これにより臨床的利益に非常に長い遅延が生じる可能性がある（Ciceri, F. ら、Lancet Oncol. 2009年、262巻：1019～24頁）。さらに、免疫抑制されたヒト免疫不全ウイルスおよび骨髓移植患者においてさえHSV-TKにより導かれる免疫応答によりHSV-TKを形質導入した細胞が排除され、これにより、注入されたT細胞の持続性、したがって有効性

が損なわれる。HSV-TKはまたウイルス由来であり、したがって、潜在的に免疫原性である (Bonini Cら、Science. 1997年、276巻: 1719~1724頁; Riddell SRら、Nat Med. 1996年、2巻: 216~23頁)。E coli由来のシトシンデアミナーゼ遺伝子も臨床的に使用されているが (Freytag SOら、Cancer Res. 2002年、62巻: 4968~4976頁)、異種抗原として免疫原性であり得、したがって、長期間の持続が必要なT細胞に基づく療法と適合しない。モノクローナルキメラ抗CD20抗体によって活性化することができるトランスジェニックヒトCD20が非免疫原性安全性系として提案されている (Introna Mら、Hum Gene Ther. 2000年、11巻: 611~620頁)。

10

【0317】

以下の節では、カスパーゼ-9キメラタンパク質を使用して、細胞療法のために使用される細胞内に安全スイッチをもたらす方法の例が提供される。

(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
ベクターの構築および発現の確認

【0318】

ヒトT細胞において安定にかつ効率的に発現させることができる安全スイッチが本明細書に示されている。当該系は、改変遺伝子を発現する形質導入されたT細胞の選択的な排除を引き起こすことができる小分子二量体化薬と相互作用するように改変された、免疫原性の潜在性が低いヒト遺伝子産物を含む。さらに、誘導性カスパーゼ-9は、T細胞において抗アポトーシス分子を過剰発現する機能を維持する。

20

【0319】

例えばFKBP12v36などのヒトFK506結合性タンパク質 (FKBP) と融合した改変ヒトカスパーゼ-9活性を含む治療剤として使用するために適した発現ベクターを構築した。カスパーゼ-9/FK506ハイブリッド活性は小分子医薬品を使用して二量体化することができる。全長型、短縮型、および改変型のカスパーゼ-9活性をリガンド結合性ドメイン、または多量体化領域と融合し、蛍光マーカーであるGFPの発現も可能にするレトロウイルスベクターMSCV、IRES、GRPに挿入した。図1Aには、アポトーシスを誘導するための自殺スイッチとして構築し、評価した全長カスパーゼ-9発現ベクター、短縮型カスパーゼ-9発現ベクターおよび改変カスパーゼ-9発現ベクターが例示されている。

30

【0320】

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さなサブユニットおよび大きなサブユニットと連結した2つ、3つ、またはそれ超のFK506結合性タンパク質 (FKBP-例えば、FKBP12v36バリエーション) を含む (図1Aを参照されたい)。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変異を含有する2つの12kDaのヒトFK506結合性タンパク質 (FKBP12; GenBank AH002818) と連結したカスパーゼ動員ドメイン (CARD; GenBank NM001229) も含む (図1A)。レトロウイルスにおいて発現させた際の相同組換えを予防するために、FKBP (F') のうちの1つまたは複数のアミノ酸配列はコドンゆらぎ型 (例えば、各アミノ酸コドンの3番目のヌクレオチドが、最初にコードされたアミノ酸が維持されるサイレント変異によって変更されたもの) であった。F'-F-C-Casp9C3Sは、その活性化部位を乱す、287位における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は、それぞれカスパーゼ活性化ドメイン (CARD)、1つのFKBP、または両方のFKBPのいずれかが欠失したものであった。全ての構築物をMSCV、IRES、GFPにEcoRI-XhoI断片としてクローニングした。

40

50

【0321】

これらの構築物のそれぞれを293T細胞にトランスフェクトし、形質導入の48時間後に、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時間後に、293T細胞を100nMのCIDと一緒に一晚インキュベートし、その後、アポトーシスのマーカーであるアネキシンVを用いて染色した。4回の別々の実験からの、導入遺伝子の発現レベルの平均および標準偏差（平均GFP）ならびに化学的二量体化誘導物質（CID）に曝露した前後のアポトーシス細胞の数（GFP～細胞内の%アネキシンV）が図1Aの表の2段目から5段目までに示されている。GFP発現のレベルおよびアネキシンVでの染色に加えて、全長カスパーゼ9、短縮型カスパーゼ9および改変カスパーゼ9の発現遺伝子産物もウエスタンブロットによって分析して、カスパーゼ9遺伝子が発現しており、発現産物のサイズが予測されたものであることを確認した。ウエスタンブロットの結果が図1Bに示されている。

10

【0322】

トランスフェクトした293T細胞における、予測された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の同時発現が、全長カスパーゼ分子および短縮型カスパーゼ分子の両方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たウエスタンブロットによって実証された。ウエスタンブロットは、本明細書で提示されている通り実施した。

【0323】

トランスフェクトした293T細胞を、アプロチニン、ロイペプチン、およびフッ化フェニルメチルスルホニル（Boehringer、Ingelheim、Germany）を含有する溶解緩衝液（50%Tris/Gly、10%ドデシル硫酸ナトリウム[SDS]、4%ベーターメルカプトエタノール、10%グリセロール、12%水、4%ブROMフェノールブルー、0.5%）に再懸濁させ、氷上で30分インキュベートした。30分遠心分離した後、上清を回収し、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ローディングした。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）を用いて、およびマウス抗GFP IgG（Covance、Berkeley、CA；1:25,000希釈）を用いて膜をプローブした。次いで、ブロットを適切なペルオキシダーゼとカップリングした二次抗体に曝露し、増強化学発光（ECL；Amersham、Arlington Heights、IL）を用いてタンパク質の発現を検出した。次いで、膜をはがし、ヤギポリクローナル抗アクチン（Santa Cruz Biotechnology；1:500希釈）を用いて再プローブしてローディングの均等性を確認した。

20

30

【0324】

図1Bにおいて見られるサイズがより小さい追加的なバンドは、分解生成物を示す可能性が高い。F'F-Casp9構築物およびF'F-Casp9構築物の分解生成物は、これらの構築物の発現レベルがそれらの基底の活性の結果として低いことに起因して、検出されない可能性がある。各試料の均等なローディングを、ウエスタンブロットの各レーンの下に示されている実質的に等量のアクチンによって確認し、これにより、各レーンに実質的に同様の量のタンパク質がローディングされたことが示された。

40

【0325】

カスパーゼ9自殺スイッチ発現構築物の評価
細胞株

【0326】

B95-8 EBVで形質転換したB細胞株（LCL）、Jurkat細胞、およびMT-2細胞（Dr S. Marriott、Baylor College of Medicine、Houston、TXより善意で提供された）を、10%ウシ胎仔血清（FBS；Hyclone）を含有するRPMI1640（Hyclone、Loga

50

n、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、以前報告された通り生成した。簡単に述べると、末梢血単核細胞(24ウェルプレートのウェル当たり 2×10^6 個)を、4000radで放射線を照射した自己由来LCLを用いて、応答物質対刺激物質(R/S)比40:1で刺激した。9~12日後に、生存細胞を、放射線を照射したLCLを用いてR/S比4:1で再刺激した。その後、細胞傷害性T細胞(CTL)を、40U/mL~100U/mLの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を用いて週に1回再刺激することによって増大させた。

10

レトロウイルスによる形質導入

【0327】

レトロウイルスの一過性産生のために、GeneJuiceトランスフェクション試薬(Novagen、Madison、WI)を使用して293T細胞にiCasp9/iFas構築物をgag-polおよびRD114エンベロープをコードするプラスミドと一緒にトランスフェクトした。トランスフェクションの48~72時間後にウイルスを回収し、スナップ凍結させ、使用するまで約80℃で保管した。安定なFLYRD18由来のレトロウイルス産生株を、VSV-Gにシュードタイプされた一過性のレトロウイルス上清を用いた多数の形質導入によって生成した。導入遺伝子の発現が最も高いFLYRD18細胞を単一細胞選別し、最も高いウイルス力価を生じるクローンを増大させ、それを使用して、リンパ球への形質導入に使用するためのウイルスを産生させた。8週間超にわたる継続的な培養の間、このクローンの導入遺伝子の発現、機能、およびレトロウイルス力価を維持した。ヒトリンパ球への形質導入のために、組織培養物で処理していない24ウェルプレート(Becton Dickinson、San Jose、CA)に組換えフィブロネクチン断片をコーティングし(FNCH-296; Retronection; Takara Shuzo、Otsu、Japan; PBS中4μg/mL、4℃で一晩)、ウェル当たり0.5mLのレトロウイルスと一緒に37℃で30分、2回インキュベートした。その後、ウェル当たりT細胞 $3 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 個に、100U/mLのIL-2の存在下、ウェル当たり1mLのウイルスを使用して48~72時間にわたって形質導入した。同時発現させたマーカー遺伝子である緑色蛍光タンパク質(GFP)の発現をFACScanフローサイトメーター(Becton Dickinson)で分析することによって形質導入効率を決定した。機能的研究のために、形質導入したCTLを、選択しないか、または、示されている通りMoFlo血球計算器(Dako Cytomation、Ft Collins、CO)を使用して、GFP発現が低い集団、GFP発現が中程度の集団、もしくはGFP発現が高い集団に分離した。

20

30

アポトーシスの誘導および分析

【0328】

示されている濃度のCID(AP20187; ARIAD Pharmaceutical)をトランスフェクトした293T細胞または形質導入したCTLに添加した。接着性細胞および非接着性細胞を回収し、アネキシン結合性緩衝液(BD Pharmingen、San Jose、CA)で洗浄した。細胞を、アネキシン-Vおよび7-アミノアクチノマイシンD(7-AAD)を製造者(BD Pharmingen)の説明書に従って用いて15分染色した。染色後1時間以内に、細胞をCellQuest software(Becton Dickinson)を使用したフローサイトメトリーによって分析した。

40

細胞毒性アッセイ

【0329】

各CTL株の細胞傷害活性を以前に示されている通り標準の4時間 ^{51}Cr 放出アッセイにおいて評価した。標的細胞には、自己由来LCL、ヒト白血球抗原(HLA)クラスI-不適合LCLおよびリンフォカインにより活性化されたキラー細胞感受性T細胞リン

50

パ腫株H S B-2が含まれた。完全培地または1%T r i t o n X100 (S i g m a、S t L o u i s、M O) 中でインキュベートした標的細胞を使用して、それぞれ自然 ^{51}Cr 放出および最大 ^{51}Cr 放出を決定した。3連のウェルの特異的な溶解の平均百分率を $100 \times (\text{実験的放出} - \text{自然放出}) / (\text{最大放出} - \text{自然放出})$ として算出した。

表現型決定

【0330】

以下のモノクローナル抗体を使用して細胞表面表現型を調査した：C D 3、C D 4、C D 8 (B e c t o n D i c k i n s o n) およびC D 5 6 およびT C R- α/β (I m m u n o t e c h、M i a m i、F L)。抗N G F R抗体 (C h r o m a p r o b e、A p t o s、C A) を使用して Δ N G F R-i F a sを検出した。適切な適合アイソタイプ対照 (B e c t o n D i c k i n s o n) を各実験に使用した。F A C S s c a n フローサイトメーター (B e c t o n D i c k i n s o n) を用いて細胞を分析した。

10

サイトカイン産生の分析

【0331】

C T L 培養上清中のインターフェロン- γ (I F N- γ)、I L-2、I L-4、I L-5、I L-10、および腫瘍壊死因子- α (T N F α) の濃度を、H u m a n T h 1 / T h 2 c y t o k i n e c y t o m e t r i c B e a d A r r a y (B D P h a r m i n g e n) を使用して測定し、培養上清中のI L-12の濃度を酵素結合免疫吸着検定法 (E L I S A ; R & D S y s t e m s、M i n n e a p o l i s、M N) により、製造者の説明書に従って測定した。

20

i n v i v oでの実験

【0332】

6~8週齢の非肥満糖尿病重症複合免疫不全 (N O D / S C I D) マウスに、放射線を照射し (250 rad)、M a t r i g e l (B D B i o s c i e n c e) に再懸濁させたL C L $10 \times 10^6 \sim 15 \times 10^6$ 個を右側腹部に皮下注射した。2週間後、直径およそ0.5 cmの腫瘍を有するマウスの尾静脈に、形質導入していないE B V C T L およびi C a s p 9、I . G F P 高を形質導入したE B V C T L (全部で 15×10^6 個) の1:1混合物を注射した。C T L 注入の4~6時間前および3日後に、マウスに組換えh I L-2 (2000 U ; P r o l e u k i n ; C h i r o n) を腹腔内注射した。4日目に、マウスを2群にランダムに分離し、1群にはC I Dを与え (50 μ gのA P 2 0 1 8 7、腹腔内) および1群には担体のみを与えた (16.7%プロパンジオール、22.5% P E G 400、および1.25% T w e e n 80、腹腔内)。7日目に全てのマウスを屠殺した。腫瘍をホモジナイズし、抗ヒトC D 3 (B D P h a r m i n g e n) を用いて染色した。F A C S 分析により、ゲーティングしたC D 3⁺ 集団内のG F P⁺ 細胞の数を評価した。形質導入していないC T Lのみ (全部で 15×10^6 個) を受けた対照群のマウス由来の腫瘍をC D 3⁺ / G F P⁺ 細胞の分析において陰性対照として使用した。

30

誘導性カスパーゼ-9の発現および機能の最適化

【0333】

カスパーゼ3、7、および9をそれらの誘導性安全スイッチ分子としての適合性について、トランスフェクトした293T細胞と形質導入したヒトT細胞の両方においてスクリーニングした。誘導性カスパーゼ-9 (i C a s p 9) のみが、選択されたC I D (例えば、化学的二量体化誘導物質) に対する感受性が付与されるのに十分なレベルで発現した。最初のスクリーニングにより、おそらく形質導入された細胞が導入遺伝子の基底の活性により排除されることに起因して、全長i C a s p 9をT細胞において高レベルで安定に維持することができないことが示された。C A R Dドメインは、チトクロムCおよびアデノシン三リン酸 (A T P) により駆動されるアポトーシス性プロテアーゼ活性化因子1 (A p a f-1) との相互作用によるカスパーゼ-9分子の生理的な二量体化に関与する。C I Dは自殺スイッチの二量体化および活性化を誘導するために使用するものなので、この場合にはC A R Dドメインの機能は不必要であり、基底の活性を低下させる方法として

40

50

CARDドメインの除去を調査した。カスパーゼ-9の活性化には多量体化ではなく二量体化のみが必要であることを考慮して、活性化をもたらす方法として単一のFKBP12v36ドメインも調査した。

【0334】

得られた短縮形態および／または改変形態のカスパーゼ-9（例えば、CARDドメイン、または2つのFKBPドメインのうちの1つまたはその両方が除去されている）の活性を比較した。活性化部位が乱された構築物である $F'F-C-Casp9_{C \rightarrow S}$ により、非機能性対照がもたらされる（図1Aを参照されたい）。全ての構築物を、レトロウイルスの長い末端反復（LTR）により導入遺伝子の発現を導き、配列内リボソーム進入部位（IRES）を使用することによって同じmRNAから増強されたGFPを同時発現させるレトロウイルスベクターMSCV²⁶にクローニングした。トランスフェクトした293T細胞では、全ての誘導性カスパーゼ-9構築物の予測されたサイズでの発現ならびにGFPの同時発現がウエスタンブロットによって実証された（図1Bを参照されたい）。タンパク質の発現（GFPの平均蛍光によって推定され、ウエスタンブロットで可視化される）は、非機能性構築物 $F'F-C-Casp9_{C \rightarrow S}$ において最も高く、全長構築物 $F'F-C-Casp9$ では著しく減弱した。CARD（ $F'F-C-Casp9$ ）、1つのFKBP（ $F-C-Casp9$ ）、またはその両方（ $F-C-Casp9$ ）を除去することにより、誘導性カスパーゼ-9とGFPの両方の発現が次第に高くなり、対応して、CIDに対する感受性が増強された（図1Aを参照されたい）。これらの結果に基づいて、 $F-C-Casp9$ 構築物（以降 $iCasp9_M$ と称される）をヒトTリンパ球におけるさらなる試験に使用した。

ヒトTリンパ球における $iCasp9_M$ の安定発現

【0335】

遺伝子操作された細胞が持続する限りは自殺遺伝子の発現が必要であるので、自殺遺伝子発現の長期間安定性が最も重要である。T細胞への形質導入に関しては、高力価のRD114にシュードタイプされたウイルスを産生するFLYRD18由来のレトロウイルス生産クローンを生成して、T細胞への形質導入を容易にした。EBV特異的CTL株は機能および特異性がよく特徴付けられており、EBV関連悪性腫瘍を予防および処置するためのin vivo療法としてすでに使用されているので、EBV特異的CTL株（EBV-CTL）における $iCasp9_M$ 発現を評価した。レトロウイルスを用いた単回の形質導入後に、70%超（5つの異なるドナーにおいて、平均75.3%；71.4%～83.0%の範囲）の一貫したEBV-CTLの形質導入効率が得られた。EBV-CTLにおける $iCasp9_M$ の発現は、選択または導入遺伝子機能の喪失を伴わずに形質導入後少なくとも4週間にわたって安定であった。

$iCasp9_M$ により、形質導入されたT細胞の特性は変更されない

【0336】

$iCasp9_M$ の発現によりT細胞の特性が変更されないことを確実にするために、形質導入していないEBV-CTLまたは非機能性の $iCasp9_{C \rightarrow S}$ を形質導入したEBV-CTLの表現型、抗原特異性、増殖潜在性、および機能を、 $iCasp9_M$ を形質導入したEBV-CTLのものと比較した。4つの別々のドナーにおいて、形質導入したCTLおよび形質導入していないCTLは、同数のCD4⁺、CD8⁺、CD56⁺、およびTCR α/β ⁺細胞からなった（図2Aを参照されたい）。同様に、IFN- γ 、TNF α 、IL-10、IL-4、IL-5、およびIL-2を含めたサイトカインの産生は $iCasp9_M$ 発現によって変更されなかった（図2Bを参照されたい）。 $iCasp9_M$ を形質導入したEBV-CTLにより、形質導入していないCTLおよび対照形質導入CTLと同等の自己由来LCLが特異的に溶解された（図2Cを参照されたい）。 $iCasp9_M$ の発現は、指数関数的に成長しているCTLの成長特性に影響を及ぼさず、重要なことに、抗原およびIL-2への増殖の依存は保護された（図2Dを参照されたい）。図2Aおよび2Bは、抗原刺激時のTH1型サイトカインおよびTH2型サイトカインの表現型データおよび分泌データのグラフである。図2Cは、形質導入後15日目～1

8日目の、自己由来EBVで形質転換したリンパ芽球様B細胞株(LCL)、HLA不適合LCL、およびHSB-2(LAK細胞標的)に対する細胞傷害活性のレベルを、形質導入していないEBV特異的CTL(EBV-CTL)(白棒)、F-Casp9_Mを形質導入したEBV特異的CTL(EBV-CTL)(黒棒)、およびF'-F-C-Casp9_{C->S}を形質導入したEBV特異的CTL(EBV-CTL)(点模様の棒)と比較して例示するグラフである(形質導入後の2回の抗原による刺激)。3連のウェルの平均および標準偏差が示されている。4つの異なるドナー由来EBV-CTLを使用した実験の例が示されている。図2Dは、iCasp9_M形質導入CTLの抗原依存を例示するグラフである。形質導入後の21日目に、自己由来LCLおよびIL-2を用いた通常の週に1回の抗原による刺激を継続した(黒色のひし形)または中止した(黒色の四角)。抗原刺激の中止により、T細胞の一定の減退がもたらされた。

*in vitro*における導入遺伝子の高発現に関して選択されたTリンパ球の99%超の排除

【0337】

CTLにおける誘導性iCasp9_Mの効力を、CIDの投与後のGFP発現細胞の喪失をモニタリングすることによって試験した;単一の10nM用量のCIDの後にGFP⁺細胞の91.3%(5つの異なるドナーにおいて89.5%~92.6%の範囲)が排除された(図3Aを参照されたい)。CIDへの曝露時間にかかわらず同様の結果が得られた(範囲、1時間~継続的)。全ての実験において、CID処理後に残存したCTLの導入遺伝子の発現は低く、CID後のGFPの平均蛍光強度は70%(範囲、55%~82%)低下した。抗原による刺激、その後の2回目の10nM用量のCIDにより、生存しているGFP⁺T細胞のさらなる排除を得ることはできなかった。したがって、非応答性CTLはCIDによる機能活性化のためには不十分なiCasp9_Mを発現する可能性が最も高かった。低発現レベルとCIDに対するCTL非応答の間の相関を調査するために、CTLを、連結したマーカー遺伝子GFPの低発現、中発現および高発現に関して選別し、CIDに誘導されるアポトーシスに応答する形質導入されたT細胞の数の正確な定量化を可能にするために同じドナー由来の形質導入していないCTLと1:1で混合した。

【0338】

排除される形質導入されたT細胞の数は、GFP導入遺伝子発現のレベルが上昇するにつれて増加した(図4A、図4Bおよび図4Cを参照されたい)。導入遺伝子の発現とiCasp9_Mの機能の間の相関を決定するために、iCasp9_M IRES-GFPを形質導入したEBV-CTLをGFPの低発現(平均21)、GFPの中発現(平均80)およびGFPの高発現(平均189)に関して選択した(図4Aを参照されたい)。選択されたT細胞を10nMのCIDと一緒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を用いて染色した。アネキシンV⁺⁺/7-AAD⁻T細胞およびアネキシンV⁺/7-AAD⁺T細胞の百分率が示されている(図4Bを参照されたい)。選択されたT細胞を、形質導入されていないT細胞と1:1で混合し、抗原による刺激後に10nMのCIDと一緒にインキュベートした。7日目の残留GFP陽性T細胞の百分率が示されている(図4Cを参照されたい)。

【0339】

GFP_高選択された細胞に関しては、10nMのCIDにより、形質導入された細胞の99.1%(98.7%~99.4%の範囲)が消失した(図3Aを参照されたい)。抗原刺激の当日に、F-Casp9_M IRES-GFPを形質導入したCTLを無処理のままにしたか、または10nMのCIDを用いて処理した。7日後に、CIDに対する応答をGFPについてのフローサイトメトリーによって測定した。CID処理後の残留GFP⁺細胞の正確な測定を可能にするために、形質導入されたT細胞の百分率を50%に調整した。選択されていないCTLにおけるCIDに対する応答(図3Aの上の段)とGFP_高選択されたCTLにおけるCIDに対する応答(図3Aの下段)を比較した。残留GFP⁺細胞の百分率が示されている(図3Aを参照されたい)。

【0340】

GFP_高選択された細胞における急速なアポトーシスの誘導は、CIDを投与してから14時間以内の細胞の縮小および断片化などのアポトーシス特性によって実証される(図3Bを参照されたい)。10nMのCIDと一緒に一晚インキュベートした後、F-Casp9_M. I. GFP_高を形質導入したT細胞は、顕微鏡レベルの評価により、細胞の縮小および断片化などのアポトーシス特性を有した。高発現に関して選択されたT細胞のうち64%(59%~69%の範囲)がアポトーシス性表現型を有し(アネキシンV⁺/7-AAD⁻)、30%(26%~32%の範囲)が壊死性表現型を有した(アネキシンV⁺/7-AAD⁺) (図3Cを参照されたい)。アポトーシスのマーカーを用いた染色により、T細胞の64%がアポトーシス性表現型を有し(アネキシンV⁺、7-AAD⁻、右下の四半分)および32%が壊死性表現型(アネキシンV⁺、7-AAD⁺、右上の四半分)ことが示された。3回の別々の実験の代表例が示されている。

【0341】

対照的に、アポトーシスの誘導は、GFPの中発現またはGFPの低発現に関して選択されたT細胞では有意に低かった(図4A、図4Bおよび図4Cを参照されたい)。したがって、臨床的適用のためには、高コピー数、高発現レベル、または高コピー数と高発現レベルの両方に関する選択を可能にする選択マーカーを伴う型の発現構築物が望ましい可能性がある。CIDに誘導されるアポトーシスは汎カスパーゼ阻害物質zVAD-fmk(100μM、CIDを添加する前に1時間)によって阻害された。CIDの力価測定により、1nMのCIDが最大の消失効果を得るために十分であることが示された(図3D)。

示されている量のCID(AP20187)を使用した用量反応曲線により、F-Casp9_M. I. GFP_高のCIDに対する感受性が示されている。示されている量のCIDの投与後7日目にGFP⁺細胞の生存を測定する。各時点についての平均および標準偏差が示されている。健康な志願者に投与した際に有害作用が実質的でないことが臨床的に示されている別の化学的二量体化誘導物質(CID)、AP1903を使用して同様の結果が得られた。用量反応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。

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的である

【0342】

臨床使用するための誘導性アポトーシス促進分子として、以前に提示されたiFasおよびiFADDではなくカスパーゼ9を選択した。これは、カスパーゼ9がアポトーシスシグナル伝達の比較的后期で作用し、したがって、アポトーシス阻害物質による阻害を受けにくいことが予想されるからである。したがって、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細胞株においてだけでなく、記憶細胞の長期間の保護を確実にするプロセスの一部として抗アポトーシス分子の発現が上昇している正常なT細胞の亜集団においても自殺機能が保護されるはずである。この仮説をさらに調査するために、iCasp9_MおよびiFasの機能をまずEBV-CTLにおいて比較した。ベクターに基づく差異のあらゆる潜在性を排除するために、誘導性FasもiCasp9と同じくMSCV. IRES. GFPベクターで発現させた。これらの実験のために、ΔNGFR. iFas. I. GFPおよびiCasp9_M. I. GFPを形質導入したCTLをGFP_高発現に関して選別し、形質導入していないCTLと1:1比で混合して、iFasまたはiCasp9_Mのいずれかを同等の割合かつ同様のレベルで発現する細胞集団を得た(図5Aを参照されたい)。

ΔNGFR-iFas. I. GFPを形質導入したEBV-CTLが図5Aの左側のパネルに示されている。iCasp9_M. I. GFPを形質導入したEBV-CTLが図5Aの右側のパネルに示されている。EBV-CTLを高GFP発現に関して選別し、示されている通り形質導入していないCTLと1:1で混合した。ΔNGFR⁺/GFP⁺およびGFP⁺T細胞の百分率が示されている。

【0343】

10nMのCIDを投与した後のGFP⁺細胞の排除は、iCasp9_Mにおいて、iFasを形質導入したCTLよりも急速かつ効率的であった(CIDの7日後、iFas

を形質導入した細胞の $89.3\% + / - 4.9\%$ と比較して、 $iCasp9_M$ を形質導入した細胞の $99.2\% + / - 0.14\%$; $P < .05$; 図 5 B を参照されたい)。LCL 刺激の当日に、 10 nM の CID を投与し、示されている時点で GFP を測定して CID に対する応答を決定した。黒色のひし形は $\Delta NGFR-iFas.I.GFP$ についてのデータを示し、黒色の四角は $iCasp9_M.I.GFP$ 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が示されている。

【0344】

$iCasp9_M$ および $iFas$ の機能を、 $c-FLIP$ 発現および $bcl-xL$ 発現に起因して、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、アポトーシス抵抗性 T 細胞株においても比較した。Jurkat 細胞および MT-2 細胞に $iFas$ および $iCasp9_M$ を同様の効率で形質導入し (Jurkat では 92% 対 84% 、MT-2 では 76% 対 70%)、 10 nM の CID の存在下で 8 時間培養した。アネキシン-V 染色により、 $iFas$ および $iCasp9_M$ により同数の Jurkat 細胞でアポトーシスが誘導されたが (それぞれ $56.4\% + / - 15.6\%$ および $57.2\% + / - 18.9\%$)、MT-2 細胞では $iCasp9_M$ の活性化によってのみアポトーシスがもたらされた ($iFas$ および $iCasp9_M$ について、それぞれ $19.3\% + / - 8.4\%$ および $57.9\% + / - 11.9\%$; 図 5 C を参照されたい) ことが示された。

【0345】

ヒト T 細胞株 Jurkat (左側) および MT-2 (右側) に $\Delta NGFR-iFas.I.GFP$ (図 5 C の上の段) または $iCasp9_M.I.GFP$ (図 5 C の下の段) を形質導入した。同等の百分率の T 細胞に自殺遺伝子のそれぞれが形質導入された：Jurkat では $\Delta NGFR-iFas.I.GFP$ が 92% 、対して $iCasp9_M.I.GFP$ が 84% 、MT-2 では $\Delta NGFR-iFas.I.GFP$ が 76% 、対して $iCasp9_M.I.GFP$ が 70% 。T 細胞を無処理のままにしたか、または 10 nM の CID と一緒にインキュベートした。CID に曝露した 8 時間後に、アポトーシスをアネキシン V および 7-AAD での染色によって測定した。3 回の実験の代表例が示されている。PE はフィコエリトリンを示す。これらの結果から、アポトーシス阻害分子を過剰発現する T 細胞では、 $iFas$ の機能が遮断される可能性があるが、それでも $iCasp9_M$ により有効にアポトーシスが誘導されることが実証される。

免疫調節性導入遺伝子を発現する T 細胞の $iCasp9_M$ 媒介性排除

【0346】

$iCasp9_M$ により、活性な導入遺伝子産物を発現するように遺伝子改変された細胞を有効に破壊することができるかどうかを決定するために、IL-12 を安定に発現する EBV-CTL を排除する $iCasp9_M$ の能力を測定した。IL-12 は形質導入していない CTL および $iCasp9_M.IRES.GFP$ を形質導入した CTL の上清では検出不可能であったが、 $iCasp9_M.IRES.IL-12$ を形質導入した細胞の上清は $324\text{ pg/mL} \sim 762\text{ pg/mL}$ の IL-12 を含有した。しかし、 10 nM の CID を投与した後には、上清中の IL-12 は検出不可能なレベル ($< 8\text{ pg/mL}$) にまで低下した。したがって、導入遺伝子高発現細胞の事前選別を行わなくても、 $iCasp9_M$ の活性化は、生物学的に意味のあるレベルの IL-12 を産生する全ての T 細胞を完全に排除するために十分なものである (図 6)。IL-12 と同時発現させた際の $iCasp9_M$ の機能が図 6 において棒グラフで表されている。 $iCasp9_M.I.GFP$ 構築物におけるマーカー遺伝子 GFP を、ヒト IL-12 の p40 サブユニットおよび p35 サブユニットをコードする flexi IL-12 で置き換えた。 $iCasp9_M.I.GFP$ を形質導入した EBV-CTL および $iCasp9_M.I.IL-12$ を形質導入した EBV-CTL を LCL で刺激し、次いで、無処理のままにした、または 10 nM の CID に曝露した。第 2 の抗原による刺激の 3 日後に、培養上清中の IL-12 のレベルを IL-12 ELISA によって測定した (このアッセイの検出限界は 8 pg/mL である)。3 連のウェルの平均および標準偏差が示されている。2 つの異なるドナ

ー由来のCTLを用いた2回の実験のうちの1回の結果が示されている。

*in vivo*における、導入遺伝子の高発現に関して選択されたT細胞の99%超の排除

【0347】

*iCasp9_M*の機能を*in vivo*においても形質導入したEBV-CTLで評価した。養子免疫療法のためにSCIDマウス-ヒト異種移植片モデルを使用した。形質導入していないCTLと*iCasp9_M. IRES. GFP_高*を形質導入したCTLの1:1混合物を、自己由来LCL異種移植片を有するSCIDマウスに静脈内注入した後、マウスをCIDまたは担体のみの単回用量で処置した。CID/担体投与の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抗体を使用して注入産物の非形質導入成分が検出されたことにより、CIDを受けたマウスへの尾部静脈注入の成功が確認された。CIDを用いて処置したマウスでは、担体単独を用いて注入処置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、これにより、*iCasp9_M*を形質導入したT細胞の*in vivo*および*in vitro*における同等に高い感受性が実証される(図7を参照されたい)。

【0348】

*in vivo*における*iCasp9_M*の機能が図7にグラフで例示されている。NOD/SCIDマウスに放射線を照射し、 $10 \times 10^6 \sim 15 \times 10^6$ のLCLを皮下注射した。14日後に、直径0.5cmの腫瘍を有するマウスに合計 15×10^6 個のEBV-CTLを与えた(これらの細胞の50%は形質導入していないものであり、50%が*iCasp9_M. I. GFP*を形質導入し、高GFP発現について選別したものであった)。CTL投与後3日目に、マウスにCID(50μgのAP20187;(黒色のひし形、n=6)または担体のみ(黒色の四角、n=5)のいずれかを与え、6日目に、腫瘍内のヒトCD3⁺/GFP⁺T細胞の存在を分析した。形質導入していないCTLのみを与えた対照群のマウス(15×10^6 個のCTL;n=4)の腫瘍から単離したヒトCD3⁺T細胞を腫瘍内のCD3⁺/GFP⁺T細胞の分析の陰性対照として使用した。

考察

【0349】

本明細書では、一部の実施形態において、*in vivo*において遺伝子改変T細胞を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提示される。本明細書で提示されている自殺遺伝子発現ベクターは、改変性遺伝子を有する全ての細胞における安定な同時発現、細胞死を引き出すために十分に高いレベルでの発現、基底の活性が低いこと、特異的活性が高いこと、および内在性抗アポトーシス分子の影響の受けやすさが最小限であることを含めた、ある特定の非限定的な有利な特徴を有する。本明細書では、ある特定の実施形態において、基底の活性が低く、それによりヒトT細胞において4週間超にわたって安定発現が可能になる誘導性カスパーゼ9、*iCasp9_M*が提示される。10nM用量の小分子化学的二量体化誘導物質(CID)が、*in vitro*および*in vivo*のどちらにおいても、*iCasp9_M*を形質導入し、導入遺伝子の高発現に関して選択された細胞の99%超を死滅させるために十分である。さらに、Th1サイトカインIL-12と同時発現させると、導入遺伝子の高発現に関する選択を行わなくても、*iCasp9_M*の活性化により、検出可能なIL-12産生細胞の全てが排除される。カスパーゼ9は、大多数の抗アポトーシス分子の下流で作用し、したがって、レベルが上昇したbcl-2ファミリーの抗アポトーシス分子の存在にかかわらず、CIDに対する高感受性が保護される。したがって、*iCasp9_M*は、アポトーシスに対して比較的抵抗性である形質転換されたT細胞および記憶T細胞に対してさえも、その破壊を誘導するために有用であることも証明され得る。

【0350】

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の活性化のために十分でないと思われる。結晶学的データおよび機能的データから、不活性カスパーゼ9単量体の二量体化により、コンフォメーションの変化に誘導される活性化が導かれることが

示されている。生理的環境におけるプロカスペアーゼ-9の濃度は、約20 nMの範囲内であり、二量体化に必要な閾値を十分に下回る。

【0351】

理論に限定されることなく、二量体化に対するエネルギー障壁は、チトクロムCおよびATPによって駆動されるApaf-1のCARDドメインとカスペアーゼ-9の間の同種親和性相互作用により克服することができると考えられる。2つのFKBPとつながったカスペアーゼ-9の過剰発現により、自然二量体化の発現が可能になり得、最初の全長カスペアーゼ-9構築物で観察された毒性が説明され得る。1つのFKBPを除去した後に毒性の低下および遺伝子発現の増加が観察され、これは、自然二量体化に関連する毒性の低下に起因する可能性が最も高い。多くの場合、多量体化が表面細胞死受容体の活性化に関与するが、カスペアーゼ-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。本明細書で提示されているデータから、単一のFKBPを有するiCasp9構築物が2つのFKBPを有するものと同様に有効に機能することが示される。CARDドメインを除去することによってCIDに対する感受性を増大させることは、CID結合の際の二量体化のエネルギー閾値の低下を示し得る。

【0352】

HSV-TKおよびシトシンデアミナーゼなどのウイルス由来または細菌由来の致死遺伝子の持続および機能は、ウイルスまたは細菌に由来する致死遺伝子を発現してい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る。FKBPおよびiCasp9_Mの成分を形成するアポトーシス促進分子はヒト由来の分子であり、したがって、免疫応答が誘導される可能性が低い。FKBPとカスペアーゼ-9の間のリンカーおよびFKBPドメインにおける単一の点変異により新規のアミノ酸配列が導入されるが、配列はiFasを形質導入した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の成分はヒト由来の分子であるので、HSV-TKなどのウイルス由来のタンパク質とは異なり、接合部の配列に特異的な記憶T細胞はレシピエントに存在しないはずであり、それにより、iCasp9_Mを形質導入されたT細胞が免疫応答媒介性排除されるリスクが低下する。

【0353】

誘導性FasまたはFas関連デスドメインタンパク質(FADD)のデスエフェクタードメイン(DED)を使用した以前の試験により、形質導入された細胞のおよそ10%が破壊性遺伝子の活性化に対して無反応性であることが示された。本明細書で提示されている実験において観察された通り、CIDに対する不応答性についての可能性のある説明は、導入遺伝子の低発現である。CID投与後に残存した、我々の試験でiCasp9_Mを形質導入したT細胞および他者による試験でiFasを形質導入したT細胞は導入遺伝子の発現のレベルが低かった。認められているレトロウイルスの「位置効果」を克服するための試みにおいて、レトロウイルス組み込み体にニフトリベーターグロビクロマチンインスレーターを隣接させることにより均一な導入遺伝子の発現レベルの上昇が実現された。クロマチンインスレーターを付加することにより、形質導入した293T細胞の発現の均一性が劇的に増大したが、形質導入した初代T細胞における有意な効果はなかった。発現レベルが高いT細胞を選択することにより、二量体化剤に対する応答の変動性が最小化された。高GFP発現について選別された形質導入されたT細胞の99%超が、10 nMのCIDの単回投与後に排除された。これにより、高レベルの自殺遺伝子を発現している細胞を、選択マーカーを使用して単離することができるという仮説の裏付けが実証される。

【0354】

非常に少数の抵抗性残留細胞により毒性の復活が引き起こされる可能性があり、最大2 logの消失効率により、この可能性が有意に低下する。臨床使用のためには、短縮型ヒトNGFR、CD20、またはCD34などの非免疫原性選択マーカー（例えば、GFPの代わりに）と同時発現させることにより、導入遺伝子を高発現しているT細胞の選択が可能になる。自殺スイッチ（例えば、iCASP9_M）と適切な選択マーカー（例えば、

短縮型ヒトNGFR、CD20、CD34など、およびこれらの組合せ)の同時発現は、配列内リボソーム進入部位(IRES)または自己切断性配列(例えば2A)を含有する融合タンパク質の翻訳後修飾のいずれかを使用して得ることができる。対照的に、唯一の安全性の懸念が導入遺伝子に媒介される毒性(例えば、人工T細胞受容体、サイトカインなど、またはこれらの組合せ)である状況では、iCasp9_Mと導入遺伝子の発現の密接な関連により、生物学的に意味のあるレベルの治療用導入遺伝子を発現している細胞の実質的に全てを排除することが可能になるので、この選択ステップは不必要になり得る。これは、iCasp9_MとIL-12を同時発現させることにより実証された。iCasp9_Mの活性化により、あらゆる測定可能なIL-12産生が実質的に排除された。導入遺伝子の発現およびその後の「自殺スイッチ」の活性化の成功は、導入遺伝子の機能および活性に左右され得る。

10

【0355】

CIDに対する不応答性についての別の可能性のある説明は、高レベルのアポトーシス阻害物質によりCID媒介性アポトーシスが弱められる可能性があることである。阻害物質の例としては、通常アポトーシスと生存の間の平衡を調節するc-FLIP、bcl-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物質(IAP)が挙げられる。例えば、c-FLIPおよびbcl-2の上方制御により、記憶プールが確立されるように運命づけられたT細胞の亜集団が、コグネイトな標的または抗原提示細胞に応答した活性化誘導性細胞死に対して抵抗性になる。いくつかのTリンパ系腫瘍では、細胞生存が有利になり、アポトーシスと生存の間の生理的平衡が乱される。自殺遺伝子により、記憶細胞および悪性に形質転換した細胞を含めた実質的に全ての形質導入されたT細胞が消失するべきである。したがって、選択された誘導性自殺遺伝子は、抗アポトーシス分子のレベルが上昇している中で、その活性の実質的に全てではないにしろ、かなりの部分を保持するべきである。

20

【0356】

iFas(またはiFADD)の位置がアポトーシスシグナル伝達経路の頂点であることにより、iFas(またはiFADD)はアポトーシスの阻害物質の攻撃を特に受けやすいままになり、したがって、これらの分子はアポトーシス性安全スイッチの重要な成分としてあまり適さないものになる。カスパーゼ3またはカスパーゼ7は、末端エフェクター分子としてよく適すると思われるが、いずれも初代ヒトT細胞において機能的なレベルで発現させることができない。したがって、c-FLIPおよび抗アポトーシス性bcl-2ファミリーメンバーの阻害効果を迂回するという点でアポトーシス経路の十分に後期で機能し、また、機能的なレベルで安定に発現させることもできるカスパーゼ9を自殺遺伝子として選択した。アポトーシスのX連鎖阻害物質(XIAP)は理論的には自然カスパーゼ9活性化を低下させ得るが、AP20187(またはAP1903)のFKBP_{V36}に対する親和性が高いことにより、この非共有結合により会合するXIAPが取って代われ得る。iFasとは対照的に、iCasp9_Mは、bcl-xLを含めた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る。

30

【0357】

ヒトT細胞によりオンコレトロウイルスベクターから発現させるために特に設計された誘導性安全スイッチが本明細書で提示される。iCasp9_Mは、最適な消失効果のために必要な用量で安全であることが証明されている小さな化学的二量体化誘導物質であるAP1903(または類似体)によって活性化することができ、また、ガンシクロビルまたはリツキシマブとは異なり、in vivoにおける他の生物学的影響を有さない。したがって、養子移入のためにこの自殺遺伝子をT細胞において発現させることにより、安全性を増大させることができ、臨床的適用の範囲を広げることができ得る。

40

(実施例2)

ハプロタイプ一致幹細胞移植後のアロ枯渇T細胞の安全性を改善するための、iCasp9自殺遺伝子の使用

【0358】

50

本実施例では、ハプロタイプ一致幹細胞移植後のアロ枯渇T細胞の安全性を改善するための発現構築物および発現構築物の使用方法が提示される。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細胞に対する安全スイッチとして生成した。アロ枯渇（抗CD25免疫毒素を使用する）の後でさえ、ドナーT細胞を効率的に形質導入し、増大させ、その後、CD19免疫磁気選択によって90%超の純度まで富化させることができる。工学的に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有した。小分子二量体化剤を用いてiCasp9を活性化することにより、90%超のアポトーシスが急速に生じた。休止T細胞では導入遺伝子の発現が下方制御されたが、iCasp9は、活性化された（アロ反応性の）T細胞における発現が急速に上方制御されたので効率的な自殺遺伝子のままであった。

10

材料および方法

アロ枯渇T細胞の生成

【0359】

アロ枯渇細胞を以前に示されている通り健康な志願者から生成した。簡単に述べると、健康なドナー由来の末梢血単核細胞（PBMC）を、放射線を照射したレシピエントエプスタイン・バーウイルス（EBV）で形質転換したリンパ芽球様細胞株（LCL）と、応答物質対刺激物質比40:1、無血清培地（AIM-V; Invitrogen、Carlsbad、CA）中で共培養した。72時間後に、CD25を発現した活性化T細胞を、RFT5-SMPT-dgA免疫毒素の下で一晩インキュベートすることによって共培養物から枯渇させた。残留CD3⁺CD25⁺集団が1%未満であり、3H-チミジンの組み入れによる残留増殖が10%未満であった場合にアロ枯渇が適切であるとみなした。

20

プラスミドおよびレトロウイルス

【0360】

SFG. iCasp9. 2A. CD19は、切断可能な2A様配列を介して短縮型ヒトCD19（CD19; 図8Aを参照されたい）と連結し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 NM001229）と接続した、F36V変異を有するヒトFK506結合性タンパク質（FKBP12; GenBank AH002818）からなる。F36V変異により、FKBP12の合成ホモ二量体化剤AP20187またはAP1903に対する結合親和性が増大する。カスパーゼ動員ドメイン（CARD）は、その生理機能がFKBP12で置き換えられており、当該ドメインを除去することにより導入遺伝子の発現および機能が増大するので、ヒトカスパーゼ9配列から欠失させてある。2A様配列は、グリシンと末端プロリン残基の間の99%超の切断を媒介し、それにより、iCasp9のC末端に19個の付加的なアミノ酸、およびCD19のN末端に1つの付加的なプロリン残基をもたらすThos e a a s i g n a 昆虫ウイルス由来の20アミノ酸のペプチドをコードする。CD19は、細胞質内のドメインが242アミノ酸から19アミノ酸まで短くなり、リン酸化の潜在的な部位である保存されたチロシン残基が全て除去される、全長CD19（GenBank NM001770）がアミノ酸333（TDPTRRF）において短縮されたものからなる。

30

40

【0361】

テナガザル白血病ウイルス（Gal-V）にシュードタイプされたレトロウイルスを産生する安定なPG13クローンを、Phoenix Eco細胞株（ATCC product #SD3444; ATCC、Manassas、VA）にSFG. iCasp9. 2A. CD19を一過性にトランスフェクトすることによって作出した。これにより、Ecoにシュードタイプされたレトロウイルスが生じた。PG13パッケージング細胞株（ATCC）に、Ecoにシュードタイプされたレトロウイルスを用いて3回形質導入して、細胞当たり多数のSFG. iCasp9. 2A. CD19プロウイルス組み込み体を含有する産生株を生成した。単一細胞クローニングを実施し、最も高い力価を生じたPG

50

1 3 クローンを増大させ、ベクターを作製するために使用した。

レトロウイルスによる形質導入

【0362】

T細胞を活性化し、増大させるための培養培地は、45%RPMI 1640 (Hyclone、Logan、UT)、45%Clicks (Irvine Scientific、Santa Ana、CA) および10%ウシ胎仔血清 (FBS; Hyclone) からなった。レトロウイルスベクターを形質導入する前に48時間にわたって、固定化した抗CD3 (OKT3; Ortho Biotech、Bridgewater、NJ) によってアロ枯渴細胞を活性化した (図8Bを参照されたい)。図8Bには、形質導入された導入遺伝子を発現する「最終的な細胞産物」を産生するためのプロセスの概要が示されている。ドナーPBMCをレシピエントEBV-LCLと共培養することによって選択的なアロ枯渴を実施して、アロ反応性細胞を活性化した。活性化された細胞はCD25を発現し、その後、抗CD25免疫毒素によって排除された。アロ枯渴細胞をOKT3によって活性化し、48時間後にレトロウイルスベクターを形質導入した。形質導入の4日目に免疫磁気選択を実施し、陽性画分をさらに4日間増大させ、凍結保存した。

10

【0363】

小規模実験において、組織培養物で処理していない24ウェルプレート (Becton Dickinson、San Jose、CA) を、1g/mlのOKT3を用いて37℃で2~4時間コーティングした。アロ枯渴細胞をウェル当たり細胞 1×10^6 個で添加した。24時間の時点で、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。活性化の48時間後にレトロウイルスによる形質導入を実施した。組織培養物で処理していない24ウェルプレートに3.5 μ g/cm²の組換えフィブロネクチン断片 (CH-296; Retronectin; Takara Mirus Bio、Madison、WI) をコーティングし、そのウェルにレトロウイルスベクターを含有する上清をウェル当たり0.5mlで2回、37℃で30分にわたってローディングし、その後、OKT3により活性化された細胞を新鮮なレトロウイルスベクターを含有する上清、および100U/mlのIL-2を補充したT細胞培養培地に3:1の比でウェル当たり細胞 5×10^5 個でプレーティングした。細胞を2~3日後に回収し、50U/mlのIL-2の存在下で増大させた。

20

30

遺伝子改変アロ枯渴細胞のスケールアップ産生

【0364】

臨床的な適用のための形質導入プロセスのスケールアップに、1 μ g/mlのOKT3 10mlまたは7 μ g/mlのフィブロネクチン10mlを4℃で一晩コーティングした、組織培養物で処理していないT75フラスコ (Nunc、Rochester、NY) を使用した。細胞接着を増加させるためにコロナ処理したフッ素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。アロ枯渴細胞を、OKT3をコーティングしたフラスコに1ml当たり細胞 1×10^6 個で播種した。次の日に100U/mlのIL-2を添加した。レトロウイルスによる形質導入のために、レトロネ

40

CD19免疫磁気選択

【0365】

CD19についての免疫磁気選択を形質導入の4日後に実施した。細胞をモノクローナ

50

ルマウス抗ヒトCD19抗体 (Miltenyi Biotech, Auburn, CA) とコンジュゲートした常磁性マイクロビーズで標識し、小規模実験ではMSまたはLSカラムで、および大規模実験ではCliniMacs Plus automated selection deviceで選択した。CD19により選択された細胞をさらに4日間増大させ、形質導入の8日後に凍結保存した。これらの細胞を「遺伝子改変アロ枯渇細胞」と名付けた。

免疫表現型調査および五量体分析

【0366】

フローサイトメトリー分析 (FACSCaliburおよびCellQuest software; Becton Dickinson) を、以下の抗体を使用して実施した：CD3、CD4、CD8、CD19、CD25、CD27、CD28、CD45RA、CD45RO、CD56およびCD62L。CD19-PE (Clone 4G7; Becton Dickinson) により最適な染色がもたらされることが見出され、これをその後の全ての分析に使用した。形質導入していない対照を使用してCD19についての陰性ゲーティングを設定した。HLA五量体であるHLA-B8-RAKFKQLL (Proimmune, Springfield, VA) を使用してEBV溶解性抗原 (BZLF1) 由来のエピトープを認識するT細胞を検出した。HLA-A2-NLVPMVA TV五量体を使用してCMV-pp65抗原由来のエピトープを認識するT細胞を検出した。

10

抗ウイルス応答についてのインターフェロン-ELISpotアッセイ

20

【0367】

EBV、CMVおよびアデノウイルス抗原に対する応答を評価するためのインターフェロン-ELISpotを、公知の方法を使用して実施した。形質導入の8日後に凍結保存した遺伝子改変アロ枯渇細胞を解凍し、応答物質細胞として使用する前にIL-2を伴わない完全培地中で一晚静置した。同じドナー由来の凍結保存PBMCを比較器として使用した。応答物質細胞をウェル当たり細胞 2×10^5 個、 1×10^5 個、 5×10^4 個および 2.5×10^4 個の段階希釈物中で、連または3連でプレーティングした。刺激物質細胞をウェル当たり 1×10^5 個でプレーティングした。EBVに対する応答に関しては、40Gyでの放射線を照射したドナー由来のEBV-LCLを刺激物質として使用した。アデノウイルスに対する応答に関しては、Ad5f35アデノウイルスを感染させたドナー由来の活性化された単球を使用した。

30

【0368】

簡単に述べると、ドナーPBMCを、24ウェルプレート中、X-Vivo 15 (Cambrex, Walkersville, MD) 中で一晚プレーティングし、翌朝回収し、Ad5f35を感染多重度 (MOI) 200で2時間にわたって感染させ、洗浄し、30Gyの放射線を照射し、刺激物質として使用した。抗CMV応答に関しては、CMV pp65導入遺伝子をコードするAd5f35アデノウイルス (Ad5f35-pp65) をMOI 5000で使用する同様のプロセスを使用した。特異的なスポット形成単位 (spot-forming unit) (SFU) を、応答物質単独のウェルからのSFUおよび刺激物質単独のウェルからのSFUを試験ウェルから引き算することによって算出した。CMVに対する応答はAd5f35-pp65ウェルとAd5f35ウェルの間のSFUの差異であった。

40

EBV特異的細胞傷害性

【0369】

遺伝子改変アロ枯渇細胞を、40Gyの放射線を照射したドナー由来のEBV-LCLを用いて応答物質：刺激物質比40：1で刺激した。9日後に、培養物を応答物質：刺激物質比4：1で再刺激した。再刺激を示されている通り週に1回実施した。2ラウンドまたは3ラウンドの刺激後、ドナーEBV-LCLを標的細胞として使用し、ドナーOKT3芽球を自己由来対照として使用した4時間51Cr放出アッセイで細胞傷害性を測定した。30倍過剰の低温K562細胞を加えることによってNK活性を阻害した。

50

化学的二量体化誘導物質、AP20187を用いたアポトーシスの誘導

【0370】

CD19免疫磁気選択の翌日に小分子合成ホモ二量体化剤、AP20187 (Ariad Pharmaceuticals; Cambridge, MA) を最終濃度10nMで添加することによって自殺遺伝子の機能性を評価した。24時間の時点で細胞をアネキシン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と7-AADの両方について陰性の細胞を生存可能とみなし、アネキシンV陽性の細胞をアポトーシス性とみなし、アネキシンVと7-AADの両方について陽性の細胞を壊死性とみなした。二量体化によって誘導される死滅の百分率を以下の通りベースライン生存能力に対して補正した：死滅の百分率 = $100\% - (AP20187 \text{ で処理した細胞の} \% \text{ 生存能力} \div \text{無処理の細胞の} \% \text{ 生存能力})$ 。

10

培養の延長および再活性化後の導入遺伝子の発現の評価

【0371】

細胞を、50U/mlのIL-2を含有するT細胞培地中で形質導入後22日目まで維持した。1g/mlのOKT3および1μg/mlの抗CD28 (Clone CD28.2, BD Pharmingen, San Jose, CA) をコーティングした24ウェルプレート上で細胞の一部を48~72時間にわたって再活性化した。形質導入後24日目または25日目に、再活性化した細胞と再活性化していない細胞の両方におけるCD19発現および自殺遺伝子の機能を測定した。

20

【0372】

いくつかの実験では、同様に、細胞を形質導入後3週間にわたって培養し、30Gの放射線を照射した同種異系PBMCを応答物質：刺激物質比1:1で用いて刺激した。4日間共培養した後、細胞の一部を10nMのAP20187で処理した。24時間の時点でアネキシンV/7-AAD染色によって死滅を測定し、バ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処理した細胞および無処理の細胞に対する五量体分析によって評価した。

調節性T細胞

【0373】

遺伝子改変アロ枯渇細胞におけるCD4、CD25およびFoxp3発現を、フローサイトメトリーを使用して解析した。ヒトFoxp3染色に関しては、eBioscience (San Diego, CA) 染色セットを適切なラットIgG2aアイソタイプ対照と共に使用した。これらの細胞を表面CD25-FITCおよびCD4-PEと共染色した。アロ枯渇および遺伝子改変後に選択されたCD4⁺25⁺細胞をカルボキシフルオレセイン二酢酸N-スクシンイミジルエステル (CFSE) で標識した自己由来PBMCと共培養することによって機能分析を実施した。まず抗CD8マイクロビーズ (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) を使用してCD8⁺細胞を枯渇させ、その後、抗CD25マイクロビーズ (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) を使用して正の選択を行うことによってCD4⁺25⁺選択を実施した。自己由来PBMCを、1.5μMのCFSEを含有するリン酸緩衝生理食塩水中1ml当たり2×10⁷個で10分インキュベートすることによってCFSE標識を実施した。同体積のFBSを添加し、37℃で10分インキュベートすることによって反応を停止させた。細胞を使用する前に2回洗浄した。CFSEで標識したPBMCを、500ng/mlのOKT3および40Gで放射線を照射した同種異系PBMCフィーダーをPBMC：同種異系フィーダー比5:1で用いて刺激した。次いで、細胞を、同数の自己由来CD4⁺25⁺遺伝子改変アロ枯渇細胞を伴ってまたは伴わずに培養した。5日間培養した後に、細胞分裂をフローサイトメトリーによって分析した。CD19を使用して、CFSEで標識されなかったCD4⁺CD25⁺遺伝子改変T細胞をゲーティングアウトした。

30

40

統計解析

【0374】

50

対応のある両側スチューデント t 検定を使用して試料間の差異の統計的有意性を決定した。全てのデータは、平均±1標準偏差として示されている。

結果

選択的にアロ枯渇させたT細胞は i C a s p 9 を効率的に形質導入し、増大させることができる

【0375】

臨床プロトコールの手順に従って選択的なアロ枯渇を実施した。簡単に述べると、3／6～5／6のHLA不適合PBMCおよびリンパ芽球様細胞株（LCL）を共培養した。72時間共培養した後にRFT5-SMPT-dgA免疫毒素を適用し、残留する増殖が10%未満であり（平均4.5±2.8%；範囲0.74～9.1%；10回の実験）、含有される残留CD3⁺CD25⁺細胞が1%未満である（平均0.23±0.20%；範囲0.06～0.73%；10回の実験）アロ枯渇細胞を確実に作製し、それにより、選択的なアロ枯渇に関する放出基準を満たし、その後の操作の出発材料としての機能を果たした。

【0376】

固定化OKT3上で48時間にわたって活性化したアロ枯渇細胞には、SFG. i C a s p 9 . 2 A . C D 1 9 をコードする、Ga1-Vにシュードタイプされたレトロウイルスベクターを効率的に形質導入することができた。形質導入の2～4日後にCD19発現についてのFACS分析によって評価され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）形質導入の結果と大規模（T75フラスコ）形質導入の結果は同等であった（それぞれ6回の実験および4回の実験で約55±8%対約50%±10%）。細胞数はOKT3活性化後の最初の2日間で縮小し、したがって、形質導入の当日にはアロ枯渇細胞の約61%±12%（約45%～80%の範囲）しか回収されなかった（図9を参照されたい）。図9には、形質導入後にアロ枯渇細胞を首尾よく増大させることができるかを決定するために実施した実験の結果がグラフにより例示されている。黒色のひし形はフラスコおよびバッグで実施した大規模実験を指す。白抜き丸は24ウェルプレートで実施した小規模実験を指す。その後、細胞は有意な増大を示し、その後の8日間にわたる平均増大は約94±46倍の範囲（約40～約153の範囲）であり、正味58±33倍の増大がもたらされた。小規模実験および大規模実験のどちらにおいても細胞増大は同様であり、正味の増大は、5回の小規模実験では約45±29倍（約25～約90の範囲）であり、3回の大規模実験では約79±34倍（約50～約116の範囲）であった。

ΔCD19により、免疫磁気カラムにおける形質導入された細胞の効率的かつ選択的な富化が可能になる

【0377】

自殺遺伝子活性化の効率は、時には自殺遺伝子自体の機能性に左右され、時には遺伝子改変細胞を富化するために使用する選択系に左右される。CD19による選択により純度および収率が十分な遺伝子改変細胞の選択が可能になるか、および選択によりその後の細胞の成長に何らかの悪影響があるかどうかを決定するために、選択マーカーとしてのCD19の使用を調査した。製造者の説明書に従って小規模選択を実施したが、細胞1.3×10⁷個当たりCD19マイクロビーズ101を使用する場合には大規模選択が最適であることが決定された。抗CD19マイクロビーズによる干渉を最小限にするために、免疫磁気選択の24時間後にFACS分析を実施した。免疫磁気選択後の細胞の純度は一貫して90%超であり、CD19⁺細胞の平均百分率は小規模選択では約98.3%±0.5%の範囲内（n=5）であり、大規模CliniMacによる選択では約97.4%±0.9%の範囲内（n=3）であった（図10を参照されたい）。図10には、形質導入の2日後に実施した免疫磁気選択の代表的なFACS分析トレースが示されている。

【0378】

小規模選択および大規模選択の絶対的な収率は、形質導入効率に対して補正後、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

小規模選択では約 54% ± 14% であり、大規模選択では約 72% ± 18% であった。選択プロセスは、その後の細胞増大に対していかなる識別可能な悪影響も及ぼさなかった。4 回の実験において、CD19 免疫磁気選択後 3 日間にわたる平均細胞増大は、CD19 陽性画分について約 3.5 倍であり、それに対して選択していない形質導入された細胞では約 4.1 倍であり ($p = 0.34$)、形質導入されていない細胞では約 3.7 倍であった ($p = 0.75$)。

遺伝子改変アロ枯渇細胞の免疫表現型

【0379】

最終的な細胞産物（形質導入の 8 日後に凍結保存した遺伝子改変アロ枯渇細胞）の免疫表現型検査を行い、下記の表に示されている通り、CD4 細胞と CD8 細胞の両方を含有し、CD8 細胞が優勢で 62% ± 11% CD8⁺ であり、それに対して CD4⁺ が 23% ± 8% であることが見出された。NS = 有意でない、SD = 標準偏差。

【表 1 B】

表1

	操作していない PBMC (平均%±SD)	遺伝子改変 アロ枯渇細胞 (平均%±SD)	
T細胞:総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	$p < 0.05$

【0380】

大多数の細胞が 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。CD62L、CD27 および CD28 を含めた記憶マーカーの発現は異種性であった。細胞のおよそ 24% が、中心的な記憶細胞上に主に発現するリンパ節ホーミング分子である CD62L を発現した。

遺伝子改変アロ枯渇細胞は抗ウイルス性のレパトリリーおよび機能性を保持した

【0381】

最終産物細胞の抗ウイルス免疫を媒介する能力を、インターフェロナー E L I S p o t、細胞毒性アッセイ、および五量体分析によって評価した。凍結保存した遺伝子改変アロ枯渇細胞は臨床研究における使用について現在評価されている製品を代表するものであるため、これを全ての分析において使用した。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ナー γ 分泌は保護された

が、操作していないP B M Cに対して、遺伝子改変アロ枯渴細胞における抗E B V応答が低下する傾向があった(図1 1 Aを参照されたい)。図1 1 Aにインターフェロン分泌試験の結果が例示されている。4対の操作していないP B M Cと遺伝子改変アロ枯渴細胞(G M A C)においてウイルス抗原に対する応答をE L I S p o tによって評価した。アデノウイルス抗原およびC M V抗原を、それぞれA d 5 f 3 5ヌルベクターおよびA d 5 f 3 5 - p p 6 5ベクターを感染させることにより、ドナー由来の活性化された単球によって提示させた。E B V抗原をドナーE B V - L C Lによって提示させた。スポット形成単位(S F U)の数を刺激物質単独のウェルおよび応答物質単独のウェルに対して補正した。4つのドナーのうち3つがC M V応答について評価可能であり、1つの血清反応陰性ドナーは排除した。図1 1 Aにおいて、横棒は中央値を示す。

10

【0 3 8 2】

細胞傷害性を、ドナー由来のE B V - L C Lを標的として使用して評価した。ドナー由来のE B V - L C Lを用いて2ラウンドまたは3ラウンドの刺激を与えた遺伝子改変アロ枯渴細胞により、ウイルスに感染している自己由来標的細胞を効率的に溶解することができた(図1 1 Bを参照されたい)。図1 1 Bには、細胞毒性アッセイの結果が示されている。遺伝子改変アロ枯渴細胞を、ドナーE B V - L C Lを用いて2サイクルまたは3サイクル刺激した。^{5 1} C r放出アッセイを、ドナー由来のE B V - L C LおよびドナーO K T 3芽球を標的として使用して実施した。30倍過剰の低温K 5 6 2を用いてN K活性を遮断した。左側のパネルは、完全にまたは部分的に適合しないドナーレシピエント対を使用した5回の独立した実験からの結果を示す。右側のパネルは、非血縁H L Aハプロタイプ一致ドナーレシピエント対を使用した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

【0 3 8 3】

E B V - L C Lを選択的なアロ枯渴の間の抗原提示細胞として使用し、したがって、ドナーとレシピエントがハプロタイプ一致である場合にE B V特異的T細胞を有意に枯渴させることができる可能性があった。この仮説を調査するために、非血縁H L A - ハプロタイプ一致ドナーレシピエント対を使用した3回の実験を含め、その結果から、ドナー由来のE B V - L C Lに対する細胞傷害性が保持されることが示された。結果から、E B V溶解性抗原(B Z L F 1)エピトープであるH L A - B 8 - R A K F K Q L Lを認識するT細胞についての五量体分析により、H L A - B 8陰性ハプロタイプ一致レシピエントに対する2つの情報価値のあるアロ枯渴後のドナーが確証された(図1 1 Cを参照されたい)。図1 1 Cには、B Z L F 1エピトープに特異的なT細胞の頻度が例示されている。操作していないP B M Cを比較器として使用した。R A K - 五量体陽性集団は遺伝子改変アロ枯渴細胞において保持され、i n v i t r oにおいてドナー由来のE B V - L C Lを用いて何回か刺激した後に増大することができた。図1 1 Cに提示されているグラフに示されている百分率は、C D 8集団内の五量体陽性細胞の百分率を示す。まとめると、これらの結果から、遺伝子改変アロ枯渴細胞が著しい抗ウイルス機能性を保持することが示される。

30

遺伝子改変アロ枯渴細胞集団における調節性T細胞

【0 3 8 4】

フローサイトメトリーおよび機能分析を使用して、調節性T細胞が我々のアロ枯渴遺伝子改変T細胞産物に保持されるかどうかを決定した。図1 2 Aに示されている通り、F o x p 3 + C D 4 + 2 5 + 集団が見出された。免疫磁気分離後、C D 4 + C D 2 5 + 富化画分では、C F S Eで標識した自己由来P B M CとO K T 3および同種異系フィーダーの存在下で共培養した場合に抑制因子機能が実証された(図1 2 Bを参照されたい)。図1 2 Bには、C D 4 + C D 2 5 + 機能アッセイの結果が例示されている。ドナー由来のP B M CをC F S Eで標識し、O K T 3および同種異系フィーダーを用いて刺激した。C D 4 + C D 2 5 + 細胞を遺伝子改変細胞集団から免疫磁気により選択し、1 : 1比で試験ウェルに添加した。5日後にフローサイトメトリーを実施した。遺伝子改変T細胞をC D 1 9発現によってゲーティングアウトした。C D 4 + C D 2 5 + 遺伝子改変細胞を添加すること

40

50

により（下のパネル）、細胞増殖が有意に低下した。したがって、アロ枯渴T細胞はCD 25を枯渴させる免疫毒素に曝露した後でさえ調節性表現型を再獲得することができる。

化学的二量体化誘導物質を添加することにより遺伝子改変アロ枯渴細胞が効率的かつ急速に排除された

【0385】

免疫磁気選択の翌日、アポトーシスを誘導するために10 nMの化学的二量体化誘導物質AP20187を添加し、アポトーシスは24時間以内に発生した。24時間の時点でのアネキシンVおよび7-AAD染色を用いたFACS分析により、AP20187で処理した細胞は約5.5%±2.5%のみが生存可能なままであったが、無処理の細胞は約81.0%±9.0%が生存可能であったことが示された（図13Aを参照されたい）。ベースライン生存能力に対して補正した後の死滅の効率は約92.9%±3.8%であった。大規模CD19による選択により、小規模選択と同様の効率で死滅する細胞が生じた：大規模選択および小規模選択におけるAP20187を用いた場合および用いていない場合の平均生存能力、ならびに死滅の百分率は、それぞれ約3.9%、約84.0%、約95.4%（n=3）および約6.6%、約79.3%、約91.4%（n=5）であった。AP20187は形質導入されていない細胞に対して無毒性であった：AP20187を用いた場合および用いていない場合の生存能力はそれぞれ約86%±9%および87%±8%であった（n=6）。

培養が延長されるにつれ導入遺伝子の発現および機能が低下したが、細胞再活性化に際して回復した

【0386】

導入遺伝子の発現および機能の安定性を評価するために、細胞をT細胞培養培地および低用量のIL-2（50 U/ml）中で形質導入の24日後まで維持した。次いで、OKT3/抗CD28を用いて細胞の一部を再活性化した。48～72時間後にCD19発現をフローサイトメトリーによって分析し、自殺遺伝子の機能を10 nMのAP20187を用いた処理によって評価した。図13Bに示されている結果は、形質導入後5日目（すなわち、CD19による選択の1日後）および形質導入後24日目の、48～72時間の再活性化を伴うまたは伴わない細胞についての結果である（5回の実験）。2回の実験では、OKT3/aCD28活性化の後にCD25による選択を実施して、活性化された細胞をさらに富化した。エラーバーは標準偏差を示す。*は、形質導入の5日後の細胞と比較した $p < 0.05$ を示す。24日目までに、表面CD19発現は約98%±1%から約88%±4%まで低下し（ $p < 0.05$ ）、それと並行して平均蛍光強度（MFI）が793±128から478±107まで低下した（ $p < 0.05$ ）（図13Bを参照されたい）。同様に、自殺遺伝子の機能が有意に低下し、残留生存能力はAP20187を用いて処理した後には19.6±5.6%であり、ベースライン生存能力に対して補正した後には54.8±20.9%であり、これは、死滅の効率がたった63.1±6.2%であるのと等しい。

【0387】

経時的な導入遺伝子の発現の減少がT細胞の静止後の転写の低下に起因するものであるか形質導入された細胞の排除に起因するものであるかを決定するために、形質導入後22日目にOKT3および抗CD28抗体を用いて細胞の一部を再活性化した。48～72時間の時点で（形質導入後24日目または25日目）、OKT3/aCD28により再活性化された細胞では、再活性化されていない細胞よりも導入遺伝子の発現が有意に高かった。CD19発現は約88%±4%から約93%±4%まで増加し（ $p < 0.01$ ）、CD19のMFIは478±107から643±174まで増加した（ $p < 0.01$ ）。さらに、自殺遺伝子の機能も、約63.1%±6.2%の死滅の効率から約84.6%±8.0%（ $p < 0.01$ ）の死滅の効率まで有意に増加した。さらに、細胞を活性化マーカーCD25について免疫磁気によって選別した場合には死滅の効率が完全に回復し、CD25陽性細胞の死滅の効率は約93.2%±1.2%であり、これは形質導入の5日後の死滅の効率（93.1±3.5%）と同じであった（図13Cを参照されたい）。CD25

陰性画分の死滅は $78.6 \pm 9.1\%$ であった。図13Cには、自殺遺伝子の機能に対する培養の延長およびT細胞活性化の影響を示す代表的なFACSプロットが例示されている。

【0388】

非特異的なマイトジェン刺激によってではなく、同種異系PBMCによって再活性化された遺伝子改変細胞を枯渇させるために二量体化剤を使用した場合に、多くのウイルス特異的T細胞が残されることが注目すべき知見であった。図14Aおよび図14Bに示されている通り、EBVおよびCMVに由来するペプチドに特異的なHLA五量体と反応性のT細胞の割合によって測定される通り、同種異系細胞を用いて4日間再活性化した後、AP20187を用いた処理によりウイルス反応性亜集団が残される（そしてそれにより富化される）遺伝子改変アロ枯渇細胞を、形質導入後3週間にわたって培養物中で維持して、導入遺伝子を下方調節させた。細胞を同種異系PBMCで4日間刺激し、その後、一部を 10 nM のAP20187で処理した。EBV特異的T細胞の頻度（図14Aを参照されたい）およびCMV特異的T細胞の頻度（図14Bを参照されたい）をアロ刺激前、アロ刺激後、およびアロ刺激した細胞を二量体化剤で処理した後に五量体分析によって数量化した。ウイルス特異的T細胞の百分率はアロ刺激後に低下した。二量体化剤で処理した後、ウイルス特異的T細胞は部分的に、優先的に保持された。

考察

【0389】

2つの別個の安全性機構、選択的なアロ枯渇および自殺遺伝子改変を用いて同種異系T細胞を工学的に操作することの実現性が本明細書において実証されている。これらの改変を組み合わせ、ハプロタイプ一致移植後でさえも、実質的な数の、抗ウイルス性活性および抗腫瘍活性を有するT細胞を増強しかつ／またはその追加輸注を可能にすることができる。本明細書で提示されているデータから、自殺遺伝子*iCasp9*が効率的に機能すること（二量体化剤を用いた処理後、 90% 超のアポトーシス）、および経時的に起こった導入遺伝子の発現の下方調節がT細胞活性化に際してアロ反応性T細胞がそれらの標的に遭遇すると生じるのと同様に急速に逆転したことが示されている。本明細書で提示されているデータから、CD19が、形質導入された細胞の 90% 超の純度までの効率的かつ選択的な富化を可能にする適切な選択マーカーであることも示される。さらに、本明細書で提示されているデータから、これらの操作には、抗ウイルス活性の保持、および*Treg*活性を有するCD4⁺CD25⁺Foxp3⁺集団の再生を伴う工学的に操作されたT細胞の免疫適格性に対する識別可能な影響はないことが示される。

【0390】

自殺遺伝子の全体的な機能性が自殺遺伝子自体と形質導入された細胞を選択するために使用するマーカーの両方に左右されることを考慮すると、臨床使用への変換には、2つの遺伝子の発現を併せるために使用する成分と方法の両方を最適化する必要がある。現在診療において最も広く使用されている選択マーカーの2つにはそれぞれ欠点がある。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7日間培養することが必要であり、これにより、系の複雑さが増すだけでなく、ウイルス特異的T細胞に損傷を与える潜在性もある。広く使用されている表面選択マーカー、LNGFRには、最近、その明らかな臨床的な安全性にもかかわらず、マウスモデルにおける発がんの潜在性および白血病との潜在的相関に関する懸念が生じている。さらに、LNGFR選択は、ほぼ排他的に遺伝子療法において使用されているので、広範に利用可能なものではない。いくつかの代替選択マーカーが提案されている。CD34も*in vitro*においてよく試験されているが、主に稀な造血前駆細胞を選択するために構成された系を最適化するために必要なステップ、およびより決定的に、*in vivo*におけるT細胞ホーミングの変更の潜在性により、CD34が自殺スイッチ発現構築物に対する選択マーカーとして使用するために最適以下のものになる。幹細胞自家移植片のB細胞枯渇のための方法として臨床グレードのCD19による選択が容易に利用可能であるので、CD19を代替選択マーカーとして選択した。本明細書で提示されてい

る結果から、CD19による富化を高純度および高収率で実施することができ、さらに、選択プロセスには、その後の細胞の成長および機能性に対する識別可能な影響がないことが実証された。

【0391】

CD19により選択されたiCasp9細胞における自殺遺伝子活性化の効果は、HSVtk遺伝子を発現するように形質導入された、neoにより選択された細胞またはLNGFRにより選択された細胞における自殺遺伝子活性化の効果と非常に好都合に比較された。以前の世代のHSVtk構築物では³H-チミジン取り込みの80~90%の抑制がもたらされ、in vitroにおける培養が延長されると死滅の効率の同様の低下が示されたが、それにもかかわらず、臨床的に効果的であった。わずか80%のin vivoにおける循環遺伝子改変細胞の減少を伴う急性GVHDと慢性GVHDの両方の完全な消散が報告されている。これらのデータから、GVHDに関与する活性化T細胞では自殺遺伝子発現が上方制御され、したがって当該細胞はin vivoにおいて選択的に排除されるので、in vitroにおいて見られた導入遺伝子の下方調節が問題になる可能性は低いという仮説が裏付けられる。この効果がin vivoにおいてウイルス特異的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、臨床的な状況でこれから試験される。自殺遺伝子改変前のin vitroにおける選択的なアロ枯渴を組み合わせることで、自殺遺伝子機構を活性化する必要性を著しく低下させ、それにより、追加輸注T細胞に基づく療法の利益を最大にすることができる。

【0392】

in vitroにおいて見られるiCasp9媒介性自殺の高効率は、in vivoにおいて再現されている。SCIDマウス-ヒト異種移植片モデルでは、iCasp9により改変されたT細胞の99%超が単回用量の二量体化剤後に排除された。AP20187と非常に近い機能および化学的同等性を有し、現在臨床的な適用における使用が提案されているAP1903の安全性試験が健康なヒト志願者に対して行われており、安全であることが示されている。2時間の静脈内注入として投与した0.01mg/kg~1.0mg/kg用量範囲に対して、AP1903約10ng/mlから約1275ng/mlまでの間の最大血漿中レベル(約7nMから約892nMまでの間と同等である)が達成された。有意な有害作用は実質的になかった。急速に血漿中再分布させた後、in vitroにおいて使用した二量体化剤の濃度がin vivoにおいて容易に実現可能であった。

【0393】

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、形質導入された細胞を選択するための方法、および培養の持続時間の影響を受ける可能性があるため、安全スイッチ、選択マーカーおよび細胞型の各組合せについて、自殺遺伝子改変T細胞の免疫適格性を維持するために最適な培養条件を決定し、定義しなければならない。CD4:CD8比に関して、操作していないPBMCとよく似ている遺伝子改変細胞を生成するための、CD28による同時刺激の添加および細胞サイズ常磁性ビーズの使用、およびリンパ節ホーミング分子CD62LおよびCCR7を含めた記憶サブセットマーカーの発現により、遺伝子改変T細胞のin vivoにおける機能性を改善することができる。CD28による同時刺激により、レトロウイルスによる形質導入および増大の効率を上昇させることもできる。しかし、興味深いことに、CD28による同時刺激の添加にはアロ枯渴細胞の形質導入に対する影響がなく、また、実証された細胞増大の程度が、他の試験における抗CD3単独群と比較して高いことが見出された。さらに、iCasp9により改変されたアロ枯渴細胞は有意な抗ウイルス機能性を保持し、およそ4分の1がCD62L発現を保持した。CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺調節性T細胞の再生も見られた。T細胞活性化および形質導入の出発材料として使用したアロ枯渴細胞は、同時刺激としての抗CD28抗体の添加に対する感受性が低いものであった可能性がある。CD25による枯渴を行ったPBMC/EBV-LCL共培養物は、すでにCD86を操作していないPBMCよりも有意に高いレベルで発現しているT細胞およびB細胞

胞を含有し、それら自体により同時刺激がもたらされ得る。抗CD3を用いてポリクローナルT細胞活性化を行う前のCD25⁺調節性T細胞の枯渇により、最終的なT細胞産物の免疫適格性が增強されることが報告されている。in vitroにおける培養および増大の機能的な適格性に対する影響を最小限にするために、本明細書で提示されているいくつかの実験では、細胞を形質導入後合計8日間にわたって増大させ、CD19による選択を4日目に実施する、比較的短い培養期間を使用した。

【0394】

最後に、成人患者を1kg当たり細胞最大10⁷個の用量で処置するために十分な細胞産物を産生することができるような産生のスケールアップが実証された。アロ枯渇細胞を活性化し、フラスコ当たり細胞4×10⁷個で形質導入し、形質導入後8日目に、最低8倍になった、CD19により選択された最終的な細胞産物を得て、元のフラスコ当たり少なくとも3×10⁸個のアロ枯渇遺伝子改変細胞を産生させることができる。増加した培養物の体積は追加的なフラスコまたはバッグに容易に適応する。

10

【0395】

本明細書で提示されているアロ枯渇およびiCasp9による改変により、特にハプロタイプ一致幹細胞同種異系移植後のT細胞の追加輸注の安全性が有意に改善され得る。今度はこれにより、より大きな用量漸増が可能になり、抗白血病効果を生じる見込みが高まる。

(実施例3)

CASPALLO-ハプロタイプ一致幹細胞移植後のアロ枯渇させた誘導性カスパーゼ-9自殺遺伝子を形質導入したT細胞の第I相臨床試験

20

【0396】

この実施例では、図22に例示されている代替自殺遺伝子戦略を使用した第I相臨床試験の結果を提示する。簡単に述べると、ドナー末梢血単核細胞を、放射線を照射したレシピエントEBVで形質転換したリンパ芽球様細胞と一緒に72時間共培養し(40:1)、CD25免疫毒素を用いてアロ枯渇させ、次いで、iCasp9自殺遺伝子および選択マーカー(ΔCD19)を有するレトロウイルス上清を形質導入した。図23において例示されている通り、ΔCD19により、免疫磁気選択によって90%超の純度まで富化することが可能になった。

【0397】

細胞療法製品を生成するためのプロトコルの例が本明細書において提供される。

30

原料

【0398】

末梢血最大240ml(2つの集合)を、確立されたプロトコルに従って移植ドナーから得た。いくつかの場合には、ドナーおよびレシピエントのサイズに応じて、白血球フェレーシスを実施して十分なT細胞を単離した。レシピエントから血液10cc~30ccも採血し、それを使用して、刺激物質細胞として使用する、エプスタイン・バーウイルス(EBV)で形質転換したリンパ芽球様細胞株を生成した。いくつかの場合には、低B細胞数の病歴および/または指標に応じて、適切な第一度近親者(例えば、親、同胞、または子孫)を使用して末梢血単核細胞を使用してLCLを生成した。

40

アロ枯渇細胞の生成

【0399】

本明細書で提示されている通り、移植ドナーからアロ枯渇細胞を生成した。健康なドナー由来の末梢血単核細胞(PBMC)を、放射線を照射したレシピエントエプスタイン・バーウイルス(EBV)で形質転換したリンパ芽球様細胞株(LCL)と、応答物質対刺激物質比40:1、無血清培地(AIM V; Invitrogen、Carlsbad、CA)中で共培養した。72時間後に、CD25を発現している活性化T細胞を、RFT5-SMPT-dgA免疫毒素の下で一晩インキュベートすることによって共培養物から枯渇させた。残留CD3⁺CD25⁺集団が1%未満であり、残留³H-チミジンの組み入れによる増殖が10%未満であった場合にアロ枯渇が適切であるとみなした。

50

レトロウイルスの産生

【0400】

i Casp9-CD19を構築するためにレトロウイルス産生株クローンを生成した。産生株のマスター細胞バンクも生成した。マスター細胞バンクの試験を実施して、複製適格レトロウイルスの生成およびMycoplasma、HIV、HBV、HCVなどによる感染を排除した。産生株を集密まで増殖させ、上清を回収し、濾過し、分注し、急速凍結し、-80℃で保管した。レトロウイルス上清の全てのバッチに対して追加試験を実施して、複製適格レトロウイルス(RCR)を排除し、プロトコールに従って分析証明書を発行した。

アロ枯渴細胞の形質導入

【0401】

アロ枯渴させたT-リンパ球にフィブロネクチンを形質導入した。プレートまたはバッグを組換えフィブロネクチン断片CH-296(Retronection™, Takara Shuzo, Otsu, Japan)でコーティングした。コーティングしたプレートまたはバッグ中で産生株の上清をインキュベートすることによってウイルスをレトロネクチンに付着させた。次いで、細胞をウイルスがコーティングされたプレートまたはバッグに移した。形質導入後、プロトコールに従ってアロ枯渴T細胞にIL-2を週2回供給して十分な数の細胞に到達するまでアロ枯渴T細胞を増大させた。

CD19免疫磁気選択

【0402】

CD19についての免疫磁気選択を形質導入の4日後に実施した。細胞をモノクローナルマウス抗ヒトCD19抗体(Miltenyi Biotech, Auburn, CA)とコンジュゲートした常磁性マイクロビーズで標識し、CliniMacs Plus automated selection deviceで選択する(図24を参照されたい)。臨床的な注入のために必要な細胞の数に応じて、細胞を、CliniMacsによる選択後に凍結保存したか、またはIL-2を用いてさらに増大させ、形質導入後6日目または8日目に凍結保存した。

凍結

【0403】

FDAによる最終的な放出試験に必要な形質導入効率、同一性、表現型および微生物学的培養を試験するために、一定分量の細胞を取り出した。プロトコールに従って、投与する前に細胞を凍結保存した。

試験薬

RFT5-SMPT-dgA

【0404】

RFT5-SMPT-dgAは、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-アルファ-メチル-d-(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)とコンジュゲートしたマウスIgG1抗CD25(IL-2受容体アルファ鎖)である。RFT5-SMPT-dgAを0.5mg/mlの滅菌溶液として製剤化した。

合成ホモ二量体化剤、AP1903

【0405】

作用機構: AP1903誘導性細胞死は、アポトーシス細胞死のシグナルを伝達するヒト(カスパーゼ-9タンパク質)受容体の細胞内部分とヒトFK506結合性タンパク質(FKBP)に由来する薬物結合性ドメインが融合したキメラタンパク質を発現させることによって実現される。このキメラタンパク質は、FKBPドメインを架橋結合させ、カスパーゼシグナル伝達およびアポトーシスを開始させるAP1903を投与するまで、内側細胞において休止したままである。

【0406】

毒性学: AP1903は、FDAにより治験薬(IND)として評価され、第I相臨床

10

20

30

40

50

安全性試験が首尾よく完了している。AP1903を0.01mg/kg～1.0mg/kgの用量範囲にわたって投与した場合に有意な有害作用は認められなかった。

【0407】

薬理学／薬物動態学：患者に0.4mg/kgのAP1903を2時間かけて注入した。これは、0.01mg/kg～1.0mg/kgの用量範囲にわたる血漿中濃度が10ng/mL～1275ng/mLであり、血漿中レベルが投薬の0.5時間後および2時間後に最大レベルの18%および7%まで低下したことが示されている公開されたPkデータに基づくものであった。

【0408】

ヒトにおける副作用プロファイル：志願者における第I相試験の間に重篤な有害事象は起こらなかった。各処置後の有害事象の発生率は非常に低く、全ての有害事象の重症度が軽度であった。有害事象の1つのみがおそらくAP1903に関連するものと考えられた。これは血管拡張のエピソードであり、投薬量が1.0mg/kgのAP1903であった志願者1名の「顔面紅潮」として見られた。この事象は、注入開始後3分の時点で起こり、32分持続した後に消散した。試験の間に報告された他の有害事象は全て、研究者により、試験薬とは無関係であるまたは関係する可能性が低いとみなされた。これらの事象には、胸痛、インフルエンザ症候群（flu syndrome）、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、および斑状出血が含まれた。

【0409】

グレード1のGVHDが発生している患者に、0.4mg/kgのAP1903を2時間かけて注入した。グレード1のGVHDの患者にAP1903を投与するためのプロトコルを以下の通り確立した。アロ枯渇T細胞の注入後にGVHDが発生している患者の生検を行って診断を確認し、0.4mg/kgのAP1903を2時間かけて注入する。グレード1のGVHDを有する患者は最初に他の療法を受けなかったが、GVHDの進行を示した場合には、従来のGVHD療法を施設のガイドラインに従って施した。グレード2～4のGVHDが発生している患者には、AP1903二量体化薬に加えて、標準の全身免疫抑制療法を施設のガイドラインに従って施した。

【0410】

調製および注入の説明：注射用AP1903を、5mg/mLの濃度で、3mLのバイアル中2.33mLの濃縮溶液として得る（すなわち、バイアル当たり10.66mg）。投与する前に、注入のために、算出された用量を通常生理食塩水100mL中0.9%まで希釈した。体積100mL中注射用AP1903（0.4mg/kg）を、非DEHP、非エチレンオキシド滅菌済注入セットおよび注入ポンプを使用し、2時間にわたるIV注入によって投与した。

【0411】

図25に示されているiCasp9自殺遺伝子発現構築物（例えば、SFG-iCasp9.2A.ACD19）は、切断可能な2A様配列を介して短縮型ヒトCD19（ACD19）と連結した誘導性カスパーゼ9（iCasp9）からなる。iCasp9は、Ser-Gly-Gly-Gly-Ser-Glyリンカーを介してヒトカスパーゼ9（CASP9；GenBank NM001229）と接続したF36V変異を有するヒトFK506結合性タンパク質（FKBP12；GenBank AH002818）を含む。F36V変異により、FKBP12の合成ホモ二量体化剤、AP20187またはAP1903に対する結合親和性が増大し得る。ヒトカスパーゼ9配列からカスパーゼ動員ドメイン（CARD）を欠失させ、その生理機能をFKBP12で置き換えた。CARDをFKBP12で置き換えることにより、導入遺伝子の発現および機能が増大する。2A様配列は、Thosea Asigna昆虫ウイルス由来の18アミノ酸のペプチドをコードし、グリシンと末端プロリン残基の間の99%超の切断を媒介し、それにより、iCasp9のC末端に17個の付加的なアミノ酸、およびCD19のN末端に1つの付加的なプロリン残基をもたらすものである。ΔCD19は、細胞質内のドメインが242アミノ酸から19アミノ酸まで短縮され、リン酸化の潜在的な部位である保存されたチ

10

20

30

40

50

ロシン残基が全て除去される、全長CD19 (GenBank NM001770) がアミノ酸333 (TDPTRRF) において短縮されたものからなる。図26には、iCasp9自殺スイッチを有する遺伝子改変T細胞の排除におけるiCasp9およびAP1903の結果が例示されている。

in vivo 試験

【0412】

3名の患者が、ハプロ-C D 3 4 ⁺ 幹細胞移植 (SCT) 後に i C a s p 9 ⁺ T細胞を1kg当たり細胞約 1×10^6 から約 3×10^6 個の間の用量レベルで受けた。

【0413】

【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時の 疾患の状態	SCTから T細胞注 入までの 日数	1kg当たり の注入細 胞数	急性GvH D	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で12カ月超生存、GvHDなし
P2	F(17)	B-ALL	CR2	80 and 112	(1×10^6) 2	グレード1 (皮膚)	CRで12カ月超生存、GvHDなし
P3	M(8)	T-ALL	PIF/CR1	93	3×10^6	なし	CRで12カ月超生存、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で12カ月超生存、GvHDなし

【0414】

図27、図28、および図29において例示されている通り、注入されたT細胞は早け

10

20

30

40

50

れば注入の7日後にフローサイトメトリー（ $CD3^+ \Delta CD19^+$ ）またはqPCRによってin vivoで検出され、最大の増大倍率は 170 ± 5 （注入 29 ± 9 日後）であった。注入から30分以内に、2名の患者でグレードI/I IのaGvHDが発生し（図31～32を参照されたい）、AP1903投与により $CD3^+ \Delta CD19^+$ 細胞の90%超の消失が引き起こされ（図30、図33および図34を参照されたい）、24時間以内にさらなる対数関数的低下、ならびに24時間以内に皮膚および肝臓 aGvHDの消散が伴い（図35を参照されたい）、これにより、iCasp9 導入遺伝子がin vivoにおいて機能的であったことが示される。

【表3】

表3:GvHDの患者(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)

【0415】

ex vivo実験からこのデータが確認された。さらに、図36～42に示されている通り、残留アロ枯渴T細胞は増大可能であり、また、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 の産生）。これらのin vivo試験により、単回用量の二量体化薬により、GvHDを引き起こすT細胞の亜集団を低下させるまたは排除することができるが、ウイルス特異的CTLは残し、次いでそれを再増大させることができることが見出された。

免疫再構成

【0416】

患者細胞および試薬の利用可能性に応じて、移植後に段階的な間隔で免疫再構成試験（免疫表現型調査、T細胞機能およびB細胞機能）を得ることができる。iカスパーゼ形質導入アロ枯渴T細胞によって生じる免疫再構成が測定されるいくつかのパラメータを分析すること、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細胞受容体）のFACS分析が含まれた。CD41CD251FoxP3などの患者T細胞T調節性細胞マーカーも分析する。患者血液を、可能であれば、注入の4時間後、1カ月にわたって週に1回、月に1回×9カ月、次いで、1年および2年の時点で、およそ10～60ml取得する。取得する血液の量はレシピエントのサイズに左右され、いずれの1回の採血においても全部で1～2cc/kgを超えない（臨床ケアおよび試験評価用の血液取得が可能になる）。

形質導入アロ枯渴T細胞の持続および安全性

【0417】

形質導入されたT細胞の機能、持続および安全性を試験カレンダーに示されている時点でモニタリングするために、末梢血試料に対して以下の分析も実施した。

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

【0418】

PCRによるRCR試験

【0419】

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

【0420】

PCRによるRCR試験を試験前、3カ月時点、6カ月時点、および12カ月時点、次

10

20

30

40

50

いで、合計15年にわたって年に1回実施する。FDAにより義務付けられている通り、今後のRCRの試験において使用するための組織、細胞、および血清試料を保管する。

【0421】

統計解析および停止規則。

【0422】

MTDを、適格症例の最大25%においてグレードIII/IVの急性GVHDを引き起こす用量と定義する。決定は、サイズ2のコホートを用いたロジスティックモデルを使用した改変連続再評価法(CRM)に基づく。3つの用量群、すなわち、それぞれ毒性の事前確率を10%、15%、および30%と見積もった、 1×10^6 、 3×10^6 、 1×10^7 の用量群を評価した。提案されたCRMデザインでは、各コホートの対象を2名以上10にすること、1用量レベルを超えないように用量漸増を限定すること、および、形質導入されていない細胞に関して安全であることが示されている最低用量レベルで患者登録を開始することにより元のCRMを改変したものを使用する。最低用量コホートにおける毒性転帰を使用して用量-毒性曲線を更新する。次の患者コホートを、標的確率25%に最も近い関連する毒性の確率を有する用量レベルに割り当てる。この用量漸増試験の患者が少なくとも10名になるまでこのプロセスを続ける。患者の入手可能性に応じて、最大で18名の患者を第I相試験に登録することもでき、6名の患者を現行のMTDで処置することもできる。最終的なMTDは、これらの終結点において標的毒性率に最も近い確率を有する用量になる。

【0423】

シミュレーションを実施して提案されたデザインの動作特性を決定し、これを標準の3+3用量漸増デザインと比較した。提案されたデザインにより、適切な用量レベルがMTDとして示される確率がより高かったこと、低く効力のない可能性のある用量レベルの患者がより少数であったこと、および試験に必要な患者の平均総数がより少なく維持されたことに基づいて、より良好なMTDの推定値がもたらされた。本発明で提案された用量の範囲にわたって緩やかな用量-毒性曲線が予測され、したがって、患者の安全性を損なうことなく急速な用量漸増を行うことができる。実施したシミュレーションにより、改変されたCRMデザインにより、標準のデザインと比較して総毒性の平均数は大きくならなかった(それぞれ1.9および2.1と等しい総毒性)。

【0424】

アロ枯渴T細胞の最初の注入後45日以内に起こるグレードIII/IVのGVHDをCRM算出の考慮に入れる。用量-毒性曲線の推定を実行し、予め指定し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に対する用量レベルを決定するために、試験中に患者毒性転帰のリアルタイムモニタリングを実施する。

処置制限毒性は、

注入に関連するグレード4の反応、

TC-Tの注入後30日以内に起こる移植片不全(その後の異なる日数での3回の連続した測定におけるANCの 5001 mm^3 未満までの減退、少なくとも14日間持続する増殖因子療法に対する無反応性として定義される)、

注入後30日以内に起こるグレード4の非造血系の非感染性有害事象、

TC-Tの注入の45日後までのグレード3~4の急性GVHD、

注入後30日以内に起こる処置に関連する死亡

を含む。

【0425】

GVHD率は、安全性および毒性の他の測定基準と一緒に記述統計値を使用して要約する。同様に、記述統計値を算出して、グレード1を超えるGVHDに起因してAP1903を受けた患者における臨床的応答および生物学的応答を要約する。

【0426】

iカスパーゼ形質導入アロ枯渴T細胞によって生じる免疫再構成を測定するいくつかのパラメータを分析する。これらとしては、総リンパ球数、T細胞数およびCD19 B細

10

20

30

40

50

胞数を繰り返し測定すること、ならびにT細胞サブセット（CD3、CD4、CD5、CD16、CD19、CD27、CD44、CD62L、CCR7、CD56、CD45RA、CD45RO、アルファ／ベータおよびガンマ／デルタT細胞受容体）のFACS分析が挙げられる。分析のために十分なT細胞が残っている場合、CD4／CD25／FoxP3などのT調節性細胞マーカーも分析する。各対象を注入前および上記の注入後の多数の時点で測定する。

【0427】

全患者群および用量群ごとならびに測定した時間ごとの、これらのパラメータの記述的要約を提示する。患者内の経時的な測定を示す成長曲線を生成して一般的な免疫再構成のパターンを可視化する。iCasp9陽性細胞の割合も各時点で要約する。これらのエンドポイントの注入前と比較した経時的な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符号順位検定を使用して実行する。

10

【0428】

繰り返し測定された免疫再構成パラメータのそれぞれの、ランダム係数モデルを使用した縦断的解析を実施する。縦断的解析により、患者ごとの免疫再構成モデルパターンの構築が可能になると同時に、患者内で切片および傾きを変動させることが可能になる。患者が受けた異なる用量レベルを説明するためのこのモデルにおける独立変数として用量レベルも使用する。本明細書で提示されているモデルを使用して、免疫機能が経時的に有意に改善されたかどうか、ならびにこれらの改善の大きさの推定値を傾きおよびその標準誤差の推定値に基づいて試験することが可能である。CTLの異なる用量レベルにわたる免疫再構成の速度の差異のあらゆる指標の評価も実施する。恒等リンクを用いた正規分布をこれらのモデルにおいて利用し、SAS MIXED手順を使用して実行する。免疫再構成パラメータの正規性の仮定を評価し、必要であれば変換（例えば、対数、平方根）を実施して正規性を実現することができる。

20

【0429】

上記のものと同様の戦略を使用してT細胞の生存、増大および持続のカイネティクスを評価することができる。絶対的なT細胞数とマーカー遺伝子陽性細胞の数の比を決定し、経時的に縦方向にモデリングする。傾きの推定値が正であることにより、免疫の回復に対するT細胞の寄与の増加が示される。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、ex vivoにおける刺激ウイルス特異的CTLに基づいてIFNガンマを放出するT細胞の数を分析することによって評価する。EBV、CMVおよびアデノウイルスの免疫の評価を解析するために別々のモデルを生成する。

30

【0430】

最後に、患者コホート全体の全生存率および無病生存率を、カプラン・マイヤー積極限法を使用して要約する。移植の100日後および1年後に生存しており、疾患を有さない患者の割合をカプラン・マイヤー曲線から推定することができる。

【0431】

結論として、ハプロCD34⁺ SCT後のiCasp9⁺アロ枯渇T細胞の追加輸注により、in vivoにおける機能的なドナーリンパ球の有意な増大およびaGvHDの消散を伴うアロ反応性T細胞の急速なクリアランスが可能になる。

40

（実施例4）

in vivoにおけるT細胞のアロ枯渇

【0432】

実施例1～3で提供されるプロトコルを改変して、in vivoにおけるT細胞のアロ枯渇を提供することができる。当該手法を、急性GvHDを伴わない免疫再構成が有効であり得るより大きな対象群に拡張するために、in vivoにおけるT細胞枯渇の方法をもたらすことによってプロトコルを簡易化することができる。本明細書で考察されている処置前アロ枯渇方法では、まずEBVで形質転換されたリンパ芽球様細胞株をレシピエントから調製し、次いでそれを、アロ抗原提示細胞として機能させる。この手順には最大8週間かかり、また、以前に処置を受けた悪性腫瘍の対象、特にそれらの最初の療

50

法の成分としてリツキシマブを受けた対象では広範囲にわたって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、次いで、アロ反応性T細胞（活性化抗原CD25を発現する）をCD25-リシンとコンジュゲートしたモノクローナル抗体で処理する。この手順には各対象について実験室での試験にさらに多くの日数がかかる。

【0433】

観察された二量体化薬による急速な *in vivo* におけるアロ反応性T細胞の枯渇に基づき、刺激されていないがウイルス／真菌反応性T細胞を残す *in vivo* におけるアロ枯渇の方法を使用することによってプロセスを簡易化することができる。

【0434】

グレードIまたはそれ超の急性GVHDが発生している場合、単回用量の二量体化薬を投与する、例えば、0.4mg/kgのAP1903の用量を2時間かけて静脈内注入する。急性GVHDが持続する場合には、3回までの追加用量の二量体化薬を48時間間隔で投与することができる。グレードIIまたはそれ超の急性GVHDを有する対象では、これらの追加用量の二量体化薬をステロイドと組み合わせることができる。持続性のGVHDを有し、二量体化剤に対するグレードIIIまたはIVの反応に起因して追加用量の二量体化剤を受けることができない患者に対しては、二量体化剤の0回または1回の用量の後にステロイドを単独で用いて患者を処置することができる。

治療用T細胞の生成

【0435】

末梢血最大240ml（2つの集合）を、獲得の同意にしたがって移植ドナーから得る。必要であれば、白血球除去を使用して十分なT細胞を得る；（幹細胞動員前またはG-CSFの最終用量の7日後）。肝炎およびHIVなどの感染症について試験するために血液をさらに10～30ml採取することもできる。

【0436】

末梢血単核細胞を、0日目に抗ヒトCD3抗体（例えば、OrthotechまたはMiltenyiからのもの）を使用して活性化し、2日目に、組換えヒトインターロイキン2（rhIL-2）の存在下で増大させた。CD3抗体により活性化されたT細胞に、組換えフィブロネクチン断片CH-296（RetronectionTM、Takara Shuzo、Otsu、Japan）をコーティングしたフラスコまたはプレートにおいて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。レトロネクチンをコーティングしたプレートまたはフラスコで産生株の上清をインキュベートすることによってウイルスをレトロネクチンに付着させる。次いで、細胞を、ウイルスをコーティングした組織培養デバイスに移す。形質導入後、プロトコールに従ってT細胞にrhIL-2を週2回供給することによって十分な数の細胞に到達するまでT細胞を増大させる。

【0437】

注入されたT細胞の大多数が自殺遺伝子を有することを確実にするために、選択マーカーである短縮型ヒトCD19（ΔCD19）および商業的な選択デバイスを使用して、形質導入された細胞を選択して90%超の純度にするすることができる。CD19についての免疫磁気選択を形質導入の4日後に実施することができる。細胞をモノクローナルマウス抗ヒトCD19抗体（Miltenyi Biotech、Auburn、CA）とコンジュゲートした常磁性マイクロビーズで標識し、CliniMac Plus自動選択デバイスで選択する。臨床的な注入のために必要な細胞の数に応じて、細胞をCliniMacによる選択後に凍結保存することもでき、IL-2を用いてさらに増大させ、十分な細胞が増大したらすぐに凍結保存することもできる（産生開始から最大14日）。

【0438】

FDAによる最終的な放出試験に必要な形質導入効率、同一性、表現型、自律的成長および微生物学的調査を試験するために一定分量の細胞を取り出すことができる。細胞投与する前に凍結保存する。

T細胞の投与

【0439】

例えば幹細胞移植後30日から120日までの間から、形質導入されたT細胞を患者に投与する。凍結保存T細胞を解凍し、通常生理食塩水を用いてカテーテルラインにより注入する。小児に対しては、体重ごとに前投薬を行う。細胞の用量は、例えば、1kg当たり細胞約 1×10^4 個から1kg当たり細胞 1×10^8 個まで、例えば、1kg当たり細胞約 1×10^5 個から1kg当たり細胞 1×10^7 個まで、1kg当たり細胞約 1×10^6 個から1kg当たり細胞 5×10^6 個まで、1kg当たり細胞約 1×10^4 個から1kg当たり細胞 5×10^6 個まで、例えば、1kg当たり細胞約 1×10^4 個、約 1×10^5 個、約 2×10^5 個、約 3×10^5 個、約 5×10^5 個、 6×10^5 個、約 7×10^5 個、約 8×10^5 個、約 9×10^5 個、約 1×10^6 個、約 2×10^6 個、約 3×10^6 個、約 4×10^6 個、または約 5×10^6 個の範囲であってよい。

GvHDの処置

【0440】

グレード1以上の急性GVHDが発生している患者に 0.4 mg/kg のAP1903を2時間かけて注入する。注射用AP1903は、例えば、 5 mg/ml の濃度で3mlのバイアル中2.33mlの濃縮溶液（すなわち、バイアル当たり 10.66 mg ）として提供され得る。投与する前に、注入のために、算出された用量を通常生理食塩水100ml中0.9%に希釈する。体積100ml中注射用AP1903（ 0.4 mg/kg ）は、2時間にわたるIV注入によって、非DEHP、非エチレンオキシド滅菌済注入セットおよび注入ポンプを使用して投与することができる。

【表4】

表4:試料処理スケジュール

時間	ドナー	レシピエント
移植前	骨髄移植ドナーから血液最大240mlを得るまたは非刺激白血球除去を行う。後の免疫再構成試験用の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の供給	
3日目	形質導入	
4日目	増大	
6日目	CD19による選択。凍結保存(*必要な用量が満たされる場合)	
8日目	形質導入効率およびカスパーゼ9 導入遺伝子機能性を表現型によって評価する。凍結保存(*まだ行われていない場合)	
10日目または12日目から14日目まで	凍結保存(まだ行われていない場合)	
移植後30日目から120日目まで		幹細胞注入に30日～120日後にT細胞を解凍し、注入する。

【0441】

他の方法は、例えば、本明細書の実施例1～3で提供される臨床療法および評価に従ってよい。

(実施例5)

間葉系間質細胞療法の安全性を改善するための i C a s p 9 自殺遺伝子の使用

【0442】

間葉系間質細胞 (M S C) は、現在まで数百名の患者に注入されており、報告された有害な副作用は最小限である。経過観察が限定されており、また、M S C が疾患の処置に使用されている時間が比較的短いので、長期の副作用は未知である。いくつかの動物モデルにより副作用の潜在性が存在することが示されており、したがって、治療的に使用される M S C の成長および生存の制御を可能にする系が望ましい。本明細書で提示されてい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、M S C を排除する方法として i n v i v o および i n v i t r o において調査した。

材料および方法

M S C の単離

【0443】

M S C を健康なドナーから単離した。簡単に述べると、注入後廃棄された健康なドナー骨髄採取バッグおよびフィルターを R P M I 1 6 4 0 (H y C l o n e、L o g a n、U T) で洗浄し、組織培養フラスコ中、10%ウシ胎仔血清 (F B S)、2 mM のアラニルグルタミン (G l u t a m a x、I n v i t r o g e n)、100 単位/mL のペニシリンおよび 100 μ g/mL のストレプトマイシン (I n v i t r o g e n) を伴う D M E M (I n v i t r o g e n、C a r l s b a d、C A) 中にプレーティングした。48 時間後に、上清を廃棄し、細胞を完全培養培地 (C C M) : 16.5% F B S、2 mM のアラニルグルタミン、100 単位/mL のペニシリンおよび 100 μ g/mL のストレプトマイシンを伴う α -M E M (I n v i t r o g e n) 中で培養した。細胞を 80% 未満の集密度まで成長させ、必要に応じて、より低い密度で再プレーティングした。

免疫表現型調査

【0444】

フィコエリトリン (P E)、フルオレセインイソチオシアネート (F I T C)、ペリジニクロロフィルタンパク質 (P e r C P) またはアロフィコシアニン (A P C) とコンジュゲートした C D 1 4、C D 3 4、C D 4 5、C D 7 3、C D 9 0、C D 1 0 5 および C D 1 3 3 モノクローナル抗体を使用して M S C を染色した。抗体は、示されている場合を除き、全て B e c t o n D i c k i n s o n - P h a r m i n g e n (S a n D i e g o、C A) からのものであった。適切なアイソタイプを適合させた抗体で標識した対照試料を各実験に含めた。細胞を、4 種の蛍光シグナルに対するフィルターセットを備えた蛍光活性化細胞選別 F A C S c a n (B e c t o n D i c k i n s o n) によって分析した。

i n v i t r o における分化試験

【0445】

脂肪細胞への分化。M S C (細胞 7.5×10^4 個) を、6 ウェルプレートのウェル中、N H A d i p o D i f f M e d i u m (M i l t e n y i B i o t e c h、A u b u r n、C A) にプレーティングした。21 日間にわたり、培地を 3 日ごとに交換した。細胞を、リン酸緩衝生理食塩水 (P B S) 中 4% ホルムアルデヒドを用いて固定した後、オイルレッド O 溶液 (イソプロパノール中 0.5% w/v のオイルレッド O を水 3:2 比に希釈することによって得られる) で染色した。

【0446】

骨形成分化。M S C (細胞 4.5×10^4 個) を、6 ウェルプレート中、N H O s t e o D i f f M e d i u m (M i l t e n y i B i o t e c h) にプレーティングした。10 日間にわたり、培地を 3 日ごとに交換した。細胞を、低温メタノールを用いて固定した後、S i g m a F a s t B C I P / N B T s u b s t r a t e (S i g m a

10

20

30

40

50

ーAldrich、St. Louis、MO)を製造者の説明書に従って使用してアルカリホスファターゼ活性について染色した。

【0447】

軟骨芽細胞への分化。15mLまたは1.5mLのポリプロピレン円錐管中で遠心分離することによって細胞 2.5×10^5 個 $\sim 5 \times 10^5$ 個を含有するMSCペレットを得、それをNH ChondroDiff Medium (Miltenyi Biotec h)中で培養した。合計24日間にわたり、培地を3日ごとに交換した。細胞ペレットをPBS中4%ホルマリン中に固定し、常套的なパラフィン切片作製のために処理した。切片を、ペプシン(Thermo Scientific、Fremont、CA)を用いた抗原回復後、アルシアンブルーを用いて、または間接免疫蛍光法を使用してII型コラーゲンについて染色した(マウス抗II型コラーゲンモノクローナル抗体MAB8887、Millipore、Billerica、MA)。

iCasp9- Δ CD19レトロウイルスの産生およびMSCの形質導入

【0448】

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)と連結したiCasp9からなる。上記の通り、iCasp9は、Ser-Gly-Gly-Gly-Ser-Glyリンカーを介して、動員ドメイン(CARD)が欠失されており、その機能がFKBP12により置き換えられたヒトカスパーゼ9と接続した、当該タンパク質の合成ホモ二量体化剤(AP20187またはAP1903)に対する結合親和性を増大させるF36V変異を有するヒトFK506結合性タンパク質(FKBP12)である。

【0449】

2A様配列は、Thomasa Assigna昆虫ウイルス由来の20アミノ酸のペプチドをコードし、これは、グリシンと末端プロリン残基の間の99%超の切断を媒介して、翻訳された際にiCasp9と Δ CD19が確実に分離されるようにするものである。 Δ CD19は、リン酸化の潜在的な部位である細胞質内の保存されたチロシン残基が全て除去される、アミノ酸333において短縮されたヒトCD19からなる。Phoenix Eco細胞株(ATCC製品番号SD3444; ATCC、Manassas、VA)に、EcoにシュードタイプされたレトロウイルスをもたらしSFG. iCasp9. 2A. Δ CD19を一過性にトランスフェクトすることによって、テナガザル白血病ウイルス(Gal-V)にシュードタイプされたレトロウイルスを産生する安定なPG13クローンを作出した。PG13パッケージング細胞株(ATCC)にEcoにシュードタイプされたレトロウイルスを3回形質導入して、細胞当たり多数のSFG. iCasp9. 2A. Δ CD19プロウイルス組み込み体を含む産生株を生成した。単一細胞クローニングを実施し、最も高い力価を生じたPG13クローンを増大させ、ベクターを作製するために使用した。産生細胞株を、10%FBS、2mMのアラニルグルタミン、100単位/mLのペニシリンおよび100 μ g/mLのストレプトマイシンを伴うIMDM(Invitrogen)中で培養することによってレトロウイルス上清を得た。最初の培養の48時間後および72時間後に、レトロウイルスを含む上清を採取した。形質導入のために、1cm²当たりMSCおよそ 2×10^4 個を6ウェルプレート、T75またはT175フラスコ中CMにプレーティングした。24時間後に、培地を、ポリブレンを用いて10倍希釈したウイルス上清(最終濃度5 μ g/mL)と取り換え、細胞を37 $^{\circ}$ C、5%CO₂で48時間インキュベートし、その後、細胞を完全培地中で維持した。

細胞の富化

【0450】

誘導性iCasp9- Δ CD19陽性MSCを選択するために、レトロウイルスにより形質導入したMSCを、抗CD19(クローン4G7)とコンジュゲートした磁気ビーズ(Miltenyi Biotec)を製造者の説明書に従って使用して、CD19陽性細胞について富化した。細胞試料をPEとコンジュゲートしたCD19(クローンSJ25C1)抗体またはAPCとコンジュゲートした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。

*in vitro*におけるアポトーシス試験

【0451】

未分化のMSC。50 nMの化学的二量体化誘導物質(CID)(AP20187; AR1AD Pharmaceuticals, Cambridge, MA)を、iCasp9を形質導入したMSCの完全培地中培養物に添加した。24時間後に、細胞を回収し、アネキシンV結合性緩衝液(BD Biosciences, San Diego, CA)中でアネキシンV-PEおよび7-AADを用いて染色した後、FACS分析によってアポトーシスを評価した。対照iCasp9を形質導入したMSCを、CIDに曝露せずに培養物中で維持した。

10

【0452】

分化したMSC。形質導入したMSCを上記の通り分化させた。分化期間の最後に、50 nMのCIDを分化培地に添加した。上記の通り細胞を試験する組織について適切に染色し、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の形態を評価した。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(In Situ Cell Death Detection Kit, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)のために製造者の説明書に従って処理した。各時点について、4つの確率場を最終的な拡大率40×で撮影し、ImageJソフトウェア型1.430(NIH, Bethesda, MD)を用いて画像を解析した。細胞密度を表面積の単位(mm^2)当たりの核(DAPI陽性)の数として算出した。アポトーシス細胞の百分率を、核の総数に対する陽性TUNELシグナルを有する(FITC陽性)核の数の比として決定した。対照はCIDを用いずに培養物中で維持した。

20

マウスモデルにおける*in vivo*死滅試験

【0453】

マウス実験は全てBaylor College of Medicine animal husbandry guidelineに従って実施した。改変MSCの*in vivo*における持続を評価するために、SCIDマウスモデルを*in vivo*画像診断系と併せて使用した。MSCに、高感受性緑色蛍光タンパク質-ホタルルシフェラーゼ(eGFP-FFLuc)遺伝子を単独でまたはiCasp9- Δ CD19遺伝子と一緒にコードするレトロウイルスを形質導入した。MoFloフローサイトメーター(Beckman Coulter, Fullerton, CA)を使用した蛍光活性化細胞選別によって細胞をeGFP陽性について選別した。二重形質導入した細胞もPEとコンジュゲートした抗CD19を用いて染色し、PE陽性について選別した。SCIDマウス(8~10週齢)に、 5×10^5 個の、iCasp9- Δ CD19を伴うMSCとiCasp9- Δ CD19を伴わないMSCを反対側の側腹部に皮下注射した。マウスに、50 μ gのCIDを、1週間後に開始し、24時間あけて2回、腹腔内注射した。eGFP-FFLucを発現するMSCの*in vivo*画像診断のために、マウスにD-ルシフェリン(150 mg/kg)を腹腔内注射し、Xenogen-IVIS Imaging Systemを使用して解析した。各時点で総発光(蓄積した総標識MSCに比例する測定)をMSC埋め込み部位にわたって自動的に定義される関心領域(ROI)によって算出した。これらのROIには、発光シグナルがバックグラウンドを少なくとも5%超える全ての領域が含まれた。総光子数を各ROIに対して組み込み、平均値を算出した。ゼロ時間が100%シグナルに対応するように結果を正規化した。

30

40

【0454】

実験の第2のセットにおいて、eGFP-FFLucで標識したMSC、 2.5×10^6 個とeGFP-FFLucで標識した、iCasp9- Δ CD19を形質導入したMSC、 2.5×10^6 個の混合物を右側腹部に皮下注射し、マウスに50 μ gのCIDを、7日後に開始し、24時間あけて2回、腹腔内注射した。CID注射後のいくつかの時点において、ヒト検体全体を同定し、採取するため、およびマウス組織コンタミネーション

50

を最小限にするために、組織発光を使用してMSCの皮下ペレットを回収した。次いで、QIAmp（登録商標）DNA Mini（Qiagen、Valencia、CA）を使用してゲノムDNAを単離した。各導入遺伝子のコピー数を決定するために、特異的なプライマーおよびプローブ（eGFP-FFLuc構築物に対して：フォワードプライマー5'-TCCGCCCTGAGCAAGAC-3'、リバー5'-ACGAACCTCCAGCAGGACCAT-3'、プローブ5'-FAM、6-カルボキシフルオレセイン-ACGAGAAAGCGCGATC-3' MGBNFQ、副溝結合性非蛍光クエンチャー；iCasp9-ΔCD19：フォワード5'-CTGGAATCTTGGCGGGTGGAT-3'、リバー5'-CAAACTCTCAAGAGCACCAGACAT-3'、プローブ5'-FAM-CGGAGTCTGACGGGATT-3' MGBNFQ）を使用した定量的PCR（qPCR）において100ngの一定分量のDNAを使用した。既知数の、各導入遺伝子の単一のコピーを含むプラスミドを使用して標準曲線を確立した。eGFP-FFLucを単独で形質導入したMSCまたはeGFP-FFLucおよびiCasp9を二重形質導入したMSCの「純粋な」集団から単離したおよそ100ngのDNAは同様の数のeGFP-FFLuc遺伝子コピー（およそ 3.0×10^4 ）、ならびに、それぞれゼロおよび 1.7×10^3 個のiCasp9-ΔCD19遺伝子コピーを有することが決定された。

【0455】

形質導入していないヒト細胞およびマウス組織は、100ngのゲノムDNAにおいて、いずれの遺伝のコピー数もゼロであった。eGFP遺伝子のコピー数はMSCのいずれかの集団（iCasp9陰性または陽性）から単離した同一量のDNAと同じであるので、細胞の任意の混合物から単離したDNAにおけるこの遺伝子のコピー数はeGFP-FFLuc陽性細胞の総数（iCasp9陽性MSCプラスiCasp9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試料におけるiCasp9遺伝子のコピー数はiCasp9陽性細胞の総数に比例する。したがって、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、任意のDNA試料について、 $N_{eGFP} = g \cdot (C + G)$ および $N_{iCasp9} = k \cdot C$ であり、式中、Nは遺伝子コピー数を指し、gおよびkはそれぞれeGFPおよびiCasp9遺伝子のコピー数および細胞数に関連する定数である。したがって、 $N_{iCasp9} / N_{eGFP} = (k / g) \cdot [C / (C + G)]$ 、すなわち、iCasp9コピー数とeGFPコピー数の比は、eGFP陽性細胞全ての中の二重形質導入された（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外植片におけるマウスの細胞によるコンタミネーションが増加するにつれて減少するが、各時点について、ヒト細胞の両方の型が物理的に混合しているので、含まれるマウス組織の量にかかわらず比は一定になる。両方の集団の自然アポトーシスの率が同様であると仮定すると（in vitroにおける培養により実証された通り）、任意の時点におけるN_{iCasp9} / N_{eGFP} の商およびゼロ時間におけるN_{iCasp9} / N_{eGFP} の商は、CIDに曝露した後に生存しているiCasp9陽性細胞の百分率を表す。コピー数の決定は全て3連で行った。

統計解析

【0456】

対応のある両側スチューデントt検定を使用して試料間の差異の統計的有意性を決定した。数値データは全て平均±1標準偏差として示されている。

結果

MSCはiCasp9-ΔCD19を容易に形質導入され、それらの基本的な表現型を維持する

【0457】

3名の健康なドナー由来のMSCのフローサイトメトリー分析により、これらがCD73、CD90およびCD105について均一に陽性であり、造血マーカーCD45、CD14、CD133（図15A）およびCD34について陰性であることが示された。骨髓

から単離した単核接着性画分はCD73、CD90およびCD105について均一に陽性であり、造血マーカーについては陰性であった。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性が特異的アッセイで確認され（図15Bを参照されたい）、これにより、これらの細胞が真正MSCであることが実証される。図15Bには、分化試験の結果が例示されており、単離されたMSCは、適切な培地中で培養した場合、脂肪細胞（左、オイルレッドおよびメチレンブルー）、骨芽細胞（中央、アルカリホスファターゼプロモクロロインドリルホスフェート／ニトロブルーテトラゾリウムおよびメチレンブルー）および軟骨芽細胞（右、抗I型コラーゲン抗体－テキサスレッドおよびDAPI）に分化することができた。

【0458】

初期継代MSCに誘導型のカスパーゼ9をコードするiCasp9-ΔCD19レトロウイルスベクターを形質導入した。最適な単回の形質導入条件の下で、細胞の47±6%が、iCasp9とシスで転写され、上首尾の形質導入の代理としての機能を果たし、形質導入された細胞の選択を可能にする短縮型のCD19を発現した。図16Aに示されている通り、CD19について陽性の細胞の百分率は培養物中で2週間超にわたって安定であり、これにより、構築物によるMSCに有害なまたは成長に有利な影響はないことが実証された。図9Aには、iCasp9-ΔCD19レトロウイルスを用いた単一ラウンドの形質導入を行ったMSCの結果が例示されている。iCasp9の上首尾の形質導入の代理であるCD19陽性細胞の百分率は2週間超にわたって一定のままである。構築物の安定性にさらに対処するために、蛍光活性化された細胞選別機（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。6週間にわたってCD19陽性細胞の百分率に有意差は認められなかった（ベースラインにおいて96.5±1.1%、それに対して43日後は97.4±0.8%、 $P=0.46$ ）。図16B)において例示されている通り、iCasp9-CD19陽性細胞の表現型は、他の点では形質導入されていない細胞の表現型と実質的に同一であり、事実上全ての細胞がCD73、CD90およびCD105について陽性であり、造血マーカーについて陰性であり、これにより、MSCの遺伝子操作によりそれらの基本特性は改変されないことが確認された。

iCasp9-ΔCD19を形質導入したMSCはin vitroにおいてCIDに曝露した後に選択的なアポトーシスを受ける

【0459】

アポトーシス促進性遺伝子産物であるiCasp9は、iCasp9製品に存在するFK506結合性ドメインに結合するタクロリムスの類似体である、小さな化学的二量体化誘導物質（CID）、AP20187によって活性化することができる。形質導入していないMSCの培養物における自然のアポトーシスの率はおよそ18%（±7%）であり、ベースラインにおけるiCasp9陽性細胞と同様である（15±6%、 $P=0.47$ ）。iCasp9-ΔCD19を形質導入した後にMSC培養物にCID（50nM）を添加することにより、24時間以内にiCasp9陽性細胞の90%超のアポトーシスによる死滅がもたらされるが（93±1%、 $P<0.0001$ ）、iCasp9陰性細胞では形質導入していない対照と同様のアポトーシス指数が保持される（20±7%、CIDを用いた、または用いていない形質導入していない対照に対してそれぞれ $P=0.99$ および $P=0.69$ ）（図17Aおよび図70Bを参照されたい）。MSCにiCasp9を形質導入した後、完全培地中の培養物に50nMの化学的二量体化誘導物質（CID）を添加した。24時間後に、細胞を回収し、アネキシンV-PEおよび7-AADを用いて染色した後、FACS分析によってアポトーシスを評価した。iCasp9-CD19陽性細胞（iCasp pos / CID）の93パーセントがアネキシン陽性になり、それに対して陰性集団（iCasp neg / CID）では19%のみであり、この割合は同じ化合物に曝露した形質導入していない対照MSC（対照 / CID、15%）およびCIDに曝露していないiCasp9-CD19陽性細胞（iCasp pos / CIDなし、13%）と同等であり、また、形質導入していないMSCのベースラインのアポトーシス率（対照 / CIDなし、16%）と類似するものであった。iCasp9-CD19陽性

10

20

30

40

50

細胞の磁気免疫選択により、高い程度の純度を実現することができる。C I Dに曝露した後、選択された細胞の95%超がアポトーシス性になる。

【0460】

C I Dに単回曝露した後の後期の時点における、高度に精製されたi C a s p 9陽性集団の分析により、わずかなi C a s p 9陰性細胞が増大すること、およびi C a s p 9陽性細胞の集団は残ること、しかしC I Dに再曝露することにより後者が死滅し得ることが示される。したがって、C I Dによるさらなる死滅に対して抵抗性のi C a s p 9陽性集団は検出されなかった(図18を参照されたい)。i C a s p 9-CD19陰性MSCの集団は早ければC I Dを導入した24時間後に出現する。純度が100%の集団を実現することは非現実的であるので、また、MSCをin v i t r oにおいてそれらの急速な増大に有利な条件で培養するので、i C a s p 9-CD19陰性MSCの集団が予測される。死滅は100%効率的ではないという事実(例えば、99%純粋な集団において99%が死滅すると仮定すると、生じた集団は、49.7%のi C a s p 9陽性細胞および50.3%のi C a s p 9陰性細胞を有する)により予測される通り、ごく一部のi C a s p 9-CD19陽性集団が持続する。しかし、後期の時点においてC I Dに再曝露することにより、生存している細胞を死滅させることができる。

i C a s p 9-ΔCD19を形質導入したMSCは改変されていないMSCの分化潜在性を維持し、それらの後代はC I Dへの曝露により死滅する

【0461】

i C a s p 9陽性MSCの分化した後代をC I Dにより選択的に死滅させることができるかを決定するために、CD19についての免疫磁気選択を使用して改変集団の純度を上昇させた(1ラウンドの選択後に90%超の、図16Bを参照されたい)。したがって選択されたi C a s p 9陽性細胞はin v i v oにおいて試験した結合組織系列の全てに分化することができた(図19A~19Qを参照されたい)。ヒトMSCをCD19(したがって、i C a s p 9)発現について免疫磁気により選択し、純度は91%を超えた。特異的な分化培地中で培養した後、i C a s p 9陽性細胞は脂肪細胞系列(A、オイルレッドおよびメチレンアズール)、骨芽細胞系列(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列(C、アルシアンブルーおよびn u c l e a r r e d)を生じさせることができた。これらの分化した組織は、50nMのC I D(D-N)に曝露することによってアポトーシスに駆動された。無処理の、i C a s p 9を形質導入した対照とは対照的に(示されている脂肪生成条件、O~Q)(F、I、L、O、DAPI; G、J、M、P、TUNEL-FITC; H、K、N、Q、オーバーレイ)、多数のアポトーシス小体(矢印)、細胞質膜小胞形成(挿入図)および細胞構造の喪失(DおよびE); 軟骨細胞小結節における広範にわたるTUNEL陽性(F~H)、および脂肪生成性培養物(I~K)および骨形成性培養物(L~N)を確認されたい。

【0462】

50nMのC I Dに曝露した24時間後に、脂肪生成性培養物および骨形成性培養物全体を通して、膜小胞形成、細胞の縮小および脱離、ならびにアポトーシス小体の存在を伴うアポトーシスの顕微鏡レベルの証拠が観察された。TUNELアッセイにより、脂肪生成性培養物および骨形成性培養物、ならびに軟骨細胞小結節における広範にわたる陽性が示された(図19A~19Qを参照されたい)、これは経時的に増加した(図20を参照されたい)。脂肪細胞の分化培地中で培養した後、i C a s p 9陽性細胞は脂肪細胞を生じる。50nMのC I Dに曝露した後、TUNEL陽性細胞の割合の増加によって証明される通り、進行性アポトーシスが観察された。24時間後に、細胞密度が有意に減少し(1mm²当たり細胞584個からmm²当たり細胞14個未満まで)、ほとんど全てのアポトーシス細胞がスライドから剥離し、アポトーシス細胞の割合のさらなる信頼できる算出が妨げられた。したがって、i C a s p 9はMSC分化の後でさえ機能的なままであり、その活性化により、分化した後代の死滅がもたらされる。

i C a s p 9-ΔCD19を形質導入したMSCは、in v i v oにけるC I Dへの

曝露後に選択的なアポトーシスを受ける

【0463】

静脈内注射したMSCは*in vivo*における生存時間が短いことがすでに明らかであるが、局所的に注射した細胞はより長く生存し得、対応してきわめて大きな有害作用を生じ得る。そのような状況における*iCasp9*自殺系の*in vivo*における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にeGFP-FFLuc（上記）および*iCasp9-ΔCD19*遺伝子を二重形質導入した。MSCに、eGFP-FFLucを単独でも形質導入した。eGFP陽性（および、適用可能な場合にはCD19陽性）画分を蛍光活性化細胞選別によって95%超の純度で単離した。各動物に*iCasp9*陽性MSCと対照MSC（どちらもeGFP-FFLuc陽性）を反対側の側腹部に皮下注射した。Xenogen-IVIS Imaging Systemを使用してMSCの局在化を評価した。実験の別のセットでは、単独形質導入したMSCおよび二重形質導入したMSCの1:1混合物を右側腹部に皮下注射し、マウスに上記の通りCIDを与えた。異なる時点においてMSCの皮下ペレットを回収し、ゲノムDNAを単離し、qPCRを使用してeGFP-FFLucおよび*iCasp9-ΔCD19*遺伝子のコピー数を決定した。これらの条件下で、*iCasp9*とeGFP遺伝子コピー数の比は、全ヒト細胞の中の*iCasp9*陽性細胞の画分に比例する（詳細に関しては上記の方法を参照されたい）。比を、ゼロ時間が*iCasp9*陽性細胞の100%に対応するように正規化した。MSCを皮下接種した後（CID注射前）の動物の段階的な調査により、両方の細胞集団における自然アポトーシスの証拠が示される（全体的な発光シグナルがベースラインの約20%に低下したことによって実証された通り）。これは、以前に異種モデルにおけるMSCの全身送達および局所送達後に観察されている。

【0464】

発光データから、MSCを局所送達した後、CIDを投与する前でさえ、最初の96時間にわたるヒトMSCの実質的な喪失が示され（図21Cを参照されたい）、1週間後に生存していた細胞はおよそ20%であった。しかし、その時点以降は、二量体化薬を用いた場合と用いていない場合の*iCasp9*陽性MSCの生存の間に有意差があった。MSC埋め込みの7日後に、動物に50μgのCIDを24時間あけて2回注射した。図21Aにおいて例示されている通り、*iCasp9*を形質導入したMSCは、それらの発光シグナルの消失によって実証された通り、当該薬物により直ちに死滅した。*iCasp9*について陰性の細胞は当該薬物の影響を受けなかった。当該薬物を注射しなかった動物では、両方の集団において、MSC埋め込み後最大1カ月のシグナルの持続が示された。細胞死滅をさらに数量化するために、eGFP-FFLucおよび*iCasp9-ΔCD19*遺伝子のコピー数を測定するためのqPCRアッセイを展開した。マウスに二重形質導入したMSCおよび単独形質導入したMSCの1:1混合物を皮下注射し、MSC埋め込みの1週間後に上記の通りCIDを投与した。MSC外植片をいくつかの時点で採取し、ゲノムDNAを試料から単離し、実質的に同一の量のDNAに対してqPCRアッセイを実施した。これらの条件下（方法を参照されたい）、任意の時点で、*iCasp9-ΔCD19*コピー数とeGFP-FFLucコピー数の比は、生存可能な*iCasp9*陽性細胞の画分に比例する。*iCasp9*陽性細胞の進行性の死滅が観察され（>99%）、したがって、生存している*iCasp9*陽性細胞の割合は1週間後には元の集団の0.7%まで低下した（図21Bを参照されたい）。したがって、*iCasp9*を形質導入したMSCを*in vivo*においてCIDに曝露した後に選択的に死滅させるが、そうでなければ持続させることができる。

考察

【0465】

誘導性自殺タンパク質を使用して安全性機構を発現するようにヒトMSCを工学的に操作することの実現性が本明細書において実証されている。本明細書で提示されている日付は、MSCに選択可能な表面マーカーCD19とカップリングした自殺遺伝子*iCasp9*を容易に形質導入することができることを示す。同時形質導入された遺伝子の発現はM

10

20

30

40

50

SCおよびそれらの分化した後代のどちらにおいても安定であり、それらの表現型または分化の潜在性は明らかに変更されない。これらの形質導入された細胞は、iCasp9に結合する適切な小分子化学的二量体化誘導物質に曝露されるとin vitroおよびin vivoにおいて死滅し得る。

【0466】

細胞に基づく療法を成功させるためには、移植された細胞を回収してから最終的にin vivoにおいて臨床的に適用するまでの期間、それらの細胞が生存しなければならない。さらに、安全な細胞に基づく療法には、首尾よく移植された細胞の望ましくない成長および活性を制御する能力も含まれるべきである。MSCは顕著な副作用を伴わずに多くの患者に投与されているが、最近の報告では、移植されたMSCを遺伝的かつ後成的に改変してそれらの機能性を増強し、骨および軟骨を含めた系列に分化させる潜在性がさらに調査され、活用されているので、本明細書で提示されている安全スイッチなどの付加的な防御により細胞に基づく療法を制御する付加的な方法がもたらされ得る。生物活性のあるタンパク質を放出するように遺伝子改変されたMSCを受けている対象に対して、自殺遺伝子によって付加される安全性が特に有効である。

【0467】

本明細書で提示されている自殺系により、他の公知の自殺系にまさる潜在的な利点はいくつかもたらされる。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)を組み合わせるもの、および細菌また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-FC)を組み合わせるものなどの、ヌクレオシド類似体を伴う戦略は細胞周期依存性であり、MSCを再生医療に適用している間に形成され得る有糸分裂後の組織においては有効である見込みがない。さらに、増殖中の組織においてさえも、有糸分裂画分が全ての細胞を構成するのではなく、かなりの部分の移植片が生存し、機能不全のままの可能性がある。いくつかの例では、自殺に必要なプロドラッグは、それら自体に治療的使用があり得、したがって、それらが非標的器官(例えば、多くのチトクロムP450基質)により代謝された結果として、または標的細胞(例えば、細菌ニトロレダクターゼの基質であるCB1954)により活性化された後に近隣組織に拡散することに起因して排除される(例えば、GCV)、または毒性であり得る(例えば、5-FC)。

【0468】

対照的に、本明細書で提示されている小分子化学的二量体化誘導物質は、iCasp9を活性化するために必要な用量の10倍の用量においてさえ毒性の証拠は示されなかった。さらに、HSV-tkおよびDCなどの非ヒト酵素系は、形質導入された細胞に対する破壊性免疫応答のリスクが高い。iCasp9自殺遺伝子と選択マーカーCD19はどちらもヒト起源のものであり、したがって、望ましくない免疫応答が誘導される可能性が低いはずである。選択マーカーの発現と自殺遺伝子を非ヒト起源の2A様切断可能ペプチドによって連結することにより問題が生じ得るが、2A様リンカーは20アミノ酸長であり、非ヒトタンパク質よりも免疫原性が低い可能性がある。最後に、iCasp9陽性細胞における自殺遺伝子活性化の効果は他の自殺系を発現している細胞の死滅に勝るとも劣らず、iCasp9により改変されたT細胞の90%またはそれより多くが単回用量の二量体化剤後に排除され、これは臨床的に効果的な可能性があるレベルである。

【0469】

本明細書で提示されているiCasp9系により、他の細胞に基づき、かつ/または自殺スイッチに基づく療法において見られるさらなる限定も回避され得る。哺乳動物細胞へのレトロウイルスによる形質導入後に、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が頻繁に観察された。本明細書で提示されている発現構築物ではそのような影響の証拠は示されなかった。1カ月培養した後でさえも発現の減少または死滅の誘導は明らかにならなかった。

他の細胞に基づき、かつ/または自殺スイッチに基づく療法において時々観察された別の潜在的な問題は、抗アポトーシス遺伝子が上方制御された細胞における抵抗性の発生で

10

20

30

40

50

ある。この影響は、F a sなどのプログラム細胞死経路の種々の要素を伴う他の自殺系において観察された。i C a s p 9はこの限定を有する可能性が低かったので、本明細書で提示されている発現構築物に対する自殺遺伝子としてこれを選択した。アポトーシスカスケードの他のメンバーと比較して、カスパーゼ-9の活性化はアポトーシス性経路の後期で起こり、したがって、c - F L I Pおよびb c l - 2ファミリーメンバーなどの、全てではないが多くの抗アポトーシス調節因子の影響を迂回するはずである。

【0470】

本明細書で提示されている系に特異的な潜在的限定は、i C a s p 9の自然二量体化であり得、今度はこれにより望ましくない細胞死および不十分な持続が引き起こされる可能性がある。この影響は、F a sを利用するある特定の他の誘導性系において観察された。形質導入された細胞における自然死率が低いことおよびi n v i v oにおいてトランスジェニック細胞が長期にわたって持続されるという知見により、この可能性は、i C a s p 9に基づく発現構築物を使用する場合には重要な考察ではないことが示される。

【0471】

レトロウイルスによるM S Cの形質導入に由来する組み込み事象により有害な変異誘発が駆動される潜在性があり得、特にレトロウイルスベクターの多数の挿入がある場合、望ましくないコピー数の影響および／または他の望ましくない影響が引き起こされる。これらの望ましくない影響は、レトロウイルスにより形質導入した自殺系の利益により相殺され得る。これらの影響は、多くの場合、安定な産生細胞株および同様の培養条件から得た臨床グレードのレトロウイルス上清をTリンパ球に形質導入するために使用することによって最小化することができる。本発明で形質導入し、評価したT細胞は、約1～3個の範囲の組み込み体を含む（上清は1 m L当たり約 1×10^6 個の範囲のウイルス粒子を含む）。レンチウイルスベクターでレトロウイルスベクターを置換することにより、特に自己再生性および分化潜在性が高い細胞における遺伝毒性のリスクがさらに低下し得る。

【0472】

C I Dに単回曝露した後に小さな割合のi C a s p 9陽性M S Cが持続するが、これらの生存している細胞は、その後、C I Dへの再曝露後に死滅し得る。i n v i v oでは、2回用量で99%超が枯渇するが、臨床的な状況における最大限の枯渇のために反復用量のC I Dが必要になり得る。誘導性自殺スイッチ系を使用した場合に付加的な安全性をもたらすためのさらなる非限定的な方法としては、投与した細胞集団の純度をさらに上昇させるための追加的なラウンドの細胞選別および死滅の効率を増強するための2つ以上の自殺遺伝子系の使用が挙げられる。

【0473】

Bリンパ球により生理的に発現されるC D 1 9分子にはネオマイシンホスホトランスフェラーゼ (n e o) および短縮型低親和性神経増殖因子受容体 (Δ L N G F R) などの他の入手可能な選択系にまさる潜在的な利点があるので、形質導入された細胞に対する選択マーカーとしてこれを選択した。「n e o」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7日間培養することが必要であり、これにより、系の複雑さが増し、また、選択された細胞に損傷を与える潜在性がある。 Δ L N G F R発現により、他の表面マーカーと同様の単離戦略が可能になるはずであるが、これらは臨床使用のために広範に利用可能なものではなく、また、 Δ L N G F Rの発がんの潜在性に関する懸念が長く残っている。対照的に、臨床グレードのデバイスを使用したC D 1 9発現によるi C a s p 9陽性細胞の磁気選択は容易に利用可能であり、その後の細胞の成長または分化に対する顕著な影響は示されていない。

【0474】

カスパーゼ-9安全スイッチを含む間葉系間質細胞の調製および投与のために使用する手順を、胚性幹細胞および誘導性多能性幹細胞を調製するためにも使用することができる。したがって、本実施例で概説されている手順に関して、本実施例で提供される間葉系間質細胞を胚性幹細胞または誘導性多能性幹細胞で置換することができる。これらの細胞で

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を、例えば、CMVプロモーター、またはroninプロモーターと一緒に使用することができる。

(実施例6)

基底の活性が低く、およばりガンドIC₅₀の低下が最小限である改変カスパーゼ9ポリペプチド

【0475】

基底のシグナル伝達、アゴニストまたは活性化剤の不在下でのシグナル伝達は、多数の生体分子に広くいきわたっている。これは、例えば、多数の垂科由来の60種超の野生型Gタンパク質共役受容体(GPCR) [1]、ERKおよびablなどのキナーゼ [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。基底のシグナル伝達は、胚性幹細胞多能性の維持から、B細胞の発生および分化 [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]、植物の成長及び発達 [11] までの非常に多様な生物学的事象に寄与するという仮説が立てられている。その生物学的な重要性は必ずしも十分に理解されているまたは明らかになっているとは限らないが、不完全な基底のシグナル伝達は重篤な結果に至る可能性がある。不完全な基底のGタンパク質シグナル伝達は、網膜色素変性症、色覚異常、腎性尿崩症、家族性ACTH抵抗性、および家族性低カルシウム尿性高カルシウム血症などの疾患に至っている [12、13]。

【0476】

野生型イニシエーターカスパーゼ9のホモ二量体化はエネルギー的に好ましくなく、溶液中では大部分が単量体になる [14-16] にもかかわらず、未処理のカスパーゼ9の低レベルの固有の基底の活性 [15、17] は、その天然のアロステリック調節因子であるApaf-1に基づく「アポトソーム」の存在下で増強される [6]。さらに、超生理的発現レベルおよび/または共局在により、近傍により駆動される二量体化が導かれ得、これにより基底の活性化がさらに増強される。

【0477】

キメラ非改変カスパーゼ9ポリペプチドでは、生得的なカスパーゼ9の基底の活性はCaspase-Recruitment pro-Domain (CARD) [18] を除去し、コグネイトな高親和性AP1903結合性ドメイン、FKBP12-F36Vで置き換えることにより有意に低下する。細胞療法に対するアポトーシス促進性「安全スイッチ」としての有用性は多数の試験において十分に実証されている [18~20]。Gタンパク質共役受容体とは対照的に、特異的が高く基底の活性が低いことにより細胞療法における強力なツールになっているが、現在のところ、製造のために、およばりいくつかの適用において望ましい場合がある、基底のシグナル伝達を排除するための「インバースアゴニスト」は存在しない [21]。マスターセルバンクの調製は、基底の活性のレベルが低いキメラポリペプチドの高い増幅に起因して困難であることが証明されている。さらに、いくつかの細胞は、基底の活性のレベルが低いカスパーゼ9に対して他の細胞よりも感受性であり、それにより、形質導入された細胞の意図されたものではないアポトーシスが導かれる [18]。

【0478】

キメラカスパーゼ9ポリペプチドの基底の活性を改変するために、ランダムに生成した変異体に対する選択圧力として多数のスクリーニングのサイクルを使用する「定向進化」 [22] ではなく、「合理的な設計」に基づく方法を使用して、ホモ二量体化、XIA P媒介性阻害、またはリン酸化において極めて重要な役割を果たすことが分かっている残基に基づいて75種のiCasp9変異体を工学的に作製した (図44、下の表)。二量体化により駆動されるカスパーゼ9の活性化は、イニシエーターカスパーゼ活性化の優性モデルであると考えられている [15、23、24]。自然二量体化を減少させるために、ホモ二量体化、したがって基底のカスパーゼ9シグナル伝達に極めて重要な残基の部位特異的変異誘発を行った。カスパーゼ9の重要な二量体化の境界面であるβ6鎖内の5つの重要な残基 (G402-C-F-N-F406) を、構成的に二量体のエフェク

ターであるカスパーゼー3のもの（C264-I-V-S-M268）と置き換えることにより、カスパーゼー9を著しい構造再編成がなければA p a f-1活性化に対して無反応性である構成的に二量体のタンパク質に変換した〔25〕。自然ホモ二量体化を改変するために、アミノ酸化学、および溶液中で単量体として優勢に存在するイニシエーターカスパーゼー2、-8、-9、および-10の対応する残基に基づいて5つの残基の体系変異誘発を行った〔14、15〕。28種のi C a s p 9変異体を作成し、分泌型アルカリホスファターゼ（S E A P）に基づく代理死滅アッセイによって試験した後（以下の表）、N405Q変異により、A P 1903に対するI C₅₀が高くなる中程度（＜10倍）の犠牲を伴って基底のシグナル伝達が低下することが見出された。

【0479】

タンパク質分解は、一般にはカスパーゼ活性化が必要であるが、カスパーゼー9活性化のためには絶対必要なものではないので〔26〕、自己タンパク質分解を阻害するための熱力学的「ハードル」があがった。さらに、X I A P媒介性カスパーゼー9結合により、カスパーゼー9が単量体状態に捕捉されてその触媒活性および基底の活性が減弱するので〔14〕、X I A Pとの相互作用に重大なテトラペプチド（A316-T-P-F319、D330-A-I-S-S334）に対して変異誘発することによってX I A Pとカスパーゼー9の間の相互作用を強化するための取り組みがなされた。これらのi C a s p 9変異体のうちの17種から、D330A変異により、最小（＜5倍）のA P 1903 I C₅₀の犠牲で基底のシグナル伝達が低下することが決定された。

【0480】

第3の手法は、カスパーゼー9が、P K C-ζによるS144のリン酸化〔27〕、プロテインキナーゼAによるS183のリン酸化〔28〕、A k t 1によるS196のリン酸化〔29〕に際してキナーゼによって阻害され、c-a b lによるY153のリン酸化に際して活性化される〔30〕という以前報告された所見に基づくものであった。これらの「ブレーキ」によりI C₅₀が改善され得る、またはリン酸化模倣（p h o s p h o r y l a t i o n m i m i c）（「リン酸化模倣（p h o s p h o m i m e t i c）」）残基での置換により、これらの「ブレーキ」が増強されて基底の活性が低下し得る。しかし、これらの残基に基づく15種の単一の残基変異体でA P 1903に対するI C₅₀が首尾よく低下したものはなかった。

【0481】

例えば実施例1～5において、および本出願全体を通して考察されているものなどの方法を、必要であれば適切な改変を伴ってキメラ改変カスパーゼー9ポリペプチド、および種々の治療用細胞に適用することができる。

（実施例7）

材料および方法

カスパーゼー9のP C R部位特異的変異誘発：

【0482】

カスパーゼー9の基底のシグナル伝達を改変するために、変異を含有するオリゴおよびK a p a（K a p a B i o s y s t e m s、W o b u r n、MA）を用いてP C Rに基づく部位特異的な変異誘発〔31〕を行った。増幅を18サイクル行った後、P C R産物をインタクトなままにするメチル化依存性D p n I制限酵素を用いて親プラスミドを除去した。得られた反応物2 μ lを使用してX L 1-b l u eまたはD H 5 αを化学的に形質転換した。その後、配列決定（S e q W r i g h t、H o u s t o n、TX）によって陽性変異体を同定した。

細胞株の維持およびトランスフェクション：

【0483】

初期継代H E K 293 T／16細胞（A T C C、M a n a s s a s、VA）を、10 % F B S、100 U／m Lのペニシリン、および100 U／m Lのストレプトマイシンを補充したI M D M、G l u t a M A X（商標）（L i f e T e c h n o l o g i e s、C a r l s b a d、CA）中、加湿、37℃、5 % C O₂／95 % 空気雰囲気下でトランス

10

20

30

40

50

フェクトするまで維持した。対数期の増殖中の細胞に、15 mLの円錐管中、細胞百万個当たり、iCasp9変異体をコードする発現プラスミド800 ng～2 µgおよびSRαプロモーターにより駆動されるSEAPをコードする発現プラスミド500 ngを一過性にトランスフェクトした。触媒として不活性カスパーゼ9 (C285A) (FKBPドメインを伴わない) 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総プラスミドレベルを一定に保った。GeneJammer (登録商標) Transfection Reagentを1 µgのプラスミドDNA当たり3 µlの比で使用して、抗生物質の不在下、HEK293T/16細胞に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100 µlまたは2 mL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最低3時間インキュベートした後、AP1903の対数希釈物を添加した。ウエスタンブロットのために、細胞を回収前にAP1903 (10 nM) と一緒に20分インキュベートした。

10

分泌型アルカリホスファターゼ (SEAP) アッセイ:

【0484】

AP1903処理の24～48時間後に、上清約100 µlを回収して96ウェルプレートに入れ、記載されている通りSEAP活性についてアッセイした [19, 32]。簡単に述べると、65℃で45分の熱変性を行って熱に対して感受性の内在性 (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低下させた後、上清5 µlを95 µlのPBSに添加し、2 Mのジエタノールアミンに再懸濁させた100 mMの4-メチルウンベリフェリルホスフェート (4-MUP; Sigma, St. Louis, MO) 1 µlを含有する基質緩衝液100 µlに添加した。SEAPによる4-MUPの加水分解により、容易に測定することができる励起/放出 (355/460 nm) を伴う蛍光基質が生じる。ウェル間の蛍光漏出を最小限にするために、アッセイを黒色の不透明な96ウェルプレート中で実施した (図45)。

20

ウエスタンブロット分析:

【0485】

プラスミド2 µgを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、AP1903を用いて37℃で7.5～20分 (示されている通り) 処理し、その後、Halt (商標) Protease Inhibitor Cocktailを伴うRIPA緩衝液 (0.01 MのTris・HCl, pH8.0/140 mMのNaCl/1% Triton X-100/1 mMのフッ化フェニルメチルスルホン/1%デオキシコール酸ナトリウム/0.1% SDS) 500 µlに溶解させた。溶解物を採取し、氷上で30分溶解させた。細胞片をペレット化した後、上を覆っている上清由来のタンパク質の濃縮物を96ウェルプレート中でBCA (商標) Protein Assayを製造者によって推奨されている通り用いて測定した。タンパク質30 µgを、2.5% 2-メルカプトエタノールを伴うLaemmli試料緩衝液 (Bio-Rad, Hercules, CA) 中、95℃で5分煮沸した後、Criterion TGX10% Tris/グリシンタンパク質ゲルによって分離した。1/1000のウサギ抗ヒトカスパーゼ9ポリクローナル抗体、その後1/10,000のHRPとコンジュゲートしたヤギ抗ウサギIgG F(ab')₂ 二次抗体 (Bio-Rad) を用いて膜をプローブした。タンパク質のバンドを、Supersignal West Femto化学発光基質を使用して検出した。同等の試料ローディングを確実にするために、ブロットを、1/10,000のウサギ抗アクチンポリクローナル抗体で標識する前にRestore PLUS Western Blot Stripping Bufferを用いて65℃で1時間ストリッピングした。別段の指定のない限り、試料は全てThermo Scientificから購入した。

30

40

【0486】

実施例1～5において、および本明細書全体を通して考察されている方法および構築物を、改変カスパーゼ9ポリペプチドのアッセイおよび使用にも使用することができる。

50

(実施例 8)

キメラ改変カスパーゼ-9 ポリペプチドの評価および活性

基底の活性および AP1903 に誘導された活性の比較：

【0487】

キメラ改変カスパーゼ-9 ポリペプチドの基底の活性および AP1903 に誘導された活性の両方を調査するために、SEAP および異なる量の iCasp9 変異体を同時トランスフェクトした HEK293T/16 細胞の SEAP 活性を調査した。iCasp9 D330A、N405Q、および D330A-N405Q では、細胞百万個当たり 1 μ g の iCasp9 (相対的な SEAP 活性単位：148928、179081、205772 対 114518) または細胞百万個当たり 2 μ g の iCasp9 (136863、175529、174366 対 98889) のいずれかをトランスフェクトした細胞について、改変されていない iCasp9 よりも有意に低い基底の活性が示された (図 46A、46B)。細胞百万個当たり 2 μ g でトランスフェクトした 3 種のキメラ改変カスパーゼ-9 ポリペプチド全ての基底のシグナル伝達是有意に高かった (p 値 < 0.05)。iCasp9 D330A、N405Q、および D330A-N405Q でも、AP1903 に対する推定 IC_{50} の上昇が示されたが、それでも、WT の 1 pM と比較して、これらは全て 6 pM 未満であり (SEAP アッセイに基づいて) (図 46C)、これにより、潜在的に有用なアポトーシススイッチになる。

10

タンパク質発現レベルおよびタンパク質分解の評価：

【0488】

観察されたキメラ改変カスパーゼ-9 ポリペプチドの基底の活性の低下がタンパク質の安定性の低下またはトランスフェクション効率の変動に起因する可能性を排除するため、および iCasp9 の自己タンパク質分解を調査するために、トランスフェクトされた 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。キメラ非改変カスパーゼ-9 ポリペプチドのタンパク質レベルは、iCasp9 D330A、および iCasp9 D330A-N405Q によりこの試験において使用したトランスフェクション条件下で全て同様のタンパク質レベルが示された (図 47A)。対照的に、iCasp9 N405Q バンドは、特に発現プラスミド 2 μ g を使用した場合、他のバンドよりも暗く見えた。使用したトランスフェクション条件では、おそらく生存細胞のみを採取したことが原因で自己タンパク質分解は容易に検出可能ではなかった。抗アクチンタンパク質再プロットニングにより、各レーンに同等の溶解物量がローディングされたことが確認された (図 47B)。これらの結果から、SEAP アッセイによって観察された、iCasp9 D330A、N405Q、および D330A-N405Q 変異体において観察された低い基底のシグナル伝達が裏付けられる。

20

30

考察：

【0489】

SEAP スクリーニングアッセイに基づいて、これらの 3 種のキメラ改変カスパーゼ-9 ポリペプチドでは、iCasp9 WT トランスフェクタントと比較して AP1903 に依存しない高い SEAP 活性、したがって、低い基底のシグナル伝達を示された。しかし、二重変異 (D330-N405Q) により基底の活性または IC_{50} (0.05 nM) のいずれかを単一のアミノ酸変異体と比較してさらに低下させることはできなかった (図 46A、46B、46C)。観察された差異は、トランスフェクションの間に使用するタンパク質の不安定性にもプラスミドの示差的な量にも起因しないと思われた (図 47B)。

40

(実施例 9)

キメラ改変カスパーゼ-9 ポリペプチドの評価および活性

【0490】

誘導性カスパーゼ-9 により、急速な、細胞周期に依存しない、細胞自律的な死滅が AP1903 依存的にもたらされる。この誘導性カスパーゼ-9 ポリペプチドの特性を改善することにより、いっそう広範な適用性が可能になる。タンパク質のリガンド非依存性細胞

50

胞傷害性を低下させ、低発現レベルでのその死滅を増加させることが望ましい。リガンド非依存性細胞傷害性は、比較的低発現レベルにおいては懸念がないが、例えばベクター産生の間など、発現のレベルが主要な標的細胞におけるものよりも1つまたは複数の桁高いものに達し得ると重大な影響を及ぼす可能性がある。また、細胞は、細胞が発現するX I A PおよびB c l-2のようなアポトーシス阻害物質のレベルに起因して、低レベルのカスパーゼ発現に対して示差的に感受性であり得る。したがって、カスパーゼポリペプチドを、基底の活性が低くなるように、および場合によってA P 1 9 0 3リガンドに対する感受性が高くなるように再度工学的に操作するために、4つの変異誘発戦略を考案した。

【0491】

二量体化ドメイン：カスパーゼ-9は生理的なレベルでは溶液中で単量体であるが、例えば、アポトーシス促進性の、A p a fにより駆動される「アポトソーム」において起こる高発現レベルでは、カスパーゼ-9は二量体を形成する可能性があり、これによりD 3 1 5における自己タンパク質分解および触媒活性の大きな増加をもたらされる。C 2 8 5は活性部位の一部であるので、変異C 2 8 5 Aは触媒として不活性であり、これを陰性対照構築物として使用する。二量体化には特に5つの残基、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の非常に密接な相互作用が必要である。各残基について、異なるクラスのアミノ酸（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におけるすべての変異体（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により、触媒として不活性なカスパーゼポリペプチドが生じた。追加的な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と同様であり、それ以上追求しなかった。F 4 0 4における変異は全て基底の活性を低下させるものであったが、I C₅₀に対する感受性の、約1 l o gから測定できないところまでの低下も反映された。有効性の順に、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であった。N 4 0 5における変異は、N 4 0 5 Aのように影響がなかったか、N 4 0 5 Tのように基底の活性が上昇したか、または、それぞれN 4 0 5 QおよびN 4 0 5 FのようにI C₅₀に対する小さな（約5倍）またはより大きな悪影響と同時に基底の活性が低下した。最後に、F 4 0 4と同様に、F 4 0 6における変異は全て基底の活性を低下させ、I C₅₀に対する感受性の約1 l o gから測定できないところまでの低下を反映するものであった。有効性の順に、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である。

【0492】

二量体化ドメイン内の化合物変異であるが、溶液中で単量体であることが分かっている他のカスパーゼ（例えば、カスパーゼ-2、-8、-10）または二量体であることが分かっている他のカスパーゼ（例えば、カスパーゼ-3）に由来する類似の5残基で置換された変異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アラニン置換と一緒にカスパーゼ-2、-3、および-8由来の5残基の変化を含有するカスパーゼ-9ポリペプチドは全て触媒として不活性であったが、カスパーゼ-10由来の同等の残基（I S A Q T）により、基底の活性の低下が生じたがI C₅₀は高かった。

【0493】

全体的に、I C₅₀に対するほんの軽い影響と組み合わせた一貫して低い基底の活性の組合せに基づいて、N 4 0 5 Qをさらなる実験のために選択した。有効性を改善するために、N 4 0 5 Q c oと称される、N 4 0 5 Q置換を有するコドン最適化型の改変カスパーゼ-9ポリペプチドを試験した。このポリペプチドは野生型N 4 0 5 Qで置換したカスパーゼ-9ポリペプチドよりもA P 1 9 0 3に対する感受性がわずかに高いと思われた。

【0494】

切断部位変異体：アポトソーム内へのカスパーゼ-9の凝集後またはA P 1 9 0 3により強制されるホモ二量体化を介して、D 3 1 5における自己タンパク質分解が起こる。これにより、少なくとも一過性に、A 3 1 6に新しいアミノ末端が創出される。興味深いことに、新しく現れたテトラペプチド、^{3 1 6}A T P F^{3 1 9}は、上記の通り二量体化モチーフ、G C F N Fにおいてカスパーゼ-9自体と二量体化について競合するカスパーゼ

ー9阻害物質であるX I A Pに結合する。したがって、D 3 1 5切断の最初の転帰はX I A P結合であり、これにより、さらなるカスパーゼー9活性化が減弱する。しかし、下流のエフェクターカスパーゼ、カスパーゼー3の標的である第2のカスパーゼ切断部位がD 3 3 0に存在する。アポトーシス促進圧が高まるにつれて、D 3 3 0がますます切断されるようになり、それにより残基3 1 6～3 3 0内のX I A P結合性小ペプチドが放出され、したがって、この軽減性カスパーゼー9阻害物質が除去される。基底の活性が低下しているが、N 4 0 5 Qによるものほどは低くないD 3 3 0 A変異体を構築した。高コピー数でのS E A Pアッセイにより、I C₅₀がわずかに上昇することも明らかになったが、初代T細胞における低コピー数では、I C₅₀が実際にわずかに上昇し、標的細胞の死滅が改善された。自己タンパク質分解部位であるD 3 1 5における変異によっても基底の活性が低下したが、これにより、おそらくD 3 3 0切断が次にカスパーゼ活性化に必要なだったのでI C₅₀が大きく上昇した。D 3 1 5 AおよびD 3 3 0 Aにおける二重変異により、適正にプロセシングされない不活性な「ロックド」カスパーゼー9が生じた。

10

【0495】

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を含めた他のD 3 3 0変異体を創出した。D 3 2 7における変異により、コンセンサスカスパーゼー3切断部位はD x x Dであるので、D 3 3 0における切断も妨げられるが、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と併せて、D 3 3 0変異とは異なり、基底の活性を低下させるものではなく、これ以上追求しなかった。

20

【0496】

X I A P結合性変異体：上記の通り、D 3 1 5における自己タンパク質分解により、X I A Pをカスパーゼー9複体内に「誘引」するX I A P結合性テトラペプチド、^{3 1 6}A T P F^{3 1 9}が現れる。A T P Fをミトコンドリア由来の抗X I A P阻害物質であるS M A C/D I A B L O由来の類似のX I A P結合性テトラペプチド、A V P Iで置換することにより、X I A Pへの結合がよりしっかりしたものになり、基底の活性が低下する可能性がある。しかし、この4残基置換に効果はなかった。A T P Fモチーフ内の他の置換は、基底の活性を低下させる効果なし（すなわち、T 3 1 7 C、P 3 1 8 A、F 3 1 9 A）から、I C₅₀の非常に軽度の上昇を伴う基底の活性の低下（すなわち、T 3 1 7 S）、I C₅₀の軽度の上昇を伴う基底の活性の低下（すなわち、T 3 1 7 A）、I C₅₀の大きな上昇を伴う基底の活性の低下（すなわち、A 3 1 6 G、F 3 1 9 W）までにわたった。全体的に、X I A P結合性テトラペプチドを変化させることの効果は軽度であったが、それにもかかわらず、T 3 1 7 Sを、I C₅₀に対する影響が群の中で最も軽度であったことを理由として、二重変異（下記）において試験するために選択した。

30

【0497】

リン酸化変異体：少数のカスパーゼー9残基が阻害性リン酸化の標的であるか（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）または活性化リン酸化の標的である（すなわち、Y 1 5 3）ことが報告された。したがって、酸性の残基（例えば、A s p）で置換することによってリン酸化を模倣する（「リン酸化模倣（p h o s p h o m i m e t i c）」）変異か、またはリン酸化を排除する変異のいずれかを試験した。概して、リン酸化模倣（p h o s p h o m i m e t i c）であるか試みなかったかにかかわらず、大多数の変異により基底の活性が低下した。基底の活性が低い変異体の中で、S 1 4 4における変異（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には、I C₅₀に対する識別可能な影響はなく、変異体S 1 8 3 A、S 1 9 5 A、およびS 1 9 6 Aにより、I C₅₀が穏やかに上昇し、変異体Y 1 5 3 A、Y 1 5 3 A、およびS 3 0 7 AにはI C₅₀に対する大きな悪影響があった。基底の活性が低いことと、I C₅₀に対する影響があったとしても最小であることの組合せに起因して、S 1 4 4 Aを二重変異（下記）のために選択した。

40

【0498】

二重変異体：有効性がわずかに改善されたD 3 3 0 Aバリエントと基底の活性をさらに

50

低下させ得る可能性のある残基を組み合わせるために、多数の D 3 3 0 A 二重変異体を構築し、試験した。一般には、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 の変異を含め、これらにより、低い基底の活性が維持され、I C₅₀ のほんのわずかな上昇が伴った。二重変異体 D 3 3 0 A-N 4 0 5 T は基底の活性が高く、D 3 3 0 A の Y 1 5 3 A、Y 1 5 3 F、および T 3 1 7 E との二重変異体は触媒として不活性であった。有効性を改善するまたは I C₅₀ を低下させることを意図した、基底の活性が低い N 4 0 5 Q を用いた一連の二重変異体を試験した。これらの全てが、C a s p a C I D e-1. 0 と比較して基底の活性が低く、I C₅₀ がわずかに上昇していることに関して N 4 0 5 Q と同様であると思われ、N 4 0 5 Q と S 1 4 4 A、N 4 0 5 Q と S 1 4 4 D、N 4 0 5 Q と S 1 9 6 D、および N 4 0 5 Q と T 3 1 7 S を含めた。

10

【0499】

図 5 2 A には、二量体化ドメイン変異体のいくつかの基底の活性および C I D 感受性を試験するための S E A P アッセイが示されている。これにより、N 4 0 5 Q (黒い丸) が、A P 1 9 0 3 に依存しないシグナル伝達が上向きにシフトしたことによって決定される通り、W T カスパーゼ-9 よりも低い基底の活性で試験した変異体の中で最も A P 1 9 0 3 感受性が高いことが示される。F 4 0 6 T の C I D 感受性がこの群で最低であった。5 2 B には、最大の S E A P 活性 (基底の活性を反映する) および I C₅₀ の表が示されている。

【0500】

図 5 3 A には、変異体カスパーゼポリペプチド D 3 3 0 A および N 4 0 5 Q、併せて二重変異体 D 3 3 0 A-N 4 0 5 Q の二量体非依存性 S E A P 活性が示されている。多数のトランスフェクション (N=7~13) の結果が示されており、これにより、N 4 0 5 Q の基底の活性が D 3 3 0 A よりも低く、および二重変異体は中間であることが例示される。

20

【0501】

図 5 3 B には、変異体カスパーゼポリペプチド D 3 3 0 A および N 4 0 5 Q、併せて二重変異体 D 3 3 0 A-N 4 0 5 Q の平均 (+ s t d e v, n=5) I C₅₀ が示されている。結果から、一過性トランスフェクションアッセイにおいて、D 3 3 0 A の A P 1 9 0 3 に対する感受性が N 4 0 5 Q 変異体よりもいくらか高いが、W T カスパーゼ-9 の感受性の約 2 分の 1 であることが示される。

30

【0502】

図 5 4 には、W T カスパーゼ-9、N 4 0 5 Q、不活性 C 2 8 5 A、およびいくつかの X I A P 結合性ドメイン内の T 3 1 7 変異体を反映する S E A P アッセイが示されている。結果から、T 3 1 7 S および T 3 1 7 A により、A P f 1 9 0 3 に対する I C₅₀ の大きなシフトを伴わずに基底の活性が低下し得ることが示される。したがって、N 4 0 5 Q との二重変異体を作成するために T 3 1 7 S を選択した。

【0503】

図 5 5 には、実験 5 0 B からの I C₅₀ が示されており、T 3 1 7 A および T 3 1 7 S は、I C₅₀ が野生型カスパーゼ-9 ポリペプチドと同様であるにもかかわらず基底の活性が低いことが示されている。

40

【0504】

図 5 6 には、いくつかの D 3 3 0 変異体からの二量体非依存性 S E A P 活性が示されており、D 3 3 0 A、D 3 3 0 E、D 3 3 0 N、D 3 3 0 V、D 3 3 0 G、および D 3 3 0 S を含めた試験したこのクラスのメンバーの全てが、野生型カスパーゼ-9 よりも基底の活性が低いことが示されている。

【0505】

図 5 7 にはウエスタンブロットの結果が示されており、D 3 3 0 変異により D 3 3 0 における切断が遮断され、それにより、わずかに大きな (移動が遅い) 小さなバンド (< 20 k D a のマーカー) が生じることが例示されている。他のプロットには、D 3 2 7 変異によっても切断が遮断されることが示されている。

50

【0506】

図58には、示されているカスパーゼ9ポリペプチドをコードするレトロウイルスを5回形質導入したPG13の多数のクローンの平均蛍光強度が示されている。基底の活性がより低いことは、一般には、遺伝的に連鎖しているレポーター、CD19と併せてカスパーゼ9遺伝子の発現が高レベルであることに変換される。結果から、平均で、N405Q変異体を発現するクローンは高レベルのCD19を発現することが示され、N405Qの基底の活性がD330変異体またはWTカスパーゼ9よりも低いことを反映する。

【0507】

図59には、初代T細胞における、大部分が単一コピーである種々のカスパーゼポリペプチドの影響が示されている。これは、これらの自殺遺伝子がどのように治療的に使用されるかをより正確に反映し得る。驚いたことに、このデータから、D330A変異体が実際に、24時間アッセイにおいて試験した場合、低力価でAP1903に対する感受性がより高く、少なくともWTカスパーゼ9と同じくらいよく死滅させることが示されている。N405Q変異体はAP1903に対する感受性がより低く、24時間以内に標的細胞を効率的に死滅させることができない。

10

【0508】

図60は、別々の健康なドナー由来の6つの独立したT細胞試料への形質導入の結果を示す。これらの結果から、D330A変異体(mut)が野生型カスパーゼ9ポリペプチドよりもAP1903に対する感受性が高いことが確認される。

【0509】

図61には、図56に示されている6名の健康なドナーからの平均IC₅₀、範囲および標準偏差が示されている。このデータから、改善が統計的に有意であることが示される。

20

【0510】

図62には、いくつかのD330変異体の結果が示されており、試験した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ポリペプチドよりもAP1903に対する感受性が高いことが示されている。

【0511】

図63には、N405Q変異体により、N404YおよびN406Yを含めた他の二量体化ドメイン変異体と併せて、野生型カスパーゼ9ポリペプチドまたはD330Aから区別できない標的T細胞が10日以内に死滅し得ることが示されている。0日目にAP1903を受けた細胞は4日目にAP1903の2回目の用量を受けた。このデータから、N405Qのような感受性が低下したカスパーゼ9変異体の、調節された有効性スイッチの一部としての使用が裏付けられる。

30

【0512】

図64には、「N405Qco」と称されるN405Qカスパーゼポリペプチドのコードン最適化の結果が示されており、コードン最適化により、誘導性カスパーゼ機能に対しては非常にわずかな影響のみで発現の増加がもたらされる可能性が高いことが示されている。これは、元のカスパーゼ9遺伝子における共通のコードンの使用を反映する可能性が高い。

40

【0513】

図65には、in vivoにおけるカスパーゼ9ポリペプチドの用量反応曲線が、カスパーゼ9ポリペプチドを発現するT細胞の変動する画分を排除するために使用することができるものであることが示されている。このデータから、0.5mg/kg用量のAP1903が、大多数の改変T細胞をin vivoにおいて排除するために十分であることも示される。

【0514】

図66には、in vivoにおけるD330E変異体の用量反応曲線が示されている。この試験により、in vivoにおける用量設定可能なT細胞の排除も示されている。

50

【0515】

結論：記載されている通り、単一の変異体変異の中からこれまでのこの78種の変異体の分析から、D330変異で、いくらか改善された有効性とわずかに低下した基底の活性が組み合わされる。N405Q変異体も、基底の活性が非常に低く、 IC_{50} の4～5倍の上昇によって反映される有効性の低下がほんのわずかだけであるので、魅力的である。初代T細胞における実験から、N405Q変異体は、標的細胞を有効に死滅させることができるものであるが、カイネティクスがD330変異体よりもいくらか遅いことが示され、これにより、初回用量のAP1903後に部分的に死滅させ、2回目の用量のAP1903に際して最大完全な死滅を実現することができる段階的な自殺スイッチとして潜在的に非常に有用なものになることが示された。

10

【0516】

以下の表には、本明細書で考察されている方法に従って調製し、アッセイした種々のキメラ改変カスパーゼ9ポリペプチドについての基底の活性および IC_{50} の要約が提示されている。結果は、1回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、D330AとS144D、またはD330AとS183A；およびN405QとS144A、N405QとS144D、N405QとS196D、またはN405QとT317S）以外は最低2回の非依存性SEAPアッセイに基づく。試験するキメラ改変カスパーゼ9ポリペプチドを生成するために4つの多面的な手法を取った。「死」改変カスパーゼ9ポリペプチドはもはやAP1903に応答しないものである。二重変異体はハイフンで示されており、例えば、D330A-N405Qは330位における置換および405位における置換を有する改変カスパーゼ9ポリペプチドを示す。

20

【表 5 - 1】

表5 カスパーゼ変異体のクラス

基底の活性	ホモ二量体化ドメイン	切断部位およびXIAP相互作用	リン酸化	二重変異体、Misc.	変異体の総数
基底が低下し、IC ₅₀ は同様			S144A		80
			S144D		*、予測
		T317S	S196D		
基底が低下、IC ₅₀ はより高い	N405Q	D330A	S183A	D330A-N405Q	太字、T細胞において試験した
	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	
	N405Qco	L329E		N405Q-S144D	
		T317A		N405Q-S196D	
				N405Q-T317S	
				<i>*N405Q-S144Aco</i>	
				<i>*N405Q-T317Sco</i>	
基底が低下、IC ₅₀ はるかに高い	F404T	D315A	Y153A		
	F404W	A316G	Y153F		
	N405F	F319W	S307A		
	F406T				

10

20

30

40

【表 5 - 2】

基底および IC ₅₀ が同様	C403A	³¹⁶ ATPF ³¹⁹ AVPI (SMAC/Diablo)		
	C403S	T317C		
	C403T	P318A		
	N405A	F319A		
基底が上 昇	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 (Casp-8)			D330A-Y153F
	G402A			D330A-T317E
	G402I			
	G402Q			
	G402Y			
	C403P			
	F404A			
	F404S			
	F406L			

【0517】

実施例 6～9 において引用されている参考文献

【0518】

1. Seifert, R. および K. Wenzel-Seifert、Constitutive activity of G-protein-coupled receptors: cause of disease and common property of wild-type receptors. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol、2002 年、366 巻 (5 号) : 381～416 頁。

【0519】

2. Roose, J. P. ら、T cell receptor-independe

10

20

30

40

50

nt basal signaling via Erk and Abl kinases suppresses RAG gene expression. PLoS Biol、2003年、1巻(2号):E53頁。

【0520】

3. Tze, L. E. ら、Basal immunoglobulin signaling actively maintains developmental stage in immature B cells. PLoS Biol、2005年、3巻(3号):e82頁。

【0521】

4. Schram, B. R. ら、B cell receptor basal signaling regulates antigen-induced Ig light chain rearrangements. J Immunol、2008年、180巻(7号):4728~41頁。

10

【0522】

5. Randall, K. L. ら、Dock8 mutations cripple B cell immunological synapses, germinal centers and long-lived antibody production. Nat Immunol、2009年、10巻(12号):1283~91頁。

【0523】

6. Kouskoff, V. ら、B cell receptor expression level determines the fate of developing B lymphocytes: receptor editing versus selection. Proc Natl Acad Sci U S A、2000年、97巻(13号):7435~9頁。

20

【0524】

7. Hong, T. ら、A simple theoretical framework for understanding heterogeneous differentiation of CD4⁺ T cells. BMC Syst Biol、2012年、6巻:66頁。

【0525】

8. Rudd, M. L、A. Tua-Smith、およびD. B. Straus、Lck SH3 domain function is required for T-cell receptor signals regulating thymocyte development. Mol Cell Biol、2006年、26巻(21号):7892~900頁。

30

【0526】

9. Sorkin, A. およびM. von Zastrow、Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks. Nat Rev Mol Cell Biol、2009年、10巻(9号):609~22頁。

40

【0527】

10. Luning Prak, E. T、M. Monestier、およびR. A. Eisenberg、B cell receptor editing in tolerance and autoimmunity. Ann N Y Acad Sci、2011年、1217巻:96~121頁。

【0528】

11. Boss, W. F. ら、Basal signaling regulates plant growth and development. Plant Physiol、2010年、154巻(2号):439~43頁。

【0529】

50

12. Tao, Y. X、Constitutive activation of G protein-coupled receptors and diseases: insights into mechanisms of activation and therapeutics. *Pharmacol Ther*、2008年、120巻(2号):129~48頁。

【0530】

13. Spiegel, A. M、Defects in G protein-coupled signal transduction in human disease. *Annu Rev Physiol*、1996年、58巻:143~70頁。

【0531】

14. Shiozaki, E. N. ら、Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9. *Mol Cell*、2003年、11巻(2号):519~27頁。

【0532】

15. Renatus, M. ら、Dimer formation drives the activation of the cell death protease caspase-9. *Proc Natl Acad Sci U S A*、2001年、98巻(25号):14250~5頁。

【0533】

16. Shi, Y、Mechanisms of Caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell*、2002年、9巻(3号):459~70頁。

【0534】

17. Shiozaki, E. N、J. Chai、およびY. Shi、Oligomerization and activation of caspase-9, induced by Apaf-1 CARD. *Proc Natl Acad Sci U S A*、2002年、99巻(7号):4197~202頁。

【0535】

18. Straathof, K. C. ら、An inducible caspase-9 safety switch for T-cell therapy. *Blood*、2005年、105巻(11号):4247~54頁。

【0536】

19. MacCorkle, R. A、K. W. Freeman、およびD. M. Spencer、Synthetic activation of Caspases: artificial death switches. *Proc Natl Acad Sci U S A*、1998年、95巻(7号):3655~60頁。

【0537】

20. Di Stasi, A. ら、Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy. *N Engl J Med*、2011年、365巻(18号):1673~83頁。

【0538】

21. Chang, W. C. ら、Modifying ligand-induced and constitutive signaling of the human 5-HT₄ receptor. *PLoS One*、2007年、2巻(12号):e1317頁。

【0539】

22. Bloom, J. D. およびF. H. Arnold、In the light of directed evolution: pathways of adaptive protein evolution. *Proc Natl Acad*

10

20

30

40

50

Sci U S A、2009年、106巻、補遺1：9995～10000頁。

【0540】

23. Boatright, K. M. および G. S. Salvesen、Mechanisms of Caspase activation. Curr Opin Cell Biol、2003年、15巻(6号)：725～31頁。

【0541】

24. Boatright, K. M. ら、A unified model for apical Caspase activation. Mol Cell、2003年、11巻(2号)：529～41頁。

【0542】

25. Chao, Y. ら、Engineering a dimeric caspase-9：a re-evaluation of the induced proximity model for Caspase activation. PLoS Biol、2005年、3巻(6号)：e183頁。

【0543】

26. Stennicke, H. R. ら、caspase-9 can be activated without proteolytic processing. J Biol Chem、1999年、274巻(13号)：8359～62頁。

【0544】

27. Brady, S. C、L. A. Allan、および P. R. Clarke、Regulation of caspase-9 through phosphorylation by protein kinase C zeta in response to hyperosmotic stress. Mol Cell Biol、2005年、25巻(23号)：10543～55頁。

【0545】

28. Martin, M. C. ら、Protein kinase A regulates caspase-9 activation by Apaf-1 downstream of cytochrome c. J Biol Chem、2005年、280巻(15号)：15449～55頁。

【0546】

29. Cardone, M. H. ら、Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. Science、1998年、282巻(5392号)：1318～21頁。

【0547】

30. Raina, D. ら、c-Abl tyrosine kinase regulates caspase-9 autocleavage in the apoptotic response to DNA damage. J Biol Chem、2005年、280巻(12号)：11147～51頁。

【0548】

31. Papworth, C、Bauer, J. C、Braman, J. および Wright, D. A.、Site-directed mutagenesis in one day with >80% efficiency. Strategies、1996年、9巻(3号)：3～4頁。

【0549】

32. Spencer, D. M. ら、Functional analysis of Fas signaling in vivo using synthetic inducers of dimerization. Curr Biol、1996年、6巻(7号)：839～47頁。

【0550】

33. Hsiao, E. C. ら、Constitutive Gs activation

10

20

30

40

50

on using a single-construct tetracycline-inducible expression system in embryonic stem cells and mice. Stem Cell Res Ther、2011年、2巻(2号):11頁。

【0551】

34. Waldner, C.ら、Double conditional human embryonic kidney cell line based on FLP and PhiC31 mediated transgene integration. BMC Res Notes、2011年、4巻:420頁。

(実施例10)

リガンド誘導因子の投薬量を変動させて投与することによる制御されたレベルのアポトーシスの誘導

10

いくつかの臨床的なシナリオでは養子移入された細胞(例えば、CAR T細胞)を急速かつ完全に排除することが望ましいが、これらの細胞を部分的に排除および低下させることがより望ましい他のシナリオが多く存在する。そのようなシナリオの可能性は、キメラ抗原受容体(CAR) T細胞標的および付随する有害事象(AE)の種類に固有の種々の性質に支配される。これらの性質としては、標的とする分子および器官、毒性の重症度、および発症の迅速性が挙げられる。より別個の数の治療用細胞においてアポトーシスを誘導するために多量体リガンドをより制御された量で送達することが有効である臨床的なシナリオと関連する可能性がある、有効性および安全性を支配するこれらの性質に関して異なるプロファイルを有する異なる型のCAR/T細胞標的は少なくとも5種存在する。これらは、細胞療法の安全性レオスタットの使用とオン/オフスイッチの使用を区別する際に考慮することができる:

20

【0552】

カテゴリー1:分化抗原(例えば、MART、gp100、CEA、Her-2/neu)は成人では低レベルで発現する。これらの抗原を標的とするCAR T細胞には、それらの臨床的な生存能力を限定し、大多数が初期試験を通過して進行しない重篤であり命にかかわるAEの率が高いことが伴っている。正常な器官(例えば、肺)におけるこれらの抗原の発現のレベルが低いことに起因して、予想外の患者合併症および死亡が生じている。

30

【0553】

カテゴリー2:標的非必須組織(例えば、B細胞におけるCD19、甲状腺におけるサイログロブリン、前立腺細胞におけるPSMA)。これらのCAR T細胞により、患者における劇的な抗がん活性が示されたが、多くの場合、他の点では処置に応答する患者における腫瘍崩壊症候群およびサイトカインストームに関連する患者の死亡を含めたSAEも伴っている。

【0554】

カテゴリー3:がん・精巢抗原(CTA)(例えば、NY-ESO-1、MAGE-A1、-A3;がんの50%でこれらの2つのファミリーのいずれかが発現する)。CTAは、生殖細胞および一部の腫瘍において発現する。ファミリーメンバーとの交差反応性に起因するカテゴリー1と同様の懸念。

40

【0555】

カテゴリー4:独特の抗原(例えば、EGFRvIII)が利用可能であればおそらく最良であるが、それでもほんの少数の腫瘍である。

【0556】

カテゴリー5:腫瘍間質(例えば、VEGF-R2、FAP)は腫瘍では高レベルであり、正常な組織では低レベルである。多少の完全奏効(CR)が存在しているが、SAEの潜在的なリスクが高い。

【0557】

一般的なT細胞療法、例えば、幹細胞移植後のT細胞追加輸注により、移植片対宿主病

50

に関する、本明細書で考察されているものなどの有害事象が生じ得る。別個の数の移植されたT細胞における制御されたアポトーシスの誘導などの制御されたレベルのT細胞除去により、GvHDの症状を緩和することができ、同時に、なお十分な患者の免疫系の再構成が可能になる。リガンド誘導因子のレベルを決定するために、段階的に上昇させた用量の誘導因子を患者、例えば、CD34で選択された幹細胞ハプロ移植を受けている患者に投与することができる。誘導因子の所望の投薬量は、生着を容易にし、免疫再構成を増強し、移植片対白血病（GvL）の影響を潜在的に改善すると同時に、重症の急性GvHDの重症度および持続時間を低下させることができるレベルになる。一実施例では、重症の急性GvHD（グレード3および4）を示している対象、ならびにコルチコステロイド療法が進行しているグレード1および2の対象は、例えば、AP1903、40mgの単一のバイアル（5mg/mL；8mL）を2時間の注入で受けることができる。最大100kgの患者に対して、これは少なくとも0.4mg/kgまたはそれより多くの投薬量に等しい。

【0558】

iCasp9についての IC_{50} は、0.001~0.01nMの範囲であり、用量反応曲線は約1~2対数濃度にわたって急勾配になる。0.4mg/kgの2時間注入の C_{max} は15~30分以内の100~1000nMに到達するので、体内のAP1903レベルはiCasp9についての IC_{50} よりも $>3\log$ 急速に高くなり、これにより、iCasp9が「オン/オフスイッチ」として有効に機能することが可能になり、測定第1の時点（すなわち、30分）以内に細胞の90%超が死滅し、最初の24時間以内にさらなる $\log$ 死滅が伴った。適切な量または濃度のリガンド誘導因子を投与することにより、「野生型」誘導性カスパーゼ9を発現する治療用細胞部分的に除去し、一部の治療用細胞を患者に残すことができる。あるいは、治療用細胞は、異なる量または濃度のリガンド誘導因子に応答し得る、 IC_{50} が異なる誘導性カスパーゼ9バリエーションを発現し得る。

【0559】

安全スイッチを含有する治療用細胞、またはこれらの治療用細胞のごく一部を選択的に死滅させるための方法の他の例は本明細書において提供される。

【0560】

肺および肝臓への転移性疾患を有し、多数の標準の処置に不応性の結腸がん患者を、Erbb2 CARにより改変されたT細胞を用いて処置する。注入してから15分以内に、患者に呼吸窮迫および肺浸潤が発生する。サイトカインストームが結果として起こり、思い切った手段にもかかわらず、患者は5日以内に死亡する。CAR T細胞の傷害性はオフオーガンのターゲティング（肺）に起因するものであり、また急速かつ命にかかわるものであった。処置する医師はおそらくErbb2 CARにより改変されたT細胞をできるだけ迅速にかつ完全に終結させることを望む。この種のシナリオでは、安全性「オン/オフ」スイッチによってできるだけ多くの治療用細胞を死滅させることが最も適切な選択肢だと思われる。

【0561】

化学療法を用いて処置された白血病患者では、潜在的に治癒的なHSCTに対する適格性に必要なCRが実現できない。CD19を標的とするCAR T細胞療法がなされる。患者は急速に応答するが、疾患の大きな負荷により、腫瘍崩壊症候群が発生し、ICU入院、全身性ステロイド薬、および支持療法が必要な重症になる。患者はこの療法に応答するが、後におそらくステロイドによる全体的な免疫抑制に起因して白血病が再発する。CAR T細胞の毒性はオフモレキュラー（off-molecular）またはオフオーガンの特異性には関連しなかったが、応答の過剰効果に起因して、命にかかわる腫瘍崩壊症候群およびサイトカインストームが生じた。処置する医師は、アポトーシスを誘導し、治療用細胞の全てを死滅させることによって、命にかかわる白血病に対する有効な処置を完全に終結させることには気が進まない可能性がある。医師は抗がん活性をより安全な、より持続可能なレベルに調節するためにCAR T細胞の数を単に減少させたい可能性が

10

20

30

40

50

ある。この臨床的なシナリオでは、治療用細胞のごく一部のみを選択的に死滅させるための方法が好ましい可能性がある。

【0562】

ステージ4神経芽細胞腫の2歳にGD2を標的とするCAR T細胞の注入を行う。患者は療法にゆっくりと応答するが、発熱、咳、発疹、疼痛、および運動神経障害を含めた厄介な副作用が発生し、これらは全て以前に抗GD2モノクローナル抗体療法で見られたものである。患者を抗炎症薬、ステロイドおよび疼痛薬で処置し、わずかに軽減する。CAR T細胞の傷害性は、オンモレキュラー（on-molecular）標的／オフオーガン標的シナリオに関連し、亜急性であり、命にかかわるものではない。処置する医師は、アポトーシスを誘導し、治療用細胞の全てを死滅させることによって、命にかかわる神経芽細胞腫に対する有効な処置を完全に終結させることには気が進まない可能性がある。医師抗がん活性をより安全な、より持続可能なレベルに調節するためにCAR T細胞の数を単に減少させたい可能性がある。この臨床的なシナリオでは、治療用細胞のごく一部のみを選択的に死滅させるための方法が好ましい可能性がある。

10

【0563】

AMLを有し、化学療法後の2回目の寛解状態にある52歳をHSC Tについて評価するが適合ドナーが見つからない。CD34で選択されたハプロタイプ一致HSC Tを実施し、HSC T時にBPX-501 T細胞追加輸注を行う。HSC T後50日目に、患者においてグレードIIからIIIのGVHDを示す症候性の発疹およびビリルビンのわずかな上昇が発生したが、白血病の寛解状態のままである。毒性はオンモレキュラー標的／オフオーガン標的であるが、亜急性であり命にかかわるものではない。AP1903を40mgの用量（0.4mg/kg）で与え、GVHDが消散した場合、付随的なGVL効果も消失する可能性があり、これにより、医師が当該技術を使用する気が進まなくなる。この場合、処置する医師は、GVHDの症状を緩和するためにT細胞を単に部分的に排除することを望む可能性がある。

20

（実施例11）

制御されたレベルのアポトーシスのための改変カスパーゼポリペプチド

【0564】

例えばAP1903などの高用量の化学的誘導物質を用いて排除される細胞の割合の増加に「ダイヤルイン」可能なカスパーゼレオスタットにより、細胞療法の毒性の異なる臨床的なシナリオに対する測定される応答を可能にすることによってまだ対処されていない臨床的な必要性がよりよく満たされる可能性がある。レオスタットとしてカスパーゼ技術を使用することにより、0.5~1mg/kgの十分な用量で90%超の急速な死滅を実現する能力が維持されると同時に、低用量における臨床的に用量設定可能に低下させた死滅が可能になる（図48および図49）。

30

【0565】

一実施形態では、0.01mg/kgから1mg/kgまでの用量漸増をわずか15~30分きざみで行いながら、応答に関して患者の有害事象（複数可）をモニタリングする。

【0566】

別の実施形態では、持続注入ポンプを使用してAP1903注入を非常に低用量で開始し、わずか15~30分きざみで徐々に高く用量設定を行い、患者の有害事象をモニタリングする。

40

【0567】

別の実施形態では、AP1903の緩慢放出製剤（経口、IM、SQ、SL）を数日または数週間かけて行って、養子移入された細胞の一部を排除することによって亜急性の命にかかわるものではない細胞療法の毒性の制御を徐々に実現する。

【0568】

一実施形態では、タンパク質-タンパク質二量体化の境界面内（すなわち、小サブユニット内のカスパーゼ-9のβ6鎖内のGCFFNF⁴⁰²⁻⁴⁰⁶）に種々の点変異を含む

50

改変カスパーゼポリペプチド（（１、２））により、基底の活性の低下と併せて、 IC_{50} レベルの改変が生じる（図５０）。

【０５６９】

改変カスパーゼ－９の基底のシグナル伝達を改変するために、組み入れられたヌクレオチド当たり誤差 2.8×10^7 の誤差率であることが分かっており、*Taq*ポリメラーゼよりも忠実度が１００倍高い*Kapa*高忠実度ポリメラーゼ（*Kapa Biosystems*、*Woburn*、*MA*）を用いてPCRに基づく部位特異的な変異誘発（３）を行った。増幅を１８サイクル行った後、PCR産物をインタクトなままにするメチル化依存性*DpnI*制限酵素を用いて親プラスミドを除去した。得られた反応物 $2 \mu l$ を使用して*XL1-blue*または*DH5 α* を化学的に形質転換した。その後、配列決定（*SeqWright*、*Houston*、*TX*）によって陽性変異体を同定した。

【０５７０】

基底の活性とAP1903媒介性活性の両方を評価するために、トランスフェクションまで１０％FBS、 $100 U/mL$ のペニシリン、および $100 U/mL$ のストレプトマイシンを補充したIMDM、*GlutaMAX*（商標）（*Life Technologies*、*Carlsbad*、*CA*）中、加湿、 $37^{\circ}C$ 、 $5\% CO_2$ ／ 95% 空気雰囲気下で維持した初期継代HEK293T／１６細胞（ATCC、*Manassas*、*VA*）においてトランスフェクションを行った。対数期の成長中の細胞に、 $15 mL$ の円錐管中、細胞百万個当たり、*iCasp9*変異体をコードする発現プラスミド $800 ng \sim 2 \mu g$ および*SR α* プロモーターにより駆動されるSEAPをコードする発現プラスミド $500 ng$ を一過性にトランスフェクトした。触媒として不活性カスパーゼ－９（C285A）（FKBPドメインを伴わない）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総プラスミドレベルを一定に保った。*GeneJammer*（登録商標）*Transfection Reagent*を $1 \mu g$ のプラスミドDNA当たり $3 \mu l$ の比で使用して、抗生物質の不在下、HEK293T／１６細胞に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 $100 \mu l$ または $2 mL$ 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最低３時間インキュベートした後、AP1903の対数希釈物を添加した。

【０５７１】

基底の活性とAP1903媒介性活性の両方を評価するために、分泌型アルカリホスファターゼ（SEAP）アッセイを実施した。AP1903処理の２４～４８時間後に、上清約 $100 \mu l$ を回収して９６ウェルプレート中に入れ、記載されている通りSEAP活性についてアッセイした（４、５）。簡単に述べると、 $65^{\circ}C$ で４５分の熱変性を行って、熱感受性の内在性（および血清由来）アルカリホスファターゼを不活化した後、上清 $5 \mu l$ をイスコフ改変ダルベッコ培地（IMDM） $95 \mu l$ に添加し、 $2 M$ のジエタノールアミンに再懸濁させた $100 mM$ の４－メチルウンベリフェリルホスフェート（４－MUP；*Sigma*、*St. Louis*、*MO*） $1 \mu l$ を含有する基質緩衝液 $100 \mu l$ に添加した。SEAPによる４－MUPの加水分解により、容易に測定することができる励起／放出（ $355/460 nm$ ）を伴う蛍光基質が生じる。ウェル間の蛍光「漏出」を最小限にするために、アッセイを黒色の不透明な９６ウェルプレート中で実施した。

【０５７２】

一実施形態では、細胞療法は、高感受性改変カスパーゼ、例えばN405Qを発現している細胞を、低感受性カスパーゼ、例えばF406Tを発現している細胞と併せて含み、それにより、CID制御下で、最もリガンド感受性の高いサブセットを選択的に排除すると同時に、感受性の低い細胞を保護することが可能になる。

【０５７３】

別の実施形態では、患者に２つの型の細胞、例えば、２つの型のキメラ抗原受容体を用いた細胞療法を行うこともでき、例えば、幹細胞移植後のT細胞追加輸注およびCAR細胞療法を行うこともできる。この実施形態では、細胞の１つのセットに高感受性改変カス

パーゼを発現させることができ、細胞の他のセットに低感受性カスパーゼを発現させることができ、これにより、有害事象に際して細胞の選択的な除去が可能になる。例えば、幹細胞移植後に追加輸注されるT細胞に高感受性改変カスパーゼを発現させることができ、CARにより改変された細胞に低感受性改変カスパーゼを発現させることができる。移植片対宿主病が出現したら、低用量の多量体リガンドを投与することによってT細胞を排除することができる、その一方でCARにより改変された治療用細胞は保持される。別の実施形態では、CARにより改変された細胞に高感受性改変カスパーゼを発現させることができ、幹細胞移植後に追加輸注されるT細胞に低感受性改変カスパーゼを発現させることができる。オフターゲットの毒性、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)、またはCARにより改変された治療用細胞に関連する他の有害な転帰が出現したら、低用量の多量体リガンドを投与することによってこれらの細胞を排除することができる。さらに別の実施形態では、細胞のうちの1つの集団を排除することが望まれる前に有害事象または移植片対宿主病が患者に存在しない場合がある。療法の持続時間を限定することが必要になり得る。例えば、幹細胞移植後に追加輸注されたT細胞を維持しながら、CARにより改変された治療用細胞療法を限られた時間にわたって追跡することが有効であり得る。本実施例では、CARにより改変された治療用細胞は高感受性改変カスパーゼを発現する。または、例えば、CARにより改変された治療用細胞療法を追求しながら、幹細胞移植後にT細胞を限られた時間にわたってもたらすことが有効であり得る。本実施例では、T細胞は高感受性改変カスパーゼを発現する。

10

20

【0574】

1. Chao, Y, Shiozaki, E. N, Srinivasula, S. M, Rigotti, D. J, Fairman, R, および Shi, Y. 2005年、Engineering a dimeric caspase-9: a re-evaluation of the induced proximity model for caspase activation. PLoS Biol 3巻: e183頁。

【0575】

2. Shiozaki, E. N, Chai, J, Rigotti, D. J, Riedl, S. J, Li, P, Srinivasula, S. M, Alnemri, E. S, Fairman, R, および Shi, Y. 2003年、Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9. Mol Cell 11巻: 519~527頁。

30

【0576】

3. Papworth, C, Bauer, J. C, Braman, J. および Wright, D. A. . 1996年、Site-directed mutagenesis in one day with > 80% efficiency. Strategies 9巻: 3~4頁。

【0577】

4. MacCorkle, R. A, Freeman, K. W, および Spencer, D. M. 1998年、Synthetic activation of caspases: artificial death switches. Proc Natl Acad Sci U S A 95巻: 3655~3660頁。

40

【0578】

5. Spencer, D. M, Belshaw, P. J, Chen, L, Ho, S. N, Randazzo, F, Crabtree, G. R, および Schreiber, S. L. 1996年、Functional analysis of Fas signaling in vivo using synthetic inducers of dimerization. Curr Biol 6巻: 839~847頁。

50

(実施例 12)

移植片対宿主病を回避するためのリガンド誘導因子の用量設定

【0579】

療法後の治療用細胞の部分的な消失を、例えば G v H D などの有害事象の出現を回避するために予防的に実施することができる。スケジュールならびに治療用細胞およびリガンド誘導因子の投薬量を決定するために使用する方法を、有害事象を緩和するためのスケジュールおよび治療用細胞およびリガンド誘導因子の投薬量を決定するためにも使用することができる。これらの方法を使用することにより、アロ反応性 T 細胞が先制して排除され、G v H D が回避されると同時に、G v L 媒介性 T 細胞を含めた有益な T 細胞が最大数で維持される、リガンド誘導因子、例えば A P 1 9 0 3 の最低用量を同定することができる。さらに、アロ反応性 T 細胞を予防的に標的化することにより、高用量の T 細胞を患者に投与することができ、したがって、生着が容易になり、感染に対する免疫機能が保護されると同時に、G v H D の出現が減少する。

10

【0580】

移植片対宿主病が起こり得る 1 つの例は、血液悪性腫瘍の成人および小児における骨髓破壊的ハプロ移植後である。治療転帰の測定には、例えば、療法の 3 カ月後、6 カ月後、12 カ月後、および 24 カ月後の生着、免疫機能および再発が含まれる。血液悪性腫瘍を有する成体または小児対象に、0 日目に骨髓破壊的ハプロ移植を行う。0 日目～2 日目に、誘導性カスパーゼ 9、または誘導性カスパーゼ 9 バリエーションを発現する T 細胞を固定用量で患者に投与する。T 細胞追加輸注の濃度の範囲は、例えば、1 k g 当たり細胞 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^8$ 個であり得る。

20

【0581】

7 日目に、リガンド誘導因子、例えば A P 1 9 0 3 を予防的に投与する。他の例では、リガンド誘導因子を 3 日目～15 日目に投与することができる。誘導因子の最初の用量を、例えば、患者 3 名の各コホートにおいて、100 日目までに、2 回目の十分な用量の A P 1 9 0 3 によって緩和される G v H D が出現するまでハーフログ (half-log) ずつ減少させる。他の方法では、誘導因子の最初の用量を低用量にし、例えば、各コホートにおいて G v H D の出現がなくなるまでハーフログずつ増加させる。誘導因子の用量範囲は、例えば、1 k g 当たり 0.01～0.1 マイクログラムであり得る。

【0582】

表 7 には、G v H D を回避するために適したリガンド誘導因子の投薬量を決定するためのプロトコルの例の要約が提示されている。

30

【表 7】

表7

日数	事象
-7~-1	順化レジメン
0	部分的に一致するT細胞枯渇PBSCT
0-2	誘導性カスパーゼ-9またはカスパーゼ-9バリエーションを発現するT細胞を投与する
7	低用量のAP1903を投与する
2~100-急性GvHDまたは慢性GvHDが存在する場合	完全な用量 (0.4mg/kg) のAP1903注入を行う
経過観察、3カ月、6カ月、12カ月、24カ月	生着;免疫再構成;再発を評価する

10

20

【0583】

(実施例13)

特定の核酸配列およびアミノ酸配列の例

配列番号1、5'LTR配列のヌクレオチド配列

【化1】

TGAAAGACCCACCTGTAGGTTTGGCAAGCTAGCTTAAGTAACGCCATTTTGCAAGGCATGGA
 AAAATACATAACTGAGAATAGAAAAGTTCAGATCAAGGTCAGGAACAGATGGAACAGCTGAAT
 ATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGAT
 GGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCAGG
 GCCAAGAACAGATGGTCCCCAGATGCGGTCCAGCCCTCAGCAGTTTCTAGAGAACCATCAGA
 TGTTTCCAGGGTGCCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGTGCCTTATTTGAACTAACCAATCAGT
 TCGCTTCTCGCTTCTGTTGCGCGCTTATGCTCCCCGAGCTCAATAAAAGAGCCCACAACCCC
 TCACTCGGGGCGCCAGTCCTCCGATTGACTGAGTCGCCCGGGTACCCGTGTATCCAATAAAC
 CCTCTTGAGTTGCATCCGACTTGTGGTCTCGCTGTTCTTGGGAGGGTCTCCTCTGAGTGAT
 TGACTIONCCGTCAGCGGGGGTCTTTCA

30

40

配列番号2、F_v(ヒトFKBP12v36)のヌクレオチド配列

【化 2】

GGAGTGCAGGTGGAAACCATCTCCCCAGGAGACGGGCGCACCTTCCCCAAGCGCGGCCAGA
CCTGCGTGGTGCACTACACCGGGATGCTTGAAGATGGAAAGAAAGTTGATTCCTCCCGGGAC
AGAAACAAGCCCTTTAAGTTTATGCTAGGCAAGCAGGAGGTGATCCGAGGCTGGGAAGAAGG
GGTTGCCAGATGAGTGTGGGTCAGAGAGCCAACTGACTATATCTCCAGATTATGCCTATGG
TGCCACTGGGCACCCAGGCATCATCCCACCACATGCCACTCTCGTCTTCGATGTGGAGCTTC
TAAAACTGGAA

10

配列番号 3、Fv（ヒトFKBP12v36）のアミノ酸配列

【化 3】

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

配列番号 4、GSリンカーヌクレオチド配列

【化 4】

TCTGGCGGTGGATCCGGA

20

配列番号 5、GSリンカーアミノ酸配列

【化 5】

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Casp9の間）

【化 6】

GTCGAC

30

配列番号 7、リンカーアミノ酸配列（GSリンカーとCasp9の間）

【化 7】

VD

配列番号 8、Casp9（短縮型）ヌクレオチド配列

【化 8 - 1】

GGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTTACATCCTG
 AGCATGGAGCCCTGTGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAACTTCTGCCGTGAGTCCGG
 GCTCCGCACCCGCACTGGCTCCAACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTTCTCCTCGC
 TGCATTTTCATGGTGGAGGTGAAGGGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTGGCTTTGCTG
 GAGCTGGCGCAGCAGGACCACGGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTCTCTCTCACG
 GCTGTCAGGCCAGCCACCTGCAGTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGT
 GTCGGTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGGAAG
 CCCAAGCTCTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGTTTGAGGTGGC
 CTCCACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCCACCCCGTTCC
 AGGAAGGTTTGAGGACCTTCGACCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCACACCCAGTGAC

10

【化 8 - 2】

ATCTTTGTGTCCTACTCTACTTTCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCCAAGAGTGGCTCC
 TGGTACGTTGAGACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAAGACCTGCAGTC
 CCTCCTGCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACAGATGCCTGGTTG
 CTTTAATTTCTCCGGAATAAACTTTTCTTTAAACATCA

20

配列番号 9、カスパーゼー 9（短縮型）アミノ酸配列－CARDドメイン欠失

【化 9】

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 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

30

配列番号 10、リンカーヌクレオチド配列（カスパーゼー 9 と 2 A の間）

【化 10】

GCTAGCAGA

40

配列番号 11、リンカーアミノ酸配列（カスパーゼー 9 と 2 A の間）

【化 11】

ASR

配列番号 12、カプシドタンパク質前駆体由来の Thosea asigna ウイルス

50

【化 1 2】

【化 1 3】

10

【化 1 4】

20

30

配列番号15、ヒトCD19（Δ細胞質ドメイン）アミノ酸配列

【化 1 5】

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

配列番号 1 6、3' L T Rヌクレオチド配列

【化 1 6】

TGAAAGACCCACCTGTAGGTTTGGCAAGCTAGCTTAAGTAACGCCATTTTGCAAGGCATGGA
AAAATACATAACTGAGAATAGAGAAGTTCAGATCAAGGTCAGGAACAGATGGAACAGCTGAAT
ATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGAT
GGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCGGCTCAGG
GCCAAGAACAGATGGTCCCCAGATGCGGTCCAGCCCTCAGCAGTTTCTAGAGAACCATCAGA
TGTTTCCAGGGTGCCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGTGCCTTATTTGAACTAACCAATCAGT
TCGCTTCTCGCTTCTGTTCGCGCGCTTCTGCTCCCCGAGCTCAATAAAAGAGCCCACAACCCC
TCACTCGGGGCGCCAGTCCCTCCGATTGACTGAGTCGCCCCGGGTACCCGTGTATCCAATAAAC
CCTCTTGCAAGTTGCATCCGACTTGTGGTCTCGCTGTTCTTGGGAGGGTCTCCTCTGAGTGAT
TGACTACCCGTCAGCGGGGGTCTTTCA

20

30

【0 5 8 4】

配列番号 1 7、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および 5' L
T R 配列および 3' L T R 配列、ならびに追加的なベクター配列をコードするヌクレオチ
ド配列。

【化 17 - 1】

TGAAAGACCCACCTGTAGGTTTGGCAAGCTAGCTTAAGTAACGCCATTTTGCAAGGCATGGA
AAAATACATAACTGAGAATAGAAAAGTTCAGATCAAGGTCAGGAACAGATGGAACAGCTGAAT
ATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGAT
GGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCAGG
GCCAAGAACAGATGGTCCCCAGATGCGGTCCAGCCCTCAGCAGTTTCTAGAGAACCATCAGA
TGTTTCCAGGGTGCCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGTGCCTTATTTGAACTAACCAATCAGT
TCGCTTCTCGCTTCTGTTTCGCGCGCTTATGCTCCCCGAGCTCAATAAAAGAGCCCACAACCCC
TCACTCGGGGCGCCAGTCCTCCGATTGACTGAGTCGCCCCGGGTACCCGTGTATCCAATAAAC
CCTCTTGCAAGTTGCATCCGACTTGTGGTCTCGCTGTTTCTTGGGAGGGTCTCCTCTGAGTGAT
TGACTACCCGTCAGCGGGGGTCTTTTCAATTTGGGGGCTCGTCCGGGATCGGGAGACCCCTGC
CCAGGGACCACCGACCCACCACCGGGAGGTAAGCTGGCCAGCAACTTATCTGTGTCTGTCC
GATTGTCTAGTGTCTATGACTGATTTTATGCGCCTGCGTCGGTACTAGTTAGCTAACTAGCTCT
GTATCTGGCGGACCCGTGGTGGAACTGACGAGTTCGGAACACCCGGCCGCAACCCTGGGAG
ACGTCCCAGGGACTTCGGGGGCGGTTTTTGTGGCCCGACCTGAGTCCTAAAATCCCGATCGT
TTAGGACTCTTTGGTGCACCCCCCTTAGAGGAGGGATATGTGGTTCTGGTAGGAGACGAGAA
CCTAAAACAGTTCCCGCCTCCGTCTGAATTTTGTCTTCGGTTTGGGACCGAAGCCGCGCCG
CGCGTCTTGTCTGCTGCAGCATCGTTCTGTGTTGTCTCTGTCTGACTGTGTTTCTGTATTTGTC
TGAAAATATGGGCCCCGGGCTAGCCTGTTACCACTCCCTTAAGTTTGACCTTAGGTCACTGGAA

10

20

【化 1 7 - 2】

AGATGTCGAGCGGATCGCTCACAACCAGTCGGTAGATGTCAAGAAGAGACGTTGGGTTACCT
TCTGCTCTGCAGAATGGCCAACCTTTAACGTCGGATGGCCGCGAGACGGCACCTTTAACCGA
GACCTCATCACCAGGTTAAGATCAAGGTCTTTTACCTGGCCCGCATGGACACCCAGACCA
GGTGGGGTACATCGTGACCTGGGAAGCCTTGGCTTTTGACCCCCCTCCCTGGGTCAAGCCCT
TTGTACACCCTAAGCCTCCGCCTCCTCTTCTCCATCCGCCCGTCTCTCCCCCTTGAACCTC
CTCGTTGACCCCCGCTCGATCCTCCCTTTATCCAGCCCTCACTCCTTCTCTAGGCGCCCCCA
TATGGCCATATGAGATCTTATATGGGGCACCCCCGCCCTTGTAACCTTCCCTGACCCTGACA
TGACAAGAGTTACTAACAGCCCCTCTCTCCAAGCTCACTTACAGGCTCTCTACTTAGTCCAGC
ACGAAGTCTGGAGACCTCTGGCGGCAGCCTACCAAGAACAACCTGGACCGACCGGTGGTACC
TCACCCTTACCGAGTCGGCGACACAGTGTGGGTCCGCCGACACCAGACTAAGAACCTAGAAC
CTCGCTGGAAAGGACCTTACACAGTCCTGCTGACCACCCCCACCGCCCTCAAAGTAGACGGC
ATCGCAGCTTGGATACACGCCGCCACGTGAAGGCTGCCGACCCCCGGGGGTGGACCATCCT
CTAGACTGCCATGCTCGAGGGAGTGCAGGTGGAACCATCTCCCCAGGAGACGGGCGCACC
TTCCCCAAGCGCGGCCAGACCTGCGTGGTGCCTACACCGGGATGCTTGAAGATGGAAAGAA
AGTTGATTCCTCCCGGGACAGAAACAAGCCCTTTAAGTTTATGCTAGGCAAGCAGGAGGTGAT
CCGAGGCTGGGAAGAAGGGGTGCCAGATGAGTGTGGGTCAGAGAGCCAACTGACTATA
TCTCCAGATTATGCCTATGGTGCCACTGGGCACCCAGGCATCATCCCACCACATGCCACTCTC
GTCTTCGATGTGGAGCTTCTAAACTGGAATCTGGCGGTGGATCCGGAGTCGACGGATTTGG
TGATGTCGGTGCTCTTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTTACATCCTGAGCATGGA
GCCCTGTGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAACTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCA
CCCGCACTGGCTCCAACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTCT
ATGGTGGAGGTGAAGGGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCTGG
CGCAGCAGGACCACGGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTCTCTCTCACGGCTGTCAG
GCCAGCCACCTGCAGTTCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGTGTGCGGTGG
AGAAGATTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGGAAGCCCAAGCTC
TTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGTTTGAGGTGGCCTCCACTTC
CCCTGAAGACGAGTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCCACCCCGTTCCAGGAAGGT
TTGAGGACCTTCGACCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCACACCCAGTGACATCTTTGTG
TCCTACTCTACTTTCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTT
GAGACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCT
TAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACAGATGCCTGGTTGCTTTAATTTCT
CTCCGGAAAAAATTTTTCTTTAAACATCAGCTAGCAGAGCCGAGGGGCAGGGGAAGTCTTCTA
ACATGCGGGGACGTGGAGGAAAATCCCGGGCCCATGCCACCTCCTCGCCTCCTCTTCTTCTCCT
CCTCTTCTCACCCCCATGGAAGTCAGGCCCGAGGAACCTCTAGTGGTGAAGGTGGAAGAGG

10

20

30

40

【化 17 - 3】

GAGATAACGCTGTGCTGCAGTGCCTCAAGGGGACCTCAGATGGCCCCACTCAGCAGCTGAC
CTGGTCTCGGGAGTCCCCGCTTAAACCCTTCTTAAAACTCAGCCTGGGGCTGCCAGGCCTGG
GAATCCACATGAGGCCCTGGCCATCTGGCTTTTCATCTTCAACGTCTCTCAACAGATGGGGG
GCTTCTACCTGTGCCAGCCGGGGCCCCCCTCTGAGAAGGCCTGGCAGCCTGGCTGGACAGT
CAATGTGGAGGGCAGCGGGGAGCTGTTCCGGTGGAATGTTTCGGACCTAGGTGGCCTGGGC
TGTGGCCTGAAGAACAGGTCCTCAGAGGGCCCCAGCTCCCCTTCCGGGAAGCTCATGAGCC
CCAAGCTGTATGTGTGGGCCAAAGACCGCCCTGAGATCTGGGAGGGAGAGCCTCCGTGTCT
CCCACCGAGGGACAGCCTGAACCAGAGCCTCAGCCAGGACCTCACCATGGCCCCCTGGCTCC
ACACTCTGGCTGTCTGTGGGGTACCCCTGACTCTGTGTCCAGGGGGCCCCCTCTCCTGGAC
CCATGTGCACCCCAAGGGGCCTAAGTCATTGCTGAGCCTAGAGCTGAAGGACGATCGCCCG
GCCAGAGATATGTGGGTAAATGGAGACGGGTCTGTTGTTGCCCGGGGCCACAGCTCAAGACG
CTGGAAAGTATTATTGTCACCGTGGCAACCTGACCATGTCAATCCACCTGGAGATCACTGCTC
GGCCAGTACTATGGCACTGGCTGCTGAGGACTGGTGGCTGGAAGGTCTCAGCTGTGACTTTG
GCTTATCTGATCTTCTGCCTGTGTTCCCTTGTGGGCATTCTTCATCTTCAAAGAGCCCTGGTCC
TGAGGAGGAAAAGAAAGCGAATGACTGACCCACAGGAGATTCTAACGCGTCATCATCGAT
CCGGATTAGTCCAATTTGTTAAAGACAGGATATCAGTGGTCCAGGCTCTAGTTTTGACTCAAC
AATATCACCAGCTGAAGCCTATAGAGTACGAGCCATAGATAAAATAAAAGATTTTATTTAGTCT
CCAGAAAAAGGGGGGAATGAAAGACCCACCTGTAGGTTTGGCAAGCTAGCTTAAGTAACGC
CATTTTGAAGGCATGGAATAACATACTGAGAATAGAGAAGTTCAGATCAAGGTCAGGAA
CAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGC
TCAGGGCCAAGAACAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAG
TTCCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCCCCAGATGCGGTCCAGCCCTCAGCAG
TTTCTAGAGAACCATCAGATGTTTCCAGGGTGCCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGTGCCTTA
TTTGAACATAACCAATCAGTTCGCTTCTCGCTTCTGTTGCGCGCTTCTGCTCCCCGAGCTCAA
TAAAGAGCCACAACCCCTCACTCGGGGCGCCAGTCCTCCGATTGACTGAGTCGCCCCGGT
ACCCGTGTATCCAATAAACCCCTCTTGCAGTTGCATCCGACTTGTGGTCTCGCTGTTCCCTGGG
AGGGTCTCCTCTGAGTGATTGACTACCCGTCAGCGGGGGTCTTTCACACATGCAGCATGTAT
CAAAATTAATTTGGTTTTTTTTCTTAAGTATTTACATTAATGGCCATAGTACTTAAAGTTACATT
GGCTTCCTTGAAATAAACATGGAGTATTCAGAATGTGTCATAAATATTTCTAATTTAAGATAGT
ATCTCCATTGGCTTTCTACTTTTTCTTTATTTTTTTTTGTCTCTGTCTTCCATTTGTTGTTGTT
GTTGTTTGTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTAATTTTTTTTTAAAGATCCTACACTATAGTTC
AAGCTAGACTATTAGCTACTCTGTAACCCAGGGTGACCTTGAAGTCATGGGTAGCCTGCTGTT
TTAGCCTTCCCACATCTAAGATTACAGGTATGAGCTATCATTTTTGGTATATTGATTGATTGATT
GATTGATGTGTGTGTGTGATTGTGTTTGTGTGTGTGACTGTGAAAATGTGTGTATGGGTGT

10

20

30

40

【化 17 - 4】

GTGTGAATGTGTGTATGTATGTGTGTGTGTGAGTGTGTGTGTGTGTGTGTGCATGTGTGTGTG
TGTGACTGTGTCTATGTGTATGACTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
GTGTGTGTTGTGAAAAAATATTCTATGGTAGTGAGAGCCAACGCTCCGGCTCAGGTGTCAGGT
TGGTTTTTGAGACAGAGTCTTTCACCTTAGCTTGGAATTCACCTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGT
GACTGGGAAAACCCCTGGCGTTACCCAACCTTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTTCGCCAG
CTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATG
GCGAATGGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCATAT
GGTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCA
ACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGT
GACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTACCGTCATCACCGAAACGCGCGATGA
CGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGA
CGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTATTTTTCTAAATACA
TTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGG
AAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTC
CTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCAC
GAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAA
GAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTG
ACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTAC
TCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCC
ATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGA
GCTAACCGCTTTTTTGACAACATGGGGGATCATGTAACCTGCCTTGATCGTTGGGAACCGGA
GCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAA
CGTTGCGCAAACCTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAAGACT
GGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTT
ATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCC
AGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATG
AACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACCTGTCAGACC
AAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTTAATTTAAAGGATCTAGGTGA
AGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTC
AGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGC
TTGCAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGCGCGATCAAGAGCTACCAACT
CTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAG
CCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATC
CTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACG

10

20

30

40

【化 17 - 5】

ATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGC
 TTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCATTGAGAAAGCGCCAC
 GCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGA
 GCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCTGGGTTTCGCC
 ACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAAC
 GCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTT
 CCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCT
 CGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCA
 ATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTT
 TCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGG
 CACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAAC
 AATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTTTGCTCTTAGGAGTTTCCTAA
 TACATCCCAAACCTCAAATATATAAAGCATTTGACTTGTTCTATGCCCTAGGGGGCGGGGGGAA
 GCTAAGCCAGCTTTTTTTAAACATTTAAATGTTAATTCCATTTTAAATGCACAGATGTTTTATTT
 CATAAGGGTTTCAATGTGCATGAATGCTGCAATATTCCTGTTACCAAAGCTAGTATAAATAAAA
 ATAGATAAACGTGGAAATTACTTAGAGTTTCTGTCTTAACGTTTCCTTCCTCAGTTGACAACAT
 AAATGCGCTGCTGAGCAAGCCAGTTTGCATCTGTGAGGATCAATTTCCCATTATGCCAGTCAT
 ATTAATTACTAGTCAATTAGTTGATTTTTATTTTTGACATATACATGTGAA

10

20

配列番号 18、(Xho I / Sal I リンカーを伴う F_v・F_vL_s のヌクレオチド配列、(F_v・内のゆらぎコドンが小文字で示されている))

【化 18】

ctcgagGGcGTcCAaGTcGAaACcATtagtCCcGGcGAtGGcaGaACaTTtCctAAaaGgGGaCAaACaTGt
 GTcGTcCAtTAtACaGGcATGtTgGAgGAcGGcAAaAAgGTgGAcagtagtaGaGAtcGcAAtAAaCCtTtc
 AAaTTcATGtTgGGaAAaCAaGAaGTcATtaGgGGaTGGGAgGAgGGcGTgGCtCAaATGtccGTcGGc
 CAacGcGCtAAgCTcACcATcagcCCcGAcTAcGCaTAcGGcGCtACcGGaCAtCCcGGaATtATtCCcC
 CtCAcGCtACctTgGTgTTtGAcGTcGAaCTgtTgAAgCTcGAagtcgagggagtcagggtgaaaccatctcccag
 gagacgggpgcaccttcccaagcgcgccagacctgctggtgcactacaccgggatgctgaagatggaagaaagtgattcctc
 ccgggacagaaacaagcccttaagtattatgctaggcaagcaggaggtgatccgaggctggaagaaggggtgcccagatgagtggtg
 ggtcagagagccaaactgactatatctccagattatgcctatggtgccactgggcacccaggcatcatccaccacatgccactctcgtctt
 cgatgtggagcttctaaaactggaatctggcgggtgatccggagtcgag

30

40

配列番号 19、(F_v・F_vL_s アミノ酸配列)

【化 1 9】

GlyValGlnValGluThrIleSerProGlyAspGlyArgThrPheProLysArgGlyGlnThrCysValValHisTyrThrGlyMetLeuGluAspGlyLysLysValAspSerSerArgAspArgAsnLysProPheLysPheMetLeuGlyLysGlnGluValIleA
 rgGlyTrpGluGluGlyValAlaGlnMetSerValGlyGlnArgAlaLysLeuThrIleSerProAspTyrAlaTyrGlyAlaThrG
 lyHisProGlyIleIleProProHisAlaThrLeuValPheAspValGluLeuLeuLysLeuGlu (ValGlu)

GlyValGlnValGluThrIleSerProGlyAspGlyArgThrPheProLysArgGlyGlnThrCysValValHisTyrThrGlyMe
 tLeuGluAspGlyLysLysValAspSerSerArgAspArgAsnLysProPheLysPheMetLeuGlyLysGlnGluValIleA
 rgGlyTrpGluGluGlyValAlaGlnMetSerValGlyGlnArgAlaLysLeuThrIleSerProAspTyrAlaTyrGlyAlaThrG
 lyHisProGlyIleIleProProHisAlaThrLeuValPheAspValGluLeuLeuLysLeuGlu-SerGlyGlyGlySerGly

10

配列番号 20、FKBP12v36 (残基 2 ~ 108)

SGGGSG リンカー (6 アミノ酸)

ΔCasp9 (残基 135 ~ 416)

【化 2 0】

ATGCTCGAGGGAGTGCAGGTGGAGACiATCTCCCCAGGAGACGGGCGCACCTTCCCCAAGCG
 CGGCCAGACCTGCGTGGTGCACCTACACCGGGATGCTTGAAGATGGAAAGAAAGTTGATTCCT
 CCCGGGACAGAAACAAGCCCTTTAAGTTTATGCTAGGCAAGCAGGAGGTGATCCGAGGCTGG
 GAAGAAGGGGTTGCCAGATGAGTGTGGGTGAGAGAGCCAACTGACTATATCTCCAGATTA
 TGCCTATGGTGCCACTGGGCACCCAGGCATCATCCCACCACATGCCACTCTCGTCTTCGATG
 TGGAGCTTCTAAAACTGGAATCTGGCGGTGGATCCGGAGTCGACGGATTTGGTGATGTCGGT
 GCTCTTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGG
 CCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAACTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTG
 GCTCCAACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTTCATGGTGGAG
 GTGAAGGGCGACCTGACTGCCAAGAAATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGAGG
 ACCACGGTGCTCTGGAAGTGTGCGTGGTGGTCACTTCTCTCACGGCTGTGAGGCCAGCCAC
 CTGCAGTTCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGTGTGCGGTGAGAAAGATTGT
 GAACATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTCATCC
 AGGCCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGTTTGAGGTGGCCTCCACTTCCCTGAAGA
 CGAGTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCCACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACC
 TTCGACCAGCTGGAGCCCATATCTAGTTTGCCACACCCAGTGACATCTTTGTGTCTACTCT
 ACTTTCCAGGTTTTGTTTCTGGAGGGACCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCT
 GGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCG
 CTAATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTATAAACAGATGCCTGGTTGCTTTAATTTCCTCCGGAA
 AAAACTTTTCTTTAAACATCA

20

30

配列番号 21、FKBP12v36 (残基 2 ~ 108)

【化 2 1】

GVQVETISP GDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLLEDGKK
 VDSSRD RNKPFKFMLGKQEVIRGWEEGV AQMSVGQ
 RAKLTISP DYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKE

40

配列番号 22、ΔCasp9 (残基 135 ~ 416)

【化 2 2 - 1】

GFGDVGALES LRGNADLAYILSMEPCGHCLINN VN
 FCRESGLRTRTGSNIDCEKLR RRFSSSLHFMVEVKGD
 LTAKKMVLALLELARQDHGALDCCVVVILSHGCQAS

50

【化 2 2 - 2】

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 2 3、Δ C a s p 9（残基 1 3 5～4 1 6）D 3 3 0 A、ヌクレオチド配列
 【化 2 3】

GGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTTACATCCTG
 AGCATGGAGCCCTGTGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAACTTCTGCCGTGAGTCCGG
 GCTCCGCACCCGCACTGGCTCCAACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCTCTCCTCGC
 TGCATTTTCATGGTGGAGGTGAAGGGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTGGCTTTGCTG
 GAGCTGGCGC_gGCAGGACCACGGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTCTCTCTCACG
 GCTGTCAGGCCAGCCACCTGCAGTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGT
 GTCGGTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGGGAAG
 CCCAAGCTCTTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGTTTGAGGTGGC
 CTCCACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCCACCCCGTTCC
 AGGAAGGTTTGAGGACCTTCGACCAGCTGGCCGCCATATCTAGTTTGCCCACACCCAGTGAC
 ATCTTTGTGTCCTACTCTACTTTCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCCAAGAGTGGCTCC
 TGGTACGTTGAGACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAAGACCTGCAGTC
 CCTCCTGCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTATAAACAGATGCCTGGTTG
 CTTTAATTTCTCCGGAAAAAACTTTTCTTTAAACATCA

配列番号 2 4、Δ C a s p 9（残基 1 3 5～4 1 6）D 3 3 0 A、アミノ酸配列
 【化 2 4】

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

配列番号 2 5、Δ C a s p 9（残基 1 3 5～4 1 6）N 4 0 5 Qヌクレオチド配列
 【化 2 5 - 1】

GGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTTACATCCTG
 AGCATGGAGCCCTGTGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAACTTCTGCCGTGAGTCCGG
 GCTCCGCACCCGCACTGGCTCCAACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCTCTCCTCGC
 TGCATTTTCATGGTGGAGGTGAAGGGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTGGCTTTGCTG
 GAGCTGGCGC_gGCAGGACCACGGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTCTCTCTCACG
 GCTGTCAGGCCAGCCACCTGCAGTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGT
 GTCGGTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGGGAAG
 CCCAAGCTCTTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGTTTGAGGTGGC
 CTCCACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCCACCCCGTTCC
 AGGAAGGTTTGAGGACCTTCGACCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCCACACCCAGTGAC
 ATCTTTGTGTCCTACTCTACTTTCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCCAAGAGTGGCTCC
 TGGTACGTTGAGACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAAGACCTGCAGTC

【化 2 5 - 2】

CCTCCTGCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACAGATGCCTGGTTG
CTTTCAGTTCTCCGGAAAAAACTTTTCTTTAAAACATCA

配列番号 26、 Δ Casp9（残基 135～416）N405Q アミノ酸配列
【化 2 6】

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

10

配列番号 27、 Δ Casp9（残基 135～416）D330A N405Qヌクレオ
チド配列
【化 2 7】

GGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTTACATCCTG
AGCATGGAGCCCTGTGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAACCTTCTGCCGTGAGTCCGG
GCTCCGCACCCGCACTGGCTCCAACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCGTTTCTCCTCGC
TGCATTTTCATGGTGGAGGTGAAGGGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTGGCTTTGCTG
GAGCTGGCGCGGCAGGACCACGGTGCTCTGGACTGCTGCGTGCTGGTGCTATTCTCTCTCACG
GCTGTCAGGCCAGCCACCTGCAGTTCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGT
GTCCGGTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGGAAAG
CCCAAGCTCTTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGTTTGAGGTGGC
CTCCACTTCCCCTGAAGACGATCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCCACCCCGTTCC
AGGAAGGTTTGAGGACCTTCGACCAGCTGGCCGCCATATCTAGTTTGCCACACCCAGTGAC
ATCTTTGTGTCCTACTCTACTTTCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCCAAGAGTGGCTCC
TGGTACGTTGAGACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAAGACCTGCAGTC
CCTCCTGCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACAGATGCCTGGTTG
CTTTCAGTTCTCCGGAAAAAACTTTTCTTTAAAACATCA

20

30

配列番号 28、 Δ Casp9（残基 135～416）D330A N405Q アミノ酸
配列
【化 2 8】

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

40

配列番号 29、FKBPv36（Fv1）ヌクレオチド配列

【化 2 9】

GGCGTTCAAGTAGAAACAATCAGCCCAGGAGACGGAAGGACTTTCCCCAAACGAGGCCAAAC
ATGCGTAGTTCATTATACTGGGATGCTCGAAGATGGAAAAAAGTAGATAGTAGTAGAGACCG
AAACAAACCATTTAAATTTATGTTGGGAAAACAAGAAGTAATAAGGGGCTGGGAAGAAGGTGT
AGCACAAATGTCTGTTGGCCAGCGCGCAAACTCACAAATTTCTCCTGATTATGCTTACGGAGC
TACCGGCCACCCCGGCATCATACCCCTCATGCCACACTGGTGTGACGTCGAATTGCTCA
AACTGGAA

配列番号 30、FKBPv36 (Fv1) アミノ酸配列

【化 3 0】

10

GVQVETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLDGGKVDSSRDRNKPFFKMLGKQEVIRGWEEGV
AQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKE

配列番号 31、FKBPv36 (Fv2) ヌクレオチド配列

【化 3 1】

GGaGTgCAgGTgGAgACgATtAGtCCtGGgGAtGGgAGaACcTTtCCaAAgCGcGGtCAgACcTgTGTt
GTcCAcTAcACcGGtATGCTgGAgGAcGGgAAgAAgGTgGActcTtcacGcGAtCGcAAtAAgCCtTTcAA
gTTcATGcTcGGcAAgCAgGAgGTgATccGGGGgTGGGAgGAgGGcGTgGcTCAgATGTCgGTcGGg
CAaCGaGcGAAgCTtACcATcTCaCCcGAcTAcGcGTAtGGgGCaACgGGgCAtCCgGGaATtATcCCt
CCcCAcGcTACgCTcGTaTTcGAtGTgGAgcTctgAAgCTtGag

20

配列番号 32、FKBPv36 (Fv2) アミノ酸配列

【化 3 2】

GVQVETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLDGGKVDSSRDRNKPFFKMLGKQEVIRGWEEGV
AQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKE

配列番号 33、ΔCD19 ヌクレオチド配列

30

【化 3 3】

ATGCCCCCTCCTAGACTGCTGTTTTCTGCTCTTTCTCACCCCAATGGAAGTTAGACCTGAG
GAACCACTGGTCGTTAAAGTGGAAGAAGGTGATAATGCTGTCTCCTCCAATGCCTTAAAGGGACC
AGCGACGGACCAACGCAGCAACTGACTTGGAGCCGGGAGTCCCCTCTCAAGCCGTTTCTCAA
GCTGTCACTTGGCCTGCCAGGTCTTGGTATTCACATGCGCCCCCTTGCCATTTGGCTCTTCAT
ATTCAATGTGTCTCAACAAATGGGTGGATTCTACCTTTGCCAGCCCGGCCCTTCTGAGAA
AGCTTGGCAGCCTGGATGGACCGTCAATGTTGAAGGCTCCGGTGAGCTGTTTAGATGGAATG
TGAGCGACCTTGGCGGACTCGGTTGCGGACTGAAAAATAGGAGCTCTGAAGGACCCTCTTCT
CCCTCCGGTAAGTTGATGTACCTAAGCTGTACGTGTGGGCCAAGGACCGCCCCGAAATCTG
GGAGGGCGAGCCTCCATGCCTGCCGCTCGCGATTCACTGAACCAGTCTCTGTCCCAGGATC
TCACTATGGCGCCCGGATCTACTCTTTGGCTGTCTTGCGGCGTTCCCCAGATAGCGTGTC
AGAGGACCTCTGAGCTGGACCCACGTACACCCTAAGGGCCCTAAGAGCTTGTGAGCCTGGA
ACTGAAGGACGACAGACCCGCACGCGATATGTGGGTAAATGGAGACCGGCCTTCTGCTCCCTC
GCGCTACCGCACAGGATGCAGGGAATACTACTGTCATAGAGGGAATCTGACTATGAGCTTT
CATCTCGAAATTACAGCACGGCCCGTTCTTTGGCATTGGCTCCTCCGGAAGTGGAGGCTGGAA
GGTGTCTGCCGTAACACTCGCTTACTTGATTTTTTGCCTGTGTAGCCTGGTTGGGATCCTGCA
TCTTCAGCGAGCCCTTGTATTGCGCCGAAAAAGAAAACGAATGACTGACCCTACACGACGATT
CTGA

40

配列番号 34、ΔCD19 アミノ酸配列

【化 3 4】

MPPPRLLFFLLFLTPMEVRPEEPLVVKVEEGDNAVLQCLKGTSDGPTQQLTWSRESPLKPFLKLSL
GLPGLGIHMRPLAIWLFIFNVSQQMGGFYLCQPGPPSEKAWQPGWTVNVEGSGELFRWNVSDL
GGLGCGLKNSSEGPSSPSGKLMSPKLYVWAKDRPEIWEGEPPCLPPRDSLNSLSQDLTMAP
GSTLWLSCGVPPDSVSRGPLSWTHVHPKGPKSLLSLELKDDRPARDMWVVMETGLLLPRATAQDA
GKYYCHRGNLMTSFHLEITARPVLWHWLLRTGGWKVSAVTLAYLIFCLCSLVGILHLQRALVLRK
RKRMTDPTRRF*

【0 5 8 5】

コドン最適化 i C a s p 9 - N 4 0 5 Q - 2 A - Δ C D 1 9 配列：（ヌクレオチド配列
の名称の後ろの． c o はコドン最適化されたものであること（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配列）を示す。

10

配列番号 3 5、F K B P v 3 6． c o (F v 3) ヌクレオチド配列

【化 3 5】

ATGCTGGAGGGAGTGCAGGTGGAGACTATTAGCCCCGGAGATGGCAGAACATTCCCCAAAAG
AGGACAGACTTGCCTCGTGCATTATACTGGAATGCTGGAAGACGGCAAGAAGGTGGACAGCA
GCCGGGACCGAAACAAGCCCTTCAAGTTCATGCTGGGGAAGCAGGAAGTGATCCGGGGCTG
GGAGGAAGGAGTCGCACAGATGTCAGTGGGACAGAGGGCCAACTGACTATTAGCCCAGAC
TACGCTTATGGAGCAACCGGCCACCCCGGGATCATTCCCCCTCATGCTACACTGGTCTTCGA
TGTGGAGCTGCTGAAGCTGGAA

20

配列番号 3 6、F K B P v 3 6． c o (F v 3) アミノ酸配列

【化 3 6】

MLEGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLLEDGKKVDSSRDRNKPFFKMLGKQEVIRGWEE
GVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKE

配列番号 3 7、リンカー． c o ヌクレオチド配列

【化 3 7】

AGCGGAGGAGGATCCGGA

30

配列番号 3 8、リンカー． c o アミノ酸配列

【化 3 8】

SGGGSG

配列番号 3 9、カスパーゼー 9． c o ヌクレオチド配列

【化 3 9】

GTGGACGGGTTTGGAGATGTGGGAGCCCTGGAATCCCTGCGGGGCAATGCCGATCTGGCTT
ACATCCTGTCTATGGAGCCTTGCGGCCACTGTCTGATCATTAAACAATGTGAACTTCTGCAGAG
AGAGCGGGCTGCGGACCAGAACAGGATCCAATATTGACTGTGAAAAGCTGCGGAGAAGGTTT
TCTAGTCTGCACTTTATGGTCGAGGTGAAAGGCGATCTGACCGCTAAGAAAATGGTGCTGGC
CCTGCTGGAACTGGCTCGGCAGGACCATGGGGCACTGGATTGCTGCGTGGTCTGTGATCCTG
AGTCACGGCTGCCAGGCTTCACATCTGCAGTTCCCTGGGGCAGTCTATGGAAGTACGGGCTG
TCCAGTCAGCGTGGAGAAGATCGTGAACATCTTCAACGGCACCTCTTGCCCAAGTCTGGGCG
GGAAGCCCCAACTGTTCTTTATTGAGGCTGTGGAGGCGAGCAGAAAGATCACGGCTTCGAA
GTGGCTAGCACCTCCCCGAGGACGAATCACCTGGAAGCAACCCTGAGCCAGATGCAACCC
CCTTCCAGGAAGGCCTGAGGACATTTGACCAGCTGGATGCCATCTCAAGCCTGCCACACCT
TCTGACATTTTCGTCTCTTACAGTACTTTCCCTGGATTTGTGAGCTGGCGCGATCCAAAGTCA
GGCAGCTGGTACGTGGAGACACTGGACGATATCTTTGAGCAGTGGGCCATTCTGAAGACCT
GCAGAGTCTGCTGCTGCGAGTGGCCAATGCTGTCTCTGTGAAGGGGATCTACAAACAGATGC
CAGGATGCTTCCAGTTTCTGAGAAAGAACTGTTCTTTAAGACCTCCGCATCTAGGGCC

10

配列番号 40、カスパーゼ-9. c o アミノ酸配列

【化 4 0】

VDGFGDVGALSLRGNADLAYILSMEPCGHCLINNVNFCRESGLRTRTGSNIDCEKLRRRFSSLH
FMVEVKGDLTAKKMLLALLELARQDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQFPGAVYGTGCPVSVEKI
VNIFNGTSCPSLGKPKLFFIQACGGEQKDHGFEVASTSPEDESPGSNPEPDATPFQEGLRTFDQ
LDAISSLPSPDIFVSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDIFEQWAHSEDLSLLLLRVANAVSVK
GIYKQMPGCFQFLRKKLFFKTSASRA

20

配列番号 41、リンカー. c o ヌクレオチド配列

【化 4 1】

CCGCGG

配列番号 42、リンカー. c o アミノ酸配列

30

【化 4 2】

PR

配列番号 136 : T2A. c o ヌクレオチド配列

【化 4 3】

GAAGGCCGAGGGAGCCTGCTGACATGTGGCGATGTGGAGGAAAACCCAGGACCA

配列番号 43 : T2A. c o アミノ酸配列

40

【化 4 4】

EGRGSLLTCGDVEENPGP

配列番号 137 : ΔCD19. c o ヌクレオチド配列

【化 4 5】

ATGCCACCACCTCGCCTGCTGTTCTTTCTGCTGTTCCCTGACACCTATGGAGGTGCGACCTGAG
GAACCACTGGTCGTGAAGGTCGAGGAAGGCGACAATGCCGTGCTGCAGTGCCTGAAAGGCA
CTTCTGATGGGCCAACTCAGCAGCTGACCTGGTCCAGGGAGTCTCCCCTGAAGCCTTTTCTG
AACTGAGCCTGGGACTGCCAGGACTGGGAATCCACATGCGCCCTCTGGCTATCTGGCTGTT
CATCTTCAACGTGAGCCAGCAGATGGGAGGATTCTACCTGTGCCAGCCAGGACCACCATCCG
AGAAGGCCTGGCAGCCTGGATGGACCGTCAACGTGGAGGGGTCTGGAGAACTGTTTAGGTG
GAATGTGAGTGACCTGGGAGGACTGGGATGTGGGCTGAAGAACCGCTCCTCTGAAGGCCCA
AGTTCACCCCTCAGGGAAGCTGATGAGCCCAAACTGTACGTGTGGGCCAAAGATCGGCCCGA
GATCTGGGAGGGAGAACCTCCATGCCTGCCACCTAGAGACAGCCTGAATCAGAGTCTGTCAC
AGGATCTGACAATGGCCCCCGGGTCCACTCTGTGGCTGTCTTGTGGAGTCCCACCCGACAGC
GTGTCCAGAGGCCCTCTGTCTGGACCCACGTGCATCCTAAGGGGCCAAAAAGTCTGCTGTC
ACTGGAAGTGAAGGACGATCGGCCTGCCAGAGACATGTGGGTGATGGAGACTGGACTGCTG
CTGCCACGAGCAACCGCACAGGATGCTGGAAAATACTATTGCCACCGGGGGCAATCTGACAAT
GTCCTTCCATCTGGAGATCACTGCAAGGCCCGTGCTGTGGCACTGGCTGCTGCGAACCGGA
GGATGGAAGGTCAGTGCTGTGACACTGGCATATCTGATCTTTTGCCTGTGCTCCCTGGTGGG
CATTCTGCATCTGCAGAGAGCCCTGGTGCTGCGGAGAAAGAGAAAGAGAATGACTGACCCAA
CAAGAAGGTTTTGA

10

配列番号 138 : ΔCD19. c o アミノ酸配列

【化 4 6】

MPPPRLLFFLLFLTPMEVRPEEPLVVKVEEGDNAVLQCLKGTSDGPTQQLTWSRESPLKPFLKLSL
GLPGLGIHMRPLAIWLFIFNVSQQMGGFYLCQPGPPSEKAWQPGWTVNVEGSGELFRWNVSDL
GGLGCGLKNRSSEGPSSPSGKLMSPKLYVWAKDRPEIWEGEPPCLPPRDSLNSQLSQDLTMAP
GSTLWLSCGVPPDSVSRGPLSWTHVHPKGPKSLLSLELKDDRPARDMWVWVETGLLLPRATAQDA
GKYYCHRGNTMSFHLEITARPVLWHWLLRTGGWKVSAVTLAYLIFCLCSLVGILHLQRALVLRK
RKRMTPTRRF*

20

【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	(Fv) 配列番号44 ATGCTCGAGGGAGTGCAGGTGGAGACTAT CTCCCCAGGAGACGGGCGCACCTTCCCCA AGCGCGGCCAGACCTGCGTGGTGCCTAC ACCGGGATGCTTGAAGATGGAAAAGAAAGT TGATTCTCCCGGGACAGAAACAAGCCCTT TAAGTTTATGCTAGGCAAGCAGGAGGTGA TCCGAGGCTGGGAAGAAGGGGTTGCCCA GATGAGTGTGGGTCAGAGAGCCAACTGA CTATATCTCCAGATTATGCCTATGGTGCCA CTGGGCACCCAGGCATCATCCACCACATG CCACTCTCGTCTTCGATGTGGAGCTTCTAA AACTGGA-(リンカー) 配列番号139 TCTGGCGGTGGATCCGGA-(iCasp9) 配列 番号140 GTCGACGGATTTGGTGTGTCGGTGCTCTT GAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTGGC TTACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCA CTGCCTCATTATCAACAATGTGAACCTCTG CCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTG GCTCCAACATCGACTGTGAGAAGTTGCGG CGTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTTCATGGTG GAGGTGAAGGGCGACCTGACTGCCAAGA AAATGGTGTGCTGGCTTTGCTGGAGCTGGCG CGGCAGGACCACGGTGCTCTGGACTGCTG CGTGGTGGTCATTCTCTCTCACGGCTGTCA GGCCAGCCACCTGCAGTTCCAGGGGCTG TCTACGGCACAGATGGATGCCCTGTGTCG GTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCAATGG GACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGGAAGC	(Fv) 配列番号45 MLEGVQVETISPGDGRTFPKRGQT CVVHYTGMLDGKKVDSSRDNRKP FKFMLGKQEVIR GWEEGVAQMSVQGQRAKLTISPDYA YGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLE- (リンカー) 配列番号142 SGGGSG-(iCasp9) 配列番号143 VDGF GDVGALES LRGNADLAYILSMPECG HCLIIINN VNF CRESGLRTRTGSNIDC EKLRRRFSS LHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAR QDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQ FPGAVYGTGDC PVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFF IQACGGEQKDGHFEVASTSPEDESP GSNPEPDA TPFQEGLRTFDQLDAISSLPTSPDIFV SYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLD DIFEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMP GCFNFLRKKLFFKTSASRA-配列番 号144 EGRGSLLTCGDVEENP GP-

10

20

30

40

10

20

30

40

【表 6 - 3】

	ACTGTCTGATCATTAACAATGTGAACTTCT GCAGAGAGAGCGGGCTGCGGACCAGAAC AGGATCCAATATTGACTGTGAAAAGCTGC GGAGAAGGTTCTCTAGTCTGCACTTTATGG TCGAGGTGAAAGGCGATCTGACCGCTAAG AAAATGGTGCTGGCCCTGCTGGAAGTGGC TCGGCAGGACCATGGGGCACTGGATTGCT GCGTGGTCGTGATCCTGAGTCACGGCTGC CAGGCTTCACATCTGCAGTTCCTGGGGCA GTCTATGGAAGTACGGCTGTCCAGTCAG CGTGGAGAAGATCGTGAACATCTTCAACG GCACCTCTTGCCCAAGTCTGGGCGGGAAG CCCAACTGTTCTTTATTAGGCCTGTGGA GGCGAGCAGAAAGATCACGGCTTCGAAGT GGCTAGCACCTCCCCGAGGACGAATCAC CTGGAAGCAACCCTGAGCCAGATGCAACC CCCTTCCAGGAAGGCCTGAGGACATTTGA CCAGCTGGATGCCATCTCAAGCCTGCCCAC ACCTTCTGACATTTTCGTCTTTACAGTACT TTCCTGGATTTGTGAGCTGGCGCGATCCA AAGTCAGGCAGCTGGTACGTGGAGACACT GGACGATATCTTTGAGCAGTGGGCCCAT CTGAAGACCTGCAGAGTCTGCTGCTGCGA GTGGCCAATGCTGTCTCTGTGAAGGGGAT CTACAAACAGATGCCAGGATGCTTCAACTT TCTGAGAAAGAACTGTTCTTTAAGACCTC CGCATCTAGGGCC-(T2A)- 配列番号 CCGCGGGAAGGCCGAGGGAGCCTGCTGA CATGTGGCGATGTGGAGGAAAACCCAGGA CCA		10
			20
			30

【表 6 - 4】

Fv-iCASP9 S144A-T2A	配列番号48	配列番号49
	(Fv-L)-GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGT GCTCTTGAG ~~gc~~ TTTGAGGGGAAATGCAGA TTTGGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTG TGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAA CTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCG CACTGGCTCCAACATCGACTGTGAGAAGTT GCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTTCAT GGTGGAGGTGAAGGGCGACCTGACTGCC AAGAAAATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCT GGCGCGGCAGGACCACGGTGCTCTGGACT GCTGCGTGGTGGTCATTCTCTCTCACGGCT GTCAGGCCAGCCACCTGCAGTTCCCAGGG GCTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGT GTCGGTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCA ATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGG AAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGGCCTGT GGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGTTTG AGGTGGCCTCCACTCCCCTGAAGACGAG TCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGC CACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTT CGACCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCC CACACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTC TACTTTCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGA CCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGA CCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCT CACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTT AGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAAAGG GATTTATAAACAGATGCCTGGTTGCTTTAA TTTCCTCCGAAAAAACTTTTCTTTAAACA TCAGCTAGCAGAGCC-(T2A)	(Fv-L)-VDGFGDVGALeALRGNADL AYILSMEPCGHCLINNVNFCRESGL RTRTGSNIDCEKLRRRFSSLHFMVEV KGDLTAKKMVLALLELARQDHGAL DCCVVVILSHGCQASHLQFPGAVYG TDGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGK PKLFFIQACGGEQKDHGFVASTSP EDESPPGSNPEPDATPFQEGLRTFDQ LDAISSLPTSDIFVSYSTFPGFVSWR DPKSGSWYVETLDDIFEQWAHSED LQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCF NFLRKKLFFKTSASRA

10

20

30

40

【表 6 - 5】

Fv-iCASP9 S144D-T2A	配列番号50	配列番号51
	(Fv-L)-GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGT GCTCTTGAG gac TTGAGGGGAAATGCAGA TTTGGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTG TGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAA CTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCG CACTGGCTCCAACATCGACTGTGAGAAGTT GCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTCAT GGTGGAGGTGAAGGGCGACCTGACTGCC AAGAAAATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCT GGCGCGGCAGGACCACGGTGCTCTGGACT GCTGCGTGGTGGTCATTCTCTCTCACGGCT GTCAGGCCAGCCACCTGCAGTTCCCAGGG GCTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGT GTCGGTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCA ATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGG AAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGGCCTGT GGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGTTTG AGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAG TCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGC CACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTT CGACCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCC CACACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTC TACTTTCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGA CCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGA CCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCT CACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTT AGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAAAGG GATTTATAAACAGATGCCTGGTTGCTTTAA TTTCCTCCGGAATAAATTTCTTTAAACA TCAGCTAGCAGAGCC-(T2A)	(Fv-L)-VDGFGDVGALE d LRGNADL AYILSMEPCGHCLINNVNFCRESGL RTRTGSNIDCEKLRFRFSSLHFMVEV KGDLTAKKMVLALLELARQDHGAL DCCVVVILSHGCQASHLQFPGAVYG TDGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGK PKLFFIQACGGEQKDHGFEVASTSP EDESPGSNPEPDATPFQEGLRTFDQ LDAISSLPTPSDIFVSYSTFPGFVSWR DPKSGSWYVETLDDIFEQWAHSED LQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCF NFLRKKLFFKTSASRA

10

20

30

40

【表 6 - 6】

Fv-iCASP9 S183A-T2A	配列番号52	配列番号53
	(Fv-L)-GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGT GCTCTTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGA TTTGGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTG TGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAA CTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCG CACTGGCG CCA ACATCGACTGTGAGAAAGTT GCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTTCA GGTGGAGGTGAAGGGCGACCTGACTGCC AAGAAAATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCT GGCGCGGCAGGACCACGGTGCTCTGGACT GCTGCGTGGTGGTCATTCTCTCTCACGGCT GTCAGGCCAGCCACCTGCAGTTCCCAGGG GCTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGT GTCGGTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCA ATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGG AAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGGCCTGT GGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGTTTG AGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAG TCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGC CACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTT CGACCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCC CACACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTC TACTTTCCCAGGTTTTGTTTCTGGAGGGA CCCCAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGA CCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCT CACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTT AGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAAAGG GATTTATAAACAGATGCCTGGTTGCTTTAA TTTCTCCGGAAAAAACTTTTCTTTAAACA TCAGCTAGCAGAGCC-(T2A)	(Fv-L)-VDGFGDVGALESLRGNADL AYILSMEPCGHCLIINNPNFCRESGL RTRTG a NIDCEKLRRRFSSLHFMVE VKGDLTAKKMVLALLELARQDHGA LDCCVVVILSHGCQASHLQFPGAVY GTDGCPSVVEKIVNIFNGTSCPSLGG KPKLFFIQACGGEQKDHGFEVASTS PEDESPGSNPEPDATPFQEGRLRTFD QLDAISSLPTPSDIFVSYSTFPGFVS WRDPKSGSWYVETLDDIFEQWAHS EDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPG CFNFLRKKLFFKTSASRA-(T2A)

10

20

30

40

【表 6 - 7】

Fv-iCASP9 S196A-T2A	配列番号54	配列番号55
	(Fv-L)-GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGT GCTCTTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGA TTTGGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTG TGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAA CTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCG CACTGGCTCCAACATCGACTGTGAGAAGTT GCGGCGTCGCTTCTCC gCG CTGCATTTCT GGTGGAGGTGAAGGGCGACCTGACTGCC AAGAAAATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCT GGCGCGGCAGGACCACGGTGCTCTGGACT GCTGCGTGGTGGTCATTCTCTCTCACGGCT GTCAGGCCAGCCACCTGCAGTTCCCAGGG GCTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGT GTCGGTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCA ATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGG AAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGGCCTGT GGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGTTTG AGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAG TCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGC CACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTT CGACCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCC CACACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTC TACTTTCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGA CCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGA CCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCT CACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTT AGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAAAGG GATTTATAAACAGATGCCTGGTTGCTTTAA TTTCTCCGGAAAAAACTTTTCTTTAAAACA TCAGCTAGCAGAGCC-(T2A)	(Fv-L)-VDGFGDVGALES LRGNADL AYILSMEPCGHCLIINN VNF CRESGL RTRTGSNIDCEKLRRRFSaLHFMVE VKGDLTAKKMVLALLELARQDHGA LDCCVVVILSHGCQASHLQFPGAVY GTDGPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGG KPKLFFIQACGGGEQKDHGF EVASTS PEDESPGSNPEPDATPFQEGRLTFD QLDAISSLPSPDIFVSYSTFPGFVS WRDPKSGSWYVETLDDIFEQWAHS EDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPG CFNFLRKKLFFKTSASRA-(T2A)

10

20

30

40

【表 6 - 8】

Fv-iCASP9 S196D-T2A	配列番号56	配列番号57
	(Fv-L)-GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGT GCTCTTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGA TTTGGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTG TGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAA CTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCG CACTGGCTCCAACATCGACTGTGAGAAGTT GCGGCGTCGCTTCTCC gac CTGCATTTCATG GTGGAGGTGAAGGGCGACCTGACTGCCA AGAAAATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCTG GCGCGGCAGGACCACGGTGCTCTGGA CTGCGTGGTGGTCATTCTCTCTCACGGCTG TCAGGCCAGCCACCTGCAGTTCCAGGGG CTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGTGT CGGTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCAAT GGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGGA AGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGGCCTGTG GTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGTTTGA GGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAGTC CCCTGGCAGTAACCCGAGCCAGATGCCA CCCCCTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTC GACCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCC ACACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCT ACTTTCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGAC CCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGAC CCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCTC ACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTTA GGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAAAGGG ATTTATAAACAGATGCCTGGTTGCTTTAAT TTCCTCCGGAAAAAATTTTCTTTAAACAT CAGCTAGCAGAGCC-(T2A)	(Fv-L)-VDGFGDVGALSLRGNADL AYILSMEPCGHCLIINNPNFCRESGL RTRTGSNIDCEKLRFRFS d LHFMVE VKGDLTAKKMVLALLELARQDHGA LDCCVVVILSHGCQASHLQFPGAVY GTDGPVSVVEKIVNIFNGTSCPSLGG KPKLFFIQACGGEQKDHGFVASTS PEDESPGSNPEPDATPFQELRTFD QLDAISSLPTPSDIFVSYSTFPGFVS WRDPKSGSWYVETLDDIFEQWAHS EDLQSLLLRVANAVSVKGIYKMPG CFNFLRKKLFFKTSASRA-(T2A)

10

20

30

40

【表 6 - 9】

Fv-iCASP9 C285A-T2A	配列番号58	配列番号59
	(Fv-L)-GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGT GCTCTTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGA TTTGGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTG TGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAA CTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCG CACTGGCTCCAACATCGACTGTGAGAAGTT GCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTTCA GGTGGAGGTGAAGGGCGACCTGACTGCC AAGAAAATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCT GGCGCGGCAGGACCACGGTGCTCTGGACT GCTGCGTGCTGGTCATTCTCTCTCACGGCT GTCAGGCCAGCCACCTGCAGTTCCCAGGG GCTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGT GTCGGTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCA ATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGG AAGCCCAAGCTCTTTTTTTCATCCAGGCC gcg GGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGTTTG AGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAG TCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGC CACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTT CGACCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCC CACACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTC TACTTTCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGA CCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGA CCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCT CACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTT AGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAAAGG GATTTATAAACAGATGCCTGGTTGCTTTAA TTTCCTCCGGAAAAAACTTTTCTTTAAAACA TCAGCTAGCAGAGCC-(T2A)	(Fv-L)-VDGFGDVGALES LRGNADL AYILSMEPCGHCLIINN VNF CRESGL RTRTGSNIDCEKLR RRFSSLHFMVEV KGDLTAKKMVLALLELARQDHGAL DCCVVVILSHGCQASHLQFPGAVYG TDGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGK PKLFFIQA a GGGEQKDHGFEVASTSP EDES PGSNPEPDATPFQEGLRTFDQ LDAISSLPTSDIFVSYSTFPGFVSWR DPKSGSWYVETLDDIFEQWAHSED LQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCF NFLRKKLFFKTSASRA-(T2A)

10

20

30

40

【表 6 - 1 0】

Fv-ICASP9 A316G-T2A	配列番号60	配列番号61
	(Fv-L)-GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGT GCTCTTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGA TTTGGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTG TGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAA CTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCG CACTGGCTCCAACATCGACTGTGAGAAGTT GCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTTAT GGTGGAGGTGAAGGGCGACCTGACTGCC AAGAAAATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCT GGC GCGGCAGGACACGGTGCTCTGGACT GCTGCGTGGTGGTCATTCTCTCTCACGGCT GTCAGGCCAGCCACCTGCAGTTCCAGGG GCTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGT GTCGGTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCA ATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGG AAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGGCCTGT GGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGTTTG AGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAG TCCCCTGGCAGTAACCCGAGCCAGAT GgC ACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTC GACCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCC ACACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCT ACTTTCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGAC CCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGAC CCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCTC ACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTTA GGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAAAGGG ATTTATAAACAGATGCCTGGTTGCTTTAAT TTCCTCCGAAAAAACTTTTCTTTAAACAT CAGCTAGCAGAGCC-(T2A)	(Fv-L)-VDGFGDVGALES LRGNADL AYILSMEPCGHCLINNVNFCRESGL RTRTGSNIDCEKLRRRFSSLHFMVEV KGDLTAKKMVLALLELARQDHGAL DCCVVVILSHGCQASHLQFPGAVYG TDGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGK PKLFFIQACGGEQKDHGFEVASTSP EDESPGSNPEPD g TPFQEGLRTFDQ LDAISSLPTSDIFVSYSTFPGFVSWR DPKSGSWYVETLDDIFEQWAHSED LQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCF NFLRKKLFFKTSASRA-(T2A)

10

20

30

40

【表 6 - 1 1】

Fv-iCASP9 T317A-T2A	配列番号62	配列番号63
	(Fv-L)-GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGT GCTCTTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGA TTTGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTG TGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAA CTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCG CACTGGCTCCAACATCGACTGTGAGAAGTT GCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTTCA GGTGGAGGTGAAGGGCGACCTGACTGCC AAGAAAATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCT GGCGCGGCAGGACCACGGTGCTCTGGACT GCTGCGTGGTGGTCATTCTCTCACGGCT GTCAGGCCAGCCACCTGCAGTTCCCAGGG GCTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGT GTCGGTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCA ATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGG AAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGGCCTGT GGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGTTTG AGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAG TCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGC Cg CCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTT CGACCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCC CACCCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTC TACTTTCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGA CCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGA CCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCT CACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTT AGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAAAGG GATTTATAAACAGATGCCTGGTTGCTTTAA TTTCCTCCGGAATACTTTCTTTAAACA TCAGCTAGCAGAGCC-(T2A)	(Fv-L)-VDGFGDVGALSLRGNADL AYILSMEPCGHCLIIINNVCRESGL RTRTGSNIDCEKLRFRFS LHFMVEVKGDLTAKKMLALLELAR QDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQ FPGAVYGTDCG PVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFF IQACGGEQKDHGFEVASTSPEDESP GSNPEPDA a PFQEGLRTFDQLDAISSLPTPSDIFV SYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLD DIFEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMP GCFNFLRKKLFFKTSASRA -(T2A)

10

20

30

40

【表 6 - 1 2】

Fv-iCASP9 T317C-T2A	配列番号64	配列番号65
	(Fv-L)-GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGT GCTCTTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGA TTTGGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTG TGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAA CTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCG CACTGGCTCCAACATCGACTGTGAGAAAGTT GCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTTCAT GGTGGAGGTGAAGGGCGACCTGACTGCC AAGAAAATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCT GGCGCGGCAGGACCACGGTGCTCTGGACT GCTGCGTGGTGGTCATTCTCTCTCACGGCT GTCAGGCCAGCCACCTGCAGTCCCAGGG GCTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGT GTCGGTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCA ATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGG AAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGGCCTGT GGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGTTTG AGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAG TCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGC CtgCCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTT CGACCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCC CACACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTC TACTTTCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGA CCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGA CCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCT CACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTT AGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAAAGG GATTTATAAACAGATGCCTGGTTGCTTTAA TTTCTCCGGAAAAAACTTTTCTTTAAACA TCAGCTAGCAGAGCC-(T2A)	(Fv-L)-VDGFGDVGALES LRGNADL AYILSMEPCGHCLIINN VNF CRESGL RTRTGSNIDCEKLR RRFSS LHF MVEVKGDLTAKKMVLALLELAR QDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQ FPGAVYGT DGC PVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFF IQACGGGEQKD HGF EVASTSPEDESP GSNPEPDA cPFQEGLRTFDQLDAISSLPTPSDIFV SYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLD DIFEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMP GCFNFLRKKLFFKTSASRA -(T2A)

10

20

30

40

【表 6 - 1 3】

Fv-iCASP9 T317S-T2A	配列番号66	配列番号67
	(Fv-L)-GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGT GCTCTTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGA TTTGGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTG TGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAA CTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCG CACTGGCTCCAACATCGACTGTGAGAAGTT GCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTTAT GGTGGAGGTGAAGGGCGACCTGACTGCC AAGAAAATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCT GGC GCGG CAGGAC CACGGTGCTCTGGACT GCTGCGTGGTGGTCATTCTCTCTCACGGCT GTCAGGCCAGCCACCTGCAGTTCCCAGGG GCTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGT GTCGGTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCA ATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGG AAGCCCAAGCTCTTTTTTATCCAGGCCTGT GGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGTTTG AGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAG TCCCCTGGCAGTAACCCGAGCCAGATGC Ct CCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTT CGACCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCC CACACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTC TACTTTCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGA CCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGA CCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCT CACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTT AGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAAAGG GATTTATAAACAGATGCCTGGTTGCTTTAA TTTCTCCGGAAAAAACTTTTCTTTAAACA TCAGCTAGCAGAGCC-(T2A)	(Fv-L)-VDGFGDVGALES LRGNADL AYILSMEPCGHCLINN VNFCRESGL RTRTGSNIDCEKLR RRFSS LHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAR QDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQ FPGAVYGT DGC PVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFF IQACGGEQKDHGFEVASTSPEDESP GSNPEPDA sPFQEGLRTFDQLDAISSLPTPSDIFV SYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLD DIFEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMP GCFNFLRKKLFFKTSASRA -(T2A)

10

20

30

40

【表 6 - 1 4】

Fv-iCASP9 F326K-T2A	配列番号68	配列番号69
	(Fv-L)-GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGT GCTCTTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGA TTTGGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTG TGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAA CTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCG CACTGGCTCCAACATCGACTGTGAGAAAGTT GCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTTCAT GGTGGAGGTGAAGGGCGACCTGACTGCC AAGAAAATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCT GGCGCGGCAGGACCACGGTGCTCTGGACT GCTGCGTGGTGGTCATTCTCTCTCACGGCT GTCAGGCCAGCCACCTGCAGTTCCCAGGG GCTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGT GTCGGTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCA ATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGG AAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGGCCTGT GGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGTTTG AGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAG TCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGC CACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACC aa g GACCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCC CACACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTC TACTTTCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGA CCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGA CCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCT CACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTT AGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAAAGG GATTATATAACAGATGCCTGGTTGCTTTAA TTTCTCCGGAAAAAACTTTTCTTTAAAACA TCAGCTAGCAGAGCC	(Fv-L)-VDGFGDVGALSLRGNADL AYILSMEPCGHCLIIINNPNFCRESGL RTRTGSNIDCEKLRFRFSSLHFMVEV KGDLTAKKMVLALLELARQDHGAL DCCVVVILSHGCQASHLQFPGAVYG TDGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGK PKLFFIQACGGEQKDHGFEVASTSP EDESPGSNPEPDATPFQEGLRT k DQ LDAISSLPTSDIFVSYSTFPGFVSWR DPKSGSWYVETLDDIFEQWAHSED LQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCF NFLRKKLFFKTSASRA

10

20

30

40

【表 6 - 1 5】

Fv-iCASP9 D327K-T2A	配列番号70	配列番号71
	(Fv-L)-GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGT GCTCTTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGA TTTGGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTG TGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAA CTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCG CACTGGCTCCAACATCGACTGTGAGAAGTT GCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTTCA GGTGGAGGTGAAGGGCGACCTGACTGCC AAGAAAATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCT GCGCGGGCAGGACCACGGTGCTCTGGACT GCTGCGTGGTGGTCATTCTCTCTCACGGCT GTCAGGCCAGCCACCTGCAGTTCCAGGG GCTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGT GTCGGTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCA ATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGG AAGCCCAAGCTCTTTTTTCATCCAGGCCTGT GGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGTTTG AGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAG TCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGC CACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTT CaAg CAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCC CACACCCAGTGACATCTTTGTGTCTACTC TACTTTCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGA CCCCAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGA CCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCT CACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTT AGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAAAGG GATTTATAAACAGATGCCTGGTTGCTTTAA TTTCTCCGGAAAAAACTTTTCTTTAAACA TCAGCTAGCAGAGCC-(T2A)	(Fv-L)-VDGFGDVGALESRLGNADL AYILSMEPCGHCLIINNVNFCRESGL RTRTGSNIDCEKLRRRFSSLHFMVEV KGDLTAKKMVLLALLELARQDHGAL DCCVVVILSHGCQASHLQFPGAVYG TDGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGK PKLFFIQACGGEQKDHGFEVASTSP EDESPGSNPEPDATPFQEGRLRTF kQ LDAISSLPTPSDIFVSYSTFPGFVSWR DPKSGSWYVETLDDIFEQWAHSED LQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCF NFLRKKLFFKTSASRA-(T2A)

10

20

30

40

【表 6 - 1 6】

Fv-iCASP9 D327R-T2A	配列番号72	配列番号73
	GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTT GAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGC TTACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCA CTGCCTCATTATCAACAATGTGAACCTCTG CCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTG GCTCCAACATCGACTGTGAGAAGTTGCGG CGTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTTCATGGTG GAGGTGAAGGGCGACCTGACTGCCAAGA AAATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCTGGCG CGGCAGGACCACGGTGCTCTGGACTGCTG CGTGGTGGTCATTCTCTCTCACGGCTGTCA GGCCAGCCACCTGCAGTTCCAGGGGCTG TCTACGGCACAGATGGATGCCCTGTGTCG GTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCAATGG GACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGGAAGC CCAAGCTCTTTTCATCCAGGCCTGTGGTG GGGAGCAGAAAGACCATGGGTTTGAGGT GGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCC TGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCCACCC CGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTT caggc AGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCACAC CCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTTT CCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCAA GAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGG ACGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTG AAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCG CTAATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTATA AACAGATGCCTGGTTGCTTTAATTTCTCC GGAAAAAACTTTTCTTTAAACATCAGCTA GCAGAGCC-(T2A)	(Fv-L)-VDGFGDVGALES LRGNADL AYILSMEPCGHCLINNVNFCRESGL RTRTGSNIDCEKLRRRFSSLHFMVEV KGDLTAKKMVLALLELARQDHGAL DCCVVVILSHGCQASHLQFPGAVYG TDGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGK PKLFFIQACGGEQKDHGFEVASTSP EDESPGSNPEPDATPFQEGLRTFrQL DAISLPTPSDIFVSYSTFPGFVSWR DPKSGSWYVETLDDIFEQWAHSED LQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCF NFLRKKLFFKTSASRA-(T2A)

10

20

30

40

【表 6 - 1 7】

Fv-iCASP9 D327G-T2A	配列番号74	配列番号75	10
	GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTT GAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGC TTACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCA CTGCCTCATTATCAACAATGTGAACCTCTG CCGTGAGTCCGGGGCTCCGCACCCGCACTG GCTCCAACATCGACTGTGAGAAGTTGCGG CGTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTTCATGGTG GAGGTGAAGGGCGACCTGACTGCCAAGA AAATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCTGGCG CGGCAGGACCACGGTGCTCTGGACTGCTG CGTGGTGGTCATTCTCTCTCACGGCTGTCA GGCCAGCCACCTGCAGTTCCCAGGGGCTG TCTACGGCACAGATGGATGCCCTGTGTGCG GTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCAATGG GACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGGAAGC CCAAGCTCTTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTG GGGAGCAGAAAGACCATGGGTTTGAGGT GGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCC TGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCCACCC CGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTC GgCC AGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCACAC CCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTTT CCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCCAA GAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGG ACGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTG AAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCG CTAATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATA AACAGATGCCTGGTTGCTTTAATTTCTCC GGAAAAAATTTTCTTTAAACATCAGCTA GCAGAGCC-(T2A)	(Fv-L)-VDGFGDVGALES LRGNADL AYILSMEPCGHCLIINN VNF CRESGL RTRTGSNIDCEKLRRRFSSLHFMVEV KGDLTAKKMVLALLELARQDHGAL DCCVVVILSHGCQASHLQFPGAVYG TDGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGK PKLFFIQACGGEQKDHGFVASTSP EDESPGSNPEPDATPFQEGLRTF gQ LDAISSLPTPSDIFVSYSTFPGFVSWR DPKSGSWYVETLDDIFEQWAHSED LQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCF NFLRKKLFFKTSASRA-(T2A)	20
			30
			40

【表 6 - 1 8】

Fv-iCASP9 Q328K-T2A	配列番号76	配列番号77
	(Fv-L)-GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGT GCTCTTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGA TTTGGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTG TGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAA CTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCG CACTGGCTCCAACATCGACTGTGAGAAGTT GCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTTCAT GGTGGAGGTGAAGGGCGACCTGACTGCC AAGAAAATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCT GGCGCGGCAGGACCACGGTGCTCTGGACT GCTGCGTGGTGGTCATTCTCTCTCACGGCT GTCAGGCCAGCCACCTGCAGTCCCAGGG GCTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGT GTCGGTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCA ATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGG AAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGGCCTGT GGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGTTTG AGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAG TCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGC CACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTT CGACa AG CTGGACGCCATATCTAGTTTGCC CACACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTC TACTTTCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGA CCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGA CCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCT CACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTT AGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAAAGG GATTTATAAACAGATGCCTGGTTGCTTTAA TTTCCTCCGGAAAAAACTTTTCTTTAAACA TCAGCTAGCAGAGCC-(T2A)	VDGFGDVGALES LRGNADLAYILSM EPCGHCLIINN VNFCRESGLRTRTGS NIDCEKLRRRFSSLHFMVEVKGDLT AKKMVLALLELARQDHGALDCCVV VILSHGCQASHLQFPGAVYGTGDCP VSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFI QACGGEQKD HGFVASTSPEDESP GSNPEPDATPFQEGLRTFD k LDAISS LPTPSDIFVSYSTFPGFVSWRDPKSG SWYVETLDDIFEQWAHSEDLQSLLL RVANAVSVKGIYKQMPGCFNFLRK KLFFKTSASRA-(T2A)

10

20

30

40

【表 6 - 1 9】

Fv-iCASP9 Q328R-T2A	配列番号78	配列番号79
	(Fv-L)-GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGT GCTCTTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGA TTTGGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTG TGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAA CTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCG CACTGGCTCCAACATCGACTGTGAGAAGTT GCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTTCT GGTGGAGGTGAAGGGCGACCTGACTGCC AAGAAAATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCT GGC GCGG CAGGAC CACGGT GCTCTGGACT GCTGCGTGGTGGTCATTCTCTCACGGCT GTCAGGCCAGCCACCTGCAGTTCCCAGGG GCTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGT GTCGGTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCA ATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGG AAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGGCCTGT GGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGTTTG AGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAG TCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGC CACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTT CGAC agG CTGGACGCCATATCTAGTTTGCC CACACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTC TACTTTCCCAGGTTTTGTTTCTGGAGGGA CCCC AAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGA CCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCT CACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTT AGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAAAGG GATTATAAACAGATGCCTGGTTGCTTTAA TTTCTCCGGAAAAAACTTTTCTTTAAACA TCAGCTAGCAGAGCC-(T2A)	(Fv-L)-VDGFGDVGALES LRGNADL AYILSMEPCGHCLII NN VNFCRESGL RTRTGSNIDCEKLRRRFSSLHFMVEV KGDLTAKKMVLALLELARQDHGAL DCCVVVILSHGCQASHLQFP GAVYG TDGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGK PKLFFIQACGGGEQKDHGFEVASTSP EDESPGSNPEPDATPFQEGLRTFD rL DAISSLPTPSDIFVSYSTFP GFVSWR DPKSGSWYVETLDDIFEQWAHSED LQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCF NFLRKKLFFKTSASRA-(T2A)

10

20

30

40

【表 6 - 2 0】

Fv-iCASP9 L329K-T2A	配列番号80	配列番号81
	(Fv-L)-GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGT GCTCTTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGA TTTGGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTG TGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAA CTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCG CACTGGCTCCAACATCGACTGTGAGAAAGTT GCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTTAT GGTGGAGGTGAAGGGCGACCTGACTGCC AAGAAAATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCT GGCGCGGCAGGACCACGGTGCTCTGGACT GCTGCGTGGTGGTCATTCTCTCTCACGGCT GTCAGGCCAGCCACCTGCAGTTCCCAGGG GCTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGT GTCGGTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCA ATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGG AAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGGCCTGT GGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGTTTG AGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAG TCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGC CACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTT CGACCAGaaGGACGCCATATCTAGTTTGCC CACACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTC TACTTTCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGA CCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGA CCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCT CACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTT AGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAAAGG GATTTATAAACAGATGCCTGGTTGCTTTAA TTTCTCCGGAAAAAACTTTTCTTTAAAACA TCAGCTAGCAGAGCC	(Fv-L)-VDGFGDVGALES LRGNADL AYILSMEPCGHCLINNVNFCRESGL RTRTGSNIDCEKLRFRFSSLHFMVEV KGDLTAKKMVLALLELARQDHGAL DCCVVVILSHGCQASHLQFPGAVYG TDGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGK PKLFFIQACGGEQKDHGFEVASTSP EDESPGSNPEPDATPFQEGLRTFDQ kDAISSLPTSDIFVSYSTFPGFVSWR DPKSGSWYVETLDDIFEQWAHSED LQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCF NFLRKKLFFKTSASRA

10

20

30

40

【表 6 - 2 1】

Fv-iCASP9 L329E-T2A	配列番号82	配列番号83
	(Fv-L)-GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGT GCTCTTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGA TTTGGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTG TGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAA CTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCG CACTGGCTCCAACATCGACTGTGAGAAGTT GCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTTCA GGTGGAGGTGAAGGGCGACCTGACTGCC AAGAAAATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCT GGCGCGGCAGGACCACGGTGCTCTGGACT GCTGCGTGGTGGTCATTCTCTCACGGCT GTCAGGCCAGCCACCTGCAGTTCCCAGGG GCTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGT GTCGGTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCA ATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGG AAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGGCCTGT GGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGTTTG AGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAG TCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGC CACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTT CGACCAGgaGGACGCCATATCTAGTTTGCC CACACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTC TACTTTCCCAGGTTTTGTTTCTGGAGGGA CCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGA CCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCT CACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTT AGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAAAGG GATTATAAACAGATGCCTGGTTGCTTTAA TTTCTCCGGAAAAAACTTTTCTTTAAACA TCAGCTAGCAGAGCC-(T2A)	(Fv-L)-VDGFGDVGALESRLGNADL AYILSMEPCGHCLIINNPNFCRESGL RTRTGSNIDCEKLRRRFSSLHFMVEV KGDLTAKKMVLALLELARQDHGAL DCCVVVILSHGCQASHLQFPGAVYG TDGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGK PKLFFIQACGGEQKDHGFEVASTSP EDESPGSNPEPDATPFQEGLRTFDQ eDAISSLPTPSDIFVSYSTFPGFVSWR DPKSGSWYVETLDDIFEQWAHSED LQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCF NFLRKKLFFKTSASRA-(T2A)

10

20

30

40

【表 6 - 2 2】

Fv-iCASP9 L329G-T2A	配列番号84	配列番号85
	GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTT GAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGC TTACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCA CTGCCTCATTATCAACAATGTGAACCTCTG CCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTG GCTCCAACATCGACTGTGAGAAGTTGCGG CGTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTTCATGGTG GAGGTGAAGGGCGACCTGACTGCCAAGA AAATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCTGGCG CGGCAGGACCACGGTGCTCTGGACTGCTG CGTGGTGCTCATTCTCTCTCACGGCTGTCA GGCCAGCCACCTGCAGTTCCCAGGGGCTG TCTACGGCACAGATGGATGCCCTGTGTCG GTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCAATGG GACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGGAAGC CCAAGCTCTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTG GGGAGCAGAAAGACCATGGGTTTGAGGT GGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCC TGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCCACCC CGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGAC CAGggcGACGCCATATCTAGTTTGCCACA CCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTT TCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCCA AGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTG GACGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCT GAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTC GCTAATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTAT AAACAGATGCCTGGTTGCTTTAATTCCTC CGGAAAAAACTTTTCTTTAAACATCAGCT AGCAGAGCC	VDGFGDVGALES LRGNADLAYILSM EPCGHCLIINN VNF CREGLRTRTGS NIDCEKLR RRFSSLHFMVEVKGDLT AKKMVLALLELARQDHGALDCCVV VILSHGCQASHLQFP GAVYGT DGCP VSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFI QACGGEQKDHGF EVASTSPEDESP GSNPEPDATPFQEG LRFTDQgDAIS SLPTPSDIFVSYSTFP GFVSWRDPKS GSWYVETLDDIFEQWAHSEDLQSL LRVANAVSVKGIYQMPGCFNFLRK KLFFKTSASRA

10

20

30

40

【表 6 - 2 3】

Fv-L-カスパーゼ9 D330A-T2A	配列番号86	配列番号87
	(Fv-L)-GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGT GCTCTTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGA TTTGGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTG TGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAA CTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCG CACTGGCTCCAACATCGACTGTGAGAAAGTT GCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTTCT GGTGGAGGTGAAGGGCGACCTGACTGCC AAGAAAATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCT GGCGCGGCAGGACCACGGTGCTCTGGACT GCTGCGTGTTGGTCACTTCTCTCACGGCT GTCAGGCCAGCCACCTGCAGTCCCAGGG GCTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGT GTCGGTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCA ATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGG AAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGGCCTGT GGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGTTTG AGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAG TCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGC CACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTT CGACCAGCTG Gc CGCCATATCTAGTTTGCC CACACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTC TACTTTCCAGGTTTTGTTTCTGGAGGGA CCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGA CCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCT CACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTT AGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAAAGG GATTTATAAACAGATGCCTGGTTGCTTTAA TTTCTCCGGAAAAAACTTTTCTTTAAACA TCAGCTAGCAGAGCC-(T2A)	(Fv-L)-VDGFGDVGALSLRGNADL AYILSMEPCGHCLINNPNFCRESGL RTRTGSNIDCEKLRRRFSS LHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAR QDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQ FPGAVYGTGDC PVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFF IQACGGGEQKDHGFEVASTSPEDESP GSNPEPDA TPFQEGRLRTFDQLaAISSLPTPSDIFV SYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLD DIFEQWAH SEDLSLLLRVANAVSVKGIYKQMP GCFNFLRKKLFFKTSASRA-(T2A)

10

20

30

40

【表 6 - 2 4】

Fv-L-カスパーゼ9 D330E-T2A	配列番号88	配列番号89
	(Fv-L)-GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGT GCTCTTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGA TTTGGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTG TGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAA CTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCG CACTGGCTCCAACATCGACTGTGAGAAAGTT GCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTTCAT GGTGGAGGTGAAGGGCGACCTGACTGCC AAGAAAATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCT GGCGCGGCAGGACCACGGTGCTCTGGACT GCTGCGTGGTGGTCATTCTCTCTCACGGCT GTCAGGCCAGCCACCTGCAGTCCCAGGG GCTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGT GTCGGTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCA ATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGG AAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGGCCTGT GGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGTTTG AGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAG TCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGC CACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTT CGACCAGCTGGC CG CCATATCTAGTTTGCC CACACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTC TACTTTCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGA CCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGA CCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCT CACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTT AGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAAAGG GATTTATAAACAGATGCCTGGTTGCTTTAA TTTCTCCGGAAAAAACTTTTCTTTAAAACA TCAGCTAGCAGAGCC-(T2A)	(Fv-L)-VDGFGDVGALSLRGNADL AYILSMEPCGHCLIINNPNFCRESGL RTRTGSNIDCEKLRRRFSS LHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAR QDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQ FPGAVYGTGDC PVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFF IQACGGGEQKDHGFEVASTSPEDESP GSNPEPDA TPFQEGLRTFDQLeAISSLPTPSDIFV SYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLD DIFEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMP GCFNFLRKKLFFKTSASRA-(T2A)

10

20

30

40

【表 6 - 2 5】

Fv-L-カスパーゼ9 D330N-T2A	配列番号90	配列番号91
	(Fv-L)-GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGT GCTCTTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGA TTTGGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTG TGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAA CTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCG CACTGGCTCCAACATCGACTGTGAGAAGTT GCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTTAT GGTGGAGGTGAAGGGCGACCTGACTGCC AAGAAAATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCT GGCGCGGCAGGACCACGGTGCTCTGGACT GCTGCGTGGTGGTCATTCTCTCTCACGGCT GTCAGGCCAGCCACCTGCAGTCCCAGGG GCTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGT GTCGGTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCA ATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGG AAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGGCCTGT GGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGTTTG AGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAG TCCCCTGGCAGTAACCCGAGCCAGATGC CACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTT CGACCAGCTGGcCGCCATATCTAGTTTGCC CACACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTC TACTTTCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGA CCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGA CCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCT CACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTT AGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAAAGG GATTTATAAACAGATGCCTGGTTGCTTTAA TTTCTCCGGAAAAAACTTTTCTTTAAACA TCAGCTAGCAGAGCC-(T2A)	(Fv-L)-VDGFGDVGALES LRGNADL AYILSMEPCGHCLINNVNFCRESGL RTRTGSNIDCEKLR RRFSS LHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAR QDHGALDCCVVVILSHGCCQASHLQ FPGAVYGT DGC PVSVEKIVNIFNGTSCPSLGKPKLFF IQACGGEQKD HGFVASTSPEDESP GSNPEPDA TPFQEGLRTFDQLnAISSLPTPSDIFV SYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLD DIFEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMP GCFNFLRKKLFFKTSASRA-(T2A)

10

20

30

40

【表 6 - 2 6】

Fv-L-カスパーゼ9 D330V-T2A	配列番号92	配列番号93	10
	(Fv-L)-GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGT GCTCTTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGA TTTGGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTG TGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAA CTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCG CACTGGCTCCAACATCGACTGTGAGAAGTT GCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTTAT GGTGGAGGTGAAGGGCGACCTGACTGCC AAGAAAATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCT GGCGCGGCAGGACACGGTGCTCTGGACT GCTGCGTGTTGGTTCATTCTCTCACGGCT GTCAGGCCAGCCACCTGCAGTTCCCAGGG GCTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGT GTCGGTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCA ATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGG AAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGGCCTGT GGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGTTTG AGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAG TCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGC CACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTT CGACCAGCTG Gc CGCCATATCTAGTTTGCC CACACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTC TACTTTCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGA CCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGA CCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCT CACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTT AGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAAAGG GATTTATAAACAGATGCCTGGTTGCTTTAA TTTCTCCGGAATAAATTTTCTTTAAACA TCAGCTAGCAGAGCC-(T2A)	(Fv-L)-VDGFGDVGALESRLGNADL AYILSMEPCGHCLINNVNFCRESGL RTRTGSNIDCEKLRRRFSS LHFMEVKGDLTAKKMVLALLELAR QDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQ FPGAVYGTGDC PVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFF IQACGGEQKDHGFEVASTSPEDESP GSNPEPDA TPFQEGLRTFDQL lv AISSLPTPSDIFV SYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLD DIFEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMP GCFNFLRKKLFFKTSASRA-(T2A)	20
			30
			40

【表 6 - 2 7】

Fv-L-カスパーゼ9 D330G-T2A	配列番号94	配列番号95
	(Fv-L)-GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGT GCTCTTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGA TTTGGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTG TGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAA CTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCG CACTGGCTCCAACATCGACTGTGAGAAGTT GCGGCGTGCCTTCTCCTCGCTGCATTTCA GGTGGAGGTGAAGGGCGACCTGACTGCC AAGAAAATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCT GGCGCGGCAGGACCACGGTCTGCTGGACT GCTGCGTGGTGGTCATTCTCTCACGGCT GTCAGGCCAGCCACCTGCAGTTCCCAGGG GCTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGT GTCGGTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCA ATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGG AAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGGCCTGT GGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGTTTG AGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAG TCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGC CACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTT CGACCAGCTGG Gc CGCCATATCTAGTTTGCC CACACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTC TACTTTCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGA CCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGA CCCTGGACGACATCTTGAGCAGTGGGCT CACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTT AGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAAAGG GATTTATAAACAGATGCCTGGTTGCTTTAA TTTCTCCGGAATAAATCTTTCTTTAAACA TCAGCTAGCAGAGCC-(T2A)	(Fv-L)-VDGFGDVGALES LRGNADL AYILSMEPCGHCLINNVNFCRESGL RTRTGSNIDCEKLRFRFSS LHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAR QDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQ FPGAVYGTGDC PVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFF IQACGGEQKDHGFEVASTSPEDESP GSNPEPDA TPFQEGLRTFDQL g AISSLPTPSDIFV SYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLD DIFEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMP GCFNFLRKKLFFKTSASRA-(T2A)

10

20

30

40

【表 6 - 2 8】

Fv-L-カスパーゼ9 D330S-T2A	配列番号96	配列番号97
	(Fv-L)-GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGT GCTCTTGAGAGTTTGGAGGGAAATGCAGA TTTGGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTG TGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAA CTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCG CACTGGCTCCAACATCGACTGTGAGAAGTT GCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTTCAT GGTGGAGGTGAAGGGCGACCTGACTGCC AAGAAAATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCT GGCGCGGCAGGACCACGGTGCTCTGGACT GCTGCGTGGTGGTCATTCTCTCTCACGGCT GTCAGGCCAGCCACCTGCAGTTCCCAGGG GCTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGT GTCGGTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCA ATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGG AAGCCCAAGCTCTTTTTTCATCCAGGCCTGT GGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGTTTG AGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAG TCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGC CACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTT CGACCAGCTGGcCGCCATATCTAGTTTGCC CACACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTC TACTTTCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGA CCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGA CCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCT CACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTT AGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAAAGG GATTTATAAACAGATGCCTGGTTGCTTTAA TTTCCTCCGAAAAAACTTTTCTTTAAAACA TCAGCTAGCAGAGCC-(T2A)	(Fv-L)-VDGFGDVGALSLRGNADL AYILSMEPCGHCLINNPNFCRESGL RTRTGSNIDCEKLRRRFSS LHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAR QDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQ FPGAVYGTGDC PVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFF IQACGGGEQKDHGFEVASTSPEDESP GSNPEPDA TPFQEGLRTFDQLsAISSLPTPSDIFV SYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLD DIFEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMP GCFNFLRKKLFFKTSASRA-(T2A)

10

20

30

40

【表 6 - 2 9】

Fv-iCASP9 A331K-T2A	配列番号98	配列番号99
	(Fv-L)-GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGT GCTCTTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGA TTTGGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTG TGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAA CTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCG CACTGGCTCCAACATCGACTGTGAGAAGTT GCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTTCA GGTGGAGGTGAAGGGCGACCTGACTGCC AAGAAAATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCT GGCGCGGCAGGACCACGGTGCTCTGGACT GCTGCGTGGTGGTCATTCTCTCTCACGGCT GTCAGGCCAGCCACCTGCAGTTCCCAGGG GCTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGT GTCGGTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCA ATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGG AAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGGCCTGT GGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGTTTG AGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAG TCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGC CACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTT CGACCAGCTGGACaagATATCTAGTTTGCC CACACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTC TACTTTCCCAGGTTTTGTTTCTGGAGGGA CCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGA CCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCT CACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTT AGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAAAGG GATTTATAAACAGATGCCTGGTTGCTTTAA TTTCTCCGGAAAAAACTTTCTTTAAACA TCAGCTAGCAGAGCC-(T2A)	(Fv-L)-VDGFGDVGALES LRGNADL AYILSMEPCGHCLII NNVNFCRESGL RTRTGSNIDCEKLR RFSSLFHFMVEV KGDLTAKKMVLALLELARQDHGAL DCCVVVILSHGCQASHLQFPGAVYG TDGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGK PKLFFIQACGGEQKD HGFVASTSP EDES PGSNPEPDATPFQEGLRTFDQ LDkISSLPTSDIFVSYSTFP GFVSWR DPKSGSWYVETLDDIFEQWAHSED LQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCF NFLRKKLFFKTSASRA-(T2A)

10

20

30

40

【表 6 - 3 0】

Fv-L-iカスパーゼ9 F404Y-T2A	配列番号100	配列番号101
	(Fv-L)-GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGT GCTCTTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGA TTTGGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTG TGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAA CTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCG CACTGGCTCCAACATCGACTGTGAGAAAGTT GCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTTCAT GGTGGAGGTGAAGGGCGACCTGACTGCC AAGAAAATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCT GGCGCGGCAGGACCACGGTGCTCTGGACT GCTGCGTGGTGGTCATTCTCTCTCACGGCT GTCAGGCCAGCCACCTGCAGTCCCAGGG GCTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGT GTCGGTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCA ATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGG AAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGGCCTGT GGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGTTTG AGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAG TCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGC CACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTT CGACCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCC CACACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTC TACTTTCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGA CCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGA CCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCT CACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTT AGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAAAGG GATTTATAAACAGATGCCTGGTTGCTaTAA TTTCTCCGGAAAAAACTTTTCTTTAAACA TCAGCTAGCAGAGCC-(T2A)	(Fv-L)-VDGFGDVGALES LRGNADL AYILSMEPCGHCLIINN VNFRESGL RTRTGSNIDCEKLRRRFSS LHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAR QDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQ FPGAVYGT DGC PVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFF IQACGGGEQKDHGF EVASTSPEDESP GSNPEPDA TPFQEGLRTFDQLDAISSLPTPSDIFV SYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLD DIFEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMP GCyNFLRKKLFFKTSASRA-(T2A)

10

20

30

40

【表 6 - 3 1】

Fv-L-iCASP9 F404W-T2A	配列番号102	配列番号103	10
	(Fv-L)-GTCGACGGATTTGGTGATGTCCGGT GCTCTTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGA TTTGGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTG TGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAA CTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCG CACTGGCTCCAACATCGACTGTGAGAAGTT GCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTTCAT GGTGGAGGTGAAGGGCGACCTGACTGCC AAGAAAATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCT GGCGCGGCAGGACCACGGTGCTCTGGACT GCTGCGTGTTGGTGCTATTCTCTCACGGCT GTCAGGCCAGCCACCTGCAGTTCCCAGGG GCTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGT GTCGGTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCA ATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGG AAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGGCCTGT GGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGTTTG AGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAG TCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGC CACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTT CGACCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCC CACACCCAGTGACATCTTTGTGTCTACTC TACTTTCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGA CCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGA CCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCT CACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTT AGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAAAGG GATTTATAAACAGATGCCTGGTTGCT TggAA TTTCCTCCGGAATAAACTTTTCTTTAAACA TCAGCTAGCAGAGCC-(T2A)	(Fv-L)-VDGFGDVGALSLRGNADL AYILSMEPCGHCLINNVNFCRESGL RTRTGSNIDCEKLRRRFSS LHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAR QDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQ FPGAVYGTGDC PVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFF IQACGGEQKDHGFEVASTSPEDESP GSNPEPDA TPFQEGLRTFDQLDAISSLPTPSDIFV SYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLD DIFEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMP GC w NFLRKKLFFKTSASRA-(T2A)	20
			30
			40

【表 6 - 3 2】

Fv-L-iカスパーゼ9 N405Q-T2A	配列番号104	配列番号105
	(Fv-L)-GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGT GCTCTTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGA TTTGGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTG TGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAA CTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCG CACTGGCTCCAACATCGACTGTGAGAAGTT GCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTTCT GGTGGAGGTGAAGGGCGACCTGACTGCC AAGAAAATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCT GGCGCGGCAGGACCACGGTGCTCTGGACT GCTGCGTGGTGGTCATTCTCTCACGGCT GTCAGGCCAGCCACCTGCAGTCCCAGGG GCTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGT GTCGGTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCA ATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGG AAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGGCCTGT GGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGTTTG AGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAG TCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGC CACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTT CGACCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCC CACACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTC TACTTTCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGA CCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGA CCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCT CACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTT AGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAAAGG GATTTATAAACAGATGCCTGGTTGCTTT cag TTCCTCCGGAAAAAATTTTCTTTAAACAT CAGCTAGCAGAGCC-(T2A)	(Fv-L)-VDGFGDVGALESRLGNADL AYILSMEPCGHCLIINNPNFCRESGL RTRTGSNIDCEKLRRRFSS LHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAR QDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQ FPGAVYGTGDC PVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFF IQACGGEQKDHGFEVASTSPEDESP GSNPEPDA TPFQEGRLTFDQLDAISSLPTPSDIFV SYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLD DIFEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMP GCF q FLRKKLFFKTSASRA-(T2A)

10

20

30

40

【表 6 - 3 3】

Fv-L-iカスパーゼ9 N405Qコドン最適 化-T2A	配列番号106	配列番号107
	-(Fv-L)-GTGGACGGGTTTGGAGATGTGGG AGCCCTGGAATCCCTGCGGGGCAATGCCG ATCTGGCTTACATCCTGTCTATGGAGCCTT GCGGCCACTGTCTGATCATTAAACAATGTGA ACTTCTGCAGAGAGAGCGGGCTGCGGACC AGAACAGGATCCAATATTGACTGTGAAAA GCTGCGGAGAAGGTTCTCTAGTCTGCACTT TATGGTCGAGGTGAAAGGCGATCTGACCG CTAAGAAAATGGTGCTGGCCCTGCTGGAA CTGGCTCGGCAGGACCATGGGGCACTGGA TTGCTGCGTGGTCGTGATCCTGAGTCACG GCTGCCAGGCTTCACATCTGCAGTTCCTG GGGCAGTCTATGGAAGTACGGCTGTCCA GTCAGCGTGGAGAAGATCGTGAACATCTT CAACGGCACCTCTTGCCCAAGTCTGGGCG GGAAGCCCAAAGTGTCTTTATTCAGGCCT GTGGAGGCGAGCAGAAAGATCACGGCTTC GAAGTGGCTAGCACCTCCCCGAGGACGA ATCACCTGGAAGCAACCCTGAGCCAGATG CAACCCCTTCCAGGAAGGCCTGAGGACA TTTGACCAGCTGGATGCCATCTCAAGCCTG CCCACACCTTCTGACATTTTCGTCTCTTACA GTACTTTCCCTGGATTTGTGAGCTGGCGCG ATCCAAAGTCAGGCAGCTGGTACGTGGAG AACTGGACGATATCTTTGAGCAGTGGGC CCATTCTGAAGACCTGCAGAGTCTGCTGCT GCGAGTGGCCAATGCTGTCTCTGTGAAGG GGATCTACAAACAGATGCCAGGATGCTTCC ag TTTCTGAGAAAGAAAGTGTCTTTAAGA CCTCCGCATCTAGGGCC-(T2A)	(Fv-L)-VDGFGDVGALESIRGNADL AYILSMEPCGHCLINNVNFCRESGL RTRTGSNIDCEKLRRRFSS LHFMMVEVKGDLTAKKMVLALLELAR QDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQ FPGAVYGTGDC PVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFF IQACGGEQKDHGFEVASTSPEDESP GSNPEPDA TPFQEGLRTFDQLDAISSLPTPSDIFV SYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLD DIFEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYQMP GCF q FLRKKLFFKTSASRA-(T2A)

10

20

30

40

【表 6 - 3 4】

Fv-iCASP9 F406L-T2A	配列番号108	配列番号109
	(Fv-L)-GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGT GCTCTTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGA TTTGGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTG TGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAA CTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCG CACTGGCTCCAACATCGACTGTGAGAAAGTT GCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTTCA GGTGGAGGTGAAGGGCGACCTGACTGCC AAGAAAATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCT GGCGCGGCAGGACCACGGTGCTCTGGACT GCTGCGTGGTGGTCATTCTCTCTCACGGCT GTCAGGCCAGCCACCTGCAGTTCCCAGGG GCTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGT GTCGGTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCA ATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGG AAGCCCAAGCTCTTTTTTTCATCCAGGCCTGT GGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGTTTG AGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAG TCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGC CACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTT CGACCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCC CACACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTC TACTTTCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGA CCCCAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGA CCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCT CACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTT AGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAAAGG GATTTATAAACAGATGCCTGGTTGCTTTAA TcTCCTCCGGAAAAAACTTTTCTTTAAACA TCAGCTAGCAGAGCC-(T2A)	(Fv-L)-VDGFGDVGALES LRGNADL AYILSMEPCGHCLINN VNFCRESGL RTRTGSNIDCEKLRRRFSSLHFMVEV KGDLTAKKMVLALLELARQDHGAL DCCVVVILSHGCQASHLQFPGAVYG TDGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGK PKLFFIQACGGEQKDHGFVASTSP EDESPGSNPEPDATPFQEGRLTFDQ LDAISSLPTSDIFVSYSTFPGFVSWR DPKSGSWYVETLDDIFEQWAHSED LQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCF NLLRKKLFFKTSASRA-(T2A)

10

20

30

40

【表 6 - 3 5】

Fv-iCASP9 F406T-T2A	配列番号110	配列番号111
	(Fv-L)-GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGT GCTCTTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGA TTTGGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTG TGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAA CTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCG CACTGGCTCCAACATCGACTGTGAGAAGTT GCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTTCT GGTGGAGGTGAAGGGCGACCTGACTGCC AAGAAAATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCT GGCGCGGCAGGACCACGGTGCTCTGGACT GCTGCGTGGTGGTCATTCTCTCTCACGGCT GTCAGGCCAGCCACCTGCAGTCCCAGGG GCTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGT GTCGGTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCA ATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGG AAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGGCCTGT GGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGTTTG AGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAG TCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGC CACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTT CGACCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCC CACACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTC TACTTTCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGA CCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGA CCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCT CACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTT AGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAAAGG GATTTATAAACAGATGCCTGGTTGCTTTAA ttc CCTCCGGAAAAAACTTTTCTTTAAACA TCAGCTAGCAGAGCC-(T2A)	(Fv-L)-VDGFGDVGALES LRGNADL AYILSMEPCGHCLINNVNFCRESGL RTRTGSNIDCEKLRRRFSSLHFMVEV KGDLTAKKMVLALLELARQDHGAL DCCVVVILSHGCQASHLQFPGAVYG TDGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGK PKLFFIQACGGEQKDHGFEVASTSP EDESPGSNPEPDATPFQEGRLRTFDQ LDAISSLPTSDIFVSYSTFPGFVSWR DPKSGSWYVETLDDIFEQWAHSED LQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCF N LRKKLFFKTSASRA-(T2A)

10

20

30

40

【表 6 - 3 6】

Fv-L-iカスパーゼ9 S144A N405Q-T2A、 コドン最適化	配列番号112 (Fv-L)-GTGGACGGGTTTGGAGATGTGGGA GCCCTGGAAGCCCTGCGGGGCAATGCCGA TCTGGCTTACATCCTGTCTATGGAGCCTTG CGGCCACTGTCTGATCATTAAACAATGTGAA CTTCTGCAGAGAGAGCGGGCTGCGGACCA GAACAGGATCCAATATTGACTGTGAAAAG CTGCGGAGAAGGTTCTCTAGTCTGCACTTT ATGGTCGAGGTGAAAGGCGATCTGACCGC TAAGAAAATGGTGCTGGCCCTGCTGGAAC TGGCTCGGCAGGACCATGGGGCACTGGAT TGCTGCGTGGTCGTGATCCTGAGTCACGG CTGCCAGGCTTCACATCTGCAGTTCCTGG GGCAGTCTATGGAAGTACGCGCTGTCCAG TCAGCGTGGAGAAGATCGTGAACATCTTC AACGGCACCTCTTGCCCAAGTCTGGGCGG GAAGCCCAAACTGTTCTTTATTAGGCCTG TGGAGGCGAGCAGAAAGATCACGGCTTCG AAGTGGCTAGCACCTCCCCGAGGACGAA TCACCTGGAAGCAACCCTGAGCCAGATGC AACCCCTTCCAGGAAGGCCTGAGGACAT TTGACCAGCTGGATGCCATCTCAAGCCTGC CCACACCTTCTGACATTTTCGTCTCTTACAG TACTTTCCTGGATTTGTGAGCTGGCGCGA TCCAAAGTCAGGCAGCTGGTACGTGGAGA CACTGGACGATATCTTTGAGCAGTGGGCC CATTCTGAAGACCTGCAGAGTCTGCTGCTG CGAGTGGCCAATGCTGTCTCTGTGAAGGG GATCTACAAACAGATGCCAGGATGCTTca gTTTCTGAGAAAGAACTGTTCTTTAAGAC CTCCGCATCTAGGGCC-(T2A)	配列番号113 (Fv-L)-VDGFGDVGALEaLRGNADL AYILSMEPCGHCLIINNPNFCRESGL RTRTGSNIDCEKLRRRFSS LHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAR QDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQ FPGAVYGTGDC PVSVEKIVNIFNGTSCPSLGKPKLFF IQACGGEQKDHGFEVASTSPEDESP GSNPEPDA TPFQEGRLRTFDQLDAISSLPTPSDIFV SYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLD DIFEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYQMP GCFqFLRKKLFFKTSASRA-(T2A)	10 20 30 40
---	--	--	---

【表 6 - 3 7】

Fv-iCASP9 S144A D330A -T2A	配列番号114	配列番号115
	(Fv-L)-GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGT GCTCTTGAG gc TTTGAGGGGAAATGCAGA TTTGGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTG TGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAA CTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCG CACTGGCTCCAACATCGACTGTGAGAAAGTT GCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTTCAT GGTGGAGGTGAAGGGCGACCTGACTGCC AAGAAAATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCT GGCGCGGCAGGACCACGGTGCTCTGGACT GCTGCGTGGTGGTCATTCTCTCTCACGGCT GTCAGGCCAGCCACCTGCAGTTCCCAGGG GCTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGT GTCGGTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCA ATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGG AAGCCCAAGCTCTTTTTTCATCCAGGCCTGT GGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGTTTG AGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAG TCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGC CACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTT CGACCAGCTG Gc CGCCATATCTAGTTTGCC CACACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTC TACTTTCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGA CCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGA CCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCT CACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTT AGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAAAGG GATTTATAAACAGATGCCTGGTTGCTTTAA TTTCCTCCGGAAAAAACTTTTCTTTAAACA TCAGCTAGCAGAGCC-(T2A)	(Fv-L)-VDGFGDVGALE a LRGNADL AYILSMEPCGHCLIINNPNFCRESGL RTRTGSNIDCEKLRRRFSSLHFMVEV KGDLTAKKMVLALLELARQDHGAL DCCVVVILSHGCQASHLQFPGAVYG TDGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGK PKLFFIQACGGEQKDHGFVASTSP EDESPPGSNPEPDATPFQEGRLTFDQ La AISSLPTPSDIFVSYSTFPGFVSWR DPKSGSWYVETLDDIFEQWAHSED LQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCF NFLRKKLFFKTSASRA

10

20

30

40

【表 6 - 3 8】

Fv-iCASP9 S144D D330A-T2A	配列番号116	配列番号117
	(Fv-L)-GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGT GCTCTTGAG gac TTGAGGGGAAATGCAGA TTTGGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTG TGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAA CTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCG CACTGGCTCCAACATCGACTGTGAGAAGTT GCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTTCAT GGTGGAGGTGAAGGGCGACCTGACTGCC AAGAAAATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCT GGCGCGGCAGGACCACGGTGCTCTGGACT GCTGCGTGGTGGTCATTCTCTCTCACGGCT GTCAGGCCAGCCACCTGCAGTTCCCAGGG GCTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGT GTCGGTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCA ATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGG AAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGGCCTGT GGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGTTTG AGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAG TCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGC CACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTT CGACCAGCTG Gc CGCCATATCTAGTTTGCC CACACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTC TACTTTCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGA CCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGA CCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCT CACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTT AGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAAAGG GATTTATAAACAGATGCCTGGTTGCTTTAA TTTCCTCCGGAAAAAACTTTTCTTTAAAACA TCAGCTAGCAGAGCC-(T2A)	(Fv-L)-VDGFGDVGALE d LRGNADL AYILSMEPCGHCLIINNPNFCRESGL RTRTGSNIDCEKLRFRFSSLHFMVEV KGDLTAKKMLLALLELARQDHGAL DCCVVVILSHGCQASHLQFPGAVYG TDGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGK PKLFFIQACGGGEQKDGHGFEVASTSP EDES PGSNPEPDATPFQEGRLRTFDQ La AISSLPTPSDIFVSYSTFPGFVSWR DPKSGSWYVETLDDIFEQWAHSED LQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCF NFLRKKLFFKTSASRA

10

20

30

40

【表 6 - 3 9】

Fv-iCASP9 S196A D330A-T2A	配列番号118	配列番号119
	(Fv-L)-GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGT GCTCTTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGA TTTGGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTG TGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAA CTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCG CACTGGCTCCAACATCGACTGTGAGAAGTT GCGGCGTCGCTTCTCC gCG CTGCATTTCTAT GGTGGAGGTGAAGGGCGACCTGACTGCC AAGAAAATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCT GGC GCGGCAGGACACGGTGCTCTGGACT GCTGCGTGGTGGTCATTCTCTCTCACGGCT GTCAGGCCAGCCACCTGCAGTTCACAGGG GCTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGT GTCGGTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCA ATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGG AAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGGCCTGT GGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGTTTG AGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAG TCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGC CACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTT CGACCAGCTG GcCG CCATATCTAGTTTGCC CACACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTC TACTTTCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGA CCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGA CCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCT CACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTT AGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAAAGG GATTTATAAACAGATGCCTGGTTGCTTTAA TTTCTCCGGAAAAAACTTTTCTTTAAACA TCAGCTAGCAGAGCC-(T2A)	(Fv-L)-VDGFGDVGALES LRGNADL AYILSMEPCGHCLINNVNFCRESGL RTRTGSNIDCEKLRRRFS a LHFMVE VKGDLTAKKMVLALLELARQDHGA LDCCVVVILSHGCQASHLQFPGAVY GTDGCVPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGG KPKLFFIQACGGEQKD HGF EVASTS PEDESPGSNPEPDATPFQEGRLRTFD QL a AISSLPTSDIFVSYSTFPGFVSW RDPKSGSWYVETLDDIFEQWAHSE DLQSLLLRVANAVSVKGIYQMPPGC FNFLRKKLFFKTSASRA-(T2A)

10

20

30

40

【表 6 - 4 0】

Fv-iCASP9 S196D D330A-T2A	配列番号120	配列番号121	10
	(Fv-L)-GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGT GCTCTTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGA TTTGGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTG TGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAA CTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCG CACTGGCTCCAACATCGACTGTGAGAAGTT GCGGCGTCGCTTCTCC gac CTGCATTTCATG GTGGAGGTGAAGGGCGACCTGACTGCCA AGAAAATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCTG GCGCGGCAGGACCACGGTGCTCTGGACTG CTGCGTGGTGGTCATTCTCTCACGGCTG TCAGGCCAGCCACCTGCAGTCCCAGGGG CTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGTGT CGGTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCAAT GGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGGA AGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGGCCTGTG GTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGTTTGA GGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAGTC CCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCCA CCCC GTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTC GACCAGCTG Gc CGCCATATCTAGTTTGCCC ACACCCAGTGACATCTTTGTGCCTACTCT ACTTTCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGAC CCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGAC CCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCTC ACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTTA GGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAAAGGG ATTTATAAACAGATGCCTGGTTGCTTTAAT TTCCTCCGGAACAAAACTTTCTTTAAACAT CAGCTAGCAGAGCC-(T2A)	(Fv-L)-VDGFGDVGALES LRGNADL AYILSMEPCGHCLIIINN VNF CRESGL RTRTGSNIDCEKLRRRFS d LHFMVE VKGDLTAKKMVLALLELARQDHGA LDCCVVVILSHGCQASHLQFPGAVY GTDGC PVSVEKIVNIFNGTSCPSLGG KPKLFFIQACGGEQKD HGF E VASTS PEDESPGSNPEPDATPFQEGLRTFD QL a AISSLPTSDIFVSYSTFPGFVSW RDPKSGSWYVETLDDIFEQWAHSE DLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGC FNFLRKKLFFKTSASRA-(T2A)	20
			30
			40

【表 6 - 4 1】

Fv-L-iカスパーゼ9 T317S N405Q-T2A、 コドン最適化	配列番号122	配列番号123
	(Fv-L)-GTGGACGGGTTTGGAGATGTGGGA GCCCTGGAATCCCTGCGGGCAATGCCGA TCTGGCTTACATCCTGTCTATGGAGCCTTG CGGCCACTGTCTGATCATTAACAATGTGAA CTTCTGCAGAGAGAGCGGGCTGCGGACCA GAACAGGATCCAATATTGACTGTGAAAAG CTGCGGAGAAGGTTCTCTAGTCTGCACTTT ATGGTCGAGGTGAAAGGCGATCTGACCGC TAAGAAAATGGTGCTGGCCCTGCTGGAAC TGGCTCGGCAGGACCATGGGGCACTGGAT TGCTGCGTGGTCGTGATCCTGAGTCACGG CTGCCAGGCTTCACATCTGCAGTTCCTGG GGCAGTCTATGGAAGTACGCGCTGTCCAG TCAGCGTGGAGAAGATCGTGAACATCTTC AACGGCACCTCTTGCCCAAGTCTGGGCGG GAAGCCCAAAGTCTTTATTTCAGGCCTG TGGAGGCGAGCAGAAAGATCACGGCTTCG AAGTGGCTAGCACCTCCCCGAGGACGAA TCACCTGGAAGCAACCCTGAGCCAGATGC AAg CCCCTTCAGGAAGGCCTGAGGACAT TTGACCAGCTGGATGCCATCTCAAGCCTGC CCACACCTTCTGACATTTTCGTCTCTTACAG TACTTCCCTGGATTTGTGAGCTGGCGCGA TCCAAAGTCAGGCAGCTGGTACGTGGAGA CACTGGACGATATCTTTGAGCAGTGGGCC CATTCTGAAGACCTGCAGAGTCTGCTGCTG CGAGTGGCCAATGCTGTCTCTGTGAAGGG GATCTACAAACAGATGCCAGGATGCTT ca g TTTCTGAGAAAGAAAGTCTTTAAGAC CTCCGCATCTAGGGCC-(T2A)	(Fv-L)-VDGFGDVGALES LRGNADL AYILSMEPCGHCLINN NVNFCRESGL RTRTGSNIDCEKLR RRFSS LHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAR QDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQ FPGAVYGT DGC PVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFF IQACGGEQKD HGF EAVASTSPEDESP GSNPEPDA s PFQEGLRTFDQLDAISSLPTPSDIFV SYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLD DIFEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMP GCF q FLRKKLFFKTSASRA-(T2A)

10

20

30

40

【表 6 - 4 2】

Fv-L-カスパーゼ9 D330A N405Q-T2A	配列番号124	配列番号125
	(Fv-L)-GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGT GCTCTTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGA TTTGGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTG TGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAA CTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCG CACTGGCTCCAACATCGACTGTGAGAAAGTT GCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTTCT GGTGGAGGTGAAGGGCGACCTGACTGCC AAGAAAATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCT GGCGCGGCAGGACACGGTGCTCTGGACT GCTGCGTGGTGGTCATTCTCTCTCACGGCT GTCAGGCCAGCCACCTGCAGTTCCCAGGG GCTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGT GTCGGTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCA ATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGG AAGCCCAAGCTCTTTTCTATCCAGGCCTGT GGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGTTTG AGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAG TCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGC CACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTT CGACCAGCTG Gc CGCCATATCTAGTTTGCC CACACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTC TACTTTCCCAGGTTTTGTTTCTGGAGGGA CCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGA CCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCT CACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTT AGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAAAGG GATTTATAAACAGATGCCTGGTTGCTT cag T TTCCTCCGGAAAAAACTTTCTTTAAACAT CAGCTAGCAGAGCC-(T2A)	(Fv-L)-VDGFGDVGALESIRGNADL AYILSMEPCGHCLIINNPNFCRESGL RTRTGSNIDCEKLRRRFSS LHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAR QDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQ FPGAVYGTGDC PVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFF IQACGGGEQKDHFGEVASTSPEDESP GSNPEPDA TPFQEGLRTFDQL a AISSLPTPSDIFV SYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLD DIFEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMP GCF q FLRKKLFFKTSASRA-(T2A)

10

20

30

40

【表 6 - 4 3】

Fv-iCASP9 ATPF316AVPI -T2A	配列番号126	配列番号127
	(Fv-L)-GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGT GCTCTTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGA TTTGGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTG TGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAA CTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCG CACTGGCTCCAACATCGACTGTGAGAAGTT GCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTCT GGTGGAGGTGAAGGGCGACCTGACTGCC AAGAAAATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCT GGCGCGGCAGGACCACGGTGCTCTGGACT GCTGCGTGGTGGTCATTCTCTCTCACGGCT GTCAGGCCAGCCACCTGCAGTCCCAGGG GCTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGT GTCGGTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCA ATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGG AAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGGCCTGT GGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGTTTG AGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAG TCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGC CgtgCCcaTCC AGGAAGGTTTGAGGACCTTC GACCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCC ACACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCT ACTTTCCCAGGTTTTGTTTCTGGAGGGAC CCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGAC CCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCTC ACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTTA GGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAAAGGG ATTTATAAACAGATGCCTGGTTGCTTTAAT TTCCTCCGGAAAAAATTTTCTTTAAACAT CAGCTAGCAGAGCC-(T2A)	(Fv-L)-VDGFGDVGALES LRGNADL AYILSMEPCGHCLIINN VNF CRE SGL RTRTGSNIDCEKLR RRFSSLHFMVEV KGDLTAKKMVLALLELARQDHGAL DCCVVVILSHGCQASHLQFPGAVYG TDGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGK PKLFFIQACGGEQKD HGF EVASTSP EDES PGSNPEPD AvPi QEGLRTFDQ LDAISSLPTSDIFVSYSTFP GFVSWR DPKSGSWYVETLDDIFEQWAHSED LQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCF NFLRKKLFFKTSASRA-(T2A)

10

20

30

40

【表 6 - 4 4】

Fv-iCASP9 isaqt -T2A	配列番号128	配列番号129
	(Fv-L)-GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGT GCTCTTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGA TTTGGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTG TGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAA CTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCG CACTGGCTCCAACATCGACTGTGAGAAGTT GCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTTAT GGTGGAGGTGAAGGGCGACCTGACTGCC AAGAAAATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCT GGCGCGGCAGGACCACGGTGCTCTGGACT GCTGCGTGGTGGTCATTCTCTCTCACGGCT GTCAGGCCAGCCACCTGCAGTTCCCAGGG GCTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGT GTCGGTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCA ATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGG AAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGGCCTGT GGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGTTTG AGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAG TCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGC CACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTT CGACCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCC CACACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTC TACTTTCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGA CCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGA CCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCT CACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTT AGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAAAGG GATTTATAAACAGATGCC gatatccgcacagac a CTCCGGAAAAAACTTTTCTTTAAACATC AGCTAGCAGAGCC-(T2A)	(Fv-L)-VDGFGDVGALESRLGNADL AYILSMEPCGHCLIINNPNFCRESGL RTRTGSNIDCEKLRFRSS LHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAR QDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQ FPGAVYGTGDC PVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFF IQACGGEQKDGHGFEVASTSPEDESP GSNPEPDA TPFQEGRLRTFDQLDAISSLPTPSDIFV SYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLD DIFEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYQM Pi saqt LRKKLFFKTSASRA-(T2A)

10

20

30

40

【0586】

配列番号130、 Δ Casp9（残基135～416）F406Wのヌクレオチド配列

【化 4 7】

GGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTTACATCCTG
 AGCATGGAGCCCTGTGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAACTTCTGCCGTGAGTCCGG
 GCTCCGCACCCGCACTGGCTCCAACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTTCTCCTCGC
 TGCATTTTCATGGTGGAGGTGAAGGGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTGGCTTTGCTG
 GAGCTGGCGCG_gGCAGGACCACGGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTCTCTCTCACG
 GCTGTCAGGCCAGCCACCTGCAGTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGT
 GTCGGTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGGGAAG
 CCCAAGCTCTTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGTTTGAGGTGGC
 CTCCACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCCACCCCGTTCC
 AGGAAGGTTTGAGGACCTTCGACCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCCACACCCAGTGAC
 ATCTTTGTGTCCTACTCTACTTTCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCCAAGAGTGGCTCC
 TGGTACGTTGAGACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAAGACCTGCAGTC
 CCTCCTGCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACAGATGCCTGGTTG
 CTTTAATTGGGCTCCGGAAAAAACTTTTCTTTAACTCCGGAAAAAACTTTTCTTTAAACATCA

10

配列番号 131、Δ Casp9（残基 135～416）F406Wのアミノ酸配列
 【化 4 8】

GFGDVGALES LRGNADLAYILSMEPCGHCLIIINN VNF CRESLRTRTGSNIDCEKLRRRFSSLHFM
 VEVKGDLTAKKMVLALLELARQDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQFP GAVYGT DGC PVSVEKIVNI
 FNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGEQKDHGFVASTPEDESPGSNPEPDATPFQEGLRTFDQLD
 AISSLPTPSDIFVSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDIFEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGI
 YKQMPGCFNWLRKKLFFNSGKNFSLKH

20

配列番号 132、Δ Casp9（残基 135～416）F406Yのヌクレオチド配列
 【化 4 9 - 1】

GGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTTACATCCTG
 AGCATGGAGCCCTGTGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAACTTCTGCCGTGAGTCCGG
 GCTCCGCACCCGCACTGGCTCCAACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTTCTCCTCGC
 TGCATTTTCATGGTGGAGGTGAAGGGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTGGCTTTGCTG
 GAGCTGGCGCG_gGCAGGACCACGGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTCTCTCTCACG
 GCTGTCAGGCCAGCCACCTGCAGTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGT

30

【化 4 9 - 2】

GTCGGTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGGGAAG
 CCCAAGCTCTTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGTTTGAGGTGGC
 CTCCACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCCACCCCGTTCC
 AGGAAGGTTTGAGGACCTTCGACCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCCACACCCAGTGAC
 ATCTTTGTGTCCTACTCTACTTTCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCCAAGAGTGGCTCC
 TGGTACGTTGAGACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAAGACCTGCAGTC
 CCTCCTGCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACAGATGCCTGGTTG
 CTTTAATTACCTCCGGAAAAAACTTTTCTTTAACTCCGGAAAAAACTTTTCTTTAAACATCA

40

配列番号 133、Δ Casp9（残基 135～416）F406Yのアミノ酸配列
 【化 5 0】

GFGDVGALES LRGNADLAYILSMEPCGHCLIIINN VNF CRESLRTRTGSNIDCEKLRRRFSSLHFM
 VEVKGDLTAKKMVLALLELARQDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQFP GAVYGT DGC PVSVEKIVNI
 FNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGEQKDHGFVASTPEDESPGSNPEPDATPFQEGLRTFDQLD
 AISSLPTPSDIFVSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDIFEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGI
 YKQMPGCFNYLRKKLFFNSGKNFSLKH

50

配列番号 134、Δ Casp9（残基 135～416）C403A のヌクレオチド配列
【化 51】

GGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTTACATCCTG
AGCATGGAGCCCTGTGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAACTTCTGCCGTGAGTCCGG
GCTCCGCACCCGCACTGGCTCCAACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTTCTCCTCGC
TGCATTTTCATGGTGGAGGTGAAGGGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTGGCTTTGCTG
GAGCTGGCGCG_gGCAGGACCACGGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTCTCTCACG
GCTGTCAGGCCAGCCACCTGCAGTTCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGT
GTCGGTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGGAAG
CCCAAGCTCTTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGTTTGAGGTGGC
CTCCACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCCACCCCGTTCC
AGGAAGGTTTGAGGACCTTCGACCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCCACACCCAGTGAC
ATCTTTGTGTCCTACTCTACTTTCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCCAAGAGTGGCTCC
TGGTACGTTGAGACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAAGACCTGCAGTC
CCTCCTGCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACAGATGCCTGGCGC
CTTTAATTTCTCCGGAAAAAACTTTTCTTTAACTCCGGAAAAAACTTTTCTTTAAACATCA

10

配列番号 135、Δ Casp9（残基 135～416）C403A アミノ酸配列
【化 52】

GFGDVGALSLRGNADLAYILSMPCGHCLINNVNFCRESGLRTRTGSNIDCEKLRRRFSSLHFM
VEVKGDLTAKKMVLALLELARQDHGALDCCVVVLSHGQCASHLQFPGAVYGTGCPVSVEKIVNI
FNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGEQKDHGFVASTSPEDESPGSNPEPDATPFQEGLRTFDQLD
AISSLPTPSDIFVSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDIFEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGI
YKQMPGA¹FNFLRKKLFFNSGKNFSLKH

20

（実施例 14）

代表的な実施形態

【0587】

当該技術のある特定の実施形態が以下に提示されている。

30

A1. 対象における移植された治療用細胞の生存を制御する方法であって、

a) 治療用細胞を調製するまたは得るステップ、

b) 治療用細胞に、多量体化領域およびカスパーゼ-9 ポリペプチドまたは改変カスパーゼ-9 ポリペプチドを含むキメラポリペプチドをコードする核酸をトランスフェクトまたは形質導入するステップであって、カスパーゼ-9 ポリペプチドまたは改変カスパーゼ-9 ポリペプチドが、配列番号 9 に対して少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むステップ、

c) 形質導入またはトランスフェクトされた治療用細胞を対象に移植するステップ、および

d) (c) の後に、対象に、多量体化領域に結合する多量体リガンドを、カスパーゼ-9 ポリペプチドまたは改変カスパーゼ-9 ポリペプチドを発現する移植された治療用細胞の 80% 未満を死滅させるために有効な量で投与するステップ
を含み、

40

改変カスパーゼ-9 ポリペプチドが、改変されていないカスパーゼ-9 ポリペプチドと比較して、多量体リガンドに対する応答において低下した IC₅₀、および伸長した用量反応曲線を有する、

方法。

【0588】

A2. カスパーゼ-9 ポリペプチドまたは改変カスパーゼ-9 ポリペプチドを発現する移植された治療用細胞の 70% 未満が、多量体リガンドの投与後に死滅する、実施形態 A

50

1に記載の方法。

【0589】

A3. カスパーゼ-9ポリペプチドまたは改変カスパーゼ-9ポリペプチドを発現する移植された治療用細胞の60%未満が、多量体リガンドの投与後に死滅する、実施形態A1またはA2に記載の方法。

【0590】

A4. カスパーゼ-9ポリペプチドまたは改変カスパーゼ-9ポリペプチドを発現する移植された治療用細胞の50%未満が、多量体リガンドの投与後に死滅する、実施形態A1からA3までのいずれか1つに記載の方法。

【0591】

A5. カスパーゼ-9ポリペプチドまたは改変カスパーゼ-9ポリペプチドを発現する移植された治療用細胞の40%未満が、多量体リガンドの投与後に死滅する、実施形態A1からA4までのいずれか1つに記載の方法。

【0592】

A6. カスパーゼ-9ポリペプチドまたは改変カスパーゼ-9ポリペプチドを発現する移植された治療用細胞の30%未満が、多量体リガンドの投与後に死滅する、実施形態A1からA5までのいずれか1つに記載の方法。

【0593】

A6. 1. 治療用細胞が、異種タンパク質をさらに発現する、実施形態A1からA6までのいずれか1つに記載の方法。

【0594】

A6. 2. 異種タンパク質がキメラ抗原受容体である、実施形態A6. 1に記載の方法。

【0595】

A6. 3. キメラ抗原受容体がキメラT細胞受容体である、実施形態A6. 2に記載の方法。

【0596】

A6. 4. キメラ抗原受容体がscFvドメインを含む、実施形態A6. 1に記載の方法。

【0597】

A7. 改変カスパーゼ-9ポリペプチドの多量体リガンドに対する IC_{50} が0.01pM超である、実施形態A1からA6. 4までのいずれか1つに記載の方法。

【0598】

A7. 1 改変カスパーゼ-9ポリペプチドの多量体リガンドに対する IC_{50} が0.05pM超である、実施形態A1からA6. 4までのいずれか1つに記載の方法。

【0599】

A7. 2 改変カスパーゼ-9ポリペプチドの多量体リガンドに対する IC_{50} が0.1pM超である、実施形態A1からA6. 4までのいずれか1つに記載の方法。

【0600】

A7. 3 改変カスパーゼ-9ポリペプチドの多量体リガンドに対する IC_{50} が0.5pM超である、実施形態A1からA6. 4までのいずれか1つに記載の方法。

【0601】

A7. 4 改変カスパーゼ-9ポリペプチドの多量体リガンドに対する IC_{50} が0.01nM超である、実施形態A1からA6. 4までのいずれか1つに記載の方法。

【0602】

A8. 改変カスパーゼ-9ポリペプチドの多量体リガンドに対する IC_{50} が0.05nM超である、実施形態A1からA7. 4までのいずれか1つに記載の方法。

【0603】

A9. 改変カスパーゼ-9ポリペプチドの多量体リガンドに対する IC_{50} が0.1nM超である、実施形態A1からA8までのいずれか1つに記載の方法。

10

20

30

40

50

【0604】

A10. 改変カスパーゼ-9ポリペプチドの多量体リガンドに対する IC_{50} が0.5 nM超である、実施形態A1からA9までのいずれか1つに記載の方法。

【0605】

A11. 改変カスパーゼ-9ポリペプチドの多量体リガンドに対する IC_{50} が1 nM超である、実施形態A1からA10までのいずれか1つに記載の方法。

B1. 対象における移植された治療用細胞の生存を制御する方法であって、

a) 治療用細胞を調製するまたは得るステップ、

b) 治療用細胞の第1のサブセットに、多量体化領域および第1のカスパーゼ-9ポリペプチドを含むキメラポリペプチドをコードする核酸をトランスフェクトまたは形質導入するステップであって、第1のカスパーゼ-9ポリペプチドが、配列番号9に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むステップ、

c) 治療用細胞の第2のサブセットに、多量体化領域および第2のカスパーゼ-9ポリペプチドを含むキメラポリペプチドをコードする核酸をトランスフェクトまたは形質導入するステップであって、第2のカスパーゼ-9ポリペプチドが、配列番号9に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むステップ、

d) 形質導入またはトランスフェクトされた治療用細胞の第1のサブセットおよび治療用細胞の第2のサブセットを対象に移植するステップ、および

【0606】

e) (d)の後に、対象に、多量体化領域に結合する多量体リガンドを、治療用細胞の第1のサブセットを治療用細胞の第2のサブセットよりも多く死滅させるために有効な量で投与するステップを含む方法。

【0607】

B2. 第1のカスパーゼ-9ポリペプチドおよび第2のカスパーゼ-9ポリペプチドが、異なるアミノ酸配列を含み、異なる基底の活性または異なる IC_{50} を有する、実施形態B1に記載の方法。

【0608】

B3. 第1のカスパーゼ-9ポリペプチドのアミノ酸配列と第2のカスパーゼ-9ポリペプチドのアミノ酸配列が異なる、実施形態B1またはB2に記載の方法。

【0609】

B4. 第1のカスパーゼ-9ポリペプチドが、第2のカスパーゼ-9ポリペプチドと比較して、多量体リガンドに対する応答において低下した IC_{50} 、および伸長した用量反応曲線を有する、実施形態B1からB3までのいずれか1つに記載の方法。

【0610】

B5. 治療用細胞の第1のサブセットと治療用細胞の第2のサブセットが異なる型の細胞である、実施形態B1からB4までのいずれか1つに記載の方法。

【0611】

B6. 治療用細胞の第1のサブセットまたは第2のサブセットがT細胞である、実施形態B5に記載の方法。

【0612】

B7. 治療用細胞の第1のサブセットまたは第2のサブセットが異種タンパク質をさらに発現する、実施形態B5またはB6に記載の方法。

【0613】

B8. 異種タンパク質がキメラ抗原受容体である、実施形態B7に記載の方法。

【0614】

B8. 1. キメラ抗原受容体がキメラT細胞受容体である、実施形態B8に記載の方法。

【0615】

B8. 2. キメラ抗原受容体がscFvドメインを含む、実施形態B8に記載の方法。

10

20

30

40

50

【0616】

B 9. 治療用細胞の第 1 のサブセットおよび治療用細胞の第 2 のサブセットが異なる時間に対象から単離した同じ細胞型である、実施形態 B 1 から B 8. 2 までのいずれか 1 つに記載の方法。

【0617】

B 10. 治療用細胞が、造血幹細胞、誘導性前駆細胞 (i P S)、胚性幹 (E S) 細胞、間葉系幹細胞 (M S C)、形質 (B) 細胞、筋細胞、ナチュラルキラー (N K) 細胞、マクロファージ、腫瘍浸潤リンパ球 (T I L)、および T 細胞からなる群から選択される、実施形態 B 1 から B 9 までのいずれか 1 つに記載の方法。

【0618】

B 11. 予備。

【0619】

B 12. 第 1 のカスパーゼー 9 ポリペプチドまたは第 2 のカスパーゼー 9 ポリペプチドの多量体リガンドに対する IC_{50} が 0. 01 pM 超である、実施形態 B 1 から B 10 までのいずれか 1 つに記載の方法。

【0620】

B 12. 1. 第 1 のカスパーゼー 9 ポリペプチドまたは第 2 のカスパーゼー 9 ポリペプチドの多量体リガンドに対する IC_{50} が 0. 05 pM 超である、実施形態 B 1 から B 10 までのいずれか 1 つに記載の方法。

【0621】

B 12. 2 第 1 のカスパーゼー 9 ポリペプチドまたは第 2 のカスパーゼー 9 ポリペプチドの多量体リガンドに対する IC_{50} が 0. 1 pM 超である、実施形態 B 1 から B 10 までのいずれか 1 つに記載の方法。

【0622】

B 12. 3 第 1 のカスパーゼー 9 ポリペプチドまたは第 2 のカスパーゼー 9 ポリペプチドの多量体リガンドに対する IC_{50} が 0. 5 pM 超である、実施形態 B 1 から B 10 までのいずれか 1 つに記載の方法。

【0623】

B 12. 4 第 1 のカスパーゼー 9 ポリペプチドまたは第 2 のカスパーゼー 9 ポリペプチドの多量体リガンドに対する IC_{50} が 0. 01 nM 超である、実施形態 B 1 から B 10 までのいずれか 1 つに記載の方法。

【0624】

B 13. 第 1 のカスパーゼー 9 ポリペプチドまたは第 2 のカスパーゼー 9 ポリペプチドの多量体リガンドに対する IC_{50} が 0. 05 nM 超である、実施形態 B 1 から B 12. 4 までのいずれか 1 つに記載の方法。

【0625】

B 14. 第 1 のカスパーゼー 9 ポリペプチドまたは第 2 のカスパーゼー 9 ポリペプチドの多量体リガンドに対する IC_{50} が 0. 1 nM 超である、実施形態 B 1 から B 13 までのいずれか 1 つに記載の方法。

【0626】

B 15. 第 1 のカスパーゼー 9 ポリペプチドまたは第 2 のカスパーゼー 9 ポリペプチドの多量体リガンドに対する IC_{50} が 0. 5 nM 超である、実施形態 B 1 から B 14 までのいずれか 1 つに記載の方法。

【0627】

B 16. 第 1 のカスパーゼー 9 ポリペプチドまたは第 2 のカスパーゼー 9 ポリペプチドの多量体リガンドに対する IC_{50} が 1 nM 超である、実施形態 B 1 から B 15 までのいずれか 1 つに記載の方法。

【0628】

B 17. 第 1 の治療用細胞または第 2 の治療用細胞が T 細胞である、実施形態 B 1 から B 16 までのいずれか 1 つに記載の方法。

10

20

30

40

50

【0629】

B18. 第2の治療用細胞がT細胞である、実施形態B1からB17までのいずれか1つに記載の方法。

【0630】

B19. 第2の治療用細胞が、幹細胞移植後の対象に投与されるT細胞である、実施形態B18に記載の方法。

【0631】

B20. 対象に投与する前にT細胞をアロ枯渇させる、実施形態B19またはB20に記載の方法。

【0632】

B21. 対象に投与する前にT細胞をアロ枯渇させない、実施形態B19またはB20に記載の方法。

【0633】

B22. 第2の治療用細胞がキメラ抗原受容体を含む、実施形態B1からB21までのいずれか1つに記載の方法。

【0634】

B23. 第1の治療用細胞がT細胞である、実施形態B22に記載の方法。

【0635】

B24. 第2の治療用細胞が幹細胞移植後の対象に投与されるT細胞である、実施形態B23に記載の方法。

【0636】

B25. 対象に投与する前にT細胞をアロ枯渇させる、実施形態B23またはB2に記載の方法。

【0637】

B26. 対象に投与する前にT細胞をアロ枯渇させない、実施形態B23またはB24に記載の方法。

C1. 対象における移植された治療用細胞の生存を制御する方法であって、

a) 治療用細胞を対象に移植するステップであって、治療用細胞が、多量体化領域およびカスパーゼー9ポリペプチドまたは改変カスパーゼー9ポリペプチドを含むキメラポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含み、カスパーゼー9ポリペプチドまたは改変カスパーゼー9ポリペプチドが、配列番号9に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むステップ、および

b) (a)の後に、対象に、多量体化領域に結合する多量体リガンドを、カスパーゼー9ポリペプチドまたは改変カスパーゼー9ポリペプチドを発現する移植された治療用細胞の最大70%を死滅させるために有効な量で投与するステップ、を含み、

改変カスパーゼー9ポリペプチドが、改変されていないカスパーゼー9ポリペプチドと比較して、多量体リガンドに対する応答において低下したIC₅₀、および伸長した用量反応曲線を有するが伸長する、方法。

【0638】

C2. 細胞に、キメラポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが形質導入またはトランスフェクトされている、実施形態C1に記載の方法。

【0639】

C3. 治療用細胞が、造血幹細胞、誘導性前駆細胞(iPS)、胚性幹(ES)細胞、間葉系幹細胞、形質(B)細胞、筋細胞、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、腫瘍浸潤リンパ球、およびT細胞からなる群から選択される、実施形態C1またはC2に記載の方法。

【0640】

C4. カスパーゼー9ポリペプチドまたは改変カスパーゼー9ポリペプチドを発現する

10

20

30

40

50

移植された治療用細胞の70%未満が、多量体リガンドの投与後に死滅する、実施形態C1からC3までのいずれか1つに記載の方法。

【0641】

C5. カスパーゼ-9ポリペプチドまたは改変カスパーゼ-9ポリペプチドを発現する移植された治療用細胞の60%未満が、多量体リガンドの投与後に死滅する、実施形態C1からC4までのいずれか1つに記載の方法。

【0642】

C6. カスパーゼ-9ポリペプチドまたは改変カスパーゼ-9ポリペプチドを発現する移植された治療用細胞の50%未満が、多量体リガンドの投与後に死滅する、実施形態C1からC5までのいずれか1つに記載の方法。

10

【0643】

C7. カスパーゼ-9ポリペプチドまたは改変カスパーゼ-9ポリペプチドを発現する移植された治療用細胞の40%未満が、多量体リガンドの投与後に死滅する、実施形態C1からC6までのいずれか1つに記載の方法。

【0644】

C8. カスパーゼ-9ポリペプチドまたは改変カスパーゼ-9ポリペプチドを発現する移植された治療用細胞の30%未満が、多量体リガンドの投与後に死滅する、実施形態C1からC7までのいずれか1つに記載の方法。

【0645】

C9. 改変カスパーゼ-9ポリペプチドの多量体リガンドに対する IC_{50} が0.01

20

pM超である、実施形態C1からC8までのいずれか1つに記載の方法。

【0646】

C8. 1. 改変カスパーゼ-9ポリペプチドの多量体リガンドに対する IC_{50} が0.05 pM超である、実施形態C1からC8までのいずれか1つに記載の方法。

【0647】

C8. 2. 改変カスパーゼ-9ポリペプチドの多量体リガンドに対する IC_{50} が0.1 pM超である、実施形態C1からC8までのいずれか1つに記載の方法。

【0648】

C8. 3. 改変カスパーゼ-9ポリペプチドの多量体リガンドに対する IC_{50} が0.5 pM超である、実施形態C1からC8までのいずれか1つに記載の方法。

30

【0649】

C8. 4. 改変カスパーゼ-9ポリペプチドの多量体リガンドに対する IC_{50} が0.01 nM超である、実施形態C1からC8までのいずれか1つに記載の方法。

【0650】

C9. 予備。

【0651】

C10. 改変カスパーゼ-9ポリペプチドの多量体リガンドに対する IC_{50} が0.05 nM超である、実施形態C1からC8. 4までのいずれか1つに記載の方法。

【0652】

C11. 改変カスパーゼ-9ポリペプチドの多量体リガンドに対する IC_{50} が0.1

40

nM超である、実施形態C1からC10までのいずれか1つに記載の方法。

【0653】

C12. 改変カスパーゼ-9ポリペプチドの多量体リガンドに対する IC_{50} が0.5 nM超である、実施形態C1からC11までのいずれか1つに記載の方法。

【0654】

C13. 改変カスパーゼ-9ポリペプチドの多量体リガンドに対する IC_{50} が1 nM超である、実施形態C1からC12までのいずれか1つに記載の方法。

【0655】

C14. 治療用細胞がキメラ抗原受容体を含む、実施形態C1からC13までのいずれか1つに記載の方法。

50

【0656】

C14. 1. キメラ抗原受容体がキメラT細胞受容体である、実施形態C14に記載の方法。

【0657】

C14. 2. キメラ抗原受容体がs c F vドメインを含む、実施形態C14に記載の方法。

【0658】

C15. 治療有効レベルの、キメラ抗原受容体を含む治療用細胞が、多量体リガンドの投与後に対象において活性なままである、実施形態C14からC14. 2までのいずれかに記載の方法。

D1. 対象における移植された治療用細胞の生存を制御する方法であって、

a) 治療用細胞の第1のセットを対象に移植するステップであって、治療用細胞の第1のセットが、多量体化領域および第1のカスパーゼ-9ポリペプチドまたは第1の改変カスパーゼ-9ポリペプチドを含むキメラポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含み、カスパーゼ-9ポリペプチドまたは改変カスパーゼ-9ポリペプチドが、配列番号9に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むステップ、

b) 治療用細胞の第2のセットを対象に移植するステップであって、治療用細胞の第2のセットが、多量体化領域および第2のカスパーゼ-9ポリペプチドまたは第2の改変カスパーゼ-9ポリペプチドを含むキメラポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含み、カスパーゼ-9ポリペプチドまたは改変カスパーゼ-9ポリペプチドが、配列番号9に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むステップ、および

【0659】

c) 対象に、多量体化領域に結合する多量体リガンドを、治療用細胞の第1のサブセットを治療用細胞の第2のサブセットよりも多く死滅させるために有効な量で投与するステップを含む方法。

【0660】

D2. 第1のカスパーゼ-9ポリペプチドおよび第2のカスパーゼ-9ポリペプチドが、異なるアミノ酸配列を含み、異なる基底の活性または異なる IC_{50} を有する、実施形態D1に記載の方法。

【0661】

D3. 第1のカスパーゼ-9ポリペプチドのアミノ酸配列と第2のカスパーゼ-9ポリペプチドのアミノ酸配列が異なる、実施形態D1またはD2に記載の方法。

【0662】

D4. 第1のカスパーゼ-9ポリペプチドが、第2のカスパーゼ-9ポリペプチドと比較して、多量体リガンドに対する応答において低下した IC_{50} 、および伸長した用量反応曲線を有する、実施形態D1からD3までのいずれか1つに記載の方法。

【0663】

D5. 治療用細胞の第1のサブセットと治療用細胞の第2のサブセットが異なる型の細胞である、実施形態D1からD4までのいずれか1つに記載の方法。

【0664】

D6. 治療用細胞の第1のサブセットおよび治療用細胞の第2のサブセットが異なる時間に対象から単離した同じ細胞型である、実施形態D1からD4までのいずれか1つに記載の方法。

【0665】

D7. 治療用細胞が、造血幹細胞、誘導性前駆細胞(iPS)、胚性幹(ES)細胞、間葉系幹細胞、形質(B)細胞、筋細胞、腫瘍浸潤リンパ球、およびT細胞からなる群から選択される、実施形態D1またはD2に記載の方法。

【0666】

D8. 第2のカスパーゼ-9ポリペプチドの多量体リガンドに対する IC_{50} が0. 0

10

20

30

40

50

1 pM超である、実施形態 D 1 から D 7 までのいずれか 1 つに記載の方法。

【0667】

D 8. 1 第 2 のカスパーゼ-9 ポリペプチドの多量体リガンドに対する IC_{50} が 0.05 pM 超である、実施形態 D 1 から D 7 までのいずれか 1 つに記載の方法。

【0668】

D 8. 2 第 2 のカスパーゼ-9 ポリペプチドの多量体リガンドに対する IC_{50} が 0.1 pM 超である、実施形態 D 1 から D 7 までのいずれか 1 つに記載の方法。

【0669】

D 8. 3 第 2 のカスパーゼ-9 ポリペプチドの多量体リガンドに対する IC_{50} が 0.5 pM 超である、実施形態 D 1 から D 7 までのいずれか 1 つに記載の方法。

10

【0670】

D 8. 4 第 2 のカスパーゼ-9 ポリペプチドの多量体リガンドに対する IC_{50} が 0.01 nM 超である、実施形態 D 1 から D 7 までのいずれか 1 つに記載の方法。

【0671】

D 9. 第 2 のカスパーゼ-9 ポリペプチドの多量体リガンドに対する IC_{50} が 0.05 nM 超である、実施形態 D 1 から D 8. 4 までのいずれか 1 つに記載の方法。

【0672】

D 10. 第 2 のカスパーゼ-9 ポリペプチドの多量体リガンドに対する IC_{50} が 0.1 nM 超である、実施形態 D 1 から D 9 までのいずれか 1 つに記載の方法。

【0673】

D 11. 第 2 のカスパーゼ-9 ポリペプチドの多量体リガンドに対する IC_{50} が 0.5 nM 超である、実施形態 D 1 から D 10 までのいずれか 1 つに記載の方法。

20

【0674】

D 12. 第 2 のカスパーゼ-9 ポリペプチドの多量体リガンドに対する IC_{50} が 1 nM 超である、実施形態 D 1 から D 11 までのいずれか 1 つに記載の方法。

【0675】

D 13. 追加用量の多量体リガンドを対象に投与するステップをさらに含み、追加用量の多量体リガンドの投与の後に、追加用量の前の移植された細胞の数と比較して、第 1 のカスパーゼ-9 ポリペプチドまたは第 2 のカスパーゼ-9 ポリペプチドを発現する移植された治療用細胞の少なくとも 10 % が死滅する、実施形態 D 1 から D 12 までのいずれか 1 つに記載の方法。

30

【0676】

D 14. 追加用量の多量体リガンドを対象に投与するステップをさらに含み、追加用量の多量体リガンドの投与の後に、追加用量の前の移植された細胞の数と比較して、第 1 のカスパーゼ-9 ポリペプチドまたは第 2 のカスパーゼ-9 ポリペプチドを発現する移植された治療用細胞の少なくとも 10 % が死滅する、実施形態 D 1 から D 13 までのいずれか 1 つに記載の方法。

【0677】

D 15. 2 回用量の多量体リガンドを対象に投与し、多量体リガンドの 2 回目の用量を多量体リガンドの 1 回目の用量の 24 時間より後に投与する、実施形態 D 1 から D 14 までのいずれか 1 つに記載の方法。

40

【0678】

D 16. 多量体リガンドの 2 回目の用量を多量体リガンドの 1 回目の用量の少なくとも 1 週間後に対象に投与する、実施形態 D 14 または D 15 に記載の方法。

【0679】

D 17. 対象への多量体リガンドの 3 回目の用量を多量体リガンドの 2 回目の用量の 24 時間より後に投与する、実施形態 D 14 または D 16 に記載の方法。

【0680】

D 18. 対象への多量体リガンドの 3 回目の用量を多量体リガンドの 2 回目の用量の少なくとも 1 週間後に投与する、実施形態 D 14 または D 16 に記載の方法。

50

D 1 9. 患者における移植された治療用細胞によって生じる状態の存在、不在またはステージを含む情報を受け取るステップ、および

患者において同定された状態の存在、不在またはステージに基づいて、患者に対して多量体化領域に結合する多量体リガンドを投与するか、その後の多量体リガンドの投薬量を維持するか、またはその後の多量体リガンドの投薬量を調整するステップ
をさらに含む、実施形態 D 1 から D 1 8 までのいずれか 1 つに記載の方法。

D 2 0.

患者における、移植された治療用細胞によって生じる状態の存在、不在またはステージを同定するステップ、および

状態の存在、不在またはステージを、対象において同定された状態の存在、不在またはステージに基づいて、多量体化領域に結合する多量体リガンドを投与するか、患者に投与するその後の多量体リガンドの投薬量を維持するか、またはその後の多量体リガンドの投薬量を調整するか
の意思決定者に伝達するステップ
をさらに含む、実施形態 D 1 から D 1 8 までのいずれか 1 つに記載の方法。

D 2 1.

患者における、移植された治療用細胞によって生じる状態の存在、不在またはステージを同定するステップ、および

対象において同定された状態の存在、不在またはステージに基づいて、多量体結合性領域に結合する多量体リガンドを投与するか、患者に投与するその後の多量体リガンドの投薬量を維持するか、またはその後の多量体リガンドの投薬量を調整するかの指示を伝達するステップ
をさらに含む、実施形態 D 1 から D 1 8 までのいずれか 1 つに記載の方法。

【0681】

D 2 2. 状態が移植片対宿主病である、実施形態 D 1 から D 2 1 までのいずれか 1 つに記載の方法。

【0682】

D 2 3. 第 1 の治療用細胞または第 2 の治療用細胞が T 細胞である、実施形態 D 1 から D 2 2 までのいずれか 1 つに記載の方法。

【0683】

D 2 4. 所望の百分率の第 1 の治療用細胞が死滅するまで多量体リガンドの濃度を上昇させる、実施形態 D 1 から D 2 3 までのいずれか 1 つに記載の方法。

【0684】

D 2 5. 対象が移植片対宿主病を有し、多量体リガンドの投与により疾患が緩和される、実施形態 D 1 から D 2 4 までのいずれか 1 つに記載の方法。

【0685】

D 2 6. 第 1 の治療用細胞がキメラ抗原受容体を含む、実施形態 D 1 から D 2 5 までのいずれか 1 つに記載の方法。

【0686】

D 2 6. 1. キメラ抗原受容体がキメラ T 細胞受容体である、実施形態 D 2 6 に記載の方法。

【0687】

D 2 6. 2. キメラ抗原受容体が s c F v ドメインを含む、実施形態 D 2 6 に記載の方法。

【0688】

D 2 7. 治療有効レベルの、キメラ抗原受容体を含む第 1 の治療用細胞が、多量体リガンドの投与後に対象において活性なままである、実施形態 D 1 から D 2 6. 2 までのいずれか 1 つに記載の方法。

【0689】

D 2 8. 第 2 の治療用細胞が T 細胞である、実施形態 D 1 から D 2 7 までのいずれか 1 つに記載の方法。

10

20

30

40

50

【0690】

D29. 第2の治療用細胞が、幹細胞移植後の対象に投与されるT細胞である、実施形態D28に記載の方法。

【0691】

D30. 対象に投与する前にT細胞をアロ枯渇させる、実施形態D28またはD29に記載の方法。

【0692】

D31. 対象に投与する前にT細胞をアロ枯渇させない、D28またはD29に記載の方法。

【0693】

D32. 第2の治療用細胞がキメラ抗原受容体を含む、実施形態D1からD31までのいずれか1つに記載の方法。

【0694】

D33. 第1の治療用細胞がT細胞である、実施形態D32に記載の方法。

【0695】

D34. 第2の治療用細胞が幹細胞移植後の対象に投与されるT細胞である、実施形態D33に記載の方法。

【0696】

D35. 対象に投与する前にT細胞をアロ枯渇させる、実施形態D33またはD34に記載の方法。

【0697】

D36. 対象に投与する前にT細胞をアロ枯渇させない、D33またはD34に記載の方法。

【0698】

D37. 予備。

【0699】

F1. 対象ががんを有する、実施形態A1からA11まで、B1からB26まで、C1からC15まで、またはD1からD36までのいずれか1つに記載の方法。

【0700】

F2. 対象が固形腫瘍を有する、実施形態A1からA11まで、B1からB26まで、C1からC15まで、またはD1からD36までのいずれか1つに記載の方法。

【0701】

F3. がんが、対象の血液または骨髄に存在する、実施形態F1に記載の方法。

【0702】

F4. 対象が血液疾患または骨髄疾患を有する、実施形態A1からA11まで、B1からB26まで、C1からC15まで、またはD1からD36までのいずれか1つに記載の方法。

【0703】

F5. 対象が、幹細胞移植によって緩和することができる任意の状態または障害と診断されている、実施形態A1からA11まで、B1からB26まで、C1からC15まで、またはD1からD36までのいずれか1つに記載の方法。

【0704】

F6. 対象が、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A1からA11まで、B1からB26まで、C1からC15まで、またはD1からD36までのいずれか1つに記載の方法。

【0705】

F7. 患者が、原発性免疫不全障害、血球貪食リンパ組織球増多症(HLH)または他の血球貪食障害、遺伝性骨髄不全障害、異常ヘモグロビン症、代謝障害、および破骨細胞障害からなる群から選択される状態と診断されている、実施形態A1からA11まで、B1からB26まで、C1からC15まで、またはD1からD36までのいずれか1つに記

10

20

30

40

50

載の方法。

【0706】

F 8. 状態が、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／欠乏症、分類不能型免疫不全症 (CVID)、慢性肉芽腫性疾患、IPEX (免疫不全、多腺性内分泌障害、腸疾患、X連鎖) または IPEX 様、ウィスコット・アルドリッチ症候群、CD40 リガンド欠乏症、白血球接着不全症、DOCK8 欠乏症、IL-10 欠乏／IL-10 受容体欠乏症、GATA2 欠乏症、X連鎖リンパ増殖性疾患 (XLP)、軟骨毛髪形成不全症、シュワヒマン・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、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から選択される、実施形態 A1 から A11 まで、B1 から B26 まで、C1 から C15 まで、または D1 から D36 までのいずれか 1 つに記載の方法。

10

【0707】

F 9. 対象が、1 つまたは複数のステージ 1 移植片対宿主病の症状を示している、実施形態 A1 から A11 まで、B1 から B26 まで、C1 から C15 まで、または D1 から D36 までのいずれか 1 つに記載の方法。

【0708】

F 10. 対象が、1 つまたは複数のステージ 2 移植片対宿主病の症状を示している、実施形態 A1 から A11 まで、B1 から B26 まで、C1 から C15 まで、または D1 から D36 までのいずれか 1 つに記載の方法。

20

【0709】

F 11. 対象が、1 つまたは複数のステージ 3 移植片対宿主病の症状を示している、実施形態 A1 から A11 まで、B1 から B26 まで、C1 から C15 まで、または D1 から D36 までのいずれか 1 つに記載の方法。

【0710】

F 12. 対象が、1 つまたは複数のステージ 4 移植片対宿主病の症状を示している、実施形態 A1 から A11 まで、B1 から B26 まで、C1 から C15 まで、または D1 から D36 までのいずれか 1 つに記載の方法。

【0711】

F 13. 多量体リガンドの投与後にアロ反応性 T 細胞の数が減少する、実施形態 A1 から A11 まで、B1 から B26 まで、C1 から C15 まで、D1 から D36 まで、または F1 から F2 までのいずれか 1 つに記載の方法。

30

【0712】

F 14. アロ反応性 T 細胞がマーカーおよび CD3 を発現する、実施形態 A1 から A11 まで、B1 から B26 まで、C1 から C15 まで、F1 から F2 まで、または D1 から D36 までのいずれか 1 つに記載の方法。

【0713】

F 15. アロ反応性 T 細胞の数が多量体リガンドの投与後に約 90% またはそれより多く減少する、実施形態 A1 から A11 まで、B1 から B26 まで、C1 から C15 まで、F1 から F14 まで、または D1 から D36 までのいずれか 1 つに記載の方法。

40

【0714】

F 16. 多量体リガンドの投与後に、対象において、増大することができ、かつウイルスおよび真菌に対して反応性であるドナー T 細胞が生存する、実施形態 A1 から A11 まで、B1 から B26 まで、C1 から C15 まで、F1 から F15 まで、または D1 から D36 までのいずれか 1 つに記載の方法。

【0715】

F 17. 多量体リガンドの投与後に、対象において、増大することができ、かつ対象における腫瘍細胞に対して反応性であるドナー T 細胞が生存する、実施形態 A1 から A11 まで、B1 から B26 まで、C1 から C15 まで、F1 から F16 まで、または D1 から D36 までのいずれか 1 つに記載の方法。

50

【0716】

F18. 少なくとも1つのアミノ酸置換が、S144A、S144D、Y153A、Y153F、S183A、S195A、S196A、S196D、S307A、D315A、A316G、T317A、T317C、T317E、T317S、P318A、F319A、F319W、F326K、D327G、D327K、D327R、Q328K、Q328R、L329E、L329G、L329K、D330A、D330E、D330G、D330N、D330S、D330V、A331K、C403A、C403S、C403T、F404T、F404W、F404Y、N405A、N405F、N405Q、N405T、F406A、F406T、F406W、F406Y、G402A、G402I、G402Q、G402Y、C403P、F404A、F404S、およびF406Lからなる群から選択される、実施形態A1からA11まで、B1からB26まで、C1からC15まで、F1からF17まで、またはD1からD36までのいずれか1つに記載の方法。

10

【0717】

F19. 少なくとも1つのアミノ酸置換が、S144A、S144D、Y153A、Y153F、S183A、S195A、S196A、S196D、S307A、D315A、A316G、T317A、T317C、T317E、T317S、P318A、F319A、F319W、F326K、D327G、D327K、D327R、Q328K、Q328R、L329E、L329G、L329K、D330A、D330E、D330G、D330N、D330S、D330V、A331K、C403A、C403S、C403T、F404T、F404W、F404Y、N405A、N405F、N405Q、N405T、F406A、F406T、F406W、およびF406Yからなる群から選択される、実施形態A1からA11まで、B1からB26まで、C1からC15まで、D1からD36まで、またはF1からF17までのいずれか1つに記載の方法。

20

【0718】

F20. 少なくとも1つのアミノ酸置換が、S144A、S144D、Y153A、Y153F、S183A、S195A、S196A、S196D、S307A、D315A、A316G、T317A、T317C、T317S、P318A、F319A、F319W、L329E、D330A、D330E、D330G、D330N、D330S、D330V、C403A、C403S、C403T、F404T、F404W、F404Y、N405A、N405F、N405Q、F406A、F406T、F406W、およびF406Yからなる群から選択される、実施形態A1からA11まで、B1からB26まで、C1からC15まで、またはD1からD36まで、またはF1からF17までのいずれか1つに記載の方法。

30

【0719】

F21. 少なくとも1つのアミノ酸置換が、S144A、S144D、Y153A、Y153F、S183A、S195A、S196A、S196D、S307A、D315A、A316G、T317A、T317S、F319W、L329E、D330A、D330E、D330G、D330N、D330S、D330V、F404T、F404W、F404Y、N405F、N405Q、F406A、F406T、F406W、およびF406Yである、実施形態A1からA11まで、B1からB26まで、C1からC15まで、またはD1からD36まで、またはF1からF17までのいずれか1つに記載の方法。

40

【0720】

F22. 少なくとも1つのアミノ酸置換が、S144A、S144D、S183A、S195A、S196A、S196D、T317A、T317S、L329E、D330A、D330E、D330G、D330N、D330S、D330V、F404Y、N405Q、F406A、F406W、およびF406Yである、実施形態A1からA11まで、B1からB26まで、C1からC15まで、またはD1からD36まで、またはF1からF17までのいずれか1つに記載の方法。

【0721】

50

F 2 3. 少なくとも1つのアミノ酸置換が、T 3 1 7 S、S 1 4 4 A、S 1 3 3、およびS 1 9 6 Dからなる群から選択される、実施形態A 1からA 1 1まで、B 1からB 2 6まで、C 1からC 1 5まで、またはD 1からD 3 6まで、またはF 1からF 1 7までのいずれか1つに記載の方法。

【0722】

F 2 4. 少なくとも1つのアミノ酸置換が、S 1 8 3 A、S 1 9 5 A、S 1 9 6 A、S 1 9 6 D、T 3 1 7 A、L 3 2 9 E、D 3 3 0 A、D 3 3 0 E、D 3 3 0 G、D 3 3 0 N、D 3 3 0 S、D 3 3 0 V、F 4 0 4 Y、N 4 0 5 Q、F 4 0 6 A、F 4 0 6 W、およびF 4 0 6 Yからなる群から選択される、実施形態A 1からA 1 1まで、B 1からB 2 6まで、C 1からC 1 5まで、またはD 1からD 3 6まで、またはF 1からF 1 7までのいずれか1つに記載の方法。

10

【0723】

F 2 5. 少なくとも1つのアミノ酸置換がD 3 3 0 Aである、実施形態A 1からA 1 1まで、B 1からB 2 6まで、C 1からC 1 5まで、またはD 1からD 3 6まで、またはF 1からF 1 7までのいずれか1つに記載の方法。

【0724】

F 2 6. 少なくとも1つのアミノ酸置換がD 3 3 0 Eである、実施形態A 1からA 1 1まで、B 1からB 2 6まで、C 1からC 1 5まで、またはD 1からD 3 6まで、またはF 1からF 1 7までのいずれか1つに記載の方法。

20

【0725】

F 2 7. 少なくとも1つのアミノ酸置換がN 4 0 5 Qである、実施形態A 1からA 1 1まで、B 1からB 2 6まで、C 1からC 1 5まで、またはD 1からD 3 6まで、またはF 1からF 1 7までのいずれか1つに記載の方法。

【0726】

F 2 8. 改変カスパーゼ-9ポリペプチドが、D 3 3 0 A-N 4 0 5 Q、D 3 3 0 A-S 1 4 4 A、D 3 3 0 A-S 1 4 4 D、D 3 3 0 A-S 1 8 3 A、D 3 3 0 A-S 1 9 6 A、N 4 0 5 Q-S 1 4 4 A、N 4 0 5 Q-S 1 4 4 D、N 4 0 5 Q-S 1 9 6 D、N 4 0 5 Q-T 3 1 7 S、N 4 0 5 Q-S 1 4 4 A c o、N 4 0 5 Q-T 3 1 7 S c o、^{4 0 2}G C F N F^{4 0 6}I S A Q T (C A S P-1 0)、^{3 1 6}A T P F^{3 1 9}A V P I (S M A C/D i a b l o)、D 3 3 0 A-N 4 0 5 T、D 3 1 5 A-D 3 3 0 A、D 3 3 0 A-Y 1 5 3 A、D 3 3 0 A-Y 1 5 3 F、D 3 3 0 A-T 3 1 7 E、^{4 0 2}G C F N F^{4 0 6}C I V S M (C A S P-3)、^{4 0 2}G C F N F^{4 0 6}A A A A A、^{4 0 2}G C F N F^{4 0 6}Y C S T L (C A S P-2)、および^{4 0 2}G F N F^{4 0 6}Q P T F T (C A S P-8)からなる群から選択されるアミノ酸置換を少なくとも2つ含む、実施形態A 1からA 1 1まで、B 1からB 2 6まで、C 1からC 1 5まで、またはD 1からD 3 6まで、またはF 1からF 1 7までのいずれか1つに記載の方法。

30

【0727】

F 2 9. 改変カスパーゼ-9ポリペプチドが、D 3 3 0 A-N 4 0 5 Q、D 3 3 0 A-S 1 4 4 A、D 3 3 0 A-S 1 4 4 D、D 3 3 0 A-S 1 8 3 A、D 3 3 0 A-S 1 9 6 A、N 4 0 5 Q-S 1 4 4 A、N 4 0 5 Q-S 1 4 4 D、N 4 0 5 Q-S 1 9 6 D、N 4 0 5 Q-T 3 1 7 S、N 4 0 5 Q-S 1 4 4 A c o、N 4 0 5 Q-T 3 1 7 S c o、^{4 0 2}G C F N F^{4 0 6}I S A Q T (C A S P-1 0)、^{3 1 6}A T P F^{3 1 9}A V P I (S M A C/D i a b l o)、およびD 3 3 0 A-N 4 0 5 Tからなる群から選択されるアミノ酸置換を少なくとも2つ含む、実施形態A 1からA 1 1まで、B 1からB 2 6まで、C 1からC 1 5まで、またはD 1からD 3 6まで、またはF 1からF 1 7までのいずれか1つに記載の方法。

40

【0728】

F 3 0. 改変カスパーゼ-9ポリペプチドが、D 3 3 0 A-N 4 0 5 Q、D 3 3 0 A-S 1 4 4 A、D 3 3 0 A-S 1 4 4 D、D 3 3 0 A-S 1 8 3 A、D 3 3 0 A-S 1 9 6 A、N 4 0 5 Q-S 1 4 4 A、N 4 0 5 Q-S 1 4 4 D、N 4 0 5 Q-S 1 9 6 D、N 4

50

05Q-T317S、N405Q-S144Aco、N405Q-T317Sco、⁴⁰₂GCFNF⁴⁰⁶ISAQT(CASP-10)、および³¹⁶ATPF³¹⁹AVPI(SMAC/Diablo)からなる群から選択されるアミノ酸置換を少なくとも2つ含む、実施形態A1からA11まで、B1からB26まで、C1からC15まで、またはD1からD36まで、またはF1からF17までのいずれか1つに記載の方法。

【0729】

F31. 改変カスパーゼ-9ポリペプチドが、D330A-N405Q、D330A-S144A、D330A-S144D、D330A-S183A、D330A-S196A、N405Q-S144A、N405Q-S144D、N405Q-S196D、N405Q-T317S、N405Q-S144Aco、N405Q-T317Sco、および⁴⁰²GCFNF⁴⁰⁶ISAQT(CASP-10)からなる群から選択されるアミノ酸置換を少なくとも2つ含む、実施形態A1からA11まで、B1からB26まで、C1からC15まで、またはD1からD36まで、またはF1からF17までのいずれか1つに記載の方法。

10

【0730】

F32. 改変カスパーゼ-9ポリペプチドが、N405Q-S144AcoおよびN405Q-T317Scoからなる群から選択されるアミノ酸置換を少なくとも2つ含む、実施形態A1からA11まで、B1からB26まで、C1からC15まで、またはD1からD36まで、またはF1からF17までのいずれか1つに記載の方法。

20

【0731】

F32. 1. 少なくとも2つのアミノ酸置換がN405QおよびS114Aである、実施形態F32に記載の方法。

【0732】

F32. 2. カスパーゼ-9ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列がコドン最適化されたものである、実施形態F32に記載の方法。

【0733】

F33. 少なくとも1つのアミノ酸置換が、S144A、S144D、Y153A、Y153F、S183A、S195A、S196A、S307A、D315A、A316G、T317A、T317C、T317E、T317S、P318A、F319A、F319W、F326K、D327G、D327K、D327R、Q328K、Q328R、L329E、L329G、L329K、D330A、D330E、D330G、D330N、D330S、D330V、A331K、F404T、F404W、F404Y、N405F、N405Q、およびF406Tからなる群から選択される、実施形態A1からA11まで、B1からB26まで、C1からC15まで、またはD1からD36まで、またはF1からF17までのいずれか1つに記載の方法。

30

【0734】

F34. 少なくとも1つのアミノ酸置換が、S144A、S144D、Y153A、Y153F、S183A、S195A、S196A、S307A、D315A、A316G、T317A、T317C、T317E、T317S、P318A、F319A、F319W、F326K、D327G、D327K、D327R、Q328K、Q328R、L329E、L329G、L329K、D330A、D330E、D330G、D330N、D330S、D330V、A331K、F404T、F404W、F404Y、N405F、N405Q、およびF406Tからなる群から選択される、実施形態A1からA11まで、B1からB26まで、C1からC15まで、またはD1からD36まで、またはF1からF17までのいずれか1つに記載の方法。

40

【0735】

F35. 少なくとも1つのアミノ酸置換が、S144A、S144D、Y153A、Y153F、S183A、S195A、S196A、S307A、D315A、A316G、T317A、T317C、T317S、P318A、F319A、F319W、L329E、D330A、D330E、D330G、D330N、D330S、D330V、F

50

404 T、F404 W、F404 Y、N405 F、N405 Q、およびF406 Tからなる群から選択される、実施形態A1からA11まで、B1からB26まで、C1からC15まで、またはD1からD36まで、またはF1からF17までのいずれか1つに記載の方法。

【0736】

F36. 少なくとも1つのアミノ酸置換が、S144 A、S144 D、Y153 A、Y153 F、S183 A、S195 A、S196 A、S307 A、D315 A、A316 G、T317 A、T317 S、F319 W、D330 A、F404 T、F404 W、F404 Y、N405 F、N405 Q、およびF406 Tからなる群から選択される、実施形態A1からA11まで、B1からB26まで、C1からC15まで、またはD1からD36まで、またはF1からF17までのいずれか1つに記載の方法。

10

【0737】

F37. 少なくとも1つのアミノ酸置換が、S144 A、S144 D、S183 A、S195 A、S196 A、T317 A、T317 S、D330 A、F404 Y、およびN405 Qからなる群から選択される、実施形態A1からA11まで、B1からB26まで、C1からC15まで、またはD1からD36まで、またはF1からF17までのいずれか1つに記載の方法。

【0738】

F38. 少なくとも1つのアミノ酸置換が、S196 D、T317 C、T317 E、P318 A、F319 A、F326 K、D327 G、D327 K、D327 R、Q328 K、Q328 R、L329 E、L329 G、L329 K、D330 E、D330 G、D330 N、D330 S、D330 V、A331 K、C403 A、C403 S、C403 T、N405 A、N405 T、F406 A、F406 W、F406 Y、G402 A、G402 I、G402 Q、G402 Y、C403 P、F404 A、F404 S、およびF406 Lからなる群から選択される、実施形態A1からA11まで、B1からB26まで、C1からC15まで、またはD1からD36まで、またはF1からF17までのいずれか1つに記載の方法。

20

【0739】

F39. 少なくとも1つのアミノ酸置換が、S196 D、T317 C、T317 E、P318 A、F319 A、F326 K、D327 G、D327 K、D327 R、Q328 K、Q328 R、L329 E、L329 G、L329 K、D330 E、D330 G、D330 N、D330 S、D330 V、A331 K、C403 A、C403 S、C403 T、N405 A、N405 T、F406 A、F406 W、およびF406 Yからなる群から選択される、実施形態A1からA11まで、B1からB26まで、C1からC15まで、またはD1からD36まで、またはF1からF17までのいずれか1つに記載の方法。

30

【0740】

F40. 少なくとも1つのアミノ酸置換が、S196 D、T317 C、P318 A、F319 A、L329 E、D330 E、D330 G、D330 N、D330 S、D330 V、C403 A、C403 S、C403 T、N405 A、F406 A、F406 T、F406 W、およびF406 Yからなる群から選択される、実施形態A1からA11まで、B1からB26まで、C1からC15まで、またはD1からD36まで、またはF1からF17までのいずれか1つに記載の方法。

40

【0741】

F41. 少なくとも1つのアミノ酸置換が、S196 D、L329 E、D330 E、D330 G、D330 N、D330 S、D330 V、F406 A、F406 T、F406 W、およびF406 Yからなる群から選択される、実施形態A1からA11まで、B1からB26まで、C1からC15まで、またはD1からD36まで、またはF1からF17までのいずれか1つに記載の方法。

【0742】

F42. 少なくとも1つのアミノ酸置換が、S196 D、L329 E、D330 E、D

50

330G、D330N、D330S、D330V、F406A、F406W、およびF406Yからなる群から選択される、実施形態A1からA11まで、B1からB26まで、C1からC15まで、またはD1からD36まで、またはF1からF17までのいずれか1つに記載の方法。

【0743】

F43. ポリヌクレオチドが、カスパーゼ9ポリペプチドをコードする最適化されたコドンを含む、実施形態A1からA11まで、B1からB26まで、C1からC15まで、またはD1からD36まで、またはF1からF17までのいずれか1つに記載の方法。

【0744】

F44. 改変カスパーゼ9ポリペプチドが、N405Qのアミノ酸置換を含む、実施形態A1からA11まで、B1からB26まで、C1からC15まで、またはD1からD36まで、またはF1からF17までのいずれか1つに記載の方法。

10

【0745】

F45. 改変カスパーゼ9ポリペプチドが配列番号39の核酸配列によりコードされる、または配列番号88の改変カスパーゼ9ポリペプチドD330Eの核酸配列によりコードされる、実施形態A1からA11まで、B1からB26まで、C1からC15まで、またはD1からD36まで、またはF1からF17までのいずれか1つに記載の方法。

【0746】

F46. 少なくとも1つのアミノ酸置換が、N405Q、F404Y、F406A、F406W、F406Y、F404T、F404W、N405F、F406T、C403A、C403S、C403T、N405A、およびN405Tからなる群から選択される、実施形態A1からA11まで、B1からB26まで、C1からC15まで、またはD1からD36まで、またはF1からF17までのいずれか1つに記載の方法。

20

【0747】

F47. 少なくとも1つのアミノ酸置換が、N405Q、F404Y、F406A、F406W、およびF406Yからなる群から選択される、実施形態A1からA11まで、B1からB26まで、C1からC15まで、またはD1からD36まで、またはF1からF17までのいずれか1つに記載の方法。

【0748】

F48. 少なくとも1つのアミノ酸置換が、T317S、D330A、D330E、D330G、D330N、D330S、D330V、L329E、T317A、D315A、A316G、T317C、P318A、F319A、T317E、F326K、D327G、D327K、D327R、Q328K、Q328R、L329G、L329K、およびA331Kからなる群から選択される、実施形態A1からA11まで、B1からB26まで、C1からC15まで、またはD1からD36まで、またはF1からF17までのいずれか1つに記載の方法。

30

【0749】

F49. 少なくとも1つのアミノ酸置換が、T317S、D330A、D330E、D330G、D330N、D330S、D330V、L329E、およびT317Aからなる群から選択される、実施形態A1からA11まで、B1からB26まで、C1からC15まで、またはD1からD36まで、またはF1からF17までのいずれか1つに記載の方法。

40

【0750】

F50. 少なくとも1つのアミノ酸置換が、S144A、S144D、S196D、S183A、S195A、S196A、Y153A、Y153F、およびS307Aからなる群から選択される、実施形態A1からA11まで、B1からB26まで、C1からC15まで、またはD1からD36まで、またはF1からF17までのいずれか1つに記載の方法。

【0751】

F51. 改変カスパーゼ9ポリペプチドが、表5または表6のカスパーゼバリエーション

50

からなる群から選択されるアミノ酸置換を含む、実施形態 A 1 から A 1 1 まで、B 1 から B 2 6 まで、C 1 から C 1 5 まで、または D 1 から D 3 6 まで、または F 1 から F 1 7 までのいずれか 1 つに記載の方法。

【0752】

F 5 2. 細胞がヒト細胞である、実施形態 A 1 から A 1 1 まで、B 1 から B 2 6 まで、C 1 から C 1 5 まで、F 1 から F 5 1 まで、または D 1 から D 3 6 までのいずれか 1 つに記載の方法。

【0753】

F 5 3. 細胞が前駆細胞である、実施形態 A 1 から A 1 1 まで、B 1 から B 2 6 まで、C 1 から C 1 5 まで、F 1 から F 5 1 まで、または D 1 から D 3 6 までのいずれか 1 つに記載の方法。

10

【0754】

F 5 4. 細胞が造血前駆細胞である、実施形態 A 1 から A 1 1 まで、B 1 から B 2 6 まで、C 1 から C 1 5 まで、F 1 から F 5 1 まで、または D 1 から D 3 6 までのいずれか 1 つに記載の方法。

【0755】

F 5 5. 細胞が、間葉系間質細胞、胚性幹細胞、腫瘍浸潤リンパ球、および誘導性多能性幹細胞からなる群から選択される、実施形態 A 1 から A 1 1 まで、B 1 から B 2 6 まで、C 1 から C 1 5 まで、F 1 から F 5 1 まで、または D 1 から D 3 6 までのいずれか 1 つに記載の方法。

20

【0756】

F 5 6. 細胞が T 細胞である、実施形態 A 1 から A 1 1 まで、B 1 から B 2 6 まで、C 1 から C 1 5 まで、F 1 から F 5 1 まで、または D 1 から D 3 6 までのいずれか 1 つに記載の方法。

【0757】

F 5 7. 細胞を骨髓から得るまたは調製する、実施形態 A 1 から A 1 1 まで、B 1 から B 2 6 まで、C 1 から C 1 5 まで、F 1 から F 5 1 まで、または D 1 から D 3 6 までのいずれか 1 つに記載の方法。

【0758】

F 5 8. 細胞を臍帯血から得るまたは調製する、実施形態 A 1 から A 1 1 まで、B 1 から B 2 6 まで、C 1 から C 1 5 まで、F 1 から F 5 1 まで、または D 1 から D 3 6 までのいずれか 1 つに記載の方法。

30

【0759】

F 5 9. 細胞を末梢血から得るまたは調製する、実施形態 A 1 から A 1 1 まで、B 1 から B 2 6 まで、C 1 から C 1 5 まで、F 1 から F 5 1 まで、または D 1 から D 3 6 までのいずれか 1 つに記載の方法。

【0760】

F 6 0. 細胞を末梢血単核細胞から得るまたは調製する、実施形態 A 1 から A 1 1 まで、B 1 から B 2 6 まで、C 1 から C 1 5 まで、F 1 から F 5 1 まで、または D 1 から D 3 6 までのいずれか 1 つに記載の方法。

40

【0761】

F 6 1. ポリヌクレオチドがプロモーターに作動可能に連結している、実施形態 A 1 から A 1 1 まで、B 1 から B 2 6 まで、C 1 から C 1 5 まで、F 1 から F 6 0 まで、または D 1 から D 3 6 までのいずれか 1 つに記載の方法。

【0762】

F 6 2. 第 1 のカスパーゼー 9 ポリペプチドまたは第 2 のカスパーゼー 9 ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの少なくとも 1 つがプロモーターに作動可能に連結している、実施形態 A 1 から A 1 1 まで、B 1 から B 2 6 まで、C 1 から C 1 5 まで、または D 1 から D 3 6 までのいずれか 1 つに記載の方法。

【0763】

50

F 6 3. プロモーターが発生的に調節されるものであり、カスパーゼー 9 ポリペプチドが発生的に分化した細胞において発現する、実施形態 F 6 2 または F 6 3 に記載の方法。

【0 7 6 4】

F 6 4. プロモーターが組織特異的なものであり、カスパーゼー 9 ポリペプチドが特異的な組織において発現する、実施形態 F 6 2 または G 6 3 に記載の方法。

【0 7 6 5】

F 6 5. プロモーターが活性化 T 細胞において活性化される、実施形態 F 6 2 または F 6 3 に記載の方法。

【0 7 6 6】

F 6 6. プロモーターが 5'LTR 配列を含む、実施形態 F 6 2 または F 6 3 に記載の方法。

10

【0 7 6 7】

F 6 7. キメラタンパク質がマーカーポリペプチドをさらに含む、実施形態 F 6 2 または F 6 3 に記載の方法。

【0 7 6 8】

F 6 8. マーカーポリペプチドが ΔCD19 ポリペプチドである、実施形態 F 6 7 に記載の方法。

【0 7 6 9】

F 6 9. マーカーを発現する細胞を対象への投与のために選択する選択ステップをさらに含む、実施形態 F 6 7 または F 6 8 に記載の方法。

20

【0 7 7 0】

F 7 0. カスパーゼー 9 ポリペプチドが短縮型カスパーゼー 9 ポリペプチドである、実施形態 A 1 から A 1 1 まで、B 1 から B 2 6 まで、C 1 から C 1 5 まで、F 1 から F 6 9 まで、または D 1 から D 3 6 までのいずれか 1 つに記載の方法。

【0 7 7 1】

F 7 1. カスパーゼー 9 ポリペプチドがカスパーゼ動員ドメイン (CARD) を欠く、実施形態 A 1 から A 1 1 まで、B 1 から B 2 6 まで、C 1 から C 1 5 まで、F 1 から F 7 0 まで、または D 1 から D 3 6 までのいずれか 1 つに記載の方法。

【0 7 7 2】

F 7 2. 多量体化領域が、FKBP、シクロフィリン受容体、ステロイド受容体、テトラサイクリン受容体、重鎖抗体サブユニット、軽鎖抗体サブユニット、柔軟なリンカードメインによって分離されたタンデムな重鎖可変領域および軽鎖可変領域で構成される単鎖抗体、およびその変異配列からなる群から選択される、実施形態 A 1 から A 1 1 まで、B 1 から B 2 6 まで、C 1 から C 1 5 まで、F 1 から F 7 1 まで、または D 1 から D 3 6 までのいずれか 1 つに記載の方法。

30

【0 7 7 3】

F 7 3. 多量体化領域が FKBP12 領域である、実施形態 A 1 から A 1 1 まで、B 1 から B 2 6 まで、C 1 から C 1 5 まで、F 1 から F 7 1 まで、または D 1 から D 3 6 までのいずれか 1 つに記載の方法。

【0 7 7 4】

F 7 4. FKBP12 領域が FKBP12v₃₆ 領域である、実施形態 F 7 3 に記載の方法。

40

【0 7 7 5】

F 7 5. 多量体化領域が Fv'Fvls である、実施形態 A 1 から A 1 1 まで、B 1 から B 2 6 まで、C 1 から C 1 5 まで、F 1 から F 7 4 まで、または D 1 から D 3 6 までのいずれか 1 つに記載の方法。

【0 7 7 6】

F 7 6. 多量体化領域が、FK506 二量体および二量体 FK506 類似体リガンドからなる群から選択されるリガンドと結合する、実施形態 A 1 から A 1 1 まで、B 1 から B 2 6 まで、C 1 から C 1 5 まで、F 1 から F 7 5 まで、または D 1 から D 3 6 までのい

50

れか 1 つに記載の方法。

【0777】

F77. リガンドが AP1903 または AP20187 である、実施形態 A1 から A11 まで、B1 から B26 まで、C1 から C15 まで、F1 から F76 まで、または D1 から D36 までのいずれか 1 つに記載の方法。

【0778】

F78. 多量体化領域が配列番号 29 のアミノ酸配列またはその機能性断片を有する、実施形態 A1 から A11 まで、B1 から B26 まで、C1 から C15 まで、または D1 から D36 までのいずれか 1 つに記載の方法。

【0779】

F79. 多量体化領域が配列番号 30 のヌクレオチド配列またはその機能性断片によりコードされる、実施形態 A1 から A11 まで、B1 から B26 まで、C1 から C15 まで、または D1 から D36 までのいずれか 1 つに記載の方法。

【0780】

F80. 多量体化領域が配列番号 32 のアミノ酸配列またはその機能性断片を有するポリペプチドをさらに含む、実施形態 F78 に記載の方法。

【0781】

F81. 多量体化領域が配列番号 31 のヌクレオチド配列またはその機能性断片によりコードされるポリペプチドをさらに含む、実施形態 F79 に記載の方法。

【0782】

F82. 多量体化領域が配列番号 32 のアミノ酸配列またはその機能性断片を有するポリペプチドをさらに含む、実施形態 F78 または F80 に記載の方法。

【0783】

F83. 多量体化領域が配列番号 31 のヌクレオチド配列またはその機能性断片によりコードされるポリペプチドをさらに含む、実施形態 F79 または F81 に記載の方法。

【0784】

F84. 多量体化領域が配列番号 29 または配列番号 32 のアミノ酸配列またはその機能性断片を有するポリペプチドをさらに含む、実施形態 F78、F80 または F82 のいずれか一項に記載の方法。

【0785】

F85. 多量体化領域が配列番号 30 または配列番号 31 のヌクレオチド配列またはその機能性断片によりコードされるポリペプチドをさらに含む、実施形態 F79、F81 または F83 のいずれか一項に記載の方法。

【0786】

F86. 細胞に、レトロウイルスベクターを形質導入またはトランスフェクトする、実施形態 A1 から A11 まで、B1 から B26 まで、C1 から C15 まで、F1 から F85 まで、または D1 から D36 までのいずれか 1 つに記載の方法。

【0787】

F87. レトロウイルスベクターがマウス白血病ウイルスベクターである、実施形態 F86 に記載の方法。

【0788】

F88. レトロウイルスベクターが SFG ベクターである、実施形態 A1 から A11 まで、B1 から B26 まで、C1 から C15 まで、F1 から F85 まで、または D1 から D36 までのいずれか 1 つに記載の方法。

【0789】

F89. 細胞にアデノウイルスベクターを形質導入またはトランスフェクトする、実施形態 A1 から A11 まで、B1 から B26 まで、C1 から C15 まで、F1 から F85 まで、または D1 から D36 までのいずれか 1 つに記載の方法。

【0790】

F90. 細胞にレンチウイルスベクターを形質導入またはトランスフェクトする、実施

10

20

30

40

50

形態 A 1 から A 1 1 まで、B 1 から B 2 6 まで、C 1 から C 1 5 まで、F 1 から F 8 5 まで、または D 1 から D 3 6 までのいずれか 1 つに記載の方法。

【0791】

F 9 1. 細胞に遺伝子発現ベクターをさらにトランスフェクトまたは形質導入する、実施形態 A 1 から A 1 1 まで、B 1 から B 2 6 まで、C 1 から C 1 5 まで、F 1 から F 9 0 まで、または D 1 から D 3 6 までのいずれか 1 つに記載の方法。

【0792】

F 9 2. 細胞が、改変カスパーゼ-9 ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含み、異種ポリペプチドをコードする第 2 のポリヌクレオチドをさらに含む、実施形態 A 1 から A 1 1 まで、B 1 から B 2 6 まで、C 1 から C 1 5 まで、F 1 から F 9 1 まで、または D 1 から D 3 6 までのいずれか 1 つに記載の方法。

10

【0793】

F 9 3. 異種ポリペプチドがキメラ抗原受容体 (CAR) である、実施形態 F 9 2 に記載の方法。

【0794】

F 9 3. 1 細胞が、改変カスパーゼ-9 ポリペプチドをコードし、異種ポリペプチドをさらにコードするポリヌクレオチド、および改変カスパーゼ-9 ポリペプチドと異種ポリペプチドを連結する切断可能なリンカーポリペプチドを含む、実施形態 A 1 から A 1 1 まで、B 1 から B 2 6 まで、C 1 から C 1 5 まで、F 1 から F 9 1 まで、または D 1 から D 3 6 までのいずれか 1 つに記載の方法。

20

【0795】

F 9 3. 2 異種ポリペプチドがキメラ抗原受容体 (CAR) である、実施形態 F 9 3. 1 に記載の方法。

【0796】

F 9 3. 3. 切断可能なリンカーポリペプチドが 2 A ポリペプチドまたは 2 A 様ポリペプチドである、実施形態 F 9 3. 1 または F 9 3. 2 に記載の方法。

【0797】

F 9 3. 4. 対象が幹細胞移植を受けた対象である、実施形態 A 1 から A 1 1 まで、B 1 から B 2 6 まで、C 1 から C 1 5 まで、F 1 から F 9 3. 3 まで、または D 1 から D 3 6 までのいずれか 1 つに記載の方法。

30

【0798】

F 9 4. 幹細胞移植が、適合移植、部分適合移植、ハプロタイプ一致移植、および CD 3 4⁺ ハプロタイプ一致幹細胞移植からなる群から選択される、実施形態 F 9 3. 4 に記載の方法。

【0799】

F 9 5. 対象が、ハプロ-CD 3 4⁺ 幹細胞移植をドナー T 細胞の投与前に受けている、またはドナー T 細胞の投与と同時に受ける、実施形態 A 1 から A 1 1 まで、B 1 から B 2 6 まで、C 1 から C 1 5 まで、D 1 から D 3 6 まで、または F 1 から F 9 3. 3 までのいずれか 1 つに記載の方法。

【0800】

F 9 6. ヒトドナー T 細胞が患者の T 細胞と適合する、部分適合する、またはハプロタイプが一致するものである、実施形態 A 1 から A 1 1 まで、B 1 から B 2 6 まで、C 1 から C 1 5 まで、F 1 から F 9 5 まで、または D 1 から D 3 6 までのいずれか 1 つに記載の方法。

40

【0801】

F 9 7. 対象がヒトである、実施形態 A 1 から A 1 1 まで、B 1 から B 2 6 まで、C 1 から C 1 5 まで、F 1 から F 9 6 まで、または D 1 から D 3 6 までのいずれか 1 つに記載の方法。

【0802】

F 9 8. 移植がハプロタイプ一致移植、適合非血縁移植または適合血縁移植である、実

50

施形態 F 9 3 . 1 に記載の方法。

【0803】

F 9 9 . 対象が過剰増殖性疾患と診断されている、実施形態 A 1 から A 1 1 まで、B 1 から B 2 6 まで、C 1 から C 1 5 まで、F 1 から F 9 8 まで、または D 1 から D 3 6 までのいずれか 1 つに記載の方法。

【0804】

F 1 0 0 . 対象が免疫疾患と診断されている、実施形態 A 1 から A 1 1 まで、B 1 から B 2 6 まで、C 1 から C 1 5 まで、F 1 から F 9 8 まで、または D 1 から D 3 6 までのいずれか 1 つに記載の方法。

【0805】

F 1 0 1 . 対象に多量体リガンドの 2 回目の用量を投与するステップをさらに含み、2 回目の用量が 1 回目の用量よりも多くの多量体リガンドを含む、実施形態 A 1 から A 1 1 まで、B 1 から B 2 6 まで、C 1 から C 1 5 まで、F 1 から F 1 0 0 まで、または D 1 から D 3 6 までのいずれか 1 つに記載の方法。

【0806】

F 1 0 2 . 複数回用量の多量体リガンドを複数回用量の間で投薬量レベルを漸増させながら対象に対して投与する、実施形態 A 1 から A 1 1 まで、B 1 から B 2 6 まで、C 1 から C 1 5 まで、F 1 から F 1 0 1 まで、または D 1 から D 3 6 までのいずれか 1 つに記載の方法。

【0807】

F 1 0 3 . 投薬量レベルの漸増により、死滅する治療用細胞の数が増加する、実施形態 F 1 0 2 に記載の方法。

【0808】

F 1 0 4 . 用量を 0 . 0 1 m g / k g から 1 m g / k g まで漸増させる、実施形態 F 1 0 2 または F 1 0 3 に記載の方法。

【0809】

F 1 0 5 . 約 1 5 ~ 3 0 分きざみで用量を投与する、実施形態 F 1 0 1 から F 1 0 4 までのいずれか 1 つに記載の方法。

【0810】

F 1 0 6 . 持続注入ポンプを使用して多量体リガンドを投与し、注入の間に多量体リガンドの濃度を上昇させる、実施形態 A 1 から A 1 1 まで、B 1 から B 2 6 まで、C 1 から C 1 5 まで、F 1 から F 1 0 5 まで、または D 1 から D 3 6 までのいずれか 1 つに記載の方法。

【0811】

F 1 0 7 . 所望の百分率の治療用細胞が死滅するまで多量体リガンドの濃度を上昇させる、実施形態 A 1 から A 1 1 まで、B 1 から B 2 6 まで、C 1 から C 1 5 まで、F 1 から F 1 0 6 まで、または D 1 から D 3 6 までのいずれか 1 つに記載の方法。

【0812】

F 1 0 8 . 対象が移植片対宿主病を有し、多量体リガンドの投与により疾患が緩和される、実施形態 A 1 から A 1 1 まで、B 1 から B 2 6 まで、C 1 から C 1 5 まで、F 1 から F 1 0 7 まで、または D 1 から D 3 6 までのいずれか 1 つに記載の方法。

【0813】

F 1 0 9 . 対象がヒトである、実施形態 A 1 から A 1 1 まで、B 1 から B 2 6 まで、C 1 から C 1 5 まで、F 1 から F 1 0 8 まで、または D 1 から D 3 6 までのいずれか 1 つに記載の方法。

【0814】

F 1 1 0 . 治療用細胞がキメラ抗原受容体を含む、実施形態 A 1 から A 1 1 まで、B 1 から B 2 6 まで、C 1 から C 1 5 まで、F 1 から F 1 0 9 まで、または D 1 から D 3 6 までのいずれか 1 つに記載の方法。

【0815】

10

20

30

40

50

F 1 1 0. 1 キメラ抗原受容体がキメラ T 細胞受容体である、実施形態 F 1 1 0 に記載の方法。

【 0 8 1 6 】

F 1 1 0. 2 キメラ抗原受容体が s c F v ドメインを含む、実施形態 F 1 1 0 に記載の方法。

【 0 8 1 7 】

F 1 1 1. 対象が、多量体リガンドの投与前にオフターゲットまたはオフオーガンの毒性の症状を示している、実施形態 A 1 から A 1 1 まで、B 1 から B 2 6 まで、C 1 から C 1 5 まで、F 1 から F 1 1 0. 2 まで、または D 1 から D 3 6 までのいずれか 1 つに記載の方法。

10

【 0 8 1 8 】

F 1 1 2. 対象が、多量体リガンドの投与前に腫瘍崩壊症候群 (T L S)、サイトカイン放出症候群 (C R S) またはマクロファージ活性化症候群 (M A S) の症状を示している、実施形態 A 1 から A 1 1 まで、B 1 から B 2 6 まで、C 1 から C 1 5 まで、F 1 から F 1 1 1 まで、または D 1 から D 3 6 までのいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 8 1 9 】

F 1 1 3. 多量体リガンドの投与によりオフターゲットまたはオフオーガンの毒性が緩和される、実施形態 F 1 1 1 に記載の方法。

【 0 8 2 0 】

F 1 1 4. 多量体リガンドの投与により腫瘍崩壊症候群 (T L S)、サイトカイン放出症候群 (C R S) またはマクロファージ活性化症候群 (M A S) が緩和される、実施形態 A 1 から A 1 1 まで、B 1 から B 2 6 まで、C 1 から C 1 5 まで、または D 1 から D 3 6 までのいずれか 1 つに記載の方法。

20

【 0 8 2 1 】

F 1 1 5. 治療有効レベルの、キメラ抗原受容体を含む治療用細胞が、多量体リガンドの投与後に対象において活性化ままである、実施形態 F 1 1 2 に記載の方法。

【 0 8 2 2 】

F 1 1 6. 追加用量の多量体リガンドを対象に投与すべきかどうかを決定するステップをさらに含む、実施形態 A 1 から A 1 1 まで、B 1 から B 2 6 まで、C 1 から C 1 5 まで、F 1 から F 1 1 5 まで、または D 1 から D 3 6 までのいずれか 1 つに記載の方法。

30

【 0 8 2 3 】

F 1 1 7. 追加用量の多量体リガンドを対象に投与するステップをさらに含み、追加用量の多量体リガンドの投与の後に、追加用量の前の移植された細胞の数と比較して、カスパーゼ 9 ポリペプチドまたは改変カスパーゼ 9 ポリペプチドを発現する移植された治療用細胞の少なくとも 1 0 % が死滅する、実施形態 A 1 から A 1 1 まで、B 1 から B 2 6 まで、C 1 から C 1 5 まで、F 1 から F 1 1 6 まで、または D 1 から D 3 6 までのいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 8 2 4 】

F 1 1 8. 追加用量の多量体リガンドを対象に投与するステップをさらに含み、追加用量の多量体リガンドの投与の後に、追加用量の前の移植された細胞の数と比較して、カスパーゼ 9 ポリペプチドまたは改変カスパーゼ 9 ポリペプチドを発現する移植された治療用細胞の少なくとも 1 0 % が死滅する、実施形態 A 1 から A 1 1 まで、B 1 から B 2 6 まで、C 1 から C 1 5 まで、F 1 から F 1 1 7 まで、または D 1 から D 3 6 までのいずれか 1 つに記載の方法。

40

【 0 8 2 5 】

F 1 1 9. 2 回用量の多量体リガンドを対象に投与し、多量体リガンドの 2 回目の用量を多量体リガンドの 1 回目の用量の 2 4 時間より後に投与する、実施形態 A 1 から A 1 1 まで、B 1 から B 2 6 まで、C 1 から C 1 5 まで、F 1 から F 1 1 8 まで、または D 1 から D 3 6 までのいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 8 2 6 】

50

F 1 2 0. 多量体リガンドの 2 回目の用量を多量体リガンドの 1 回目の用量の少なくとも 1 週間後に対象に投与する、実施形態 A 1 から A 1 1 まで、B 1 から B 2 6 まで、C 1 から C 1 5 まで、F 1 から F 1 1 9 まで、または D 1 から D 3 6 までのいずれか 1 つに記載の方法。

【0 8 2 7】

F 1 2 1. 対象への多量体リガンドの 3 回目の用量を多量体リガンドの 2 回目の用量の 2 4 時間より後に投与する、実施形態 A 1 から A 1 1 まで、B 1 から B 2 6 まで、C 1 から C 1 5 まで、F 1 から F 1 2 0 まで、または D 1 から D 3 6 までのいずれか 1 つに記載の方法。

【0 8 2 8】

F 1 2 2. 対象への多量体リガンドの 3 回目の用量を多量体リガンドの 2 回目の用量の少なくとも 1 週間後に対象に投与する、実施形態 A 1 から A 1 1 まで、B 1 から B 2 6 まで、C 1 から C 1 5 まで、F 1 から F 1 2 1 まで、または D 1 から D 3 6 までのいずれか 1 つに記載の方法。

F 1 2 3. 患者における移植された治療用細胞によって生じる状態の存在、不在またはステージを含む情報を受け取るステップ、および

患者において同定された状態の存在、不在またはステージに基づいて、患者に対して多量体化領域に結合する多量体リガンドを投与するか、その後の多量体リガンドの投薬量を維持するか、またはその後の多量体リガンドの投薬量を調整するステップ

をさらに含む、実施形態 A 1 から A 1 1 まで、B 1 から B 2 6 まで、C 1 から C 1 5 まで、F 1 から F 1 2 2 まで、または D 1 から D 3 6 までのいずれか 1 つに記載の方法。

F 1 2 4. 患者における、移植された治療用細胞によって生じる状態の存在、不在またはステージを同定するステップ、および

状態の存在、不在またはステージを、対象において同定された状態の存在、不在またはステージに基づいて、多量体化領域に結合する多量体リガンドを投与するか、患者に投与するその後の多量体リガンドの投薬量を維持するか、またはその後の多量体リガンドの投薬量を調整するかの意思決定者に伝達するステップ

をさらに含む、実施形態 A 1 から A 1 1 まで、B 1 から B 2 6 まで、C 1 から C 1 5 まで、F 1 から F 1 2 3 まで、または D 1 から D 3 6 までのいずれか 1 つに記載の方法。

【0 8 2 9】

F 1 2 5.

患者における、移植された治療用細胞によって生じる状態の存在、不在またはステージを同定するステップ、および

対象において同定された状態の存在、不在またはステージに基づいて、多量体結合性領域に結合する多量体リガンドを投与するか、患者に投与するその後の多量体リガンドの投薬量を維持するか、またはその後の多量体リガンドの投薬量を調整するかの指示を伝達するステップ

をさらに含む、実施形態 A 1 から A 1 1 まで、B 1 から B 2 6 まで、C 1 から C 1 5 まで、F 1 から F 1 2 4 まで、または D 1 から D 3 6 までのいずれか 1 つに記載の方法。

【0 8 3 0】

F 1 2 6. 状態が移植片対宿主病である、実施形態 A 1 から A 1 1 まで、B 1 から B 2 6 まで、C 1 から C 1 5 まで、F 1 から F 1 2 5 まで、または D 1 から D 3 6 までのいずれか 1 つに記載の方法。

【0 8 3 1】

F 1 2 7. 状態が移植片対宿主病である、実施形態 A 1 から A 1 1 まで、B 1 から B 2 6 まで、C 1 から C 1 5 まで、F 1 から F 1 2 6 まで、または D 1 から D 3 6 までのいずれか 1 つに記載の方法。

【0 8 3 2】

本明細書において参照されている特許、特許出願、刊行物および文書のそれぞれの全体が、これによって参照により組み込まれる。上記の特許、特許出願、刊行物および文書を

10

20

30

40

50

引用することは、前述のいずれもが先行技術に関連することを認めるものではなく、また、これらの刊行物または文書の内容または日付に関していかなる容認も成すものではない。

【0833】

当該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改変を行うことができる。当該技術は、1つまたは複数の特定の実施形態を参照してかなり詳細に記載されているが、本出願に詳細に開示されている実施形態に変化を生じさせることができ、それでもこれらの改変および改良は当該技術の範囲および主旨の中に入ることが当業者には理解されよう。

【0834】

本明細書において適切に例示的に記載されている技術は、本明細書に詳細に開示されていない要素（複数可）のいずれがなくとも実施することができる。したがって、例えば、本明細書の各例における「含む（comprising）」、「から本質的になる（consisting essentially of）」および「からなる（consisting of）」という用語はいずれも、他の2つの用語と置き換えることができる。使用されている用語および表現は、説明する用語として使用され、限定ではなく、そのような用語および表現を使用することにより、示され、記載されている特徴の等価物またはその一部は排除されず、特許請求された技術の範囲内で種々の改変が可能である。「a（1つの）」または「an（1つの）」という用語は、要素のうちの1つ、または要素のうちの1つ超のいずれかが記載されていることが文脈上明らかでない限り、それが修飾する要素の1つまたは複数を指し得る（例えば、「a（1つの）試薬」は、1つまたは複数の試薬を意味し得る）。「約」という用語は、本明細書で使用される場合、基になるパラメータの10%以内の値（すなわち、プラス10%またはマイナス10%）を指し、一連の値の最初に「約」という用語を使用することにより、値のそれぞれが修飾される（すなわち、「約1、2および3」とは、約1、約2および約3を指す）。例えば、「約100グラム」の重量は、90グラムから110グラムの間の重量を含み得る。さらに、値の列挙が本明細書に記載されている場合（例えば、約50%、60%、70%、80%、85%または86%）、その列挙は、それらの中間の値および小数値の全てを含む（例えば、54%、85.4%）。したがって、本技術は代表的な実施形態および任意選択の特徴によって詳細に開示されているが、当業者は本明細書に開示されている概念の改変および変形を用いることができ、そのような改変および変形は本技術の範囲内であるとみなされることが理解されるべきである。

【0835】

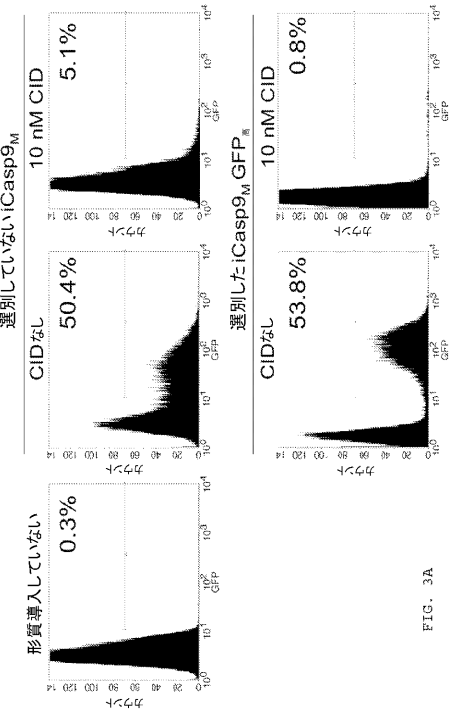
当該技術のある特定の実施形態は、続く請求項（複数可）に記載されている。

10

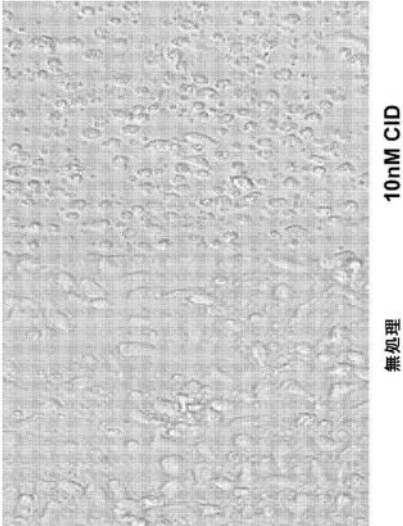
20

30

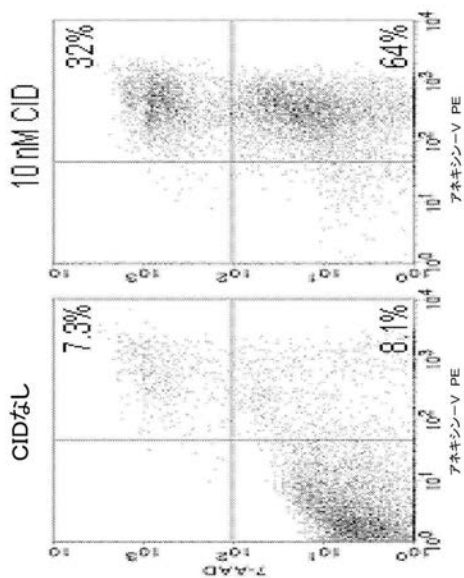
【図 3 A】



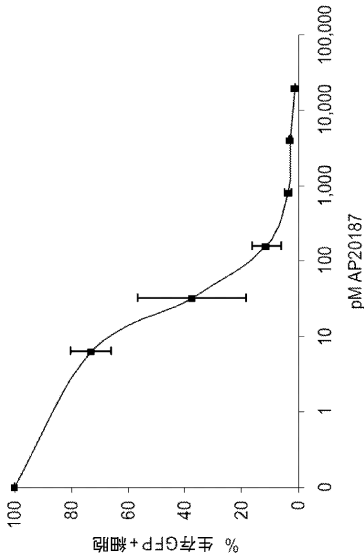
【図 3 B】



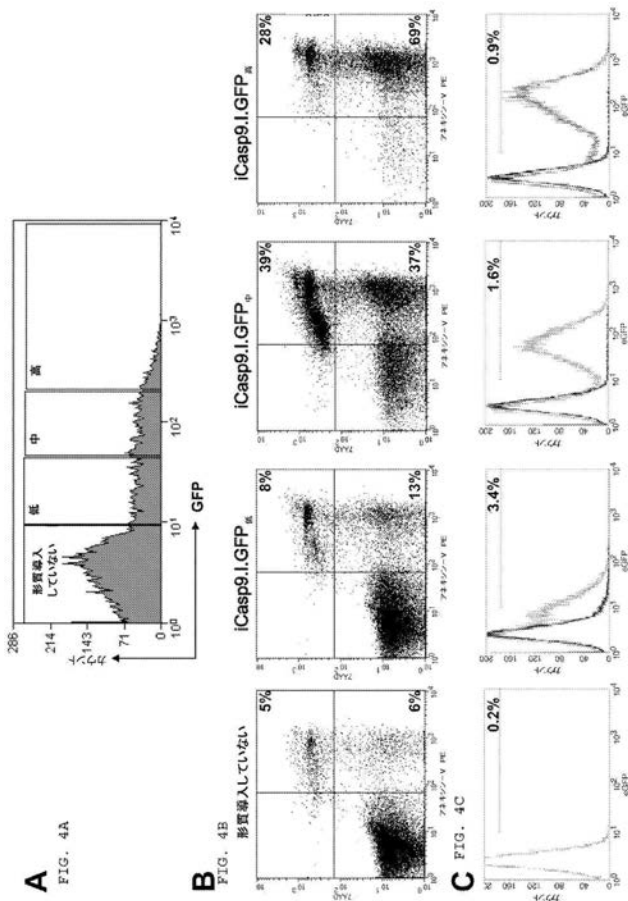
【図 3 C】



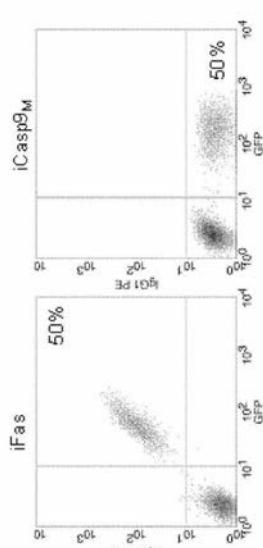
【図 3 D】



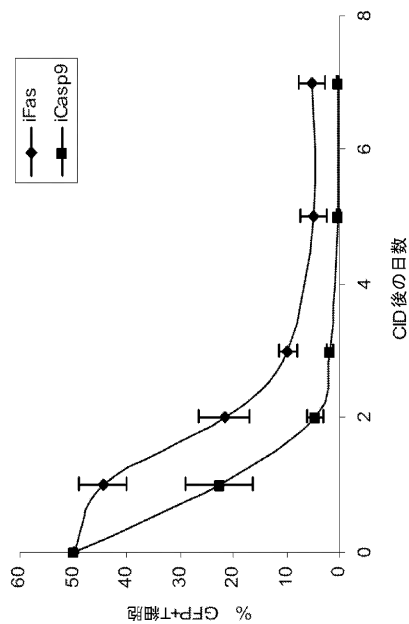
【図 4】



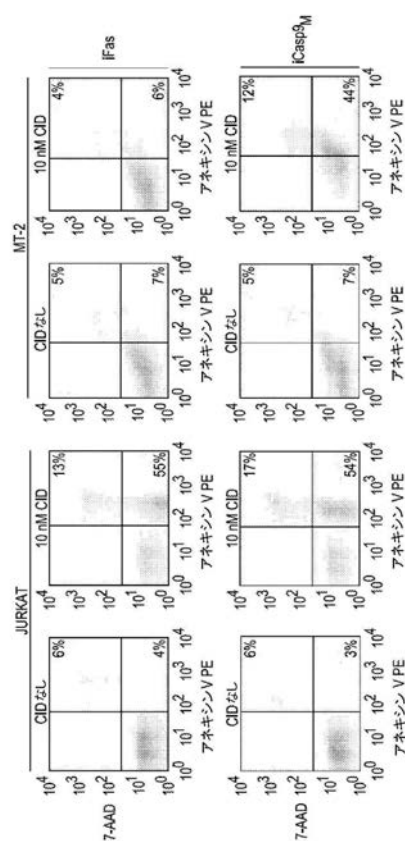
【図 5 A】



【図 5 B】



【図 5 C】



【図 6】

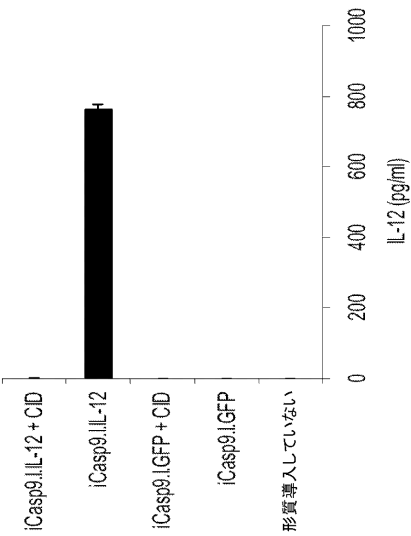


FIG. 6

【図 7】

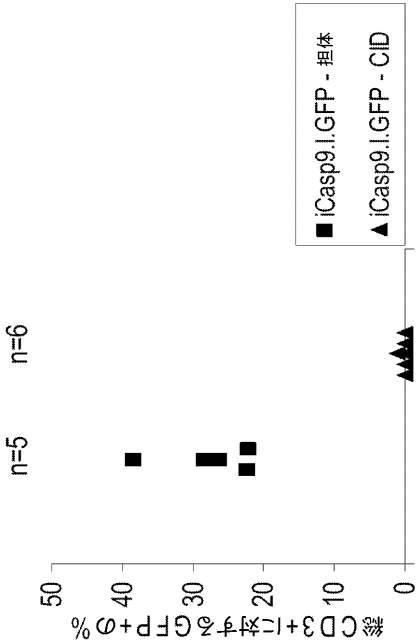


FIG. 7

【図 8】

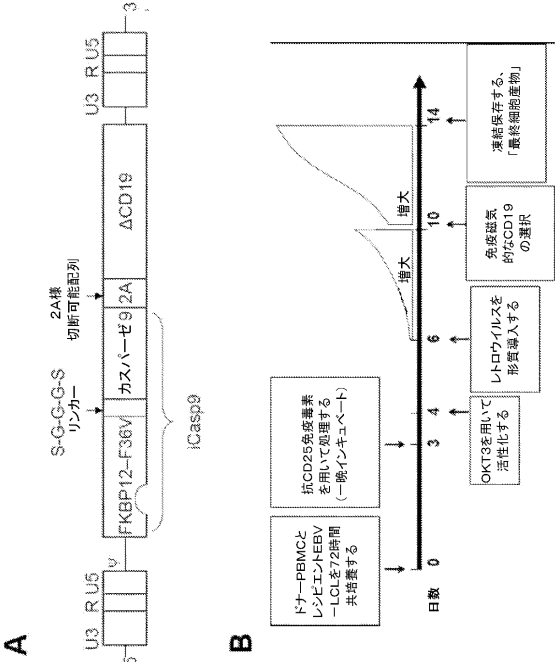


FIG. 8A および 8B

【図 9】

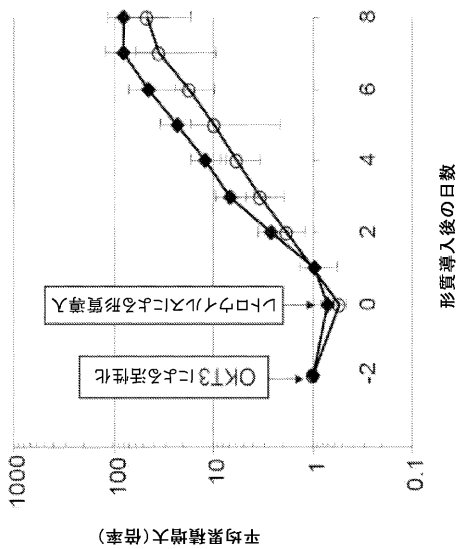
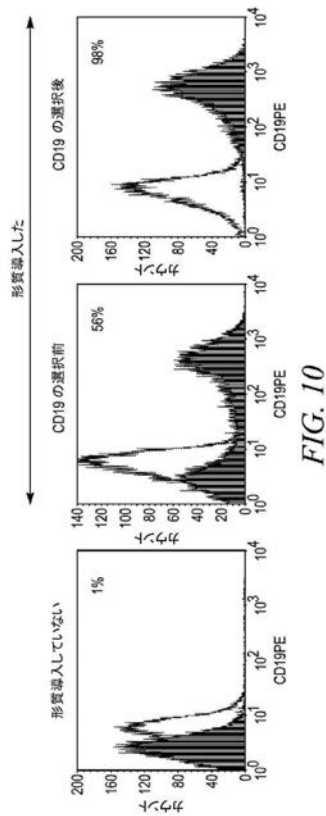
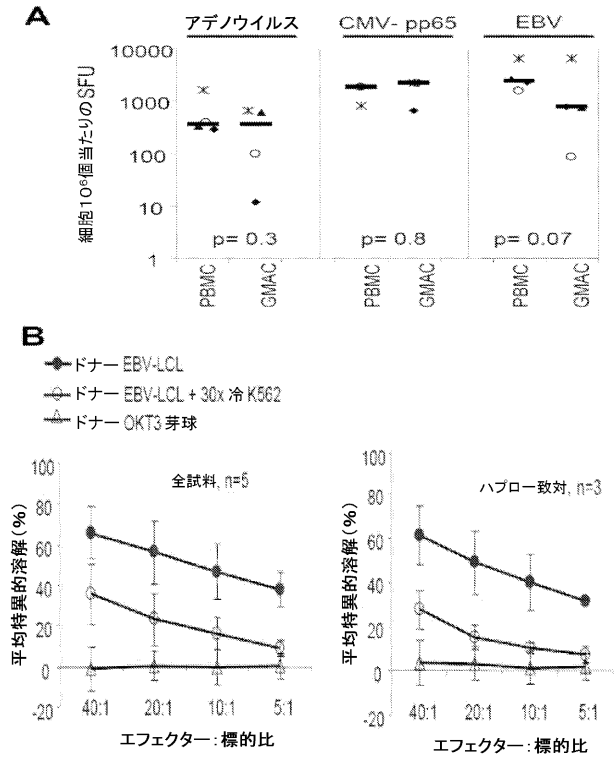


FIG. 9

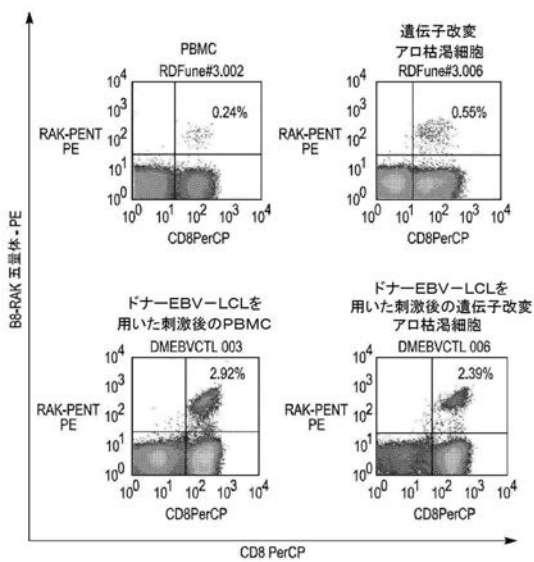
【図 10】



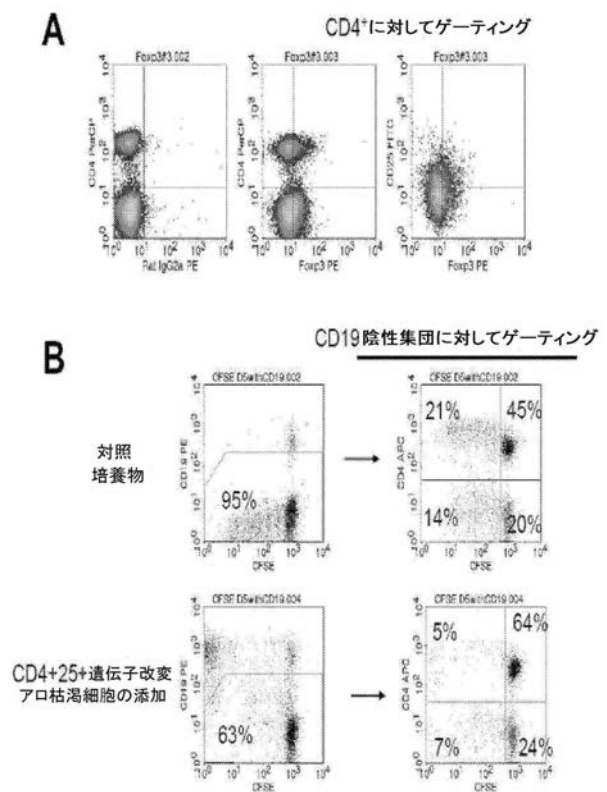
【図 11 A B】



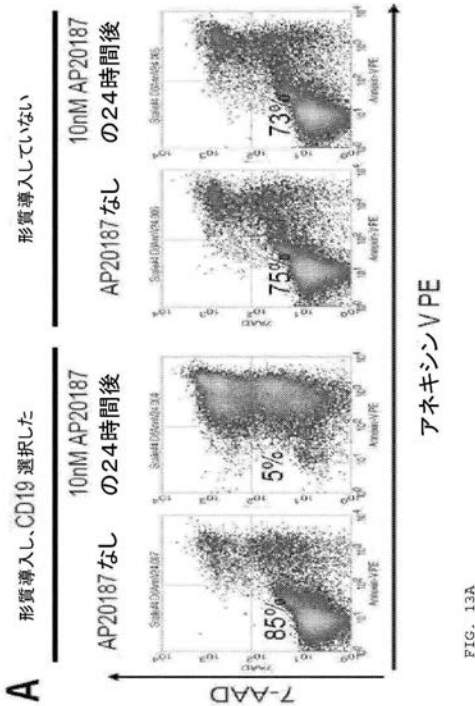
【図 11 C】



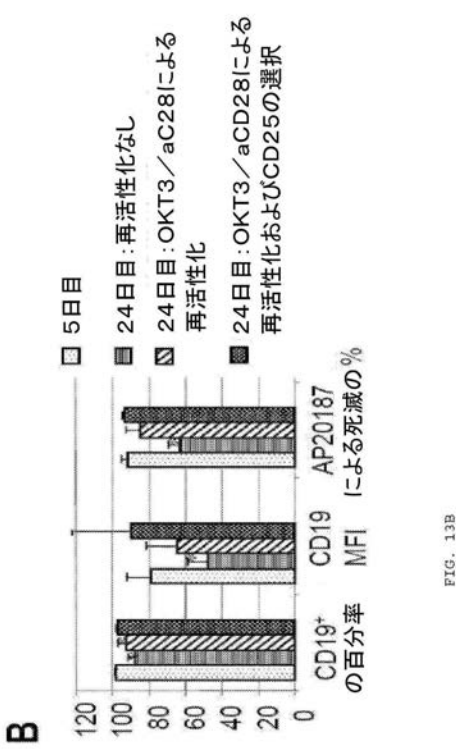
【図 12】



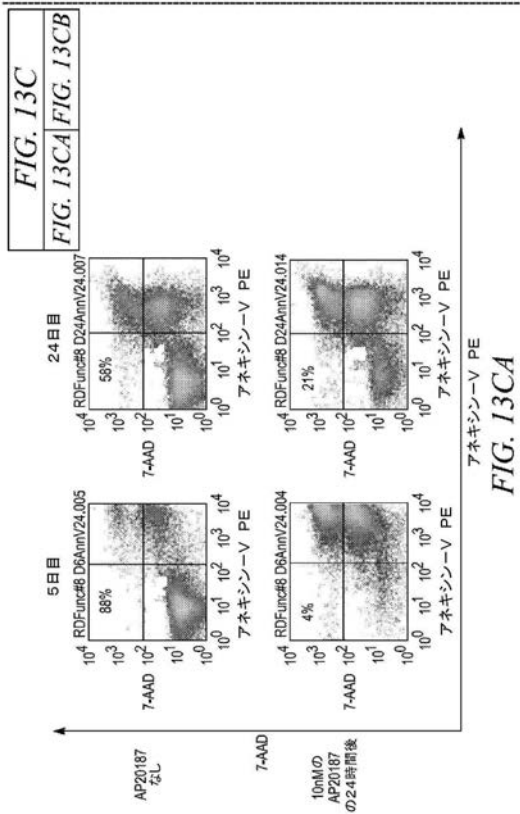
【図 1 3 A】



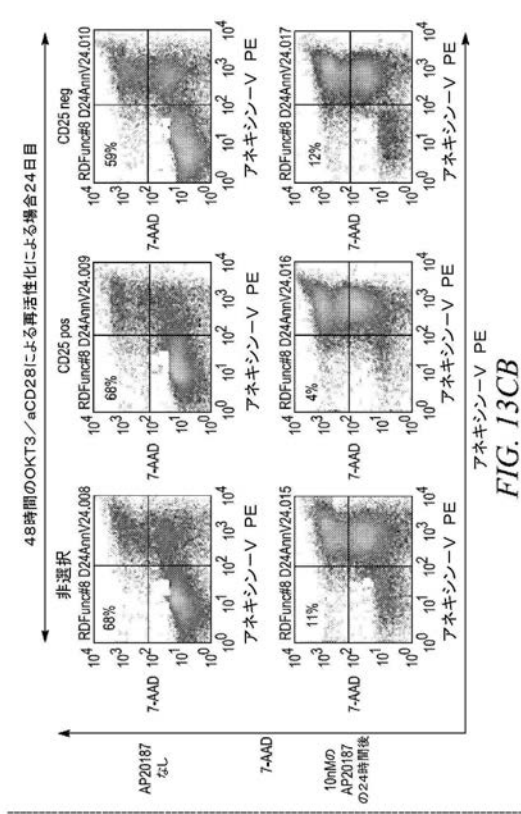
【図 1 3 B】



【図 1 3 C A】



【図 1 3 C B】



【図 14】

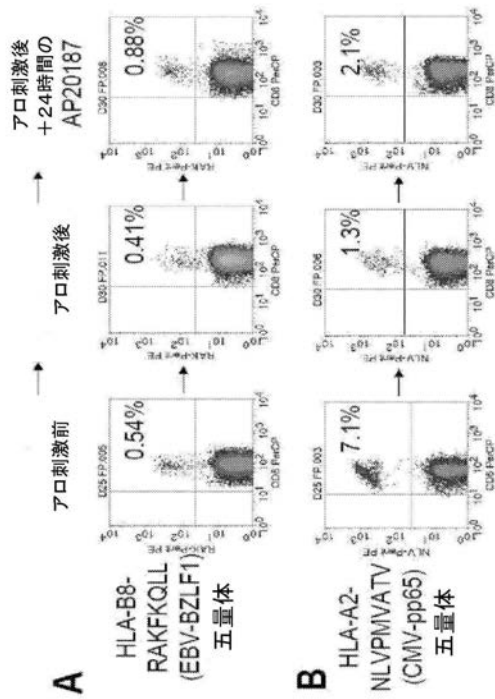


FIG. 14A および 14B

【図 15】

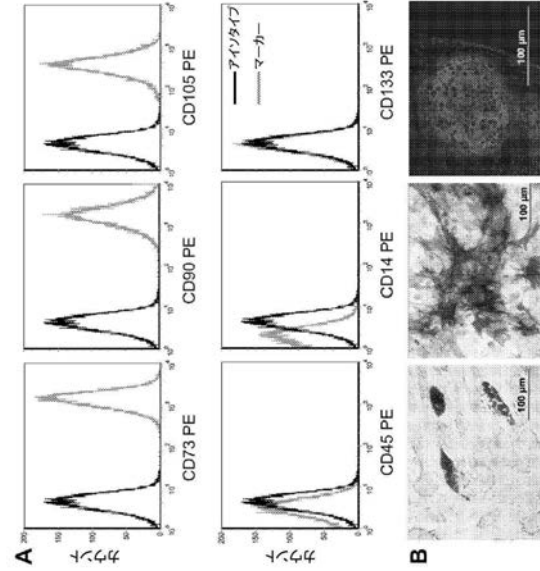


FIG. 15A および 15B

【図 16】

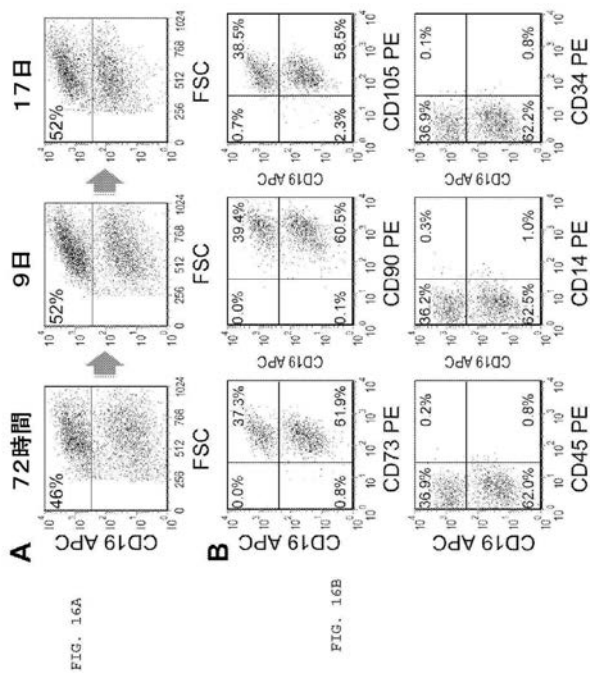


FIG. 16A

FIG. 16B

【図 17】

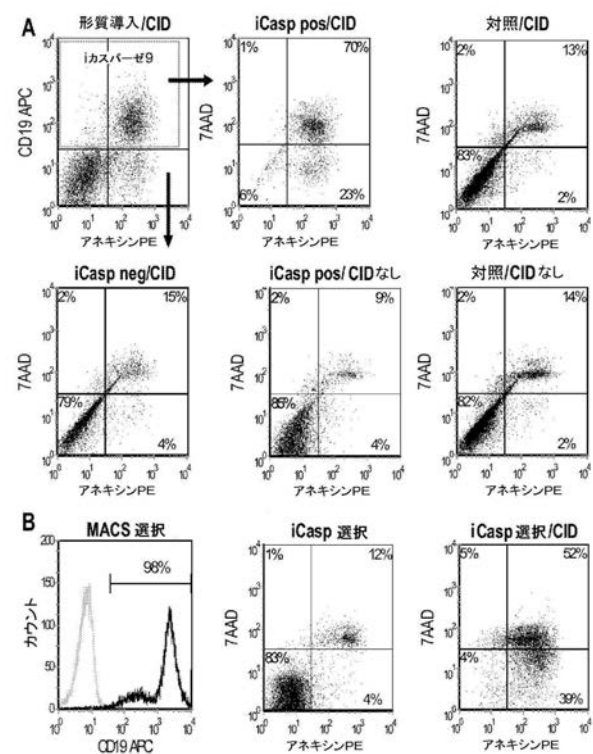


FIG. 17A および 17B

【図 18】

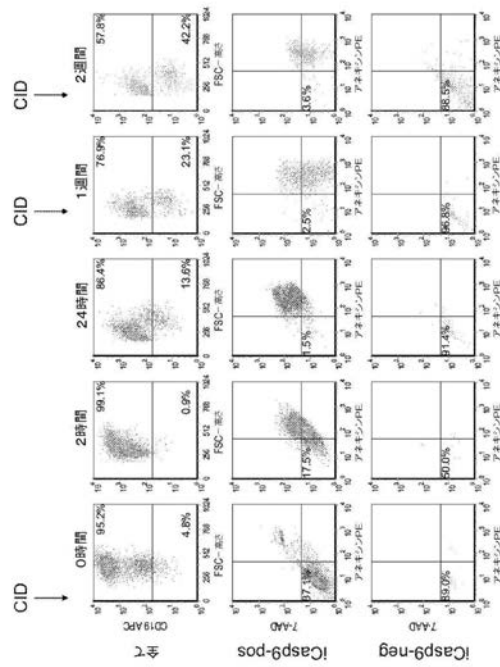


FIG. 18

【図 19】

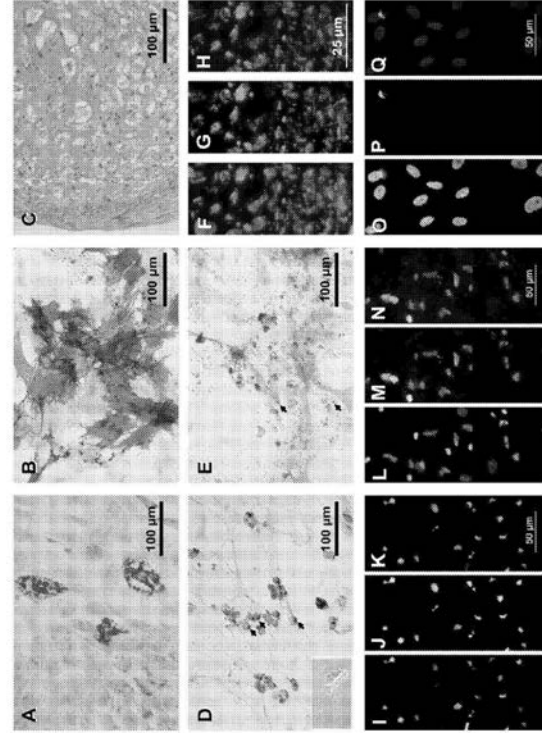


FIG. 19 パネル A-Q

【図 20】

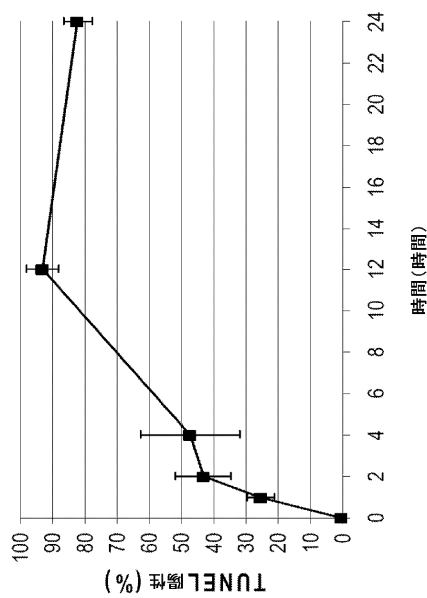


FIG. 20

【図 21】

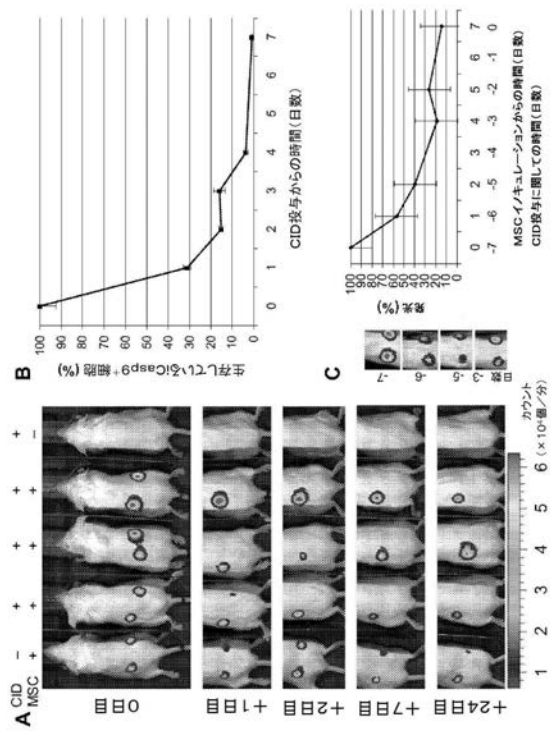
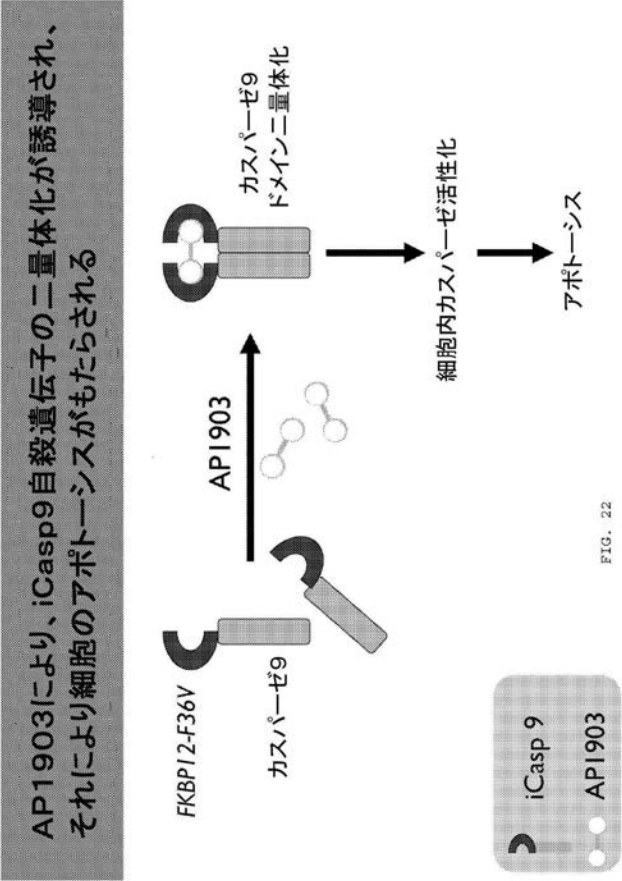
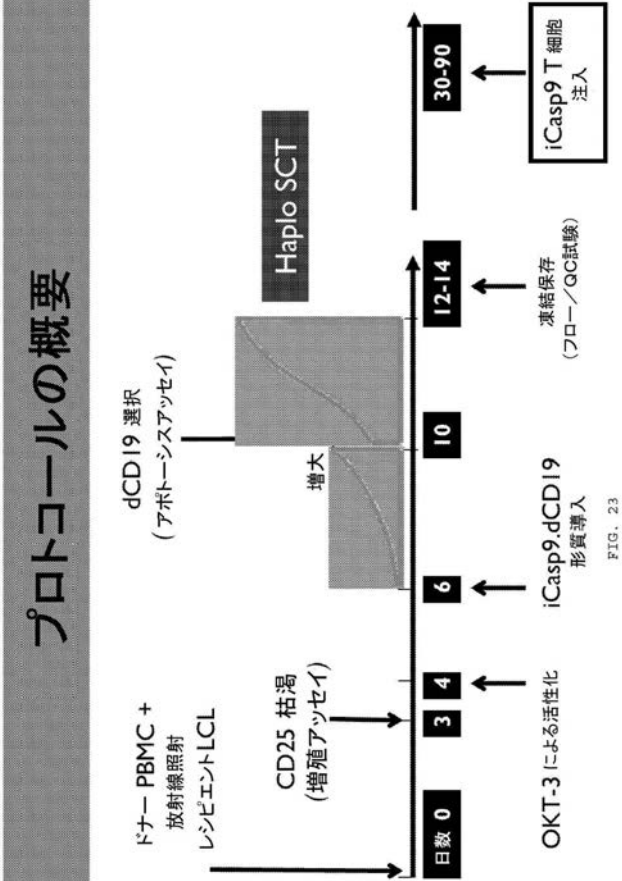


FIG. 21A, 21B および 21C

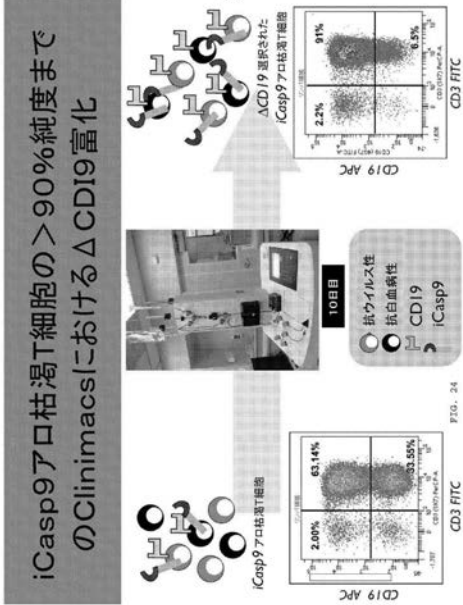
【図 2 2】



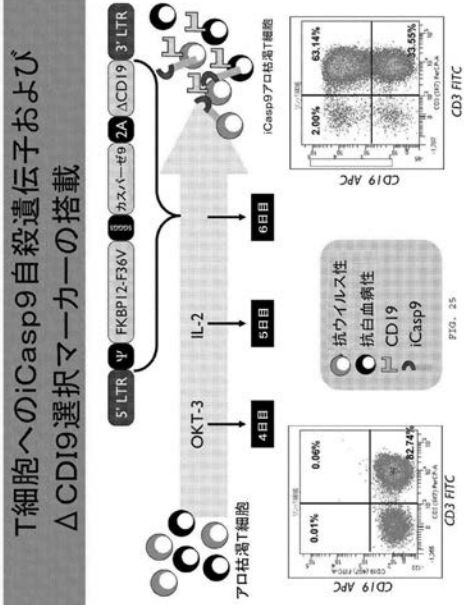
【図 2 3】



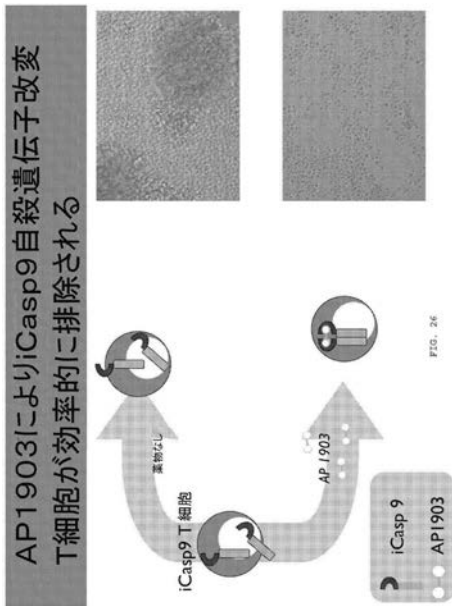
【図 2 4】



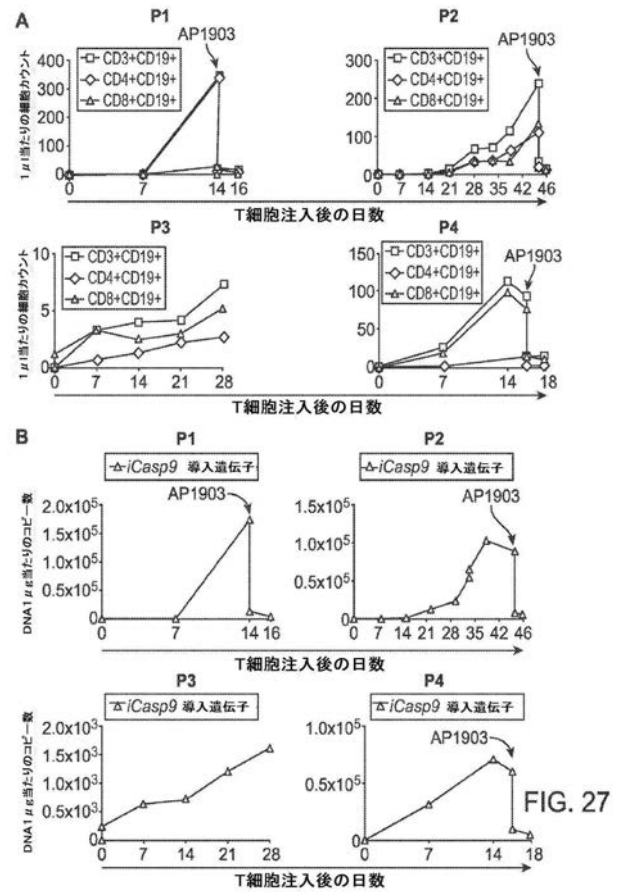
【図 2 5】



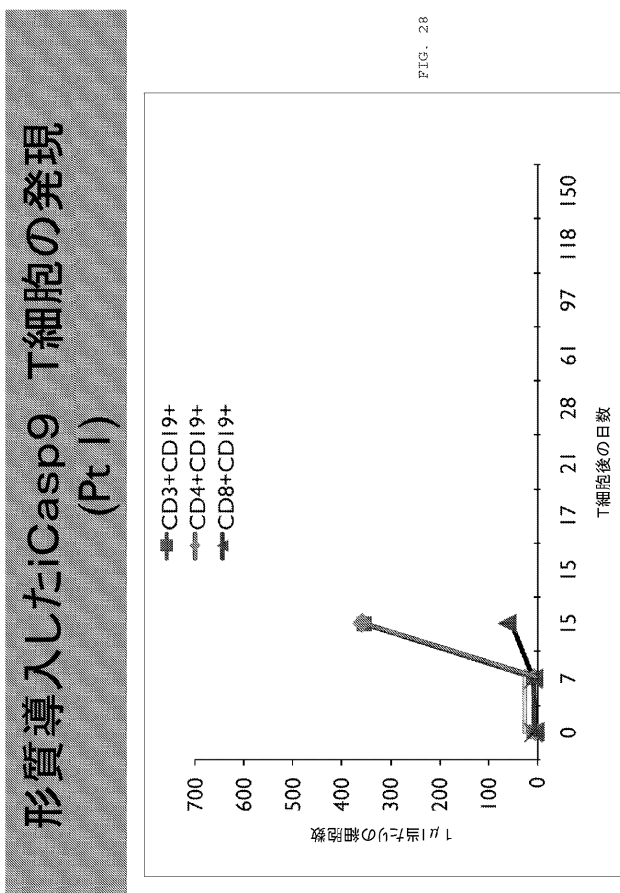
【図 26】



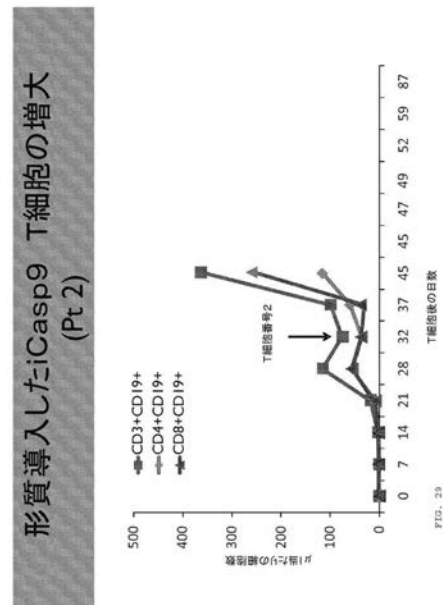
【図 27】



【図 28】



【図 29】



【図 30】

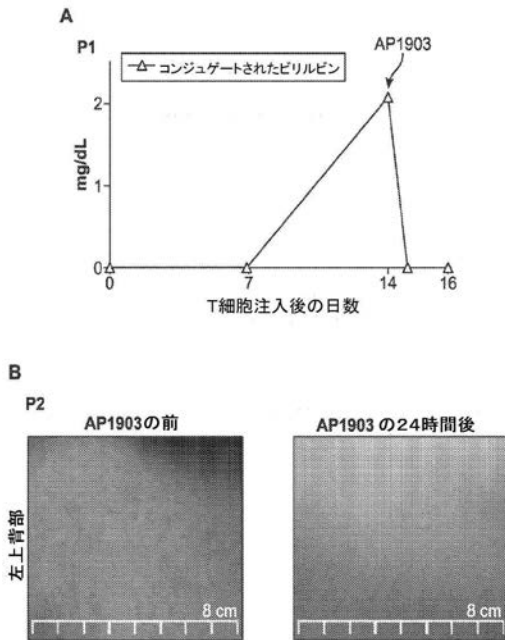


FIG. 30

【図 31】

iCasp9 T細胞増大後のグレード2急性
肝臓GvHD (Pt 1)

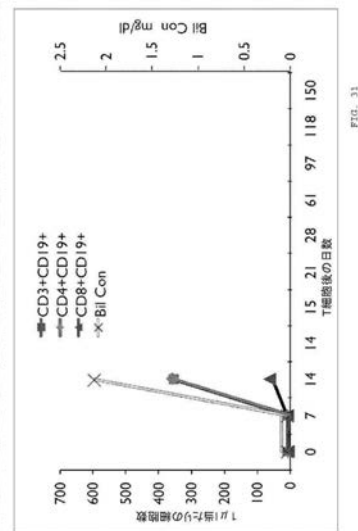


FIG. 31

【図 32】

iCasp9 T細胞増大後のグレード2急性
皮膚GvHD (Pt 2)

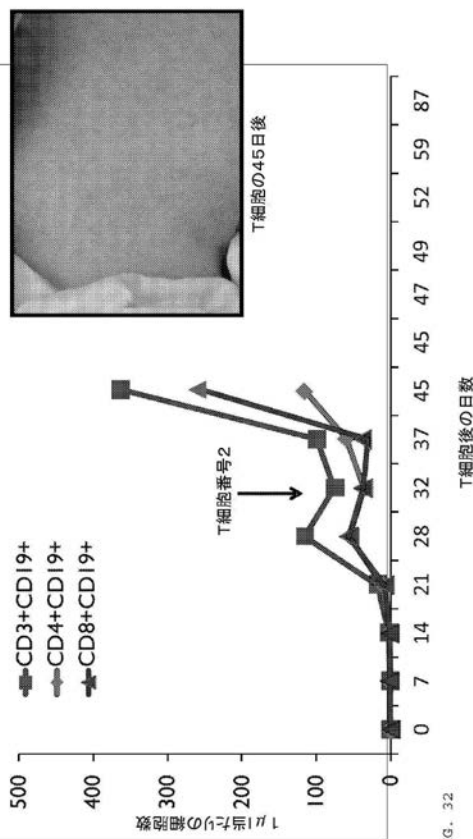


FIG. 32

【図 33】

AP1903によりiCasp9 T細胞が効率的に
排除される (Pt 1)

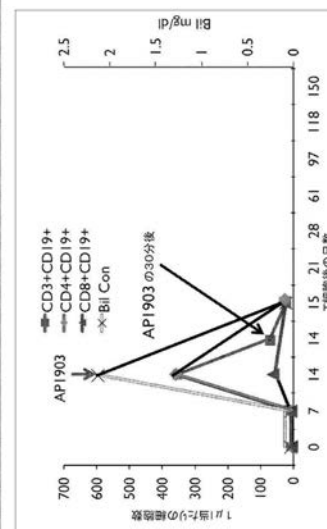


FIG. 33

【図 3 4】

AP1903によりiCasp9 T細胞が効率的に
排除される (Pt 2)

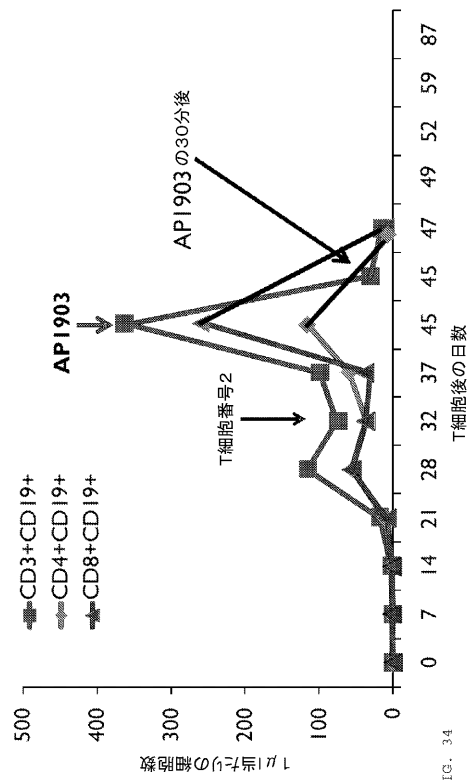


FIG. 34

【図 3 6】

iCasp9アロ枯渇T細胞はAP1903後に
GvHDの徴候を伴わずに増大できる (Pt 1)

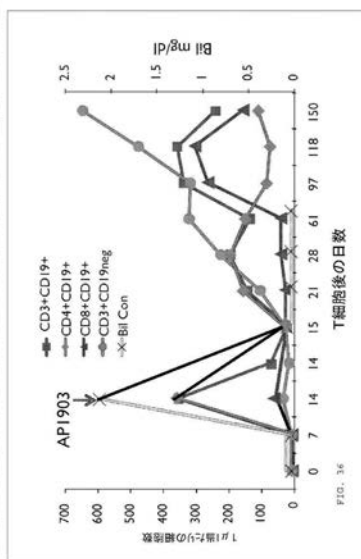


FIG. 36

【図 3 5】

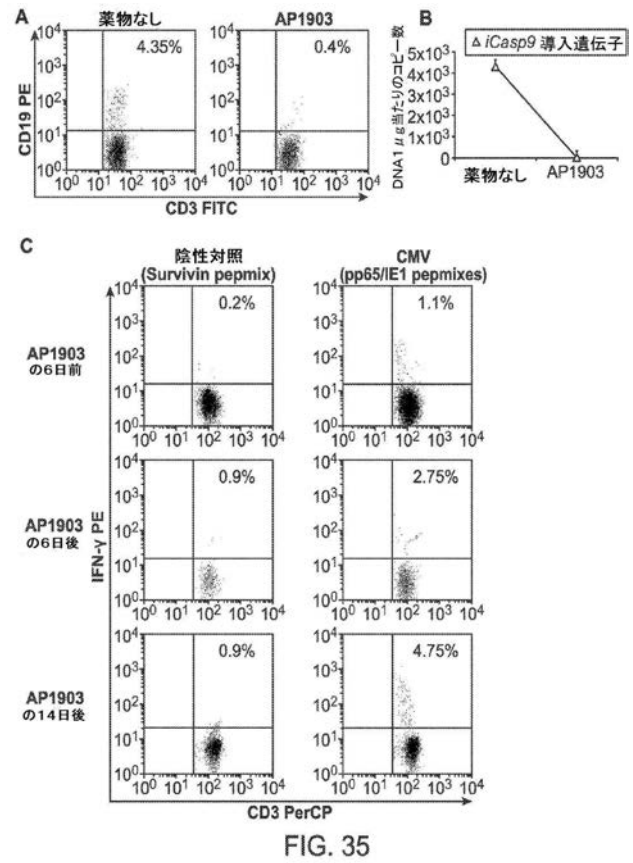


FIG. 35

【図 3 7】

注入後のナイーブ、中心記憶、エフェクター
記憶の再構築 (pt 1)

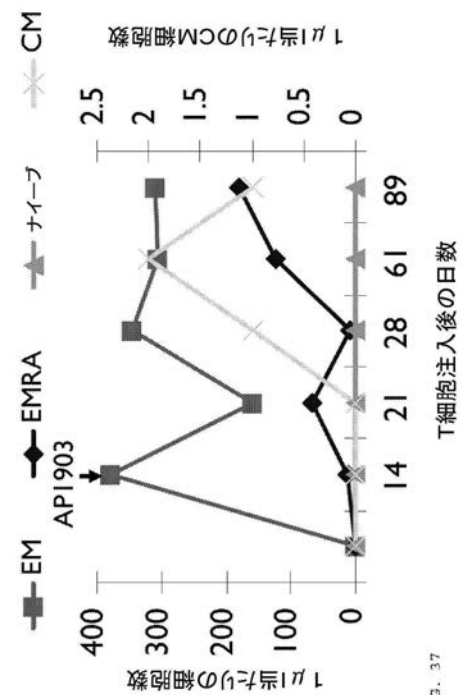
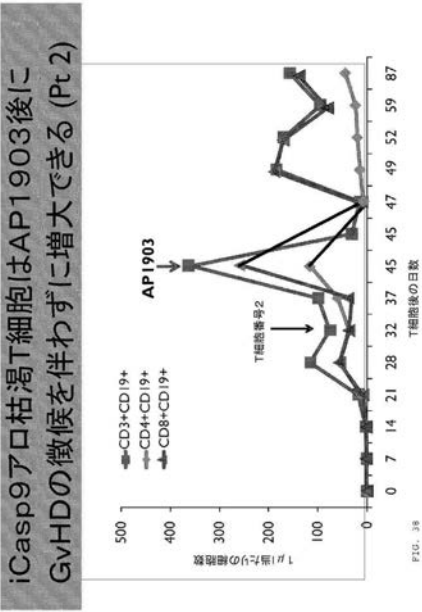
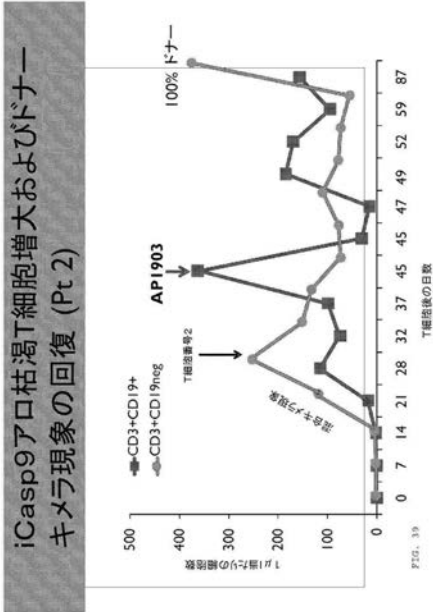


FIG. 37

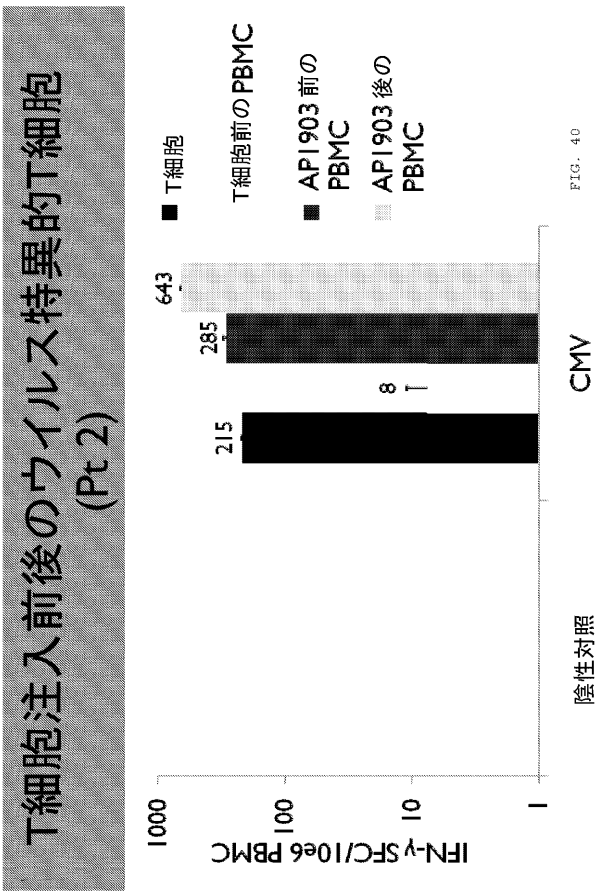
【図 38】



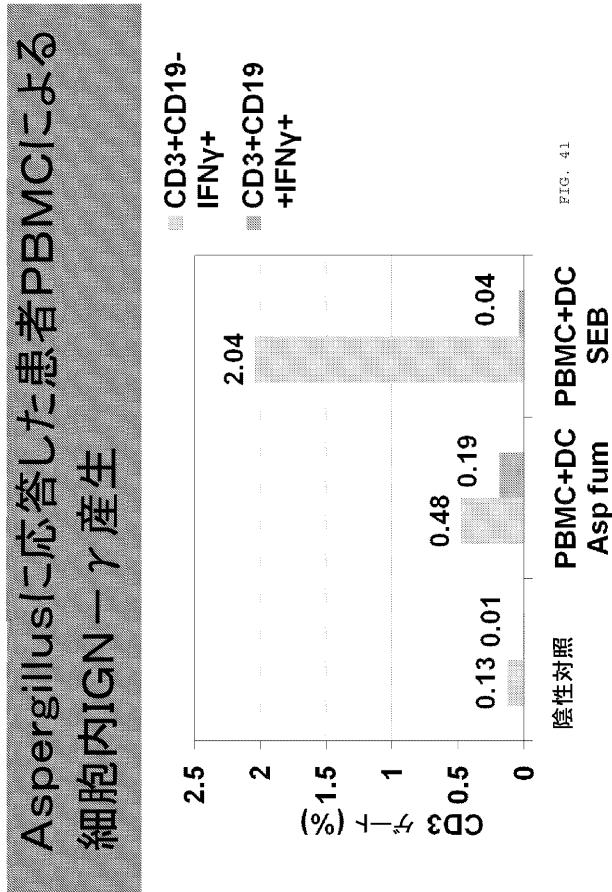
【図 39】



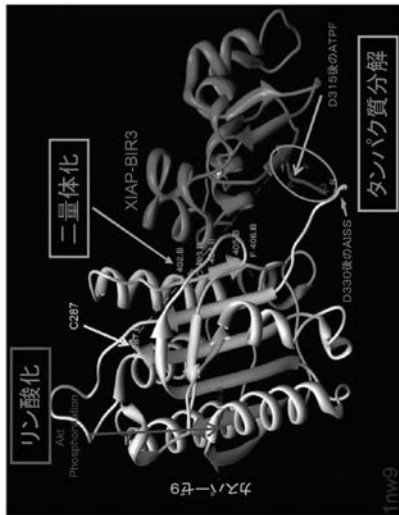
【図 40】



【図 41】

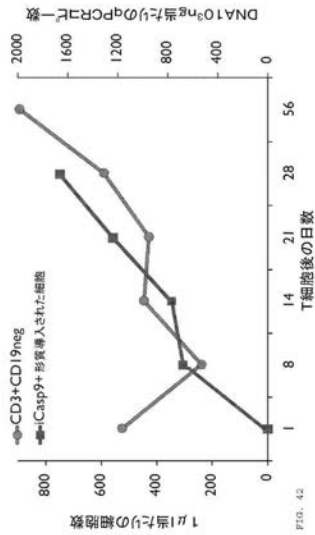


基底の活性の改変



【図 4 4】

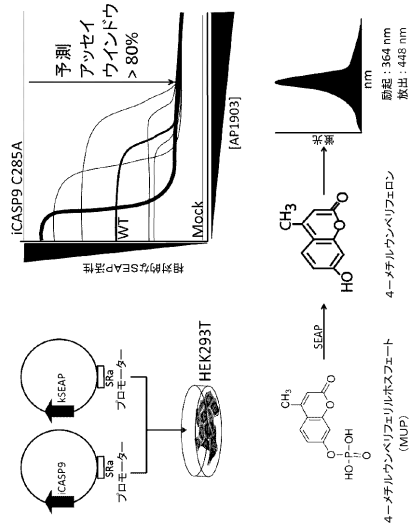
iCasp9 T細胞増大 (Pt 3)



【図 4 2】

FIG 44

分泌型アルカリホスファターゼ (SeAP) アッセイ



【図 4 5】

FIG 45

【図 46】

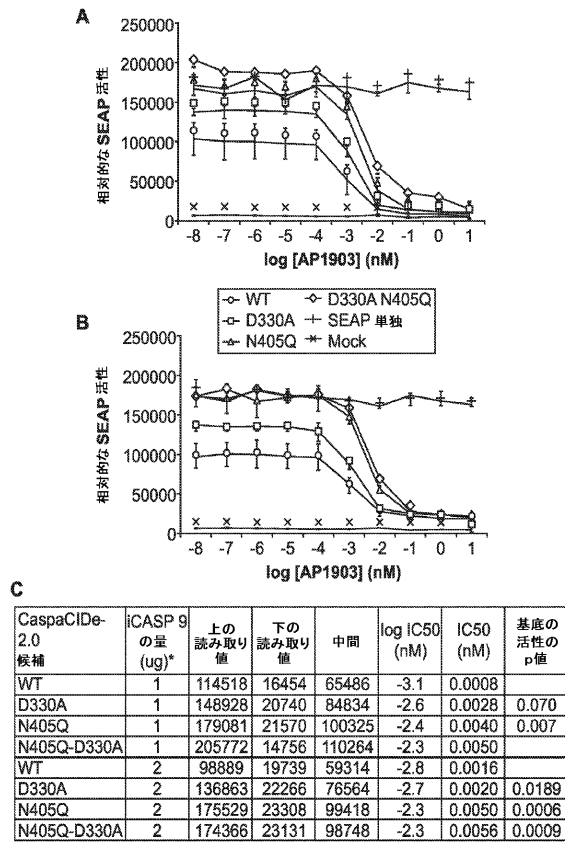
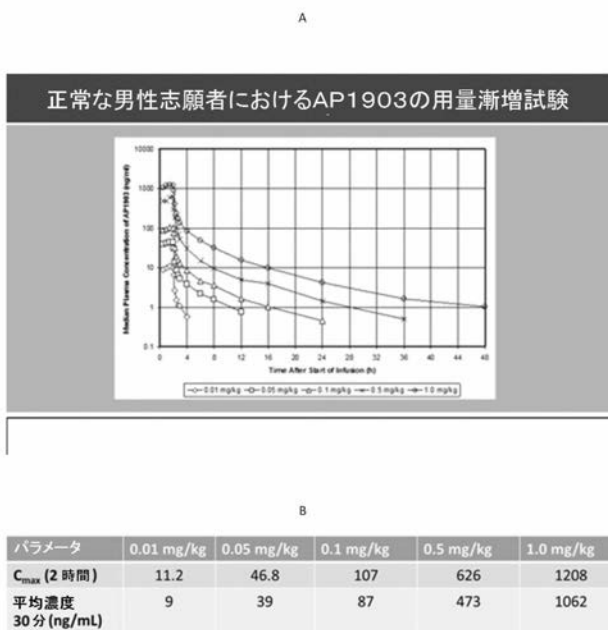


FIG. 46

【図 49】



30分以内のダイナミックレンジ: 10-1000 nM

FIG 49

【図 47】



Figure 47

【図 48】

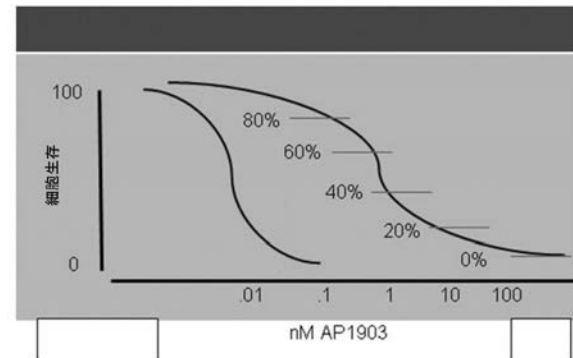
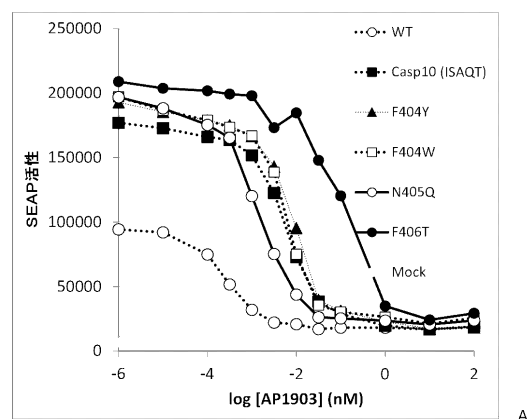


FIG. 48

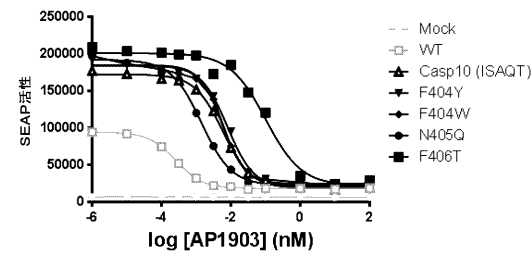
【図 50 A】



A

FIG. 50A

【図 5 0 B】



B

【図 5 0 C】

CaspaCide	最大SEAP活性	IC ₅₀ (pM)
WT	96154	0.3
Casp10 (ISAQT)	179081	5.9
F404Y	192420	8.0
F404W	197190	5.7
N405Q	207815	1.4
F406T	213509	101

C

Fig. 50C

FIG 50B

【図 5 1】

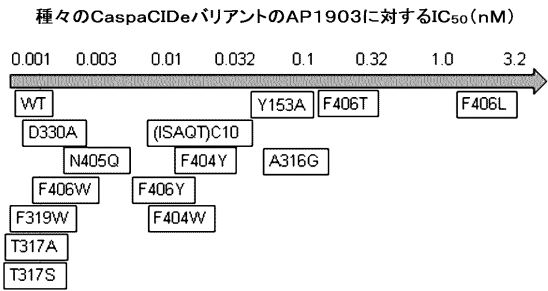


FIG. 51

【図 5 2】

カスパーゼー9二量体化ドメインの部位特異的変異誘発

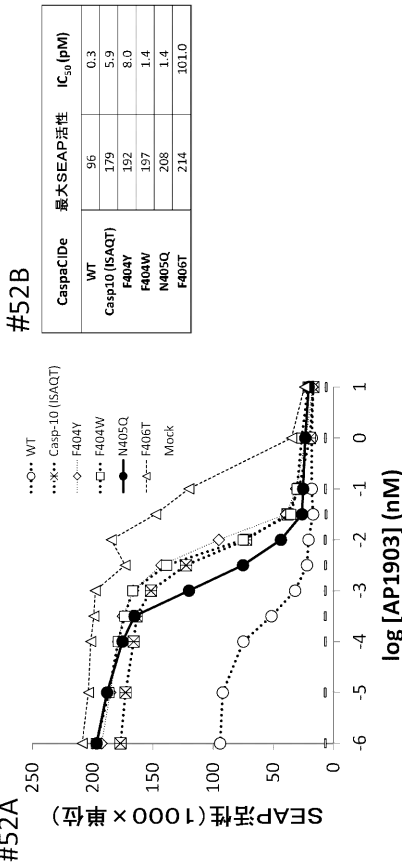


FIG 52

#52B

#52A

【図 5 3 A】

N405Qの基底のシグナル伝達は野生型よりも有意に低い

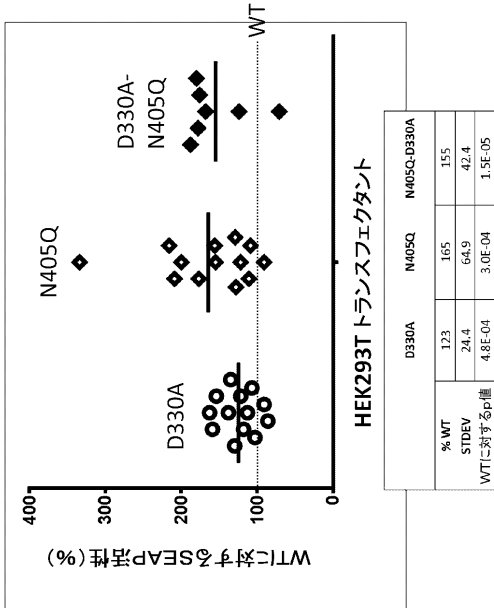


FIG 53A

【図 5 3 B】

N405QのAP1903に対するIC₅₀は野生型よりも3~4倍高い

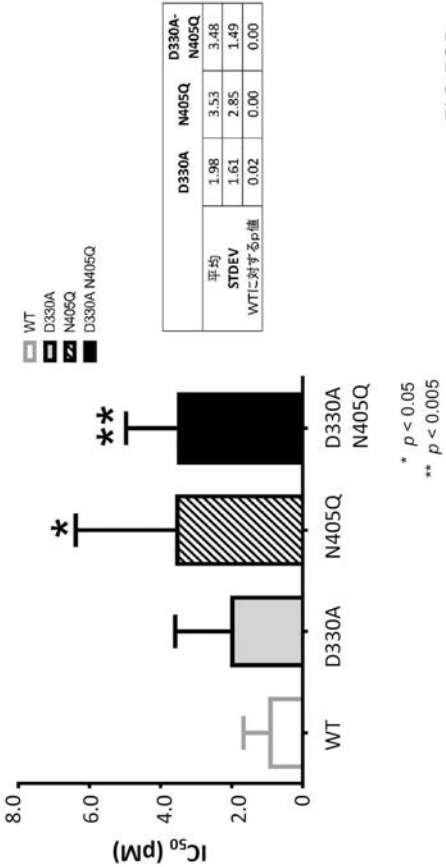


FIG 53B

【図 5 4】

iCasp9-T317A/Sにより、IC₅₀が大きくシフトすることなく基底が減少する

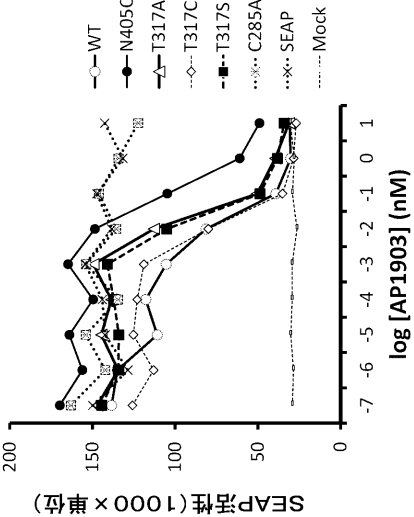


FIG 54

【図 5 5】

T317A/Sにより、IC₅₀が大きくシフトすることなく基底の活性が低下する

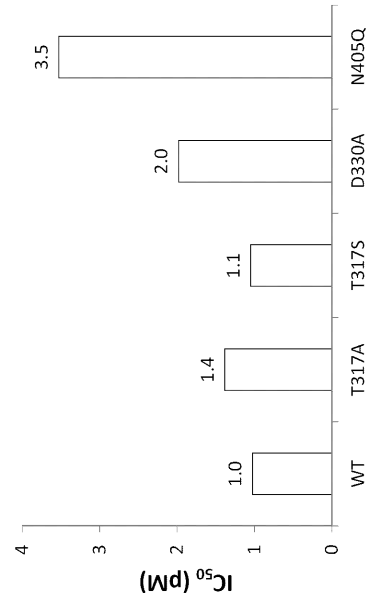


FIG 55

機密

【図 5 8】

iCasp9-2.0候補を形質導入した(5回)PG13細胞

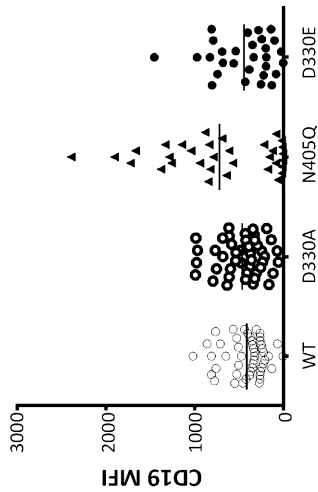


FIG 58

【図 5 9】

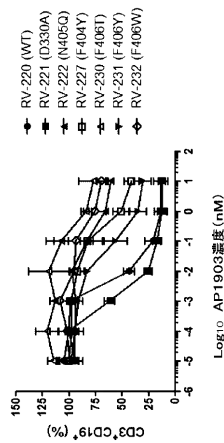


FIG 59

【図 5 6】

iCaspase9-D330変異体(A、E、およびS)により、同様のIC₅₀で統計学的により低い基底の活性が示された

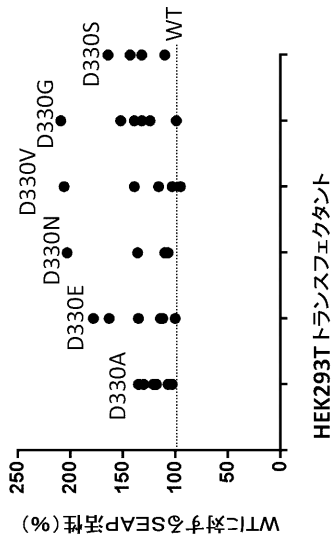


FIG 56

【図 5 7】

D330A、D330E、およびD330Gでは、基底の活性がより低いことと一致して、より低い自己タンパク質分解が示される

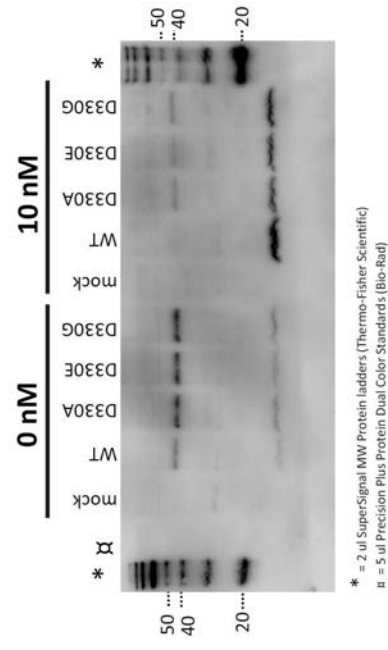


FIG 57

【図 60】

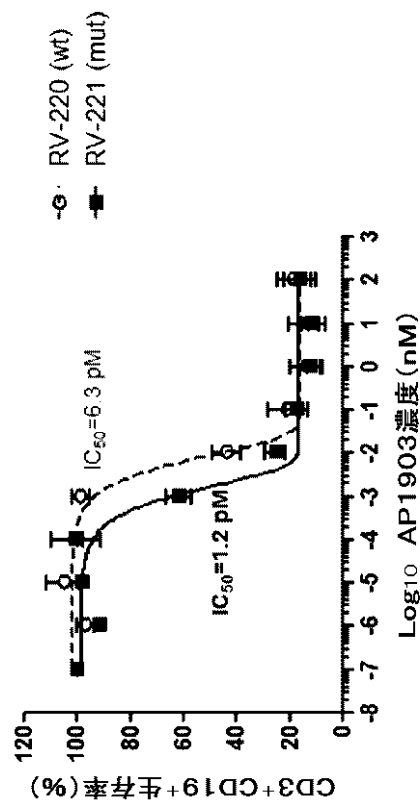


FIG 60

【図 62】

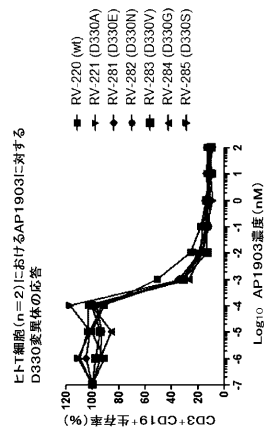


FIG 62

【図 61】

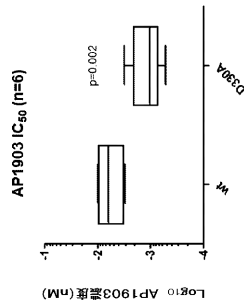


FIG 61

【図 63】

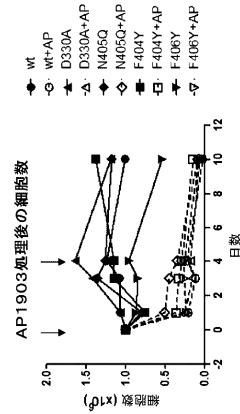


FIG 63

【図 6 4】

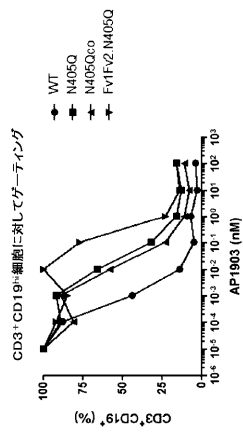


FIG 64

【図 6 5】

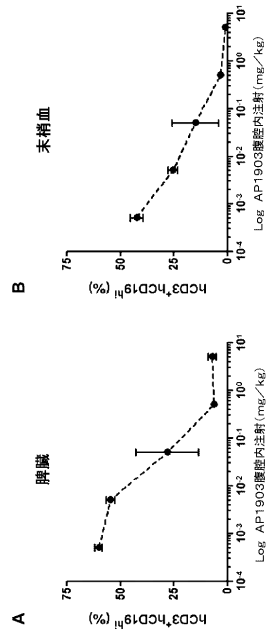


FIG 65

【図 6 6】

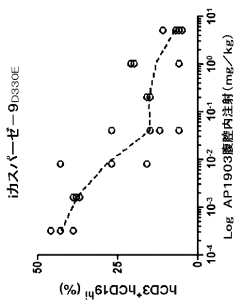


FIG 66

【配列表】

2018188475000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/57	(2006.01)	C 1 2 N	15/57	4 C 0 8 7	
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K	48/00	4 H 0 4 5	
A 6 1 K	35/17	(2015.01)	A 6 1 K	35/17	Z	
A 6 1 K	35/28	(2015.01)	A 6 1 K	35/28		
A 6 1 P	7/06	(2006.01)	A 6 1 P	7/06		
A 6 1 P	7/00	(2006.01)	A 6 1 P	7/00		
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1	
A 6 1 P	1/04	(2006.01)	A 6 1 P	1/04		
A 6 1 P	19/00	(2006.01)	A 6 1 P	19/00		
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00		
A 6 1 K	31/4545	(2006.01)	A 6 1 K	31/4545		
A 6 1 K	47/66	(2017.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1	
A 6 1 K	47/68	(2017.01)	A 6 1 K	47/66		
A 6 1 K	35/545	(2015.01)	A 6 1 K	47/68		
A 6 1 K	35/34	(2015.01)	A 6 1 K	35/545		
A 6 1 K	35/15	(2015.01)	A 6 1 K	35/34		
A 6 1 P	3/00	(2006.01)	A 6 1 K	35/15	Z	
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	3/00		
A 6 1 P	27/02	(2006.01)	A 6 1 P	25/00		
A 6 1 P	37/04	(2006.01)	A 6 1 P	27/02		
A 6 1 P	5/00	(2006.01)	A 6 1 P	37/04		
A 6 1 P	19/08	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5	
A 6 1 P	17/00	(2006.01)	A 6 1 P	5/00		
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 P	19/08		
A 6 1 K	35/51	(2015.01)	A 6 1 P	17/00		
A 6 1 K	47/64	(2017.01)	A 6 1 P	37/06		
A 6 1 K	35/76	(2015.01)	A 6 1 K	35/51		
A 6 1 K	35/761	(2015.01)	A 6 1 K	35/17	A	
C 0 7 K	16/32	(2006.01)	A 6 1 K	47/64		
C 0 7 K	14/725	(2006.01)	A 6 1 K	35/76		
C 0 7 K	19/00	(2006.01)	A 6 1 K	35/761		
C 1 2 N	9/50	(2006.01)	C 0 7 K	16/32		
A 6 1 K	38/48	(2006.01)	C 0 7 K	14/725		
			C 0 7 K	19/00		
			C 1 2 N	9/50		
			A 6 1 K	38/48		

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ケビン スラウイン

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 2
336

(72)発明者 デイビッド スペンサー

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 281
1

(72)発明者 アーロン エドワード フォスター

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 224

4

F ターム(参考) 4B050 DD07 DD11 LL01
4B065 AA92X AA94X AB01 AC14 AC20 BA02 CA24 CA44
4C076 AA95 CC41 EE59
4C084 AA02 AA13 BA41 BA44 DC07 MA02 NA06 NA14 ZA511 ZA551
ZA661 ZA891 ZA961 ZB071 ZB081 ZB091 ZB211 ZB261 ZC021 ZC211
ZC331
4C086 AA01 BC21 GA07 MA02 MA04 NA06 ZA01 ZA33 ZA51 ZA55
ZA66 ZA89 ZA94 ZA96 ZB07 ZB08 ZB09 ZB21 ZB26 ZC02
ZC21 ZC33 ZC75
4C087 AA01 AA02 BB37 BB47 BB65 BC83 CA04 CA12 CA16 MA02
NA06 ZA01 ZA33 ZA51 ZA55 ZA66 ZA89 ZA94 ZA96 ZB07
ZB08 ZB09 ZB21 ZB26 ZC02 ZC21 ZC33 ZC75
4H045 AA30 BA41 CA40 DA50 DA89 EA20 FA74

【外国語明細書】
2018188475000001.pdf