

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6541639号  
(P6541639)

(45) 発行日 令和1年7月10日(2019.7.10)

(24) 登録日 令和1年6月21日(2019.6.21)

(51) Int.Cl.	F 1
A 6 1 K 48/00	(2006.01)
A 6 1 K 35/17	(2015.01)
C 12 N 15/62	(2006.01)
C 12 N 5/10	(2006.01)
A 6 1 P 35/00	(2006.01)
A 6 1 K	48/00
A 6 1 K	35/17
C 12 N	15/62
C 12 N	5/10
A 6 1 P	35/00

請求項の数 46 (全 108 頁)

(21) 出願番号	特願2016-502228 (P2016-502228)
(86) (22) 出願日	平成26年3月13日 (2014.3.13)
(65) 公表番号	特表2016-519068 (P2016-519068A)
(43) 公表日	平成28年6月30日 (2016.6.30)
(86) 國際出願番号	PCT/US2014/026734
(87) 國際公開番号	W02014/151960
(87) 國際公開日	平成26年9月25日 (2014.9.25)
審査請求日	平成29年2月28日 (2017.2.28)
(31) 優先権主張番号	61/783,445
(32) 優先日	平成25年3月14日 (2013.3.14)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	510274452 ベリカム ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド アメリカ合衆国 テキサス 77030, ヒューストン, ウエスト ホルコム ブルバード 2130, スイート 8 50
(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(74) 代理人	100181674 弁理士 飯田 貴敏
(74) 代理人	100181641 弁理士 石川 大輔

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 T細胞増殖をコントロールするための方法

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

改变された細胞であって、各改变された細胞が誘導可能なキメラシグナル伝達分子をコードするポリヌクレオチドを含む核酸を含み、ここで、前記改变された細胞は、T細胞、NK細胞またはNK-T細胞であり、そして、前記誘導可能なキメラシグナル伝達分子は、

(a) 膜標的化領域、

(b) F K B P 1 2 ポリペプチドもしくはF K B P 1 2 バリアントポリペプチドを含む多量体化領域、

(c) C D 2 7、C D 2 8、I C O S、4 - 1 B B、C D 4 0、R A N K / T R A N C E - R、C D 3 ゼータ鎖およびO X 4 0 からなる群より選択される第1の共刺激ポリペプチド細胞質シグナル伝達領域、ならびに

(d) C D 2 7、C D 2 8、I C O S、4 - 1 B B、C D 4 0、R A N K / T R A N C E - R、C D 3 ゼータ鎖およびO X 4 0 からなる群より選択される第2の共刺激ポリペプチド細胞質シグナル伝達領域

を含み、前記キメラシグナル伝達分子は、細胞外ドメインを欠くか、または、機能的な細胞外ドメインを有さず、その結果、前記改变された細胞が前記F K B P 1 2 ポリペプチドまたは前記F K B P 1 2 バリアントポリペプチドに結合する多量体リガンドに曝露されると、前記キメラシグナル伝達分子がオリゴマー化し、前記改变された細胞の活性化を誘導する、改变された細胞。

10

20

## 【請求項 2】

前記第1および第2の共刺激ポリペプチド細胞質シグナル伝達領域が、CD27、CD28、ICOS、4-1BB、およびOX40からなる群より選択される、請求項1に記載の改变された細胞。

## 【請求項 3】

前記第1および第2の共刺激ポリペプチド細胞質シグナル伝達領域が、(a) OX40細胞質シグナル伝達領域ポリペプチドおよび4-1BB細胞質シグナル伝達領域ポリペプチド、あるいは(b) CD28細胞質シグナル伝達領域および4-1BB細胞質シグナル伝達領域を含む、請求項1または2に記載の改变された細胞。

## 【請求項 4】

改变された細胞であって、各改变された細胞が誘導可能なキメラシグナル伝達分子をコードするポリヌクレオチドを含む核酸を含み、ここで、前記誘導可能なキメラシグナル伝達分子は、

(a) 膜標的化領域、

(b) FKP12ポリペプチドもしくはFKB12バリアントポリペプチドを含む多量体化領域、および

(c) CD27、CD28、ICOS、4-1BBおよびOX40からなる群より選択される共刺激ポリペプチド細胞質シグナル伝達領域を含み、

前記改变された細胞は、T細胞、NK細胞およびNK-T細胞からなる群より選択され、

前記キメラシグナル伝達分子は、細胞外ドメインを欠くか、または、機能的な細胞外ドメインを有さず、その結果、前記改变された細胞が前記FKP12ポリペプチドまたは前記FKB12バリアントポリペプチドに結合する多量体リガンドに曝露されると、前記キメラシグナル伝達分子がオリゴマー化し、前記改变された細胞の活性化を誘導する、改变された細胞。

## 【請求項 5】

前記膜標的化領域が、レセプター由来の、ミリストイル化標的化配列、パルミトイ化標的化配列、ブレニル化配列、タンパク質間相互作用モチーフ、および、シグナルペプチドを利用する膜貫通配列からなる群より選択される、請求項1～4のいずれか1項に記載の改变された細胞。

## 【請求項 6】

前記膜標的化領域が、ミリストイル化標的化配列である、請求項5に記載の改变された細胞。

## 【請求項 7】

前記誘導可能なキメラシグナル伝達分子が、CD3ポリペプチドをさらに含む、請求項1～6のいずれか1項に記載の改变された細胞。

## 【請求項 8】

前記多量体化領域が、FKB12バリアントポリペプチド領域である、請求項1～7のいずれか1項に記載の改变された細胞。

## 【請求項 9】

前記FKB12バリアントポリペプチド領域が、FKB12v36ポリペプチド領域である、請求項1～7のいずれか1項に記載の改变された細胞。

## 【請求項 10】

前記多量体化領域が、Fv'Fv1sである、請求項1～7のいずれか1項に記載の改变された細胞。

## 【請求項 11】

前記多量体化領域が、2つのFKB12ポリペプチドもしくはFKB12バリアントポリペプチド領域を含む、請求項1～7のいずれか1項に記載の改变された細胞。

## 【請求項 12】

10

20

30

40

50

前記多量体リガンドが、A P 1 9 0 3 または A P 2 0 1 8 7 である、請求項 1\_1 に記載の改変された細胞。

【請求項 1 3】

前記多量体化領域が、配列番号 5 8 のアミノ酸配列またはその機能的フラグメントを有する、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の改変された細胞。

【請求項 1 4】

前記多量体化領域が、配列番号 6 0 のアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはその機能的フラグメントをさらに含む、請求項 1\_3 に記載の改変された細胞。

【請求項 1 5】

前記多量体化領域が、配列番号 5 8 のアミノ酸配列を有するポリペプチドもしくはその機能的フラグメント、または、配列番号 6 0 のアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはその機能的フラグメントをさらに含む、請求項 1\_3 または 1\_4 に記載の改変された細胞。 10

【請求項 1 6】

前記核酸が、前記ポリヌクレオチドに作動可能に連結されたプロモーター配列を含む、請求項 1 ~ 1\_5 のいずれか 1 項に記載の改変された細胞。

【請求項 1 7】

前記核酸が、ウイルスベクター内に含まれている、請求項 1 ~ 1\_6 のいずれか 1 項に記載の改変された細胞。

【請求項 1 8】

前記ウイルスベクターが、レトロウイルスベクターである、請求項 1\_7 に記載の改変された細胞。 20

【請求項 1 9】

前記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、請求項 1\_8 に記載の改変された細胞。

【請求項 2 0】

前記マウス白血病ウイルスベクターが、M o M L V ベクターである、請求項 1\_9 に記載の改変された細胞。

【請求項 2 1】

前記レトロウイルスベクターが、S F G ベクターである、請求項 1\_8 に記載の改変された細胞。 30

【請求項 2 2】

前記ウイルスベクターが、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、請求項 1\_7 に記載の改変された細胞。

【請求項 2 3】

前記核酸が、プラスミド内に含まれている、請求項 1 ~ 1\_6 のいずれか 1 項に記載の改変された細胞。

【請求項 2 4】

前記細胞が、T 細胞である、請求項 1 ~ 2\_3 のいずれか 1 項に記載の改変された細胞。

【請求項 2 5】

前記細胞が、骨髄から得られるかまたは調製される、請求項 1 ~ 2\_4 のいずれか 1 項に記載の改変された細胞。 40

【請求項 2 6】

前記細胞が、臍帯血、末梢血、または末梢血単核球から得られるかまたは調製される、請求項 1 ~ 2\_3 のいずれか 1 項に記載の改変された細胞。

【請求項 2 7】

前記細胞が、ヒト細胞である、請求項 1 ~ 2\_6 のいずれか 1 項に記載の改変された細胞。

【請求項 2 8】

前記細胞が、シグナルペプチド、一本鎖可変フラグメント、C H 2 - C H 3 ヒンジ領域および C D 3 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 50

含む第2の核酸をさらに含む、請求項1～27のいずれか1項に記載の改変された細胞。

【請求項29】

前記一本鎖可変フラグメントが、腫瘍細胞上の抗原に結合するか、または過剰増殖性疾患に関する細胞上の抗原に結合する、請求項28に記載の改変された細胞。

【請求項30】

前記一本鎖可変フラグメントが、PSMA、PSCA、MUC1、CD19、ROR1、メソテリン、GD2、CD123、MUC16およびHer2/Neu一本鎖可変フラグメントからなる群より選択される、請求項28または29に記載の改変された細胞。

【請求項31】

10

免疫応答を誘導するための方法であって、

請求項1～30のいずれか1項に記載の改変された細胞を、エキソソームにおいて、前記FKBP12ポリペプチドまたは前記FKBP12バリアントポリペプチドに結合する前記多量体リガンドと接触させて、誘導可能なキメラシグナル伝達分子の多量体化をもたらす工程

を含む、方法。

【請求項32】

インビボにおいて免疫応答を誘導するための組成物であって、請求項1～30のいずれか1項に記載の細胞を含み、被験体に投与されることを特徴とする、組成物。

【請求項33】

20

前記組成物が、誘導可能なキメラシグナル伝達分子の多量体化をもたらす多量体化領域に結合するリガンドを含む組成物と組み合わせて投与されることを特徴とする、請求項32に記載の組成物。

【請求項34】

前記リガンドが、二量体である、請求項33に記載の組成物。

【請求項35】

前記リガンドが、二量体のFK506または二量体のFK506様アナログである、請求項33に記載の組成物。

【請求項36】

30

前記リガンドが、AP1903またはAP20187である、請求項33に記載の組成物。

【請求項37】

前記被験体が、過剰増殖性疾患と診断されている、請求項32～36のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項38】

前記被験体が、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、請求項32～36のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項39】

前記被験体が、原発性免疫不全障害、血球貪食リンパ組織球增多症(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より選択される状態と診断されている、請求項32～36のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項40】

前記被験体が、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/欠損症、分類不能型免疫不全症(CVID)、慢性肉芽腫症、IPEX(免疫不全、多腺性内分泌障害、腸疾患、X連鎖)またはIPEX様、ウィスコット・オールドリッヂ症候群、CD40リガンド欠損症、白血球接着不全、DOCK8欠損症、IL-10欠損症/IL-10レセプター欠損症、GATA2欠損症、X連鎖リンパ球増殖性疾患(XLP)、軟骨毛髪形成不全、シュバッハマン・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、鎌状

40

50

赤血球症、サラセミア、ムコ多糖症、スフィンゴリピドーシスおよび大理石骨病からなる群より選択される状態と診断されている、請求項3 2 ~ 3 6のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項41】

被験体における白血病を処置するための組成物であって、請求項2 8 ~ 3 0のいずれか1項に記載の改変された細胞を含み、前記一本鎖可変フラグメントがCD19に結合し、前記組成物が、前記多量体リガンドと組み合わせて前記被験体に投与されることを特徴とする、組成物。

【請求項42】

前記多量体リガンドの投与後のCD19発現B細胞のレベルと比べたときの、前記被験体におけるCD19発現B細胞の増加の存在または不在が決定されること、ならびに

前記被験体におけるCD19発現B細胞の増加の存在が決定された場合に、前記被験体にさらなる用量の前記多量体リガンドが投与されることを特徴とする、請求項4 1に記載の組成物。

【請求項43】

前記被験体が、HIV、インフルエンザ、疱疹、ウイルス性肝炎、エブスタイン・バー、ポリオ、ウイルス性脳炎、麻疹、水痘、サイトメガロウイルス(CMV)、アデノウイルス(ADV)、HHV-6(ヒトヘルペスウイルス6,I)およびパピローマウイルスからなる群より選択されるウイルス病因の感染症と診断されているか、または肺炎、結核および梅毒からなる群より選択される細菌病因の感染症と診断されているか、またはマラリア、トリパノソーマ症、リーシュマニア症、トリコモナス症およびアーベバ症からなる群より選択される寄生生物病因の感染症と診断されている、請求項3 2 ~ 3 6のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項44】

さらなる用量の前記多量体リガンドが、前記被験体に投与されるべきであるか否かが決定されることを特徴とする、請求項3 2 ~ 4 1のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項45】

前記多量体リガンドの投与後の腫瘍サイズおよび/または腫瘍細胞数と比べたときの、前記被験体における腫瘍サイズの増加および/または腫瘍細胞数の増加の存在または不在が決定されること、ならびに

腫瘍サイズの増加および/または腫瘍細胞数の増加の存在が決定された場合に、前記被験体にさらなる用量の前記多量体リガンドが投与されることを特徴とする、請求項3 2 ~ 3 6のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項46】

前記被験体が、ヒトである、請求項3 2 ~ 4 5のいずれか1項に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

分野

本技術は、概して免疫学の分野に関し、部分的には、T細胞、例えば、治療用T細胞の増殖をコントロールするための組成物および方法に関する。それらの方法は、被験体において免疫応答を誘導するための組成物および方法にさらに関する。

【0002】

関連特許出願

優先権は、2013年3月14日に出願され、「T細胞増殖をコントロールするための方法」との表題の米国特許出願第61/783,445号(これは、その全体が全て本明細書に言及され、参考として援用される)に対して主張される。

【背景技術】

【0003】

背景

10

20

30

40

50

T細胞の活性化は、病原微生物（例えば、ウイルス、細菌および寄生生物）、外来タンパク質および環境内の有害な化学物質に対する防御免疫において重要な工程である。T細胞は、その表面上に、抗原提示細胞の表面上に提示された抗原を認識するレセプター（すなわち、T細胞レセプター）を発現している。正常な免疫応答では、これらの抗原がT細胞レセプターに結合することにより、細胞内の変化が惹起され、T細胞の活性化に至る。

#### 【0004】

キメラ抗原レセプター（CAR）は、T細胞に抗原特異性を伝えるためにデザインされた人工レセプターである。それらは、T細胞を活性化し、特異免疫をもたらすように選択された、抗原特異的な構成要素、膜貫通の構成要素および細胞内の構成要素を含む。キメラ抗原レセプターを発現しているT細胞は、癌治療をはじめとした様々な治療において使用され得る。これらの治療は、腫瘍に対して有効であるが、場合によっては、健康な組織に対する非特異的な攻撃に部分的に起因して、副作用をもたらした。強力な免疫療法反応をもたらし、かつ有毒な副作用を回避する、コントロール可能なT細胞治療のための方法が必要とされている。

10

#### 【発明の概要】

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0005】

##### 要旨

例えば、免疫応答を誘導するためまたは増大させるために使用され得る、CIDによって誘導可能なキメラシグナル伝達分子（CSM）が、部分的に提供される。CSMは、単独でまたはキメラ抗原レセプター（CAR）と組み合わせて使用され得、特定の腫瘍細胞に対する免疫応答を特異的に生じさせる。コントロールされたT細胞活性化の方法は、以前のCARに基づく処置の有毒な副作用の多くを回避する。

20

#### 【0006】

本明細書中で論じられるキメラシグナル伝達分子は、細胞内で共発現されるキメラ抗原レセプター（CAR）の持続的で調節されたコントロールを可能にする。ある疾患または状態に関係している細胞性抗原を標的化するようにデザインされた抗原特異的T細胞の活性化は、リガンド誘導物質の投与に依存する。そのリガンド誘導物質は、キメラシグナル伝達分子を多量体化することによってCAR発現細胞を活性化し、次に、細胞、例えば、T細胞、腫瘍浸潤リンパ球、ナチュラルキラー細胞またはナチュラルキラーT細胞を活性化するNF-Bシグナル伝達を活性化する。（例えば、図20を参照のこと）。リガンド誘導物質の非存在下では、T細胞は、静止状態であるか、または基底レベルの活性を有する。そのリガンドの定期的な投薬スケジュールは、CAR発現T細胞の増殖および活性化の速度および規模を決定する。

30

#### 【0007】

完全な活性化および腫瘍細胞殺傷は、依然として、抗原認識、およびCD3ゼータシグナル伝達を介したNFATのさらなる活性化に依存している。完全奏効（CR）が達成されると、リガンドの投薬を終了する。疾患または状態が再発した場合、リガンドの投薬を再開し、腫瘍を標的にしている静止状態のT細胞の再拡大および再活性化がもたらされる。

40

#### 【0008】

細胞治療の1つの例において、キメラ抗原レセプターをコードする核酸を形質導入されたT細胞が、癌を処置するために患者に投与された（Zhong, X. - S. , (2010) Molecular Therapy 18: 413 - 420）。例えば、ヒト化モノクローナル抗体Trastuzumab（Herceptin）に基づくキメラ抗原レセプターを発現しているT細胞が、癌患者を処置するために使用された。しかしながら、有害事象が生じる可能性があり、少なくとも1つの報告された症例では、その治療は、患者に対して致命的結果をもたらした（Morgan, R. A. ら (2010) Molecular Therapy 18: 843 - 851）。本明細書中に提示されるように、コントロール可能で誘導可能な安全スイッチを細胞に形質導入することにより、リガンド

50

誘導物質の投与を停止することによって有害事象が進行するのを阻止できる安全スイッチが提供され得る。低レベルの基底活性が残るかもしれないが、その誘導物質の存在を除去することにより、有害事象の症状は、無くなるとまではいかなくとも、大幅に減少するはずである。

#### 【0009】

細胞治療の別の例において、T細胞は、非機能性のTGF-ベータレセプターを発現するように改変され、それにより、そのT細胞は、TGF-ベータに抵抗性になる。これにより、その改変されたT細胞が、TGF-ベータによって引き起こされる細胞傷害を回避することが可能になり、それらの細胞を細胞治療において使用できるようになる (Boland, C. J. ら (2002) Blood 99: 3179 - 3187; Boland, C. M. ら (2004) J. Exptl. Med. 200: 1623 - 1633)。しかしながら、それは、T細胞リンパ腫、または改変されたT細胞が正常な細胞コントロールの一部を欠くときは他の有害作用ももたらし得；これらの治療用T細胞自体が、悪性になり得る。本明細書中に提示されるように、これらの改変されたT細胞に、誘導可能なCSMポリペプチドに基づく安全スイッチを形質導入することにより、この結果を回避できる安全スイッチが提供され得る。

#### 【0010】

したがって、誘導可能なキメラシグナル伝達分子をコードするポリヌクレオチドを含む核酸を含む組成物が、いくつかの実施形態において特徴付けられ、ここで、その誘導可能なキメラシグナル伝達分子は、膜標的化領域、多量体化領域、ならびにCD27、CD28、ICOS、4-1BB、CD40、RANK/TRANCE-R、CD3ゼータ鎖およびOX40からなる群より選択される共刺激ポリペプチド細胞質シグナル伝達領域を含む。いくつかの実施形態において、膜標的化領域は、レセプター由来の、ミリストイル化標的化配列、パルミトイル化標的化配列、ブレニル化配列（すなわち、ファルネシル化、ゲラニル-ゲラニル化、CAX Box）、タンパク質間相互作用モチーフおよび膜貫通配列（シグナルペプチドを利用する）からなる群より選択される。ある特定の態様において、膜標的化領域は、ミリストイル化標的化配列である。いくつかの実施形態において、誘導可能なキメラシグナル伝達分子は、CD27、CD28、ICOS、4-1BB、CD40、RANK/TRANCE-R、CD3ゼータ鎖およびOX40からなる群より選択される第2の共刺激ポリペプチド細胞質シグナル伝達領域をさらに含む。いくつかの実施形態において、共刺激ポリペプチド細胞質シグナル伝達領域は、CD28細胞質シグナル伝達領域および4-1BB細胞質シグナル伝達領域を含む。いくつかの実施形態において、共刺激ポリペプチド細胞質シグナル伝達領域は、OX40細胞質シグナル伝達領域ポリペプチドおよび4-1BB細胞質シグナル伝達領域ポリペプチドを含む。いくつかの実施形態において、誘導可能なキメラシグナル伝達分子は、CD3ポリペプチドをさらに含む。

#### 【0011】

いくつかの実施形態において、多量体化領域は、FKBP、シクロフィリンレセプター、ステロイドレセプター、テトラサイクリンレセプター、重鎖抗体サブユニット、軽鎖抗体サブユニットおよびそれらの変異された配列からなる群より選択される。いくつかの実施形態において、多量体化領域は、FKBP12領域である。いくつかの実施形態において、FKB12領域は、FKB12v36領域である。いくつかの実施形態において、多量体化領域は、Fv'Fv1sである。いくつかの実施形態において、多量体化領域は、FK506二量体および二量体のFK506アナログリガンドからなる群より選択されるリガンドに結合する。いくつかの実施形態において、リガンドは、AP1903またはAP20187である。いくつかの実施形態において、多量体化領域は、配列番号58のアミノ酸配列またはその機能的フラグメントを有する。いくつかの実施形態において、多量体化領域は、配列番号57の中のスクレオチド配列またはその機能的フラグメントによってコードされる。いくつかの実施形態において、多量体化領域は、配列番号60のアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはその機能的フラグメントをさらに含む。いくつかの実

10

20

30

40

50

施形態において、多量体化領域は、配列番号 59 の中のヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドまたはその機能的フラグメントをさらに含む。いくつかの実施形態において、多量体化領域は、配列番号 60 のアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはその機能的フラグメントをさらに含む。いくつかの実施形態において、多量体化領域は、配列番号 59 の中のヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドまたはその機能的フラグメントをさらに含む。いくつかの実施形態において、多量体化領域は、配列番号 58 もしくは配列番号 60 のアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはその機能的フラグメントをさらに含む。いくつかの実施形態において、多量体化領域は、配列番号 57 もしくは配列番号 59 の中のヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドまたはその機能的フラグメントをさらに含む。

10

#### 【0012】

いくつかの実施形態において、上記核酸は、上記ポリヌクレオチドに作動可能に連結されたプロモーター配列を含む。いくつかの実施形態において、上記核酸は、ウイルスベクター内に含まれている。いくつかの実施形態において、ウイルスベクターは、レトロウイルスベクターである。いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクターは、マウス白血病ウイルスベクターである。いくつかの実施形態において、マウス白血病ウイルスベクターは、M o M L V ベクターである。いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクターは、S F G ベクターである。いくつかの実施形態において、ウイルスベクターは、アデノウイルスベクターである。いくつかの実施形態において、ウイルスベクターは、レンチウイルスベクターである。いくつかの実施形態において、上記核酸は、プラスミド内に含まれている。

20

#### 【0013】

本願の組成物のいずれかで形質転換されたまたはトランスフェクトされた細胞もまた本願において特徴付けられる。いくつかの実施形態において、その細胞は、T 細胞、腫瘍浸潤リンパ球、B 細胞、N K 細胞またはN K - T 細胞である。いくつかの実施形態において、細胞は、T 細胞である。いくつかの実施形態において、細胞は、骨髄から得られるかまたは調製される。いくつかの実施形態において、細胞は、臍帯血から得られるかまたは調製される。いくつかの実施形態において、細胞は、末梢血から得られるかまたは調製される。いくつかの実施形態において、細胞は、末梢血单核球から得られるかまたは調製される。いくつかの実施形態において、細胞は、ヒト細胞である。

30

#### 【0014】

他の実施形態において、上記細胞は、シグナルペプチド、一本鎖可変フラグメント、C H 2 - C H 3 ヒンジ領域およびC D 3 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む核酸でさらに形質転換されるかまたは形質導入される。いくつかの実施形態において、一本鎖可変フラグメントは、腫瘍細胞上の抗原に結合する。いくつかの実施形態において、一本鎖可変フラグメントは、過剰増殖性疾患に関する細胞上の抗原に結合する。いくつかの実施形態において、一本鎖可変フラグメントは、P S M A、P S C A、M U C 1、C D 1 9、R O R 1、メソテリン、G D 2、C D 1 2 3、M U C 1 6 およびH e r 2 / N e u 一本鎖可変フラグメントからなる群より選択される。いくつかの実施形態において、一本鎖可変フラグメントは、C D 1 9 一本鎖可変フラグメントである。

40

#### 【0015】

免疫応答を誘導するための方法もまた提供され、その方法は、インビトロまたはエキソビオにおいて、本願の組成物で細胞をトランスフェクトするかまたは形質導入する工程を含む。いくつかの実施形態において、その方法は、誘導可能なキメラシグナル伝達分子の多量体化をもたらす多量体化領域に結合するリガンドと細胞を接触させる工程をさらに含む。いくつかの実施形態において、そのリガンドは、二量体である。いくつかの実施形態において、そのリガンドは、二量体のF K 5 0 6 または二量体のF K 5 0 6 様アナログである。いくつかの実施形態において、そのリガンドは、A P 1 9 0 3 またはA P 2 0 1 8 7 である。いくつかの実施形態において、上記方法は、トランスフェクトされたまたは形

50

質転換された細胞を被験体に投与する工程をさらに含む。いくつかの実施形態において、その細胞は、静脈内投与によって被験体に投与される。いくつかの実施形態において、インビボにおいて免疫応答を誘導するための方法が提供され、その方法は、本願の組成物を被験体に投与する工程を含む。いくつかの実施形態において、その方法は、誘導可能なキメラシグナル伝達分子の多量体化をもたらす多量体化領域に結合するリガンドを含む組成物を被験体に投与する工程をさらに含む。いくつかの実施形態において、そのリガンドは、二量体である。いくつかの実施形態において、そのリガンドは、二量体の F K 5 0 6 または二量体の F K 5 0 6 様アナログである。いくつかの実施形態において、そのリガンドは、 A P 1 9 0 3 または A P 2 0 1 8 7 である。

## 【 0 0 1 6 】

10

いくつかの実施形態において、本願の組成物または細胞で処置される被験体は、過剰増殖性疾患と診断されている。他の実施形態において、被験体は、腫瘍と診断されている。他の実施形態において、被験体は、癌を有する。他の実施形態において、被験体は、 固形腫瘍を有する。他の実施形態において、細胞は、腫瘍浸潤リンパ球またはT細胞である。他の実施形態において、細胞は、腫瘍床に送達される。他の実施形態において、癌は、被験体の血液中または骨髄中に存在する。他の実施形態において、被験体は、血液または骨髄の疾患を有する。他の実施形態において、被験体は、幹細胞移植によって緩和され得る任意の状態または障害と診断されている。他の実施形態において、被験体は、 鎌状赤血球貧血または異染性白質ジストロフィーと診断されている。他の実施形態において、被験体は、原発性免疫不全障害、血球貪食リンパ組織球增多症( 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より選択される状態と診断されている。他の実施形態において、被験体は、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/欠損症、分類不能型免疫不全症( C V I D )、慢性肉芽腫症、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・オールドリッヂ症候群、C D 4 0 リガンド欠損症、白血球接着不全、D O C K 8 欠損症、I L - 1 0 欠損症/ I L - 1 0 レセプター欠損症、G A T A 2 欠損症、X連鎖リンパ球増殖性疾患( X L P )、軟骨毛髪形成不全、シュバッハマン・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、鎌状赤血球症、サラセニア、ムコ多糖症、スフィンゴリピドーシスおよび大理石骨病からなる群より選択される状態と診断されている。いくつかの実施形態において、被験体は、H I V 、インフルエンザ、疱疹、ウイルス性肝炎、エプスタイン・バー、ポリオ、ウイルス性脳炎、麻疹、水痘、サイトメガロウイルス( C M V )、アデノウイルス( A D V )、H H V - 6 (ヒトヘルペスウイルス6, I ) およびパピローマウイルスからなる群より選択されるウイルス病原の感染症と診断されているか、または肺炎、結核および梅毒からなる群より選択される細菌病原の感染症と診断されているか、またはマラリア、トリパノソーマ症、リーシュマニア症、トリコモナス症およびアメーバ症からなる群より選択される寄生生物病原の感染症と診断されている。

## 【 0 0 1 7 】

30

被験体における白血病を処置するための方法もまた提供され、その方法は、本願の細胞を投与する工程(ここで、その細胞は、誘導可能な C S M および一本鎖可変フラグメントを含むキメラ抗原レセプターで形質導入されるかまたはトランスフェクトされる) および多量体リガンドを被験体に投与する工程を含む。いくつかの実施形態において、一本鎖可変フラグメントは、C D 1 9 に結合する。いくつかの実施形態において、多量体リガンドは、A P 1 9 0 3 またはA P 2 0 1 8 7 である。いくつかの実施形態において、細胞は、T細胞である。

## 【 0 0 1 8 】

40

いくつかの実施形態において、被験体は、ヒトである。いくつかの実施形態において、上記方法は、さらなる用量の多量体リガンドが、被験体に投与されるべきであるか否かを決定する工程をさらに含む。いくつかの実施形態において、上記方法は、被験体にさらな

50

る用量の多量体リガンドを投与する工程をさらに含み、ここで、上記疾患または状態の症状は、症状が減少した後に残っているかまたは検出される。いくつかの実施形態において、上記被験体は、本願の組成物または細胞を投与する前に、疾患または状態と診断されており、多量体リガンドを投与した後に、その疾患または状態が検出され、さらなる用量の多量体リガンドが、被験体に投与される。

#### 【0019】

いくつかの実施形態において、上記方法は、被験体における状態もしくは疾患の存在、不在もしくはステージを特定する工程、および多量体結合領域に結合する多量体リガンドを投与する指示、多量体リガンドのその後の投与量を維持する指示、または被験体において特定された状態もしくは疾患の存在、不在もしくはステージに基づいて患者に投与される多量体リガンドのその後の投与量を調整する指示を伝える工程をさらに含む。

10

#### 【0020】

いくつかの実施形態において、上記状態は、癌である。いくつかの実施形態において、上記状態は、白血病である。いくつかの実施形態において、上記状態は、固形腫瘍である。

#### 【0021】

他の実施形態において、上記方法は、多量体リガンドの投与後の腫瘍サイズおよび/または腫瘍細胞数と比べたときの、被験体における腫瘍サイズの増加および/または腫瘍細胞数の増加の存在または不在を決定する工程、ならびに腫瘍サイズの増加および/または腫瘍細胞数の増加の存在が決定された場合に、被験体にさらなる用量の多量体リガンドを投与する工程をさらに含む。いくつかの実施形態において、腫瘍サイズおよび/または腫瘍細胞数は、多量体リガンドの投与前の腫瘍サイズおよび/または腫瘍細胞数と比べて、多量体リガンドの投与後に減少する。

20

#### 【0022】

いくつかの実施形態において、上記方法は、多量体リガンドの投与後のCD19発現B細胞のレベルと比べたときの、被験体におけるCD19発現B細胞の増加の存在または不在を決定する工程、ならびに被験体におけるCD19発現B細胞の増加の存在が決定された場合に、被験体にさらなる用量の多量体リガンドを投与する工程をさらに含む。いくつかの実施形態において、CD19発現B細胞のレベルは、多量体リガンドの投与前のCD19発現B細胞のレベルと比べて、多量体リガンドの投与後に減少する。

30

#### 【0023】

ある特定の実施形態が、以下の説明、実施例、請求項および図面においてさらに説明される。

#### 【0024】

例えば、本発明は以下の項目を提供する。

##### (項目1)

誘導可能なキメラシグナル伝達分子をコードするポリヌクレオチドを含む核酸を含む組成物であって、ここで、前記誘導可能なキメラシグナル伝達分子は、膜標的化領域、多量体化領域、ならびにCD27、CD28、ICOS、4-1BB、CD40、RANK/TRAUCCE-R、CD3ゼータ鎖およびOX40からなる群より選択される共刺激ポリペプチド細胞質シグナル伝達領域を含む、組成物。

40

##### (項目2)

前記膜標的化領域が、レセプター由来の、ミリストイル化標的化配列、パルミトイ化標的化配列、プレニル化配列（すなわち、ファルネシル化、ゲラニル-ゲラニル化、CAXBOX）、タンパク質間相互作用モチーフおよび膜貫通配列（シグナルペプチドを利用する）からなる群より選択される、項目1に記載の組成物。

##### (項目3)

前記膜標的化領域が、ミリストイル化標的化配列である、項目1または2に記載の組成物。

##### (項目4)

50

前記誘導可能なキメラシグナル伝達分子が、CD27、CD28、ICOS、4-1B  
B、CD40、RANK/TRANCE-R、CD3ゼータ鎖およびOX40からなる群  
より選択される第2の共刺激ポリペプチド細胞質シグナル伝達領域をさらに含む、項目1  
～3のいずれか1項に記載の組成物。

(項目5)

前記共刺激ポリペプチド細胞質シグナル伝達領域が、CD28細胞質シグナル伝達領域  
および4-1BB細胞質シグナル伝達領域を含む、項目1～4のいずれか1項に記載の組  
成物。

(項目6)

前記共刺激ポリペプチド細胞質シグナル伝達領域が、OX40細胞質シグナル伝達領域  
ポリペプチドおよび4-1BB細胞質シグナル伝達領域ポリペプチドを含む、項目1～5  
のいずれか1項に記載の組成物。

10

(項目7)

前記誘導可能なキメラシグナル伝達分子が、CD3ポリペプチドをさらに含む、項目  
1～6のいずれか1項に記載の組成物。

(項目8)

前記多量体化領域が、FKBP、シクロフィリンレセプター、ステロイドレセプター、  
テトラサイクリンレセプター、重鎖抗体サブユニット、軽鎖抗体サブユニットおよびそれ  
らの変異された配列からなる群より選択される、項目1～7のいずれか1項に記載の組  
成物。

20

(項目9)

前記多量体化領域が、FKB12領域である、項目1～8のいずれか1項に記載の組  
成物。

(項目10)

前記FKB12領域が、FKB12v36領域である、項目1～8のいずれか1項に記  
載の組成物。

(項目11)

前記多量体化領域が、Fv'Fv1sである、項目1～8のいずれか1項に記載の組成  
物。

(項目12)

30

前記多量体化領域が、FK506二量体および二量体のFK506アナログリガンドか  
らなる群より選択されるリガンドに結合する、項目1～8のいずれか1項に記載の組成物  
。

(項目13)

前記リガンドが、AP1903またはAP20187である、項目1～12のいずれか  
1項に記載の組成物。

(項目14)

前記多量体化領域が、配列番号58のアミノ酸配列またはその機能的フラグメントを有  
する、項目1～13のいずれか1項に記載の組成物。

(項目15)

40

前記多量体化領域が、配列番号57の中のヌクレオチド配列またはその機能的フラグメ  
ントによってコードされる、項目1～14のいずれか1項に記載の組成物。

(項目16)

前記多量体化領域が、配列番号60のアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはその機  
能的フラグメントをさらに含む、項目14に記載の組成物。

(項目17)

前記多量体化領域が、配列番号59の中のヌクレオチド配列によってコードされるポリ  
ペプチドまたはその機能的フラグメントをさらに含む、項目15に記載の組成物。

(項目18)

50

前記多量体化領域が、配列番号60のアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはその機

能的フラグメントをさらに含む、項目 14 または 16 に記載の組成物。

(項目 19)

前記多量体化領域が、配列番号 59 の中のヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドまたはその機能的フラグメントをさらに含む、項目 15 または 17 に記載の組成物。

(項目 20)

前記多量体化領域が、配列番号 58 もしくは配列番号 60 のアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはその機能的フラグメントをさらに含む、項目 14、16 または 18 のいずれか 1 項に記載の組成物。

(項目 21)

前記多量体化領域が、配列番号 57 もしくは配列番号 59 の中のヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドまたはその機能的フラグメントをさらに含む、項目 15、17 または 19 のいずれか 1 項に記載の組成物。

(項目 22)

前記核酸が、前記ポリヌクレオチドに作動可能に連結されたプロモーター配列を含む、項目 1～21 のいずれか 1 項に記載の組成物。

(項目 23)

前記核酸が、ウイルスベクター内に含まれている、項目 1～22 のいずれか 1 項に記載の組成物。

(項目 24)

前記ウイルスベクターが、レトロウイルスベクターである、項目 23 に記載の組成物。

(項目 25)

前記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、項目 24 に記載の組成物。

(項目 26)

前記マウス白血病ウイルスベクターが、M<sub>o</sub>M<sub>L</sub>V ベクターである、項目 25 に記載の組成物。

(項目 27)

前記レトロウイルスベクターが、SFG ベクターである、項目 26 に記載の組成物。

(項目 28)

前記ウイルスベクターが、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、項目 23 に記載の組成物。

(項目 29)

前記核酸が、プラスミド内に含まれている、項目 1～22 のいずれか 1 項に記載の組成物。

(項目 30)

項目 1～29 のいずれか 1 項に記載の組成物で形質転換されたまたはトランスフェクトされた、細胞。

(項目 31)

前記細胞が、T 細胞、腫瘍浸潤リンパ球、B 細胞、NK 細胞または NK-T 細胞である、項目 30 に記載の細胞。

(項目 32)

前記細胞が、T 細胞である、項目 30 に記載の細胞。

(項目 33)

前記細胞が、骨髄から得られるかまたは調製される、項目 30 に記載の細胞。

(項目 34)

前記細胞が、臍帯血から得られるかまたは調製される、項目 30 に記載の細胞。

(項目 35)

前記細胞が、末梢血から得られるかまたは調製される、項目 30 に記載の細胞。

(項目 36)

10

20

30

40

50

前記細胞が、末梢血単核球から得られるかまたは調製される、項目30に記載の細胞。  
 (項目37)

前記細胞が、ヒト細胞である、項目30～36のいずれか1項に記載の細胞。  
 (項目38)

前記細胞が、シグナルペプチド、一本鎖可変フラグメント、CH2-CH3ヒンジ領域およびCD3 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む核酸でさらに形質転換されるかまたは形質導入される、項目30～37のいずれか1項に記載の細胞。  
 (項目39)

前記一本鎖可変フラグメントが、腫瘍細胞上の抗原に結合する、項目38に記載の細胞  
 。  
 (項目40)

前記一本鎖可変フラグメントが、過剰増殖性疾患に関する細胞上の抗原に結合する、項目39に記載の細胞。

(項目41)  
前記一本鎖可変フラグメントが、PSMA、PSCA、MUC1、CD19、ROR1、メソテリン、GD2、CD123、MUC16およびHer2/Neu一本鎖可変フラグメントからなる群より選択される、項目38～40のいずれか1項に記載の細胞。

(項目42)  
前記一本鎖可変フラグメントが、CD19一本鎖可変フラグメントである、項目38～40のいずれかに記載の細胞。

(項目43)  
免疫応答を誘導するための方法であって、インビトロまたはエキソビオにおいて、項目1～29のいずれか1項に記載の組成物で細胞をトランスフェクトするかまたは形質導入する工程を含む、方法。

(項目44)  
誘導可能なキメラシグナル伝達分子の多量体化をもたらす多量体化領域に結合するリガンドと前記細胞を接触させる工程をさらに含む、項目43に記載の方法。

(項目45)  
前記リガンドが、二量体である、項目44に記載の方法。

(項目46)  
前記リガンドが、二量体のFK506または二量体のFK506様アナログである、項目44に記載の方法。

(項目47)  
前記リガンドが、AP1903またはAP20187である、項目44に記載の方法。

(項目48)  
トランスフェクトされたまたは形質転換された前記細胞を被験体に投与する工程をさらに含む、項目43～47のいずれか1項に記載の方法。

(項目49)  
前記細胞が、静脈内投与によって前記被験体に投与される、項目48に記載の方法。

(項目50)  
インビトロにおいて免疫応答を誘導するための方法であって、項目1～29のいずれか1項に記載の組成物を被験体に投与する工程を含む、方法。

(項目51)  
誘導可能なキメラシグナル伝達分子の多量体化をもたらす多量体化領域に結合するリガンドを含む組成物を前記被験体に投与する工程をさらに含む、項目50に記載の方法。

(項目52)  
前記リガンドが、二量体である、項目51に記載の方法。

(項目53)

10

20

30

40

50

前記リガンドが、二量体の F K 5 0 6 または二量体の F K 5 0 6 様アナログである、項目 5 1 に記載の方法。

(項目 5 4)

前記リガンドが、A P 1 9 0 3 または A P 2 0 1 8 7 である、項目 5 1 に記載の方法。

(項目 5 5)

前記被験体が、過剰増殖性疾患と診断されている、項目 4 8 ~ 5 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 5 6)

前記被験体が、腫瘍と診断されている、項目 4 8 ~ 5 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 5 7)

前記被験体が、癌を有する、項目 4 8 ~ 5 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 5 8)

前記被験体が、固形腫瘍を有する、項目 4 8 ~ 5 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 5 9)

前記細胞が、腫瘍浸潤リンパ球または T 細胞である、項目 5 8 に記載の方法。

(項目 6 0)

前記細胞が、腫瘍床に送達される、項目 5 8 または 5 9 に記載の方法。

(項目 6 1)

前記癌が、前記被験体の血液中または骨髄中に存在する、項目 5 7 に記載の方法。

(項目 6 2)

前記被験体が、血液または骨髄の疾患を有する、項目 4 8 ~ 5 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 6 3)

前記被験体が、幹細胞移植によって緩和され得る任意の状態または障害と診断されている、項目 4 8 ~ 5 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 6 4)

前記被験体が、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 4 8 ~ 5 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 6 5)

前記被験体が、原発性免疫不全障害、血球貪食リンパ組織球增多症 (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より選択される状態と診断されている、項目 4 8 ~ 5 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 6 6)

前記被験体が、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 / 欠損症、分類不能型免疫不全症 (C V I D) 、慢性肉芽腫症、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・オールドリッチ症候群、C D 4 0 リガンド欠損症、白血球接着不全、D O C K 8 欠損症、I L - 1 0 欠損症 / I L - 1 0 レセプター欠損症、G A T A 2 欠損症、X 連鎖リンパ球増殖性疾患 (X L P) 、軟骨毛髪形成不全、シュバッハマン・ダイアモンド症候群、ダイアモンド・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より選択される状態と診断されている、項目 4 8 ~ 5 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 6 7)

被験体における白血病を処置するための方法であって、前記被験体に項目 3 8 に記載の組成物を投与する工程および多量体リガンドを投与する工程を含む、方法。

(項目 6 8)

一本鎖可変フラグメントが、C D 1 9 に結合する、項目 6 7 に記載の方法。

(項目 6 9)

前記多量体リガンドが、A P 1 9 0 3 または A P 2 0 1 8 7 である、項目 6 7 または 6

10

20

30

40

50

8 に記載の方法。(項目 7 0 )前記細胞が、T 細胞である、項目 6 7 ~ 6 9 のいずれかに記載の方法。(項目 7 1 )前記被験体が、ヒトである、項目 4 3 ~ 7 0 のいずれか 1 項に記載の方法。(項目 7 2 )さらなる用量の前記多量体リガンドが、前記被験体に投与されるべきであるか否かを決定する工程をさらに含む、項目 4 3 ~ 7 1 のいずれか 1 項に記載の方法。(項目 7 3 )前記被験体にさらなる用量の前記多量体リガンドを投与する工程をさらに含み、ここで前記疾患または状態の症状が、症状が減少した後に残っているかまたは検出される、項目 4 3 ~ 7 2 のいずれか 1 項に記載の方法。(項目 7 4 )前記被験体が、項目 1 ~ 4 2 のいずれか 1 項に記載の組成物または細胞を投与する前に、疾患または状態と診断されており、前記多量体リガンドを投与した後に、前記疾患または状態が検出され、さらなる用量の前記多量体リガンドが、前記被験体に投与される、項目 7 3 に記載の方法。(項目 7 5 )被験体における状態もしくは疾患の存在、不在もしくはステージを特定する工程、および

20

前記多量体結合領域に結合する多量体リガンドを投与する指示、前記多量体リガンドのその後の投与量を維持する指示、または前記被験体において特定された前記状態もしくは疾患の存在、不在もしくはステージに基づいて前記患者に投与される前記多量体リガンドのその後の投与量を調整する指示を伝える工程をさらに含む、項目 4 3 ~ 7 4 のいずれか 1 項に記載の方法。(項目 7 6 )前記状態が、癌である、項目 7 2 ~ 7 5 のいずれか 1 項に記載の方法。(項目 7 7 )前記状態が、白血病である、項目 7 2 ~ 7 5 のいずれか 1 項に記載の方法。(項目 7 8 )前記状態が、 固形腫瘍である、項目 7 2 ~ 7 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

(項目 7 9 )前記多量体リガンドの投与後の腫瘍サイズおよび / または腫瘍細胞数と比べたときの、被験体における腫瘍サイズの増加および / または腫瘍細胞数の増加の存在または不在を決定する工程、ならびに腫瘍サイズの増加および / または腫瘍細胞数の増加の存在が決定された場合に、前記被験体にさらなる用量の前記多量体リガンドを投与する工程を含む、項目 7 8 に記載の方法。(項目 8 0 )前記多量体リガンドの投与後の CD 1 9 発現 B 細胞のレベルと比べたときの、前記被験体における CD 1 9 発現 B 細胞の増加の存在または不在を決定する工程、ならびに前記被験体における CD 1 9 発現 B 細胞の増加の存在が決定された場合に、前記被験体にさらなる用量の前記多量体リガンドを投与する工程を含む、項目 7 7 に記載の方法。(項目 8 1 )前記腫瘍サイズおよび / または前記腫瘍細胞数が、前記多量体リガンドの投与前の腫瘍サイズおよび / または腫瘍細胞数と比べて、前記多量体リガンドの投与後に減少する、項目 7 9 に記載の方法。(項目 8 2 )前記多量体リガンドの投与後の CD 1 9 発現 B 細胞のレベルが、前記多量体リガンドの

40

50

投与前の C D 1 9 発現 B 細胞のレベルと比べて減少している、項目 8 0 に記載の方法。

(項目 8 3)

前記被験体が、H I V、インフルエンザ、疱疹、ウイルス性肝炎、エブスタイン・バー、ポリオ、ウイルス性脳炎、麻疹、水痘、サイトメガロウイルス (C M V)、アデノウイルス (A D V)、H H V - 6 (ヒトヘルペスウイルス 6, I) およびパピローマウイルスからなる群より選択されるウイルス病因の感染症と診断されているか、または肺炎、結核および梅毒からなる群より選択される細菌病因の感染症と診断されているか、またはマラリア、トリパノソーマ症、リーシュマニア症、トリコモナス症およびアメーバ症からなる群より選択される寄生生物病因の感染症と診断されている、項目 4 8 ~ 7 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

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

【図面の簡単な説明】

【0 0 2 5】

【図 1】図 1 は、キメラ抗原レセプター (C A R) の遺伝子移入の図示を提供している。

【図 2】図 2 は、C A R の改善および関連する毒性の図示を提供している。

【図 3】図 3 は、自殺 (アポトーシス) 遺伝子も発現している C A R 発現細胞と比べて、C I D によってコントロールされるキメラシグナル伝達分子の理論的解析のグラフ描写を提供している。

20

【図 4】図 4 は、C I D によってコントロールされる C S M のいくつかの例の図示を提供している。

【図 5】図 5 は、C S M の C I D 誘導、および C A R を含む T 細胞の誘導可能な C S M 活性化の図示を提供している。

【図 6】図 6 は、C I D によってコントロールされる T 細胞による腫瘍細胞の殺傷の図示を提供している。

【図 7】図 7 は、改変された T 細胞の F A C s 選別解析の結果を提供している。

【図 8】図 8 は、改変された T 細胞およびコントロール T 細胞における G M - C S F およびインターフェロンガンマのレベルの棒グラフを提供している。

30

【図 9】図 9 は、改変された T 細胞およびコントロール T 細胞における I L - 1 0 および I L - 1 3 のレベルの棒グラフを提供している。

【図 1 0】図 1 0 は、改変された T 細胞およびコントロール T 細胞における I L - 4 および I L - 5 のレベルの棒グラフを提供している。

【図 1 1】図 1 1 は、改変された T 細胞およびコントロール T 細胞における I L - 6 および I L - 8 のレベルの棒グラフを提供している。

【図 1 2】図 1 2 は、改変された T 細胞およびコントロール T 細胞における I L - 1 および I L - 1 2 - p 7 0 のレベルの棒グラフを提供している。

【図 1 3】図 1 3 は、改変された T 細胞およびコントロール T 細胞における I P - 1 0 および M I P 1 のレベルの棒グラフを提供している。

40

【図 1 4】図 1 4 は、改変された T 細胞およびコントロール T 細胞における M I P 1 および R A N T E S のレベルの棒グラフを提供している。

【図 1 5】図 1 5 は、改変された T 細胞およびコントロール T 細胞における T N F - レベルの棒グラフを提供している。

【図 1 6】i M C を形質導入された T 細胞の A P 1 9 0 3 による活性化は、腫瘍細胞の T 細胞殺傷を誘導する。コントロールベクター (M y D 8 8 / C D 4 0 シグナル伝達ドメインを欠く) または i M C を形質導入された T 細胞を、C A P A N - 1 - G F P 腫瘍細胞とともに、5 : 1 という T 細胞と腫瘍細胞との比で培養した。共培養物を、1 0 n M A P 1 9 0 3 ありまたはなしで培養した。7 2 時間後、共培養物をフローサイトメトリーによって G F P + 腫瘍細胞 (X 軸) について解析した。

50

【図17】図17は、図16について論じた実験と類似の、異なるドナーに対する実験の結果を示している。

【図18】iMCを形質導入されたT細胞のAP1903による活性化は、腫瘍細胞のT細胞殺傷を誘導する。コントロールベクター(MyD88/CD40シグナル伝達ドメインを欠く)またはiMCを形質導入されたT細胞を、CAPAN-1-GFP腫瘍細胞とともに、5:1というT細胞と腫瘍細胞との比で培養した。共培養物を、10nM AP1903ありまたはなしで培養した。72時間後、共培養物をフローサイトメトリーによってGFP<sup>+</sup>腫瘍細胞について解析した(n=2)。

【図19】iMCを形質導入されたT細胞のAP1903による活性化は、腫瘍細胞のT細胞殺傷を誘導する。コントロールベクター(MyD88/CD40シグナル伝達ドメインを欠く)またはiMCを形質導入されたT細胞を、CAPAN-1-GFP腫瘍細胞とともに、5:1というT細胞と腫瘍細胞との比で培養した。共培養物を、10nM AP1903ありまたはなしで培養した。72時間後、共培養物を蛍光顕微鏡法によって解析したところ、10nM AP1903で活性化されたとき、T細胞芽球の活性化(右の2つのパネル)およびGFP<sup>+</sup>腫瘍細胞の排除が示された。

【図20】図20は、キメラ抗原レセプターを形質導入されたまたはトランスフェクトされた細胞(左)および本明細書中に提供されるようなキメラシグナル伝達分子の例の模式図である。

【図21】図21は、キメラ抗原レセプターで形質導入されたまたはトランスフェクトされた細胞(左)および本明細書中に提供されるようなキメラシグナル伝達分子の例の模式図である。

【図22】図22は、誘導可能なキメラ抗原レセプターのプラスミドマップである。

#### 【発明を実施するための形態】

##### 【0026】

###### 詳細な説明

一般に、T細胞治療は、注入された細胞のインビボでの拡大が不良であるという困難を伴っていた。この問題に対処する1つの方法は、高用量のIL-2を患者に投与することによるものである。この治療は、T細胞の成長および抗腫瘍機能を助けるが、患者にとって非常に有毒である。高用量のIL-2は、メラノーマに対する標準治療法(standard-of-care therapy)であると考えられているので、これは、その疾患において広く使用してきた。他のほとんどのT細胞治療の適用は、有毒作用に起因して、T細胞治療とともにIL-2を使用してこなかった。T細胞治療において生じている別の問題は、注入されたT細胞の生着および存続が不良であること(インビボでの増殖の機能)であり、これは、T細胞を注入する前にリンパ球枯渇前処置(lymphodepleting conditioning)を行うことによって対処してきた。研究者らは、これを達成するために化学療法(特にシクロホスファミド)を広く使用するが、一部の研究者は、Campathを含む抗体を使用する。前処置は、リンパ系の「空間」を作り出すことならびに増殖因子および生存因子について競合する調節性の免疫細胞を枯渇させることによって、T細胞治療を大いに促進するとみられる。しかしながら、それは、患者にとって非常に有毒であり、正常な免疫細胞(例えば、病原体特異的)を完全に除去するので、いくつかのタイプの癌または高齢患者に対して容易に使用できない。さらに、リンパ球枯渇レジメンの使用は、T細胞治療を独立型の治療ではなく「一連の手順」に押し進め得る。

##### 【0027】

各患者は、その患者に対して製造されたユニークな細胞生成物を有する必要があるので、T細胞治療は、ブティック療法(boutique therapy)であると広く考えられてきた。従来のT細胞治療(反復性の抗原刺激または腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の単離によってもたらされる)は、それらの特異性または機能に関して再現できず、極端に変動する結果をもたらし、場合によっては、処置用の生成物を生成できないことがある。天然のT細胞レセプターまたはキメラT細胞レセプターの遺伝子移入は、この問題を解

10

20

30

40

50

決し始めている（ここで、高度に腫瘍特異的なT細胞は、2週間未満で產生され得る）が、遺伝子が改変されたT細胞が、天然に存在するT細胞と異なって機能し得ることは明らかである。さらに、高度に特異的なCAR-T細胞または最適化されたTCRアルファ鎖およびベータ鎖を発現しているT細胞は、オフターゲット毒性を引き起こし得ることから、自殺遺伝子を含めることが必要である。

【0028】

図1は、キメラ抗原レセプター(CAR)の最も基本的な構成要素を図示している。腫瘍特異的モノクローナル抗体に対する可変重( $V_H$ )鎖および可変軽( $V_L$ )鎖が、T細胞レセプター複合体由来のCD3ゼータ鎖( )とインフレームで融合される。その $V_H$ および $V_L$ は、通常、グリシン-セリン可動性リンカーを使用して互いに接続され、次いで、スペーサー(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)によって膜貫通ドメインに付着されることにより、腫瘍抗原と相互作用できるようにscFvが細胞表面から離れて伸長する。

【0029】

形質導入の後、T細胞は、この時点で、その表面上にCARを発現し、腫瘍抗原と接触し、ライゲーションすると、細胞傷害および細胞活性化を誘導するCD3ゼータ鎖を介してシグナル伝達する。

【0030】

図2は、様々なキメラ抗原レセプターの開発を図示している。研究者らは、CD3ゼータを介したT細胞の活性化が、腫瘍特異的殺傷を誘導するのに十分であるが、T細胞の増殖および生存を誘導するには不十分であることを述べている。ゼータ鎖のみを発現しているCARによって改変されたT細胞を使用した初期の臨床試験は、遺伝子が改変されたT細胞が、インビボにおいて不良な生存および増殖を示すことを示した。これらの構築物は、第1世代CARと呼ばれる。

【0031】

B7軸を介した共刺激は、完全なT細胞活性化にとって必要であるので、研究者らは、共刺激ポリペプチドCD28シグナル伝達ドメインをCAR構築物に加えた。この領域は、通常、膜貫通領域(CD3ゼータバージョンの代わりに)、ならびにPI3KおよびLckに結合するためのYMMNMモチーフを含む。ゼータだけを有するCARまたはゼータとCD28の両方を有するCARを発現しているT細胞の間のインビボでの比較から、CD28が、活性化後のIL-2産生の増加に部分的に起因して、インビボにおいて拡大を促進することが実証された。CD28を含んでいるものは、第2世代CARと呼ばれる。

【0032】

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

【0033】

しかしながら、CARは、抗腫瘍効果を改善したので、それらは、より危険にもなった。第2および第3世代のCARを使用した2つの目立った死亡例があり、ほんの少数の患者しか処置されていないことを考慮すれば、これは、甚だしい。これらの死亡は、高度に活性化されたT細胞によって引き起こされるサイトカインストームおよび腫瘍崩壊症候群に起因する敗血症が原因で生じた(Morgan, R. A. ら(2010)Mol. Ther. 14: 843-851)。

10

20

30

40

50

## 【0034】

自殺遺伝子は、養子導入されたT細胞による望まれない副作用からの十分な保護を提供するが；しかしながら、遺伝子改変されたT細胞を毒性の後に排除すると、その処置の治療効果も除去され得る。

## 【0035】

T細胞レセプターシグナル伝達は、二量体化化学誘導物質 (chemical inducer of dimerization) (CID) に結合する多量体化領域を含むキメラレセプターと組み合わせてCIDを使用して誘導され得る。T細胞を、1、2または3つのFKBPフラグメントと連結されたCD3ゼータ鎖を発現するように操作した。それらの細胞は、キメラレセプターを発現し、CID依存性のT細胞活性化を示した (Spencer, D. M. ら、Science, 1993. 262: p. 1019-1024)。本願は、CIDによってコントロールされる誘導可能なキメラシグナル伝達分子 (CSM) を部分的に提供する。誘導可能なCSMを発現するT細胞をCIDと接触させることにより、細胞の活性化および免疫応答の誘導がもたらされる。

10

## 【0036】

図3では、本願の治療法を、自殺遺伝子を使用するCAR処置の方法と比較している。本願は、抗腫瘍効果が徐々に増大するようにインビボにおけるT細胞の増殖および機能を増幅する遺伝子操作アプローチを部分的に提供する。二量体化化学誘導物質は、T細胞の機能および頻度を高めるために、インビボにおいてT細胞を活性化するためのコントロール可能な系において使用される。

20

## 【0037】

図4および5に示されているように、いくつかの実施形態において、CSMは、CD3ゼータ鎖を伴っておよび伴わずに、1つ以上の共刺激ポリペプチド (例えば、CD28および4-1BB) とタンデムで、Fvドメインなどの多量体化領域を使用することにより、CID依存性の増殖および共刺激が可能になる。共刺激を提供するためおよびT細胞免疫応答を増加させるために、CSMは、単独で使用され得る。この方法を使用して、T細胞の集団、例えば、非特異的な標的を含む集団が、CSMをコードするDNAでトランسفェクトされ得るかまたは形質転換され得、次いで、被験体に投与されることにより、全身的免疫応答が高められ得る。

30

## 【0038】

このCSMは、例えばscFvポリペプチドおよびCD3ゼータ鎖を含み得るCARとともに、細胞において発現され得る。この方法では、誘導可能なCSM分子は、CARと組み合わせて使用され、それにより、CARシグナル伝達が2つの別個の機能に分離される。CARによって提供されるこの第2の機能は、操作されたT細胞に対して抗原特異的細胞傷害をもたらす。図4において、この例は、PSMAに対して特異性を有するCARを示しており；これらの操作されたT細胞は、例えば、被験体に投与されることにより、特異的な免疫応答、例えば、前立腺癌腫瘍に対する免疫応答をもたらし得る (図6)。

## 【0039】

図22に示されるように、いくつかの実施形態において、誘導可能な共刺激ポリペプチド、例えば、CD40細胞質領域ポリペプチドまたは切断型MyD88ポリペプチドが、キメラ抗原レセプター自体の活性化をコントロールするために使用される。この改変された誘導可能なキメラ抗原レセプターをコードするポリヌクレオチドは、細胞、例えば、T細胞を形質導入するために使用され得る。これらの細胞は、本明細書中で論じられるようなキメラシグナル伝達分子をさらに発現し得、ある特定の実施形態において、キメラシグナル伝達分子は、CD3ゼータポリペプチドを含む。いくつかの実施形態において、誘導可能なキメラ抗原レセプターは、CD40細胞質領域ポリペプチドとMyD88ポリペプチドの両方を含む。

40

## 【0040】

本明細書中で使用されるとき、請求項および/または明細書において用語「含む (comprising)」とともに使用されるときの単語「a」または「an」の使用は、「

50

「1つの」を意味し得るが、「1つ以上の」、「少なくとも1つの」および「2つ以上の」の意味とも一致する。なおもさらに、用語「有する」、「含む (including)」、「含む (containing)」および「含む (comprising)」は、相互交換可能であり、当業者は、これらの用語がオープンエンドな (open ended) 用語であると認識している。

【0041】

本明細書中で使用される用語「同種異系」は、宿主細胞とドナー細胞との間で抗原的に異なる HLA 遺伝子座または MHC 遺伝子座のことを指す。

【0042】

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

【0043】

本明細書中で使用される用語「抗原」は、免疫応答を引き起こす分子として定義される。この免疫応答は、抗体の產生もしくは特定の免疫適格細胞の活性化またはその両方を含み得る。抗原は、生物、タンパク質 / 抗原のサブユニット、殺傷されたまたは不活性化されたホールセルまたは溶解産物に由来し得る。例示的な生物としては、ヘリコバクター、カンピロバクター、クロストリジウム、*Corynebacterium diphtheriae*、*Bordetella pertussis*、インフルエンザウイルス、パラインフルエンザウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、*Borrelia burgdorferi*、プラスモディウム、単純ヘルペスウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、パピローマウイルス、*Vibrio cholera*、大腸菌、麻疹ウイルス、ロタウイルス、赤痢菌、*Salmonella typhi*、*Neisseria gonorrhoea*が挙げられるが、これらに限定されない。ゆえに、実質的にすべてのタンパク質またはペプチドを含む任意の高分子が、抗原として働き得る。さらに、抗原は、組換えDNAまたはゲノムDNAに由来し得る。病原性ゲノム、または免疫応答を誘発するタンパク質に対する遺伝子もしくは遺伝子のフラグメントのヌクレオチド配列または部分ヌクレオチド配列を含む任意のDNAは、抗原の合成をもたらす。さらに、本方法は、遺伝子またはゲノムの核酸配列全体の使用に限定されない。本発明が、2つ以上の遺伝子またはゲノムの部分的な核酸配列の使用を含むがこれに限定されないこと、およびこれらの核酸配列が、所望の免疫応答を誘発するように様々な組み合わせで配置されることは、容易に固有のことである。

【0044】

本明細書中で使用される用語「癌」は、そのユニークな特質である正常なコントロールの喪失が、制御されない成長、分化の欠如、局所的な組織浸潤および転移をもたらす、細胞の過剰増殖として定義される。例としては、メラノーマ、非小細胞肺、小細胞肺、肺、肝細胞癌、白血病、網膜芽細胞腫、星状細胞腫、神経膠芽腫、歯肉、舌、神経芽細胞腫、頭部、頸部、乳、脾、前立腺、癌、骨、精巣、卵巣、中皮腫、子宮頸、胃腸、リンパ腫、脳、結腸、肉腫または膀胱が挙げられるが、これらに限定されない。

【0045】

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

【0046】

本明細書中で使用されるとき、用語「cDNA」は、鑄型としてメッセンジャーRNA (mRNA) を使用して調製されたDNAのことを指すと意図されている。ゲノムDNA、またはゲノムRNA鑄型、プロセシングされていないRNA鑄型もしくは部分的にプロセシングされたRNA鑄型から重合されたDNAに対立するものとしてcDNAを使用することの利点は、cDNAが、主に、対応するタンパク質のコード配列を含む点である。

10

20

30

40

50

完全または部分的なゲノム配列が使用されるときがあり、例えば、最適な発現のために非コード領域を必要とする場合、またはイントロンなどの非コード領域がアンチセンスストラテジーにおいて標的化される場合が存在する。

【0047】

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

【0048】

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

【0049】

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

【0050】

本明細書中で使用されるとき、用語「機能的等価物」は、それが共刺激ポリペプチド、細胞質領域またはシグナル伝達領域に関するとき、核酸のフラグメント、バリアントもしくはアナログのことを指すとき、免疫応答を刺激して腫瘍または過剰増殖性疾患を消失させる共刺激をコードする核酸のことを指す。「機能的等価物」とは、例えば、細胞外ドメインを欠いているが、T細胞において発現されたとき、T細胞によって媒介される腫瘍殺傷応答を増幅することができる、共刺激ポリペプチドのことを指す。

【0051】

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

【0052】

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

【0053】

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

【0054】

10

20

30

40

50

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

【0055】

本明細書中で使用されるとき、用語「薬学的または薬理学的に許容され得る」は、動物またはヒトに投与されたとき、有害(*adverse*)反応、アレルギー反応または他の有害(*untoward*)反応をもたらさない分子実体および組成物のことを指す。いくつかの実施形態において、被験体は、哺乳動物である。いくつかの実施形態において、被験体は、ヒトである。

【0056】

本明細書中で使用されるとき、「薬学的に許容され得るキャリア」は、任意およびすべての溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤ならびに吸収遅延剤などを含む。薬学的に活性な物質に対するそのような媒質および作用物質の使用は、当該分野で周知である。任意の従来の媒質または作用物質が、本明細書中に提示されるベクターまたは細胞と不適合性である場合を除いては、治療的な組成物におけるその使用が企図される。補助的な活性成分もまた、その組成物に組み込まれ得る。

【0057】

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

【0058】

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

【0059】

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

【0060】

本明細書中で使用されるとき、用語「免疫応答を制御する」、「免疫応答を調節する」または「免疫応答をコントロールする」とは、免疫応答を改変できることを指す。例えば

10

20

30

40

50

、組成物は、免疫応答を増強することおよび／または活性化することができる。なおさらに、組成物は、免疫応答を阻害することもできる。制御の形態は、組成物とともに使用されるリガンドによって決定される。例えば、化学物質の二量体アナログが、共刺激ポリペプチドの二量体化をもたらし、T細胞活性化をもたらすが、しかしながら、その化学物質のモノマーアナログは、共刺激ポリペプチドの二量体化をもたらさず、T細胞を活性化しないだろう。

【0061】

用語「トランスフェクション」および「形質導入」は、相互交換可能であり、外来性DNA配列が真核生物宿主細胞に導入されるプロセスのことを指す。トランスフェクション（または形質導入）は、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、遺伝子銃送達、レトロウイルス感染、リポフェクション、スーパーフェクション（superfection）などを含むいくつかの手段のうちのいずれか1つによって達成され得る。10

【0062】

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

【0063】

用語用語「患者」または「被験体」は、相互交換可能であり、本明細書中で使用されるとき、生物または動物；哺乳動物（例えば、ヒト、非ヒト霊長類（例えば、サル）、マウス、ブタ、ウシ、ヤギ、ウサギ、ラット、モルモット、ハムスター、ウマ、サル、ヒツジまたは他の非ヒト哺乳動物を含む）；非哺乳動物（例えば、非哺乳動物の脊椎動物、例えば、鳥類（例えば、ニワトリまたはアヒル）または魚類、および非哺乳動物の無脊椎動物を含む）を含むが、これらに限定されない。20

【0064】

本明細書中で使用されるとき、用語「ワクチン」とは、動物に投与することができる形態で存在する、本明細書中に提示される組成物を含む製剤のことを指す。代表的には、ワクチンは、組成物が懸濁されるかまたは溶解される従来の食塩水または緩衝水溶液媒質を含む。この形態において、組成物は、ある状態を予防するか、回復させるか、または別途処置するために都合よく使用され得る。ワクチンは、被験体に導入されたとき、抗体、サイトカインの産生および／または他の細胞応答を含むがこれらに限定されない免疫応答を引き起こすことができる。30

【0065】

本明細書中で使用されるとき、用語「転写支配下」または「作動可能に連結された」は、プロモーターが、RNAポリメラーゼの開始および遺伝子の発現をコントロールする核酸に対して正しい位置および方向で存在することとして定義される。

【0066】

本明細書中で使用されるとき、用語「処置」、「処置する（treat）」、「処置される」または「処置する（treating）」とは、予防法および／または治療のことを指す。その用語は、例えば、癌性の固形腫瘍などの固形腫瘍について使用されるとき、固形腫瘍または癌に対する被験体の抵抗性を高める予防的処置による予防のことを指す。いくつかの例において、被験体は、癌を予防するために処置され得、ここで、その癌は、家族性であるか、または遺伝的に関連する。その用語は、例えば、感染症について使用されるとき、病原体による感染に対する被験体の抵抗性を高める予防的処置、すなわち換言すれば、その被験体が病原体に感染する可能性もしくはその感染症に起因し得る疾病的徴候を示す可能性を低下させる予防的処置、ならびに感染症と闘うための、例えば、感染症を弱めるためもしくは排除するための、または悪化するのを防ぐための、その被験体が感染した後の処置のことを指す。40

【0067】

血液疾患：本明細書中で使用される用語「血液疾患」、「血液疾患」および／または「

50

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

【0068】

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

10

【0069】

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

20

【0070】

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

30

【0071】

臍帯血：臍帯血は、末梢血、およびリンパ系、脾臓、肝臓または骨髓内に隔離された血液とは異なる。交換可能に使用され得る用語「臍帯血（umbilical blood）」、「臍帯血（umbilical blood）」または「臍帯血（cord blood）」は、胎盤および出産後のつながったままの臍帯に残存する血液のことを指す。臍帯血は、造血細胞をはじめとした幹細胞を含むことが多い。

40

【0072】

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

【0073】

あるパーセントの細胞が殺傷される場合におけるような「殺傷する（kill）」または「殺傷する（killing）」は、アポトーシスを計測するための公知の任意の方法を用いて計測されるときの、アポトーシスによる細胞の死を意味する。その用語は、細胞剥離のことも指し得る。

50

## 【0074】

ドナーT細胞：ここで使用される用語「ドナーT細胞」は、同種異系の幹細胞移植の後に抗ウイルス免疫および/または抗腫瘍免疫をもたらすためにレシピエントにしばしば投与されるT細胞のことを指す。ドナーT細胞は、骨髄移植片拒絶反応を阻害するためおよび同種異系生着(alloengraftment)の成功を増加させるために利用されることが多いが、しかしながら、同じドナーT細胞は、宿主抗原に対する同種異系攻撃反応(alloaggressive response)を引き起こし得、それはその後、移植片対宿主病(GVHD)をもたらし得る。ある特定の活性化ドナーT細胞は、他の活性化T細胞よりも高いまたは低いGVHD反応を引き起こし得る。ドナーT細胞は、レシピエントの腫瘍細胞に対しても反応性であり得、有益な移植片対腫瘍効果を引き起こす。

10

## 【0075】

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

## 【0076】

20

「保存アミノ酸と示されるアミノ酸以外のアミノ酸は、タンパク質または酵素において異なり得、機能が類似した任意の2つのタンパク質の間のタンパク質配列またはアミノ酸配列の類似性のパーセントは、変動し得、アラインメントスキームに従って測定されるとき、例えば、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。本明細書中で言及されるとき、「配列類似性」は、ヌクレオチド配列またはタンパク質配列が関係する程度を意味する。2つの配列間の類似性の程度は、配列同一性および/または保存のパーセントに基づき得る。本明細書中の「配列同一性」は、2つのヌクレオチド配列またはアミノ酸配列が不变である程度を意味する。「配列アラインメント」は、類似性の程度を評価する目的のために最大の同一性(およびアミノ酸配列の場合、保存)レベルを達成するように2つ以上の配列を並べるプロセスを意味する。配列をアラインメントするためおよび類似性/同一性を評価するための数多くの方法(例えば、類似性がMEGALIGNアルゴリズムに基づくcluster法ならびにBLASTN、BLASTPおよびFASTA)が、当該分野で公知である。これらのプログラムのうちのいずれかを使用するとき、好ましい設定は、最も高い配列類似性をもたらす設定である。

30

## 【0077】

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

40

## 【0078】

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

## 【0079】

50

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

10

#### 【0080】

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

20

#### 【0081】

腫瘍浸潤リンパ球（TIL）は、標的化された様式（manor）で、腫瘍に浸潤し、腫瘍細胞を殺傷する、様々なレセプターを有するT細胞のことを指す。本願の方法を使用してTILの活性を制御することは、腫瘍細胞の排除のより直接的なコントロールを可能にし得る。

30

#### 【0082】

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

40

#### 【0083】

発生的に制御されるプロモーター：本明細書中で使用される用語「発生的に制御されるプロモーター」は、発生のプログラムまたは経路によってコントロールされるか、開始さ

50

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

#### 【0084】

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

#### 【0085】

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

#### 【0086】

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

#### 【0087】

##### 発現構築物の操作

発現構築物は、共刺激ポリペプチドおよびリガンド結合ドメインをコードし、これらはすべて、作動可能に連結されている。一般に、用語「作動可能に連結された」は、プロモーター配列が第2の配列に機能的に連結されていることを示すと意味され、ここで、そのプロモーター配列は、第2の配列に対応するDNAの転写を開始し、媒介する。より詳細には、2つ以上のリガンド結合ドメインが、発現構築物において使用される。なおもさらに、発現構築物は、膜標的化配列を含む。適切な発現構築物は、上記のFKBPRリガンド結合エレメントのいずれかの側に共刺激ポリペプチドエレメントを含み得る。発現構築物は、ベクター、例えば、ウイルスベクターまたはプラスミドに挿入され得る。提供される方法の工程は、任意の好適な方法を使用して行われ得、これらのこととして、本明細書中に提示される抗原提示細胞に核酸を形質導入する方法、形質転換する方法または別途提供する方法が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0088】

発現構築物は、マーカーポリペプチドをさらに含み得る。ある特定の実施形態において、マーカーポリペプチドは、共刺激ポリペプチドに連結される。例えば、マーカーポリペプチドは、ポリペプチド配列、例えば、切断可能な2A様配列を介して共刺激ポリペプチドに連結され得る。マーカーポリペプチドは、例えば、CD19、CD19であり得るか、または例えば誘導可能なCSMの活性に影響しないように選択される異種タンパク質

10

20

30

40

50

であり得る。

【0089】

2 A 様配列または「切斷可能な」2 A 配列は、例えば、Those a a s i g n a を含む、例えば、多くの異なるウイルスに由来する。これらの配列は、時折、「ペプチドスキッピング配列」としても知られる。このタイプの配列が、分断されるように意図された2つのペプチドの間のシストロン内に配置されるとき、リボソームは、ペプチド結合をスキップするとみられ、Those a a s i g n a 配列の場合、G1yアミノ酸とProアミノ酸との間の結合が省略される。これにより、2~3個のポリペプチド、この場合、共刺激ポリペプチドの細胞質領域およびマーカーポリペプチドが残される。この配列が使用されるとき、2 A 配列の5'側でコードされるペプチドは、カルボキシ末端において、G1y残基および2 A 配列内の任意の上流を含むさらなるアミノ酸で終わることがある。2 A 配列の3'側でコードされるペプチドは、アミノ末端において、Pro残基および2 A 配列内の任意の下流を含むさらなるアミノ酸で終わることがある。

【0090】

共刺激ポリペプチド

共刺激ポリペプチド分子は、細胞の生存および増殖に関するシグナル伝達経路の活性化によって細胞媒介性の免疫応答を增幅することができる。企図される共刺激タンパク質としては、例えば、腫瘍壊死因子レセプター(TNFR)ファミリーのメンバー(すなわち、CD40、RANK/TRANCE-R、OX40、4-1BB)およびCD28ファミリーのメンバー(CD28、ICOS)が挙げられるが、これらに限定されない。共刺激タンパク質には、例えば、CD28、4-1BB、OX40およびCD3ゼータ鎖、または例えばそれらの細胞質領域が含まれ得る。2つ以上の共刺激ポリペプチドまたは共刺激ポリペプチドの細胞質領域が、本明細書中で論じられる誘導可能なキメラシグナル伝達分子において使用され得る。例えば、誘導可能なCSMは、CD28細胞質ポリペプチドおよび4-1BB細胞質ポリペプチドを含み得る。または、例えば、誘導可能なCSMは、CD28細胞質ポリペプチドおよびOX40細胞質ポリペプチドを含み得る。または、例えば、誘導可能なCSMは、CD3ゼータドメインポリペプチドをさらに含み得る。

【0091】

共刺激ポリペプチドには、NF-カッパーB経路、Akt経路および/またはp38経路を活性化する任意の分子またはポリペプチドが含まれる。細胞活性化システムは、1つ以上のリガンド結合ドメイン(すなわち、小分子結合ドメイン)に融合された組換えシグナル伝達分子の利用に基づき、ここで、共刺激ポリペプチドは、オリゴマー化をもたらすリガンド(すなわち、脂質透過性の有機二量体化薬物)によって活性化されるおよび/または制御される。共刺激ポリペプチドの架橋またはオリゴマー化のために使用され得る他のシステムは、抗体、天然のリガンドおよび/または人工の交差反応リガンドもしくは合成リガンドを含む。なおもさらに、企図される別の二量体化のシステムは、クーママイシン/DNAジャイレースBシステムを含む。

【0092】

使用され得る共刺激ポリペプチドは、NF-カッパーBおよび他の可変性のシグナル伝達カスケード、例えば、p38経路および/またはAkt経路を活性化するポリペプチドを含む。そのような共刺激ポリペプチドとしては、CD28ファミリーメンバー(例えば、CD28、ICOS)、TNFレセプター(すなわち、CD40、RANK/TRANCE-R、OX40、4-1BB)が挙げられるが、これらに限定されない。

【0093】

ある特定の実施形態において、本方法は、誘導可能な形態の共刺激ポリペプチド(例えば、iCD28、i4-1BB、iCD3-ゼータ)をコードする発現構築物を生成するような遺伝物質の操作を含む。そのような方法は、例えば、それぞれの細胞質ドメインをコードする異種核酸配列を含む、発現構築物の作製、およびその発現のための手段を含む。ベクターは、適切なヘルパー細胞において複製され得、ウイルス粒子が、それらから產生され得、細胞が、その組換えウイルス粒子に感染され得る。

10

20

30

40

50

## 【0094】

したがって、本明細書中に提示される共刺激分子は、例えば、細胞外ドメインを欠くことがある。特定の実施形態において、細胞外ドメインは、切断されているか、または除去されている。機能的な細胞外ドメインを有しない共刺激分子を生成するように、標準的な突然変異誘発、挿入、欠失または置換を用いて細胞外ドメインが変異され得ることもまた企図される。

## 【0095】

いくつかの実施形態において、キメラシグナル伝達分子は、例えば、図21に示されるように、CD40細胞質領域ポリペプチドおよび切断型MyD88ポリペプチドを含む。CD40細胞質領域ポリペプチドおよび切断型MyD88ポリペプチドを含むポリペプチドは、2009年9月21日に出願された、METHODS AND COMPOSITIONS FOR GENERATING AN IMMUNE RESPONSE BY INDUCING CD40 AND PATTERN RECOGNITION RECEPTOR ADAPTERSという表題の米国特許出願番号12/563,991において論じられている（その全体が本明細書中で参照により援用される）。

10

## 【0096】

遺伝子治療の文脈において、遺伝子は、ベクターの骨格を提供するウイルスゲノム以外の起源に由来する異種ポリヌクレオチド配列であり得る。遺伝子は、原核生物または真核生物の起源（例えば、細菌、ウイルス、酵母、寄生生物、植物または動物）に由来する。また、異種DNAは、2つ以上の起源に由来し、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。また、異種DNAは、1つの起源に由来する制御配列および異なる起源に由来する遺伝子を含み得る。

20

## 【0097】

共刺激ポリペプチドは、本明細書中に提供されるアミノ酸配列を含み得るが、これらに限定されず、欠失または切断をはじめとした機能的な保存的変異を含み得、本明細書中に提供されるアミノ酸配列と70%、75%、80%、85%、90%、95%または100%同一であるアミノ酸配列を含み得る。

## 【0098】

## リガンド結合領域

発現構築物のリガンド結合（「二量体化」）ドメインは、天然または非天然のリガンド、例えば、非天然の合成リガンドを使用して誘導を可能にし得る任意の好都合なドメインであり得る。多量体化領域またはリガンド結合ドメインは、構築物の性質およびリガンドの選択に応じて、細胞膜に対して内側または外側であり得る。上に示された細胞質領域と会合されるリガンド結合タンパク質を含むレセプターをはじめとした多種多様のリガンド結合タンパク質が公知である。本明細書中で使用されるとき、用語「リガンド結合ドメインは、用語「レセプター」と相互交換可能であり得る。リガンド（例えば、小さい有機リガンド）が公知であるかまたは容易に生成され得るリガンド結合タンパク質が、特に興味深い。これらのリガンド結合ドメインまたはレセプターには、FKBPおよびシクロフィリンレセプター、ステロイドレセプター、テトラサイクリンレセプター、上に示された他のレセプターなど、ならびに抗体から得ることができる「非天然の」レセプター、特に、重鎖または軽鎖サブユニット、その変異された配列、確率論的手順、コンビナトリアル合成などによって得られるランダムアミノ酸配列が含まれる。ある特定の実施形態において、リガンド結合領域は、FKBPリガンド結合領域、シクロフィリンレセプターリガンド結合領域、ステロイドレセプターリガンド結合領域、シクロフィリンレセプターリガンド結合領域およびテトラサイクリンレセプターリガンド結合領域からなる群より選択される。しばしば、リガンド結合領域は、F<sub>v</sub>F<sub>v1s</sub>配列を含む。時折、F<sub>v</sub>，F<sub>v1s</sub>配列は、さらなるF<sub>v'</sub>配列をさらに含む。例としては、例えば、Kopytek, S. J. ら、Chemistry & Biology 7:313-321 (2000) および Gestwicki, J. E. ら、Combinatorial Chem. & High Throughput Screening 10:667-675 (2007)；

30

40

50

Clackson T (2006) Chem Biol Drug Des 67:440-2; Clackson, T., in Chemical Biology: From Small Molecules to Systems Biology and Drug Design (Schreiber, S. L., eds., Wiley, 2007)において論じられているものが挙げられる。

#### 【0099】

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

#### 【0100】

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

#### 【0101】

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

#### 【0102】

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

#### 【0103】

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

10

20

30

40

50

## 【0104】

## オリゴマー化

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

## 【0105】

レセプターを多量体化する場合、キメラ表面膜タンパク質のリガンド結合ドメイン／レセプタードメインに対するリガンドは、通常、少なくとも2つの結合部位を有し、それらの結合部位の各々がリガンドレセプタードメインに結合することができるという意味において、多量体であり得る。「多量体リガンド結合領域」とは、多量体リガンドに結合するリガンド結合領域のことを意味する。用語「多量体リガンド」には、二量体のリガンドが含まれる。二量体のリガンドは、リガンドレセプタードメインに結合することができる2つの結合部位を有し得る。望ましくは、対象のリガンドは、二量体またはそれより高次のオリゴマー、通常、約四量体以下の、小さい合成有機分子であり得、個々の分子は、代表的には、少なくとも約150Daおよび約5kDa未満、通常、約3kDa未満であり得る。合成リガンドとレセプターとの種々の対が、使用され得る。例えば、天然のレセプターを含む実施形態において、二量体のFK506は、FKBP12レセプターとともに使用され得、二量体化されたシクロスボリンAは、シクロフィリンレセプターとともに使用され得、二量体化されたエストロゲンは、エストロゲンレセプターとともに使用され得、二量体化された糖質コルチコイドは、糖質コルチコイドレセプターとともに使用され得、二量体化されたテトラサイクリンは、テトラサイクリンレセプターとともに使用され得、二量体化されたビタミンDは、ビタミンDレセプターとともに使用され得るなど。あるいは、それより高次のリガンド、例えば、三量体が、使用され得る。非天然のレセプター、例えば、抗体サブユニット、改変された抗体サブユニット、可動性リンクードメインによって分断された重鎖可変領域および軽鎖可変領域をタンデムで含む一本鎖抗体、または改変されたレセプターならびにその変異された配列などを含む実施形態の場合、多種多様な化合物のうちのいずれかが使用され得る。これらのリガンド単位の有意な特色は、各結合部位が、高親和性でレセプターに結合することができる点、およびそれらのリガンド単位が、化学的に二量体化される点である。また、リガンドが、機能的なレベルで血清に溶解することができ、なおもほとんどの用途のために原形質膜を横断して拡散することができるよう、これらのリガンドの疎水性／親水性のバランスをとる方法も利用可能である。

## 【0106】

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

## 【0107】

CIDシステムは、合成二価リガンドを使用して、リガンド結合ドメインに融合されたシグナル伝達分子を迅速に架橋する。このシステムは、細胞表面タンパク質（Spencer, D.M.ら、Science, 1993.262:p.1019-1024; Spencer D.M.ら、Curr Biol 1996, 6:839-847; Blau, C.A.ら、Proc Natl Acad Sci. USA 1997, 94:3076-3081）またはサイトゾルタンパク質（Luo, Z.ら、Nature 1996, 383:181-185; MacCorkle, R.A.ら、Proc Natl Acad Sci USA 1998, 95:3655-3660）のオリゴマー化および活性化、転写を調節するDNAエレメントへの転写因子のリクルートメント（Ho, S.N.ら、Nature 1996, 382:822-826; Rivera, V.M. 50

10

20

30

40

50

. ら、 *Nat. Med.* 1996, 2: 1028 - 1032 ) またはシグナル伝達を刺激する原形質膜へのシグナル伝達分子のリクルートメント ( *Spencer D. M.* ら、 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995, 92: 9805 - 9809 ; *Holsinger, L. J.* ら、 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995, 92: 9810 - 9814 ) を引き起こすために使用されている。

#### 【0108】

CIDシステムは、表面レセプターの凝集が、下流のシグナル伝達カスケードを効率的に活性化するという概念に基づく。最も単純な実施形態において、CIDシステムは、脂質透過性免疫抑制薬FK506の二量体アナログを使用し、その二量体アナログは、その正常な生物活性を失っているが、FK506結合タンパク質であるFKBPsに遺伝的に融合された分子を架橋する能力を獲得している。1つ以上のFKBPsおよびミリストイル化配列を、標的レセプターの細胞質シグナル伝達ドメインに融合することによって、二量体化薬物に依存的であるがリガンドおよび外部ドメインに非依存的な様式でシグナル伝達を刺激することができる。これにより、時間的なコントロール、モノマー薬物アナログを使用して可逆性、および高い特異性を備えたシステムが提供される。第3世代のAP20187/AP1903 CIDの、それらの結合ドメインであるFKBPsに対する高親和性は、インビボにおいて、内在性のFKBPsによる非特異的な副作用を誘導することなく、組換えレセプターの特異的な活性化を可能にする。二量体化薬に結合する、アミノ酸の置換および欠失を有するFKBPsバリエント（例えば、FKBPs<sub>V36</sub>）もまた使用され得る。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、インビボにおけるレセプターの活性化において、送達されるほとんどのタンパク質剤よりも効率的になる。

#### 【0109】

使用されるリガンドは、リガンド結合ドメインの2つ以上に結合することができる。キメラシグナル伝達分子は、2つ以上のリガンド結合ドメインを含むとき、2つ以上のリガンドに結合することができる場合がある。そのリガンドは、代表的には、非タンパク質または化学物質である。例示的なリガンドとしては、二量体のFK506（例えば、FK1012）が挙げられるが、これに限定されない。

#### 【0110】

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

#### 【0111】

F36V'-FKBPs: F36V'-FKBPsは、F36V-FKBPsのコドンゆらぎバージョンである。それは、

F36V-FKBPsと同一のポリペプチド配列をコードするが、スクレオチドレベルでは62%の相同性しか有しない。F36V'-FKBPsは、レトロウイルスベクターにおける組換えを減少させるようにデザインされた（Scheel hammer, P. F. ら、*J. Urol.* 157, 1731-5 (1997)）。F36V'-FKBPsは、PCRアセンブリ手順によって構築された。その導入遺伝子は、1コピーのF36V-FKBPsに直接連結された1コピーのF36V'-FKBPsを含む。

#### 【0112】

いくつかの実施形態において、リガンドは、小分子である。選択されたリガンド結合領域に対する適切なリガンドが、選択され得る。しばしば、リガンドは、二量体であり、時

10

20

30

40

50

折、リガンドは、二量体の F K 5 0 6 または二量体の F K 5 0 6 アナログである。ある特定の実施形態において、リガンドは、A P 1 9 0 3 ( C A S 索引名: 2 - ピペリジンカルボン酸、1 - [ ( 2 S ) - 1 - オキソ - 2 - ( 3 , 4 , 5 - トリメトキシフェニル ) プチル ] - 、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 [ ( 1 R ) - 3 - ( 3 , 4 - ジメトキシフェニル ) プロピリデン ] ] エステル、[ 2 S - [ 1 ( R \* ) , 2 R \* [ S \* [ S \* [ 1 ( R \* ) , 2 R \* ] ] ] ] - ( 9 C 1 ) C A S 登録番号: 1 9 5 5 1 4 - 6 3 - 7 ; 分子式: C 7 8 H 9 8 N 4 O 2 0

分子量: 1 4 1 1 . 6 5 ) である。ある特定の実施形態において、リガンドは、A P 2 0 1 8 7 である。ある特定の実施形態において、リガンドは、A P 2 0 1 8 7 アナログ、10 例えば、A P 1 5 1 0 である。いくつかの実施形態において、ある特定のアナログは、F K B P 1 2 に対して適切であり得、ある特定のアナログは、F K B P 1 2 のゆらぎバージョンに対して適切であり得る。ある特定の実施形態において、1つのリガンド結合領域が、キメラタンパク質に含められる。他の実施形態において、2つ以上のリガンド結合領域が、含められる。例えば、リガンド結合領域が、F K B P 1 2 である場合、これらの領域の2つが含められる場合、一方は、例えば、ゆらぎバージョンであり得る。

#### 【 0 1 1 3 】

企図される他の二量体化システムとしては、クーママイシン / D N A ジャイレース B システムが挙げられる。クーママイシンによって誘導される二量体化は、改変された R a f タンパク質を活性化し、M A P キナーゼカスケードを刺激する。F a r r a r a 、 1 9 9 6 を参照のこと。20

#### 【 0 1 1 4 】

##### 膜標的化

膜標的化配列は、細胞表面膜へのキメラタンパク質の輸送を提供し、ここで、同じ配列または他の配列が、細胞表面膜へのキメラタンパク質の結合をコードし得る。細胞膜と会合した分子は、膜会合を容易にするある特定の領域を含み、そのような領域は、キメラタンパク質分子に組み込まれることにより、膜標的化分子をもたらし得る。例えば、いくつかのタンパク質は、アシル化される配列を N 末端または C 末端に含み、これらのアシル部分は、膜会合を容易にする。そのような配列は、アシルトランスフェラーゼによって認識され、特定の配列モチーフに一致することが多い。ある特定のアシル化モチーフは、単一のアシル部分 ( その後に、陰イオン性脂質頭部基との会合を改善するいくつかの正に帯電した残基 ( 例えば、ヒト c - S r c : M - G - S - N - K - S - K - P - K - D - A - S - Q - R - R - R ) が続くことが多い ) によって修飾されることができ、他のものは、複数のアシル部分によって修飾されることができる。例えば、タンパク質チロシンキナーゼ S r c の N 末端配列は、単一のミリストイル部分を含み得る。二重アシル化領域は、ある特定のタンパク質キナーゼ ( 例えば、S r c ファミリーメンバーのサブセット ( 例えば、Y e s 、 F y n 、 L c k ) および G タンパク質アルファサブユニット ) の N 末端領域内に配置されている。そのような二重アシル化領域は、そのようなタンパク質の最初の 1 8 アミノ酸の中に配置されることが多く、それは、配列モチーフ M e t - G l y - C y s - X a a - C y s に一致し、ここで、M e t は、切断され、G l y は、N - アシル化され、C y s 残基のうちの 1 つは、S - アシル化される。G l y は、ミリストイル化されることが多く、C y s は、パルミトイ化され得る。配列モチーフ C y s - A l a - A l a - X a a ( いわゆる「 C A A X ボックス」 ) に一致するアシル化領域は、G タンパク質ガンマサブユニットの C 末端由来の C 1 5 または C 1 0 イソプレニル部分によって修飾され得、他のタンパク質 ( 例えば、ワールドワイドウェブアドレス e b i . a c . u k / i n t e r p r o / D i s p l a y I p r o E n t r y ? a c = I P R 0 0 1 2 3 0 ) もまた使用され得る。これらのおよび他のアシル化モチーフとしては、例えば、G a u t h i e r - C a m p b e l l ら、M o l e c u l a r B i o l o g y o f t h e C e l l 1 5 : 2 2 0 5 - 2 2 1 7 ( 2 0 0 4 ) ; G l a b a t i ら、B i o c h e m . J . 3 0 3 : 6 9 7 - 7 0 0 ( 1 9 9 4 ) および Z l a k i n e ら、J . C e l l S c i e n c e 50

110:673-679 (1997)において論じられているものが挙げられ、そのモチーフは、膜局在化を誘導するためにキメラ分子に組み込まれ得る。ある特定の実施形態において、アシル化モチーフを含むタンパク質由来の天然の配列が、キメラタンパク質に組み込まれる。例えば、いくつかの実施形態において、Lck、FynもしくはYesのN末端部分またはGタンパク質アルファサブユニット（例えば、最初の25個のN末端アミノ酸またはそのようなタンパク質由来のそれより少ないアミノ酸（例えば、随意の変異を有する、その天然の配列の約5～約20アミノ酸、約10～約19アミノ酸または約15～約19アミノ酸））が、キメラタンパク質のN末端の中に組み込まれ得る。ある特定の実施形態において、CAXボックスモチーフ配列を含むGタンパク質ガンマサブユニット由来の約25アミノ酸以下のC末端配列（例えば、随意の変異を有する、天然の配列の約5～約20アミノ酸、約10～約18アミノ酸または約15～約18アミノ酸）が、キメラタンパク質のC末端に連結され得る。  
10

#### 【0115】

いくつかの実施形態において、アシル部分は、+1から+6という10g p値を有し、時折、+3から+4.5という10g p値を有する。Log p値は、疎水性の尺度であり、オクタノール/水の分配研究に由来することが多く、ここで、より高い疎水性を有する分子は、より高い頻度でオクタノールに分配し、より高い10g p値を有すると特徴付けられる。Log p値は、いくつかの親油性分子に対して公表されており、10g p値は、公知の分配プロセスを使用して計算され得る（例えば、Chemical Reviews, Vol. 71, Issue 6, page 599、エントリー4493は、4.2という10g p値を有するラウリン酸を示している）。任意のアシル部分が、上で論じられたペプチド組成物に連結され得、公知の方法および本明細書中以後に論じられる方法を用いて抗菌活性について試験され得る。アシル部分は、時折、例えば、C1-C20アルキル、C2-C20アルケニル、C2-C20アルキニル、C3-C6シクロアルキル、C1-C4ハロアルキル、C4-C12シクロアルキルアルキル（cycloalkylalkyl）、アリール、置換アリールまたはアリール（C1-C4）アルキルである。任意のアシル含有部分は、時折、脂肪酸であり、脂肪酸部分の例は、プロピル（C3）、ブチル（C4）、ペンチル（C5）、ヘキシル（C6）、ヘプチル（C7）、オクチル（C8）、ノニル（C9）、デシル（C10）、ウンデシル（C11）、ラウリル（C12）、ミリスチル（C14）、パルミチル（C16）、ステアリル（C18）、アラキジル（C20）、ベヘニル（C22）およびリグノセリル部分（C24）であり、各部分は、0、1、2、3、4、5、6、7または8つの不飽和（すなわち、二重結合）を含み得る。アシル部分は、時折、脂質分子（例えば、ホスファチジル脂質（例えば、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルコリン）、スフィンゴ脂質（例えば、スフィンゴミエリン（sphingomyelin）、スフィンゴシン、セラミド、ガングリオシド、セレブロシド））またはそれらの改変バージョンである。ある特定の実施形態において、1、2、3、4もしくは5個またはそれ以上のアシル部分が、膜会合領域に連結される。  
20

#### 【0116】

本明細書中のキメラタンパク質は、一回貫通型（single-pass）または複数回貫通型（multiple-pass）の膜貫通配列も含み得る（例えば、キメラタンパク質のN末端またはC末端に）。一回貫通型膜貫通領域は、ある特定のCD分子、チロシンキナーゼレセプター、セリン/トレオニンキナーゼレセプター、TGFベータ、BMP、アクチビンおよびホスファターゼに見られる。一回貫通型膜貫通領域は、シグナルペプチド領域および約20～約25アミノ酸（それらの多くは、疎水性アミノ酸であり、アルファヘリックスを形成し得る）の膜貫通領域を含むことが多い。短いトラックの正に帶電したアミノ酸が、タンパク質を膜に繋ぎ止める膜貫通の範囲の後に続くことが多い。複数回貫通型タンパク質には、イオンポンプ、イオンチャネルおよびトランスポーターが含まれ、膜を複数回またぐ2つ以上のらせんを含む。複数回貫通型タンパク質のすべてまたは実質的にすべてが、時折、キメラタンパク質に組み込まれる。一回貫通型および複数回  
30  
40  
50

貫通型膜貫通領域に対する配列は、公知であり、キメラタンパク質分子に組み込むために選択され得る。

#### 【0117】

宿主において機能性であり、キメラタンパク質の他のドメインのうちの1つと会合していることもあるし会合されていないこともある、任意の膜標的化配列が、使用され得る。いくつかの実施形態において、そのような配列としては、ミリストイル化標的化配列、パルミトイ化標的化配列、プレニル化配列（すなわち、ファルネシル化、ゲラニル-ゲラニル化、CAAXボックス）、タンパク質間相互作用モチーフ、またはレセプター由来の膜貫通配列（シグナルペプチドを利用する）が挙げられるが、これらに限定されない。例としては、例えば、ten Klooster JPら、*Biology of the Cell* (2007) 99, 1-12, Vincent, S.ら、*Nature Biotechnology* 21: 936-40, 1098 (2003)において論じられているものが挙げられる。

#### 【0118】

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

#### 【0119】

AP1903 AP1903は、Alphora Research Inc. によって製造されており、AP1903 Drug Product for Injectionは、AAI Pharma Services Corpによって作製されている。それは、非イオン性可溶化剤Solutol HS 15 (250mg/mL, BASF)の25%溶液中のAP1903の5mg/mL溶液として製剤化されている。室温において、この製剤は、透明の溶液である。冷蔵されると、この製剤は、長期の貯蔵において可逆的な相転移を起こし、乳白色の溶液になる。室温に再度温めると、この相転移は、元に戻る。1本分は、10mLのガラスバイアルにおける8mLである（バイアル1本あたり合計約40mgのAP1903 for Injection）。

#### 【0120】

使用するために、AP1903は、投与前に、室温に温め、希釈される。50kgを超える被験体の場合、AP1903は、100mLの生理食塩水に希釈された40mgの用量で、1時間あたり50mLの速度で2時間にわたって、DEHPフリー食塩水バッグおよび溶液セットを使用して、i.v.注入によって投与される。50kg未満の被験体は、0.4mg/kgのAP1903を投与される。

#### 【0121】

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

#### 【0122】

AP1903を投与する必要性、ならびに治療用T細胞、例えば、キメラ抗原レセプターおよび誘導可能なキメラシグナル伝達分子を発現しているT細胞を活性化する必要性を判定する際、患者には、例えば、非DEHPで非エチレンオキシドの滅菌された注入セットを使用して、2時間にわたるIV注入によって、単一の固定された用量のAP1903 for Injection (0.4mg/kg)が投与され得る。AP1903の用量は、すべての患者に対して個別に計算され、体重が 10%上下しない限り、再計算されない。計算された用量は、注入前に0.9%生理食塩水における100mLに希釈され

る。

#### 【0123】

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

#### 【0124】

使用されるAP1903 for injectionの固定された用量は、例えば、2時間にわたって静脈内に注入される0.4mg/kgであり得る。細胞の効率的なシグナル伝達のためにインピトロにおいて必要とされるAP1903の量は、約10~100nM (MW: 1412Da) である。これは、14~140μg/Lまたは約0.014~0.14mg/kg (1.4~140μg/kg) に等しい。投与量は、用途に応じて変動することがあり、ある特定の例では、0.1~10nMの範囲内、または50~150nM、10~200nM、75~125nM、100~500nM、100~600nM、100~700nM、100~800nMもしくは100~900nMの範囲内であり得る。1mg/kgまでの用量が、上に記載されたAP1903の第I相研究において耐容性がよかつた。

#### 【0125】

##### 選択マーカー

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

#### 【0126】

##### 調節領域

###### 1. プロモーター

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

## 【0127】

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

10

## 【0128】

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

## 【0129】

20

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

30

## 【0130】

有用であり得る別の誘導可能なシステムは、もともとはGossenおよびBujardによって開発された(Gossen and Bujard, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5547-5551, 1992; Gossenら、Science, 268:1766-1769, 1995)、Tet-Off<sup>TM</sup>またはTet-On<sup>TM</sup>システム(Clontech, Palo Alto, CA)である。このシステムもまた、テトラサイクリンまたはテトラサイクリン誘導体(例えば、ドキシサイクリン)に応答して高レベルの遺伝子発現を制御することが可能である。Tet-On<sup>TM</sup>システムでは、ドキシサイクリンの存在下において遺伝子発現がオンになるのに対し、Tet-Off<sup>TM</sup>システムでは、ドキシサイクリンの非存在下において遺伝子発現がオンになる。これらのシステムは、大腸菌のテトラサイクリン抵抗性オペロンに由来する2つの制御エレメントに基づく。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。目的の遺伝子は、プラスミドの中に存在するテトラサイクリン応答性エレメントを有するプロモーターの後

40

50

ろにクローニングされる。第2のプラスミドは、テトラサイクリンによってコントロールされるトランス活性化因子と呼ばれる制御エレメントを含み、その制御エレメントは、*Tet-O<sub>ff</sub>*<sup>TM</sup>システムでは、単純ヘルペスウイルス由来のVP16ドメインおよび野生型テトラサイクリン(*tetracycline*)リプレッサーから構成される。したがって、ドキシサイクリンの非存在下において、転写は、恒常にオンである。*Tet-On*<sup>TM</sup>システムでは、テトラサイクリンリプレッサーは、野生型でなく、ドキシサイクリンの存在下において転写を活性化する。遺伝子治療ベクターを作製する場合、テトラサイクリンまたはドキシサイクリンの存在下において産生細胞が生育され得、潜在的に有毒な導入遺伝子の発現を妨げ得るように、*Tet-O<sub>ff</sub>*<sup>TM</sup>システムが使用され得るが、そのベクターが患者に導入されると、遺伝子発現は恒常にオンになり得る。 10

#### 【0131】

いくつかの状況において、遺伝子治療ベクターにおける導入遺伝子の発現を制御することが望ましい。例えば、様々な活性強度を有する種々のウイルスプロモーターが、所望の発現レベルに応じて使用される。哺乳動物細胞では、CMV最初期プロモーターが、強力な転写活性化をもたらすために使用されることが多い。CMVプロモーターは、*Donnelly, J. J. ら、1997. Annu. Rev. Immunol. 15: 617-48*において概説されている。導入遺伝子の低い発現レベルが望まれるとき、それほど強力でないCMVプロモーターの改変バージョンもまた、使用されている。造血細胞における導入遺伝子の発現が望まれるとき、MLVまたはMMTV由来のLTRなどのレトロウイルスプロモーターが使用されることが多い。所望の効果に応じて使用される他のウイルスプロモーターとしては、SV40、RSV-LTR、HIV-1およびHIV-2-LTR、アデノウイルスプロモーター(例えば、E1A、E2AまたはMLP領域由来のもの)、AAV-LTR、HSV-TKおよびトリ肉腫ウイルスが挙げられる。 20

#### 【0132】

他の例では、発生的に制御され、特定の分化細胞において活性であるプロモーターが選択され得る。したがって、例えば、あるプロモーターは、多能性幹細胞では活性でないことがあるが、例えば、その多能性幹細胞が、より成熟した細胞に分化した場合、そのプロモーターは、活性化されることがある。

#### 【0133】

同様に、組織特異的プロモーターは、標的化されていない組織に対する潜在的な毒性または望ましくない効果を減少させるように、特定の組織または細胞において転写をもたらすために使用される。これらのプロモーターは、CMVプロモーターなどのより強力なプロモーターと比べて低い発現をもたらし得るが、より限定された発現および免疫原性ももたらし得る(*Bojak, A. ら、2002. Vaccine 20: 1975-79; Cazeaux, N. ら、2002. Vaccine 20: 3322-31*)。例えば、組織特異的プロモーター(例えば、PSA関連プロモーター)または前立腺特異的腺性カリクレインまたは筋肉クレアチニーゼ遺伝子が、必要に応じて使用され得る。 30

#### 【0134】

組織特異的プロモーターまたは分化特異的プロモーターの例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない: B29(B細胞); CD14(単球性細胞); CD43(白血球および血小板); CD45(造血細胞); CD68(マクロファージ); デスミン(筋肉); エラスター-1(膵腺房細胞); エンドグリン(内皮細胞); フィブロネクチン(分化中の細胞、治癒中の組織); およびF1t-1(内皮細胞); GFAP(アストロサイト)。 40

#### 【0135】

ある特定の適応症では、遺伝子治療ベクターを投与した後の特定の時点において転写を活性化することが望ましい。これは、ホルモンまたはサイトカインによって制御可能であるようなプロモーターを用いて行われる。使用され得るサイトカイン応答性プロモーターおよび炎症性タンパク質応答性プロモーターとしては、KキニノーゲンおよびTキニノーゲン(*Kageyama (1987) J. Biol. Chem., 262, 2345-* 50

2351)、c-fos、TNF-アルファ、C反応性タンパク質(Arcconeら(1988)Nucl. Acids Res., 16(8), 3195-3207)、ハプトグロビン(Olivieroら(1987)EMBO J., 6, 1905-1912)、血清アミロイドA2、C/EBPアルファ、IL-1、IL-6(Poli and Cortese, (1989) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 86, 8202-8206)、補体C3(Wilsonら(1990) Mol. Cell. Biol., 6181-6191)、IL-8、アルファ-1酸性糖タンパク質(Proewe and Baumann, (1988) Mol. Cell. Biol., 8, 42-51)、アルファ-1抗トリプシン、リポタンパク質リバーゼ(Zechnerら、Mol. Cell. Biol., 2394-2401, 1988)、アンジオテンシノーゲン(Ronら(1991) Mol. Cell. Biol., 2887-2895)、フィブリノゲン、c-jun(ホルボールエステル、TNF-アルファ、UV照射、レチノイン酸および過酸化水素によって誘導可能)、コラゲナーゼ(ホルボールエステルおよびレチノイン酸によって誘導される)、メタロチオネイン(重金属および糖質コルチコイド誘導性)、ストロメライシン(ホルボールエステル、インターロイキン-1およびEGFによって誘導可能)、アルファ-2マクロ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)、モロニーウイルス、ALV、エプスタイン・バーウイルス、ラウス肉腫ウイルス、ヒトアクチン、ミオシン、ヘモグロビンおよびクレアチシンが挙げられる。  
10

## 【0136】

20

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

## 【0137】

## 2. エンハンサー

エンハンサーは、同じDNA分子上の離れた位置に配置されたプロモーターからの転写を増加させる遺伝的エレメントである。初期の例としては、コード配列に隣接し、かついくつかのイントロンの中に存在する、免疫グロブリンおよびT細胞レセプターに関連するエンハンサーが挙げられる。多くのウイルスプロモーター(例えば、CMV、SV40およびレトロウイルスLTR)は、エンハンサーの活性と密接に関連し、単一エレメントのように扱われることが多い。エンハンサーは、ほぼプロモーターのように組織化される。すなわち、エンハンサーは、多くの個々のエレメントから構成され、その各々が、1つ以上の転写性タンパク質に結合する。エンハンサーとプロモーターとの基本的な区別は、操作上のものである。エンハンサー領域は概して、少し離れて、しばしば向きに関係なく、転写を刺激する；これは、プロモーター領域またはその構成要素エレメントには必ずしも当てはまらない。他方で、プロモーターは、特定の部位において特定の向きでRNA合成の開始を指示する1つ以上のエレメントを有するのに対し、エンハンサーは、これらの特異性を欠く。プロモーターおよびエンハンサーは、しばしば重複し、近接することから、しばしば非常によく似たモジュール構成を有するようである。エンハンサーのサブセットには、転写活性を増加させ得るだけでなく、ゲノムにインテグレートされたとき、隣接する配列から転写性エレメントを(インスレーターエレメントとともに)隔離するのを助け得る、遺伝子座調節領域(LCR)が含まれる。  
30

## 【0138】

40

任意のプロモーター/エンハンサーの組み合わせ(Eukaryotic Promoter Data Base EPDBのように)が、遺伝子の発現を駆動するために使用され得るが、多くは、特定の組織タイプまたは組織のサブセットに発現を限定し得る(例えば、Kutzler, M. A., and Weiner, D. B., 2008. Nature Reviews Genetics 9: 776-88に概説されている)。  
50

例としては、ヒトアクチン、ミオシン、ヘモグロビン、筋肉クレアチニナーゼ由来のエンハンサー、ならびにウイルスCMV、RSVおよびEBV由来の配列が挙げられるが、これらに限定されない。適切なエンハンサーが、特定の用途に対して選択され得る。適切な細菌ポリメラーゼが、送達複合体の一部としてまたは追加の遺伝的発現構築物として提供される場合、真核細胞は、ある特定の細菌プロモーターからの細胞質内転写を支持し得る。

【0139】

3. ポリアデニル化シグナル

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

【0140】

4. 開始シグナルおよび内部リボソーム結合部位

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

【0141】

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

【0142】

配列の最適化

タンパク質産生は、導入遺伝子におけるコドンを最適化することによっても増加され得

10

20

30

40

50

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

#### 【0143】

##### リーダー配列

リーダー配列は、mRNAの安定性を高めるためおよびより効率的な翻訳をもたらすために付加され得る。リーダー配列は、通常、mRNAを小胞体に標的化することに関与する。例としては、自身の切断を遅延させる、HIV-1エンベロープ糖タンパク質(Env)に対するシグナル配列、およびIgE遺伝子リーダー配列が挙げられる(Kutzler, M. A., and Weiner, D. B., 2008. *Nature Rev. Gen.* 9: 776-88; Li, V. ら、2000. *Virology* 272: 417-28; Xu, Z. L. ら、2001. *Gene* 272: 149-56; Malin, A. S. ら、2000. *Microbes Infect.* 2: 1677-85; Kutzler, M. A. ら、2005. *J. Immunol.* 175: 112-125; Yang, J. S. ら、2002. *Emerg. Infect. Dis.* 8: 1379-84; Kumar, S. ら、2006. *DNA Cell Biol.* 25: 383-92; Wang, S. ら、2006. *Vaccine* 24: 4531-40)。IgEリーダーは、小胞体への挿入を高めるために使用され得る(Tepler, I. (1989) *J. Biol. Chem.* 264: 5912)。

#### 【0144】

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

#### 【0145】

##### 核酸

本明細書中で使用される「核酸」は、一般に、核酸塩基を含む、DNA、RNAまたはその誘導体もしくはアナログの分子(1本、2本またはそれ以上の鎖)のことを指す。核酸塩基には、例えば、DNA(例えば、アデニン「A」、グアニン「G」、チミン「T」

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

#### 【0146】

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

#### 【0147】

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

ー」および用語「低ストリンジエンシー」または「低ストリンジエンシー条件」を包含する。

【0148】

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

10

【0149】

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

【0150】

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

20

【0151】

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

30

【0152】

保存アミノ酸と示されるアミノ酸以外のアミノ酸は、タンパク質または酵素において異なり得、機能が類似した任意の2つのタンパク質の間のタンパク質配列またはアミノ酸配列の類似性のパーセントは、変動し得、アラインメントスキームに従って測定されるとき、例えば、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。本明細書中で言及されるとき、「配列類似性」は、ヌクレオチド配列またはタンパク質配列が関係する程度を意味する。2つの配列間の類似性の程度は、配列同一性および/または保存のパーセントに基づき得る。本明細書中の「配列同一性」は、2つのヌクレオチド配列またはアミノ酸配列が不变である程度を意味する。「配列アラインメント」は、類似性の程度を評価する目的のために最大の同一性（およびアミノ酸配列の場合、保存）レベルを達成するように2つ以

40

50

上の配列を並べるプロセスを意味する。配列をアラインメントするためおよび類似性／同一性を評価するための数多くの方法（例えば、類似性がM E G A L I G Nアルゴリズムに基づくC l u s t e r法ならびにB L A S T N、B L A S T PおよびF A S T A）が、当該分野で公知である。これらのプログラムのうちのいずれかを使用するとき、好ましい設定は、最も高い配列類似性をもたらす設定である。

#### 【0153】

##### 核酸修飾

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

#### 【0154】

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

#### 【0155】

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

10

20

30

40

50

たはビシクロ[3.3.1]ノナンである。

【0156】

ニトロピロリル核酸塩基およびニトロインドリル核酸塩基は、ユニバーサル塩基として公知の化合物のクラスのメンバーである。ユニバーサル塩基は、オリゴヌクレオチド二重鎖の融解挙動または活性に実質的に影響せずに4つの天然に存在する塩基のいずれかを置き換える化合物である。天然に存在する核酸塩基に関連する安定化する水素結合相互作用とは対照的に、3-ニトロピロリル核酸塩基を含むオリゴヌクレオチド二重鎖は、スタッキング相互作用によって単独で安定化され得る。ニトロピロリル核酸塩基との有意な水素結合相互作用が無いことにより、特定の相補性塩基に対する特異性は不要になる。さらに、4-、5-および6-ニトロインドリルは、4つの天然塩基に対して非常に低い特異性しか示さない。1-(2'-O-メチル-β-D-リボフラノシリル)-5-ニトロインドールを調製するための手順は、Gaubert, G.; Wengel, J. *Tetrahedron Letters* 2004, 45, 5629に論じられている。他のユニバーサル塩基としては、ヒポキサンチニル、イソイノシニル、2-アザ-イノシニル、7-デアザ-イノシニル、ニトロイミダゾリル、ニトロピラゾリル、ニトロベンゾイミダゾリル、ニトロインダゾリル、アミノインドリル、ピロロピリミジニルおよびそれらの構造的誘導体が挙げられる。

【0157】

ジフルオロトリルは、ユニバーサル塩基として機能する非天然の核酸塩基である。ジフルオロトリルは、天然の核酸塩基チミンの同配体である。しかしながら、チミンとは異なり、ジフルオロトリルは、天然塩基のいずれに対しても、顕著な選択性を示さない。ユニバーサル塩基として機能する他の芳香族化合物は、4-フルオロ-6-メチルベンゾイミダゾールおよび4-メチルベンゾイミダゾールである。さらに、比較的疎水性のイソカルボスチリリル誘導体である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および3-メチル-7-プロピニルイソカルボスチリリルは、天然塩基だけを含むオリゴヌクレオチド配列と比べてオリゴヌクレオチド二重鎖の不安定化をわずかにしか引き起こさないユニバーサル塩基である。他の非天然の核酸塩基としては、7-アザインドリル、6-メチル-7-アザインドリル、イミジゾピリジニル、9-メチル-イミジゾピリジニル、ピロロピリジニル、イソカルボスチリリル、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、ナフタレンイル、アントラセニル、フェナントラセニル、ピレニル、スチルベニル、テトラセニル、ペンタセニルおよびそれらの構造的誘導体が挙げられる。ジフルオロトリル、4-フルオロ-6-メチルベンゾイミダゾール、4-メチルベンゾイミダゾールおよび上で言及された他の非天然塩基の合成手順を含むより詳細な考察については、Schweitzerら、J. Org. Chem., 59: 7238-7242 (1994)を参照のこと。

【0158】

さらに、化学的置換基、例えば、架橋剤が、反応物に対して安定性または不可逆性をさらに付加するために使用され得る。架橋剤の非限定的な例としては、例えば、1,1-ビス(ジアゾアセチル)-2-フェニルエタン、グルタルアルデヒド、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、例えば、4-アジドサリチル酸とのエステル、ホモ二官能性イミドエステル(ジスクシンイミジルエステル、例えば、3,3'-ジチオビス(スクシンイミジルプロピオネート)を含む)、二官能性マレイミド(例えば、ビス-N-マレイミド-1,8-オクタン)およびメチル-3-[*p*-アジドフェニル]ジチオ]プロピオイミデートなどの作用物質が挙げられる。

【0159】

ヌクレオチドアナログは、「ロックド(lock ed)」核酸も含み得る。ある特定の組成物は、内因性の核酸を特定の構造に本質的に「繋ぎ止める」または「ロックする」ために使用され得る。配列を繋ぎ止めることは、核酸複合体の解離を防ぐために役立ち、ゆえに、複製を防ぎ得るだけでなく、内在性配列の標識、修飾および/またはクローニング

も可能にし得る。ロックされた構造は、遺伝子発現を制御し得る（すなわち、転写または複製を阻害し得るかまたは増強し得る）か、または内在性の核酸配列を標識するためもしくはその他の方法で修飾するために使用され得る安定した構造として使用され得るか、またはその内在性配列を単離するために、すなわちクローニングのために使用され得る。

#### 【0160】

核酸分子は、RNAまたはDNAだけを含む分子に必ずしも限定されず、化学的に修飾されたヌクレオチドおよび非ヌクレオチドをさらに包含する。非ヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチドのパーセントは、1%～100%（例えば、約5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90または95%）であり得る。

10

#### 【0161】

##### 核酸調製物

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

20

#### 【0162】

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

#### 【0163】

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

30

#### 【0164】

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

40

#### 【0165】

核酸単離プロセスは、時折、a)サンプル中の細胞を、グアニジニウムを含む溶解液で溶解する工程（ここで、少なくとも約1Mグアニジニウムの濃度を有する溶解産物が生成される）；b)その溶解産物から核酸分子を、フェノールを含む抽出液を用いて抽出する工程；c)その溶解産物にアルコール溶液を加えることにより、溶解産物/アルコール混合物を形成する工程（ここで、その混合物中のアルコールの濃度は、約35%～約70%である）；d)その溶解産物/アルコール混合物を固体支持体に適用する工程；e)イオ

50

ン性溶液を用いてその固体支持体から核酸分子を溶出する工程；およびf) その核酸分子を捕捉する工程を含み得る。サンプルは、乾燥され得、その後の操作にとって適切な液体および体積で再懸濁され得る。

【0166】

遺伝子移入の方法

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

【0167】

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

【0168】

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

【0169】

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

【0170】

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

【0171】

核酸またはウイルスベクターを移入する方法の例

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

【0172】

1. エキソビオ形質転換

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

【0173】

2. 注射

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

【0174】

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

【0175】

3. エレクトロポレーション

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

【0176】

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

【0177】

インビオにおけるワクチン用エレクトロポレーション (electroporation for vaccines)、すなわちeVacは、単純な注射法を介して臨床で実行されている。腫瘍抗原をコードするDNAベクターが、患者の皮内に注射される。次いで、電極によって皮内の空間に電気的パルスが適用されることにより、そこに局在化して

10

20

30

40

50

いる細胞、特に、常在の皮膚樹状細胞が、DNAベクターを取り込み、コードされる腫瘍抗原を発現するようになる。次いで、局所炎症によって活性化された、腫瘍抗原を発現しているこれらの樹状細胞が、リンパ節に遊走し、腫瘍抗原を提示し、腫瘍抗原特異的T細胞をプライムし得る。核酸が、エレクトロポレーションによって細胞に送達され得る場合、その核酸は、例えば、限定されないが、核酸の注射または他の任意の投与手段の後で、エレクトロポレーションを使用して投与されるとき、電気穿孔的に (electroporationically) 投与される。

## 【0178】

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

## 【0179】

## 4. リン酸カルシウム

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

## 【0180】

## 5. DEAE-デキストラン

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

## 【0181】

## 6. 音波処理負荷 (Sonication Loading)

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

## 【0182】

## 7. リポソーム媒介性トランスフェクション

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

## 【0183】

10

20

30

40

50

### 8. レセプター媒介性トランスフェクション

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

#### 【0184】

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

#### 【0185】

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

#### 【0186】

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

#### 【0187】

### 9. 微粒子銃 (microparticle bombardment)

微粒子銃法は、ポリヌクレオチドを少なくとも1つの細胞小器官、細胞、組織または生物に導入するために使用され得る (米国特許第5,550,318号; 米国特許第5,538,880号; 米国特許第5,610,042号; およびPCT出願WO 94/09699; これらの各々は、参照により本明細書中に援用される)。この方法は、DNAでコーティングされた微小発射体が高速度に加速して、それらが細胞膜を貫通し、細胞を殺傷せずにそれらの細胞に入ることを可能にする能力に依存する (Kleinら (1987) Nature, 327, 70-73)。当該分野で公知の多種多様の微粒子銃法が存在し、それらの多くは、本方法に適用可能である。

#### 【0188】

この微粒子銃では、1つ以上の粒子が、少なくとも1つのポリヌクレオチドでコーティングされ、推進力によって細胞に送達され得る。小粒子を加速するためのいくつかのデバイスが、開発された。1つのそのようなデバイスは、電流を発生させ、その後その電流が輸送力を提供する高圧放電に依存する (Yangら (1990) Proc. Nat'l

10

20

30

40

50

Acad. Sci. USA, 87, 9568 - 9572)。使用される微小発射体は、生物学的に不活性な物質（例えば、タンゲステンまたは金の粒子またはビーズ）からなった。例示的な粒子としては、タンゲステン、白金、およびある特定の例では、金を含む粒子（例えば、ナノ粒子を含む）が挙げられる。場合によっては、金属粒子上へのDNA沈殿が、微粒子銃を使用したレシピエント細胞へのDNA送達に必要ないことがあることが企図される。しかしながら、粒子は、DNAでコーティングされるのではなく、DNAを含み得ることが企図される。DNAでコーティングされた粒子は、粒子銃を介したDNA送達のレベルを上昇させ得るが、本質的に必要ない。

【0189】

ウイルスベクター媒介性移入方法の例

10

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

【0190】

1. アデノウイルス

20

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

【0191】

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

30

【0192】

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

40

【0193】

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

50

ノウイルスペクターに含めることにより、複製が可能になり得る。

【0194】

さらに、ウイルス封入のためのパッケージングシグナルは、ウイルスゲノムの左端の 194 ~ 385 bp (0.5 ~ 1.1 マップ単位) に局在する (Hearingら、J. (1987) Virology, 67, 2555 - 2558)。このシグナルは、左端に近いが付着末端配列の外側の特異的配列が、頭部構造へのDNAの挿入に必要とされるタンパク質への結合を媒介する、バクテリオファージラムダDNAにおけるタンパク質認識部位を模倣している。AdのE1置換ベクターは、ウイルスゲノムの左端の 450 bp (0 ~ 1.25 マップ単位) フラグメントが 293 細胞においてパッケージングを指示し得ることを実証した (Levieroら、Gene, 101: 195 - 202, 1991)。 10

【0195】

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

【0196】

複製欠損性アデノウイルスペクターは、ヘルパーウイルスによってトランスで補完され得る。しかしながら、複製機能を提供するのに必要なヘルパーウイルスが存在するせいで、いずれの調製物も汚染され得るので、この知見だけでは、複製欠損性ベクターの単離が可能にならない。したがって、複製欠損性ベクターの複製および/またはパッケージングに特異性を付加し得るさらなるエレメントが必要だった。そのエレメントは、アデノウイルスのパッケージング機能に由来する。 20

【0197】

アデノウイルスに対するパッケージングシグナルは、従来のアデノウイルスマップの左端に存在することが示されている (Tibbattsら (1977) Cell, 12, 243 - 249)。後の研究から、ゲノムの E1A (194 ~ 358 bp) 領域に欠失を有する変異体が、初期 (E1A) 機能を補完した細胞株においてさえ不十分にしか成長しないことが示された (Hearing and Shenk, (1983) J. Mol. Biol. 167, 809 - 822)。代償的な (compensating) アデノウイルスDNA (0 ~ 353 bp) が、その変異体の右端に組み換えられたとき、そのウイルスは、正常にパッケージングされた。さらなる突然変異解析から、Ad5ゲノムの左端に、短い反復性の位置依存性エレメントが同定された。その反復は、ゲノムのいずれかの末端に存在する場合、効率的なパッケージングには 1 コピーで十分であるが、Ad5DNA分子の内側に向かって移動した場合は、そうではないことが見出された (Hearingら、J. (1987) Virology, 67, 2555 - 2558)。 30

【0198】

パッケージングシグナルの突然変異バージョンを使用することによって、様々な効率でパッケージングされるヘルパーウイルスを作製することが可能である。代表的には、変異は、点突然変異または欠失である。パッケージングが低効率であるヘルパーウイルスをヘルパー細胞内で生育させると、そのウイルスは、野生型ウイルスと比べて低い速度であったとしてもパッケージングされ、それにより、ヘルパーの繁殖が可能となる。しかしながら、これらのヘルパーウイルスを、野生型パッケージングシグナルを含むウイルスとともに細胞内で生育させると、その野生型パッケージングシグナルは、変異バージョンよりも優先的に認識される。パッケージング因子の量が限られていると仮定すると、野生型シグナルを含むウイルスは、ヘルパーと比べて選択的にパッケージングされる。優先性が十分大きい場合、均質に近い系統が達成され得る。 40

【0199】

特定の組織または種に対するADV構築物の向性を改善するために、レセプター結合フ

50

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

#### 【0200】

##### 2. レトロウイルス

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

#### 【0201】

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

#### 【0202】

レトロウイルスベクターの特異的標的化を可能にするようにデザインされたアプローチ

10

20

30

40

50

は、ウイルスエンベロープへのガラクトース残基の化学的付加によるレトロウイルスの化学修飾に基づいて最近開発された。アシアロ糖タンパク質レセプターを介した肝細胞などの細胞の特異的感染を可能にし得るこの修飾が望まれる場合がある。

#### 【0203】

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

#### 【0204】

##### 3. アデノ随伴ウイルス

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

#### 【0205】

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

#### 【0206】

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

#### 【0207】

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

#### 【0208】

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

10

20

30

40

50

eeら(1995)Ann.N.Y.Acad.Sci., 770, 79-90; Ferrariら(1996)J.Virol., 70, 3227-3234; Fisherら(1996)J.Virol., 70, 520-532; Flotteら、Proc.Nat'l Acad.Sci.USA, 90, 10613-10617, (1993); Goodmanら(1994), Blood, 84, 1492-1500; Kaplittら(1994)Nat'l Genet., 8, 148-153; Kaplitt, M.G.ら、Ann Thorac Surg. 1996 Dec; 62(6): 1669-76; Kesslerら(1996)Proc.Nat'l Acad.Sci.USA, 93, 14082-14087; Koeberlら(1997)Proc.Nat'l Acad.Sci.USA, 94, 1426-1431; Mizukamiら(1996)Virology, 217, 124-130)。 10

#### 【0209】

肺におけるAAV媒介性の効率的な遺伝子移入および遺伝子発現は、囊胞性線維症の処置のための臨床試験に至っている(Carter and Flotte, 1995; Flotteら、Proc.Nat'l Acad.Sci.USA, 90, 10613-10617, (1993))。同様に、骨格筋へのジストロフィン遺伝子のAAV媒介性の遺伝子送達による筋ジストロフィーの処置、脳へのチロシンヒドロキシラーゼ遺伝子送達によるパーキンソン病の処置、肝臓への第IX因子遺伝子送達による血友病Bの処置、および潜在的に、心臓への血管内皮成長因子遺伝子による心筋梗塞の処置の見込みは、これらの器官におけるAAV媒介性の導入遺伝子発現が高度に効率的であると最近示されたので、有望であるとみられる(Fisherら(1996)J.Virol., 70, 520-532; Flotteら、1993; Kaplittら、1994; 1996; Koeberlら、1997; McCownら(1996)Brain Res., 713, 99-107; Pingら(1996)Microcirculation, 3, 225-228; Xiaoら(1996)J.Virol., 70, 8098-8108)。 20

#### 【0210】

##### 4. 他のウイルスベクター

他のウイルスベクターも、本発明の方法および組成物において発現構築物として用いられる。ワクシニアウイルス(Ridgeway, (1988)In: Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses, pp. 467-492; Baichwal and Sugden, (1986)In, Gene Transfer, pp. 117-148; Couparら、Gene, 68: 1-10, 1988)カナリアポックスウイルスおよびヘルペスウイルスなどのウイルスに由来するベクターが使用される。これらのウイルスは、様々な哺乳動物細胞への遺伝子移入において使用するためのいくつかの特徴を提供する。 30

#### 【0211】

いったん、構築物が細胞内に送達されたら、導入遺伝子をコードする核酸は、種々の部位に位置づけられ、発現される。ある実施形態において、導入遺伝子をコードする核酸は、細胞のゲノムに安定に組み込まれる。この組み込みは、相同組換えを介して相同の(cognate)位置および向きである(遺伝子置換)かまたはランダムで非特異的な位置に組み込まれる(遺伝子増強)。なおもさらなる実施形態において、核酸は、DNAの別個のエピソームセグメントとして細胞において安定に維持される。そのような核酸セグメントまたは「エピソーム」は、宿主細胞周期と無関係のまたはそれと同期した維持および複製を可能にするのに十分な配列をコードする。発現構築物がどのように細胞に送達され、その核酸が細胞のどこにとどまるかは、使用される発現構築物のタイプに依存する。 40

#### 【0212】

##### 疾患を処置するための方法

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

#### 【0213】

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

## 【0214】

10

「治療用細胞」とは、細胞治療のために使用される細胞、すなわち、状態または疾患を処置するためまたは予防するために被験体に投与される細胞のことを意味する。

## 【0215】

20

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

## 【0216】

本明細書中に提示される多量体リガンドなどの薬学的組成物の有効量は、60%、70%、80%、85%、90%、95%もしくは97%超または80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%もしくは10%未満の治療用細胞が活性化されるようないし、誘導可能なCSM発現T細胞を活性化するこの選択された結果を達成する量であり得る。この用語は、「十分な量」とも同義である。有効量は、所望の治療的応答（例えば、リガンド誘導物質が投与される前の時点と比べて、腫瘍サイズの減少、腫瘍細胞のレベルの低下、またはCD19発現白血病細胞のレベルの低下）を達成する量でもあり得る。

30

## 【0217】

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

40

## 【0218】

用語「接觸される」および「曝露される」は、細胞、組織または生物に適用されるとき、薬学的組成物および/もしくは別の作用物質、例えば、化学療法剤または放射線治療薬が、標的細胞、組織もしくは生物に送達されるプロセス、または標的細胞、組織もしくは生物のすぐ近位に配置されるプロセスを記述するために本明細書中で使用される。細胞の殺傷または静止を達成するために、薬学的組成物および/またはさらなる作用物質が、細胞を殺傷するのに有効または細胞の分裂を防ぐのに有効な合計量で1つ以上の細胞に送達される。

## 【0219】

50

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

#### 【0220】

##### 最適化されたおよび個別化された治療的処置

リガンド誘導物質の投与量および投与スケジュールは、処置される疾患または状態のレベルを測定することによって最適化され得る。例えば、任意の残存している固体腫瘍のサイズ、または標的化される細胞、例えば、患者の中に残存している可能性がある腫瘍細胞またはCD19発現B細胞のレベルが、測定され得る。

#### 【0221】

例えば、患者が臨床的に関連するレベルの腫瘍細胞を有するか、または最初の治療の後に固体腫瘍を有するという判定は、多量体リガンドを投与することによって、キメラ抗原レセプターを発現しているT細胞活性化することによってこれらの細胞を活性化する必要があり得るという指示を臨床医に提供する。別の例では、多量体リガンドで処置した後に、患者が、低下したレベルの腫瘍細胞または減少した腫瘍サイズを有するという判定は、追加の用量の多量体リガンドが必要ないと臨床医に指示し得る。同様に、多量体リガンドで処置した後、患者が、疾患もしくは状態の症状を示し続けているかまたは症状の再発に苦しんでいるという判定は、少なくとも1つのさらなる用量の多量体リガンドを投与する必要があり得ると臨床医に指示し得る。用語「投与量」は、投与の用量と投与の頻度（例えば、次の投与のタイミング）の両方を含むと意味される。用語「投与量レベル」とは、被験体の体重との関係から投与される多量体リガンドの量のことを指す。したがって、投与量レベルの上昇は、被験体の体重に対して投与されるリガンドの量の増加を意味し得る。さらに、投与される用量（例えば、多量体リガンドが持続注入ポンプを使用して投与されるとき）の濃度の上昇は、1分あたりまたは1秒あたりに投与される濃度（ひいては、投与される量）が上昇することを意味し得る。

#### 【0222】

したがって、例えば、ある特定の実施形態において、上記方法は、多量体リガンドの投与後の腫瘍サイズおよび／または腫瘍細胞数と比べて、被験体における腫瘍サイズの増加および／または腫瘍細胞数の増加の存在または不在を決定する工程、ならびに腫瘍サイズの増加および／または腫瘍細胞数の増加の存在が決定された場合、さらなる用量の多量体リガンドを被験体に投与する工程を含む。上記方法は、例えば、多量体リガンドの投与後のCD19発現B細胞のレベルと比べて、被験体におけるCD19発現B細胞の増加の存在または不在を決定する工程、および被験体におけるCD19発現B細胞の増加の存在が決定された場合、さらなる用量の多量体リガンドを被験体に投与する工程も含む。これらの実施形態では、例えば、患者は最初に、本明細書中に提供される方法に従って治療用細胞およびリガンドで処置される。最初の処置の後、例えば、腫瘍サイズ、腫瘍細胞数またはCD19発現B細胞数は、最初の処置の前の時点と比べて減少し得る。この最初の処置の後のある特定の時点において、患者は、再度試験されるか、または患者は、疾患症状について継続的にモニターされ得る。例えば、腫瘍サイズ、腫瘍細胞数またはCD19発現B細胞数が、最初の処置の直後の時点と比べて増加していると判定される場合、リガンドは、さらなる用量のために投与され得る。誘導可能なCSMを発現する治療用細胞が、さ

10

20

30

40

50

らなるリガンドの非存在下においては比較的不活性な状態であるが患者の中に残っているので、このモニタリングおよび処置スケジュールは、継続され得る。

#### 【0223】

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

10

#### 【0224】

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

20

#### 【0225】

本明細書中に提示されるような方法は、有効量の活性化された細胞、核酸またはそれをコードする発現構築物の送達を含むが、これらに限定されない。薬学的組成物の「有効量」は、一般に、述べられた所望の結果を検出可能におよび繰り返し達成するのに十分な量、例えば、疾患またはその症状を回復させるか、減少させるか、最小にするか、またはその程度を限定するのに十分な量として定義される。疾患の排除、根絶または治癒を含む他のより厳密な定義が、適用され得る。いくつかの実施形態において、処置の有効性を評価するためおよび毒性をコントロールするために生物学的マーカーをモニターする工程が存在し得る。

30

#### 【0226】

患者に投与するための製剤および経路

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

40

#### 【0227】

多量体リガンド、例えば、AP1903は、例えば、約0.01～1mg/kg被験体体重、約0.05～0.5mg/kg被験体体重、0.1～2mg/kg被験体体重、約0.05～1.0mg/kg被験体体重、約0.1～5mg/kg被験体体重、約0.2～4mg/kg被験体体重、約0.3～3mg/kg被験体体重、約0.3～2mg/kg被験体体重または約0.3～1mg/kg被験体体重、例えば、約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.5、2.2.5、3.3.5、4.4.5、5.6、7.8、9もしくは10mg/kg被験体体重の用

50

量で送達され得る。いくつかの実施形態において、リガンドは、1用量あたり0.4mg/kg、例えば、5mg/mLの濃度で提供される。リガンドを、例えば、バイアル1本あたり約0.25mL～約10mL、例えば、約0.25、0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5または10mL、例えば、約2mLの体積で含むバイアルまたは他の容器が提供され得る。

#### 【0228】

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

#### 【0229】

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

#### 【0230】

注射可能な使用に適した薬学的な形態としては、滅菌された水溶液または分散液、および滅菌された注射可能な溶液または分散液の即時調製用の滅菌された粉末が挙げられる。すべての場合において、その形態は、滅菌されており、容易に注射できる程度に流動性である。それは、製造および貯蔵の条件下で安定であり、細菌および真菌などの微生物の汚染作用から保護される。キャリアは、例えば、水、エタノール、ポリオール(例えば、グリセロール、プロピレングリコールおよび液体ポリエチレングリコールなど)、それらの好適な混合物、および植物油を含む溶媒または分散媒であり得る。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングを使用すること、分散液の場合、必要とされる粒径を維持すること、および界面活性物質を使用することによって、維持され得る。微生物の作用の防止は、様々な抗菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサールなどによってもたらされ得る。ある特定の例では、等張剤、例えば、糖または塩化ナトリウムが、含められ得る。注射可能な組成物の持続性の吸収は、吸収を遅延させる作用物質、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを組成物において使用することによってもたらされ得る。

#### 【0231】

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

#### 【0232】

組成物は、中性または塩の形態で製剤化され得る。薬学的に許容され得る塩としては、

10

20

30

40

50

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

#### 【0233】

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

#### 【0234】

投与スケジュールは、患者にふさわしいように決定され得、例えば、細胞が0週目に投与された後、二量体化化学誘導物質の投与による誘導が行われ、それに続いて、さらなる細胞および誘導物質が2週間間隔で、例えば、合計2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28または30週間にわたって投与される投薬スケジュールを含み得る。

#### 【0235】

他の投薬スケジュールには、例えば、1用量の細胞および1用量の誘導物質が投与されるスケジュールが含まれる。別の例では、そのスケジュールは、細胞を投与する工程を含み得、誘導物質が、0週目に投与された後、さらなる細胞および誘導物質の投与が、4週間間隔で、例えば、合計4、8、12、16、20、24、28または32週間にわたって行われる。

#### 【0236】

ある用量の細胞の投与は、1セッションでまたは2以上のセッションで行われ得るが、用量という用語は、リガンドを投与する前に投与される細胞の総量のことを指し得る。

#### 【0237】

必要であれば、上記方法は、処置において使用されるより多くの細胞を得るためのさらなる白血球アフェレーシスをさらに含み得る。

#### 【0238】

##### 疾患を処置するための方法

本方法は、病原微生物によって引き起こされる疾患および/または過剰増殖性疾患の処置または予防の方法も包含する。

#### 【0239】

処置され得るかまたは予防され得る疾患としては、ウイルス、細菌、酵母、寄生生物、原生動物、癌細胞などによって引き起こされる疾患が挙げられる。薬学的組成物（形質導入されたT細胞、発現ベクター、発現構築物など）は、一般化された免疫賦活物（T細胞を活性化する組成物またはシステム）として使用され得、それ自体、疾患を処置する際の有用性を有する。処置され得るおよび/または予防され得る例示的な疾患としては、ウイ

10

20

30

40

50

ルス病因の感染症（例えば、HIV、インフルエンザ、疱疹、ウイルス性肝炎、エプスタイン・バー、ポリオ、ウイルス性脳炎、麻疹、水痘、サイトメガロウイルス（CMV）、アデノウイルス（ADV）、HHV-6（ヒトヘルペスウイルス6,I）、パピローマウイルスなど）；または細菌病因の感染症（例えば、肺炎、結核、梅毒など）；または寄生生物病因の感染症（例えば、マラリア、トリパノソーマ症、リーシュマニア症、トリコモナス症、アメーバ症など）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0240】

薬学的組成物（形質導入されたT細胞、発現ベクター、発現構築物など）を使用して処置され得るかまたは予防され得る新生物発生前または過形成の状態としては、結腸ポリープ、クローン病、潰瘍性大腸炎、乳房病変などのような新生物発生前または過形成の状態が挙げられるが、これらに限定されない。10

【0241】

薬学的組成物を使用して処置され得る、 固形腫瘍を含む癌としては、原発性または転移性メラノーマ、腺癌、扁平上皮癌腫、腺扁平上皮癌腫、胸腺腫、リンパ腫、肉腫、肺癌、肝臓癌、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、白血病、子宮癌、乳癌、前立腺癌、卵巣癌、膀胱癌、結腸癌、多発性骨髄腫、神経芽細胞腫、NPC、膀胱癌、子宮頸癌などが挙げられるが、これらに限定されない。

【0242】

本明細書中に提示されるT細胞活性化システムを使用して処置され得る、 固形腫瘍を含む他の過剰増殖性疾患としては、関節リウマチ、炎症性腸疾患、変形性関節症、平滑筋腫、アデノーマ、脂肪腫、血管腫、線維腫、血管閉塞、再狭窄、アテローム性動脈硬化症、新生物発生前の病変（例えば、腺腫様過形成および前立腺上皮内新形成）、上皮内癌、口腔毛状白斑症または乾癬が挙げられるが、これらに限定されない。20

【0243】

処置方法において、薬学的組成物（発現構築物、発現ベクター、融合タンパク質、形質導入された細胞、活性化T細胞、形質導入されたT細胞）の投与は、「予防的」または「治療的」な目的であり得る。薬学的組成物は、予防的に提供されるとき、任意の症状よりも先に提供される。薬学的組成物の予防的投与は、その後の任意の感染または疾患を予防するためまたは回復させるために役立つ。薬学的組成物は、治療的に提供されるとき、感染または疾患の症状の発生時または発生後に提供される。したがって、本明細書中に提示される組成物は、疾患を引き起こす物質もしくは疾患状態への予想される曝露の前または感染もしくは疾患の開始後に提供され得る。30

【0244】

例えば、脈管構造においてPSA、例えば、PSMAを発現する任意の腫瘍、例えば、肺、骨、肝臓、前立腺または脳、ならびにまた、例えば、乳房、卵巣、腸、精巣、結腸、膀胱、腎臓、膀胱、神経内分泌系、軟部組織、骨塊（bonney mass）およびリンパ系に存在する 固形腫瘍を含む、任意の組織または器官由来の 固形腫瘍が、本方法を用いて処置され得る。処置され得る他の 固形腫瘍としては、例えば、神経膠芽腫および悪性骨髄腫が挙げられる。

【0245】

用語「単位用量」は、それが接種材料に関するとき、哺乳動物に対する単位投与量として好適な物理的に分離した単位のことを指し、各単位は、必要とされる希釈剤とともに、所望の免疫原性効果をもたらすと計算された所定の量の薬学的組成物を含む。接種材料の単位用量に対する詳述は、薬学的組成物のユニークな特色および達成されるべき特定の免疫学的効果によって規定され、その特色に依存する。40

【0246】

薬学的組成物の有効量は、免疫応答を増強するこの選択された結果を達成する量であり得、そのような量は、決定され得る。例えば、免疫系不全を処置するための有効量は、免疫系の活性化を引き起こし、抗原に曝露されたときに抗原特異的な免疫応答を発生させるために必要な量であり得る。この用語は、「十分な量」とも同義である。50

## 【0247】

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

## 【0248】

## A. 遺伝子に基づく治療

ある特定の実施形態において、共刺激ポリペプチド（例えば、本明細書中で論じられるもの）を提供することができる発現構築物が、細胞に、および例えばT細胞において提供される。発現ベクターおよびその中に使用される遺伝的エレメントに関する長い考察が、10 参照によりこの項に援用される。ある特定の例では、発現ベクターは、ウイルスベクター（例えば、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルスおよびレトロウイルス）であり得る。別の例では、ベクターは、リソソームによって被包された発現ベクターであり得る。

## 【0249】

遺伝子送達は、インビボとエキソビボの両方の状況において行われ得る。ウイルスベクターの場合、一般に、ウイルスベクターストックが調製され得る。エキソビボおよびインビボにおけるウイルスベクター媒介性の遺伝子送達の例は、本願において提示される。インビボで送達する場合、ウイルスの種類および達成可能な力価に応じて、例えば、約1、20 2、3、4、5、6、7、8もしくは $9 \times 10^4$ 、1、2、3、4、5、6、7、8もしくは $9 \times 10^5$ 、1、2、3、4、5、6、7、8もしくは $9 \times 10^6$ 、1、2、3、4、5、6、7、8もしくは $9 \times 10^7$ 、1、2、3、4、5、6、7、8もしくは $9 \times 10^8$ 、1、2、3、4、5、6、7、8もしくは $9 \times 10^9$ 、1、2、3、4、5、6、7、8もしくは $9 \times 10^{10}$ 、1、2、3、4、5、6、7、8もしくは $9 \times 10^{11}$ または1、2、3、4、5、6、7、8もしくは $9 \times 10^{12}$ 個の感染性粒子が患者に送達され得る。類似の数字は、相対的な取り込み効率を比較することによって、リポソーム製剤または他の非ウイルス製剤に対して外挿され得る。薬学的に許容され得る組成物としての製剤は、下記で論じられる。多量体リガンド、例えば、A P 1 9 0 3は、例えば、約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.5、2.2.5、3.3.5、4.4.5、5.6、7、8、9または10mg/kg30 被験体体重の用量で送達され得る。

## 【0250】

## B. 細胞に基づく治療

企図される別の治療は、形質導入されたT細胞の投与である。それらのT細胞は、インビトロにおいて形質導入され得る。薬学的に許容され得る組成物としての製剤は、本明細書中で論じられる。

## 【0251】

細胞に基づく治療では、形質導入されるT細胞は、例えば、標的抗原核酸（例えば、mRNAまたはDNA）もしくはタンパク質でトランスフェクトされ得るか；細胞溶解産物、タンパク質もしくは核酸でパルスされ得るか；または細胞と電気的に融合され得る。それらの細胞、タンパク質、細胞溶解産物または核酸は、腫瘍細胞などの細胞、または他の病原微生物、例えば、ウイルス、細菌、原生動物などに由来し得る。40

## 【0252】

## C. 併用療法

本明細書中に提示される発現ベクターの有効性を高めるために、これらの組成物および方法をその疾患の処置において有効な作用物質と組み合わせることが、望ましい場合がある。

## 【0253】

ある特定の実施形態において、抗癌剤が、本方法と組み合わせて使用され得る。「抗癌」剤は、例えば、1つ以上の癌細胞を殺傷すること、1つ以上の癌細胞においてアポトー50

シスを誘導すること、1つ以上の癌細胞の成長速度を低下させること、転移の発生率もしくは数を減少させること、腫瘍のサイズを減少させること、腫瘍の成長を阻害すること、腫瘍もしくは1つ以上の癌細胞への血液の供給を減少させること、1つ以上の癌細胞もしくは腫瘍に対する免疫応答を促進すること、癌の進行を予防するもしくは阻害すること、または癌を有する被験体の寿命を延長することによって、被験体における癌に悪影響を与えることができる。抗癌剤としては、例えば、化学療法剤（化学療法）、放射線治療剤（放射線治療）、外科手技（手術）、免疫治療剤（免疫療法）、遺伝的治療剤（遺伝子治療）、ホルモン治療、他の生物学的薬剤（生物療法）および/代替療法が挙げられる。

#### 【0254】

さらなる実施形態では、感染症を処置するためおよび/または予防するために、抗生物質が薬学的組成物と組み合わせて使用され得る。そのような抗生物質としては、アミカシン、アミノグリコシド類（例えば、ゲンタマイシン）、アモキシシリン、アンホテリシンB、アンピシリン、アンチモン類（antimonials）、アトバコン、スチボグルコン酸ナトリウム、アジスロマイシン、カブレオマイシン、セフォタキシム、セフォキシチン、セフトリアキソン、クロラムフェニコール、クラリスロマイシン、クリンダマイシン、クロファジミン、サイクロセリン、ダブソン、ドキシサイクリン、エタンブトール、エチオナミド、フルコナゾール、フルオロキノロン類、イソニアジド、イトラコナゾール、カナマイシン、ケトコナゾール、ミノサイクリン、オフロキサシン）、パラ-アミノサリチル酸、ペニタミジン、ポリミキシン、ディフェンシン類（defensins）、プロチオナミド、ピラジナミド、ピリメタミン、スルファジアジン、キノロン類（例えば、シプロフロキサシン）、リファブチン、リファンピン、スバルフロキサシン、ストレブトマイシン、スルホンアミド類、テトラサイクリン類、チアセタゾン、トリメトブリム（trimethoprim）-スルファメトキサゾール、バイオマイシンまたはそれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0255】

より一般的には、そのような薬剤は、癌細胞および/もしくは微生物を殺傷するためまたは癌細胞および/もしくは微生物の増殖を阻害するために有効な発現ベクターとともに、合計量で提供され得る。このプロセスは、細胞を薬剤および薬学的組成物と同時にまたはある時間内に接触させる工程を含み得、ここで、細胞、組織または生物への薬学的組成物と薬剤との別個の投与によって、所望の治療的な利益がもたらされる。これは、薬学的組成物と1つ以上の薬剤の両方を含む单一の組成物または薬理学的製剤と細胞、組織もしくは生物を接触させることによって、または2つ以上の別々の組成物もしくは製剤（ここで、一方の組成物は薬学的組成物を含み、他方は1つ以上の薬剤を含む）と細胞を接触させることによって達成され得る。

#### 【0256】

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

#### 【0257】

薬学的組成物の投与は、数分から数週間の範囲の間隔だけ、他の作用物質より先に行われ得る、他の作用物質と同時であり得る、および/または他の作用物質の後に行われ得る。薬学的組成物および他の作用物質が別々に細胞、組織または生物に適用される実施形態では、その薬学的組成物および作用物質がなおも、都合よく組み合わされた効果をその細胞、組織または生物に対して発揮することができ得るように、各送達の時点の間に有効時間が満了しないことが通常、保証され得る。例えば、そういう場合には、2、3、4つまたはそれ以上の様式を用いて、細胞、組織または生物を実質的に同時に（すなわち、約

10

20

30

40

50

1分未満以内に)薬学的組成物と接触させ得ることが企図される。他の態様において、1つ以上の作用物質が、発現ベクターを投与する前および/または投与した後に、実質的に同時、約1分以内から、約24時間、約7日間、約1~約8週間またはそれ以上まで、およびそれらの中の任意の導き出せる範囲で投与され得る。なおもさらに、本明細書中に提示される薬学的組成物と1つ以上の作用物質との様々な併用レジメンが、使用され得る。

#### 【0258】

いくつかの実施形態において、化学療法剤は、タキソテール(ドセタキセル)または別のタキサン、例えば、カバジタキセル(cabazitaxel)であり得る。化学療法剤は、治療用細胞および誘導物質による処置の前、処置中または処置の後に投与され得る。例えば、化学療法剤は、第1の用量のT細胞を投与する約1年前、11、10、9、8、7、6、5もしくは4ヶ月前、または18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2週間前もしくは1週間前に、投与され得る。または、例えば、化学療法剤は、第1の用量のT細胞または誘導物質を投与した約1週間後、または2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17もしくは18週間後、または4、5、6、7、8、9、10もしくは11ヶ月後、または1年後に投与され得る。

#### 【0259】

化学療法剤の投与は、2つ以上の化学療法剤の投与を含み得る。例えば、シスプラチンは、タキソテールまたは他のタキサン、例えば、カバジタキセルに加えて投与され得る。

#### 【実施例】

#### 【0260】

下記に示される実施例は、ある特定の実施形態を例証するものであって、本技術を限定しない。

#### 【0261】

以下の項では、治療用細胞、例えば、T細胞において、誘導可能なキメラシグナル伝達分子を発現する方法、および形質転換された細胞を使用する方法の例が、提供される。誘導可能なポリペプチドを発現する方法、形質転換されたまたはトランスフェクトされた細胞の使用、およびアッセイは、例えば、Spencer, D. M.ら、Science 262:1019-1024(1993); 2008年7月29日に発行された“Induced Activation in Dendritic Cells”という表題の米国特許第7,404,950号; 2011年4月14日に出願された“Methods for Treating Solid Tumors”という表題の米国特許出願番号13/087,329; および2011年5月20日に出願された“Methods for Inducing Selective Apoptosis”という表題の米国特許出願番号13/112,739(これらの全体が参照により本明細書中に援用される)に論じられている。

#### 【0262】

実施例1:誘導可能なキメラシグナル伝達分子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

ヒトFK506結合タンパク質(FKBP)、例えば、FKBP12v36に融合されたシグナル伝達分子を含む、治療薬としての使用に適した発現ベクターを構築する。これらの方法は、1つ以上の共刺激ポリペプチドを発現するためにも使用され得る。誘導可能なCSMは、小分子医薬を使用して二量体化(または多量体化)され得る。誘導可能なCSMをコードする核酸を、リガンド結合ドメインをコードする核酸に融合し、蛍光マーカーであるGFPの発現も可能にする、SFGレトロウイルスベクターまたはpLenti7.3レンチウイルスベクターに挿入する。

#### 【0263】

誘導可能なCSMポリペプチドは、Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-SerリンクカーとともにCSM配列に連結された、2つ、3つまたはそれ以上、ある特定の実施形態では、2つまたは3つのFK506結合タンパク質(FKBP-例えば、F36V変

10

20

30

40

50

異を含む F K B P 1 2 v 3 6 バリエントまたは F K B P 1 2 ; G e n B a n k A H 0 0 2 8 1 8 ) ) を含む。レトロウイルスにおいて発現されたときの相同組換えを防ぐために、 F K B P ( F v 2 ) の 1 つ以上のアミノ酸配列をコドンゆらぎにする ( 例えは、各アミノ酸コドンの 3 番目のヌクレオチドを、元々コードされていたアミノ酸を維持したサイレント変異によって変更する ) 。すべての構築物を、 S F G または p L e n t i 7 . 3 にクローニングする。

【 0 2 6 4 】

2 9 3 T 細胞を、これらの各構築物でトランスフェクトし、形質導入の 4 8 時間後に、マーカー遺伝子 G F P または C D 1 9 の発現をフローサイトメトリーによって解析する。 G F P または C D 1 9 の発現レベルに加えて、発現された遺伝子産物をウエスタンプロットによって解析することにより、誘導可能なキメラシグナル伝達分子の発現も確かめる。例えば、共刺激ポリペプチドに結合する抗体が、そのウエスタンプロットのために使用され得る。

【 0 2 6 5 】

トランスフェクトされた 2 9 3 T 細胞を、アプロチニン、ロイペプチドおよびフッ化フェニルメチルスルホニル ( B o e h r i n g e r , I n g e l h e i m , G e r m a n y ) を含む溶解緩衝液 ( 5 0 % T r i s / G l y 、 1 0 % ドデシル硫酸ナトリウム [ S D S ] 、 4 % ベータ - メルカプトエタノール、 1 0 % グリセロール、 1 2 % 水、 4 % プロモフェノールブルー 0 . 5 % ) に再懸濁し、氷上で 3 0 分間インキュベートする。 3 0 分間の遠心分離の後、上清を収集し、 1 : 2 で L a e m m l i 緩衝液 ( B i o - R a d , H e r c u l e s , C A ) と混合し、煮沸し、 1 0 % S D S - ポリアクリルアミドゲルにローディングする。膜を、ウサギ抗共刺激ポリペプチド免疫グロブリン G ( I g G ; A f f i n i t y B i o R e a g e n t s , G o l d e n , C O ; 1 : 5 0 0 希釈 ) およびマウス抗 G F P I g G ( C o v a n c e , B e r k e l e y , C A ; 1 : 2 5 , 0 0 0 希釈 ) でプロービングする。次いで、プロットを、適切なペルオキシダーゼ結合二次抗体に曝露し、タンパク質の発現を、高感度化学発光 ( E C L ; A m e r s h a m , A r l i n g t o n H e i g h t s , I L ) で検出する。次いで、その膜をストリッピングし、ヤギボリクローナル抗アクチシン ( S a n t a C r u z B i o t e c h n o l o g y ; 1 : 5 0 0 希釈 ) でリプロービングすることにより、ローディングの質を調べる。

【 0 2 6 6 】

誘導可能な C S M 発現構築物の評価

細胞株

癌細胞株 L N C a P 、 P C 3 、 D U 1 4 5 および A 5 4 9 、ならびにヒト胎児腎細胞株 H E K - 2 9 3 T を、 A m e r i c a n T y p e C u l t u r e C o l l e c t i o n ( R o c k v i l l e , M D ) から入手する。細胞を、 3 7 における 5 % 二酸化炭素 ( C O 2 ) を含む加湿雰囲気において、 1 0 % ウシ胎児血清 ( H y c l o n e , W a l t h a m , M A ) および 2 m M L - グルタミンを含む完全 I M D M ( S i g m a , S t L o u i s , M O ) 中で維持する。形質導入された T 細胞および P H A 芽球を、 1 0 0 U / m l I L - 2 ( C e l l g e n i x ) が補充された C e l l g e n i x D C ( C e l l g e n i x ) 培地の中で維持する。

【 0 2 6 7 】

T 細胞の活性化

拡大および形質導入のための T 細胞の活性化は、可溶性 C D 3 および C D 2 8 ( M i l t e n y i B i o t e c , A u b u r n , C A ) を使用して行われる。 P B M C を、 1 0 0 U / m l I L - 2 ( C e l l g e n i x ) が補充された C e l l g e n i x D C 培地に、 1 × 1 0 6 細胞 / m l で再懸濁し、 0 . 2 μ g / m l C D 3 および 0 . 5 μ g / m l C D 2 8 可溶性抗体で刺激する。次いで、細胞を 3 7 、 5 % C O 2 において 4 日間培養する。 4 日目に、 I L - 2 を含む 1 m l の新鮮培地を加える。 7 日目に、形質導入に向けて、細胞を収集し、 C e l l g e n i x D C 培地に再懸濁する。

【 0 2 6 8 】

10

20

30

40

50

## レトロウイルス構築物およびレンチウイルス構築物

P S M A、P S C A、M U C 1 および H e r 2 / N e u を標的化するコドン最適化された一本鎖可変フラグメントを含む誘導可能な C S M ( i C S M ) および C A R - C D 3 ゼータ構築物は、B l u e H e r o n B i o ( B o t h e l l , W A ) によって合成される。i C S M 構築物は、T 細胞レセプターの C D 2 8、4 - 1 B B および C D 3 ゼータ鎖を含む共刺激内部ドメインにインフレームで連結された F K B P 1 2 v 3 6 ドメインからなる。C A R 構築物は、ヒト I g G 1 - C h 2 C h 3 ドメインおよび C D 3 - ゼータ鎖をインフレームで含む s c F v フラグメントをクローニングすることによって作製される。i C S M 構築物と C A R - C D 3 ゼータ構築物の両方を、エメラルド G F P を共発現する、S F G レトロウイルス骨格または p L e n t i 7 . 3 レンチウイルス骨格 ( I n v i t r o g e n ) にサブクローニングする。i C S M の刺激作用および共刺激作用、ならびに C A R - C D 3 ゼータの細胞傷害性の評価を、これらの導入遺伝子をコードするレトロウイルスまたはレンチウイルスで T 細胞を個別にまたは同時に形質導入することによって行う。  
10

### 【 0 2 6 9 】

#### レトロウイルス形質導入

レトロウイルスの一過性の生成のために、G e n e J u i c e トランスフェクション試薬 ( N o v a g e n , M a d i s o n , W I ) を使用して、g a g - p o l および R D 1 1 4 エンベロープをコードするプラスミドとともに、i C S M 構築物で 2 9 3 T 細胞をトランスフェクトする。トランスフェクションの 4 8 ~ 7 2 時間後にウイルスを収集し、急速凍結し、使用するまで約 8 0 で保存する。レンチウイルスの一過性の生成のために、G e n e J u i c e を使用して、プラスミド p L P 1 ( g a g / p o l ) 、p L P 2 ( r e v ) および p L P / V S V G ( V S V G e n v ) とともに、i C A R 構築物で 2 9 3 T 細胞をトランスフェクトする。トランスフェクションの 4 8 ~ 7 2 時間後にウイルスを収集し、急速凍結し、使用するまで約 8 0 で保存する。大規模なレトロウイルスの生成のために、一過性 V S V - G シュードタイプ化レトロウイルス上清を用いた複数回の形質導入によって、安定な F L Y R D 1 8 由来レトロウイルス産生株を作製する。導入遺伝子発現が最も高い F L Y R D 1 8 細胞を、単一細胞ソーティングし、最も高いウイルス力価をもたらすクローンを拡大し、リンパ球形質導入のためのウイルスを作製するために使用する。このクローンの導入遺伝子発現、機能およびレトロウイルス力価を、8 週間超にわたる連續培養中、維持する。組織培養用の処理が行われていない 2 4 ウェルプレートを、3 7 において 1 時間または 4 において一晩、7  $\mu$  g / m l R e t r o n e c t i o n ( T a k a r a B i o , O t s u , S h i g a , J a p a n ) でコーティングする。それらのウェルを、リン酸緩衝食塩水 ( P B S ) で洗浄し、次いで、3 7 において 3 0 分間、プレートを 1 . 5 m l の上清とともにインキュベートすることによって、レトロウイルス上清でコーティングする。続いて、T 細胞芽球を、1 0 0 U / m l I L - 2 が補充されたウイルス上清において 1 ウェルあたり  $5 \times 1 0^5$  細胞でブレーティングする。6 0 時間にわたって形質導入を行う。形質導入後、細胞を収集し、フローサイトメトリーによって C D 1 9 または G F P の発現について表現型分析を行う。  
20  
30  
30

### 【 0 2 7 0 】

#### i C S M / C A R を形質導入された T 細胞の細胞傷害性

形質導入された各 T 細胞株の細胞傷害活性を、以前に提示されたような、標準的な 4 時間の  $^{51} C r$  放出アッセイにおいて評価する。i C S M 、P S M A C A R - C D 3 ゼータ、または i C S M ウィルスと C A R ウィルスの両方で形質導入された T 細胞を、フィトヘマグルチニン ( P H A ) によって刺激された自家リンパ球 ( P H A 芽球 ) 、L N C a P 、P C 3 または D U 1 4 5 および A 5 4 9 癌細胞株、ならびにヒト P S M A を発現するトランスジェニック A 5 4 9 ( A 5 4 9 - P S M A ) を含む、C r  $^{51}$  で標識された標的細胞に対して比較する。完全培地または 1 % T r i t o n X - 1 0 0 ( S i g m a , S t L o u i s , M O ) 中でインキュベートされた標的細胞をそれぞれ自発的および最大の  $^{51} C r$  放出を測定するために使用する。3 つ組ウェルの特異的溶解の平均パーセンテ  
40  
50

ージを、100×(実験による放出-自発的な放出)/(最大放出-自発的な放出)として計算した。クロム放出アッセイに加えて、共培養実験を行う。ここでは、細胞株LNCaP、PC3、DU145、A549およびA549-PSMAを、蛍光性mOrangeを発現するように形質導入し、標的細胞として使用する。mOrangeを発現している腫瘍細胞を、完全培地中、IL-2(50U/ml)の存在下において、形質導入されていないT細胞またはCARによって改変されたT細胞とともに、腫瘍細胞とT細胞とが1:10という比で共培養する。24時間後、iCARを有するT細胞を100nM AP1903で刺激する。72時間後、細胞を捕集し、カウントし、T細胞を検出するためにCD3で標識し、mOrange腫瘍細胞のパーセンテージをフローサイトメトリー(LSR II; BD)によって解析する。

10

## 【0271】

iCSMを形質導入されたT細胞の表現型分析および活性化状態

iCARを形質導入されたT細胞の細胞表面の表現型を、以下のモノクローナル抗体を使用して調べる: CD3、CD4、CD8、CD19、CD25、CD27、CD28、CD44、CD45RA、CD45RO、CD62L、CD80、CD83、CD86、CD127、CD134、CD137、HLA-ABCおよびHLA-DR。iCSM刺激剤として10~100nM AP1903を用いておよび用いずに、表現型分析を行う。適切なアイソタイプマッチコントロールを各実験において使用し、LSR IIフローサイトメーター(BD)を用いて細胞を解析する。抗F(ab')2(Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA)を使用して、CARの発現を評価した。

20

## 【0272】

iCSMを形質導入されたT細胞のサイトカイン産生の解析

100nM AP1903による刺激の前および後(24時間)のT細胞培養上清中のインターフェロン- (IFN-)、IL-2、IL-4、IL-5、IL-10および腫瘍壊死因子- (TNF)の濃度を、ヒトTh1/Th2サイトカインサイトメトリビーズアレイ(BD Pharmingen)を使用して計測する。培養上清中の誘導されたサイトカイン産生を、製造者の指示書に従って酵素結合免疫吸着測定法(ELISA; R&D Systems, Minneapolis, MN)によって検証する。

30

## 【0273】

iCSMを形質導入されたT細胞の増殖

iCSMを介したAP1903誘導性シグナル伝達の増殖効果を、AP1903に曝露した後の、形質導入されたT細胞および形質導入されていないT細胞の細胞成長を計測することによって評価する。T細胞を、37において10分間、10μMカルボキシフルオレセインジアセテート、スクシンイミジルエステル(CFSE)で標識する。インキュベーション後、細胞をPBS中で洗浄し、次いで、Cellgenix DC培地に再懸濁する。その後、1×10<sup>6</sup>個のCFSEで標識されたiCSM改変T細胞または形質導入されていないT細胞を、Cellgenix DC培地のみにおいて培養するか、または100nM AP1903で刺激する。5日後、細胞を収集し、CD3-PerCP.Cy5.5およびCD19-PEで標識し、CFSE希釈についてフローサイトメトリーによって解析する。

40

## 【0274】

可溶性免疫グロブリンがCAR<sup>+</sup>リンパ球の増殖および拡大に影響するかを評価するために、いかなる外来性サイトカインも加えずに、健常ドナーから得られたヒト血漿の段階希釈物または精製されたヒト免疫グロブリン(Jackson ImmunoResearch)の段階希釈物とともに細胞を1×10<sup>5</sup>細胞/ウェルで培養する。72時間後、それらの細胞を、1μCi(0.037MBq)メチル-<sup>3</sup>[H]チミジン(Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)でパルスし、さらに15時間培養する。次いで、それらの細胞を、フィルター上に収集し、乾燥させ、毎分のカウント数を、-シンチレーションカウンター(Tricarb 250

50

0 TR ; Packard BioScience, Meridiem, CT)において計測する。これらの実験は、3つ組で行う。他の実験では、コントロールおよびCAR<sup>+</sup>トリプル球を、培地のみ、または血漿もしくは精製された免疫グロブリンの段階希釈物を1日おきに加える培地を用いて培養する。次いで、トリパンブルー排除を用いて細胞を2日おきにカウントする。

#### 【0275】

##### インビボ実験

6～8週齢の非肥満糖尿病重症複合免疫不全(NOD/SCID)マウスを照射し(250rad)、Matrigel(BD Bioscience)に再懸濁された10×10<sup>6</sup>～15×10<sup>6</sup>個のLNCaP腫瘍細胞を、そのマウスの右側腹部の皮下に注射する。2週間後、直径がおよそ0.5cmの腫瘍を有するマウスの尾静脈に、形質導入されていないT細胞またはiCSM/CARを形質導入されたT細胞(合計15×10<sup>6</sup>個)を注射した。それらのマウスを、ランダムに2群に分ける：T細胞を拡大するために、1群には、CID(50～125μg AP1903、腹腔内、1週間に2回)を投与し、もう1群には、キャリアのみ(16.7%プロパンジオール、22.5%PEG400および1.25%Tween80、腹腔内、1週間に2回)を投与する。21日間にわたるノギス計測によって、腫瘍の成長についてマウスを評価する。末梢血サンプルを、7、14および21日目に後眼窩出血によって採取することにより、ヒトCD3/ヒトCD19発現T細胞に対するフローサイトメトリー解析を用いて、iCSMまたはコントロールT細胞の残留および拡大を計測する。

10

20

#### 【0276】

##### iCSMを形質導入されたT細胞の特色のインビボにおける評価

誘導可能なCSMの発現が、T細胞の特色を変化させないことを確実にするために、形質導入されていないまたは非機能性の誘導可能なCAR(PSMA CAR-CD3ゼータのみ)の表現型、抗原特異性、増殖能および機能を、iCSM/CARを形質導入されたT細胞と比較する。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CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、CD56<sup>+</sup>およびTCR<sup>+</sup>細胞の数を比較し、IFN-<sup>+</sup>、TNF<sup>+</sup>、IL-10、IL-4、IL-5およびIL-2を含むサイトカインの産生量も同様に比較する。指標関数的に増えるCTLの成長の特色、ならびに増殖に対する抗原およびIL-2への依存性を評価し、抗原刺激の際のタイプTH1およびTH2サイトカインの表現型データおよび分泌データも同様に評価する。

30

#### 【0277】

##### 実施例2：治療のためのヒト細胞における誘導可能なCSMの使用

発現構築物、およびヒト細胞においてその発現構築物を使用する方法が、この実施例に提示される。

#### 【0278】

##### 材料および方法

###### 遺伝子改変されたT細胞の大規模产生

T細胞は、標準的な方法を用いて健常志願者から作製される。簡潔には、健常ドナーまたは癌患者由来の末梢血単核球(PBMC)を、可溶性CD3およびCD28(Miltenyi Biotech, Auburn, CA)を使用して、拡大および形質導入のために活性化する。PBMCを、100U/ml IL-2(Cellegene)が補充されたCellegene DC培地に、1×10<sup>6</sup>細胞/mlで再懸濁し、0.2μg/ml CD3および0.5μg/ml CD28可溶性抗体で刺激する。次いで、細胞を37%、5%CO<sub>2</sub>において4日間培養する。4日目に、IL-2を含む1mlの新鮮培地を加える。7日目に、形質導入に向けて、細胞を収集し、Cellegene DC培地に再懸濁する。

40

#### 【0279】

##### プラスミドおよびレトロウイルス

SFGプラスミドは、切断可能な2A様配列を介して切断型ヒトCD19に連結された

50

誘導可能なCSMからなる。その誘導可能なCSMは、F36V変異を有し、Ser-Gly-Gly-Gly-Serリンクカーを介してヒトCSMに接続された、ヒトFK506結合タンパク質(FKBP12; GenBank AH002818)からなる。そのF36V変異は、合成ホモ二量体化剤(homodimerizer)AP20187またはAP1903に対するFKBP12の結合親和性を高める。その2A様配列は、Thosea asigna昆虫ウイルス由来の20アミノ酸ペプチドをコードし、それは、グリシンと末端プロリン残基との間での>95%の切断を媒介して、iCSMのC末端に19個の追加のアミノ酸およびCD19のN末端に1つの追加のプロリン残基をもたらす。CD19は、細胞質内ドメインを242アミノ酸から19アミノ酸に短縮し、リン酸化に対する潜在的な部位である保存されたすべてのチロシン残基を除去する、アミノ酸333(TDPTRRF)で切断される、完全長CD19(GenBank NM001770)からなる。

#### 【0280】

テナガザル白血病ウイルス(Gal-V)シュードタイプ化レトロウイルスを產生するPG13ベースの安定したクローンを、Phoenix Eco細胞株(ATCC product #SD3444; ATCC, Manassas, VA)をSFGプラスミドで一過性にトランسفエクトすることによって、作製する。これは、Ecoシュードタイプ化レトロウイルスを產生する。そのPG13パッケージング細胞株(ATCC)を、Ecoシュードタイプ化レトロウイルスで3回形質導入することにより、細胞1つあたり複数のSFGプラスミドプロウイルス組み込み体を含む產生株を作製する。単一細胞クローニングを行い、最も高い力値をもたらしたPG13クローンを、拡大し、ベクター作製のために使用する。

#### 【0281】

##### レトロウイルス形質導入

T細胞の活性化および拡大のための培養液は、100U/ml IL-2(Cellegene)が補充された無血清Cellegene DC培地(Cellegene)である。レトロウイルスベクターで形質導入する前の7日間にわたって、T細胞を可溶性抗CD3および抗CD28(Miltenyi Biotec)によって活性化する。必要であれば、CD19の免疫磁気選択を形質導入後の4日目に行い；陽性画分をさらに2日間にわたって拡大し、凍結保存する。

#### 【0282】

遺伝子改変され、同種異系枯渇された(allodepleted)細胞のスケールアップ產生

臨床適用のための形質導入プロセスのスケールアップでは、10mlの抗CD3 0.5μg/mlおよび抗CD28 0.2μg/mlまたは10mlのフィブロネクチン7μg/mlで4において一晩コーティングされた、組織培養用に処理されていないT75フラスコ(Nunc, Rochester, NY)を使用する。高細胞粘着性のためにコロナ処理されたフッ化ホウ素プロピレンバッジ(2PF-0072AC, American Fluoroseal Corporation, Gaithersburg, MD)も使用する。PBMCを、抗CD3、抗CD28によってコーティングされたフラスコに、100U/ml IL-2が補充された培地中、1×10<sup>6</sup>細胞/mlで播種する。レトロウイルス形質導入に向けて、レトロネクチンでコーティングされたフラスコまたはバッジを、10mlのレトロウイルス含有上清で2~3時間、一度負荷する。活性化T細胞を、レトロウイルスベクター含有新鮮培地と100U/ml IL-2が補充されたT細胞培養液とが3:1の中に1×10<sup>6</sup>細胞/mlで播種する。細胞を、翌朝収集し、組織培養用に処理されたT75またはT175フラスコ内、100U/ml IL-2が補充された培養液中で、約5×10<sup>5</sup>細胞/ml~8×10<sup>5</sup>細胞/mlの播種密度で拡大する。

#### 【0283】

##### CD19免疫磁気選択

10

20

30

40

50

CD19に対する免疫磁気選択は、1つの例において、形質導入の4日後に行われ得る。細胞を、モノクローナルマウス抗ヒトCD19抗体 (Miltenyi Biotech, Auburn, CA) に結合体化され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カラムにおいて、および大規模実験ではCliniMacs Plus自動選択デバイスにおいて、選択する。CD19によって選択された細胞を、さらに4日間拡大し、形質導入後の8日目に凍結保存する。これらの細胞は、「遺伝子改変細胞」と称される。

【0284】

免疫表現型分析および五量体解析

フローサイトメトリー解析 (FACSCalibur および CellQuest ソフトウェア; Becton Dickinson) を、以下の抗体を使用して行う：CD3、CD4、CD8、CD19、CD25、CD27、CD28、CD45RA、CD45RO、CD56 および CD62L。CD19 - PE (クローン4G7; Becton Dickinson) は、最適な染色をもたらすと見出されており、その後のすべての解析において使用された。形質導入されていないコントロールを、CD19に対するネガティブゲートを設定するために使用する。CAR発現を、抗F(ab')2 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) を使用して評価する。

【0285】

統計解析

対応のある両側スチューデントt検定を使用して、サンプル間の差の統計的有意性を判定する。すべてのデータを平均値±1標準偏差として表す。

【0286】

実施例3：AP1903依存性T細胞活性化の計測

目的：2つのFKB Pv36分子に連結されたシグナル伝達分子をコードするレトロウイルスベクターで初代T細胞を形質導入することにより、そのT細胞のAP1903活性化を可能にすること。この実験では、二量体化に応答したサイトカインの産生を、マルチプレックスサイトカインビーズアレイを使用して計測した。

【0287】

方法：

誘導可能なT細胞分子のデザインおよびクローニング：

1. 2つのSFGベースのレトロウイルスベクターを、Gibsonクローニングによって構築した（ここで、PCR産物を、pAd1127-02-iMCから增幅し、LFv1.Fv2L DNAフラグメントの代わりにpBPO320-SFG-Myr.LFv1.Fv2L.2A.CD19構築物に挿入した）。

【0288】

a. 第1のベクターにおいて、増幅されるPCR産物は、Fv'Fv であるか、またはFKB Pv36フラグメントだけをレトロウイルス骨格に挿入した場合、XhoIおよびSalI部位においてLFv1.Fv2Lを置き換えた。このベクターは、pBPO171-SFG-Myr.Fv'.Fv.2A.CD19と呼ばれ、いかなるT細胞シグナル伝達分子も有しないコントロールベクターである。

【0289】

b. 第2のベクターにおいて、増幅されるPCR産物は、MyD88/CD40.Fv'.Fv（またはiMCnoE）だった。これを、LFv1.Fv2L DNA配列の代わりに、XhoIおよびSalI制限酵素認識部位においてpBPO320プラスミドに挿入した。このベクターは、pBPO172-SFG-Myr.iMCnoE.2A.CD19と呼ばれる。「noE」という接尾辞は、このiMC DNAが、エピトープタグをコードしないことを示す。

【0290】

レトロウイルスの産生：

10

20

30

40

50

2. 一過性のトランスフェクション法によってレトロウイルスを作製し、ここで、HEK293T細胞を以下のプラスミドでトランスフェクトした：

- a. SFGレトロウイルスプラスミド (pBPO171またはpBPO172；それぞれRV-171またはRV-172)
- b. レトロウイルスエンベローププラスミド (RD114)
- c. Gag/polプラスミド (pEQ-PAM-E)。

【0291】

3. 48および72時間後に、複製欠損レトロウイルスを含むトランスフェクトされた細胞からの上清を捕集し、ドライアイス/エタノールにおいて急速凍結し、T細胞の形質導入まで-80で保存した。

10

【0292】

4. 初代T細胞を形質導入するために、健常ドナー由来のPBMCを、100U/ml IL-2が補充されたT細胞増殖培地中において、抗CD3抗体および抗CD28抗体で活性化した。3日後、T細胞を活性化し、収集し、レトロウイルス形質導入の準備を整えた。それらのT細胞を形質導入するために、まず、組織培養用に処理されていないプレートを4において一晩、Retronectinでコーティングした。次いで、Retronectinを除去し、プレートをPBSで洗浄した。次いで、レトロウイルス上清を、Retronectinプレートをコーティングするために使用した。次いで、活性化T細胞をウェルに加え、プレートを遠心分離することにより、ウイルス粒子の結合および形質導入を促進した。48時間後、それらのT細胞を収集し、CD3とCD19との同時発現についてフローサイトメトリーによって解析することにより、ウイルスの形質導入効率を測定した。

20

【0293】

AP1903によって誘導されたT細胞活性化の、サイトカイン産生による解析：

5. T細胞のAP1903依存性T細胞活性化を評価するために、 $1 \times 10^5$ 個の形質導入されていない(NT)T細胞またはコントロールレトロウイルス(RV-171)もしくはiMCを含むレトロウイルス(RV-172)で形質導入されたT細胞を、96ウェルプレートに3つ組でプレーティングし、培地のみまたは10nM AP1903を含む培地を用いて37、5%CO<sub>2</sub>において培養した。

30

【0294】

6. 24時間後、それらの細胞を静かに混合し、プレートを遠心分離した。次いで、上清を捕集し、以下のサイトカインおよびケモカインを計測するBio-Plex Human Cytokine/Chemokine 27-plexプレートにプレーティングした：

- a. 塩基性FGF、G-CSF、GM-CSF、IFN-ガンマ、IL-1Ra、IL-1ベータ、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12p70、IL-13、IL-15、IL-17RA、エオタキシン、IP10、MCP-1、MIP-1アルファ、MIP-1ベータ、PDGF-bb、RANTES、TNF-アルファおよびVEGF。

40

【0295】

b. 続いて、Bio-Plex MAGPIX Multiplex Readerを使用して、上清中のサイトカインおよびケモカインを計測し、そのプレートにおける標準物質と比較した。

【0296】

結果：

形質導入効率：

1. 2人の健常ドナー由来のT細胞を、レトロウイルスで形質導入し、48時間後、CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>同時発現についてフローサイトメトリーによって測定された効率は、以下のとおりだった：

- a. ドナー063

50

i . N T = 6 . 5 4 %  
 i i . R V - 1 7 1 = 7 3 . 9 %  
 i i i . R V - 1 7 2 = 5 4 . 6 %  
 b . ドナー 7 0 7  
 i . N T = 2 . 1 6 %  
 i i . R V - 1 7 1 = 8 5 . 2 %  
 i i i . R V - 1 7 2 = 7 3 . 6 % 。

## 【0297】

2 . 形質導入は、ベクターとドナーの両方についてかなり高かったことから、それらが H E K 2 9 3 T 細胞にとって有毒でないことおよびウイルス力価が良好であることが示唆された。 10

## 【0298】

## サイトカイン / ケモカインの產生

3 . サイトカインおよびケモカインの分泌の解析から、 A P 1 9 0 3 二量体化に対する顕著な依存性が示された。 T 細胞によって產生された以下のサイトカインおよびケモカインは、 2 4 時間にわたって誘導を示したが、コントロールベクターで形質導入された T 細胞または形質導入されていない T 細胞からは誘導されなかった :

a . G M - C S F 、 I F N - ガンマ、 I L - 1 3 、 I L - 4 、 I L - 5 、 I L - 6 、 I L - 8 、 I L - 1 ベータ、 I L - 1 2 p 7 0 、 I P 1 0 、 M I P - 1 アルファ、 M I P - 1 ベータ、 R A N T E S および T N F - アルファ 。

## 【0299】

4 . さらに、他のサイトカインおよびケモカインは、 i M C の A P 1 9 0 3 活性化によって誘導されないとみられた。これらには、以下が含まれる :

a . 塩基性 F G F 、 G - C S F 、 I L - 1 R a 、 I L - 2 、 I L - 7 、 I L - 9 、 I L - 1 0 、 I L - 1 5 、 I L - 1 7 R A 、 エオタキシン、 M C P - 1 、 P D G F - b b および V E G F 。

## 【0300】

ある特定の結果は、図 7 ~ 1 5 にも示される。 N T = 形質導入されていない活性化 T 細胞

R V 0 1 7 1 = S F G - M y r . F v ' . F v . 2 A . C D 1 9 ; R V 0 1 7 2 = S F G = M y r . M y D 8 8 / C D 4 0 . F v ' . F v . 2 A . C D 1 9 。

## 【0301】

T 細胞を、 1 0 n M A P 1 9 0 3 で 2 4 時間刺激し、次いで、上清をサイトカインレベルについてアッセイした。

## 【0302】

## 実施例 4 : A P 1 9 0 3 依存性の T 細胞の細胞傷害性の計測 :

目的 : 2 つの F K B P v 3 6 分子に連結されたシグナル伝達分子をコードするレトロウイルスベクターで初代 T 細胞を形質導入することにより、その T 細胞の A P 1 9 0 3 活性化を可能にすること。この実験では、 A P 1 9 0 3 活性化の 2 つの態様を調べた。第 1 に、 T 細胞が、腫瘍細胞の近位に存在する場合、それらの活性化によって腫瘍細胞の殺傷が誘導されるのか ? 第 2 に、 T 細胞が、 A P 1 9 0 3 を介して活性化される場合、それらは増殖するのか ? 40

## 方法 :

誘導可能な T 細胞分子のデザインおよびクローニングならびにレトロウイルスの產生

1 . 方法は、上記の実施例 4 において論じられた方法と本質的に同じである。同じ細胞をこのアッセイのために使用した。

## 【0303】

## G F P によってマークされた C A P A N - 1 ( 脾臓腺癌 ) 細胞株の作製 :

2 . C A P A N - 1 を A T C C から購入した。続いて、 E G F P / ホタルルシフェラーゼ融合タンパク質に対する遺伝子、ならびに安定にトランスフェクトされた細胞が、 G 4 50

18 抗生物質とともに培養することによって長い時間にわたって選択されるのを可能にするネオマイシン耐性遺伝子を含む p B P 0 1 6 8 - p c D N A 3 . 1 - E G F P l u c プラスミドによるトランスフェクションによって、その細胞株を遺伝子改変した。培養後、高い G F P 発現を有するクローニーを選択し、> 95% G F P を有する細胞株が得られるまで継代培養した。

【0304】

i M C 対応 (en a b l e d) T 細胞と C A P A N - 1 腫瘍細胞との共培養：

3. 形質導入されていない T 細胞または R V - 1 7 1 (コントロールベクター) もしくは R V - 1 7 2 (i M C ベクター) で形質導入された細胞を、10 n M A P 1 9 0 3 ありまたはなしで 5 0 U / m l I L - 2 が補充された培地中において T 細胞と腫瘍細胞とが 5 : 1 の比で培養した。次いで、共培養物を 3 7 および 5% C O<sub>2</sub> において 7 2 時間インキュベートした。続いて、蛍光顕微鏡法によって、および 0 . 2 5 % トリプシン / E D T A を用いて培養物を収集し、培養物中の G F P<sup>+</sup> C D 3<sup>-</sup> 腫瘍細胞の頻度をフローサイトメトリーによって計測することによって、G F P<sup>+</sup> 腫瘍細胞の存在について培養物を解析した。

【0305】

結果：

4. 共培養物のウェルを調べたところ、両方のドナーにおいて、A P 1 9 0 3 で刺激された R V - 1 7 2 (i M C 含有ベクター) で形質導入された T 細胞は、大きな T 細胞芽球コロニーによって明らかであるように、増殖していることが明らかだった。さらに、蛍光顕微鏡法によって、A P 1 9 0 3 を投与された R V - 1 7 2 を形質導入された T 細胞を含む共培養物は、非常に少ない生存可能な G F P<sup>+</sup> 腫瘍細胞しか示さなかった。これらの最初の観察の後、T 細胞および腫瘍細胞を収集し、フローサイトメトリーによって解析することにより、残存している C A P A N - 1 G F P<sup>+</sup> 腫瘍細胞の頻度を測定した。

【0306】

5. 顕微鏡法によって観察されたように、フローサイトメトリーは、A P 1 9 0 3 によって処理された i M C を形質導入された (R V - 1 7 2) T 細胞を含む共培養物における A P 1 9 0 3 の明白な効果を示した。G F P<sup>+</sup> 腫瘍細胞の減少は、この条件だけで生じ、コントロールベクターで形質導入された T 細胞では生じず、二量体化剤を投与されなかつた R V - 1 7 2 で形質導入された T 細胞ではより低い程度でしか生じなかった。

【0307】

6. まとめると、これらのデータから、T 細胞における i M C の活性化が、T 細胞の殺傷を誘導することができ、A P 1 9 0 3 によって処理された T 細胞の増殖を誘導することが示唆される。集合的には、サイトカイン / ケモカイン産生に関する本発明者らの知見とともに、これらのデータは、i M C が、T 細胞において活性化され得ること、および i M C 二量体化の際に T 細胞がそのエフェクター機能を保持し、高めることを示唆する。

【0308】

ある特定の結果は、図 1 6 ~ 1 9 にも示される。

【0309】

実施例 5 : エキソビボにおける T 細胞の活性化およびヒト被験体への投与

ヒトを治療するために、改変された T 細胞を使用する方法が、この実施例に提示される。この実施例では、共刺激ポリペプチドの細胞質領域は、C D 4 0 および M y D 8 8 に由来する。これらの方は、他の細胞、例えば、N K および N K T 細胞、ならびに腫瘍浸潤リンパ球に対して適合され得、本明細書中で論じられるような他の共刺激ポリペプチド細胞質領域を含む誘導可能な C S M に対しても適合され得る。

【0310】

材料および方法

遺伝子改変された T 細胞の大規模產生

T 細胞は、標準的な方法を用いて健常志願者から作製される。簡潔には、健常ドナーまたは癌患者由来の末梢血単核球 (P B M C) を、可溶性 C D 3 および C D 2 8 (M i

10

20

30

40

50

l t e n y i B i o t e c , A u b u r n , C A ) を使用して、拡大および形質導入のために活性化する。P B M C を、1 0 0 U / m l I L - 2 ( C e l l g e n i x ) が補充された C e l l g e n i x D C 培地に、 $1 \times 10^6$  細胞 / m l で再懸濁し、0.2  $\mu$  g / m l C D 3 および 0.5  $\mu$  g / m l C D 2 8 可溶性抗体で刺激する。次いで、細胞を 37% 、5% C O 2 において 4 日間培養する。4 日目に、I L - 2 を含む 1 m l の新鮮培地を加える。7 日目に、形質導入に向けて、細胞を収集し、C e l l g e n i x D C 培地に再懸濁する。

#### 【 0 3 1 1 】

##### プラスミドおよびレトロウイルス

S F G プラスミドは、切断可能な 2 A 様配列を介して切断型ヒト C D 1 9 に連結された誘導可能な C S M からなる。その誘導可能な C S M は、F 3 6 V 変異を有し、S e r - G 1 y - G 1 y - G 1 y - S e r リンカーを介してヒト C S M に接続された、ヒト F K 5 0 6 結合タンパク質 ( F K B P 1 2 ; G e n B a n k A H 0 0 2 8 1 8 ) からなる。その F 3 6 V 変異は、合成ホモ二量体化剤 A P 2 0 1 8 7 または A P 1 9 0 3 に対する F K B P 1 2 の結合親和性を高める。その 2 A 様配列は、T h o s e a a s i g n a 昆虫ウイルス由来の 20 アミノ酸ペプチドをコードし、それは、グリシンと末端プロリン残基との間での > 99% の切断を媒介して、誘導可能な C S M の C 末端に 19 個の追加のアミノ酸および C D 1 9 の N 末端に 1 つの追加のプロリン残基をもたらす。C D 1 9 は、細胞質内ドメインを 242 アミノ酸から 19 アミノ酸に短縮し、リン酸化に対する潜在的な部位である保存されたすべてのチロシン残基を除去する、アミノ酸 333 ( T D P T R R F ) で切断される、完全長 C D 1 9 ( G e n B a n k N M 0 0 1 7 7 0 ) からなる。

#### 【 0 3 1 2 】

テナガザル白血病ウイルス ( G a l - V ) シュードタイプ化レトロウイルスを産生する安定した P G 1 3 クローンを、P h o e n i x E c o 細胞株 ( A T C C p r o d u c t # S D 3 4 4 4 ; A T C C , M a n a s s a s , V A ) を S F G プラスミドで一過性にトランスフェクトすることによって、作製する。これは、E c o シュードタイプ化レトロウイルスを産生する。その P G 1 3 パッケージング細胞株 ( A T C C ) を、E c o シュードタイプ化レトロウイルスで 3 回形質導入することにより、細胞 1 つあたり複数の S F G プラスミド ( p l a m i d ) プロウイルス組み込み体を含む産生株を作製する。単一細胞クローニングを行い、最も高い力価をもたらした P G 1 3 クローンを、拡大し、ベクター作製のために使用する。

#### 【 0 3 1 3 】

##### レトロウイルス形質導入

T 細胞の活性化および拡大のための培養液は、1 0 0 U / m l I L - 2 ( C e l l g e n i x ) が補充された無血清 C e l l g e n i x D C 培地 ( C e l l g e n i x ) である。レトロウイルスベクターで形質導入する前の 7 日間にわたって、T 細胞を可溶性抗 C D 3 および抗 C D 2 8 ( M i l t e n y i B i o t e c ) によって活性化する。必要であれば、C D 1 9 の免疫磁気選択を形質導入後の 4 日目に行い；陽性画分をさらに 2 日間にわたって拡大し、凍結保存する。

#### 【 0 3 1 4 】

##### 遺伝子改変され、同種異系枯渇された細胞のスケールアップ産生

臨床適用のための形質導入プロセスのスケールアップでは、10 m l の抗 C D 3 0.5  $\mu$  g / m l および抗 C D 2 8 0.2  $\mu$  g / m l または 10 m l のフィブロネクチン 7  $\mu$  g / m l で 4 において一晩コーティングされた、組織培養用に処理されていない T 7 5 フラスコ ( N u n c , R o c h e s t e r , N Y ) を使用する。高細胞粘着性のためにコロナ処理されたフッ化エチレンプロピレンバッジ ( 2 P F - 0 0 7 2 A C , A m e r i c a n F l u o r o s e a l C o r p o r a t i o n , G a i t h e r s b u r g , M D ) も使用する。P B M C を、抗 C D 3 、抗 C D 2 8 によってコーティングされたフラスコに、1 0 0 U / m l I L - 2 が補充された培地中、 $1 \times 10^6$  細胞 / m l で播種する。レトロウイルス形質導入に向けて、レトロネクチンでコーティングされたフラスコま

10

20

30

40

50

たはバッグを、10mlのレトロウイルス含有上清で2～3時間、一度負荷する。活性化T細胞を、レトロウイルスベクター含有新鮮培地と100U/ml IL-2が補充されたT細胞培養液とが3：1の中に $1 \times 10^6$ 細胞/mlで播種する。細胞を、翌朝収集し、組織培養用に処理されたT75またはT175フラスコ内、100U/ml IL-2が補充された培養液中で、約 $5 \times 10^5$ 細胞/ml～ $8 \times 10^5$ 細胞/mlの播種密度で拡大する。

### 【0315】

#### CD19免疫磁気選択

必要であれば、CD19に対する免疫磁気選択を、形質導入の4日後に行う。細胞を、モノクローナルマウス抗ヒトCD19抗体 (Miltenyi Biotech, Auburn, CA) に結合体化され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カラムにおいて、および大規模実験ではCliniMac Plus自動選択デバイスにおいて、選択する。CD19によって選択された細胞を、さらに4日間拡大し、形質導入後の8日目に凍結保存する。これらの細胞は、「遺伝子改変細胞」と称される。

### 【0316】

#### 実施例6：白血病患者の処置

本願の方法を使用して、進行した治療抵抗性白血病を有する白血病患者を処置する本実施例は、他の状態または疾患、例えば、他の過剰増殖性疾患または固形腫瘍にも適用され得る。これらの方法は、標的抗原に応じて一本鎖可変フラグメントが変化し得るという理解の下で、本質的には論じられるように使用され得る。

### 【0317】

T細胞を、誘導可能なキメラシグナル伝達分子をコードするポリヌクレオチドを含む核酸で形質導入する。それらのT細胞を、キメラ抗原レセプターをコードするポリヌクレオチドを含む核酸でも形質導入する。誘導可能なCSMの例としては、CD28ポリペプチド細胞質刺激領域および4-1BBポリペプチド細胞質シグナル伝達領域を含む、図4に示されるものが挙げられるが、これらに限定されない。誘導可能なCSMは、CD3ゼータポリペプチドも含み得る。キメラ抗原レセプターは、CD19を認識する一本鎖可変フラグメントを含む。

### 【0318】

患者は、リンパ球枯渇の前処置を受けた後、形質導入されたCD19標的化T細胞を投与される。それらのT細胞は、自家、同種異系または非同種異系であり得る。それらのT細胞を投与した後、キメラシグナル伝達分子を誘導することによってCD19標的化T細胞を拡大するために、リガンド誘導物質をその患者に投与する。その用量は、例えば、毎日、1週間に2回、または毎週、提供され得る。腫瘍細胞のレベルをモニターし、リガンド誘導物質、例えば、AP1903の投薬スケジュールを腫瘍細胞の負荷に基づいて調整する。制御されない速すぎる速度のT細胞の拡大、活性化および腫瘍細胞殺傷は、不必要に患者を害するより重度のサイトカインストーム (cytokine storm) をもたらし得るという懸念を理由に、投薬スケジュールは、毒性を限定し、患者に対して多大な害を引き起こさず、例えば、患者を病院の集中治療室の外で維持する速度で完全な回復を達成するようにデザインされる。いったん患者が完全な回復を達成し、決定されるある特定の長さの時間、例えば、1ヶ月間、3ヶ月間、6ヶ月間にわたって疾患の無いままになると、AP1903の投与は、停止される。処置の後、リガンド誘導物質の非存在下において、CD19標的化T細胞の数は、減少する。少数の静止状態のCD19標的化T細胞の生存を可能にする低レベルの基底のシグナル伝達が、存在し得る。リガンド誘導物質なしでは、これらの細胞は、不活性のままであり、正常なB細胞を取り戻させる。将来の任意の時点において、患者が、白血病の再発を起こした場合、リガンド誘導物質であるAP1903の投与を再開することにより、CD19標的化T細胞が再活性化し、その患者において完全奏効が再誘導される。複数の再発の場合には、この追加の投与は、2回以上繰り返されてもよい。

10

20

30

40

50

## 【0319】

実施例7：CARを形質導入されたT細胞におけるiMC活性の計測：

目的：2つのFKB Pv36分子に連結されたシグナル伝達分子をコードするレトロウイルスベクターで初代T細胞を形質導入することにより、そのT細胞のAP1903活性化を可能にすること。この実験は、切断型MyD88およびCD40ポリペプチドを含む誘導可能な共刺激分子が、CAPAN-1腫瘍細胞上に高度に発現される前立腺幹細胞抗原(PSCA)を認識するCARで形質導入されたT細胞によるGFP改変CAPAN-1(膵臓腺癌)細胞の殺傷を改善するかを調べるためにデザインされる。

## 【0320】

方法：

誘導可能なT細胞分子のデザインおよびクローニング：

1. T細胞の形質導入は、RV-172(SFG-Myr.MyD88/CD40.Fv.Fv'.2A.CD19)およびRV-89(SFG.PSCAsFcV.CH2CH3.CD28.ゼータ)を用いて行う。そのscFvは、ヒト化モノクローナル抗体1G8(US2012077962A1におけるヒト化抗PSCAから得られる)由来のscFvを使用してPSCAを標的化する。これは、ヒトIgG1のCH2CH3領域に連結され、それは続いて、その分子の膜貫通部分と細胞質部分の両方を含むCD28に連結される。CD28は、CD3ゼータの細胞質部分に連結される。

## 【0321】

レトロウイルスの產生：

2. 本質的には、前の実施例と同じである。

## 【0322】

GFPによってマークされたCAPAN-1(膵臓腺癌)細胞株の作製：

3. CAPAN-1をATCCから購入する。続いて、EGFP/ホタルルルシフェリン融合タンパク質に対する遺伝子、ならびに安定にトランスフェクトされた細胞が、G418抗生物質とともに培養することによって長い時間にわたって選択されるのを可能にするネオマイシン耐性遺伝子を含むpBPO168-pcDNA3.1-EGFPlucによるトランスフェクションによって、その細胞株を遺伝子改変する。培養後、高いGFP発現を有するクローンを選択し、>95%GFPを有する細胞株が得られるまで継代培養する。

## 【0323】

iMC対応T細胞とCAPAN-1腫瘍細胞との共培養：

4. 形質導入されていないT細胞またはRV-89(PSCA CAR)およびRV-172(iMCベクター)で同時形質導入された細胞を、10nM AP1903あるいはなしで50U/ml IL-2が補充された培地中においてT細胞と腫瘍細胞とが5:1の比で培養する。次いで、共培養物を37および5%CO<sub>2</sub>において72時間インキュベートする。続いて、蛍光顕微鏡法によって、および0.25%トリプシン/EDTAを用いて培養物を回収し、培養物中のGFP<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>腫瘍細胞の頻度をフローサイトメトリーによって計測することによって、GFP<sup>+</sup>腫瘍細胞の存在について培養物を解析する。

## 【0324】

結果：

1. 培養物を蛍光顕微鏡法によって調べることにより、誘導可能な共刺激分子およびキメラ抗原レセプターを形質導入されたT細胞を含むウェルおよびAP1903を投与されたウェルにおける腫瘍細胞殺傷の改善を評価する。

## 【0325】

2. フローサイトメトリーを使用して、トリプシン処理後の培養物中のGFP<sup>+</sup>細胞を解析することにより、AP1903がこの短い培養期間(72時間)において腫瘍細胞数の減少に寄与するかを判定する。培養の時間は、およそ5日間まで延長され得る。フローサイトメトリーのプロットは、5:1の比において、両方のウイルスで形質導入され、A

10

20

30

40

50

P 1 9 0 3 を投与されたウェル内の G F P <sup>+</sup> 細胞の減少を示し得る。

【 0 3 2 6 】

3. 残存している生存可能な C A P A N - 1 - G F P 細胞を、 A P 1 9 0 3 なしの N T T 細胞の条件に正規化することにより、腫瘍細胞殺傷に対する i M C 活性化の効果が示される。

【 0 3 2 7 】

実施例 8 : 特定の核酸配列およびアミノ酸配列の例

以下の配列は、誘導可能なキメラシグナル伝達分子 ( C S M ) 配列のために使用されたヌクレオチド配列およびアミノ酸配列の例を順番に提供する。

配列番号 1 、 ミリストイル化 ( M y r i s t o l a t i o n ) n t

A T G G G G A G T A G C A A G G A G C A A G C C T A A G G A C C C C A G C C A G C  
G C

配列番号 2 、 ミリストイル化 a a

M G S S K S K P K D P S Q R

配列番号 3 、 リンカー配列 ( M y r と F v 1 との間 ) n t

C T C G A G T C T G G C G G T G G A T C C G G A G

配列番号 4 、 リンカー配列 ( M y r と F v 1 との間 ) a a

L E S G G G S G

配列番号 5 、 F K B P v 3 6 ( F v 1 ) n t

G G C G T T C A A G T A G A A A C A A T C A G C C C A G G A G A C G G A A G G A  
C T T T C C C C A A A C G A G G G C C A A A C A T G C G T A G T T C A T T A T A C  
T G G G A T G C T C G A A G A T G G A A A A A A A G T A G A T A G T A G T A G A  
G A C C G A A A C A A A C C A T T T A A A T T T A T G T T G G G A A A A C A A G  
A A G T A A T A A G G G G C T G G G A A G A A G G T G T A G C A C A A A T G T C  
T G T T G G C C A G C G C G C A A A C T C A C A A T T T C T C C T G A T T A T  
G C T T A C G G A G G C T A C C G G C C A C C C C G G C A T C A T A C C C C C T C  
A T G C C A C A C T G G T G T T T G A C G T C G A A T T G C T C A A A C T G G A  
A

配列番号 6 、 F K B P v 3 6 ( F v 1 ) a a

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 7 、 リンカー配列 ( F v 1 と F v 2 との間 ) n t

G T C G A G

配列番号 8 、 リンカー配列 ( F v 1 と F v 2 との間 ) a a

V E

配列番号 9 、 F K B P v 3 6 ( F v 2 ) n t

G G A G T G C A G G T G G A G A C G A T T A G T C C T G G G G A T G G G A G A A  
C C T T T C C A A A G C G C G G T C A G A C C T G T G T T G T C C A C T A C A C  
C G G T A T G C T G G A G G A C G G G A A G A A G G T G G A C T C T T C A C G C  
G A T C G C A A T A A G C C T T T C A A G T T C A T G C T C G G C A A G C A G G  
A G G T G A T C C G G G G T G G G A G G G A G G G C G T G G C T C A G A T G T C  
G G T C G G G C A A C G A G C G A A G C T T A C C A T C T C A C C C G A C T A C  
G C G T A T G G G G C A A C G G G G C A T C C G G G A A T T A T C C C T C C C C  
A C G C T A C G C T C G T A T T C G A T G T G G A G C T C T T G A A G C T T G A  
G

配列番号 10 、 F K B P v 3 6 ( F v 2 ) a a

G V Q V E T I S P G D G R T F P K R G Q T C V V H Y T G M L E D G K K V D S S R  
D R N K P F K F M L G K Q E V I R G W E E G V A Q M S V G Q R A K L T I S P D Y  
A Y G A T G H P G I I P P H A T L V F D V E L L K L E

10

20

30

40

50

配列番号 11、リンカー配列 ( F<sub>v</sub> 2 と CD28 との間 ) nt

TCTGGCGGTGGATCCGGAGTCGAG

配列番号 12、リンカー配列 ( Myr と CD28 との間 ) aa

SGGGSGVE

配列番号 13、CD28 nt

TTCTGGGTACTGGTTGTAGTCGGTGGCGTACCTGCTTGT  
ATTCTCTTCTTGTACCGTAGCCTTCATTATATTCTGGGT  
CCGATCAAAGCGCTCAAGACTCCTCCATTCCGATTATATG  
AACATGACACCTCGCCGACCTGGTCCTACACGCAAACATT  
ATCAACCCCTACGCACCCCCCGAGACTTCGCTGCTTATCG 10  
ATCC

配列番号 14、CD28 aa

FWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSODYM  
NMTPRRPGPTRKHYPYAPP RDFAAYRS

配列番号 15、リンカー配列 ( CD28 と 4 - 1BB との間 ) nt

GGATCC

配列番号 16、リンカー配列 ( CD28 と 4 - 1BB との間 ) aa

GS

配列番号 17、4 - 1BB nt

AGTGTAGTTAAAAGAGGAAGAAAAAGTTGCTGTATATAT 20  
TTAAACAAACCATTATGAGACCAAGTGCACCAACCCACCAAGA  
AGAAGACGGATGTTCATGCAGATTCCAGAAGAAGAAGAA  
GGAGGATGTAATTG

配列番号 18、4 - 1BB aa

SVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE  
GGCEL

配列番号 19、リンカー配列 ( 4 - 1BB と CD3 ゼータとの間 ) nt

ACGCGT

配列番号 20、リンカー配列 ( 4 - 1BB と CD3 ゼータとの間 ) aa

TR

30

配列番号 21、CD3 ゼータ nt

CGGGTCAAATTCAGCCGGAGTGCTGACGCCAGCATAACC  
AACAGGGACAAACCAACTCTACAAACGAGCTCAACCTGGG  
TAGACGCGAGGGAGTACGACGTTCTGGATAAGAGGGCGGG  
CGGGACCCAGAGATGGGGGGCAAACCTCAGCGGCGGAAGA  
ACCCGCAGGGAGGGTCTTTATAACGAGCTCCAGAAGGACAA  
GATGGCGGAAGCCTATTCAAGAAATTGGGATGAAAGGGCGAG  
AGACGCAGGGGAAAAGGTCACGATGGTCTGTATCAAGGAC  
TGTCAACCGCCACCAAAGACACTTACGATGCGCTCCACAT  
GCAGGCCCTCCCTCCCCGC 40

配列番号 22、CD3 ゼータ aa

RVKF SRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE EYDVLDKRRG  
RDP EMGGKPKRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGE  
RRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

配列番号 23、リンカー配列 ( CD3 ゼータと フューリンとの間 ) nt

GTCGAC

配列番号 24、リンカー配列 ( CD3 ゼータと フューリンとの間 ) aa

VD

配列番号 25、フューリン nt

CGCGCAAGCGT

50

配列番号 26、フューリン aa

R A K R

配列番号 27、V5エピトープタグ nt

G G A A A A C C T A T A C C T A A T C C A T T G C T G G G C T T A G A C T C A A  
C A

配列番号 28、V5エピトープタグ aa

G K P I P N P L L G L D S T

配列番号 29、リンカー配列 (V5とP2Aとの間) nt

G G C A G C G G A A G C

配列番号 30、リンカー配列 (V5とP2Aとの間) aa

G S G S

10

配列番号 31、ブタテッショウウイルス-1 2A (P2A) nt

G C A A C G A A T T T T C C C T G C T G A A A C A G G C A G G G G A C G T A G  
A G G A A A A T C C T G G T C C T

配列番号 32、ブタテッショウウイルス-1 2A (P2A) aa

A T N F S L L K Q A G D V E E N P G P

配列番号 33、リンカー配列 (P2AとCD19との間) nt

A C G C G T

配列番号 34、リンカー配列 (P2AとCD19との間) aa

T R

20

配列番号 35、CD19 nt

A T G C C C C C T C C T A G A C T G C T G T T T T C C T G C T C T T T C T C A  
C C C C A A T G G A A G T T A G A C C T G A G G A A C C A C T G G T C G T T A A  
A G T G G A A G A A G G T G A T A A T G C T G T C C T C C A A T G C C T T A A A  
G G G A C C A G C G A C G G A C C A A C G C A G C A A C T G A C T T G G A G C C  
G G G A G T C C C C T C T C A A G C C G T T T C T C A A G C T G T C A C T T G G  
C C T G C C A G G T C T T G G T A T T C A C A T G C G C C C C T T G C C A T T  
T G G C T C T T C A T A T T C A A T G T G T C T C A A C A A A T G G G T G G A T  
T C T A C C T T T G C C A G C C C G G C C C C T T C T G A G A A A G C T T G  
G C A G C C T G G A T G G A C C G T C A A T G T T G A A G G C T C C G G T G A G  
C T G T T T A G A T G G A A T G T G A G C G A C C T T G G C G G A C T C G G T T  
G C G G A C T G A A A A A T A G G G A G C T C T G A A G G A C C C T C T T C T C C  
C T C C G G T A A G T T G A T G T C A C C T A A G C T G T A C G T G T G G G C C  
A A G G A C C G C C C G A A A T C T G G G A G G G C G A G C C T C C A T G C C  
T G C C G C C T C G C G A T T C A C T G A A C C A G T C T C T G T C C C A G G A  
T C T C A C T A T G G C G C C C G G A T C T A C T C T T T G G C T G T C T T G C  
G G C G T T C C C C C A G A T A G C G T G T C A A G A G G A C C T C T G A G C T  
G G A C C C A C G T A C A C C C T A A G G G C C C T A A G A G G C T T G T T G A G  
C C T G G A A C T G A A G G A C G A C A G A C C C G C A C G C G A T A T G T G G  
G T A A T G G A G A C C G G C C T T C T G C T C C C T C G C G C T A C C G C A C  
A G G A T G C A G G G A A A T A C T A C T G T C A T A G A G G G A A T C T G A C  
T A T G A G C T T T C A T C T C G A A A T T A C A G C A C G G C C C G T T C T T  
T G G C A T T G G C T C C T C C G G A C T G G A G G G C T G G A A G G T G T C T G  
C C G T A A C A C T C G C T T A C T T G A T T T T G C C T G T G T A G C C T  
G G T T G G G A T C C T G C A T C T T C A G C G A G C C C T T G T A T T G C G C  
C G A A A A A G A A A A C G A A T G A C T G A C C C T A C A C G A C G A T T C T  
G A

30

配列番号 36、CD19 aa

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

50

WLFIFNVSQQMGGFYLCQPGPPSEKAWQPGWTVNVEGSGE  
 LFRWNVSDLGGLGCLKNRSSEGPPSGKLMSPKLYVWA  
 KDRPEIWEGEPPCLPPRDSLNLQSLSQDLTMAPGSTLWLSC  
 GVPPDSVSRGPLSWTHVHPKGPKSLLSLELKDDRPARDMW  
 VMETGLLLPRATAQDAGKYYCHRGNLTMMSFHLEITARPVL  
 WHWLLRTGGWKVSAVTLAYLIFCLCSLVGILHLQRALVLR  
 RKRKRMTDPTRRF

以下は、キメラ抗原レセプター（CAR）配列のためのヌクレオチド配列およびアミノ酸配列の例である（順番に、scFv フラグメントなしで）

配列番号 37、シグナルペプチド nt

ATGGAGTTGGGCTGTCATGGCTGTTCTCGTGGCCATTCTCAAAGGGGTCAGTGTTCCTCGC

配列番号 38、シグナルペプチド aa

MGFGLSWLFLVAILKGVQCSR

配列番号 39、可動性リンカー配列 nt

GGGGGAGGAGGTTCTGGAGGGCGGGAGCGGGAGGAGGAGGCAGC

配列番号 40、可動性リンカー配列 aa

GGGGSGGGSGGGSG

配列番号 41、リンカー配列 (scFv と CH2CH3 の間) nt

G G A T C C

配列番号 42、リンカー配列 (scFv と CH2CH3 の間) aa

G S

配列番号 43、IgG1 CH2CH3 nt

GATCCAGCCGAACCCAAATCCCCCGATAAAACACATACTTGC  
 CCCCCCTTGTCCCCGCACCAAGAATTGCTTGGCGGACCTTC  
 CGTTTTCTTTCCCCAAACCTAAAGATAACCTGATG  
 ATTTCGGAAACCCCTGAAGTTACGTGCGTAGTCGTAGATG  
 TGTCTCACGAAGATCCAGAAGTAAAATTAACTGGTACGT  
 AGATGGAGTCGAAGTTACAAACGCAAAGACGAAGCCCCGA

GAAGAACAAATAATTCCACATACCGAGTAGTTAGCGTTCT  
 CACCGTACTGCATCAGGACTGGCTTAACGGCAAAGAATA

TAAATGTAAGGTCTCAAACAAAGCACTCCCAGCCCCCTATC  
 GAAAAGACTATCTCCAAAGCTAAAGGACAACCCCCGGAAC

CCCAGGTCTATACACTTCCCCCTCACGCGATGAAC  
 TACCCCTAGCGATATCGCAGTCGAATGGGAATCCAATGGCC

AGCCCCGAAACAAACTATAAAACAACCCACCTGTCCTCGA  
 TTCAAGATGGCTATTCTTCTCTATTCAAACACTGACTGTA

GACAAATCCCAGATGGCAACAAAGGTAACGTGTTCTCTTGCT  
 CAGTCATGCATGAAGCGCTTCATAACCATTACACACAAAAA

ATCTCTCTCACTGTCCTCCGGAAAGAAGGACCC  
 配列番号 44、IgG1 CH2CH3 aa

DPAEPKSPDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM  
 ISRTPEVTCVVVDVSHEDEPEVKFNWYVDGVEVHN  
 AKTKPR

EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI  
 EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF

YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV  
 DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKKDP

配列番号 45、リンカー配列 (scFv と CH2CH3 の間) nt

10

20

30

40

50

C T C G A G

配列番号46、リンカー配列 (s c F vとCH2CH3との間) aa

L E

配列番号47、CD3ゼータ膜貫通 nt

AA ACT GT GT TAC CCT CTC GAT GGC AT CCT CTT ATT ATG  
 GCG TG ATT CTG ACC CGC ATT GTT CCT CGA GT AAA ATT CTC  
 TAG AT CCG CAG AC GCT CCC GC AT AT CAG CA AGG AC AAA AT  
 CAG CTT ATA ACG AACT TA ACC CT CGG CAG AC GCG AAG AAT  
 ACG AT GT ACT GG ACA AG AGA AG AGA AG AT CCC GAA AT  
 GGG CGG AAA ACC CCAG AG AGA AGA AT CCC AAG AAG GT 10  
 CTT TATA ACG AACT GC AG AA AG AT AAA AT GGC GA AG CGT  
 ACG AT GAA ATT GGT AT GAA AGG AGA AGA AG AC GCG GAA  
 AGG AC AT GAC GG ACT CT ACC AAG GACT CT CA ACT GCT ACT  
 AA AGA TAC AT ACG AC GCC CTT CAT AT GCA AG GCC CT CCCC  
 CG AGATAA

配列番号48、CD3ゼータ膜貫通 aa

KLCYLLDGILFIFYGVILTALFLRVKF SRSADAPAYQQGQN  
 QLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPQRKNPQEG  
 LYNE LQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTAT 20  
 KDTYDALHMQALPPR

さらなるキメラシグナル伝達分子の配列

配列番号49、OX40 nt

GTTGCCGCCAT CCTGGGCCTGGGCCTGGTGCCTGGGCTGC  
 TGGGCCCTGGCCAT CCTGCTGGCCCTGTACCTGCTCCG  
 GGACCAAGAGGCTGCCCTGGATGCCACAAGGCCCTGGG  
 GGAGGCAGTTCCGGACCCCATCCAAGAGGAGCAGGCCG  
 ACGCCCACTCCACCCCTGGCCAAGATC

配列番号50、OX40 aa

VAAILGLGLVLGLLGPLAILLALYLLRRDQRLPPDAHKPP  
 GGGSFRTPIQE EQADAHS TLAKI 30

配列番号51、5'LTR配列の配列番号22ヌクレオチド配列

TGAAAGACCCCACCTGTAGGTTGGCAAGCTAGCTTAAGT  
 AACGCCATT TGCAAGGCATGGAAAAATACATAACTGAGA  
 ATAGAAAAGTTAGATCAAGGTCAGGAACAGATGGAACAG  
 CTGAATATGGCCAACAGGGATATCTGTGGTAAGCAGTT  
 CTGCCCGGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCCCCAGAT  
 CGGGCTCAGCAGTTCTAGAGAACCATCAGATGTTCCA  
 GGGTGCCCAAGGACCTGAAATGACCTGTGCCTTATTG  
 AACTAACCAATCAGTTCGCTCTCGCTCTGTTCGCGCG  
 TTATGCTCCCCGAGCTCAATAAGAGGCCACAACCCCTC  
 ACTCGGGGCGCCAGTCCTCGATTGACTGAGTCGCCGG  
 TACCCGTGTATCCAATAAACCCCTTGCAGTTGCATCCGA  
 CTTGTGGTCTCGCTGTTCTGGAGGGTCTCCTCTGAGT  
 GATTGACTACCCGTCAGCGGGGGTCTTTCA

さらなる配列

配列番号52 キャプシドタンパク質前駆体ヌクレオチド配列からのThosea as  
ignaウイルス-2A

GCCGAGGGCAGGGGAAGTCTTAACATGCGGGGACGTGG 50

A G G A A A A A T C C C G G G C C C

配列番号 53、キャプシドタンパク質前駆体アミノ酸配列からの Thosea asig  
naウイルス - 2A

A E G R G S L L T C G D V E E N P G P

配列番号 54、3'LTRヌクレオチド配列

T G A A A G A C C C C A C C T G T A G G T T T G G C A A G C T A G C T T A A G T  
A A C G C C A T T T G C A A G G C A T G G A A A A A T A C A T A A C T G A G A  
A T A G A G A A G T T C A G A T C A A G G T C A G G A A C A G A T G G A A C A G  
C T G A A T A T G G G C C A A A C A G G A T A T C T G T G G T A A G C A G T T C  
C T G C C C C G G C T C A G G G C C A A G A A C A G A T G G A A C A G C A G T G A A 10  
T A T G G G C C A A A C A G G A T A T C T G T G G T A A G C A G T T C C T G C C  
C C G G C T C A G G G C C A A G A A C A G A T G G T C C C C A G A T G C G G T C  
C A G C C C T C A G C A G T T T C T A G A G A A C C A T C A G A T G T T C C A  
G G G T G C C C C A A G G A C C T G A A A T G A C C C T G T G C C T T A T T G  
A A C T A A C C A A T C A G T T C G C T T C T C G C T T C T G T T C G C G C G C  
T T C T G C T C C C C G A G C T C A A T A A A A G A G C C C A C A A C C C C T C  
A C T C G G G G C G C A G T C C T C C G A T T G A C T G A G T C G C C C G G G  
T A C C C G T G T A T C C A A T A A A C C C T C T T G C A G T T G C A T C C G A  
C T T G T G G T C T C G C T G T T C C T T G G G A G G G T C T C C T C T G A G T  
G A T T G A C T A C C C G T C A G C G G G G G T C T T T C A 20

配列番号 55、(XhoI / SalI 部位を有するリンカー - F<sub>v</sub>1 - F<sub>v</sub>2 - リンカー  
のヌクレオチド配列 (F<sub>v</sub>2 の中の小文字はゆらいだコドン))

C T C G A G T C T G G C G G T G G A T C C G G A G G G C G T T C A A G T A G A A A  
C A A T C A G C C C A G G A G A C G G A A G G A C T T T C C C C A A A C G A G G  
C C A A A C A T G C G T A G T T C A T T A T A C T G G G A T G C T C G A A G A T  
G G A A A A A A A G T A G A T A G T A G T A G A G A C C G A A A C A A A C C A T  
T T A A A T T T A T G T T G G G A A A C A A G A A G T A A T A A G G G G C T G  
G G A A G A A G G T G T A G C A C A A A T G T C T G T T G G C C A G C G C G C A  
A A A C T C A C A A T T T C T C C T G A T T A T G C T T A C G G A G C T A C C G  
G C C A C C C C G G C A T C A T A C C C C C T C A T G C C A C A C T G G T G T T 30  
T G A C G T C G A A T T G C T C A A A C T G G A A G T C G A G G G a G T g C A g  
G T g G A g A C g A T t A G t C C t G G g G A t G G g A G a A C c T T t C C a A  
A g C G c G G t C A g A C c T G t G T t G T c C A c T A c A C c G G t A T G C T  
g G A g G A c G G g A A g A A g G T g G A c t c T t c a c G c G A t C G c A A t  
A A g C C t T T c A A g T T c A T G c T c G G c A A g C A g G A g G T g A T c c  
G G G G g T G G G A g G A g G G c G T g G C t C A g A T G T C g G T c G G g C A  
a C G a G C g A A g C T t A C c A T c T C a C C c G A c T A c G C g T A t G G g  
G C a A C g G G g C A t C C g G G a A T t A T c C C t C C c C A c G C t A C g C  
T c G T a T T c G A t G T g G A g c T c t t g A A g C T t G a g T C T G G C G G  
T G G A T C C G G A G T C G A C 40

配列番号 56、(F<sub>v</sub> · F<sub>vLs</sub> アミノ酸配列)

L E S G G G S G 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 V E 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 S G G G S G V D

配列番号 57、F K B P v 3 6 (F<sub>v</sub>1) ヌクレオチド配列

G G C G T T C A A G T A G A A A C A A T C A G C C C A G G A G A C G G A A G G A  
C T T T C C C C A A A C G A G G C C A A A C A T G C G T A G T T C A T T A T A C 50

T G G G A T G C T C G A A G A T G G A A A A A A A G T A G A T A G T A G T A G A  
 G A C C G A A A C A A A C C A T T T A A A T T T A T G T T G G G A A A A C A A G  
 A A G T A A T A A G G G G C T G G G A A G A A G G T G T A G C A C A A A T G T C  
 T G T T G G C C A G C G C G C A A A C T C A C A A T T T C T C C T G A T T A T  
 G C T T A C G G A G G C T A C C G G C C A C C C C G G C A T C A T A C C C C T C  
 A T G C C A C A C T G G T G T T G A C G T C G A A T T G C T C A A A C T G G A  
 A

配列番号 58、FKB Pv 36 (Fv1) アミノ酸配列

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 10  
 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 59、FKB Pv 36 (Fv2) ヌクレオチド配列

G G a G T g C A g G T g G A g A C g A T t A G t C C t G G g G A t G G g A G a A  
 C c T T t C C a A A g C G c G G t C A g A C c T G t G T t G T c C A c T A c A C  
 c G G t A T G C T g G A g G A c G G g A A g A A g G T g G A c t c T t c a c G c  
 G A t C G c A A t A A g C C t T T c A A g T T c A T G c T c G G c A A g C A g G  
 A g G T g A T c c G G G G g T G G G A g G A g G G c G T g G C t C A g A T G T C  
 g G T c G G g C A a C G a G C g A A g C T t A C c A T c T C a C C c G A c T A c  
 G C g T A t G G g G C a A C g G G g C A t C C g G G a A T t A T c C C t C C c C  
 A c G C t A C g C T c G T a T T c G A t G T g G A g c T c t t g A A g C T t G a 20  
 g

配列番号 60、FKB Pv 36 (Fv2) アミノ酸配列

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

誘導可能なMyD88/CD40キメラポリペプチドに対するさらなる配列

配列番号 81、ミリストイル化ポリペプチドのヌクレオチド配列

A T G G G G A G T A G C A A G A G C A A G C C T A A G G A C C C C A G C C A G C  
 G C

配列番号 82、ミリストイル化ポリペプチドのアミノ酸配列

M G S S K S K P K D P S Q R 30

配列番号 83、リンカーヌクレオチド配列 (リンカー1)

C T C G A G

配列番号 84、リンカーアミノ酸配列 (リンカー1)

L E

配列番号 85、切断型MyD88ポリペプチドのヌクレオチド配列

A T G G C C G C T G G G G G C C C A G G C G C C G G A T C A G C T G C T C C C G  
 T A T C T T C T A C T T C T T C T T G C C G C T G G C T G C T C T G A A C A T  
 G C G C G T G A G A A G A C G C C T C T C C C T G T T C C T T A A C G T T C G C  
 A C A C A A G T C G C T G C C G A T T G G A C C G C C C T T G C C G A A G A A A 40  
 T G G A C T T T G A A T A C C T G G A A A T T A G A C A A C T T G A A A C A C A  
 G G C C G A C C C C A C T G G C A G A C T C C T G G A C G C A T G G C A G G G A  
 A G A C C T G G T G C A A G C G T T G G A C G G C T C C T G G A T C T C C T G A  
 C A A A A C T G G G A C G C G A C G A C G T A C T G C T T G A A C T C G G A C C  
 T A G C A T T G A A G A A G A C T G C C A A A A A T A T A T C C T G A A A C A A  
 C A A C A A G A A G A A G C C G A A A A A C C T C T C C A A G T C G C A G C A G  
 T G G A C T C A T C A G T A C C C C G A A C A G G C T G A G G C T T G C T G G G A T  
 T A C T A C A C T C G A C G A C C C A C T C G G A C A T A T G C C T G A C A T A  
 T T C G A C G C T T C A T T G C T A T T G C C C C T C T G A C A T A

配列番号 86、切断型MyD88ポリペプチドのアミノ酸配列

50

MAAGGGAGGSAAPVSSSTSSLPLAALNMRVRRRLSLFLNVR  
 TQVAADWTALAAEEMDFEYLEIRQLETQADPTGRLLDAWQG  
 RPGASVGRLLDLLTKLGRDDVLLLELGPSIEEDCQKYILKQ  
 QQEEAEKPLQVAAVDSSVPRTAELAGITTLDDPLGHMPER  
 FDAFICYCPSDI

配列番号87、CD40ポリペプチドのヌクレオチド配列

AAGAAAGTTGCAAAGAAACCCACAAATAAAAGCCCCACACC  
 CTAAACAGGAACCCCAAGAAATCAATTCTCCAGATGATCT  
 CCCTGGATCTAATACTGCCGCCGGTCCAAGAAACCTG  
 CATGGTTGCCAGCCTGTCACCCAAGAGGACGGAAAAGAAT 10  
 CACGGATTAGCGTACAAGAGAGACAA

配列番号88、CD40ポリペプチドのアミノ酸配列

KKVAKKPTNKAPHPKQEPQEINFPPDLPGSNTAAPVQETL  
 HGCQPVQTQEDGKESRISVQERQ

配列番号89、リンカーヌクレオチド配列(リンカー2)

GTCGAGTCTGGCGGTGGATCCGGA

配列番号90、リンカーアミノ酸配列(リンカー2)

VE SGGGSG

配列番号91、FKB Pv 36(Fv1)ヌクレオチド配列

GGCGTTCAAGTAGAAACAAATCAGCCCCAGGGAGACGGAAAGGA 20  
 CTTTCCCCAAACGAGGCCAACATGCGTAGTTCAATTATAC  
 TGGGATGCTCGAAGATGGAAAAAAAGTAGATAGTAGTAGA  
 GACCGAAACAAACCATTTAAATTATGTTGGGAAACAAAG  
 AAGTAATAAGGGGCTGGGAAGAAGGTGTAGCACAAATGTC  
 TGTTGGCCAGCGCGCAAAACTCACAAATTCTCCTGATTAT  
 GCTTACGGAGCTACCGGCCACCCCGGCATCATAACCCCTC  
 ATGCCACACTGGTGTGTTGACGTCGAATTGCTCAAACATGGA  
 A

配列番号92、FKB Pv 36(Fv1)アミノ酸配列

GVQVETISP GDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKVDSSR 30  
 DRNKPFKFM LGKQEVIRGWE EGVAQMSVGQRAKLTISPDY  
 AYGATGHPGIIPPHATL VFDVELLKLE

配列番号93、リンカーヌクレオチド配列(リンカー3)

GTCGAG

配列番号94、リンカーアミノ酸配列(リンカー3)

VE

配列番号95、FKB Pv 36(Fv2)ヌクレオチド配列

GGAGTgCAGGTgGAGACgATtAGtCCtGGgGAtGGgAGaA  
 CcTTtCCaAAgCGcGGtCAGACcTGtGTTGTCACtACAC  
 cGGtATGCTgGAGGACGGgAAgAAgGTgGAcTcTTcacGc 40  
 GAtCGcAAAtAAgCCtTTcAAgTTcATGcTcGGcAAgCAGG  
 AgGTgATccGGGGgTGGGAGGAGGGcGTgGCTCAGATGTC  
 gGTcGGgCAaCGAGCgAAgCTtACcATcTCAcCCcGAcTAc  
 GCgTAtGGgGCaACgGGgCATCCgGGaATTATcCCtCCcC  
 AcGCTACgCTcGTaTTcGAtGTgGAgcTcttgAAgCTtGa  
 g

配列番号95、FKB Pv 36(Fv2)アミノ酸配列

GVQVETISP GDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKVDSSR  
 DRNKPFKFM LGKQEVIRGWE EGVAQMSVGQRAKLTISPDY  
 AYGATGHPGIIPPHATL VFDVELLKLE 50

配列番号 96、リンカーヌクレオチド配列（リンカー 4）

T C T G G C G G T G G A T C C G G A G T C G A C

配列番号 97、リンカーアミノ酸配列（リンカー 4）

S G G G S G V D

配列番号 98、フューリンプロテアーゼコンセンサス切断部位のヌクレオチド配列

C G C G C A A A G C G T

配列番号 99、フューリンプロテアーゼコンセンサス切断部位のアミノ酸配列

R A K R

配列番号 100、V5エピトープヌクレオチド配列

G G A A A A C C T A T A C C T A A T C C A T T G C T G G G C T T A G A C T C A A 10  
C A

配列番号 101、V5エピトープヌクレオチド配列

G K P I P N P L L G L D S T

配列番号 102、リンカーヌクレオチド配列（リンカー 5）

G G C A G C G G A A G C

配列番号 103、リンカーアミノ酸配列（リンカー 5）

G S G S

配列番号 104、P2Aヌクレオチド配列

G C A A C G A A T T T T C C C T G C T G A A A C A G G C A G G G G A C G T A G 20  
A G G A A A A T C C T G G T C C T

配列番号 105、P2Aアミノ酸配列

A T N F S L L K Q A G D V E E N P G P

配列番号 106、リンカーヌクレオチド配列（リンカー 6）

A C G C G T

配列番号 107、リンカーアミノ酸配列（リンカー 6）

T R

配列番号 108、CD19ヌクレオチド配列

A T G C C C C C T C C T A G A C T G C T G T T T T C C T G C T C T T T C T C A 30  
C C C C A A T G G A A G T T A G A C C T G A G G A A C C A C T G G T C G T T A A  
A G T G G A A G A A G G T G A T A A T G C T G T C C T C C A A T G C C T T A A  
G G G A C C A G C G A C G G A C C A A C G C A G C A A C T G A C T T G G A G C C  
G G G A G T C C C C T C T C A A G G C C G T T T C T C A A G G C T G T C A C T T G G  
C C T G C C A G G T C T T G G T A T T C A C A T G C G C C C C C T T G C C A T T  
T G G C T C T T C A T A T T C A A T G T G T C T C A A C A A A T G G G T G G A T  
T C T A C C T T T G C C A G C C C G G C C C C C T T C T G A G A A A G C T T G  
G C A G C C T G G A T G G A C C G T C A A T G T G A A G G C T C C G G T G A G  
C T G T T T A G A T G G A A T G T G A G G C G A C C T T G G C G G A C T C G G T T  
G C G G A C T G A A A A A T A G G A G G C T C T G A A G G A C C C T C T T C T C C  
C T C C G G T A A G T T G A T G T C A C C T A A G C T G T A C G T G T G G G C C 40  
A A G G A C C G C C C G A A A T C T G G G A G G G C G A G C C T C C A T G C C  
T G C C G C C T C G C G A T T C A C T G A A C C A G T C T C T G T C C C A G G A  
T C T C A C T A T G G C G C C C G G A T C T A C T C T T T G G C T G T C T T G C  
G G C G T T C C C C C A G A T A G C G T G T C A A G A G G A C C C T C T G A G C T  
G G A C C C A C G T A C A C C C T A A G G G C C C T A A G A G G C T T G T T G A G  
C C T G G A A C T G A A G G A C G A C A G A C C C G C A C G C G A T A T G T G G  
G T A A T G G A G A C C G G C C T T C T G C T C C C T C G C G C T A C C G C A C  
A G G A T G C A G G G A A A T A C T A C T G T C A T A G A G G G A A T C T G A C  
T A T G A G C T T T C A T C T C G A A A T T A C A G C A C G G C C C G T T C T T  
T G G C A T T G G C T C C T C C G G A C T G G A G G G C T G G A A G G T G T C T G  
C C G T A A C A C T C G C T T A C T T G A T T T T G C C T G T G T A G C C T 50

GGTTGGGATCCCTGCATCTTCAGCGAGCCCTTGTATTGCGC  
CGAAAAAGAAAAACGAATGACTGACCCCTACACGACGATTCT  
GA

配列番号109、CD19アミノ酸配列

M P P P R L L F F 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 10  
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 \* 。

【0328】

実施例9：代表的な実施形態

本技術のある特定の実施形態の例を、この後に提供する。

【0329】

A1. キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列を有する核酸を含む組成物であつて、ここで、そのキメラタンパク質は、膜標的化領域、多量体化領域、ならびにCD27、CD28、ICOS、4-1BBおよびOX40からなる群より選択される共刺激ポリペプチド細胞質シグナル伝達領域を含む、組成物。 20

【0330】

A2. 前記キメラタンパク質が、CD27、CD28、ICOS、4-1BBおよびOX40からなる群より選択される第2の共刺激ポリペプチド細胞質シグナル伝達領域をさらに含む、実施形態A1に記載の組成物。

【0331】

A3. 前記共刺激ポリペプチド細胞質シグナル伝達領域が、CD28細胞質シグナル伝達領域および4-1BB細胞質シグナル伝達領域を含む、実施形態A2に記載の組成物。

【0332】

A4. 前記共刺激ポリペプチド細胞質シグナル伝達領域が、CD28細胞質シグナル伝達領域ポリペプチドおよび4-1BB細胞質シグナル伝達領域ポリペプチドを含む、実施形態A2に記載の組成物。 30

【0333】

A5. 前記キメラタンパク質が、CD3ポリペプチドをさらに含む、実施形態A1～A4のいずれかに記載の組成物。

【0334】

A6. 前記多量体リガンド結合領域が、FKBPRリガンド結合領域、シクロフィリンレセプターリガンド結合領域、ステロイドレセプターリガンド結合領域、シクロフィリンレセプターリガンド結合領域およびテトラサイクリンレセプターリガンド結合領域からなる群より選択される、実施形態A1～A5のいずれかに記載の組成物。 40

【0335】

A7. 前記リガンド結合領域が、F<sub>v</sub>、F<sub>v1s</sub>アミノ酸配列を含む、実施形態A1～A6のいずれかに記載の組成物。

【0336】

A8. 前記リガンド結合領域が、FKBPr36アミノ酸配列を含む、実施形態A1～A6のいずれかに記載の組成物。

【0337】

A9. 前記リガンド結合領域が、F<sub>v1</sub>およびF<sub>v2w</sub>アミノ酸配列を含む、実施形態A8に記載の組成物。

【0338】

A 1 0 . 前記核酸が、前記スクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーター配列を含む、実施形態 A 1 ~ A 9 のいずれかに記載の組成物。

【 0 3 3 9 】

A 1 0 . 1 . 前記プロモーターが、発生的に制御され、前記キメラポリペプチドが、発生的に分化した細胞において発現される、実施形態 A 1 0 に記載の組成物。

【 0 3 4 0 】

A 1 0 . 2 . 前記プロモーターが、組織特異的であり、前記キメラポリペプチドが、その特異的な組織において発現される、実施形態 A 1 0 または A 1 0 . 1 に記載の組成物

A 1 0 . 3 . 前記プロモーターが、活性化 T 細胞において活性化される、実施形態 A 1 0 に記載の組成物。

10

【 0 3 4 1 】

A 1 0 . 4 . 前記プロモーターが、5'LTR配列を含む、実施形態 A 1 0 ~ A 1 0 . 3 のいずれかに記載の組成物。

【 0 3 4 2 】

A 1 1 . 前記核酸が、ウイルスベクター内に含まれている、実施形態 A 1 ~ A 1 0 のいずれかに記載の組成物。

【 0 3 4 3 】

A 1 2 . 前記ウイルスベクターが、レンチウイルスベクターである、実施形態 A 1 1 に記載の組成物。

【 0 3 4 4 】

A 1 3 . 前記核酸が、プラスミド内に含まれている、実施形態 A 1 ~ A 1 0 のいずれかに記載の組成物。

20

【 0 3 4 5 】

A 1 4 . 実施形態 A 1 ~ A 1 3 のいずれかに記載の組成物で形質転換されたまたはトランسفエクトされた、細胞。

【 0 3 4 6 】

A 1 5 . 前記細胞が、T 細胞、腫瘍浸潤リンパ球 (tumor infiltrating lymphocyte) 、B 細胞またはNK 細胞である、実施形態 A 1 4 に記載の細胞。

【 0 3 4 7 】

30

A 1 6 . 前記細胞が、シグナルペプチド、一本鎖可変フラグメント、CH2 - CH3 ヒンジ領域およびCD3 ポリペプチドを含むキメラタンパク質をコードするスクレオチド配列を含む核酸で形質転換されているかまたは形質導入されている、実施形態 A 1 5 に記載の細胞。

【 0 3 4 8 】

A 1 7 . 前記一本鎖可変フラグメントが、腫瘍細胞上の抗原に結合する、実施形態 A 1 6 に記載の細胞。

【 0 3 4 9 】

A 1 8 . 前記一本鎖可変フラグメントが、過剰増殖性疾患に関する細胞上の抗原に結合する、実施形態 A 1 6 に記載の細胞。

40

【 0 3 5 0 】

A 1 9 . 前記一本鎖可変フラグメントが、PSMA 、 PSCA 、 MUC1 、 CD19 、 ROR1 、 メソテリン、 GD2 および Her2Neu からなる群より選択される、実施形態 A 1 7 または A 1 8 のいずれかに記載の細胞。

【 0 3 5 1 】

A 2 0 . 前記多量体化領域が、二量体のリガンドに結合する、実施形態 A 1 ~ A 1 3 のいずれかに記載の組成物または実施形態 A 1 4 ~ A 1 7 のいずれかに記載の細胞。

【 0 3 5 2 】

A 2 1 . 前記リガンドが、二量体のFK506 または二量体のFK506 様アナログである、実施形態 A 2 0 に記載の組成物または細胞。

50

## 【0353】

A 22. 前記リガンドが、A P 1 9 0 3 である、実施形態A 21に記載の組成物または細胞。

## 【0354】

A 23. 免疫応答を誘導するための方法であって、その方法は、インビトロまたはエキソビオにおいて、実施形態A 1～A 13のいずれかに記載の組成物でT細胞をトランスフェクトするかまたは形質導入する工程を含む、方法。

## 【0355】

A 24. 多量体化をもたらす多量体化領域に結合するリガンドと前記細胞を接触させる工程をさらに含む、実施形態A 23に記載の方法。

10

## 【0356】

A 25. 前記リガンドが、二量体である、実施形態A 24に記載の方法。

## 【0357】

A 26. 前記リガンドが、二量体のF K 5 0 6 または二量体のF K 5 0 6 様アナログである、実施形態A 24に記載の方法。

## 【0358】

A 27. 前記リガンドが、A P 1 9 0 3 である、実施形態A 24に記載の方法。

## 【0359】

A 28. トランスフェクトされたまたは形質転換されたT細胞を被験体に投与する工程をさらに含む、実施形態A 23～A 27のいずれかに記載の方法。

20

## 【0360】

A 29. 前記細胞が、皮内投与または皮下投与によって前記被験体に投与される、実施形態A 28に記載の方法。

## 【0361】

A 30. インビオにおいて免疫応答を誘導するための方法であって、実施形態A 1～A 13のいずれかに記載の組成物を被験体に投与する工程を含む、方法。

## 【0362】

A 31. 多量体化をもたらす多量体化領域に結合するリガンドを含む組成物を前記被験体に投与する工程をさらに含む、実施形態A 30に記載の方法。

## 【0363】

30

A 32. 前記リガンドが、二量体である、実施形態A 31に記載の方法。

## 【0364】

A 33. 前記リガンドが、二量体のF K 5 0 6 または二量体のF K 5 0 6 様アナログである、実施形態A 31に記載の方法。

## 【0365】

A 34. 前記リガンドが、A P 1 9 0 3 である、実施形態A 31に記載の方法。

## 【0366】

A 35. 前記被験体が、過剰増殖性疾患と診断されている、実施形態A 28～A 34のいずれかに記載の方法。

## 【0367】

40

A 36. 前記被験体が、腫瘍と診断されている、実施形態A 28～A 34のいずれかに記載の方法。

## 【0368】

B 1. 誘導可能なキメラシグナル伝達分子をコードするポリヌクレオチドを含む核酸を含む組成物で形質転換されたまたはトランスフェクトされた細胞であって、ここで、その誘導可能なキメラシグナル伝達分子は、膜標的化領域、多量体化領域、およびT I R ドメインを欠く切断型M y D 8 8 ポリペプチドを含む、細胞。

## 【0369】

B 1. 1. 前記誘導可能なキメラシグナル伝達分子が、細胞外ドメインを欠く細胞質C D 4 0 ポリペプチドをさらに含む、実施形態B 1に記載の細胞。

50

## 【0370】

B1.2. 誘導可能なキメラシグナル伝達分子をコードするポリヌクレオチドを含む核酸を含む組成物で形質転換されたまたはトランスフェクトされた細胞であって、ここで、その誘導可能なキメラシグナル伝達分子は、膜標的化領域、多量体化領域、および細胞外ドメインを欠く細胞質CD40ポリペプチドを含む、細胞。

## 【0371】

B2. 前記切断型MyD88ポリペプチドが、配列番号86のアミノ酸配列またはその機能的フラグメントを有する、実施形態B1またはB1.2のいずれかに記載の細胞。

## 【0372】

B2.1. 前記細胞質CD40ポリペプチドが、配列番号88のアミノ酸配列またはその機能的フラグメントを有する、実施形態B1.1またはB1.2のいずれかに記載の細胞。 10

## 【0373】

B3. 前記膜標的化領域が、ミリストイル化標的化配列である、実施形態B1～B2.1のいずれかに記載の細胞。

## 【0374】

B4～B6. 保留。

## 【0375】

B7. 前記誘導可能なキメラシグナル伝達分子が、CD3ポリペプチドをさらに含む、実施形態B1～B3のいずれか1つに記載の細胞。 20

## 【0376】

B8. 前記多量体化領域が、FKBP、シクロフィリンレセプター、ステロイドレセプター、テトラサイクリンレセプター、重鎖抗体サブユニット、軽鎖抗体サブユニットおよびそれらの変異された配列からなる群より選択される、実施形態B1～B7のいずれか1つに記載の細胞。

## 【0377】

B9. 前記多量体化領域が、FKB12領域である、実施形態B1～B8のいずれか1つに記載の細胞。

## 【0378】

B10. 前記FKB12領域が、FKB12v36領域である、実施形態B1～B9のいずれか1つに記載の細胞。 30

## 【0379】

B11. 前記多量体化領域が、Fv'Fv1sである、実施形態B1～B8のいずれか1つに記載の細胞。

## 【0380】

B12. 前記多量体化領域が、FK506二量体および二量体のFK506アナログリガンドからなる群より選択されるリガンドに結合する、実施形態B1～B8のいずれか1つに記載の細胞。

## 【0381】

B13. 前記リガンドが、AP1903またはAP20187である、実施形態B1～B12のいずれか1つに記載の細胞。 40

## 【0382】

B14. 前記多量体化領域が、配列番号58のアミノ酸配列またはその機能的フラグメントを有する、実施形態B1～B13のいずれか1つに記載の細胞。

## 【0383】

B15. 前記多量体化領域が、配列番号57の中のヌクレオチド配列またはその機能的フラグメントによってコードされる、実施形態B1～B14のいずれか1つに記載の細胞。

## 【0384】

B16. 前記多量体化領域が、配列番号60のアミノ酸配列を有するポリペプチドまた 50

はその機能的フラグメントをさらに含む、実施形態 B 1 4 に記載の細胞。

【 0 3 8 5 】

B 1 7 . 前記多量体化領域が、配列番号 5 9 の中のヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドまたはその機能的フラグメントをさらに含む、実施形態 B 1 5 に記載の細胞。

【 0 3 8 6 】

B 1 8 . 前記多量体化領域が、配列番号 6 0 のアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはその機能的フラグメントをさらに含む、実施形態 B 1 4 または B 1 6 に記載の細胞。

【 0 3 8 7 】

B 1 9 . 前記多量体化領域が、配列番号 5 9 の中のヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドまたはその機能的フラグメントをさらに含む、実施形態 B 1 5 または B 1 7 に記載の細胞。 10

【 0 3 8 8 】

B 2 0 . 前記多量体化領域が、配列番号 5 8 もしくは配列番号 6 0 のアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはその機能的フラグメントをさらに含む、実施形態 B 1 4 、 B 1 6 または B 1 8 のいずれか 1 つに記載の細胞。

【 0 3 8 9 】

B 2 1 . 前記多量体化領域が、配列番号 5 7 もしくは配列番号 5 9 の中のヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドまたはその機能的フラグメントをさらに含む、実施形態 B 1 5 、 B 1 7 または B 1 9 のいずれか 1 つに記載の細胞。 20

【 0 3 9 0 】

B 2 2 . 前記核酸が、前記ポリヌクレオチドに作動可能に連結されたプロモーター配列を含む、実施形態 B 1 ~ B 2 1 のいずれか 1 つに記載の細胞。

【 0 3 9 1 】

B 2 3 . 前記核酸が、ウイルスベクター内に含まれている、実施形態 B 1 ~ B 2 2 のいずれか 1 つに記載の細胞。

【 0 3 9 2 】

B 2 4 . 前記ウイルスベクターが、レトロウイルスベクターである、実施形態 B 2 3 に記載の細胞。

【 0 3 9 3 】

B 2 5 . 前記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 B 2 4 に記載の細胞。 30

【 0 3 9 4 】

B 2 6 . 前記レトロウイルスベクターが、S F G ベクターである、実施形態 B 2 4 に記載の細胞。

【 0 3 9 5 】

B 2 7 . 前記ウイルスベクターが、アデノウイルスベクターである、実施形態 B 2 3 に記載の細胞。

【 0 3 9 6 】

B 2 8 . 前記ウイルスベクターが、レンチウイルスベクターである、実施形態 B 2 3 に記載の細胞。 40

【 0 3 9 7 】

B 2 9 . 前記核酸が、プラスミド内に含まれている、実施形態 B 1 ~ B 2 2 のいずれか 1 つに記載の細胞。

【 0 3 9 8 】

B 3 0 . 保留。

【 0 3 9 9 】

B 3 1 . 前記細胞が、T 細胞、腫瘍浸潤リンパ球、N K - T 細胞または N K 細胞である、実施形態 B 1 ~ B 3 0 のいずれか 1 つに記載の細胞。

【 0 4 0 0 】

B 3 2 . 前記細胞が、T細胞である、実施形態B 3 1 に記載の細胞。

【0 4 0 1】

B 3 3 . 前記細胞が、骨髓から得られるかまたは調製される、実施形態B 1 ~ B 3 2 のいずれか1つに記載の細胞。

【0 4 0 2】

B 3 4 . 前記細胞が、臍帯血から得られるかまたは調製される、実施形態B 1 ~ B 3 2 のいずれか1つに記載の細胞。

【0 4 0 3】

B 3 5 . 前記細胞が、末梢血から得られるかまたは調製される、実施形態B 1 ~ B 3 2 のいずれか1つに記載の細胞。

10

【0 4 0 4】

B 3 6 . 前記細胞が、末梢血单核球から得られるかまたは調製される、実施形態B 1 ~ B 3 2 のいずれか1つに記載の細胞。

【0 4 0 5】

B 3 7 . 前記細胞が、ヒト細胞である、実施形態B 3 1 ~ B 3 6 のいずれか1つに記載の細胞。

【0 4 0 6】

B 3 8 . 前記細胞が、シグナルペプチド、一本鎖可変フラグメント、C H 2 - C H 3 ヒンジ領域およびC D 3 ポリペプチドを含む誘導可能なキメラシグナル伝達分子をコードするポリヌクレオチドを含む核酸でさらに形質転換されるかまたは形質導入される、実施形態B 1 ~ B 3 7 のいずれか1つに記載の細胞。

20

【0 4 0 7】

B 3 8 . 1 . 前記誘導可能なキメラシグナル伝達分子が、C D 3 ポリペプチドを含まない、実施形態B 3 8 に記載の細胞。

【0 4 0 8】

B 3 8 . 2 . 前記誘導可能なキメラシグナル伝達分子が、C D 3 ポリペプチドを含む、実施形態B 3 8 またはB 3 8 . 1 に記載の細胞。

【0 4 0 9】

B 3 9 . 前記一本鎖可変フラグメントが、腫瘍細胞上の抗原に結合する、実施形態B 3 8 ~ B 3 8 . 2 のいずれか1つに記載の細胞。

30

【0 4 1 0】

B 4 0 . 前記一本鎖可変フラグメントが、過剰増殖性疾患に関する細胞上の抗原に結合する、実施形態B 3 8 ~ B 3 8 . 2 のいずれか1つに記載の細胞。

【0 4 1 1】

B 4 1 . 前記一本鎖可変フラグメントが、P S M A 、P S C A 、M U C 1 、C D 1 9 、R O R 1 、メソテリン、G D 2 、C D 1 2 3 、M U C 1 6 およびH e r 2 / N e u一本鎖可変フラグメントからなる群より選択される、実施形態B 3 8 ~ B 4 0 のいずれか1つに記載の細胞。

【0 4 1 2】

B 4 2 . 前記一本鎖可変フラグメントが、C D 1 9 一本鎖可変フラグメントである、実施形態B 3 8 ~ B 4 0 のいずれかに記載の細胞。

40

【0 4 1 3】

B 4 2 . 1 . 前記一本鎖可変フラグメントが、P S C A 一本鎖可変フラグメントである、実施形態B 3 8 ~ B 4 0 のいずれかに記載の細胞。

【0 4 1 4】

B 4 3 . 免疫応答を誘導するための方法であって、前記誘導可能なキメラシグナル伝達分子の多量体化をもたらす多量体化領域に結合するリガンドと実施形態B 1 ~ B 4 2 . 1 に記載の細胞を接触させる工程を含む、方法。

【0 4 1 5】

B 4 4 . 前記細胞が、インビボにおいて前記リガンドと接触される、実施形態B 4 3 に

50

記載の方法。

【0416】

B45. 前記リガンドが、二量体である、実施形態B43またはB44に記載の方法。

【0417】

B46. 前記リガンドが、二量体のFK506または二量体のFK506様アナログである、実施形態B45に記載の方法。

【0418】

B47. 前記リガンドが、AP1903またはAP20187である、実施形態B45に記載の方法。

【0419】

B48. トランスフェクトされたまたは形質転換された細胞を被験体に投与する工程をさらに含む、実施形態B43～B47のいずれか1つに記載の方法。

【0420】

B49. 前記細胞が、静脈内投与によって前記被験体に投与される、実施形態B48に記載の方法。

【0421】

B50～B56. 保留。

【0422】

B56. 前記被験体が、腫瘍と診断されている、実施形態B43～B49のいずれか1つに記載の方法。

【0423】

B57. 前記被験体が、癌を有する、実施形態B43～B49のいずれか1つに記載の方法。

【0424】

B58. 前記被験体が、固形腫瘍を有する、実施形態B43～B49のいずれか1つに記載の方法。

【0425】

B59. 前記細胞が、腫瘍浸潤リンパ球またはT細胞である、実施形態B58に記載の方法。

【0426】

B60. 前記細胞が、腫瘍床に送達される、実施形態B58またはB59に記載の方法。

【0427】

B61. 前記癌が、前記被験体の血液中または骨髄中に存在する、実施形態B57に記載の方法。

【0428】

B62. 前記被験体が、血液または骨髄の疾患を有する、実施形態B43～B49のいずれか1つに記載の方法。

【0429】

B63. 前記被験体が、幹細胞移植によって緩和され得る任意の状態または障害と診断されている、実施形態B43～B49のいずれか1つに記載の方法。

【0430】

B64. 前記被験体が、鐸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B43～B49のいずれか1つに記載の方法。

【0431】

B65. 前記患者が、原発性免疫不全障害、血球貪食リンパ組織球增多症(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より選択される状態と診断されている、実施形態B43～B49のいずれか1つに記載の方法。

【0432】

10

20

30

40

50

B 6 6 . 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／欠損症、分類不能型免疫不全症（C V I D）、慢性肉芽腫症、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・オールドリッヂ症候群、C D 4 0 リガンド欠損症、白血球接着不全、D O C K 8 欠損症、I L - 1 0 欠損症／I L - 1 0 レセプター欠損症、G A T A 2 欠損症、X連鎖リンパ球増殖性疾患（X L P）、軟骨毛髪形成不全、シュバッハマン・ダイアモンド症候群、ダイアモンドプラックファン貧血、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より選択される、実施形態B 4 3 ~ B 4 9 のいずれか1つに記載の方法。

## 【0 4 3 3】

10

B 6 7 . 被験体における白血病を処置するための方法であって、実施形態B 1 ~ B 4 2 . 1 のいずれか1つに記載の細胞を投与する工程およびその被験体に多量体リガンドを投与する工程を含む、方法。

## 【0 4 3 4】

B 6 8 . 前記一本鎖可変フラグメントが、C D 1 9 に結合する、実施形態B 6 7 に記載の方法。

## 【0 4 3 5】

B 6 9 . 前記多量体リガンドが、A P 1 9 0 3 またはA P 2 0 1 8 7 である、実施形態B 6 7 またはB 6 8 に記載の方法。

## 【0 4 3 6】

20

B 7 0 . 前記細胞が、T細胞である、実施形態B 6 7 ~ B 6 9 のいずれかに記載の方法。

## 【0 4 3 7】

B 7 1 . 前記被験体が、ヒトである、実施形態B 4 3 ~ B 7 0 のいずれか1つに記載の方法。

## 【0 4 3 8】

B 7 2 . さらなる用量の前記多量体リガンドが、前記被験体に投与されるべきであるか否かを決定する工程をさらに含む、実施形態B 4 3 ~ B 7 1 のいずれか1つに記載の方法。

## 【0 4 3 9】

30

B 7 3 . 前記被験体にさらなる用量の前記多量体リガンドを投与する工程をさらに含み、ここで、前記疾患または状態の症状は、症状が減少した後に残っているかまたは検出される、実施形態B 4 3 ~ B 7 2 のいずれか1つに記載の方法。

## 【0 4 4 0】

B 7 4 . 前記被験体が、実施形態1 ~ 4 2 . 1 のいずれか1つに記載の細胞を投与する前に、疾患または状態と診断されており、前記多量体リガンドを投与した後に、その疾患または状態が検出され、さらなる用量の多量体リガンドが、被験体に投与される、実施形態B 7 3 に記載の方法。

## 【0 4 4 1】

B 7 5 . 被験体における状態もしくは疾患の存在、不在もしくはステージを特定する工程、および

40

前記多量体結合領域に結合する多量体リガンドを投与する指示、その多量体リガンドのその後の投与量を維持する指示、またはその被験体において特定された状態もしくは疾患の存在、不在もしくはステージに基づいてその患者に投与される多量体リガンドのその後の投与量を調整する指示を伝える工程

をさらに含む、実施形態B 4 3 ~ B 7 4 のいずれか1つに記載の方法。

## 【0 4 4 2】

B 7 6 . 前記状態が、癌である、実施形態B 7 2 ~ B 7 5 のいずれか1つに記載の方法。

## 【0 4 4 3】

50

B 7 7 . 前記状態が、白血病である、実施形態 B 7 2 ~ B 7 5 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 4 4 4 】

B 7 8 . 前記状態が、固形腫瘍である、実施形態 B 7 2 ~ B 7 5 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 4 4 5 】

B 7 9 . 前記多量体リガンドの投与後の腫瘍サイズおよび / または腫瘍細胞数と比べたときの、被験体における腫瘍サイズの増加および / または腫瘍細胞数の増加の存在または不在を決定する工程、ならびに

腫瘍サイズの増加および / または腫瘍細胞数の増加の存在が決定された場合に、その被験体にさらなる用量の多量体リガンドを投与する工程  
を含む、実施形態 B 7 8 に記載の方法。

【 0 4 4 6 】

B 8 0 . 前記多量体リガンドの投与後の C D 1 9 発現 B 細胞のレベルと比べたときの、前記被験体における C D 1 9 発現 B 細胞の増加の存在または不在を決定する工程、ならびに

その被験体における C D 1 9 発現 B 細胞の増加の存在が決定された場合に、その被験体にさらなる用量の多量体リガンドを投与する工程  
を含む、実施形態 B 7 7 に記載の方法。

【 0 4 4 7 】

B 8 1 . 前記腫瘍サイズおよび / または前記腫瘍細胞数が、前記多量体リガンドの投与前の腫瘍サイズおよび / または腫瘍細胞数と比べて、多量体リガンドの投与後に減少する、実施形態 B 7 9 に記載の方法。

【 0 4 4 8 】

B 8 2 . C D 1 9 発現 B 細胞のレベルが、前記多量体リガンドの投与前の C D 1 9 発現 B 細胞のレベルと比べて、前記多量体リガンドの投与後に減少する、実施形態 B 8 0 に記載の方法。

【 0 4 4 9 】

B 8 3 . 前記被験体が、H I V 、インフルエンザ、疱疹、ウイルス性肝炎、エプスタイン・バー、ポリオ、ウイルス性脳炎、麻疹、水痘、サイトメガロウイルス ( C M V ) 、アデノウイルス ( A D V ) 、H H V - 6 ( ヒトヘルペスウイルス 6 , I ) およびパピローマウイルスからなる群より選択されるウイルス病原の感染症と診断されているか、または肺炎、結核および梅毒からなる群より選択される細菌病原の感染症と診断されているか、またはマラリア、トリパノソーマ症、リーシュマニア症、トリコモナス症およびアメーバ症からなる群より選択される寄生生物病原の感染症と診断されている、実施形態 B 4 3 ~ B 7 4 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 4 5 0 】

C 1 . 誘導可能なキメラ抗原レセプターをコードするポリヌクレオチドを含む核酸を含む組成物であって、ここで、その誘導可能なキメラ抗原レセプターは、多量体化領域、T I R ドメインを欠く切断型 M y D 8 8 ポリペプチドおよび一本鎖可変フラグメントを含む、組成物。

【 0 4 5 1 】

C 1 . 1 . 前記誘導可能なキメラ抗原レセプターが、細胞外ドメインを欠く細胞質 C D 4 0 ポリペプチドをさらに含む、実施形態 C 1 に記載の組成物。

【 0 4 5 2 】

C 1 . 2 . 誘導可能なキメラ抗原レセプターをコードするポリヌクレオチドを含む核酸を含む組成物であって、ここで、その誘導可能なキメラ抗原レセプターは、多量体化領域、細胞外ドメインを欠く細胞質 C D 4 0 ポリペプチドおよび一本鎖可変フラグメントを含む、組成物。

【 0 4 5 3 】

10

20

30

40

50

C 2 . 前記切断型 M y D 8 8 ポリペプチドが、配列番号 8 6 のアミノ酸配列またはその機能的フラグメントを有する、実施形態 C 1 または C 1 . 2 のいずれかに記載の組成物

C 2 . 1 . 前記細胞質 C D 4 0 ポリペプチドが、配列番号 8 8 のアミノ酸配列またはその機能的フラグメントを有する、実施形態 C 1 . 1 または C 1 . 2 のいずれかに記載の組成物。

【 0 4 5 4 】

C 3 ~ C 6 . 保留。

【 0 4 5 5 】

C 7 . 前記誘導可能なキメラ抗原レセプターが、 C D 3 ポリペプチドをさらに含む、実施形態 C 1 ~ C 2 . 1 のいずれか 1 つに記載の組成物。

【 0 4 5 6 】

C 8 . 前記多量体化領域が、 F K B P 、シクロフィリンレセプター、ステロイドレセプター、テトラサイクリンレセプター、重鎖抗体サブユニット、軽鎖抗体サブユニットおよびそれらの変異された配列からなる群より選択される、実施形態 C 1 ~ C 7 のいずれか 1 つに記載の組成物。

【 0 4 5 7 】

C 9 . 前記多量体化領域が、 F K B P 1 2 領域である、実施形態 C 1 ~ C 8 のいずれか 1 つに記載の組成物。

【 0 4 5 8 】

C 1 0 . 前記多量体化領域が、 F K B 1 2 v 3 6 領域である、実施形態 C 1 ~ C 9 のいずれか 1 つに記載の組成物。

【 0 4 5 9 】

C 1 1 . 前記多量体化領域が、 F v ' F v l s である、実施形態 C 1 ~ C 8 のいずれか 1 つに記載の組成物。

【 0 4 6 0 】

C 1 2 . 前記多量体化領域が、 F K 5 0 6 二量体および二量体の F K 5 0 6 アナログリガンドからなる群より選択されるリガンドに結合する、実施形態 C 1 ~ C 8 のいずれか 1 つに記載の組成物。

【 0 4 6 1 】

C 1 3 . 前記リガンドが、 A P 1 9 0 3 または A P 2 0 1 8 7 である、実施形態 C 1 ~ C 1 2 のいずれか 1 つに記載の組成物。

【 0 4 6 2 】

C 1 4 . 前記多量体化領域が、配列番号 5 8 のアミノ酸配列またはその機能的フラグメントを有する、実施形態 C 1 ~ C 1 3 のいずれか 1 つに記載の組成物。

【 0 4 6 3 】

C 1 5 . 前記多量体化領域が、配列番号 5 7 の中のヌクレオチド配列またはその機能的フラグメントによってコードされる、実施形態 C 1 ~ C 1 4 のいずれか 1 つに記載の組成物。

【 0 4 6 4 】

C 1 6 . 前記多量体化領域が、配列番号 6 0 のアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはその機能的フラグメントをさらに含む、実施形態 C 1 4 に記載の組成物。

【 0 4 6 5 】

C 1 7 . 前記多量体化領域が、配列番号 5 9 の中のヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドまたはその機能的フラグメントをさらに含む、実施形態 C 1 5 に記載の組成物。

【 0 4 6 6 】

C 1 8 . 前記多量体化領域が、配列番号 6 0 のアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはその機能的フラグメントをさらに含む、実施形態 C 1 4 または C 1 6 に記載の組成物。

【 0 4 6 7 】

C 1 9 . 前記多量体化領域が、配列番号 5 9 の中のヌクレオチド配列によってコードさ

10

20

30

40

50

れるポリペプチドまたはその機能的フラグメントをさらに含む、実施形態 C 1 5 または C 1 7 に記載の組成物。

【 0 4 6 8 】

C 2 0 . 前記多量体化領域が、配列番号 5 8 もしくは配列番号 6 0 のアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはその機能的フラグメントをさらに含む、実施形態 C 1 4 、 C 1 6 または C 1 8 のいずれか 1 つに記載の組成物。

【 0 4 6 9 】

C 2 1 . 前記多量体化領域が、配列番号 5 7 もしくは配列番号 5 9 の中のスクレオチド配列によってコードされるポリペプチドまたはその機能的フラグメントをさらに含む、実施形態 C 1 5 、 C 1 7 または C 1 9 のいずれか 1 つに記載の組成物。

10

【 0 4 7 0 】

C 2 2 . 前記核酸が、前記ポリスクレオチドに作動可能に連結されたプロモーター配列を含む、実施形態 C 1 ~ C 2 1 のいずれか 1 つに記載の組成物。

【 0 4 7 1 】

C 2 3 . 前記核酸が、ウイルスベクター内に含まれている、実施形態 C 1 ~ C 2 2 のいずれか 1 つに記載の組成物。

【 0 4 7 2 】

C 2 4 . 前記ウイルスベクターが、レトロウイルスベクターである、実施形態 C 2 3 に記載の組成物。

【 0 4 7 3 】

20

C 2 5 . 前記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 C 2 4 に記載の組成物。

【 0 4 7 4 】

C 2 6 . 前記レトロウイルスベクターが、SFGベクターである、実施形態 C 2 4 に記載の組成物。

【 0 4 7 5 】

C 2 7 . 前記ウイルスベクターが、アデノウイルスベクターである、実施形態 C 2 3 に記載の組成物。

【 0 4 7 6 】

C 2 8 . 前記ウイルスベクターが、レンチウイルスベクターである、実施形態 C 2 3 に記載の組成物。

30

【 0 4 7 7 】

C 2 9 . 前記核酸が、プラスミド内に含まれている、実施形態 C 1 ~ C 2 2 のいずれか 1 つに記載の組成物。

【 0 4 7 8 】

C 3 0 . 実施形態 C 1 ~ C 2 9 のいずれか 1 つに記載の組成物で形質導入されたまたは形質転換された細胞。

【 0 4 7 9 】

C 3 1 . 前記細胞が、T細胞、腫瘍浸潤リンパ球、NK-T細胞またはNK細胞である、実施形態 C 3 0 に記載の細胞。

40

【 0 4 8 0 】

C 3 2 . 前記細胞が、T細胞である、実施形態 C 3 1 に記載の細胞。

【 0 4 8 1 】

C 3 3 . 前記細胞が、骨髄から得られるかまたは調製される、実施形態 C 1 ~ C 3 のいずれか 1 つに記載の細胞。

【 0 4 8 2 】

C 3 4 . 前記細胞が、臍帯血から得られるかまたは調製される、実施形態 C 1 ~ C 3 のいずれか 1 つに記載の細胞。

【 0 4 8 3 】

C 3 5 . 前記細胞が、末梢血から得られるかまたは調製される、実施形態 C 1 ~ C 3 の

50

いずれか1つに記載の細胞。

【0484】

C36. 前記細胞が、末梢血単核球から得られるかまたは調製される、実施形態C1～C3のいずれか1つに記載の細胞。

【0485】

C37. 前記細胞が、ヒト細胞である、実施形態C31～C3のいずれか1つに記載の細胞。

【0486】

C38. 保留。

【0487】

C39. 前記一本鎖可変フラグメントが、腫瘍細胞上の抗原に結合する、実施形態C1～C37のいずれか1つに記載の細胞。

【0488】

C40. 前記一本鎖可変フラグメントが、過剰増殖性疾患に関する細胞上の抗原に結合する、実施形態C1～C37のいずれか1つに記載の細胞。

【0489】

C41. 前記一本鎖可変フラグメントが、PSMA、PSCA、MUC1、CD19、ROR1、メソテリン、GD2、CD123、MUC16およびHer2/Neu一本鎖可変フラグメントからなる群より選択される、実施形態C1～C40のいずれか1つに記載の細胞。

【0490】

C42. 前記一本鎖可変フラグメントが、CD19一本鎖可変フラグメントである、実施形態C1～C40のいずれかに記載の細胞。

【0491】

C42.1. 前記一本鎖可変フラグメントが、PSCA一本鎖可変フラグメントである、実施形態C1～C40のいずれかに記載の細胞。

【0492】

C43. 免疫応答を誘導するための方法であって、前記誘導可能なキメラ抗原レセプターの多量体化をもたらす多量体化領域に結合するリガンドと実施形態C1～C42.1に記載の細胞を接触させる工程を含む、方法。

【0493】

C44. 前記細胞が、インビボにおいて前記リガンドと接触される、実施形態C43に記載の方法。

【0494】

C45. 前記リガンドが、二量体である、実施形態C43またはC44に記載の方法。

【0495】

C46. 前記リガンドが、二量体のFK506または二量体のFK506様アナログである、実施形態C45に記載の方法。

【0496】

C47. 前記リガンドが、APP1903またはAPP20187である、実施形態C45に記載の方法。

【0497】

C48. トランスフェクトされたまたは形質転換された細胞を被験体に投与する工程をさらに含む、実施形態C43～C47のいずれか1つに記載の方法。

【0498】

C49. 前記細胞が、静脈内投与によって被験体に投与される、実施形態C48に記載の方法。

【0499】

C50～C56. 保留。

【0500】

10

20

30

40

50

C 5 6 . 前記被験体が、腫瘍と診断されている、実施形態 C 4 3 ~ C 4 9 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 5 0 1 】

C 5 7 . 前記被験体が、癌を有する、実施形態 C 4 3 ~ C 4 9 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 5 0 2 】

C 5 8 . 前記被験体が、 固形腫瘍を有する、実施形態 C 4 3 ~ C 4 9 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 5 0 3 】

C 5 9 . 前記細胞が、腫瘍浸潤リンパ球または T 細胞である、実施形態 C 5 8 に記載の方法。 10

【 0 5 0 4 】

C 6 0 . 前記細胞が、腫瘍床に送達される、実施形態 C 5 8 または C 5 9 に記載の方法。 。

【 0 5 0 5 】

C 6 1 . 前記癌が、前記被験体の血液中または骨髄中に存在する、実施形態 C 5 7 に記載の方法。

【 0 5 0 6 】

C 6 2 . 前記被験体が、血液または骨髄の疾患を有する、実施形態 C 4 3 ~ C 4 9 のいずれか 1 つに記載の方法。 20

【 0 5 0 7 】

C 6 3 . 前記被験体が、幹細胞移植によって緩和され得る任意の状態または障害と診断されている、実施形態 C 4 3 ~ C 4 9 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 5 0 8 】

C 6 4 . 前記被験体が、 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 C 4 3 ~ C 4 9 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 5 0 9 】

C 6 5 . 前記患者が、原発性免疫不全障害、血球貪食リンパ組織球增多症 ( 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より選択される状態と診断されている、実施形態 C 4 3 ~ C 4 9 のいずれか 1 つに記載の方法。 30

【 0 5 1 0 】

C 6 6 . 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 / 欠損症、分類不能型免疫不全症 ( C V I D ) 、慢性肉芽腫症、 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・オールドリッヂ症候群、 C D 4 0 リガンド欠損症、白血球接着不全、 D O C K 8 欠損症、 I L - 1 0 欠損症 / I L - 1 0 レセプター欠損症、 G A T A 2 欠損症、 X 連鎖リンパ球増殖性疾患 ( X L P ) 、軟骨毛髪形成不全、シュバッハマン・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、 鎌状赤血球症、サラセミア、ムコ多糖症、スフィンゴリピドーシスおよび大理石骨病からなる群より選択される、実施形態 C 4 3 ~ C 4 9 のいずれか 1 つに記載の方法。 40

【 0 5 1 1 】

C 6 7 . 被験体における白血病を処置するための方法であって、その方法は、実施形態 C 1 ~ C 4 2 . 1 のいずれか 1 つに記載の細胞を投与する工程およびその被験体に多量体リガンドを投与する工程を含む、方法。

【 0 5 1 2 】

C 6 8 . 前記一本鎖可変フラグメントが、 C D 1 9 に結合する、実施形態 C 6 7 に記載の方法。

【 0 5 1 3 】

C 6 9 . 前記多量体リガンドが、 A P 1 9 0 3 または

A P 2 0 1 8 7 である、実施形態 C 6 7 または C 6 8 に記載の方法。

【 0 5 1 4 】

C 7 0 . 前記細胞が、T 細胞である、実施形態 C 6 7 ~ C 6 9 のいずれかに記載の方法。  
。

【 0 5 1 5 】

C 7 1 . 前記被験体が、ヒトである、実施形態 C 4 3 ~ C 7 0 のいずれか 1 つに記載の方法。  
。

【 0 5 1 6 】

C 7 2 . さらなる用量の前記多量体リガンドが、前記被験体に投与されるべきであるか否かを決定する工程をさらに含む、実施形態 C 4 3 ~ C 7 1 のいずれか 1 つに記載の方法  
。

10

【 0 5 1 7 】

C 7 3 . 前記被験体にさらなる用量の前記多量体リガンドを投与する工程をさらに含み、ここで、前記疾患または状態の症状は、症状が減少した後に残っているかまたは検出される、実施形態 C 4 3 ~ C 7 2 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 5 1 8 】

C 7 4 . 前記被験体が、実施形態 1 ~ 4 2 . 1 のいずれか 1 つに記載の細胞を投与する前に、疾患または状態と診断されており、前記多量体リガンドを投与した後に、その疾患または状態が検出され、さらなる用量の多量体リガンドが、その被験体に投与される、実施形態 C 7 3 に記載の方法。  
。

20

【 0 5 1 9 】

C 7 5 . 被験体における状態もしくは疾患の存在、不在もしくはステージを特定する工程、および

前記多量体結合領域に結合する多量体リガンドを投与する指示、その多量体リガンドのその後の投与量を維持する指示、またはその被験体において特定された状態もしくは疾患の存在、不在もしくはステージに基づいてその患者に投与される多量体リガンドのその後の投与量を調整する指示を伝える工程

をさらに含む、実施形態 C 4 3 ~ C 7 4 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 5 2 0 】

C 7 6 . 前記状態が、癌である、実施形態 C 7 2 ~ C 7 5 のいずれか 1 つに記載の方法  
。

30

【 0 5 2 1 】

C 7 7 . 前記状態が、白血病である、実施形態 C 7 2 ~ C 7 5 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 5 2 2 】

C 7 8 . 前記状態が、固形腫瘍である、実施形態 C 7 2 ~ C 7 5 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 5 2 3 】

C 7 9 . 前記多量体リガンドの投与後の腫瘍サイズおよび / または腫瘍細胞数と比べたときの、被験体における腫瘍サイズの増加および / または腫瘍細胞数の増加の存在または不在を決定する工程、ならびに

40

腫瘍サイズの増加および / または腫瘍細胞数の増加の存在が決定された場合に、その被験体にさらなる用量の多量体リガンドを投与する工程  
を含む、実施形態 C 7 8 に記載の方法。

【 0 5 2 4 】

C 8 0 . 前記多量体リガンドの投与後の C D 1 9 発現 B 細胞のレベルと比べたときの、前記被験体における C D 1 9 発現 B 細胞の増加の存在または不在を決定する工程、ならびに

その被験体における C D 1 9 発現 B 細胞の増加の存在が決定された場合に、その被験体にさらなる用量の多量体リガンドを投与する工程

50

を含む、実施形態 C 7 7 に記載の方法。

【 0 5 2 5 】

C 8 1 . 前記腫瘍サイズおよび / または前記腫瘍細胞数が、前記多量体リガンドの投与前の腫瘍サイズおよび / または腫瘍細胞数と比べて、多量体リガンドの投与後に減少する、実施形態 C 7 9 に記載の方法。

【 0 5 2 6 】

C 8 2 . C D 1 9 発現 B 細胞のレベルが、前記多量体リガンドの投与前の C D 1 9 発現 B 細胞のレベルと比べて、前記多量体リガンドの投与後に減少する、実施形態 C 8 0 に記載の方法。

【 0 5 2 7 】

C 8 3 . 前記被験体が、H I V 、インフルエンザ、疱疹、ウイルス性肝炎、エプスタイン・バー、ポリオ、ウイルス性脳炎、麻疹、水痘、サイトメガロウイルス ( C M V ) 、アデノウイルス ( A D V ) 、H H V - 6 ( ヒトヘルペスウイルス 6 , I ) およびパピローマウイルスからなる群より選択されるウイルス病因の感染症と診断されているか、または肺炎、結核および梅毒からなる群より選択される細菌病因の感染症と診断されているか、またはマラリア、トリパノソーマ症、リーシュマニア症、トリコモナス症およびアーベ症からなる群より選択される寄生生物病因の感染症と診断されている、実施形態 C 4 3 ~ C 7 4 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 5 2 8 】

本明細書中で参照された特許、特許出願、刊行物および文書の各々の全体が、参照により援用される。上記特許、特許出願、刊行物および文書の引用は、前述のいずれかが、関連する従来技術であることを自認するものでもないし、これらの刊行物または文書の内容または日付に関する自認するものである性質でもない。

【 0 5 2 9 】

本技術の基本的な態様から逸脱することなく、前述のものに対して改変が行われ得る。本技術は、1 つ以上の特定の実施形態に照らして実質的に詳細に説明されてきたが、当業者は、本願において具体的に開示された実施形態に対して変更が行われ得るが、これらの改変および改善が本技術の範囲内および精神内であることを認識するだろう。

【 0 5 3 0 】

本明細書中に例証的に記載された技術は、本明細書中に具体的に開示されていない任意のエレメントの非存在下において、適切に実施され得る。したがって、例えば、本明細書中の各場合において、用語「 ~ を含む」、「 ~ から本質的になる」および「 ~ からなる」のいずれかは、他の 2 つの用語のいずれかと置き換えられてもよい。使用してきた用語および表現は、限定の用語ではなく説明の用語として使用され、そのような用語および表現の使用は、示されたおよび記載された特徴またはそれらの一部のいかなる等価物も排除せず、特許請求される本技術の範囲内で様々な改変が可能である。エレメントのうちの 1 つまたはエレメントのうちの 2 つ以上が記載されていることが文脈から明らかでない限り、用語「 a 」または「 a n 」は、それが修飾するエレメントのうちの 1 つまたは複数のことを指し得る（例えば、「試薬 ( a r e a g e n t ) 」は、1 つ以上の試薬を意味し得る）。本明細書中で使用される用語「約」は、基となるパラメータの 1 0 % 以内の値（すなわち、プラスまたはマイナス 1 0 % ）のことを指し、一続きの値の始めに用語「約」を使用することにより、それらの値の各々が修飾される（すなわち、「約 1 、 2 および 3 」は、約 1 、約 2 および約 3 のことを指す）。例えば、「約 1 0 0 グラム」という重量は、9 0 グラム ~ 1 1 0 グラムの重量を含み得る。さらに、値のリストが、本明細書中に記載されるとき（例えば、約 5 0 % 、 6 0 % 、 7 0 % 、 8 0 % 、 8 5 % または 8 6 % ）、そのリストには、それらのすべての中間値および分数値（例えば、5 4 % 、 8 5 . 4 % ）が含まれる。したがって、本技術は、代表的な実施形態および随意の特徴によって具体的に開示されてきたが、本明細書中に開示された概念の改変およびバリエーションが、当業者によって用いられることがあり、そのような改変およびバリエーションは、本技術の範囲内であるとみなされると理解されるべきである。

10

20

30

40

50

## 【 0 5 3 1 】

本技術のある特定の実施形態が、以下の請求項に示される。

【 図 1 】

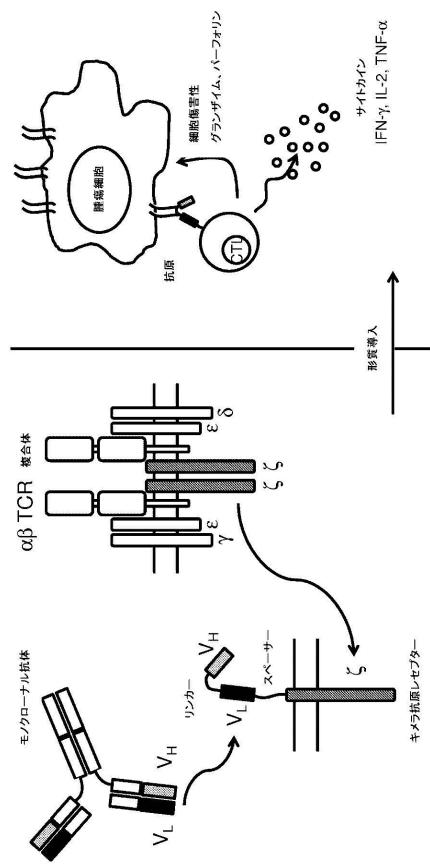


FIGURE 1

【 図 2 】

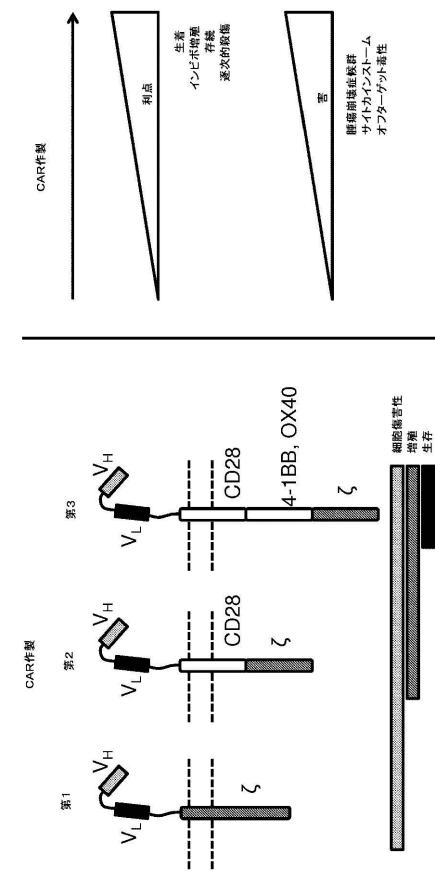


FIGURE 2

【図3】

## 提案されるコントロールメカニズム

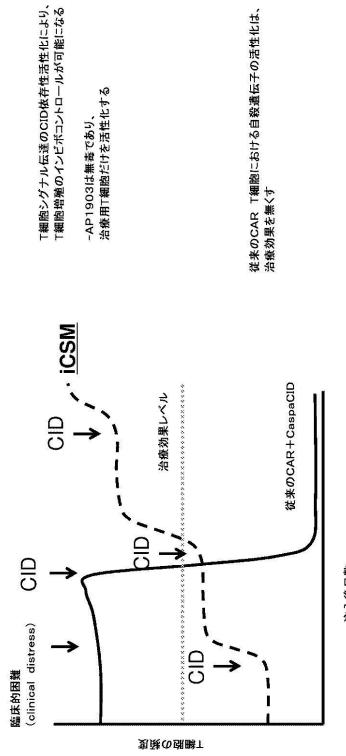


FIGURE 3

【図5】

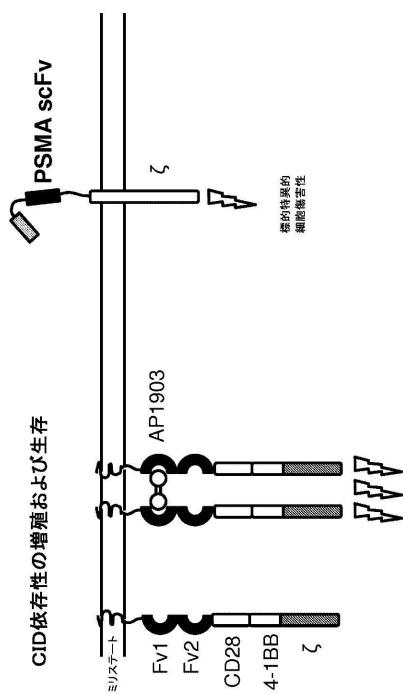


FIGURE 5

【図4】

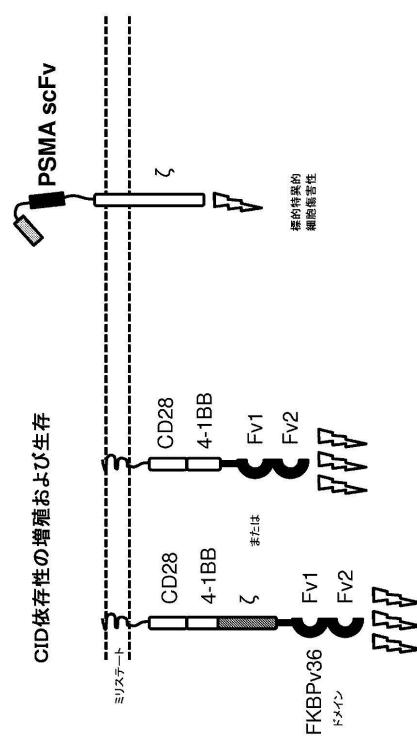


FIGURE 4

【図6】

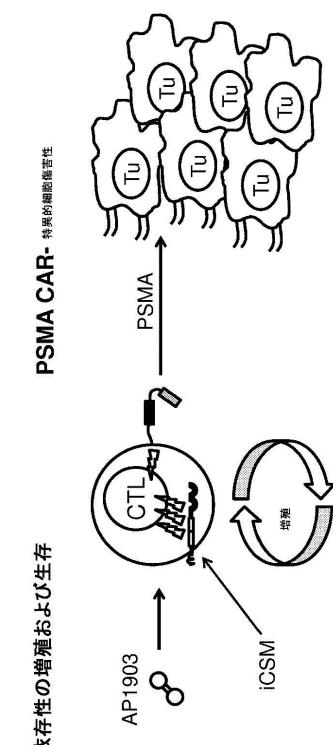


FIGURE 6

【図7】

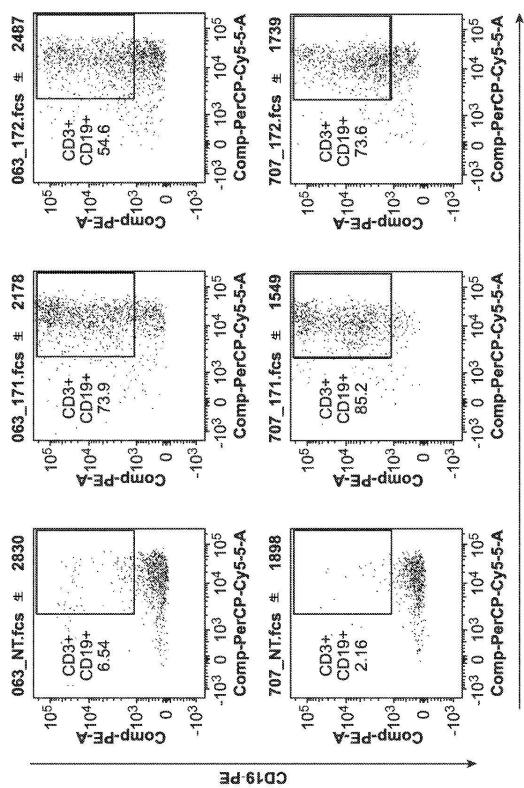
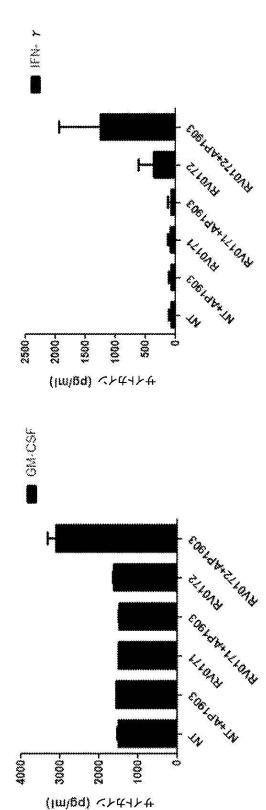


FIG. 7  
3-PerCP.Cy5.5

〔 四 8 〕



8  
Fig.

〔 9 〕

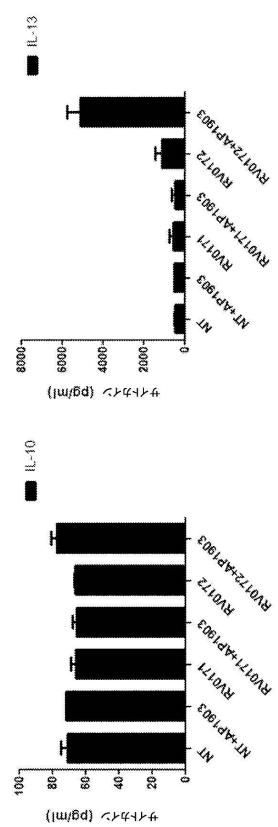


Fig 9

【 10 】

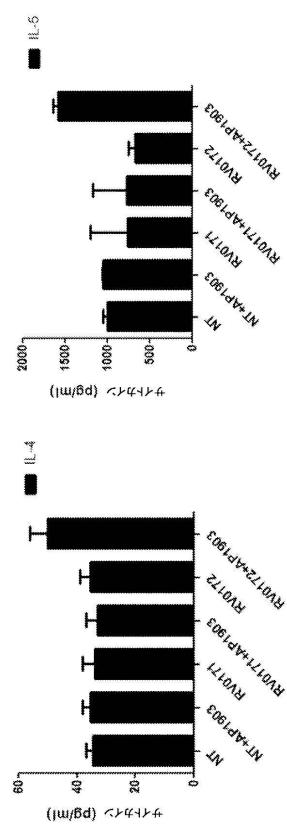


Fig. 10

【図 1 1】

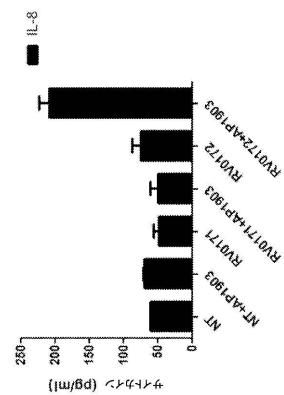
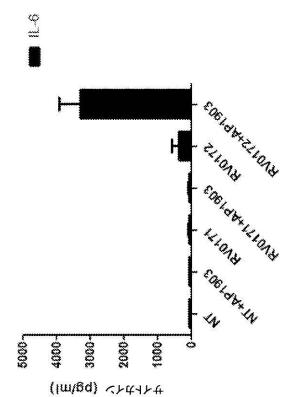


Fig.11



【図 1 3】

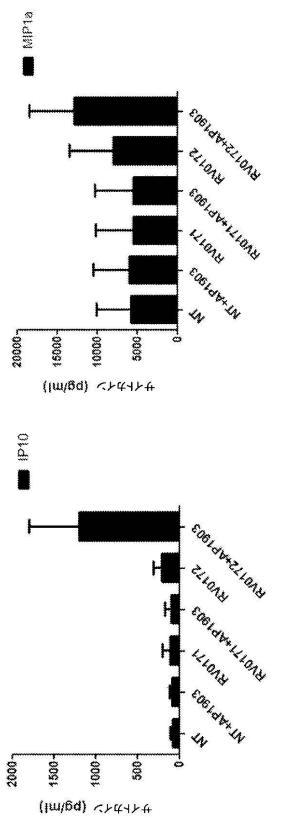


Fig.13

【図 1 2】

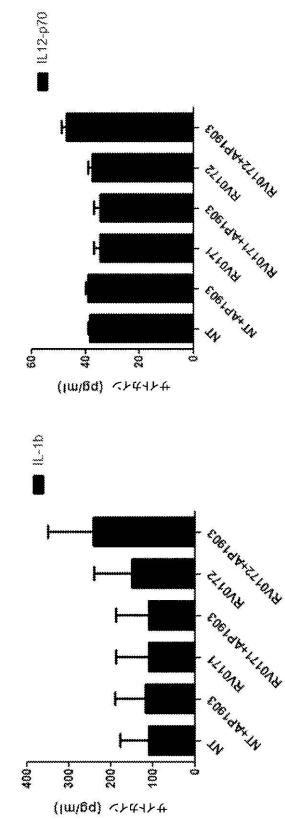


Fig.12

【図 1 4】

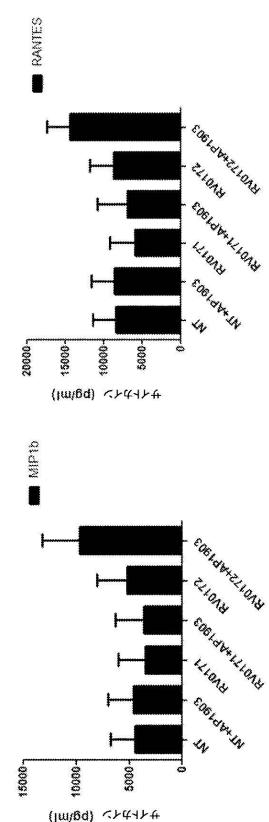


Fig.14

【図 15】

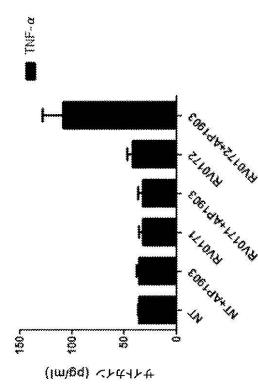


Fig. 15

【図 16】

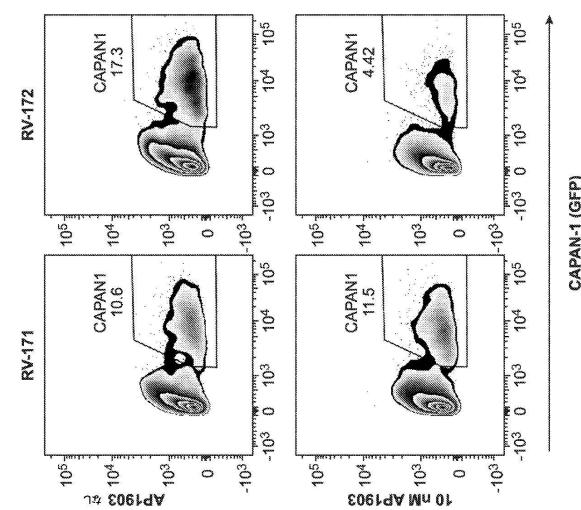


FIG. 16

【図 17】

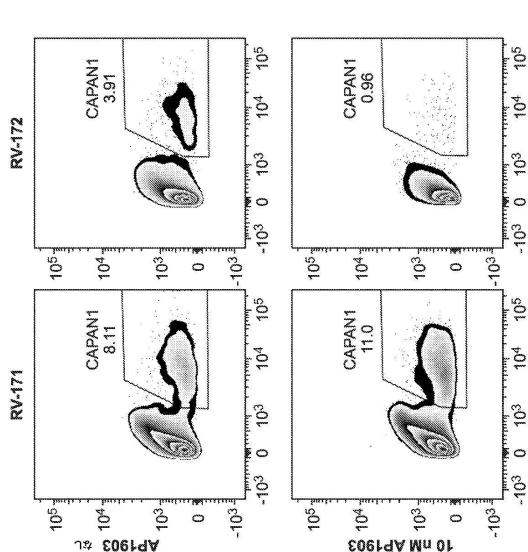


Fig. 17

【図 18】

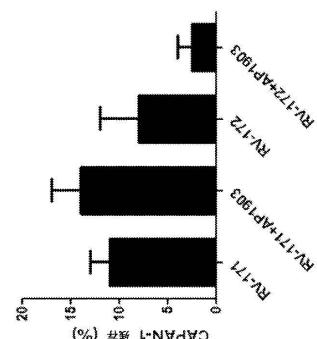


Figure 18

【図 19】

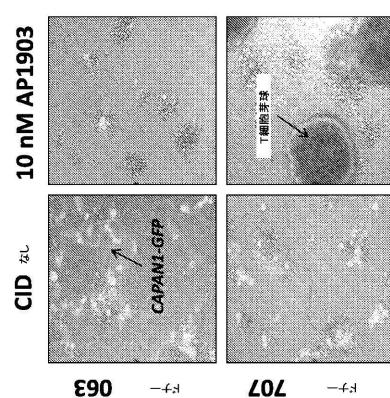


Figure 19

CID nL 10 nM AP1903

690 707 703

【図20】

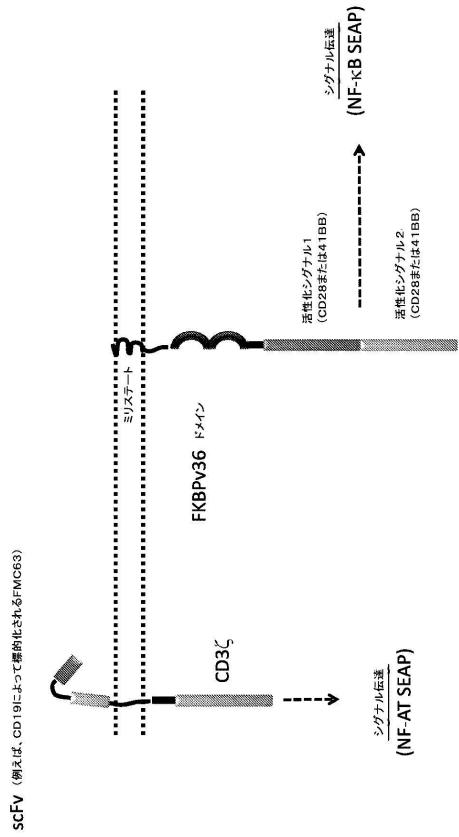


Fig. 20

【図21】

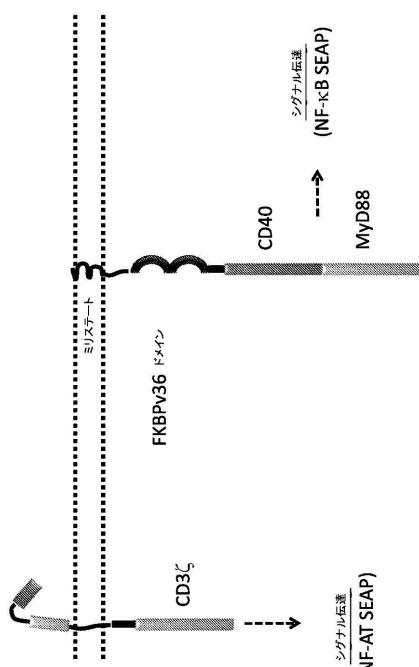


Fig. 21

## 【図22】

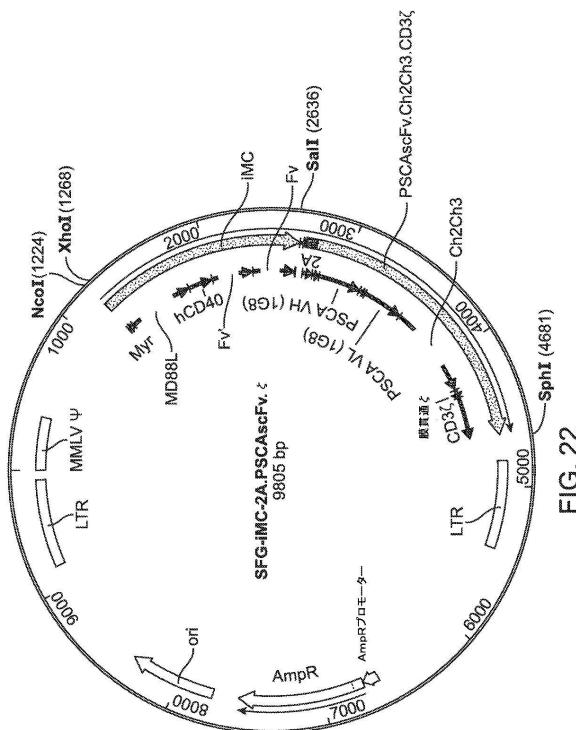


FIG. 22

【配列表】

0006541639000001.app

---

フロントページの続き

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 スペンサー, デイビッド

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 フォスター, アーロン エドワード

アメリカ合衆国 テキサス 77030, ヒューストン, スウィフト ブールバード 224  
4

(72)発明者 スローウィン, ケビン

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

審査官 山村 祥子

(56)参考文献 國際公開第2012/079000 (WO, A1)

國際公開第2011/130566 (WO, A1)

國際公開第2004/073641 (WO, A1)

Drug Delivery System, 2013年 1月30日, 28-1, p.35-44

Science, 1993年, VOL.262, 1019-1024

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 61 K 48 / 00

A 61 K 35 / 17

A 61 P 35 / 00

C 12 N 5 / 10

C 12 N 15 / 62

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )