

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-221211

(P2017-221211A)

(43) 公開日 平成29年12月21日(2017.12.21)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 ZNAA	4B065
C07K 14/705 (2006.01)	C07K 14/705	4C084
C12N 5/0783 (2010.01)	C12N 5/0783	4C087
A61K 35/17 (2015.01)	A61K 35/17 Z	4H045
A61P 35/00 (2006.01)	A61P 35/00	

審査請求 有 請求項の数 21 O L 外国語出願 (全 35 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-144609 (P2017-144609)	(71) 出願人	598004424
(22) 出願日	平成29年7月26日 (2017.7.26)		シティ・オブ・ホープ
(62) 分割の表示	特願2011-525168 (P2011-525168) の分割		City of Hope
原出願日	平成21年8月26日 (2009.8.26)		アメリカ合衆国カリフォルニア州91010-0269, デュアーテ, イースト・デュアーテ・ロード 1500
(31) 優先権主張番号	61/091, 915		1500 East, Duarte Road, Duarte, California 91010-0269, United States of America
(32) 優先日	平成20年8月26日 (2008.8.26)	(74) 代理人	100140109
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 小野 新次郎
		(74) 代理人	100118902
			弁理士 山本 修

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 T細胞の抗腫瘍エフェクター機能増進のための方法および組成物

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 癌免疫療法のためのCD4+およびCD8+T細胞の抗腫瘍エフェクター機能増進のための方法、及び組成物；そして特に細胞外ドメインの提供。

【解決手段】 特異的認識要素、場合による支持またはリンカー領域、膜貫通領域、CD3ゼータ鎖のシグナル伝達ドメイン、及び少なくとも1つのさらなる共刺激シグナル伝達受容体のシグナル伝達ドメインを含む、前記腫瘍特異的キメラ抗原受容体。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

特異的認識要素、場合による支持またはリンカー領域、膜貫通領域、CD3ゼータ鎖のシグナル伝達ドメインおよび少なくとも1つのさらなる共刺激シグナル伝達受容体のシグナル伝達ドメインを含む、腫瘍特異的キメラ抗原受容体（CAR）。

【請求項 2】

前記シグナル伝達ドメインが2つの共刺激シグナル伝達受容体のシグナル伝達ドメインを含む、請求項1のCAR。

【請求項 3】

前記共刺激シグナル伝達受容体が、CD28、4-1BBおよびOX-40からなる群より選択される、請求項1のCAR。 10

【請求項 4】

前記共刺激シグナル伝達受容体がCD28および4-1BBである、請求項2のCAR。

【請求項 5】

前記膜貫通領域がヒトCD4膜貫通領域またはヒトCD28膜貫通領域である、請求項1のCAR。

【請求項 6】

前記支持またはリンカー領域がヒトIgG₄Fc領域である、請求項1のCAR。

【請求項 7】

前記特異的認識要素が、IL13分子、IL3分子、またはHer/2Neu、 α 3インテグリン、CD20、CD19およびEGFRVIIIからなる群より選択される抗原を認識する一本鎖免疫グロブリンの細胞外結合ドメインである、請求項1のCAR。 20

【請求項 8】

前記特異的認識要素がIL13分子である、請求項7のCAR。

【請求項 9】

前記IL13分子がE13Y突然変異を含有する、請求項8のCAR。

【請求項 10】

IL13-CD28-4-1BB である、請求項1のCAR。

【請求項 11】

IL13-CD28-4-1BB である、請求項9のCAR。 30

【請求項 12】

請求項1のCARをコードする単離ポリ核酸。

【請求項 13】

請求項9のCARをコードする単離ポリ核酸。

【請求項 14】

請求項1のCARを発現する単離Tリンパ球。

【請求項 15】

請求項9のCARを発現する単離Tリンパ球。

【請求項 16】

請求項1のCARを発現するTリンパ球を、必要とする患者に投与する工程を含む、癌免疫療法の方法。 40

【請求項 17】

請求項14のTリンパ球を、必要とする患者に投与する工程を含む、癌免疫療法の方法。

【請求項 18】

請求項15のCARを発現するTリンパ球を、必要とする患者に投与する工程を含む、癌免疫療法の方法。

【請求項 19】

前記癌が、神経膠芽腫、髄芽腫、乳癌、頭部および頸部癌、腎臓癌、卵巣癌、カボジ肉腫、急性骨髄性白血病、およびB細胞系譜悪性腫瘍からなる群より選択される、請求項17の方法。 50

【請求項20】

前記癌が、神経膠芽腫、髄芽腫、乳癌、頭部および頸部癌、腎臓癌、卵巣癌、カボジ肉腫、急性骨髄性白血病、およびB細胞系譜悪性腫瘍からなる群より選択される、請求項18の方法。

【請求項21】

前記受容体にCD28および4-1BBシグナル伝達ドメインを付加する工程を含む、腫瘍に対するキメラ抗原受容体活性を増進させる方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

政府が支援した研究に関する言及

[0001] 本発明は、米国保健福祉省、米国衛生研究所から癌センター助成金番号P30-CA33572-21の形で、政府の援助を受けて行った。米国政府は、本発明に一定の権利を有する。

【背景技術】

【0002】

1. 技術分野

[0002] 本発明は、生物医学の分野および特に癌療法に有用な方法に関する。特に、本発明の態様は、ヒト脳腫瘍および他の癌の治療において、キメラ免疫受容体を発現している遺伝子修飾されたTリンパ球の使用を含む、癌のための特異的CTL免疫療法戦略のための方法に関する。

【0003】

2. 背景技術の説明

[0003] 腫瘍特異的T細胞に基づく免疫療法は、抗腫瘍治療のために研究されてきているが、T細胞は、十分に長い期間、in vivoで生存せず、そして活性なままではないという問題がある。しばしば、養子導入T細胞は、腫瘍細胞殺傷の望ましい強度および期間を持たない。したがって、当該技術分野には、より長期の抗腫瘍機能を持つ腫瘍特異的癌療法に関する必要性がある。

【0004】

[0004] 癌に向けられる免疫療法は、伝統的に、CD8⁺ CTL反応を誘発することに焦点を置いている。しかし、CD4⁺ T細胞（ヘルパー）反応の刺激もまた、癌に対する免疫療法の成功のために重要である。CD4⁺ T細胞は、CD40-CD40Lを介したプロフェッショナル抗原提示細胞の条件付けを通じて、そしてIL2およびIFN- γ などのサイトカインの産生を通じて、直接または間接的に、天然の腫瘍特異的CTL反応に影響を及ぼしうる。CD4⁺ T細胞が用いる細胞破壊的エフェクター機構は、腫瘍細胞表面上の死受容体を活性化するサイトカインの放出を通じて、または直接細胞接触を通じてのいずれかで仲介され、後者の場合、Fas/FasL、TNF関連アポトーシス誘導性リガンド（TRAIL）、またはグランザイム-パーフォリン依存性経路が、腫瘍細胞アポトーシスを仲介する。これらのヘルパー細胞は、一次CD8⁺ CTLエフェクターの初期クローン性拡大および生成を増大することも可能であり、そしてまた機能するメモリーCD8⁺ T細胞の生成および拡大の両方に影響を及ぼすことも可能である。

【0005】

[0005] 天然のCD4⁺ T細胞の完全な活性化には、T細胞受容体/CD3複合体と適切なペプチド/MHCクラスII複合体の会合を通じた抗原特異的シグナル、および共刺激シグナルの両方が必要である。これらの共刺激シグナルは、通常、特殊化抗原提示細胞上で選択的に発現されるリガンドによって送達される。T細胞共刺激は、この二次シグナルを送達しない組織によって発現される正常自己抗原に対する寛容性を維持するのを補助すると考えられる。大部分の腫瘍細胞は、正常組織同様、MHCクラスIIまたは共刺激分子を発現しないため、腫瘍細胞もまた、通常は、CD4⁺ T細胞刺激を直接促進しないのは当然である。この理論は、共刺激リガンドB7-1でトランスフェクションされた腫瘍細胞をワクチン接種

10

20

30

40

50

することによる、T細胞仲介性抗腫瘍免疫増進を立証するいくつかの研究によって裏付けられる。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

[0006] 共刺激分子の腫瘍細胞発現を改変することは、T細胞活性化の駆動を補助する1つの方法であるが、別の戦略、特に実際の共刺激リガンド(単数または複数)を必要とせず、T細胞が共刺激シグナルを受け取り、そして該シグナルに作用するのを可能にすることを伴う戦略が非常に望ましいであろう。

【課題を解決するための手段】

【0007】

[0007] したがって、本発明の態様は、癌免疫療法のためのCD4⁺およびCD8⁺ T細胞の抗腫瘍エフェクター機能増進のための方法および組成物;そして特に細胞外ドメイン、膜貫通領域および細胞内シグナル伝達ドメインを含む、キメラ膜貫通免疫受容体(キメラ抗原受容体または「CAR」と称される)を提供する。細胞外ドメインは、細胞表面に細胞外ドメインを束縛可能な、場合による支持領域に連結された、可溶性受容体リガンド(ターゲット腫瘍抗原または他の腫瘍細胞表面分子に対して特異的である)で構成される。細胞内シグナル伝達ドメインは、ヒトCD3複合体のゼータ鎖(CD3 ζ)由来のシグナル伝達ドメインおよび1以上の共刺激シグナル伝達ドメイン、例えば、CD28、4-1BBおよびOX-40由来のものを含有する。細胞外ドメインは、認識要素であって、CARがT細胞表面上に発現された場合に、この認識要素がそれに対して特異的な受容体またはリガンドを発現している細胞に、T細胞活性を向けることを可能にする、該認識要素を含有する。例えば、腫瘍抗原に特異的な認識要素を含有する細胞外ドメインを含有するCARは、この抗原を所持する腫瘍細胞に、T細胞活性を向けることも可能である。細胞内領域は、T細胞が共刺激シグナルを受け取ることを可能にする。共刺激シグナル伝達ドメインは、好ましくは、CD28、4-1BB、OX-40またはこれらの任意の組み合わせから選択される。好ましいキメラ受容体は、ヒトCD4膜貫通領域、ヒトIgG₄ Fcおよび腫瘍特異的な受容体またはリガンド、例えばIL13またはIL3分子を含む。IL13分子はE13Y突然変異を含有してもよい。

【0008】

[0008] 本発明の態様はまた、上述のものなどの受容体を、必要とする患者に投与する工程を含む、癌免疫療法の方法も提供する。IL13R α 2をターゲティングする好ましい方法は、例えば、神経膠芽腫、乳癌、頭部および頸部癌、腎臓癌、卵巣癌およびカボジ肉腫を含む癌の治療に有用である。該方法は、CAR上の認識要素に特異的に結合する要素を所持する任意のアクセス可能な腫瘍を治療する際に有用である。

【0009】

[0009] 本発明のさらなる態様は、受容体にCD28、および/または4-1BB、OX-40シグナル伝達ドメインを付加する工程を含む、腫瘍に対するキメラ抗原受容体(CAR)活性を増進させる方法を提供する。

【0010】

[0010] 本発明に含まれる特定の態様には、特異的認識要素、場合による支持またはリンカー領域、膜貫通領域、CD3ゼータ鎖および少なくとも1つのさらなる共刺激シグナル伝達受容体のシグナル伝達ドメインを含む、腫瘍特異的キメラ抗原受容体(CAR)が含まれる。こうしたCARには、2つの共刺激シグナル伝達受容体、例えば、CD28、4-1BBおよびOX-40からなる群より選択されるもの、例えばCD28および4-1BBを含むものが含まれてもよい。

【0011】

[0011] 本発明のCARには、膜貫通領域が、ヒトCD4膜貫通領域、ヒトCD28膜貫通領域、またはヒトIgG₄ Fc領域であるものが含まれる。CARの特異的認識要素は、IL13分子、IL3分子、またはHer/2Neu、 α 3インテグリン、CD20、CD19およびEGFRVIIIからなる群より選択される抗原を認識する一本鎖免疫グロブリンの細胞外結合ドメインであってもよく、

10

20

30

40

50

そして好ましくはIL13分子、最も好ましくはE13Y突然変異を含有するIL13分子、例えばIL13-CD28-41BB である。

【 0 0 1 2 】

[00012] 本発明の態様はまた、本明細書に論じるCARのいずれかをコードする単離ポリ核酸、および本明細書に論じるCARのいずれかを発現する単離Tリンパ球も含む。さらに、本発明の態様には、こうしたポリ核酸またはTリンパ球を、必要とする患者に投与する工程を含む、癌免疫療法の方法が含まれ、これには、以下の癌：神経膠芽腫、髄芽腫、乳癌、頭部および頸部癌、腎臓癌、卵巣癌、カボジ肉腫、急性骨髄性白血病、およびB細胞系譜悪性腫瘍のいずれかのための治療としての方法が含まれる。

【 0 0 1 3 】

[00013] さらに態様には、受容体にCD28および4-1BBシグナル伝達ドメインを付加する工程を含む、腫瘍に対するキメラ抗原受容体活性を増進させる方法が含まれる。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 1 4 】

【 図 1 】 [00014] 図1は、IL13 およびIL-13-CD28-41BB キメラ抗原受容体 (CAR) タンパク質分子の略図である。

【 図 2 】 [00015] 図2は、示すような天然IL13配列上のIL13 CAR構築のための例示的なプライマーの位置を示す。矢印は、IL13配列上のプライマーの位置を示す。

【 図 3 A 】 [00016] 図3 (図3A ~ 図3Cとして提供する) は、IL13ゼータカインをコードする例示的なヌクレオチド配列 (SEQ ID NO: 5、上部鎖 ; SEQ ID NO: 6、下部鎖) を提供する。配列中のDNAセグメントには、GM-CSFRアルファ・シグナルペプチド (SEQ ID NO: 7)、IL13 (E13Y) (SEQ ID NO: 8)、IgG₄ (SmP) (SEQ ID NO: 9)、CD4tm (SEQ ID NO: 10) およびCD3ゼータ (SEQ ID NO: 11) が含まれる。完全アミノ酸配列はSEQ ID NO: 4として提供される。

【 図 3 B 】 [00016] 図3 (図3A ~ 図3Cとして提供する) は、IL13ゼータカインをコードする例示的なヌクレオチド配列 (SEQ ID NO: 5、上部鎖 ; SEQ ID NO: 6、下部鎖) を提供する。

【 図 3 C 】 [00016] 図3 (図3A ~ 図3Cとして提供する) は、IL13ゼータカインをコードする例示的なヌクレオチド配列 (SEQ ID NO: 5、上部鎖 ; SEQ ID NO: 6、下部鎖) を提供する。

【 図 4 】 [00017] 図4は、ベクターIL13ゼータカイン / HyTK-pMGのマップである。こうしたベクターの例示的な配列を図5に提供する。

【 図 5 A 】 [00018] 図5 (図5A ~ 図5Lとして提供する) は、例示的なプラスミドDNAベクターの配列 (SEQ ID NO: 13、上部鎖 ; SEQ ID NO: 14、下部鎖) を提供する。IL13ゼータカインアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 15) およびHyTkアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 16) もまた示す。完全配列を構成するDNAセグメントには、hEF1p (ヌクレオチド6 ~ 549 ; SEQ ID NO: 41)、IL13ゼータカイン (ヌクレオチド690 ~ 2183 ; SEQ ID NO: 42)、後期sv40pAn (ヌクレオチド2230 ~ 2498 ; SEQ ID NO: 43)、Ori ColE1 (ヌクレオチド2499 ~ 3245 ; SEQ ID NO: 44)、SpAn (ヌクレオチド3246 ~ 3432 ; SEQ ID NO: 45)、hCMV-1Aprom (ヌクレオチド3433 ~ 4075 ; SEQ ID NO: 46)、HyTK (ヌクレオチド4244 ~ 6319 ; SEQ ID NO: 47)、およびBGh pAna (ヌクレオチド6320 ~ 6618 ; SEQ ID NO: 48) が含まれる。

【 図 5 B 】 [00018] 図5 (図5A ~ 図5Lとして提供する) は、例示的なプラスミドDNAベクターの配列 (SEQ ID NO: 13、上部鎖 ; SEQ ID NO: 14、下部鎖) を提供する。

【 図 5 C 】 [00018] 図5 (図5A ~ 図5Lとして提供する) は、例示的なプラスミドDNAベクターの配列 (SEQ ID NO: 13、上部鎖 ; SEQ ID NO: 14、下部鎖) を提供する。

【 図 5 D 】 [00018] 図5 (図5A ~ 図5Lとして提供する) は、例示的なプラスミドDNAベクターの配列 (SEQ ID NO: 13、上部鎖 ; SEQ ID NO: 14、下部鎖) を提供する。

【 図 5 E 】 [00018] 図5 (図5A ~ 図5Lとして提供する) は、例示的なプラスミドDNAベクターの配列 (SEQ ID NO: 13、上部鎖 ; SEQ ID NO: 14、下部鎖) を提供する。

【 図 5 F 】 [00018] 図5 (図5A ~ 図5Lとして提供する) は、例示的なプラスミドDNAベク

10

20

30

40

50

ターの配列 (SEQ ID NO: 13、上部鎖 ; SEQ ID NO: 14、下部鎖) を提供する。

【図 5 G】 [00018] 図5 (図5A ~ 図5Lとして提供する) は、例示的なプラスミドDNAベクターの配列 (SEQ ID NO: 13、上部鎖 ; SEQ ID NO: 14、下部鎖) を提供する。

【図 5 H】 [00018] 図5 (図5A ~ 図5Lとして提供する) は、例示的なプラスミドDNAベクターの配列 (SEQ ID NO: 13、上部鎖 ; SEQ ID NO: 14、下部鎖) を提供する。

【図 5 I】 [00018] 図5 (図5A ~ 図5Lとして提供する) は、例示的なプラスミドDNAベクターの配列 (SEQ ID NO: 13、上部鎖 ; SEQ ID NO: 14、下部鎖) を提供する。

【図 5 J】 [00018] 図5 (図5A ~ 図5Lとして提供する) は、例示的なプラスミドDNAベクターの配列 (SEQ ID NO: 13、上部鎖 ; SEQ ID NO: 14、下部鎖) を提供する。

【図 5 K】 [00018] 図5 (図5A ~ 図5Lとして提供する) は、例示的なプラスミドDNAベクターの配列 (SEQ ID NO: 13、上部鎖 ; SEQ ID NO: 14、下部鎖) を提供する。

【図 5 L】 [00018] 図5 (図5A ~ 図5Lとして提供する) は、例示的なプラスミドDNAベクターの配列 (SEQ ID NO: 13、上部鎖 ; SEQ ID NO: 14、下部鎖) を提供する。

【図 6】 [00019] 図6は、例示的なCAR直鎖プラスミド構築物の2つの略図を含有する。図6AはIL13 構築物を示し、そして図6BはIL13-CD28-41BB 構築物を示す。

【図 7】 [00020] 図7は、マウス抗ヒトCD3 特異的mAbを用いた、CAR発現に関する、偽、IL13 およびIL13-CD28-41BB トランスフェクションCD4⁺ T細胞由来の細胞溶解物のウェスタンブロット分析を示す。

【図 8】 [00021] 図8は、IL13 およびIL13-CD28-41BB 発現バルクCD4⁺ 細胞の細胞表面表現型を比較する8つのフローサイトメトリー分析のパネルである。

【図 9】 [00022] 図9は、U87神経膠腫ターゲット細胞上のアイソタイプ対照 (白抜きのヒストグラム) に比較した、示すようなHLA-A2およびHLA-DR (MHC分子)、IL13R 2、ならびに共刺激分子CD80、CD86、およびCD137-L (4-1BBL) (黒塗りのヒストグラム) の表面染色のフローサイトメトリー結果を示す6つのグラフのパネルである。

【図 10】 [00023] 図10は、それぞれの基質 (すなわちP-cJun (リン酸化c-Jun癌原遺伝子)、p-GSK3 (リン酸化グリコーゲンシンターゼキナーゼ3) およびP-ATF2 (リン酸化活性化転写因子2)) のリン酸化を介して測定される、JNKおよびp38 (図3A) およびAKT (図3B) 活性化の動力学を決定するキナーゼアッセイの結果を示す一連の免疫プロットである。

【図 11】 [00024] 図11は、T細胞Th₁ サイトカインmRNA (図11A)、ならびにTh₁ およびTh₂ サイトカインタンパク質産生 (図11B) に関する、IL13-CD28-41BB⁺ CD4⁺ T細胞のTh₁ 極性化増進を示す。

【図 12】 [00025] 図12Aは、4時間のルシフェラーゼ細胞傷害性アッセイ (LCA) における、示すE:T比でのIL13⁺ CD4⁺ T細胞 () のものに比較した、U87ターゲットに対するIL13-CD28-41BB⁺ CD4⁺ T細胞 () の細胞傷害性活性増進を示すデータを提供する。図12Bは、2:1のE:T比で48時間共培養し、そして次いで再び、同じE:T比で新鮮なターゲットを添加した後、さらに48時間共培養した、IL13-CD28-41BB⁺ CD4⁺ T細胞 (黒いバー) およびIL13⁺ CD4⁺ T細胞 (白いバー) に関する、類似のデータを示す。図12Cは、接着性U87細胞と共培養した、示すCARを発現しているT細胞のビデオ画像化で得たデータを提供し、画像あたりの生存細胞数を示す。

【図 13】 [00026] 図13は、IL13-CD28-41BB⁺ CD4⁺ T細胞によるin vivoの確立された神経膠芽腫異種移植片に対して、持続された抗腫瘍効果を示す流動データを提供する。IL-13 および偽トランスフェクションT細胞で観察された結果もまた示す。

【図 14】 [00027] 図14は、IL13-IgG₄-cd28tm-CD28gg-ゼータ (CO) (SEQ ID NO: 36) の配列を提供する。

【図 15】 [00028] 図15は、以下の実施例に関して、用いられ/上に論じられる、IL13-CD28-41BB としてもまた本明細書に言及される、IL13-IgG₄-cd4tm-CD28-4-1BB-ゼータの配列を提供する (SEQ ID NO: 37)。図1、6、7、8、10、11、12および13に記載しそして用いるような、IL13-CD28-41BB CARを発現するようにT細胞を遺伝子改変するのに、この配列を用いた。

10

20

30

40

50

【図16】 [00029] 図16は、IL13-IgG₄-cd28tm-CD28-Ox40-ゼータの配列を提供する (SEQ ID NO: 38)。

【図17】 [00030] 図17は、IL13-IgG₄-cd28tm-CD28gg-4-1BB-ゼータの配列を提供する (SEQ ID NO: 39)。

【図18】 [00031] 図18は、IL13-IgG₄-cd28tm-CD28gg[^]199-4-1BB-ゼータの配列を提供する (SEQ ID NO: 40)。

【発明を実施するための形態】

【0015】

[00032] 腫瘍特異的キメラ抗原受容体 (CAR) を発現するTリンパ球を用いた養子免疫療法は、癌の治療のための強力な療法的戦略でありうる。CARは、膜貫通ドメインを通じて、CD3 細胞質シグナル伝達ドメインに連結された細胞外特異的認識要素 (腫瘍抗原に結合する受容体など) で構成される。したがって、これらの受容体は、MHC制限とは独立に、抗原に結合することもそしてT細胞活性化を伝達することもどちらも可能である。したがって、CARは、HLA遺伝子型とは関わりなく、抗原陽性腫瘍を持つ患者集団を治療可能な「普遍的」免疫受容体である。

10

【0016】

[00033] 本発明の態様にしたがって、CARは、細胞が腫瘍などのターゲットと会合することを可能にする特異的受容体に加えて、CD3 のシグナル伝達ドメイン、およびCARを発現している養子導入された細胞のリサイクリング、生存および/または拡大をさらに促進する、1以上の共刺激受容体のシグナル伝達部分を含有する。共刺激受容体のシグナル伝達ドメインは、細胞において活性化シグナルを生じる各受容体タンパク質の細胞内部分である。例は、天然CD28分子のアミノ酸180~220および天然4-1BB分子のアミノ酸214~255である。特に好ましいCARは、ユニークな癌細胞表面受容体に特異的であり、in vivoで安定であり、そして低い免疫原性を有する、細胞外認識要素を含む。天然存在可溶性細胞シグナル分子からの誘導は、これらの目的を達成するのを補助する。

20

【0017】

[00034] 用語「CAR」は、細胞外認識ドメイン、膜貫通領域、および細胞内シグナル伝達ドメインを含有する組換え生体分子であるキメラ抗原受容体を指す。したがって、用語「抗原」は、抗体に結合する分子に限定されず、任意の受容体に特異的に結合可能な任意の分子を指す。したがって、「抗原」は、CARの認識ドメインを指す。細胞外認識ドメイン (細胞外ドメインとも称されるか、または単に該ドメインが含有する認識要素による) は、ターゲット細胞の細胞表面上に存在する分子に特異的に結合する認識要素を含む。膜貫通領域は、膜中にCARを係留する。細胞内シグナル伝達ドメインは、ヒトCD3複合体のゼータ鎖由来のシグナル伝達ドメインを含み、そして場合によって、1以上の共刺激シグナル伝達ドメインを含む。

30

【0018】

[00035] E13Y突然変異を含むIL13ドメイン (IL13 (E13Y)) およびCD3ゼータ鎖シグナル伝達ドメインを含有するCARは、本明細書において、「IL13」と称される。この用語には、IL13細胞外認識ドメイン (腫瘍細胞上のIL13R₂を特異的に認識するドメイン)、膜貫通領域、およびCD3ゼータ鎖細胞内シグナル伝達ドメインを含有する、任意のキメラ抗原受容体 (CAR) が含まれる。こうしたCARの限定されない例を実施例8~12に提供する。IL13 (E13Y) を含有し、そしてまた場合による共刺激細胞内ドメインCD28および4-1BBも含有するCARを、本明細書において、「IL13-CD28-41BB」と称する。

40

【0019】

[00036] 当業者は、IL13 (E13Y) をコードする任意のヌクレオチド配列もまたこの同じ目的に適しているであろうことを認識するであろう。IL13シグナル伝達ドメインの突然変異されていない配列もまた適している。天然配列に90%、95%、98%または99%同一性を持つ変異体を含む任意のIL13またはIL13 (E13Y) コード配列が本明細書において使用可能である。したがって、IL13R₂などのIL13受容体腫瘍抗原を特異的に認識するのに有用なこうした配列には、天然核酸にコードされるもの (その開示が本明細書に援用される、

50

Smernovら, Gene 155 : 277-281, 1995を参照されたい)、E13Y突然変異を欠く同じ核酸配列、これらの配列に95%、98%または99%相同である配列、こうした配列を含むが、また3'または5'端のさらなるヌクレオチド、例えば3、6、9、12またはそれより多いヌクレオチド、あるいは約12、20、50または100までのさらなるヌクレオチドなどの任意の数のさらなるヌクレオチドまたはコドンも含む、より長い配列、および遺伝暗号の縮重のためこれらの核酸と同じアミノ酸配列をコードする任意の配列が含まれる。特に、所望の宿主による発現のためにコドン最適化された(CO)配列は、本発明の一部と意図される。

【0020】

[00037] 本発明で用いられる場合、可溶性認識要素は、実施例1中のIL13(E13Y)コード配列に関して記載するような新規合成ポリペプチドに由来するか、あるいはファージディスプレイライブラリーまたは化学的に合成されたライブラリーなどのコンビナトリアルライブラリーのポリペプチドに由来する。好ましい可溶性認識要素は、ヒト起源のものであり、そしてしたがって、非免疫原性であるが、突然変異誘発を通じてアフィニティまたは特異性が調整されていてもよい。T細胞上で発現すると、可溶性認識要素は、T細胞活性化を生じる方式で、ターゲット細胞上のターゲット要素に結合可能である(例えば腫瘍細胞に結合するが、いかなる認識可能な度合いにも非ターゲット細胞には結合しない)。したがって、本発明に適した可溶性認識要素は、細胞外環境中で安定であり、非抗原性であり、そしてより選択性である可能性がより高く、そしてしたがって好ましいため、本発明のCARにおいて、ターゲット特異性に関して、抗体断片または細胞接着分子に勝る、特定の利点を有する。適切な可溶性受容体要素の例には、自己分泌およびパラ分泌増殖因子、ケモカイン、サイトカイン、ホルモン、および必要な特異性を示す操作された人工的小分子リガンドが含まれる。天然リガンド配列を操作して、特定のターゲット細胞に対する特異性を増加させてもよい。特定のCARで使用するための認識要素の選択は、ターゲット細胞の性質、および上に論じる特性によって支配される。本発明の1つの好ましい態様において、CARは、認識要素としてIL13の突然変異体(E13Y)を用いて、T細胞をIL13R₂発現腫瘍細胞に対して特異的に向けることによって、悪性神経膠腫、腎細胞癌腫および他の腫瘍によるIL13R₂の腫瘍に制限される発現を利用する。それに対する選択的認識要素が知られているかまたは操作可能である、受容体抗原または任意の特異的分子を細胞表面上で選択的に発現する、任意の多様な癌細胞タイプに特異的な、類似の認識要素を生成可能である。

【0021】

[00038] 本発明とともに使用するのに適した支持(膜貫通)領域の例には、免疫グロブリンの定常(Fc)領域、ヒトCD8、およびターゲット細胞へのアクセスおよび該細胞上の結合を改善するため、ターゲティング部分を細胞表面から離して移動させるように働く人工的リンカーが含まれる。好ましい支持領域は、IgG(例えばIgG₄)のFc領域である。適切な膜貫通ドメインの例には、白血球CDマーカーの膜貫通ドメイン、好ましくはCD4またはCD28のものが含まれる。細胞内受容体シグナル伝達ドメインの例には、T細胞抗原受容体複合体、好ましくはCD3のゼータ鎖が含まれるが、CARを膜に係留するのに十分な任意の膜貫通領域が使用可能である。当業者は、多くの膜タンパク質において膜貫通ドメインを生じる、多くの膜貫通領域および構造要素(親油性アミノ酸領域など)を知っており、そしてしたがって任意の好適な配列を置換可能である。CAR発現細胞の機能および活性を改善するのに適したT細胞共刺激シグナル伝達受容体には、限定されるわけではないが、CD28および(CD137)としても知られる4-1BB、ならびにOX-40が含まれる。

【0022】

[00039] CD28を介したシグナル伝達は、IL2産生および増殖に必要であるが、T細胞機能および活性を維持するのに主な役割は果たさない。4-1BB(CD28活性化後に発現される腫瘍壊死因子受容体ファミリーメンバー)およびOX-40は、T細胞の長期生存およびT細胞の集積を駆動するのに関与する。これらの受容体のリガンドは、典型的には、樹状細胞および活性化マクロファージなどのプロフェッショナル抗原提示細胞上で発現されるが、腫瘍細胞上では発現されない。CD4⁺ T細胞において、CD28および/または4-1BBシグナル伝

10

20

30

40

50

達ドメインを取り込むCARを発現させると、CD3 シグナル伝達ドメインのみを含有するCARを発現するものに比較して、これらの細胞の活性および抗腫瘍強度が増進される。好ましくは、本発明のCARは、CD28および4-1BBシグナル伝達ドメインの両方を含有する。

【0023】

[00040] CARが腫瘍細胞をターゲティングするために、CARは、腫瘍表面マーカーに結合し、そして好ましくはユニークな腫瘍表面分子に特異的に結合する、細胞外結合分子を含有する。いくつかの癌は、免疫系の分子を発現するかまたは過剰発現する。神経膠腫は例えばIL13受容体を発現し、そして特に、高アフィニティIL13受容体を発現する。しかし、免疫系によって用いられるIL13受容体3分子複合体（IL13R 1、IL4R、およびcからなる）とは異なり、神経膠腫細胞は、IL4R または c44に対する必要性とは独立に、IL13に結合可能なユニークなIL13R 2鎖を過剰発現する。その相同体であるIL4と同様、IL13は、CNSの外部で、多面的免疫制御活性を有する。IL13およびIL4はどちらも、Bリンパ球によるIgE産生を刺激し、そしてマクロファージによる炎症促進性サイトカイン産生を抑制する。

10

【0024】

[00041] 放射標識IL13でのオートラジオグラフィーを用いる詳細な研究によって、研究したほとんどすべての悪性神経膠腫組織上に豊富なIL13結合があることが示された。この結合は、腫瘍切片内で、そして単細胞分析において、非常に均質である。しかし、IL13R 2 mRNAに特異的な分子プローブ分析は、正常な脳要素による神経膠腫特異的受容体の発現を検出せず、そして放射標識IL13でのオートラジオグラフィーもまた、正常CNSにおける特異的IL13結合を検出不能であった。これらの研究によって、共有されるIL13R 1/IL4 / c受容体は、正常CNSにおいて、検出可能には発現されないことが示唆される。したがって、IL13R 2は神経膠腫の非常に特異的な細胞表面ターゲットであり、そして本発明に非常に適したターゲットである。当業者は、ターゲティングしようとする細胞上に発現されるかまたは過剰発現され、そして好ましくは他の細胞上で発現されないかまたははるかに低い度合いで発現される、CARの他の適切なターゲットを知っている。本発明のCARでターゲティングするのに適した腫瘍特異的ターゲットの別の例は、IL3受容体（IL3R；例えば急性骨髄性白血病（AML）細胞上で発現される）である。

20

【0025】

[00042] しかし、広く発現されるIL13R 1/IL4 / c受容体複合体に対する、IL-13に基づく細胞毒素の結合は、CNS外部の正常組織に対して、望ましくない毒性を仲介する潜在能力を有し、そしてしたがってこれらの剤の全身投与を制限する。IL13アルファらせんAにおけるアミノ酸13での天然グルタミン酸に対するチロシンのアミノ酸置換は、IL13のIL13R 1/IL4 / c受容体に対するアフィニティを選択的に減少させる。しかし、この突然変異体（IL13（E13Y）と称される）のIL13R 2に対する結合は、野生型IL13に比較して50倍増加した。したがって、この最小限に改変されたIL13類似体は、神経膠腫細胞に対するIL13の特異性およびアフィニティを同時に増加させる。したがって、本発明の好ましい態様は、アミノ酸13での突然変異を含有するIL13を使用する。天然配列を有するIL13もまた、本発明で使用可能であるが、腫瘍塊内に直接注射することによるなど、修飾T細胞を局所的に投与しようとする状況において、特に有用でありうる。

30

40

【0026】

[00043] IL13R 2を発現する腫瘍を特異的にターゲティングするためのCARの好ましいタイプは、CD4膜貫通ドメインおよび細胞質CD3 シグナル伝達配列に融合されたヒトIgG₄ ヒンジ-Fcドメイン支持領域に連結され、IL13タンパク質がタンパク質のアミノ酸13で天然存在グルタミン酸に対するチロシンの置換を含有する、細胞外IL13突然変異体サイトカイン（本明細書において、IL13（E13Y）と称される）で構成される。図1、左側を参照されたい。このCARは、本明細書において、「IL13 CAR」と称される。このCARがまた、CD28および4-1BBシグナル伝達ドメインも含有する場合、該CARはIL13-CD28-41BB と称される。図1、右側を参照されたい。

【0027】

50

[00044] 本発明記載の免疫受容体を当業者に知られる任意の手段によって産生してもよいが、好ましくは、組換えDNA技術を用いて産生する。好適であるように、当該技術分野に知られる分子クローニングの標準的技術（ゲノムライブラリースクリーニング、PCR、プライマー補助連結、部位特異的突然変異誘発等）によって、キメラ受容体のいくつかの領域をコードする核酸を調製し、そして組み立てて完全コード配列にしてもよい。好ましくは、生じたコード領域を発現ベクター内に挿入して、そしてこれを用いて適切な発現宿主細胞株、好ましくはTリンパ球細胞株、そして最も好ましくは自己Tリンパ球細胞株を形質転換する。

【0028】

[00045] 簡潔には、既知の方法を用いて、以下のように、IL13 CARを構築してもよい。既知のIL13 mRNA配列に基づくプライマーを用いたPCRによって、IL13突然変異体DNA IL13 (E13Y) を合成してもよい。完全IL13遺伝子配列は、その開示が本明細書に援用される、Smernovら, "Tandem arrangement of human genes for interleukin-4 and interleukin-13: resemblance in their organization." *Gene* 155:277-281, 1995に報告される。以下の表1、および図2に示す、順方向プライマーIL13P1、ならびに4つの逆方向プライマー、IL13P2、IL13P3、IL13P4、およびIL13P5を用いて、IL13 (E13Y) の新規合成を行った。次いで、望ましい場合、このIL13突然変異体配列が5'リーダー配列を含有するように、これを修飾してもよい。ヒトIgG₄-CD4膜貫通 (IgG₄-CD4_{tm}) などの膜貫通アンカーおよびCD3ゼータカイン (CD3 ζ) 細胞質配列もまた、PCR融合技術または任意の好適な方法によって、3'端に付加してもよい。本発明の例として、完全IL13 配列を図3に提供する。同じ方法を用い、異なる認識要素を用いて、同等の分子を構築してもよい。次いで、最終構築物を任意の適切なプラスミド発現ベクター内に連結してもよい。好ましいプラスミド発現ベクターはpMG (Invitrogen™より入手可能) である。

【0029】

[00046] IL13 (E13Y) 含有CARは、MHC独立方式で、T細胞が、IL13受容体 2 (本明細書においてIL13R 2と称される) を発現する神経膠腫細胞、腎癌腫細胞およびIL13R 2を発現する任意の癌をターゲティングするように特異的に導く。抗腫瘍CD4⁺ T細胞エフェクターを生成して、CD3 ζ 、CD28および4-1BB由来のシグナル伝達ドメインを含有するCARを用いて、腫瘍細胞を認識するように再指示した。非ウイルスプラスミドベクター (pEK) およびエレクトロポレーション法 (Amaxa Biosystems™のNucleofector Technology™、メリーランド州ガイザーズバーグ) を用いて、IL13 またはIL13-CD28-41BB CARいずれかをヒト初代T細胞にトランスフェクションした。いずれかのCAR (IL13 またはIL13-CD28-41BB) を発現するCD4⁺ T細胞を、エフェクターに関連するシグナル伝達経路を活性化し、サイトカインを産生し、ターゲット細胞を溶解し、そしてin vivo腫瘍増殖を制御する潜在能力に関して比較した。結果によって、IL13 にCD28および4-1BBシグナル伝達ドメインを付加すると、CARを発現しているCD4⁺ T細胞の抗腫瘍エフェクター機能が増進することが示された。IL13-CD28-41BB 免疫受容体を発現しているエフェクターT細胞は、共刺激が制限されていると予期される腫瘍環境において、JNK、p38およびAKTキナーゼを通じた共刺激シグナルを仲介することが可能であった。ヒト初代CD4⁺ T細胞における強制的な共刺激は、これらの細胞が、in vitroおよびin vivoの両方で、持続された抗腫瘍有効性と関連する方式で、Th₁表現型に極性化することを支持する。CD4⁺ T細胞におけるCARの下流のエフェクターシグナルが立証された。これらのエフェクターシグナルは、in vitroおよびin vivoの両方で、観察されるTh₁バイアスおよび抗腫瘍エフェクター活性の延長と関連した。

【0030】

[00047] CD3 シグナル伝達は単独でERK活性化を駆動する。これは、ERK活性が、IL13 発現対照に比較して、IL13-CD28-41BB 発現細胞では増進されない (どちらのCARもCD3 シグナル伝達ドメインを含有する) という本明細書の知見とよく関連する。CD28でのCD3の共刺激は、JNKおよびp38の活性化を駆動し; CD3の4-1BB仲介性共刺激もまた、JNK活性化を伴う。JNKおよびp38はどちらも、IL2、IFN- γ およびTNF- α の産生を含めて、CD4⁺ T

細胞によるTh₁極性化免疫反応を駆動する際に主な役割を果たす。CD28および4-1BBの両方の別の下流シグナル伝達構成要素であるAKTキナーゼの活性化もまた、IL2およびINF- γ の上方制御に関与するが、Th₂サイトカインの上方制御には関与しない。IL13-CD28-41BB発現T細胞における、顕著なTh₁表現型（以下の実施例を参照されたい）と、増進されたJNKおよびp38 MAPキナーゼ誘導ならびに持続されたATK活性化（以下の実施例を参照されたい）が関連していることから、CD28および4-1BBシグナル伝達部分が、このキメラ受容体において、CD3シグナル伝達ドメインとともに働いて、これらの共刺激受容体と通常関連する下流シグナル伝達経路に伝達する能力を保持することが強く示される。共刺激ドメインシグナルによって駆動される、活性化されたTh₁表現型がどのくらい強いものでありうるかに関わらず、腫瘍微小環境内の機能する抗腫瘍エフェクターCD4⁺T細胞の保持およびリサイクリングは、抗腫瘍強度の達成を大いに補助する。

10

【0031】

【00048】 CD3 仲介性活性化のみに比較して、IL13-CD28-41BB CARを発現しているCD4⁺エフェクターT細胞は、増大した/維持されたMAPKおよびAKT活性、上方制御されたTh₁サイトカイン産生、ならびに腫瘍ターゲットに対する増大した細胞溶解強度を示した。さらに、腫瘍での再発性刺激に際して、IL13-CD28-41BB⁺CD4⁺細胞は、その溶解機能を保持/リサイクリングする一方、CD13⁺CD4⁺細胞は有効であるが、まもなく反応不顕性となり/消耗した。これらのin vitro観察は、共刺激CARを発現しているex vivo拡大されたCD4⁺T細胞を養子導入することによって仲介される免疫不全マウスにおいて確立された同所性CNS神経腫瘍異種移植片のin vivo制御増進と関連した。したがって、これらの研究は、CD3シグナル伝達事象と共刺激を統合すると、腫瘍微小環境において、機能維持のため、CD4⁺抗腫瘍エフェクター細胞が完全に活性化される効果があることを立証する。

20

【0032】

【00049】 AKTを通じて仲介されるCD28および4-1BB共刺激シグナルは、抗アポトーシスタンパク質の上方制御を通じて、活性化が誘導する細胞死を阻害しうる。IL13-CD28-41BBを発現するT細胞において見られるAKT活性化増進は、in vitroでの腫瘍特異的活性のリサイクリングの増進、ならびにin vivoでの腫瘍増殖制御の延長と関連した。したがって、共刺激CARは、養子療法プロトコルの臨床的有効性を有意に改善しうる方式で、抗腫瘍活性の期間および/または保持を増進しうる。

30

【0033】

【00050】 それ自体の共刺激シグナル伝達ドメインを含有する腫瘍特異的CARは、これらの共刺激リガンドを発現しない、より広範囲の多様な固形腫瘍に対して、Tリンパ球を活性化するための新規アプローチを提供する。例えば、IL13R₂は、乳癌、頭部および頸部癌、腎臓癌、卵巣癌、カポジ肉腫ならびに神経膠腫を含む、多様なヒト腫瘍上の過剰発現された細胞表面ターゲットとして同定されてきている。したがって、IL13ゼータカインおよびCD28および4-1BBを含有するCARを発現しているT細胞を用いて、神経膠芽腫（神経膠腫）および表面上にIL13ターゲットを有する、上に列挙するものなどの任意の癌を治療してもよい。

40

【0034】

【00051】 本発明は、細胞表面に発現された腫瘍ターゲット、例えば抗原に結合する部分を取り込むことによって、任意の腫瘍に向けられることも可能な、CD3、CD28および4-1BB（および/または他の共刺激シグナル伝達ドメイン）を含有するCARを特に意図する。他の腫瘍特異的ターゲット結合剤の例には、Her2/Neu（ErbB-2）、 α 3インテグリン、CD20、CD19、EGFRVIII、IL3R（CD123）、LEA、CD44v6、またはCAR上に含有される共刺激シグナル伝達ドメインを発現しない腫瘍、好ましくは固形腫瘍に特異的な任意のターゲットが含まれる。したがって、この方式で、ヒト腫瘍をターゲティングするための構築物には、Her2/Neu（ErbB-2）、 α 3インテグリン、CD20、CD19、EGFRVIII、IL3R（CD123）、LEA、CD44v6、あるいはキメラT細胞受容体による結合にアクセス可能な任意の特異的腫瘍抗原または他の細胞表面構成要素に対する特異性を持つものが含まれてもよい。当業

50

者は、これらの特異的腫瘍抗原および特定の腫瘍をターゲティングするのに利用可能な受容体を知っており、そしてこの方式でターゲティング可能な腫瘍を知っている。

【0035】

[00052] CD4⁺ およびCD8⁺ T細胞エフェクター機能はどちらも、これらの受容体を介して誘発可能であり、したがって、これらのT細胞タイプはどちらも、本発明での使用が意図される。本発明のIL13 CARを発現しているCD8⁺ T細胞を用いて、これらの細胞の他の機能の中でもとりわけ、ターゲット細胞を溶解し、そしてターゲット細胞の存在下で、IL2を産生してもよい。CD4⁺ およびCD8⁺ T細胞のいずれかまたは両方における適切な共刺激CARの発現を用いて、したがって増進されたおよび/または長期の生存および抗腫瘍活性を示すプロフェッショナルヘルパーおよびキラーT細胞のいずれかまたは両方からなる、養子免疫療法のための細胞の最も有効な集団を提供する。

10

【0036】

[00053] 本明細書に引用されるすべての参考文献は、その全体が本明細書に援用される。以下の実施例は、本発明の1つの態様を例示する目的のみのためのものである。

【実施例】

【0037】

実施例1. 初代ヒトTリンパ球におけるIL13R 2特異的キメラ受容体のトランスフェクションおよび発現

[00054] 神経膠腫腫瘍抗原IL13R 2との相互作用に際して、T細胞受容体 (TCR) カスケードおよび共刺激様シグナル伝達カスケードの両方を関与させるため、CD28および4-1BB由来のシグナル伝達要素をIL13ゼータカイン (IL13 ζ) キメラ抗原受容体 (CAR) 内に組み込んだ。好ましいIL13 ζ CARは、ヒトCD4の膜貫通ドメインを介して、ヒト細胞質CD3に連結された、細胞外IL13 (E13Y) 突然変異タンパク質 (mutein)、ヒトIgG₄ ヒンジ-Fcで構成される。図1を参照されたい。プライマーIL13P1、IL13P2、IL13P3、IL13P4、およびIL13P5を用いて、IL13 (E13Y) コード配列の新規合成を行った。以下の表1および図2を参照されたい。最終配列 (417 bp) をEcoRI-BamHIで末端消化し、そして連結312#3としてプラスミドpSK (Staratagene™) 内に連結した。プライマーIL13 312#3 mut5-3およびIL13 312#3 mut3-5、ならびにテンプレートとして連結312#3を用いて、連結312#3を突然変異誘発し (Stratagene™キット、製造者の指示による)、欠失されたヌクレオチドを修復して、連結348#1 (IL13 ζ / pSK) を形成した。

20

30

【0038】

[00055] 標準的PCRプライス重複伸長によって、IL13 (E13Y) の5' 端に、ヒトGM-CSFアルファ鎖シグナルペプチド (hsp) コード配列を融合させた。プライマー5' : 19hsp5' および3' : hsp-IL13FRを用いて、テンプレート連結301#10 (hsp / pSK) からhsp配列を得た。表Iを参照されたい。プライマー5' : hsp-IL13FFおよび3' : IL13-IgG4FR、ならびにテンプレートとして連結312#3を用いて、IL13配列を得た。表Iを参照されたい。

【0039】

[00056] 同じ方法を用いて、IgG4 Fc、CD4膜貫通領域およびCD3 細胞質領域をコードする配列 (IgG4m: ゼータ; 図3の完全IL13 ζ 配列のヌクレオチド421~1512 (SEQ ID NO: 12)) を、ヒト・シグナルペプチド-IL13融合配列の3' 端に融合させた。プライマー5' : IL13-IgG4FFおよび3' : ゼータN3' (表1を参照されたい) を用い、テンプレートとして配列R9.10 (IgG4mゼータ / pSK) を用いて、IgG4m: ゼータ配列を得た。テンプレートとしてそれぞれの配列を、そしてプライマー5' : 19hsp5' および3' : ゼータN3' (表1を参照されたい) を用いて、1119 bpのIgG4m: ゼータ配列をhsp-IL13融合配列に融合させて、1522 bp hsp-IL13-IgG4m: ゼータ融合配列を生じた。末端をXbaI-NotIで消化し、そして連結351#7としてpSK内に連結して、プラスミドIL13 ζ / pSK (4464 bp) を生成した (すなわち図3のpSKクロニングベクター内のIL13 ζ 配列)。

40

【0040】

[00057] IL13 ζ / pSKをXbaI-NotIで消化し、そしてクレノウで平滑末端を生成し、そして生じた断片をプラスミドpMG⁺ Pac (Invitrogen™) (まず、SgrAIで開環し、クレノ

50

ウで平滑化し、そしてSAPで脱リン酸化することによって調製)内に連結して、プラスミドIL13 / pMGを生じることによって、IL13 コード配列を含有する発現ベクターを生成した。NotI-NheIで消化することによって、IL13 / pMGのハイグロマイシン耐性領域を除去し、そしてNotI-NheIでの消化によってプラスミドCE7R / HyTK-pMGから得られた選択 / 自殺融合物HyTKによって置換して、発現ベクターIL13 / HyTK-pMG (6785 bp)を生成した。このプラスミドは、塩基6~549にヒト伸長因子-1 プロモーター (hEF1p)、塩基690~2183にIL13 コード配列、塩基2230~2498にシミアンウイルス40後期ポリアデニル化シグナル (後期SV40pAN)、塩基2499~3245に最小大腸菌 (E. coli) 複製起点 (Ori ColE1)、塩基3246~3432に合成ポリAおよび休止部位 (SpAN)、塩基3453~4075に極初期CMVエンハンサー / プロモーター (hCMV-1Aprom)、塩基4244~6319にハイグロマイシン耐性チミジンキナーゼ・コード領域融合物 (HyTK)、ならびに塩基6320~6618にウシ成長ホルモン・ポリアデニル化シグナルおよび転写休止 (BGh pAn)を含む。該プラスミドは塩基3233~3240にPacI直鎖化部位を有する。hEF1p、後期SV40pAN、ori ColE1、SpAn、およびhCMV-1Aprom要素すべてを、親プラスミドpMG^ΔPacから得た。要約すると、IL13 / HyTK-pMGは修飾されたpMG主鎖であり、hEF1プロモーターからIL13 遺伝子を発現し、そしてhCMV-1AプロモーターからHyTK融合物を生成する。プラスミドIL13 / HyTK-pMGのマップを図4に示す。プラスミドの全長核酸配列を図5A~図5Lに示す (SEQ ID NO: 13および14)。IL13 挿入物の配列もまた、図3に示す (SEQ ID NO: 5および6)。

【0041】

[00058] 抗ヒトCD3 モノクローナル抗体クローン8D3 (BD PharMingenTM、カリフォルニア州サンディエゴ)を用いて、グリコシル化阻害剤のツニカマイシンの存在下または非存在下で共培養したJurkat T細胞安定トランスフェクタント由来の全細胞溶解物を探査するウェスタンブロットによって、発現された構築物の完全性の評価を確認した。IL13 / HyTK-pMG発現ベクターをJurkat T細胞にエレクトロポレーションした後、陽性トランスフェクタントを選択しそして拡大することによって、Jurkat T細胞安定トランスフェクタント (Jurkat-IL13-pMGバルク株)を得た。24ウェルプレートのウェルあたり、Jurkat-IL13-pMGバルク株由来の 2×10^6 細胞を、5 μ g/mL、10 μ g/mL、または20 μ g/mLのツニカマイシンを伴いまたは伴わずに、プレティングした。プレートを37 °Cで22時間インキュベーションした。各ウェルから細胞を採取し、そして各試料をPBSで洗浄し、そしてプロテアーゼ阻害剤 (1錠剤 / 10 mL完全プロテアーゼ阻害剤カクテル)を含有する50 μ L RIPA緩衝液 (PBS、1%NP40、0.5%デオキシコール酸ナトリウム、0.1%SDS)中に再懸濁した。試料を氷上で1時間インキュベーションした後、14,000 rpm、4 °Cで20分間遠心分離した。遠心分離した溶解物上清試料を採取して、そして還元条件下で、1:3体積の試料緩衝液中で煮沸し、次いで12%アクリルアミドゲル上のSDS-PAGE電気泳動に供した。ニトロセルロースに転写した後、T-TBS (Tris緩衝生理食塩水pH8.0中の0.1%Tween20TM)中、4%脱脂粉乳を含有するBlottoTM溶液中で、膜を1時間ブロッキングした。次いで、0.5 μ g/mLの濃度の一次マウス抗ヒトCD3 モノクローナル抗体と膜を1時間インキュベーションし、洗浄し、そして次いで、1:3000希釈 (BlottoTM溶液中)のヤギ抗マウスIgGアルカリホスファターゼ・コンジュゲート化二次抗体 (Bio-RadTMImmunoStarTMキット)と1時間インキュベーションした。現像前に、膜をT-TBS中でさらに4回洗浄し、そして次いで、3 mLホスファターゼ基質溶液 (Bio-RadTMImmunoStarTMキット)と、室温で5分間インキュベーションした。次いで、膜をプラスチック現像ホルダー (TropixTM)で覆い、そしてX線フィルムに曝露させた。野生型ヒトIL13の既知のグリコシル化パターンと一致して、発現されたIL13 (E13Y) ゼータカインの電気泳動移動度は、非常にグリコシル化されたタンパク質を示し、これは、ツニカマイシンの存在下で発現された際、およそ54 kDaのアミノ酸主鎖に減少する。

【0042】

[00059] pcDNA3.1 (+) (InvitrogenTM)内にクローニングされた、選択 / 自殺融合遺伝子HyTK、新規合成された自己切断可能口蹄疫2Aペプチド (tctagaggag catgccagct gt tgaatttt gaccttctta agcttgcggg agacgtcgag tccaaccctg ggccc; SEQ ID NO: 49)、お

10

20

30

40

50

よびIL13 分子 (図3) をコードするHyTK-2A-IL13 -pcDNA3.1 (+) 構築物で、共刺激CARの構築を開始した。メトトレキサート (MTX) に対する耐性を与えるため、HyTK遺伝子を、PCRによって、ジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR) 遺伝子 (T細胞受容体のCD3鎖を認識するOKT3抗体で、3日間刺激した末梢血単核細胞 (PBMC) から得られるcDNAライブラリーより増幅され、QuikChange™部位特異的突然変異誘発キット (Stratagene™) を用いて生成されたL22FおよびF33S突然変異を含有した) と交換した。次いで、生じたDHFRdm-2A-IL13 構築物をNheIおよびNotIで切除し、溶出し、そして同様に消化した哺乳動物プラスミド発現ベクター-pEK内に連結した。該pEKベクターは、元来、CMVプロモーターおよびアンピシリン遺伝子を除去し、そしてこれらを、pMG (Invitrogen™) 由来のヒト伸長因子1プロモーター (EF1p) 遺伝子で置換することによってpcDNA3.1 (+) から修飾されており、プラスミドDHFRdm-2A-IL13 -pEK (pJ01275-9) が生成された。CD28 cDNAをInvitrogen™より購入し、そしてOKT3抗体で3日間刺激しておいた末梢血単核細胞 (PBMC) に由来するcDNAライブラリーから4-1BBコード領域をPCRによって増幅した (プライマー-41BB5' および41BB3' を用いる、表1を参照されたい)。

10

20

30

40

50

【0043】

[00060] CD28および4-1BBの細胞内シグナル伝達領域 (それぞれ、天然CD28および4-1BB配列のアミノ酸180~220および214~255) を、PCR (表Iに提供するプライマーCD4-CD28F、CD28-4-1-BBR、CD28-4-1bbF、および41bb93) によって、CD4膜貫通および細胞質CD3 (天然CD3 のアミノ酸52~164) 領域間の接合部に融合させた。IL13 (図6A) およびIL13-CD28-41BB (図6B) 直鎖プラスミド構築物例の略図を提供する図6を参照されたい。ヒトIL13突然変異タンパク質 (E13Y)、ヒトIgG₄ ヒンジ-Fc (IgG₄)、ヒトCD4膜貫通 (tm)、ヒトCD3 細胞質 (ゼータ)、CD28細胞質 (28c) および4-1BB細胞質 (BBc) セグメントを図6に示す。異なるPCR断片を挿入するのに用いた制限酵素部位もまた、予測される塩基対位置を括弧内に提供して、図6に示す (NheI、KpnI、NsiI、NotI)。図6Aに示すように、CAR、IL13-CD28-41BB は、CD3 のものに融合したCD28および4-1BBの細胞質ドメインを含む。図6Aに示す各構築物は、IL13R 2特異的となるE13Y突然変異を含有するhuIL13ドメイン、ヒトIgG₄ ヒンジ-Fcドメイン (hu₄Fc)、ヒトCD4膜貫通 (huCD4tm) ドメイン、およびヒトCD3 細胞質 (huCD3 cyt) ドメインを有し; IL13-CD28-41BB CARは、CD4膜貫通およびCD3 細胞質ドメイン間に挿入されたCD28および4-1BBのシグナル伝達 (sig) ドメインを有する。プラスミドの構築に用い、そして発現分析に用いたPCRプライマーを表Iに提供する。

【0044】

[00061] 製造者のプロトコル (Miltenyi Biotec™ Inc.) を用いたMACS™分離によって得たCD4⁺ T細胞のバルク培養を、10% FCS、1% L-グルタミン、2.5% HEPES緩衝液、50 U/mL rhIL2、10 ng/mL rhIL15および0.1 μM MTXを含むRPMI培地中で維持した。ヒトT細胞の単離、活性化、およびエレクトロポレーションを、以下のように行った。同意を得た健康なドナーから得たヘパリン処理末梢血のFicoll-Paque (Pharmacia Biotec™) 上の密度勾配遠心分離によってPBMCを単離した。Amata™ヒトT細胞Nucleofectorキット (Amata™ Inc.) を用いて、ヌクレオフェクション溶液中に細胞を再懸濁した。プラスミド (1 μg / 5 × 10⁶ 細胞) を添加し、そしてAmata™Nucleofector 1 (Amata™ Inc.)、プログラムU-14を用いて細胞にエレクトロポレーションした。次いで、10% FCSを含むフェノールレッド不含培地中に細胞を採取し、一晩休ませ、そして次いで、10% FCSを含むRPMI中、30 ng/mL OKT3および5 ng/mL rhIL15で3日間刺激した。0.1 μM MTXおよび5 ng/mL rhIL15を含有する培地を用いて、成功したトランスフェクタントを選択した。

【0045】

[00062] CD3 に特異的な抗体を用いた免疫プロットング分析によって、CARの発現を評価した。既知の方法および商業的に入手可能なマウス抗ヒトCD3 特異的モノクローナル抗体、1D3を用いて、バルクMTX選択CD4⁺ T細胞 (偽、IL13 、およびIL13-CD28-41BBトランスフェクション) の全細胞溶解物を、CAR発現 (キメラCD3) に関して試験した。こうした非常にグリコシル化されたタンパク質で予期されるように、予期される分子量

内の多数のバンドが観察された。図7を参照されたい。

【 0 0 4 6 】

[00063] フローサイトメトリーを用いて、膜結合IL13を検出することによって、CD4⁺ T細胞表面上に発現されるIL13 またはIL13-CD28-41BB CARのレベルを調べた。図8を参照されたい。IL13 またはIL13-CD28-41BB CARでトランスフェクションしたPBMCを、MTX (0.1 μM) の選択的濃度下で平均10週間増殖させ、MACSTM分離によって、CD4⁺ 細胞に関して磁氣的にソーティングし、そして示すように、IL13含有CAR (Y軸)、およびCD4、CD8、TCR / 、またはCD28 (X軸) の表面発現に関して調べた。アイソタイプマッチした蛍光mAbを用いて、象限を確立した。これらの遺伝子修飾されたT細胞集団は、CD4⁺ 細胞の磁気ビーズに基づくMACSTM精製後に予期されるように、主にCD4⁺ およびCD8⁺ であるだけでなく、高いそして同等のレベルの内因性TCR、および低いか検出不能なレベルの共刺激CD28も発現した。図8を参照されたい。

10

【 0 0 4 7 】

[00064] また、これらの研究で用いたIL13R²⁺ ヒト神経膠芽腫腫瘍細胞ターゲット株、U87もまた表現型決定して、これらの細胞が表面上にMHCクラスIおよびクラスIIを発現し、そして共刺激リガンドCD80/86または4-1BBLを発現しないことを確認した。フローサイトメトリーによって分析されるような、U87神経膠腫ターゲット細胞上のアイソタイプ対照 (白抜きのヒストグラム) に比較して、示すようなMHC分子HLA-A2およびHLA-DR、IL13R、ならびに共刺激分子CD80、CD86、およびCD137-L (4-1BBL) (黒塗りのヒストグラム) の表面染色を示す、図9を参照されたい。

20

【 0 0 4 8 】

[00065] フローサイトメトリー分析は、PEコンジュゲート化またはFITCコンジュゲート化抗ヒトIL13モノクローナル抗体 (BD PharMingenTM) での染色による、IL13-CAR構築物の細胞表面発現を評価する工程を伴った。FITCコンジュゲート化抗CD4、抗CD8、および抗TCR / 抗体またはPEコンジュゲート化抗CD28抗体 (BD PharMingenTM) を用いて、初代ヒトT細胞トランスフェクタントの細胞表面表現型をアッセイした。FITCおよびPEコンジュゲート化アイソタイプ対照 (BD PharMingenTM) に比較して、FITCコンジュゲート化抗HLA-A2、抗HLA-DR、および抗CD80抗体、またはPEコンジュゲート化抗CD86および抗CD137-L (4-1BBL) 抗体を用いて、ヒトU87神経膠腫細胞の細胞表面表現型をアッセイした。ヤギ抗ヒトIL13R² (R&D SystemsTM)、その後、FITCコンジュゲート化マウス抗ヤギIgG (Jackson ImmunoResearchTM) を用いて、IL13R²発現をアッセイした。

30

【 0 0 4 9 】

表I. CAR構築のためのPCRプライマー

【 0 0 5 0 】

【表1】

プライマー名	プライマー配列 (5'-3')	SEQ ID NO
IL3P1	TATGAATTCATGGCGCTTTTGTGACCACGGTCATTGCTCTCACTTGCCTT GGCGGCTTTGCCTCCCCAGGCCCTGTGCCTCCCTCTACAGCCCTCAGGTA C	17
IL3P2	GTTGATGCTCCATACCATGCTGCCATTGCAGAGCGGAGCCTTCTGGTTCT GGGTGATGTTGACCAGCTCCTCAATGAGGTACCTGAGGGCTGTAGAGGGA G	18
IL3P3	CTCTGGGTCTTCTCGATGGCACTGCAGCCTGACACGTTGATCAGGGATTC CAGGGCTGCACAGTACATGCCAGCTGTCAGGTTGATGCTCCATACCATGC	19
IL3P4	CCTCGATTTTGGTGTCTCGGACATGCAAGCTGGAAAAGTCCAGCTGAG ACCTTGTGCGGGCAGAATCCGCTCAGCATCCTCTGGGTCTTCTCGATGGC	20
IL3P5	TCGGATCCTCAGTTGAACCGTCCCTCGCGAAAAAGTTTCTTTAAATGTAA GAGCAGGTCCTTTACAACTGGGCCACCTCGATTTTGGTGTCTCGG	21
IL13 312#3 mut5-3	CAACCTGACAGCTGGCATGTACTGTGCAGCCCTGGAATC	22
IL13 312#3 mut3-5	GTTGGACTGTCGACCGTACATGACACGTCGGGACCTTAG	23
5':19hsp5'	ATCTCTAGAGCCGCCACCATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTC	24
3': hsp-IL13FR	GAGGGAGGCACAGGGCCTGGGATCAGGAGGAATG	25
5': hsp-IL13FF	CATTCTCCTGATCCCAGGCCCTGTGCCTCCCTC	26
3': IL13-IgG4FR	GGGACCATATTTGGACTCGTTGAACCGTCCCTCGC	27
5': IL13-IgG4FF	GCGAGGGACGGTTCAACGAGTCCAAATATGGTCCC	28
3': ゼータN3'	ATGCGGCCGCTCAGCGAGGGGGCAGG	29
41BB5'	ATCGAATTCGCCGCCACCATGGGAAACAGCTGTTACAAC	30
41BB3'	GATAAGCTTATCGATTACACACATCCTCCTTCAGTT	31
CD4-CD28F	CATTGGGCTAGGCATCTTCTTCAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTC	32
CD28-4-1BBR	GTTTCTTTCTGCCCCGTTTGCCACCTCCGGAGCGATAGGCTGCGAAG	33
CD28-4-1BBF	CTTCGCAGCCTATCGCTCCGGAGGTGGCAAACGGGGCAGAAAGAAAC	34
4-1BB93'	GTTGCGGCCGCTCACAGTTCACATCCTCCTTCTTCTTC	35

【0051】

実施例2. IL13-CD28-41BB による持続AKTシグナル伝達でのJNKおよびp38 MAPKシグナル伝達の増強

[00066] 補助受容体CD28または4-1BBを伴うTCR-CD3複合体の会合によって刺激されるT細胞は、AKT、ならびにマイトジェン活性化プロテインキナーゼ (MAPK) を通じてシグナルを駆動することが知られる。共刺激CARがこれらの下流エフェクター経路に影響を及ぼ

10

20

30

40

50

す能力を調べるため、*in vitro*キナーゼアッセイを用いて、U87ターゲット細胞の会合後、IL13 およびIL13-CD28-41BB 発現CD4⁺ T細胞において、AKTおよびMAPKファミリーメンバーERK、JNKおよびp38の活性を評価し、そして比較した。ヒト神経膠腫株U87をATCC (メリーランド州ロックビル) から得た。すべての腫瘍株は接着性であり、そして10%熱不活化FCS、25 mM HEPES、および2 mM L-グルタミンを補ったDMEM (Irvine ScientificTM) 中で増殖させた。IL13 またはIL13-CD28-41BB CARを発現しているCD4⁺ T細胞を、アッセイ前に、図10に示す時間、U87神経膠腫細胞とインキュベーションした。

【0052】

[00067] IL-13 またはIL13-CD28-41BB を発現しているCD4⁺ T細胞を腫瘍ターゲット細胞で最長48時間 (図10A) または72時間 (図10B) 刺激した後、JNK、p38およびAKT総タンパク質基質 (すなわち、それぞれ、cJun、ATF2、およびGSK3) およびリン酸化基質 (それぞれ、P-cJun、P-ATF2、およびP-GSK3) レベルをウェスタン免疫プロットによって測定した。キナーゼ活性の測定値としての各基質のリン酸化の倍増加を図10において各群の下部に示す。

10

【0053】

[00068] Hibiら, "Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain." *Genes Dev.* 7: 2135-2148, 1993を修飾した方法を用いて、非放射性固体状態キナーゼアッセイを行った。穏やかな遠心分離 (1000 rpm、<3分間) によって、ターゲット細胞から分離されているT細胞溶解物を用いて、ERK1/2、JNK、p38、およびAKTに特異的な抗体 (Cell Signaling Technology Inc.TM) を用いて、選択されるキナーゼを4 で一晩免疫沈降させた。免疫沈降した複合体を、溶解緩衝液 (1%NP40、0.1%SDS、および0.5%デオキシコール酸ナトリウムを含むPBS) およびキナーゼ緩衝液 (10 mM MgCl₂および2 mM EGTAを含有する25 mM Tris、pH7.5) 中で、免疫沈降した複合体を洗浄し、そして10 μM ATPの存在下で、1 μgの基質を用いて、30 で30分間アッセイを行った。

20

【0054】

[00069] グルタチオンSトランスフェラーゼ (GST) 融合タンパク質: GST-ELK、GST-ATF2およびGST-GSK3 (Cell Signaling TechnologyTM Inc.)、およびGST-cJun (1-79) (Changら, *Cell* 124: 601-613, 2006に記載されるとおり) を、それぞれ、ERK、p38、AKT、およびJNKキナーゼアッセイの基質として用いた。標準法にしたがって、生じた産物を12%NuPAGETM (InvitrogenTM) 中に溶解し、そしてXcell IIプロットモジュールTM (InvitrogenTM) を用いて、ニトロセルロース膜にトランスファーした。プロットを、ホスホ-ELK、ATF2、cJunおよびGSK3 に対する抗体 (Cell Signaling TechnologyTM Inc.) で探査して、リン酸化GST融合タンパク質を検出し、そしてGSTに対する抗体 (BD PharMingenTM) で探査して、基質総量を検出した。次いで、免疫プロットをIRDye 680コンジュゲート化ウサギまたはIRDye800コンジュゲート化マウス免疫グロブリン特異的抗体 (LI-CORTM) とインキュベーションした。プロットを前処理し、そして抗体を希釈するために、ブロッキング緩衝液 (LI-CORTMより購入) を用いた。OdysseyTM赤外画像化系 (LI-CORTM) を用いて、プロットを視覚化し、そして記録し、そしてOdysseyTM v2.0ソフトウェア (LI-CORTM) を用いてバンド強度を定量化した。キナーゼ活性の測定値である基質のリン酸化を定量化して、そして対応する、免疫沈降キナーゼおよび総キナーゼ基質の検出された量に対して標準化した。IL13⁺ CD4⁺ T細胞のt=0での相対キナーゼ活性に、任意の値1.0を与え; ダッシュ記号 (-) は、倍相違が<1.0であることを示す (図10を参照されたい)。

30

40

【0055】

[00070] キナーゼアッセイは、U87神経膠腫細胞との共培養後、IL13-CD28-41BB⁺ CD4⁺ T細胞における、JNKおよびp38MAPK活性増進ならびにAKTキナーゼ活性延長を検出可能であった。図10に示すように、JNKおよびp38活性化は、IL13 を発現するCD4⁺ T細胞よりも、IL13-CD28-41BB を発現するものにおいてより強かった。図10を参照されたい。対照的に、別のMAPK、ERKの活性化は、2つの細胞種間で同程度であった。どちらのT細胞集団でもAKT活性化が観察されたが、IL13⁺ 細胞においては、24時間までのみ上昇し、

50

一方、IL13-CD28-41BB⁺細胞は、72時間までまたはそれより長く、上昇したAKT活性を示した。図10Bを参照されたい。したがって、どちらのCARも有効であったが、IL13-CD28-41BB CAR内の共刺激ドメインは、IL13 CARで観察されるものに比較して、より持続されたAKT活性を生じた。

【0056】

実施例3. 共刺激シグナルは、腫瘍再指示CD4⁺エフェクターのTh₁極性を強化する
 [00071] p38活性は、Th₁細胞で検出されているがTh₂細胞では検出されておらず、そしてJNK/p38活性化は、関連するTNF- およびIFN- サイトカインのTh₁産生を誘導することが知られるため、Th₁関連サイトカインのCAR仲介性誘導に対するCD28および4-1BB共刺激機能の影響を調べた。IL13 またはIL13-CD28-41BB を発現している遺伝子修飾された CD4⁺ T細胞 (10⁶細胞) を、2 mLの培地中、異なる刺激因子細胞 (5 × 10⁵細胞) と、24ウェル組織培養プレート中で共培養した。刺激因子細胞は、図11Aに示すように、U87神経膠腫細胞 (U87)、親NS0マウス骨髄腫細胞 (NS0)、表面IL13R₂を安定発現しているNS0細胞 (NS0-IL13R₂) または膜結合OKT3を安定発現しているNS0細胞 (NS0-OKT3) であった。

10

【0057】

[00072] リアルタイム定量的RT-PCR (qPCR) を用いて、培養後の相対的mRNAレベルを測定した。遺伝子発現分析のため、RNeasyTMキット (QiagenTM) を用いて、CD4⁺ T細胞トランスフェクタントの総細胞RNAを単離した。体積30 mL (1 × 逆転写酵素緩衝剤、2.5 mMオリゴdT、0.25 mM dNTP、0.01 Mジチオスレイトール、20 UのRnasinおよび200 UのSuperScriptTMII RNAアーゼH⁻逆転写酵素 (InvitrogenTM) を含有する) 中、5 μg総RNAの逆転写を用いて、cDNAを合成した。試料を42 °Cで1時間インキュベーションし、そして次いで、70 °Cで5分間加熱することによって、逆転写酵素を不活化した。SYBRグリーンTM PCRマスターミックス (Applied BiosystemsTM) およびDNA Engine Opticon 2TMリアルタイムPCR検出系 (MJ Research Inc.TM) によって設計されたプライマーを用いて、0.2 μgの総RNAと同等である、生じたcDNAをqPCR分析に供した。試験した遺伝子IL2およびIFN- のプライマー配列は以下のとおりである: IL2順方向: CAAGAATCCCAAACCTCACCAG、SEQ ID NO: 50; IL2逆方向: CGTTGATATTGCTGATTAAGTCC、SEQ ID NO: 51; IFN- 順方向: ATCCAGTAATGGTTGTCCTGCCT、SEQ ID NO: 52; IFN- 逆方向: TCTTGCTTAGGTTGGCTGCCTAGT、SEQ ID NO: 53。シクロフィリンmRNAの平均サイクル閾値 (CT) (Changら, "The E3 ubiquitin ligase itch couples JAK activation to TNFalpha-induced cell death by inducing c-FLIP (L) turnover." Cell 124: 601-613, 2006に記載されるとおり) を用いて、試験した遺伝子を標準化した。各実験条件において、各遺伝子に関する3つ組qPCR測定によって、平均CT値を決定した。

20

30

【0058】

[00073] 示すヒトmRNAのqPCR分析のため、T細胞総mRNAを、0時間 (図11A、白いバー)、7時間 (図11A、黒いバー) および24時間 (図11A、影を付けたバー) で収集した。* は、対応のない学生t検定を用いて、IL13 発現CD4⁺ T細胞の7時間の値に比較した際のp < 0.05を示す。IL13R₂ターゲット抗原の発現およびミコフェノール酸 (MPA) に対する耐性を与えるIL13R₂-IMPDH2_{pMG} (pJ00659)、またはMPAに対する耐性ととも に、CD3架橋 (そしてしたがってT細胞刺激性) OKT3分子の発現を与えるOKT3-IMPDH2_{pCDNA3.1 (+)} (pJ01056) のいずれかを、マウス骨髄腫株NS0にエレクトロポレーションし、そして次いで6 μMミコフェノール酸 (MPA) の存在下でクローニングし、そしてヒトIL13R₂導入遺伝子発現に関してスクリーニングした。U87およびNS0-IL13R₂腫瘍細胞を用いた実験に関しては、n = 3; NS0-OKT3およびNS0腫瘍細胞を用いた実験に関しては、n = 1。

40

【0059】

[00074] IL2およびINF- mRNAのレベルは、U87神経膠芽腫細胞との培養後、IL13⁺ T細胞におけるよりも、IL13-CD28-41BB⁺ T細胞において、より高かった。図11Aを参照されたい。NS0細胞と共培養した場合、どちらのT細胞集団でもIL2またはINF- mRNA誘導は観察されなかった。IL13R₂導入遺伝子を発現するNS0細胞によって刺激すると、IL1

50

3-CD28-41BB を発現しているT細胞ではIL2およびINF- mRNA誘導が回復したが、IL13を発現しているT細胞では回復せず、サイトカイン誘導遺伝子が、IL13R 2依存性であることが示された。誘導されたIL2およびINF- mRNAの相対量は、U87および導入遺伝子を発現するNS0細胞上のIL13R 2表面発現レベルと直接相関し；U87のレベルはNS0-IL13R 2細胞のレベルよりも高い。対照的に、IL13⁺ T細胞におけるIL2およびINF- 遺伝子の誘導は、各集団を、CD3 の会合を介してT細胞を活性化するアゴニスト免疫グロブリン分子である膜結合性OKT3を安定に発現するNS0細胞と共培養した場合、IL13-CD28-41BB⁺ T細胞で見られるものと類似であった。これらの結果によって、IL13 とIL13R 2の会合によって仲介されるIL2およびINF- mRNAの誘導がより低いのは、これらのT細胞における本質的な欠陥によるのではなく、CAR内にCD28および4-1BB共刺激ドメインが欠けているためであることが示される。

10

【0060】

[00075] これらのCAR発現T細胞から放出されるTh₁サイトカイン対Th₂サイトカインタンパク質の量を定量化するため、これらの共培養由来の上清を、サイトカイン含量に関してアッセイした。24時間インキュベーションした後、IL13⁺ (白いバー)またはIL13-CD28-41BB⁺ (黒いバー)の培養上清を採取し、そして製造者の指示(Bio-RadTM Laboratories)によって、ヒト17-Plex PanelTMキットを用いる、多重細胞数測定ビーズアレイによって、Th₁サイトカインおよびTh₂サイトカインに関してアッセイした。図11Bを参照されたい。

20

【0061】

[00076] U87神経膠腫またはIL13R 2⁺ NS0細胞は、IL13⁺ T細胞からよりも、IL13-CD28-41BB⁺ T細胞から、より多くのTh₁サイトカイン放出(IL2、IFN-、TNF- およびGM-CSF)およびより少ないTh₂サイトカイン放出(IL5、IL10およびIL13)を刺激した。OKT3を発現しているNS0細胞と培養したIL13⁺ およびIL13-CD28-41BB⁺ を発現しているCD4⁺ T細胞によって、同等のレベルのTh₁サイトカインおよびTh₂サイトカインが産生され、これらの細胞は内因性CD3を介したポリクローン性活性化に際して、極性化されないままであることが示される。T細胞を親NS0細胞と培養した場合、サイトカインレベルはすべて、低いか検出不能であった。T細胞を任意の腫瘍細胞株と培養した場合、Th₂サイトカインIL4レベルは、低いか検出不能であった。総合すると、これらのデータによって、CAR内にCD28および4-1BB共刺激ドメインが存在すると、CD4⁺ T細胞のTh₁様サイトカイン転写および分泌を駆動するのが補助されることが示される。

30

【0062】

実施例4. IL13-CD28-41BB⁺ CD4⁺ T細胞におけるリサイクリング抗腫瘍溶解活性の増加

[00077] 共刺激CARが、CD4⁺ T細胞の腫瘍特異的細胞傷害活性に影響を及ぼすかどうかを決定するため、発光細胞溶解アッセイ(LCA)を行って、in vitroで、腫瘍細胞のホタル(firefly)・ルシフェラーゼ(ffLuc)導入遺伝子発光活性を検出した。0.14 mg/mL D-ルシフェリンおよびVictor2TMルミノメーターを用いて、Brownら, "Biophotonic cytotoxicity assay for high-throughput screening of cytolytic killing." J. Immunol. Meth. 297: 39-52, 2005によって記載されるように、このアッセイを行った。簡潔には、Victor2TMルミノメーターを用い、0.14 mg/mL D-ルシフェリン(XeonogenTM)を伴うLCAによって、腫瘍細胞のffLuc導入遺伝子発光活性をin vitroで分析した。4時間後、示すE:T比で、IL13⁺ CD4⁺ T細胞()に比較した、U87ターゲットに対するIL13-CD28-41BB⁺ CD4⁺ T細胞()の細胞傷害活性増進を示す、図12Aを参照されたい。3つ組値の平均±SEを示す；*は、対応のないスチューデントt検定を用いたp<0.05を示す。

40

【0063】

[00078] ffLucでトランスフェクションしたU87ターゲット細胞と共培養した4時間後、IL13-CD28-41BB⁺ 細胞は、IL13⁺ 細胞に比較して、溶解活性の統計的に有意な増進を示した。共培養を48時間まで延ばすと、IL13⁺ 発現細胞およびIL13-CD28-41BB⁺ 発現細胞間では、細胞傷害活性の相違は観察されなかった(どちらの細胞でも100%特異的溶解に

50

到達した)。図12Bのデータは、2:1のE:T比で48時間共培養し、そして次いで再び、新鮮なターゲットを添加した後、2:1のE:T比でさらに48時間共培養した、LCAアッセイによる特異的溶解を示す。3つ組値の平均 \pm SEを示す；*は、示す共培養中で、IL13-CD28-41BB⁺ CD4⁺ T細胞（黒いバー）をIL13⁺ CD4⁺ T細胞（白いバー）に比較した $p < 0.05$ （対応するスチューデントt検定）を示す。

【0064】

[00079] パーフォリンおよびグランザイムB mRNAレベルは、IL13⁺ 細胞およびIL13-CD28-41BB⁺ 細胞において等しく上方制御されており、これらのCAR発現T細胞が、殺傷の同様の機構を用いることを示唆した。しかし、同じCAR発現CD4⁺ T細胞との48時間共培養の第二の周期のため、新鮮なffLuc⁺ ターゲットを添加すると、IL13-CD28-41BB⁺ 細胞は、IL13⁺ 細胞よりも、有意により高い溶解活性を示した（図12B）。これによって、共刺激CARは、CD4⁺ T細胞殺傷活性の期間および/またはリサイクリングに有益に影響を及ぼすことが示唆される。

10

【0065】

[00080] この現象をさらに調べるため、 1.2×10^6 のIL13⁺ またはIL13-CD28-41BB⁺ を発現しているCD4⁺ T細胞と、 6×10^5 接着性U87神経腫細胞の共培養のビデオ・タイムラプス顕微鏡（VTLM）を用いて、IL13⁺ またはIL13-CD28-41BB⁺ T細胞との共培養中のU87腫瘍細胞の生存度を分析した。培養を45時間後に洗浄し、そして次いで、新鮮なU87神経腫細胞（ 6×10^5 ）と再培養した。生存腫瘍細胞の数を42時間に渡って（最初の殺傷）、および45時間～139時間まで（第二の殺傷）プロットした。図12Cを参照されたい。

20

【0066】

[00081] 各々、タングステン-ハロゲンランプ、GIF（緑色）フィルター、ELWD 0.3NAコンデンサー、Plan FluorTM 4x / 0.13 PhL DL無限遠補正対物レンズ、D10NLC 1x 無レンズCマウントアダプター（Diagnostic InstrumentsTM）およびVCB-3524 B/W RS-170ビデオ1/2" CCDカメラ（SanyoTMNorth America Corp.）を装備した4台のEclipse TS100TM顕微鏡（NikonTM Inc.）上、37[°]の暖かい室内で画像を同時に撮影した。データを収集するため、 1.2×10^6 T細胞（0.1%ヒト血清アルブミンを補充した200 μ Lハックス緩衝塩溶液中）を、 6×10^5 接着性U87細胞（ 3×10^5 細胞/フラスコで1日前にプレティングしたもの）を含有するT-25フラスコに添加した。画像化前に、フラスコを顕微鏡ステージ上で30分間平衡化させた。タイムラプス獲得速度は2分間隔であった。各ビデオにおいて、腫瘍細胞のみの数フレームを獲得した後、T細胞を添加した。次いで、合わせた細胞を連続80時間記録した。T細胞を添加した後、各フラスコに5%CO₂を10秒間ガス供給し、そしてパラフィルムで密封して、それぞれ、優れたpH調節（HBSS中の重炭酸塩）および安定したピントを確実にした。COH VTLFカメラ・オーガナイザーを用いて画像を獲得し、そしてMatroxTM 4チャンネルフレーム・グラバードを用いて、640x480ピクセルでデジタル化した。MetaMorphTM 6.33（Universal Imaging / Molecular DevicesTMCorp.）の「対象を手動で計数」コマンドを用いて、10時間以下の間隔で、生存腫瘍細胞計数を行った。すべてのデータセットをMetaMorphTMにインポートし、そしてMetaMorphTMスタックおよびAVI動画として保存した。

30

【0067】

[00082] 遺伝子修飾されたCD4⁺ T細胞のいずれかが、共培養の最初の42時間中に腫瘍細胞を殺す能力は、実質的に同じであった（ほぼ100%のU87細胞が30時間までに殺された）。しかし、U87腫瘍細胞との第二の遭遇において、回復したIL13-CD28-41BB⁺ T細胞は、IL13⁺ T細胞よりもより高い細胞溶解活性を保持した。重要なことに、U87細胞を2回目に添加する前に、T細胞を計数すると、細胞数の有意な相違はないことが明らかになった。さらに、U87細胞との共培養72時間に渡るCFSEに基づくアッセイは、*in vitro*で、IL13⁺ またはIL13-CD28-41BB⁺ T細胞の増殖において相違がないことを明らかにした。これによって、新鮮なターゲットの添加に際して細胞溶解活性がより大きいのは、より多くのキラーが存在するためではなく、個々のキラーが機能する能力が増進しているためであったことが立証される。総合すると、これらのデータによって、共刺激CARは、CD4⁺

40

50

T細胞機能のリサイクリングおよび保持を支持することが示される。

【0068】

実施例5. IL13-CD28-41BB⁺ CD4⁺ T細胞による in vivo腫瘍クリアランスの増進

[00083] 同所性ネズミ異種移植片モデルにおいて、確立されたU87腫瘍を用いて、CD28および4-1BBシグナル伝達ドメインを含むCARが、CD4⁺ T細胞の抗腫瘍能を増進させる能力を評価した。in vivo研究のため、製造者の支持にしたがって、オリゴフェクチミン (oligofectimine) (InvitrogenTM) を用いて、U87細胞をffluc-ゼオシン_pcDNA3.1 (+) (pJ00778、ホタル・ルシフェラーゼ酵素およびゼオシン薬剤耐性遺伝子のタンパク質融合物を発現するプラスミド) およびIL2 (2)_HyTk-pMG (pJ00976、IL2サイトカインおよび選択/自殺融合遺伝子HyTKを発現するプラスミド) でトランスフェクションし、そして次いで、0.2 mg/mLゼオシンおよび0.1 mg/mLハイグロマイシンの存在下でクローニングした。

10

【0069】

[00084] 同所性神経膠腫異種移植片モデルを産生するため、マウスを以下のように治療した。250 radで照射した翌日、雄の6~8週齢NOD-scidマウスを麻酔し、剃毛し、そしてCunninghamTMマウス/新生ラットアダプター定位固定装置拘束具 (StoeltingTM) 中で固定した。次いで、3~5 mmに渡って、プレグマに対して2 mm側方でそして0.5 mm前側で、腫瘍 (U87神経膠腫) をマウスに定位誘導注射した。2 μLのフェノール不含RPMI (Irvin Scientific、カリフォルニア州アービン) 中に懸濁したU87-ffLucZeo / IL2⁺ 腫瘍細胞 (2 × 10⁵細胞/マウス) を、硬膜から2.5 mmの深さに注射した。腫瘍接種の7日後、IL13またはIL13-CD28-41BBのいずれかを発現している10⁶ T細胞を2 μL中で脳の腫瘍座標に送達した (養子導入)。対照動物にはPBSのみを投与した (「偽対照」)。穿頭孔をボーンワックスで密封し、そして切開をNexabandTMグルーで閉じた。術後回復のため、動物に0.1 mg/kgのBuprenexTMを皮下注射した。このモデルにおいて、内因性免疫系の回復のため、腫瘍は注射の13~14日後に自発的に退行し始めるため、実験を第12日までに完了した。

20

【0070】

[00085] ホタル・ルシフェラーゼ (ffLuc) およびヒトIL2を安定して発現する確立されたU87神経膠芽腫細胞における腫瘍由来のffLuc流動シグナルを監視することによって、同所性腫瘍増殖を非侵襲的に定量化可能である。Kahlonら, "Specific recognition and killing of glioblastoma multiforme by interleukin 13-zetakine redirected cytolytic T cells." Cancer Res. 64: 9160-9166, 2004に先に記載されるように、XenogenTM In Vivo画像化系 (IVIS) でマウスにおいて in vivo生体光子腫瘍画像化を用いて、in vivoルシフェラーゼ活性を検出した。簡潔には、ffLuc流動を監視するため、マウスに4.29 mg D-ルシフェリンを腹腔内注射し、マウスを麻酔し (1.5 L/分の酸素 + 4% イソフルラン)、そしてルシフェリン注射の14分後、1分間の積分時間に渡って、発光を測定した。関心対象の領域において、時間に渡って測定される総カウントとして、流動 (光子/秒) を定量化した。図13中の結果を参照されたい。Y軸上の値は、腫瘍移植から示す日数後、偽群および治療群 (各群n=6) 由来のffLuc⁺ 腫瘍の総流動レベルの平均 | SDを示す。「Tx」は、養子導入T細胞での治療を示す。

30

【0071】

[00086] CAR発現CD4⁺ T細胞の養子導入前、すべてのマウスは、予期されるように、腫瘍由来ffLuc流動シグナルレベルの増加を示した (図13を参照されたい; 腫瘍移植2日後および6日後を比較されたい)。養子導入 (Tx) 2日後、腫瘍ffLuc流動レベルは、偽治療マウスに比較した際、IL13またはIL13-CD28-41BBのいずれかを発現するT細胞で治療したマウスにおいて減少した。しかし、T細胞治療5日後 (移植12日後)、IL13-CD28-41BB⁺ T細胞で治療したマウスにおいて、腫瘍流動シグナルは低いままであり、一方、IL13⁺ T細胞で治療したマウス由来の流動シグナルは、偽治療 (対照) 群のものと同様のレベルに増加した。CD28および4-1BBの共刺激シグナル伝達ドメインは、遺伝的に再指示されたT細胞による腫瘍増殖制御を増進させ、そして/または延長させた。

40

【0072】

50

実施例6. 療法に適したT細胞の調製

【00087】白血球フェレーシスによって、患者からTリンパ球を得て、そして自己T細胞がCARを発現するように遺伝子改変し、次いで、抗癌療法を達成するため、患者に投与し直した。

【0073】

【00088】療法使用に適したIL13⁺ T細胞を調製するため、臨床等級Ficoll™上の遠心分離によって、白血球フェレーシスした血液から単核細胞を分離した。0.526 mM EDTAを含有する無菌リン酸緩衝生理食塩水中でPBMCを2回、そして次いで無菌PBS中で1回洗浄し、そしてRPMI 1640 HEPES、10%熱不活化FCS、および4 mM L-グルタミンからなる培地中に再懸濁した。培養にOrthoclone™ OKT3 (30 ng/mL)を添加することによって、患者PBMC中に存在するT細胞をポリクローン性に活性化した。次いで、研究被験体用に指定されたインキュベーター中、通気孔を付けたT-75組織培養フラスコ中で、細胞培養をインキュベーションした。培養開始24時間後、rhIL2を25 U/mLで添加した。培養開始3日後、PBMCを採取し、遠心分離し、そして低張エレクトロポレーション緩衝液中、 20×10^6 細胞/mLに再懸濁した。400 μ Lの細胞懸濁物とともに、25マイクログラムのプラスミドIL13 / Hy TK-pMGを、無菌0.2 cmエレクトロポレーション・キュベットに添加した。各キュベットを250 V / 40 μ sの単回電気パルスに供し、そして再び室温で10分間インキュベーションした。キュベットから生存細胞を採取し、プールし、そして25 U/mL rhIL2を含有する培地中に再懸濁した。フラスコを患者用に指定された組織培養インキュベーター中に入れた。エレクトロポレーション3日後、0.2 mg/mLの最終濃度でハイグロマイシンを細胞に添加した。エレクトロポレーションしたPBMCを培地と全部で14日間培養し、そしてIL2を48時間ごとに補充した。

【0074】

【00089】エレクトロポレーションしたOKT3活性化患者PBMCからの、ハイグロマイシン耐性CD8⁺ CTLのクローニングを、培養第14日に開始した。簡潔には、 100×10^6 凍結保存照射フィーダーPBMCおよび 20×10^6 照射TM-LCL (フィーダー細胞として働くEBV形質転換リンパ芽球細胞)の混合物に、30 ng/mL OKT3および50 U/mL rhIL2を含有する、体積200 mLの培地中、生存患者PBMCを添加した。この混合物を10枚の96ウェル・クローニングプレートの各ウェル内に0.2 mLプレティングした。プレートをアルミホイルで包んで、蒸発損失を減少させ、そして患者用に指定された組織培養インキュベーター中に入れた。培養第19日、各ウェルに0.2 mg/mLの最終濃度のハイグロマイシンを入れた。第30日、倒立顕微鏡上で細胞成長に関してウェルを視覚的に調べ、そして再刺激のために陽性ウェルに印を付けた。

【0075】

【00090】25 mL組織培地中の 50×10^6 照射PBMC、 10×10^6 照射LCL、および30 ng/mL OKT3を含有するT-25フラスコに、細胞増殖があった各クローニングウェルの内容物を個々に移した。再刺激の1日後、3日後、5日後、7日後、9日後、11日後、および/または13日後、必要な場合、フラスコに50 U/mL rhIL2および15 mLの新鮮な培地を添加した。また、刺激周期の第5日、フラスコにハイグロマイシン0.2 mg/mLも補充した。植え付け14日後、細胞を採取し、計数し、そして50 mL組織培地中、 100×10^6 照射PBMC、 20×10^6 照射TM-LCLおよび30 ng/mL OKT3を含有するT-75フラスコ中で再刺激した。フラスコの培養に、上に概略するとおり、rhIL2およびハイグロマイシンを添加した。

【0076】

【00091】FITCコンジュゲート化モノクローナル抗体WT / 31 (a TCR)、Leu2a (CD8)、およびOKT4 (CD4)を用い、蛍光活性化細胞ソーター上、免疫蛍光によって、療法におけるありうる使用のため、拡大するために選択したCTLを分析して、クローン表現型 (TCR⁺、CD4⁻、CD8⁺、およびIL13⁺)を確認した。臨床使用のためのクローンの選択基準には、アイソタイプ対照FITC / PEコンジュゲート化抗体に比較されるような、均一なTCR⁺、CD4⁻、CD8⁺、およびIL13⁺が含まれた。プラスミドベクター染色体組込みが単一部位であることをサザンプロット分析によって確認した。遺伝子修飾されたT細胞クロー

ーン由来のDNAをプラスミドベクターに特異的なDNAプローブでスクリーニングした。

【0077】

[00092] 標準法にしたがって、上述の抗CD3 ゼータ鎖抗体を用いて、キメラ受容体タンパク質を検出するウェスタンブロットによって、IL13-CD28-41BB の発現を決定した。簡潔には、1錠剤/10 mL完全プロテアーゼ阻害剤カクテルを含有する1 mL RIPA緩衝液 (PBS、1%NP40、0.5%デオキシコール酸ナトリウム、0.1%SDS) 中に 2×10^7 洗浄細胞を溶解することによって、トランスフェクションしたT細胞クローンの全細胞溶解物を生成した。氷上で80分間インキュベーションした後、遠心分離した全細胞溶解物上清のアリコットを採取し、そして等体積の装填緩衝液中、還元条件下で煮沸し、次いでプレキャスト12%アクリルアミドゲル上のSDS-PAGE電気泳動に供した。ニトロセルロースにトランスファーした後、次いで、T-TBS (Tris緩衝生理食塩水中、0.1%Tween20TM、pH8.0) 中、4%脱脂粉乳を含有するBlottoTM溶液中で膜を1時間ブロッキングした。T-TBS中で膜を洗浄し、次いで、0.5 µg/mLの濃度の一次マウス抗ヒトCD3 モノクローナル抗体8D3 (PharmingenTM) と1時間インキュベーションした。T-TBS中でさらに4回洗浄した後、膜を1:3000希釈 (BlottoTM溶液中) のヤギ抗マウスIgGアルカリホスファターゼ・コンジュゲート化二次抗体と1時間インキュベーションした。基質を添加する前、膜をT-TBS中でリンスし、次いで、製造者の指示にしたがって、3 mLホスファターゼ基質溶液 (Bio-RadTMImmunoStarTMキット) とインキュベーションした。

10

【0078】

[00093] 療法効果に適した用量は、好ましくは一連の用量周期中、用量あたり約 $10^6 \sim 10^9$ 細胞の間である。好ましい投薬措置は、増大する用量の4回の1週間投薬周期からなり、第0日の約 10^7 細胞から始まり、第5日までに、約 10^8 細胞のターゲット用量まで徐々に増加する。適切な投与様式には、静脈内、皮下、腔内 (例えばリザーバーアクセスデバイスによる)、腹腔内、および腫瘍塊への直接注射が含まれる。

20

【0079】

実施例7. ヒト患者における頭蓋内再発性神経膠腫の治療

[00094] 本発明にしたがってIL13-CD28-41BB 発現T細胞を用いた、本明細書に記載するような神経膠腫または任意の他の癌の治療を以下のように行った。好ましくは実施例6に記載するようなT細胞クローンを：

30

- a. TCR⁺ / CD4⁺、CD8⁺、IL13⁺細胞表面表現型；
 - b. 染色体に組み込まれた単一コピーのプラスミドベクターDNAの存在；
 - c. IL13-CD28-41BB タンパク質の発現；
 - d. ヒトIL13R² ターゲットの特異的溶解；
 - e. *in vitro*増殖のための外因性IL2に対する依存性；
 - f. マイコプラズマ、真菌および細菌無菌性、ならびに5EU/mL未満の内毒素レベル；
- ならびに
- g. ガンシクロビルに対するクローンの*in vitro*感受性に関して選択した。

【0080】

[00095] 好ましくは最初の切除術からの快復後、そしてステロイド漸減および/または最近の全身性化学療法から少なくとも3週間の時点より後に、白血球フェレーシスによって、患者から末梢血単核細胞を得た。ターゲット白血球フェレーシス単核細胞収量は、一般的に、 5×10^9 であり、そしてハイグロマイシン耐性細胞溶解性T細胞クローンのターゲット数は25であった。一般的に、*in vitro*拡大のため、すべての品質管理パラメーターを満たす、少なくとも5つのクローンが同定された。クローンを凍結保存し、そして連続X線検査および臨床検査によって患者を監視した。疾患進行の再発が実証された場合、患者に、再切除および/または腫瘍切除腔にT細胞を送達するためのリザーバーアクセスデバイス配置を行った。

40

【0081】

[00096] 手術からの回復およびステロイド漸減後、適用可能であれば、患者に以下の

50

ようなT細胞療法を開始した。患者は、少なくとも4回の1週間周期の療法のターゲットを受けた。最初の周期中、細胞用量増大は、第0日、約 10^7 細胞の初期用量、その後、第3日、約 5×10^7 細胞から、第5日、約 10^8 細胞のターゲット用量に進んだ。第2周期は、早くも第1周期開始の1週間後から始めた。T細胞を投与する日、50 ccのPBS中で2回洗浄し、次いで、2 mL中、患者送達用の細胞用量を生じる体積で、薬学的保存剤不含正常生理食塩水に再懸濁することによって、拡大クローンを無菌的にプロセッシングした。好ましくは、T細胞を5~10分間に渡って注入し、その後、2 mL PFNSフラッシュを5分間に渡って投与した。分光法を用いて、MRI + / - ガドリニウム (gandolinium) によって、療法に対する応答を評価した。

【0082】

[00097] 一般的に、腔内LAK細胞（個々の細胞用量は最大 10^9 、そして累積細胞数は 2.7×10^{10} と同程度に高い）、*ex vivo*拡大TIL（最大 10^9 細胞/用量）およびアロ反応性リンパ球（細胞用量 10^8 から開始して、累積細胞用量は最大 51.5×10^8 ）を使用する研究で投与される用量より、少なくとも1対数少なかった。低用量反復投与は、単回多数細胞点滴注入で起こりうる、潜在的に危険な炎症反応を回避するために好ましい。各注入は、好ましくは、単一T細胞クローンからなり、そして患者治療経過を通じて、好ましくは、同じクローンが投与された。

【0083】

[00098] 腫瘍退行を示し、MRI上で残った疾患がある患者には、X線評価に基づいて、疾患進行が立証されるか、または完全反応（CR）が達成される時点まで、これらの治療がよく許容されるならば、第7週以降に始まり、第3周期および第4周期の反復後、1週間の休止/再病期決定からなる、さらなる療法経過を有してもよい。一般的に認められる最大毒性は、グレード3未満であるが、これは治療する医師の判断による。

【0084】

[00099] ガンシクロビルでの治療は、CAR⁺HyTK⁺CD8⁺CTLクローンの消失を導く。したがって、起こりうる、療法に関連するいかなる副作用（頭痛、発熱、悪寒、吐き気等）を、状態に適した、確立された治療を用いて管理してもよい。例えば、新規グレード3毒性いずれかがグレード4に進行した場合、または治療する医師の意見で、患者が有意な医学的危険に置かれるグレード4治療関連毒性いずれかが観察される場合、患者にガンシクロビルを投与してもよい。非経口投与されるガンシクロビルは、12時間ごとに分けて、10 mg/kg/日で投薬される。患者は、ガンシクロビル療法の最初の72時間、監視目的のために入院しなければならない。症状が48時間以内にガンシクロビルに反応しない場合、限定されるわけではないが、コルチコステロイドおよびシクロスポリンを含む、さらなる免疫抑制剤を、治療する医師の判断で追加してもよい。毒性が重度である場合、ガンシクロビルとともに、デカドロンおよび/または他の免疫抑制剤もまた、治療する医師の判断で用いてもよい。

【0085】

[00100] IL13-CAR発現CTLクローンを頭蓋内再発性神経膠腫ヒト患者に投与する、上に概略するプロトコルを用いた予備的安全研究によって、T細胞の腔内投与とありうる相関を有する副作用のうち、唯一のグレード3事象は、現在まで2人の患者各々において、 10^8 細胞の投与で起こった頭痛であったことが示された。グレード4または5の副作用は、遺伝子改変されたT細胞の投与とはまったく関連しないことが見出された。したがって、本明細書のこの養子導入療法の全体的な安全性プロフィールは許容しうるものであった。

【0086】

実施例8~12. 例示的CAR分子。

[00101] 図14~18は、本発明にしたがったさらなるCARの配列を提供する。これらは、本発明の態様の限定されない例として働く。

【0087】

[00102] 図14は、IL13-IgG₄-cd28tm-CD28gg-ゼータ（CO）CARの配列（SEQ ID NO: 36）を提供する。この配列は、（1）E13Y突然変異を含むIL13分子（腫瘍表面上の腫瘍表面

10

20

30

40

50

受容体IL13R 2のリガンドである (IL13))、(2) 免疫グロブリンアイソタイプG₄細胞外ドメインのFc部分 (IgG₄)、(3) 共刺激分子CD28の膜貫通部分 (cd28tm)、(4) 発現を増加させる目的のため、2つのロイシンをグリシンに変化させたCD28のシグナル伝達ドメイン (CD28gg)、および(5) T細胞受容体のCD3 鎖のシグナル伝達ドメイン (ゼータ) をコードする。すべてのセグメントは、哺乳動物発現を増加させるため、コドン最適化 (CO) された。配列の下線部分は、CD28ggのコード配列である。

【 0 0 8 8 】

[000103] 図15は、IL13-IgG₄-cd4tm-CD28-4-1BB-ゼータCARの配列 (本明細書において、IL13-CD28-41BB とも称される; SEQ ID NO: 37) を提供する。この配列は、(1) E13Y突然変異を含むIL13分子 (腫瘍表面上の腫瘍表面受容体IL13R 2のリガンドである (IL13))、(2) 免疫グロブリンアイソタイプG₄細胞外ドメインのFc部分 (IgG₄)、(3) CD4の膜貫通部分 (cd4tm); 共刺激分子CD28のシグナル伝達ドメイン (CD28) (4) 共刺激分子4-1BBのシグナル伝達ドメイン (4-1BB)、および(5) T細胞受容体のCD3 鎖のシグナル伝達ドメイン (ゼータ) をコードする。配列の下線部分はCD28をコードし、そして配列の太字部分は4-1BBをコードする。

10

【 0 0 8 9 】

[000104] 図16は、IL13-IgG₄-cd28tm-CD28-Ox40-ゼータCARの配列 (SEQ ID NO: 38) を提供する。この配列は、(1) E13Y突然変異を含むIL13分子 (腫瘍表面上の腫瘍表面受容体IL13R 2のリガンドである (IL13))、(2) 免疫グロブリンアイソタイプG₄細胞外ドメインのFc部分 (IgG₄)、(3) 共刺激分子CD28の膜貫通部分 (cd28tm)、(4) CD28のシグナル伝達ドメイン (CD28)、(5) 共刺激分子OX-40のシグナル伝達ドメイン (Ox40)、および(6) T細胞受容体のCD3z鎖のシグナル伝達ドメイン (ゼータ) をコードする。cd28tmをコードする配列を下線で示し (アミノ酸364~390); CD28をコードする配列を斜字で示し (アミノ酸391~431); Ox40をコードする配列を太字で示し (アミノ酸432~467); そしてゼータをコードする配列を下線および斜字両方で示す (アミノ酸468~580)。

20

【 0 0 9 0 】

[000105] 図17は、IL13-IgG₄-cd28tm-CD28gg-4-1BB-ゼータCARの配列 (SEQ ID NO: 39) を提供する。この配列は、(1) E13Y突然変異を含むIL13分子 (腫瘍表面上の腫瘍表面受容体IL13R 2のリガンドである (IL13))、(2) 免疫グロブリンアイソタイプG₄細胞外ドメインのFc部分 (IgG₄)、(3) 共刺激分子CD28の膜貫通部分 (cd28tm)、(4) 発現を増加させる目的のため、2つのロイシンをグリシンに変化させたCD28のシグナル伝達ドメイン (CD28gg)、(5) 共刺激分子4-1BBのシグナル伝達ドメイン (4-1BB)、および(6) T細胞受容体のCD3 鎖のシグナル伝達ドメイン (ゼータ) をコードする。配列の下線部分はCD28ggをコードし、そして配列の太字部分は4-1BBをコードする。

30

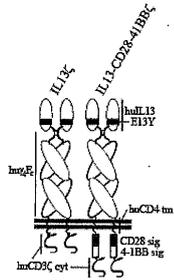
【 0 0 9 1 】

[000106] 図18は、IL13-IgG₄-cd28tm-CD28gg^Δ199-4-1BB-ゼータCARの配列 (SEQ ID NO: 40) を提供する。この配列は、(1) E13Y突然変異を含むIL13分子 (腫瘍表面上の腫瘍表面受容体IL13R 2のリガンドである (IL13))、(2) 免疫グロブリンアイソタイプG₄細胞外ドメインのFc部分 (IgG₄)、(3) 共刺激分子CD28の膜貫通部分 (cd28tm)、(4) 発現を増加させる目的のため、2つのロイシンをグリシンに変化させ、そしてシグナル伝達活性を除去する目的のため、キナーゼドメインを欠失させた (すなわちSEQ ID NO: 39の陰性対照として) CD28のシグナル伝達ドメイン (CD28gg^Δ199)、(5) 共刺激分子4-1BBのシグナル伝達ドメイン (4-1BB)、および(6) T細胞受容体のCD3 鎖のシグナル伝達ドメイン (ゼータ) をコードする。配列の下線部分はCD28gg^Δ199をコードし、そして配列の太字部分は4-1BBをコードする。

40

【 図 1 】

FIG. 1



【 図 2 】

FIG. 2

IL13P1
 1 M A L L L T T V I A L T C L G G F
 TATGAATTCA TGGCGCTTT GTTGACCACG GTCATTGCTC TCACCTGCTT TGGCGGCTT
 AFACTTAAGT ACCCGGAAAA CCACTGGTGC CAGTAACGAG AGTGAACGGA ACCCGGAAAA
 IL13P1
 IL13P2
 61 A S P G P V P P S T A L R Y L I E E L V
 GCCTCOCCAG GCCCTGTGCC TCCCTCTACA GCCCTCAGST ACCTCATTTA GGAGCTGGTC
 CGGAGGGGTC CGGACACGG AGGGAGATGT CGGGATGCCA TGGATTAECT CTCTGACCAG
 121 N I T Q N Q K A P L C N G S M V W S I N
 AACATCACCC AGAACCCAGAA GGCTCCGCTC TGCAATGGCA GCATGGTATG GAGCATCAAC
 TTGTAGTGGG TCTTGGTCTT CCGAGCCGAG ACSTTACCGT CGTACCATAC CTCTAGTTG
 IL13P2
 IL13P3
 181 L T A G M Y C A A L E S L I N V S G C S
 CTGACAGCTG GCATGTACTG TGCAGCCCTG GAATCCCTCA TCACTGTGTG AGCTGCATG
 GACTGTCCAG CGTACATGAC ACGTCGGGAC CTTAGGGACT AGTTGCACAG TCCGAGCTCA
 IL13P3
 241 A I E K T Q R M L S G F C P H K V S A G
 GCCATCGAGA AGACCCAGAG GATGCTGAGC GGATTTCTGCC GCACACAGGT CTCGACTGGG
 CGGTAGCTCT TCTGGTCTC CTACGACTGC CCTAAGACGG GCTGTCTCCA GAGTCGACCC
 IL13P3
 IL13P4
 301 Q F S S L H V R D T K I E V A Q F V K D
 CAGTTTCCA GCTTGCATG CCGAGACACC AAAATCGAGG TGGCCAGTT TGTAAGGAC
 CTCAAAAGGT CGAACCTACA GGCTCTGTGG TTTAGCTCC ACCGGGTCAA ACATTTCTCT
 IL13P4
 IL13P5
 361 L L L H L K K L F R E G R F N * (SEQ ID NO:1)
 CTGCTTTAC ATTTAAGAAA ACTTTTTCGC GAGGGACGGT TCAACTGAGG ATCGCA (SEQ ID NO:2)
 GACGAGAATG TAAATTTCTT TGAAAAAGCG CTCCTTGCCA AGTTGACTCC TAGGCT (SEQ ID NO:3)

【 図 3 A 】

FIG. 3A

M L L L V T S L L L C E L P
 1 ATCTCTAGAG CGCCACCAT GCTTCTCCTG GTGACAAGCC TTCTGCTCTG TGAGTTACCA
 TAGAGATCTC GCGG9TGTGA CGAAGAGGAC CACTGTTCCG AAGACGAGAC ACTCAATGGT
 H P A F L L I P G P V P P S T A L R Y L
 61 CACCCAGCAT TCCTCTGAT CCCAGGCCCT GTGCCCTCCT CTACAGCCCT CAGGTACCTC
 GTGGTCCGTA AGGAGGACTA GGGTCCGGGA CACGGAGGGA GATGTCGGGA GTCCATGGAG
 I E E L V N I T Q N Q K A P L C N G S M
 121 ITTGGAGGC TGGTCAACAT CACCCAGAAC CAGAAGGCTC CGCTCTGCAI TGGCAGCATG
 TAACCTCTCG ACCAGTTGTA TGGGTCTTGG GTCTCCGAG CCGAGAGCTT ACCGTCGTAC
 V W S I N L T A G M Y C A A L E S L I N
 181 GTATGGAGCA TCAACCTGAC AGTGTGGCAT TACTGTCCAG CCCTGGAACT CCTGATCAAC
 CATACTCGT AGTTGGAGCA TCAGCCGTAC ATGACACCTG GGGACCTTAG GGACTAGTTG
 V S G C S A I E K T Q R M L S G F C P H
 241 GTTCAGGCT GCAGTGCCAT CGAGAGACC CAGAGGATGC TGAGCGGATT CTGCCCCGAC
 CACAGTCCGA CGTACCGGTA GCTCTTCTGG GTCTCTACG ACTCGCTAA GACGGGCGTG
 K V S A G Q F S S L H V R D T K I E V A
 301 AAGTCTCAG CTGGGAGTT TTCCAGCTTG CATGTCCGAG ACACCAAAAT CGAGGTGGCC
 TTCCAGAGTC GACCCGTCAA AAGTTCGAAC GTACAGGCTC TGTGGTTTTA GCTCCACCGC
 Q F V K D L L L H L K K L F R E G R F N
 361 CAGTTTGTAA AGGACCTGCT CTTACATTTA AAGAACTTT TTCCGAGGG ACGGTTCAC
 GTCAACACTT TACCAGGGG TACGGTGGT ACGGGTGTG GACTCAAGGA CCCCCCTGGT
 E S K Y G P P C P P C P A P E F L G G P
 421 GAGTCCAAAT ATGGTCCCC ATGCCACCA TGCCAGCAGC CTGAGTTCTT GGGGGACCA
 CTCAGTTTA TACCAGGGG TACGGTGGT ACGGGTGTG GACTCAAGGA CCCCCCTGGT
 S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E
 481 TCAGCTTCC TGTTCACCC AAAACCCAG GACTCTCA TGATCTCCG GACCCCTGAG
 AGTCAGAGG ACAGGGGGG TTTTGGTGT CTGTGAGAT ACTAGAGGC CTGGGACTC
 V T C V V V D V S Q E D P E V Q F N W Y
 541 GTCACGTGG TGGTGGTGA CGTGAACCG GAAGACCCG AGTCCAGTT CAACGTGTAC
 CAGTGCACG ACCACCACT GCACCTGGTC TTCTGGGGC TCCAGGTCAA GTGACCATG
 V D G V E V H N A K T K P R E E Q F N S
 601 GTGGATGCG TGGAGTGCA TATGCCAAG ACAAGCCCG GGGAGGAGCA GTTCAACACG
 CACTACCCG ACCTCCAGT ATTACGGTTC TGTTCGGCG CCCTCTCTGT CAAGTTGTGC

【 図 3 B 】

FIG. 3B

T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E
 661 ACGTACCGTG TGGTACGGT CCTCACCGTC CTGACCAGG ACTGGCTGAA GCGCAAGGAG
 TGCAATGGCAG ACCAGTCCGA GGAGTGGCAG GACGTGGTCC TGACCAGATT GCGCTTCCTC
 Y K C K V S N K G L P S S I E K T I S K
 721 TACAGTGA AGTCTCCAA CAAGGCCCTC CCGTCCCTCA TCGAGAAAAC CATCTCCAAA
 ATGTTACAGT TCCAGAGGTT GTTTCGGGAG GCGAGGAGT AGCTCTTTTG GTAGAGGTTT
 A K G Q P R E P Q V Y T L P P S Q E E M
 781 GCCAAAGGGC AGCCCCGAGA GCCACAGTGT TACACCTGFC CCCCATCCCA GGAGGAGATG
 CGGTTTCCCG TCGGGGCTCT CGGTGTCCAC ATGTGGGACC GGGTTRAGGT CCTCTCTTAC
 T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A
 841 ACCAAGAAC AGGTGACGCT GACTGCTGCT GTCAAGGCT TCTACCCAG CGACATCGCC
 TGTTCTTGG TCCAGTCGGA CTGGACGGAC CAGTTTCCGA AGATGGGCTG GCTGTAGCGG
 V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L
 901 GTGGAGTGG AGAGCAATGG GCAGCCGGAG ACAAATAA AGACCCGCT TCCCGTGTG
 CACTCACCC TCTGTTTACC CAGCGGCTC TTGTGATGT TCTGGTGGG AGGGACACGAC
 D S D G S F F L Y S R L T V D K S R W Q
 961 GACTCCGAGC GCTCCTTCTT CCTCTACAG AGGTAACCG TGGACAAGAG CAGGTGGCAG
 CTGAGGCTGC CGAGGAAGAA GGAGATGTGC TCCGATGGC ACCTGTTCTC GTCCACCGTC
 E G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q
 1021 GAGGGGAATG TCTTCTCATG CTCGGTGATG CATGAGGCTC TGCACAACCA CTACACACAG
 CTCCTTACAG AGAAGAGTAC GAGGACTACT GTACTCCGAG ACSTGTTGGT GATGTGTCTC
 K S L S L S L G K M A L I V L G G V A G
 1081 AAGAGCTCT CCTCTCTCT GGTAAAATG GCCCTGATTG TGTGGGGGG GGTCCCGGGC
 TTCTCGGAGA GGGACAGAGA CCAATTTTAC CGGACTAAC ACGACCCCCC GCAGCGGGCC
 L L L F I G L G I F F R V K F S R S A D
 1141 CTCCTGCTTT TCATTGGGCT AGGCATCTT TCCAGAGTA AGTTACAGAG GAGCGCAGAC
 GAGGACGAAA AGTAACCCGA TCCGTAGAAG AAGTCTCACT TCAAGTCTCT CTGCGTCTC
 A P A Y Q Q G Q N Q L Y N E L N L G R R
 1201 GCCCCCGCT ACCAGCAGGG CCAGAACCAG CTCTATAACG AGCTCAATCT AGGACGAAAG
 CCGGGGCGCA TGGTCTCCC GGTCTGTGTC GAGATATTGC TCGAGTTAGA TCTGCTTCT
 E E Y D V L D K R R G R D P E M G G K P
 1261 GAGGAGTACG ATGTTTGGGA CAAGAGACGT GGCCTGGACC CTGAGATGGG GGGAAAGCCG
 CTCCTCATGC TACAAAACCT GTTCTCTGCA CCGGCCCTGG GACTCTACCC CCCTTTCGGC

【 図 3 C 】

```

R R K N P Q E G L Y N E L Q K D K M A E
1321 AGAAGGAGA ACCCTCAGGA AGGCCTGTAC AATGAAGTGC AGAAGATATA GATGGCGGAG
TCTTCCCTCT TGGGAGTCTT TCCGGACATG TTAAGTTGACG TCTTCTATT CTACCGCCTC

A Y S E I G M K G E R R R G K G H D G L
1381 GCCTACAGTG AGATTGGATG GAAAGGCGAG CGCCGGAGGG GCAAGGGGCA CGATGGCCTT
CGGATGTAC TCTAACCGTA CTTCCGCTC GGGCCCTCCC CGTTCGCCCT GTTACCGGAA

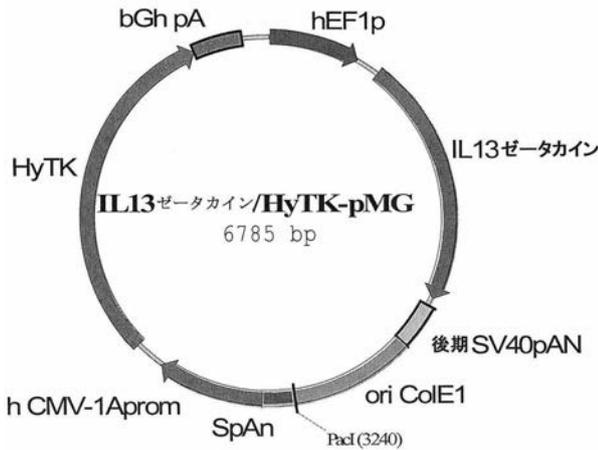
Y Q G L S T A T K D T Y D A L H M Q A L
1441 TACCAGGGTC TCAGTACAGC CACCAAGGAC ACCTACGACG CCTTTCACAT GCAGGCGCTG
ATGTTCCAG AGTCATGTCC GTGTTCCCTG TGGATGCTCG GGAAGTGTGA CGTCCGGGAC

P P R * (SEQ ID NO:4)
1501 CCCCCTCGCT AAGGGCGCG AT (SEQ ID NO:5)
GGGGAGCGA TTCGCCGCG TA (SEQ ID NO:6)

```

GM-CSFR アルファ・シグナルペプチド (ヌクレオチド18-84; SEQ ID NO:7)
 IL13 (EmY) (ヌクレオチド85-420; SEQ ID NO:8)
 IgG4 (SmP) (ヌクレオチド421-1107; SEQ ID NO:9)
 CD4tm (ヌクレオチド1108-1173; SEQ ID NO:10)
 CD3 ゼータ (ヌクレオチド1174-1512; SEQ ID NO:11)

【 図 4 】



【 図 5 B 】

(IL13ゼータカイン-)

```

M L L L V T S L L L
661 ACAGCTGAGA TCACCTAGA GCCGCCACCA TGCTTCTCCT GGTGACAAGC CTTCTGCTCF
TGTCGACTCT AGTGGGATCT CGCGGTGGT ACGAAGAGGA CCACTGTTCG GAAGCAGAGA

C E L P H P A F L L I P G P V P P S T A
721 GTGAGTTACC ACACCCAGCA TTCTCTCTGA TCCCAGGCC TGTGCCTCCC TCTACAGCCC
CACTCAATGG TGTGGTCTG AAGGAGACT AGGGTCCGG ACACGGAGG AGATGTCCGG

L R Y L I E E L V N I T Q N Q K A P L C
781 TCAGGTACT CATTTGAGGAG CTGGTCAACA TCACCCAGAA CCAGAAGGCT CCGCTCTGCA
AGTCCATGGA GTAACCTCTC GACCAGTTGT AGTGGTCTT GTCTTCCGA GGGAGAGAGT

N G S M V W S I N L T A G M Y C A A L E
841 ATGGCAGCAT GGTATGGAGC ATCAACCTGA CAGCTGGCAT GACTGTGCA GCCCTGGAAT
TACCCTCGTA CCATACCTCG TAGTTGGACT GTCCAGCCGA CATGACAGT CCGGACCTTA

S L I N V S G C S A I E K T Q R M L S G
901 CCCTGATCAA CGTGTACAGC TGCAAGTCCA TCGAGAAGAC CCAGAGGATG CTGAGCGGAT
GGGACTAGTT GCACAGTCCG ACGTCAAGGT AGCTTCTCTG GGTCTCTTAC GACTCGCCTA

F C P H K V S A G Q F S S L H V R D T K
961 TCTGCCCGCA CAAGGTCTCA GCTGGGAGT TTTCCAGCTT GCATGTCCGA GACACCAAAA
AGACGGGCGT GTTCCAGAGT CGACCCGTCA AAGGTGCGAA CGTACAGGCT CTGTGGTTTT

I E V A Q F V K D L L L H L K K L F R E
1021 TCGAGGTGCG CCAGTTTGTGA AAGGACCTGC TCTTACATT AAAGAACTT TTTCCGAGG
AGCTCCAGC GGTCAACAT TTCTGGAGC AGAATGTAAA TTTCTTTGAA AAGAGCGTCC

G R F N E S K Y G P P C P P C P A P E F
1081 GACGGTTCAA CGAGTCCAAA TATGGTCCCC CATGCCACC ATGCCAGCA CCTGAGTTCC
CTGCCAAGT GCTCAGGTTT ATACCAAGGG GTACGGGTG TACGGGTCTG GACTCAAGG

L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S
1141 TGGGGGACC ATCAGTCTTC CTGTTCCCCC CAAAACCCAA GGACACTCTC ATGATCTCCC
ACCCCTCGT TAGTCAGAG GACAAGGGGG GTTTGGGTT CCTGTGAGAG TACTAGAGGG

```

【 図 5 A 】

FIG. 5A

(hEF1p-)

```

1 TCGAAGGATC TGGATCGCT CCGGTGCCCG TCAGTGGGCA GAGCGCACAT CGCCCACAGT
AGTTCCTTAG ACGCTAGCGA GGCCACGGCG AGTCACCCCT CTCCGGTGTGA GCGGGTGTCA

61 CCCCAGAAAG TTGGGGGAG GGGTCGGCAA TTGAACCCGT GCCTAGAGAA GGTGGCGCGG
GGGGCTCTC AACCCCCCTC CCCAGCCGTT AACTTGGCCA CGGATCTCTT CCACCGCGCC

121 GGTAAACTGG GAAAGTATG TCGTGTACTG GCTCCGCTT TTTCCCGAGG GTGGGGGAGA
CCATTTGACC CTTTCACTAC AGCACATGAC CGAGCGGAA AAAGGGCTCC CACCCCTCT

181 ACCGTATATA AGTGCAGTAG TCGCCGTGAA GCTTCTTTT CGCAACGGGT TTGCCGCCAG
TGGCATATAT TCACGTATC AGCCGCACTT GCAAGAAAAA GCGTGTGCCA AACGGCGGTC

241 AACACAGCTG AAGCTTCGAG GGGCTCGCAT CTCTCTTTC CGCGCCCGCC GCCTACCTG
TTGTGTGCAC TTCGAAGCTC CCGAGCGCTA GAGAGAAAGT CGCGCGCGCC GGGATGGAC

301 AGGCCCCAT CCACGCCGT TGAGTCGCT TCTGCCCTT CCCGCTGTG GTGCCCTCTG
TCCGGCGGTA GGTGCGCCA ACTCAGCGCA AGACGGCGA GGGCGACAC CACGGAGGAC

361 AACTGCGTCC GCCGTCTAGG TAAGTTTAAA GCTCAGTGC AGACCGGGCC TTTGTCCGGC
TTGACGACG CGGCAGATCC ATTCAAATTT CGAGTCCAGC TCTGGCCCG AAACAGGGCC

421 GTCCTCTGG AGCCTACCTA GACTCAGCCG GCTCTCCAG CTTTCCGCTA CCTGCTTGC
CGAGGAAAC TCGGATGGAT CTGAGTCGGC CGAGAGGTGC GAAACGGACT GGGACGAGC

481 TCAACTCTAC GTCTTTGTTT CGTTTTCTG TCTGGCCGT TACAGATCCA AGCTGTGACC
AGTTGAGATG CAGAAACAAA GCAAAAGACA AGACCGCGCA ATGTCTAGGT TCGACTGTC

541 GCGCCTACG TAAGTATAT CTACTAGATT TATCAAAAAG AGTGTGACT TGTGAGCGCT
CCCGGATGC ATTCACTATA GATGATCTAA ATAGTTTTTC TCACAATGTA ACACTCGCGA

601 CACAATTGAT ACGGATTCAT CGAGAGGGAC ACGTCGACTA CTAACCTTCT TCTTCTTCT
GTGTTAATA TGCCTAAGTA GCTCTCCCTG TGCAGCTGAT GATTGGAAGA AGAGAAAAGA

```

【 図 5 C 】

FIG. 5C

```

R T P E V T C V V V D V S Q E D P E V Q
1201 GGACCCCTGA GGTACAGTGC GTGGTGGTGG ACGTGAGCCA GGAAGACCCG GAGGTCCAGT
CCTGGGGACT CCAGTGCAGC CACCACCAC TGCACTCGGT CCTTCTGGGG CTCCAGGTCA

F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E
1261 TCAACTGTA CGTGATGGC GTGGAGGTG ATAATGCCAA GACAAGCCG CCGGAGGAGC
AGTTGACCAT GCACCTACCG CACCTCCAGC TATTACGGTT CTGTTTCGGC GCCTCTCTG

Q F N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L
1321 AGTTCAACAG CACGTACCGT GTGGTCAGC TCCTCACCT CCTGCACCAG GACTGGCTGA
TCAAGTTGTC GTGCATGGCA CACCAGTCCG AGGAGTGGCA GGCAGTGGT CTGACCGACT

N G K E Y K C K V S N K G L P S S I E K
1381 ACGCAAGGA GTACAAGTGC AAGGTCTCCA ACAAGGCTC CCGTCTCC ATCGAGAAAA
TGCCGTCTCT CATGTTACG TCCAGAGGT TSTTCCGGA GGGCAGGAGG TAGCTCTTTT

T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S
1441 CCATCTCAA AGCCAAAGG CAGCCCGAG AGCCACAGGT GTACACCCTG CCCCATCCC
GGTAGAGGTT TCGGTTTCC GTCGGGGCTC TCGGTGCCA CATGTGGGAC GGGGTAGGG

Q E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P
1501 AGGAGGAGAT GACCAAGAC CAGGTACGCC TGACCTGCT GGTCAAAGG TTCTACCCCA
TCTCTCTTA CTGGTCTTG GTCCAGTCG ACTGAGCGGA CCAAGTTCCG AAGATGGGT

S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T
1561 GCGACATCCG CGTGGAGTG GAGAGCAATG GGCAGCCGA GAACAACATC AAGACACGC
CGCTGTAGC GCACCTCAC CTCTCGTAC CCGTCCGCT CTGTGTGATG TTCTGTGGG

P P V L D S D G S F F L Y S R L T V D K
1621 CTCCCGTGT GACTCCGAC GGCTCCTTCT TCCTCTACAG CAGGCTAAC GTGGACAAGA
GAGGACAGA CCTGAGGCTG CCGAGGAAGA AGGAGATGTC GTCCGATTGG CACTGTGTT

S R W Q E G N V F S C S V M H E A L H N
1681 CGAGGTGGCA GGAGGGGAT GTCTTCTCAT GCTCCGTGAT GCATGAGGCT CTGCACAACC
CGTCCACCGT CCTCCCTTA CAGAAGAGTA CGAGGACTA CTAAGTCCGA GACTGTGTTG

```

【 5 D 】

H Y T Q K S L S L S L G K M A L I V L G
 1741 ACTACACACA GAAGAGCCTC TCCCTGTCCC TAGGTAATAA GGCCCTGATT GTGCTGGGGG
 TGTATGTGTCT CTTCTCGGAG AGGGACAGGG ATCCATTTTA CCGGGACTAA CAGCACCCCC

G V A G L L L F I G L G I F F R V K F S
 1801 GCGTCGCGG CCTCCTGCTT TTCATTGGGC TAGGCATCTT CTTCAGAGTG AAGTTACGCA
 CGCAGCGGCC GGAGGACGAA AAGTAACCCG ATCCGTAGAA GAAGTCTCAC TTCAGTCTGT

R S A D A P A Y Q Q G Q N Q L Y N E L N
 1861 GGAGCGCAGA CGCCCCCGG TACCAGCAGG GCCAGAACA GCTCTATAAC GAGCTCAATC
 CCTCGCGTCT GCGGGGCGC ATGGTCGTCC CGGTCTTGTG CGAGATATTG CTCGAGTTAG

L G R R E E Y D V L D K R R G R D P E M
 1921 TAGGACGAAG AGAGGAGTAC GATGTTTTGG ACAAGAGACG TGGCCGGGAC CCTGAGATGG
 ATCCTGCTCT TCTCCTCATG CTACAAAACC TGTTCTCTGC ACCGCGCCCTG GGACTCTACC

G G K P R R K N P Q E G L Y N E L Q K D
 1981 GGGAAAAGCC GAGAAGGAAG AACCTCAGG AAGGCTGTA CAATGAACTG CAGAAAAGATA
 CCCCTTCGG CTCCTCCTTC TTGGGAGTCC TTCCGGACAT GTTACTTGAC GTCTTTCTAT

K M A E A Y S E I G M K G E R R R G K G
 2041 AGATGGCGGA GGCCTACAGT GAGATTGGGA TGAAAGGCGA GCGCCGGAGG GGCAAGGGGC
 TCTACCCGCT CCGGATGCA CTCTAACCTT ACTTTCCGCT CGCGGCCCTC CCGTTCCCGG

H D G L Y Q G L S T A T K D T Y D A L H
 2101 AGCATGGCCT TTACCAGGCT CTCAGTACAG CCACCAAGGA CACCTACGAC GCCCTTCACA
 TCGTACCGGA AATGGTCCCA GAGTCATGTC GGTGGTTCTT GTGGATGCTG CGGGAAGTGT

M Q A L P P R *
 2161 TGCAGGCCCT GCCCCCTGCG TGAGCGCGCG GCGAAGGAGG CCTAGATCTA TCGATTGTAC
 ACGTCCGGGA CCGGGGAGCG ACTCGCGCGC CGCTTCCTCC GGATCTAGAT AGCTAACATG

(後期 SV40pAn-)
 2221 AGCTAGCTCG ACATGATAAG ATACATTGAT GAGTTTGGAC AAACCACAAC TAGAATGCAG
 TCGATCGAGC TGTACTATTC TATGTAACCTA CTCAAAACCTG TTTGGTGTGG ATCTTACGTC

【 5 E 】

FIG. 5E

2281 TGAAAAAAT GCTTTATTG TGAATTTGT GATGCTATTG CTTTATTGT GAAATTTGTG
 ACITTTTTTA CGAATAAAC ACTTTAAACA CTACGATAAC GAAATAACA CTTTAAACAC

2341 ATGCTATTG TTTATTGTA ACCATTATAA GCTGCAATAA ACAAGTTAAC AACACAATT
 TACGATAACG AAATAAACAT TGGTAATATT CGACGTTATT TGTTCATTG TTGTGTATA

2401 GCATTCATT TATGTTTCAG GTTCAGGGG AGGTGTGGGA GGTTTTTTAA AGCAAGTAAA
 CGTAAGTAAA ATACAAAGTC CAAGTCCCCC TCCACCACCT CCAAAAATTT TCGTTCATTT

(Ori Cole1-)
 2461 ACCTCTACAA ATGTGGTGA TCCATTTTAA TGTTAGCGAA GAACATGTGA GCAAAAAGCC
 TGGAGATGTT TACACCATCT AGGTAAATTT ACAATCGCTT CTTGTACACT CGTTTTCCGG

2521 AGCAAAAGC CAGGAACCGT AAAAAGGCC CGTGTCTGGC GTTTTTCCAT AGGCTCCGCC
 TCGTTTTCCG GTCCCTGGCA TTTTCCCGC GAACGACCGC CAAAAAGGTA TCCGAGCGCG

2581 CCCCTGACGA GCATCAAAA AATCGACGCT CAAGTCAGAG GTGGGGAAC CCGACAGGAC
 GGGACTGCT CAGTGTGTT TTAGCTGCGA GTTCAGTCTC CACCGCTTGG GGCTGTCTCG

2641 TATAAAGATA CCAGCGGTTT CCCCTGGAA GCTCCCTCGT GGGCTCTCCT GTTCCGACCC
 ATATTTCTAT GGTCCGCAAA GGGGGACCTT CGAGGGAGCA CCGGAGAGGA CAAGGCTGGG

2701 TGCCGCTTAC CGGATACCTG TCCGCTTTC TCCCTCCGG AAGCGTGGCG CTTTCTCAAT
 ACGCGCAATG GCCTATGGAC AGCGGGAAG AGGGAAGCC TFCGACCGC GAAAGATTA

2761 GCTCACGCTG TAGGTATCTC AGTTCGGTGT AGTTCGTTCG CTCCAAGCTG GGCTGTGTGC
 CGAGTGGGAC ATCCATAGAG TCAAGCCACA TCCAGCAGC GAGGTTCCAG CCGACACAGG

2821 ACGAACCCCG CGTTCAGCCG GACCGCTGCG CTTTATCCGG TAACACTCGT CTTGAGTCCA
 TGCTTGGGG GCAAGTCCGG CTGGCGAGCG GGAATAGGCC ATTGATAGCA GAACTCAGGT

2881 ACCCGGTAAG ACACGACTTA TCGCCACTGG CAGCAGCCAC TGGTAACAGG ATTAGCAGAG
 TGGGCCATTC TGTGTGAAT AGCGGTGACC GTCGTCGGTG ACCATTGTCC TAATCGTCTC

2941 CGAGGTATGT AGCGGTGCT ACAGAGTTCT TGAAGTGGT GCCTAATAC GGCTACACTA
 GCTCCATACA TCCGCCAGA TGTCTCAAGA ACTTCACCAC CGGATGTAGT CCGATGTGAT

【 5 F 】

FIG. 5F

3001 GAAGAACAGT ATTTGGTATC TGCGCTCTGC TGAAGCCAGT TACCTTCGGA AAAAGAGTTG
 CTTCTTGTA TAAACCATAG ACGCGAGACG ACTTCGGTCA ATGGAAGCCCT TTTTCTCAAC

3061 GTAGCTCTTG ATCCGGCAA CAAACCAGC CTGGTAGCGG TGTTTTTTT GTTTGCAAGC
 CATCGAGAAC TAGGCGCTTT GTTGTGTGGC GACCATCGCC ACCAAAAAAA CAAAGCTTCG

3121 AGCAGATTAC GCGCAGAAAA AAAGGATCTC AAGAAGATCC TTTGATCTTT TCTACGGGGT
 TCGTCTAATG CCGCTCTTTT TTTCTTAGAG TTCTTCTAG AACTAGAAA AGATGCCCA

PacI
 ~~~~~  
 3181 CTGACGCTCA GTGGAACGAA AACTACAGTT AAGGGATTTT GGTCATGGCT AGTTAATTA  
 GACTCGAGT CACCTTGCTT TTGAGTGCAA TTCCCTAAAA CCAGTACCGA TCAATTAAT

(SpAn-)  
 3241 GCTGCAATAA ACAATCATT TTTTCAATG ATCTGTGTGT TGTTTTTTG TGTGGGCTTG  
 CGACGTTATT TGTAGTAAAT AAAAGTAACC TAGACACACA ACCAAAAAAC ACACCCGAA

3301 GGGGAGGGG AGGCCAGAA GACTCCAAGA GCTACAGGAA GGCAGGTCAG AGACCCCACT  
 CCCCTCCCC TCGGCTCTTA CTGAGTTCTT CGATGTCCTT CCGTCCAGTC TCTGGGGTGA

3361 GGACAAACAG TGGCTGGACT CTGACCATA ACACACAATC AACAGGGGAG TGAGCTGGAT  
 CCTGTTTTG ACCGACTGA GACGTGGTAT TGTGTGTAG TGTCCCTC ACTCGACCTA

(hCMV-1Prom-)  
 3421 CGAGCTAGAG TCCGTTACAT AACTTACGGT AAATGGCCCC CCTGGCTGAC CGCCCAACGA  
 GCTCGATCTC AGGCAATGTA TTGAATGCCA TTTACCAGGC GGACCGACTG GCGGGTTGCT

3481 CCCCAGCCCA TTGACGTCAA TARTGACGTA TGTTCACATA GTAACGCCAA TAGGGACTTT  
 GGGGCGGGT AACTGCAGTT ATTACTGCAT ACAAGGGTAT CATTGCGGTT ATCCCTGAAA

3541 CCATTGACGT CAATGGGTGG AGTATTTACG GTAACCTGCC CACTTGGCAG TACATCAAGT  
 GGTAACTGCA GTTACCACCC TCATAAATGC CATTGACGG GTGAACCGTC ATGTAGTTC

3601 GTATCATATG CCAAGTACGC CCCCTATTGA CGTCAATGAC GGTAAATGGC CCGCTGGCA  
 CATAGTATAC GGTTCATGCG GGGGATAACT GCAGTTACTG CCATTTACCG GCGCGACCTG

【 5 G 】

FIG. 5G

3661 TTATGCCAG TACATGACCT TATGGACTT TCCTACTTGG CAGTACATCT ACGTATTAGT  
 AATACGGGTC ATGTACTGGA ATACCCTGAA AGGATAGCAA GTCACTAGA TGCATAATCA

3721 CATCGCTATT ACCATGGTGA TGCGGTTTTG GCAGTACATC AATGGGCGTG GATAGCGGTT  
 GTAGCGATAA TGGTACCCTC ACGCCAAAAC CGTCAATGAG TTACCCGCAC CATTGCGCAA

3781 TGACTCACGG GATTTTCAA GTCTCCACCC CATTGACGTC AATGGGAGTT TGTTTTGGCA  
 ACTGAGTGCC CTAAGAGTT CAGAGGTGGG GTAACGTAGC TTACCTCAA ACAAAACCGT

3841 CCAAAATCAA CCGGACTTTC CAAAATGTCG TAACAATCCG GCCCATTTGA CGCAATGGG  
 GTTTTAGTT GCCCTGAAAG GTTTTACAGC ATTTGTTGAG CCGGGTAACT GCGTTTACCC

3901 CGGTAGGCGT GTACGGTGGG AGGTCTATAT AAGCAGAGCT CGTTTAGTGA ACCGTGAGT  
 GCCATCCGCA CATGCCACCC TCCAGATATA TTGCTCTGGA GCAAACTACT TGGCAGTCTA

3961 CGCCTGGAGA CGCCATCCAC GCTGTTTTGA CCTCCATAGA AGACACCGGG ACCGATCCAG  
 GCGGACCTCT CCGGTAGGTT CGACAAAAC TTGAGTATCT TGTGTGGCC TGGTATGTC

4021 CCTCCGCGC GGGGAACGCT GCATTGGAAC GCGGATPCCC CGTGCCAAGA GTGACGTAAG  
 GGAGGCGCGC GCCCTTGCCA CGTAACCTTG CGCTAAGGG GCACGGTTCT CACTGCATTC

4081 TACCGCTAT AGAGTCTATA GGCCCACTA GTTGTGACCG GCGCCTAGTG TTGACAATTA  
 ATGGCGGATA TCTCAGATAT CCGGTGGAT CAACACTGGC CCGGATAC AACTGTTAAT

4141 ATCATCGGCA TAGTATAATA CGACTACTA TAGGAGGGCC ACCATGTCGA CTAATAACCT  
 TAGTAGCCCT ATCATATAT GCTGAGTGT ATCCTCCCGG TGGTACAGCT GATGATTGGA

(HyTK-)  
 M K K P E L  
 4201 TCTTCTCTT CCTACAGCTG AGATCACCGG TAGGAGGGCC ATCATGAAA AGCCTGAACT  
 AGAAGAGAAA GGATGTCGAC TCTAGTGGCC ATCCTCCCGG TAGTACTTTT TCGGACTTGA

T A T S V A K F L I E K F D S V S D L M  
 4261 CACCGCGACG TCTGTCCGGA AGTTTCTGAT CGAAAAGTTC GACAGCGTCT CCGACCTGAT  
 GTGGCGCTGC AGACAGCGCT TCAAAGACTA GCTTTTCAAG CTGTCCGAGA GGCTGGACTA

【 5 H 】

FIG. 5H

Q L S E G E E S R A F S F D V G G R G Y  
4321 GCAGCTCTCG GAGGGCGAAG AATCTCGTGC TTTCAGCTTC GATGTAGGAG GCGTGGATA  
CGTCGAGAGC CTCCCGCTTC TTAGAGCAGC AAAGTCSAAG CTACATCTCC CCGCRACCTAT

V L R V N S C A D G F Y K D R Y V Y R H  
4381 TGTCTGCGG GTAATAGCT GCGCCGATGG TTCTACAAA GATCGTTATG TTTATCGGCA  
ACAGGACGCC CATTATTCGA CGCGGTACC AAAGATGTTT CTAGCAATAC AAATAGCCGT

F A S A A L P I P E V L D I G E F S E S  
4441 CTTTGCATCG GCGCGCTCC CGATTCCGGA AGTGTCTGAC ATTGGGGAAT TCAGCGAGAG  
GAAACGTAGC CGCGCGGAGG GCTAAGGCT TCACGAACTG TAACCCCTTA AGTCGCTCTC

L T Y C I S R R A Q G V T L Q D L P E T  
4501 CCTGACCTAT TGCATCTCCC GCGGTGCACA GGTGTCTCAG TTGCAAGACC TGCCTGAAC  
GGACTGGATA ACGTAGAGGG CGGCACGTGT CCACACAGTC AACGTTCTGG ACGGACTTTG

E L P A V L Q P V A E L M D A I A A A D  
4561 CGAACTGCC CCTGTTCTGC AACCCGTCGC GGAGCTCATG GATCGCATGC CTGCGGCCGA  
GCTTGACGGG CGACAAGAGC ATCCGAGTAC CTACGCTAGC GACCGCGGCT

L S Q T S G F G P F G P Q G I G Q Y T T  
4621 TCTTAGCCAG ACGAGCGGTG TCGGCCATT CGGACCGCAA GGAATCGCTC AATACACTAC  
AGAATCGCTC TGCTCGCCA AGCCGGTAA GCTTGGCCTT CCTTAGCCAG TTATGTGATG

W R D F I C A I A D P H V Y H W Q T V M  
4681 ATGGCTGAT TTCATATGCG CGATTGCTGA TCCCATGTG TACTACTGGC AAAGTGTGAT  
TACCGCACTA AAGTATAGCG ATCGACACTA AAGGTACACC ATAGTGACC TTTGCACTA

D D T V S A S V A Q A L D E L M L W A E  
4741 GGACGACACC GTCAGTGCCT CCGTCGCGCA GGCTCTCGAT GAGCTGATGC TTTGGGCCGA  
CCTGCTGTGG CAGTACGCA GGCAGCGGT CCGAGAGCTA CTCGACTACG AAACCCGCT

D C P E V R H L V H A D F G S N N V L T  
4801 GGACTGCCCC GAAGTCGGCG ACCTCGTGA CGCGGATTC GGCTCCAACA ATGTCTGTAC  
CCTGACGGGG CTTCAGGCCG TGGAGCACGT GCGCCTAAG CCGAGGTTGT TACAGGACTG

【 5 I 】

FIG. 5I

D N G R I T A V I D W S E A M F G D S Q  
4861 GGACAAATGG CGCATAACAG CCGTCATGA CTGGAGCCAG CGCATGTTCG GGGATTCCCA  
CCTGTACCAG CCGTATTGTC CCGAGTAAT GACCTCGCTC CGTACACAGC CCCTAAGGGT

Y E V A N I F F W R P W L A C M E Q Q T  
4921 ATACGAGGTC GCCAACATCT TCTCTGGAG GCGGTGGTTC GCTGTATATG AGCAGCAGAC  
TATGCTCCAG CCGTGTAGA AGAAGCCCT CGGCACCAAC CGAACATACC TCGTCTGCTG

R Y F E R R H P E L A G S P R L R A Y M  
4981 GCGCTACTTC GAGCGGAGG ATCCGGAGCT TCGAGGATCG CCGCGGCTCC GCGCTATAT  
CGCATGAAG CTCGCCCTCG TAGGCCTCGA ACGTCTACG GGCGCCGAG CCCGCATATA

L R I G L D Q L Y Q S L V D G N F D D A  
5041 GCTCCGCATT GGTCTTGACC AACTCTATCA GAGCTTGGTT GACGGCAAIT TCGATGATGC  
CGAGGCTTAA CCAGAACTGG TTGAGATAGT CTCGAACCAA CTGCCGTTAA AGCTACTAGC

A W A Q G R C D A I V R S G A G T V G R  
5101 AGTTGGGCG CAGGGTCGAT GCGACGCAAT CGTCCGATCC GGAGCCGGGA CTGTGCGGGC  
TCGAACCCGC TGCCACGCTA CGTCTGCTTA CGAGGTAGG CCTCGGCCCT GACAGCCCGC

T Q I A R R S A A V W T D G C V E V A S  
5161 TACACAAATC GCCCGCAGAA GCGCGGCGCT CTGACCGAT GGCTGTGTAG AAGTCGCTC  
ATGTGTTTAG CCGGCTCTT CCGCCCGCA GACCTGGCTA CCGACACATC TTCAGCGCAG

A F D Q A A R S R G H S N R R T A L R P  
5221 TGGCTCGAC CAGGGTCGCG GTTCTCGCGG CCATAGCAAC CGACGTACGG CTGTGCGGGC  
ACGCAACGCTG TGCCGACGCG CAAGAGCCGC GGTATCGTGT GCTGCATGCC GCAACGCGGG

R R Q Q E A T E V R P E Q K M P T L L R  
5281 TCGCCGCGAC CAAGAGCCA CGGAAGTCCG CCGGAGCAG AAAATGCCCA CGTACTGCG  
AGCGCCGCTC GTTCTCGGT GCCTCAGCG GGGCTCTGCT TTTTACGGGT GCGATGACGC

V Y I D G P H G M G K T T T T Q L L V A  
5341 GGTATATATA GACGGTCCCG ACGGGATGGG GAAACCACCC ACACCGCAAC TGTGTGGTGC  
CCAATATATAT TGCCAGGGG TGCCCTACCC CTTTTGGTGG TGGTGGCTGG ACGACCACCC

【 5 J 】

FIG. 5J

L G S R D D I V Y V P E P M T Y W R V L  
5401 CCTGGGTTCC GCGGACGATA TCGTCTACGT ACCCGAGCCG ATGACTTACT GCGGGTGTCT  
GCGCCCAAGC GCGCTGCTAT AGCAGATGCA TGGGCTCGGC TACTGAATGA CCGCCQACGA

G A S E T I A N I Y T T Q H R L D Q G E  
5461 GGGGGTTCG GAGACAATCG CGAACATCTA CACCACACAA CACCGCTCG ACCAGGTGA  
CCCCGAAGG CTCGTGTAGC GCTTGTAGAT GTGGTGTGTT GTGGCGGAGC TGGTCCCACT

I S A G D A A V V M T S A Q I T M G M P  
5521 GATATGCGCC GGGGACGCGG CCGTGGTAA TACAAGCGCC CAGATAACAA TGGGATCGCC  
CATATAGCCGG CCCCTGCGCG GGCACATTA CTGTTCCGCGC GTCTATTGTT ACCCTACGCG

Y A V T D A V L A P H I G G E A G S S H  
5581 TTATGCGGTG ACCGACGCGG TCTGGCTCC TCATATCGGG GGGGAGGTA GAGSCTACA  
AATACGGCAC TGCTGCGCGG AAGACCGAGG AGTATAGCCC CCCCTCCGAC CCTFCAGTGT

A P P P A L T L I F D R H P I A A L L C  
5641 TGCCCCGCC CCGGCCCTCA CCTCATCTT CGACCGCAT CCCATCGCCG CCTCCTGTG  
ACGGGGCGGG GCGCGGAGT GGGAGTAGAA GCTGGCGGTA GGGTAGCGGC GGGAGGACAC

Y P A R Y L M G S M T P Q A V L A F V  
5701 CTACCCGCGC GCGCGTACC TTATGGGCG CAGTACCCCG CAGCGCTGCG TGGCTTCTGT  
GATGGCGCGG CGCGCCATGG AATACCCGTC GTACTGGGGG GTCCGGCAGC ACCGCAAGCA

A L I P P T L P G T N I V L G A L P E D  
5761 GGCCCTCATC CCGCGGACT TGCCCGGAC CAACATCGTG CTTGGGGCCC TTCGGAGGA  
CCGGAGTAGG GCGCGCTGGA ACGGGAGTGA GTTGTAGCAC GAACCCCGGG AAGGCCCTCT

R H I D R L A K R Q R P F E R L D L A M  
5821 CAGACACATC GACCGCTGG CCAAACGCCA GCGCCCGCGC GAGCGCTGG ACCTGGCTAT  
GTCTGTGTAG CTGGCGGACC GFTTGGCGGT CCGCGGGCCG CTCGCGGACC TGGACCGATA

L A A I R R V Y G L L A N T V R Y L Q C  
5881 GCTGGCTGCG ATTCGCCGCG TTTACGGGCT ACTTGCCAAT ACGGTGCGGT ATCTGCACTG  
CGACCGACGC TAAGCGCGCG AAATGCCGGA TGAACGGTTA TGCCACGCCA TAGACGTCAC

【 5 K 】

FIG. 5K

G G S W R E D W G Q L S G T A V P P Q G  
5941 CCGCGGGTCC TGGCGGGAGG ACTGGGGACA GCTTTCGGGG ACGGCGCTCG CCGCCAGGG  
GCGCCGCCAG ACCGCCCTCC TGACCCCTCT CGAACCCCTT CCGAGCCGACG TCGGGCTCC

A E P Q S N A G P R P H I G D T L F G T L  
6001 TGCCGAGCCC CAGAGCAACG CCGGCCACCG ACCCATATC GGGGACAGT TATTACCCCT  
ACGGTCCGGG GTCTCGTTC GCGCGGCTGC TGGGTATAG CCCCTGTGCA ATAAATGGGA

F R A P E L L A P N G D L Y N V F A W A  
6061 GTTTCGGGG CCGAGTTGC TGGCCCCAA CCGGACCTGC TATAACGTTT TGGCTGGGC  
CAACGCCCGG GCGCTCAACG ACCGGGGGTT CCGCTGAGC ATATTGCACA AACGCCCCCG

L D V L A K R L R S M H V F I L D Y D Q  
6121 CTTGGAGTTC TGGCCAAAC GCCTCCGTT CATGACGCT TTTATCCTGG ATTACGACCA  
GAACCTGACG AACCCGTTT CCGAGGCAAG GTACTGACG AAATAGGACC TAATGCTGTT

S P A G C R D A L L Q L T S G M V Q T H  
6181 ATCGCCCGCG GGTGCGCGG ACGCCCTGCT GCAACTTACC TCCGGGATGG TCCAGACCCA  
TAGCCGCGCG CCGACGGGCC TCGGGGACGA CGTGAATGG AGCCCTACC AGGTCTGGGT

V T T P G S I P T I C D L A R T F A R E  
6241 CGTACCACCC CCGGGTCCA TACCGACGAT ATGCGACCTG GCGGACAGT TGGCCGGGA  
GCAGTGTGG GGGCCGAGGT ATGGTGCTA TACGCTGGAC CCGCGGTGA AACGGCCCT

M G E A N \* (BGh pAn-)  
6301 GATGGGGGAG GCTAAGTACG TCGAGAATTC GCTAGAGGGC CCTATTCTAT AGTGTACCT  
CTACGCCCTC CGATTGACTC AGCTCTTAAG AGCTCTCCG GGTATAGATA TCACAGTGGGA

AAATGCTAGA GCTCGCTGAT CAGCCTCGAC TGTGCTTCT AGTTGCCAGC CATCTGTTT  
6361 TTTAGTACT CGACGACTA GTCCGAGCTG ACACGGAGA TCAACGGTGC GTAGACAACA

TTGCCCTCC CCGTGCCTT CCTTGACCT GGAAGGTGCC ACTCCCACTG TCCTTCCCTA  
6421 AACGGGGAGG GGGCACGGAA GGAAGTGGGA CCTTCCACGG TGGGTTGAC AGGAAGGAT

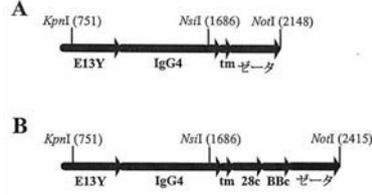
ATAAATGAG GAAATGCTC GCATTTGCT GAGTAGGTTT CATTCTATTC TGGGGGTTG  
6481 TATTTTACTC CTTTACGTA GCGTARAGA CTCATCCACA GTAAGATAAG ACCCCCCACC

【 図 5 L 】

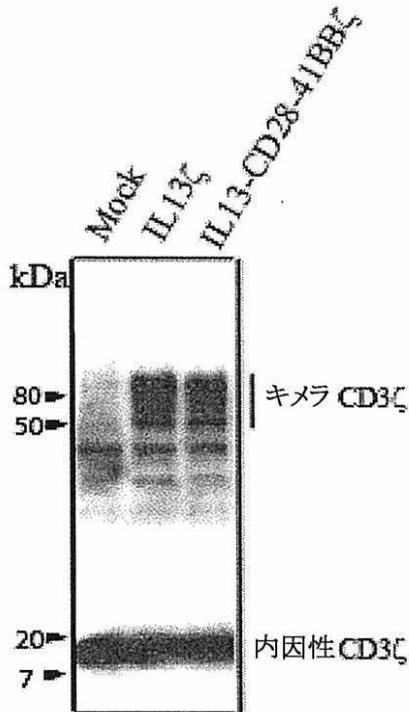
6541 GGTGGGCGAG GACAGCAGG GGGAGGATG GGAAGACAAAT AGCAGGATG GCGAGGGCCC  
 CCACCCCGTC CTGTCCGTTCC CCTCCTAAC CCTTCGTGA TCGTCCGTAC GGGTCCGGG  
 6601 AATTCCTCGA GGGCCCGCA TAAATATCT TTATTTTCAT TACAATCTG TGTTCGTTTT  
 TTAACGAGCT CCGCCGCGT ATTTATAGA AATAAACTA ATGTAGACAC AGAACCAAA  
 6661 TTGTCTGAAAT CGTACTRAC ATGCGCTTC CATCAACA AAGCAACA AACAACTA  
 AACACACTTA GCATTAATG TATCGGAGG GTAGTTTTGT TTGCTTTGT TTTGTTGAT  
 6721 GCAAAATAGG CTGTCCCGAG TGCRASTGA GGTCCAGAA CATTTCTTA (SEQ ID NO:13)  
 CGTTTTATCC GACAGGGGTC AGGTTCACTT CCAAGGAT (SEQ ID NO:14)

IL13 ゼータカインアプス/機能列 (SEQ ID NO:15).  
 HYTK アプス/機能列 (SEQ ID NO:16).

【 図 6 】

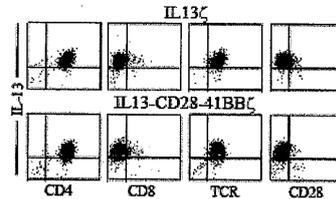


【 図 7 】

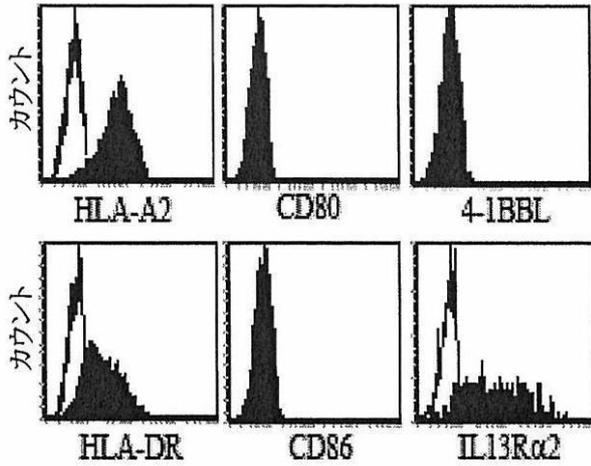


【 図 8 】

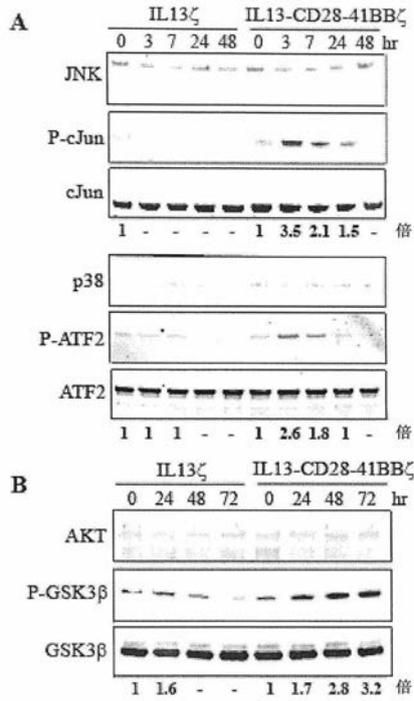
FIG. 8



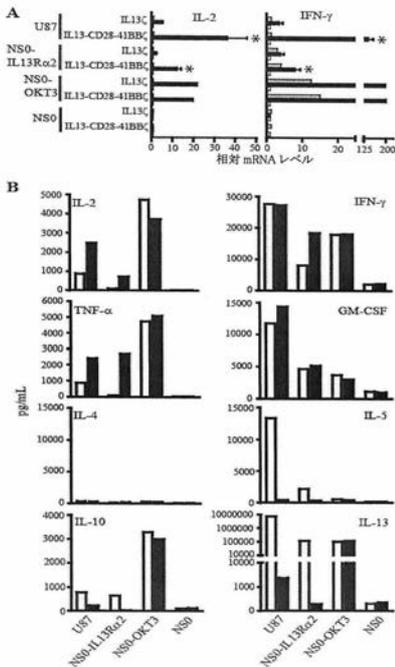
【 図 9 】



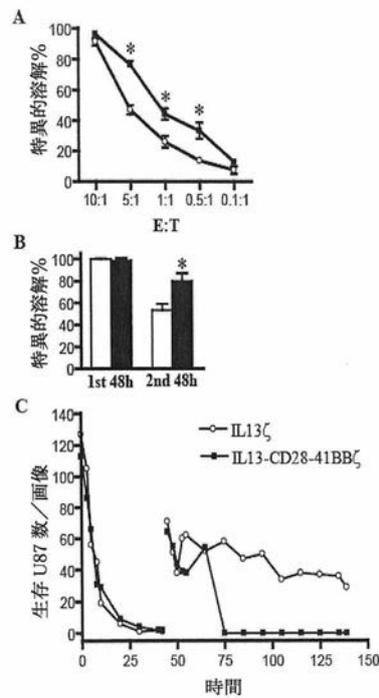
【 図 10 】



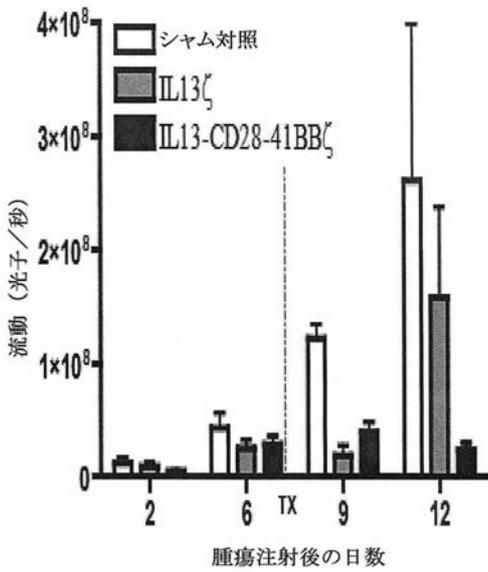
【 図 11 】



【 図 12 】



【 図 1 3 】



【 図 1 4 】

FIG. 14

```

ATGCTGCTGC TGGTACCAG
CCTGCTGCTG TGGAGCTGC CCCACCCCGC CTTTCTGCTG ATCCCTGGCC CCGTGCCCCC
TAGCACCGCC CTGCGCTACC TGATCGAGGA ACTGGTGAAC ATCACCCAGA ACCAGAAAGC
CCCCCTGTGC AACGGCAGCA TGGTGTGGAG CATCAACCTG ACCGCCGCA TGTACTGTGC
CGCCCTGGAA AGCCTGATCA ACCTGAGCGG CTGCAGCGCC ATCGAGAAAA CCCAGCGGAT
GCTGTCCGGC TTCTGCCCCC ACAGGTGTGC CGCCGGACAG TTACAGCACC TGCACGTGGC
GGACCCCAAG ATCGAGGTGG CCCAGTTCGT GAAGGACCTG CTGCTGCACC TGAAGAAGCT
GTTCCGGGAG GGCCGGTTC ACGAGAGCAA GTACGGCCCT CCCTGCCCCC CTTGCCCTGC
CCCAGAGTTC CTGGCGGAC CACGCGTGT CCTGTTCACC CCCAAGCCCA AGGACACCTC
GATGATCAGC CGGACCCCTG AGGTGACCTG CGTGGTGGT GACGTGAGCC AGGAAGATCC
TGAGGTCCAG TTCAATTGGT ACSTGGACGG CGTGAAGTG CACAACGCCA AGACCAAGCC
CAGAGAGGAA CAGTTCACCA GCACCTACCG GGTGGTGTCT GTGCTGACCG TGCTGCACCA
GGACTGGCTG AACGGCAAG AATACAAGTG CAAGGTGTCC AACAGGGCC TGCCACGAG
CATCGAAAAG ACCATCAGCA AGGCCAAGGG CCAGCCTCGC GAGCCCCAGG TGTACACCTT
GCCTCCCTCC CAGGAAGAGA TGACCAAGAA CCAGGTGTCC CTGACCTGCC TGGTGAAGGG
CTTCTACCCC AGCGACATCG CCGTGGAGTG GGAGAGCAAC GGCCAGCCTG AGAACAACTA
CAAGACCACC CCTCCCGTGC TGGACAGCGA CGGCAGCTTC TTCTGTACA GCCGCTGAC
CGTGACAAG AGCCGGTGGC AGGAAGGCAA CGCTTTTAGC TGCAGCGTGA TGCACGAGGC
CCTGCACAAC CACTACACCC AGAAGAGCCT GAGCCTGTCC CTGGCAAGA TGTCTGGGT
GCTGTGGTGG GTGGCGGGG TGCTGGCCTG CTACAGCCTG CTGGTACAG TGGCCTTCAT
CATCTTTTGG GTGGGAGCA AGCGGAGCAG AGCGGGCCAC AGCGACTACA TGAACATGAC
CCCCAGCGC CTGGCCCCA CCGGGAAGCA CTACCAGCCC TAGCCCCAC CCAGGGACTT
TGCCGCTTCC CGTCCGGCG GAGGGCGGGT GAAGTTCAGC AGAAGCGCCG AGCCCTGGTC
CTACCAGCA GGCCAGAATC AGGTGTACAA CGAGCTGAAC CTGGGCAGAA GGAAGAGTA
CGACGTCTGT GATAAGCGGA GAGGCCGGGA CCCTGAGATG GCGGCAGAC CTGCGGGAA
GAACCCCGAG GAAGGCCTGT ATAACGAAC CTGAGAAAGC AAGATGGCCG AGGCCTACAG
CGAGATCGCC ATGAAGGGCG AGCGGAGCG GGCAGGGC CACGACGGCC TGTATCAGGG
CCTGTCCACC GCCACCAAGG ATACTACGA GCCTCTGAC ATGCAGGCC TGCCCCAAG
GTGA (SEQ ID NO:36)

```

【 図 1 5 】

FIG. 15

```

ATGCT TCTCCTGGTG ACAAGCCTTC TGCTCTGTA GTTACCACAC
CCAGCATTC TCTGATCCC AGGCCCTGTG CCTCCCTCTA CAGCCCTCAG GGAGCTCATT
GAGGAGCTGG TCAACATCAC CCAGAACAGC AAGGCTCCGC TCTGCAATGG CAGCATGGTA
TGGAGCATCA ACCTGACAGC TGGCATGTAC TGTGACGCC TGGAACTCCT GATCAACCTG
TCAGCTGCA GTGCCATCGA GAAGACCAGC AGGATGCTGA GCGGATCTG CCGCACAAG
GTCTCAGCTG GGCAGTTTTT CAGCTTGCAT GTCCGAGACA CCAAAATCGA GGTGGCCAG
TTTGTAAAG ACCTGCTCTT ACATTTAAAG AAATTTTTT GCGAGGAGC GTTCAACGAG
TCCAAATATG TCCCCCATG CCCACCATGC CCAGCACCTG AGTTCTGGG GGGACATCA
GTCTTCTGT TCCCCCAA ACCEAAGGAC ACTCTCATGA TCTCCCGGAC CCTGAGGTG
ACGTGCTGG TGGTGGACGT GAGCCAGGAA GACCCGAGG TCCAGTTCAA CTGTACCTG
GATGGCCTGG AGGTGCATAA TGCCAAAGCA AAGCCCGGG AGGAGCAGTT CAACAGCAGC
TACCCTGTGG TCAGCCTCCT CACCCTCCTG CACCAGGACT GGCTGAACGG CAAGAGTAC
AAGTGCAAG TCTCCAAACA AGGCCCTCCG TCCTCCATCG AGAAAACCAT CTCCAAAGCC
AAAGGGCAGC CCCGAGAGCC ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC CATCCAGGA GGAGATGACC
AAGAACGAG TCAGCCTGAC CTGCTGGTTC AAAGCTTCT ACCCCAGCA CATCGCCGTG
GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCGGAGAAC AACTACAAGA CCACGCCTCC CGTGTGGTAC
TCCGACGGCT CCTTCTTCT CTACAGCAGG CTAACCTGG ACAAGAGCAG GTGGCAGGAG
GGGAATGTCT TCTCATGCTC CGTGTGATC GAGGCTCTGC ACAACCACTA CACACAGAAG
AGCCTCTCCC TGTCTCTGG TAAATGGCC CTGATTGTGC TGGGGGCGT CGCCGGCCTC
CTGCTTTTCA TTGGGTAGG CATCTTCTT AGGAGTAAGA GGAGCAGGCT CCTGCACAGT
GACTACATGA ACATGACTCC CCGCCGCGCT GGGCCACCC GCAAGCATT CAGCCCTAT
GCCCCACCAC GCGACTTCGC AGCCTATCGC TCCGGAGGTG GCAACGGGG CAGAAAGAA
CTCCTGTATA TATTCAAACA ACCATTTATG AGACAGTAC AAACACTCA AGAGGAAGAT
GGCTGTAGCT GCCGATTTC AGAAGAAGAA GAAGGAGGAT GTGAACCTGG AGGTGGCAGA
GTGAAGTTCA GCAGGAGCCG AGACGCCCC CGCTACCAG AGGGCCAGAA CCAAGCTTAT
AACGAGTCA ATCTAGGAGC AAGAGAGGAG TACGATGTT TGGACAAGAG ACSTGGCCGG
GACCCTGAGA TGGGGGAAA GCCGAGAAAG AAGAACCCTC AGAAGGCCCT GTACATGAA
CTGCAGAAAG ATAAGATGGC GGAGGCCTAC AGTGAATGG GGATGAAAG CGAGCCGGC
AGGGCAAGG GGCACGATGG CCTTTACCAG GGTCTCAGTA CAGCCACCAA GGACACCTAC
GACGCCCTTC ACATGCAGCC CCTGCCCTCT CGCTGA (SEQ ID NO:37)

```

【 図 1 6 】

FIG. 16

```

AT GCTTCTCCTG GTGACAAGCC TTCTGCTCTG TGAGTTACCA
CACCAGCAT TCCTCCTGAT CCCAGGCCCT GTGCTCCCTC CTACAGCCCT CAGGTACCTC
ATTGAGGAGC TGCTCAACAT CACCAGAAC CAGAAGGCTC CGCTCTGCAA TGGCAGCATG
GTATGGAGCA TCAACCTGAC AGTGGCATG TACTGTGCAG CCCTGGAATC CCTGATCAAC
GTGTCAAGCT GCAGTGCCAT CGAGAAGACC CAGAGGATGC TGAGCGGATT CTGCCCGCA
AAGTCTCAG CTGGCAGTT TTCCAGCTTG CATGTCCGAG ACACCAAAAT CGAGGTGGCC
CAGTTTGTAA AGGACCTGTCT TTACATTTA AAGAACTTT TTCCGAGGGC ACGTTCAAC
TAGTCTTTC TTCTCCCCC AAAACCCAG GACACTCTCA TGATCTCCC GACCCCTGAG
GTCACGTCCG TGGTGGTGA CGTGAAGCCG GAAGACCCCG AGTCCAGTT CAACTGGTAC
GTGGATGGCG TGGAGGTGCA TAATGCCAAG ACAAAAGCCG GGGAGGAGCA GTTCAACAGC
ACGTACCTCG TGGTCAAGCT CTCACCGCTC CTGACCCAG ACTGGCTGAA CGGCAGGAG
TACAAGTGA AGTCTCCAA CAAAGGCCCT CCCTCTCCA TCGAAGAAAC CATCTCCAAA
GCCAAAGGGC AGCCCGGAGA GCCAAGGTC TACACCTGCG CCCATCCCA GGAGGAGATG
ACCAAGAACC AGTCAAGCT GACCTGCTG GTCAAAGGCT TCTACCCAG CGACATCGCC
GTGGAGTGGG AGAGCAATGG GCAGCCGGAG AACAATACA AGACCAAGC TCCCTGTCTG
GACTCCGAGC GCTCTTCTT CCTCTACAG AGGCTAACCG TGGACAAGAG CAGTGTGCAG
GAGGGGAATG TCTTCTCATG CTCCGTGATG CATGAGGCTC TGCACAACA CTACACACAG
AAGAGCCTCT CCCTGCTCCT AGTAAATTT TGGGTGCTGG TGGTGGTTGG TGGAGTCTG
GCTTGTATA GCTTGTAGT AACAGTGGCC TTTTATTTT TCTGGTGGAG GAGTAAGAG
AGCAGGCTCC TGCAAGTGA CTACATGAAC ATGACTCCCC GCGGCCCGG GCCACCCCG
AAGCATTACC AGCCCTATGC CCCACACGC GACTTCGAG CCTATGCTC CAGGGACCAG
AGGCTGCCCC CCGATGCCCA CAAAGCCCTT GGGGAGGCA GTTTCGGAC CCCATCCAA
GAGGAGCAG CCGAGCCCA CTCCACCTG CCAAGATCA GAGTGAAGTT CAGCAGGAGC
GCAGAGCCCG CCGCTACA GCAGGGCCAG AACAGCTCT ATACGAGCT CAATCTAGGA
CGAAGAGAG AGTACGATGT TTTGGACAAG AGAGTGGCC GGGACCTGA GATGGGGGA
AAGCCGAGAA GGAAGAACCC TCAGGAAGGC CTGTACAATG AACTCAGAA AGATAGATG
CGGGAGCCT ACAGTGAAT TGGATGAAA GCGAGCGCC GAGGGGCAA GGGCCAGAT
GGCTTTTACC AGGCTCTAG TACAGCCAC AAGGACACT ACAGCCCT TCACATGCA
GCCCTGCCCT CTGCTGA (SEQ ID NO:38)

```

【 図 1 7 】

FIG. 17

ATGCTTCTCC TGGTGACAAG CCTCTGCTC TGTGAGTTAC CACACCCAGC ATTCTCTCTG  
ATCCCAGGCC CTGTGCCTCC CTCTACAGCC CTCAGGTACC TCATTGAGGA GCTGTGCAAC  
ATCACCCAGA ACCAGAAGGC TCCGCTCTGC AATGGCAGCA TGGTATGGAG CATCAACCTG  
ACAGCTGGCA TGTACTGTGC AGCCCTGGAA TCCCTGATCA ACCTGTCAGG CTGCAGTGCC  
ATCGAGAAGA CCCAGAGGAT GCTGAGCGGA TTCTGCCCGC ACAAGGTCTC AGCTGGGCAG  
TTTTCCAGCT TGCATGTCCG AGACACCAAA ATCGAGGTGG CCCAGTTTGT AAAGGACCTG  
CTCTTACATT TAAAGAAACT TTTTCCGGAG GGACCGTTCA ACGAGTCCAA ATATGGTCCC  
CCATGCCAC CATGCCAGC ACCTGAGTTC CTGGGGGAC CATCAGTCTT CCTGTTCGCC  
CCAAAACCCA AGGACACTCT CATGATCTCC CGGACCCCTG AGGTACAGTG CGTGGTGGT  
GACCTGAGCC AGGAAGACCC CGAGTCCAG TTCAACTGCT ACCTGGATGG CGTGGAGGTG  
CATAATGCCA AGACAAAGCC GCGGGAGGAG CAGTTCAACA GCACGTACC GGTGGTCAGC  
GTCTCACC GTCCTGCCA GGCATGGCTG AACGGCAAGG AGTACAAGT CAAGGTCTCC  
AACAAAGGCC TCCCGTCTC CATCGAGAAA ACCATCTCCA AAGCCAAGG GCAGCCCCGA  
GAGCCACAGG TGTACACCTT GCCCCATCC CAGGAGGAGA TGACCAAGAA CCAGGTGACG  
CTGACCTGCC TGGTCAAAGG CTTCTACCCC AGCGACATCG CCGTGGAGT GGAGAGCAAT  
GGGCAGCCG AGAACAACTA CAAGACCACG CCTCCCGTGC TGGACTCCGA CGGCTCTTTC  
TTCTCTACA GCAGACTAAC CGTGGACAAG AGCAGGTGGC AGGAGGGGAA TGCTTCTCA  
TGCTCCGTGA TGCATGAGGC TCTGCACAC CACTACACAC AGAAGAGCCT CTCCCTGTCC  
CTAGGTAAAA TGTTTTGGGT GCTGGTGGT GTTGGTGGAG TCCTGGCTTG CTATAGCTTG  
CTAGTACAG TGGCCCTTAT TATTTTCTGG GTGAGGAGTA AGAGGAGCAG GGGCGGACAC  
AGTGACTACA TGAACATGAC TCCCGGCGC CCTGGGCCA CCGCAAGCA TTACCAGCCC  
TATGCCCCAC CAGCGACTT CGCAGCCTAT CGTCCGGAG GTGGCAACG GGGCAGAAG  
**AAACTCTGT ATATATCAA ACAACCAATT ATGAGACCAG TACAACCTAC TCAAGAGGAA**  
**GATGGCTGT GCTGCCGATT TCCAGAAGAA GAAGAAGGAG GATGTGAAT GGGAGTGGC**  
AGAGTGAAGT TCAGCAGGAG CGCAGACGCC CCCGCTACC AGCAGGGCCA GAACCAAGTTC  
TATATCGAGC TCAATCTAGG ACGAAGAGAG GAGTACGATG TTTTGGACAA GAGACGTGGC  
CGGGACCCCTG AGATGGGGGG AAGCCGAGA AGGAAGAACC CTCAGGAAGG CCTGTACAAT  
GAATGCAGA AAGATAAGAT GCGGAGGCC TACAGTGAAG TTTGGATGAA AGCGGAGCCG  
CGGAGGGGCA AGGGGCACGA TGGCCTTAC CAGGGTCTCA GTACAGCCAC CAAGGACACC  
TACGACGCC TTCACATGCA GGCCCTGCC CCTCGCTGA (SEQ ID NO:39)

【 図 1 8 】

FIG. 18

ATGCTTCTCC TGGTGACAAG CCTCTGCTC  
TGTGAGTTAC CACACCCAGC ATTCTCTCTG ATCCCAGGCC CTGTGCCTCC CTCTACAGCC  
CTCAGGTACC TCATTGAGGA GCTGGTCAAC ATCACCCAGA ACCAGAAGGC TCCGCTCTGC  
AATGGCAGCA TGGTATGGAG CATCAACCTG ACAGCTGGCA TGTACTGTGC AGCCCTGGAA  
TCCCTGATCA ACCTGTCAGG CTGCAGTGCC ATCGAGAAGA CCCAGAGGAT GCTGAGCGGA  
TTCTGCCCGC ACAAGGTCTC AGCTGGGCAG TTTTCCAGCT TGCATGTCCG AGACACCAAA  
ATCGAGGTGG CCCAGTTTGT AAAGGACCTG CTCTTACATT TAAAGAAACT TTTTCCGGAG  
GGACCGTTCA ACGAGTCCAA ATATGGTCCC CCATGCCAC CATGCCAGC ACCTGAGTTC  
CTGGGGGAC CATCAGTCTT CCTGTTCGCC CCAAAAACCA AGGACACTCT CATGATCTCC  
CGGACCCCTG AGGTACAGTG CGTGGTGGT GAGCTGAGCC AGGAAGACCC CGAGTCCAG  
TTCAACTGCT ACCTGGATGG CGTGGAGGTG CATAATGCCA AGACAAAGCC GCGGGAGGAG  
CAGTTCAACA GCACGTACC TGTGGTCAGC GTCTCACCC TCTGCCACCA GGACTGGCTG  
AACGGCAAGG AGTACAAGT CAAGTCTCC AACAAAGCC TCCGCTCTC CATCGAGAAA  
ACCATCTCCA AAGCCAAGG GCAGCCCCGA GAGCCACAGG TGTACACCTT GCCCCATCC  
CAGGAGGAGA TGACCAAGAA CCAGTACAG CTGACCTGCC TGGTCAAAGG CTTCTACCCC  
AGCGACATCG CCGTGGAGT GGAGAGCAAT GGGCAGCCG AGAACAACTA CAAGACCACG  
CCTCCCGTGC TGGACTCCA CGGCTCTTC TTCTCTACA GCAGCTAAC CGTGGACAAG  
AGCAGGTGGC AGGAGGGGAA TGCTTCTCA TGCTCCGTGA TGCATGAGGC TCTGCACAC  
CACTACACAC AGAAGAGCCT CTCCCTGTCC CTAGGTAAAA TGTTTTGGGT GCTGGTGGT  
GTTGGTGGAG TCCGCTTG CTATAGCTTG CTAGTACAG TGGCCTTAT TATTTTCTGG  
GTGAGGAGTA AGAGGAGCAG GGGCGGACAC AGTGACTACA TGAACATGAC TCCCGGCGC  
CCTGGGCCA CCGCAAGCA TTACCAGCCC  
GTTGGCGGAG GTGGCAACG **GGCAGAAG ARACTCTGT ATATATCAA ACAACCAATT**  
**ATGAGCCAG TACAACCTAC TCAAGAGGAA GATGGCTGT GCTGCCGATT TCCAGAAGAA**  
**GAAGAAGGAG GATGTGAAT** GGGAGTGGC AGAGTGAAGT TCAGCAGGAG CGCAGACGCC  
CCCGCTACC AGCAGGGCCA GAACCAAGT TATAACGAGC TCAATCTAGG ACGAAGAGAG  
GAGTACGATG TTTTGGACAA GAGACCTGGC CGGGACCCCTG AGATGGGGGG AAGCCGAGA  
AGGAGAGACC CTCAGGAGG CCTGTACAAT GAATGCAGA AAGATAAGAT GCGGAGGCC  
TACAGTGAAG TTTGGATGAA AGCGGAGCCG CGGAGGGGCA AGGGGCACGA TGGCCTTAC  
CAGGCTCTCA GTACAGCCAC CAAGGACACC TACGACGCC TTCACATGCA GGCCCTGCC  
CCTCGCTGA (SEQ ID NO:40)

【 配 列 表 】

2017221211000001.app

## フロントページの続き

| (51)Int.Cl.   |           | F I           | テーマコード(参考) |
|---------------|-----------|---------------|------------|
| A 6 1 P 35/02 | (2006.01) | A 6 1 P 35/02 |            |
| A 6 1 K 38/17 | (2006.01) | A 6 1 K 38/17 |            |

(74)代理人 100106208

弁理士 宮前 徹

(74)代理人 100120112

弁理士 中西 基晴

(72)発明者 ジェンセン, マイケル

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 1 1 0 4 , パサデナ, ウッドリン・ロード 2 3 0 5

F ターム(参考) 4B065 AA90X AA90Y AC20 CA44

4C084 AA02 AA03 AA07 BA41 BA44 DC50 NA14 ZB262 ZB272

4C087 AA01 AA03 BB37 CA12 DA03 DA19 DA32 NA14 ZB26 ZB27

4H045 AA10 AA11 BA10 BA41 CA40 DA50 DA76 EA20 FA74

【外国語明細書】

2017221211000001.pdf