

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6543626号
(P6543626)

(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 I
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10 Z N A
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12
C O 7 K 19/00 (2006.01)	C O 7 K 19/00
C O 7 K 16/00 (2006.01)	C O 7 K 16/00
C O 7 K 14/705 (2006.01)	C O 7 K 14/705

請求項の数 27 (全 98 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-531761 (P2016-531761)	(73) 特許権者	513167522
(86) (22) 出願日	平成26年7月23日 (2014.7.23)		ブルーバード バイオ, インコーポレイ
(65) 公表番号	特表2016-531567 (P2016-531567A)		テッド
(43) 公表日	平成28年10月13日 (2016.10.13)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/047852		1 4 2, ケンブリッジ, ビニー スト
(87) 国際公開番号	W02015/017214		リート 6 O
(87) 国際公開日	平成27年2月5日 (2015.2.5)	(74) 代理人	100078282
審査請求日	平成29年7月21日 (2017.7.21)		弁理士 山本 秀策
(31) 優先権主張番号	61/859,697	(74) 代理人	100113413
(32) 優先日	平成25年7月29日 (2013.7.29)		弁理士 森下 夏樹
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100181674
(31) 優先権主張番号	61/934,092		弁理士 飯田 貴敏
(32) 優先日	平成26年1月31日 (2014.1.31)	(74) 代理人	100181641
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 石川 大輔

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 多部分シグナル伝達タンパク質およびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

非天然細胞であって、以下：

(a) F K B Pーラパマイシン結合 (F R B) 多量体化ドメイン、第 1 の膜貫通ドメイン、C D 2 7、C D 2 8、I C O S、D A P 1 0、4-1 B B または O X 4 0 共刺激ドメイン、ならびに C D 3 ζ アクチュエータードメインを含む第 1 の融合タンパク質をコードする第 1 の核酸分子であって、前記第 1 の融合タンパク質が発現すると、前記 F R B 多量体化ドメインが細胞外に局在化する、第 1 の核酸分子と、

(b) 単鎖抗体もしくはその抗原結合性断片および F K 5 0 6 結合性タンパク質 (F K B P) 多量体化ドメインを含む第 2 の融合タンパク質をコードする第 2 の核酸分子であって、前記 F K B P 多量体化ドメインが発現すると細胞外に局在化する、第 2 の核酸分子と

を含み、ここで

第 1 の架橋因子は、前記非天然細胞の表面でポリペプチド複合体の形成を促進し、前記架橋因子は、前記第 1 の融合タンパク質の前記多量体化ドメインおよび前記第 2 の融合タンパク質の前記多量体化ドメインと会合し、これらの間に配置される、

非天然細胞。

【請求項 2】

非天然細胞であって、以下：

(a) F K B P 多量体化ドメイン、第 1 の膜貫通ドメイン、C D 2 7、C D 2 8、I C

10

20

OS、DAP10、4-1BBまたはOX40共刺激ドメイン、ならびにCD3ζアクチュエータードメインを含む第1の融合タンパク質をコードする第1の核酸分子であって、前記第1の融合タンパク質が発現すると、前記FKBP多量体化ドメインが細胞外に局在化する、第1の核酸分子と、

(b) 単鎖抗体もしくはその抗原結合性断片およびFRB多量体化ドメインを含む第2の融合タンパク質をコードする第2の核酸分子であって、前記FRB多量体化ドメインが発現すると細胞外に局在化する、第2の核酸分子とを含み、ここで

第1の架橋因子は、前記非天然細胞の表面でポリペプチド複合体の形成を促進し、前記架橋因子は、前記第1の融合タンパク質の前記多量体化ドメインおよび前記第2の融合タンパク質の前記多量体化ドメインと会合し、これらの間に配置される、非天然細胞。

【請求項3】

前記FRB多量体化ドメインが、FRBT2098Lポリペプチドを含み、前記FKBP多量体化ドメインが、FKBP12ポリペプチドを含む、請求項1または2に記載の非天然細胞。

【請求項4】

前記架橋因子が、AP21967、シロリムス、エベロリムス、ノボリムス、ピメクロリムス、リダホロリムス、タクロリムス、テムシロリムス、ウミロリムス、またはゾタロリムスである、請求項1～3のいずれか一項に記載の非天然細胞。

【請求項5】

前記第2の融合タンパク質が、第2の膜貫通ドメインを含む、請求項1～4のいずれか一項に記載の非天然細胞。

【請求項6】

前記第1または第2の膜貫通ドメインが、CD4、CD8、またはCD28膜貫通ドメインである、請求項5に記載の非天然細胞。

【請求項7】

前記共刺激ドメインが、4-1BB共刺激ドメインである、請求項1～6のいずれか一項に記載の非天然細胞。

【請求項8】

前記単鎖抗体またはその抗原結合性断片が、ドメイン抗体、sFv、scFv、F(ab')₂、およびFabからなる群から選択される、請求項1～7のいずれか一項に記載の非天然細胞。

【請求項9】

前記単鎖抗体またはその抗原結合性断片が、BCMA、B7-H3、CD19、CD20、CD22、CD33、EGFR、EGFRvIIIおよびNKG2Dリガンドから選択される抗原標的に結合する、請求項1～8のいずれか一項に記載の非天然細胞。

【請求項10】

第1の融合タンパク質が、FRBT2098L多量体化ドメイン、CD8α膜貫通ドメイン、4-1BB共刺激ドメイン、およびCD3ζアクチュエータードメインを含み、前記第2の融合タンパク質は、CD19もしくはBCMAに特異的なscFv、およびFKBP12多量体化ドメインを含み；前記非天然細胞の表面でポリペプチド複合体の形成を促進する前記第1の架橋因子が、ラパマイシンまたはラパログのAP21967である、請求項1に記載の非天然細胞。

【請求項11】

第1の融合タンパク質が、FRBT2098L多量体化ドメイン、CD8α膜貫通ドメイン、4-1BB共刺激ドメイン、およびCD3ζアクチュエータードメインを含み、前記第2の融合タンパク質は、CD19もしくはBCMAに特異的なscFv、FKBP12多量体化ドメイン、およびCD4膜貫通ドメインを含み；前記非天然細胞の表面でポリペプチド複合体の形成を促進する前記第1の架橋因子が、ラパマイシンまたはラパログ

10

20

30

40

50

の A P 2 1 9 6 7 である、請求項 1 に記載の非天然細胞。

【請求項 1 2】

第 1 の融合タンパク質が、F K B P 1 2 多量体化ドメイン、C D 8 α 膜貫通ドメイン、4 - 1 B B 共刺激ドメイン、および C D 3 ζ アクチュエータードメインを含み、前記第 2 の融合タンパク質は、C D 1 9 もしくは B C M A に特異的な s c F v、および F R B T 2 0 9 8 L 多量体化ドメインを含み；前記非天然細胞の表面でポリペプチド複合体の形成を促進する前記第 1 の架橋因子が、ラパマイシンまたはラパログの A P 2 1 9 6 7 である、請求項 2 に記載の非天然細胞。

【請求項 1 3】

第 1 の融合タンパク質が、F K B P 1 2 多量体化ドメイン、C D 8 α 膜貫通ドメイン、4 - 1 B B 共刺激ドメイン、および C D 3 ζ アクチュエータードメインを含み、前記第 2 の融合タンパク質は、C D 1 9 もしくは B C M A に特異的な s c F v、F R B T 2 0 9 8 L 多量体化ドメイン、および C D 4 膜貫通ドメインを含み；前記非天然細胞の表面でポリペプチド複合体の形成を促進する前記第 1 の架橋因子が、ラパマイシンまたはラパログの A P 2 1 9 6 7 である、請求項 2 に記載の非天然細胞。

【請求項 1 4】

融合ポリペプチドヘテロ複合体であって、以下：

(a) F K B P - ラパマイシン結合 (F R B) 多量体化ドメイン、第 1 の膜貫通ドメイン、C D 2 7、C D 2 8、I C O S、D A P 1 0、4 - 1 B B または O X 4 0 共刺激ドメイン、ならびに C D 3 ζ アクチュエータードメインを含む第 1 の融合タンパク質であって、前記第 1 の融合タンパク質が発現すると、前記 F R B 多量体化ドメインが細胞外に局在化する、第 1 の融合タンパク質と、

(b) 単鎖抗体もしくはその抗原結合性断片および F K 5 0 6 結合性タンパク質 (F K B P) 多量体化ドメインを含む第 2 の融合タンパク質であって、前記 F K B P 多量体化ドメインが発現すると細胞外に局在化する、第 2 の融合タンパク質と

(c) A P 2 1 9 6 7、シロリムス、エベロリムス、ノボリムス、ピメクロリムス、リダホロリムス、タクロリムス、テムシロリムス、ウミロリムス、またはゾタロリムスからなる群から選択される、架橋因子と

を含み、ここで、前記第 1 の融合タンパク質と、前記第 2 の融合タンパク質と、前記架橋因子とが会合して融合ポリペプチドヘテロ複合体を形成し、前記架橋因子が、前記第 1 の融合タンパク質の前記多量体化ドメインおよび前記第 2 の融合タンパク質の前記多量体化ドメインと会合し、これらの間に配置される、融合ポリペプチドヘテロ複合体。

【請求項 1 5】

融合ポリペプチドヘテロ複合体であって、以下：

(a) F K B P 多量体化ドメイン、第 1 の膜貫通ドメイン、C D 2 7、C D 2 8、I C O S、D A P 1 0、4 - 1 B B または O X 4 0 共刺激ドメイン、ならびに C D 3 ζ アクチュエータードメインを含む第 1 の融合タンパク質であって、前記第 1 の融合タンパク質が発現すると、前記 F K B P 多量体化ドメインが細胞外に局在化する、第 1 の融合タンパク質と、

(b) 単鎖抗体もしくはその抗原結合性断片および F R B 多量体化ドメインを含む第 2 の融合タンパク質であって、前記 F R B 多量体化ドメインが発現すると細胞外に局在化する、第 2 の融合タンパク質と

(c) A P 2 1 9 6 7、シロリムス、エベロリムス、ノボリムス、ピメクロリムス、リダホロリムス、タクロリムス、テムシロリムス、ウミロリムス、またはゾタロリムスからなる群から選択される、架橋因子と

を含み、ここで、前記第 1 の融合タンパク質と、前記第 2 の融合タンパク質と、前記架橋因子とが会合して融合ポリペプチドヘテロ複合体を形成し、前記架橋因子が、前記第 1 の融合タンパク質の前記多量体化ドメインおよび前記第 2 の融合タンパク質の前記多量体化ドメインと会合し、これらの間に配置される、融合ポリペプチドヘテロ複合体。

【請求項 1 6】

前記FRB多量体化ドメインが、FRB T2098Lポリペプチドを含み、前記FKBP多量体化ドメインが、FKBP12ポリペプチドを含む、請求項14または15に記載の融合ポリペプチドヘテロ複合体。

【請求項17】

前記第2の融合タンパク質が、第2の膜貫通ドメインを含む、請求項14～16のいずれか一項に記載の融合ポリペプチドヘテロ複合体。

【請求項18】

前記第1または第2の膜貫通ドメインが、CD4、CD8、またはCD28膜貫通ドメインである、請求項17に記載の融合ポリペプチドヘテロ複合体。

【請求項19】

前記共刺激ドメインが、4-1BB共刺激ドメインである、請求項14～18のいずれか一項に記載の融合ポリペプチドヘテロ複合体。

【請求項20】

前記単鎖抗体またはその抗原結合性断片が、ドメイン抗体、sFv、scFv、F(ab')₂、およびFabからなる群から選択される、請求項14～19のいずれか一項に記載の融合ポリペプチドヘテロ複合体。

【請求項21】

前記単鎖抗体またはその抗原結合性断片が、BCMA、B7-H3、CD19、CD20、CD22、CD33、EGFR、EGFRvIIIおよびNKG2Dリガンドから選択される抗原標的に結合する、請求項14～20のいずれか一項に記載の融合ポリペプチドヘテロ複合体。

【請求項22】

第1の融合タンパク質が、FRB T2098L多量体化ドメイン、CD8α膜貫通ドメイン、4-1BB共刺激ドメイン、およびCD3ζアクチュエータードメインを含み、前記第2の融合タンパク質は、CD19もしくはBCMAに特異的なscFv、およびFKBP12多量体化ドメインを含み；非天然細胞の表面でポリペプチド複合体の形成を促進する前記架橋因子が、ラパマイシンまたはラパログのAP21967である、請求項14に記載の融合ポリペプチドヘテロ複合体。

【請求項23】

第1の融合タンパク質が、FRB T2098L多量体化ドメイン、CD8α膜貫通ドメイン、4-1BB共刺激ドメイン、およびCD3ζアクチュエータードメインを含み、前記第2の融合タンパク質は、CD19もしくはBCMAに特異的なscFv、FKBP12多量体化ドメイン、およびCD4膜貫通ドメインを含み；非天然細胞の表面でポリペプチド複合体の形成を促進する前記架橋因子が、ラパマイシンまたはラパログのAP21967である、請求項14に記載の融合ポリペプチドヘテロ複合体。

【請求項24】

第1の融合タンパク質が、FKBP12多量体化ドメイン、CD8α膜貫通ドメイン、4-1BB共刺激ドメイン、およびCD3ζアクチュエータードメインを含み、前記第2の融合タンパク質は、CD19もしくはBCMAに特異的なscFv、およびFRB T2098L多量体化ドメインを含み；非天然細胞の表面でポリペプチド複合体の形成を促進する前記架橋因子が、ラパマイシンまたはラパログのAP21967である、請求項15に記載の融合ポリペプチドヘテロ複合体。

【請求項25】

第1の融合タンパク質が、FKBP12多量体化ドメイン、CD8α膜貫通ドメイン、4-1BB共刺激ドメイン、およびCD3ζアクチュエータードメインを含み、前記第2の融合タンパク質は、CD19もしくはBCMAに特異的なscFv、FRB T2098L多量体化ドメイン、およびCD4膜貫通ドメインを含み；非天然細胞の表面でポリペプチド複合体の形成を促進する前記架橋因子が、ラパマイシンまたはラパログのAP21967である、請求項15に記載の融合ポリペプチドヘテロ複合体。

【請求項26】

10

20

30

40

50

請求項 1～25 のいずれか一項に記載の第 1 の融合タンパク質または第 2 の融合タンパク質をコードする核酸分子。

【請求項 27】

前記第 1 の融合タンパク質と第 2 の融合タンパク質とが、ポリシストロニックのメッセージとして、または 2 A ペプチドで隔てられた単一のタンパク質としてコードされている、請求項 26 に記載の核酸分子。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照

10

この出願は、米国特許法 § 119 (e) の下、2014 年 1 月 31 日に出願された米国仮出願第 61/934,092 号および 2013 年 7 月 29 日に出願された米国仮出願第 61/859,697 号（これらの各々は、その全体が参考として本明細書に援用される）の利益を主張する。

【0002】

配列表についての言明

本出願と関連する配列表は、紙原稿ではなく、テキストフォーマットで提供され、本明細書における参照により本明細書に組み込まれる。配列表を含有するテキストファイルの名称は、BLBD_036_02WO_ST25.txt である。テキストファイルは、433 KB であり、2014 年 7 月 23 日に作成され、EFS-Web を介して電子的に提出された。

20

【0003】

本開示は、免疫療法において多成分タンパク質を使用するための組成物および方法に関し、より詳細には、化学的に誘導される多量体化を使用して、養子免疫療法における、細胞シグナルの誘発および下流の応答の空間的な制御および時間的な制御をモジュレートするためのキメラ抗原受容体タンパク質を作り出すことに関する。

【背景技術】

【0004】

細胞療法は、生物学的作用のための複合シグナルを送達するための強力な枠組みとして出現しつつある。低分子かつ生物学的な薬物組成物とは対照的に、細胞は、それらの多種多様な感知応答プログラム、ならびにますます明確とされつつある遺伝子制御機構のために、固有の治療的役割を果たす潜在的な可能性を有する。このような治療的価値を達成するために、細胞は、局所的な生理学的環境と関連する化学的情報および／または生物学的情報を感知および統合するための機構を備える必要がある。

30

【0005】

操作された感知-応答機構の、最も臨床的に先進的な例は、養子細胞免疫療法における使用のための遺伝子操作された T 細胞内のキメラ抗原受容体 (CAR) である (June ら、Nat. Biotechnol.、30 巻：611 頁、2012 年；Restifo ら、Nat. Rev. Immunol.、12 巻：269 頁、2012 年を参照されたい)。抗原の結合は、CAR の細胞内セグメント上のシグナル伝達ドメインを刺激し、これにより炎症機構および細胞傷害機構の抑制を解除するシグナルを伝達する。CAR ベースの養子細胞免疫療法は、従来の標準治療処置に対して不応性の腫瘍を伴うがん患者を処置するのに使用されている (Grupp ら、N. Engl. J. Med.、368 巻：1509 頁、2013 年；Kalos ら、Sci. Transl. Med.、3 巻：95～73 頁、2011 年を参照されたい)。

40

【0006】

T 細胞の活性化の標的化および誘発に加えて、有効な養子細胞免疫療法はまた、T 細胞の増殖および存続のほか、T 細胞シグナル伝達の強度および質もモジュレートすることが好ましい。しかし、現行の CAR に媒介される T 細胞応答は、T 細胞の活性化および増殖の潜在的な可能性を十分には実現していない。CAR 機能の改善は、共刺激性シグナル伝達

50

ドメインを、CAR構造に組み入れることにより達成されている（例えば、Kowolikら、Cancer Res.、66巻：10995頁、2006年；Miloneら、Mol. Ther.、17巻：1453頁、2009年；Puleら、Mol. Ther.、12巻：933頁、2005年；Carpenitoら、Proc. Nat'l Acad. Sci. U. S. A.、106巻：3360頁、2009年を参照されたい）が、臨床結果は様々である（例えば、Brentjensら、Blood、118巻：4817頁、2011年；Tillら、Blood、119巻：3940頁、2012年；KochenderferおよびRosenberg、Nat. Rev. Clin. Oncol.、10巻：267頁、2013年を参照されたい）。他の研究者らは、CARに加えて、共刺激性リガンド（例えば、Stephanら、Nat. Med.、13巻：1440頁、2007年を参照されたい）、共刺激性受容体（例えば、Duongら、Immunother.、3巻：33頁、2011年；Wilkieら、J. Clin. Immunol.、32巻：1059頁、2012年を参照されたい）、およびサイトカイン（例えば、Hsuら、J. Immunol.、175巻：7226頁、2005年；Quintarelliら、Blood、110巻：2793頁、2007年を参照されたい）の共発現も含めた。

10

【0007】

CARの使用に関する懸念は、2つの形態で生じる毒性であって、1つは、正常組織の標的化された破壊であり、第2は、サイトカイン放出関連の有害事象（例えば、サイトカインストーム）である形態で生じる毒性である。例えば、CD19を標的化するCARに付随して観察される損傷は、B細胞形成不全である（Kalosら、2011年；Kochenderferら、Blood、119巻：2709頁、2012年）。このようなオフターゲット効果は、特に、標的抗原が、心臓または肺など、他の組織上で見出される場合に、極めて危険となる。多数の活性化T細胞と関連するサイトカインストームは、致死性でありうる（Kalosら、2011年；Kochenderferら、2012年）。薬物投与量を低減することにより、毒性を制御しうる、従来の薬物処置と異なり、T細胞の増殖は、現行のCAR技術では制御することができず、したがって、T細胞の閾値レベルに到達すれば、免疫性病態が結果としてもたらされる。

20

【先行技術文献】

【非特許文献】

30

【0008】

【非特許文献1】Juneら、Nat. Biotechnol.（2012年）30巻：611頁

【非特許文献2】Restifoら、Nat. Rev. Immunol.（2012年）12巻：269頁

【非特許文献3】Gruppら、N. Engl. J. Med.（2013年）368巻：1509頁

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

40

CARに媒介されるT細胞応答と関連する限界を踏まえると、当技術分野では、免疫細胞シグナルの誘発および増殖のモジュレーションが制御可能な免疫療法に有用な、代替的な組成物および方法が必要とされている。本開示は、このような必要を満たし、他の関連する利点もさらに提示する。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本開示は、薬理学的作用物質により制御される（それらの活性化および不活化の両方において）シグナル伝達系を有する、非天然細胞組成物について記載する。本明細書では、薬理学的に制御される、多数の多部分シグナル伝達系が想定される。

【0011】

50

多様な実施形態では、第1の多量体化ドメイン、疎水性ドメイン、およびアクチュエータドメインを含む第1の融合タンパク質をコードする第1の核酸分子であって、第1の融合タンパク質が発現すると、第1の多量体化ドメインが細胞外に局在化する、第1の核酸分子と、結合性ドメインおよび第2の多量体化ドメインを含む第2の融合タンパク質をコードする第2の核酸分子であって、第2の融合タンパク質が、発現すると細胞外に局在化する、第2の核酸分子とを含み、第1の架橋因子が非天然細胞の表面でポリペプチド複合体の形成を促進し、架橋因子が、第1の融合タンパク質の多量体化ドメインおよび第2の融合タンパク質の多量体化ドメインと会合し、これらの間に配置される、非天然細胞が提供される。

【0012】

10

特定の実施形態では、第1の多量体化ドメインと第2の多量体化ドメインとは、同じであるかまたは異なる。

【0013】

追加の実施形態では、第1の融合タンパク質の多量体化ドメインおよび第2の融合タンパク質の多量体化ドメインは、ラパマイシンもしくはそのラパログ、クーママイシンもしくはその誘導体、ジベレリンもしくはその誘導体、アブシシン酸（ABA）もしくはその誘導体、メトトレキサートもしくはその誘導体、シクロスポリンAもしくはその誘導体、FKCsAもしくはその誘導体、トリメトプリム（Tm p）（FKBPの合成リガンド（SLF））もしくはその誘導体、またはこれらの任意の組合せから選択される架橋因子と会合する。

20

【0014】

さらなる実施形態では、第1の多量体化ドメインおよび第2の多量体化ドメインは、FKBPおよびFRB、FKBPおよびカルシニューリン、FKBPおよびシクロフィリン、FKBPおよび細菌性DHFR、カルシニューリンおよびシクロフィリン、PYL1およびABI1、もしくはGIB1およびGAI、またはこれらの変異体から選択される対である。

【0015】

ある特定の実施形態では、第1の多量体化ドメインは、第1のFKBPポリペプチドまたはその変異体を含み、第2の多量体化ドメインは、第1のFRBポリペプチドまたはその変異体を含む。

30

【0016】

特定の実施形態では、第1の多量体化ドメインは、第1のFRBポリペプチドまたはその変異体を含み、第2の多量体化ドメインは、第1のFKBPポリペプチドまたはその変異体を含む。

【0017】

一実施形態では、架橋因子は、シロリムス、エベロリムス、ノボリムス（novolimus）、ピメクロリムス、リダホロリムス、タクロリムス、テムシロリムス、ウミロリムス（umirolimus）、またはゾタロリムスである。

【0018】

さらなる実施形態では、第1の核酸分子は、第3の多量体化ドメインをさらに含む、第1の融合タンパク質をコードする。

40

【0019】

さらなる実施形態では、第1の融合タンパク質の第3の多量体化ドメインは、ラパマイシンもしくはそのラパログ、クーママイシンもしくはその誘導体、ジベレリンもしくはその誘導体、ABAもしくはその誘導体、メトトレキサートもしくはその誘導体、シクロスポリンAもしくはその誘導体、FKCsAもしくはその誘導体、Tm p-SLFもしくはその誘導体、またはこれらの任意の組合せから選択される架橋因子のための結合性ドメインである。

【0020】

特定の実施形態では、第2の架橋因子が少なくとも2つの第1の融合タンパク質の会合

50

を促進し、架橋因子は、第1の融合タンパク質の第3の多量体化ドメインと会合し、これらの間に配置される。

【0021】

特定の実施形態では、タンパク質複合体は、少なくとも2つの第1の融合タンパク質を含むホモ複合体である。

【0022】

さらなる実施形態では、第1の融合タンパク質は、FKBP、DHFRまたはGyrBのうちの少なくとも1つの多量体化ドメインを有する。

【0023】

ある特定の実施形態では、ポリペプチド複合体の結合性ドメインは、標的細胞表面に位置する標的に特異的に結合する。

10

【0024】

さらなる実施形態では、タンパク質複合体は、1種または複数の第1の融合タンパク質および1種または複数の第2の融合タンパク質を含むヘテロ複合体である。

【0025】

さらなる実施形態では、タンパク質ヘテロ複合体の結合性ドメインは、標的細胞表面に位置する標的に特異的に結合する。

【0026】

特定の実施形態では、疎水性ドメインは、膜貫通ドメインである。

【0027】

20

別の特定の実施形態では、膜貫通ドメインは、CD4膜貫通ドメイン、CD8膜貫通ドメイン、またはCD28膜貫通ドメインである。

【0028】

一実施形態では、アクチュエータードメインは、リンパ球受容体シグナル伝達ドメインを含む。

【0029】

ある特定の実施形態では、アクチュエータードメインは、1種または複数の免疫受容体チロシンベース活性化モチーフ(ITAM)を含む。

【0030】

ある特定の実施形態では、アクチュエータードメインは、CD3 ϵ 、CD3 δ 、CD3 ζ 、pT α 、TCR α 、TCR β 、FcR α 、FcR β 、FcR γ 、NKG2D、CD22、CD79A、もしくはCD79B、またはこれらの任意の組合せを含む。

30

【0031】

特定の実施形態では、第1の核酸分子は、異なるアクチュエータードメイン、共刺激ドメイン、接着因子、またはこれらの任意の組合せをさらに含む、第1の融合タンパク質をコードする。

【0032】

さらなる実施形態では、共刺激ドメインは、CD27、CD28、CD30、CD40、LAT、Zap70、ICOS、DAP10、4-1BB、CARD11、HVEM、LAG3、SLAMF1、Lck、Fyn、Slp76、TRIM、OX40、またはこれらの任意の組合せから選択される。

40

【0033】

特定の実施形態では、アクチュエータードメインは、細胞質シグナル伝達タンパク質と会合する細胞質部分を含む。

【0034】

一実施形態では、細胞質シグナル伝達タンパク質は、リンパ球受容体もしくはそのシグナル伝達ドメイン、複数の免疫受容体チロシンベース活性化モチーフ(ITAM)を含むタンパク質、共刺激ドメイン、接着因子、またはこれらの任意の組合せである。

【0035】

さらなる実施形態では、リンパ球受容体またはそのシグナル伝達ドメインは、CD3 ϵ

50

、CD3 δ 、CD3 ζ 、pT α 、TCR α 、TCR β 、FcR α 、FcR β 、FcR γ 、NKG2D、CD22、CD79A、もしくはCD79B、またはこれらの任意の組合せである。

【0036】

さらなる実施形態では、共刺激ドメインは、CD27、CD28、CD30、CD40、LAT、Zap70、ICOS、DAP10、4-1BB、CARD11、HVEM、LAG3、SLAMF1、Lck、Fyn、Slp76、TRIM、OX40、またはこれらの任意の組合せから選択される。

【0037】

特定の実施形態では、非天然細胞は、共刺激因子、免疫調節因子、共刺激因子に対するアゴニスト、免疫調節因子に対するアゴニスト、またはこれらの任意の組合せを過剰発現させる。

10

【0038】

一実施形態では、第2の融合タンパク質が、発現すると非天然細胞から分泌されるように、第2の核酸分子は、分泌シグナルをさらにコードし、任意選択で、アンカードメインをさらにコードする。

【0039】

ある特定の実施形態では、第2の融合タンパク質の結合性ドメインは、単鎖抗体の可変領域、受容体のエクストドメイン、またはリガンドである。

【0040】

20

さらなる実施形態では、単鎖抗体の可変領域は、ドメイン抗体、sFv、scFv、F(ab')₂、またはFabである。

【0041】

特定の実施形態では、第2の融合タンパク質の結合性ドメインは、多量体化ドメインのアミノ末端側にある。

【0042】

一実施形態では、第2の融合タンパク質の結合性ドメインは、多量体化ドメインのカルボキシ末端側にある。

【0043】

さらなる実施形態では、第2の融合タンパク質をコードする第2の核酸分子は、結合性ドメインと第2の多量体化ドメインとの間に配置されたリンカーをコードする配列をさらに含む。

30

【0044】

特定の実施形態では、細胞は、結合性ドメインおよび第2の多量体化ドメインを含む第3の融合タンパク質をコードする第3の核酸分子であって、第3の融合タンパク質が、発現すると細胞外に局在化する、第3の核酸分子をさらに含む。

【0045】

関連する特定の実施形態では、結合性ドメインを含む融合タンパク質は、1つ、2つ、3つ、または4つの結合性ドメインを有する。

【0046】

40

さらなる実施形態では、1つ、2つ、3つ、または4つの結合性ドメインは、1つの標的または最大で4つの異なる標的に特異的である。

【0047】

ある特定の実施形態では、結合性ドメインは、がん、炎症性疾患、自己免疫疾患、または移植片対宿主病と関連する抗原である標的に特異的である。

【0048】

特定の実施形態では、がんは、充実性悪性疾患または血液悪性疾患である。

【0049】

さらなる実施形態では、血液悪性疾患と関連する抗原標的は、CD19、CD20、CD22、CD33、またはCD37である。

50

【0050】

一実施形態では、結合性ドメインは、 α -葉酸受容体、 $\alpha v \beta 6$ インテグリン、BCM A、B7-H3、B7-H6、CAIX、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD37、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD70、CD123、CD138、CD171、CEA、DLL4、EGP-2、EGP-40、CSPG4、EGFR、ErbB2 (HER2)を含むEGFRファミリー、EGFRvIII、EPCAM、EphA2、EPCAM、FAP、FBP、胎児型アセチルコリン受容体、Fzd7、GD2、GD3、グリピカン3 (GPC3)、h5T4、IL-11R α 、IL13R- α 2、KDR、 κ 軽鎖、 λ 軽鎖、LeY、L1CAM、MAGE-A1、メソテリン、MHC提示ペプチド、MUC1、MUC16、NCAM、NKG2Dリガンド、Notch1、Notch2/3、NY-ESO-1、PRAME、PSCA、PSMA、サバイビン、TAG-72、TEM、TERT、VEGFR2、およびROR1から選択される標的に特異的に結合する。

10

【0051】

ある特定の実施形態では、第1の架橋因子は、ラパマイシンもしくはそのラパログ、クーママイシンもしくはその誘導体、ジベレリンもしくはその誘導体、ABAもしくはその誘導体、メトトレキサートもしくはその誘導体、シクロスポリンAもしくはその誘導体、FKCsAもしくはその誘導体、またはTm p-S L Fもしくはその誘導体である。

【0052】

一実施形態では、第2の架橋因子は、ラパマイシンもしくはそのラパログ、クーママイシンもしくはその誘導体、ジベレリンもしくはその誘導体、ABAもしくはその誘導体、メトトレキサートもしくはその誘導体、シクロスポリンAもしくはその誘導体、FKCsAもしくはその誘導体、またはTm p-S L Fもしくはその誘導体である。

20

【0053】

さらなる実施形態では、コードされた第1の融合タンパク質は、FRB T2098Lの第1の多量体化ドメイン、膜貫通ドメイン、4-1BBの共刺激ドメイン、およびCD3 ζ のアクチュエータードメインを含み；コードされた第2の融合タンパク質は、CD19に特異的なscFvの結合性ドメイン、およびFKBP12の第2の多量体化ドメインを含み；非天然細胞の表面でポリペプチド複合体の形成を促進する第1の架橋因子は、ラパログのAP21967である。

30

【0054】

特定の実施形態では、第1の融合タンパク質は、配列番号15に示されるアミノ酸配列を有し、第2の融合タンパク質は、配列番号1に示されるアミノ酸配列を有する。

【0055】

多様な実施形態では、過剰増殖性疾患、炎症性疾患、自己免疫疾患、または移植片対宿主病を処置するための方法であって、第1の核酸分子および第2の核酸分子を含む組換え細胞を投与するステップであって、第1の核酸分子が、第1の多量体化ドメイン、疎水性ドメイン、およびアクチュエータードメインを含む第1の融合タンパク質をコードし、第1の融合タンパク質が発現すると、第1の多量体化ドメインが細胞外に局在化し、第2の核酸分子が、結合性ドメインおよび第2の多量体化ドメインを含む第2の融合タンパク質をコードし、第2の融合タンパク質が発現すると細胞外に局在化する、ステップと；架橋因子を投与するステップであって、架橋因子が組換え細胞の表面でポリペプチド複合体の形成を促進し、架橋因子が、第1の融合タンパク質の多量体化ドメインおよび第2の融合タンパク質の多量体化ドメインと会合し、これらの間に配置される、ステップとを含み、ポリペプチド複合体の結合性ドメインが、過剰増殖性疾患細胞、炎症性疾患細胞、自己免疫疾患細胞、または移植片対宿主病細胞の細胞表面標的に特異的に結合して免疫調節応答を促進し、これにより過剰増殖性疾患、炎症性疾患、自己免疫疾患、または移植片対宿主病を処置する方法が提供される。

40

【0056】

多様な実施形態では、過剰増殖性疾患、炎症性疾患、自己免疫疾患、または移植片対宿主

50

主病を処置するための方法であって、第1の多量体化ドメイン、疎水性ドメイン、およびアクチュエータードメインを含む第1の融合タンパク質をコードする第1の核酸分子を含む非天然細胞を投与するステップであって、第1の融合タンパク質が発現すると、第1の多量体化ドメインが細胞外に局在化する、ステップと；結合性ドメインおよび第2の多量体化ドメインを含む第2の融合タンパク質を投与するステップと；架橋因子を投与するステップであって、架橋因子が組換え細胞の表面でポリペプチド複合体の形成を促進し、架橋因子が、第1の融合タンパク質の多量体化ドメインおよび第2の融合タンパク質の多量体化ドメインと会合し、これらの間に配置される、ステップとを含み、ポリペプチド複合体の結合性ドメインが、過剰増殖性疾患細胞、炎症性疾患細胞、自己免疫疾患細胞、または移植片対宿主病細胞の細胞表面標的に特異的に結合して免疫調節応答を促進し、これにより過剰増殖性疾患、炎症性疾患、自己免疫疾患、または移植片対宿主病を処置する、方法。

10

【0057】

さらなる実施形態では、第1の多量体化ドメインと第2の多量体化ドメインとは、同じであるかまたは異なる。

【0058】

さらなる実施形態では、第1の融合タンパク質の多量体化ドメインおよび第2の融合タンパク質の多量体化ドメインは、ラパマイシンもしくはそのラパログ、クーママイシンもしくはその誘導体、ジベレリンもしくはその誘導体、アブシシン酸（ABA）もしくはその誘導体、メトトレキサートもしくはその誘導体、シクロスポリンAもしくはその誘導体、FKCsAもしくはその誘導体、トリメトプリム（Tm p）（FKBPの合成リガンド（SLF））もしくはその誘導体、またはこれらの任意の組合せから選択される架橋因子と会合する。

20

【0059】

特定の実施形態では、第1の多量体化ドメインおよび第2の多量体化ドメインは、FKBPおよびFRB、FKBPおよびカルシニューリン、FKBPおよびシクロフィリン、FKBPおよび細菌性DHFR、カルシニューリンおよびシクロフィリン、PYL1およびABI1、もしくはGIB1およびGAI、またはこれらの変異体から選択される対である。

【0060】

特定の実施形態では、第1の多量体化ドメインは、第1のFKBPポリペプチドまたはその変異体を含み、第2の多量体化ドメインは、第1のFRBポリペプチドまたはその変異体を含む。

30

【0061】

一実施形態では、第1の多量体化ドメインは、第1のFRBポリペプチドまたはその変異体を含み、第2の多量体化ドメインは、第1のFKBPポリペプチドまたはその変異体を含む。

【0062】

ある特定の実施形態では、架橋因子は、シロリムス、エベロリムス、ノボリムス、ピメクロリムス、リダホロリムス、タクロリムス、テムシロリムス、ウミロリムス、またはゾタロリムスである。

40

【0063】

別のある特定の実施形態では、第1の核酸分子は、第3の多量体化ドメインをさらに含む、第1の融合タンパク質をコードする。

【0064】

特定の実施形態では、第1の融合タンパク質の第3の多量体化ドメインは、ラパマイシンもしくはそのラパログ、クーママイシンもしくはその誘導体、ジベレリンもしくはその誘導体、ABAもしくはその誘導体、メトトレキサートもしくはその誘導体、シクロスポリンAもしくはその誘導体、FKCsAもしくはその誘導体、Tm p-SLFもしくはその誘導体、またはこれらの任意の組合せから選択される架橋因子のための結合性ドメイン

50

である。

【0065】

一実施形態では、少なくとも2つの第1の融合タンパク質の会合を第2の架橋因子が促進し、架橋因子は、第1の融合タンパク質の第3の多量体化ドメインと会合し、これらの間に配置される。

【0066】

さらなる実施形態では、タンパク質複合体は、少なくとも2つの第1の融合タンパク質を含むホモ複合体である。

【0067】

さらなる実施形態では、第1の融合タンパク質は、FKBP、DHFRまたはGyrBのうちの少なくとも1つの多量体化ドメインを有する。

10

【0068】

特定の実施形態では、ポリペプチド複合体の結合性ドメインは、標的過剰増殖性疾患細胞表面に位置する標的に特異的に結合する。

【0069】

さらなる実施形態では、タンパク質複合体は、1種または複数の第1の融合タンパク質および1種または複数の第2の融合タンパク質を含むヘテロ複合体である。

【0070】

さらなる実施形態では、タンパク質ヘテロ複合体の結合性ドメインは、標的過剰増殖性疾患細胞表面に位置する標的に特異的に結合する。

20

【0071】

さらなる一実施形態では、疎水性ドメインは、膜貫通ドメインである。

【0072】

特定の実施形態では、膜貫通ドメインは、CD4膜貫通ドメイン、CD8膜貫通ドメイン、またはCD28膜貫通ドメインである。

【0073】

別の特定の実施形態では、アクチュエータードメインは、リンパ球受容体シグナル伝達ドメインを含む。

【0074】

さらに別の特定の実施形態では、アクチュエータードメインは、複数の免疫受容体チロシンベース活性化モチーフ(ITAM)を含む。

30

【0075】

なおさらに別の特定の実施形態では、アクチュエータードメインは、CD3 ϵ 、CD3 δ 、CD3 ζ 、pT α 、TCR α 、TCR β 、FcR α 、FcR β 、FcR γ 、NKG2D、CD22、CD79A、もしくはCD79B、またはこれらの任意の組合せを含む。

【0076】

ある特定の実施形態では、第1の核酸分子は、異なるアクチュエータードメイン、共刺激ドメイン、接着因子、またはこれらの任意の組合せをさらに含む、第1の融合タンパク質をコードする。

【0077】

さらなる実施形態では、共刺激ドメインは、CD27、CD28、CD30、CD40、LAT、Zap70、ICOS、DAP10、4-1BB、CARD11、HVEM、LAG3、SLAMF1、Lck、Fyn、Slp76、TRIM、OX40、またはこれらの任意の組合せから選択される。

40

【0078】

さらなる実施形態では、アクチュエータードメインは、細胞質シグナル伝達タンパク質と会合する細胞質部分を含む。

【0079】

特定の一実施形態では、細胞質シグナル伝達タンパク質は、リンパ球受容体もしくはそのシグナル伝達ドメイン、1種または複数の免疫受容体チロシンベース活性化モチーフ(

50

I T A M) を含むタンパク質、共刺激ドメイン、接着因子、またはこれらの任意の組合せである。

【0080】

特定の実施形態では、リンパ球受容体またはそのシグナル伝達ドメインは、C D 3 ε、C D 3 δ、C D 3 ζ、p T α、T C R α、T C R β、F c R α、F c R β、F c R γ、N K G 2 D、C D 2 2、C D 7 9 A、もしくはC D 7 9 B、またはこれらの任意の組合せである。

【0081】

一実施形態では、共刺激ドメインは、C D 2 7、C D 2 8、C D 3 0、C D 4 0、L A T、Z a p 7 0、I C O S、D A P 1 0、4 - 1 B B、C A R D 1 1、H V E M、L A G 3、S L A M F 1、L c k、F y n、S l p 7 6、T R I M、O X 4 0、またはこれらの任意の組合せから選択される。

10

【0082】

別の実施形態では、細胞質シグナル伝達タンパク質は、C D 3 ζと4 - 1 B Bとの組合せ、またはC D 3 ζとO X 4 0との組合せである。

【0083】

さらに別の実施形態では、非天然細胞は、共刺激因子、免疫調節因子、共刺激因子に対するアゴニスト、免疫調節因子に対するアゴニスト、またはこれらの任意の組合せをさらに過剰発現させる。

【0084】

20

ある特定の実施形態では、第2の融合タンパク質の結合性ドメインは、単鎖抗体の可変領域、受容体のエクストドメイン、またはリガンドである。

【0085】

ある特定の一実施形態では、単鎖抗体の可変領域は、ドメイン抗体、s F v、s c F v、F (a b ') 2、またはF a bである。

【0086】

特定の実施形態では、第2の融合タンパク質の結合性ドメインは、多量体化ドメインのアミノ末端側にある。

【0087】

さらなる実施形態では、第2の融合タンパク質の結合性ドメインは、多量体化ドメインのカルボキシ末端側にある。

30

【0088】

特定の実施形態では、第2の融合タンパク質は、結合性ドメインと第2の多量体化ドメインとの間に配置されたリンカーをさらに含む。

【0089】

さらなる実施形態では、細胞は、結合性ドメインおよび第2の多量体化ドメインを含む第3の融合タンパク質をコードする第3の核酸分子であって、第3の融合タンパク質が、発現すると細胞外に局在化する、第3の核酸分子をさらに含む。

【0090】

ある特定の実施形態では、結合性ドメインを含む融合タンパク質は、1つ、2つ、3つ、または4つの結合性ドメインを有する。

40

【0091】

一実施形態では、1つ、2つ、3つ、または4つの結合性ドメインは、1つの標的または最大で4つの異なる標的に特異的である。

【0092】

特定の実施形態では、結合性ドメインは、がんに関連する抗原である標的に特異的である。

【0093】

さらなる実施形態では、がんは、充実性悪性疾患または血液悪性疾患である。

【0094】

50

さらなる実施形態では、血液悪性疾患と関連する抗原標的は、CD19、CD20、CD22、CD33、またはCD37である。

【0095】

一実施形態では、結合性ドメインは、 α -葉酸受容体、 $\alpha v \beta 6$ インテグリン、BCM A、B7-H3、B7-H6、CAIX、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD37、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD70、CD123、CD138、CD171、CEA、DLL4、EGP-2、EGP-40、CSPG4、EGFR、ErbB2 (HER2)を含むEGFRファミリー、EGFRvIII、EPCAM、EphA2、EPCAM、FAP、FBP、胎児型アセチルコリン受容体、Fzd7、GD2、GD3、グリピカン3 (GPC3)、h5T4、IL-11R α 、IL13R- α 2、KDR、 κ 軽鎖、 λ 軽鎖、LeY、L1CAM、MAGE-A1、メソテリン、MHC提示ペプチド、MUC1、MUC16、NCAM、NKG2Dリガンド、Notch1、Notch2/3、NY-ESO-1、PRAME、PSCA、PSMA、サバイビン、TAG-72、TEM、TERT、VEGFR2、およびROR1から選択される標的に特異的に結合する。

10

【0096】

特定の実施形態では、第1の架橋因子は、ラパマイシンもしくはそのラパログ、クーママイシンもしくはその誘導体、ジベレリンもしくはその誘導体、ABAもしくはその誘導体、メトトレキサートもしくはその誘導体、シクロスポリンAもしくはその誘導体、FKCsAもしくはその誘導体、またはTnp-SLFもしくはその誘導体である。

20

【0097】

特定の実施形態では、第2の架橋因子は、ラパマイシンもしくはそのラパログ、クーママイシンもしくはその誘導体、ジベレリンもしくはその誘導体、ABAもしくはその誘導体、メトトレキサートもしくはその誘導体、シクロスポリンAもしくはその誘導体、FKCsAもしくはその誘導体、またはTnp-SLFもしくはその誘導体である。

【0098】

さらなる実施形態では、第1の融合タンパク質は、FRB T2098Lの第1の多量体化ドメイン、膜貫通ドメイン、4-1BBの共刺激ドメイン、およびCD3 ζ のアクチュエータードメインを含み；第2の融合タンパク質は、CD19に特異的なscFvの結合性ドメイン、およびFKBP12の第2の多量体化ドメインを含み；非天然細胞の表面でポリペプチド複合体の形成を促進する第1の架橋因子は、ラパログのAP21967である。

30

【0099】

一実施形態では、第1の融合タンパク質は、配列番号15に示されるアミノ酸配列を有し、第2の融合タンパク質は、配列番号1に示されるアミノ酸配列を有する。

【0100】

特定の実施形態では、方法は、T細胞の活性化の阻害剤をアンタゴナイズまたは遮断する薬剤を投与するステップをさらに含む。

【0101】

さらなる実施形態では、薬剤は、T細胞リガンドをアンタゴナイズまたは遮断する。

40

【0102】

特定の実施形態では、薬剤は、T細胞受容体をアンタゴナイズまたは遮断する。

【0103】

さらなる実施形態では、T細胞の活性化の阻害剤をアンタゴナイズまたは遮断する薬剤は、抗PD1抗体もしくはその抗原結合性断片、抗PD-L1抗体もしくはその抗原結合性断片、または抗CTLA4抗体もしくはその抗原結合性断片、あるいはPD-1を標的とする、操作されたホーミングエンドヌクレアーゼである。

【0104】

特定の実施形態では、方法は、サイトカインアゴニストを投与するステップをさらに含む。

50

【0105】

多様な実施形態では、第1の多量体化ドメイン、疎水性ドメイン、およびアクチュエータードメインを含む、第1の融合タンパク質と；細胞外結合性ドメインおよび第2の多量体化ドメインを含む、第2の融合タンパク質と；架橋因子とを含み、第1の融合タンパク質と、第2の融合タンパク質と、架橋因子とが会合してポリペプチドヘテロ複合体を形成し、架橋因子が、第1の融合タンパク質の多量体化ドメインおよび第2の融合タンパク質の多量体化ドメインと会合し、これらの間に配置される、融合ポリペプチドヘテロ複合体が提供される。

【0106】

一実施形態では、結合性ドメインは、単鎖抗体の可変領域、受容体のエクストドメイン、またはリガンドである。

10

【0107】

さらなる実施形態では、単鎖抗体の可変領域は、ドメイン抗体、sFv、scFv、F(ab')₂、またはFabである。

【0108】

一実施形態では、結合性ドメインは、多量体化ドメインのアミノ末端側にある。

【0109】

特定の実施形態では、結合性ドメインは、多量体化ドメインのカルボキシ末端側にある。

【0110】

20

特定の実施形態では、第1の多量体化ドメインは、第1のFKBPポリペプチドまたはその変異体を含み、第2の多量体化ドメインは、第1のFRBポリペプチドまたはその変異体を含む。

【0111】

ある特定の実施形態では、第1の多量体化ドメインは、第1のFRBポリペプチドまたはその変異体を含み、第2の多量体化ドメインは、第1のFKBPポリペプチドまたはその変異体を含む。

【0112】

さらなる実施形態では、疎水性ドメインは、膜貫通ドメインである。

【0113】

30

ある特定の実施形態では、アクチュエータードメインは、リンパ球受容体鎖を含む。

【0114】

一実施形態では、架橋因子は、ラパマイシンもしくはそのラパログ、クーママイシンもしくはその誘導体、ジベレリンもしくはその誘導体、ABAもしくはその誘導体、メトトレキサートもしくはその誘導体、シクロスポリンAもしくはその誘導体、FKCsAもしくはその誘導体、またはTm p-SLFもしくはその誘導体である。

【0115】

さらなる実施形態では、第2の融合タンパク質は、アンカードメインをさらに含む。

【0116】

特定の実施形態では、アンカードメインは、膜貫通ドメインである。

40

【0117】

さらなる実施形態では、第2の融合タンパク質は、閾値下シグナル伝達ドメインをさらに含む。

【0118】

特定の実施形態では、アンカードメインは、GPIシグナル配列である。

【0119】

一実施形態では、GPIシグナル配列を変化させており、第2の融合タンパク質は、GPI分子をさらに含む。

【0120】

さらなる実施形態では、結合性ドメインは、がん、炎症性疾患、自己免疫疾患、または

50

移植片対宿主病と関連する抗原である標的に特異的である。

【0121】

さらなる実施形態では、がんは、CD19、CD20、CD22、CD33、またはCD37の抗原標的を有する血液悪性疾患である。

【0122】

多様な実施形態では、本明細書で想定される融合タンパク質のうちの任意の1種または複数をコードする核酸分子が提供される。

【0123】

さらなる実施形態では、核酸分子は、ゲノム遺伝子座と相同な5'側ポリヌクレオチド配列と3'側ポリヌクレオチド配列との間に配置されている。

10

【0124】

多様な実施形態では、本明細書で想定される核酸を含有する、発現ベクターが提供される。

【0125】

特定の実施形態では、第1の融合タンパク質および第2の融合タンパク質を、ポリシストロニックのメッセージまたは2Aペプチドで隔てられた単一のタンパク質としてコードする。

【0126】

特定の実施形態では、ポリシストロニックのメッセージは、融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列の間に、内部リボソーム侵入部位(IRES)を含む。

20

【0127】

多様な実施形態では、T細胞の受容体に結合する結合性ドメインおよび第1の多量体化ドメインを含む第1の融合タンパク質をコードする第1の核酸分子であって、第1の融合タンパク質が細胞から分泌される、第1の核酸分子と、標的細胞表面に位置する標的に結合する結合性ドメインおよび第2の多量体化ドメインを含む第2の融合タンパク質をコードする第2の核酸分子であって、第2の融合タンパク質が細胞から分泌される、第2の核酸分子とを含み、架橋因子がポリペプチド複合体の形成を促進し、架橋因子が、第1の融合タンパク質の多量体化ドメインおよび第2の融合タンパク質の多量体化ドメインと会合し、これらの間に配置される、非天然細胞が提供される。

【0128】

30

ある特定の実施形態では、第1の多量体化ドメインと第2の多量体化ドメインとは、同じであるかまたは異なる。

【0129】

さらなる実施形態では、第1の融合タンパク質の多量体化ドメインおよび第2の融合タンパク質の多量体化ドメインは、ラパマイシンもしくはそのラパログ、クーママイシンもしくはその誘導体、ジベレリンもしくはその誘導体、アブシシン酸(ABA)もしくはその誘導体、メトトレキサートもしくはその誘導体、シクロスポリンAもしくはその誘導体、FKCsAもしくはその誘導体、トリメトプリム(Tmp)(FKBPの合成リガンド(SLF))もしくはその誘導体、またはこれらの任意の組合せから選択される架橋因子と会合する。

40

【0130】

特定の実施形態では、第1の多量体化ドメインおよび第2の多量体化ドメインは、FKBPおよびFRB、FKBPおよびカルシニューリン、FKBPおよびシクロフィリン、FKBPおよび細菌性DHFR、カルシニューリンおよびシクロフィリン、PYL1およびABI1、もしくはGIB1およびGAI、またはこれらの変異体から選択される対である。

【0131】

さらなる実施形態では、第1の多量体化ドメインは、第1のFKBPポリペプチドまたはその変異体を含み、第2の多量体化ドメインは、第1のFRBポリペプチドまたはその変異体を含む。

50

【0132】

特定の実施形態では、第1の多量体化ドメインは、第1のFRBポリペプチドまたはその変異体を含み、第2の多量体化ドメインは、第1のFKBPポリペプチドまたはその変異体を含む。

【0133】

一実施形態では、架橋因子は、シロリムス、エベロリムス、ノボリムス、ピメクロリムス、リダホロリムス、タクロリムス、テムシロリムス、ウミロリムス、またはゾタロリムスである。

【0134】

特定の実施形態では、非天然細胞は、共刺激因子、免疫調節因子、共刺激因子に対するアゴニスト、免疫調節因子に対するアゴニスト、またはこれらの任意の組合せをさらに過剰発現させる。

10

【0135】

ある特定の実施形態では、第1の融合タンパク質の結合性ドメイン、および第2の融合タンパク質の結合性ドメインの各々は、単鎖抗体の可変領域、受容体のエクストドメイン、またはリガンドからなる群より独立に選択される。

【0136】

さらなる実施形態では、単鎖抗体の可変領域は、ドメイン抗体、sFv、scFv、F(ab')₂、またはFabである。

【0137】

さらなる実施形態では、第1の融合タンパク質の結合性ドメインは、第1の多量体化ドメインのアミノ末端側にある。

20

【0138】

一実施形態では、第1の融合タンパク質の結合性ドメインは、第1の多量体化ドメインのカルボキシ末端側にある。

【0139】

さらなる実施形態では、第2の融合タンパク質の結合性ドメインは、第2の多量体化ドメインのアミノ末端側にある。

【0140】

特定の実施形態では、第2の融合タンパク質の結合性ドメインは、第2の多量体化ドメインのカルボキシ末端側にある。

30

【0141】

一実施形態では、第1の融合タンパク質をコードする第1の核酸分子は、結合性ドメインと第1の多量体化ドメインとの間に配置されたリンカーをコードする配列をさらに含む。

【0142】

特定の実施形態では、第2の融合タンパク質をコードする第2の核酸分子は、結合性ドメインと第2の多量体化ドメインとの間に配置されたリンカーをコードする配列をさらに含む。

【0143】

特定の実施形態では、第2の核酸分子の結合性ドメインは、がん、炎症性疾患、自己免疫疾患、または移植片対宿主病と関連する抗原である標的に特異的である。

40

【0144】

ある特定の実施形態では、がんは、充実性悪性疾患または血液悪性疾患である。

【0145】

ある特定の実施形態では、血液悪性疾患と関連する抗原標的は、CD19、CD20、CD22、CD33、またはCD37である。

【0146】

一実施形態では、第2の核酸分子の結合性ドメインは、 α -葉酸受容体、 α v β 6インテグリン、BCMA、B7-H3、B7-H6、CAIX、CD19、CD20、CD2

50

2、CD30、CD33、CD37、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD70、CD123、CD138、CD171、CEA、DLL4、EGP-2、EGP-40、CSPG4、EGFR、ErbB2 (HER2) を含むEGFRファミリー、EGFRvIII、EPCAM、EphA2、EPCAM、FAP、FBP、胎児型アセチルコリン受容体、Fzd7、GD2、GD3、グリピカン3 (GPC3)、h5T4、IL-11Ra、IL13R-α2、KDR、κ軽鎖、λ軽鎖、LeY、L1CAM、MAGE-A1、メソテリン、MHC提示ペプチド、MUC1、MUC16、NCAM、NKG2Dリガンド、Notch1、Notch2/3、NY-ESO-1、PRAME、PSCA、PSMA、サバイビン、TAG-72、TEM、TERT、VEGFR2、およびROR1から選択される標的に特異的に結合する。

10

【0147】

さらなる実施形態では、架橋因子は、ラパマイシンもしくはそのラパログ、クーママイシンもしくはその誘導体、ジベレリンもしくはその誘導体、ABAもしくはその誘導体、メトトレキサートもしくはその誘導体、シクロスポリンAもしくはその誘導体、FKCSAもしくはその誘導体、またはTnp-SLFもしくはその誘導体である。

【0148】

特定の実施形態では、第1の核酸は、CD3に特異的なscFvの結合性ドメイン、およびFRB T2098Lの第1の多量体化ドメインを含む第1の融合タンパク質をコードし；第2の核酸は、CD19に特異的なscFvの結合性ドメイン、およびFKBP12の第2の多量体化ドメインを含む第2の融合タンパク質をコードし；ポリペプチド複合体の形成を促進する架橋因子は、ラパログのAP21967である。

20

【0149】

さらなる実施形態では、第1の核酸は、CD3に特異的なscFvの結合性ドメイン、およびFRB T2098Lの第1の多量体化ドメインを含む第1の融合タンパク質をコードし；第2の核酸は、BCMAに特異的なscFvの結合性ドメイン、およびFKBP12の第2の多量体化ドメインを含む第2の融合タンパク質をコードし；ポリペプチド複合体の形成を促進する架橋因子は、ラパログのAP21967である。

【0150】

多様な実施形態では、過剰増殖性疾患、炎症性疾患、自己免疫疾患、または移植片対宿主病を処置するための方法であって、本明細書で想定される非天然細胞を投与するステップと、架橋因子を投与するステップであって、架橋因子がポリペプチド複合体の形成を促進し、架橋因子が、第1の融合タンパク質の多量体化ドメインおよび第2の融合タンパク質の多量体化ドメインと会合し、これらの間に配置される、ステップとを含み；第2の融合ポリペプチドの結合性ドメインが、過剰増殖性疾患細胞の細胞表面標的に特異的に結合して免疫調節応答を促進し、これにより過剰増殖性疾患を処置する方法が提供される。

30

【0151】

多様な実施形態では、過剰増殖性疾患、炎症性疾患、自己免疫疾患、または移植片対宿主病を処置するための方法であって、T細胞の受容体に結合する結合性ドメインおよび第1の多量体化ドメインを含む第1の融合タンパク質；ならびに過剰増殖性疾患細胞、炎症性疾患細胞、自己免疫疾患細胞、または移植片対宿主病細胞の細胞表面標的に結合する結合性ドメイン、および第2の多量体化ドメインを含む第2の融合タンパク質を投与するステップと；架橋因子を投与するステップであって、架橋因子がポリペプチド複合体の形成を促進し、架橋因子が、第1の融合タンパク質の多量体化ドメインおよび第2の融合タンパク質の多量体化ドメインと会合し、これらの間に配置される、ステップとを含み、これにより過剰増殖性疾患、炎症性疾患、自己免疫疾患、または移植片対宿主病を処置する方法が提供される。

40

【0152】

多様な実施形態では、T細胞の受容体に結合する結合性ドメインおよび第1の多量体化ドメインを含む第1の融合タンパク質と；標的細胞の細胞表面標的に結合する結合性ドメインを含む第2の融合タンパク質と；架橋因子とを含み、第1の融合タンパク質と、第2

50

の融合タンパク質と、架橋因子とが会合してポリペプチドヘテロ複合体を形成し、架橋因子が、第1の融合タンパク質の多量体化ドメインおよび第2の融合タンパク質の多量体化ドメインと会合し、これらの間に配置される、融合ポリペプチドヘテロ複合体が提供される。

【0153】

特定の実施形態では、第1の多量体化ドメインと第2の多量体化ドメインとは、同じであるかまたは異なる。

【0154】

さらなる実施形態では、第1の融合タンパク質の多量体化ドメインおよび第2の融合タンパク質の多量体化ドメインは、ラパマイシンもしくはそのラパログ、クーママイシンもしくはその誘導体、ジベレリンもしくはその誘導体、アブシシン酸（ABA）もしくはその誘導体、メトトレキサートもしくはその誘導体、シクロスポリンAもしくはその誘導体、FKCsAもしくはその誘導体、トリメトプリム（Tm p）（FKBPの合成リガンド（SLF））もしくはその誘導体、またはこれらの任意の組合せから選択される架橋因子と会合する。

10

【0155】

ある特定の実施形態では、第1の多量体化ドメインおよび第2の多量体化ドメインは、FKBPおよびFRB、FKBPおよびカルシニューリン、FKBPおよびシクロフィリン、FKBPおよび細菌性DHFR、カルシニューリンおよびシクロフィリン、PYL1およびABI1、もしくはGIB1およびGAI、またはこれらの変異体から選択される対である。

20

【0156】

さらなる実施形態では、第1の多量体化ドメインは、第1のFKBPポリペプチドまたはその変異体を含み、第2の多量体化ドメインは、第1のFRBポリペプチドまたはその変異体を含む。

【0157】

ある特定の実施形態では、第1の多量体化ドメインは、第1のFRBポリペプチドまたはその変異体を含み、第2の多量体化ドメインは、第1のFKBPポリペプチドまたはその変異体を含む。

【0158】

特定の実施形態では、架橋因子は、シロリムス、エベロリムス、ノボリムス、ピメクロリムス、リダホロリムス、タクロリムス、テムシロリムス、ウミロリムス、またはゾタロリムスである。

30

【0159】

一実施形態では、第1の融合タンパク質の結合性ドメイン、および第2の融合タンパク質の結合性ドメインの各々は、単鎖抗体の可変領域、受容体のエクストドメイン、またはリガンドからなる群より独立に選択される。

【0160】

さらなる実施形態では、単鎖抗体の可変領域は、ドメイン抗体、sFv、scFv、F(ab')₂、またはFabである。

40

【0161】

さらなる実施形態では、第2の融合ポリペプチドの結合性ドメインは、 α -葉酸受容体、 α v β 6インテグリン、BCMA、B7-H3、B7-H6、CAIX、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD37、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD70、CD123、CD138、CD171、CEA、DLL4、EGP-2、EGP-40、CSPG4、EGFR、ErbB2（HER2）を含むEGFRファミリー、EGFRvIII、EPCAM、EphA2、EPCAM、FAP、FBP、胎児型アセチルコリン受容体、Fzd7、GD2、GD3、グリピカン3（GPC3）、h5T4、IL-11R α 、IL13R- α 2、KDR、 κ 軽鎖、 λ 軽鎖、LeY、L1CAM、MAGE-A1、メソテリン、MHC提示ペプチド、MUC1、MUC16、N

50

CAM、NKG2Dリガンド、Notch1、Notch2／3、NY-ESO-1、PRAME、PSCA、PSMA、サバイビン、TAG-72、TEM、TERT、VEGFR2、およびROR1から選択される標的に特異的に結合する。

【0162】

ある特定の実施形態では、第1の融合タンパク質は、CD3に特異的なscFvの結合性ドメイン、およびFRBT2098Lの第1の多量体化ドメインを含み；第2の融合タンパク質は、CD19に特異的なscFvの結合性ドメイン、およびFKBP12の第2の多量体化ドメインを含み；架橋因子は、ラパログのAP21967である。

【0163】

特定の実施形態では、第1の融合タンパク質は、CD3に特異的なscFvの結合性ドメイン、およびFRBT2098Lの第1の多量体化ドメインを含み；第2の融合タンパク質は、BCMAに特異的なscFvの結合性ドメイン、およびFKBP12の第2の多量体化ドメインを含み；架橋因子は、ラパログのAP21967である。

【0164】

多様な実施形態では、本明細書で想定される融合タンパク質のうちの任意の1種または複数をコードする核酸分子が提供される。

【0165】

特定の実施形態では、核酸分子は、ゲノム遺伝子座と相同な5'側ポリヌクレオチド配列と3'側ポリヌクレオチド配列との間に配置されている。

【0166】

多様な実施形態では、本明細書で想定される核酸を含有する発現ベクターが提供される。

【0167】

一実施形態では、発現ベクターは、ポリシストロニックのメッセージまたは2Aペプチドで隔てられた単一のタンパク質としてコードされた第1の融合タンパク質および第2の融合タンパク質を含む。

【0168】

別の実施形態では、ポリシストロニックのメッセージは、融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列の間に、内部リボソーム侵入部位(IRES)を含む。

特定の実施形態では、例えば以下が提供される：

(項目1)

非天然細胞であって、以下：

(a) 第1の多量体化ドメイン、疎水性ドメイン、およびアクチュエータードメインを含む第1の融合タンパク質をコードする第1の核酸分子であって、前記第1の融合タンパク質が発現すると、前記第1の多量体化ドメインが細胞外に局在化する、第1の核酸分子と、

(b) 結合性ドメインおよび第2の多量体化ドメインを含む第2の融合タンパク質をコードする第2の核酸分子であって、前記第2の融合タンパク質が、発現すると細胞外に局在化する、第2の核酸分子と

を含み、ここで

第1の架橋因子は、前記非天然細胞の表面でポリペプチド複合体の形成を促進し、前記架橋因子は、前記第1の融合タンパク質の前記多量体化ドメインおよび前記第2の融合タンパク質の前記多量体化ドメインと会合し、これらの間に配置される、
非天然細胞。

(項目2)

前記第1の多量体化ドメインと前記第2の多量体化ドメインとが、同じであるかまたは異なる、項目1に記載の非天然細胞。

(項目3)

前記第1の融合タンパク質の前記多量体化ドメインおよび前記第2の融合タンパク質の前記多量体化ドメインが、ラパマイシンもしくはそのラパログ、クーママイシンもしくはは

10

20

30

40

50

その誘導体、ジベレリンもしくはその誘導体、アブシシン酸（A B A）もしくはその誘導体、メトトレキサートもしくはその誘導体、シクロスポリンAもしくはその誘導体、F K C s Aもしくはその誘導体、トリメトプリム（T m p）（F K B Pの合成リガンド（S L F））もしくはその誘導体、またはこれらの任意の組合せから選択される架橋因子と会合する、項目1または項目2に記載の非天然細胞。

（項目4）

前記第1の多量体化ドメインおよび前記第2の多量体化ドメインが、F K B PおよびF R B、F K B Pおよびカルシニューリン、F K B Pおよびシクロフィリン、F K B Pおよび細菌性D H F R、カルシニューリンおよびシクロフィリン、P Y L 1およびA B I 1、もしくはG I B 1およびG A I、またはこれらの変異体から選択される対である、前記項目のいずれか一項に記載の非天然細胞。

10

（項目5）

前記第1の多量体化ドメインが、第1のF K B Pポリペプチドまたはその変異体を含み、前記第2の多量体化ドメインが、第1のF R Bポリペプチドまたはその変異体を含む、前記項目のいずれか一項に記載の非天然細胞。

（項目6）

前記第1の多量体化ドメインが、第1のF R Bポリペプチドまたはその変異体を含み、前記第2の多量体化ドメインが、第1のF K B Pポリペプチドまたはその変異体を含む、前記項目のいずれか一項に記載の非天然細胞。

20

（項目7）

前記架橋因子が、シロリムス、エベロリムス、ノボリムス、ピメクロリムス、リダホロリムス、タクロリムス、テムシロリムス、ウミロリムス、またはゾタロリムスである、項目5または6に記載の非天然細胞。

（項目8）

前記第1の核酸分子が、第3の多量体化ドメインをさらに含む第1の融合タンパク質をコードする、前記項目のいずれか一項に記載の非天然細胞。

（項目9）

前記第1の融合タンパク質の前記第3の多量体化ドメインが、ラパマイシンもしくはそのラパログ、クーママイシンもしくはその誘導体、ジベレリンもしくはその誘導体、A B Aもしくはその誘導体、メトトレキサートもしくはその誘導体、シクロスポリンAもしくはその誘導体、F K C s Aもしくはその誘導体、T m p－S L Fもしくはその誘導体、またはこれらの任意の組合せから選択される架橋因子のための結合性ドメインである、項目8に記載の非天然細胞。

30

（項目10）

第2の架橋因子が少なくとも2つの第1の融合タンパク質の会合を促進し、前記架橋因子が、前記第1の融合タンパク質の前記第3の多量体化ドメインと会合し、これらの間に配置される、前記項目のいずれか一項に記載の非天然細胞。

（項目11）

タンパク質複合体が、少なくとも2つの第1の融合タンパク質を含むホモ複合体である、前記項目のいずれか一項に記載の非天然細胞。

40

（項目12）

前記第1の融合タンパク質が、F K B P、D H F RまたはG y r Bのうちの少なくとも1つの多量体化ドメインを有する、前記項目のいずれか一項に記載の非天然細胞。

（項目13）

前記ポリペプチド複合体の前記結合性ドメインが、標的細胞表面に位置する標的に特異的に結合する、項目1から12のいずれか一項に記載の非天然細胞。

（項目14）

前記タンパク質複合体が、1種または複数の第1の融合タンパク質および1種または複数の第2の融合タンパク質を含むヘテロ複合体である、項目13に記載の非天然細胞。

（項目15）

50

前記タンパク質ヘテロ複合体の前記結合性ドメインが、標的細胞表面に位置する標的に特異的に結合する、項目 14 に記載の非天然細胞。

(項目 16)

前記疎水性ドメインが、膜貫通ドメインである、前記項目のいずれか一項に記載の非天然細胞。

(項目 17)

前記膜貫通ドメインが、CD4 膜貫通ドメイン、CD8 膜貫通ドメイン、または CD28 膜貫通ドメインである、前記項目のいずれか一項に記載の非天然細胞。

(項目 18)

前記アクチュエータードメインが、リンパ球受容体シグナル伝達ドメインを含む、前記項目のいずれか一項に記載の非天然細胞。

10

(項目 19)

前記アクチュエータードメインが、1 種または複数の免疫受容体チロシンベース活性化モチーフ (ITAM) を含む、前記項目のいずれか一項に記載の非天然細胞。

(項目 20)

前記アクチュエータードメインが、CD3 ϵ 、CD3 δ 、CD3 ζ 、pT α 、TCR α 、TCR β 、FcR α 、FcR β 、FcR γ 、NKG2D、CD22、CD79A、もしくは CD79B、またはこれらの任意の組合せを含む、前記項目のいずれか一項に記載の非天然細胞。

(項目 21)

20

前記第 1 の核酸分子が、異なるアクチュエータードメイン、共刺激ドメイン、接着因子、またはこれらの任意の組合せをさらに含む前記第 1 の融合タンパク質をコードする、前記項目のいずれか一項に記載の非天然細胞。

(項目 22)

前記共刺激ドメインが、CD27、CD28、CD30、CD40、LAT、Zap70、ICOS、DAP10、4-1BB、CARD11、HVEM、LAG3、SLAMF1、Lck、Fyn、Slp76、TRIM、OX40、またはこれらの任意の組合せから選択される、項目 18 に記載の非天然細胞。

(項目 23)

前記アクチュエータードメインが、細胞質シグナル伝達タンパク質と会合する細胞質部分を含む、前記項目のいずれか一項に記載の非天然細胞。

30

(項目 24)

前記細胞質シグナル伝達タンパク質が、リンパ球受容体もしくはそのシグナル伝達ドメイン、複数の免疫受容体チロシンベース活性化モチーフ (ITAM) を含むタンパク質、共刺激ドメイン、接着因子、またはこれらの任意の組合せである、項目 23 に記載の非天然細胞。

(項目 25)

前記リンパ球受容体またはそのシグナル伝達ドメインが、CD3 ϵ 、CD3 δ 、CD3 ζ 、pT α 、TCR α 、TCR β 、FcR α 、FcR β 、FcR γ 、NKG2D、CD22、CD79A、もしくは CD79B、またはこれらの任意の組合せである、項目 24 に記載の非天然細胞。

40

(項目 26)

前記共刺激ドメインが、CD27、CD28、CD30、CD40、LAT、Zap70、ICOS、DAP10、4-1BB、CARD11、HVEM、LAG3、SLAMF1、Lck、Fyn、Slp76、TRIM、OX40、またはこれらの任意の組合せから選択される、項目 24 に記載の非天然細胞。

(項目 27)

共刺激因子、免疫調節因子、共刺激因子に対するアゴニスト、免疫調節因子に対するアゴニスト、またはこれらの任意の組合せをさらに過剰発現させる、前記項目のいずれか一項に記載の非天然細胞。

50

(項目 28)

前記第2の融合タンパク質が、発現すると前記非天然細胞から分泌されるように、前記第2の核酸分子が、分泌シグナルをさらにコードし、任意選択で、アンカードメインをさらにコードする、前記項目のいずれか一項に記載の非天然細胞。

(項目 29)

前記第2の融合タンパク質の前記結合性ドメインが、単鎖抗体の可変領域、受容体のエクストドメイン、またはリガンドである、前記項目のいずれか一項に記載の非天然細胞。

(項目 30)

前記単鎖抗体の可変領域が、ドメイン抗体、sFv、scFv、F(ab')₂、またはFabである、項目29に記載の非天然細胞。

10

(項目 31)

前記第2の融合タンパク質の前記結合性ドメインが、前記多量体化ドメインのアミノ末端側にある、前記項目のいずれか一項に記載の非天然細胞。

(項目 32)

前記第2の融合タンパク質の前記結合性ドメインが、前記多量体化ドメインのカルボキシ末端側にある、前記項目のいずれか一項に記載の非天然細胞。

(項目 33)

前記第2の融合タンパク質をコードする前記第2の核酸分子が、前記結合性ドメインと前記第2の多量体化ドメインとの間に配置されたリンカーをコードする配列をさらに含む、前記項目のいずれか一項に記載の非天然細胞。

20

(項目 34)

前記細胞が、結合性ドメインおよび第2の多量体化ドメインを含む第3の融合タンパク質をコードする第3の核酸分子をさらに含み、前記第3の融合タンパク質は、発現すると細胞外に局在化する、前記項目のいずれか一項に記載の非天然細胞。

(項目 35)

結合性ドメインを含む前記融合タンパク質が、1つ、2つ、3つ、または4つの結合性ドメインを有する、前記項目のいずれか一項に記載の非天然細胞。

(項目 36)

1つ、2つ、3つ、または4つの前記結合性ドメインが、1つの標的または最大で4つの異なる標的に特異的である、前記項目のいずれか一項に記載の非天然細胞。

30

(項目 37)

前記結合性ドメインが、がん、炎症性疾患、自己免疫疾患、または移植片対宿主病と関連する抗原である標的に特異的である、前記項目のいずれか一項に記載の非天然細胞。

(項目 38)

前記がんが、充実性悪性疾患または血液悪性疾患である、項目37に記載の非天然細胞。

(項目 39)

前記血液悪性疾患と関連する抗原標的が、CD19、CD20、CD22、CD33、またはCD37である、項目38に記載の非天然細胞。

(項目 40)

前記結合性ドメインが、α-葉酸受容体、α_vβ₆インテグリン、BCMA、B7-H3、B7-H6、CAIX、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD37、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD70、CD123、CD138、CD171、CEA、DLL4、EGP-2、EGP-40、CSPG4、EGFR、ErbB2 (HER2)を含むEGFRファミリー、EGFRvIII、EPCAM、EphA2、EPCAM、FAP、FBP、胎児型アセチルコリン受容体、Fzd7、GD2、GD3、グリピカン-3 (GPC3)、h5T4、IL-11Ra、IL13Ra2、KDR、κ軽鎖、λ軽鎖、LeY、L1CAM、MAGE-A1、メソテリン、MHC提示ペプチド、MUC1、MUC16、NCAM、NKG2Dリガンド、Notch1、Notch2/3、NY-ESO-1、PRAME、PSCA、PSMA、サバイビン

40

50

、TAG-72、TEM、TERT、VEGFR2、およびROR1から選択される標的に特異的に結合する、前記項目のいずれか一項に記載の非天然細胞。

(項目41)

前記第1の架橋因子が、ラパマイシンもしくはそのラパログ、クーママイシンもしくはその誘導体、ジベレリンもしくはその誘導体、ABAもしくはその誘導体、メトトレキサートもしくはその誘導体、シクロスポリンAもしくはその誘導体、FKCSAもしくはその誘導体、またはTm p-S L Fもしくはその誘導体である、前記項目のいずれか一項に記載の非天然細胞。

(項目42)

前記第2の架橋因子が、ラパマイシンもしくはそのラパログ、クーママイシンもしくはその誘導体、ジベレリンもしくはその誘導体、ABAもしくはその誘導体、メトトレキサートもしくはその誘導体、シクロスポリンAもしくはその誘導体、FKCSAもしくはその誘導体、またはTm p-S L Fもしくはその誘導体である、項目10に記載の非天然細胞。

(項目43)

コードされた前記第1の融合タンパク質が、FRB T2098Lの第1の多量体化ドメイン、膜貫通ドメイン、4-1BBの共刺激ドメイン、およびCD3ζのアクチュエータードメインを含み；コードされた前記第2の融合タンパク質が、CD19に特異的なscFvの結合性ドメイン、およびFKBP12の第2の多量体化ドメインを含み；前記非天然細胞の表面でポリペプチド複合体の形成を促進する前記第1の架橋因子が、ラパログのAP21967である、前記項目のいずれか一項に記載の非天然細胞。

(項目44)

前記第1の融合タンパク質が、配列番号15に示されるアミノ酸配列を有し、前記第2の融合タンパク質が、配列番号1に示されるアミノ酸配列を有する、項目43に記載の非天然細胞。

(項目45)

過剰増殖性疾患、炎症性疾患、自己免疫疾患、または移植片対宿主病を処置するための方法であって、前記方法は、以下：

(a) 第1の核酸分子および第2の核酸分子を含む組換え細胞を投与するステップであって、前記第1の核酸分子が、第1の多量体化ドメイン、疎水性ドメイン、およびアクチュエータードメインを含む第1の融合タンパク質をコードし、前記第1の融合タンパク質が発現すると、前記第1の多量体化ドメインが細胞外に局在化し、そして前記第2の核酸分子が、結合性ドメインおよび第2の多量体化ドメインを含む第2の融合タンパク質をコードし、前記第2の融合タンパク質が、発現すると細胞外に局在化する、ステップと；

(b) 架橋因子を投与するステップであって、前記架橋因子が前記組換え細胞の表面でポリペプチド複合体の形成を促進し、前記架橋因子が、前記第1の融合タンパク質の前記多量体化ドメインおよび前記第2の融合タンパク質の前記多量体化ドメインと会合し、これらの間に配置される、ステップとを含む、

前記ポリペプチド複合体の前記結合性ドメインが、過剰増殖性疾患細胞、炎症性疾患細胞、自己免疫疾患細胞、または移植片対宿主病細胞の細胞表面標的に特異的に結合して免疫調節応答を促進し、これにより前記過剰増殖性疾患、前記炎症性疾患、前記自己免疫疾患、または前記移植片対宿主病を処置する、方法。

(項目46)

過剰増殖性疾患、炎症性疾患、自己免疫疾患、または移植片対宿主病を処置するための方法であって、前記方法は、以下：

(a) 第1の多量体化ドメイン、疎水性ドメイン、およびアクチュエータードメインを含む第1の融合タンパク質をコードする第1の核酸分子を含む非天然細胞を投与するステップであって、前記第1の融合タンパク質が発現すると、前記第1の多量体化ドメインが細胞外に局在化する、ステップと；

(b) 結合性ドメインおよび第2の多量体化ドメインを含む第2の融合タンパク質を投与するステップと；

(c) 架橋因子を投与するステップであって、前記架橋因子が前記組換え細胞の表面でポリペプチド複合体の形成を促進し、前記架橋因子が、前記第1の融合タンパク質の前記多量体化ドメインおよび前記第2の融合タンパク質の前記多量体化ドメインと会合し、これらの間に配置される、ステップと

を含み、

前記ポリペプチド複合体の前記結合性ドメインが、過剰増殖性疾患細胞、炎症性疾患細胞、自己免疫疾患細胞、または移植片対宿主病細胞の細胞表面標的に特異的に結合して免疫調節応答を促進し、これにより前記過剰増殖性疾患、前記炎症性疾患、前記自己免疫疾患、または前記移植片対宿主病を処置する、方法。

10

(項目47)

前記第1の多量体化ドメインと前記第2の多量体化ドメインとが、同じであるかまたは異なる、項目45または46に記載の方法。

(項目48)

前記第1の融合タンパク質の前記多量体化ドメインおよび前記第2の融合タンパク質の前記多量体化ドメインが、ラパマイシンもしくはそのラパログ、クーママイシンもしくはその誘導体、ジベレリンもしくはその誘導体、アブシシン酸 (ABA) もしくはその誘導体、メトトレキサートもしくはその誘導体、シクロスポリンAもしくはその誘導体、FKCsAもしくはその誘導体、トリメトプリム (Tm p) (FKBPの合成リガンド (SLF)) もしくはその誘導体、またはこれらの任意の組合せから選択される架橋因子と会合する、項目45から47のいずれか一項に記載の方法。

20

(項目49)

前記第1の多量体化ドメインおよび前記第2の多量体化ドメインが、FKBPおよびFRB、FKBPおよびカルシニューリン、FKBPおよびシクロフィリン、FKBPおよび細菌性DHFR、カルシニューリンおよびシクロフィリン、PYL1およびABI1、もしくはGIB1およびGAI、またはこれらの変異体から選択される対である、項目45から48のいずれか一項に記載の方法。

(項目50)

前記第1の多量体化ドメインが、第1のFKBPポリペプチドまたはその変異体を含み、前記第2の多量体化ドメインが、第1のFRBポリペプチドまたはその変異体を含む、項目45から49のいずれか一項に記載の方法。

30

(項目51)

前記第1の多量体化ドメインが、第1のFRBポリペプチドまたはその変異体を含み、前記第2の多量体化ドメインが、第1のFKBPポリペプチドまたはその変異体を含む、項目45から50のいずれか一項に記載の方法。

(項目52)

前記架橋因子が、シロリムス、エベロリムス、ノボリムス、ピメクロリムス、リダホリムス、タクロリムス、テムシロリムス、ウミロリムス、またはゾタロリムスである、項目50または51に記載の方法。

40

(項目53)

前記第1の核酸分子が、第3の多量体化ドメインをさらに含む、第1の融合タンパク質をコードする、項目45から52のいずれか一項に記載の方法。

(項目54)

前記第1の融合タンパク質の前記第3の多量体化ドメインが、ラパマイシンもしくはそのラパログ、クーママイシンもしくはその誘導体、ジベレリンもしくはその誘導体、ABAもしくはその誘導体、メトトレキサートもしくはその誘導体、シクロスポリンAもしくはその誘導体、FKCsAもしくはその誘導体、Tm p-SLFもしくはその誘導体、またはこれらの任意の組合せから選択される架橋因子のための結合性ドメインである、項目53に記載の方法。

50

(項目 5 5)

少なくとも 2 つの第 1 の融合タンパク質の会合を第 2 の架橋因子が促進し、前記架橋因子は、前記第 1 の融合タンパク質の前記第 3 の多量体化ドメインと会合し、これらの間に配置される、項目 4 5 から 5 4 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 5 6)

タンパク質複合体が、少なくとも 2 つの第 1 の融合タンパク質を含むホモ複合体である、項目 4 5 から 5 5 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 5 7)

前記第 1 の融合タンパク質が、F K B P、D H F R または G y r B のうちの少なくとも 1 つの多量体化ドメインを有する、項目 4 5 から 5 6 のいずれか一項に記載の方法。

10

(項目 5 8)

前記ポリペプチド複合体の前記結合性ドメインが、標的過剰増殖性疾患細胞表面に位置する標的に特異的に結合する、項目 4 5 から 5 7 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 5 9)

前記タンパク質複合体が、1 種または複数の第 1 の融合タンパク質および 1 種または複数の第 2 の融合タンパク質を含むヘテロ複合体である、項目 5 8 に記載の方法。

(項目 6 0)

前記タンパク質ヘテロ複合体の前記結合性ドメインが、標的過剰増殖性疾患細胞表面に位置する標的に特異的に結合する、項目 5 9 に記載の方法。

20

(項目 6 1)

前記疎水性ドメインが、膜貫通ドメインである、項目 4 5 から 6 0 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 6 2)

前記膜貫通ドメインが、C D 4 膜貫通ドメイン、C D 8 膜貫通ドメイン、または C D 2 8 膜貫通ドメインである、項目 4 5 から 6 1 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 6 3)

前記アクチュエータードメインが、リンパ球受容体シグナル伝達ドメインを含む、項目 4 5 から 6 2 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 6 4)

前記アクチュエータードメインが、複数の免疫受容体チロシンベース活性化モチーフ (I T A M) を含む、項目 4 5 から 6 3 のいずれか一項に記載の方法。

30

(項目 6 5)

前記アクチュエータードメインが、C D 3 ε、C D 3 δ、C D 3 ζ、p T α、T C R α、T C R β、F c R α、F c R β、F c R γ、N K G 2 D、C D 2 2、C D 7 9 A、もしくは C D 7 9 B、またはこれらの任意の組合せを含む、項目 4 5 から 6 4 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 6 6)

前記第 1 の核酸分子が、異なるアクチュエータードメイン、共刺激ドメイン、接着因子、またはこれらの任意の組合せをさらに含む、前記第 1 の融合タンパク質をコードする、項目 4 5 から 6 5 のいずれか一項に記載の方法。

40

(項目 6 7)

前記共刺激ドメインが、C D 2 7、C D 2 8、C D 3 0、C D 4 0、L A T、Z a p 7 0、I C O S、D A P 1 0、4 - 1 B B、C A R D 1 1、H V E M、L A G 3、S L A M F 1、L c k、F y n、S l p 7 6、T R I M、O X 4 0、またはこれらの任意の組合せから選択される、項目 6 6 に記載の方法。

(項目 6 8)

前記アクチュエータードメインが、細胞質シグナル伝達タンパク質と会合する細胞質部分を含む、項目 4 5 から 6 7 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 6 9)

前記細胞質シグナル伝達タンパク質が、リンパ球受容体もしくはそのシグナル伝達ドメ

50

イン、1種または複数の免疫受容体チロシンベース活性化モチーフ（ITAM）を含むタンパク質、共刺激ドメイン、接着因子、またはこれらの任意の組合せである、項目68に記載の方法。

（項目70）

前記リンパ球受容体またはそのシグナル伝達ドメインが、CD3 ϵ 、CD3 δ 、CD3 ζ 、pT α 、TCR α 、TCR β 、FcR α 、FcR β 、FcR γ 、NKG2D、CD22、CD79A、もしくはCD79B、またはこれらの任意の組合せである、項目69に記載の方法。

（項目71）

前記共刺激ドメインが、CD27、CD28、CD30、CD40、LAT、Zap70、ICOS、DAP10、4-1BB、CARD11、HVEM、LAG3、SLAMF1、Lck、Fyn、Slp76、TRIM、OX40、またはこれらの任意の組合せから選択される、項目69に記載の方法。

（項目72）

前記細胞質シグナル伝達タンパク質が、CD3 ζ と4-1BBとの組合せ、またはCD3 ζ とOX40との組合せである、項目69に記載の方法。

（項目73）

前記非天然細胞が、共刺激因子、免疫調節因子、共刺激因子に対するアゴニスト、免疫調節因子に対するアゴニスト、またはこれらの任意の組合せをさらに過剰発現させる、項目45から72のいずれか一項に記載の方法。

（項目74）

前記第2の融合タンパク質の前記結合性ドメインが、単鎖抗体の可変領域、受容体のエクストドメイン、またはリガンドである、項目45から73のいずれか一項に記載の方法。

（項目75）

前記単鎖抗体の可変領域が、ドメイン抗体、sFv、scFv、F(ab')₂、またはFabである、項目74に記載の方法。

（項目76）

前記第2の融合タンパク質の前記結合性ドメインが、前記多量体化ドメインのアミノ末端側にある、項目45から75のいずれか一項に記載の方法。

（項目77）

前記第2の融合タンパク質の前記結合性ドメインが、前記多量体化ドメインのカルボキシ末端側にある、項目45から76のいずれか一項に記載の方法。

（項目78）

前記第2の融合タンパク質が、前記結合性ドメインと前記第2の多量体化ドメインとの間に配置されたリンカーをさらに含む、項目45から77のいずれか一項に記載の方法。

（項目79）

前記細胞が、結合性ドメインおよび第2の多量体化ドメインを含む第3の融合タンパク質をコードする第3の核酸分子を含み、前記第3の融合タンパク質が、発現すると細胞外に局在化する、項目45から78のいずれか一項に記載の方法。

（項目80）

結合性ドメインを含む前記融合タンパク質が、1つ、2つ、3つ、または4つの結合性ドメインを有する、項目45から76のいずれか一項に記載の方法。

（項目81）

1つ、2つ、3つ、または4つの前記結合性ドメインが、1つの標的または最大で4つの異なる標的に特異的である、項目45から80のいずれか一項に記載の方法。

（項目82）

前記結合性ドメインが、がんに関連する抗原である標的に特異的である、項目45から81のいずれか一項に記載の方法。

（項目83）

前記がんが、充実性悪性疾患または血液悪性疾患である、項目82に記載の方法。

10

20

30

40

50

(項目 8 4)

前記血液悪性疾患と関連する抗原標的が、CD 1 9、CD 2 0、CD 2 2、CD 3 3、または CD 3 7 である、項目 8 3 に記載の方法。

(項目 8 5)

前記結合性ドメインが、 α -葉酸受容体、 $\alpha_v\beta_6$ インテグリン、BCMA、B 7-H 3、B 7-H 6、CAIX、CD 1 9、CD 2 0、CD 2 2、CD 3 0、CD 3 3、CD 3 7、CD 4 4、CD 4 4 v 6、CD 4 4 v 7/8、CD 7 0、CD 1 2 3、CD 1 3 8、CD 1 7 1、CEA、DLL 4、EGP-2、EGP-4 0、CSPG 4、EGFR、Erbb 2 (HER 2) を含む EGFR ファミリー、EGFR v I I I、EPCAM、EphA 2、EPCAM、FAP、FBP、胎児型アセチルコリン受容体、Fzd 7、GD 2、GD 3、グリピカン 3 (GPC 3)、h 5 T 4、IL-1 1 R α 、IL 1 3 R- α 2、KDR、 κ 軽鎖、 λ 軽鎖、LeY、L1CAM、MAGE-A 1、メソテリン、MHC 提示ペプチド、MUC 1、MUC 1 6、NCAM、NKG 2 D リガンド、Notch 1、Notch 2/3、NY-ESO-1、PRAME、PSCA、PSMA、サバイビン、TAG-7 2、TEM、TERT、VEGFR 2、および ROR 1 から選択される標的に特異的に結合する、項目 4 5 から 8 4 のいずれか一項に記載の方法。

10

(項目 8 6)

前記第 1 の架橋因子が、ラパマイシンもしくはそのラパログ、クーママイシンもしくはその誘導体、ジベレリンもしくはその誘導体、ABA もしくはその誘導体、メトトレキサートもしくはその誘導体、シクロスポリン A もしくはその誘導体、FKCs A もしくはその誘導体、または Tmp-SLF もしくはその誘導体である、項目 4 5 から 8 5 のいずれか一項に記載の方法。

20

(項目 8 7)

前記第 2 の架橋因子が、ラパマイシンもしくはそのラパログ、クーママイシンもしくはその誘導体、ジベレリンもしくはその誘導体、ABA もしくはその誘導体、メトトレキサートもしくはその誘導体、シクロスポリン A もしくはその誘導体、FKCs A もしくはその誘導体、または Tmp-SLF もしくはその誘導体である、項目 5 5 に記載の方法。

(項目 8 8)

前記第 1 の融合タンパク質が、FRB T 2 0 9 8 L の第 1 の多量体化ドメイン、膜貫通ドメイン、4-1 BB の共刺激ドメイン、および CD 3 ζ のアクチュエータードメインを含み；前記第 2 の融合タンパク質が、CD 1 9 に特異的な scFv の結合性ドメイン、および FKBP 1 2 の第 2 の多量体化ドメインを含み；前記非天然細胞の表面でポリペプチド複合体の形成を促進する前記第 1 の架橋因子が、ラパログの AP 2 1 9 6 7 である、項目 4 5 から 8 7 のいずれか一項に記載の方法。

30

(項目 8 9)

前記第 1 の融合タンパク質が、配列番号 1 5 に示されるアミノ酸配列を有し、前記第 2 の融合タンパク質が、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を有する、項目 8 8 に記載の方法。

(項目 9 0)

T 細胞の活性化の阻害剤をアンタゴナイズまたは遮断する薬剤を投与するステップをさらに含む、項目 4 5 から 8 9 のいずれか一項に記載の方法。

40

(項目 9 1)

前記薬剤が、T 細胞リガンドをアンタゴナイズまたは遮断する、項目 9 0 に記載の方法。

(項目 9 2)

前記薬剤が、T 細胞受容体をアンタゴナイズまたは遮断する、項目 9 0 に記載の方法。

(項目 9 3)

T 細胞の活性化の阻害剤をアンタゴナイズまたは遮断する前記薬剤が、抗 PD 1 抗体もしくはその抗原結合性断片、抗 PD-L 1 抗体もしくはその抗原結合性断片、または抗 CTLA 4 抗体もしくはその抗原結合性断片、あるいは PD-1 を標的とする、操作された

50

ホーミングエンドヌクレアーゼである、項目 90 から 92 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 94)

サイトカインアゴニストを投与するステップをさらに含む、項目 45 から 93 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 95)

以下：

(a) 第 1 の多量体化ドメイン、疎水性ドメイン、およびアクチュエータードメインを含む第 1 の融合タンパク質と；

(b) 細胞外結合性ドメインおよび第 2 の多量体化ドメインを含む第 2 の融合タンパク質と；

(c) 架橋因子と

を含む、融合ポリペプチドヘテロ複合体であって、ここで、

前記第 1 の融合タンパク質と、前記第 2 の融合タンパク質と、前記架橋因子とが会合してポリペプチドヘテロ複合体を形成し、前記架橋因子が、前記第 1 の融合タンパク質の前記多量体化ドメインおよび前記第 2 の融合タンパク質の前記多量体化ドメインと会合し、これらの間に配置される、

融合ポリペプチドヘテロ複合体。

(項目 96)

前記結合性ドメインが、単鎖抗体の可変領域、受容体のエクストドメイン、またはリガンドである、項目 95 に記載のポリペプチドヘテロ複合体。

(項目 97)

前記単鎖抗体の可変領域が、ドメイン抗体、sFv、scFv、F(ab')₂、または Fab である、項目 96 に記載のポリペプチドヘテロ複合体。

(項目 98)

前記結合性ドメインが、前記多量体化ドメインのアミノ末端側にある、項目 95 から 97 のいずれか一項に記載のポリペプチドヘテロ複合体。

(項目 99)

前記結合性ドメインが、前記多量体化ドメインのカルボキシ末端側にある、項目 95 から 97 のいずれか一項に記載のポリペプチドヘテロ複合体。

(項目 100)

前記第 1 の多量体化ドメインが、第 1 の FKB P ポリペプチドまたはその変異体を含み、前記第 2 の多量体化ドメインが、第 1 の FRB ポリペプチドまたはその変異体を含み、項目 95 から 99 のいずれか一項に記載のポリペプチドヘテロ複合体。

(項目 101)

前記第 1 の多量体化ドメインが、第 1 の FRB ポリペプチドまたはその変異体を含み、前記第 2 の多量体化ドメインが、第 1 の FKB P ポリペプチドまたはその変異体を含み、項目 95 から 99 のいずれか一項に記載のポリペプチドヘテロ複合体。

(項目 102)

前記疎水性ドメインが、膜貫通ドメインである、項目 95 から 101 のいずれか一項に記載のポリペプチドヘテロ複合体。

(項目 103)

前記アクチュエータードメインが、リンパ球受容体鎖を含む、項目 95 から 102 のいずれか一項に記載のポリペプチドヘテロ複合体。

(項目 104)

前記架橋因子が、ラパマイシンもしくはそのラパログ、クーママイシンもしくはその誘導体、ジベレリンもしくはその誘導体、ABA もしくはその誘導体、メトトレキサートもしくはその誘導体、シクロスポリン A もしくはその誘導体、FKCs A もしくはその誘導体、または Tmp-SLF もしくはその誘導体である、項目 95 から 103 のいずれか一項に記載のポリペプチドヘテロ複合体。

(項目 105)

10

20

30

40

50

前記第2の融合タンパク質が、アンカードメインをさらに含む、項目95から104のいずれか一項に記載のポリペプチドヘテロ複合体。

(項目106)

前記アンカードメインが、膜貫通ドメインである、項目105に記載のポリペプチドヘテロ複合体。

(項目107)

前記第2の融合タンパク質が、閾値下シグナル伝達ドメインをさらに含む、項目105または106に記載のポリペプチドヘテロ複合体。

(項目108)

前記アンカードメインが、GPIシグナル配列である、項目105に記載のポリペプチドヘテロ複合体。

(項目109)

前記GPIシグナル配列を変化させており、前記第2の融合タンパク質が、GPI分子をさらに含む、項目105に記載のポリペプチドヘテロ複合体。

(項目110)

前記結合性ドメインが、がん、炎症性疾患、自己免疫疾患、または移植片対宿主病と関連する抗原である標的に特異的である、項目95から109のいずれか一項に記載のポリペプチドヘテロ複合体。

(項目111)

前記がんが、CD19、CD20、CD22、CD33、またはCD37の抗原標的を有する血液悪性疾患である、項目110に記載のポリペプチドヘテロ複合体。

(項目112)

項目1から44または95から109のいずれか一項に記載の融合タンパク質のうちの任意の1種または複数をコードする核酸分子。

(項目113)

ゲノム遺伝子座と相同な5'側ポリヌクレオチド配列と3'側ポリヌクレオチド配列との間に配置された、項目112に記載の核酸分子。

(項目114)

項目112または項目113に記載の核酸を含有する発現ベクター。

(項目115)

前記第1の融合タンパク質および前記第2の融合タンパク質を、ポリシストロニックのメッセージまたは2Aペプチドで隔てられた単一のタンパク質としてコードする、項目114に記載の発現ベクター。

(項目116)

前記ポリシストロニックのメッセージが、前記融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列の間に、内部リボソーム侵入部位(IRES)を含む、項目115に記載の発現ベクター。

(項目117)

非天然細胞であって、以下：

(a) T細胞の受容体に結合する結合性ドメインおよび第1の多量体化ドメインを含む第1の融合タンパク質をコードする第1の核酸分子であって、前記第1の融合タンパク質が前記細胞から分泌される、第1の核酸分子と、

(b) 標的細胞表面に位置する標的に結合する結合性ドメインおよび第2の多量体化ドメインを含む第2の融合タンパク質をコードする第2の核酸分子であって、前記第2の融合タンパク質が前記細胞から分泌される、第2の核酸分子とを含む、ここで

架橋因子がポリペプチド複合体の形成を促進し、前記架橋因子が、前記第1の融合タンパク質の前記多量体化ドメインおよび前記第2の融合タンパク質の前記多量体化ドメインと会合し、これらの間に配置される、非天然細胞。

10

20

30

40

50

(項目 1 1 8)

前記第 1 の多量体化ドメインと前記第 2 の多量体化ドメインとが、同じであるかまたは異なる、項目 1 1 7 に記載の非天然細胞。

(項目 1 1 9)

前記第 1 の融合タンパク質の前記多量体化ドメインおよび前記第 2 の融合タンパク質の前記多量体化ドメインが、ラパマイシンもしくはそのラパログ、クーママイシンもしくはその誘導体、ジベレリンもしくはその誘導体、アブシシン酸 (ABA) もしくはその誘導体、メトトレキサートもしくはその誘導体、シクロスポリン A もしくはその誘導体、FKCsA もしくはその誘導体、トリメトプリム (Tm p) (FKBP の合成リガンド (SLF)) もしくはその誘導体、またはこれらの任意の組合せから選択される架橋因子と会合する、項目 1 1 7 または項目 1 1 8 に記載の非天然細胞。

10

(項目 1 2 0)

前記第 1 の多量体化ドメインおよび前記第 2 の多量体化ドメインが、FKBP および FRB、FKBP およびカルシニューリン、FKBP およびシクロフィリン、FKBP および細菌性 DHFR、カルシニューリンおよびシクロフィリン、PYL1 および ABI1、もしくは GIB1 および GAI、またはこれらの変異体から選択される対である、項目 1 1 7 から 1 1 9 のいずれか一項に記載の非天然細胞。

(項目 1 2 1)

前記第 1 の多量体化ドメインが、第 1 の FKBP ポリペプチドまたはその変異体を含み、前記第 2 の多量体化ドメインが、第 1 の FRB ポリペプチドまたはその変異体を含む、項目 1 1 7 から 1 2 0 のいずれか一項に記載の非天然細胞。

20

(項目 1 2 2)

前記第 1 の多量体化ドメインが、第 1 の FRB ポリペプチドまたはその変異体を含み、前記第 2 の多量体化ドメインが、第 1 の FKBP ポリペプチドまたはその変異体を含む、項目 1 1 7 から 1 2 0 のいずれか一項に記載の非天然細胞。

(項目 1 2 3)

前記架橋因子が、シロリムス、エベロリムス、ノボリムス、ピメクロリムス、リダホロリムス、タクロリムス、テムシロリムス、ウミロリムス、またはゾタロリムスである、項目 1 2 1 または項目 1 2 2 に記載の非天然細胞。

(項目 1 2 4)

共刺激因子、免疫調節因子、共刺激因子に対するアゴニスト、免疫調節因子に対するアゴニスト、またはこれらの任意の組合せをさらに過剰発現させる、項目 1 1 7 から 1 2 3 のいずれか一項に記載の非天然細胞。

30

(項目 1 2 5)

前記第 1 の融合タンパク質の前記結合性ドメイン、および前記第 2 の融合タンパク質の前記結合性ドメインの各々が、単鎖抗体の可変領域、受容体のエクトドメイン、またはリガンドからなる群より独立に選択される、項目 1 1 7 から 1 2 4 のいずれか一項に記載の非天然細胞。

(項目 1 2 6)

前記単鎖抗体の可変領域が、ドメイン抗体、sFv、scFv、F(ab')₂、または Fab である、項目 1 2 5 に記載の非天然細胞。

40

(項目 1 2 7)

前記第 1 の融合タンパク質の前記結合性ドメインが、前記第 1 の多量体化ドメインのアミノ末端側にある、項目 1 1 7 から 1 2 6 のいずれか一項に記載の非天然細胞。

(項目 1 2 8)

前記第 1 の融合タンパク質の前記結合性ドメインが、前記第 1 の多量体化ドメインのカルボキシ末端側にある、項目 1 1 7 から 1 2 6 のいずれか一項に記載の非天然細胞。

(項目 1 2 9)

前記第 2 の融合タンパク質の前記結合性ドメインが、前記第 2 の多量体化ドメインのアミノ末端側にある、項目 1 1 7 から 1 2 6 のいずれか一項に記載の非天然細胞。

50

(項目 1 3 0)

前記第 2 の融合タンパク質の前記結合性ドメインが、前記第 2 の多量体化ドメインのカルボキシ末端側にある、項目 1 1 7 から 1 2 6 のいずれか一項に記載の非天然細胞。

(項目 1 3 1)

前記第 1 の融合タンパク質をコードする前記第 1 の核酸分子が、前記結合性ドメインと前記第 1 の多量体化ドメインとの間に配置されたリンカーをコードする配列をさらに含む、項目 1 1 7 から 1 3 0 のいずれか一項に記載の非天然細胞。

(項目 1 3 2)

前記第 2 の融合タンパク質をコードする前記第 2 の核酸分子が、前記結合性ドメインと前記第 2 の多量体化ドメインとの間に配置されたリンカーをコードする配列をさらに含む、項目 1 1 7 から 1 3 0 のいずれか一項に記載の非天然細胞。

10

(項目 1 3 3)

前記第 2 の核酸分子の前記結合性ドメインが、がん、炎症性疾患、自己免疫疾患、または移植片対宿主病と関連する抗原である標的に特異的である、項目 1 1 7 から 1 3 2 のいずれか一項に記載の非天然細胞。

(項目 1 3 4)

前記がんが、充実性悪性疾患または血液悪性疾患である、項目 1 3 3 に記載の非天然細胞。

(項目 1 3 5)

前記血液悪性疾患と関連する抗原標的が、CD 1 9、CD 2 0、CD 2 2、CD 3 3、または CD 3 7 である、項目 1 3 4 に記載の非天然細胞。

20

(項目 1 3 6)

前記第 2 の核酸分子の前記結合性ドメインが、 α -葉酸受容体、 $\alpha_v \beta_6$ インテグリン、BCMA、B7-H3、B7-H6、CAIX、CD 1 9、CD 2 0、CD 2 2、CD 3 0、CD 3 3、CD 3 7、CD 4 4、CD 4 4 v 6、CD 4 4 v 7 / 8、CD 7 0、CD 1 2 3、CD 1 3 8、CD 1 7 1、CEA、DLL 4、EGP-2、EGP-4 0、CSPG 4、EGFR、ErbB 2 (HER 2) を含む EGFR ファミリー、EGFR v I I I、EPCAM、EphA 2、EPCAM、FAP、FBP、胎児型アセチルコリン受容体、Fzd 7、GD 2、GD 3、グリピカン 3 (GPC 3)、h 5 T 4、IL-1 1 R α 、IL 1 3 R- α 2、KDR、 κ 軽鎖、 λ 軽鎖、LeY、L1CAM、MAGE-A 1、メソテリン、MHC 提示ペプチド、MUC 1、MUC 1 6、NCAM、NKG 2 D リガンド、Notch 1、Notch 2 / 3、NY-ESO-1、PRAME、PSCA、PSMA、サバイビン、TAG-7 2、TEM、TERT、VEGFR 2、および ROR 1 から選択される標的に特異的に結合する、項目 1 1 7 から 1 3 2 のいずれか一項に記載の非天然細胞。

30

(項目 1 3 7)

前記架橋因子が、ラパマイシンもしくはそのラパログ、クーママイシンもしくはその誘導体、ジベレリンもしくはその誘導体、ABA もしくはその誘導体、メトトレキサートもしくはその誘導体、シクロスポリン A もしくはその誘導体、FKCs A もしくはその誘導体、または Tmp-SLF もしくはその誘導体である、項目 1 1 7 から 1 3 6 のいずれか一項に記載の非天然細胞。

40

(項目 1 3 8)

前記第 1 の核酸が、CD 3 に特異的な s c F v の結合性ドメイン、および FRB T 2 0 9 8 L の第 1 の多量体化ドメインを含む第 1 の融合タンパク質をコードし；前記第 2 の核酸が、CD 1 9 に特異的な s c F v の結合性ドメイン、および FKBP 1 2 の第 2 の多量体化ドメインを含む第 2 の融合タンパク質をコードし；ポリペプチド複合体の形成を促進する前記架橋因子が、ラパログの AP 2 1 9 6 7 である、項目 1 1 7 から 1 3 7 のいずれか一項に記載の非天然細胞。

(項目 1 3 9)

前記第 1 の核酸が、CD 3 に特異的な s c F v の結合性ドメイン、および FRB T 2

50

098Lの第1の多量体化ドメインを含む第1の融合タンパク質をコードし；前記第2の核酸が、BCMAに特異的なscFvの結合性ドメイン、およびFKBP12の第2の多量体化ドメインを含む第2の融合タンパク質をコードし；ポリペプチド複合体の形成を促進する前記架橋因子が、ラパログのAP21967である、項目117から137のいずれか一項に記載の非天然細胞。

(項目140)

過剰増殖性疾患、炎症性疾患、自己免疫疾患、または移植片対宿主病を処置するための方法であって、項目117から139のいずれか一項に記載の非天然細胞を投与するステップと、架橋因子を投与するステップであって、前記架橋因子がポリペプチド複合体の形成を促進し、前記架橋因子が、第1の融合タンパク質の多量体化ドメインおよび第2の融合タンパク質の多量体化ドメインと会合し、これらの間に配置される、ステップとを含み；前記第2の融合ポリペプチドの結合性ドメインが、過剰増殖性疾患細胞の細胞表面標的に特異的に結合して免疫調節応答を促進し、これにより前記過剰増殖性疾患を処置する、方法。

10

(項目141)

過剰増殖性疾患、炎症性疾患、自己免疫疾患、または移植片対宿主病を処置するための方法であって、前記方法は、以下：

(a) T細胞の受容体に結合する結合性ドメイン、および第1の多量体化ドメインを含む第1の融合タンパク質；ならびに過剰増殖性疾患細胞、炎症性疾患細胞、自己免疫疾患細胞、または移植片対宿主病細胞の細胞表面標的に結合する結合性ドメイン、および第2の多量体化ドメインを含む第2の融合タンパク質を投与するステップと；

20

(b) ポリペプチド複合体の形成を促進する架橋因子を投与するステップであって、前記架橋因子は、前記第1の融合タンパク質の前記多量体化ドメインおよび前記第2の融合タンパク質の前記多量体化ドメインと会合し、これらの間に配置される、ステップとを含み、

これにより前記過剰増殖性疾患、前記炎症性疾患、前記自己免疫疾患、または前記移植片対宿主病を処置する、方法。

(項目142)

融合ポリペプチドヘテロ複合体であって、以下：

(a) T細胞の受容体に結合する結合性ドメインおよび第1の多量体化ドメインを含む第1の融合タンパク質と；

30

(b) 標的細胞の細胞表面標的に結合する結合性ドメインを含む第2の融合タンパク質と；

(c) 架橋因子とを含み、

前記第1の融合タンパク質と前記第2の融合タンパク質と前記架橋因子とが会合してポリペプチドヘテロ複合体を形成し、前記架橋因子が、前記第1の融合タンパク質の前記多量体化ドメインおよび前記第2の融合タンパク質の前記多量体化ドメインと会合し、これらの間に配置される、

融合ポリペプチドヘテロ複合体。

40

(項目143)

前記第1の多量体化ドメインと前記第2の多量体化ドメインとが、同じであるかまたは異なる、項目142に記載の融合ポリペプチドヘテロ複合体。

(項目144)

前記第1の融合タンパク質の前記多量体化ドメインおよび前記第2の融合タンパク質の前記多量体化ドメインが、ラパマイシンもしくはそのラパログ、クーママイシンもしくはその誘導体、ジベレリンもしくはその誘導体、アブシシン酸(ABA)もしくはその誘導体、メトトレキサートもしくはその誘導体、シクロスポリンAもしくはその誘導体、FKCsAもしくはその誘導体、トリメトプリム(Tmp)(FKBPの合成リガンド(SLF))もしくはその誘導体、またはこれらの任意の組合せから選択される架橋因子と会合

50

する、項目142または項目143に記載の融合ポリペプチドヘテロ複合体。

(項目145)

前記第1の多量体化ドメインおよび前記第2の多量体化ドメインが、FKBPおよびFRB、FKBPおよびカルシニューリン、FKBPおよびシクロフィリン、FKBPおよび細菌性DHFR、カルシニューリンおよびシクロフィリン、PYL1およびABI1、もしくはGIB1およびGAI、またはこれらの変異体から選択される対である、項目142から144のいずれか一項に記載の融合ポリペプチドヘテロ複合体。

(項目146)

前記第1の多量体化ドメインが、第1のFKBPポリペプチドまたはその変異体を含み、前記第2の多量体化ドメインが、第1のFRBポリペプチドまたはその変異体を含む、項目142から145のいずれか一項に記載の融合ポリペプチドヘテロ複合体。

10

(項目147)

前記第1の多量体化ドメインが、第1のFRBポリペプチドまたはその変異体を含み、前記第2の多量体化ドメインが、第1のFKBPポリペプチドまたはその変異体を含む、項目142から145のいずれか一項に記載の融合ポリペプチドヘテロ複合体。

(項目148)

前記架橋因子が、シロリムス、エベロリムス、ノボリムス、ピメクロリムス、リダホロリムス、タクロリムス、テムシロリムス、ウミロリムス、またはゾタロリムスである、項目146または項目147のいずれか一項に記載の融合ポリペプチドヘテロ複合体。

(項目149)

前記第1の融合タンパク質の前記結合性ドメイン、および前記第2の融合タンパク質の前記結合性ドメインの各々が、単鎖抗体の可変領域、受容体のエクトドメイン、またはリガンドからなる群より独立に選択される、項目142から148のいずれか一項に記載の融合ポリペプチドヘテロ複合体。

20

(項目150)

前記単鎖抗体の可変領域が、ドメイン抗体、sFv、scFv、F(ab')₂、またはFabである、項目149に記載の融合ポリペプチドヘテロ複合体。

(項目151)

前記第2の融合ポリペプチドの前記結合性ドメインが、 α -葉酸受容体、 $\alpha_v\beta_6$ インテグリン、BCMA、B7-H3、B7-H6、CAIX、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD37、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD70、CD123、CD138、CD171、CEA、DLL4、EGP-2、EGP-40、CSPG4、EGFR、Erbb2 (HER2)を含むEGFRファミリー、EGFRvIII、EPCAM、EphA2、EpCAM、FAP、FBP、胎児型アセチルコリン受容体、Fzd7、GD2、GD3、グリピカン3 (GPC3)、h5T4、IL-11R α 、IL13R- α 2、KDR、 κ 軽鎖、 λ 軽鎖、LeY、L1CAM、MAGE-A1、メソテリン、MHC提示ペプチド、MUC1、MUC16、NCAM、NKGD2リガンド、Notch1、Notch2/3、NY-ESO-1、PRAME、PSCA、PSMA、サバイピン、TAG-72、TEM、TERT、VEGFR2、およびROR1から選択される標的に特異的に結合する、項目142から150のいずれか一項に記載の融合ポリペプチドヘテロ複合体。

30

40

(項目152)

前記第1の融合タンパク質が、CD3に特異的なscFvの結合性ドメイン、およびFRB T2098Lの第1の多量体化ドメインを含み；前記第2の融合タンパク質が、CD19に特異的なscFvの結合性ドメイン、およびFKBP12の第2の多量体化ドメインを含み；前記架橋因子が、ラパログのAP21967である、項目141から150のいずれか一項に記載の融合ポリペプチドヘテロ複合体。

(項目153)

前記第1の融合タンパク質が、CD3に特異的なscFvの結合性ドメイン、およびFRB T2098Lの第1の多量体化ドメインを含み；前記第2の融合タンパク質が、B

50

CMAに特異的なs c F vの結合性ドメイン、およびFKBP12の第2の多量体化ドメインを含み；前記架橋因子が、ラパログのAP21967である、項目141から150のいずれか一項に記載の融合ポリペプチドヘテロ複合体。

(項目154)

項目117から153のいずれか一項に記載の融合タンパク質のうちの任意の1種または複数をコードする核酸分子。

(項目155)

ゲノム遺伝子座と相同な5'側ポリヌクレオチド配列と3'側ポリヌクレオチド配列との間に配置された、項目154に記載の核酸分子。

(項目156)

項目154または項目155に記載の核酸を含有する発現ベクター。

(項目157)

第1の融合タンパク質および第2の融合タンパク質を、ポリシストロニックのメッセージまたは2Aペプチドで隔てられた単一のタンパク質としてコードする、項目156に記載の発現ベクター。

(項目158)

前記ポリシストロニックのメッセージが、前記融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列の間に、内部リボソーム侵入部位(IRES)を含む、項目157に記載の発現ベクター。

【図面の簡単な説明】

【0169】

【図1A】図1A～1Mは、本開示の、多様な種類の多部分シグナル伝達複合体についての概略を示す図である。

【図1B】図1A～1Mは、本開示の、多様な種類の多部分シグナル伝達複合体についての概略を示す図である。

【図1C】図1A～1Mは、本開示の、多様な種類の多部分シグナル伝達複合体についての概略を示す図である。

【図1D】図1A～1Mは、本開示の、多様な種類の多部分シグナル伝達複合体についての概略を示す図である。

【図1E】図1A～1Mは、本開示の、多様な種類の多部分シグナル伝達複合体についての概略を示す図である。

【図1F】図1A～1Mは、本開示の、多様な種類の多部分シグナル伝達複合体についての概略を示す図である。

【図1G】図1A～1Mは、本開示の、多様な種類の多部分シグナル伝達複合体についての概略を示す図である。

【図1H】図1A～1Mは、本開示の、多様な種類の多部分シグナル伝達複合体についての概略を示す図である。

【図1I】図1A～1Mは、本開示の、多様な種類の多部分シグナル伝達複合体についての概略を示す図である。

【図1J】図1A～1Mは、本開示の、多様な種類の多部分シグナル伝達複合体についての概略を示す図である。

【図1K】図1A～1Mは、本開示の、多様な種類の多部分シグナル伝達複合体についての概略を示す図である。

【図1L】図1A～1Mは、本開示の、多様な種類の多部分シグナル伝達複合体についての概略を示す図である。

【図1M】図1A～1Mは、本開示の、多様な種類の多部分シグナル伝達複合体についての概略を示す図である。

【図2】図2は、本開示の、特定の多部分シグナル伝達複合体による、特異的な細胞の殺滅およびサイトカインの分泌を検出するアッセイについての概略を示す図である。

【図3A】図3Aおよび3Bは、本開示の、多部分シグナル伝達複合体を発現させるヒト

10

20

30

40

50

T細胞の細胞傷害特性を示す図である。

【図3B】図3Aおよび3Bは、本開示の、多部分シグナル伝達複合体を発現させるヒトT細胞の細胞傷害特性を示す図である。

【図4】図4は、本開示の、多部分シグナル伝達複合体を発現させるヒトT細胞についての、サイトカイン分泌プロファイルを示す図である。

【図5-1】図5は、架橋成分に対して異なる特異性を有する、独立の多量体化ドメインの使用により、本開示の、多部分シグナル伝達複合体を発現させるヒトT細胞の、方向付けられた細胞傷害活性が可能となることを示す図である。加えて、この図は、本開示の、多部分シグナル伝達複合体を発現させるヒトT細胞は、DARIC結合性成分およびDARICシグナル伝達成分を、別個の細胞内で個別に発現させる場合であってもなお、細胞傷害性でありうることを示す。

10

【図5-2】図5は、架橋成分に対して異なる特異性を有する、独立の多量体化ドメインの使用により、本開示の、多部分シグナル伝達複合体を発現させるヒトT細胞の、方向付けられた細胞傷害活性が可能となることを示す図である。加えて、この図は、本開示の、多部分シグナル伝達複合体を発現させるヒトT細胞は、DARIC結合性成分およびDARICシグナル伝達成分を、別個の細胞内で個別に発現させる場合であってもなお、細胞傷害性でありうることを示す。

【図6】図6は、架橋因子が、DARIC系において、臨床的に関連する濃度で機能しうることを示す図である。

【図7-1】図7は、DARIC結合性成分が、細胞から放出されるか、または細胞表面に係留され、DARICシグナル伝達成分となおも機能的に会合して、本開示の、多部分シグナル伝達複合体を形成しうることを示す図である。

20

【図7-2】図7は、DARIC結合性成分が、細胞から放出されるか、または細胞表面に係留され、DARICシグナル伝達成分となおも機能的に会合して、本開示の、多部分シグナル伝達複合体を形成しうることを示す図である。

【図8】図8は、DARIC結合性成分が、GPIアンカーを介して、細胞表面に係留され、架橋因子の存在下で、DARICシグナル伝達成分となおも機能的に会合して、本開示の、多部分シグナル伝達複合体を形成しうることを示す図である。

【図9】図9は、さらなるモデル抗原である、CD123を標的化するDARIC系であって、骨髄性がんを根絶するのに使用することもでき、骨髄移植の前の馴化レジメンにおいて、骨髄細胞を除去するのに使用することもできる、DARIC系を示す図である。

30

【図10】図10は、FRB多量体化ドメインおよびFKBP12多量体化ドメインを、DARIC結合性成分またはDARICシグナル伝達成分に付加し、架橋因子の存在下で、機能的な多部分シグナル伝達複合体をなおも形成しうることを示す図である。

【図11】図11は、DARIC結合性成分とDARICシグナル伝達成分とのカップリングを、多量体化ドメインのうちの1つだけに結合する一価薬物である、抗架橋因子の添加により不活化し、これにより細胞の活性化を遮断しうることを示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0170】

一実施形態では、養子免疫療法などの免疫療法に対する生物学的応答のモジュレーションにおける使用のための、多成分融合タンパク質が提供される。背景として述べると、細胞表面受容体によるシグナル伝達は、細胞外情報を、細胞内応答に変換するものであり、リガンド認識および膜貫通(transmembrane)シグナル伝達の両方のための機構を必要とする。細胞表面受容体は、細胞外結合性ドメインの使用を介して、リガンドを認識し、リガンドに結合すると、細胞内シグナル伝達ドメインと接続された膜貫通(membrane spanning)ドメインを介して、細胞膜を越えてシグナルを伝達する。これらは、結合とシグナル伝達とが直接関連する単一鎖単位として、またはリガンドの細胞表面への結合が、シグナル伝達ドメインの、他のタンパク質との細胞内相互作用であって、細胞シグナル伝達を媒介する細胞内相互作用を可能とする、複数鎖の接触を介して生じる。

40

50

【0171】

本明細書で想定される組成物および方法の利点は、このようなシグナル伝達結合およびシグナル伝達活性に対する、空間的な制御および時間的な制御の両方をもたらすことである。一実施形態では、本開示は、結合性成分およびシグナル伝達成分であって、各々が、別個の融合タンパク質として発現するが、細胞表面の2つの機能的な成分（本明細書では、DARIC結合性成分およびDARICシグナル伝達成分と称する）の再カップリングのための細胞外多量体化機構（架橋因子）であり、時間的な制御をもたらす細胞外多量体化機構（架橋因子）を含有する成分を提示する。結合性成分は、分泌されるか、表面で発現するか、または組換え形態で送達されるので、いかなる細胞シグナル伝達機構とも基本的にカップリングすることなく、細胞外環境内に存在する。目的の細胞により発現させる、膜貫通シグナル伝達融合タンパク質は、膜貫通ドメインを介して、FRBタンパク質またはFKBP12タンパク質（いずれも、結合性成分上には存在しない）などの、細胞外多量体化ドメインに融合させた、1種または複数の細胞内シグナル伝達（アクチュエーター）ドメインを含む。FRB/FKBP12カップリング薬（例えば、ラパマイシンまたはそのラパログ）が適用されるときに限り、結合性成分とシグナル伝達成分とは、シグナル伝達を誘発することが可能な複合体を形成する。

10

【0172】

特定の実施形態では、構築を解除された、薬物調節型の、二特異性T細胞エンゲージャー（BiTE）であって、別個の融合タンパク質として発現するBiTEが提供される。図1Lを参照されたい。BiTEは、T細胞受容体に結合する結合剤、および第1の多量体化ドメインを含む、DARICシグナル伝達成分と；標的細胞の抗原に結合する結合剤、およびFRBタンパク質またはFKBP12タンパク質（いずれも、結合性成分上には存在しない）などの、第2の多量体化ドメインを含む、DARIC結合性成分とを含む。FRB/FKBP12カップリング薬（例えば、ラパマイシンまたはそのラパログ）が適用されるときに限り、BiTE成分は、シグナル伝達を誘発することが可能な複合体を形成する。

20

【0173】

しかし、シグナル伝達のための機構を刺激するのは、本明細書で記載される多量体化機構を介して達成される時間的な制御に限られる。化学的に誘導される多量体化は、シグナル伝達の強化された受容体を再構成するが、細胞内シグナル伝達成分を凝集させないため、下流におけるシグナル伝達は活性化させない。したがって、結合性成分上の結合性ドメインにより認識される標的の存在または非存在に基づき、空間的な制御が達成される。結合性成分の融合タンパク質は、細胞の外部に分泌される（または外部から適用される）ので、標的（例えば、細胞表面抗原）および架橋因子の両方が存在する場合に限り、細胞が活性化するように、標的が存在する場所だけに蓄積される。

30

【0174】

ある特定の実施形態では、第1の多量体化ドメイン、疎水性ドメイン、およびアクチュエータードメインを含む第1の融合タンパク質をコードする第1の核酸分子であって、第1の融合タンパク質が発現すると、第1の多量体化ドメインが細胞外に局在化する、第1の核酸分子を含む組換え細胞を、過剰増殖性疾患（例えば、がん）、炎症性疾患、自己免疫疾患、または移植片対宿主病を有する被験体に投与する。このような融合タンパク質をDARICシグナル伝達成分と称する場合があるが、これは、1種または複数の膜貫通タンパク質として発現しうる。DARICシグナル伝達成分は、ホモ二価架橋因子の存在下で、ホモ二量体化を促進する、多量体化ドメインを含む、1つを超える多量体化ドメインを含有しうる。このような実施形態（図1cを参照されたい）では、架橋因子の投与により、細胞外標的への結合の非存在下で、あるレベルの基礎的なシグナル伝達が促進される（例えば、DARIC結合性成分（この文脈では、薬物と同様に機能する）による活性化の前に、*in vitro*または*in vivo*における細胞増殖を駆動する方途として）である。T細胞では、低レベルの活性化であれば、増殖が促進されるが、より高次の多量体化（標的細胞の高密度の抗原、およびDARIC成分の、架橋成分とのヘテロ二量体

40

50

化により生じる)であれば、細胞傷害応答の活性化がもたらされることが公知である。

【0175】

さらなる実施形態では、DARICシグナル伝達成分を発現させる、組換え(非天然)細胞(例えば、T細胞)を受容する被験体に、結合性ドメインおよび多量体化ドメイン(DARIC結合性成分)を含む融合タンパク質と、架橋因子(例えば、ラパマイシンまたはそのラパログ)とを、同時的または逐次的に、さらに投与して、非天然細胞の表面でポリペプチド複合体の形成を促進することができ、架橋因子が、第1の融合タンパク質の多量体化ドメインおよび第2の融合タンパク質の多量体化ドメイン(それぞれ、DARICシグナル伝達成分およびDARIC結合性成分)と会合し、これらの間に配置される。ある特定の実施形態では、核酸分子は、分泌シグナル、結合性ドメイン、および多量体化ドメインを含む融合タンパク質をさらにコードし、ここで、融合タンパク質(DARIC結合性成分)は、発現すると非天然細胞から分泌される。一部の実施形態では、核酸分子は、分泌シグナル、結合性ドメイン、および多量体化ドメインを含む融合タンパク質をさらにコードし、ここで、発現する融合タンパク質(DARIC結合性成分)は、分泌され、非天然細胞の細胞表面に、係留またはアンカリングされる(図1I~Kを参照されたい)。DARIC結合性成分は、DARICシグナル伝達成分と会合する前に、またはこれと会合した後で、架橋因子を介して、標的細胞(例えば、がん細胞、自己免疫細胞)に特異的に結合し、ここで、2つのDARIC成分および架橋因子による三部分会合は、過剰増殖性疾患、炎症性疾患、自己免疫疾患、または移植片対宿主病を処置する細胞応答を誘発する。例えば、少なくとも1つのDARIC結合性成分および細胞表面標的が存在すれば、多量体化に起因する、標的の密度に比例して増大するシグナルがもたらされる。

10

20

【0176】

さらなる実施形態では、DARICシグナル伝達成分は、薬物調節型二特異性T細胞エンゲージャー(BiTE)を使用して、細胞(例えば、T細胞)表面に既存の活性化受容体を活用することにより創出することができる。この場合、標的細胞に結合する結合性成分、およびT細胞の受容体(例えば、TCR/CD3複合体)に結合するシグナル伝達成分の、両方のDARIC成分が分泌される。一実施形態では、非天然細胞は、両方の成分を分泌する。別の実施形態では、1種または複数の非天然細胞は、成分のうちの1種または複数分泌する。

【0177】

本開示をより詳細に示す前に、本明細書で使用される、ある特定の用語の定義を提示することが、その理解の一助となりうる。さらなる定義は、本開示を通して示される。

30

【0178】

本記載では、そうでないことが示されない限りにおいて、任意の濃度範囲、百分率の範囲、比の範囲、または整数の範囲は、列挙された範囲内の任意の整数の値、適切な場合は、その分数(整数の10分の1および100分の1など)を含むと理解される。また、そうでないことが示されない限りにおいて、ポリマーのサブユニット、サイズ、または厚さなど、任意の物理的特徴に関して、本明細書で列挙される任意の数の範囲も、列挙された範囲内の任意の整数を含むと理解されたい。本明細書で使用する「約」という用語は、(1)表示の範囲、値、もしくは構造に対する $\pm 1\%$ 、 $\pm 2\%$ 、 $\pm 3\%$ 、 $\pm 4\%$ 、 $\pm 5\%$ 、 $\pm 10\%$ 、 $\pm 15\%$ 、または $\pm 20\%$ ；(2)値を決定するのに用いられる方法についての、固有のばらつきもしくは誤差を含む値；または(3)そうでないことが示されない限りにおいて、多連の実験の間に存在するばらつきを含む値を意味する。本明細書で使用する「1つの(a)」および「1つの(an)」という用語は、列挙された構成要素のうちの「1または複数」を指すことを理解されたい。代替物(例えば、「または」)の使用は、代替物または列挙された構成要素のうちの1つ、両方、またはこれらの任意の組合せを意味するものと理解されたい。本明細書で使用する「含む(include)」、「有する」、「および含む(comprise)」という用語は、同義に使用され、これらの用語およびそれらの変形は、非限定的と解釈されることを意図する。

40

【0179】

50

本明細書で使用する、タンパク質またはポリペプチドは、複数のドメインの外部の部分（例えば、アミノ末端もしくはカルボキシ末端のアミノ酸、または2つのドメインの間のアミノ酸）の、タンパク質またはポリペプチドの長さへの寄与が、組合せで、最大20%（例えば、最大15%、10%、8%、6%、5%、4%、3%、2%、または1%）であり、多様なドメインのうちの1種または複数の活性（例えば、結合性ドメインの標的結合親和性、多量体化ドメインの、複合体の形成を容易とする能力、およびアクチュエータードメインの、機能的なシグナルを、細胞に伝達する能力）には実質的に影響を及ぼさない（すなわち、40%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%を超えないなど、50%を超えて活性を変化させない）場合に、数個のドメイン（例えば、結合性ドメイン、リンカーまたはスペーサー、疎水性ドメイン、多量体化ドメイン、アクチュエータードメイン）「から本質的になる」。ある特定の実施形態では、タンパク質（例えば、単鎖ポリペプチド）は、標的、リンカー、および多量体化ドメインに特異的に結合する、結合性ドメインから本質的になり、ここで、タンパク質は、タンパク質のアミノ末端および／もしくはカルボキシ末端に、または2つの異なるドメインの間に（例えば、結合性ドメインと多量体化ドメインとの間に、多量体化ドメインとリンカーとの間に）、接合部アミノ酸を含みうる。

10

【0180】

本明細書で使用する「融合タンパク質」または「キメラタンパク質」とは、1種または複数の親タンパク質または親ポリペプチドに由来するポリペプチド成分を含み、宿主細胞内では天然に存在しないタンパク質を指す。融合タンパク質は、2つまたはこれを超える天然に存在するアミノ酸配列であって、天然に存在しない様式で併せて連結されたアミノ酸配列を含有する。例えば、融合タンパク質は、細胞内で通常は見出されない様式で連結された同じタンパク質に由来する、2つまたはこれを超える部分を有する場合もあり、融合タンパク質は、細胞内で通常は見出されない様式で連結された、2つ、3つ、4つ、5つ、またはこれを超える異なるタンパク質に由来する部分を有する場合もある。融合タンパク質は、1つのタンパク質またはその部分をコードするヌクレオチド配列が、1種もしくは複数の異なるタンパク質またはその部分をコードする核酸分子とインフレームで付加され、そして任意選択で、リンカー、スペーサー、または接合部アミノ酸をコードするヌクレオチドにより隔てられた核酸分子でコードされうる。ある特定の実施形態では、融合タンパク質をコードする核酸分子を、宿主細胞に導入し、発現させる。

20

30

【0181】

本明細書で使用する「宿主」という用語は、外因性の核酸分子により、目的のポリペプチド（例えば、DARIC結合性成分およびDARICシグナル伝達成分）を産生するように遺伝子改変されうる、細胞（例えば、T細胞）または微生物を指す。ある特定の実施形態では、宿主細胞は、任意選択で、融合タンパク質の生合成と関連するかまたは関連しない、所望の特性（例えば、TCRの欠失、変化、または切断；共刺激性因子の発現の増大）を付与する、他の遺伝子改変を既に保有する場合もあり、これらを含むように改変される場合もある。ある特定の実施形態では、宿主細胞は、ヒトT細胞、またはTCR α 、TCR β 、もしくはこれらの両方を、部位特異的ヌクレアーゼ（例えば、LAGL1DADGホーミングエンドヌクレアーゼであるLHE）でノックアウトしたヒトT細胞である。

40

【0182】

本明細書で使用する「組換え」または「非天然」とは、少なくとも1カ所の、操作された遺伝子変化を有するか、もしくは異種核酸分子の導入により改変されている、生物、微生物、細胞、核酸分子、もしくはベクターを指すか、または内因性核酸分子もしくは遺伝子の発現を制御するように変化させた細胞を指す。組換えはまた、非天然細胞に由来するか、または1カ所もしくは複数カ所のこのような改変を有する非天然細胞の後代である細胞も指す。遺伝子変化は、例えば、タンパク質をコードする発現可能な核酸分子、または他の核酸分子の付加、欠失、置換、もしくは細胞の遺伝子物質の他の機能的な変化を導入する改変を含む。例えば、組換え細胞は、遺伝子、または天然（野生型）細胞内では

50

、同一または相同な形態で見出されない、他の核酸分子（例えば、融合タンパク質またはキメラタンパク質をコードする核酸分子）を発現させる場合もあり、過剰発現させるか、過少発現させるか、最小限に発現させるか、または全く発現させないなど、内因性遺伝子の発現パターンの変化をもたらす場合もある。

【0183】

当技術分野では、外因性核酸または異種核酸を、細胞内で発現させるための組換え法が周知である。このような方法は、例えば、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、3版、Cold Spring Harbor Laboratory、New York（2001年）；および Ausubelら、Current Protocols in Molecular Biology、John Wiley and Sons、Baltimore、MD（1999年）において記載されていることが見出されうる。発現させる、例示的な外因性タンパク質または外因性酵素は、scFv、CD3ζ、FKBP、FRB、サイトカイン、またはこれらの任意の組合せを含む。融合タンパク質をコードする核酸分子に対する遺伝子改変は、組換え細胞または非天然細胞に、その天然に存在する状態から変化させた、生化学的能力または代謝能を付与しうる。

【0184】

本明細書で使用される「内因性」または「天然」という用語は、通常宿主細胞内に存在する、遺伝子、タンパク質、化合物、または活性を指す。「相同な」または「相同体」という用語は、外因性（非天然）供給源に由来する分子または活性であって、宿主細胞、宿主種、または宿主株において見出されるか、またはこれらに由来する分子または活性と同じであるかまたは類似の分子または活性を指す。

【0185】

本明細書で使用される「異種」核酸分子、「異種」構築物、または「異種」配列とは、それを発現させる細胞に対して天然ではない核酸分子もしくは核酸分子配列の部分、宿主細胞に対して天然である、核酸分子もしくは核酸分子の部分であって、変化させるかもしくは変異させた核酸分子もしくは核酸分子の部分、または類似の条件下で、天然の発現レベルと比較して発現を変化させた核酸分子を指す。例えば、異種制御配列（例えば、プロモーター、エンハンサー）を使用して、遺伝子または核酸分子の発現を、天然で、または培養物中で、通常発現する、遺伝子または核酸分子とは異なる様式で調節することができる。ある特定の実施形態では、異種核酸分子は、天然の宿主細胞遺伝子と相同でありうるが、発現レベルを変化させる場合もあり、異なる配列を有する場合もあり、これらの両方の場合もある。他の実施形態では、異種核酸分子または外因性核酸分子は、宿主細胞または宿主ゲノムに対して内因性ではなく（例えば、融合タンパク質をコードする核酸分子であり）、代わりに、形質転換（例えば、トランスフェクション、電気穿孔）により宿主細胞に導入することができるが、ここで、付加された分子は、宿主ゲノムに組み込まれる場合もあり、1世代を超える世代にわたり、一過性に（例えば、mRNA）、または安定的に、染色体外遺伝子物質として存在する（例えば、エピソームウイルスベクター、プラスミド、または他の自己複製型ベクター）場合もある。

【0186】

ある特定の実施形態では、1つを超える異種核酸分子または外因性核酸分子は、宿主細胞に、別個の核酸分子として導入することもでき、ポリシストロニックの核酸分子として導入することもでき、融合タンパク質をコードする単一の核酸分子として導入することもでき、これらの任意の組合せとして導入することもでき、やはり、1つを超える異種核酸または外因性核酸として考えることができる。2つまたはこれを超える外因性核酸分子を、宿主細胞に導入する場合、2つまたはこれを超える外因性核酸分子は、単一の核酸分子（例えば、単一のベクター上の）として導入することもでき、別個のベクター上で導入することもでき、単一または複数のmRNA分子として導入することもでき、単一の部位または複数の部位において、宿主染色体に組み込むこともでき、これらの実施形態の各々は、やはり、2つまたはこれを超える外因性核酸分子であると考えられることが理解される

。したがって、言及される、異種核酸分子または異種タンパク質の活性の数とは、コード核酸分子の数またはタンパク質活性の数を指すものであり、宿主細胞に導入された別個の核酸分子の数を指すものではない。

【0187】

例えば、細胞は、2つまたはこれを超える異種核酸分子または外因性核酸分子であって、同じ場合もあり、異なる場合もあり、本明細書で開示される、1種または複数の融合タンパク質をコードする異種核酸分子または外因性核酸分子を発現させるように改変することができる。ある特定の実施形態では、宿主細胞は、第1の融合タンパク質をコードする第1の核酸分子、および第2の融合タンパク質をコードする別個の第2の核酸分子を含有するか、または宿主細胞は、第1の融合タンパク質および第2の融合タンパク質をコードする単一のポリシストロニックの核酸分子、または第1の融合タンパク質、自己切断型アミノ酸配列、および第2の融合タンパク質をコードする単一の核酸分子を含有する。

10

【0188】

当業者には、適切なプロテアーゼ切断部位および自己切断型ペプチドが公知である（例えば、Ryanら、1997年、J. Gener. Virol.、78巻、699～722頁；Scymczakら（2004年）、Nature Biotech.、5巻、589～594頁を参照されたい）。例示的なプロテアーゼ切断部位は、ポチウイルスNIaプロテアーゼ（例えば、タバコエッチウイルスプロテアーゼ）、ポチウイルスHCプロテアーゼ、ポチウイルスP1（P35）プロテアーゼ、ビモウイルス（bystovirus）NIaプロテアーゼ、ビモウイルスRNA-2コードプロテアーゼ、アフトウイルスLプロテアーゼ、エンテロウイルス2Aプロテアーゼ、ライノウイルス2Aプロテアーゼ、ピコルナ3Cプロテアーゼ、コモウイルス24Kプロテアーゼ、ネボウイルス24Kプロテアーゼ、RTSV（コメツングロ球状ウイルス（rice tungro spherical virus））3C様プロテアーゼ、PVYF（パースニップ黄斑ウイルス（parsnip yellow fleck virus））3C様プロテアーゼ、ヘパリン、トロンビン、第Xa因子、およびエンテロキナーゼによる切断部位を含むがこれらに限定されない。一実施形態では、その高度な切断厳密性のために、TEV（タバコエッチウイルス）プロテアーゼ切断部位、例えば、EXXYXQ（G/S）、例えば、ENLYFQGおよびENLYFQS（配列中、Xは、任意のアミノ酸を表す）が好ましい（TEVによる切断は、QとGとの間、またはQとSとの間に生じる）。

20

30

【0189】

ある特定の実施形態では、自己切断型ポリペプチド部位は、2A部位、2A配列、もしくは2Aドメインまたは2A様部位、2A様配列、もしくは2A様ドメインを含む（Donnellyら、2001年、J. Gen. Virol.、82巻：1027～1041頁）。特定の実施形態では、ウイルス2Aペプチドは、アフトウイルス2Aペプチド、ポチウイルス2Aペプチド、またはカルジオウイルス2Aペプチドである。

【0190】

一実施形態では、ウイルス2Aペプチドは、口蹄疫ウイルス（FMDV）2Aペプチド、ウマ鼻炎Aウイルス（ERAV）2Aペプチド、Thosea asignaウイルス（TaV）2Aペプチド、ブタテスコウイルス1（PTV-1）2Aペプチド、タイロウイルス2Aペプチド、および脳心筋炎ウイルス2Aペプチドからなる群より選択される。

40

【0191】

本明細書で使用される「ポリペプチド複合体」または「タンパク質複合体」は、標的に特異的な結合性ドメインを有する、少なくとも1つの鎖と、アクチュエータードメインを有する1つの鎖とを含む、少なくとも2つの異なる単鎖ポリペプチドにより形成された、二量体、三量体、またはより高次の多量体を指す。この用語は、4つの単鎖ポリペプチド（すなわち、2つの軽鎖および2つの重鎖）から形成された抗体を含まない。「二量体」とは、互いと会合した2つのサブユニットを含有する生物学的実体を指し、「ポリペプチド複合体」とは、少なくとも2つのタンパク質サブユニットと、架橋因子とを含む生物学的実体であって、共有結合（例えば、ジスルフィド結合）および他の相互作用（例えば、

50

静電相互作用、塩架橋、水素結合、および疎水性相互作用)を含む、分子間力の1種または複数の形態を介して互いと会合し、適切な条件下で(例えば、生理学的条件下で、組換えタンパク質を発現させ、精製し、かつ／もしくは保存するのに適する水溶液中で、または非変性型電気泳動および／もしくは非還元型電気泳動のための条件下で)安定な生物学的実体を指す。

【0192】

「単鎖ポリペプチド」とは、単一の、直鎖状で、連続的な、共有結合的に連結されたアミノ酸の配置である。「単鎖ポリペプチド」は、鎖間ジスルフィド結合などを介して、非直鎖状の様式で併せて連結される、2つのポリペプチド鎖(例えば、軽鎖が、ジスルフィド結合を介して、重鎖と連結される、免疫グロブリン分子の半分)を含まない。ある特定の
10 の実施形態では、単鎖ポリペプチドは、1種または複数の鎖間ジスルフィド結合を有するかまたは形成しうる。ある特定の他の実施形態では、2つまたはこれを超える単鎖ポリペプチド(例えば、融合タンパク質)は、複合体が、融合タンパク質またはキメラタンパク質など、少なくとも1つの非天然タンパク質からなり、天然の抗体ではないという条件で、潜在的に活性の複合体をもたらすように、鎖間ジスルフィド結合を介して会合しうる。

【0193】

本明細書で使用される「多量体化ドメイン」とは、別の異なるポリペプチド分子と、直接または架橋分子を介して、優先的に相互作用するかまたは会合する、ポリペプチド分子を指し、ここで、異なる多量体化ドメインの相互作用は、多量体化(すなわち、ホモ二量体、ヘテロ二量体、ホモ三量体、ヘテロ三量体、ホモ多量体、ヘテロ多量体でありうる、
20 二量体、三量体、または多部分複合体の形成)に実質的に寄与するか、またはこれを効率的に促進する。本開示の代表的な多量体化ドメインは、本明細書で提示される通り、FKBP、FRB、カルシニューリン、シクロフィリン、細菌性DHFR、PYL1、ABI1、GIB1、GAI、またはこれらの変異体を含む。

【0194】

ある特定の実施形態では、ポリペプチド複合体は、(i)第1の多量体化ドメインを有する、第1の融合タンパク質と、(ii)第1の多量体化ドメインと同じではない、第2の多量体化ドメインを有する、第2の融合タンパク質とを含み、ここで、第1の多量体化ドメインおよび第2の多量体化ドメインは、架橋因子の存在下で、ポリペプチド複合体の形成に実質的に寄与するか、またはこれを効率的に促進する。第1の多量体化ドメイン、
30 第2の多量体化ドメイン、または架橋因子の非存在下で、第1の融合タンパク質と、第2の融合タンパク質との間の会合の、統計学的に有意な低減が見られるなら、第1の多量体化ドメインと、第2の多量体化ドメインとの間の相互作用は、第1の融合タンパク質と、第2の融合タンパク質との多量体化に実質的に寄与するか、またはこれを効率的に促進する。ある特定の実施形態では、第1の融合タンパク質と、第2の融合タンパク質とを、共発現させる場合、第1の単鎖ポリペプチドおよび第2の単鎖ポリペプチドのうちの、少なくとも約60%、例えば、少なくとも約60%~約70%、少なくとも約70%~約80%、少なくとも約80%~約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%、および少なくとも約90%~約92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%は、架橋因子の存在下で
40 、互いと多量体を形成する。

【0195】

本明細書で使用される「疎水性ドメイン」とは、細胞膜内で、熱力学的に安定な三次元構造を有する、アミノ酸配列を指す。疎水性ドメインの構造は、アルファヘリックス、ベータバレル、ベータシート、ベータヘリックス、またはこれらの任意の組合せを含みうる。ある特定の実施形態では、疎水性ドメインは、内在性膜タンパク質(例えば、受容体、表面抗原分類(CD: cluster of differentiation)分子、酵素、輸送体、細胞接着分子など)に由来する膜貫通ドメインなどの膜貫通ドメインである。

【0196】

10

20

30

40

50

本明細書で使用される「アンカードメイン」とは、本開示の融合タンパク質の、細胞表面への係留、アンカリング、またはこれとの会合を促進する、アミノ酸配列、または他の分子を指す。例示的なアンカードメインは、細胞膜内で安定な構造を伴うアミノ酸配列、または糖脂質（グリコシルホスファチジルイノシトールまたはGPIとしてもまた公知である）の付加を促進するアミノ酸配列などを含む。背景として述べると、GPI分子は、カルボキシ末端のGPIシグナル配列の切断（例えば、Whiteら、J. Cell Sci.、113巻：721頁、2000年を参照されたい）、および既に合成されたGPIアンカー分子の、新たに形成されたカルボキシ末端のアミノ酸への同時的な移動（例示的なGPIアンカーであって、参照によりその全体が組み込まれるGPIアンカーについては、www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20711を参照されたい）を結果としてもたらす、アミノ基転移反応により、翻訳後において、タンパク質標的に付着される。ある特定の実施形態では、アンカードメインは、疎水性ドメイン（例えば、膜貫通ドメイン）、またはGPIシグナル配列である。一部の実施形態では、アンカードメインを伴う、本開示の、融合タンパク質をコードする核酸分子は、GPI分子をさらに含む、融合タンパク質を結果としてもたらす。

【0197】

本明細書で使用される「アクチュエータードメイン」は、適切なシグナルを受け取ると、直接的または間接的に、細胞内の生物学的応答または生理学的応答を促進する。ある特定の実施形態では、アクチュエータードメインとは、標的分子に結合されるか、またはこれに結合すると、シグナルを受け取る、タンパク質またはタンパク質複合体の一部であり、結合により、アクチュエータードメインからのシグナルが誘発される。アクチュエータードメインは、それが、免疫受容体チロシンベース活性化モチーフ（ITAM）などのシグナル伝達ドメインまたはシグナル伝達モチーフを含有する場合に、細胞応答を直接促進しうる。他の実施形態では、アクチュエータードメインは、細胞応答を直接促進する、1種または複数の他のタンパク質と会合することにより、細胞応答を間接的に促進する。例示的なアクチュエータードメインは、CD2、CD3 ϵ 、CD3 δ 、CD3 ζ 、pT α 、TCR α 、TCR β 、FcR α 、FcR β 、FcR γ 、NKG2D、CD79A、CD79B、CD22、CD27、CD28、CD30、CD40、LAT、Zap70、ICOS、DAP10、4-1BB、CARD11、HVEM、LAG3、SLAMF1、Lck、Fyn、Slp76、TRIM、OX40、またはこれらの任意の組合せを含む。

【0198】

特定の実施形態では、「膜貫通ドメイン」とは、シグナル伝達成分の部分であって、細胞外多量体化ドメインと、1種または複数の細胞内シグナル伝達ドメインとを融合させ、シグナル伝達成分を、T細胞の細胞膜にアンカリングする部分を指す。ある特定の実施形態では、「膜貫通ドメイン」とは、結合性成分の部分であって、細胞外多量体化ドメインに融合し、結合性成分を、T細胞の細胞膜にアンカリングする部分を指す。膜貫通ドメインは、天然の供給源に由来する場合もあり、合成の供給源に由来する場合もあり、半合成の供給源に由来する場合もあり、組換え供給源に由来する場合もある。例示的な膜貫通ドメインは、T細胞受容体のアルファ鎖、ベータ鎖、またはゼータ鎖、CD3 ϵ 、CD3 ζ 、CD4、CD5、CD8 α 、CD9、CD16、CD22、CD27、CD28、CD33、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD152、CD154、およびPD1に由来しうる（すなわち、これらの少なくとも膜貫通領域を含む）。多様な実施形態では、結合性成分および／またはシグナル伝達成分の膜貫通ドメインを、短鎖オリゴペプチドリンカーまたはポリペプチドリンカーであって、好ましくは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10アミノ酸の間の長さであり、任意選択で、シグナル伝達成分の膜貫通ドメインと、細胞内シグナル伝達ドメインとを連結する、リンカーに融合させる。

【0199】

本明細書で使用される「結合性ドメイン」（また、「結合性領域」、「結合性作用因子」、または「結合性部分」とも称する）とは、標的（例えば、CD19、CD20）を特

10

20

30

40

50

異的に認識し、これらに結合する能力を保有する、タンパク質、ポリペプチド、オリゴペプチド、またはペプチドを指す。結合性ドメインは、任意の、天然に存在するか、合成であるか、半合成であるか、または組み換えにより生成された結合性パートナーであって、目的の生物学的分子または別の標的に対する結合性パートナーを含む。例示的な結合性ドメインは、単鎖抗体の可変領域（例えば、ドメイン抗体、sFv、scFv、Fab）、受容体のエクストドメイン（例えば、c-Met）、またはリガンド（例えば、サイトカイン、ケモカイン、または細胞表面関連のリガンド）を含む。特定の実施形態では、結合性ドメインは、ラクダIg（ラクダ科動物抗体（VHH））、Ig NAR、Fab断片、Fab'断片、F(ab)'₂断片、F(ab)'₃断片、Fv、単鎖Fv抗体（「scFv」：single chain Fv）、bis-scFv、(scFv)₂、ミニボディー（minibody）、ダイアボディー（diabody）、トリアボディー（triabody）、テトラボディー（tetrabody）、ジスルフィド安定化Fvタンパク質（「dsFv」）、および単一ドメイン抗体（sdAb、ナノボディー）を含むがこれらに限定されない、抗体またはその抗原結合性断片を含む。特定の標的に特異的に結合する、本開示の結合性ドメインを同定することのための様々なアッセイであって、ウェスタンブロット、ELISA、およびBiacore解析を含むアッセイが公知である。

【0200】

結合性ドメインおよびその融合タンパク質は、それが、被験試料中に存在する他の成分に有意に結合せずに、 10^5 M^{-1} と等しいかまたはこれを超える K_a （すなわち、単位を $1/\text{M}$ とする、特定の結合性相互作用の平衡会合定数）の親和性で標的に結合するなら、標的「に特異的に結合する」。結合性ドメイン（またはその融合タンパク質）は、「高親和性」の結合性ドメイン（またはその融合タンパク質）および「低親和性」の結合性ドメイン（またはその融合タンパク質）と分類することができる。「高親和性」の結合性ドメインとは、 K_a を、少なくとも 10^7 M^{-1} 、少なくとも 10^8 M^{-1} 、少なくとも 10^9 M^{-1} 、少なくとも 10^{10} M^{-1} 、少なくとも 10^{11} M^{-1} 、少なくとも 10^{12} M^{-1} 、または少なくとも 10^{13} M^{-1} とする結合性ドメインを指す。「低親和性」の結合性ドメインとは、 K_a を、最大で 10^7 M^{-1} 、最大で 10^6 M^{-1} 、最大で 10^5 M^{-1} とする結合性ドメインを指す。代替的に、親和性は、単位をMとする、特定の結合性相互作用の平衡解離定数（ K_d ）（例えば、 $10^{-5} \text{ M} \sim 10^{-13} \text{ M}$ ）と定義することもできる。本開示に従う、結合性ドメインポリペプチドおよび融合タンパク質の親和性は、従来の技法を使用して、容易に決定することができる（例えば、Scatchardら（1949年）、Ann. N. Y. Acad. Sci.、51巻：660頁；および米国特許第5,283,173号、同第5,468,614号、または同等物を参照されたい）。

【0201】

「T細胞受容体」（TCR）とは、CD3と共に、T細胞の表面に見出される分子であって、一般に、主要組織適合性複合体（MHC：major histocompatibility complex）分子に結合した抗原の認識の一因となる分子である。大半のT細胞では、TCRは、高度に可変性の α 鎖と β 鎖との、ジスルフィド連結されたヘテロ二量体からなる。他のT細胞では、可変性の γ 鎖および δ 鎖から構成される、代替的な受容体が発現する。TCRの各鎖は、免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーであり、1つのN末端免疫グロブリン可変ドメイン、1つの免疫グロブリン定常ドメイン、膜貫通領域、およびC末端における短い細胞質テールを保有する（AbbasおよびLichtman、Cellular and Molecular Immunology（5版）、Saunders編、Philadelphia、2003年；Janewayら、Immunobiology：The Immune System in Health and Disease、4版、Current Biology Publications、148、149、および172頁、1999年を参照されたい）。本開示で使用されるTCRは、ヒト、マウス、ラット、または他の哺乳動物を含む、1つ

または多様な動物種に由来しうる。

【0202】

当技術分野では、「CD3」は、6つの鎖の多重タンパク質複合体として公知である（AbbasおよびLichtman、2003年；Janewayら、172および178頁、1999年を参照されたい）。哺乳動物では、複合体は、CD3 γ 鎖、CD3 δ 鎖、2つのCD3 ϵ 鎖、およびCD3 ζ 鎖のホモ二量体を含む。CD3 γ 鎖、CD3 δ 鎖、およびCD3 ϵ 鎖は、単一の免疫グロブリンドメインを含有する、免疫グロブリンスーパーファミリーの関連性が高い細胞表面タンパク質である。CD3 γ 鎖、CD3 δ 鎖、およびCD3 ϵ 鎖の膜貫通領域は、負に帯電しており、これは、これらの鎖が、正に帯電したT細胞受容体鎖と会合することを可能とする特徴である。CD3 γ 鎖、CD3 δ 鎖、およびCD3 ϵ 鎖の細胞内テールの各々が、免疫受容体チロシンベース活性化モチーフすなわちITAMとして公知の、単一の保存されたモチーフを含有するのに対し、各CD3 ζ 鎖は、3つの保存されたモチーフを有する。ITAMは、TCR複合体のシグナル伝達能のために重要であると考えられている。本開示で使用されるCD3は、ヒト、マウス、ラット、または他の哺乳動物を含む、1つまたは多様な動物種に由来しうる。

10

【0203】

本明細書で使用される「TCR複合体」とは、CD3の、TCRとの会合により形成された複合体を指す。例えば、TCR複合体は、CD3 γ 鎖、CD3 δ 鎖、2つのCD3 ϵ 鎖、CD3 ζ 鎖のホモ二量体、TCR α 鎖、およびTCR β 鎖からなる場合がある。代替的に、TCR複合体は、CD3 γ 鎖、CD3 δ 鎖、2つのCD3 ϵ 鎖、CD3 ζ 鎖のホモ二量体、TCR γ 鎖、およびTCR δ 鎖からなる場合もある。

20

【0204】

本明細書で使用される「TCR複合体の成分」とは、TCR鎖（すなわち、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、またはTCR δ ）、CD3鎖（すなわち、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、またはCD3 ζ ）、または2つまたはこれを超えるTCR鎖もしくはCD3鎖により形成された複合体（例えば、TCR α とTCR β との複合体、TCR γ とTCR δ との複合体、CD3 ϵ とCD3 δ との複合体、CD3 γ とCD3 ϵ との複合体、またはTCR α 、TCR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、および2つのCD3 ϵ 鎖によるTCR部分複合体（sub-TCR complex））を指す。

【0205】

本明細書において、異なる形で明示的に定義されない限りにおいて、抗体技術の技術分野の当業者により理解される用語の各々には、当技術分野で獲得されている意味を与える。抗体は、可変領域、ヒンジ領域、および定常ドメインを有することが公知である。免疫グロブリンの構造および機能は、例えば、Harlowら編、Antibodies：A Laboratory Manual、14章（Cold Spring Harbor Laboratory、Cold Spring Harbor、1988年）において総説されている。

30

【0206】

例えば、「VL」および「VH」という用語は、抗体の軽鎖および重鎖のそれぞれに由来する、可変結合性領域を指す。可変結合性領域は、個別の、十分に規定された部分領域であって、「相補性決定領域」（CDR：complementarity determining region）および「フレームワーク領域」（FR）として公知の部分領域から構成される。「CL」という用語は、「免疫グロブリン軽鎖定常領域」または「軽鎖定常領域」、すなわち、抗体の軽鎖に由来する定常領域を指す。「CH」という用語は、抗体のアイソタイプに応じて、CH1、CH2、およびCH3（IgA、IgD、IgG）、またはCH1、CH2、CH3、およびCH4ドメイン（IgE、IgM）にさらに分けられる、「免疫グロブリン重鎖定常領域」または「重鎖定常領域」を指す。「Fab」（抗原結合性断片）とは、抗体の部分であって、抗原に結合し、鎖間ジスルフィド結合を介して、軽鎖に連結された重鎖の可変領域およびCH1を含む部分である。

40

【0207】

50

本明細書で使用される「Fc領域定常ドメイン部分」または「Fc領域部分」とは、抗体に由来するFc断片（「結晶化可能な断片」領域すなわちFc領域）の重鎖定常領域セグメントであって、CH2、CH3、CH4、またはこれらの任意の組合せなど、1種または複数の定常ドメインを含みうるセグメントを指す。ある特定の実施形態では、Fc領域部分は、IgG抗体、IgA抗体、もしくはIgD抗体のCH2ドメインおよびCH3ドメイン、ならびにこれらの任意の組合せ、またはIgM抗体もしくはIgE抗体のCH3ドメインおよびCH4ドメイン、ならびにこれらの任意の組合せを含む。一実施形態では、CH2CH3構造またはCH3CH4構造は、IgG、IgA、IgD、IgE、またはIgMなど、同じ抗体アイソタイプに由来する。背景として述べると、Fc領域は、ADCC（抗体依存性細胞介在性細胞傷害）、ADCP（抗体依存性細胞性食作用）、CDC（補体依存性細胞傷害）、および補体結合、Fc受容体（例えば、CD16、CD32、FcRn）への結合、Fc領域を欠くポリペプチドと比べた、*in vivo*における半減期の延長、プロテインA結合、および、なおおそらくは、胎盤通過など、免疫グロブリンのエフェクター機能の一因となる（Caponら、Nature、337巻：525頁（1989年）を参照されたい）。

10

【0208】

「リンカー」または「スペーサー」とは、2つのタンパク質、ポリペプチド、ペプチド、ドメイン、領域、またはモチーフを接続し、結果として得られるポリペプチドが、標的分子に対する特異的結合親和性を保持するか、またはシグナル伝達活性（例えば、アクチュエータードメイン活性）を保持するように、2つの部分結合性（例えば、多量体化）ドメインの相互作用と適合性のスペーサー機能をもたらしうる、アミノ酸配列を指す。ある特定の実施形態では、リンカーは、約2～約35アミノ酸、例えば、または約4～約20アミノ酸、または約8～約15アミノ酸、または約15～約25アミノ酸から構成される。他の実施形態では、スペーサーは、抗体のCH2CH3ドメイン、ヒンジドメインなど、特定の構造を有しうる。一実施形態では、スペーサーは、IgG1またはIgG4のCH2ドメインおよびCH3ドメインを含む。

20

【0209】

「接合部アミノ酸」または「接合部アミノ酸残基」とは、結合性ドメインと隣接する多量体化ドメインとの間、または疎水性領域と隣接する多量体化ドメインとの間、または2つのモチーフ、領域、もしくはドメインを連結する、ペプチドリリンカーもしくはペプチドスペーサーと、隣接するアクチュエータードメインとの間など、ポリペプチドの、2つの隣接するモチーフ、領域、またはドメインの間の、1個または複数の（例えば、約2～10個の）アミノ酸残基を指す。接合部アミノ酸は、融合タンパク質の構築物デザインからもたらされる場合がある（例えば、融合タンパク質をコードする核酸分子の構築時における、制限酵素部位の使用からもたらされるアミノ酸残基）。

30

【0210】

「変化させたドメイン」または「変化させたタンパク質」とは、野生型のモチーフ、領域、ドメイン、ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質（例えば、野生型ヒトFKBP12、野生型ヒトFRP、野生型ヒトITAM、野生型ヒトCD3ζ、野生型ヒトTCR）に対する配列同一性を、少なくとも75%（例えば、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または99.5%）とする、モチーフ、領域、ドメイン、ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質を指す。例えば、「変化させたFKBP」とは、野生型FKBP（例えば、ヒトFKBP）に対する配列同一性を、少なくとも75%（例えば、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または99.5%）とするFKBPを指す。同様に、「変化させたCD3ζ」とは、野生型CD3ζ（例えば、ヒトCD3ζ）に対する配列同一性を、少なくとも75%（例えば、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または99.5%）とするCD3ζを指す。

40

50

【0211】

本明細書で使用される「核酸」または「核酸分子」とは、デオキシリボ核酸（DNA：deoxyribonucleic acid）、リボ核酸（RNA：ribonucleic acid）、オリゴヌクレオチド、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR：polymerase chain reaction）により、またはin vitroにおける翻訳により作り出される断片、およびライゲーション、切断、エンドヌクレアーゼ作用、またはエクソヌクレアーゼ作用のうちのいずれかにより作り出される断片のうちのいずれかを指す。ある特定の実施形態では、本開示の核酸は、PCRにより生成される。核酸は、天然に存在するヌクレオチドである単量体（デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドなど）、天然に存在するヌクレオチドの類似体（例えば、天然に存在するヌクレオチドのα-光学異性形態）、またはこれらの両方の組合せからなる場合がある。修飾ヌクレオチドは、糖部分またはピリミジン塩基部分もしくはプリン塩基部分の修飾または置き換えを有する。核酸の単量体は、ホスホジエステル結合またはこのような連結の類似物により連結することができる。ホスホジエステル連結の類似物は、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロセレノエート、ホスホロジセレノエート、ホスホロアニロチオエート、ホスホルアニリデート、ホスホルアミデート、モルホリノなどを含む。「核酸分子」という用語はまた、ポリアミド骨格に付着させた、天然に存在する核酸塩基または改変された核酸塩基を含む、「ペプチド核酸」（PNA）も含む。核酸分子は、一本鎖の場合もあり、二本鎖の場合もある。

10

【0212】

本明細書で使用される「変異」とは、核酸分子またはポリペプチド分子の配列の、基準核酸分子もしくは野生型核酸分子または基準ポリペプチド分子もしくは野生型ポリペプチド分子のそれぞれと比較した変化を指す。変異は、配列の、複数の異なる種類の変化であって、ヌクレオチドまたはアミノ酸の置換、挿入、または欠失を含む変化を結果としてもたらしうる。他の実施形態では、変異は、1種または複数のヌクレオチドまたは残基の置換である。

20

【0213】

「構築物」という用語は、組換え核酸を含有する任意のポリヌクレオチドを指す。構築物は、ベクター（例えば、細菌性ベクター、ウイルスベクター）内に存在する場合もあり、ゲノムに組み込まれる場合もある。「ベクター」とは、別の核酸を運ぶことが可能な核酸分子である。ベクターは、例えば、プラスミド、コスミド、ウイルス、RNAベクター、または直鎖状もしくは環状のDNA分子もしくはRNA分子で有り得、これらは染色体核酸、非染色体核酸、半合成核酸、もしくは合成核酸を含みうる。例示的なベクターは、自律複製が可能なベクター（エピソードベクター）、および／またはそれらが連結された核酸の発現が可能なベクター（発現ベクター）である。

30

【0214】

ウイルスベクターは、レトロウイルス、アデノウイルス、パルボウイルス（例えば、アデノ随伴ウイルス）、コロナウイルス、オルトミクソウイルス（例えば、インフルエンザウイルス）、ラブドウイルス（例えば、狂犬病ウイルスおよび水疱性口内炎ウイルス）、パラミクソウイルス（例えば、麻疹ウイルスおよびセンダイウイルス）などのマイナス鎖RNAウイルス、ピコルナウイルスおよびアルファウイルスなどのプラス鎖RNAウイルス、ならびにアデノウイルス、ヘルペスウイルス（例えば、1型および2型単純ヘルペスウイルス、エプスタインバーウイルス、サイトメガロウイルス）を含む、二本鎖DNAウイルス、ならびにポックスウイルス（例えば、ワクシニアウイルス、鶏痘ウイルス、およびカナリア痘ウイルス）を含む。他のウイルスは、例えば、ノーウォークウイルス、トガウイルス、フラビウイルス、レオウイルス、パポバウイルス、ヘパドナウイルス、および肝炎ウイルスを含む。レトロウイルスの例は、トリ白血病肉腫ウイルス、哺乳動物C型レトロウイルス、哺乳動物B型レトロウイルス、哺乳動物D型レトロウイルス、HTLV-BLV群、レンチウイルス、スプマウイルスを含む（Coffin, J. M., Retroviridae: The viruses and their replicat

40

50

ion, Fundamental Virology, 3版, B. N. Fields
ら編, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996年)。

【0215】

本明細書で使用される「レンチウイルスベクター」とは、それらの比較的大きなパッケージング容量、低減された免疫原性、および高効率で、広範にわたる、異なる細胞型を安定的に形質導入するそれらの能力のために、遺伝子送達に極めて有望な、HIVベースのレンチウイルスベクターを意味する。レンチウイルスベクターは通常、3つまたはこれを超えるプラスミド（パッケージングプラスミド、エンベローププラスミド、および導入プラスミド）の、産生細胞への一過性のトランスフェクションに従い作り出される。HIVと同様に、レンチウイルスベクターも、ウイルス表面の糖タンパク質の、細胞表面の受容体との相互作用を介して標的細胞に入る。侵入すると、ウイルスRNAは、逆転写を経るが、これは、ウイルス逆転写酵素複合体に媒介される。逆転写の産物は、二本鎖直鎖状のウイルスDNAであり、これは、感染細胞のDNA内のウイルスの組み込みのための基質である。

10

【0216】

本明細書で使用される「組み込み型レンチウイルスベクター（すなわちLV）」とは、標的細胞のゲノムに組み込むことができるベクターの例などのベクターを意味する。

【0217】

「非組み込み型レンチウイルスベクター」（すなわちNILV: non-integrative lentiviral vector）とは、効率的な遺伝子送達ベクターであって、ウイルスインテグラーゼの作用を介して、標的細胞のゲノムに組み込まないベクターを意味する。一実施形態では、NILVとは、そのインテグラーゼ活性を特異的に減少させるように変異させたインテグラーゼタンパク質を有する、レンチウイルスを指す。インテグラーゼ活性を低減するのに適する、HIV-1 pol 遺伝子内の例示的な変異は、H12N、H12C、H16C、H16V、S81R、D41A、K42A、H51A、Q53C、D55V、D64E、D64V、E69A、K71A、E85A、E87A、D116N、D116I、D116A、N120G、N120I、N120E、E152G、E152A、D35E、K156E、K156A、E157A、K159E、K159A、K160A、R166A、D167A、E170A、H171A、K173A、K186Q、K186T、K188T、E198A、R199c、R199T、R199A、D202A、K211A、Q214L、Q216L、Q221L、W235F、W235E、K236S、K236A、K246A、G247W、D253A、R262A、R263AおよびK264Hを含むがこれらに限定されない。

20

30

【0218】

「作動可能に連結された」という用語は、一方の核酸配列の機能が、他方の核酸配列の影響を受けるような、単一の核酸断片上の核酸配列の関係を指す。例えば、プロモーターは、それが、そのコード配列の発現に影響を及ぼすことが可能である（すなわち、コード配列は、プロモーターの転写制御下にある）とき、コード配列と作動可能に連結されている。「連結されていない」は、関連の遺伝子エレメントが、互いと緊密に関係しておらず、一方の機能が、他方に影響を及ぼさないことを意味する。

40

【0219】

本明細書で使用される「発現ベクター」とは、適切な宿主内の核酸分子の発現をもたらすことが可能な、適切な制御配列に作動可能に連結された核酸分子を含有する、DNA構築物を指す。このような制御配列は、転写をもたらすプロモーター、このような転写を制御する、任意選択のオペレーター配列、適切なmRNAリボソーム結合性部位をコードする配列、ならびに転写および翻訳の終結を制御する配列を含む。ベクターは、プラスミドの場合もあり、ファージ粒子の場合もあり、ウイルスの場合もあり、単なる潜在的なゲノムインサートの場合もある。適切な宿主に形質転換されると、ベクターは、複製され、宿主ゲノムと独立に機能する可能性もあり、場合によって、ゲノム自体に組み込まれる可能

50

性もある。本明細書では、「プラスミド」、「発現プラスミド」、「ウイルス」、および「ベクター」は、互換的に使用されることが多い。

【0220】

本明細書で使用される「発現」という用語は、ポリペプチドが、遺伝子の核酸配列に基づき産生される過程を指す。過程は、転写および翻訳の両方を含む。

【0221】

核酸配列を細胞に挿入する文脈における「導入された」という用語は、「トランスフェクション」または「形質転換」または「形質導入」を意味し、核酸配列の、真核細胞または原核細胞への組込みに対する言及を含み、ここで、核酸配列は、細胞のゲノムに組み込まれる（例えば、染色体、プラスミド、プラスチド、またはミトコンドリアDNA）場合もあるか、自律性レプリコンに変換される場合もあるか、または一過性に発現される（例えば、トランスフェクトされたmRNA）場合もある。

10

【0222】

本明細書で使用される「配列同一性」とは、配列を整列し、必要な場合、最大の配列同一性パーセントを達成するようにギャップを導入し、そしていかなる保存的置換も配列同一性の一部とみなさない後における、1つの配列内の、別の基準ポリペプチド配列内のアミノ酸残基と同一なアミノ酸残基の百分率を指す。配列同一性の百分率値は、Altschulら（1997年）、「Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs」、Nucleic Acids Res.、25巻：3389～3402頁により規定される通り、パラメータを、デフォルト値に設定した、NCBI BLAST 2.0ソフトウェアによりもたらされる。

20

【0223】

ある特定の実施形態では、変化させた免疫グロブリンは、野生型免疫グロブリンドメインの保存的アミノ酸置換だけを含有する。ある特定の他の実施形態では、変化させた免疫グロブリンドメインは、野生型免疫グロブリンドメインの非保存的アミノ酸置換だけを含有する。さらに他の実施形態では、変化させた免疫グロブリンドメインは、保存的アミノ酸置換および非保存的アミノ酸置換の両方を含有する。

【0224】

当技術分野では、「保存的置換」は、1つのアミノ酸の、類似の特性を有する別のアミノ酸への置換として認識されている。当技術分野では、例示的な保存的置換が周知である（例えば、1997年3月13日に公開された、WO97/09433、10頁；Lehninger、Biochemistry、2版、Worth Publishers, Inc. NY、NY（1975年）、71～77頁；Lewin、Genes IV、Oxford University Press、NY and Cell Press、Cambridge、MA（1990年）、8頁を参照されたい）。ある特定の実施形態では、保存的置換は、ロイシンからセリンへの置換を含む。

30

【0225】

本明細書で使用される「誘導体」という用語は、酵素を伴うかまたは伴わない、化学的手段または生物学的手段による、例えば、グリコシル化、アルキル化、アシル化、エステル形成、またはアミド形成による、ペプチドの1種または複数のアミノ酸残基の修飾を指す。一般に、「誘導体」は、親ポリペプチドが、「誘導体」を作り出す出発材料ではあるが、「類似体」を作り出す出発材料として必ずしも使用されるわけではないという点で、「類似体」と異なる。誘導体は、親ポリペプチドの、異なる化学的特性、生物学的特性、または物理的特性を有しうる。例えば、誘導体は、親ポリペプチドと比較して、より親水性の場合もあり、反応性を変化させている（例えば、CDRが、標的に対するその親和性を変化させるアミノ酸変化を有するか、またはFKBPが、ラパマイシンまたはそのラパログに対するその親和性を変化させるアミノ酸変化を有する）場合もある。

40

【0226】

「受容体」とは、細胞の細胞膜内または細胞質内に存在するタンパク質であって、シグ

50

ナル分子（すなわち、リガンド、例えば、ホルモン、神経伝達物質、毒素、サイトカイン）が結合または付着しうるタンパク質である。単一の分子の、受容体への結合は、受容体のコンフォメーション変化を結果としてもたらす可能性があり、これにより細胞応答が誘発されうる。しかし、一部のリガンドは、いかなる応答も誘導せずに、受容体を遮断する（例えば、アンタゴニスト）に過ぎない。一部の受容体タンパク質は、末梢の膜タンパク質であり、多くのホルモンおよび神経伝達物質の受容体は、細胞膜のリン脂質二重層内に埋め込まれた膜貫通タンパク質であり、受容体の別の主要なクラスは、ステロイドに対する細胞内タンパク質、および細胞内分泌ペプチドホルモン受容体などの細胞内タンパク質である。

【0227】

本明細書で使用される「単離された」という用語は、それが天然に存在する供給源から除去された物質を指す。物質は、単離するために精製する必要はない。例えば、宿主細胞内で産生されるタンパク質は、それが、細胞から取り出されるか、または放出されるとき、単離されると考えられる。本開示の目的では、粗細胞溶解物画分中に含有されるタンパク質は、「単離された」とみなされる。さらに、「単離核酸分子」とは、個別の断片の形態にあるポリヌクレオチド分子、またはより大型の核酸構築物の成分としてのポリヌクレオチド分子であって、その供給源である細胞であって、それが通常は存在する染色体を含む細胞から、少なくとも一度は分離されたポリヌクレオチド分子を指す。例えば、組換えポリペプチド、組換えペプチド、またはこれらの変異体をコードするDNA分子であって、細胞のゲノムDNAから分離されたDNA分子は、単離核酸分子である。単離核酸分子の別の例は、適切な宿主細胞内の複製が可能なベクターにクローニングされうる、バクテリオファージのプロモーター（例えば、T5またはT7）、または核酸の発現制御配列である。単離核酸分子のなおも別の例は、化学合成された核酸分子またはPCRにより合成された核酸分子である。

【0228】

本明細書で使用される「精製された」という用語は、それに随伴することが典型的である夾雑物および他の材料を少なくとも部分的に含まないようにされた物質を指す。物質は、多様な程度まで精製することができる。物質は、物質の調製物または組成物が、約1%未満の夾雑物を含有する場合に、「実質的に純粋」である。物質は、物質の調製物または組成物が、約5%未満の夾雑物を含有する場合に、「本質的に純粋」である。物質の調製物または組成物が、約2%未満の夾雑物を含有する場合に、「純粋」である。「均一性まで精製された」物質では、夾雑物は、従来の解析法では検出することができない。

【0229】

「処置」、「処置すること」、または「改善すること（ameliorating）」とは、治療的処置または予防的／防止的処置を指す。処置を施される個体における疾患の少なくとも1つの症状を改善する（improve）か、または処置が、個体における進行性疾患の増悪を遅延させうるか、もしくはさらなる関連の疾患の発症を防止しうるなら、処置は、治療的である。

【0230】

特異的結合分子または特異的化合物の「治療有効量（または治療有効用量）」または「有効量（または有効用量）」とは、処置される疾患の1種または複数の症状の、統計学的に有意な様式での改善を結果としてもたらすのに十分な化合物の量を指す。単独で投与された個別の有効成分に言及する場合、治療有効用量とは、その成分単独を指す。組合せに言及する場合、治療有効用量とは、組み合わせられた有効成分の量であって、逐次的に投与されたのであれ、同時的に投与されたのであれ、治療効果を結果としてもたらす量を指す。

【0231】

「薬学的に許容される」という用語は、当技術分野で周知の経路を使用して投与される場合に、アレルギー性有害反応または他の重篤な有害反応をもたらさない、分子の実体お

10

20

30

40

50

よび組成物を指す。

【0232】

「必要とする被験体」とは、本明細書で提示される、非天然細胞、ポリペプチド複合体、またはこれらの組成物による処置または改善に適する、疾患、障害、または状態の危険性があるか、またはこれらを患う被験体を指す。ある特定の実施形態では、被験体は、ヒトである。

【0233】

さらなる定義は、本開示を通して提示される。

【0234】

ある特定の態様では、本開示は、(a) 第1の多量体化ドメイン、疎水性ドメイン、およびアクチュエータードメインを含む第1の融合タンパク質をコードする第1の核酸分子であって、第1の融合タンパク質が発現すると、第1の多量体化ドメインが細胞外に局在化する、第1の核酸分子と；(b) 結合性ドメインおよび第2の多量体化ドメインを含む第2の融合タンパク質をコードする第2の核酸分子であって、第2の融合タンパク質が、発現すると細胞から分泌されるかまたは細胞表面にアンカリングされて、細胞外に局在化する、第2の核酸分子とを含み；第1の架橋因子が非天然細胞の表面のポリペプチド複合体の形成を促進し、架橋因子が、第1の融合タンパク質の多量体化ドメインおよび第2の融合タンパク質の多量体化ドメインと会合し、これらの間に配置される、非天然細胞を対象とする。ある特定の実施形態では、第2の融合タンパク質（例えば、DARIC結合性成分）は、アンカードメイン（例えば、膜貫通ドメイン、GPIシグナル配列）をさらに含み、ここで、細胞外に局在化した第2の融合タンパク質は、非天然細胞の表面に係留またはアンカリングされている。ある特定の実施形態では、融合タンパク質は、CD4、CD8、CD28などに由来する膜貫通ドメインなどの膜貫通ドメインにより、非天然細胞の表面にアンカリングされている。一部の実施形態では、融合タンパク質は、GPI分子により、非天然細胞の表面にアンカリングされている。

【0235】

さらなる実施形態では、第1の融合タンパク質は、それ自体の疎水性ドメインおよびアクチュエータードメインを含むのではなく、代わりに、T細胞の表面に発現する膜貫通タンパク質であって、疎水性ドメインおよびアクチュエータードメインを含む膜貫通タンパク質（例えば、TCR/CD3など）に結合する、結合性ドメインを含む。

【0236】

さらなる態様では、本開示は、第1の多量体化ドメイン、疎水性ドメイン、およびアクチュエータードメインを含む第1の融合タンパク質をコードする異種核酸分子であって、第1の融合タンパク質が発現すると、第1の多量体化ドメインが細胞外に局在化する、異種核酸分子を含む第1の非天然細胞；ならびに結合性ドメインおよび第2の多量体化ドメインを含む第2の融合タンパク質をコードする第2の異種核酸分子であって、第2の融合タンパク質が、発現すると細胞外に放出される、第2の異種核酸分子を含む第2の非天然細胞であって、第1の架橋因子が第1の非天然細胞の表面でポリペプチド複合体の形成を促進し、架橋因子が、第1の融合タンパク質の多量体化ドメインおよび第2の融合タンパク質の多量体化ドメインと会合し、これらの間に配置される、第1の非天然細胞ならびに第2の非天然細胞を対象とする。

【0237】

ある特定の実施形態では、第1の多量体化ドメインと、第2の多量体化ドメインとは、同じであるかまたは異なる。例示的な架橋因子であって、多量体化ドメインと会合し、本開示の融合タンパク質に対して有用な架橋因子は、ラパマイシン（シロリムス）またはそのラパログ、クーママイシンもしくはその誘導体、ジベレリンもしくはその誘導体、アブシシン酸（ABA: *abscisic acid*）もしくはその誘導体、メトトレキサートもしくはその誘導体、シクロスポリンAもしくはその誘導体、FKCsAもしくはその誘導体、トリメトプリム（Tmp: *trimethoprim*）（FKBPの合成リガンド（SLF: *synthetic ligand for FKBP*））もしくはその誘

導体、またはこれらの任意の組合せを含む。

【0238】

例示的なラパマイシン類似体（ラパログ）は、米国特許第6,649,595号において開示されている、ラパマイシン類似体（ラパログ）であって、参照により本明細書に組み込まれるラパログ構造を含む。ある特定の実施形態では、架橋因子は、免疫抑制効果が、ラパマイシンと比較して実質的に低減されたラパログである。「実質的に低減された免疫抑制効果」とは、臨床で測定されるか、またはヒト免疫抑制活性についての、適切な *in vitro* におけるサロゲート（例えば、T細胞増殖の阻害）、もしくは *in vivo* におけるサロゲートにおいて測定される免疫抑制効果が、当モル量のラパマイシンについて観察または予測される免疫抑制効果の、少なくとも0.1～0.005倍未満であるラパログを指す。代替的に、「実質的に低減された免疫抑制効果」とは、このような *in vitro* アッセイにおける EC_{50} 値が、同じアッセイにおいて、ラパマイシンについて観察される EC_{50} 値の、少なくとも10～250倍であるラパログを指す。他の例示的なラパログは、エベロリムス、ノボリムス、ピメクロリムス、リダホロリムス、タクロリムス、テムシロリムス、ウミロリムス、およびゾタロリムスを含む。

10

【0239】

ある特定の実施形態では、多量体化ドメインは、ラパマイシンまたはそのラパログである架橋因子と会合する。例えば、第1の多量体化ドメインおよび第2の多量体化ドメインは、FKBPおよびFRBから選択される対である。FRBドメインとは、FKBPタンパク質およびラパマイシンまたはそのラパログとの三部分複合体を形成することが可能なポリペプチド領域（タンパク質「ドメイン」）である。FRBドメインは、ヒトおよび他の種に由来する、mTORタンパク質（文献ではまた、FRAP、RAPT1、またはRAFTとも称する）；Tor1およびTor2を含む酵母タンパク質；ならびにCandida属のFRAP相同体を含む、多数の天然に存在するタンパク質内に存在する。当技術分野では、これらのタンパク質のヌクレオチド配列、クローニング、および他の側面に関する情報が既に公知である。例えば、ヒトmTORのタンパク質配列の受託番号は、GenBank受託番号L34075.1（Brownら、Nature、369巻：756頁、1994年）である。

20

【0240】

本開示の融合タンパク質における使用のためのFRBドメインは一般に、少なくとも約85～約100のアミノ酸残基を含有する。ある特定の実施形態では、本開示の融合タンパク質における使用のためのFRBアミノ酸配列は、GenBank受託番号L34075.1のアミノ酸配列に基づき、93アミノ酸の配列であるIle-2021～Lys-2113、およびT2098Lの変異を含む。本開示の融合タンパク質における使用のためのFRBドメインは、本開示の、ラパマイシンまたはそのラパログに結合させたFKBPタンパク質による複合体への結合が可能である。ある特定の実施形態では、FRBドメインのペプチド配列は、(a) ヒトmTORの、少なくとも表示の93アミノ酸の領域、もしくは相同なタンパク質の対応する領域に及ぶ、天然に存在するペプチド配列；(b) 天然に存在するペプチドのうちの、最大で約10アミノ酸、または約1～約5アミノ酸、または約1～約3アミノ酸、または、一部の実施形態では、ただ1つのアミノ酸を、欠失させるか、挿入するか、もしくは置換した、天然に存在するFRBの変異体；または(c) 天然に存在するFRBドメインをコードするDNA分子と選択的にハイブリダイズすることが可能な核酸分子によりコードされるペプチド、もしくは遺伝子コードの縮重を別として、天然に存在するFRBドメインをコードするDNA分子と選択的にハイブリダイズすることが可能なDNA配列によりコードされるペプチドを含む。

30

40

【0241】

FKBP（FK506結合性タンパク質）は、FK506、FK520、およびラパマイシンなどのマクロライドに対する、細胞質ゾル受容体であり、種系列を越えて高度に保存されている。本開示の目的では、FKBPは、ラパマイシンまたはそのラパログへの結合が可能であり、FRB含有タンパク質またはFRBを含有する融合タンパク質との三部

50

分複合体をさらに形成することも可能な、タンパク質またはタンパク質ドメインである。FKBPドメインはまた、「ラパマイシン結合性ドメイン」とも称する。当技術分野では、多様なFKBP分子種の、ヌクレオチド配列、クローニング、および他の側面に関する情報が公知である（例えば、Staendartら、Nature、346巻：671頁、1990年（ヒトFKBP12）；Kay、Biochem. J.、314巻：361頁、1996年を参照されたい）。当技術分野ではまた、他の哺乳動物種、酵母、および他の生物における、相同なFKBPタンパク質も公知であり、本明細書で開示される融合タンパク質内で使用することができる。本発明における使用のためのFKBPドメインのサイズは、どのFKBPタンパク質を用いるのかに応じて変化する。本開示の融合タンパク質のFKBPドメインは、ラパマイシンまたはそのラパログに結合し、FRB含有タンパク質との三部分複合体に関与すること（このような結合を検出するための、直接的または間接的な任意の手段により決定されうる）が可能である。

10

【0242】

本発明のFKBP融合タンパク質のFKBPドメインのペプチド配列は、（a）ヒトFKBP12タンパク質（GenBank受託番号AAA58476.1）もしくはこれに由来するペプチド配列に由来することが好ましい、天然に存在するFKBPペプチド配列、別のヒトFKBPに由来する天然に存在するFKBPペプチド配列、マウスFKBPもしくは他の哺乳動物FKBPに由来する天然に存在するFKBPペプチド配列、または一部の他の動物のFKBP、酵母FKBP、もしくは真菌FKBPに由来する天然に存在するFKBPペプチド配列；（b）天然に存在するペプチドのうちの、最大で約10アミノ酸、または約1～約5アミノ酸、または約1～約3アミノ酸、または、一部の実施形態では、ただ1つのアミノ酸を、欠失させるか、挿入するか、または置換した、天然に存在するFKBP配列の変異体；あるいは（c）天然に存在するFKBPをコードするDNA分子と選択的にハイブリダイズすることが可能な核酸分子によりコードされるペプチド配列、または遺伝子コードの縮重を別として、天然に存在するFKBPをコードするDNA分子と選択的にハイブリダイズすることが可能なDNA配列によりコードされるペプチド配列を含む。

20

【0243】

他の多量体化ドメイン対は、FKBPおよびカルシニューリン、FKBPおよびシクロフィリン、FKBPおよび細菌性DHFR、カルシニューリンおよびシクロフィリン、PYL1およびABI1、もしくはGIB1およびGAI、またはこれらの変異体を含む。

30

【0244】

さらに他の実施形態では、抗架橋因子は、少なくとも2つの第1の融合タンパク質の、架橋因子との会合を遮断する。例えば、シクロスポリンまたはFK506は、ラパマイシンを追い出し（titrate out）、したがって、結合する多量体化ドメインが1つだけであるので、シグナル伝達を停止させる、抗架橋因子として使用されうる。ある特定の実施形態では、抗架橋因子（例えば、シクロスポリン（cyclosporine）、FK506）は、免疫抑制剤である。例えば、免疫抑制剤である抗架橋因子を使用して、本開示の融合タンパク質の機能を遮断するかまたは最小化し、同時に、臨床的状況における、望ましくない炎症応答または病理学的炎症応答を阻害または遮断することができる。

40

【0245】

ある特定の実施形態では、第1の融合タンパク質（例えば、DARICシグナル伝達成分）は、第1のFKBPポリペプチドまたはこれらの変異体を含む第1の多量体化ドメインを有し、第2の融合タンパク質（例えば、DARIC結合性成分）は、第1のFRBポリペプチドまたはこれらの変異体を含む第2の多量体化ドメインを有する。他の実施形態では、第1の融合タンパク質（例えば、DARICシグナル伝達成分）は、第1のFRBポリペプチドまたはこれらの変異体を含む第1の多量体化ドメインを有し、第2の融合タンパク質（例えば、DARIC結合性成分）は、第1のFKBPポリペプチドまたはこれらの変異体を含む第2の多量体化ドメインを有する。これらの実施形態のうちのいずれか

50

では、第2の融合タンパク質は、アンカードメイン（例えば、膜貫通ドメイン、GPIシグナル配列）をさらに含み、任意選択で、閾値下シグナル伝達ドメインをさらに含む。一部の実施形態では、第2の融合タンパク質は、GPIシグナル配列が除去されているか、またはGPIシグナル配列をGPI分子に付着させるように変化させた、GPI分子を含有する。

【0246】

ある特定の実施形態では、第1の核酸分子は、第1の多量体化ドメイン、第3の多量体化ドメイン、疎水性ドメイン、およびアクチュエータードメインを含む第1の融合タンパク質をコードし、ここで第1の多量体化ドメインおよび第3の多量体化ドメインは、第1の融合タンパク質が、細胞内で発現すると細胞外に局在化する。ある特定の実施形態では、第1の融合タンパク質の第3の多量体化ドメインは、ラパマイシンもしくはそのラパログ、クーマイシンもしくはその誘導体、ジベレリンもしくはその誘導体、ABAもしくはその誘導体、メトトレキサートもしくはその誘導体、シクロスポリンAもしくはその誘導体、FKCsAもしくはその誘導体、Tm p-SLFもしくはその誘導体、またはこれらの任意の組合せから選択される架橋因子のための結合性ドメインである。

【0247】

なおさらなる実施形態では、第2の架橋因子が少なくとも2つの第1の融合タンパク質の会合を促進し、架橋因子は、第1の融合タンパク質の第3の多量体化ドメインと会合し、これらの間に配置される。ある特定の実施形態では、形成されるタンパク質複合体は、少なくとも2つの第1の融合タンパク質を含むホモ複合体であり、ここで、多量体化ドメインは、DHFR（架橋分子はメトトレキサートである）、またはGyrB（架橋分子はクーマイシンである）、またはFKBP（架橋分子はAP1903またはAP20187である）でありうる。ある特定の他の実施形態では、タンパク質複合体は、1種または複数の第1の融合タンパク質および1種または複数の第2の融合タンパク質を含むヘテロ複合体である。

【0248】

ある特定の実施形態では、疎水性ドメインは、CD4、CD8、CD28などに由来する膜貫通ドメインなどの膜貫通ドメインである。一部の実施形態では、融合タンパク質（例えば、DARIC結合性成分）は、膜貫通ドメインまたはGPIシグナル配列などのアンカードメインを含む。さらなる実施形態では、融合タンパク質（例えば、DARIC結合性成分）は、GPIシグナル配列が除去されているか、またはGPIシグナル配列をGPI分子に付着させるように変化させた、GPI分子を含有する。

【0249】

さらなる実施形態では、アクチュエータードメインは、リンパ球受容体シグナル伝達ドメインを含むか、または1種または複数の免疫受容体チロシンベース活性化モチーフ（ITAM）を有するアミノ酸配列を含む。なおさらなる実施形態では、アクチュエータードメインは、細胞質シグナル伝達タンパク質と会合する細胞質部分であって、細胞質シグナル伝達タンパク質が、リンパ球受容体もしくはそのシグナル伝達ドメイン、複数の免疫受容体チロシンベース活性化モチーフ（ITAM）を含むタンパク質、共刺激ドメイン、接着因子、またはこれらの任意の組合せである、細胞質部分を含む。例示的なアクチュエータードメインは、CD2、CD3ε、CD3δ、CD3ζ、pTα、TCRα、TCRβ、FcRα、FcRβ、FcRγ、NKG2D、CD22、CD79AおよびCD79B、CD27、CD28、CD30、CD40、LAT、Zap70、ICOS、DAP10、4-1BB、CARD11、HVEM、LAG3、SLAMF1、Lck、Fyn、Slp76、TRIM、OX40、またはこれらの任意の組合せを含むがこれらに限定されない。なおさらなる実施形態では、第1の核酸分子は、1種もしくは複数の異なるアクチュエータードメイン、共刺激ドメイン、接着因子、またはこれらの任意の組合せをさらに含む、第1の融合タンパク質をコードする。本明細書で使用される「共刺激性シグナル伝達ドメイン」または「共刺激ドメイン」という用語は、共刺激因子の細胞内シグナル伝達ドメインを指す。例示的な共刺激ドメインは、CD2、CD27、CD28、CD30

10

20

30

40

50

、CD40、LAT、Zap70、ICOS、DAP10、4-1BB、CARD11、HVEM、LAG3、SLAMF1、Lck、Fyn、Slp76、TRIM、およびOX40に由来する細胞内シグナル伝達ドメインを含むがこれらに限定されない。

【0250】

ある特定の実施形態では、非天然細胞は、共刺激因子、免疫調節因子、共刺激因子に対するアゴニスト、免疫調節因子に対するアゴニスト、またはこれらの任意の組合せをさらに過剰発現させる。関連の実施形態では、共因子であるIL-12を過剰発現させるか、または細胞に供給する。

【0251】

本発明で有用な融合タンパク質の結合性ドメインは、当技術分野で公知であるかもしくは本明細書で記載される結合性ドメイン、または当技術分野で公知の様々な方法（例えば、米国特許第6,291,161号および同第6,291,158号を参照されたい）により作り出される結合性ドメインを含む。例えば、融合タンパク質の結合性ドメインは、目的の標的に特異的に結合するFab断片についてのFabファージライブラリー（Hoetra、Nat. Biotechnol.、23巻：344頁、2005年を参照されたい）をスクリーニングすることにより同定することができる。加えて、標的抗原を、好都合な系（例えば、マウス、HuMAb mouse（登録商標）、TC mouse（商標）、KM-mouse（登録商標）、ラマ、ヒツジ、ニワトリ、ラット、ハムスター、ウサギなど）において免疫原として使用することなど、ハイブリドーマ開発のための従来の戦略を使用して、目的の標的特異的な結合性ドメインを有する、抗標的抗体を開発することができる。

【0252】

さらなる結合性ドメインの供給源は、ヒト、齧歯動物、鳥類、およびヒツジを含む、多様な種に由来する標的特異的な抗体可変ドメイン（抗体、sFv、scFv、Fab、または可溶性VHドメインまたはドメイン抗体としてフォーマットされうる）を含む。結合性ドメインのさらなる供給源は、ラクダ科動物（ラクダ、ヒトコブラクダ、またはラマに由来する）（Ghahroudiら、FEBS Letters、414巻：521頁、1997年；Vinckeら、J. Biol. Chem.、284巻：3273頁、2009年；およびHamers-Castermanら、Nature、363巻：446頁、1993年；およびNguyenら、J. Mol. Biol.、275巻：413頁、1998年）、テンジクザメ（Rouxら、Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA)、95巻：11804頁、1998年）、スポットテッドラットフィッシュ（Nguyenら、Immunogenetics、54巻：39頁、2002年）、またはヤツメウナギ（Herrinら、Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA)、105巻：2040頁、2008年；およびAlderら、Nature Immunol.、9巻：319頁、2008年）など、他の種に由来する抗体の可変ドメインを含む。これらの抗体は、重鎖可変領域だけを使用して、抗原結合性領域を形成しうる、すなわち、これらの機能的な抗体は、重鎖だけのホモ二量体（「重鎖抗体」と称する）（Jespersら、Nat. Biotechnol.、22巻：1161頁、2004年；Cortez-Retamozoら、Cancer Res.、64巻：2853頁、2004年；Baralら、Nature Med.、12巻：580頁、2006年；およびBarthelemyら、J. Biol. Chem.、283巻：3639頁、2008年）であると考えられる。

【0253】

標的特異的な結合性ドメインの他の代替的な供給源は、ランダムペプチドライブラリーをコードする配列、またはフィブリノーゲンドメイン（例えば、Weiselら（1985年）、Science、230巻：1388頁を参照されたい）、Kunitzドメイン（例えば、米国特許第6,423,498号を参照されたい）、アンキリンリピートタンパク質（DARPsとしてもまた公知である；Binzら、J. Mol. Biol.、332巻：489頁、2003年；およびBinzら、Nat. Biotec

10

20

30

40

50

hnol.、22巻：575頁、2004年）、フィブロネクチン結合性ドメイン（アドネクチンまたはモノボディーとしてもまた公知である；Richardsら、J. Mol. Biol.、326巻：1475頁、2003年；Parkerら、Protein Eng. Des. Sel.、18巻：435頁、2005年；およびHackelら、J. Mol. Biol.、381巻：1238頁、2008年）、システインノットミニタンパク質（Vitaら、Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA)、92巻：6404頁、1995年；Martinら、Nat. Biotechnol.、21巻：71頁、2002年；およびHuangら、Structure、13巻：755頁、2005年）、テトラトリコペプチドリピートドメイン（Mainら、Structure、11巻：497頁、2003年；およびCortajarenaら、ACS Chem. Biol.、3巻：161頁、2008年）、ロイシンリッチリピートドメイン（Stumppら、J. Mol. Biol.、332巻：471頁、2003年）、アンチカリン（Skerra、FEBS J.、275巻：2677頁、2008年）、リボカリンドメイン（例えば、PCT公開第WO2006/095164号；Bestera、Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA)、96巻：1898頁、1999年；およびSchoenfeldら、Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA)、106巻：8198頁、2009年を参照されたい）、アルマジロリピータンパク質（ArmRP；Varadamsettyら、J. Mol. Biol.、424巻：68頁、2012年）、ダイアボディー（Manzkeら、Int. J. Cancer、82巻：700頁、1999年）、レペボディー（repebody）（Leeら、Proc. Nat'l. Acad. Sci. U. S. A.、109巻：3299頁、2012年）、ミニボディー（Huら、Cancer Res.、56巻：3055頁、1996年）、シクロチド（Craikら、J. Mol. Biol.、294巻：1327頁、1999年）、V様ドメイン（例えば、米国特許出願公開第2007/0065431号を参照されたい）、C型レクチンドメイン（ZelenskyおよびGready、FEBS J.、272巻：6179頁、2005年；Beavilら、Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA)、89巻：753頁、1992年；およびSatoら、Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA)、100巻：7779頁、2003年）、mAb²またはFcab（商標）（例えば、PCT公開第WO2007/098934号；同第WO2006/072620号を参照されたい）、その他（Nordら、Protein Eng.、8巻：601頁、1995年；Nordら、Nat. Biotechnol.、15巻：772頁、1997年；Nordら、Eur. J. Biochem.、268巻：4269頁、2001年；およびBinzら（2005年）、Nat. Biotechnol.、23巻：1257頁、2005年）など、代替的な非抗体足場のループ領域内の、操作された多様なアミノ酸をコードする配列を含む。

【0254】

ある特定の実施形態では、第2の融合タンパク質の結合性ドメインは、単鎖抗体の可変領域、受容体のエクトドメイン、またはリガンドである。さらなる実施形態では、単鎖抗体の可変領域は、ドメイン抗体、sFv、scFv、F(ab')₂、またはFabである。なおさらなる実施形態では、第2の融合タンパク質の結合性ドメインは、多量体化ドメインのアミノ末端側またはカルボキシ末端側にある。

【0255】

ある特定のさらなる態様では、非天然細胞は、結合性ドメインおよび多量体化ドメインを含み、任意選択で、アンカードメイン（例えば、膜貫通ドメイン、GPIシグナル配列）、または閾値下シグナル伝達ドメインを伴うアンカードメインを含む、融合体をコードする核酸分子であって、結合性ドメインが、標的細胞表面に位置する標的に特異的に結合する、核酸分子を含む。さらなる実施形態では、結合性ドメインは、がん（例えば、充実性悪性疾患、血液悪性疾患）、炎症性疾患、自己免疫疾患、または移植片対宿主病と関連する抗原である標的に特異的である。例示的な標的抗原は、 α -葉酸受容体、 $\alpha_v\beta_6$ イ

10

20

30

40

50

ンテグリン、BCMA、B7-H3、B7-H6、CAIX、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD37、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD70、CD123、CD138、CD171、CEA、DLL4、EGP-2、EGP-40、CSPG4、EGFR、Erbb2 (HER2) を含むEGFRファミリー、EGFRvIII、EPCAM、EphA2、EPCAM、FAP、FBP、胎児型アセチルコリン受容体、Fzd7、GD2、GD3、グリピカン3 (GPC3)、h5T4、IL-11R α 、IL13R- α 2、KDR、 κ 軽鎖、 λ 軽鎖、LeY、L1CAM、MAGE-A1、メソテリン、MHC提示ペプチド、MUC1、MUC16、NCAM、NKGD2リガンド、Notch1、Notch2/3、NY-ESO-1、PRAME、PSCA、PSMA、サバイビン、TAG-72、TEM、TERT、VEGFR2、およびROR1を含むがこれらに限定されない。

10

【0256】

ある特定の実施形態では、このような結合性融合タンパク質 (DARIC結合性成分) は、DARICシグナル伝達成分および架橋因子との三部分複合体を形成して、ポリペプチド複合体を形成する。このような複合体のための、例示的な架橋因子は、ラパマイシンもしくはそのラパログ、クーママイシンもしくはその誘導体、ジベレリンもしくはその誘導体、ABAもしくはその誘導体、メトトレキサートもしくはその誘導体、シクロスポリンAもしくはその誘導体、FKCsAもしくはその誘導体、またはTm p-SLFもしくはその誘導体を含む。

【0257】

20

他の実施形態では、本開示は、(a) 第1の多量体化ドメイン、疎水性ドメイン、およびアクチュエータードメインを含む第1の融合タンパク質をコードする第1の異種核酸分子であって、第1の融合タンパク質が発現すると、第1の多量体化ドメインが細胞外に局在化する、第1の異種核酸分子と；(b) 結合性ドメイン、第2の多量体化ドメイン、およびアンカードメイン (例えば、膜貫通ドメイン、GPI分子) を含む第2の融合タンパク質をコードする第2の核酸分子であって、第2の融合タンパク質が、発現すると細胞表面に局在化する、第2の核酸分子とを含む非天然細胞であって、第1の架橋因子が非天然細胞の表面でポリペプチド複合体の形成を促進し、架橋因子が、第1の融合タンパク質の多量体化ドメインおよび第2の融合タンパク質の多量体化ドメインと会合し、これらの間に配置される、非天然細胞を対象とする。ある特定の実施形態では、第2の融合タンパク質は、細胞内に局在化した、閾値下シグナル伝達ドメインをさらに含む。

30

【0258】

本明細書で使用される「閾値下シグナル伝達ドメイン」は、1種または複数の他の閾値下シグナル伝達ドメインの存在下では、十分に頑健なシグナル伝達カスケードを誘導することも活性化させることもできないが、アクチュエータードメインの存在下では、シグナル伝達カスケードを誘導するかもしくは活性化させるか、またはシグナルを定性的に調整することが可能である。例えば、細胞表面に係留された第2の融合タンパク質であって、細胞表面に係留された別の第2の融合タンパク質と会合する融合タンパク質は、シグナル伝達を誘導しないか、シグナル伝達を最小限にしか活性化しない。例示的な閾値下シグナル伝達ドメインは、CD28、CD2、CD4、CD5、CD8、CD9、CD27、CD44、CD46、CD81、CD137、LFA-1、ICAM-1、VLA-4、OX40、4-1BB、LIGHT、SLAM、ICOS、CTLA-4、PD-1などの共刺激ドメインを含む。

40

【0259】

特定の実施形態では、コードされた第1の融合タンパク質は、FRB T2098Lの第1の多量体化ドメイン、膜貫通ドメイン、4-1BBの共刺激ドメイン、およびCD3 ζ のアクチュエータードメインを含み；コードされた第2の融合タンパク質は、CD19に特異的なscFvの結合性ドメイン、およびFKBP12の第2の多量体化ドメインを含み、任意選択で、アンカードメイン (例えば、膜貫通ドメイン、GPIシグナル配列)、または閾値下シグナル伝達ドメインを伴うアンカードメインを含み；非天然細胞の表面

50

でポリペプチド複合体の形成を促進する第1の架橋因子は、ラパログのAP21967である。例示的な、第1の融合タンパク質は、配列番号15に示されるアミノ酸配列を有し、例示的な、第2の融合タンパク質は、配列番号1または56に示されるアミノ酸配列を有する。

【0260】

ある特定の実施形態では、DARIC結合性成分は、複数の結合性ドメインを有しうる。例えば、非天然細胞は、第3の融合タンパク質をコードする第3の核酸分子であって、結合性ドメインおよび第2の多量体化ドメイン、任意選択で、アンカードメイン（例えば、膜貫通ドメイン、GPIシグナル配列）、または閾値下シグナル伝達ドメインを伴うアンカードメインを含み、第3の融合タンパク質が、発現すると細胞外に局在化する、第3の核酸分子をさらに含む。関連の実施形態では、結合性ドメインを含む融合タンパク質は、1つ、2つ、3つ、または4つの結合性ドメインを有し、ここで、1つ、2つ、3つ、または4つの結合性ドメインは、1つの標的または最大で4つの異なる標的に特異的である。

10

【0261】

前述の実施形態のうちのいずれかでは、第2の（結合性）融合タンパク質をコードする第2の核酸分子は、結合性ドメインと第2の多量体化ドメインとの間に配置された、リンカー、スペーサー、または接合部アミノ酸をコードする配列をさらに含む。ある特定の実施形態では、第2の融合タンパク質（例えば、DARIC結合性成分）をコードする第2の核酸分子は、アンカードメイン（例えば、膜貫通ドメイン、GPIシグナル配列）をさらに含み、任意選択で、閾値下シグナル伝達ドメインをさらに含む。さらなる実施形態では、第2の融合タンパク質（例えば、DARIC結合性成分）は、GPIシグナル配列が除去されているか、またはGPIシグナル配列をGPI分子に付着させるように変化させた、GPI分子を含有する。

20

【0262】

過剰な受容体介在性シグナル伝達と関連する、例示的な疾患または障害は、がん（例えば、充実性悪性疾患および血液悪性疾患）、自己免疫疾患もしくは自己免疫状態または炎症性疾患もしくは炎症性状態、細菌感染から生じる敗血症、およびウイルス感染を含む。

【0263】

一態様では、本開示は、T細胞の活性化を方向付けるための方法であって、腫瘍特異的抗原、またはT細胞の活性化が所望される部位または細胞における、選択された他の抗原である、細胞表面標的などの標的に特異的に結合する、有効量のDARIC結合性成分またはその医薬組成物を、それを必要とする被験体に投与するステップを含む方法を提示する。

30

【0264】

医薬技術分野ではまた、治療的使用のための、薬学的に許容される担体も周知であり、例えば、それらの各々が、関連する部分において、参照により本明細書に組み込まれる、the Physicians Desk Reference、62版、Oradell, NJ: Medical Economics Co.、2008年; Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics、11版、McGraw-Hill、2005年; Remington: The Science and Practice of Pharmacy、20版、Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins、2000年; およびThe Merck Index、14版、Whitehouse Station, NJ: Merck Research Laboratories、2006年において記載されている。例示的な、薬学的に許容される担体は、生理学的pHにおける、滅菌食塩液およびリン酸緩衝食塩液を含む。医薬組成物中には、保存剤、安定化剤、色素なども施すことができる。加えてまた、抗酸化剤および懸濁剤も使用することができる。

40

【0265】

50

医薬組成物はまた、緩衝剤などの希釈剤、アスコルビン酸などの抗酸化剤、低分子量（約10残基未満）のポリペプチド、タンパク質、アミノ酸、炭水化物（例えば、グルコース、スクロース、デキストリン）、キレート化剤（例えば、EDTA）、グルタチオン、および他の安定化剤および賦形剤も含有しうる。中性の緩衝食塩液または非特異的血清アルブミンと混合した食塩液は、例示的な希釈剤である。

【0266】

別の態様では、本開示は、悪性疾患（例えば、充実性悪性疾患または血液悪性疾患）の成長、転移、または転移性成長を阻害するための方法であって、それを必要とする被験体に、本明細書で提示されるポリペプチド複合体をコードする有効量の細胞、またはこれらの組成物を投与するステップを含む方法を提示する。

10

【0267】

充実性悪性疾患および血液悪性疾患を含む、多種多様ながんが、本明細書で開示される組成物および方法に適する。処置されうる種類のがんは、乳房、前立腺、膵臓、結腸、および直腸の腺がん；肺の気管支原性癌の全ての形態（有棘細胞癌、腺がん、小細胞肺癌、および非小細胞肺癌を含む）；骨髄性がん；黒色腫；肝がん；神経芽細胞腫；乳頭種；アブドーマ；分離腫；鰓腫；悪性カルチノイド症候群；カルチノイド心疾患；および癌腫（例えば、ウォーカー癌腫、基底細胞癌、基底有棘細胞癌、ブラウニーピアス癌、腺管癌、エールリッヒ腫瘍、クレブス2癌、メルケル細胞癌、粘液性癌腫、非小細胞肺癌、燕麦細胞癌、乳頭癌、硬性癌、細気管支癌、気管支原性癌、有棘細胞癌、および移行上皮癌）を含む。処置されうるさらなる種類のがんは、組織球性障害（histiocytic disorder）；白血病；悪性組織球増殖症（histiocytosis malignant）；ホジキン病；非ホジキンリンパ腫；形質細胞腫；細網内皮症；黒色腫；腎細胞癌；軟骨芽細胞腫；軟骨腫；軟骨肉腫；線維腫；線維肉腫；巨細胞腫；組織球腫；脂肪腫；脂肪肉腫；中皮腫；粘液腫；粘液肉腫；骨腫；骨肉腫；脊索腫；頭蓋咽頭腫；未分化胚細胞腫；過誤腫；間葉腫；中腎腫；筋肉腫；エナメル上皮腫；セメント質腫；歯牙腫；奇形腫；胸腺腫；栄養膜腫瘍（trophoblastic tumor）を含む。

20

【0268】

さらにまた、以下の種類のがん：腺腫；胆管腫；真珠腫；円柱腫（cyclindroma）；嚢胞腺癌；嚢胞腺腫；顆粒膜細胞腫；半陰陽性卵巢腫瘍；肝がん；汗腺腫；膵島細胞腫；レイディッヒ細胞腫；乳頭種；セルトリ細胞腫；卵胞膜細胞腫；平滑筋腫（leiomyoma）；平滑筋肉腫；筋芽細胞腫；筋腫；筋肉腫；横紋筋腫；横紋筋肉腫；上衣腫；神経節細胞腫；神経膠腫；髓芽腫；髓膜腫；神経鞘腫；神経芽細胞腫；神経上皮腫；神経線維腫；神経腫；傍神経節腫；非クロム親和性傍神経節腫；および多形性神経膠芽腫も、処置に適すると想定されている。処置されうる種類のがんはまた、被角血管腫；好酸球増加症随伴性血管類リンパ組織増殖症；硬化性血管腫；血管腫症；グロムス血管腫；血管内皮腫；血管腫；血管周囲細胞腫；血管肉腫；リンパ管腫；リンパ管筋腫症；リンパ管肉腫；松果体腫；癌肉腫；軟骨肉腫；葉状嚢胞肉腫；線維肉腫；血管肉腫；平滑筋肉腫；白血肉腫（leukosarcoma）；脂肪肉腫；リンパ管肉腫；筋肉腫；粘液肉腫；卵巢癌；横紋筋肉腫；肉腫；新生物；神経線維腫症；および子宮頸部異形成も含む。

30

40

【0269】

同様に本明細書で開示される組成物および方法に適する、さらなる例示的ながんは、B細胞リンパ腫（多様な形態のホジキン病、非ホジキンリンパ腫（NHL）、または中枢神経系リンパ腫など）を含む、B細胞がん、白血病（急性リンパ芽球性白血病（ALL）、慢性リンパ球性白血病（CLL）、ヘアリーセル白血病、および慢性骨髄芽球性白血病（chronic myoblastic leukemia）など）、および骨髄腫（多発性骨髄腫など）である。さらなるB細胞がんは、小リンパ球性リンパ腫、B細胞前リンパ球性白血病、リンパ形質細胞性リンパ腫（lymphoplasmacytic lymphoma）、脾辺縁帯リンパ腫、形質細胞性骨髄腫、孤発性骨形質細胞腫、骨外形質細胞腫（extraosseous plasmacytoma）、粘膜関連リンパ組織

50

(MALT) 型節外性辺縁帯B細胞リンパ腫、節性辺縁帯B細胞リンパ腫 (nodal marginal zone B-cell lymphoma)、濾胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、縦隔(胸腺)大細胞型B細胞リンパ腫、血管内大細胞型B細胞リンパ腫、原発性滲出液リンパ腫、パーキットリンパ腫／パーキット白血病、悪性の可能性をもつB細胞増殖、リンパ腫様肉芽腫症、および移植後リンパ増殖性障害を含む。

【0270】

ある特定の実施形態では、充実性悪性疾患の成長または充実性悪性疾患もしくは血液悪性疾患の転移もしくは転移性成長を阻害するのに有用なポリペプチド複合体をコードする細胞は、腫瘍抗原またはがん抗原およびがん細胞の第2の標的抗原に特異的に結合するものを含む。

10

【0271】

別の態様では、本開示は、自己免疫疾患、自己免疫障害、もしくは自己免疫状態、または炎症性疾患、炎症性障害、もしくは炎症性状態を処置するための方法であって、それを必要とする被験体に、本明細書で提示されるポリペプチド複合体をコードする有効量の細胞、またはこれらの組成物を投与するステップを含む方法を提示する。

【0272】

融合タンパク質ならびにそれらの組成物および単位用量形態により処置されうる、例示的な自己免疫疾患、自己免疫障害、もしくは自己免疫状態、または炎症性疾患、炎症性障害、もしくは炎症性状態は、炎症性腸疾患(例えば、クローン病または潰瘍性大腸炎)、糖尿病(例えば、I型糖尿病)、皮膚筋炎、多発性筋炎、悪性貧血、原発性胆汁性肝硬変、急性播種性脳脊髄炎(ADEM)、アジソン病、強直性脊椎炎、抗リン脂質抗体症候群(APS)、自己免疫性肝炎、グッドパスチャー症候群、グレーブズ病、ギラン・バレー症候群(GBS)、橋本病、特発性血小板減少性紫斑病、全身性エリテマトーデス、ループス腎炎、神経精神ループス、多発性硬化症(MS)、重症筋無力症、尋常性天疱瘡、喘息、乾癬性関節炎、関節リウマチ、シェーグレン症候群、側頭動脈炎(「巨細胞性動脈炎」としてもまた公知である)、自己免疫性溶血性貧血、水疱性類天疱瘡、血管炎、セリアック病、慢性閉塞性肺疾患、子宮内膜症、汗腺膿瘍、間質性膀胱炎、斑状強皮症、強皮症、ナルコレプシー、神経性筋強直、白斑、および自己免疫性内耳疾患を含む。

20

【0273】

ある特定の実施形態では、過剰増殖性疾患、炎症性疾患、自己免疫疾患、または移植片対宿主病を処置するための方法は、(a)第1の核酸分子および第2の核酸分子を含む組換え細胞を投与するステップであって、第1の核酸分子が、第1の多量体化ドメイン、疎水性ドメイン、およびアクチュエータードメインを含む第1の融合タンパク質をコードし、第1の融合タンパク質が発現すると、第1の多量体化ドメインが細胞外に局在化し、第2の核酸分子が、結合性ドメインおよび第2の多量体化ドメインを含む第2の融合タンパク質をコードし、第2の融合タンパク質が、発現すると細胞外に局在化する、ステップと；(c)架橋因子を投与するステップであって、架橋因子が組換え細胞の表面でポリペプチド複合体の形成を促進し、架橋因子が、第1の融合タンパク質の多量体化ドメインおよび第2の融合タンパク質の多量体化ドメインと会合し、これらの間に配置される、ステップとを含み；ポリペプチド複合体の結合性ドメインが、過剰増殖性疾患細胞の細胞表面標的に特異的に結合して免疫調節応答を促進し、これにより過剰増殖性疾患を処置する。

30

40

【0274】

特定の実施形態では、過剰増殖性疾患、炎症性疾患、自己免疫疾患、または移植片対宿主病を処置するための方法は、(a)第1の核酸分子および第2の核酸分子を含む1種または複数の組換え細胞を投与するステップであって、第1の核酸分子が、T細胞で発現される受容体に結合する結合剤および第1の多量体化ドメインを含む第1の融合タンパク質をコードし；第2の核酸分子が、過剰増殖性疾患細胞の細胞表面標的に結合する結合剤および第2の多量体化ドメインを含む第2の融合タンパク質をコードする、ステップと；(c)架橋因子を投与するステップであって、架橋因子がポリペプチド複合体、例えば、B

50

i T Eの形成を促進し、架橋因子が、第1の融合タンパク質の多量体化ドメインおよび第2の融合タンパク質の多量体化ドメインと会合し、これらの間に配置される、ステップとを含み；第1の融合タンパク質の結合剤がT細胞の受容体に結合し、第2の融合タンパク質の結合剤が過剰増殖性疾患細胞の細胞表面標的に結合して免疫調節応答を促進し、これにより過剰増殖性疾患を処置する。

【0275】

他の実施形態では、過剰増殖性疾患、炎症性疾患、自己免疫疾患、または移植片対宿主病を処置するための方法は、(a) 第1の多量体化ドメイン、疎水性ドメイン、およびアクチュエータードメインを含む第1の融合タンパク質をコードする第1の核酸分子を含む非天然細胞を投与するステップであって、第1の融合タンパク質が発現すると、第1の多量体化ドメインが細胞外に局在化する、ステップと；(b) 結合性ドメインおよび第2の多量体化ドメインを含み、任意選択で、アンカードメイン（例えば、膜貫通ドメイン、GPIシグナル配列）、または閾値下シグナル伝達ドメインを伴うアンカードメインを含む第2の融合タンパク質を投与するステップと；(c) 架橋因子を投与するステップであって、架橋因子が組換え細胞表面のポリペプチドヘテロ複合体の形成を促進し、架橋因子が、第1の融合タンパク質の多量体化ドメインおよび第2の融合タンパク質の多量体化ドメインと会合し、これらの間に配置される、ステップとを含み；ポリペプチドヘテロ複合体の結合性ドメインが、過剰増殖性疾患細胞の細胞表面標的に特異的に結合して免疫調節応答を促進し、これにより過剰増殖性疾患を処置する。

【0276】

本開示の処置方法では、前述の非天然細胞、融合タンパク質、架橋因子、および他のアクセサリ分子のうちのいずれも使用することができる。ある特定の実施形態では、方法は、T細胞リガンドまたはT細胞受容体をアンタゴナイズまたは遮断する薬剤など、T細胞の活性化の阻害剤をアンタゴナイズまたは遮断する薬剤を投与するステップをさらに含む。ある特定の実施形態では、T細胞の活性化の阻害剤をアンタゴナイズまたは遮断する薬剤は、抗PD1抗体、抗PD-L1抗体、もしくは抗CTLA4抗体、またはこれらの抗原結合性断片、あるいはPD-1を標的とする、操作されたホーミングエンドヌクレアーゼである。さらなる実施形態では、方法は、サイトカインアゴニストを投与するステップをさらに含む。

【0277】

本開示の細胞、融合タンパク質、架橋因子、他のアクセサリ分子、またはこれらの組成物は、経口投与することもでき、局所投与することもでき、経皮投与することもでき、非経口投与することもでき、吸入スプレーにより投与することもでき、腔に投与することもでき、直腸に投与することもでき、頭蓋内注射により投与することもでき、これらの任意の組合せにより投与することもできる。ある特定の実施形態では、融合タンパク質、架橋因子、またはこれらの組成物を、非経口投与する。本明細書で使用される「非経口」という用語は、皮下注射、静脈内注射法、筋内注射法、槽内注射法、または注入法を含む。血管内注射、静脈内注射、動脈内注射、皮内注射、筋内注射、乳房内注射、腹腔内注射、髄腔内注射、眼球後注射、肺内注射、および／または特定の部位における手術による植込みによる投与もまた想定されている。ある特定の実施形態では、融合タンパク質、架橋因子、またはこれらの組成物は、静脈内注射などの注射により投与する。

【0278】

また、架橋因子を伴う組換え細胞、融合タンパク質および架橋因子またはこれらの組成物を伴う組換え細胞の、第2の薬剤と組み合わせた投与も想定される。第2の薬剤は、がん、炎症、自己免疫、および感染など、特定の疾患状態または障害のための標準的処置として当技術分野で許容された薬剤でありうる。想定される、例示的な第2の薬剤は、架橋因子を伴う組換え細胞、融合タンパク質および架橋因子またはこれらの組成物を伴う組換え細胞であって、主要な(primary)タンパク質複合体が結合する標的とは異なる標的に結合する組換え細胞、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、免疫グロブリン由来の融合タンパク質、化学療法剤、電離放射線、ステロイド、NSAID、抗感染剤、

もしくは他の活性剤および補助剤、またはこれらの任意の組合せを含む。

【0279】

本明細書で提示される、架橋因子を伴う組換え細胞、融合タンパク質および架橋因子またはこれらの組成物を伴う組換え細胞と組み合わせて有用な第2の薬剤は、ステロイド、NSAID、mTOR阻害剤（例えば、ラパマイシン（シロリムス）、テムシロリムス、デフォロリムス、エベロリムス、ゾタロリムス、クルクミン、ファルネシルチオサリチル酸）、カルシニューリン阻害剤（例えば、シクロスポリン、タクロリムス）、代謝拮抗剤（例えば、ミコフェノール酸、ミコフェノール酸モフェチル）、ポリクローナル抗体（例えば、抗胸腺細胞グロブリン）、モノクローナル抗体（例えば、ダクリズマブ、バシリキシマブ）、およびCTLA4-Ig融合タンパク質（例えば、アバタセプトまたはベラタセプト）でありうる。

10

【0280】

充実性悪性疾患の成長を阻害するのに有用であるか、充実性悪性疾患の転移もしくは転移性成長を阻害するのに有用であるか、または血液悪性疾患を処置もしくは改善するのに有用である第2の薬剤は、化学療法剤、電離放射線、および他の抗がん薬を含む。さらなる治療剤として想定される化学療法剤の例は、アルキル化剤、例えば、ナイトロジェンマスタード（例えば、メクロレタミン、シクロホスファミド、イホスファミド、メルファラン、およびクロランブシル）；二官能性化学療法剤（例えば、ベンダムスチン）；ニトロソウレア（例えば、カルムスチン（BCNU）、ロムスチン（CCNU）、およびセムスチン（メチルーCCNU））；エチレンイミンおよびメチルーメラミン（例えば、トリエチレンメラミン（TEM: triethylenemelamine）、トリエチレンチオホスホルアミド（チオテパ）、およびヘキサメチルメラミン（HMM、アルトレタミン））；スルホン酸アルキル（例えば、ブスルファン）；およびトリアジン（例えば、ダカルバジン（dacarbazine）（DTIC））；代謝拮抗剤、例えば、葉酸類似体（例えば、メトトレキサート、トリメトトレキサート、およびペメトレキセド（多重標的化葉酸代謝拮抗剤））；ピリミジン類似体（5-フルオロウラシル（5-FU）、フルオロデオキシウリジン、ゲムシタビン、シトシンアラビノシド（AraC、シタラビン）、5-アザシチジン、および2, 2'-ジフルオロデオキシシチジンなど）；およびプリン類似体（例えば、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、アザチオプリン、2'-デオキシコホルマイシン（ペントスタチン）、エリスロヒドロキシニルアデニン（EHNA）、リン酸フルダラビン、2-クロロデオキシシアデノシン（クラドリビン、2-CdA））；カンプトテシン（CPT）、トポテカン、およびイリノテカンなどのI型トポイソメラーゼ阻害剤；天然生成物、例えば、エポドフィロトキシン（例えば、エトポシドおよびテニポシド）；およびビンカアルカロイド（例えば、ビンブラスチン、ビンクリスチン、およびビンORELビン）；アクチノマイシンD、ドキソルビシン、およびブレオマイシンなどの抗腫瘍抗生物質；5-ブロモデオキシウリジン（5-bromodeoxyuridine）、5-ヨードデオキシウリジン、およびブロモデオキシシチジンなどの放射線増感剤；シスプラチン、カルボプラチン、およびオキサリプラチンなどの白金配位錯体；ヒドロキシ尿素などの置換尿素；ならびにN-メチルヒドラジン（MIH）およびプロカルバジンなどのメチルヒドラジン誘導体を含む。

20

30

40

【0281】

自己免疫疾患の処置のための、本開示により想定されるさらなる治療剤は、免疫抑制剤と呼ばれ、処置される個体の免疫系を抑制または遮蔽するように作用する。免疫抑制剤は、例えば、非ステロイド系抗炎症薬（NSAID: non-steroidal anti-inflammatory drug）、鎮痛剤、グルココルチコイド、関節炎の処置のための、疾患修飾抗リウマチ薬（DMARD: disease-modifying antirheumatic drug）、または生物学的応答修飾剤を含む。また、DMARDについての記載中の組成物も、関節リウマチを除く、他の多くの自己免疫疾患の処置に有用である。

【0282】

50

例示的なNSAIDは、イブプロフェン、ナプロキセン、ナプロキセンナトリウム、Cox-2阻害剤（VioxxまたはCelebrexなど）、およびシアリレートを含む。例示的な鎮痛剤は、アセトアミノフェン、オキシコドン、トラマドール、または塩酸プロポキシフェン（propoxyphene）を含む。例示的なグルココルチコイドは、コルチゾン、デキサメタゾン、ヒドロコルチゾン、メチルプレドニゾロン、プレドニゾロン、またはプレドニゾンを含む。例示的な生物学的応答修飾剤は、細胞表面マーカー（例えば、CD4、CD5など）を指向する分子、TNFアンタゴニスト（例えば、エタネルセプト（Enbrel）、アダリムマブ（Humira）、およびインフリキシマブ（Remicade））などのサイトカイン阻害剤、ケモカイン阻害剤、および接着分子阻害剤を含む。生物学的応答修飾剤は、モノクローナル抗体のほか、分子の組換え形態も含む。例示的なDMARDは、アザチオプリン、シクロホスファミド、シクロスポリン、メトトレキサート、ペニシラミン、レフルノミド、スルファサラジン、ヒドロキシクロロキン、金（経口（オーラノフィン）および筋肉）、およびミノサイクリンを含む。

10

【0283】

なおさらなる態様では、本開示は、（a）第1の多量体化ドメイン、疎水性ドメイン、およびアクチュエータードメインを含む、第1の融合タンパク質と；（b）細胞外結合性ドメインおよび第2の多量体化ドメインを含む、第2の融合タンパク質と；（c）架橋因子とを含み、第1の融合タンパク質と、第2の融合タンパク質と、架橋因子とが会合してポリペプチドヘテロ複合体を形成し、架橋因子が、第1の融合タンパク質の多量体化ドメインおよび第2の融合タンパク質の多量体化ドメインと会合し、これらの間に配置される、融合ポリペプチドヘテロ複合体を提示する。これらの実施形態では、前述の融合タンパク質成分および架橋因子のうちのいずれも使用することができる。

20

【0284】

他の態様では、本開示は、前述の融合タンパク質のうちの任意の1種または複数をコードする核酸分子を提示する。このような核酸分子は、第1の融合タンパク質および第2の融合タンパク質を、ポリシストロニックのメッセージまたは2Aペプチドで隔てられた単一のタンパク質としてコードする発現ベクター（例えば、レンチウイルスベクター）に組み込むことができる。ある特定の実施形態では、ポリシストロニックのメッセージは、融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列の間に、内部リボソーム侵入部位（IRES）を含む。

30

【0285】

DARIC結合性成分およびDARICシグナル伝達成分の例示的な例を、配列番号1～75および下記の表1に提示する。

【0286】

【表 1 - 1】

表1.例示的なDARIC結合性成分およびDARICシグナル伝達成分

配列番号	構築物	配列
1	scFvCD19-FKBPタンパク質	MGSDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPD GTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYF CQQGNTLPYTFGGGKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQE SGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGV IWGSETTYYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDITAIIYY CAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVTVSSASGGGGSGVQVETISP GDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLEDGKKFDSSRDNRNPKFKFMLG KQEVIRGWEEGVAQMSVGRQAKLTISPDYAYGATGHPGHIIPPH ATLVFDVELLKLEG
2	SS-scFvCD19-FKBP mRNA	AUGCCCCUGGGCCUGCUGUGGCUGGGCCUGGCCUGCUGGG CGCCCUGCACGCCAGGCCGGAUCCGAUAUCCAGAUAGACCC AGACCACCAGCAGCCUGAGCGCCAGCCUGGGCGAUAGAGU GACCAUCAGCUGCAGAGCCAGCCAGGACAUACAGCAAGUACC UGAACUGGUAUCAGCAGAAACCCGACGGCACCCUGAAGCU GCUGAUCUACCACACCAGCAGACUGCACAGCGGCGUGCCCA GCAGAUUUUCUGGCAGCGGCUCGCGCACCGACUACAGCCUG ACCAUCUCCAACCUGGAACAGGAAGAUUAUCGCUACCUACU UCUGUCAGCAAGGCAACACCCUGCCCUACACCUUCGGCGGA GGCACCAAGCUGGAAAUCACCGGCAGCACAAGCGGCAGCG GCAAGCCUGGAUCUGGCGAGGGAAGCACCAAGGGCGAAGU GAAACUGCAGGAAAGCGGCCUGGACUGGUGGCCCAAGC CAGUCUCUGAGCGUGACCUGUACCGUGUCCGGCGUGUCCCU GCCUGACUAUGGCGUGUCCUGGAUCAGACAGCCCCCAGAA AGGGCCUGGAAUGGCUGGGAGUGAUCUGGGGCAGCGAGAC AACCUACUACAACAGCGCCUGAAGUCCCGGCUGACCAUCA UCAAGGACAACUCCAAGAGCCAGGUGUCCUGAAGAUGAA CAGCCUGCAGACCGACGACACCGCCAUCUACUACUGCGCCA AGCACUACUACUACGCGCGCAGCUACGCCAUGGACUACUG GGGCCAGGGCACAAGCGUGACCGUGUCCAGCGCUAGCGGC GGAGGUGGGAGCGGAGUGCAGGUGGAAACCAUCUCCCCAG GAGACGGGCGCACCUUCCCCAAGCGCGGCCAGCUGCGUG GUGCACUACACCGGGAUGCUUGAAGAUGGAAAGAAUUAUG AUUCCUCCCGGACAGAAACAAGCCUUAAGUUAUGCU AGGCAAGCAGGAGGUGAUCGAGGCUGGGAAGAAGGGGUU GCCCAGAUGAGUGUGGUCAGAGAGCCAAACUGACUUAU CUCCAGAUUAUGCCUAUGGUGCCACUGGGCACCCAGGCAUC AUCCCACCACAUGCCACUCUCGUCUUCGAUGUGGAGCUUCU AAAACUGGAAGGCUGA
3	SS-scFvCD19-FKBP DNA	ATGCCCCCTGGGCTGCTGTGGCTGGGCTGGCCCTGCTGGGC GCCCTGCACGCCAGGCCGATCCGATATCCAGATGACCCAG ACCACCAGCAGCCTGAGCGCCAGCCTGGGCGATAGAGTGAC CATCAGCTGCAGAGCCAGCCAGGACATCAGCAAGTACCTGA ACTGGTATCAGCAGAAACCCGACGGCACCGTGAAGCTGCTG ATCTACCACACCAGCAGACTGCACAGCGGCGTGGCCAGCAG ATTTCTGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTACAGCCTGACCAT CTCCAACCTGGAACAGGAAGATATCGCTACCTACTTCTGTCA GCAAGGCAACACCTGCCCTACACCTTCGGCGGAGGCACCA AGCTGGAAATCACCGGCAGCACAAGCGGCAGCGGCAAGCCT GGATCTGGCGAGGGAAGCACCAAGGGCGAAGTGAACTGCA GGAAAGCGGCCCTGGACTGGTGGCCCCAAGCCAGTCTCTGA GCGTGACCTGTACCGTGTCCGGCGTGTCCCTGCCTGACTATG GCGTGTCTGGATCAGACAGCCCCCAGAAAGGCGCTGGAA TGGCTGGGAGTGATCTGGGGCAGCGAGACAACCTACTACAA CAGCGCCCTGAAGTCCCGGCTGACCATCATCAAGGACAACCTC CAAGAGCCAGGTGTTCTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCG ACGACACCGCCATCTACTACTGCGCCAAGCACTACTACTACG GCGGCAGCTACGCCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACAAGC

10

20

30

40

【表 1 - 2】

配列番号	構築物	配列
		GTGACCGTGTCCAGCGCTAGCGGCGGAGGTGGGAGCGGAGT GCAGGTGGAAACCATCTCCCCAGGAGACGGGCGCACCTTCC CCAAGCGCGGCCAGACCTGCGTGGTGCACTACACCGGGATG CTTGAAGATGGAAAGAAATTTGATTCTCCCGGGACAGAAA CAAGCCCTTTAAGTTTATGCTAGGCAAGCAGGAGGTGATCCG AGGCTGGGAAGAAGGGGTTGCCAGATGAGTGTGGGTGAGA GAGCCAAACTGACTATATCTCCAGATTATGCCTATGGTGCCA CTGGGCACCCAGGCATCATCCACCACATGCCACTCTCGTCT TCGATGTGGAGCTTCTAAACTGGAAGGCTGA
4	scFvCD19-FKBP(F36V)タンパク質	MGSDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYNWYQQKPD GTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYF CQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQE SGPGLVAPSQLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLG IWGSETTYYNALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDITAIYY CAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVTVSSASGGGSGVQVETISP GDGRITFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKVDSSDRNKPFFKMLG KQEVIRGWEEGVAQMSVGVQRAKLTIPTDYAYGATGHPGIIPPH ATLVFDVELLKLEG
5	SS-scFvCD19-FKBP(F36V) mRNA	AUGCCCCUGGGCCUGCUGUGGCUGGGCCUGGCCUGCUGGG CGCCUGCAGCGCCAGGCCGGAUCCGAUAUCCAGAUAGACC AGACCACCAGCAGCCUGAGCGCCAGCCUGGGCGAUAGAGU GACCAUCAGCUGCAGAGCCAGCCAGGACAUCAGCAAGUACC UGAACUGGUAUCAGCAGAAACCCGACGGCACCGUGAAGCU GCUGAUCUACCACACCAGCAGACUGCACAGCGGCGUGCCCA GCAGAUUUUCUGGCAGCGGCUCCGGCACCGCAUACAGCU ACCAUCCCAACCUGGAACAGGAAGAUUCGCUACCUACU UCUGUCAGCAAGGCAACACCCUGCCCUACACCUUCGGCGGA GGCACCAAGCUGGAAAUCACCGGCAGCACAAGCGGCAGCG GCAAGCCUGGAUCUGGCGAGGGAAGCACCAGGGCGAAGU GAAACUGCAGGAAAGCGGCCUGGACUGGUGGCCCAAGC CAGUCUCUGAGCGUGACCUGUACCGUGUCCGGCGUGUCCU GCCUGACUAUGGCGUGUCCUGGAUCAGACAGCCCCCAGAA AGGGCCUGGAAUGGCUGGGAGUGAUCUGGGGACGCGAGAC AACCUACUACAACAGCGCCUGAAGUCCCGGCGUACCAUCA UCAAGGACAACUCCAAGAGCCAGGUGUCCUGAAGAUGAA CAGCCUGCAGACCGACGACACCGCCAUCUACUACUGCGCCA AGCACUACUACUACGGCGGCAGCUACGCCAUGGACUACUG GGGCCAGGGCACAAAGCGUGACCGUGUCCAGCGCUAGCGGC GGAGGUGGGAGCGGAGUGCAGGUGGAAACCAUCUCCCGAG GAGACGGGCGCACCUUCCCCAAGCGCGGCCAGCGGUG GUGCACUACACCGGGAUGCUUGAAGAUGGAAAGAAAGUUG AUUCCUCCCGGGACAGAAACAAGCCCUUUAAGUUUAUGCU AGGCAAGCAGGAGGUGAUCGAGGCUGGGAAGAAGGGGUU GCCCAGAUAGUGUGGUGCAGAGAGCCAAACUGACUUAU CUCCAGAUUAUGCCUAUGGUGCCACUGGGCACCCAGGCAUC AUCCACCAUAGCCACUCUGUCUUCGAUGUGGAGCUUCU AAAACUGGAAGGCUGA
6	SS-scFvCD19-FKBP(F36V) DNA	ATGCCCCTGGGCTGTGTGGCTGGGCTGGCCCTGCTGGGC GCCCTGCACGCCCAGGCCGATCCGATATCCAGATGACCCAG ACCACCAGCAGCCTGAGCGCCAGCCTGGGCGATAGAGTGAC CATCAGCTGCAGAGCCAGCCAGGACATCAGCAAGTACCTGA ACTGGTATCAGCAGAAACCCGACGGCACCGTGAAGCTGCTG ATCTACCACACCAGCAGACTGCACAGCGGCGTGCCAGCAG ATTTTCTGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTACAGCTGACCAT CTCCAACCTGGAACAGGAAGATATCGCTACCTACTTCTGTCA GCAAGGCAACACCCTGCCCTACACCTTCGGCGGAGGCACCA AGCTGGAAATCACCGGCAGCACAAGCGGCAGCGGCAAGCCT GGATCTGGCGAGGGAAGCACCAGGGCGAAGTGAAACTGCA GGAAAGCGGCCCTGGACTGGTGGCCCCAAGCCAGTCTCTGA GCGTGACCTGTACCGTGTCCGGCGTGTCCCTGCCTGACTATG GCGTGTCTTGATCAGACAGCCCCCAGAAAGGCCCTGGAA TGGCTGGGAGTGATCTGGGGCAGCGAGACAACCTACTACAA CAGCGCCCTGAAGTCCCGGCTGACCATCATCAAGGACAACCTC

10

20

30

40

【表 1 - 3】

配列番号	構築物	配列
		CAAGAGCCAGGTGTTCTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCG ACGACACCGCCATCTACTACTGCGCCAAGCACTACTACTACG GCGGCAGCTACGCCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACAAAGC GTGACCGTGTCCAGCGCTAGCGGCGGAGGTGGGAGCGGAGT GCAGGTGGAAACCATCTCCCCAGGAGACGGGCGCACCTTCC CCAAGCGCGGCCAGACCTGCGTGGTGCCTACACCGGGATG CTTGAAGATGGAAAGAAAGTTGATTCTCCCGGGACAGAAA CAAGCCCTTTAAGTTTATGCTAGGCAAGCAGGAGGTGATCCG AGGCTGGGAAGAAGGGGTGCCCAGATGAGTGTGGGTGAGA GAGCCAACTGACTATATCTCCAGATTATGCCTATGGTGCCA CTGGGCACCCAGGCATCATCCACCACATGCCACTCTCGTCT TCGATGTGGAGCTTCTAAACTGGAAGGCTGA
7	scFvCD19-FRB(T209 8L)タンパク質	MGSDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYNWYQKPD GTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYF CQQGNTLPYTFGGGTGLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQE SGPGLVAPSQLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGV IWGSETTYNSALKSRLLTIKDNSKSQVFLKMNSLQDDTAIYY CAKHYYGGSYAMDYWGQTSVTVSSASGGGGSILWHEMWH EGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFN QAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRRI KG
8	SS-scFvCD19-FRB(T2 098L) mRNA	AUGCCCCUGGGCCUGCUGUGGGCUGGGCCUGGGCCUGCUGGG CGCCUGCAGCGCCAGGCCGGAUCCGAUAUCCAGAUGACCC AGACCACAGCAGCCUGAGCGCCAGCCUGGGCGAUAGAGU GACCAUCAGCUGCAGAGCCAGCCAGGACAUCAGCAAGUACC UGAACUGGUAUCAGCAGAAACCCGACGGCACCGUGAAGCU GCUGAUCUACCACACCAGCAGACUGCACAGCGGCGUGCCCA GCAGAUUUUCUGGCAGCGGCUCGCGCACCGACUACAGCCUG ACCAUCUCCAACCUGGAACAGGAAGAUUUCGUACCUACU UCUGUCAGCAAGGCAACACCCUGCCCUACACCUUCGGCGGA GGCACCAAGCUGGAAAUCACCGGCAGCACAAAGCGGCAGCG GCAAGCCUGGAUCUGGCGAGGGAAGCACCAAGGGCGAAGU GAAACUGCAGGAAAGCGGCCUGGACUGGUGGCCCCAACG CAGUCUCUGAGCGUGACCUGUACCGUGUCCGGCGUGUCCCU GCCUGACUAUGGCGUGUCCUGGAUCAGACAGCCCCCAGAA AGGGCCUGGAAUGGCUGGGAGUGAUCUGGGGCGAGCGAGAC AACCUACUACAACAGCGCCUGAAGUCCCGGCUGACCAUCA UCAAGGACAACUCCAAGAGCCAGGUGUCCUGAAGAUGAA CAGCCUGCAGACCGACGACACCGCCAUCUACUACUGCGCCA AGCACUACUACUACGGCGGCAGCUACGCCAUGGACUACUG GGGCCAGGGCACAAAGCGUGACCGUGUCCAGCGCUAGCGGC GGAGGUGGGAGCAUCCUCUGGCAUGAGAUGUGGCAUGAAG GCCUGGAAGAGGCAUCUCGUUUGUACUUUGGGGAAAGGAA CGUGAAAGGCAUGUUUGAGGUGCUGGAGCCCUUGCAUGCU AUGAUGGAACGGGGCCCCCAGACUCUGAAGGAAACAUCCU UUAUACAGGCCUAUGGUCGAGAUUUAAUGGAGGCCCAAGA GUGGUGCAGGAAGUACAUGAAUACAGGGAUUGUCAAGGAC CUCCUCCAAGCCUGGGACCUCUAUUAUCAUGUGUCCGACG AAUCUCAAGGGCUGA
9	SS-scFvCD19-FRB(T2 098L) DNA	ATGCCCCTGGGCCTGCTGTGGCTGGGCCTGGCCCTGCTGGGC GCCCTGCACGCCAGGCCGATCCGATATCCAGATGACCCAG ACCACCAGCAGCCTGAGCGCCAGCCTGGGCGATAGAGTGAC CATCAGCTGCAGAGCCAGCCAGGACATCAGCAAGTACCTGA ACTGGTATCAGCAGAAACCCGACGGCACCGTGAAGCTGCTG ATCTACCACACCAGCAGACTGCACAGCGCGTGCACAGCAG ATTTTCTGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTACAGCCTGACCAT CTCCAACCTGGAACAGGAAGATATCGCTACCTACTTCTGTCA GCAAGGCAACACCCTGCCCTACACCTTCGGCGGAGGCACCA AGCTGGAATACACCGGCAGCACAAAGCGGCAGCGGCAAGCCT GGATCTGGCGAGGGAAGCACCAAGGGCGAAGTGAACTGCA GGAAAGCGGCCCTGGACTGGTGGCCCCAAGCCAGTCTCTGA GCGTGACCTGTACCGTGTCCGGCGTGTCCCTGCCTGACTATG GCGTGTCTGGATCAGACAGCCCCCAGAAAGGGCCTGGAA

【表 1 - 4】

配列番号	構築物	配列
		TGGCTGGGAGTGATCTGGGGCAGCGAGACAACCTACTACAA CAGCGCCCTGAAGTCCCGGCTGACCATCATCAAGGACAACCT CAAGAGCCAGGTGTTCTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCG ACGACACCGCCATCTACTACTGCGCCAAGCACTACTACTACG GCGGCAGCTACGCCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACAAGC GTGACCGTGTCAGCGCTAGCGGCGGAGGTGGGAGCATCCT CTGGCATGAGATGTGGCATGAAGGCCTGGAAGAGGCATCTC GTTTGTACTTTGGGGAAAGGAACGTGAAAGGCATGTTTGAGG TGCTGGAGCCCTTGCTATGCTATGATGGAACGGGGCCCCCAGA CTCTGAAGGAAACATCCTTTAATCAGGCCTATGGTCGAGATT TAATGGAGGCCCAAGAGTGGTGCAGGAAGTACATGAAATCA GGGAATGTCAAGGACCTCCTCCAAGCCTGGGACCTCTATTAT CATGTGTTCCGACGAATCTCAAAGGGCTGA
13	scFvCD19-TM-41BB- CD3z-BFP mRNA	AUGGCUCUGCCUGUGACAGCUCUGCUGGCCUCUGGCCCU GCUGCUCCAUGCCGCCAGACCCGGAUCCGAUAUCCAGAUAGA CCCAGACCACCAGCAGCCUGAGCGCCAGCCUGGGCGAUAGA GUGACCAUCAGCUGCAGAGCCAGCCAGGACAUCAGCAAGU ACCUGAACUGGUUUCAGCAGAAACCCGACGGCAGCGUGAA GCUGCUGAUCUACCACACCAGCAGACUGCACAGCGGCGUGC CCAGCAGAUUUUCUGGCAGCGGCUCCGGCACCGACUACAGC CUGACCAUCUCCAACCUGGAACAGGAAGAUUUCGUACCU ACUUCUGUCAGCAAGGCAACACCCUGCCCUACACCUUCGGC GGAGGCACCAAGCUGGAAAUCACCGGCAGCACAAGCGGCA GCGGCAAGCCUGGAUCUGGCGAGGGGAAGCACCAAGGGCGA AGUGAAACUGCAGGAAAGCGGCCCUGGACUGGUGGCCCA AGCCAGUCUCUGAGCGUGACCUGUACCGUGUCCGGCGUGU CCCUGCCUGACUAUGGCGUGUCCUGGAUCAGACAGCCACCC AGAAAGGGCCUGGAAUGGCUGGGAGUGAUCUGGGGCAGCG AGACAACCUACUACAACAGCGCCUGAAGUCCCGGCUGACC AUCAUCAAGGACAACUCCAAGAGCCAGGUGUCCUGAAGA UGAACAGCCUGCAGACCGACGACACCGCCAUCUACUACUGC GCCAAGCACUACUACUACGCGCGCAGCUACGCCAUGGACUA CUGGGGCCAGGGCACAAGCGUG-ACCGUGUCCAGCGCAGC GCCAAGCCUACCACACCCCUGCCCUAGACCUCCAACACC CGCCCCAACAAUCGCCAGCCAGCCUCUGUCUCUGAGGCCCG AGGCUUGUAGACCAGCUGCUGGCGGAGCCGUGCACACCAG AGGACUGGAUUUCGCCUGCGACAUCUACAUCUGGGCCCCUC UGGCCGGCACAUUGGGCGUGCUGCUGCUGAGCCUCGUGAU CACCAUGCAUAAACGGGGCAGAAAGAAACUCCUGUAUAUA UUCAACAACCAUUUAUGAGACCAGUACAACAUCACUAAG AGGAAGAUGGCUGUAGCUGCCGAUUUCCAGAAGAAGAAGA AGGAGGAUGUGAACUGCGGGUGAAGUUCAGCAGAAGCGCC GACGCCCCUGCCUACCAGCAGGGCCAGAAUCAGCUGUACAA CGAGCUGAACCUGGGCAGAAGGGAAGAGUACGACGUCCUG GAUAAGCGGAGAGGCCGGGACCCUGAGAUGGGCGGCAAGC CUCGGCGGAAGAACCCCCAGGAAGGCCUGUAUAACGAACU GCAGAAAGACAAGAUUGGCCGAGGCCUACAGCGAGAUCCGC AUGAAGGGCGAGCGGAGGCGGGCAAGGGCCACGACGGCC UGUUACAGGGCCUGUCCACCGCCACCAAGGAUACCUACGAC GCCCUGCACAUGCAGGCCUGCCCCCAAGGGGCGGGCCGUC CGGUGAGGGCAGAGGAAGUCUUCUAACAUGCGGUGACGUG GAGGAGAAUCCGGGCCCCUCUAGAAGCGAGCUGAUUAAGG AGAACAUGCACAUGAAGCUGUACAUGGAGGGCACCUGUGA CAACCAUCACUUAAGUGCACAUCGAGGGCGAAGGCAAG CCCUACGAGGGCACCCAGACCAUGAGAAUCAAGGUGGUCG AGGGCGGGCCUCUCCCCUUCGCCUUCGACAUCUGGCUACU AGCUUCCUCUACGGCAGCAAGACCUUCAUCAACCACACCCA GGGCAUCCCCGACUUCUUAAGCAGUCCUCCUGAGGGCU UCACAUUGGGAGAGAGUCACCACAUACGAAGACGGGGGCGU GCUGACCGCUACCCAGGACACCAGCCUCCAGGACGGCUGCC UCAUCUACAACGUAAGAUCAGAGGGGUGAACUUCACAU CAACGGCCCUGUGAUGCAGAAAGAAAACUCGCGUGGGAG GCCUUCACCGAGACGCUGUACCCCGCUGACGGCGGCCUGGA

10

20

30

40

【表 1 - 5】

配列番号	構築物	配列
		AGGCAGAAACGACAUGGCCUGAAGCUCGUGGGCGGGAGC CAUCUGAUCGCAAAACAUCAAGACCACAUUAUAGAUGCAAGA AACCCGCUAAGAACCUCACAGAUAGCCUGGCGUCUACUAUGU GGACUACAGACUGGAAAGAAUCAAGGAGGCCAACACGAG ACCUACGUCGAGCAGCACGAGGUGGCAGUGGCCAGAUACU GCGACCUCUCCUAGCAAACUGGGGACACAAGCUAAUUGA
15	FRB (T2098L)-TM-4 1BB-CD3zタンパク 質	MGSILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMME RGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQA WDLYYHVFRISKASAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEAC RPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAFLAGTCGVLLLSLVITMHKR GRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRFPEEEEGGCELRVKF SRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHG LYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRG
16	SS-FRB (T2098L)-T M-41BB-CD3z mRN A	AUGGCUCUGCCUGUGACAGCUCUGCUGGCCUCUGGCCCU GCUGCUCCAUGCCGCCAGACCCGGAUCCAUCUCUGGCAUG AGAUGUGGCAUGAAGGCCUGGAAGAGGCAUCUCGUUUGUA CUUUGGGGAAAGGAACGUGAAAGGCAUGUUUGAGUGCUG GAGCCCUUGCAUGCUAUGAUGGAACGGGGCCCCCAGACUC UGAAGGAAACAUCUUAUUAUCAGGCCUAUGGUCGAGAUUU AAUGGAGGCCCAAGAGUGGUGCAGGAAGUACAUGAAAUCA GGGAAUGUCAAGGACCUCUCCAAGCCUGGGACCUCUAUU AUC AUGUGUUCGACGAAUCUCAAAAGGCUAGCGCCAAGCC UACCACCACCCUGCCCCUAGACCUC AACACCCGCCCCAA CAAUCGCCAGCCAGCCUCUGUCUGAGGCCCCGAGGCUUGU AGACCAGCUGCUGGCGGAGCCGUGCACACCAGAGACUGG AUUUCGCCUGCGACAUCUACAUCUGGGCCCCUCUGGCCGGC ACAUGUGGCGUGCUGCUGCUGAGCCUCUGAUCACCAUGC AUAACGGGGCAGAAAGAAACUCCUGUAUAUAUCAAACA ACCAUUUAUGAGACCAGUACAAACUACUAAGAGGAAGAU GGCUGUAGCUGCCGAUUUCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGAU GUGAACUGCGGGUGAAGUUCAGCAGAAGCGCCGACGCCCC UGCCUACCAGCAGGGCCAGAAUCAGCUGUACAACGAGCUG AACCUGGGCAGAAGGGAAGAGUACGACGUCCUGGAUAAGC GGAGAGGCCGGGACCCUGAGAUUGGGCGGCAAGCCUCGGCG GAAGAACCCCCAGGAAGGCCUGUAUAACGAACUGCAGAAA GACAAGAUGGCCGAGGCCUACAGCGAGAUCCGGCAUGAAGG GCGAGCGGAGGCGGGCAAGGGCCACGACGGCCUGUAUCA GGGCCUGUCCACCGCCACCAAGGAUACCUACGACGCCUCG ACAUGCAGGCCUGCCCCCAAGGGGC
17	SS-FRB (T2098L)-T M-41BB-CD3z DNA	ATGGCTCTGCCTGTGACAGCTCTGCTGCTGCCTCTGGCCCTGC TGCTCCATGCCGCCAGACCCGGATCCATCCTCTGGCATGAGA TGTGGCATGAAGGCCTGGAAGAGGCATCTCGTTTGTACTTTG GGGAAAGGAACGTGAAAGGCATGTTTGAGGTGCTGGAGCCC TTGCATGCTATGATGGAACGGGGCCCCCAGACTCTGAAGGA AACATCCTTTAATCAGGCCTATGGTCGAGATTTAATGGAGGC CCAAGAGTGGTGCAGGAAGTACATGAAATCAGGGAATGTCA AGGACCTCCTCCAAGCCTGGGACCTCTATTATCATGTGTTCC GACGAATCTCAAAGGCTAGCGCCAAGCCTACCACCACCCCTG CCCCTAGACCTCCAACACCCGCCCAACAATCGCCAGCCAGC CTCTGTCTCTGAGGCCCGAGGCTTG TAGACCAGCTGCTGGCG GAGCCGTGCACACCAGAGGACTGGATTTGCGCTGCGACATCT ACATCTGGGCCCCCTCTGGCCGGCACATGTGGCGTGCTGCTGC TGAGCCTCGTGATCACCATGCATAAACGGGGCAGAAAGAAA CTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAAGTACAA ACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAA GAAGAAGAAGGAGGATGTGAAGTGCAGGGAAGTTCAGCAG AAGCGCCGACGCCCCCTGCCTACCAGCAGGGCCAGAAATCAGC TGTACAACGAGCTGAACCTGGGCAGAAAGGGAAGAGTACGAC GTCCTGGATAAGCGGAGAGGCCGGGACCCTGAGATGGGCGG CAAGCCTCGGCGGAAGAACCCCAAGGAAGGCCTGTATAACG AACTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCTACAGGATGATC GGCATGAAGGGCGAGCGGAGGCGGGGCAAGGGCCACGACG

10

20

30

40

【表 1 - 6】

配列番号	構築物	配列
18	SS-FRB(T2098L)-ス ペーサー-TM-41BB- CD3z DNA	GCCTGTATCAGGGCCTGTCCACCGCCACCAAGGATACCTACG ACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCCCAAGGGGC ATGGCTCTGCCTGTGACAGCTCTGCTGCTGCCTCTGGCCCTGC TGCTCCATGCCGCCAGACCCGGATCCATCCTCTGGCATGAGA TGTGGCATGAAGGCCTGGAAGAGGCATCTCGTTTGTACTTTG GGGAAAGGAACGTGAAAGGCATGTTTGAGGTGCTGGAGCCC TTGCATGCTATGATGGAACGGGGCCCCCAGACTCTGAAGGA AACATCCTTTAATCAGGCCTATGGTCGAGATTTAATGGAGGC CCAAGAGTGGTGCAGGAAGTACATGAAATCAGGGAATGTCA AGGACCTCCTCCAAGCCTGGGACCTCTATTATCATGTGTTCC GACGAATCTCAAAGGCTAGCGAGAGCAAGTACGAGACCGCCC TGCCACCTTGCCCTGCCCCGAGTTCCTGGGCGGACCCAGC GTGTTCTGTTCACCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATC AGCCGGACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAG CCAGGAAGATCCCGAGGTCCAGTTCATTGGTACGTGGACG GCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAA CAGTTCAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCTGTGCTGACCGTG CTGCACCAAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATCAAGTGCAA GGTGTCCAACAAGGGCCTGCCAGCAGCATCGAAAAGACCA TCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGCGAGCCCCAGGTGTAC ACCCTGCCTCCCTCCCAGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGT GTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACAT CGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCTGAGAACAACT ACAAGACCACCCCTCCCGTGTGGACAGCGACGGCAGCTTCT TCCTGTACAGCCGGCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAG GAAGGCAACGTCTTTAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTG CACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCTGGGC AAGATGCATAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATT CAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGG AAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGA GGATGTGAAGTGCAGGGTGAAGTTCAGCAGAAGCGCCGACGC CCCTGCCTACCAGCAGGGCCAGAATCAGCTGTACAACAGCT GAACCTGGGCAGAAAGGAAGAGTACGACGTCTGGATAAGC GGAGAGGCCGGGACCCTGAGATGGGCGGCAAGCCTCGGCGG AAGAACCCCCAGGAAGGCCTGTATAACGAAGTGCAGAAAGA CAAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCG AGCGGAGGCGGGGCAAGGGCCACGACGGCCTGTATCAGGGC CTGTCCACCGCCACCAAGGATACCTACGACGCCCTGCACATG CAGGCCCTGCCCCAAGGGGC
19	FKBP(F36V)-TM-41B B-CD3zタンパク質	MGSQVQVETISPGDGRTPKRGQTCVHVTGMLEDGKKVDSR DRNKPFFKFMGLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTI SPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLEASAKPTT PAPRPPTPAPTIA SQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLD FACDIYIWAPLAGTCGVLL LSLVITMHKRGRKKLLY IFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRFPEEE EGGCELRV KFSSADAPAYQQGQNLNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAY SEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQAL PPRG
20	SS-FKBP(F36V)-TM- 41BB-CD3z mRNA	AUGGCUCUGCCUGUGACAGCUCUGCUGCUGGCCUGG CCCCUGCUGCUCAUGCCGCCAGACCCGGAUCCGGAG UGCAGGUGGAAACCAUCUCCCAGGAGACGGGCGCAC CUUCCCCAAGCGCGGCCAGACCUGCGUGGUGCACU ACACCGGGAUGCUUGAAGAUGGAAAGAAAGUUGAU UCCUCCCGGGACAGAAACAAGCCCUUUAAGUUUA UGCUAGGCAAGCAGGAGGUGAUCCGAGGCUGGGA AGAAGGGGUUGCCAGAUAGUGUGUGUCAGAGAG CCAAACUGACUAUAUCCAGAUUAUGCCUAUGGUG CCACUGGGCACCCAGGCAUCAUCCACCACAUGCCAC UCUCUCUGAUGUGGAGCUUCUAAAACUGGAAGCUA GCGCCAAGCCUACCACCACCCUGCCCCUAGACCUC CAACACCCGCCCAAUCGCCAGCCAGCCUCUGUCUG AGAGGCCGAGGCUUGUAGACCAGCUGCUGGCGGAG CCGUGCACACCAGAGGACUGGAUUUCGCCUGCGAC AUCUACAUCUGGGCCCCUCUGCCCGGACAUGUGG CGUGCUGAGCCUCUGAUCACCAUAAAACUGGUAU AUUAUCAAACA

【表 1 - 7】

配列番号	構築物	配列
		ACCAUUUAUGAGACCAGUACAAACUACUCAAGAGGAAGAU GGCUGUAGCUGCCGAUUUCCAGAAGAAGAAGAGGAGGAU GUGAACUGCGGGUGAAGUUCAGCAGAAGCGCCGACGCCCC UGCCUACCAGCAGGGCCAGAAUCAGCUGUACAACGAGCUG AACCUGGGCAGAAGGGAAGAGUACGACGUCCUGGAUAAGC GGAGAGGCCGGGACCCUGAGAUGGGCGGCAAGCCUCGGCG GAAGAACCCCCAGGAAGGCCUGUAUAACGAACUGCAGAAA GACAAGAUUGCCGAGGCCUACAGCGAGAUCGGCAUGAAGG GCGAGCGGAGGCGGGCAAGGGCCACGACGGCCUGUAUCA GGCCUGUCCACCGCCACCAAGGAUACCUACGACGCCUGC ACAUGCAGGCCUGCCCCCAAGGGGC
21	SS-FKBP(F36V)-TM-41BB-CD3z DNA	ATGGCTCTGCCTGTGACAGCTCTGCTGCTGCCTCTGGCCCTGC TGCTCCATGCCGCCAGACCCGGATCCGGAGTGCAGGTGGAA ACCATCTCCCCAGGAGACGGGCGCACCTTCCCCAAGCGCGGC CAGACCTGCGTGGTGCCTACACCGGGATGCTTGAAGATGG AAAGAAAGTTGATTCTCCCGGGACAGAAACAAGCCCTTTA AGTTTATGCTAGGCAAGCAGGAGGTGATCCGAGGCTGGGAA GAAGGGGTTGCCAGATGAGTGTGGGTGAGAGGCCAAACT GACTATATCTCCAGATTATGCCTATGGTGCCACTGGGCACCC AGGCATCATCCCACCACATGCCACTCTCGTCTTCGATGTGGA GCTTCTAAACTGGAAGCTAGCGCCAAGCCTACCACCACCCC TGCCCCCTAGACCTCCAACACCCGCCCAACAATCGCCAGCCA GCCTCTGTCTCTGAGGCCCGAGGCTTGTAGACCAGCTGCTGG CGGAGCCGTGCACACCAGAGGACTGGATTTCGCTCGGACAT CTACATCTGGGCCCCCTCTGGCCGGCACATGTGGCTGCTGCT GCTGAGCCTCGTGATCACCATGCATAAACGGGGCAGAAAGA AACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTAC AACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAG AAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAAGTGCGGGTGAAGTTCAGC AGAAGCGCCGACGCCCCCTGCCTACCAGCAGGGCCAGAATCA GCTGTACAACGAGCTGAACCTGGGCAGAAAGGAAGAGTACG ACGTCCTGGATAAGCGGAGAGGCGGGGACCCCTGAGATGGC GGCAAGCCTCGGCGGAAGAACCCCAAGGAAGGCCTGTATAA CGAACTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGA TCGGCATGAAGGGCGAGCGGAGGCGGGGCAAGGGCCACGAC GGCCTGTATCAGGGCCTGTCCACCGCCACCAAGGATACCTAC GACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCCCCAAGGGGC
22	SS-FKBP(F36V)-スベ ーサー-TM-41BB-CD 3z DNA	ATGGCTCTGCCTGTGACAGCTCTGCTGCTGCCTCTGGCCCTGC TGCTCCATGCCGCCAGACCCGGATCCGGAGTGCAGGTGGAA ACCATCTCCCCAGGAGACGGGCGCACCTTCCCCAAGCGCGGC CAGACCTGCGTGGTGCCTACACCGGGATGCTTGAAGATGG AAAGAAAGTTGATTCTCCCGGGACAGAAACAAGCCCTTTA AGTTTATGCTAGGCAAGCAGGAGGTGATCCGAGGCTGGGAA GAAGGGGTTGCCAGATGAGTGTGGGTGAGAGGCCAAACT GACTATATCTCCAGATTATGCCTATGGTGCCACTGGGCACCC AGGCATCATCCCACCACATGCCACTCTCGTCTTCGATGTGGA GCTTCTAAACTGGAAGCTAGCGAGAGCAAGTACGACCGC CCTGCCCCACCTTGCCCTGCCCCCGAGTTCTGGGCGGACCCA GCGTGTTCTGTTCACCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGA TCAGCCGGACCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTG AGCCAGGAAGATCCCGAGGTCCAGTTCAATTGGTACGTGGA CGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGG AACAGTTCAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCTGTGCTGACCG TGTCACCCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATAACAAGTGC AAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCAGCAGCATCGAAAAGAC CATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGCGAGCCCCAGGTGT ACACCCTGCCTCCCTCCAGGAAGAGATGACCAAGAACCAG GTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGAC ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCTGAGAACAA CTACAAGACCACCCCTCCCGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTT CTCCTGTACAGCCGGCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCA GGAAGGCAACGTCTTTAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCT GCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCTGG

【表 1 - 8】

配列番号	構築物	配列
		GCAAGATGCATAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATA TTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAG GAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCAGAGAAGAAGAAGG AGGATGTGAACTGCGGGTGAAGTTCAGCAGAAGCGCCGACG CCCCTGCCTACCAGCAGGGCCAGAATCAGCTGTACAACGAG CTGAACCTGGGCAGAAGGGAAGAGTACGACGTCCTGGATAA GCGGAGAGGCCGGGACCCTGAGATGGGCGGCAAGCCTCGGC GGAAGAACCCCCAGGAAGGCCTGTATAACGAACTGCAGAAA GACAAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGG CGAGCGGAGGCGGGGCAAGGGCCACGACGCGCTGTATCAGG GCCTGTCCACCGCCACCAAGGATACCTACGACGCCCTGCACA TGCAGGCCCTGCCCCAAGGGGC
23	FKBP-TM-41BB-CD3 z タンパク質	MMSGVQVETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLEDGKKFDSR DRNKPFFKMLGKQEVIRGWEEGAQMSVGQRAKLITSPDYAY GATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLEASAKPTTTPAPRPPTPAPTIA SQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLL LSLVITMHKRGKRLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRFPEEE EGGCELRVKFSRADAPAYQQGQNLQYNELNLGRREYDVL KRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG ERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRG
24	FKBP-TM-41BB-CD3 z mRNA	AUGGCUCUGCCUGUGACAGCUCUGCUGCUGCCUCUGGCCCCU GCUGCUCAUGCCGCCAGACCCGGAUCCGGAGUGCAGGUGG AAACCAUCUCCCCAGGAGACGGGCGCACCUUCCCCAAGCGC GGCCAGACCUGCGUGGUGCACUACACCGGGAUGCUUGAAG AUGGAAAGAAAUUUGAUUCCUCCCGGGACAGAAACAAGCC CUUUAAAGUUUAUGCUAAGGCAAGCAGGAGGUGAUCCGAGGC UGGGAAGAAGGGGUUGCCCAGAUAGUGUGGGUCAGAGAG CCAAACUGACUAUAUCUCCAGAUUAUGCCUAUGGUGCCAC UGGGCACCCAGGCAUCAUCCACCACAUGCCACUCUGUCU UCGAUGUGGAGCUUCUAAAACUGGAAGCUAGCGCCAAGCC UACCACCACCCUGCCCCUAGACCUCCAACACCCGCCCCAA CAAUCGCCAGCCAGCCUCUGUCUGAGGCCGAGGCUUGU AGACCAGCUGCUGGCGGAGCCGUGCACACCAGGACGAGG AUUUCGCCUGCGACAUCUACAUCUGGGCCCCUCUGGCCGGC ACAUGUGGCGUGCUGCUGCUGAGCCUCGUGAUCACCAUGC AUAAACGGGGCAGAAAGAAACUCCUGUAUAUAUCAAACA ACCAUUUAUGAGACCAGUACAAACUACUAAGAGGAAGAU GGCUGUAGCUGCCGAUUUCCAGAAGAAGAAGAGGAGGAU GUGAACUGCGGGUGAAGUUCAGCAGAAGCGCCGACGCCCC UGCCUACCAGCAGGGCCAGAAUCAGCUGUACAACGAGCUG AACCUGGGCAGAAGGGAAGAGUACGACGUCCUGGAUAAGC GGAGAGGCCGGGACCCUGAGAUAGGGCGGCAAGCCUCGGCG GAAGAACCCCCAGGAAGGCCUGUAUAACGAACUGCAGAAA GACAAGAUGGCCGAGGCCUACAGCGAGAUCCGGAUGAAGG GCGAGCGGAGGCGGGCAAGGGCCACGACGGCCUGUAUCA GGGCCUGUCCACCGCCACCAAGGAUACCUACGACGCCUGC ACAUGCAGGCCUGCCCCAAGGGGC
25	FKBP-TM-41BB-CD3 z DNA	ATGGCTCTGCCTGTGACAGCTCTGCTGCTGCCTCTGGCCCTGC TGCTCCATGCCGCCAGACCCGGATCCGGAGTGCAAGTGGAA ACCATCTCCCCAGGAGACGGGCGCACCTTCCCCAAGCGCGC CAGACCTGCGTGCTGCACTACACCGGGATGCTTGAAGATGG AAAGAAATTTGATTCCTCCCGGGACAGAAACAAGCCCTTTAA GTTTATGCTAGGCAAGCAGGAGGTGATCCGAGGCTGGGAAG AAGGGGTTGCCAGATGAGTGTGGGTCAGAGAGCCAACTG ACTATATCTCCAGATTATGCCTATGGTGCCACTGGGCACCCA GGCATCATCCACCACATGCCACTCTCGTCTTCGATGTGGAG CTTCTAAAACTGGAAGCTAGCGCCAAGCCTACCACCACCCCT GCCCCTAGACCTCCAACACCCGCCCAACAATCGCCAGCCAG CCTCTGTCTCTGAGGCCCCGAGGCTTGTAGACCAGCTGCTGGC GGAGCCGTGCACACCAGAGGACTGGATTTCGCCTGCGACATC TACATCTGGGCCCCCTCTGGCCGGCACATGTGGCGTGCTGTG CTGAGCCTCGTGATCACCATGCATAAACGGGGCAGAAAGAA ACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACA

【表 1 - 9】

配列番号	構築物	配列
		AACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCAGA AGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGCGGGTGAAGTTCAGCA GAAGCGCCGACGCCCCTGCCTACCAGCAGGGCCAGAATCAG CTGTACAACGAGCTGAACCTGGGCAGAAGGGAAGAGTACGA CGTCCTGGATAAGCGGAGAGGCCGGGACCCTGAGATGGGCG GCAAGCCTCGGCGGAAGAACCCCCAGGAAGGCCTGTATAAC GAACTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGAT CGGCATGAAGGGCGAGCGGAGGCGGGGCAAGGGCCACGAC GGCCTGTATCAGGGCCTGTCCACCGCCACCAAGGATACCTAC GACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCCCCAAGGGGC
26	FKBP-スパーサー-T M-41BB-CD3z DNA	ATGGCTCTGCCTGTGACAGCTCTGCTGCTGCCTCTGGCCCTGC TGCTCCATGCCGCCAGACCCGGATCCGGAGTGCAGGTGGAA ACCATCTCCCCAGGAGACGGGGCGCACCTTCCCCAAGCGCGGC CAGACCTGCGTGGTGCCTACACCGGGATGCTTGAAGATGG AAAGAAATTTGATTCTCCCGGGACAGAAACAAGCCCTTTAA GTTTATGCTAGGCAAGCAGGAGGTGATCCGAGGCTGGGAAG AAGGGGTTGCCAGATGAGTGTGGGTGAGAGAGCCAACTG ACTATATCTCCAGATTATGCCTATGGTGCCACTGGGCACCCA GGCATCATCCACCACATGCCACTCTCGTCTTCGATGTGGAG CTTCTAAACTGGAAGCTAGCGAGAGCAAGTACGGACCGCC CTGCCACCTTGCCCTGCCCCGAGTTCCTGGGCGGACCCAG CGTGTTCCTGTTCCCAACCAAGCCCAAGGACACCCTGATGAT CAGCCGGACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGACGTGA GCCAGGAAGATCCCGAGGTCCAGTTCATTGGTACGTGGAC GGCCTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCAGAGAGGA ACAGTTCAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCTGTGCTGACCGT GCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCA AGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCAGCAGCATCGAAAAGACC ATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGCGAGCCCCAGGTGTA CACCCTGCCTCCCTCCAGGAAGAGATGACCAAGAACCAGG TGTCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACA TCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCTGAGAACAAC TACAAGACCACCCCTCCCGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTC TTCTGTACAGCCGGCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCA GGAAGGCAACGTCTTTAGCTGCAGCGTATGCACGAGGCCCT GCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCTGG GCAAGATGCATAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATA TTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAG GAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAG AGGATGTGAAGTGCAGGTGAAGTTCAGCAGAAGAGCCGACG CCCCTGCCTACCAGCAGGGCCAGAATCAGCTGTACAACGAG CTGAACCTGGGCAGAAGGGAAGAGTACGACGTCCTGGATAA GCGGAGAGGCCGGGACCCTGAGATGGGCGGCAAGCCTCGGC GGAAGAACCCCAAGGAAGGCCTGTATAACGAACTGCAGAAA GACAAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGG CGAGCGAGGCGGGGCAAGGGCCACGACGGCCTGTATCAGG GCCTGTCCACCGCCACCAAGGATACCTACGACGCCCTGCACA TGCAGGCCCTGCCCCAAGGGGC
37	SS-2xDmrB-DmrC-T M-41BB-CD3zタンパ ク質	MALPVTALLPLALLHAARPGSGGVQVETISPGDGRFTPKRGQ TCVVHYTGMLLEDGKKVDSSRDNRNPKFKMLGKQEVIRGWEEG VAQMSVGRRAKLTISPDIYAGATGHPGIIPPHATLVFDVEFLKL ESGTSGTSGVQVETISPGDGRFTPKRGQTCVVHYTGMLLEDGKK VDSSRDNRNPKFKMLGKQEVIRGWEEGV
38	SS-2xDmrB-DmrC-T M-41BB-CD3z mRN A	AUGGCUCUGCCUGUGACAGCUCUGCUGCUGCCUCUGGCCCU GCUGCUCCAUGCCGCCAGACCCGGAUCCGGCGGUGUCCAAG UCGAAACUAUAUCGCCUGGCGAUGGCAGAACGUUCCCCAA ACGUGGCCAGACCUGUGUCGUACACUAUACCGGCAUGCUA GAGGAUGGGAAAAAGGUUGAUUCCAGUCGCAUCGGAACA AACCGUUUAAAUUCAUGUUGGGGAAGCAAGAGGUUAUCAG GGAUGGGAAGAGGGUGUCGCGCAAAUGUCGGUUGGGCAA CGUGCGAAACUCACAAUUUCCCCGGAUUAACGCAUACGGAG CUACCGGACACCCUGGGAUUAUCCCAACCGCAUCGACGCUA GUGUUUGACGUAGAGUUCUUGAAGCUCGAAUCAGGUACAA

【表 1 - 1 0】

配列番号	構築物	配列	
		GCGGCACUUCUGGGCGUACAGGUUGAGACAAUUAGUCCCGG AGACGGACGUACAUUCCCAAAGAGAGGGCAAACUUGCGUA GUCCAUUACACUGGAAUGUUGGAAGACGGCAAGAAAGUGG ACAGUUCAAGAGACCGCAAUAAGCCUUUCAAGUUUAUGCU CGGAAAACAGGAAGUCAUACGCGGUUGGGAGGAAGGCGUG GCUCAGAUAGCGUCGGACAGAGGGCAAAGUUGACCAUCA GUCCCGACUAUGCGUAUGGCGCGACAGGCCAUCCCGGAAUC AUACCUCACGCAACCUUGGUUUAUUCGAUGUCGAACUGCU CAAAUUAGAGGGUAGUAGAUAUCCAUCCUCUGGCAUGAGAUG UGGCAUGAAGGCCUGGAAGAGGCAUCUCGUUUUGUACUUUG GGGAAAGGAACGUGAAAGGCAUGUUUGAGGUGCUGGAGCC CUUGCAUGCUAUGAUGGAACGGGGCCCCCAGACUCUGAAG GAAACAUCUUUAAUCAGGCCUAUGGUCGAGAUUUAAUGG AGGCCCAAGAGUGGUGCAGGAAGUACAUGAAAUCAGGGAA UGUCAAGGACCUCUCCAAGCCUGGGACCUCUAUUUAUCAU GUGUCCGACGAAUCUCAAAGGCUAGCGCCAAGCCUACCAC CACCCUGCCCCUAGACCUCAACACCCGCCCCAACAAUCG CCAGCCAGCCUCUGUCUCUGAGGCCGAGGCUUUGUAGACCA GCUGCUGGCGGAGCCGUACACACCAGAGGACUGGAUUUCG CCUGCGACAUCUACAUCUGGGCCCCUCUGGCCGGCACAUGU GGCGUGCUGCUGCUGAGCCUCUGAUCACCAUGCAUAAAC GGGGCAGAAAGAAACUCCUGUAUAUAUUAACAAACCAUU UAUGAGACCAGUACAAACUACUCAAGAGGAAGAUGGCUGU AGCUGCCGAUUUCCAGAAGAAGAAGAGGAGGAUGUGAAC UGCGGGUGAAGUUCAGCAGAAGCGCCGACGCCCUUGCCUAC CAGCAGGGCCAGAAUCAGCUGUACAACGAGCUGAACCUGG GCAGAAGGGAAGAGUACGACGUCCUGGAUAAGCGGAGAGG CCGGGACCCUGAGAUGGGCGGCAAGCCUCGGCGGAAGAAC CCCAGGAAGGCCUGUAUAACGAACUGCAGAAAGACAAGA UGGCCGAGGCCUACAGCGAGAUCCGCAUGAAGGGCGAGCG GAGGCGGGGCAAGGGCCACGACGGCCUGUAUCAGGGCCUG UCCACCGCCACCAAGGAUACCUACGACGCCUGCACAUCA GGCCUGCCCCCAAGGGGC	10
39	SS-2xDmrB-DmrC-T M-41BB-CD3z DNA	ATGGCTCTGCCTGTGACAGCTCTGCTGCTGCCTCTGGCCCTGC TGCTCCATGCCGCCAGACCCGGATCCGGCGGTGTCCAAGTCG AAATATATCGCCTGGCGATGGCAGAACGTTTCCCAAACGTG GCCAGACCTGTGTCGTACACTATACCGGCATGCTAGAGGATG GGAAAAAGGTTGATTCCAGTCGCGATCGGAACAAACCGTTT AAATTTCATGTTGGGGAAGCAAGAGGTTATCAGGGGATGGGA AGAGGGTGTGCGCGCAAATGTCGGTTGGGCAACGTGCGAAAC TCACAATTTCCCGGATTACGCATACGGAGCTACCGGACACC CTGGGATTATCCACCGCATGCGACGCTAGTGTGTTGACGTAG AGTTCTTGAAGCTCGAATCAGGTACAAGCGGCACTTCTGGCG TACAGGTTGAGACAATTAGTCCCGGAGACGGACGTACATTCC CAAAGAGAGGGCAAACCTGCGTAGTCCATTACACTGGAATG TTGGAAGACGGCAAAGAAAGTGGACAGTTCAAGAGACCGCAA TAAGCCTTTCAAGTTTATGCTCGGAAAACAGGAAGTCATACG CGGTTGGGAGGAAGGCGTGGCTCAGATGAGCGTCGGACAGA GGGCAAAGTTGACCATCAGTCCCGACTATGCGTATGGCGCGA CAGGCCATCCCGGAATCATACCTCCCCACGCAACCTTGGTAT TCGATGTGCAACTGCTCAAATTAGAGGGTAGTAGATCCATCC TCTGGCATGAGATGTGGCATGAAGGCCTGGAAGAGGCATCT CGTTTGTACTTTGGGGAAGGAACGTGAAAGGCATGTTTGTAG GTGCTGGAGCCCTTGCATGCTATGATGGAACGGGGCCCCCAG ACTCTGAAGGAAACATCCTTTAATCAGGCCTATGGTCGAGAT TTAATGGAGGCCCAAGAGTGGTGCAGGAAGTACATGAAATC AGGGAATGTCAAGGACCTCCTCAAGCCTGGGACCTCTATTA TCATGTGTTCCGACGAATCTCAAAGGCTAGCGCCAAGCCTAC CACCACCCCTGCCCCTAGACCTCCAACACCCGCCCAACAAT CGCCAGCCAGCCTCTGTCTCTGAGGCCCGAGGCTGTAGACC AGCTGCTGGCGAGCCGTACACACCAGAGGACTGGATTTCG CCTGCGACATCTACATCTGGGCCCCTCTGGCCGGCACATGTG GCGTGCTGCTGCTGAGCCTCGTGATCACCATGCATAAACGGG	30 40

【表 1 - 1 1】

配列番号	構築物	配列
		GCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTATGA GACCACTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGC CGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAAGTGCAGGT GAAGTTCAGCAGAAGCGCCGACGCCCTGCCTACCAGCAGG GCCAGAATCAGCTGTACAACGAGCTGAACCTGGGCAGAAGG GAAGAGTACGACGTCCTGGATAAGCGGAGAGGCCGGGACCC TGAGATGGGCGCAAGCCTCGGCGGAAGAACCCCAAGGAAG GCCTGTATAACGAACTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCC TACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAGCGGAGGCGGGGCAA GGGCCACGACGGCCTGTATCAGGCGCTGTCCACCGCCACCA GGATACCTACGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCCCAAG GGGC
41	SS-scFvCD19-DmrA-f uP2A-DmrC-TM-41B B-CD3zタンパク質	METDTLLLWVLLLVWPGSTGDYKDEGSDIQMTQTSSLSASLG DRVITISCRASQDISKYLNWYQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPS RFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLE ITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQLSVTCTVS GVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSE
42	SS-scFvCD19-DmrA-f uP2A-DmrC-TM-41B B-CD3z DNA	ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGG GTTCCAGGTTCCACTGGTGACTACAAGGACGAGGGATCCGAT ATCCAGATGACCCAGACCACCAGCAGCCTGAGCGCCAGCCT GGGCGATAGAGTGACCATCAGCTGCAGAGCCAGCCAGGACA TCAGCAAGTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAACCCGACGGC ACCGTGAAGCTGCTGATCTACCACACCAGCAGACTGCACAGC GGCGTGCCAGCAGATTTCTGGCAGCGGCTCCGGCACCCGAC TACAGCCTGACCATCTCCAACCTGGAACAGGAAGATATCGCT ACCTACTTCTGTCAGCAAGGCAACACCCTGCCCTACACCTTC GGCGGAGGCACCAAGCTGGAAATCACCGGCAGCACAAGCGG CAGCGGCAAGCCTGGATCTGGCGAGGGAAGCACCAAGGGCG AAGTGAACTGCAGGAAAGCGGCCCTGGACTGGTGGCCCCA AGCCAGTCTCTGAGCGTGACCTGTACCGTGTCCGGCGTGTCC CTGCCTGACTATGGCGTGTCTGGATCAGACAGCCACCCAGA AAGGGCCTGGAATGGCTGGGAGTGATCTGGGGCAGCGAGAC AACCTACTACAACAGCGCCCTGAAGTCCCGGCTGACCATCAT CAAGGACAACCTCCAAGAGCCAGGTGTTCTGAAGATGAACA GCCTGCAGACCGACGACACCGCCATCTACTACTGCGCCAAGC ACTACTACTACGGCGGCAGCTACGCCATGGACTACTGGGGCC AGGGCACAAGCGTGACCGTGTCCAGCGCTAGCGGCTCAGGA GGAGTGAGGTTGAAACCATCTCCCCAGGAGACGGGCGCAC CTTCCCGAAGCGCGGACAGACATGCGTGGTGCACTACACCG GGATGCTTGAAGATGGAAAGAAATTGATTTCATGCGGGAC AGAAACAAGCCCTTTAAGTTTATGCTGGGCAAGCAGGAGGT CATCCGAGGCTGGGAAGAAGGGGTTGCCAGATGAGTGTCTG GCCAGAGAGCCAACTGACTATATCACCTGACTACGCCTATG GGGCCACTGGGCACCCTGGCATAATTCCGCCACACGCCACTC TCGTCTTCGATGTGGAGCTTCTAAACTGGAAGGCGGCCGCG CTCGTTACAAGCGAAGTGTCTCAGGATCTGGCGCCACGAAC TCTCTCTGTTAAAGCAAGCAGGAGATGTTGAAGAAAACCCCG GGCCTTCAAGATCCATCCTCTGGCATGAGATGTGGCATGAAG GCCTGGAAGAGGCATCTCGTTTGTACTTTGGGGAAAGGAACG TGAAAGGCATGTTTGAGGTGCTGGAGCCCTTGCATGCTATGA TGGAACGGGGCCCCCAGACTCTGAAGGAAACATCCTTTAATC AGGCCTATGGTCGAGATTTAATGGAGGCCCAAGAGTGGTGC AGGAAGTACATGAAATCAGGGAATGTCAAGGACCTCCTCCA AGCCTGGGACCTCTATTATCATGTGTTCCGACGAATCTCAA GGCTAGCGCCAAGCCTACCACCACCCCTGCCCTAGACCTCC AACACCCGCCCAACAATCGCCAGCCAGCCTCTGTCTCTGAG GCCCCAGGCTTGTAGACCAGCTGCTGGCGGAGCCGTACACA CCAGAGGACTGGATTTGCGCTGCGACATCTACATCTGGGCCC CTCTGGCCGGCACATGTGGCGTGCTGCTGCTGAGCCTCGTGA TCACCATGCATAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATAT TCAAACAACCATTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAG GAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGG AGGATGTGAACTGCGGGTGAAGTTCAGCAGAAGCGCCGACG

10

20

30

40

【表 1 - 1 2】

配列番号	構築物	配列
		CCCCTGCCTACCAGCAGGGCCAGAATCAGCTGTACAACGAGCTGAACCTGGGCAGAAAGGGAAGAGTACGACGTCCTGGATAAGCGGAGAGGCCGGGACCCTGAGATGGGCGGCAAGCCTCGGCGGAAGAACCCCCAGGAAGGCCTGTATAACGAACTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAGCGGAGGCGGGGCAAGGGCCACGACGGCCTGTATCAGGCGCTGTCCACCGCCACCAAGGATACCTACGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCCCAAGGGGC
44	SS-scFvCD19-DmrA-f uP2A-FRB-TM-41BB- CD3zタンパク質	METDTLLLWVLLLVWPGSTGDYKDEGSDIQMTQTTSSLASLGRVITISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSE
45	SS-scFvCD19-DmrA-f uP2A-FRB-TM-41BB- CD3z DNA	ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTCCAGGTTCCACTGGTGACTACAAGGACGAGGGATCCGATATCCAGATGACCCAGACCACCAGCAGCCTGAGCGCCAGCCTGGGCGATAGAGTGACCATCAGCTGCAGAGCCAGCCAGGACATCAGCAAGTACCTGAACCTGGTATCAGCAGAAACCCGACGGCACCGTGAAGCTGCTGATCTACCACACCAGCAGACTGCACAGCGGCGTGCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTACAGCCTGACCATCTCCAACCTGGAACAGGAAGATATCGCTACCTACTTCTGTCAGCAAGGCAACACCCTGCCCTACACCTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGGAAATCACCGGCAGCACAAGCGGCAGCGGCAAGCCTGGATCTGGCGAGGGAAGCACCAAGGGCGAAGTGAAGCTGCAGGAAAGCGGCCCTGGACTGGTGGCCCCAAGCCAGTCTCTGAGCGTGACCTGTACCGTGTCCGGCGTGTCTGCTGCTGACTATGGCGTGTCTGATCAGACAGCCACCCAGAAAGGGCCTGGAATGGCTGGGAGTGATCTGGGGCAGCGAGAACCTACTACAACAGCGCCCTGAAGTCCCGGCTGACCATCATCAAGGACAACCTCCAAGAGCCAGGTGTTCTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCGACGACACCGCCATCTACTACTGCGCCAAGCCTACTACTACGGCGGCAGCTACGCCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACAAGCGTGACCGTGACCGTGTCCAGCGCTAGCGGTGAGGAGTGAGGTTGAAACCATCTCCCCAGGAGACGGGCGCACCTTCCCGAAGCGCGGACAGACATGCGTGGTGCACTACACCGGGATGCTTGAAGATGGAAAGAAATTCGATTCATCGCGGGACAGAAACAAGCCCTTTAAGTTTATGCTGGGCAAGCAGGAGGTATCCGAGGCTGGGAAGAAGGGGTTGCCAGATGAGTGTGCGCCAGAGAGCCAACTGACTATATCACCTGACTACGCCTATGGGCCACTGGGCACCCTGGCATAATTCCGCCACAGCCACTCTCGTCTTCGATGTGGAGCTTCTAAAAGTGAAGGCGGCCGCGCTCGTTACAAGCGAAGTGTCTCAGGATCTGGCGCCACGAACTTCTCTGTATAAGCAAGCAGGAGATGTTGAAGAAAACCCCGGCCCTCAAGATCCATCCTCTGGCATGAGATGTGGCATGAAGGCCTGGAAGAGGCATCTCGTTTGTACTTTGGGGAAGGAACGTGAAAGGCATGTTTGAGGTGCTGGAGCCCTTGATGCTATGATGGAACGGGGCCCCAGACTCTGAAGGAAACATCTTTAATAGGCCTATGGTCGAGATTTAATGGAGGCCCAAGAGTGGTGCAGGAAGTACATGAAATCAGGGAATGTCAAGGACCTCACCCAAGCCTGGGACCTCTATTATCATGTGTTCCGACGAATCTCAAAAGCTAGCGCCAAGCCTACCACCACCCCTGCCCTAGACCTCCAACACCCGCCCCAACAAATCGCCAGCCAGCCTCTGTCTCTGAGGCCGAGGCTGTAGACCAGCTGCTGGCGGAGCCGTACACACAGAGGACTGGATTTCGCCTGCGACATCTACATCTGGGCCCTCTGGCCGGCACATGTGGCGTGCTGCTGCTGAGCCTCGTGA TCACCATGCATAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAGGAGGATGTGAACTGCGGGTGAAGTTCAGCAGAAGCGCCGACGCCCCTGCCTACCAGCAGGGCCAGAATCAGCTGTACAACGAGCTGAACCTGGGCAGAAAGGGAAGAGTACGACGTCCTGGATAAGCGGAGAGGCCGGGACCCTGAGATGGGCGGCAACCTGCGCGGAAGAACCCCCAGGAAGGCCTGTATAACGAACTGCAGAAA

10

20

30

40

【表 1 - 1 3】

配列番号	構築物	配列
		GACAAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGG CGAGCGGAGGCGGGGCAAGGGCCACGACGGCCTGTATCAGG GCCTGTCCACCGCCACCAAGGATACCTACGACGCCCTGCACA TGCAGGCCCTGCCCCAAGGGGC
47	SS-scFvCD19-DmrA-f uP2A-2xDmrB-DmrC- TM-41BB-CD3zタン パク質	METDTLLLWVLLLVPGSTGDYKDEGSDIQMTQTSSLSASLG DRVITSCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPS RFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLE ITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSSLSVTCTVS GVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSE
48	SS-scFvCD19-DmrA-f uP2A-2xDmrB-DmrC- TM-41BB-CD3z DN A	ATGGAGACAGACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGG GTCCAGGTTCCACTGGTGACTACAAGGACGAGGATCCGAT ATCCAGATGACCCAGACCACCAGCAGCCTGAGCGCCAGCCT GGGCGATAGAGTGACCATCAGCTGCAGAGCCAGCCAGGACA TCAGCAAGTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAACCCGACGGC ACCGTGAAGCTGCTGATCTACCACACCAGCAGACTGCACAGC GGCGTGCCAGCAGATTTCTGGCAGCGGCTCCGGCACCGAC TACAGCCTGACCATCTCCAACCTGGAACAGGAAGATATCGCT ACCTACTTCTGTGAGCAAGGCAACACCCTGCCCTACACCTTC GGCGGAGGCACCAAGCTGGAAATCACCGGCAGCACAAGCGG CAGCGGCAAGCCTGGATCTGGCGAGGGAAGCACCAAGGGCG AAGTGAACTGCAGGAAAGCGGCCCTGGACTGGTGGCCCCA AGCCAGTCTCTGAGCGTGACCTGTACCGTGTCCGGCGTGTCC CTGCCTGACTATGGCGTGTCTGGATCAGACAGCCACCCAGA AAGGGCCTGGAATGGCTGGGAGTGATCTGGGGCAGCGAGAC AACCTACTACAACAGCGCCCTGAAGTCCCGGTGACCATCAT CAAGGACAACTCCAAGAGCCAGGTGTTCTGAAGATGAACA GCCTGCAGACCGACGACACCGCCATCTACTACTGCGCCAAGC ACTACTACTACGGCGGCAGCTACGCCATGGACTACTGGGGCC AGGGCACAAGCGTGACCGTGTCCAGCGCTAGCGGCTCAGGA GGAGTGAGGTTGAAACCATCTCCCCAGGAGACGGGGCGCAC CTTCCCGAAGCGCGGACAGACATGCGTGGTGCATACACCG GGATGCTTGAAGATGGAAAGAAATTCGATTTCATCGCGGGAC AGAAACAAGCCCTTAAAGTTTATGCTGGGCAAGCAGGAGGT CATCCGAGGCTGGGAAGAAGGGGTTGCCAGATGAGTGTCTG GCCAGAGAGCCAACTGACTATATCACCTGACTACGCCTATG GGGCCACTGGGCACCCTGGCATAATTCCGCCACACGCCACTC TCGTCTTCGATGTGGAGCTTCTAAACTGGAAGGCGGCCGCG CTCGTTACAAGCGAAGTGTCTCAGGATCTGGCGCCACGAAT TCTCTCTGTTAAAGCAAGCAGGAGATGTTGAAGAAAACCCCG GGCCTTCAAGATCCGGCGGTGTCCAAGTCGAAATCTATCGC CTGGCGATGGCAGAACGTTTCCCAAACGTGGCCAGACCTGTG TCGTACACTATAACCGCATGCTAGAGGATGGGAAAAAGGTT GATTCCAGTCGCGATCGGAACAAACCGTTTAAATTCATGTTG GGGAAGCAAGAGGTTATCAGGGGATGGGAAGAGGGTGTCTGC GCAAATGTCTGGTGGGCAACGTGCGAACTCACAATTTCCCC GGATTACGCATACGGAGCTACCGGACACCCTGGGATTATCCC ACCGCATGCGACGCTAGTGTTTGACGTAGAGTTCTTGAAGCT CGAATCAGGTACAAGCGGCACTTCTGGCGTACAGGTTGAGA CAATTAGTCCCGGAGACGGACGTACATTTCCCAAAGAGAGGG CAAATTTGCGTAGTCCATTACACTGGAATGTTGGAAGACGGC AAGAAAGTGGACAGTTCAAGAGACCGCAATAAGCCTTTCAA GTTTATGCTCGGAAAACAGGAAGTCATACGCGGTTGGGAGG AAGGCGTGGCTCAGATGAGCGTCGGACAGAGGGCAAAGTTG ACCATCAGTCCCGACTATGCGTATGGCGCGACAGGCCATCCC GGAATCATACCTCCCCACGCAACCTTGGTATTCTGATGTCTGAA CTGCTCAAATTAGAGGGTAGTAGATCCATCCTCTGGCATGAG ATGTGGCATGAAGGCCTGGAAGAGGCATCTCGTTTGTACTTT GGGGAAAGGAACGTGAAAGGCATGTTTGAGGTGCTGGAGCC CTTGCATGCTATGATGGAACGGGGCCCCCAGACTCTGAAGGA AACATCCTTTAATCAGGCCTATGGTCGAGATTTAATGGAGGC CCAAGAGTGGTGACGGAAGTACATGAAATCAGGGAATGTCA AGGACCTCCTCCAAGCCTGGGACCTCTATTATCATGTGTCC GACGAATCTCAAAGGCTAGCGCCAAGCCTACCACCACCCCTG

10

20

30

40

【表 1 - 1 4】

配列番号	構築物	配列
		CCCCTAGACCTCCAACACCCGCCCAACAATCGCCAGCCAGC CTCTGTCTCTGAGGCCCGAGGCTTGTAGACCAGCTGCTGGCG GAGCCGTACACACCAGAGGACTGGATTTCGCCTGCGACATCT ACATCTGGGCCCCCTCTGGCCGGCACATGTGGCGTGCTGCTGC TGAGCCTCGTGATCACCATGCATAAACGGGGCAGAAAGAAA CTCCTGTATATATTCAAACAACCATTATGAGACCAGTACAA ACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAA GAAGAAGAAGGAGGATGTGAAGTGCAGGTTGAGTTTCAGCAG AAGCGCCGACGCCCCCTGCCTACCAGCAGGGCCAGAATCAGC TGTACAACGAGCTGAACCTGGGCAGAAAGGGAAGTACGAC GTCCTGGATAAGCGAGAGGCGGGACCCTGAGATGGGCGG CAAGCCTCGGCGGAAGAACCCCCAGGAAGGCCTGTATAACG AACTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATC GGCATGAAGGGCGAGCGGAGGCGGGGCAAGGGCCACGACG GCCTGTATCAGGGCCTGTCCACCGCCACCAAGGATACCTACG ACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCCCCAAGGGGC
50	SS-CD19scFv-DmrA- CD4TMタンパク質	MPLGLLWLGLALLGALHAQAGSDIQMTQTSSLSASLGDRVTIS CRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFGSG SGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGSTS GSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQLSVTCTVSGVSLP DYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYN
51	SS-CD19scFv-DmrA- CD4TM DNA	ATGCCCCCTGGGCCTGCTGTGGCTGGGCCTGGCCCTGCTGGGC GCCCTGCACGCCCAGGCCGATCCGATATCCAGATGACCCAG ACCACCAGCAGCCTGAGCGCCAGCCTGGGCGATAGAGTGAC CATCAGCTGCAGAGCCAGCCAGGACATCAGCAAGTACCTGA ACTGGTATCAGCAGAAACCCGACGGCACCGTGAAGCTGCTG ATCTACCACACCAGCAGACTGCACAGCGGCGTGGCCAGCAG ATTTTCTGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTACAGCCTGACCAT CTCCAACCTGGAACAGGAAGATATCGCTACCTACTTCTGTCA GCAAGGCAACACCCTGCCCTACACCTTCGGCGGAGGCACCA AGCTGGAATCACCAGCAGCACAAGCGGCAGCGGCAAGCCT GGATCTGGCGAGGGAAGCACCAAGGGCGAAGTGAACCTGCA GGAAGCGGCCCTGGACTGGTGGCCCCAAGCCAGTCTCTGA GCGTGACCTGTACCGTGTCCGGCGTGTCCCTGCCTGACTATG GCGTGTCTTGGATCAGACAGCCACCCAGAAAGGGCCTGGAA TGGCTGGGAGTGATCTGGGGCAGCGAGACAACCTACTACAA CAGCGCCCTGAAGTCCCGGCTGACCATCATCAAGGACAATC CAAGAGCCAGGTGTTCTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCG ACGACACCGCCATCTACTACTGCGCCAAGCACTACTACTACG GCGGCAGCTACGCCATGGACTACTGGGGCCAGGCGACAAAGC GTGACCGTGTCCAGCGCTAGCGGCGGAGGTGGGAGCGGAGT GCAGGTGGAAACCATCTCCCAGGAGACGGGCGCACCTTCC CCAAGCGCGGCCAGACCTGCGTGGTGCCTACACCGGGATG CTTGAAGATGGAAAGAAATTTGATTCCTCCCGGGACAGAAA CAAGCCCTTTAAGTTTATGCTAGGCAAGCAGGAGGTGATCCG AGGCTGGGAAGAAGGGGTGCCCAGATGAGTGTGGGTGAG GAGCCAACTGACTATATCTCCAGATTATGCCTATGGTGCCA CTGGGCACCCAGGCATCATCCACCACATGCCACTCTCGTCT TCGATGTGGAGCTTCTAAAAGTGAAGGCGGCGCATGGCCC TGATTGTGCTGGGGGGCGTCGCCGGCCTCCTGCTTTTCATTG GGCTAGGCATCTTCTTC
53	SS-CD19scFv-DmrA- CD8ヒンジTMタンパ ク質	MPLGLLWLGLALLGALHAQAGSDIQMTQTSSLSASLGDRVTIS CRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFGSG SGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGSTS GSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQLSVTCTVSGVSLP DYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYN
54	SS-CD19scFv-DmrA- CD8ヒンジTM DNA	ATGCCCCCTGGGCCTGCTGTGGCTGGGCCTGGCCCTGCTGGGC GCCCTGCACGCCCAGGCCGATCCGATATCCAGATGACCCAG ACCACCAGCAGCCTGAGCGCCAGCCTGGGCGATAGAGTGAC CATCAGCTGCAGAGCCAGCCAGGACATCAGCAAGTACCTGA ACTGGTATCAGCAGAAACCCGACGGCACCGTGAAGCTGCTG ATCTACCACACCAGCAGACTGCACAGCGGCGTGGCCAGCAG ATTTTCTGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTACAGCCTGACCAT

【表 1 - 1 5】

配列番号	構築物	配列
		CTCCAACCTGGAACAGGAAGATATCGCTACCTACTTCTGTCA GCAAGGCAACACCCTGCCCTACACCTTCGGCGGAGGCCACCA AGCTGGAATCACCAGGAGCACAAGCGGCAGCGGCAAGCCT GGATCTGGCGAGGGAAGCACCAGGGCGAAGTGAACTGCA GGAAAGCGGCCCTGGACTGGTGGCCCCAAGCCAGTCTCTGA GCGTGACCTGTACCGTGTCCGGCGTGTCCCTGCCTGACTATG GCGTGTCTGGATCAGACAGCCACCCAGAAAGGGCCTGGAA TGGCTGGGAGTGATCTGGGGCAGCGAGACAACCTACTACAA CAGCGCCCTGAAGTCCCGGCTGACCATCATCAAGGACAACCTC CAAGAGCCAGGTGTTCTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCG ACGACACCGCCATCTACTACTGCGCCAAGCACTACTACTACG GCGGCAGCTACGCCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACAAGC GTGACCGTGTCCAGCGCTAGCGGCGGAGGTGGGAGCGGAGT GCAGGTGGAAACCATCTCCCCAGGAGACGGGCGCACCTTCC CCAAGCGCGGCCAGACCTGCGTGGTGCCTACACCGGGATG CTTGAAGATGGAAAGAAATTTGATTCTCCCGGGACAGAAA CAAGCCCTTTAAGTTTATGCTAGGCAAGCAGGAGGTGATCCG AGGCTGGGAAGAAGGGGTTGCCAGATGAGTGTGGGTGAGA GAGCCAACTGACTATATCTCCAGATTATGCCTATGGTGCCA CTGGGCACCCAGGCATCATCCACCACATGCCACTCTCGTCT TCGATGTGGAGCTTCTAAACTGGAAGGCGGCCGCGCCAAG CCTACCACCACCCCTGCCCTAGACCTCCAACACCCGCCCCA ACAATCGCCAGCCAGCCTCTGTCTCTGAGGCCCGAGGCTTGT AGACCAGCTGCTGGCGGAGCCGTGCACACCAGAGGACTGGA TTTCGCCTGCGACATCTACATCTGGGCCCTCTGCGCGGCAC ATGTGGCGTGCTGCTGCTGAGCCTCGTGATCACC
56	SS-CD19scFv-DmrA- スパーサー-CD4TM タンパク質	MPLGLLWLGLALLGALHAQAGSDIQMTQTSSLSASLGDRVTIS CRASQDISKYLWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSG SGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTS GSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQLSVTCTVSGVSLP DYGVSWSIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYN
57	SS-CD19scFv-DmrA- スパーサー-CD4TM DNA	ATGCCCCCTGGGCCTGCTGTGGCTGGGCCTGGCCCTGCTGGGC GCCCTGCACGCCAGCCAGCGGATCCGATATCCAGATGACCCAG ACCACCAGCAGCCTGAGCGCCAGCCTGGGCGATAGAGTGAC CATCAGCTGCAGAGCCAGCCAGGACATCAGCAAGTACCTGA ACTGGTATCAGCAGAAACCCGACGGCACCGTGAAGCTGCTG ATCTACCACACCAGCAGACTGCACAGCGGCGTGCCAGCAG ATTTTCTGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTACAGCCTGACCAT CTCCAACCTGGAACAGGAAGATATCGCTACCTACTTCTGTCA GCAAGGCAACACCCTGCCCTACACCTTCGGCGGAGGCACCA AGCTGGAATCACCAGGAGCACAAGCGGCAGCGGCAAGCCT GGATCTGGCGAGGGAAGCACCAGGGCGAAGTGAACTGCA GGAAAGCGGCCCTGGACTGGTGGCCCCAAGCCAGTCTCTGA GCGTGACCTGTACCGTGTCCGGCGTGTCCCTGCCTGACTATG GCGTGTCTCTGGATCAGACAGCCACCCAGAAAGGGCCTGGAA TGGCTGGGAGTGATCTGGGGCAGCGAGACAACCTACTACAA CAGCGCCCTGAAGTCCCGGCTGACCATCATCAAGGACAACCTC CAAGAGCCAGGTGTTCTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCG ACGACACCGCCATCTACTACTGCGCCAAGCACTACTACTACG GCGGCAGCTACGCCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACAAGC GTGACCGTGTCCAGCGCTAGCGGCGGAGGTGGGAGCGGAGT GCAGGTGGAAACCATCTCCCCAGGAGACGGGCGCACCTTCC CCAAGCGCGGCCAGACCTGCGTGGTGCCTACACCGGGATG CTTGAAGATGGAAAGAAATTTGATTCTCCCGGACAGAAA CAAGCCCTTTAAGTTTATGCTAGGCAAGCAGGAGGTGATCCG AGGCTGGGAAGAAGGGGTTGCCAGATGAGTGTGGGTGAGA GAGCCAACTGACTATATCTCCAGATTATGCCTATGGTGCCA CTGGGCACCCAGGCATCATCCACCACATGCCACTCTCGTCT TCGATGTGGAGCTTCTAAACTGGAAGGCGGCCGCGAGAGC AAGTACGGACCGCCCTGCCACCTTGCCCTGCCCCGAGTTC CTGGGCGGACCCAGCGTGTTCCTGTTCCCAACCAAGCCAAAG GACACCCTGATGATCAGCCGAGCCCCGAGGTGACCTGCGTG GTGGTGACGTGAGCCAGGAAGATCCCGAGGTCCAGTTCAA

10

20

30

40

【表 1 - 1 6】

配列 番号	構築物	配列
		TTGGTACGTGGACGGCGTGGAAAGTGCACAACGCCAAGACCA AGCCCAGAGAGGAACAGTTCAACAGCACCTACCGGGTGGTG TCTGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAA GAATACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCAGCAG CATCGAAAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGCG AGCCCCAGGTGTACACCCTGCCTCCCTCCCAGGAAGAGATGA CCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCT ACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAG CCTGAGAACAACATAAGACCACCCCTCCCGTGCTGGACAGC GACGGCAGCTTCTTCTGTACAGCCGGCTGACCGTGGACAAG AGCCGGTGGCAGGAAGGCAACGTCTTTAGCTGCAGCGTGAT GCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGA GCCTGTCCCTGGGCAAGATGGCCCTGATTGTCTGGGGGGCG TCGCCGGCCTCCTGCTTTTCATTGGGCTAGGCATCTTCTTC
59	SS-CD19scFv-DmrA- CD52 GPIアンカー タンパク質	MPLGLLWLGLALLGALHAQAGSDIQMTQTSSLSASLGDRVTIS CRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSG SGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTS SGSKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQLSVTCTVSGVSLP DYGVSIRQPPRKGLEWLGVWGSSETTYYN
60	SS-CD19scFv-DmrA- CD52 GPIアンカーD NA	ATGCCCCCTGGGCCTGCTGTGGCTGGGCCTGGCCCTGCTGGGC GCCCTGCACGCCCAGGCCGATCCGATATCCAGATGACCCAG ACCACCAGCAGCCTGAGCGCCAGCCTGGGCGATAGAGTGAC CATCAGCTGCAGAGCCAGCCAGGACATCAGCAAGTACCTGA ACTGGTATCAGCAGAAACCCGACGGCACCGTGAAGCTGCTG ATCTACCACACCAGCAGACTGCACAGCGGCGTGCCAGCAG ATTTCTGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTACAGCCTGACCAT CTCCAACCTGGAACAGGAAGATATCGCTACCTACTTCTGTCA GCAAGGCAACACCCTGCCCTACACCTTCGGCGGAGGCACCA AGCTGGAATCACCAGCAGCACAAGCGGCAGCGGCAAGCCT GGATCTGGCGAGGGAAGCACCAAGGGCGAAGTGAACTGCA GGAAGCGGCCCTGGACTGGTGGCCCCAAGCCAGTCTCTGA GCGTGACCTGTACCGTGTCCGGCGTGTCCCTGCCTGACTATG GCGTGCTCTGGATCAGACAGCCACCCAGAAAGAGCGCCTGAA TGGCTGGGAGTGATCTGGGGCAGCGAGACAACCTACTACAA CAGCGCCCTGAAGTCCCGGCTGACCATCATCAAGGACAACCTC CAAGAGCCAGGTGTTCTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCG ACGACACCGCCATCTACTACTGCGCCAAGCACTACTACTACG GCGGCAGCTACGCCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACAAAGC GTGACCGTGTCCAGCGCTAGCGGCGGAGGTGGGAGCGGAGT GCAGGTGGAACCATCTCCCAGGAGACGGGCGCCTTCC CCAAGCGCGGCCAGACCTGCGTGGTGCCTACACCGGGATG CTTGAAGATGGAAGAAATTTGATTCCTCCCGGGACAGAAA CAAGCCCTTTAAGTTTATGCTAGGCAAGCAGGAGGTGATCCG AGGCTGGGAAGAAAGGGGTGCCCAGATGAGTGTGGGTGAGA GAGCCAACTGACTATATCTCCAGATTATGCCTATGGTGCCA CTGGGCACCCAGGCATCATCCACCACATGCCACTCTCGTCT TCGATGTGGAGCTTCTAAAAGTGAAGGCGGCCGCCACAGC CAAACCAGCAGCCCCTCAGCATCCAGCAACATAAGCGGAGG CATTTTCCTTTTCTTCGTGGCCAATGCCATAATCCACCTCTTC TGCTTCAGT
64	CD8ss-DmrC-CD8TM -41BB-CD3z-P2A-IgK ss-CD19scFv-DmrA-C D4TMタンパク質	MALPVTALLLPLALLLHAARPGSILWHEMWHEGLEEASRLYFG ERNVKGMEFVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQ EWCRCYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRISKASAGTGSDIYI WAPLAGTCGVLLLSLVITMHKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQ EEDGCSRFPEEEEGGCELVRKFSRSDAPAYQQGQNQLYNEL NLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ ALPPRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPSMETDTLLWVLLW VPGSTGSDIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQ QKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQED IATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSKPGSGEGSTKGE VKLQESGPGLVAPSQLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGL EWLGVWGSSETTYYN

10

20

30

40

【表 1 - 1 7】

配列番号	構築物	配列
		TAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSASGGGGSGVQ VETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLEDGKKFDDSSRDNRNPF KFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDIYAYGATGHP GIIPPHATLVFDVELLKLEGGRMALIVLGGVAGLLLLFIGLGIFFC VRCRHHRRRQ
65	CD8ss-DmrC-CD8TM -41BB-CD3z-P2A-IgK ss-CD19scFv-DmrA-C D4TM DNA	ATGGCTCTGCCTGTGACAGCTCTGCTGCTGCCTCTGGCCCTGC TGCTCCATGCCGCCAGACCCGGATCCATCCTCTGGCATGAGA TGTGGCATGAAGGCCTGGAAGAGGCATCTCGTTTGTACTTTG GGGAAAGGAACGTGAAAGGCATGTTTGAGGTGCTGGAGCCC TTGCATGCTATGATGGAACGGGGCCCCAGACTCTGAAGGA AACATCCTTTAATCAGGCCTATGGTCGAGATTAAATGGAGGC CCAAGAGTGGTGCAGGAAGTACATGAAATCAGGGAATGTCA AGGACCTCCTCCAAGCCTGGGACCTCTATTATCATGTGTTCC GACGAATCTCAAAGGCTAGCGCCGGCACTGGTTCCGACATCT ACATCTGGGCCCCCTCTGGCCGGCACATGTGGCGTGCTGCTGC TGAGCCTCGTGATCACCATGCATAAACGGGGCAGAAAGAAA CTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAA ACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAA GAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGCGGGTGAAGTTCAGCAG AAGCGCCGACGCCCCCTGCCTACCAGCAGGGCCAGAATCAGC TGTACAACGAGCTGAACCTGGGCAGAAAGGAAGAGTACGAC GTCCTGGATAAGCGGAGAGGCCGGGACCCTGAGATGGGCGG CAAGCCTCGGCGGAAGAACCCCCAGGAAGGCCTGTATAACG AACTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATC GGCATGAAGGGCGAGCGGAGGCGGGGCAAGGGCCACGACG GCCTGTATCAGGGCCTGTCCACCGCCACCAAGGATACCTACG ACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCCCAAGGTCAGGATCTG GCGCCACGAACCTTCTCTGTAAAGCAAGCAGGAGATGTTG AAGAAAACCCCGGGCCTTCAATGGAGACAGACACACTCCTG CTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCCACTGGTTCCG ATATCCAGATGACCCAGACCACCAGCAGCCTGAGCGCCAGC CTGGGCGATAGAGTGACCATCAGCTGCAGAGCCAGCGAGGA CATCAGCAAGTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAACCCGACG GCACCGTGAAGCTGCTGATCTACCACACCAGCAGACTGCACA GCGGCGTGCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCTCCGGCACCG ACTACAGCCTGACCATCTCAAACCTGGAACAGGAAGATATCG CTACCTACTTCTGTGAGCAAGGCAACACCCTGCCCTACACCT TCGGCGGAGGCACCAAGCTGGAAATCACCGGCAGCACAAAGC GGCAGCGGCAAGCCTGGATCTGGCGAGGGAAGCACCAAGGG CGAAGTGAAACTGCAGGAAAGCGGCCCTGGACTGGTGGCCC CAAGCCAGTCTCTGAGCGTGACCTGTACCGTGTCCGGCGTGT CCCTGCCTGACTATGGCGTGTCTGGATCAGACAGCCACCCA GAAAGGGCCTGGAATGGCTGGGAGTGATCTGGGGCAGCGAG ACAACCTACTACAACAGCGCCCTGAAGTCCCGGTGACCATC ATCAAGGACAACCTCAAGAGCCAGGTGTTCTGAAGATGAA CAGCCTGCAGACCGACGACACCGCCATCTACTACTGCGCCAA GCACTACTACTACGGCGGACGCTACGCCATGGACTACTGGGG CCAGGGCACAAGCGTGACCGTGTCCAGCGCTAGCGGCGGAG GTGGGAGCGGAGTGCAGGTGGAAACCATCTCCCAGGAGAC GGGCGCACCTTCCCCAAGCGCGGCCAGACCTGCGTGGTGCAC TACACCGGGATGCTTGAAGATGGAAGAAATTTGATTCTCTCC CGGGACAGAAACAAGCCCTTTAAGTTTATGCTAGGCAAGCA GGAGGTGATCCGAGGCTGGGAAGAAGGGGTGCCAGATGA GTGTGGGTGAGAGAGCCAACTGACTATATCTCCAGATTATG CCTATGGTGCCACTGGGCACCCAGGCATCATCCCACCACATG CCACTCTCGTCTTCGATGTGGAGCTTCTAAAAGTGAAGGCG GCCGATGGCCCTGATTGTGCTGGGGGGCGTCGCCGGCCTCC TGCTTTTCATTGGGCTAGGCATCTTCTTGTGTCAGGTGCCG GCACCGAAGGCGCCAATAA
67	CD8ss-DmrC-CD8TM -41BB-CD3z-P2A-IgK ss-CD19scFv-DmrA-C D4TMコドン最適化	MALPVTALLLPLALLLHAARPGSILWHEMWHEGLEEASRLYFG ERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQ EWCRRYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRRISKASAGTGSDIYI WAPLAGTCGVLLLSLVITMHKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQ

【表 1 - 1 8】

配列番号	構築物	配列
	タンパク質	EEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNEL NLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ ALPPRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPSMETDTLLLVVLLW VPGSTGDIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLWYQQ KPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDI ATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEV KLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLE WLGVIWGSSETTYNSALKSRLTIHKDNSKSQVFLKMNSLQDDT AIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQTSVTVSSPRGGGSGVQV ETISPGDGRTFPRKGQTCVVHYTGMLEDGKKFDSSRDNRNPKFK FMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLISPDIYAGATGHPGI IPPHATLVFDVELLKLEGGRMALIVLGGVAGLLLFIGLGIFFCVR CRHRRRQ
68	CD8ss-DmrC-CD8TM-41BB-CD3z-P2A-IgKss-CD19scFv-DmrA-CD4TMコドン最適化DNA	ATGGCCCTCCCTGTGACCGCCCTGCTGCTCCCCCTCGCCCTGT TGCTCCATGCTGCCCCGACCTGGATCCATCCTTTGGCACGAGA TGTGGCACGAGGGACTCGAAGAAGCGTCCCGGCTGTACTTCG GAGAGCGGAACGTGAAGGGATGTTTGAAGTGGTGGAAACCC CTGCACGCCATGATGGAGCGGGGTCCTCAGACCCCTAAAGA AACAAGCTTCAACCAGGCGTACGGGCGCGACCTGATGGAAG CCCAGGAGTGGTGCCGCAAGTACATGAAGTCCGGAAACGTG AAGGATCTGCTGCAAGCCTGGGATCTGTACTACCACGTGTTC AGAAGGATCTCAAAGGCTAGCGCCGGCACTGGTTCGGATAT CTACATTTGGGCACCGCTCGCCGGCACTTGTGGAGTGTCTGT GCTGTCCCTCGTGATCACCATGCATAAGAGGGGACGGAAGA AGCTGCTGTACATTTTCAAGCAGCCATTTCATGCGGCCTGTGC AAACCACCCAGGAGGAGGACGGGTGCAGCTGCCGGTTCCT GAGGAAGAGGAGGGCGGATGCGAACTGCGCGTGAAGTTCAG CCGAGCGCAGATGCTCCCGCATACCAACAGGGACAGAACC AGCTGTATAACGAGCTGAACCTGGGCAGAAAGGGAAGAGTAC GACGTCCTCGACAAGCGGCGGGGACGCGACCCAGAAATGGG AGGAAAGCCCCGCGGAAGAACCAGCAGGAAGGCTGTACA ACGAGTTGCAGAAAGACAAGATGGCTGAAGCTTACTCGGAG ATTGGCATGAAGGGGGAGAGAAGAAGAGGGAAGGGCCACG ACGGCCTTTACCAAGGACTGAGCACTGCCACCAAGGACACCT ACGATGCGCTGCACATGCAGGCCCTGCCCCGCGGTCCGGTT CGGGCGCGACTAATTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCCGGAGAT GTGGAGGAAAACCCTGGACCGTCCATGGAGACTGATACCT GCTTCTGTGGGTCTGCTCCTCTGGGTGCCGGGTCCACCGG TGACATCCAGATGACCCAGACCACTCATCCCTGAGCGCCTC TCTGGGTGATCGCGTGACTATCTCCTGCCGGGCGTTCGAGGA TATCTCCAAGTACCTGAAGTGGTACCAGCAAAAACCGGACG GGACCGTGAAACTGCTGATCTACCATACTTCCCGCCTTCATT CCGGAGTGCCCTCCCGGTTTTCCGGCTCGGGTTCAGGGACTG ATTATTCGCTGACCATTTCCAACCTGGAGCAGGAGGACATTG CGACCTACTTCTGCCAACAAGGAAACACCCTGCCCTACACTT TCGGTGGTGGAACCAAGCTCGAGATCACCAGATCAACCTCG GGCAGCGGGAAGCCGGGCAGCGGAGAGGGATCGACGAAAG GAGAAGTCAAGCTGCAGGAATCCGGCCCGGGACTGGTGGCC CCGAGCCAGTCGCTCTCCGTCACTTGCACCGTGTCCGGAGTG TCCTTGCCCGACTACGGAGTGTGATGATTTCGGCAGCCACCT CGCAAGGGCCTGGAATGGCTCGGCGTGATTTGGGGCTCAGA AACCACATACTACAACAGCGCCCTGAAGTCTCGGCTCACCAT CATCAAGGACAATTCCAAGTCCAAGTGTTCTCGGACTGAA TAGCTTGCAGACTGACGACACCGCGATCTACTACTGTGCCAA GCACTACTACTACGGCGGTTCCCTACGCCATGGACTACTGGGG ACAAGGAACTTCCGTGACTGTCTCCTCCCCTAGGGGGGGTGG TGTTTCGGGGGTCCAGGTGGAACCATTTCCCCCGCGACGG GCGCACCTTCCCGAAGCGCGGACAGACCTGTGTGGTGCATA TACCGGAATGCTCGAAGATGGAAGAAGTTTGACAGCTCCA GGGACCGCAACAAGCCTTTCAAGTTTATGCTTGGAAGCAGG AAGTCATCCGGGGCTGGGAAGAGGGAGTCGCCAGATGAGC GTCGGCCAGCGGGCCAAGCTGACGATCTCCCTGACTATGCC

【表 1 - 1 9】

配列番号	構築物	配列
		TACGGCGCTACCGGCCATCCCGGAATCATTCCGCCGCACGCA ACCCTCGTGTTTCGACGTGGAATTGCTCAAGCTGGAAGGCGGC CGCATGGCGCTGATAGTGCTCGGCGGAGTGGCCGGACTGCTG CTGTTTCATCGGCCTGGGCATCTTCTTCTGCGTGAGATGCCGCC ATAGAAGGCGGCAATGA
70	SS-DmrC-CD8TM-41 BB-CD3z-P2A-SS-CD 123scFv-DmrA-CD4T Mタンパク質	MRPTWAWWLFLVLLLALWAPARGGSILWHEMWHEGLEEASR LYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDL MEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRISKASAGTG SDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVTMHKRGRKKLLYIFKQPFMRPV QTTQEEDGCSRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNL YNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNEL QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDAL HMQALPPRGRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPSLWWRLWW LLLLLLLLWPMVWAPRADYKDIVMTQSHKFMSTSVGDRVNITC KASQNVDSAVAWYQQKPGQSPKALIYSASYRYSVGPDRFTGRG SGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQYYSTPWTFGGGTKLEIKRGG GGSGGGSGGGSGGGGSEVKLVESGGGLVQPGGSLSLSCAAS GFTFTDYMSWVRQPPGKALEWLALIRSKADGYTTEYSASVKG RFTLSRDDSQSILYLQMNALRPEDSATYYCARDAAYYSYYSPE GAMDYWGQTSVTVSSASGGGGSGVQVETISPGDGRTFPKRG QTCVVHYTGMLEDGKKFDSSRDNRNPKFKFMLGKQEVIRGWEE GVAQMSVQGQRAKLITSPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLK LEGGRMALIVLGGVAGLLFLFIQGLIFFCVRCRHRRRQ
71	SS-DmrC-CD8TM-41 BB-CD3z-P2A-SS-CD 123scFv-DmrA-CD4T M DNA	ATGCGCCCCACCTGGGCCTGGTGGCTGTTCTGCTGCTGCTG CTGGCCCTGTGGGCACCCGCTCGCGCGGATCCATCCTCTGG CATGAGATGTGGCATGAAGGCCTGGAAGAGGCATCTCGTTTG TACTTTGGGGAAGGAACGTGAAAGGCATGTTTGAGGTGCT GGAGCCCTTGCTATGCTATGATGGAACGGGGCCCCCAGACTCT GAAGGAAACATCCTTTAATCAGGCCTATGGTCGAGATTTAAT GGAGGCCCAAGAGTGGTGCAGGAAGTACATGAAATCAGGGA ATGTCAAGGACCTCCTCCAAGCCTGGGACCTCTATTATCATG TGTTCCGACGAATCTCAAAGGCTAGCGCCGGCACTGGTTCCG ACATCTACATCTGGGCCCTCTGGCCGGCACATGTGGCGTGC TGCTGCTGAGCCTCGTGATCACCATGCATAAACGGGGCAGAA AGAAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAG TACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTC CAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGCGGGTGAAGTTC AGCAGAAGCGCCGACGCCCTGCCTACCAGCAGGGCCAGAA TCAGCTGTACAACGAGCTGAACCTGGGCAGAAGGGAAGAGT ACGACGTCCTGGATAAGCGGAGAGGCCGGGACCTGAGATG GGCGGCAAGCCTCGGCGGAAGAACCCCCAGGAAGGCCTGTA TAACGAACTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCCTACAGCG AGATCGGCATGAAGGGCGAGCGGAGGCGGGGCAAGGGCCA CGACGGCCTGTATCAGGGCCTGTCCACCGCCACCAAGGATAC CTACGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCCCCAAGGGGCG GCCGCTCAGGATCTGGCGCCACGAACCTCTCTCTGTTAAAGC AAGCAGGAGATGTTGAAGAAAACCCCGGCCCTCAGATGTGG TGGCGCCTGTGGTGGCTGCTCCTGCTTCTGTTGCTCCTGTGGC CCATGGTGTGGGCCCTAGGGCGGACTACAAAGATATTGTGA TGACCCAGTCTCACAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACA GGGTCAACATCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGATAGT GCTGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGGCAATCTCCTAAA GCACTGATTTACTCGGCATCCTACCGGTACAGTGGAGTCCCT GATCGCTTCACAGGCAGGGGATCTGGGACAGATTCTCACTCTC ACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTAC TGTCAGCAATATTATAGCACTCCGTGGACGTTCCGGTGGAGGC ACCAAGCTGGAAATCAAACGTGGTGGTGGTGGTTCTGGTGGT GGTGGTTCTGGCGCGCGCGGCTCCGGTGGTGGTGGATCCGAG GTGAAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTACAGCCTGG GGTTCTCTGAGTCTCTCCTGTGCAGCTTCTGGATTACCTTC ACTGATTACTACATGAGCTGGGTCCGCCAGCCTCCAGGGAAG GCACTTGAGTGGTTGGCTTTGATTAGAAGCAAAGCTGATGGT TACACAACAGAATACAGTGCATCTGTGAAGGGTCGGTTACC

【表 1 - 2 0】

配列 番号	構築物	配列
		CTCTCCAGAGATGATTCCCAAAGCATCCTCTATCTTCAAATG AATGCCCTGAGACCTGAAGACAGTGCCACTTATTACTGTGCA AGAGATGCGGCCTACTATAGTTACTATAGTCCCGAGGGGGCT ATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCG AGCGCTAGCGGCGGAGGTGGGAGCGGAGTGCAGGTGGAAAC CATCTCCCCAGGAGACGGGCGCACCTTCCCCAAGCGCGGCCA GACCTGCGTGGTGCACTACACCGGGATGCTTGAAGATGGAA AGAAATTTGATTCTCCCGGGACAGAAACAAGCCCTTTAAGT TTATGCTAGGCAAGCAGGAGGTGATCCGAGGCTGGGAAGAA GGGGTTGCCAGATGAGTGTGGGTGAGAGAGCCAAACTGAC TATATCTCCAGATTATGCCTATGGTGCCACTGGGCACCCAGG CATCATCCCACCACATGCCACTCTCGTCTTCGATGTGGAGCTT CTAAAACTGGAAGGCGGCCGCATGGCCCTGATTGTGCTGGG GGGCGTCGCCGGCCTCCTGCTTTTCATTGGGCTAGGCATCTTC TTCTGTGTCAGGTGCCGGCACCGAAGGCGCCAATAA

10

【実施例】

【0306】

(実施例1)

DARIC結合性成分およびDARICシグナル伝達成分の構築

DARIC結合性成分およびDARICシグナル伝達成分の各々を、T7プロモーター、hScn分泌シグナルまたはhCD8分泌シグナルのそれぞれと、下流の直鎖化部位とを含有するプラスミドベクターに、別個にクローニングした。次いで、直鎖化されたプラスミドを、*in vitro*転写反応に続く、3'-ポリアダニル化ステップおよび5'-キャッピングステップのための鋳型として使用して、初代ヒトT細胞に電気穿孔される、*in vitro*転写された成熟IVT-mRNA (*in vitro transcribed mRNA*)を創出した。ヒトT細胞は、常磁性ビーズを使用する陰性選択により、PBMCから単離し、抗CD3/抗CD28ビーズと共に、48時間にわたり増殖させてから、電気穿孔にかけた。蛍光タンパク質をコードするIVT-mRNAを使用する、対照の電気穿孔を、並行して実施して、トランスフェクション効率を確認するか、または2Aタンパク質を連結した蛍光タンパク質を、DARIC成分のmRNA分子種に直接組み込んだ。

20

30

【0307】

結合性成分(CD19に特異的なscFv、および多量体化ドメインである、FKBP12(「DmrA」)、FKBP12 F36V(「DmrB」)、FRB(2021~2113)T2098L(「DmrC」))をコードする例示的なIVT-mRNAを、配列番号2、5、および8(CD19に特異的なscFv、および多量体化ドメインである、FKBP12、FKBP12 F36V、またはFRB(2021~2113)T2098Lのそれぞれ)に提示する。シグナル伝達成分をコードする例示的なIVT-mRNAを、配列番号16、20、および24(多量体化ドメインである、FRB(2021~2113)T2098L、FKBP12 F36V、またはFKBP12のそれぞれ、膜貫通ドメイン、4-1BB、およびCD3ζ)に提示する。

40

【0308】

多量体化は、ラパマイシンもしくはそのラパログ、またはジベレリンもしくはその誘導体などの架橋因子により促進する。ラパマイシンおよびその誘導体(例えば、C-16-(S)-7-メチルインドールラパマイシンとしてもまた公知であり、 $IC_{50} = 10 \text{ nM}$ とする、化学修飾された非免疫抑制性ラパマイシン類似体である、AP21967)は、FKBP12と、FRB含有融合タンパク質とのヘテロ二量体化を誘導しうる。AP1903またはAP20187は、ラパマイシンのFKBP12相互作用性成分に基づくホモ二価薬物であって、本明細書で記載されるホモ二量体化状況において使用されうるホモ二価薬物である。

50

【0309】

(実施例2)

DARIC成分をコードするT細胞の細胞傷害

2つのDARIC成分を発現させる組換えT細胞を、CD19抗原またはCD20抗原を発現させるように改変された、K562標的細胞(ヒト骨髄性白血病細胞系)と共にインキュベートして、標的細胞の溶解について検討した。略述すると、T細胞を、K562-CD19標的細胞系と、K562-CD20標的細胞系との50:50混合物と共に、3:1または10:1のT細胞対標的細胞比で、共インキュベートした。被験試料には、最終濃度を500nMとするヘテロ二価ラパログであるAP21967を添加した。標的細胞系の各々の相対百分率を、CD19抗原およびCD20抗原についてのフローサイトメトリー染色によりモニタリングして、細胞の溶解を評価した(図3を参照されたい)。

10

【0310】

初代ヒトT細胞についての4例の試料は、(i)広範に検証された単鎖キメラ抗原受容体(CAR)(CD19-CAR、配列番号14、陽性対照)；(ii)DARICシグナル伝達成分だけ(DSC、配列番号16、陰性対照)；(iii)DARIC結合性成分だけ(DBC-CD19、配列番号2、陰性対照)；および(iv)DARIC結合性成分およびDARICシグナル伝達成分の両方(DSC、配列番号16に加えたDBC-CD19、配列番号2)をコードするIVT-mRNAを伴う電気穿孔により調製した。標的細胞系の各々の相対百分率を、CD19抗原およびCD20抗原についてのフローサイトメトリー染色によりモニタリングした(図3A)。

20

【0311】

比細胞傷害パーセントを、各条件について、投入されたK562-CD19:K562-CD20比と比べた百分率の変化として計算した。検証されたCD19-CAR(配列番号14)を発現させるT細胞は、実質的な細胞傷害を示し、特に、T細胞対標的細胞比を10:1とするときに、生細胞ゲートにおける、CD20細胞と対比したCD19細胞の比の非対称を示した。DARIC結合性成分を単独で発現させるT細胞、DARICシグナル伝達成分を単独で発現させるT細胞、または両方のDARIC成分を発現させるが、ヘテロ二価ラパログであるAP21967の添加を伴わないT細胞は、有意な細胞傷害作用を示さなかった。AP21967の存在下では、両方のDARIC成分を発現させるT細胞との共インキュベーションの際に、実質的な特異的細胞傷害およびK562-CD19標的細胞の喪失が観察された(図3B)。

30

【0312】

これらの結果は、DARIC機構が、抗原特異的標的細胞の溶解を再構成しうることを示す。さらに、DARICデザインは、T細胞による抗原特異的な細胞傷害作用の薬理的制御を可能とする。

【0313】

(実施例3)

DARIC成分をコードするT細胞の、サイトカイン分泌プロファイル

2つのDARIC成分を発現させる組換えT細胞を、CD19抗原またはCD20抗原を発現させるように改変された、K562標的細胞(ヒト骨髄性白血病細胞系)と共にインキュベートして、サイトカインの発現を調べた。略述すると、IVT-mRNAをトランスフェクトされたT細胞を、1:1のT細胞対標的比を使用して、K562-CD19細胞系またはK562-CD20細胞系と共に、500nMのAP21967の添加を伴うかまたはを伴わずに、共インキュベートした。サイトカイン産生を解析するために、上清を単離した(図4を参照されたい)。

40

【0314】

初代ヒトT細胞についての2例の試料を単離し、増殖させ、次いで、(i)検証された単鎖CAR(CD19-CAR、配列番号13、陽性対照)；または(ii)DARIC結合性成分およびDARICシグナル伝達成分の両方(DSC、配列番号16に加えたDBC-CD19、配列番号2)をコードするIVT-mRNAを伴う電気穿孔により調

50

製した。増殖させ、電気穿孔されたT細胞を十分に洗浄して、残留サイトカインを成長培地から除去した後で、T細胞を、ヒトCD19抗原（左パネル）またはCD20抗原（右パネル）を発現させるK562細胞系と共に、1：1のT細胞対標的細胞比で、AP21967ラパログの存在下または非存在下において共インキュベートした。次いで、上清を回収し、サイトカイン捕捉抗体で標識されたビーズ（Becton Dickinson Cytokine Bead Array、ヒトTh1/Th2キット）を使用して、分析物の濃度についてアッセイした。組換えタンパク質の標準物質との比較により、ビーズアレイにより包含される6つのサイトカインの各々の絶対濃度の計算を可能とした。

【0315】

CD19を発現させるK562標的細胞と共に共インキュベートしたところ、陽性対照であるCD19-CARを発現させるT細胞が、実質的な量のインターフェロン-ガンマ（IFN γ ：interferon-gamma）およびインターロイキン2（IL-2：interleukin-2）を産生したことは、細胞傷害についてのかつての知見と符合する。DARIC成分を発現させるT細胞は、架橋因子であるAP21967の非存在下では、有意なサイトカイン産生を示さなかったが、AP21967の存在下では、IFN γ およびIL-2を、単鎖CD19-CAR陽性対照と同等であるかまたはこれを上回るレベルで産生した。

【0316】

（実施例4）

DARIC成分のレンチウイルスによる送達

初代ヒトT細胞を単離し、活性化させ、次いで、DARIC結合性成分およびDARICシグナル伝達成分（配列番号44および47）をコードするレンチウイルスベクターにより形質導入した。次いで、形質導入されたT細胞を、CD19（K562-CD19）を発現させるK562標的細胞またはCD20（K562-CD20）を発現させるK562標的細胞の約50：50混合物と共に共インキュベートして、抗原特異的細胞傷害作用について評価した。T細胞対K562細胞の全体比は、全ての試料中で5：1とした。対照試料には、架橋因子を添加しなかったのに対し、被験試料には、ラパマイシン（10 nM）またはAP21967（100 nM）を、分泌された抗原結合性成分およびシグナル伝達成分のための架橋因子として適用した（例えば、図1Bを参照されたい）。DARIC抗原結合性成分は、CD19抗原結合性scFvドメインおよびFKBP12多量体化ドメインを含み、mCherry蛍光タンパク質に連結された。DARICシグナル伝達成分上では、架橋成分に対する異なる特異性を有する、2つの独立の多量体化ドメイン：ラパマイシンに対して応答性であるFRB、ならびにラパマイシンおよびAP21967の両方に対して応答性であるFRB（2021～2113）T2098L変異体であって、各々が青色蛍光タンパク質（BFP：blue fluorescent protein）に連結された多量体化ドメインについて調べた。

【0317】

レンチウイルスにより形質導入されたT細胞についてのフローサイトメトリー解析により、mCherryタンパク質およびBFPタンパク質の両方の同時の発現が裏付けられたことから、両方のDARIC成分が、同じ細胞内で発現していたことが示される（各処理については、図5の第1列を参照されたい）。K562細胞についてのフローサイトメトリー解析は、変異体のFRB（2021～2113）T2098L多量体化ドメインを発現させる試料中の、CD19を発現させるK562細胞の、ラパマイシン依存性消失およびAP21967依存性消失を実証したのに対し、架橋因子の非添加は、細胞の生存に対して効果を及ぼさないことを実証した（各処理については、図5の第2列の上段の行を参照されたい）。しかし、ラパマイシンだけが、FRB二量体化ドメインを発現するT細胞により、K562-CD19細胞の消失を活性化させることが可能であったのに対し、AP21967、または架橋因子を添加しないことは、細胞の生存に対して効果を及ぼさなかった（各処理については、図5の第2列の第2行を参照されたい）。これらのデータは、DARIC多部分成分系により達成されうる、細胞傷害活性の特異性を示す。

【0318】

加えて、一方の集団が、DARIC抗原結合性成分を発現させており、他の集団が、DARICシグナル伝達成分を発現させている、2つの顕著に異なるT細胞集団を混合した。この混合細胞集団は、CD19を発現させるK562細胞およびCD20を発現させるK562細胞と共に共培養されると、K562-CD19細胞に対するラパマイシン依存性細胞傷害応答を示したが、架橋因子の非存在は、標的細胞の生存に対して効果を及ぼさなかった（図5の下段の行を参照されたい）。これらのデータは、一方のT細胞集団によって発現されたDARIC抗原結合性成分が、DARICシグナル伝達成分を発現させる、異なるT細胞集団とトランスで作用し、標的細胞を攻撃することを示す。

【0319】

CD19を標的化するDARIC結合性成分が、FRBに基づくDmrCドメインを含み、DARICシグナル伝達成分が、FKBP12に基づくDmrAドメインを含む（配列番号12、31）ように、多量体化ドメインをスワッピングすることにより、DARIC系の柔軟性を検証した。初代ヒトT細胞を、「スワッピングされた」DARIC成分を発現させるように生成し、次いで、K562-CD19標的細胞とK562-CD20標的細胞との50：50混合物と共に、表示濃度のラパマイシンの非存在下または存在下で共インキュベートした（図10）。架橋因子を含有する被験試料中では、抗原特異的細胞傷害が観察されたが、ラパマイシンを欠く対照試料では観察されなかった。これらのデータは、DARIC系の構築が、柔軟であり、様々な多量体化ドメインの方向付けに適することを裏付ける。

【0320】

（実施例5）

亜治療（sub-therapeutic）レベルまでの架橋因子の滴定

広範にわたる架橋因子（ラパマイシンおよびエベロリムス）濃度について調べて、DARIC系が、臨床的に関連する濃度で機能しうののかどうかについて決定した。実施例4における通り、初代ヒトT細胞を単離し、活性化させ、次いで、DARIC結合性成分（配列番号1、4、7）およびDARICシグナル伝達成分（配列番号15、19、23）を発現させるレンチウイルスベクターにより形質導入した。次いで、DARICを発現させるT細胞を、K562-CD19標的細胞とK562-CD20標的細胞との50：50混合物と共に共インキュベートして、抗原特異的細胞傷害作用について評価した。T細胞対K562細胞の全体比は、全ての試料中で5：1とした。

【0321】

表示濃度のラパマイシンおよびエベロリムスを、共培養物試料に添加し、次いで、細胞傷害応答を、フローサイトメトリーにより評価した（図6）。細胞傷害応答は、ナノモル濃度未満の薬物濃度であって、これらの薬物を、診療所において患者に投与する場合に現在達成される、ラパマイシンおよびエベロリムスの定常状態濃度をはるかに下回る薬物濃度まで維持された。

【0322】

（実施例6）

係留されたDARIC結合性成分の使用

一連のさらなるDARIC分子であって、抗原結合性成分が、細胞外空間に放出されるのではなくT細胞表面に維持されるDARIC分子について調べた（例えば、図1Iを参照されたい）。複数のタンパク質領域および膜貫通ドメイン（配列番号50、53、56、59）であって、各々が、DARIC結合性成分およびDARICシグナル伝達成分の多量体化を支配するスペーシングパラメータまたは立体パラメータを変化させたタンパク質領域および膜貫通ドメインを使用して、結合性ドメインをT細胞表面にアンカリングした。前出の実施例における通り、レンチウイルスにより形質導入されたT細胞、およびK562-CD19標的細胞とK562-CD20標的細胞との50：50混合物を使用する、抗原特異的細胞傷害応答を使用して、係留されたDARIC結合性成分について評価した。T細胞対K562細胞の全体比は、全ての試料中で5：1とし、被験試料中では、

表示濃度の架橋因子を使用した。

【0323】

各デザインは、K562-CD19細胞に対する、架橋因子応答性の、抗原特異的細胞傷害作用の特性を有した。係留されたDARIC結合性成分であって、CD8ヒンジドメイン/CD8膜貫通ドメインを含有するDARIC結合性成分（配列番号53）は、架橋因子の非存在下で、測定可能なレベルの活性を示した。係留されたDARIC結合性成分であって、CD4膜貫通ドメインとともにIgG4-CH2CH3スパーサーを含む、DARIC結合性成分（配列番号56）は、ラパマイシン（架橋因子）を添加すると、最も強力な細胞傷害性応答をもたらしたが、CD4膜貫通ドメインだけを含む係留されたDARIC結合性成分（配列番号50）は、中程度に活性であった（図7）。また、CD52タンパク質に由来するGPIシグナル配列を含むDARIC結合性成分（図1Kの概略図を参照されたい）についても調べた。GPIによりアンカリングされたDARICは、適切な架橋因子の存在下に限り、抗原特異的細胞傷害応答をもたらした（図8）。これらのデータは、DARIC結合性成分が、放出される場合もあり、細胞表面に係留される場合もあるが、なおもDARICシグナル伝達成分と共に機能することを裏付ける。

10

【0324】

係留されたDARIC結合性成分を含む、さらなるレンチウイルス構築物であって、修飾されたCD4膜貫通ドメインを含み、他の係留された膜貫通DARIC結合性成分に対して活性が改善された構築物（配列番号64～69）を作り出し、同様にヒトT細胞内で調べた。加えて、DARICシグナル伝達成分およびDARIC結合性成分を、2つの成分（図11で使用される成分など）の間に配置した2Aペプチドを含む、単一のオープンリーディングフレームに組み込み、これにより、単一のレンチウイルスベクターを使用する、単純化されたDARIC送達スキームについても検証した（配列番号66、69、72）。

20

【0325】

任意のDARIC構成部分のデザインについて、例えば、二方向性プロモーターを含むもの（配列番号73）などの様々なレンチウイルスベクターデザインを使用して、または代替的な導入遺伝子送達ベクター（例えば、アデノウイルスまたはAAV）および例えば、相同組換え（遺伝子特異的ヌクレアーゼを使用して、高効率に刺激されうる工程）を介する導入遺伝子の標的化された組込みを含む導入遺伝子送達スキームを使用して、類似の結果が期待される。

30

【0326】

（実施例7）

さらなるモデル抗原のDARICによる標的化

DARIC系を、さらなるモデル抗原に拡張して、本明細書で想定される、薬物調節型多部分受容体を発現させる人工細胞の、広範な適用可能性を示した。CD123抗原を発現させるK562標的細胞系を、この抗原を、ピューロマイシン選択カセットを含むレンチウイルスベクター（配列番号74）にサブクローニングすることにより作り出し、レンチウイルス粒子を生成し、K562細胞に感染させ、ピューロマイシンにより選択した。初代ヒトT細胞を単離し、活性化させ、次いで、CD123を標的化するDARIC結合性成分を、DARICシグナル伝達成分と共にコードするレンチウイルスベクターにより形質導入した（配列番号70～72）。K562-CD19標的細胞とK562-CD123標的細胞との50：50混合物と共に共培養された、レンチウイルスにより形質導入されたT細胞を使用し、従来のCD123を標的化するキメラ抗原受容体（CAR）を陽性対照として使用して、抗原特異的細胞傷害応答を評価した。T細胞対K562細胞の全体比は、全ての試料中で5：1とし、被験試料中では、表示濃度の架橋因子を使用した。陽性対照試料中、およびラパマイシンを含有するCD123-DARIC試料中では、細胞傷害が観察された。結果は、多様な抗原を標的化するDARIC系によれば、架橋因子依存性細胞傷害活性を達成しうることを裏付けた（図9）。

40

【0327】

50

(実施例 8)

抗架橋因子を使用する、D A R I Cの不活化

多量体化ドメインのうちの1つへの結合について競合する薬理学的薬剤の添加による、D A R I C系の不活化について調べた。従来のC D 1 9を標的化するC A Rを発現させる初代ヒトT細胞、またはC D 1 9を標的化するD A R I C成分(配列番号66)を発現させる初代ヒトT細胞を、K 5 6 2 - C D 1 9細胞とK 5 6 2 - C D 2 0細胞との50:50混合物と共に共インキュベートした。C D 1 9を標的化するC A R(配列番号14)を発現させるT細胞については、ラパマイシンの存在下または非存在下のいずれにおいても、細胞傷害が観察された。これに対し、C D 1 9標的化D A R I C T細胞は、ナノモル濃度未満のレベルのラパマイシンの存在下で、効率的な抗原特異的細胞傷害を示したが、架橋因子の非存在下では、細胞傷害を示さなかった(図11)。しかし、F K 5 0 6を添加すると、D A R I C T細胞については、抗原特異的細胞傷害の顕著な低減が観察されるのに対し、C A R T細胞については、最小限の低減しか観察されなかったことから、F K 5 0 6は、D A R I C構成部分のカップリングを破壊し、抗原に駆動される細胞傷害応答を不活化したことが示される。

10

【0328】

本実施例は、架橋因子の競合的阻害剤が、D A R I C抗原受容体を実質的に阻害し、したがって、投与された細胞の過剰な増殖または活性化の結果として生じうる病態を制限する、臨床的使用に適することを示す。いかなる特定の理論に束縛されることも望まずに述べると、この戦略は、T細胞増殖性応答を促進する、細胞内シクロフィリンを阻害するF K 5 0 6について当てはまる通り、阻害剤が、細胞応答に寄与する天然タンパク質を伴う、さらなる免疫抑制作用機構を有する場合に、特に、有効でありうる。

20

【0329】

(実施例 9)

内因性シグナル伝達受容体を活用するD A R I C系

2つの分泌性D A R I C成分(配列番号75)をもたらすように、D A R I C系をデザインした。D A R I C結合性成分は、C D 1 9に結合する結合性ドメインを含み、D A R I Cシグナル伝達成分は、C D 3に結合する結合性ドメインと、多量体化ドメインを含む。改変された、共培養物による細胞傷害実験を使用して、この系について調べる。2つの分泌性D A R I C成分をコードするレンチウイルス粒子により形質導入されたT細胞に由来する上清を、K 5 6 2 - C D 1 9標的細胞とK 5 6 2 - C D 2 0標的細胞との50:50ミックスであって、形質導入されていないT細胞もまた含有するミックスに移す。細胞傷害を、架橋因子の存在下および非存在下で、測定する。架橋因子を施さずにおくことにより、カップリングを解除された状態に保たれた上清を含む対照試料は、何ら抗原特異的細胞傷害を示さないことが予測される。しかし、上清および架橋因子を添加した試料は、抗原特異的細胞傷害応答を誘発することが予測される。この結果は、細胞傷害応答を、薬物調節型様式で、全身において誘発する、可溶性D A R I C系を発現させるように、人工細胞を作製しうることを裏付ける。

30

【0330】

上記で記載した多様な実施形態を組み合わせて、さらなる実施形態をもたらすことができる。本明細書で言及され、かつ／または出願データシートで列挙される、米国特許、米国特許出願公開、米国特許出願、外国特許、外国特許出願、および非特許公開の全ては、参照によりそれらの全体において本明細書に組み込まれる。多様な特許、出願、および公開の概念を援用して、なおさらなる実施形態をもたらすことが必要な場合、実施形態の態様を改変することもできる。

40

【0331】

上記で詳述した記載に照らして、これらの変化および他の変化を実施形態に施すことができる。一般に、以下の特許請求の範囲では、使用される用語は、特許請求の範囲を、本明細書で開示される具体的な実施形態および特許請求の範囲に限定するものとみなされるべきではなく、全ての可能な実施形態を、このような特許請求の範囲が付与される、同等

50

物の全ての範囲と共に含むものとみなされるべきである。したがって、特許請求の範囲は、本開示により限定されるものではない。

【図 1 A】

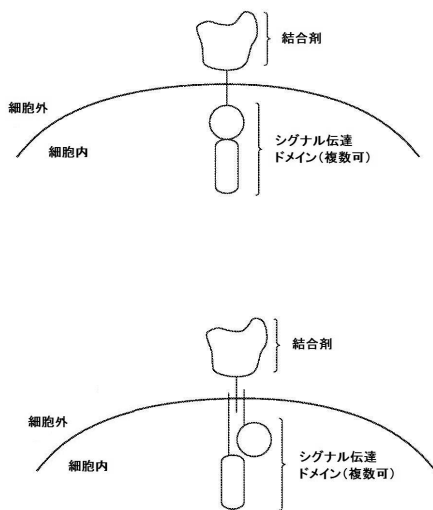


FIG. 1A

【図 1 B】

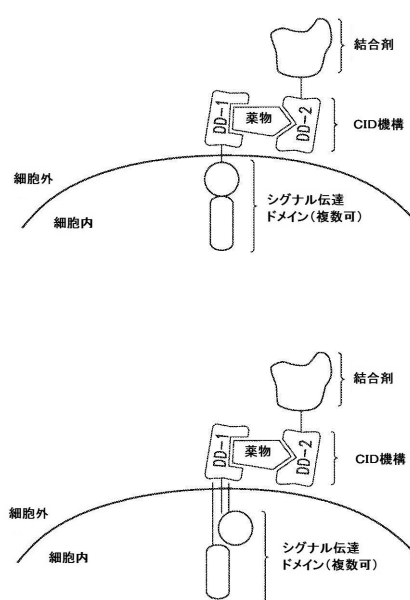


FIG. 1B

【図 1 C】

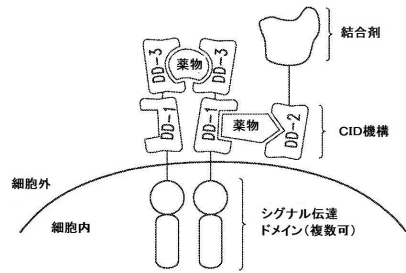


FIG. 1C

【図 1 E】

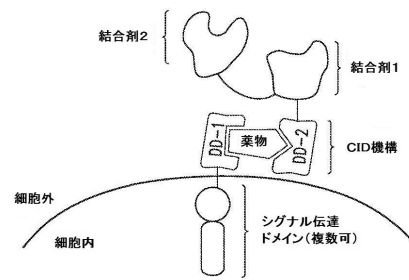


FIG. 1E

【図 1 D】

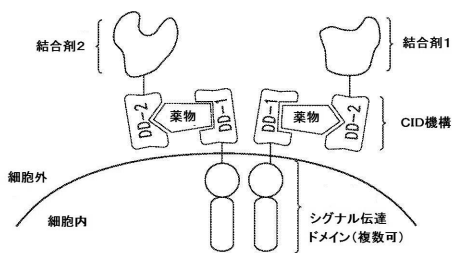


FIG. 1D

【図 1 F】

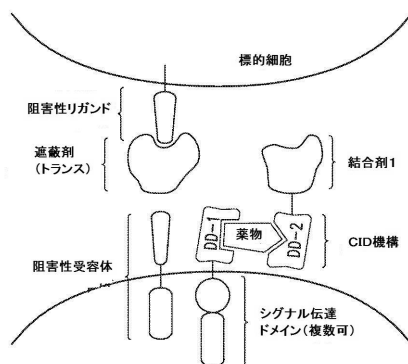


FIG. 1F

【図 1 G】

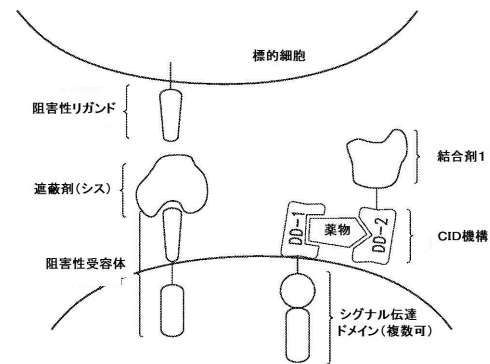


FIG. 1G

【図 1 H】

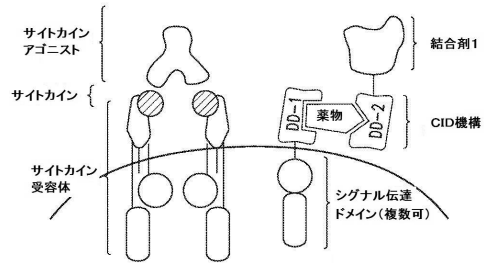


FIG. 1H

【図 1 I】

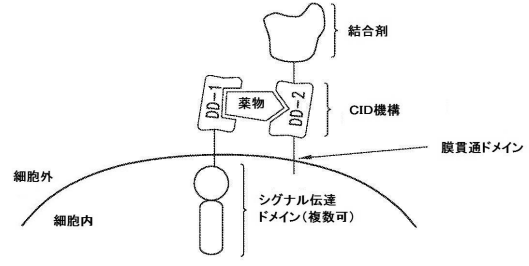


FIG. 1I

【図 1 J】

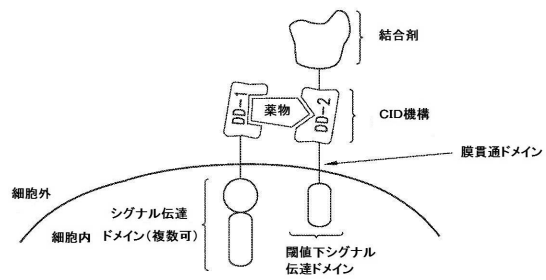


FIG. 1J

【図 1 K】

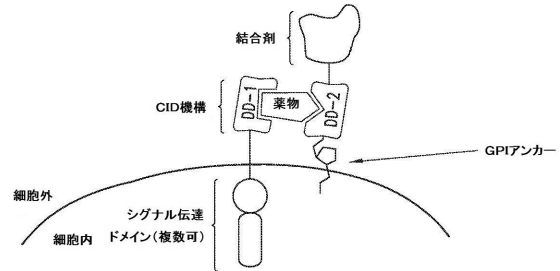


FIG. 1K

【図 1 L】

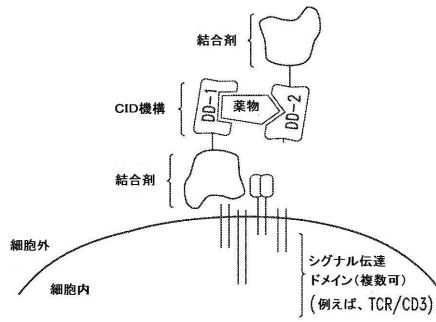


FIG. 1L

【図 1 M】

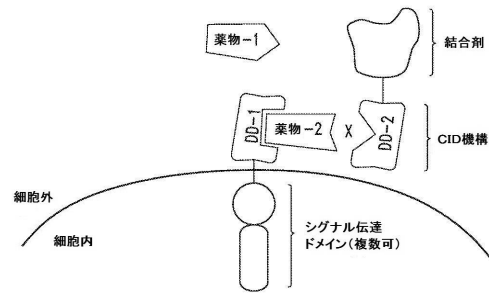


FIG. 1M

【図 2】

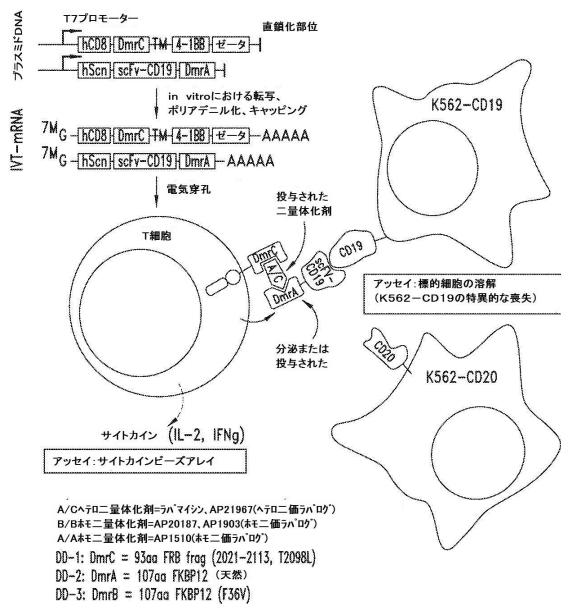


FIG. 2

【図 3 A】

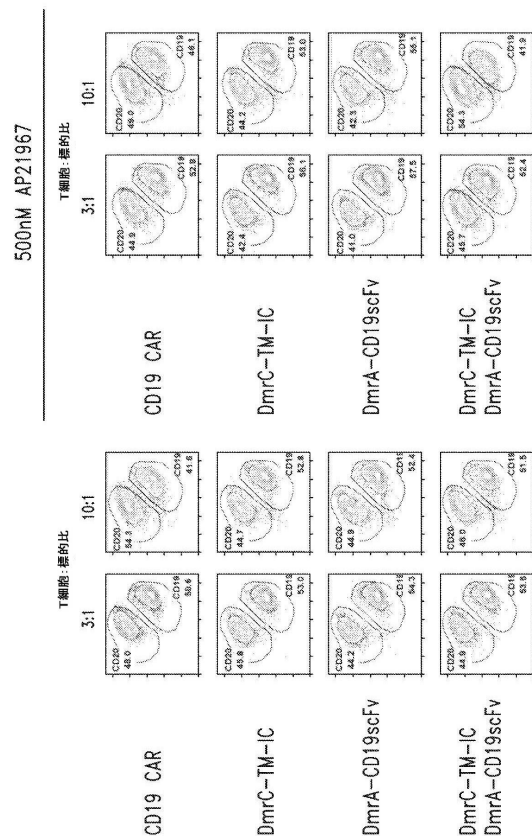


FIG. 3A

【図 3 B】

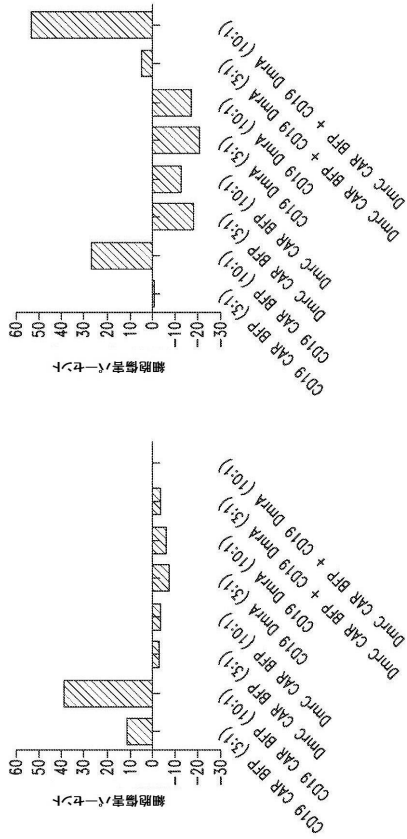


FIG. 3B

【図 4】

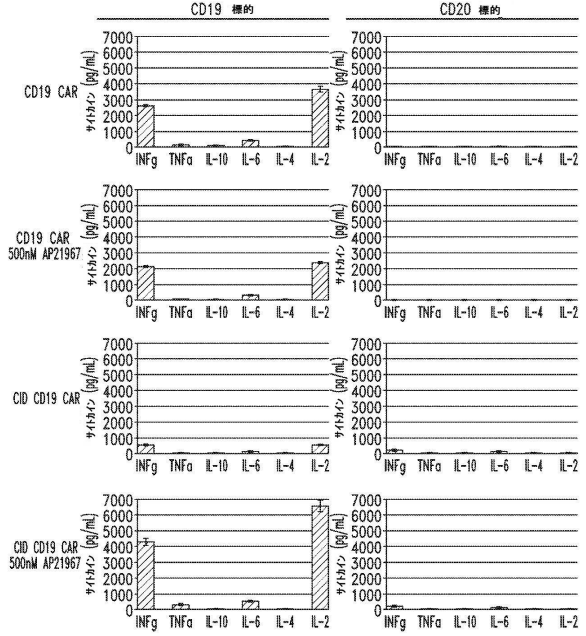


FIG. 4

【図 5 - 1】

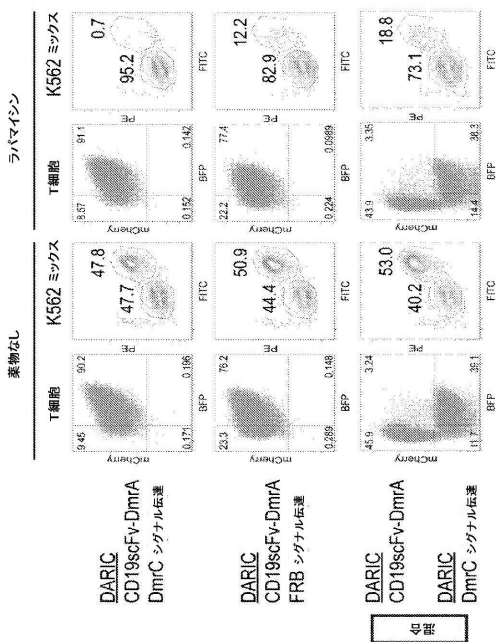


FIG. 5

【図 5 - 2】

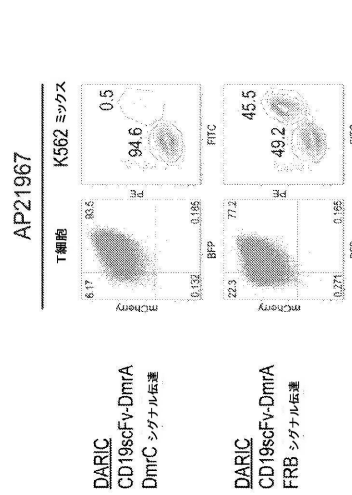


FIG. 5 (続き)

【図 6】

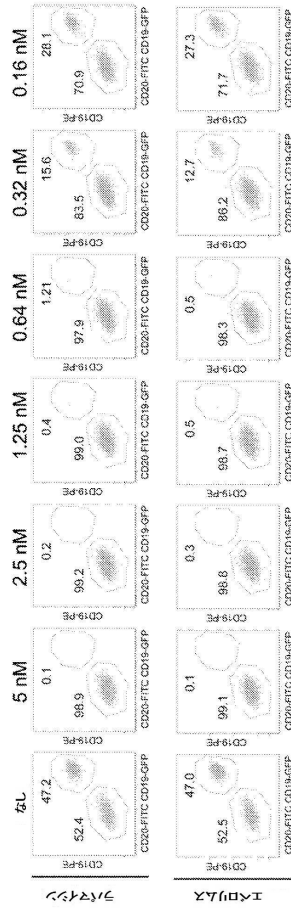


Fig. 6

【図 7 - 2】

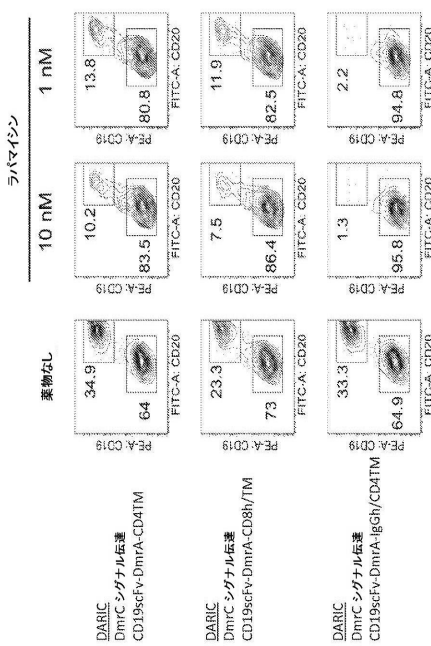


FIG. 7 (続き)

【図 7 - 1】

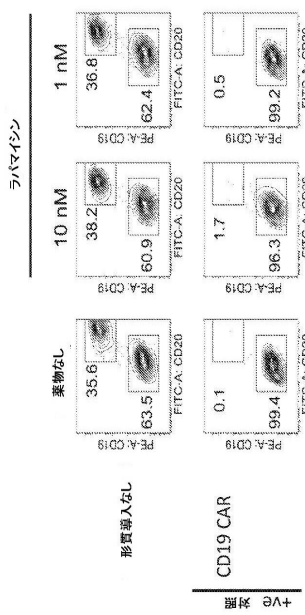


FIG. 7

【図 8】

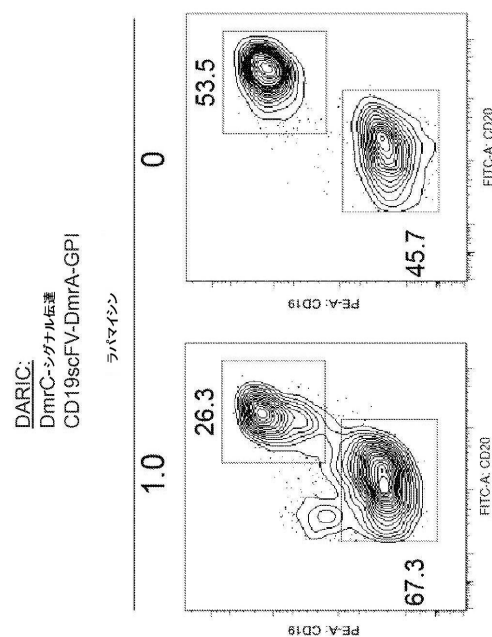


FIG. 8

【図 9】

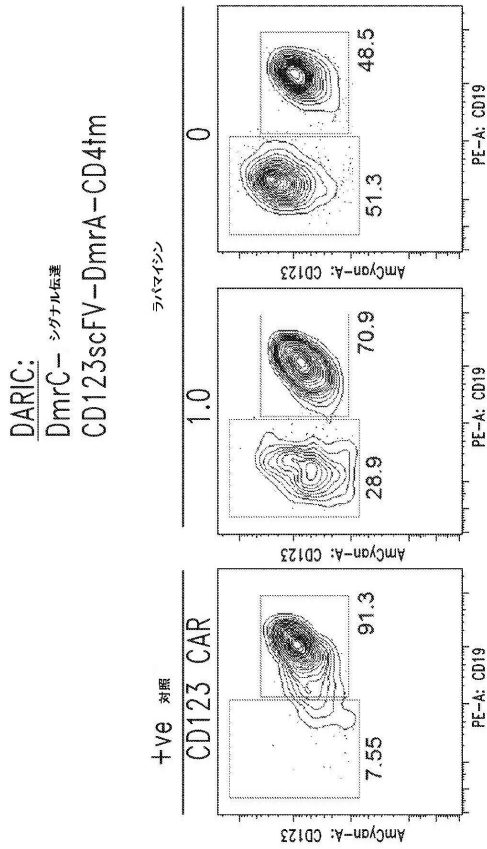


FIG. 9

【図 10】

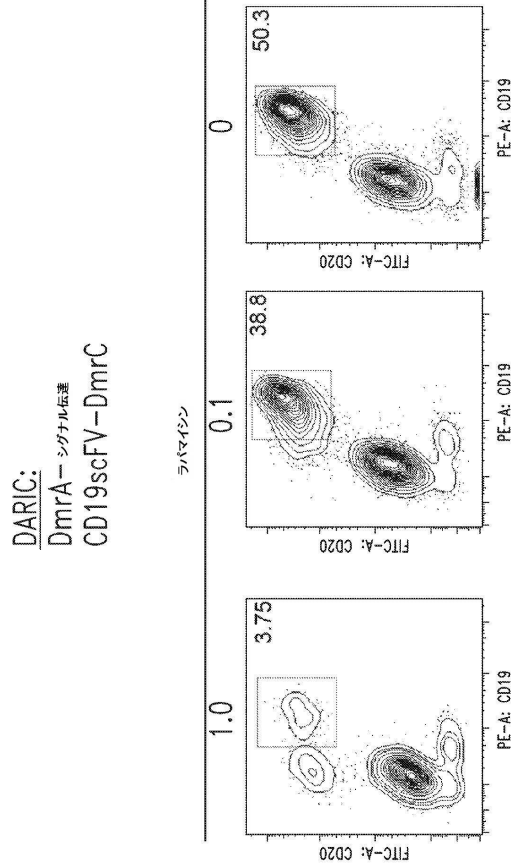


FIG. 10

【図 11】

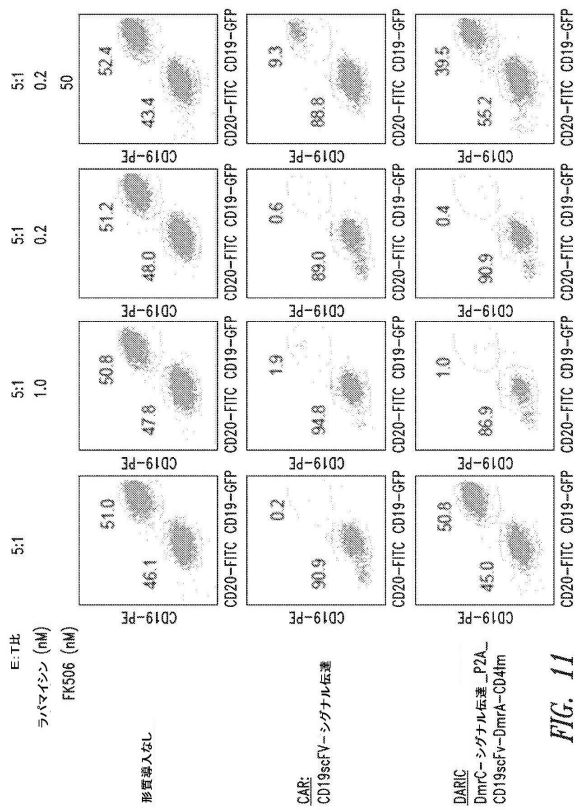


FIG. 11

【配列表】

0006543626000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5	
A 6 1 P 29/00	(2006.01)	A 6 1 P 29/00		
A 6 1 P 37/06	(2006.01)	A 6 1 P 37/06		
A 6 1 K 35/12	(2015.01)	A 6 1 K 35/12		
A 6 1 K 38/17	(2006.01)	A 6 1 K 38/17		
A 6 1 K 45/00	(2006.01)	A 6 1 K 45/00		
A 6 1 P 37/02	(2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1	
A 6 1 K 35/76	(2015.01)	A 6 1 P 37/02		
A 6 1 K 39/395	(2006.01)	A 6 1 K 35/76		
A 6 1 K 45/06	(2006.01)	A 6 1 K 39/395		D
A 6 1 K 31/436	(2006.01)	A 6 1 K 39/395		N
A 6 1 K 31/519	(2006.01)	A 6 1 K 45/06		
A 6 1 K 31/505	(2006.01)	A 6 1 K 31/436		
A 6 1 K 31/706	(2006.01)	A 6 1 K 31/519		
A 6 1 K 31/675	(2006.01)	A 6 1 K 31/505		
A 6 1 K 31/7056	(2006.01)	A 6 1 K 31/706		
A 6 1 K 31/365	(2006.01)	A 6 1 K 31/675		
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 K 31/7056		
A 6 1 K 31/201	(2006.01)	A 6 1 K 31/365		
A 6 1 K 48/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00		
		A 6 1 K 31/201		
		A 6 1 K 48/00		

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ジャーヴォル, ジョーダン

アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 1 2 6, シアトル, 3 0 ティーエイチ アベニュー サウスウエスト 7 3 5 1

(72)発明者 アストラカーン, アレクサンダー

アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 1 2 6, シアトル, 3 1 エスティー アベニュー サウスウエスト 8 6 2 6

(72)発明者 チェルト, マイケル

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 4 6, ブルックライン, ウェストボーン テラス 1 2 0 エー

審査官 清野 千秋

(56)参考文献 特表2016-508518 (JP, A)

国際公開第2014/127261 (WO, A1)

特表2014-504294 (JP, A)

特表平08-510896 (JP, A)

特表2002-503667 (JP, A)

特表2002-508971 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 5/00

C 1 2 N 15/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)
WPIDS/WPIX (STN)