(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2025-500465
(P2025-500465A)
(43)公表日　令和7年1月9日(2025.1.9)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
C12N 5/10 (2006.01)		C12N	5/10	ZNA	4B065
C07K 14/71 (2006.01)		C07K	14/71		4C085
C07K 19/00 (2006.01)		C07K	19/00		4C087
C12N 15/12 (2006.01)		C12N	15/12		4H045
C12N 15/62 (2006.01)		C12N	15/62	Z	

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全95頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-538173(P2024-538173)
(86)(22)出願日　令和4年12月22日(2022.12.22)
(85)翻訳文提出日　令和6年8月21日(2024.8.21)
(86)国際出願番号　PCT/GB2022/053359
(87)国際公開番号　WO2023/118878
(87)国際公開日　令和5年6月29日(2023.6.29)
(31)優先権主張番号　2118797.6
(32)優先日　令和3年12月22日(2021.12.22)
(33)優先権主張国・地域又は機関
英国(GB)
(81)指定国・地域　AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV
最終頁に続く

(71)出願人　522164226
クウェル セラピューティックス リミテッド
イギリス、ダブリュー１２　０ビーゼット ロンドン、８４ ウッド レーン、トランスレーション アンド イノベーション ハブ
(74)代理人　110000040
弁理士法人池内アンドパートナーズ
(72)発明者　マルティネス‐ローデラ、マーク
イギリス、ロンドン グレーター ロンドン ダブリュー１２　０ビーゼット、８４ ウッド レーン、トランスレーション アンド イノベーション ハブ、シー／オー クウェル セラピューティックス リミテ
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　構成的サイトカイン受容体

(57)【要約】
少なくとも一部分がＥＰＯＲの細胞外領域に由来するエキソドメインを含む組換えタンパク質が提供され、前記エキソドメインは、シグナル誘導物質分子の非存在下で前記組換えタンパク質と第２のタンパク質との二量体化と前記Ｔ細胞へのシグナルの提供とを可能にする二量体化ドメインを含む。また、このような組換えタンパク質をコードする核酸分子、組換え構築物、ベクター、および該核酸分子を含有する細胞、このような細胞の作製方法、ならびに治療目的のそれらの使用も提供される。
【選択図】なし

10

20

【特許請求の範囲】
【請求項１】
組換えタンパク質を含むＴ細胞であって、前記組換えタンパク質が、少なくとも一部分がＥＰＯＲの細胞外領域に由来するエキソドメインを含み、前記エキソドメインが、シグナル誘導物質分子の非存在下で前記組換えタンパク質と第２のタンパク質との二量体化と前記Ｔ細胞へのシグナルの提供とを可能にする二量体化ドメインを含む、Ｔ細胞。
【請求項２】
前記エキソドメインの前記少なくとも一部分が、配列番号３または配列番号５に対して少なくとも７０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項１に記載のＴ細胞。
【請求項３】
ＥＰＯＲの細胞外領域に由来する前記エキソドメインの前記少なくとも一部分が前記二量体化ドメインを含む、請求項１または２に記載のＴ細胞。
【請求項４】
前記二量体化ドメインがロイシンジッパーまたはシステイン残基である、請求項１から３のうちのいずれか一項に記載のＴ細胞。
【請求項５】
前記二量体化がジスルフィド結合二量体化である、請求項１から４のうちのいずれか一項に記載のＴ細胞。
【請求項６】
前記二量体化がホモ二量体化またはヘテロ二量体化である、請求項１から５のうちのいずれか一項に記載のＴ細胞。
【請求項７】
前記シグナル誘導物質分子がＥＰＯである、請求項１から６のうちのいずれか一項に記載のＴ細胞。
【請求項８】
前記エキソドメインが、配列番号２に示すアミノ酸配列、もしくは配列番号２に対して少なくとも８０％の配列同一性を有し、かつ１３０位にシステイン残基を有するバリアントを含むか、またはそれからなり、あるいは、配列番号４に示すアミノ酸配列、もしくは配列番号４に対して少なくとも８０％の配列同一性を有し、かつ１５４位にシステイン残基を有するバリアントを含むか、またはそれからなる、請求項１から７のうちのいずれか一項に記載のＴ細胞。
【請求項９】
前記Ｔ細胞がＴ制御性細胞またはその前駆体である、請求項１から８のうちのいずれか一項に記載のＴ細胞。
【請求項１０】
前記第２のタンパク質が前記組換えタンパク質と異なる、請求項１から９のうちのいずれか一項に記載のＴ細胞。
【請求項１１】
前記Ｔ細胞が前記第２のタンパク質をさらに含む、請求項１０に記載のＴ細胞。
【請求項１２】
前記Ｔ細胞が、キメラ抗原受容体、異種ＴＣＲ、安全スイッチポリペプチド、異種ＦＯＸＰ３ポリペプチド、および／または変異カルシニューリンタンパク質をさらに含む、請求項１から１１のうちのいずれか一項に記載のＴ細胞。
【請求項１３】
前記エキソドメインが、ＥＰＯＲに対して異種の１つ以上のドメインまたは配列を含む、請求項１から１２のうちのいずれか一項に記載のＴ細胞。
【請求項１４】
前記エキソドメインが、１つ以上のタグペプチド、自殺部分、および／または誘導性二量体化ドメインを含む、請求項１３に記載のＴ細胞。
【請求項１５】

前記ＥＰＯＲの細胞外領域がＥＰＯに結合可能である、請求項１から１４のうちのいずれか一項に記載のＴ細胞。
【請求項１６】
前記組換えタンパク質がエンドドメインを含む、請求項１から請求項１５のうちのいずれか一項に記載のＴ細胞。
【請求項１７】
前記組換えタンパク質が、エンドドメインを含むシグナル伝達タンパク質と会合可能である、請求項１から１５のうちのいずれか一項に記載のＴ細胞。
【請求項１８】
前記エンドドメインが、ＪＡＫ１結合モチーフおよび／またはＪＡＫ２結合モチーフを含むチロシンキナーゼ活性化ドメインと、ＪＡＫ１および／またはＪＡＫ２によってリン酸化され得る１つ以上のチロシン残基を含むチロシンエフェクタードメインとを含む、請求項１６または１７に記載のＴ細胞。
【請求項１９】
前記チロシンエフェクタードメインが、少なくとも１つのＳＴＡＴ会合モチーフ、好ましくはＳＴＡＴ５会合モチーフを含む、請求項１８に記載のＴ細胞。
【請求項２０】
前記エンドドメインが、ＪＡＫ３結合モチーフをさらに含む、請求項１６から１９のうちのいずれか一項に記載のＴ細胞。
【請求項２１】
前記エンドドメインが、配列番号８に示すＥＰＯＲエンドドメイン、もしくは配列番号８に対して少なくとも４０％の配列同一性を有するＥＰＯＲエンドドメインバリアントを含むか、またはそれからなる、請求項１６から２０のうちのいずれか一項に記載のＴ細胞。
【請求項２２】
前記ＥＰＯＲエンドドメインバリアントが、ＥＰＯＲエンドドメイン配列へのＳＨＰ１の結合を減少させるための少なくとも１つの改変を含み、特に、前記改変が、配列番号８のＹ１８１および／またはＹ１８３に対する改変である、請求項２１に記載のＴ細胞。
【請求項２３】
前記ＥＰＯＲエンドドメインバリアントが、前記ＥＰＯＲエンドドメインのうち少なくとも、配列番号８のＹ１８１および／またはＹ１８３を含む部分がトランケートされたトランケート型ＥＰＯＲエンドドメインを含むか、またはそれからなり、例えば、前記トランケート型ＥＰＯＲエンドドメインが、配列番号６２、配列番号１０６、もしくは配列番号１０７の配列、または配列番号６２、配列番号１０６、もしくは配列番号１０７に対して少なくとも８０％の配列同一性を有するバリアントを含むか、またはそれからなる、請求項２１または２２に記載のＴ細胞。
【請求項２４】
前記バリアントＥＰＯＲエンドドメインバリアントが、少なくとも配列番号１０８の配列または配列番号８との差異がアミノ酸２個以内である配列の挿入を含み、例えば、前記バリアントが、少なくとも配列番号１０９、配列番号１１０、配列番号１１１、配列番号１１２、もしくは配列番号１１３の配列、または配列番号１０９、配列番号１１０、配列番号１１１、配列番号１１２、もしくは配列番号１１３との差異がアミノ酸１個以内もしくは２個以内である配列の挿入を含む、請求項２１から２３のうちのいずれか一項に記載のＴ細胞。
【請求項２５】
前記ＥＰＯＲエンドドメインバリアントが、配列番号１１４、配列番号１１５、もしくは配列番号１１６の配列、または配列番号１１４、配列番号１１５、もしくは配列番号１１６に対して少なくとも８０％の配列同一性を有するバリアントを含むか、またはそれからなる、請求項２４に記載のＴ細胞。
【請求項２６】

請求項１から２５のうちのいずれか一項で定義される組換えタンパク質をコードする塩基配列を含む核酸分子を含むＴ細胞。
【請求項２７】
請求項２６で定義される核酸分子と１つ以上のさらなる塩基配列とを含む構築物を含むＴ細胞。
【請求項２８】
前記さらなる塩基配列が、（ｉ）調節配列であり、かつ／または、（ｉｉ）目的のタンパク質をコードし、かつ／あるいは、前記目的のタンパク質が、（ｉｉｉ）治療用タンパク質、（ｉｖ）抗原受容体、（ｖ）ＣＡＲもしくはＴＣＲ、（ｖｉ）安全スイッチポリペプチド、または（ｖｉｉ）ＦＯＸＰ３ポリペプチドである、請求項２７に記載のＴ細胞。
【請求項２９】
請求項２６から２８で定義される核酸分子または構築物を含むベクターを含むＴ細胞。
【請求項３０】
請求項１から２９のうちのいずれか一項で定義されるＴ細胞を含む細胞集団。
【請求項３１】
請求項２６から２９のうちのいずれか一項で定義される核酸分子、構築物、またはベクターを細胞に導入する工程を含む、請求項１から２９のうちのいずれか一項に記載のＴ細胞の作製方法。
【請求項３２】
請求項２６から２９のうちのいずれか一項で定義される核酸分子、構築物、またはベクターを細胞に導入することを含む、細胞の生存または持続を促進する方法。
【請求項３３】
ＥＰＯの存在下で前記細胞を培養する工程をさらに含む、請求項３２に記載の方法。
【請求項３４】
請求項１から３０のうちのいずれか一項で定義される細胞または細胞集団を含む、医薬組成物。
【請求項３５】
治療法に使用するための、請求項１から３０のうちのいずれか一項に記載のＴ細胞もしくは細胞集団、または請求項３４に記載の医薬組成物。
【請求項３６】
癌、感染性疾患、神経変性疾患、もしくは炎症性疾患を治療するための、または免疫抑制を誘導するための、請求項１から３０のうちのいずれか一項に記載のＴ細胞もしくは細胞集団、または請求項３４に記載の医薬組成物。
【請求項３７】
対象において、移植に対する寛容の誘導、移植片対宿主病（ＧｖＨＤ）、自己免疫疾患、またはアレルギー性疾患の治療および／または予防、組織修復および／または組織再生の促進、あるいは炎症の改善に使用するための、請求項３６に記載のＴ細胞、細胞集団、または医薬組成物であって、好ましくは前記細胞がＴｒｅｇ細胞である、請求項３６に記載のＴ細胞、細胞集団、または医薬組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
分野
本開示および本発明は、組換えタンパク質および養子細胞療法（ＡＣＴ）におけるその使用に関する。特に、組換えタンパク質は、当該タンパク質を発現する細胞に、所望の構成的シグナル、例えば構成的ＳＴＡＴ媒介シグナルを提供することができる。シグナルは、細胞に、所望の効果または特性（例えば、機能、活性、活力、または生存（例えば、移植された宿主対象における持続性）の増加）を付与し得る。また、そのような組換えタンパク質をコードする核酸分子、組換え構築物、ベクター、および上記核酸分子を含有する細胞、そのような細胞の作製方法、ならびに治療目的のそれらの使用も提供される。

【０００２】

背景

機能的な免疫細胞を対象に投与する養子細胞療法（ＡＣＴ）は、特に悪性疾患や感染性疾患を含む様々な医学的状態に対する確立された、かつ発展を続ける免疫療法的アプローチとなっている。当初、腫瘍浸潤リンパ球が転移性黒色腫の治療に有効であることが示され、その後、様々な細胞標的分子を標的とするためにキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）または異種Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）を発現するリダイレクトされた（re-directed）Ｔ細胞またはＮＫ細胞が開発され、臨床使用に採用されている。当初のアプローチは、細胞傷害性を有する免疫細胞、例えば、細胞傷害性Ｔ細胞またはＮＫ細胞を用いて、体内の不要または有害な細胞を標的にして死滅させていたが、より最近では、ＡＣＴ用に制御性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）が開発されている。Ｔｒｅｇは免疫抑制機能を有する。Ｔｒｅｇは、細胞変性免疫応答を制御するように作用し、免疫寛容の維持に必須である。Ｔｒｅｇの抑制性は、例えば、炎症性障害や自己免疫疾患、移植などにおける免疫介在性の器官損傷を改善および／または防止するためなど、治療目的に利用できる。

【０００３】

ＡＣＴにおいて有用であるためには、移植または投与された細胞は、有用な治療効果を発揮するのに十分な期間、機能的な状態でレシピエント（ＡＣＴ治療の対象）の中で生存し、持続する必要がある。さらに、治療目的の使用に十分な数の細胞を調製するためには、細胞をインビトロで生成（例えば操作）、培養、および増殖する必要がある。

【０００４】

増殖因子インターロイキン－２（ＩＬ－２）は、特にＴｒｅｇを含む免疫細胞の恒常性（発生、増殖、生存）、およびその抑制機能と表現型安定性に、必須である。活性化された通常Ｔ細胞（Ｔｃｏｎ）は、インビボでのＩＬ－２の主要な発生源である。一方で、ＴｒｅｇはＩＬ－２を産生することができず、微小環境に存在するＴｃｏｎが産生したＩＬ－２への傍分泌アクセスに依存している。

【０００５】

ＩＬ－２の獲得は、インビトロで増殖されて患者に移植されるＴｒｅｇの治療効果への影響が大きい。これは、１）インビトロの増殖プロトコルは、概して、高濃度のＩＬ－２を必要とし、このためＴｒｅｇはこのサイトカインへの依存度が高く、２）免疫抑制剤投与の結果、患者体内でＩＬ－２の濃度が低下することが多く、３）炎症組織の微小環境内では、ＩＬ－２へのアクセスが限られていることが多いためである。炎症を起こしている肝臓ではＩＬ－２のレベルが下がることが知られており、カルシニューリン阻害薬の常用でさらにそれが悪化し、ＴｃｏｎがＩＬ－２を産生する能力を実質的に減少させることを考えると、肝臓移植は特に困難な徴候を示す。低用量の外因性ＩＬ－２の投与は、カルシニューリン阻害薬によって誘発されるＴｒｅｇ機能障害を回復させ、Ｔｒｅｇの肝臓における蓄積を促進する。しかしながら、低用量ＩＬ－２の治療目的の使用については、同時にＴｃｏｎを活性化させ、これが組織損傷を助長しうる危険性が懸念される。

【０００６】

ＷＯ２０２０／０４４０５５には、外因性ＩＬ－２投与の必要性を回避するためのアプローチが記載されている。この場合は、標的抗原に結合すると生産的ＩＬ－２シグナルを細胞に提供することができるように改変されたＣＡＲを発現するように、Ｔｒｅｇ細胞が操作されている。換言すると、ＣＡＲの細胞内シグナル伝達ドメインであるエンドドメインがＩＬ受容体由来の配列またはドメインを含み、これらが、内因性ＩＬ－２の非存在下で、ＩＬ－２結合を必要とせずに、「ＩＬ－２シグナル」を伝達することを可能にする。ＩＬ－２は、転写因子ＳＴＡＴ５（シグナル伝達兼転写活性化因子５）を介してシグナルを伝達する。ＳＴＡＴ５は、インターロイキン（例えば、ＩＬ－２）が受容体に結合すると通常活性化されるキナーゼＪＡＫ１および／またはＪＡＫ２によって、活性状態でリン酸化される。したがって、ＷＯ２０２０／０４４０５５におけるＣＡＲは、ＳＴＡＴ５会合モチーフとＪＡＫ１結合モチーフおよび／またはＪＡＫ２結合モチーフとを含むエンドドメインを含んでいる。

【０００７】
同様に、ＡＣＴ用の他の免疫細胞、例えば細胞傷害性Ｔ細胞や、ＣＡＲ－Ｔ細胞を含む他のＴエフェクター細胞も、生存または機能の持続性を高めるために追加のシグナル伝達能力が提供されることを必要とするか、その恩恵を受ける可能性がある。したがって、ＡＣＴ用細胞の生存または持続性を高めるためであれ、その機能的活性または治療効果を改善するためであれ、追加のシグナル伝達、より具体的には操作されたシグナル伝達が必要であることは、Ｔｒｅｇ細胞に限定されない。
【０００８】
ＷＯ２０２０／０４４０５は重要な進歩をもたらしたが、ＡＣＴの分野においては、新しい改良されたアプローチ、特に、標的ごとに改変されたＣＡＲを開発する必要性を回避または低減する、より普遍的に応用され得るアプローチが引き続き必要とされている。
【０００９】
エリスロポエチン（ＥＰＯ）は、胎児の肝臓によって、または成人では腎臓の血管周囲間質線維芽細胞によって作られる糖タンパク質である。ＥＰＯ産生は、インビボで、主に、低酸素誘導因子（ＨＩＦ）－１α転写因子の安定化およびその後のＥＰＯの転写をもたらす低酸素によって刺激される。ＥＰＯは、赤血球前駆体細胞上のエリスロポエチン受容体（ＥＰＯＲ）に結合することによって赤血球産生を誘導するが、さらに非造血組織においても発現される。ＥＰＯＲは、５０８個のアミノ酸からなる膜貫通受容体であり、ＷＳＸＷＳモチーフを含む細胞外ドメインと、１つの膜貫通疎水性領域と、細胞質ドメインとを含む。ＥＰＯＲは、ＥＰＯと結合するとホモ二量体を形成し、ＪＡＫ２、ＭＡＰＫ、およびＰＩ３の各キナーゼの活性化とＳＴＡＴ５のリン酸化とを介してシグナル伝達することができる。ＥＰＯＲはＣＤ１３１とのヘテロ二量体化が可能であり得ることも文献に示唆されている。
【００１０】
ＷＯ２０１９／１６９２９０には、薬剤の存在下で二量体化が可能な二量体化ドメインを含むキメラ受容体を用いて、細胞にシグナルを誘導的に導入するためのアプローチが記載されている。ＷＯ２０１９／１６９２９０に開示されているある構築物は、ＥＰＯＲ由来のドメインまたはＩＬ２ＲＢ由来のドメインを含んでいたが、シグナル伝達はリガンドの存在下でのみ誘導された。誘導性は、細胞内のシグナル伝達の制御を可能にし、ある特定の疾患状態において有用であり得るが、リガンドが存在しないかまたは低レベルで存在するような条件下では、そのような構築物からのシグナル伝達が減少する場合があり、その結果、細胞の持続性が欠如する。したがって、誘導性が可能でないおよび／または望ましくない条件下で有用な、細胞に構成的シグナルを提供することができるサイトカイン受容体を開発することが求められている。
【００１１】
<u>概要</u>
本発明者らが同定した組換えタンパク質は、リガンドの非存在下で、ホモ二量体化が可能であり、かつ、当該組換えタンパク質を発現する細胞に構成的シグナルを提供することが可能である。特に、この組換えタンパク質は、サイトカイン受容体の改変された細胞外ドメインに由来するエキソドメインを有しており、当該改変は、サイトカイン受容体に対する天然のリガンドの非存在下でホモ二量体化および構成的シグナル伝達を促進するものである。この組換えタンパク質は、特に、エンドドメインをさらに含んでもよく、いくつかの細胞タイプにおいて使用されて、一貫したシグナル、例えばＳＴＡＴシグナルを提供することができ、当該一貫したシグナルは、特にＡＣＴの状況下で、サイトカイン受容体リガンドが制限されているかまたは制限され得る環境での細胞の生存を可能にすることができる。このような環境では、細胞に生存シグナルを提供するための誘導性タンパク質の使用が適切でない場合があり、本発明は、ここに特定の有用性を有し、この特定の問題に対処するものである。
【００１２】
特に、本発明者らが使用するために同定した組換えタンパク質は、ＥＰＯＲの細胞外領

域に由来するエキソドメインを含み得るが、ＥＰＯの非存在下で当該受容体を介した構成的シグナル伝達を可能にする改変をさらに含み得る。細胞外領域は、ＥＰＯが環境中に存在する場合にはＥＰＯに結合する能力も保持し得るため、改変されたサイトカイン受容体を介したシグナル伝達を増加させる可能性がある。したがって、有利なことに、上記組換えタンパク質は、二量体化して細胞に構成的シグナルを提供することが可能であり、また、環境リガンドが利用可能な場合には環境リガンドに結合することが可能でもあり得、シグナル伝達増強の可能性をもたらす。ただし、所望の機能性／生存優位性を有する組換えタンパク質を発現する細胞を提供するには、リガンドの非存在下での構成的シグナル伝達だけで十分である。一実施形態において、組換えタンパク質は、１５４位の残基のシステインへのアミノ酸置換を有するＥＰＯＲの改変されたヒト細胞外領域を含み得、これは、ＥＰＯ非存在下での単量体組換えタンパク質鎖のホモ二量体化と構成的シグナル伝達とを促進する。

【００１３】

本発明で使用するための組換えタンパク質は、当該組換えタンパク質を発現する細胞に任意のシグナルを提供し得るが、この組換えタンパク質は、特に細胞療法の状況下で、細胞が対象への投与後に生存または持続することを可能にして、ある治療法が病気の対象において有効となるための最良の機会を提供するために利用され得ることが特に想定される。特に、組換えタンパク質を介したシグナル伝達には、チロシンキナーゼ活性とタンパク質リン酸化とが関与し、より具体的には、ヤヌスキナーゼ（ＪＡＫ）のリン酸化および活性、例えば、ＪＡＫ１および／またはＪＡＫ２が関与するＪＡＫ－ＳＴＡＴシグナル伝達経路の活性化が関与する。したがって、特に、本明細書で述べる組換えタンパク質のエンドドメインは、エキソドメインと同じタンパク質（ＪＡＫ２結合モチーフとＳＴＡＴ５会合モチーフとを含むＥＰＯＲ）に由来または部分的に由来してもよく、あるいは、１種以上の異なるタンパク質に由来してもよく（組換えタンパク質がキメラ組換えタンパク質であってもよく）、上記１種以上の異なるタンパク質は、ＥＰＯＲと同じもしくは類似のシグナルの伝達を可能にする。または、天然のＥＰＯＲ受容体とは異なる細胞シグナルの提供を可能にする可能性もある。有利なことに、本発明者らは、組換えタンパク質のエンドドメインがＥＰＯＲ由来である場合は、活性化されるとＪＡＫ２のリン酸化を阻害し得るのに加えてＩＬ２Ｒなどの他の内因性受容体に影響を与える能力も有するＳＨＰ１への結合能力が低下した、改変されたエンドドメインを利用することが可能であることをさらに確認した。また、本発明者らは、組換えタンパク質のエンドドメインがＥＰＯＲ由来である場合は、ＥＰＯＲのエンドドメインに由来する上記エンドドメインの部分のＣ末端において細胞質テールなどのアミノ酸配列を挿入すると、組換えタンパク質の細胞表面発現を増加または安定化させ得、かつ／またはＥＰＯに対する感受性を増加させ得ることをさらに確認した。

【００１４】

本明細書に記載の組換えタンパク質は、投与後に対象内で一定期間持続することが必要とされ得るＴ細胞において特に有用であり、より具体的には、生存するためにＳＴＡＴ５シグナル伝達を必要とし（通常は内因性ＩＬ２Ｒを介して）、そのようなシグナル伝達を誘発するために外因性リガンドの供給に完全に依存するＴｒｅｇにおいて特に有用である。受容体の構成的シグナル伝達能力、Ｔｒｅｇが一定のＳＴＡＴ５シグナル伝達を必要とすること、および特定の疾患状態（例えば、Ｉ型糖尿病）における天然に利用可能なリガンド（例えば、ＩＬ２）の不足を考慮すると、組換えタンパク質をＴｒｅｇ内で使用することは特に有利である。本発明者らは、有利なことに、本明細書に記載の組換えタンパク質を発現するＴｒｅｇがそれらの通常の表現型と抑制機能を維持し、そのため細胞の安定性が保持され得ることを示した。

【００１５】

したがって、本発明は、組換えタンパク質を含むＴ細胞であって、該組換えタンパク質が、ＥＰＯＲの細胞外領域に少なくとも一部分が由来するエキソドメインを含み、該エキソドメインが、シグナル誘導物質分子の非存在下で、該組換えタンパク質と第２のタンパ

ク質との二量体化と該Ｔ細胞へのシグナルの提供とを可能にする二量体化ドメインを含む、Ｔ細胞を提供する。

【００１６】

上記二量体化ドメインは、シグナル誘導物質分子の非存在下での組換え分子の第２のタンパク質との結合と、細胞へのシグナル伝達とを可能にする二量体化ドメインであればよい。よって、上記二量体化ドメインは、細胞への構成的シグナルの提供を可能にする。上記二量体化ドメインは、上記ＥＰＯＲの細胞外領域に由来するエキソドメインの部分の外（すなわち、エキソドメインにおけるこの部分とは異なる位置）にあってもよく、または特には、上記ＥＰＯＲの細胞外領域に由来するエキソドメインの部分の中に含まれていてもよい。

【００１７】

したがって、この点において、本発明は、組換えタンパク質を含むＴ細胞であって、該組換えタンパク質が、ＥＰＯＲの細胞外領域に少なくとも一部分が由来するエキソドメインを含み、該部分が、ＥＰＯＲの細胞外領域に対して、シグナル誘導物質分子の非存在下での該組換えタンパク質と第２のタンパク質との二量体化および該Ｔ細胞へのシグナルの提供を可能にする改変を含む、Ｔ細胞を提供する。

このため、Ｔ細胞内に存在する組換えタンパク質は、Ｔ細胞内で当該細胞または前駆体細胞に形質導入された核酸分子から発現されてもよく、遺伝子編集技術を用いて改変された内因性核酸配列から発現されてもよい。

【００１８】

特定の実施形態において、上記組換えタンパク質は、該組換えタンパク質と第２のタンパク質とのジスルフィド結合二量体化を可能にするエキソドメインを含む。したがって、組換えタンパク質は、特にジスルフィド結合二量体化を可能にする少なくとも１つの二量体化ドメインを含む。

【００１９】

二量体化は、本明細書に記載のように組換えタンパク質が別の組換えタンパク質と結合するホモ二量体化であってもよく、組換えタンパク質が異なるタンパク質と二量体化するヘテロ二量体化であってもよいことが、当業者にはさらに理解されるであろう。ヘテロ二量体化が起こるためには、上記第２のタンパク質が、組換えタンパク質内に存在する二量体化ドメインに結合可能な同族二量体化ドメインを含んでいる必要があることが理解されるであろう。Ｔ細胞へのシグナルの産生を可能にするのは、典型的には、組換えタンパク質の二量体化である。本発明の特定の実施形態では、上記二量体化はホモ二量体化であり、この点において、本発明は、組換えタンパク質を含むＴ細胞であって、該組換えタンパク質が、ＥＰＯＲの細胞外領域に少なくとも一部分が由来するエキソドメインを含み、該エキソドメインが、シグナル誘導物質分子の非存在下での該組換えタンパク質のホモ二量体化および該Ｔ細胞へのシグナルの提供を可能にする二量体化ドメインを含む、Ｔ細胞を提供する。特に、上述したように、ＥＰＯＲの細胞外領域に由来するエキソドメインの少なくとも一部分は、ＥＰＯＲの細胞外領域に対して、シグナル誘導物質の非存在下での上記組換えタンパク質のホモ二量体化および上記Ｔ細胞へのシグナルの提供を可能にする改変を含み得る。

【００２０】

上記組換えタンパク質の二量体化は、第２のタンパク質の存在下で自然に起こり、シグナル誘導物質分子、例えばエリスロポエチンの存在を必要とせず、より詳細には、いかなるシグナル誘導物質分子（リガンドも二量体化誘導物質分子も含む）の存在も必要としない。

【００２１】

この点において、本発明は、組換えタンパク質を含むＴ細胞であって、該組換えタンパク質が、ＥＰＯＲの細胞外領域に少なくとも一部分が由来するエキソドメインを含み、該エキソドメインが、ＥＰＯの非存在下での該組換えタンパク質と第２のタンパク質との二量体化および該Ｔ細胞へのシグナルの提供を可能にする二量体化ドメインを含む、Ｔ細胞

をさらに提供する。特に、上述したように、ＥＰＯＲの細胞外領域に由来するエキソドメインの少なくとも一部分は、ＥＰＯＲの細胞外領域に対して、ＥＰＯの非存在下での上記組換えタンパク質のホモ二量体化および上記Ｔ細胞へのシグナルの提供を可能にする改変を含み得る。

【００２２】

特に、本発明は、組換えタンパク質を含むＴ細胞であって、該組換えタンパク質が、ＥＰＯＲの細胞外領域に少なくとも一部分が由来するエキソドメインを含み、該エキソドメインが、ＥＰＯの非存在下での該組換えタンパク質のホモ二量体化および該Ｔ細胞へのシグナルの提供を可能にする二量体化ドメインを含む、Ｔ細胞を提供する。特に、上述したように、ＥＰＯＲの細胞外領域に由来するエキソドメインの少なくとも一部分は、ＥＰＯＲの細胞外領域に対して、ＥＰＯの非存在下での上記組換えタンパク質のホモ二量体化および上記Ｔ細胞へのシグナルの提供を可能にする改変を含み得る。

【００２３】

上記ＥＰＯＲの細胞外領域に由来するエキソドメインの部分は、ＥＰＯＲの細胞外領域の全長、またはその一部分もしくはバリアント配列を含み得る。特に、存在するＥＰＯＲ細胞外領域配列は、シグナル誘導物質分子、特にＥＰＯの非存在下での組換えタンパク質の二量体化および構成的シグナル伝達を可能にする少なくとも１つの改変を含み得る。したがって、上記少なくとも１つの改変は、組換えタンパク質の構成的シグナル伝達をもたらす任意の改変であり得る。上記組換えタンパク質内に存在するＥＰＯＲ細胞外領域配列は、シグナル誘導物質分子、特にＥＰＯの非存在下での組換えタンパク質の二量体化および構成的シグナルの提供を可能にする少なくとも１つの改変に加えて、他の改変を含んでもよい。特に、上記ＥＰＯＲの細胞外領域に由来するエキソドメインの部分は、配列番号１に由来するものであってもよく、より具体的には、配列番号１の１位から２５０位のアミノ酸（配列番号５）に由来するものであってもよい。上記少なくとも１つの改変は、ＥＰＯＲの細胞外領域のアミノ酸配列に対して、二量体化、特にジスルフィド結合二量体化を可能にする変異であってもよく、かつ／または、シグナル誘導物質分子の非存在下で二量体化を可能にする配列、例えばロイシンジッパーの挿入であってもよい。より具体的には、上記組換えタンパク質は、配列番号５の１５４位のアルギニンのシステインへの改変（Ｒ１５４Ｃ）を含む。最も具体的な実施形態では、上記エキソドメインは、配列番号２または配列番号４のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなっていてもよい。

【００２４】

したがって、別の実施形態において、本発明は、組換えタンパク質を含むＴ細胞であって、該組換えタンパク質が、シグナル誘導物質分子、特にＥＰＯの非存在下で、該組換えタンパク質と第２のタンパク質との二量体化を可能にし、該Ｔ細胞においてシグナルを提供するように改変されたＥＰＯＲの細胞外領域またはその一部分もしくはバリアントを含むエキソドメインを含む、Ｔ細胞を提供する。

【００２５】

ＥＰＯＲの細胞外領域の部分またはバリアントは、一実施形態において、ＥＰＯＲ細胞外領域の機能を保持し得、したがってＥＰＯに結合可能であり得る。このようにして、前述のように、ＥＰＯの存在下で細胞に提供されるシグナルを増加させることが可能となり得る。あるいは、またはさらに、このような部分またはバリアントは、ＥＰＯＲ細胞外領域に対して少なくとも７０％、８０％、または９０％の同一性を有し得る。特定の実施形態において、バリアントおよび部分は、二量体化ドメインを提供する少なくとも１つの改変を含み得、これにより、シグナル誘導物質分子、例えばＥＰＯの非存在下で、組換えタンパク質と第２のタンパク質との二量体化および発現細胞へのシグナルの提供を可能にする。

【００２６】

さらなる実施形態において、本発明は、組換えタンパク質を含むＴ細胞であって、該組換えタンパク質が、配列番号２もしくは配列番号４を含むエキソドメイン、または配列番号２もしくは配列番号４に対して少なくとも９０％の同一性を有し、かつ配列番号２の１

３０位にシステインを含むかもしくは配列番号４の１５４位にシステインを含む配列番号２もしくは配列番号４の一部分もしくはバリアントを含むエキソドメインを含み、該組換えタンパク質が、シグナル誘導分子、特にＥＰＯの非存在下で、第２のタンパク質と二量体化することが可能であり、該Ｔ細胞においてシグナルを提供することが可能である、Ｔ細胞を提供する。

【００２７】

組換えタンパク質のエキソドメインは、ＥＰＯＲの細胞外領域に由来する部分に加えて、二量体化に関連しない追加の異種ドメインまたは領域（すなわち、野生型ＥＰＯＲに存在しない非二量体化ドメインまたは領域）、例えば自殺モチーフまたはタグを含んでもよく、したがって、エキソドメインは、ＥＰＯＲの細胞外領域に由来する部分のみからなるわけではない場合もある。

【００２８】

上述したように、本明細書に記載の組換えタンパク質のエキソドメインは、シグナル誘導物質分子の非存在下での二量体化および構成的シグナル伝達を可能にする少なくとも１つの二量体化ドメイン（例えば、少なくとも２つ、３つ、４つ、または５つの）二量体化ドメインを含む。特に、二量体化ドメインは、例えば、アミノ酸配列に１つ以上の改変（例えば、少なくとも２つ、３つ、４つ、または５つの改変）を加えることによって、ＥＰＯＲの細胞外領域に由来するエキソドメインの部分に導入することができる。したがって、本明細書に記載の組換えタンパク質を含む細胞においてシグナル伝達が起こるのに、シグナル誘導物質分子（例えば、ＥＰＯ）は必要とされない。特に、上記組換えタンパク質は、ＥＰＯＲの天然のリガンドであるＥＰＯの非存在下で、二量体化し、構成的シグナルを提供することが可能である。そのため構成的シグナル伝達には必要ないが、本明細書に記載の組換えタンパク質のエキソドメインは、組換えタンパク質と第２のタンパク質との誘導性二量体化を可能にする１つ以上の二量体化ドメインを含んでもよい。このような「誘導性二量体化ドメイン」は、二量体化するために二量体化誘導物質分子の存在を必要とする。一実施形態において、少なくとも１つの誘導性二量体化ドメインの存在は、以下に詳述するように、組換えタンパク質を介したシグナル伝達の増強または増加を可能にし得る。典型的には、上記１つ以上の誘導性二量体化ドメインは、ＥＰＯＲに対して異種（すなわち、野生型ＥＰＯＲには存在しない）であり得る。当業者には、上記１つ以上の誘導性二量体化ドメインが、組換えタンパク質内の任意の場所（任意のエンドドメイン内またはエキソドメイン内を含む）に含まれ得るが、特に、エキソドメイン内、例えば、ＥＰＯＲの細胞外領域に由来するエキソドメインの部分内、またはエキソドメイン内ではあるがＥＰＯＲの細胞外領域に由来する部分内ではない場所に、例えば別個のドメインもしくは領域として、含まれ得ることが、理解されるであろう。

【００２９】

本発明の組換えタンパク質は、エキソドメインを細胞膜内につなぎ留めるための膜貫通ドメインを含んでもよい。上記膜貫通ドメインは、例えば、ＥＰＯＲ、ＩＬ２ＲＢ、ＣＤ２８、ＣＤ８などを含む、膜貫通ドメインを有する任意のタンパク質に由来するものであり得る。一実施形態では、上記膜貫通ドメインは、別のタンパク質の膜貫通ドメインと会合してもよく、例えば、上記膜貫通ドメインは、ＤＡＰ１０／１２と会合可能なＴＲＥＭタンパク質に由来するものであってもよい。

【００３０】

組換えタンパク質によって提供され得るシグナルは、細胞の機能的特性または活性を改善または増加させるシグナルであり得る。したがって、細胞の機能または効果が増加し得、この機能または効果は、インビトロまたはインビボでの、すなわち、ＡＣＴ用に調製されている途中の細胞の生成もしくは増殖中または細胞が対象に投与された後の、機能または効果であり得る。これは、例えば、細胞の生存、細胞の持続、細胞の機能の持続、活力、機能的効果（例えば、免疫抑制効果もしくは細胞傷害性効果）、記憶表現型を含む細胞の表現型、増殖能力、および／または細胞の治療有効性であり得る。その増加は、組換えタンパク質を含む細胞において、組換えタンパク質を含まない細胞と比較して、認められ

得る。上述のシグナルは、特に構成的シグナルである。

【００３１】

特定の実施形態において、シグナルは、生存促進シグナルであり、培養中および培養後に細胞が生存することおよび機能する能力を維持することを助け、治療の過程で対象に投与された後も細胞が持続しその機能的能力を維持することを助ける。これは持続性シグナルと呼ばれることもある。したがって、組換えタンパク質は、誘導性生存促進シグナル伝達能力を細胞に付与するために細胞内で発現され得る。このタンパク質は、ＡＣＴ治療に使用するために調製された細胞において特に有用であり、このような細胞においてＴＣＲまたはＣＡＲまたは任意のキメラ受容体などの抗原受容体と一緒に発現されてもよい。したがって、このタンパク質はＡＣＴ用の細胞の操作において有用である。

【００３２】

一実施形態では、シグナルは、ＳＴＡＴ媒介シグナル（例えば、ＳＴＡＴ３媒介シグナルまたはＳＴＡＴ５媒介シグナル）であり、より具体的には、ＳＴＡＴ５媒介シグナルであり、これは通常、ＩＬ－２などのインターロイキンによって、またはＥＰＯによって細胞内で誘導され得る。

【００３３】

本発明の組換えタンパク質は、細胞にシグナルを提供するために、特に、エンドドメインを含むか、またはエンドドメインを含むさらなるシグナル伝達タンパク質と会合可能である。したがって、エンドドメインは、本明細書に記載の組換えタンパク質の一部であってもよく、または、例えば、組換えタンパク質と例えばそれぞれの膜貫通ドメインを介して会合するシグナル伝達タンパク質内に含まれていてもよく、ここで、例えば、組換えタンパク質の膜貫通ドメインは、骨髄受容体由来であってもよく、シグナル伝達タンパク質の膜貫通ドメインは、ＤＡＰ１０由来またはＤＡＰ１２由来であってもよい。

【００３４】

特定の実施形態において、上記エンドドメインは、少なくとも１つのＪＡＫ１結合モチーフおよび／またはＪＡＫ２結合モチーフと、少なくとも１つのＳＴＡＴ会合モチーフ（例えば、ＳＴＡＴ３会合モチーフおよび／またはＳＴＡＴ５会合モチーフ）とを含む。特に、上記エンドドメインは、少なくとも１つのＪＡＫ２結合モチーフと少なくとも１つのＳＴＡＴ５会合モチーフ、または少なくとも１つのＪＡＫ１結合モチーフと少なくとも１つのＳＴＡＴ５会合モチーフを含み得る。上記エンドドメインはさらなるドメインを含んでいてもよく、例えば、少なくとも１つのＪＡＫ３結合モチーフを含んでいてもよい。

【００３５】

本発明は、本明細書で定義される組換えタンパク質をコードする塩基配列を含む核酸分子（ポリヌクレオチドとも呼ばれる）を含むＴ細胞をさらに提供する。

【００３６】

上記核酸分子は、構築物の形態であってもよく、より具体的には、核酸分子と１つ以上の他の塩基配列（目的の塩基配列）とを含む組換え構築物の形態であってもよい。例えば、上記構築物は、核酸分子と共に、調節配列（例えば、発現制御配列）および／または別の機能性タンパク質（より一般的には、目的のタンパク質）（例えば、ＣＡＲまたはＴＣＲなどの受容体）をコードする配列を含み得る。エンドドメインがさらなるシグナル伝達タンパク質内に存在する場合は、組換えタンパク質をコードする塩基配列とシグナル伝達タンパク質をコードする塩基配列とが同じ構築物中に提供されてもよい。あるいは、組換えタンパク質とシグナル伝達タンパク質のために別個の核酸分子または構築物が提供されてもよい。上記構築物は、核酸分子を１つ以上の他のコード塩基配列と連結する１つ以上の共発現配列を含んでもよい。

【００３７】

本明細書で定義される核酸分子または構築物は、ベクター内に含まれていてもよい。別個の組換えタンパク質と他の発現タンパク質（例えば、機能性タンパク質またはシグナル伝達タンパク質）とが別個の分子または構築物にコードされている場合、それらはそれぞれ別個のベクターに含まれていてもよい。したがって、別個の所望のタンパク質をコード

する配列をそれぞれが含む一組のベクターが存在してもよい。
【００３８】
ベクターは、ウイルス性ベクターであってもよく、非ウイルス性ベクターであってもよい。一実施形態では、ベクターは、本明細書で定義される核酸分子と、目的のタンパク質、特に、ＣＡＲまたはＴＣＲなどの受容体をコードするさらなる塩基配列と、を含み得る。
【００３９】
上記細胞（Ｔ細胞）は、その細胞膜上に組換えタンパク質を発現する。
【００４０】
また、本発明によれば、本明細書で定義される細胞を含む細胞集団、例えばＴ細胞集団も提供される。
【００４１】
一実施形態では、上記細胞は、ＣＤ４＋　Ｔ細胞もしくはＣＤ８＋　Ｔ細胞またはそれらの任意の前駆体を含む、Ｔ細胞である。したがって、細胞は、幹細胞、より具体的には、造血幹細胞（ＨＳＣ）または多能性幹細胞（ＰＳＣ）、例えば人工多能性幹細胞（ｉＰＳＣ）、すなわちＴ細胞への分化または転換前の細胞であってもよい。特に、Ｔ細胞は、Ｔｒｅｇ細胞であり得る。細胞は、初代細胞であってもよく、細胞株由来であってもよい。
【００４２】
本発明は、本明細書で定義されるＴ細胞（すなわち、組換えタンパク質を含む細胞または組換えタンパク質をコードする核酸分子を含む細胞）の調製方法であって、本明細書で定義される核酸分子、構築物、またはベクターをＴ細胞に導入する（例えば、細胞に形質導入または遺伝子導入する）ことを含む方法をさらに提供する。本方法は、組換えタンパク質を細胞内で発現させることを含んでもよい。これには、例えば、細胞を培養することが含まれ得る。
【００４３】
このような方法は、当該方法で使用する細胞を、単離、富化、用意、または生成する先行工程をさらに含んでもよい。さらに、細胞の単離または富化または生成を核酸分子導入工程の後に行ってもよい。例えば、核酸分子を前駆体細胞または前駆細胞、例えば幹細胞に導入し、その後、当該細胞のＴ細胞への分化または変化を誘導するかまたは起こさせてもよい。例えば、ｉＰＳＣ細胞をＴｒｅｇ細胞または他のＴ細胞に分化させてもよく、Ｔｃｏｎ細胞をＴｒｅｇ細胞に転換させてもよい。
【００４４】
この態様はまた、本明細書で定義される組換えタンパク質の調製方法であって、本明細書で定義される核酸分子、構築物、またはベクターをＴ細胞に導入することと、該細胞によってキメラタンパク質を発現させることと、必要に応じて、該キメラタンパク質を検出および／または回収することと、を含む方法も含み得る。
【００４５】
本発明は、本明細書で定義されるＴ細胞の調製方法であって、ＥＰＯＲをコードする内因性核酸を、発現されたＥＰＯＲがＥＰＯの非存在下でホモ二量体化する細胞外領域を含み、したがってＴ細胞にシグナルを提供するような改変を含むように遺伝子操作することを含む方法をさらに提供する。特に、本方法は、Ｔ細胞への分化前のｉＰＳＣなどのＴ細胞前駆体を用いて実施されてもよく、より具体的には、上記遺伝子操作された内因性核酸から発現されたＥＰＯＲは、１５４位にＲからＣへのアミノ酸置換を含む。
【００４６】
本発明は、細胞の生存または持続を促進する方法であって、本明細書で定義される核酸分子、構築物、またはベクターを細胞に導入すること、あるいは上記のように内因性核酸を遺伝子操作すること、を含む方法をさらに提供する。
【００４７】
この態様は、本明細書で定義される細胞を対象に投与し、必要に応じてシグナル誘導物

質分子（例えば、構成的シグナルを増加させることが望まれる場合はＥＰＯ）を対象に投与する、追加の工程を含んでもよい。細胞の投与前、投与中、または投与後に、任意の誘導物質を投与することができる。したがって、この態様では、本方法をインビボで実施することができる。あるいは、本方法は、インビトロ／エクスビボで実施してもよい。

【００４８】

別の観点からは、本発明は、本明細書に記載の組換え分子の使用であって、該組換え分子を発現する細胞の生存または持続を促進するための使用を提供する。

【００４９】

上記のように、組換えタンパク質は、有利には、治療の状況において細胞内で発現され得る。上記細胞は、治療目的の使用のためにさらに遺伝子操作されていないという意味で、未改変の細胞、例えば、対象から単離されたＴ細胞や、そのような単離された細胞に由来する細胞であってもよい（もっとも、当然ながらこの細胞は本方法によって組換えタンパク質を発現するように改変されるが）が、典型的には、上記細胞は、さらなる分子（すなわち、さらなるタンパク質）、特に、ＣＡＲまたはＴＣＲなどの受容体を発現するようにさらに改変または操作された細胞である。

【００５０】

したがって、本発明は、養子細胞移入療法（ＡＣＴ）に使用するための細胞の調製方法であって、本明細書で定義される組換えタンパク質を上記細胞に提供することを含む方法をさらに提供する。より具体的には、本方法は、本明細書で定義される核酸分子、構築物、またはベクターを上記細胞に導入することを含み得る。本方法はまた、細胞に、別個の核酸分子、構築物、またはベクター、例えば、別個の（例えば第２の）タンパク質、もしくは治療用タンパク質、特に受容体、例えばＣＡＲもしくはＴＣＲをコードする塩基配列を含む核酸分子、構築物、またはベクターを導入することを含み得る。

【００５１】

さらに、本発明は、本明細書で定義される組換えタンパク質をコードする核酸分子を含む細胞、細胞集団、またはベクターを、少なくとも１つの薬学的に許容される担体または賦形剤と共に含む医薬組成物を提供する。一実施形態では、上記細胞またはベクターは、さらなるタンパク質、特にキメラタンパク質、または受容体、例えばＣＡＲもしくはＴＣＲをコードする追加の塩基配列を含む。別の実施形態では、上記細胞は、さらなるタンパク質、特にキメラタンパク質、またはＣＡＲもしくはＴＣＲなどの受容体をコードする塩基配列を含む別個の核酸分子、構築物、またはベクターを含む。

【００５２】

さらに、本発明は、治療法に使用するための、本明細書で定義される組換えタンパク質をコードする核酸分子を含む細胞もしくは細胞集団、または本明細書で定義される医薬組成物、または本明細書で定義される組換えタンパク質をコードする核酸分子を含むベクターを提供する。特に、上記細胞、細胞集団、または上記細胞もしくは細胞集団を含む医薬組成物は、ＡＣＴ用であり得る。上記ベクターまたは上記ベクターを含む医薬組成物は、遺伝子治療用であってもよい。上記ＡＣＴまたは遺伝子治療は、ＡＣＴまたは遺伝子治療、特に、ＡＣＴまたは遺伝子治療による免疫療法、に応答する任意の状態を治療または予防するためのものであってもよい。

【００５３】

本発明は、癌、または感染性疾患、神経変性疾患、炎症性疾患、自己免疫性疾患、もしくはアレルギー性疾患、または不要もしくは有害な免疫応答に関連する任意の状態の治療または予防に使用するための、本明細書で定義される組換えタンパク質をコードする核酸分子を含む細胞、細胞集団、もしくはベクター、または本明細書で定義される医薬組成物をさらに提供する。特に、上記細胞がＴｒｅｇまたは他の免疫抑制細胞である場合、その細胞は、例えば、炎症性障害、自己免疫疾患もしくは状態、またはアレルギー性疾患もしくは状態において、また移植において、免疫介在性臓器障害を改善および／または予防するために、免疫抑制を誘導するため（すなわち、不要または有害な免疫応答を抑制するため）に使用され得る。

【００５４】
この態様はまた、養子細胞移入療法の方法であって、該治療法を必要とする対象に、本明細書で定義される組換えタンパク質をコードする核酸分子を含む細胞もしくは細胞集団、または本明細書で定義される医薬組成物、特に、有効量の該細胞、細胞集団、または医薬組成物を投与することを含む方法を提供する。
【００５５】
また、癌、または感染性疾患、神経変性疾患、炎症性疾患、自己免疫性疾患、もしくはアレルギー性疾患、または不要もしくは有害な免疫応答に関連する状態を、治療または予防する方法であって、該方法を必要とする対象に、本明細書で定義される組換えタンパク質をコードする核酸分子を含む細胞、細胞集団、もしくはベクター、または本明細書で定義される医薬組成物、特に、有効量の該細胞、細胞集団、ベクター、または医薬組成物を投与することを含む方法も提供される。
【００５６】
さらに、癌、または感染性疾患、神経変性疾患、炎症性疾患、自己免疫性疾患、もしくはアレルギー性疾患、または不要もしくは有害な免疫応答に関連する状態の治療または予防に使用するための医薬の製造における、本明細書で定義される組換えタンパク質をコードする核酸分子を含む細胞、細胞集団、またはベクターの使用が提供される。
【００５７】
こうした治療目的の態様のいくつかの実施形態では、上記使用は、移植に対する寛容の誘導における使用；細胞性および／または体液性移植拒絶反応の治療および／または予防における使用；移植片対宿主病（ＧｖＨＤ）、自己免疫疾患、またはアレルギー疾患の治療および／または予防における使用；組織修復および／または組織再生の促進のための使用；あるいは炎症の改善のための使用であり得る。特に、このような実施形態では、上記細胞はＴｒｅｇ細胞であり得る。
【００５８】
上記の様々な治療目的の態様において、上記細胞、細胞集団、ベクター、または医薬組成物は、シグナル誘導物質分子（特にＥＰＯ）と組み合わせて、または一緒に使用するためのものであってもよい。
【００５９】
したがって、さらなる態様は、治療法、特にＡＣＴ療法または遺伝子治療において使用するための、（ａ）本明細書で定義される組換えタンパク質をコードする核酸分子を含む細胞、細胞集団、もしくはベクター、または本明細書で定義される医薬組成物と、（ｂ）シグナル誘導物質分子（特にＥＰＯ）と、を含む組み合わせ製品を提供する。上記治療法は、上記で定義され、本明細書中にさらに記載される任意の治療法であり得る。
【００６０】
上記組み合わせ製品の各成分（ａ）および（ｂ）は、別々に、逐次的に、または同時に使用するためのものであってもよい。
【図面の簡単な説明】
【００６１】
【図１】図１は、ＥＰＯの存在下でＥＰＯＲ鎖のホモ二量体化を示す野生型マウスＥＰＯＲを示す。受容体がＥＰＯによって活性化されると、ＪＡＫ２が受容体のエンドドメインと会合でき、その結果、Ｙ３４３がリン酸化され、ＳＴＡＴ５が動員され二量体化される。ＳＨＰ１は、ＥＰＯＲを介したシグナル伝達の制御のための負のフィードバックループを提供し、ＪＡＫ２を直接阻害することができる。
【図２Ａ】図２は、本明細書に記載の様々な組換えタンパク質を示す。図２Ａは、１２９位がシステイン（マウスの配列番号付け）に改変されたＥＰＯＲ由来のエキソドメインと、ＥＰＯＲの膜貫通ドメインと、Ｙ３４３（マウスの配列番号付け）を含むＥＰＯＲのエンドドメインと、を含む組換えタンパク質を示す。この組換えタンパク質は、ホモ二量体化し、ＳＴＡＴ５を介して細胞に構成的シグナルを提供することができる。
【図２ＢＣ】図２Ｂは、１２９位がシステイン（マウスの配列番号付け）に改変されたＥ

ＰＯＲ由来のエキソドメインと、ＥＰＯＲの膜貫通ドメインと、ＳＨＰ１の結合部位を除去することにより、ＪＡＫ２に対するＳＨＰ１の負のフィードバックを除去し、ＳＴＡＴ５シグナル伝達を増強する、ＥＰＯＲのトランケート型（truncated）エンドドメインと、を含む組換えタンパク質を示す。図２Ｃは、１２９位がシステイン（マウスの配列番号付け）に改変されたＥＰＯＲ由来のエキソドメインと、ＥＰＯＲの膜貫通ドメインと、ＪＡＫ１結合モチーフおよびＳＴＡＴ５会合モチーフ（Ｙ５１０を有する）を保持するＩＬ２ＲＢ由来のトランケート型エンドドメインを含むエンドドメインと、を含む組換えタンパク質を示す。

【図３－１】図３は、実施例５で試験した構築物を示す。ＥＰＯＲエキソドメイン由来のエキソドメインにより、タンパク質を発現する細胞をＥＰＯＲ抗体を用いて同定することができた。

【図３－２】図３つづき

【図４Ａ】図４Ａは、様々な構築物を形質導入した新鮮なＴｒｅｇの形質導入効率を示すＦＡＣＳプロットを示す。形質導入効率は、ＨＬＡ－Ａ２デキストラマーおよびＥＰＯＲ発現を用いて測定した。

【図４Ｂ】図４Ｂは、様々な構築物を形質導入した凍結Ｔｒｅｇの形質導入効率を示すＦＡＣＳプロットを示す。形質導入効率は、ＨＬＡ－Ａ２デキストラマーおよびＥＰＯＲ発現を用いて測定した。

【図５】図５は、ＥＰＯ処理を行った細胞と行わなかった細胞の形質導入画分および非形質導入画分についてのｐＳＴＡＴ５　ＭＦＩを示す。

【図６Ａ】図６Ａは、ＩＬ２有りの場合とＩＬ２無しの場合の、６日間の、細胞集団における形質導入細胞（Ａ２　ＣＡＲの存在によって判定）の割合（％）を示す。

【図６Ｂ】図６Ｂは、ＩＬ２有りの場合とＩＬ２無しの場合の、６日間の、細胞の形質導入画分（Ａ２　Ｄｅｘ＋）および非形質導入画分（Ａ２　Ｄｅｘ－）のＦｏｘＰ３発現を示す。

【図６Ｃ】図６Ｃは、６５８構築物または７８６構築物のいずれかを形質導入したＴｒｅｇの、５日間および７日間の増殖倍率を示す。

【図７－１】図７は、細胞の形質導入画分および非形質導入画分ならびにモック形質導入細胞における、様々なＴｒｅｇマーカーの発現を示す。

【図７－２】図７つづき

【図７－３】図７つづき

【図８－１】図８は、ａＣＤ３／ＣＤ２８ビーズ、ＨＬＡ－Ａ２－　Ｂ細胞、およびＨＬＡ－Ａ２＋　Ｂ細胞という異なる刺激を用いたＴエフェクター細胞の増殖に対するＴｒｅｇの抑制率（％）を示す。

【図８－２】図８つづき

【図９】図９は、異なる構築物を形質導入したＴｒｅｇの標的細胞に対する細胞傷害性を示す、死滅標的細胞の割合（％）を示す。

【図１０】図１０は、モックＴｒｅｇと６５８構築物または７８６構築物を形質導入したＴｒｅｇ（形質導入細胞画分および非形質導入細胞画分の両方）とにおける、様々な細胞内サイトカインのレベルを示す。

【００６２】

詳細な説明

本明細書における製品、方法、および使用の主題は、組換えタンパク質であって、それが発現される細胞の機能性または生存または実際には任意の特性を促進するために使用することができる組換えタンパク質である。したがって、このタンパク質は、養子細胞移入に有用であり、ＡＣＴ用の細胞の調製を補助し、かつ／または、対象への移入後に細胞を生存状態に保ち機能的に保つのに役立つ。細胞の治療効果が改善され得る。

【００６３】

本明細書に記載の組換えタンパク質は、ＥＰＯＲの細胞外領域に少なくとも一部分が由来するエキソドメインの存在に基づくものであり、エキソドメインは、シグナル誘導物質

分子、特にＥＰＯの非存在下で組換えタンパク質と別のタンパク質（第２のタンパク質）との二量体化と組換えタンパク質を含む細胞へのシグナルの提供とを可能にする二量体化ドメイン（例えば、少なくとも１つの二量体化ドメイン）を含む。本明細書に記載の組換えタンパク質は、第２のタンパク質（例えば、別の組換えタンパク質）と自発的に二量体化することができ、組換えタンパク質が発現された細胞に構成的シグナルを提供することができる。特に、シグナルは、エンドドメインを介して細胞に伝達され得、このエンドドメインは、特定の実施形態では、組換え分子内に含まれてもよく、別の実施形態では、別個のタンパク質（「シグナル伝達タンパク質」）上に提供されてもよい。

【００６４】

したがって、本発明は、細胞に構成的シグナルを提供する組換え分子の能力に基づく。特に、本明細書に記載の組換えタンパク質の二量体化は、特にＪＡＫ１活性またはＪＡＫ２活性を含む、ＪＡＫキナーゼ活性によって媒介されるシグナル伝達経路、特にＪＡＫ１－ＳＴＡＴシグナル伝達経路またはＪＡＫ２－ＳＴＡＴシグナル伝達経路を活性化する。このようにして、組換えタンパク質は、天然のサイトカイン受容体、例えば、ＥＰＯＲまたはインターロイキン（例えば、ＩＬ－２）受容体の活性化によって誘導されるシグナル伝達を模倣し得る。「模倣する」とは、本開示の組換えタンパク質によって活性化されるシグナル伝達カスケードは、天然のサイトカイン受容体によって活性化されるシグナル伝達カスケードと類似しているが、一方において、本開示の組換えタンパク質によって誘導される活性化の規模は、天然のサイトカイン受容体のものとは異なり得ることを意味する。

【００６５】

本明細書に記載されるように、組換えタンパク質は、エキソドメインを含む。本明細書における「エキソドメイン」とは、膜結合タンパク質として発現された場合に細胞の外側に見出され得る組換えタンパク質の一部分または一部をいう。したがって、典型的には、エキソドメインは、細胞膜内でも細胞質内でもなく細胞外に見出されるタンパク質の部分を指す。当業者には、組換えタンパク質の発現がまず細胞内で起こり、その過程においてタンパク質の全体が細胞内に見出されることが理解されるであろう。さらに、組換えタンパク質は、（例えば、ＥＰＯなどのリガンドの結合に応答して、）周期的に内部移行および循環され得る。しかしながら、発現後の通常の形態では、組換えタンパク質は、典型的には膜結合タンパク質であり、このタンパク質の一部としてのエキソドメインが、細胞膜および細胞の外側に見出され得る。「エキソドメイン」、「細胞外ドメイン」、および「細胞外領域」という用語は、本明細書において互換的に使用される。

【００６６】

組換えタンパク質のエキソドメインは、ＥＰＯＲの細胞外領域に由来する配列を含む。例えば、組換えタンパク質のエキソドメインは、ＥＰＯＲの細胞外領域に由来する配列からなってもよい。本明細書における「に由来する」は、組換えタンパク質のエキソドメインが、ＥＰＯＲの細胞外領域に対して少なくとも７０％の同一性を有する配列、より具体的には、ＥＰＯＲの細胞外領域に対して少なくとも８０％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有する配列を含むことを意味する。組換えタンパク質のエキソドメイン内に含まれるＥＰＯＲの細胞外領域に由来する配列は、ＥＰＯＲの野生型細胞外領域に対して、少なくとも１つの改変（例えば、少なくとも１つのアミノ酸置換、挿入、欠失、または転座）を含み得る。この点において、一実施形態では、組換えタンパク質のエキソドメインは、ＥＰＯＲの野生型細胞外領域、例えば、配列番号３または配列番号５に示すものを含まないことがある。したがって、エキソドメイン内に含まれるＥＰＯＲ細胞外領域配列は、１つの改変を含むものであってもよく、２つ以上の改変、例えば、少なくとも２つ、３つ、４つ、５つ、１０個、１５個、または２０個の改変を含むものであってもよい。特に、改変の少なくとも１つは、二量体化ドメインの導入をもたらし得、任意のシグナル誘導物質分子の非存在下で（特にＥＰＯの非存在下で）、組換えタンパク質が二量体化、特にホモ二量体化し、組換えタンパク質を発現する細胞にシグナルを提供する能力をもたらし得る。エキソドメイン内に含まれるＥＰＯＲ細胞外領域配列

は、さらに、またはあるいは、二量体化ドメインの導入をもたらさず、したがって、任意のシグナル誘導物質分子の非存在下で二量体化しかつ／またはシグナル伝達する組換えタンパク質の能力をもたらさない改変を含んでもよい。しかしながら、二量体化ドメインがエキソドメインの他の場所（すなわち、ＥＰＯＲの細胞外ドメインに由来する部分内ではない）に設けられる場合は、エキソドメイン内のＥＰＯＲ細胞外領域配列は、野生型配列を含むかまたはそれからなってもよく、二量体化ドメインの導入をもたらさない１つ以上の改変を含んでもよい。

【００６７】

ＥＰＯＲは、天然のコンフォメーションでエリスロポエチン（ＥＰＯ）に結合する受容体であり、ＥＰＯとの結合により、二量体化およびＪＡＫ２／ＳＴＡＴ５シグナル伝達カスケードが誘発される。したがって、野生型ＥＰＯＲは、当該受容体を発現する細胞に対して構成的シグナルではなく誘導性シグナルを提供する。野生型ヒトＥＰＯＲは、５０８個のアミノ酸を含んでなり、シグナルペプチド（配列番号６、配列番号１の１～２４位のアミノ酸からなる）、細胞外領域（配列番号３（シグナルペプチドを含まない）、配列番号１の２５～２５０位のアミノ酸残基からなる）、膜貫通ドメイン（配列番号７、配列番号１の２５１～２７３位のアミノ酸残基からなる）、および細胞質ドメイン（配列番号８、配列番号１の２７４～５０８位のアミノ酸残基からなる）を含む。ＥＰＯＲのヒト全長野生型配列を配列番号１に示す。

【００６８】

本明細書における「ＥＰＯＲの細胞外領域」とは、ＥＰＯＲの細胞外、すなわち細胞の外側に通常見出されるＥＰＯＲの領域をいう。特に、ヒトＥＰＯＲまたはマウスＥＰＯＲを考えた場合、「ＥＰＯＲの細胞外領域」は、配列番号３もしくは配列番号５（ヒトの場合）に示す配列または配列番号１１（マウスの場合）に示す配列を指し得る。したがって、ＥＰＯＲの細胞外領域は、シグナルペプチドを含んでいてもよく、シグナルペプチドがなくてもよい。

【００６９】

前述のように、本明細書に記載の組換えタンパク質のエキソドメインは、ＥＰＯＲの細胞外領域に由来する配列を含み、この配列は１つ以上の改変を含み得る。特に、改変の少なくとも１つは、組換えタンパク質が、シグナル誘導分子の非存在下で、第２のタンパク質と二量体化し、組換えタンパク質を含む細胞にシグナルを提供することを可能にし得る（より具体的には、組換えタンパク質は、シグナル誘導物質分子（特にＥＰＯ）の非存在下で第２のタンパク質と二量体化する能力が、シグナル誘導物質分子（特にＥＰＯ）の非存在下の野生型ＥＰＯＲと比較して増加し得、かつ／または、組換えタンパク質を含む細胞にシグナルを供給する能力が、シグナル誘導物質分子（特にＥＰＯ）の非存在下の野生型ＥＰＯＲと比較して増加し得る）。したがって、組換えタンパク質は、シグナル誘導物質分子（例えば、ＥＰＯ）の非存在下で、野生型ＥＰＯＲと比較して、二量体化する能力および／またはシグナルを提供する能力が、少なくとも１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、または９０％増加し得る。二量体化および／またはシグナル伝達の増加は、以下にさらに述べるように判定することができる。

【００７０】

典型的には、上記機能（シグナル誘導物質分子の非存在下でのシグナル伝達、すなわち構成的シグナル伝達）をもたらす１つ以上の改変が、本発明におけるＥＰＯＲの細胞外領域に対して行われ得る。そのような１つ以上の改変は、近接した場合に会合、例えば、結合または何らかの形で相互作用する同族二量体化ドメインに基づいて、組換えタンパク質と第２のタンパク質との二量体化を可能にし得る。したがって、ＥＰＯＲの細胞外領域の改変により、シグナル誘導物質分子の非存在下での二量体化を可能にする二量体化ドメインが導入され得る。

【００７１】

特定の一実施形態において、上記１つ以上の改変は、組換えタンパク質と第２のタンパク質とのジスルフィド結合による二量体化（ジスルフィド結合二量体化）を可能にしても

よく、より具体的には、ジスルフィド結合ホモ二量体化を可能にしてもよい。典型的には、この効果を達成するために、天然由来ではない１つ以上のシステイン残基を、ＥＰＯＲの細胞外領域に挿入または置換することができる。この点において、ＥＰＯＲの細胞外領域に由来するエキソドメイン内に含まれる配列は、配列番号３の１３０位、配列番号５の１５４位、または配列番号１１の１２９位にアミノ酸改変を有し得る。より具体的には、改変は、アルギニンからシステインへのアミノ酸置換であってもよく、したがって、配列番号３、配列番号５（もしくは配列番号１）、または配列番号１１（もしくは配列番号９）において、それぞれ、Ｒ１３０Ｃ、Ｒ１５４Ｃ、またはＲ１２９Ｃと呼ばれる場合がある。当業者には、この実施形態が、特に、組換えタンパク質鎖間のジスルフィド結合を可能にし、組換えタンパク質のホモ二量体化をもたらすことが理解されるであろう。したがって、組換えタンパク質のエキソドメインは、１３０位においてＲからＣへのアミノ酸置換を有する配列番号３、１５４位においてＲからＣへのアミノ酸置換を有する配列番号５、または１２９位においてＲからＣへのアミノ酸置換を有する配列番号１１のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなってもよい。

【００７２】

別の見方をすると、エキソドメインは、配列番号２、配列番号４、または配列番号１０の配列を含むかまたはそれからなってもよい。

【００７３】

本明細書における「二量体化ドメイン」とは、第２のドメインに結合可能な第１のドメインを指し、これら第１および第２のドメインは、同じであってもよく（ホモ二量体化ドメイン）、異なっていてもよい（ヘテロ二量体化ドメイン）。本発明の二量体化ドメインは、シグナル誘導物質分子（例えば、二量体化誘導物質分子）の非存在下で二量体化がその同族パートナーに対して起こるため、構成的二量体化ドメインと称される場合もある。上述したように、二量体化ドメインは、エキソドメインの任意の部分内に存在し得、例えば、ＥＰＯＲの細胞外領域に由来する部分内に、またはエキソドメイン内の他の場所に、存在し得る。したがって、二量体化ドメインは、上記のようにＥＰＯＲの細胞外領域に加えられる改変によって形成されてもよく、後述するように、当該技術分野で公知の他の構成的二量体化システム（ＥＰＯＲの細胞外領域に由来する配列内、ＥＰＯＲの細胞外領域のＮ末端もしくはＣ末端、またはエキソドメイン内の他の場所に位置し得る）に基づくものであってもよい。

【００７４】

これに関して、当該技術分野において広く知られ記載されているロイシンジッパーを特に挙げることができる。ロイシンジッパードメインは、転写因子によく見られるタンパク質－タンパク質相互作用ドメインの一種であり、ロイシン残基がａ－ヘリックスを介して等間隔に並んでいるのが特徴である。したがって、一実施形態では、本明細書における二量体化ドメインは、ロイシンジッパー配列であるか、またはロイシンジッパー配列を含む。これらは、使用されるロイシンジッパー配列に応じて、ヘテロ二量体化またはホモ二量体化に使用され得る。ＦｏｓタンパクＪｕｎタンパク質分子に由来するロイシンジッパードメインは、Patel et al., 1996, J. Biol. Chem. 271(8), 30386-30391およびStuhlmann-Laeisz et al., 2006, Mol. Biol. Cell 17, 2986-2995に記載されている。ヒトｃ－Ｊｕｎに基づく代表的なロイシンジッパー配列を配列番号２０に示し（これはＮ末端にＧＧを含み得る）、Ｆｏｓロイシンジッパー配列を配列番号２１に示す。

【００７５】

ＪｕｎロイシンジッパーおよびＦｏｓロイシンジッパーをそれぞれ含むヘテロ二量体化ドメインを用いてもよい。あるいは、Ｊｕｎロイシンジッパーを含むホモ二量体化ドメインを用いてもよい。

【００７６】

当該技術分野で公知の他のロイシンジッパー二量体化ドメインとしては、転写因子の１つのクラスであるＺＩＰタンパク質に基づくものが挙げられる。ＺＩＰドメインは、ロイ

シンジッパーモチーフを形成するように並んだロイシンを含むアルファ－ヘリックスの領域である。ＺＩＰドメインは、他のＺＩＰドメイン上のロイシンと相互作用して、アルファ－ヘリックスを可逆的に結合させる（すなわち、二量体化させる）ことができる。したがって、本明細書における二量体化ドメインは、ｂＺＩＰロイシンジッパードメインまたはａＺＩＰロイシンジッパードメインを含み得る。例えば、ヘテロ二量体化ドメインは、ＡＺＩＰ（ＥＥ）ドメインとヘテロ二量体化するＢＺＩＰ（ＲＲ）ドメインであるかまたはそれを含んでもよい。ロイシンジッパーは、二量体化ドメインを作製するために使用され得るコイルドコイル構造タンパク質モチーフの例である。ｂＺＩＰおよび合成コイルドコイルペプチドに基づくヘテロ二量体化ドメインが、Reinke et al. 2010, J. Am. Chem. Soc. 132(17), 6025-6031に記載されており、これらのいずれも使用することができる。例えば、適切なロイシンジッパードメインとしては、ＳＹＮＺＩＰ１～ＳＹＮＺＩＰ４８が挙げられる。ロイシンジッパードメインの他の例としては、ＢＡＴＦ、ＡＴＦ４、ＡＴＦ３、ＢＡＣＨ１、ＪＵＮＤ、ＮＦＥ２Ｌ３、およびＨＥＰＴＡＤが挙げられる。ＢＺｉｐ（ＲＲ）ロイシンジッパードメインの配列を配列番号２２に示す。ＡＺｉｐ（ＥＥ）ロイシンジッパードメインの配列を配列番号２３に示す。

【００７７】

いくつかの実施形態では、好適なロイシンジッパードメイン対は、１０００ｎＭ以下、例えば、１００ｎＭ以下、１０ｎＭ以下、または１ｎＭ以下の解離定数（Ｋｄ）を有する。

【００７８】

二量体化ドメイン対のさらなる例としては、ＰＳＤ９５－Ｄｌｇｌ－ｚｏ－１（ＰＤＺ）ドメイン、またはストレプトアビジンドメインおよびストレプトアビジン結合タンパク質（ＳＢＰ）ドメインが挙げられる。他の二量体化ドメインは、互いに相互作用または結合することが知られている他のタンパク質から得られるかまたはそれらに由来し得る。例えば、あるヘテロ二量体化ドメイン対は、ＣＤ８０およびＰＤＬ－１を含み得る。

【００７９】

ホモ二量体化ドメインのさらなる例としては、免疫グロブリンＧのＦｃ領域が挙げられる。Ｆｃ領域は、例えば二量体化ドメインを提供するために、融合タンパク質において広く使用されており、二量体化可能なＦｃ領域の様々な断片および変異体、例えば、Ｆｃ領域の最初の５個のアミノ酸を欠く断片が、文献に記載されている。

【００８０】

上述したように、エキソドメイン内に含まれるＥＰＯＲ由来の細胞外領域配列は、シグナル誘導物質分子の非存在下で二量体化してシグナル伝達する組換え分子の能力に寄与するかしないかを問わず、追加の改変を含んでいてもよい。特に、本発明者らは、組換えタンパク質が、自発的に二量体化し（すなわち、二量体化が可能な第２のタンパク質と共に位置する場合にシグナル誘導物質分子の非存在下で二量体化し）、組換えタンパク質（および、第２のタンパク質が組換えタンパク質と異なる場合は第２のタンパク質）を含む細胞にシグナルを提供するという、所望の能力を有する限り、ＥＰＯＲの細胞外領域のバリアントまたは断片を本発明において利用し得ると想定している。上記に示したように、特に、そのようなバリアントまたは断片／部分は、ＥＰＯＲの野生型細胞外領域（例えば、配列番号３、配列番号５、または配列番号１１）に対して少なくとも７０％の配列同一性を有し得る。したがって、例えば、追加のアミノ酸置換、欠失、付加、または転座、例えば、少なくとも１個、２個、３個、４個、または５個のアミノ酸置換、欠失、付加、または転座を含む、ＥＰＯＲのさらに改変された細胞外領域を本発明において使用することができる。この点において、組換えタンパク質が、シグナル誘導物質分子の非存在下で、第２のタンパク質と二量体化し、組換えタンパク質を発現する細胞にシグナルを提供するという望ましい機能を有することを条件として、エキソドメインは、配列番号２、配列番号４、または配列番号１０のバリアントまたは断片（例えば、配列番号２、配列番号４、または配列番号１０に対して少なくとも６０％、７０％、８０％、９０％、または９５％の同一性を有するバリアントまたは断片）を含むかまたはそれからなってもよい。そのよう

なバリアントまたは断片を含む組換えタンパク質は、配列番号２、配列番号４、または配列番号１０を含むエキソドメインを含む組換えタンパク質と同じまたは類似の、第２のタンパク質と二量体化する能力および／またはシグナルを提供する能力を有し得るか、あるいは、変化した、第２のタンパク質と二量体化する能力を有し得ることが理解されるであろう。特に、上記バリアントまたは断片を含む組換えタンパク質は、二量体化および／またはシグナル伝達能力が、配列番号２を含むエキソドメインを含む組換えタンパク質の少なくとも４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、１２０％、１５０％、１７０％、１９０％、または２００％であってもよい。二量体化は、以下にさらに説明するように検出および測定することができる。

【００８１】

より具体的には、エキソドメインは、配列番号２、配列番号４、または配列番号１０のバリアントまたは断片（例えば、配列番号２、配列番号４、または配列番号１０に対して少なくとも６０％、７０％、８０％、９０％、または９５％の同一性を有するバリアントまたは断片）を含むかまたはそれからなってもよいが、ただし、配列番号２のバリアントまたは断片はＲ１３０Ｃを含み、配列番号４のバリアントまたは断片はＲ１５４Ｃを含み、配列番号１０のバリアントまたは断片はＲ１２９Ｃを含むものとする。さらに、上記バリアントまたは断片は、組換えタンパク質に、シグナル誘導分子の非存在下で、第２のタンパク質と二量体化し、組換えタンパク質を含む細胞にシグナルを提供する能力を与える必要がある。

【００８２】

当該技術分野で報告されているＥＰＯＲの細胞外領域に対する改変としては、Ｔ１１４Ａ、Ｓ１１５Ａ、Ｓ１１６Ａ、Ｆ１１７Ａ、Ｆ１１７Ｌ、Ｆ１１７Ｗ、Ｆ１１７Ｙ、Ｖ１１８Ａ、Ｌ１２０Ａ、Ｅ１２１Ａ、Ｒ１６５Ａ、Ｍ１７４Ａ、Ｓ１７６Ａ、Ｈ１７７Ａ、およびＲ１７９Ａが挙げられる。これらの改変のいずれか１つ以上が、本発明におけるＥＰＯＲの細胞外領域に由来するエキソドメイン配列と共に存在してもよい。

【００８３】

いくつかの実施形態では好ましいが、組換えタンパク質のエキソドメインと共に含まれるＥＰＯＲの細胞外領域に由来する配列がＥＰＯに結合する能力を保持することは必須ではない。したがって、ＥＰＯに結合する能力を低下させる（例えば、１０％超、２０％超、３０％超、４０％超、５０％超、６０％超、７０％超、８０％超、または９０％超低下させる）かまたは除去するためのＥＰＯＲの細胞外領域のＥＰＯ結合部位に対する改変は、本発明の範囲内である。あるいは、上述したように、一実施形態では、エキソドメイン（したがって、ＥＰＯＲの細胞外領域）が、その領域に加えられた改変に鑑みて提供される構成的シグナルを上回る追加のシグナルを細胞に提供するためにＥＰＯに結合可能であることが望ましい場合もある。本発明はさらに、未改変の野生型ＥＰＯＲ細胞外領域と比較してＥＰＯに対する結合が増強されるようにＥＰＯ結合部位が特異的に改変されているＥＰＯＲの細胞外領域を提供することを包含する。この点において、ＥＰＯ結合部位の改変は、結合部位に対するＥＰＯの親和性を少なくとも１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、または９０％増加させることを可能にしてもよい。ＥＰＯ結合部位は、配列番号１または配列番号５の１１７位に見出され、したがって、この位置の改変は、本発明に包含される。

【００８４】

エキソドメインは、ＥＰＯＲの細胞外領域に由来する配列に加えて、かつ／または任意の構成的二量体化ドメインに加えて、他の異種ドメインまたはタグをさらに含んでもよい。したがって、本明細書において、ＥＰＯＲの細胞外領域に少なくとも一部分が由来するエキソドメインへの言及は、このエキソドメインがＥＰＯＲの細胞外領域に由来するアミノ酸配列を含むものの、追加の異種配列（すなわち、野生型ＥＰＯＲに存在しない配列）が存在してもよいことを意味する。例えば、エキソドメインは、細胞治療の投与中または投与後の有害事象の発生時などに必要となるかまたは望ましい可能性がある細胞死の誘導を可能にするために、自殺部分をさらに含んでもよい。考えられる自殺部分の例としては

、ＣＤ２０エピトープが挙げられ、その場合、リツキシマブの投与によって細胞死を誘導することができる。ＷＯ２０１３／１５３３９には、このように使用できるＣＤ２０エピトープが記載されている。使用され得る他のドメインとしては、組換え分子を発現する細胞を同定および選別するために使用できるタグ、例えば、Ｓｔｒｅｐタグまたはｍｙｃタグが挙げられる。

【００８５】

さらに、場合によっては、組換え分子のエキソドメイン内に１つ以上のさらなる誘導性二量体化ドメインを含むことが、シグナル伝達の考えられる増強（例えば、同じアミノ酸配列を有しているが１つ以上のさらなる誘導性二量体化ドメインを含まない組換え分子と比較して、少なくとも１０％、２０％、３０％、４０％、または５０％のシグナル伝達の増加）を可能にするために、望ましい場合がある。別の見方をすると、１つ以上のさらなる誘導性二量体化ドメインの存在は、さらなる誘導性二量体化ドメインを含まない組換えタンパク質と比較して、本明細書で定義される組換えタンパク質と第２のタンパク質との間のより多くの量の二量体化（例えば、少なくとも１０％、２０％、３０％、４０％、または５０％の増加）を可能にし得る。追加の誘導性二量体化ドメインは任意の手段による二量体化を可能にし得る。例えば、二量体化は、直接的または間接的な会合であり得、２つの二量体化ドメインが直接に結合しているかまたは連結されていることを意味するものではないが、これが除外されるわけではない。典型的には、誘導性二量体化ドメインはそれぞれ二量体化誘導物質分子に結合し得る。当業者は、任意のさらなる誘導性二量体化ドメイン間の二量体化に二量体化誘導物質分子が必要とされる場合、シグナル伝達の増加または得られる二量体の割合の増加は、二量体化誘導物質分子の存在下でのみ起こり得ることを理解するであろう。このようなさらなる誘導性二量体化ドメインは、ＥＰＯＲの細胞外領域に由来する配列内のＥＰＯ結合部位の存在に加えて存在してもよく、そのようなＥＰＯ結合部位の喪失に置き換わるために存在してもよい。

【００８６】

様々な二量体化誘導物質分子と二量体化のための異なるタンパク質ドメインとを用いた化学的に誘導される二量体化システムが、当該技術分野で知られており、以下にさらに説明する。

【００８７】

小分子誘導物質によって媒介される化学誘導二量体化の概念は、長年知られており、誘導物質結合ドメインに融合された目的のタンパク質同士の二量体化を制御するためのツールとして使用されてきた。そのようなシステムは、細胞生物学における、例えばシグナル伝達経路や他の生物学的メカニズムを調査するためにタンパク質を近接させるための、様々な用途への使用、病原性タンパク質を分解または不活性化するための医学における使用、ならびに遺伝子治療および細胞治療における使用が記述されている。典型的な化学的二量体化誘導物質（ＣＩＤ）、または本明細書中の用語を使用すると二量体化誘導物質は、分子の両側で１つずつ、２つのタンパク質またはタンパク質ドメインと相互作用または結合することができるという特徴を有する。したがって、二量体化誘導物質は、２つの結合部位または結合面（またはより一般的には、相互作用部位）を有する。ヘテロ二量体化の場合、二量体化誘導物質は、２つの異なるタンパク質または二量体化ドメインと相互作用または結合することができる。ホモ二量体化の場合、二量体化誘導物質は、同じ二量体化ドメインの２つのコピーまたは分子と相互作用または結合することができる。元のシステムは、マクロライドであるＦＫ５０６およびラパマイシンに基づくものであった。これらのマクロライドは、ヘテロ二量体化ドメイン対およびＣＩＤの組み合わせを実現するために異なる組み合わせで使用することができる、ＦＫ５０６結合タンパク質（ＦＫＢＰ）、ｍＴＯＲのＦＫＢＰ－ラパマイシンドメイン（ＦＲＢ）、カルシニューリン、およびシクロフィリンを含む、種々の異なるタンパク質またはタンパク質ドメインに結合し、そのヘテロ二量体化を誘導することができる。そのようなシステムは、カルシニューリンまたはシクロフィリンに結合するシクロスポリンの使用を含む場合もある。その後、異なる分子に基づく他のＣＩＤヘテロ二量体化システムが開発されており、文献に記載されている。

さらに、２つのＦＫＢＰ分子に結合することができるＦＫ５０６誘導体に基づくホモ二量体化システムが開発されている。すなわち、同じ二量体化ドメインに対する２つの結合部位を含む対称なまたは二量体の誘導物質に基づくホモ二量体化システムである。

【００８８】

一実施形態では、二量体化誘導物質分子はラパマイシンまたはその類似体であり、二量体化ドメインはそれに結合するタンパク質ドメインである。ラパマイシンおよびラパマイシン類似体は、ｍＴＯＲのＦＲＢドメインとＦＫ５０６結合タンパク質（ＦＫＢＰ）との間に界面を生成することによってヘテロ二量体化を誘導する。この会合により、ＦＫＢＰは、ｍＴＯＲ活性部位へのアクセスをブロックし、その機能を阻害する。ｍＴＯＲは非常に大きなタンパク質であるが、ラパマイシンとの相互作用に必要なｍＴＯＲの正確な小さなセグメントは知られており、それを利用することができる。

【００８９】

マクロライドであるラパマイシンおよびＦＫ５０６は、細胞タンパク質のヘテロ二量体化を誘導することによって作用する。各薬剤は、ＦＫＢＰ１２タンパク質に高い親和性で結合し、薬剤－タンパク質複合体を形成し、この複合体は、その後、それぞれｍＴＯＲ／ＦＲＡＰおよびカルシニューリンに結合し、それらを不活性化する。ｍＴＯＲのＦＫＢＰ－ラパマイシン結合（ＦＲＢ）ドメインは、目的のタンパク質に融合され得る、８９個のアミノ酸からなる単離されたタンパク質部分として定義され、応用されている。そして、ラパマイシンは、ＦＫＢＰ１２またはＦＫＢＰ１２と融合したタンパク質へのＦＲＢ融合体の接近を誘導することができる。

【００９０】

「ＦＲＢ」および「ＦＫＢＰ」という用語は、それらのバリアントを含む。そのようなバリアントは、天然の配列に対して１つ以上のアミノ酸改変（例えば、置換、付加、および／または欠失）を有するアミノ酸配列を含み得る。「ＦＫＢＰ」という用語はＦＫＢＰ１２を含む。

【００９１】

ラパマイシンは、理想的な誘導性二量体化剤のいくつかの特性を有している。すなわち、ラパマイシンは、ＦＫＢＰに結合したときにＦＲＢに対して高い親和性（ＫＤ＜１ｎＭ）を有し、ｍＴＯＲのＦＲＢドメインに対して高い特異性を有する。ラパマイシンは、哺乳動物において好ましい薬物動態学的および薬力学的プロファイルを有する有効な治療的免疫抑制剤である。エベロリムス、テムシロリムス、およびデフォロリムスなどの、異なる薬物動態学的特性および動的特性を有するラパマイシンの薬理学的類似体（Benjamin et al, Nature Reviews, Drug Discovery, 2011）も、臨床環境に応じて使用され得る。

【００９２】

ラパマイシンが内因性ｍＴＯＲに結合して内因性ｍＴＯＲを不活性化させるのを防ぐために、ＦＲＢと接触するラパマイシンの表面を改変することができる。「突起を持たせた（bumped）」ラパマイシンを収容する表面を形成するためのＦＲＢドメインの補償的な変異（compensatory mutation）は、内因性ｍＴＯＲタンパク質とではなく、ＦＲＢ変異体とのみ二量体化相互作用を回復させる。

【００９３】

Bayle et al.（Chem Bio; 2006; 13; 99-107）は、様々なラパマイシン類似体、つまり「ラパログ（rapalog）」と、それらに対応する改変されたＦＲＢ結合ドメインとを記載している。例えば、Bayle et al.（2006）は、ラパログとして、図２に示すように、Ｃ－２０－メチルリルラパマイシン（C-20-methyllyrlrapamycin）（ＭａＲａｐ）、Ｃ１６（Ｓ）－ブチルスルホンアミドラパマイシン（Ｃ１６－ＢＳ－Ｒａｐ）、およびＣ１６－（Ｓ）－７－メチルインドールラパマイシン（ＡＰ２１９７６／Ｃ１６－ＡｉＲａｐ）を、それぞれの相補的結合ドメインと組み合わせて記載している。他のラパマイシン／ラパログとしては、シロリムスおよびタクロリムス（ＦＫ５０６）が挙げられる。

【００９４】
したがって、そのような実施形態では、本明細書に記載の組換えタンパク質内の誘導性二量体化ドメインがＦＫＢＰを含み、第２のタンパク質が同族二量体化ドメインＦＲＢを含んでもよく、あるいは、その逆であってもよい。ＦＫＢＰ／ＦＲＢは、配列番号１５から配列番号１９のいずれか１つに示す配列またはそのバリアントを有し得るかまたは含み得る。

【００９５】
本明細書において互換的に使用される「シグナル誘導物質分子」または「シグナル誘導分子」とは、エキソドメインと膜貫通ドメインとエンドドメインとを含むタンパク質または受容体を介して、そのようなタンパク質または受容体を含む細胞へのシグナル伝達を誘導することができる分子をいう。シグナル誘導物質分子は、任意の種類のシグナルを誘導可能であり得、当業者は、誘導されるシグナルがタンパク質または受容体内に存在するエンドドメインに依存することを理解するであろう。典型的には、シグナル誘導物質分子はタンパク質または受容体に結合してシグナルを誘導する。１つの態様において、シグナル誘導物質は、タンパク質または受容体に結合して二量体化または多量体化を誘導し、その結果、タンパク質または受容体のエンドドメインを介したシグナルの伝達をもたらし得る。この態様では、シグナル誘導物質分子は二量体化誘導物質分子であってもよい。しかしながら、シグナル誘導物質が受容体またはタンパク質に結合し、コンフォメーション変化を誘導することも可能であり、これによって、タンパク質または受容体のエンドドメインによって移動される（translocated）シグナルの産生がもたらされる。この点において、シグナル誘導物質分子は、既に二量体化した受容体またはタンパク質（例えば、シグナル伝達をしないかまたは弱いシグナル伝達をする）に結合して、細胞内でエンドドメインを介してシグナルを産生することもある。本発明において、組換えタンパク質は、このようなシグナル誘導物質分子の非存在下で細胞にシグナルを提供することができる。したがって、組換えタンパク質は、細胞にシグナルを提供するのに（かつ／または第２のタンパク質と二量体化するのに）シグナル誘導物質分子の存在を必要としない。特に、シグナル誘導物質分子はＥＰＯであり得る。

【００９６】
本明細書における「ＥＰＯ」は、エリスロポエチンを指し、配列番号１４のアミノ酸配列を含む。ＥＰＯは、典型的には、配列番号１のアミノ酸位置１１７でＥＰＯＲに結合する。詳述したように、本発明の組換えタンパク質は、組換えタンパク質を含む細胞へのシグナルを産生するのにＥＰＯの存在を必要としない。

【００９７】
本明細書における「二量体化誘導物質分子」とは、２つの誘導性二量体化ドメイン（例えば、組換えタンパク質内と第２のタンパク質内）の間に界面を形成してそれらを二量体として結合させてもよく、２つの誘導性二量体化ドメイン（例えば、組換えタンパク質内と第２のタンパク質内）の間の化学的架橋を可能にして二量体の形成を可能にするものであってもよい。本明細書で何度も述べるように、組換えタンパク質は、二量体化誘導物質分子の非存在下を含む、シグナル誘導物質分子の非存在下で、第２のタンパク質と二量体化することができ、組換えタンパク質を含む細胞においてシグナルを提供することができる。ただし、１つ以上の他の誘導性二量体化ドメインが組換え分子内に存在し得ることが除外されるわけではない。二量体化誘導物質分子としては、例えば、上述したラパマイシンが挙げられる。

【００９８】
本明細書に記載の組換えタンパク質の第２のタンパク質との二量体化（本明細書に記載の改変による、かつ／または１つ以上の誘導性二量体化ドメインの存在による）は、当該技術分野で周知の非変性ＳＤＳ　ＰＡＧＥまたは動的光散乱技術によって判定または測定することができる。したがって、二量体化は、一般に、タンパク質（本発明では組換えタンパク質）の単量体形態と二量体形態のサイズの差によって検出することができる。したがって、組換えタンパク質が第２のタンパク質と二量体化する（特に、ホモ二量体化する

）能力は、細胞内または細胞集団内の組換えタンパク質の二量体の存在を検出することによって測定（または判定）することができる。本明細書に記載の組換えタンパク質は、シグナル誘導物質分子、特にＥＰＯの非存在下で、第２のタンパク質と二量体化する能力を有する。したがって、この二量体化能力は、細胞内で発現（ホモ二量体化の場合は単独で、またはヘテロ二量体化の場合は異なる第２のタンパク質と一緒に）された場合の組換えタンパク質の二量体形態の検出によって判定することができる。典型的には、本発明の組換えタンパク質は、シグナル誘導物質分子の非存在下で、野生型ＥＰＯＲがＥＰＯの存在下で二量体化するのと同じ程度または類似の程度まで二量体化し得る。あるいは、組換えタンパク質は、ＥＰＯの存在下での野生型ＥＰＯＲと比較して、変化した、第２のタンパク質と二量体化する能力を有し得る。したがって、変化した二量体化能力とは、ある基準と比較した場合の、例えば、ＥＰＯの存在下での野生型ＥＰＯＲと比較した場合の、または配列番号２のバリアントもしくは断片については配列番号２と比較した場合の、細胞または細胞集団における二量体形態または単量体形態の組換えタンパク質の相対量の増加または減少（例えば、二量体形態の組換えタンパク質の少なくとも４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％の増加または減少）を指し得る。当業者は、ＥＰＯの非存在下での組換えタンパク質の二量体化／シグナル伝達がＥＰＯの存在下での野生型ＥＰＯＲと比較して減少（例えば、少なくとも１０％、２０％、３０％、４０％、または５０％減少）していてもなお、所望の結果（例えば、持続性）を提供するのに十分なシグナルが細胞に伝達され、特定の実施形態において好ましい場合があることを理解するであろう。

【００９９】

本明細書でいう「第２のタンパク質」との二量体化は、組換えタンパク質が第２のタンパク質と二量体を形成できる（すなわち、組換えタンパク質の単量体が、第２のタンパク質の単量体と会合して二量体（各単量体の１つのコピーを含む）を形成することができる）ことを意味する。１つの態様において、第２のタンパク質は組換えタンパク質であり、したがってこの場合、組換えタンパク質は、ホモ二量体化、例えば、それ自体と二量体化することが可能であり、その場合、二量体は、２つの組換えタンパク質単量体を含む。したがって、この実施形態では、二量体化が起こるためには、組換えタンパク質が細胞内で発現すれば十分であり（異なるタンパク質の発現は二量体化に不要である）、前述のように、シグナル誘導物質分子は必要ない。二量体化は上記のように検出することができる。

【０１００】

あるいは、またはさらに、本明細書で定義される組換えタンパク質は、本発明の組換えタンパク質ではない異なる第２のタンパク質とヘテロ二量体化することが可能であってもよい。したがって、第２のタンパク質は、組換えタンパク質とは異なるドメインまたは部分を含んでもよい。ただし、第２のタンパク質は、シグナル誘導物質分子の非存在下で、組換えタンパク質と二量体化し、シグナルを提供することが可能である必要がある。したがって、第２のタンパク質は、シグナル誘導物質分子の非存在下での会合およびシグナル伝達が可能な組換えタンパク質の二量体化ドメインと同族の二量体化ドメインを含んでいる必要がある。例えば、組換えタンパク質がＥＰＯＲの改変された細胞外領域を含むエキソドメインを含み、その改変がシステインへのアミノ酸残基の挿入または置換（ジスルフィド結合二量体化の目的のため）を含む一実施形態においては、第２のタンパク質は、シグナル誘導物質分子の非存在下での二量体化を可能にするために適切な位置に同族システイン残基を含んでいる必要がある。あるいは（またはさらに）、組換えタンパク質がロイシンジッパーを有するエキソドメインを含む場合、第２のタンパク質は、シグナル誘導物質分子の非存在下での二量体化を可能にするために同族ロイシンジッパーを含み得る。例えば、組換えタンパク質がＪｕｎロイシンジッパーまたはＦｏｓロイシンジッパーを含み、第２のタンパク質がＪｕｎロイシンジッパーを含んでもよい（あるいは、その逆であってもよい）。当業者は、本明細書に記載の組換えタンパク質はホモ二量体化およびヘテロ二量体化が可能であることを理解するであろう。したがって、組換えタンパク質と異なる第２のタンパク質とを発現する細胞は、組換えタンパク質のホモ二量体とともに組換えタ

ンパク質と異なる第２のタンパク質とのヘテロ二量体も含み得る。
【０１０１】
したがって、一実施形態では、第２のタンパク質は、組換え分子のバリアントまたは一部分であってもよく、特に、第２のタンパク質は、組換え分子のエキソドメインのバリアントまたは一部分である（例えば、それに対して少なくとも７０％、８０％、９０％、または９５％の配列同一性を有し得る）エキソドメインを含んでもよい。あるいは、第２のタンパク質は、組換え分子のエンドドメインのバリアントまたは一部分である（例えば、それに対して少なくとも７０％、８０％、９０％、または９５％の同一性を有し得る）エンドドメインを含んでもよい。第２のタンパク質は、シグナル誘導物質分子の非存在下で組換えタンパク質に結合することが可能でなければならない。特に、追加の誘導性二量体化ドメイン、例えば誘導性ヘテロ二量体化ドメインを含む組換えタンパク質の場合には、組換えタンパク質内に存在する追加の誘導性二量体化ドメインは、第２のタンパク質に存在する追加の誘導性二量体化ドメイン（例えば、ＦＲＢ／ＦＫＢＰまたはその機能的バリアント）とは異なり得る（この実施形態では、組換えタンパク質がＦＲＢをさらに含み、第２のタンパク質がＦＫＢＰを含んでもよく、あるいは、その逆であってもよい）。
【０１０２】
さらに、またはあるいは、組換えタンパク質および第２のタンパク質は、異なるタグを含んでもよく、例えば、組換えタンパク質がｓｔｒｅｐタグを含み、第２のタンパク質がｍｙｃタグを含んでもよく、または、その逆であってもよい。当業者には、第２のタンパク質は、典型的には組換えタンパク質であってもよく、本発明は、細胞中で本発明の組換えタンパク質と一緒に第２の組換えタンパク質を発現させることをさらに必要とする場合があることが、理解されるであろう。したがって、本発明は、第２のタンパク質をコードする塩基配列を含む第２の核酸分子を、例えば、本明細書で定義される組換えタンパク質をコードする塩基配列を含む核酸と一緒に、細胞に導入することをさらに可能にする。
【０１０３】
本明細書で提示される任意のアミノ酸配列のバリアントは、別段の記載がない限り、参照配列（すなわち、本明細書中で指定される参照配列番号）に対して少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９８％、または９９％の配列同一性を有し得る。特に、そのようなバリアントは、それが由来する親分子、すなわち参照配列の所望のまたは必要な特性を保持している。したがって、バリアント配列は、そのバリアント配列が有効な二量体化システムおよびシグナルを提供することを条件として、記載された配列同一性（％）を有し得る。
【０１０４】
本発明のタンパク質またはポリペプチドに関連して本明細書において互換的に使用される「誘導体」または「バリアント」という用語は、結果として生じるタンパク質またはポリペプチドが所望の機能を保持していることを条件として、配列からの、または配列への、１つ（または複数）のアミノ酸残基の任意の置換（substitution）、変異、改変、置換（replacement）、欠失、および／または付加を含む。例えば、誘導体またはバリアントがエンドドメインである場合、上記所望の機能とは、そのドメインがシグナル伝達する（例えば、下流の分子を活性化または不活性化する）能力であってもよく、誘導体またはバリアントが二量体化ドメインである場合は、上記所望の機能とは、同族二量体化ドメインとの（直接的または間接的な）相互作用である。別の見方をすると、本明細書でいうバリアントまたは誘導体は、典型的には、機能的バリアントまたは機能的誘導体である。例えば、上記バリアントまたは誘導体は、対応する参照配列と比較して、少なくとも少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、または少なくとも９０％の機能を有していてもよい。上記バリアントまたは誘導体は、対応する参照配列と比較して、近いレベル、または同じレベルの機能を有していてもよく、または、対応する参照配列よりも高いレベル（例えば、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、または少なくとも５０％高くなったレベル）の機能を有していて

もよい。

【０１０５】

典型的には、アミノ酸の置換は、それにより改変された配列が求められる活性または能力を保持するなら、例えば１個、２個または３個から１０個または２０個の置換からなっていてもよい。アミノ酸置換は、天然由来ではない類似体の使用を含んでいてもよい。例えば、上記バリアントまたは誘導体は、対応する参照配列と比較して、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、または少なくとも９０％の活性または能力を有していてもよい。上記バリアントまたは誘導体は、対応する参照配列と比較して、近いレベル、または同じレベルの活性または能力を有していてもよく、または、対応する参照配列よりも高いレベル（例えば、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、または少なくとも５０％高くなったレベル）の活性または能力を有していてもよい。

【０１０６】

タンパク質またはペプチドは、また、サイレントな変化を生じ（produce a silent change）、かつ機能的に同等のタンパク質となる、アミノ酸残基の欠失、挿入、または置換を有してもよい。内在的な機能が保持される限り、上記残基の極性、電荷、溶解性、疎水性、親水性、および／または、両親媒性に基づいて、意図的なアミノ酸置換を行ってもよい。例えば、負帯電アミノ酸としては、アスパラギン酸およびグルタミン酸などがあり、正帯電アミノ酸としては、リジンおよびアルギニンがあり、同様の親水性値をもつ非荷電の極性先端基を有するアミノ酸としては、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、およびチロシンがある。

【０１０７】

例えば下記表１にしたがい、同類置換を行ってもよい。

【表１】

表１

脂肪族	非極性	ＧＡＰ
		ＩＬＶ
	極性－非荷電	ＣＳＴＭ
		ＮＱ
	極性－荷電	ＤＥ
		ＫＲ
芳香族		ＨＦＷＹ

【０１０８】

上記誘導体は、相同体でもよい。本明細書における「相同体」という用語は、野生型アミノ酸配列および野生型塩基配列と、特定の相同性を有した実体を意味する。「相同性」という用語は、「同一性」と同等視することができる。

【０１０９】

相同配列またはバリアント配列は、上記対象配列に対して少なくとも８０％、８５％、または９０％、好ましくは少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有してもよいアミノ酸配列を含んでもよい。典型的には、上記バリアントは、対象のアミノ酸配列と同じ活性部位などを含んでもよい。相同性は、類似性（すなわち、類似の化学的特性／機能を有するアミノ酸残基）の観点から考えることもできるが、本明細書の文脈においては、配列同一性の観点から相同性を表すことが好ましい。

【０１１０】

相同性の比較は、目視で、またはより一般には、容易に入手可能な配列比較プログラムを用いて実施することができる。これら市販のコンピュータプログラムは、二つ以上の配

列間の百分率相同性または同一性の比率を算出できる。
百分率相同性または配列同一性は、連続した配列にわたって算出され得る。すなわち、一方の配列を他方の配列と整列させ、一方の配列中の各アミノ酸を他方の配列中の対応するアミノ酸と一残基ずつ直接比較する。これは、「非ギャップ（ungapped）」アライメントと呼ばれる。典型的には、そのような非ギャップアライメントは、比較的短い数の残基にわたってのみ行われる。
【０１１１】
これは非常に単純で一貫した方法であるが、例えば、１個の挿入または欠失を除いては同一の配列対において、該塩基配列中のその挿入または欠失が、その後に続くコドンがアラインメントから外される原因となり得る、すなわちグローバルアライメントが行われた場合に％相同性の大幅な減少を潜在的に生じるということが考慮されていない。結果として、ほとんどの配列比較方法は、全体的な相同性スコアを過度に不利にすることなく、考えられる挿入および欠失を考慮に入れた最適アライメントを作製するように設計される。これは、配列アライメントに「ギャップ」を挿入して局所相同性を最大にすることによって達成される。
【０１１２】
しかしながら、これらのより複雑な方法は、アライメント中に生じる各ギャップに「ギャップペナルティ」を割り当て、同じ数の同一アミノ酸について、できるだけ少ないギャップの配列アラインメント（２つの比較した配列間の類似性が高いことを反映する）が、多くのギャップを持つスコアよりも高いスコアを達成するようにする。ギャップの存在に対して比較的高いコストを課し、ギャップ内のそれぞれ後続の残基に対してより小さいペナルティを課す「アフィンギャップコスト」が通常使用される。これは、最も一般的に使用されるギャップスコアリングシステムである。高いギャップペナルティは、当然ながら、ギャップのより少ない最適化アライメントを作製する。ほとんどのアラインメントプログラムは、ギャップペナルティを修正することを可能にする。しかしながら、そのようなソフトウェアを配列比較に使用する際は、デフォルト値を使用することが好ましい。例えば、ＧＣＧ　Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ　Ｂｅｓｔｆｉｔパッケージを使用する際、アミノ酸配列のデフォルトのギャップペナルティは、ギャップについては－１２、それぞれの延長については－４である。
【０１１３】
最大百分率相同性／配列同一性の算出は、したがって、ギャップペナルティを考慮に入れ、最適アライメントの作製を最初に必要とする。そのようなアラインメントを実行するのに好適なコンピュータプログラムは、ＧＣＧ　Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ　Ｂｅｓｔｆｉｔパッケージ（University of Wisconsin, U.S.A.; Devereux et al. (1984) Nucleic Acids Res. 12: 387）である。配列比較を行うことができる他のソフトウェアの例には、限定されないが、ＢＬＡＳＴパッケージ（Ausubel et al. (1999) ibid-Ch.18を参照）、ＦＡＳＴＡ（Atschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 403-410）およびＧＥＮＥＷＯＲＫＳ比較ツール一式が挙げられる。ＢＬＡＳＴおよびＦＡＳＴＡの両方が、オフラインおよびオンライン検索に利用可能である（Ausubel et al. (1999) ibid, pages 7-58 to 7-60を参照）。しかしながら、いくつかのアプリケーションについては、ＧＣＧ　Ｂｅｓｔｆｉｔプログラムを使用することが好ましい。ＢＬＡＳＴ２　Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓと呼ばれる別のツールも、タンパク質および塩基配列を比較するために利用できる。（FEMS Microbiol. Lett. (1999) 174:247-50; FEMS Microbiol. Lett. (1999) 177:187-8参照）。
【０１１４】
最終的な百分率相同性は同一性の観点から測定することができるが、アライメントプロセス自体は、典型的には、オールオアナッシング対比較に基づくものではない。その代わりに、化学的類似性または進化距離に基づいて各対ごとの比較にスコアを割り当てるスケール化類似性スコアマトリクスが一般的に使用される。一般に使用されるそのようなマトリクスの一例は、ＢＬＯＳＵＭ６２マトリクス（一連のＢＬＡＳＴプログラムのデフォル

トマトリクス）である。ＧＣＧ　Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎプログラムでは、一般的には、パブリックデフォルト値または供給されるのであればカスタムシンボル比較表のいずれかが使用される（さらに詳しくはユーザーマニュアルを参照されたい）。しかしながら、いくつかのアプリケーションについては、ＧＣＧパッケージではデフォルト値を使用することが好ましく、他のソフトウェアの場合は、ＢＬＯＳＵＭ６２のようなデフォルトマトリクスを使用することが好ましい。好適には、百分率同一性は、参照配列および／または問い合わせ配列の全体にわたって判断される。

【０１１５】

ソフトウェアが最適アライメントを作製すると、百分率相同性、好ましくは百分率配列同一性を計算することが可能である。ソフトウェアは、典型的にはこれを配列比較の一部として行い、数値結果を与える。

【０１１６】

「断片」は、典型的には、機能の点で着目の、例えば機能的であるかまたは機能的断片をコードする、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドの選択された領域のことである。したがって、「断片」は、全長ポリペプチドまたはポリヌクレオチドの一部分（または一部）であるアミノ酸または核酸の配列のことである。

【０１１７】

そのようなバリアント、誘導体、および断片は部位特異的変異誘発などの標準的な組換えＤＮＡ技術を使用して調製されてもよい。挿入が作製される場合には、挿入位置のどちらか一方の側で天然に発生する配列に対応する５’および３’隣接領域とともに挿入部分をコードする合成ＤＮＡが作製されてもよい。上記隣接領域は、上記配列が適切な酵素（または複数の酵素）で切断され合成ＤＮＡが切断場所に連結（ligated）され得るように、天然に発生する配列における部位に対応する適当な制限酵素部位を含む。上記ＤＮＡは次に、コードされるタンパク質を作製するために本発明に従って発現される。これらの方法はＤＮＡ配列操作のための当該技術分野において周知の多数の標準的手法の実例となるだけであり、他の公知の手法もまた使用されてもよい。

【０１１８】

本明細書に記載の組換えタンパク質は、特に、典型的には組換えタンパク質のエキソドメインを細胞膜につなぎ留める膜貫通ドメインを含む。膜貫通ドメインは、Ｉ型膜貫通タンパク質、ＩＩ型膜貫通タンパク質、またはＩＩＩ型膜貫通タンパク質などの、膜貫通ドメインを有するタンパク質のいずれに由来するものであってもよい。

【０１１９】

キメラタンパク質の膜貫通ドメインはまた、人工疎水性配列を含んでもよい。さらなる膜貫通ドメインは、当業者に明らかであろう。ＴＭドメインは、例えば、組換え膜貫通タンパク質において典型的に使用されるもののいずれかから選択されてもよい。使用され得る膜貫通（ＴＭ）領域の例を、下記に示す。１）ＣＤ２８　ＴＭ領域（Pule et al, Mol Ther, 2005, Nov; 12(5):933-41; Brentjens et al, CCR, 2007, Sep 15;13(18 Pt 1):5426-35; Casucci et al, Blood, 2013, Nov 14;122(20):3461-72.）；２）ＯＸ４０　ＴＭ領域（Pule et al, Mol Ther, 2005, Nov;12(5):933-41）；３）４１ＢＢ　ＴＭ領域（Brentjens et al, CCR, 2007, Sep 15;13(18 Pt 1):5426-35）；４）ＣＤ３ゼータＴＭ領域（Pule et al, Mol Ther, 2005, Nov;12(5):933-41; Savoldo B, Blood, 2009, Jun 18;113(25):6392-402.）；５）ＣＤ８ａ　ＴＭ領域（Maher et al, Nat Biotechnol, 2002, Jan;20(1):70-5.; Imai C, Leukemia, 2004, Apr;18(4):676-84; Brentjens et al, CCR, 2007, Sep 15;13(18 Pt 1):5426-35; Milone et al, Mol Ther, 2009, Aug;17(8):1453-64.）。使用され得る他の膜貫通ドメインとしては、ＣＤ４、ＣＤ４５、ＣＤ９、ＣＤ１６、ＣＤ２２、ＣＤ３３、ＣＤ６４、ＣＤ８０、ＣＤ８６、またはＣＤ１５４に由来する膜貫通ドメインが挙げられる。膜貫通ドメインはさらに、ＩＬ２ＲＢ由来またはＥＰＯＲ由来であってもよい。

【０１２０】

例として、膜貫通ドメインは、ＣＤ２８膜貫通ドメインに由来してもよく、配列番号３４として示すアミノ酸配列、または配列番号２４に対して少なくとも８０％の同一性を有するバリアントを含むかまたはそれからなってもよい。上記バリアントは、配列番号２４に対して少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有してもよい。

【０１２１】

特定の実施形態では、膜貫通ドメインは、ＥＰＯＲ膜貫通ドメインに由来してもよく、配列番号７として示すアミノ酸配列、または配列番号７に対して少なくとも８０％の同一性を有するバリアントを含むかまたはそれからなってもよい。上記バリアントは、配列番号７に対して少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有してもよい。

【０１２２】

あるいは、膜貫通ドメインは、ＩＬ２ＲＢ膜貫通ドメインに由来してもよく、 配列番号２５として示すアミノ酸配列、または配列番号２５に対して少なくとも８０％の同一性を有するバリアントを含むかまたはそれからなってもよい。上記バリアントは、配列番号２５に対して少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有してもよい。

【０１２３】

あるいは、組換えタンパク質は、ＣＤ８α膜貫通ドメインに由来するドメインを含んでもよい。したがって、膜貫通ドメインは、ヒトＣＤ８αの１８３位から２０３位のアミノ酸を表す配列番号２６として示すアミノ酸配列、または配列番号２６に対して少なくとも８０％の同一性を有するバリアントを含むかまたはそれからなってもよい。好適には、上記バリアントは、配列番号２６に対して少なくとも８５％、９０％、９５％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有してもよい。

【０１２４】

あるいは、膜貫通ドメインは、骨髄受容体タンパク質の膜貫通ドメイン、例えば、ＴＲＥＭ１またはＴＲＥＭ２などのＴＲＥＭタンパク質に由来してもよい。したがって、組換えタンパク質は、配列番号２７もしくは配列番号２８に示すアミノ酸配列、または配列番号２７もしくは配列番号２８に対して少なくとも８０％の同一性を有するバリアントを含むかまたはそれからなる膜貫通ドメインを含んでもよい。好適には、上記バリアントは、配列番号２７または配列番号２８に対して少なくとも８５％、９０％、９５％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有してもよい。

【０１２５】

本明細書に記載の組換えタンパク質は、組換えタンパク質を発現（ホモ二量体化の場合は単独で、またはヘテロ二量体化の場合は第２のタンパク質と一緒に）する細胞にシグナルを提供することができる。シグナルは、典型的には、エンドドメインによって細胞に提供される。したがって、一実施形態では、本発明の組換えタンパク質は、エンドドメインをさらに含む。代替的な実施形態では、エンドドメインは、組換えタンパク質とは別個のタンパク質であるシグナル伝達タンパク質によって提供され得る。この態様では、組換えタンパク質とシグナル伝達タンパク質とが一緒になってシグナルを細胞に提供する。したがって、本明細書に記載の組換えタンパク質は、直接的（例えば、それ自体のエンドドメインを介して）または間接的（シグナル伝達タンパク質のエンドドメインを介して）に、シグナルを細胞に提供し得る。

【０１２６】

したがって、本明細書に記載の「シグナル伝達タンパク質」とは、本明細書で定義される組換えタンパク質と会合することができ、細胞にシグナルを伝達することができるタンパク質を指す。したがって、典型的には、シグナル伝達タンパク質は、膜貫通ドメインとエンドドメインとを含み、組換えタンパク質（および／または第２のタンパク質）と一緒に細胞内で発現され得る。この実施形態では、シグナル伝達タンパク質が組換えタンパク質とそれぞれの膜貫通ドメインを介して会合してもよく、そのような会合がシグナル伝達

タンパク質のエンドドメインを介したシグナルの伝達をもたらし得ることが、特に想定される。１つの特定の実施形態において、シグナル伝達ドメインは、配列番号もしくはに示すＤＡＰ１０もしくはＤＡＰ１２に由来する膜貫通ドメイン、または配列番号２７もしくは配列番号２８に対して少なくとも８０％の同一性を有するバリアントを含み得る。好適には、上記バリアントは、配列番号２７または配列番号２８に対して少なくとも８５％、９０％、９５％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有してもよい。当業者には、シグナル伝達タンパク質の膜貫通ドメインがＤＡＰ１０またはＤＡＰ１０に由来する場合、組換えタンパク質の膜貫通ドメインは、骨髄受容体、特に、上述したようなＴＲＥＭ受容体に由来してもよいことが理解されるであろう。

【０１２７】

本明細書に記載の「エンドドメイン」は、上述したように、組換えタンパク質内に提供されてもよく、別個のシグナル伝達タンパク質内に提供されてもよい。しかしながら、特に、組換えタンパク質がエンドドメインを含み得る。エンドドメインは、少なくともＪＡＫ１結合モチーフおよび／またはＪＡＫ２結合モチーフを含むチロシンキナーゼ活性化ドメインと、ＪＡＫ１キナーゼおよび／またはＪＡＫ２キナーゼによってリン酸化され得るチロシンエフェクタードメインとを含む。チロシンエフェクタードメインのリン酸化は、シグナル伝達カスケードを生じさせることを可能にし、例えば、シグナル伝達カスケード中の他のタンパク質がエフェクタードメインに結合すること、および／または細胞中でシグナルを伝達するように活性化されることを可能にする。換言すれば、チロシンエフェクタードメインは、リン酸化されると、シグナル伝達因子を動員することができる。本明細書で述べるように、組換えタンパク質は、シグナル誘導物質分子の非存在下で、組換えタンパク質を含む細胞にシグナルを提供することができ、したがって、別の見方をすると、構成的シグナルを産生する。構成的シグナルとは、細胞が組換えタンパク質からのシグナルを常に受け取っていることを意味する。シグナルは、野生型ＥＰＯＲと比較して多くても少なくてもよいが、組換えタンパク質は、シグナルを常に提供することができる。「エンドドメイン」、「細胞内ドメインまたは領域」、および「細胞質ドメインまたは領域」という用語は、本明細書において互換的に使用される。

【０１２８】

チロシンキナーゼ活性化ドメインは、いくつかの実施形態において、ＪＡＫ３結合モチーフも含み得る。特に、ＪＡＫ１結合モチーフとＪＡＫ３結合モチーフとを含み得る。

【０１２９】

一実施形態において、例えば、組換えタンパク質がエンドドメイン中にＪＡＫ３結合モチーフを含まない場合、組換えタンパク質は、ＪＡＫ３結合モチーフを含むエンドドメインドメインを含む第２のタンパク質と組み合わせて使用されてもよい。

【０１３０】

エンドドメインは、ＪＡＫ－ＳＴＡＴシグナル伝達経路を介してシグナル伝達してもよく、換言すれば、シグナルは、ＪＡＫ－ＳＴＡＴシグナル伝達経路の活性化によって媒介されてもよい。

【０１３１】

ＳＴＡＴタンパク質は、活性化された受容体に動員される転写因子であり、したがって、特にチロシンエフェクタードメインは、ＳＴＡＴの結合部位であるＳＴＡＴ会合モチーフを含んでもよい。ＳＴＡＴは、ＳＴＡＴ１、ＳＴＡＴ２、ＳＴＡＴ３、ＳＴＡＴ４、ＳＴＡＴ５、もしくはＳＴＡＴ６、またはそれらの任意の組み合わせであってよい。ＳＴＡＴ会合モチーフは、サイトカイン受容体および受容体チロシンキナーゼ（ＲＴＫ）を含む受容体から得られるかまたはそれらに由来し得る。チロシンエフェクタードメインは、１つ以上、例えば２つ以上、例えば３つ、４つ、５つ、またはそれ以上のＳＴＡＴ会合モチーフを含んでもよく、これらのＳＴＡＴ会合モチーフは同じであっても異なっていてもよい。

【０１３２】

例として、ＳＴＡＴ５は、ＩＬ－２シグナル伝達経路に関与する転写因子であり、ＦＯ

ＸＰ３、ＩＬ２ＲＡおよびＢＣＬＸＬなどの遺伝子の発現を促進することによって、Ｔｒｅｇの機能、安定性、および生存において鍵となる役割を果たす。機能し、かつ核移行するためには、ＳＴＡＴ５はリン酸化する必要がある。ＩＬ－２ライゲーションの結果、ＩＬ－２Ｒβ鎖およびＩＬ－２Ｒγ鎖のそれぞれに存在する特異的なシグナル伝達ドメインを介してＪａｋ１／Ｊａｋ２およびＪａｋ３キナーゼを活性化することにより、ＳＴＡＴ５がリン酸化する。ＪＡＫ１（またはＪＡＫ２）は、ＪＡＫ３を必要とせずにＳＴＡＴ５をリン酸化できるが、ＪＡＫ１／ＪＡＫ２とＪＡＫ３との両方のトランスリン酸化によりＳＴＡＴ５の活性を増加することができ、これにより活性が安定する。

【０１３３】

本明細書における「ＳＴＡＴ会合モチーフ」とは、チロシンを含みＳＴＡＴポリペプチドと結合することのできるアミノ酸モチーフのことである。タンパク質－タンパク質相互作用を判定するための当該技術分野において周知の方法を用いて、会合モチーフがＳＴＡＴと結合できるかどうか判定してもよい。例えば、共免疫沈降の後にウエスタンブロットを行ってもよい。

【０１３４】

ＳＴＡＴ会合モチーフは、例えば、リン酸化するとＳＴＡＴ５ポリペプチド（その他のＳＴＡＴポリペプチドについても同様である）に結合することができるＳＴＡＴ５会合モチーフであってもよい。

【０１３５】

一実施形態において、ＳＴＡＴ会合モチーフはＳＴＡＴ５会合モチーフである。

【０１３６】

好適には、エンドドメインは、本明細書で定義される、２個（例えば、少なくとも２個）以上のＳＴＡＴ５会合モチーフを含んでもよい。例えば、シグナル伝達ドメインは、本明細書で定義される、２個、３個、４個、５個、またはそれ以上のＳＴＡＴ５会合モチーフを含んでもよい。一実施形態において、シグナル伝達ドメインは、本明細書で定義される、２個または３個のＳＴＡＴ５会合モチーフを含んでもよい。

【０１３７】

好適には、上記ＳＴＡＴ５会合モチーフは、本明細書においてエンドドメインを提供するために使用され得る膜貫通タンパク質の細胞質ドメイン中に内因的に存在し得る。例えば、上記ＳＴＡＴ５会合モチーフは、インターロイキン受容体（ＩＬ）受容体エンドドメインまたはホルモン受容体由来であってもよい。

【０１３８】

上記エンドドメインは、ＳＴＡＴ５が下流成分であるインターロイキン受容体の鎖のいずれかから選択されたアミノ酸配列を含んでもよく、例えば、ＩＬ－２受容体β鎖のアミノ酸番号２６６～５５１（米国立バイオテクノロジー情報センター（ＮＣＢＩ）標準配列（ＲＥＦＳＥＱ）：ＮＰ＿０００８６９．１、配列番号３１）、ＩＬ－９Ｒ鎖のアミノ酸番号２９２～５２１（ＮＣＢＩ　ＲＥＦＳＥＱ：ＮＰ＿００２１７７．２、配列番号３３）、ＩＬ－４Ｒα鎖のアミノ酸番号２５７～８２５（ＮＣＢＩ　ＲＥＦＳＥＱ：ＮＰＪＤ００４０９．１、配列番号３４）、ＩＬ－３ＲＢ鎖のアミノ酸番号４６１～８９７（ＮＣＢＩ　ＲＥＦＳＥＱ：ＮＰ＿０００３８６．１、配列番号３５）、および／またはＩＬ－１７Ｒβ鎖のアミノ酸番号３１４～５０２（ＮＣＢＩ　ＲＥＦＳＥＱ：ＮＰ＿０６１１９５．２、配列番号３６）を含む細胞質ドメインが使用されてもよい。これらの配列のいずれか１つ以上を使用できることが、当業者には理解されるであろう。インターロイキン受容体鎖の細胞質ドメインの領域全体が使用されてもよい。

【０１３９】

上記シグナル伝達ドメインは、配列番号３１～３７として示すアミノ酸配列、または配列番号３１～３７に対して少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有するバリアントを含む、１つ以上のＳＴＡＴ５会合モチーフを含んでいてもよい。例えば、上記バリアントは、配列番号３１～３７の１つとして示すアミノ酸配列のＳＴＡＴ５との結合のレベルの、少なくとも１０％、少なくとも

２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、または少なくとも９０％のレベルで、ＳＴＡＴ５と結合できればよい。上記バリアントまたは誘導体は、配列番号３１～３７の１つのレベルに近いレベル、または同じレベルでＳＴＡＴ５と結合できてもよく、または、配列番号３１～３７の１つとして示すアミノ酸配列よりも高いレベル（例えば、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、または少なくとも５０％高くなったレベル）でＳＴＡＴ５と結合できてもよい。

【０１４０】

例えば、上記ＳＴＡＴ５会合モチーフは、ＩＬ２Ｒβ、ＩＬ－３Ｒβ（ＣＳＦ２ＲＢ）、ＩＬ－９Ｒ、ＩＬ－１７Ｒβ、エリスロポエチン受容体（ＥＰＯＲ）、トロンボポエチン受容体、成長ホルモン受容体、およびプロラクチン受容体のいずれか１つ以上に由来するものであってもよい。エンドドメインは、例えば、ＩＬ２ＲＢおよびＥＰＯＲの両方に由来するＳＴＡＴ会合モチーフを含んでいてもよい。

【０１４１】

上記ＳＴＡＴ５会合モチーフは、アミノ酸モチーフＹＸＸＦ／Ｌ（配列番号３８）（Ｘは任意のアミノ酸）を含んでいてもよい。

【０１４２】

好適には、上記ＳＴＡＴ５会合モチーフは、アミノ酸モチーフＹＣＴＦ（配列番号３９）、ＹＦＦＦ（配列番号４０）、ＹＬＳＬ（配列番号４１）、またはＹＬＳＬＱ（配列番号４２）を含んでいてもよい。

【０１４３】

上記エンドドメインは、アミノ酸モチーフＹＣＴＦ（配列番号３９）、ＹＦＦＦ（配列番号４０）、ＹＬＳＬ（配列番号４１）、および／またはＹＬＳＬＱ（配列番号４２）を含む上記ＳＴＡＴ５会合モチーフを１個以上含んでいてもよい。

【０１４４】

上記エンドドメインは、アミノ酸モチーフＹＬＳＬＱ（配列番号４２）を含む第１のＳＴＡＴ５会合モチーフと、アミノ酸モチーフＹＣＴＦ（配列番号３９）またはＹＦＦＦ（配列番号４０）を含む第２のＳＴＡＴ５会合モチーフとを含んでいてもよい。

【０１４５】

上記エンドドメインは、以下のＳＴＡＴ５会合モチーフを含んでいてもよい：ＹＬＳＬＱ（配列番号４２）、ＹＣＴＦ（配列番号３９）、およびＹＦＦＦ（配列番号４０）。

【０１４６】

他のＳＴＡＴポリペプチドに対する会合モチーフが当該技術分野において知られており、使用されてもよい。例えば、細胞（特にＴｃｏｎ細胞）にＳＴＡＴ３シグナルを提供するために、エンドドメインのチロシンエフェクタードメインが、ＹＸＸＱ（配列番号５７）を含んでいてもよく、ここで、Ｘは任意のアミノ酸であり、例えばＹＲＨＱ（配列番号５８）である。ＳＴＡＴ３会合モチーフは、例えばＩＬ－６Ｒ、ＩＬ１０Ｒ、およびＩＬ２１Ｒなどの、シグナル伝達タンパク質に存在する。一実施形態では、本明細書で定義されるエンドドメインは、ＪＡＫ１との会合に必要な、ＩＬ２１Ｒα鎖の細胞質ドメイン（例えばＩＬ－２１Ｒα鎖（ＮＣＢＩ　ＲｅｆＳｅｑ：ＮＰ＿０６８５７０．１）のアミノ酸番号２５６～５３８を含む）、またはボックス１モチーフ（ＮＣＢＩ　ＲｅｆＳｅｑ：ＮＰ＿０６８５７０．１のアミノ酸番号２６６～２７４）を含むそのトランケート型断片と、ＳＴＡＴ１／３会合に必要な、チロシン残基５００（ＮＣＢＩ　ＲｅｆＳｅｑ：ＮＰ＿０００８６９．１のアミノ酸番号５１９）およびチロシン残基５００のＣ末端側の隣接する３残基、すなわちＹＬＲＱ（配列番号５９）を含むＳＴＡＴ会合モチーフと、を含んでいてもよい。あるいは、ＳＴＡＴ１またはＳＴＡＴ４シグナル伝達が同様の方法で提供されてもよい。例えば、以下の配列によって表されるように、ＩＬ２Ｒｂ（サブドメインＡｃｉ２）のアミノ酸３３５～３６５にＳＴＡＴ１会合モチーフが見出され得る。

ＱＬＬＱＱＤＫＶＰＥＰＡＳＬＳＳＮＨＳＬＴＳＣＦＴＮＱＧＹＦ（配列番号６０）

【０１４７】

本明細書における「ＪＡＫ１結合モチーフ」とは、チロシンキナーゼＪＡＫ１会合を可能にするＢＯＸモチーフをいう。同様に、本明細書における「ＪＡＫ２結合モチーフ」とは、チロシンキナーゼＪＡＫ２会合を可能にするＢＯＸモチーフをいう。好適なＪＡＫ１結合モチーフおよびＪＡＫ２結合モチーフは、例えば、Ferrao & Lupardus（Frontiers in Endocrinology; 2017; 8(71)；この参照により本明細書に援用される）により記載されている。

【０１４８】

上記のように、ＪＡＫ１および／またはＪＡＫ２結合モチーフは、膜貫通タンパク質の細胞質ドメイン内に内在的に発生してもよい。

【０１４９】

例えば、ＪＡＫ１および／またはＪＡＫ２結合モチーフは、インターフェロンラムダ受容体１（ＩＦＮＬＲ１）、インターフェロンアルファ受容体１（ＩＦＮＡＲ）、インターフェロンガンマ受容体１（ＩＦＮＧＲ１）、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ２０ＲＡ、ＩＬ２２ＲＡ、インターフェロンガンマ受容体２（ＩＦＮＧＲ２）、またはＩＬ１０ＲＢ由来であってもよい。

【０１５０】

ＪＡＫ１結合モチーフは、ＪＡＫ１と結合できる、配列番号４３～４９として示すアミノ酸モチーフまたはそのバリアントを含むかまたはそれからなっていてもよい。

ＫＶＬＫＣＮＴＰＤＰＳＫＦＦＳＱＬＳＳＥＨＧＧＤＶＱＫＷＬＳＳＰＦＰＳＳＳＦＳＰＧＧＬＡＰＥＩＳＰＬＥＶＬＥＲＤＫ（配列番号４３）

ＮＰＷＦＱＲＡＫＭＰＲＡＬＤＦＳＧＨＴＨＰＶＡＴＦＱＰＳＲＰＥＳＶＮＤＬＦＬＣＰＱＫＥＬＴ（配列番号４４）

ＧＹＩＣＬＲＮＳＬＰＫＶＬＮＦＨＮＦＬＡＷＰＦＰＮＬＰＰＬＥＡＭＤＭＶＥＶＩＹＩＮＲ（配列番号４５）

ＰＬＫＥＫＳＩＩＬＰＫＳＬＩＳＶＶＲＳＡＴＬＥＴＫＰＥＳＫＹＶＳＬＩＴＳＹＱＰＦＳＬ（配列番号４６）

ＲＲＲＫＫＬＰＳＶＬＬＦＫＫＰＳＰＦＩＦＩＳＱＲＰＳＰＥＴＱＤＴＩＨＰＬＤＥＥＡＦＬＫ（配列番号４７）

ＹＩＨＶＧＫＥＫＨＰＡＮＬＩＬＩＹＧＮＥＦＤＫＲＦＦＶＰＡＥＫＩＶＩＮＦＩＴＬＮＩＳＤＤＳ（配列番号４８）

ＲＹＶＴＫＰＰＡＰＰＮＳＬＮＶＱＲＶＬＴＦＱＰＬＲＦＩＱＥＨＶＬＩＰＶＦＤＬＳＧＰ（配列番号４９）

【０１５１】

配列番号４３～４９のバリアントは、配列番号２１～２７のいずれかと比較して１個、２個、または３個のアミノ酸の差異を含んでいてもよく、ＪＡＫ１と結合する能力を保持し得る。

【０１５２】

上記バリアントは、配列番号４３～４９のいずれか１つに対して少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有していてもよく、ＪＡＫ１と結合する能力を保持し得る。

【０１５３】

好ましい実施形態において、ＪＡＫ１結合ドメインは、ＪＡＫ１と結合できる、配列番号４３またはそのバリアントを含むかまたはそれからなる。

【０１５４】

例えば、上記バリアントは、対応する参照配列の結合レベルの、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、または少なくとも９０％のレベルで、ＪＡＫ１と結合できればよい。上記バリアントまたは誘導体は、対応する参照配列のレベルに近いレベル、または同じレベルでＪＡＫ１と結合できてもよく、または、対応する参照配列よりも高いレベル（例えば、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０

％、少なくとも４０％、または少なくとも５０％高くなったレベル）でＪＡＫ１と結合できてもよい。
【０１５５】
ＪＡＫ２結合モチーフは、ＪＡＫ２と結合できる、配列番号５０～５２として示すアミノ酸モチーフまたはそのバリアントを含んでもよい。
ＮＹＶＦＦＰＳＬＫＰＳＳＳＩＤＥＹＦＳＥＱＰＬＫＮＬＬＬＳＴＳＥＥＱＩＥＫＣＦＩＩＥＮ（配列番号５０）
ＹＷＦＨＴＰＰＳＩＰＬＱＩＥＥＹＬＫＤＰＴＱＰＩＬＥＡＬＤＫＤＳＳＰＫＤＤＶＷＤＳＶＳＩＩＳＦＰＥ（配列番号５１）
ＹＡＦＳＰＲＮＳＬＰＱＨＬＫＥＦＬＧＨＰＨＨＮＴＬＬＦＦＳＦＰＬＳＤＥＮＤＶＦＤＫＬＳＶＩＡＥＤＳＥＳ（配列番号５２）
【０１５６】
配列番号５０～５２のバリアントは、配列番号５０～５２のいずれかと比較して１個、２個、または３個のアミノ酸の差異を含んでいてもよく、ＪＡＫ２と結合する能力を保持し得る。
【０１５７】
例えば、上記バリアントは、対応する参照配列の結合レベルの、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、または少なくとも９０％のレベルで、ＪＡＫ２と結合できればよい。上記バリアントまたは誘導体は、対応する参照配列のレベルに近いレベル、または同じレベルでＪＡＫ２と結合できてもよく、または、対応する参照配列よりも高いレベル（例えば、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、または少なくとも５０％高くなったレベル）でＪＡＫ２と結合できてもよい。
【０１５８】
タンパク質－タンパク質相互作用を判定するための当該技術分野において周知の方法を用いて、ＪＡＫ１結合モチーフまたはＪＡＫ２結合モチーフがＪＡＫ１またはＪＡＫ２と結合できるかどうか判定してもよい。例えば、共免疫沈降の後にウエスタンブロットを行ってもよい。
【０１５９】
好適には、上記エンドドメインは、配列番号３１として示すＩＬ２Ｒβエンドドメイン、または、配列番号３１に対して少なくとも８０％の配列同一性を有するバリアントを含んでいてもよい。
【０１６０】
上記バリアントは、配列番号３１に対して少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有してもよい。
【０１６１】
好適には、上記エンドドメインは、配列番号５３もしくは５４のいずれか１つとして示すトランケート型ＩＬ２Ｒβエンドドメイン、または配列番号５３もしくは５４のいずれか１つに対して少なくとも８０％の配列同一性を有するバリアントを含んでいてもよい。配列番号５３は、Ｙ５１０変異を有するＩＬ２ＲＢトランケート型バリアントを表す。配列番号５４は、Ｙ５１０変異およびＹ３９２変異を有するＩＬ２ＲＢトランケート型バリアントを表す。
【０１６２】
上記バリアントは、配列番号５３または５４に対して少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有してもよい。
【０１６３】
この実施形態において、本発明は、組換えタンパク質を提供し、該組換えタンパク質は、（ｉ）ＥＰＯＲの細胞外領域に少なくとも一部分が由来するエキソドメインであって、該部分が、ＥＰＯＲの細胞外領域に対して、シグナル誘導物質分子の非存在下での該組換

えタンパク質と第２のタンパク質との二量体化および該Ｔ細胞へのシグナルの提供を可能にする改変を含む、エキソドメインと、（ｉｉ）配列番号５３もしくは配列番号５４のトランケート型ＩＬ２Ｒβエンドドメインまたはそれに対して少なくとも８０％の配列同一性を有するバリアントを含む、エンドドメインとを含む。

【０１６４】

特定の実施形態では、組換えタンパク質は、ＥＰＯＲ（配列番号８）のエンドドメイン（細胞質）領域に少なくとも一部分が由来するエンドドメインを含む。特定の実施形態では、上記エンドドメインは、配列番号８に示すＥＰＯＲエンドドメイン、または配列番号８に対して少なくとも４０％の配列同一性を有するバリアントを含んでいてもよい。例えば、上記バリアントは、配列番号８に対して少なくとも４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、または８０％の同一性を有してもよい。

【０１６５】

エンドドメインの改変は、ＳＴＡＴ５シグナルの所望のレベルに応じて選択され得る。

【０１６６】

上記バリアントは、配列番号８に対して少なくとも８０％の配列同一性を有してもよい。上記バリアントは、配列番号８に対して少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有してもよい。いずれのバリアントも、機能的バリアントであってもよく、したがって組換えタンパク質が発現される細胞にシグナルを供給する能力を保持し得る。特に、組換えタンパク質のエンドドメインがバリアントＥＰＯＲエンドドメイン以外の他の機能的（シグナル伝達）エンドドメインを含まない実施形態、例えば、組換えタンパク質のエンドドメインがバリアントＥＰＯＲエンドドメインからなる実施形態では、上記バリアントは機能的バリアントであり、したがって、組換えタンパク質が発現される細胞にシグナルを供給する能力を保持する。シグナルは、特に、ＪＡＫ－ＳＴＡＴシグナル伝達経路、特にＪＡＫ２－ＳＴＡＴ５シグナル伝達経路を介してシグナル伝達してもよく、したがって、本明細書に記載されるように、少なくとも１つのＪＡＫ結合モチーフ（例えば、ＪＡＫ２結合モチーフ）と少なくとも１つのＳＴＡＴ会合モチーフ（例えば、ＳＴＡＴ５会合モチーフ）とを含んでいてもよい。上記バリアントＥＰＯＲエンドドメインは、例えば、少なくとも配列番号１の３６８位のチロシン（Ｙ）残基（配列番号８のＹ９５）および／または少なくとも配列番号１の４２６位のチロシン（Ｙ）残基（配列番号８のＹ１５３）を保持し得る。例えば、上記バリアントＥＰＯＲエンドドメインは、配列番号１の３６８位のチロシン（Ｙ）残基（配列番号８のＹ９５）および配列番号１の４２６位のチロシン（Ｙ）残基（配列番号８のＹ１５３）の一方のみを保持してもよく、両方を保持してもよい。

【０１６７】

好適には、上記バリアントは、ＳＨＰ１のＥＰＯＲエンドドメイン配列への結合を低減（例えば、排除）し、ひいてはＪＡＫ２に対するＳＨＰ１の負の効果を低減するために、少なくとも１つの改変を含み得る。ＳＨＰ１は、ＳＨＩＰ１とも呼ばれており、ＳＨ２ドメインを含み、配列番号６１に示すアミノ酸配列を有するチロシンホスファターゼタンパク質である。ＳＨＰ１は、活性化されたＥＰＯＲと会合し、ＪＡＫ２によるリン酸化によって誘導されるシグナル伝達を負に調節することが知られている。ＳＨＰ１は、配列番号８のＥＰＯＲエンドドメインのＹ１８１およびＹ１８３と会合することができる。したがって、本発明は、配列番号８のＹ１８１および／またはＹ１８３が、ＳＨＰ１の負の効果を低減（例えば、少なくとも１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％、例えば、最大で１００％）するように改変されたＥＰＯＲエンドドメイン配列の使用を包含する。別の見方をすると、配列番号８のＹ１８１および／またはＹ１８３の改変は、細胞へのシグナル伝達を少なくとも１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、または９０％増加させ得る。特に、Ｙ１８１および／またはＹ１８３は、本明細書のエンドドメイン内で使用されるＥＰＯＲエンドドメイン配列から欠失されてもよく、異なるアミノ酸で置換されてもよい。例えば、上記バリアントＥＰＯＲエンドドメインは、配列番号

８のＹ１８１およびＹ１８３を包含する連続したアミノ酸の配列の欠失を含んでいてもよい。配列番号８のＹ１８１およびＹ１８３を包含する連続したアミノ酸の配列は、少なくとも３アミノ酸長、４アミノ酸長、５アミノ酸長、６アミノ酸長、７アミノ酸長、８アミノ酸長、９アミノ酸長、１０アミノ酸長、またはそれ以上のアミノ酸長であってもよい。例えば、配列番号８のＹ１８１およびＹ１８３を包含する連続したアミノ酸の配列は、少なくとも５５アミノ酸長、例えば、少なくとも６０アミノ酸長、６５アミノ酸長、７０アミノ酸長、または７５アミノ酸長であってもよい。例えば、配列番号８のＹ１８１およびＹ１８３を包含する連続したアミノ酸の配列は、最長で１４０アミノ酸長、１３５アミノ酸長、１３０アミノ酸長、１２５アミノ酸長、１２０アミノ酸長、１１５アミノ酸長、１１０アミノ酸長、１０５アミノ酸長、１００アミノ酸長、９５アミノ酸長、９０アミノ酸長、８５アミノ酸長、または８０アミノ酸長までであってもよい。例えば、上記バリアントＥＰＯＲエンドドメインは、配列番号８のアミノ酸１８１～２３５（配列番号１のアミノ酸４５４～５０８）の欠失を含むかまたはそれからなっていてもよい。例えば、上記バリアントＥＰＯＲエンドドメインは、配列番号８のアミノ酸１０６～２３５（配列番号１のアミノ酸３７９～５０８）の欠失を含むかまたはそれからなっていてもよい。例えば、上記バリアントＥＰＯエンドドメインは、配列番号８のアミノ酸１６１～２３５（配列番号１のアミノ酸４３４～５０８）の欠失を含むかまたはそれからなっていてもよい。あるいは、Ｙ１８１および／またはＹ１８３は、特に、細胞へのシグナルの増大が必要とされなければ、改変されていない場合もある。

【０１６８】

あるいは、エンドドメインは、配列番号６２として示すトランケート型ＥＰＯＲエンドドメイン、または配列番号６２に対して少なくとも８０％の配列同一性を有するバリアントを含むかまたはそれからなっていてもよい。上記バリアントは、配列番号６２に対して少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有してもよい。したがって、典型的には、トランケート型ＥＰＯＲエンドドメインは、少なくとも、配列番号８のＹ１８１およびＹ１８３を含むエンドドメインの部分が、トランケートされ得る。上記バリアントは、例えば、配列番号６２と同じトランケーションを含み、したがって、配列番号６２との差異が、配列番号６２の配列内の欠失、置換、または挿入のみであってもよい。上記のように、いずれのバリアントも、機能的ＥＰＯＲエンドドメインバリアントであってもよい。

【０１６９】

組換えタンパク質のエンドドメインは、配列番号１０６として示すトランケート型ＥＰＯＲエンドドメイン、または配列番号１０６に対して少なくとも８０％の配列同一性を有するバリアントを含むかまたはそれからなっていてもよい。上記バリアントは、配列番号１０６に対して少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有してもよい。上記バリアントは、少なくとも、配列番号８のＹ１８１およびＹ１８３を含むエンドドメインの部分が、トランケートされ得る。上記バリアントは、例えば、配列番号１０６と同じトランケーションを含み、したがって、配列番号１０６との差異が、配列番号１０６の配列内の欠失、置換、または挿入のみであってもよい。上記のように、いずれのバリアントも、機能的ＥＰＯＲエンドドメインバリアントであってもよい。

【０１７０】

組換えタンパク質のエンドドメインは、配列番号１０７として示すトランケート型ＥＰＯＲエンドドメイン、または配列番号１０７に対して少なくとも８０％の配列同一性を有するバリアントを含むかまたはそれからなっていてもよい。上記バリアントは、配列番号１０７に対して少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有してもよい。上記バリアントは、少なくとも、配列番号８のＹ１８１およびＹ１８３を含むエンドドメインの部分が、トランケートされ得る。上記バリアントは、例えば、配列番号１０７と同じトランケーションを含み、したがって、配列番号１０７との差異が、配列番号１０７の配列内の欠失、置換、または挿入のみであっても

よい。上記のように、いずれのバリアントも、機能的ＥＰＯＲエンドドメインバリアントであってもよい。

【０１７１】

上記バリアントＥＰＯＲエンドドメインは、例えば、１個以上のアミノ酸の挿入を含んでいてもよい。特定の実施形態では、挿入は、バリアントＥＰＯＲエンドドメインのＣ末端においてであってもよく、これは、バリアントＥＰＯＲエンドドメインが組換えタンパク質のＣ末端に位置する場合は、組換えタンパク質のＣ末端であってもよい。しかしながら、挿入は、バリアントＥＰＯＲエンドドメイン内の他の場所であってもよい。例えば、バリアントＥＰＯＲエンドドメインは、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個、またはそれ以上のアミノ酸の挿入を含んでいてもよい。例えば、バリアントＥＰＯＲエンドドメインは、１～３０個のアミノ酸、例えば２～２０個、例えば５～１５個のアミノ酸の挿入を含んでいてもよい。例えば、バリアントＥＰＯＲエンドドメインは、例えばそのＣ末端に、少なくとも５個、６個、７個、８個、９個、または１０個のアミノ酸の挿入を含んでいてもよい。上記少なくとも５個のアミノ酸は、配列ＭＤＴＶＰ（配列番号１０８）、または配列番号１０８との差異がアミノ酸１個以内もしくは２個以内（例えば、欠失および／または置換）である配列を有してもよい（含んでいてもよい、またはそれからなっていてもよい）。上記少なくとも６個のアミノ酸は、配列ＳＭＤＴＶＰ（配列番号１０９）、または配列番号１０９との差異がアミノ酸１個以内もしくは２個以内（例えば、欠失および／または置換）である配列を有してもよい。上記少なくとも７個のアミノ酸は、配列ＡＳＭＤＴＶＰ（配列番号１１０）、または配列番号１１０との差異がアミノ酸１個以内もしくは２個以内（例えば、欠失および／または置換）である配列を有してもよい（含んでいてもよい、またはそれからなっていてもよい）。上記少なくとも８個のアミノ酸は、配列ＬＡＳＭＤＴＶＰ（配列番号１１１）、または配列番号１１１との差異がアミノ酸１個以内もしくは２個以内（例えば、欠失および／または置換）である配列を有してもよい（含んでいてもよい、またはそれからなっていてもよい）。上記少なくとも９個のアミノ酸は、配列ＡＬＡＳＭＤＴＶＰ（配列番号１１２）、または配列番号１１２との差異がアミノ酸１個以内もしくは２個以内（例えば、欠失および／または置換）である配列を有してもよい（含んでいてもよい、またはそれからなっていてもよい）。上記少なくとも１０個のアミノ酸は、配列ＰＡＬＡＳＭＤＴＶＰ（配列番号１１３）、または配列番号１１３との差異がアミノ酸１個以内もしくは２個以内（例えば、欠失および／または置換）である配列を有してもよい（含んでいてもよい、またはそれからなっていてもよい）。例えば、バリアントＥＰＯＲエンドドメインは、例えばそのＣ末端に、５個のアミノ酸（例えば配列番号１０８）、６個のアミノ酸（例えば配列番号１０９）、７個のアミノ酸（例えば配列番号１１０）、８個のアミノ酸（例えば配列番号１１１）、９個のアミノ酸（例えば配列番号１１２）、または１０個のアミノ酸（例えば配列番号１１３）の挿入を含んでいてもよい。特定の実施形態では、バリアントＥＰＯＲエンドドメインは、例えばそのＣ末端に、少なくとも１０個、例えば１０個のアミノ酸の挿入を含んでいてもよく、例えば、それら少なくとも１０個のアミノ酸は、配列番号１１３の配列、または配列番号１１３との差異がアミノ酸と１個以内もしくは２個以内である配列を有する。上記挿入されたアミノ酸は、野生型ＥＰＯＲエンドドメインのＣ末端（すなわち、配列番号８のＣ末端）に位置してもよく、他の改変も有するＥＰＯＲエンドドメインのＣ末端に位置してもよく、例えば、本明細書に記載のトランケート型ＥＰＯＲエンドドメインのＣ末端（例えば、配列番号６２、配列番号１０６、または配列番号１０７のＣ末端）に位置してもよい。あるいは、挿入は、その挿入がなければ野生型ＥＰＯＲエンドドメイン（当該挿入以外）であるＥＰＯＲエンドドメイン内、または他の改変も有するＥＰＯＲエンドドメイン内、例えば、トランケート型ＥＰＯＲエンドドメイン内（例えば、配列番号６２、配列番号１０６、もしくは配列番号１０７内）に位置してもよい。

【０１７２】

バリアントＥＰＯＲエンドドメインのＣ末端に挿入された１個以上のアミノ酸は、例えば、組換えタンパク質の細胞表面発現を増加もしくは安定化させることができ、かつ／ま

たは、ＥＰＯに対する感受性を増加させることができ、かつ／または、細胞（例えば、Ｔｒｅｇ細胞）において発現された場合、挿入されていない同じ組換えタンパク質を発現する同じ細胞と比較して、ＪＡＫ－ＳＴＡＴシグナル伝達経路の活性化を増加させることができる。増加は、少なくとも１０％、２０％、３０％、４０％、または５０％であり得る。したがって、バリアントＥＰＯＲエンドドメインのＣ末端に挿入された１個以上のアミノ酸は、本明細書の例示的な実施形態に記載されるように、ＥＰＯＲの細胞外ドメインに由来するエキソドメインの部分がＥＰＯに結合する能力を保持する実施形態において特に有用であり得る。ＥＰＯに対する感受性の増加は、本明細書の他の箇所に記載されるように、ＪＡＫ－ＳＴＡＴシグナル伝達の活性化を測定することによって判定することができる。ＥＰＯに対する感受性が増加した組換えタンパク質は、同じＥＰＯ濃度において（特に、約０．１Ｕ／ｍｌ以下、例えば、約０．０１Ｕ／ｍｌ以下、または約０．００１Ｕ／ｍｌ以下などの、低いＥＰＯ濃度において）、より大きなＪＡＫ－ＳＴＡＴシグナルを提供する。

【０１７３】

組換えタンパク質のエンドドメインは、例えば、配列番号１１４、配列番号１１５、もしくは配列番号１１６に示すバリアントＥＰＯＲエンドドメイン、または配列番号１１４、配列番号１１５、もしくは配列番号１１６に対して少なくとも８０％の配列同一性を有するそのバリアントを含むかまたはそれからなっていてもよい。上記バリアントは、配列番号１１４、配列番号１１５、または配列番号１１６に対してそれぞれ少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有してもよい。上記バリアントは、少なくとも、配列番号８のＹ１８１およびＹ１８３を含むエンドドメインの部分が、トランケートされ得る。上記のように、いずれのバリアントも、機能的ＥＰＯＲエンドドメインバリアントであってもよい。

【０１７４】

ＪＡＫ１／ＪＡＫ２とＪＡＫ３との両方のトランスリン酸化により、ＳＴＡＴ、例えばＳＴＡＴ５の活性が増加し、これにより活性が安定する。上記のように、エンドドメイン、より具体的にはそのチロシンキナーゼ活性化ドメインは、ＪＡＫ３結合モチーフをさらに含んでもよい。本明細書における「ＪＡＫ３結合モチーフ」とは、チロシンキナーゼＪＡＫ３をもたらすＢＯＸモチーフのことである。好適なＪＡＫ３結合モチーフは、例えば、Ferrao & Lupardus（Frontiers in Endocrinology; 2017; 8(71)；この参照により本明細書に援用される）により記載されている。

【０１７５】

タンパク質－タンパク質相互作用を判定するための当該技術分野において周知の方法を用いて、モチーフがＪＡＫ３と結合できるかどうか判定してもよい。例えば、共免疫沈降の後にウエスタンブロットを行ってもよい。

【０１７６】

ＪＡＫ３結合モチーフは、膜貫通タンパク質の細胞質ドメイン内に内在的に発生してもよい。

【０１７７】

例えば、上記ＪＡＫ３結合モチーフは、ＩＬ－２Ｒγポリペプチド由来であってもよい。機能的なトランケート型またはバリアントＩＬ２Ｒγポリペプチドをエンドドメイン内で使用してもよく、ここで、機能的なトランケート型またはバリアントＩＬ２Ｒγポリペプチドは、ＪＡＫ３結合活性（例えば、ＩＬ２Ｒγの結合活性の少なくとも２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、または９５％）を保持する。特に、ＪＡＫ３結合モチーフを含むトランケート型ＩＬ２ＲγおよびＳＴＡＴ５会合モチーフを含むトランケート型ＩＬ２Ｒβ、ならびにＪＡＫ１結合モチーフが、本明細書で定義されるエンドドメインに含まれてもよい。機能的トランケート体は、発現のための構築物サイズを小さくするという利点を提供し得る。

【０１７８】

ＪＡＫ３結合モチーフは、配列番号５５もしくは配列番号５６として示すアミノ酸モチ

ーフ配列、またはＪＡＫ３に結合できるそのバリアント（例えば、配列番号５５もしくは５６に対して少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、もしくは９９％の同一性を有する機能的バリアントもしくは断片）を含むかまたはそれからなっていてもよい。

【０１７９】

上記バリアントは、配列番号５５または配列番号５６に対して少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有してもよい。

【０１８０】

特定の実施形態において、シグナル伝達ドメインは、１つ以上のＪＡＫ１結合ドメインと少なくとも１つのＪＡＫ３結合ドメイン／モチーフ（例えば、少なくとも２つまたは３つのＪＡＫ３結合ドメイン／モチーフ）とを含む。

【０１８１】

当業者には、ＪＡＫ３結合ドメインをコードするポリヌクレオチド配列は、チロシンエフェクタードメイン、例えば、ＳＴＡＴ５などのＳＴＡＴ会合モチーフならびにＪＡＫ１および／またはＪＡＫ２結合モチーフをコードするポリヌクレオチド配列の上流または下流（５’または３’）に位置してもよいことが理解されるであろう。典型的には、ＪＡＫ１および／またはＪＡＫ２結合モチーフは、チロシンエフェクタードメイン、例えばＳＴＡＴ／ＳＴＡＴ５の上流（５’）にあるが、これは変化し得る。特に、ＪＡＫ３結合ドメインをコードするポリヌクレオチドは、ＳＴＡＴ会合モチーフおよびＪＡＫ１／ＪＡＫ２結合モチーフをコードするポリヌクレオチドの下流（３’）に位置し得る。したがって、別の見方をすると、本明細書に記載のエンドドメインにおいて、ＪＡＫ３結合ドメインは、チロシンエフェクタードメイン（例えば、ＳＴＡＴ会合モチーフ）ならびにＪＡＫ１および／またはＪＡＫ２結合ドメインに対してＮ末端またはＣ末端、好ましくはＣ末端であり得る。一実施形態では、ＪＡＫ３結合ドメインおよびＳＴＡＴ会合モチーフ／ＪＡＫ１／２結合ドメインは、互いに直接隣接して位置する（すなわち、配列によって遠位に分離されていない）。特定の実施形態では、ＪＡＫ３結合ドメインは、逆向きに翻訳され、したがって、ＪＡＫ３結合モチーフは、配列番号５５または配列番号５６と逆向きの配列（例えば、配列番号６３に示す配列）を含んでもよい。したがって、シグナル伝達ドメインをコードするポリヌクレオチドは、５’－３’ＪＡＫ１、５’－３’ＳＴＡＴ会合モチーフ、３’－５’ＪＡＫ３の順序で塩基配列を含んでもよい。

【０１８２】

特定の実施形態では、ＪＡＫ３結合モチーフとＳＴＡＴ会合モチーフ／ＪＡＫ１またはＪＡＫ２結合モチーフとの間にリンカーまたはヒンジが存在してもよい。上記リンカーまたはヒンジは、少なくとも２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個、１１個、１２個、１３個、１４個、１５個、１６個、１７個、１８個、１９個、２０個、２５個、または３０個のアミノ酸、例えば、少なくとも２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、または１０個のグリシン残基を含むかまたはそれらからなっていてもよい。最も具体的な実施形態では、エンドドメインは、ＪＡＫ３結合ドメイン（例えば、配列番号５５または配列番号５６）を含むＩＬ２Ｒγに由来する第１のアミノ酸配列と、ＳＴＡＴ５会合モチーフおよびＪＡＫ１結合モチーフ（例えば、配列番号４３または配列番号４４）を含むＩＬ２Ｒβに由来する第２のアミノ酸配列とを含み、第１および第２のアミノ酸配列は、リンカーまたはヒンジによって接続または接合される。

【０１８３】

エンドドメインは、他のシグナル伝達機能（例えば、ＳＴＡＴシグナルを提供する以外に、細胞の表現型を維持するかまたは活性化もしくは機能を誘導するシグナルである生存促進または持続シグナルを提供することができるシグナル伝達機能）を提供してもよく、したがって、そのようなシグナル伝達機能を提供することができるさらなるドメインを含んでいてもよい。

【０１８４】

エンドドメインは、例えば、Ｔ細胞受容体またはその相同体（例えば、η鎖、ＦｃεＲ１γおよびβ鎖、ＭＢ１（Ｉｇα）鎖、Ｂ２９（Ｉｇβ）鎖など）のζ鎖エンドドメイン

、ＣＤ３ポリペプチドドメイン（Δ、δ、およびε）、ｓｙｋファミリーチロシンキナーゼ（Ｓｙｋ、ＺＡＰ　７０、など）、ｓｒｃファミリーチロシンキナーゼ（Ｌｃｋ、Ｆｙｎ、Ｌｙｎなど）、ならびに、ＣＤ２、ＣＤ５、およびＣＤ２８などのＴ細胞形質導入に関与する他の分子などの、細胞内シグナル伝達ドメインをさらに含んでいてもよい。上記細胞内シグナル伝達ドメインは、ヒトＣＤ３ゼータ鎖エンドドメイン、ＦｃｙＲＩＩＩ、ＦｃｓＲＩ、Ｆｃ受容体の細胞質側末端、免疫受容体チロシン活性化モチーフ（ＩＴＡＭ）を有する細胞質受容体、またはそれらの組み合わせを含んでいてもよい。

【０１８５】

したがって、エンドドメインは、ヒトＣＤ３ゼータ鎖の細胞内シグナル伝達ドメインを含んでもよく、これは、一実施形態では、以下の配列を含むかまたはそれからなる。

ＵＮＩＰＲＯＴ：Ｐ２０９６３、ＣＤ３Ｚ＿ヒト、３１～１４３位
ＲＶＫＦＳＲＳＡＤＡＰＡＹＱＱＧＱＮＱＬＹＮＥＬＮＬＧＲＲＥＥＹＤＶＬＤＫＲＲＧＲＤＰＥＭＧＧＫＰＱＲＲＫＮＰＱＥＧＬＹＮＥＬＱＫＤＫＭＡＥＡＹＳＥＩＧＭＫＧＥＲＲＲＧＫＧＨＤＧＬＹＱＧＬＳＴＡＴＫＤＴＹＤＡＬＨＭＱＡＬＰＰＲ（配列番号６４）

【０１８６】

一実施形態において、エンドドメインは、配列番号６４に対して少なくとも８５％、９０％、９５％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含む細胞内シグナル伝達ドメインを含む。

【０１８７】

キメラタンパク質の細胞内シグナル伝達ドメインは、下記のＣＤ２８シグナル伝達ドメインを含んでもよい。
ＲＳＫＲＳＲＬＬＨＳＤＹＭＮＭＴＰＲＲＰＧＰＴＲＫＨＹＱＰＹＡＰＰＲＤＦＡＡＹＲＳ（配列番号６５）

【０１８８】

一実施形態において、上記細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号６５に対して少なくとも８５％、９０％、９５％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有するシグナル伝達モチーフを含む。

【０１８９】

エンドドメインの細胞内シグナル伝達ドメインは、下記のＣＤ２７シグナル伝達ドメインを含んでもよい。
ＱＲＲＫＹＲＳＮＫＧＥＳＰＶＥＰＡＥＰＣＨＹＳＣＰＲＥＥＥＧＳＴＩＰＩＱＥＤＹＲＫＰＥＰＡＣＳＰ（配列番号６６）

【０１９０】

一実施形態において、上記細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号６６に対して少なくとも８５％、９０％、９５％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有するシグナル伝達モチーフを含む。

【０１９１】

さらなる細胞内シグナル伝達ドメインは、当業者に明らかであり、本発明の代替の実施形態と関連して用いられてもよい。

【０１９２】

この態様では、エンドドメインは、そのエンドドメインが発現される細胞に転写因子活性、例えば、細胞の表現型または機能にとって重要な転写因子を提供する追加のドメインまたは配列含んでいてもよい。例えばＴｒｅｇの場合、シグナル伝達ドメインはさらに、ＦＯＸＰ３、ｃ－Ｒｅｌ、Ｒｕｎｘ、Ｅｔｓ－１、ＣＲＥＢ、ＮＦＡＴ、および／またはＪｕｎＢを（直接的または間接的に）細胞に提供することができる。特に、エンドドメインは、ＦＯＸＰ３活性化または誘導シグナルを細胞に提供することが可能であってもよい。１つの態様では、エンドドメインは、ＦＯＸＰ３（またはその任意の機能的バリアント、トランケート体、もしくはアイソフォーム）を含んでいてもよく、ここで、ＦＯＸＰ３は、ＣＩＤによる誘導（例えば、Ｎｏｔｃｈ系を使用）時にキメラタンパク質から切断可

能であってもよい。この場合は、任意の切断可能部分（例えば、ＦＯＸＰ３）がエンドドメインのＣ末端に存在する。上記のように、様々なドメイン、およびドメインの個々の部分（例えば、エンドドメイン内のモチーフ）は、リンカーによって互いに連結されてもよい。

【０１９３】

本明細書でいうリンカーとは、タンパク質の１つのドメインまたは部分を別のドメインまたは部分に連結するアミノ酸配列である。リンカー配列は、２つのドメイン同士またはその一部分同士を、それらが機能を発揮し得るように連結または接続する機能を有する任意のアミノ酸配列であり得る。したがって、リンカーは、連結されている要素を間隔を空けて配置することができる。

【０１９４】

リンカーの性質は、そのアミノ酸組成および／またはアミノ酸の配列に関して、様々であり、限定されない。しかしながら、リンカーはフレキシブルリンカーであってもよい。したがって、リンカーは、（剛性リンカーとは対照的に、）リンカーにフレキシブル性を付与することが知られているアミノ酸を含むかまたはそれらからなっていてもよい。

【０１９５】

フレキシブルリンカーは、当該技術分野においてよく知られ、記載されているリンカー配列のカテゴリーである。リンカー配列は、一般に、例えば、融合タンパク質もしくはキメラタンパク質または多機能タンパク質もしくはポリペプチドを作製するために、タンパク質またはタンパク質ドメインを連結または接合するために使用され得る配列として知られている。それらは、異なる特徴を有し、例えば、フレキシブルであったり、剛性であったり、切断可能であったりし得る。タンパク質リンカーについては、例えば、Chen et al., 2013, Advanced Drug Delivery Reviews 65, 1357-1369において概説されており、フレキシブルリンカーのカテゴリーが剛性リンカーおよび切断可能なリンカーのカテゴリーと比較されている。フレキシブルリンカーについては、Klein et al., 2014, Protein Engineering Design and Selection, 27(10), 325-330；van Rosmalen et al., 2017, Biochemistry, 56,6565-6574；およびChichili et al., 2013, Protein Science, 22, 153-167にも記載されている。

【０１９６】

フレキシブルリンカーは、連結されたドメインまたは成分間のある程度の動きを可能にするリンカーである。フレキシブルリンカーは、一般に、小さな、非極性（Ｇｌｙなど）または極性（ＳｅｒまたはＴｈｒなど）のアミノ酸残基で構成される。アミノ酸のサイズが小さいことにより、フレキシブルであり、接続された部分（ドメインまたは成分）の可動性が可能になっている。極性アミノ酸を組み込むと、水分子と水素結合を形成することによって、水性環境下でのリンカーの安定性を維持することができる。最も一般的に使用されているフレキシブルリンカーは、主にＳｅｒ残基およびＧｌｙ残基で構成される配列を有する（いわゆる「ＧＳリンカー」）。しかしながら、他の多くのフレキシブルリンカーも記載されており（例えば、Chen et al, 2013、前掲）、これらは、溶解性を改善し得る追加のアミノ酸（例えば、Ｔｈｒおよび／またはＡｌａならびに／あるいはＬｙｓおよび／またはＧｌｕ）を含み得る。当該技術分野で公知であり報告されている任意のフレキシブルリンカーを使用することができる。

【０１９７】

ＧＳリンカー、より具体的にはリンカー中のＧＳ（「Ｇｌｙ－Ｓｅｒ」）ドメインの使用は、ＧＳドメインの反復数を変化させることによってリンカーの長さを容易に変化させることを可能にし得るため、そのようなリンカーは、リンカーの１つの好適なクラスを代表するものである。しかし、フレキシブルリンカーは、「ＧＳ」反復に基づくものに限定されず、リンカー配列全体に分散したＳｅｒ残基およびＧｌｙ残基を含む他のリンカーが、Chen et al.（前掲）をはじめとして報告されている。

【０１９８】

一実施形態では、リンカー配列は、Ｓｅｒ残基およびＧｌｙ残基のみから構成される少

なくとも１つのＧｌｙ－Ｓｅｒドメインを含む。そのような実施形態では、リンカーは、１５個以下の他のアミノ酸残基、例えば、１４個以下、１３個以下、１２個以下、１１個以下、１０個以下、９個以下、８個以下、６個以下、７個以下、５個以下、または４個以下の他のアミノ酸残基を含んでもよい。

【０１９９】

Ｇｌｙ－Ｓｅｒドメインは、下記の式を有し得る。

（Ｓ）ｑ－［（Ｇ）ｍ－（Ｓ）ｍ］ｎ－（Ｇ）ｐ

ここで、ｑは０または１であり、ｍは１～８の整数であり、ｎは１以上の整数（例えば１～８、より具体的には１～６）であり、ｐは０または１～３の整数である。

【０２００】

より具体的には、Ｇｌｙ－Ｓｅｒドメインは、下記の式を有し得る。

（ｉ）Ｓ－［（Ｇ）ｍ－Ｓ］ｎ；

（ｉｉ）［（Ｇ）ｍ－Ｓ］ｎ；または

（ｉｉｉ）［（Ｇ）ｍ－Ｓ］ｎ－（Ｇ）ｐ

ここで、ｍは２～８（例えば３～４）の整数であり、ｎは１以上の（例えば１～８、より具体的には１～６）の整数であり、ｐは０または１～３の整数である。

代表的な例では、Ｇｌｙ－Ｓｅｒドメインは、下記の式を有し得る。

Ｓ－［Ｇ－Ｇ－Ｇ－Ｇ－Ｓ］ｎ

ここで、ｎは１以上の（好ましくは１～８、または１～６、１～５、１～４、または１～３）の整数である。上記式中、配列ＧＧＧＧＳは配列番号７０である。

【０２０１】

しかし、全てのリンカーがフレキシブルである必要はなく、場合によってはリンカー配列がフレキシブルリンカー配列ではないこともある。リンカーが相互作用ドメイン、またはＤ１／Ｈｔ１もしくはＤ２／Ｈｔ２をシグナル伝達ドメインに接続する場合は、フレキシブルリンカーであることが好ましい。

【０２０２】

リンカーの長さは重要ではないが、どのドメインなどが連結されているかに応じて、より短いリンカー配列、またはより長いリンカー配列を有することが望ましい場合もある。

【０２０３】

いくつかの場合において、リンカーは、アミノ酸長が、２、３、４、５、または６のいずれか１つから、２４、２３、２２、または２１のいずれか１つまででであってもよい。他の場合には、アミノ酸長が、２、３、４、５、または６のいずれか１つから、２１、２０、１９、１８、１７、１６、または１５のいずれか１つまででであってもよい。他の場合には、これらの範囲の中間、例えば、６～２１、６～２０、７～２０、８～２０、９～２０、１０～２０、８～１８、９～１８、１０～１８、９～１７、１０～１７、９～１６、１０～１６などであってもよい。したがって、上記の整数のいずれかからなる範囲内であってもよい。

【０２０４】

他の場合には、リンカーは、より長い長さであってもよく、例えば、アミノ酸長が、４、５、６、７、８、９、１０、１２、１５、または２０のいずれか１つから、１００、９０、８０、７０、６０、５０、４５、４０、３０、２８、２５、または２４のいずれか１つまででであってもよい。他の場合には、この範囲と上記に示した範囲のいずれかとの間の中間であってもよい。したがって、上記の整数のいずれかからなる範囲内であってもよい。

【０２０５】

ＧＳリンカー、より具体的にはリンカー中のＧＳ（「Ｇｌｙ－Ｓｅｒ」）ドメインの使用は、ＧＳドメインの反復数を変化させることによってリンカーの長さを容易に変化させることを可能にし得るため、そのようなリンカーは、使用に有利なリンカーのタイプを代表するものである。しかしながら、フレキシブルリンカーは、「ＧＳ」反復に基づくものに限定されず、リンカー配列全体に分散したＳｅｒ残基およびＧｌｙ残基を含む他のリン

カーが、Chen et al.（前掲）をはじめとして報告されている。

【０２０６】

リンカー配列は、上記に記載または定義されたような１つ以上のＧｌｙ－Ｓｅｒドメインのみから構成されてもよい、つまり、それ（それら）からなっていてもよい。しかしながら、上記のように、リンカー配列は、１つ以上のＧｌｙ－Ｓｅｒドメインと追加のアミノ酸を含んでもよい。追加のアミノ酸は、Ｇｌｙ－Ｓｅｒドメインの一方または両方の末端に存在していてもよく、Ｇｌｙ－Ｓｅｒドメインの反復区間の一方または両方の末端に存在していてもよい。したがって、他のアミノ酸であり得る追加のアミノ酸は、リンカー配列の一方または両方の末端に位置してもよく、例えば、Ｇｌｙ－Ｓｅｒドメイン（１つまたは複数）を挟んでいてもよい。他の実施形態において、追加のアミノ酸は、Ｇｌｙ－Ｓｅｒドメイン間に存在していてもよい。例えば、２つのＧｌｙ－Ｓｅｒドメインがリンカー配列中のひと続きの他のアミノ酸を挟んでいてもよい。さらに、上記のように、他のリンカーでは、ＧＳドメインが反復されていなくてもよく、Ｇ残基および／またはＳ残基、またはＧＳなどの短いドメインが、長さまたは配列に沿って分布しているだけであってもよい。

【０２０７】

代表的なリンカー配列の例を以下に示す。

ＥＴＳＧＧＧＧＳＲＬ（配列番号６８）
ＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号６９）
Ｓ（ＧＧＧＧＳ）１－５（ここで、ＧＧＧＧＳは、配列番号７０である）
（ＧＧＧＧＳ）１－５（ここで、ＧＧＧＧＳは、配列番号７０である）
ＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号７１）
Ｓ（ＧＧＧＳ）１－５（ここで、ＧＧＧＳは、配列番号６７である）
（ＧＧＧＳ）１－５（ここで、ＧＧＧＳは、配列番号６７である）
ＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号７２）
ＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号７３）
Ｓ（ＧＧＧＧＧＳ）１－５（ここで、ＧＧＧＧＧＳは、配列番号７４である）
（ＧＧＧＧＧＳ）１－５（ここで、ＧＧＧＧＧＳは、配列番号７４である）
Ｓ（ＧＧＧＧＧＧＧＳ）１－５（ここで、ＧＧＧＧＧＧＧＳは、配列番号７５である）
（ＧＧＧＧＧＧＧＳ）１－５（ここで、ＧＧＧＧＧＧＧＳは、配列番号７５である）
Ｇ６（配列番号７６）
Ｇ８（配列番号７７）
ＫＥＳＧＳＶＳＳＥＱＬＡＱＦＲＳＬＤ（配列番号７８）
ＥＧＫＳＳＧＳＧＳＥＳＫＳＴ（配列番号７９）
ＧＳＡＧＳＡＡＧＳＧＥＦ（配列番号８０）
ＳＧＧＧＧＳＡＧＳＡＡＧＳＧＥＦ（配列番号８１）
ＳＧＧＧＬＬＬＬＬＬＬＬＧＧＧＳ（配列番号８２）
ＳＧＧＧＡＡＡＡＡＡＡＡＧＧＧＳ（配列番号８３）
ＳＧＧＧＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＧＧＧＳ（配列番号８４）
ＳＧＡＬＧＧＬＡＬＡＧＬＬＬＡＧＬＧＬＧＡＡＧＳ（配列番号８５）
ＳＬＳＬＳＰＧＧＧＧＧＰＡＲ（配列番号８６）
ＳＬＳＬＳＰＧＧＧＧＧＰＡＲＳＬＳＬＳＰＧＧＧＧＧ（配列番号８７）
ＧＳＳＧＳＳ（配列番号８８）
ＧＳＳＳＳＳＳ（配列番号８９）
ＧＧＳＳＳＳ（配列番号９０）
ＧＳＳＳＳＳ（配列番号９１）
ＳＧＧＧＧＳ（配列番号９２）

【０２０８】

シグナル伝達ドメイン内のモチーフの連結用には、以下のリンカーを挙げることができる。

ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号９３）
ＧＧＧＧＧ（配列番号９４）
ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号９５）
ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号９６）
ＧＧＧＧＧＧＧ（配列番号９７）

【０２０９】

本明細書における「ポリヌクレオチド」および「核酸」という用語は、互いに同義であることを意図している。

【０２１０】

当業者には、遺伝コードの縮重の結果として多数の異なるポリヌクレオチドおよび核酸が同じポリペプチドをコードし得ることが理解されるであろう。さらに、当業者は、常用の技術を用いて、本明細書に記載のポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド配列に影響を与えないヌクレオチド置換を行い、ポリペプチドが発現される特定の宿主生物のコドン使用を反映することができることが理解されるべきである。本明細書に記載の様々なドメインおよびモチーフなどをコードする塩基配列は、当該技術分野において公知であって入手可能であり、これらのいずれも本明細書における使用のために使用または改変することができる。

【０２１１】

本発明に係る核酸は、ＤＮＡまたはＲＮＡを含み得る。それらは、一本鎖であってもよく、二本鎖であってもよい。また、合成または改変ヌクレオチドを内部に含むポリヌクレオチドであってもよい。多くの異なるタイプの改変が当該技術分野で知られている。これらには、メチルホスホネート骨格およびホスホロチオエート骨格、分子の３’末端および／または５’末端へのアクリジン鎖またはポリリシン鎖の付加が含まれる。本明細書に記載の使用の目的のために、ポリヌクレオチドは、当該技術分野で利用可能な任意の方法によって改変され得ることが理解されるべきである。そのような改変は、目的のポリヌクレオチドのインビボ活性または寿命を向上させるために行われてもよい。塩基配列に関連する「バリアント」、「相同体」、または「誘導体」という用語は、配列からの、または配列への、１個（または複数個）の核酸の任意の置換（substitution）、変異、改変、置換（replacement）、欠失、または付加を含む。

【０２１２】

ＤＮＡ核酸分子／ポリヌクレオチド／配列などの、核酸分子／ポリヌクレオチド／塩基配列は、遺伝子組換え、合成、または当業者が利用可能な任意の手段によって作製することができる。標準的な技術でそれらのクローンを作ってもよい。

より長い核酸分子／ポリヌクレオチド／塩基配列は、一般的に、遺伝子組換え手段を使用して、例えばポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）クローニング技術を使用して作製されるだろう。これは、クローンを作りたい標的配列の横に並べた一対のプライマー（例えば、約１５～３０個のヌクレオチドのもの）を作り、上記プライマーを動物またはヒトの細胞から得られたｍＲＮＡまたはｃＤＮＡと接触させ、所望の領域の増幅をもたらすような条件でポリメラーゼ連鎖反応を行い、増幅された断片を単離し（例えば、アガロースゲルで反応混合物を精製することにより）、増幅されたＤＮＡを回収することを含むだろう。上記プライマーは、増幅されたＤＮＡが好適なベクターにクローニングされるように、好適な制限酵素認識部位を含むように設計されてもよい。

【０２１３】

核酸構築物は、核酸分子を、１つ以上の他の塩基配列、例えば、発現制御配列などの調節配列、および／または他のコード配列と一緒に含んでもよい。特に、上記他のコード配列は、目的のタンパク質をコードしてもよい。これは、治療用タンパク質であってもよい。

【０２１４】

上記のように、組換えタンパク質が、別の目的タンパク質、例えば、第２のタンパク質または受容体、特に、抗原受容体、例えば、ＣＡＲもしくはＴＣＲまたはその誘導体（例

えば、ＴＣＲ－ＣＡＲ構築物、または単鎖ＴＣＲ構築物など）と共発現されてもよい。そのようなさらなるタンパク質、例えば受容体、のコード配列は、上記の構築物内に含まれてもよい。

【０２１５】

組換えタンパク質は、安全スイッチポリペプチドと共発現されてもよい。安全スイッチポリペプチドは、それが発現される細胞に自殺部分を提供する。これは、対象に投与された細胞を、必要が生じた場合に、または実際にはより一般的には、要望もしくは必要性に応じて、例えば、細胞がその治療効果を発揮または完了した後に、除去することを可能にする安全機構として有用である。あるいは、上述したように、組換えタンパク質は、自殺部分を含んでもよい。

【０２１６】

自殺部分は、細胞死、またはより一般的には細胞の排除もしくは欠失をもたらす誘導能を有する。自殺部分の一例は、自殺遺伝子によってコードされる自殺タンパク質であり、これは、所望の導入遺伝子、この場合、組換えタンパク質（および任意に、細胞によって本組換えタンパク質と共発現されるＣＡＲまたは他の受容体）と一緒に細胞内または細胞上で発現され得、発現されると、細胞を除去（deleted）させて、導入遺伝子（ＣＡＲ）の発現をオフにする。本明細書において自殺部分とは、許容条件下、すなわち、誘導されたかまたはオンにされた条件下で、細胞を除去させることができるポリペプチドである自殺ポリペプチドである。

【０２１７】

自殺部分は、対象に投与される活性化剤によって活性化されて細胞除去活性を発揮し得るか、または対象に投与され得る基質の存在下で活性であって細胞除去活性を発揮する、ポリペプチドまたはアミノ酸配列であってもよい。特定の実施形態では、自殺部分が、対象に投与される別個の細胞除去剤の標的となってもよい。細胞除去剤は、自殺部分に結合することによって、除去させる細胞を標的とすることができる。特に、自殺部分が抗体に認識されてもよく、細胞表面に発現された場合の安全スイッチポリペプチドに抗体が結合すると、細胞が排除または除去される。

【０２１８】

自殺部分は、当該技術分野で知られているように、ＨＳＶ－ＴＫまたはｉＣａｓｐ９であってもよい。しかしながら、他の例では、自殺部分は、細胞除去抗体または細胞の除去を誘発できる他の結合分子によって認識されるエピトープであるかまたはそれを含んでいてもよい。

【０２１９】

細胞除去の文脈において本明細書で使用される「除去（delete）」という用語は、「除去（remove）」または「除去（ablate）」または「排除（eliminate）」と同義である。この用語は、対象における細胞の数が減少するような細胞死滅または細胞増殖阻害を包含するために使用される。１００％完全な除去が望ましいが、必ずしも達成されるわけではない。対象において細胞数を減少させるかまたは細胞増殖を阻害することは、有益な効果を有するのに十分であり得る。

【０２２０】

特に、自殺部分は、抗体リツキシマブによって認識されるＣＤ２０エピトープであってもよい。したがって、安全スイッチポリペプチドにおいて、自殺部分は、抗体リツキシマブによって認識されるＣＤ２０由来のエピトープに基づく最小エピトープを含んでいてもよい。より具体的には、ポリペプチドは、リンカーＬによって間隔を空けて配置された２つのＣＤ２０エピトープＲ１およびＲ２を含んでいてもよい。

【０２２１】

リツキシマブエピトープに基づく安全スイッチがＷＯ２０１３／１５３３９に記載されている。リツキシマブによって認識されるエピトープを模倣するペプチド（いわゆるミモトープ）が開発されており、これらは、ＷＯ２０１３／１５３３９で、マーカー部分としてのＣＤ３４最小エピトープも含む自殺・マーカー複合ポリペプチド構築物における自殺

部分として用いられている。詳細には、ＷＯ２０１３／１５３３９は、配列番号９９に示す配列を有するＲＱＲ８と呼ばれるポリペプチドを開示しており、このポリペプチドは、スペーサー配列および介在ＣＤ３４マーカー配列によって互いに分離され、かつ、ポリペプチドが発現される細胞の表面からポリペプチドが突出することを可能にするストーク配列にさらに連結された、２つのＣＤ２０最小エピトープを含む。安全スイッチポリペプチドは、ＲＱＲ８であってもよく、ＲＱＲ８に対して少なくとも８０％の配列同一性、例えば、ＲＱＲ８に対して少なくとも８５％、８８％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の配列同一性を有するバリアントであってもよい。安全スイッチドメインのベースとして使用され得る他の安全スイッチポリペプチドとしては、本発明者らの同時係属中のＰＣＴ特許出願第ＰＣＴ／ＥＰ２０２１／０６４０５３号（ＷＯ２０２１／２３９８１２）に記載されているものが挙げられる。

【０２２２】

本明細書に記載のキメラタンパク質または組換えタンパク質と共発現され得る他のポリペプチドには、転写因子、増殖因子、または細胞の生存の機能性の増強を支援し得る他の因子が含まれる。例えば、転写因子ＦＯＸＰ３は、Ｔｒｅｇ細胞の抑制表現型を維持するために使用され得る。「ＦＯＸＰ３」は、フォークヘッドボックスＰ３タンパク質の略称である。ＦＯＸＰ３は、転写因子のＦＯＸタンパク質ファミリーのメンバーであり、制御性Ｔ細胞の発生（development）と機能において調節経路のマスターレギュレーターとして機能する。本明細書における「ＦＯＸＰ３」は、ＦＯＸＰ３のバリアント、アイソフォーム、および機能的断片を包含する。「ＦＯＸＰ３ポリペプチド」は、ＦＯＸＰ３活性を有するポリペプチド、すなわち、ＦＯＸＰ３標的ＤＮＡに結合し、Ｔｒｅｇの発生および機能を調節する転写因子として機能することができるポリペプチドである。本明細書に記載の組換えタンパク質と一緒にＦＯＸＰ３をＴｒｅｇに発現させることは、Ｔｒｅｇ表現型を維持するさらなる助けとなり得る。

【０２２３】

ＦＯＸＰ３を構成的に活性な組換え受容体と共発現させることは、細胞内のＦＯＸＰ３発現を増加させ、Ｔｒｅｇ細胞または調節表現型を有する細胞の抑制表現型を維持する助けとなり得る。

【０２２４】

「ＦＯＸＰ３発現を増加させる」とは、細胞（または細胞の集団）中のＦＯＸＰ３　ｍＲＮＡおよび／またはタンパク質のレベルを、核酸分子またはベクターの導入による改変を受けていない対応する細胞（または細胞の集団）と比較して、増加させることを意味する。例えば、本発明に従って改変された細胞（またはそのような細胞の集団）におけるＦＯＸＰ３　ｍＲＮＡおよび／またはタンパク質のレベルは、本発明に従って改変されていない対応する細胞（またはそのような細胞の集団）におけるレベルの少なくとも１．５倍、少なくとも２倍、少なくとも５倍、少なくとも１０倍、少なくとも５０倍、少なくとも１００倍、少なくとも１５０倍に増加し得る。好ましくは、上記細胞はＴｒｅｇであり、上記細胞の集団はＴｒｅｇの集団である。

【０２２５】

好適には、改変された細胞（またはそのような細胞の集団）におけるＦＯＸＰ３　ｍＲＮＡおよび／またはタンパク質のレベルは、そのように改変されていない対応する細胞（またはそのような細胞の集団）におけるレベルの少なくとも１．５倍、少なくとも２倍、少なくとも５倍に増加し得る。好ましくは、上記細胞はＴｒｅｇであり、上記細胞の集団はＴｒｅｇの集団である。

【０２２６】

特定のｍＲＮＡおよびタンパク質のレベルを測定するための技術は、当該技術分野で周知である。Ｔｒｅｇなどの細胞の集団におけるｍＲＮＡレベルは、アフィメトリクス社（Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ）のｅｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ　ｐｒｉｍｅ　ｆｌｏｗ　ＲＮＡアッセイ、ノーザンブロッティング、遺伝子発現連続分析（ＳＡＧＥ）、または定量的ポリメラーゼ連鎖反応（ｑＰＣＲ）などの技術によって測定することができる。細胞集団中のタ

ンパク質レベルは、フローサイトメトリー、高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）、液体クロマトグラフィー質量分析（ＬＣ／ＭＳ）、ウェスタンブロッティング、または酵素結合免疫吸着測定法（ＥＬＩＳＡ）などの技術によって測定することができる。

【０２２７】

「ＦＯＸＰ３ポリペプチド」は、ＦＯＸＰ３活性を有するポリペプチド、すなわち、ＦＯＸＰ３標的ＤＮＡに結合し、Ｔｒｅｇの発生および機能を調節する転写因子として機能することができるポリペプチドである。特に、ＦＯＸＰ３ポリペプチドは、野生型ＦＯＸＰ３（配列番号１２９）と同じまたは類似の活性を有してもよく、例えば、野生型ＦＯＸＰ３ポリペプチドの活性の少なくとも４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、１００％、１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、または１５０％を有してもよい。したがって、本明細書に記載の核酸またはベクター中の塩基配列によってコードされるＦＯＸＰ３ポリペプチドは、野生型ＦＯＸＰ３と比較して、活性が増加していてもよく、減少していてもよい。転写因子活性を測定するための技術は、当該技術分野でよく知られている。例えば、転写因子ＤＮＡ結合活性は、ＣｈＩＰによって測定することができる。転写因子の転写調節活性は、それが調節する遺伝子の発現レベルを定量することによって測定することができる。遺伝子発現は、ノーザンブロッティング、ＳＡＧＥ、ｑＰＣＲ、ＨＰＬＣ、ＬＣ／ＭＳ、ウェスタンブロッティング、またはＥＬＩＳＡなどの技術を用いて、遺伝子から産生されるｍＲＮＡおよび／またはタンパク質のレベルを測定することによって定量することができる。ＦＯＸＰ３によって調節される遺伝子には、ＩＬ－２、ＩＬ－４、およびＩＦＮ－γなどのサイトカインが含まれる（Siegler et al. Annu. Rev. Immunol. 2006, 24: 209-26、参照により本明細書に援用される）。以下に詳述するように、ＦＯＸＰ３またはＦＯＸＰ３ポリペプチドには、その、例えば配列番号３２の、機能的断片、バリアント、およびアイソフォームが含まれる。

【０２２８】

「ＦＯＸＰ３の機能的断片」とは、全長ＦＯＸＰ３ポリペプチドまたはポリヌクレオチドと同じまたは類似の活性を有する、ＦＯＸＰ３ポリペプチドまたはＦＯＸＰ３ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（すなわち、塩基配列）の一部分または一領域を指し得る。上記機能的断片は、全長ＦＯＸＰ３ポリペプチドまたはポリヌクレオチドの活性の少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、または１００％を有してもよい。当業者であれば、ＦＯＸＰ３の既知の構造的特徴および機能的特徴に基づいて機能的断片を生成することができるであろう。これらは、例えば、Song, X. et al., 2012. Cell reports, 1(6), pp. 665-675；Lopes, J.E. et al., 2006. The Journal of Immunology, 177(5), pp. 3133-3142；およびLozano, T. et al., 2013. Frontiers in oncology, 3, p. 294に記載されている。さらに、例えば、後述するように配列番号３７の配列を有するＮ末端およびＣ末端トランケート型ＦＯＸＰ３断片が、ＷＯ２０１９／２４１５４９（参照により本明細書に援用される）に記載されている。

【０２２９】

「ＦＯＸＰ３バリアント」は、ＦＯＸＰ３ポリペプチドまたはＦＯＸＰ３ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、例えば、配列番号１２９に対して、少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、または少なくとも９０％の同一性、好ましくは、少なくとも９５％または少なくとも９７％または少なくとも９９％の同一性を有してもよいアミノ酸配列または塩基配列を含み得る。ＦＯＸＰ３バリアントは、野生型ＦＯＸＰ３ポリペプチドまたはポリヌクレオチドと同じまたは類似の活性を有してもよく、例えば、野生型ＦＯＸＰ３ポリペプチドまたはポリヌクレオチドの活性の少なくとも４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、１００％、１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、または１５０％を有してもよい。当業者であれば、ＦＯＸＰ３の既知の構造的特徴および機能的特徴に基づいて、かつ／または、保存的置換を用いて、ＦＯＸＰ３バリアントを生成することができるであろう。ＦＯＸＰ３バリアントは、野生型ＦＯＸＰ３と比較

して、Ｔｒｅｇ細胞内での代謝回転時間（または分解速度）が類似または同じ、例えば、Ｔｒｅｇ内での野生型ＦＯＸＰ３の代謝回転時間（または分解速度）の少なくとも４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９９％、または１００％であってもよい。いくつかのＦＯＸＰ３バリアントは、野生型ＦＯＸＰ３と比較して減少した代謝回転時間（または分解速度）を有してもよく、例えば、ＷＯ２０１９／２４１５４９（参照により本明細書に援用される）に記載されているように、配列番号３２のアミノ酸４１８および／または４２２にアミノ酸置換、例えば、Ｓ４１８Ｅおよび／またはＳ４２２Ａを有するＦＯＸＰ３バリアントが挙げられる。

【０２３０】

好適には、本明細書に記載の核酸分子またはベクターによってコードされるＦＯＸＰ３ポリペプチドは、ＵｎｉＰｒｏｔＫＢアクセッション番号Ｑ９ＢＺＳ１（配列番号３２）などのヒトＦＯＸＰ３のポリペプチド配列、またはその機能的断片もしくはバリアントを含むかまたはそれからなっていてもよい。

【０２３１】

本発明のいくつかの実施形態において、ＦＯＸＰ３ポリペプチドは、配列番号３２に対して少なくとも７０％の同一性を有するアミノ酸配列、またはその機能的断片を含むかまたはそれからなる。好適には、ＦＯＸＰ３ポリペプチドは、配列番号３２に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％の同一性を有するアミノ酸配列、またはその機能的断片を含むかまたはそれからなる。いくつかの実施形態では、ＦＯＸＰ３ポリペプチドは、配列番号３２またはその機能的断片を含むかまたはそれからなる。

【０２３２】

いくつかの実施形態では、上述したように、ＦＯＸＰ３ポリペプチドは、配列番号３２の残基４１８及び／または４２２に変異を含んでもよい。

【０２３３】

本発明のいくつかの実施形態では、ＦＯＸＰ３ポリペプチドがＮ末端および／またはＣ末端でトランケートされることにより機能的断片が産生されてもよい。特に、Ｎ末端およびＣ末端でトランケートされたＦＯＸＰ３の機能的断片は、配列番号３７のアミノ酸配列、または配列番号３７に対して少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、もしくは９９％の同一性を有する機能的バリアントを含むかまたはそれからなっていてもよい。

【０２３４】

好適には、ＦＯＸＰ３ポリペプチドは、配列番号３２のバリアント、例えば天然のバリアントであってもよい。好適には、ＦＯＸＰ３ポリペプチドは、配列番号３２のアイソフォームである。例えば、ＦＯＸＰ３ポリペプチドは、配列番号３２に対して、７２位～１０６位のアミノ酸の欠失を含んでもよい。あるいは、ＦＯＸＰ３ポリペプチドは、配列番号３２に対して、２４６位～２７２位のアミノ酸の欠失を含んでもよい。

【０２３５】

本核酸分子または構築物は、選択可能なマーカーをコードする核酸配列を、さらに含んでもよい。好適に選択可能なマーカーは、当該技術分野において周知であり、ＧＦＰなどの蛍光蛋白質を含むが、これらに限定されるわけではない。好適には、上記選択可能なマーカーは、例えばＧＦＰ、ＹＦＰ、ＲＦＰ、ｔｄＴｏｍａｔｏ、ｄｓＲｅｄ、またはこれらのバリアントなどの蛍光蛋白質であってもよい。いくつかの実施形態において、上記蛍光蛋白質は、ＧＦＰ、またはＧＦＰバリアントである。

【０２３６】

好適には、上記選択可能なマーカー／レポータードメインは、ルシフェラーゼ系レポーター、ＰＥＴレポーター（例えば、ヨウ化ナトリウム共輸送体（ＮＩＳ）、または膜タンパク質（例えば、ＣＤ３４、低親和性神経成長因子受容体（ＬＮＧＦＲ））であってもよい。

【０２３７】

選択可能なマーカーを使用することにより、核酸分子、構築物、またはベクターが首尾

よく（コードされているキメラタンパク質またはその他のコードされているタンパク質もしくはポリペプチドが発現するように）導入された細胞（例えば、Ｔｒｅｇ）を、例えばフローサイトメトリーなどの一般的な方法を使用して開始細胞集団から選択し単離できるので、選択可能なマーカーの使用が有利である。

【０２３８】

なおさらなる実施形態では、組換えタンパク質は、少なくとも１つのカルシニューリン阻害薬に対して耐性がある変異体カルシニューリンタンパク質、特に、少なくとも１つのカルシニューリン阻害薬に対して耐性があり、かつ少なくとも１つのカルシニューリン阻害薬に対して感受性がある変異体カルシニューリンタンパク質と、共発現されてもよい。このようなカルシニューリン変異体については、さらに後述する。そのような実施形態において、核酸分子または構築物は、そのような変異体カルシニューリンをコードする塩基配列をさらに含んでもよい。

【０２３９】

２つ以上のコード配列が単一の核酸分子または構築物から発現される場合、当該２つ以上のコード配列はそれらの共発現を可能にする配列によって連結されてもよい。特に、この共発現配列（共発現部位とも呼ばれる）は、コードされたタンパク質またはポリペプチドを個別の実体として発現することを可能にし得る。例えば、上記構築物は、内部プロモーター、配列内リボソーム進入配列（ＩＲＥＳ）配列、または切断部位をコードする配列を含んでもよい。

【０２４０】

特に、共発現配列は、コードされたポリペプチド間に、自己切断配列をコードしてもよい。特に、自己切断配列は、自己切断ペプチドであってもよい。そのような配列は、タンパク質産生中に自己切断する。使用され得る自己切断ペプチドは、当該技術分野で公知であり、例えばDonnelly et al., Journal of General Virology, 2001, 82, 1027-1041（参照により本明細書に援用される）に記載されている、２Ａペプチドまたは２Ａ様ペプチドである。２Ａペプチドおよび２Ａ様ペプチドは、リボソームスキッピングを引き起こし、リボソームが２Ａペプチドの末端と下流のアミノ酸配列との間のペプチド結合の形成をスキップする切断の形態をもたらすと考えられている。「切断」は、２ＡペプチドのＣ末端のグリシン残基とプロリン残基との間で起こる。つまり、上流のシストロンは、末端にいくつかの追加の残基が付加され、下流のシストロンは、プロリンから開始することになる。

【０２４１】

好適な自己切断ドメインとしては、配列番号１００～１０３にそれぞれ示すＰ２Ａ配列、Ｔ２Ａ配列、Ｅ２Ａ配列、およびＦ２Ａ配列が挙げられる。これらの配列は、２ＡペプチドのＮ末端にアミノ酸ＧＳＧを含むように改変されてもよい。したがって、配列番号１００～１０３に対応するがＮ末端にＧＳＧを有する配列も、可能な選択肢として挙げられる。そのような改変された代替的な２Ａ配列は、当該技術分野で公知であり、報告されている。使用され得る代替的な２Ａ様配列は、Donnelly et al（前掲）に示されており、例えばＴａＶ配列である。

【０２４２】

核酸分子に含まれる自己切断配列は、同じであってもよく、異なっていてもよい。

【０２４３】

自己切断配列は、細胞に存在する一般的な酵素によって切断され得る追加の切断部位を含んでもよい。これは、翻訳後の２Ａ配列の完全な除去の達成を支援し得る。そのような追加の切断部位は、例えば、フューリン切断部位を含んでいてもよい。そのような切断部位は、当該技術分野で公知であり、例えば、ＲＸＸＲ（配列番号１０４）、例えばＲＲＫＲ（配列番号１０５）が含まれ得る。

【０２４４】

本明細書で使用される核酸分子／ポリヌクレオチドは、コドン最適化されていてもよい。コドン最適化は、以前より、ＷＯ１９９９／４１３９７およびＷＯ２００１／７９５１

８に記載されている。細胞が異なっていれば、特定のコドンの使用も異なる。このコドンバイアスは、細胞タイプにおける特定のｔＲＮＡの相対的存在量の偏りに対応している。配列中のコドンを変えて、対応するｔＲＮＡの相対的存在量に合うようにコドンを適合させることにより、発現を増加させることが可能である。同様に、対応するｔＲＮＡが特定の細胞タイプにおいて少ないとわかっているコドンを故意に選択することによって、発現を減少させることが可能である。このように、翻訳調節の度合いをさらに増やすこともできる。

【０２４５】

組換えタンパク質をコードする塩基配列、およびその他のコード塩基配列は、それらがプロモーターに動作可能に連結されている構築物中に提供されてもよい。場合によっては、異なる塩基配列が同じプロモーターに動作可能に連結されてもよい。「プロモーター」とは、遺伝子の転写を開始させるＤＮＡの領域である。プロモーターは、遺伝子の転写開始部位の近くでＤＮＡにおける上流側（センス鎖の５’領域寄り）に位置する。任意の適切なプロモーターを使用することができ、その選択は当業者によって容易になされ得る。プロモーターは、いかなる供給源に由来してもよく、ウイルスプロモーターであってもよく、哺乳動物プロモーターまたはヒトプロモーター（すなわち、生理学的プロモーター）をはじめとする真核生物プロモーターであってもよい。一実施形態では、プロモーターはウイルスプロモーターである。特定のプロモーターとして、ＬＴＲプロモーター、ＥＦＳ（またはその機能的トランケート体）、ＳＦＦＶ、ＰＧＫ、およびＣＭＶが挙げられる。一実施形態では、プロモーターは、ＳＦＦＶまたはウイルスＬＴＲプロモーターである。「同じプロモーターに動作可能に連結された」とは、各ポリヌクレオチド配列の転写が同じプロモーターから開始され得ること、および転写がプロモーターから開始されるように各塩基配列が配置および配向されることを意味する。プロモーターに動作可能に連結されたポリヌクレオチドは、プロモーターの転写調節下にある。

【０２４６】

ベクターは、１つの環境から別の環境へのある実体の移入を可能にする、または容易にするツールである。本明細書において、例として、組換え核酸技術に使用されるいくつかのベクターは、核酸のセグメント（例えば、異種ｃＤＮＡセグメントなどの異種ＤＮＡセグメント）などの実体を、標的細胞に移入することができる。ベクターは、非ウイルスベクターであってもよく、ウイルスベクターであってもよい。組換え核酸技術に使用されるベクターとしては、例えば、プラスミド、ｍＲＮＡ分子（例えば、インビトロ転写ｍＲＮＡ）、染色体、人工染色体、およびウイルスが挙げられるが、これらに限定されるわけではない。ベクターはまた、例えば、ネイキッド核酸（例えば、ＤＮＡ）であってもよい。最も単純な形態では、ベクターそれ自体が、目的の塩基配列であってもよい。

【０２４７】

本明細書で使用されるベクターは、例えば、プラスミド、ｍＲＮＡ、またはウイルスベクターであってもよく、核酸分子／ポリヌクレオチドの発現のためのプロモーター（上記）、場合によってはそのプロモーターのレギュレーターを含んでもよい。

【０２４８】

一実施形態では、ベクターは、ウイルスベクター、例えば、レトロウイルスベクター、例えば、レンチウイルスベクターまたはガンマレトロウイルスベクターである。

【０２４９】

ベクターは、追加のプロモーターをさらに含んでもよく、例えば、一実施形態では、プロモーターは、ＬＴＲ、例えば、レトロウイルスＬＴＲまたはレンチウイルスＬＴＲであってもよい。長末端反復（ＬＴＲ）とは、レトロトランスポゾンやレトロウイルスＲＮＡの逆転写によって形成されるプロウイルスＤＮＡの両端に見られる、数百回または数千回繰り返すＤＮＡの同一配列である。ＬＴＲは、ウイルスが宿主ゲノムに遺伝物質を挿入するために使用する。ＬＴＲには以下の遺伝子発現のシグナルが存在する：エンハンサー、プロモーター（転写エンハンサーまたは調節エレメントの両方を有し得る）、転写開始（キャッピングなど）、転写ターミネーター、およびポリアデニル化シグナル。

【０２５０】
好適には、ベクターは、５’ＬＴＲおよび３’ＬＴＲを含み得る。
【０２５１】
ベクターは、転写前または転写後に作用し得る１つ以上の追加の調節配列を含んでもよい。「調節配列」とは、ポリペプチドの発現を促進する任意の配列であり、例えば、転写物の発現を増加させたり、ｍＲＮＡ安定性を高めたりする働きをする。好適な調節配列としては、例えば、エンハンサーエレメント、転写後調節エレメント、およびポリアデニル化部位が挙げられる。好適には、追加の調節配列はＬＴＲ中に存在し得る。
【０２５２】
好適には、ベクターは、例えばプロモーターに動作可能に連結された、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント（ＷＰＲＥ）を含み得る。
【０２５３】
本核酸分子／ポリヌクレオチドを含むベクターを、形質転換や形質導入など、当該技術分野で周知の様々な技術を使用して細胞に導入してもよい。いくつかの技術が当該技術分野で知られており、例えば、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ関連ウイルスベクター、バキュロウイルスベクター、単純ヘルペスウイルスベクターなどの組換えウイルスベクターを使用した感染、核酸の直接注入や、遺伝子銃形質転換が挙げられる。
【０２５４】
非ウイルス送達システムには、ＤＮＡ導入法などがあるが、これらに限定されるわけではない。なお、遺伝子導入は、遺伝子を標的細胞へ送達するための非ウイルスベクターを使用したプロセスを含む。非ウイルス送達システムは、リポソームまたは両親媒性細胞浸透性ペプチド、好ましくは、核酸分子または構築物と複合されたものを含むことができる。
【０２５５】
典型的な遺伝子導入法としては、エレクトロポレーション、ＤＮＡ遺伝子銃、脂質媒介トランスフェクション、圧縮ＤＮＡ媒介トランスフェクション、リポソーム、イムノリポソーム、リポフェクション、カチオン性薬剤媒介トランスフェクション、カチオン性表面両親媒性物質（ＣＦＡｓ）（Nat. Biotechnol. (1996)14: 556）、および、これらの組み合わせがある。
【０２５６】
場合によっては、本核酸分子は、組換えタンパク質およびその他のポリペプチド（例えば、受容体またはマーカーまたは他の機能的ポリペプチドまたは目的のタンパク質）をコードする単一の構築物として使用されるように設計されてもよく、この構築物は単一のベクターに含有されるであろうが、例えばやはり細胞に導入することが所望され得る他のポリペプチドをコードする他のベクターと組み合わせて細胞に導入されることを除外するものではない。
【０２５７】
上記のように、組換えタンパク質は、ＣＡＲと組み合わせて細胞内または細胞上に共発現させてもよい。本明細書における「キメラ抗原受容体」または「ＣＡＲ」という用語は、細胞（例えば、Ｔｒｅｇ）に抗原特異性を付与することができる操作された受容体のことである。ＣＡＲはまた、人工Ｔ細胞受容体、キメラＴ細胞受容体、またはキメラ免疫受容体として知られている。ＣＡＲは、典型的には、本明細書において抗原結合ドメインと呼ばれる抗原特異的標的化領域を含む細胞外ドメインと、膜貫通ドメインと、１つ以上の共刺激ドメインを任意に含む細胞内ドメインと、細胞内シグナル伝達ドメインとを含む。抗原結合ドメインは、典型的には、ヒンジドメインによって膜貫通ドメインに連結される。ＣＡＲの設計、およびそれらが含有し得る様々なドメインは、当該技術分野で周知である。
【０２５８】
ＣＡＲが標的抗原と結合すると、その結果、ＣＡＲが発現する細胞に活性化シグナルが

伝達される。このように、ＣＡＲは、操作された細胞の特異性を、標的抗原、特に標的抗原を発現する細胞へ向ける。

【０２５９】

ＣＡＲの抗原結合ドメインは、所望の標的抗原、より一般的には所望の標的分子に結合する（すなわち、親和性を有する）任意のタンパク質またはポリペプチドに由来するかまたはそれから得られてもよい。これは、例えば、リガンドもしくは受容体、または標的分子に対する生理学的結合タンパク質、もしくはその一部、または合成タンパク質もしくは誘導体タンパク質であってもよい。標的分子は、一般に、細胞、例えば、標的細胞または標的細胞近傍の細胞（バイスタンダー効果のため）などの表面に発現され得るが、そうでなくてもよい。ＣＡＲは、抗原結合ドメインの性質および特異性に応じて、可溶性分子を認識し得る。これは、例えば、抗原結合ドメインが細胞受容体に基づくかまたは由来する場合である。

【０２６０】

抗原結合ドメインは、抗体可変鎖に由来するのが最も一般的である（例えば、ｓｃＦｖの形態をとるのが一般的である）が、Ｔ細胞受容体可変ドメイン、または、上述したように、リガンドもしくは他の結合分子に対する受容体などの他の分子から生成されてもよい。

【０２６１】

ＣＡＲは、典型的には、シグナル配列（リーダー配列としても知られる）、特にＣＡＲを細胞の原形質膜に標的化するシグナル配列も含む、ポリペプチドとして発現される。シグナル配列は、一般に、抗原結合ドメインの隣または近くで、一般には抗原結合ドメインの上流側に、位置する。したがって、ＣＡＲの細胞外ドメイン、つまり外部ドメイン（ectodomain）は、シグナル配列と抗原結合ドメインとを含み得る。

【０２６２】

抗原結合ドメインは、ＣＡＲに、結合相手の所定の抗原と結合する能力を提供する。抗原結合ドメインは、好ましくは、臨床的に関心が持たれる抗原または疾患部位の抗原を標的とする。

【０２６３】

上記のように、抗原結合ドメインは、生体分子（例えば、細胞表面受容体またはその構成部分）を特異的に認識しそれと結合する能力を有するタンパク質またはペプチドであってもよい。抗原結合ドメインは、結合相手の生体分子用の、天然由来、合成、半合成、または遺伝子組換えにより作製した結合パートナーを含む。抗原特異的標的ドメインの例としては、抗体または抗体断片または誘導体、受容体の細胞外ドメイン、細胞表面分子／受容体用のリガンド、またはその受容体結合ドメイン、および腫瘍結合タンパク質などがある。後述するように、上記抗原特異的標的ドメインは、好ましくは、抗体または抗体由来であってもよいが、他の抗原特異的標的ドメイン、例えば、移植、炎症、または疾患の部位で活性なＴｃｏｎ細胞のＴＣＲと結合することが可能な抗原ペプチド／ＭＨＣまたはＨＬＡの組み合わせからなる抗原特異的標的ドメインなども含まれる。

【０２６４】

ＣＡＲは、任意の所望の標的抗原または標的分子に向けられ得る。これは、意図する治療法や治療したい状態に応じて選択することができる。例えば、特定の状態に関連する抗原もしくは分子、またはその状態を治療するために標的としたい細胞に関連する抗原もしくは分子であってもよい。典型的には、上記抗原または分子は、細胞表面抗原または細胞表面分子である。

【０２６５】

「に対して向けられる（directed against）」という用語は、「に特異的な」または「抗」と同義である。換言すれば、ＣＡＲは標的分子を認識する。したがって、この用語は、ＣＡＲが、特定のまたは所与の抗原つまり標的に特異的に結合することができることを意味する。特に、ＣＡＲの抗原結合ドメインは、標的分子または標的抗原に特異的に結合することができる（より具体的には、ＣＡＲが細胞、特に免疫エフェクター細胞の表面

に発現されている場合）。特異的な結合は、非標的分子または非標的抗原に対する非特異的な結合とは区別され得る。したがって、ＣＡＲを発現する細胞は、標的分子または標的抗原を発現する標的細胞、特に、細胞表面上に標的抗原または標的分子を発現する標的細胞に特異的に結合するように向けられる（directed）、またはリダイレクトされる（re-directed）。

【０２６６】

当該ＣＡＲによって標的とされる抗原には、移植された臓器、自己免疫疾患、アレルギー疾患、および炎症性疾患（例えば、神経変性疾患）に関連する細胞上に発現する抗原があるが、これらに限定されるわけではない。ＣＡＲを発現するように操作された細胞がＴｒｅｇ細胞またはその前駆体である場合は、Ｔｒｅｇ細胞のバイスタンダー効果のため、移植部位、炎症部位、または疾患部位に抗原が単に存在する、および／または発現するということは、当業者に理解されるであろう。

【０２６７】

神経変性疾患に関連する細胞上に発現する抗原としては、グリア細胞上に提示される抗原、例えばＭＯＧが挙げられる。

【０２６８】

臓器移植に関連する抗原、および／または移植された臓器に関連する細胞としては、移植された臓器に存在するが患者には存在しないＨＬＡ抗原や、移植拒絶の間に発現が増加する抗原、例えばＣＣＬ１９、ＭＭＰ９、ＳＬＣ１Ａ３、ＭＭＰ７、ＨＭＭＲ、ＴＯＰ２Ａ、ＧＰＮＭＢ、ＰＬＡ２Ｇ７、ＣＸＣＬ９、ＦＡＢＰ５、ＧＢＰ２、ＣＤ７４、ＣＸＣＬ１０、ＵＢＤ、ＣＤ２７、ＣＤ４８、ＣＸＣＬ１１などが挙げられるが、これらに限定されるわけではない。

【０２６９】

一実施形態では、ＣＡＲは、ＨＬＡ抗原、特にＨＬＡ－Ａ２抗原に対して向けられる。

【０２７０】

このような抗原に対する抗体は当該技術分野で公知であり、好都合なことに、ｓｃＦｖは公知の抗体または入手可能な抗体に基づいて取得または生成され得る。この点において、そのような抗体結合ドメインの調製を助けるためのＶＨ配列およびＶＬ配列、ならびにＣＤＲ配列が公開されている。例えば、ＷＯ２０２０／０４４０５５に開示されており、その開示は参照により本明細書に援用される。ＷＯ２０２０／０４４０５５に開示されている抗原結合ドメイン、またはＣＤＲ配列、ＶＨ配列、および／もしくはＶＬ配列のいずれを用いてもよい。

【０２７１】

例としては、ＣＡＲは、ＨＬＡ－Ａ２（ＨＬＡ－Ａ２は、本明細書においてＨＬＡ－Ａ*０２、ＨＬＡ－Ａ０２、およびＨＬＡ－Ａ*２とも称される）と結合可能な抗原結合ドメインを含んでいてもよい。ＨＬＡ－Ａ*０２は、ＨＬＡ－Ａ座にある、ある特定のクラスＩ主要組織適合複合体（ＭＨＣ）対立遺伝子群である。

【０２７２】

抗原認識ドメインは、ＨＬＡ－Ａ２内の１個以上の領域またはエピトープと結合してもよく、好適には特異的に結合してもよい。エピトープは抗原決定基としても知られ、抗原認識ドメイン（例えば抗体）によって認識される抗原の一部である。つまり、エピトープは抗体が結合する抗原の特定の部分である。好適には、抗原認識ドメインは、ＨＬＡ－Ａ２内の１個の領域またはエピトープと結合し、好適には特異的に結合する。

【０２７３】

ウイルスベクターを用いた形質導入や、ＤＮＡまたはＲＮＡを用いた遺伝子導入などの多数の手段のうちのひとつによって、本明細書で定義された核酸分子、構築物、またはベクターを導入することにより、操作された細胞、特にＴ細胞が生成されてもよい。

【０２７４】

本細胞は、本明細書で定義された核酸分子、構築物、またはベクターを細胞に（例えば、形質導入または遺伝子導入によって）導入することにより、作製される。

【０２７５】
好適な細胞についてはさらに後述するが、細胞は、対象から単離されたサンプルに由来するものであってもよい。対象は、ドナー対象であってもよく、治療の対象であってもよい（すなわち、細胞は、自己細胞であってもよく、別のレシピエントに導入するためのドナー細胞、例えば、同種細胞であってもよい）。
【０２７６】
細胞は、以下の工程を含む方法によって生成され得る。
（ｉ）対象から細胞含有サンプルを単離する、または細胞含有サンプルを得る工程、および
（ｉｉ）本明細書で定義される核酸分子、構築物、またはベクターを細胞含有サンプルに導入し（例えば、形質導入または遺伝子導入により）、操作された細胞の集団を得る工程。
【０２７７】
核酸分子、構築物、またはベクターが導入される細胞を標的細胞と呼ぶ場合もある。上記方法の工程（ｉｉ）の前および／または後に、標的細胞富化サンプルを、細胞含有サンプルから単離し、富化し、および／または細胞含有サンプルから生成してもよい。例えば、Ｔｒｅｇ（または他の標的細胞）の単離、富化、および／または生成を工程（ｉｉ）の前および／または後に行って、Ｔｒｅｇ富化サンプルを単離、富化、または生成してもよい。細胞含有サンプルからの単離および／または富化を工程（ｉｉ）の後に行って、本明細書に記載のＣＡＲ、核酸分子／ポリヌクレオチド、構築物、および／またはベクターを含む細胞および／またはＴｒｅｇ（または他の標的細胞）を富化してもよい。
【０２７８】
Ｔｒｅｇ富化サンプルは、当業者に周知のいずれかの方法によって、例えばＦＡＣＳおよび／または磁性ビーズ分離によって、単離または富化されてもよい。Ｔｒｅｇ富化サンプルは、当業者に周知のいずれかの方法によって、細胞含有サンプルから生成されてもよく、例えば、ＦＯＸＰ３をコードするＤＮＡまたはＲＮＡを導入することによりＴｃｏｎ細胞から生成されてもよく、かつ／または、誘導性前駆細胞もしくは胚性前駆細胞のエクスビボ分化から生成されてもよい。他の標的細胞を単離および／または富化するための方法は、当該技術分野で公知である。
【０２７９】
標的細胞は、Ｔｒｅｇ細胞、またはその前駆体もしくは前駆細胞であってもよい。
【０２８０】
「操作された細胞」は、細胞によって自然にコードされたわけではないポリヌクレオチドを含むか、または発現するように改変された細胞を意味する。細胞を操作する方法は、当該技術分野で周知であり、例えば、細胞の遺伝子改変があり、それは、例えば、レトロウイルス形質導入またはレンチウイルス形質導入などの形質導入、リポフェクション法、ポリエチレングリコール法、リン酸カルシウム法およびエレクトロポレーション法などの遺伝子導入（ＤＮＡまたはＲＮＡの一過性形質転換など）によるものであるが、これらに限定されるわけではない。核酸配列を細胞に導入するために、いずれかの適切な方法が使用されればよい。核酸を導入するために両親媒性細胞浸透性ペプチドなどの非ウイルス性技術を使用してもよい。細胞はまた、例えば、本明細書に記載のヌクレオチド、ポリヌクレオチド、または核酸配列をゲノムに挿入するために任意の公知の遺伝子編集技術を用いて、例えばＣＲＩＳＰＲ、Ｔａｌｅｎ、またはＺｎフィンガーを用いて、遺伝子改変されてもよい。
【０２８１】
したがって、本明細書に記載の核酸分子は、対応する未改変の細胞によって自然に発現されるわけではない。実際、組換えタンパク質をコードする核酸分子は人工的な構築物であり、自然に存在したり発現したりすることはできない。好適には、操作された細胞は、例えば形質導入または遺伝子導入により改変された細胞である。好適には、操作された細胞は、例えば形質導入または遺伝子導入によって、改変またはゲノム改変された細胞であ

る。好適には、操作された細胞は、レトロウイルス形質導入によって、改変またはゲノム改変された細胞である。好適には、操作された細胞は、レンチウイルス形質導入によって、改変またはゲノム改変された細胞である。

【０２８２】

本明細書における「導入された」という用語は、外来の核酸、例えばＤＮＡまたはＲＮＡを細胞に挿入するための方法のことである。本明細書における「導入された」という用語は、形質導入法、遺伝子導入法の両方を含む。遺伝子導入は、非ウイルス法により核酸を細胞内に導入するプロセスである。形質導入は、ウイルスベクターを介して細胞に外来のＤＮＡまたはＲＮＡを導入するプロセスである。ウイルスベクターを用いた形質導入や、ＤＮＡまたはＲＮＡを用いた遺伝子導入などの多数の手段のうちのひとつによって、本明細書に記載の核酸を導入することにより、操作された細胞が生成されてもよい。

【０２８３】

本明細書に記載の核酸の導入前または導入後に、例えば、抗ＣＤ３モノクローナル抗体での処理、または抗ＣＤ３モノクローナル抗体と抗ＣＤ２８モノクローナル抗体の両方での処理により、細胞を活性化および／または増殖させてもよい。また、ＩＬ－２と組み合わせた抗ＣＤ３モノクローナル抗体および抗ＣＤ２８モノクローナル抗体の存在下で細胞を増殖させてもよい。好適には、ＩＬ－２はＩＬ－１５と置き換えられてもよい。細胞（例えば、Ｔｒｅｇ）増殖プロトコルで使用されてもよい別の成分としては、ラパマイシン、全トランス型レチノイン酸（ＡＴＲＡ）、およびＴＧＦβがあるが、これらに限定されるわけではない。本明細書における「活性化される」とは、細胞が刺激されて、細胞の増殖が起こることを意味する。本明細書における「増殖される」とは、細胞または細胞の集団の増殖が誘導されることを意味する。細胞の集団の増殖は、例えば、集団に存在する細胞の数をカウントすることにより測定してもよい。細胞の表現型は、フローサイトメトリーなど当該技術分野で周知の方法によって判定してもよい。一実施形態において、細胞は、ＥＰＯの存在下で培養および／または活性化されてもよい。

【０２８４】

細胞は、免疫細胞であってもよく、その前駆体であってもよい。前駆体細胞（precursor cell）は、前駆細胞（progenitor cell）であってもよい。したがって、代表的な免疫細胞としては、Ｔ細胞、特に細胞傷害性Ｔ細胞（ＣＴＬ；ＣＤ８＋　Ｔ細胞）、ヘルパーＴ細胞（ＨＴＬ；ＣＤ４＋　Ｔ細胞）、および制御性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）が挙げられる。Ｔ細胞の他の集団、例えばナイーブＴ細胞やメモリーＴ細胞もまた本明細書において有用である。他の免疫細胞としては、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、樹状細胞、ＭＤＳＣ、好中球、およびマクロファージが挙げられる。免疫細胞の前駆体としては、多能性（pluripotent）幹細胞、例えば人工多能性幹細胞（ｉＰＳＣ）、または、多分化能性（multipotent）幹細胞つまりある系統に拘束された細胞を含む、より拘束された前駆細胞が挙げられる。前駆体細胞は、インビボまたはインビトロで免疫細胞に分化するように誘導することができる。１つの態様において、前駆体細胞は、目的の免疫細胞への分化形質転換が可能な体細胞であってもよい。

【０２８５】

最も注目すべきことに、上記免疫細胞は、ＮＫ細胞、樹状細胞、ＭＤＳＣ、または細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）もしくはＴｒｅｇ細胞などのＴ細胞であってもよい。

【０２８６】

特に、上記免疫細胞は、Ｔｒｅｇ細胞であってもよい。「制御性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）またはＴ制御性細胞」は、細胞変性免疫応答を制御し、免疫寛容の維持に必須である、免疫抑制機能を有する免疫細胞である。本明細書において、Ｔｒｅｇという用語は、免疫抑制機能を有するＴ細胞のことである。

【０２８７】

本明細書で使用されるＴ細胞は、アルファベータＴ細胞（例えばＣＤ８またはＣＤ４＋）、ガンマデルタＴ細胞、メモリーＴ細胞、Ｔｒｅｇ細胞などの任意のタイプのＴ細胞を含むリンパ球である。

【０２８８】
好適には、免疫抑制機能とは、病原体、同種抗原、または自己抗原など刺激に応答する免疫系によって促進される生理的な細胞の現象が多数ある内の１つ以上を低減または阻害するＴｒｅｇの能力を表してもよい。かかる現象の例には、通常Ｔ細胞（Ｔｃｏｎ）の増殖の増加、および炎症性サイトカインの分泌などがある。かかる現象はいずれも、免疫応答の強さの指標として使用してもよい。Ｔｒｅｇの存在下でＴｃｏｎｖによる免疫応答が相対的に弱いことは、Ｔｒｅｇの免疫応答を抑制する能力を示すといえる。例えば、サイトカインの分泌が相対的に低下することは、免疫応答の弱まりを示し、したがって、Ｔｒｅｇの免疫応答を抑制する能力を示す。Ｔｒｅｇは、Ｂ細胞、樹状細胞、およびマクロファージなど抗原提示細胞（ＡＰＣ）の共刺激分子の発現を調節することにより、免疫応答を抑制することもできる。ＣＤ８０およびＣＤ８６の発現レベルは、共存培養後のインビトロでの活性化されたＴｒｅｇの抑制能を調査するために使用できる。
【０２８９】
免疫応答の強度の指標を測定し、それによってＴｒｅｇの抑制能を測定するためのアッセイが、当該技術分野で周知である。特に、抗原特異的なＴｃｏｎｖ細胞は、Ｔｒｅｇと共存培養してもよく、対応する抗原のペプチドを上記共存培養に加えてＴｃｏｎｖ細胞からの応答を刺激してもよい。Ｔｃｏｎｖ細胞の増殖の度合い、および／または上記ペプチドの追加に応答してＴｃｏｎｖ細胞が分泌したサイトカインＩＬ－２の量を、共存培養したＴｒｅｇの抑制能の指標として使用してもよい。
【０２９０】
本明細書で言及されるＴｒｅｇと共存培養された抗原特異的なＴｃｏｎｖ細胞の増殖は、Ｔｒｅｇの非存在下で培養された同じＴｃｏｎｖ細胞の増殖と比較して、５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、９０％、９５％、または９９％少なくてもよい。例えば、本Ｔｒｅｇと共存培養された抗原特異的なＴｃｏｎｖ細胞の増殖は、操作されていないＴｒｅｇの存在下で培養された同じＴｃｏｎｖ細胞の増殖と比較して、５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、９０％、９５％、または９９％少なくてもよい。本明細書で定義される核酸、発現構築物、またはベクターを含む細胞、例えば、Ｔｒｅｇは、操作されていないＴｒｅｇと比較して、抑制活性が増加していてもよい（例えば、抑制活性が少なくとも５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、または９０％増加していてもよい）。
【０２９１】
本明細書のＴｒｅｇと共存培養された抗原特異的なＴｃｏｎｖ細胞は、Ｔｒｅｇの非存在下（例えば、操作されていないＴｒｅｇの存在下）で培養された対応するＴｃｏｎｖ細胞と比較して、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、または少なくとも６０％少ないエフェクターサイトカインを発現してもよい。上記エフェクターサイトカインは、ＩＬ－２、ＩＬ－１７、ＴＮＦα、ＧＭ－ＣＳＦ、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－９、ＩＬ－１０、およびＩＬ－１３から選択されてもよい。好適には、上記エフェクターサイトカインは、ＩＬ－２、ＩＬ－１７、ＴＮＦα、ＧＭ－ＣＳＦ、およびＩＦＮ－γから選択されてもよい。
異なる、または異なるレベルの、特定のマーカーを発現し得るＴｒｅｇのいくつかの異なる亜集団が同定されている。Ｔｒｅｇは、一般に、ＣＤ４、ＣＤ２５、およびＦＯＸＰ３というマーカーを発現（$CD4^+CD25^+FOXP3^+$）するＴ細胞である。
【０２９２】
Ｔｒｅｇはまた、ＣＴＬＡ－４（細胞障害性Ｔリンパ球関連分子４）またはＧＩＴＲ（グルココルチコイド誘導ＴＮＦ受容体）を発現する。
【０２９３】
Ｔｒｅｇ細胞は末梢血、リンパ節、および組織に存在し、本明細書で使用されるＴｒｅｇには、胸腺由来の天然のＴｒｅｇ（ｎＴｒｅｇ）細胞と、末梢で生成されたＴｒｅｇと、誘導されたＴｒｅｇ（ｉＴｒｅｇ）細胞とがある。
【０２９４】

細胞表面マーカーＣＤ４およびＣＤ２５を、表面タンパク質ＣＤ１２７の非存在下で、または表面タンパク質ＣＤ１２７の低発現と組み合わせて（$CD4^+CD25^+CD127^-$または$CD4^+CD25^+CD127^{low}$）、使用して、Ｔｒｅｇを同定してもよい。かかるマーカーをＴｒｅｇの同定のために使用することは、当該技術分野において周知であり、例えば、Liu et al（JEM; 2006; 203; 7(10); 1701-1711）に記載されている。

【０２９５】

Ｔｒｅｇは、$CD4^+CD25^+FOXP3^+$ Ｔ細胞、$CD4^+CD25^+CD127^-$ Ｔ細胞、または$CD4^+CD25^+FOXP3^+CD127^{-/low}$ Ｔ細胞であってもよい。

【０２９６】

好適には、Ｔｒｅｇは、天然Ｔｒｅｇ（ｎＴｒｅｇ）であってもよい。本明細書において、「天然Ｔｒｅｇ」という用語は、胸腺由来Ｔｒｅｇという意味である。天然Ｔｒｅｇは、$CD4^+CD25^+FOXP3^+Helios^+$ニューロピリン１$^+$である。ｉＴｒｅｇと比較して、ｎＴｒｅｇは、ＰＤ－１（プログラム細胞死－１、ｐｄｃｄ１）、ニューロピリン１（Ｎｒｐ１）、Ｈｅｌｉｏｓ（Ｉｋｚｆ２）、およびＣＤ７３を高発現する。Ｈｅｌｉｏｓタンパク質またはニューロピリン１（Ｎｒｐ１）の発現にそれぞれ基づいて、ｎＴｒｅｇをｉＴｒｅｇｓから区別してもよい。

【０２９７】

ＴｒｅｇはＴｒｅｇ特異的な脱メチル化領域（ＴＳＤＲ）を有してもよい。ＴＳＤＲは、Ｆｏｘｐ３の発現を制御する、重要なメチル化感受性のあるエレメントである（Polansky, J.K. et al., 2008. European journal of immunology, 38(6), pp. 1654-1663）。

【０２９８】

さらなる好適なＴｒｅｇとしては、Ｔｒ１細胞（Ｆｏｘｐ３を発現せず、ＩＬ－１０を高産生する）、$CD8^+FOXP3^+$ Ｔ細胞、およびγδ$FOXP3^+$ Ｔ細胞が挙げられるが、これらに限定されるわけではない。

【０２９９】

Ｔｒｅｇには、ナイーブＴｒｅｇ（$CD45RA^+FoxP3^{low}$）、エフェクター／メモリーＴｒｅｇ（$CD45RA^-FoxP3^{high}$）、およびサイトカイン産生Ｔｒｅｇ（$CD45RA^-FoxP3^{low}$）など、様々な亜集団が存在することが知られている。「メモリーＴｒｅｇ」とは、ＣＤ４５ＲＯを発現し、$CD45RO^+$であるとみなされるＴｒｅｇである。これらの細胞は、ナイーブＴｒｅｇと比較してＣＤ４５ＲＯのレベルが高く（例えば、ＣＤ４５ＲＯが少なくとも１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、または９０％多い）、好ましくは、ＣＤ４５ＲＡ（ｍＲＮＡおよび／またはタンパク質）を発現しないか、またはナイーブＴｒｅｇと比較してＣＤ４５ＲＡのレベルが低い（例えば、ナイーブＴｒｅｇと比較してＣＤ４５ＲＡが少なくとも８０％、９０％、または９５％少ない）。「サイトカイン産生Ｔｒｅｇ」とは、ＣＤ４５ＲＡ（ｍＲＮＡおよび／またはタンパク質）を発現しないか、またはナイーブＴｒｅｇと比較してＣＤ４５ＲＡのレベルが非常に低く（例えば、ナイーブＴｒｅｇと比較してＣＤ４５ＲＡが少なくとも８０％、９０％、または９５％少ない）、かつ、メモリーＴｒｅｇと比較してＦＯＸＰ３のレベルが低い（例えば、メモリーＴｒｅｇと比較してＦＯＸＰ３が５０％未満、６０％未満、７０％未満、８０％未満、または９０％未満である）Ｔｒｅｇである。サイトカイン産生Ｔｒｅｇは、インターフェロンガンマを産生し得、ナイーブＴｒｅｇと比較してインビトロでの抑制性が低い（例えば、ナイーブＴｒｅｇと比較して抑制性が５０％未満、６０％未満、７０％未満、８０％未満、または９０％未満である）場合がある。本明細書における発現レベルとは、ｍＲＮＡまたはタンパク質の発現を指し得る。特に、ＣＤ４５ＲＡ、ＣＤ２５、ＣＤ４、ＣＤ４５ＲＯなどの細胞表面マーカーについては、発現は、細胞表面発現、すなわち、細胞表面に発現されるマーカータンパク質の量または相対量を指し得る。発現レベルは、当該技術分野における任意の公知の方法によって判定することができる。例えば、ｍＲＮＡ発現レベルは、ノーザンブロッティング／アレイ分析によって判定することができ、タンパク質発現は、ウェスタンブロッティングに

よって、好ましくは細胞表面発現に対する抗体染色を用いたＦＡＣＳによって、判定することができる。

【０３００】

特に、Ｔｒｅｇはナイーブ Ｔｒｅｇであってもよい。本明細書において互換的に使用される「ナイーブ制御性Ｔ細胞、ナイーブＴ制御性細胞、またはナイーブＴｒｅｇ」は、ＣＤ４５ＲＡを発現する（特に、ＣＤ４５ＲＡを細胞表面に発現する）Ｔｒｅｇ細胞を指す。したがって、ナイーブＴｒｅｇはＣＤ４５ＲＡ$^{+}$と記載される。ナイーブＴｒｅｇは、一般に、ペプチド／ＭＨＣによって内因性ＴＣＲを介して活性化されていないＴｒｅｇを表し、一方、エフェクター／メモリーＴｒｅｇは、内因性ＴＣＲを介した刺激によって活性化されたＴｒｅｇに関する。典型的には、ナイーブＴｒｅｇは、ナイーブではないＴｒｅｇ細胞（例えば、メモリーＴｒｅｇ細胞）に比べて、ＣＤ４５ＲＡを少なくとも１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、または９０％多く発現してもよい。別の見方をすると、ナイーブＴｒｅｇ細胞は、非ナイーブＴｒｅｇ細胞（例えば、メモリーＴｒｅｇ細胞）と比較して、ＣＤ４５ＲＡを少なくとも２倍、３倍、４倍、５倍、１０倍、５０倍、または１００倍の量で発現してもよい。ＣＤ４５ＲＡの発現レベルは、当該技術分野の方法、例えば、市販の抗体を用いたフローサイトメトリーによって、容易に判定することができる。典型的に、非ナイーブＴｒｅｇ細胞は、ＣＤ４５ＲＡを発現しないか、またはＣＤ４５ＲＡの発現レベルが低い。

【０３０１】

特に、ナイーブＴｒｅｇは、ＣＤ４５ＲＯを発現しない場合があり、ＣＤ４５ＲＯ$^{-}$とみなされる場合がある。したがって、ナイーブＴｒｅｇは、メモリーＴｒｅｇと比較して、ＣＤ４５ＲＯを少なくとも１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、または９０％少なく発現してもよく、別の見方をすると、メモリーＴｒｅｇ細胞に比べて、ＣＤ４５ＲＯの発現が少なくとも２分の１、３分の１、４分の１、５分の１、１０分の１、５０分の１、または１００分の１であってもよい。

【０３０２】

ナイーブＴｒｅｇは上述したようにＣＤ２５を発現するが、ナイーブＴｒｅｇの起源によっては、ＣＤ２５の発現レベルがメモリーＴｒｅｇにおける発現レベルよりも低い場合がある。例えば、末梢血から単離されたナイーブＴｒｅｇに関しては、ＣＤ２５の発現レベルがメモリーＴｒｅｇよりも少なくとも１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、または９０％低い場合がある。そのようなナイーブＴｒｅｇは、ＣＤ２５の発現が中レベルから低レベルであるとみなされ得る。しかしながら、当業者は、臍帯血から単離されたナイーブＴｒｅｇはこのような差を示さない場合があることを理解するであろう。

【０３０３】

典型的には、本明細書で定義されるナイーブＴｒｅｇは、ＣＤ４$^{+}$、ＣＤ２５$^{+}$、ＦＯＸＰ３$^{+}$、ＣＤ１２７^{low}、ＣＤ４５ＲＡ$^{+}$であり得る。

【０３０４】

本明細書におけるＣＤ１２７の低発現とは、同じ対象またはドナー由来のＣＤ４$^{+}$非制御性またはＴｃｏｎ細胞と比較してＣＤ１２７の発現レベルが低いことをいう。特に、ナイーブＴｒｅｇは、同じ対象またはドナー由来のＣＤ４$^{+}$非制御性またはＴｃｏｎ細胞と比較して、ＣＤ１２７の発現が９０％未満、８０％未満、７０％未満、６０％未満、５０％未満、４０％未満、３０％未満、２０％未満、または１０％未満であってもよい。ＣＤ１２７のレベルは、抗ＣＤ１２７抗体で染色された細胞のフローサイトメトリーをはじめとする当該技術分野で標準的な方法によって評価することができる。

【０３０５】

典型的には、ナイーブＴｒｅｇは、ＣＣＲ４、ＨＬＡ－ＤＲ、ＣＸＣＲ３、および／またはＣＣＲ６を発現しないか、またはその発現レベルが低い。特に、ナイーブＴｒｅｇは、ＣＣＲ４、ＨＬＡ－ＤＲ、ＣＸＣＲ３、およびＣＣＲ６の発現レベルがメモリーＴｒｅｇよりも低い場合があり、例えば、少なくとも１０％、２０％、３０％、４０％、５０％

、６０％、７０％、８０％、または９０％低い発現レベルである場合がある。
【０３０６】
ナイーブＴｒｅｇは、ＣＣＲ７$^{+}$およびＣＤ３１$^{+}$を含む追加のマーカーをさらに発現し得る。
【０３０７】
単離されたナイーブＴｒｅｇは、単離された細胞の細胞表面における上記のマーカーのいずれか１つ以上のパネルの存在の有無を判定する方法をはじめとする当該技術分野で公知の方法によって同定することができる。例えば、ある細胞がナイーブＴｒｅｇであるかどうかを判定するためにＣＤ４５ＲＡ、ＣＤ４、ＣＤ２５、およびＣＤ１２７ｌｏｗを使用することができる。単離された細胞がナイーブＴｒｅｇであるかどうか、または所望の表現型を有するかどうかを判定する方法は、実施され得る追加の工程に関して以下で説明するように実施することができ、細胞マーカーの存在および／または発現レベルを判定するための方法は、当該技術分野で周知であり、例えば、市販の抗体を用いたフローサイトメトリーが挙げられる。
【０３０８】
好適には、Ｔｒｅｇなどの細胞は、対象から得られた末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）から単離される。好適には、ＰＢＭＣが得られる対象は、哺乳動物であり、好ましくはヒトである。好適には、上記細胞は、操作された細胞が投与される対象に適合（例えば、ＨＬＡ適合）しているか、または、対象自身のものである。好適には、治療される対象は、哺乳動物であり、特にヒトである。上記細胞は、患者本人の末梢血（第一者）から、またはドナー末梢血（第二者）由来の造血性幹細胞移植の環境において、または無関係のドナー（第三者）由来の末梢血からのいずれかで、エクスビボ（生体外）で生成されてもよい。好適には、上記細胞は、操作された細胞が投与される対象自身のものである。
【０３０９】
好適には、上記Ｔｒｅｇは、細胞の集団の一部である。好適には、Ｔｒｅｇの集団は、Ｔｒｅｇが少なくとも７０％であり、例えばＴｒｅｇが少なくとも７５％、８５％、９０％、９５％、９７％、９８％、または９９％である。かかる集団を、「富化されたＴｒｅｇ集団」と称してもよい。
【０３１０】
いくつかの態様で、Ｔｒｅｇは、誘導性前駆細胞（例えば、ｉＰＳＣ）または胚性前駆細胞の、Ｔｒｅｇへのエクスビボ分化から由来してもよい。本明細書に記載の核酸分子、構築物、またはベクターは、Ｔｒｅｇへの分化前または分化後に誘導性前駆細胞または胚性前駆細胞へ導入されてもよい。分化のための好適な方法は、当該技術分野で公知であり、Haque et al, J Vis Exp., 2016, 117, 54720（参照により本明細書に援用される）に開示されている方法を含む。別の態様において、組換えタンパク質が、シグナル誘導物質分子の非存在下での二量体化およびシグナル伝達を可能にする改変を有するＥＰＯＲである場合、内因性ＥＰＯＲ核酸が遺伝子編集技術（例えば、ＣＲＩＳＰＲ）によって改変されて本発明の細胞を提供してもよい。
【０３１１】
本明細書における「通常Ｔ細胞」またはＴｃｏｎもしくはＴｃｏｎｖ（本明細書において互換的に使用される）という用語は、αβＴ細胞受容体（ＴＣＲ）と、分化抗原群４（ＣＤ４）または分化抗原群８（ＣＤ８）であってもよい共受容体とを発現し、免疫抑制機能をもたないＴリンパ球細胞を意味する。通常Ｔ細胞は末梢血、リンパ節、および組織に存在する。好適には、操作されたＴｒｅｇは、ＦＯＸＰ３をコードする配列を含む核酸を導入することによってＴｃｏｎから生成されてもよい。あるいは、操作されたＴｒｅｇは、ＩＬ－２およびＴＧＦ－βの存在下でＣＤ４＋ＣＤ２５－ＦＯＸＰ３－細胞のインビトロ培養によってＴｃｏｎから生成されてもよい。
【０３１２】
組換えタンパク質が発現されると、本明細書のＴｒｅｇは、組換えタンパク質を含まないＴｒｅｇ細胞と比較して、持続性が増加し得る。本明細書における「持続性」は、Ｔｒ

ｅｇが特定の環境、例えばインビボ（例えば、ヒト患者または動物モデルの中）で生存できる時間の長さを定義する。本明細書に開示されるＴｒｅｇは、本明細書の組換えタンパク質を発現しないＴｒｅｇと比較して、持続性が少なくとも１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、または９０％増加し得る。持続性は、例えば、本発明の組換えタンパク質を発現する細胞を、組換えタンパク質を発現しない同等の細胞タイプと比較するか、操作されていない細胞と比較するかして、経時的に対象または患者内の投与細胞の量または数を特定することによって測定することができる。マーカータンパク質、例えば、ＲＱＲ８安全性スイッチも発現する細胞の場合にはＣＤ３４を用いて、投与細胞を追跡することが可能である。

【０３１３】

別の実施形態では、核酸分子、構築物、またはベクターが導入される標的細胞は、治療を目的とした細胞ではない。一実施形態では、細胞は、産生宿主細胞である。細胞は、核酸の産生、例えばクローニング用、またはベクターの産生用、またはポリペプチドの産生用であってもよい。

【０３１４】

本明細書で定義または記載される細胞を含む細胞集団もまた本明細書において提供される。細胞集団は、本明細書で定義される核酸分子、構築物、またはベクターを含む本細胞と、核酸分子、構築物、またはベクターを含まない細胞、例えば非形質導入細胞または非遺伝子導入細胞との両方を含んでもよいことが理解されるであろう。特定の実施形態では、集団中の全ての細胞が核酸、発現構築物、またはベクターを含んでもよいが、核酸、発現構築物、またはベクターを含む細胞が少なくとも１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、または９９％である細胞集団が提供される。

【０３１５】

本明細書で定義または記載される細胞または細胞集団、本明細書で定義されるベクターを含む医薬組成物も提供される。ベクターは、遺伝子治療に使用することができる。したがって、細胞を投与するのではなく、ベクターを投与し、導入された核酸分子を発現するように対象中の内因性細胞を改変してもよい。遺伝子治療における使用に適したベクターは、当該技術分野で公知であり、ウイルスベクターが含まれる。

【０３１６】

医薬組成物は、治療上有効量の医薬的に活性な薬剤、すなわち上記細胞（例えば、Ｔｒｅｇ）、細胞集団、もしくはベクターを含むかまたはそれからなる組成物である。好ましくは、医薬組成物は、薬学的に許容される担体、希釈剤、または賦形剤（それらの組み合わせを含む）を含む。治療目的の使用のために許容される担体または希釈剤は、薬学的技術分野で周知であり、例えばRemington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co.（A. R. Gennaro編、1985）に記載されている。薬学的担体、賦形剤、または希釈剤の選択は、意図する投与経路と標準的な薬務とを考慮して選択できる。上記医薬組成物は、担体、賦形剤、または希釈剤として、またはそれらに加えて、適した結合剤、滑剤、懸濁化剤、コーティング剤、または可溶化剤を含んでもよい。

【０３１７】

「薬学的に許容される」とは、製剤が滅菌済であり、発熱物質（pyrogen）を含まないという意味を含む。担体、希釈剤および／または賦形剤は、上記細胞またはベクターと親和性があり、レシピエントに対して有害ではないという意味において、「許容可能」でなければならない。典型的には、担体、希釈剤および／または賦形剤は、滅菌済であり、発熱物質を含まない生理的媒体または輸液媒体であるが、他の許容可能な担体、希釈剤、賦形剤を用いてもよい。

【０３１８】

薬学的に許容される担体の例としては、例えば、水、塩類溶液、アルコール、シリコーン、蝋、ワセリン、植物油、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、リポソーム、糖、ゼラチン、ラクトース、アミロース、ステアリン酸マグネシウム、タルク、界面

活性剤、珪酸、粘性パラフィン、香油、脂肪酸モノグリセリド、脂肪酸ジグリセリド、ペトロエスラル脂肪酸エステル、ヒドロキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドンなどがある。

【０３１９】

上記細胞、細胞集団、または医薬組成物は、所望の疾患または状態の治療および／または予防に適した方法で投与することができる。投与量および投与頻度は、対象の状態ならびに対象の疾患または状態の種類および重症度などの要因によって決定されるが、適切な投与量は、臨床試験によって決定されてもよい。上記医薬組成物は、それに応じて製剤化され得る。

【０３２０】

本明細書に記載の細胞、細胞集団、または医薬組成物は、非経口投与、例えば静脈内投与でき、または輸液技術により投与してもよい。上記細胞、細胞集団、または医薬組成物は、血液と等張にするために、例えば十分な塩類やグルコースなど、他の物質を含んだ滅菌済水溶液の形態で投与してもよい。上記水溶液は、好適には緩衝してもよい（好ましくはｐＨ３～９）。上記医薬組成物は、それに応じて製剤化され得る。滅菌条件のもとでの好適な非経口製剤の調製は、当業者に周知の標準的な薬学的技術によって容易に成しえる。

【０３２１】

上記医薬組成物は、輸液媒体、例えば滅菌済等張溶液中に細胞を含んでもよい。上記医薬組成物は、ガラスまたはプラスチック製の、アンプル、使い捨て注射器、または複数回投与バイアルに封入してもよい。

【０３２２】

上記細胞、細胞集団、または医薬組成物は、単回または複数回で投与されてもよい。特に、上記細胞、細胞集団、または医薬組成物は、単回の使い切りで投与されてもよい。上記医薬組成物は、それに応じて製剤化され得る。

【０３２３】

上記医薬組成物は、さらに、１つ以上の活性な薬剤を含んでもよい。上記医薬組成物はさらに、リンパ球枯渇剤（例えば、サイモグロブリン、ｃａｍｐａｔｈ－１Ｈ、抗ＣＤ２抗体、抗ＣＤ３抗体、抗ＣＤ２０抗体、シクロホスファミド、フルダラビン）、ｍＴＯＲ阻害剤（例えば、シロリムス、エベロリムス）、共刺激経路を阻害する薬剤（例えば、抗ＣＤ４０／ＣＤ４０Ｌ、ＣＴＡＬ４Ｉｇ）、および／または特異的なサイトカイン（ＩＬ－６、ＩＬ－１７、ＴＮＦアルファ、ＩＬ１８）を阻害する薬剤などの、１つ以上の他の治療薬を含んでいてもよい。

【０３２４】

治療する疾患／状態や対象、投与経路によって、上記細胞、細胞集団、または医薬組成物が様々な投与量（例えば、細胞数／ｋｇ、または細胞数／対象、などで測定）で投与されてもよい。いずれにしても、医師が個体対象にとって最も適した実際の投与量を判定するものであり、それはその対象の年齢、体重、および反応に応じて変わるであろう。しかしながら典型的には、本明細書の細胞については、投与量として一個の対象につき５ｘ１０^{7}～３ｘ１０^{9}個の細胞、または１０^{8}～２ｘ１０^{9}個の細胞が投与されてもよい。

【０３２５】

上記細胞は、医薬組成物に使用するために適切に変更されてもよい。例えば、細胞は、対象に注入される前に、凍結保存されて適切な時間に解凍されてもよい。

【０３２６】

本明細書の細胞、細胞集団、および／もしくは医薬組成物を含むキットまたは組み合わせ製品の使用が、本明細書においてさらに提供される。好ましくは、当該キットは、本明細書に記載の上記方法および使用、例えば、本明細書に記載の治療方法に用いられるためのものである。好ましくは、当該キットは、キットの構成要素の使用についての指示書を含む。キットまたは組成物は、誘導物質、例えばラパマイシンまたはその類似体をさらに含んでもよい。

【０３２７】
本明細書の細胞、細胞集団、組成物、およびベクターは、治療法、すなわち疾患または状態の治療または予防に使用するためのものであってもよい。上記のように、組換えタンパク質が発現される細胞は、典型的には、さらなる分子（例えば、さらなるタンパク質）、特に受容体、例えばＣＡＲまたはＴＣＲを発現するように改変または操作された細胞である。したがって、上記治療法は、受容体、例えばＣＡＲを発現する細胞によって、またはそれを用いて、治療され得る疾患または状態の予防または治療のためのものであってもよい。上記細胞および上記細胞を含有する組成物は、養子細胞療法（ＡＣＴ）のためのものである。本開示によるＣＡＲを発現する細胞（特にＴｒｅｇ細胞を含む）の投与によって様々な状態が治療され得る。上記のように、これは、免疫抑制、特に、Ｔｒｅｇ細胞の免疫抑制効果に応答する状態であってもよい。したがって、本明細書に記載の細胞、細胞集団、組成物、およびベクターは、対象において免疫抑制を誘導または達成するために使用されてもよい。投与されるＴｒｅｇ細胞、またはインビボで改変されるＴｒｅｇ細胞は、受容体、例えばＣＡＲの発現によって標的化され得る。このような治療に適した状態としては、感染性疾患、神経変性疾患、もしくは炎症性疾患、またはより広範には、あらゆる望まれないもしくは不要なもしくは有害な免疫応答に関連する状態が挙げられる。

【０３２８】
治療または予防される状態としては、炎症、あるいは、炎症に関連するかまたは炎症を伴う状態が挙げられる。炎症は、慢性であっても急性であってもよい。さらに、炎症は、低レベルの炎症であっても全身性の炎症であってもよい。例えば、炎症は、代謝障害、例えばメタボリックシンドロームの状況下、またはインスリン抵抗性、ＩＩ型糖尿病、もしくは肥満などの状況下で起こる炎症であり得る。

【０３２９】
特に、上記細胞、細胞集団、ベクター、および医薬組成物は、移植に対する寛容を誘導するための手段；細胞性および／または体液性移植拒絶反応を治療および／または予防するための手段；移植片対宿主病（ＧｖＨＤ）、自己免疫疾患、またはアレルギー疾患を治療および／または予防するための手段；組織修復および／または組織再生を促進するための手段；あるいは、炎症を改善するための手段を提供する。上記細胞、細胞集団、ベクター、および医薬組成物は、本明細書に記載の細胞、細胞集団、ベクター、または医薬組成物を対象に投与する工程を含む方法において使用することができる。

【０３３０】
本明細書において、「移植に対する寛容を誘導する」とは、レシピエントに移植された臓器への寛容を誘導することをいう。換言すれば、移植に対する寛容を誘導するとは、ドナー移植臓器に対するレシピエントの免疫応答のレベルを下げることを意味する。移植臓器に対する寛容を誘導することで、移植レシピエントが必要とする免疫抑制剤の量を減らすか、または、免疫抑制剤の中断を可能にしてもよい。

【０３３１】
例えば、操作された細胞、例えばＴｒｅｇは、黄疸、暗色尿、かゆみ、腹部膨満もしくは腹部圧痛、倦怠、吐き気もしくは嘔吐、および／または食欲不振などの、疾患の少なくとも１つの症状を軽減、低減、または改善するために、疾患を有する対象に投与されてもよい。上記少なくとも１つの症状は、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、または少なくとも５０％軽減、低減、または改善され得、あるいは、上記少なくとも１つの症状は、完全に緩和され得る。

【０３３２】
操作された細胞、例えばＴｒｅｇは、疾患の進行を遅延させるか、低減させるか、または妨げるために、疾患を有する対象に投与されてもよい。疾患の進行は、操作された細胞の投与を受けない対象と比較して、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、または少なくとも５０％遅延されるか、低減されるか、または妨げられ得、あるいは、疾患の進行は、完全に停止され得る。

【０３３３】

一実施形態において、対象は免疫抑制治療を受けている移植レシピエントである。

【０３３４】

好適には、対象は哺乳動物である。好適には、対象はヒトである。

【０３３５】

移植は、肝臓移植、腎臓移植、心臓移植、肺移植、膵臓移植、腸移植、胃移植、骨髄移植、血管柄付複合組織移植、および皮膚移植から選択され得る。

【０３３６】

好適には、細胞は、移植（graft/transplant）ドナーに存在するが、移植（graft/transplant）レシピエントには存在しないＨＬＡ抗原と特異的に結合できる抗原結合ドメインを含むＣＡＲを発現し得る。

【０３３７】

好適には、移植は肝臓移植である。移植が肝臓移植である実施形態において、抗原としては、移植された臓器に存在するが患者には存在しないＨＬＡ抗原や、ＮＴＣＰなど肝臓特異的な抗原、または、拒絶の間に発現が増加する抗原、たとえばＣＣＬ１９、ＭＭＰ９、ＳＬＣ１Ａ３、ＭＭＰ７、ＨＭＭＲ、ＴＯＰ２Ａ、ＧＰＮＭＢ、ＰＬＡ２Ｇ７、ＣＸＣＬ９、ＦＡＢＰ５、ＧＢＰ２、ＣＤ７４、ＣＸＣＬ１０、ＵＢＤ、ＣＤ２７、ＣＤ４８、ＣＸＣＬ１１などが挙げられる。

【０３３８】

上述したように、代表的な好ましい一実施形態において、抗原はＨＬＡ－Ａ２である。

【０３３９】

疾患または状態を治療するための方法は、本明細書における細胞の、治療目的の使用に関する。この点において、疾患または状態に関連する少なくとも１つの症状を軽減、低減、または改善するために、かつ／あるいは疾患の進行を遅延させるか、低減させるか、または妨げるために、既存の疾患または病状を有する対象に上記細胞を投与してもよい。

【０３４０】

好適には、細胞性および／または体液性移植拒絶反応を治療および／または予防するとは、移植レシピエントが必要とする免疫抑制剤の量が減少するように有効量の細胞（例えば、Ｔｒｅｇ）を投与することを指してもよく、免疫抑制剤の中断を可能にすることであってもよい。

【０３４１】

疾患または状態を予防することは、本明細書における細胞の予防目的の使用に関する。この点において、疾患または状態を予防するために、あるいは疾患または状態に関連する少なくとも１つの症状の発症を低減または予防するために、疾患または状態にまだ罹患していないかまたは発症していない、かつ／あるいは疾患または状態の症状を示していない対象に上記細胞を投与してもよい。対象は、上記疾患または状態にかかりやすい体質であってもよく、上記疾患または状態を発症する危険性があると考えられるものであってもよい。

【０３４２】

自己免疫疾患またはアレルギー疾患は、乾癬や皮膚炎（例えば、アトピー性皮膚炎）などの炎症性皮膚疾患；炎症性腸疾患（クローン病、潰瘍性大腸炎など）に関連する応答；皮膚炎；食物アレルギー、湿疹、喘息などのアレルギー状態；関節リウマチ；全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）（ループス腎炎、皮膚ループスを含む）；真性糖尿病（例えば、Ｉ型真性糖尿病や、インスリン依存性糖尿病）；多発性硬化症；神経変性疾患、例えば、筋萎縮性側索硬化症（ＡＬＳ）；慢性炎症性脱髄性多発神経炎（ＣＩＰＤ）；および若年型糖尿病から選択され得る。

上記に示したように、組換えタンパク質は、免疫抑制療法の状況下での使用に限定されず、癌または感染症などの状態の治療のためにこのタンパク質を細胞において発現させてもよい。このような状況下では、癌細胞または感染細胞を死滅させるかまたは除去（ablate）することが望ましい場合があり、そのような場合には、キメラタンパク質を、細胞傷害性Ｔ細胞もしくはＮＫ細胞などの細胞傷害性細胞、またはその前駆体において発現さ

せてもよい。そのような場合にキメラタンパク質と共発現される受容体（例えば、ＣＡＲまたはＴＣＲ）は、癌抗原、または病原体などに由来する抗原に対して向けられてもよい。

【０３４３】

本明細書における医療上の使用または方法は、以下の工程を含み得る。

（ｉ）細胞含有サンプルを単離する、または細胞含有サンプルを用意する工程、

（ｉｉ）本明細書で定義される核酸分子、構築物、またはベクターを細胞に導入する工程、および

（ｉｉｉ）（ｉｉ）で得られた細胞を対象に投与する工程。

上記細胞は、本明細書で定義されるＴｒｅｇであってもよい。上記方法の工程（ｉｉ）の前および／または後に、富化されたＴｒｅｇ集団を細胞含有サンプルから単離および／または生成してもよい。例えば、富化されたＴｒｅｇサンプルを単離および／または生成するために、工程（ｉｉ）の前および／または後に単離および／または生成を行ってもよい。本明細書に記載の組換えタンパク質、核酸分子、構築物、および／またはベクターを含む細胞および／またはＴｒｅｇについて富化を行うために、工程（ｉｉ）の後に富化を行ってもよい。

【０３４４】

好適には、上記細胞は、自家細胞である。好適には、上記細胞は、同種細胞である。

【０３４５】

好適には、細胞（例えば、操作されたＴｒｅｇ）は、リンパ球枯渇剤などの１つ以上の他の治療薬と組み合わせて投与され得る。操作された細胞、例えばＴｒｅｇは、上記１つ以上の他の治療薬と同時にまたは逐次的に（すなわち、上記１つ以上の他の治療薬の前後に）投与されてもよい。

【０３４６】

本明細書に記載の核酸分子の導入前または導入後に、例えば、抗ＣＤ３モノクローナル抗体での処理により、または抗ＣＤ３モノクローナル抗体と抗ＣＤ２８モノクローナル抗体の両方での処理により、細胞、例えばＴｒｅｇを活性化および／または増殖させてもよい。増殖プロトロルは上述の通りである。

【０３４７】

上記方法の各工程後、特に増殖後に、細胞、例えばＴｒｅｇを洗浄してもよい。

【０３４８】

操作された細胞、例えばＴｒｅｇ細胞の集団は、当業者に周知のいずれかの方法によって、例えばＦＡＣＳまたは磁性ビーズ分離によって、さらに富化されてもよい。

【０３４９】

作製方法の工程は、閉鎖された無菌の細胞培養系で行われてもよい。

【０３５０】

本発明はまた、本明細書で提供される核酸分子、発現構築物、またはベクターを細胞に導入する工程を含む、細胞の安定性および／または抑制機能を増加させるための方法を提供し得る。抑制機能の増加は、上述したように、例えば、活性化された抗原特異的Ｔｃｏｎｖ細胞を本発明の細胞と共存培養し、例えば、Ｔｃｏｎｖ細胞によって産生されるサイトカインのレベルを測定することによって、測定することができる。抑制機能の増加は、操作されていないＴｒｅｇと比較して、少なくとも１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、または９０％の増加であり得る。

【０３５１】

本明細書で定義される細胞、例えばＴｒｅｇの安定性の増加とは、操作されていないＴｒｅｇと比較した場合の、それらの細胞の持続性もしくは生存の増加、または、ある期間にわたってＴｒｅｇ表現型を保持する細胞の割合（例えば、ＦＯＸＰ３やＨｅｌｉｏｓなどのＴｒｅｇマーカーを保持する細胞に対する）の増加をいう。安定性の増加は、少なくとも１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、または９０％の安定性の増加であり得、当該技術分野で公知の技術、例えば、細胞集団内のＴｒｅｇ細

胞マーカーの染色とＦＡＣＳによる解析によって測定することができる。

【０３５２】

本明細書で提供されるさらなる態様は、治療法、特にＡＣＴまたは遺伝子治療に使用するための、（ａ）本明細書で定義される細胞、細胞集団、ベクター、または医薬組成物と（ｂ）ＥＰＯと、を含む組み合わせ製品である。治療法は、上記で定義され本明細書中でさらに記載される任意の治療法であり得る。

【０３５３】

上記組み合わせ製品の各成分（ａ）および（ｂ）は、別々に、逐次的に、または同時に使用するためのものであってもよい。

【０３５４】

上記組み合わせ製品の各成分（ａ）および（ｂ）は、典型的には、別々の組成物として提供される。すなわち、別々に製剤化される。したがって、組み合わせ製品は、キットと定義または呼称されてもよい。

【０３５５】

この開示は、本明細書に開示する上記例示の方法や材料によって制限されず、本明細書に記載された方法や材料と類似の、または等価の方法や材料を、この開示の実施形態の実施や試験に使用できる。数の範囲は、その範囲を定義する数を含む。特に断らない限り、核酸配列は左から右へ、５’から３’の方向に、アミノ酸配列は左から右へ、アミノからカルボキシの方向にそれぞれ書く。

【０３５６】

値の範囲が提供されている場合、文脈において明確に別段の指示がない限り下限値の単位の１０分の１まで（to the tenth of the unit of the lower limit）、その範囲の上限値と下限値の間に介在する各値もまた特に開示されていると理解されたい。記載された範囲内のいずれかの記載された値または介在値と、当該記載された範囲内のいずれかの別の記載された値または介在値との間の、より狭い範囲の各々も、この開示に包含される。これらのより狭い範囲の上限値および下限値は、独立して、その範囲に含まれてもよく、または除外されてもよく、境界値のどちらかがより狭い範囲に含まれる場合、境界値のどちらも含まれない場合、またはどちらも含まれる場合の各範囲も本開示に包含される。但し、明確に除外された境界値が示された範囲内にある場合はその限りではない。示された範囲が境界値の一方または両方を含む場合、含まれる境界値のいずれかまたは両方を除外する範囲も本開示に含まれる。

【０３５７】

本明細書および添付の特許請求の範囲で用いられているように、単数形「ａ」、「ａｎ」、および「ｔｈｅ」は、文脈において明確に別段の指示がない限り、複数の指示対象を含むことに留意されたい。

【０３５８】

本明細書における「ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ（含む）」、「ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ（含む）」および「ｃｏｍｐｒｉｓｅｄ　ｏｆ（含む）」という用語は、「ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ（含む）」、「ｉｎｃｌｕｄｅｓ（含む）」、または「ｃｏｎｔａｉｎｉｎｇ（含有する）」、「ｃｏｎｔａｉｎｓ（含有する）」の同義語で、包括的または非限定的であり、記載されていない追加の部材や要素、方法の工程を除外するものではない。「ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ（含む）」、「ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ（含む）」および「ｃｏｍｐｒｉｓｅｄ　ｏｆ（含む）」という用語はまた、「ｃｏｎｓｉｓｔｉｎｇ　ｏｆ（からなる）」という用語も含む。

【０３５９】

本明細書で論じられる刊行物は、本願の出願日の前の開示を単に提供する。本明細書のいずれの記載も、かかる刊行物が添付の特許請求の範囲に対する先行技術を構成していると認めるものとして解釈されはしない。本明細書で言及される全ての刊行物は、参照により本明細書に援用される。

配列表

配列番号１（野生型ヒトＥＰＯＲ）
ＭＤＨＬＧＡＳＬＷＰＱＶＧＳＬＣＬＬＬＡＧＡＡＷＡＰＰＰＮＬＰＤＰＫＦＥＳＫＡＡ
ＬＬＡＡＲＧＰＥＥＬＬＣＦＴＥＲＬＥＤＬＶＣＦＷＥＥＡＡＳＡＧＶＧＰＧＮＹＳＦＳ
ＹＱＬＥＤＥＰＷＫＬＣＲＬＨＱＡＰＴＡＲＧＡＶＲＦＷＣＳＬＰＴＡＤＴＳＳＦＶＰＬ
ＥＬＲＶＴＡＡＳＧＡＰＲＹＨＲＶＩＨＩＮＥＶＶＬＬＤＡＰＶＧＬＶＡＲＬＡＤＥＳＧ
ＨＶＶＬＲＷＬＰＰＰＥＴＰＭＴＳＨＩＲＹＥＶＤＶＳＡＧＮＧＡＧＳＶＱＲＶＥＩＬＥ
ＧＲＴＥＣＶＬＳＮＬＲＧＲＴＲＹＴＦＡＶＲＡＲＭＡＥＰＳＦＧＧＦＷＳＡＷＳＥＰＶ
ＳＬＬＴＰＳＤＬＤＰＬＩＬＴＬＳＬＩＬＶＶＩＬＶＬＬＴＶＬＡＬＬＳＨＲＲＡＬＫＱ
ＫＩＷＰＧＩＰＳＰＥＳＥＦＥＧＬＦＴＴＨＫＧＮＦＱＬＷＬＹＱＮＤＧＣＬＷＷＳＰＣ
ＴＰＦＴＥＤＰＰＡＳＬＥＶＬＳＥＲＣＷＧＴＭＱＡＶＥＰＧＴＤＤＥＧＰＬＬＥＰＶＧ
ＳＥＨＡＱＤＴＹＬＶＬＤＫＷＬＬＰＲＮＰＰＳＥＤＬＰＧＰＧＧＳＶＤＩＶＡＭＤＥＧ
ＳＥＡＳＳＣＳＳＡＬＡＳＫＰＳＰＥＧＡＳＡＡＳＦＥＹＴＩＬＤＰＳＳＱＬＬＲＰＷＴ
ＬＣＰＥＬＰＰＴＰＰＨＬＫＹＬＹＬＶＶＳＤＳＧＩＳＴＤＹＳＳＧＤＳＱＧＡＱＧＧＬ
ＳＤＧＰＹＳＮＰＹＥＮＳＬＩＰＡＡＥＰＬＰＰＳＹＶＡＣＳ
配列番号２（シグナルペプチドを含まないＲ１３０Ｃ改変ヒトＥＰＯＲ細胞外領域）
ＡＰＰＰＮＬＰＤＰＫＦＥＳＫＡＡＬＬＡＡＲＧＰＥＥＬＬＣＦＴＥＲＬＥＤＬＶＣＦＷ
ＥＥＡＡＳＡＧＶＧＰＧＮＹＳＦＳＹＱＬＥ
ＤＥＰＷＫＬＣＲＬＨＱＡＰＴＡＲＧＡＶＲＦＷＣＳＬＰＴＡＤＴＳＳＦＶＰＬＥＬＲＶ
ＴＡＡＳＧＡＰＲＹＨＲＶＩＨＩＮＥＶＶＬ
ＬＤＡＰＶＧＬＶＡＣＬＡＤＥＳＧＨＶＶＬＲＷＬＰＰＰＥＴＰＭＴＳＨＩＲＹＥＶＤＶ
ＳＡＧＮＧＡＧＳＶＱＲＶＥＩＬＥＧＲＴＥ
ＣＶＬＳＮＬＲＧＲＴＲＹＴＦＡＶＲＡＲＭＡＥＰＳＦＧＧＦＷＳＡＷＳＥＰＶＳＬＬＴ
ＰＳＤＬＤＰ
配列番号３（シグナルペプチドを含まない野生型ヒトＥＰＯＲ細胞外領域）
ＡＰＰＰＮＬＰＤＰＫＦＥＳＫＡＡＬＬＡＡＲＧＰＥＥＬＬＣＦＴＥＲＬＥＤＬＶＣＦＷ
ＥＥＡＡＳＡＧＶＧＰＧＮＹＳＦＳＹＱＬＥ
ＤＥＰＷＫＬＣＲＬＨＱＡＰＴＡＲＧＡＶＲＦＷＣＳＬＰＴＡＤＴＳＳＦＶＰＬＥＬＲＶ
ＴＡＡＳＧＡＰＲＹＨＲＶＩＨＩＮＥＶＶＬ
ＬＤＡＰＶＧＬＶＡＲＬＡＤＥＳＧＨＶＶＬＲＷＬＰＰＰＥＴＰＭＴＳＨＩＲＹＥＶＤＶ
ＳＡＧＮＧＡＧＳＶＱＲＶＥＩＬＥＧＲＴＥ
ＣＶＬＳＮＬＲＧＲＴＲＹＴＦＡＶＲＡＲＭＡＥＰＳＦＧＧＦＷＳＡＷＳＥＰＶＳＬＬＴ
ＰＳＤＬＤＰ
配列番号４（シグナルペプチドを含むＲ１５４Ｃ改変ヒトＥＰＯＲ細胞外領域）
ＭＤＨＬＧＡＳＬＷＰＱＶＧＳＬＣＬＬＬＡＧＡＡＷＡＰＰＰＮＬＰＤＰＫＦＥＳＫＡＡ
ＬＬＡＡＲＧＰＥＥＬＬＣＦＴＥＲＬＥＤＬＶＣＦＷＥＥＡＡＳＡＧＶＧＰＧＮＹＳＦＳ
ＹＱＬＥＤＥＰＷＫＬＣＲＬＨＱＡＰＴＡＲＧＡＶＲＦＷＣＳＬＰＴＡＤＴＳＳＦＶＰＬ
ＥＬＲＶＴＡＡＳＧＡＰＲＹＨＲＶＩＨＩＮＥＶＶＬＬＤＡＰＶＧＬＶＡＣＬＡＤＥＳＧ
ＨＶＶＬＲＷＬＰＰＰＥＴＰＭＴＳＨＩＲＹＥＶＤＶＳＡＧＮＧＡＧＳＶＱＲＶＥＩＬＥ
ＧＲＴＥＣＶＬＳＮＬＲＧＲＴＲＹＴＦＡＶＲＡＲＭＡＥＰＳＦＧＧＦＷＳＡＷＳＥＰＶ
ＳＬＬＴＰＳＤＬＤＰ
配列番号５（シグナルペプチドを含まない野生型ヒトＥＰＯＲ細胞外領域）
ＭＤＨＬＧＡＳＬＷＰＱＶＧＳＬＣＬＬＬＡＧＡＡＷＡＰＰＰＮＬＰＤＰＫＦＥＳＫＡＡ
ＬＬＡＡＲＧＰＥＥＬＬＣＦＴＥＲＬＥＤＬＶＣＦＷＥＥＡＡＳＡＧＶＧＰＧＮＹＳＦＳ
ＹＱＬＥＤＥＰＷＫＬＣＲＬＨＱＡＰＴＡＲＧＡＶＲＦＷＣＳＬＰＴＡＤＴＳＳＦＶＰＬ
ＥＬＲＶＴＡＡＳＧＡＰＲＹＨＲＶＩＨＩＮＥＶＶＬＬＤＡＰＶＧＬＶＡＲＬＡＤＥＳＧ
ＨＶＶＬＲＷＬＰＰＰＥＴＰＭＴＳＨＩＲＹＥＶＤＶＳＡＧＮＧＡＧＳＶＱＲＶＥＩＬＥ
ＧＲＴＥＣＶＬＳＮＬＲＧＲＴＲＹＴＦＡＶＲＡＲＭＡＥＰＳＦＧＧＦＷＳＡＷＳＥＰＶ
ＳＬＬＴＰＳＤＬＤＰ
配列番号６（野生型ヒトＥＰＯＲシグナルペプチド）
ＭＤＨＬＧＡＳＬＷＰＱＶＧＳＬＣＬＬＬＡＧＡＡＷ

配列番号７（野生型ヒトＥＰＯＲ膜貫通ドメイン）
ＬＩＬＴＬＳＬＩＬＶＶＩＬＶＬＬＴＶＬＡＬＬＳ
配列番号８（野生型ヒトＥＰＯＲ細胞質ドメイン）
ＨＲＲＡＬＫＱＫＩＷＰＧＩＰＳＰＥＳＥＦＥＧＬＦＴＴＨＫＧＮＦＱＬＷＬＹＱＮＤＧ
ＣＬＷＷＳＰＣＴＰＦＴＥＤＰＰＡＳＬＥＶ
ＬＳＥＲＣＷＧＴＭＱＡＶＥＰＧＴＤＤＥＧＰＬＬＥＰＶＧＳＥＨＡＱＤＴＹＬＶＬＤＫ
ＷＬＬＰＲＮＰＰＳＥＤＬＰＧＰＧＧＳＶＤＩＶＡＭＤＥＧＳＥＡＳＳＣＳＳＡＬＡＳＫ
ＰＳＰＥＧＡＳＡＡＳＦＥＹＴＩＬＤＰＳＳＱＬＬＲＰＷＴＬＣＰＥＬＰＰＴＰＰＨＬＫ
ＹＬＹＬＶＶＳＤＳＧＩＳＴＤＹＳＳＧＤＳＱＧＡＱＧＧＬＳＤＧＰＹＳＮＰＹＥＮＳＬ
ＩＰＡＡＥＰＬＰＰＳＹＶＡＣＳ
配列番号９（野生型マウスＥＰＯＲ）
ＭＤＫＬＲＶＰＬＷＰＲＶＧＰＬＣＬＬＬＡＧＡＡＷＡＰＳＰＳＬＰＤＰＫＦＥＳＫＡＡ
ＬＬＡＳＲＧＳＥＥＬＬＣＦＴＱＲＬＥＤＬＶＣＦＷＥＥＡＡＳＳＧＭＤＦＮＹＳＦＳＹ
ＱＬＥＧＥＳＲＫＳＣＳＬＨＱＡＰＴＶＲＧＳＶＲＦＷＣＳＬＰＴＡＤＴＳＳＦＶＰＬＥ
ＬＱＶＴＥＡＳＧＳＰＲＹＨＲＩＩＨＩＮＥＶＶＬＬＤＡＰＡＧＬＬＡＲＲＡＥＥＧＳＨ
ＶＶＬＲＷＬＰＰＰＧＡＰＭＴＴＨＩＲＹＥＶＤＶＳＡＧＮＲＡＧＧＴＱＲＶＥＶＬＥＧ
ＲＴＥＣＶＬＳＮＬＲＧＧＴＲＹＴＦＡＶＲＡＲＭＡＥＰＳＦＳＧＦＷＳＡＷＳＥＰＡＳ
ＬＬＴＡＳＤＬＤＰＬＩＬＴＬＳＬＩＬＶＬＩＳＬＬＬＴＶＬＡＬＬＳＨＲＲＴＬＱＱＫ
ＩＷＰＧＩＰＳＰＥＳＥＦＥＧＬＦＴＴＨＫＧＮＦＱＬＷＬＬＱＲＤＧＣＬＷＷＳＰＧＳ
ＳＦＰＥＤＰＰＡＨＬＥＶＬＳＥＰＲＷＡＶＴＱＡＧＤＰＧＡＤＤＥＧＰＬＬＥＰＶＧＳ
ＥＨＡＱＤＴＹＬＶＬＤＫＷＬＬＰＲＴＰＣＳＥＮＬＳＧＰＧＧＳＶＤＰＶＴＭＤＥＡＳ
ＥＴＳＳＣＰＳＤＬＡＳＫＰＲＰＥＧＴＳＰＳＳＦＥＹＴＩＬＤＰＳＳＱＬＬＣＰＲＡＬ
ＰＰＥＬＰＰＴＰＰＨＬＫＹＬＹＬＶＶＳＤＳＧＩＳＴＤＹＳＳＧＧＳＱＧＶＨＧＤＳＳ
ＤＧＰＹＳＨＰＹＥＮＳＬＶＰＤＳＥＰＬＨＰＧＹＶＡＣＳ
配列番号１０（シグナルペプチドを含むＲ１２９Ｃ改変マウスＥＰＯＲ細胞外領域
ＭＤＫＬＲＶＰＬＷＰＲＶＧＰＬＣＬＬＬＡＧＡＡＷＡＰＳＰＳＬＰＤＰＫＦＥＳＫＡＡ
ＬＬＡＳＲＧＳＥＥＬＬＣＦＴＱＲＬＥＤＬＶＣＦＷＥＥＡＡＳＳＧＭＤＦＮＹＳＦＳＹ
ＱＬＥＧＥＳＲＫＳＣＳＬＨＱＡＰＴＶＲＧＳＶＲＦＷＣＳＬＰＴＡＤＴＳＳＦＶＰＬＥ
ＬＱＶＴＥＡＳＧＳＰＲＹＨＲＩＩＨＩＮＥＶＶＬＬＤＡＰＡＧＬＬＡＣＲＡＥＥＧＳＨ
ＶＶＬＲＷＬＰＰＰＧＡＰＭＴＴＨＩＲＹＥＶＤＶＳＡＧＮＲＡＧＧＴＱＲＶＥＶＬＥＧ
ＲＴＥＣＶＬＳＮＬＲＧＧＴＲＹＴＦＡＶＲＡＲＭＡＥＰＳＦＳＧＦＷＳＡＷＳＥＰＡＳ
ＬＬＴＡＳＤＬＤＰ
配列番号１１（シグナルペプチドを含む野生型マウスＥＰＯＲ細胞外領域）
ＭＤＫＬＲＶＰＬＷＰＲＶＧＰＬＣＬＬＬＡＧＡＡＷＡＰＳＰＳＬＰＤＰＫＦＥＳＫＡＡ
ＬＬＡＳＲＧＳＥＥＬＬＣＦＴＱＲＬＥＤＬＶＣＦＷＥＥＡＡＳＳＧＭＤＦＮＹＳＦＳＹ
ＱＬＥＧＥＳＲＫＳＣＳＬＨＱＡＰＴＶＲＧＳＶＲＦＷＣＳＬＰＴＡＤＴＳＳＦＶＰＬＥ
ＬＱＶＴＥＡＳＧＳＰＲＹＨＲＩＩＨＩＮＥＶＶＬＬＤＡＰＡＧＬＬＡＲＲＡＥＥＧＳＨ
ＶＶＬＲＷＬＰＰＰＧＡＰＭＴＴＨＩＲＹＥＶＤＶＳＡＧＮＲＡＧＧＴＱＲＶＥＶＬＥＧ
ＲＴＥＣＶＬＳＮＬＲＧＧＴＲＹＴＦＡＶＲＡＲＭＡＥＰＳＦＳＧＦＷＳＡＷＳＥＰＡＳ
ＬＬＴＡＳＤＬＤＰ
配列番号１２（野生型マウスＥＰＯＲ膜貫通領域）
ＬＩＬＴＬＳＬＩＬＶＬＩＳＬＬＬＴＶＬＡＬＬＳ
配列番号１３（野生型マウスＥＰＯＲ細胞質領域）
ＨＲＲＴＬＱＱＫＩＷＰＧＩＰＳＰＥＳＥＦＥＧＬＦＴＴＨＫＧＮＦＱＬＷＬＬＱＲＤＧ
ＣＬＷＷＳＰＧＳＳＦＰＥＤＰＰＡＨＬＥＶＬＳＥＰＲＷＡＶＴＱＡＧＤＰＧＡＤＤＥＧ
ＰＬＬＥＰＶＧＳＥＨＡＱＤＴＹＬＶＬＤＫＷＬＬＰＲＴＰＣＳＥＮＬＳＧＰＧＧＳＶＤ
ＰＶＴＭＤＥＡＳＥＴＳＳＣＰＳＤＬＡＳＫＰＲＰＥＧＴＳＰＳＳＦＥＹＴＩＬＤＰＳＳ
ＱＬＬＣＰＲＡＬＰＰＥＬＰＰＴＰＰＨＬＫＹＬＹＬＶＶＳＤＳＧＩＳＴＤＹＳＳＧＧＳ
ＱＧＶＨＧＤＳＳＤＧＰＹＳＨＰＹＥＮＳＬＶＰＤＳＥＰＬＨＰＧＹＶＡＣＳ
配列番号１４（ＥＰＯ）

ＭＧＶＨＥＣＰＡＷＬ　ＷＬＬＬＳＬＬＳＬＰ　ＬＧＬＰＶＬＧＡＰＰ　ＲＬＩＣＤＳＲ
ＶＬＥ　ＲＹＬＬＥＡＫＥＡＥ
ＮＩＴＴＧＣＡＥＨＣ　ＳＬＮＥＮＩＴＶＰＤ　ＴＫＶＮＦＹＡＷＫＲ　ＭＥＶＧＱＱＡ
ＶＥＶ　ＷＱＧＬＡＬＬＳＥＡ
ＶＬＲＧＱＡＬＬＶＮ　ＳＳＱＰＷＥＰＬＱＬ　ＨＶＤＫＡＶＳＧＬＲ　ＳＬＴＴＬＬＲ
ＡＬＧ　ＡＱＫＥＡＩＳＰＰＤ
ＡＡＳＡＡＰＬＲＴＩ　ＴＡＤＴＦＲＫＬＦＲ　ＶＹＳＮＦＬＲＧＫＬ　ＫＬＹＴＧＥＡ
ＣＲＴ　ＧＤＲ

配列番号１５－天然のＦＫＢＰ１２ドメイン

ＭＧＶＱＶＥＴＩＳＰＧＤＧＲＴＦＰＫＲＧＱＴＣＶＶＨＹＴＧＭＬＥＤＧＫＫＦＤＳＳ
ＲＤＲＮＫＰＦＫＦＭＬＧＫＱＥ　ＶＩＲＧＷＥＥＧＶＡＱＭＳＶＧＱＲＡＫＬＴＩＳＰ
ＤＹＡＹＧＡＴＧＨＰＧＩＩＰＰＨＡＴＬＶＦＤＶＥＬＬＫＬＥ

配列番号１６－ｍＴＯＲの野生型ＦＲＢセグメント

ＭＡＳＲＩＬＷＨＥＭＷＨＥＧＬＥＥＡＳＲＬＹＦＧＥＲＮＶＫＧＭＦＥＶＬＥＰＬＨＡ
ＭＭＥＲＧＰＱＴＬＫＥＴＳＦＮ　ＱＡＹＧＲＤＬＭＥＡＱＥＷＣＲＫＹＭＫＳＧＮＶＫ
ＤＬＴＱＡＷＤＬＹＹＨＶＦＲＲＩＳＫＬＥＳ

配列番号１７－２０９８におけるＴからＬへの置換を伴うＦＲＢ

ＭＡＳＲＩＬＷＨＥＭＷＨＥＧＬＥＥＡＳＲＬＹＦＧＥＲＮＶＫＧＭＦＥＶＬＥＰＬＨＡ
ＭＭＥＲＧＰＱＴＬＫＥＴＳＦＮ　ＱＡＹＧＲＤＬＭＥＡＱＥＷＣＲＫＹＭＫＳＧＮＶＫ
ＤＬＬＱＡＷＤＬＹＹＨＶＦＲＲＩＳＫＬＥＳ

配列番号１８－２０９８におけるＴからＨへの置換および残基２１０１におけるＷからＦ
への置換を伴うｍＴＯＲのＦＲＢセグメント

ＭＡＳＲＩＬＷＨＥＭＷＨＥＧＬＥＥＡＳＲＬＹＦＧＥＲＮＶＫＧＭＦＥＶＬＥＰＬＨＡ
ＭＭＥＲＧＰＱＴＬＫＥＴＳＦＮ　ＱＡＹＧＲＤＬＭＥＡＱＥＷＣＲＫＹＭＫＳＧＮＶＫ
ＤＬＨＱＡＦＤＬＹＹＨＶＦＲＲＩＳＫＬＥＳ

配列番号１９は、残基２０９５におけるＫからＰへの置換を伴うｍＴＯＲのＦＲＢセグメ
ントである

ＭＡＳＲＩＬＷＨＥＭＷＨＥＧＬＥＥＡＳＲＬＹＦＧＥＲＮＶＫＧＭＦＥＶＬＥＰＬＨＡ
ＭＭＥＲＧＰＱＴＬＫＥＴＳＦＮ　ＱＡＹＧＲＤＬＭＥＡＱＥＷＣＲＫＹＭＫＳＧＮＶＰ
ＤＬＴＱＡＷＤＬＹＹＨＶＦＲＲＩＳＫＬＥＳ

配列番号２０－ｃ－Ｊｕｎロイシンジッパー

ＲＩＡＲＬＥＥＫＶＫＴＬＫＡＱＮＳＥＬＡＳＴＡＮＭＬＲＥＱＶＡＱＬＫＱＫＶＭＮ

配列番号２１　Ｆｏｓロイシンジッパー

ＬＴＤＴＬＱＡＥＴＤＱＬＥＤＫＫＳＡＬＱＴＥＩＡＮＬＬＫＥＫＥＫＬＥＦＩＬＡＡＹ

配列番号２２－ＢＺｉｐ（ＲＲ）ロイシンジッパードメイン

ＭＤＰＤＬＥＩＲＡＡＦＬＲＱＲＮＴＡＬＲＴＥＶＡＥＬＥＱＥＶＱＲＬＥＮＥＶＳＱＹ
ＥＴＲＹＧＰＬＧＧＧＫ

配列番号２３－ＡＺｉｐ（ＥＥ）ロイシンジッパードメイン

ＭＤＰＤＬＥＩＥＡＡＦＬＥＲＥＮＴＡＬＥＴＲＶＡＥＬＲＱＲＶＱＲＬＲＮＲＶＳＱＹ
ＲＴＲＹＧＰＬＧＧＧＫ

配列番号２４－ＣＤ２８膜貫通ドメイン

ＦＷＶＬＶＶＶＧＧＶＬＡＣＹＳＬＬＶＴＶＡＦＩＩＦＷＶ

配列番号２５－ＩＬ２ＲＢ膜貫通ドメイン

ＩＰＷＬＧＨＬＬＶＧＬＳＧＡＦＧＦＩＩＬＶＹＬＬＩ

配列番号２６　ＣＤ８ａ　ＴＭドメイン

ＩＹＩＷＡＰＬＡＧＴＣＧＶＬＬＬＳＬＶＩＴ

配列番号２７：ＴＲＥＭ１　ＴＭドメイン

ＩＶＩＬＬＡＧＧＦＬＳＫＳＬＶＦＳＶＬＦＡ

配列番号２８：ＴＲＥＭ２　ＴＭドメイン

ＩＬＬＬＬＡＣＩＦＬＩＫＩＬＡＡＳＡＬＷＡ

配列番号２９：ＤＡＰ１０　ＴＭドメイン
ＬＬＡＧＬＶＡＡＮＡＶＡＳＬＬＩＶＧＡＶＦ
配列番号３０：ＤＡＰ１２　ＴＭドメイン
ＧＶＬＡＧＩＶＭＧＮＬＶＬＴＶＬＩＡＬＡＶ
配列番号３１（受容体β鎖（ＮＣＢＩ　ＲＥＦＳＥＱ：ＮＰ＿０００８６９．１）のアミノ酸番号２６６から５５１
ＮＣＲＮＴＧＰＷＬＫＫＶＬＫＣＮＴＰＤＰＳＫＦＦＳＱＬＳＳＥＨＧＧＤＶＱＫＷＬＳ
ＳＰＦＰＳＳＳＦＳＰＧＧＬＡＰＥＩＳＰＬＥＶＬＥＲＤＫＶＴＱＬＬＬＱＱＤＫＶＰＥ
ＰＡＳＬＳＳＮＨＳＬＴＳＣＦＴＮＱＧＹＦＦＦＨＬＰＤＡＬＥＩＥＡＣＱＶＹＦＴＹＤ
ＰＹＳＥＥＤＰＤＥＧＶＡＧＡＰＴＧＳＳＰＱＰＬＱＰＬＳＧＥＤＤＡＹＣＴＦＰＳＲＤ
ＤＬＬＬＦＳＰＳＬＬＧＧＰＳＰＰＳＴＡＰＧＧＳＧＡＧＥＥＲＭＰＰＳＬＱＥＲＶＰＲ
ＤＷＤＰＱＰＬＧＰＰＴＰＧＶＰＤＬＶＤＦＱＰＰＰＥＬＶＬＲＥＡＧＥＥＶＰＤＡＧＰ
ＲＥＧＶＳＦＰＷＳＲＰＰＧＱＧＥＦＲＡＬＮＡＲＬＰＬＮＴＤＡＹＬＳＬＱＥＬＱＧＱ
ＤＰＴＨＬＶ
配列番号３２（野生型ＦＯＸＰ３（ＵｎｉＰｒｏｔＫＢアクセッションＱ９ＢＺＳ１）のアミノ酸配列）
ＭＰＮＰＲＰＧＫＰＳＡＰＳＬＡＬＧＰＳＰＧＡＳＰＳＷＲＡＡＰＫＡＳＤＬＬＧＡＲＧ
ＰＧＧＴＦＱＧＲＤＬＲＧＧＡＨＡＳＳＳＳＬＮＰＭＰＰＳＱＬＱＬＰＴＬＰＬＶＭＶＡ
ＰＳＧＡＲＬＧＰＬＰＨＬＱＡＬＬＱＤＲＰＨＦＭＨＱＬＳＴＶＤＡＨＡＲＴＰＶＬＱＶ
ＨＰＬＥＳＰＡＭＩＳＬＴＰＰＴＴＡＴＧＶＦＳＬＫＡＲＰＧＬＰＰＧＩＮＶＡＳＬＥＷ
ＶＳＲＥＰＡＬＬＣＴＦＰＮＰＳＡＰＲＫＤＳＴＬＳＡＶＰＱＳＳＹＰＬＬＡＮＧＶＣＫ
ＷＰＧＣＥＫＶＦＥＥＰＥＤＦＬＫＨＣＱＡＤＨＬＬＤＥＫＧＲＡＱＣＬＬＱＲＥＭＶＱ
ＳＬＥＱＱＬＶＬＥＫＥＫＬＳＡＭＱＡＨＬＡＧＫＭＡＬＴＫＡＳＳＶＡＳＳＤＫＧＳＣ
ＣＩＶＡＡＧＳＱＧＰＶＶＰＡＷＳＧＰＲＥＡＰＤＳＬＦＡＶＲＲＨＬＷＧＳＨＧＮＳＴ
ＦＰＥＦＬＨＮＭＤＹＦＫＦＨＮＭＲＰＰＦＴＹＡＴＬＩＲＷＡＩＬＥＡＰＥＫＱＲＴＬ
ＮＥＩＹＨＷＦＴＲＭＦＡＦＦＲＮＨＰＡＴＷＫＮＡＩＲＨＮＬＳＬＨＫＣＦＶＲＶＥＳ
ＥＫＧＡＶＷＴＶＤＥＬＥＦＲＫＫＲＳＱＲＰＳＲＣＳＮＰＴＰＧＰ
配列番号３３－ＩＬ９Ｒ（ＮＰ＿００２１７７．２のアミノ酸２９２から５２１）
ＫＬＳＰＲＶＫＲＩＦＹＱＮＶＰＳＰＡＭＦＦＱＰＬＹＳＶＨＮＧＮＦＱＴＷＭＧＡＨＧ
ＡＧＶＬＬＳＱＤＣＡＧＴＰＱＧＡＬＥＰＣＶＱＥＡＴＡＬＬＴＣＧＰＡＲＰＷＫＳＶＡ
ＬＥＥＥＱＥＧＰＧＴＲＬＰＧＮＬＳＳＥＤＶＬＰＡＧＣＴＥＷＲＶＱＴＬＡＹＬＰＱＥ
ＤＷＡＰＴＳＬＴＲＰＡＰＰＤＳＥＧＳＲＳＳＳＳＳＳＳＳＮＮＮＮＹＣＡＬＧＣＹＧＧ
ＷＨＬＳＡＬＰＧＮＴＱＳＳＧＰＩＰＡＬＡＣＧＬＳＣＤＨＱＧＬＥＴＱＱＧＶＡＷＶＬ
ＡＧＨＣＱＲＰＧＬＨＥＤＬＱＧＭＬＬＰＳＶＬＳＫＡＲＳＷＴＦ
配列番号３４－ＩＬ４ＲＡ（ＮＰ＿０００４０９．１のアミノ酸２５７から８２５）
ＫＩＫＫＥＷＷＤＱＩＰＮＰＡＲＳＲＬＶＡＩＩＩＱＤＡＱＧＳＱＷＥＫＲＳＲＧＱＥＰ
ＡＫＣＰＨＷＫＮＣＬＴＫＬＬＰＣＦＬＥＨＮＭＫＲＤＥＤＰＨＫＡＡＫＥＭＰＦＱＧＳ
ＧＫＳＡＷＣＰＶＥＩＳＫＴＶＬＷＰＥＳＩＳＶＶＲＣＶＥＬＦＥＡＰＶＥＣＥＥＥＥＥ
ＶＥＥＥＫＧＳＦＣＡＳＰＥＳＳＲＤＤＦＱＥＧＲＥＧＩＶＡＲＬＴＥＳＬＦＬＤＬＬＧ
ＥＥＮＧＧＦＣＱＱＤＭＧＥＳＣＬＬＰＰＳＧＳＴＳＡＨＭＰＷＤＥＦＰＳＡＧＰＫＥＡ
ＰＰＷＧＫＥＱＰＬＨＬＥＰＳＰＰＡＳＰＴＱＳＰＤＮＬＴＣＴＥＴＰＬＶＩＡＧＮＰＡ
ＹＲＳＦＳＮＳＬＳＱＳＰＣＰＲＥＬＧＰＤＰＬＬＡＲＨＬＥＥＶＥＰＥＭＰＣＶＰＱＬ
ＳＥＰＴＴＶＰＱＰＥＰＥＴＷＥＱＩＬＲＲＮＶＬＱＨＧＡＡＡＡＰＶＳＡＰＴＳＧＹＱ
ＥＦＶＨＡＶＥＱＧＧＴＱＡＳＡＶＶＧＬＧＰＰＧＥＡＧＹＫＡＦＳＳＬＬＡＳＳＡＶＳ
ＰＥＫＣＧＦＧＡＳＳＧＥＥＧＹＫＰＦＱＤＬＩＰＧＣＰＧＤＰＡＰＶＰＶＰＬＦＴＦＧ
ＬＤＲＥＰＰＲＳＰＱＳＳＨＬＰＳＳＳＰＥＨＬＧＬＥＰＧＥＫＶＥＤＭＰＫＰＰＬＰＱ
ＥＱＡＴＤＰＬＶＤＳＬＧＳＧＩＶＹＳＡＬＴＣＨＬＣＧＨＬＫＱＣＨＧＱＥＤＧＧＱＴ
ＰＶＭＡＳＰＣＣＧＣＣＣＧＤＲＳＳＰＰＴＴＰＬＲＡＰＤＰＳＰＧＧＶＰＬＥＡＳＬＣ
ＰＡＳＬＡＰＳＧＩＳＥＫＳＫＳＳＳＳＦＨＰＡＰＧＮＡＱＳＳＳＱＴＰＫＩＶＮＦＶＳ
ＶＧＰＴＹＭＲＶＳ

配列番号３５－ＩＬ３ＲＢ（ＮＰ＿０００３８６．１のアミノ酸４６１から８９７）
ＲＦＣＧＩＹＧＹＲＬＲＲＫＷＥＥＫＩＰＮＰＳＫＳＨＬＦＱＮＧＳＡＥＬＷＰＰＧＳＭ
ＳＡＦＴＳＧＳＰＰＨＱＧＰＷＧＳＲＦＰＥＬＥＧＶＦＰＶＧＦＧＤＳＥＶＳＰＬＴＩＥ
ＤＰＫＨＶＣＤＰＰＳＧＰＤＴＴＰＡＡＳＤＬＰＴＥＱＰＰＳＰＱＰＧＰＰＡＡＳＨＴＰ
ＥＫＱＡＳＳＦＤＦＮＧＰＹＬＧＰＰＨＳＲＳＬＰＤＩＬＧＱＰＥＰＰＱＥＧＧＳＱＫＳ
ＰＰＰＧＳＬＥＹＬＣＬＰＡＧＧＱＶＱＬＶＰＬＡＱＡＭＧＰＧＱＡＶＥＶＥＲＲＰＳＱ
ＧＡＡＧＳＰＳＬＥＳＧＧＧＰＡＰＰＡＬＧＰＲＶＧＧＱＤＱＫＤＳＰＶＡＩＰＭＳＳＧ
ＤＴＥＤＰＧＶＡＳＧＹＶＳＳＡＤＬＶＦＴＰＮＳＧＡＳＳＶＳＬＶＰＳＬＧＬＰＳＤＱ
ＴＰＳＬＣＰＧＬＡＳＧＰＰＧＡＰＧＰＶＫＳＧＦＥＧＹＶＥＬＰＰＩＥＧＲＳＰＲＳＰ
ＲＮＮＰＶＰＰＥＡＫＳＰＶＬＮＰＧＥＲＰＡＤＶＳＰＴＳＰＱＰＥＧＬＬＶＬＱＱＶＧ
ＤＹＣＦＬＰＧＬＧＰＧＰＬＳＬＲＳＫＰＳＳＰＧＰＧＰＥＩＫＮＬＤＱＡＦＱＶＫＫＰ
ＰＧＱＡＶＰＱＶＰＶＩＱＬＦＫＡＬＫＱＱＤＹＬＳＬＰＰＷＥＶＮＫＰＧＥＶＣ
配列番号３６－ＩＬ１７ＲＢ（ＮＰ＿０６１１９５．２のアミノ酸３１４から５０２）
ＲＨＥＲＩＫＫＴＳＦＳＴＴＴＬＬＰＰＩＫＶＬＶＶＹＰＳＥＩＣＦＨＨＴＩＣＹＦＴＥ
ＦＬＱＮＨＣＲＳＥＶＩＬＥＫＷＱＫＫＫＩＡＥＭＧＰＶＱＷＬＡＴＱＫＫＡＡＤＫＶＶ
ＦＬＬＳＮＤＶＮＳＶＣＤＧＴＣＧＫＳＥＧＳＰＳＥＮＳＱＤＬＦＰＬＡＦＮＬＦＣＳＤ
ＬＲＳＱＩＨＬＨＫＹＶＶＶＹＦＲＥＩＤＴＫＤＤＹＮＡＬＳＶＣＰＫＹＨＬＭＫＤＡＴ
ＡＦＣＡＥＬＬＨＶＫＱＱＶＳＡＧＫＲＳＱＡＣＨＤＧＣＣＳＬ
配列番号３７　ＷＯ２０１９／２４１５４９に記載されたＮおよびＣ末端トランケート型ＦＯＸＰ３フラグメントのアミノ酸配列
ＧＧＡＨＡＳＳＳＳＬ　ＮＰＭＰＰＳＱＬＱＬ　ＰＴＬＰＬＶＭＶＡＰ　ＳＧＡＲＬＧＰ
ＬＰＨ　ＬＱＡＬＬＱＤＲＰＨ　ＦＭＨＱＬＳＴＶＤＡ　ＨＡＲＴＰＶＬＱＶＨ　ＰＬＥ
ＳＰＡＭＩＳＬ　ＴＰＰＴＴＡＴＧＶＦ　ＳＬＫＡＲＰＧＬＰＰ　ＧＩＮＶＡＳＬＥＷＶ
ＳＲＥＰＡＬＬＣＴＦ　ＰＮＰＳＡＰＲＫＤＳ　ＴＬＳＡＶＰＱＳＳＹ　ＰＬＬＡＮＧＶ
ＣＫＷ　ＰＧＣＥＫＶＦＥＥＰ　ＥＤＦＬＫＨＣＱＡＤ　ＨＬＬＤＥＫＧＲＡＱ　ＣＬＬ
ＱＲＥＭＶＱＳ　ＬＥＱＱＬＶＬＥＫＥ　ＫＬＳＡＭＱＡＨＬＡ　ＧＫＭＡＬＴＫＡＳＳ
ＶＡＳＳＤＫＧＳＣＣ　ＩＶＡＡＧＳＱＧＰＶ　ＶＰＡＷＳＧＰＲＥＡ　ＰＤＳＬＦＡＶ
ＲＲＨ　ＬＷＧＳＨＧＮＳＴＦ　ＰＥＦＬＨＮＭＤＹＦ　ＫＦＨＮＭＲＰＰＦＴ　ＹＡＴ
ＬＩＲＷＡＩＬ　ＥＡＰＥＫＱＲＴＬＮ　ＥＩＹＨＷＦＴＲＭＦ　ＡＦＦＲＮＨＰＡＴＷ
ＫＮＡＩＲＨＮＬＳＬ　ＨＫＣＦＶＲＶＥＳＥ　ＫＧＡＶＷＴＶＤＥＬ　ＥＦ
配列番号３８　ＳＴＡＴ５会合モチーフ
ＹＸＸＦ／Ｌ
配列番号３９　ＳＴＡＴ５会合モチーフ
ＹＣＴＦ
配列番号４０　ＳＴＡＴ５会合モチーフ
ＹＦＦＦ
配列番号４１　ＳＴＡＴ５会合モチーフ
ＹＬＳＬ
配列番号４２　ＳＴＡＴ５会合モチーフ
ＹＬＳＬＱ
配列番号４３　ＪＡＫ１結合モチーフ
ＫＶＬＫＣＮＴＰＤＰＳＫＦＦＳＱＬＳＳＥＨＧＧＤＶＱＫＷＬＳＳＰＦＰＳＳＳＦＳＰ
ＧＧＬＡＰＥＩＳＰＬＥＶＬＥＲＤＫ
配列番号４４　ＪＡＫ１結合モチーフ
ＮＰＷＦＱＲＡＫＭＰＲＡＬＤＦＳＧＨＴＨＰＶＡＴＦＱＰＳＲＰＥＳＶＮＤＬＦＬＣＰ
ＱＫＥＬＴ
配列番号４５　ＪＡＫ１結合モチーフ
ＧＹＩＣＬＲＮＳＬＰＫＶＬＮＦＨＮＦＬＡＷＰＦＰＮＬＰＰＬＥＡＭＤＭＶＥＶＩＹＩ
ＮＲ
配列番号４６　ＪＡＫ１結合モチーフ

ＰＬＫＥＫＳＩＩＬＰＫＳＬＩＳＶＶＲＳＡＴＬＥＴＫＰＥＳＫＹＶＳＬＩＴＳＹＱＰＦＳＬ

配列番号４７　ＪＡＫ１結合モチーフ

ＲＲＲＫＫＬＰＳＶＬＬＦＫＫＰＳＰＦＩＦＩＳＱＲＰＳＰＥＴＱＤＴＩＨＰＬＤＥＥＡＦＬＫ

配列番号４８　ＪＡＫ１結合モチーフ

ＹＩＨＶＧＫＥＫＨＰＡＮＬＩＬＩＹＧＮＥＦＤＫＲＦＦＶＰＡＥＫＩＶＩＮＦＩＴＬＮＩＳＤＤＳ

配列番号４９　ＪＡＫ１結合モチーフ

ＲＹＶＴＫＰＰＡＰＰＮＳＬＮＶＱＲＶＬＴＦＱＰＬＲＦＩＱＥＨＶＬＩＰＶＦＤＬＳＧＰ

配列番号５０　ＪＡＫ２結合モチーフ

ＮＹＶＦＦＰＳＬＫＰＳＳＳＩＤＥＹＦＳＥＱＰＬＫＮＬＬＬＳＴＳＥＥＱＩＥＫＣＦＩＩＥＮ

配列番号５１　ＪＡＫ２結合モチーフ

ＹＷＦＨＴＰＰＳＩＰＬＱＩＥＥＹＬＫＤＰＴＱＰＩＬＥＡＬＤＫＤＳＳＰＫＤＤＶＷＤＳＶＳＩＩＳＦＰＥ

配列番号５２　ＪＡＫ２結合モチーフ

ＹＡＦＳＰＲＮＳＬＰＱＨＬＫＥＦＬＧＨＰＨＨＮＴＬＬＦＦＳＦＰＬＳＤＥＮＤＶＦＤＫＬＳＶＩＡＥＤＳＥＳ

配列番号５３（ＩＬ２ＲＢトランケート－Ｙ５１０）

ＮＣＲＮＴＧＰＷＬＫＫＶＬＫＣＮＴＰＤＰＳＫＦＦＳＱＬＳＳＥＨＧＧＤＶＱＫＷＬＳＳＰＦＰＳＳＳＦＳＰＧＧＬＡＰＥＩＳＰＬＥＶＬＥＲＤＫＶＴＱＬＬＰＬＮＴＤＡＹＬＳＬＱＥＬＱＧＱＤＰＴＨＬＶ

配列番号５４（ＩＬ２ＲＢトランケート－Ｙ５１０およびＹ３９２）

ＮＣＲＮＴＧＰＷＬＫＫＶＬＫＣＮＴＰＤＰＳＫＦＦＳＱＬＳＳＥＨＧＧＤＶＱＫＷＬＳＳＰＦＰＳＳＳＦＳＰＧＧＬＡＰＥＩＳＰＬＥＶＬＥＲＤＫＶＴＱＬＬＤＡＹＣＴＦＰＳＲＤＤＬＬＬＦＳＰＳＬＬＧＧＰＳＰＰＳＴＡＰＧＧＳＧＡＧＥＥＲＭＰＰＳＬＱＥＲＶＰＲＤＷＤＰＱＰＬＧＰＰＴＰＧＶＰＤＬＶＤＦＱＰＰＰＥＬＶＬＲＥＡＧＥＥＶＰＤＡＧＰＲＥＧＶＳＦＰＷＳＲＰＰＧＱＧＥＦＲＡＬＮＡＲＬＰＬＮＴＤＡＹＬＳＬＱＥＬＱＧＱＤＰＴＨＬＶ

配列番号５５　ＪＡＫ３モチーフ

ＥＲＴＭＰＲＩＰＴＬＫＮＬＥＤＬＶＴＥＹＨＧＮＦＳＡＷＳＧＶＳＫＧＬＡＥＳＬＱＰＤＹＳＥＲＬＣＬＶＳＥＩ

配列番号５６　ＪＡＫ３モチーフ

ＥＲＴＭＰＲＩＰＴＬＫＮＬＥＤＬＶＴＥＹＨＧＮＦＳＡＷＳＧＶＳＫＧＬＡＥＳＬＱＰＤＹＳＥＲＬＣＬＶＳＥＩＰＰＫＧＧＡＬＧＥＧＰＧＡＳＰＣＮＱＨＳＰＹＷＡＰＰＣＹＴＬＫＰＥＴ

配列番号５７：ＳＴＡＴ３シグナル

ＹＸＸＱ

配列番号５８：ＳＴＡＴ３シグナル

ＹＲＨＱ

配列番号５９－ＳＴＡＴ３会合モチーフ

ＹＬＲＱ

配列番号６０－ＳＴＡＴ１会合モチーフ

ＱＬＬＬＱＱＤＫＶＰＥＰＡＳＬＳＳＮＨＳＬＴＳＣＦＴＮＱＧＹＦ

配列番号６：ＳＨＰ１

ＭＶＲＷＦＨＲＤＬＳＧＬＤＡＥＴＬＬＫＧＲＧＶＨＧＳＦＬＡＲＰＳＲＫＮＱＧＤＦＳＬＳＶＲＶＧＤＱＶＴＨＩＲＩＱＮＳＧＤＦ

ＹＤＬＹＧＧＥＫＦＡＴＬＴＥＬＶＥＹＹＴＱＱＱＧＶＬＱＤＲＤＧＴＩＩＨＬＫＹＰＬ

ＮＣＳＤＰＴＳＥＲＷＹＨＧＨＭＳＧＧＱＡ
ＥＴＬＬＱＡＫＧＥＰＷＴＦＬＶＲＥＳＬＳＱＰＧＤＦＶＬＳＶＬＳＤＱＰＫＡＧＰＧＳ
ＰＬＲＶＴＨＩＫＶＭＣＥＧＧＲＹＴＶＧＧ
ＬＥＴＦＤＳＬＴＤＬＶＥＨＦＫＫＴＧＩＥＥＡＳＧＡＦＶＹＬＲＱＰＹＹＡＴＲＶＮＡ
ＡＤＩＥＮＲＶＬＥＬＮＫＫＱＥＳＥＤＴＡ
ＫＡＧＦＷＥＥＦＥＳＬＱＫＱＥＶＫＮＬＨＱＲＬＥＧＱＲＰＥＮＫＧＫＮＲＹＫＮＩＬ
ＰＦＤＨＳＲＶＩＬＱＧＲＤＳＮＩＰＧＳＤ
ＹＩＮＡＮＹＩＫＮＱＬＬＧＰＤＥＮＡＫＴＹＩＡＳＱＧＣＬＥＡＴＶＮＤＦＷＱＭＡＷ
ＱＥＮＳＲＶＩＶＭＴＴＲＥＶＥＫＧＲＮＫ
ＣＶＰＹＷＰＥＶＧＭＱＲＡＹＧＰＹＳＶＴＮＣＧＥＨＤＴＴＥＹＫＬＲＴＬＱＶＳＰＬ
ＤＮＧＤＬＩＲＥＩＷＨＹＱＹＬＳＷＰＤＨ
ＧＶＰＳＥＰＧＧＶＬＳＦＬＤＱＩＮＱＲＱＥＳＬＰＨＡＧＰＩＩＶＨＣＳＡＧＩＧＲＴ
ＧＴＩＩＶＩＤＭＬＭＥＮＩＳＴＫＧＬＤＣ
ＤＩＤＩＱＫＴＩＱＭＶＲＡＱＲＳＧＭＶＱＴＥＡＱＹＫＦＩＹＶＡＩＡＱＦＩＥＴＴＫ
ＫＫＬＥＶＬＱＳＱＫＧＱＥＳＥＹＧＮＩＴ
ＹＰＰＡＭＫＮＡＨＡＫＡＳＲＴＳＳＫＨＫＥＤＶＹＥＮＬＨＴＫＮＫＲＥＥＫＶＫＫＱ
ＲＳＡＤＫＥＫＳＫＧＳＬＫＲＫ

配列番号６２：トランケート型ＥＰＯＲエンドドメイン

ＨＲＲＡＬＫＱＫＩＷＰＧＩＰＳＰＥＳＥＦＥＧＬＦＴＴＨＫＧＮＦＱＬＷＬＹＱＮＤＧ
ＣＬＷＷＳＰＣＴＰＦＴＥＤＰＰＡＳＬＥＶ
ＬＳＥＲＣＷＧＴＭＱＡＶＥＰＧＴＤＤＥＧＰＬＬＥＰＶＧＳＥＨＡＱＤＴＹＬＶＬＤＫ
ＷＬＬＰＲＮＰＰＳＥＤＬＰＧＰＧＧＳＶＤＩＶＡＭＤＥＧＳＥＡＳＳＣＳＳＡＬＡＳＫ
ＰＳＰＥＧＡＳＡＡＳＦＥＹＴＩＬＤＰＳＳＱＬＬＲＰＷＴＬＣＰＥＬＰＰＴＰＰＨＬＫ

配列番号６３－ＪＡＫ３逆向き

ＩＥＳＶＬＣＬＲＥＳＹＤＰＱＬＳＥＡＬＧＫＳＶＧＳＷＡＳＦＮＧＨＹＥＴＶＬＤＥＬ
ＮＫＬＴＰＩＲＰＭＴＲＥ

配列番号６４　ＣＤ３ゼータ

ＲＶＫＦＳＲＳＡＤＡＰＡＹＱＱＧＱＮＱＬＹＮＥＬＮＬＧＲＲＥＥＹＤＶＬＤＫＲＲＧ
ＲＤＰＥＭＧＧＫＰＱＲＲＫＮＰＱＥＧＬＹＮＥＬＱＫＤＫＭＡＥＡＹＳＥＩＧＭＫＧＥ
ＲＲＲＧＫＧＨＤＧＬＹＱＧＬＳＴＡＴＫＤＴＹＤＡＬＨＭＱＡＬＰＰＲ

配列番号６５　ＣＤ２８細胞内シグナル伝達

ＲＳＫＲＳＲＬＬＨＳＤＹＭＮＭＴＰＲＲＰＧＰＴＲＫＨＹＱＰＹＡＰＰＲＤＦＡＡＹＲ
Ｓ

配列番号６６　ＣＤ２７細胞内シグナル伝達

ＱＲＲＫＹＲＳＮＫＧＥＳＰＶＥＰＡＥＰＣＨＹＳＣＰＲＥＥＥＧＳＴＩＰＩＱＥＤＹＲ
ＫＰＥＰＡＣＳＰ

配列番号６７　リンカー配列

ＧＧＧＳ

配列番号６８～９８－リンカー

ＥＴＳＧＧＧＧＳＲＬ（配列番号６８）
ＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号６９）
Ｓ（ＧＧＧＧＳ）$_{1-5}$（ここで、ＧＧＧＧＳは、配列番号７０である）
（ＧＧＧＧＳ）$_{1-5}$（ここで、ＧＧＧＧＳは、配列番号７０である）
ＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号７１）
Ｓ（ＧＧＧＳ）$_{1-5}$（ここで、ＧＧＧＳは、配列番号６７である）
（ＧＧＧＳ）$_{1-5}$（ここで、ＧＧＧＳは、配列番号６７である）
ＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号７２）
ＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号７３）
Ｓ（ＧＧＧＧＧＳ）$_{1-5}$（ここで、ＧＧＧＧＧＳは、配列番号７４である）
（ＧＧＧＧＧＳ）$_{1-5}$（ここで、ＧＧＧＧＧＳは、配列番号７４である）

Ｓ（ＧＧＧＧＧＧＳ）$_{1-5}$（ここで、ＧＧＧＧＧＧＳは、配列番号７５である）
（ＧＧＧＧＧＧＳ）$_{1-5}$（ここで、ＧＧＧＧＧＧＳは、配列番号７５である）
Ｇ$_{6}$（配列番号７６）
Ｇ$_{8}$（配列番号７７）
ＫＥＳＧＳＶＳＳＥＱＬＡＱＦＲＳＬＤ（配列番号７８）
ＥＧＫＳＳＧＳＧＳＥＳＫＳＴ（配列番号７９）
ＧＳＡＧＳＡＡＧＳＧＥＦ（配列番号８０）
ＳＧＧＧＧＳＡＧＳＡＡＧＳＧＥＦ（配列番号８１）
ＳＧＧＧＬＬＬＬＬＬＬＬＧＧＧＳ（配列番号８２）
ＳＧＧＧＡＡＡＡＡＡＡＡＧＧＧＳ（配列番号８３）
ＳＧＧＧＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＧＧＧＳ（配列番号８４）
ＳＧＡＬＧＧＬＡＬＡＧＬＬＬＡＧＬＧＬＧＡＡＧＳ（配列番号８５）
ＳＬＳＬＳＰＧＧＧＧＧＰＡＲ（配列番号８６）
ＳＬＳＬＳＰＧＧＧＧＧＰＡＲＳＬＳＬＳＰＧＧＧＧＧ（配列番号８７）
ＧＳＳＧＳＳ（配列番号８８）
ＧＳＳＳＳＳＳ（配列番号８９）
ＧＧＳＳＳＳ（配列番号９０）
ＧＳＳＳＳＳ（配列番号９１）
ＳＧＧＧＧＳ（配列番号９２）
ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号９３）
ＧＧＧＧＧ（配列番号９４）
ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号９５）
ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号９６）
ＧＧＧＧＧＧＧ（配列番号９７）
ＧＧＧＧＧＧＧＧＧ（配列番号９８）
配列番号９９　ＲＱＲ８：
ＡＣＰＹＳＮＰＳＬＣＳＧＧＧＧＳＥＬＰＴＱＧＴＦＳＮＶＳＴＮＶＳＰＡＫＰＴＴＴＡ
ＣＰＹＳＮＰＳＬＣＳＧＧＧＧＳＰＡＰＲＰＰＴＰＡＰＴＩＡＳＱＰＬＳＬＲＰＥＡＣＲ
ＰＡＡＧＧＡＶＨＴＲＧＬＤＦＡＣＤＩＹＩＷＡＰＬＡＧＴＣＧＶＬＬＬＳＬＶＩＴＬＹ
ＣＮＨＲＮＲＲＲＶＣＫＣＰＲＰＶＶ
配列番号１００　Ｐ２Ａペプチド　切断ドメイン
ＡＴＮＦＳＬＬＫＱＡＧＤＶＥＥＮＰＧＰ
配列番号１０１　Ｔ２Ａペプチド　切断ドメイン：
ＥＧＲＧＳＬＬＴＣＧＤＶＥＥＮＰＧＰ
配列番号１０２　Ｅ２Ａペプチド　切断ドメイン：
ＱＣＴＮＹＡＬＬＫＬＡＧＤＶＥＳＮＰＧＰ
配列番号１０３　Ｆ２Ａペプチド　切断ドメイン：
ＶＫＱＴＬＮＦＤＬＬＫＬＡＧＤＶＥＳＮＰＧＰ
配列番号１０４　フューリン切断部位
ＲＸＸＲ
配列番号１０５　フューリン切断部位
ＲＲＫＲ
配列番号１０６－トランケート型ＥＰＯＲエンドドメイン（配列番号１のアミノ酸２７４～３７８）
ＨＲＲＡＬＫＱＫＩＷＰＧＩＰＳＰＥＳＥＦＥＧＬＦＴＴＨＫＧＮＦＱＬＷＬＹＱＮＤＧ
ＣＬＷＷＳＰＣＴＰＦＴＥＤＰＰＡＳＬＥＶ
ＬＳＥＲＣＷＧＴＭＱＡＶＥＰＧＴＤＤＥＧＰＬＬＥＰＶＧＳＥＨＡＱＤＴＹＬＶＬＤＫ
ＷＬＬＰＲ
配列番号１０７－トランケート型ＥＰＯＲエンドドメイン（配列番号１のアミノ酸２７４～４３３）

ＨＲＲＡＬＫＱＫＩＷＰＧＩＰＳＰＥＳＥＦＥＧＬＦＴＴＨＫＧＮＦＱＬＷＬＹＱＮＤＧ
ＣＬＷＷＳＰＣＴＰＦＴＥＤＰＰＡＳＬＥＶ
ＬＳＥＲＣＷＧＴＭＱＡＶＥＰＧＴＤＤＥＧＰＬＬＥＰＶＧＳＥＨＡＱＤＴＹＬＶＬＤＫ
ＷＬＬＰＲＮＰＰＳＥＤＬＰＧＰＧＧＳＶＤＩＶＡＭＤＥＧＳＥＡＳＳＣＳＳＡＬＡＳＫ
ＰＳＰＥＧＡＳＡＡＳＦＥＹＴＩＬＤＰＳＳ

配列番号１０８－ＥＰＯＲ由来のエンドドメインのＣ末端テール

ＭＤＴＶＰ

配列番号１０９－ＥＰＯＲ由来のエンドドメインのＣ末端テール

ＳＭＤＴＶＰ

配列番号１１０－ＥＰＯＲ由来のエンドドメインのＣ末端テール

ＡＳＭＤＴＶＰ

配列番号１１１－ＥＰＯＲ由来のエンドドメインのＣ末端テール

ＬＡＳＭＤＴＶＰ

配列番号１１２－ＥＰＯＲ由来のエンドドメインのＣ末端テール

ＡＬＡＳＭＤＴＶＰ

配列番号１１３－ＥＰＯＲ由来のエンドドメインのＣ末端テール

ＰＡＬＡＳＭＤＴＶＰ

配列番号１１４－Ｃ末端に１０アミノ酸テールを有するＷＴ　ＥＰＯＲエンドドメイン

ＨＲＲＡＬＫＱＫＩＷＰＧＩＰＳＰＥＳＥＦＥＧＬＦＴＴＨＫＧＮＦＱＬＷＬＹＱＮＤＧ
ＣＬＷＷＳＰＣＴＰＦＴＥＤＰＰＡＳＬＥＶ
ＬＳＥＲＣＷＧＴＭＱＡＶＥＰＧＴＤＤＥＧＰＬＬＥＰＶＧＳＥＨＡＱＤＴＹＬＶＬＤＫ
ＷＬＬＰＲＮＰＰＳＥＤＬＰＧＰＧＧＳＶＤＩＶＡＭＤＥＧＳＥＡＳＳＣＳＳＡＬＡＳＫ
ＰＳＰＥＧＡＳＡＡＳＦＥＹＴＩＬＤＰＳＳＱＬＬＲＰＷＴＬＣＰＥＬＰＰＴＰＰＨＬＫ
ＹＬＹＬＶＶＳＤＳＧＩＳＴＤＹＳＳＧＤＳＱＧＡＱＧＧＬＳＤＧＰＹＳＮＰＹＥＮＳＬ
ＩＰＡＡＥＰＬＰＰＳＹＶＡＣＳＰＡＬＡＳＭＤＴＶＰ

配列番号１１５－Ｃ末端に１０アミノ酸テールを有するトランケート型ＥＰＯＲエンドドメイン

ＨＲＲＡＬＫＱＫＩＷＰＧＩＰＳＰＥＳＥＦＥＧＬＦＴＴＨＫＧＮＦＱＬＷＬＹＱＮＤＧ
ＣＬＷＷＳＰＣＴＰＦＴＥＤＰＰＡＳＬＥＶ
ＬＳＥＲＣＷＧＴＭＱＡＶＥＰＧＴＤＤＥＧＰＬＬＥＰＶＧＳＥＨＡＱＤＴＹＬＶＬＤＫ
ＷＬＬＰＲＰＡＬＡＳＭＤＴＶＰ

配列番号１１６－Ｃ末端に１０アミノ酸テールを有するトランケート型たＥＰＯＲエンドドメイン

ＨＲＲＡＬＫＱＫＩＷＰＧＩＰＳＰＥＳＥＦＥＧＬＦＴＴＨＫＧＮＦＱＬＷＬＹＱＮＤＧ
ＣＬＷＷＳＰＣＴＰＦＴＥＤＰＰＡＳＬＥＶ
ＬＳＥＲＣＷＧＴＭＱＡＶＥＰＧＴＤＤＥＧＰＬＬＥＰＶＧＳＥＨＡＱＤＴＹＬＶＬＤＫ
ＷＬＬＰＲＮＰＰＳＥＤＬＰＧＰＧＧＳＶＤＩＶＡＭＤＥＧＳＥＡＳＳＣＳＳＡＬＡＳＫ
ＰＳＰＥＧＡＳＡＡＳＦＥＹＴＩＬＤＰＳＳＰＡＬＡＳＭＤＴＶＰ

【実施例】

【０３６０】

実施例

実施例１

材料および方法

クローニング：

図２に示す本発明の構築物を自社で設計した。ｐＭＰ７１骨格にクローニングすることができ、Ｄ５ａ高効率細菌をプラスミドで形質転換し、選択薬剤アンピシリンで増殖させることができる。ＤＮＡはＭｉｎｉｐｒｅｐ　Ｋｉｔ（キアゲン社（Ｑｉａｇｅｎ））を用いて抽出することができる。インサートはＰＣＲクローニングによってレンチウイルス骨格に導入可能である。

【０３６１】

ＰＢＭＣの採取：
白血球コーン（leukocyte cone）は英国ＮＨＳ献血・臓器移植機構（ＮＨＳ ｂｌｏｏｄ ａｎｄ ｔｒａｎｓｐｌａｎｔ）から入手可能である。ＰＢＭＣは密度遠心分離プロトコルを用いて単離することができる。簡単に述べると、血液を１ｘＰＢＳで１：１に希釈し、Ｆｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅ（ＧＥヘルスケア社（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ））に重層することができる。サンプルを遠心分離し、白血球層を取り出してＰＢＳで洗浄することができる。

【０３６２】

ＴｒｅｇおよびＴｃｏｎｖ単離プロトコル：
Ｔｒｅｇ集団およびＴｅｆｆ集団を誘導するために血液コーンを使用することができる。血液コーンは、ＲｏｓｅｔｔｅＳｅｐ（商標）Ｈｕｍａｎ ＣＤ４＋ Ｔ Ｃｅｌｌ Ｅｎｒｉｃｈｍｅｎｔ Ｃｏｃｋｔａｉｌを用いたネガティブセレクションによるＣＤ４富化に供することができる。その後、密度遠心分離によってＣＤ４＋細胞を単離することができる。次に、ＣＤ４＋ＣＤ２５＋ Ｔ細胞を、ＣＤ２５ ＭｉｃｒｏＢｅａｄｓ ＩＩ（ミルテニー社（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ））を用いたポジティブセレクションにより単離することができる。細胞のＣＤ４＋ＣＤ２５－画分は、従来のＴ細胞（Ｔｃｏｎｖ）集団として使用するために保持しておくことができる。ＣＤ４＋ＣＤ２５＋画分を、フローサイトメトリー用抗体ＣＤ４ ＦＩＴＣ（ＯＫＴ４、バイオレジェンド社（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ））、ＣＤ２５ ＰＥ－Ｃｙ７（ＢＣ９６、バイオレジェンド社）、ＣＤ１２７ ＢＶ４２１（Ａ０１９Ｄ５、バイオレジェンド社）、ＣＤ４５ＲＡ ＢＶ５１０（ＨＩ１００、バイオレジェンド社）、およびＬＩＶＥ／ＤＥＡＤ（商標）Ｆｉｘａｂｌｅ Ｎｅａｒ－ＩＲ－Ｄｅａｄ Ｃｅｌｌ Ｓｔａｉｎ（サーモフィッシャー社（Ｔｈｅｒｍｏｆｉｓｈｅｒ））で染色した後、ＦＡＣＳソーティングすることができる。示されている場合、ＣＤ４＋ＣＤ２５＋ＣＤ１２７ｌｏｗ（バルクＴｒｅｇ）またはＣＤ４＋ＣＤ２５＋ＣＤ１２７ｌｏｗ ＣＤ４５ＲＡ＋（ＣＤ４５ＲＡ＋ Ｔｒｅｇ）を選別して使用することができる。

【０３６３】

Ｔｃｏｎｖ培養培地：
ヒトＴｃｏｎｖは、１０％熱不活性化ウシ胎児血清、ペニシリン、ストレプトマイシン、Ｌ－グルタミン（ギブコ社（Ｇｉｂｃｏ））を添加したＲＰＭＩ－１６４０（ギブコ社）中で増殖させることができる。

【０３６４】

Ｔｒｅｇ培養培地および増殖：
ヒト制御性Ｔ細胞は、ＩＬ－２を添加したＴｅｘｍａｃｓ培地（ミルテニー社）中で培養し、Ｈｕｍａｎ Ｔ－Ａｃｔｉｖａｔｏｒ ＣＤ３／ＣＤ２８ Ｄｙｎａｂｅａｄｓ（商標）（ギブコ社）で活性化することができる。ＩＬ－２を添加したＴｒｅｇ培地を２～３日ごとに細胞に再供給することができる。Ｔｒｅｇ細胞のさらなる増殖を促進するために、Ｄｙｎａｂｅａｄｓ（商標）による２回目の刺激を行うことができる。

【０３６５】

遺伝子導入およびウイルス粒子の作製
ＨＥＫ２９３Ｔ細胞を、ＤＭＥＭ（ダルベッコ改変イーグル培地）＋１０％ウシ胎児血清（ＦＢＳ）に播種して２４時間培養することができる。遺伝子導入試薬を室温に戻し、目的のＤＮＡ構築物／プラスミド、パッケージングプラスミド（ｐＤ８．９１）、およびウイルスエンベロープ（ｐＶＳＶ－Ｇ）と混合することができる。希釈したＤＮＡにＰＥＩを加えて混合し、ＨＥＫ２９３Ｔに添加することができる。遺伝子導入の４８時間後に上清を採取し、濾過してウイルスを濃縮することができる。

【０３６６】

Ｔ細胞の形質導入
Ｔｃｏｎｖを、抗ＣＤ３および抗ＣＤ２８ Ｄｙｎａｂｅａｄｓ（ギブコ社）で活性化し、Ｔ細胞培養培地に再懸濁することができる。レトロネクチン（タカラバイオ株式会社

（Ｔａｋａｈａｒａ－ｂｉｏ）、大津、日本）でコーティングすることによって、組織培養用処理済みではない２４ウェルプレートを準備することができ、細胞懸濁液をレンチウイルス上清と一緒に加えることができる。細胞をインキュベートすることができ、１日おきに培地交換を行うことができる。細胞は形質導入の７日後に実験に使用することができる。

【０３６７】

フローサイトメトリー染色

Ｔ細胞を培養物から取り出し、ＦＡＣＳ緩衝液で洗浄し、まずＰＢＳ中でＬＩＶＥ／ＤＥＡＤ（商標）Ｆｉｘａｂｌｅ Ｎｅａｒ－ＩＲ－Ｄｅａｄ Ｃｅｌｌ Ｓｔａｉｎ（サーモフィッシャー社）で染色し、次いでＦＡＣＳ染色緩衝液中の抗ＣＤ４ ＡＦ７００（ＲＰＡ－Ｔ４、ＢＤ社（ＢＤ））および抗ＣＤ３ ＰＥ－Ｃｙ７で染色することができる。ＦＯＸＰ３の細胞内染色のために、細胞を固定し、透過処理し、抗ＦｏｘＰ３ ＰＥ（１５０Ｄ／Ｅ４、サーモフィッシャー社）抗体で染色することができる。細胞は、ＢＤ ＬＳＲＩＩフローサイトメーターで解析することができる。

【０３６８】

形質導入細胞のフローサイトメトリー表現型解析

Ｔ細胞を培養物から取り出し、上記のようにＬＩＶＥ／ＤＥＡＤ（商標）Ｆｉｘａｂｌｅ Ｎｅａｒ－ＩＲ－Ｄｅａｄ Ｃｅｌｌ Ｓｔａｉｎを用いて染色して生細胞を識別することができる。細胞の表面染色は、抗ＣＤ４ ＡＦ７００、抗ＣＤ２５ ＰＥ－Ｃｙ７（ＢＣ９６、バイオレジェンド社）、抗ＣＤ３９ ＰｅｒＣＰＣｙ５．５（Ａ１、バイオレジェンド社）、抗ＣＤ６２Ｌ ＰＥ－ＣＦ５９４（ＤＲＥＧ－５６、ＢＤ社）、抗ＴＩＭ３ ＢＶ７８６（７Ｄ３、ＢＤ社）、抗ＴＩＧＩＴ ＢＶ６０５（Ａ１５１５３Ｇ、バイオレジェンド社）、抗ＣＤ４５ＲＯ ＢＵＶ３９５（ＵＣＨＬ１、ＢＤ社）、抗ＣＤ２７９ ＢＵＶ７３７（ＥＨ１２．１、ＢＤ社）、および抗ＣＤ２２３ ＢＶ７１１（１１Ｃ３Ｃ６５、バイオレジェンド社）を用いて実施することができる。細胞を透過処理し、抗ＦｏｘＰ３ ＰＥ（１５０Ｄ／Ｅ４、サーモフィッシャー社）で染色することができる。

【０３６９】

データ解析

フローサイトメトリーデータは、フローサイトメトリー解析ソフトウェアＦｌｏｗＪｏ（ＦｌｏｗＪｏ，ＬＬＣ社）を用いて解析することができる。全ての統計解析は、Ｇｒａｐｈｐａｄ Ｐｒｉｓｍ ｖ．５（グラフパッドソフトウェア社（Ｇｒａｐｈｐａｄ，Ｓｏｆｔｗａｒｅ））を用いて実施することができる。

【０３７０】

<u>実施例１ａ：Ｊｕｒｋａｔにおける発現</u>

構築物は、上記のように、ピューロマイシン耐性遺伝子をコードするレンチウイルス骨格にクローニングすることができる。ウイルスベクターを作製し、Ｊｕｒｋａｔ Ｔ細胞株の形質導入に使用することができる。形質導入の２日後、４μｇ／ｍｌのピューロマイシンで１週間にわたってＪｕｒｋａｔ細胞を選択することが可能である。細胞を計数し、０．５×10^6個の細胞を抗ＥＰＯＲ抗体で染色して、細胞内で発現された組換えタンパク質のレベルを特定することができる。発現は上記のようにフローサイトメトリーによって評価することができる。

【０３７１】

<u>実施例２：構築物のＳＴＡＴ５シグナル伝達</u>

組換えタンパク質の様々な構築物を、ピューロマイシン耐性遺伝子をコードするレンチウイルス骨格にクローニングする。ウイルスベクターを作製し、ＮＦＡＴ、ＮｆｋＢ、およびＳＴＡＴ５ Ｊｕｒｋａｔレポーター細胞株の形質導入に使用する。ここで、ＮＦＡＴ応答エレメント、ＮｆｋＢ応答エレメント、またはＳＴＡＴ５応答エレメントは、ｌｕｃ２レポーター遺伝子の活性を制御する。形質導入の２日後、４μｇ／ｍｌのピューロマイシンで１週間にわたってＪｕｒｋａｔ細胞を選択する。ＯＮＥ－Ｇｌｏ（商標）ルシフェラーゼアッセイシステム（プロメガ社（Ｐｒｏｍｅｇａ））を用いて様々なレポーター

細胞株においてルシフェラーゼを評価する。

【０３７２】

実施例３：キメラタンパク質を発現する制御性Ｔ細胞の生成

健康なドナー由来のＣＤ４＋ＣＤ２５＋ＣＤ１２７－細胞として、制御性Ｔ細胞を精製し、ＦＡＣＳソーティングする。インターロイキン－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）の存在下でＸ－Ｖｉｖｏ培地（ロンザ社（Ｌｏｎｚａ））中でＨｕｍａｎ　Ｔ－Ａｃｔｉｖａｔｏｒ　ＣＤ３／ＣＤ２８　Ｄｙｎａｂｅａｄｓ（商標）（サーモフィッシャーサイエンティフィック社（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ））を用いて細胞を活性化する。４８時間の活性化後、細胞に、組換えタンパク質構築物をコードするレンチウイルス粒子を形質導入する。細胞をさらに増殖させ、異なる条件間で増殖速度を比較する。１４日目に細胞を回収し、計数する。０．５×10^6個の細胞を抗ＥＰＯＲ抗体で染色する。ＥＰＯＲの発現レベルと形質導入効率は、フローサイトメトリーで抗ＥＰＯＲ抗体の割合を見て評価した。Ｔｒｅｇ表現型は、固定および透過処理（Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ　Ｆａｃｔｏｒ　Ｓｔａｉｎｉｎｇ　Ｂｕｆｆｅｒ　Ｓｅｔ、サーモフィッシャーサイエンティフィック社）後、抗ＣＤ４、抗ＣＤ２５、抗ＣＤ１２７、抗ＣＤ８、抗ＧＩＴＲ、抗ＣＤ３９、抗ＣＤ４５ＲＡ、抗ＣＤ４５ＲＯ、抗ＩＣＯＳでの表面染色と、抗ＦＯＸＰ３および抗ＨＥＬＩＯＳでの細胞内染色とによって評価する。

【０３７３】

実施例４：ＩＬ２Ｒシグナル伝達の指標としてのＳＴＡＴ５リン酸化解析

キメラタンパク質を形質導入したＴｒｅｇを、ＩＬ２を含まない培地中で一晩静置した。ＴｒｅｇのＳＴＡＴ５リン酸化は、培地のみでの培養またはラパマイシンとの培養の１０分後と１２０分後にＦＡＣＳ解析によって評価した。

【０３７４】

実施例５：構築物７８３、７８４、７８５、７８６、７８７、および７８８の解析

材料および方法

クローニング：

図３に示す各構築物を自社で設計した。クローニングはレンチウイルスベクター骨格で行い、ＮＥＢ　Ｓｔａｂｌｅ高効率細菌をプラスミドで形質転換し、選択剤カナマイシンで増殖させた。Ｍｉｎｉｐｒｅｐ　ＫｉｔおよびＭａｘｉｐｒｅｐ　Ｋｉｔ（キアゲン社）を用いてＤＮＡを抽出した。インサートは、ＰＣＲクローニングにより、他のレンチウイルス骨格またはレトロウイルス骨格に導入した。クローニングは、部位特異的変異誘発法またはＰＣＲベースの方法によって実施した。

【０３７５】

構築物：

構築物ｐＱＴＸ　７８３（ＥＰＯＲ　ＷＴ）は、ＨＬＡ－Ａ２特異的なＣＡＲとＦｏｘＰ３（Ｔ２Ａ自己切断ドメインとＰ２Ａ自己切断ドメインによって分離）に動作可能に連結された野生型ＥＰＯ受容体を含む。

構築物ｐＱＴＸ　７８４（ＥＰＯＲ　ｍｕｔ）は、ＨＬＡ－Ａ２特異的なＣＡＲとＦｏｘＰ３（Ｔ２Ａ自己切断ドメインとＰ２Ａ自己切断ドメインによって分離されている）に動作可能に連結された変異（ｍｕｔａｔｅｄ）ＥＰＯ受容体を含む。上記変異ＥＰＯＲは、エキソドメインに変異を有する（配列番号１の１５４位でＲがＣに変異している）。上記変異ＥＰＯＲの膜貫通ドメインおよびエンドドメインは、それぞれ野生型ＥＰＯＲの膜貫通ドメインおよびエンドドメインである。

構築物ｐＱＴＸ　７８５（ＥＰＯＲ　ｔｒｕｎｃ　Ｖ１）は、ＨＬＡ－Ａ２特異的なＣＡＲとＦｏｘＰ３（Ｔ２Ａ自己切断ドメインとＰ２Ａ自己切断ドメインによって分離されている）に動作可能に連結された変異ＥＰＯ受容体を含む。上記変異ＥＰＯＲは、エキソドメインに変異を有し（配列番号１の１５４位でＲがＣに変異している）、エンドドメインが配列番号１の３７８位の後でトランケートされている。膜貫通ドメインは野生型ＥＰＯＲの膜貫通ドメインである。

構築物ｐＱＴＸ　７８６（ＥＰＯＲ　ｔｒｕｎｃ　Ｖ２）は、ＨＬＡ－Ａ２特異的なＣ

ＡＲとＦｏｘＰ３（Ｔ２Ａ自己切断ドメインとＰ２Ａ自己切断ドメインによって分離されている）に動作可能に連結された変異ＥＰＯ受容体を含む。上記変異ＥＰＯＲは、エキソドメインに変異を有し（配列番号１の１５４位でＲがＣに変異している）、エンドドメインが配列番号１の４３３位の後でトランケートされている。膜貫通ドメインは野生型ＥＰＯＲの膜貫通ドメインである。

構築物ｐＱＴＸ ７８７（ＥＰＯＲ ｔｒｕｎｃ Ｖ３ ＦＳ）は、ＨＬＡ－Ａ２特異的なＣＡＲとＦｏｘＰ３（Ｔ２Ａ自己切断ドメインとＰ２Ａ自己切断ドメインによって分離されている）に動作可能に連結された変異ＥＰＯ受容体を含む。上記変異ＥＰＯＲは、エキソドメインに変異を有し（配列番号１の１５４位でＲがＣに変異している）、エンドドメインが配列番号１の４３３位の後でトランケートされており、Ｃ末端に追加の１０アミノ酸テールが挿入されている（ＰＡＬＡＳＭＤＴＶＰ）。膜貫通ドメインは野生型ＥＰＯＲの膜貫通ドメインである。

構築物ｐＱＴＸ ７８８（ＷＴ ＥＰＯＲ ｔｒｕｎｃ Ｖ３ ＦＳ）は、ＨＬＡ－Ａ２特異的なＣＡＲとＦｏｘＰ３（Ｔ２Ａ自己切断ドメインとＰ２Ａ自己切断ドメインによって分離されている）に動作可能に連結された変異ＥＰＯ受容体を含む。エキソドメインおよび膜貫通ドメインは、それぞれ野生型ＥＰＯＲのエキソドメインおよび膜貫通ドメインである。エンドドメインは、配列番号１の４３３位の後でトランケートされており、Ｃ末端に追加の１０アミノ酸テールが挿入されている（ＰＡＬＡＳＭＤＴＶＰ）。

【０３７６】

ＰＢＭＣの採取：

ロイコパック（leukopak）をＢｉｏＩＶＴ社から入手した。ネガティブセレクションキット（ステムセルテクノロジーズ社（ＳｔｅｍＣｅｌｌ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ））を用いてＰＢＭＣを単離した。簡単に述べると、不要な画分を抗体複合体と磁気ビーズで標識して除去の標的とし、その後、磁石を用いて分離する。

【０３７７】

ＴｒｅｇおよびＴｃｏｎｖ（Ｔｅｆｆ）単離プロトコル：

ロイコパックを使用して、Ｔｒｅｇ集団およびＴｃｏｎｖ集団を誘導した。ロイコパック由来のＰＢＭＣを、ＣＤ２５ポジティブセレクションにかけた後、ネガティブセレクションによりＣＤ４富化を行った。それぞれ、Ｈｕｍａｎ ＣＤ２５ Ｐｏｓｉｔｉｖｅ Ｓｅｌｅｃｔｉｏｎ ＣｏｃｋｔａｉｌとＨｕｍａｎ ＣＤ４＋ Ｔ Ｃｅｌｌ Ｅｎｒｉｃｈｍｅｎｔ Ｃｏｃｋｔａｉｌ（ステムセルテクノロジーズ社）を用いた。磁石を用いて目的の細胞を分離した。細胞のＣＤ４＋ＣＤ２５－画分をＴｃｏｎｖ集団として使用するために保持した。ＣＤ１２７ｈｉｇｈ Ｄｅｐｌｅｔｉｏｎ Ｃｏｃｋｔａｉｌ（ステムセルテクノロジーズ社）を使用して、ＣＤ４＋ＣＤ２５＋ＣＤ１２７－／ｌｏｗ細胞集団と磁石を用いて分離した目的の細胞をさらに分離した。各細胞画分を、フローサイトメトリー用抗体である、抗ＣＤ４ ＶｉｏＢｌｕｅ（Ｍ－Ｔ４６６、ミルテニーバイオテク社（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ））、抗ＣＤ２５ ＰＥ（３Ｇ１０、ミルテニーバイオテク社）、抗ＣＤ１２７ ＡＰＣ（ＭＢ１５－１８Ｃ９、ミルテニーバイオテク社）、抗ＣＤ４５ＲＡ ＦＩＴＣ（Ｔ６Ｄ１１、ミルテニーバイオテク社）、およびＬＤ７ＡＡＤ（バイオレジェンド社）で染色した後、ＦＡＣＳソーティングした。示されている場合、ＣＤ４＋ＣＤ２５＋ＣＤ１２７－／ｌｏｗ（バルクＴｒｅｇ）またはＣＤ４＋ＣＤ２５＋ＣＤ１２７－／ｌｏｗ ＣＤ４５ＲＡ＋（ＣＤ４５ＲＡ＋ Ｔｒｅｇ）を選別して使用した。

【０３７８】

Ｔｒｅｇ培養培地および増殖：

ヒト制御性Ｔ細胞を、５％ヒトＡＢ血清（熱不活性化、メルク社（Ｍｅｒｃｋ））とＩＬ－２（プロロイキン、クリニジェンヘルスケア社（Ｃｌｉｎｉｇｅｎ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ））を添加したＸ－ＶＩＶＯ １５培地（ロンザ社（Ｌｏｎｚａ））で培養し、抗ＣＤ３／ＣＤ２８ビーズで活性化した。細胞には、ＩＬ－２を添加したＴｒｅｇ培養培地を２～３日ごとに再供給した。Ｔｒｅｇ細胞のさらなる増殖を促進するために、抗ＣＤ３

／ＣＤ２８ビーズによる２回目の刺激を行った。
【０３７９】
遺伝子導入およびウイルス粒子の作製：
ＨＥＫ２９３Ｔ細胞を、ＤＭＥＭ（ダルベッコ改変イーグル培地）＋１０％ウシ胎児血清（ＦＢＳ）に播種し、２４時間培養した。遺伝子導入試薬を室温に戻し、目的のＤＮＡ構築物／プラスミド、パッケージングプラスミド（ｐＭＤＬｇ　ｐＲＲＥ）、調節プラスミド（ＰＲＳＶ－ＲＥＶ）、およびウイルスエンベロープ（ｐＭＤ２．Ｇ）と混合した。希釈したＤＮＡにＦｕＧＥＮＥ　ＨＤ　Ｔｒａｎｓｆｅｃｔｉｏｎ　Ｒｅａｇｅｎｔ（プロメガ社（Ｐｒｏｍｅｇａ））を加えて混合し、ＨＥＫ２９３Ｔに添加した。遺伝子導入の４８時間後に上清を採取し、濾過してウイルスを濃縮した。
【０３８０】
Ｔ細胞の形質導入：
Ｔｒｅｇを抗ＣＤ３／ＣＤ２８ビーズで活性化し、Ｔ細胞培養培地（Ｘ－Ｖｉｖｏ　１５培地（ロンザ社）、５％ヒトＡＢ血清、およびＩＬ２）に再懸濁した。レトロネクチン（タカラバイオ株式会社（Ｔａｋａｈａｒａ－ｂｉｏ）、大津、日本）でコーティングすることによって、組織培養用処理済みではない２４ウェルプレートを準備し、細胞懸濁液をレンチウイルス上清と一緒に加えた。細胞培養物をスピノキュレーションし、１日おきに培地交換を行った。形質導入の７日後以降に細胞を実験に使用した。
【０３８１】
形質導入効率：
Ｔｒｅｇを、まず、ＨＬＡ－Ａ２　Ｄｅｘｔｒａｍｅｒ－　ＡＰＣ（Ｉｍｍｕｄｅｘ社）で室温で１５分間表面染色した。次いで、洗浄した細胞を、ＰＢＳ中のＬＩＶＥ／ＤＥＡＤ（商標）Ｆｉｘａｂｌｅ　Ｎｅａｒ－ＩＲ－Ｄｅａｄ　Ｃｅｌｌ　Ｓｔａｉｎ（サーモフィッシャー社）で室温で２０分間染色した。次いで、洗浄した細胞を、ＦＡＣＳ染色緩衝液中の抗ＣＤ４　ＢＶ５１０（Ａ１６１Ａ１、バイオレジェンド社）、抗ＣＤ２５　ＰＥ－Ｃｙ７（ＢＣ９６、バイオレジェンド社）、および抗ＥＰＯＲ　ＰＥ（３８４０９、バイオテクニ社（Ｂｉｏ－Ｔｅｃｈｎｅ））で４℃で２０分間染色した。細胞を洗浄した後、Ａｔｔｕｎｅ（商標）ＮｘＴフローサイトメーターで取得を行った。ＦｌｏｗＪｏソフトウェアを用いて細胞表面発現を解析した。以下のゲーティング戦略を使用した：リンパ球＞単一細胞＞生存細胞＞ＣＤ４＋ＣＤ２５＋＞ＨＬＡ－Ａ２　Ｄｅｘ＋　ＥＰＯＲ＋。
【０３８２】
ｐＳＴＡＴ５アッセイ：
Ｔｒｅｇ単離後１４日目に、形質導入したＴｒｅｇを、抗ＣＤ３／ＣＤ２８ビーズの枯渇とＩＬ２の除去により２４～４８時間休ませた後、アッセイのセットアップを行った。Ｔｒｅｇを、１ＩＵ／ｍｌのＥＰＯ（ステムセルテクノロジーズ社、英国）を用いて、または用いずに、３７℃で３０分間処理した後、染色を開始した。Ｔｒｅｇを、まず、ＨＬＡ－Ａ２　Ｄｅｘｔｒａｍｅｒ－　ＡＰＣ（Ｉｍｍｕｄｅｘ社）で室温で１５分間表面染色した。次いで、洗浄した細胞を、ＰＢＳ中のＬＩＶＥ／ＤＥＡＤ（商標）Ｆｉｘａｂｌｅ　Ｎｅａｒ－ＩＲ－Ｄｅａｄ　Ｃｅｌｌ　Ｓｔａｉｎ（サーモフィッシャー社）で室温で２０分間染色した。次いで、洗浄した細胞を、ＦＡＣＳ染色緩衝液中の抗ＣＤ４　ＢＶ５１０（Ａ１６１Ａ１、バイオレジェンド社）および抗ＣＤ２５　ＰＥ－Ｃｙ７（ＢＣ９６、バイオレジェンド社）で４℃で２０分間染色した。次いで、ＰｅｒＦｉｘ　Ｅｘｐｏｓｅ　ｋｉｔ（ベックマン・コールター社（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ））を用いて細胞を固定し、透過処理した後、ｐＳＴＡＴ５　ＰＥ－ＣＦ５９４（４７／Ｓｔａｔ５ｐＹ６９４、ＢＤバイオサイエンス社（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ））で細胞内染色した。細胞を２回洗浄した後、Ａｔｔｕｎｅ（商標）ＮｘＴフローサイトメーターで取得を行った。ＦｌｏｗＪｏソフトウェアを用いてｐＳＴＡＴ５の発現を解析した。以下のゲーティング戦略を使用した：リンパ球＞単一細胞＞生存細胞＞ＣＤ４＋ＣＤ２５＋＞ＨＬＡ－Ａ２　Ｄｅｘ＋＞ｐＳＴＡＴ５＋。ただし、モックＴｒｅｇについては、以下のゲーテ

ィング戦略を使用した：リンパ球＞単一細胞＞生存細胞＞ＣＤ４＋ＣＤ２５＋＞ｐＳＴＡＴ５＋。

【０３８３】

形質導入細胞の富化およびＦＯＸＰ３発現の測定：

Ｔｒｅｇ単離後１４日目に、形質導入したＴｒｅｇを、抗ＣＤ３／ＣＤ２８ビーズの枯渇とＩＬ２の除去により２４時間休ませた後、アッセイのセットアップを行った。培地、ＣＤ３／ＣＤ２８ビーズ、０ＩＵ／ｍｌおよび３００ＩＵ／ｍｌのＩＬ２からなる様々な条件を設定し、０日目、４日目、および６日目に読み取りを行った。Ｔｒｅｇを、まずＨＬＡ－Ａ２　Ｄｅｘｔｒａｍｅｒ－　ＡＰＣ（Ｉｍｍｕｄｅｘ社）で表面染色し、次いでＰＢＳ中のＬＩＶＥ／ＤＥＡＤ（商標）Ｆｉｘａｂｌｅ　Ｎｅａｒ－ＩＲ－Ｄｅａｄ　Ｃｅｌｌ　Ｓｔａｉｎ（サーモフィッシャー社）で染色した。次いで、洗浄した細胞を、ＦＡＣＳ染色緩衝液中の抗ＣＤ４　ＢＶ５１０（Ａ１６１Ａ１、バイオレジェンド社）および抗ＣＤ２５　ＰＥ－Ｃｙ７（ＢＣ９６、バイオレジェンド社）で４℃で３０分間染色した。次いで、洗浄した細胞を、ＦＯＸＰ３／Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ　Ｆａｃｔｏｒ　Ｓｔａｉｎｉｎｇ　Ｂｕｆｆｅｒ　Ｓｅｔ（サーモフィッシャーサイエンティフィック社、英国）を用いて、製造業者の指示に従って透過処理した。透過処理した細胞を、抗ＦｏｘＰ３　ＢＶ４２１（２０６Ｄ、バイオレジェンド社）抗体で染色した。細胞を２回洗浄した後、Ａｔｔｕｎｅ（商標）ＮｘＴフローサイトメーターで取得を行った。ＦｌｏｗＪｏソフトウェアを用いてＦｏｘＰ３発現を解析した。以下のゲーティング戦略を使用した：リンパ球＞単一細胞＞生存細胞＞ＣＤ４＋ＣＤ２５＋＞ＨＬＡ－Ａ２　Ｄｅｘ＋＞ＦｏｘＰ３＋。ただし、モックＴｒｅｇについては、以下のゲーティング戦略を使用した：リンパ球＞単一細胞＞生存細胞＞ＣＤ４＋ＣＤ２５＋＞ＦｏｘＰ３＋。

【０３８４】

細胞生存率／増殖倍率の測定：

Ｔｒｅｇ単離後１４日目に、形質導入されたＴｒｅｇを、抗ＣＤ３／ＣＤ２８ビーズの枯渇とＩＬ２の除去により２４時間休ませた後、アッセイのセットアップを行った。培地、ＩＬ２非存在下でのＡ１＋　Ｋ５６２細胞（Ａ２－であった）またはＡ２＋　Ｋ５６２細胞からなる様々な条件を設定し、０日目、５日目、および７日目に読み取りを行った。Ｋ５６２：Ｔｒｅｇの比率は１：４とした。Ｔｒｅｇを、抗ＥＰＯＲ　ＰＥ（３８４０９、バイオテクニ社）、抗ＣＤ３４　ＦＩＴＣ（ＱＢＥＮＤ１０、ライフテクノロジーズ社（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ））、抗ＣＤ４　ＢＶ５１０（Ａ１６１Ａ１、バイオレジェンド社）、および抗ＣＤ２５　ＰＥ－Ｃｙ７（ＢＣ９６、バイオレジェンド社）で表面染色した。その後、洗浄した細胞を、Ａｎｎｅｘｉｎ　Ｖ　Ａｐｏｐｔｏｓｉｓ　Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ　Ｋｉｔ　ｗｉｔｈ　７－ＡＡＤ（バイオレジェンド社）を用いて、Ａｎｎｅｘｉｎ　Ｖ　Ｂｉｎｄｉｎｇ　Ｂｕｆｆｅｒ中のＡｎｎｅｘｉｎ　Ｖ　ＢＶ４２１および７－ＡＡＤで染色した。各ウェル中の生存形質導入細胞の公正な定量を可能にするために、全てのウェルにわたって等容量の細胞懸濁液を取得した。細胞をＡｔｔｕｎｅ（商標）ＮｘＴフローサイトメーターで取得した。ＦｌｏｗＪｏソフトウェアを用いて細胞生存率を解析した。以下のゲーティング戦略を使用した：リンパ球＞単一細胞＞アネキシンＶ－７－ＡＡＤ－（生存細胞）＞ＣＤ４＋ＣＤ２５＋＞ＣＤ３４／ＱＢＥＮＤ＋またはＥＰＯＲ＋。

【０３８５】

ディープフェノタイピング（deep phenotyping）：

Ｔｒｅｇ単離後１４日目に、形質導入したＴｒｅｇを、抗ＣＤ３／ＣＤ２８ビーズの枯渇とＩＬ２の除去により２４時間休ませた後、染色を行った。Ｔｒｅｇを、まず、ＨＬＡ－Ａ２　Ｄｅｘｔｒａｍｅｒ　ＡＰＣ（Ｉｍｍｕｄｅｘ社）で室温で１５分間表面染色した。次いで、洗浄した細胞を、ＰＢＳ中のＬＩＶＥ／ＤＥＡＤ（商標）ＦｉｘａｂｌｅｅＦｌｕｏｒ４５５－Ｄｅａｄ　Ｃｅｌｌ　Ｓｔａｉｎ（サーモフィッシャー社）で室温で２０分間染色した。次いで、洗浄した細胞を、Ｂｒｉｌｌｉａｎｔ　Ｓｔａｉｎ　Ｂｕｆｆｅｒ　Ｐｌｕｓ中の抗ＣＣＲ４　ＢＶ４８０（１Ｇ１、ＢＤバイオサイエンス社）、

抗ＣＣＲ７　ＢＵＶ３９５（２－Ｌ１－Ａ、ＢＤバイオサイエンス社）、抗ＣＤ１８３／ＣＸＣＲ３　ＰＥ－Ｃｙ７（Ｇ０２５Ｈ７、バイオレジェンド社）で３７℃で２０分間染色した。次いで、洗浄した細胞を、Ｂｒｉｌｌｉａｎｔ　Ｓｔａｉｎ　Ｂｕｆｆｅｒ　Ｐｌｕｓ中の抗ＨＬＡ－ＤＲ　ＡＰＣ－Ｆｉｒｅ８１０（Ｇ４６－６、ＢＤバイオサイエンス社）、抗ＰＤ－１　ＢＶ６５０（ＥＨ１２．２Ｈ７、バイオレジェンド社）、抗ＩＣＯＳ　ＢＶ７５０（ＤＸ２９、ＢＤバイオサイエンス社）、抗ＣＤ８ａ　ＢＵＶ８０５（ＳＫ１、ＢＤバイオサイエンス社）、抗ＴＩＭ－３／ＣＤ３６６　ＢＶ７１１（７Ｄ３、ＢＤバイオサイエンス社）、抗ＣＤ２７　ＰＥ－ＡＦ７００（０３２３、バイオレジェンド社）、抗ＣＣＲ６　ＢＶ６０５（Ｇ０３４Ｅ３、バイオレジェンド社）、抗ＣＤ９５　ＰＥ－Ｃｙ５（ＤＸ２、ＢＤバイオサイエンス社）、抗ＴＩＧＩＴ　ＡＰＣ－Ｃｙ７（ＶＳＴＭ３、バイオレジェンド社）、抗ＣＤ７０　ＢＶ７８６（Ｋｉ－２４、ＢＤバイオサイエンス社）、抗ＣＤ４　ＶｉｏＢｌｕｅ（Ｍ－Ｔ４６６、ミルテニーバイオテク社）、抗ＣＤ３４　ＰＥ（ＱＢＥＮＤ１０、ライフテクノロジーズ社）、および抗ＣＤ２５　ＢＵＶ５６３（２Ａ３、ＢＤバイオサイエンス社）で４℃で３０分間染色した。細胞の細胞内染色のために、ＦＯＸＰ３／Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ　Ｆａｃｔｏｒ　Ｓｔａｉｎｉｎｇ　Ｂｕｆｆｅｒ　Ｓｅｔ（サーモフィッシャーサイエンティフィック社、英国）を用いて、製造業者の指示に従って、細胞を固定し、透過処理した。透過処理した細胞を、透過処理緩衝液中の抗Ｈｅｌｉｏｓ　ＰＥ－Ｄａｚｚｌｅ５９４（２２Ｆ６、バイオレジェンド社）、抗ＣＴＬＡ－４　ＢＢ７００（ＢＮＩ３、ＢＤバイオサイエンス社）、および抗ＦＯＸＰ３　ＡＦ６４７（２０６Ｄ、ＢＤバイオサイエンス社）で染色した。細胞を２回洗浄した後、フローサイトメーターで取得を行った。ＦｌｏｗＪｏソフトウェアを用いてマーカー発現を解析した。

【０３８６】

抑制アッセイ：

Ｔｒｅｇ単離後１４日目に、形質導入したＴｒｅｇを、抗ＣＤ３／ＣＤ２８ビーズの枯渇とＩＬ２の除去により２４時間休ませた後、アッセイのセットアップを行った。Ｔｒｅｇの染色にはＣｅｌｌＴｒａｃｅ（商標）Ｖｉｏｌｅｔ（ＣＴＶ）Ｃｅｌｌ　Ｐｒｏｌｉｆｅｒａｔｉｏｎ　Ｋｉｔ（サーモフィッシャー社）を、Ｔエフェクターの染色にはＣｅｌｌＴｒａｃｅ（商標）Ｙｅｌｌｏｗ（ＣＴＹ）Ｃｅｌｌ　ＰｒｏｌｉｆｅｒａｔｉｏｎＫｉｔ（サーモフィッシャー社）を、製造業者のプロトコルに従って使用した。ＣＴＶで染色したＴｒｅｇを、示した異なる比率で、ＣＴＹで染色したＴエフェクターと共に培養した。１２０Ｇｙを照射したＨＬＡ－Ａ２＋　Ｂ細胞またはＨＬＡ－Ａ２－　Ｂ細胞を、Ｂ細胞：Ｔエフェクター＝１：３．３の比率で共存培養した。あるいは、Ｈｕｍａｎ　Ｔ－Ａｃｔｉｖａｔｏｒ　ＣＤ３／ＣＤ２８　Ｄｙｎａｂｅａｄｓ（商標）（ギブコ社）を、ビーズ：Ｔエフェクター＝１：１の比率で添加した。細胞培養物を、３７℃、５％CO_2で４日間インキュベートした後、染色した。細胞は、ＰＢＳで洗浄した後、ＰＢＳ中のＦｉｘａｂｌｅ　Ｎｅａｒ　ＩＦ－Ｄｅａｄ　Ｃｅｌｌ　Ｓｔａｉｎ（サーモフィッシャー社）で室温で２０分間染色した。次いで、洗浄した細胞を、抗ＥＰＯＲ　ＰＥ（３８４０９、　バイオテクニ社）、抗ＣＤ３４　ＦＩＴＣ（ＱＢＥＮＤ１０、ライフテクノロジーズ社）、およびＨＬＡ－Ａ３（ＲＥＡ９５０、ミルテニーバイオテク社）で４℃で２０分間染色した。細胞を洗浄した後、Ａｔｔｕｎｅ（商標）ＮｘＴフローサイトメーターで取得を行った。ＦｌｏｗＪｏソフトウェアを用いてデータを解析した。以下のゲーティング戦略を使用した：リンパ球＞単一細胞＞生存細胞＞ＨＬＡ－Ａ３－＞ＣＴＹ＋。

【０３８７】

細胞傷害性アッセイ：

ＣｅｌｌＴｒａｃｅ（商標）Ｖｉｏｌｅｔ（ＣＴＶ）Ｃｅｌｌ　Ｐｒｏｌｉｆｅｒａｔｉｏｎ　Ｋｉｔ（サーモフィッシャー社）を用いて、製造業者のプロトコルに従って、標的細胞であるＨＬＡ－Ａ２＋　Ｋ５６２またはＨＬＡ－Ａ２－　Ｋ５６２を標識した。示したＴｒｅｇまたはナチュラルキラー細胞（ＮＫ）のエフェクター細胞を、示した様々な比率で、標的細胞と共存培養した。抗ＣＤ１０７ａ　ＰＥ（Ｈ４Ａ３、ＢＤバイオサイエ

ンス社）を培養物に添加し、３７℃、５％CO_2で合計４時間インキュベートした。１時間のインキュベーション後、培養物にＧｏｌｇｉＳＴＯＰ標準溶液（working solution）（ＢＤバイオサイエンス社）を添加した。洗浄した細胞を、Ａｔｔｕｎｅ（商標）ＮｘＴフローサイトメーターで取得した。ＦｌｏｗＪｏソフトウェアを用いてデータを解析した。

【０３８８】

細胞内サイトカイン染色：

Ｔｒｅｇ細胞またはＴ細胞を、Ｌｅｕｋｏｃｙｔｅ Ａｃｔｉｖａｔｉｏｎ Ｃｏｃｋｔａｉｌ ｗｉｔｈ ＢＤ ＧｏｌｇｉＰｌｕｇ（商標）で３７℃で５時間活性化した。次いで、細胞を、ＰＢＳ中のＬＩＶＥ／ＤＥＡＤ（商標）Ａｑｕａで室温で２０分間染色した。次いで、洗浄した細胞を、抗ＣＤ４ ＰｅｒＣＰＣｙ５．５（ＳＫ３、バイオレジェンド社）、抗ＥＰＯＲ ＰＥ（３８４０９、バイオテクニ社）、および抗ＣＤ３４ ＦＩＴＣ（ＱＢＥＮＤ１０、ライフテクノロジーズ社）で４℃で３０分間染色した。次いで、洗浄した細胞を、ＦＯＸＰ３／Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ Ｆａｃｔｏｒ Ｓｔａｉｎｉｎｇ Ｂｕｆｆｅｒ Ｓｅｔ（サーモフィッシャーサイエンティフィック社、英国）を用いて、製造業者の指示に従って、固定し、透過処理した。次いで、透過処理した細胞を、抗ＩＬ－１７Ａ ＢＶ６０５（ＢＬ１６８、バイオレジェンド社）、抗ＴＮＦα ＡＰＣ－Ｃｙ７（Ｍａｂ１１、バイオレジェンド社）、抗ＩＦＮ－γ ＰＥ－Ｃｙ７（４Ｓ．Ｂ３、バイオレジェンド社）、および抗ＩＬ２ ＰＥ－ＰＥ／Ｄａｚｚｌｅ ５９４（ＭＱ１－１７Ｈ１２、バイオレジェンド社）で染色した。細胞を洗浄した後、フローサイトメーターで取得を行った。

【０３８９】

データ解析：

フローサイトメトリーデータは、フローサイトメトリー解析ソフトウェアＦｌｏｗＪｏ（ＦｌｏｗＪｏ，ＬＬＣ社）を用いて解析することができる。全ての統計解析は、Ｇｒａｐｈｐａｄ Ｐｒｉｓｍ ｖ．９．４．１（グラフパッドプリズムソフトウェア社（Ｇｒａｐｈｐａｄ Ｐｒｉｓｍ Ｓｏｆｔｗａｒｅ））を用いて実施することができる。

【０３９０】

結果

図４Ａ－構築物は形質導入されたヒトＴｒｅｇにおいて良好に発現される

様々な構築物、すなわち６５８（ｎｏ ｔｅｃｈ）、７８３、７８４、７８５、７８６、およびモックを形質導入した新鮮なＴｒｅｇの形質導入効率を示すＦＡＣＳプロットも示す。形質導入効率は、ＨＬＡ－Ａ２デキストラマーおよびＥＰＯＲ発現を用いて測定した。各構築物について類似した形質導入効率が得られた。これを下記の表にも示す。

【表２】

構築物	形質導入効率（%）
６５８	５０．６
７８３	４０．５
７８４	４０．３
７８５	５０．７
７８６	５３．３

【０３９１】

図４Ｂ－構築物は形質導入されたヒトＴｒｅｇにおいて良好に発現される

様々な構築物、すなわち７８３、７８４、７８５、７８６、７８７、７８８、およびモックを形質導入した凍結Ｔｒｅｇの形質導入効率を示すＦＡＣＳプロットも示す。形質導入効率は、ＨＬＡ－Ａ２デキストラマーおよびＥＰＯＲ発現を用いて測定した。各構築物について類似した形質導入効率が得られた。これを下記の表にも示す。

【表３】

構築物	形質導入効率（%）
７８３	２９．５
７８４	３９．９
７８５	５２．３
７８６	５８．５
７８７	３９．４
７８８	３７．２

【０３９２】

図５－ＥＰＯＲ由来タンパク質を形質導入したＴｒｅｇは、ｐＳＴＡＴ５レベルを特異的にアップレギュレートする

形質導入したＴｒｅｇを、ＥＰＯを用いて、または用いずに、処理した後、ｐＳＴＡＴ５発現レベルを調べるために染色した。細胞の、ＨＬＡ－Ａ２　ＣＡＲ＋と定義される形質導入画分をプレゲートした。一方、非形質導入画分はＨＬＡ－Ａ２　ＣＡＲ－である。構築物７８３、７８４、７８５、および７８６のうちの１つを発現する細胞の形質導入画分は、細胞の非形質導入画分と比較してｐＳＴＡＴ５のＭＦＩレベルが高く、ＥＰＯＲ由来タンパク質がＪＡＫ－ＳＴＡＴシグナル伝達を促進することを示している。構築物７８３、７８４、７８５、および７８６のうちの１つを発現する細胞の形質導入画分はまた、ｐＳＴＡＴ５のより高いＭＦＩレベルによって検出されたように、外因性ＥＰＯに特異的に応答したが、一方で、非形質導入画分は外因性ＥＰＯに応答せず、この非形質導入画分は、ｐＳＴＡＴ５のＭＦＩが類似した基底レベルのままであった。ＥＰＯＲ由来タンパク質を有さない構築物６５８を形質導入した細胞は、形質導入画分および非形質導入画分の両方においてｐＳＴＡＴ５のＭＦＩレベルが類似していた。尚、ＥＰＯは血清中に存在するため、使用した培地（Ｘ－ｖｉｖｏ＋５％ヒト血清）はＥＰＯを含有している可能性が高い。このことは、構築物７８３（ＷＴ　ＥＰＯＲ）を形質導入した細胞のｐＳＴＡＴ５の増加と、さらにＥＰＯを添加した場合のさらなる増加とを説明する。しかしながら、追加のＥＰＯが使用されない場合、７８４、７８５、および７８６の形質導入画分は７８３よりもｐＳＴＡＴ５が高い。

【０３９３】

図６Ａ－ＥＰＯＲ由来タンパク質を形質導入したＴｒｅｇは、時間の経過と共に富化し、対照Ｔｒｅｇと比較して生存優位性が高い

形質導入したＴｒｅｇを、ＩＬ２と共に、またはＩＬ２なしで、培養した。７８４、７８５、および７８６という構成的ＥＰＯＲ技術を用いて形質導入した細胞は、時間の経過と共に集団の割合が高まっている。対照的に、６５８（ＥＰＯＲ由来タンパク質を含まない）および７８３（ＷＴ　ＥＰＯＲ）の各構築物は、時間の経過と共に優先的に富化するわけではない。構成的ＥＰＯＲ（７８４、７８５、および７８６）を形質導入した細胞は、ＩＬ２が存在しない場合、７８３（ＷＴ　ＥＰＯＲ）および６５８（ｎｏ　ｔｅｃｈ）よりも高い生存優位性を示す。７８６（ＥＰＯＲ　ｔｒｕｎｃ　Ｖ２）は、これらの形質導入細胞が非形質導入細胞と比較して時間の経過と共に割合が増加しているため、最も高い優位性を持つと思われる。ＩＬ２が存在する場合は、天然のＩＬ２Ｒを介したシグナル伝達の結果として、細胞の非形質導入画分が増殖することができるため、構成的ＥＰＯＲ技術を用いて形質導入した細胞集団が富化することはない。

【０３９４】

図６Ｂ－ＥＰＯＲ由来タンパク質を形質導入したＴｒｅｇは、ＦｏｘＰ３発現を経時的に維持する

形質導入したＴｒｅｇを、ＩＬ２と共に、またはＩＬ２なしで、培養した。ＦｏｘＰ３を発現する細胞の割合は、６５８と比較して、７８３、７８４、７８５、および７８６の

全ての形質導入画分にわたって類似していた。細胞の非形質導入画分では、ＦｏｘＰ３発現の割合は、細胞の形質導入画分よりもやや低かった。ＥＰＯＲ由来タンパク質を形質導入した細胞は、ＦｏｘＰ３発現レベルを発現し、経時的に維持しており、Ｔｒｅｇがその表現型を維持することを示している。

【０３９５】

図６Ｃ－７８６形質導入Ｔｒｅｇは、同族Ａ２抗原を認識し、６５８対照Ｔｒｅｇと同様に応答する

Ａ２＋　Ｋ５６２細胞またはＡ２－　Ｋ５６２（Ａ１＋　Ｋ５６２）細胞と共存培養した６５８形質導入Ｔｒｅｇおよび７８６形質導入Ｔｒｅｇを示す生存アッセイ。データは、細胞増殖倍率の変化によって、６５８形質導入Ｔｒｅｇおよび７８６形質導入Ｔｒｅｇの両方が、Ａ２抗原を特異的に認識して応答することを示している。したがって、構成的ＥＰＯＲ技術（７８６）による形質導入は、細胞の機能に悪影響を及ぼさない。

【０３９６】

図７－ＥＰＯＲ由来タンパク質を形質導入したＴｒｅｇは、重要なＴｒｅｇマーカーの発現を維持した

形質導入したＴｒｅｇを、様々なＴｒｅｇ関連マーカーについてディープフェノタイピングした。グラフは、示したマーカーの、モックＴｒｅｇ、細胞の形質導入画分（ＨＬＡ－Ａ２　Ｄｅｘ＋）、または非形質導入画分（ＨＬＡ－Ａ２　Ｄｅｘ－）内における発現の割合を示す。ＥＰＯＲ形質導入Ｔｒｅｇ（形質導入画分および非形質導入画分の両方）は、モック形質導入Ｔｒｅｇと比較して、ＣＤ２５、ＣＤ２７、ＣＤ９５、ＣＴＬＡ－４、ＣＸＣＲ３、およびＦｏｘＰ３などの重要なＴｒｅｇマーカーの発現レベルを、類似した高いレベルに維持した。この結果は、ＥＰＯＲ由来タンパク質による形質導入がＴｒｅｇの表現型に対して有意な影響を及ぼさなかったことを示唆する。

【０３９７】

図８－ＥＰＯＲ由来タンパク質を形質導入したＴｒｅｇは、抑制能を維持した

形質導入したＴｒｅｇの抑制能を調べるために機能試験を行った。グラフは、ａＣＤ３／ＣＤ２８ビーズ、ＨＬＡ－Ａ２－　Ｂ細胞、およびＨＬＡ－Ａ２＋　Ｂ細胞という様々な刺激によるＴエフェクター細胞の増殖に対する形質導入Ｔｒｅｇ（またはモックＴｒｅｇ）の抑制率を示す。結果は、ＥＰＯＲ技術を用いたＴｒｅｇがモックＴｒｅｇと類似した抑制能を有することを示している。

【０３９８】

図９－ＥＰＯＲ由来タンパク質を形質導入したＴｒｅｇは、標的細胞を死滅させない

形質導入したＴｒｅｇの標的細胞に対する細胞傷害性を試験した。ＨＬＡ－Ａ２－　Ｋ５６２細胞またはＨＬＡ－Ａ２＋　Ｋ５６２細胞を様々な比率で形質導入Ｔｒｅｇと共存培養した。ＨＬＡ－Ａ２＋　ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞を陽性対照として使用した。結果は、モックＴｒｅｇおよびＥＰＯＲ形質導入Ｔｒｅｇが標的細胞も非標的細胞も死滅させないこと、したがって調節表現型が維持されることを示している。

【０３９９】

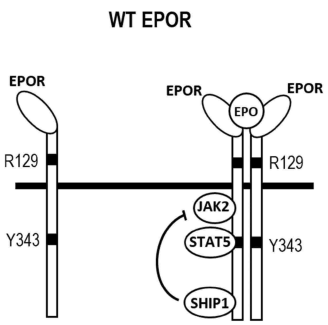
図１０－ＥＰＯＲ由来タンパク質を形質導入したＴｒｅｇは、対照Ｔｒｅｇと類似の細胞内サイトカインプロファイルを有する

６５８形質導入Ｔｒｅｇおよび７８６形質導入Ｔｒｅｇの細胞内サイトカインの存在を試験した。細胞をＰＭＡ／イオノマイシンで刺激した後、細胞内サイトカインを検出した。Ｔエフェクター細胞を陽性対照として使用した。７８６形質導入Ｔｒｅｇは、形質導入画分および非形質導入画分の両方で、細胞内サイトカインＩＬ２、ＴＮＦα、ＩＬ－１７、およびＩＦＮγのレベルが６５８形質導入Ｔｒｅｇと類似した低いレベルであった。このことは、７８６構築物が細胞に炎症反応を引き起こさず、細胞がその調節表現型を維持することを示唆する。

【図面】

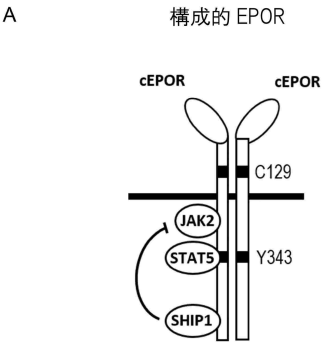
【図１】

FIGURE 1



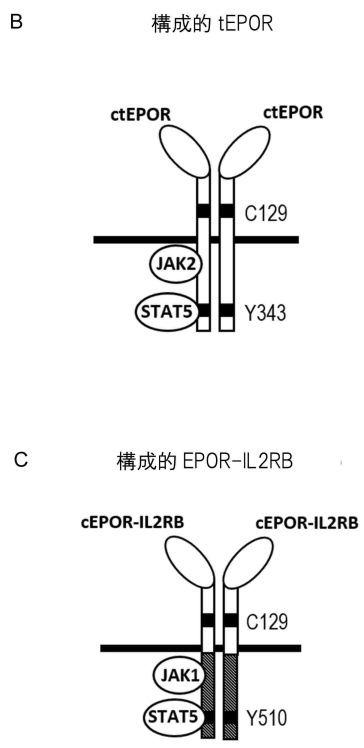
【図２Ａ】

FIGURE 2



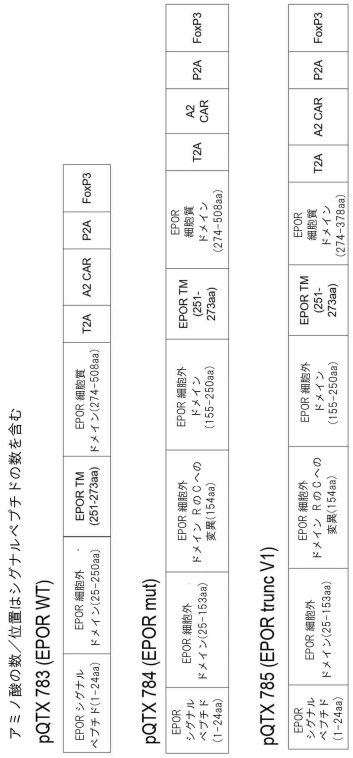
【図２ＢＣ】

FIGURE 2 CONTINUED



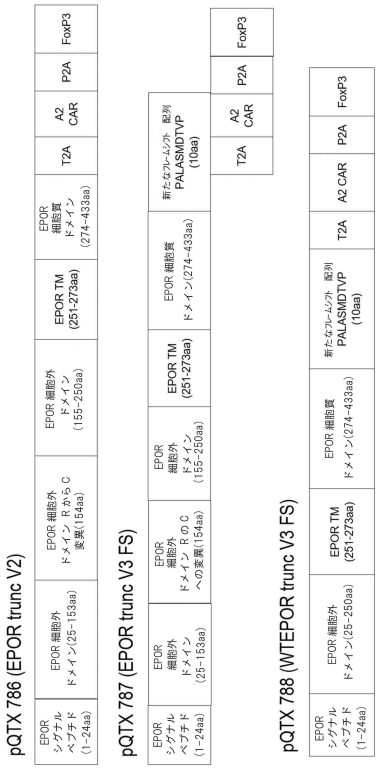
【図３－１】

FIGURE 3



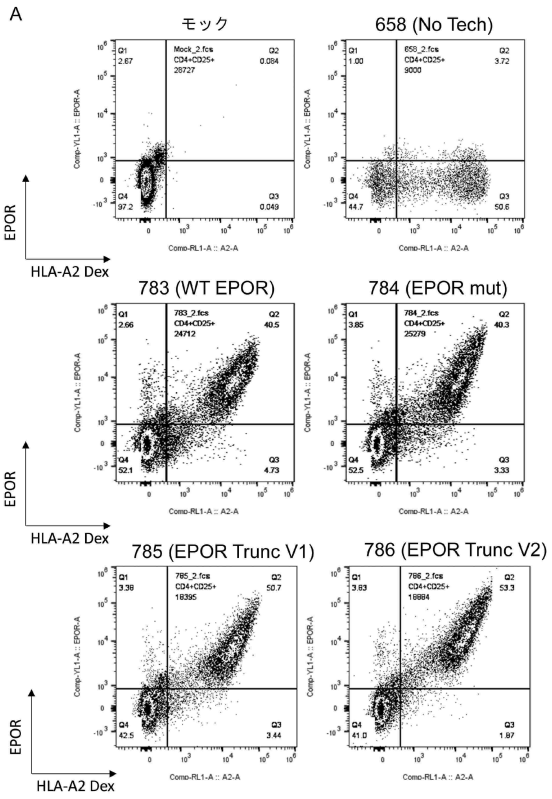
【図３－２】

FIGURE 3 CONTINUED



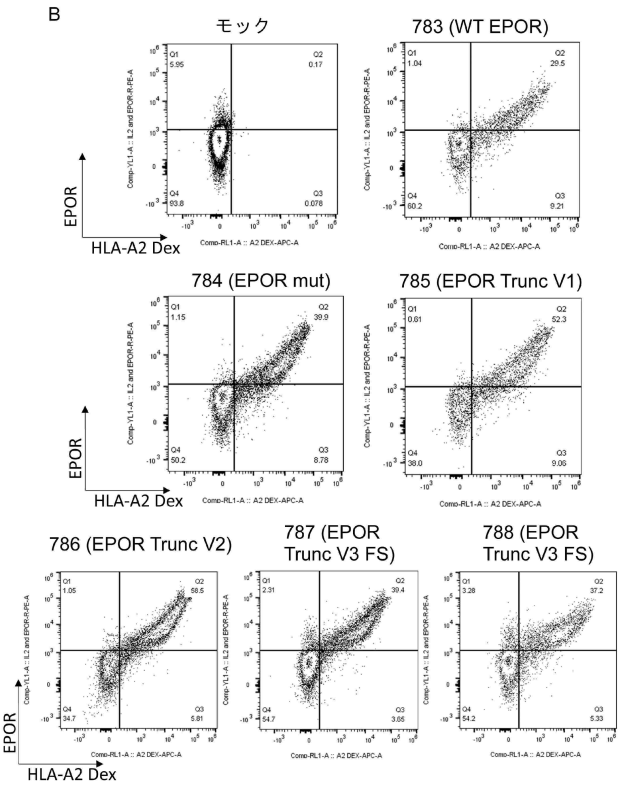
【図４Ａ】

FIGURE 4



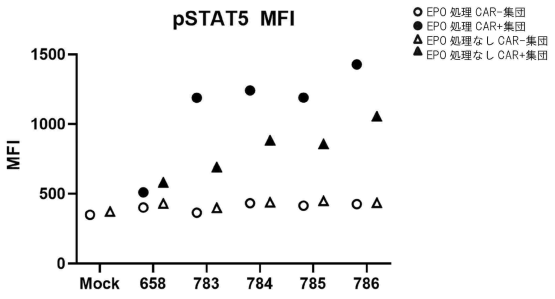
【図４Ｂ】

FIGURE 4 CONTINUED

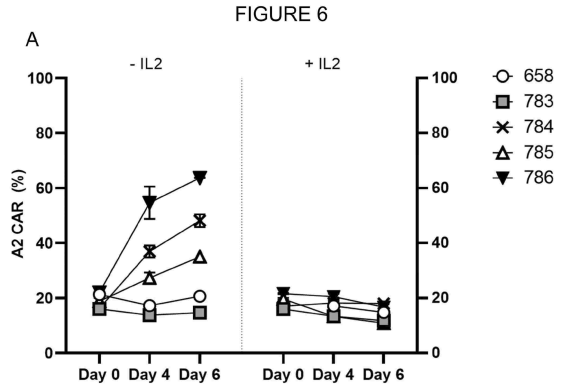


【図５】

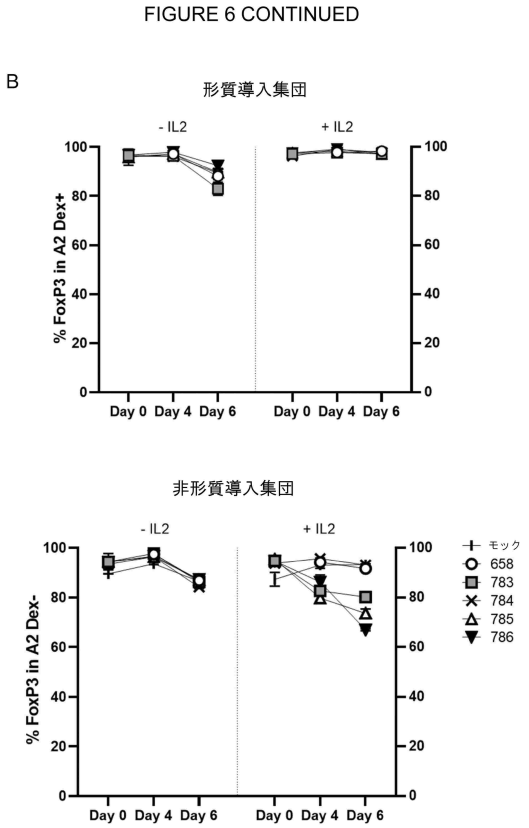
FIGURE 5



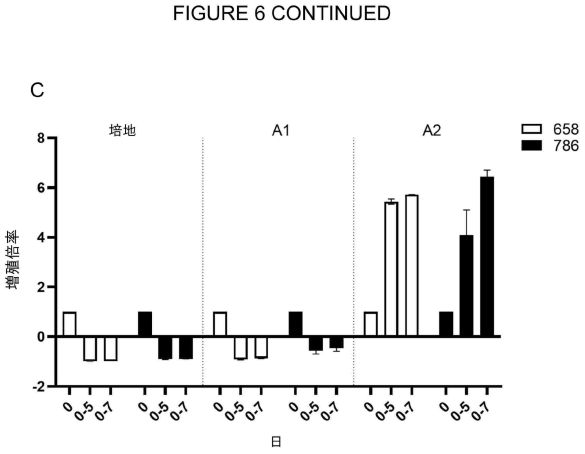
【図６Ａ】



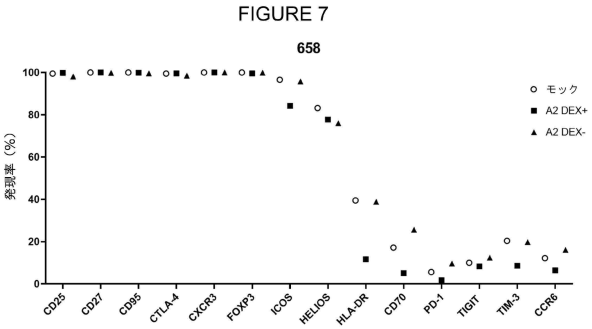
【図６Ｂ】



【図６Ｃ】

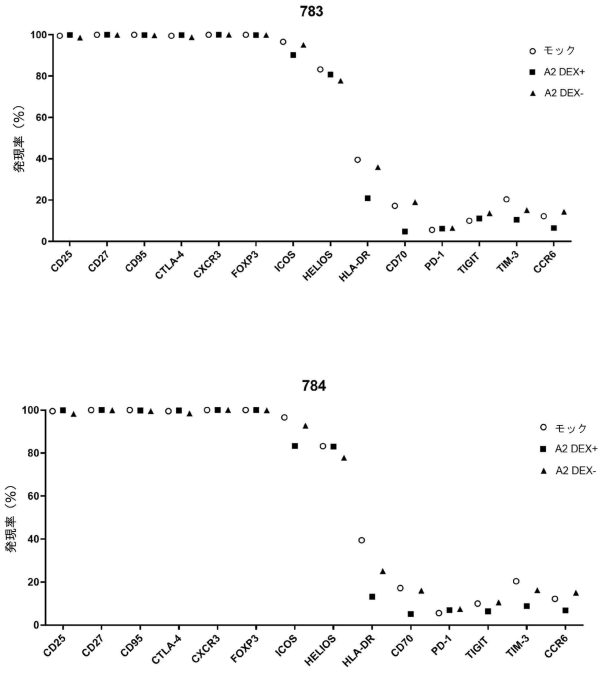


【図７－１】



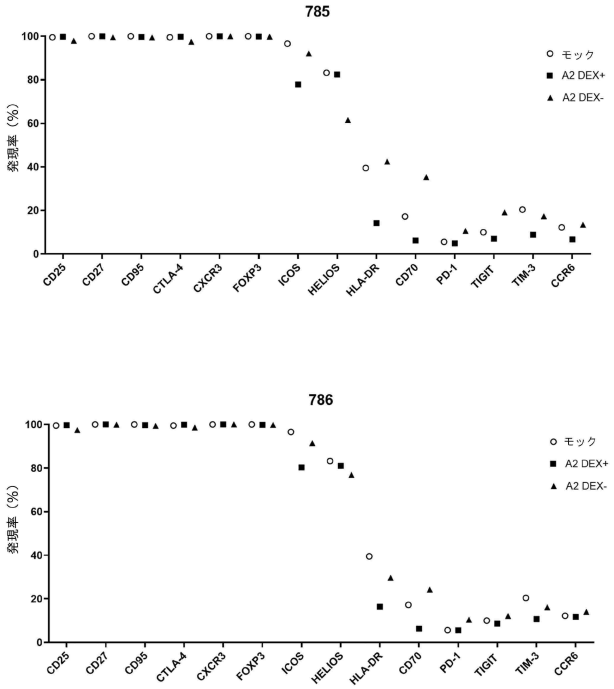
【図７－２】

FIGURE 7 CONTINUED



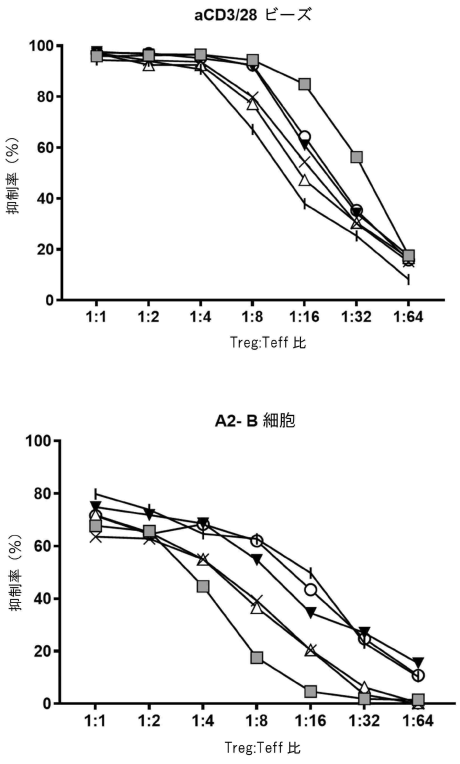
【図７－３】

FIGURE 7 CONTINUED



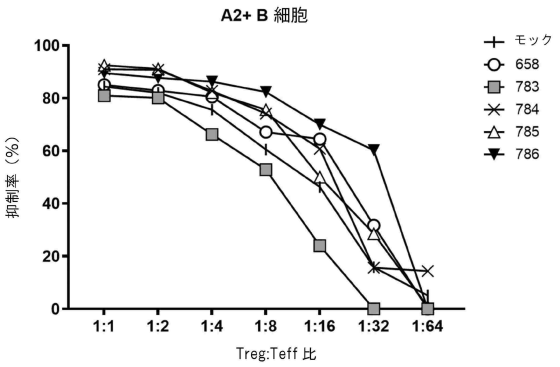
【図８－１】

FIGURE 8



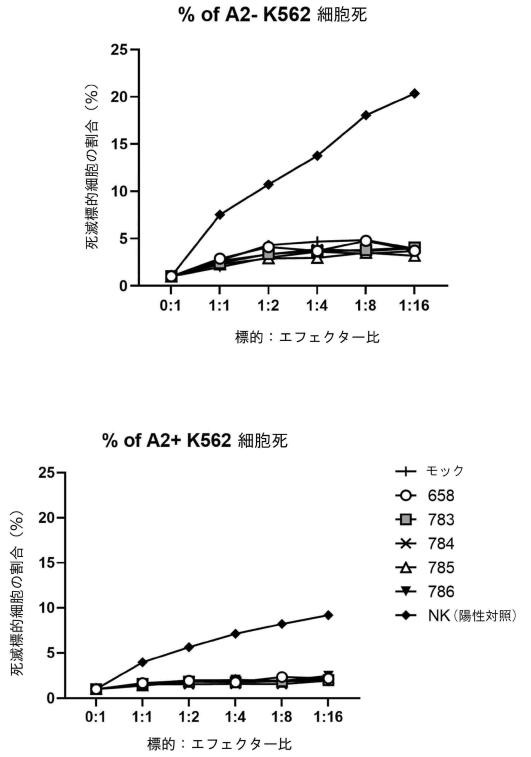
【図８－２】

FIGURE 8 CONTINUED



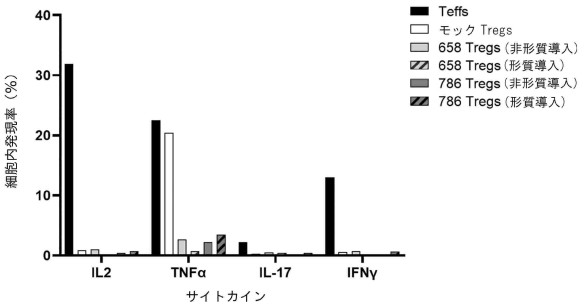
【図９】

FIGURE 9



【図１０】

FIGURE 10



【配列表】

<u>２０２５００４６５０００００１．ｘｍｌ</u>

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2022/053359

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K14/71 C12N5/0783
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, CHEM ABS Data, Sequence Search, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SHIKAMA YAYOI ET AL: "A constitutively activated chimeric cytokine receptor confers factor-independent growth in hematopoietic cell lines", BLOOD, AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, US, vol. 88, no. 2, 1 January 1996 (1996-01-01), pages 455-464, XP002303774, ISSN: 0006-4971 page 455, left-hand column, paragraphs 1, 2 page 477, right-hand column, paragraph 2; table 1 page 458, right-hand column, paragraph 2 - page 459, left-hand column, paragraph 1 page 461, left-hand column, paragraph 2; figure 6 ----- -/--	1-37

[x] Further documents are listed in the continuation of Box C.
[x] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
2 March 2023	14/03/2023

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Petri, Bernhard

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2022/053359

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2019/055946 A1 (F1 ONCOLOGY INC [US]) 21 March 2019 (2019-03-21) paragraphs [0003], [0007], [0008] - [0010], [0025], [0237], [0238], [0240], [0246]; table 1B; sequences 76, 89-91, 102-103, 144 paragraphs [0269], [0336] - [0338], [0340], [0344]	1-7,9-37
X	VINANICA NATASHA ET AL: "Abstract", BLOOD, vol. 135, no. 9, 27 February 2020 (2020-02-27), pages 668-679, XP055805405, US ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/blood.2019001645 abstract page 668, right-hand column, paragraph 1 page 669, right-hand column, paragraph 6-7 page 670, left-hand column, paragraph 2 page 671, left-hand column, paragraph 2 page 673, left-hand column, paragraph 2	1-7,9-37
A	WO 2020/044055 A1 (KING S COLLEGE LONDON [GB]) 5 March 2020 (2020-03-05) cited in the application page 2, paragraphs 2, 4 page 7, paragraph 3 - page 11, paragraph 6 page 12, paragraph 1 - page 22, paragraph 5	1-37
A	US 6 361 998 B1 (BELL DAVID N [CA] ET AL) 26 March 2002 (2002-03-26) column 2, line 56 - column 3, line 39; sequence 7 column 4, lines 41-61	1-37

-/--

2

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2022/053359

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PHARR P N ET AL: "Expression of a constitutively active erythropoietin receptor in primary hematopoietic progenitors abrogates erythropoietin dependence and enhances erythroid colony-forming unit, erythroid burst-forming unit, and granulocyte/macrophage progenitor growth.", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 90, no. 3, 1 February 1993 (1993-02-01), pages 938-942, XP093027732, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.90.3.938 Retrieved from the Internet: URL:http://dx.doi.org/10.1073/pnas.90.3.938> abstract -----	1-37
A	WATOWICH S S ET AL: "HOMODIMERIZATION AND CONSTITUTIVE ACTIVATION OF THE ERYTHROPOIETIN RECEPTOR", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 89, no. 6, 1 January 1992 (1992-01-01), pages 2140-2144, XP002154450, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.89.6.2140 abstract; figure 1 -----	1-37
A	LU XIAOHUI ET AL: "Active Conformation of the Erythropoietin Receptor", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 281, no. 11, 1 March 2006 (2006-03-01), pages 7002-7011, XP093018829, US ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M512638200 abstract; table 1 -----	1-37

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/GB2022/053359

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. [X] forming part of the international application as filed.

   b. [ ] furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)).

      [ ] accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. [ ] With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/GB2022/053359

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2019055946 A1	21-03-2019	CN 111479921 A	31-07-2020
		EP 3735460 A1	11-11-2020
		TW 201920250 A	01-06-2019
		WO 2019055946 A1	21-03-2019
WO 2020044055 A1	05-03-2020	AU 2019333012 A1	29-04-2021
		CA 3110012 A1	05-03-2020
		CN 112969784 A	15-06-2021
		EP 3844264 A1	07-07-2021
		GB 2591929 A	11-08-2021
		IL 280942 A	29-04-2021
		JP 2021536237 A	27-12-2021
		KR 20210054543 A	13-05-2021
		SG 11202101668T A	30-03-2021
		US 2021338726 A1	04-11-2021
		WO 2020044055 A1	05-03-2020
US 6361998 B1	26-03-2002	EP 1104455 A2	06-06-2001
		US 6361998 B1	26-03-2002
		WO 9967360 A2	29-12-1999

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
C12N	*15/63 (2006.01)*	C12N	15/63	Z	
C12N	*15/13 (2006.01)*	C12N	15/13		
C07K	*16/28 (2006.01)*	C07K	16/28		
C07K	*14/725 (2006.01)*	C07K	14/725		
C07K	*14/47 (2006.01)*	C07K	14/47		
A61P	*35/00 (2006.01)*	A61P	35/00		
A61P	*31/00 (2006.01)*	A61P	31/00		
A61P	*29/00 (2006.01)*	A61P	29/00		
A61P	*25/28 (2006.01)*	A61P	25/28		
A61P	*37/06 (2006.01)*	A61P	37/06		
A61P	*37/08 (2006.01)*	A61P	37/08		
A61K	*39/395 (2006.01)*	A61K	39/395	N	
A61K	*35/17 (2025.01)*	A61K	35/17		

,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW
ッド

(72)発明者 トゥン、シム
イギリス、ロンドン グレーター ロンドン ダブリュー１２ ０ビーゼット、８４ ウッド レーン、トランスレーション アンド イノベーション ハブ、シー／オー クウェル セラピューティックス リミテッド
(72)発明者 マックロスキー、ベサニー
イギリス、ロンドン グレーター ロンドン ダブリュー１２ ０ビーゼット、８４ ウッド レーン、トランスレーション アンド イノベーション ハブ、シー／オー クウェル セラピューティックス リミテッド

Fターム（参考） 4B065 AA90X AA90Y AB01 AC14 AC20 BA02 CA24 CA25 CA44
4C085 AA14 AA16 BB11 BB17 CC23
4C087 AA01 AA02 BB65 CA12 NA05 ZA02 ZB08 ZB11 ZB13 ZB26 ZB32
4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 BA41 CA40 DA50 DA51 DA75 EA20 FA74