(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2024-515577
(P2024-515577A)
(43)公表日　令和6年4月10日(2024.4.10)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
C12N 15/27 (2006.01)		C12N	15/27		4B065
C07K 14/535 (2006.01)		C07K	14/535	ZNA	4C084
C12N 15/63 (2006.01)		C12N	15/63	Z	4C087
C12N 5/10 (2006.01)		C12N	5/10		4H045
C07K 14/705 (2006.01)		C07K	14/705		

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全380頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2023-562188(P2023-562188)
(86)(22)出願日　令和4年4月7日(2022.4.7)
(85)翻訳文提出日　令和5年12月6日(2023.12.6)
(86)国際出願番号　PCT/CA2022/050540
(87)国際公開番号　WO2022/213208
(87)国際公開日　令和4年10月13日(2022.10.13)
(31)優先権主張番号　63/171,933
(32)優先日　令和3年4月7日(2021.4.7)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/171,950
(32)優先日　令和3年4月7日(2021.4.7)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/171,980
最終頁に続く

(71)出願人　522140183
プロヴィンシャル ヘルス サービシーズ オーソリティ
カナダ ブイ５ゼット ４イー６ ブリティッシュ コロンビア バンクーバー ウエスト テンス アベニュー ６００
(71)出願人　522140194
ユーヴィック インダストリー パートナーシップス インコーポレイテッド
カナダ ブイ８ダブリュー ２ワイ２ ブリティッシュ コロンビア ヴィクトリア ピー．オー． ボックス １７００ エスティーエヌ シーエスシー セジウィック エー ウイング ユニバーシティー オブ ヴィクトリア
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　修飾された顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）及びこれに結合するキメラサイトカイン受容体

(57)【要約】
本明細書では、バリアントサイトカイン受容体及びサイトカインペアを用いた細胞の選択的活性化のための方法及び組成物であって、該サイトカイン受容体が、顆粒球コロニー刺激因子受容体（Ｇ－ＣＳＦＲ）の細胞外ドメイン（ＥＣＤ）を含む、方法及び組成物が記載される。特定の実施形態では、本明細書に記載の方法及び組成物は、養子細胞移植療法のための細胞の排他的活性化に有用である。したがって、本明細書に含まれるのは、そのネイティブ受容体には結合しないサイトカインによって選択的に活性化されるバリアント受容体を発現する細胞を産生する方法である。また、本明細書では、Ｇ－ＣＳＦＲの細胞外ドメインを含むバリアント受容体を発現する細胞を対象に投与することと、該バリアント受容体を活性化するバリアントサイトカインを共投与することとを含む、その必要がある対象を治療する方法が開示される。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
バリアント顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）であって、
前記バリアントＧ－ＣＳＦが、サイトＩＩ界面領域における少なくとも１つの変異、サイトＩＩＩ界面領域における少なくとも１つの変異、またはそれらの組み合わせを含み、前記サイトＩＩ界面領域における前記少なくとも１つの変異が、Ｌ１０８Ｒ、Ｄ１１２Ｒ、Ｅ１２２Ｒ　Ｅ１２２Ｋ、Ｅ１２３Ｋ、及びＥ１２３Ｒ、ならびにこれらの組み合わせのうち少なくとも１つを含み、前記サイトＩＩ界面領域の変異が、配列番号１に示す配列の対応するアミノ酸位置に対するものであり、
前記サイトＩＩＩ界面領域における前記少なくとも１つの変異が、配列番号１に示す配列の対応するアミノ酸位置に対する変異Ｅ４６Ｒを含み、且つ
前記バリアントＧ－ＣＳＦが、顆粒球コロニー刺激因子受容体（Ｇ－ＣＳＦＲ）のバリアント細胞外ドメイン（ＥＣＤ）を含む受容体に選択的に結合する、
前記バリアントＧ－ＣＳＦ。
【請求項２】
細胞表面上に発現した受容体を選択的に活性化させるためのシステムであって、
（ａ）配列番号８３または８４に対応するバリアントＧ－ＣＳＦと、
（ｂ）Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む受容体と
を含み、
前記バリアントＧ－ＣＳＦが、他の点では同一の野生型Ｇ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤと比較して、前記Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む前記受容体に優先的に結合し、前記Ｇ－ＣＳＦＲの前記バリアントＥＣＤを含む前記受容体が、他の点では同一の野生型Ｇ－ＣＳＦと比較して、前記バリアントＧ－ＣＳＦに優先的に結合し、前記バリアントＧ－ＣＳＦＲが、Ｇ２Ｒ－３またはＧ１２／２Ｒ－１を含む、
前記システム。
【請求項３】
細胞によって発現されるＧ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む受容体に結合する、請求項１に記載のバリアントＧ－ＣＳＦ。
【請求項４】
前記Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む前記受容体を発現する前記細胞が、免疫細胞である、請求項３に記載のバリアントＧ－ＣＳＦ。
【請求項５】
前記Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む前記受容体を発現する前記免疫細胞が、
Ｔ細胞であり、任意選択で、
ＮＫ細胞であり、任意選択で、
ＮＫＴ細胞であり、任意選択で、
Ｂ細胞であり、任意選択で、
形質細胞であり、任意選択で、
マクロファージであり、任意選択で、
樹状細胞であり、任意選択で、
前記細胞が幹細胞であり、任意選択で、
前記細胞が初代細胞であり、任意選択で、
前記細胞がヒト細胞である、
請求項４に記載のバリアントＧ－ＣＳＦ。
【請求項６】
前記Ｔ細胞が、ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞、細胞傷害性ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞、ナイーブＣＤ８＋Ｔ細胞、ナイーブＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞、ヘルパーＴ細胞、制御性Ｔ細胞、メモリーＴ細胞、及びγδＴ細胞からなる群から選択される、請求項５に記載のバリアントＧ－ＣＳＦ。
【請求項７】
前記Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む前記受容体への前記バリアントＧ－ＣＳＦ

の前記選択的結合によって、前記受容体を発現する細胞の、増殖、生存能力、持続性、細胞傷害性、サイトカイン分泌、記憶、及び活性増強、ならびにこれらの組み合わせのうち少なくとも１つを含む細胞応答が、引き起こされる、請求項１～６のいずれか１項に記載のバリアントＧ－ＣＳＦ。
【請求項８】
前記Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む前記受容体が、サイトＩＩ界面領域における少なくとも１つの変異、サイトＩＩＩ界面領域における少なくとも１つの変異、またはそれらの組み合わせを含む、前記請求項のいずれか１項に記載のバリアントＧ－ＣＳＦ。
【請求項９】
前記Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む前記受容体が、
Ｒ１４１ＥまたはＲ１６７Ｄ変異のうち一方または両方を含む、前記Ｇ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤの前記サイトＩＩ界面領域における少なくとも１つの変異
を含み、
前記Ｇ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤの前記サイトＩＩＩ界面領域における前記少なくとも１つの変異が、Ｒ４１Ｅ変異を含み、
前記バリアントＧ－ＣＳＦＲの変異が、配列番号２に示す配列のアミノ酸位置に対応する、
前記請求項のいずれか１項に記載のバリアントＧ－ＣＳＦ。
【請求項１０】
前記Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む前記受容体が、キメラ受容体である、前記請求項のいずれか１項に記載のバリアントＧ－ＣＳＦ。
【請求項１１】
化学修飾されている、前記請求項のいずれか１項に記載のバリアントＧ－ＣＳＦ。
【請求項１２】
前記化学修飾がＰＥＧ化を含む、請求項１１に記載のバリアントＧ－ＣＳＦ。
【請求項１３】
前記Ｇ－ＣＳＦのＮ末端またはＣ末端でＰＥＧ化されている、請求項１２に記載のバリアントＧ－ＣＳＦ。
【請求項１４】
請求項１～６または１０～１２のいずれか１項に記載のバリアントＧ－ＣＳＦをコードする、１つ以上の核酸配列。
【請求項１５】
請求項１０に記載の核酸配列を含む、１つ以上の発現ベクター。
【請求項１６】
請求項１～６または１０～１２のいずれか１項に記載のバリアントＧ－ＣＳＦを発現するように操作された、細胞。
【請求項１７】
前記細胞が免疫細胞である、請求項１２に記載の細胞。
【請求項１８】
前記免疫細胞が、
Ｔ細胞であり、任意選択で、
ＮＫ細胞であり、任意選択で、
ＮＫＴ細胞であり、任意選択で、
Ｂ細胞であり、任意選択で、
形質細胞であり、任意選択で、
マクロファージであり、任意選択で、
樹状細胞であり、任意選択で、
前記細胞が幹細胞であり、任意選択で、
前記細胞が初代細胞であり、任意選択で、
前記細胞がヒト細胞である、

請求項１３に記載の細胞。
【請求項１９】
前記Ｔ細胞が、ＣＤ８＋Ｔ細胞、細胞傷害性ＣＤ８＋Ｔ細胞、細胞傷害性ＣＤ４＋Ｔ細胞、ナイーブＣＤ８＋Ｔ細胞、ナイーブＣＤ４＋Ｔ細胞、ヘルパーＴ細胞、制御性Ｔ細胞、メモリーＴ細胞、及びγδＴ細胞からなる群から選択される、請求項１４に記載の細胞。
【請求項２０】
細胞表面上に発現した受容体を選択的に活性化させるためのシステムであって、
（ａ）請求項１～６または１０～１２のいずれか１項に記載のバリアントＧ－ＣＳＦと、
（ｂ）Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む受容体と
を含み、
前記バリアントＧ－ＣＳＦが、他の点では同一の野生型Ｇ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤと比較して、前記Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む前記受容体に優先的に結合し、前記Ｇ－ＣＳＦＲの前記バリアントＥＣＤを含む前記受容体が、他の点では同一の野生型Ｇ－ＣＳＦと比較して、前記バリアントＧ－ＣＳＦに優先的に結合する、
前記システム。
【請求項２１】
前記バリアントＧ－ＣＳＦが、表４ＡのＧ－ＣＳＦバリアント番号のサイトＩＩ及びサイトＩＩＩ界面の変異の組み合わせを含み、前記バリアントＧ－ＣＳＦの変異が、配列番号１に示す配列のアミノ酸位置に対応する、請求項１６に記載のシステム。
【請求項２２】
前記バリアントＧ－ＣＳＦが、配列番号１に示す配列の対応するアミノ酸位置に対する変異Ｅ４６Ｒ、Ｌ１０８Ｋ、Ｄ１１２Ｒ、Ｅ１２２Ｒ、及びＥ１２３Ｒを含み、且つＧ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む前記受容体が、配列番号２に示す配列の対応するアミノ酸位置に対する変異Ｒ４１Ｅ、Ｒ１４１Ｅ、及びＲ１６７Ｄを含む、請求項１７に記載のシステム。
【請求項２３】
前記バリアントＧ－ＣＳＦが、配列番号１に示す配列の対応するアミノ酸位置に対する変異Ｅ４６Ｒ、Ｌ１０８Ｋ、Ｄ１１２Ｒ、及びＥ１２２Ｋを含み、且つＧ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む前記受容体が、配列番号２に示す配列の対応するアミノ酸位置に対する変異Ｒ４１Ｅ、Ｒ１４１Ｅ、及びＲ１６７Ｄを含む、請求項１７に記載のシステム。
【請求項２４】
前記バリアントＧ－ＣＳＦが、配列番号１に示す配列の対応するアミノ酸位置に対する変異Ｅ４６Ｒ、Ｌ１０８Ｋ、Ｄ１１２Ｒ、及びＥ１２３Ｋを含み、且つＧ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む前記受容体が、配列番号２に示す配列の対応するアミノ酸位置に対する変異Ｒ４１Ｅ、Ｒ１４１Ｅ、及びＲ１６７Ｄを含む、請求項１７に記載のシステム。
【請求項２５】
前記バリアントＧ－ＣＳＦが、配列番号１に示す配列の対応するアミノ酸位置に対する変異Ｅ４６Ｒ、Ｌ１０８Ｋ、Ｄ１１２Ｒ、及びＥ１２２Ｒを含み、且つＧ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む前記受容体が、配列番号２に示す配列の対応するアミノ酸位置に対する変異Ｒ４１Ｅ、Ｒ１４１Ｅ、及びＲ１６７Ｄを含む、請求項１７に記載のシステム。
【請求項２６】
前記バリアントＧ－ＣＳＦが、配列番号１に示す配列の対応するアミノ酸位置に対する変異Ｅ４６Ｒ、Ｌ１０８Ｋ、Ｄ１１２Ｒ、及びＥ１２３Ｒを含み、且つＧ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む前記受容体が、配列番号２に示す配列の対応するアミノ酸位置に対する変異Ｒ４１Ｅ、Ｒ１４１Ｅ、及びＲ１６７Ｄを含む、請求項１７に記載のシステム。
【請求項２７】
前記バリアントＧ－ＣＳＦが、配列番号１に示す配列の対応するアミノ酸位置に対する変異Ｅ４６Ｒ、Ｌ１０８Ｋ、Ｄ１１２Ｒ、Ｅ１２２Ｋ、及びＥ１２３Ｋを含み、且つＧ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む前記受容体が、配列番号２に示す配列の対応するアミ

ノ酸位置に対する変異Ｒ４１Ｅ、Ｒ１４１Ｅ、及びＲ１６７Ｄを含む、請求項１７に記載のシステム。
【請求項２８】
前記バリアントＧ－ＣＳＦが化学修飾されている、請求項２０～２７のいずれか１項に記載のシステム。
【請求項２９】
前記バリアントＧ－ＣＳＦの前記化学修飾が、ＰＥＧ化を含む、請求項２８に記載のシステム。
【請求項３０】
前記バリアントＧ－ＣＳＦが、前記Ｇ－ＣＳＦのＮ末端またはＣ末端でＰＥＧ化されている、請求項２９に記載のシステム。
【請求項３１】
１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質を更に含み、
任意選択で、前記１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質が、１つ以上のサイトカイン、ケモカイン、ホルモン、抗体、もしくはこれらの誘導体、または他の親和性試薬を含む、
請求項１６～３０のいずれか１項に記載のシステム。
【請求項３２】
１つ以上の抗原結合性シグナル伝達受容体を更に含む、請求項１６～３１のいずれか１項に記載のシステム。
【請求項３３】
前記１つ以上の抗原結合性シグナル伝達受容体が、天然のＴ細胞受容体、操作されたＴ細胞受容体（ＴＣＲ）、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、天然のＢ細胞受容体、操作されたＢ細胞受容体（ＢＣＲ）、ストレスリガンド受容体、パターン認識受容体、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される少なくとも１つの受容体を含む、請求項３２に記載のシステム。
【請求項３４】
前記抗原結合性シグナル伝達受容体が、１つ以上のＣＡＲを含み、任意選択で、前記ＣＡＲがメソテリンＣＡＲである、請求項３３に記載のシステム。
【請求項３５】
前記サイトカインまたはケモカインが、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、インターフェロンα、インターフェロンβ、インターフェロンγ、ＩＬ－１７、ＩＬ－２１、ＴＮＦ－α、ＣＸＣＬ１３、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１α）、ＣＣＬ４（ＭＩＰ－１β）、ＣＤ４０リガンド、Ｂ細胞活性化因子（ＢＡＦＦ）、Ｆｌｔ３リガンド、ＣＣＬ２１、ＣＣＬ５、ＸＣＬ１、ＣＣＬ１９、受容体ＮＫＧ２Ｄ、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項３１に記載のシステム。
【請求項３６】
前記サイトカインがＩＬ－１８である、請求項３５に記載のシステム。
【請求項３７】
前記サイトカインがヒトのものである、請求項３５または３６に記載のシステム。
【請求項３８】
細胞の表面上に発現した受容体を選択的に活性化させる方法であって、
Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む受容体を、請求項１～６または１０～１２のいずれか１項に記載のバリアントＧ－ＣＳＦと接触させること
を含む、前記方法。
【請求項３９】
Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む前記受容体が、免疫細胞上で発現し、任意選択で、前記免疫細胞が、
Ｔ細胞であり、任意選択で、

ＮＫ細胞であり、任意選択で、
ＮＫＴ細胞であり、任意選択で、
Ｂ細胞であり、任意選択で、
形質細胞であり、任意選択で、
マクロファージであり、任意選択で、
樹状細胞であり、任意選択で、
前記細胞が幹細胞であり、任意選択で、
前記細胞が初代細胞であり、任意選択で、
前記細胞がヒト細胞である、
請求項３８に記載の方法。

【請求項４０】
前記Ｔ細胞が、ＣＤ８$^+$Ｔ細胞、細胞傷害性ＣＤ８$^+$Ｔ細胞、細胞傷害性ＣＤ４$^+$Ｔ細胞、ナイーブＣＤ８$^+$Ｔ細胞、ナイーブＣＤ４$^+$Ｔ細胞、ヘルパーＴ細胞、制御性Ｔ細胞、メモリーＴ細胞、及びγδＴ細胞からなる群から選択される、請求項３９に記載の方法。

【請求項４１】
前記免疫細胞の前記選択的活性化により、前記受容体を発現する細胞の、増殖、生存能力、持続性、細胞傷害性、サイトカイン分泌、記憶、及び活性増強のうち少なくとも１つを含む細胞応答が、引き起こされる、請求項３９に記載の方法。

【請求項４２】
その必要がある対象において免疫応答を増加させる方法であって、
Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む受容体を発現する細胞を、前記対象に投与することと、
請求項１～６または１０～１２のいずれか１項に記載のバリアントＧ－ＣＳＦを投与または提供することと
を含む、前記方法。

【請求項４３】
その必要がある対象において疾患を治療する方法であって、
Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む受容体を発現する細胞を、前記対象に投与することと、
請求項１～６または１０～１２のいずれか１項に記載のバリアントＧ－ＣＳＦを投与または提供することと
を含む、前記方法。

【請求項４４】
がんを治療するために使用される、請求項４２または４３に記載の方法。

【請求項４５】
炎症状態を治療するために使用される、請求項４２または４３に記載の方法。

【請求項４６】
自己免疫疾患を治療するために使用される、請求項４２または４３に記載の方法。

【請求項４７】
変性疾患を治療するために使用される、請求項４２または４３に記載の方法。

【請求項４８】
移植のための、天然のまたは操作された細胞、組織、または器官を生成するために使用される、請求項４２または４３に記載の方法。

【請求項４９】
移植片拒絶反応を予防または治療するために使用される、請求項４２または４３に記載の方法。

【請求項５０】
感染性疾患を治療するために使用される、請求項４２または４３に記載の方法。

【請求項５１】

１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質を投与または提供することを更に含み、
任意選択で、前記１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質が、１つ以上のサイトカイン、ケモカイン、ホルモン、抗体、もしくはこれらの誘導体、または他の親和性試薬を含む、
請求項４２または４３に記載の方法。
【請求項５２】
前記対象が、
（ｉ）Ｇ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤを含む別個のキメラ受容体または（ｉｉ）Ｇ－ＣＳＦの少なくとも１つの別個のバリアント型のうち一方または両方をそれぞれ発現する、２つ以上の細胞集団
を投与される、請求項４２～５１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５３】
細胞の少なくとも１つの集団が、少なくとも１つの別個の抗原結合性シグナル伝達受容体を更に発現し、任意選択で、前記少なくとも１つの別個の抗原結合性シグナル伝達受容体が、少なくとも１つのＣＡＲを含む、請求項４２に記載の方法。
【請求項５４】
免疫細胞の第１及び第２の集団のうち一方または両方が、
（ａ）少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質であって、任意選択で、前記少なくとも１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質が、１つ以上のサイトカイン、ケモカイン、ホルモン、抗体、もしくはこれらの誘導体、または他の親和性試薬を含む、前記少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質、及び
（ｂ）少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体
のうち一方または両方を更に発現する、請求項５２に記載の方法。
【請求項５５】
１つ以上の追加の免疫細胞集団を更に含み、
各追加の免疫細胞集団が、
（ｉ）Ｇ－ＣＳＦＲの別個のバリアントＥＣＤを含む別個の受容体、
（ｉｉ）別個のバリアントＧ－ＣＳＦ、
（ｉｉｉ）別個のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質、及び
（ｉｖ）別個の抗原結合性シグナル伝達受容体
のうち少なくとも１つを発現する、
請求項５２～５４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５６】
Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む少なくとも１つの受容体を発現する前記細胞が、少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体を更に発現する、請求項４２～５５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５７】
前記抗原結合性シグナル伝達受容体が、天然のＴ細胞受容体、操作されたＴ細胞受容体（ＴＣＲ）、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、天然のＢ細胞受容体、操作されたＢ細胞受容体（ＢＣＲ）、ストレスリガンド受容体、パターン認識受容体、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される少なくとも１つの受容体を含む、請求項５６に記載の方法。
【請求項５８】
前記抗原結合性シグナル伝達受容体がＣＡＲを含む、請求項５７に記載の方法。
【請求項５９】
前記サイトカインまたはケモカインが、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、インターフェロンα、インターフェロンβ、インターフェロンγ、ＩＬ－１７、ＩＬ－２１、ＴＮＦ－α、ＣＸＣＬ１３、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１α）、ＣＣＬ４（ＭＩＰ－１β）、ＣＤ４０リガンド、Ｂ細胞活性化因子（ＢＡＦＦ）、Ｆｌｔ３リガンド、ＣＣＬ２１、ＣＣＬ５、ＸＣＬ１

、ＣＣＬ１９、受容体ＮＫＧ２Ｄ、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項５５に記載の方法。
【請求項６０】
前記サイトカインがＩＬ－１８である、請求項５９に記載の方法。
【請求項６１】
前記サイトカインがヒトのものである、請求項６１または６２に記載の方法。
【請求項６２】
その必要がある対象を治療する方法であって、
（ｉ）免疫細胞含有試料を単離することと、
（ｉｉ）Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む受容体をコードする核酸配列で前記免疫細胞の形質導入またはトランスフェクションを行うことと、
（ｉｉｉ）（ｉｉ）の前記免疫細胞を前記対象に投与することと、
（ｉｖ）前記免疫細胞を、前記受容体に選択的に結合する請求項１～６または１０～１２に記載のバリアントＧ－ＣＳＦと接触させることと
を含む、前記方法。
【請求項６３】
前記細胞を前記対象に投与する前に、前記対象が、免疫除去治療を受けている、請求項６２に記載の方法。
【請求項６４】
前記免疫細胞含有試料が、前記細胞が投与されることになる対象から単離される、請求項６２に記載の方法。
【請求項６５】
前記免疫細胞含有試料が、前記細胞が投与されることになる対象とは異なる対象から単離される、請求項６２に記載の方法。
【請求項６６】
前記免疫細胞含有試料が、前記細胞が投与される対象由来の、または前記細胞が投与されることになる対象とは異なる対象由来の細胞から生成され、任意選択で、前記細胞が、幹細胞であり、任意選択で多能性幹細胞である、請求項６２に記載の方法。
【請求項６７】
前記免疫細胞を前記対象に投与する前に、前記細胞がｉｎ　ｖｉｔｒｏで前記バリアントＧ－ＣＳＦと接触させられる、請求項６２に記載の方法。
【請求項６８】
前記免疫細胞が、前記受容体に結合する前記バリアントＧ－ＣＳＦと、前記受容体からのシグナル伝達を活性化するのに十分な時間接触させられる、請求項６２に記載の方法。
【請求項６９】
Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む受容体をコードする細胞と、使用説明書とを含む、キットであって、
前記キットが、請求項１～６または１０～１２のいずれか１項に記載のバリアントＧ－ＣＳＦを含み、任意選択で、前記細胞が免疫細胞である、
前記キット。
【請求項７０】
（ａ）Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む受容体をコードする１つ以上の核酸配列と、
（ｂ）請求項１～６もしくは１０～１２のいずれか１項に記載のバリアントＧ－ＣＳＦ、請求項７に記載の核酸配列、または請求項１１に記載の１つ以上の発現ベクターと、
（ｃ）使用説明書と
を含む、キット。
【請求項７１】
ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、インターフェロンα、インターフェロンβ、インターフェロンγ、ＩＬ－１７、ＩＬ－２１、ＴＮＦ－α、ＣＸＣＬ１３、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１α）

、ＣＣＬ４（ＭＩＰ－１β）、ＣＤ４０リガンド、Ｂ細胞活性化因子（ＢＡＦＦ）、Ｆｌｔ３リガンド、ＣＣＬ２１、ＣＣＬ５、ＸＣＬ１、ＣＣＬ１９、受容体ＮＫＧ２Ｄ、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される１つ以上のサイトカインまたはケモカインをコードする１つ以上の発現ベクターを更に含む、請求項７０に記載のキット。

【請求項７２】

少なくとも１つの抗原結合性受容体をコードする１つ以上の発現ベクターを更に含む、請求項７０に記載のキット。

【請求項７３】

前記少なくとも１つの抗原結合性受容体が、天然のＴ細胞受容体、操作されたＴ細胞受容体（ＴＣＲ）、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、天然のＢ細胞受容体、操作されたＢ細胞受容体（ＢＣＲ）、ストレスリガンド受容体、パターン認識受容体、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項７０または７２に記載のキット。

【請求項７４】

キメラ抗原受容体をコードする１つ以上の発現ベクターを更に含む、請求項７３に記載のキット。

【請求項７５】

前記細胞が、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、インターフェロンα、インターフェロンβ、インターフェロンγ、ＩＬ－１７、ＩＬ－２１、ＴＮＦ－α、ＣＸＣＬ１３、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１α）、ＣＣＬ４（ＭＩＰ－１β）、ＣＣＬ１９、受容体ＮＫＧ２Ｄ、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される少なくとも１つのサイトカインまたはケモカインをコードする１つ以上の発現ベクターを更に含む、請求項６９に記載のキット。

【請求項７６】

前記細胞が、少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体をコードする１つ以上の発現ベクターを更に含む、請求項６９または７５に記載のキット。

【請求項７７】

前記少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体が、天然のＴ細胞受容体、操作されたＴ細胞受容体（ＴＣＲ）、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、天然のＢ細胞受容体、操作されたＢ細胞受容体（ＢＣＲ）、ストレスリガンド受容体、パターン認識受容体、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項７６に記載のキット。

【請求項７８】

前記細胞が、少なくとも１つのＣＡＲをコードする１つ以上の発現ベクターを更に含み、任意選択で、前記ＣＡＲがメソテリンＣＡＲである、請求項７７に記載のキット。

【請求項７９】

以下を含む、キメラ受容体：

（ａ）少なくとも１つの第２のドメインに作動可能に連結された細胞外ドメイン（ＥＣＤ）；

ここで前記第２のドメインが、以下：

（ｂ）サイトカイン受容体の細胞内ドメインに由来する少なくとも１つのシグナル伝達分子結合部位を含む、細胞内ドメイン（ＩＣＤ）であって、

前記少なくとも１つのシグナル伝達分子結合部位が、インターロイキン（ＩＬ）－２Ｒβの ＳＨＣ結合部位、ＩＬ－２ＲβのＳＴＡＴ５結合部位、ＩＬ－４ＲαのＩＲＳ－１もしくはＩＲＳ－２結合部位、ＩＬ－４ＲαのＳＴＡＴ６結合部位、ｇｐ１３０のＳＨＰ－２結合部位、ｇｐ１３０のＳＴＡＴ３結合部位、ＥＰＯＲのＳＨＰ－１もしくはＳＨＰ－２結合部位、エリスロポイエチン受容体（ＥＰＯＲ）のＳＴＡＴ５結合部位、インターフェロンアルファ及びベータ受容体サブユニット２（ＩＦＮＡＲ２）のＳＴＡＴ１もしくはＳＴＡＴ２結合部位、ならびにインターフェロンガンマ受容体１（ＩＦＮγＲ１）のＳＴＡＴ１結合部位、またはこれらの組み合わせからなる群から選択され、

前記ＩＣＤが、Ｇ－ＣＳＦＲ、ｇｐ１３０、ＥＰＯＲ、及びインターフェロンガンマ受容体２（ＩＦＮγＲ２）、またはこれらの組み合わせからなる群から選択される少なくとも１つのタンパク質の少なくとも１つのＢｏｘ１領域及び少なくとも１つのＢｏｘ２領域

を更に含む、
前記ＩＣＤ
を含み；
ならびに
（ｃ）膜貫通ドメイン（ＴＭＤ）を含む、少なくとも１つの第３のドメインであって、
前記ＥＣＤが前記ＴＭＤのＮ末端側であり、前記ＴＭＤが前記ＩＣＤのＮ末端側である、
前記少なくとも１つの第３のドメイン。
【請求項８０】
第２のドメインに作動可能に連結したＥＣＤ
を含む、キメラ受容体であって、
前記第２のドメインがＩＣＤを含み、前記ＩＣＤが、
（ｉ）
（ａ）Ｇ－ＣＳＦＲのＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）ＩＬ－４Ｒαの少なくとも１つのシグナル伝達分子結合部位、または
（ｉｉ）
（ａ）ｇｐ１３０のＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）ｇｐ１３０の少なくとも１つのシグナル伝達分子結合部位、または
（ｉｉｉ）
（ａ）エリスロポイエチン受容体（ＥＰＯＲ）のＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）ＥＰＯＲの少なくとも１つのシグナル伝達分子結合部位、または
（ｉｖ）
（ａ）Ｇ－ＣＳＦＲのＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）インターフェロンアルファ及びベータ受容体サブユニット２（ＩＦＮＡＲ２）
の少なくとも１つのシグナル伝達分子結合部位、または
（ｖ）
（ａ）インターフェロンガンマ受容体２（ＩＦＮγＲ２）のＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）インターフェロンガンマ受容体１（ＩＦＮγＲ１）の少なくとも１つのシグナル伝達分子結合部位
を含み、
前記ＥＣＤがＴＭＤのＮ末端側であり、前記ＴＭＤが前記ＩＣＤのＮ末端側である、
前記キメラ受容体。
【請求項８１】
前記ＥＣＤが、Ｇ－ＣＳＦＲ（顆粒球コロニー刺激因子受容体）のＥＣＤであり、任意選択で、前記Ｇ－ＣＳＦＲのＥＣＤが、請求項２～１０のいずれか１項に記載のＧ－ＣＳＦＲのＥＣＤを含む、請求項７９または８０に記載のキメラ受容体。
【請求項８２】
前記ＴＭＤがＧ－ＣＳＦＲのＴＭＤであり、任意選択で、前記ＴＭＤが野生型ＴＭＤである、請求項７９～８１のいずれか１項に記載のキメラ受容体。
【請求項８３】
前記キメラ受容体の活性型がホモ二量体を形成し、任意選択で、
前記キメラ受容体の活性化により、前記受容体を発現する細胞の、増殖、生存能力、持続性、細胞傷害性、サイトカイン分泌、記憶、及び活性増強のうち少なくとも１つを含む細胞応答が、引き起こされ、任意選択で、前記キメラ受容体が、Ｇ－ＣＳＦに接触すると活性化され、任意選択で、
前記Ｇ－ＣＳＦが野生型Ｇ－ＣＳＦであり、任意選択で、
前記Ｇ－ＣＳＦＲの前記細胞外ドメインが野生型細胞外ドメインである、
請求項７９～８２のいずれか１項に記載のキメラ受容体。
【請求項８４】

前記キメラ受容体が、細胞、任意選択で免疫細胞において発現し、任意選択で、前記免疫細胞が、
Ｔ細胞であり、任意選択で、
ＮＫ細胞であり、任意選択で、
ＮＫＴ細胞であり、任意選択で、
Ｂ細胞であり、任意選択で、
形質細胞であり、任意選択で、
マクロファージであり、任意選択で、
樹状細胞であり、任意選択で、
前記細胞が幹細胞であり、任意選択で、
前記細胞が初代細胞であり、任意選択で、
前記細胞がヒト細胞である、
請求項７９～８１のいずれか１項に記載のキメラ受容体。
【請求項８５】
前記Ｔ細胞が、ＣＤ８＋Ｔ細胞、細胞傷害性ＣＤ８＋Ｔ細胞、ナイーブＣＤ４＋Ｔ細胞、ナイーブＣＤ８＋Ｔ細胞、ヘルパーＴ細胞、制御性Ｔ細胞、メモリーＴ細胞、及びγδＴ細胞からなる群から選択される、請求項８４に記載のキメラ受容体。
【請求項８６】
前記ＩＣＤが、
（ａ）配列番号９０もしくは９１のうち一方もしくは両方のアミノ酸配列、または
（ｂ）配列番号９０もしくは９２のうち一方もしくは両方のアミノ酸配列、または
（ｃ）配列番号９３のアミノ酸配列、または
（ｄ）配列番号９４のアミノ酸配列、または
（ｅ）配列番号９５もしくは９６のうち一方もしくは両方のアミノ酸配列、または
（ｆ）配列番号９７もしくは９８のアミノ酸配列、または
（ｇ）配列番号９９もしくは１００のアミノ酸配列
を含む、前記請求項のいずれか１項に記載のキメラ受容体。
【請求項８７】
前記膜貫通ドメインが、配列番号８８に記載される配列を含む、前記請求項のいずれか１項に記載のキメラ受容体。
【請求項８８】
細胞表面上に発現した受容体を選択的に活性化させるためのシステムであって、
（ａ）請求項１～６または１０～１２のいずれか１項に記載のバリアントＧ－ＣＳＦと、
（ｂ）請求項７９～８７のいずれか１項に記載のＧ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む前記受容体と
を含み、
前記バリアントＧ－ＣＳＦが、他の点では同一の野生型Ｇ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤと比較して、前記Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む前記受容体に優先的に結合し、前記Ｇ－ＣＳＦＲの前記バリアントＥＣＤを含む前記受容体が、他の点では同一の野生型Ｇ－ＣＳＦと比較して、前記バリアントＧ－ＣＳＦに優先的に結合する、
前記システム。
【請求項８９】
前記請求項のいずれか１項に記載のキメラ受容体をコードする、１つ以上の核酸配列。
【請求項９０】
前記Ｇ－ＣＳＦＲの前記ＥＣＤが、配列番号８５、８６、または８７のいずれか１つに記載される核酸配列によってコードされる、請求項８９に記載の核酸配列。
【請求項９１】
請求項８９または９０に記載の核酸配列を含む、１つ以上の発現ベクター。
【請求項９２】
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、及びプ

ラスミドからなる群から選択される、請求項９１に記載の発現ベクター。
【請求項９３】
キメラ受容体をコードする１つ以上の核酸配列であって、
前記キメラ受容体が、
第２のドメインに作動可能に連結されたＥＣＤ
を含み、
前記第２のドメインが、以下：
（ｉ）
（ａ）Ｇ－ＣＳＦＲのＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）ＩＬ－４Ｒαの少なくとも１つのシグナル伝達分子結合部位、または
（ｉｉ）
（ａ）ｇｐ１３０のＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）ｇｐ１３０の少なくとも１つのシグナル伝達分子結合部位、または
（ｉｉｉ）
（ａ）エリスロポイエチン受容体（ＥＰＯＲ）のＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）ＥＰＯＲの少なくとも１つのシグナル伝達分子結合部位、または
（ｉｖ）
（ａ）Ｇ－ＣＳＦＲのＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）インターフェロンアルファ及びベータ受容体サブユニット２（ＩＦＮＡＲ２）の少なくとも１つのシグナル伝達分子結合部位、または
（ｖ）
（ａ）インターフェロンガンマ受容体２（ＩＦＮγＲ２）のＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）インターフェロンガンマ受容体１（ＩＦＮγＲ１）の少なくとも１つのシグナル伝達分子結合部位
を含む、
核酸配列。
【請求項９４】
前記ＥＣＤが、Ｇ－ＣＳＦＲ（顆粒球コロニー刺激因子受容体）のＥＣＤである、請求項９３に記載の核酸。
【請求項９５】
前記ＴＭＤがＧ－ＣＳＦＲのＴＭＤであり、任意選択で、前記ＴＭＤが野生型ＴＭＤである、請求項９３または９４に記載の核酸。
【請求項９６】
前記Ｇ－ＣＳＦＲの前記ＥＣＤが、配列番号８５、８６、または８７のいずれか１つに記載される核酸配列によってコードされる、請求項９４または９５に記載の核酸配列。
【請求項９７】
（ａ）配列番号９０もしくは９１のうち一方もしくは両方のアミノ酸配列を含むＩＣＤをコードする配列、または
（ｂ）配列番号９０もしくは９２のうち一方もしくは両方のアミノ酸配列を含むＩＣＤをコードする配列、または
（ｃ）配列番号９３のアミノ酸配列を含むＩＣＤをコードする配列、または
（ｄ）配列番号９４のアミノ酸配列を含むＩＣＤをコードする配列、または
（ｅ）配列番号９５もしくは９６のうち一方もしくは両方のアミノ酸配列を含むＩＣＤをコードする配列、または
（ｆ）配列番号９７または９８のアミノ酸配列を含むＩＣＤをコードする配列、または
（ｇ）配列番号９９または１００のアミノ酸配列を含むＩＣＤをコードする配列
を含む、請求項９３～９６のいずれか１項に記載の核酸配列。
【請求項９８】
請求項９３～９７のいずれか１項に記載の核酸配列を含む、１つ以上の発現ベクター。

【請求項９９】
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、及びプラスミドからなる群から選択される、請求項９８に記載の発現ベクター。
【請求項１００】
請求項７９～８７のいずれか１項に記載のキメラ受容体をコードする核酸配列を含む、細胞。
【請求項１０１】
前記細胞が免疫細胞であり、任意選択で、前記免疫細胞が、
Ｔ細胞であり、任意選択で、
ＮＫ細胞であり、任意選択で、
ＮＫＴ細胞であり、任意選択で、
Ｂ細胞であり、任意選択で、
形質細胞であり、任意選択で、
マクロファージであり、任意選択で、
樹状細胞であり、任意選択で、
前記細胞が幹細胞であり、任意選択で、
前記細胞が初代細胞であり、任意選択で、
前記細胞がヒト細胞である、
請求項１００に記載の細胞。
【請求項１０２】
前記Ｔ細胞が、ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞、細胞傷害性ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞、ナイーブＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞、ナイーブＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞、ヘルパーＴ細胞、制御性Ｔ細胞、メモリーＴ細胞、及びγδＴ細胞からなる群から選択される、請求項１０１に記載の細胞。
【請求項１０３】
請求項９３～９７のいずれか１項に記載の核酸配列を含む、細胞。
【請求項１０４】
請求項９８または９９に記載の発現ベクターを含む、細胞。
【請求項１０５】
細胞の表面上に発現したキメラ受容体を選択的に活性化させる方法であって、
請求項７９～８７のいずれか１項に記載のキメラ受容体を、前記キメラ受容体に選択的に結合するサイトカインと接触させること
を含む、前記方法。
【請求項１０６】
前記キメラ受容体の活性型がホモ二量体を形成し、任意選択で、
前記キメラ受容体の活性化により、前記受容体を発現する細胞の、増殖、生存能力、持続性、細胞傷害性、サイトカイン分泌、記憶、及び活性増強のうち少なくとも１つを含む細胞応答が、引き起こされ、任意選択で、前記キメラ受容体が、前記サイトカインに接触すると活性化される、
請求項１０５に記載の方法。
【請求項１０７】
前記キメラ受容体に選択的に結合する前記サイトカインがＧ－ＣＳＦであり、任意選択で、前記キメラ受容体が、Ｇ－ＣＳＦに接触すると活性化され、任意選択で、
前記Ｇ－ＣＳＦが野生型Ｇ－ＣＳＦであり、任意選択で、
前記Ｇ－ＣＳＦＲの前記細胞外ドメインが野生型細胞外ドメインである、
請求項１０５または１０６に記載の方法。
【請求項１０８】
前記キメラ受容体が、細胞、任意選択で免疫細胞において発現し、任意選択で、前記免疫細胞が、
Ｔ細胞であり、任意選択で、
ＮＫ細胞であり、任意選択で、

ＮＫＴ細胞であり、任意選択で、
Ｂ細胞であり、任意選択で、
形質細胞であり、任意選択で、
マクロファージであり、任意選択で、
樹状細胞であり、任意選択で、
前記細胞が幹細胞であり、任意選択で、
前記細胞が初代細胞であり、任意選択で、
前記細胞がヒト細胞である、
請求項１０５～１０７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１０９】
免疫細胞の第１の集団が前記キメラ受容体を発現し、免疫細胞の第２の集団が、前記キメラ受容体に結合するサイトカインを発現し、任意選択で、前記免疫細胞の第１及び第２の集団のうち一方または両方が、少なくとも１つの別個の抗原結合性シグナル伝達受容体を更に発現し、任意選択で、前記少なくとも１つの別個の抗原結合性シグナル伝達受容体が、少なくとも１つのＣＡＲを含む、請求項１０８に記載の方法。
【請求項１１０】
前記免疫細胞の第１及び第２の集団のうち一方または両方が、
（ａ）少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質であって、任意選択で、前記少なくとも１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質が、１つ以上のサイトカイン、ケモカイン、ホルモン、抗体、もしくはこれらの誘導体、または他の親和性試薬を含む、前記少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質、及び
（ｂ）少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体
のうち一方または両方を更に発現する、請求項１０９に記載の方法。
【請求項１１１】
前記免疫細胞の第１及び第２の集団のそれぞれが、Ｇ－ＣＳＦＲの別個のバリアントＥＣＤを含む別個のキメラ受容体と、別個のバリアントＧ－ＣＳＦとを発現する、請求項１０９または１１０に記載の方法。
【請求項１１２】
１つ以上の追加の免疫細胞集団を更に含み、
各追加の免疫細胞集団が、
（ｉ）Ｇ－ＣＳＦＲの別個のバリアントＥＣＤを含む別個の受容体、
（ｉｉ）別個のバリアントＧ－ＣＳＦ、
（ｉｉｉ）別個のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質、及び
（ｉｖ）別個の抗原結合性シグナル伝達受容体
のうち少なくとも１つを発現する、
請求項１０９～１１１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１１３】
請求項８９、９０、もしくは９３～９７のいずれか１項に記載の核酸配列または請求項９１、９２、９８、もしくは９９のいずれか１項に記載の発現ベクターを前記細胞に導入すること
を含む、細胞においてキメラ受容体を産生する方法であって、
任意選択で、前記方法が遺伝子編集を含み、任意選択で、
前記細胞が免疫細胞であり、任意選択で、前記免疫細胞が、
Ｔ細胞であり、任意選択で、
ＮＫ細胞であり、任意選択で、
ＮＫＴ細胞であり、任意選択で、
Ｂ細胞であり、任意選択で、
形質細胞であり、任意選択で、
マクロファージであり、任意選択で、

樹状細胞であり、任意選択で、
前記細胞が幹細胞であり、任意選択で、
前記細胞が初代細胞であり、任意選択で、
前記細胞がヒト細胞である、
前記方法。
【請求項１１４】
その必要がある対象を治療する方法であって、
請求項７９～８７のいずれか１項に記載のキメラ受容体を発現する細胞を、前記対象に投与することと、
前記キメラ受容体に特異的に結合するサイトカインを前記対象に提供することと
を含む、前記方法。
【請求項１１５】
前記キメラ受容体の活性型がホモ二量体を形成し、任意選択で、
前記キメラ受容体の活性化により、前記受容体を発現する細胞の、増殖、生存能力、持続性、細胞傷害性、サイトカイン分泌、記憶、及び活性増強のうち少なくとも１つを含む細胞応答が、引き起こされ、任意選択で、前記キメラ受容体が、前記サイトカインに接触すると活性化される、
請求項１１４に記載の方法。
【請求項１１６】
前記サイトカインがＧ－ＣＳＦであり、任意選択で、
前記Ｇ－ＣＳＦが野生型Ｇ－ＣＳＦであり、任意選択で、
前記Ｇ－ＣＳＦＲの前記細胞外ドメインが野生型細胞外ドメインである、
請求項１１４または１１５に記載の方法。
【請求項１１７】
前記キメラ受容体が、細胞、任意選択で免疫細胞において発現し、任意選択で、前記免疫細胞が、
Ｔ細胞であり、任意選択で、
ＮＫ細胞であり、任意選択で、
ＮＫＴ細胞であり、任意選択で、
Ｂ細胞であり、任意選択で、
形質細胞であり、任意選択で、
マクロファージであり、任意選択で、
樹状細胞であり、任意選択で、
前記細胞が幹細胞であり、任意選択で、
前記細胞が初代細胞であり、任意選択で、
前記細胞がヒト細胞である、
請求項１１４～１１６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１１８】
少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質を投与または提供することを更に含み、
任意選択で、前記１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質が、１つ以上のサイトカイン、ケモカイン、ホルモン、抗体、もしくはこれらの誘導体、または他の親和性試薬を含む、
請求項１０６～１１７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１１９】
前記対象が、
別個のキメラ受容体をそれぞれ発現し、且つサイトカインの別個のバリアント型をそれぞれ発現する、２つ以上の細胞集団
を投与される、請求項１１４～１１８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１２０】

前記キメラ受容体を発現する前記細胞が、少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体を更に発現する、請求項１１４～１１９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１２１】
前記抗原結合性シグナル伝達受容体が、天然のＴ細胞受容体、操作されたＴ細胞受容体（ＴＣＲ）、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、天然のＢ細胞受容体、操作されたＢ細胞受容体（ＢＣＲ）、ストレスリガンド受容体、パターン認識受容体、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される少なくとも１つの受容体を含む、請求項１２０に記載の方法。
【請求項１２２】
前記抗原結合性シグナル伝達受容体がＣＡＲである、請求項１２１に記載の方法。
【請求項１２３】
前記少なくとも１つのサイトカインまたはケモカインが、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、インターフェロンα、インターフェロンβ、インターフェロンγ、ＩＬ－１７、ＩＬ－２１、ＴＮＦ－α、ＣＸＣＬ１３、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１α）、ＣＣＬ４（ＭＩＰ－１β）、ＣＤ４０リガンド、Ｂ細胞活性化因子（ＢＡＦＦ）、Ｆｌｔ３リガンド、ＣＣＬ２１、ＣＣＬ５、ＸＣＬ１、もしくはＣＣＬ１９、または受容体ＮＫＧ２Ｄ、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項１１８に記載の方法。
【請求項１２４】
前記サイトカインがＩＬ－１８である、請求項１２３に記載の方法。
【請求項１２５】
前記サイトカインがヒトのものである、請求項１２３または１２４に記載の方法。
【請求項１２６】
がんを治療するために使用される、請求項１１４～１２５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１２７】
自己免疫疾患を治療するために使用される、請求項１１４～１２５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１２８】
炎症状態を治療するために使用される、請求項１１４～１２５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１２９】
変性疾患を治療するために使用される、請求項１１４～１２５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１３０】
移植のための、天然のまたは操作された細胞、組織、または器官を生成するために使用される、請求項１１４～１２５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１３１】
同種移植片拒絶反応を予防または治療するために使用される、請求項１１４～１２５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１３２】
（ｉ）免疫細胞含有試料を単離することと、
（ｉｉ）前記キメラサイトカイン受容体をコードする核酸配列を前記免疫細胞に導入することと、
（ｉｉｉ）（ｉｉ）の前記免疫細胞を前記対象に投与することと、
（ｉｖ）前記免疫細胞を、前記キメラ受容体に結合する前記サイトカインと接触させることと
を含む、請求項１１４に記載の方法。
【請求項１３３】
前記細胞を前記対象に投与または注入する前に、前記対象が、免疫除去治療を受けている、請求項１３２に記載の方法。
【請求項１３４】

前記免疫細胞含有試料が、前記細胞が投与されることになる対象から単離される、請求項１３２に記載の方法。
【請求項１３５】
前記免疫細胞含有試料が、前記細胞が投与されることになる対象とは異なる対象から単離される、請求項１３２に記載の方法。
【請求項１３６】
前記免疫細胞含有試料が、前記細胞が投与されることになる対象に由来する、または前記細胞が投与されることになる対象とは異なる対象に由来する細胞から生成され、任意選択で、前記細胞が幹細胞であり、任意選択で多能性幹細胞である、請求項１３２に記載の方法。
【請求項１３７】
前記免疫細胞を前記対象に投与または注入する前に、前記細胞がｉｎ　ｖｉｔｒｏで前記サイトカインと接触させられる、請求項１３２に記載の方法。
【請求項１３８】
前記免疫細胞が、前記キメラ受容体からのシグナル伝達を活性化するのに十分な時間、前記サイトカインと接触させられる、請求項１３２に記載の方法。
【請求項１３９】
前記サイトカインがＧ－ＣＳＦであり、任意選択で、
前記Ｇ－ＣＳＦが野生型Ｇ－ＣＳＦであり、任意選択で、
前記Ｇ－ＣＳＦＲの前記細胞外ドメインが野生型細胞外ドメインである、
請求項１３２～１３８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１４０】
請求項７９～８７のいずれか１項に記載の１つ以上のキメラ受容体をコードする細胞であって、任意選択で、前記細胞が免疫細胞である、前記細胞と、
使用説明書と
を含む、キットであって、
任意選択で、前記キットが、前記キメラ受容体に結合する少なくとも１つのサイトカインを含む、
前記キット。
【請求項１４１】
請求項７９～８７のいずれか１項に記載の１つ以上のキメラ受容体をコードする少なくとも１つの発現ベクターと、
使用説明書と
を含む、キットであって、
任意選択で、前記キットが、前記キメラ受容体に結合する少なくとも１つのサイトカインを含む、
前記キット。
【請求項１４２】
ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、インターフェロンα、インターフェロンβ、インターフェロンγ、ＩＬ－１７、ＩＬ－２１、ＴＮＦ－α、ＣＸＣＬ１３、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１α）、ＣＣＬ４（ＭＩＰ－１β）、ＣＤ４０リガンド、Ｂ細胞活性化因子（ＢＡＦＦ）、Ｆｌｔ３リガンド、ＣＣＬ２１、ＣＣＬ５、ＸＣＬ１、もしくはＣＣＬ１９、または受容体ＮＫＧ２Ｄ、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される１つ以上のサイトカインまたはケモカインをコードする１つ以上の発現ベクターを更に含む、請求項１４１に記載のキット。
【請求項１４３】
少なくとも１つの抗原結合性受容体をコードする１つ以上の発現ベクターを更に含む、請求項１４１または１４２に記載のキット。
【請求項１４４】
前記少なくとも１つの抗原結合性受容体が、天然のＴ細胞受容体、操作されたＴ細胞受

容体（ＴＣＲ）、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、天然のＢ細胞受容体、操作されたＢ細胞受容体（ＢＣＲ）、ストレスリガンド受容体、パターン認識受容体、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項１４２に記載のキット。

【請求項１４５】

少なくとも１つのＣＡＲをコードする発現ベクターを更に含み、

任意選択で、前記ＣＡＲがメソテリンＣＡＲである、

請求項１４４に記載のキット。

【請求項１４６】

前記細胞が、少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質をコードする１つ以上の発現ベクターを更に含み、任意選択で、前記１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質が、１つ以上のサイトカイン、ケモカイン、ホルモン、抗体、もしくはこれらの誘導体、または他の親和性試薬を含む、請求項１４０に記載のキット。

【請求項１４７】

前記細胞が、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、インターフェロンα、インターフェロンβ、インターフェロンγ、ＩＬ－１７、ＩＬ－２１、ＴＮＦ－α、ＣＸＣＬ１３、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１α）、ＣＣＬ４（ＭＩＰ－１β）、ＣＤ４０リガンド、Ｂ細胞活性化因子（ＢＡＦＦ）、Ｆｌｔ３リガンド、ＣＣＬ２１、ＣＣＬ５、ＸＣＬ１、もしくはＣＣＬ１９、または受容体ＮＫＧ２Ｄ、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される少なくとも１つのサイトカインまたはケモカインをコードする１つ以上の発現ベクターを更に含む、請求項１４０に記載のキット。

【請求項１４８】

少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質をコードする１つ以上の発現ベクターを更に含み、

任意選択で、前記１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質が、１つ以上のサイトカイン、ケモカイン、ホルモン、抗体、もしくはこれらの誘導体、または他の親和性試薬を含む、

請求項１４２に記載のキット。

【請求項１４９】

前記細胞が、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、インターフェロンα、インターフェロンβ、インターフェロンγ、ＩＬ－１７、ＩＬ－２１、ＴＮＦ－α、ＣＸＣＬ１３、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１α）、ＣＣＬ４（ＭＩＰ－１β）、ＣＤ４０リガンド、Ｂ細胞活性化因子（ＢＡＦＦ）、Ｆｌｔ３リガンド、ＣＣＬ２１、ＣＣＬ５、ＸＣＬ１、もしくはＣＣＬ１９、または受容体ＮＫＧ２Ｄ、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される少なくとも１つのサイトカインまたはケモカインをコードする１つ以上の発現ベクターを更に含む、請求項１４８に記載のキット。

【請求項１５０】

前記細胞が、少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体をコードする１つ以上の発現ベクターを更に含む、請求項１４０、１４６、または１４７のいずれか１項に記載のキット。

【請求項１５１】

前記少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体が、天然のＴ細胞受容体、操作されたＴ細胞受容体（ＴＣＲ）、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、天然のＢ細胞受容体、操作されたＢ細胞受容体（ＢＣＲ）、ストレスリガンド受容体、パターン認識受容体、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項１５０に記載のキット。

【請求項１５２】

前記細胞が、少なくとも１つのＣＡＲをコードする１つ以上の発現ベクターを更に含み、任意選択で、前記ＣＡＲがメソテリンＣＡＲである、請求項１４０、１４６、１４７、１５０、または１５１のいずれか１項に記載のキット。

【請求項１５３】

前記細胞が、請求項７９～８７のいずれか１項に記載の１つ以上の別個のキメラ受容体をコードする１つ以上の発現ベクターを更に含む、請求項１４０、１４６、１４７、１５０、または１５１のいずれか１項に記載のキット。
【請求項１５４】
請求項７９～８７のいずれか１項に記載の１つ以上の別個のキメラ受容体をコードする１つ以上の発現ベクターを更に含む、請求項１４１～１４５、１４８、または１４９のいずれか１項に記載のキット。
【請求項１５５】
細胞を選択的に活性化させるためのシステムであって、
（ｉ）顆粒球コロニー刺激因子受容体（Ｇ－ＣＳＦＲ）のバリアント細胞外ドメイン（ＥＣＤ）を含む受容体、ならびに
（ｉｉ）（ｉ）の前記受容体に選択的に結合するバリアントＧ－ＣＳＦ、ならびに、以下：
（ａ）少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質であって、任意選択で、前記１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質が、１つ以上のサイトカイン、ケモカイン、ホルモン、抗体、もしくはこれらの誘導体、または他の親和性試薬を含む、前記少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質、
及び
（ｂ）少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体
のうちの一方または両方
を含む、前記システム。
【請求項１５６】
前記バリアントＧ－ＣＳＦが、請求項１～６または１０～１２のいずれか１項を含む、請求項１５５に記載のシステム。
【請求項１５７】
前記受容体が、請求項７９～８７のいずれか１項に記載のＧ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む、請求項１５５または１５６に記載のシステム。
【請求項１５８】
前記少なくとも１つの追加のサイトカインまたはケモカインが、インターロイキン（ＩＬ）－１８、ＩＬ－２１、インターフェロンα、インターフェロンβ、インターフェロンγ、ＩＬ－１７、ＩＬ－２１、ＴＮＦ－α、ＣＸＣＬ１３、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１α）、ＣＣＬ４（ＭＩＰ－１β）、及びＣＣＬ１９、ならびに受容体ＮＫＧ２Ｄ、ならびにこれらの組み合わせのうち少なくとも１つを含む、請求項１５５に記載の細胞を選択的に活性化させるためのシステム。
【請求項１５９】
前記少なくとも１つの追加のサイトカインが、ＩＬ－１８を含む、請求項１５８に記載の細胞を選択的に活性化させるためのシステム。
【請求項１６０】
前記抗原結合性シグナル伝達受容体が、天然のＴ細胞受容体、操作されたＴ細胞受容体（ＴＣＲ）、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、天然のＢ細胞受容体、操作されたＢ細胞受容体（ＢＣＲ）、ストレスリガンド受容体、パターン認識受容体、及びこれらの組み合わせのうち少なくとも１つを含む、請求項１５５～１５９のいずれか１項に記載の細胞を選択的に活性化させるためのシステム。
【請求項１６１】
前記抗原結合性シグナル伝達受容体がＣＡＲを含み、任意選択で、前記ＣＡＲがメソテリンＣＡＲである、請求項１６０に記載の細胞を選択的に活性化させるためのシステム。
【請求項１６２】
前記Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤが、サイトＩＩ界面領域における少なくとも１つの変異、サイトＩＩＩ界面領域における少なくとも１つの変異、またはそれらの組み合わ

せを含む、前記請求項のいずれか１項に記載の細胞を選択的に活性化させるためのシステム。
【請求項１６３】
前記サイトＩＩ界面領域における前記少なくとも１つの変異が、配列番号２に示す配列のアミノ酸位置１４１、１６７、１６８、１７１、１７２、１７３、１７４、１９７、１９９、２００、２０２、及び２８８からなる群から選択される前記Ｇ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤのアミノ酸位置に位置する、請求項１６２に記載の細胞を選択的に活性化させるためのシステム。
【請求項１６４】
前記Ｇ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤの前記サイトＩＩ界面領域における前記少なくとも１つの変異が、配列番号２に示す配列のＲ１４１Ｅ、Ｒ１６７Ｄ、Ｋ１６８Ｄ、Ｋ１６８Ｅ、Ｌ１７１Ｅ、Ｌ１７２Ｅ、Ｙ１７３Ｋ、Ｑ１７４Ｅ、Ｄ１９７Ｋ、Ｄ１９７Ｒ、Ｍ１９９Ｄ、Ｄ２００Ｋ、Ｄ２００Ｒ、Ｖ２０２Ｄ、Ｒ２８８Ｄ、及びＲ２８８Ｅからなる群から選択される、請求項１６２に記載の細胞を選択的に活性化させるためのシステム。
【請求項１６５】
前記Ｇ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤの前記サイトＩＩＩ界面領域における前記少なくとも１つの変異が、配列番号２に示す配列のアミノ酸２～３０８のアミノ酸位置３０、４１、７３、７５、７９、８６、８７、８８、８９、９１、及び９３からなる群から選択される、請求項１６２に記載の細胞を選択的に活性化させるためのシステム。
【請求項１６６】
前記Ｇ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤの前記サイトＩＩＩ界面領域における前記少なくとも１つの変異が、配列番号２に示す配列のＳ３０Ｄ、Ｒ４１Ｅ、Ｑ７３Ｗ、Ｆ７５ＫＦ、Ｓ７９Ｄ、Ｌ８６Ｄ、Ｑ８７Ｄ、Ｉ８８Ｅ、Ｌ８９Ａ、Ｑ９１Ｄ、Ｑ９１Ｋ、及びＥ９３Ｋからなる群から選択される、請求項１６２に記載の細胞を選択的に活性化させるためのシステム。
【請求項１６７】
前記Ｇ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤが、表４に示すデザイン番号の複数の変異の組み合わせを含み、前記変異が、配列番号２に示す配列のアミノ酸位置に対応する、前記請求項のいずれか１項に記載の細胞を選択的に活性化させるためのシステム。
【請求項１６８】
前記Ｇ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤが、配列番号２に示す配列の変異：Ｒ４１Ｅ、Ｒ１４１Ｅ、及びＲ１６７Ｄを含む、前記請求項のいずれか１項に記載の細胞を選択的に活性化させるためのシステム。
【請求項１６９】
Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む前記受容体が、キメラ受容体である、前記請求項のいずれか１項に記載の細胞を選択的に活性化させるためのシステム。
【請求項１７０】
前記キメラ受容体が、少なくとも１つの第２のドメインと作動可能に連結し、前記第２のドメインが、１つ以上のサイトカイン受容体の細胞内ドメイン（ＩＣＤ）由来の少なくとも１つのシグナル伝達分子結合部位を含み、
前記少なくとも１つのシグナル伝達分子結合部位が、Ｇ－ＣＳＦＲのＳＴＡＴ３結合部位、糖タンパク質１３０（ｇｐ１３０）のＳＴＡＴ３結合部位、ｇｐ１３０のＳＨＰ－２結合部位、ＩＬ－２Ｒβ$_2$のＳＨＣ結合部位、ＩＬ－２Ｒβ$_2$のＳＴＡＴ５結合部位、ＩＬ－２Ｒβ$_2$のＳＴＡＴ３結合部位、ＩＬ－２Ｒβ$_2$のＳＴＡＴ１結合部位、ＩＬ－７Ｒαのホスファチジルイノシトール３－キナーゼ（ＰＩ３Ｋ）結合部位、ＩＬ－１２Ｒβ$_2$のＳＴＡＴ４結合部位、ＩＬ－１２Ｒβ$_2$のＳＴＡＴ５結合部位、ＩＬ－１２Ｒβ$_2$のＳＴＡＴ３結合部位、ＩＬ－２１ＲのＳＴＡＴ５結合部位、ＩＬ－２１ＲのＳＴＡＴ３結合部位　ＩＬ－２１ＲのＳＴＡＴ１結合部位、ＩＬ－４ＲαのＩＲＳ－１またはＩＲＳ－２結合部位、ＩＬ－４ＲαのＳＴＡＴ６結合部位、エリスロポイエチン受容体（ＥＰＯＲ）のＳＨＰ－１またはＳＨＰ－２結合部位、ＥＰＯＲのＳＴＡ

Ｔ５結合部位、インターフェロンアルファ及びベータ受容体サブユニット２（ＩＦＮＡＲ２）のＳＴＡＴ１またはＳＴＡＴ２結合部位、ならびにインターフェロンガンマ受容体１（ＩＦＮγＲ１）のＳＴＡＴ１結合部位、またはこれらの組み合わせからなる群から選択され、

任意選択で、前記ＩＣＤが、Ｇ－ＣＳＦＲ、ｇｐ１３０ＥＰＯＲ、及びインターフェロンガンマ受容体２（ＩＦＮγＲ２）、またはこれらの組み合わせからなる群から選択されるタンパク質のＢｏｘ１領域及びＢｏｘ２領域を含み、

任意選択で、前記キメラ受容体が、Ｇ－ＣＳＦＲ、ｇｐ１３０（糖タンパク質１３０）、及びＩＬ－２Ｒからなる群から選択されるタンパク質の膜貫通ドメイン（ＴＭＤ）を含む第３のドメインを含み、任意選択で、前記ＴＭＤが野生型ＴＭＤである、請求項１６９に記載の細胞を選択的に活性化させるためのシステム。

【請求項１７１】

前記キメラ受容体が、少なくとも１つの第２のドメインと作動可能に連結し、前記第２のドメインが、以下：

（ｉ）

（ａ）ｇｐ１３０のＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、ならびに

（ｂ）ＩＬ－２Ｒβ のＣ末端領域、または

（ｉｉ）

（ａ）Ｇ－ＣＳＦＲのＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、ならびに

（ｂ）ＩＬ－２Ｒβ のＣ末端領域、または

（ｉｉｉ）

（ａ）Ｇ－ＣＳＦＲのＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、ならびに

（ｂ）ＩＬ－１２Ｒβ$_2$のＣ末端領域、または

（ｉｖ）

（ａ）Ｇ－ＣＳＦＲのＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、ならびに

（ｂ）ＩＬ－２１ＲのＣ末端領域、または

（ｖ）

（ａ）ＩＬ－２Ｒβのボックス１及びＢｏｘ２領域、ならびに

（ｂ）ＩＬ－２Ｒβのボックス末端領域、または

（ｖｉ）

（ａ）Ｇ－ＣＳＦＲのＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、ならびに

（ｂ）ＩＬ－７Ｒαのボックス末端領域、または

（ｖｉｉ）

（ａ）Ｇ－ＣＳＦＲのＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、

（ｂ）ＩＬ－４Ｒαのボックス末端領域、または

（ｖｉｉｉ）

（ａ）ｇｐ１３０のＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、

（ｂ）ｇｐ１３０のＣ末端領域、または

（ｉｘ）

（ａ）エリスロポイエチン受容体（ＥＰＯＲ）のＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、

（ｂ）ＥＰＯＲのＣ末端領域、または

（ｘ）

（ａ）Ｇ－ＣＳＦＲのＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、

（ｂ）インターフェロンアルファ及びベータ受容体サブユニット２（ＩＦＮＡＲ２）のＣ末端領域、または

（ｘｉ）

（ａ）インターフェロンガンマ受容体２（ＩＦＮγＲ２）のＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、

（ｂ）インターフェロンガンマ受容体１（ＩＦＮγＲ１）のＣ末端領域

を含む、請求項１６９に記載の細胞を選択的に活性化させるためのシステム。

【請求項１７２】
前記ＥＣＤが前記ＴＭＤのＮ末端側であり、ＴＭＤが前記ＩＣＤのＮ末端側である、請求項１７０または１７１に記載の細胞を選択的に活性化させるためのシステム。
【請求項１７３】
Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む前記受容体が、前記細胞上で発現する、前記請求項のいずれか１項に記載の細胞を選択的に活性化させるためのシステム。
【請求項１７４】
前記細胞が免疫細胞であり、任意選択で、前記免疫細胞が、
Ｔ細胞であり、任意選択で、
ＮＫ細胞であり、任意選択で、
ＮＫＴ細胞であり、任意選択で、
Ｂ細胞であり、任意選択で、
形質細胞であり、任意選択で、
マクロファージであり、任意選択で、
樹状細胞であり、任意選択で、
前記細胞が幹細胞であり、任意選択で、
前記細胞が初代細胞であり、任意選択で、
前記細胞がヒト細胞である、
前記請求項のいずれか１項に記載の細胞を選択的に活性化させるためのシステム。
【請求項１７５】
前記Ｔ細胞が、ＣＤ８$^+$Ｔ細胞、細胞傷害性ＣＤ８$^+$Ｔ細胞、細胞傷害性ＣＤ４$^+$Ｔ細胞、ナイーブＣＤ４$^+$Ｔ細胞、ナイーブＣＤ８$^+$Ｔ細胞、ヘルパーＴ細胞、制御性Ｔ細胞、メモリーＴ細胞、及びγδＴ細胞からなる群から選択される、請求項１７４に記載のシステム。
【請求項１７６】
前記バリアントＧ－ＣＳＦによる、Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む前記受容体の活性化により、前記受容体を発現する細胞の、増殖、生存能力、持続性、細胞傷害性、サイトカイン分泌、記憶、活性増強、またはこれらの組み合わせのうち少なくとも１つを含む細胞応答が、引き起こされる、前記請求項のいずれか１項に記載の細胞を選択的に活性化させるためのシステム。
【請求項１７７】
前記バリアントＧ－ＣＳＦが、サイトＩＩ界面領域における少なくとも１つの変異、サイトＩＩＩ界面領域における少なくとも１つの変異、またはそれらの組み合わせを含む、前記請求項のいずれか１項に記載の細胞を選択的に活性化させるためのシステム。
【請求項１７８】
前記バリアントＧ－ＣＳＦの前記サイトＩＩ界面領域における前記少なくとも１つの変異が、配列番号１に示す配列のアミノ酸位置１２、１６、１９、２０、１０４、１０８、１０９、１１２、１１５、１１６、１１８、１１９、１２２、及び１２３からなる群から選択されるアミノ酸位置に位置する、請求項１７７に記載の細胞を選択的に活性化させるためのシステム。
【請求項１７９】
前記バリアントＧ－ＣＳＦの前記サイトＩＩ界面領域における前記少なくとも１つの変異が、Ｓ１２Ｅ、Ｓ１２Ｋ、Ｓ１２Ｒ、Ｋ１６Ｄ、Ｌ１８Ｆ、Ｅ１９Ｋ、Ｑ２０Ｅ、Ｄ１０４Ｋ、Ｄ１０４Ｒ、Ｌ１０８Ｋ、Ｌ１０８Ｒ、Ｄ１０９Ｒ、Ｄ１１２Ｒ、Ｄ１１２Ｋ、Ｔ１１５Ｅ、Ｔ１１５Ｋ、Ｔ１１６Ｄ、Ｑ１１９Ｅ、Ｑ１１９Ｒ、Ｅ１２２Ｋ、Ｅ１２２Ｒ、及びＥ１２３Ｒからなる群から選択される変異の群から選択される、請求項１７８に記載の細胞を選択的に活性化させるためのシステム。
【請求項１８０】
前記バリアントＧ－ＣＳＦの前記サイトＩＩＩ界面領域における前記少なくとも１つの変異が、配列番号１に示す配列の３８、３９、４０、４１、４６、４７、４８、４９、及

び１４７からなる群から選択される変異の群から選択される、請求項１７７～１７９のいずれか１項に記載の細胞を選択的に活性化させるためのシステム。
【請求項１８１】
前記バリアントＧ－ＣＳＦの前記サイトＩＩＩ界面領域における前記少なくとも１つの変異が、Ｔ３８Ｒ、Ｙ３９Ｅ、Ｋ４０Ｄ、Ｋ４０Ｆ、Ｌ４１Ｄ、Ｌ４１Ｅ、Ｌ４１Ｋ、Ｅ４６Ｒ、Ｌ４７Ｄ、Ｖ４８Ｋ、Ｖ４８Ｒ、Ｌ４９Ｋ、及びＲ１４７Ｅからなる群から選択される変異の群から選択される、請求項１８０に記載の細胞を選択的に活性化させるためのシステム。
【請求項１８２】
前記細胞が、前記Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む前記受容体と、前記少なくとも１つの追加のサイトカインまたはケモカインとの両方を発現する、前記請求項のいずれか１項に記載の細胞を選択的に活性化させるためのシステム。
【請求項１８３】
２つ以上の細胞集団が、Ｇ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤを含む別個のキメラ受容体をそれぞれ発現し、且つＧ－ＣＳＦの別個のバリアント型をそれぞれ発現する、請求項１５５～１８１のいずれか１項に記載の細胞を選択的に活性化させるためのシステム。
【請求項１８４】
前記免疫細胞の第１の集団が、
（ａ）少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質であって、任意選択で、前記１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質が、１つ以上のサイトカイン、ケモカイン、ホルモン、抗体、もしくはこれらの誘導体、または他の親和性試薬を含む、前記少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質、及び
（ｂ）少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体
のうち一方または両方を更に発現する、請求項１８３に記載のシステム。
【請求項１８５】
前記細胞が免疫細胞であり、前記免疫細胞が少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体を更に発現し、前記抗原結合性シグナル伝達受容体が、第２の細胞の上に発現した抗原と選択的に結合する、請求項１８２に記載の細胞を選択的に活性化させるためのシステム。
【請求項１８６】
前記抗原結合性シグナル伝達受容体がキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を含み、
任意選択で、前記ＣＡＲがメソテリンＣＡＲである、
請求項１８４に記載の細胞を選択的に活性化させるためのシステム。
【請求項１８７】
前記追加のサイトカインがＩＬ－１８を含む、請求項１８６に記載の細胞を選択的に活性化させるためのシステム。
【請求項１８８】
前記第２の細胞が、がん細胞である、請求項１８４～１８７のいずれか１項に記載の細胞を選択的に活性化させるためのシステム。
【請求項１８９】
前記請求項のいずれか１項に記載のシステムをコードする、１つ以上の核酸配列。
【請求項１９０】
請求項１８９に記載の核酸配列を含む、１つ以上の発現ベクター。
【請求項１９１】
請求項１５５～１８８のいずれか１項に記載のシステムを発現するように操作された、１つ以上の細胞。
【請求項１９２】
前記細胞が免疫細胞であり、任意選択で、前記免疫細胞が、
Ｔ細胞であり、任意選択で、

ＮＫ細胞であり、任意選択で、
ＮＫＴ細胞であり、任意選択で、
Ｂ細胞であり、任意選択で、
形質細胞であり、任意選択で、
マクロファージであり、任意選択で、
樹状細胞であり、任意選択で、
前記細胞が幹細胞であり、任意選択で、
前記細胞が初代細胞であり、任意選択で、
前記細胞がヒト細胞である、
請求項１９１に記載の細胞。

【請求項１９３】

前記Ｔ細胞が、ＣＤ８＋Ｔ細胞、細胞傷害性ＣＤ８＋Ｔ細胞、細胞傷害性ＣＤ４＋Ｔ細胞、ナイーブＣＤ８＋Ｔ細胞、ナイーブＣＤ４＋Ｔ細胞、ヘルパーＴ細胞、制御性Ｔ細胞、メモリーＴ細胞、及びγδＴ細胞からなる群から選択される、請求項１９２に記載の細胞。

【請求項１９４】

細胞の表面上に発現したＧ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む受容体を、選択的に活性化させる方法であって、

前記細胞中に、

請求項１５５～１８８のいずれか１項に記載のシステムのＧ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む少なくとも１つの受容体と、

以下：

（ｉ）少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質であって、任意選択で、前記１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質が、請求項１５５～１８８のいずれか１項に記載のシステムの、１つ以上のサイトカイン、ケモカイン、ホルモン、抗体、もしくはこれらの誘導体、または他の親和性試薬を含む、前記少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質、及び

（ｉｉ）請求項１５５～１８８のいずれか１項に記載のシステムの、少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体

のうちの一方または両方と

をコードする１つ以上の核酸配列を導入することと、

前記Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む前記受容体を、バリアントＧ－ＣＳＦ、または請求項１５５～１８８のいずれか１項に記載のバリアントＧ－ＣＳＦと接触させることと

を含む、前記方法。

【請求項１９５】

前記受容体が免疫細胞上で発現し、任意選択で、前記免疫細胞が、
Ｔ細胞であり、任意選択で、
ＮＫ細胞であり、任意選択で、
ＮＫＴ細胞であり、任意選択で、
Ｂ細胞であり、任意選択で、
形質細胞であり、任意選択で、
マクロファージであり、任意選択で、
樹状細胞であり、任意選択で、
前記細胞が幹細胞であり、任意選択で、
前記細胞が初代細胞であり、任意選択で、
前記細胞がヒト細胞である、
請求項１９４に記載の方法

【請求項１９６】

前記Ｔ細胞が、ＣＤ８＋Ｔ細胞、細胞傷害性ＣＤ８＋Ｔ細胞、細胞傷害性ＣＤ４＋Ｔ細胞、ナイーブＣＤ４＋Ｔ細胞、ナイーブＣＤ８＋Ｔ細胞、ヘルパーＴ細胞、制御性Ｔ細胞、メモリーＴ細胞、及びγδＴ細胞からなる群から選択される、請求項１９５に記載の方法。

【請求項１９７】

前記免疫細胞上で発現した前記受容体の前記選択的活性化により、前記免疫細胞の増殖、生存能力、持続性、細胞傷害性、サイトカイン分泌、記憶、活性増強、またはこれらの組み合わせのうち少なくとも１つを含む細胞応答が引き起こされる、請求項１９５に記載の方法。

【請求項１９８】

免疫細胞の第１の集団が、前記Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む１つ以上の受容体を発現し、免疫細胞の第２の集団が、１つ以上のバリアントＧ－ＣＳＦを発現し、任意選択で、前記免疫細胞の第１及び第２の集団のうち一方または両方が、少なくとも１つの別個の抗原結合性シグナル伝達受容体を更に発現し、任意選択で、前記少なくとも１つの別個の抗原結合性シグナル伝達受容体が、少なくとも１つのＣＡＲを含む、請求項１９５に記載の方法。

【請求項１９９】

前記免疫細胞の第１及び第２の集団のうち一方または両方が、

（ａ）少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質であって、任意選択で、前記少なくとも１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質が、１つ以上のサイトカイン、ケモカイン、ホルモン、抗体、もしくはこれらの誘導体、または他の親和性試薬を含む、前記少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質、及び

（ｂ）少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体

のうち一方または両方を更に発現する、請求項１９８に記載の方法。

【請求項２００】

前記免疫細胞の第１及び第２の集団のそれぞれが、Ｇ－ＣＳＦＲの別個のバリアントＥＣＤを含む少なくとも１つの別個の受容体と、少なくとも１つの別個のバリアントＧ－ＣＳＦとを発現する、請求項１９８または１９９に記載の方法。

【請求項２０１】

１つ以上の追加の免疫細胞集団を更に含み、

各追加の免疫細胞集団が、

（ｉ）Ｇ－ＣＳＦＲの別個のバリアントＥＣＤを含む別個の受容体、

（ｉｉ）別個のバリアントＧ－ＣＳＦ、

（ｉｉｉ）別個のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質、及び

（ｉｖ）別個の抗原結合性シグナル伝達受容体

のうち少なくとも１つを発現する、

請求項１９８～２００のいずれか１項に記載の方法。

【請求項２０２】

請求項１５５～１８８のいずれか１項に記載のシステムのＧ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む受容体と、

以下：

（ｉ）少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質であって、任意選択で、前記少なくとも１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質が、請求項１５５～１８８のいずれか１項に記載のシステムの、１つ以上のサイトカイン、ケモカイン、ホルモン、抗体、もしくはこれらの誘導体、または他の親和性試薬を含む、前記少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質、及び

（ｉｉ）請求項１５５～１８８のいずれか１項に記載のシステムの、少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体

のうちの一方または両方と
を発現する細胞を産生する方法であって、
前記細胞に、前記受容体をコードする１つ以上の核酸または発現ベクターと、（ｉ）及び（ｉｉ）のうち一方または両方とを導入すること
を含む、前記方法。
【請求項２０３】
免疫細胞の第１の集団が、前記Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む前記受容体を発現し、免疫細胞の第２の集団が、前記バリアントＧ－ＣＳＦを発現する、請求項２００に記載の方法。
【請求項２０４】
前記免疫細胞の第１及び第２の集団のうち一方または両方が、
（ａ）少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質であって、任意選択で、前記少なくとも１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質が、１つ以上のサイトカイン、ケモカイン、ホルモン、抗体、もしくはこれらの誘導体、または他の親和性試薬を含む、前記少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質、及び
（ｂ）少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体
のうち一方または両方を更に発現する、請求項２０３に記載の方法。
【請求項２０５】
その必要がある対象において免疫応答を増加させる方法であって、
請求項１９２に記載の免疫細胞を前記対象に投与すること
を含む、前記方法。
【請求項２０６】
その必要がある対象において疾患を治療する方法であって、
請求項１９２に記載の免疫細胞を前記対象に投与すること
を含む、前記方法。
【請求項２０７】
少なくとも１つのバリアントＧ－ＣＳＦを前記対象に投与または提供することを更に含む、請求項２０４に記載の方法。
【請求項２０８】
がんを治療するために使用される、請求項２０４～２０７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２０９】
炎症状態を治療するために使用される、請求項２０４～２０７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２１０】
自己免疫疾患または状態を治療するために使用される、請求項２０４～２０７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２１１】
変性疾患を治療するために使用される、請求項２０４～２０７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２１２】
移植のための、天然のまたは操作された細胞、組織、または器官を生成するために使用される、請求項２０４～２０７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２１３】
移植片拒絶反応を予防または治療するために使用される、請求項２０４～２０７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２１４】
感染性疾患を治療するために使用される、請求項２０４～２０７のいずれか１項に記載の方法。

【請求項２１５】
少なくとも１つの追加の活性剤を投与または提供することを更に含み、
任意選択で、前記少なくとも１つの追加の活性剤が、少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質を含み、任意選択で、前記１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質が、１つ以上のサイトカイン、ケモカイン、ホルモン、抗体、もしくはこれらの誘導体、または他の親和性試薬を含む、
請求項２０４～２０７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２１６】
その必要がある対象を治療する方法であって、
（ｉ）免疫細胞含有試料を単離することと、
（ｉｉ）前記免疫細胞に、
請求項１５５～１８８のいずれか１項に記載のシステムのＧ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む１つ以上の受容体と、
以下：
（ａ）少なくとも１つの追加の活性剤であって、任意選択で、前記少なくとも１つの追加の活性剤が、少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質を含み、任意選択で、前記１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質が、請求項１５５～１８８のいずれか１項に記載のシステムの、１つ以上のサイトカイン、ケモカイン、ホルモン、抗体、もしくはこれらの誘導体、または他の親和性試薬を含む、前記少なくとも１つの追加の活性剤、及び、任意選択で、
（ｂ）請求項１５５～１８８のいずれか１項に記載のシステムの、１つ以上の抗原結合性シグナル伝達受容体
のうちの一方または両方と
をコードする１つ以上の核酸配列を導入することと、
（ｉｉｉ）（ｉｉ）の前記免疫細胞を前記対象に投与することと、
（ｉｖ）前記免疫細胞を、前記Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む前記受容体と特異的に結合するバリアントＧ－ＣＳＦと接触させることと
を含む、前記方法。
【請求項２１７】
前記免疫細胞を前記対象に投与または注入する前に、前記対象が、免疫除去治療を受けている、請求項２１６に記載の方法。
【請求項２１８】
前記免疫細胞含有試料が、前記細胞が投与される対象から単離される、請求項２１６に記載の方法。
【請求項２１９】
前記免疫細胞含有試料が、前記細胞が投与される対象とは異なる対象から単離される、請求項２１６に記載の方法。
【請求項２２０】
前記免疫細胞含有試料が、前記細胞が投与される対象由来の、または前記細胞が投与されることになる対象とは異なる対象由来の供給源細胞から生成され、任意選択で、前記供給源細胞が、幹細胞であり、任意選択で多能性幹細胞である、請求項２１６～２１９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２２１】
前記免疫細胞を前記対象に投与する前に、前記細胞がｉｎ　ｖｉｔｒｏで前記バリアントＧ－ＣＳＦまたは追加のサイトカインもしくはケモカインと接触させられる、請求項２１６に記載の方法。
【請求項２２２】
前記免疫細胞が、請求項１～３２のいずれか１項に記載のシステムのＧ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む前記受容体からのシグナル伝達を活性化するのに十分な時間、前記

バリアントＧ－ＣＳＦと接触させられる、請求項２１６～２２０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２２３】
請求項１５５～１８８のいずれか１項に記載のシステムのＧ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む受容体、ならびに、以下：
（ａ）請求項１５５～１８８のいずれか１項に記載のシステムの、少なくとも１つの追加のサイトカイン及びケモカイン、ならびに
（ｂ）請求項１５５～１８８のいずれか１項に記載のシステムの、少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体
のうちの一方または両方
をコードする細胞と、
使用説明書と
を含む、キットであって、
任意選択で、前記細胞が免疫細胞である、
前記キット。
【請求項２２４】
（ｉ）請求項１５５～１８８のいずれか１項に記載のシステムのＧ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む受容体、ならびに、以下：
（ａ）少なくとも１つの追加の活性剤であって、任意選択で、前記少なくとも１つの追加の活性剤が、少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質を含み、任意選択で、前記１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質が、請求項１５５～１８８のいずれか１項に記載のシステムの、１つ以上のサイトカイン、ケモカイン、ホルモン、抗体、もしくはこれらの誘導体、または他の親和性試薬を含む、前記少なくとも１つの追加の活性剤、及び
（ｂ）請求項１５５～１８８のいずれか１項に記載のシステムの、少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体
のうちの一方または両方
をコードする１つ以上の核酸配列または発現ベクターと、
（ｉｉ）少なくとも１つのバリアントＧ－ＣＳＦと、
（ｉｉｉ）使用説明書と
を含む、キットであって、
前記受容体ならびに（ａ）及び（ｂ）のうち一方または両方が、同じまたは別の核酸配列または発現ベクター上に位置する、
前記キット。
【請求項２２５】
（ｉ）請求項１５５～１８８のいずれか１項に記載のシステムのＧ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む受容体、ならびに、以下：
（ａ）少なくとも１つの追加の活性剤であって、任意選択で、前記少なくとも１つの追加の活性剤が、少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質を含み、任意選択で、前記１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質が、請求項１５５～１８８のいずれか１項に記載のシステムの、１つ以上のサイトカイン、ケモカイン、ホルモン、抗体、もしくはこれらの誘導体、または他の親和性試薬を含む、前記少なくとも１つの追加の活性剤、及び
（ｂ）請求項１５５～１８８のいずれか１項に記載のシステムの、少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体
のうちの一方または両方
をコードする１つ以上の核酸配列または発現ベクターを含む細胞と、
（ｉｉ）使用説明書と
を含む、キットであって、
任意選択で、前記キットが、前記Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む前記受容体と

特異的に結合するバリアントＧ－ＣＳＦを含む、
前記キット。
【請求項２２６】
（ｉ）インターロイキン受容体アルファ（ＩＬ－７Ｒα）の細胞外ドメイン（ＥＣＤ）と、
（ｉｉ）膜貫通ドメイン（ＴＭＤ）と、
（ｉｉｉ）配列番号１０９に記載される野生型ヒトＩＬ－７Ｒα細胞内シグナル伝達ドメインとは異なるサイトカイン受容体の細胞内ドメイン（ＩＣＤ）と
を含む、キメラ受容体であって、
前記ＥＣＤ及びＴＭＤがそれぞれ前記ＩＣＤと作動可能に連結している、
前記キメラ受容体。
【請求項２２７】
前記ＥＣＤのカルボキシ末端（Ｃ末端）が、前記ＴＭＤのアミノ末端（Ｎ末端）に連結し、前記ＴＭＤのＣ末端が、前記ＩＣＤのＮ末端に連結している、請求項２２６に記載のキメラ受容体。
【請求項２２８】
前記ＥＣＤが、天然ヒトＩＬ－７ＲαのＥＣＤである、請求項２２６または２２７に記載のキメラ受容体。
【請求項２２９】
前記ＴＭＤが、ＩＬ－７ＲαのＴＭＤである、請求項２２６～２２８のいずれか１項に記載のキメラ受容体。
【請求項２３０】
前記ＴＭＤが、天然ヒトＩＬ－７ＲαのＴＭＤである、請求項２２９に記載のキメラ受容体。
【請求項２３１】
前記ＩＣＤが、サイトカイン受容体の細胞内ドメイン由来の少なくとも１つのシグナル伝達分子結合部位を含み、任意選択で、前記少なくとも１つのシグナル伝達分子結合部位が、
（ａ）ＩＬ－２Ｒβ、ＩＬ－４Ｒα、ＩＬ－７Ｒａ、ＩＬ－２１Ｒ、もしくはｇｐ１３０のＪａｋ１結合部位（Ｂｏｘ１及び２領域）、
（ｂ）ＩＬ－２ＲβのＳＨＣ結合部位、
（ｃ）ＩＬ－２ＲβもしくはＩＬ－７ＲａのＳＴＡＴ５結合部位、
（ｄ）ＩＬ－２１Ｒもしくはｇｐ１３０のＳＴＡＴ３結合部位、
（ｅ）ＩＬ－１２Ｒβ２のＳＴＡＴ４結合部位、
（ｆ）ＩＬ－４ＲαのＳＴＡＴ６結合部位、
（ｇ）ＩＬ－４ＲαのＩＲＳ－１もしくはＩＲＳ－２結合部位、及び
（ｈ）ｇｐ１３０のＳＨＰ－２結合部位、
（ｉ）ＩＬ－７ＲαのＰＩ３Ｋ結合部位、
またはこれらの組み合わせ
を含む、請求項２２６～２３０のいずれか１項に記載のキメラ受容体。
【請求項２３２】
前記ＩＣＤが、共通のガンマ鎖（ｇｃ）でのヘテロ二量体化によって活性化される受容体の少なくとも細胞内シグナル伝達ドメインを含む、請求項２２６～２３１のいずれか１項に記載のキメラ受容体。
【請求項２３３】
前記ＩＣＤが、ＩＬ－２Ｒβ（インターロイキン－２受容体ベータ）、ＩＬ－４Ｒα（インターロイキン－４受容体アルファ）、ＩＬ－９Ｒα（インターロイキン－９受容体アルファ）、ＩＬ－１２Ｒ（インターロイキン－１２受容体）、ＩＬ－２１Ｒ（インターロイキン－２１受容体）、及び糖タンパク質１３０（ｇｐ１３０）、ならびにこれらの組み合わせからなる群から選択されるサイトカイン受容体の少なくとも細胞内シグナル伝達ド

メインを含む、請求項２２６～２３１のいずれか１項に記載のキメラ受容体。
【請求項２３４】
ＩＣＤと作動可能に連結したＩＬ－７ＲαのＥＣＤ及びＴＭＤを含む、キメラ受容体であって、
前記ＩＣＤが、
（ｉ）
（ａ）ＩＬ－２ＲβのＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）ＩＬ－２ＲβのＳＨＣ結合部位、及び
（ｃ）ＩＬ－２ＲβのＳＴＡＴ５結合部位、または
（ｉｉ）
（ａ）ＩＬ－７ＲαのＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）ＩＬ－２ＲβのＳＨＣ結合部位、及び
（ｃ）ＩＬ－２ＲβのＳＴＡＴ５結合部位、または
（ｉｉｉ）
（ａ）ＩＬ－２ＲβのＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）ＩＬ－２ＲβのＳＨＣ結合部位、
（ｃ）ＩＬ－２ＲβのＳＴＡＴ５結合部位、及び
（ｄ）ＩＬ－１２Ｒβ２のＳＴＡＴ４結合部位、または
（ｉｖ）
（ａ）ＩＬ－７ＲαのＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）ＩＬ－２ＲβのＳＨＣ結合部位、
（ｃ）ＩＬ－２ＲβのＳＴＡＴ５結合部位、及び
（ｄ）ＩＬ－１２Ｒβ２のＳＴＡＴ４結合部位、または
（ｖ）
（ａ）ＩＬ－２１ＲのＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、及び
（ｂ）ＩＬ－２１ＲのＳＴＡＴ３結合部位、または
（ｖｉ）
（ａ）ＩＬ－７ＲαのＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、及び
（ｂ）ＩＬ－２１ＲのＳＴＡＴ３結合部位、または
（ｖｉｉ）
（ａ）ＩＬ－２１ＲのＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）ＩＬ－２１ＲのＳＴＡＴ３結合部位、及び
（ｃ）ＩＬ－７ＲαのＳＴＡＴ５及びＰＩ３キナーゼ結合部位、
（ｖｉｉｉ）
（ａ）ＩＬ－７ＲαのＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）ＩＬ－２１ＲのＳＴＡＴ３結合部位、及び
（ｃ）ＩＬ－７ＲαのＳＴＡＴ５及びＰＩ３キナーゼ結合部位、
（ｉｘ）
（ａ）ＩＬ－２ＲβのＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）ＩＬ－２ＲβのＳＨＣ結合部位、
（ｃ）ＩＬ－２ＲβのＳＴＡＴ５結合部位、及び
（ｄ）ＩＬ－２１ＲのＳＴＡＴ３結合部位、または
（ｘ）
（ａ）ＩＬ－７ＲαのＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）ＩＬ－２ＲβのＳＨＣ結合部位、
（ｃ）ＩＬ－２ＲβのＳＴＡＴ５結合部位、及び
（ｄ）ＩＬ－２１ＲのＳＴＡＴ３結合部位、または
（ｘｉ）
（ａ）ＩＬ－２ＲβのＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）ＩＬ－２ＲβのＳＨＣ結合部位、

（ｃ）ＩＬ－２Ｒβの ＳＴＡＴ５結合部位、
（ｄ）ＩＬ１２Ｒβ２の ＳＴＡＴ４結合部位、及び
（ｅ）ＩＬ－２１Ｒの ＳＴＡＴ３結合部位、または
（ｘｉｉ）
（ａ）ＩＬ－７Ｒαの Ｂｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）ＩＬ－２Ｒβの ＳＨＣ結合部位、
（ｃ）ＩＬ－２Ｒβの ＳＴＡＴ５結合部位、
（ｄ）ＩＬ１２Ｒβ２の ＳＴＡＴ４結合部位、及び
（ｅ）ＩＬ－２１Ｒの ＳＴＡＴ３結合部位、または
（ｘｉｉｉ）
（ａ）ＩＬ－４Ｒαの Ｂｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）ＩＬ－４Ｒαの ＩＲＳ－１もしくはＩＲＳ－２結合部位、及び
（ｃ）ＩＬ－４Ｒαの ＳＴＡＴ６結合部位、または
（ｘｉｖ）
（ａ）ＩＬ－７Ｒαの Ｂｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）ＩＬ－４αの ＩＲＳ－１もしくはＩＲＳ－２結合部位、及び
（ｃ）ＩＬ－４αの ＳＴＡＴ６結合部位、または
（ｘｖ）
（ａ）ｇｐ１３０の Ｂｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）ｇｐ１３０の ＳＨＰ－２結合部位、及び
（ｃ）ｇｐ１３０の ＳＴＡＴ３結合部位、または
（ｘｖｉ）
（ａ）ＩＬ－７αの Ｂｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）ｇｐ１３０の ＳＨＰ－２結合部位、及び
（ｃ）ｇｐ１３０の ＳＴＡＴ３結合部位
を含む、
前記キメラ受容体。
【請求項２３５】
（ｂ）が（ｃ）のＮ末端側であるか、または
（ｃ）が（ｂ）のＮ末端側であるか、または
（ｃ）が（ｄ）のＮ末端側であるか、または
（ｄ）が（ｃ）のＮ末端側であるか、または
（ｄ）が（ｅ）のＮ末端側であるか、または
（ｅ）が（ｄ）のＮ末端側である、
請求項２３４に記載のキメラ受容体。
【請求項２３６】
前記ＩＣＤが、配列番号８５～１０７のうち少なくとも１つに示す配列に対して少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％同一の配列を含む、前記請求項のいずれか１項に記載のキメラ受容体。
【請求項２３７】
前記キメラ受容体の活性型がヘテロ二量体を形成し、任意選択で、前記キメラ受容体の活性化により、前記キメラ受容体を発現する細胞の、増殖、生存能力、持続性、細胞傷害性、サイトカイン分泌、記憶、及び活性増強のうち少なくとも１つを含む細胞応答が、引き起こされ、任意選択で、
前記キメラ受容体が、インターロイキン（ＩＬ）－７に接触すると活性化される、
前記請求項のいずれか１項に記載のキメラ受容体。
【請求項２３８】
前記ＩＬ－７が、野生型ヒトＩＬ－７である、請求項２３７に記載のキメラ受容体。

【請求項２３９】
前記ＩＬ－７が、野生型ＩＬ－７と比較して１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個の変異を含む、請求項２３７に記載のキメラ受容体。
【請求項２４０】
前記ＩＬ－７が１つ以上の化学修飾を含む、請求項２３７に記載のキメラ受容体。
【請求項２４１】
前記ＩＬ－７がＰＥＧ化によって修飾されている、請求項２４０に記載のキメラ受容体。
【請求項２４２】
前記ＩＬ－７が、前記ＩＬ－７タンパク質のＮ末端またはＣ末端に対するポリエチレングリコール（ＰＥＧ）の薬剤添加によってＰＥＧ化されている、請求項２４１に記載のキメラ受容体。
【請求項２４３】
前記キメラ受容体が細胞上で発現する、前記請求項のいずれか１項に記載のキメラ受容体。
【請求項２４４】
前記細胞が免疫細胞であり、任意選択で、前記免疫細胞が、
Ｔ細胞であり、任意選択で、
ＮＫ細胞であり、任意選択で、
ＮＫＴ細胞であり、任意選択で、
Ｂ細胞であり、任意選択で、
形質細胞であり、任意選択で、
マクロファージであり、任意選択で、
樹状細胞であり、任意選択で、
前記細胞が幹細胞であり、任意選択で、
前記細胞が初代細胞であり、任意選択で、
前記細胞がヒト細胞である、
請求項２４３に記載のキメラ受容体。
【請求項２４５】
前記Ｔ細胞が、ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞、細胞傷害性ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞、ナイーブＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞、ナイーブＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞、ヘルパーＴ細胞、制御性Ｔ細胞、メモリーＴ細胞、及びγδＴ細胞からなる群から選択される、請求項２４４に記載のキメラ受容体。
【請求項２４６】
ＩＬ－７による前記受容体の活性化により、前記受容体を発現する細胞の、増殖、生存能力、持続性、細胞傷害性、サイトカイン分泌、記憶、及び活性増強のうち少なくとも１つを含む細胞応答が、引き起こされる、前記請求項のいずれか１項に記載のキメラ受容体。
【請求項２４７】
前記請求項のいずれか１項に記載の受容体をコードする、１つ以上の核酸配列。
【請求項２４８】
請求項２０に記載の核酸配列を含む、１つ以上の発現ベクター。
【請求項２４９】
請求項２４７に記載の核酸配列または請求項２４８に記載の発現ベクターを含む、細胞。
【請求項２５０】
前記細胞が免疫細胞であり、任意選択で、前記免疫細胞が、
Ｔ細胞であり、任意選択で、
ＮＫ細胞であり、任意選択で、
ＮＫＴ細胞であり、任意選択で、
Ｂ細胞であり、任意選択で、

形質細胞であり、任意選択で、
マクロファージであり、任意選択で、
樹状細胞であり、任意選択で、
前記細胞が幹細胞であり、任意選択で、
前記細胞が初代細胞であり、任意選択で、
前記細胞がヒト細胞である、
請求項２４９に記載の細胞。
【請求項２５１】
前記Ｔ細胞が、ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞、細胞傷害性ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞、ナイーブＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞、ナイーブＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞、ヘルパーＴ細胞、制御性Ｔ細胞、メモリーＴ細胞、及びγδＴ細胞からなる群から選択される、請求項２５０に記載の細胞。
【請求項２５２】
細胞表面上に発現した受容体を活性化させるためのシステムであって、
（ａ）請求項２２６～２４５のいずれか１項に記載のキメラ受容体、及び
（ｂ）ＩＬ－７
を含む、前記システム。
【請求項２５３】
免疫細胞を活性化させるためのシステムであって、
（ａ）請求項２２６～２４５のいずれか１項に記載のキメラ受容体、
（ｂ）ＩＬ－７、及び
（ｃ）抗原結合性シグナル伝達受容体
を含む、前記システム。
【請求項２５４】
免疫細胞を活性化させるためのシステムであって、
（ａ）請求項２２６～２４５のいずれか１項に記載のキメラ受容体、
（ｂ）ＩＬ－７、及び
（ｃ）少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質であって、任意選択で、前記１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質が、１つ以上のサイトカイン、ケモカイン、ホルモン、抗体、もしくはこれらの誘導体、または他の親和性試薬を含む、前記少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質
を含む、前記システム。
【請求項２５５】
少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体を更に含む、請求項２５４に記載のシステム。
【請求項２５６】
前記少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体が、天然のＴ細胞受容体、操作されたＴ細胞受容体（ＴＣＲ）、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、天然のＢ細胞受容体、操作されたＢ細胞受容体（ＢＣＲ）、ストレスリガンド受容体、パターン認識受容体、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される少なくとも１つの受容体を含む、請求項２５３または２５５に記載のシステム。
【請求項２５７】
前記少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体がＣＡＲである、請求項２５６に記載のシステム。
【請求項２５８】
前記サイトカインまたはケモカインが、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、インターフェロン－ａ、インターフェロン－ｂ、インターフェロン－ｇ、ＩＬ－１７、ＩＬ－２１、ＴＮＦ－ａ、ＣＸＣＬ１３、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１ａ）、ＣＣＬ４（ＭＩＰ－１ｂ）、ＣＣＬ１９、ＮＫＧ２Ｄ、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項２５４に記載のシステム。

【請求項２５９】
前記サイトカインがＩＬ－１８である、請求項２５８に記載のシステム。
【請求項２６０】
前記サイトカインがヒトのものである、請求項２５８または２５９に記載のシステム。
【請求項２６１】
細胞の表面上に発現したキメラ受容体を活性化させる方法であって、
前記キメラ受容体を活性化させるために前記キメラ受容体をＩＬ－７と接触させることを含み、
前記キメラ受容体が、
（ｉ）ＩＬ－７Ｒαの細胞外ドメイン（ＥＣＤ）と、
（ｉｉ）膜貫通ドメイン（ＴＭＤ）と、
（ｉｉｉ）配列番号１０９に記載される野生型ヒトＩＬ－７Ｒα細胞内シグナル伝達ドメインとは異なるサイトカイン受容体の細胞内ドメイン（ＩＣＤ）と
を含み、前記ＥＣＤ及びＴＭＤがそれぞれ前記ＩＣＤと作動可能に連結している、
前記方法。
【請求項２６２】
前記キメラ受容体が、請求項２２７～２４５のいずれか１項に記載のキメラ受容体である、請求項２５３に記載の方法。
【請求項２６３】
細胞においてキメラ受容体を産生する方法であって、
前記細胞に、請求項２４７に記載の核酸配列または請求項２６２に記載の発現ベクターを導入すること
を含む、前記方法。
【請求項２６４】
前記配列または前記ベクターの配列を前記細胞のゲノム中へと編集することを更に含む、請求項２６２に記載の方法。
【請求項２６５】
前記細胞が免疫細胞であり、任意選択で、前記免疫細胞が、
Ｔ細胞であり、任意選択で、
ＮＫ細胞であり、任意選択で、
ＮＫＴ細胞であり、任意選択で、
Ｂ細胞であり、任意選択で、
形質細胞であり、任意選択で、
マクロファージであり、任意選択で、
樹状細胞であり、任意選択で、
前記細胞が幹細胞であり、任意選択で、
前記細胞が初代細胞であり、任意選択で、
前記細胞がヒト細胞である、
請求項２６２または２６３に記載の方法。
【請求項２６６】
前記Ｔ細胞が、ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞、細胞傷害性ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞、ナイーブＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞、ナイーブＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞、ヘルパーＴ細胞、制御性Ｔ細胞、メモリーＴ細胞、及びγδＴ細胞からなる群から選択される、請求項２６５に記載の方法。
【請求項２６７】
その必要がある対象において免疫応答を増加させる方法であって、
請求項２２６～２４５のいずれか１項に記載のキメラ受容体を発現する細胞を、前記対象に投与することと、
ＩＬ－７を前記対象に投与または提供することと
を含む、前記方法。
【請求項２６８】

その必要がある対象を治療する方法であって、
請求項２２６～２４５のいずれか１項に記載のキメラ受容体を発現する細胞を、前記対象に投与することと、
ＩＬ－７を前記対象に投与または提供することと
を含む、前記方法。
【請求項２６９】
がんを治療するために使用される、請求項２６７または２６８に記載の方法。
【請求項２７０】
自己免疫疾患を治療するために使用される、請求項２６７または２６８に記載の方法。
【請求項２７１】
炎症状態を治療するために使用される、請求項２６７または２６８に記載の方法。
【請求項２７２】
変性疾患を治療するために使用される、請求項２６７または２６８に記載の方法。
【請求項２７３】
移植のための、天然のまたは操作された細胞、組織、または器官を生成するために使用される、請求項２６７または２６８に記載の方法。
【請求項２７４】
移植片拒絶反応を予防または治療するために使用される、請求項２６７または２６８に記載の方法。
【請求項２７５】
感染性疾患を治療するために使用される、請求項２６７または２６８に記載の方法。
【請求項２７６】
少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質を投与または提供することを更に含み、
任意選択で、前記１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質が、１つ以上のサイトカイン、ケモカイン、ホルモン、抗体、もしくはこれらの誘導体、または他の親和性試薬を含む、
請求項２６７または２６８に記載の方法。
【請求項２７７】
前記対象が、少なくとも１つの追加の別個のキメラ受容体を発現する細胞を投与される、請求項２６７または２６８に記載の方法。
【請求項２７８】
前記少なくとも１つの追加の別個のキメラ受容体が、顆粒球細胞刺激因子受容体（Ｇ－ＣＳＦＲ）のバリアントＥＣＤを含むキメラ受容体である、請求項２７７に記載の方法。
【請求項２７９】
Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む前記少なくとも１つの追加の別個のキメラ受容体を発現する前記細胞が、１つ以上のバリアントＧ－ＣＳＦと接触させられ、任意選択で、前記対象が、１つ以上のバリアントＧ－ＣＳＦを投与される、請求項２７８に記載の方法。
【請求項２８０】
（ｉ）免疫細胞含有試料を単離することと、
（ｉｉ）前記キメラサイトカイン受容体をコードする核酸配列で前記免疫細胞の形質導入またはトランスフェクションを行うことと、
（ｉｉｉ）（ｉｉ）の前記免疫細胞を前記対象に投与することと、
（ｉｖ）前記免疫細胞をＩＬ－７と接触させることと
を含む、請求項２７６～２７９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２８１】
前記免疫細胞に、少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質をコードする核酸配列を導入することを更に含み、
任意選択で、前記１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タ

ンパク質が、１つ以上のサイトカイン、ケモカイン、ホルモン、抗体、もしくはこれらの誘導体、または他の親和性試薬を含む、
請求項２７７に記載の方法。
【請求項２８２】
前記少なくとも１つのサイトカインまたはケモカインが、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、インターフェロン－ａ、インターフェロン－ｂ、インターフェロン－ｇ、ＩＬ－１７、ＩＬ－２１、ＴＮＦ－ａ、ＣＸＣＬ１３、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１ａ）、ＣＣＬ４（ＭＩＰ－１ｂ）、ＣＣＬ１９、ＮＫＧ２Ｄ、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項２８１に記載の方法。
【請求項２８３】
前記免疫細胞に、少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体をコードする核酸配列を導入することを更に含む、請求項２８０に記載の方法。
【請求項２８４】
前記少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体が、天然のＴ細胞受容体、操作されたＴ細胞受容体（ＴＣＲ）、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、天然のＢ細胞受容体、操作されたＢ細胞受容体（ＢＣＲ）、ストレスリガンド受容体、パターン認識受容体、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項２８３に記載の方法。
【請求項２８５】
前記細胞を前記対象に投与する前に、前記対象が、免疫除去治療を受けている、請求項２８０に記載の方法。
【請求項２８６】
前記免疫細胞含有試料が、前記細胞が投与される対象から単離される、請求項２８０に記載の方法。
【請求項２８７】
前記免疫細胞含有試料が、前記細胞が投与されることになる対象とは異なる対象から単離される、請求項２８０に記載の方法。
【請求項２８８】
前記免疫細胞含有試料が、前記細胞が投与される対象由来の、または前記細胞が投与されることになる対象とは異なる対象由来の細胞から生成され、任意選択で、前記細胞が、幹細胞であり、任意選択で多能性幹細胞である、請求項２８０に記載の方法。
【請求項２８９】
前記免疫細胞を前記対象に投与する前に、前記細胞がｉｎ　ｖｉｔｒｏでＩＬ－７またはバリアントＧ－ＣＳＦのうち一方または両方と接触させられる、請求項２８０に記載の方法。
【請求項２９０】
前記免疫細胞が、請求項２２６～２４６のいずれか１項に記載のキメラ受容体からのシグナル伝達を活性化するのに十分な時間、ＩＬ－７またはバリアントＧ－ＣＳＦのうち一方または両方と接触させられる、請求項２８０に記載の方法。
【請求項２９１】
前記対象に投与される前記細胞が、天然のＴ細胞受容体、操作されたＴ細胞受容体（ＴＣＲ）、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、天然のＢ細胞受容体、操作されたＢ細胞受容体（ＢＣＲ）、ストレスリガンド受容体、パターン認識受容体、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体を更に発現する、請求項２６７～２９０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２９２】
前記対象に投与された前記細胞が、Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む受容体を更に発現する、請求項２６７～２９１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２９３】
前記Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤが、サイトＩＩ界面領域における少なくとも１つの変異、サイトＩＩＩ界面領域における少なくとも１つの変異、またはそれらの組み合わ

せを含む、請求項２９２に記載の方法。
【請求項２９４】
前記対象に投与された前記細胞が、ＩＬ－１８を更に発現する、請求項２６７～２９１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２９５】
請求項２２６～２４５のいずれか１項に記載のキメラ受容体をコードする細胞であって、任意選択で、前記細胞が免疫細胞である、前記細胞と、
使用説明書と
を含む、キットであって、
任意選択で、前記キットがＩＬ－７を含み、任意選択で、任意選択で、前記キットがバリアントＧ－ＣＳＦを含む、
前記キット。
【請求項２９６】
請求項２２６～２４５のいずれか１項に記載のキメラ受容体をコードする核酸配列を含む１つ以上の発現ベクターと、
使用説明書と
を含む、キットであって、
任意選択で、前記キットがＩＬ－７を含み、任意選択で、前記キットがバリアントＧ－ＣＳＦを含む、
前記キット。
【請求項２９７】
ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、インターフェロン－ａ、インターフェロン－ｂ、インターフェロン－ｇ、ＩＬ－１７、ＩＬ－２１、ＴＮＦ－ａ、ＣＸＣＬ１３、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１ａ）、ＣＣＬ４（ＭＩＰ－１ｂ）、ＣＣＬ１９、ＮＫＧ２Ｄ、及びこれらの組み合わせからなる群から選択されるサイトカインまたはケモカインをコードする１つ以上の発現ベクターを更に含む、請求項２９６に記載のキット。
【請求項２９８】
天然のＴ細胞受容体、操作されたＴ細胞受容体（ＴＣＲ）、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、天然のＢ細胞受容体、操作されたＢ細胞受容体（ＢＣＲ）、ストレスリガンド受容体、パターン認識受容体、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される少なくとも１つの受容体をコードする１つ以上の発現ベクターを更に含む、請求項２９６に記載のキット。
【請求項２９９】
キメラ抗原受容体をコードする発現ベクターを更に含む、請求項２９８に記載のキット。
【請求項３００】
前記細胞が、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、インターフェロン－ａ、インターフェロン－ｂ、インターフェロン－ｇ、ＩＬ－１７、ＩＬ－２１、ＴＮＦ－ａ、ＣＸＣＬ１３、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１ａ）、ＣＣＬ４（ＭＩＰ－１ｂ）、ＣＣＬ１９、ＮＫＧ２Ｄ、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される少なくとも１つのサイトカインまたはケモカインをコードする１つ以上の発現ベクターを更に含む、請求項２９５に記載のキット。
【請求項３０１】
前記細胞が、少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体をコードする１つ以上の発現ベクターを更に含む、請求項２９５に記載のキット。
【請求項３０２】
前記少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体が、天然のＴ細胞受容体、操作されたＴ細胞受容体（ＴＣＲ）、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、天然のＢ細胞受容体、操作されたＢ細胞受容体（ＢＣＲ）、ストレスリガンド受容体、パターン認識受容体、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項３０１に記載のキット。
【請求項３０３】

前記細胞が、少なくとも１つのＣＡＲをコードする１つ以上の発現ベクターを更に含む、請求項３０２に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

関連出願の相互参照

本出願は、それぞれ全体が参照によりあらゆる目的に関して本明細書に組み込まれる、２０２１年４月７日出願の米国特許仮出願番号６３／１７１，９３３号、２０２１年４月７日出願の同第６３／１７１，９５０号、２０２１年４月７日出願の同第６３／１７１，９８０号、及び２０２１年４月７日出願の同第６３／１７２，０２５号の利益を主張する。

【０００２】

配列表

該当なし

【０００３】

分野

特定の態様では、本明細書では、バリアントサイトカイン受容体及びサイトカインペアを用いた細胞の選択的活性化のための方法及び組成物であって、該サイトカイン受容体が顆粒球コロニー刺激因子受容体（Ｇ－ＣＳＦＲ）のバリアント細胞外ドメイン（ＥＣＤ）を含む、方法及び組成物が記載される。また、本明細書では、養子細胞移植によって対象を治療する方法であって、対象にバリアント受容体を発現する細胞を投与することと、バリアントサイトカインを投与して、バリアント受容体を発現する細胞にシグナルを送ることと、を含む、方法が開示される。本開示に含まれるのは、バリアントサイトカイン及び受容体を発現する細胞を産生するための核酸、発現ベクター、及びキットであり、該キットは、バリアント受容体に結合するためのサイトカインも提供する。特定の態様では、本明細書に記載されるのは、目的の細胞におけるサイトカインシグナル伝達を選択的に活性化するための、Ｇ－ＣＳＦＲ（顆粒球コロニー刺激因子受容体）の細胞外ドメイン及び様々なサイトカイン受容体の細胞内ドメインを含む、キメラサイトカイン受容体である。本開示はまた、キメラサイトカイン受容体を発現する細胞、及び／またはキメラサイトカイン受容体をコードする発現ベクター、及び／またはキメラサイトカイン受容体に結合するサイトカイン、を含む、養子細胞移植（ＡＣＴ）に用いるための方法、細胞、及びキットを含む。特定の態様では、本明細書に記載されるのは、目的の細胞におけるサイトカインシグナル伝達を選択的に活性化するための、Ｇ－ＣＳＦＲ（顆粒球コロニー刺激因子受容体）の細胞外ドメイン及び様々なサイトカイン受容体の細胞内ドメインを含む、キメラサイトカイン受容体を含む、制御されたパラクリンシグナル伝達のためのシステム及び方法である。

【０００４】

本明細書では、バリアントサイトカイン受容体及びサイトカインペアを用いた細胞の選択的活性化のための方法及び組成物であって、該サイトカイン受容体がインターロイキン－７受容体α（ＩＬ－７Ｒα）の細胞外ドメイン（ＥＣＤ）を含む、方法及び組成物も記載される。

【背景技術】

【０００５】

過去２０年間で、養子細胞移植（ＡＣＴ）によるがんの治療には大きな進歩がもたらされた。内在性腫瘍浸潤Ｔ細胞（ＴＩＬ）を用いたＡＣＴは、現在、進行性メラノーマにおいて５０％を超える客観的臨床奏効率が再現性よく得られる。Ｂ細胞系白血病を認識する（ＣＤ１９指向性キメラ抗原受容体、またはＣＤ１９　ＣＡＲを使用して）ように操作されたＴ細胞を用いたＡＣＴでは、最大９０％の完全奏効率が得られ、大半の患者は持続的な奏効を達成する。操作されたＴ細胞受容体（ＴＣＲ）を発現するＴ細胞を用いたＡＣＴは、さまざまな固形腫瘍に対して有望であることが示されている。ＡＣＴの成功は、Ｔ細

胞の代わりにナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、ナチュラルキラーＴ細胞（ＮＫＴ細胞）、及びマクロファージなどの他のエフェクター細胞型を使用しても報告されている。これらの顕著な結果に刺激され、いくつかの企業はＴＩＬ、ＣＡＲ、及び操作されたＴＣＲ　ＡＣＴアプローチを商品化している。

【０００６】

ＡＣＴのためのＴ細胞または他のエフェクター細胞の生着、増殖、及び持続性は、臨床的な安全性及び有効性の重要な決定要因である。Ｔ細胞の場合、これは、ＡＣＴ移植後のＩＬ－２の全身投与、及び移植前に体外でＴ細胞をＩＬ－２で増殖させることによって対処されることが多い。意図した免疫刺激効果に加えて、全身的なＩＬ－２治療は、血管漏出症候群などの重篤な毒性を引き起こす可能性もあり、これは、患者の安全のために厳重に制御する必要がある。これらのリスクを管理するために、患者は通常２～３週間入院し、予防措置としてＩＣＵを利用する必要がある。更に、ＩＬ－２は、エフェクターＴ細胞と制御性（抑制性）Ｔ細胞（５）の両方の増殖を誘発するため、患者にＩＬ－２を投与することは、アクセルとブレーキペダルとを同時に踏むようなものである。ＣＡＲ　Ｔ細胞は、一部の患者においてはＴ細胞の増殖及び持続性が安全なレベルを超え、他の患者においては時期尚早に弱化するという逆の問題をもたらす。更に、これらは正常なＢ細胞（ＣＤ１９も発現する）も例外なく根絶してしまうため、患者は部分的に免疫不全となる。理想的には、Ｔ細胞の増殖、持続性、及び効力を安全に強化し、かつがんを根絶した後で移入細胞を除去する能力を含む、ＡＣＴ後の腫瘍反応性Ｔ細胞の数を厳密に制御することが望ましい。幹細胞療法などの他の細胞ベース療法も、注入された細胞の増殖、分化、及び持続性に対する制御を改善することで恩恵を得ることができるだろう。

【０００７】

ヒトＧ－ＣＳＦ（Ｎｅｕｐｏｇｅｎ（登録商標）、フィルグラスチム）及びヒトＧ－ＣＳＦのＰＥＧ化バージョン（Ｎｅｕｌａｓｔａ（登録商標）、ペグフィルグラスチム）は、がん患者の好中球減少症を治療するために用いられる承認済み療法である。Ｇ－ＣＳＦは、４－ヘリックスバンドルであり（Ｈｉｌｌ，ＣＰ　ｅｔ　ａｌ．Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　Ｕ　Ｓ　Ａ．１９９３　Ｊｕｎ　１；９０（１１）：５１６７－７１（非特許文献１））、Ｇ－ＣＳＦの、その受容体Ｇ－ＣＳＦＲと複合体を形成した構造は十分に特徴付けられている（Ｔａｍａｄａ，Ｔ　ｅｔ　ａｌ．Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　Ｕ　Ｓ　Ａ．２００６　Ｆｅｂ　２８；１０３（９）：３１３５－４０（非特許文献２））。Ｇ－ＣＳＦ：Ｇ－ＣＳＦＲ複合体は、２：２ヘテロ二量体である。Ｇ－ＣＳＦは、Ｇ－ＣＳＦＲとの２つの結合界面を有する。１つはサイトＩＩと呼ばれるものであり、Ｇ－ＣＳＦとＧ－ＣＳＦＲのサイトカイン受容体相同（ＣＲＨ）ドメインの間のより大きな界面である。もう１つはサイトＩＩＩと呼ばれるものであり、これは、Ｇ－ＣＳＦとＧ－ＣＳＦＲのＮ末端Ｉｇ様ドメインとの間のより小さな界面である。

【０００８】

インターロイキン７（ＩＬ－７）は、安全で忍容性の高いサイトカインの例であるが、がん免疫療法の場面では有効性が限られている。ＩＬ－７は、Ｔ細胞及びＢ細胞の成長因子であり、胸腺の発達に重要であり、ナイーブＴ細胞及びメモリーＴ細胞の生存及び恒常性を支援する。ＩＬ－２とは異なり、ＩＬ－７は、この抑制性リンパ球集団上ではＩＬ－７Ｒαの発現レベルが低いため、最小限のＴｒｅｇ増殖を誘導する。ＩＬ－７は造血細胞によって産生されず、間質細胞によって分泌される。ＩＬ－７は、Ｔ細胞の数、持続性、及び活性を増加させることを目的としたがん免疫療法に使用されている（Ｂａｒａｔａ　ＪＴ　ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．２０１９　Ｄｅｃ；２０（１２）：１５８４－１５９３（非特許文献３））。これは、忍容性が良好であることが示されているが、単剤療法としては無視できる程度の抗癌効果を示している（Ｒｏｓｅｎｂｅｒｇ　ｅｔ　ａｌ．Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００６　Ｍａｙ－Ｊｕｎ；２９（３）：３１３－９（非特許文献４）），（Ｓｐｏｒｔｅｓ　Ｃ．ｅｔ　ａｌ．，Ｃｌｉｎ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．２０１０　Ｊａｎ　１５；１６（２）：７２７－３５（非特許文献５））、及び（Ｓｐｏｒｔｅｓ　Ｃ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ　Ｅｘｐ　Ｍｅｄ．２００８　Ｊｕｌ　７；

２０５（７）：１７０１－１４（非特許文献６））。更に、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）中で作られた組換えＩＬ－７は免疫原性が高いことが判明したが、この問題は、哺乳動物細胞においてＩＬ－７を産生することによって改善された（Ｃｏｎｌｏｎ ＫＣ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｉｎｔｅｒｆｅｒｏｎ Ｃｙｔｏｋｉｎｅ Ｒｅｓ．２０１９ Ｊａｎ；３９（１）：６－２１（非特許文献７））。これらの理由により、ＩＬ－２及びＩＬ－１５などのより治療効果の高いサイトカインと比較して、腫瘍学におけるＩＬ－７の臨床開発は限られてきた。しかし、ＩＬ－７は、天然のＩＬ－７受容体によって達成されるよりも強力な細胞内シグナルを誘導するキメラ受容体のリガンドとして使用するのに魅力的である。

【０００９】

サイトカインの全身送達に付随する毒性の問題を軽減するため、いくつかのグループは、オートクリン／パラクリン式にサイトカインを産生及び分泌するようにＴ細胞またはＮＫ細胞を操作した。目標は、操作されたＴ／ＮＫ細胞が、それ自体及び隣接する細胞の消費には十分であるが、全身毒性を引き起こすほどではないサイトカインを産生するようにすることだ。例えば、この戦略は、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１２、及びＩＬ－１８などのサイトカインを使用したキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）Ｔ細胞及びＣＡＲ ＮＫ細胞療法を改善するために適用されている。一般的なアプローチは、レトロウイルスまたはレンチウイルスを使用して、ＣＡＲ遺伝子及びサイトカイン遺伝子をＴ細胞またはＮＫ細胞集団に安定的に導入することである。これは、２つのウイルスベクターの同時形質導入、または２つの導入遺伝子を運ぶバイシストロン性ウイルスベクターの使用によるなど、さまざまなアプローチによって達成できる。ＣＡＲ及びサイトカイン導入遺伝子を共発現するＴ細胞及びＮＫ細胞は、一般に「装甲ＣＡＲ」または「ＴＲＵＣＫ」と呼ばれる。

【００１０】

装甲ＣＡＲは、マウスの腫瘍モデルで評価されており、程度は低いがヒトの臨床試験でも評価されている。いくつかの研究で、装甲ＣＡＲ Ｔ／ＮＫ細胞は、標準のＣＡＲ Ｔ／ＮＫ細胞（つまり、ＣＡＲを有するがサイトカイン導入遺伝子を有さない細胞）と比較して、安全かつ有効であることが証明されている。しかし、一部のマウス研究（Ａｔａｃａ Ａｔｉｌｌａ Ｐ．，ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ Ｃａｎｃｅｒ．２０２０ Ｓｅｐ；８（２）：ｅ００１２２９（非特許文献８））及び臨床試験（Ｚｈａｎｇ Ｌ．，ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．２０１５ Ｍａｙ １５；２１（１０）：２２７８－８８（非特許文献９））では、毒性が観察されている。更に、Ｔ／ＮＫ細胞（または任意の細胞型）にオートクリン増殖因子を産生する能力を与えるという概念には理論的な懸念が常に存在しており、これは、制御不可のＴ／ＮＫ細胞の増殖を引き起こし、二次的なリンパ増殖性疾患または悪性腫瘍をもたらす潜在的可能性を有する。一部の研究者は、毒性、制御不可の増殖、またはその他の懸念が生じた場合に、薬物に反応してＴ／ＮＫ細胞を殺すために使用できる「自殺遺伝子」を共発現させることで、このリスクを軽減しようと試みている。しかし、自殺遺伝子の導入により、定義上細胞療法が終了し、患者に残留腫瘍量を残す可能性がある。したがって、治療上関連するサイトカインシグナルを安全かつ制御された方法で免疫細胞に送達できるようにするために、装甲ＣＡＲアプローチに付随する毒性及び安全性のリスクを軽減するための新規な組成物及び方法が必要とされる。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【００１１】

【非特許文献１】Ｈｉｌｌ，ＣＰ ｅｔ ａｌ．Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ．１９９３ Ｊｕｎ １；９０（１１）：５１６７－７１
【非特許文献２】Ｔａｍａｄａ，Ｔ ｅｔ ａｌ．Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ．２００６ Ｆｅｂ ２８；１０３（９）：３１３５－４０
【非特許文献３】Ｂａｒａｔａ ＪＴ ｅｔ ａｌ．Ｎａｔ Ｉｍｍｕｎｏｌ．２０１９ Ｄｅｃ；２０（１２）：１５８４－１５９３
【非特許文献４】Ｒｏｓｅｎｂｅｒｇ ｅｔ ａｌ．Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００

６　Ｍａｙ－Ｊｕｎ；２９（３）：３１３－９
【非特許文献５】Ｓｐｏｒｔｅｓ　Ｃ．ｅｔ　ａｌ．，Ｃｌｉｎ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．２０１０　Ｊａｎ　１５；１６（２）：７２７－３５
【非特許文献６】Ｓｐｏｒｔｅｓ　Ｃ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ　Ｅｘｐ　Ｍｅｄ．２００８　Ｊｕｌ　７；２０５（７）：１７０１－１４
【非特許文献７】Ｃｏｎｌｏｎ　ＫＣ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ　Ｉｎｔｅｒｆｅｒｏｎ　Ｃｙｔｏｋｉｎｅ　Ｒｅｓ．２０１９　Ｊａｎ；３９（１）：６－２１
【非特許文献８】Ａｔａｃａ　Ａｔｉｌｌａ　Ｐ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ　Ｃａｎｃｅｒ．２０２０　Ｓｅｐ；８（２）：ｅ００１２２９
【非特許文献９】Ｚｈａｎｇ　Ｌ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｃｌｉｎ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．２０１５　Ｍａｙ　１５；２１（１０）：２２７８－８８

【発明の概要】

【００１２】

概要

バリアント顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）が本明細書に記載され、バリアントＧ－ＣＳＦは、サイトＩＩ界面領域における少なくとも１つの変異、サイトＩＩＩ界面領域における少なくとも１つの変異、またはそれらの組み合わせを含み、サイトＩＩ界面領域における少なくとも１つの変異は、Ｌ１０８Ｒ、Ｄ１１２Ｒ、Ｅ１２２Ｒ　Ｅ１２２Ｋ、Ｅ１２３Ｋ、及びＥ１２３Ｒ、ならびにこれらの組み合わせからなる変異の群から選択され、サイトＩＩ界面領域の変異は、配列番号１に示す配列の対応するアミノ酸位置に対するものであり、サイトＩＩＩ界面領域における少なくとも１つの変異は、配列番号１に示す配列の対応するアミノ酸位置に対する変異Ｅ４６Ｒを含み、バリアントＧ－ＣＳＦは、顆粒球コロニー刺激因子受容体（Ｇ－ＣＳＦＲ）のバリアント細胞外ドメイン（ＥＣＤ）を含む受容体に選択的に結合する。

【００１３】

特定の態様では、細胞表面上に発現した受容体を選択的に活性化させるためのシステムであって、（ａ）配列番号８３または８４に対応するバリアントＧ－ＣＳＦと、（ｂ）Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む受容体と、を含み、バリアントＧ－ＣＳＦは、他の点では同一の野生型Ｇ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤと比較して、Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む受容体に優先的に結合し、Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む受容体は、他の点では同一の野生型Ｇ－ＣＳＦと比較して、バリアントＧ－ＣＳＦに優先的に結合し、バリアントＧ－ＣＳＦＲは、Ｇ２Ｒ－３またはＧ１２／２Ｒ－１を含む、システム、が本明細書に記載される。

【００１４】

いくつかの実施形態では、バリアントＧ－ＣＳＦは、細胞によって発現されるＧ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む受容体に結合する。いくつかの実施形態では、Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む受容体を発現する細胞は、免疫細胞である。いくつかの実施形態では、Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む受容体を発現する免疫細胞は、Ｔ細胞、任意選択でＮＫ細胞、任意選択でＮＫＴ細胞、任意選択でＢ細胞、任意選択で形質細胞、任意選択でマクロファージ、任意選択で樹状細胞であり、任意選択で該細胞は幹細胞であり、任意選択で該細胞は初代細胞であり、任意選択で該細胞はヒト細胞である。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞、細胞傷害性ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞、ナイーブＣＤ８＋Ｔ細胞、ナイーブＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞、ヘルパーＴ細胞、制御性Ｔ細胞、メモリーＴ細胞、及びγδＴ細胞からなる群から選択される。

【００１５】

いくつかの実施形態では、Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む受容体へのバリアントＧ－ＣＳＦの選択的結合によって、受容体を発現する細胞の増殖、生存能力、持続性、細胞傷害性、サイトカイン分泌、記憶、及び活性増強のうち少なくとも１つを含む細胞応答が引き起こされる。いくつかの実施形態では、Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む受容体は、サイトＩＩ界面領域における少なくとも１つの変異、サイトＩＩＩ界面領域に

おける少なくとも１つの変異、またはそれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む受容体は、Ｒ１４１ＥまたはＲ１６７Ｄ変異のうち一方または両方を含む、Ｇ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤのサイトＩＩ界面領域における少なくとも１つの変異を含み、Ｇ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤのサイトＩＩＩ界面領域における少なくとも１つの変異はＲ４１Ｅ変異を含み、バリアントＧ－ＣＳＦＲの変異は、配列番号２に示す配列のアミノ酸位置に対応する。いくつかの実施形態では、Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む受容体はキメラ受容体である。

【００１６】

特定の態様では、本開示は、本明細書に記載されるバリアントＧ－ＣＳＦをコードする１つ以上の核酸配列（複数可）について記載する。特定の態様では、本開示は、核酸配列を含む１つ以上の発現ベクター（複数可）について記載する。特定の態様では、本開示は、本明細書に記載されるバリアントＧ－ＣＳＦを発現するように操作された細胞について記載する。いくつかの実施形態では、細胞は、免疫細胞である。いくつかの実施形態では、免疫細胞は、Ｔ細胞、任意選択でＮＫ細胞、任意選択でＮＫＴ細胞、任意選択でＢ細胞、任意選択で形質細胞、任意選択でマクロファージ、任意選択で樹状細胞であり、任意選択で該細胞は幹細胞であり、任意選択で該細胞は初代細胞であり、任意選択で該細胞はヒト細胞である。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、ＣＤ８$^+$Ｔ細胞、細胞傷害性ＣＤ８$^+$Ｔ細胞、ナイーブＣＤ８$^+$Ｔ細胞、ナイーブＣＤ４$^+$Ｔ細胞、ヘルパーＴ細胞、制御性Ｔ細胞、メモリーＴ細胞、及びγδＴ細胞からなる群から選択される。

【００１７】

特定の態様では、細胞表面上に発現した受容体を選択的に活性化させるためのシステムであって、（ａ）請求項１～［００１４］のいずれか１項に記載のバリアントＧ－ＣＳＦと、（ｂ）Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む受容体と、を含み、バリアントＧ－ＣＳＦは、他の点では同一の野生型Ｇ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤと比較して、Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む受容体に優先的に結合し、Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む受容体は、他の点では同一の野生型Ｇ－ＣＳＦと比較して、バリアントＧ－ＣＳＦに優先的に結合する、システム、が本明細書に記載される。いくつかの実施形態では、バリアントＧ－ＣＳＦは、表４ＡのＧ－ＣＳＦバリアント番号のサイトＩＩ及びサイトＩＩＩ界面の変異の組み合わせを含み、バリアントＧ－ＣＳＦの変異は、配列番号１に示す配列のアミノ酸位置に対応する。

【００１８】

いくつかの実施形態では、バリアントＧ－ＣＳＦは、配列番号１に示す配列の対応するアミノ酸位置に対する変異Ｅ４６Ｒ、Ｌ１０８Ｋ、Ｄ１１２Ｒ、Ｅ１２２Ｒ、及びＥ１２３Ｒを含み、Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む受容体は、配列番号２に示す配列の対応するアミノ酸位置に対する変異Ｒ４１Ｅ、Ｒ１４１Ｅ、及びＲ１６７Ｄを含む。いくつかの実施形態では、バリアントＧ－ＣＳＦは、配列番号１に示す配列の対応するアミノ酸位置に対する変異Ｅ４６Ｒ、Ｌ１０８Ｋ、Ｄ１１２Ｒ、及びＥ１２２Ｋを含み、Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む受容体は、配列番号２に示す配列の対応するアミノ酸位置に対する変異Ｒ４１Ｅ、Ｒ１４１Ｅ、及びＲ１６７Ｄを含む。いくつかの実施形態では、バリアントＧ－ＣＳＦは、配列番号１に示す配列の対応するアミノ酸位置に対する変異Ｅ４６Ｒ、Ｌ１０８Ｋ、Ｄ１１２Ｒ、及びＥ１２３Ｋを含み、Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む受容体は、配列番号２に示す配列の対応するアミノ酸位置に対する変異Ｒ４１Ｅ、Ｒ１４１Ｅ、及びＲ１６７Ｄを含む。いくつかの実施形態では、バリアントＧ－ＣＳＦは、配列番号１に示す配列の対応するアミノ酸位置に対する変異Ｅ４６Ｒ、Ｌ１０８Ｋ、Ｄ１１２Ｒ、及びＥ１２２Ｒを含み、Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む受容体は、配列番号２に示す配列の対応するアミノ酸位置に対する変異Ｒ４１Ｅ、Ｒ１４１Ｅ、及びＲ１６７Ｄを含む。いくつかの実施形態では、バリアントＧ－ＣＳＦは、配列番号１に示す配列の対応するアミノ酸位置に対する変異Ｅ４６Ｒ、Ｌ１０８Ｋ、Ｄ１１２Ｒ、及びＥ１２３Ｒを含み、Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む受容体は、配列番号２に示す配列の対応するアミノ酸位置に対する変異Ｒ４１Ｅ、Ｒ１４１Ｅ、及びＲ１６７Ｄを含

む。いくつかの実施形態では、バリアントＧ－ＣＳＦは、配列番号１に示す配列の対応するアミノ酸位置に対する変異Ｅ４６Ｒ、Ｌ１０８Ｋ、Ｄ１１２Ｒ、Ｅ１２２Ｋ、及びＥ１２３Ｋを含み、Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む受容体は、配列番号２に示す配列の対応するアミノ酸位置に対する変異Ｒ４１Ｅ、Ｒ１４１Ｅ、及びＲ１６７Ｄを含む。

【００１９】

いくつかの実施形態では、システムは、１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）を更に含み、任意選択で、１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）は、１つ以上のサイトカイン（複数可）、ケモカイン（複数可）、ホルモン（複数可）、抗体（複数可）、もしくはこれらの誘導体（複数可）、または他の親和性試薬を含む。いくつかの実施形態では、システムは、抗原結合性シグナル伝達受容体を更に含む。いくつかの実施形態では、抗原結合性シグナル伝達受容体は、天然のＴ細胞受容体、操作されたＴ細胞受容体（ＴＣＲ）、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、天然のＢ細胞受容体、操作されたＢ細胞受容体（ＢＣＲ）、ストレスリガンド受容体、及びパターン認識受容体からなる群から選択される少なくとも１つの受容体を含む。いくつかの実施形態では、抗原結合性シグナル伝達受容体はＣＡＲである。いくつかの実施形態では、サイトカインまたはケモカインは、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、インターフェロンα、インターフェロンβ、インターフェロンγ、ＩＬ－１７、ＩＬ－２１、ＴＮＦ－α、ＣＸＣＬ１３、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１α）、ＣＣＬ４（ＭＩＰ－１β）、ＣＤ４０リガンド、Ｂ細胞活性化因子（ＢＡＦＦ）、Ｆｌｔ３リガンド、ＣＣＬ２１、ＣＣＬ５、ＸＣＬ１、及びＣＣＬ１９、ならびに受容体ＮＫＧ２Ｄからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、サイトカインはＩＬ－１８である。いくつかの実施形態では、サイトカインはヒトのものである。

【００２０】

特定の態様では、細胞の表面上に発現した受容体を選択的に活性化させる方法であって、Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む受容体を本明細書に記載されるバリアントＧ－ＣＳＦと接触させることを含む、方法が本明細書に記載される。いくつかの実施形態では、Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む受容体が免疫細胞上で発現し、任意選択で、免疫細胞は、Ｔ細胞、任意選択でＮＫ細胞、任意選択でＮＫＴ細胞、任意選択でＢ細胞、任意選択で形質細胞、任意選択でマクロファージ、任意選択で樹状細胞であり、任意選択で該細胞は幹細胞であり、任意選択で該細胞は初代細胞であり、任意選択で該細胞はヒト細胞である。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、ＣＤ８$^+$Ｔ細胞、細胞傷害性ＣＤ８$^+$Ｔ細胞、ナイーブＣＤ８$^+$Ｔ細胞、ナイーブＣＤ４$^+$Ｔ細胞、ヘルパーＴ細胞、制御性Ｔ細胞、メモリーＴ細胞、及びγδＴ細胞からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫細胞の選択的活性化により、受容体を発現する細胞の増殖、生存能力、持続性、細胞傷害性、サイトカイン分泌、記憶、及び活性増強のうち少なくとも１つを含む細胞応答が引き起こされる。

【００２１】

特定の態様では、本開示は、その必要がある対象において免疫応答を増加させる方法であって、Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む受容体を発現する細胞（複数可）を投与することと、本明細書に記載されるバリアントＧ－ＣＳＦを投与または提供することと、を含む、方法について記載する。特定の態様では、本開示は、その必要がある対象において疾患を治療する方法であって、Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む受容体を発現する細胞（複数可）を投与することと、本明細書に記載されるバリアントＧ－ＣＳＦを対象に投与または提供することと、を含む、方法について記載する。いくつかの実施形態では、本方法は、がんを治療するために使用される。いくつかの実施形態では、本方法は、炎症状態を治療するために使用される。いくつかの実施形態では、本方法は、自己免疫疾患を治療するために使用される。いくつかの実施形態では、本方法は、変性疾患を治療するために使用される。いくつかの実施形態では、本方法は、移植のための、天然のまたは操作された細胞、組織、または器官を生成するために使用される。いくつかの実施形態では、本方法は、移植片拒絶反応を予防または治療するために使用される。いくつかの実施形

態では、本方法は、感染性疾患を治療するために使用される。いくつかの実施形態では、本方法は、１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）を投与または提供することを更に含み、任意選択で、１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）は、１つ以上のサイトカイン（複数可）、ケモカイン（複数可）、ホルモン（複数可）、抗体（複数可）、もしくはこれらの誘導体（複数可）、または他の親和性試薬を含む。

【００２２】

いくつかの実施形態では、対象は、（ｉ）Ｇ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤを含む別個のキメラ受容体及び（ｉｉ）Ｇ－ＣＳＦの少なくとも１つの別個のバリアント型のうち一方または両方をそれぞれ発現する２つ以上の細胞集団を投与され、細胞の少なくとも１つの集団（複数可）が、少なくとも１つの別個の抗原結合性シグナル伝達受容体（複数可）を更に発現し、任意選択で、少なくとも１つの別個の抗原結合性シグナル伝達受容体（複数可）が少なくとも１つのＣＡＲ（複数可）を含む。いくつかの実施形態では、免疫細胞の第１及び第２の集団（複数可）のうち一方または両方が、（ａ）少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）であって、任意選択で、少なくとも１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）は、１つ以上のサイトカイン（複数可）、ケモカイン（複数可）、ホルモン（複数可）、抗体（複数可）、もしくはこれらの誘導体（複数可）、または他の親和性試薬（複数可）を含む、少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）、及び（ｂ）少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体、のうち一方または両方を更に発現する。いくつかの実施形態では、本方法は、１つ以上の追加の免疫細胞集団を更に含み、各追加の免疫細胞集団は、（ｉ）Ｇ－ＣＳＦＲの別個のバリアントＥＣＤを含む別個の受容体、（ｉｉ）別個のバリアントＧ－ＣＳＦ、（ｉｉｉ）別個のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質、及び（ｉｖ）別個の抗原結合性シグナル伝達受容体のうち少なくとも１つを発現する。

【００２３】

本方法のいくつかの実施形態では、Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む受容体を発現する細胞は、少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体（複数可）を更に発現する。いくつかの実施形態では、抗原結合性シグナル伝達受容体（複数可）は、天然のＴ細胞受容体、操作されたＴ細胞受容体（ＴＣＲ）、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、天然のＢ細胞受容体、操作されたＢ細胞受容体（ＢＣＲ）、ストレスリガンド受容体、パターン認識受容体、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される少なくとも１つの受容体を含む。いくつかの実施形態では、抗原結合性シグナル伝達受容体（複数可）は、１つ以上のＣＡＲ（複数可）を含む。いくつかの実施形態では、サイトカインまたはケモカインは、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、インターフェロンα、インターフェロンβ、インターフェロンγ、ＩＬ－１７、ＩＬ－２１、ＴＮＦ－α、ＣＸＣＬ１３、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１α）、ＣＣＬ４（ＭＩＰ－１β）、ＣＤ４０リガンド、Ｂ細胞活性化因子（ＢＡＦＦ）、Ｆｌｔ３リガンド、ＣＣＬ２１、ＣＣＬ５、ＸＣＬ１、及びＣＣＬ１９、ならびに受容体ＮＫＧ２Ｄ、ならびにこれらの組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、サイトカインはＩＬ－１８である。いくつかの実施形態では、サイトカインはヒトのものである。

【００２４】

特定の態様では、その必要がある対象を治療する方法が本明細書で説明され、本方法は、ｉ）免疫細胞含有試料を単離することと、（ｉｉ）Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む少なくとも１つの受容体（複数可）をコードする核酸配列（複数可）で免疫細胞（複数可）を形質導入またはトランスフェクトすることと、（ｉｉｉ）（ｉｉ）の免疫細胞（複数可）を対象に投与することと、（ｉｖ）免疫細胞（複数可）を、受容体（複数可）と選択的に結合する本明細書に記載の１つ以上のバリアントＧ－ＣＳＦと接触させることと、を含む。いくつかの実施形態では、対象は、細胞を対象に投与する前に、免疫除去治療を受けたことがある。いくつかの実施形態では、免疫細胞含有試料は、細胞が投与される

ことになる対象から単離される。いくつかの実施形態では、免疫細胞含有試料は、細胞が投与される対象由来の、または細胞が投与されることになる対象とは異なる対象由来の細胞から生成され、任意選択で、細胞は、幹細胞であり、任意選択で多能性幹細胞である。いくつかの実施形態では、免疫細胞（複数可）は、細胞が対象に投与される前に、ｉｎｖｉｔｒｏで少なくとも１つのバリアントＧ－ＣＳＦと接触させられる。いくつかの実施形態では、免疫細胞（複数可）は、受容体（複数可）に結合する少なくとも１つのバリアントＧ－ＣＳＦと、受容体（複数可）からのシグナル伝達を活性化するのに十分な時間接触させられる。

【００２５】

特定の態様では、Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む少なくとも１つの受容体（複数可）をコードする細胞と、使用説明書と、を含むキットが本明細書で説明され、キットは、請求項１～［００１４］のいずれか１項に記載の少なくとも１つのバリアントＧ－ＣＳＦを含み、任意選択で、細胞が免疫細胞である。特定の態様では、（ａ）Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む１つ以上の受容体（複数可）をコードする１つ以上の核酸配列（複数可）と、（ｂ）本明細書に記載の少なくとも１つのバリアントＧ－ＣＳＦ、本明細書に記載の核酸配列（複数可）、または本明細書に記載の１つ以上の発現ベクター（複数可）と、（ｃ）使用説明書と、を含むキットが本明細書に記載される。いくつかの実施形態では、キットは、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、インターフェロンα、インターフェロンβ、インターフェロンγ、ＩＬ－１７、ＩＬ－２１、ＴＮＦ－α、ＣＸＣＬ１３、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１α）、ＣＣＬ４（ＭＩＰ－１β）、ＣＤ４０リガンド、Ｂ細胞活性化因子（ＢＡＦＦ）、Ｆｌｔ３リガンド、ＣＣＬ２１、ＣＣＬ５、ＸＣＬ１、及びＣＣＬ１９、ならびに受容体ＮＫＧ２Ｄ、ならびにこれらの組み合わせからなる群から選択される１つ以上のサイトカイン（複数可）またはケモカイン（複数可）をコードする１つ以上の発現ベクター（複数可）を更に含む。いくつかの実施形態では、キットは、少なくとも１つの抗原結合性受容体（複数可）をコードする１つ以上の発現ベクター（複数可）を更に含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの抗原結合性受容体（複数可）は、天然のＴ細胞受容体、操作されたＴ細胞受容体（ＴＣＲ）、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、天然のＢ細胞受容体、操作されたＢ細胞受容体（ＢＣＲ）、ストレスリガンド受容体、パターン認識受容体、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、キットは、キメラ抗原受容体をコードする１つ以上の発現ベクター（複数可）を更に含む。いくつかの実施形態では、細胞は、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、インターフェロンα、インターフェロンβ、インターフェロンγ、ＩＬ－１７、ＩＬ－２１、ＴＮＦ－α、ＣＸＣＬ１３、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１α）、ＣＣＬ４（ＭＩＰ－１β）、ＣＤ４０リガンド、Ｂ細胞活性化因子（ＢＡＦＦ）、Ｆｌｔ３リガンド、ＣＣＬ２１、ＣＣＬ５、ＸＣＬ１、及びＣＣＬ１９、ならびに受容体ＮＫＧ２Ｄ、ならびにこれらの組み合わせからなる群から選択される少なくとも１つのサイトカイン（複数可）またはケモカイン（複数可）をコードする１つ以上の発現ベクター（複数可）を更に含む。いくつかの実施形態では、細胞は、少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体（複数可）をコードする１つ以上の発現ベクター（複数可）を更に含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体（複数可）は、天然のＴ細胞受容体、操作されたＴ細胞受容体（ＴＣＲ）、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、天然のＢ細胞受容体、操作されたＢ細胞受容体（ＢＣＲ）、ストレスリガンド受容体、パターン認識受容体、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、細胞は、少なくとも１つのＣＡＲ（複数可）をコードする１つ以上の発現ベクター（複数可）を更に含み、任意選択で、ＣＡＲはメソテリンＣＡＲである。

【００２６】

特定の態様では、キメラ受容体が本明細書に記載され、キメラ受容体は以下を含む：（ａ）少なくとも１つの第２のドメインに作動可能に連結された細胞外ドメイン（ＥＣＤ）；ここで第２のドメインは、以下：（ｂ）サイトカイン受容体の細胞内ドメインに由来する少なくとも１つのシグナル伝達分子結合部位を含む細胞内ドメイン（ＩＣＤ）であって

、少なくとも１つのシグナル伝達分子結合部位が、インターロイキン（ＩＬ）－２Ｒβの
ＳＨＣ結合部位、ＩＬ－２Ｒβの ＳＴＡＴ５結合部位、ＩＬ－４Ｒαの ＩＲＳ－１もしく
はＩＲＳ－２結合部位、ＩＬ－４Ｒαの ＳＴＡＴ６結合部位、ｇｐ１３０の ＳＨＰ－２結
合部位、ｇｐ１３０の ＳＴＡＴ３結合部位、ＥＰＯＲの ＳＨＰ－１もしくは ＳＨＰ－２結
合部位、エリスロポイエチン受容体（ＥＰＯＲ）の ＳＴＡＴ５結合部位、インターフェロ
ンアルファ及びベータ受容体サブユニット２（ＩＦＮＡＲ２）の ＳＴＡＴ１もしくは ＳＴ
ＡＴ２結合部位、ならびにインターフェロンガンマ受容体１（ＩＦＮγＲ１）の ＳＴＡＴ
１結合部位、またはこれらの組み合わせからなる群から選択され、ＩＣＤが、Ｇ－ＣＳＦ
Ｒ、ｇｐ１３０、ＥＰＯＲ、及びインターフェロンガンマ受容体２（ＩＦＮγＲ２）、ま
たはこれらの組み合わせからなる群から選択される少なくとも１つのタンパク質の少なく
とも１つのＢｏｘ１領域及び少なくとも１つのＢｏｘ２領域を更に含む、ＩＣＤを含み；
ならびに（ｃ）膜貫通ドメイン（ＴＭＤ）を含む少なくとも１つの第３のドメインであっ
て、ＥＣＤはＴＭＤのＮ末端側であり、ＴＭＤはＩＣＤのＮ末端側である、第３のドメイ
ン。

【００２７】

特定の態様では、キメラ受容体であって、第２のドメインに作動可能に連結したＥＣＤ
を含み、第２のドメインがＩＣＤを含み、ＩＣＤが、

（ｉ）

（ａ）Ｇ－ＣＳＦＲのＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、

（ｂ）ＩＬ－４Ｒαの少なくとも１つのシグナル伝達分子結合部位、または

（ｉｉ）

（ａ）ｇｐ１３０のＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、

（ｂ）ｇｐ１３０の少なくとも１つのシグナル伝達分子結合部位、または

（ｉｉｉ）

（ａ）エリスロポイエチン受容体（ＥＰＯＲ）のＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、

（ｂ）ＥＰＯＲの少なくとも１つのシグナル伝達分子結合部位、または

（ｉｖ）

（ａ）Ｇ－ＣＳＦＲのＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、

（ｂ）インターフェロンアルファ及びベータ受容体サブユニット２（ＩＦＮＡＲ２）
の少なくとも１つのシグナル伝達分子結合部位、または

（ｖ）

（ａ）インターフェロンガンマ受容体２（ＩＦＮγＲ２）のＢｏｘ１及びＢｏｘ２領
域、

（ｂ）インターフェロンガンマ受容体１（ＩＦＮγＲ１）の少なくとも１つのシグナ
ル伝達分子結合部位

を含み、ＥＣＤはＴＭＤのＮ末端側であり、ＴＭＤはＩＣＤのＮ末端側である、キメラ受
容体が本明細書に記載される。

【００２８】

特定の実施形態では、キメラ受容体のＥＣＤはＧ－ＣＳＦＲ（顆粒球コロニー刺激因子
受容体）のＥＣＤである。特定の実施形態では、キメラ受容体のＴＭＤはＧ－ＣＳＦＲの
ＴＭＤであり、任意選択で、ＴＭＤは野生型ＴＭＤである。特定の実施形態では、キメラ
受容体の活性型がホモ二量体を形成し、任意選択で、キメラ受容体の活性化により、受容
体を発現する細胞の増殖、生存能力、持続性、細胞傷害性、サイトカイン分泌、記憶、及
び活性増強のうち少なくとも１つを含む細胞応答が引き起こされ、任意選択で、キメラ受
容体はＧ－ＣＳＦに接触すると活性化され、任意選択で、Ｇ－ＣＳＦは野生型Ｇ－ＣＳＦ
であり、任意選択で、Ｇ－ＣＳＦＲの細胞外ドメインは野生型細胞外ドメインである。

【００２９】

特定の実施形態では、キメラ受容体は細胞、任意選択で免疫細胞において発現し、任意
選択で、免疫細胞は、Ｔ細胞、任意選択でＮＫ細胞、任意選択でＮＫＴ細胞、任意選択で
Ｂ細胞、任意選択で形質細胞、任意選択でマクロファージ、任意選択で樹状細胞であり、

任意選択で該細胞は幹細胞であり、任意選択で該細胞は初代細胞であり、任意選択で該細胞はヒト細胞である。特定の実施形態では、Ｔ細胞は、ＣＤ８＋Ｔ細胞、細胞傷害性ＣＤ８＋Ｔ細胞、ナイーブＣＤ４＋Ｔ細胞、ナイーブＣＤ８＋Ｔ細胞、ヘルパーＴ細胞、制御性Ｔ細胞、メモリーＴ細胞、及びγδＴ細胞からなる群から選択される。

【００３０】

特定の実施形態では、ＩＣＤは、

（ａ）配列番号９０もしくは９１のうち一方もしくは両方のアミノ酸配列、または

（ｂ）配列番号９０もしくは９２のうち一方もしくは両方のアミノ酸配列、または

（ｃ）配列番号９３のアミノ酸配列、または

（ｄ）配列番号９４のアミノ酸配列、または

（ｅ）配列番号９５もしくは９６のうち一方もしくは両方のアミノ酸配列、または

（ｆ）配列番号９７もしくは９８のアミノ酸配列、または

（ｇ）配列番号９９もしくは１００のアミノ酸配列

を含む。

【００３１】

特定の実施形態では、膜貫通ドメインは、配列番号８８に記載される配列を含む。

【００３２】

特定の態様では、本開示は、本明細書で説明されるキメラ受容体をコードする１つ以上の核酸配列（複数可）について記載する。特定の実施形態では、Ｇ－ＣＳＦＲのＥＣＤの核酸配列（複数可）は、配列番号８５、８６、または８７のいずれか１つに記載される核酸配列（複数可）によってコードされる。特定の実施形態では、本開示は、核酸配列（複数可）を含む１つ以上の発現ベクター（複数可）について記載する。特定の実施形態では、発現ベクター（複数可）は、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、及びプラスミドからなる群から選択される。

【００３３】

特定の態様では、本開示は、キメラ受容体をコードする１つ以上の核酸配列（複数可）を説明し、キメラ受容体は、第２のドメインに作動可能に連結されたＥＣＤを含み；第２のドメインは、

（ｉ）

（ａ）Ｇ－ＣＳＦＲのＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、

（ｂ）ＩＬ－４Ｒαの少なくとも１つのシグナル伝達分子結合部位、または

（ｉｉ）

（ａ）ｇｐ１３０のＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、

（ｂ）ｇｐ１３０の少なくとも１つのシグナル伝達分子結合部位、または

（ｉｉｉ）

（ａ）エリスロポイエチン受容体（ＥＰＯＲ）のＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、

（ｂ）ＥＰＯＲの少なくとも１つのシグナル伝達分子結合部位、または

（ｉｖ）

（ａ）Ｇ－ＣＳＦＲのＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、

（ｂ）インターフェロンアルファ及びベータ受容体サブユニット２（ＩＦＮＡＲ２）の少なくとも１つのシグナル伝達分子結合部位、または

（ｖ）

（ａ）インターフェロンガンマ受容体２（ＩＦＮγＲ２）のＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、

（ｂ）インターフェロンガンマ受容体１（ＩＦＮγＲ１）の少なくとも１つのシグナル伝達分子結合部位

を含む。

【００３４】

本明細書で説明される核酸（複数可）の特定の実施形態では、ＥＣＤは、Ｇ－ＣＳＦＲ（顆粒球コロニー刺激因子受容体）のＥＣＤである。本明細書で説明される核酸（複数可

）の特定の実施形態では、ＴＭＤはＧ－ＣＳＦＲのＴＭＤであり、任意選択で、ＴＭＤは野生型ＴＭＤである。本明細書で説明される核酸（複数可）の特定の実施形態では、Ｇ－ＣＳＦＲのＥＣＤは、配列番号８５、８６、または８７のいずれか１つに記載される核酸配列によってコードされる。特定の実施形態では、核酸配列（複数可）は、（ａ）配列番号９０もしくは９１のうち一方もしくは両方のアミノ酸配列を含むＩＣＤをコードする配列、または（ｂ）配列番号９０もしくは９２のうち一方もしくは両方のアミノ酸配列を含むＩＣＤをコードする配列、または（ｃ）配列番号９３のアミノ酸配列を含むＩＣＤをコードする配列、または（ｄ）配列番号９４のアミノ酸配列を含むＩＣＤをコードする配列、または（ｅ）配列番号９５もしくは９６のうち一方もしくは両方のアミノ酸配列を含むＩＣＤをコードする配列、または（ｆ）配列番号９７または９８のアミノ酸配列を含むＩＣＤをコードする配列、または（ｇ）配列番号９９または１００のアミノ酸配列を含むＩＣＤをコードする配列を含む。

【００３５】

特定の実施形態では、１つ以上の発現ベクター（複数可）は、本明細書で説明される核酸配列（複数可）を含む。特定の実施形態では、発現ベクター（複数可）は、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、及びプラスミドからなる群から選択される。

【００３６】

特定の態様では、本明細書で説明されるキメラ受容体をコードする核酸配列（複数可）を含む細胞が本明細書に記載される。特定の実施形態では、細胞は免疫細胞であり、任意選択で、免疫細胞は、Ｔ細胞、任意選択でＮＫ細胞、任意選択でＮＫＴ細胞、任意選択でＢ細胞、任意選択で形質細胞、任意選択でマクロファージ、任意選択で樹状細胞であり、任意選択で該細胞は幹細胞であり、任意選択で該細胞は初代細胞であり、任意選択で該細胞はヒト細胞である。特定の実施形態では、Ｔ細胞は、ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞、細胞傷害性ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞、ナイーブＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞、ナイーブＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞、ヘルパーＴ細胞、制御性Ｔ細胞、メモリーＴ細胞、及びγδＴ細胞からなる群から選択される。特定の実施形態では、細胞は、本明細書で説明される核酸配列（複数可）を含む。特定の実施形態では、細胞は、本明細書で説明される発現ベクター（複数可）を含む。

【００３７】

特定の態様では、細胞の表面上に発現したキメラ受容体を選択的に活性化させる方法であって、キメラ受容体を、キメラ受容体と選択的に結合するサイトカインと接触させることを含む、方法が本明細書に記載される。特定の実施形態では、キメラ受容体の活性型がホモ二量体を形成し、任意選択で、キメラ受容体の活性化により、受容体を発現する細胞の増殖、生存能力、持続性、細胞傷害性、サイトカイン分泌、記憶、及び活性増強のうち少なくとも１つを含む細胞応答が引き起こされ、任意選択で、キメラ受容体はサイトカインに接触すると活性化される。

【００３８】

特定の実施形態では、キメラ受容体に選択的に結合するサイトカインはＧ－ＣＳＦであり、任意選択で、キメラ受容体はＧ－ＣＳＦに接触すると活性化され、任意選択で、Ｇ－ＣＳＦは野生型Ｇ－ＣＳＦであり、任意選択で、Ｇ－ＣＳＦＲの細胞外ドメインは野生型細胞外ドメインである。特定の実施形態では、キメラ受容体は細胞、任意選択で免疫細胞において発現し、任意選択で、免疫細胞は、Ｔ細胞、任意選択でＮＫ細胞、任意選択でＮＫＴ細胞、任意選択でＢ細胞、任意選択で形質細胞、任意選択でマクロファージ、任意選択で樹状細胞であり、任意選択で該細胞は幹細胞であり、任意選択で該細胞は初代細胞であり、任意選択で該細胞はヒト細胞である。

【００３９】

いくつかの実施形態では、免疫細胞の第１の集団がキメラ受容体を発現し、免疫細胞の第２の集団が、キメラ受容体に結合するサイトカインを発現し、任意選択で、免疫細胞の第１及び第２の集団（複数可）のうち一方または両方が、少なくとも１つの別個の抗原結合性シグナル伝達受容体（複数可）を更に発現し、任意選択で、少なくとも１つの別個の

抗原結合性シグナル伝達受容体（複数可）が少なくとも１つのＣＡＲを含む。いくつかの実施形態では、免疫細胞の第１及び第２の集団（複数可）のうち一方または両方が、（ａ）少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）であって、任意選択で、少なくとも１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）は、１つ以上のサイトカイン（複数可）、ケモカイン（複数可）、ホルモン（複数可）、抗体（複数可）、もしくはこれらの誘導体（複数可）、または他の親和性試薬（複数可）を含む、少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）、及び（ｂ）少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体、のうち一方または両方を更に発現する。いくつかの実施形態では、免疫細胞の第１及び第２の集団のそれぞれが、Ｇ－ＣＳＦＲの別個のバリアントＥＣＤを含む別個のキメラ受容体と、別個のバリアントＧ－ＣＳＦとを発現する。いくつかの実施形態では、本方法は、１つ以上の追加の免疫細胞集団を更に含み、各追加の免疫細胞集団は、（ｉ）Ｇ－ＣＳＦＲの別個のバリアントＥＣＤを含む別個の受容体、（ｉｉ）別個のバリアントＧ－ＣＳＦ、（ｉｉｉ）別個のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質、及び（ｉｖ）別個の抗原結合性シグナル伝達受容体のうち少なくとも１つを発現する。

【００４０】

特定の態様では、細胞においてキメラ受容体を産生する方法が本明細書で説明され、該方法は、細胞中に、本明細書に記載の１つ以上の核酸配列（複数可）、または本明細書に記載の１つ以上の発現ベクター（複数可）を導入することを含み、任意選択で、該方法は遺伝子編集を含み、任意選択で、該細胞は免疫細胞であり、任意選択で、該免疫細胞は、Ｔ細胞、任意選択でＮＫ細胞、任意選択でＮＫＴ細胞、任意選択でＢ細胞、任意選択で形質細胞、任意選択でマクロファージ、任意選択で樹状細胞であり、任意選択で該細胞は幹細胞であり、任意選択で該細胞は初代細胞であり、任意選択で該細胞はヒト細胞である。

【００４１】

特定の態様では、その必要がある対象を治療する方法が本明細書で説明され、該方法は、本明細書に記載のキメラ受容体を発現する細胞を対象に投与することと、キメラ受容体に特異的に結合するサイトカインを対象に提供することと、を含む。特定の実施形態では、キメラ受容体の活性型がホモ二量体を形成し、任意選択で、キメラ受容体の活性化により、受容体を発現する細胞の増殖、生存能力、持続性、細胞傷害性、サイトカイン分泌、記憶、及び活性増強のうち少なくとも１つを含む細胞応答が引き起こされ、任意選択で、キメラ受容体はサイトカインに接触すると活性化される。特定の実施形態では、サイトカインはＧ－ＣＳＦであり、任意選択で、Ｇ－ＣＳＦは野生型Ｇ－ＣＳＦであり、任意選択で、Ｇ－ＣＳＦＲの細胞外ドメインは野生型細胞外ドメインである。

【００４２】

本明細書で説明される方法の特定の実施形態では、キメラ受容体は細胞、任意選択で免疫細胞において発現し、任意選択で、免疫細胞は、Ｔ細胞、任意選択でＮＫ細胞、任意選択でＮＫＴ細胞、任意選択でＢ細胞、任意選択で形質細胞、任意選択でマクロファージ、任意選択で樹状細胞であり、任意選択で該細胞は幹細胞であり、任意選択で該細胞は初代細胞であり、任意選択で該細胞はヒト細胞である。

【００４３】

特定の実施形態では、本方法は、少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）を投与または提供することを更に含み、任意選択で、１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）は、１つ以上のサイトカイン（複数可）、ケモカイン（複数可）、ホルモン（複数可）、抗体（複数可）、もしくはこれらの誘導体（複数可）、または他の親和性試薬（複数可）を含む。特定の実施形態では、対象は、Ｇ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤを含む別個のキメラ受容体をそれぞれ発現し、且つＧ－ＣＳＦの別個のバリアント型をそれぞれ発現する、２つ以上の細胞集団を投与される。特定の実施形態では、キメラ受容体を発現する細胞は、少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体を更に発現する。特定の実施形態では、抗原

結合性シグナル伝達受容体は、天然のＴ細胞受容体、操作されたＴ細胞受容体（ＴＣＲ）、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、天然のＢ細胞受容体、操作されたＢ細胞受容体（ＢＣＲ）、ストレスリガンド受容体、パターン認識受容体、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される少なくとも１つの受容体（複数可）を含む。特定の実施形態では、抗原結合性シグナル伝達受容体はＣＡＲである。特定の実施形態では、少なくとも１つのサイトカイン（複数可）またはケモカイン（複数可）は、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、インターフェロンα、インターフェロンβ、インターフェロンγ、ＩＬ－１７、ＩＬ－２１、ＴＮＦ－α、ＣＸＣＬ１３、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１α）、ＣＣＬ４（ＭＩＰ－１β）、ＣＤ４０リガンド、Ｂ細胞活性化因子（ＢＡＦＦ）、Ｆｌｔ３リガンド、ＣＣＬ２１、ＣＣＬ５、ＸＣＬ１、もしくはＣＣＬ１９、または受容体ＮＫＧ２Ｄ、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される。特定の実施形態では、サイトカインはＩＬ－１８である。特定の実施形態では、サイトカインはヒトのものである。

【００４４】

特定の実施形態では、本方法は、胆管癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、卵巣癌、結腸癌、子宮内膜癌、血液悪性腫瘍、腎臓癌（腎細胞）、白血病、リンパ腫、肺癌、黒色腫、非ホジキンリンパ腫、膵臓癌、前立腺癌、肉腫、及び甲状腺癌などであるがこれらに限定されない癌を治療するために使用される。特定の実施形態では、方法は、自己免疫疾患を治療するために使用される。特定の実施形態では、本方法は、炎症状態を治療するために使用される。特定の実施形態では、本方法は、変性疾患を治療するために使用される。特定の実施形態では、本方法は、移植のための、天然のまたは操作された細胞、組織、または器官を生成するために使用される。特定の実施形態では、本方法は、同種移植片拒絶反応を治療または予防するために使用される。

【００４５】

特定の実施形態では、本方法は、少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）を投与または提供することを更に含み、任意選択で、１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）は、１つ以上のサイトカイン（複数可）、ケモカイン（複数可）、ホルモン（複数可）、抗体（複数可）、もしくはこれらの誘導体（複数可）、または他の親和性試薬（複数可）を含む。いくつかの実施形態では、対象は、別個のキメラ受容体をそれぞれ発現し、且つサイトカインの別個のバリアント型をそれぞれ発現する、２つ以上の細胞集団を投与される。

【００４６】

特定の実施形態では、本方法は、ｉ）免疫細胞含有試料を単離することと、（ｉｉ）キメラサイトカイン受容体をコードする核酸配列を免疫細胞に導入することと、（ｉｉｉ）（ｉｉ）の免疫細胞を対象に投与することと、（ｉｖ）免疫細胞を、キメラ受容体に結合するサイトカインと接触させることと、を含む。特定の実施形態では、対象は、細胞を対象に投与または注入する前に、免疫除去治療を受けている。特定の実施形態では、免疫細胞含有試料は、細胞が投与されることになる対象から単離される。特定の実施形態では、免疫細胞含有試料は、細胞が投与されることになる対象とは異なる対象から単離される。いくつかの実施形態では、免疫細胞含有試料は、細胞が投与されることになる対象、または細胞が投与されることになる対象とは異なる対象由来の細胞から生成され、任意選択で、細胞は幹細胞であり、任意選択で多能性幹細胞である。特定の実施形態では、免疫細胞は、該細胞が対象に投与または注入される前に、ｉｎ　ｖｉｔｒｏでサイトカインと接触させられる。特定の実施形態では、免疫細胞は、キメラ受容体からのシグナル伝達を活性化するのに十分な時間、サイトカインと接触させられる。特定の実施形態では、サイトカインはＧ－ＣＳＦであり、任意選択で、Ｇ－ＣＳＦは野生型Ｇ－ＣＳＦであり、任意選択で、Ｇ－ＣＳＦＲの細胞外ドメインは野生型細胞外ドメインである。

【００４７】

特定の態様では、本明細書に記載の１つ以上のキメラ受容体（複数可）をコードする少なくとも１つの発現ベクター（複数可）と、使用説明書とを含むキットが本明細書で説明

され、任意選択で、キットは、キメラ受容体（複数可）に結合する少なくとも１つのサイトカイン（複数可）を含む。いくつかの実施形態では、キットは、少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）をコードする１つ以上の発現ベクター（複数可）を更に含み、任意選択で、１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）は、１つ以上のサイトカイン（複数可）、ケモカイン（複数可）、ホルモン（複数可）、抗体（複数可）、もしくはこれらの誘導体（複数可）、または他の親和性試薬（複数可）を含む。いくつかの実施形態では、キットは、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、インターフェロンα、インターフェロンβ、インターフェロンγ、ＩＬ－１７、ＩＬ－２１、ＴＮＦ－α、ＣＸＣＬ１３、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１α）、ＣＣＬ４（ＭＩＰ－１β）、ＣＤ４０リガンド、Ｂ細胞活性化因子（ＢＡＦＦ）、Ｆｌｔ３リガンド、ＣＣＬ２１、ＣＣＬ５、ＸＣＬ１、もしくはＣＣＬ１９、または受容体ＮＫＧ２Ｄ、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される１つ以上のサイトカイン（複数可）またはケモカイン（複数可）をコードする１つ以上の発現ベクター（複数可）を更に含む。いくつかの実施形態では、キットは、少なくとも１つの抗原結合性受容体（複数可）をコードする１つ以上の発現ベクター（複数可）を更に含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの抗原結合性受容体（複数可）は、天然のＴ細胞受容体、操作されたＴ細胞受容体（ＴＣＲ）、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、天然のＢ細胞受容体、操作されたＢ細胞受容体（ＢＣＲ）、ストレスリガンド受容体、パターン認識受容体、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、キットは、１つ以上のＣＡＲ（複数可）をコードする１つ以上の発現ベクター（複数可）を更に含み、任意選択で、ＣＡＲ（複数可）はメソテリンＣＡＲである。いくつかの実施形態では、キットは、本明細書に記載の１つ以上の別個のキメラ受容体（複数可）をコードする１つ以上の発現ベクター（複数可）を更に含む。

【００４８】

特定の態様では、本明細書に記載の１つ以上のキメラ受容体（複数可）をコードする細胞であって、任意選択で、該細胞が免疫細胞である、細胞と、使用説明書と、を含むキットが本明細書で説明され、任意選択で、キットは、キメラ受容体（複数可）に結合する少なくとも１つのサイトカイン（複数可）を含む。いくつかの実施形態では、細胞は、少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）をコードする１つ以上の発現ベクター（複数可）を更に含み、任意選択で、１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）は、１つ以上のサイトカイン（複数可）、ケモカイン（複数可）、ホルモン（複数可）、抗体（複数可）、もしくはこれらの誘導体（複数可）、または他の親和性試薬（複数可）を含む。いくつかの実施形態では、細胞は、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、インターフェロンα、インターフェロンβ、インターフェロンγ、ＩＬ－１７、ＩＬ－２１、ＴＮＦ－α、ＣＸＣＬ１３、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１α）、ＣＣＬ４（ＭＩＰ－１β）、ＣＤ４０リガンド、Ｂ細胞活性化因子（ＢＡＦＦ）、Ｆｌｔ３リガンド、ＣＣＬ２１、ＣＣＬ５、ＸＣＬ１、もしくはＣＣＬ１９、または受容体ＮＫＧ２Ｄ、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される少なくとも１つのサイトカイン（複数可）またはケモカイン（複数可）をコードする１つ以上の発現ベクター（複数可）を更に含む。いくつかの実施形態では、細胞は、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、インターフェロンα、インターフェロンβ、インターフェロンγ、ＩＬ－１７、ＩＬ－２１、ＴＮＦ－α、ＣＸＣＬ１３、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１α）、ＣＣＬ４（ＭＩＰ－１β）、ＣＤ４０リガンド、Ｂ細胞活性化因子（ＢＡＦＦ）、Ｆｌｔ３リガンド、ＣＣＬ２１、ＣＣＬ５、ＸＣＬ１、もしくはＣＣＬ１９、または受容体ＮＫＧ２Ｄ、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される少なくとも１つのサイトカイン（複数可）またはケモカイン（複数可）をコードする１つ以上の発現ベクター（複数可）を更に含む。いくつかの実施形態では、細胞は、少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体（複数可）をコードする１つ以上の発現ベクター（複数可）を更に含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体（複数可）は、天然のＴ細胞受容体、操作されたＴ細胞受容体（ＴＣＲ）、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、天然のＢ

細胞受容体、操作されたＢ細胞受容体（ＢＣＲ）、ストレスリガンド受容体、パターン認識受容体、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、細胞は、少なくとも１つのＣＡＲ（複数可）をコードする１つ以上の発現ベクター（複数可）を更に含み、任意選択で、ＣＡＲ（複数可）はメソテリンＣＡＲである。いくつかの実施形態では、細胞は、本明細書に記載の少なくとも１つの別個のキメラ受容体をコードする１つ以上の発現ベクター（複数可）を更に含む。

【００４９】

特定の態様では、細胞を選択的に活性化させるためのシステムであって、（ｉ）顆粒球コロニー刺激因子受容体（Ｇ－ＣＳＦＲ）のバリアント細胞外ドメイン（ＥＣＤ）を含む受容体と、（ｉｉ）（ｉ）の受容体に選択的に結合するバリアントＧ－ＣＳＦと、（ａ）少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）であって、任意選択で、１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）は、１つ以上のサイトカイン（複数可）、ケモカイン（複数可）、ホルモン（複数可）、抗体（複数可）、もしくはこれらの誘導体（複数可）、または他の親和性試薬（複数可）を含む、少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）、及び（ｂ）少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体（複数可）、のうちの一方または両方と、を含む、システムが本明細書に記載される。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの追加のサイトカイン（複数可）またはケモカイン（複数可）は、インターロイキン（ＩＬ）－１８、ＩＬ－２１、インターフェロンα、インターフェロンβ、インターフェロンγ、ＩＬ－１７、ＩＬ－２１、ＴＮＦ－α、ＣＸＣＬ１３、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１α）、ＣＣＬ４（ＭＩＰ－１β）、ＣＤ４０リガンド、Ｂ細胞活性化因子（ＢＡＦＦ）、Ｆｌｔ３リガンド、ＣＣＬ２１、ＣＣＬ５、ＸＣＬ１、ＣＣＬ１９、受容体ＮＫＧ２Ｄ、及びこれらの組み合わせのうち少なくとも１つを含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの追加のサイトカイン（複数可）は、ＩＬ－１８を含む。いくつかの実施形態では、抗原結合性シグナル伝達受容体（複数可）は、天然のＴ細胞受容体、操作されたＴ細胞受容体（ＴＣＲ）、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、天然のＢ細胞受容体、操作されたＢ細胞受容体（ＢＣＲ）、ストレスリガンド受容体、パターン認識受容体、及びこれらの組み合わせのうち少なくとも１つを含む。いくつかの実施形態では、抗原結合性シグナル伝達受容体はＣＡＲを含み、任意選択で、ＣＡＲはメソテリンＣＡＲである。いくつかの実施形態では、Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤは、サイトＩＩ界面領域における少なくとも１つの変異、サイトＩＩＩ界面領域における少なくとも１つの変異、またはそれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、サイトＩＩ界面領域の少なくとも１つの変異は、配列番号２に示す配列のアミノ酸位置１４１、１６７、１６８、１７１、１７２、１７３、１７４、１９７、１９９、２００、２０２、及び２８８からなる群から選択されるＧ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤのアミノ酸位置に位置する。いくつかの実施形態では、Ｇ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤのサイトＩＩ界面領域における少なくとも１つの変異は、配列番号２に示す配列のＲ１４１Ｅ、Ｒ１６７Ｄ、Ｋ１６８Ｄ、Ｋ１６８Ｅ、Ｌ１７１Ｅ、Ｌ１７２Ｅ、Ｙ１７３Ｋ、Ｑ１７４Ｅ、Ｄ１９７Ｋ、Ｄ１９７Ｒ、Ｍ１９９Ｄ、Ｄ２００Ｋ、Ｄ２００Ｒ、Ｖ２０２Ｄ、Ｒ２８８Ｄ、及びＲ２８８Ｅからなる群から選択される。

【００５０】

いくつかの実施形態では、Ｇ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤのサイトＩＩＩ界面領域における少なくとも１つの変異は、配列番号２に示す配列のアミノ酸２～３０８のアミノ酸位置３０、４１、７３、７５、７９、８６、８７、８８、８９、９１、及び９３からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、Ｇ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤのサイトＩＩＩ界面領域における少なくとも１つの変異は、配列番号２に示す配列のＳ３０Ｄ、Ｒ４１Ｅ、Ｑ７３Ｗ、Ｆ７５ＫＦ、Ｓ７９Ｄ、Ｌ８６Ｄ、Ｑ８７Ｄ、Ｉ８８Ｅ、Ｌ８９Ａ、Ｑ９１Ｄ、Ｑ９１Ｋ、及びＥ９３Ｋからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、Ｇ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤは、表４、２２、及び２３に示すデザイン番号の複数の変異の組み合わせを含み、該変異は、配列番号２に示す配列のアミノ酸位置に対応する。

【００５１】
いくつかの実施形態では、Ｇ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤは、配列番号２に示す配列の変異：Ｒ４１Ｅ、Ｒ１４１Ｅ、及びＲ１６７Ｄを含む。いくつかの実施形態では、Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む受容体はキメラ受容体である。
【００５２】
いくつかの実施形態では、キメラ受容体は少なくとも１つの第２のドメインと作動可能に連結し、第２のドメインは、１つ以上のサイトカイン受容体（複数可）の細胞内ドメイン（ＩＣＤ）由来の少なくとも１つのシグナル伝達分子結合部位を含み、少なくとも１つのシグナル伝達分子結合部位は、Ｇ－ＣＳＦＲのＳＴＡＴ３結合部位、糖タンパク質１３０（ｇｐ１３０）のＳＴＡＴ３結合部位、ｇｐ１３０のＳＨＰ－２結合部位、ＩＬ－２Ｒβ のＳＨＣ結合部位、ＩＬ－２ＲβのＳＴＡＴ５結合部位、ＩＬ－２ＲβのＳＴＡＴ３結合部位、ＩＬ－２ＲβのＳＴＡＴ１結合部位、ＩＬ－７ＲαのＳＴＡＴ５結合部位、ＩＬ－７Ｒαのホスファチジルイノシトール３－キナーゼ（ＰＩ３Ｋ）結合部位、ＩＬ－１２Ｒβ $_2$ のＳＴＡＴ４結合部位、ＩＬ－１２Ｒβ $_2$ のＳＴＡＴ５結合部位、ＩＬ－１２Ｒβ $_2$ のＳＴＡＴ３結合部位、ＩＬ－２１ＲのＳＴＡＴ５結合部位、ＩＬ－２１ＲのＳＴＡＴ３結合部位ＩＬ－２１ＲのＳＴＡＴ１結合部位、ＩＬ－４ＲαのＩＲＳ－１またはＩＲＳ－２結合部位、ＩＬ－４ＲαのＳＴＡＴ６結合部位、エリスロポイエチン受容体（ＥＰＯＲ）のＳＨＰ－１またはＳＨＰ－２結合部位、ＥＰＯＲのＳＴＡＴ５結合部位、インターフェロンアルファ及びベータ受容体サブユニット２（ＩＦＮＡＲ２）のＳＴＡＴ１またはＳＴＡＴ２結合部位、ならびにインターフェロンガンマ受容体１（ＩＦＮγＲ１）のＳＴＡＴ１結合部位、またはこれらの組み合わせからなる群から選択され、任意選択で、ＩＣＤが、Ｇ－ＣＳＦＲ、ｇｐ１３０ＥＰＯＲ、及びインターフェロンガンマ受容体２（ＩＦＮγＲ２）、またはこれらの組み合わせからなる群から選択されるタンパク質のＢｏｘ１領域及びＢｏｘ２領域を含み、任意選択で、キメラ受容体が、Ｇ－ＣＳＦＲ、ｇｐ１３０（糖タンパク質１３０）、及びＩＬ－２Ｒβからなる群から選択されるタンパク質の膜貫通ドメイン（ＴＭＤ）を含む第３のドメインを含み、任意選択で、ＴＭＤは野生型ＴＭＤである。
【００５３】
いくつかの実施形態では、キメラ受容体は少なくとも１つの第２のドメインと作動可能に連結し、第２のドメインは、
（ｉ）
（ａ）ｇｐ１３０のＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、及び
（ｂ）ＩＬ－２ＲβのＣ末端領域、または
（ｉｉ）
（ａ）Ｇ－ＣＳＦＲのＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、及び
（ｂ）ＩＬ－２ＲβのＣ末端領域、または
（ｉｉｉ）
（ａ）Ｇ－ＣＳＦＲのＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、及び
（ｂ）ＩＬ－１２Ｒβ $_2$ のＣ末端領域、または
（ｉｖ）
（ａ）Ｇ－ＣＳＦＲのＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、及び
（ｂ）ＩＬ－２１ＲのＣ末端領域、または
（ｖ）
（ａ）ＩＬ－２ＲβのＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、及び
（ｂ）ＩＬ－２ＲβのＣ末端領域、または
（ｖｉ）
（ａ）Ｇ－ＣＳＦＲのＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、及び
（ｂ）ＩＬ－７ＲαのＣ末端領域、または
（ｖｉｉ）
（ａ）Ｇ－ＣＳＦＲのＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、

（ｂ）ＩＬ－４ＲαのＣ末端領域、または
（ｖｉｉｉ）
（ａ）ｇｐ１３０のＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）ｇｐ１３０のＣ末端領域、または
（ｉｘ）
（ａ）エリスロポイエチン受容体（ＥＰＯＲ）のＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）ＥＰＯＲのＣ末端領域、または
（ｘ）
（ａ）Ｇ－ＣＳＦＲのＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）インターフェロンアルファ及びベータ受容体サブユニット２（ＩＦＮＡＲ２）のＣ末端領域、または
（ｘｉ）
（ａ）インターフェロンガンマ受容体２（ＩＦＮγＲ２）のＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）インターフェロンガンマ受容体１（ＩＦＮγＲ１）のＣ末端領域
を含む。

【００５４】

いくつかの実施形態では、ＥＣＤはＴＭＤのＮ末端側であり、ＴＭＤはＩＣＤのＮ末端側である。いくつかの実施形態では、Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む受容体が、細胞上で発現する。いくつかの実施形態では、細胞は免疫細胞であり、任意選択で、免疫細胞は、Ｔ細胞、任意選択でＮＫ細胞、任意選択でＮＫＴ細胞、任意選択でＢ細胞、任意選択で形質細胞、任意選択でマクロファージ、任意選択で樹状細胞であり、任意選択で該細胞は幹細胞であり、任意選択で該細胞は初代細胞であり、任意選択で該細胞はヒト細胞である。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞、細胞傷害性ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞、ナイーブＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞、ナイーブＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞、ヘルパーＴ細胞、制御性Ｔ細胞、メモリーＴ細胞、及びγδＴ細胞からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、バリアントＧ－ＣＳＦによる、Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む受容体の活性化により、受容体を発現する細胞の増殖、生存能力、持続性、細胞傷害性、サイトカイン分泌、記憶、活性増強、及びこれらの組み合わせのうち少なくとも１つを含む細胞応答が引き起こされる。いくつかの実施形態では、バリアントＧ－ＣＳＦは、サイトＩＩ界面領域における少なくとも１つの変異、サイトＩＩＩ界面領域における少なくとも１つの変異、またはそれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、バリアントＧ－ＣＳＦのサイトＩＩ界面領域における少なくとも１つの変異は、配列番号１に示す配列のアミノ酸位置１２、１６、１９、２０、１０４、１０８、１０９、１１２、１１５、１１６、１１８、１１９、１２２、及び１２３からなる群から選択されるアミノ酸位置に位置する。いくつかの実施形態では、バリアントＧ－ＣＳＦのサイトＩＩ界面領域における少なくとも１つの変異は、Ｓ１２Ｅ、Ｓ１２Ｋ、Ｓ１２Ｒ、Ｋ１６Ｄ、Ｌ１８Ｆ、Ｅ１９Ｋ、Ｑ２０Ｅ、Ｄ１０４Ｋ、Ｄ１０４Ｒ、Ｌ１０８Ｋ、Ｌ１０８Ｒ、Ｄ１０９Ｒ、Ｄ１１２Ｒ、Ｄ１１２Ｋ、Ｔ１１５Ｅ、Ｔ１１５Ｋ、Ｔ１１６Ｄ、Ｑ１１９Ｅ、Ｑ１１９Ｒ、Ｅ１２２Ｋ、Ｅ１２２Ｒ、及びＥ１２３Ｒからなる群から選択される変異の群から選択される。いくつかの実施形態では、バリアントＧ－ＣＳＦのサイトＩＩＩ界面領域における少なくとも１つの変異は、配列番号１に示す配列の３８、３９、４０、４１、４６、４７、４８、４９、及び１４７からなる群から選択される変異の群から選択される。

【００５５】

いくつかの実施形態では、バリアントＧ－ＣＳＦのサイトＩＩＩ界面領域の少なくとも１つの変異は、Ｔ３８Ｒ、Ｙ３９Ｅ、Ｋ４０Ｄ、Ｋ４０Ｆ、Ｌ４１Ｄ、Ｌ４１Ｅ、Ｌ４１Ｋ、Ｅ４６Ｒ、Ｌ４７Ｄ、Ｖ４８Ｋ、Ｖ４８Ｒ、Ｌ４９Ｋ、及びＲ１４７Ｅからなる群から選択される変異の群から選択される。いくつかの実施形態では、細胞は、Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む受容体と、少なくとも１つの追加のサイトカイン（複数可）またはケモカイン（複数可）との両方を発現する。いくつかの実施形態では、２つ以上の細

胞集団が、Ｇ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤを含む１つ以上の別個のキメラ受容体（複数可）をそれぞれ発現し、１つ以上のＧ－ＣＳＦの別個のバリアント型をそれぞれ発現する。いくつかの実施形態では、免疫細胞の第１の集団は、（ａ）少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）であって、任意選択で、１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）は、１つ以上のサイトカイン（複数可）、ケモカイン（複数可）、ホルモン（複数可）、抗体（複数可）、もしくはこれらの誘導体（複数可）、または他の親和性試薬（複数可）を含む、少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）、及び（ｂ）少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体（複数可）のうち一方または両方を更に発現する。いくつかの実施形態では、細胞は免疫細胞であり、免疫細胞は、抗原結合性シグナル伝達受容体を更に発現し、抗原結合性シグナル伝達受容体は、第２の細胞の上に発現した抗原と選択的に結合する。いくつかの実施形態では、抗原結合性シグナル伝達受容体（複数可）は、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、任意選択でメソテリンＣＡＲを含む。いくつかの実施形態では、追加のサイトカインはＩＬ－１８を含む。いくつかの実施形態では、第２の細胞はがん細胞である。

【００５６】

特定の態様では、本開示は、本明細書に記載されるシステムをコードする１つ以上の核酸配列（複数可）について記載する。特定の態様では、本開示は、本明細書に記載される核酸配列（複数可）を含む１つ以上の発現ベクター（複数可）について記載する。特定の態様では、本開示は、本明細書に記載されるシステムを発現するように操作された１つ以上の細胞（複数可）について記載する。いくつかの実施形態では、細胞（複数可）は免疫細胞であり、任意選択で、免疫細胞は、Ｔ細胞、任意選択でＮＫ細胞、任意選択でＮＫＴ細胞、任意選択でＢ細胞、任意選択で形質細胞、任意選択でマクロファージ、任意選択で樹状細胞であり、任意選択で該細胞は幹細胞であり、任意選択で該細胞は初代細胞であり、任意選択で該細胞はヒト細胞である。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞、細胞傷害性ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞、ナイーブＣＤ８＋Ｔ細胞、ナイーブＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞、ヘルパーＴ細胞、制御性Ｔ細胞、メモリーＴ細胞、及びγδＴ細胞からなる群から選択される。

【００５７】

特定の態様では、細胞の表面上に発現したＧ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む受容体を選択的に活性化させる方法であって、細胞中に、本明細書に記載されるシステムのＧ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む１つ以上の受容体（複数可）をコードする１つ以上の核酸配列（複数可）、ならびに、（ｉ）少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）であって、任意選択で、１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）は、本明細書に記載されるシステムの１つ以上のサイトカイン（複数可）、ケモカイン（複数可）、ホルモン（複数可）、抗体（複数可）、もしくはこれらの誘導体（複数可）、または他の親和性試薬（複数可）を含む、少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）、及び（ｉｉ）本明細書に記載されるシステムの少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体（複数可）の一方または両方を導入することと、Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む受容体（複数可）を、１つ以上のバリアントＧ－ＣＳＦ、または本明細書に記載されるシステムのバリアントＧ－ＣＳＦと接触させることと、を含む、方法が本明細書に記載される。いくつかの実施形態では、受容体（複数可）は免疫細胞上で発現し、任意選択で、免疫細胞は、Ｔ細胞、任意選択でＮＫ細胞、任意選択でＮＫＴ細胞、任意選択でＢ細胞、任意選択で形質細胞、任意選択でマクロファージ、任意選択で樹状細胞であり、任意選択で該細胞は幹細胞であり、任意選択で該細胞は初代細胞であり、任意選択で該細胞はヒト細胞である。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞、細胞傷害性ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞、ナイーブＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞、ナイーブＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞、ヘルパーＴ細胞、制御性Ｔ細胞、メモリーＴ細胞、及びγδＴ細胞からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫細胞上で発現した受容体（複数可）の選択的

活性化により、免疫細胞の増殖、生存能力、持続性、細胞傷害性、サイトカイン分泌、記憶、活性増強、及びこれらの組み合わせのうち少なくとも１つを含む細胞応答が引き起こされる。いくつかの実施形態では、免疫細胞の第１の集団が、Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む受容体を発現し、免疫細胞の第２の集団が、バリアントＧ－ＣＳＦを発現し、任意選択で、免疫細胞の第１及び第２の集団（複数可）のうち一方または両方が、少なくとも１つの別個の抗原結合性シグナル伝達受容体（複数可）を更に発現し、任意選択で、少なくとも１つの別個の抗原結合性シグナル伝達受容体（複数可）が少なくとも１つのＣＡＲを含む。いくつかの実施形態では、免疫細胞の第１及び第２の集団（複数可）のうち一方または両方が、（ａ）少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）であって、任意選択で、少なくとも１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）は、１つ以上のサイトカイン（複数可）、ケモカイン（複数可）、ホルモン（複数可）、抗体（複数可）、もしくはこれらの誘導体（複数可）、または他の親和性試薬（複数可）を含む、少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）、及び（ｂ）少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体（複数可）のうち一方または両方を更に発現する。

【００５８】

いくつかの実施形態では、免疫細胞の第１及び第２の集団のそれぞれが、Ｇ－ＣＳＦＲの別個のバリアントＥＣＤを含む少なくとも１つの別個の受容体（複数可）と、少なくとも１つの別個のバリアントＧ－ＣＳＦとを発現する。いくつかの実施形態では、本方法は、１つ以上の追加の免疫細胞集団を更に含み、各追加の免疫細胞集団は、（ｉ）Ｇ－ＣＳＦＲの別個のバリアントＥＣＤを含む別個の受容体、（ｉｉ）別個のバリアントＧ－ＣＳＦ、（ｉｉｉ）別個のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質、及び（ｉｖ）別個の抗原結合性シグナル伝達受容体のうち少なくとも１つを発現する。

【００５９】

特定の態様では、本開示は、本明細書に記載されるシステムのＧ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤ、ならびに、（ｉ）少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）であって、任意選択で、少なくとも１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）は、本明細書に記載されるシステムの１つ以上のサイトカイン（複数可）、ケモカイン（複数可）、ホルモン（複数可）、抗体（複数可）、もしくはこれらの誘導体（複数可）、または他の親和性試薬（複数可）を含む、少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）、及び（ｉｉ）本明細書に記載されるシステムのシステムの少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体のうち一方または両方を含む１つ以上の受容体（複数可）を発現する細胞を産生する方法であって、細胞に、受容体をコードする１つ以上の核酸（複数可）または発現ベクター（複数可）、ならびに（ｉ）及び（ｉｉ）のうち一方または両方を導入することを含む、方法について記載する。いくつかの実施形態では、免疫細胞の第１の集団が、Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む受容体を発現し、免疫細胞の第２の集団が、バリアントＧ－ＣＳＦを発現する。いくつかの実施形態では、免疫細胞の第１及び第２の集団（複数可）のうち一方または両方が、（ａ）少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）であって、任意選択で、少なくとも１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）は、１つ以上のサイトカイン（複数可）、ケモカイン（複数可）、ホルモン（複数可）、抗体（複数可）、もしくはこれらの誘導体（複数可）、または他の親和性試薬（複数可）を含む、少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）、及び（ｂ）少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体（複数可）のうち一方または両方を更に発現する。

【００６０】

特定の態様では、その必要がある対象において免疫応答を増加させる方法であって、本明細書に記載の免疫細胞（複数可）を対象に投与することを含む、方法が本明細書に記載

される。特定の態様では、その必要がある対象において疾患を治療する方法であって、本明細書の免疫細胞（複数可）を対象に投与することを含む、方法が、本明細書に記載される。いくつかの実施形態では、方法は、対象にバリアントＧ－ＣＳＦを投与または提供することを更に含む。いくつかの実施形態では、本方法は、がんを治療するために使用される。いくつかの実施形態では、本方法は、炎症状態を治療するために使用される。いくつかの実施形態では、本方法は、自己免疫疾患または状態を治療するために使用される。いくつかの実施形態では、本方法は、変性疾患を治療するために使用される。いくつかの実施形態では、本方法は、移植のための、天然のまたは操作された細胞、組織、または器官を生成するために使用される。いくつかの実施形態では、本方法は、移植片拒絶反応を予防または治療するために使用される。いくつかの実施形態では、本方法は、感染性疾患を治療するために使用される。いくつかの実施形態では、本方法は、少なくとも１つの追加の活性剤を投与または提供することを更に含み、任意選択で、少なくとも１つの追加の活性剤は、少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）を含み、任意選択で、１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）は、１つ以上のサイトカイン（複数可）、ケモカイン（複数可）、ホルモン（複数可）、抗体（複数可）、もしくはこれらの誘導体（複数可）、または他の親和性試薬（複数可）を含む。

【００６１】

特定の態様では、その必要がある対象を治療する方法が本明細書に記載され、方法は、（ｉ）免疫細胞含有試料を単離することと、（ｉｉ）免疫細胞に、請求項［００４８］～［００５４］のいずれか１項に記載のシステムのＧ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む１つ以上の受容体（複数可）をコードする１つ以上の核酸配列（複数可）、ならびに、（ａ）少なくとも１つの追加の活性剤であって、任意選択で、少なくとも１つの追加の活性剤は、少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）を含み、任意選択で、１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）は、本明細書に記載されるシステムの１つ以上のサイトカイン（複数可）、ケモカイン（複数可）、ホルモン（複数可）、抗体（複数可）、もしくはこれらの誘導体（複数可）、または他の親和性試薬（複数可）を含む、少なくとも１つの追加の活性剤、及び、任意選択で、（ｂ）本明細書に記載されるシステムの抗原結合性シグナル伝達受容体の一方または両方を導入することと、（ｉｉｉ）（ｉｉ）の免疫細胞（複数可）を対象に投与することと、（ｉｖ）免疫細胞（複数可）を、Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む受容体（複数可）と特異的に結合するバリアントＧ－ＣＳＦと接触させることと、を含む。いくつかの実施形態では、対象は、免疫細胞（複数可）を対象に投与または注入する前に、免疫除去治療を受けている。いくつかの実施形態では、免疫細胞含有試料は、細胞（複数可）が投与された対象から単離される。いくつかの実施形態では、免疫細胞含有試料は、細胞（複数可）が投与された対象とは異なる対象から単離される。いくつかの実施形態では、免疫細胞含有試料は、供給源細胞が投与されることになる対象に由来する供給源細胞から生成され、任意選択で、細胞は幹細胞であり、任意選択で多能性幹細胞である。いくつかの実施形態では、免疫細胞含有試料は、供給源細胞が投与されることになる対象とは異なる対象に由来する供給源細胞から生成され、任意選択で、細胞は幹細胞であり、任意選択で多能性幹細胞である。いくつかの実施形態では、免疫細胞（複数可）は、免疫細胞（複数可）が対象に投与される前に、ｉｎ　ｖｉｔｒｏでバリアントＧ－ＣＳＦまたは追加のサイトカイン（複数可）もしくはケモカイン（複数可）と接触させられる。いくつかの実施形態では、免疫細胞（複数可）は、本明細書に記載されるシステムのＧ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む受容体（複数可）からのシグナル伝達を活性化するのに十分な時間、バリアントＧ－ＣＳＦと接触させられる。

【００６２】

特定の態様では、本明細書に記載されるシステムのＧ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む１つ以上の受容体（複数可）、ならびに、（ａ）本明細書に記載されるシステムの１つ以上の追加のサイトカイン（複数可）及びケモカイン（複数可）、ならびに（ｂ）本明

細書に記載されるシステムの１つ以上の抗原結合性シグナル伝達受容体（複数可）の一方または両方をコードする細胞と、使用説明書と、を含むキットが本明細書に記載され、任意選択で、細胞は免疫細胞である。特定の態様では、（ｉ）本明細書に記載されるシステムのＧ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む受容体（複数可）、ならびに、（ａ）少なくとも１つの追加の活性剤（複数可）であって、任意選択で、少なくとも１つの追加の活性剤（複数可）は、少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）を含み、任意選択で、１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）は、本明細書に記載されるシステムの１つ以上のサイトカイン（複数可）、ケモカイン（複数可）、ホルモン（複数可）、抗体（複数可）、もしくはこれらの誘導体（複数可）、または他の親和性試薬（複数可）を含む、少なくとも１つの追加の活性剤（複数可）、及び（ｂ）本明細書に記載されるシステムの１つ以上の抗原結合性シグナル伝達受容体の一方または両方をコードする１つ以上の核酸配列（複数可）または発現ベクター（複数可）と、（ｉｉ）１つ以上のバリアントＧ－ＣＳＦと、（ｉｉｉ）使用説明書と、を含むキットが本明細書で説明され、ここで、受容体ならびに（ａ）及び（ｂ）のうち一方または両方は、同じまたは別の核酸配列または発現ベクター上に位置する。

【００６３】

特定の態様では、（ｉ）本明細書に記載されるシステムのＧ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む受容体（複数可）、ならびに、（ａ）少なくとも１つの追加の活性剤（複数可）であって、任意選択で、少なくとも１つの追加の活性剤（複数可）は、少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）を含み、任意選択で、１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）は、本明細書に記載されるシステムの１つ以上のサイトカイン（複数可）、ケモカイン（複数可）、ホルモン（複数可）、抗体（複数可）、もしくはこれらの誘導体（複数可）、または他の親和性試薬（複数可）を含む、少なくとも１つの追加の活性剤（複数可）、及び（ｂ）本明細書に記載されるシステムの少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体（複数可）の一方または両方をコードする１つ以上の核酸配列（複数可）または発現ベクター（複数可）を含む細胞と、（ｉｉ）使用説明書と、を含むキットが本明細書で説明され、任意選択で、ここで、キットは、Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む受容体（複数可）と特異的に結合する１つ以上のバリアントＧ－ＣＳＦを含む。

【００６４】

特定の態様では、キメラ受容体であって、（ｉ）インターロイキン受容体アルファ（ＩＬ－７Ｒα）の細胞外ドメイン（ＥＣＤ）と、（ｉｉ）膜貫通ドメイン（ＴＭＤ）と、（ｉｉｉ）配列番号１０９に記載される野生型ヒトＩＬ－７Ｒα細胞内シグナル伝達ドメインとは異なる、サイトカイン受容体の細胞内ドメイン（ＩＣＤ）と、を含み、ＥＣＤ及びＴＭＤはそれぞれＩＣＤと作動可能に連結している、キメラ受容体が本明細書で開示される。いくつかの実施形態では、ＥＣＤのカルボキシ末端（Ｃ末端）は、ＴＭＤのアミノ末端（Ｎ末端）に連結し、ＴＭＤのＣ末端は、ＩＣＤのＮ末端に連結している。いくつかの実施形態では、ＥＣＤは、天然ヒトＩＬ－７ＲαのＥＣＤである。いくつかの実施形態では、ＴＭＤは、ＩＬ－７ＲαのＴＭＤである。いくつかの実施形態では、ＴＭＤは、天然ヒトＩＬ－７ＲαのＴＭＤである。いくつかの実施形態では、ＩＣＤは、サイトカイン受容体の細胞内ドメイン由来の少なくとも１つのシグナル伝達分子結合部位を含み、任意選択で、少なくとも１つのシグナル伝達分子結合部位は、（ａ）ＩＬ－２Ｒβ、ＩＬ－４Ｒα、ＩＬ－７Ｒα、ＩＬ－２１Ｒ、もしくはｇｐ１３０のＪＡＫ１結合部位（Ｂｏｘ１及び２領域）、（ｂ）ＩＬ－２ＲβのＳＨＣ結合部位、（ｃ）ＩＬ－２ＲβもしくはＩＬ－７ＲαのＳＴＡＴ５結合部位、（ｄ）ＩＬ－２１Ｒもしくはｇｐ１３０のＳＴＡＴ３結合部位、（ｅ）ＩＬ－１２Ｒβ２のＳＴＡＴ４結合部位、（ｆ）ＩＬ－４ＲαのＳＴＡＴ６結合部位、（ｇ）ＩＬ－４ＲαのＩＲＳ－１もしくはＩＲＳ－２結合部位、及び（ｈ）ｇｐ１３０のＳＨＰ－２結合部位、（ｉ）ＩＬ－７ＲαのＰＩ３Ｋ結合部位、またはこれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、ＩＣＤは、共通のガンマ鎖（ｇｃ）での

ホモ二量体化またはヘテロ二量体化によって活性化される、受容体の少なくとも細胞内シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態では、ＩＣＤは、ＩＬ－２Ｒβ（インターロイキン－２受容体ベータ）、ＩＬ－４Ｒα（インターロイキン－４受容体アルファ）、ＩＬ－９Ｒα（インターロイキン－９受容体アルファ）、ＩＬ－１２Ｒ　β２（インターロイキン－１２受容体）、ＩＬ－２１Ｒ（インターロイキン－２１受容体）、及び糖タンパク質１３０（ｇｐ１３０）、ならびにこれらの組み合わせからなる群から選択されるサイトカイン受容体の少なくとも細胞内シグナル伝達ドメインを含む。

【００６５】

特定の態様では、キメラ受容体であって、ＩＣＤと作動可能に連結したＩＬ－７ＲαのＥＣＤ及びＴＭＤを含み、ＩＣＤが、

（ｉ）
（ａ）ＩＬ－２ＲβのＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）ＩＬ－２ＲβのＳＨＣ結合部位、及び
（ｃ）ＩＬ－２ＲβのＳＴＡＴ５結合部位、または

（ｉｉ）
（ａ）ＩＬ－７ＲαのＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）ＩＬ－２ＲβのＳＨＣ結合部位、及び
（ｃ）ＩＬ－２ＲβのＳＴＡＴ５結合部位、または

（ｉｉｉ）
（ａ）ＩＬ－２ＲβのＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）ＩＬ－２ＲβのＳＨＣ結合部位、
（ｃ）ＩＬ－２ＲβのＳＴＡＴ５結合部位、及び
（ｄ）ＩＬ－１２Ｒβ２のＳＴＡＴ４結合部位、または

（ｉｖ）
（ａ）ＩＬ－７ＲαのＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）ＩＬ－２ＲβのＳＨＣ結合部位、
（ｃ）ＩＬ－２ＲβのＳＴＡＴ５結合部位、及び
（ｄ）ＩＬ－１２Ｒβ２のＳＴＡＴ４結合部位、または

（ｖ）
（ａ）ＩＬ－２１ＲのＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、及び
（ｂ）ＩＬ－２１ＲのＳＴＡＴ３結合部位、または

（ｖｉ）
（ａ）ＩＬ－７ＲαのＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、及び
（ｂ）ＩＬ－２１ＲのＳＴＡＴ３結合部位、または

（ｖｉｉ）
（ａ）ＩＬ－２１ＲのＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）ＩＬ－２１ＲのＳＴＡＴ３結合部位、及び
（ｃ）ＩＬ－７ＲαのＳＴＡＴ５及びＰＩ３キナーゼ結合部位、

（ｖｉｉｉ）
（ａ）ＩＬ－７ＲαのＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）ＩＬ－２１ＲのＳＴＡＴ３結合部位、及び
（ｃ）ＩＬ－７ＲαのＳＴＡＴ５及びＰＩ３キナーゼ結合部位、

（ｉｘ）
（ａ）ＩＬ－２ＲβのＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）ＩＬ－２ＲβのＳＨＣ結合部位、
（ｃ）ＩＬ－２ＲβのＳＴＡＴ５結合部位、及び
（ｄ）ＩＬ－２１ＲのＳＴＡＴ３結合部位、または

（ｘ）
（ａ）ＩＬ－７ＲαのＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）ＩＬ－２ＲβのＳＨＣ結合部位、

（ｃ）ＩＬ－２ＲβのＳＴＡＴ５結合部位、及び
（ｄ）ＩＬ－２１ＲのＳＴＡＴ３結合部位、または
（ｘｉ）
（ａ）ＩＬ－２ＲβのＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）ＩＬ－２ＲβのＳＨＣ結合部位、
（ｃ）ＩＬ－２ＲβのＳＴＡＴ５結合部位、
（ｄ）ＩＬ１２Ｒβ２のＳＴＡＴ４結合部位、及び
（ｅ）ＩＬ－２１ＲのＳＴＡＴ３結合部位、または
（ｘｉｉ）
（ａ）ＩＬ－７ＲαのＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）ＩＬ－２ＲβのＳＨＣ結合部位、
（ｃ）ＩＬ－２ＲβのＳＴＡＴ５結合部位、
（ｄ）ＩＬ１２Ｒβ２のＳＴＡＴ４結合部位、及び
（ｅ）ＩＬ－２１ＲのＳＴＡＴ３結合部位、または
（ｘｉｉｉ）
（ａ）ＩＬ－４ＲαのＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）ＩＬ－４ＲαのＩＲＳ－１もしくはＩＲＳ－２結合部位、及び
（ｃ）ＩＬ－４ＲαのＳＴＡＴ６結合部位、または
（ｘｉｖ）
（ａ）ＩＬ－７ＲαのＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）ＩＬ－４αのＩＲＳ－１もしくはＩＲＳ－２結合部位、及び
（ｃ）ＩＬ－４αのＳＴＡＴ６結合部位、または
（ｘｖ）
（ａ）ｇｐ１３０のＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）ｇｐ１３０のＳＨＰ－２結合部位、及び
（ｃ）ｇｐ１３０のＳＴＡＴ３結合部位、または
（ｘｖｉ）
（ａ）ＩＬ－７ＲαのＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）ｇｐ１３０のＳＨＰ－２結合部位、及び
（ｃ）ｇｐ１３０のＳＴＡＴ３結合部位
を含む、キメラ受容体が本明細書に記載される。いくつかの実施形態では、（ｂ）は（ｃ）のＮ末端側であるか、または（ｃ）は（ｂ）のＮ末端側であるか、または（ｃ）は（ｄ）のＮ末端側であるか、または（ｄ）は（ｃ）のＮ末端側であるか、または（ｄ）は（ｅ）のＮ末端側であるか、または（ｅ）は（ｄ）のＮ末端側である。

【００６６】

いくつかの実施形態では、ＩＣＤは、配列番号１９２～２１４のうち少なくとも１つに示す配列に対して、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％同一の配列を含む。

【００６７】

いくつかの実施形態では、キメラ受容体の活性型がヘテロ二量体を形成し、任意選択で、キメラ受容体の活性化により、キメラ受容体を発現する細胞の増殖、生存能力、持続性、細胞傷害性、サイトカイン分泌、記憶、及び活性増強のうち少なくとも１つを含む細胞応答が引き起こされ、任意選択で、キメラ受容体はインターロイキン（ＩＬ）－７に接触すると活性化される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－７は、野生型のヒトＩＬ－７である。いくつかの実施形態では、ＩＬ－７は、野生型ＩＬ－７と比較して１、２、３、４、または５の変異を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－７は１つ以上の化学修飾を含む。

【００６８】

いくつかの実施形態では、キメラ受容体は細胞上で発現し、細胞は、免疫細胞であり、任意選択で、免疫細胞は、Ｔ細胞、任意選択でＮＫ細胞、任意選択でＮＫＴ細胞、任意選択でＢ細胞、任意選択で形質細胞、任意選択でマクロファージ、任意選択で樹状細胞であり、任意選択で該細胞は幹細胞であり、任意選択で該細胞は初代細胞であり、任意選択で該細胞はヒト細胞である。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、ＣＤ８$^+$Ｔ細胞、細胞傷害性ＣＤ８$^+$Ｔ細胞、ナイーブＣＤ４$^+$Ｔ細胞、ナイーブＣＤ８$^+$Ｔ細胞、ヘルパーＴ細胞、制御性Ｔ細胞、メモリーＴ細胞、及びγδＴ細胞からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－７による受容体の活性化により、受容体を発現する細胞の増殖、生存能力、持続性、細胞傷害性、サイトカイン分泌、記憶、及び活性増強のうち少なくとも１つを含む細胞応答が引き起こされる。

【００６９】

特定の態様では、本開示は、本明細書に記載される受容体をコードする１つ以上の核酸配列（複数可）について記載する。特定の態様では、本開示は、本明細書に記載される核酸配列（複数可）を含む１つ以上の発現ベクター（複数可）について記載する。特定の態様では、本開示は、本明細書に記載される核酸配列（複数可）または発現ベクター（複数可）を含む細胞について記載する。いくつかの実施形態では、細胞は免疫細胞であり、任意選択で、免疫細胞は、Ｔ細胞、任意選択でＮＫ細胞、任意選択でＮＫＴ細胞、任意選択でＢ細胞、任意選択で形質細胞、任意選択でマクロファージ、任意選択で樹状細胞であり、任意選択で該細胞は幹細胞であり、任意選択で該細胞は初代細胞であり、任意選択で該細胞はヒト細胞である。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、ＣＤ８$^+$Ｔ細胞、細胞傷害性ＣＤ８$^+$Ｔ細胞、ナイーブＣＤ４$^+$Ｔ細胞、ナイーブＣＤ８$^+$Ｔ細胞、ヘルパーＴ細胞、制御性Ｔ細胞、メモリーＴ細胞、及びγδＴ細胞からなる群から選択される。

【００７０】

特定の態様では、本開示は、細胞表面上に発現した受容体を活性化させるためのシステムであって、（ａ）本明細書に記載されるキメラ受容体、及び（ｂ）ＩＬ－７を含む、システムを記載する。

【００７１】

特定の態様では、本開示は、免疫細胞を活性化させるためのシステムであって、（ａ）本明細書に記載されるキメラ受容体、（ｂ）ＩＬ－７、及び（ｃ）抗原結合性シグナル伝達受容体を含む、システム、を記載する。

【００７２】

特定の態様では、本開示は、免疫細胞を活性化させるためのシステムであって、（ａ）本明細書に記載されるキメラ受容体、（ｂ）ＩＬ－７、及び（ｃ）少なくとも１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）を含み、任意選択で、１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）は、１つ以上のサイトカイン（複数可）、ケモカイン（複数可）、ホルモン（複数可）、抗体（複数可）、もしくはこれらの誘導体（複数可）、または他の親和性試薬を含む、システム、を記載する。

【００７３】

いくつかの実施形態では、システムは、少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体を更に含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体は、天然のＴ細胞受容体、操作されたＴ細胞受容体（ＴＣＲ）、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、天然のＢ細胞受容体、操作されたＢ細胞受容体（ＢＣＲ）、ストレスリガンド受容体、パターン認識受容体、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される少なくとも１つの受容体を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体はＣＡＲである。いくつかの実施形態では、サイトカインまたはケモカインは、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、インターフェロンα、インターフェロンβ、インターフェロンγ、ＩＬ－１７、ＩＬ－２１、ＴＮＦ－α、ＣＸＣＬ１３、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１α）、ＣＣＬ４（ＭＩＰ－１β）、ＣＤ４０リガンド、Ｂ細胞活性化因子（ＢＡＦＦ）、Ｆｌｔ３リガンド、ＣＣＬ２１、ＣＣＬ５、ＸＣＬ１、ＣＣＬ１９、受容体ＮＫＧ２Ｄ、及び

これらの組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、サイトカインはＩＬ－１８である。いくつかの実施形態では、サイトカインはヒトのものである。

【００７４】

特定の態様では、細胞の表面上に発現したキメラ受容体を活性化させる方法であって、キメラ受容体をＩＬ－７と接触させて、キメラ受容体を活性化することを含む、方法が本明細書に記載され、ここでキメラ受容体は、（ｉ）ＩＬ－７Ｒαの細胞外ドメイン（ＥＣＤ）と、（ｉｉ）膜貫通ドメイン（ＴＭＤ）と、（ｉｉｉ）配列番号１０９に記載される野生型ヒトＩＬ－７Ｒα細胞内シグナル伝達ドメインとは異なる、サイトカイン受容体の細胞内ドメイン（ＩＣＤ）と、を含み、ＥＣＤ及びＴＭＤはそれぞれＩＣＤと作動可能に連結している。いくつかの実施形態では、キメラ受容体は、本明細書に記載されるキメラ受容体である。

【００７５】

特定の態様では、細胞においてキメラ受容体を産生する方法が本明細書に記載され、方法は、本明細書に記載される核酸配列（複数可）または本明細書に記載される発現ベクター（複数可）を細胞に導入することを含む。いくつかの実施形態では、方法は、配列（複数可）またはベクター（複数可）の配列（複数可）を細胞のゲノム中へと編集することを更に含む。

【００７６】

本明細書に記載される方法のいくつかの実施形態では、細胞は免疫細胞であり、任意選択で、免疫細胞は、Ｔ細胞、任意選択でＮＫ細胞、任意選択でＮＫＴ細胞、任意選択でＢ細胞、任意選択で形質細胞、任意選択でマクロファージ、任意選択で樹状細胞であり、任意選択で該細胞は幹細胞であり、任意選択で該細胞は初代細胞であり、任意選択で該細胞はヒト細胞である。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞、細胞傷害性ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞、ナイーブＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞、ナイーブＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞、ヘルパーＴ細胞、制御性Ｔ細胞、メモリーＴ細胞、及びγδＴ細胞からなる群から選択される。

【００７７】

特定の態様では、その必要がある対象において免疫応答を増加させる方法であって、本明細書に記載されるキメラ受容体を発現する細胞（複数可）を対象に投与することと、ＩＬ－７を対象に投与または提供することと、を含む、方法が本明細書に記載される。

【００７８】

特定の態様では、その必要がある対象を治療する方法であって、本明細書に記載されるキメラ受容体を発現する細胞（複数可）を対象に投与することと、ＩＬ－７を対象に投与または提供することと、を含む、方法が本明細書に記載される。いくつかの実施形態では、本方法は、がんを治療するために使用される。いくつかの実施形態では、本方法は、自己免疫疾患を治療するために使用される。いくつかの実施形態では、本方法は、炎症状態を治療するために使用される。いくつかの実施形態では、本方法は、変性疾患を治療するために使用される。いくつかの実施形態では、本方法は、移植のための、天然のまたは操作された細胞、組織、または器官を生成するために使用される。いくつかの実施形態では、本方法は、移植片拒絶反応を予防または治療するために使用される。いくつかの実施形態では、本方法は、感染性疾患を治療するために使用される。

【００７９】

特定の実施形態では、本方法は、変性疾患または状態を治療するために使用される。変性疾患または状態の例としては、加齢に関連する神経変性疾患及び状態が挙げられるが、これらに限定されない。

【００８０】

特定の実施形態では、本方法は、移植のための、天然のまたは操作された細胞、組織、または器官を生成するために使用される。

【００８１】

いくつかの実施形態では、本方法は、少なくとも１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）を投与または提供することを更に含み、

任意選択で、１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）は、１つ以上のサイトカイン（複数可）、ケモカイン（複数可）、ホルモン（複数可）、抗体（複数可）、もしくはこれらの誘導体（複数可）、または他の親和性試薬を含む。いくつかの実施形態では、対象は、少なくとも１つの追加の別個のキメラ受容体を発現する細胞を投与される。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの追加の別個のキメラ受容体は、顆粒球細胞刺激因子受容体（Ｇ－ＣＳＦＲ）のバリアントＥＣＤを含むキメラ受容体である。いくつかの実施形態では、Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む少なくとも１つの追加の別個のキメラ受容体を発現する細胞は、１つ以上のバリアントＧ－ＣＳＦと接触させられ、任意選択で、対象は、１つ以上のバリアントＧ－ＣＳＦを投与される。いくつかの実施形態では、方法は、ｉ）免疫細胞含有試料を単離することと、（ｉｉ）キメラサイトカイン受容体（複数可）をコードする核酸配列（複数可）で免疫細胞（複数可）を形質導入またはトランスフェクトすることと、（ｉｉｉ）（ｉｉ）の免疫細胞（複数可）を対象に投与することと、（ｉｖ）免疫細胞をＩＬ－７と接触させることと、を含む。

【００８２】

いくつかの実施形態では、方法は、免疫細胞（複数可）に、少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）をコードする核酸配列（複数可）を導入することを更に含み、任意選択で、１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）は、１つ以上のサイトカイン（複数可）、ケモカイン（複数可）、ホルモン（複数可）、抗体（複数可）、もしくはこれらの誘導体（複数可）、または他の親和性試薬を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのサイトカインまたはケモカインは、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、インターフェロンα、インターフェロンβ、インターフェロンγ、ＩＬ－１７、ＩＬ－２１、ＴＮＦ－α、ＣＸＣＬ１３、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１α）、ＣＣＬ４（ＭＩＰ－１β）、ＣＤ４０リガンド、Ｂ細胞活性化因子（ＢＡＦＦ）、Ｆｌｔ３リガンド、ＣＣＬ２１、ＣＣＬ５、ＸＣＬ１、ＣＣＬ１９、受容体ＮＫＧ２Ｄ、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、方法は、免疫細胞（複数可）に、少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体をコードする核酸配列（複数可）を導入することを更に含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体は、天然のＴ細胞受容体、操作されたＴ細胞受容体（ＴＣＲ）、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、天然のＢ細胞受容体、操作されたＢ細胞受容体（ＢＣＲ）、ストレスリガンド受容体、パターン認識受容体、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、対象は、細胞を対象に投与する前に、免疫除去治療を受けたことがある。いくつかの実施形態では、免疫細胞含有試料は、細胞が投与された対象から単離される。いくつかの実施形態では、免疫細胞含有試料は、細胞が投与されることになる対象とは異なる対象から単離される。いくつかの実施形態では、免疫細胞含有試料は、細胞が投与されることになる対象とは異なる対象に由来する細胞から生成され、任意選択で、細胞は幹細胞であり、任意選択で多能性幹細胞である。いくつかの実施形態では、免疫細胞は、細胞を対象に投与する前に、ｉｎ　ｖｉｔｒｏでＩＬ－７またはバリアントＧ－ＣＳＦのうち一方または両方と接触させられる。いくつかの実施形態では、免疫細胞は、本明細書に記載されるキメラ受容体からのシグナル伝達を活性化するのに十分な時間、ＩＬ－７またはバリアントＧ－ＣＳＦのうち一方または両方と接触させられる。

【００８３】

いくつかの実施形態では、対象に投与された細胞は、天然のＴ細胞受容体、操作されたＴ細胞受容体（ＴＣＲ）、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、天然のＢ細胞受容体、操作されたＢ細胞受容体（ＢＣＲ）、ストレスリガンド受容体、パターン認識受容体、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体を更に発現する。いくつかの実施形態では、対象に投与された細胞は、Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む受容体を更に発現する。いくつかの実施形態では、Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤは、サイトＩＩ界面領域における少なくとも１つの変異、サイトＩＩＩ

界面領域における少なくとも１つの変異、またはそれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、対象に投与された細胞は、ＩＬ－１８を更に発現する。

【００８４】

特定の態様では、本明細書に記載されるキメラ受容体をコードする細胞であって、任意選択で、該細胞は免疫細胞である、細胞と、使用説明書と、を含むキットが本明細書で説明され、任意選択で、該キットはＩＬ－７を含み、任意選択で、該キットは本明細書に記載のバリアントＧ－ＣＳＦを含む。特定の態様では、本明細書に記載のキメラ受容体をコードする核酸配列（複数可）を含む１つ以上の発現ベクター（複数可）と、使用説明書と、を含むキットが本明細書で説明され、任意選択で、キットはＩＬ－７を含み、任意選択で、キットは本明細書に記載のバリアントＧ－ＣＳＦを含む。いくつかの実施形態では、キットは、少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）をコードする１つ以上の発現ベクター（複数可）を更に含み、任意選択で、１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）は、１つ以上のサイトカイン（複数可）、ケモカイン（複数可）、ホルモン（複数可）、抗体（複数可）、もしくはこれらの誘導体（複数可）、または他の親和性試薬を含む。いくつかの実施形態では、キットは、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、インターフェロンα、インターフェロンβ、インターフェロンγ、ＩＬ－１７、ＩＬ－２１、ＴＮＦ－α、ＣＸＣＬ１３、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１α）、ＣＣＬ４（ＭＩＰ－１β）、ＣＤ４０リガンド、Ｂ細胞活性化因子（ＢＡＦＦ）、Ｆｌｔ３リガンド、ＣＣＬ２１、ＣＣＬ５、ＸＣＬ１、ＣＣＬ１９、受容体ＮＫＧ２Ｄ、及びこれらの組み合わせからなる群から選択されるサイトカインまたはケモカインをコードする１つ以上の発現ベクター（複数可）を更に含む。いくつかの実施形態では、キットは、天然のＴ細胞受容体、操作されたＴ細胞受容体（ＴＣＲ）、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、天然のＢ細胞受容体、操作されたＢ細胞受容体（ＢＣＲ）、ストレスリガンド受容体、パターン認識受容体、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される少なくとも１つの受容体をコードする１つ以上の発現ベクター（複数可）を更に含む。いくつかの実施形態では、キットは、キメラ抗原受容体をコードする発現ベクターを更に含む。いくつかの実施形態では、細胞は、少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）をコードする１つ以上の発現ベクター（複数可）を更に含み、任意選択で、１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）は、１つ以上のサイトカイン（複数可）、ケモカイン（複数可）、ホルモン（複数可）、抗体（複数可）、もしくはこれらの誘導体（複数可）、または他の親和性試薬を含む。いくつかの実施形態では、細胞は、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、インターフェロンα、インターフェロンβ、インターフェロンγ、ＩＬ－１７、ＩＬ－２１、ＴＮＦ－α、ＣＸＣＬ１３、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１α）、ＣＣＬ４（ＭＩＰ－１β）、ＣＤ４０リガンド、Ｂ細胞活性化因子（ＢＡＦＦ）、Ｆｌｔ３リガンド、ＣＣＬ２１、ＣＣＬ５、ＸＣＬ１、ＣＣＬ１９、受容体ＮＫＧ２Ｄ、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される少なくとも１つのサイトカインまたはケモカインをコードする１つ以上の発現ベクター（複数可）を更に含む。いくつかの実施形態では、細胞は、少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体（複数可）をコードする１つ以上の発現ベクター（複数可）を更に含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体（複数可）は、天然のＴ細胞受容体、操作されたＴ細胞受容体（ＴＣＲ）、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、天然のＢ細胞受容体、操作されたＢ細胞受容体（ＢＣＲ）、ストレスリガンド受容体、パターン認識受容体、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、細胞は、少なくとも１つのＣＡＲ（複数可）をコードする１つ以上の発現ベクター（複数可）を更に含む。

【図面の簡単な説明】

【００８５】

本発明のこれら及び他の特徴、態様、及び利点は、以下の説明、及び添付の図面に関してよりよく理解されるであろう。

【００８６】

【図１】２：２のＧ－ＣＳＦ：Ｇ－ＣＳＦＲヘテロ二量体複合体のサイトＩＩ及びＩＩＩ界面の構造を示す図を表す。
【００８７】
【図２】Ｇ－ＣＳＦ：Ｇ－ＣＳＦＲ界面デザインに使用される戦略を概説する図を表す。
【００８８】
【図３】サイトＩＩ界面相互作用のエネルギー成分を示すグラフを表す。
【００８９】
【図４】サイトＩＩ界面の構造、ならびにＧ－ＣＳＦＲ（ＣＲＨ）のＡｒｇ１６７（左）及びＡｒｇ１４１（右）とサイトＩＩ界面のＧ－ＣＳＦ残基との相互作用を示す図を表す。
【００９０】
【図５】サイトＩＩにおける野生型Ｇ－ＣＳＦを示す図（左）及びサイトＩＩデザイン＃３５の三重のＺｙｍｅＣＡＤ（商標）平均場パックの同じ領域の重ね合わせ（右）を表す。
【００９１】
【図６】Ｇ－ＣＳＦデザイン＃：６、７、８、９、１５、１７、３０、３４、３５、及び３６（上パネル）、ならびに共発現及び精製サイトＩＩデザイン複合体＃：６、７、８、９、１５、１７、３０、３４、３５、及び３６（下パネル）（第１レーンＷＴ　Ｇ－ＣＳＦ対照、第２レーンＷＴ　Ｇ－ＣＳＦ：Ｇ－ＣＳＦＲ（ＣＲＨ）対照）のＧ－ＣＳＦプルダウンアッセイの結果を示すＳＤＳ－ＰＡＧＥの画像を表す。
【００９２】
【図７】ＷＴ－Ｇ－ＣＳＦＲと共発現させたＧ－ＣＳＦデザイン＃：６、７、８、９、１５、１７、３０、３４、３５、及び３６のＧ－ＣＳＦプルダウンアッセイ（上パネル）、ならびにＧ－ＣＳＦＲデザイン＃：６、７、８、９、１５、１７、３０、３４、３５、及び３６と共発現させたＷＴ　Ｇ－ＣＳＦのＧ－ＣＳＦプルダウンアッセイ（下パネル，第１レーンＷＴ：ＷＴ　Ｇ－ＣＳＦ：Ｇ－ＣＳＦＲプルダウン対照）の結果を示すＳＤＳ－ＰＡＧＥの画像を表す。
【００９３】
【図８】サイトＩＩＩ界面相互作用のエネルギー成分を示すグラフを表す。
【００９４】
【図９】サイトＩＩＩ界面の構造、ならびにＧ－ＣＳＦＲ（Ｉｇ）のＲ４１（左）及びＥ９３（右）とサイトＩＩＩ界面のＧ－ＣＳＦ残基との相互作用を示す図を表す。
【００９５】
【図１０】デザイン＃４０１及び４０２のＧ－ＣＳＦプルダウンアッセイの結果（上パネル）、ならびに共発現し精製したサイトＩＩ／ＩＩＩデザイン複合体＃４０１及び４０２（ＷＴ　Ｇ－ＣＳＦＲと、デザイン＃４０１及び４０２　Ｇ－ＣＳＦＲと共発現させたＷＴ　Ｇ－ＣＳＦのプルダウン）のＧ－ＣＳＦプルダウンアッセイの結果（下パネル）を示し、第１レーンがＷＴ　Ｇ－ＣＳＦ対照、第２レーンがＷＴ　Ｇ－ＣＳＦ：Ｇ－ＣＳＦＲ（Ｉｇ－ＣＲＨ）対照である、ＳＤＳ－ＰＡＧＥの画像を表す。
【００９６】
【図１１】ＴＥＶ切断後の、ＷＴ（ＳＸ７５）Ｇ－ＣＳＦ、ならびにデザイン１３０（ＳＸ７５）、３０３（ＳＸ２００）、及び４０１（ＳＸ２００）Ｇ－ＣＳＦ$_E$変異体のサイズ排除クロマトグラフィープロファイルを示すグラフを表す。
【００９７】
【図１２】ＴＥＶ切断後の、ＷＴ（ＳＸ７５）、ならびに精製デザイン４０１（ＳＸ２００）及び４０２（ＳＸ２００）Ｇ－ＣＳＦＲ（Ｉｇ－ＣＲＨ）$_E$変異体のサイズ排除クロマトグラフィープロファイルを示すグラフを表す。
【００９８】
【図１３】それらの同族またはミスペアリングＧ－ＣＳＦＲ（Ｉｇ－ＣＲＨ）に結合する、ＷＴ、デザイン＃１３０、＃４０１、＃４０２Ｇ－ＣＳＦの結合ＳＰＲセンサーグラム

を示すグラフを表す。各Ｇ－ＣＳＦ対Ｇ－ＣＳＦＲペアは、各パネルの下に表記される。デザイン＃４０１及び＃４０２の同族ペアに関するＫＤを導出するために使用される代表的な定常状態での適合が、それぞれのセンサーグラムの下に示される。

【００９９】

【図１４】左上パネル：ＷＴ　Ｇ－ＣＳＦ、デザイン＃１３０及び＃１３４　Ｇ－ＣＳＦ$_{E}$のＤＳＣサーモグラム；右上パネル：ＷＴ　Ｇ－ＣＳＦＲ（Ｉｇ－ＣＲＨ）、デザイン＃１３０及び＃１３４　Ｇ－ＣＳＦＲ（Ｉｇ－ＣＲＨ）$_{E}$のＤＳＣサーモグラム；左下パネル：デザイン＃４０１及び＃４０２　Ｇ－ＣＳＦ$_{E}$のＤＳＣサーモグラム；右下パネル：デザイン＃３００、＃３０３、＃３０４及び＃３０７　Ｇ－ＣＳＦ$_{E}$のＤＳＣサーモグラムを示すグラフを表す。

【０１００】

【図１５】Ａ）Ｇ－ＣＳＦＲ$_{WT}$－ＩＣＤ$_{IL-2Rb}$（ホモ二量体）またはＢ）Ｇ－ＣＳＦＲ$_{WT}$－ＩＣＤ$_{IL-2Rb}$＋Ｇ－ＣＳＦＲ$_{WT}$－ＩＣＤ$_{gc}$（ヘテロ二量体）を発現する増殖３２Ｄ－ＩＬ－２Ｒβ$_{IL2Rb}$細胞を示すブロモ－デオキシウリジン（ＢｒｄＵ）アッセイの結果を示すグラフを表す。細胞は、サイトカインなし、ＩＬ－２（３００ＩＵ／ｍｌ）、またはＧ－ＣＳＦ$_{WT}$（Ａでは１００ｎｇ／ｍｌ、Ｂでは３０ｎｇ／ｍｌ）で刺激された。

【０１０１】

【図１６】Ａ）Ｇ－ＣＳＦＲ$_{137}$－ＩＣＤ$_{gp130-IL-2Rb}$（ホモ二量体）またはＢ）Ｇ－ＣＳＦＲ$_{137}$－ＩＣＤ$_{IL-2Rb}$＋Ｇ－ＣＳＦＲ$_{137}$－ＩＣＤ$_{gc}$（ヘテロ二量体）を発現する３２Ｄ－ＩＬ－２Ｒβ細胞の増殖を示すＢｒｄＵアッセイの結果を示すグラフを表す。細胞は、サイトカインなし、ＩＬ－２（３００ＩＵ／ｍｌ）、Ｇ－ＣＳＦ$_{WT}$（３０ｎｇ／ｍｌ）、またはＧ－ＣＳＦＲ$_{137}$（３０ｎｇ／ｍｌ）で刺激された。

【０１０２】

【図１７】Ａ）Ｇ－ＣＳＦＲ$_{WT}$－ＩＣＤ$_{gp130-IL-2Rb}$（ホモ二量体）またはＢ）Ｇ－ＣＳＦＲ$_{WT}$－ＩＣＤ$_{IL-2Rb}$＋Ｇ－ＣＳＦＲ$_{WT}$－ＩＣＤ$_{gc}$（ヘテロ二量体）を発現する３２Ｄ－ＩＬ－２Ｒβ細胞の増殖を示すＢｒｄＵアッセイの結果を示すグラフを表す。細胞は、サイトカインなし、ＩＬ－２（３００ＩＵ／ｍｌ）、Ｇ－ＣＳＦ$_{WT}$（３０ｎｇ／ｍｌ）、またはＧ－ＣＳＦＲ$_{137}$（３０ｎｇ／ｍｌ）で刺激された。

【０１０３】

【図１８】Ｇ－ＣＳＦＲ$_{WT}$－ＩＣＤ$_{gp130-IL-2Rb}$（ホモ二量体）、Ｇ－ＣＳＦＲ$_{137}$－ＩＣＤ$_{gp130-IL-2Rb}$（ホモ二量体）、Ｇ－ＣＳＦＲ$_{WT}$－ＩＣＤ$_{IL-2Rb}$＋Ｇ－ＣＳＦＲ$_{WT}$－ＩＣＤ$_{gc}$（ヘテロ二量体）、またはＧ－ＣＳＦＲ$_{137}$－ＩＣＤ$_{IL-2Rb}$＋Ｇ－ＣＳＦＲ$_{137}$－ＩＣＤ$_{gc}$（ヘテロ二量体）を発現する３２Ｄ－ＩＬ－２Ｒβ細胞のシグナル伝達を示すウエスタンブロットを表す。細胞は、サイトカインなし、ＩＬ－２（３００ＩＵ／ｍｌ）、Ｇ－ＣＳＦ$_{WT}$（３０ｎｇ／ｍｌ）、またはＧ－ＣＳＦＲ$_{137}$（３０ｎｇ／ｍｌ）で刺激された。

【０１０４】

【図１９】サイトカインなし、ＩＬ－２、またはＷＴ、１３０、３０４、または３０７サイトカインでの刺激に応答して、示されたキメラ受容体を発現する初代マウスＴ細胞（または非形質導入細胞）の細胞周期の進行を評価するＢｒｄＵ取り込みアッセイの結果を示すグラフを表す。Ａ及びＢは、反復実験を表す。

【０１０５】

【図２０】ネイティブＩＬ－２Ｒβ、ＩＬ－２Ｒγｃ、及びＧ－ＣＳＦＲサブユニット、ならびにＧ２Ｒ－１受容体サブユニットデザインの概略図を表す。

【０１０６】

【図２１】示されたＧ－ＣＳＦＲキメラ受容体サブユニットを発現し、ＷＴ　Ｇ－ＣＳＦ、ＩＬ－２、またはサイトカインなしで刺激された３２Ｄ－ＩＬ－２Ｒβ細胞（ヒトＩＬ－２Ｒβサブユニットを安定して発現する３２Ｄ細胞株）の増殖（細胞数の倍数変化）を

示すグラフを表す。Ｇ／γｃは、そのＮ末端にＭｙｃエピトープをタグ付けされ（Ｍｙｃ／Ｇ／γｃ）、Ｇ／ＩＬ－２Ｒβは、そのＮ末端にＦｌａｇエピトープをタグ付けされ（Ｆｌａｇ／Ｇ／ＩＬ－２Ｒβ）；これらのエピトープタグは、フローサイトメトリーによる検出を補助し、受容体の機能には影響を与えない。更に、Ｂ～Ｄの下パネルは、各培養条件下でＧ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤを発現する細胞の割合（％Ｇ－ＣＳＦＲ＋）を示す。四角形は、ＩＬ－２で刺激された細胞を表す。三角形は、Ｇ－ＣＳＦで刺激された細胞を表す。円形は、サイトカインで刺激されていない細胞を表す。

【０１０７】

【図２２】Ｆｌａｇタグ付きＧ／ＩＬ－２Ｒβサブユニットのみ、Ｍｙｃタグ付きＧ／γｃサブユニットのみ、または全長Ｇ－ＣＳＦＲを発現するヒトＴ細胞の増殖（細胞数の倍数変化）を示すグラフを表す。Ａ～Ｄ）ＰＢＭＣ由来Ｔ細胞；Ｅ～Ｈ）腫瘍関連リンパ球（ＴＡＬ）。四角形は、ＩＬ－２で刺激された細胞を表す。三角形は、Ｇ－ＣＳＦで刺激された細胞を表す。円形は、サイトカインで刺激されていない細胞を表す。

【０１０８】

【図２３】ＪＡＫ、ＳＴＡＴ、Ｓｈｃ、ＳＨＰ－２、及びＰＩ３Ｋ結合部位を示す、ネイティブ受容体及びキメラ受容体の概略図を表す。影付きのスキームには、図２０の受容体が含まれる。

【０１０９】

【図２４】ＪＡＫ、ＳＴＡＴ、Ｓｈｃ、ＳＨＰ－２、及びＰＩ３Ｋ結合部位を示す、キメラ受容体の概略図を表す。影付きのスキームには、図２０及び２３の受容体が含まれる。

【０１１０】

【図２５】Ｇ２Ｒ－２　ｃＤＮＡインサートを含有するレンチウイルスプラスミドの図を表す。

【０１１１】

【図２６】Ｇ２Ｒ－２で形質導入された細胞のフローサイトメトリーによって評価されたＧ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤ発現を示すグラフを表す。Ａ）３２Ｄ－ＩＬ－２Ｒβ細胞株；Ｂ）ＰＢＭＣ由来ヒトＴ細胞及びヒト腫瘍関連リンパ球（ＴＡＬ）。

【０１１２】

【図２７】非形質導入細胞と比較したＧ２Ｒ－２を発現する細胞の増殖（細胞数の倍数変化）を示すグラフを表す。Ａ）ヒトＰＢＭＣ由来Ｔ細胞；Ｂ，Ｃ）２つの独立した実験からのヒト腫瘍関連リンパ球（ＴＡＬ）。四角形は、ＩＬ－２で刺激された細胞を表す。三角形は、Ｇ－ＣＳＦで刺激された細胞を表す。円形は、サイトカインで刺激されていない細胞を表す。

【０１１３】

【図２８】非形質導入細胞と比較したＧ２Ｒ－２を発現するＣＤ４またはＣＤ８選択ヒト腫瘍関連リンパ球の増殖（細胞数の倍数変化）を示すグラフを表す。Ａ）非形質導入ＣＤ４選択細胞；Ｂ）非形質導入ＣＤ８選択細胞；Ｃ）Ｇ２Ｒ－２で形質導入されたＣＤ４選択細胞；Ｄ）Ｇ２Ｒ－２で形質導入されたＣＤ８選択細胞。灰色の点線は、ＩＬ－２で刺激された細胞を表す。黒の実線は、Ｇ－ＣＳＦで刺激された細胞を表す。灰色の破線は、サイトカインで刺激されていない細胞を表す。

【０１１４】

【図２９】Ｇ２Ｒ－２を発現するＣＤ４＋またはＣＤ８＋腫瘍関連リンパ球の増殖（細胞数の倍数変化）を示すグラフを表す。示されているように、細胞を最初にＧ－ＣＳＦまたはＩＬ－２において増殖した。次に、細胞を、ＩＬ－２、Ｇ－ＣＳＦ、または培地のみのいずれかでプレーティングした。灰色の実線は、ＩＬ－２で刺激された細胞を表す。灰色の実線は、ＩＬ－２で刺激された細胞を表す。黒の実線は、Ｇ－ＣＳＦで刺激された細胞を表す。薄い灰色の破線は、ＩＬ－２で増殖し、培地のみで刺激された細胞を表す。濃い灰色の破線は、Ｇ－ＣＳＦで増殖し、培地のみで刺激された細胞を表す。

【０１１５】

【図３０】Ｇ－ＣＳＦまたはＩＬ－２で増殖させた後の、Ｇ２Ｒ－２キメラ受容体構築物

を発現するＣＤ４またはＣＤ８選択腫瘍関連リンパ球（ＴＡＬ）対非形質導入細胞の免疫表現型（フローサイトメトリーによる）を示すグラフを表す。Ａ）ＣＤ４＋、ＣＤ８＋、またはＣＤ３－ＣＤ５６＋細胞表面の表現型を示す生細胞の割合（％）。Ｂ）ＣＤ４５ＲＡ及びＣＣＲ７発現に基づいた、示された細胞表面の表現型を示す生細胞の割合（％）。

【０１１６】

【図３１】Ｇ２Ｒ－２を発現する初代ヒトＴ細胞対非形質導入細胞の増殖を評価するためのＢｒｄＵ取り込みアッセイの結果を示すグラフを表す。Ｔ細胞は、アッセイの前に、示されているように、ＩＬ－２またはＧ－ＣＳＦでの培養によって選択された。Ａ）腫瘍関連リンパ球；Ｂ）ＰＢＭＣ由来Ｔ細胞。

【０１１７】

【図３２】Ｇ２Ｒ－２または一本鎖Ｇ／ＩＬ－２Ｒβ（Ｇ２Ｒ－１の構成要素）を発現する初代マウスＴ細胞対モック形質導入細胞の増殖を評価するためのＢｒｄＵ取り込みアッセイの結果を示すグラフを表す。Ａ）示されたサイトカインでの培養後、Ｇ－ＣＳＦＲＥＣＤを発現する細胞の割合（フローサイトメトリーによる）で反映される形質導入効率；Ｂ）示されたサイトカインに応答したすべての生細胞におけるＢｒｄＵ取り込みの割合；Ｃ）Ｇ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤを発現する細胞（Ｇ－ＣＳＦＲ＋細胞）によるＢｒｄＵ取り込みの割合。すべての細胞を、アッセイ前にＩＬ－２で３日間増殖させた。四角形は、ＩＬ－２で刺激された細胞を表す。三角形は、Ｇ－ＣＳＦで刺激された細胞を表す。円形は、サイトカインで刺激されていない細胞を表す。

【０１１８】

【図３３】Ｇ２Ｒ－２を発現するヒト初代Ｔ細胞対非形質導入細胞における、示されたサイトカインシグナル伝達イベントを検出するためのウエスタンブロットを表す。β－アクチン、総Ａｋｔ、及びヒストンＨ３は、タンパク質ローディング対照として機能する。Ａ、Ｂ）腫瘍関連リンパ球（ＴＡＬ）；Ｃ）ＰＢＭＣ由来Ｔ細胞。

【０１１９】

【図３４】Ｇ２Ｒ－２または一本鎖Ｇ／ＩＬ－２Ｒβ（Ｇ２Ｒ－１由来）を発現する初代マウスＴ細胞対モック形質導入細胞における示されたサイトカインシグナル伝達イベントを検出するためのウエスタンブロットを表す。矢印は、特異的なｐｈｏｓｐｈｏ－ＪＡＫ２バンドを示し、他のより大きなバンドは、初代抗ｐｈｏｓｐｈｏ－ＪＡＫ２抗体とｐｈｏｓｐｈｏ－ＪＡＫ１との交差反応性の結果であると推定される。β－アクチン及びヒストンＨ３はタンパク質ローディング対照として機能する。

【０１２０】

【図３５】サイトカインなし、ＩＬ－２（３００ＩＵ／ｍＬ）、またはＷＴ　Ｇ－ＣＳＦ（３０ｎｇ／ｍＬ）、または１３０　Ｇ－ＣＳＦ（３０ｎｇ／ｍＬ）での刺激に応答して、示されたキメラ受容体を発現する３２Ｄ－ＩＬ－２Ｒβ細胞（または非形質導入細胞）の細胞周期の進行を評価するＢｒｄＵ取り込みアッセイの結果を示すグラフを表す。

【０１２１】

【図３６】サイトカインなし、ＩＬ－２、ＷＴ　Ｇ－ＣＳＦ、またはＧ－ＣＳＦバリアント１３０、３０４、もしくは３０７での刺激に応答して、示されたキメラ受容体を発現する初代マウスＴ細胞（または非形質導入細胞）の細胞周期の進行を評価するＢｒｄＵ取り込みアッセイの結果を示すグラフを表す。Ａ及びＢは、反復実験を表す。

【０１２２】

【図３７】サイトカインなし、ＩＬ－２、ＷＴ　Ｇ－ＣＳＦ、または１３０　Ｇ－ＣＳＦでの刺激に応答して、示されたキメラ受容体サブユニットを発現する３２Ｄ－ＩＬ－２Ｒβ細胞（または非形質導入細胞）における示されたサイトカインシグナル伝達イベントを検出するためのウエスタンブロットを表す。β－アクチン及びヒストンＨ３は、タンパク質ローディング対照として機能する。

【０１２３】

【図３８】Ａ）サイトカインなし、ＩＬ－２、ＷＴ　Ｇ－ＣＳＦ、１３０　Ｇ－ＣＳＦ、または３０４　Ｇ－ＣＳＦでの刺激に応答して、示されたキメラ受容体サブユニットを発

現する初代マウスＴ細胞における示されたサイトカインシグナル伝達イベントを検出するためのウエスタンブロットを表す。β－アクチン及びヒストンＨ３は、タンパク質ローディング対照として機能する。Ｂ）ヒトＧ－ＣＳＦ受容体の細胞外ドメインに特異的な抗体を用いたフローサイトメトリーによって評価された、パネルＡで使用された細胞の形質導入効率を表す。

【０１２４】

【図３９】示されたキメラ受容体構築物で形質導入された初代ヒト腫瘍関連リンパ球（ＴＡＬ）におけるフローサイトメトリーによるＧ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤ発現を示すプロットを表す。生きているＣＤ３＋、ＣＤ５６－細胞を、ＣＤ８またはＣＤ４でゲートし、Ｇ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤ発現を各集団について示す。

【０１２５】

【図４０】Ｇ２Ｒ－３を発現する初代ヒト腫瘍関連リンパ球（ＴＡＬ）対非形質導入細胞の拡大、増殖、及びシグナル伝達を示すグラフ及び画像を表す。Ａ）細胞にＧ２Ｒ－３をコードするレンチウイルスを形質導入し、洗浄した後、ＩＬ－２（３００ＩＵ／ｍｌ）、野生型Ｇ－ＣＳＦ（１００ｎｇ／ｍｌ）、またはサイトカインなしで再プレーティングした、Ｔ細胞増殖アッセイの結果を示すグラフ。生細胞は３～４日ごとに計数した。四角形は、ＩＬ－２で刺激された細胞を表す。三角形は、Ｇ－ＣＳＦで刺激された細胞を表す。円形は、サイトカインで刺激されていない細胞を表す。Ｂ）細胞内シグナル伝達イベントを評価するためのウエスタンブロット。細胞を増殖アッセイから回収し、ＩＬ－２（３００ＩＵ／ｍｌ）または野生型Ｇ－ＣＳＦ（１００ｎｇ／ｍｌ）で刺激した。矢印は、１２５ｋＤａでの特異的なｐｈｏｓｐｈｏ－ＪＡＫ２バンドを示し；より大きなバンドは、初代抗ｐｈｏｓｐｈｏ－ＪＡＫ２抗体とｐｈｏｓｐｈｏ－ＪＡＫ１との交差反応性の結果であると推定される。β－アクチン及びヒストンＨ３はタンパク質ローディング対照として機能する。Ｃ）Ｔ細胞増殖を評価するためのＢｒｄＵ取り込みアッセイの結果を示すグラフ。細胞を増殖アッセイから回収し、洗浄した後、ＩＬ－２（３００ＩＵ／ｍｌ）、野生型Ｇ－ＣＳＦ（１００ｎｇ／ｍｌ）、またはサイトカインなしにおいて再プレーティングした。

【０１２６】

【図４１】ＷＴ　ＥＣＤを有するＧ２Ｒ－３を発現する初代ヒトＰＢＭＣ由来Ｔ細胞対非形質導入細胞の倍数増殖及びＧ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤ発現を示すグラフを表す。Ａ）細胞にＧ２Ｒ－３をコードするレンチウイルスを形質導入した、Ｔ細胞増殖アッセイの結果を示すグラフ。１日目に、ＷＴ　Ｇ－ＣＳＦ（１００ｎｇ／ｍｌ）またはサイトカインなし（培地のみ）を培養液に添加した。その後、２１日目まで、細胞に、ＷＴ　Ｇ－ＣＳＦを含有するか、またはサイトカインを含まない培地を補充した。増殖の２１日目に、細胞を洗浄し、ＷＴ　Ｇ－ＣＳＦ（１００ｎｇ／ｍＬ）、ＩＬ－７（２０ｎｇ／ｍＬ）、及びＩＬ－１５（２０ｎｇ／ｍＬ）、またはサイトカインなしで再プレーティングした。生細胞は２～４日ごとに計数した。四角形は、Ｇ－ＣＳＦで刺激された細胞を表す。三角形は、Ｇ－ＣＳＦで刺激され、２１日目にＩＬ－７及びＩＬ－１５で再プレーティングされた細胞を表す。円形は、サイトカインで刺激されていない細胞を表す。菱形は、Ｇ－ＣＳＦで刺激され、２１日目に培地のみで再プレーティングされた細胞を表す。Ｂ）増殖の２１日目または４２日目に、フローサイトメトリーによって測定されたＧ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤの発現を示すグラフ。

【０１２７】

【図４２】Ｇ２Ｒ－３を発現する初代ヒトＰＢＭＣ由来Ｔ細胞対非形質導入細胞の細胞内シグナル伝達及び免疫表現型を示すグラフを表す。Ａ）細胞内シグナル伝達イベントを評価するためのウエスタンブロット。細胞を増殖アッセイから回収し、ＩＬ－２（３００ＩＵ／ｍｌ）または野生型Ｇ－ＣＳＦ（１００ｎｇ／ｍｌ）で刺激した。β－アクチンはタンパク質ローディング対照として機能する。Ｂ、Ｃ）増殖の４２日目に、Ｇ２Ｒ－３を発現する細胞対非形質導入細胞の、フローサイトメトリーによって評価された免疫表現型を示す代表的なフローサイトメトリープロット及びグラフ。

【０１２８】
【図４３】３０４または３０７　ＥＣＤを有するＧ２Ｒ－３を発現する初代ヒトＰＢＭＣ由来Ｔ細胞対非形質導入細胞の倍数増殖を示すグラフを表す。Ａ）細胞にＧ２Ｒ－３　３０４　ＥＣＤをコードするレンチウイルスを形質導入した、Ｔ細胞増殖アッセイの結果を示すグラフ。Ｂ）細胞にＧ２Ｒ－３　３０７　ＥＣＤをコードするレンチウイルスを形質導入した、Ｔ細胞増殖アッセイの結果を示すグラフ。Ｃ）非形質導入細胞を用いたＴ細胞増殖アッセイの結果を示すグラフ。２日目に、示されたように、ＩＬ－２（３００ＩＵ／ｍＬ）、３０４　Ｇ－ＣＳＦ（１００ｎｇ／ｍｌ）、３０７　Ｇ－ＣＳＦ（１００ｎｇ／ｍＬ）、またはサイトカインなし（培地のみ）を培養液に添加し、その後２日ごとに補充した。生細胞は３～４日ごとに計数した。菱形は、３０４　Ｇ－ＣＳＦで刺激された細胞を表す。四角は、３０７　Ｇ－ＣＳＦで刺激された細胞を表す。三角形は、ＩＬ－２で刺激された細胞を表す。逆三角形は、サイトカインで刺激されていない細胞を表す。
【０１２９】
【図４４】３０４または３０７　ＥＣＤを有するＧ２Ｒ－３を発現する初代ヒトＰＢＭＣ由来Ｔ細胞対非形質導入細胞の増殖を評価するためのＢｒｄＵ取り込みアッセイの結果を示すグラフを表す。細胞に、Ｇ２Ｒ－３　３０４　ＥＣＤまたは３０７　ＥＣＤをコードするレンチウイルスを形質導入し、３０４または３０７　Ｇ－ＣＳＦ（１００ｎｇ／ｍＬ）において増殖させた。非形質導入細胞は、ＩＬ－２（３００ＩＵ／ｍＬ）において増殖させた。増殖の１２日目に、細胞を洗浄し、ＩＬ－２（３００ＩＵ／ｍｌ）、１３０　Ｇ－ＣＳＦ（１００ｎｇ／ｍｌ）、３０４　Ｇ－ＣＳＦ（１００ｎｇ／ｍｌ）、３０７　Ｇ－ＣＳＦ（１００ｎｇ／ｍｌ）、またはサイトカインなしで再プレーティングした。
【０１３０】
【図４５】示されたキメラ受容体構築物で形質導入された初代マウスＴ細胞におけるフローサイトメトリーによるＧ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤ発現を示すグラフを表す。
【０１３１】
【図４６】Ｇ２１Ｒ－１またはＧ２１Ｒ－２を発現する初代ＰＢＭＣ由来ヒトＴ細胞におけるＳＴＡＴ３のＧ－ＣＳＦ誘導性リン酸化（フローサイトメトリーにより検出）を示す。細胞は、Ｇ－ＣＳＦＲ陽性（上パネル）またはＧ－ＣＳＦＲ陰性（下パネル）の集団に細分化された（すなわち、ゲートされた）。
【０１３２】
【図４７】Ｇ２１Ｒ－１またはＧ１２Ｒ－１を発現する初代マウスＴ細胞におけるＧ－ＣＳＦ誘導性生化学的シグナル伝達イベントを示すグラフ及び画像を表す。Ａ）Ｇ２１Ｒ－１で形質導入され、サイトカインなし、ＩＬ－２１、またはＧ－ＣＳＦで刺激されたＣＤ４＋またはＣＤ８＋細胞におけるＳＴＡＴ３のリン酸化を示すグラフ（フローサイトメトリーにより検出）。Ｂ）サイトカインなし（黒丸）、ＩＬ－２１（四角）、またはＷＴ　Ｇ－ＣＳＦ（灰色丸）で刺激した後、ｐｈｏｓｐｈｏ－ＳＴＡＴ３に対して陽性に染色された細胞の割合（％）を示すグラフ。生細胞は、ＣＤ８またはＣＤ４でゲートされ、ｐｈｏｓｐｈｏ－ＳＴＡＴ３陽性細胞の割合が各集団について示される。Ｃ）Ｇ２１Ｒ－１またはＧ１２Ｒ－１を発現し、ＩＬ－２１、ＩＬ－１２、またはＷＴ　Ｇ－ＣＳＦで刺激された細胞における、示されたサイトカインシグナル伝達イベントを評価するためのウエスタンブロット。β－アクチン及びヒストンＨ３は、タンパク質ローディング対照として機能する。
【０１３３】
【図４８－１】図４８は、Ｇ２Ｒ－２、Ｇ２Ｒ－３、Ｇ７Ｒ－１、Ｇ２１／７Ｒ－１、及びＧ２７／２Ｒ－１、またはモック形質導入Ｔ細胞を発現する初代マウスＴ細胞における増殖、Ｇ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤ発現、及びＷＴ　Ｇ－ＣＳＦ誘導性細胞内シグナル伝達イベントを示すグラフ及び画像を表す。Ａ，Ｂ）Ｔ細胞増殖を評価するためのＢｒｄＵ取り込みアッセイの結果を示すグラフ。細胞を回収し、洗浄した後、ＩＬ－２（３００ＩＵ／ｍｌ）、野生型Ｇ－ＣＳＦ（１００ｎｇ／ｍｌ）、またはサイトカインなしにおいて再プレーティングした。パネルＡ及びＢは、反復実験を表す。Ｃ）示されたキメラ受容体構築物

で形質導入された初代マウスＴ細胞におけるフローサイトメトリーによるＧ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤ発現を示すグラフ。Ｄ）Ｇ２Ｒ－２、Ｇ２Ｒ－３、Ｇ７Ｒ－１、Ｇ２１／７Ｒ－１及びＧ２７／２Ｒ－１を発現する細胞、またはモック形質導入Ｔ細胞における示されたサイトカインシグナル伝達イベントを評価するためのウエスタンブロット。細胞をＩＬ－２（３００ＩＵ／ｍＬ）、ＩＬ－７（１０ｎｇ／ｍＬ）、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍＬ）、ＩＬ－２７（５０ｎｇ／ｍＬ）、またはＧ－ＣＳＦ（１００ｎｇ／ｍＬ）で刺激した。β－アクチン及びヒストンＨ３はタンパク質ローディング対照として機能する。

【０１３４】

【図４８－２】図４８－１の説明を参照のこと。

【０１３５】

【図４９】Ｇ２１／２Ｒ－１、Ｇ１２／２Ｒ－１、及び２１／１２／２Ｒ－１、またはモック形質導入Ｔ細胞を発現する初代マウスＴ細胞における増殖、Ｇ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤ発現、及びＧ－ＣＳＦ誘導性生化学的シグナル伝達イベントを示すグラフ及び画像を表す。Ａ，Ｂ）Ｔ細胞増殖を評価するためのＢｒｄＵ取り込みアッセイの結果を示すグラフ。細胞を回収し、洗浄した後、ＩＬ－２（３００ＩＵ／ｍｌ）、野生型Ｇ－ＣＳＦ（１００ｎｇ／ｍｌ）、またはサイトカインなしにおいて再プレーティングした。パネルＡ及びＢは、反復実験を表す。Ｃ）示されたキメラ受容体構築物で形質導入された初代マウスＴ細胞におけるフローサイトメトリーによるＧ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤ発現を示すグラフ。Ｄ）Ｇ２１／２Ｒ－１、Ｇ１２／２Ｒ－１、及びＧ２１／１２／２Ｒ－１を発現する細胞、またはモック形質導入Ｔ細胞における示されたサイトカインシグナル伝達イベントを評価するためのウエスタンブロット。細胞をＩＬ－２（３００ＩＵ／ｍＬ）、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍＬ）、ＩＬ－１２（１０ｎｇ／ｍＬ）、またはＧ－ＣＳＦ（１００ｎｇ／ｍＬ）で刺激した。β－アクチン及びヒストンＨ３はタンパク質ローディング対照として機能する。

【０１３６】

【図５０】１３４　ＥＣＤを有するＧ１２／２Ｒ－１を発現する初代ヒトＰＢＭＣ由来Ｔ細胞対非形質導入細胞の倍数増殖とＧ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤ発現を示すグラフを表す。Ａ）細胞にＧ１２／２Ｒ－１　１３４　ＥＣＤをコードするレンチウイルスを形質導入し、ＩＬ－２（３００ＩＵ／ｍｌ）、１３０Ｇ－ＣＳＦ（１００ｎｇ／ｍｌ）、または培地で増殖した、Ｔ細胞増殖アッセイの結果を示すグラフ。生細胞は４～５日ごとに計数した。四角形は、サイトカインで刺激されていない細胞を表す。三角形は、１３０　Ｇ－ＣＳＦで刺激された細胞を表す。菱形は、ＩＬ－２で刺激された細胞を表す。Ｂ）パネルＡのように細胞が形質導入されたＴ細胞増殖アッセイの結果を示すグラフ。増殖の１９日目に、細胞を洗浄し、ＩＬ－２、１３０　Ｇ－ＣＳＦ、または培地のみで再プレーティングした。生細胞は４～５日ごとに計数した。四角形は、サイトカインで刺激されていない細胞を表す。薄い灰色の菱形は、１３０　Ｇ－ＣＳＦで刺激された細胞を表す。濃い灰色の菱形は、ＩＬ－２で刺激された細胞を表す。薄い灰色の逆三角形は、最初にＩＬ－２で刺激され、その後１９日目に、培地のみで再プレーティングした細胞を表す。濃い灰色の三角形は、最初に１３０　Ｇ－ＣＳＦで刺激され、その後１９日目に、培地のみで再プレーティングした細胞を表す。Ｃ）増殖の４日目または１６日目に、フローサイトメトリーによって測定されたＧ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤの発現を示すグラフ。

【０１３７】

【図５１】Ｇ１２／２Ｒ－１　１３４　ＥＣＤを発現する初代ヒトＰＢＭＣ由来Ｔ細胞対非形質導入細胞の増殖及び免疫表現型を示すグラフを表す。Ａ）Ｔ細胞増殖を評価するためのＢｒｄＵ取り込みアッセイの結果を示すグラフ。細胞を回収し、洗浄した後、ＩＬ－２（３００ＩＵ／ｍｌ）、ＩＬ－２＋ＩＬ－１２（それぞれ、３００ＩＵ／ｍｌと１０ｎｇ／ｍＬ）、１３０Ｇ－ＣＳＦ（３００ｎｇ／ｍｌ）、または培地のみで再プレーティングした。Ｂ、Ｃ）増殖の１６日目に、１３４　ＥＣＤを有するＧ１２／２Ｒ－１を発現する細胞対非形質導入細胞の、フローサイトメトリーによって評価された免疫表現型を示す代表的なフローサイトメトリープロット及びグラフ。

【０１３８】

【図５２】３０４　ＥＣＤを有するＧ１２／２Ｒ－１を発現する初代ヒトＰＢＭＣ由来Ｔ細胞対非形質導入細胞の倍数拡大及び増殖を示すグラフを表す。Ａ）細胞にＧ１２／２Ｒ－１　１３４　ＥＣＤをコードするレンチウイルスを形質導入し、ＩＬ－２（３００ＩＵ／ｍＬ）、１３０　Ｇ－ＣＳＦ（１００ｎｇ／ｍｌ）、３０４　Ｇ－ＣＳＦ（１００ｎｇ／ｍｌ）、または培地のみで増殖した、Ｔ細胞増殖アッセイの結果を示すグラフ。非形質導入細胞は、ＩＬ－２、１３０　Ｇ－ＣＳＦ、３０４　Ｇ－ＣＳＦ、または培地のみで培養した。生細胞は３～４日ごとに計数した。逆三角形は、サイトカインで刺激されていない細胞を表す。三角形は、ＩＬ－２で刺激された細胞を表す。丸形は、１３０　Ｇ－ＣＳＦで刺激された細胞を表す。菱形は、３０４　Ｇ－ＣＳＦで刺激された細胞を表す。Ｂ）１２日目に細胞を増殖アッセイから回収し、洗浄した後、ＩＬ－２（３００ＩＵ／ｍｌ）、１３０　Ｇ－ＣＳＦ（３００ｎｇ／ｍｌ）、３０４　Ｇ－ＣＳＦ（１００ｎｇ／ｍｌ）、３０７　Ｇ－ＣＳＦ（１００ｎｇ／ｍｌ）、または培地のみで再プレーティングした。

【０１３９】

【図５３】３０４　ＥＣＤを有するＧ２Ｒ－３、３０４ＥＣＤを有するＧ１２／２Ｒ－１、または非形質導入Ｔ細胞を発現する初代ＰＢＭＣ由来Ｔ細胞において示されたサイトカインシグナル伝達イベントを検出するためのウエスタンブロットを表す。細胞を増殖アッセイから回収し、示されているように、３０４　Ｇ－ＣＳＦ（１００ｎｇ／ｍＬ）、ＩＬ－２（３００ＩＵ／ｍＬ）、ＩＬ－２及びＩＬ－１２（１０ｎｇ／ｍＬ）、または培地のみで刺激した。黒い矢印及び右側の小さな出っ張ったパネルは、タンパク質ラダーの１１５ｋＤａ及び１４０ｋＤａでの分子量マーカーを示す。β－アクチン及びヒストンＨ３はタンパク質ローディング対照として機能する。

【０１４０】

【図５４】リフォールディングされた１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ（ＧＣＳＦ＿１３０ａ１として標識される）のサイズ排除ＵＶトレース及びクマシーブルーで染色された対応するＳＤＳ　ＰＡＧＥ純度ゲルを示す。リフォールディングされた１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦは、既知の分子量の標準と比較して、予想される量で溶出した。

【０１４１】

【図５５】（Ａ、Ｂ、Ｃ）野生型（ＷＴ）ヒトＧ－ＣＳＦＲを天然に発現するＯＣＩ－ＡＭＬ１細胞、または（Ｄ、Ｅ）ＷＴマウスＧ－ＣＳＦＲを天然に発現する３２Ｄクローン３細胞の増殖を評価するための、ＢｒｄＵ取り込みアッセイの結果を示す。細胞は以下のサイトカインで刺激された：（Ａ）ＷＴ　Ｇ－ＣＳＦまたはＧ－ＣＳＦバリアント１３０、１３０ａ１、１３０ｂ１、１３０ａ２、または１３０ｂ２；（Ｂ）ＷＴ　Ｇ－ＣＳＦもしくはＧ－ＣＳＦバリアント１３０、１３０ａ１、もしくは１３０ｂ１、または培地のみ（サイトカイン無添加）；（Ｃ）ＷＴ　Ｇ－ＣＳＦもしくはＧ－ＣＳＦバリアント１３０、１３０ａ１、もしくは１３０ａ１ｂ１、または培地のみ；（Ｄ）ＷＴ　Ｇ－ＣＳＦもしくはＧ－ＣＳＦバリアント１３０、１３０ａ１、もしくは１３０ｂ１、または培地のみ；及び（Ｅ）ＷＴ　Ｇ－ＣＳＦもしくはＧ－ＣＳＦバリアント１３０、１３０ａ１、もしくは１３０ａ１ｂ１、または培地のみ。黒塗りの四角形はＷＴ　Ｇ－ＣＳＦを表し、黒塗りの三角形は１３０　Ｇ－ＣＳＦを表し、黒塗りの逆三角形は１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦを表し、白抜きの丸形は１３０ａ２　Ｇ－ＣＳＦを表し、黒塗りの菱形は１３０ｂ１　Ｇ－ＣＳＦを表し、白抜きの四角形は１３０ｂｄ　Ｇ－ＣＳＦを表し、白抜きの菱形は１３０ａ１ｂ１　Ｇ－ＣＳＦを表す。

【０１４２】

【図５６】Ｇ１２／２Ｒ－１　１３４　ＥＣＤを発現するＰＢＭＣ由来ヒトＴ細胞の増殖を評価するためのＢｒｄＵ取り込みアッセイの結果を表す。細胞を、（Ａ）培地のみ、もしくは培地及びＩＬ－２、ＩＬ－２＋ＩＬ－１２、もしくはＧ－ＣＳＦバリアント１３０、１３０ａ１、１３０ｂ１、１３０ａ２もしくは１３０ｂ２、または（Ｂ）培地のみ、もしくは培地及びＩＬ－２、ＩＬ－２＋ＩＬ－１２もしくはＧ－ＣＳＦバリアント１３０もしくは１３０ａ１ｂ１、で刺激した。結果を、Ｇ１２／２Ｒ－１　１３４　ＥＣＤを発現するＴ細胞（すなわち、フローサイトメトリーによりＧ－ＣＳＦＲ＋であったＴ細胞）に

ついて示す。
【０１４３】
【図５７】Ｇ２Ｒ－３　１３４　ＥＣＤを発現するようにレトロウイルスによって形質導入され、次いで、確立された乳腺腫瘍（ＮＯＰ２３腫瘍株）を有する同系の免疫健常マウスに注入された腫瘍特異的ＣＤ８Ｔ細胞（Ｔｈｙ１．１＋ＯＴ－Ｉ　Ｔ細胞）を用いる養子細胞療法の安全性及び有効性を決定するための、ｉｎ　ｖｉｖｏ実験の結果を表す。Ｔ細胞注入の日（０日目）から開始して、マウスを無作為化し、ビヒクル（ｎ＝４匹の動物）または１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ（１０μｇ／用量；ｎ＝４匹の動物）で毎日１４日間、続いて１日おきに１４日間、合計２１回の用量で治療した。（Ａ）－２日目から８０日目までの腫瘍面積（長さ×幅）。各線は、個々の動物からの結果を表す。（Ｂ）－２日目から２０日目までの腫瘍面積の高解像度表示。（Ｃ）０日目から８０日目まで生存した動物の割合を示すカプラン・マイヤープロット。（Ｄ）すべてのＣＤ８＋Ｔ細胞に対するＴｈｙ１．１＋（ＯＴ－Ｉ）細胞の平均割合として示される、末梢血中のＯＴ－Ｉ　Ｔ細胞の増殖（平均＋／－ＳＥＭ）。（Ｅ）末梢血中のすべてのＣＤ４５＋細胞に対する好中球の割合（平均＋／－ＳＥＭ）。（Ｆ）末梢血中のすべてのＣＤ４５＋細胞に対する好酸球の割合（平均＋／－ＳＥＭ）。（Ｇ）末梢血中のすべてのＣＤ４５＋細胞に対する単球の割合（平均＋／－ＳＥＭ）。灰色の丸はビヒクルで治療した動物を表し、黒色の三角形は１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦで治療した動物を表す。
【０１４４】
【図５８】Ｇ１２／２Ｒ－１　１３４　ＥＣＤを発現するようにレトロウイルスによって形質導入され、次いで、確立された乳腺腫瘍（ＮＯＰ２３腫瘍株）を有する同系の免疫健常マウスに注入された腫瘍特異的ＣＤ８Ｔ細胞（Ｔｈｙ１．１＋ＯＴ－Ｉ　Ｔ細胞）を用いる養子細胞療法の安全性及び有効性を決定するための、ｉｎ　ｖｉｖｏ実験の結果を表す。Ｔ細胞注入の日（０日目）から開始して、マウスを無作為化し、ビヒクル（ｎ＝４匹の動物）または１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ（１０μｇ／用量；ｎ＝３匹の動物）で毎日１４日間、続いて１日おきに１４日間、合計２１回の用量で治療した。（Ａ）－２日目から８０日目までの腫瘍面積（長さ×幅）。各線は、個々の動物からの結果を表す。（Ｂ）－２日目から２０日目までの腫瘍面積の高解像度表示。（Ｃ）０日目から８０日目まで生存した動物の割合を示すカプラン・マイヤープロット。（Ｄ）すべてのＣＤ８＋Ｔ細胞に対するＴｈｙ１．１＋（ＯＴ－Ｉ）細胞の平均割合として示される、末梢血中のＯＴ－Ｉ　Ｔ細胞の増殖（平均＋／－ＳＥＭ）。（Ｅ）末梢血中のすべてのＣＤ４５＋細胞に対する好中球の割合（平均＋／－ＳＥＭ）。（Ｆ）末梢血中のすべてのＣＤ４５＋細胞に対する好酸球の割合（平均＋／－ＳＥＭ）。（Ｇ）末梢血中のすべてのＣＤ４５＋細胞に対する単球の割合（平均＋／－ＳＥＭ）。灰色の丸はビヒクルで治療した動物を表し、黒色の三角形は１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦで治療した動物を表す。
【０１４５】
【図５９】図４及び５に示す実験からの３つの対照群の結果を表す。腫瘍特異的ＣＤ８Ｔ細胞（Ｔｈｙ１．１＋ＯＴ－Ｉ　Ｔ細胞）は、モックレトロウイルス形質導入手順を受け、次いで、確立された乳腺腫瘍（ＮＯＰ２３腫瘍株）を有する同系の免疫健常マウスに注入された。Ｔ細胞注入の日（０日目）から開始して、マウスを無作為化して、ビヒクル（ｎ＝４匹の動物）、ＩＬ－２（３０，０００ＩＵ／用量；ｎ＝５匹の動物）、または１３０ａ１（１０μｇ／用量；ｎ＝５匹の動物）で毎日１４日間、続いて１日おきに１４日間、合計２１回の用量で治療した。（Ａ）－２日目から８０日目までの腫瘍面積（長さ×幅）。各線は、個々の動物からの結果を表す。（Ｂ）－２日目から２０日目までの腫瘍面積の高解像度表示。（Ｃ）０日目から８０日目まで生存した動物の割合を示すカプラン・マイヤープロット。（Ｄ）すべてのＣＤ８＋Ｔ細胞に対するＴｈｙ１．１＋（ＯＴ－Ｉ）細胞の平均割合として示される、末梢血中のＯＴ－Ｉ　Ｔ細胞の増殖（平均＋／－ＳＥＭ）。（Ｅ）末梢血中のすべてのＣＤ４５＋細胞に対する好中球の割合（平均＋／－ＳＥＭ）。（Ｆ）末梢血中のすべてのＣＤ４５＋細胞に対する好酸球の割合（平均＋／－ＳＥＭ）。（Ｇ）末梢血中のすべてのＣＤ４５＋細胞に対する単球の割合（平均＋／－ＳＥＭ）。

灰色の丸はビヒクルで治療した動物を表し、灰色の四角形はＩＬ－２で治療した動物を表し、黒色の三角形は１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦで治療した動物を表す。

【０１４６】

【図６０－１】図６０は、野生型サイトカイン受容体サブユニット及び追加のキメラ受容体デザインの概略図を表す。

【０１４７】

【図６０－２】図６０－１の説明を参照のこと。

【０１４８】

【図６１】Ｇ４Ｒ　１３４　ＥＣＤで形質導入されたヒトＰＢＭＣ由来ＣＤ３＋Ｔ細胞上のＧ－ＣＳＦＲ　１３４　ＥＣＤの細胞表面発現を示すフローサイトメトリーデータを表す。非形質導入Ｔ細胞は陰性対照として機能した。

【０１４９】

【図６２】（Ａ）培地のみ、または培地及びＩＬ－２、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ、もしくは１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ＋ＩＬ－２で培養した、Ｇ４Ｒ　１３４　ＥＣＤを発現するヒトＰＢＭＣ由来Ｔ細胞の増殖（細胞数の倍数変化）を示すグラフを表す。（Ｂ）培地のみ、または培地及びＩＬ－２もしくは１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ＋３０７　Ｇ－ＣＳＦで培養した非形質導入Ｔ細胞の結果。３０７　Ｇ－ＣＳＦバリアントを、この実験の別のアーム（図示せず）の対照として機能するために、この後者の条件に含めた。本発明者らは、以前に、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦも３０７　Ｇ－ＣＳＦも非形質導入Ｔ細胞の増殖を誘導しないことを証明しており、これを本明細書で確認する。菱形は、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ（パネルＡ）または１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ＋３０７　Ｇ－ＣＳＦ（パネルＢ）で培養した細胞を表す。三角形は、ＩＬ－２で培養された細胞を表す。薄灰色の円形は、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ及びＩＬ－２で培養した細胞を表す。黒色の円形は培地のみ（サイトカイン無添加）で培養した細胞を表す。

【０１５０】

【図６３】（Ｂ）非形質導入Ｔ細胞と比較した（Ａ）Ｇ４Ｒ　１３４　ＥＣＤを発現する初代ヒトＴ細胞の増殖を評価するためのＢｒｄＵ取り込みアッセイの結果を示すグラフを表す。細胞を、培地のみ、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ２＋ＩＬ－４、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ、または１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ＋ＩＬ－２で刺激した。データは、ＣＤ４＋及びＣＤ８＋Ｔ細胞のサブセットについて個別に表される。パネルＡのデータは、Ｇ４Ｒ　１３４　ＥＣＤを発現するＴ細胞でゲートされている（ヒトＧ－ＣＳＦＲに対する抗体を使用して検出された）。

【０１５１】

【図６４】Ｇ４Ｒ　１３４　ＥＣＤを発現するヒトＰＢＭＣ由来Ｔ細胞対非形質導入細胞において示された生化学的シグナル伝達イベントを検出するためのウエスタンブロットを表す。細胞を、ＩＬ－２、ＩＬ－４または１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦで刺激した。β－アクチン及びヒストンＨ３は、タンパク質ローディング対照として機能した。

【０１５２】

【図６５】Ｇ６Ｒ　１３４　ＥＣＤをコードするレンチウイルスで形質導入されたヒトＰＢＭＣ由来ＣＤ３＋Ｔ細胞上のＧ－ＣＳＦＲ　１３４　ＥＣＤの細胞表面発現を示すフローサイトメトリーデータを表す。非形質導入Ｔ細胞は陰性対照として機能した。

【０１５３】

【図６６】培地のみ、またはＩＬ－２、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ、もしくは１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ＋ＩＬ－２を含む培地の中で培養した、（Ａ）Ｇ６Ｒ　１３４　ＥＣＤを発現するヒトＰＢＭＣ由来Ｔ細胞または（Ｂ）非形質導入Ｔ細胞の増殖（細胞数の倍数変化）を示すグラフを表す。菱形は、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦで刺激された細胞を表す。三角形は、ＩＬ－２で刺激された細胞を表す。薄灰色の円形は、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ＋ＩＬ－２で刺激された細胞を表す。黒色の円形は培地のみ（サイトカイン無添加）で刺激された細胞を表す。

【０１５４】

【図６７】（Ｂ）非形質導入Ｔ細胞と比較した（Ａ）Ｇ６Ｒ　１３４　ＥＣＤを発現するＰＢＭＣ由来ヒトＴ細胞の増殖を評価するためのＢｒｄＵ取り込みアッセイの結果を示すグラフを表す。細胞を、培地のみ、または培地及びＩＬ－２、ＩＬ－６、ＩＬ２＋ＩＬ－６、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ、もしくは１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ＋ＩＬ－２で刺激した。データは、ＣＤ４＋及びＣＤ８＋Ｔ細胞のサブセットについて個別に示される。パネルＡのデータは、Ｇ４Ｒ　１３４　ＥＣＤを発現するＴ細胞でゲートされた（ヒトＧ－ＣＳＦＲに対する抗体を使用して検出された）。

【０１５５】

【図６８】Ｇ６Ｒ　１３４　ＥＣＤを発現するヒトＰＢＭＣ由来Ｔ細胞対非形質導入細胞において示された生化学的シグナル伝達イベントを検出するためのウエスタンブロットを表す。細胞を、ＩＬ－２、ＩＬ－６または１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦで刺激した。ヒストンＨ３はタンパク質ローディング対照として機能した。Ｐ－ＳＴＡＴ３の画像上では、ＩＬ－２刺激条件下（特に非形質導入Ｔ細胞中の）で暗色の高分子バンドが現れることに留意されたい。これは、ｐｈｏｓｐｈｏ－ＳＴＡＴ５抗体を使用したこの膜の以前のプロービングからの残留シグナルである。低分子量バンド（矢印）はｐｈｏｓｐｈｏ－ＳＴＡＴ３を表す。

【０１５６】

【図６９】ＧＥＰＯＲ　１３４　ＥＣＤで形質導入されたヒトＰＢＭＣ由来ＣＤ３＋Ｔ細胞上のＧ－ＣＳＦＲ　１３４　ＥＣＤの細胞表面発現を示すフローサイトメトリーデータを表す。非形質導入Ｔ細胞は陰性対照として機能した。

【０１５７】

【図７０】培地のみ、またはＩＬ－２、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ、もしくは１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ＋ＩＬ－２を含む培地の中で培養した、（Ａ）ＧＥＰＯＲ　１３４　ＥＣＤを発現する初代ヒトＰＢＭＣ由来Ｔ細胞または（Ｂ）非形質導入Ｔ細胞の増殖（細胞数の倍数変化）を示すグラフを表す。非形質導入Ｔ細胞に対しては、３０７　Ｇ－ＣＳＦを、この実験の別のアーム（図示せず）の対照として機能するために、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ条件に加えた。本発明者らは、以前に、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦも３０７　Ｇ－ＣＳＦも非形質導入Ｔ細胞の増殖を誘導しないことを証明しており、これを本明細書で確認する。菱形は、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ＋／－３０７　Ｇ－ＣＳＦ中で培養された細胞を表す。三角形は、ＩＬ－２中で培養された細胞を表す。薄灰色の円形は、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ＋ＩＬ－２中で培養された細胞を表す。黒色の円形は、培地のみの中で培養された細胞を表す。

【０１５８】

【図７１】ＧＥＰＯＲ　１３４　ＥＣＤを発現するヒトＰＢＭＣ由来Ｔ細胞対非形質導入細胞において示された生化学的シグナル伝達イベントを検出するためのウエスタンブロットを表す。細胞を、培地のみ、または培地及びＩＬ－２もしくは１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦで刺激した。β－アクチン及びヒストンＨ３は、タンパク質ローディング対照として機能した。

【０１５９】

【図７２】ＧＩＦＮＡＲ　１３４　ＥＣＤで形質導入されたヒトＰＢＭＣ由来ＣＤ３＋Ｔ細胞上のＧ－ＣＳＦＲ　１３４　ＥＣＤの細胞表面発現を示すフローサイトメトリーデータを表す。非形質導入Ｔ細胞は陰性対照として機能した。

【０１６０】

【図７３】（Ａ）非形質導入であったか、または（Ｂ）ＧＩＦＮＡＲ　１３４　ＥＣＤを発現するように形質導入され、培地のみ、またはＩＬ－２、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ、もしくは１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ＋ＩＬ－２を含む培地の中で培養された、初代ヒトＰＢＭＣ由来Ｔ細胞の増殖（細胞数の倍数変化）を示すグラフを表す。菱形は、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ中で培養された細胞を表す。三角形は、ＩＬ－２中で培養された細胞を表す。薄灰色の円形は、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ＋ＩＬ－２中で培養された細胞を表す。黒色の円形は、培地のみの中で培養された細胞を表す。

【０１６１】
【図７４】ＧＩＦＮＡＲ　１３４　ＥＣＤを発現するヒトＰＢＭＣ由来Ｔ細胞対非形質導入細胞において示された生化学的シグナル伝達イベントを検出するためのウエスタンブロットを表す。細胞を、培地のみ、または培地及びＩＬ－２、ＩＦＮａ、もしくは１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦで刺激した。β－アクチン及びヒストンＨ３は、タンパク質ローディング対照として機能した。
【０１６２】
【図７５】（Ａ）ＧＩＦＮＧＲ－１　３０７　ＥＣＤ、（Ｂ）Ｇ２Ｒ３　１３４　ＥＣＤ、（Ｃ）ＧＩＦＮＧＲ－１　３０７　ＥＣＤ、及びＧ２Ｒ３　１３４　ＥＣＤ、または（Ｄ）非形質導入Ｔ細胞で形質導入されたヒトＰＢＭＣ由来Ｔ細胞の表面におけるＭｙｃタグ及びＦｌａｇタグの発現を示すフローサイトメトリーデータを表す。Ｇ２Ｒ３　１３４　ＥＣＤは、そのＮ末端にＭｙｃエピトープをタグ付けされ（ＥＱＫＬＩＳＥＥＤＬ）、ＧＩＦＮＧＲ－１　３０７　ＥＣＤは、そのＮ末端にＦｌａｇエピトープをタグ付けされ（ＤＹＫＤＤＤＤＫ）、これらのエピトープタグは、フローサイトメトリーによる検出を補助し、受容体の機能には影響を与えない。ＣＤ３＋細胞でプロットをゲートした。
【０１６３】
【図７６】（Ａ）ＧＩＦＮＧＲ－２　３０７　ＥＣＤ、（Ｂ）Ｇ２Ｒ３　１３４　ＥＣＤ、（Ｃ）ＧＩＦＮＧＲ－２　３０７　ＥＣＤ、及びＧ２Ｒ３　１３４　ＥＣＤ、または（Ｄ）非形質導入Ｔ細胞で形質導入されたヒトＰＢＭＣ由来Ｔ細胞の表面におけるＭｙｃタグ及びＦｌａｇタグの発現を示すフローサイトメトリーデータを表す。Ｇ２Ｒ３　１３４　ＥＣＤは、そのＮ末端にＭｙｃエピトープをタグ付けされ（ＥＱＫＬＩＳＥＥＤＬ）、ＧＩＦＮＧＲ－２　３０７　ＥＣＤは、そのＮ末端にＦｌａｇエピトープをタグ付けされ（ＤＹＫＤＤＤＤＫ）、これらのエピトープタグは、フローサイトメトリーによる検出を補助し、受容体の機能には影響を与えない。ＣＤ３＋細胞でプロットをゲートした。
【０１６４】
【図７７】（Ａ）非形質導入であるか、（Ｂ）ＧＩＦＮＧＲ－１　３０７　ＥＣＤを発現するように形質導入されたか、または（Ｃ）ＧＩＦＮＧＲ－１　３０７　ＥＣＤ及びＧ２Ｒ－３　１３４　ＥＣＤを発現するように共形質導入された、初代ヒトＰＢＭＣ由来Ｔ細胞の増殖（細胞数の倍数変化）を示すグラフを表す。Ｔ細胞を、培地のみ、またはＩＬ－２、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ及び３０７　Ｇ－ＣＳＦの指定された組み合わせを含む培地の中で培養した。菱形及び薄灰色の円形は、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ、３０７　Ｇ－ＣＳＦ、及びＩＬ－２の示された組み合わせで培養された細胞を表す。三角形は、ＩＬ－２中で培養された細胞を表す。黒色の円形は、培地のみの中で培養された細胞を表す。
【０１６５】
【図７８】（Ａ）非形質導入であるか、（Ｂ）ＧＩＦＮＧＲ－２　３０７　ＥＣＤを発現するように形質導入されたか、または（Ｃ）ＧＩＦＮＧＲ－２　３０７　ＥＣＤ及びＧ２Ｒ－３　１３４　ＥＣＤを発現するように共形質導入された、初代ヒトＰＢＭＣ由来Ｔ細胞の増殖（細胞数の倍数変化）を示すグラフを表す。Ｔ細胞を、培地のみ、またはＩＬ－２、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ及び３０７　Ｇ－ＣＳＦの指定された組み合わせを含む培地の中で培養した。菱形及び薄灰色の円形は、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ、３０７　Ｇ－ＣＳＦ、及びＩＬ－２の示された組み合わせで培養された細胞を表す。三角形は、ＩＬ－２中で培養された細胞を表す。黒色の円形は、培地のみの中で培養された細胞を表す。
【０１６６】
【図７９】Ｇ２Ｒ－３　１３４　ＥＣＤ及び／またはＧＩＦＮＧＲ－１　３０７　ＥＣＤを発現するヒトＰＢＭＣ由来Ｔ細胞の増殖を評価するためのＢｒｄＵ取り込みアッセイの結果を示すグラフを表す。データは、示されたキメラ受容体を発現する（Ａ）非形質導入Ｔ細胞または（Ｂ）ＣＤ４＋及び（Ｃ）ＣＤ８＋Ｔ細胞について示されている（Ｘ軸を参照）。細胞を、ＩＬ－２、ＩＦＮｇ、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ、３０７　Ｇ－ＣＳＦの示された組み合わせ、または培地のみで刺激した。
【０１６７】

【図８０】Ｇ２Ｒ－３　１３４　ＥＣＤ及び／またはＧＩＦＮＧＲ－２　３０７　ＥＣＤを発現するヒトＰＢＭＣ由来Ｔ細胞の増殖を評価するためのＢｒｄＵ取り込みアッセイの結果を示すグラフを表す。データは、示されたキメラ受容体を発現する（Ａ）非形質導入Ｔ細胞または（Ｂ）ＣＤ４＋及び（Ｃ）ＣＤ８＋Ｔ細胞について示されている（Ｘ軸を参照）。細胞を、ＩＬ－２、ＩＦＮｇ、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ、３０７　Ｇ－ＣＳＦの示された組み合わせ、または培地のみで刺激した。

【０１６８】

【図８１】ＧＩＦＮＧＲ－１　３０７　ＥＣＤまたはＧＩＦＮＧＲ－２　３０７　ＥＣＤを発現するヒトＰＢＭＣ由来Ｔ細胞対非形質導入細胞において示された生化学的シグナル伝達イベントを検出するためのウエスタンブロットを表す。細胞を、培地のみ、または培地及びＩＬ－２、ＩＦＮγ、もしくは３０７　Ｇ－ＣＳＦで刺激した。β－アクチン及びヒストンＨ３は、タンパク質ローディング対照として機能した。

【０１６９】

【図８２】以下のモノシストロン性またはバイシストロン性レンチウイルス構築物で形質導入されたヒトＰＢＭＣ由来ＣＤ３＋Ｔ細胞上のＧ２Ｒ－３　１３４　ＥＣＤ及びメソテリン特異的ＣＡＲの細胞表面発現を示すフローサイトメトリーデータを表す：（Ａ）非形質導入Ｔ細胞（陰性対照）、（Ｂ）メソテリンＣＡＲのみ、（Ｃ）Ｇ２Ｒ－３　１３４　ＥＣＤのみ、（Ｄ）ＣＡＲ＿Ｔ２Ａ＿Ｇ２Ｒ－３－１３４　ＥＣＤ（メソテリンＣＡＲ、Ｔ２Ａ部位、及びＧ２Ｒ－３　１３４　ＥＣＤの順番で遺伝子断片を有する）、及び（Ｅ）Ｇ２Ｒ－３－１３４　ＥＣＤ＿Ｔ２Ａ＿ＣＡＲ（メソテリンＣＡＲ、Ｔ２Ａ部位、及びＧ２Ｒ－３　１３４　ＥＣＤの順番で遺伝子断片を有する）。

【０１７０】

【図８３】以下のモノシストロン性またはバイシストロン性レンチウイルス構築物で形質導入されたヒトＰＢＭＣ由来ＣＤ３＋Ｔ細胞上のＧ１２／２Ｒ－１　１３４　ＥＣＤ及びメソテリン特異的ＣＡＲの細胞表面発現を示すフローサイトメトリーデータを表す：（Ａ）非形質導入Ｔ細胞（陰性対照）、（Ｂ）メソテリンＣＡＲのみ、（Ｃ）Ｇ２Ｒ－３　１３４　ＥＣＤのみ、（Ｄ）ＣＡＲ＿Ｔ２Ａ＿Ｇ１２／２Ｒ－１－１３４　ＥＣＤ（メソテリンＣＡＲ、Ｔ２Ａ部位、及びＧ１２／２Ｒ－１　１３４　ＥＣＤの順番で遺伝子断片を有する）、及び（Ｅ）Ｇ１２／２Ｒ－１－１３４　ＥＣＤ＿Ｔ２Ａ＿ＣＡＲ（メソテリンＣＡＲ、Ｔ２Ａ部位、及びＧ１２／２Ｒ－１　１３４　ＥＣＤの順番で遺伝子断片を有する）。

【０１７１】

【図８４】以下のように修飾されたＰＢＭＣ由来ヒトＴ細胞の増殖を評価するためのＢｒｄＵ取り込みアッセイの結果を表す。（Ａ）非形質導入であるか、もしくはメソテリンＣＡＲのみを発現する、または（Ｂ）Ｇ２Ｒ３　１３４　ＥＣＤ、もしくはバイシストロン性ＣＡＲ＿Ｔ２Ａ＿Ｇ２Ｒ３－１３４　ＥＣＤ、もしくはバイシストロン性ＣＡＲ＿Ｔ２Ａ＿Ｇ１２／２Ｒ－１－１３４　ＥＣＤ、もしくはバイシストロン性Ｇ１２／２Ｒ－１－１３４ＥＣＤ＿Ｔ２Ａ＿ＣＡＲ構築物を発現する。細胞を、培地のみ、または培地及びＩＬ－２もしくは１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦで刺激した。パネルＢの結果は、フローサイトメトリーによるＧ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤ発現に陽性のＴ細胞について示される。

【０１７２】

【図８５－１】図８５は、以下を発現するＰＢＭＣ由来ヒトＣＤ４＋Ｔ細胞におけるメソテリンＣＡＲの機能的特性を評価するためのｉｎ　ｖｉｔｒｏ共培養アッセイの結果を示す：（Ａ）メソテリンＣＡＲのみ、（Ｂ）Ｇ１２／２Ｒ－１　１３４　ＥＣＤのみ、または、メソテリンＣＡＲを含有する以下のバイシストロン性構築物：（Ｃ）ＣＡＲ＿Ｔ２Ａ＿Ｇ２Ｒ３－１３４　ＥＣＤ、（Ｄ）Ｇ２Ｒ３－１３４　ＥＣＤ＿Ｔ２Ａ＿ＣＡＲ、（Ｅ）ＣＡＲ＿Ｔ２Ａ＿Ｇ１２／２Ｒ－１－１３４　ＥＣＤ、もしくは（Ｆ）Ｇ１２／２Ｒ－１－１３４ＥＣＤ＿Ｔ２Ａ＿ＣＡＲ。細胞を刺激しないままで放置するか、またはＯＶＣＡＲ３細胞で１３時間刺激した後に、細胞内フローサイトメトリーでサイトカインＩＦＮγ、ＴＮＦα、及びＩＬ－２、ならびに表面分子ＣＤ６９及びＣＤ１３７の発現を検出し

た。パネルＡ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、及びＦの結果は、メソテリンＣＡＲを発現する細胞でゲートされている。

【０１７３】

【図８５－２】図８５－１の説明を参照のこと。

【０１７４】

【図８６】ＩＬ－７Ｒα、ＩＬ－２Ｒβ、ｇｐ１３０、ＩＬ－２１Ｒ、ＩＬ－１２Ｒβ２及びＩＬ－４Ｒαを含む天然サイトカイン受容体の概略図である。

【０１７５】

【図８７－１】図８７は、７／２Ｒ－１、７／２Ｒ－２、７／２／１２Ｒ－１、７／２／１２Ｒ－２、７／２１Ｒ－１、７／２１Ｒ－２、７／７／２１Ｒ－１、７／７／２１Ｒ－２、７／２／２１Ｒ－１、７／２／２１Ｒ－２７／２／１２／２１Ｒ－１、７／２／１２／２１Ｒ－２、７／２／１２／２１Ｒ－３、７／２／１２／２１Ｒ－４、７／４Ｒ－１、７／４Ｒ－２、７／６Ｒ－１、及び７／６Ｒ－２受容体サブユニットデザインの概略図である。

【０１７６】

【図８７－２】図８７－１の説明を参照のこと。

【０１７７】

【図８８】（Ａ）７／２Ｒ－１で形質導入された初代ヒトＰＢＭＣ由来Ｔ細胞、（Ｂ）非形質導入Ｔ細胞、または（Ｃ）７／２Ｒ－１で形質導入されたが、蛍光マイナスワン（ＦＭＯ）対照として染色された（すなわち、ＣＤ１２７に対する抗体が抗体染色パネルから除外された）Ｔ細胞中でのフローサイトメトリーによって評価された、ヒトＣＤ１２７（ＩＬ－７Ｒα）及びＦｌａｇタグ発現を示すグラフを表す。７／２Ｒ－１は、そのＮ末端にＦｌａｇエピトープをタグ付けされ、このエピトープタグは、フローサイトメトリーによる検出を補助し、受容体の機能には影響を与えない。レンチウイルス形質導入の１２日後に受容体の発現を分析した。

【０１７８】

【図８９】（Ｂ）非形質導入Ｔ細胞と比較した（Ａ）７／２Ｒ－１を発現し、ＩＬ－７、ＩＬ－７＋ＩＬ－１５、またはサイトカインなしで培養された初代ヒトＰＢＭＣ由来Ｔ細胞の増殖（細胞数の倍数変化）を示すグラフを表す。菱形は、ＩＬ－７で刺激された細胞を表す。三角形は、ＩＬ－７及びＩＬ－１５で刺激された細胞を表す。円形は培地のみ（サイトカイン無添加）で培養した細胞を表す。

【０１７９】

【図９０】（Ｂ）非形質導入Ｔ細胞と比較した（Ａ）７／２Ｒ－１を発現する初代ヒトＴ細胞の増殖を評価するためのＢｒｄＵ取り込みアッセイの結果を示すグラフを表す。細胞をＩＬ－７、ＩＬ－２、ＩＬ－２＋ＩＬ－７、または培地のみ（サイトカイン無添加）で刺激した。結果は、ＣＤ４＋及びＣＤ８＋Ｔ細胞のサブセットについて個別に示される。

【０１８０】

【図９１】７／２Ｒ－１を発現するヒト初代Ｔ細胞対非形質導入Ｔ細胞における、示されたサイトカインシグナル伝達イベントを検出するためのウエスタンブロットを表す。β－アクチン及びヒストンＨ３は、タンパク質ローディング対照として機能する。細胞をＩＬ－７、ＩＬ－２、ＩＬ－２＋ＩＬ－７、または培地のみ（サイトカイン無添加）で刺激した。

【０１８１】

【図９２】未修飾の１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ、ならびにＰＥＧ化形態の１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ（ＰＥＧ２０ｋ＿Ｇ－ＣＳＦ＿１３０ａ１）及び３０７　Ｇ－ＣＳＦ（ＰＥＧ２０ｋ＿Ｇ－ＣＳＦ＿３０７）を検出するためのＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルを表す。ゲルをクマシーブリリアントブルーで染色した。

【０１８２】

【図９３】Ｇ４Ｒ　１３４　ＥＣＤを発現するようにレトロウイルスによって形質導入され、次いで、確立された乳腺腫瘍（ＮＯＰ２３腫瘍株）を有する同系の免疫健常マウスに

注入された腫瘍特異的ＣＤ８Ｔ細胞（Ｔｈｙ１．１＋ＯＴ－Ｉ　Ｔ細胞）を用いる養子細胞療法の安全性及び有効性を決定するための、ｉｎ　ｖｉｖｏ実験の結果を表す。Ｔ細胞注入の日（０日目）から開始して、マウスを無作為化し、ビヒクル（ｎ＝３匹の動物）または１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ（１０μｇ／用量；ｎ＝３匹の動物）で毎日１４日間、続いて１日おきに１４日間、合計２１回の用量で治療した。（Ａ）０日目から４６日目までの腫瘍面積（長さ×幅）。各線は、個々の動物からの結果を表す。（Ｂ）すべてのＣＤ８＋Ｔ細胞に対するＴｈｙ１．１＋（ＯＴ－Ｉ）細胞の平均パーセンテージとして示される、末梢血中のＯＴ－Ｉ　Ｔ細胞の増殖（平均＋／－標準偏差［ＳＤ］）。（Ｃ）Ｔエフェクターメモリー（Ｔｅｍ；ＣＤ４４＋ＣＤ６２Ｌ－）表現型を示すＯＴ－Ｉ　Ｔ細胞（Ｔｈｙ１．１＋）の割合（平均＋／－ＳＤ）。（Ｄ）Ｔｅｍ表現型を示す宿主（Ｔｈｙ１．１－）ＣＤ８＋Ｔ細胞の割合（平均＋／－ＳＤ）。（Ｅ）プログラム死－１（ＰＤ－１）を発現する　ＯＴ－Ｉ　Ｔ細胞（Ｔｈｙ１．１＋）の割合（平均＋／－ＳＤ）。（Ｆ）ＰＤ－１を発現する宿主（Ｔｈｙ１．１－）ＣＤ８＋Ｔ細胞の割合（平均＋／－ＳＤ）。（Ｇ）末梢血中のすべてのＣＤ４５＋細胞に対する宿主（Ｔｈｙ１．１－）ＣＤ３＋Ｔ細胞の割合（平均＋／－ＳＤ）。（Ｈ）末梢血中のすべてのＣＤ４５＋細胞に対する宿主（Ｔｈｙ１．１－）ＣＤ１９＋Ｂ細胞の割合（平均＋／－ＳＤ）。灰色の丸はビヒクルで治療した動物を表し、黒色の三角形は１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦで治療した動物を表す。

【０１８３】

【図９４】Ｇ－ＣＳＦのＰＥＧ化バージョンと非ＰＥＧ化バージョンと（野生型、１３０ａ１及び３０７）を、Ｇ２Ｒ－３　１３４　ＥＣＤまたは天然Ｇ－ＣＳＦ受容体を発現する細胞の増殖を刺激する能力に関して比較するためのｉｎ　ｖｉｔｒｏ実験の結果を示す。データは、２つのウェルの平均値と標準偏差として表される。（Ａ）Ｇ２Ｒ－３　１３４　ＥＣＤを発現するヒトＰＢＭＣ由来ＣＤ４及びＣＤ８　Ｔ細胞を、指定されるサイトカイン：ヒトＩＬ－２（Ｐｒｏｌｅｕｋｉｎ、３００ＩＵ／ｍｌ、陽性対照）、培地のみ（陰性対照）、または指定される濃度の野生型Ｇ－ＣＳＦ、ＰＥＧ化野生型Ｇ－ＣＳＦ、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ、もしくはＰＥＧ化１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦで刺激した。細胞を、４８時間培養し、ＢｒｄＵ取り込みアッセイによって評価した。結果を、ヒトＧ－ＣＳＦＲに陽性であったＴ細胞に関して示す。（Ｂ）同様の実験を、野生型ヒトＧ－ＣＳＦ受容体を自然に発現するヒト骨髄細胞株ＯＣＩ－ＡＭＬ－１を使用して実行した。細胞を、指定されるサイトカイン：ヒトＧＭ－ＣＳＦ（２０ｎｇ／ｍｌ、陽性対照）、培地のみ（陰性対照）、または指定された濃度の野生型Ｇ－ＣＳＦ、ＰＥＧ化野生型Ｇ－ＣＳＦ、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ、ＰＥＧ化１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ、３０７　Ｇ－ＣＳＦ、もしくはＰＥＧ化３０７　Ｇ－ＣＳＦで刺激した。細胞を、４８時間培養し、ＢｒｄＵ取り込みアッセイによって評価した。

【０１８４】

【図９５】１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦのＰＥＧ化バージョン対非ＰＥＧ化バージョンの、Ｇ２Ｒ－３　１３４　ＥＣＤを発現するヒトＰＢＭＣ由来Ｔ細胞中で示された生化学的シグナル伝達イベントを誘発する能力を比較する、ｉｎ　ｖｉｔｒｏウエスタンブロット実験の結果を表す。Ｔ細胞を、ヒトＩＬ－２（Ｐｒｏｌｅｕｋｉｎ、３００ＩＵ／ｍｌ）、または示された濃度（ｎｇ／ｍｌ）の１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦの非ＰＥＧ化もしくはＰＥＧ化（ＰＥＧ）バージョンで２０分間刺激した。ヒストンＨ３及び合計Ｓ６は、ゲルローディング対照として機能する。

【０１８５】

【図９６】毎日、３日毎、または毎週の間隔で与えられた１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦのＰＥＧ化（ＰＥＧ）対非ＰＥＧ化バージョンの効力を比較するｉｎ　ｖｉｖｏ実験の結果を表す。腫瘍特異的ＣＤ８Ｔ細胞（Ｔｈｙ１．１＋ＯＴ－Ｉ　Ｔ細胞）は、Ｇ２Ｒ－３　１３４　ＥＣＤを発現するようにレトロウイルスによって形質導入され、次いで、確立された乳腺腫瘍（ＮＯＰ２３腫瘍株）を有する同系の免疫健常マウスに注入された。腫瘍サイズ（長さ×幅）が、４６日間にわたってプロットされる。各線は、個々の動物からの結果を表す。右パネルは、左パネルの拡張バージョンである。Ｔ細胞注入の日（０日目）から開

始して、マウスを無作為化し、示されるようにビヒクル、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ、またはＰＥＧ－１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦで治療した。（Ａ、Ｂ）「毎日」投与コホートは、指定されたサイトカイン（またはビヒクル）を、毎日１４日間、続いて１日おきに１４日間、合計で２１用量投与された。（Ｃ、Ｄ）「３日毎」投与コホートは、指定されたサイトカインを３日毎に合計で９用量投与された。（Ｅ、Ｆ）「毎週」投与コホートは、指定されたサイトカインを７日毎に合計で４用量投与された。

【０１８６】

【図９７】図９６に示される実験からの指定された時点における末梢血中のＯＴ－Ｉ　Ｔ細胞の増殖及びエフェクターメモリー（Ｔｅｍ）表現型を示す。左パネルは、すべてのＣＤ８＋Ｔ細胞に対するＴｈｙ１．１＋（ＯＴ－Ｉ）Ｔ細胞の割合を示す（平均＋／－ＳＤ）。右パネルは、Ｔｅｍ（ＣＤ４４＋ＣＤ６２Ｌ－）表現型を有するＴｈｙ１．１＋（ＯＴ－Ｉ）Ｔ細胞の割合を示す（（平均＋／－ＳＤ））。（Ａ、Ｄ）「毎日」投与コホート。（Ｂ、Ｅ）「３日毎」投与コホート。（Ｃ、Ｆ）「毎週」投与コホート。

【０１８７】

【図９８】図１０２及び１０３に示される実験からの「３日毎」コホートからの、指定された時点における、末梢血中の指定された免疫細胞サブセットの割合（すべてのＣＤ４５＋細胞と比較した）を示す。平均値及び標準偏差がプロットされる。（Ａ）好中球（ＣＤ３－、ＣＤ１９－、ＮＫ１．１－、ＣＤ１１ｂ＋、ＣＤ１１ｃ－、Ｌｙ６Ｇ＋）。（Ｂ）単球（ＣＤ３－、ＣＤ１９－、ＮＫ１．１－、ＣＤ１１ｂ＋、ＣＤ１１ｃ－、Ｌｙ６Ｇ－、ＳＳＣ－ｌｏｗ（Ｌｙ６Ｃ＋またはＬｙ６Ｃ－））。（Ｃ）好酸球（ＣＤ３－、ＣＤ１９－、ＮＫ１．１－、ＣＤ１１ｂ＋、ＣＤ１１ｃ－、Ｌｙ６Ｇ－、ＳＳＣ－ｈｉｇｈ）。（Ｄ）ＣＤ３＋Ｔ細胞。（Ｅ）ＣＤ１９＋Ｂ細胞。（Ｆ）ＮＫ１．１＋ナチュラルキラー細胞。

【０１８８】

【図９９】ＩＬ－１８制御パラクリンシグナル伝達（ＣＰＳ）実験からのｉｎ　ｖｉｔｒｏデータを示す。ヒトＰＢＭＣ由来Ｔ細胞に、メソテリン特異的ＣＡＲ、Ｔ２Ａ部位、及びＧ１２／２Ｒ－１　１３４　ＥＣＤ（Ｍｅｓｏ　ＣＡＲ＿Ｇ１２／２Ｒ－１）をコードするバイシストロン性ベクター、またはメソテリン特異的ＣＡＲ、Ｔ２Ａ部位、Ｇ１２／２Ｒ－１　１３４　ＥＣＤ、及びヒトＩＬ－１８（Ｍｅｓｏ　ＣＡＲ＿Ｇ１２／２Ｒ－１＋ｈ１８）をコードするトリシストロン性ベクターのいずれかを形質導入した。（Ａ）Ｔ細胞を、メソテリンＣＡＲ（Ｘ軸）及びＧ１２／２Ｒ－１　１３４　ＥＣＤ（Ｙ軸）の発現に関してフローサイトメトリーによって評価した。（Ｂ）ｉｎ　ｖｉｔｒｏのＢｒｄＵアッセイを用いて、培地のみ、ヒトＩＬ－２（Ｐｒｏｌｅｕｋｉｎ、３００ＩＵ／ｍｌ）、ヒトＩＬ－１８（１００ｎｇ／ｍｌ）、ヒトＩＬ－２＋ヒトＩＬ－１２（２０ｎｇ／ｍｌ）、ＩＬ－２＋ＩＬ－１２＋ＩＬ－１８、または１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ（１００ｎｇ／ｍｌ）に応答したＴ細胞の増殖を評価した。（Ｃ）ＥＬＩＳＡを使用して、培地のみ、ヒトＩＬ－２（Ｐｒｏｌｅｕｋｉｎ、３００ＩＵ／ｍｌ）＋ヒトＩＬ－１２（２０ｎｇ／ｍｌ）、または１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ（１００ｎｇ／ｍｌ）で４８時間刺激されたＴ細胞由来の培養上清中のヒトＩＬ－１８のレベルを評価した。

【０１８９】

【図１００】マウスＴ細胞を用いたｉｎ　ｖｉｔｒｏのＩＬ－１８　ＣＰＳ実験の結果を示す。マウスＣＤ４及びＣＤ８　Ｔ細胞を、Ｇ１２／２Ｒ－１　１３４　ＥＣＤをコードするモノシストロン性ベクター、またはＧ１２／２Ｒ　１３４　ＥＣＤ、Ｔ２Ａ部位、及びマウスＩＬ－１８（Ｇ１２／２Ｒ－１　１３４　ＥＣＤ＋ｍ１８）をコードするバイシストロン性ベクターのいずれかで形質導入した。（Ａ）Ｔ細胞を、Ｇ１２／２Ｒ－１　１３４　ＥＣＤの発現に関してフローサイトメトリーによって評価した。（Ｂ）ｉｎ　ｖｉｔｒｏのＢｒｄＵアッセイを用いて、培地のみ、ヒトＩＬ－２（Ｐｒｏｌｅｕｋｉｎ、３００ＩＵ／ｍｌ）、マウスＩＬ－１８（１００ｎｇ／ｍｌ）、ヒトＩＬ－２＋マウスＩＬ－１２（１０ｎｇ／ｍｌ）、ＩＬ－２＋ＩＬ－１２＋ＩＬ－１８、または１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ（１００ｎｇ／ｍｌ）に応答したＴ細胞の増殖を評価した。（Ｃ）ＥＬＩＳＡを

使用して、培地のみ、ヒトＩＬ－２（Ｐｒｏｌｅｕｋｉｎ、３００ＩＵ／ｍｌ）＋マウスＩＬ－１２（１０ｎｇ／ｍｌ）、または１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ（１００ｎｇ／ｍｌ）で４８時間刺激されたＴ細胞由来の培養上清中のマウスＩＬ－１８のレベルを評価した。

【０１９０】

【図１０１】マウスＯＴ－Ｉ　Ｔ細胞を用いたｉｎ　ｖｉｔｒｏのＩＬ－１８　ＣＰＳ実験の結果を示す。ＯＴ－Ｉ　Ｔ細胞に、Ｇ２Ｒ－２　１３４　ＥＣＤ、Ｇ２Ｒ－３　１３４　ＥＣＤ、Ｇ１２／２Ｒ－１　１３４　ＥＣＤ、またはＧ１２／２Ｒ－１　１３４　ＥＣＤ＋ｍ１８（図面ではＧ１２／２Ｒ／１８Ｃと略記されている）をコードするレトロウイルスベクターを形質導入した。分泌されたサイトカインを検出するために、５日後にＴ細胞を洗浄し、培地のみ（陰性対照）、またはヒトＩＬ－２（Ｐｒｏｌｅｕｋｉｎ　３００ＩＵ／ｍｌ）、ヒトＩＬ－２＋マウスＩＬ－１２（１０ｎｇ／ｍｌ）、もしくはＰＥＧ化（Ｐｅｇ）１３０ａ１（１００ｎｇ／ｍｌ）を含む培地の中で４８時間培養した後にマルチプレックスアッセイを行い、３２個のサイトカインを検出した。（Ａ）マウスＩＬ－１８及び（Ｂ）マウスＩＦＮ－ガンマの結果を示す。他のサイトカインの結果を表３５に示す。

【０１９１】

【図１０２】ＮＯＰ２３乳腺腫瘍モデルのＯＴ－Ｉ　Ｔ細胞におけるＧ７Ｒ－１、Ｇ２Ｒ－２、Ｇ１２／２Ｒ－１、及びＧ１２／２Ｒ－１＋ｍ１８（Ｇ１２／２Ｒ／１８Ｃと略記される）（すべて１３４　ＥＣＤを含む）の特性を比較した、ｉｎ　ｖｉｖｏ実験の結果を表す。腫瘍特異的ＣＤ８Ｔ細胞（Ｔｈｙ１．１＋ＯＴ－Ｉ　Ｔ細胞）を、Ｇ７Ｒ－１、Ｇ２Ｒ－２、Ｇ１２／２Ｒ－１、またはＧ１２／２Ｒ－１＋ｍ１８（全て１３４　ＥＣＤを含む）を発現するようにレトロウイルスによって形質導入し、続いて確立されたＮＯＰ２３乳腺腫瘍を有する同系の免疫健常マウスに注入した。Ｔ細胞注入の日（０日目）から開始して、マウスを無作為化して、ビヒクルまたはＰＥＧ化（ＰＥＧ）１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ（１０μｇ／用量）を、週１回の頻度で、合計４回の治療のために投与した。（Ａ～Ｄ）Ｔ細胞注入の日（０日目）の形質導入されたＯＴ－Ｉ　Ｔ細胞上での受容体（Ｇ－ＣＳＦＲ）の発現を示すフローサイトメトリーの結果。（Ｅ～Ｈ）５０日間にわたる腫瘍サイズ（長さ×幅）。各線は、個々の動物を表す。（Ｉ～Ｌ）連続血液試料におけるＴｈｙ１．１＋ＯＴ－Ｉ細胞の増殖及び持続性。（Ｍ～Ｐ）血中でＴエフェクターメモリー（Ｔｅｍ）表現型（ＣＤ４４＋ＣＤ６２Ｌ－）を示すＴｈｙ１．１＋ＯＴ－Ｉ　Ｔ細胞の割合。

【０１９２】

【図１０３】様々な用量のＰＥＧ化（ＰＥＧ）１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ、または野生型ＩＬ－２を比較する、ＮＯＰ２３乳腺腫瘍モデルにおけるｉｎ　ｖｉｖｏ実験の結果を表す。Ｇ２Ｒ－３　１３４　ＥＣＤ　を発現するＴｈｙ１．１＋ＯＴ－Ｉ　Ｔ細胞を、確立された腫瘍を有する同系の免疫健常マウスに注入した。Ｔ細胞注入の日（０日目）から開始して、マウスを以下の６つのサイトカイン処置群へと無作為化した：ビヒクルのみ（すべてのパネルで示される）；ＰＥＧ－１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ　２μｇ／用量、１週間に４回の用量（パネルＡ、Ｆ、Ｋ、Ｐ）；（３）ＰＥＧ－１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ　０．４μｇ／用量、１週間に４回の用量（パネルＢ、Ｇ、Ｌ、Ｑ）；（４）ＰＥＧ－１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ　０．０８μｇ／用量、１週間に４回の用量（パネルＣ、Ｈ、Ｍ、Ｒ）；（５）ＰＥＧ－１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ　１日４回の０．１μｇ用量、続いて１週間に３回の０．４μｇ用量（パネルＤ、Ｉ、Ｎ、Ｓ）；または（６）ヒトＩＬ－２（Ｐｒｏｌｅｕｋｉｎ）３０，０００ＩＵ／日を１４日間、続いて３０，０００ＩＵを２日毎に１４日間（パネルＥ、Ｊ、Ｏ、Ｔ）。連続血液試料を、フローサイトメトリーによって以下のパラメータに関して分析した：（Ａ～Ｅ）すべてのＣＤ８＋Ｔ細胞に対するＴｈｙ１．１＋ＯＴ－Ｉ細胞の割合（平均＋／－ＳＤ）。（Ｆ～Ｊ）Ｔエフェクターメモリー（Ｔｅｍ）表現型（ＣＤ４４＋ＣＤ６２Ｌ－）を有するＴｈｙ１．１＋ＯＴ－Ｉ細胞の割合（平均＋／－ＳＤ）。（Ｋ～Ｏ）すべてのＣＤ４５＋細胞に対する好中球（ＣＤ３－、ＣＤ１９－、ＮＫ１．１－、ＣＤ１１ｂ＋、ＣＤ１１ｃ－、Ｌｙ６Ｇ＋）の割合（平均＋／－ＳＤ）。（

Ｐ～Ｔ）すべてのＣＤ４５＋細胞に対する好酸球（ＣＤ３－、ＣＤ１９－、ＮＫ１．１－、ＣＤ１１ｂ＋、ＣＤ１１ｃ－、Ｌｙ６Ｇ－、ＳＳＣ－ｈｉｇｈ）の割合（平均＋／－ＳＤ）。

【発明を実施するための形態】

【０１９３】

詳細な説明

手短に言えば、以下でより詳細に説明するように、本明細書に記載されるのは、バリアントサイトカイン受容体及びサイトカインペアを用いた細胞の選択的活性化のための方法及び組成物であって、該サイトカイン受容体が、顆粒球コロニー刺激因子受容体（Ｇ－ＣＳＦＲ）のバリアント細胞外ドメイン（ＥＣＤ）を含む、方法及び組成物である。特定の実施形態では、本明細書に記載の方法及び組成物は、養子細胞移植（ＡＣＴ）療法のための細胞の排他的活性化に有用である。したがって、本明細書に含まれるのは、そのネイティブ受容体に結合しないサイトカインによって選択的に活性化されるバリアント受容体を発現する細胞を産生するための方法である。また、本明細書に開示されるのは、その必要がある対象を治療する方法であって、Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む受容体を発現する細胞を対象に投与することと、Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤに結合するＧ－ＣＳＦのバリアントを共投与することと、を含む方法である。特定の態様では、本明細書に記載の組成物及び方法は、養子細胞移植法のための細胞の選択的活性化に対するアンメットニーズに対処し、養子細胞移植の前の対象の免疫除去の必要性またはＩＬ－２などの広範囲作用性刺激サイトカインを投与する必要性を減少または排除し得る。

【０１９４】

定義

特許請求の範囲及び明細書で使用される用語は、特に明記しない限り、以下に記載するように定義する。

【０１９５】

「治療」という用語は、その重症度もしくは進行、寛解、または治癒を軽減する、疾患状態、例えば、がんの疾患状態の治療における任意の治療的に有益な結果を意味する。

【０１９６】

「ｉｎ　ｖｉｖｏ」という用語は、生体内で発生するプロセスを指す。

【０１９７】

本明細書で使用される「哺乳動物」という用語は、ヒト及び非ヒトの両方を含み、ヒト、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、ネズミ、ウシ、ウマ、及びブタを含むがこれらに限定されない。

【０１９８】

「十分な量」という用語は、所望の効果を生み出すのに十分な量、例えば、細胞上に発現する受容体を選択的に活性化するのに十分な量、を意味する。

【０１９９】

「治療的有効量」という用語は、疾患の症状を改善するのに有効な量である。

【０２００】

「作動可能に連結された」という用語は、それぞれ、別の核酸またはアミノ酸配列と機能的関係に置かれる核酸またはアミノ酸配列を指す。一般に、「作動可能に連結された」とは、連結している核酸配列またはアミノ酸配列が連続的であること、及び分泌リーダーの場合、連続的であり、リーディング相にあることを意味する。

【０２０１】

本明細書で使用される場合、「細胞外ドメイン」（ＥＣＤ）という用語は、細胞の表面上に発現される場合、原形質膜の外部にある受容体（例えば、Ｇ－ＣＳＦＲ）のドメインを指す。特定の実施形態では、Ｇ－ＣＳＦＲのＥＣＤは、配列番号２または配列番号７の少なくとも一部を含む。

【０２０２】

本明細書で使用される場合、「細胞内ドメイン」（ＩＣＤ）という用語は、受容体が細

胞表面上に発現されるときに細胞内に位置する受容体のドメインを指す。
【０２０３】
本明細書で使用される場合、「膜貫通ドメイン」（ＴＭＤまたはＴＭ）という用語は、受容体が細胞表面上に発現されるときに原形質膜内に位置する細胞表面受容体のドメインまたは領域を指す。
【０２０４】
「サイトカイン」という用語は、サイトカイン受容体に結合し、細胞上に発現するサイトカイン受容体に結合して活性化すると細胞シグナル伝達を誘発できる小タンパク質（約５～２０ｋＤａ）を指す。サイトカインの例には、インターロイキン、リンホカイン、コロニー刺激因子、及びケモカインが含まれるが、これらに限定されない。
【０２０５】
「サイトカイン受容体」という用語は、１型及び２型サイトカイン受容体を含むサイトカインに結合する受容体を指す。サイトカイン受容体としては、Ｇ－ＣＳＦＲ、ＩＬ－２Ｒ（インターロイキン－２受容体）、ＩＬ－７Ｒ（インターロイキン－７受容体）、ＩＬ－１２Ｒ（インターロイキン－１２受容体）、及びＩＬ－２１Ｒ（インターロイキン－２１受容体）が挙げられるが、これらに限定されない。
【０２０６】
本明細書で使用される「キメラ受容体」という用語は、１つ以上の異なる膜貫通タンパク質または受容体の配列に由来する少なくとも１つのドメイン（例えば、ＥＣＤ、ＩＣＤ、ＴＭＤ、またはＣ末端領域）の少なくとも一部を有するように操作された膜貫通受容体を指す。
【０２０７】
本明細書で使用される用語「サイトＩＩ界面」、「サイトＩＩ領域」、「サイトＩＩ界面領域」、または「サイトＩＩ」は、Ｇ－ＣＳＦとＧ－ＣＳＦＲのＧ－ＣＳＦ：Ｇ－ＣＳＦＲ　２：２ヘテロ二量体結合界面のうち、Ｇ－ＣＳＦとＧ－ＣＳＦＲのサイトカイン受容体ホモログ（ＣＲＨ）ドメイン間の界面に位置する大きい方を意味する。
【０２０８】
本明細書で使用される用語「サイトＩＩＩ界面」、「サイトＩＩＩ領域」、「サイトＩＩＩ界面領域」、または「サイトＩＩＩ」は、Ｇ－ＣＳＦとＧ－ＣＳＦＲのＧ－ＣＳＦ：Ｇ－ＣＳＦＲ　２：２ヘテロ二量体結合界面のうち、Ｇ－ＣＳＦとＧ－ＣＳＦＲのＮ末端Ｉｇ用ドメイン間の界面に位置する小さい方を意味する。
【０２０９】
本明細書で使用される「少なくとも一部」または「一部」という用語は、特定の態様では、本明細書に記載の配列番号の連続する核酸塩基またはアミノ酸の長さの７５％超、８０％超、９０％超、９５％超、９９％超を指す。特定の態様では、本明細書に記載されるドメインまたは結合部位（例えば、ＥＣＤ、ＩＣＤ、膜貫通、Ｃ末端領域、またはシグナル伝達分子結合部位）の少なくとも一部は、本明細書に記載の配列番号に対して７５％超、８０％超、９０％超、９５％超、９９％超、同一であり得る。
【０２１０】
「野生型」という用語は、ポリペプチドの天然アミノ酸配列または本明細書に記載のポリペプチドをコードする遺伝子のネイティブ核酸配列を指す。タンパク質または遺伝子の野生型配列は、そのタンパク質または遺伝子の種のポリペプチドまたは遺伝子の最も一般的な配列である。
【０２１１】
「バリアントサイトカイン－受容体ペア」、「バリアントサイトカイン及び受容体ペア」、「バリアントサイトカイン及び受容体デザイン（複数可）」、「バリアントサイトカイン－受容体スイッチ」、または「直交サイトカイン－受容体ペア」という用語は、（ａ）ネイティブサイトカインまたは同族受容体に結合せず、（ｂ）対応する操作された（バリアント）リガンドまたは受容体に特異的に結合するようにアミノ酸を変化させることによって修飾された遺伝子操作されたタンパク質のペアを指す。

【０２１２】
本明細書で使用される「バリアント受容体」または「直交受容体」という用語は、バリアントサイトカイン－受容体ペアの遺伝子操作された受容体を指し、キメラ受容体を含む。
【０２１３】
本明細書で使用される「バリアントＥＣＤ」という用語は、バリアントサイトカイン－受容体ペアの受容体（例えば、Ｇ－ＣＳＦＲ）の遺伝子操作された細胞外ドメインを指す。
【０２１４】
本明細書で使用される「バリアントサイトカイン」、「バリアントＧ－ＣＳＦ」、または「直交サイトカイン」という用語は、バリアントサイトカイン－受容体ペアの遺伝子操作されたサイトカインを指す。
【０２１５】
本明細書で使用される場合、「結合しない」または「結合できない」は、検出可能な結合がない、またはわずかな結合、すなわち、天然のリガンドのものよりもはるかに低い結合親和性を有することを指す。
【０２１６】
本明細書で使用される「選択的に活性化する」または「選択的活性化」という用語は、サイトカイン及びバリアント受容体について言及する場合、サイトカインがバリアント受容体に優先的に結合し、該受容体が、サイトカインがバリアント受容体に結合することにより活性化されることを指す。特定の態様では、サイトカインは、サイトカインに特異的に結合するために共進化したキメラ受容体を選択的に活性化する。特定の態様では、サイトカインは野生型サイトカインであり、細胞上で発現するキメラ受容体を選択的に活性化するが、サイトカインに対するネイティブ野生型受容体は細胞内で発現されない。
【０２１７】
本明細書で使用される「増強した活性」という用語は、バリアントサイトカインによる刺激時に細胞上に発現されるバリアント受容体の活性の増加を指し、該活性は、ネイティブサイトカインによる刺激時にネイティブ受容体について観察される活性である。
【０２１８】
「抗原結合性シグナル伝達受容体」という用語は、抗原に結合し、抗原に結合すると細胞内シグナルを生成することができる任意の細胞表面タンパク質またはタンパク質複合体を指す。
【０２１９】
本明細書で使用される「アゴニストシグナル伝達タンパク質」という用語は、標的結合分子（例えば、タンパク質受容体または抗原）に結合するタンパク質を指し、その結合は、標的結合分子を有する標的細胞において１つ以上のシグナル伝達イベントを誘発する。反対に、「アンタゴニストシグナル伝達タンパク質」という用語は、標的結合分子（例えば、タンパク質受容体または抗原）に結合するタンパク質を指し、その結合は、標的結合分子を有する標的細胞において１つ以上のシグナル伝達イベントを阻害する（例えば、同じ標的分子と結合する他のアゴニストタンパク質に干渉することによって）。
【０２２０】
本明細書で使用される「親和性試薬」という用語は、任意の標的分子に結合する能力を有する任意の分子（例えば、タンパク質、核酸など）を指す。
【０２２１】
「免疫細胞」という用語は、生物の免疫系（先天性免疫応答及び適応免疫応答を含む）をサポートするように機能することが知られている任意の細胞を指し、リンパ球（例えば、Ｂ細胞、形質細胞、及びＴ細胞）、ナチュラルキラー細胞（ＮＫ細胞）、マクロファージ、単球、樹状細胞、好中球、及び顆粒球が含まれるが、これらに限定されるものではない。免疫細胞には、幹細胞、未成熟免疫細胞、及び分化細胞が含まれる。免疫細胞には、生体内で稀であろうと豊富であろうと、あらゆる細胞の亜集団も含まれる。特定の実施形

態では、免疫細胞は、免疫細胞タイプ及び亜集団の既知のマーカー（例えば、細胞表面マーカー）を保有することによって、そのように識別される。

【０２２２】

「Ｔ細胞」という用語は、ＣＤ３及び／またはＴ細胞抗原受容体の発現を特徴とし得る哺乳動物免疫エフェクター細胞を指し、これらの細胞は、オルソロガスなサイトカイン受容体を発現するように操作され得る。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、ナイーブＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞、細胞傷害性ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞、ナイーブＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞、ヘルパーＴ細胞、例えば、$T_{H}2$、$T_{H}9$、$T_{H}11$、$T_{H}22$、T_{FH}；制御性Ｔ細胞、例えば、$T_{R}1$、天然T_{Reg}、誘導性T_{Reg}；メモリーＴ細胞、例えば、セントラルメモリーＴ細胞、エフェクターメモリーＴ細胞、ＮＫＴ細胞、及びγδＴ細胞から選択される。

【０２２３】

「Ｇ－ＣＳＦＲ」という用語は、顆粒球コロニー刺激因子受容体を指す。Ｇ－ＣＳＦＲは、ＧＣＳＦＲ、Ｇ－ＣＳＦ受容体、コロニー刺激因子３受容体、ＣＳＦ３Ｒ、ＣＤ１１４抗原、またはＳＣＮ７とも呼ばれ得る。ヒトＧ－ＣＳＦＲは、Ｅｎｓｅｍｂｌ識別番号：ＥＮＳＧ００００００１１９５３５を有する遺伝子によってコードされる。ヒトＧ－ＣＳＦＲは、ＧｅｎｅＢａｎｋ受託番号ＮＭ＿１５６０３９．３に対応するｃＤＮＡ配列によってコードされる。

【０２２４】

「Ｇ－ＣＳＦ」という用語は、顆粒球コロニー刺激因子を指す。Ｇ－ＣＳＦは、コロニー刺激因子３及びＣＳＦ３とも呼ばれ得る。ヒトＧ－ＣＳＦは、Ｅｎｓｅｍｂｌ識別番号：ＥＮＳＧ００００００１０８３４２を有する遺伝子によってコードされる。ヒトＧ－ＣＳＦは、ＧｅｎｅＢａｎｋ受託番号ＫＰ２７１００８．１に対応するｃＤＮＡ配列によってコードされる。

【０２２５】

「ＪＡＫ」は、ヤヌスキナーゼとも呼ばれ得る。ＪＡＫは、ＪＡＫ－ＳＴＡＴ経路を介してサイトカイン媒介シグナルを伝達する細胞内非受容体型チロシンキナーゼのファミリーであり、ＪＡＫ１、ＪＡＫ２、ＪＡＫ３、及びＴＹＫ２が含まれる。ヒトＪＡＫ１は、Ｅｎｓｅｍｂｌ識別番号：ＥＮＳＧ００００００１６２４３４を有する遺伝子によってコードされる。ヒトＪＡＫ１は、ＧｅｎｅＢａｎｋ受託番号ＮＭ＿００２２２７に対応するｃＤＮＡ配列によってコードされる。ヒトＪＡＫ２は、Ｅｎｓｅｍｂｌ識別番号：ＥＮＳＧ００００００９６９６８を有する遺伝子によってコードされる。ヒトＪＡＫ２は、ＧｅｎｅＢａｎｋ受託番号ＮＭ＿００１３２２１９４に対応するｃＤＮＡ配列によってコードされる。ヒトＪＡＫ３は、Ｅｎｓｅｍｂｌ識別番号：ＥＮＳＧ００００００１０５６３９を有する遺伝子によってコードされる。ヒトＪＡＫ３は、ＧｅｎｅＢａｎｋ受託番号ＮＭ＿０００２１５に対応するｃＤＮＡ配列によってコードされる。ヒトＴＹＫ２は、Ｅｎｓｅｍｂｌ識別番号：ＥＮＳＧ００００００１０５３９７を有する遺伝子によってコードされる。ヒトＴＹＫ２は、ＧｅｎｅＢａｎｋ受託番号ＮＭ＿００１３８５１９７に対応するｃＤＮＡ配列によってコードされる。

【０２２６】

ＳＴＡＴは、シグナル伝達物質及び転写活性化因子とも呼ばれ得る。ＳＴＡＴは、ＳＴＡＴ１、ＳＴＡＴ２、ＳＴＡＴ３、ＳＴＡＴ４、ＳＴＡＴ５Ａ、ＳＴＡＴ５Ｂ、及びＳＴＡＴ６の７つのＳＴＡＴタンパク質のファミリーである。ヒトＳＴＡＴ１は、Ｅｎｓｅｍｂｌ識別番号：ＥＮＳＧ００００００１１５４１５を有する遺伝子によってコードされる。ヒトＳＴＡＴ１は、ＧｅｎｅＢａｎｋ受託番号：ＮＭ＿００７３１５に対応するｃＤＮＡ配列によってコードされる。ヒトＳＴＡＴ２は、Ｅｎｓｅｍｂｌ識別番号：ＥＮＳＧ００００００１７０５８１を有する遺伝子によってコードされる。ヒトＳＴＡＴ２は、ＧｅｎｅＢａｎｋ受託番号ＮＭ＿００５４１９に対応するｃＤＮＡ配列によってコードされる。ヒトＳＴＡＴ３は、Ｅｎｓｅｍｂｌ識別番号：ＥＮＳＧ００００００１６８６１０を有する遺伝子によってコードされる。ヒトＳＴＡＴ３は、ＧｅｎｅＢａｎｋ受託番号：ＮＭ＿１３９２７６に対応するｃＤＮＡ配列によってコードされる。ヒトＳＴＡＴ４は、Ｅｎｓｅｍ

ｂｌ識別番号：ＥＮＳＧ００００００１３８３７８を有する遺伝子によってコードされる。ヒトＳＴＡＴ４は、ＧｅｎｅＢａｎｋ受託番号：ＮＭ＿００３１５１に対応するｃＤＮＡ配列によってコードされる。ヒトＳＴＡＴ５Ａは、Ｅｎｓｅｍｂｌ識別番号：ＥＮＳＧ００００００１２６５６１を有する遺伝子によってコードされる。ヒトＳＴＡＴ５Ａは、ＧｅｎｅＢａｎｋ受託番号：ＮＭ＿００３１５２に対応するｃＤＮＡ配列によってコードされる。ヒトＳＴＡＴ５Ｂは、Ｅｎｓｅｍｂｌ識別番号：ＥＮＳＧ００００００１７３７５７を有する遺伝子によってコードされる。ヒトＳＴＡＴ５Ｂは、ＧｅｎｅＢａｎｋ受託番号：ＮＭ＿０１２４４８に対応するｃＤＮＡ配列によってコードされる。ヒトＳＴＡＴ６は、Ｅｎｓｅｍｂｌ識別番号：ＥＮＳＧ００００００１６６８８８を有する遺伝子によってコードされる。ヒトＳＴＡＴ６は、ＧｅｎｅＢａｎｋ受託番号：ＮＭ＿００３１５３に対応するｃＤＮＡ配列によってコードされる。

【０２２７】

ＳＨＣは、Ｓｒｃホモロジー２ドメイン含有形質転換タンパク質とも呼ばれ得る。Ｓｈｃは、３つのアイソフォームのファミリーであり、ｐ６６Ｓｈｃ、ｐ５２Ｓｈｃ、及びｐ４６Ｓｈｃ、ＳＨＣ１、ＳＨＣ２、及びＳＨＣ３を含む。ヒトＳＨＣ１は、Ｅｎｓｅｍｂｌ識別番号：ＥＮＳＧ００００００１６０６９１を有する遺伝子によってコードされる。ヒトＳＨＣ１は、ＧｅｎｅＢａｎｋ受託番号：ＮＭ＿１８３００１に対応するｃＤＮＡ配列によってコードされる。ヒトＳＨＣ２は、Ｅｎｓｅｍｂｌ識別番号：ＥＮＳＧ００００００１２９９４６を有する遺伝子によってコードされる。ヒトＳＨＣ２は、ＧｅｎｅＢａｎｋ受託番号：ＮＭ＿０１２４３５に対応するｃＤＮＡ配列によってコードされる。ヒトＳＨＣ３は、Ｅｎｓｅｍｂｌ識別番号：ＥＮＳＧ００００００１４８０８２を有する遺伝子によってコードされる。ヒトＳＨＣ３は、ＧｅｎｅＢａｎｋ受託番号：ＮＭ＿０１６８４８に対応するｃＤＮＡ配列によってコードされる。

【０２２８】

ＳＨＰ－２は、非受容体型プロテインチロシンホスファターゼ１１（ＰＴＰＮ１１）及びプロテインチロシンホスファターゼ１Ｄ（ＰＴＰ－１Ｄ）とも呼ばれ得る。ヒトＳＨＰ－２は、Ｅｎｓｅｍｂｌ識別番号：ＥＮＳＧ００００００１７９２９５を有する遺伝子によってコードされる。ヒトＳＨＰ－２は、ＧｅｎｅＢａｎｋ受託番号：ＮＭ＿００１３３０４３７に対応するｃＤＮＡ配列によってコードされる。

【０２２９】

ＰＩ３Ｋは、ホスファチジルイノシトール－４，５－ビスホスフェート３－キナーゼとも呼ばれ得る。ＰＩ３Ｋの触媒サブユニットは、ＰＩＫ３ＣＡと呼ばれ得る。ヒトＰＩＫ３ＣＡは、Ｅｎｓｅｍｂｌ識別番号：ＥＮＳＧ００００００１２１８７９を有する遺伝子によってコードされる。ヒトＰＩＫ３ＣＡは、ＧｅｎｅＢａｎｋ受託番号：ＮＭ＿００６２１８に対応するｃＤＮＡ配列によってコードされる。

【０２３０】

ＥＰＯＲは、エリスロポイエチン受容体とも呼ばれ得る。ヒトＥＰＯＲは、Ｅｎｓｅｍｂｌ識別番号：ＥＮＳＧ００００００１８７２６６を有する遺伝子によってコードされる。ヒトＥＰＯＲは、ＧｅｎｅＢａｎｋ受託番号：ＮＭ＿０００１２１に対応するｃＤＮＡ配列によってコードされる。

【０２３１】

ＩＦＮγＲ１は、インターフェロンガンマ受容体１とも呼ばれ得る。ヒトＩＦＮγＲ１は、Ｅｎｓｅｍｂｌ識別番号：ＥＮＳＧ００００００２７６９７を有する遺伝子によってコードされる。ヒトＩＦＮγＲ１は、ＧｅｎｅＢａｎｋ受託番号：ＮＭ＿０００４１６に対応するｃＤＮＡ配列によってコードされる。

【０２３２】

ＩＦＮγＲ２は、インターフェロンガンマ受容体２とも呼ばれ得る。ヒトＩＦＮγＲ２は、Ｅｎｓｅｍｂｌ識別番号：ＥＮＳＧ００００００１５９１２８を有する遺伝子によってコードされる。ヒトＩＦＮγＲ２は、ＧｅｎｅＢａｎｋ受託番号：ＮＭ＿００１３２９１２８に対応するｃＤＮＡ配列によってコードされる。

【０２３３】
ＩＦＮＡＲ２は、インターフェロンアルファ及びベータ受容体サブユニット２とも称され得る。ヒトＩＦＮＡＲ２は、Ｅｎｓｅｍｂｌ識別番号：ＥＮＳＧ０００００１５９１１０を有する遺伝子によってコードされる。ヒトＩＦＮＡＲ２は、ＧｅｎｅＢａｎｋ受託番号：ＮＭ＿０００８７４に対応するｃＤＮＡ配列によってコードされる。
【０２３４】
本願で使用される略語には以下が含まれる：ＥＣＤ（細胞外ドメイン）、ＩＣＤ（細胞内ドメイン）、ＴＭＤ（膜貫通ドメイン）、Ｇ－ＣＳＦＲ（顆粒球コロニー刺激因子受容体）、Ｇ－ＣＳＦ（顆粒球コロニー刺激因子）、ＩＬ（インターロイキン）、ＩＬ－２Ｒ（インターロイキン－２受容体）、ＩＬ－１２Ｒ（インターロイキン１２受容体）、ＩＬ－２１Ｒ（インターロイキン－２１受容体）及びＩＬ－７ＲまたはＩＬ－７Ｒα（インターロイキン－７受容体）、ＩＬ－１８（インターロイキン－１８）、ＩＬ－２１（インターロイキン－２１）、ＩＬ－１７（インターロイキン－１７）、ＴＮＦ－α（腫瘍壊死因子アルファ）、ＣＸＣＬ１３（Ｃ－Ｘ－Ｃモチーフケモカインリガンド１３）、ＣＣＬ３（Ｃ－Ｃモチーフ）ケモカインリガンド３またはＭＩＰ－１α）、ＣＣＬ４（Ｃ－Ｃモチーフケモカインリガンド４　またはＭＩＰ－１β）、ＣＤ４０リガンド、Ｂ細胞活性化因子（ＢＡＦＦ）、Ｆｌｔ３リガンド、ＣＣＬ２１（Ｃ－Ｃモチーフケモカインリガンド２１）、ＣＣＬ５（Ｃ－Ｃモチーフケモカインリガンド５）、ＸＣＬ１（Ｘ－Ｃモチーフケモカインリガンド１）、ＣＣＬ１９（Ｃ－Ｃモチーフケモカインリガンド１９）、及びＮＫＧ２Ｄ（キラー細胞レクチン様受容体Ｋ１）。ＩＬ－２Ｒは、本明細書では、ＩＬ－２ＲＧ、ＩＬ－２Ｒｇｃ、γｃ、またはＩＬ－２Ｒγとも呼ばれ得る。選択されたキメラサイトカイン受容体デザインの場合：「Ｇ－ＣＳＦＲｗｔ－ＩＣＤＩＬ－２Ｒｂ」は、本明細書では「Ｇ／ＩＬ－２Ｒｂ」とも呼ばれる；「Ｇ－ＣＳＦＲｗｔ－ＩＣＤｇｃ」は、本明細書では「Ｇ／ｇｃ」とも呼ばれる；「Ｇ－ＣＳＦＲ１３７－ＩＣＤｇｐ１３０－ＩＬ－２Ｒｂ」は、本明細書では「１３７ＥＣＤを有するＧ２Ｒ－２」とも呼ばれる；「Ｇ－ＣＳＦＲ１３７－ＩＣＤＩＬ－２Ｒｂ＋ＧＣＳＦＲ１３７－ＩＣＤｇｃ」は、本明細書では「１３７ＥＣＤを有するＧ２Ｒ－１」とも呼ばれる。
【０２３５】
本明細書及び添付の特許請求の範囲において使用される場合、単数形「ａ」、「ａｎ」、及び「ｔｈｅ」は、文脈が別途明確に指示しない限り、複数の指示対象を含むことに留意しなければならない。
【０２３６】
値の範囲が提供される場合、文脈が別途明確に指示しない限り、下限値の単位の１０分の１までの、その範囲の上限値から下限値の間の各介在値も具体的に開示されることを理解する。いずれかの記載値、または記載範囲内の介在値からいずれかの他の記載値またはその記載範囲内の介在値の間のそれぞれのより小さな範囲を本発明内に含む。これらのより小さい範囲の上限値及び下限値は、この範囲内に独立して含まれてもよいし、含まれなくてもよく、またこれらのより小さい範囲内に、これら限界値のいずれか一方を含む、いかなる限界値も含まない、またはこれらの限界値の両方を含む各範囲は、この記載範囲内のいずれかの具体的に除外された制限に従い、本発明内に含まれる。記載範囲が一方または両方の限界値を含む場合、それらの含まれる限定値のいずれかまたは両方を除外する範囲もまた、本発明に含まれる。
【０２３７】
バリアントサイトカイン及び受容体デザイン
本明細書に記載されるのは、バリアント受容体を選択的に活性化するためのバリアントサイトカイン及び受容体ペアである。本開示のバリアント受容体は、Ｇ－ＣＳＦＲの細胞外ドメインを含み；バリアントサイトカインは、バリアント受容体に結合して活性化するＧ－ＣＳＦ（顆粒球コロニー刺激因子）を含む。特定の実施形態では、バリアント受容体は、Ｇ－ＣＳＦＲのＥＣＤと、Ｇ－ＣＳＦＲとは異なる受容体のＩＣＤの少なくとも一部と、を含むキメラ受容体である。

【０２３８】
バリアントＧ－ＣＳＦ及びバリアントＧ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤペア
特定の態様では、本明細書に記載のバリアントＧ－ＣＳＦ及び受容体デザインは、少なくとも１つのサイトＩＩ界面領域変異、少なくとも１つのサイトＩＩＩ界面領域変異、及びそれらの組み合わせを含む。特定の態様では、本明細書に記載のバリアントＧ－ＣＳＦ及び受容体デザインは、表２、２Ａ、４、または６に記載の少なくとも１つのサイトＩＩまたはサイトＩＩＩ界面領域変異を含む。
【０２３９】
特定の態様では、サイトＩＩ界面領域のバリアント受容体上の少なくとも１つの変異は、Ｇ－ＣＳＦＲ細胞外ドメイン（配列番号２）のアミノ酸位置１４１、１６７、１６８、１７１、１７２、１７３、１７４、１９７、１９９、２００、２０２、及び２８８からなる群から選択されるＧ－ＣＳＦＲ細胞外ドメインのアミノ酸位置に位置する。
【０２４０】
特定の態様では、バリアントＧ－ＣＳＦサイトＩＩ界面領域上の少なくとも１つの変異は、Ｇ－ＣＳＦ（配列番号１）のアミノ酸位置１２、１６、１９、２０、１０４、１０８、１０９、１１２、１１５、１１６、１１８、１１９、１２２、及び１２３からなる群から選択されるＧ－ＣＳＦのアミノ酸位置に位置する。
【０２４１】
特定の態様では、バリアント受容体サイトＩＩ界面領域上の少なくとも１つの変異は、Ｒ１４１Ｅ、Ｒ１６７Ｄ、Ｋ１６８Ｄ、Ｋ１６８Ｅ、Ｌ１７１Ｅ、Ｌ１７２Ｅ、Ｙ１７３Ｋ、Ｑ１７４Ｅ、Ｄ１９７Ｋ、Ｄ１９７Ｒ、Ｍ１９９Ｄ、Ｄ２００Ｋ、Ｄ２００Ｒ、Ｖ２０２Ｄ、Ｒ２８８Ｄ、及びＲ２８８ＥからなるＧ－ＣＳＦＲ細胞外ドメインの変異の群から選択される。
【０２４２】
特定の態様では、バリアントＧ－ＣＳＦサイトＩＩ界面領域上の少なくとも１つの変異は、Ｋ１６Ｄ、Ｒ、Ｓ１２Ｅ、Ｓ１２Ｋ、Ｓ１２Ｒ、Ｋ１６Ｄ、Ｌ１８Ｆ、Ｅ１９Ｋ、Ｅ１９Ｒ、Ｑ２０Ｅ、Ｄ１０４Ｋ、Ｄ１０４Ｒ、Ｌ１０８Ｋ、Ｌ１０８Ｒ、Ｄ１０９Ｒ、Ｄ１１２Ｒ、Ｄ１１２Ｋ、Ｔ１１５Ｅ、Ｔ１１５Ｋ、Ｔ１１６Ｄ、Ｑ１１９Ｅ、Ｑ１１９Ｒ、Ｅ１２２Ｋ、Ｅ１２２Ｒ、及びＥ１２３ＲからなるＧ－ＣＳＦの変異の群から選択される。
【０２４３】
特定の態様では、バリアントサイトＩＩＩ界面領域上の少なくとも１つの変異は、配列番号２のアミノ酸位置３０、４１、７３、７５、７９、８６、８７、８８、８９、９１、及び９３からなる群から選択されるＧ－ＣＳＦＲ細胞外ドメインの変異の群から選択される。
【０２４４】
特定の態様では、バリアントサイトＩＩＩ界面領域上の少なくとも１つの変異は、配列番号１のアミノ酸位置３８、３９、４０、４１、４６、４７、４８、４９、及び１４７からなる群から選択されるＧ－ＣＳＦの変異の群から選択される。
【０２４５】
特定の態様では、バリアント受容体サイトＩＩＩ界面領域上の少なくとも１つの変異が、Ｓ３０Ｄ、Ｒ４１Ｅ、Ｑ７３Ｗ、Ｆ７５Ｋ、Ｓ７９Ｄ、Ｌ８６Ｄ、Ｑ８７Ｄ、Ｉ８８Ｅ、Ｌ８９Ａ、Ｑ９１Ｄ、Ｑ９１Ｋ、及びＥ９３ＫからなるＧ－ＣＳＦＲ細胞外ドメインの変異の群から選択される。
【０２４６】
特定の態様では、バリアントＧ－ＣＳＦサイトＩＩＩ界面領域上の少なくとも１つの変異は、Ｔ３８Ｒ、Ｙ３９Ｅ、Ｋ４０Ｄ、Ｋ４０Ｆ、Ｌ４１Ｄ、Ｌ４１Ｅ、Ｌ４１Ｋ、Ｅ４６Ｒ、Ｌ４７Ｄ、Ｖ４８Ｋ、Ｖ４８Ｒ、Ｌ４９Ｋ、及びＲ１４７ＥからなるＧ－ＣＳＦの変異の群から選択される。
【０２４７】

本明細書に記載のバリアントサイトカイン及び受容体ペアは、サイトＩＩ領域のみ、サイトＩＩＩ領域のみ、またはサイトＩＩ及びサイトＩＩＩ領域の両方において変異を含み得る。

【０２４８】

本明細書に記載のバリアントサイトカイン及び受容体ペアは、任意の数の本明細書に記載のサイトＩＩ及び／またはサイトＩＩＩ変異を有することができる。特定の態様では、バリアントＧ－ＣＳＦ及び受容体は、表４に記載の変異を有する。特定の態様では、バリアント受容体及び／またはバリアントＧ－ＣＳＦは、本明細書に記載の１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、またはそれ以上の変異を有し得る。特定の態様では、本明細書に記載のバリアントサイトカイン（ｃｙｔｏｃｋｉｎｅ）は、本明細書に記載のバリアントサイトカインに対して少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％のアミノ酸同一性を共有する。特定の態様では、本明細書に記載のバリアントサイトカインは、表２１のバリアントサイトカインに対して少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％のアミノ酸同一性を共有する。

【０２４９】

特定の態様では、本明細書に記載のバリアント受容体は、本明細書に記載の配列番号のＧ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤに対して少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％のアミノ酸同一性を共有するＧ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤドメインを含む。特定の態様では、キメラ受容体は、配列番号２、３、６、または８のアミノ酸配列を有するＧ－ＣＳＦＲのＥＣＤを含む。

【０２５０】

特定の態様では、本明細書に記載のバリアントＧ－ＣＳＦは、配列番号１のＧ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤに対して少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％のアミノ酸同一性を共有するアミノ酸配列を含む。

【０２５１】

特定の態様では、Ｇ－ＣＳＦＲのＥＣＤは、Ｒ４１Ｅ、Ｒ１４１Ｅ、及びＲ１６７Ｄからなる群から選択される少なくとも１つのアミノ酸置換を含む。

【０２５２】

バリアントサイトカイン及び／または受容体は、直接のみならず、異種ポリペプチドとの融合ポリペプチドとしても組換え的に産生され得、この異種ポリペプチドは、例えば、成熟タンパク質またはポリペプチドのＮ末端に特異的切断部位を有するシグナル配列または他のポリペプチドである。一般に、シグナル配列は、ベクターの構成要素であっても、ベクターに挿入されるコード配列の一部であってもよい。選択された異種シグナル配列は、好ましくは、宿主細胞によって認識及びプロセシングされる（すなわち、シグナルペプチダーゼによって切断される）ものである。哺乳動物細胞の発現においては、ネイティブシグナル配列を用いてもよいし、他の哺乳動物のシグナル配列、例えば、同一または近縁種の分泌ポリペプチドからのシグナル配列、及びウイルス分泌リーダーが好適となり得る。特定の実施形態では、シグナル配列は、Ｇ－ＣＳＦＲまたはＧＭ－ＣＳＦＲのシグナル配列である。特定の実施形態では、シグナル配列は、配列番号１１または配列番号１２である。

【０２５３】

特定の態様では、バリアント受容体及び／またはバリアントＧ－ＣＳＦは、安定性を高

めるために、天然または合成のいずれかで修飾される（例えば、糖基、及びポリエチレングリコール（ＰＥＧ））。例えば、特定の実施形態では、バリアントサイトカインは、ＩｇＧ、アルブミン、または他の分子のＦｃドメインに融合され、例えば、当技術分野で知られているようにＰＥＧ化、グリコシル化などによって、半減期を延長させる。特定の実施形態では、本明細書に記載のバリアントサイトカインは、化学的ＰＥＧ化によって修飾される。特定の実施形態では、表２１のバリアントＧ－ＣＳＦサイトカインはＰＥＧ化されている。特定の実施形態では、配列番号：　８３、８３－１、８３－２、８３－３、８３－４、８３－５、及び８４に対応するバリアントＧ－ＣＳＦサイトカインは、ＰＥＧ化によって修飾される。特定の実施形態では、本明細書に記載のバリアントＧ－ＣＳＦサイトカイン及び／またはキメラサイトカイン受容体は、タンパク質のＮ末端及び／またはＣ末端へのＰＥＧの付加によって修飾される。特定の実施形態では、本明細書に記載のバリアントＧ－ＣＳＦサイトカイン及び／またはキメラサイトカイン受容体は、ＰＥＧを含む化合物の付加によって修飾される。特定の実施形態では、ＰＥＧまたはＰＥＧ含有化合物は、約２０ｋＤａ以下である。特定の実施形態では、ＰＥＧまたはＰＥＧ含有化合物は、２０ｋＤａ以下、１５ｋＤａ以下、１０ｋＤａ以下、５ｋＤａ以下、または１ｋＤａ以下である。

【０２５４】

Ｆｃ融合はまた、ｉｎ　ｖｉｖｏで代替的Ｆｃ受容体媒介特性を促進することもできる。「Ｆｃ領域」は、ＩｇＧをパパインで消化することによって生成されるＩｇＧ　Ｃ末端ドメインに相同な天然に存在するまたは合成のポリペプチドであり得る。ＩｇＧ　Ｆｃは、約５０ｋＤａの分子量を有する。バリアントサイトカインは、Ｆｃ領域全体を含んでもよく、またはその一部であるキメラポリペプチドの循環半減期を延長する能力を保持する、より小さい部分を含んでもよい。更に、完全長または断片化されたＦｃ領域は、野生型分子のバリアントとすることができる。

【０２５５】

バリアントサイトカインがバリアント受容体に結合すると、バリアント受容体は、ネイティブ細胞要素を通じて伝達されるシグナル伝達を活性化して、そのネイティブ応答を模倣する生物学的活性を提供するが、それはバリアント受容体を発現するように操作された細胞に対して特異的である。特定の態様では、バリアント受容体及びＧ－ＣＳＦペアは、それらのネイティブ野生型Ｇ－ＣＳＦまたはネイティブ野生型Ｇ－ＣＳＦＲと結合しない。このため、特定の実施形態では、バリアント受容体は、バリアントサイトカインのネイティブ対応物を含む、内因性対応サイトカインに結合せず、一方でバリアントサイトカインは、バリアント受容体のネイティブ対応物を含む、いかなる内因性受容体にも結合しない。特定の実施形態では、バリアントサイトカインは、ネイティブサイトカイン受容体へのネイティブサイトカインの結合と比較して著しく低下した親和性でネイティブ受容体に結合する。特定の実施形態では、ネイティブ受容体に対するバリアントサイトカインの親和性は、ネイティブサイトカイン受容体に対するネイティブサイトカインの親和性の１０倍未満、１００倍未満、１，０００倍未満、または１０，０００倍未満である。特定の実施形態では、バリアントサイトカインは、$1X10^{-4}$Ｍより大きい、$1X10^{-5}$Ｍより大きい、$1X10^{-6}$Ｍより大きい；$1X10^{-7}$Ｍより大きい、$1X10^{-8}$Ｍより大きい、または$1X10^{-9}$Ｍより大きいK_Dでネイティブ受容体に結合する。特定の実施形態では、バリアントサイトカイン受容体は、ネイティブサイトカインに対するネイティブサイトカイン受容体の結合と比較して著しく低下した親和性でネイティブサイトカインに結合する。特定の実施形態では、バリアントサイトカイン受容体は、ネイティブサイトカインを、ネイティブサイトカイン受容体に対するネイティブサイトカインの１０倍未満、１００倍未満、１，０００倍未満、または１０，０００倍未満で結合する。特定の実施形態では、バリアントサイトカイン受容体は、$1X10^{-4}$Ｍより大きい、$1X10^{-5}$Ｍより大きい、$1X10^{-6}$Ｍより大きい、または$1X10^{-7}$Ｍより大きい、$1X10^{-8}$Ｍより大きい、または$1X10^{-9}$Ｍより大きいK_Dでネイティブサイトカインに結合する。いくつかの実施形態では、バリアント受容体に対するバリアントサイトカイン

の親和性は、ネイティブ受容体に対するネイティブサイトカインの親和性に匹敵し、例えば、ネイティブサイトカイン受容体ペアの親和性の少なくとも約１％、少なくとも約５％、少なくとも約１０％、少なくとも約２５％、少なくとも約５０％、少なくとも約７５％、少なくとも約１００％である親和性を有し、それより高くてもよく、例えば、ネイティブ受容体に対するネイティブサイトカインの親和性の２倍、３倍、４倍、５倍、１０倍、またはそれ以上であり得る。親和性は、当業者によく知られている任意の数のアッセイによって決定することができる。例えば、親和性は、様々な濃度の非標識リガンドの存在下で、単一濃度の標識リガンドを用いて受容体の結合を測定する競合結合実験により決定することができる。典型的には、非標識リガンドの濃度は、少なくとも６桁にわたって変化する。競合結合実験により、ＩＣ$_{50}$を決定することができる。本明細書で使用される場合、「ＩＣ$_{50}$」は、受容体と標識リガンドとの間の会合の５０％阻害に必要とされる非標識リガンドの濃度を指す。ＩＣ$_{50}$は、リガンド－受容体結合親和性の指標である。低ＩＣ$_{50}$は高親和性を表す一方、高ＩＣ$_{50}$は低親和性を表す。

【０２５６】

細胞の表面上に発現するバリアントサイトカイン受容体へのバリアントサイトカインの結合は、バリアントサイトカイン受容体の機能に（ネイティブサイトカイン受容体活性と比較して）影響してもしなくてもよく；ネイティブ活性は、すべての場合において必要でも望まれるものでもない。特定の実施形態では、バリアントサイトカインのバリアントサイトカイン受容体への結合は、ネイティブサイトカインシグナル伝達の１つ以上の特徴を誘発することになる。特定の実施形態では、細胞の表面上に発現するバリアントサイトカイン受容体へのバリアントサイトカインの結合は、増殖、生存能力、持続性、細胞傷害性、サイトカイン分泌、記憶、及び活性増強からなる群から選択される細胞応答を引き起こす。

【０２５７】

【表１】

表１：ヒトWT　G－CSF及びヒトWT　G－CSFR　Ig－CRHドメインの配列

タンパク質	Uniprot ID	残基番号	ポリペプチド配列	配列番号
G－CSF	A0A0B4U5E3	1－174	TPLGPASSLPQSFLLKCLEQ VRKIQGDGAALQEKLCATYK LCHPEELVLLGHSLGIPWAP LSSCPSQALQLAGCLSQLHS GLFLYQGLLQALEGISPELG PTLDTLQLDVADFATTIWQQ MEELGMAPALQPTQGAMPAF ASAFQRRAGGVLVASHLQSF LEVSYRVLRHLAQP	1
E．coliで組換え産生されたヒトG－CSF			MTPLGPASSLPQSFLLKCL EQVRKIQGDGAALQEKLCAT YKLCHPEELVLLGHSLGIPW APLSSCPSQALQLAGCLSQL HSGLFLYQGLLQALEGISPE LGPTLDTLQLDVADFATTIW QQMEELGMAPALQPTQGAMP AFASAFQRRAGGVLVASHLQ SFLEVSYRVLRHLAQP	90
G－CSFR（Ig－CRH）	Q99062	Ig：1－97 CRH：98－308	EECGHISVSAPIVHLGDPIT ASCIIKQNCSHLDPEPQILW RLGAELQPGGRQQRLSDGTQ ESIITLPHLNHTQAFLSCSL NWGNSLQILDQVELRAGYPP AIPHNLSCLMNLTTSSLICQ WEPGPETHLPTSFTLKSFKS RGNCQTQGDSILDCVPKDGQ SHCSIPRKHLLLYQNMGIWV QAENALGTSMSPQLCLDPMD VVKLEPPMLRTMDPSPEAAP PQAGCLQLSWEPWQPGLHIN QKCELRHKPQRGEASWALVG PLPLEALQYELCGLLPATAY TLQIRCIRWPLPGHWSDWSP SLELRTTE	2

【０２５８】

【表１Ａ】

表１Ａ：ヒトWT　Ｇ－ＣＳＦ及びヒトWT　Ｇ－ＣＳＦＲ　Ｉｇ－ＣＲＨドメインの配列

タンパク質	Ｕｎｉｐｒｏｔ ＩＤ	残基番号	ポリペプチド配列	配列番号
Ｇ－ＣＳＦＲ（Ｉｇ－ＣＲＨ）	Ｑ９９０６２	Ｉｇ：２－９７ ＣＲＨ：９８－３０８	ＥＣＧＨＩＳＶＳＡＰＩＶＨＬＧＤＰＩＴＡＳＣＩＩＫＱＮＣＳＨＬＤＰＥＰＱＩＬＷＲＬＧＡＥＬＱＰＧＧＲＱＱＲＬＳＤＧＴＱＥＳＩＩＴＬＰＨＬＮＨＴＱＡＦＬＳＣＳＬＮＷＧＮＳＬＱＩＬＤＱＶＥＬＲＡＧＹＰＰＡＩＰＨＮＬＳＣＬＭＮＬＴＴＳＳＬＩＣＱＷＥＰＧＰＥＴＨＬＰＴＳＦＴＬＫＳＦＫＳＲＧＮＣＱＴＱＧＤＳＩＬＤＣＶＰＫＤＧＱＳＨＣＳＩＰＲＫＨＬＬＬＹＱＮＭＧＩＷＶＱＡＥＮＡＬＧＴＳＭＳＰＱＬＣＬＤＰＭＤＶＶＫＬＥＰＰＭＬＲＴＭＤＰＳＰＥＡＡＰＰＱＡＧＣＬＱＬＳＷＥＰＷＱＰＧＬＨＩＮＱＫＣＥＬＲＨＫＰＱＲＧＥＡＳＷＡＬＶＧＰＬＰＬＥＡＬＱＹＥＬＣＧＬＬＰＡＴＡＹＴＬＱＩＲＣＩＲＷＰＬＰＧＨＷＳＤＷＳＰＳＬＥＬＲＴＴＥ	１０１

【０２５９】

表１の配列番号２に記載のＧ－ＣＳＦＲアミノ酸配列は、本明細書で使用される変異番号のＧ－ＣＳＦＲアミノ酸位置に対応する。表１Ａに列挙される配列番号１０１に記載のＧ－ＣＳＦＲ配列は、Ｎ末端の１つのアミノ酸（グルタミン酸）が除去されていることを除いて、配列番号２と同一である。したがって、本明細書で使用される変異番号のＧ－ＣＳＦＲアミノ酸位置は、配列番号１０１のアミノ酸２～３０８に対応する。

【０２６０】

【表２】

表２：Ｇ－ＣＳＦ$_E$及びＧ－ＣＳＦＲ$_E$の変異を有するサイトＩＩデザイン。

デザイン	変異Ｇ－ＣＳＦ$_E$	変異Ｇ－ＣＳＦＲ$_E$
１	Ｅ１９Ｋ	Ｒ２８８Ｅ
２	Ｓ１２Ｋ＿Ｅ１９Ｋ	Ｒ２８８Ｅ
６	Ｄ１０４Ｋ	Ｋ１６８Ｄ
７	Ｄ１０４Ｒ＿Ｌ１０８Ｒ＿Ｔ１１５Ｋ	１６８Ｄ＿Ｌ１７１Ｅ＿Ｑ１７４Ｅ
８	Ｓ１２Ｒ＿Ｌ１８Ｆ＿Ｄ１０４Ｒ＿Ｌ１０８Ｋ＿Ｄ１１２Ｒ	Ｒ１６７Ｄ＿Ｋ１６８Ｄ＿Ｄ１９７Ｅ
９	Ｄ１０４Ｒ＿Ｌ１０８Ｋ＿Ｄ１１２Ｒ＿Ｑ１１９Ｒ＿Ｅ１２２Ｋ	Ｒ１４１Ｅ＿Ｒ１６７Ｄ＿Ｋ１６８Ｄ＿Ｑ１７４Ｄ
１５	Ｋ１６Ｄ＿Ｔ１１５Ｅ＿Ｔ１１６Ｄ＿Ｑ１１９Ｅ	Ｌ１７１Ｒ＿Ｙ１７３Ｖ＿Ｄ１９７Ｒ
１７	Ｅ１２２Ｒ＿Ｅ１２３Ｒ	Ｒ１４１Ｅ
１８	Ｅ１９Ｋ＿Ｑ２０Ｅ	Ｙ１７３Ｋ＿Ｒ２８８Ｅ
１９	Ｋ１６Ｅ＿Ｅ１９Ｋ	Ｄ２００Ｒ＿Ｒ２８８Ｅ
２０	Ｅ１９Ｋ＿Ｄ１０４Ｋ	Ｋ１６８Ｄ＿Ｒ２８８Ｅ
２１	Ｅ１９Ｋ＿Ｄ１１２Ｒ	Ｌ１７２Ｅ＿Ｒ２８８Ｅ
２２	Ｅ１９Ｋ＿Ｄ１０４Ｋ	Ｋ１６８Ｅ＿Ｍ１９９Ｄ＿Ｒ２８８Ｄ
２３	Ｓ１２Ｅ＿Ｋ１６Ｄ＿Ｅ１９Ｋ	Ｄ１９７Ｋ＿Ｄ２００Ｋ＿Ｒ２８８Ｅ
２４	Ｅ１９Ｒ＿Ｄ１１２Ｋ	Ｒ１６７Ｄ＿Ｖ２０２Ｄ＿Ｒ２８８Ｅ
２５	Ｅ１９Ｋ＿Ｄ１０９Ｒ＿Ｄ１１２Ｒ	Ｒ１６７Ｄ＿Ｍ１９９Ｄ＿Ｒ２８８Ｄ
２７	Ｅ１９Ｒ＿Ｄ１０４Ｒ＿Ｌ１０８Ｋ＿Ｄ１１２Ｒ	Ｒ１６７Ｄ＿Ｋ１６８Ｄ＿Ｖ２０２Ｅ＿Ｉ２３９Ｖ＿Ｒ２８８Ｅ
２８	Ｅ１９Ｋ＿Ｄ１０９Ｋ＿Ｄ１１２Ｒ＿Ｅ１２２Ｒ＿Ｅ１２３Ｒ	Ｒ１４１Ｅ＿Ｒ１６７Ｄ＿Ｍ１９９Ｄ＿Ｒ２８８Ｅ
３０	Ｌ１０８Ｋ　Ｄ１１２Ｒ	Ｒ１６７Ｄ
３４	Ｌ１０８Ｋ＿Ｄ１１２Ｒ＿Ｅ１２２Ｒ＿Ｅ１２３Ｒ	Ｒ１４１Ｅ＿Ｒ１６７Ｄ
３５	Ｔ１１５Ｋ＿Ｅ１２２Ｒ＿Ｅ１２３Ｒ	Ｒ１４１Ｅ＿Ｌ１７１Ｅ＿Ｑ１７４Ｅ
３６	Ｓ１２Ｅ＿Ｋ１６Ｅ＿Ｔ１１５Ｅ＿Ｑ１１９Ｅ	Ｌ１７１Ｒ＿Ｄ１９７Ｋ＿Ｄ２００Ｒ

４２	Ｅ１９Ｋ＿Ｄ１０９Ｋ＿Ｄ１１２Ｒ	Ｒ１６７Ｄ＿Ｌ１７２Ｅ＿Ｍ１９９Ｄ＿Ｒ２８８Ｄ
４３	Ｅ１９Ｒ＿Ｄ１０４Ｒ＿Ｄ１１２Ｋ	Ｒ１６７Ｄ＿Ｋ１６８Ｄ＿Ｖ２０２Ｄ＿Ｒ２８８Ｅ
４４	Ｅ１９Ｋ＿Ｄ１０４Ｒ＿Ｌ１０８Ｒ＿Ｄ１１２Ｒ	Ｒ１６７Ｄ＿Ｋ１６８Ｄ＿Ｒ２８８Ｄ
４５	Ｅ１９Ｋ＿Ｄ１１２Ｋ＿Ｔ１１５Ｋ	Ｒ１６７Ｅ＿Ｌ１７１Ｅ＿Ｑ１７４Ｅ＿Ｒ２８８Ｅ
４６	Ｅ１９Ｋ＿Ｄ１０４Ｋ＿Ｅ１２２Ｒ＿Ｅ１２３Ｒ	Ｒ１４１Ｅ＿Ｋ１６８Ｄ＿Ｒ２８８Ｅ
４７	Ｅ１９Ｒ＿Ｅ１２２Ｒ＿Ｅ１２３Ｒ	Ｒ１４１Ｅ＿Ｖ２０２Ｅ＿Ｉ２３９Ｖ＿Ｒ２８８Ｅ
４８	Ｅ１９Ｋ＿Ｄ１０９Ｋ＿Ｄ１１２Ｒ	Ｒ１６７Ｆ＿Ｌ１７２Ｅ＿Ｍ１９９Ｄ＿Ｒ２８８Ｄ
４９	Ｋ１６Ｅ＿Ｅ１９Ｒ＿Ｔ１１５Ｅ＿Ｑ１１９Ｅ	Ｌ１７１Ｒ＿Ｄ１９７Ｋ＿Ｄ２００Ｋ＿Ｒ２８８Ｅ
５０	Ｅ１９Ｋ＿Ｄ１０４Ｒ＿Ｌ１０８Ｋ＿Ｄ１１２Ｒ	Ｒ１６７Ｄ＿Ｋ１６８Ｄ＿Ｖ２０２Ｅ＿Ｒ２８８Ｅ
８０	Ｄ１１２Ｋ　Ｔ１１５Ｋ	Ｒ１６７Ｅ　Ｑ１７４Ｅ
８１	Ｅ１９Ｋ	Ｒ２８８Ｄ
８２	Ｌ１０８Ｋ＿Ｄ１１２Ｒ	Ｒ１４１Ｅ＿Ｒ１６７Ｄ
８３	Ｅ１９Ｒ＿Ｄ１１２Ｋ	Ｒ１６７Ｄ＿Ｒ２８８Ｅ

【０２６１】

【表３】

表３：サイトＩＩＩのデザイン。

デザイン番号	変異Ｇ－ＣＳＦ$_{E}$	変異Ｇ－ＣＳＦＲ$_{E}$
５１	Ｅ４６Ｒ＿Ｌ４９Ｋ	Ｓ３０Ｄ＿Ｒ４１Ｅ
５２	Ｋ４０Ｄ＿Ｌ４１Ｄ	Ｆ７５Ｋ＿Ｑ９１Ｋ
５３	Ｌ４１Ｋ＿Ｅ４６Ｒ	Ｒ４１Ｅ＿Ｑ９１Ｄ
５４	Ｌ４１Ｅ＿Ｌ４７Ｄ	Ｉ８８Ｋ
５５	Ｔ３８Ｒ＿Ｅ４６Ｒ	Ｒ４１Ｅ＿Ｑ７３Ｅ
５６	Ｋ４０Ｄ＿Ｒ１４７Ｅ	Ｆ７５Ｋ＿Ｅ９３Ｋ
５７	Ｅ４６Ｒ＿Ｖ４８Ｒ	Ｒ４１Ｅ＿Ｑ８７Ｅ
５８	Ｅ４６Ｒ	Ｒ４１Ｅ＿Ｌ８６Ｄ
５９	Ｋ４０Ｄ＿Ｅ４６Ｒ	Ｒ４１Ｅ＿Ｆ７５Ｋ
６０	Ｅ４６Ｒ	Ｒ４１Ｅ＿Ｉ８８Ｄ
６１	Ｅ４６Ｒ＿Ｌ４９Ｆ	Ｒ４１Ｅ＿Ｌ８９Ａ
６２	Ｌ４１Ｄ	Ｑ９１Ｋ
６３	Ｔ３８Ｒ	Ｑ７３Ｅ
６４	Ｙ３９Ｅ＿Ｋ４０Ｄ	Ｆ７５Ｋ
６５	Ｌ４１Ｋ	Ｉ８８Ｅ＿Ｑ９１Ｄ
６６	Ｅ４６Ｒ	Ｒ４１Ｅ
６７	Ｅ４６Ｒ	Ｒ４１Ｅ＿Ｓ７９Ｄ
６８	Ｋ４０Ｄ	Ｆ７５Ｋ
６９	Ｖ４８Ｋ	Ｑ８７Ｄ
７０	Ｒ１４７Ｅ	Ｅ９３Ｋ
７１	Ｌ４１Ｋ	Ｑ９１Ｄ
７２	Ｋ４０Ｆ	Ｆ７５Ｋ

【０２６２】

【表４】

表４：サイトＩＩ及びＩＩＩのデザインの組み合わせから得られるデザインの例。

デザイン番号	変異Ｇ－ＣＳＦ$_E$	変異Ｇ－ＣＳＦＲ$_E$	親のサイトＩＩデザイン	親のサイトＩＩデザイン
１０６	Ｅ４６Ｒ＿Ｄ１０４Ｋ	Ｒ４１Ｅ＿Ｋ１６８Ｄ	６	６６
１１７	Ｅ４６Ｒ＿Ｅ１２２Ｒ＿Ｅ１２３Ｒ	Ｒ４１Ｅ＿Ｒ１４１Ｅ	１７	６６
１３０	Ｅ４６Ｒ＿Ｌ１０８Ｋ＿Ｄ１１２Ｒ	Ｒ４１Ｅ＿Ｒ１６７Ｄ	３０	６６
１３４	Ｅ４６Ｒ＿Ｌ１０８Ｋ＿Ｄ１１２Ｒ＿Ｅ１２２Ｒ＿Ｅ１２３Ｒ	Ｒ４１Ｅ＿Ｒ１４１Ｅ＿Ｒ１６７Ｄ	３４	６６
１３５	Ｅ４６Ｒ＿Ｔ１１５Ｋ＿Ｅ１２２Ｒ＿Ｅ１２３Ｒ	Ｒ４１Ｅ＿Ｒ１４１Ｅ＿Ｌ１７１Ｅ＿Ｑ１７４Ｅ	３５	６６
１３７	Ｅ４６Ｒ＿Ｌ１０８Ｋ＿Ｄ１１２Ｒ	Ｒ４１Ｅ＿Ｒ１４１Ｅ＿Ｒ１６７Ｄ	８２	６６
３００	Ｋ４０Ｄ＿Ｌ４１Ｄ＿Ｌ１０８Ｋ＿Ｄ１１２Ｒ	Ｆ７５Ｋ＿Ｑ９１Ｋ＿Ｒ１６７Ｄ	３０	５２
３０１	Ｔ３８Ｒ＿Ｅ４６Ｒ＿Ｌ１０８Ｋ＿Ｄ１１２Ｒ	Ｒ４１Ｅ＿Ｑ７３Ｅ＿Ｒ１６７Ｄ	３０	５５
３０２	Ｅ４６Ｒ＿Ｌ１０８Ｋ＿Ｄ１１２Ｒ	Ｒ４１Ｅ＿Ｌ８６Ｄ＿Ｒ１６７Ｄ	３０	５８
３０３	Ｌ１０８Ｋ　Ｄ１１２Ｒ＿Ｒ１４７Ｅ	Ｅ９３Ｋ＿Ｒ１６７Ｄ	３０	７０
３０４	Ｅ４６Ｒ＿Ｌ１０８Ｋ＿Ｄ１１２Ｒ＿Ｒ１４７Ｅ	Ｒ４１Ｅ＿Ｅ９３Ｋ＿Ｒ１６７Ｄ	３０	６６，７０

３０５	Ｅ１９Ｋ＿Ｅ４６Ｒ＿Ｌ１０８Ｋ＿Ｄ１１２Ｒ	Ｒ４１Ｅ＿Ｒ１６７Ｄ＿Ｒ２８８Ｅ	１，３０	６６
３０７	Ｓ１２Ｅ＿Ｋ１６Ｄ＿Ｅ１９Ｋ＿Ｅ４６Ｒ	Ｒ４１Ｅ＿Ｄ１９７Ｋ＿Ｄ２００Ｋ＿Ｒ２８８Ｅ	２３	６６
３０８	Ｅ１９Ｒ＿Ｅ４６Ｒ＿Ｄ１１２Ｋ	Ｒ４１Ｅ＿Ｒ１６７Ｄ＿Ｖ２０２Ｄ＿Ｒ２８８Ｅ	２４	６６
４００	Ｅ１９Ｋ＿Ｅ４６Ｒ＿Ｄ１０９Ｒ＿Ｄ１１２Ｒ	Ｒ４１Ｅ＿Ｒ１６７Ｄ＿Ｍ１９９Ｄ＿Ｒ２８８Ｄ	２５	６６
４０１	Ｅ１９Ｋ＿Ｅ４６Ｒ＿Ｌ１０８Ｋ＿Ｄ１１２Ｒ	Ｒ４１Ｅ＿Ｒ１６７Ｄ＿Ｒ２８８Ｄ	３０，８１	６６
４０２	Ｅ１９Ｋ＿Ｅ４６Ｒ＿Ｄ１１２Ｋ＿Ｔ１１５Ｋ	Ｒ４１Ｅ＿Ｒ１６７Ｅ＿Ｑ１７４Ｅ＿Ｒ２８８Ｅ	１，８０	６６
４０３	Ｅ１９Ｒ＿Ｅ４６Ｒ＿Ｄ１１２Ｋ	Ｒ４１Ｅ＿Ｒ１６７Ｄ＿Ｒ２８８Ｅ	８３	６６

【０２６３】

【表４Ａ】

表４Ａ：例示的なＧ－ＣＳＦＲ及びＧ－ＣＳＦペア

Ｇ－ＣＳＦバリアント番号	Ｇ－ＣＳＦ変異	対応するＧ－ＣＳＦＲ変異
１３０	Ｅ４６Ｒ＿Ｌ１０８Ｋ＿Ｄ１１２Ｒ	Ｒ４１Ｅ＿Ｒ１６７Ｄ
１３０ａ１	Ｅ４６Ｒ＿Ｌ１０８Ｋ＿Ｄ１１２Ｒ＿Ｅ１２２Ｋ	Ｒ４１Ｅ＿Ｒ１４１Ｅ＿Ｒ１６７Ｄ
１３０ｂ１	Ｅ４６Ｒ＿Ｌ１０８Ｋ＿Ｄ１１２Ｒ＿　Ｅ１２３Ｋ	
１３０ａ２	Ｅ４６Ｒ＿Ｌ１０８Ｋ＿Ｄ１１２Ｒ＿Ｅ１２２Ｒ	
１３０ｂ２	Ｅ４６Ｒ＿Ｌ１０８Ｋ＿Ｄ１１２Ｒ＿　Ｅ１２３Ｒ	
１３０ａ１ｂ１	Ｅ４６Ｒ＿Ｌ１０８Ｋ＿Ｄ１１２Ｒ＿Ｅ１２２Ｋ＿Ｅ１２３Ｋ	
１３４	Ｅ４６Ｒ＿Ｌ１０８Ｋ＿Ｄ１１２Ｒ＿Ｅ１２２Ｒ＿Ｅ１２３Ｒ	

【０２６４】

キメラ受容体

特定の態様では、本明細書に記載されるバリアント受容体は、キメラ受容体である。キメラ受容体は、本明細書に記載のバリアントＧ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤドメインのいずれかを含むことができる。特定の態様では、キメラ受容体は、異なるサイトカイン受容体の細胞内ドメイン（ＩＣＤ）の少なくとも一部を更に含む。異なるサイトカイン受容体の細胞内ドメインは、ｇｐ１３０（糖タンパク質１３０、インターロイキン－６受容体またはＩＬ－６Ｒのサブユニット）、ＩＬ－２Ｒβもしくは ＩＬ－２Ｒｂ（インターロイキン－２受容体β）、ＩＬ－２Ｒγもしくはγｃもしくは ＩＬ－２ＲＧ（インターロイキン－２受容体ガンマ）、ＩＬ－７Ｒα（インターロイキン－７受容体アルファ）、ＩＬ－１２Ｒβ$_2$（インターロイキン－１２受容体ベータ２）、ＩＬ－２１Ｒ（インターロイキン－２１受容体）、ＩＬ－４Ｒ（インターロイキン－４受容体）、ＥＰＯＲ（エリスロポイエチン受容体）、ＩＦＮＡＲ（インターフェロンアルファ／ベータ受容体）、またはＩＦＮγＲ（インターフェロンガンマ受容体）からなる群から選択することができる。特定の態様では、細胞内ドメインの少なくとも一部は、本明細書に記載のサイトカイン受容体ＩＣＤのアミノ酸配列に対して、少なくとも７０％、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９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％のアミノ酸同一性を共有するアミノ酸配列を含む。特定の態様では、サイトカイン受容体ＩＣＤの少なくとも一部は、配列番号４、７、または９に対して、少なくとも７０％、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９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％のアミノ酸配列同一性を共有する。特定の態様では、細胞内ドメインの少なくとも一部は、表２６に列挙されるサイトカイン受容体のサイトカイン受容体ＩＣＤのアミノ酸配列に対して、少なくとも７０％、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９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％のアミノ酸同一性を共有するアミノ酸配列を含む。

【０２６５】
特定の実施形態では、本明細書に記載されるのは、第２のドメインに作動可能に連結されたＧ－ＣＳＦＲ（顆粒球コロニー刺激因子受容体）の細胞外ドメイン（ＥＣＤ）を含むキメラサイトカイン受容体であり、該第２のドメインは、マルチサブユニットサイトカイン受容体、例えば、ＩＬ－２Ｒの細胞内ドメイン（ＩＣＤ）の少なくとも一部を含む。特定の態様では、キメラサイトカイン受容体は、表１５Ａ、表１５Ｂ、表２３、及び表２４のＩＣＤの一部を含む。特定の態様では、キメラサイトカイン受容体は、表１５Ａ及び表１５Ｂから選択される膜貫通ドメインを含む。特定の態様では、キメラサイトカイン受容体ＩＣＤは、表１５Ａ、表１５Ｂ、表１６、表２３、及び表２４のＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域を含む。

【０２６６】
特定の態様では、キメラサイトカイン受容体は、表１５Ａ、表１５Ｂ、表１６、表２３、表２４、及び表２７の少なくとも１つのシグナル伝達分子結合部位を含む。いくつかの実施形態では、ＩＣＤのシグナル伝達分子結合部位（複数可）は、配列番号１１８～１４６に記載の配列を含む。いくつかの実施形態では、ＩＣＤのシグナル伝達分子結合部位（複数可）は、配列番号１１８～１４６のうち少なくとも１つに記載の配列に対して少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％同一の配列を含む。

【０２６７】
特定の態様では、本明細書に記載のキメラ受容体は、表１７～２０、２３、２４、２６、及び３２のそれぞれに開示される配列のＮ末端からＣ末端の順序のアミノ酸配列を含む。特定の態様では、本明細書に記載のキメラ受容体は、表１７～２０のそれぞれに開示される配列の５’から３’の順序の核酸配列を含む。特定の態様では、キメラサイトカイン受容体は、表１７～２０、ならびに２３、２４、２６、及び３２のそれぞれに開示されるアミノ酸配列のＮ末端からＣ末端の順序のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％のアミノ酸同一性を共有する。特定の態様では、キメラサイトカイン受容体は、表１７～２０のそれぞれに開示される核酸配列の５’～３’順序の核酸配列に対して少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％の核酸同一性を共有する。

【０２６８】
特定の態様では、本明細書に記載のキメラ受容体は、本明細書に記載のＩＣＤ配列番号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９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％のアミノ酸または核酸配列同一性を共有するサイトカイン受容体のＩＣＤの少なくとも一部を含む。特定の態様では、キメラ受容体は、配列番号２６、２９、３１、３９、４１、４３、４５、４７、または４９のアミノ酸配列を有するＩＬ－２Ｒβのｉｃｄの少なくとも一部を含む。特定の態様では、キメラ受容体は、配列番号５４、５７、５９、６７、６９、７１、７３、７５、または７７の核酸配列を有するＩＬ－２Ｒβ、すなわちＩＬ－２ＲｂのＩＣＤの少なくとも一部を含む。特定の態様では、キメラ受容体は、配列番号５１のアミノ酸配列または配列番号７９の核酸配列を有するＩＬ－７ＲαのＩＣＤの少なくとも一部を含む。特定の態様では、キメラ受容体は、配列番号５３のアミノ酸配列または配列番号８１の核酸配列を有するＩＬ－７ＲのＩＣＤの少なくとも一部を含む。特定の態様では、キメラ受容体は、配列番号３５または３７のアミノ酸配列を有するＩＬ－２１ＲのＩＣＤの少なくとも一部を含む。特定の態様では、キメラ受容体は、配列番号６３または６５の核酸配列を有するＩＬ－２１ＲのＩＣＤの少なくとも一部を含む。特定の態様では、キメラ受容体は、配列番号３３、４２、または４６のアミノ酸配列を有するＩＬ－１２Ｒβ

$_2$のＩＣＤの少なくとも一部を含む。特定の態様では、キメラ受容体は、配列番号６１、７０、または７４の核酸配列を有するＩＬ－１２Ｒβ$_2$のＩＣＤの少なくとも一部を含む。特定の態様では、キメラ受容体は、配列番号３０、３２、３４、３６、３８、４０、４４、５０、または５２のアミノ酸配列を有するＧ－ＣＳＦＲのＩＣＤの少なくとも一部を含む。特定の態様では、キメラ受容体は、配列番号５８、６０、６２、６４、６６、６８、７２、７８、または８０の核酸配列を有するＧ－ＣＳＦＲのＩＣＤの少なくとも一部を含む。特定の態様では、キメラ受容体は、配列番号２８または４８のアミノ酸配列を有するｇｐ１３０のＩＣＤの少なくとも一部を含む。特定の態様では、キメラ受容体は、配列番号５６または７６の核酸配列を有するｇｐ１３０のＩＣＤの少なくとも一部を含む。特定の態様では、キメラ受容体は、配列番号２７のアミノ酸配列を有するＩＬ－２Ｒγ（すなわち、ＩＬ－２ＲＧ、ＩＬ－２Ｒｇｃ、γｃ、またはＩＬ－２Ｒγ）のＩＣＤの少なくとも一部を含む。特定の態様では、キメラ受容体は、配列番号５５の核酸配列を有するＩＬ－２Ｒγ（すなわち、ＩＬ－２ＲＧ、ＩＬ－２Ｒｇｃ、γｃ、またはＩＬ－２Ｒγ）のＩＣＤの少なくとも一部を含む。

【０２６９】

特定の態様では、本明細書に記載のＩＣＤの少なくとも一部は、少なくとも１つのシグナル伝達分子結合部位を含む。特定の態様では、少なくとも１つのシグナル伝達分子結合部位は、Ｇ－ＣＳＦＲのＳＴＡＴ３結合部位；ｇｐ１３０のＳＴＡＴ３結合部位；ｇｐ１３０のＳＨＰ－２結合部位；ＩＬ－２ＲβのＳｈｃ結合部位；ＩＬ－２ＲβのＳＴＡＴ５結合部位；ＩＬ－２ＲβのＳＴＡＴ３結合部位；ＩＬ－２ＲβのＳＴＡＴ１結合部位；ＩＬ－７Ｒαの ＳＴＡＴ５結合部位；ＩＬ－７Ｒαのホスファチジルイノシトール３－キナーゼ（ＰＩ３Ｋ）結合部位；ＩＬ－１２Ｒβ２のＳＴＡＴ５結合部位；ＩＬ－１２Ｒβ２のＳＴＡＴ４結合部位；ＩＬ－１２Ｒβ２のＳＴＡＴ３結合部位；ＩＬ－２１ＲのＳＴＡＴ５結合部位；ＩＬ－２１ＲのＳＴＡＴ３結合部位；及びＩＬ－２１ＲのＳＴＡＴ１結合部位である。特定の態様では、少なくとも１つのシグナル伝達分子結合部位は、表１６に記載のアミノ酸を更に含む配列を含む。

【０２７０】

特定の実施形態では、キメラ受容体は、サイトカイン受容体の細胞内ドメイン由来の少なくとも１つのシグナル伝達分子結合部位を含む。特定の実施形態では、キメラ受容体は、表２４の細胞内ドメイン由来の少なくとも１つのシグナル伝達分子結合部位を含む。特定の実施形態では、少なくとも１つのシグナル伝達分子結合部位は、インターロイキン（ＩＬ）－２ＲβのＳＨＣ結合部位；ＩＬ－２ＲβのＳＴＡＴ５結合部位、ＩＬ－４ＲαのＩＲＳ－１もしくはＩＲＳ－２結合部位、ＩＬ－４ＲαのＳＴＡＴ６結合部位、ｇｐ１３０のＳＨＰ－２結合部位、ｇｐ１３０のＳＴＡＴ３結合部位、エリスロポイエチン受容体（ＥＰＯＲ）のＳＨＰ－１またはＳＨＰ－２結合部位、ＥＰＯＲのＳＴＡＴ５結合部位、インターフェロンアルファ及びベータ受容体サブユニット２（ＩＦＮＡＲ２）のＳＴＡＴ１もしくはＳＴＡＴ２結合部位、ならびにインターフェロンガンマ受容体１（ＩＦＮγＲ１）のＳＴＡＴ１結合部位、またはこれらの組み合わせからなる群から選択される。

【０２７１】

特定の実施形態では、キメラ受容体ＩＣＤは、Ｇ－ＣＳＦＲ、ｇｐ１３０、ＥＰＯＲ、及びインターフェロンガンマ受容体２（ＩＦＮγＲ２）、またはこれらの組み合わせからなる群から選択される少なくとも１つのタンパク質の少なくとも１つのＢｏｘ１領域及び少なくとも１つのＢｏｘ２領域を更に含む。

【０２７２】

特定の態様では、本明細書に記載のＩＣＤの少なくとも一部は、ｇｐ１３０またはＧ－ＣＳＦＲのＢｏｘ１及びＢｏｘ領域を含む。特定の態様では、Ｂｏｘ１領域は、表２に記載のアミノ酸の配列を含む。特定の態様では、Ｂｏｘ１領域は、表１６に記載のＢｏｘ１配列に対して５０％を超える同一性のアミノ酸配列を含む。

【０２７３】

特定の態様では、ＩＣＤは、（ａ）配列番号９０もしくは９１のうち一方もしくは両方

のアミノ酸配列、または（ｂ）配列番号９０もしくは９２のうち一方もしくは両方のアミノ酸配列、または（ｃ）配列番号９３のアミノ酸配列、または（ｄ）配列番号９４のアミノ酸配列、または（ｅ）配列番号９５もしくは９６のうち一方もしくは両方のアミノ酸配列、または（ｆ）配列番号９７もしくは９８のアミノ酸配列、または（ｇ）配列番号９９もしくは１００のアミノ酸配列を含む。

【０２７４】

特定の態様では、異なるサイトカイン受容体の細胞内ドメインは、野生型細胞内ドメインである。

【０２７５】

特定の態様では、本明細書に記載のキメラバリアント受容体は、Ｇ－ＣＳＦＲの膜貫通ドメイン（ＴＭＤ）の少なくとも一部を更に含む。特定の態様では、本明細書に記載のキメラバリアント受容体は、異なるサイトカイン受容体の膜貫通ドメイン（ＴＭＤ）の少なくとも一部を更に含む。異なるサイトカイン受容体のＴＭＤは、Ｇ－ＣＳＦＲ、ｇｐ１３０（糖タンパク質１３０）、ＩＬ－２Ｒβ（インターロイキン－２受容体β）、ＩＬ－２Ｒγまたはγｃ（ＩＬ－２受容体γ）、ＩＬ－７Ｒα（インターロイキン－７受容体α）、ＩＬ－１２Ｒβ$_2$（インターロイキン－１２受容体β２）、及びＩＬ－２１Ｒ（インターロイキン－２１受容体）からなる群から選択することができる。特定の態様では、ＴＭＤの少なくとも一部は、本明細書に記載のサイトカイン受容体ＴＭＤのアミノ酸配列に対して、少なくとも７０％、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９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％のアミノ酸同一性を共有するアミノ酸配列を含む。特定の態様では、サイトカイン受容体ＴＭＤの少なくとも一部は、配列番号４、５、７、または９に対して、少なくとも７０％、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９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％のアミノ酸配列同一性を共有する。

【０２７６】

特定の態様では、本明細書に記載のキメラ受容体は、図２０、２３、及び２４のキメラ受容体デザインに示されるように、Ｎ末端からＣ末端の順で配置されたＧ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤドメイン、膜貫通ドメイン（ＴＭＤ）、及び１つのＩＣＤの少なくとも一部を含む。

【０２７７】

特定の態様では、キメラ受容体は、配列番号３のＧ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤ、配列番号４のｇｐ１３０　ＴＭＤ及びＩＣＤの一部、ならびに配列番号５のＩＬ－２Ｒβ　ＩＣＤの一部を含む。特定の態様では、キメラ受容体は、配列番号６のＧ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤ、及び配列番号７のＩＬ－２Ｒβ　ＩＣＤの一部を含む。特定の態様では、キメラ受容体は、配列番号８のＧ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤ、及び配列番号９のＩＬ－２Ｒγ　ＩＣＤの一部を含む。

【０２７８】

細胞の表面上に発現するキメラサイトカイン受容体へのバリアントまたは野生型サイトカインの結合は、バリアントサイトカイン受容体の機能に（ネイティブサイトカイン受容体活性と比較して）影響してもしなくてもよく；ネイティブ活性は、すべての場合において必要でも望まれるものでもない。特定の実施形態では、バリアントサイトカインのキメラサイトカイン受容体への結合は、ネイティブサイトカインシグナル伝達の１つ以上の特徴を誘発することになる。特定の実施形態では、細胞の表面上に発現するキメラサイトカイン受容体へのバリアントサイトカインの結合は、増殖、生存能力、持続性、細胞傷害性、サイトカイン分泌、記憶、及び活性増強からなる群から選択される細胞応答を引き起こす。

【０２７９】

ＩＬ－７ＲαのＥＣＤを含む受容体

特定の態様では、キメラ受容体であって、（ｉ）インターロイキン－７受容体アルファ（ＩＬ－７Ｒα）の細胞外ドメイン（ＥＣＤ）と、（ｉｉ）膜貫通ドメイン（ＴＭＤ）と、（ｉｉｉ）配列番号１０９に記載される野生型ヒトＩＬ－７Ｒα細胞内シグナル伝達ド

メインとは異なる、サイトカイン受容体の細胞内ドメイン（ＩＣＤ）と、を含み、ＥＣＤ及びＴＭＤはそれぞれＩＣＤと作動可能に連結している、キメラ受容体が本明細書で開示される。いくつかの実施形態では、ＥＣＤのカルボキシ末端（Ｃ末端）は、ＴＭＤのアミノ末端（Ｎ末端）に連結し、ＴＭＤのＣ末端は、ＩＣＤのＮ末端に連結している。いくつかの実施形態では、ＥＣＤは、天然ヒトＩＬ－７ＲαのＥＣＤである。いくつかの実施形態では、ＴＭＤは、ＩＬ－７ＲαのＴＭＤである。いくつかの実施形態では、ＴＭＤは、天然ヒトＩＬ－７ＲαのＴＭＤである。いくつかの実施形態では、ＩＣＤは、サイトカイン受容体の細胞内ドメイン由来の少なくとも１つのシグナル伝達分子結合部位を含み、任意選択で、少なくとも１つのシグナル伝達分子結合部位は、（ａ）ＩＬ－２Ｒβ、ＩＬ－４Ｒα、ＩＬ－７Ｒα、ＩＬ－２１Ｒ、もしくはｇｐ１３０のＪＡＫ１結合部位（Ｂｏｘ１及び２領域）、（ｂ）ＩＬ－２ＲβのＳＨＣ結合部位、（ｃ）ＩＬ－２ＲβもしくはＩＬ－７ＲαのＳＴＡＴ５結合部位、（ｄ）ＩＬ－２１Ｒもしくはｇｐ１３０のＳＴＡＴ３結合部位、（ｅ）ＩＬ－１２Ｒβ２のＳＴＡＴ４結合部位、（ｆ）ＩＬ－４ＲαのＳＴＡＴ６結合部位、（ｇ）ＩＬ－４ＲαのＩＲＳ－１もしくはＩＲＳ－２結合部位、（ｈ）ｇｐ１３０のＳＨＰ－２結合部位、（ｉ）ＩＬ－７ＲαのＰＩ３Ｋ結合部位、またはこれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、ＩＣＤがそのネイティブ受容体の一部である場合、ＩＣＤは、共通のガンマ鎖　（γｃ）でのヘテロ二量体化によって活性化される、受容体の少なくとも細胞内シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態では、キメラ受容体のＩＣＤは、共通のガンマ鎖とヘテロ二量体化しない。いくつかの実施形態では、キメラ受容体のＩＣＤは、活性化するとホモ二量体化する。いくつかの実施形態では、ＩＣＤは、ＩＬ－２Ｒβ（インターロイキン－２受容体ベータ）、ＩＬ－４Ｒα（インターロイキン－４受容体アルファ）、ＩＬ－９Ｒα（インターロイキン－９受容体アルファ）、ＩＬ－１２Ｒβ２（インターロイキン－１２受容体）、ＩＬ－２１Ｒ（インターロイキン－２１受容体）、及び糖タンパク質１３０（ｇｐ１３０）、ならびにこれらの組み合わせからなる群から選択されるサイトカイン受容体の少なくとも細胞内シグナル伝達ドメインを含む。

【０２８０】

特定の態様では、キメラ受容体であって、ＩＣＤと作動可能に連結したＩＬ－７ＲαのＥＣＤ及びＴＭＤを含み、ＩＣＤが、

（ｉ）
　（ａ）ＩＬ－２ＲβのＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
　（ｂ）ＩＬ－２ＲβのＳＨＣ結合部位、及び
　（ｃ）ＩＬ－２ＲβのＳＴＡＴ５結合部位、または

（ｉｉ）
　（ａ）ＩＬ－７ＲαのＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
　（ｂ）ＩＬ－２ＲβのＳＨＣ結合部位、及び
　（ｃ）ＩＬ－２ＲβのＳＴＡＴ５結合部位、または

（ｉｉｉ）
　（ａ）ＩＬ－２ＲβのＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
　（ｂ）ＩＬ－２ＲβのＳＨＣ結合部位、
　（ｃ）ＩＬ－２ＲβのＳＴＡＴ５結合部位、及び
　（ｄ）ＩＬ－１２Ｒβ２のＳＴＡＴ４結合部位、または

（ｉｖ）
　（ａ）ＩＬ－７ＲαのＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
　（ｂ）ＩＬ－２ＲβのＳＨＣ結合部位、
　（ｃ）ＩＬ－２ＲβのＳＴＡＴ５結合部位、及び
　（ｄ）ＩＬ－１２Ｒβ２のＳＴＡＴ４結合部位、または

（ｖ）
　（ａ）ＩＬ－２１ＲのＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、及び
　（ｂ）ＩＬ－２１ＲのＳＴＡＴ３結合部位、または

（ｖｉ）
（ａ）ＩＬ－７ＲαのＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、及び
（ｂ）ＩＬ－２１ＲのＳＴＡＴ３結合部位、または
（ｖｉｉ）
（ａ）ＩＬ－２１ＲのＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）ＩＬ－２１ＲのＳＴＡＴ３結合部位、及び
（ｃ）ＩＬ－７ＲαのＳＴＡＴ５及びＰＩ３キナーゼ結合部位、
（ｖｉｉｉ）
（ａ）ＩＬ－７ＲαのＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）ＩＬ－２１ＲのＳＴＡＴ３結合部位、及び
（ｃ）ＩＬ－７ＲαのＳＴＡＴ５及びＰＩ３キナーゼ結合部位、
（ｉｘ）
（ａ）ＩＬ－２ＲβのＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）ＩＬ－２ＲβのＳＨＣ結合部位、
（ｃ）ＩＬ－２ＲβのＳＴＡＴ５結合部位、及び
（ｄ）ＩＬ－２１ＲのＳＴＡＴ３結合部位、または
（ｘ）
（ａ）ＩＬ－７ＲαのＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）ＩＬ－２ＲβのＳＨＣ結合部位、
（ｃ）ＩＬ－２ＲβのＳＴＡＴ５結合部位、及び
（ｄ）ＩＬ－２１ＲのＳＴＡＴ３結合部位、または
（ｘｉ）
（ａ）ＩＬ－２ＲβのＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）ＩＬ－２ＲβのＳＨＣ結合部位、
（ｃ）ＩＬ－２ＲβのＳＴＡＴ５結合部位、
（ｄ）ＩＬ１２Ｒβ２のＳＴＡＴ４結合部位、及び
（ｅ）ＩＬ－２１ＲのＳＴＡＴ３結合部位、または
（ｘｉｉ）
（ａ）ＩＬ－７ＲαのＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）ＩＬ－２ＲβのＳＨＣ結合部位、
（ｃ）ＩＬ－２ＲβのＳＴＡＴ５結合部位、
（ｄ）ＩＬ１２Ｒβ２のＳＴＡＴ４結合部位、及び
（ｅ）ＩＬ－２１ＲのＳＴＡＴ３結合部位、または
（ｘｉｉｉ）
（ａ）ＩＬ－４ＲαのＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）ＩＬ－４ＲαのＩＲＳ－１もしくはＩＲＳ－２結合部位、及び
（ｃ）ＩＬ－４ＲαのＳＴＡＴ６結合部位、または
（ｘｉｖ）
（ａ）ＩＬ－７ＲαのＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）ＩＬ－４αのＩＲＳ－１もしくはＩＲＳ－２結合部位、及び
（ｃ）ＩＬ－４αのＳＴＡＴ６結合部位、または
（ｘｖ）
（ａ）ｇｐ１３０のＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）ｇｐ１３０のＳＨＰ－２結合部位、及び
（ｃ）ｇｐ１３０のＳＴＡＴ３結合部位、または
（ｘｖｉ）
（ａ）ＩＬ－７ＲαのＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）ｇｐ１３０のＳＨＰ－２結合部位、及び
（ｃ）ｇｐ１３０のＳＴＡＴ３結合部位を含む、キメラ受容体が本明細書に記載される。いくつかの実施形態では、（ｂ）は（ｃ）のＮ末端側であるか、または（ｃ）は（ｂ

）のＮ末端側であるか、または（ｃ）は（ｄ）のＮ末端側であるか、または（ｄ）は（ｃ）のＮ末端側であるか、または（ｄ）は（ｅ）のＮ末端側であるか、または（ｅ）は（ｄ）のＮ末端側である。

【０２８１】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のＩＣＤは、ｇｐ１３０またはＧ－ＣＳＦＲのＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域を含む。特定の態様では、Ｂｏｘ１領域は、表１６に列挙されるアミノ酸の配列を含む。特定の態様では、Ｂｏｘ１領域は、表１６に列挙されたＢｏｘ１配列と５０％を超えて同一であるアミノ酸配列を含む。

【０２８２】

いくつかの実施形態では、ＩＣＤは、配列番号１９２～２１４のうち少なくとも１つに記載の配列に対して少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％同一の配列を含む。

【０２８３】

いくつかの実施形態では、ＩＣＤのシグナル伝達分子結合部位（複数可）は、配列番号１１８～１４６に記載の配列を含む。いくつかの実施形態では、ＩＣＤのシグナル伝達分子結合部位（複数可）は、配列番号１１８～１４６のうち少なくとも１つに記載の配列に対して少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％同一の配列を含む。特定の態様では、キメラサイトカイン受容体は、表３２に開示されるアミノ酸配列のＮ末端からＣ末端の順序のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％のアミノ酸同一性を共有する。

【０２８４】

キメラ受容体及びＩＬ－７を含むシステム

特定の態様では、本開示は、細胞表面上に発現した受容体を選択的に活性化させるためのシステムであって、（ａ）本明細書に記載されるキメラ受容体、及び（ｂ）ＩＬ－７を含む、システムを記載する。

【０２８５】

特定の態様では、本開示は、免疫細胞を選択的に活性化させるためのシステムであって、（ａ）本明細書に記載されるキメラ受容体、（ｂ）ＩＬ－７、及び（ｃ）抗原結合性シグナル伝達受容体を含む、システムを記載する。

【０２８６】

特定の態様では、本開示は、免疫細胞を選択的に活性化させるためのシステムであって、（ａ）本明細書に記載されるキメラ受容体、（ｂ）ＩＬ－７、及び（ｃ）少なくとも１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）を含み、任意選択で、１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）は、１つ以上のサイトカイン（複数可）、ケモカイン（複数可）、ホルモン（複数可）、抗体（複数可）、もしくはこれらの誘導体（複数可）、または他の親和性試薬を含む、システムを記載する。いくつかの実施形態では、サイトカインまたはケモカインは、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、インターフェロンα、インターフェロンβ、インターフェロンγ、ＩＬ－１７、ＩＬ－２１、ＴＮＦ－α、ＣＸＣＬ１３、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１α）、ＣＣＬ４（ＭＩＰ－１β）、ＣＤ４０リガンド、Ｂ細胞活性化因子（ＢＡＦＦ）、Ｆｌｔ３リガンド、ＣＣＬ２１、ＣＣＬ５、ＸＣＬ１、ＣＣＬ１９、ＮＫＧ２Ｄ、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、サイトカインはＩＬ－１８である。いくつかの実施形態では、サイトカインはヒトのものである。

【０２８７】

いくつかの実施形態では、システムは、少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体を更に含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体は、天然のＴ細胞受容体、操作されたＴ細胞受容体（ＴＣＲ）、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、天然のＢ細胞受容体、操作されたＢ細胞受容体（ＢＣＲ）、ストレスリガンド受容体、パターン認識受容体、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される少なくとも１つの受容体を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体はＣＡＲである。

【０２８８】

アゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質

特定の態様では、本明細書に記載のシステム及び方法は、少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）であって、任意選択で、１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）は、１つ以上のサイトカイン（複数可）、ケモカイン（複数可）、ホルモン（複数可）、抗体（複数可）、もしくはこれらの誘導体（複数可）、または他の親和性試薬（複数可）を含む、少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）、及び（ｂ）少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体（複数可）を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの追加のサイトカイン（複数可）またはケモカイン（複数可）は、インターロイキン（ＩＬ）－１８、ＩＬ－２１、インターフェロンα、インターフェロンβ、インターフェロンγ、ＩＬ－１７、ＩＬ－２１、ＴＮＦ－α、ＣＸＣＬ１３、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１α）、ＣＣＬ４（ＭＩＰ－１β）、ＣＤ４０リガンド、Ｂ細胞活性化因子（ＢＡＦＦ）、Ｆｌｔ３リガンド、ＣＣＬ２１、ＣＣＬ５、ＸＣＬ１、ＣＣＬ１９、及び受容体ＮＫＧ２Ｄ、ならびにこれらの組み合わせのうち少なくとも１つを含む。

【０２８９】

抗原結合性シグナル伝達受容体

特定の態様では、本明細書に記載のシステム及び方法は、抗原結合性シグナル伝達受容体（複数可）を含む。いくつかの実施形態では、抗原結合性シグナル伝達受容体（複数可）は、天然のＴ細胞受容体、操作されたＴ細胞受容体（ＴＣＲ）、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、天然のＢ細胞受容体、操作されたＢ細胞受容体（ＢＣＲ）、ストレスリガンド受容体、パターン認識受容体、及びこれらの組み合わせのうち少なくとも１つを含む。メソテリンＣＡＲ、または本明細書に記載の任意のＣＡＲが挙げられるがこれらに限定されない、当技術分野で既知の任意のＣＡＲを使用することができる。本明細書に記載の任意のＴＣＲが挙げられるがこれらに限定されない、当技術分野で既知の任意のＴＣＲを使用することができる。

【０２９０】

バリアントサイトカイン及び受容体をコードする核酸

本開示に含まれるのは、本明細書に記載の受容体及びバリアントＧ－ＣＳＦのいずれか１つをコードする核酸である。

【０２９１】

バリアント受容体またはバリアントＧ－ＣＳＦは、組み換えにより直接生成されるだけでなく、異種ポリペプチド、例えば、シグナル配列、または成熟タンパク質もしくはポリペプチドのＮ末端に特定の切断部位を有する他のポリペプチドとの融合ポリペプチドとしても生成されてもよい。一般に、シグナル配列は、ベクターの構成要素であっても、ベクターに挿入されるコード配列の一部であってもよい。選択された異種シグナル配列は、好ましくは、宿主細胞によって認識及びプロセシングされる（すなわち、シグナルペプチダーゼによって切断される）ものである。哺乳動物細胞の発現では、天然シグナル配列が使用されても、他の哺乳動物のシグナル配列、例えば、同じ種または関連種の分泌ポリペプチド由来のシグナル配列、及びウイルス分泌リーダーが適していてもよい。特定の態様では、シグナル配列は、配列番号２、３、６、または８のＮ末端領域にシグナル配列を含むアミノ酸配列であり得る。特定の態様では、シグナル配列は、ＭＡＲＬＧＮＣＳＬＴＷＡ

ＡＬＩＩＬＬＬＰＧＳＬＥ（配列番号１１）のアミノ酸配列であり得る。
【０２９２】
本開示に含まれるのは、本明細書に記載の受容体、ＩＬ－７、及びバリアントＧ－ＣＳＦのいずれか１つをコードする核酸である。
【０２９３】
バリアント受容体、または野生型もしくはバリアントＩＬ－７、もしくはバリアントＧ－ＣＳＦは、組み換えにより直接生成されるだけでなく、異種ポリペプチド、例えば、シグナル配列、または成熟タンパク質もしくはポリペプチドのＮ末端に特定の切断部位を有する他のポリペプチドとの融合ポリペプチドとしても生成されてもよい。一般に、シグナル配列は、ベクターの構成要素であっても、ベクターに挿入されるコード配列の一部であってもよい。選択された異種シグナル配列は、好ましくは、宿主細胞によって認識及びプロセシングされる（すなわち、シグナルペプチダーゼによって切断される）ものである。哺乳動物細胞の発現では、天然シグナル配列が使用されても、他の哺乳動物のシグナル配列、例えば、同じ種または関連種の分泌ポリペプチド由来のシグナル配列、及びウイルス分泌リーダーが適していてもよい。特定の態様では、シグナル配列は、配列番号２、３、６、または８のＮ末端領域にシグナル配列を含むアミノ酸配列であり得る。特定の態様では、シグナル配列は、ＭＴＩＬＧＴＴＦＧＭＶＦＳＬＬＱＶＶＳＧ（配列番号８４）のアミノ酸配列であり得る。特定の態様では、シグナル配列は、ＭＡＲＬＧＮＣＳＬＴＷＡＡＬＩＩＬＬＬＰＧＳＬＥ（配列番号１１）のアミノ酸配列であり得る。
【０２９４】
バリアントサイトカインまたは受容体をコードする発現ベクター
本明細書に記載のバリアント受容体、バリアントＧ－ＣＳＦ、または野生型もしくはバリアントＩＬ－７の１つ以上をコードする１つ以上の核酸配列（複数可）を含む、発現ベクター及び発現ベクターのキットもまた本明細書に記載される。
【０２９５】
特定の実施形態では、バリアント受容体またはバリアントＧ－ＣＳＦをコードする核酸は、発現のため複製可能なベクターに挿入される。このようなベクターは、本明細書に記載のバリアント受容体またはサイトカインを発現するように、核酸配列（複数可）を宿主細胞に導入するために使用され得る。多くのそのようなベクターが利用可能である。ベクターの構成要素は、一般に、複製起点、１つ以上のマーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーター、及び転写終結配列のうちの１つ以上を含むが、これらに限定されない。ベクターは、ウイルスベクター、プラスミドベクター、組み込みベクターなどを含む。ベクターは、例えば、プラスミドまたはウイルスベクター、例えばレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、レンチウイルスベクター、またはトランスポゾンベースのベクターまたは合成ｍＲＮＡであり得る。ベクターは、細胞（例えば、Ｔ細胞、ＮＫ細胞、または他の細胞）をトランスフェクトまたは形質導入することができ得る。
【０２９６】
発現ベクターは、通常、選択可能なマーカーとも呼ばれる選択遺伝子を含有する。選択可能なマーカー遺伝子は、選択的培養培地で増殖する形質転換された宿主細胞の生存または増殖に必要なタンパク質をコードする。選択遺伝子を含有するベクターで形質転換されなかった宿主細胞は、培養培地で生存しない。典型的な選択遺伝子は、（ａ）抗生物質もしくは他の毒素、例えば、アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキセート、もしくはテトラサイクリンに対する耐性を付与するか、（ｂ）栄養要求性欠損を補うか、または（ｃ）複合培地から入手不可能な重要な栄養素を供給する、タンパク質をコードする。
【０２９７】
特定の態様では、発現ベクターは、宿主生物により認識され、バリアントタンパク質コード配列に作動可能に連結されるプロモーターを含有する。プロモーターは、それらが作動可能に連結される特定の核酸配列の転写及び翻訳を制御する構造遺伝子の開始コドンの上流（５’）に位置する非翻訳配列（一般に約１００～１０００ｂｐ以内）である。そのようなプロモーターは、典型的には、２つのクラス、誘導プロモーター及び構成プロモー

ターに分けられる。誘導プロモーターは、培養条件の何らかの変化、例えば、栄養素の有無または温度の変化に応じてそれらの制御下で、ＤＮＡから、増加したレベルの転写を開始するプロモーターである。様々な潜在的な宿主細胞により認識される多数のプロモーターが周知である。

【０２９８】

哺乳動物宿主細胞におけるベクターからの転写は、ポリオーマウイルス、鶏痘ウイルス、アデノウイルス（例えば、アデノウイルス２）、ウシパピローマウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス（例えば、マウス幹細胞ウイルス）、Ｂ型肝炎ウイルス、最も好ましくは、シミアンウイルス４０（ＳＶ４０）などのウイルスのゲノムから、異種哺乳動物プロモーター、例えば、アクチンプロモーター、ＰＧＫ（ホスホグリセリン酸キナーゼ）、または免疫グロブリンプロモーターから、熱ショックプロモーターから得られるプロモーターにより制御され得る。ただし、そのようなプロモーターが宿主細胞系と適合することを条件とする。ＳＶ４０ウイルスの初期及び後期プロモーターは、ＳＶ４０ウイルスの複製起点も含有するＳＶ４０制限フラグメントとして都合よく得られる。

【０２９９】

高等真核生物による転写は、多くの場合、エンハンサー配列をベクターに挿入することにより増加する。エンハンサーはＤＮＡのシス作用エレメントであり、通常約１０～３００ｂｐであり、プロモーターに作用してその転写を促進する。エンハンサーは、相対的に配向及び位置に依存せず、転写ユニットの５’側及び３’側、イントロン内、ならびにコード配列それ自体内のうちに見出される。哺乳動物遺伝子（グロビン、エラスターゼ、アルブミン、フェトプロテイン、及びインスリン）由来の多くのエンハンサー配列が知られている。しかしながら、典型的には、真核細胞ウイルス由来のエンハンサーが使用される。例としては、複製起点の後期側のＳＶ４０エンハンサー、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期側のポリオーマエンハンサー、及びアデノウイルスエンハンサーが挙げられる。エンハンサーは、コード配列の５’または３’位で発現ベクターにスプライシングされてもよいが、好ましくは、プロモーター由来の５’部位に位置する。

【０３００】

真核生物宿主細胞に使用される発現ベクターは、転写の終結及びｍＲＮＡの安定化に必要な配列も含有する。そのような配列は、一般に、真核生物またはウイルスのＤＮＡまたはｃＤＮＡの、５’側、場合により３’側の非翻訳領域から得ることができる。上記の構成要素の１つ以上を含有する好適なベクターの構築は、標準的な技術を用いる。

【０３０１】

特定の態様では、本明細書に開示されるのは、本明細書に開示されるキメラ受容体をコードするレンチウイルスベクターである。特定の態様では、レンチウイルスベクターは、ＨＩＶ－１　５’ＬＴ及び３’ＬＴＲを含む。特定の態様では、レンチウイルスベクターは、ＥＦ１ａプロモーターを含む。特定の態様では、レンチウイルスベクターは、ＳＶ４０ポリターミネーター配列を含む。特定の態様では、ベクターはｐｓＰＡＸ２、Ａｄｄｇｅｎｅ（登録商標）１２２６０、ｐＣＭＶ－ＶＳＶ－Ｇ、またはＡｄｄｇｅｎｅ（登録商標）８４５４である。

【０３０２】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の配列に対して高い配列同一性、例えば、９５、９６、９７、９８、９９％以上の配列同一性を有する核酸及びポリペプチド配列も記載される。パーセント配列「同一性」という用語は、２つ以上の核酸またはポリペプチド配列の文脈において、以下に記載する配列比較アルゴリズム（例えば、ＢＬＡＳＴＰ及びＢＬＡＳＴＮまたは当業者が利用できる他のアルゴリズム）の１つを使用して、または目視検査により測定された、最大対応性について比較及びアラインメントされるときに、同一である特定の割合のヌクレオチドまたはアミノ酸残基を有する、２つ以上の配列または部分配列を指す。用途に応じて、パーセント「同一性」は、比較される配列の領域上にわ

たり、例えば、機能ドメイン上にわたり、あるいは、比較される２つの配列の全長上にわたり存在することができる。

【０３０３】

配列比較のため、典型的には、１つの配列が基準配列の役割を果たし、これと試験配列が比較される。配列比較アルゴリズムを使用する場合、コンピューターに試験配列及び参照配列を入力し、必要に応じて部分配列座標を指定し、配列アルゴリズムプログラムパラメーターを指定する。次に、配列比較アルゴリズムは、指定されたプログラムパラメーターに基づいて、参照配列に対する試験配列（複数可）のパーセント配列同一性を計算する。

【０３０４】

比較のための配列の最適なアラインメントは、例えば、Ｓｍｉｔｈ＆Ｗａｔｅｒｍａｎ，Ａｄｖ．Ａｐｐｌ．Ｍａｔｈ．２：４８２（１９８１）の局所的相同性アルゴリムにより、Ｎｅｅｄｌｅｍａｎ＆Ｗｕｎｓｃｈ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．４８：４４３（１９７０）の相同性アラインメントアルゴリズムにより、Ｐｅａｒｓｏｎ＆Ｌｉｐｍａｎ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ’ｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８５：２４４４（１９８８）の類似性探求方法により、これらのアルゴリズムのコンピュータ化実装により（Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｓｏｆｔｗａｒｅ Ｐａｃｋａｇｅ，Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ，５７５ Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｄｒ．，Ｍａｄｉｓｏｎ，Ｗｉｓ．におけるＧＡＰ，ＢＥＳＴＦＩＴ，ＦＡＳＴＡ，及びＴＦＡＳＴＡ）、または目視検査（一般的には、Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．、以下を参照）により実施され得る。

【０３０５】

パーセント配列同一性及び配列類似性を決定するのに適したアルゴリズムの１つの例は、ＢＬＡＳＴアルゴリズムであり、Ａｌｔｓｃｈｕｌ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２１５：４０３－４１０（１９９０）に記載される。ＢＬＡＳＴ分析を実行するためのソフトウェアは、アメリカ国立生物工学情報センター（ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／）を介して公的に利用可能である。

【０３０６】

バリアント受容体及びバリアントサイトカインを発現する細胞

本明細書には、バリアント受容体を発現する細胞も記載されている。操作された免疫細胞を含む宿主細胞に、バリアントサイトカインまたは受容体発現のための上記の発現ベクターをトランスフェクトまたは形質導入することができる。

【０３０７】

特定の実施形態では、本開示は、本明細書に記載のバリアント受容体またはバリアントサイトカインのうちの１つ以上を含む細胞を提供する。細胞は、本明細書に記載のバリアント受容体またはバリアントサイトカインをコードする核酸またはベクターを含み得る。本開示はまた、バリアント受容体を発現する細胞を産生する方法を提供する。特定の態様では、細胞は、本明細書に記載の核酸または発現ベクターを細胞に導入することによって産生される。核酸または発現ベクターは、トランスフェクション、ウイルスベクターの形質導入、転移または遺伝子編集を含むがこれらに限定されない任意のプロセスによって細胞に導入することができる。当技術分野で知られている任意の遺伝子編集技術を使用することができ、クラスター化等間隔短鎖回分リピート（ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ）システム、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、転写活性化因子様エフェクターベースヌクレアーゼ、及びメガヌクレアーゼからなる技術を含むがこれに限定されない。

【０３０８】

宿主細胞は、体内の任意の細胞であり得る。特定の実施形態では、細胞は免疫細胞である。いくつかの実施形態では、細胞はＴ細胞であり、ナイーブＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞、細胞傷害性ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞、ナイーブＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞、ヘルパーＴ細胞、例えば、$Ｔ_{Ｈ}１$、$Ｔ_{Ｈ}２$、$Ｔ_{Ｈ}９$、$Ｔ_{Ｈ}１１$、$Ｔ_{Ｈ}２２$、$Ｔ_{ＦＨ}$；制御性Ｔ細胞、例えば、$Ｔ_{Ｒ}１$、天然$Ｔ_{Ｒｅｇ}$、誘導性$Ｔ_{Ｒｅｇ}$；メモリーＴ細胞、例えば、セントラルメモリーＴ細胞、エフェクターメモリーＴ細胞、ＮＫＴ細胞、γδＴ細胞などを含むが、これらに限定されない。特定の実

施形態では、細胞はＢ細胞であり、ナイーブＢ細胞、胚中心Ｂ細胞、メモリーＢ細胞、細胞傷害性Ｂ細胞、サイトカイン産生Ｂ細胞、制御性Ｂ細胞（Ｂｒｅｇ）、中心芽細胞、中心細胞、抗体分泌細胞、形質細胞などを含むが、これらに限定されない。特定の実施形態では、細胞は自然リンパ系細胞であり、ＮＫ細胞などを含むが、これらに限定されない。特定の実施形態では、細胞は骨髄系細胞であり、マクロファージ、樹状細胞、骨髄由来抑制細胞などを含むが、これらに限定されない。

【０３０９】

特定の実施形態では、細胞は幹細胞であり、造血幹細胞、間葉系幹細胞、神経幹細胞などを含むが、これらに限定されない。

【０３１０】

いくつかの実施形態では、細胞は、対象に移植される前に、ｅｘ　ｖｉｖｏ手順で遺伝的に改変される。細胞は、治療のために単位用量で提供され得、意図されたレシピエントに関して同種他家由来、自己由来などであることができる。

【０３１１】

Ｔ細胞またはＴリンパ球は、細胞媒介性免疫において中心的な役割を果たすリンパ球の一種である。それらは、細胞表面上のＴ細胞受容体（ＴＣＲ）の存在によって、Ｂ細胞及びナチュラルキラー細胞（ＮＫ細胞）のような他のリンパ球と区別されることができる。以下にまとめるように、Ｔ細胞には様々な種類がある。

【０３１２】

ヘルパーＴヘルパー細胞（Ｔｈ細胞）は、形質細胞及びメモリーＢ細胞へのＢ細胞の成熟、ならびに細胞傷害性Ｔ細胞及びマクロファージの活性化を含む、免疫学的プロセスにおいて他の白血球を補助している。Ｔｈ細胞は、その表面にＣＤ４を発現する。Ｔｈ細胞は、抗原提示細胞（ＡＰＣ）の表面上にあるＭＨＣクラスＩＩ分子によってペプチド抗原を提示されると、活性化状態になる。これらの細胞は、Ｔｈ１、Ｔｈ２、Ｔｈ３、Ｔｈ１７、Ｔｈ９、またはＴｆｈを含むいくつかのサブタイプ（これらは、異なるタイプの免疫応答を促進するために異なるサイトカインを分泌する）のうちの１つへと分化し得る。

【０３１３】

細胞溶解性Ｔ細胞（ＴＣ細胞またはＣＴＬ）は、ウイルス感染細胞及び腫瘍細胞を破壊し、移植拒絶反応にも関与する。ほとんどのＣＴＬは、その表面にＣＤ８を発現する。これらの細胞は、ＭＨＣクラスＩ（すべての有核細胞の表面に存在する）に会合される抗原への結合により標的を認識する。

【０３１４】

メモリーＴ細胞は抗原特異的Ｔ細胞のサブセットであり、感染が回復した後であっても長期的に存続する。メモリーＴ細胞は、その同種抗原へ再暴露されると、ただちに多数のエフェクターＴ細胞へと拡張し、免疫系に、過去の感染に対する「メモリー」を提供する。メモリーＴ細胞は、セントラルメモリーＴ細胞（ＴＣＭ細胞）と２種類のエフェクターメモリーＴ細胞（ＴＥＭ細胞及びＴＥＭＲＡ細胞）の、３つのサブタイプを含む。メモリー細胞は、ＣＤ４＋またはＣＤ８＋のいずれかであり得る。典型的に、メモリーＴ細胞は、細胞表面タンパク質ＣＤ４５ＲＯを発現する。

【０３１５】

制御性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ細胞）は、以前はサプレッサーＴ細胞として知られており、免疫寛容の維持に不可欠である。それらの主な役割は、Ｔ細胞媒介性免疫を免疫応答の終わりに向けてシャットダウンし、胸腺における負の選択のプロセスを逃れた自己反応性Ｔ細胞を抑制することである。ＣＤ４＋Ｔｒｅｇ細胞には、内在性Ｔｒｅｇ細胞と適応性Ｔｒｅｇ細胞の２つの主要分類が記載されている。

【０３１６】

内在性Ｔｒｅｇ細胞（ＣＤ４＋ＣＤ２５＋ＦｏｘＰ３＋Ｔｒｅｇ細胞としても公知である）は胸腺で生じ、ＴＳＬＰによって活性化された骨髄性（ＣＤ１１ｃ＋）及び形質細胞様（ＣＤ１２３＋）樹状細胞の両方と発達中のＴ細胞との間の相互反応に関連している。Ｔｒｅｇ細胞は、ＦｏｘＰ３と呼ばれる細胞内分子の存在により他のＴ細胞と区別するこ

とができる。

【０３１７】

適応性Ｔｒｅｇ細胞（Ｔｒ１細胞またはＴｈ３細胞としても公知である）は、正常な免疫応答中に発生し得る。細胞は、ナチュラルキラー細胞（またはＮＫ細胞）であり得る。ＮＫ細胞は、自然免疫系の一部を形成する。ＮＫ細胞は、ＭＨＣ非依存的にウイルス感染細胞からの自然免疫シグナルに対して、迅速な応答を提供する。

【０３１８】

特定の態様では、本明細書に記載のバリアント受容体またはバリアントサイトカインを発現する細胞は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）または腫瘍関連リンパ球（ＴＡＬ）である。特定の態様では、ＴＩＬまたはＴＡＬは、ＣＤ４＋Ｔ細胞、ＣＤ８＋Ｔ細胞、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、及びそれらの組み合わせを含む。

【０３１９】

特定の実施形態では、本明細書に記載されるＴ細胞は、免疫療法で使用するための人工Ｔ細胞受容体を産生するように遺伝子操作されたキメラ抗原受容体Ｔ細胞（ＣＡＲ－Ｔ細胞）である。特定の態様では、ＣＡＲ－Ｔ細胞は、患者自身の血液中のＴ細胞に由来する（すなわち、自己由来）。特定の態様では、ＣＡＲ－Ｔは、別の健康なドナーのＴ細胞に由来する（すなわち、同種他家由来）。特定の態様では、ＣＡＲ－Ｔ細胞は、多能性幹細胞などの非免疫細胞型に由来するか、またはそれから合成される。

【０３２０】

特定の実施形態では、本明細書に記載のＴ細胞は、免疫療法で使用するための特定のＴ細胞受容体を産生するように遺伝子操作された、操作されたＴ細胞受容体（ｅＴＣＲ－Ｔ細胞）である。特定の態様では、ｅＴＣＲ－Ｔ細胞は、患者自身の血液中のＴ細胞に由来する（すなわち、自己由来）。特定の態様では、ｅＴＣＲ－Ｔ細胞は、ドナーのＴ細胞に由来する（すなわち、同種他家由来）。特定の態様では、ｅＴＣＲ－Ｔ細胞は、多能性幹細胞などの非免疫細胞型に由来するか、またはそれから合成される。

【０３２１】

特定の態様では、本明細書に記載されるキメラサイトカイン受容体を発現する細胞は、ＮＫ細胞である。ＮＫ細胞（自然リンパ球の群に属する）は、大顆粒リンパ球（ＬＧＬ）として定義され、Ｂリンパ球及びＴリンパ球を生成する共通のリンパ性前駆細胞から分化した第３の種類の細胞を構成する。ＮＫ細胞は、骨髄、リンパ節、脾臓、扁桃腺、及び胸腺で分化及び成熟し、次いでそこから循環系に入ることが知られている。特定の態様では、ＮＫ細胞は、患者自身の血液中のＮＫ細胞に由来する（すなわち、自己由来）。特定の態様では、ＮＫ細胞は、ドナーのＮＫ細胞に由来する（すなわち、同種他家由来）。特定の態様では、ＮＫ細胞は、多能性幹細胞などの非免疫細胞型に由来するか、またはそれから合成される。

【０３２２】

特定の態様では、本明細書に記載されるキメラサイトカイン受容体を発現する細胞は、Ｂ細胞である。Ｂ細胞には、ナイーブＢ細胞、胚中心Ｂ細胞、メモリーＢ細胞、細胞傷害性Ｂ細胞、サイトカイン産生Ｂ細胞、制御性Ｂ細胞（Ｂｒｅｇ）、胚中心細胞、中心細胞、抗体分泌細胞、形質細胞が含まれるが、これらに限定されない。特定の態様では、Ｂ細胞は、患者自身の血液中のＢ細胞に由来する（すなわち、自己由来）。特定の態様では、Ｂ細胞は、ドナーのＢ細胞に由来する（すなわち、同種他家由来）。特定の態様では、Ｂ細胞は、多能性幹細胞などの非免疫細胞型に由来するか、またはそれから合成される。

【０３２３】

特定の態様では、本明細書に記載のキメラサイトカイン受容体を発現する細胞は、マクロファージ、樹状細胞、骨髄由来サプレッサー細胞などを含むがこれらに限定されない骨髄細胞である。特定の態様では、骨髄細胞は、患者自身の血液中の骨髄細胞に由来する（すなわち、自己由来）。特定の態様では、骨髄細胞は、ドナーの骨髄細胞に由来する（すなわち、同種他家由来）。特定の態様では、骨髄細胞は、多能性幹細胞などの非免疫細胞型に由来するか、またはそれから合成される。

【０３２４】
本明細書に記載のバリアント受容体またはバリアントサイトカインを発現する細胞は、任意の細胞型であり得る。特定の態様では、本明細書に記載されるバリアント受容体またはバリアントサイトカインを発現する細胞は、造血系の細胞である。本発明による免疫細胞（例えば、Ｔ細胞またはＮＫ細胞）は、患者自身の末梢血（ファーストパーティー）からか、ドナー末梢血からの造血幹細胞移植の設定（セカンドパーティー）においてか、または非血縁者のドナー由来の末梢血（サードパーティー）から、ｅｘ　ｖｉｖｏに作製され得る。あるいは、本明細書に記載の免疫細胞は、誘導性前駆細胞または胚性前駆細胞の、免疫細胞へのｅｘ　ｖｉｖｏな分化に由来し得る。あるいは、エフェクター機能を保持し、治療薬として作用することができる、不死化免疫細胞株を使用することができる（例えば、溶解機能を保持するＴ細胞またはＮＫ細胞株、抗体産生機能を保持する形質細胞株、または食作用及び抗原提示機能を保持する樹状細胞株もしくはマクロファージなど）。これらすべての実施形態では、バリアント受容体発現細胞は、ウイルスベクターによる形質導入またはＤＮＡもしくはＲＮＡによるトランスフェクションを含む、多くの手段のうちの１つによって、各バリアント受容体（複数可）をコードするＤＮＡまたはＲＮＡを導入することによって生成される。

【０３２５】
本明細書に記載の細胞は、バリアント受容体及び／またはバリアントサイトカインを発現するようにｅｘ　ｖｉｖｏで操作された対象に由来する免疫細胞であり得る。免疫細胞は、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）試料または腫瘍試料由来であり得る。免疫細胞は、本発明の第１の態様によるバリアント受容体またはバリアントサイトカインを提供する分子をコードする核酸で形質導入される前に、例えば抗ＣＤ３モノクローナル抗体及び／またはＩＬ－２での処理によって、活性化及び／または拡大され得る。本発明の免疫細胞は、（ｉ）対象または上記の他の供給源から免疫細胞含有試料を単離することと、（ｉｉ）バリアント受容体またはバリアントサイトカインをコードする１つ以上の核酸配列（複数可）を用いて免疫細胞の形質導入またはトランスフェクションすることと、によって作製され得る。

【０３２６】
細胞は、プロモーターの誘導、形質転換体の選択、または所望の配列をコードする遺伝子の増幅のために必要に応じて改変される従来の栄養培地において培養することができる。哺乳動物の宿主細胞は、さまざまな培地で培養することができる。Ｈａｍ’ｓ　Ｆ１０（Ｓｉｇｍａ）、最小必須培地（（ＭＥＭ）、Ｓｉｇｍａ）、ＲＰＭＩ　１６４０（Ｓｉｇｍａ）、及びダルベッコ修飾イーグル培地（（ＤＭＥＭ）、Ｓｉｇｍａ）などの市販の培地は、宿主細胞の培養に好適である。これらの培地のいずれにも、必要に応じて、ホルモン及び／または他の増殖因子（インスリン、トランスフェリン、または上皮増殖因子など）、塩（塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム、及びリン酸塩など）、緩衝液（ＨＥＰＥＳなど）、ヌクレオシド（アデノシン及びチミジンなど）、抗生物質、微量要素、及びグルコースまたは同等のエネルギー源が補充され得る。任意の他の必要な補充物もまた、当業者には既知であろう適切な濃度で含まれ得る。温度、ｐＨなどの培養条件は、発現のために選択された宿主細胞にこれまでに使用されているものであり、当業者には明らかであろう。

【０３２７】
次に、免疫細胞は、精製、例えば、抗原結合ポリペプチドの抗原結合ドメインの発現に基づいて選択することができる。特定の実施形態では、細胞は、選択可能なマーカー（例えば、タンパク質、蛍光マーカー、またはエピトープタグ）の発現によって、または細胞の選択、単離、及び／または精製のための当技術分野で知られている任意の方法によって選択される。

【０３２８】
キット
本開示は、本明細書に記載のバリアント受容体またはバリアントＧ－ＣＳＦのいずれか

の少なくとも１つを発現する細胞を産生するためのキットも記載する。特定の態様では、本明細書に記載されるキメラ受容体をコードする細胞であって、任意選択で、該細胞は免疫細胞である、細胞と、使用説明書と、を含むキットが本明細書で説明され、任意選択で、該キットはＩＬ－７及び／またはバリアントＧ－ＣＳＦを含む。特定の態様では、本明細書に記載のキメラ受容体をコードする核酸配列（複数可）を含む１つ以上の発現ベクター（複数可）と、使用説明書と、を含むキットが本明細書で説明され、任意選択で、キットはＩＬ－７及び／またはバリアントＧ－ＣＳＦを含む。特定の実施形態では、キットは、少なくとも１つのバリアント受容体をコードする少なくとも１つの発現ベクターと、使用説明書とを含む。特定の態様では、キットは、医薬製剤中の少なくとも１つのバリアントサイトカイン、または本明細書に記載のバリアント受容体の少なくとも１つと結合するバリアントＧ－ＣＳＦをコードする発現ベクターを更に含む。特定の実施形態では、キットは、本明細書に記載されるバリアント受容体をコードする発現ベクターを含む細胞を含む。

【０３２９】

特定の実施形態では、キットは、（ＣＡＲ）／操作されたＴ細胞受容体（ｅＴＣＲ）など（例えば、操作された非ネイティブＴＣＲ受容体）をコードする発現ベクターを含む細胞を含む。特定の実施形態では、キットは、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）／操作されたＴ細胞受容体（ｅＴＣＲ）などをコードする発現ベクターを含む。特定の実施形態では、キットは、本明細書に記載のバリアント受容体及びキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）／操作されたＴ細胞受容体（ｅＴＣＲ）などをコードする発現ベクターを含む。

【０３３０】

特定の態様では、本明細書に記載のキットは、バリアントサイトカインを更に含む。特定の実施形態では、キットは、少なくとも１つの追加のバリアントサイトカインを更に含む。特定の態様では、キットは、医薬製剤中の少なくとも１つのバリアントサイトカインを更に含む。特定の態様では、本明細書に記載のキットは、少なくとも１つのサイトカイン（例えば、ＩＬ－７及び／またはバリアントＧ－ＣＳＦ）を更に含む。いくつかの実施形態では、キットは、少なくとも１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）を含み、任意選択で、１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）は、１つ以上のサイトカイン（複数可）、ケモカイン（複数可）、ホルモン（複数可）、抗体（複数可）、もしくはこれらの誘導体（複数可）、または他の親和性試薬を含む。いくつかの実施形態では、キットは、少なくとも１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）をコードする１つ以上の発現ベクター（複数可）を含み、任意選択で、１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）は、１つ以上のサイトカイン（複数可）、ケモカイン（複数可）、ホルモン（複数可）、抗体（複数可）、もしくはこれらの誘導体（複数可）、または他の親和性試薬を含む。

【０３３１】

特定の実施形態では、成分は、任意の便利な包装中で液状または固形の剤形で提供される。

【０３３２】

いくつかの実施形態では、キットは、少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）をコードする１つ以上の発現ベクターを含み、任意選択で、少なくとも１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）は、１つ以上のサイトカイン（複数可）、ケモカイン（複数可）、ホルモン（複数可）、抗体（複数可）、もしくはこれらの誘導体（複数可）、または他の親和性試薬（複数可）を含む。特定の実施形態では、キットは、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、インターフェロンα、インターフェロンβ、インターフェロンγ、ＩＬ－１７、ＩＬ－２１、ＴＮＦ－α、ＣＸＣＬ１３、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１α）、ＣＣＬ４（ＭＩＰ－１β）、ＣＤ４０リガンド、Ｂ細胞活性化因子（ＢＡＦＦ）、Ｆｌｔ３リガンド、ＣＣＬ２１、ＣＣＬ５、ＸＣＬ１、もしくはＣＣＬ１９、または受容体ＮＫＧ２Ｄ、及びこれらの

組み合わせからなる群から選択されるサイトカイン（複数可）またはケモカイン（複数可）をコードする１つ以上の発現ベクター（複数可）を更に含む。特定の実施形態では、キットは、少なくとも１つの抗原結合性受容体（複数可）をコードする１つ以上の発現ベクター（複数可）を更に含む。特定の実施形態では、少なくとも１つの抗原結合性受容体（複数可）は、天然のＴ細胞受容体、操作されたＴ細胞受容体（ＴＣＲ）、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、天然のＢ細胞受容体、操作されたＢ細胞受容体（ＢＣＲ）、ストレスリガンド受容体、パターン認識受容体、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される。特定の実施形態では、キットは、キメラ抗原受容体をコードする発現ベクターを更に含む。

【０３３３】

いくつかの実施形態では、細胞は、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、インターフェロンα、インターフェロンβ、インターフェロンγ、ＩＬ－１７、ＩＬ－２１、ＴＮＦ－α、ＣＸＣＬ１３、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１α）、ＣＣＬ４（ＭＩＰ－１β）、ＣＤ４０リガンド、Ｂ細胞活性化因子（ＢＡＦＦ）、Ｆｌｔ３リガンド、ＣＣＬ２１、ＣＣＬ５、ＸＣＬ１、もしくはＣＣＬ１９、または受容体ＮＫＧ２Ｄ、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される少なくとも１つのサイトカイン（複数可）またはケモカイン（複数可）をコードする１つ以上の発現ベクター（複数可）を更に含む。いくつかの実施形態では、細胞は、少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体（複数可）をコードする１つ以上の発現ベクター（複数可）を更に含む。

【０３３４】

特定の態様では、少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体（複数可）は、天然のＴ細胞受容体、操作されたＴ細胞受容体（ＴＣＲ）、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、天然のＢ細胞受容体、操作されたＢ細胞受容体（ＢＣＲ）、ストレスリガンド受容体、パターン認識受容体、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、細胞は、少なくとも１つのＣＡＲ（複数可）をコードする１つ以上の発現ベクター（複数可）を更に含み、任意選択で、ＣＡＲはメソテリンＣＡＲである。特定の実施形態では、成分は、任意の便利な包装中で液状または固形の剤形で提供される。

【０３３５】

本明細書に記載されるように提供される細胞または産生される細胞の増殖、選択、及び調製のために、追加の試薬が提供され得る。例えば、キットは、細胞培養のための成分、成長因子、分化剤、トランスフェクションまたは形質導入のための試薬などを含むことができる。

【０３３６】

特定の実施形態では、上記の成分に加えて、キットは使用説明書も含むことができる。説明書は、任意の便利な形態で提供することができる。例えば、説明書は、印刷された情報として、キットのパッケージ、パッケージの挿入物などに提供されてもよい。説明書は、情報が記録されたコンピュータ可読媒体として提供することもできる。更に、説明書は、情報にアクセスするために使用できるウェブサイトのアドレスで提供されてもよい。

【０３３７】

バリアント受容体の選択的活性化の方法

本開示は、細胞の表面上に発現したバリアント受容体を選択的に活性化するための方法であって、本明細書に記載のバリアント受容体を、キメラ受容体を選択的に活性化するサイトカインと接触させることを含む、方法を提供する。特定の態様では、キメラ受容体を選択的に活性化するサイトカインは、バリアントＧ－ＣＳＦである。Ｇ－ＣＳＦは、ネイティブ（野生型）サイトカイン受容体と比較して、バリアント受容体へのＧ－ＣＳＦの優先的結合及び活性化をもたらす１つ以上の変異を含む、野生型Ｇ－ＣＳＦまたはＧ－ＣＳＦであることができる。

【０３３８】

特定の態様では、バリアント受容体へのサイトカインの結合によるバリアント受容体の選択的活性化は、ホモ二量体化、ヘテロ二量体化、またはそれらの組み合わせをもたらす

。

【０３３９】

特定の態様では、バリアント受容体の活性化は、下流のシグナル伝達分子の活性化をもたらす。特定の態様では、バリアント受容体は、ネイティブ細胞内シグナル伝達分子を通じて伝達されるシグナル伝達分子または経路を活性化して、そのネイティブ応答を模倣する生物学的活性を提供するが、それはバリアント受容体を発現するように操作された細胞に対して特異的である。特定の実施形態では、キメラ受容体の活性型がホモ二量体を形成し、任意選択で、キメラ受容体の活性化により、受容体を発現する細胞の増殖、生存能力、持続性、細胞傷害性、サイトカイン分泌、記憶、及び活性増強、ならびにこれらの組み合わせのうち少なくとも１つを含む細胞応答が引き起こされ、任意選択で、キメラ受容体はサイトカインに接触すると活性化される。

【０３４０】

特定の態様では、下流のシグナル伝達分子の活性化は、細胞周期の進行、増殖、生存、及び／または増強された活性を刺激する細胞シグナル伝達経路の活性化を含む。特定の態様では、活性化されるシグナル伝達経路または分子は、これらに限定されないが、ＪＡＫ１、ＪＡＫ２、ＪＡＫ３、ＴＹＫ２、ＳＴＡＴ１、ＳＴＡＴ２、ＳＴＡＴ３、ＳＴＡＴ４、ＳＴＡＴ５Ａ、ＳＴＡＴ５Ｂ、ＳＴＡＴ６、Ｓｈｃ、ＥＲＫ１／２、ＩＲＳ－１、ＩＲＳ－２、及びＡｋｔである。特定の態様では、バリアント受容体の活性化は、受容体に結合するサイトカインの投与後の細胞増殖の増加をもたらす。特定の態様では、増殖の程度は、細胞がＩＬ－２で刺激されたときに観察される増殖の０．１～１０倍である。

【０３４１】

特定の態様では、細胞の表面上に発現した１つ以上のキメラ受容体（複数可）を活性化させる方法であって、１つ以上のキメラ受容体（複数可）をＩＬ－７と接触させて、キメラ受容体を活性化することを含む、方法が本明細書に記載され、ここでキメラ受容体は、（ｉ）ＩＬ－７Ｒαの細胞外ドメイン（ＥＣＤ）と、（ｉｉ）膜貫通ドメイン（ＴＭＤ）と、（ｉｉｉ）配列番号１０９に記載される野生型ヒトＩＬ－７Ｒα細胞内シグナル伝達ドメインとは異なる、サイトカイン受容体の細胞内ドメイン（ＩＣＤ）と、を含み、ＥＣＤ及びＴＭＤはそれぞれＩＣＤと作動可能に連結している。いくつかの実施形態では、キメラ受容体（複数可）は、本明細書に記載されるＩＣＤを含むキメラ受容体である。

【０３４２】

細胞を選択的に活性化させるための方法及びシステム

特定の態様では、細胞を選択的に活性化させるための方法及びシステムであって、（ｉ）顆粒球コロニー刺激因子受容体（Ｇ－ＣＳＦＲ）のバリアント細胞外ドメイン（ＥＣＤ）を含む受容体と、（ｉｉ）（ｉ）の受容体に選択的に結合するバリアントＧ－ＣＳＦと、（ａ）少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）であって、任意選択で、１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）は、１つ以上のサイトカイン（複数可）、ケモカイン（複数可）、ホルモン（複数可）、抗体（複数可）、もしくはこれらの誘導体（複数可）、または他の親和性試薬（複数可）を含む、少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）、及び（ｂ）少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体のうちの一方または両方と、を含む、方法及びシステムが本明細書に記載される。いくつかの実施形態では、受容体は免疫細胞上で発現し、任意選択で、免疫細胞は、Ｔ細胞、任意選択でＮＫ細胞、任意選択でＮＫＴ細胞、任意選択でＢ細胞、任意選択で形質細胞、任意選択でマクロファージ、任意選択で樹状細胞であり、任意選択で該細胞は幹細胞であり、任意選択で該細胞は初代細胞であり、任意選択で該細胞はヒト細胞である。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞、細胞傷害性ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞、ナイーブＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞、ナイーブＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞、ヘルパーＴ細胞、制御性Ｔ細胞、メモリーＴ細胞、及びγδＴ細胞からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの追加のサイトカイン（複数可）またはケモカイン（複数可）は、インターロイキン（ＩＬ）－１８、ＩＬ－２１、インターフェロンα、インターフェロンβ、

インターフェロンγ、ＩＬ－１７、ＩＬ－２１、ＴＮＦ－α、ＣＸＣＬ１３、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１α）、ＣＣＬ４（ＭＩＰ－１β）、ＣＤ４０リガンド、Ｂ細胞活性化因子（ＢＡＦＦ）、Ｆｌｔ３リガンド、ＣＣＬ２１、ＣＣＬ５、ＸＣＬ１、及びＣＣＬ１９、ならびに受容体ＮＫＧ２Ｄ、ならびにこれらの組み合わせのうち少なくとも１つを含む。特定の実施形態では、Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む受容体は、本明細書に記載のキメラ受容体である。

【０３４３】

特定の実施形態では、システムは、抗原結合性シグナル伝達受容体を更に含む。特定の実施形態では、抗原結合性シグナル伝達受容体は、天然のＴ細胞受容体、操作されたＴ細胞受容体（ＴＣＲ）、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、天然のＢ細胞受容体、操作されたＢ細胞受容体（ＢＣＲ）、ストレスリガンド受容体、パターン認識受容体、及びこれらの組み合わせのうち少なくとも１つを含む。メソテリンＣＡＲを含むがこれに限定されない、当該技術分野で既知の任意のＣＡＲを使用してよい。

【０３４４】

特定の態様では、本明細書に記載されるシステムのＧ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む受容体、並びに、（ｉ）少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）であって、任意選択で、少なくとも１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）は、本明細書に記載されるシステムの１つ以上のサイトカイン（複数可）、ケモカイン（複数可）、ホルモン（複数可）、抗体（複数可）、もしくはこれらの誘導体（複数可）、または他の親和性試薬（複数可）を含む、少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）、及び（ｉｉ）本明細書に記載されるシステム少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体、の一方または両方を発現する細胞を産生する方法が本明細書に記載される。いくつかの実施形態では、方法は、細胞に、受容体をコードする１つ以上の核酸（複数可）または発現ベクター（複数可）、並びに（ｉ）及び（ｉｉ）のうち一方または両方を導入することを含む。いくつかの実施形態では、免疫細胞の第１の集団が、Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む受容体を発現し、免疫細胞の第２の集団が、バリアントＧ－ＣＳＦを発現する。いくつかの実施形態では、免疫細胞の第１及び第２の集団（複数可）のうち一方または両方が、（ａ）少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）であって、任意選択で、少なくとも１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）は、１つ以上のサイトカイン（複数可）、ケモカイン（複数可）、ホルモン（複数可）、抗体（複数可）、もしくはこれらの誘導体（複数可）、または他の親和性試薬（複数可）を含む、少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）、及び（ｂ）少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体、のうち一方または両方を更に発現する。

【０３４５】

特定の態様では、キメラ受容体を含む細胞を活性化させるための方法及びシステムであって、（ａ）インターロイキン受容体アルファ（ＩＬ－７Ｒα）の細胞外ドメイン（ＥＣＤ）と、（ｂ）膜貫通ドメイン（ＴＭＤ）と、（ｃ）配列番号１０９に記載される野生型ヒトＩＬ－７Ｒα細胞内シグナル伝達ドメインとは異なる、サイトカイン受容体の細胞内ドメイン（ＩＣＤ）と、を含み、ＥＣＤ及びＴＭＤはそれぞれＩＣＤと作動可能に連結している、方法及びシステムが本明細書に記載される。

【０３４６】

養子細胞移植の方法

本発明は、本明細書に記載のバリアント受容体及び／またはバリアントサイトカインを発現する細胞（例えば、以下に記載の医薬組成物）を対象に投与するステップを含む、疾患を治療及び／または予防するための方法を提供する。

【０３４７】

疾患を治療するための方法は、本明細書に記載の細胞、例えば、Ｔ細胞、ＮＫ細胞、ま

たはバリアント受容体を発現する他の任意の免疫細胞または非免疫細胞の治療的使用に関する。細胞は、疾患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、及び／または疾患の進行を減速、低減、または阻止するために、既存の疾患または状態を有する対象に投与することができる。疾患を予防するための方法は、本開示の細胞の予防的使用に関連する。そのような細胞は、疾患の原因を予防もしくは損なわせるため、または疾患に関連する少なくとも１つの症状の発生を低減もしくは予防するために、まだ疾患に罹患していない及び／または疾患の症状を示していない対象に投与され得る。対象は、疾患の素因を持っているか、または発症するリスクがあると考えられ得る。

【０３４８】

いくつかの実施形態では、主題の組成物、方法、及びキットを使用して、免疫応答を増強する。いくつかの実施形態では、免疫応答は、サイトカインの全身投与（例えば、筋肉内、腹腔内、静脈内など）による、標的細胞、例えば、がん細胞、感染細胞、自己免疫疾患に関わる免疫細胞などの枯渇または調節が望ましい状態に対して行われる。

【０３４９】

本方法は、（ｉ）免疫細胞含有試料を単離するステップと、（ｉｉ）そのような細胞を、例えばバリアント受容体を発現する核酸配列またはベクターで形質導入またはトランスフェクトするステップと、（ｉｉｉ）（ｉｉ）の細胞を対象に投与（すなわち、注入）するステップと、（ｉｖ）注入された細胞を刺激するバリアントサイトカインを投与するステップと、を含み得る。特定の態様では、対象は、細胞を対象に投与する前に、免疫除去治療を受けたことがある。特定の態様では、対象は、細胞を対象に投与する前に、免疫除去治療を受けたことがない。特定の態様では、対象は、細胞を対象に投与する前に、本明細書に記載のバリアント受容体を使用しなければ必要となるであろう重症度、用量、及び／または期間が低減された免疫除去治療を受けたことがある。

【０３５０】

特定の実施形態では、方法は、少なくとも１つの追加の活性剤、及び任意選択で、少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）を投与または提供することを更に含み、任意選択で、少なくとも１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）は、１つ以上のサイトカイン（複数可）、ケモカイン（複数可）、ホルモン（複数可）、抗体（複数可）、もしくはこれらの誘導体（複数可）、または他の親和性試薬（複数可）を含む。特定の実施形態では、対象は、別個のキメラ受容体をそれぞれ発現し、且つサイトカインの別個のバリアント型をそれぞれ発現する、２つ以上の細胞集団を投与される。特定の実施形態では、キメラ受容体を発現する細胞は、少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体を更に発現する。特定の実施形態では、抗原結合性シグナル伝達受容体は、天然のＴ細胞受容体、操作されたＴ細胞受容体（ＴＣＲ）、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、天然のＢ細胞受容体、操作されたＢ細胞受容体（ＢＣＲ）、ストレスリガンド受容体、パターン認識受容体、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される少なくとも１つの受容体（複数可）を含む。特定の実施形態では、抗原結合性シグナル伝達受容体はＣＡＲである。特定の実施形態では、少なくとも１つのサイトカイン（複数可）またはケモカイン（複数可）は、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、インターフェロンα、インターフェロンβ、インターフェロンγ、ＩＬ－１７、ＩＬ－２１、ＴＮＦ－α、ＣＸＣＬ１３、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１α）、ＣＣＬ４（ＭＩＰ－１β）、ＣＤ４０リガンド、Ｂ細胞活性化因子（ＢＡＦＦ）、Ｆｌｔ３リガンド、ＣＣＬ２１、ＣＣＬ５、ＸＣＬ１、もしくはＣＣＬ１９、または受容体ＮＫＧ２Ｄ、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される。

【０３５１】

免疫細胞含有試料は、例えば上記のように、対象または他の供給源から単離することができる。免疫細胞は、対象自身の末梢血（ファーストパーティー）からか、ドナー末梢血からの造血幹細胞移植の設定（セカンドパーティー）においてか、または非血縁者のドナー由来の末梢血（サードパーティー）から、単離することができる。免疫細胞はまた、幹細胞または他の形態の前駆細胞から誘導分化させるなど、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ方法で誘導す

ることも可能である。

【０３５２】

いくつかの実施形態では、免疫細胞は、ｉｎ　ｖｉｖｏでバリアントサイトカインと接触する、すなわち、免疫細胞をレシピエントに移し、有効量のバリアントサイトカインをレシピエントに投与して、その本来の場所、例えばリンパ節などで免疫細胞と接触させる。いくつかの実施形態では、接触はｉｎ　ｖｉｔｒｏで行われる。細胞がｉｎ　ｖｉｔｒｏでバリアントサイトカインと接触する場合、サイトカインは、受容体からのシグナル伝達を活性化するのに十分な用量及び期間、細胞に添加され、これは、ネイティブな細胞内機構の特徴、例えば、アクセサリータンパク質、共受容体などを利用することができる。活性化された細胞は、抗原特異性の決定、サイトカインプロファイリング、及びｉｎ　ｖｉｖｏでの送達に関連する実験目的を含むがこれらに限定されない、任意の目的に使用することができる。

【０３５３】

特定の態様では、治療的有効な数の細胞が対象に投与される。特定の態様では、対象は、複数の別々の機会にバリアント受容体を発現する細胞を投与または注入される。特定の実施形態では、少なくとも１ｘ１０^{6}細胞／ｋｇ、少なくとも１ｘ１０^{7}細胞／ｋｇ、少なくとも１ｘ１０^{8}細胞／ｋｇ、少なくとも１ｘ１０^{9}細胞／ｋｇ、少なくとも１ｘ１０^{10}細胞／ｋｇ、またはそれ以上が投与され、これは、採取中に得られる細胞、例えば、トランスフェクトされたＴ細胞の数によって制限されることがある。トランスフェクトされた細胞は、任意の生理学的に許容される培地で、通常は血管内で対象に注入することができるが、細胞が増殖に適した部位を見つけ得る、他の任意の都合のよい部位に導入されてもよい。

【０３５４】

特定の態様では、治療的有効量のバリアントサイトカインが対象に投与される。特定の態様では、対象は、複数の別々の機会にバリアントサイトカインを投与される。特定の態様では、投与されるバリアントサイトカインの量は、治療的に望ましい結果を達成する（例えば、対象の疾患の症状を軽減する）のに十分な量である。特定の態様では、投与されるバリアントサイトカインの量は、本明細書に記載のバリアントサイトカイン受容体を発現する細胞の細胞周期の進行、増殖、生存、及び／または機能的活性を刺激するのに十分な量である。特定の態様では、バリアントサイトカインは、治療的に望ましい結果を達成するのに必要とされる用量及び／または期間で投与される。特定の態様では、バリアントサイトカインは、本明細書に記載のバリアントサイトカイン受容体を発現する細胞の細胞周期の進行、増殖、生存、及び／または機能的活性を刺激するのに十分な用量及び／または期間で投与される。投与量及び頻度は、薬剤、投与方法、サイトカインの性質などによって異なる場合がある。そのようなガイドラインは個々の状況に合わせて調整されることが当業者によって理解されるであろう。投与量はまた、局所投与（例えば、鼻腔内投与、吸入など）について、全身投与（例えば、筋肉内、腹腔内、血管内など）について、変えることができる。

【０３５５】

養子細胞移植の適応症

本開示は、疾患の治療及び／または予防に使用するための、本明細書に記載のバリアント受容体を発現する細胞を提供する。本発明はまた、疾患の治療及び／または予防のための薬剤の製造における、本明細書に記載のバリアント受容体を発現する細胞の使用に関する。

【０３５６】

本発明の方法によって治療及び／または予防される疾患は、胆管癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、卵巣癌、結腸癌、子宮内膜癌、血液悪性腫瘍、腎臓癌（腎細胞）、白血病、リンパ腫、肺癌、メラノーマ、非ホジキンリンパ腫、膵臓癌、前立腺癌、肉腫、及び甲状腺癌などの癌性疾患であり得るが、これらに限定されない。

【０３５７】

治療及び／または予防される疾患は、自己免疫疾患であってもよい。自己免疫疾患は、自己タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、及び／または他の自己分子を異常に標的とするＴ及びＢリンパ球により、体内の器官、組織、または細胞型（例えば、膵臓、脳、甲状腺、または消化管）の損傷及びまたは機能不全を引き起こして、疾患の臨床症状を引き起こすことが特徴である。自己免疫疾患には、特定の組織に影響を与える疾患と、複数の組織に影響を与えることができる疾患があり、これは、応答が特定の組織に限定された抗原に向けられるか、または体内に広く分布する抗原に向けられるかによって、部分的に左右され得る。自己免疫疾患には、１型糖尿病、全身性エリテマトーデス、関節リウマチ、自己免疫性甲状腺疾患、及びバセドウ病が含まれるが、これらに限定されるものではない。

【０３５８】

治療及び／または予防すべき疾患は、心臓線維症などの炎症状態であってもよい。一般に、炎症性状態または障害は、典型的には、免疫系が身体の自身の細胞または組織を攻撃し、異常な炎症を引き起こす可能性があり、慢性的な痛み、発赤、腫脹、硬直、及び正常な組織の損傷をもたらす可能性がある。炎症性疾患は、炎症を特徴とする、または炎症によって引き起こされるものであり、セリアック病、血管炎、ループス、慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）、過敏性腸疾患、動脈硬化、関節炎、筋炎、強皮症、痛風、シェーグレン症候群、強直性脊椎炎、抗リン脂質抗体症候群、及び乾癬が含まれるが、これらに限定されるものではない。

【０３５９】

特定の実施形態では、本方法は、感染性疾患を治療するために使用される。

【０３６０】

特定の実施形態では、本方法は、変性疾患または状態を治療するために使用される。変性疾患または状態の例としては、加齢に関連する神経変性疾患及び状態が挙げられるが、これらに限定されない。

【０３６１】

特定の実施形態では、本方法は、移植のための、天然のまたは操作された細胞、組織、または器官を生成するために使用される。

【０３６２】

特定の実施形態では、治療されるべき状態は、移植片拒絶反応を予防及び治療することである。特定の実施形態では、治療及び／または予防されるべき状態は、同種移植片拒絶反応である。特定の態様では、同種移植片拒絶反応は、急性同種移植片拒絶反応である。

【０３６３】

治療及び／または予防されるべき疾患は、罹患した個体への細胞、組織、器官、または他の解剖学的構造の移植を含み得る。細胞、組織、臓器、または他の解剖学的構造は、同じ個体（自家または「自家」移植）または異なる個体（同種他家または「同種」移植）に由来する可能性がある。細胞、組織、臓器、または他の解剖学的構造は、細胞クローニング、細胞分化誘導、または合成生体材料による作製を含む、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ方法を用いて作製することも可能である。

【０３６４】

本発明は、本明細書に記載のバリアントサイトカイン及び／または細胞（例えば、上記の医薬組成物中の）を対象に投与する１つ以上のステップを含む、疾患を治療及び／または予防するための方法を提供する。

【０３６５】

疾患を治療及び／または予防するための方法は、本開示の細胞の治療的使用に関する。本明細書では、細胞は、疾患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、及び／または疾患の進行を減速、低減、または阻止するために、既存の疾患または状態を有する対象に投与することができる。疾患を予防するための方法は、本開示の細胞の予防的使用に関連する。そのような細胞は、疾患の原因を予防もしくは損なわせるため、または疾患に関連する少なくとも１つの症状の発生を低減もしくは予防するために、まだ疾患に罹患していない及び／または疾患の症状を示していない対象に投与され得る

。対象は、疾患の素因を持っているか、または発症するリスクがあると考えられ得る。本方法は、（ｉ）免疫細胞含有試料を単離するステップと、（ｉｉ）そのような細胞を、本発明によって提供される核酸配列またはベクターで形質導入またはトランスフェクトするステップと、（ｉｉｉ）（ｉｉ）の細胞を対象に投与するステップと、（ｉｖ）注入された細胞を刺激するバリアントサイトカインを投与するステップと、を含み得る。免疫細胞含有試料は、例えば上記のように、対象または他の供給源から単離することができる。免疫細胞は、対象自身の末梢血（ファーストパーティー）からか、ドナー末梢血からの造血幹細胞移植の設定（セカンドパーティー）においてか、または非血縁者のドナー由来の末梢血（サードパーティー）から、単離することができる。

【０３６６】

治療は、他の活性剤、例えば、抗生物質、抗がん剤、抗ウイルス剤、及び他の免疫調節剤（例えば、プログラム細胞死タンパク質－１［ＰＤ－１］経路に対する抗体またはＣＴＬＡ－４に対する抗体）と組み合わせてもよいが、これらに限定されるものではない。また、追加のサイトカインが含まれてもよい（例えば、インターフェロンγ、腫瘍壊死因子α、インターロイキン１２など）。

【０３６７】

バリアントサイトカイン受容体を発現する幹細胞を使用する方法

本発明は、本明細書に記載のバリアント受容体及び／またはバリアントサイトカインを発現する幹細胞を投与するステップを含む、状態または疾患を治療及び／または予防するための方法を提供する。特定の実施形態では、本明細書に記載のバリアントサイトカイン受容体及び／またはバリアントサイトカインを発現する幹細胞は、再生医療、細胞／組織／臓器移植、組織再建、または組織修復に使用される。

【０３６８】

医薬組成物

本開示はまた、本明細書に記載のバリアント受容体及び／または本明細書に記載のサイトカインを発現する複数の細胞を含有する医薬組成物に関する。本開示はまた、本明細書に記載のバリアントサイトカインを含有する医薬組成物に関する。本発明の細胞は、医薬組成物に製剤化することができる。これらの組成物は、本明細書に記載のバリアント受容体を発現する１つ以上の細胞に加えて、薬学的に許容される賦形剤、担体、緩衝剤、安定剤、または当業者に周知の他の材料を含むことができる。そのような材料は無毒性でなければならず、活性成分の有効性を妨げてはならない。医薬組成物は、任意選択で、１つ以上のさらなる薬学的に活性なポリペプチド及び／または化合物を含んでもよい。そのような製剤は、例えば、静脈内注入に適した形態であり得る。

【０３６９】

個体に投与されるべき本開示による、本明細書に記載のバリアント受容体及びバリアントサイトカインを発現する細胞の場合、投与は、個体に利益を示すのに十分な「治療的有効量」であることが好ましい。個体に利益を示すのに十分な場合、「予防的に有効な量」もまた投与することができる。投与されるサイトカインの実際の量または細胞数、ならびに投与の速度及び時間経過は、治療される疾患の性質及び重篤度に依存する。治療法、例えば投与量の決定などは、一般開業医及び他の医師の責任の範囲内であり、通常、治療すべき障害、個々の患者の状態、送達部位、投与方法、及び開業医に知られている他の要因を考慮する。上記の技術及びプロトコルの例は、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，１６ｔｈ ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｏｓｏｌ，Ａ．（ｅｄ），１９８０に見出すことができる。

【０３７０】

医薬組成物は、治療すべき状態に応じて、単独で、または他の治療と組み合わせて、同時投与または逐次投与することができる。

【実施例】

【０３７１】

以下は、本発明を実行するための特定の実施形態の実施例である。これらの実施例は、

例示を目的として提供されているにすぎず、決して本発明の範囲を限定することを意図するものではない。使用される数値（例えば、量、温度など）に対する正確さを確保する努力がなされているが、当然いくつかの実験によるエラー及び偏差が許容されるはずである。

【０３７２】

本発明の実施は、別途指示のない限り、当業者の範囲内で、タンパク質化学、生化学、組み換えＤＮＡ手法、細胞培養、養子細胞移植、及び薬理学の従来の方法を用いるであろう。そのような手法は、文献で完全に説明される。例えば、Ｔ．Ｅ．Ｃｒｅｉｇｈｔｏｎ，Ｐｒｏｔｅｉｎｓ：Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅｓ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ（Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ ａｎｄ Ｃｏｍｐａｎｙ，１９９３）；Ａ．Ｌ．Ｌｅｈｎｉｎｇｅｒ，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ（Ｗｏｒｔｈ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ，Ｉｎｃ．，ｃｕｒｒｅｎｔ ａｄｄｉｔｉｏｎ）；Ｓａｍｂｒｏｏｋ，ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（２ｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，１９８９）；Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ（Ｓ．Ｃｏｌｏｗｉｃｋ ａｎｄ Ｎ．Ｋａｐｌａｎ ｅｄｓ．，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｉｎｃ．）；Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，１８ｔｈ Ｅｄｉｔｉｏｎ（Ｅａｓｔｏｎ，Ｐｅｎｎｓｙｌｖａｎｉａ：Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏｍｐａｎｙ，１９９０）；Ｃａｒｅｙ ａｎｄ Ｓｕｎｄｂｅｒｇ Ａｄｖａｎｃｅｄ Ｏｒｇａｎｉｃ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ３ｒｄ Ｅｄ．（Ｐｌｅｎｕｍ Ｐｒｅｓｓ）Ｖｏｌｓ Ａ ａｎｄ Ｂ（１９９２）を参照のこと。

【０３７３】

実施例１：Ｇ－ＣＳＦ：Ｇ－ＣＳＦＲ（ＣＲＨ）の排他的サイトＩＩ界面の合理的デザイン

野生型（ＷＴ）Ｇ－ＣＳＦ$_{WT}$：Ｇ－ＣＳＦＲ$_{WT}$複合体は、２：２ヘテロ二量体である。Ｇ－ＣＳＦは、Ｇ－ＣＳＦＲの細胞外ドメイン（ＥＣＤ）との２つの結合界面を有する。Ｇ－ＣＳＦとＧ－ＣＳＦＲの細胞外サイトカイン受容体相同（ＣＲＨ）ドメインとの間のより大きな界面は、サイトＩＩと呼ばれる。Ｇ－ＣＳＦとＧ－ＣＳＦＲのＮ末端Ｉｇ様（Ｉｇ）細胞外ドメインとの間のより小さな界面は、サイトＩＩＩと呼ばれる（図１を参照）。

【０３７４】

共進化した、操作された（Ｅ）Ｇ－ＣＳＦ$_{E}$：Ｇ－ＣＳＦＲ$_{E}$サイトカイン：受容体ペアを設計するために、ＷＴ Ｇ－ＣＳＦと、Ｇ－ＣＳＦＲのＩｇ－ＣＲＨ細胞外ドメインとの２：２複合体（プロテインデータバンクＩＤ ２Ｄ９Ｑ，Ｔａｍａｄａ ｅｔ ａｌ．ＰＮＡＳ ２００６）を、サイトＩＩ及びサイトＩＩＩ界面を包含する、それぞれＧ－ＣＳＦ：Ｇ－ＣＳＦＲ（ＣＲＨ）及びＧ－ＣＳＦ：Ｇ－ＣＳＦＲ（Ｉｇ）からなる、２つの異なるサブコンプレックスに分離した（図１を参照）。配列については表１及び表１Ａを参照のこと。表１の配列番号２に記載のＧ－ＣＳＦＲアミノ酸配列は、Ｇ－ＣＳＦＲに関して本明細書で使用される変異番号付けに使用されるアミノ酸位置に対応する。表１Ａに列挙される配列番号１０１に記載のＧ－ＣＳＦＲ配列は、Ｎ末端の１つのアミノ酸（グルタミン酸）が除去されていることを除いて、配列番号２と同一である。したがって、本明細書で使用される変異番号付けのためのアミノ酸位置は、配列番号１０１のアミノ酸２～３０８に対応する。

【０３７５】

方法

共進化した排他的なＧ－ＣＳＦ$_{E}$：Ｇ－ＣＳＦＲ$_{E}$変異ペア（デザイン）を作成するために、コンピュテーショナルデザインワークフローを採用した（図２を参照）。まず、サイトＩＩでの排他的デザインを作成した。

【０３７６】

Ｇ－ＣＳＦ$_{WT}$：Ｇ－ＣＳＦＲ（ＣＲＨ）$_{WT}$のサイトＩＩ界面相互作用のｉｎ ｓｉｌｉｃｏ構造解析は、サイトＩＩでの引力ＡＭＢＥＲエネルギー合計１０９．６４ｋｃａ

ｌ／ｍｏｌを占める、ほとんどの分子相互作用が荷電残基によって行われることを示した（図３を参照）。詳細な検査により、ほとんどが静電相互作用と水素結合相互作用、例えば、Ｇ－ＣＳＦＲ（ＣＲＨ）のＲ１６７とＧ－ＣＳＦのＤ１１２／Ｄ１０９間であることが明らかとなり、これはサイトＩＩでの引力ＡＭＢＥＲエネルギー合計の２８％を占める。別の重要な静電相互作用は、Ｇ－ＣＳＦＲ（ＣＲＨ）のＲ１４１とＧ－ＣＳＦのＥ１２２／Ｅ１２３間に存在し（図４を参照）、これはサイトＩＩの引力ＡＭＢＥＲエネルギー合計の２１．４％を占める（図３を参照）。同様に、サイトカインのＥ１９と受容体ＣＲＨドメインのＲ２８８の間の塩橋は１７．３％を占め、アルギニンは、受容体ＣＲＨドメインのＤ２００への静電及び水素結合相互作用によって更に安定化される。

【０３７７】

サイトＩＩでの各デザインは、Ｇ－ＣＳＦ$_{E}$とＧ－ＣＳＦＲ（ＣＲＨ）$_{E}$の変異ペアからなる。まず、サイトＩＩでのポジティブデザインを、例えば、結合パートナー側の塩基性残基を酸性残基に、またはその逆に変異させることによる電荷の反転を通じて作成しながら、必要に応じて追加の変異によりパッキング及び疎水性相互作用を維持した。変異ペアＧ－ＣＳＦ$_{E}$：Ｇ－ＣＳＦＲ（ＣＲＨ）$_{E}$は、ＺｙｍｅＣＡＤ（商標）の平均場パッキングワークフローでパッキングした。パッキングしたサイトＩＩのデザインのｉｎ　ｓｉｌｉｃｏモデルを、構造の完全性について目視で検査し、ＺｙｍｅＣＡＤ（商標）メトリックにより評価した。具体的には、Ｇ－ＣＳＦ$_{E}$変異体が、対応するＧ－ＣＳＦＲ（ＣＲＨ）$_{E}$変異体に対して、ＺｙｍｅＣＡＤ（商標）のｉｎ　ｓｉｌｉｃｏのｄＡＭＢＥＲ結合親和力を１０ｋｃａｌ／ｍｏｌ未満有するようにデザインすることを目指した（ペア相互作用）。このメトリックは、Ｌｅｎｎａｒｄ　Ｊｏｎｅｓ親和性及び静電親和性の合計であるＡＭＢＥＲ親和性を、ＷＴ：ＷＴのサイトカイン－受容体ペアのＡＭＢＥＲ親和性と比較したものである。ｄＡＭＢＥＲ＿ｆｏｌｄｉｎｇが８０ｋｃａｌ／ｍｏｌ超のデザインは除外された。ｄＡＭＢＥＲ＿ｆｏｌｄｉｎｇメトリックは、変異時の、Ｌｅｎｎａｒｄ　Ｊｏｎｅｓ結合フォールディングと静電フォールディングの合計の変化をスコアリングする。また、ｄＤＤＲＷアポスタビリティ（ａｐｏｓｔａｂｉｌｉｔｙ）において４００ｋｃａｌ／ｍｏｌよりも高いスコアを得たデザインも除外した。このメトリックは、タンパク質がそのアポ型から変異した際の、知識ベースの潜在的安定性における変化を表す。

【０３７８】

次に、各デザインのＧ－ＣＳＦ$_{E}$変異体を、ＺｙｍｅＣＡＤ（商標）により、ＷＴ　Ｇ－ＣＳＦＲとの複合体（及びその逆のＧ－ＣＳＦＲ$_{E}$とＧ－ＣＳＦ$_{WT}$）にパッキングし、以下の２つの複合体Ｇ－ＣＳＦ$_{WT}$：Ｇ－ＣＳＦＲ（ＣＲＨ）$_{E}$とＧ－ＣＳＦ$_{E}$：Ｇ－ＣＳＦＲ（ＣＲＨ）$_{WT}$を形成する際のミスペアリング条件下で、各ポジティブデザインのメトリックを評価した。ＺｙｍｅＣＡＤ（商標）を用いて、ミスペアリングした配向について、ｉｎ　ｓｉｌｉｃｏのｄｄＡＭＢＥＲメトリックを計算した（ＤｄＡＭＢＥＲ＿ａｆｆｉｎｉｔｙ＿Ａｗｔ＿Ｂｍｕｔは、ペアリングした操作された複合体のＡＭＢＥＲ親和性から、ミスペアリングした複合体Ｇ－ＣＳＦ$_{WT}$：Ｇ－ＣＳＦＲ（ＣＲＨ）$_{E}$のＡＭＢＥＲ親和性を差し引いたものであり、ｄｄＡＭＢＥＲ＿ａｆｆｉｎｉｔｙ＿Ａｍｕｔ＿Ｂｗｔは、ペアリングした操作された複合体のＡＭＢＥＲ親和性から、ミスペアリングした複合体Ｇ－ＣＳＦ$_{E}$：Ｇ－ＣＳＦＲ（ＣＲＨ）$_{WT}$のＡＭＢＥＲ親和性を差し引いたものである。ミスペアリングしたｄｄＡＭＢＥＲ親和性メトリックを最小化するデザインは、野生型サイトカインまたは受容体結合への結合よりも、そのペアリングした結合パートナーに対して選択的であると考えられた。

【０３７９】

すべてのサイトＩＩデザインをクラスター化し、Ｇ－ＣＳＦ$_{E}$：Ｇ－ＣＳＦＲ（ＣＲＨ）$_{E}$、Ｇ－ＣＳＦ$_{WT}$：Ｇ－ＣＳＦＲ（ＣＲＨ）$_{E}$、Ｇ－ＣＳＦ$_{E}$：Ｇ－ＣＳＦＲ（ＣＲＨ）$_{WT}$のパッキングメトリックを検討して、ペアリングの強度（ポジティブデザイン）ならびにＷＴ　Ｇ－ＣＳＦ及びＧ－ＣＳＦＲ（ＣＲＨ）とのミスペアリングに対する選択性（ネガティブデザイン）を評価し、デザインのランク付けをした。

【０３８０】
結果
表２に記載のデザインは、ｉｎ　ｓｉｌｉｃｏでＧ－ＣＳＦ$_{E}$：Ｇ－ＣＳＦＲ（ＣＲＨ）$_{E}$のペアリングに有利であるＺｙｍｅＣＡＤ（商標）におけるパッキングメトリックを有し（表５を参照）、塩橋、水素結合の存在、及び激しい衝突の不在など、目視検査上、ｉｎ　ｓｉｌｉｃｏにおいて満足のいく相互作用を示した（図５を参照）。また、これらのデザインは、ＷＴ　Ｇ－ＣＳＦまたはＧ－ＣＳＦＲ（ＣＲＨ）とのミスペアリングに対して高い選択性を示した（表５を参照）。
【０３８１】
したがって、表２に示す同じバリアントＧ－ＣＳＦ及び受容体デザインのサイトＩＩ変異は、それぞれ野生型Ｇ－ＣＳＦＲ及びＧ－ＣＳＦよりも優先的な結合を示すと予測される。
【０３８２】
【表５】

表５：ＺｙｍｅＣＡＤ（商標）を用いたトリプリケートｉｎ　ｓｉｌｉｃｏ平均場パッキングからのｋｃａｌ／ｍｏｌで示したＡＭＢＥＲメトリックを有するサイトＩＩデザイン。

	Ｇ－ＣＳＦ$_{E}$：Ｇ－ＣＳＦＲ（ＣＲＨ）$_{E}$		Ｇ－ＣＳＦ$_{E}$：Ｇ－ＣＳＦＲ（ＣＲＨ）$_{WT}$	Ｇ－ＣＳＦ$_{WT}$：Ｇ－ＣＳＦＲ（ＣＲＨ）$_{E}$
デザイン	ｄＡＭＢＥＲ＿ａｆｆ	ｄＡＭＢＥＲ＿ｆｏｌｄｉｎｇ	ｄｄＡＭＢＥＲ＿ａｆｆ＿Ｅ＿ＷＴ	ｄｄＡＭＢＥＲ＿ａｆｆ＿ＷＴ＿Ｅ
１	－１３．２	３６．０	－３５．２	－４７．３
２	－２４．２	３５．６	－４１．０	－５５．８
６	８．９	－７．５	－８．８	－１３．３
７	－２４．１	－７．８	－４５．８	－５１．７
８	－３０．５	１２．２	－７３．５	－８６．５
９	－２５．１	１７．４	－８９．６	－１１９．５
１５	－５３．３	５９．５	－７２．４	－７１．０
１７	－０．２	１９．３	－２３．２	－２８．５
１８	－１７．６	７５．２	－４４．２	－２７．８
１９	２０．６	３８．１	－１０．７	－１７．３
２０	－９．９	２８．５	－５２．７	－６４．４

２１	－１８．０	５１．５	－５５．４	－４７．８
２２	－３２．３	５２．２	－７５．０	－５３．３
２４	－１３．０	５７．７	－５０．８	－８６．４
２５	－４９．８	８３．５	－１００．２	－９１．３
２７	－６０．５	４３．０	－１３１．４	－１５６．４
２８	－６１．６	８２．６	－１４８．８	－１３５．９
３０	９．６	－５．０	－３１．４	－２９．１
３４	２．９	１６．７	－６０．４	－６３．１
３５	－２７．４	０．３	－５０．１	－６３．０
３６	－９２．２	３５．１	－１１０．７	－９３．５
４２	－８２．１	６７．７	－１３７．０	－１１９．７
４３	－１４．９	５１．０	－８７．４	－１１１．２
４４	－２０．２	５３．６	－８６．４	－１０８．４
４５	－３５．５	３８．１	－７０．７	－１０７．０
４６	－１１．６	４４．２	－７５．０	－９５．８
４７	－２７．８	７５．８	－７２．４	－９１．５
４８	－６９．７	７６．８	－１２７．８	－８７．７
４９	－５５．９	７９．３	－９４．７	－８４．７

５０	－５２．０	３８．６	－１２３．５	－１３４．９
８０	１５．３	１３．０	－１６．２	１０．８
８１	－２．４	５２．７	－２４．５	－２８．９
８２	２９．８	１０．９	１．６	０．７
８３	３６．３	５４．６	－２１．６	５．５

【０３８３】

実施例２：サイトＩＩデザインのｉｎ　ｖｉｔｒｏスクリーニング

選択されたサイトＩＩデザインは、バキュロウイルスベースの昆虫細胞システムにおいて共発現させたときにサイトＩＩ複合体を形成する能力について、Ｇ－ＣＳＦ$_{E}$：Ｇ－ＣＳＦＲ（ＣＲＨ）$_{E}$の形式でプルダウン実験でスクリーニングした。また、Ｇ－ＣＳＦ$_{E}$変異体の各デザインとＧ－ＣＳＦＲ（ＣＲＨ）$_{WT}$を共発現させることにより、その逆でＧ－ＣＳＦＲ（ＣＲＨ）$_{E}$変異体の各デザインをＧＣＳＦ$_{WT}$と共発現させることにより、デザインがＷＴ受容体またはサイトカインとミスペアリング複合体を形成できるかどうかを評価した。Ｇ－ＣＳＦ$_{E}$のみの発現は、サイトカイン変異体の単一感染によって確認した。

【０３８４】

方法

簡単に言えば、サイトＩＩ　Ｇ－ＣＳＦデザイン及び対応するペアのＧ－ＣＳＦＲ（ＣＲＨ）変異体は、昆虫細胞トランスフェクションベクターに別々にクローニングした。Ｇ－ＣＳＦ　ＷＴ（残基１－１７３、表１）及び変異体を、Ｎ末端分泌シグナル及びＣ末端ＴＥＶ切断可能Ｔｗｉｎ　Ｓｔｒｅｐタグ（配列
AAAENLYFQ/GSAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK

を有する）がインフレームに存在する修飾ｐＡｃＧＰ６７ｂトランスファーベクター（Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ）にクローニングした。受容体細胞外ドメインの中では、サイトＩＩデザイン変異体を有するＣＲＨドメイン（残基９８－３０８、表１）のみが、Ｎ末端分泌シグナル及び配列
HHHHHHSSGRENLYFQ/GSMG

切断可能ヘキサヒスチジンタグがインフレームに存在する修飾ｐＡｃＧＰ６７ｂトランスファーベクターにクローニングされた。すべてのコンストラクトを合成し、昆虫細胞の発現のためにコドンを最適化した（Ｇｅｎｓｃｒｉｐｔ）。トランスファーベクターＤＮＡは、Ｍｉｄｉ－ｐｒｅｐ（ＴｈｅｒｍｏＳｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，ｃａｔ．Ｋ０４８１）により調製し、エンドトキシンを含まず、Ａ$_{260}$／$_{280}$吸光度比が１．８～２．０であった。組換えウイルス生成は、製造元（Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ）の説明に従って付着法を用いて、組換え、線状化バキュロウイルスＤＮＡとベクターＤＮＡを、Ｓｐｏｄｏｐｔｅｒａ　ｆｒｕｇｉｐｅｒｄａ　９（Ｓｆ９）細胞に、共トランスフェクションすることにより達成された。トランスフェクションの約１時間前に、０．４６×１０^{6}細胞ｍｌ$^{-1}$で、健康な対数期Ｓｆ９細胞２ｍＬを６ウェル組織培養プレート（Ｇｒｅｉｎｅｒ，ｃａｔ．６５７－１６０）のウェルごとに播種した。トランスフェクション混合物は以下のように調製した：１００μｌのトランスフェクション培地（Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ，ｃａｔ．９５－０２０－１００）を２本の滅菌１．５ｍｌマイクロチューブＡ及びＢのそれぞれに入

れた。チューブＡには、０．４μｇの組換えＢｅｓｔＢａｃ　２．０Δ　ｖ－ｃａｔｈ／ｃｈｉＡ線状化ＤＮＡ（Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ，ｃａｔ．９１－００２）及び２μｇのベクターＤＮＡを加えた。チューブＢには、１．２μｌの５ＸのＥｘｐｒｅｓｓ^{2}ＴＲトランスフェクション試薬（Ｅｘｐｒｅｓ２ＩＯＮ，ｃａｔ．Ｓ２－５５Ａ－００１）を添加した。溶液Ａ及び溶液Ｂを約２４℃で５分間インキュベートした後、それらを合わせて、３０分間インキュベートした。インキュベーション後、８００μｌのトランスフェクション培地を各トランスフェクション反応物に加え、容量を１ｍｌまで増加させた。古いＥＳＦ９２１培地をウェルから取り除き、細胞の単層を乱さないように滴下して１ｍＬのトランスフェクション混合液で置換した。プレート（複数可）を前後左右に穏やかに揺り動かして、トランスフェクション混合物を均一に分散させ、２７℃で４時間インキュベートした。４時間後、トランスフェクション混合物を共トランスフェクションプレート（複数可）から取り出し、ゲンタマイシンを１０μｇ／ｍｌ（ｃａｔ．１５７５０－０６０）で含有する２ｍＬの新鮮なＥＳＦ９２１昆虫細胞培養培地（Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ、ｃａｔ．９６－００１－０１）を滴下して加えた。蒸発を防ぐため、プレートをサランラップで包み、滅菌プラスチックボックスに入れ、２７℃で４～５日間インキュベートした。トランスフェクション後４日目または５日目に、Ｐ１上清を収集し、５０００ｒｐｍで５分間遠心分離して清澄化し、新しい滅菌チューブに移し、光から保護して４℃で保存した。

【０３８５】

上記のようにして生成した組換えＰ１ストックを更に増幅して、タンパク質発現研究のための高力価、低継代のＰ２ストックを得た。次のワークフローでは、共トランスフェクションから採取したウイルスのＰ１シードストックを接種原として使用して、５０～１００ｍＬのウイルスを生成した。１．５ｘ１０^{6}細胞ｍｌ$^{-1}$での対数期Ｓｆ９細胞５０ｍＬを、２５０ｍＬの振盪フラスコ（ＦｉｓｈｅｒＳｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，ｃａｔ．ＰＢＶ２５０）に播種し、０．５ｍＬのＰ１ウイルスストックを加えた。細胞を２７℃で、１３５ｒｐｍで振盪しながらインキュベートし、感染について観察した。感染後５～７日目にＰ２ウイルス上清を回収し、４０００ｒｐｍで１０分間遠心分離することにより清澄化した。力価の低下を最小限に抑えるため、１０％の熱不活化ＦＢＳ（ＶＷＲ，ｃａｔ．９７０６８－０８５）を加え、Ｐ２ウイルスを４℃で暗所に保管した。

【０３８６】

Ｐ２ウイルスストックを、小規模でのタンパク質発現について試験した。Ｐ２ウイルスを使用して、Ｇ－ＣＳＦ$_{E}$変異体及びその対応するＧ－ＣＳＦＲ$_{E}$変異体を１２ウェルプレート中のＴｒｉｃｈｏｐｌｕｓｉａ　ｎｉ（Ｔｎｉ）細胞に共感染させた。Ｇ－ＣＳＦ$_{WT}$及びＧＣＳＦＲ（ＣＲＨ）$_{WT}$のＰ２ストックを用いて、各デザインの変異体、そしてＧ－ＣＳＦ$_{E}$変異体のみに関して別々の共感染を実施した。各反応について、２ｘ１０^{6}細胞ｍｌ$^{-1}$での健康な対数期Ｔｎｉ２ｍＬに、２０μｌのＰ２ウイルスを接種した。プレートは２７℃で約７０時間、１３５ｒｐｍで振盪しながらインキュベートした。上清を５０００ｒｐｍで３分間遠心分離により清澄化し、分泌タンパク質を、Ｇ－ＣＳＦ$_{E}$変異体及びＧ－ＣＳＦ$_{WT}$上のＴｗｉｎ－Ｓｔｒｅｐ　Ｔａｇ（ＴＳＴ）を介して、ｓｔｒｅｐｔａｃｔｉｎ－ＸＴスーパーフロー（ＩＢＡ　Ｌｉｆｅｓｃｉｅｎｃｅｓ，ｃａｔ．２－４０１０－０１０）によりバッチモードでプルダウンした。簡単に言えば、各１．８ｍＬの反応上清に、０．２ｍＬの１０ＸのＨＥＰＥＳ緩衝生理食塩水（ＨＢＳ：２０ｍＭのＨＥＰＥＳ　ｐＨ８、１５０ｍＭのＮａＣｌ）を１Ｘの２０μｌのベッドボリューム（ｂ．ｖ）の精製ビーズを加え、反応物を２４℃で転倒式に混合しながら３０分間インキュベーションした。更に２０μｌのｂ．ｖ．の精製ビーズを加え、続いて、再度３０分間インキュベートした。ビーズを２２００ｒｐｍで３分間遠心分離してペレット化し、上清を除去して１ＸのＨＢＳ緩衝液で洗浄した。タンパク質を３０μｌのＢＸＴ溶出緩衝液（１００ｍＭのＴｒｉｓ－ＣＬ　ｐＨ８、１５０ｍＭのＮａＣｌ、１ｍＭのＥＤＴＡ、５０ｍＭのビオチン（ＩＢＡ　Ｌｉｆｅｓｃｉｅｎｃｅｓ，ｃａｔ．２－１０４２－０２５））で溶出し、ＳＤＳ－ＰＡＧＥサンプル緩衝液で煮沸して、１２％のＢｏｌｔ　Ｂｉｓ－Ｔ

ｒｉｓ ｐｌｕｓ、１２ウェルゲル（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，ｃａｔ．ＮＷ００１２２ＢＯＸ）上で、２００Ｖで３０分間、還元条件下で解析した。

【０３８７】

結果

サイトＩＩデザイン＃６、７、８、９、１５、１７、３０、３４、３５、３６は、Ｇ－ＣＳＦ$_E$単独での発現を示し、Ｇ－ＣＳＦ$_E$上のＴｗｉｎ Ｓｔｒｅｐタグを介してプルダウンされた十分に安定なペアリングしたＧ－ＣＳＦ$_E$：Ｇ－ＣＳＦＲ$_E$複合体を形成した（図６を参照）。例えば、操作された複合体のプルダウン後のサイトＩＩデザイン＃６は、ＳＤＳ－ＰＡＧＥで、そのＧ－ＣＳＦ$_E$変異体の約２２ｋＤａのバンドと、対応する共発現したＧ－ＣＳＦＲ（ＣＲＨ）$_E$変異体の約３３ｋＤａのバンドを示した（図６を参照）。

【０３８８】

サイトＩＩデザイン＃８、９、１５、及び３４は、共発現アッセイにおいて、ＷＴ Ｇ－ＣＳＦ及びＷＴ Ｇ－ＣＳＦＲとのミスペアリングに対して選択的であり（図７を参照）、その理由は、それらがＷＴ Ｇ－ＣＳＦによってプルダウンされず（図７の下パネル参照）、また、ＷＴ受容体がＧ－ＣＳＦ$_E$変異体によってプルダウンされなかった（図７の上パネル参照）ためである。サイトＩＩ Ｇ－ＣＳＦＲ$_E$デザイン３０及び３５は、ＷＴ Ｇ－ＣＳＦによってプルダウンされなかったので、共発現アッセイにおいてＷＴ Ｇ－ＣＳＦとのミスペアリングに対して選択的であったが（図７の下パネル参照）、相互Ｇ－ＣＳＦ$_E$デザインは、ＷＴ Ｇ－ＣＳＦＲがプルダウンされたため（図７の上パネル参照）、共発現アッセイにおいてＷＴ Ｇ－ＣＳＦＲとのミスペアリングに対して選択的ではなかった。サイトＩＩデザイン６、７、１７、及び３６は、ＷＴ Ｇ－ＣＳＦＲをプルダウンし、ＷＴ Ｇ－ＣＳＦによってプルダウンされたため、共発現アッセイにおいてＷＴ Ｇ－ＣＳＦまたはＷＴ Ｇ－ＣＳＦＲとのミスペアリングに対して選択的ではなかった（図７を参照）。

【０３８９】

残基Ｒ２８８に変異を有するサイトＩＩ受容体変異体は、Ｉｇドメインを有さないＧ－ＣＳＦＲ（ＣＲＨ）受容体鎖の形式では発現しなかった。Ｒ２８８を含むデザインを、Ｉｇドメイン上のサイトＩＩＩデザインと組み合わせて、ＳＰＲによってペアリングした複合体形成について評価した（実施例６を参照）。したがって、ＷＴ Ｇ－ＣＳＦ及びＷＴ Ｇ－ＣＳＦＲとのミスペアリングに対しても選択的である、十分に安定な、ペアリングしたＧ－ＣＳＦ$_E$：Ｇ－ＣＳＦＲ$_E$複合体を形成した、いくつかのサイトＩＩデザインが同定された。

【０３９０】

したがって、表２に示す同じバリアントＧ－ＣＳＦ及び受容体デザインのさまざまなサイトＩＩ変異は、それぞれ野生型Ｇ－ＣＳＦＲ及びＧ－ＣＳＦに対する優先的な結合を示す。

【０３９１】

実施例３：Ｇ－ＣＳＦ：Ｇ－ＣＳＦＲ（Ｉｇ）の排他的サイトＩＩＩ界面の合理的デザイン

Ｇ－ＣＳＦに結合するサイトＩＩＩ受容体Ｉｇドメインの結合活性効果は、２：２ヘテロ二量体化学量論のＧ－ＣＳＦ：Ｇ－ＣＳＦＲ（Ｉｇ－ＣＲＨ）複合体の形成に寄与する（図１を参照）。ＷＴサイトＩＩＩ界面を有するサイトＩＩにのみ存在する選択的デザインは、完全に排他的な２：２ Ｇ－ＣＳＦ$_E$：Ｇ－ＣＳＦＲ（Ｉｇ－ＣＲＨ）$_E$複合体を作成するには不十分であるように思われる。ＷＴサイトカインまたは受容体へのミスペアリング結合よりも選択的であるペアリングした共進化デザインの結合を優先するために、実施例１で述べたｉｎ ｓｉｌｉｃｏデザインワークフローをサイトＩＩＩ界面に適用し、選択的サイトＩＩＩデザインを作成した（図２を参照）。

【０３９２】

方法

まず、サイトＩＩＩ界面相互作用の構造解析を実施した。サイトＩＩＩ界面は、５５．６４ｋｃａｌ／ｍｏｌのＡＭＢＥＲエネルギーをＧ－ＣＳＦ：Ｇ－ＣＳＦＲ複合体にもたらし、６９２．６Å^{2}の界面領域のサイトＩＩと比較して、５７１．５Å^{2}の全体的に小さい界面領域を有する。サイトＩＩＩ界面の詳細な検査により、サイトＩＩ界面と比較して、静電相互作用及び水素結合相互作用が少ないことが明らかである（図８を参照）。サイトＩＩＩでの重要な相互作用は、例えば、Ｇ－ＣＳＦのＥ４６と受容体Ｉｇドメインの Ｒ４１間、更にＧ－ＣＳＦのＲ１４７と受容体Ｉｇドメインのの塩橋である（図９を参照）。両方の相互作用は、サイトＩＩＩの引力ＡＭＢＥＲエネルギー合計に対して、それぞれ１５．９％と１５．４％を占める。さらなる相互作用は、例えば、受容体Ｉｇドメインの Ｑ８７を介して作られ、Ｇ－ＣＳＦサイトＩＩＩのバックボーンへの側鎖アミドとの水素結合相互作用を形成し、Ｅ４６及びＬ４９など、サイトカインの周囲の側鎖とのＬｅｎｎａｒｄ Ｊｏｎｅｓ相互作用を有する。この相互作用は、サイトＩＩＩの引力ＡＭＢＥＲエネルギー合計の１２．３％を占める。

【０３９３】

次に、Ｇ－ＣＳＦ$_E$変異体が、その共進化したＧ－ＣＳＦＲ（Ｉｇ）$_E$変異体（ペアの相互作用）に対して、ｉｎ ｓｉｌｉｃｏで好ましいＡＭＢＥＲ結合親和性を有するサイトＩＩＩでのポジティブデザインを作成した。これは、例えば、Ｌｅｎｎａｒｄ Ｊｏｎｅｓ及び水素結合相互作用を維持しながら、電荷の反転または形状相補性の変更により実施した。変異体ペアＧ－ＣＳＦ$_E$：Ｇ－ＣＳＦＲ（Ｉｇ）$_E$は、ＺｙｍｅＣＡＤ（商標）の平均場パッキングワークフローでパッキングした。パッキングしたサイトＩＩＩのデザインのｉｎ ｓｉｌｉｃｏモデルを、構造の完全性について目視で検査し、実施例１に記載のＺｙｍｅＣＡＤ（商標）メトリックにより評価した。次に、各デザインのＧ－ＣＳＦ$_E$変異体を、ＺｙｍｅＣＡＤ（商標）により、ＷＴ Ｇ－ＣＳＦＲ（Ｉｇ）（及びその逆のＧ－ＣＳＦＲ（Ｉｇ）$_E$とＧ－ＣＳＦ$_{WT}$）とパッキングし、ＷＴサイトカイン及び受容体とのミスペアリングの条件下で、メトリックを評価した。サイトＩＩについて実施例１で前述したように、ＺｙｍｅＣＡＤ（商標）を使用したサイトＩＩＩデザインについて、ｄｄＡＭＢＥＲ親和性メトリック（Ｇ－ＣＳＦ$_{WT}$：Ｇ－ＣＳＦＲ（Ｉｇ）$_E$、Ｇ－ＣＳＦ$_E$：Ｇ－ＣＳＦＲ（Ｉｇ）$_{WT}$）を計算した（表６を参照）。

【０３９４】

サイトＩＩＩデザインをクラスター化し、３つすべてのｉｎ ｓｉｌｉｃｏ複合体Ｇ－ＣＳＦ$_E$：Ｇ－ＣＳＦＲ（Ｉｇ）$_E$、Ｇ－ＣＳＦ$_{WT}$：Ｇ－ＣＳＦＲ（Ｉｇ）$_E$、Ｇ－ＣＳＦ$_E$：Ｇ－ＣＳＦＲ（Ｉｇ）$_{WT}$のパッキングメトリックを目視検査と合わせて検討し、デザインのランク付けのためにペアリングの強度及びＷＴとのミスペアリングに対する選択性を評価した。

【０３９５】

結果

表３に記載のデザインは、Ｇ－ＣＳＦ$_E$：Ｇ－ＣＳＦＲ（Ｉｇ）$_E$のペアリングに有利であるＺｙｍｅＣＡＤ（商標）におけるｉｎ ｓｉｌｉｃｏパッキングメトリックを有し、ＷＴ Ｇ－ＣＳＦまたはＧ－ＣＳＦＲ（Ｉｇ）とのミスペアリングに対して高い選択性を持っている。

【０３９６】

したがって、表３に示す同じバリアントＧ－ＣＳＦ及び受容体デザインの様々なサイトＩＩＩ変異は、それぞれ野生型Ｇ－ＣＳＦＲ及びＧ－ＣＳＦよりも優先的な結合を示すと予測される。

【０３９７】

【表６】

表６：ＺｙｍｅＣＡＤ（商標）における、ｋｃａｌ／ｍｏｌ単位で示した、トリプリケートｉｎ　ｓｉｌｉｃｏ平均場パッキングからのＡＭＢＥＲメトリックを有するサイトＩＩＩデザイン。

	$G-CSF_E$：G－ＣＳＦＲ（Ｉｇ）$_E$		$G-CSF_E$：G－ＣＳＦＲ（Ｉｇ）$_{WT}$	$G-CSF_{WT}$：G－ＣＳＦＲ（Ｉｇ）$_E$
デザイン番号	ｄＡｍｂｅｒ＿ａｆｆｉｎｉｔｙ	ｄＡｍｂｅｒ＿ｆｏｌｄｉｎｇ	ｄｄＡｍｂｅｒ＿ａｆｆｉｎｉｔｙ＿Ｅ＿ＷＴ	ｄｄＡｍｂｅｒ＿ａｆｆｉｎｉｔｙ＿ＷＴ＿Ｅ
５１	－３１．８４	２１．４２	－２８．６０	－４９．０４
５２	－３１．８１	２１．５７	－３６．１４	－４２．０８
５３	－２８．７２	３０．２４	－３６．２９	－４８．４９
５４	－２７．３０	３６．１５	－３４．２９	－３１．５１
５５	－２３．３２	２１．３６	－３３．７１	－３７．６２
５６	－２１．２５	２８．７０	－４０．４０	－３６．６０
５７	－１８．３１	１５．７７	－２４．６８	－５１．８１
５８	－１７．６９	１７．１４	－２４．６２	－３６．７７
５９	－１７．６４	２８．３９	－２７．７６	－４０．４２
６０	－１６．０１	３０．５４	－２２．９４	－４５．２７
６１	－１５．８４	２９．６４	－９．０７	－３３．７６
６２	－１４．２９	２．８９	－２１．１８	－１２．７８
６３	－１４．２０	３．５７	－１４．４２	－１４．６５
６４	－１３．６８	３４．７９	－２２．８５	－２２．９３
６５	－１３．５１	２８．０１	－１５．４３	－３４．９３
６６	－１２．５８	１０．８８	－１９．５１	－２６．５３
６７	－１１．４３	３５．７２	－２１．７９	－２７．４６
６８	－１０．９５	１５．９９	－１２．５２	－２０．２０
６９	－９．５３	１８．４６	－７．３７	－３２．２３
７０	－９．３４	１３．１３	－２７．７４	－１０．２８
７１	－７．６３	１５．０５	－７．９５	－１５．０３
７２	－５．６８	１０．９５	－１．９７	－１６．５４

【０３９８】

実施例４：バリアント、共進化したサイトカイン受容体スイッチを作成するためのサイトＩＩ及びＩＩＩの組み合わせ

２：２のヘテロ二量体の操作した複合体を介した結合及びシグナル伝達を可能にし、野生型サイトカインまたは受容体との交差反応性が低いか、または完全に消失した完全選択性デザインペア$G-CSF_E$：G－ＣＳＦ（Ｉｇ－ＣＲＨ）$_E$を開発するために、実施例１及び３の選択したサイトＩＩ及びＩＩＩデザインを組み合わせ（表４を参照）、ｉｎｖｉｔｒｏで試験した。

【０３９９】

表４のデザインを組み合わせたのと同様に、実施例１のサイトＩＩデザイン（表２）と実施例３のサイトＩＩＩデザイン（表３）の任意の他の組み合わせにより、バリアントシグナル伝達を可能にする完全選択的Ｇ－ＣＳＦ$_{E}$：Ｇ－ＣＳＦＲ（Ｉｇ－ＣＲＨ）$_{E}$デザインの組み合わせを得ることができた。組み合わせデザイン４０１及び４０２を、実施例２に記載の共発現アッセイにおいて、操作したＧ：ＣＳＦ$_{E}$：Ｇ－ＣＳＦＲ（Ｉｇ－ＣＲＨ）$_{E}$複合体を形成する能力、及びＷＴサイトカインまたは受容体を結合する能力について試験した。

【０４００】

方法

サイトカインＴＳＴタグを介したプルダウンを伴う共発現アッセイは、上記の実施例２で説明したように実施したが、受容体コンストラクトがＧ－ＣＳＦＲ（Ｉｇ－ＣＲＨ）と呼ばれるＩｇ及びＣＲＨドメイン（残基２－３０８、表１）を含むという点で異なる。

【０４０１】

結果

組合せデザイン４０１及び４０２は、本デザインサイトカインが、それらの共進化した、操作された受容体をプルダウンするがＷＴ受容体はプルダウンせず、その逆にＷＴ　Ｇ－ＣＳＦが、操作された受容体をプルダウンしなかったという点で、共発現アッセイにおいて完全に選択的であった（図１０を参照）。

【０４０２】

これらの結果は、バリアントＧ－ＣＳＦ、ならびに選択したサイトＩＩ及びサイトＩＩＩ変異体を組み合わせたバリアントＧ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤデザインを含む受容体が、それぞれ操作されたサイトカイン受容体ペアに特異的に結合することができ、野生型受容体またはサイトカインに結合しないことを示す。

【０４０３】

<u>実施例５：Ｇ－ＣＳＦ及びＧ－ＣＳＦＲ野生型及び変異体の産生</u>

野生型及び操作されたサイトカイン及び受容体バリアントを産生し、それらの生物物理学的特性を比較するために、組換えタンパク質を発現させ、昆虫細胞から精製した。

【０４０４】

方法

Ｇ－ＣＳＦ$_{E}$及びＧ－ＣＳＦ$_{WT}$を、上記のようにクローン化した。組換えタンパク質の分取スケール生成は、２～４Ｌの健常な対数期Ｔｎｉ細胞において以下のように行った。２×１０^{6}細胞ｍｌ$^{-1}$での８００ｍＬのＴｎｉに、２ｍｌ細胞当たり２０μｌのサイトカインバリアントＰ２ウイルスを接種し、１３５ｒｐｍで振盪しながら２７℃で７０時間インキュベートした。インキュベーション後、５５００ｒｐｍで１５分間遠心分離することにより細胞をペレット化し、上清を２回、まず１μｍのＡ／Ｅ型ガラス繊維フィルター（ＰＡＬＬ，ｃａｔ．６１６３１）、続いて０．４５μｍのＰＶＤＦメンブレンフィルター（Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ，ｃａｔ．ＨＶＬＰ０４７００）を通じてろ過した。プロテアーゼ阻害剤カクテルＩＩＩ（Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ，ｃａｔ．５３９１３４）を加え、上清緩衝液をＨＢＳ（２０ｍＭのＨＥＰＥＳ　ｐＨ８、１５０ｍＭのＮａＣｌ）に交換し、タンジェンシャルフローで３００ｍＬに濃縮した。タンパク質を、３ｘ３ｍＬのｂ．ｖ　Ｓｔｒｅｐｔａｃｔｉｎ－ＸＴ　ｓｕｐｅｒｆｌｏｗによりバッチモードで精製し、４℃で２ｘ１時間、１ｘ一晩、撹拌しながらインキュベートした。溶出前に樹脂を１０ＣＶのＨＢＳ緩衝液で洗浄した。タンパク質を４ｘ５ｍＬのＢＸＴ溶出緩衝液で溶出した。溶出液をｎａｎｏｄｒｏｐ　Ａ２８０及び還元型ＳＤＳ－ＰＡＧＥにより分析し、約２ｍＬに濃縮し、ＴＥＶ：タンパク質比１：８０で１８℃で一晩、ＴＥＶと転倒式に混合してインキュベートすることによりＴＳＴ精製タグを切断した。切断されたタンパク質は、２０ｍＭのＢｉｓＴｒｉｓ　ｐＨ６．５、１５０ｍＭのＮａＣｌで平衡化したＳＸ７５　１６／６００またはＳＸ２００　１６／６００サイズ排除カラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ，ｃａｔ．２８－９８９３－３３または２８－９８９３－３５）にロードする前に、ＳＤＳ－ＰＡＧＥによって確認した（図１１を参照）。タンパク質含有フラク

ションを還元型ＳＤＳ－ＰＡＧＥにより分析し、プールして、ｎａｎｏｄｒｏｐ　Ａ２８０測定により濃度を測定した。

【０４０５】

受容体バリアントのタンパク質精製のために、野生型及びＧ－ＣＳＦＲ（Ｉｇ－ＣＲＨ）$_{E}$変異体を上記のようにクローニングし、精製のための受容体コンストラクトはＣＲＨドメイン（Ｕｎｉｐｒｏｔ　ＩＤ　Ｑ９９０６２の残基３－３０８、表１）に加えてＩｇドメインを含んだ。ウイルスストックを調製し、上記のように２～４Ｌのスケールで感染に使用した。清澄化した上清を、Ｎｉ－ＮＴＡ結合緩衝液（２０ｍＭのＨＥＰＥＳ　ｐＨ８、１ＭのＮａＣｌ、３０ｍＭのイミダゾール）に緩衝液交換し、上記のように３００ｍＭに濃縮した。タンパク質を、３ｘ３ｍＬのｂ．ｖ　Ｎｉ－ＮＴＡ　ｓｕｐｅｒｆｌｏｗによりバッチ結合モードで精製し、４℃で２ｘ１時間、１ｘ一晩、撹拌しながらインキュベートした。溶出前に樹脂を１０ＣＶの結合緩衝液で洗浄した。タンパク質を４ｘ５ｍＬのＮｉ－ＮＴＡ溶出緩衝液（２０ｍＭのＨＥＰＥＳ　ｐＨ８、１ＭのＮａＣｌ、２５０ｍＭのイミダゾール）で溶出した。溶出液を分析し、２０ｍＭのＢｉｓ－Ｔｒｉｓ　ｐＨ６．５、１５０ｍＭのＮａＣｌに緩衝液交換し、濃縮し、上記のように一晩切断した。切断されたタンパク質は、続いて、２０ｍＭのＢｉｓＴｒｉｓ　ｐＨ６．５、１５０ｍＭのＮａＣｌで平衡化したＳＸ７５　１６／６００またはＳＸ２００　１６／６００サイズ排除カラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）にロードした（図１２を参照）。タンパク質含有フラクションを還元型ＳＤＳ－ＰＡＧＥにより分析し、プールして、ｎａｎｏｄｒｏｐ　Ａ２８０測定により濃度を測定した。

【０４０６】

結果

野生型、Ｇ－ＣＳＦ$_{E}$、及びＧ－ＣＳＦＲ$_{E}$変異体は、還元型ＳＤＳ－ＰＡＧＥにより判断すると、ＳＥＣ後の純度は９０％を超えていた（図１１及び１２を参照）。デザイン４０１及び４０２のＧ－ＣＳＦ$_{E}$の１Ｌの培養物当たりのＳＥＣ後の収量は、それぞれ２．７ｍｇ及び１．６ｍｇであった。デザイン４０１及び４０２のＧ－ＣＳＦＲ$_{E}$の１Ｌの生産当たりのＳＥＣ後の収量は、それぞれ１．７ｍｇ及び１．５ｍｇであった。ＷＴ　Ｇ－ＣＳＦは、１Ｌの培養物当たり２．１ｍｇのＳＥＣ後の収量で精製され、ＷＴ　Ｇ－ＣＳＦＲは、１Ｌの培養物当たり３．１ｍｇのＳＥＣ後の収量で精製された。

【０４０７】

これらの結果により、バリアントＧ－ＣＳＦ及び受容体を精製するために使用される方法が、ｉｎ　ｖｉｔｒｏでの生物物理学的特性の分析に使用される精製タンパク質を得るのに効率的であったことが確認される。

【０４０８】

<u>実施例６：ＳＰＲによるペアリングされた及びミスペアリングされた結合パートナーに対するデザインの親和性の決定</u>

共進化した受容体変異体に対するデザインサイトカインの親和性を決定するために、Ｇ－ＣＳＦＲ$_{E}$に対するＧ－ＣＳＦ$_{E}$の親和性を測定した。また、Ｇ－ＣＳＦ$_{E}$とＧ－ＣＳＦＲ$_{WT}$の親和性、及びＧ－ＣＳＦ$_{WT}$とＧ－ＣＳＦＲ$_{E}$の親和性を、ＳＰＲによりデザインのサブセット（ミスペアリングした）について測定した。

【０４０９】

方法

ＳＰＲ結合アッセイは、Ｂｉａｃｏｒｅ　Ｔ２００装置（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ，Ｍｉｓｓｉｓｓａｕｇａ，ＯＮ，Ｃａｎａｄａ）で、ＰＢＳ－Ｔ（ＰＢＳ＋０．０５％（ｖ／ｖ）Ｔｗｅｅｎ　２０）ランニング緩衝液を用いて、２５℃の温度で実施された。ＣＭ５　Ｓｅｒｉｅｓ　Ｓセンサチップ、Ｂｉａｃｏｒｅアミンカップリングキット（ＮＨＳ，ＥＤＣ，及び１Ｍのエタノールアミン）、及び１０ｍＭの酢酸ナトリウム緩衝液は、すべてＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅから購入した。０．０５％　Ｔｗｅｅｎ２０を含むＰＢＳランニング緩衝液（ＰＢＳ－Ｔ）はＴｅｋｎｏｖａ　Ｉｎｃ．（Ｈｏｌｌｉｓｔｅｒ，ＣＡ）から購入した。デザインは、３つの異なる固定化配向において評価した。

【０４１０】
Ｇ－ＣＳＦ$_{E}$のＧ－ＣＳＦＲ$_{E}$への結合親和性を決定するために、Ｇ－ＣＳＦＲ$_{E}$変異体を、製造元（ＧＥ　ＬｉｆｅＳｃｉｅｎｃｅｓ）が説明するように標準的なアミンカップリングにより捕捉した。簡単に説明すると、ＥＤＣ／ＮＨＳ活性化直後に、１０ｍＭのＮａＯＡｃ，ｐＨ５．０中のＧ－ＣＳＦＲ$_{E}$の５μｇ／ｍＬ溶液を、約７００～９００ＲＵの受容体密度に達するまで５μＬ／分の流速で注入した。残りの活性基は、１Ｍのエタノールアミン塩酸塩－ＮａＯＨ　ｐＨ８．５を１０μＬ／分で４２０秒間注入してクエンチした。シングルサイクルキネティクスを用い、６つの濃度の２００ｎＭから始まる対応するＧ－ＣＳＦ$_{E}$変異体の２倍希釈系列とブランクの緩衝液対照を、２５μＬ／分で３００秒間、順次注入し、１８００秒の解離相を伴い、緩衝液ブランク基準で一連のセンサーグラムを得た。同じ試料滴定は、バリアントが捕捉されていない基準セルでも実行した。１０ｍＭのグリシン／ＨＣｌ，ｐＨ２．０の１パルス（３０μＬ／分で３０秒間）によって、次の注入サイクルに備えるためにチップを再生した。

【０４１１】
Ｇ－ＣＳＦ$_{WT}$のＧ－ＣＳＦＲ$_{E}$への結合親和性を評価するために、Ｇ－ＣＳＦ$_{E}$を、上記のように約７００～９００ＲＵの密度でチップ上に捕捉した。シングルサイクルキネティクスを用い、６つの濃度の２００ｎＭから始まる各Ｇ－ＣＳＦＲ$_{WT}$の２倍希釈系列とブランクの緩衝液対照を、２５μＬ／分で３００秒間、順次注入し、１８００秒の総解離時間を伴い、緩衝液ブランク基準で一連のセンサーグラムを得た。同じ試料滴定は、上述のようにバリアントが捕捉されず、チップが再生された基準セルでも実行した。

【０４１２】
Ｇ－ＣＳＦ$_{E}$のＧ－ＣＳＦＲ$_{WT}$への結合親和性を評価するために、実施例５に記載されるように精製された組換えＧ－ＣＳＦＲ$_{WT}$を、この実施例に記載されるように捕捉した。シングルサイクルキネティクスを用い、６つの濃度の２００ｎＭから始まる各Ｇ－ＣＳＦ$_{E}$変異体の２倍希釈系列とブランクの緩衝液対照を上述のように順次注入した。同じ試料滴定は、バリアントが捕捉されていない基準セルでも実行した。Ｇ－ＣＳＦＲ$_{WT}$表面は、上述のように再生した。

【０４１３】
対照として、ＷＴＧ－ＣＳＦのＷＴ　Ｇ－ＣＳＦＲ（Ｉｇ－ＣＲＨ）への結合を各実験で評価し、各独立した測定内のＫ$_{D}$倍数変化を算出するために使用した。

【０４１４】
Ｂｉａｃｏｒｅ（商標）Ｔ２００評価ソフトウェアｖ３．０を使用して、２回または３回の繰り返し注入からのダブルリファレンスしたセンサーグラムを分析し、１：１ラングミュア結合モデルに適合させた。

【０４１５】
結果
曲線の会合及び解離相を適合させることによって速度論的導出親和性定数（Ｋ$_{D}$）を得た。ＷＴ　Ｇ－ＣＳＦＲ（Ｉｇ－ＣＲＨ）に対するＷＴ　Ｇ－ＣＳＦのＫ$_{D}$は、１．８～２．５Ｅ－９の範囲であった。速度論的パラメータを適合させることができなかった場合、定常状態の親和性定数を導出することを試みた。これらの場合、ＫＤ倍数変化は、ＷＴＧ－ＣＳＦ：ＷＴ　Ｇ－ＣＳＦＲ（Ｉｇ－ＣＲＨ）ペアの定常状態から導出されたＫ$_{D}$から算出され、表７に示される。

【０４１６】
デザイン９、１３０、１３４、１３７、３０７、４０１、及び４０２は、ＷＴ：ＷＴ　ＫＤと２倍以内の違いで、共進化した結合パートナーに対する親和性を示した（表７及び図１３を参照）。

【０４１７】
デザイン９、３０、及び３４のＧ－ＣＳＦＲ（Ｉｇ－ＣＲＨ）$_{E}$変異体は、ＷＴ　Ｇ－ＣＳＦＲ（Ｉｇ－ＣＲＨ）と比較してＷＴ　Ｇ－ＣＳＦに対して７００倍超弱い親和性を示した。デザイン＃３５のＧ－ＣＳＦＲ（Ｉｇ－ＣＲＨ）$_{E}$は、ＷＴサイトカインとのミ

スペアリングに対して選択性が低く、ＷＴ　Ｇ－ＣＳＦに対する親和性はＷＴ：ＷＴ親和性と比較して約１９分の１に減少した。デザイン１３０、１３４、４０１、４０２、３００、３００３、３０４、及び３０７のＧ－ＣＳＦＲ（Ｉｇ－ＣＲＨ）$_{E}$変異体は、ＷＴ　Ｇ－ＣＳＦとのミスペアリングに対して最も選択的であり、滴定された濃度でＷＴ　Ｇ－ＣＳＦに対して顕著な結合を示さなかった（表８、図１３を参照）。

【０４１８】

デザイン１２４、１３０、４０１、４０２、３００、３０３、３０４、及び３０７のＧ－ＣＳＦ$_{E}$変異体は、滴定された濃度でＷＴ　Ｇ－ＣＳＦＲ（Ｉｇ－ＣＲＨ）に対して顕著な結合を示さなかった。デザイン９、３０、及び３４のＧ－ＣＳＦ$_{E}$変異体は、ＷＴ：ＷＴ　ＫＤと比較して、ＷＴ　Ｇ－ＣＳＦＲ（Ｉｇ－ＣＲＨ）に対して少なくとも約２０倍弱いK_{D}を示した。デザイン＃１３４のＧ－ＣＳＦ$_{E}$は、ＷＴ　Ｇ－ＣＳＦＲ（Ｉｇ－ＣＲＨ）に対して約５００倍弱い親和性を示した（表９、図１３を参照）。デザイン３５及び１１７のＧ－ＣＳＦ$_{E}$変異体は、ＷＴ：ＷＴ　ＫＤと同様にＷＴ　Ｇ－ＣＳＦＲ（Ｉｇ－ＣＲＨ）に対する結合を示す。

【０４１９】

これらの結果は、選択されたバリアントＧ－ＣＳＦデザインが野生型Ｇ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤに結合しないか、または野生型Ｇ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤに対して親和性が大幅に低下して結合する（少なくとも約２０倍弱いＫＤ）ことを示す。

【０４２０】

【表７】

表７：ＳＰＲによって測定されたＷＴ：ＷＴ結合親和性と比較した対応するＧ－ＣＳＦＲ（Ｉｇ－ＣＲＨ）$_{E}$変異体に対するＧ－ＣＳＦ$_{E}$変異体の結合親和性（ＫＤ）の変化

	K_{D}倍数変化
ＷＴ：ＷＴ対照	－
デザインＧ－ＣＳＦ$_{E}$：Ｇ－ＣＳＦＲ（Ｉｇ－ＣＲＨ）$_{E}$	
９	１．２
３０	１１
３４	５．０
３５	３．３
１３０	０．９
１３４	１．０
１３７	０．３
４０１	０．６^{ss}
４０２	０．８^{ss}
３００	１９４
３０１	測定されず
３０３	２．２^{ss}
３０４	６．５
３０７	０．６^{ss}

^{ss}は、定常状態から導出された親和性定数を示す。

【０４２１】

【表８】

表８：ＳＰＲによって測定されたＷＴ：ＷＴ結合親和性と比較したデザインＧ－ＣＳＦＲ（Ｉｇ－ＣＲＨ）$_{E}$に対するＷＴ　Ｇ－ＣＳＦの結合親和性の変化

	K_D倍数変化
ＷＴ：ＷＴ対照	－
デザインＧ－ＣＳＦＲ（Ｉｇ－ＣＲＨ）$_{E}$	
９	８８０７^{ss}
３０	７７４
３４	４２５８^{ss}
３５	１９
１３０	結合なし
１３４	結合なし
４０１	結合なし
４０２	結合なし
３００	結合なし
３０１	測定されず
３０３	結合なし
３０４	結合なし
３０７	結合なし

^{ss}は、定常状態から導出された親和性定数を示す。

【０４２２】

【表９】

表９：ＳＰＲによって測定されたＷＴ：ＷＴ結合親和性と比較した野生型Ｇ－ＣＳＦＲ（Ｉｇ－ＣＲＨ）に対するＧ－ＣＳＦ$_{E}$の結合親和性の変化

	K_D倍数変化
ＷＴ：ＷＴ対照	－
デザインＧ－ＣＳＦ$_{E}$	
９	７９
３０	２０
３４	３３
３５	５．０
１１７	３．４
１２４	結合なし
１３０	結合なし
１３４	４６５
４０１	結合なし
４０２	結合なし
３００	結合なし
３０１	測定されず
３０３	結合なし
３０４	結合なし
３０７	結合なし

【０４２３】

実施例７：デザインＧ－ＣＳＦ$_{E}$変異体の熱安定性の測定

ＷＴサイトカイン及び受容体と比較したＧ－ＣＳＦ$_{E}$及びＧ－ＣＳＦＲ$_{E}$変異体の熱安定性を測定するために、示差走査熱量測定（ＤＳＣ）を実施した。

【０４２４】

方法

バリアントの熱安定性は、示差走査熱量測定（ＤＳＣ）により以下のように評価した：濃度１～２ｍｇ／ｍＬの精製試料９５０ｍＬを、Ｎａｎｏ　ＤＳＣ（ＴＡ　ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ，Ｎｅｗ　Ｃａｓｔｌｅ，ＤＥ）を用いたＤＳＣ分析に使用した。各分析の開始時に、ベースラインの安定化のために緩衝液ブランクの注入を行った。各試料を、６０ｐｓｉの窒素圧力下、６０℃／時の速度で２５～９５℃で走査した。得られたサーモグラムを参照し、ＮａｎｏＡｎａｌｙｚｅソフトウェアを用いて解析し、熱安定性の指標となる融解温度（Ｔｍ）を測定した。

【０４２５】

結果

操作されたバリアントの熱安定性は、同じ条件及び実験設定下で測定された、操作された分子と同等の野生型分子との間の最も顕著な遷移（最高のエンタルピー）の差として報告される。測定されたＷＴ　ＧＣＳＦのＴｍは、独立した実験間で５２．２～５５．４℃の間で変動し、ＷＴ　Ｇ－ＣＳＦＲのＴｍは５０．５℃を示した。デザイン＃１５及び３４を除いて試験したＧ－ＣＳＦ$_{E}$変異体は、ＷＴ　Ｇ－ＣＳＦのＴｍとは５℃未満異なるＴｍを示した（表１０及び図１４を参照）。試験したすべての受容体変異体は、ＷＴ受容

体と同じ熱安定性を示した（表１０及び図１４を参照）。

【０４２６】

これらの結果は、バリアントＧ－ＣＳＦ、及びバリアントＧ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤデザインを有する受容体が、野生型Ｇ－ＣＳＦ及びＧ－ＣＳＦＲと同様の熱安定性を有することと、サイトＩＩ及び／またはサイトＩＩＩ変異が、Ｇ－ＣＳＦまたはＧ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤのいずれの熱安定性も損なわないことを示したものである。

【０４２７】

【表１０】

表１０：ＤＳＣによって測定された野生型と比較したデザインサイトカイン及び受容体変異体の融解温度（Ｔｍ）の変化。

ＧＣＳＦ$_E$デザインの変異体	ΔＴｍ　（℃）
ＷＴ	－
＃１５	－９．９
＃３４	－６．１
＃３５	－３．５
＃１０６	＋７．５
＃１３０	－１．８
＃１３４	＋２．０
＃１３５	－０．８
＃３００	＋１．０
＃３０１	－３．２
＃３０３	＋４．２
＃３０４	＋２．７
＃３０７	－３．８
＃４０１	－２．５
＃４０２	－３．８
ＧＣＳＦＲ　（Ｉｇ－ＣＲＨ）$_E$デザインの変異体	
ＷＴ	－
＃９	＋１．４
＃３０	＋１．４
＃３４	＋１．８
＃３５	＋１．８
＃１３０＊	－１．９
＃１３４	－０．９
＃３００	測定されず
＃３０１	測定されず
＃３０３	測定されず
＃３０４	測定されず
＃３０７	測定されず
＃４０１	測定されず
＃４０２	測定されず

＊１５０ｍＭのＮａＣｌ、２０ｍＭのＢｉｓＴｒｉｓ　ｐＨ６．５で測定

【０４２８】

実施例８：ＵＰＬＣ－ＳＥＣによるＧ－ＣＳＦ$_E$変異体の単分散性の測定

ＷＴ　Ｇ－ＣＳＦと比較したＧ－ＣＳＦ$_E$変異体の単分散性を測定するために、ＵＰＬＣ－ＳＥＣによって変異体を分析した。

【０４２９】

方法

ＳＥＣ精製したタンパク質試料に対して、Ａｃｑｕｉｔｙ　ＢＥＨ１２５　ＳＥＣカラム（４．６ｘ１５０ｍｍ，ステンレススチール，１．７μｍ粒子）（Ｗａｔｅｒｓ　ＬＴＤ，Ｍｉｓｓｉｓｓａｕｇａ，ＯＮ）を３０℃に設定し、ＰＤＡ検出器を備えたＡｇｉｌｅｎｔ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ　１２６０　ｉｎｆｉｎｉｔｙ　ＩＩシステムに取り付けてＵＰＬＣ－ＳＥＣを実施した。分析時間は、１５０ｍＭのＮａＣｌ、２０ｍＭのＨＥＰＥＳ　ｐＨ８．０または１５０ｍＭのＮａＣｌ、２０ｍＭのＢｉｓＴｒｉｓ　ｐＨ６．５のランニング緩衝液を用いて、流速０．４ｍＬ／分で７分間のランタイムで構成された。溶出は、２１０～５００ｎｍの範囲でＵＶ吸光度によりモニターし、クロマトグラムは２８０ｎｍで抽出した。ピーク積分は、ＯｐｅｎＬＡＢ（商標）ＣＤＳ　ＣｈｅｍＳｔａｔｉｏｎ（商標）ソフトウェアを使用して実施した。

【０４３０】

結果

ＷＴ　Ｇ－ＣＳＦ及びデザイン３４、３５、及び１３０のＧ－ＣＳＦ$_E$変異体は、１００％単分散性であった（表１１を参照）。変異体８、９、１５、１１７、１３５は、６５．３～７９．５％のより低い単分散性を示した。デザイン＃１３４サイトカインは、ｐＨ８．０で５７．３％の単分散性を示したが、ｐＨ６．５では８６．６％の単分散性に改善した。移動相のより低いｐＨでの単分散性の改善は、ｐＩのシフト（例えば、ＷＴ　Ｇ－ＣＳＦでの算出されたｐＩ５．４１からデザイン＃１３４のＧ－ＣＳＦ$_E$での算出されたｐＩ８．３５へ）に起因する可能性がある。

【０４３１】

これらの結果から、バリアントＧ－ＣＳＦデザインのいくつかは野生型Ｇ－ＣＳＦと同じ１００％単分散性を持つことが示され、サイトＩＩ及び／またはサイトＩＩＩ変異体のサブセットがＧ－ＣＳＦの単分散性を損なわないことが示唆される一方で、他のバリアントＧ－ＣＳＦデザインでは単分散性が低くなり、低いｐＨで増加したことが示された。

【０４３２】

【表１１】

表１１：ＵＰＬＣ－ＳＥＣによって測定されたＧ－ＣＳＦ$_E$デザインの変異体の単分散性。

Ｇ－ＣＳＦ$_E$デザインの変異体	単分散性（％）
ＷＴ	１００．０（９６．７＊）
８	７３．７
９	６５．３
１５	５７．３
３４	１００．０
３５	１００．０
１１７	７４．７＊
１３０	１００．０＊
１３４	５７．３（８６．６＊）
１３５	７９．５＊
４０１	８９．６＊

＊１５０ｍＭのＮａＣｌ、ＢｉｓＴｒｉｓ　ｐＨ６．５における

【０４３３】

実施例９：細胞内ＩＬ－２受容体シグナル伝達ドメインを有するキメラＧ－ＣＳＦ受容体の構築

デザインＧ－ＣＳＦ$_{E}$サイトカイン変異体がデザインＧ－ＣＳＦＲ（Ｉｇ－ＣＲＨ）$_{E}$受容体変異体を介してシグナル伝達し、免疫細胞増殖を引き起こすことができるかどうかを調べるために、ｇｐ１３０膜貫通（ＴＭ）ドメイン及び細胞内シグナル伝達ドメイン（ＩＣＤ）、ならびにＩＬ－２Ｒβ細胞内シグナル伝達ドメインに融合したＧ－ＣＳＦＲ ＥＣＤ（Ｇ－ＣＳＦＲ$_{WT}$－ＩＣＤｇｐ１３０－ＩＬ－２Ｒβ）を使用して、一本鎖キメラＧ－ＣＳＦ受容体を構築した。また、ヘテロ二量体受容体として共発現するようにデザインされた２つのサブユニットからなるキメラＧ－ＣＳＦＲも利用した。１）Ｇ－ＣＳＦＲ$_{WT}$－ＩＣＤ$_{IL-2Rβ}$サブユニットはＩＬ－２ＲβＴＭ及びＩＣＤに融合したＧ－ＣＳＦＲ ＥＣＤからなり、また２）Ｇ－ＣＳＦＲ$_{WT}$－ＩＣＤ$_{γc}$サブユニットは共通ガンマ鎖（γｃ、ＩＬ－２Ｒγ）ＴＭ及びＩＣＤに融合したＧ－ＣＳＦＲ ＥＣＤからなる。

【０４３４】

方法

一本鎖キメラ受容体構築物は、Ｇ－ＣＳＦＲシグナルペプチド及びＥＣＤ、次いでｇｐ１３０ ＴＭ及び部分ＩＣＤ、ならびにＩＬ－２Ｒβ部分ＩＣＤを含むようにデザインした（表１２）。ヘテロ二量体キメラ受容体構築物は、以下を含むようにデザインした。１）Ｇ－ＣＳＦＲシグナルペプチド及びＥＣＤ、次いでＩＬ－２Ｒβ ＴＭ及びＩＣＤ（表１３）；ならびに２）Ｇ－ＣＳＦＲシグナルペプチド及びＥＣＤ、次いでγｃ ＴＭ及びＩＣＤ（表１４）。キメラ受容体構築物をレンチウイルストランスファープラスミドにクローニングし、構築物配列をサンガーシークエンシングにより確認した。トランスファープラスミド及びレンチウイルスパッケージングプラスミド（ｐｓＰＡＸ２、ｐＶＳＶＧ）を、以下のようにレンチウイルスパッケージング細胞株ＨＥＫ２９３Ｔ／１７細胞（ＡＴＣＣ）に共トランスフェクションさせた：細胞を、１０％ウシ胎児血清及びペニシリン／ストレプトマイシンを含有するＤＭＥＭ中で一晩プレーティングし、トランスフェクションの２～４時間前に培地交換した。プラスミドＤＮＡ及び水をポリプロピレンチューブ内で混合し、$CaCl_2$（０．２５Ｍ）を滴下して加えた。２～５分間インキュベートした後、２ｘのＨＥＰＥＳ緩衝生理食塩水（０．２８ＭのＮａＣｌ、１．５ｍＭのNa_2HPO_4、０．１ＭのＨＥＰＥＳ）と１：１で混合することにより、ＤＮＡを沈殿させた。沈殿したＤＮＡ混合物を細胞上に添加し、３７℃、５％のCO_2で一晩インキュベートした。翌日、ＨＥＫ２９３Ｔ／１７培地を交換し、細胞を更に２４時間インキュベートした。翌朝、プレートから細胞上清を回収し、軽く遠心分離して破片を除去し、０．４５μｍフィルターで濾過した。上清をＢｅｃｋｍａｎ Ｏｐｔｉｍａ Ｌ－ＸＰ超遠心機のＳＷ－３２Ｔｉローターを用いて２５，０００ｒｐｍで９０分間回転させた。上清を除去し、ペレットを適当量のＯｐｔｉ－ＭＥＭ培地に再懸濁させた。ウイルスの連続希釈液をＢＡＦ３細胞（１０％ウシ胎児血清、ペニシリン、ストレプトマイシン、及び１００ＩＵ／ｍｌのｈＩＬ－２を含有する増殖用ＲＰＭＩ）に添加することにより、ウイルス力価を測定した。形質導入の４８～７２時間後、細胞を抗ヒトＧ－ＣＳＦＲ ＡＰＣコンジュゲート抗体（１：５０希釈）及びｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ（商標）Ｆｉｘａｂｌｅ Ｖｉａｂｉｌｉｔｙ Ｄｙｅ ｅＦｌｕｏｒ（商標）４５０（１：１０００希釈）とともに４℃で１５分間インキュベートして洗浄し、Ｃｙｔｅｋ ＡｕｒｏｒａまたはＢＤ ＦＡＣＳ Ｃａｌｉｂｕｒフローサイトメーターで分析した。この方法により測定した推定力価を用いて、３２Ｄ－ＩＬ－２Ｒβ細胞株（１０％ウシ胎児血清、ペニシリン、ストレプトマイシン、及び３００ＩＵ／ｍｌのｈＩＬ－２を含有するＲＰＭＩにおいて増殖）に、ＭＯＩ０．５でキメラ受容体構築物をコードするレンチウイルス上清を形質導入した。形質導入は、適切な量のウイルス上清を細胞に添加し、２４時間インキュベートし、細胞培地を交換することにより行った。形質導入から３～４日後、上記のようにフローサイトメトリーによりヒトＧ－ＣＳＦＲの発現を確認した。ＢｒｄＵアッセイを行う前に、細胞をＧ－ＣＳＦ ＷＴ中で約１４～２８日間増殖させた。

【０４３５】
上記のようにＧ－ＣＳＦ$_{WT}$中で増殖した３２Ｄ－ＩＬ－２Ｒβ細胞をＰＢＳで３回洗浄し、関連するアッセイサイトカイン（サイトカインなし、ｈＩＬ－２（３００ＩＵ／ｍｌ）、Ｇ－ＣＳＦ$_{WT}$（３０ｎｇ／ｍｌ）またはＧ－ＣＳＦ$_{E}$（３０ｎｇ／ｍｌ）を含有する新鮮な培地で４８時間再プレーティングした。ＢｒｄＵアッセイ手順は、ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ（商標）ＡＰＣ　ＢｒｄＵフローキット（５５７８９２）の取扱説明書に従って行い、更に以下を追加した：細胞をＢｒｄＵ及びｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ（商標）Ｆｉｘａｂｌｅ　Ｖｉａｂｉｌｉｔｙ　Ｄｙｅ　ｅＦｌｕｏｒ（商標）４５０（１：５０００）と３０分間共インキュベートした。Ｃｙｔｅｋ　Ａｕｒｏｒａ機器を使用して、分析フローサイトメトリーを実行した。

【０４３６】
結果
ＢｒｄＵアッセイでは、一本鎖キメラ受容体構築物Ｇ－ＣＳＦＲ$_{WT}$－ＩＣＤ$_{gp130}$－ＩＬ－２Ｒβまたはヘテロ二量体受容体構築物Ｇ－ＣＳＦＲ$_{WT}$－ＩＣＤ$_{IL-2Rβ}$＋Ｇ－ＣＳＦＲ$_{WT}$－ＩＣＤ$_{γc}$でトランスフェクトした細胞は、Ｇ－ＣＳＦ$_{WT}$（３０ｎｇ／ｍｌ）に反応してｈＩＬ－２（３００ＩＵ／ｍｌ）と比較して同等またはより優れた増殖が示された。細胞は、サイトカインの非存在下では増殖しなかった（図１５を参照）。

【０４３７】
これらの結果は、Ｇ－ＣＳＦによる刺激により、一本鎖及びヘテロ二量体キメラ受容体構築物が、細胞増殖を誘発するように活性化され得ることを示す。

【０４３８】
実施例１０：ＢｒｄＵにより調査したデザイン１３７のＧ－ＣＳＦＲ$_{E}$－ＩＣＤ$_{IL-2}$で形質導入され、野生型またはデザインＧ－ＣＳＦ$_{137}$で処理された３２Ｄ－ＩＬ－２Ｒβ細胞の増殖
ＳＰＲまたは共発現アッセイによって判断されるように十分に選択的であったサイトＩＩ／ＩＩＩの組み合わせデザインを、３２Ｄ－ＩＬ－２Ｒβ細胞の増殖を誘発する能力についてｉｎ　ｖｉｔｒｏで試験した。

【０４３９】
方法
デザイン１３７の点変異を、表１２～１４に記載の構築物に導入した。Ｇ－ＣＳＦＲ$_{137}$－ＩＣＤ$_{gp130}$－ＩＬ－２Ｒβ（ホモ二量体）またはＧ－ＣＳＦＲ$_{137}$－ＩＣＤ$_{IL-2Rβ}$＋Ｇ－ＣＳＦＲ$_{137}$－ＩＣＤ$_{γc}$（ヘテロ二量体）構築物のクローニング及び発現は、上記と同じ手順に従った。ＢｒｄＵアッセイを行う前に、細胞をＧ－ＣＳＦ$_{137}$中で約１４～２８日間増殖させた。

【０４４０】
Ｇ－ＣＳＦ$_{137}$中で増殖した３２Ｄ－ＩＬ－２Ｒβ細胞を、上記のＢｒｄＵアッセイ手順を用いて、Ｇ－ＣＳＦ$_{137}$（３０ｎｇ／ｍｌ）、Ｇ－ＣＳＦ$_{WT}$（３０ｎｇ／ｍｌ）、ｈＩＬ－２（３００ＩＵ／ｍｌ）、またはサイトカインなしでの増殖に関してアッセイした。

【０４４１】
結果
ＢｒｄＵアッセイでは、一本鎖キメラ受容体構築物Ｇ－ＣＳＦＲ$_{137}$－ＩＣＤ$_{gp130}$－ＩＬ－２Ｒβまたはヘテロ二量体受容体構築物Ｇ－ＣＳＦＲ$_{137}$－ＩＣＤ$_{IL-2Rβ}$＋Ｇ－ＣＳＦＲ$_{137}$－ＩＣＤ$_{γc}$で形質導入された細胞は、Ｇ－ＣＳＦ$_{137}$（３０ｎｇ／ｍｌ）においてｈＩＬ－２（３００ＩＵ／ｍｌ）と比較して同等またはより優れた増殖が示された。細胞はサイトカインの非存在下では増殖せず、Ｇ－ＣＳＦ$_{WT}$（３０ｎｇ／ｍｌ）において劣った増殖を示した（図１６）。

【０４４２】
これらの結果は、バリアントＧ－ＣＳＦが操作された受容体を特異的に活性化すること

を示し；逆に、操作された受容体はバリアントＧ－ＣＳＦによって活性化されるが、野生型Ｇ－ＣＳＦよりも顕著に活性化されないことを示している。したがって、バリアントＧ－ＣＳＦは、バリアントＧ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤによってキメラ受容体を特異的に活性化して、キメラ受容体を発現する細胞の増殖を特異的に誘発することができる。

【０４４３】

実施例１１：ＢｒｄＵにより調査した、野生型Ｇ－ＣＳＦＲ－ＩＣＤ$_{ＩＬ－２}$で形質導入され、野生型またはデザインＧ－ＣＳＦ$_{Ｅ}$で処理された３２Ｄ－ＩＬ－２Ｒβ細胞の増殖

続いて、３２Ｄ－ＩＬ－２Ｒ２Ｒβ細胞においてペアリングしたシグナル伝達を回復することができたサイトＩＩ／ＩＩＩの組み合わせデザインを、一本鎖キメラ受容体構築物Ｇ－ＣＳＦＲ$_{ＷＴ}$－ＩＣＤ$_{ｇｐ１３０－ＩＬ－２Ｒβ}$またはヘテロ二量体受容体構築物Ｇ－ＣＳＦＲ$_{ＷＴ}$－ＩＣＤ$_{ＩＬ－２Ｒβ}$＋Ｇ－ＣＳＦＲ$_{ＷＴ}$－ＩＣＤ$_{γｃ}$で形質導入された３２Ｄ－ＩＬ－２Ｒ２Ｒβ細胞の増殖を誘発する能力について試験した。

【０４４４】

方法

Ｇ－ＣＳＦＲ$_{ＷＴ}$－ＩＣＤ$_{ｇｐ１３０－ＩＬ－２Ｒβ}$（ホモ二量体）またはＧ－ＣＳＦＲ$_{ＷＴ}$－ＩＣＤ$_{ＩＬ－２Ｒβ}$＋Ｇ－ＣＳＦＲ$_{ＷＴ}$－ＩＣＤ$_{γｃ}$（ヘテロ二量体）構築物のクローニング及び発現は、上記と同じ手順に従った。ＢｒｄＵアッセイを行う前に、細胞をＧ－ＣＳＦ$_{ＷＴ}$中で約１４～２８日間増殖させた。

【０４４５】

Ｇ－ＣＳＦ$_{ＷＴ}$中で増殖した３２Ｄ－ＩＬ－２Ｒβ細胞を、上記のＢｒｄＵアッセイ手順を用いて、Ｇ－ＣＳＦ$_{１３７}$（３０ｎｇ／ｍｌ）、Ｇ－ＣＳＦ$_{ＷＴ}$（３０ｎｇ／ｍｌ）、ｈＩＬ－２（３００ＩＵ／ｍｌ）、またはサイトカインなしでの増殖に関してアッセイした。

【０４４６】

結果

ＢｒｄＵアッセイでは、一本鎖キメラ受容体構築物Ｇ－ＣＳＦＲ$_{ＷＴ}$－ＩＣＤ$_{ｇｐ１３０－ＩＬ－２Ｒβ}$またはヘテロ二量体受容体構築物Ｇ－ＣＳＦＲ$_{ＷＴ}$－ＩＣＤ$_{ＩＬ－２Ｒβ}$及びＧ－ＣＳＦＲ$_{ＷＴ}$－ＩＣＤ$_{γｃ}$で形質導入された細胞は、Ｇ－ＣＳＦ$_{１３７}$（３０ｎｇ／ｍｌ）においてＧ－ＣＳＦ$_{ＷＴ}$（３０ｎｇ／ｍｌ）と比較して劣った増殖を示した。細胞は、サイトカインの非存在下では増殖しなかった（図１７を参照）。

【０４４７】

これらの結果は、バリアントＧ－ＣＳＦが野生型Ｇ－ＣＳＦＲに効率的に結合せず、バリアントＧ－ＣＳＦが操作された受容体を特異的に活性化するが、野生型Ｇ－ＣＳＦＲは活性化せず、細胞増殖を誘発することを示している。

【０４４８】

実施例１２：ウエスタンブロットにより分析したＷＴまたはデザイン１３７のＧ－ＣＳＦＲ$_{Ｅ}$－ＩＣＤ$_{ＩＬ－２}$で形質導入され、野生型またはデザインＧ－ＣＳＦ$_{１３７}$で処理された３２Ｄ－ＩＬ－２Ｒβ細胞のシグナル伝達

３２Ｄ－ＩＬ－２Ｒβ細胞の操作されたサイトカイン受容体複合体を介して増殖シグナル伝達を回復することができ、Ｇ－ＣＳＦ$_{ＷＴ}$またはＷＴ－ＧＣＳＦＲ－ＩＣＤ－ＩＬ２の結合を介して有意にシグナル伝達しなかったサイトＩＩ／ＩＩＩの組み合わせデザインを、Ｇ－ＣＳＦ$_{ＷＴ}$またはＧ－ＣＳＦ$_{１３７}$に応答して下流のシグナル伝達分子を活性化する能力についてウエスタンブロットによって評価した。

【０４４９】

方法

Ｇ－ＣＳＦＲ$_{ＷＴ}$－ＩＣＤ$_{ｇｐ１３０－ＩＬ－２Ｒβ}$（ホモ二量体）またはＧ－ＣＳＦＲ$_{ＷＴ}$－ＩＣＤ$_{ＩＬ－２Ｒβ}$＋Ｇ－ＣＳＦＲ$_{ＷＴ}$－ＩＣＤ$_{γｃ}$（ヘテロ二量体）構築物のクローニング及び発現は、上記と同じ手順に従った。ウエスタンブロットアッセイを実施する前に、細胞をＧ－ＣＳＦ$_{１３７}$またはＧ－ＣＳＦ$_{ＷＴ}$で約１４～２８日間増殖させた。非形質導入細胞はＩＬ－２において維持した。

【０４５０】
ウエスタンブロットを行うために、細胞をＰＢＳで３回洗浄し、サイトカインを含まない培地で１６～２０時間静置した。細胞を、サイトカインなし、ＩＬ－２（３００ＩＵ／ｍｌ）、Ｇ－ＣＳＦ$_{137}$（３０ｎｇ／ｍｌ）、またはＧ－ＣＳＦ$_{WT}$（３０ｎｇ／ｍｌ）で、３７℃で２０分間刺激した。１０ｍＭのＨＥＰＥＳ、ｐＨ７７．９、１ｍＭのＭｇＣｌ$_2$、０．０５ｍＭのＥＧＴＡ、０．５ｍＭのＥＤＴＡ，ｐＨ８．０、１ｍＭのＤＴＴ、１ｘのＰｉｅｒｃｅプロテアーゼ及びホスファターゼ阻害剤ミニタブレット（Ａ３２９６１）を含有する洗浄緩衝液で細胞を１回洗浄した。０．２％のＩｇｅｐａｌ　ＣＡ６３０（Ｓｉｇｍａ）を加えた上記洗浄緩衝液中、氷上で、１０分間細胞を溶解し、１３，０００ｒｐｍ、４℃で１０分間遠心分離後、上清（細胞質画分）を回収した。ペレットを、０．４２ＭのＮａＣｌ及び２０％のグリセロールを加えた上記洗浄緩衝液中で再懸濁及び溶解させた。細胞を氷上で３０分間、頻繁にボルテックスしながら溶解し、１３，０００ｒｐｍ、４℃で２０分間遠心分離した後、核画分（上清）を回収した。細胞質画分と核画分を１０分間還元し（７０℃）、ＮｕＰＡＧＥ（商標）４～１２％のＢｉｓ－Ｔｒｉｓタンパク質ゲルで泳動した。ゲルをニトロセルロース膜に転写し（Ｔｒａｎｓ－Ｂｌｏｔ（登録商標）ＳＤセミドライ転写セルにて２０Ｖで６０分）、乾燥し、ＴＢＳ中のＯｄｙｓｓｅｙ（登録商標）ブロッキング緩衝液（９２７－５００００）で１時間ブロッキングした。ブロットを、０．１％のＴｗｅｅｎ２０を含有するＴＢＳ中のＯｄｙｓｓｅｙ（登録商標）ブロッキング緩衝液中、４℃で一次抗体（１：１，０００）を用いて一晩インキュベートした。使用した一次抗体はＣｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓから入手した：Ｐｈｏｓｐｈｏ－Ｓｈｃ（Ｔｙｒ２３９／２４０）抗体＃２４３４、Ｐｈｏｓｐｈｏ－Ａｋｔ（Ｓｅｒ４７３）（Ｄ９Ｅ）ＸＰ（登録商標）ウサギｍＡｂ＃４０６０、Ｐｈｏｓｐｈｏ－Ｓ６リボソームタンパク質（Ｓｅｒ２３５／２３６）抗体＃２２１１、Ｐｈｏｓｐｈｏ－ｐ４４／４２　ＭＡＰＫ（Ｅｒｋ１／２）（Ｔｈｒ２０２／Ｔｙｒ２０４）抗体＃９１０１、β－アクチン（１３Ｅ５）ウサギｍＡｂ＃４９７０、Ｐｈｏｓｐｈｏ－Ｓｔａｔ３（Ｔｙｒ７０５）（Ｄ３Ａ７）ＸＰ（登録商標）ウサギｍＡｂ＃９１４５、Ｐｈｏｓｐｈｏ－Ｓｔａｔ５（Ｔｙｒ６９４）（Ｃ１１Ｃ５）ウサギｍＡｂ＃９３５９、及びヒストンＨ３（９６Ｃ１０）マウスｍＡｂ＃３６３８。ブロットを０．１％のＴｗｅｅｎ２０を含有するＴＢＳで３回洗浄し、０．１％のＴｗｅｅｎ２０を含有するＴＢＳ緩衝液中で二次抗体（１：１０，０００）とともに室温で３０～６０分間インキュベートした。二次抗体は、Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓから入手した：抗マウスＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）　（ＤｙＬｉｇｈｔ（商標）８００　４ＸのＰＥＧコンジュゲート）＃５２５７及び抗ウサギＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）（ＤｙＬｉｇｈｔ（商標）８００　４Ｘ　ＰＥＧコンジュゲート）＃５１５１。ブロットを洗浄し、ＬＩ－ＣＯＲ　Ｏｄｙｓｓｅｙイメージャーで露光した。

【０４５１】
結果
非形質導入３２Ｄ－ＩＬ－２Ｒβ細胞において、ＩＬ－２のみでの刺激に応答した活性化ＩＬ－２Ｒ関連シグナル伝達分子を検出した。Ｇ－ＣＳＦＲ$_{WT}$－ＩＣＤ$_{gp130-IL-2Rβ}$またはＧ－ＣＳＦＲ$_{WT}$－ＩＣＤ$_{IL-2Rβ}$＋Ｇ－ＣＳＦＲ$_{WT}$－ＩＣＤ$_{γc}$のいずれかを発現する３２Ｄ－ＩＬ－２Ｒβ細胞において、ＩＬ－２またはＧ－ＣＳＦ$_{WT}$に応答した活性化シグナル伝達分子の同様のパターンが観察された。Ｇ－ＣＳＦＲ$_{WT}$－ＩＣＤ$_{gp130-IL-2Rβ}$を発現する３２Ｄ－ＩＬ－２Ｒβ細胞またはＧ－ＣＳＦＲ$_{WT}$－ＩＣＤ$_{IL-2Rβ}$＋Ｇ－ＣＳＦＲ$_{WT}$－ＩＣＤ$_{γc}$を発現する細胞のＧ－ＣＳＦ$_{137}$刺激に応答したＩＬ－２Ｒ関連シグナル伝達分子の活性化は観察されなかった。Ｇ－ＣＳＦＲ$_{137}$－ＩＣＤ$_{gp130-IL-2Rβ}$またはＧ－ＣＳＦＲ$_{137}$－ＩＣＤ$_{IL-2Rβ}$＋Ｇ－ＣＳＦＲ$_{137}$－ＩＣＤ$_{γc}$を発現する３２Ｄ－ＩＬ－２Ｒβ細胞において、ＩＬ－２またはＧ－ＣＳＦ$_{137}$に応答した活性化シグナル伝達分子の同様のパターンが観察された。Ｇ－ＣＳＦＲ$_{137}$－ＩＣＤ$_{gp130-IL-2Rβ}$を発現する３２Ｄ－ＩＬ－２Ｒβ細胞またはＧ－ＣＳＦＲ$_{137}$－ＩＣＤ$_{IL-2Rβ}$＋Ｇ－ＣＳＦＲ$_{137}$－Ｉ

ＣＤγｃを発現する細胞におけるＧ－ＣＳＦＷＴ刺激に応答したＩＬ－２Ｒ２Ｒ２Ｒ関連シグナル伝達分子の活性化は観察されなかった（図１８を参照されたい）。

【０４５２】

これらの結果は、バリアントＧ－ＣＳＦが、バリアントＧ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤを発現するキメラ受容体を活性化して、キメラ受容体を発現する細胞におけるネイティブサイトカインシグナル伝達の特徴を誘発することができることを実証している。

【０４５３】

実施例１３～３０の方法

初代細胞及び細胞株：レンチウイルスパッケージング細胞株ＨＥＫ２９３Ｔ／１７（ＡＴＣＣ）は、１０％ウシ胎児血清及びペニシリン／ストレプトマイシンを含有するＤＭＥＭ中で培養した。ＢＡＦ３－ＩＬ－２Ｒβ細胞を、ＢＡＦ３細胞株へのヒトＩＬ－２Ｒβサブユニットの安定的トランスフェクションによって事前に生成し、１０％ウシ胎児血清、ペニシリン、ストレプトマイシン、及び１００ＩＵ／ｍｌのヒトＩＬ－２（ｈＩＬ－２）（ＰＲＯＬＥＵＫＩＮ（登録商標）、Ｎｏｖａｒｔｉｓ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ　Ｃａｎａｄａ）を含有するＲＰＭＩ－１６４０中で増殖させた。３２Ｄ－ＩＬ－２Ｒβ細胞株を、３２Ｄ細胞株へのヒトＩＬ－２Ｒβサブユニットの安定的トランスフェクションによって事前に生成し、１０％ウシ胎児血清、ペニシリン、ストレプトマイシン、及び３００ＩＵ／ｍｌのｈＩＬ－２、または示された他のサイトカインを含有するＲＰＭＩ－１６４０において増殖させた。ヒトＰＢＭＣ由来Ｔ細胞（Ｈｅｍａｃａｒｅ）を、３％ヒトＡＢ血清（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ，Ｈ４５２２）、及び３００ＩＵ／ｍｌのｈＩＬ－２、または示された他のサイトカインを含有するＴｅｘＭＡＣＳ（商標）培地（Ｍｉｌｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ，１３０－０９７－１９６）において増殖させた。ヒト腫瘍関連リンパ球（ＴＡＬ）を、Ｔ細胞培地（以下の５０：５０混合物）において、初代腹水試料を１４日間培養することにより生成した：１）１０％ウシ胎児血清、５０ｕＭβ－メルカプトエタノール、１０ｍＭのＨＥＰＥＳ、２ｍＭのＬ－グルタミン、ペニシリン、ストレプトマイシン含有ＲＰＭＩ－１６４０；及び２）最終濃度３０００ＩＵ／ｍｌのｈＩＬ－２を含有するＡＩＭ　Ｖ（商標）培地（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ，１２０５５０８３）。この高用量のＩＬ－２増殖の後、ＴＡＬを３００ＩＵ／ｍｌのｈＩＬ－２または示された他のサイトカインを含有するＴ細胞培地において培養した。レトロウイルスパッケージング細胞株Ｐｌａｔｉｎｕｍ－Ｅ（Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌａｂｓ，ＲＶ－１０１）を、１０％ＦＢＳ、ペニシリン／ストレプトマイシン、ピューロマイシン（１ｍｃｇ／ｍｌ）、及びブラストサイジン（１０ｍｃｇ／ｍｌ）を含有するＤＭＥＭにおいて培養した。

【０４５４】

レンチウイルスの生成及び３２Ｄ－ＩＬ－２Ｒβ細胞の形質導入：キメラ受容体構築物をレンチウイルストランスファープラスミドにクローニングし、得られた配列をサンガーシークエンシングにより確認した。トランスファープラスミド及びレンチウイルスパッケージングプラスミドは、リン酸カルシウムトランスフェクション法を用いて、以下のようにＨＥＫ２９３Ｔ／１７細胞に共トランスフェクトした：細胞は一晩プレーティングし、トランスフェクションの２～４時間前に培地交換した。プラスミドＤＮＡ及び水をポリプロピレンチューブ内で混合し、$CaCl_2$（０．２５Ｍ）を滴下して加えた。２～５分間インキュベートした後、２ｘのＨＥＰＥＳ緩衝生理食塩水（０．２８ＭのＮａＣｌ、１．５ｍＭのNa_2HPO_4、０．１ＭのＨＥＰＥＳ）と１：１で混合することにより、ＤＮＡを沈殿させた。沈殿したＤＮＡ混合物を細胞上に添加し、３７℃、５％のCO_2で一晩インキュベートした。翌日、ＨＥＫ２９３Ｔ／１７培地を交換し、細胞を更に２４時間インキュベートした。翌朝、プレートから細胞上清を回収し、軽く遠心分離して破片を除去し、上清を０．４５ミクロンフィルターで濾過した。上清をＢｅｃｋｍａｎ　Ｏｐｔｉｍａ　Ｌ－ＸＰ超遠心機のＳＷ－３２Ｔｉローターを用いて２５，０００ｒｐｍで９０分間回転させた。上清を除去し、ペレットを適当量のＯｐｔｉ－ＭＥＭ培地に再懸濁させた。ウイルスの連続希釈液をＢＡＦ３－ＩＬ－２Ｒβ細胞に添加することにより、ウイルス価を決定した。形質導入の４８～７２時間後に、細胞を抗ヒトＧ－ＣＳＦＲ　ＡＰＣコンジ

ュゲート抗体（１：５０；Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ、１３０－０９７－３０８）及びＦｉｘａｂｌｅ Ｖｉａｂｉｌｉｔｙ Ｄｙｅ ｅＦｌｕｏｒ（商標）４５０（１：１０００、ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ（商標）、６５－０８６３－１４）とともに４℃で１５分間インキュベートして洗浄し、Ｃｙｔｅｋ ＡｕｒｏｒａまたはＢＤ ＦＡＣＳ Ｃａｌｉｂｕｒフローサイトメーターで分析した。この方法により測定した推定力価を用いて、３２Ｄ－ＩＬ－２Ｒβ細胞株に、感染多重度（ＭＯＩ）０．５でキメラ受容体構築物をコードするレンチウイルス上清を形質導入した。形質導入は、適切な量のウイルス上清を細胞に加え、２４時間インキュベートした後、培地を交換することによって行った。形質導入の３～４日後に、ヒトＧ－ＣＳＦＲの発現を、上記のようにフローサイトメトリーにより測定した。

【０４５５】

ヒト初代Ｔ細胞のレンチウイルス形質導入：ＰＢＭＣ由来Ｔ細胞及びＴＡＬの形質導入のために、細胞を解凍し、Ｈｕｍａｎ Ｔ Ｃｅｌｌ ＴｒａｎｓＡｃｔ（商標）（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ，１３０－１１１－１６０）の存在下で、製造元のガイドラインに従って、プレーティングした。活性化の２４時間後、レンチウイルス上清をＭＯＩ０．１２５～０．５で添加した。活性化の４８時間後、細胞を新鮮な培地に分割し、残留ウイルス及び活性化試薬を除去した。形質導入の２～４日後に、上記のようにフローサイトメトリーにより形質導入効率を測定した。ＣＤ４＋及びＣＤ８＋画分の形質導入効率を別々に測定した実験では、ヒトＧ－ＣＳＦＲに対する抗体、ＣＤ４（１：５０，Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ（登録商標）７００ ｃｏｎｊｕｇａｔｅ，ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ，３００５２６）、ＣＤ８（１：５０，ＰｅｒＣＰコンジュゲート、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ，３０１０３０）、ＣＤ３（１：５０，Ｂｒｉｌｌｉａｎｔ Ｖｉｏｌｅｔ ５１０（商標）コンジュゲート、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ，３００４４８）及びＣＤ５６（１：５０，Ｂｒｉｌｌｉａｎｔ Ｖｉｏｌｅｔ ７１１（商標）コンジュゲート，ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ、３１８３３６）を、Ｆｉｘａｂｌｅ Ｖｉａｂｉｌｉｔｙ Ｄｙｅ ｅＦｌｕｏｒ（商標）４５０（１：１０００）とともに、利用した。

【０４５６】

ヒトＴ細胞及び３２Ｄ－ＩＬ－２Ｒβ増殖アッセイ：上記で生成した、示されたキメラ受容体構築物を発現するヒト初代Ｔ細胞または３２－ＩＬ－２Ｒβ細胞を、ＰＢＳ中で３回洗浄し、示されるように、新鮮な培地で再プレーティングするか、またはその培地を徐々に交換した。完全培地を交換し、野生型ヒトＧ－ＣＳＦ（自家生成またはＮＥＵＰＯＧＥＮ（登録商標），Ａｍｇｅｎ Ｃａｎａｄａ）、変異体Ｇ－ＣＳＦ（自家生成）、ｈＩＬ－２、またはサイトカインなしのいずれかを含有するようにした。３～５日ごとに、トリパンブルー排除により細胞生存率及び密度を測定し、開始時細胞数に対する増殖倍率を算出した。Ｇ－ＣＳＦＲの発現は、上記のようにフローサイトメトリーにより評価した。

【０４５７】

ＣＤ４＋及びＣＤ８＋ヒトＴＡＬ増殖アッセイ：ＴＡＬのＣＤ４＋及びＣＤ８＋画分の増殖を調べるために、ｅｘ ｖｉｖｏ腹水試料を解凍し、ＣＤ４＋及びＣＤ８＋画分を、それぞれ、Ｈｕｍａｎ ＣＤ４＋Ｔ細胞単離キット（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ，１３０－０９６－５３３）及びＨｕｍａｎ ＣＤ８＋Ｔ細胞単離キット（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ，１３０－０９６－４９５）を用いて富化させた。サイトカイン含有培地での増殖後、細胞の免疫表現型を、ヒトＧ－ＣＳＦＲに対する抗体、ＣＤ４（１：５０、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ（登録商標）７００コンジュゲート、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ、３００５２６）、ＣＤ８（１：５０、ＰｅｒＣＰコンジュゲート、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ、３０１０３０、ＣＤ３（１：５０、Ｂｒｉｌｌｉａｎｔ Ｖｉｏｌｅｔ ５１０（商標）コンジュゲート、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ，３００４４８）、及びＣＤ５６（１：５０、Ｂｒｉｌｌｉａｎｔ Ｖｉｏｌｅｔ ７１１（商標）コンジュゲート、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ、３１８３３６）を利用して、Ｆｉｘａｂｌｅ Ｖｉａｂｉｌｉｔｙ Ｄｙｅ ｅＦｌｕｏｒ（商標）４５０（１：１０００）とともに、フローサイトメトリーにより評価した。

【０４５８】

初代ヒトＴ細胞免疫表現型解析アッセイ：サイトカイン含有培地での増殖後、Ｔ細胞の免疫表現型を、ヒトＧ－ＣＳＦＲに対する抗体、ＣＤ４（１：１００、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ（登録商標）７００コンジュゲート、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ、３００５２６またはＰＥコンジュゲート、ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ（商標）、１２－００４８－４２、またはＢｒｉｌｌｉａｎｔ Ｖｉｏｌｅｔ ５７０（商標）コンジュゲート、Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、３１７４４５）、ＣＤ８（１：１００、ＰｅｒＣＰコンジュゲート、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ、３０１０３０）、ＣＤ３（１：１００、Ｂｒｉｌｌｉａｎｔ Ｖｉｏｌｅｔ ５１０（商標）またはＢｒｉｌｌｉａｎｔ Ｖｉｏｌｅｔ ７５０（商標）コンジュゲート、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ、３００４４８または３４４８４５）、ＣＤ５６（１：１００、Ｂｒｉｌｌｉａｎｔ Ｖｉｏｌｅｔ ７１１（商標）コンジュゲート、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ，３１８３３６）、ＣＣＲ７（１：５０、ＡＰＣ／Ｆｉｒｅ（商標）７５０コンジュゲート、Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、３５３２４６）、ＣＤ６２Ｌ（１：３３、ＰＥ／Ｄａｚｚｌｅ（商標）５９４コンジュゲート、Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、３０４８４２）、ＣＤ４５ＲＡ（１：３３、ＦＩＴＣコンジュゲート、Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、３０４１４８）、ＣＤ４５ＲＯ（１：２５、ＰｅｒＣＰ－ｅＦｌｕｏｒ（登録商標）７１０コンジュゲート、ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ（商標）、４６－０４５７－４２）、ＣＤ９５（１：３３、ＰＥ－シアニン７コンジュゲート、ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ（商標）、２５－０９５９－４２）を利用して、Ｆｉｘａｂｌｅ Ｖｉａｂｉｌｉｔｙ Ｄｙｅ ｅＦｌｕｏｒ（商標）４５０または５１０６（１：１０００）とともに、フローサイトメトリーにより評価した。

【０４５９】

レトロウイルス形質導入：ｐＭＩＧトランスファープラスミド（プラスミド＃９０４４，Ａｄｄｇｅｎｅ）は、制限エンドヌクレアーゼクローニングにより変更され、ＩＲＥＳ－ＧＦＰ（ＢｇｌＩＩからＰａｃＩサイト）を除去し、カスタムマルチクローニングサイトをコードするアニーリングプライマーを導入した。キメラ受容体構築物をカスタマイズしたトランスファープラスミドにクローニングし、得られた配列をサンガーシークエンシングにより確認した。トランスファープラスミドを、上記のように、リン酸カルシウムトランスフェクション法を用いてＰｌａｔｉｎｕｍ－Ｅ細胞にトランスフェクションした。トランスフェクションの２４時間後、培地を５ｍｌの新鮮な完全培地に交換した。トランスフェクションの４８時間後、細胞上清をプレートから回収し、０．４５ミクロンフィルターで濾過した。臭化ヘキサジメトリン（１．６ｍｃｇ／ｍｌ，Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）及びマウスＩＬ－２（２ｎｇ／ｍｌ，Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ）を上清に添加した。この精製されたレトロウイルス上清を使用して、以下に記載するようにマウスリンパ球を形質導入した。

【０４６０】

レトロウイルス上清を回収する４８時間前に、２４ウェル付着プレートを、ＰＢＳ中で希釈した非コンジュゲート抗マウスＣＤ３（５ｍｃｇ／ｍｌ、ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、５５３０５８）及び抗マウスＣＤ２８（１ｍｃｇ／ｍｌ、ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、５５３２９４）抗体でコートし、４℃で保存した。レトロウイルス上清を回収する２４時間前に、Ｃ５７Ｂｌ／６Ｊマウス（自家生成）を、ビクトリア大学動物実験委員会が管理する承認済みの動物実験計画書の下で安楽死させた。脾臓を採取し、マウスＴ細胞を以下のように単離した：脾臓を手作業で取り除き、１００ミクロンフィルターで濾過した。赤血球は、ＡＣＫ溶解緩衝液（Ｇｉｂｃｏ、Ａ１０４９２０１）中で室温で５分間インキュベートすることにより溶解し、その後、血清含有培地で１回洗浄した。ＣＤ８ａ陽性細胞またはＰａｎ－Ｔ細胞を、特異的ビーズベース分離キット（それぞれＭｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ、１３０－１０４－０７５または１３０－０９５－１３０）を使用して単離した。細胞を、マウスＴ細胞増殖培地（１０％ＦＢＳ、ペニシリン／ストレプトマイシン、０．０５ｍＭβ－メルカプトエタノール、及び２ｎｇ／ｍｌのマウスＩＬ－２（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、２１２－１２）を含有するＲＰＭＩ－１６４０）中の抗ＣＤ３－抗体及び抗ＣＤ２８－抗体または３００ＩＵ／ｍＬのヒトＩＬ－２（Ｐｒｏｌｅｕｋｉｎ）でコートしたプレートに加えて、３７℃、５％CO_2で２４時間インキュベートした。

形質導入当日、培地の約半分を上記で生成したレトロウイルス上清と交換した。このレトロウイルス上清を用いて、３０℃で９０分間、１０００ｇで細胞をスピンフェクトした。プレートをインキュベーターに０～４時間戻し、その後、培地の約半分を新鮮なＴ細胞増殖培地と交換した。上記のように、レトロウイルス形質導入を２４時間後に繰り返し、合計２回の形質導入を行った。最後の形質導入から２４時間後に、Ｔ細胞を６ウェルプレートに分割し、抗体刺激から除去した。

【０４６１】

形質導入の４８～７２時間後、上記のように、ヒトＧ－ＣＳＦＲ、ＣＤ４（ＡｌｅｘａＦｌｕｏｒ　５３２コンジュゲート、ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ（商標）、５８－００４２－８２）、ＣＤ８ａ（ＰｅｒＣＰ－ｅＦｌｕｏｒ　７１０コンジュゲート、ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ（商標），４６－００８１－８２）、及びＦｉｘａｂｌｅ　Ｖｉａｂｉｌｉｔｙ　Ｄｙｅ　ｅＦｌｕｏｒ（商標）４５０（１：１０００希釈）を検出するフローサイトメトリーにより形質導入効率を評価した。

【０４６２】

ＢｒｄＵ取り込みアッセイ：上記のように生成したヒト初代Ｔ細胞、３２Ｄ－ＩＬ－２Ｒβ細胞、またはマウス初代Ｔ細胞をＰＢＳで３回洗浄し、関連するアッセイサイトカイン：サイトカインなし、ｈＩＬ－２（３００ＩＵ／ｍｌ）、野生型または操作されたＧ－ＣＳＦ（個々の実験で示された濃度の）を含有する新鮮な培地で４８時間再プレーティングした。ＢｒｄＵアッセイ手順は、ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ（商標）ＡＰＣ　ＢｒｄＵフローキット（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ，５５７８９２）の取扱説明書に従って行い、更に以下を追加した：細胞をＢｒｄＵ及びＦｉｘａｂｌｅ　Ｖｉａｂｉｌｉｔｙ　Ｄｙｅ　ｅＦｌｕｏｒ（商標）４５０（１：５０００）と３０分間～４時間、３７℃で共インキュベートした。Ｃｙｔｅｋ　Ａｕｒｏｒａ機器を使用して、フローサイトメトリーを実行した。キメラ受容体を発現するマウスＴ細胞の増殖を特異的に評価するために、ヒトＧ－ＣＳＦＲ（１：２０希釈）、ＣＤ４（１：５０希釈）、及びＣＤ８（１：５０希釈）の追加染色を、固定化前に、氷上で１５分間実施した。

【０４６３】

ウエスタンブロット：上記のように生成したヒト初代Ｔ細胞、３２Ｄ－ＩＬ－２Ｒβ細胞、またはマウス初代Ｔ細胞をＰＢＳ中で３回洗浄し、サイトカインを含まない培地で１６～２０時間静置した。細胞を、サイトカインなし、ＩＬ－２（３００ＩＵ／ｍｌ）、野生型Ｇ－ＣＳＦ（個々の実験で示された濃度の）、またはＧ－ＣＳＦ$_{137}$（３０ｎｇ／ｍｌ）によって、３７℃で２０分間刺激した。１０ｍＭのＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．９、１ｍＭのＭｇＣｌ$_2$、０．０５ｍＭのＥＧＴＡ、０．５ｍＭのＥＤＴＡ、ｐＨ８．０、１ｍＭのＤＴＴ、及び１ｘのＰｉｅｒｃｅプロテアーゼ及びホスファターゼ阻害剤ミニタブレット（Ａ３２９６１）を含有する緩衝液で細胞を１回洗浄した。細胞を上記の洗浄緩衝液に溶解し、０．２％のＮＰ－４０（Ｓｉｇｍａ）を氷上で１０分間加えた。溶解物を４℃で１３０００ｒｐｍで１０分間遠心分離し、上清（細胞質画分）を回収した。ペレット（核タンパク質を含む）を、０．４２ＭのＮａＣｌ及び２０％のグリセロールを加えた上記洗浄緩衝液中で再懸濁させた。核を氷上で頻繁にボルテックスしながら３０分間インキュベートし、１３，０００ｒｐｍ、４℃で２０分間遠心分離した後、上清（核画分）を回収した。細胞質画分及び核画分を１０分間還元し（７０℃）、ＮｕＰＡＧＥ（商標）４～１２％のＢｉｓ－Ｔｒｉｓタンパク質ゲルで泳動した。ゲルをニトロセルロース膜に転写し（Ｔｒａｎｓ－Ｂｌｏｔ（登録商標）ＳＤセミドライ転写セルにて２０Ｖで６０分）、乾燥し、ＴＢＳ中のＯｄｙｓｓｅｙ（登録商標）ブロッキング緩衝液（９２７－５００００）で１時間ブロッキングした。ブロットを、０．１％のＴｗｅｅｎ２０を含有するＴＢＳ中のＯｄｙｓｓｅｙ（登録商標）ブロッキング緩衝液中、４℃で一次抗体（１：１，０００）を用いて一晩インキュベートした。使用した一次抗体はＣｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓから入手した：Ｐｈｏｓｐｈｏ－ＪＡＫ１（Ｔｙｒ１０３４／１０３５）（Ｄ７Ｎ４Ｚ）ウサギｍＡｂ＃７４１２９、Ｐｈｏｓｐｈｏ－ＪＡＫ２（Ｔｙｒ１００７／１００８）＃３７７１、Ｐｈｏｓｐｈｏ－ＪＡＫ３（Ｔｙｒ９８０／９８１

）（Ｄ４４Ｅ３）ウサギｍＡｂ＃５０３１、Ｐｈｏｓｐｈｏ－ｐ７０　Ｓ６キナーゼ（Ｔｈｒ４２１／Ｓｅｒ４２４）抗体＃９２０４、Ｐｈｏｓｐｈｏ－Ｓｈｃ（Ｔｙｒ２３９／２４０）抗体＃２４３４、Ｐｈｏｓｐｈｏ－Ａｋｔ（Ｓｅｒ４７３）（Ｄ９Ｅ）ＸＰ（登録商標）ウサギｍＡｂ＃４０６０、Ｐｈｏｓｐｈｏ－Ｓ６リボソームタンパク質（Ｓｅｒ２３５／２３６）抗体＃２２１１、Ｐｈｏｓｐｈｏ－ｐ４４／４２　ＭＡＰＫ（Ｅｒｋ１／２）（Ｔｈｒ２０２／Ｔｙｒ２０４）抗体＃９１０１、β－アクチン（１３Ｅ５）ウサギｍＡｂ＃４９７０、Ｐｈｏｓｐｈｏ－ＳＴＡＴ１（Ｔｙｒ７０１）（５８Ｄ６）ウサギｍＡｂ＃９１６７、Ｐｈｏｓｐｈｏ－ＳＴＡＴ３（Ｔｙｒ７０５）（Ｄ３Ａ７）ＸＰ（登録商標）ウサギｍＡｂ＃９１４５、Ｐｈｏｓｐｈｏ－ＳＴＡＴ４（Ｔｙｒ６９３）抗体＃５２６７、Ｐｈｏｓｐｈｏ－ＳＴＡＴ５（Ｔｙｒ６９４）（Ｃ１１Ｃ５）ウサギｍＡｂ＃９３５９、及びヒストンＨ３（９６Ｃ１０）マウスｍＡｂ＃３６３８。ブロットを０．１％のＴｗｅｅｎ２０を含有するＴＢＳで３回洗浄し、０．１％のＴｗｅｅｎ２０を含有するＴＢＳ緩衝液中で二次抗体（１：１０，０００）とともに室温で３０～６０分間インキュベートした。Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓから入手した二次抗体は、抗マウスＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）（ＤｙＬｉｇｈｔ（商標）８００　４ＸのＰＥＧコンジュゲート）＃５２５７及び抗ウサギＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）（ＤｙＬｉｇｈｔ（商標）８００　４Ｘ　ＰＥＧコンジュゲート）＃５１５１であった。ブロットを洗浄し、ＬＩ－ＣＯＲ　Ｏｄｙｓｓｅｙイメージャーで露光した。

【０４６４】

リン酸化タンパク質を検出するフローサイトメトリー：上記のように生成したヒト初代Ｔ細胞、３２Ｄ－ＩＬ－２Ｒβ細胞、またはマウス初代Ｔ細胞をＰＢＳ中で３回洗浄し、サイトカインを含まない培地で１６～２０時間静置した。細胞を、示されたようにＦｉｘａｂｌｅ　Ｖｉａｂｉｌｉｔｙ　Ｄｙｅ　ｅＦｌｕｏｒ（商標）４５０（１：１０００）、及び抗Ｇ－ＣＳＦＲ（１：２０）、抗ＣＤ４（１：５０）、及び抗ＣＤ８ａ（１：５０）の存在下、３７℃で２０分間、サイトカインなし、ＩＬ－２（３００ＩＵ／ｍｌ）、または野生型Ｇ－ＣＳＦ（１００ｎｇ／ｍｌ）で刺激した。細胞をペレット化し、ＢＤ　Ｐｈｏｓｆｌｏｗ（商標）固定緩衝液Ｉ（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ，５５７８７０）を用いて室温で１５分間固定化した。細胞を洗浄後、ＢＤ　Ｐｈｏｓｆｌｏｗ（商標）Ｐｅｒｍ緩衝液ＩＩＩ（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ，５５８０５０）を用いて氷上で１５分間透過処理した。細胞を２回洗浄し、ＢＤ　Ｐｈｏｓｆｌｏｗ（商標）ＰＥマウス抗Ｓｔａｔ３（ｐＹ７０５）（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ，６１２５６９）またはＰＥマウスＩｇＧ２ａ，κアイソトープコントロール（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ，５５８５９５）２０μｌを含有する緩衝液に再懸濁した。細胞を洗浄し、Ｃｙｔｅｋ　Ａｕｒｏｒａ機器を使用して、フローサイトメトリーを実行した。

【０４６５】

実施例１３：Ｇ２Ｒ－１、Ｇ－ＣＳＦＲ／ＩＬ－２ＲＢサブユニットのみ、ＭＹＣタグ付きＧ－ＣＳＦＲ／Γ－Ｃサブユニットのみ、または完全長Ｇ－ＣＳＦＲを発現するヒトＴ細胞の増殖

ＰＢＭＣ由来Ｔ細胞または腫瘍関連リンパ球（ＴＡＬ）に、図２０、２４及び２４に示すキメラ受容体構築物をコードするレンチウイルスで形質導入し、細胞を洗浄した後、示されたサイトカインで再プレーティングした。細胞を３～４日ごとに計数した。Ｇ／γｃは、そのＮ末端にＭｙｃエピトープをタグ付けされ（Ｍｙｃ／Ｇ／γｃ）、Ｇ／ＩＬ－２Ｒβは、そのＮ末端にＦｌａｇエピトープをタグ付けされ（Ｆｌａｇ／Ｇ／ＩＬ－２Ｒβ）；これらのエピトープタグは、フローサイトメトリーによる検出を補助し、受容体の機能には影響を与えない。予想通り、すべてのＴ細胞培養物は陽性対照サイトカインであるＩＬ－２（３００ＩＵ／ｍｌ）に反応して増殖を示した。Ｇ－ＣＳＦ（１００ｎｇ／ｍｌ）で刺激した後、ＰＭＢＣ由来のＴ細胞及びＧ２Ｒ－１キメラサイトカイン受容体を発現するＴＡＬについてのみ、増殖が観察された（図２２）。レンチウイルスの形質導入効率は、Ｔ細胞の１００％未満が、示されたキメラサイトカイン受容体を発現するように１００％未満であったことに留意されたい。これは、ＩＬ－２と比較してＧ２Ｒ－１によって

媒介される増殖率が低いことの原因であると考えられる。同様に、増殖の増加は、Ｇ－ＣＳＦＲキメラ受容体サブユニットＧ２Ｒ－１及びＧ２Ｒ－２を発現し、Ｇ－ＣＳＦで刺激された３２Ｄ－ＩＬ－２Ｒβ細胞（ヒトＩＬ－２Ｒβサブユニットを安定して発現する）において観察された（図２１）。Ｔ細胞とは対照的に、Ｇ／ＩＬ－２Ｒβキメラ受容体サブユニットのみを発現する３２Ｄ－ＩＬ－２Ｒβ細胞は、Ｇ－ＣＳＦに反応して増殖し（図２１）、Ｇ－ＣＳＦ誘導性増殖は、Ｇ／γｃキメラ受容体サブユニットのみを発現する３２Ｄ－ＩＬ－２Ｒβ細胞では見られなかった（図２１）。

【０４６６】

これらの結果から、Ｇ－ＣＳＦはＧ２Ｒ－１キメラ受容体を発現するＰＭＢＣ由来のＴ細胞及びＴＡＬ、ならびにＧ／ＩＬ－２Ｒβ、Ｇ２Ｒ－１、及びＧ２Ｒ－２キメラ受容体を発現する３２Ｄ－ＩＬ－２Ｒβ細胞の増殖及び生存を刺激することができることが示された。

【０４６７】

実施例１４：Ｇ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤは、Ｇ／ＩＬ－２Ｒβ、Ｇ２Ｒ－１、及びＧ２Ｒ－２で形質導入された細胞の表面に発現する

Ｇ２Ｒ－２キメラサイトカイン受容体をコードするレンチウイルスベクター（図２３及び２５に概略的に示す）を形質導入した後の３２Ｄ－ＩＬ－２Ｒβ細胞株、ＰＢＭＣ由来のヒトＴ細胞及びヒト腫瘍関連リンパ球に対してフローサイトメトリーを行い、細胞が細胞表面にＧ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤを発現するかどうかを測定した。Ｇ－ＣＳＦＲ陽性細胞は、すべての形質導入された細胞タイプにおいて検出された（図２６）。別の実験では、Ｇ／ＩＬ－２Ｒβ、Ｇ２Ｒ－１、及びＧ２Ｒ－２キメラ受容体を発現する３２Ｄ－ＩＬ－２Ｒβ細胞は、フローサイトメトリーによりＧ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤに対して陽性であった（図２１Ｂ～Ｄの下段）。

【０４６８】

これらの結果は、Ｇ／ＩＬ－２Ｒβ、Ｇ２Ｒ－１、及びＧ２Ｒ－２キメラ受容体が細胞表面上に発現していることを示すものである。

【０４６９】

実施例１５：非形質導入細胞と比較したＧ２Ｒ－２を発現する細胞の増殖

ヒトＰＢＭＣ由来のＴ細胞及びヒト腫瘍関連リンパ球に、Ｇ２Ｒ－２受容体構築物（図２３及び図２５）をレンチウイルスで形質導入し、洗浄し、示されたサイトカインで再プレーティングした。いくつかの実験では、Ｔ細胞もＴｒａｎｓＡｃｔで刺激することにより定期的に再活性化させた。生細胞は３～４日ごとに計数した。ＰＭＢＣ由来のＴ細胞（図２７Ａ）及び腫瘍関連リンパ球（図２７Ｂ，Ｃの２つの独立した実験）の増殖は、Ｇ２Ｒ－２キメラ受容体を発現する細胞においてＧ－ＣＳＦ（１００ｎｇ／ｍｌ）で刺激した後に観察されたが、非形質導入細胞では観察されなかった。

【０４７０】

これらの結果は、Ｇ－ＣＳＦ誘導性のＧ２Ｒ－２キメラ受容体の活性化が、免疫細胞の増殖及び生存を誘発するのに十分であることを示す。

【０４７１】

実施例１６：非形質導入細胞と比較した、Ｇ２Ｒ－２を発現するＣＤ４またはＣＤ８選択ヒト腫瘍関連リンパ球の増殖及び免疫表現型

ＣＤ４選択及びＣＤ８選択ヒトＴ細胞に、Ｇ２Ｒ－２をコードするレンチウイルスベクター（図２５）を形質導入するか、または示された場所では形質導入しないままにした。細胞を洗浄し、示されたサイトカインで再プレーティングして３～４日ごとに計数した。Ｇ２Ｒ－２を発現するＣＤ４またはＣＤ８選択ＴＡＬの増殖は、Ｇ－ＣＳＦ（１００ｎｇ／ｍｌ）またはＩＬ－２（３００ＩＵ／ｍｌ）での刺激後に観察されたが、添加したサイトカインがない場合（培地のみ）では観察されなかった（図２８及び図２９）。図２８では、各線は５つの患者試料のうちの１つからの結果を表す。

【０４７２】

フローサイトメトリーによる免疫表現型解析は、Ｇ－ＣＳＦまたはＩＬ－２で培養した

Ｔ細胞が、これらの培養条件下で、ＣＤ４＋またはＣＤ８＋の特徴を保持し（図３０Ａ）、ＮＫ細胞表現型（ＣＤ３－ＣＤ５６＋）を欠き（図３０Ａ）、ＣＤ４５ＲＡ－ＣＣＲ７－Ｔエフェクターメモリー（T_{EM}）表現型を示した（図３０Ｂ）ことを示した。

【０４７３】

Ｇ－ＣＳＦで刺激するとＧ２Ｒ－２を発現するＴ細胞の細胞周期の進行が促進することを確認するために、ＢｒｄＵアッセイを行った（図３１）。Ｔ細胞は、アッセイの前に、示されているように、ＩＬ－２またはＧ－ＣＳＦでの培養によって選択された。腫瘍関連リンパ球（図３１Ａ）及びＰＢＭＣ由来Ｔ細胞（図３１Ｂ）の両方を評価した。

【０４７４】

これらの結果は、Ｇ－ＣＳＦがキメラサイトカイン受容体Ｇ２Ｒ－２の活性化により、初代ヒトＴＡＬの細胞周期の進行と長期的増殖を選択的に活性化できることを示す。また、これらの結果は、ホモ二量体形成によるＧ２Ｒ－２キメラ受容体の活性化が、ＴＡＬにおけるサイトカイン様シグナル伝達及び増殖を活性化するのに十分であることを示す。更に、Ｇ２Ｒ－２を発現するＴＡＬは、Ｇ－ＣＳＦの離脱により、ＩＬ－２の離脱に対する反応と同様に細胞死を起こすというサイトカイン依存性を維持している。Ｇ－ＣＳＦで培養したＴＡＬは、ＩＬ－２で培養したＴＡＬと同様の免疫表現型を維持する。

【０４７５】

<u>実施例１７：Ｇ２Ｒ－２を発現する初代マウスＴ細胞はＧ－ＣＳＦに応答して増殖する</u>

Ｇ－ＣＳＦによる刺激時の、Ｇ２Ｒ－２または一本鎖Ｇ／ＩＬ－２Ｒβ（Ｇ２Ｒ－１の構成要素）を発現する初代マウスＴ細胞対モック形質導入細胞の増殖を評価するために、ＢｒｄＵ取り込みアッセイを実施した。すべての細胞を、アッセイ前にＩＬ－２で３日間増殖させた。Ｇ２Ｒ－２またはＧ／ＩＬ－２Ｒβの細胞表面発現は、フローサイトメトリーにより確認した（図３２Ａ）。示されたように、次に細胞をＩＬ－２（３００ＩＵ／ｍｌ）、野生型Ｇ－ＣＳＦ（１００ｎｇ／ｍｌ）、またはサイトカインなしでプレーティングした。Ｇ－ＣＳＦによる刺激後の細胞周期進行の増加は、非形質導入細胞または一本鎖Ｇ／ＩＬ－２Ｒβを発現する細胞よりもＧ２Ｒ－２を発現する細胞において観察された（図３２Ｂ、Ｃ）。パネルＢ及びＣは、それぞれ、すべての生細胞またはＧ－ＣＳＦＲ＋細胞についての結果を示す。

【０４７６】

これらの結果は、Ｇ－ＣＳＦ誘導性ホモ二量体化に応答して、Ｇ２Ｒ－２キメラ受容体が一本鎖Ｇ／ＩＬ－２Ｒβ受容体よりも効率的であり、マウスＴ細胞においてサイトカイン様シグナル伝達及び増殖を活性化することを示す。

【０４７７】

<u>実施例１８：Ｇ－ＣＳＦまたはＩＬ－２に応答したＧ２Ｒ－２を発現するヒト初代Ｔ細胞におけるサイトカイン関連細胞内シグナル伝達イベントの活性化</u>

キメラサイトカイン受容体が、実際にＩＬ－２と同様のサイトカインシグナル伝達を活性化することができることを確認するために、サイトカイン受容体がさまざまなシグナル伝達分子を活性化する能力を評価した。Ｇ２Ｒ－２を発現する腫瘍関連リンパ球及びＰＢＭＣ由来Ｔ細胞は、あらかじめＧ－ＣＳＦにおいて、非形質導入細胞は、あらかじめＩＬ－２において増殖させた。細胞を洗浄し、次にＩＬ－２（３００ＩＵ／ｍｌ）、野生型Ｇ－ＣＳＦ（１００ｎｇ／ｍｌ）、またはサイトカインなしで刺激し、示されたシグナル伝達分子に対する抗体を用いて細胞溶解物にウエスタンブロットを行った（図３３）。パネルＡ及びＢはＴＡＬの結果を示し、パネルＣはＰＢＭＣ由来Ｔ細胞の結果を示す。Ｇ２Ｒ－２を発現するＴ細胞は、Ｇ－ＣＳＦにより刺激すると、非形質導入細胞または形質導入細胞のＩＬ－２刺激後に見られるのと同程度に（Ｇ－ＣＳＦがＪＡＫ２リン酸化を誘発したのに対し、ＩＬ－２はＪＡＫ３リン酸化を誘発したという予想される例外を除いて）、ＩＬ－２関連シグナル伝達分子を活性化した。

【０４７８】

これらの結果は、Ｇ２Ｒ－２キメラ受容体が、Ｇ－ＣＳＦにより刺激すると、ＩＬ－２受容体様サイトカイン受容体シグナル伝達を活性化することができることを確認するもの

である。

【０４７９】

実施例１９：　Ｇ２Ｒ－２を発現するマウス初代Ｔ細胞において、Ｇ－ＣＳＦに応答してサイトカインシグナル伝達が活性化される

キメラサイトカイン受容体Ｇ２Ｒ－２または一本鎖Ｇ／ＩＬ－２Ｒβ（Ｇ２Ｒ－１由来）が、サイトカインシグナル伝達を活性化することができるかどうかを評価するために、これらのサイトカイン受容体のさまざまなシグナル伝達分子を活性化する能力を、Ｇ２Ｒ－２またはＧ／ＩＬ－２Ｒβを発現するマウス初代Ｔ細胞の細胞溶解物対モック形質導入細胞のウエスタンブロットによって評価した。すべての細胞を、アッセイ前にＩＬ－２で３日間増殖させた。その後、細胞を洗浄し、ＩＬ－２（３００ＩＵ／ｍｌ）、野生型Ｇ－ＣＳＦ（１００ｎｇ／ｍｌ）、またはサイトカインなしで刺激した。Ｇ２Ｒ－２を発現する細胞は、Ｇ－ＣＳＦにより刺激すると、非形質導入細胞または形質導入細胞のＩＬ－２刺激後に見られるのと同程度に（Ｇ－ＣＳＦがＪＡＫ２リン酸化を誘発したのに対し、ＩＬ－２はＪＡＫ３リン酸化を誘発したという予想される例外を除いて）、ＩＬ－２関連シグナル伝達分子を活性化した（図３４）。対照的に、Ｇ／ＩＬ－２Ｒβは、Ｇ－ＣＳＦへの曝露時にサイトカインシグナル伝達を活性化しなかった。

【０４８０】

これらの結果により、Ｇ２Ｒ－２キメラ受容体がＧ－ＣＳＦ刺激によるホモ二量体化によってＩＬ－２受容体様サイトカイン受容体シグナル伝達を活性化することができるのに対し、一本鎖Ｇ／ＩＬ－２Ｒβのみは Ｇ－ＣＳＦに応答したホモ二量体化によってサイトカインシグナル伝達を活性化することができないことが、初代マウスＴ細胞において確認された。

【０４８１】

実施例２０：キメラ受容体の発現は、直交Ｇ－ＣＳＦによる刺激後、３２Ｄ－ＩＬ－２Ｒβ細胞及び初代マウスＴ細胞の増殖をもたらす

キメラサイトカイン受容体を発現する細胞が直交バージョンのＧ－ＣＳＦに応答して選択的に活性化され得るかどうかを判定するために、３２Ｄ－ＩＬ－２Ｒβ細胞または初代マウスＴ細胞に野生型Ｇ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤを含むキメラ受容体Ｇ２Ｒ－１及びＧ２Ｒ－２（Ｇ２Ｒ－１　ＷＴ　ＥＣＤ、Ｇ２Ｒ－２　ＷＴ　ＥＣＤ）と、アミノ酸置換Ｒ４１Ｅ、Ｒ１４１Ｅ、及びＲ１６７Ｄを有するＧ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤを含むキメラ受容体Ｇ２Ｒ－１及びＧ２Ｒ－２（Ｇ２Ｒ－１　１３４　ＥＣＤ、Ｇ２Ｒ－２　１３４　ＥＣＤ）と、を形質導入した。細胞を、ＩＬ－２、野生型Ｇ－ＣＳＦ、またはＧ２Ｒ－１　１３４　ＥＣＤ、及びＧ２Ｒ－２　１３４　ＥＣＤに結合できるが野生型Ｇ－ＣＳＦＲへの結合が著しく低下した直交Ｇ－ＣＳＦ（１３０　Ｇ－ＣＳＦ）のいずれかで刺激した。ＢｒｄＵ取り込みアッセイを行い、サイトカイン刺激時に細胞周期進行を促進する細胞の能力を評価した（図３５）。Ｇ２Ｒ－２　１３４　ＥＣＤを発現する３２Ｄ－ＩＬ－２Ｒβ細胞は、１３０　Ｇ－ＣＳＦ（アミノ酸置換Ｅ４６Ｒ、Ｌ１０８Ｋ、及びＤ１１２Ｒを保有；３０ｎｇ／ｍｌ）で刺激すると細胞周期の進行を示したが、野生型Ｇ－ＣＳＦ（３０ｎｇ／ｍｌ）で刺激すると細胞周期の進行は起こらなかった。操作されたサイトカイン：受容体ＥＣＤペアの直交性は、「クリスクロス」増殖アッセイで初代マウスＴ細胞を刺激することによって更に示され、このアッセイでは、ＷＴ、１３０、１３４、３０４、または３０７ＥＣＤを有するＧ２Ｒ－３を発現する細胞（図２３）がＷＴ、１３０、３０４または３０７サイトカイン（１００ｎｇ／ｍｌ）で刺激された（図３６）。１３０　ＥＣＤは、アミノ酸置換：Ｒ４１Ｅ及びＲ１６７Ｄを有する。３０４　ＥＣＤは、アミノ酸置換：Ｒ４１Ｅ、Ｅ９３Ｋ、及びＲ１６７Ｄを有し、３０４サイトカインは、アミノ酸置換：Ｅ４６Ｒ、Ｌ１０８Ｋ、Ｄ１１２Ｒ、及びＲ１４７Ｅを有する。３０７　ＥＣＤは、アミノ酸置換：Ｒ４１Ｅ、Ｄ１９７Ｋ、Ｄ２００Ｋ、及びＲ２８８Ｅを有し、３０７サイトカインは、アミノ酸置換：Ｓ１２Ｅ、Ｋ１６Ｄ、Ｅ１９Ｋ、及びＥ４６Ｒを有する。図３６のパネルＡ及びＢは、反復実験を表す。

【０４８２】

これらの結果は、直交キメラサイトカイン受容体を発現する細胞が、直交Ｇ－ＣＳＦＣＳＦで刺激すると選択的な活性化及び細胞周期の進行が可能であることを示す。

【０４８３】

実施例２１：細胞内シグナル伝達は、３２Ｄ－ＩＬ２Ｒβ細胞、及び直交キメラサイトカイン受容体を発現する初代ヒトＴ細胞で活性化され、直交Ｇ－ＣＳＦにより刺激される

キメラサイトカイン受容体を発現する細胞が直交バージョンのＧ－ＣＳＦに応答して細胞内サイトカインシグナル伝達イベントを選択的に活性化し得るかどうかを判定するために、３２Ｄ－ＩＬ－２Ｒβ細胞に、野生型Ｇ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤを含むキメラ受容体Ｇ２Ｒ－１及びＧ２Ｒ－２（Ｇ２Ｒ－１　ＷＴ　ＥＣＤ及びＧ２Ｒ－２　ＷＴ　ＥＣＤ）と、アミノ酸置換Ｒ４１Ｅ、Ｒ１４１Ｅ、及びＲ１６７Ｄを有するＧ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤを含むキメラ受容体Ｇ２Ｒ－１及びＧ２Ｒ－２（Ｇ２Ｒ－１　１３４　ＥＣＤ、Ｇ２Ｒ－２　１３４　ＥＣＤ）と、を形質導入した。細胞を、ＩＬ－２（３００ＩＵ／ｍｌ）、野生型Ｇ－ＣＳＦ（３０ｎｇ／ｍｌ）、またはＧ２Ｒ－１　１３４　ＥＣＤ、Ｇ２Ｒ－２　１３４　ＥＣＤに結合できるが野生型Ｇ－ＣＳＦＲへの結合が著しく低下した直交Ｇ－ＣＳＦ（１３０　Ｇ－ＣＳＦ－Ｅ４６Ｒ＿Ｌ１０８Ｋ＿Ｄ１１２Ｒ；３０ｎｇ／ｍｌ）のいずれかで刺激した。サイトカインへの曝露時にサイトカインシグナル伝達を活性化する細胞の能力を評価するために、細胞溶解物に対してウエスタンブロットを実施した（図３７）。Ｇ２Ｒ－２　１３４　ＥＣＤを発現する細胞は、野生型Ｇ－ＣＳＦではなく１３０Ｇ－ＣＳＦで刺激時のサイトカインシグナル伝達の証拠を示した。更に、Ｇ２Ｒ－２　ＷＴ　ＥＣＤを発現する細胞は、１３０Ｇ－ＣＳＦで刺激するとサイトカインシグナル伝達を活性化することができなかった。

【０４８４】

操作されたサイトカイン：受容体ペアの直交性は、初代マウスＴ細胞をウエスタンブロット分析にかけることによって更に示され、この分析では、ＷＴ、１３４、または３０４ＥＣＤ（Ｒ４１Ｅ＿Ｅ９３Ｋ＿Ｒ１６７Ｄ）を有するＧ２Ｒ－３を発現する細胞がＷＴ、１３０、または３０４　Ｇ－ＣＳＦ（Ｅ４６Ｒ＿Ｌ１０８Ｋ＿Ｄ１１２Ｒ＿Ｒ１４７Ｅ；１００ｎｇ／ｍｌ）で刺激され、示されたシグナル伝達イベントを測定した（図３８Ａ）。ＩＬ－２（３００ＩＵ／ｍｌ）及びＩＬ－１２（１０ｎｇ／ｍｌ）は、対照サイトカインとして機能した。Ｇ２Ｒ－３　ＷＴ　ＥＣＤを発現する細胞は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、またはＷＴ　Ｇ－ＣＳＦによる刺激時のサイトカインシグナル伝達の証拠を示した。Ｇ２Ｒ－３　１３４　ＥＣＤを発現する細胞は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、または１３０　Ｇ－ＣＳＦによる刺激時のサイトカインシグナル伝達の証拠を示した。Ｇ２Ｒ－３　３０４ＥＣＤを発現する細胞は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、または３０４　Ｇ－ＣＳＦによる刺激時のサイトカインシグナル伝達の証拠を示した。

【０４８５】

Ｇ２Ｒ－３の３つのＥＣＤバリアントの細胞表面発現は、フローサイトメトリーによって確認した（図３８Ｂ）。

【０４８６】

これらの結果は、直交キメラサイトカイン受容体を発現する細胞が、直交Ｇ－ＣＳＦで刺激すると細胞内サイトカインシグナル伝達イベントを選択的に活性化できることを示す。

【０４８７】

実施例２２：Ｇ２Ｒ－３の発現は、初代ヒトＴ細胞において、増殖、細胞周期の進行、ならびにサイトカイン関連細胞内シグナル伝達及び免疫表現型をもたらす

Ｇ２Ｒ－３キメラ受容体が初代ヒトＴ細胞においてＧ－ＣＳＦで刺激するとサイトカインシグナル伝達関連イベントを促進できるかどうかを判定するために、ＴＡＬにＧ２Ｒ－３をコードするレンチウイルスベクターを形質導入した。Ｔ細胞増殖アッセイを実施して、ＩＬ－２（３００ＩＵ／ｍｌ）、野生型Ｇ－ＣＳＦ（１００ｎｇ／ｍｌ）、またはサイトカインなしでの刺激時における細胞の増殖を試験した。生細胞は３～４日ごとに計数した。非形質導入対応物とは対照的に、Ｇ２Ｒ－３を発現する初代ＴＡＬは、Ｇ－ＣＳＦに

応答して培養液中で増殖させた（図４０Ａ）。Ｇ－ＣＳＦによる刺激時にサイトカインシグナル伝達イベントが活性化されたかどうかを判定するために、細胞溶解物にウエスタンブロットを行い、細胞内シグナル伝達を評価した。細胞を増殖アッセイから回収し、洗浄した後、ＩＬ－２（３００ＩＵ／ｍｌ）または野生型Ｇ－ＣＳＦ（１００ｎｇ／ｍｌ）で刺激した。Ｇ２Ｒ－３を発現する初代ＴＡＬは、Ｇ－ＣＳＦがＪＡＫ２リン酸化を誘発したのに対し、ＩＬ－２がＪＡＫ３リン酸化を誘発したという予想される例外を除いて、Ｇ－ＣＳＦに応答してＩＬ－２関連シグナル伝達イベントを実証した（図４０Ｂ）。

【０４８８】

Ｇ－ＣＳＦによる刺激時の細胞周期の進行を評価するために、ＢｒｄＵ取り込みアッセイを実施した。細胞を増殖アッセイから回収し、洗浄した後、ＩＬ－２（３００ＩＵ／ｍｌ）、野生型Ｇ－ＣＳＦ（１００ｎｇ／ｍｌ）、またはサイトカインなしにおいて再プレーティングした。Ｇ２Ｒ－３を発現する初代ＴＡＬは、Ｇ－ＣＳＦに応答して細胞周期の進行を示した（図４０Ｃ）。

【０４８９】

Ｇ２Ｒ－３を発現する細胞のＧ－ＣＳＦ誘導性増殖は、初代ＰＢＭＣ由来のヒトＴ細胞を使用しても実証された（図４１）。Ｇ２Ｒ－３　ＷＴ　ＥＣＤを発現する細胞は、ＷＴ　Ｇ－ＣＳＦに応答して増殖したが、培地のみでは増殖しなかった（図４１Ａ）。細胞が外因性サイトカインに継続的に依存していることを実証するために、培養の２１日目に、Ｇ－ＣＳＦ増殖条件の細胞を洗浄し、ＷＴ　Ｇ－ＣＳＦ（１００ｎｇ／ｍＬ）、ＩＬ－７（２０ｎｇ／ｍＬ）＋ＩＬ－１５（２０ｎｇ／ｍＬ）、または培地のみで再プレーティングした。Ｇ－ＣＳＦまたはＩＬ－７＋ＩＬ－１５の存在下で再プレーティングされた細胞のみが、時間経過とともに生存力を維持した。

【０４９０】

フローサイトメトリーによって評価されるＧ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤの発現は、ＣＤ４＋及びＣＤ８＋Ｔ細胞の両方において、増殖の２１～４２日目の間、安定したままであった（図４１Ｂ）。

【０４９１】

ウエスタンブロットにより、Ｇ２Ｒ－３を発現する初代ＰＢＭＣ由来Ｔ細胞は、Ｇ－ＣＳＦに応答してＩＬ－２関連シグナル伝達イベントを示した（図４２Ａ）。ＷＴ　Ｇ－ＣＳＦ対ＩＬ－７＋ＩＬ－１５において４２日間増殖した初代ＰＢＭＣ由来Ｔ細胞に対して、フローサイトメトリーに基づく免疫表現型解析を実施した。Ｇ２Ｒ－３　ＷＴ　ＥＣＤを発現し、Ｇ－ＣＳＦ中で培養した細胞は、ＩＬ－７＋ＩＬ－１５中で培養した非形質導入細胞と同様の表現型を保持し、幹細胞様メモリーＴ細胞表現型（T_{SCM}）を示すＣＤ６２Ｌ＋、ＣＤ４５ＲＯ＋表現型を主に示した（図４２Ｂ，Ｃ）。同様に、セントラルメモリー（T_{CM}）、エフェクターメモリー（T_{EM}）、及び終末分化（T_{TE}）Ｔ細胞の画分も類似していた。

【０４９２】

これらの結果は、Ｇ２Ｒ－３キメラサイトカイン受容体が、サイトカインシグナル伝達イベントを活性化し、初代細胞における細胞周期の進行及び増殖を促進することができることを確認している。Ｇ２Ｒ－３を発現し、Ｇ－ＣＳＦ中で長期的に増殖したＴ細胞の免疫表現型は、ＩＬ－７＋ＩＬ－１５中で増殖した非形質導入細胞と類似している。

【０４９３】

実施例２３：直交Ｇ－ＣＳＦは、直交ＥＣＤを有するＧ２Ｒ－３を発現する初代ヒトＴ細胞における拡大及び増殖を誘発する

３０４（Ｒ４１Ｅ＿Ｅ９３Ｋ＿Ｒ１６７Ｄ）または３０７（Ｒ４１Ｅ＿Ｄ１９７Ｋ＿Ｄ２００Ｋ＿Ｒ２８８Ｅ）　ＥＣＤを有するキメラサイトカイン受容体Ｇ２Ｒ－３が直交リガンド１３０、３０４、または３０７　Ｇ－ＣＳＦによる刺激に応答して増殖及び拡大を誘発できるかどうかを評価した。初代ＰＢＭＣ由来ヒトＴ細胞にＧＲ－３　３０４　ＥＣＤまたはＧ２Ｒ－３　３０７（Ｒ４１Ｅ＿Ｄ１９７Ｋ＿Ｄ２００Ｋ＿Ｒ２８８Ｅ）ＥＣＤをコードするレンチウイルスベクターを形質導入した。ＩＬ－２（３００ＩＵ／ｍｌ）、

３０４　Ｇ－ＣＳＦ（１００ｎｇ／ｍｌ）、３０７　Ｇ－ＣＳＦ（１００ｎｇ／ｍｌ）、またはサイトカインなしで培養したときの細胞の倍数増殖を評価するためにＴ細胞増殖アッセイを実施した。生細胞は３～４日ごとに計数した。Ｇ２Ｒ－３　３０４　ＥＣＤを発現するＴ細胞を、ＩＬ－２または３０４　Ｇ－ＣＳＦに応答して培養液中で増殖させた（図４３Ａ）。Ｇ２Ｒ－３　３０７　ＥＣＤを発現するＴ細胞を、ＩＬ－２または３０７　Ｇ－ＣＳＦに応答して培養液中で増殖させた（図４３Ｂ）。非形質導入Ｔ細胞のみを、ＩＬ－２に応答して増殖させた（図４３Ｃ）。

【０４９４】

ＢｒｄＵ取り込みアッセイを、１３０、３０４、及び３０７　Ｇ－ＣＳＦによる刺激時の細胞周期の進行を評価するために、クリスクロスデザインで実施した。細胞を増殖アッセイから回収し、洗浄した後、ＩＬ－２（３００ＩＵ／ｍｌ）、１３０Ｇ－ＣＳＦ（１００ｎｇ／ｍｌ）、３０４Ｇ－ＣＳＦ（１００ｎｇ／ｍｌ）、３０７Ｇ－ＣＳＦ（１００ｎｇ／ｍｌ）、またはサイトカインなしで再プレーティングした。Ｇ２Ｒ－３　３０４　ＥＣＤを発現する初代ヒトＴ細胞は、１３０または３０４　Ｇ－ＣＳＦに応答した細胞周期の進行を示したが、３０７　Ｇ－ＣＳＦには応答しなかった（図４４）。Ｇ２Ｒ－３　３０７　ＥＣＤを発現するＴ細胞は、３０７　Ｇ－ＣＳＦに応答した細胞周期の進行を示したが、１３０または３０４　Ｇ－ＣＳＦには応答しなかった。すべてのＴ細胞は、ＩＬ－２に応答して細胞周期の進行を示した。

【０４９５】

この結果は、キメラ受容体Ｇ２Ｒ－３　３０４　ＥＣＤ及びＧ２Ｒ－３　３０７　ＥＣＤが、それぞれ直交３０４または３０７　Ｇ－ＣＳＦで刺激すると、初代ヒトＣＤ４＋及びＣＤ８＋Ｔ細胞の選択的な細胞周期の進行及び増殖を誘発することができることを示す。更に、１３０　Ｇ－ＣＳＦは、Ｇ２Ｒ－３　３０４　ＥＣＤを発現する細胞の増殖を刺激することができるが、Ｇ２Ｒ－３　３０７　ＥＣＤを発現する細胞の増殖は刺激しない。

【０４９６】

実施例２４：Ｇ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤは、Ｇ２１Ｒ－１、Ｇ２１Ｒ－２、Ｇ１２Ｒ－１及びＧ２Ｒ－３キメラ受容体構築物で形質導入された初代ヒト腫瘍関連リンパ球（ＴＡＬ）の表面に発現される

キメラサイトカイン受容体構築物が初代ヒト腫瘍関連リンパ球（ＴＡＬ）の表面上で発現できるかどうかを評価するために、ＴＡＬにＧ２１Ｒ－１、Ｇ２１Ｒ－２、Ｇ１２Ｒ－１、及びＧ２Ｒ－３キメラ受容体をコードするレンチウイルスベクターを形質導入し、細胞をフローサイトメトリーによって細胞表面上のＧ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤ発現について試験した（図３９）。４つのキメラサイトカイン受容体デザインすべてについて、Ｇ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤ陽性細胞が検出された。

【０４９７】

これらの結果は、Ｇ２１Ｒ－１、Ｇ２１Ｒ－２、Ｇ１２Ｒ－１、及びＧ２Ｒ－３キメラ受容体が初代細胞の表面上で発現できることを示す。これらの結果は、Ｇ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤキメラ受容体のデザインが初代細胞の表面上で発現していることも示す。

【０４９８】

実施例２５：Ｇ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤは、Ｇ１２Ｒ－１及びＧ２１Ｒ－１キメラ受容体構築物で形質導入された初代マウスＴ細胞の表面に発現される

Ｇ１２Ｒ－１及びＧ２１Ｒ－１キメラ受容体が初代Ｔ細胞の表面上に発現することができるかどうかを判定するために、初代マウスＴ細胞にＧ１２Ｒ－１及びＧ２１Ｒ－１キメラ受容体をコードするレトロウイルスベクターを形質導入し、フローサイトメトリーにより分析した（図４５）。

【０４９９】

この結果は、Ｇ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤが、Ｇ１２Ｒ－１及びＧ２１Ｒ－１をコードするレトロウイルスベクターで形質導入された初代マウスＣＤ４＋及びＣＤ８＋Ｔ細胞の表面上に発現していることを示す。

【０５００】

実施例２６：Ｇ－ＣＳＦは、Ｇ２１Ｒ－１またはＧ２１Ｒ－２を発現する初代ＰＢＭＣ由来ヒトＴ細胞においてサイトカインシグナル伝達イベントを誘発する

Ｇ２１Ｒ－１及びＧ２１Ｒ－２構築物が初代細胞においてサイトカインシグナル伝達イベントを誘発することができるかどうかを判定するために、初代ＰＢＭＣ由来ヒトＴ細胞に、Ｇ２１Ｒ－１またはＧ２１Ｒ－２キメラサイトカイン受容体をコードするレンチウイルスベクターを形質導入した。細胞をｐｈｏｓｐｈｏ－ＳＴＡＴ３（ｐ－ＳＴＡＴ３）特異的抗体で細胞内染色し、フローサイトメトリーにより評価し、ＳＴＡＴ３活性化の尺度であるＳＴＡＴ３リン酸化の程度を測定した（図４６）。Ｇ－ＣＳＦ（１００ｎｇ／ｍｌ）で刺激すると、Ｇ２１Ｒ－１またはＧ２１Ｒ－２のいずれかで形質導入したＧ－ＣＳＦＲ陽性細胞のサブセットにおいて、リン酸化ＳＴＡＴ３を発現する細胞数が増加した。対照的に、Ｇ－ＣＳＦＲ陰性（すなわち非発現）細胞は、Ｇ－ＣＳＦで刺激してもリン酸化ＳＴＡＴ３の増加を示さなかったが、ＩＬ－２１で刺激すると増加した。

【０５０１】

これらの結果は、Ｇ２１Ｒ－１及びＧ２１Ｒ－２キメラ受容体が、初代ヒトＴ細胞においてＧ－ＣＳＦを刺激すると、ＩＬ－２１関連サイトカインシグナル伝達イベントを活性化できることを示す。

【０５０２】

実施例２７：Ｇ－ＣＳＦは、Ｇ２１Ｒ－１またはＧ－１２Ｒ－１を発現する初代マウスＴ細胞において細胞内シグナル伝達イベントを誘発する

キメラサイトカイン受容体Ｇ２１Ｒ－１がサイトカインシグナル伝達イベントを活性化できるかどうかを判定するために、初代マウスＴ細胞にＧ２１Ｒ－１をコードするレトロウイルスベクターを形質導入し、フローサイトメトリーにより評価して、Ｇ－ＣＳＦによる刺激時にリン酸化ＳＴＡＴ３を検出した。生細胞をＣＤ８またはＣＤ４でゲーティングし、サイトカインなし、ＩＬ－２１（１ｎｇ／ｍｌ）、またはＧ－ＣＳＦ（１００ｎｇ／ｍｌ）での刺激後、ｐｈｏｓｐｈｏ－ＳＴＡＴ３陽性染色細胞の割合をＣＤ８及びＣＤ４細胞集団について測定した。Ｇ－ＣＳＦで刺激すると、Ｇ２１Ｒ－１を発現する細胞（非形質導入細胞ではない）は、リン酸化ＳＴＡＴ３の量の増加を示した（図４７Ａ及び４７Ｂ）。Ｇ－ＣＳＦで刺激するとＧ２１Ｒ－１またはＧ１２Ｒ－１を発現する細胞の細胞内サイトカインシグナル伝達を評価するためにウエスタンブロットを実施した。予想通り、Ｇ２１Ｒ－１を発現し、Ｇ－ＣＳＦで刺激された細胞は、ＳＴＡＴ３のリン酸化の増加を示し、ｐｈｏｓｐｈｏ－ＳＴＡＴ４及びｐｈｏｓｐｈｏ－ＳＴＡＴ５においてわずかに増加した（図４７Ｃ）。また予想通り、Ｇ１２Ｒ－１を発現する細胞では、Ｇ－ＣＳＦに応答して、ＳＴＡＴ４の強いリン酸化が見られた。Ｇ－ＣＳＦは、モック形質導入細胞においてシグナル伝達イベントを誘発しなかった。（Ｇ１２Ｒ－１群では、陽性対照（ｈＩＬ－１２　１０ｎｇ／ｍｌ）がシグナル伝達イベントを誘発しなかったと思われることに留意されたい；これは、マウスＩＬ－１２ＲへのヒトｌＬ－１２の結合が不十分なためである可能性がある。）

【０５０３】

結果は、Ｇ２１Ｒ－１及びＧ１２Ｒ－１が、Ｇ－ＣＳＦでの刺激時に初代マウスＴ細胞においてサイトカインシグナル伝達イベントを誘発できることを示す。

【０５０４】

実施例２８：Ｇ－ＣＳＦは、Ｇ２Ｒ－２、Ｇ２Ｒ－３、Ｇ７Ｒ－１、Ｇ２１／７Ｒ－１、Ｇ２７／２Ｒ－１、Ｇ２１／２Ｒ－１、Ｇ１２／２Ｒ－１、またはＧ２１／１２／２Ｒ－１を発現する初代マウスＴ細胞において増殖及び細胞内シグナル伝達イベントを誘発する

キメラサイトカイン受容体によって媒介されるサイトカインシグナル伝達イベント及び細胞増殖を評価するために、初代マウスＴ細胞にＧ２Ｒ－２、Ｇ２Ｒ－３、Ｇ７Ｒ－１、Ｇ２１／７Ｒ－１、Ｇ２７／２Ｒ－１、Ｇ２１／２Ｒ－１、Ｇ１２／２Ｒ－１、またはＧ２１／１２／２Ｒ－１をコードするレトロウイルスベクターを形質導入した。Ｇ－ＣＳＦによる刺激時の細胞周期の進行を評価するために、ＢｒｄＵ取り込みアッセイを実施した。細胞を回収し、洗浄した後、ＩＬ－２（３００ＩＵ／ｍｌ）、野生型Ｇ－ＣＳＦ（１０

０ｎｇ／ｍｌ）、またはサイトカインなしにおいて再プレーティングした。Ｇ－ＣＳＦ誘導性細胞周期の進行は、Ｇ２Ｒ－２、Ｇ２Ｒ－３、Ｇ７Ｒ－１、Ｇ２１／７Ｒ－１、もしくはＧ２７／２Ｒ－１（図４８Ａ，４８Ｂ）、またはＧ２１／２Ｒ－１、Ｇ１２／２Ｒ－１、もしくはＧ２１／１２／２Ｒ－１を発現する初代マウスＴ細胞において見られた（図４９Ａ，４９Ｂ）。Ｇ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤの発現は、フローサイトメトリーによっても検出可能であった（図４８Ｃ，４９Ｃ）。

【０５０５】

ウエスタンブロットにより、示されたキメラサイトカイン受容体を発現する細胞において、Ｇ－ＣＳＦ（１００ｎｇ／ｍｌ）に応答して複数のサイトカインシグナル伝達イベントが観察されたが、モック形質導入細胞においては観察されなかった（図４８Ｄ，４９Ｄ）。一般に、観察されたサイトカインシグナル伝達イベントは、さまざまなＩＣＤデザインに組み込まれたシグナル伝達ドメインに基づいて予想通りであった（図２３及び図２４）。一例として、Ｇ７Ｒ－１キメラ受容体は、ＳＴＡＴ５のリン酸化を誘発し（図４８Ｄ）、これは、ＩＬ－７Ｒα（図２３）からＳＴＡＴ５結合部位が組み込まれたことに起因すると予想される。第２の例として、Ｇ２１／２Ｒ－１キメラ受容体は、ＳＴＡＴ３のリン酸化を誘発し（図４９Ｄ）、これは、Ｇ－ＣＳＦＲ（図２４）からＳＴＡＴ３結合部位が組み込まれたことに起因すると予想される。第３の例として、Ｇ１２／２Ｒ－１キメラ受容体は、ＳＴＡＴ４のリン酸化を誘発し、これはＩＬ－１２Ｒβ２（図２４）からＳＴＡＴ４結合部位が組み込まれたことに起因すると予想される。他のキメラサイトカイン受容体は、細胞内シグナル伝達イベントの他の明確に異なるパターンを示した。

【０５０６】

結果は、Ｇ２Ｒ－２、Ｇ２Ｒ－３、Ｇ７Ｒ－１、Ｇ２１／７Ｒ－１、Ｇ２７／２Ｒ－１、Ｇ２１／２Ｒ－１、Ｇ１２／２Ｒ－１、及びＧ２１／１２／２Ｒ－１が、Ｇ－ＣＳＦで刺激すると、初代マウスＴ細胞におけるサイトカインシグナル伝達イベント及び増殖を誘発することができることを示す。更に、キメラ受容体のＩＣＤに異なるシグナル伝達ドメインを組み込むことにより、細胞内シグナル伝達イベントの異なるパターンを生成することができる。

【０５０７】

実施例２９：直交Ｇ－ＣＳＦは、直交ＥＣＤを有するＧ１２／２Ｒ－１を発現する初代ヒトＴ細胞において、拡大、増殖、サイトカイン関連細胞内シグナル伝達、及び免疫表現型を誘発する

１３４　ＥＣＤを有するキメラサイトカイン受容体Ｇ１２／２Ｒ－１が、直交リガンド１３０　Ｇ－ＣＳＦでの刺激に応答して増殖及び拡大を誘発できるかどうかを判定するために、初代ＰＢＭＣ由来ヒトＴ細胞にＧ１２／２Ｒ－１　１３４　ＥＣＤをコードするレンチウイルスベクターを形質導入した。ＩＬ－２（３００ＩＵ／ｍｌ）、１３０　Ｇ－ＣＳＦ（１００ｎｇ／ｍｌ）、またはサイトカインなしで培養したときの細胞の倍数増殖を評価するためにＴ細胞増殖アッセイを実施した。生細胞は４～５日ごとに計数した。Ｇ１２／２Ｒ－１　１３４　ＥＣＤを発現する初代ヒトＴ細胞は、ＩＬ－２または１３０　Ｇ－ＣＳＦに応答して培養液中で拡大したが（図５０Ａ）、培地のみでは限定的な一過性の拡大を示した。

【０５０８】

この実験の１９日目に、１３０　Ｇ－ＣＳＦまたはＩＬ－２で拡大させたＴ細胞を３回洗浄し、ＩＬ－２、１３０　Ｇ－ＣＳＦ、または培地のみで再プレーティングした。培地のみでは、Ｔ細胞は生存能力の低下及び数の減少を示した（図５０Ｂ）。対照的に、ＩＬ－２またはＧ－ＣＳＦ　１３０で再プレーティングされたＴ細胞は、継続的な生存能力及び安定した数を示した。

【０５０９】

Ｇ－ＣＳＦ受容体に対する抗体を用いたフローサイトメトリーによって検出されたＧ１２／２Ｒ－１　１３４　ＥＣＤの発現は、１３０　Ｇ－ＣＳＦによる刺激によって拡大したＣＤ４＋及びＣＤ８＋Ｔ細胞の両方において４日目から１６日目まで増加した（図５０

Ｃ）。１３０　Ｇ－ＣＳＦによる刺激時の細胞周期の進行を評価するために、ＢｒｄＵ取り込みアッセイを実施した。

【０５１０】

ＢｒｄＵアッセイによって細胞周期の進行を評価するために、細胞を増殖アッセイから回収し、洗浄した後、ＩＬ－２（３００ＩＵ／ｍｌ）、ＩＬ－２及びＩＬ－１２（１０ｎｇ／ｍｌ）、１３０Ｇ－ＣＳＦ（３００ｎｇ／ｍｌ）またはサイトカインなしで再プレーティングした。Ｇ１２／２Ｒ－１　１３４　ＥＣＤを発現する初代ヒトＴ細胞は、１３０Ｇ－ＣＳＦ、ＩＬ－２、またはＩＬ－２＋ＩＬ－１２に応答して細胞周期の進行を示したが、非形質導入細胞は、ＩＬ－２またはＩＬ－２＋ＩＬ－１２に対してのみ応答した（図５１Ａ）。

【０５１１】

１６日間の培養期間の後、ＣＤ６２Ｌ及びＣＤ４５ＲＯに対する抗体を用いてフローサイトメトリーにより免疫表現型解析を行い、１３０　Ｇ－ＣＳＦにおいて拡大したＧ１２／２Ｒ－１　１３４　ＥＣＤを発現するＴ細胞とＩＬ－２において拡大した非形質導入細胞とを比較した。２つのＴ細胞集団は、幹細胞様メモリー（T_{SCM}）、セントラルメモリー（T_{CM}）、エフェクターメモリー（T_{EM}）、及び終末分化（T_{TE}）表現型の類似した割合を示した（図５１Ｂ，Ｃ）。

【０５１２】

同様の実験を、３０４　ＥＣＤ（１３４　ＥＣＤではなく）を有するキメラサイトカイン受容体Ｇ１２／２Ｒ－１を用いて行った。初代ＰＢＭＣ由来ヒトＴ細胞に、Ｇ１２／２Ｒ－１　３０４　ＥＣＤをコードするレンチウイルスベクターを形質導入した。ＩＬ－２（３００ＩＵ／ｍｌ）、１３０　Ｇ－ＣＳＦ（１００ｎｇ／ｍｌ）、３０４　Ｇ－ＣＳＦ（１００ｎｇ／ｍｌ）、または培地のみで培養したときの細胞の倍数増殖を評価するためにＴ細胞増殖アッセイを実施した。生細胞は４～５日ごとに計数した。３０４　ＥＣＤを有するＧ１２／２Ｒ－１を発現するＴ細胞は、ＩＬ－２、１３０　Ｇ－ＣＳＦ、または３０４　Ｇ－ＣＳＦの存在下で拡大し得るが、培地のみでは拡大せず、非形質導入細胞はＩＬ－２のみに応答して拡大することができた（図５２Ａ）。

【０５１３】

ＢｒｄＵアッセイにより細胞周期の進行を評価するために、１３０　Ｇ－ＣＳＦまたは３０４　Ｇ－ＣＳＦのいずれかで事前に拡大させたＧ１２／２Ｒ－１　３０４　ＥＣＤを発現するＴ細胞を、増殖アッセイから回収し、洗浄した後、ＩＬ－２（３００ＩＵ／ｍｌ）、１３０Ｇ－ＣＳＦ（１００ｎｇ／ｍｌ）、３０４　Ｇ－ＣＳＦ（１００ｎｇ／ｍｌ）、３０７　Ｇ－ＣＳＦ（１００ｎｇ／ｍｌ）、または培地のみで再プレーティングした。Ｇ１２／２Ｒ－１　３０４　ＥＣＤを発現するＴ細胞は、１３０または３０４　Ｇ－ＣＳＦに応答して細胞周期の進行を示したが、３０７　Ｇ－ＣＳＦまたは培地のみでは応答しなかった（図５２Ｂ）。

【０５１４】

この結果は、Ｇ１２／２Ｒ－１　１３４　ＥＣＤが、直交１３０　Ｇ－ＣＳＦで刺激すると、初代ヒトＣＤ４＋及びＣＤ８＋Ｔ細胞の細胞周期の進行及び拡大を誘発できることを示す。Ｇ１２／２Ｒ－１　１３４　ＥＣＤを発現し、１３０　Ｇ－ＣＳＦで拡大させた細胞のＴ細胞メモリー表現型は、ＩＬ－２で拡大させた非形質導入細胞と同様である。更に、Ｇ１２／２Ｒ－１　３０４　ＥＣＤは、１３０または３０４　Ｇ－ＣＳＦで刺激するとＴ細胞の選択的な細胞周期の進行及び拡大を誘発できるが、３０７　Ｇ－ＣＳＦに応答して誘発することはない。

【０５１５】

実施例３０：直交Ｇ－ＣＳＦは、直交ＥＣＤを有するＧ２Ｒ－３またはＧ１２／２Ｒ－１を発現する初代ヒトＴ細胞において、明確に異なる細胞内シグナル伝達イベントを誘発する

細胞内シグナル伝達イベントを評価するために、初代ＰＢＭＣ由来ヒトＴ細胞に、Ｇ２Ｒ－３　３０４　ＥＣＤまたはＧ１２／２Ｒ－１　３０４　ＥＣＤをコードするレンチウ

イルスベクターを形質導入した。３０４　Ｇ－ＣＳＦ（１００ｎｇ／ｍＬ）、ＩＬ－２（３００ＩＵ／ｍＬ）、ＩＬ－２、及びＩＬ－１２（１０ｎｇ／ｍＬ）、または培地のみで刺激時の、Ｇ２Ｒ－３　３０４　ＥＣＤもしくはＧ１２／２Ｒ－１　３０４　ＥＣＤを発現する細胞、または非形質導入細胞における細胞内サイトカインシグナル伝達を評価するためにウエスタンブロットを実施した。形質導入されたＴ細胞と非形質導入Ｔ細胞の両方において、ＳＴＡＴ５の強いリン酸化が、ＩＬ－２＋ＩＬ－１２、またはＩＬ－２のみでの刺激のいずれかに応答して検出された（図５３）。ＳＴＡＴ４の強いリン酸化は、ＩＬ－２＋ＩＬ－１２の両方による刺激に応答して検出されたが、ＳＴＡＴ４の弱いリン酸化のみが、ＩＬ－２のみでの刺激に応答して検出された。Ｇ２Ｒ－３　３０４　ＥＣＤを発現する細胞では、ＳＴＡＴ４の弱いリン酸化及びＳＴＡＴ５の強いリン酸化が３０４　Ｇ－ＣＳＦでの刺激に応答して検出され、ＩＬ－２のみに応答して見られるパターンに類似していた。Ｇ１２／２Ｒ－１　３０４　ＥＣＤを発現する細胞では、ＳＴＡＴ４及びＳＴＡＴ５の強いリン酸化が３０４　Ｇ－ＣＳＦの刺激に応答して検出され、ＩＬ－２＋ＩＬ－１２に対する応答に見られるパターンに類似していた。非形質導入Ｔ細胞は、３０４　Ｇ－ＣＳＦに対する応答を示さなかった。

【０５１６】

この結果は、３０４　ＥＣＤを有するＧ１２／２Ｒ－１が、３０４　Ｇ－ＣＳＦでの刺激に応答して、ＳＴＡＴ４及びＳＴＡＴ５の強いリン酸化を含む、サイトカインシグナル伝達イベントを誘発することができることを示す。シグナル伝達イベントの異なるパターンは、３０４　Ｇ－ＣＳＦによる刺激後のＧ２Ｒ－３　３０４　ＥＣＤを発現する細胞において見られ、ＳＴＡＴ５の強いリン酸化を含むがＳＴＡＴ４の強いリン酸化は含まない。

【０５１７】

実施例３１：新規Ｇ－ＣＳＦバリアントのデザイン

本明細書に記載される発明は、Ｇ－ＧＣＳＦ受容体（Ｇ－ＣＳＦＲ）の対応する操作された細胞外ドメイン（ＥＣＤ）に選択的に結合する操作されたバリアントＧ－ＣＳＦサイトカインの発明である。選択性の閾値は、バリアントＧ－ＣＳＦとＷＴ　Ｇ－ＣＳＦＲとの間、及びＷＴ　Ｇ－ＣＳＦとバリアントＧ－ＣＳＦＲとの間の結合の程度及び誘発される細胞増殖を測定する細胞ベースのアッセイを使用して確立される。本明細書に記載されるように、第１世代及び第２世代の操作されたＧ－ＣＳＦ／Ｇ－ＣＳＦＲペアのパネルが開発された。この例では、改善された熱安定性及び選択性を示す第３世代のＧ－ＣＳＦデザイン（１３０ａ１、１３０ｂ１、１３０ａ２、１３０ｂ２、１３０ａ１ｂ１）（表４Ａ）を開示する。

【０５１８】

第２世代のＧ－ＣＳＦ１３０バリアントには、ＷＴ　Ｇ－ＣＳＦと比較して３つのアミノ酸置換（Ｅ４６Ｒ、Ｌ１０８Ｋ、及びＤ１１２Ｒ）が含まれている。変異するとＷＴ　Ｇ－ＣＳＦＲに対するサイトカイン結合を低下させる可能性がある追加の残基を特定するため、最初に、Ｇ－ＣＳＦ／Ｇ－ＣＳＦＲ共結晶構造を用いて、過去に本発明者らがデザインした全てのＧ－ＣＳＦバリアントからの生物物理学的データ及び細胞ベースのデータを更なるガイダンスのために分析した。反復分析を介して、タンデムグルタミン酸残基（Ｅ１２２及びＥ１２３）が置換の主要候補として同定された。注目すべきことに、Ｅ４６Ｒ、Ｌ１０８Ｋ、及びＤ１１２Ｒに加えて、これら２つのグルタミン酸は、不安定であることが判明している、過去にデザインされた第２世代Ｇ－ＣＳＦ　１３４バリアント中でアルギニンに置換された。本明細書では、アルギニンまたはリジンによる「電荷交換」戦略を使用してＥ１２２及びＥ１２３を個別に置換した。また、Ｅ１２２及びＥ１２３を同時にリジンで置換した。構造分析に基づいて、サイトカイン上の１２２及び／または１２３位における新規な正に荷電した残基は、ＷＴ　Ｇ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤの１４１位にある対応する正に荷電したアルギニンに反発して、結合を減少をもたらし、ひいては選択性を向上させることが予想される。１つの位置（すなわち、Ｅ１２２またはＥ１２３）のみを修飾することにより、両方の位置が同時に置換された、過去にデザインされた１３４　Ｇ

－ＣＳＦで観察された安定性の問題を軽減することが予想された。更に、構造分析に基づいて、１２２位及び１２３位に（アルギニンの代わりに）リジンを組み込むことにより、Ｇ－ＣＳＦ　１３４よりも安定したバリアントが得られることが予想された。これらの新規なＧ－ＣＳＦバリアント（１３０ａ１、１３０ｂ１、１３０ａ２、１３０ｂ２、１３０ａ１ｂ１と称する）（表４Ａ）は、相補的なＲ１４１Ｅ置換によりＧ－ＣＳＦＲ　１３４ＥＣＤと効率的に対合すると予想された。

【０５１９】

実施例３２：大腸菌におけるＷＴ及び操作されたバリアントＧ－ＣＳＦサイトカインの組換え産生

ＷＴ及び操作された　Ｇ－ＣＳＦサイトカインバリアントを組換え生成するために、大腸菌ベースの発現システムを使用して封入体を生成し、そこから正しくフォールディングされた目的のタンパク質をリフォールディングによって精製した。

【０５２０】

方法

野生型及び操作されたＧ－ＣＳＦバリアントを、Ｔ７ウイルスプロモーターの制御下でｐＥＴ大腸菌発現ベクターにクローニングした。調製スケールの大腸菌による組換えサイトカインの産生を、ＢＬ２１（ＤＥ３）細胞の２Ｌ培養物中で実施し、発現を、ＺＹＰ－５０５２自己誘導培地中のｌａｃオペロンの自然な働きによって制御される乳糖ベースの自己誘導を介して誘導し、その後、細胞培養物を２００ｒｐｍで振盪しながら３０℃で約１６時間増殖させた。次いで、細胞を８，２００ＲＣＦで１０分間遠心分離することによってペレット化し、上清を廃棄した。細胞ペレット（約１０ｇ）を４０ｍｌの溶解緩衝液（５０ｍＭ　ＴＲＩＳ　ｐＨ８、１ｍＭ　ＥＤＴＡ）に再懸濁し、続いてプロテアーゼ阻害剤カクテルＩＩＩ（Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ、カタログ５３９１３４）を添加した。大腸菌細胞をフレンチプレスによって溶解し、溶解物を溶解緩衝液で２５０ｍｌに希釈した後、３０，０００ＲＣＦで３０分間遠心分離した。上清を廃棄し、封入体を含むペレットを７０ｍｌの洗浄緩衝液＃１（５０ｍＭ　ＴＲＩＳ　ｐＨ８、５ｍＭ　ＥＤＴＡ、１％　ｔｒｉｔｏｎ　ｘ－１００）に十分に再懸濁し、再度遠心分離した。次に、細胞ペレットを更に2回洗浄した（７０ｍｌの洗浄緩衝液＃２（５０ｍＭ　ＴＲＩＳ　ｐＨ８、５ｍＭ　ＥＤＴＡ、１％デオキシコール酸ナトリウム）で１回、及び７０ｍｌの洗浄緩衝液＃３（５０ｍＭ　ＴＲＩＳ　ｐＨ８、５ｍＭ　ＥＤＴＡ、１Ｍ　ＮａＣｌ）で１回）。最後に、封入体を１００ｍｌの可溶化緩衝液（５０ｍＭ　ＴＲＩＳ　ｐＨ１０、８Ｍ尿素、１０ｍＭ　２－メルカプトエタノール）に再懸濁した。この溶液を室温で１～２時間攪拌して封入体を完全に可溶化させてから、３０，０００ＲＣＦで３０分間遠心分離して、残っている全ての不溶性物質を除去した。次いで、可溶化した封入体を透析緩衝液＃１（５０ｍＭ　ＴＲＩＳ　ｐＨ８、１Ｍ　尿素、１００ｍＭ　ＮａＣｌ、５ｍＭ還元グルタチオン）で５００ｍｌに希釈した。可溶化したＧ－ＣＳＦを、８，０００Ｄａの分子量カットオフ（ｍｗｃｏ）透析チューブ（ＢｉｏＤｅｓｉｇｎ　Ｉｎｃ．、カタログＤ１０４）を使用して、３Ｌの透析緩衝液＃１に対して４℃で４０時間透析し、続いて、３Ｌの透析緩衝液＃２（５０ｍＭ　ＴＲＩＳ　ｐＨ８、１００ｍＭ　ＮａＣｌ、１ｍＭ還元グルタチオン）に対して４℃で８時間透析し、最後に、３Ｌの透析緩衝液＃３（２５ｍＭ酢酸ナトリウム　ｐＨ４、５０ｍＭ　ＮａＣｌ）に対して４℃で１６時間透析した。リフォールディングされたＧ－ＣＳＦを、１０ｋＤａのｍｗｃｏを有するＡｍｉｃｏｎ（登録商標）Ｕｌｔｒａ－１５遠心濾過ユニット（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ　Ｓｉｇｍａ、カタログＵＦＣ９０１０２４）を用いて濃縮し、透析緩衝液＃３で平衡化し、５０ｍＭ～５００ｍＭのＮａＣｌの勾配で溶出したＥＮｒｉｃｈ（商標）Ｓ　５ｘ５０カラム（Ｂｉｏ－Ｒａｄ、カタログ７８０００２１）を使用した陽イオン交換クロマトグラフィーによって更に精製した。リフォールディングされたＧ－ＣＳＦを含む画分をプールし、濃縮した後、２５ｍＭ酢酸ナトリウム　ｐＨ４．０、１５０ｍＭ　ＮａＣｌで平衡化したＥＮｒｉｃｈ（商標）ＳＥＣ７０　１０×３００サイズ排除カラム（Ｂｉｏ－Ｒａｄ、カタログ７８０１０７０）にロードした（図１）。タンパク質を含有する画分を還元型ＳＤＳ－ＰＡＧＥにより分析し

、プールして、０．８３６の減衰係数を用いたｎａｎｏｄｒｏｐ　Ａ２８０測定により濃度を測定した。

【０５２１】

結果

野生型及び操作されたＧ－ＣＳＦバリアントは、ＳＥＣ７０からの標準と比較して予想される量で溶出し、これはクロマトグラフィー精製に耐えるほど十分な安定性を示した正しくフォールディングされたタンパク質と一致する。更に、凝集タンパク質のピークは観察されず、リフォールディングプロトコルの有効性が更に確認された。Ｇ－ＣＳＦ＿１３０ａ１の代表的なＳＥＣ　ＵＶトレース及びＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルを示す（図５４）。培養液１リットルあたりの収量は、Ｇ－ＣＳＦバリアントに応じて、２．５～５ｍｇの範囲の精製されたリフォールディングタンパク質であった。

【０５２２】

実施例３３：操作されたＧ－ＣＳＦバリアントの熱安定性の決定

示差走査蛍光分析（ＤＳＦ）を使用して、ＷＴ　Ｇ－ＣＳＦと比較したリフォールディングＧ－ＣＳＦバリアントの熱安定性を測定した。ＤＳＦは、タンパク質のアンフォールディングに伴って露出するタンパク質の疎水性部分に対して親和性を有する色素の蛍光の変化をモニタリングすることにより、タンパク質のアンフォールディングを測定する。

【０５２３】

方法

示差走査蛍光分析は、Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ　ＳｔｅｐＯｎｅＰｌｕｓ（商標）ＲＴ－ＰＣＲ装置（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、カタログ４３７６６００）を使用し、励起波長と発光波長をそれぞれ５８７ｎｍ及び６０７ｎｍに設定して実行した。簡単に説明すると、濃度１ｍｇ／ｍＬの精製Ｇ－ＣＳＦ（ＷＴまたはバリアント）２０μｌを、９６ウェルプレートに３回分注した。治療用ＷＴ　Ｇ－ＣＳＦに使用される臨床的に確証された製剤（１０ｍＭ　酢酸ナトリウム　ｐＨ４、５％ソルビトール、０．００４％ポリソルベート－２０）（ＰＭＩＤ：１７８２２８０２）に近づけるため、ＤＳＦに使用されるアッセイ緩衝液は１０ｍＭ　酢酸ナトリウム　ｐＨ４、２５ｍＭ　ＮａＣｌであった。ＳＹＰＲＯオレンジ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を、５，０００倍の原液２倍の濃度に希釈した。熱安定性の測定では、温度スキャン速度を０．５℃／分に固定し、温度範囲は２０℃～９５℃であった。データ分析を、Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｔｈｅｒｍａｌ　Ｓｈｉｆｔ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ　ｖ１．４（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、カタログ４４６６０３８）を使用して実行し、これは、蛍光データを２状態ボルツマンモデルにフィッティングすることによって個々の複製の融解温度（Ｔｍ）を決定し、その後、続いて、各バリアントに関する３回のＴｍを平均化した。

【０５２４】

結果

試験したすべてのバリアントＧ－ＣＳＦデザインは、臨床的に関連する緩衝液中で測定した場合、ＷＴ　Ｇ－ＣＳＦよりも１０～１７℃高い融解温度を有することが判明し（表６Ａ）、操作された変異によって付与された熱安定性の大幅な改善が実証された。

【０５２５】

【表６Ａ】

表６Ａ：　ＤＳＦによって測定されたＷＴ及び操作されたＧ－ＣＳＦバリアントの融解温度（Ｔｍ）　。

Ｇ－ＣＳＦ	Ｔｍ（℃）
ＷＴ	５０．５５　±０．３４
１３０	６１．９６　±０．１２
１３０ａ１	６７．３２　±０．０２
１３０ｂ１	６６．７３　±０．２４
１３０ａ２	６５．８４　±０．０２
１３０ｂ２	６６．３８　±０．０７

＊１０ｍＭ酢酸ナトリウム　ｐＨ　４．０、２５ｍＭ　ＮａＣｌ中で測定

【０５２６】

実施例３４：野生型Ｇ－ＣＳＦ中の野生型Ｇ－ＣＳＦ受容体または操作されたサイトカイン１３０、１３０ａ１、１３０ａ２、１３０ｂ１、１３０ｂ２及び１３０ａ１ｂ１を発現するヒト及びマウス細胞株の増殖

ＷＴ　Ｇ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤの結合に関して１３０　Ｇ－ＣＳＦよりも交差反応性が低いと予測されているが、実施例３１～３３のｉｎ　ｖｉｔｒｏアッセイにより許容可能な生物物理学的特性及び熱安定性を示したサイトカインを、細胞株ＯＣＩ－ＡＭＬ１（ＷＴヒトＧ－ＣＳＦＲを天然に発現する）及び３２Ｄクローン３（ＷＴマウスＧ－ＣＳＦＲを天然に発現する）の増殖を誘導する能力に関して試験した。

【０５２７】

方法

ＯＣＩ－ＡＭＬ１細胞株（ＤＳＭＺ）を、２０％ウシ胎児血清（Ｓｉｇｍａ）、２０ｎｇ／ｍｌヒトＧＭ－ＣＳＦ（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ）ならびに１％ペニシリン及びストレプトマイシン（Ｇｉｂｃｏ）を含むアルファ－ＭＥＭ培地（Ｇｉｂｃｏ）中で維持した。３２Ｄクローン３細胞株（ＡＴＣＣ）（以下、「３２Ｄ」と呼ぶ）は、１０％ウシ胎児血清、１ｎｇ／ｍｌマウスＩＬ－３（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ）、ならびに１％ペニシリン及びストレプトマイシンを含むＲＰＭＩ　１６４０（ＡＴＣＣ修飾）培地（Ｇｉｂｃｏ）中で維持した。

【０５２８】

ＢｒｄＵ取り込みアッセイを行うために、ＯＣＩ－ＡＭＬ１または３２Ｄ細胞を採取し、それぞれＰＢＳで２回、アルファ－ＭＥＭまたはＲＰＭＩで１回洗浄した。細胞を、指定されたアッセイサイトカインを指定された濃度で含む新鮮な完全培地に再プレーティングし、３７℃、５％CO_2で４８時間インキュベートした。ＢｒｄＵアッセイ手順は、ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ（商標）ＦＩＴＣ　ＢｒｄＵ　Ｆｌｏｗ　Ｋｉｔ（５５７８９１）の取扱説明書に従ったが、生存率染色を濃度１：６００のｅＦｌｕｏｒ（商標）４５０　Ｆｉｘａｂｌｅ　Ｖｉａｂｉｌｉｔｙ　Ｄｙｅ（ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ（商標））を使用して実行した点を追加した。Ｃｙｔｅｋ（商標）Ａｕｒｏｒａ機器を使用して、フ

ローサイトメトリーを実行した。

【０５２９】

結果

ＯＣＩ－ＡＭＬ１細胞株を利用するＢｒｄＵ取り込みアッセイにおいては、細胞は、Ｇ－ＣＳＦバリアント１３０、１３０ａ１、１３０ａ２、１３０ｂ１及び１３０ｂ２に応答して、ＷＴ　Ｇ－ＣＳＦと比較してより低い増殖を示した（図５５Ａ）。更に、細胞は、Ｇ－ＣＳＦバリアント１３０ａ１、１３０ａ２、１３０ｂ１及び１３０ｂ２に応答して、１３０と比較してより低い増殖を示した（図５５Ａ）。

【０５３０】

サイトカインＷＴ　Ｇ－ＣＳＦ及びＧ－ＣＳＦバリアント１３０、１３０ａ１、及び１３０ｂ１を、より広範囲のサイトカイン濃度を使用するＢｒｄＵアッセイで更に評価した（図５５Ｂ）。ＷＴ　Ｇ－ＣＳＦと比較すると、ＯＣＩ－ＡＭＬ１細胞の増殖を誘導するには、はるかにより高い濃度の３つのバリアントサイトカインが必要であった。１３０　Ｇ－ＣＳＦと比較すると、ＯＣＩ－ＡＭＬ１細胞の増殖を誘導するには、より高い濃度の１３０ａ１及び１３０ｂ１　Ｇ－ＣＳＦが必要であった（図５５Ｂ）。

【０５３１】

独立したＢｒｄＵアッセイを実施して、ＷＴ　Ｇ－ＣＳＦとＧ－ＣＳＦバリアント１３０、１３０ａ１、及び１３０ａ１ｂ１とを比較した（図５５Ｃ）。ＷＴ　Ｇ－ＣＳＦと比較すると、ＯＣＩ－ＡＭＬ１細胞の増殖を誘導するには、はるかにより高い濃度の３つのバリアントサイトカインが必要であった。１３０　Ｇ－ＣＳＦと比較すると、ＯＣＩ－ＡＭＬ１細胞の増殖を誘導するには、より高い濃度の１３０ａ１及び１３０ａ１ｂ１　Ｇ－ＣＳＦが必要であった（図５５Ｃ）。

【０５３２】

同様の結果が、３２Ｄ細胞を伴うＢｒｄＵアッセイでも見られた（図５５Ｄ、Ｅ）。ＷＴ　Ｇ－ＣＳＦと比較すると、３２Ｄ細胞の増殖を誘導するには、はるかにより高い濃度のＧ－ＣＳＦバリアント１３０、１３０ａ１、１３０ｂ１、及び１３０ａ１ｂ１が必要であった（図５５Ｄ、Ｅ）。

【０５３３】

したがって、ヒトまたはマウスのＷＴ　Ｇ－ＣＳＦと比較して、Ｇ－ＣＳＦバリアント１３０、１３０ａ１、１３０ｂ１、１３０ａ２、１３０ｂ２、及び１３０ａ１ｂ１は、ヒトまたはマウスのＷＴ　Ｇ－ＣＳＦＲを発現する細胞中で増殖を誘導する能力の有意な低下を示した。更に、１３０　Ｇ－ＣＳＦと比較して、バリアント１３０ａ１、１３０ｂ１、１３０ａ２、１３０ｂ２、及び１３０ａ１ｂ１は、ＯＣＩ－ＡＭＬ１細胞株の増殖を誘導する能力の低下を示した。

【０５３４】

実施例３５：操作されたサイトカイン１３０、１３０ａ１、１３０ａ２、１３０ｂ１、１３０ｂ２及び１３０ａ１ｂ１中で１３４ＥＣＤを含むＧ１２／２Ｒ－１を発現する初代ヒトＴ細胞の増殖

Ｇ－ＣＳＦバリアント１３０、１３０ａ１、１３０ａ２、１３０ｂ１、１３０ｂ２及び１３０ａ１ｂ１を、Ｇ１２／２Ｒ－１　１３４　ＥＣＤを発現するＰＢＭＣ由来ヒトＴ細胞の増殖を誘導する能力について試験した。

【０５３５】

方法

Ｇ１２／２Ｒ－１　１３４　ＥＣＤ　ｃＤＮＡを合成し、レンチウイルストランスファープラスミドにクローニングした。トランスファープラスミド及びレンチウイルスパッケージングプラスミド（ｐｓＰＡＸ２、ｐＭＤ２．Ｇ、Ａｄｄｇｅｎｅ）を、以下のようにレンチウイルスパッケージング細胞株ＨＥＫ２９３Ｔ／１７（ＡＴＣＣ）に同時トランスフェクトした。細胞を、５％ウシ胎児血清及び０．２ｍＭピルビン酸ナトリウムを含むＯｐｔｉ－ＭＥＭ（商標）Ｉ還元血清培地、ＧｌｕｔａＭＡＸ（商標）Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ（Ｇｉｂｃｏ（商標））中で一晩プレーティングした。プラスミドＤＮＡ及びＬｉｐｏ

ｆｅｃｔａｍｉｎｅ（商標）３０００トランスフェクション試薬（Ｇｉｂｃｏ（商標））を、製造元の仕様書に従って混合し、細胞に滴下した。細胞を３７℃、５％CO_2で６時間インキュベートし、続いて培地を交換し、更に一晩インキュベートした。翌日、細胞上清をプレートから回収し、４℃で貯蔵し、培地を交換した。翌日、細胞上清を再び細胞から回収し、前日の上清と共にプールした。上清を軽く遠心分離して破片を除去し、０．４５μｍフィルターで濾過した。上清をＢｅｃｋｍａｎ　Ｏｐｔｉｍａ　Ｌ－ＸＰ超遠心機のＳＷ－３２Ｔｉローターを用いて２５，０００ｒｐｍで９０分間回転させた。上清を除去し、ペレットをＯｐｔｉ－ＭＥＭ Ｉ培地中で３０分間穏やかに振盪して再懸濁させた。

【０５３６】

ヒトＴ細胞を、以下のように健康なドナーの白血球搬出生成物から単離した。末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を、密度勾配遠心分離を用いて単離した。ＣＤ４＋及びＣＤ８＋Ｔ細胞を、ヒトＣＤ４及びＣＤ８　ＭｉｃｒｏＢｅａｄｓ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ）を使用して、製造元の仕様書に従い単離した。単離したＴ細胞を、４８ウェルプレート中の、３％ヒト血清（Ｓｉｇｍａ）及び０．５％ゲンタマイシン（ＤＩＮ　０２２６８５３）を含むＴｅｘＭＡＣＳ（商標）培地（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ）（以下、「完全ＴｅｘＭＡＣＳ」と呼ぶ）中に、１ウェルあたり5×10^5で播種した。ヒトＴ細胞ＴｒａｎｓＡｃｔ（商標）（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ）を添加し（１ウェルあたり１０μｌ）、細胞を　３７℃、５％CO_2でインキュベートした。活性化から２０～２８時間後、Ｔ細胞に　Ｇ１２／２Ｒ－１　１３４　ＥＣＤ構築物をコードするレンチウイルスを形質導入した。形質導入から２４時間後、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ（１００ｎｇ／ｍｌ）を含む新鮮な培地をＴ細胞に添加した。その後、２日毎に新鮮な培地及び／またはサイトカインを細胞培養物に補充し、１ｍｌあたり約5×10^5～1×10^6細胞の密度に維持した。

【０５３７】

ＢｒｄＵ取り込みアッセイでは、拡大１０～１４日目にＴ細胞を採取し、ＰＢＳで２回、完全ＴｅｘＭＡＣＳで１回洗浄した。細胞を、培地のみ、または以下のサイトカインを加えた培地を含む完全ＴｅｘＭＡＣＳに再プレーティングした：：ＩＬ－２（３００ＩＵ／ｍｌ）、ＩＬ－２＋ＩＬ－１２（それぞれ１０ｎｇ／ｍｌ）、または個々のＧ－ＣＳＦバリアント（１３０、１３０ａ１、１３０ｂ１、１３０ａ２、１３０ｂ２、または１３０ａ１ｂ１、それぞれ１００ｎｇ／ｍｌで）。Ｔ細胞を、３７℃、５％$CO_2$２で４８時間インキュベートした。ＢｒｄＵアッセイの残りの部分は、細胞を、抗ヒトＧ－ＣＳＦＲ　ＡＰＣ結合抗体、及びＣＤ３　ＢＶ７５０結合抗体で更に染色したことを除いて、実施例３４に記載した通りに実施した。

【０５３８】

結果

ＩＬ－２またはＩＬ－２＋ＩＬ－１２と比較して、Ｇ－ＣＳＦ　バリアント１３０、１３０ａ１、１３０ｂ１、１３０ａ２、１３０ｂ２、及び１３０ａ１ｂ１は、すべて、Ｇ１２／２Ｒ－１　１３４　ＥＣＤを発現するヒトＴ細胞の増殖を同様のレベルで誘導した（図５６Ａ）。培地のみでは、無視できる程度の増殖が見られた。同様の結果が、Ｇ－ＣＳＦバリアント１３０及び１３０ａ１ｂ１を用いた反復ＢｒｄＵアッセイでも得られた（図５６Ｂ）。

【０５３９】

したがって、Ｇ－ＣＳＦバリアント１３０、１３０ａ１、１３０ｂ１、１３０ａ２、１３０ｂ２、及び１３０ａ１ｂ１は、キメラ受容体Ｇ１２／２Ｒ－１　１３４　ＥＣＤを発現するＴ細胞の増殖を効率的に誘導して、その結果、ＩＬ－２またはＩＬ－２＋ＩＬ－１２によって誘発されるのと同様の増殖応答を得ることができる。

【０５４０】

実施例３６：マウス乳癌モデルにおいて、バリアントサイトカイン１３０ａ１による処置は、Ｇ２Ｒ－３　１３４　ＥＣＤを発現する腫瘍特異的Ｔ細胞の増殖及び抗腫瘍活性を選択的に増強する

１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦがＧ１２／２Ｒ－１　１３４　ＥＣＤを発現するＴ細胞の増殖を刺激する能力と、そのＷＴマウス及びヒトＧ－ＣＳＦＲとの低い交差反応性とに基づいて、マウス乳癌モデルでのｉｎ　ｖｉｖｏ試験へと進められた。

【０５４１】

方法

すべての手順はＣａｎａｄｉａｎ　Ｃｏｕｎｃｉｌ　ｆｏｒ　Ａｎｉｍａｌ　Ｃａｒｅのガイドラインに従い、Ｖｉｃｔｏｒｉａ　Ａｎｉｍａｌ　Ｃａｒｅ　Ｃｏｍｍｉｔｔｅｅによって承認された。ＭＭＴＶプロモーターの制御下で乳腺上皮中でＮｅｕ$^{ＯＴ－Ｉ／ＯＴ－ＩＩ}$導入遺伝子を発現するＣ５７Ｂｌ／６マウスを腫瘍宿主として利用した（Ｗａｌｌ　ｅｔ　ａｌ．，２００７）。腫瘍特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞は、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）トランスジェニックＯＴ－Ｉマウス（以下、「ＯＴ－Ｉ」マウスと呼ぶ；Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）から得られた。ＯＴ－Ｉ　Ｔ細胞は、ＭＨＣクラスＩによって提示されるニワトリオボアルブミンの残基２５７～２６４を認識する。Ｔリンパ球特異的Ｔｈｙ１ａ（Ｔｈｙ１．１）対立遺伝子を有するコンジェニックマウス（以下、「Ｔｈｙ１．１＋」マウスと呼ぶ；Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）も得られた。ＯＴ－Ｉ系統とＴｈｙ１．１＋系統とをホモ接合性になるまで交配して「Ｔｈｙ１．１＋ＯＴ－Ｉ」マウスを作製した。これにより、フローサイトメトリーによる、Ｔｈｙ１．１マーカーを使用したＯＴ－Ｉ　Ｔ細胞の識別が可能になる。ＮＯＰ２３は、乳腺上皮中でＮｅｕ$^{ＯＴ－Ｉ／ＯＴ－ＩＩ}$及びドミナントネガティブバージョンのｐ５３を発現するトランスジェニックマウス中の自然発生腫瘍に由来する同系乳腺腫瘍株である（Ｗａｌｌ　ｅｔ　ａｌ．，２００７）（Ｙａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，２００９）。ＮＯＰ２３細胞は、ＭＨＣクラスＩ上のニワトリオボアルブミンの残基２５７～２６４を提示するため、ＯＴ－Ｉ　Ｔ細胞によって認識され得る。ＮＯＰ２３細胞は初期継代で維持され、１０％ウシ胎児血清、１×インスリン－トランスフェリン－セレンサプリメント（Ｃｏｒｎｉｎｇ）、及び１％ペニシリン／ストレプトマイシン（Ｇｉｂｃｏ）を含むＤＭＥＭ高グルコース（Ｈｙｃｌｏｎｅ）中で培養された。この細胞株は、マウスの病原体及びマイコプラズマ種に関して定期的な検査を受けた。

【０５４２】

宿主ＭＭＴＶ　Ｎｅｕ$^{ＯＴ－Ｉ／ＯＴ－ＩＩ}$マウスのひ腹に１×１０^{6}個のＮＯＰ２３細胞を皮下移植した。腫瘍が平均面積２０～５０ｍｍ^{2}に達したら（移植から約１５日後）、次の段落で説明するように、Ｇ２Ｒ－３　１３４　ＥＣＤを発現するようにレトロウイルスによって形質導入された５×１０^{6}個のドナーＴｈｙ１．１＋ＯＴ－Ｉリンパ球をマウスに静脈内注入した。

【０５４３】

レトロウイルスパッケージング細胞株Ｐｌａｔｉｎｕｍ－Ｅ（Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌａｂｓ，ＲＶ－１０１）を、１０％ＦＢＳ、１％ペニシリン／ストレプトマイシン、ピューロマイシン（１μｇ／ｍｌ）、及びブラストサイジン（１０μｇ／ｍｌ）を含有するＤＭＥＭにおいて培養した。キメラ受容体構築物を合成し、制限エンドヌクレアーゼクローニングによってＩＲＥＳ－ＧＦＰ（ＢｇｌＩＩからＰａｃＩサイト）を除去し、カスタムマルチクローニングサイトをコードするアニーリングプライマーを導入するように変更されたｐＭＩＧレトロウイルストランスファープラスミド（プラスミド＃９０４４、Ａｄｄｇｅｎｅ）へとクローニングした。得られた配列をサンガー配列決定法によって検証した。上記のように、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ３０００トランスフェクション法を使用して、トランスファープラスミドをＰｌａｔｉｎｕｍ－Ｅ細胞にトランスフェクトした。トランスフェクションから２４時間及び４８時間後にレトロウイルス上清をプレートから回収し、０．４５ミクロンのフィルターで濾過した。臭化ヘキサジメトリン（１．６μｇ／ｍｌ、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）及びヒトＩＬ－２（３００ＩＵ／ｍｌ）を上清に添加した。精製されたレトロウイルス上清を使用して、以下に記載するようにマウスリンパ球を形質導入した。

【０５４４】

レトロウイルス上清を採取する４８時間前に、２４ウェル付着プレートを、ＰＢＳ中に希釈した非コンジュゲート抗マウスＣＤ３（１０μｇ／ｍｌ、ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、５５３０５８）及び抗マウスＣＤ２８（２μｇ／ｍｌ、ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、５５３２９４）抗体でコートし、４℃で保存した。レトロウイルス上清を回収する２４時間前に、Ｔｈｙ１．１＋ＯＴ－Ｉマウスを安楽死させ、以下のようにＴ細胞を脾臓から採取した。脾臓を手作業で分離し、１００ミクロンのフィルターで濾過した。赤血球は、ＡＣＫ溶解緩衝液（Ｇｉｂｃｏ、Ａ１０４９２０１）中で室温で５分間インキュベートすることにより溶解し、その後、血清含有培地で１回洗浄した。ＣＤ８ａ陽性Ｔ細胞を、ビーズベースの単離キット（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ，１３０－１０４－０７５）を使用して単離した。細胞を、マウスＴ細胞増殖培地（１０％ＦＢＳ、ペニシリン／ストレプトマイシン、０．０５ｍＭ　β－メルカプトエタノール、及び３００ＩＵ／ｍＬヒトＩＬ－２を含有するＲＰＭＩ－１６４０）中の抗ＣＤ３抗体及び抗ＣＤ２８抗体でコーティングしたプレートに添加し、３７℃、５％CO_2で２４時間インキュベートした。

【０５４５】

レトロウイルス形質導入は、以下のように連続した２日間（１日目及び２日目）に実施した。培地の約半分をレトロウイルス上清（上記のとおりに生成した）と交換した。このレトロウイルス上清を用いて、３０℃で９０分間、１０００ｇで細胞をスピンフェクトした。プレートをインキュベーターに０～４時間戻し、その後、培地の約半分を新鮮なＴ細胞増殖培地と交換した。この手順を翌日も繰り返した。２回目の形質導入から２４時間後、Ｔ細胞を　６ウェルプレートへと分割し、抗体刺激から取り出し、標準条件下で培養した。

【０５４６】

５日目に、形質導入されたＴ細胞を採取し、形質導入の効率を、上述したようにヒトＧ－ＣＳＦＲ及びＣＤ８ａに対する抗体（ＰｅｒＣＰ－ｅＦｌｕｏｒ　７１０コンジュゲート、ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ（商標）、４６－００８１－８２）ならびにＦｉｘａｂｌｅ　Ｖｉａｂｉｌｉｔｙ　Ｄｙｅ　ｅＦｌｕｏｒ（商標）５０６（１：１０００希釈）を用いたフローサイトメトリーによって評価した。細胞をＰＢＳで３回洗浄し、その後、確立されたＮＯＰ２３腫瘍を有する宿主マウスに尾静脈注射によって注入した。

【０５４７】

Ｔ細胞注入後、マウスの腫瘍増殖及び末梢血中のＴｈｙ１．１＋ＯＴ－Ｉ細胞の生着をモニタリングした。マウスを無作為化し、ビヒクル対１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ（１０μｇ／用量）の腹腔内注射を１４日間毎日、続いて１日おきに更に１４日間、合計で２１用量投与した。サイトカイン処置期間中、オペレーターはサイトカインシリンジの内容（すなわち、ビヒクル対１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ）を知らされなかった。ＡＣＴ後１、４、７、１０、１４　及び１９日目に、各マウスから末梢血の試料を回収した。ＡＣＫ溶解（上記）後にＰＢＭＣを単離し、マウスＦｃ　ｂｌｏｃｋ及びＺｏｍｂｉｅ　ＮＩＲ生存率色素（１：４，０００）中でインキュベートし、マウスＣＤ４５（ＰｅｒＣＰコンジュゲート抗体、１：２００）、ＣＤ３（ＡｌｅｘａＦｌｕｏｒ（商標）７００コンジュゲート抗体、１：１００），ＣＤ８ａ（ＡＰＣコンジュゲート抗体、１：８０）、ＮＫ１．１（ＰＥＣｙ７コンジュゲート抗体、１：２５）、ＣＤ１９（ＳｕｐｅｒＢｒｉｇｈｔ（商標）７８０コンジュゲート抗体、１：１００）、ＣＤ１１ｂ（ＦＩＴＣコンジュゲート抗体、１：２５）、ＣＤ１１ｃ（ＢＶ５１０コンジュゲート抗体、１：５０）、Ｌｙ６Ｃ（ＢＶ６０５コンジュゲート抗体、１：１０）、及びＬｙ６Ｇ（ＰＥコンジュゲート抗体、１：８０）に特異的な抗体で染色した。Ｃｙｔｅｋ　Ａｕｒｏｒａ機器上でフローサイトメトリーを実行した。

【０５４８】

マウスの腫瘍サイズ、体重、一般的な健康状態をモニタリングし、実験のエンドポイント（＞１５０ｍｍ^{2}の腫瘍面積）に達したとき、または、完全な腫瘍退縮を経験したマウスの場合、Ｔ細胞注入後８０日目に、安楽死させた。

【０５４９】

結果

全てのマウスに、Ｇ２Ｒ－３　１３４　ＥＣＤを発現するように形質導入されたＴｈｙ１．１＋ＯＴ－Ｉ細胞を等量（５×１０^{6}）投与した。フローサイトメトリーによってヒトＧ－ＣＳＦＲを発現するＴｈｙ１．１＋細胞の割合で評価したところ、形質導入効率は３６％であった。１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ処置群では、４匹中４匹のマウスが腫瘍の完全退縮（ＣＲ）を経験し、実用上の理由で研究が中止される８０日目まで腫瘍のない状態を保った（図５７Ａ及び５７Ｂ）。対照的に、ビヒクル処置群では、４匹中１匹のマウスのみがＣＲを経験し、一方で残りの４匹中３匹のマウスは実験のエンドポイントまで進行した腫瘍を有した。これは、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ処置群ではマウスの１００％が生存し、ビヒクル処置群では２５％が生存したことになる（図５７Ｃ）。

【０５５０】

Ｔｈｙ１．１＋ＯＴ－Ｉ細胞の増殖及び持続性を、マウスから回収した連続血液試料中でモニタリングした。１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ処置群では、Ｔｈｙ１．１＋ＯＴ－Ｉ細胞は、７日目にすべてのＣＤ８＋Ｔ細胞の４９．８％の平均ピーク生着に達したが、ビヒクル処置群ではＴｈｙ１．１＋ＯＴ－Ｉ細胞は、７日目にすべてのＣＤ８＋Ｔ細胞のわずか８．６％の平均ピーク生着に達した（図５７Ｄ）。

【０５５１】

末梢血試料を、すべてのＣＤ４５＋細胞に対する骨髄細胞サブセットの割合に関しても評価した。１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ及びビヒクル処置群は、末梢血中のすべてのＣＤ４５＋細胞と比較して、好中球（ＣＤ３－、ＣＤ１９－、ＮＫ１．１－、ＣＤ１１ｂ＋、ＣＤ１１ｃ－、Ｌｙ６Ｇ＋）、好酸球（ＣＤ３－、ＣＤ１９－、ＮＫ１．１－、ＣＤ１１ｂ＋、ＣＤ１１ｃ－、Ｌｙ６Ｇ－、ＳＳＣ^{ｈｉｇｈ}）、または単球（ＣＤ３－、ＣＤ１９－、ＮＫ１．１－、ＣＤ１１ｂ＋、ＣＤ１１ｃ－、Ｌｙ６Ｇ－、ＳＳＣ^{ｌｏｗ}）の割合の有意な差を経時的に示さなかった（図５７Ｅ、５７Ｆ、及び５７Ｇ）。

【０５５２】

研究全体を通じて、両群のすべてのマウスは、一部のマウスでは腫瘍が進行したにもかかわらず、正常な体重を維持し、全体的に良好な健康状態を示した。

【０５５３】

したがって、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦは、Ｇ２Ｒ－３　１３４　ＥＣＤを発現する腫瘍特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞の選択的かつ大規模な増殖を誘導することができた。これにより、持続的ＣＲ率は１００％となり、これと比較してビヒクル処置群では２５％であった。１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦによる処置は、末梢血の好中球、好酸球、または単球の数に影響を与えなかった。１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ処置に関連する明白な毒性は存在しなかった。

【０５５４】

実施例３７：マウス乳癌モデルにおいて、バリアントＧ－ＣＳＦ１３０ａ１による処置は、Ｇ１２／２Ｒ－１　１３４　ＥＣＤを発現する腫瘍特異的Ｔ細胞の増殖及び抗腫瘍活性を選択的に増強する

バリアントサイトカイン１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦを、ｉｎ　ｖｉｖｏマウス乳癌モデル中でＧ１２／２Ｒ－１　１３４　ＥＣＤを発現するように操作されたＴ細胞の増殖及び抗腫瘍活性を増強する能力について更に試験した。

【０５５５】

方法

Ｔｈｙ１．１＋ＯＴ－Ｉ細胞を、Ｇ２Ｒ－３　１３４　ＥＣＤではなくＧ１２／２Ｒ－１　１３４　ＥＣＤを発現するようにレトロウイルスによって形質導入したことを除いて、実施例３６に記載したものと同じ方法が使用された。

【０５５６】

結果

全てのマウスに、Ｇ１２／２Ｒ－１　１３４　ＥＣＤを発現するように形質導入されたＴｈｙ１．１＋ＯＴ－Ｉ細胞を等量（５×１０^{6}）投与した。フローサイトメトリーによってヒトＧ－ＣＳＦＲ＋を発現するＴｈｙ１．１＋細胞の割合で評価したところ、形質導

入効率は４３％であった。１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ処置群では、３匹中３匹のマウスが腫瘍の完全退縮（ＣＲ）を経験し、実用上の理由で研究が中止される８０日目まで腫瘍のない状態を保った（図５８Ａ及び５８Ｂ）。対照的に、ビヒクル処置群では、４匹中１匹のマウスのみがＣＲを経験し、一方で残りの４匹中３匹のマウスは実験のエンドポイントまで進行した腫瘍を有した。これは、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ処置群ではマウスの１００％が生存し、ビヒクル処置群では２５％が生存したことになる（図５８Ｃ）。

【０５５７】

Ｔｈｙ１．１＋ＯＴ－Ｉ細胞の増殖及び持続性を、マウスから回収した連続血液試料中でモニタリングした。１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ処置群では、Ｔｈｙ１．１＋ＯＴ－Ｉ細胞は、７日目にすべてのＣＤ８＋Ｔ細胞の３４．３％の平均ピーク生着に達したが、ビヒクル処置群ではＴｈｙ１．１＋ＯＴ－Ｉ細胞は、７日目にすべてのＣＤ８＋Ｔ細胞のわずか７．７％の平均ピーク生着に達した（図５８Ｄ）。

【０５５８】

末梢血試料を、すべてのＣＤ４５＋細胞に対するいくつかの骨髄細胞サブセットの割合に関しても評価した。１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ及びビヒクル処置群は、末梢血中のすべてのＣＤ４５＋細胞と比較して、好中球（ＣＤ３－、ＣＤ１９－、ＮＫ１．１－、ＣＤ１１ｂ＋、ＣＤ１１ｃ－、Ｌｙ６Ｇ＋）、好酸球（ＣＤ３－、ＣＤ１９－、ＮＫ１．１－、ＣＤ１１ｂ＋、ＣＤ１１ｃ－、Ｌｙ６Ｇ－、ＳＳＣ^{ｈｉｇｈ}）、または単球（ＣＤ３－、ＣＤ１９－、ＮＫ１．１－、ＣＤ１１ｂ＋、ＣＤ１１ｃ－、Ｌｙ６Ｇ－、ＳＳＣ^{ｌｏｗ}）の割合の有意な差を経時的に示さなかった（図５８Ｅ、５８Ｆ、及び５８Ｇ）。

【０５５９】

研究全体を通じて、両群のすべてのマウスは、一部のマウスでは腫瘍が進行したにもかかわらず、正常な体重を維持し、全体的に良好な健康状態を示した。

【０５６０】

したがって、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦは、Ｇ１２／２Ｒ－１　１３４　ＥＣＤを発現する腫瘍特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞の選択的かつ大規模な拡大を誘導することができた。これにより、持続的ＣＲ率は１００％となり、これと比較してビヒクル処置群では２５％であった。１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦによる処置は、末梢血中の好中球、好酸球、または単球の数に影響を与えなかった。１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ処置に関連する明白な毒性は存在しなかった。

【０５６１】

<u>実施例３８：１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦの治療効果は、腫瘍特異的ＯＴ－Ｉ　Ｔ細胞による同族の操作されたサイトカイン受容体の発現を必要とする</u>

１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦが、Ｇ－ＣＳＦＲ　１３４　ＥＣＤを含む受容体を通してその免疫学的及び抗腫瘍効果を媒介することを実証するために、モック形質導入ＯＴ－Ｉ　Ｔ細胞（すなわち、レトロウイルス構築物を含めることを除くレトロウイルス形質導入手順を受けたＯＴ－Ｉ　Ｔ細胞）を使用して上記のｉｎ　ｖｉｖｏ実験を実施した。１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦの活性を、ヒトＩＬ－２の活性とも比較した。

【０５６２】

方法

以下の２つ点を除いて、実施例３６に記載されたものと同じ方法を用いた。（ａ）モックトランスフェクトされたＰｌａｔｉｎｕｍ－Ｅｃｏ細胞に由来する上清を使用して、Ｔｈｙ１．１＋ＯＴ－Ｉ細胞をモック形質導入した。レトロウイルス形質導入プロセスの他のすべての側面は同じであった。（ｂ）同じ処置スケジュールに従い、ビヒクルまたは１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦの代わりにヒトインターロイキン－２（３０，０００ＩＵ／用量；Ｐｒｏｌｅｕｋｉｎ）が投与されたマウスの追加の対照群を含めた。

【０５６３】

結果

全てのマウスに、モック形質導入プロセスを受けたＴｈｙ１．１＋ＯＴ－Ｉ細胞を等量（５×１０^{6}）投与した。続いて、ビヒクル、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ、またはＩＬ－２

を投与するようにマウスを無作為化した。１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ処置群では、５匹中３匹のマウスが腫瘍の完全退縮（ＣＲ）を経験し、実用上の理由で研究が中止される８０日目まで腫瘍のない状態を保った（図５９Ａ及び５９Ｂ）。ＩＬ－２処置群では、５匹中４匹のマウスがＣＲを経験し、８０日目まで腫瘍のない状態を維持した。ビヒクル処置群では、４匹中３匹のマウスがＣＲを経験し、８０日目まで腫瘍のない状態を維持した（図５９Ａ及び５９Ｂ）。これは、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ及びＩＬ－２処置群ではマウスの８０％が生存し、ビヒクル処置群では７５％が生存したことになる（図５９Ｃ）。

【０５６４】

モック形質導入されたＯＴ－Ｉ　Ｔ細胞によって達成された完全奏効率は、これらの群のいずれも、Ｇ２Ｒ－３　１３４　ＥＣＤまたはＧ１２／２Ｒ－１　１３４　ＥＣＤを介したシグナル伝達の利点を有さなかったにもかかわらず、Ｇ２Ｒ－３　１３４　ＥＣＤまたはＧ１２／２Ｒ－１　１３４　ＥＣＤのいずれかを発現するビヒクル処置ＯＴ－Ｉ　Ｔ細胞で見られたものよりも高かった（実施例３６及び３７）。形質導入されたビヒクル処置ＯＴ－Ｉ　Ｔ細胞の効力の低下は、レトロウイルス形質導入によって引き起こされるＴ細胞機能のわずかな障害を反映している可能性がある。

【０５６５】

Ｔｈｙ１．１＋ＯＴ－Ｉ細胞の増殖及び持続性を、マウスから回収した連続血液試料中でモニタリングした。Ｔｈｙ１．１＋ＯＴ－Ｉ細胞の数は、３つの群すべてで４日目にピークに達し、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ、ＩＬ－２、及びビヒクル処置群で全ＣＤ８＋Ｔ細胞の８．０％、１０．６％、及び９．９％のレベルに達した（図５９Ｄ）。

【０５６６】

１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ、ＩＬ－２、またはビヒクル処置群間で、全末梢血ＣＤ４５＋細胞の割合としての好中球または単球の数に有意差は存在しなかった（図５９Ｅ及び５９Ｇ）。

【０５６７】

７日目に、好酸球は、ＩＬ－２処置群では全ＣＤ４５＋細胞の平均６．７％に達し、これと比較して、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ及びビヒクル処置群ではそれぞれ２．９％及び２．７％であった（図５９Ｆ）。好酸球増加は、マウス及びヒトにおけるＩＬ－２の全身投与の既知の影響である。

【０５６８】

研究全体を通じて、両群のすべてのマウスは、一部のマウスでは腫瘍が進行したにもかかわらず、正常な体重を維持し、全体的に良好な健康状態を示した。

【０５６９】

したがって、モック形質導入されたＴｈｙ１．１＋ＯＴ－Ｉ細胞を投与されたマウスでは、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦは抗腫瘍活性を媒介することも、Ｔ細胞拡大を誘導することもなかった。上述したように、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦは、末梢血中の好中球、好酸球、または単球の数に対して影響を持たなかった。１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ処置に関連する明白な毒性は存在しなかった。ＩＬ－２（使用した用量及びスケジュールでの）は、一過性の好酸球増加を誘発したにもかかわらず、Ｔ細胞の増殖及び抗腫瘍活性に対しては非常にわずかな効果を示した。

【０５７０】

実施例３９：Ｇ－ＣＳＦＲ受容体由来のバリアント細胞外ドメイン及びＩＬ－４受容体α由来の細胞内シグナル伝達ドメインを有するキメラ受容体の構築及び機能評価

ヒトＩＬ－４受容体アルファの細胞内ドメインの一部に融合した、ヒトＧ－ＣＳＦＲの細胞外ドメイン（１３４バリアント）、膜貫通ドメイン、ならびにＢｏｘ１及び２領域を含む、Ｇ４Ｒ　１３４　ＥＣＤと呼ばれるキメラ受容体（図６０）が合成された。キメラ受容体サブユニットは、ヒトＣＤ４＋及びＣＤ８＋Ｔ細胞に形質導入するために使用されるレンチウイルスベクター中でコードされた。形質導入されたＴ細胞（及び非形質導入対照Ｔ細胞）をフローサイトメトリーによって分析して、Ｇ４Ｒ　１３４　ＥＣＤの細胞表面発現を検出した。Ｇ４Ｒ　１３４　ＥＣＤがＴ細胞の拡大及び増殖を誘導する能力をｉ

ｎ　ｖｉｔｒｏで評価した。Ｇ４Ｒ　１３４　ＥＣＤによって媒介される生化学的シグナル伝達イベントを、ＳＴＡＴ６に対するｐｈｏｓｐｈｏ－特異的抗体及びＩＬ－４シグナル伝達に関連する他のシグナル伝達媒介物を使用するウエスタンブロットによって評価した。

【０５７１】

方法

キメラ受容体構築物Ｇ４Ｒ　１３４　ＥＣＤを合成し、レンチウイルストランスファープラスミド（Ｔｗｉｓｔ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）にクローニングした。トランスファープラスミド及びレンチウイルスパッケージングプラスミド（ｐｓＰＡＸ２、ｐＭＤ２．Ｇ、Ａｄｄｇｅｎｅ）を、以下のようにレンチウイルスパッケージング細胞株ＨＥＫ２９３Ｔ／１７（ＡＴＣＣ）に同時トランスフェクトした。細胞を、５％ウシ胎児血清及び０．２ｍＭピルビン酸ナトリウムを含むＯｐｔｉ－ＭＥＭ（商標）Ｉ還元血清培地、ＧｌｕｔａＭＡＸ（商標）Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ（Ｇｉｂｃｏ（商標））中で一晩プレーティングした。プラスミドＤＮＡ及びＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ（商標）３０００トランスフェクション試薬（Ｇｉｂｃｏ（商標））を、製造元の仕様書に従って混合し、細胞に滴下した。細胞を３７℃、５％CO_2で６時間インキュベートし、続いて培地を交換し、更に一晩インキュベートした。翌日、細胞上清をプレートから回収し、４℃で貯蔵し、培地を交換した。翌日、細胞上清を再び細胞から回収し、前日の上清と共にプールした。上清を軽く遠心分離して破片を除去し、０．４５μｍフィルターで濾過した。上清をＢｅｃｋｍａｎ　Ｏｐｔｉｍａ　Ｌ－ＸＰ超遠心機のＳＷ－３２Ｔｉローターを用いて２５，０００ｒｐｍで９０分間回転させた。上清を除去し、ペレットをＯｐｔｉ－ＭＥＭ　Ｉ培地中で３０分間穏やかに振盪して再懸濁させた。

【０５７２】

初代ヒトＴ細胞を、以下のように健康なドナーの白血球搬出生成物から単離した。末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を、密度勾配遠心分離を用いて単離した。ＣＤ４＋及びＣＤ８＋Ｔ細胞を、ヒトＣＤ４及びＣＤ８　ＭｉｃｒｏＢｅａｄｓ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ）を使用して、製造元の仕様書に従い単離した。一部の実験では、Ｔ細胞を生存可能な状態で凍結し、後に分析のために解凍した。単離したＴ細胞を、４８ウェルプレート中の、３％ヒト血清（Ｓｉｇｍａ）及び０．５％ゲンタマイシン（ＤＩＮ　０２２６８５３）を含むＴｅｘＭＡＣＳ（商標）培地（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ）（以下、「完全ＴｅｘＭＡＣＳ」と呼ぶ）中に、１ウェルあたり5×10^5で播種した。ヒトＴ細胞ＴｒａｎｓＡｃｔ（商標）（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ）を添加し（１ウェルあたり１０ｍｌ）、細胞を　３７℃、５％CO_2でインキュベートした。活性化から２０～２８時間後、受容体構築物をコードするレンチウイルスでＴ細胞に形質導入した。翌日、ＩＬ－２（３００ＩＵ／ｍｌ）、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ（１００ｎｇ／ｍｌ）、ＩＬ－２＋１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ（それぞれ３００ＩＵ／ｍｌまたは１００ｎｇ／ｍｌ）のいずれかと共に、またはサイトカインを添加せずに、新鮮な培地をＴ細胞に添加した（非形質導入Ｔ細胞の場合、３０７　Ｇ－ＣＳＦバリアントは、この実験の別のアーム（図示せず）の対照として機能するために、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦと共に添加された。この実験の利便性の使用は、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦまたは３０７　Ｇ－ＣＳＦのどちらも、非形質導入Ｔ細胞中で増殖またはその他のシグナル伝達イベントを誘導しないという事実によって正当化された）。密度を約5×10^5～1×10^6細胞／ｍｌに維持しながら、新鮮な培地、及び／または指定されたサイトカインを２日毎に添加することによって、Ｔ細胞を維持した。

【０５７３】

形質導入から８日後、ＩＬ－２培養条件から採取したＴ細胞のフローサイトメトリーによってＧ４Ｒ　１３４　ＥＣＤの発現を評価した。Ｔ細胞を、４℃で１５分間、抗ヒトＧ－ＣＳＦＲ　ＡＰＣコンジュゲート抗体（１：５０希釈）、抗ヒトＣＤ３　ＢＶ７５０（商標）コンジュゲート抗体（１：５０希釈）、抗ヒトＣＤ４　ＰＥコンジュゲート抗体（１：２５希釈）、抗ヒトＣＤ８　ＰｅｒＣＰコンジュゲート抗体（１：１００）、及びｅ

Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ（商標）Ｆｉｘａｂｌｅ Ｖｉａｂｉｌｉｔｙ Ｄｙｅ ｅＦｌｕｏｒ（商標）５０６（１：１０００希釈）でインキュベートした。次に細胞を２回洗浄し、Ｃｙｔｅｋ（商標）Ａｕｒｏｒａフローサイトメーターで分析した。

【０５７４】

Ｔ細胞の拡大を評価するために、Ｃｙｔｅｋ（商標）Ａｕｒｏｒａフローサイトメーターを使用して、各培養条件からの細胞を ４、８、１２、及び１６日目に計数した。

【０５７５】

細胞周期の進行（ＢｒｄＵの取り込み）を評価するために、細胞を１２日目に採取し（１３０ａ１ Ｇ－ＣＳＦ＋ＩＬ－２培養条件から）、ＰＢＳで２回、完全ＴｅｘＭＡＣＳ培地で１回洗浄し、以下の指定されたサイトカインを含む新鮮な完全ＴｅｘＭＡＣＳ培地に再プレーティングした：ＩＬ－２（３００ＩＵ／ｍｌ）、ＩＬ－４（５０ｎｇ／ｍｌ）、ＩＬ－２＋ＩＬ－４（それぞれ３００ＩＵ／ｍｌ及び５０ｎｇ／ｍｌ）、１３０ａ１ Ｇ－ＣＳＦ（１００ｎｇ／ｍｌ）、１３０ａ１ Ｇ－ＣＳＦ＋ＩＬ－２、または培地のみ（サイトカイン無添加）。細胞を、３７℃、５％CO_2で４８時間培養した。ＢｒｄＵアッセイ手順は、Ｇ－ＣＳＦＲ ＥＣＤの細胞表面発現を検出するために細胞も染色したという１点の例外を除いて、ＢＤ Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ（商標）ＦＩＴＣ ＢｒｄＵ Ｆｌｏｗ Ｋｉｔ（５５７８９１）の取扱説明書に従った（実施例３５に記載されるとおり）。Ｃｙｔｅｋ（商標）Ａｕｒｏｒａ機器を使用して、フローサイトメトリーを実行した。

【０５７６】

ウエスタンブロット実験のために、細胞を１３０ａ１ Ｇ－ＣＳＦ＋ＩＬ－２培養条件から採取し、３回洗浄し、完全ＴｅｘＭＡＣＳ中で一晩静置した。翌日、細胞を、培地のみ、または培地及びＩＬ－２（３００ＩＵ／ｍｌ）、ＩＬ－４（５０ｎｇ／ｍｌ）、もしくは１３０ａ１ Ｇ－ＣＳＦ（１００ｎｇ／ｍｌ）を用いて３７℃で２０分間刺激した。１０ｍＭのＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．９、１ｍＭの$MgCl_2$、０．０５ｍＭのＥＧＴＡ、０．５ｍＭのＥＤＴＡ、ｐＨ８．０、１ｍＭのＤＴＴ、及び１ｘのＰｉｅｒｃｅプロテアーゼ及びホスファターゼ阻害剤ミニタブレット（Ａ３２９６１）を含有する緩衝液で細胞を１回洗浄した。細胞を、０．２％ＮＰ－４０代替物（Ｓｉｇｍａ）を含む洗浄緩衝液中の氷上で１０分間溶解した。溶解物を、４℃で、１３，０００ｒｐｍで１０分間遠心分離し、その後、上清（細胞質画分）を収集した。核画分を抽出するため、溶解工程からのペレットを、０．４２ＭのＮａＣｌ及び２０％のグリセロールを加えながら上記の洗浄緩衝液に再懸濁させた。核画分を氷上で３０分間、頻繁にボルテックスしながらインキュベートし、１３，０００ｒｐｍ、４℃で２０分間遠心分離した後、核画分（上清）を回収した。細胞質画分及び核画分を還元条件下で１０分間加熱し（７０℃）、ＮｕＰＡＧＥ（商標）４～１２％Ｂｉｓ－Ｔｒｉｓタンパク質ゲルで泳動した。ゲル内容物をニトロセルロース膜に転写し（Ｔｒａｎｓ－Ｂｌｏｔ（登録商標）ＳＤセミドライ転写セルにて２０Ｖで６０分）、乾燥させ、ＴＢＳ中のＩｎｔｅｒｃｅｐｔ（登録商標）ブロッキング緩衝液（９２７－６０００００１、ＬＩ－ＣＯＲ）中で１時間ブロッキングした。ブロットを、０．１％のＴｗｅｅｎ２０を含有するＴＢＳ中のＩｎｔｅｒｃｅｐｔ（登録商標）ブロッキング緩衝液中、一次抗体（１：１，０００）を用いて４℃で一晩インキュベートした。一次抗体はＣｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓから入手した：Ｐｈｏｓｐｈｏ－Ｓｈｃ（Ｔｙｒ２３９／２４０）抗体＃２４３４、Ｐｈｏｓｐｈｏ－Ａｋｔ（Ｓｅｒ４７３）（Ｄ９Ｅ）ＸＰ（登録商標）ウサギモノクローナル抗体＃４０６０、Ｐｈｏｓｐｈｏ－Ｓ６リボソームタンパク質（Ｓｅｒ２３５／２３６）抗体＃２２１１、Ｐｈｏｓｐｈｏ－ｐ４４／４２ ＭＡＰＫ（Ｅｒｋ１／２）（Ｔｈｒ２０２／Ｔｙｒ２０４）抗体＃９１０１、β－アクチン（１３Ｅ５）ウサギモノクローナル抗体＃４９７０、Ｐｈｏｓｐｈｏ－ＪＡＫ１（Ｔｙｒ１０３４／１０３５）（Ｄ７Ｎ４Ｚ）ウサギモノクローナル抗体＃７４１２９、Ｐｈｏｓｐｈｏ－ＪＡＫ３（Ｔｙｒ９８０／９８１）（Ｄ４４Ｅ３）ウサギモノクローナル抗体＃５０３１、Ｐｈｏｓｐｈｏ－Ｓｔａｔ６（Ｔｙｒ６４１）（Ｃ１１Ｃ５）ウサギモノクローナル抗体＃９３６１、及びヒストンＨ３（９６Ｃ１０）マ

ウスモノクローナル抗体＃３６３８。ブロットを０．１％のＴｗｅｅｎ２０を含有するＴＢＳで３回洗浄し、０．１％のＴｗｅｅｎ２０を含有するＴＢＳ緩衝液中で二次抗体（１：１０，０００）と共に室温で３０～６０分間インキュベートした。二次抗体は、Ｃｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓから入手した：抗マウスＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）（ＤｙＬｉｇｈｔ（商標）８００ ４Ｘ ＰＥＧコンジュゲート）＃５２５７及び抗ウサギＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）（ＤｙＬｉｇｈｔ（商標）８００ ４Ｘ ＰＥＧコンジュゲート）＃５１５１。ブロットを洗浄し、ＬＩ－ＣＯＲ Ｏｄｙｓｓｅｙイメージャーで露光した。

【０５７７】

結果

【０５７８】

フローサイトメトリー（図６１）により、Ｇ４Ｒ １３４ ＥＣＤをコードするレンチウイルスベクターで形質導入されたＣＤ３＋Ｔ細胞の大部分（９３．７％）はＧ－ＣＳＦＲ ＥＣＤを発現したが、非形質導入Ｔ細胞は発現しなかった。

【０５７９】

したがって、Ｇ４Ｒ １３４ ＥＣＤは、操作されたＴ細胞の表面で発現させることができる。

【０５８０】

図６２に示すように、Ｇ４Ｒ １３４ ＥＣＤをコードするレンチウイルスベクターで形質導入されたＴ細胞は、ＩＬ－２またはＩＬ－２＋１３０ａ１ Ｇ－ＣＳＦを含む培地中でよく増殖し、１３０ａ１ Ｇ－ＣＳＦのみに応答して中間レベルの増殖を示した（図６２Ａ）。非形質導入Ｔ細胞はＩＬ－２に応答して良好に増殖したが、１３０ａ１ Ｇ－ＣＳＦとＧ－ＣＳＦバリアント３０７との組み合わせには応答を示さなかった（後者はこの実験の別のアームの対照として含まれていた（図示せず））（図６２Ｂ）。どちらの培養物も培地のみでは良好に増殖しなかった。

【０５８１】

したがって、Ｔ細胞上のＧ４Ｒ １３４ ＥＣＤの発現は、１３０ａ１ Ｇ－ＣＳＦに応答して増殖の増加をもたらし、Ｇ４Ｒ １３４ ＥＣＤのハイブリッド細胞内ドメインがＴ細胞において機能的増殖シグナルを伝達することを実証する。

【０５８２】

図６３に示すように、Ｇ４Ｒ １３４ ＥＣＤを発現するＣＤ４＋及びＣＤ８＋Ｔ細胞は、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－２＋ＩＬ－４、１３０ａ１ Ｇ－ＣＳＦ、または１３０ａ１ Ｇ－ＣＳＦ＋ＩＬ－２に応答した増殖（ＢｒｄＵ取り込み）を示した（図６３Ａ）。対照的に、非形質導入ＣＤ４＋Ｔ細胞及びＣＤ８＋Ｔ細胞は、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－２＋ＩＬ－４、及び１３０ａ１ Ｇ－ＣＳＦ＋ＩＬ－２に応答して増殖したが、１３０ａ１ Ｇ－ＣＳＦのみに応答しては増殖しなかった（図６３Ｂ）。この特定の実験ではバックグラウンドの増殖が上昇したＧ４Ｒ １３４ ＥＣＤを発現するＣＤ８＋Ｔ細胞を除いて、どの培養物も培地のみに応答して増殖することはなかった。

【０５８３】

したがって、ＣＤ４＋及びＣＤ８＋Ｔ細胞上のＧ４Ｒ １３４ ＥＣＤの発現は、１３０ａ１ Ｇ－ＣＳＦに応答した増殖の増加をもたらし、ＩＬ－２またはＩＬ－４によって誘導されるレベルと同等または更にはそれを超えるレベルを達成する。これは、Ｇ４Ｒ １３４ ＥＣＤのハイブリッド細胞内ドメインが、Ｔ細胞の機能的増殖シグナルを伝達することを実証する。

【０５８４】

図６４に示すように、非形質導入Ｔ細胞及びＧ４Ｒ １３４ ＥＣＤを発現するＴ細胞の両方において、ＩＬ－２は、ＪＡＫ１、ＪＡＫ３、Ｓｈｃ、Ｅｒｋ１／２、Ａｋｔ、及びＳ６のリン酸化を誘導した。ＩＬ－４はＳＴＡＴ６、ＪＡＫ１、及びＪＡＫ３のリン酸化を誘導したが、Ｅｒｋ１／２、Ａｋｔ、及びＳ６はわずかなリン酸化のみであり、Ｓｈｃはリン酸化しなかった。Ｇ４Ｒ １３４ ＥＣＤを発現するＴ細胞では、１３０ａ１

Ｇ－ＣＳＦはＳＴＡＴ６及びＪＡＫ１のリン酸化を誘導し、Ｅｒｋ１／２、Ａｋｔ、及びＳ６は中級のリン酸化であり（ＩＬ－２と比較して）、ＪＡＫ３またはＳｈｃはリン酸化しなかった。Ｇ４Ｒ　１３４　ＥＣＤが、ＪＡＫ３ではなくＪＡＫ２に結合する、ヒトＧ－ＣＳＦＲのＢｏｘ１及び２領域を使用していることを考えると、ＪＡＫ３のリン酸化の欠如が予想される。予想されたように、１３０ａは、非形質導入Ｔ細胞中でシグナル伝達イベントを誘導しなかった。

【０５８５】

したがって、Ｇ４Ｒ　１３４　ＥＣＤのハイブリッド細胞内ドメインは、天然のＩＬ－４受容体と同じ生化学的シグナル伝達イベントのうちの多く、特にＳＴＡＴ６のチロシンリン酸化を活性化する。

【０５８６】

実施例４０：Ｇ－ＣＳＦＲ受容体由来のバリアント細胞外ドメイン及びＩＬ－６受容体β（ｇｐ１３０）由来の細胞内シグナル伝達ドメインを有するキメラ受容体の構築及び機能評価

ヒトＩＬ－６受容体ベータ（ｇｐ１３０）の細胞内ドメインの一部に融合した、ヒトＧ－ＣＳＦＲの細胞外ドメイン（１３４バリアント）、膜貫通ドメイン、ならびにＢｏｘ１及び２領域を含む、Ｇ６Ｒ　１３４　ＥＣＤと呼ばれるキメラ受容体（図６０）が合成された。キメラ受容体サブユニットは、ヒトＣＤ４＋及びＣＤ８＋Ｔ細胞に形質導入するために使用されるレンチウイルスベクター中でコードされた。形質導入されたＴ細胞（及び非形質導入対照Ｔ細胞）をフローサイトメトリーによって分析して、Ｇ６Ｒ　１３４　ＥＣＤの細胞表面発現を検出した。Ｇ６Ｒ　１３４　ＥＣＤがＴ細胞の拡大及び増殖を誘導する能力をｉｎ　ｖｉｔｒｏで評価した。Ｇ６Ｒ　１３４　ＥＣＤによって媒介される生化学的シグナル伝達イベントを、ＳＴＡＴ３及びＳＴＡＴ５に対するｐｈｏｓｐｈｏ－特異的抗体を使用するウエスタンブロットによって評価した。

【０５８７】

方法

【０５８８】

一般に、実施例３９に記載されるものと同様の方法に従ったが、実験は、ＩＬ－６シグナル伝達機構に焦点を当てるように調整された。例えば、ＩＬ－４の代わりにＩＬ－６が参照サイトカインとして使用された。

【０５８９】

実施例３９に従い、ヒトＴ細胞はＧ６Ｒ　１３４　ＥＣＤを発現するように操作され、８日目に、フローサイトメトリーにより形質導入効率が測定された。

【０５９０】

Ｔ細胞を、ＩＬ－２（３００　ＩＵ／ｍｌ）、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ（１００ｎｇ／ｍｌ）、ＩＬ－２＋１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ（それぞれ３００ＩＵ／ｍｌ及び１００ｎｇ／ｍｌ）、または培地のみ（サイトカイン無添加）中で１６日間増殖させ、培地及び指定されたサイトカインを２日毎に交換した。増殖の４、８、１２、及び１６日目に、Ｃｙｔｅｋ（商標）Ａｕｒｏｒａフローサイトメーターを使用してＴ細胞を計数した。

【０５９１】

ＢｒｄＵ取り込みアッセイでは、増殖１２日目にＴ細胞をＩＬ－２培養条件から回収し、ＰＢＳで２回、完全ＴｅｘＭＡＣＳ培地で１回洗浄した。細胞を、以下の関連するアッセイサイトカインを含む新鮮な完全ＴｅｘＭＡＣＳ培地に再プレーティングした：ＩＬ－２（３００ＩＵ／ｍｌ）、ＩＬ－６（１００ｎｇ／ｍｌ）、ＩＬ－２＋ＩＬ－６（それぞれ３００ＩＵ／ｍｌ及び１００ｎｇ／ｍｌ）、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ（１００ｎｇ／ｍｌ）、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ＋ＩＬ－２（それぞれ３００ＩＵ／ｍｌ及び１００ｎｇ／ｍｌ）、または培地のみ（サイトカイン無添加）。細胞を、３７℃、５％CO_2で４８時間培養した。ＢｒｄＵ取り込みアッセイは、実施例３９に記載されるように実施した。

【０５９２】

ウエスタンブロット実験では、細胞をＩＬ－２（３００ＩＵ／ｍｌ）中で１８日間増殖

させ、続いて上記のように洗浄し、完全ＴｅｘＭＡＣＳ培地中で一晩静置した。翌日、細胞を、培地のみ、または培地及びＩＬ－２（３００ＩＵ／ｍｌ）、ＩＬ－６（１００ｎｇ／ｍｌ）、もしくは１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ（１００ｎｇ／ｍｌ）を用いて３７℃で２０分間刺激した。細胞質及び核画分を調製し、実施例３９に記載したようにウエスタンブロットを実施した。一次抗体はＣｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓから入手した：Ｐｈｏｓｐｈｏ－Ｓｔａｔ３（Ｔｙｒ７０５）（Ｄ３Ａ７）ウサギｍＡｂ＃９１４５、Ｐｈｏｓｐｈｏ－Ｓｔａｔ５（Ｔｙｒ６９４）（Ｃ１１Ｃ５）ウサギｍＡｂ＃９３５９、及びヒストンＨ３（９６Ｃ１０）マウスｍＡｂ＃３６３８。

【０５９３】

結果

【０５９４】

フローサイトメトリー（図６５）により、Ｇ６Ｒ　１３４　ＥＣＤをコードするレンチウイルスベクターで形質導入されたＣＤ３＋Ｔ細胞の大部分（９３．７％）はＧ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤを発現したが、非形質導入Ｔ細胞は発現しなかった。

【０５９５】

したがって、Ｇ６Ｒ　１３４　ＥＣＤは、操作されたＴ細胞の表面で発現させることができる。

【０５９６】

図６６に示すように、Ｇ６Ｒ　１３４　ＥＣＤをコードするレンチウイルスベクターで形質導入されたＴ細胞は、ＩＬ－２を含む培地中でよく増殖し、ＩＬ－２＋１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦに応答して中間レベルの増殖を示し、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦのみに応答して乏しい増殖を示した（図６６Ａ）。非形質導入Ｔ細胞は、ＩＬ－２に応答して良好に増殖したが、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦに応答して良好に増殖はしなかった（図６６Ｂ）。どちらの培養物も培地のみでは良好に増殖しなかった。

【０５９７】

したがって、この増殖アッセイにより評価すると、Ｇ６Ｒ　１３４　ＥＣＤは、Ｔ細胞で増殖シグナルを誘導しないものと思われる。

【０５９８】

図６７に示すように、Ｇ６Ｒ　１３４　ＥＣＤを発現するＣＤ４＋及びＣＤ８＋Ｔ細胞は、ＩＬ－２、ＩＬ－２＋ＩＬ－６または１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ＋ＩＬ－２に応答した増殖（ＢｒｄＵ取り込み）を示し、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦは、ＣＤ４＋Ｔ細胞のわずかな増殖、及びＣＤ８＋Ｔ細胞の弱い増殖を誘導した（図６７Ａ）。対照的に、非形質導入ＣＤ４＋Ｔ細胞及びＣＤ８＋Ｔ細胞は、ＩＬ－２、ＩＬ－２＋ＩＬ－６、及び１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ＋ＩＬ－２に応答して増殖したが、ＩＬ－６または１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦのみに応答しては増殖しなかった（図６７Ｂ）。この特定の実験では、バックグラウンドの増殖が上昇したＧ６Ｒ　１３４　ＥＣＤを発現するＣＤ８＋Ｔ細胞を除き、どの培養物も培地のみに応答して増殖することはなかった。

【０５９９】

したがって、Ｇ６Ｒ　１３４　ＥＣＤは、ＣＤ８＋Ｔ細胞及びＣＤ４＋Ｔ細胞においてそれぞれ弱いまたは中程度の増殖シグナルを誘導するものと思われる。

【０６００】

図６８に示すように、非形質導入Ｔ細胞及びＧ６Ｒ　１３４　ＥＣＤを発現するＴ細胞の両方において、ＩＬ－２はＳＴＡＴ３（矢印）及びＳＴＡＴ５のチロシンリン酸化を誘導し、その一方で、ＩＬ－６はＳＴＡＴ３のチロシンリン酸化を誘導したが、ＳＴＡＴ５のチロシンリン酸化を誘導しなかった。Ｇ６Ｒ　１３４　ＥＣＤを発現するＴ細胞において、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦはＳＴＡＴ３のチロシンリン酸化を誘導したが、ＳＴＡＴ５のチロシンリン酸化を誘導しなかった。１３０ａは、非形質導入Ｔ細胞中でＳＴＡＴ３またはＳＴＡＴ５のチロシンリン酸化を誘導しなかった。Ｐ－ＳＴＡＴ３の画像上では、ＩＬ－２刺激条件下（特に非形質導入Ｔ細胞中の）で暗色の高分子バンドが現れることに留意されたい。これは、ｐｈｏｓｐｈｏ－ＳＴＡＴ５抗体を使用したこの膜の以前のプロー

ビングからの残留シグナルである。低分子量バンド（矢印）はｐｈｏｓｐｈｏ－ＳＴＡＴ３を表す。

【０６０１】

したがって、Ｇ６Ｒ　１３４　ＥＣＤのハイブリッド細胞内ドメインは、Ｔ細胞中でＩＬ－６によって誘導されるものと同様のＳＴＡＴリン酸化のパターンを誘導する。

【０６０２】

実施例４１：Ｇ－ＣＳＦＲ受容体由来のバリアント細胞外ドメイン及びＥＰＯ受容体の細胞内ドメインを有するキメラ受容体の構築及び機能評価

ヒトＥＰＯ受容体の細胞内ドメイン全体に融合したヒトＧ－ＣＳＦＲの細胞外ドメイン（１３４バリアント）及び膜貫通ドメインを含む、ＧＥＰＯＲ　１３４　ＥＣＤと呼ばれるキメラ受容体（図６０）が合成された。キメラ受容体サブユニットは、ヒトＣＤ４＋及びＣＤ８＋Ｔ細胞に形質導入するために使用されるレンチウイルスベクター中でコードされた。形質導入されたＴ細胞（及び非形質導入対照Ｔ細胞）をフローサイトメトリーによって分析して、ＧＥＰＯＲ　１３４　ＥＣＤの細胞表面発現を検出した。ＧＥＰＯＲ　１３４　ＥＣＤがＴ細胞の増殖を誘導する能力をｉｎ　ｖｉｔｒｏで評価した。ＧＥＰＯＲ　１３４　ＥＣＤによって媒介される生化学的シグナル伝達イベントを、ＳＴＡＴ５及び他のシグナル伝達媒介物に対するｐｈｏｓｐｈｏ－特異的抗体を使用するウエスタンブロットによって評価した。

【０６０３】

方法

一般に、実施例３９に記載されるものと同様の方法に従ったが、実験は、ＥＰＯ－Ｒ及びＩＬ－２シグナル伝達機構に焦点を当てるように調整された。

【０６０４】

実施例３９に従い、ヒトＴ細胞はＧＥＰＯＲ　１３４　ＥＣＤを発現するように操作され、８日目に、フローサイトメトリーにより形質導入効率が測定された。

【０６０５】

Ｔ細胞を、ＩＬ－２（３００　ＩＵ／ｍｌ）、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ（１００ｎｇ／ｍｌ）、ＩＬ－２＋１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ（それぞれ３００ＩＵ／ｍｌ及び１００ｎｇ／ｍｌ）、または培地のみ（サイトカイン無添加）中で１６日間増殖させ、培地及び指定されたサイトカインを２日毎に交換した。非形質導入Ｔ細胞の場合、３０７　Ｇ－ＣＳＦは、この実験の別のアーム（図示せず）の対照として機能するために、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦと共に添加された。この実験の利便性の使用は、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦまたは３０７　Ｇ－ＣＳＦのどちらも、非形質導入Ｔ細胞中で増殖またはその他のシグナル伝達イベントを誘導しないという事実によって正当化された。増殖の４、８、１２、及び１６日目に、Ｃｙｔｅｋ（商標）Ａｕｒｏｒａフローサイトメーターを使用してＴ細胞を計数した。

【０６０６】

ウエスタンブロット実験では、細胞をＩＬ－２（３００ＩＵ／ｍｌ）中で１８日間増殖させ、続いて上記のように洗浄し、完全ＴｅｘＭＡＣＳ培地中で一晩静置した。翌日、細胞を、培地のみ、または培地及びＩＬ－２（３００ＩＵ／ｍｌ）、もしくは１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ（１００ｎｇ／ｍｌ）を用いて３７℃で２０分間刺激した。細胞質及び核画分を調製し、実施例３９に記載したようにウエスタンブロットを実施した。一次抗体はＣｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓから入手した：Ｐｈｏｓｐｈｏ－Ｓｔａｔ５（Ｔｙｒ６９４）（Ｃ１１Ｃ５）ウサギｍＡｂ＃９３５９、ヒストンＨ３（９６Ｃ１０）マウスｍＡｂ＃３６３８、Ｐｈｏｓｐｈｏ－ＪＡＫ２（Ｔｙｒ１００７／１００８）抗体＃３７７１、Ｐｈｏｓｐｈｏ－Ａｋｔ（Ｓｅｒ４７３）（Ｄ９Ｅ）ＸＰ（登録商標）ウサギｍＡｂ＃４０６０、Ｐｈｏｓｐｈｏ－ｐ４４／４２　ＭＡＰＫ（Ｅｒｋ１／２）（Ｔｈｒ２０２／Ｔｙｒ２０４）抗体＃９１０１、及びβ－アクチン（１３Ｅ５）ウサギｍＡｂ＃４９７０。

【０６０７】

結果

フローサイトメトリー（図６９）により、ＧＥＰＯＲ　１３４　ＥＣＤをコードするレンチウイルスベクターで形質導入されたＣＤ３＋Ｔ細胞の大部分（９６．５％）はＧ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤを発現したが、非形質導入Ｔ細胞は発現しなかった。

【０６０８】

したがって、ＧＥＰＯＲ　１３４　ＥＣＤは、操作されたＴ細胞の表面で発現させることができる。

【０６０９】

図７０に示すように、ＧＥＰＯＲ　１３４　ＥＣＤをコードするレンチウイルスベクターで形質導入されたＴ細胞は、ＩＬ－２またはＩＬ－２＋１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦを含む培地中でよく増殖し、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦのみに応答して中間レベルの増殖を示した（図６４Ａ）。非形質導入Ｔ細胞は、ＩＬ－２に応答して良好に増殖したが、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ＋３０７　Ｇ－ＣＳＦに応答して良好に増殖はしなかった（図７０Ｂ）。どちらの培養物も培地のみでは良好に増殖しなかった。

【０６１０】

したがって、この増殖アッセイにより評価すると、ＧＥＰＯＲ　１３４　ＥＣＤは、Ｔ細胞で中級の増殖シグナルを誘導するものと思われる。

【０６１１】

図７１に示すように、非形質導入Ｔ細胞及びＧＥＰＯＲ　１３４　ＥＣＤを発現するＴ細胞の両方において、ＩＬ－２はＳＴＡＴ５、Ａｋｔ及びＥｒｋ１／２のリン酸化を誘導した。ＩＬ－２に応答したＪＡＫ２の見掛けリン酸化は、抗ｐｈｏｓｐｈｏ－ＪＡＫ２抗体とｐｈｏｓｐｈｏ－ＪＡＫ３との交差反応性が原因である（矢印で示される、実際のＪＡＫ２と比較したタンパク質サイズの違いに注意されたい）。ＧＥＰＯＲ　１３４　ＥＣＤを発現するＴ細胞では、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦは、ＳＴＡＴ５、ＪＡＫ２（矢印）、及びＥｒｋ１／２のリン酸化、ならびにＡｋｔの弱いリン酸化を誘導した。予想されたように、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦは、非形質導入Ｔ細胞中で生化学的シグナル伝達イベントを誘導しなかった。

【０６１２】

したがって、ＧＥＰＯＲ　１３４　ＥＣＤは、ＩＬ－２によって誘導されるものと類似するが、Ａｋｔの弱いリン酸化、及びＪＡＫ３ではなくＪＡＫ２の予期される活性化を伴う、生化学的シグナル伝達イベントを誘導する。

【０６１３】

実施例４２：Ｇ－ＣＳＦＲ受容体由来のバリアント細胞外ドメイン及びインターフェロンアルファ受容体２の細胞内ドメインを有するキメラ受容体の構築及び機能評価

ヒトインターフェロン受容体アルファ２の細胞内ドメインの一部に融合した、ヒトＧ－ＣＳＦＲの細胞外ドメイン（１３４バリアント）、膜貫通ドメイン、ならびにＢｏｘ１及び２領域を含む、ＧＩＦＮＡＲ　１３４　ＥＣＤと呼ばれるキメラ受容体（図６０）が合成された。キメラ受容体サブユニットは、ヒトＣＤ４＋及びＣＤ８＋Ｔ細胞に形質導入するために使用されるレンチウイルスベクター中でコードされた。形質導入されたＴ細胞（及び非形質導入対照Ｔ細胞）をフローサイトメトリーによって分析して、ＧＩＦＮＡＲ　１３４　ＥＣＤの細胞表面発現を検出した。ＧＩＦＮＡＲ　１３４　ＥＣＤがＴ細胞の増殖を誘導する能力をｉｎ　ｖｉｔｒｏで評価した。ＧＩＦＮＡＲ　１３４　ＥＣＤによって媒介される生化学的シグナル伝達イベントを、ＳＴＡＴ１、ＳＴＡＴ２、及び他のシグナル伝達媒介物に対するｐｈｏｓｐｈｏ－特異的抗体を使用するウエスタンブロットによって評価した。

【０６１４】

方法

一般に、実施例３９に記載されるものと同様の方法に従ったが、実験は、ＩＦＮアルファシグナル伝達機構に焦点を当てるように調整された。

【０６１５】

実施例３９に従い、ヒトＴ細胞はＧＩＦＮＡＲ　１３４　ＥＣＤを発現するように操作され、８日目に、フローサイトメトリーにより形質導入効率が測定された。

【０６１６】

Ｔ細胞を、ＩＬ－２（３００　ＩＵ／ｍｌ）、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ（１００ｎｇ／ｍｌ）、ＩＬ－２＋１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ（それぞれ３００ＩＵ／ｍｌ及び１００ｎｇ／ｍｌ）、または培地のみ（サイトカイン無添加）中で１６日間増殖させ、培地及び指定されたサイトカインを２日毎に交換した。増殖の４、８、１２、及び１６日目に、Ｃｙｔｅｋ（商標）Ａｕｒｏｒａフローサイトメーターを使用してＴ細胞を計数した。

【０６１７】

ウエスタンブロット実験では、細胞をＩＬ－２（３００ＩＵ／ｍｌ）中で１８日間増殖させ、続いて上記のように洗浄し、完全ＴｅｘＭＡＣＳ培地中で一晩静置した。翌日、細胞を、培地のみ、または培地及びＩＬ－２（３００ＩＵ／ｍｌ）、ＩＦＮα（３００ＩＵ／ｍｌ）、もしくは１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ（１００ｎｇ／ｍｌ）を用いて３７℃で２０分間刺激した。細胞質及び核画分を調製し、実施例３９に記載したようにウエスタンブロットを実施した。一次抗体はＣｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓから入手した：Ｐｈｏｓｐｈｏ－Ｓｔａｔ１（Ｔｙｒ７０１）（５８Ｄ６）ウサギｍＡｂ＃９１６７、Ｐｈｏｓｐｈｏ－Ｓｔａｔ２（Ｔｙｒ６９０）（Ｄ３Ｐ２Ｐ）ウサギｍＡｂ＃８８４１０、ヒストンＨ３（９６Ｃ１０）マウスｍＡｂ＃３６３８、Ｐｈｏｓｐｈｏ－ＪＡＫ１（Ｔｙｒ１０３４／１０３５）（Ｄ７Ｎ４Ｚ）ウサギｍＡｂ＃７４１２９、Ｐｈｏｓｐｈｏ－Ａｋｔ（Ｓｅｒ４７３）（Ｄ９Ｅ）ＸＰ（登録商標）ウサギｍＡｂ＃４０６０、Ｐｈｏｓｐｈｏ－Ｓ６リボソームタンパク質（Ｓｅｒ２３５／２３６）抗体＃２２１１、及びβ－アクチン（１３Ｅ５）ウサギｍＡｂ＃４９７０。

【０６１８】

結果

フローサイトメトリー（図７２）により、ＧＩＦＮＡＲ　１３４　ＥＣＤをコードするレンチウイルスベクターで形質導入されたＣＤ３＋Ｔ細胞の大部分（９７．９％）はＧ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤを発現したが、非形質導入Ｔ細胞は発現しなかった。

【０６１９】

したがって、ＧＩＦＮＡＲ　１３４　ＥＣＤは、操作されたＴ細胞の表面で発現させることができる。

【０６２０】

図７３に示すように、ＧＩＦＮＡＲ　１３４　ＥＣＤをコードするレンチウイルスベクターで形質導入されたＴ細胞は、ＩＬ－２を含む培地中では良好に増殖したが、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦのみまたはＩＬ－２＋１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦを含む培地中では著しく減少した増殖を示した。実際、これら後者の２つの条件下での増殖のレベルは、培地のみで見られるものよりも劣るように見えた（図７３Ｂ）。非形質導入Ｔ細胞は、ＩＬ－２に応答して良好に増殖したが、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦに応答して良好に増殖はしなかった（図７３Ａ）。どちらの培養物も培地のみでは良好に増殖しなかった。

【０６２１】

したがって、この増殖アッセイにより評価すると、ＧＩＦＮＡＲ　１３４　ＥＣＤは、Ｔ細胞で増殖阻害シグナルを誘導するものと思われる。

【０６２２】

図７４に示すように、非形質導入Ｔ細胞及びＧＩＦＮＡＲ　１３４　ＥＣＤを発現するＴ細胞の両方において、ＩＬ－２は、ＳＴＡＴ１の弱いリン酸化、ならびにＪＡＫ１、ＡｋｔおよびＳ６の典型的なレベルのリン酸化を誘導した。非形質導入Ｔ細胞、及びＧＩＦＮＡＲ　１３４　ＥＣＤを発現するＴ細胞の両方において、ＩＦＮαは、ＳＴＡＴ１及びＳＴＡＴ２の強いリン酸化を誘導し、ＪＡＫ１、ＡｋｔまたはＳ６の見掛けのリン酸化はなかった。ＧＩＦＮＡＲ　１３４　ＥＣＤを発現するＴ細胞では、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦはＳＴＡＴ１、ＳＴＡＴ２、及びＪＡＫ１の強いリン酸化を誘導し、ＡｋｔまたはＳ６の見掛けのリン酸化は存在しなかった。１３０ａは、非形質導入Ｔ細胞中で生化学的シグ

ナル伝達イベントを誘導しなかった。
【０６２３】
したがって、ＧＩＦＮＡＲ　１３４　ＥＣＤは、ＩＦＮαによって誘導されるものと類似の生化学的シグナル伝達イベントを誘導する。
【０６２４】
実施例４３：Ｇ－ＣＳＦＲ受容体由来のバリアント細胞外ドメイン及びインターフェロンガンマ受容体由来の細胞内シグナル伝達ドメインを有するキメラ受容体の構築及び機能評価
ＧＩＦＮＧＲ－１　３０７　ＥＣＤ及びＧＩＦＮＧＲ－２　３０７　ＥＣＤと呼ばれる２つのキメラ受容体（図６０）が合成された。ＧＩＦＮＧＲ－１　３０７　ＥＣＤは、ヒトＩＦＮγＲ２のＢｏｘ１及び２領域、ならびにヒトＩＦＮγＲ１の細胞内ドメイン由来のＳＴＡＴ１結合部位に融合した、ヒトＧ－ＣＳＦＲの細胞外ドメイン（３０７バリアント）及び膜貫通ドメインを含む。ＧＩＦＮＧＲ－２　３０７　ＥＣＤは、細胞外ドメイン（３０７バリアント）、膜貫通ドメイン、ならびにヒトＩＦＮγＲ１の細胞内ドメイン由来のＳＴＡＴ１結合部位に融合したヒトＧ－ＣＳＦＲのＢｏｘ１及び２領域を含む。キメラ受容体サブユニットは、ヒトＣＤ４＋及びＣＤ８＋Ｔ細胞に形質導入するために使用される別個のレンチウイルスベクター中でコードされた。形質導入されたＴ細胞（及び非形質導入対照Ｔ細胞）をフローサイトメトリーによって分析して、ＧＩＦＮＧＲ－１　３０７　ＥＣＤ及びＧＩＦＮＧＲ－２　３０７　ＥＣＤの細胞表面発現を検出した。ＧＩＦＮＧＲ－１　３０７　ＥＣＤ及びＧＩＦＮＧＲ－２　３０７　ＥＣＤがＴ細胞の増殖を誘導する能力をｉｎ　ｖｉｔｒｏで評価した。ＧＩＦＮＧＲ－１　３０７　ＥＣＤ及びＧＩＦＮＧＲ－２　３０７　ＥＣＤによって媒介される生化学的シグナル伝達イベントを、ＳＴＡＴ１及び他のシグナル伝達媒介物に対するｐｈｏｓｐｈｏ－特異的抗体を使用するウエスタンブロットによって評価した。
【０６２５】
方法
一般に、実施例３９に記載されるものと同様の方法に従ったが、実験は、ＩＦＮガンマシグナル伝達機構に焦点を当てるように調整された。
【０６２６】
ヒトＴ細胞を、ＧＩＦＮＧＲ－１　３０７　ＥＣＤまたはＧＩＦＮＧＲ－２　３０７　ＥＣＤをコードするレンチウイルスベクターで形質導入した。更に、一部のＴ細胞は、ＧＩＦＮＧＲ－１　３０７　ＥＣＤ及びＧ２Ｒ－３　１３４　ＥＣＤ、またはＧＩＦＮＧＲ－２　３０７　ＥＣＤ及びＧ２Ｒ－３　１３４　ＥＣＤをコードするレンチウイルスベクターで共形質導入した。Ｇ２Ｒ－３　１３４　ＥＣＤは、Ｎ末端にＭｙｃエピトープ（ＥＱＫＬＩＳＥＥＤＬ）をタグ付けされ、ＧＩＦＮＧＲ－１　３０７　ＥＣＤ及びＧＩＦＮＧＲ－２　３０７　ＥＣＤは、Ｎ末端にＦｌａｇエピトープ（ＤＹＫＤＤＤＤＫ）をタグ付けされ、異なる受容体サブユニットがフローサイトメトリーによって識別されることが可能となった。
【０６２７】
実施例３９に従い、８日目に、フローサイトメトリーにより形質導入効率を測定した。ＦｌａｇタグＭｙｃタグは、それぞれＢＶ４２１コンジュゲート抗体及びＡｌｅｘａＦｌｕｏｒ（商標）４８８コンジュゲート抗体を使用して検出した。
【０６２８】
Ｔ細胞を、ＩＬ－２（３００　ＩＵ／ｍｌ）、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ及び／または３０７（各１００ｎｇ／ｍｌ）、ＩＬ－２＋１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ（それぞれ３００ＩＵ／ｍｌ及び１００ｎｇ／ｍｌ）、ＩＬ－２＋３０７　Ｇ－ＣＳＦ（それぞれ３００ＩＵ／ｍｌ及び１００ｎｇ／ｍｌ）、または培地のみ（サイトカイン無添加）の中で１８日間増殖させた。培地及び指定されたサイトカインを、２日毎に交換した。増殖の４、８、１２、及び１６日目に、Ｃｙｔｅｋ（商標）Ａｕｒｏｒａフローサイトメーターを使用してＴ細胞を計数した。

【０６２９】
ＢｒｄＵ取り込みアッセイのために、ＩＬ－２中で増殖させたＴ細胞を１２日目に採取し、ＰＢＳで２回、完全ＴｅｘＭＡＣＳ培地で１回洗浄した。細胞を、培地のみもしくは培地及びＩＬ－２（３００ＩＵ／ｍｌ）、ＩＦＮγ（１００ｎｇ／ｍｌ）、ＩＬ－２＋ＩＦＮγ（それぞれ３００ＩＵ／ｍｌ及び１００ｎｇ／ｍｌ）、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ（１００ｎｇ／ｍｌ）、３０７　Ｇ－ＣＳＦ（１００ｎｇ／ｍｌ）、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ＋３０７　Ｇ－ＣＳＦ（各１００ｎｇ／ｍｌ）、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ＋ＩＦＮγ（各１００ｎｇ／ｍｌ）、または３０７　Ｇ－ＣＳＦ＋ＩＬ－２γ（それぞれ１００ｎｇ／ｍｌ及び３００ＩＵ／ｍｌ）を含む新鮮な完全ＴｅｘＭＡＣＳ培地に再プレーティングした。細胞を、３７℃、５％ＣＯ２で４８時間インキュベートした。ＢｒｄＵアッセイは、実施例３９に記載されるように実施した。
【０６３０】
ウエスタンブロット実験では、Ｔ細胞をＩＬ－２（３００ＩＵ／ｍｌ）中で１８日間増殖させ、上記のように洗浄し、完全ＴｅｘＭＡＣＳ培地中で一晩静置した。翌日、細胞を、培地のみ、または培地及びＩＬ－２（３００ＩＵ／ｍｌ）、ＩＦＮγ（１００ｎｇ／ｍｌ）、もしくは３０７　Ｇ－ＣＳＦ（１００ｎｇ／ｍｌ）を用いて３７℃で２０分間刺激した。細胞質及び核画分を調製し、実施例３９に記載したようにウエスタンブロットを実施した。一次抗体はＣｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓから入手した：Ｐｈｏｓｐｈｏ－Ｓｔａｔ１（Ｔｙｒ７０１）（５８Ｄ６）ウサギｍＡｂ＃９１６７、ヒストンＨ３（９６Ｃ１０）マウスｍＡｂ＃３６３８、Ｐｈｏｓｐｈｏ－ＪＡＫ２（Ｔｙｒ１００７／１００８）抗体＃３７７１、Ｐｈｏｓｐｈｏ－Ａｋｔ（Ｓｅｒ４７３）（Ｄ９Ｅ）ＸＰ（登録商標）ウサギｍＡｂ＃４０６０、Ｐｈｏｓｐｈｏ－Ｓ６リボソームタンパク質（Ｓｅｒ２３５／２３６）抗体＃２２１１、及びβ－アクチン（１３Ｅ５）ウサギｍＡｂ＃４９７０。
【０６３１】
結果
フローサイトメトリー（図７５）により、ＧＩＦＮＧＲ－１　３０７　ＥＣＤをコードするレンチウイルスベクターで形質導入されたＣＤ３＋Ｔ細胞の大部分（９３．８％）は、Ｇ－ＣＳＦＲ　３０７　ＥＣＤ上にＦｌａｇエピトープを発現した（図７５Ａ）。同様に、Ｇ２Ｒ－３　１３４　ＥＣＤをコードするレンチウイルスベクターで形質導入されたＣＤ３＋Ｔ細胞の大部分（５１．７％）が、Ｇ－ＣＳＦＲ　１３４　ＥＣＤ上でＭｙｃエピトープを発現した（図７５Ｂ）。ＧＩＦＮＧＲ－１　３０７　ＥＣＤ及びＧ２Ｒ－３　１３４　ＥＣＤをコードするレンチウイルスベクターで共形質導入されたＴ細胞の場合、３２．０％が、Ｇ－ＣＳＦＲ　３０７及び１３４　ＥＣＤ上でＦｌａｇ及びＭｙｃエピトープの両方をそれぞれ共発現した（図６９Ｃ）。予測された通り、非形質導入Ｔ細胞は、ＭｙｃエピトープまたはＦｌａｇエピトープのいずれも発現しなかった（図７５Ｄ）。
【０６３２】
したがって、ＧＩＦＮＧＲ－１　３０７　ＥＣＤは、Ｇ２Ｒ－３　１３４　ＥＣＤの有無にかかわらず、操作されたＴ細胞の表面で発現させることができる。
【０６３３】
同様のフローサイトメトリーの結果が、ＧＩＦＮＧＲ－２　３０７　ＥＣＤで得られた（図７６）。ＧＩＦＮＧＲ－２　３０７　ＥＣＤをコードするレンチウイルスベクターで形質導入されたＣＤ３＋Ｔ細胞の大部分（９７．６％）が、Ｇ－ＣＳＦＲ　３０７　ＥＣＤ上でＦｌａｇエピトープを発現した（図７６Ａ）。同様に、Ｇ２Ｒ－３　１３４　ＥＣＤをコードするレンチウイルスベクターで形質導入されたＣＤ３＋Ｔ細胞の大部分（５１．７％）が、Ｇ－ＣＳＦＲ　１３４　ＥＣＤ上でＭｙｃエピトープを発現した（図７６Ｂ；これは図７５Ｂと同じデータである）。ＧＩＦＮＧＲ－２　３０７　ＥＣＤ及びＧ２Ｒ－３　１３４　ＥＣＤをコードするレンチウイルスベクターで共形質導入されたＴ細胞の場合、３２．６％が、Ｇ－ＣＳＦＲ　３０７及び１３４　ＥＣＤ上でＦｌａｇ及びＭｙｃエピトープの両方をそれぞれ共発現した（図７６Ｃ）。予測された通り、非形質導入Ｔ細

胞は、ＭｙｃエピトープまたはＦｌａｇエピトープのいずれも発現しなかった（図７６Ｄ；これは図７５Ｄと同じデータである）。

【０６３４】

したがって、ＧＩＦＮＧＲ－２　３０７　ＥＣＤは、Ｇ２Ｒ－３　１３４　ＥＣＤの有無にかかわらず、操作されたＴ細胞の表面で発現させることができる。

【０６３５】

図７１に示すように、ＧＩＦＮＧＲ－１　３０７　ＥＣＤをコードするレンチウイルスベクターで形質導入されたＴ細胞は、ＩＬ－２またはＩＬ－２＋３０７　Ｇ－ＣＳＦを含む培地中では良好に増殖したが、３０７　Ｇ－ＣＳＦのみ、または培地のみの場合はそうならなかった（図７７Ｂ）。ＧＩＦＮＧＲ－１　３０７　ＥＣＤ及びＧ２Ｒ－３　１３４　ＥＣＤをコードするレンチウイルスベクターで共形質導入されたＴ細胞は、ＩＬ－２またはＩＬ－２＋１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦを含む培地中でよく増殖した（図７７Ｃ）。これらのＴ細胞が１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ＋３０７　Ｇ－ＣＳＦ中で培養された場合は、これらは１２日目に増殖の減少を示し、これは１６日目までに増加した（図７７Ｃ）。非形質導入Ｔ細胞は、ＩＬ－２に応答して良好に増殖したが、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ＋３０７　Ｇ－ＣＳＦに応答して良好に増殖はしなかった（図７７Ａ）。Ｔ細胞株のいずれも、培地のみではよく増殖しなかった。

【０６３６】

したがって、この増殖アッセイにより評価すると、Ｔ細胞の増殖に対するＧＩＦＮＧＲ－１　３０７　ＥＣＤの影響は無視できる程度であると思われる。

【０６３７】

図７８に示すように、ＧＩＦＮＧＲ－２　３０７　ＥＣＤをコードするレンチウイルスベクターで形質導入されたＴ細胞は、ＩＬ－２を含む培地中では良好に増殖したが、３０７　Ｇ－ＣＳＦのみ、ＩＬ－２＋３０７　Ｇ－ＣＳＦ、または培地のみを含む培地ではそうならなかった（図７８Ｂ）。ＧＩＦＮＧＲ－２　３０７　ＥＣＤ及びＧ２Ｒ－３　１３４　ＥＣＤをコードするレンチウイルスベクターで共形質導入されたＴ細胞は、ＩＬ－２またはＩＬ－２＋１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦを含む培地中でよく増殖した（図７８Ｃ）。これらのＴ細胞は、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ＋３０７　Ｇ－ＣＳＦ中で培養した場合は増殖できなかった（図７８Ｃ）。非形質導入Ｔ細胞は、ＩＬ－２に応答して良好に増殖したが、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ＋３０７　Ｇ－ＣＳＦに応答して良好に増殖はしなかった（図７８Ａ；これは図７７Ａと同じデータを示す）。Ｔ細胞株のいずれも、培地のみではよく増殖しなかった。

【０６３８】

したがって、この増殖アッセイにより評価すると、ＧＩＦＮＧＲ－２　３０７　ＥＣＤはＴ細胞の増殖を阻害するもとと思われる。

【０６３９】

図７９に示すように、非形質導入ＣＤ４＋及びＣＤ８＋Ｔ細胞は、ＩＬ－２、ＩＬ－２＋ＩＦＮγ、及び３０７　Ｇ－ＣＳＦ＋ＩＬ－２に応答して増殖を示した（ＢｒｄＵ取り込み）（図７９Ａ）。

【０６４０】

Ｇ２Ｒ－３　１３４　ＥＣＤのみを発現するＣＤ４＋及びＣＤ８＋Ｔ細胞は、ＩＬ－２、ＩＬ－２＋ＩＦＮγ、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ＋３０７　Ｇ－ＣＳＦ、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ＋ＩＦＮγ、及び３０７　Ｇ－ＣＳＦ＋ＩＬ－２に応答して増殖を示した（図７９Ｂ、Ｃ）。

【０６４１】

ＧＩＦＮＧＲ－１　３０７　ＥＣＤのみを発現するＣＤ４＋及びＣＤ８＋Ｔ細胞は、ＩＬ－２、ＩＬ－２＋ＩＦＮγ、及び３０７　Ｇ－ＣＳＦ＋ＩＬ－２に応答して増殖を示した（図７９Ｂ、Ｃ）。

【０６４２】

ＧＩＦＮＧＲ－１　３０７　ＥＣＤ及びＧ２Ｒ－３　１３４　ＥＣＤを共発現するＣＤ

４＋及びＣＤ８＋Ｔ細胞は、ＩＬ－２、ＩＬ－２＋ＩＦＮγ、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ＋３０７　Ｇ－ＣＳＦ、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ＋ＩＦＮγ、及び３０７　Ｇ－ＣＳＦ＋ＩＬ－２に応答して増殖を示した（図７９Ｂ、Ｃ）。これらはまた、３０７　Ｇ－ＣＳＦのみに応答して弱い増殖を示した（図７９Ｂ、Ｃ）。

【０６４３】

したがって、ＧＩＦＮＧＲ－１　３０７　ＥＣＤがＣＤ８＋及びＣＤ４＋Ｔ細胞の増殖に対して有する影響は、中立的か、または無視できる程度であると思われる。

【０６４４】

図８０は、ＧＩＦＮＧＲ－２の増殖の結果を示す。非形質導入Ｔ細胞及びＧ２Ｒ－３１３４　ＥＣＤのみを発現するＣＤ４＋及びＣＤ８＋Ｔ細胞のデータは、図７９に示すものと同じであるため、再度説明しない。

【０６４５】

ＧＩＦＮＧＲ－２　３０７　ＥＣＤのみを発現するＣＤ４＋及びＣＤ８＋Ｔ細胞は、ＩＬ－２、ＩＬ－２＋ＩＦＮγ、３０７　Ｇ－ＣＳＦ、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ＋３０７　Ｇ－ＣＳＦ、及び３０７　Ｇ－ＣＳＦ＋ＩＬ－２に応答して増殖を示した（図８０Ｂ、Ｃ）。

【０６４６】

ＧＩＦＮＧＲ－２　３０７　ＥＣＤ及びＧ２Ｒ－３　１３４　ＥＣＤを共発現するＣＤ４＋及びＣＤ８＋Ｔ細胞は、ＩＬ－２、ＩＬ－２＋ＩＦＮγ、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ、３０７、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ＋３０７　Ｇ－ＣＳＦ、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ＋ＩＦＮγ、及び３０７　Ｇ－ＣＳＦ＋ＩＬ－２に応答して増殖を示した（図８０Ｂ、Ｃ）。

【０６４７】

したがって、長期培養におけるＴ細胞増殖の阻害（図７８）にもかかわらず、ＢｒｄＵアッセイにより評価すると、ＧＩＦＮＧＲ－２　３０７　ＥＣＤは、ＣＤ４＋及びＣＤ８＋Ｔ細胞増殖を強化させるように思われる。

【０６４８】

図８１に示すように、非形質導入Ｔ細胞及びＧＩＦＮＧＲ－１　３０７　ＥＣＤまたはＧＩＦＮＧＲ－２　３０７　ＥＣＤを発現するＴ細胞の両方で、ＩＬ－２は、ＳＴＡＴ１の弱い／無視できる程度のリン酸化、Ａｋｔの強いリン酸化、及び（この特定の実験では）Ｓ６の弱いリン酸化を誘導した。ＩＦＮγは、これらのシグナル伝達イベントのいずれも誘導しないものと思われた。ＧＩＦＮＧＲ－１　３０７　ＥＣＤまたはＧＩＦＮＧＲ－２　３０７　ＥＣＤを発現するＴ細胞では、３０７　Ｇ－ＣＳＦは、ＳＴＡＴ１の強いリン酸化を誘導した。ＧＩＦＮＧＲ－２　３０７　ＥＣＤを発現するＴ細胞では、３０７　Ｇ－ＣＳＦは、ＪＡＫ２及びＡｋｔの強いリン酸化も誘導した。

【０６４９】

したがって、ＧＩＦＮＧＲ－１　３０７　ＥＣＤ及びＧＩＦＮＧＲ－２　３０７　ＥＣＤは、ＳＴＡＴ１のチロシンリン酸化を誘導するが、その方法は天然のＩＦＮγ受容体シグナルとは異なる。

【０６５０】

<u>実施例４４：キメラ受容体Ｇ１２／２Ｒ－１　１３４　ＥＣＤまたはＧ２Ｒ－３　１３４　ＥＣＤ及びメソテリン特異的キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）をコードするバイシストロン性構築物の構築及び機能評価</u>

ＣＡＲ＿Ｔ２Ａ＿Ｇ２Ｒ－３－１３４－ＥＣＤ、Ｇ２Ｒ－３－１３４－ＥＣＤ＿Ｔ２Ａ＿ＣＡＲ、ＣＡＲ＿Ｔ２Ａ＿Ｇ１２／２Ｒ－１－１３４－ＥＣＤ、及びＧ１２／２Ｒ－１－１３４－ＥＣＤ＿Ｔ２Ａ＿ＣＡＲと呼ばれるバイシストロン性構築物、ならびにメソテリンＣＡＲのみの発現を駆動するモノシストロン性構築物が合成された。バイシストロン性構築物の命名法は、遺伝子セグメントが５’末端から３’末端までどのように順序付けられているかを示す。例えば、ＣＡＲ＿Ｔ２Ａ＿Ｇ２Ｒ－３－１３４－ＥＣＤは、メソテリン特異的ＣＡＲ、Ｔ２Ａリボソームスキップエレメント、及びＧ２Ｒ－３　１３４　ＥＣＤを（５’から３’まで）コードする。バイシストロン性構築物は、Ｔ２Ａリボソームスキ

ップエレメントによって分離された、メソテリンＣＡＲ、及びＧ２Ｒ－３　１３４　ＥＣＤまたはＧ１２／２Ｒ－１のいずれかをコードする単一のレンチウイルスベクターを使用して発現された。これらのバイシストロン性構築物を使用してヒトＣＤ４＋及びＣＤ８＋Ｔ細胞を形質導入し、形質導入されたＴ細胞（及び非形質導入の対照Ｔ細胞）をフローサイトメトリーで分析して、Ｇ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤ及びＣＡＲの細胞表面発現を検出した。１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦがＧ２Ｒ－３　１３４　ＥＣＤまたはＧ１２／２Ｒ－１　１３４　ＥＣＤを介してＴ細胞増殖を誘導する能力をｉｎ　ｖｉｔｒｏで評価した。Ｔ細胞は、Ｔ細胞とメソテリン陽性ヒト卵巣癌細胞株ＯＶＣＡＲ３との共インキュベーションによるＣＡＲの活性化に応答したサイトカインＩＦＮγ、ＴＮＦα、及びＩＬ－２、ならびに細胞表面マーカーＣＤ６９及びＣＤ１３７の発現を測定するための細胞内フローサイトメトリーによっても評価された。

【０６５１】

方法

一般に、実施例３１に記載されるものと類似の方法に従ったが、下記で説明するように、実験は、メソテリンＣＡＲと操作されたキメラサイトカイン受容体Ｇ２Ｒ－３　１３４　ＥＣＤ及びＧ１２／２Ｒ－１　１３４　ＥＣＤとの共発現及び機能性に焦点を当てるように調整された。

【０６５２】

Ｇ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤ及びメソテリンＣＡＲを検出するためのフローサイトメトリーのために、細胞をＩＬ－７及びＩＬ－１５（各１０ｎｇ／ｍｌ）中で８日間増殖させた。細胞を、ＣＤ３（ＢＶ７５０コンジュゲート）、ＣＤ４（ＰＥコンジュゲート）、ＣＤ８（ＰｅｒＣＰコンジュゲート）、及びＧ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤ（ＡＰＣコンジュゲート）ならびに組み換えＦｃ標識メソテリンタンパク質（ＦＩＴＣコンジュゲート）、及びｅｆｌｕｏｒ５０６（商標）生存率色素に特異的な抗体でインキュベートした。

【０６５３】

細胞内フローサイトメトリーのために、形質導入されたＴ細胞を１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ中で１３日間増殖させた。ＯＶＣＡＲ３細胞（ＡＴＣＣ）を、０．０１ｍｇ／ｍｌのウシインスリン及び２０％のウシ胎児血清を含むＡＴＣＣ配合ＲＰＭＩ－１６４０培地で増殖させた。Ｔ細胞を洗浄し、ＯＶＣＡＲ３細胞の存在下または不在下（エフェクター：標的細胞比２：１で）で、摂氏３７度、５％ＣＯ２で１３時間かけて、完全ＴｅｘＭＡＣＳ培地に再プレーティングした。インキュベーションの最後の４時間は、タンパク質輸送阻害剤（Ｂｒｅｆｅｌｄｉｎ　Ａ）の存在下で実施された。インキュベーションの最後に、細胞をＺｏｍｂｉｅ　ＮＩＲ（商標）Ｆｉｘａｂｌｅ　Ｖｉａｂｉｌｉｔｙ　Ｋｉｔで染色し、続いて、ＣＤ３（ＢＶ５１０コンジュゲート）、ＣＤ４（ＡｌｅｘａＦｌｕｏｒ（商標）７００コンジュゲート）、Ｇ－ＣＳＦＲ（ＡＰＣコンジュゲート）、ＣＤ６９（ＢＶ７８５コンジュゲート）、及びＣＤ１３７（ＢＶ６０５コンジュゲート）、ならびに組み換えメソエテリン（ｍｅｓｏｅｔｈｅｌｉｎ）（ＦＩＴＣコンジュゲート）及びＦｃブロックに対する抗体のカクテルで染色した。次いで、細胞を固定して及び透過化処理し（ＢＤ　Ｃｙｔｏｆｉｘ／Ｃｙｔｏｐｅｒｍ（商標）セット）、サイトカインＩＦＮγ（ＢＶ６５０コンジュゲート）、ＴＮＦα（ＰＥＣｙ７コンジュゲート）、及びＩＬ－２（ＰＥ－ＣＦ５９４コンジュゲート）に対して染色した。細胞を、Ｃｙｔｅｋ　Ａｕｒｏｒａフローサイトメーターを用いて分析した。

【０６５４】

結果

フローサイトメトリーによって（図８２及び８３）、非形質導入細胞は、Ｇ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤ及びメソテリンＣＡＲのごくわずかな発現を示し（図６６Ａ及び６７Ａ）、一方で、メソテリンＣＡＲ構築物のみをコードするレンチウイルスで形質導入されたＣＤ３＋Ｔ細胞の５５．３％はＣＡＲを発現し（図８２Ｂ及び８３Ｂ）、Ｇ２Ｒ－３　１３４　ＥＣＤをコードするレンチウイルスで形質導入されたＴ細胞の１３．１％はＧ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤを発現した（図８２Ｃ）。ＣＡＲ＿Ｔ２Ａ＿Ｇ２Ｒ－３－１３４ＥＣＤをコードする

レンチウイルスで形質導入されたＴ細胞の２６．７％は、Ｇ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤ及びメソテリンＣＡＲの両方を発現し（図８２Ｄ）、一方で、Ｇ２Ｒ－３－１３４ＥＣＤ＿Ｔ２Ａ＿ＣＡＲをコードするレンチウイルスで形質導入されたＣＤ３＋Ｔ細胞の２５．２％が、Ｇ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤ及びメソテリンＣＡＲの両方を発現した（図８２Ｅ）。同様に、Ｇ１２／２Ｒ－１　１３４　ＥＣＤのみをコードするレンチウイルスで形質導入されたＴ細胞の１３．１％が、Ｇ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤを発現した（図８３Ｃ）。ＣＡＲ＿Ｔ２Ａ＿Ｇ１２／２Ｒ－１－１３４ＥＣＤをコードするレンチウイルスで形質導入されたＴ細胞の３０．８％が、Ｇ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤ及びメソテリンＣＡＲの両方を発現し（図８３Ｄ）、Ｇ１２／２Ｒ－１－１３４ＥＣＤ＿Ｔ２Ａ＿ＣＡＲをコードするレンチウイルスで形質導入されたＴ細胞の３６．０％が、Ｇ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤ及びメソテリンＣＡＲの両方を発現した（図８３Ｅ）。

【０６５５】

したがって、メソテリンＣＡＲ＋Ｇ２Ｒ－３　１３４　ＥＣＤまたはメソテリンＣＡＲ＋Ｇ１２／２Ｒ－１　１３４　ＥＣＤをコードするバイシストロン性レンチウイルスベクターは、ＣＡＲ及びキメラサイトカイン受容体の両方の細胞表面発現を生じさせ得る。

【０６５６】

ＢｒｄＵ取り込みアッセイによって（図８４）、非形質導入Ｔ細胞、またはメソテリンＣＡＲのみを発現するように操作されたＴ細胞は、ＩＬ－２に応答して増殖し、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦまたは培地のみに応答した増殖は無視できる程度であった。Ｇ２Ｒ－３　１３４　ＥＣＤのみを発現するＴ細胞は、ＩＬ－２または１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦに応答して増殖した（図８４Ｂ）。ＣＡＲ＿Ｔ２Ａ＿Ｇ２Ｒ－３－１３４ＥＣＤ、ＣＡＲ＿Ｔ２Ａ＿Ｇ１２／２Ｒ－１－１３４ＥＣＤ、またはＧ１２／２Ｒ－１－１３４ＥＣＤ＿Ｔ２Ａ＿ＣＡＲをコードするレンチウイルスベクターで形質導入されたＴ細胞は、ＩＬ－２または１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦに応答して増殖した。Ｔ細胞集団のいずれも、培地のみに応答して有意な増殖を示すことはなかった。

【０６５７】

したがって、Ｇ２Ｒ－３　１３４　ＥＣＤ及びＧ１２／２Ｒ－１　１３４　ＥＣＤは、メソテリンＣＡＲと共にバイシストロン性構築物の一部として共発現されたとき、ＣＡＲの上流に配置されるか下流に配置されるかに関係なくその機能的特性を保持する。

【０６５８】

細胞内フローサイトメトリーにより（図８５）、モノシストロン性メソテリンＣＡＲ構築物を発現するＴ細胞は、ＯＶＣＡＲ３細胞による刺激に応答して、サイトカインＩＦＮγ、ＴＮＦα　及びＩＬ－２、ならびに活性化マーカーＣＤ６９及びＣＤ１３７の発現を上方制御した（図８５Ａ）。対照的に、Ｇ１２／２Ｒ－１　１３４　ＥＣＤのみを発現するように操作され、ＯＶＣＡＲ３細胞で刺激されたＴ細胞では、ＩＦＮγ、ＴＮＦα、ＩＬ－２、ＣＤ６９、またはＣＤ１３７の発現の変化は観察されなかった（図８５Ｂ）。バイシストロン性構築物ＣＡＲ＿Ｔ２Ａ＿Ｇ２Ｒ－３－１３４ＥＣＤを発現するＴ細胞は、ＯＶＣＡＲ３細胞に応答して、ＩＦＮγ、ＴＮＦα、ＩＬ－２、ＣＤ６９、及びＣＤ１３７の発現の増加を示した（図８５Ｃ）。同様に、Ｇ２Ｒ－３－１３４ＥＣＤ＿Ｔ２Ａ＿ＣＡＲ、ＣＡＲ＿Ｔ２Ａ＿Ｇ１２／２Ｒ－１－１３４ＥＣＤ、またはＧ１２／２Ｒ－１－１３４ＥＣＤ＿Ｔ２Ａ＿ＣＡＲ構築物を発現するＴ細胞は、ＯＶＣＡＲ３細胞による刺激に応答して、これらのサイトカイン及びマーカーの発現の増加を示した（図８５Ｄ、８５Ｅ、及び８５Ｆ）。

【０６５９】

したがって、ＯＶＣＡＲ３細胞に対する同種抗原による刺激に応答したＩＦＮγ、ＴＮＦα、及びＩＬ－２、ならびに活性化マーカーＣＤ６９及びＣＤ１３７の上方制御によって証明されるように、メソテリンＣＡＲは、Ｇ２Ｒ－３　１３４　ＥＣＤまたはＧ１２／２Ｒ－１　１３４　ＥＣＤを有するバイシストロン性レンチウイルス構築物の一部として発現されたとき、その機能的特性を保持する。ＣＡＲは、Ｇ２Ｒ－３　１３４　ＥＣＤまたはＧ１２／２Ｒ－１　１３４　ＥＣＤの上流または下流のいずれかに配置された場合に

機能した。

【０６６０】

実施例４５：メソテリン特異的ＣＡＲ及びＩＬ－２エミュレートキメラサイトカイン受容体を共発現するヒトＴ細胞は、メソテリン発現標的細胞に対して細胞傷害性を示す

ＣＡＲ構築物及びキメラサイトカイン受容体は、共発現されると、それらの期待される機能的特性を示すこと、及び、Ｇ２Ｒ－３　１３４　ＥＣＤなどのキメラサイトカイン受容体の刺激により、適切なＣＡＲ抗原を発現する標的細胞に対するＣＡＲ媒介性の細胞傷害性（ｃｙｔｏｔｏｘｉｔｙ）が強化されることを示すための実験が実施される。以下の実施例は、Ｇ２Ｒ－３　１３４　ＥＣＤと共発現されたメソテリン特異的ＣＡＲを用いる。

【０６６１】

方法

ホタルルシフェラーゼをコードする哺乳類発現トランスファープラスミドであるｐＣＣＬ　Ｌｕｃピューロマイシンを、標準のリン酸カルシウムトランスフェクションプロトコル及び第２世代パッケージングベクター（ＡｄｄＧｅｎｅ）を使用して、レンチウイルスベクターに導入する。メソテリンを発現するＯＶＣＡＲ３細胞株に、ルシフェラーゼをコードするレンチウイルスを形質導入し、ピューロマイシン（１．５μｇ／ｍｌ、Ｓｉｇｍａ、カタログ番号Ｐ８８３３）に対する耐性に関して２週間かけて選択して、細胞傷害性アッセイで標的細胞集団として使用するためのピューロマイシン耐性細胞株を生成する。

【０６６２】

ルシフェラーゼを発現する標的ＯＶＣＡＲ３株を、９６ウェルプレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ、カタログ＃３９１７）に１ウェル当たり２×10^4細胞、１００μｌで播種し、プレートに接着させるために一晩インキュベートする。ヒトＰＢＭＣ由来Ｔ細胞をレンチウイルスで形質導入し、メソテリン特異的ＣＡＲを、単独でまたはＧ２Ｒ－３　１３４　ＥＣＤと共に発現させる。Ｔ細胞を９６ウェルプレートにプレーティングし（１ウェル当たり１００μｌ）、２倍希釈系列に分割して２０：１から０．６２５：１の範囲のエフェクター／ターゲット（Ｅ：Ｔ）比を達成する。次に、希釈したＴ細胞懸濁液を接着した腫瘍細胞培養物に添加して、２００μｌの総量を達成する。ＩＬ－２（３００ＩＵ／ｍｌ）、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ（１００ｎｇ／ｍｌ）またはＰＢＳをいくつかのウェルに添加して、細胞傷害性がＩＬ－２または１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦによって増強されるかどうかを決定する。すべての条件を３重に試験する。標的細胞のみの３つのウェルと培地のみの３つのウェルをプレーティングして、アッセイの最大及び最小相対発光単位（ＲＬＵ）を決定する。細胞を、３７℃の５％CO_2中で２４～４８時間培養する。

【０６６３】

アッセイ当日、２２μｌのＸｅｎｏｌｉｇｈｔ（商標）Ｄ－Ｌｕｃｉｆｅｒｉｎ（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ、カタログ＃１２２７９９）の１０倍原液を各ウェルに添加し、プレートを室温の暗所で１０分間インキュベートする。プレートを、発光プレートリーダー（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ　Ｗａｌｌａｃ　Ｅｎｖｉｓｉｏｎ　２１０４　Ｍｕｌｔｉｌａｂｅｌ　Ｒｅａｄｅｒ）でスキャンする。３つのウェルからのＲＬＵを平均し、特異的細胞傷害性百分率を次の方程式によって決定する：特異的細胞傷害性百分率＝１００×（最大発光ＲＬＵ－試験発光ＲＬＵ）／（最小発光ＲＬＵ－最大発光ＲＬＵ）。更に、２４時間及び４８時間の時点で標的細胞の細胞死の形態学的兆候をイメージングする。

【０６６４】

予想された結果

メソテリン特異的ＣＡＲを発現するＴ細胞は、用量依存的に標的細胞の溶解を引き起こす。より低いＥ：Ｔ比における死滅の増加によって反映されるとおり、標的細胞の溶解はＩＬ－２の添加によって増加する。メソテリン特異的ＣＡＲとＧ２Ｒ－３　１３４　ＥＣＤとを共発現するＴ細胞の場合、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦを添加すると、標的細胞の溶解が、ＩＬ－２で見られるものと類似の程度まで増加する。これらの結果は、メソテリン特異的ＣＡＲとＧ２Ｒ－３　１３４　ＥＣＤとを共発現するＴ細胞において、ＣＡＲが予想される通りに標的細胞の認識及び死滅を媒介すること、ならびに１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ

でＧ２Ｒ－３　１３４　ＥＣＤを刺激することによって、Ｔ細胞の細胞傷害性が選択的に増強され得ること、を示す。

【０６６５】

実施例４６：ＣＡＲと対合した制御されたパラクリンシグナル伝達システムの構築及び機能評価

実施例４１に記載の方法を使用して、Ｇ１２／２Ｒ　１３４　ＥＣＤ、ＩＬ－１８、及びメソテリン特異的ＣＡＲの例を使用して、ＣＰＳシステムをＣＡＲと対合させる（表３１のＣＡＲ＿Ｐ２Ａ＿Ｇ１２－２Ｒ１－１３４＿Ｔ２Ａ＿ｈＩＬ－１８と呼ばれる構築物を参照されたい）。この組み合わせられたシステムを、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ及びｉｎ　ｖｉｖｏで機能的に評価する。

【０６６６】

方法

３つのｃＤＮＡをＰ２Ａ部位及びＴ２Ａ部位によって分離して、単一のｍＲＮＡ転写物から３つのタンパク質を産生することを可能にする。このようなトリシストロン性構築物では、一方のｃＤＮＡがもう一方よりも高いレベルで発現されることは珍しいことではなく、最適な構成は経験的に決定する必要がある。したがって、少なくとも３つの構成が構築される（５’から３’まで列挙する）：（ａ）Ｇ１２／２Ｒ－１　１３４　ＥＣＤ、ＩＬ－１８、Ｍｅｓｏ　ＣＡＲ、（ｂ）ＩＬ－１８、Ｇ１２／２Ｒ－１　１３４　ＥＣＤ、Ｍｅｓｏ　ＣＡＲ、及び（ｃ）Ｍｅｓｏ　ＣＡＲ　Ｇ１２／２Ｒ－１　１３４　ＥＣＤ、ＩＬ－１８（図８２～８５）（表３１）。

【０６６７】

Ｔ細胞の形質導入、拡大、増殖、ＩＬ－１８分泌、及び生化学的シグナル伝達は、実施例４９と類似する方法を使用して評価する。ＣＡＲ発現、ならびにメソテリン陽性腫瘍細胞の認識及び死滅は、実施例４４と類似する方法を使用して評価する。

【０６６８】

予想された結果

Ｔ細胞を、２つの異なるレンチウイルス構築物で形質導入する：１つはＩＬ－１８及びＭｅｓｏ　ＣＡＲと協力してＧ１２／２Ｒ－１　１３４　ＥＣＤをコードするもの（本実施例では、ＣＰＳ$^{2／12+18}$＋Ｍｅｓｏ　ＣＡＲと称され、表３１ではＣＡＲ＿Ｐ２Ａ＿Ｇ１２－２Ｒ１－１３４＿Ｔ２Ａ＿ｈＩＬ－１８とも称される）。もう１つはＧ１２／２Ｒ－１　１３４　ＥＣＤ及びＭｅｓｏ　ＣＡＲをコードするもの（表３１）（対照として機能するため）。

【０６６９】

フローサイトメトリーにより、ＣＰＳ$^{2／12+18}$＋Ｍｅｓｏ　ＣＡＲまたはＧ１２／２Ｒ－１＋Ｍｅｓｏ　ＣＡＲを発現するＴ細胞は、Ｔ細胞のかなりの割合（１５～９０％）でのヒトＧ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤ及びＭｅｓｏ　ＣＡＲの共発現を示した。実施例４４と同様に、Ｍｅｓｏ　ＣＡＲ発現Ｔ細胞は、メソテリンを発現する標的細胞に曝露されると、ＣＤ６９またはＣＤ１３７などの活性化マーカーの発現を上方制御する。

【０６７０】

ＢｒｄＵアッセイにより、Ｍｅｓｏ　ＣＡＲ発現Ｔ細胞は、メソテリンを発現する標的細胞に応答して増殖する。

【０６７１】

ＩＦＮ－γＥＬＩＳＡにより、Ｍｅｓｏ　ＣＡＲ発現Ｔ細胞は、メソテリンを発現する標的細胞に応答してＩＦＮ－γを分泌する。ＩＦＮ－γの分泌は、ＩＬ－２、ＩＬ－２＋ＩＬ－１２、及び／または１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦを培養物に添加することによって増強される。ＩＬ－１８は、特にＩＬ－２及びＩＬ－１２シグナルと組み合わせると、Ｔ細胞によるＩＦＮ－γ分泌を増強できるため、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦの効果は、ＣＰＳ$^{2／12+18}$＋Ｍｅｓｏ　ＣＡＲを発現する細胞においてより顕著となる。

【０６７２】

ｉｎ　ｖｉｔｒｏ細胞傷害性アッセイ（実施例４５に類似する）により、Ｍｅｓｏ　Ｃ

ＡＲ発現Ｔ細胞は、メソテリンを発現する標的細胞を死滅させる。ＩＬ－２及びＩＬ－１２の両方がＴ細胞の細胞傷害性を増強し得るため、この効果は、ＩＬ－２、ＩＬ－２＋ＩＬ－１２、及び／または１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦを培養物に添加することによって増強される。ＩＬ－１８は、ＩＬ－２及びＩＬ－１２シグナルと組み合わせると、Ｔ細胞の細胞傷害性を更に増強できるため、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦの効果は、ＣＰＳ$^{2/12+18}$＋Ｍｅｓｏ　ＣＡＲを発現する細胞においてより顕著となる。

【０６７３】

ｉｎ　ｖｉｖｏ腫瘍退縮モデルでは、Ｍｅｓｏ　ＣＡＲ発現Ｔ細胞は、メソテリンを発現する腫瘍細胞の退縮を誘導する。ＩＬ－２は、Ｔ細胞の細胞傷害性を増強し得るため、この効果は、ＩＬ－２または１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦを培養物に投与することによって増強される（ＩＬ－１２は毒性が高すぎるため安全に全身投与できない）。Ｇ１２／２Ｒ１３４　ＥＣＤ由来のＩＬ－２＋ＩＬ－１２シグナルの組み合わせは、ＩＬ－２のみよりも強力であるはずなので、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦは、ＩＬ－２よりも強力な抗腫瘍効果を有する。ＩＬ－１８は、ＩＬ－２及びＩＬ－１２シグナルと組み合わせると、Ｔ細胞の抗腫瘍活性を更に増強するため、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦの効果は、ＣＰＳ$^{2/12+18}$＋Ｍｅｓｏ　ＣＡＲを発現する細胞において更により顕著となる。

【０６７４】

フローサイトメトリー及び免疫組織学などの方法により、ＣＰＳ$^{2/12+18}$＋Ｍｅｓｏ　ＣＡＲを発現するＴ細胞は、（Ｇ１２／２Ｒ－１＋Ｍｅｓｏ　ＣＡＲを発現するＴ細胞と比較して）より強力な抗腫瘍免疫応答を誘導する。これは、腫瘍内微小環境におけるＩＬ－１８のパラクリン効果に起因する、活性化された宿主Ｔ細胞、ＮＫ細胞、骨髄細胞、及びその他の細胞型による腫瘍浸潤の増加によって反映される。

【０６７５】

したがって、この実施例における実験は、Ｔ細胞によるＩＦＮ－γ分泌及び細胞傷害性などの機能に対するＩＬ－１８の刺激効果、ならびに宿主免疫細胞に対するパラクリン効果に因る、Ｇ１２／２Ｒ－１のみを発現するＴ細胞よりも優れたＣＰＳ$^{2/12+18}$を発現するＴ細胞のエフェクター機能を実証した。

【０６７６】

<u>実施例４７：デュアルサイトカインで制御されたパラクリンシグナル伝達システムの構築及び機能評価</u>

慢性シグナル伝達は、細胞に対して望ましくない、または有害な効果を有し得る。例えば、ＩＬ－１２シグナルに対する長期的または慢性的な曝露は、Ｔ細胞の最終端分化を促進し、それによってその増殖能及び／または持続性を制限する可能性がある。したがって、状況によっては、例えば、ＩＬ－２及びＩＬ－１２シグナルが別個の直交サイトカインによって制御されるＣＰＳシステムを使用することが望ましい場合がある。このようにして、Ｔ細胞は、１つのサイトカインに応答して増殖し（例えば、ＩＬ－２シグナルをエミュレートするための１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦによるＧ２Ｒ－３の刺激を介して）、その後、別のサイトカインに応答して分化する（例えば、ＩＬ－１２シグナルルをエミュレートするための３０７　Ｇ－ＣＳＦによるＧ１２Ｒ－１の刺激を介して）ように誘導される。こうした制御を可能にするために、上記の例で説明した方法を使用して、Ｇ２Ｒ－３　１３４　ＥＣＤ、Ｇ１２Ｒ－１　３０７　ＥＣＤ、及びＩＬ－１８をコードするトリシストロン性ベクターで構成されるＣＰＳシステム（ＣＰＳ$^{2+12+18}$と呼ばれる）を構築して評価する。この組み合わせられたシステムを、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ及びｉｎ　ｖｉｖｏで機能的に評価する。

【０６７７】

<u>実施例４８：その他のサイトカインの組み合わせをエミュレートする制御されたパラクリンシグナル伝達システムの構築及び機能評価</u>

実施例４１に記載の方法を使用して、Ｇ１２／２Ｒ－１を、図３１に示すものなどの他のＩＣＤをコードするキメラサイトカイン受容体で置換することによって、他のサイトカインの組み合わせをエミュレートする。これらのキメラ受容体は、ヒトＧ－ＣＳＦＲの１

３４　ＥＣＤ、もしくはヒトＧ－ＣＳＦＲの他のバリアントＥＣＤ（例えば、３０７　ＥＣＤ）、または他のサイトカイン受容体由来のＥＣＤを使用することができる。

【０６７８】

ＩＬ－１８ｃＤＮＡの代わりに、ＣＸＣＬ１３、ＩＬ－２１、ＣＣＬ３、ＣＣＬ４、ＣＤ４０リガンド、Ｂ細胞活性化因子（ＢＡＦＦ）、Ｆｌｔ３リガンド、ＣＣＬ２１、ＣＣＬ５、ＸＣＬ１、ＣＣＬ１９、ＩＦＮ－γ、ＩＦＮ－α、ＩＬ－１７、またはＴＮＦ－αなどの他のサイトカインまたはケモカインをコードするｃＤＮＡが挿入される。受容体ＮＫＧ２Ｄなどの他の細胞表面タンパク質が挿入される（表３０）。目的の用途に応じて、こうした因子のヒト、マウス、またはその他のバージョンが使用される。

【０６７９】

実施例４９：ＩＬ－７α受容体サブユニットからの細胞外ドメイン及び膜貫通ドメイン、ならびにＩＬ－２／ＩＬ－１５受容体βサブユニットからの細胞内ドメインを有するキメラ受容体の構築及び発現

ヒトＩＬ－２／ＩＬ－１５受容体βサブユニットの細胞内ドメインに融合したヒトＩＬ－７受容体αサブユニットの細胞外及び膜貫通ドメインを含む、７／２Ｒ－１と称されるキメラ受容体（図９２及び９３）が合成された。ＩＬ－７受容体αサブユニットは、そのＮ末端に標準Ｆｌａｇエピトープ（ＤＹＫＤＤＤＤＫ）をタグ付けされ、同じくＴ細胞によって発現されることの多い天然のＩＬ－７受容体αサブユニットからこのキメラ受容体サブユニットを区別することが可能となった。キメラ受容体サブユニットは、ヒトＣＤ４＋及びＣＤ８＋Ｔ細胞に形質導入するために使用されるレンチウイルスベクター中でコードされた。１２日後、形質導入された細胞（及び非形質導入の対照細胞）をフローサイトメトリーで分析して、天然のＩＬ－７受容体αサブユニットと比較したキメラ受容体サブユニットの発現を検出した。

【０６８０】

方法

Ｆｌａｇでタグ付けされたキメラ受容体（７／２Ｒ－１）を合成し、レンチウイルストランスファープラスミド（Ｔｗｉｓｔ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）にクローニングした。トランスファープラスミド及びレンチウイルスパッケージングプラスミド（ｐｓＰＡＸ２、ｐＭＤ２．Ｇ、Ａｄｄｇｅｎｅ）を、以下のようにレンチウイルスパッケージング細胞株ＨＥＫ２９３Ｔ／１７（ＡＴＣＣ）に同時トランスフェクトした。細胞を、５％ウシ胎児血清及び０．２ｍＭピルビン酸ナトリウムを含むＯｐｔｉ－ＭＥＭ（商標）Ｉ還元血清培地、ＧｌｕｔａＭＡＸ（商標）Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ（Ｇｉｂｃｏ（商標））中で一晩プレーティングした。プラスミドＤＮＡ及びＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ（商標）３０００トランスフェクション試薬（Ｇｉｂｃｏ（商標））を、製造元の仕様書に従って混合し、細胞に滴下した。細胞を３７℃、５％CO_2で６時間インキュベートし、続いて培地を交換し、更に一晩インキュベートした。翌日、細胞上清をプレートから回収し、４℃で貯蔵し、培地を交換した。翌日、細胞上清を細胞から回収し、前日の上清と共にプールした。上清を軽く遠心分離して破片を除去し、０．４５μｍフィルターで濾過した。上清をＢｅｃｋｍａｎ　Ｏｐｔｉｍａ　Ｌ－ＸＰ超遠心機のＳＷ－３２Ｔｉローターを用いて２５，０００ｒｐｍで９０分間回転させた。上清を除去し、ペレットを、適量のＯｐｔｉ－ＭＥＭ　Ｉ培地中で３０分間穏やかに振盪することにより再懸濁させた。

【０６８１】

初代ヒトＴ細胞を、以下のように健康なドナーの白血球搬出生成物から単離した。末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を、密度勾配遠心分離を用いて単離した。ＣＤ４＋及びＣＤ８＋Ｔ細胞を、ヒトＣＤ４及びＣＤ８　ＭｉｃｒｏＢｅａｄｓ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ）を使用して、製造元の仕様書に従い単離した。一部の実験では、Ｔ細胞を生存可能な状態で凍結し、後の時点で解凍した。単離したＴ細胞を、４８ウェルプレート中の、３％ヒト血清（Ｓｉｇｍａ）及び０．５％ゲンタマイシン（ＤＩＮ　０２２６８５３）を含むＴｅｘＭＡＣＳ（商標）培地（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ）（以下、「完全ＴｅｘＭＡＣＳ」と呼ぶ）中に、１ウェルあたり5×10^5で播種した。ヒトＴ細胞Ｔｒａｎ

ｓＡｃｔ（商標）（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ）を添加し（１ウェルあたり１０μｌ）、細胞を　３７℃、５％CO_2でインキュベートした。活性化から２０～２８時間後、受容体構築物をコードするレンチウイルスでＴ細胞に形質導入した。形質導入から２４時間後、ＩＬ－７（１０ｎｇ／ｍｌ）、ＩＬ－７及びＩＬ－１５（各１０ｎｇ／ｍｌ）と共に、またはサイトカインを加えずに、新鮮な培地をＴ細胞に添加し、細胞を更に４８時間インキュベートした。増殖の１２日目に、以下のようにフローサイトメトリーによって受容体の発現を評価した。細胞を、４℃で１５分間、抗ヒトＣＤ１２７　ｅＦｌｕｏｒ（商標）４５０コンジュゲート抗体（１：５０希釈）、ＰＥまたはＰＥＣｙ７にコンジュゲートした抗Ｆｌａｇ抗体（１：５０希釈）、ＢＶ７５０（商標）にコンジュゲートした抗ヒトＣＤ３抗体（１：５０希釈）、ＰＥまたはＡｌｅｘａＦｌｕｏｒ（商標）７００にコンジュゲートした抗ヒトＣＤ４抗体（１：２５希釈）、ＰｅｒＣＰにコンジュゲートした抗ヒトＣＤ８抗体（１：１００）、及びｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ（商標）ＦｉｘａｂｌｅＶｉａｂｉｌｉｔｙ　Ｄｙｅ　ｅＦｌｕｏｒ（商標）５０６（１：１０００希釈）でインキュベートした。次に細胞を緩衝液で２回洗浄し、Ｃｙｔｅｋ（商標）Ａｕｒｏｒａフローサイトメーターで分析した。図８８は、ＣＤ４＋及びＣＤ８＋サブセットの両方を含む、ＣＤ３＋Ｔ細胞の結果を示す。

【０６８２】

結果

７／２Ｒ－１をコードするレンチウイルスベクターで形質導入されたＣＤ３＋Ｔ細胞の大部分（４８．５％）が、ＣＤ１２７（ＩＬ－７Ｒα）及びＦｌａｇエピトープタグを共発現し（図８８Ａ）、その一方で、非形質導入Ｔ細胞は、天然のＣＤ１２７を低／中程度発現したが、Ｆｌａｇエピトープタグは発現しなかった（図８８Ｂ）。ＣＤ１２７検出の特異性は、ＣＤ１２７　ＦＭＯ対照によって確認された（図８８Ｃ）。

【０６８３】

したがって、７／２Ｒ－１はレンチウイルスで形質導入されたＴ細胞の表面で発現され得る。

【０６８４】

実施例５０：７／２Ｒ－１で形質導入され、ＩＬ－７で刺激されたヒトＴ細胞の増殖

７／２Ｒ－１がＴ細胞の増殖（細胞数の増加）を促進したかどうかを決定するために、実施例４９の形質導入条件及び非形質導入条件からのＴ細胞を、ＩＬ－７＋ＩＬ－１５と対比して、またはＩＬ－７と対比して、培地のみで培養し、一定の間隔で計数した。ＩＬ－７＋ＩＬ－１５はレンチウイルス形質導入後のヒトＴ細胞の増殖に一般的に使用されるため、ＩＬ－７のみに対するコンパレータとして、ＩＬ－７＋ＩＬ－１５の組み合わせを選択した。

【０６８５】

方法

実施例４９に記載されているように、ヒトＴ細胞を単離し、７／２Ｒ－１を発現するように形質導入した（０日目）。細胞を、ＩＬ－７（１０ｎｇ／ｍｌ）、ＩＬ－７及びＩＬ－１５（各１０ｎｇ／ｍｌ）、または培地のみで合計１６日間増殖させ、培地及びサイトカインを２日ごとに交換した。増殖の４、８、１２、及び１６日目に、Ｃｙｔｅｋ（商標）Ａｕｒｏｒａフローサイトメーターを使用して、生きているＴ細胞を計数し、０日目と比較しての倍数増殖を評価した。

【０６８６】

結果

図５７に示すように、７／２Ｒ－１をコードするレンチウイルスベクターで形質導入されたＣＤ３＋Ｔ細胞は、ＩＬ－７またはＩＬ－７＋ＩＬ－１５のいずれかで同等の増殖を示し（図８９Ａ）、一方で、非形質導入ＣＤ３＋Ｔ細胞は、ＩＬ－７＋ＩＬ－１５では良好に増加したが、ＩＬ－７ではわずか増加するのみであった（図８９Ｂ）。どちらの培養物も培地のみでは良好に増殖しなかった。

【０６８７】

したがって、Ｔ細胞上での７／２Ｒ－１の発現は、ＩＬ－７に応答した増殖の増加をもたらして、ＩＬ－７＋ＩＬ－１５によって誘導されるものと同等の細胞密度に到達する。これは、ＩＬ－２／ＩＬ－１５受容体βサブユニットの細胞内ドメインが、７／２Ｒ－１キメラ受容体と関連して機能するという機能的証明を提供する。

【０６８８】

実施例５１：ＢｒｄＵ取り込みアッセイによって評価される、７／２Ｒ－１で形質導入され、ＩＬ－７で刺激されたヒトＴ細胞の増殖

７／２Ｒ－１が細胞増殖（細胞周期）を促進するかどうかを決定するために、実施例４９の形質導入条件及び非形質導入条件からのＴ細胞を、ＩＬ－２、ＩＬ－７、またはＩＬ－２＋ＩＬ－７の組み合わせを含む培地と対比して、培地のみで培養した。細胞増殖を、４８時間のＢｒｄＵアッセイによって測定した。

【０６８９】

方法

実施例４９に記載されているように、細胞を単離し、７／２Ｒ－１を発現するように操作した。７／２Ｒ－１を発現する細胞をＩＬ－７（１０ｎｇ／ｍｌ）中で増殖させ、非形質導入細胞をＩＬ－７及びＩＬ－１５（各１０ｎｇ／ｍｌ）中で増殖させた。増殖１２日目に、細胞を採取し、ＰＢＳで２回、及び完全ＴｅｘＭＡＣＳ培地で１回洗浄し、３７℃、５％CO_2で４８時間かけて、以下の関連するアッセイサイトカイン（１０ｎｇ／ｍｌのＩＬ－７、３００ＩＵ／ｍｌのＩＬ－２、それぞれ１０ｎｇ／ｍｌ及び３００ＩＵ／ｍｌのＩＬ－７及びＩＬ－２、またはサイトカインなし）を含む新鮮な完全ＴｅｘＭＡＣＳ培地に再プレーティングした。ＢｒｄＵアッセイ手順は、ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ（商標）ＦＩＴＣ　ＢｒｄＵ　Ｆｌｏｗ　Ｋｉｔ（５５７８９１）の取扱説明書に従ったが、ＢｒｄＵ取り込みに加えて７／２Ｒ－１発現を評価するために、実施例４９に記載されるように表面染色を実施した点を追加した。Ｃｙｔｅｋ（商標）Ａｕｒｏｒａ機器を使用して、フローサイトメトリーを実行した。

【０６９０】

結果

図５８に示すように、７／２Ｒ－１をコードするレンチウイルスベクターで形質導入されたＣＤ４＋及びＣＤ８＋Ｔ細胞は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、またはＩＬ－２＋ＩＬ－７のいずれかに応答して同等の増殖を示したが（図９０Ａ）、非形質導入ＣＤ４＋及びＣＤ８＋Ｔ細胞は、ＩＬ－２及びＩＬ－２＋ＩＬ－７に応答しては良好に増殖したが、ＩＬ－７に応答してはわずか増加するのみであった（図９０Ｂ）。この特定のアッセイでは、高いバックグラウンド増殖を有した７／２Ｒ－１を発現するＣＤ８＋Ｔ細胞を除き、どの培養物も培地のみで良好に増殖することはなかった。

【０６９１】

したがって、Ｔ細胞上での７／２Ｒ－１の発現は、ＩＬ－７に応答した増殖の増加をもたらして、ＩＬ－２、またはＩＬ－２＋ＩＬ－７によって誘導されるものと同等のレベルに到達する。これは、ＩＬ－２／ＩＬ－１５受容体βサブユニットの細胞内ドメインが、７／２Ｒ－１キメラ受容体と関連して機能するという機能的証明を提供する。

【０６９２】

実施例５２：７／２Ｒ－１を発現するヒトＴ細胞における生化学的シグナル伝達イベントのウエスタンブロット検出

７／２Ｒ－１が、天然のＩＬ－２受容体と同様の生化学的シグナル伝達イベントを誘導したかどうかを決定するために、実施例３１の形質導入条件及び非形質導入条件からのＴ細胞を、ＩＬ－２、ＩＬ－７、またはＩＬ－２＋ＩＬ－７の組み合わせを含む培地と対比して、培地のみで培養した。細胞溶解物を調製し、ＩＬ－７及びＩＬ－２受容体シグナル伝達に関与する様々なタンパク質に対する抗体を用いたウエスタンブロットによって精査した（図９１）。

【０６９３】

方法

実施例４９に記載されているように、細胞を単離し、７／２Ｒ－１を発現するように操作した。７／２Ｒ－１を発現する細胞をＩＬ－７（１０ｎｇ／ｍｌ）中で増殖させ、非形質導入細胞をＩＬ－７及びＩＬ－１５（各１０ｎｇ／ｍｌ）中で増殖させた。増殖１２日目に、細胞を採取し、ＰＢＳで２回洗浄し、完全ＴｅｘＭＡＣＳ培地で１回洗浄し、３７℃、５％CO_2で、添加されたサイトカインを含まない完全ＴｅｘＭＡＣＳ培地中で一晩静置した。

【０６９４】

ウエスタンブロットを実施するために、細胞を、サイトカインなし、ＩＬ－２（３００ＩＵ／ｍｌ）、ＩＬ－７（１０ｎｇ／ｍｌ）、またはＩＬ－２及びＩＬ－７（それぞれ３００ＩＵ／ｍｌ及び１０ｎｇ／ｍｌ）で、３７℃で２０分間刺激した。１０ｍＭのＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．９、１ｍＭの$MgCl_2$、０．０５ｍＭのＥＧＴＡ、０．５ｍＭのＥＤＴＡ、ｐＨ８．０、１ｍＭのＤＴＴ、及び１ｘのＰｉｅｒｃｅプロテアーゼ及びホスファターゼ阻害剤ミニタブレット（Ａ３２９６１）を含有する緩衝液で細胞を１回洗浄した。０．２％のＮＰ－４０代替品（Ｓｉｇｍａ）を加えた上記洗浄緩衝液中、氷上で、１０分間細胞を溶解し、１３，０００ｒｐｍ、４℃で１０分間遠心分離後、上清（細胞質画分）を回収した。核ペレットを、０．４２ＭのＮａＣｌ及び２０％のグリセロールを加えた上記洗浄緩衝液中に再懸濁させて抽出した。核ペレットを氷上で３０分間、頻繁にボルテックスしながら抽出し、１３，０００ｒｐｍ、４℃で２０分間遠心分離した後、可溶性の核画分（上清）を回収した。細胞質画分及び核画分を還元緩衝液中１０分間加熱し（７０℃）、ＮｕＰＡＧＥ（商標）４～１２％Ｂｉｓ－Ｔｒｉｓタンパク質ゲルで泳動した。ゲルをニトロセルロース膜に転写し（Ｔｒａｎｓ－Ｂｌｏｔ（登録商標）ＳＤセミドライ転写セルにて２０Ｖで６０分）、乾燥させ、ＴＢＳ中のＩｎｔｅｒｃｅｐｔ（登録商標）ブロッキング緩衝液（９２７－５００００、ＬＩ－ＣＯＲ）中で１時間ブロッキングした。ブロットを、０．１％のＴｗｅｅｎ２０を含有するＴＢＳ中のＩｎｔｅｒｃｅｐｔ（登録商標）ブロッキング緩衝液中、指定された一次抗体（１：１，０００）を用いて４℃で一晩インキュベートした。使用された一次抗体はＣｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓから入手した：Ｐｈｏｓｐｈｏ－Ｓｈｃ（Ｔｙｒ２３９／２４０）抗体＃２４３４、Ｐｈｏｓｐｈｏ－Ａｋｔ（Ｓｅｒ４７３）（Ｄ９Ｅ）ＸＰ（登録商標）ウサギモノクローナル抗体＃４０６０、Ｐｈｏｓｐｈｏ－Ｓ６リボソームタンパク質（Ｓｅｒ２３５／２３６）抗体＃２２１１、Ｐｈｏｓｐｈｏ－ｐ４４／４２ ＭＡＰＫ（Ｅｒｋ１／２）（Ｔｈｒ２０２／Ｔｙｒ２０４）抗体＃９１０１、β－アクチン（１３Ｅ５）ウサギモノクローナル抗体＃４９７０、Ｐｈｏｓｐｈｏ－ＪＡＫ１（Ｔｙｒ１０３４／１０３５）（Ｄ７Ｎ４Ｚ）ウサギモノクローナル抗体＃７４１２９、Ｐｈｏｓｐｈｏ－ＪＡＫ３（Ｔｙｒ９８０／９８１）（Ｄ４４Ｅ３）ウサギモノクローナル抗体＃５０３１、Ｐｈｏｓｐｈｏ－Ｓｔａｔ５（Ｔｙｒ６９４）（Ｃ１１Ｃ５）ウサギモノクローナル抗体＃９３５９、及びヒストンＨ３（９６Ｃ１０）マウスモノクローナル抗体＃３６３８。ブロットを０．１％のＴｗｅｅｎ２０を含有するＴＢＳで３回洗浄し、０．１％のＴｗｅｅｎ２０を含有するＴＢＳ緩衝液中で二次抗体（１：１０，０００）と共に室温で３０～６０分間インキュベートした。二次抗体は、Ｃｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓから入手した：抗マウスＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）（ＤｙＬｉｇｈｔ（商標）８００ ４Ｘ ＰＥＧコンジュゲート）＃５２５７及び抗ウサギＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）（ＤｙＬｉｇｈｔ（商標）８００ ４Ｘ ＰＥＧコンジュゲート）＃５１５１。ブロットを洗浄し、ＬＩ－ＣＯＲ Ｏｄｙｓｓｅｙイメージャーで露光した。

【０６９５】

結果

図５９に示すように、非形質導入Ｔ細胞及び７／２Ｒ－１を発現するＴ細胞の両方において、ＩＬ－２は、ＳＴＡＴ５、ＪＡＫ１、ＪＡＫ３、Ｓｈｃ、Ｅｒｋ１／２、Ａｋｔ、及びＳ６のリン酸化を誘導した。両方のＴ細胞培養物で、ＩＬ－２＋ＩＬ－７に応答して同様のパターンが見られた。非形質導入Ｔ細胞では、ＩＬ－７の刺激は、ＩＬ－２の刺激と比べるとＳＴＡＴ５、Ｓｈｃ、Ａｋｔ、及びＳ６のリン酸化をあまり誘導しなかった。

対照的に、７／２Ｒ－１を発現するＴ細胞では、ＩＬ－７及びＩＬ－２によって誘導されるリン酸化のパターンは区別できなかった。ヒストンＨ３及びβ－アクチンは、ローディング対照として機能した。

【０６９６】

したがって、ＩＬ－７による７／２Ｒ－１の刺激は、天然のＩＬ－２受容体の刺激の後に見られるものと同様の生化学的シグナル伝達イベントをＴ細胞にもたらし、ＩＬ－２／ＩＬ－１５受容体βサブユニットの細胞内ドメインが、７／２Ｒ－１キメラ受容体と関連して機能するという生化学的証拠を提供する。

【０６９７】

実施例５３：ＩＬ－７受容体αドメインの細胞外及び膜貫通ドメイン、ならびにＩＬ－２受容体βサブユニットの細胞内ドメインを含む代替的キメラ受容体の構築及び評価

７／２Ｒ－２と呼ばれる７／２Ｒ－１の代替的バージョンがデザインされた（図９２及び９３）。重要な違いは、ＩＬ－７ＲαとＩＬ－２Ｒβとの間の融合部位が移動され、その結果、７／２Ｒ－２がＩＬ－２ＲβではなくＩＬ－７ＲαのＢｏｘ１及び２領域を含むことである。この受容体は、例えば、７／２Ｒ－１の融合部位がヒトにおいて免疫原性であることが証明された場合に有利である可能性がある。実施例４９～５２の方法に従って、７／２－Ｒ２のＦｌａｇエピトープでタグ付けされたバージョンを構築して、レンチウイルスベクター中にコードし、このレンチウイルスベクターをＴ細胞に形質導入する。７／２Ｒ－２の発現はフローサイトメトリーによって評価される。７／２Ｒ－２の機能的特性は拡大及び増殖アッセイによって評価され、７／２Ｒ－２の生化学的シグナル伝達特性はウエスタンブロットによって評価される。

【０６９８】

実施例５４：１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦのＮ末端へのＰＥＧ２０ｋ部分の化学的付加

２０ｋＤａのポリエチレングリコール（ＰＥＧ）部分がタンパク質のＮ末端に化学結合した、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦの完全配列を含む、ＰＥＧ２０Ｋ＿Ｇ－ＣＳＦ＿１３０ａ１（図９３）（ＰＥＧ－１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦとも呼ばれる）と呼ばれる修飾タンパク質が合成された。更に、ＰＥＧ２０Ｋ＿Ｇ－ＣＳＦ＿３０７またはＰＥＧ－３０７　Ｇ－ＣＳＦと呼ばれる、３０７　Ｇ－ＣＳＦの類似バージョンも合成された。

【０６９９】

方法

２０ｍｇの精製１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦを、４４ｍｇの２０ｋＤａメトキシ－ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒド（ｍＰＥＧ－ＡＬＤ、Ｃｒｅａｔｉｖｅ　ＰＥＧｗｏｒｋｓ）と組み合わせた。反応緩衝液（１０ｍＭ酢酸ナトリウム、ｐＨ５．０、５ｍＭ　ＮａＣｌ）を、２ｍｌの最終容量まで添加した。４０μｌのシアノ水素化ホウ素ナトリウムの１．０Ｍ溶液（最終［$NaBH_3CN$］＝２０ｍＭ）を添加して十分に混合することによって、ＰＥＧ化反応を開始した。次いで、反応物を、１８℃のローテーター上で８時間インキュベートした。３ｍｌの停止緩衝液（１０ｍＭ酢酸ナトリウム、ｐＨ３．５、５ｍＭ　ＮａＣｌ）を添加することによって反応を停止させた。次に、最後の５ｍｌ試料を陽イオン交換カラムで泳動させ、残りの未修飾タンパク質またはマルチＰＥＧ化種からモノＰＥＧ化タンパク質を分離した。同じプロトコルを、３０７　Ｇ－ＣＳＦを使用して成功裏に完了させた。

【０７００】

結果

ＳＤＳ－ＰＡＧＥは、モノＰＥＧ化１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ及び３０７　Ｇ－ＣＳＦの均質な集団を示し、これらはｉｎ　ｖｉｔｒｏで未修飾タンパク質と同様のシグナル伝達活性を示した。

【０７０１】

実施例５５：マウス乳癌モデルにおいて、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦによる処置は、Ｇ４Ｒ－１　１３４　ＥＣＤを発現する腫瘍特異的Ｔ細胞の増殖及び抗腫瘍表現型を選択的に増強する

バリアントサイトカイン１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦを、ｉｎ　ｖｉｖｏマウス乳癌モデル中でＧ４Ｒ　１３４　ＥＣＤを発現するように操作されたＴ細胞の増殖、表現型、及び抗腫瘍活性を増強する能力について更に試験した。

【０７０２】

方法

Ｔｈｙ１．１＋ＯＴ－Ｉ細胞を、Ｇ２Ｒ－３　１３４　ＥＣＤではなくＧ４Ｒ　１３４　ＥＣＤを発現するようにレトロウイルスによって形質導入したことを除き、実施例３６に記載したものと同様の方法が使用された。血液試料のフローサイトメトリーに使用した抗体パネルは、以下を含んだ：マウスＣＤ４５（クローン３０－Ｆ１１、ＡＰＣ－コンジュゲート）、ＣＤ３（クローン１７Ａ２、ＡＦ７００－コンジュゲート）、ＣＤ８ａ（クローン５３－６．７、ＰｅｒＣＰ－コンジュゲート）、ＣＤ４（クローンＲＭ４－５、ＢＶ５１０－コンジュゲート）、ＮＫ１．１（クローンＰＫ１３６、ＰＥＣｙ７－コンジュゲート）、ＣＤ１９（クローン６Ｄ５、ＳｐａｒｋＮＩＲ６８５－コンジュゲート）、ＣＤ１１ｂ（クローンＭ１／７０、ＦＩＴＣ－コンジュゲート）、ＣＤ１１ｃ（クローンＮ４１８、ＢＶ７１１－コンジュゲート）、Ｌｙ６Ｃ（クローンＨＫ１．４、ＢＶ６０５－コンジュゲート）、及びＬｙ６Ｇ（クローン１Ａ８、ＰＥ－コンジュゲート）。ＣｙｔｅｋＡｕｒｏｒａ機器上でフローサイトメトリーを実行した。

【０７０３】

結果

全てのマウスに、Ｇ４Ｒ　１３４　ＥＣＤを発現するように形質導入されたＴｈｙ１．１＋ＯＴ－Ｉ細胞を等量（5×10^{6}）投与した。０日目にフローサイトメトリーによってヒトＧ－ＣＳＦＲ＋を発現するＴｈｙ１．１＋細胞の割合で評価したところ、形質導入効率は７４．７％であった。

【０７０４】

１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ処置群では、３匹中１匹のマウスが腫瘍の完全退縮（ＣＲ）を経験し、実用上の理由で研究が中止される４６日目まで腫瘍のない状態を保った（図９３Ａ）。同様に、ビヒクル処置群でも、３匹中１匹のマウスがＣＲを経験した。したがって、１３０ａ１ Ｇ－ＣＳＦ処置群とビヒクル処置群とは統計的に有意な差を示さなかった。

【０７０５】

Ｔｈｙ１．１＋ＯＴ－Ｉ細胞の増殖及び持続性を、マウスから回収した連続血液試料中でフローサイトメトリーによってモニタリングした。１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ処置群では、Ｔｈｙ１．１＋ＯＴ－Ｉ細胞は、４日目に全ＣＤ８＋Ｔ細胞の６．１％の平均ピーク生着に達した（ビヒクル処置群のピーク３．３％と比較して）（図９３Ｂ）。

【０７０６】

Ｔｈｙ１．１＋ＯＴ－Ｉ細胞の表現型を、連続血液試料のフローサイトメトリーによってモニタリングした。１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ処置群では、Ｔｈｙ１．１＋ＯＴ－Ｉ細胞の大部分（平均＝７０．４％）が、８日目までにＴエフェクターメモリー（Ｔｅｍ）表現型（ＣＤ４４＋ＣＤ６２Ｌ－）を採用した（ビヒクル処置群の平均２７．９％と比較して）（図９３Ｃ）。対照的に、宿主（Ｔｈｙ１．１－）ＣＤ８＋Ｔ細胞は、どの時点においても、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ処置群とビヒクル処置群との間でＴｅｍ細胞の割合の有意差を示さなかった（図９３Ｄ）。

【０７０７】

プログラム死－１（ＰＤ－１）分子の発現をフローサイトメトリーによって評価した。１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ処置群では、Ｔｈｙ１．１＋ＯＴ－Ｉ細胞のごく少数（平均＝１．３％）のみが、１２日目までにＰＤ－１を発現した（ビヒクル処置群の平均１５．５％と比較して）（図９３Ｅ）。対照的に、宿主（Ｔｈｙ１．１－）ＣＤ８＋Ｔ細胞は、どの時点においても、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ処置群とビヒクル処置群との間でＰＤ－１＋細胞の割合の有意差を示さなかった（図９３Ｆ）。

【０７０８】

フローサイトメトリーは、宿主（Ｔｈｙ１．１－）ＣＤ４＋Ｔ細胞及びＣＤ１９＋Ｂ細

胞の全体的割合（宿主ＣＤ４５＋細胞と比較しての）は、どの時点においても１３０ａ１Ｇ－ＣＳＦ処置群とビヒクル処置群との間で有意差がなかったことを示した（図９３Ｇ、Ｈ）。同様に、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦによる処置は、末梢血中の好中球、好酸球、または単球の数に影響を与えなかった（データは示さない）。

【０７０９】

研究全体を通じて、両群のすべてのマウスは、一部のマウスでは腫瘍が進行したにもかかわらず、正常な体重を維持し、全体的に良好な健康状態を示した。

【０７１０】

したがって、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦは、Ｇ４Ｒ　１３４　ＥＣＤを発現する腫瘍特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞のわずかであるが選択的な増殖を誘導することができた。これにより、３３％の持続的ＣＲ率が得られた。１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦでの処置により、かなりの割合の腫瘍特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞が、Ｔｅｍ表現型を採用し、かつＰＤ－１の発現を減少させた。１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ処置に関連する明白な毒性は存在しなかった。

【０７１１】

実施例５６：細胞増殖アッセイにおいて、Ｇ－ＣＳＦ　１３０ａ１及び３０７のＰＥＧ化バージョンは、非ＰＥＧ化バージョンと比較して同様の効力及び選択性を示す

Ｇ－ＣＳＦのＰＥＧ化バージョンと非ＰＥＧ化バージョンと（野生型、１３０ａ１、及び３０７）を、Ｇ２Ｒ－３　１３４　ＥＣＤまたは野生型ヒトＧ－ＣＳＦ受容体を発現する細胞の増殖を刺激する能力に関して比較するためのｉｎ　ｖｉｔｒｏ細胞増殖実験を実施した。

【０７１２】

方法

図９４Ａでは、実施例３５と同様の方法を使用して、健康なドナーのＰＢＭＣに由来するヒトＣＤ４及びＣＤ８　Ｔ細胞にレンチウイルスで形質導入して、Ｇ２Ｒ－３　１３４　ＥＣＤを発現させた。増殖（ＢｒｄＵ取り込み）を評価するため、Ｔ細胞を、ＰＢＳで２回、及び培地で１回洗浄し、続いて以下の指定されるサイトカインを含む新鮮な培地に再プレーティングした：ヒトＩＬ－２（Ｐｒｏｌｅｕｋｉｎ、３００ＩＵ／ｍｌ、陽性対照）、培地のみ（陰性対照）、または指定される濃度（単位：ｎｇ／ｍｌ）の野生型Ｇ－ＣＳＦ、ＰＥＧ化野生型Ｇ－ＣＳＦ（ＰＥＧ－ＷＴ　Ｇ－ＣＳＦ）、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ、もしくはＰＥＧ－１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ。細胞を４８時間培養した。ＢｒｄＵアッセイ手順は、Ｇ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤの細胞表面発現を検出するために細胞も染色したという１点の例外を除いて、ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ（商標）ＦＩＴＣ　ＢｒｄＵ　Ｆｌｏｗ　Ｋｉｔ（５５７８９１）の取扱説明書に従った（実施例３５に記載されるとおり）。Ｃｙｔｅｋ　Ａｕｒｏｒａ機器を使用して、フローサイトメトリーを実行した。ＢｒｄＵ取り込みは、Ｇ－ＣＳＦＲの発現が陽性のＴ細胞に関して示される。

【０７１３】

図９４Ｂでは、野生型ヒトＧ－ＣＳＦ受容体を天然で発現し、野生型Ｇ－ＣＳＦに応答して増殖するヒト骨髄細胞株ＯＣＩ－ＡＭＬ－１を使用して、同様の実験を実施した（実施例３４を参照）。細胞を、ＰＢＳで２回、及び培地で１回洗浄し、続いて以下の指定されるサイトカインを含む培地に再プレーティングした：ヒトＧＭ－ＣＳＦ（２０ｎｇ／ｍｌ、陽性対照）、培地のみ（陰性対照）、または指定された濃度（単位：ｎｇ／ｍｌ）の野生型Ｇ－ＣＳＦ、ＰＥＧ－ＷＴ　Ｇ－ＣＳＦ、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ、ＰＥＧ－１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ、３０７　Ｇ－ＣＳＦ、もしくはＰＥＧ－３０７　Ｇ－ＣＳＦ。細胞を、４８時間培養し、フローサイトメトリーによってＢｒｄＵ取り込みに関して評価した。

【０７１４】

結果

図９４Ａに示すように、Ｇ２Ｒ－３　１３４　ＥＣＤを発現するヒトＴ細胞は、サイトカイン濃度の範囲にわたって、非ＰＥＧ化１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦと比較してＰＥＧ化１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦに対して同様の増殖応答を示した。これらの細胞は、非ＰＥＧ化野

生型Ｇ－ＣＳＦと比較してＰＥＧ化野生型Ｇ－ＣＳＦに対しても同様の増殖応答を示したが、応答は、１３０ａ１バージョンのＧ－ＣＳＦで見られたものよりも大幅に弱かった。

【０７１５】

図９４Ｂに示すように、ヒトＯＣＩ－ＡＭＬ１骨髄細胞は、濃度の範囲にわたって、非ＰＥＧ化１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦと比較してＰＥＧ化１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦに対して同様の増殖応答を示し、唯一の注目すべき差異は、同レベルの細胞増殖を誘導するには、わずかに高い濃度のＰＥＧ化１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦが必要であったということであった。ＯＣＩ－ＡＭＬ１細胞は、非ＰＥＧ化３０７　Ｇ－ＣＳＦと比較してＰＥＧ化３０７　Ｇ－ＣＳＦに対して同様の増殖応答を示した。最後に、ＯＣＩ－ＡＭＬ１細胞は、非ＰＥＧ化野生型Ｇ－ＣＳＦと比較してＰＥＧ化野生型Ｇ－ＣＳＦに対して同様の増殖応答を示し、より低い濃度では、ＰＥＧ化Ｇ－ＣＳＦに対する応答は、非ＰＥＧ化Ｇ－ＣＳＦに対する応答よりも大きかった。ＯＣＩ－ＡＭＬ１細胞は、１３０ａ１または３０７バージョンのＧ－ＣＳＦよりも野生型バージョンのＧ－ＣＳＦに対してはるかに強い応答を示した。

【０７１６】

したがって、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦのＰＥＧ化は、Ｇ２Ｒ－３　１３４　ＥＣＤ受容体を介して細胞増殖を誘導する能力に無視できる程度の影響しか与えなかった。更に、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦまたは３０７　Ｇ－ＣＳＦのＰＥＧ化は、野生型Ｇ－ＣＳＦ受容体と比較して、Ｇ２Ｒ－３　１３４　ＥＣＤに対するこれらのサイトカインの特異性に無視できる程度の影響しか与えなかった。

【０７１７】

実施例５７：１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦのＰＥＧ化バージョン及び非ＰＥＧ化バージョンは、Ｔ細胞において同様の生化学的シグナル伝達イベントを誘導する

ＰＥＧ化１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦと非ＰＥＧ化１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦとを、Ｇ２Ｒ－３　１３４　ＥＣＤを発現するヒトＴ細胞中で生化学的シグナル伝達イベントを誘導する能力に関して比較するための、ｉｎ　ｖｉｔｒｏのウエスタンブロット実験を実施した。

【０７１８】

方法

Ｇ２Ｒ－３　１３４　ＥＣＤを発現するヒトＰＢＭＣ由来Ｔ細胞を、実施例３９と同様に調製し、続いて、培地のみ、ヒトＩＬ－２（Ｐｒｏｌｅｕｋｉｎ、３００ＩＵ／ｍｌ）、または１～４００ｎｇ／ｍｌの範囲の非ＰＥＧ化もしくはＰＥＧ化バージョンの１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦで２０分間刺激した。実施例３９と同様に、細胞及び核抽出物を調製し、図９５で指定され、前述の実施例でより詳細に説明される抗体を用いたウエスタンブロットに供した。

【０７１９】

結果

図９５に示すように、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦのＰＥＧ化バージョン及び非ＰＥＧ化バージョンの両方が、ＳＴＡＴ５、ＳＴＡＴ３、Ｅｒｋ－１／２、Ａｋｔ及びＳ６のリン酸化を含む、ＩＬ－２と同様のシグナル伝達イベントを誘導した。ＩＬ－２とは異なり、ＰＥＧ化１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ及び非ＰＥＧ化１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦはＪＡＫ２のリン酸化を誘導し、これは、そのデザインに基づいて予期されることである。ＰＥＧ化１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦは、１ｎｇ／ｍｌでリン酸化イベントがわずかに減少したことから分かるように、非ＰＥＧ化１３０ａ１ Ｇ－ＣＳＦよりも効力がわずかに弱いように思われた。

【０７２０】

したがって、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦのＰＥＧ化バージョン及び非ＰＥＧ化バージョンは、ヒトＴ細胞において同様の生化学的シグナル伝達イベントを誘導し、効力の差はごくわずかである。

【０７２１】

実施例５８：マウス乳癌モデルにおいて、ＰＥＧ化Ｇ－ＣＳＦ　１３０ａ１による処置は、Ｇ２Ｒ－３　１３４　ＥＣＤを発現する腫瘍特異的Ｔ細胞の増殖及び抗腫瘍活性を選択的に増強する

バリアントサイトカイン１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦのＰＥＧ化型を、３つの投与スケジュールにわたり、マウス乳癌モデル中でＧ２Ｒ－３　１３４　ＥＣＤを発現するＴ細胞の増殖、表現型、及び抗腫瘍活性を増強する能力に関して試験した。

【０７２２】

方法

実施例３６に記載されるものと同様の方法が使用された。全てのマウスに、Ｇ２Ｒ－３１３４　ＥＣＤを発現するように形質導入されたＴｈｙ１．１＋ＯＴ－Ｉ細胞を等量（５×10^6）投与した。血液試料のフローサイトメトリーに使用される抗体パネルは、実施例５９におけるものと同じであった。

【０７２３】

結果

０日目にフローサイトメトリーによってヒトＧ－ＣＳＦＲ＋を発現するＴｈｙ１．１＋細胞の割合で評価したところ、形質導入効率は７９．８％であった。養子細胞移植の当日から開始し（０日目）、マウスを異なるサイトカイン処置群へと無作為化した。「毎日」の群では、マウスを無作為化して、以下のスケジュールで、ビヒクル、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ（１０μｇ／用量）、またはＰＥＧ化（ＰＥＧ）１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ（１０μｇ／用量）のいずれかを投与した：１４日間毎日、続いて１４日間隔日。「３日毎」の群では、マウスを無作為化して、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦまたはＰＥＧ化１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦのいずれかを３日毎に９サイクル投与した。「毎週」の群では、マウスを無作為化して、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦまたはＰＥＧ化１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦのいずれかを７日毎に４サイクル投与した。

【０７２４】

ビヒクル処置群では、４匹中１匹のマウスが腫瘍の完全退縮（ＣＲ）を経験し、実用上の理由で研究が中止される４６日目まで腫瘍のない状態を保った（図９６Ａ、Ｂ）。「毎日」の１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ処置群及びＰＥＧ－１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ処置群の両方で、４匹中４匹のマウスがＣＲを経験した。「３日毎」の１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ処置群及びＰＥＧ－１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ処置群では、それぞれ４匹中３匹及び４匹中４匹のマウスがＣＲを経験した（図９６Ｃ、Ｄ）。「毎週」の１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ処置群及びＰＥＧ－１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ処置群では、それぞれ３匹中３匹及び４匹中４匹のマウスがＣＲを経験した（図９６Ｅ、Ｆ）。

【０７２５】

Ｔｈｙ１．１＋ＯＴ－Ｉ細胞の増殖及び持続性を、マウスから回収した連続血液試料中でフローサイトメトリーによってモニタリングした（図９７Ａ～Ｃ）。「毎日」コホートでは、４日目に、Ｔｈｙ１．１＋ＯＴ－Ｉ細胞が、ビヒクル、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ、及びＰＥＧ－１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ処置群でそれぞれ８．８５％、５２．７５％、及び４３．６３％（全ＣＤ８＋Ｔ細胞に対して）の平均ピークレベルに達した（図９７Ａ）。「３日毎」コホートでは、４日目に、Ｔｈｙ１．１＋ＯＴ－Ｉ細胞が、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ及びＰＥＧ－１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ処置群でそれぞれ８．４１％及び３１．１３％の平均ピークレベルに達した（図９７Ｂ）。「毎週」コホートでは、４日目に、Ｔｈｙ１．１＋ＯＴ－Ｉ細胞が、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ及びＰＥＧ－１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ処置群でそれぞれ１３．６３％及び４１．９３％の平均ピークレベルに達した（図９７Ｃ）。

【０７２６】

Ｔｈｙ１．１＋ＯＴ－Ｉ細胞のＴエフェクターメモリー（Ｔｅｍ、ＣＤ４４＋ＣＤ６２Ｌ－）表現型も、連続血液試料中でフローサイトメトリーによってモニタリングした（図９７Ｄ～Ｆ）。「毎日」コホートでは、４日目に、Ｔｅｍ表現型を示すＴｈｙ１．１＋ＯＴ－Ｉ細胞の平均割合は、ビヒクル、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ、及びＰＥＧ－１３０ａ１Ｇ－ＣＳＦ処置群でそれぞれ２４．５０％、４９．３５％、及び７４．４０％であった（図９７Ｄ）。「３日毎」コホートでは、４日目に、Ｔｅｍ表現型を示すＴｈｙ１．１＋ＯＴ－Ｉ細胞の平均割合は、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ及びＰＥＧ－１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ

処置群でそれぞれ３２．０３％及び７１．５３％であった（図９７Ｅ）。「毎週」コホートでは、４日目に、Ｔｅｍ表現型を示すＴｈｙ１．１＋ＯＴ－Ｉ細胞の平均割合は、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ及びＰＥＧ－１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ処置群でそれぞれ３２．３３％及び７０．５８％であった（図９７Ｆ）。

【０７２７】

プログラム死－１（ＰＤ－１）分子の発現も、連続血液試料中でフローサイトメトリーによって評価した。３つの投与スケジュールのいずれにわたるいかなる時点においても、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ処置群とＰＥＧ－１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ処置群との間で、ＰＤ－１＋ＯＴ－Ｉ　Ｔ細胞の割合に有意な差は観察されなかった（データは示さない）。

【０７２８】

Ｔ細胞免疫グロブリン及びムチンドメイン含有タンパク質３（ＴＩＭ－３）分子の発現も、連続血液試料中でフローサイトメトリーによって評価された。３つの投与スケジュールのいずれにわたるいかなる時点においても、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ処置群とＰＥＧ－１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ処置群との間で、ＴＩＭ－３＋ＯＴ－Ｉ　Ｔ細胞の割合に有意な差は観察されなかった（データは示さない）。

【０７２９】

図９８は、「３日毎」投与コホートからの連続血液試料由来の宿主好中球、単球、好酸球、ＣＤ３＋Ｔ細胞、ＣＤ１９＋Ｂ細胞、及びＮＫ１．１＋ナチュラルキラー細胞の、フローサイトメトリーに基づく評価を示す。ビヒクル処置群、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ処置群、またはＰＥＧ－１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ処置群の間では、いかなる時点においても、これらの細胞型のいずれの割合にも実質的な差は観察されなかった。

【０７３０】

研究全体を通じて、すべての処置群のすべてのマウスは、一部のマウスでは腫瘍が進行したにもかかわらず、正常な体重を維持し、全体的に良好な健康状態を示した。

【０７３１】

したがって、ＰＥＧ－１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦは、本モデルにおいては抗腫瘍効果の点で１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦと少なくとも同等であると思われる。１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦと比較すると、ＰＥＧ－１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦは、「３日毎」及び毎週の投与スケジュールで、実質的により高いＯＴ－Ｉ　Ｔ細胞増殖を誘導した。３つの投与スケジュールの全てで、ＰＥＧ－１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦは、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦと比較して、より大きな割合のＯＴ－Ｉ　Ｔ細胞がＴｅｍ表現型を採用するように誘導した。いずれの型の１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦでの処置にも関連する明白な毒性は存在しなかった。

【０７３２】

<u>実施例５９：ヒトＴ細胞におけるＩＬ－２、ＩＬ－１２及びＩＬ－１８シグナルの組み合わせをエミュレートする制御パラクリンシグナル伝達戦略のｉｎ　ｖｉｔｒｏ実証</u>

健康なドナーのＰＢＭＣ由来のヒトＣＤ４及びＣＤ８Ｔ細胞に、メソテリン特異的ＣＡＲ及びＧ１２／２Ｒをコードするバイシストロン性ベクター、またはメソテリン特異的ＣＡＲ、Ｇ１２／２Ｒ　１３４　ＥＣＤ、及びヒトＩＬ－１８をコードするトリシストロン性ベクターを形質導入した。Ｔ細胞を、ＣＡＲ及びＧ１２／２Ｒ－１　１３４　ＥＣＤの発現に関して、増殖に関して、ならびにＩＬ－１８の産生に関して、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで評価した。

【０７３３】

方法

実施例３５に類似する方法を用いて、健康なドナーのＰＢＭＣ由来のヒトＣＤ４及びＣＤ８Ｔ細胞に、（５’から３’の順番に）メソテリン特異的ＣＡＲ、Ｔ２Ａリボソームスキップ部位、Ｇ１２／２Ｒ－１　１３４　ＥＣＤ、Ｔ２Ａリボソームスキップ部位、及びヒトＩＬ－１８の成熟型（配列番号１０２）をコードするトリシストロン性レンチウイルスベクターを形質導入した。対照は、非形質導入Ｔ細胞と、メソテリン特異的ＣＡＲ、Ｔ２Ａリボソームスキップ部位、及びＧ１２／２Ｒ　１３４　ＥＣＤをコードするバイシストロン性レンチウイルスベクターで形質導入されたＴ細胞とを含んだ。非形質導入Ｔ細胞は

、ＩＬ－２中で１２日間増殖され、形質導入Ｔ細胞は１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ中で増殖された。増殖させた後に、Ｔ細胞を、Ｇ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤに特異的な抗体（ＡＰＣコンジュゲート）を用いた、及び組み換えＦｃ標識メソテリンタンパク質（ＦＩＴＣコンジュゲート）を用いたフローサイトメトリーに供した。

【０７３４】

Ｔ細胞の増殖を、以下のサイトカインを用いて実施例６０に従うＢｒｄＵ取り込みアッセイにより評価した：ヒトＩＬ－２（Ｐｒｏｌｅｕｋｉｎ、３００ＩＵ／ｍｌ）、ヒトＩＬ－１８（１００ｎｇ／ｍｌ）、ヒトＩＬ－２＋ヒトＩＬ－１２（１００ｎｇ／ｍｌ）、ＩＬ－２＋ＩＬ－１２＋ＩＬ－１８、または１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ（１００ｎｇ／ｍｌ）。

【０７３５】

ヒトＩＬ－１８の産生をＥＬＩＳＡによって検出した。Ｔ細胞を、1×10^{6}／ｍｌでプレーティングし、培地のみ、ヒトＩＬ－２（Ｐｒｏｌｅｕｋｉｎ、３００ＩＵ／ｍｌ）＋ヒトＩＬ－１２（２０ｎｇ／ｍｌ）、または１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ（１００ｎｇ／ｍｌ）を含む培地で培養した。４８時間後に上清を収集し、製造元の使用説明書に従ってＥＬＩＳＡ（ＤｕｏＳｅｔ　ＥＬＩＳＡ　Ａｎｃｉｌｌａｒｙ　Ｒｅａｇｅｎｔキット、カタログ＃ＤＹ００８と共に使用される、Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｈｕｍａｎ　Ｔｏｔａｌ　ＩＬ－１８　ＤｕｏＳｅｔ　ＥＬＩＳＡキット、カタログ＃ＤＹ３１８－０５）に供した。絶対ＩＬ－１８濃度は、キットに付属の標準曲線を使用して決定した。

【０７３６】

結果

図９９Ａに示すように、メソテリンＣＡＲ及びＧ１２／２Ｒ　１３４　ＥＣＤの共発現は、バイシストロン性ベクターで形質導入されたＴ細胞の３８．１８％、及びトリシストロン性ベクターで形質導入されたＴ細胞の７８．４０％で見られた。予想された通り、非形質導入Ｔ細胞中では、いずれの受容体も検出されなかった。

【０７３７】

図９９Ｂに示すように、バイシストロン性ベクターまたはトリシストロン性ベクターのいずれかで形質導入されたＴ細胞は、ＩＬ－２；ＩＬ－２＋ＩＬ－１２；ＩＬ－２＋ＩＬ－１２＋ＩＬ－１８；または１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦに応答して増殖し、培地のみまたはＩＬ－１８のみに応答した増殖は見られなかった。同様の結果が、Ｔ細胞の　ＣＤ４＋サブセット及びＣＤ８＋サブセットの両方で見られた（データは示さない）。

【０７３８】

図９９Ｃに示すように、ヒトＩＬ－１８は、トリシストロン性ベクターを発現し、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦで刺激されたＴ細胞によって産生された。他の条件では、無視できるレベルのＩＬ－１８が検出された。

【０７３９】

したがって、Ｇ１２／２Ｒ　１３４　ＥＣＤ及びヒトＩＬ－１８をコードするベクターで（本実施例ではメソテリン特異的ＣＡＲと共に）形質導入されたヒトＴ細胞では、Ｔ細胞の増殖は１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ、ならびに様々なＩＬ－２含有サイトカインの組み合わせに応答して誘導された。ＩＬ－１８の発現は、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦに応答して誘導された。

【０７４０】

<u>実施例６０：マウスＴ細胞におけるＩＬ－１８ベースの制御されたパラクリンシグナル伝達システムのＩｎ　ｖｉｔｒｏ実証</u>

マウスＣＤ４及びＣＤ８　Ｔ細胞に、Ｇ１２／２Ｒ　１３４　ＥＣＤ、またはＧ１２／２Ｒ　１３４　ＥＣＤ及び成熟型のマウスＩＬ－１８（ｍ１８）をコードするレトロウイルスベクターを形質導入した。形質導入受容体の発現をフローサイトメトリーによって評価した。Ｔ細胞を、増殖及びマウスＩＬ－１８の産生に関して評価した。

【０７４１】

方法

実施例３６に類似する方法を用いて、バルクＣＤ４及びＣＤ８　Ｔ細胞を健康なドナーマウス（Ｃ５７Ｂｌ／６Ｊ）から単離し、可溶性抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８で活性化し、ヒトＩＬ－２（３００　ＩＵ／ｍｌ）の存在下で４日間増殖させた。細胞に、Ｇ１２／２Ｒ－１　１３４　ＥＣＤまたはＧ１２／２Ｒ－１　１３４　ＥＣＤ＋ｍ１８をコードするレトロウイルスベクターを形質導入した。モック形質導入Ｔ細胞を、レトロウイルスを使用しない形質導入プロトコルに供した。増殖させた後に、細胞を洗浄し、以下のサイトカイン条件下で再プレーティングした：培地のみ；ヒトＩＬ－２（Ｐｒｏｌｅｕｋｉｎ、３００ＩＵ／ｍｌ）；マウスＩＬ－１８（１００ｎｇ／ｍｌ）；ＩＬ－２＋ｍＩＬ－１２（１０ｎｇ／ｍｌ）；ＩＬ－２＋ＩＬ－１２＋１８；または１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ（１００ｎｇ／ｍｌ）。４８時間後に、Ｔ細胞の増殖をＢｒｄＵ取り込みによって評価した。ＩＬ－１８産生を評価するために、形質導入されたＴ細胞を洗浄し、培地のみ；ヒトＩＬ－２（３００ＩＵ／ｍｌ）＋マウスＩＬ－１２（１０ｎｇ／ｍｌ）；または１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ（１００ｎｇ／ｍｌ）の中に２×１０^{6}細胞／ｍｌの密度で４８時間かけてプレーティングした。マウスＩＬ－１８は、ＥＬＩＳＡ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ，ＭｏｕｓｅＩＬ－１８　ＥＬＩＳＡキット、カタログ＃７６２５）により細胞培養上清中で検出された。

【０７４２】

結果

図１００Ａに示すように、ヒトＧ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤの発現は、形質導入されたすべてのＴ細胞集団上で検出され、形質導入が成功したことを示した。Ｇ１２／２Ｒ　１３４　ＥＣＤの発現は、それのみと比較した場合、ＩＬ－１８　ＣＰＳとの関係においてはより低くなり、この問題は、同等のレンチウイルスベクターで形質導入されたヒトＴ細胞では見られなかったため、これは、このレトロウイルスベクターの技術的問題を反映しているものと思われる（実施例５７を参照）。

【０７４３】

図１００Ｂに示すように、Ｇ１２／２Ｒ　１３４　ＥＣＤまたはＧ１２／２Ｒ　１３４　ＥＣＤ＋ｍ１８で形質導入されたＴ細胞は、ＩＬ－２、ＩＬ－２＋ＩＬ－１２、ＩＬ－２＋ＩＬ－１２＋ＩＬ－１８、または１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦに応答して増殖した。

【０７４４】

図１００Ｃに示すように、マウスＩＬ－１８は、Ｇ１２／２Ｒ　１３４　ＥＣＤ＋ｍ１８で形質導入され、ＩＬ－２＋ＩＬ－１２または１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦで刺激されたＴ細胞によって産生された。

【０７４５】

したがって、Ｇ１２／２Ｒ　１３４　ＥＣＤ＋ｍ１８で形質導入されたマウスＴ細胞では、１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦによる刺激は増殖及びマウスＩＬ－１８の分泌を誘導する。

【０７４６】

<u>実施例６１：操作された受容体及びＩＬ－１８　ＣＰＳを介して刺激されたマウスＴ細胞のｉｎ　ｖｉｔｒｏサイトカイン分泌プロファイル</u>

ＯＴ－Ｉ　Ｔ細胞に、Ｇ２Ｒ－２、Ｇ２Ｒ－３、Ｇ１２／２Ｒ－１、またはＧ１２／２Ｒ－１＋ｍ１８（すべて１３４　ＥＣＤを含む）をコードするレトロウイルスベクターを形質導入した。形質導入受容体の発現をフローサイトメトリーによって評価した。ＩＬ－１８及び他の３２種類の他のサイトカインの発現を、多重ビーズベースのアッセイで評価した。

【０７４７】

方法

実施例３６に類似する方法を用いて、健康なドナーマウス由来のＯＴ－Ｉ　Ｔ細胞に、Ｇ２Ｒ－２、Ｇ２Ｒ－３、Ｇ１２／２Ｒ－１、またはＧ１２／２Ｒ－１＋ｍ１８（すべて１３４　ＥＣＤを含む）をコードするレトロウイルスベクターを形質導入した。５日後、Ｔ細胞を、Ｇ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤに特異的な抗体を用いたフローサイトメトリーに供した。分泌されたサイトカインを検出するために、Ｔ細胞をＰＢＳで３回洗浄し、４８ウェル

プレート中、なにも添加していない（培地のみ、陰性対照）か、ヒトＩＬ－２（Ｐｒｏｌｅｕｋｉｎ　３００ＩＵ／ｍｌ）か、ヒトＩＬ－２＋マウスＩＬ－１２（１０ｎｇ／ｍｌ）か、またはＰＥＧ－１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ（１００ｎｇ／ｍｌ）を添加した組織培養培地に、２×１０^{6}細胞／ｍｌで培養した。４８時間後、培養上清を採取し、－８０℃で凍結した。上清を、Ｅｖｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ（Ｃａｌｇａｒｙ，Ａｌｂｅｒｔａ，Ｃａｎａｄａ）に輸送し、ビーズベースの多重サイトカインアッセイ（Ｍｏｕｓｅ　Ｃｙｔｏｋｉｎｅ／Ｃｈｅｍｏｋｉｎｅ　３１－Ｐｌｅｘ　Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ　Ａｓｓａｙ（登録商標）Ａｒｒａｙ，ＭＤ３１）及びＩＬ－１８検出アッセイ（Ｍｏｕｓｅ　ＩＬ－１８　Ｓｉｎｇｌｅ　Ｐｌｅｘ　Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ　Ａｓｓａｙ（登録商標）Ａｒｒａｙ，ＭＤＩＬ１８）に供した。

【０７４８】

結果

図１００Ａに示すように、ヒトＧ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤの発現は、形質導入されたすべてのＴ細胞集団上で検出され、形質導入が成功したことを示した。Ｇ１２／２Ｒ　１３４　ＥＣＤの発現は、それのみと比較した場合、ＩＬ－１８　ＣＰＳとの関係においてはより低くなり、この問題は、同等のレンチウイルスベクターで形質導入されたヒトＴ細胞では見られなかったため、これは、このレトロウイルスベクターの技術的問題を反映しているものと思われる（実施例５７を参照）。

【０７４９】

図１０１の上部パネルは、マウスＩＬ－１８産生の結果を示す。Ｇ１２／２Ｒ　１３４　ＥＣＤ＋ｍ１８を発現するＴ細胞のみが、検出可能なレベルのマウスＩＬ－１８を産生した。これらの細胞によるマウスＩＬ－１８の発現は、ＩＬ－２＋ＩＬ－１２またはＰＥＧ－１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦによる刺激によって増加した。

【０７５０】

表３５に示すように、以下のサイトカインの発現は、ＩＬ－２またはＩＬ－２＋ＩＬ－１２によって誘導された：ＧＭ－ＣＳＦ、ＴＮＦ－α、ＩＬ－１０、及びＶＥＧＦ。ＩＬ－２＋ＩＬ－１２は更に、ＩＦＮ－ガンマの発現を誘導した（表３５、及び図１０１の下部パネル）。Ｇ１２／２Ｒ　１３４　ＥＣＤ＋ｍ１８を発現するＴ細胞では、ＩＬ－２＋ＩＬ－１２は更にＩＰ－１０の発現を誘導し、ＩＦＮ－ガンマ、ＴＮＦ－アルファ、及びＧＭ－ＣＳＦの発現を増加させた（表３５）。

【０７５１】

Ｇ２Ｒ－２　１３４　ＥＣＤ、Ｇ２Ｒ－３　１３４　ＥＣＤ、またはＧ１２／２Ｒ－１　１３４　ＥＣＤ（ＩＬ－１８　ＣＰＳを含まない）を発現するＴ細胞では、ＰＥＧ－１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦは、以下のサイトカインの発現を誘導した：ＧＭ－ＣＳＦ、ＴＮＦ－α、ＩＬ－１０、及びＶＥＧＦ。Ｇ１２／２Ｒ－１　１３４　ＥＣＤ＋ｍ１８を発現するＴ細胞では、ＰＥＧ－１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦは更に、ＩＦＮ－ガンマ及びＩＰ－１０の発現を誘導し、ＧＭ－ＣＳＦ、ＴＮＦ－アルファ、及びＩＬ－１０の発現を増加させた（表３５）。

【０７５２】

したがって、ＰＥＧ－１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦに応答して、Ｇ２Ｒ－２及びＧ２Ｒ－３は、ＩＬ－２によって誘導されるものと類似したサイトカイン分泌パターンを誘導した。Ｇ２／１２Ｒ　１３４　ＥＣＤ＋ｍ１８を発現する細胞では、ＩＬ－２＋ＩＬ－１２またはＰＥＧ－１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦによる刺激は、ＩＬ－１８の産生増加を誘導し、ＰＥＧ－１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦによる刺激は、ＩＬ－２＋ＩＬ－１２によって誘導されるものと類似したサイトカイン分泌パターンを誘導した。

【０７５３】

実施例６２：ＩＬ－２、ＩＬ－１２、及びＩＬ－１８シグナルの組み合わせをエミュレートする制御されたパラクリンシグナル伝達戦略は、マウス乳癌モデルにおける抗腫瘍活性の増強をもたらす

ＮＯＰ２３乳腺腫瘍モデルを使用して、Ｇ１２／２Ｒ－１　１３４　ＥＣＤ＋ｍ１８を

コードするレトロウイルスベクターで操作されたＯＴ－Ｉ　Ｔ細胞を、ｉｎ　ｖｉｖｏ増殖、エフェクター表現型、及び抗腫瘍活性に関して評価した。比較のために、他のマウスの群には、Ｇ７Ｒ－１、Ｇ２Ｒ－２、またはＧ１２／２Ｒ－１（すべて１３４　ＥＣＤを含む）を発現するＯＴ－Ｉ　Ｔ細胞を投与した。

【０７５４】

方法

実施例３６に記載されるものと同様の方法が使用された。Ｔｈｙ１．１＋ＯＴ－Ｉ細胞を、Ｇ７Ｒ－１、Ｇ２Ｒ－２、Ｇ１２／２Ｒ－１、またはＧ１２／２Ｒ－１＋ｍ１８（全て１３４　ＥＣＤを含む）を発現するように、レトロウイルスによって形質導入した。血液試料のフローサイトメトリーに使用される抗体パネルは、実施例５９におけるものと類似していた。

【０７５５】

結果

図１０２Ａ～Ｄに示されるように、養子細胞移植の当日（０日目）、形質導入されたＯＴ－Ｉ　Ｔ細胞は、ヒトＧ－ＣＳＦＲに対する抗体を用いて検出して、Ｇ７Ｒ、Ｇ２Ｒ－２、またはＧ１２／２Ｒ－１（すべて１３４　ＥＣＤを含む）を発現した。Ｇ１２／２Ｒ－１　１３４　ＥＣＤの発現は、それのみと比較した場合、ＩＬ－１８　ＣＰＳとの関係においてはより低くなり、この問題は、同等のレンチウイルスベクターで形質導入されたヒトＴ細胞では見られなかったため、これは、このレトロウイルスベクターの技術的問題を反映しているものと思われる（実施例５９を参照）。

【０７５６】

全てのマウスに、形質導入されたＴｈｙ１．１＋ＯＴ－Ｉ細胞を等量（２．５×１０^{6}）投与した。養子細胞移植の後で（０日目）、マウスを無作為化して、ビヒクルまたはＰＥＧ－１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ（１０μｇ／用量）のいずれかを７日毎に４サイクル投与した。

【０７５７】

Ｇ７Ｒ－１コホートでは、ＰＥＧ－１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ処置群の４匹のマウスのうち４匹中２匹と比較して、ビヒクルのみを投与されたマウスのうち４匹中２匹が腫瘍の完全退縮（ＣＲ）を経験した（図１０２Ｅ）。Ｇ２Ｒ－２コホートでは、ＰＥＧ－１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ処置群のマウスのうち４匹中３匹と比較して、ビヒクルのみを投与されたマウスのうち５匹中１匹が腫瘍の完全退縮（ＣＲ）を経験した（図１０２Ｆ）。Ｇ１２／２Ｒ－１コホートでは、ビヒクルを投与されたマウスのうち４匹に１匹のみがＣＲを経験し、これと比較して、ＰＥＧ－１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ処置群のマウスのうちの４匹中３匹がＣＲを経験したが、後者の動物のうち１匹は、約３５日後に腫瘍再発を経験した（図１０２Ｇ）。Ｇ１２／２Ｒ－１＋ｍ１８コホートでは、ビヒクルを投与されたマウスのうち４匹に３匹のみがＣＲを経験し、これと比較して、ＰＥＧ－１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ処置群のマウスのうちの４匹中４匹がＣＲを経験した（図１０２Ｈ）。すべてのコホートで、持続的ＣＲを経験したマウスは、実用上の理由で研究が中止される５３日目まで腫瘍のない状態を保った。

【０７５８】

Ｔｈｙ１．１＋ＯＴ－Ｉ細胞の増殖及び持続性を、マウスから回収した連続血液試料中でフローサイトメトリーによってモニタリングした。Ｇ７Ｒコホートでは、４日目に、Ｔｈｙ１．１＋ＯＴ－Ｉ細胞が、ビヒクル及びＰＥＧ－１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ処置群でそれぞれ１．９９％及び１５．３１％（全ＣＤ８＋Ｔ細胞に対して）の平均ピークレベルに達した（図１０２Ｉ）。Ｇ２Ｒ－２コホートでは、４日目に、Ｔｈｙ１．１＋ＯＴ－Ｉ細胞が、ビヒクル及びＰＥＧ－１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ処置群でそれぞれ１．２１％及び１３．７８％の平均ピークレベルに達した（図１０２Ｊ）。Ｇ１２／２Ｒ－１コホートでは、Ｔｈｙ１．１＋ＯＴ－Ｉ細胞が、ビヒクル及びＰＥＧ－１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ処置群でそれぞれ２．１８％及び１１．６３％の平均ピークレベルに達した（図１０２Ｋ）。Ｇ１２／２Ｒ－１＋ｍ１８コホートでは、Ｔｈｙ１．１＋ＯＴ－Ｉ細胞が、ビヒクル及びＰ

ＥＧ－１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ処置群でそれぞれ２．３５％及び６．２１％の平均ピークレベルに達した（図１０２Ｌ）。

【０７５９】

Ｔｈｙ１．１＋ＯＴ－Ｉ細胞のＴエフェクターメモリー（Ｔｅｍ、ＣＤ４４＋ＣＤ６２Ｌ－）表現型も、連続血液試料中でフローサイトメトリーによってモニタリングした。Ｇ７Ｒコホートでは、４日目に、Ｔｅｍ表現型を示すＴｈｙ１．１＋ＯＴ－Ｉ細胞の平均割合は、ビヒクル及びＰＥＧ－１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ処置群でそれぞれ１７．７５％及び３４．６５％であった（図１０２Ｍ）。Ｇ２Ｒ－２コホートでは、これらの値は、ビヒクル及びＰＥＧ－１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ処置群でそれぞれ１５．１２％及び５７．８５％であった（図１０２Ｎ）。Ｇ１２／２Ｒ－１コホートでは、これらの値は、ビヒクル及びＰＥＧ－１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ処置群でそれぞれ１４．７８％及び４８．８０％であった（図１０２Ｏ）。Ｇ１２／２Ｒ／１８Ｃコホートでは、これらの値は、ビヒクル及びＰＥＧ－１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ処置群でそれぞれ４２．０３％及び５７．５５％であった（図１０２Ｐ）。

【０７６０】

研究全体を通じて、すべての処置群のすべてのマウスは、一部のマウスでは腫瘍が進行したにもかかわらず、正常な体重を維持し、全体的に良好な健康状態を示した。

【０７６１】

したがって、ＰＥＧ化１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦに応答したＯＴ－Ｉのｉｎ　ｖｉｖｏ増殖及びエフェクター分化の程度は、受容体の細胞内ドメイン及びＣＰＳサイトカインによって影響される。このモデルでは、Ｇ１２／２Ｒ－１＋ｍ１８が最も強い抗腫瘍効果を示した。

【０７６２】

実施例６３：マウス乳癌モデルにおけるＩＬ－２と比較したＰＥＧ－１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦのｉｎ　ｖｉｖｏ用量反応特性

ＮＯＰ２３乳腺腫瘍モデルを使用して、Ｇ２Ｒ－３　１３４　ＥＣＤを発現するＯＴ－Ｉ　Ｔ細胞を、さまざまな用量のＰＥＧ－１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦまたはヒトＩＬ－２（Ｐｒｏｌｅｕｋｉｎ）に応答したｉｎ　ｖｉｖｏ増殖及びエフェクター表現型に関して評価した。末梢血中の好中球及び好酸球数に対するこれらのサイトカインの影響も評価した。

【０７６３】

方法

実施例３６に記載されるものと同様の方法が使用された。Ｔｈｙ１．１＋ＯＴ－Ｉ細胞を、Ｇ２Ｒ－３　１３４　ＥＣＤを発現するようにレトロウイルスによって形質導入した。すべてのマウスに、２．５×１０^{6}個のＯＴ－Ｉ　Ｔ細胞を投与した。養子細胞移植の当日（０日目）、マウスを以下の６つのサイトカイン処置群へと無作為化した：（１）ビヒクルのみ；（２）ＰＥＧ－１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ、２μｇ／用量、４回の毎週用量；（３）ＰＥＧ－１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ、０．４μｇ／用量、４回の毎週用量；（４）ＰＥＧ－１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ、０．０８μｇ／用量、４回の毎週用量；（５）ＰＥＧ－１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ、４回の０．１μｇの毎日用量、続いて３回の０．４μｇの毎週用量；または（６）ヒトＩＬ－２（Ｐｒｏｌｅｕｋｉｎ）３０，０００ＩＵ／日を１４日間、続いて３０，０００ＩＵを２日毎に１４日間。血液試料のフローサイトメトリーに使用される抗体パネルは、実施例５５で使用されるものと類似していた。

【０７６４】

結果

Ｔｈｙ１．１＋ＯＴ－Ｉ細胞の増殖及び持続性を、マウスから回収した連続血液試料中でフローサイトメトリーによってモニタリングした。図１０３Ａ～Ｅは、様々なサイトカイン処置群にわたる、４日目におけるＴｈｙ１．１＋ＯＴ－Ｉ細胞の平均ピーク割合（全ＣＤ８＋Ｔ細胞に対する）を示す：ビヒクルのみ群＝０．７０％（各パネルに示される）；（Ａ）２μｇのＰＥＧ－１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ群＝９．３８％；（Ｂ）０．４μｇの

ＰＥＧ－１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ群＝４．０９％；（Ｃ）０．０８μｇのＰＥＧ－１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ群＝１．５０％；（Ｄ）０．１μｇ、続いて０．４μｇのＰＥＧ－１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ群＝１８．８０％；（Ｅ）ヒトＩＬ－２群＝４．５６％。

【０７６５】

Ｔｈｙ１．１＋ＯＴ－Ｉ細胞のＴエフェクターメモリー（Ｔｅｍ、ＣＤ４４＋ＣＤ６２Ｌ－）表現型も、連続血液試料中でフローサイトメトリーによってモニタリングした。図１０３Ｆ～Ｊは、４日目にＴｅｍ表現型を示すＴｈｙ１．１＋ＯＴ－Ｉ細胞の平均割合を示す：ビヒクル群＝２７．０５％（各パネルに示される）；（Ａ）２μｇのＰＥＧ－１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ群＝６６．３８％；（Ｂ）０．４μｇのＰＥＧ－１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ群＝７４．８０％；（Ｃ）０．０８μｇのＰＥＧ－１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ群＝３３．０３％；（Ｄ）０．１μｇ、続いて０．４μｇのＰＥＧ－１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ群＝７４．９０％；（Ｅ）ヒトＩＬ－２群＝６４．３０％。

【０７６６】

時点にわたって、すべてのサイトカイン処置群は、ビヒクル群と比較して同様のレベルの好中球を示した（図１０３Ｋ～Ｏ）。

【０７６７】

時点にわたって、すべてのサイトカイン処置群は、ビヒクル群と比較して同様のレベルの好酸球を示した（図１０３Ｐ～Ｓ）が、８日目及び１２日目に好酸球の増加を示したＩＬ－２処置群は例外である（図１０３Ｔ）。

【０７６８】

ＩＬ－２処置群の１匹のマウスが、おそらくＩＬ－２に関連する毒性が原因で１９日目に死亡した１点を除いて、研究全体を通じて、すべての処置群のすべてのマウスが、正常な体重を維持し、全体的に良好な健康状態を示した。

【０７６９】

したがって、末梢血中のＯＴ－Ｉ　Ｔ細胞のｉｎ　ｖｉｖｏ増殖及びエフェクター分化の程度は、ＰＥＧ化１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦの用量によって影響される。ＰＥＧ化１３０ａ１　Ｇ－ＣＳＦ及びＩＬ－２は、血中で類似するＯＴ－Ｉ　Ｔ細胞増殖及び分化プロファイルを誘導した。評価された用量では、どちらのサイトカインも血中の好中球レベルに対して有意な影響を有さなかった。ＩＬ－２は好酸球増加を特異的に誘導し、処置に関連した死亡を１件引き起こした可能性がある。

【０７７０】

本発明は、好ましい実施形態及びさまざまな代替実施形態を参照して特に示され、説明されてきたが、本発明の趣旨及び範囲から逸脱することなく、形態及び詳細におけるさまざまな変更がこれらになされ得ることは、関連技術分野の当業者であれば理解されよう。

【０７７１】

本明細書の本文中で引用されるすべての参考文献、発行済特許、及び特許出願は、その全体があらゆる目的のために参照により本明細書に組み込まれる。

【０７７２】

参考文献

Ｗａｌｌ　ＥＭ，Ｍｉｌｎｅ　Ｋ，Ｍａｒｔｉｎ　ＭＬ，Ｗａｔｓｏｎ　ＰＨ，Ｔｈｅｉｓｓ　Ｐ，Ｎｅｌｓｏｎ　ＢＨ（２００７）Ｓｐｏｎｔａｎｅｏｕｓ　ｍａｍｍａｒｙ　ｔｕｍｏｒｓ　ｄｉｆｆｅｒ　ｗｉｄｅｌｙ　ｉｎ　ｔｈｅｉｒ　ｉｎｈｅｒｅｎｔ　ｓｅｎｓｉｔｉｖｉｔｙ　ｔｏ　ａｄｏｐｔｉｖｅｌｙ　ｔｒａｎｓｆｅｒｒｅｄ　Ｔ　ｃｅｌｌｓ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ　６７：６４４２-６４５０

【０７７３】

Ｙａｎｇ，Ｔ．，Ｍａｒｔｉｎ，Ｍ．Ｌ．，Ｎｉｅｌｓｅｎ，Ｊ．Ｓ．，Ｍｉｌｎｅ，Ｋ．，Ｗａｌｌ，Ｅ．Ｍ．，Ｌｉｎ，Ｗ．，Ｗａｔｓｏｎ，Ｐ．Ｈ．，＆Ｎｅｌｓｏｎ，Ｂ．Ｈ．（２００９）．Ｍａｍｍａｒｙ　ｔｕｍｏｒｓ　ｗｉｔｈ　ｄｉｖｅｒｓｅ　ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ　ｐｈｅｎｏｔｙｐｅｓ　ｓｈｏｗ　ｄｉｆｆｅｒｉｎｇ　ｓｅｎｓｉｔｉｖｉｔｙ　ｔｏ　ａｄｏｐｔｉｖｅｌｙ　ｔｒａｎｓｆｅｒｒｅｄ　ＣＤ８

＋ Ｔ ｃｅｌｌｓ ｌａｃｋｉｎｇ ｔｈｅ Ｃｂｌ－ｂ ｇｅｎｅ．Ｃａｎｃｅｒ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ， Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ，５８（１１），１８６５-１８７５．

【０７７４】

【表１２】

表１２：Ｇ－ＣＳＦＲ$_{WT}$－ＩＣＤ$_{GP130-IL-2Rβ}$の配列

タンパク質	Ｕｎｉｐｒｏｔ ＩＤ	残基番号	ポリペプチド配列	配列番号
Ｇ－ＣＳＦＲ（シグナルペプチド，ＥＣＤ）	Ｑ９９０６２	１－６２７	ＭＡＲＬＧＮＣＳＬＴＷＡＡＬＩＩＬＬＬＰ ＧＳＬＥＥＣＧＨＩＳＶＳＡＰＩＶＨＬＧＤ ＰＩＴＡＳＣＩＩＫＱＮＣＳＨＬＤＰＥＰＱ ＩＬＷＲＬＧＡＥＬＱＰＧＧＲＱＱＲＬＳＤ ＧＴＱＥＳＩＩＴＬＰＨＬＮＨＴＱＡＦＬＳ ＣＣＬＮＷＧＮＳＬＱＩＬＤＱＶＥＬＲＡＧ ＹＰＰＡＩＰＨＮＬＳＣＬＭＮＬＴＴＳＳＬ ＩＣＱＷＥＰＧＰＥＴＨＬＰＴＳＦＴＬＫＳ ＦＫＳＲＧＮＣＱＴＱＧＤＳＩＬＤＣＶＰＫ ＤＧＱＳＨＣＣＩＰＲＫＨＬＬＬＹＱＮＭＧ ＩＷＶＱＡＥＮＡＬＧＴＳＭＳＰＱＬＣＬＤ ＰＭＤＶＶＫＬＥＰＰＭＬＲＴＭＤＰＳＰＥ ＡＡＰＰＱＡＧＣＬＱＬＣＷＥＰＷＱＰＧＬ ＨＩＮＱＫＣＥＬＲＨＫＰＱＲＧＥＡＳＷＡ ＬＶＧＰＬＰＬＥＡＬＱＹＥＬＣＧＬＬＰＡ ＴＡＹＴＬＱＩＲＣＩＲＷＰＬＰＧＨＷＳＤ ＷＳＰＳＬＥＬＲＴＴＥＲＡＰＴＶＲＬＤＴ ＷＷＲＱＲＱＬＤＰＲＴＶＱＬＦＷＫＰＶＰ ＬＥＥＤＳＧＲＩＱＧＹＶＶＳＷＲＰＳＧＱ ＡＧＡＩＬＰＬＣＮＴＴＥＬＳＣＴＦＨＬＰ ＳＥＡＱＥＶＡＬＶＡＹＮＳＡＧＴＳＲＰＴ ＰＶＶＦＳＥＳＲＧＰＡＬＴＲＬＨＡＭＡＲ ＤＰＨＳＬＷＶＧＷＥＰＰＮＰＷＰＱＧＹＶ ＩＥＷＧＬＧＰＰＳＡＳＮＳＮＫＴＷＲＭＥ ＱＮＧＲＡＴＧＦＬＬＫＥＮＩＲＰＦＱＬＹ ＥＩＩＶＴＰＬＹＱＤＴＭＧＰＳＱＨＶＹＡ ＹＳＱＥＭＡＰＳＨＡＰＥＬＨＬＫＨＩＧＫ ＴＷＡＱＬＥＷＶＰＥＰＰＥＬＧＫＳＰＬＴ ＨＹＴＩＦＷＴＮＡＱＮＱＳＦＳＡＩＬＮＡ ＳＳＲＧＦＶＬＨＧＬＥＰＡＳＬＹＨＩＨＬ ＭＡＡＳＱＡＧＡＴＮＳＴＶＬＴＬＭＴＬＴ ＰＥＧＳＥＬＨ	３

gp130（TM, ICD）	P401 89	628－751	AIVVPVCLAFLLTTLLGVLF CFNKRDLIKKHIWPNVPDPS KSHIAQWSPHTPPRHNFNSK DQMYSDGNFTDVSVVEIEAN DKKPFPEDLKSLDLFKKEKI NTEGHSSGIGGSSCMSSSRP SIS	4
IL－2Rβ ICD）	P1477 84	752－857	ASLSSNHSLTSCFTNQGYFF FHLPDALEIEACQVYFTYDP YSEEDPDEGVAGAPTGSSPQ PLQPLSGEDDAYCTFPSRDD LLLFSPSLLGGPSPPSTAPG GSGAGEERMPPSLQERVPRD WDPQPLGPPTPGVPDLVDFQ PPPELVLREAGEEVPDAGPR EGVSFPWSRPPGQGEFRALN ARLPLNTDAYLSLQELQGQD PTHLV	5

【0775】

【表１３】

表１３：Ｇ－ＣＳＦＲ$_{WT}$－ＩＣＤ$_{IL-2R\beta}$の配列

タンパク質	Ｕｎｉｐｒｏｔ ＩＤ	残基番号	ポリペプチド配列	配列番号
Ｇ－ＣＳＦＲ（シグナルペプチド，ＥＣＤ）	Ｑ９９０６２	１－６２７	ＭＡＲＬＧＮＣＳＬＴＷＡＡＬＩＩＬＬＬＰ ＧＳＬＥＥＣＧＨＩＳＶＳＡＰＩＶＨＬＧＤ ＰＩＴＡＳＣＩＩＫＱＮＣＳＨＬＤＰＥＰＱ ＩＬＷＲＬＧＡＥＬＱＰＧＧＲＱＱＲＬＳＤ ＧＴＱＥＳＩＩＴＬＰＨＬＮＨＴＱＡＦＬＳ ＣＣＬＮＷＧＮＳＬＱＩＬＤＱＶＥＬＲＡＧ ＹＰＰＡＩＰＨＮＬＳＣＬＭＮＬＴＴＳＳＬ ＩＣＱＷＥＰＧＰＥＴＨＬＰＴＳＦＴＬＫＳ ＦＫＳＲＧＮＣＱＴＱＧＤＳＩＬＤＣＶＰＫ ＤＧＱＳＨＣＣＩＰＲＫＨＬＬＬＹＱＮＭＧ ＩＷＶＱＡＥＮＡＬＧＴＳＭＳＰＱＬＣＬＤ ＰＭＤＶＶＫＬＥＰＰＭＬＲＴＭＤＰＳＰＥ ＡＡＰＰＱＡＧＣＬＱＬＣＷＥＰＷＱＰＧＬ ＨＩＮＱＫＣＥＬＲＨＫＰＱＲＧＥＡＳＷＡ ＬＶＧＰＬＰＬＥＡＬＱＹＥＬＣＧＬＬＰＡ ＴＡＹＴＬＱＩＲＣＩＲＷＰＬＰＧＨＷＳＤ ＷＳＰＳＬＥＬＲＴＴＥＲＡＰＴＶＲＬＤＴ ＷＷＲＱＲＱＬＤＰＲＴＶＱＬＦＷＫＰＶＰ ＬＥＥＤＳＧＲＩＱＧＹＶＶＳＷＲＰＳＧＱ ＡＧＡＩＬＰＬＣＮＴＴＥＬＳＣＴＦＨＬＰ ＳＥＡＱＥＶＡＬＶＡＹＮＳＡＧＴＳＲＰＴ ＰＶＶＦＳＥＳＲＧＰＡＬＴＲＬＨＡＭＡＲ ＤＰＨＳＬＷＶＧＷＥＰＰＮＰＷＰＱＧＹＶ ＩＥＷＧＬＧＰＰＳＡＳＮＳＮＫＴＷＲＭＥ ＱＮＧＲＡＴＧＦＬＬＫＥＮＩＲＰＦＱＬＹ ＥＩＩＶＴＰＬＹＱＤＴＭＧＰＳＱＨＶＹＡ ＹＳＱＥＭＡＰＳＨＡＰＥＬＨＬＫＨＩＧＫ ＴＷＡＱＬＥＷＶＰＥＰＰＥＬＧＫＳＰＬＴ ＨＹＴＩＦＷＴＮＡＱＮＱＳＦＳＡＩＬＮＡ ＳＳＲＧＦＶＬＨＧＬＥＰＡＳＬＹＨＩＨＬ ＭＡＡＳＱＡＧＡＴＮＳＴＶＬＴＬＭＴＬＴ ＰＥＧＳＥＬＨ	６

ＩＬ－２Ｒβ（ＴＭ及びＩＣＤ）	Ｐ１４７８４	６２８－９５６	ＡＩＶＶＰＶＣＬＡＦＬＬＴＴＬＬＧＶＬＦ ＣＦＮＫＲＤＬＩＫＫＨＩＷＰＮＶＰＤＰＳ ＫＳＨＩＡＱＷＳＰＨＴＰＰＲＨＮＦＮＳＫ ＤＱＭＹＳＤＧＮＦＴＤＶＳＶＶＥＩＥＡＮ ＤＫＫＰＦＰＥＤＬＫＳＬＤＬＦＫＫＥＫＩ ＮＴＥＧＨＳＳＧＩＧＧＳＳＣＭＳＳＳＲＰ ＳＩＳＡＳＬＳＳＮＨＳＬＴＳＣＦＴＮＱＧ ＹＦＦＦＨＬＰＤＡＬＥＩＥＡＣＱＶＹＦＴ ＹＤＰＹＳＥＥＤＰＤＥＧＶＡＧＡＰＴＧＳ ＳＰＱＰＬＱＰＬＳＧＥＤＤＡＹＣＴＦＰＳ ＲＤＤＬＬＬＦＳＰＳＬＬＧＧＰＳＰＰＳＴ ＡＰＧＧＳＧＡＧＥＥＲＭＰＰＳＬＱＥＲＶ ＰＲＤＷＤＰＱＰＬＧＰＰＴＰＧＶＰＤＬＶ ＤＦＱＰＰＰＥＬＶＬＲＥＡＧＥＥＶＰＤＡ ＧＰＲＥＧＶＳＦＰＷＳＲＰＰＧＱＧＥＦＲ ＡＬＮＡＲＬＰＬＮＴＤＡＹＬＳＬＱＥＬＱ ＧＱＤＰＴＨＬＶ	７

【０７７６】

【表１４】

表１４：Ｇ－ＣＳＦＲ$_{WT}$－ＩＣＤ$_{\gamma c}$の配列

タンパク質	Ｕｎｉｐｒｏｔ ＩＤ	残基番号	ポリペプチド配列	配列番号
Ｇ－ＣＳＦＲ（シグナルペプチド，ＥＣＤ）	Ｑ９９０６２	１－６２７	ＭＡＲＬＧＮＣＳＬＴＷＡＡＬＩＩＬＬＬＰＧＳ ＬＥＥＣＧＨＩＳＶＳＡＰＩＶＨＬＧＤＰＩＴＡ ＳＣＩＩＫＱＮＣＳＨＬＤＰＥＰＱＩＬＷＲＬＧ ＡＥＬＱＰＧＧＲＱＱＲＬＳＤＧＴＱＥＳＩＩＴ ＬＰＨＬＮＨＴＱＡＦＬＳＣＣＬＮＷＧＮＳＬＱ ＩＬＤＱＶＥＬＲＡＧＹＰＰＡＩＰＨＮＬＳＣＬ ＭＮＬＴＴＳＳＬＩＣＱＷＥＰＧＰＥＴＨＬＰＴ ＳＦＴＬＫＳＦＫＳＲＧＮＣＱＴＱＧＤＳＩＬＤ ＣＶＰＫＤＧＱＳＨＣＣＩＰＲＫＨＬＬＬＹＱＮ ＭＧＩＷＶＱＡＥＮＡＬＧＴＳＭＳＰＱＬＣＬＤ ＰＭＤＶＶＫＬＥＰＰＭＬＲＴＭＤＰＳＰＥＡＡ ＰＰＱＡＧＣＬＱＬＣＷＥＰＷＱＰＧＬＨＩＮＱ ＫＣＥＬＲＨＫＰＱＲＧＥＡＳＷＡＬＶＧＰＬＰ ＬＥＡＬＱＹＥＬＣＧＬＬＰＡＴＡＹＴＬＱＩＲ ＣＩＲＷＰＬＰＧＨＷＳＤＷＳＰＳＬＥＬＲＴＴ ＥＲＡＰＴＶＲＬＤＴＷＷＲＱＲＱＬＤＰＲＴＶ ＱＬＦＷＫＰＶＰＬＥＥＤＳＧＲＩＱＧＹＶＶＳ ＷＲＰＳＧＱＡＧＡＩＬＰＬＣＮＴＴＥＬＳＣＴ ＦＨＬＰＳＥＡＱＥＶＡＬＶＡＹＮＳＡＧＴＳＲ ＰＴＰＶＶＦＳＥＳＲＧＰＡＬＴＲＬＨＡＭＡＲ ＤＰＨＳＬＷＶＧＷＥＰＰＮＰＷＰＱＱＧＹＶＩＥ ＷＧＬＧＰＰＳＡＳＮＳＮＫＴＷＲＭＥＱＮＧＲ ＡＴＧＦＬＬＫＥＮＩＲＰＦＱＬＹＥＩＩＶＴＰ ＬＹＱＤＴＭＧＰＳＱＨＶＹＡＹＳＱＥＭＡＰＳ ＨＡＰＥＬＨＬＫＨＩＧＫＴＷＡＱＬＥＷＶＰＥ ＰＰＥＬＧＫＳＰＬＴＨＹＴＩＦＷＴＮＡＱＮＱ ＳＦＳＡＩＬＮＡＳＳＲＧＦＶＬＨＧＬＥＰＡＳ ＬＹＨＩＨＬＭＡＡＳＱＡＧＡＴＮＳＴＶＬＴＬ ＭＴＬＴＰＥＧＳＥＬＨ	８
ＩＬ－２Ｒγ（ＴＭ及びＩＣＤ）	Ｐ３１７８５	６２８－７３５	ＶＶＩＳＶＧＳＭＧＬＩＩＳＬＬＣＶＹＦＷＬＥ ＲＴＭＰＲＩＰＴＬＫＮＬＥＤＬＶＴＥＹＨＧＮ ＦＳＡＷＳＧＶＳＫＧＬＡＥＳＬＱＰＤＹＳＥＲ ＬＣＬＶＳＥＩＰＰＫＧＧＡＬＧＥＧＰＧＡＳＰ ＣＮＱＨＳＰＹＷＡＰＰＣＹＴＬＫＰＥＴ	９

【０７７７】

【表１５Ａ】

表１５Ａ：キメラサイトカイン受容体

名称	ＥＣＤ	ＴＭＤ	Ｂｏｘ１／２	ＩＣＤ	ＳＴＡＴ部位（複数可）	他の部位（複数可）
Ｇ２Ｒ－１	Ｇ－ＣＳＦＲ	ＩＬ－２Ｒβ＋γｃ	ＩＬ－２Ｒβ＋γｃ	ＩＬ－２Ｒβ＋γｃ	５，５	Ｓｈｃ
Ｇ２Ｒ－２	Ｇ－ＣＳＦＲ	ｇｐ１３０	ｇｐ１３０	ＩＬ－２Ｒβ	５，５	Ｓｈｃ
Ｇ２Ｒ－３	Ｇ－ＣＳＦＲ	Ｇ－ＣＳＦＲ	Ｇ－ＣＳＦＲ	ＩＬ－２Ｒβ	５，５	Ｓｈｃ
Ｇ２１Ｒ－１	Ｇ－ＣＳＦＲ	Ｇ－ＣＳＦＲ	Ｇ－ＣＳＦＲ	ＩＬ－２１Ｒ	３	
Ｇ２１Ｒ－２	Ｇ－ＣＳＦＲ	Ｇ－ＣＳＦＲ	Ｇ－ＣＳＦＲ	ＩＬ－２１Ｒ	３	不明
Ｇ１２Ｒ－１	Ｇ－ＣＳＦＲ	Ｇ－ＣＳＦＲ	Ｇ－ＣＳＦＲ	ＩＬ－１２Ｒβ$_2$	４	

【０７７８】

【表１５Ｂ】

表１５Ｂ：キメラサイトカイン受容体

名称	ＥＣＤ	ＴＭＤ	Ｂｏｘ１／２	ＩＣＤ	ＳＴＡＴ部位（複数可）	他の部位（複数可）
Ｇ２１／２Ｒ－１	Ｇ－ＣＳＦＲ	Ｇ－ＣＳＦＲ	Ｇ－ＣＳＦＲ	Ｇ－ＣＳＦＲ，ＩＬ－２Ｒβ	３，５，５	Ｓｈｃ
Ｇ１２／２Ｒ－１	Ｇ－ＣＳＦＲ	Ｇ－ＣＳＦＲ	Ｇ－ＣＳＦＲ	ＩＬ－１２Ｒβ$_2$のＳＴＡＴ４部位がＩＬ－２ＲβのＳＴＡＴ５部位と置き換わる	４，５	Ｓｈｃ
Ｇ２１／１２／２Ｒ－１	Ｇ－ＣＳＦＲ	Ｇ－ＣＳＦＲ	Ｇ－ＣＳＦＲ	Ｇ－ＣＳＦＲ　ＩＣＤのＳＴＡＴ３部位を含む；ＩＬ－１２Ｒβ$_2$のＳＴＡＴ４部位がＩＬ－２ＲβのＳＴＡＴ５部位と置き換わる	３，４，５	Ｓｈｃ
Ｇ２７／２Ｒ－１	Ｇ－ＣＳＦＲ	ｇｐ１３０	ｇｐ１３０	ｇｐ１３０　＋ＩＬ－２Ｒβ	３，５，５	ＳＨＰ－２，Ｓｈｃ
Ｇ７Ｒ－１	Ｇ－ＣＳＦＲ	Ｇ－ＣＳＦＲ	Ｇ－ＣＳＦＲ	ＩＬ－７Ｒα	５	ＰＩ３Ｋ

【０７７９】

【表１６】

表１６：Ｂｏｘ１及びサイトカイン受容体ＩＣＤ上のその他の結合部位

ネイティブＩＣＤ	Ｂｏｘ　１（ソース）	配列番号	Ｓｈｃ	ＳＨＰ－２	ＳＴＡＴ５	ＳＴＡＴ４	ＳＴＡＴ３	ＳＴＡＴ１	ＰＩ３Ｋ
Ｇ－ＣＳＦＲ	ＬＷＰＳＶＰＤＰＡ（Ｑ９９０６２）		該当なし	該当なし	該当なし	該当なし	Ｙ７０４	該当なし	該当なし
ｇｐ１３０	ＩＷＰＮＶＰＤＰＳ（Ｐ４０１８９）		該当なし	Ｙ７５９	該当なし	該当なし	Ｙ７６７	該当なし	該当なし
ＩＬ－２Ｒβ	ＬＫＣＮＴＰＤＰＳ（Ｐ１４７８４）		Ｙ３３８	該当なし	Ｙ３９２，Ｙ５１０	該当なし	Ｙ３９２，Ｙ５１０	Ｙ３９２，Ｙ５１０	該当なし
ＩＬ－２１Ｒ	ＫＩＷＡＶＰＳＰＥ（Ｑ９ＨＢＥ５）		該当なし	該当なし	該当なし	該当なし	Ｙ５１０	Ｙ５１０	該当なし
ＩＬ－１２Ｒβ_2	ＣＳＲＥＩＰＤＰＡ（Ｑ９９６６５）		該当なし	該当なし	Ｙ８００	Ｙ８００	Ｙ８００	該当なし	該当なし
ＩＬ－７Ｒα	ＶＷＰＳＬＰＤＨＫ（Ｐ１６８７１）		該当なし	該当なし	Ｙ４４９	該当なし	該当なし	該当なし	Ｙ４４９

【０７８０】

【表１７】

表１７：シグナルペプチド

ドメイン	Ｕｎｉｐｒｏｔ ＩＤ	ポリペプチド配列	配列番号
Ｇ－ＣＳＦＲ（シグナルペプチド）	Ｑ９９０６２	ＭＡＲＬＧＮＣＳＬＴＷＡＡＬＩＩＬＬＬＰＧＳＬＥ	１１
ＧＭ－ＣＳＦＲ－α（シグナルペプチド）	Ｐ１５５０９	ＭＬＬＬＶＴＳＬＬＬＣＥＬＰＨＰＡＦＬＬＩＰ	１２
ドメイン	Ｇｅｎｂａｎｋ受託ＩＤ	核酸配列	
Ｇ－ＣＳＦＲ（シグナルペプチド，ネイティブ配列）	ＮＰ＿０００７５１	ＡＴＧＧＣＡＡＧＧＣＴＧＧＧＡＡＡＣＴＧＣＡＧＣＣＴＧＡＣＴＴＧＧＧＣＴＧＣＣＣＴＧＡＴＣＡＴＣＣＴＧＣＴＧＣＴＣＣＣＣＧＧＡＡＧＴＣＴＧＧＡＧ	１３
ＧＭ－ＣＳＦＲ－α（シグナルペプチド，ネイティブ配列）	ＮＰ＿０３４１００	ＡＴＧＣＴＧＣＴＧＣＴＡＧＴＧＡＣＣＴＣＣＣＴＧＣＴＧＣＴＣＴＧＴＧＡＧＣＴＧＣＣＴＣＡＣＣＣＧＧＣＧＴＴＣＣＴＧＣＴＧＡＴＴＣＣＴ	１４

【０７８１】

【表１８】

表１８：野生型Ｇ－ＣＳＦＲ細胞外ドメイン（ＥＣＤ）：

ドメイン	Ｕｎｉｐｒｏｔ　ＩＤ	ポリペプチド配列	配列番号
Ｇ－ＣＳＦＲ（ＥＣＤ）	Ｑ９９０６２	ＥＣＧＨＩＳＶＳＡＰＩＶＨＬＧＤＰＩＴＡＳＣＩＩＫＱＮＣＳＨＬＤＰＥＰＱＩＬＷＲＬＧＡＥＬＱＰＧＧＲＱＱＲＬＳＤＧＴＱＥＳＩＩＴＬＰＨＬＮＨＴＱＡＦＬＳＣＣＬＮＷＧＮＳＬＱＩＬＤＱＶＥＬＲＡＧＹＰＰＡＩＰＨＮＬＳＣＬＭＮＬＴＴＳＳＬＩＣＱＷＥＰＧＰＥＴＨＬＰＴＳＦＴＬＫＳＦＫＳＲＧＮＣＱＴＱＧＤＳＩＬＤＣＶＰＫＤＧＱＳＨＣＣＩＰＲＫＨＬＬＬＹＱＮＭＧＩＷＶＱＡＥＮＡＬＧＴＳＭＳＰＱＬＣＬＤＰＭＤＶＶＫＬＥＰＰＭＬＲＴＭＤＰＳＰＥＡＡＰＰＱＡＧＣＬＱＬＣＷＥＰＷＱＰＧＬＨＩＮＱＫＣＥＬＲＨＫＰＱＲＧＥＡＳＷＡＬＶＧＰＬＰＬＥＡＬＱＹＥＬＣＧＬＬＰＡＴＡＹＴＬＱＩＲＣＩＲＷＰＬＰＧＨＷＳＤＷＳＰＳＬＥＬＲＴＴＥＲＡＰＴＶＲＬＤＴＷＷＲＱＲＱＬＤＰＲＴＶＱＬＦＷＫＰＶＰＬＥＥＤＳＧＲＩＱＧＹＶＶＳＷＲＰＳＧＱＡＧＡＩＬＰＬＣＮＴＴＥＬＳＣＴＦＨＬＰＳＥＡＱＥＶＡＬＶＡＹＮＳＡＧＴＳＲＰＴＰＶＶＦＳＥＳＲＧＰＡＬＴＲＬＨＡＭＡＲＤＰＨＳＬＷＶＧＷＥＰＰＮＰＷＰＱＧＹＶＩＥＷＧＬＧＰＰＳＡＳＮＳＮＫＴＷＲＭＥＱＮＧＲＡＴＧＦＬＬＫＥＮＩＲＰＦＱＬＹＥＩＩＶＴＰＬＹＱＤＴＭＧＰＳＱＨＶＹＡＹＳＱＥＭＡＰＳＨＡＰＥＬＨＬＫＨＩＧＫＴＷＡＱＬＥＷＶＰＥＰＰＥＬＧＫＳＰＬＴＨＹＴＩＦＷＴＮＡＱＮＱＳＦＳＡＩＬＮＡＳＳＲＧＦＶＬＨＧＬＥＰＡＳＬＹＨＩＨＬＭＡＡＳＱＡＧＡＴＮＳＴＶＬＴＬＭＴＬＴＰＥＧＳＥＬＨ	１５

ドメイン	Ｇｅｎｂａｎｋ受託ＩＤ	核酸配列	
Ｇ－ＣＳＦＲ（ＥＣＤ，ネイティブ配列）	ＮＰ＿０００７５１	ＧＡＧＴＧＣＧＧＧＣＡＣＡＴＣＡＧＴＧＴＣＴＣ ＡＧＣＣＣＣＣＡＴＣＧＴＣＣＡＣＣＴＧＧＧＧＧ ＡＴＣＣＣＡＴＣＡＣＡＧＣＣＴＣＣＴＧＣＡＴＣ ＡＴＣＡＡＧＣＡＧＡＡＣＴＧＣＡＧＣＣＡＴＣＴ ＧＧＡＣＣＣＧＧＡＧＣＣＡＣＡＧＡＴＴＣＴＧＴ ＧＧＡＧＡＣＴＧＧＧＡＧＣＡＧＡＧＣＴＴＣＡＧ ＣＣＣＧＧＧＧＧＣＡＧＧＣＡＧＣＡＧＣＧＴＣＴ ＧＴＣＴＧＡＴＧＧＧＡＣＣＣＡＧＧＡＡＴＣＴＡ ＴＣＡＴＣＡＣＣＣＴＧＣＣＣＣＡＣＣＴＣＡＡＣ ＣＡＣＡＣＴＣＡＧＧＣＣＴＴＴＣＴＣＴＣＣＴＧ ＣＴＧＣＣＴＧＡＡＣＴＧＧＧＧＣＡＡＣＡＧＣＣ ＴＧＣＡＧＡＴＣＣＴＧＧＡＣＣＡＧＧＴＴＧＡＧ ＣＴＧＣＧＣＧＣＡＧＧＣＴＡＣＣＣＴＣＣＡＧＣ ＣＡＴＡＣＣＣＣＡＣＡＡＣＣＴＣＴＣＣＴＧＣＣ ＴＣＡＴＧＡＡＣＣＴＣＡＣＡＡＣＣＡＧＣＡＧＣ ＣＴＣＡＴＣＴＧＣＣＡＧＴＧＧＧＡＧＣＣＡＧＧ ＡＣＣＴＧＡＧＡＣＣＣＡＣＣＴＡＣＣＣＡＣＣＡ ＧＣＴＴＣＡＣＴＣＴＧＡＡＧＡＧＴＴＴＣＡＡＧ ＡＧＣＣＧＧＧＧＣＡＡＣＴＧＴＣＡＧＡＣＣＣＡ ＡＧＧＧＧＡＣＴＣＣＡＴＣＣＴＧＧＡＣＴＧＣＧ ＴＧＣＣＣＡＡＧＧＡＣＧＧＧＣＡＧＡＧＣＣＡＣ ＴＧＣＴＧＣＡＴＣＣＣＡＣＧＣＡＡＡＣＡＣＣＴ ＧＣＴＧＴＴＧＴＡＣＣＡＧＡＡＴＡＴＧＧＧＣＡ ＴＣＴＧＧＧＴＧＣＡＧＧＣＡＧＡＧＡＡＴＧＣＧ ＣＴＧＧＧＧＡＣＣＡＧＣＡＴＧＴＣＣＣＣＡＣＡ ＡＣＴＧＴＧＴＣＴＴＧＡＴＣＣＣＡＴＧＧＡＴＧ ＴＴＧＴＧＡＡＡＣＴＧＧＡＧＣＣＣＣＣＣＡＴＧ ＣＴＧＣＧＧＡＣＣＡＴＧＧＡＣＣＣＣＡＧＣＣＣ ＴＧＡＡＧＣＧＧＣＣＣＣＴＣＣＣＣＡＧＧＣＡＧ ＧＣＴＧＣＣＴＡＣＡＧＣＴＧＴＧＣＴＧＧＧＡＧ ＣＣＡＴＧＧＣＡＧＣＣＡＧＧＣＣＴＧＣＡＣＡＴ ＡＡＡＴＣＡＧＡＡＧＴＧＴＧＡＧＣＴＧＣＧＣＣ ＡＣＡＡＧＣＣＧＣＡＧＣＧＴＧＧＡＧＡＡＧＣＣ ＡＧＣＴＧＧＧＧＣＡＣＴＧＧＴＧＧＧＣＣＣＣＣＴ ＣＣＣＣＴＴＧＧＡＧＧＣＣＣＴＴ	１６

		CAGTATGAGCTCTGCGGGCTCCTC CCAGCCACGGCCTACACCCTGCAG ATACGCTGCATCCGCTGGCCCCTG CCTGGCCACTGGAGCGACTGGAGC CCCAGCCTGGAGCTGAGAACTACC GAACGGGCCCCCACTGTCAGACTG GACACATGGTGGCGGCAGAGGCAG CTGGACCCCAGGACAGTGCAGCTG TTCTGGAAGCCAGTGCCCCTGGAG GAAGACAGCGGACGGATCCAAGGT TATGTGGTTTCTTGGAGACCCTCA GGCCAGGCTGGGGCCATCCTGCCC CTCTGCAACACCACAGAGCTCAGC TGCACCTTCCACCTGCCTTCAGAA GCCCAGGAGGTGGCCCTTGTGGCC TATAACTCAGCCGGGACCTCTCGT CCCACTCCGGTGGTCTTCTCAGAA AGCAGAGGCCCAGCTCTGACCAGA CTCCATGCCATGGCCCCGAGACCCT CACAGCCTCTGGGTAGGCTGGGAG CCCCCCAATCCATGGCCTCAGGGC TATGTGATTGAGTGGGGCCTGGGC CCCCCCAGCGCGAGCAATAGCAAC AAGACCTGGAGGATGGAACAGAAT GGGAGAGCCACGGGGTTTCTGCTG AAGGAGAACATCAGGCCCTTTCAG CTCTATGAGATCATCGTGACTCCC TTGTACCAGGACACCATGGGACCC TCCCAGCATGTCTATGCCTACTCT CAAGAAATGGCTCCCTCCCATGCC CCAGAGCTGCATCTAAAGCACATT GGCAAGACCTGGGCACAGCTGGAG TGGGTGCCTGAGCCCCCTGAGCTG GGGAAGAGCCCCCTTACCCACTAC ACCATCTTCTGGACCAACGC	

		TCAGAACCAGTCCTTCTCCGCCA TCCTGAATGCCTCCTCCCGTGGC TTTGTCCTCCATGGCCTGGAGCC CGCCAGTCTGTATCACATCCACC TCATGGCTGCCAGCCAGGCTGGG GCCACCAACAGTACAGTCCTCAC CCTGATGACCTTGACCCCAGAGG GGTCGGAGCTACAC	
G－CSFR（ECD，4コドン変更）		GAGTGCGGGCACATCAGTGTCTC AGCCCCCATCGTCCACCTGGGGG ATCCCATCACAGCCTCCTGCATC ATCAAGCAGAACTGCAGCCATCT GGACCCGGAGCCACAGATTCTGT GGAGACTGGGAGCAGAGCTTCAG CCCGGGGGCAGGCAGCAGCGTCT GTCTGATGGGACCCAGGAATCTA TCATCACCCTGCCCCACCTCAAC CACACTCAGGCCTTTCTCTCCTG CTGCCTGAACTGGGGCAACAGCC TGCAGATCCTGGACCAGGTTGAG CTGCGCGCAGGCTACCCTCCAGC CATACCCCACAACCCTCTCCTGCC TCATGAACCTCACAACCCAGCAGC CTCATCTGCCAGTGGGAGCCAGG ACCTGAGACCCACCTACCCACCA GCTTCACTCTGAAGAGTTTCAAG AGCCGGGGCAACTGTCAGACCCA AGGGGACTCCATCCTGGACTGCG TGCCCAAGGACGGGCAGAGCCAC TGCTGCATCCCACGCAAACACCT GCTGTTGTACCAGAATATGGGCA TCTGGGTGCAGGCAGAGAATGCG CTGGGGACCAGCATGTCCCCACA ACTGTGTCTTGATCCCATGGATG TTGTGAAACTGGAGCCCCCCATG CTGCGGACCATGGACCCCAGCCC TGAAGCGGCCCCTCCCCAGGCAG GCTGC	17

		CTACAGCTGTGCTGGGAGCCATG GCAGCCAGGCCTGCACATAAATC AGAAGTGTGAGCTGCGCCACAAG CCGCAGCGTGGAGAAGCCAGCTG GGCACTGGTGGGCCCCCTCCCCT TGGAGGCCCTTCAGTATGAGCTC TGCGGGCTCCTCCCAGCCACGGC CTACACCCTGCAGATACGCTGCA TCCGCTGGCCCCTGCCTGGCCAC TGGAGCGACTGGAGCCCCAGCCT GGAGCTGAGAACTACCGAACGGG CCCCCACTGTCAGACTGGACACA TGGTGGCGGCAGAGGCAGCTGGA CCCCAGGACAGTGCAGCTGTTCT GGAAGCCAGTGCCCCTGGAGGAA GACAGCGGACGCATCCAAGGTTA TGTGGTTTCTTGGAGACCCTCAG GCCAGGCTGGGGCCATCCTGCCC CTCTGCAACACCACAGAGCTCAG CTGCACCTTCCACCTGCCTTCAG AAGCCCAGGAGGTGGCCCTTGTG GCCTATAACTCAGCCGGGACCTC TCGCCCCACCCCGGTGGTCTTCT CAGAAAGCAGAGGCCCAGCTCTG ACCAGACTCCATGCCCATGGCCCG AGACCCTCACAGCCTCTGGGTAG GCTGGGAGCCCCCCAATCCATGG CCTCAGGGCTATGTGATTGAGTG GGGCCTGGGCCCCCCCCAGCGCGA GCAATAGCAACAAGACCTGGAGG ATGGAACAGAATGGGAGAGCCAC GGGGTTTCTGCTGAAGGAGAACA TCAGGCCCTTTCAGCTCTATGAG ATCATCGTGACTCCCTTGTACCA GGACACCATGGGACCCTCCCAGC ATGTCTATGCCTACTCTCAAGAA ATGGCTCCCTCCCATGCCCCAGA GCTGCAT	

		CTAAAGCACATTGGCAAGACC TGGGCACAGCTGGAGTGGGTG CCTGAGCCCCCTGAGCTGGGG AAGAGCCCCCTTACCCACTAC ACCATCTTCTGGACCAACGCT CAGAACCAGTCCTTCTCCGCC ATCCTGAATGCATCCTCCCGT GGCTTTGTCCTCCATGGCCTG GAGCCCGCCAGTCTGTATCAC ATCCACCTCATGGCTGCCAGC CAGGCTGGGGCCACCAACAGT ACAGTCCTCACCCTGATGACC TTGACCCCAGAGGGGTCGGAG CTACAC	

【０７８２】

【表１９】

表１９：膜貫通ドメイン（ＴＭ）

ドメイン	Ｕｎｉｐｒｏｔ ＩＤ	ポリペプチド配列	配列番号
Ｇ－ＣＳＦＲ（ＴＭ）	Ｑ９９０６２	ＩＩＬＧＬＦＧＬＬＬＬＬＴＣＬＣＧＴＡＷＬＣＣ	１８
ｇｐ１３０（ＴＭ）	Ｐ４０１８９	ＡＩＶＶＰＶＣＬＡＦＬＬＴＴＬＬＧＶＬＦＣＦ	１９
ＩＬ－２Ｒｂ（ＴＭ）	Ｐ１４７８４	ＩＰＷＬＧＨＬＬＶＧＬＳＧＡＦＧＦＩＩＬＶＹＬＬＩ	２０
ＩＬ－２ＲＧ（ＴＭ）	Ｐ３１７８５	ＶＶＩＳＶＧＳＭＧＬＩＩＳＬＬＣＶＹＦＷＬ	２１
ドメイン	Ｇｅｎｂａｎｋ受託ＩＤ	核酸配列	
Ｇ－ＣＳＦＲ（ＴＭ）	ＮＰ＿００７５１	ＡＴＣＡＴＣＣＴＧＧＧＣＣＴＧＴＴＣＧＧＣＣＴＣＣＴＧＣＴＧＴＴＧＣＴＣＡＣＣＴＧＣＣＴＣＴＧＴＧＧＡＡＣＴＧＣＣＴＧＧＣＴＣＴＧＴＴＧＣ	２２
ｇｐ１３０（ＴＭ）	ＮＭ＿００２１８４	ＧＣＣＡＴＡＧＴＣＧＴＧＣＣＴＧＴＴＴＧＣＴＴＡＧＣＡＴＴＣＣＴＡＴＴＧＡＣＡＡＣＴＣＴＴＣＴＧＧＧＡＧＴＧＣＴＧＴＴＣＴＧＣＴＴＴ	２３
ＩＬ－２Ｒｂ（ＴＭ）	ＮＭ＿０００８７８	ＡＴＴＣＣＧＴＧＧＣＴＣＧＧＣＣＡＣＣＴＣＣＴＣＧＴＧＧＧＴＣＴＣＡＧＣＧＧＧＧＣＴＴＴＴＧＧＣＴＴＣＡＴＣＡＴＣＴＴＡＧＴＧＴＡＣＴＴＧＣＴＧＡＴＣ	２４
ＩＬ－２ＲＧ（ＴＭ）	ＮＰ＿００１９７	ＧＴＧＧＴＴＡＴＣＴＣＴＧＴＴＧＧＣＴＣＣＡＴＧＧＧＡＴＴＧＡＴＴＡＴＣＡＧＣＣＴＴＣＴＣＴＧＴＧＴＧＴＡＴＴＴＣＴＧＧＣＴＧ	２５

【０７８３】

【表２０】

表２０：細胞内ドメイン（ＩＣＤ）

ドメイン	Ｕｎｉｐｒｏｔ ＩＤ	ポリペプチド配列	配列番号
ＩＬ－２Ｒｂ（ＩＣＤ，Ｇ２Ｒ－１）	Ｐ１４７８４	ＮＣＲＮＴＧＰＷＬＫＫＶＬＫＣＮＴＰＤＰＳＫＦＦＳＱＬＳＳＥＨＧＧＤＶＱＫＷＬＳＳＰＦＰＳＳＳＦＳＰＧＧＬＡＰＥＩＳＰＬＥＶＬＥＲＤＫＶＴＱＬＬＬＱＱＤＫＶＰＥＰＡＳＬＳＳＮＨＳＬＴＳＣＦＴＮＱＧＹＦＦＦＨＬＰＤＡＬＥＩＥＡＣＱＶＹＦＴＹＤＰＹＳＥＥＤＰＤＥＧＶＡＧＡＰＴＧＳＳＰＱＰＬＱＰＬＳＧＥＤＤＡＹＣＴＦＰＳＲＤＤＬＬＬＦＳＰＳＬＬＧＧＰＳＰＰＳＴＡＰＧＧＳＧＡＧＥＥＲＭＰＰＳＬＱＥＲＶＰＲＤＷＤＰＱＰＬＧＰＰＴＰＧＶＰＤＬＶＤＦＱＰＰＰＥＬＶＬＲＥＡＧＥＥＶＰＤＡＧＰＲＥＧＶＳＦＰＷＳＲＰＰＧＱＧＥＦＲＡＬＮＡＲＬＰＬＮＴＤＡＹＬＳＬＱＥＬＱＧＱＤＰＴＨＬＶ＊	２６
ＩＬ－２ＲＧ（ＩＣＤ，Ｇ２Ｒ－１）	Ｐ３１７８５	ＥＲＴＭＰＲＩＰＴＬＫＮＬＥＤＬＶＴＥＹＨＧＮＦＳＡＷＳＧＶＳＫＧＬＡＥＳＬＱＰＤＹＳＥＲＬＣＬＶＳＥＩＰＰＫＧＧＡＬＧＥＧＰＧＡＳＰＣＮＱＨＳＰＹＷＡＰＰＣＹＴＬＫＰＥＴ＊	２７
ｇｐ１３０（ＩＣＤ，Ｇ２Ｒ－２）	Ｐ４０１８９	ＮＫＲＤＬＩＫＫＨＩＷＰＮＶＰＤＰＳＫＳＨＩＡＱＷＳＰＨＴＰＰＲＨＮＦＮＳＫＤＱＭＹＳＤＧＮＦＴＤＶＳＶＶＥＩＥＡＮＤＫＫＰＦＰＥＤＬＫＳＬＤＬＦＫＫＥＫＩＮＴＥＧＨＳＳＧＩＧＧＳＳＣＭＳＳＳＲＰＳＩＳ	２８
ＩＬ－２Ｒｂ（ＩＣＤ，Ｇ２Ｒ－２）	Ｐ１４７８４	ＡＳＬＳＳＮＨＳＬＴＳＣＦＴＮＱＧＹＦＦＦＨＬＰＤＡＬＥＩＥＡＣＱＶＹＦＴＹＤＰＹＳＥＥＤＰＤＥＧＶＡＧＡＰＴＧＳＳＰＱＰＬＱＰＬＳＧＥＤＤＡＹＣＴＦＰＳＲＤＤＬＬＬＦＳＰＳＬＬＧＧＰＳＰＰＳＴＡＰＧＧＳＧＡＧＥＥＲＭＰＰＳＬＱＥＲＶＰＲＤＷＤＰＱＰＬＧＰＰＴＰＧＶＰＤＬＶＤＦＱＰＰＰＥＬＶＬＲＥＡＧＥＥＶＰＤＡＧＰＲＥＧＶＳＦＰＷＳＲＰＰＧＱＧＥＦＲＡＬＮＡＲＬＰＬＮＴＤＡＹＬＳＬＱＥＬＱＧＱＤＰＴＨＬＶ＊	２９

G－CSFR（ICD，G2R－3）	Q990 62	SPNRKNPLWPSVPDPAHSSLGSW VPTIMEEDAFQLPGLGTPPITKL TVLEEDEKKPVPWESH	30
IL－2Rb（ICD，G2R－3）	P1478 4	SSNHSLTSCFTNQGYFFFHLPDA LEIEACQVYFTYDPYSEEDPDEG VAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDAY CTFPSRDDLLLFSPSLLGGPSPP STAPGGSGAGEERMPPSLQERVP RDWDPQPLGPPTPGVPDLVDFQP PPELVLREAGEEVPDAGPREGVS FPWSRPPGQGEFRALNARLPLNT DAYLSLQELQGQDPTHLV＊	31
G－CSFR（ICD，G12R－1）	Q990 62	SPNRKNPLWPSVPDPAHSSLGSW VPTIMEEDAFQLPGLGTPPITKL TVLEEDEKKPVPWESHNSSET	32
IL－12Rb2（ICD，G12R－1）	Q996 65	AGDLPTHDGYLPSNIDDLPSHEA PLADSLEELEPQHISLSVFPSSS LHPLTFSCGDKLTLDQLKMRCDS LML＊	33
G－CSFR（ICD，G21R－1）	Q990 62	SPNRKNPLWPSVPDPAHSSLGSW VPTIMEEDAFQLPGLGTPPITKL TVLEEDEKKPVPWESHNSSET	34
IL－21R（ICD，G21R－1）	Q9HB E5	SPGDEGPPRSYLRQWVVIPPPLS SPGPQAS＊	35

G－CSFR（ICD，G21R－2）	Q9906 2	SPNRKNPLWPSVPDPAHSSLGSW VPTIMEEDAFQLPGLGTPPITKL TVLEEDEKKPVPWESHN	36
IL－21R（ICD，G21R－2）	Q9HBE5	QNSGGSAYSEERDRPYGLVSIDT VTVLDAEGPCTWPCSCEDDGYPA LDLDAGLEPSPGLEDPLLDAGTT VLSCGCVSAGSPGLGGPLGSLLD RLKPPLADGEDWAGGLPWGGRSP GGVSESEAGSPLAGLDMDTFDSG FVGSDCSSPVECDFTSPGDEGPP RSYLRQWVVIPPPLSSPGPQAS＊	37
G－CSFR（ICD，G21／2R－1）	Q9906 2	SPNRKNPLWPSVPDPAHSSLGSW VPTIMEEDAFQLPGLGTPPITKL TVLEEDEKKPVPWESHNSSETCG LPTLVQTYVLQGDPRAVSTQPQS Q	38
IL－2Rb（ICD，G21／2R－1）	P14784	SSNHSLTSCFTNQGYFFFHLPDA LEIEACQVYFTYDPYSEEDPDEG VAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDAY CTFPSRDDLLLFSPSLLGGPSPP STAPGGSGAGEERMPPSLQERVP RDWDPQPLGPPTPGVPDLVDFQP PPELVLREAGEEVPDAGPREGVS FPWSRPPGQGEFRALNARLPLNT DAYLSLQELQGQDPTHLV＊	39
G－CSFR（ICD，G12／2R－1）	Q9906 2	SPNRKNPLWPSVPDPAHSSLGSW VPTIMEEDAFQLPGLGTPPITKL TVLEEDEKKPVPWESH	40
IL－2Rb（ICD，G12／2R－1）	P14784	SSNHSLTSCFTNQGYFFFHLPDA LEIEACQVYFTYDPYSEEDP	41

ＩＬ－１２Ｒｂ２（ＩＣＤ，Ｇ１２／２Ｒ－１）	Ｑ９９６６５	ＡＧＤＬＰＴＨＤＧＹＬＰＳＮＩＤＤＬＰＳ	４２
ＩＬ－２Ｒｂ（ＩＣＤ，Ｇ１２／２Ｒ－１）	Ｐ１４７８４	ＧＧＰＳＰＰＳＴＡＰＧＧＳＧＡＧＥＥＲＭＰＰＳＬＱＥＲＶＰＲＤＷＤＰＱＰＬＧＰＰＴＰＧＶＰＤＬＶＤＦＱＰＰＰＥＬＶＬＲＥＡＧＥＥＶＰＤＡＧＰＲＥＧＶＳＦＰＷＳＲＰＰＧＱＧＥＦＲＡＬＮＡＲＬＰＬＮＴＤＡＹＬＳＬＱＥＬＱＧＱＤＰＴＨＬＶ＊	４３
Ｇ－ＣＳＦＲ（ＩＣＤ，Ｇ２１／１２／２Ｒ－１）	Ｑ９９０６２	ＳＰＮＲＫＮＰＬＷＰＳＶＰＤＰＡＨＳＳＬＧＳＷＶＰＴＩＭＥＥＤＡＦＱＬＰＧＬＧＴＰＰＩＴＫＬＴＶＬＥＥＤＥＫＫＰＶＰＷＥＳＨＮＳＳＥＴＣＧＬＰＴＬＶＱＴＹＶＬＱＧＤＰＲＡＶＳＴＱＰＱＳＱ	４４
ＩＬ－２Ｒｂ（ＩＣＤ，Ｇ２１／１２／２Ｒ－１）	Ｐ１４７８４	ＳＳＮＨＳＬＴＳＣＦＴＮＱＧＹＦＦＦＨＬＰＤＡＬＥＩＥＡＣＱＶＹＦＴＹＤＰＹＳＥＥＤＰ	４５
ＩＬ－１２Ｒｂ２（ＩＣＤ，Ｇ２１／１２／２Ｒ－１）	Ｑ９９６６５	ＡＧＤＬＰＴＨＤＧＹＬＰＳＮＩＤＤＬＰＳ	４６
ＩＬ－２Ｒｂ（ＩＣＤ，Ｇ２１／１２／２Ｒ－１）	Ｐ１４７８４	ＧＧＰＳＰＰＳＴＡＰＧＧＳＧＡＧＥＥＲＭＰＰＳＬＱＥＲＶＰＲＤＷＤＰＱＰＬＧＰＰＴＰＧＶＰＤＬＶＤＦＱＰＰＰＥＬＶＬＲＥＡＧＥＥＶＰＤＡＧＰＲＥＧＶＳＦＰＷＳＲＰＰＧＱＧＥＦＲＡＬＮＡＲＬＰＬＮＴＤＡＹＬＳＬＱＥＬＱＧＱＤＰＴＨＬＶ＊	４７

ｇｐ１３０（ＩＣＤ，Ｇ２７／２Ｒ－１）	Ｐ４０１８９	ＮＫＲＤＬＩＫＫＨＩＷＰＮＶＰＤＰＳＫＳＨＩＡＱＷＳＰＨＴＰＰＲＨＮＦＮＳＫＤＱＭＹＳＤＧＮＦＴＤＶＳＶＶＥＩＥＡＮＤＫＫＰＦＰＥＤＬＫＳＬＤＬＦＫＫＥＫＩＮＴＥＧＨＳＳＧＩＧＧＳＳＣＭＳＳＳＲＰＳＩＳＳＳＤＥＮＥＳＳＱＮＴＳＳＴＶＱＹＳＴＶＶＨＳＧＹＲＨＱＶＰＳＶＱＶＦＳＲ	４８
ＩＬ－２Ｒｂ（ＩＣＤ，Ｇ２７／２Ｒ－１）	Ｐ１４７８４	ＡＳＬＳＳＮＨＳＬＴＳＣＦＴＮＱＧＹＦＦＦＨＬＰＤＡＬＥＩＥＡＣＱＶＹＦＴＹＤＰＹＳＥＥＤＰＤＥＧＶＡＧＡＰＴＧＳＳＰＱＰＬＱＰＬＳＧＥＤＤＡＹＣＴＦＰＳＲＤＤＬＬＬＦＳＰＳＬＬＧＧＰＳＰＰＳＴＡＰＧＧＳＧＡＧＥＥＲＭＰＰＳＬＱＥＲＶＰＲＤＷＤＰＱＰＬＧＰＰＴＰＧＶＰＤＬＶＤＦＱＰＰＰＥＬＶＬＲＥＡＧＥＥＶＰＤＡＧＰＲＥＧＶＳＦＰＷＳＲＰＰＧＱＧＥＦＲＡＬＮＡＲＬＰＬＮＴＤＡＹＬＳＬＱＥＬＱＧＱＤＰＴＨＬＶ＊	４９
Ｇ－ＣＳＦＲ（ＩＣＤ，Ｇ７Ｒ－１）	Ｑ９９０６２	ＳＰＮＲＫＮＰＬＷＰＳＶＰＤＰＡＨＳＳＬＧＳＷＶＰＴＩＭＥＥＤＡＦＱＬＰＧＬＧＴＰＰＩＴＫＬＴＶＬＥＥＤＥＫＫＰＶＰＷＥＳＨ	５０
ＩＬ－７Ｒａ（ＩＣＤ，Ｇ７Ｒ－１）	Ｐ１６８７１	ＳＧＫＮＧＰＨＶＹＱＤＬＬＬＳＬＧＴＴＮＳＴＬＰＰＰＦＳＬＱＳＧＩＬＴＬＮＰＶＡＱＧＱＰＩＬＴＳＬＧＳＮＱＥＥＡＹＶＴＭＳＳＦＹＱＮＱ＊	５１
Ｇ－ＣＳＦＲ（ＩＣＤ，Ｇ２１／７Ｒ－１）	Ｑ９９０６２	ＳＰＮＲＫＮＰＬＷＰＳＶＰＤＰＡＨＳＳＬＧＳＷＶＰＴＩＭＥＥＤＡＦＱＬＰＧＬＧＴＰＰＩＴＫＬＴＶＬＥＥＤＥＫＫＰＶＰＷＥＳＨＮＳＳＥＴＣＧＬＰＴＬＶＱＴＹＶＬＱＧＤＰＲＡＶＳＴＱＰＱＳＱ	５２
ＩＬ７Ｒ（ＩＣＤ，Ｇ２１／７Ｒ－１）	Ｐ１６８７１	ＳＳＳＲＳＬＤＣＲＥＳＧＫＮＧＰＨＶＹＱＤＬＬＬＳＬＧＴＴＮＳＴＬＰＰＰＦＳＬＱＳＧＩＬＴＬＮＰＶＡＱＧＱＰＩＬＴＳＬＧＳＮＱＥＥＡＹＶＴＭＳＳＦＹＱＮＱ＊	５３

ドメイン	Ｇｅｎｂａｎｋ受託ＩＤ	核酸配列	
ＩＬ－２ＲＢ（ＩＣＤ，Ｇ２Ｒ－１）	ＮＭ＿０００８７８	ＡＡＣＴＧＣＡＧＧＡＡＣＡＣＣＧＧＧＣＣＡＴＧ ＧＣＴＧＡＡＧＡＡＧＧＴＣＣＴＧＡＡＧＴＧＴＡ ＡＣＡＣＣＣＣＡＧＡＣＣＣＣＴＣＧＡＡＧＴＴＣ ＴＴＴＴＣＣＣＡＧＣＴＧＡＧＣＴＣＡＧＡＧＣＡ ＴＧＧＡＧＧＡＧＡＣＧＴＣＣＡＧＡＡＧＴＧＧＣ ＴＣＴＣＴＴＣＧＣＣＣＴＴＣＣＣＣＴＣＡＴＣＧ ＴＣＣＴＴＣＡＧＣＣＣＴＧＧＣＧＧＣＣＴＧＧＣ ＡＣＣＴＧＡＧＡＴＣＴＣＧＣＣＡＣＴＡＧＡＡＧ ＴＧＣＴＧＧＡＧＡＧＧＧＡＣＡＡＧＧＴＧＡＣＧ ＣＡＧＣＴＧＣＴＣＣＴＧＣＡＧＣＡＧＧＡＣＡＡ ＧＧＴＧＣＣＴＧＡＧＣＣＣＧＣＡＴＣＣＴＴＡＡ ＧＣＡＧＣＡＡＣＣＡＣＴＣＧＣＴＧＡＣＣＡＧＣ ＴＧＣＴＴＣＡＣＣＡＡＣＣＡＧＧＧＴＴＡＣＴＴ ＣＴＴＣＴＴＣＣＡＣＣＴＣＣＣＧＧＡＴＧＣＣＴ ＴＧＧＡＧＡＴＡＧＡＧＧＣＣＴＧＣＣＡＧＧＴＧ ＴＡＣＴＴＴＡＣＴＴＡＣＧＡＣＣＣＣＴＡＣＴＣ ＡＧＡＧＧＡＡＧＡＣＣＣＴＧＡＴＧＡＧＧＧＴＧ ＴＧＧＣＣＧＧＧＧＣＡＣＣＣＡＣＡＧＧＧＴＣＴ ＴＣＣＣＣＣＣＡＡＣＣＣＣＴＧＣＡＧＣＣＴＣＴ ＧＴＣＡＧＧＧＧＡＧＧＡＣＧＡＣＧＣＣＴＡＣＴ ＧＣＡＣＣＴＴＣＣＣＣＴＣＣＡＧＧＧＡＴＧＡＣ ＣＴＧＣＴＧＣＴＣＴＴＣＴＣＣＣＣＣＡＧＴＣＴ ＣＣＴＣＧＧＴＧＧＣＣＣＣＡＧＣＣＣＣＣＣＡＡ ＧＣＡＣＴＧＣＣＣＣＴＧＧＧＧＧＣＡＧＴＧＧＧ ＧＣＣＧＧＴＧＡＡＧＡＧＡＧＧＡＴＧＣＣＣＣＣ ＴＴＣＴＴＴＧＣＡＡＧＡＡＡＧＡＧＴＣＣＣＣＡ ＧＡＧＡＣＴＧＧＧＡＣＣＣＣＣＡＧＣＣＣＣＴＧ ＧＧＧＣＣＴＣＣＣＡＣＣＣＣＡＧＧＡＧＴＣＣＣ ＡＧＡＣＣＴＧＧＴＧＧＡＴＴＴＴＣＡＧＣＣＡＣ ＣＣＣＣＴＧＡＧＣＴＧＧＴＧＣＴＧＣＧＡＧＡＧ ＧＣＴＧＧＧＧＡＧＧＡＧＧＴＣＣＣＴＧＡＣＧＣ ＴＧＧＣＣＣＣＡＧＧＧＡＧＧＧＡＧＴＣＡＧＴＴ ＴＣＣＣＣＴＧＧＴＣＣＡＧＧＣＣＴＣＣＴＧＧＧ ＣＡＧＧＧＧＧＡＧＴＴＣＡＧＧＧＣＣＣＴＴＡＡ ＴＧＣＴＣＧＣＣＴＧＣＣＣＣＴＧＡＡＣＡＣＴＧ ＡＴＧＣＣＴＡＣＴＴＧＴＣＣＣＴＣＣＡＡＧＡＡ ＣＴＣＣＡＧＧＧＴＣＡＧＧＡＣＣＣＡＡＣＴＣＡ ＣＴＴＧＧＴＧＴＡＧ	５４

ＩＬ－２ＲＧ（ＩＣＤ，Ｇ２Ｒ－１）	ＮＰ＿０００１９７	ＧＡＡＣＧＧＡＣＧＡＴＧＣＣＣＣＧＡＡＴＴＣＣＣＡＣＣＣＴＧＡＡＧＡＡＣＣＴＡＧＡＧＧＡＴＣＴＴＧＴＴＡＣＴＧＡＡＴＡＣＣＡＣＧＧＧＡＡＣＴＴＴＴＣＧＧＣＣＴＧＧＡＧＴＧＧＴＧＴＧＴＣＴＡＡＧＧＧＡＣＴＧＧＣＴＧＡＧＡＧＴＣＴＧＣＡＧＣＣＡＧＡＣＴＡＣＡＧＴＧＡＡＣＧＡＣＴＣＴＧＣＣＴＣＧＴＣＡＧＴＧＡＧＡＴＴＣＣＣＣＣＡＡＡＡＧＧＡＧＧＧＧＣＣＣＴＴＧＧＧＧＡＧＧＧＧＧＣＣＴＧＧＧＧＣＣＴＣＣＣＣＡＴＧＣＡＡＣＣＡＧＣＡＴＡＧＣＣＣＣＴＡＣＴＧＧＧＣＣＣＣＣＣＣＣＡＴＧＴＴＡＣＡＣＣＣＴＡＡＡＧＣＣＴＧＡＡＡＣＣＴＧＡ	５５
ｇｐ１３０（ＩＣＤ，Ｇ２Ｒ－２）	ＮＭ＿００２１８４	ＡＡＴＡＡＧＣＧＡＧＡＣＣＴＡＡＴＴＡＡＡＡＡＡＣＡＣＡＴＣＴＧＧＣＣＴＡＡＴＧＴＴＣＣＡＧＡＴＣＣＴＴＣＡＡＡＧＡＧＴＣＡＴＡＴＴＧＣＣＣＡＧＴＧＧＴＣＡＣＣＴＣＡＣＡＣＴＣＣＴＣＣＡＡＧＧＣＡＣＡＡＴＴＴＴＡＡＴＴＣＡＡＡＡＧＡＴＣＡＡＡＴＧＴＡＴＴＣＡＧＡＴＧＧＣＡＡＴＴＴＣＡＣＴＧＡＴＧＴＡＡＧＴＧＴＴＧＴＧＧＡＡＡＴＡＧＡＡＧＣＡＡＡＴＧＡＣＡＡＡＡＡＧＣＣＴＴＴＴＣＣＡＧＡＡＧＡＴＣＴＧＡＡＡＴＣＡＴＴＧＧＡＣＣＴＧＴＴＣＡＡＡＡＡＧＧＡＡＡＡＡＡＴＴＡＡＴＡＣＴＧＡＡＧＧＡＣＡＣＡＧＣＡＧＴＧＧＴＡＴＴＧＧＧＧＧＧＴＣＴＴＣＡＴＧＴＡＴＧＴＣＡＴＣＴＴＣＴＡＧＧＣＣＡＡＧＣＡＴＴＴＴＣＴ	５６

ＩＬ－２Ｒｂ（ＩＣＤ，Ｇ２Ｒ－２）	ＮＭ＿００８７８	ＧＣＡＴＣＣＴＴＡＡＧＣＡＧＣＡＡＣＣＡＣＴＣ ＧＣＴＧＡＣＣＡＧＣＴＧＣＴＴＣＡＣＣＡＡＣＣ ＡＧＧＧＴＴＡＣＴＴＣＴＴＣＴＴＣＣＡＣＣＴＣ ＣＣＧＧＡＴＧＣＣＴＴＧＧＡＧＡＴＡＧＡＧＧＣ ＣＴＧＣＣＡＧＧＴＧＴＡＣＴＴＴＡＣＴＴＡＣＧ ＡＣＣＣＣＴＡＣＴＣＡＧＡＧＧＡＡＧＡＣＣＣＴ ＧＡＴＧＡＧＧＧＴＧＴＧＧＣＣＧＧＧＧＣＡＣＣ ＣＡＣＡＧＧＧＴＣＴＴＣＣＣＣＣＣＡＡＣＣＣＣ ＴＧＣＡＧＣＣＴＣＴＧＴＣＡＧＧＧＧＡＧＧＡＣ ＧＡＣＧＣＣＴＡＣＴＧＣＡＣＣＴＴＣＣＣＣＴＣ ＣＡＧＧＧＡＴＧＡＣＣＴＧＣＴＧＣＴＣＴＴＣＴ ＣＣＣＣＣＡＧＴＣＴＣＣＴＣＧＧＴＧＧＣＣＣＣ ＡＧＣＣＣＣＣＣＡＡＧＣＡＣＴＧＣＣＣＣＴＧＧ ＧＧＧＣＡＧＴＧＧＧＧＣＣＧＧＴＧＡＡＧＡＧＡ ＧＧＡＴＧＣＣＣＣＣＴＴＣＴＴＴＧＣＡＡＧＡＡ ＡＧＡＧＴＣＣＣＣＡＧＡＧＡＣＴＧＧＧＡＣＣＣ ＣＣＡＧＣＣＣＣＴＧＧＧＧＣＣＴＣＣＣＡＣＣＣ ＣＡＧＧＡＧＴＣＣＣＡＧＡＣＣＴＧＧＴＧＧＡＴ ＴＴＴＣＡＧＣＣＡＣＣＣＣＣＴＧＡＧＣＴＧＧＴ ＧＣＴＧＣＧＡＧＡＧＧＣＴＧＧＧＧＡＧＧＡＧＧ ＴＣＣＣＴＧＡＣＧＣＴＧＧＣＣＣＣＡＧＧＧＡＧ ＧＧＡＧＴＣＡＧＴＴＴＣＣＣＣＴＧＧＴＣＣＡＧ ＧＣＣＴＣＣＴＧＧＧＣＡＧＧＧＧＧＡＧＴＴＣＡ ＧＧＧＣＣＣＴＴＡＡＴＧＣＴＣＧＣＣＴＧＣＣＣ ＣＴＧＡＡＣＡＣＴＧＡＴＧＣＣＴＡＣＴＴＧＴＣ ＣＣＴＣＣＡＡＧＡＡＣＴＣＣＡＧＧＧＴＣＡＧＧ ＡＣＣＣＡＡＣＴＣＡＣＴＴＧＧＴＧＴＡＧ	５７
Ｇ－ＣＳＦＲ（ＩＣＤ，Ｇ２Ｒ－３）	ＮＰ＿００７５１	ＡＧＣＣＣＣＡＡＣＡＧＧＡＡＧＡＡＴＣＣＣＣＴ ＣＴＧＧＣＣＡＡＧＴＧＴＣＣＣＡＧＡＣＣＣＡＧ ＣＴＣＡＣＡＧＣＡＧＣＣＴＧＧＧＣＴＣＣＴＧＧ ＧＴＧＣＣＣＡＣＡＡＴＣＡＴＧＧＡＧＧＡＧＧＡ ＴＧＣＣＴＴＣＣＡＧＣＴＧＣＣＣＧＧＣＣＴＴＧ ＧＣＡＣＧＣＣＡＣＣＣＡＴＣＡＣＣＡＡＧＣＴＣ ＡＣＡＧＴＧＣＴＧＧＡＧＧＡＧＧＡＴＧＡＡＡＡ ＧＡＡＧＣＣＧＧＴＧＣＣＣＴＧＧＧＡＧＴＣＣＣ ＡＴ	５８

ＩＬ－２Ｒｂ（ＩＣＤ，Ｇ２Ｒ－３）	ＮＭ＿００８７８	ＡＧＣＡＧＣＡＡＣＣＡＣＴＣＧＣＴＧＡＣＣＡＧ ＣＴＧＣＴＴＣＡＣＣＡＡＣＣＡＧＧＧＴＴＡＣＴ ＴＣＴＴＣＴＴＣＣＡＣＣＴＣＣＣＧＧＡＴＧＣＣ ＴＴＧＧＡＧＡＴＡＧＡＧＧＣＣＴＧＣＣＡＧＧＴ ＧＴＡＣＴＴＴＡＣＴＴＡＣＧＡＣＣＣＣＴＡＣＴ ＣＡＧＡＧＧＡＡＧＡＣＣＣＴＧＡＴＧＡＧＧＧＴ ＧＴＧＧＣＣＧＧＧＧＣＡＣＣＣＡＣＡＧＧＧＴＣ ＴＴＣＣＣＣＣＣＡＡＣＣＣＣＴＧＣＡＧＣＣＴＣ ＴＧＴＣＡＧＧＧＧＡＧＧＡＣＧＡＣＧＣＣＴＡＣ ＴＧＣＡＣＣＴＴＣＣＣＣＴＣＣＡＧＧＧＡＴＧＡ ＣＣＴＧＣＴＧＣＴＣＴＴＣＴＣＣＣＣＣＡＧＴＣ ＴＣＣＴＣＧＧＴＧＧＣＣＣＣＡＧＣＣＣＣＣＣＡ ＡＧＣＡＣＴＧＣＣＣＣＴＧＧＧＧＧＣＡＧＴＧＧ ＧＧＣＣＧＧＴＧＡＡＧＡＧＡＧＧＡＴＧＣＣＣＣ ＣＴＴＣＴＴＴＧＣＡＡＧＡＡＡＧＡＧＴＣＣＣＣ ＡＧＡＧＡＣＴＧＧＧＡＣＣＣＣＣＡＧＣＣＣＣＴ ＧＧＧＧＣＣＴＣＣＣＡＣＣＣＣＡＧＧＡＧＴＣＣ ＣＡＧＡＣＣＴＧＧＴＧＧＡＴＴＴＴＣＡＧＣＣＡ ＣＣＣＣＣＴＧＡＧＣＴＧＧＴＧＣＴＧＣＧＡＧＡ ＧＧＣＴＧＧＧＧＡＧＧＡＧＧＴＣＣＣＴＧＡＣＧ ＣＴＧＧＣＣＣＣＡＧＧＧＡＧＧＧＡＧＴＣＡＧＴ ＴＴＣＣＣＣＴＧＧＴＣＣＡＧＧＣＣＴＣＣＴＧＧ ＧＣＡＧＧＧＧＧＡＧＴＴＣＡＧＧＧＣＣＣＴＴＡ ＡＴＧＣＴＣＧＣＣＴＧＣＣＣＣＴＧＡＡＣＡＣＴ ＧＡＴＧＣＣＴＡＣＴＴＧＴＣＣＣＴＣＣＡＡＧＡ ＡＣＴＣＣＡＧＧＧＴＣＡＧＧＡＣＣＣＡＡＣＴＣ ＡＣＴＴＧＧＴＧＴＡＧ	５９
Ｇ－ＣＳＦＲ（ＩＣＤ，Ｇ１２Ｒ－１）	ＮＰ＿００７５１	ＡＧＣＣＣＣＡＡＣＡＧＧＡＡＧＡＡＴＣＣＣＣＴ ＣＴＧＧＣＣＡＡＧＴＧＴＣＣＣＡＧＡＣＣＣＡＧ ＣＴＣＡＣＡＧＣＡＧＣＣＴＧＧＧＣＴＣＣＴＧＧ ＧＴＧＣＣＣＡＣＡＡＴＣＡＴＧＧＡＧＧＡＧＧＡ ＴＧＣＣＴＴＣＣＡＧＣＴＧＣＣＣＧＧＣＣＴＴＧ ＧＣＡＣＧＣＣＡＣＣＣＡＴＣＡＣＣＡＡＧＣＴＣ ＡＣＡＧＴＧＣＴＧＧＡＧＧＡＧＧＡＴＧＡＡＡＡ ＧＡＡＧＣＣＧＧＴＧＣＣＣＴＧＧＧＡＧＴＣＣＣ ＡＴＡＡＣＡＧＣＴＣＡＧＡＧＡＣＣ	６０

ＩＬ１２Ｒｂ２（ＩＣＤ，Ｇ１２Ｒ－１）	ＮＰ＿００１５５０	ＧＣＡＧＧＴＧＡＣＣＴＴＣＣＣＡＣＣＣＡＴＧＡＴＧＧＣＴＡＣＴＴＡＣＣＣＴＣＣＡＡＣＡＴＡＧＡＴＧＡＣＣＴＣＣＣＣＴＣＡＣＡＴＧＡＧＧＣＡＣＣＴＣＴＣＧＣＴＧＡＣＴＣＴＣＴＧＧＡＡＧＡＡＣＴＧＧＡＧＣＣＴＣＡＧＣＡＣＡＴＣＴＣＣＣＴＴＴＣＴＧＴＴＴＴＣＣＣＣＴＣＡＡＧＴＴＣＴＣＴＴＣＡＣＣＣＡＣＴＣＡＣＣＴＴＣＴＣＣＴＧＴＧＧＴＧＡＴＡＡＧＣＴＧＡＣＴＣＴＧＧＡＴＣＡＧＴＴＡＡＡＧＡＴＧＡＧＧＴＧＴＧＡＣＴＣＣＣＴＣＡＴＧＣＴＣＴＧＡ	６１
Ｇ－ＣＳＦＲ（ＩＣＤ，Ｇ２１Ｒ－１）	ＮＰ＿０００７５１	ＡＧＣＣＣＣＡＡＣＡＧＧＡＡＧＡＡＴＣＣＣＣＴＣＴＧＧＣＣＡＡＧＴＧＴＣＣＣＡＧＡＣＣＣＡＧＣＴＣＡＣＡＧＣＡＧＣＣＴＧＧＧＣＴＣＣＴＧＧＧＴＧＣＣＣＡＣＡＡＴＣＡＴＧＧＡＧＧＡＧＧＡＴＧＣＣＴＴＣＣＡＧＣＴＧＣＣＣＧＧＣＣＴＴＧＧＣＡＣＧＣＣＡＣＣＣＡＴＣＡＣＣＡＡＧＣＴＣＡＣＡＧＴＧＣＴＧＧＡＧＧＡＧＧＡＴＧＡＡＡＡＧＡＡＧＣＣＧＧＴＧＣＣＣＴＧＧＧＡＧＴＣＣＣＡＴＡＡＣＡＧＣＴＣＡＧＡＧＡＣＣ	６２
ＩＬ－２１Ｒ（ＩＣＤ，Ｇ２１Ｒ－１）	ＮＰ＿０６８５７０（１コドン変更）	ＡＧＣＣＣＴＧＧＧＧＡＣＧＡＡＧＧＡＣＣＣＣＣＣＣＧＧＡＧＣＴＡＣＣＴＣＣＧＣＣＡＧＴＧＧＧＴＧＧＴＣＡＴＴＣＣＴＣＣＧＣＣＡＣＴＴＴＣＧＡＧＣＣＣＴＧＧＡＣＣＣＣＡＧＧＣＣＡＧＣＴＡＡ	６３
Ｇ－ＣＳＦＲ（ＩＣＤ，Ｇ２１Ｒ－２）	ＮＰ＿０００７５１	ＡＧＣＣＣＣＡＡＣＡＧＧＡＡＧＡＡＴＣＣＣＣＴＣＴＧＧＣＣＡＡＧＴＧＴＣＣＣＡＧＡＣＣＣＡＧＣＴＣＡＣＡＧＣＡＧＣＣＴＧＧＧＣＴＣＣＴＧＧＧＴＧＣＣＣＡＣＡＡＴＣＡＴＧＧＡＧＧＡＧＧＡＴＧＣＣＴＴＣＣＡＧＣＴＧＣＣＣＧＧＣＣＴＴＧＧＣＡＣＧＣＣＡＣＣＣＡＴＣＡＣＣＡＡＧＣＴＣＡＣＡＧＴＧＣＴＧＧＡＧＧＡＧＧＡＴＧＡＡＡＡＧＡＡＧＣＣＧＧＴＧＣＣＣＴＧＧＧＡＧＴＣＣＣＡＴＡＡＣ	６４

10 20 30 40 50

ＩＬ－２１Ｒ（ＩＣＤ，Ｇ２１Ｒ－２）	ＮＰ＿０６８５７０（１コドン変更）	ＣＡＧＡＡＣＴＣＧＧＧＧＧＣＴＣＡＧＣＴＴＡＣＡＧＴＧＡＧＧＡＧＡＧＧＧＡＴＣＧＧＣＣＡＴＡＣＧＧＣＣＴＧＧＴＧＴＣＣＡＴＴＧＡＣＡＣＡＧＴＧＡＣＴＧＴＧＣＴＡＧＡＴＧＣＡＧＡＧＧＧＧＣＣＡＴＧＣＡＣＣＴＧＧＣＣＣＴＧＣＡＧＣＴＧＴＧＡＧＧＡＴＧＡＣＧＧＣＴＡＣＣＣＡＧＣＣＣＴＧＧＡＣＣＴＧＧＡＴＧＣＴＧＧＣＣＴＧＧＡＧＣＣＣＡＧＣＣＣＡＧＧＣＣＴＡＧＡＧＧＡＣＣＣＡＣＴＣＴＴＧＧＡＴＧＣＡＧＧＧＡＣＣＡＣＡＧＴＣＣＴＧＴＣＣＴＧＴＧＧＣＴＧＴＧＴＣＴＣＡＧＣＴＧＧＣＡＧＣＣＣＴＧＧＧＣＴＡＧＧＡＧＧＧＣＣＣＣＴＧＧＧＡＡＧＣＣＴＣＣＴＧＧＡＣＡＧＡＣＴＡＡＡＧＣＣＡＣＣＣＣＴＴＧＣＡＧＡＴＧＧＧＧＡＧＧＡＣＴＧＧＧＣＴＧＧＧＧＧＡＣＴＧＣＣＣＴＧＧＧＧＴＧＧＣＣＧＧＴＣＡＣＣＴＧＧＡＧＧＧＧＴＣＴＣＡＧＡＧＡＧＴＧＡＧＧＣＧＧＧＣＴＣＡＣＣＣＣＴＧＧＣＣＧＧＧＣＣＴＧＧＡＴＡＴＧＧＡＣＡＣＧＴＴＴＧＡＣＡＧＴＧＧＣＴＴＴＧＴＧＧＧＣＴＣＴＧＡＣＴＧＣＡＧＣＡＧＣＣＣＴＧＴＧＧＡＧＴＧＴＧＡＣＴＴＣＡＣＣＡＧＣＣＣＴＧＧＧＧＡＣＧＡＡＧＧＡＣＣＣＣＣＣＣＧＧＡＧＣＴＡＣＣＴＣＣＧＣＣＡＧＴＧＧＧＴＧＧＴＣＡＴＴＣＣＴＣＣＧＣＣＡＣＴＴＴＣＧＡＧＣＣＣＴＧＧＡＣＣＣＣＡＧＧＣＣＡＧＣ	65
Ｇ－ＣＳＦＲ（ＩＣＤ，Ｇ２１／２Ｒ－１）	ＮＰ＿００７５１	ＡＧＣＣＣＣＡＡＣＡＧＧＡＡＧＡＡＴＣＣＣＣＴＣＴＧＧＣＣＡＡＧＴＧＴＣＣＣＡＧＡＣＣＣＡＧＣＴＣＡＣＡＧＣＡＧＣＣＴＧＧＧＣＴＣＣＴＧＧＧＴＧＣＣＣＡＣＡＡＴＣＡＴＧＧＡＧＧＡＧＧＡＴＧＣＣＴＴＣＣＡＧＣＴＧＣＣＣＧＧＣＣＴＴＧＧＣＡＣＧＣＣＡＣＣＣＡＴＣＡＣＣＡＡＧＣＴＣＡＣＡＧＴＧＣＴＧＧＡＧＧＡＧＧＡＴＧＡＡＡＡＧＡＡＧＣＣＧＧＴＧＣＣＣＴＧＧＧＧＡＧＴＣＣＣＡＴＡＡＣＡＧＣＴＣＡＧＡＧＡＣＣＴＧＴＧＧＣＣＴＣＣＣＣＡＣＴＣＴＧＧＴＣＣＡＧＡＣＣＴＡＴＧＴＧＣＴＣＣＡＧＧＧＧＧＡＣＣＣＡＡＧＡＧＣＡＧＴＴＴＣＣＡＣＣＣＡＧＣＣＣＣＡＡＴＣＣＣＡＧ	66

ＩＬ－２Ｒｂ（ＩＣＤ，Ｇ２１／２Ｒ－１）	ＮＭ＿００８７８	ＡＧＣＡＧＣＡＡＣＣＡＣＴＣＧＣＴＧＡＣＣＡＧ ＣＴＧＣＴＴＣＡＣＣＡＡＣＣＡＧＧＧＴＴＡＣＴ ＴＣＴＴＣＴＴＣＣＡＣＣＴＣＣＣＧＧＡＴＧＣＣ ＴＴＧＧＡＧＡＴＡＧＡＧＧＣＣＴＧＣＣＡＧＧＴ ＧＴＡＣＴＴＴＡＣＴＴＡＣＧＡＣＣＣＣＴＡＣＴ ＣＡＧＡＧＧＡＡＧＡＣＣＣＴＧＡＴＧＡＧＧＧＴ ＧＴＧＧＣＣＧＧＧＧＣＡＣＣＣＡＣＡＧＧＧＴＣ ＴＴＣＣＣＣＣＣＡＡＣＣＣＣＴＧＣＡＧＣＣＴＣ ＴＧＴＣＡＧＧＧＧＡＧＧＡＣＧＡＣＧＣＣＴＡＣ ＴＧＣＡＣＣＴＴＣＣＣＣＴＣＣＡＧＧＧＡＴＧＡ ＣＣＴＧＣＴＧＣＴＣＴＴＣＴＣＣＣＣＣＡＧＴＣ ＴＣＣＴＣＧＧＴＧＧＣＣＣＣＡＧＣＣＣＣＣＣＡ ＡＧＣＡＣＴＧＣＣＣＣＴＧＧＧＧＧＣＡＧＴＧＧ ＧＧＣＣＧＧＴＧＡＡＧＡＧＡＧＧＡＴＧＣＣＣＣ ＣＴＴＣＴＴＴＧＣＡＡＧＡＡＡＧＡＧＴＣＣＣＣ ＡＧＡＧＡＣＴＧＧＧＡＣＣＣＣＣＡＧＣＣＣＣＴ ＧＧＧＧＣＣＴＣＣＣＡＣＣＣＣＡＧＧＡＧＴＣＣ ＣＡＧＡＣＣＴＧＧＴＧＧＡＴＴＴＴＣＡＧＣＣＡ ＣＣＣＣＣＴＧＡＧＣＴＧＧＴＧＣＴＧＣＧＡＧＡ ＧＧＣＴＧＧＧＧＡＧＧＡＧＧＴＣＣＣＴＧＡＣＧ ＣＴＧＧＣＣＣＣＡＧＧＧＡＧＧＧＡＧＴＣＡＧＴ ＴＴＣＣＣＣＴＧＧＴＣＣＡＧＧＣＣＴＣＣＴＧＧ ＧＣＡＧＧＧＧＧＡＧＴＴＣＡＧＧＧＣＣＣＴＴＡ ＡＴＧＣＴＣＧＣＣＴＧＣＣＣＣＴＧＡＡＣＡＣＴ ＧＡＴＧＣＣＴＡＣＴＴＧＴＣＣＣＴＣＣＡＡＧＡ ＡＣＴＣＣＡＧＧＧＴＣＡＧＧＡＣＣＣＡＡＣＴＣ ＡＣＴＴＧＧＴＧＴＡＧ	６７
Ｇ－ＣＳＦＲ（ＩＣＤ，Ｇ１２／２Ｒ－１）	ＮＰ＿００７５１	ＡＧＣＣＣＣＡＡＣＡＧＧＡＡＧＡＡＴＣＣＣＣＴ ＣＴＧＧＣＣＡＡＧＴＧＴＣＣＣＡＧＡＣＣＣＡＧ ＣＴＣＡＣＡＧＣＡＧＣＣＴＧＧＧＣＴＣＣＴＧＧ ＧＴＧＣＣＣＡＣＡＡＴＣＡＴＧＧＡＧＧＡＧＧＡ ＴＧＣＣＴＴＣＣＡＧＣＴＧＣＣＣＧＧＣＣＴＴＧ ＧＣＡＣＧＣＣＡＣＣＣＡＴＣＡＣＣＡＡＧＣＴＣ ＡＣＡＧＴＧＣＴＧＧＡＧＧＡＧＧＡＴＧＡＡＡＡ ＧＡＡＧＣＣＧＧＴＧＣＣＣＴＧＧＧＡＧＴＣＣＣ ＡＴ	６８

ＩＬ－２Ｒｂ（ＩＣＤ，Ｇ１２／２Ｒ－１）	ＮＭ＿０００８７８	ＡＧＣＡＧＣＡＡＣＣＡＣＴＣＧＣＴＧＡＣＣＡＧＣＴＧＣＴＴＣＡＣＣＡＡＣＣＡＧＧＧＴＴＡＣＴＴＣＴＴＣＴＴＣＣＡＣＣＴＣＣＣＧＧＡＴＧＣＣＴＴＧＧＡＧＡＴＡＧＡＧＧＣＣＴＧＣＣＡＧＧＴＧＴＡＣＴＴＴＡＣＴＴＡＣＧＡＣＣＣＣＴＡＣＴＣＡＧＡＧＧＡＡＧＡＣＣＣＴ	６９
ＩＬ－２Ｒｂ（ＩＣＤ，Ｇ１２／２Ｒ－１）	ＮＰ＿００１５５０	ＧＣＡＧＧＴＧＡＣＣＴＴＣＣＣＡＣＣＣＡＴＧＡＴＧＧＣＴＡＣＴＴＡＣＣＣＴＣＣＡＡＣＡＴＡＧＡＴＧＡＣＣＴＣＣＣＣＴＣＡ	７０
ＩＬ－２Ｒｂ（ＩＣＤ，Ｇ１２／２Ｒ－１）	ＮＭ＿０００８７８	ＧＧＴＧＧＣＣＣＣＡＧＣＣＣＣＣＣＡＡＧＣＡＣＴＧＣＣＣＣＴＧＧＧＧＧＣＡＧＴＧＧＧＧＣＣＧＧＴＧＡＡＧＡＧＡＧＧＡＴＧＣＣＣＣＣＴＴＣＴＴＴＧＣＡＡＧＡＡＡＧＡＧＴＣＣＣＣＡＧＡＧＡＣＴＧＧＧＡＣＣＣＣＣＡＧＣＣＣＣＴＧＧＧＧＣＣＴＣＣＣＡＣＣＣＣＣＡＧＧＡＧＴＣＣＣＡＧＡＣＣＴＧＧＴＧＧＡＴＴＴＴＣＡＧＣＣＡＣＣＣＣＣＴＧＡＧＣＴＧＧＴＧＣＴＧＣＧＡＧＡＧＧＣＴＧＧＧＧＡＧＧＡＧＧＴＣＣＣＴＧＡＣＧＣＴＧＧＣＣＣＣＡＧＧＧＡＧＧＧＡＧＴＣＡＧＴＴＴＣＣＣＣＴＧＧＴＣＣＡＧＧＣＣＴＣＣＴＧＧＧＣＡＧＧＧＧＡＧＴＴＣＡＧＧＧＧＣＣＣＴＴＡＡＴＧＣＴＣＧＣＣＴＧＣＣＣＣＴＧＡＡＣＡＣＴＧＡＴＧＣＣＴＡＣＴＴＧＴＣＣＣＴＣＣＡＡＧＡＡＣＴＣＣＡＧＧＧＴＣＡＧＧＡＣＣＣＡＡＣＴＣＡＣＴＴＧＧＴＧＴＡＧ	７１

G－CSFR（ICD，G21／12／2R－1）	NP＿000751	AGCCCCAACAGGAAGAATCCCCTCTGGCCAAGTGTCCCAGACCCAGCTCACAGCAGCCTGGGCTCCTGGGTGCCCACAATCATGGAGGAGGATGCCTTCCAGCTGCCCGGCCTTGGCACGCCACCCATCACCAAGCTCACAGTGCTGGAGGAGGATGAAAAGAAGCCGGTGCCCTGGGAGTCCCATAACAGCTCAGAGACCTGTGGCCTCCCCACTCTGGTCCAGACCTATGTGCTCCAGGGGGACCCAAGAGCAGTTCCACCCAGCCCCAATCCCAG	72
IL－2Rb（ICD，G21／12／2R－1）	NM＿008778	AGCAGCAACCACTCGCTGACCAGCTGCTTCACCAACCAGGGTTACTTCTTCTTCCACCTCCCGGATGCCTTGGAGATAGAGGCCTGCCAGGTGTACTTTACTTACGACCCCTACTCAGAGGAAGACCCT	73
IL－12Rb2（ICD，G21／12／2R－1）	NP＿001550	GCAGGTGACCTTCCCACCCATGATGGCTACTTACCCTCCAACATAGATGACCTCCCCTCA	74

ＩＬ－２Ｒｂ（ＩＣＤ，Ｇ２１／１２／２Ｒ－１）	ＮＭ＿００８７８	ＧＧＴＧＧＣＣＣＣＡＧＣＣＣＣＣＣＡＡＧＣＡＣＴＧＣＣＣＣＴＧＧＧＧＧＧＣＡＧＴＧＧＧＧＣＣＧＧＴＧＡＡＧＡＧＡＧＧＡＴＧＣＣＣＣＣＴＴＣＴＴＴＧＣＡＡＧＡＡＡＧＡＧＴＣＣＣＣＡＧＡＧＡＣＴＧＧＧＡＣＣＣＣＣＡＧＣＣＣＣＴＧＧＧＧＣＣＴＣＣＣＡＣＣＣＣＡＧＧＡＧＴＣＣＣＡＧＡＣＣＴＧＧＴＧＧＡＴＴＴＴＣＡＧＣＣＡＣＣＣＣＣＴＧＡＧＣＴＧＧＴＧＣＴＧＣＧＡＧＡＧＧＣＴＧＧＧＡＧＧＡＧＧＧＴＣＣＣＴＧＡＣＧＣＴＧＧＣＣＣＣＡＧＧＧＡＧＧＧＡＧＴＣＡＧＴＴＴＣＣＣＣＴＧＧＴＣＣＡＧＧＣＣＴＣＣＴＧＧＧＧＣＡＧＧＧＧＧＧＡＧＴＴＣＡＧＧＧＧＣＣＣＴＴＡＡＴＧＣＴＣＧＣＣＴＧＣＣＣＣＣＴＧＡＡＣＡＣＴＧＡＴＧＣＣＴＡＣＴＴＧＴＣＣＣＴＣＣＡＡＧＡＡＣＴＣＣＡＧＧＧＴＣＡＧＧＡＣＣＣＡＡＣＴＣＡＣＴＴＧＧＴＧＴＡＧ	７５
ｇｐ１３０（ＩＣＤ，Ｇ２７／２Ｒ－１）	ＮＭ＿００２１８４（３コドン変更）	ＡＡＴＡＡＧＣＧＡＧＡＣＣＴＡＡＴＴＡＡＡＡＡＡＣＡＣＡＴＣＴＧＧＣＣＴＡＡＴＧＴＴＣＣＡＧＡＴＣＣＴＴＣＡＡＡＧＡＧＴＣＡＴＡＴＴＧＣＣＣＡＧＴＧＧＴＣＡＣＣＴＣＡＣＡＣＴＣＣＴＣＣＡＡＧＧＣＡＣＡＡＴＴＴＣＡＡＴＴＣＡＡＡＧＧＡＴＣＡＡＡＴＧＴＡＴＴＣＡＧＡＴＧＧＣＡＡＴＴＴＣＡＣＴＧＡＴＧＴＡＡＧＴＧＴＴＧＴＧＧＡＡＡＡＴＡＧＡＡＧＣＡＡＡＴＧＡＣＡＡＡＡＡＧＣＣＴＴＴＴＣＣＡＧＡＡＧＡＴＣＴＧＡＡＡＴＣＡＴＴＧＧＡＣＣＴＧＴＴＣＡＡＡＡＡＧＧＡＡＡＡＡＡＴＴＡＡＴＡＣＴＧＡＡＧＧＡＣＡＣＡＧＣＡＧＴＧＧＴＡＴＴＧＧＧＧＧＧＴＣＴＴＣＡＴＧＴＡＴＧＴＣＡＴＣＴＴＣＴＡＧＧＣＣＡＡＧＣＡＴＴＴＣＴＡＧＣＡＧＴＧＡＴＧＡＡＡＡＴＧＡＡＴＣＴＴＣＡＣＡＡＡＡＣＡＣＴＴＣＧＡＧＣＡＣＴＧＴＣＣＡＧＴＡＴＴＣＴＡＣＣＧＴＧＧＴＡＣＡＣＡＧＴＧＧＣＴＡＣＡＧＡＣＡＣＣＡＡＧＴＴＣＣＧＴＣＡＧＴＣＣＡＡＧＴＣＴＴＣＴＣＡＡＧＡ	７６

ＩＬ－２Ｒｂ（ＩＣＤ，Ｇ２７／２Ｒ－１）	ＮＭ＿００８７８（２コドン変更）	ＧＣＡＴＣＣＴＴＡＡＧＣＡＧＣＡＡＣＣＡＣＴＣ ＧＣＴＧＡＣＣＡＧＣＴＧＣＴＴＣＡＣＣＡＡＣＣ ＡＧＧＧＴＴＡＣＴＴＣＴＴＣＴＴＣＣＡＣＣＴＣ ＣＣＧＧＡＴＧＣＣＴＴＧＧＡＧＡＴＡＧＡＧＧＣ ＣＴＧＣＣＡＧＧＴＧＴＡＣＴＴＴＡＣＴＴＡＣＧ ＡＣＣＣＣＴＡＣＴＣＡＧＡＧＧＡＡＧＡＣＣＣＴ ＧＡＴＧＡＧＧＧＴＧＴＧＧＣＣＧＧＧＧＣＡＣＣ ＣＡＣＡＧＧＧＴＣＴＴＣＣＣＣＣＣＡＡＣＣＣＣ ＴＧＣＡＧＣＣＴＣＴＧＴＣＡＧＧＧＧＡＧＧＡＣ ＧＡＣＧＣＣＴＡＣＴＧＣＡＣＣＴＴＣＣＣＣＴＣ ＣＡＧＧＧＡＴＧＡＣＣＴＧＣＴＧＣＴＣＴＴＣＴ ＣＣＣＣＣＡＧＴＣＴＣＣＴＣＧＧＴＧＧＣＣＣＣ ＡＧＣＣＣＣＣＣＡＡＧＣＡＣＴＧＣＣＣＣＴＧＧ ＧＧＧＣＡＧＴＧＧＧＧＣＣＧＧＴＧＡＡＧＡＧＡ ＧＧＡＴＧＣＣＣＣＣＴＴＣＴＴＴＧＣＡＡＧＡＡ ＡＧＡＧＴＣＣＣＣＡＧＡＧＡＣＴＧＧＧＡＣＣＣ ＣＣＡＧＣＣＣＣＴＧＧＧＧＣＣＴＣＣＣＡＣＣＣ ＣＡＧＧＡＧＴＣＣＣＡＧＡＣＣＴＧＧＴＧＧＡＴ ＴＴＴＣＡＧＣＣＡＣＣＣＣＣＴＧＡＧＣＴＧＧＴ ＧＣＴＧＣＧＡＧＡＧＧＣＴＧＧＧＧＡＧＧＡＧＧ ＴＣＣＣＴＧＡＣＧＣＴＧＧＣＣＣＣＡＧＧＧＡＧ ＧＧＡＧＴＣＡＧＴＴＴＣＣＣＣＴＧＧＴＣＣＡＧ ＧＣＣＴＣＣＴＧＧＧＣＡＧＧＧＧＧＡＧＴＴＣＡ ＧＧＧＣＣＣＴＴＡＡＴＧＣＴＣＧＣＣＴＧＣＣＣ ＣＴＧＡＡＣＡＣＴＧＡＴＧＣＣＴＡＣＴＴＧＴＣ ＣＣＴＣＣＡＡＧＡＡＣＴＣＣＡＧＧＧＴＣＡＧＧ ＡＣＣＣＡＡＣＴＣＡＣＴＴＧＧＴＧＴＡＧ	７７
Ｇ－ＣＳＦＲ（ＩＣＤ，Ｇ７Ｒ－１）	ＮＰ＿００７５１	ＡＧＣＣＣＣＡＡＣＡＧＧＡＡＧＡＡＴＣＣＣＣＴ ＣＴＧＧＣＣＡＡＧＴＧＴＣＣＣＡＧＡＣＣＣＡＧ ＣＴＣＡＣＡＧＣＡＧＣＣＴＧＧＧＣＴＣＣＴＧＧ ＧＴＧＣＣＣＡＣＡＡＴＣＡＴＧＧＡＧＧＡＧＧＡ ＴＧＣＣＴＴＣＣＡＧＣＴＧＣＣＣＧＧＣＣＴＴＧ ＧＣＡＣＧＣＣＡＣＣＣＡＴＣＡＣＣＡＡＧＣＴＣ ＡＣＡＧＴＧＣＴＧＧＡＧＧＡＧＧＡＴＧＡＡＡＡ ＧＡＡＧＣＣＧＧＴＧＣＣＣＴＧＧＧＡＧＴＣＣＣ ＡＴ	７８

ＩＬ－７Ｒａ（ＩＣＤ，Ｇ７Ｒ－１）	ＮＰ＿００２１７６	ＡＧＴＧＧＣＡＡＧＡＡＴＧＧＧＣＣＴＣＡＴＧＴＧＴＡＣＣＡＧＧＡＣＣＴＣＣＴＧＣＴＴＡＧＣＣＴＴＧＧＧＡＣＴＡＣＡＡＡＣＡＧＣＡＣＧＣＴＧＣＣＣＣＣＴＣＣＡＴＴＴＴＣＴＣＴＣＣＡＡＴＣＴＧＧＡＡＴＣＣＴＧＡＣＡＴＴＧＡＡＣＣＣＡＧＴＴＧＣＴＣＡＧＧＧＴＣＡＧＣＣＣＡＴＴＣＴＴＡＣＴＴＣＣＣＴＧＧＧＡＴＣＡＡＡＴＣＡＡＧＡＡＧＡＡＧＣＡＴＡＴＧＴＣＡＣＣＡＴＧＴＣＣＡＧＣＴＴＣＴＡＣＣＡＡＡＡＣＣＡＧＴＧＡ	７９
Ｇ－ＣＳＦＲ（ＩＣＤ，Ｇ２１／７Ｒ－１）	ＮＰ＿００７５１	ＡＧＣＣＣＣＡＡＣＡＧＧＡＡＧＡＡＴＣＣＣＣＴＣＴＧＧＣＣＡＡＧＴＧＴＣＣＣＡＧＡＣＣＣＡＧＣＴＣＡＣＡＧＣＡＧＣＣＴＧＧＧＣＴＣＣＴＧＧＧＴＧＣＣＣＡＣＡＡＴＣＡＴＧＧＡＧＧＡＧＧＡＴＧＣＣＴＴＴＣＣＡＧＣＴＧＣＣＣＧＧＧＣＣＴＴＧＧＣＡＣＧＣＣＡＣＣＣＡＴＣＡＣＣＡＡＧＣＴＣＡＣＡＧＴＧＣＴＧＧＡＧＧＡＧＧＡＴＧＡＡＡＡＧＡＡＧＣＣＧＧＴＧＣＣＣＴＧＧＧＡＧＴＣＣＣＡＴＡＡＣＡＧＣＴＣＡＧＡＧＡＣＣＴＧＴＧＧＣＣＴＣＣＣＣＡＣＴＣＴＧＧＴＣＣＡＧＡＣＣＴＡＴＧＴＧＣＴＣＣＡＧＧＧＧＧＡＣＣＣＡＡＧＡＧＣＡＧＴＴＴＣＣＡＣＣＣＡＧＣＣＣＣＡＡＴＣＣＣＡＧ	８０
ＩＬ７Ｒ（ＩＣＤ，Ｇ２１／７Ｒ－１）	ＮＰ＿００２１７６	ＴＣＣＴＣＴＴＣＣＡＧＧＴＣＣＣＴＡＧＡＣＴＧＣＡＧＧＧＡＧＡＧＴＧＧＣＡＡＧＡＡＴＧＧＧＣＣＴＣＡＴＧＴＧＴＡＣＣＡＧＧＡＣＣＴＣＣＴＧＣＴＴＡＧＣＣＴＴＧＧＧＡＣＴＡＣＡＡＡＣＡＧＣＡＣＧＣＴＧＣＣＣＣＣＴＣＣＡＴＴＴＴＣＴＣＴＣＣＡＡＴＣＴＧＧＡＡＴＣＣＴＧＡＣＡＴＴＧＡＡＣＣＣＡＧＴＴＧＣＴＣＡＧＧＧＴＣＡＧＣＣＣＡＴＴＣＴＴＡＣＴＴＣＣＣＴＧＧＧＡＴＣＡＡＡＴＣＡＡＧＡＡＧＡＡＧＣＡＴＡＴＧＴＣＡＣＣＡＴＧＴＣＣＡＧＣＴＴＣＴＡＣＣＡＡＡＡＣＣＡＧＴＧＡ	８１

【０７８４】

【表２１】

表２１：ＷＴ及びバリアント型の組み換えヒトＧ－ＣＳＦサイトカイン、ならびに安定性を改善するようにデザインされた１３０ａ１のバリエーションのタンパク質配列（配列番号８３－１から８３－５まで）。

タンパク質	Uniprot ID	残基番号	ポリペプチド配列	配列番号
WT G-CSF	P09919	*0-174（*０は、天然のＧ－ＣＳＦには存在しないM残基を指す）	MTPLGPASSLPQSFLLKCLEQVRKIQGDGAALQEKL CATYKLCHPEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLA GCLSQLHSGLFLYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQLD VADFATTIWQQMEELGMAPALQPTQGAMPAFASAF QRRAGGVLVASHLQSFLEVSYRVLRHLAQP	82
130a1 バリアント（変異は下線付き）	P09919 に由来	*0-174	MTPLGPASSLPQSFLLKCLEQVRKIQGDGAALQEKL CATYKLCHPE**R**LVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQL AGCLSQLHSGLFLYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQ**K** DVA**R**FATTIWQQM**K**ELGMAPALQPTQGAMPAFAS AFQRRAGGVLVASHLQSFLEVSYRVLRHLAQP	83
307 バリアント（変異は下線付き）	P09919 に由来	*0-174	MTPLGPASSLPQ**E**FLL**D**CL**K**QVRKIQGDGAALQEKL CATYKLCHPE**R**LVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQL AGCLSQLHSGLFLYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQL DVADFATTIWQQMEELGMAPALQPTQGAMPAFASA FQRRAGGVLVASHLQSFLEVSYRVLRHLAQP	84

【０７８５】

【表２２】

表２２：ＷＴ及びバリアント型のヒトＧ－ＣＳＦ受容体細胞外及び膜貫通ドメインならびにシグナルペプチドのタンパク質配列

タンパク質	Uniprot ID	ドメイン＆残基番号	ポリペプチド配列	配列番号
WT G-CSFR	Q99062	ECD: 2-308	ECGHISVSAPIVHLGDPITASCIIKQNCSHLDPEPQILWRLGAELQP GGRQQRLSDGTQESIITLPHLNHTQAFLSCSLNWGNSLQILDQVEL RAGYPPAIPHNLSCLMNLTTSSLICQWEPGPETHLPTSFTLKSFKSR GNCQTQGDSILDCVPKDGQSHCSIPRKHLLLYQNMGIWVQAENA LGTSMSPQLCLDPMDVVKLEPPMLRTMDPSPEAAPPQAGCLQLS WEPWQPGLHINQKCELRHKPQRGEASWALVGPLPLEALQYELCG LLPATAYTLQIRCIRWPLPGHWSDWSPSLELRTTE	85
134 G-CSFR バリアント（変異は下線付き）	Q99062 に由来	ECD: 2-308	ECGHISVSAPIVHLGDPITASCIIKQNCSHLDPEPQILW**E**LGAELQP GGRQQRLSDGTQESIITLPHLNHTQAFLSCSLNWGNSLQILDQVEL RAGYPPAIPHNLSCLMNLTTSSLICQWEPGPETHLPTSFTLKSFKS**E** GNCQTQGDSILDCVPKDGQSHCSIP**D**KHLLLYQNMGIWVQAENA LGTSMSPQLCLDPMDVVKLEPPMLRTMDPSPEAAPPQAGCLQLS WEPWQPGLHINQKCELRHKPQRGEASWALVGPLPLEALQYELCG LLPATAYTLQIRCIRWPLPGHWSDWSPSLELRTTE	86
307 G-CSFR バリアント（変異は下線付き）	Q99062 に由来	ECD: 2-308	ECGHISVSAPIVHLGDPITASCIIKQNCSHLDPEPQILW**E**LGAELQP GGRQQRLSDGTQESIITLPHLNHTQAFLSCSLNWGNSLQILDQVEL RAGYPPAIPHNLSCLMNLTTSSLICQWEPGPETHLPTSFTLKSFKSR GNCQTQGDSILDCVPKDGQSHCSIPRKHLLLYQNMGIWVQAENA LGTSMSPQLCL**K**PM**K**VVKLEPPMLRTMDPSPEAAPPQAGCLQLS WEPWQPGLHINQKCELRHKPQRGEASWALVGPLPLEALQYELCG LLPATAYTLQIRCI**E**WPLPGHWSDWSPSLELRTTE	87
WT G-CSFR	Q99062	TMD: 309-331	IILGLFGLLLLLTCLCGTAWLCC	88
WT G-CSFR	Q99062	シグナルペプチド	MARLGNCSLTWAALIILLLPGSLE	89

【０７８６】

【表２３】

表２３：細胞内ドメイン（ＩＣＤ）

キメラ受容体	タンパク質（ドメイン）	Uniprot ID	ポリペプチド配列	配列番号
G2R-3	G-CSFR: Box 1 は下線付き Box 2 は太下線付き	Q99062	SPNRKNPLWPSVPDPAHSSLGSWVPTIMEEDAFQLPGLGTPPITK**LTVL**EEDEKKPVPWESH	90
	IL-2Rβ: Shc & STAT5結合部位は太下線付き *終止コドン	P14784	SSNHSLTSCFTNQG**Y**FFFHLPDALEIEACQVYFTYDPYSEEDPDEGVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDAYCTFPSRDDLLLFSPSLLGGPSPPSTAPGGSGAGEERMPPSLQERVPRDWDPQPLGPPTPGVPDLVDFQPPPELVLREAGEEVPDAGPREGVSFPWSRPPGQGEFRALNARLPLNTDA**Y**LSLQELQGQDPTHLV*	91
G4R	G-CSFR: Box 1は下線付き Box 2は太下線付き	Q99062	SPNRKNPLWPSVPDPAHSSLGSWVPTIMEEDAFQLPGLGTPPITK**LTVL**EEDEKKPVPWESH	90
	IL4Rα: IRS-1 & 2 及び STAT6結合部位は太下線付き *終止コドン	P24394	DEDPHKAAKEMPFQGSGKSAWCPVEISKTVLWPESISVVRCVELFEAPVECEEEEEVEEEKGSFCASPESSRDDFQEGREGIVARLTESLFLDLLGEENGGFCQQDMGESCLLPPSGSTSAHMPWDEFPSAGPKEAPPWGKEQPLHLEPSPPASPTQSPDNLTCTETPLVIAGNPA**Y**RSFSNSLSQSPCPRELGPDPLLARHLEEVEPEMPCVPQLSEPTTVPQPEPETWEQILRRNVLQHGAAAAPVSAPTSGYQEFVHAVEQGGTQASAVVGLGPPGEAG**Y**KAFSSLLASSAVSPEKCGFGASSGEEG**Y**KPFQDLIPGCPGDPAPVPVPLFTFGLDREPPRSPQSSHLPSSSPEHLGLEPGEKVEDMPKPPLPQEQATDPLVDSLGSGIVYSALTCHLCGHLKQCHGQEDGGQTPVMASPCCGCCCGDRSSPPTTPLRAPDPSPGGVPLEASLCPASLAPSGISEKSKSSSSFHPAPGNAQSSSQTPKIVNFVSVGPTYMRVS*	92
G6R	gp130: Box 1は下線付き Box 2は太下線付き SHP-2及びSTAT3結合部位は下線付き、チロシンは太字 *終止コドン	P40189	NKRDLIKKHIWPNVPDPSKSHIAQWSPHTPPRHNFNSKDQMYSDGNFTD**VSVV**EIEANDKKPFPEDLKSLDLFKKEKINTEGHSSGIGGSSCMSSSRPSISSSDENESSQNTSSTVQ**Y**STVVHSG**Y**RHQVPSVQVFSRSESTQPLLDSEERPEDLQLVDHVDGGDGILPRQQ**Y**FKQNCSQHESSPDISHFERSKQVSSVNEEDFVRLKQQISDHISQSCGSGQMKMFQEVSAADAFGPGTEGQVERFETVGMEAATDEGMPKS**Y**LPQTVRQGG**Y**MPQ*	93
GEPOR	EPOR: Box 1 は下線付き Box 2 は太下線付き SHP-1 & 2, STAT5 結合部位は太下線付き *終止コドン	P19235	HRRALKQKIWPGIPSPESEFEGLFTTHKGNFQ**LWLY**QNDGCLWWSPCTPFTEDPPAS**LEVL**SERCWGTMQAVEPGTDDEGPLLEPVGSEHAQDT**Y**LVLDKWLLPRNPPSEDLPGPGGSVDIVAMDEGSEASSCSSALASKPSPEGASAASFE**Y**TILDPSSQLLRPWTLCPELPPTPPHLKYL**Y**LVVSDSGISTDYSSGDSQGAQGGLSDGPYSNPYENSLIPAAEPLPPS**Y**VACS*	94
GIFNAR2	G-CSFR: Box 1は下線付き Box 2は太下線付き	Q99062	SPNRKNPLWPSVPDPAHSSLGSWVPTIMEEDAFQLPGLGTPPITK**LTVL**EEDEKKPVPWESHNSS	95
	IFNAR2: STAT1 & 2 結合部位は太下線付き *終止コドン	P48551	KKKVWDYNYDDESDSDTEAAPRTSGGG**Y**TMHGLTVRPLGQASATSTESQLIDPESEEEPDLPEVDVELPTMPKDSPQQLELLSGPCERRKSPLQDPFPEEDYSSTEGSGGRITFNVDLNSVFLRVLDDEDSDDLEAPLMLSSHLEEMVDPEDPDNVQSNHLLASGEGTQPTFPSPSSEGLWSEDAPSDQSDTSESDVDLGDG**Y**IMR*	96

GIFNGR1	IFNγR2: Box 1は下線付き Box 2は太下線付き	P38484	KYRGLIKYWFHTPPSIPLQIEEYLKDPTQPILEALDKDSSPKDDVWDS**VSII**S FPEKEQEDVLQTL	97
	IFNγR1: STAT1結合部位は太下線付き *終止コドン	P15260	EGQELITVIKAPTSFG**Y**DKPHVLVDLLVDDS*	98
GIFNGR2	G-CSFR: Box 1は下線付き Box 2は太下線付き	Q99062	SPNRKNPLWPSVPDPAHSSLGSWVPTIMEEDAFQLPGLGTPPITK**LTVL**EE DEKKPVPWESHNS	99
	IFNγR1: STAT1結合部位は太下線付き *終止コドン	P15260	TEGQELITVIKAPTSFG**Y**DKPHVLVDLLVDDS*	100

【０７８７】

【表２４】

表２４：キメラサイトカイン受容体のドメイン組成

名称	シグナルペプチド（配列番号）	ＥＣＤ（配列番号）	ＴＭＤ（配列番号）	Ｂｏｘ１／２（配列番号）	ＩＣＤ（配列番号）	ＳＴＡＴ部位（複数可）	他の部位（複数可）
Ｇ２Ｒ－３	Ｇ－ＣＳＦＲ（１１）	Ｇ－ＣＳＦＲ＿１３４（８６）	Ｇ－ＣＳＦＲ（１８）	Ｇ－ＣＳＦＲ（９０）	ＩＬ－２Ｒβ（９１）	５	Ｓｈｃ
Ｇ４Ｒ	Ｇ－ＣＳＦＲ（１１）	Ｇ－ＣＳＦＲ＿１３４（８６）	Ｇ－ＣＳＦＲ（１８）	Ｇ－ＣＳＦＲ（９０）	ＩＬ－４Ｒα（９２）	６	ＩＲＳ－１＆２
Ｇ６Ｒ	Ｇ－ＣＳＦＲ（１１）	Ｇ－ＣＳＦＲ＿１３４（８６）	Ｇ－ＣＳＦＲ（１８）	ｇｐ１３０（９３）	ｇｐ１３０（９３）	３	ＳＨＰ－２
ＧＥＰＯＲ	Ｇ－ＣＳＦＲ（１１）	Ｇ－ＣＳＦＲ＿１３４（８６）	Ｇ－ＣＳＦＲ（１８）	ＥＰＯＲ（９４）	ＥＰＯＲ（９４）	５	ＳＨＰ－１＆２
ＧＩＦＮＡＲ	Ｇ－ＣＳＦＲ（１１）	Ｇ－ＣＳＦＲ＿１３４（８６）	Ｇ－ＣＳＦＲ（１８）	Ｇ－ＣＳＦＲ（９５）	ＩＦＮＡＲ２（９６）	１，２	
ＧＩＦＮＧＲ－１	Ｇ－ＣＳＦＲ（１１）	Ｇ－ＣＳＦＲ＿３０７（８７）	Ｇ－ＣＳＦＲ（１８）	ＩＦＮγＲ２（９７）	ＩＦＮγＲ１（９８）	１	
ＧＩＦＮＧＲ－２	Ｇ－ＣＳＦＲ（１１）	Ｇ－ＣＳＦＲ＿３０７（８７）	Ｇ－ＣＳＦＲ（１８）	Ｇ－ＣＳＦＲ（９９）	ＩＦＮγＲ１（１００）	１	

【０７８８】

【表２５】

表２５：Ｇ－ＣＳＦ及びＧ－ＣＳＦＲバリアントの変異

Ｇ－ＣＳＦバリアント番号	Ｇ－ＣＳＦ変異	対応するＧ－ＣＳＦＲバリアント番号	対応するＧ－ＣＳＦＲ変異
１３０ａ１	Ｅ４６Ｒ＿Ｌ１０８Ｋ＿Ｄ１１２Ｒ＿Ｅ１２２Ｋ	１３４	Ｒ４１Ｅ＿Ｒ１４１Ｅ＿Ｒ１６７Ｄ
３０７	Ｓ１２Ｅ＿Ｋ１６Ｄ＿Ｅ１９Ｋ＿Ｅ４６Ｒ	３０７	Ｒ４１Ｅ＿Ｄ１９７Ｋ＿Ｄ２００Ｋ＿Ｒ２８８Ｅ

【０７８９】

【表２６】

表２６：ヒトサイトカイン受容体のタンパク質配列

タンパク質	Uniprot ID	ドメイン	ポリペプチド配列	配列番号
IL-2Rβ/ IL-15Rβ	P14784	シグナルペプチド ECD TM ICD	MAAPALSWRLPLLILLLPLATSWASAAVNGTSQFTCFYNSRANISCV WSQDGALQDTSCQVHAWPDRRRWNQTCELLPVSQASWACNLILG APDSQKLTTVDIVTLRVLCREGVRWRVMAIQDFKPFENLRLMAPISL QVVHVETHRCNISWEISQASHYFERHLEFEARTLSPGHTWEEAPLLTL KQKQEWICLETLTPDTQYEFQVRVKPLQGEFTTWSPWSQPLAFRTK PAALGKDTIPWLGHLLVGLSGAFGFIILVYLLINCRNTGPWLKKVLKC NTPDPSKFFSQLSSEHGGDVQKWLSSPFPSSSFSPGGLAPEISPLEVLE RDKVTQLLLQQDKVPEPASLSSNHSLTSCFTNQGYFFFHLPDALEIEA CQVYFTYDPYSEEDPDEGVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDAYCTFPSR DDLLLFSPSLLGGPSPPSTAPGGSGAGEERMPPSLQERVPRDWDPQ PLGPPTPGVPDLVDFQPPPELVLREAGEEVPDAGPREGVSFPWSRPP GQGEFRALNARLPLNTDAYLSLQELQGQDPTHLV	111
IL-2Rγc	P31785	シグナルペプチド ECD TM ICD	MLKPSLPFTSLLFLQLPLLGVGLNTTILTPNGNEDTTADFFLTTMPTDS LSVSTLPLPEVQCFVFNVEYMNCTWNSSSEPQPTNLTLHYWYKNSD NDKVQKCSHYLFSEEITSGCQLQKKEIHLYQTFVVQLQDPREPRRQA TQMLKLQNLVIPWAPENLTLHKLSESQLELNWNNRFLNHCLEHLVQ YRTDWDHSWTEQSVDYRHKFSLPSVDGQKRYTFRVRSRFNPLCGSA QHWSEWSHPIHWGSNTSKENPFLFALEAVVISVGSMGLIISLLCVYF WLERTMPRIPTLKNLEDLVTEYHGNFSAWSGVSKGLAESLQPDYSER LCLVSEIPPKGGALGEGPGASPCNQHSPYWAPPCYTLKPET	112
IL-4Rα	P24394	シグナルペプチド ECD TM ICD	MGWLCSGLLFPVSCLVLLQVASSGNMKVLQEPTCVSDYMSISTCEW KMNGPTNCSTELRLLYQLVFLLSEAHTCIPENNGGAGCVCHLLMDD VVSADNYTLDLWAGQQLLWKGSFKPSEHVKPRAPGNLTVHTNVSD TLLLTWSNPYPPDNYLYNHLTYAVNIWSENDPADFRIYNVTYLEPSLR IAASTLKSGISYRARVRAWAQCYNTTWSEWSPSTKWHNSYREPFEQ HLLLGVSVSCIVILAVCLLCYVSITKIKKEWWDQIPNPARSRLVAIIIQD AQGSQWEKRSRGQEPAKCPHWKNCLTKLLPCFLEHNMKRDEDPHK AAKEMPFQGSGKSAWCPVEISKTVLWPESISVVRCVELFEAPVECEE EEEVEEEKGSFCASPESSRDDFQEGREGIVARLTESLFLDLLGEENGGF CQQDMGESCLLPPSGSTSAHMPWDEFPSAGPKEAPPWGKEQPLHL EPSPPASPTQSPDNLTCTETPLVIAGNPAYRSFSNSLSQSPCPRELGPD PLLARHLEEVEPEMPCVPQLSEPTTVPQPEPETWEQILRRNVLQHGA AAAPVSAPTSGYQEFVHAVEQGGTQASAVVGLGPPGEAGYKAFSSL LASSAVSPEKCGFGASSGEEGYKPFQDLIPGCPGDPAPVPVPLFTFGL DREPPRSPQSSHLPSSSPEHLGLEPGEKVEDMPKPPLPQEQATDPLV DSLGSGIVYSALTCHLCGHLKQCHGQEDGGQTPVMASPCCGCCCG DRSSPPTTPLRAPDPSPGGVPLEASLCPASLAPSGISEKSKSSSSFHPA PGNAQSSSQTPKIVNFVSVGPTYMRVS	113
IL-9R	Q01113	シグナルペプチド ECD TM ICD	MGLGRCIWEGWTLESEALRRDMGTWLLACICICTCVCLGVSVTGEG QGPRSRTFTCLTNNILRIDCHWSAPELGQGSSPWLLFTSNQAPGGT HKCILRGSECTVVLPPEAVLVPSDNFTITFHHCMSGREQVSLVDPEYL PRRHVKLDPPSDLQSNISSGHCILTWSISPALEPMTTLLSYELAFKKQE EAWEQAQHRDHIVGVTWLILEAFELDPGFIHEARLRVQMATLEDDV VEEERYTGQWSEWSQPVCFQAPQRQGPLIPPWGWPGNTLVAVSIF LLLTGPTYLLFKLSPRVKRIFYQNVPSPAMFFQPLYSVHNGNFQTWM GAHGAGVLLSQDCAGTPQGALEPCVQEATALLTCGPARPWKSVALE EEQEGPGTRLPGNLSSEDVLPAGCTEWRVQTLAYLPQEDWAPTSLT RPAPPDSEGSRSSSSSSSSNNNNYCALGCYGGWHLSALPGNTQSSG	114

			PIPALACGLSCDHQGLETQQGVAWVLAGHCQRPGLHEDLQGMLLP SVLSKARSWTF	
IL-12Rβ2	Q99665	シグナルペプチド ECD TM ICD	MAHTFRGCSLAFMFIITWLLIKAKIDACKRGDVTVKPSHVILLGSTVNI TCSLKPRQGCFHYSRRNKLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTT LFVCKLACINSDEIQICGAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTW ERGRDTHLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESPE SNFTAKVTAVNSLGSSSSLPSTFTFLDIVRPLPPWDIRIKFQKASVSRCT LYWRDEGLVLLNRLRYRPSNSRLWNMVNVTKAKGRHDLLDLKPFTE YEFQISSKLHLYKGSWSDWSESLRAQTPEEEPTGMLDVWYMKRHID YSRQQISLFWKNLSVSEARGKILHYQVTLQELTGGKAMTQNITGHTS WTTVIPRTGNWAVAVSAANSKGSSLPTRINIMNLCEAGLLAPRQVS ANSEGMDNILVTWQPPRKDPSAVQEYVVEWRELHPGGDTQVPLN WLRSRPYNVSALISENIKSYICYEIRVYALSGDQGGCSSILGNSKHKAPL SGPHINAITEEKGSILISWNSIPVQEQMGCLLHYRIYWKERDSNSQPQ LCEIPYRVSQNSHPINSLQPRVTYVLWMTALTAAGESSHGNEREFCL QGKANWMAFVAPSICIAIIMVGIFSTHYFQQKVFVLLAALRPQWCSR EIPDPANSTCAKKYPIAEEKTQLPLDRLLIDWPTPEDPEPLVISEVLHQ VTPVFRHPPCSNWPQREKGIQGHQASEKDMMHSASSPPPPRALQA ESRQLVDLYKVLESRGSDPKPENPACPWTVLPAGDLPTHDGYLPSNI DDLPSHEAPLADSLEELEPQHISLSVFPSSSLHPLTFSCGDKLTLDQLK MRCDSLML	115
IL-21R	Q9HBE5	シグナルペプチド ECD TM ICD	MPRGWAAPLLLLLLQGGWGCPDLVCYTDYLQTVICILEMWNLHPST LTLTWQDQYEELKDEATSCSLHRSAHNATHATYTCHMDVFHFMAD DIFSVNITDQSGNYSQECGSFLLAESIKPAPPFNVTVTFSGQYNISWRS DYEDPAFYMLKGKLQYELQYRNRGDPWAVSPRRKLISVDSRSVSLLP LEFRKDSSYELQVRAGPMPGSSYQGTWSEWSDPVIFQTQSEELKEG WNPHLLLLLLLVIVFIPAFWSLKTHPLWRLWKKIWAVPSPERFFMPLY KGCSGDFKKWVGAPFTGSSLELGPWSPEVPSTLEVYSCHPPRSPAKR LQLTELQEPAELVESDGVPKPSFWPTAQNSGGSAYSEERDRPYGLVSI DTVTVLDAEGPCTWPCSCEDDGYPALDLDAGLEPSPGLEDPLLDAGT TVLSCGCVSAGSPGLGGPLGSLLDRLKPPLADGEDWAGGLPWGGRS PGGVSESEAGSPLAGLDMDTFDSGFVGSDCSSPVECDFTSPGDEGP PRSYLRQWVVIPPPLSSPGPQAS	116
gp130	P40189	シグナルペプチド ECD TM ICD	MLTLQTWLVQALFIFLTTESTGELLDPCGYISPESPVVQLHSNFTAVC VLKEKCMDYFHVNANYIVWKTNHFTIPKEQYTIINRTASSVTFTDIASL NIQLTCNILTFGQLEQNVYGITIISGLPPEKPKNLSCIVNEGKKMRCEW DGGRETHLETNFTLKSEWATHKFADCKAKRDTPTSCTVDYSTVYFVN IEVWVEAENALGKVTSDHINFDPVYKVKPNPPHNLSVINSEELSSILKL TWTNPSIKSVIILKYNIQYRTKDASTWSQIPPEDTASTRSSFTVQDLKP FTEYVFRIRCMKEDGKGYWSDWSEEASGITYEDRPSKAPSFWYKIDP SHTQGYRTVQLVWKTLPPFEANGKILDYEVTLTRWKSHLQNYTVNA TKLTVNLTNDRYLATLTVRNLVGKSDAAVLTIPACDFQATHPVMDLK AFPKDNMLWVEWTTPRESVKKYILEWCVLSDKAPCITDWQQEDGT VHRTYLRGNLAESKCYLITVTPVYADGPGSPESIKAYLKQAPPSKGPTV	117

			RTKKVGKNEAVLEWDQLPVDVQNGFIRNYTIFYRTIIGNETAVNVDS SHTEYTLSSLTSDTLYMVRMAAYTDEGGKDGPEFTFTTPKFAQGEIEA IVVPVCLAFLLTTLLGVLFCFNKRDLIKKHIWPNVPDPSKSHIAQWSP HTPPRHNFNSKDQMYSDGNFTDVSVVEIEANDKKPFPEDLKSLDLFK KEKINTEGHSSGIGGSSCMSSSRPSISSSDENESSQNTSSTVQYSTVVH SGYRHQVPSVQVFSRSESTQPLLDSEERPEDLQLVDHVDGGDGILPR QQYFKQNCSQHESSPDISHFERSKQVSSVNEEDFVRLKQQISDHISQS CGSGQMKMFQEVSAADAFGPGTEGQVERFETVGMEAATDEGMP KSYLPQTVRQGGYMPQ	

【０７９０】
【表２７】

表２７：ＩＣＤアダプタータンパク質結合部位。

受容体名	Uniprot ID	結合部位	ポリペプチド配列	配列番号
IL-7Rα	P16871	Box 1	KRIKPIVWPSLPDHKKTLEHL	118
		Box 2 - 1	KKPRKN**LNVS**FNPESF	119
		Box 2 - 2	PESFLD**CQIH**RVDDIQ	120
IL-2Rβ	P14784	Box 1	PWLKKVLKCNTPDPSKFFSQL	121
		Box 2	APEISP**LEVL**ERDKVT	122
		Shc	TSCFTNQG**Y**FFFHLPDA	123
		STAT5	RLPLNTDA**Y**LSLQELQG	124
IL-2Rγc	P31785	Box 1	ERTMPRIPTLKNLEDL	125
		Box 2	PDYSER**LCLV**SEIPPK	126
IL-4Rα	P24394	Box 1	KIKKEWWDQIPNPARSRLVA	127
		Box 2	LTKLLP**CFLE**HNMKRD	128
		IRS-2	LVIAGNPA**Y**RSFSNSLS	129
		STAT6 - 1	LGPPGEAG**Y**KAFSSLLA	130
		STAT6 - 2	GASSGEEG**Y**KPFQDLIP	131
IL-9R	Q01113	Box 1	SPRVKRIFYQNVPSPAMFFQP	132
		Box 2 - 1	GAHGAG**VLLS**QDCAGT	133
		Box 2 - 2	GTPQGA**LEPC**VQEATA	134
IL-12Rβ2	Q99665	STAT4	AGDLPTHDG**Y**LPSNIDDLPSHEAPLA	135
IL-21R	Q9HBE5	Box 1	LWRLWKKIWAVPSPERFFMPL	136
		Box 2 - 1	PFTGSS**LELG**PWSPEV	137

		Box 2 - 2	PEVPSTLEVYSCHPPR	138
		STAT3	GDEGPPRSYLRQWVVIP	139
gp130	P40189	Box 1	DLIKKHIWPNVPDPSKSHIAQ	140
		Box 2	DGNFTDVSVVEIEAND	141
		SHP-2	QNTSSTVQYSTVVHSG	142
		STAT3 - 1	STVVHSGYRHQVPSVQ	143
		STAT3 - 2	DGILPRQQYFKQNCSQHESS	144
		STAT3 - 3	EGMPKSYLPQTVRQ	145
		STAT3 - 4	TVRQGGYMPQ	146

【０７９１】

【表２８】

表２８：操作されたＴ細胞受容体（ｅＴＣＲ）の例

キメラ受容体	受容体名：ドメイン	特許	ポリペプチド配列	配列番号
HPV 16 E7 eTCR	ＬＶＬ－修飾キメラＴＣＲ: β鎖可変領域－マウスβ鎖定常領域－リンカーペプチド（Ｐ２Ａ）－ヒトα鎖可変領域－マウスα鎖定常領域－マウスα鎖ＴＭＤ	US 10174098 B2	MAPGLLCWALLCLLGAGLVDAGVTQSPTHLIKTRGQQVTLRCSPK**SGHDTV**SWYQQALGQGPQFIFQ**YYEEEE**RQRGNFPDRFSGHQFPNYSSELNVNALLLGDSALYLC**ASSLGWRGGRYNEQF**FGPGTRLTVLEDLRNVTPPKVSLFEPSKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPRNHFRCQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVTQNISAEAWGRADCGITSASYQQGVLSA*TILYEILLGKATLYAVLVSTLVV*MAMVKRKNSRAKRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMWGVFLLYVSMKMGGTTGQNIDQPTEMTATEGAIVQINCTYQ**TSGFNG**LFWYQQHAGEAPTFLSY**NVLDGL**EEKGRFSSFLSRSKGYSYLLLKELQMKDSASYLC**ASVDGNNRLA**FGKGNQVVVIPNIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKTVLDMKAMDSKSNGAIAWSNQTSFTCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDMNLNFQNLLVIVLRILLLKVAGFNLLMTLRLWSS	147
	Ｃｙｓ－置換、ＬＶＬ－修飾キメラＴＣＲ: β鎖可変領域－マウスβ鎖定常領域－リンカーペプチド（Ｐ２Ａ）－ヒトα鎖可変領域－マウスα鎖定常領域－マウスα鎖ＴＭＤ		MAPGLLCWALLCLLGAGLVDAGVTQSPTHLIKTRGQQVTLRCSPK**SGHDTV**SWYQQALGQGPQFIFQ**YYEEEE**RQRGNFPDRFSGHQFPNYSSELNVNALLLGDSALYLC**ASSLGWRGGRYNEQF**FGPGTRLTVLEDLRNVTPPKVSLFEPSKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELSWWVNGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPRNHFRCQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVTQNISAEAWGRADCGITSASYQQGVLSA*TILYEILLGKATLYAVLVSTLVV*MAMVKRKNSRAKRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMWGVFLLYVSMKMGGTTGQNIDQPTEMTATEGAIVQINCTYQ**TSGFNG**LFWYQQHAGEAPTFLSY**NVLDGL**EEKGRFSSFLSRSKGYSYLLLKELQ	148

			MKDSASYLC**ASVDGNNRLA**FGKGNQVVVIPNIQNP EPAVYQLKDPRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESG TFITDKCVLDMKAMDSKSNGAIAWSNQTSFTCQDIF KETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDMNLNFQNLLVI VLRILLLKVAGFNLLMTLRLWSS	
NY-ESO-1 eTCR	NY-ESO-1^{c259} TCR a 鎖	WO 2020/049496 A1	METLLGLLILWLGLGWVSSKGEVTGIPAALSVPEGEN LVLNCSFTDSAIYNLGWFRGDPGKGLTSLLLIGSSGRE GTSGRLNASLDKSSGRSTLYIAASGPGDSATYLCAVR PLYGGSYIPTFGRGTSLIVHPYIONPDPAVYOLRDSKS SDKSVCLFTDFDSOTNVSOSKDSDVYITDKTVLDMR SMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFP SPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFCNLSVIGFRILLLKVA GFNLLMTLRLWSS	149
	NY-ESO-1 ^{c259} TCR b 鎖		RMSIGLLCCAALSLLWAGPVNAGVTGTPKFGVLKTG GSMTLGCAGDMNHEYMSWYRGDPGMGLRLIHYS VGAGITDGGEVPNGYNVSRSTTEDFPLRLLSAAPSGT SVYFCASSYVGNTGELFFGEGSRLTVLEDLKNVFPPE VAVFEPSEAEISHTCKATLVCLATGFYPDHVELSWW VNGKEVHSGVSTDPGPLKEGPALNDSRYCLSSRLRVS ATFWGNPRNHFRCGVGFYGLSENDEWTODRAKPV TOIVSAEAWGRADCGFTSESYOOGVLSATILYEILLG KATLYAVLVSALVLMAMVKRKDSRG	150

【０７９２】
【表２９】

表２９：キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）の例

キメラ受容体	受容体名 ドメイン	特許	ポリペプチド配列	配列番号
抗ＣＤ１９含有第２世代４－１ＢＢ **CAR**	**CTL019**: リーダー－ＶＨ－リンカー－ＶＬ－ＣＤ８ヒンジ－ＣＤ８ＴＭ－４－１ＢＢ－ＣＤ３ζ	WO2014153270A1	MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQTTSSLSASLGD RVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRIH SGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNT LPYTFGGGTKLEITGGGGSGGGGSGGGGSEVKLQES GPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKG LEWLGVIWGSETTYYNSALKSRITIIKDNSKSQVFLKM NSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTV SSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVH TRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKK LLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRV KFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI GMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQAL PPR	151
	リーダー		MALPVTALLLPLALLLHAARP	152

	VH		DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRIHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEIT	153
	リンカー		GGGGSGGGGSGGGGS	154
	VL		EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRITIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS	155
	CD8ヒンジ		TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD	156
	CD8 TM		IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC	157
	4-1BB		KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	158
	CD3ζ		RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	159
第１世代抗メソテリン **CAR**	**P4-z:** リーダーーＶＨーリンカーーＶＬーＣＤ８ヒンジーＣＤ８ＴＭーＣＤ３ζ	US 9272002 B2	MALPVTALLLPLALLLHAARPGSQVQLQQSGPGLVTPSQTLSLTCAISGDSVSSNSATWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYNDYAVSVKSRMSINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARGMMTYYYGMDVWGQGTTVTVSSGILGSGGGGSGGGGSGGGGSQPVLTQSSSLSASPGASASLTCTLRSGINVGPYRIYWYQQKPGSPPQYLLNYKSDSDKQQGSGVPSRFSGSKDASANAGVLLISGLRSEDEADYYCMIWHSSAAVFGGGTQLTVLSASTTTPAPRPPTPAPTIASRPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRVKFSRSADAPAYQNGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELNKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	160
	リーダー		MALPVTALLLPLALLLHAARPGSQVQLQQSGPGL	161
	VH		VTPSQTLSLTCAISGDSVSSNSATWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYNDYAVSVKSRMSINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARGMMTYYYGMDVWGQGTTVTVSSGIL	162
	リンカー		GSGGGGSGGGGSGGGGS	163
	VL		QPVLTQSSSLSASPGASASLTCTLRSGINVGPYRIYWYQQKPGSPPQYLLNYKSDSDKQQGSGVPSRFSGSKDASANAGVLLISGLRSEDEADYYCMIWHSSAAVFGGGTQLTVLSAS	164
	CD8 ヒンジ		TTTPAPRPPTPAPTIASRPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD	165

	CD8 TM		IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC	166
	CD3ζ		RVKFSRSADAPAYQNGQNQLYNELNLGRREEYDVLD KRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELNKDKMAEAY SEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR	167
第２世代ＣＤ２８含有抗メソテリンＣＡＲ	**HN1scFv-28Z**: リーダー - VH - リンカー - VL - CD8ヒンジ - CD8 TM - CD28 ICD - CD3ζ	US 9359447 B2	MVLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQAQVQLVQSGAEVK RPGASVQVSCRASGYSINTYYMQWVRQAPGAGLEW MGVINPSGVTSYAQKFQGRVTLTNDTSTNTVYMQLN SLTSADTAVYYCARWALWGDFGMDVWGKGTLVTV SSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSTLSASIGDRV TITCRASEGIYHWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLASG APSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPDDFATYYCQQYSNYP LTFGGGTKLEIKRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVK GKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVA FIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYA PPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNL GRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNEL QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATK DTYDALHMQALPPR	168
	リーダー		MVLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQ	169
	VH		AQVQLVQSGAEVKRPGASVQVSCRASGYSINTYYMQ WVRQAPGAGLEWMGVINPSGVTSYAQKFQGRVTLT NDTSTNTVYMQLNSLTSADTAVYYCARWALWGDFG MDVWGKGTLVTVSS	170
	リンカー		GGGGSGGGGSGGGGS	171
	VL		DIQMTQSPSTLSASIGDRVTITCRASEGIYHWLAWYQ QKPGKAPKLLIYKASSLASGAPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPDDFATYYCQQYSNYPLTFGGGTKLEIKR	172
	CD8ヒンジ		AAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPG PSKP	173
	CD8 TM		FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	174
	CD28 ICD		RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDF AAYRS	175
	CD3ζ		RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLD KRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAY SEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR	176
第３世代ＣＤ２８及び	**HN1scFv-28BBZ**:		MVLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQAQVQLVQSGAEVK RPGASVQVSCRASGYSINTYYMQWVRQAPGAGLEW MGVINPSGVTSYAQKFQGRVTLTNDTSTNTVYMQLN	177

４－１ＢＢ含有抗メソテリンＣＡＲ	リーダー - VH -リンカー - VL - CD28ヒンジ - CD28 TM - CD28 ICD - 4-1BB - CD3ζ		SLTSADTAVYYCARWALWGDFGMDVWGKGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSTLSASIGDRVTITCRASEGIYHWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLASGAPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPDDFATYYCQQYSNYPLTFGGGTKLEIKRAAAFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	
	リーダー -		MVLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQ	178
	VH -		AQVQLVQSGAEVKRPGASVQVSCRASGYSINTYYMQWVRQAPGAGLEWMGVINPSGVTSYAQKFQGRVTLTNDTSTNTVYMQLNSLTSADTAVYYCARWALWGDFGMDVWGKGTLVTVSS	179
	リンカー -		GGGGSGGGGSGGGGS	180
	VL -		DIQMTQSPSTLSASIGDRVTITCRASEGIYHWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLASGAPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPDDFATYYCQQYSNYPLTFGGGTKLEIKR	181
	CD28ヒンジ-		AAAFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD	182
	CD28 TM -		IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRN	183
	CD28 ICD -		RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS	184
	4-1BB -		RFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	185
	CD3ζ		RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	186

【０７９３】

【表３０】

表３０：サイトカイン、ケモカイン、及びその他のシグナル伝達タンパク質：

サイトカイン	Uniprot ID	ポリペプチド配列	配列番号
hIL-18: シグナルペプチドは下線付き	Q14116	MAAEPVEDNCINFVAMKFIDNTLYFIAEDDENLESDYFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISMYKDSQPRGMAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRSVPGHDNKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNED	102
hCXCL13: シグナルペプチドは下線付き	Q52X90	MKFISTSLLLMLLVSSLSPVQGVLEVYYTSLRCRCVQESSVFIPRRFIDRIQILPRGNGCPRKEIIVWKKNKSIVCVDPQAEWIQRMMEVLRKRSSSTLPVPVFKRKIP	103
hIL-21: シグナルペプチドは下線付き	Q9HBE4	MRSSPGNMERIVICLMVIFLGTLVHKSSSQGQDRHMIRMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVSIKKLKRKPPSTNAGRRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSSRTHGSEDS	104
hCCL3: シグナルペプチドは下線付き	P10147	MQVSTAALAVLLCTMALCNQFSASLAADTPTACCFSYTSRQIPQNFIADYFETSSQCSKPGVIFLTKRSRQVCADPSEEWVQKYVSDLELSA	105
hCCL4: シグナルペプチドは下線付き	P13236	MKLCVTVLSLLMLVAAFCSPALSAPMGSDPPTACCFSYTARKLPRNFVVDYYETSSLCSQPAVVFQTKRSKQVCADPSESWVQEYVYDLELN	106
hCCL19: シグナルペプチドは下線付き	Q99731	MALLLALSLLVLWTSPAPTLSGTNDAEDCCLSVTQKPIPGYIVRNFHYLLIKDGCRVPAVVFTTLRGRQLCAPPDQPWVERIIQRLQRTSAKMKRRSS	107
hIFNγ: シグナルペプチドは下線付き	P01579	MKYTSYILAFQLCIVLGSLGCYCQDPYVKEAENLKKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQRKAIHELIQVMAELSPAAKTGKRKRSQMLFRGRRASQ	108
hIFNα-1/13: シグナルペプチドは下線付き	P01562	MASPFALLMVLVVLSCKSSCSLGCDLPETHSLDNRRTLMLLAQMSRISPSSCLMDRHDFGFPQEEFDGNQFQKAPAISVLHELIQQIFNLFTTKDSSAAWDEDLLDKFCTELYQQLNDLEACVMQEERVGETPLMNADSILAVKKYFRRITLYLTEKKYSPCAWEVVRAEIMRSLSLSTNLQERLRRKE	109
hIL-17: シグナルペプチドは下線付き	Q16552	MTPGKTSLVSLLLLLSLEAIVKAGITIPRNPGCPNSEDKNFPRTVMVNLNIHNRNTNTNPKRSSDYYNRSTSPWNLHRNEDPERYPSVIWEAKCRHLGCINADGNVDYHMNSVPIQQEILVLRREPPHCPNSFRLEKILVSVGCTCVTPIVHHVA	110
hTNF-α: 膜結合部分は下線付き	P01357	MSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFLIVAGATTLFCLLHFGVIGPQREEFPRDLSLISPLAQAVRSSSRTPSDKPVAHVVANPQAEGQLQWLNRRANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGQGCPSTHVLLTHTISRIAVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL	111
hNKG2-D: ICD-TM-ECD	P26718	MGWIRGRRSRHSWEMSEFHNYNLDLKKSDFSTRWQKQRCPVVKSKCRENASPFFFCCFIAVAMGIRFIIMVAIWSAVFLNSLFNQEVQIPLTESYCGPCPKNWICYKNNCYQFFDESKNWYESQASCMSQNASLLKVYSKEDQDLLKLVKSYHWMGLVHIPTNGSWQWEDGSILSPNLLTIIEMQKGDCALYASSFKGYIENCSTPNTYICMQRTV	112

【０７９４】

【表３１】

表３１：制御されたパラクリンシグナル伝達（ＣＰＳ）の例示的構築物のＤＮＡ配列

遺伝子	参照配列ＩＤ	残基番号	ＤＮＡ配列	配列番号
ＣＡＲ＿Ｐ２Ａ＿Ｇ１２－２Ｒ１－１３４＿Ｔ２Ａ＿ｈＩＬ－１８		１－４７５８	ＣＣＣＧＣＣＡＧＧＡＴＣＣＴＧＡＣＧＣＧＴＡＴＧＧＴＧＣＴＧＣＴＧＧＴＣＡＣＣＡＧＣＴＴＡＣＴＣＣＴＧＴＧＣＧＡＧＣＴＣＣＣＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＴＴＣＴＴＧＣＴＧＡＴＣＣＣＣＧＡＣＡＴＣＣＡＧＣＡＧＧＴＧＣＡＧＣＴＧＣＡＡＣＡＧＴＣＧＧＧＣＣＣＣＧＡＧＴＴＡＧＡＡＡＡＡＣＣＣＧＧＣＧＣＣＴＣＣＧＴＧＡＡＧＡＴＣＴＣＧＴＧＴＡＡＡＧＣＴＴＣＧＧＧＣＴＡＣＴＣＧＴＴＴＡＣＣＧＧＣＴＡＣＡＣＣＡＴＧＡＡＴＴＧＧＧＴＴＡＡＧＣＡＧＡＧＣＣＡＴＧＧＡＡＡＧＴＣＴＣＴＴＧＡＡＴＧＧＡＴＡＧＧＣＣＴＧＡＴＴＡＣＧＣＣＴＴＡＴＡＡＴＧＧＧＧＣＣＴＣＧＡＧＣＴＡＣＡＡＣＣＡＧＡＡＡＴＴＴＣＧＴＧＧＴＡＡＧＧＣＡＡＣＴＣＴＧＡＣＴＧＴＡＧＡＣＡＡＧＴＣＧＴＣＣＴＣＣＡＣＣＧＣＡＴＡＣＡＴＧＧＡＴＣＴＴＣＴＧＡＧＣＣＴＡＡＣＣＴＣＡＧＡＡＧＡＣＡＧＣＧＣＡＧＴＣＴＡＣＴＴＣＴＧＣＧＣＣＣＧＴＧＧＴＧＧＴＴＡＣＧＡＴＧＧＣＣＧＣＧＧＡＴＴＣＧＡＣＴＡＴＴＧＧＧＧＣＣＡＧＧＧＧＡＣＣＡＣＣＧＴＣＡＣＣＧＴＧＡＧＣＴＣＣＧＧＣＧＧＴＧＧＣＧＧＧＴＣＣＧＧＴＧＧＣＧＧＧＣＧＧＣＴＣＡＡＧＣＧＧＡＧＧＡＧＧＴＡＧＴＧＡＣＡＴＣＧＡＧＴＴＧＡＣＣＣＡＧＴＣＧＣＣＴＧＣＣＡＴＣＡＴＧＴＣＣＧＣＡＴＣＣＣＣＣＧＧＣＧＡＧＡＡＧＧＴＧＡＣＧＡＴＧＡＣＧＴＧＴＴＣＴＧＣＴＴＣＣＡＧＣＴＣＴＧＴＡＴＣＧＴＡＣＡＴＧＣＡＣＴＧＧＴＡＣＣＡＡＣＡＧＡＡＧＴＣＣＧＧＣＡＣＣＴＣＣＣＣＣＡＡＧＣＧＴＴＧＧＡＴＣＴＡＣＧＡＣＡＣＴＴＣＣＡＡＧＣＴＧＧＣＧＴＣＴＧＧＣＧＴＣＣＣＴＧＧＧＣＧＣＴＴＴＴＣＡＧＧＴＡＧＣＧＧＧＴＣＣＧＧＣＡＡＴＡＧＣＴＡＴＴＣＣＴＴＧＡＣＧＡＴＣＡＧＴＡＧＣＧＴＧＧＡＧＧＣＴＧＡＧＧＡＴＧＡＴＧＣＣＡＣＣＴＡＣＴＡＣＴＧＣＣＡＧＣＡＧＴＧＧＡＧＣＡＡＧＣＡＣＣＣＧＣＴＣＡＣＣＴＴＣＧＧＣＧＣＣＧＧＧＡＣＣＡＡＧＣＴＴＧＡＡＡＴＣＡＡＧＧＣＧＧＧＣＧＧＣＧＡＴＣＧＡＧＧＴＧＡＴＧＴＡＴＣＣＴＣＣＴＣＣＣＴＡ	１４９

			CCTGGACAACGAGAAATCCAATGG CACTATCATCCACGTGAAGGGGAA GCACCTGTGCCCGAGCCCCCTGTT CCCCGGCCCTTCCAAGCCTTTTTG GGTGCTTGTTGTGGTCGGCGGCGT GCTGGCCTGCTACTCTCTGCTGGT AACCGTAGCGTTCATCATCTTCTG GGTGCGATCTAAGCGGTCCCGGCT GTTGCACAGTGACTACATGAACAT GACCCCGCGCCGCCCCGGCCCAAC CCGCAAGCACTACCAGCCGTACGC TCCACCTCGCGACTTTGCCGCCTA CAGGTCGCGAGTGAAATTTTCGCG CTCCGCGGACGCGCCGGCCTATCA GCAGGGCCAGAACCAGCTTTACAA CGAGTTGAACCTCGGGGCGCAGGGA GGAGTACGACGTGCTGGATAAACG TAGAGGTCGGGACCCGGAGATGGG CGGCAAACCACGCCGCAAGAACCC TCAGGAAGGCCTGTACAACGAGCT CCAGAAGGACAAAATGGCTGAGGC GTACTCGGAGATTGGGATGAAAGG CGAGCGGCGCCGCGGCAAGGGCCA CGATGGCCTGTACCAGGGGCTATC TACCGCTACAAAGGACACCTACGA CGCCCTACATATGCAGGCCCTGCC ACCGCGTGGCTCTGGCGCAACCAA CTTCTCGCTTCTGAAGCAGGCCGG TGATGTGGAGGAAAACCCCAGGTCC TATGGCCCGCCTGGGCAACTGCTC GCTGACCTGGGCGGCCCTGATCAT CCTGCTGCTGCCCGGCTCTCTGGA GGAGTGTGGCCATATTTCCGTGTC AGCTCCAATCGTGCACCTGGGCGA CCCCATCACCGCTTCTTGCATCAT CAAGCAGAACTGCTCTCACCTCGA CCCTGAGCCCCAAATACTTTGGGA GCTGGGCGCGGAGCTCCAGCCTGG AGGACGCCAGCAGCGTTTGTCAGA CGGCACTCAGGAATCCATCATCAC CCTCCCACATCTGAATCACACCCA GGCGT	

10

20

30

40

50

			TCCTGTCTTGTTGTCTCAACTGG GGCAACTCCTTGCAGATACTGGA CCAGGTGGAGCTGAGAGCTGGCT ATCCCCCGGCAATTCCTCACAAC CTGTCCTGTCTGATGAACCTGAC CACCTCCAGTCTGATCTGTCAGT GGGAGCCCGGGCCAGAGACTCAC CTTCCCACCAGCTTCACCCTTAA GTCGTTCAAATCCGAGGGCAACT GCCAGACCCAGGGTGATTCTATT TTGGATTGCGTGCCCAAGGACGG GCAGTCTCACTGTTGTATTCCCG ACAAGCACCTCCTTTTATACCAG AATATGGGCATCTGGGTGCAGGC CGAGAATGCCCTGGGAACGTCTA TGTCTCCACAGCTATGCCTGGAT CCAATGGACGTAGTGAAGCTGGA GCCCCCCATGCTACGCACTATGG ATCCTAGCCCAGAGGCCGCTCCC CCTCAGGCGGGGTGCCTGCAGCT TTGTTGGGAACCCTGGCAACCCG GGTTGCACATTAACCAGAAGTGC GAGCTGCGCCACAAGCCCCAGAG AGGAGAGGCCTCCTGGGCCCTCG TGGGCCCTCTGCCGTTGGAGGCC TTGCAGTATGAGCTGTGCGGCCT CTTGCCCGCTACAGCTTATACTC TGCAAATCAGGTGTATTCGCTGG CCTTTGCCCGGACACTGGTCCGA CTGGTCCCCCCAGCCTTGAGCTGA GAACCACGGAGCGCGCCCCCACC GTACGCTTGGACACCTGGTGGCG CCAGAGGCAGCTGGACCCTCGCA CTGTGCAGCTGTTCTGGAAGCCG GTGCCCCTGG	

			AGGAGGACTCCGGACGCATCCAG GGCTACGTGGTCAGCTGGCGTCC GAGTGGGCAGGCCGGGGCCATCC TGCCCCTGTGCAACACGACTGAG CTGAGCTGCACTTTCCATCTGCC CAGCGAGGCTCAGGAGGTGGCGC TCGTGGCTTACAACTCCGCAGGC ACTTCTCGCCCAACCCCCGTGGT GTTCTCTGAGAGTCGGGGCCCCG CCCTGACGCGCCTTCACGCCATG GCGCGCGACCCGCATTCCCTTTG GGTCGGTTGGGAGCCACCTAACC CATGGCCGCAGGGCTACGTGATC GAGTGGGGCCTGGGCCCCCCGAG CGCATCGAACAGCAACAAGACCT GGAGAATGGAACAGAACGGCCGC GCAACCGGCTTCCTATTAAAGGA GAACATCCGCCCGTTCCAGCTGT ACGAGATCATCGTGACACCGCTG TACCAGGACACTATGGGGCCTTC TCAGCACGTTTACGCCTACTCCC AGGAGATGGCCCCGAGCCACGCA CCGGAACTGCACCTAAAGCACAT CGGTAAGACCTGGGCACAGCTCG AGTGGGTCCCCGAGCCTCCCGAG CTAGGCAAGTCGCCGCTGACCCA TTACACCATCTTCTGGACCAACG CGCAGAACCAGTCCTTTAGCGCG ATCCTCAATGCCTCCTCCCGCGG TTTCGTCTTGCACGGGCTGGAGC CAGCCTCCTTATACCACATCCAC CTGATGGCGGCTTCCCAGGCTG	

			GTGCTACCAACAGCACAGTTTT GACACTGATGACCCTGACCCCC GAGGGCTCGGAGCTCCACATCA TTTTGGGACTCTTCGGACTGCT GCTGCTGCTGACCTGCCTGTGC GGCACTGCTTGGCTCTGCTGTT CTCCCAACCGCAAGAACCCTCT TTGGCCCTCTGTCCCTGACCCG GCCCATTCTAGCCTGGGATCTT GGGTCCCGACCATCATGGAAGA AGACGCGTTCCAGCTCCCTGGG CTGGGCACCCCTCCGATCACGA AGCTCACGGTCCTGGAGGAGGA CGAGAAGAAGCCCGTACCGTGG GAGAGCCACTCCTCGAATCATA GCCTAACCTCCTGCTTTACAAA CCAGGGGTATTTTTTTTTCCAC TTGCCCGACGCTCTGGAGATCG AGGCCTGCCAGGTGTACTTCAC CTACGACCCCTACAGCGAGGAG GACCCTGCCGGTGATCTGCCCA CCCATGACGGCTATCTGCCATC AAACATTGACGACCTGCCGTCC GGAGGTCCCAGTCCTCCGTCCA CCGCCCCCGGCGGTTCTGGTGC CGGCGAAGAACGGATGCCTCCC TCCCTGCAGGAGCGTGTGCCAC GGGATTGGGACCCACAGCCCTT AGGGCCGCCTACCCCCGGCGTG CCCGACCTCGTCGATTTCCAGC CGCCTCCTGAGCTGGTTCTCCG AGAGGCAGGAGAGGAGGTGCCT GATGCTGGACCCCGTGAGGGCG TGAGCTTTCCTTGGTCTCGCCC GCCAGGAC	

			AGGGGGAGTTCCGTGCTCTCAA CGCGCGTCTGCCGTTGAACACT GATGCATACCTCAGTCTTCAGG AGCTGCAGGGCCAGGATCCAAC CCACCTCGTTGGCTCAGGGGAA GGTCGCGGCTCGCTGTTGACGT GTGGTGACGTGGAGGAGAACCC CGGCCCGTACTTCGGTAAGCTG GAGTCTAAACTGTCGGTGATAC GGAACCTGAACGACCAGGTCCT GTTCATTGACCAGGGTAACCGC CCGCTGTTCGAGGACATGACTG ACTCCGATTGCCGCGACAATGC CCCCCGCACGATCTTCATTATC TCCATGTACAAGGATAGCCAAC CCCGTGGTATGGCCGTGACCAT TAGCGTCAAATGTGAGAAGATC TCTACTCTGTCCTGTGAGAATA AGATTATCTCCTTCAAGGAGAT GAACCCCCCTGATAACATCAAA GACACTAAATCGGACATCATTT TCTTTCAGAGGAGCGTGCCAGG CCACGACAACAAGATGCAGTTC GAGAGTTCTAGTTACGAGGGAT ATTTCCTGGCCTGCGAAAAAGA ACGTGACCTCTTCAAGCTAATC CTGAAGAAGGAGGACGAGCTCG GTGACAGGAGCATCATGTTTAC TGTCCAAAACGAGGACTGA	

10

20

30

40

50

Ｋｏｚａｋを含む５’上流配列		１－２１	ＣＣＣＧＣＣＡＧＧＡＴＣＣＴＧＡＣＧＣＧＴ	１５０
メソテリンＣＡＲ	該当なし	２２－１４８２	ＡＴＧＧＴＧＣＴＧＣＴＧＧＴＣＡＣＣＡＧＣＴＴＡ ＣＴＣＣＴＧＴＧＣＧＡＧＣＴＣＣＣＣＣＡＴＣＣＴ ＧＣＧＴＴＣＴＴＧＣＴＧＡＴＣＣＣＣＧＡＣＡＴＣ ＣＡＧＣＡＧＧＴＧＣＡＧＣＴＧＣＡＡＣＡＧＴＣＧ ＧＧＣＣＣＣＧＡＧＴＴＡＧＡＡＡＡＡＣＣＣＧＧＣ ＧＣＣＴＣＣＧＴＧＡＡＧＡＴＣＴＣＧＴＧＴＡＡＡ ＧＣＴＴＣＧＧＧＧＣＴＡＣＴＣＧＴＴＴＡＣＣＧＧＣ ＴＡＣＡＣＣＡＴＧＡＡＴＴＧＧＧＴＴＡＡＧＣＡＧ ＡＧＣＣＡＴＧＧＡＡＡＧＴＣＴＣＴＴＧＡＡＴＧＧ ＡＴＡＧＧＣＣＴＧＡＴＴＡＣＧＣＣＴＴＡＴＡＡＴ ＧＧＧＧＣＣＴＣＧＡＧＣＴＡＣＡＡＣＣＡＧＡＡＡ ＴＴＴＣＧＴＧＧＴＡＡＧＧＣＡＡＣＴＣＴＧＡＣＴ ＧＴＡＧＡＣＡＡＧＴＣＧＴＣＣＴＣＣＡＣＣＧＣＡ ＴＡＣＡＴＧＧＡＴＣＴＴＣＴＧＡＧＣＣＴＡＡＣＣ ＴＣＡＧＡＡＧＡＣＡＧＣＧＣＡＧＴＣＴＡＣＴＴＣ ＴＧＣＧＣＣＣＣＧＴＧＧＴＧＧＴＴＡＣＧＡＴＧＧＣ ＣＧＣＧＧＡＴＴＣＧＡＣＴＡＴＴＧＧＧＧＣＣＡＧ ＧＧＣＡＣＣＡＣＣＧＴＣＡＣＣＧＴＧＡＧＣＴＣＣ ＧＧＣＧＧＴＧＧＣＧＧＧＴＣＣＧＧＴＧＧＣＧＧＣ ＧＧＣＴＣＡＡＧＣＧＧＡＧＧＡＧＧＴＡＧＴＧＡＣ ＡＴＣＧＡＧＴＴＧＡＣＣＣＡＧＴＣＧＣＣＴＧＣＣ ＡＴＣＡＴＧＴＣＣＧＣＡＴＣＣＣＣＣＧＧＣＧＡＧ ＡＡＧＧＴＧＡＣＧＡＴＧＡＣＧＴＧＴＴＣＴＧＣＴ ＴＣＣＡＧＣＴＣＴＧＴＡＴＣＧＴＡＣＡＴＧＣＡＣ ＴＧＧＴＡＣＣＡＡＣＡＧＡＡＧＴＣＣＧＧＣＡＣＣ ＴＣＣＣＣＣＡＡＧＣＧＴＴＧＧＡＴＣＴＡＣＧＡＣ ＡＣＴＴＣＣＡＡＧＣＴＧＧＣＧＴＣＴＧＧＣＧＴＣ ＣＣＴＧＧＧＣＧＣＴＴＴＴＣＡＧＧＴＡＧＣＧＧＧ ＴＣＣＧＧＣＡＡＴＡＧＣＴＡＴＴＣＣＴＴＧＡＣＧ ＡＴＣＡＧＴＡＧＣＧＴＧＧＡＧＧＣＴＧＡＧＧＡＴ ＧＡＴＧＣＣＡＣＣＴＡＣＴＡＣＴＧＣＣＡＧＣＡＧ ＴＧＧＡＧＣＡＡＧＣＡＣＣＣＧＣＴＣＡＣＣＴＴＣ ＧＧＣＧＣＣＧＧＧＡＣＣＡＡＧＣＴＴＧＡＡＡＴＣ ＡＡＧＧＣＧＧＣＧＧＣＧＡ	１５１

			TCGAGGTGATGTATCCTCCTCCCT ACCTGGACAACGAGAAATCCAATG GCACTATCATCCACGTGAAGGGGA AGCACCTGTGCCCGAGCCCCCTGT TCCCCGGGCCCTTCCAAGCCTTTTTT GGGTGCTTGTTGTGGTCGGCGGCG TGCTGGCCCTGCTACTCTCTGCTGG TAACCGTAGCGTTCATCATCTTCT GGGTGCGATCTAAGCGGTCCCGGC TGTTGCACAGTGACTACATGAACA TGACCCCGCGCCGCCCCGGCCCAA CCCGCAAGCACTACCAGCCGTACG CTCCACCTCGCGACTTTGCCGCCT ACAGGTCGCGAGTGAAATTTTCGC GCTCCGCGGACGCGCCGGCCTATC AGCAGGGCCAGAACCAGCTTTACA ACGAGTTGAACCTCGGGCGCAGGG AGGAGTACGACGTGCTGGATAAAC GTAGAGGTCGGGACCCGGAGATGG GCGGCAAACCACGCCGCAAGAACC CTCAGGAAGGCCTGTACAACGAGC TCCAGAAGGACAAAATGGCTGAGG CGTACTCGGAGATTGGGATGAAAG GCGAGCGGCGCCGCGGCAAGGGCC ACGATGGCCTGTACCAGGGGCTAT CTACCGCTACAAAGGACACCTACG ACGCCCTACATATGCAGGCCCTGC CACCGCGT	

10

20

30

40

50

P2A		1483 －1548	GGCTCTGGCGCAACCAACTTCTCG CTTCTGAAGCAGGCCGGTGATGTG GAGGAAAACCCAGGTCCT	152
G12 ／2R －1 134 ECD		1549 －4221	ATGGCCCGCCTGGGCAACTGCTCG CTGACCTGGGCGGCCCTGATCATC CTGCTGCTGCCCGGCTCTCTGGAG GAGTGTGGCCATATTTCCGTGTCA GCTCCAATCGTGCACCTGGGCGAC CCCATCACCGCTTCTTGCATCATC AAGCAGAACTGCTCTCACCTCGAC CCTGAGCCCCAAATACTTTGGGAG CTGGGCGCGGAGCTCCAGCCTGGA GGACGCCAGCAGCGTTTGTCAGAC GGCACTCAGGAATCCATCATCACC CTCCCACATCTGAATCACACCCAG GCGTTCCTGTCTTGTTGTCTCAAC TGGGGCAACTCCTTGCAGATACTG GACCAGGTGGAGCTGAGAGCTGGC TATCCCCCCGGCAATTCCTCACAAC CTGTCCTGTCTGATGAACCTGACC ACCTCCAGTCTGATCTGTCAGTGG GAGCCCGGGCCAGAGACTCACCTT CCCACCAGCTTCACCCTTAAGTCG TTCAAATCCGAGGGCAACTGCCAG ACCCAGGGTGATTCTATTTTGGAT TGCGTGCCCAAGGACGGGCAGTCT CACTGTTGTATTCCCGACAAGCAC CTCCTTTTATACCAGAATATGGGC ATCTGGGTGCAGGCCGAGAATGCC CTGGGAACGTCTATGTCTCCACAG CTATGCCTGGATCCAATGGACGTA GTGAAGCTGGAGCCCCCCATGCTA CGCACTATGGATCCTAGCCCAGAG GCCGCTCCCCCTCAGGCGGGGTGC CTGCAGCTTTGTTGGGAACCCTGG CAACCCGGGGTTGCACATTAACCAG AAGTGCGAGCTGCGCCACAAGCCC CAGAGAGGAGAGGCCTCCTGGGCC CTCGTGGGCCCTCTGCCGTTGGAG GCCTTGCAGT	153

			ATGAGCTGTGCGGCCTCTTGCCCG CTACAGCTTATACTCTGCAAATCA GGTGTATTCGCTGGCCTTTGCCCG GACACTGGTCCGACTGGTCCCCCA GCCTTGAGCTGAGAACCACGGAGC GCGCCCCCACCGTACGCTTGGACA CCTGGTGGCGCCAGAGGCAGCTGG ACCCTCGCACTGTGCAGCTGTTCT GGAAGCCGGTGCCCCTGGAGGAGG ACTCCGGACGCATCCAGGGCTACG TGGTCAGCTGGCGTCCGAGTGGGC AGGCCGGGGCCATCCTGCCCCTGT GCAACACGACTGAGCTGAGCTGCA CTTTCCATCTGCCCAGCGAGGCTC AGGAGGTGGCGCTCGTGGCTTACA ACTCCGCAGGCACTTCTCGCCCAA CCCCCGTGGTGTTCTCTGAGAGTC GGGGCCCCGCCCTGACGCGCCTTC ACGCCATGGCGCGCGACCCGCATT CCCTTTGGGTCGGTTGGGAGCCAC CTAACCCATGGCCGCAGGGCTACG TGATCGAGTGGGGCCTGGGCCCCC CGAGCGCATCGAACAGCAACAAGA CCTGGAGAATGGAACAGAACGGCC GCGCAACCGGCTTCCTATTAAAGG AGAACATCCGCCCGTTCCAGCTGT ACGAGATCATCGTGACACCGCTGT ACCAGGACACTATGGGGCCTTCTC AGCACGTTTACGCCTACTCCCAGG AGATGGCCCCGAGCCACGCACCGG AACTGCACCTAAAGCACATCGGTA AGACCTGGGCACAGCTCGAGTGGG TCCCCCGAGCCTCCCCGAGCTAGGCA AGTCGCCGCTGACCCCATTACACCA TCTTCTGGACCAACGCGCAGAACC AGTCCTTTAGCGCGATCCTCAATG CCTCCTCCCGCGGTTTCGTCTTGC ACGGGCTGGAGCCAGCCTCCTTAT ACCACATCCACCTGATGGCGGCTT CCCAGGCTGGTGCTACCAACAGCA CAGTTTTGACACTGATGACCCTGA CCCCC	

			GAGGGCTCGGAGCTCCACATCATT TTGGGACTCTTCGGACTGCTGCTG CTGCTGACCTGCCTGTGCGGCACT GCTTGGCTCTGCTGTTCTCCCAAC CGCAAGAACCCTCTTTGGCCCTCT GTCCCTGACCCGGCCCATTCTAGC CTGGGATCTTGGGTCCCGACCATC ATGGAAGAAGACGCGTTCCAGCTC CCTGGGCTGGGCACCCCTCCGATC ACGAAGCTCACGGTCCTGGAGGAG GACGAGAAGAAGCCCGTACCGTGG GAGAGCCACTCCTCGAATCATAGC CTAACCTCCTGCTTTACAAACCAG GGGTATTTTTTTTTTCCACTTGCCC GACGCTCTGGAGATCGAGGCCTGC CAGGTGTACTTCACCTACGACCCC TACAGCGAGGAGGACCCTGCCGGT GATCTGCCCACCCATGACGGCTAT CTGCCATCAAACATTGACGACCTG CCGTCCGGAGGTCCCAGTCCTCCG TCCACCGCCCCCGGCGGTTCTGGT GCCGGCGAAGAACGGATGCCTCCC TCCCTGCAGGAGCGTGTGCCACGG GATTGGGACCCACAGCCCTTAGGG CCGCCTACCCCCGGCGTGCCCGAC CTCGTCGATTTCCAGCCGCCTCCT GAGCTGGTTCTCCGAGAGGCAGGA GAGGAGGTGCCTGATGCTGGACCC CGTGAGGGCGTGAGCTTTCCTTGG TCTCGCCCGCCAGGACAGGGGGAG TTCCGTGCTCTCAACGCGCGTCTG CCGTTGAACACTGATGCATACCTC AGTCTTCAGGAGCTGCAGGGCCAG GATCCAACCCACCTCGTT	

T2A		4222 －4284	GGCTCAGGGGAAGGTCGCGGCTCG CTGTTGACGTGTGGTGACGTGGAG GAGAACCCCGGCCCG	154
IL－18	NM_ 001 56 2．4	4285 －4758	TACTTCGGTAAGCTGGAGTCTAAA CTGTCGGTGATACGGAACCTGAAC GACCAGGTCCTGTTCATTGACCAG GGTAACCGCCCGCTGTTCGAGGAC ATGACTGACTCCGATTGCCGCGAC AATGCCCCCCCGCACGATCTTCATT ATCTCCATGTACAAGGATAGCCAA CCCCGTGGTATGGCCGTGACCATT AGCGTCAAATGTGAGAAGATCTCT ACTCTGTCCTGTGAGAATAAGATT ATCTCCTTCAAGGAGATGAACCCC CCTGATAACATCAAAGACACTAAA TCGGACATCATTTTCTTTCAGAGG AGCGTGCCAGGCCACGACAACAAG ATGCAGTTCGAGAGTTCTAGTTAC GAGGGATATTTCCTGGCCTGCGAA AAAGAACGTGACCTCTTCAAGCTA ATCCTGAAGAAGGAGGACGAGCTC GGTGACAGGAGCATCATGTTTACT GTCCAAAACGAGGACTGA	155

G12 −2R 1__1 34__ ECD __T2 A__h IL− 18		1−32 10	ATGGCTCGCCTCGGAAATTGTTCC CTGACCTGGGCAGCATTGATCATT CTCCTGCTACCAGGGAGTCTCGAA GAATGTGGCCATATCTCTGTAAGC GCCCCTATTGTGCACTTGGGAGAC CCAATCACAGCATCATGCATCATC AAGCAGAATTGCTCTCATCTCGAT CCAGAGCCACAGATACTCTGGGAG CTGGGGCGCAGAACTGCAACCCGGA GGGCGCCAGCAGAGACTGAGTGAT GGAACACAGGAGAGCATTATCACT TTACCTCATCTGAACCACACCCAG GCCTTTCTTAGCTGCTGTTTGAAC TGGGGCAACAGTCTCCAGATTCTG GACCAGGTGGAGCTGAGGGCGGGT TACCCGCCCGCCATTCCACACAAT TTGTCCTGTCTCATGAACCTGACA ACAAGTAGCCTGATATGCCAGTGG GAGCCAGGGCCGGAGACCCATCTC CCAACTAGTTTCACGCTCAAGAGC TTCAAGTCAGAGGGGAACTGCCAG ACACAAGGGGACAGCATTCTCGAC TGTGTGCCCAAGGACGGGCAGAGT CACTGTTGCATTCCAGACAAGCAT CTGCTGCTGTATCAGAACATGGGC ATTTGGGTTCAGGCCGAAAATGCC CTCGGTACTTCCATGAGTCCACAG TTGTGTCTTGACCCCATGGATGTG GTGAAGCTGGAACCGCCAATGCTG AGGACCATGGATCCCTCACCTGAG GCTGCTCCGCCACAGGCAGGGTGT CTGCAGCTGTGCTGGGAGCCCTGG CAGCCTGGATTGCACATAAACCAA AAATGTGAGCTGAGGCACAAGCCC CAGAGAGGTGAGGCGAGTTGGGCC CTGGTAGGGCCTCTTCCTCTAGAA GCCCTGCAGTATGAATTGTGTGGA TTACTTCCCGCAACCGCCTACACT CTTCAGAT	156

			CAGGTGTATCCGGTGGCCTCTGCC CGGCCACTGGAGCGACTGGTCTCC GAGCCTCGAATTGAGAACAACAGA ACGGGCTCCTACGGTGCGTCTGGA TACATGGTGGAGGCAGCGACAGTT GGACCCGCGTACAGTGCAGCTGTT CTGGAAGCCCGTACCTCTGGAAGA GGATAGTGGTCGGATTCAGGGATA TGTGGTCTCTTGGCGGCCTTCCGG TCAGGCTGGGGGCTATCCTTCCCCTT ATGCAACACTACAGAGCTCAGCTG TACCTTTCATTTACCCAGCGAAGC CCAGGAAGTGGCTCTCGTCGCCTA TAATTCCGCTGGAACGTCAAGACC CACCCCTGTCGTGTTCTCTGAGTC TCGGGGACCTGCCCTAACCAGGCT CCATGCAATGGCACGCGATCCTCA CAGTCTGTGGGTTGGCTGGGAACC ACCAAATCCCTGGCCTCAGGGCTA TGTCATCGAATGGGGCCTTGGCCC CCCATCAGCCTCCAATAGCAACAA GACCTGGAGAATGGAGCAAAATGG GAGAGCAACCGGGTTCCTGCTGAA GGAGAACATCCGACCGTTCCAGCT TTATGAAATTATTGTAACTCCACT GTACCAGGACACAATGGGACCATC TCAGCATGTCTACGCTTATTCCCA GGAGATGGCGCCTAGTCATGCTCC TGAATTACACTTGAAGCACATAGG GAAAACTTGGGCCCAATTAGAGTG GGTCCCGGAGCCTCCCGAGCTGGG GAAAAGCCCATTGACCCATTACAC GATATTTTGGACCAATGCTCAGAA CCAATCCTTTTTCTGCCATCCTGAA TGCCTCATCTCGAGGCTTTGTGCT GCATGGCCTAGAGCCTGCATCACT CTACCACATTCACCTGATGGCCGC CAGCCAGGCGGGTGCCACAAACTC CACAGTTC	

10

20

30

40

50

			TCACTTTAATGACTCTAACCCCAG AGGGCAGTGAACTGCACATCATAT TAGGGTTATTCGGATTGCTGCTTC TTTTGACTTGCCTCTGTGGCACTG CGTGGCTGTGCTGCTCCCCGAACC GAAAGAATCCTCTCTGGCCTAGCG TTCCCGATCCTGCTCACAGTTCAC TAGGATCATGGGTGCCAACCATCA TGGAAGAGGATGCCTTCCAGCTAC CAGGACTGGGTACGCCGCCCATAA CCAAATTAACGGTCCTTGAAGAGG ATGAGAAGAAACCAGTTCCATGGG AAAGCCACTCTTCCAATCATAGCC TCACCTCTTGCTTCACCAACCAAG GGTATTTTTTTTTCCACCTGCCCG ACGCTCTGGAAATTGAGGCCTGCC AAGTGTATTTCACCTACGACCCTT ACTCTGAAGAAGATCCGGCAGGCG ACCTACCCACTCATGATGGCTACC TGCCGTCAAACATCGACGACTTAC CGAGTGGAGGACCCTCCCCACCTT CTACAGCCCCTGGTGGCTCCGGTG CAGGGGAGGAAAGGATGCCTCCCT CACTGCAGGAGAGAGTCCCCAGAG ACTGGGATCCTCAGCCACTTGGAC CACCCACACCTGGTGTGCCTGACC TTGTGGATTTTCAGCCCCCTCCTG AGCTTGTTCTTCGAGAAGCAGGTG AGGAGGTTCCTGATGCAGGCCCAC GTGAGGGGGTCTCCTTTCCCTGGT CCAGGCCTCCTGGCCAAGGAGAGT TCCGCGCTCTGAATGCACGCTTGC CTCTGAACACAGATGCTTACCTGA GCCTACAAGAGTTACAAGGCCAGG ATCCGACACACCTGGTGGGATCTG GCGAGGGTAGAGGCAGCCTCCTAA CTTGTGGCGA	

			CGTGGAGGAGAACCCCGGTCCCTA CTTCGGTAAGCTGGAGTCTAAACT GTCGGTGATACGGAACCTGAACGA CCAGGTCCTGTTCATTGACCAGGG TAACCGCCCGCTGTTCGAGGACAT GACTGACTCCGATTGCCGCGACAA TGCCCCCCGCACGATCTTCATTAT CTCCATGTACAAGGATAGCCAACC CCGTGGTATGGCCGTGACCATTAG CGTCAAATGTGAGAAGATCTCTAC TCTGTCCTGTGAGAATAAGATTAT CTCCTTCAAGGAGATGAACCCCCC TGATAACATCAAAGACACTAAATC GGACATCATTTTCTTTCAGAGGAG CGTGCCAGGCCACGACAACAAGAT GCAGTTCGAGAGTTCTAGTTACGA GGGATATTTCCTGGCCTGCGAAAA AGAACGTGACCTCTTCAAGCTAAT CCTGAAGAAGGAGGACGAGCTCGG TGACAGGAGCATCATGTTTACTGT CCAAAACGAGGACTGATGA	

10

20

30

40

50

G12 ／2R －1 134 ECD		1－26 73	ATGGCTCGCCTCGGAAATTGTTCC CTGACCTGGGCAGCATTGATCATT CTCCTGCTACCAGGGAGTCTCGAA GAATGTGGCCATATCTCTGTAAGC GCCCCTATTGTGCACTTGGGAGAC CCAATCACAGCATCATGCATCATC AAGCAGAATTGCTCTCATCTCGAT CCAGAGCCACAGATACTCTGGGAG CTGGGCGCAGAACTGCAACCCGGA GGGCGCCAGCAGAGACTGAGTGAT GGAACACAGGAGAGCATTATCACT TTACCTCATCTGAACCACACCCAG GCCTTTCTTAGCTGCTGTTTGAAC TGGGGCAACAGTCTCCAGATTCTG GACCAGGTGGAGCTGAGGGCGGGT TACCCGCCCGCCATTCCACACAAT TTGTCCTGTCTCATGAACCTGACA ACAAGTAGCCTGATATGCCAGTGG GAGCCAGGGCCGGAGACCCATCTC CCAACTAGTTTCACGCTCAAGAGC TTCAAGTCAGAGGGGAACTGCCAG ACACAAGGGGACAGCATTCTCGAC TGTGTGCCCAAGGACGGGCAGAGT CACTGTTGCATTCCAGACAAGCAT CTGCTGCTGTATCAGAACATGGGC ATTTGGGTTCAGGCCGAAAATGCC CTCGGTACTTCCATGAGTCCACAG TTGTGTCTTGACCCCATGGATGTG GTGAAGCTGGAACCGCCAATGCTG AGGACCATGGATCCCTCACCTGAG GCTGCTCCGCCACAGGCAGGGTGT CTGCAGCTGTGCTGGGAGCCCTGG CAGCCTGGATTGCACATAAACCAA AAATGTGAGCTGAGGCACAAGCCC CAGAGAGGTGAGGCGAGTTGGGCC CTGGTAGGGCC	157

			TCTTCCTCTAGAAGCCCTGCAGTA TGAATTGTGTGGATTACTTCCCGC AACCGCCTACACTCTTCAGATCAG GTGTATCCGGTGGCCTCTGCCCGG CCACTGGAGCGACTGGTCTCCGAG CCTCGAATTGAGAACAACAGAACG GGCTCCTACGGTGCGTCTGGATAC ATGGTGGAGGCAGCGACAGTTGGA CCCGCGTACAGTGCAGCTGTTCTG GAAGCCCGTACCTCTGGAAGAGGA TAGTGGTCGGATTCAGGGATATGT GGTCTCTTGGCGGCCTTCCGGTCA GGCTGGGGCTATCCTTCCCTTATG CAACACTACAGAGCTCAGCTGTAC CTTTCATTTACCCAGCGAAGCCCA GGAAGTGGCTCTCGTCGCCTATAA TTCCGCTGGAACGTCAAGACCCAC CCCTGTCGTGTTCTCTGAGTCTCG GGGACCTGCCCTAACCAGGCTCCA TGCAATGGCACGCGATCCTCACAG TCTGTGGGTTGGCTGGGAACCACC AAATCCCTGGCCTCAGGGCTATGT CATCGAATGGGGCCTTGGCCCCCC ATCAGCCTCCAATAGCAACAAGAC CTGGAGAATGGAGCAAAATGGGAG AGCAACCGGGTTCCTGCTGAAGGA GAACATCCGACCGTTCCAGCTTTA TGAAATTATTGTAACTCCACTGTA CCAGGACACAATGGGACCATCTCA GCATGTCTACGCTTATTCCCAGGA GATGGCGCCTAGTCATGCTCCTGA ATTACACTTGAAGCACATAGGGAA AACTTGGGCCCAATTAGAGTGGGT CCCGGAGCCTCCCGAGCTGGGGAA AAGCCCATTGACCCATTACACGAT ATTTTGGACCAATGCTCAGAACCA ATCCTTTTCTGCCATCCTGAATGC CTCATCTCG	

			AGGCTTTGTGCTGCATGGCCTAGA GCCTGCATCACTCTACCACATTCA CCTGATGGCCGCCAGCCAGGCGGG TGCCACAAACTCCACAGTTCTCAC TTTAATGACTCTAACCCCAGAGGG CAGTGAACTGCACATCATATTAGG GTTATTCGGATTGCTGCTTCTTTT GACTTGCCTCTGTGGCACTGCGTG GCTGTGCTGCTCCCCGAACCGAAA GAATCCTCTCTGGCCTAGCGTTCC CGATCCTGCTCACAGTTCACTAGG ATCATGGGTGCCAACCATCATGGA AGAGGATGCCTTCCAGCTACCAGG ACTGGGTACGCCGCCCATAACCAA ATTAACGGTCCTTGAAGAGGATGA GAAGAAACCAGTTCCATGGGAAAG CCACTCTTCCAATCATAGCCTCAC CTCTTGCTTCACCAACCAAGGGTA TTTTTTTTTCCACCTGCCCGACGC TCTGGAAATTGAGGCCTGCCAAGT GTATTTCACCTACGACCCTTACTC TGAAGAAGATCCGGCAGGCGACCT ACCCACTCATGATGGCTACCTGCC GTCAAACATCGACGACTTACCGAG TGGAGGACCCTCCCCACCTTCTAC AGCCCCTGGTGGCTCCGGTGCAGG GGAGGAAAGGATGCCTCCCTCACT GCAGGAGAGAGTCCCCAGA	

10

20

30

40

50

			GACTGGGATCCTCAGCCACTTGGA CCACCCACACCTGGTGTGCCTGAC CTTGTGGATTTTCAGCCCCCTCCT GAGCTTGTTCTTCGAGAAGCAGGT GAGGAGGTTCCTGATGCAGGCCCA CGTGAGGGGGTCTCCTTTCCCTGG TCCAGGCCTCCTGGCCAAGGAGAG TTCCGCGCTCTGAATGCACGCTTG CCTCTGAACACAGATGCTTACCTG AGCCTACAAGAGTTACAAGGCCAG GATCCGACACACCTGGTG	
T2A		2674 －2736	GGATCTGGCGAGGGTAGAGGCAGC CTCCTAACTTGTGGCGACGTGGAG GAGAACCCCGGTCCC	157

【0795】

【表３２】

表３２：ヒトＩＬ－７Ｒα細胞外、膜貫通、及び細胞内ドメインならびにシグナルペプチドのタンパク質配列

タンパク質	Ｕｎｉｐｒｏｔ ＩＤ	ドメイン＆残基番号	ポリペプチド配列	配列番号
ＩＬ－７Ｒα	Ｐ１６８７１	ＥＣＤ：　１－２１９	ＥＳＧＹＡＱＮＧＤＬＥＤＡＥＬＤＤＹＳＦＳＣＹＳＱＬＥＶＮＧＳＱＨＳＬＴＣＡＦＥＤＰＤＶＮＩＴＮＬＥＦＥＩＣＧＡＬＶＥＶＫＣＬＮＦＲＫＬＱＥＩＹＦＩＥＴＫＫＦＬＬＩＧＫＳＮＩＣＶＫＶＧＥＫＳＬＴＣＫＫＩＤＬＴＴＩＶＫＰＥＡＰＦＤＬＳＶＶＹＲＥＧＡＮＤＦＶＶＴＦＮＴＳＨＬＱＫＫＹＶＫＶＬＭＨＤＶＡＹＲＱＥＫＤＥＮＫＷＴＨＶＮＬＳＳＴＫＬＴＬＬＱＲＫＬＱＰＡＡＭＹＥＩＫＶＲＳＩＰＤＨＹＦＫＧＦＷＳＥＷＳＰＳＹＹＦＲＴＰＥＩＮＮＳＳＧＥＭＤ	１８７
ＩＬ－７Ｒα	Ｐ１６８７１	ＴＭＤ：　２２０－２４４	ＰＩＬＬＴＩＳＩＬＳＦＦＳＶＡＬＬＶＩＬＡＣＶＬＷ	１８８
ＩＬ－７Ｒα	Ｐ１６８７１	ＩＣＤ：　２４５－４３９	ＫＫＲＩＫＰＩＶＷＰＳＬＰＤＨＫＫＴＬＥＨＬＣＫＫＰＲＫＮＬＮＶＳＦＮＰＥＳＦＬＤＣＱＩＨＲＶＤＤＩＱＡＲＤＥＶＥＧＦＬＱＤＴＦＰＱＱＬＥＥＳＥＫＱＲＬＧＧＤＶＱＳＰＮＣＰＳＥＤＶＶＩＴＰＥＳＦＧＲＤＳＳＬＴＣＬＡＧＮＶＳＡＣＤＡＰＩＬＳＳＳＲＳＬＤＣＲＥＳＧＫＮＧＰＨＶＹＱＤＬＬＬＳＬＧＴＴＮＳＴＬＰＰＰＦＳＬＱＳＧＩＬＴＬＮＰＶＡＱＧＱＰＩＬＴＳＬＧＳＮＱＥＥＡＹＶＴＭＳＳＦＹＱＮＱ	１８９
ＩＬ－７Ｒα	Ｐ１６８７１	シグナルペプチド	ＭＴＩＬＧＴＴＦＧＭＶＦＳＬＬＱＶＶＳＧ	１９０
ＩＬ－７	Ａ８Ｋ６７３	サイトカイン：１－１５２	ＤＣＤＩＥＧＫＤＧＫＱＹＥＳＶＬＭＶＳＩＤＱＬＬＤＳＭＫＥＩＧＳＮＣＬＮＮＥＦＮＦＦＫＲＨＩＣＤＡＮＫＥＧＭＦＬＦＲＡＡＲＫＬＲＱＦＬＫＭＮＳＴＧＤＦＤＬＨＬＬＫＶＳＥＧＴＴＩＬＬＮＣＴＧＱＶＫＧＲＫＰＡＡＬＧＥＡＱＰＴＫＳＬＥＥＮＫＳＬＫＥＱＫＫＬＮＤＬＣＦＬＫＲＬＬＱＥＩＫＴＣＷＮＫＩＬＭＧＴＫＥＨ	１９１

【０７９６】

【表３３】

表３３：細胞内ドメイン（ＩＣＤ）。ＩＣＤは、次のいずれか１つで構成される：

操作された構築物	タンパク質（ドメイン）	Uniprot ID	ポリペプチド配列	配列番号
7/2R-1	IL-2Rβ: Box 1は下線付き Box 2, Shc, & STAT5結合部位は太下線付き	P14784	NCRNTGPWLKKVLKCNTPDPSKFFSQLSSEHGGDVQKWLSSPFPSSSFSPGGLAPEISP**LEVL**ERDKVTQLLLQQDKVPEPASLSSNHSLTSCFTNQG**Y**FFFHLPDALEIEACQVYFTYDPYSEEDPDEGVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDAYCTFPSRDDLLLFSPSLLGGPSPPSTAPGGSGAGEERMPPSLQERVPRDWDPQPLGPPTPGVPDLVDFQPPPELVLREAGEEVPDAGPREGVSFPWSRPPGQGEFRALNARLPLNTDA**Y**LSLQELQGQDPTHLV*	192
7/2R-2	IL-7Rα: Box 1は下線付き Box 2は太下線付き	P16871	KKRIKPIVWPSLPDHKKTLEHLCKKPRKN**LNVS**FNPESFLD**CQIH**RVDDIQARDEVEG	193
	IL-2Rβ: Shc & STAT5結合部位は太下線付き *終止コドン	P14784	LERDKVTQLLLQQDKVPEPASLSSNHSLTSCFTNQG**Y**FFFHLPDALEIEACQVYFTYDPYSEEDPDEGVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDAYCTFPSRDDLLLFSPSLLGGPSPPSTAPGGSGAGEERMPPSLQERVPRDWDPQPLGPPTPGVPDLVDFQPPPELVLREAGEEVPDAGPREGVSFPWSRPPGQGEFRALNARLPLNTDA**Y**LSLQELQGQDPTHLV*	194
7/2/12R-1	IL-2Rβ: Box 1は下線付き Box 2, Shc, & STAT5結合部位は太下線付き	P14784	NCRNTGPWLKKVLKCNTPDPSKFFSQLSSEHGGDVQKWLSSPFPSSSFSPGGLAPEISP**LEVL**ERDKVTQLLLQQDKVPEPASLSSNHSLTSCFTNQG**Y**FFFHLPDALEIEACQVYFTYDPYSEEDPDEGVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDAYCTFPSRDDLLLFSPSLLGGPSPPSTAPGGSGAGEERMPPSLQERVPRDWDPQPLGPPTPGVPDLVDFQPPPELVLREAGEEVPDAGPREGVSFPWSRPPGQGEFRALNARLPLNTDA**Y**LSLQELQGQDPTHLV	192
	IL-12Rβ2: STAT4結合部位は太下線付き	Q99665	TVLPAGDLPTHDG**Y**LPSNIDDLPSHEAPLADSLEELEPQHISLSVFPSSSLHPLTFSCGDKLTLDQLKMRCDSLML*	195
7/2/12R-2	IL-7Rα: Box 1は下線付き Box 2は太下線付き	P16871	KKRIKPIVWPSLPDHKKTLEHLCKKPRKN**LNVS**FNPESFLD**CQIH**RVDDIQARDEVEG	193
	IL-2Rβ: Shc & STAT5結合部位は太下線付き *終止コドン	P14784	LERDKVTQLLLQQDKVPEPASLSSNHSLTSCFTNQG**Y**FFFHLPDALEIEACQVYFTYDPYSEEDPDEGVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDAYCTFPSRDDLLLFSPSLLGGPSPPSTAPGGSGAGEERMPPSLQERVPRDWDPQPLGPPTPGVPDLVDFQPPPELVLREAGEEVPDAGPREGVSFPWSRPPGQGEFRALNARLPLNTDA**Y**LSLQELQGQDPTHLV	194
	IL-12Rβ2: STAT4結合部位は太下線付き	Q99665	TVLPAGDLPTHDG**Y**LPSNIDDLPSHEAPLADSLEELEPQHISLSVFPSSSLHPLTFSCGDKLTLDQLKMRCDSLML*	195
7/12/2R-1	IL-2Rβ: Box 1は下線付き Box 2及びShc結合部位は太下線付き	P14784	NCRNTGPWLKKVLKCNTPDPSKFFSQLSSEHGGDVQKWLSSPFPSSSFSPGGLAPEISP**LEVL**ERDKVTQLLLQQDKVPEPASLSSNHSLTSCFTNQG**Y**FFFHLPDALEIEACQVYFTYDPYSEEDP	196
	IL-12Rβ2: STAT4結合部位は太下線付き	Q99665	AGDLPTHDG**Y**LPSNIDDLPS	197

	IL-2Rβ: STAT5結合部位は太下線付き *終止コドン	P14784	GGPSPPSTAPGGSGAGEERMPPSLQERVPRDWDPQPLGPPTP GVPDLVDFQPPPELVLREAGEEVPDAGPREGVSFPWSRPPGQG EFRALNARLPLNTDA**Y**LSLQELQGQDPTHLV*	198
7/12/2R-2	IL-7Rα: Box 1は下線付き Box 2は太下線付き	P16871	KKRIKPI**VWPSLPDHK**KTLEHLCKKPRKN**LNVS**FNPESFLD**CQIH**R VDDIQAR	199
	IL-12Rβ2: STAT4結合部位は太下線付き	Q99665	AGDLPTHDG**Y**LPSNIDDLPSHEAPLADSLEELEPQHISLSVFPSSSL HPLTFSCGDKLTLDQLKMRC	200
	IL-2Rβ: Shc & STAT5結合部位は太下線付き *終止コドン	P14784	LERDKVTQLLLQQDKVPEPASLSSNHSLTSCFTNQG**Y**FFFHLPDA LEIEACQVYFTYDPYSEEDPDEGVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDA YCTFPSRDDLLLFSPSLLGGPSPPSTAPGGSGAGEERMPPSLQER VPRDWDPQPLGPPTPGVPDLVDFQPPPELVLREAGEEVPDAGP REGVSFPWSRPPGQGEFRALNARLPLNTDA**Y**LSLQELQGQDPT HLV*	194
7/21-R1	IL-21R: Box 1は下線付き Box 2 & STAT3結合部位は太下線付き	Q9HBE5	LWRLWK**KIWAVPSPE**RFFMPLYKGCSGDFKKWVGAPFTGSS**LE LG**PWSPEVPST**LEVY**SCHPPRSPAKRLQLTELQEPAELVESDGVP KPSFWPTAQNSGGSAYSEERDRPYGLVSIDTVTVLDAEGPCTWP CSCEDDGYPALDLDAGLEPSPGLEDPLLDAGTTVLSCGCVSAGSP GLGGPLGSLLDRLKPPLADGEDWAGGLPWGGRSPGGVSESEAG SPLAGLDMDTFDSGFVGSDCSSPVECDFTSPGDEGPPRS**Y**LRQ WVVIPPPLSSPGPQAS*	201
7/21-R2	IL-7Rα: Box 1は下線付き Box 2は太下線付き	P16871	KKRIKPI**VWPSLPDHK**KTLEHLCKKPRKN**LNVS**FNPESFLD**CQIH**R VDDIQARD	202
	IL-21R: STAT3結合部位は太下線付き	Q9HBE5	RSPAKRLQLTELQEPAELVESDGVPKPSFWPTAQNSGGSAYSEE RDRPYGLVSIDTVTVLDAEGPCTWPCSCEDDGYPALDLDAGLEP SPGLEDPLLDAGTTVLSCGCVSAGSPGLGGPLGSLLDRLKPPLAD GEDWAGGLPWGGRSPGGVSESEAGSPLAGLDMDTFDSGFVGS DCSSPVECDFTSPGDEGPPRS**Y**LRQWVVIPPPLSSPGPQAS*	203
7/21/7R-1	IL-21R: Box 1は下線付き Box 2 & STAT3結合部位は太下線付き	Q9HBE5	LWRLWK**KIWAVPSPE**RFFMPLYKGCSGDFKKWVGAPFTGSS**LE LG**PWSPEVPST**LEVY**SCHPPRSPAKRLQLTELQEPAELVESDGVP KPSFWPTAQNSGGSAYSEERDRPYGLVSIDTVTVLDAEGPCTWP CSCEDDGYPALDLDAGLEPSPGLEDPLLDAGTTVLSCGCVSAGSP GLGGPLGSLLDRLKPPLADGEDWAGGLPWGGRSPGGVSESEAG SPLAGLDMDTFDSGFVGSDCSSPVECDFTSPGDEGPPRS**Y**LRQ WVVIPPPLSSPGPQAS	201
	IL-7Rα: STAT5及びPI3K結合部位は太下線付き	P16871	DCRESGKNGPHV**Y**QDLLLSLGTTNSTLPPPFSLQSGILTLNPVAQ GQPILTSLGSNQEEA**Y**VTMSSF**Y**QNQ*	204
7/7/21R-1	IL-7Rα: Box 1は下線付き	P16871	KKRIKPI**VWPSLPDHK**KTLEHLCKKPRKN**LNVS**FNPESFLD**CQIH**R VDDIQARDEVEGFLQDTFPQQLEESEKQRLGGDVQSPNCPSED VVITPESFGRDSSLTCLAGNVSACDAPILSSSRSLDCRESGKNGPH	205

	Box 2, STAT5 & PI3K 結合部位は太下線付き		VYQDLLLSLGTTNSTLPPPFSLQSGILTLNPVAQGQPILTSLGSNQ EEAYVTMSSFYQNQ	
	IL-21R: STAT3 結合部位は太下線付き	Q9HBE5	SPGDEGPPRSYLRQWVVIPPPLSSPGPQAS*	206
7/2/21R-1	IL-2Rβ: Box 1 は下線付き Box 2, Shc & STAT5 結合部位は太下線付き	P14784	NCRNTGPWLKKVLKCNTPDPSKFFSQLSSEHGGDVQKWLSSPFP SSSFSPGGLAPEISPLEVLERDKVTQLLLQQDKVPEPASLSSNHSLT SCFTNQGYFFFHLPDALEIEACQVYFTYDPYSEEDPDEGVAGAPT GSSPQPLQPLSGEDDAYCTFPSRDDLLLFSPSLLGGPSPPSTAPGG SGAGEERMPPSLQERVPRDWDPQPLGPPTPGVPDLVDFQPPPE LVLREAGEEVPDAGPREGVSFPWSRPPGQGEFRALNARLPLNTD AYLSLQELQGQDPTHLV	192
	IL-21R: STAT3 結合部位は太下線付き	Q9HBE5	SPGDEGPPRSYLRQWVVIPPPLSSPGPQAS*	206
7/2/21R-2	IL-7Rα: Box 1 は下線付き Box 2 は太下線付き	P16871	KKRIKPIVWPSLPDHKKTLEHLCKKPRKNLNVSFNPESFLDCQIHR VDDIQARDEVEG	193
	IL-2Rβ: Shc & STAT5 結合部位は太下線付き *終止コドン	P14784	LERDKVTQLLLQQDKVPEPASLSSNHSLTSCFTNQGYFFFHLPDA LEIEACQVYFTYDPYSEEDPDEGVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDA YCTFPSRDDLLLFSPSLLGGPSPPSTAPGGSGAGEERMPPSLQER VPRDWDPQPLGPPTPGVPDLVDFQPPPELVLREAGEEVPDAGP REGVSFPWSRPPGQGEFRALNARLPLNTDAYLSLQELQGQDPT HLV	194
	IL-21R: STAT3 結合部位は太下線付き	Q9HBE5	SPGDEGPPRSYLRQWVVIPPPLSSPGPQAS*	206
7/2/12/21R-1	IL-2Rβ: Box 1 は下線付き Box 2, Shc & STAT5 結合部位は太下線付き	P14784	NCRNTGPWLKKVLKCNTPDPSKFFSQLSSEHGGDVQKWLSSPFP SSSFSPGGLAPEISPLEVLERDKVTQLLLQQDKVPEPASLSSNHSLT SCFTNQGYFFFHLPDALEIEACQVYFTYDPYSEEDPDEGVAGAPT GSSPQPLQPLSGEDDAYCTFPSRDDLLLFSPSLLGGPSPPSTAPGG SGAGEERMPPSLQERVPRDWDPQPLGPPTPGVPDLVDFQPPPE LVLREAGEEVPDAGPREGVSFPWSRPPGQGEFRALNARLPLNTD AYLSLQELQGQDPTHLV	192
	IL-12Rβ2: STAT4 結合部位は太下線付き	Q99665	TVLPAGDLPTHDGYLPSNIDDLPSHEAPLADSLEELEPQHISLSVF PSSSLHPLTFSCGDKLTLDQLKMRCDSLML	195
	IL-21R: STAT3 結合部位は太下線付き	Q9HBE5	SPGDEGPPRSYLRQWVVIPPPLSSPGPQAS*	206
7/2/12/21R-2	IL-7Rα: Box 1 は下線付き Box 2 は太下線付き	P16871	KKRIKPIVWPSLPDHKKTLEHLCKKPRKNLNVSFNPESFLDCQIHR VDDIQARDEVEG	193

	IL-2Rβ: Shc & STAT5 結合部位は太下線付き	P14784	LERDKVTQLLLQQDKVPEPASLSSNHSLTSCFTNQG**Y**FFFHLPDALEIEACQVYFTYDPYSEEDPDEGVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDAYCTFPSRDDLLLFSPSLLGGPSPPSTAPGGSGAGEERMPPSLQERVPRDWDPQPLGPPTPGVPDLVDFQPPPELVLREAGEEVPDAGPREGVSFPWSRPPGQGEFRALNARLPLNTDA**Y**LSLQELQGQDPTHLV	194
	IL-12Rβ2: STAT4 結合部位は太下線付き	Q99665	TVLPAGDLPTHDG**Y**LPSNIDDLPSHEAPLADSLEELEPQHISLSVFPSSSLHPLTFSCGDKLTLDQLKMRCDSLML	195
	IL-21R: STAT3結合部位は太下線付き	Q9HBE5	SPGDEGPPRS**Y**LRQWVVIPPPLSSPGPQAS*	206
7/2/21/12R-1	IL-2Rβ: Box 1 は下線付き Box 2, Shc, & STAT5 結合部位は太下線付き	P14784	NCRNTGPWLKKVLKCNTPDPSKFFSQLSSEHGGDVQKWLSSPFPSSSFSPGGLAPEISP**LEVL**ERDKVTQLLLQQDKVPEPASLSSNHSLTSCFTNQG**Y**FFFHLPDALEIEACQVYFTYDPYSEEDPDEGVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDAYCTFPSRDDLLLFSPSLLGGPSPPSTAPGGSGAGEERMPPSLQERVPRDWDPQPLGPPTPGVPDLVDFQPPPELVLREAGEEVPDAGPREGVSFPWSRPPGQGEFRALNARLPLNTDA**Y**LSLQELQGQDPTHLV	192
	IL-21R: STAT3 結合部位は太下線付き	Q9HBE5	SPGDEGPPRS**Y**LRQWVVIPPPLSSPGPQA	207
	IL-12Rβ2: STAT4結合部位は太下線付き	Q99665	AGDLPTHDG**Y**LPSNIDDLPSHEAPLADSLEELEPQHISLSVFPSSSLHPLTFSCGDKLTLDQLKMRCDSLML*	208
7/2/21/12R-2	IL-7Rα: Box 1 は下線付き Box 2 は太下線付き	P16871	KKRIKPIVWPSLPDHKKTLEHLCKKPRKN**LNVS**FNPESFLD**CQIH**RVDDIQARDEVEG	193
	IL-2Rβ: Shc & STAT5 結合部位は太下線付き *終止コドン	P14784	LERDKVTQLLLQQDKVPEPASLSSNHSLTSCFTNQG**Y**FFFHLPDALEIEACQVYFTYDPYSEEDPDEGVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDAYCTFPSRDDLLLFSPSLLGGPSPPSTAPGGSGAGEERMPPSLQERVPRDWDPQPLGPPTPGVPDLVDFQPPPELVLREAGEEVPDAGPREGVSFPWSRPPGQGEFRALNARLPLNTDA**Y**LSLQELQGQDPTHLV	194
	IL-21R: STAT3結合部位は太下線付き	Q9HBE5	SPGDEGPPRS**Y**LRQWVVIPPPLSSPGPQA	207
	IL-12Rβ2: STAT4結合部位は太下線付き	Q99665	AGDLPTHDG**Y**LPSNIDDLPSHEAPLADSLEELEPQHISLSVFPSSSLHPLTFSCGDKLTLDQLKMRCDSLML*	208
7/4R-1	IL-4Rα: Box 1 は下線付き Box 2, IRS-2 & STAT6 結合部位は太下線付き	P24394	KIKKE**WWDQIPNPA**RSRLVAIIIQDAQGSQWEKRSRGQEPAKCPHWKNCLTKLLP**CFLE**HNMKRDEDPHKAAKEMPFQGSGKSAWCPVEISKTVLWPESISVVRCVELFEAPVECEEEEEVEEEKGSFCASPESSRDDFQEGREGIVARLTESLFLDLLGEENGGFCQQDMGESCLLPPSGSTSAHMPWDEFPSAGPKEAPPWGKEQPLHLEPSPPASPTQSPDNLTCTETPLVIAGNPA**Y**RSFSNSLSQSPCPRELGPDPLLARHL	209

			EEVEPEMPCVPQLSEPTTVPQPEPETWEQILRRNVLQHGAAAAP VSAPTSGYQEFVHAVEQGGTQASAVVGLGPPGEAG**Y**KAFSSLLA SSAVSPEKCGFGASSGEEG**Y**KPFQDLIPGCPGDPAPVPVPLFTFG LDREPPRSPQSSHLPSSSPEHLGLEPGEKVEDMPKPPLPQEQATD PLVDSLGSGIVYSALTCHLCGHLKQCHGQEDGGQTPVMASPCC GCCCGDRSSPPTTPLRAPDPSPGGVPLEASLCPASLAPSGISEKSK SSSSFHPAPGNAQSSSQTPKIVNFVSVGPTYMRVS*	
7/4R-2	IL-7Rα: Box 1 は下線付き Box 2 は太下線付き	P16871	KKRIKPI**V**WPSLPDHK**K**TLEHLCKKPRKN**LNVS**FNPESFLD**CQIH**R VDDIQA	210
	IL-4Rα: IRS-2 & STAT6 結合部位は太下線付き	P24394	DEDPHKAAKEMPFQGSGKSAWCPVEISKTVLWPESISVVRCVEL FEAPVECEEEEEVEEEKGSFCASPESSRDDFQEGREGIVARLTESL FLDLLGEENGGFCQQDMGESCLLPPSGSTSAHMPWDEFPSAGP KEAPPWGKEQPLHLEPSPPASPTQSPDNLTCTETPLVIAGNPA**Y**R SFSNSLSQSPCPRELGPDPLLARHLEEVEPEMPCVPQLSEPTTVP QPEPETWEQILRRNVLQHGAAAAPVSAPTSGYQEFVHAVEQGG TQASAVVGLGPPGEAG**Y**KAFSSLLASSAVSPEKCGFGASSGEEG**Y** KPFQDLIPGCPGDPAPVPVPLFTFGLDREPPRSPQSSHLPSSSPEH LGLEPGEKVEDMPKPPLPQEQATDPLVDSLGSGIVYSALTCHLCG HLKQCHGQEDGGQTPVMASPCCGCCCGDRSSPPTTPLRAPDPS PGGVPLEASLCPASLAPSGISEKSKSSSSFHPAPGNAQSSSQTPKI VNFVSVGPTYMRVS*	211
7/6R-1	Gp130: Box 1 は下線付き Box 2, SHP-2 & STAT3 結合部位は太下線付き	P40189	KNKRDLIKKHI**W**PNVPDPS**K**SHIAQWSPHTPPRHNFNSKDQMY SDGNFTD**VSVV**EIEANDKKPFPEDLKSLDLFKKEKINTEGHSSGIG GSSCMSSSRPSISSSDENESSQNTSSTVQ**Y**STVVHSG**Y**RHQVPSV QVFSRSESTQPLLDSEERPEDLQLVDHVDGGDGILPRQQ**Y**FKQN CSQHESSPDISHFERSKQVSSVNEEDFVRLKQQISDHISQSCGSG QMKMFQEVSAADAFGPGTEGQVERFETVGMEAATDEGMPKS **Y**LPQTVRQGG**Y**MPQ*	212
7/6R-2	IL-7Rα: Box 1は下線付き Box 2は太下線付き	P16871	KKRIKPI**V**WPSLPDHK**K**TLEHLCKKPRKN**LNVS**FNPESFLD**CQIH**R VDDIQARDEVE	213
	Gp130: SHP-2 & STAT3 結合部位は太下線付き	P40189	KKPFPEDLKSLDLFKKEKINTEGHSSGIGGSSCMSSSRPSISSSDEN ESSQNTSSTVQ**Y**STVVHSG**Y**RHQVPSVQVFSRSESTQPLLDSEER PEDLQLVDHVDGGDGILPRQQ**Y**FKQNCSQHESSPDISHFERSKQ VSSVNEEDFVRLKQQISDHISQSCGSGQMKMFQEVSAADAFGP GTEGQVERFETVGMEAATDEGMPKS**Y**LPQTVRQGG**Y**MPQ*	214

【０７９７】

【表３４】

表３４：キメラサイトカイン受容体のドメイン組成

名称	シグナルペプチド	ＥＣＤ	ＴＭＤ	Ｂｏｘ１／２	ＩＣＤ	ＳＴＡＴ部位（複数可）	他の部位（複数可）
７／２Ｒ－１	ＩＬ－７Ｒα（１９０）	ＩＬ－７Ｒα（１８７）	ＩＬ－７Ｒα（１８８）	ＩＬ－２Ｒβ（１９２）	ＩＬ－２Ｒβ（１９２）	５	Ｓｈｃ
７／２Ｒ－２	ＩＬ－７Ｒα（１９０）	ＩＬ－７Ｒα（１８７）	ＩＬ－７Ｒα（１８８）	ＩＬ－７Ｒα（１９３）	ＩＬ－２Ｒβ（１９４）	５	Ｓｈｃ
７／２／１２Ｒ－１	ＩＬ－７Ｒα（１９０）	ＩＬ－７Ｒα（１８７）	ＩＬ－７Ｒα（１８８）	ＩＬ－２Ｒβ（１９２）	ＩＬ－２Ｒβ（１９５）ＩＬ－１２Ｒβ２（１９５）	４，５	Ｓｈｃ
７／２／１２Ｒ－２	ＩＬ－７Ｒα（１９０）	ＩＬ－７Ｒα（１８７）	ＩＬ－７Ｒα（１８８）	ＩＬ－７Ｒα（１９３）	ＩＬ－２Ｒβ（１９４）ＩＬ－１２Ｒβ２（１９５）	４，５	Ｓｈｃ
７／１２／２Ｒ－１	ＩＬ－７Ｒα（１９０）	ＩＬ－７Ｒα（１８７）	ＩＬ－７Ｒα（１８８）	ＩＬ－２Ｒβ（１９６）	ＩＬ－２Ｒβ（１９６）ＩＬ－１２Ｒβ２（１９７）ＩＬ－２Ｒβ（１９８）	４，５	Ｓｈｃ
７／１２／２Ｒ－２	ＩＬ－７Ｒα（１９０）	ＩＬ－７Ｒα（１８７）	ＩＬ－７Ｒα（１８８）	ＩＬ－７Ｒα（１９９）	ＩＬ－１２Ｒβ２（２００）ＩＬ－２Ｒβ（１９４）	４，５	Ｓｈｃ

7／21－R1	IL－7Rα（190）	IL－7Rα（187）	IL－7Rα（188）	IL－21R（201）	IL－21R（201）	3	該当なし
7／21－R2	IL－7Rα（190）	IL－7Rα（187）	IL－7Rα（188）	IL－7Rα（202）	IL－21R（203）	3	該当なし
7／21／7R－1	IL－7Rα（190）	IL－7Rα（187）	IL－7Rα（188）	IL－21R（201）	IL－21R（201） IL－7Rα（204）	3，5	PI3K
7／7／21R－1	IL－7Rα（190）	IL－7Rα（187）	IL－7Rα（188）	IL－7Rα（205）	IL－7Rα（205） IL－21R（206）	3，5	PI3K
7／21／21R－1	IL－7Rα（190）	IL－7Rα（187）	IL－7Rα（188）	IL－2Rβ（192）	IL－2Rβ（192） IL－21R（206）	3，5	Shc
7／21／21R－2	IL－7Rα（190）	IL－7Rα（187）	IL－7Rα（188）	IL－7Rα（193）	IL－2Rβ（194） IL－21R（206）	3，5	Shc
7／21／12／21R－1	IL－7Rα（190）	IL－7Rα（187）	IL－7Rα（188）	IL－2Rβ（192）	IL－2Rβ（192） IL－12Rβ2（195） IL－21R（206）	3，4，5	Shc

7／2／12／21 R－2	IL－7Rα（190）	IL－7Rα（187）	IL－7Rα（188）	IL－7Rα（193）	IL－2Rβ（194） IL－12Rβ2（195） IL－21R（206）	3，4，5	Shc
7／2／21／12 R－1	IL－7Rα（190）	IL－7Rα（187）	IL－7Rα（188）	IL－2Rβ（192）	IL－2Rβ（192） IL－21R（207） IL－12Rβ2（208）	3，4，5	Shc
7／2／21／12 R－2	IL－7Rα（190）	IL－7Rα（187）	IL－7Rα（188）	IL－7Rα（193）	IL－2Rβ（194） IL－21R（207） IL－12Rβ2（208）	3，4，5	Shc
7／4 R－1	IL－7Rα（190）	IL－7Rα（187）	IL－7Rα（188）	IL－4Rα（209）	IL－4Rα（209）	6	IRS－2
7／4 R－2	IL－7Rα（190）	IL－7Rα（187）	IL－7Rα（188）	IL－7Rα（210）	IL－7Rα（210） IL－4Rα（211）	6	IRS－2
7／6 R－1	IL－7Rα（190）	IL－7Rα（187）	IL－7Rα（188）	gp130（212）	gp130（212）	3	SHP－2

7／6 R－2	IL－7Rα（190）	IL－7Rα（187）	IL－7Rα（188）	IL－7Rα（213）	IL－7Rα（213） gp130（214）	3	SHP－2

【０７９８】
【表３５】

表３５：キメラサイトカイン受容体をコードするレトロウイルスベクターで形質導入されたマウスＯＴ－Ｉ　Ｔ細胞における制御されたパラクリンシグナル伝達及び分泌されたサイトカインの検出

受容体	サイトカイン	ＩＬ－１８	エオタキシン	Ｇ－ＣＳＦ	ＧＭ－ＣＳＦ	ＩＦＮ－ｇ	ＩＬ－１ａ	ＩＬ－１ｂ	ＩＬ－２	ＩＬ－３	ＩＬ－４	ＩＬ－５
Ｇ２Ｒ－２	培地	ＯＯＲ＜	ＯＯＲ＜	０．７９	３．３１	０．９５	０．５８	０．４３	ＯＯＲ＜	１．２５	０．１２	ＯＯＲ＜
Ｇ２Ｒ－２	ＩＬ－２	ＯＯＲ＜	ＯＯＲ＜	１．０８	１３．７０	１．３２	ＯＯＲ＜	０．１４	ＯＯＲ＜	０．３５	０．１４	０．５７
Ｇ２Ｒ－２	ＰＥＧ－１３０ａ１	ＯＯＲ＜	０　９６	０．９１	１７．７０	２．２９	２．５１	ＯＯＲ＜	ＯＯＲ＜	０．３５	０．１２	１．０９
Ｇ２Ｒ－３	培地	ＯＯＲ＜	ＯＯＲ＜	０．８６	３．３４	０．８３	ＯＯＲ＜	０２９	ＯＯＲ＜	０．８６	０．１７	ＯＯＲ＜
Ｇ２Ｒ－３	ＩＬ－２	ＯＯＲ＜	ＯＯＲ＜	１．０１	１４．０９	０．８６	ＯＯＲ＜	０．１４	ＯＯＲ＜	０．４５	０．１５	０．３０
Ｇ２Ｒ－３	ＰＥＧ－１３０ａ１	ＯＯＲ＜	ＯＯＲ＜	１．０１	１４．５２	０．９５	ＯＯＲ＜	ＯＯＲ＜	ＯＯＲ＜	０．３５	０．１２	０．０６
Ｇ１２／２Ｒ－１	培地	ＯＯＲ＜	ＯＯＲ＜	０．７２	３．３４	１．２０	ＯＯＲ＜	ＯＯＲ＜	ＯＯＲ＜	０．９２	０．１６	ＯＯＲ＜

Ｇ１２／２Ｒ－１	ＩＬ－２＋ＩＬ－１２	ＯＯＲ＜	ＯＯＲ＜	０．７９	９５．７６	７１７．９３	７．９４	０２９	ＯＯＲ＜	ＯＯＲ＜	０．１８	ＯＯＲ＜
Ｇ１２／２Ｒ－１	ＰＥＧ－１３０ａ１	ＯＯＲ＜	ＯＯＲ＜	１．３８	１５．７９	２．００	０．９６	０．４３	ＯＯＲ＜	０．１９	０．１６	ＯＯＲ＜
Ｇ１２／２Ｒ－１＋ｍ１８	培地	１５５．６２	０．１８	０．８６	１２．２０	６．９２	ＯＯＲ＜	ＯＯＲ＜	ＯＯＲ＜	０．１７	０２１	ＯＯＲ＜
Ｇ１２／２Ｒ－１＋ｍ１８	ＩＬ－２＋ＩＬ－１２	２８８．２４	ＯＯＲ＜	１．５２	９７２．７５	９８７１．７１	４０．１９	ＯＯＲ＜	０．５９	０．８６	０２３	０．８１
Ｇ１２／２Ｒ－１＋ｍ１８	ＰＥＧ－１３０ａ１	８１１．１０	ＯＯＲ＜	１．２７	２７１．８１	７４２６．６３	１９．５６	ＯＯＲ＜	ＯＯＲ＜	０．４７	０２０	７．５９

受容体	サイトカイン	ＩＬ－６	ＩＬ－７	ＩＬ－９	ＩＬ－１０	ＩＬ－１２ｐ４０	ＩＬ－１２ｐ７０	ＩＬ－１３	ＩＬ－１５	ＩＬ－１７	ＩＰ－１０	ＫＣ
Ｇ２Ｒ－２	培地	０．２４	０２５	ＯＯＲ＜	２．６１	ＯＯＲ＜	３．１９	ＯＯＲ＜	１．２８	ＯＯＲ＜	２．４６	０．９６
Ｇ２Ｒ－２	ＩＬ－２	０．３８	０．５４	ＯＯＲ＜	５２．２８	ＯＯＲ＜	１．７７	ＯＯＲ＜	ＯＯＲ＜	０．１０	２．９７	２．４８
Ｇ２Ｒ－２	ＰＥＧ－１３０ａ１	０．２７	０．７４	ＯＯＲ＜	３００．０１	ＯＯＲ＜	５２６	ＯＯＲ＜	２．５６	０．２８	３．５９	１．２０
Ｇ２Ｒ－３	培地	０．３４	０．３０	ＯＯＲ＜	３．２９	ＯＯＲ＜	１．７３	ＯＯＲ＜	ＯＯＲ＜	０．０７	１．９８	０．５７
Ｇ２Ｒ－３	ＩＬ－２	０．３３	０．１９	ＯＯＲ＜	４４．２２	ＯＯＲ＜	２．５９	ＯＯＲ＜	ＯＯＲ＜	ＯＯＲ＜	２．７４	０．５５
Ｇ２Ｒ－３	ＰＥＧ－１３０ａ１	０．２８	０．０８	ＯＯＲ＜	６８．２６	ＯＯＲ＜	２．１７	ＯＯＲ＜	ＯＯＲ＜	０．０３	２．９０	０．２１
Ｇ１２／２Ｒ	培地	０．４９	０２３	ＯＯＲ＜	２．４３	ＯＯＲ＜	１．９０	ＯＯＲ＜	ＯＯＲ＜	ＯＯＲ＜	２．７６	０．５５
Ｇ１２／２Ｒ	ＩＬ－２＋ＩＬ－１２	０．３３	０．１１	０２０	１４０２．５０	２４．７９	１１６６．８１	ＯＯＲ＜	ＯＯＲ＜	０．１０	４．２９	０．９６
Ｇ１２／２Ｒ	ＰＥＧ－１３０ａ１	０．２９	０．０５	０２０	１６０．３７	ＯＯＲ＜	２．７９	ＯＯＲ＜	ＯＯＲ＜	ＯＯＲ＜	３．２６	８．２３

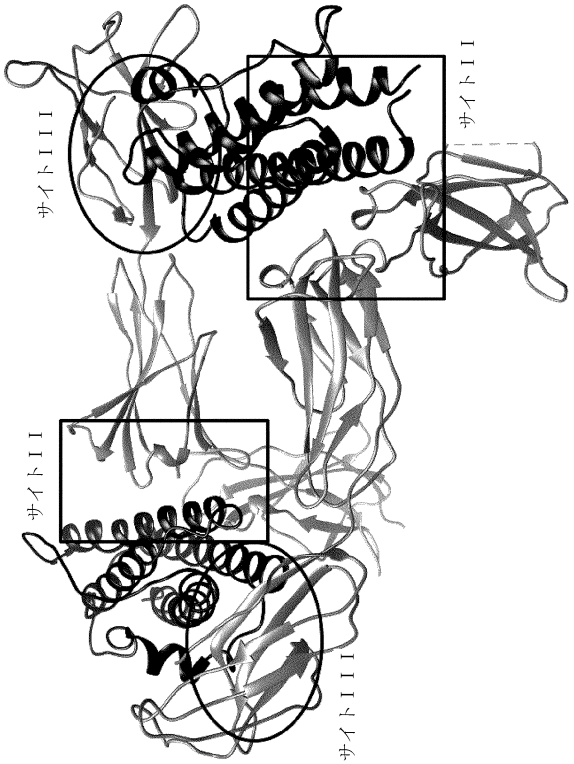
G12／2R／18C	培地	0.48	0.30	OOR＜	12.99	OOR＜	1.77	OOR＜	0.65	0.47	8.95	1.05
G12／2R／18C	IL－2＋IL－12	18.08	0.54	0.39	2911.40	19.69	875.39	OOR＜	OOR＜	1.51	18.77	2.57
G12／2R／18C	PEG－130a1	1.94	0.53	OOR＜	1202.95	OOR＜	2.99	OOR＜	0.97	0.79	11.07	0.44

受容体	サイトカイン	LIF	LIX	MCP－1	M－CSF	MG	MP－1a	MP－1b	MP－2	RANTES	TNFa	VEGF
G2R－2	培地	11.58	96.40	5.13	0.28	0.02	4.19	OOR＜	OOR＜	0.33	2.69	3.67
G2R－2	IL－2	11.91	80.86	320	0.73	0.02	OOR＜	OOR＜	20.29	1.64	6.56	45.30
G2R－2	PEG－130a1	15.25	87.57	0.99	0.23	0.04	4.02	12.86	33.70	3.12	10.33	78.42
G2R－3	培地	7.70	53.21	6.51	0.28	0.04	OOR＜	OOR＜	15.72	0.48	3.01	6.90
G2R－3	IL－2	7.55	78.33	4.30	0.46	OOR＜	3.38	OOR＜	13.24	1.60	5.45	40.10
G2R－3	PEG－130a1	8.86	104.04	4.86	0.32	OOR＜	OOR＜	OOR＜	OOR＜	1.95	7.34	76.88
G12／2R	培地	5.38	69.45	5.96	0.46	OOR＜	OOR＜	5.61	37.16	1.14	2.44	2.88
G12／2R	IL－2＋IL－12	12.60	80.50	9.57	0.82	0.18	7.98	3.52	7.05	1.92	7.12	38.94

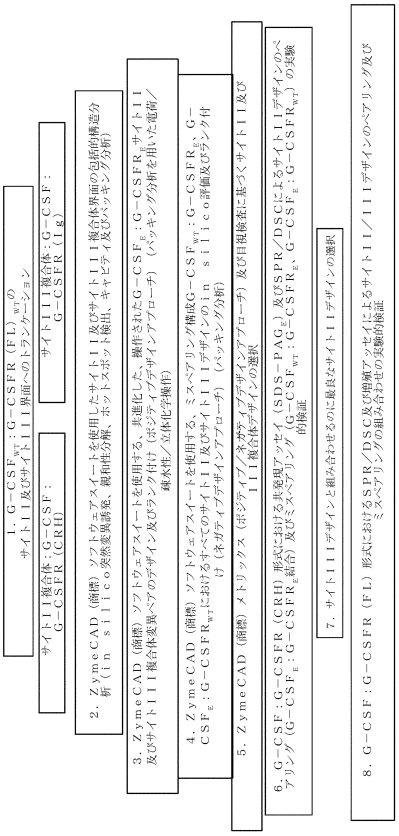
G12／2R	PEG－130a1	7.07	117.52	4.86	0.73	0.07	3.38	OOR＜	33.70	2.82	6.57	56.95
G12／2R／18C	培地	13.79	70.40	4.58	0.82	0.06	3.38	OOR＜	39.25	5.58	6.77	8.30
G12／2R／18C	IL－2＋IL－12	39.84	88.99	8.18	0.60	0.39	7.98	7.97	26.47	6.46	26.12	121.10
G12／2R／18C	PEG－130a1	17.54	85.52	7.07	0.87	0.08	OOR＜	OOR＜	20.86	8.46	16.67	78.03

【図面】

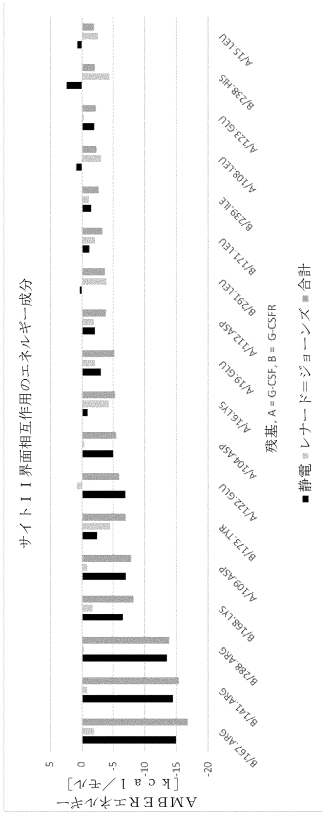
【図１】



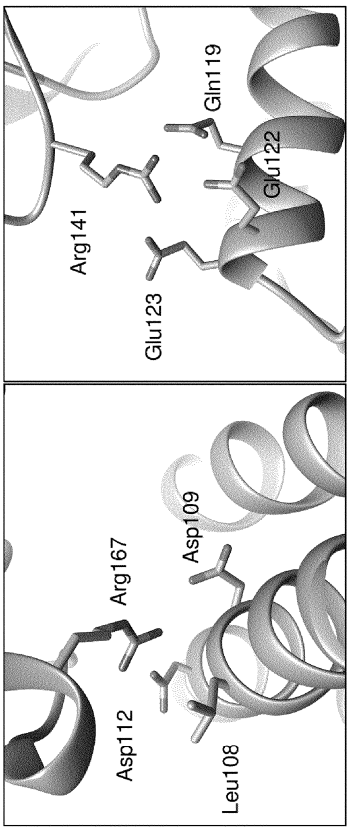
【図２】



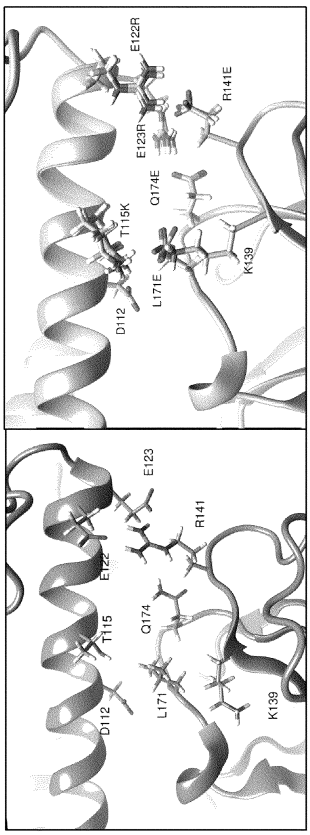
【図３】


サイトＩＩＩ界面相互作用のエネルギー成分
AMBERエネルギー
[kcal/モル]
5
0
-5
-10
-15
-20
B/167.ARG
B/141.ARG
B/238.ARG
B/158.LYS
A/109.ASP
B/173.THR
A/122.GLU
A/104.ASP
A/164.LYS
A/19.GLU
A/112.ASP
B/29|.LEU
B/171.LEU
B/239.ILE
A/108.LEU
A/123.GLU
B/238.HIS
A/15.LEU
残基, A = G-CSF, B = G-CSFR
■静電 ■レナードミージョーンズ ■合計

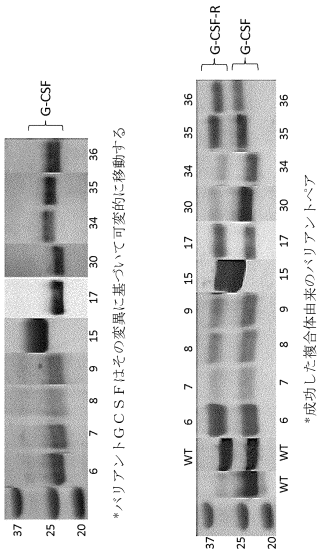
【図４】


Arg141
Glu123
Gln119
Glu122
Asp112
Arg167
Asp109
Leu108

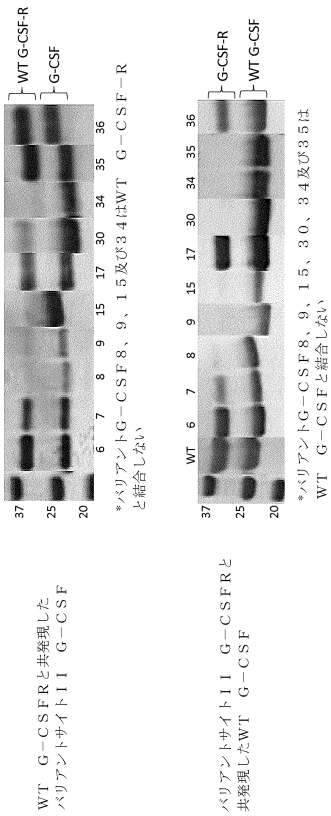
【図５】


E122R
E123R
R141E
T115K
Q174E
D112
L171E
K139
D112
T115
E122
E123
R141
Q174
L171
K139

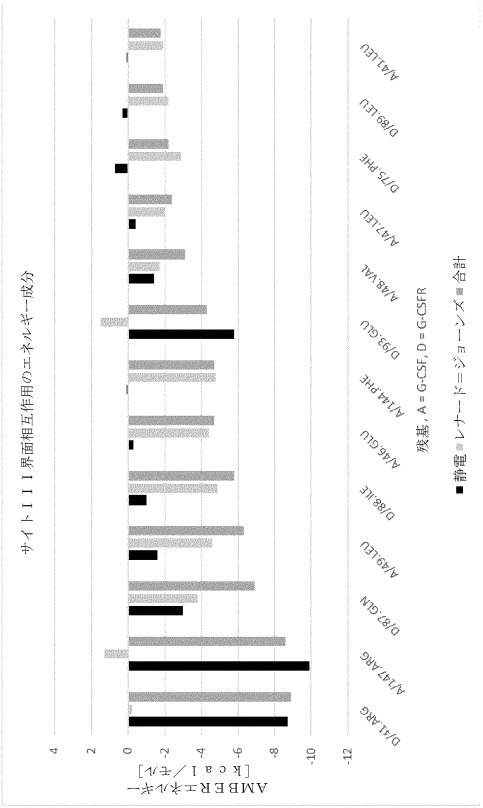
【図６】


G-CSF
37
25
20
WT 6 7 8 9 15 17 30 34 35 36
*バリアントＧＣＳＦはその変異に基づいて可変的に移動する
バリアントサイトＩＩＧ－ＣＳＦ
プルダウン
G-CSF-R
G-CSF
37
25
20
WT 6 7 8 9 15 17 30 34 35 36
WT 6 7 8 9 15 17 30 34 35 36
*成功した複合体由来のバリアントペア
バリアントサイトＩＩ共発現及び
精製複合体

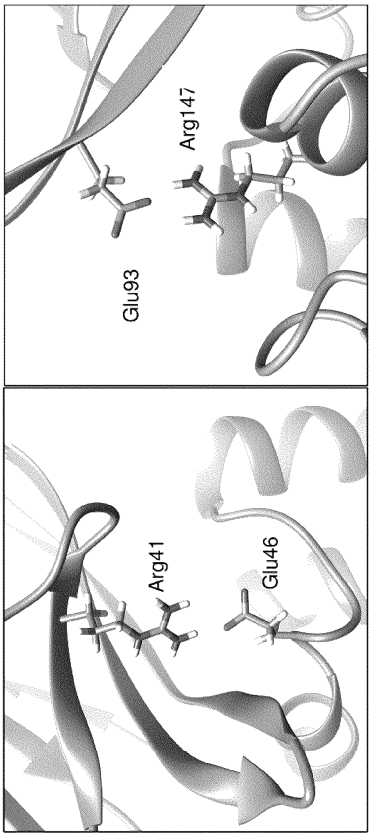
【図７】


WT G-CSF-R
G-CSF
37
25
20
6 7 8 9 15 17 30 34 35 36
*バリアントG−CSF8、9、15及び34はWT G−CSF−Rと結合しない
WT G−CSFRと共発現したバリアントサイトII G−CSF
G-CSF-R
WT G-CSF
WT 6 7 8 9 15 17 30 34 35 36
*バリアントG−CSF8、9、15、30、34及び35はWT G−CSFと結合しない
バリアントサイトII G−CSFRと共発現したWT G−CSF

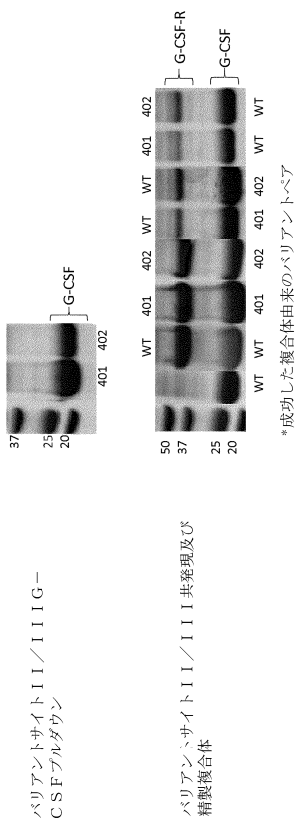
【図８】


サイトIII界面相互作用のエネルギー成分
AMBERエネルギー [kcal/モル]
4
2
0
-2
-4
-6
-8
-10
-12
D/41.ARG
A/147.ARG
D/87.GLN
A/49.LEU
D/88.ILE
A/46.GLU
A/144.PHE
D/93.GLU
A/48.VAL
A/47.LEU
D/75.PHE
D/89.LEU
A/41.LEU
残基，A = G-CSF, D = G-CSFR
静電 レナード=ジョーンズ 合計

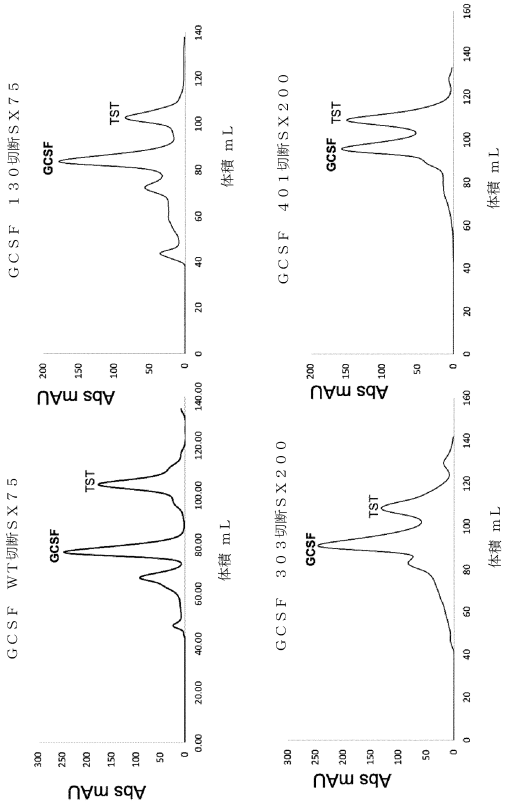
【図９】


Arg147
Glu93
Arg41
Glu46

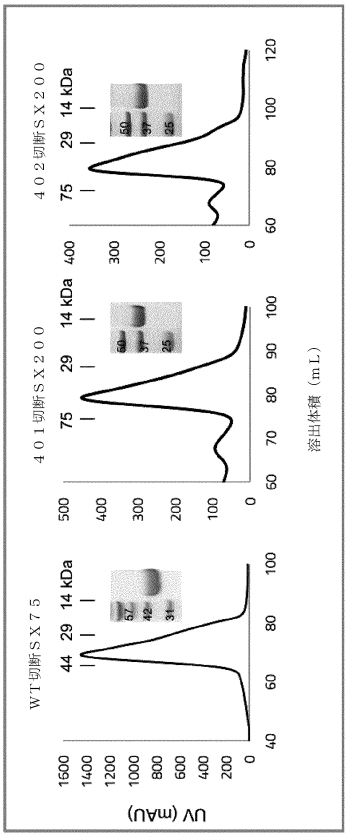
【図１０】


G-CSF
37
25
20
401 402
WT WT 401 402 WT WT 401 402
G-CSF-R
G-CSF
50
37
25
20
*成功した複合体由来のバリアントペア
バリアントサイトII／IIIG−CSFブルダウン
バリアントサイトII／III共発現及び精製複合体

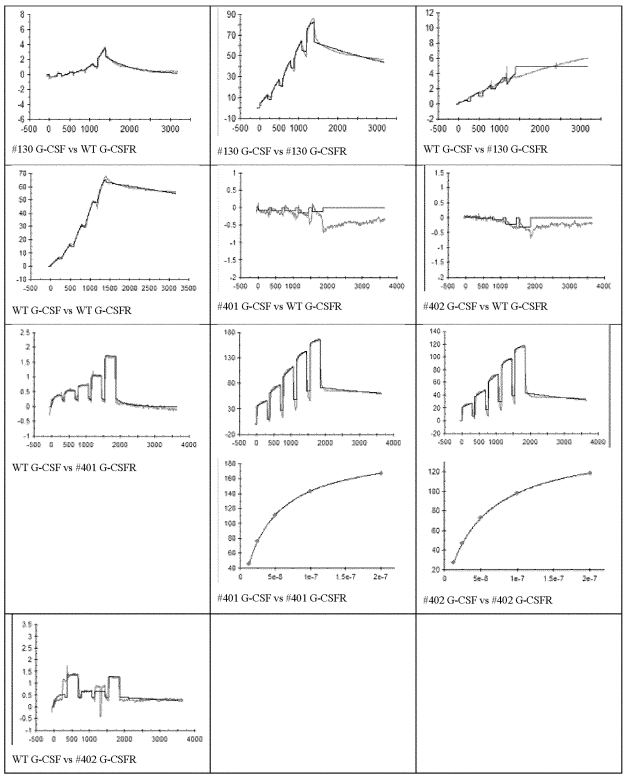
【図１１】



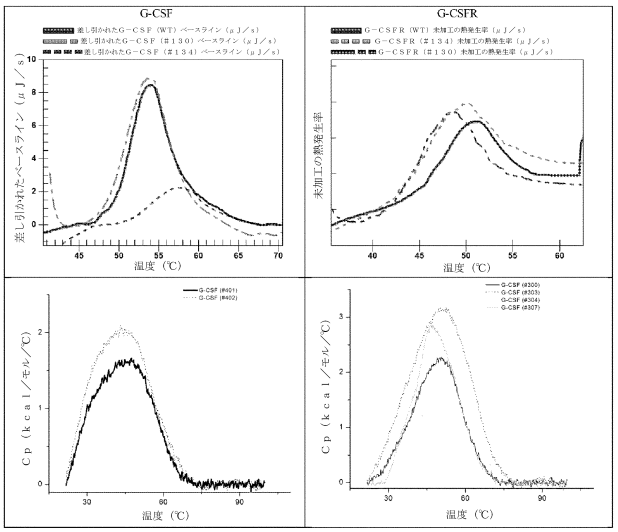
【図１２】



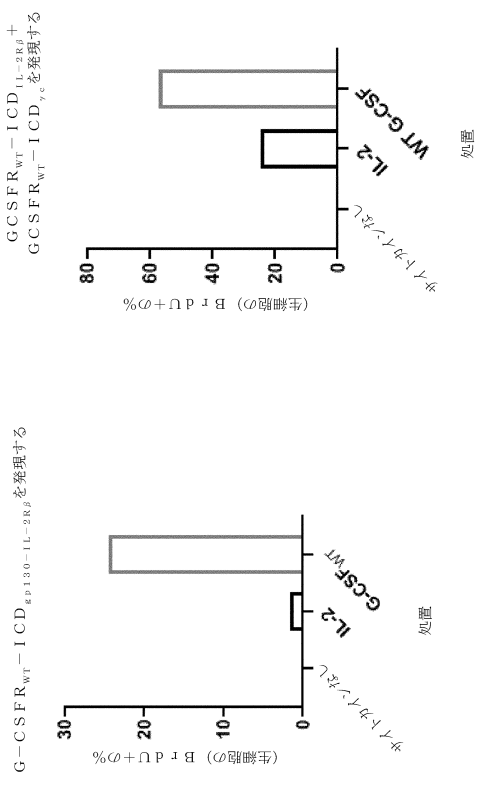
【図１３】



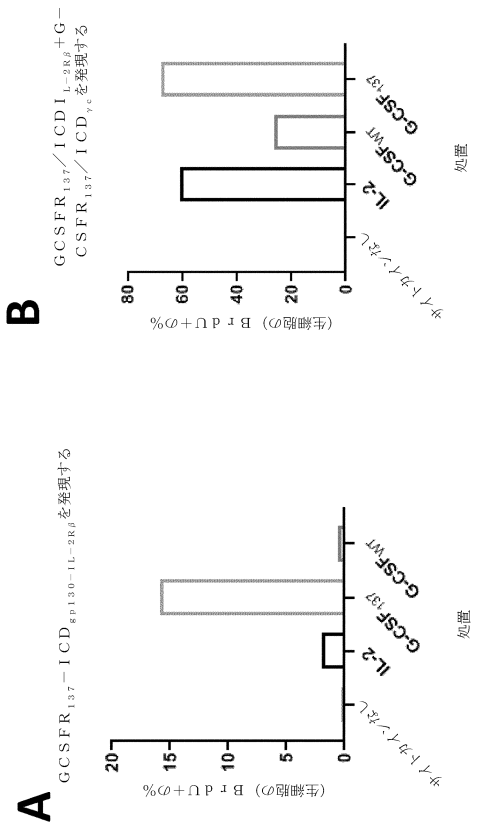
【図１４】



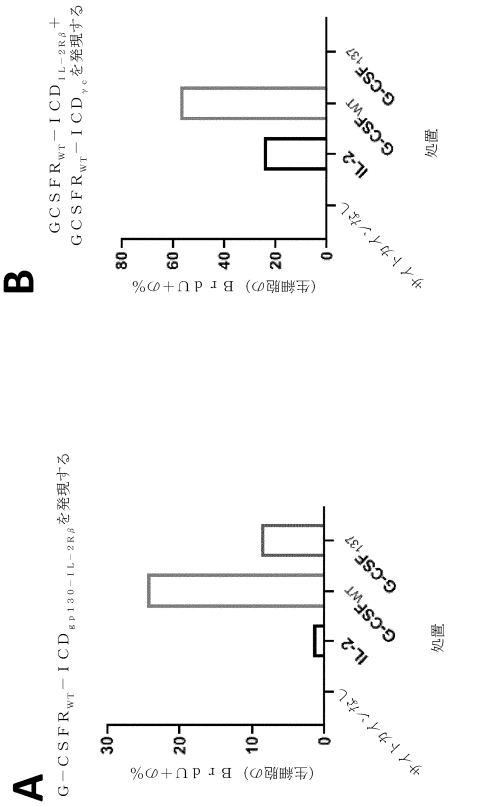
【図１５】



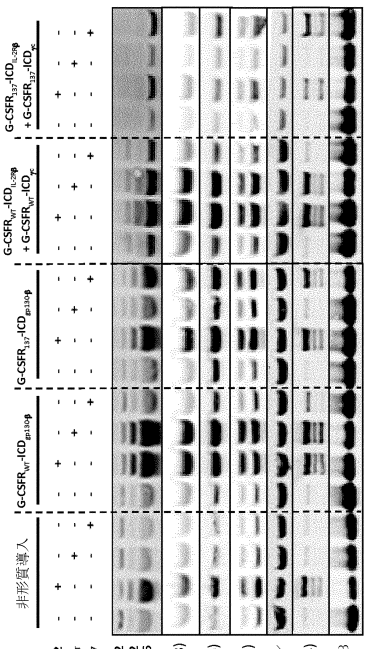
【図１６】



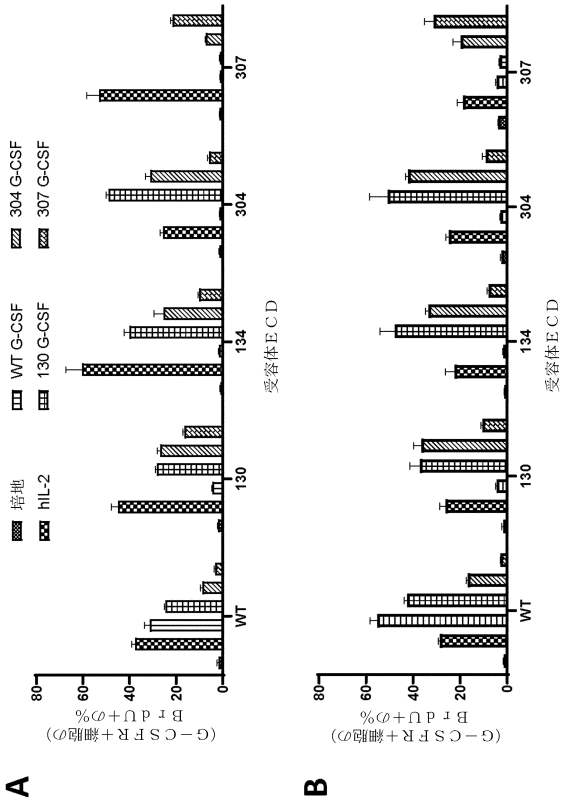
【図１７】



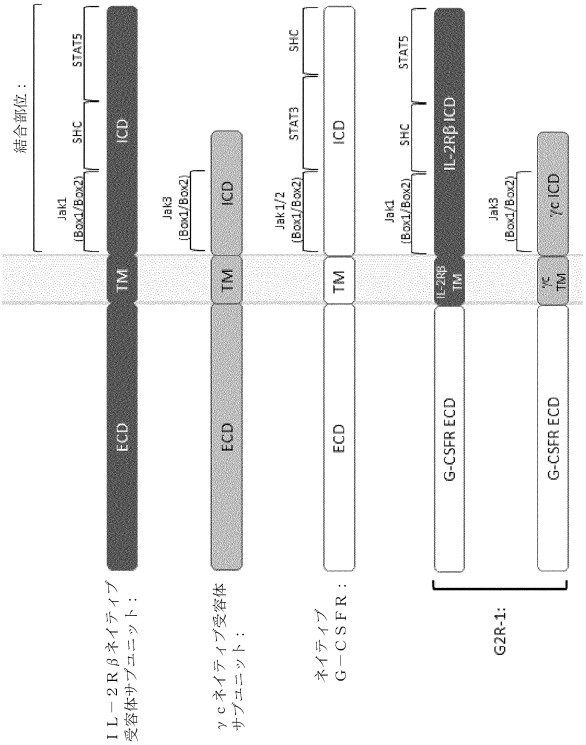
【図１８】



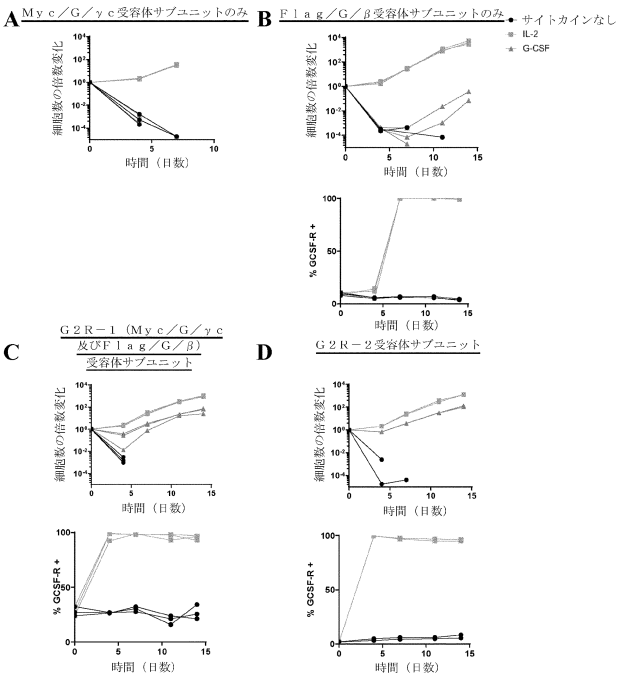
【図１９】



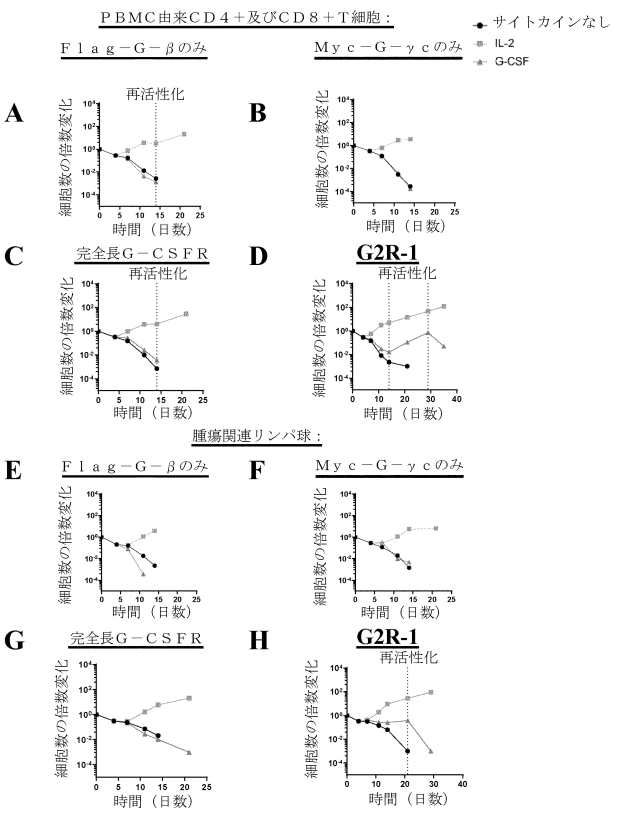
【図２０】



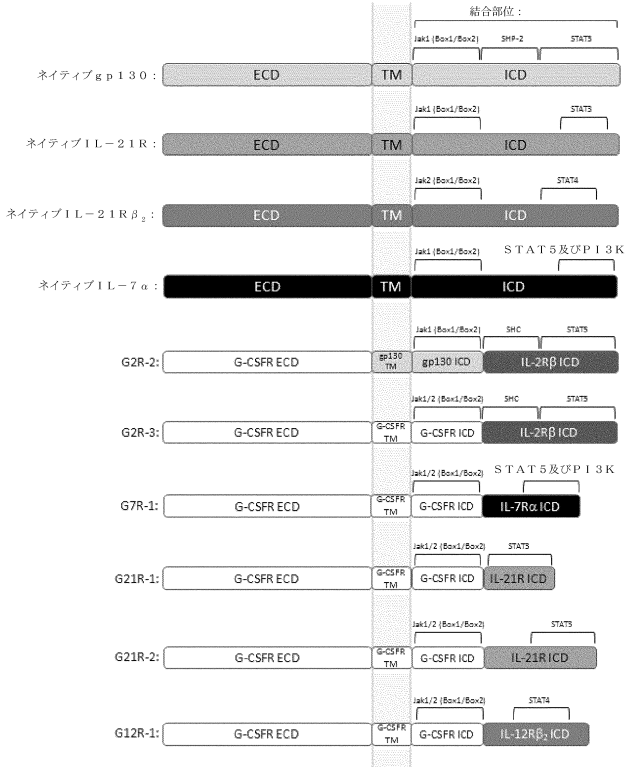
【図２１】



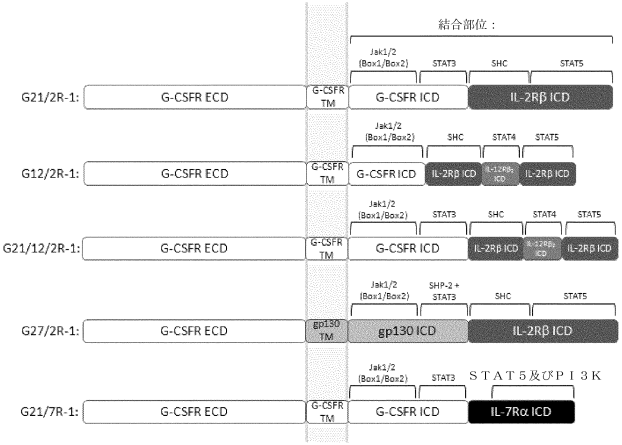
【図２２】



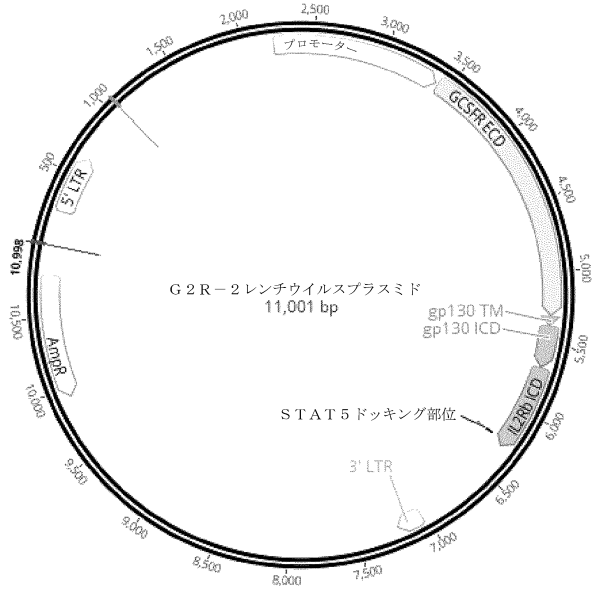
【図２３】



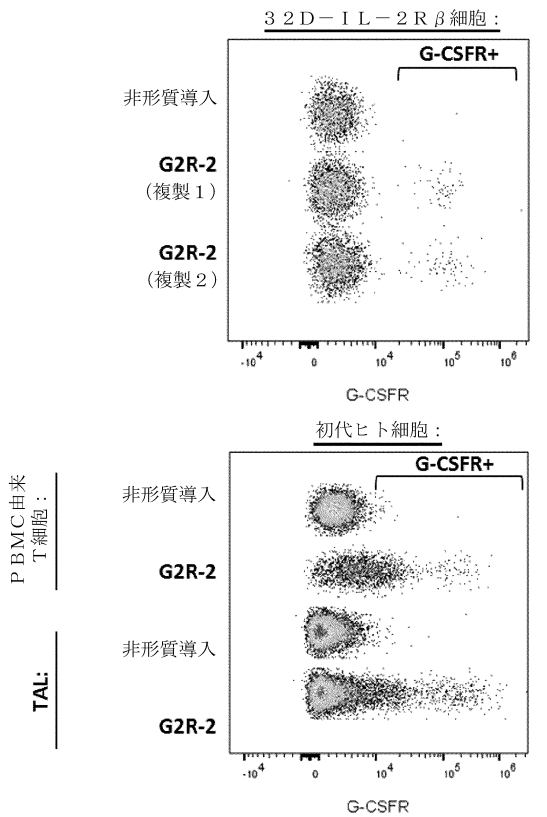
【図２４】



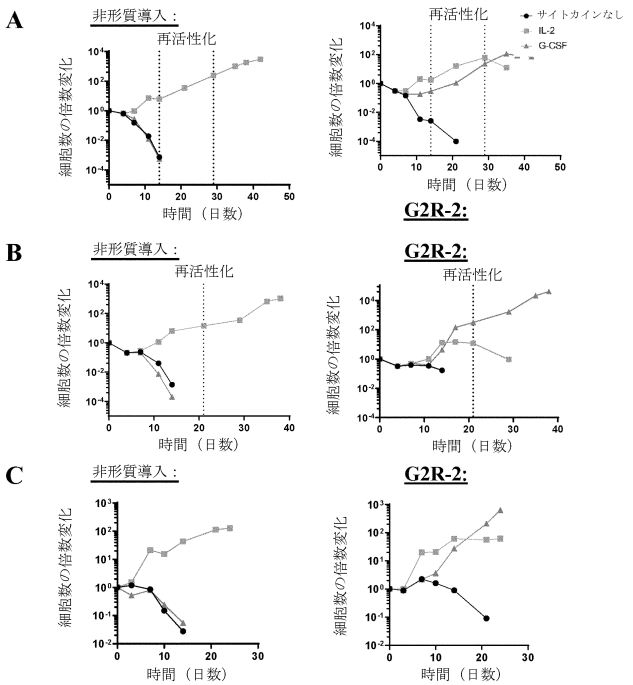
【図２５】



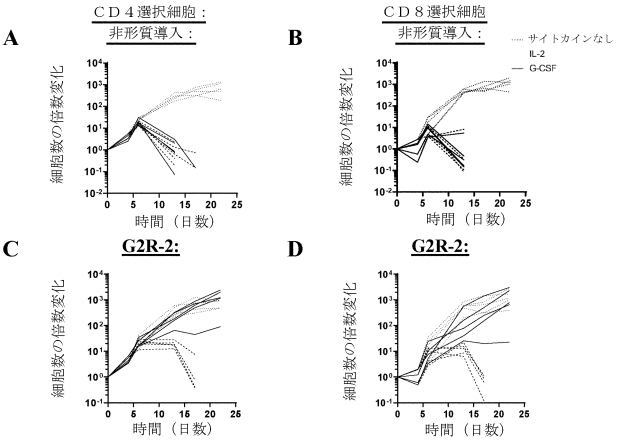
【図２６】



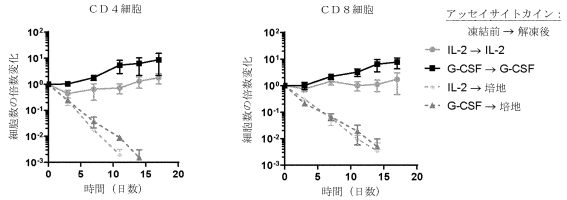
【図２７】



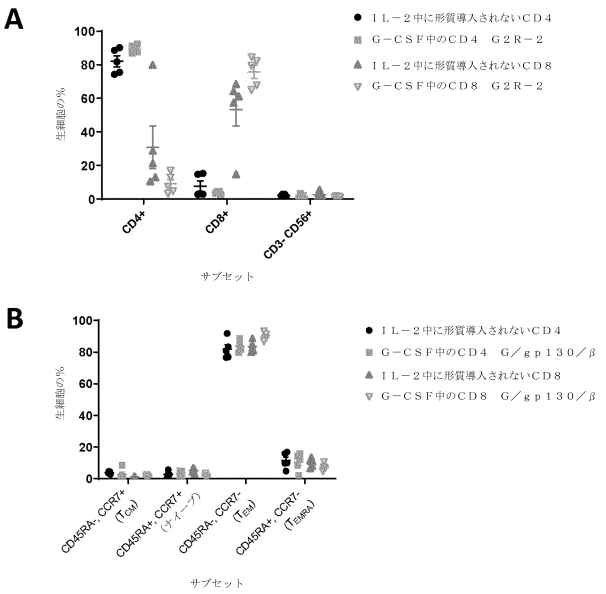
【図２８】



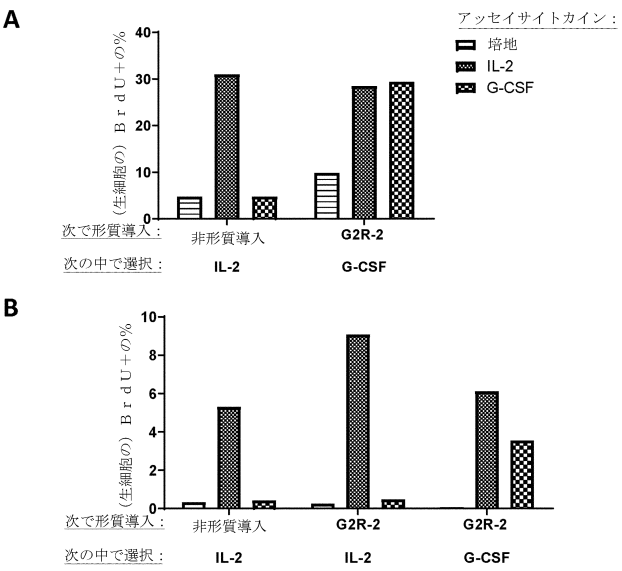
【図２９】



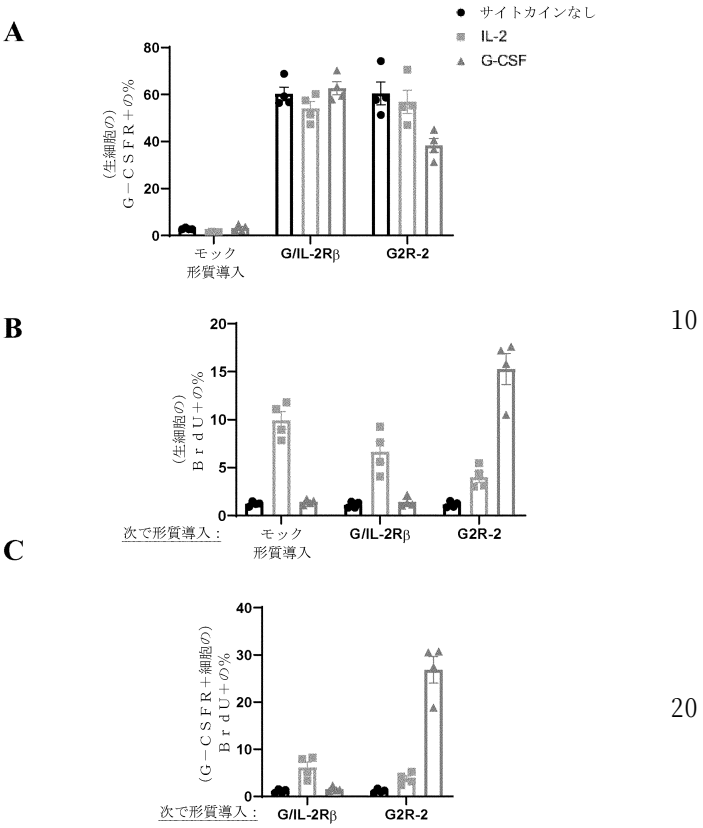
【図３０】



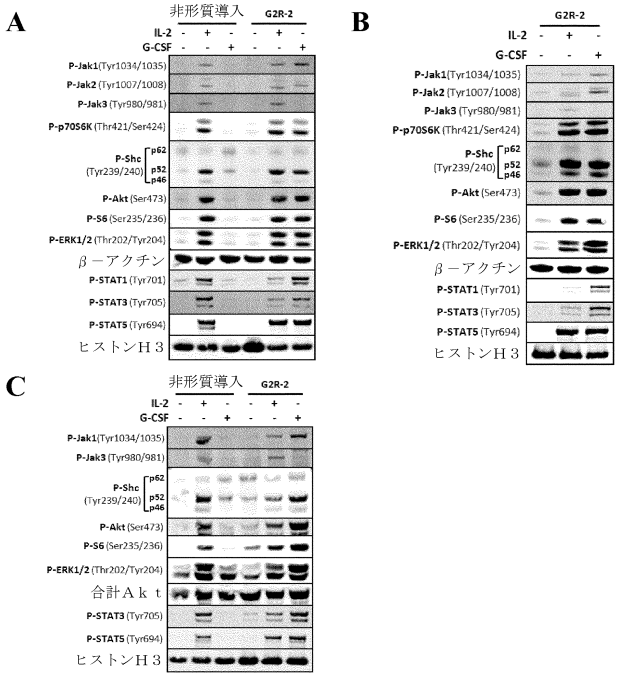
【図３１】



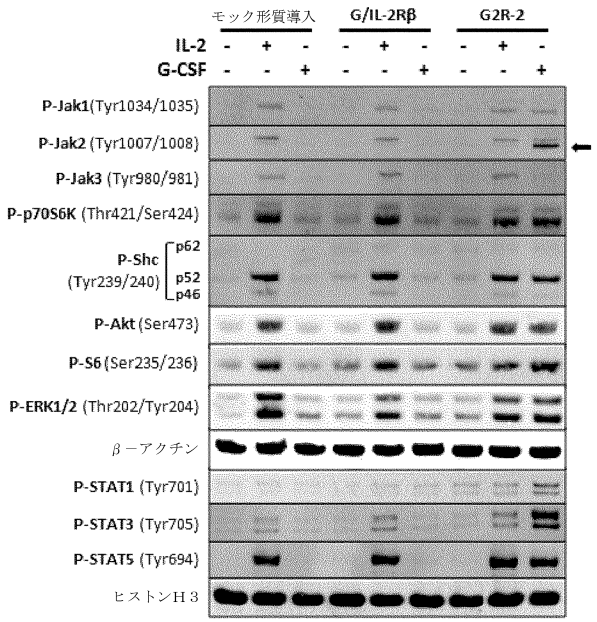
【図３２】



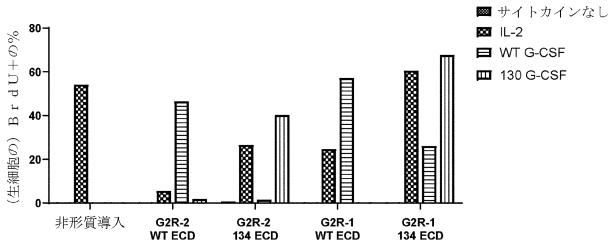
【図３３】



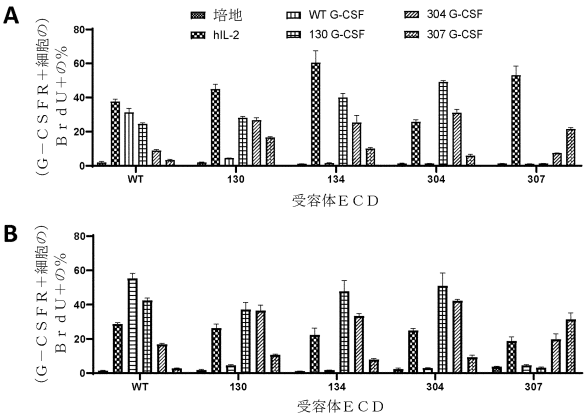
【図３４】



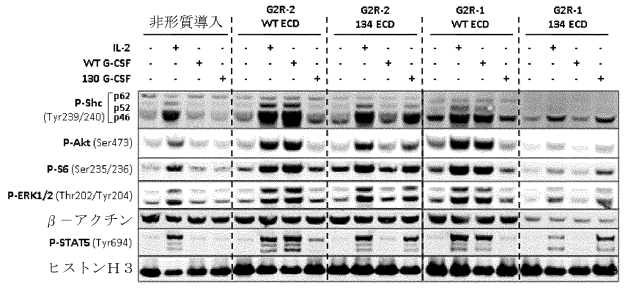
【図３５】



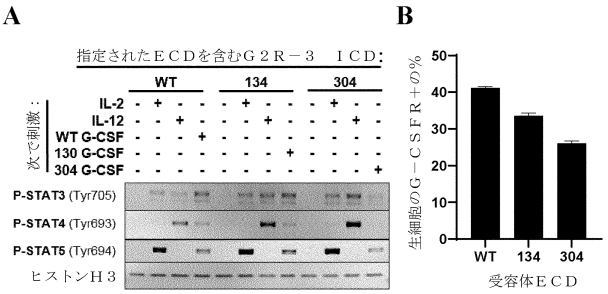
【図３６】



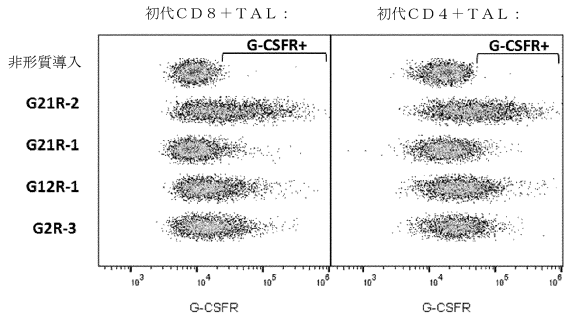
【図３７】



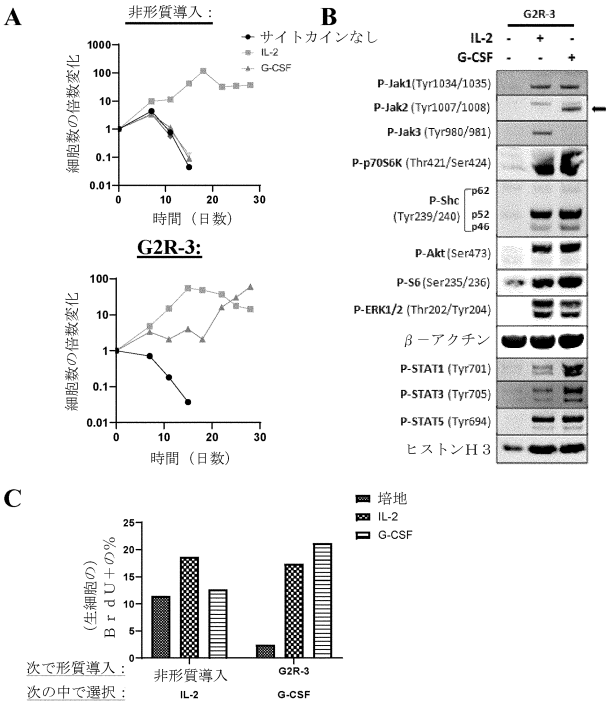
【図３８】



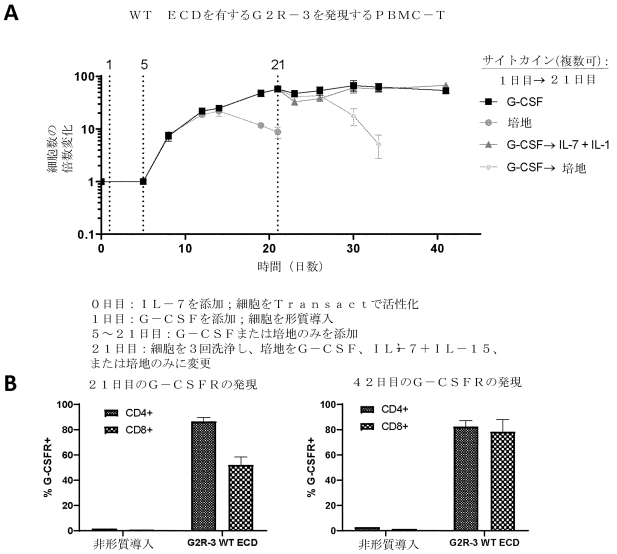
【図３９】



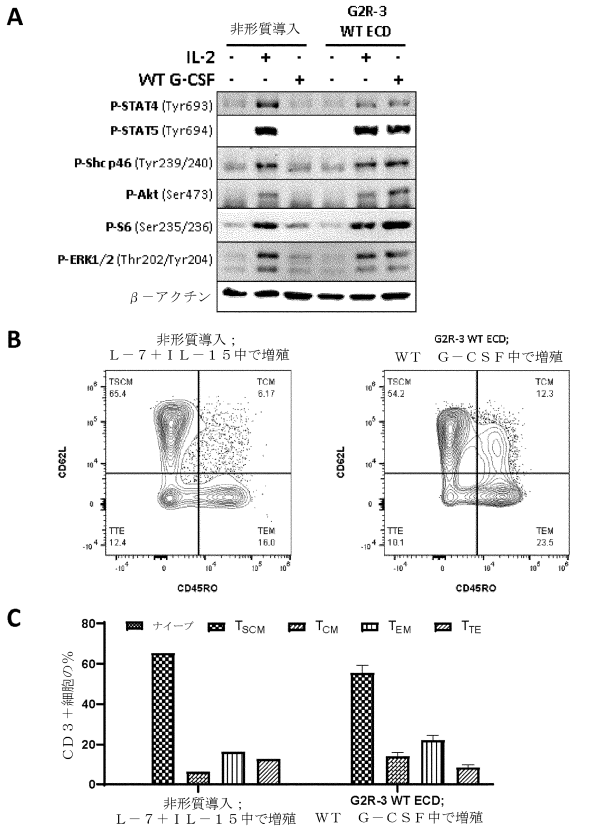
【図４０】



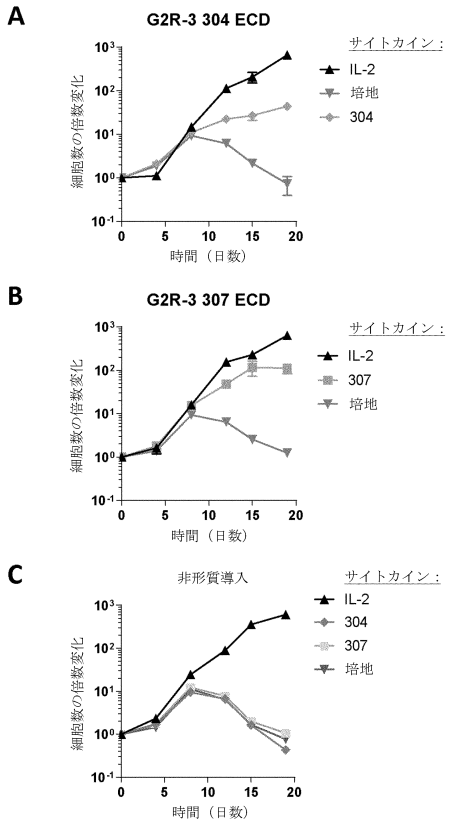
【図４１】



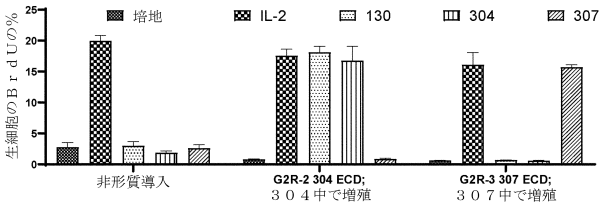
【図４２】



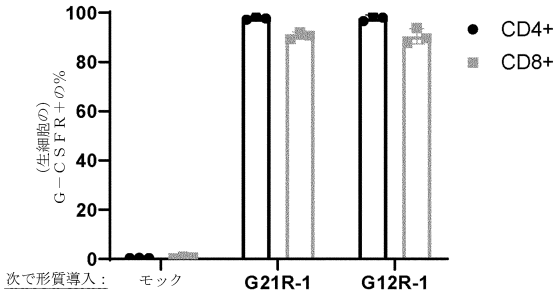
【図４３】



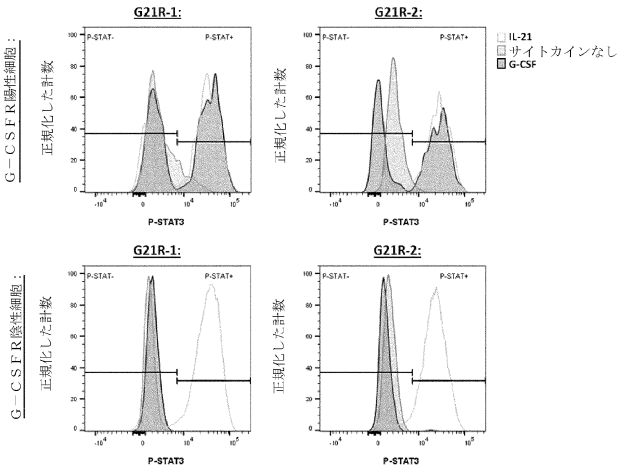
【図４４】



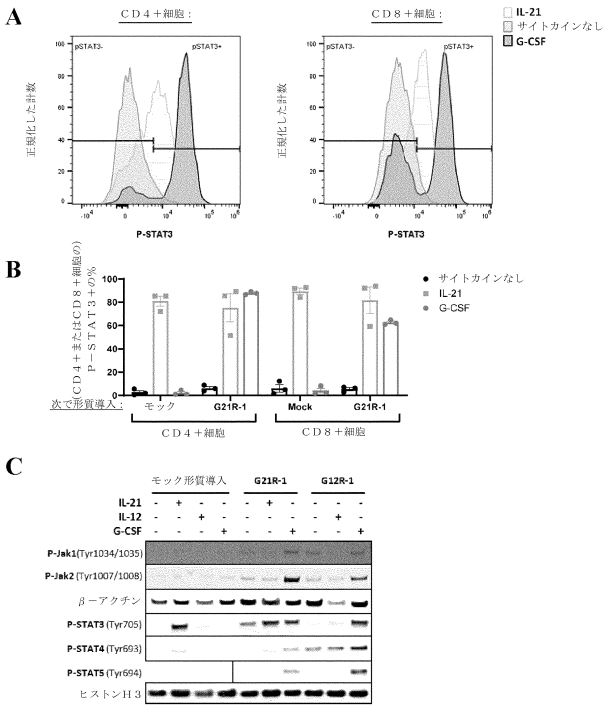
【図４５】



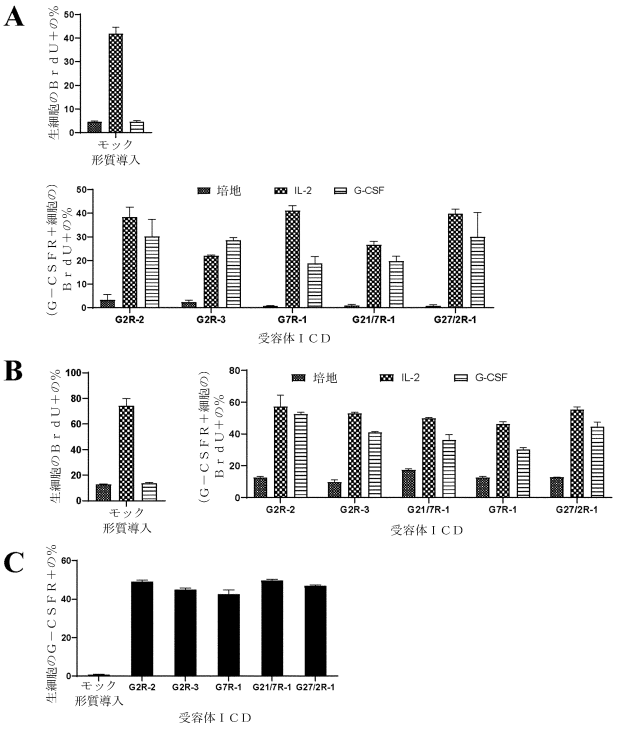
【図４６】



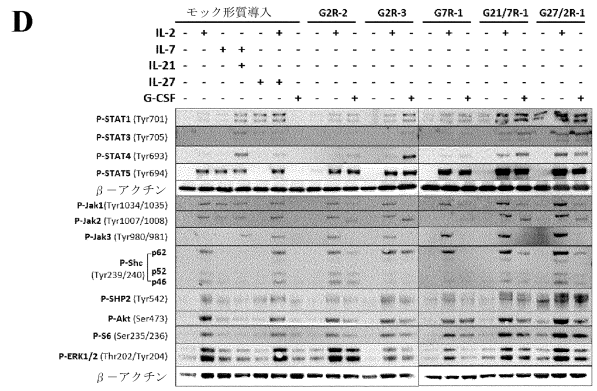
【図４７】



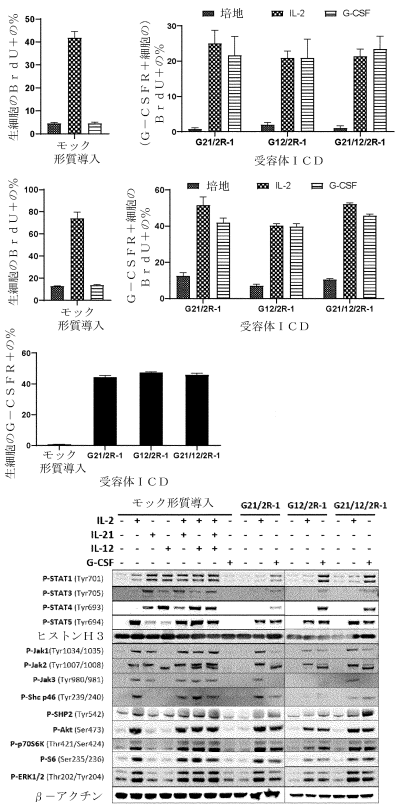
【図４８－１】



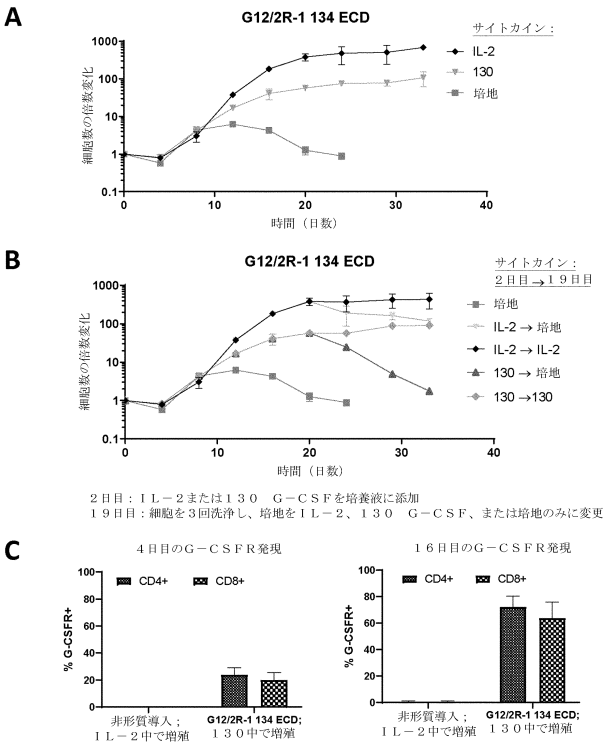
【図４８－２】



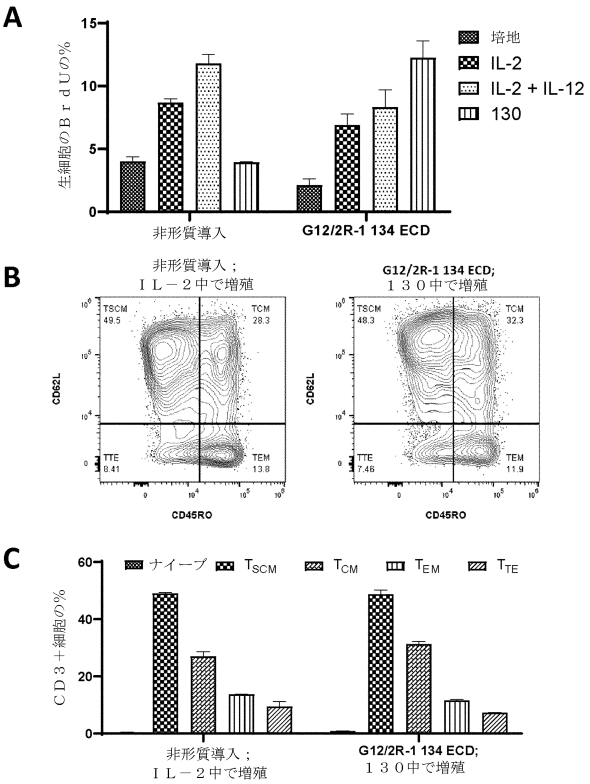
【図４９】



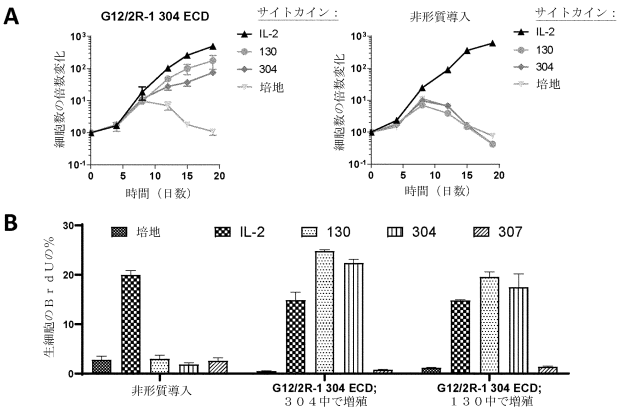
【図５０】



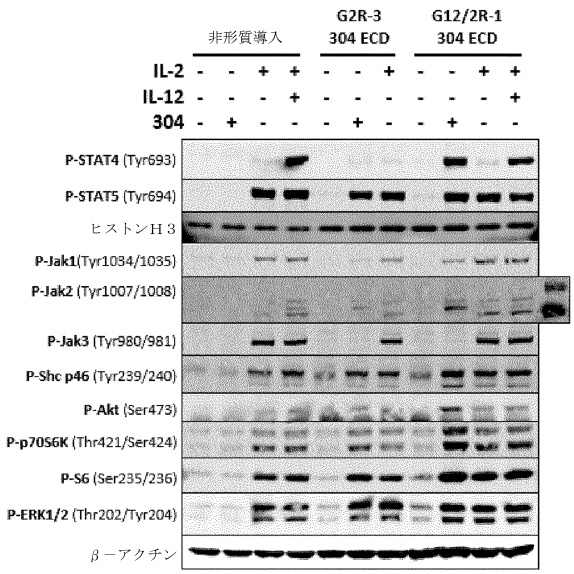
【図５１】



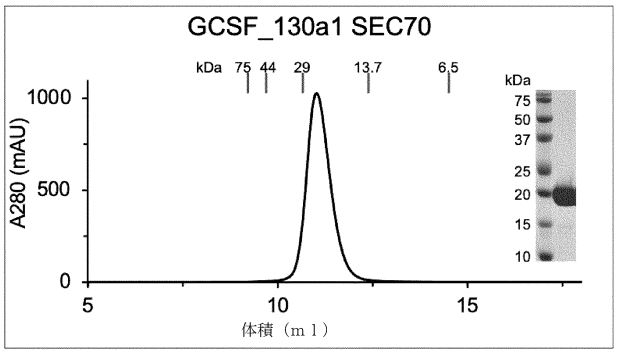
【図５２】



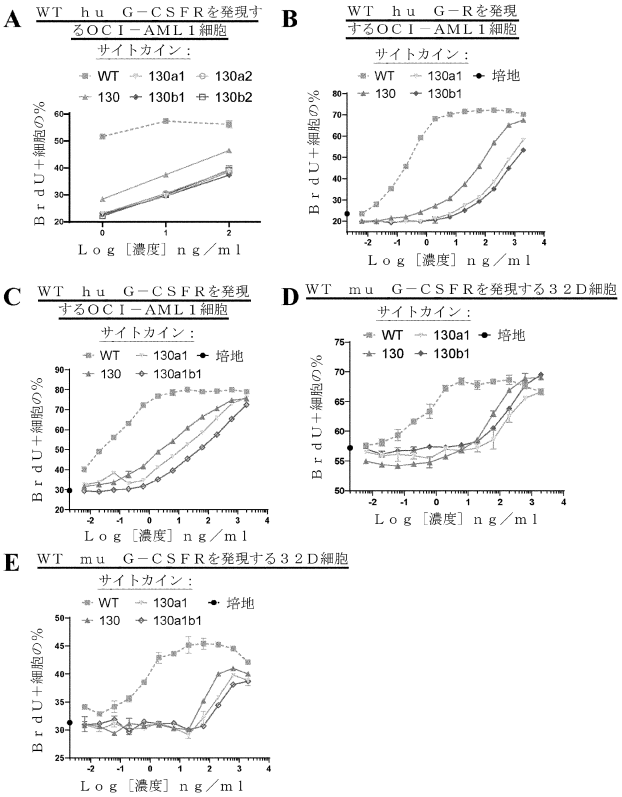
【図５３】



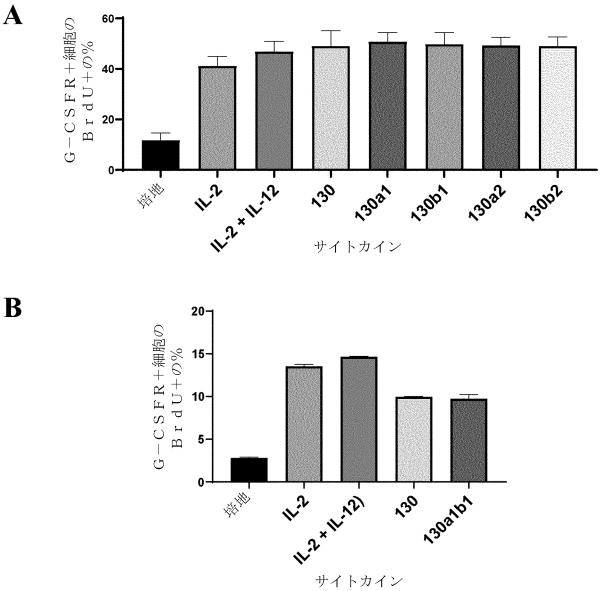
【図５４】



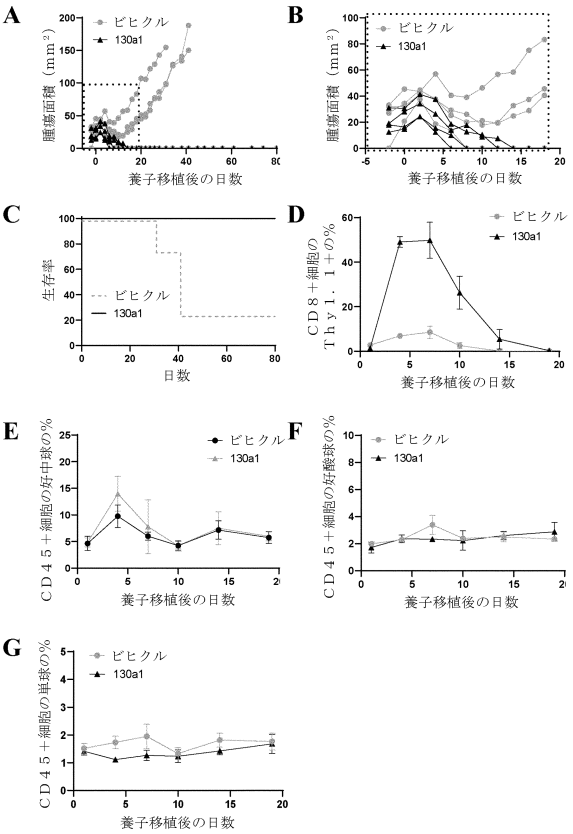
【図５５】



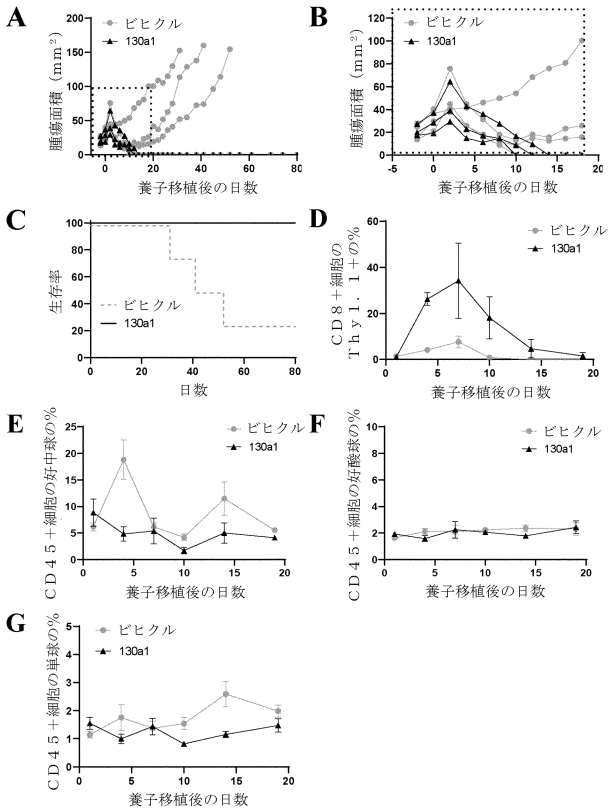
【図５６】



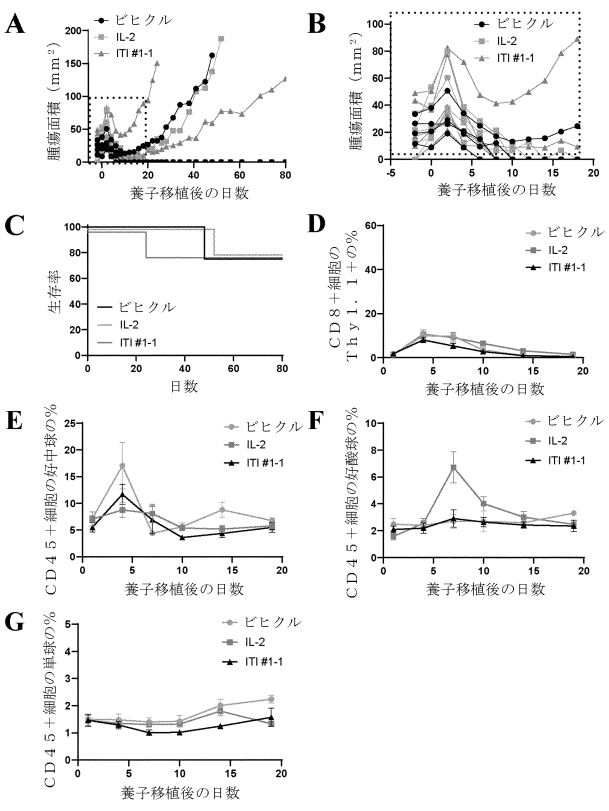
【図５７】



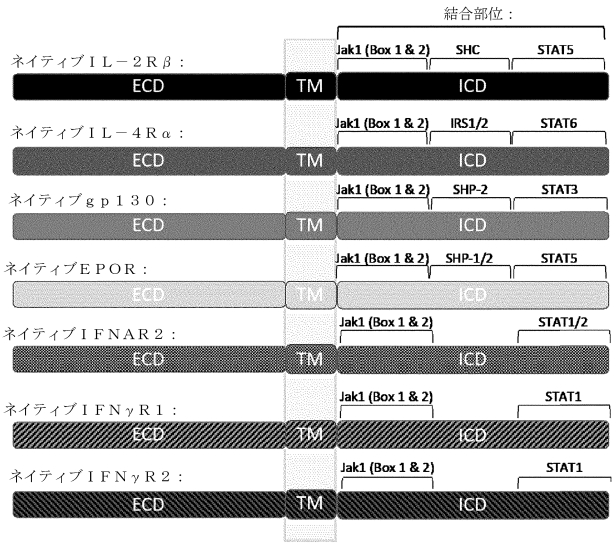
【図５８】



【図５９】

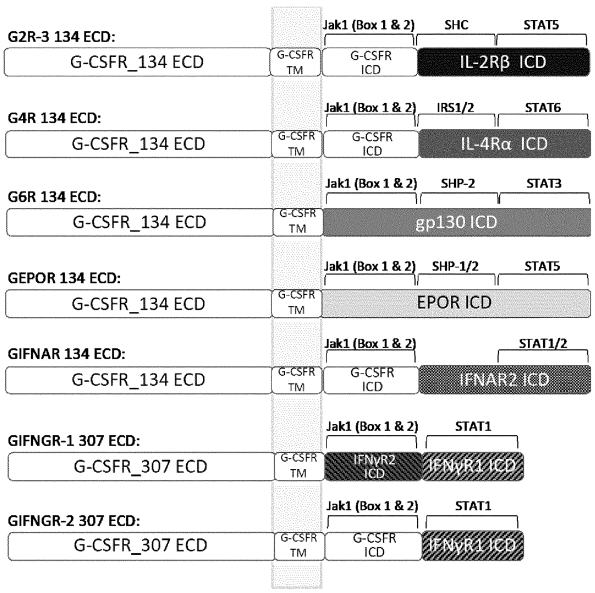


【図６０－１】



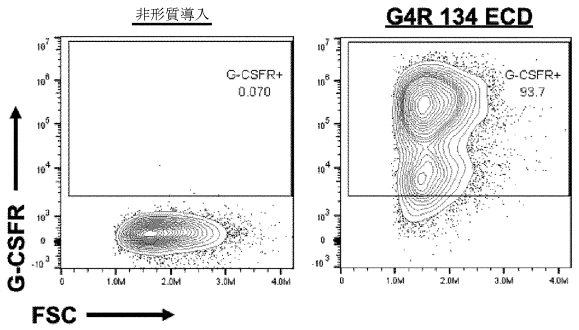
受容体の概略図

【図６０－２】



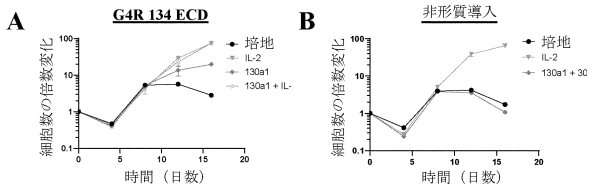
受容体の概略図

【図６１】



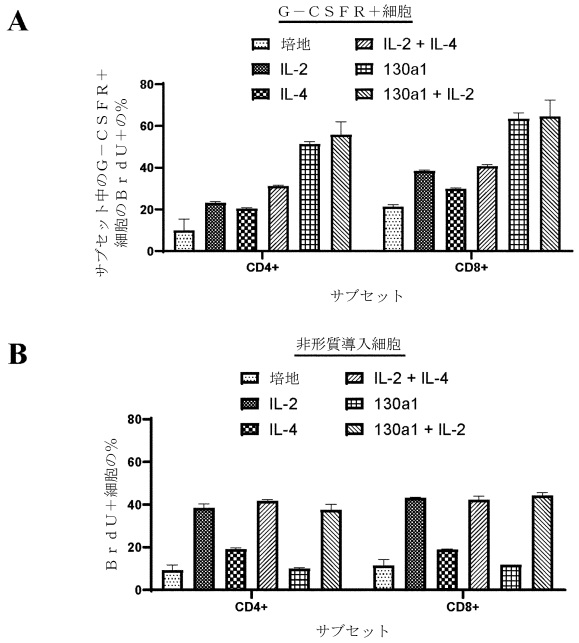
増殖８日目のＧ４Ｒ　１３４　ＥＣＤ発現

【図６２】



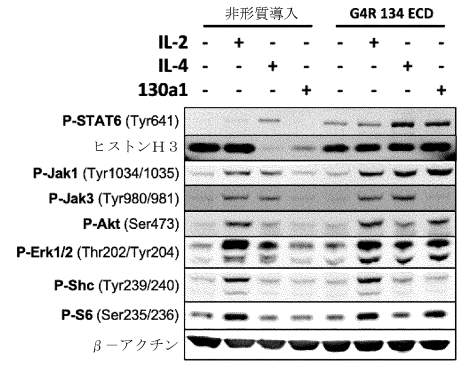
Ｇ４Ｒ　１３４　ＥＣＤを発現するヒトＴ細胞の増殖

【図６３】



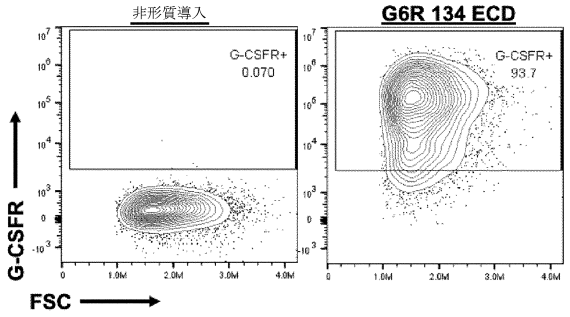
Ｇ４Ｒ　１３４　ＥＣＤを発現するヒトＴ細胞の増殖

【図６４】



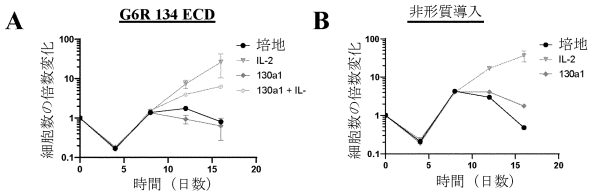
非形質導入またはＧ４Ｒ　１３４　ＥＣＤ発現ヒトＴ細胞のウェスタンブロット

【図６５】



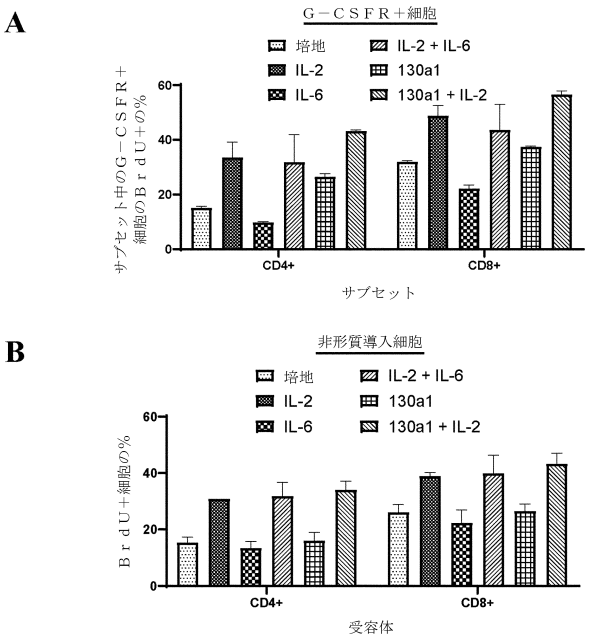
増殖８日目のＧ６Ｒ　１３４　ＥＣＤ発現

【図６６】



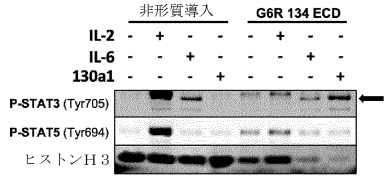
Ｇ６Ｒ　１３４　ＥＣＤを発現するヒトＴ細胞の増殖

【図６７】



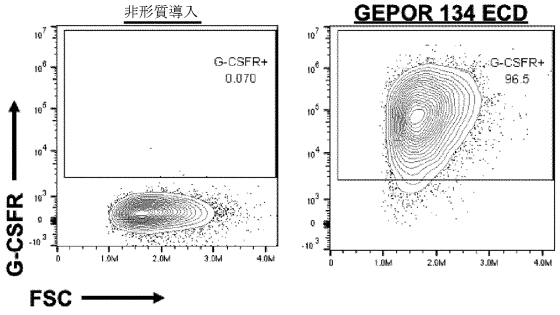
Ｇ６Ｒ　１３４　ＥＣＤを発現するヒトＴ細胞の増殖

【図６８】



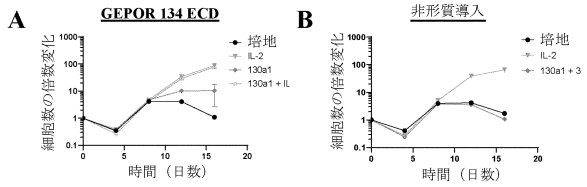
非形質導入またはＧ６Ｒ　１３４　ＥＣＤ発現ヒトＴ細胞のウェスタンブロット

【図６９】



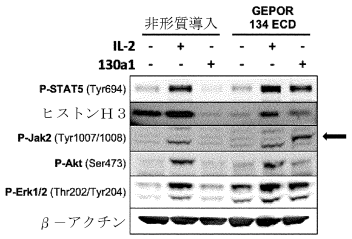
増殖８日目のＧＥＰＯＲ　１３４　ＥＣＤ発現

【図７０】



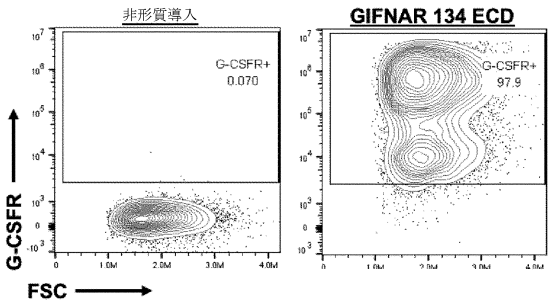
ＧＥＰＯＲ　１３４　ＥＣＤを発現するヒトＴ細胞の増殖

【図７１】



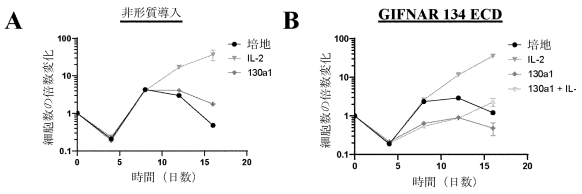
非形質導入またはＧＥＰＯＲ　１３４　ＥＣＤ発現ヒトＴ細胞のウェスタンブロット

【図７２】



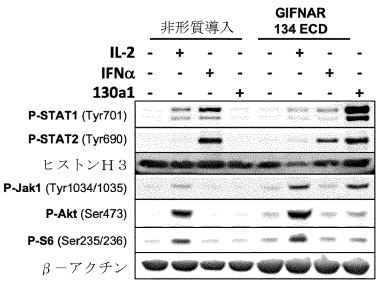
増殖８日目のＧＩＦＮＡＲ　１３４　ＥＣＤ発現

【図７３】



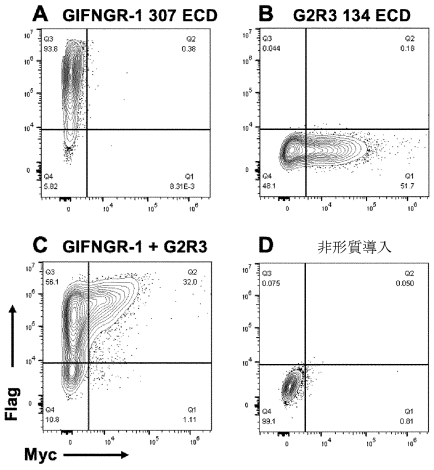
ＧＩＦＮＡＲ　１３４　ＥＣＤを発現するヒトＴ細胞の増殖

【図７４】



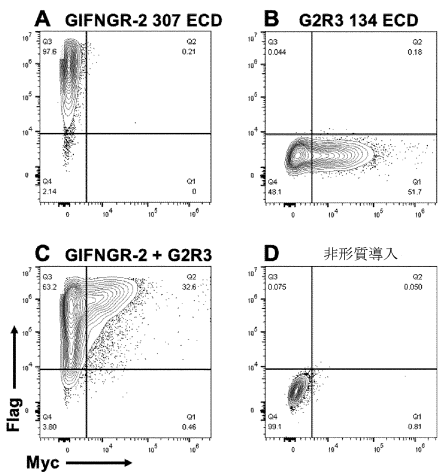
非形質導入またはＧＩＦＮＡＲ　１３４　ＥＣＤ発現ヒトＴ細胞のウェスタンブロット

【図７５】



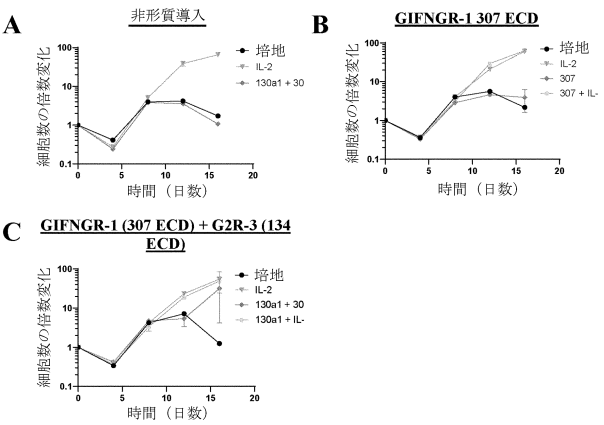
増殖８日目のＧＩＦＮＧＲ－１　３０７　ＥＣＤ（Ｆｌａｇタグ付き）及びＧ２Ｒ３（Ｍｙｃタグ付き）の発現。Ａ）ＧＩＦＮＧＲ－１　３０７　ＥＣＤのみで形質導入；Ｂ）Ｇ２Ｒ３　１３４　ＥＣＤのみで形質導入；Ｃ）ＧＩＦＮＧＲ－１　３０７　ＥＣＤ及びＧ２Ｒ３　１３４　ＥＣＤで共形質導入；ならびにＤ）非形質導入。

【図７６】



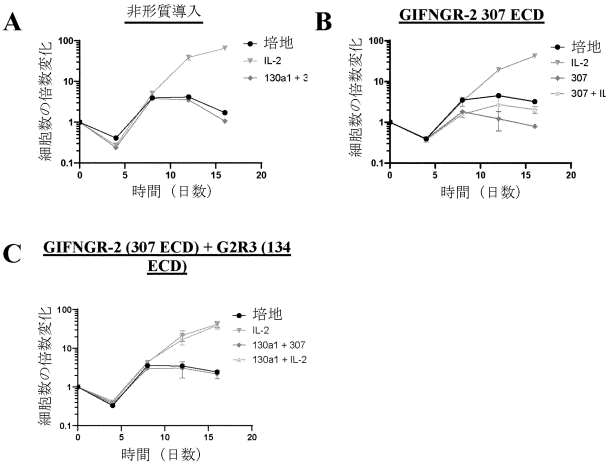
増殖８日目のＧＩＦＮＧＲ－２　３０７　ＥＣＤ（Ｆｌａｇタグ付き）及びＧ２Ｒ３（Ｍｙｃタグ付き）の発現。Ａ）ＧＩＦＮＧＲ－２　３０７　ＥＣＤのみで形質導入；Ｂ）Ｇ２Ｒ３　１３４　ＥＣＤのみで形質導入；Ｃ）ＧＩＦＮＧＲ－２　３０７　ＥＣＤ及びＧ２Ｒ３　１３４　ＥＣＤで共形質導入；ならびにＤ）非形質導入。

【図７７】



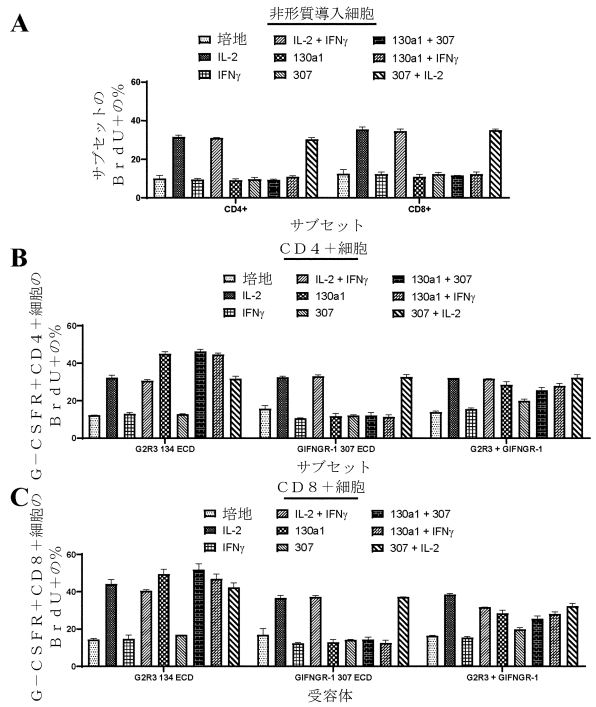
ＧＩＦＮＧＲ－１　３０７　ＥＣＤを発現するヒトＴ細胞の増殖

【図７８】



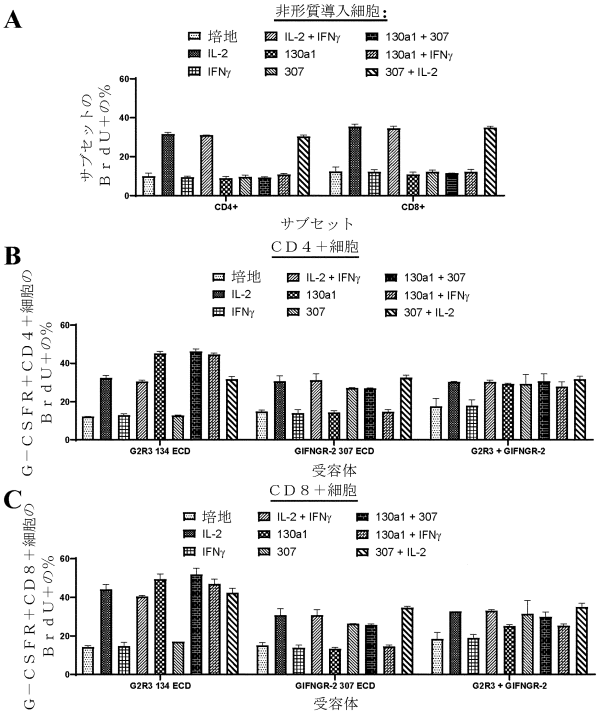
ＧＩＦＮＧＲ－２　３０７　ＥＣＤを発現するヒトＴ細胞の増殖

【図７９】



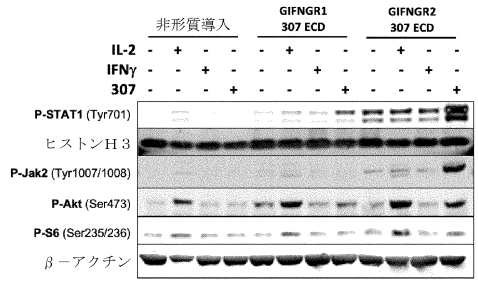
ＧＩＦＮＧＲ－１　３０７　ＥＣＤ及び／またはＧ２Ｒ－３　１３４　ＥＣＤを発現するヒトＴ細胞の増殖

【図８０】



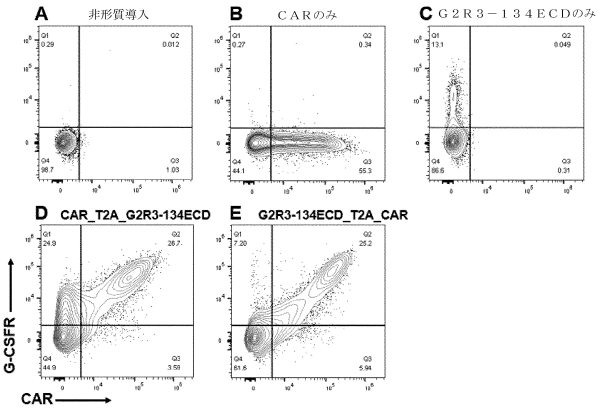
ＧＩＦＮＧＲ－２　３０７　ＥＣＤ及び／またはＧ２Ｒ－３　１３４　ＥＣＤを発現するヒトＴ細胞の増殖

【図８１】



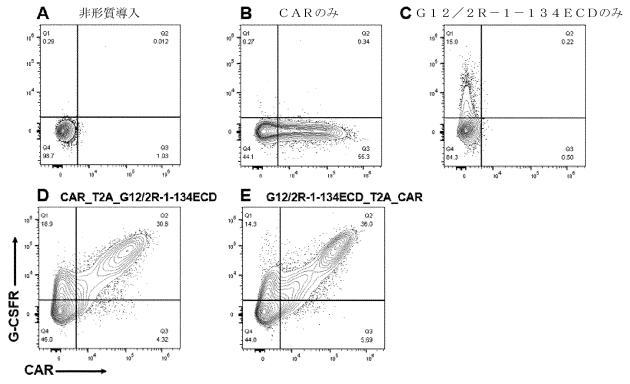
非形質導入またはＧＩＦＮＧＲ－１　３０７　ＥＣＤまたはＧＩＦＮＧＲ－２　３０７　ＥＣＤ発現ヒトＴ細胞のウェスタンブロット

【図８２】



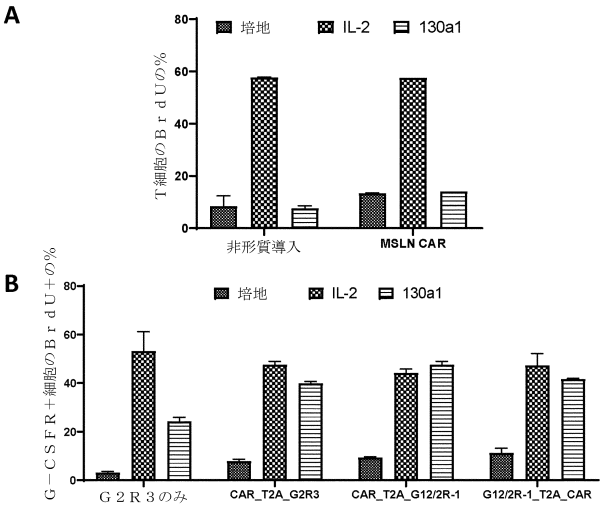
ヒトＴ細胞におけるバイシストロン性ＣＡＲ及びＧ２Ｒ３　１３４　ＥＣＤ構築物の発現

【図８３】



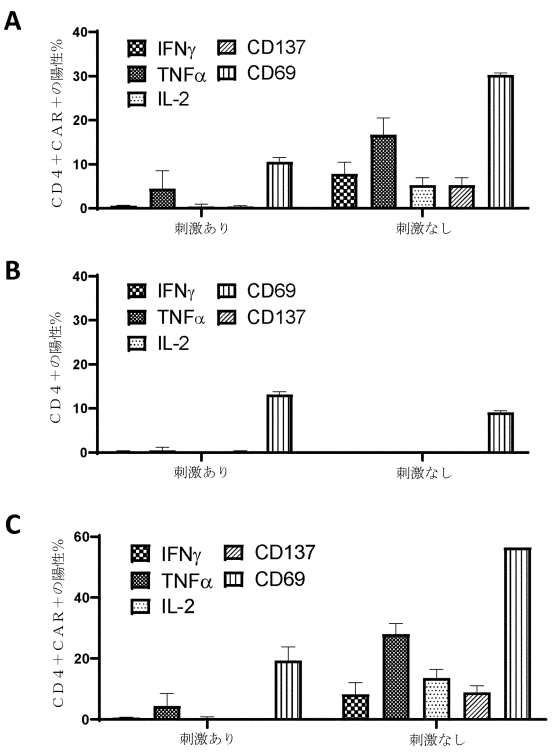
ヒトＴ細胞におけるバイシストロン性ＣＡＲ及びＧ１２／２Ｒ－１－１３４ＥＣＤ構築物の発現

【図８４】



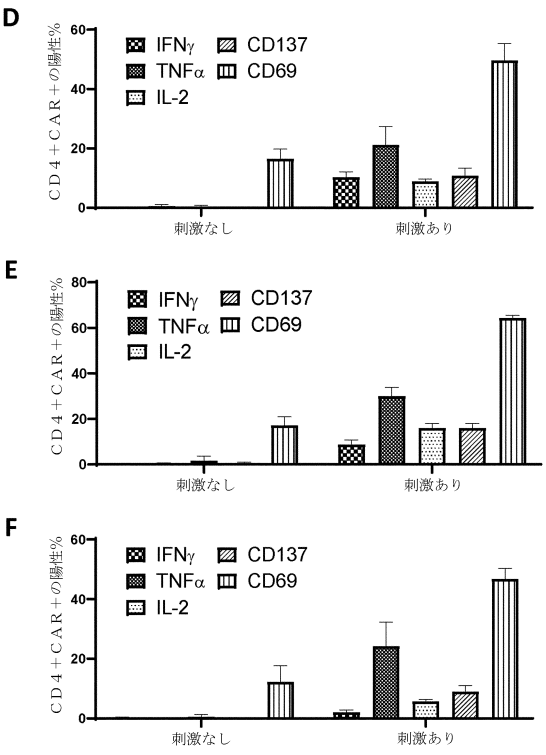
Ｇ２Ｒ３　１３４　ＥＣＤまたはＧ１２／２Ｒ－１　１３４　ＥＣＤを含むかまたは含まずにメソテリンＣＡＲを発現するＣＤ３＋Ｔ細胞の増殖

【図８５－１】



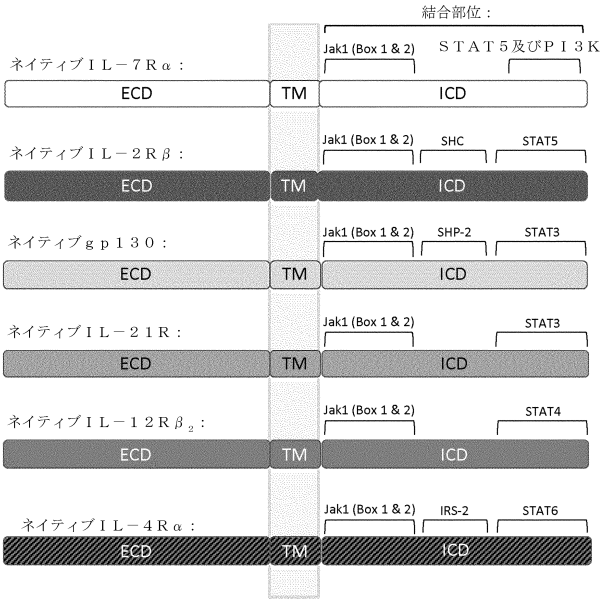
バイシストロン性メソテリンＣＡＲ構築物を発現するＣＤ４＋Ｔ細胞による
ＩＦＮ－γ、ＴＮＦ－α、ＩＬ－２、ＣＤ１３７、及びＣＤ６９の発現

【図８５－２】



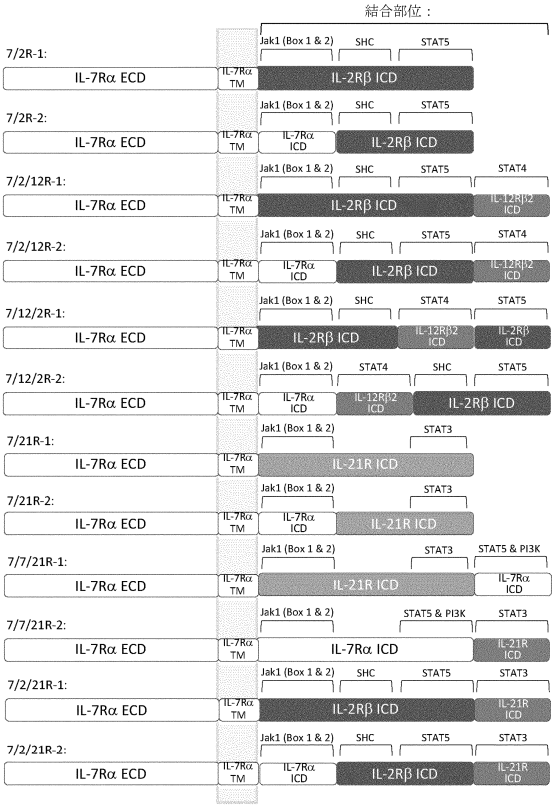
バイシストロン性メソテリンＣＡＲ構築物を発現するＣＤ４＋Ｔ細胞によるＩＦＮ－γ、ＴＮＦ－α、ＩＬ－２、ＣＤ１３７、及びＣＤ６９の発現

【図８６】



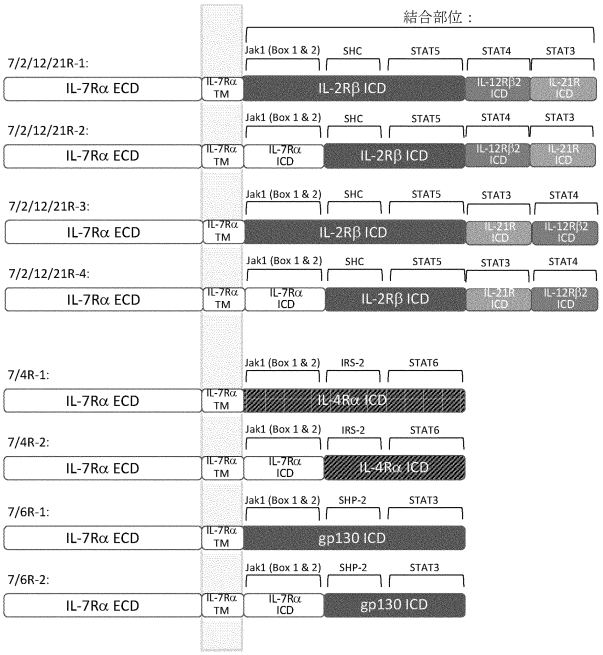
ネイティブサイトカイン受容体の概略図

【図８７－１】



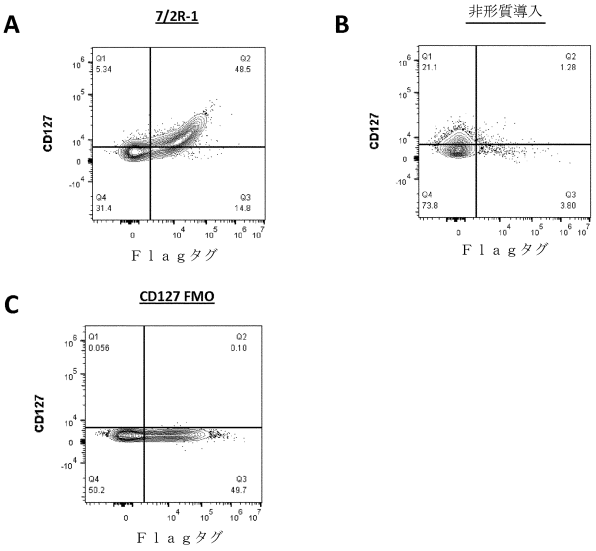
キメラ受容体の概略図

【図８７－２】



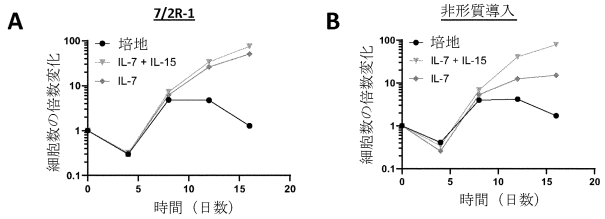
キメラ受容体の概略図

【図８８】



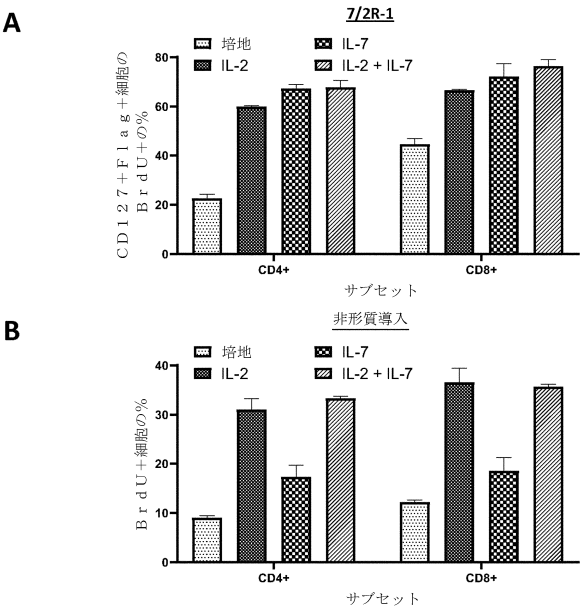
増殖１２日目の７／２Ｒ－１受容体の発現

【図８９】



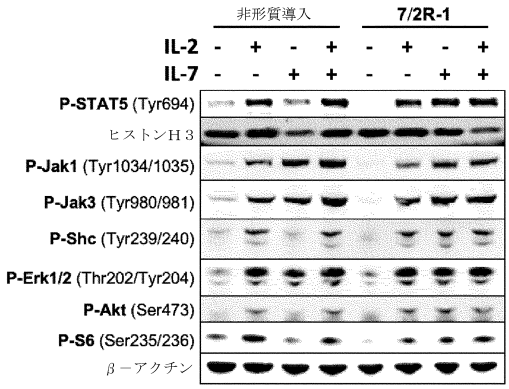
７／２Ｒ－１を発現するヒトＴ細胞の増殖

【図９０】



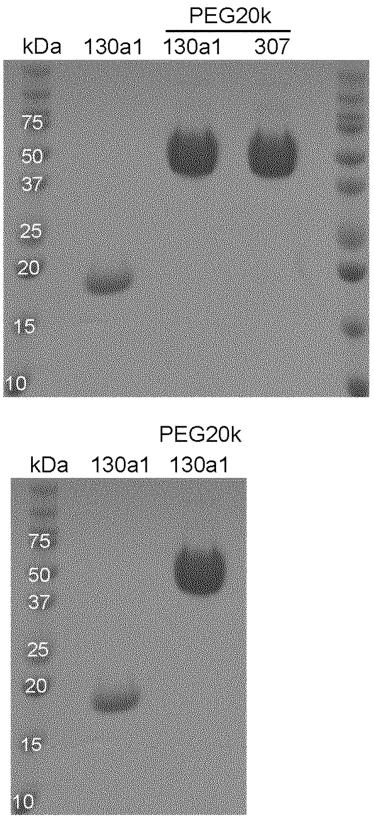
７／２Ｒ－１を発現するヒトＴ細胞の増殖

【図９１】

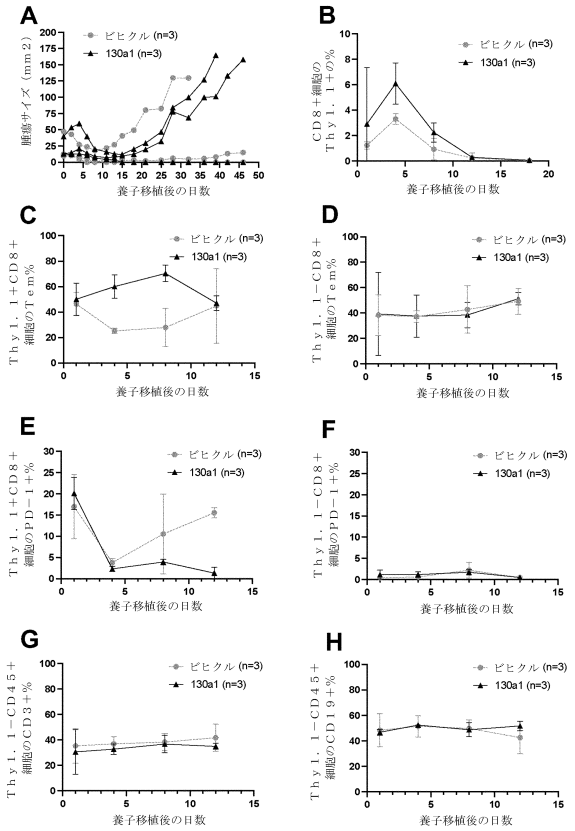


非形質導入または７／２Ｒ－１発現ヒトＴ細胞のウェスタンブロット

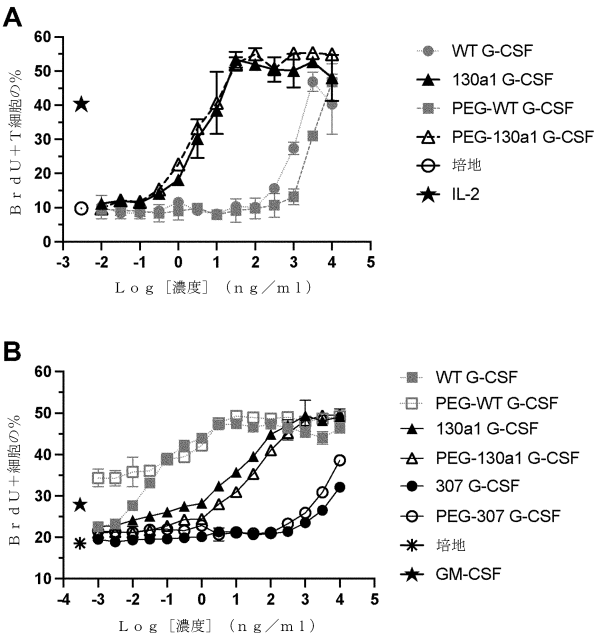
【図９２】



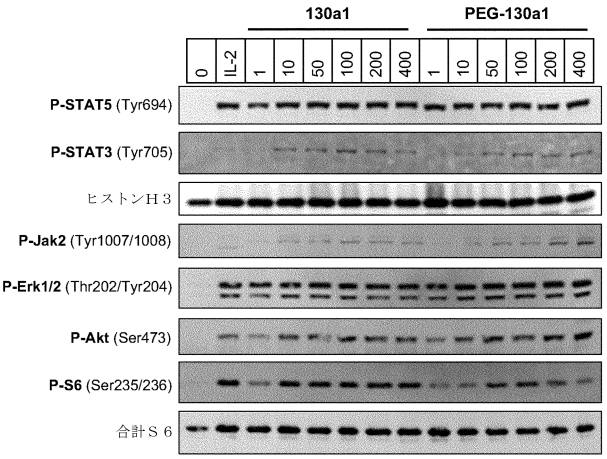
【図９３】



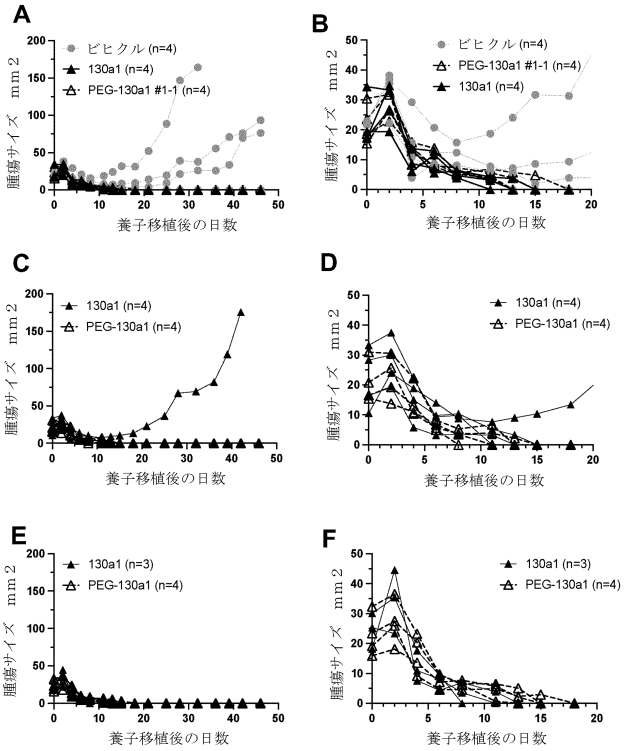
【図９４】



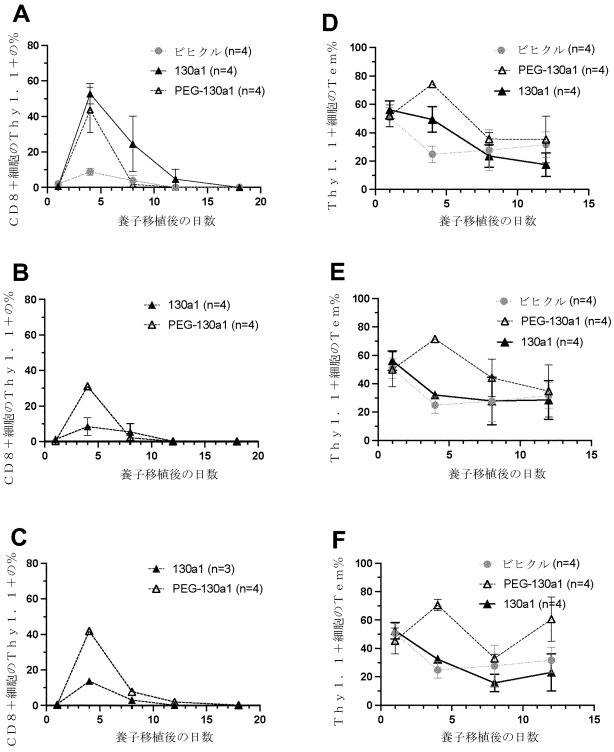
【図９５】



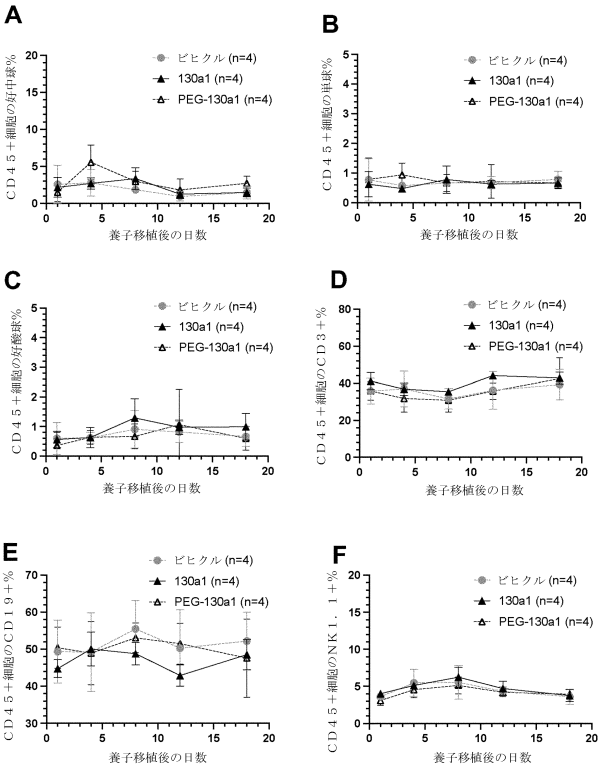
【図９６】



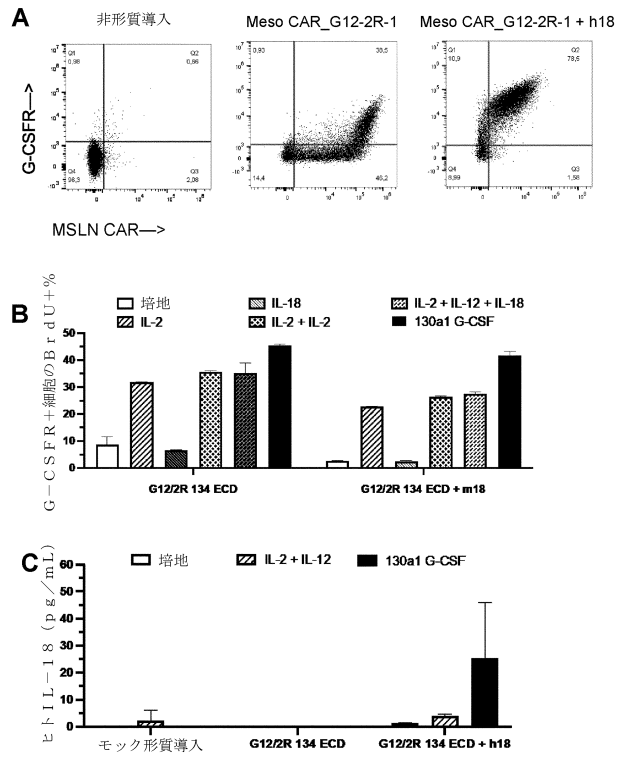
【図９７】



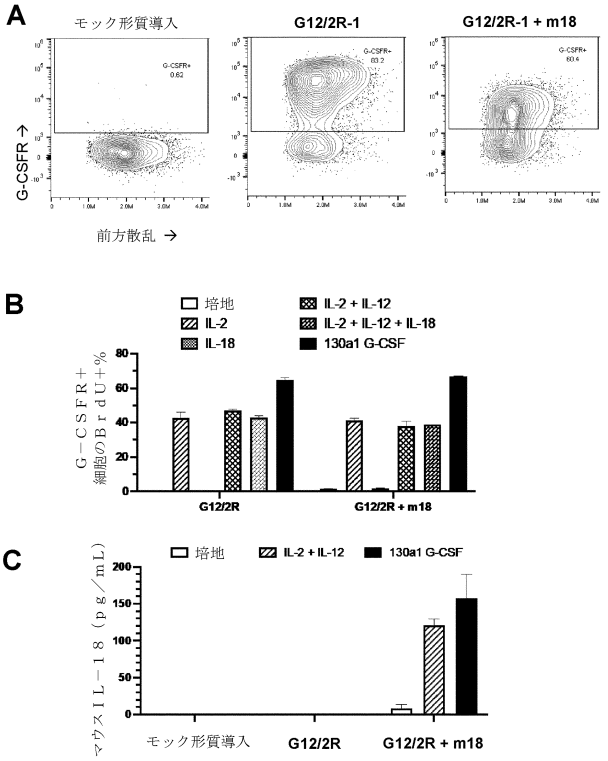
【図９８】



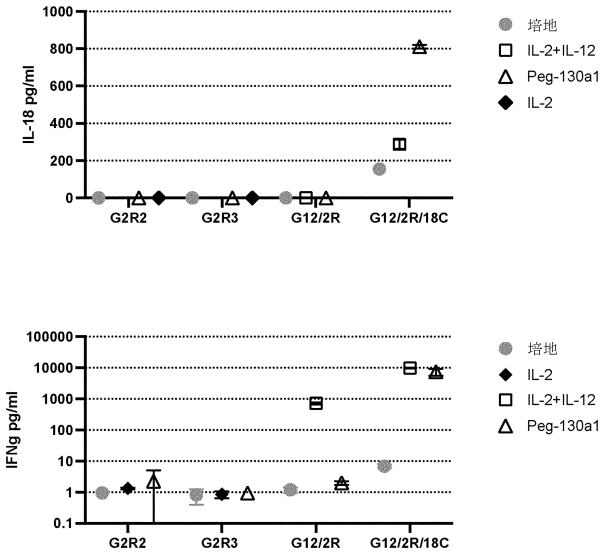
【図９９】



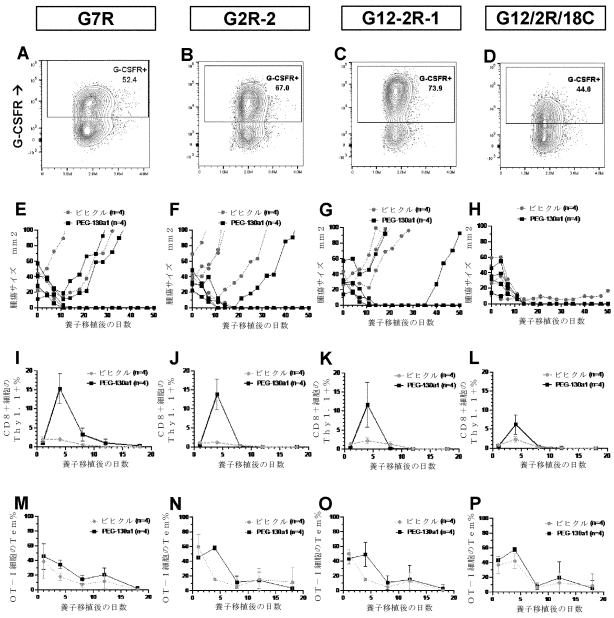
【図１００】



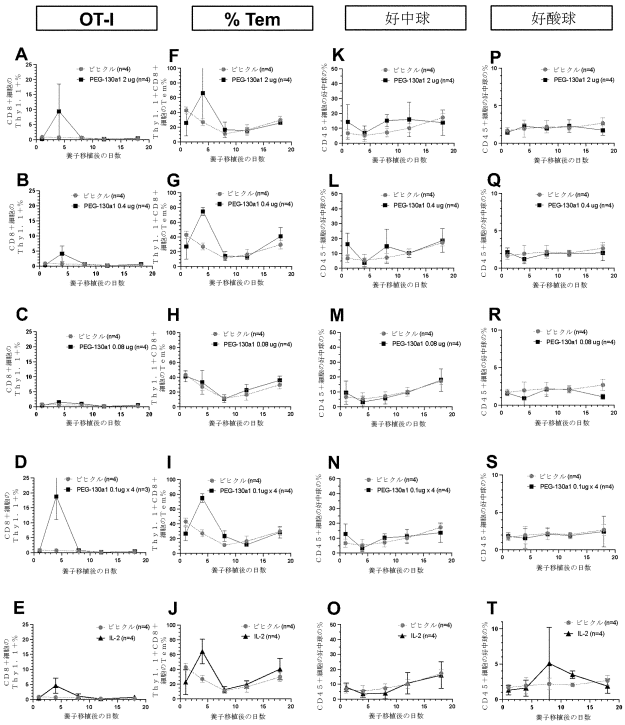
【図１０１】



【図１０２】



【図１０３】



【手続補正書】
【提出日】令和6年3月26日(2024.3.26)
【手続補正１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００８４
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００８４】
特定の態様では、本明細書に記載されるキメラ受容体をコードする細胞であって、任意選択で、該細胞は免疫細胞である、細胞と、使用説明書と、を含むキットが本明細書で説明され、任意選択で、該キットはＩＬ－７を含み、任意選択で、該キットは本明細書に記載のバリアントＧ－ＣＳＦを含む。特定の態様では、本明細書に記載のキメラ受容体をコードする核酸配列（複数可）を含む１つ以上の発現ベクター（複数可）と、使用説明書と、を含むキットが本明細書で説明され、任意選択で、キットはＩＬ－７を含み、任意選択で、キットは本明細書に記載のバリアントＧ－ＣＳＦを含む。いくつかの実施形態では、キットは、少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）をコードする１つ以上の発現ベクター（複数可）を更に含み、任意選択で、１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）は、１つ以上のサイトカイン（複数可）、ケモカイン（複数可）、ホルモン（複数可）、抗体（複数可）、もしくはこれらの誘導体（複数可）、または他の親和性試薬を含む。いくつかの実施形態では、キットは、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、インターフェロンα、インターフェロンβ、インターフェロンγ、ＩＬ－１７、ＩＬ－２１、ＴＮＦ－α、ＣＸＣＬ１３、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１α）、ＣＣＬ４（ＭＩＰ－１β）、ＣＤ４０リガンド、Ｂ細胞活性化因子（ＢＡＦＦ）、Ｆｌｔ３リガンド、ＣＣＬ２１、ＣＣＬ５、ＸＣＬ１、ＣＣＬ１９、受容体ＮＫＧ２Ｄ、及びこれらの組み合わせからなる群から選択されるサイトカインまたはケモカインをコードする１つ以上の発現ベクター（複数可）を更に含む。いくつかの実施形態では、キットは、天然のＴ細胞受容体、操作されたＴ細胞受容体（ＴＣＲ）、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、天然のＢ細胞受容体、操作されたＢ細胞受容体（ＢＣＲ）、ストレスリガンド受容体、パターン認識受容体、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される少なくとも１つの受容体をコードする１つ以上の発現ベクター（複数可）を更に含む。いくつかの実施形態では、キットは、キメラ抗原受容体をコードする発現ベクターを更に含む。いくつかの実施形態では、細胞は、少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）をコードする１つ以上の発現ベクター（複数可）を更に含み、任意選択で、１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質（複数可）は、１つ以上のサイトカイン（複数可）、ケモカイン（複数可）、ホルモン（複数可）、抗体（複数可）、もしくはこれらの誘導体（複数可）、または他の親和性試薬を含む。いくつかの実施形態では、細胞は、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、インターフェロンα、インターフェロンβ、インターフェロンγ、ＩＬ－１７、ＩＬ－２１、ＴＮＦ－α、ＣＸＣＬ１３、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１α）、ＣＣＬ４（ＭＩＰ－１β）、ＣＤ４０リガンド、Ｂ細胞活性化因子（ＢＡＦＦ）、Ｆｌｔ３リガンド、ＣＣＬ２１、ＣＣＬ５、ＸＣＬ１、ＣＣＬ１９、受容体ＮＫＧ２Ｄ、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される少なくとも１つのサイトカインまたはケモカインをコードする１つ以上の発現ベクター（複数可）を更に含む。いくつかの実施形態では、細胞は、少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体（複数可）をコードする１つ以上の発現ベクター（複数可）を更に含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体（複数可）は、天然のＴ細胞受容体、操作されたＴ細胞受容体（ＴＣＲ）、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、天然のＢ細胞受容体、操作されたＢ細胞受容体（ＢＣＲ）、ストレスリガンド受容体、パターン認識受容体、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、細胞は、少なくとも１つのＣＡＲ（複数可）をコードする１つ以上の発現ベクター（複数可）を更に含む。

[本発明１００１]
バリアント顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）であって、
前記バリアントＧ－ＣＳＦが、サイトＩＩ界面領域における少なくとも１つの変異、サイトＩＩＩ界面領域における少なくとも１つの変異、またはそれらの組み合わせを含み、前記サイトＩＩ界面領域における前記少なくとも１つの変異が、Ｌ１０８Ｒ、Ｄ１１２Ｒ、Ｅ１２２Ｒ　Ｅ１２２Ｋ、Ｅ１２３Ｋ、及びＥ１２３Ｒ、ならびにこれらの組み合わせのうち少なくとも１つを含み、前記サイトＩＩ界面領域の変異が、配列番号１に示す配列の対応するアミノ酸位置に対するものであり、
前記サイトＩＩＩ界面領域における前記少なくとも１つの変異が、配列番号１に示す配列の対応するアミノ酸位置に対する変異Ｅ４６Ｒを含み、且つ
前記バリアントＧ－ＣＳＦが、顆粒球コロニー刺激因子受容体（Ｇ－ＣＳＦＲ）のバリアント細胞外ドメイン（ＥＣＤ）を含む受容体に選択的に結合する、
前記バリアントＧ－ＣＳＦ。
[本発明１００２]
細胞表面上に発現した受容体を選択的に活性化させるためのシステムであって、
（ａ）配列番号８３または８４に対応するバリアントＧ－ＣＳＦと、
（ｂ）Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む受容体と
を含み、
前記バリアントＧ－ＣＳＦが、他の点では同一の野生型Ｇ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤと比較して、前記Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む前記受容体に優先的に結合し、前記Ｇ－ＣＳＦＲの前記バリアントＥＣＤを含む前記受容体が、他の点では同一の野生型Ｇ－ＣＳＦと比較して、前記バリアントＧ－ＣＳＦに優先的に結合し、前記バリアントＧ－ＣＳＦＲが、Ｇ２Ｒ－３またはＧ１２／２Ｒ－１を含む、
前記システム。
[本発明１００３]
細胞によって発現されるＧ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む受容体に結合する、本発明１００１のバリアントＧ－ＣＳＦ。
[本発明１００４]
前記Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む前記受容体を発現する前記細胞が、免疫細胞である、本発明１００３のバリアントＧ－ＣＳＦ。
[本発明１００５]
前記Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む前記受容体を発現する前記免疫細胞が、
Ｔ細胞であり、任意選択で、
ＮＫ細胞であり、任意選択で、
ＮＫＴ細胞であり、任意選択で、
Ｂ細胞であり、任意選択で、
形質細胞であり、任意選択で、
マクロファージであり、任意選択で、
樹状細胞であり、任意選択で、
前記細胞が幹細胞であり、任意選択で、
前記細胞が初代細胞であり、任意選択で、
前記細胞がヒト細胞である、
本発明１００４のバリアントＧ－ＣＳＦ。
[本発明１００６]
前記Ｔ細胞が、ＣＤ８$^{\pm}$Ｔ細胞、細胞傷害性ＣＤ８$^{\pm}$Ｔ細胞、ナイーブＣＤ８＋Ｔ細胞、ナイーブＣＤ４$^{\pm}$Ｔ細胞、ヘルパーＴ細胞、制御性Ｔ細胞、メモリーＴ細胞、及びγδＴ細胞からなる群から選択される、本発明１００５のバリアントＧ－ＣＳＦ。
[本発明１００７]
前記Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む前記受容体への前記バリアントＧ－ＣＳＦの前記選択的結合によって、前記受容体を発現する細胞の、増殖、生存能力、持続性、細

胞傷害性、サイトカイン分泌、記憶、及び活性増強、ならびにこれらの組み合わせのうち少なくとも１つを含む細胞応答が、引き起こされる、本発明１００１～１００６のいずれかのバリアントＧ－ＣＳＦ。

[本発明１００８]

前記Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む前記受容体が、サイトＩＩ界面領域における少なくとも１つの変異、サイトＩＩＩ界面領域における少なくとも１つの変異、またはそれらの組み合わせを含む、前記本発明のいずれかのバリアントＧ－ＣＳＦ。

[本発明１００９]

前記Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む前記受容体が、
Ｒ１４１ＥまたはＲ１６７Ｄ変異のうち一方または両方を含む、前記Ｇ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤの前記サイトＩＩ界面領域における少なくとも１つの変異
を含み、

前記Ｇ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤの前記サイトＩＩＩ界面領域における前記少なくとも１つの変異が、Ｒ４１Ｅ変異を含み、

前記バリアントＧ－ＣＳＦＲの変異が、配列番号２に示す配列のアミノ酸位置に対応する、
前記本発明のいずれかのバリアントＧ－ＣＳＦ。

[本発明１０１０]

前記Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む前記受容体が、キメラ受容体である、前記本発明のいずれかのバリアントＧ－ＣＳＦ。

[本発明１０１１]

化学修飾されている、前記本発明のいずれかのバリアントＧ－ＣＳＦ。

[本発明１０１２]

前記化学修飾がＰＥＧ化を含む、本発明１０１１のバリアントＧ－ＣＳＦ。

[本発明１０１３]

前記Ｇ－ＣＳＦのＮ末端またはＣ末端でＰＥＧ化されている、本発明１０１２のバリアントＧ－ＣＳＦ。

[本発明１０１４]

本発明１００１～１００６または１０１０～１０１２のいずれかのバリアントＧ－ＣＳＦをコードする、１つ以上の核酸配列。

[本発明１０１５]

本発明１０１０の核酸配列を含む、１つ以上の発現ベクター。

[本発明１０１６]

本発明１００１～１００６または１０１０～１０１２のいずれかのバリアントＧ－ＣＳＦを発現するように操作された、細胞。

[本発明１０１７]

前記細胞が免疫細胞である、本発明１０１２の細胞。

[本発明１０１８]

前記免疫細胞が、
Ｔ細胞であり、任意選択で、
ＮＫ細胞であり、任意選択で、
ＮＫＴ細胞であり、任意選択で、
Ｂ細胞であり、任意選択で、
形質細胞であり、任意選択で、
マクロファージであり、任意選択で、
樹状細胞であり、任意選択で、
前記細胞が幹細胞であり、任意選択で、
前記細胞が初代細胞であり、任意選択で、
前記細胞がヒト細胞である、
本発明１０１３の細胞。

[本発明１０１９]
前記Ｔ細胞が、ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞、細胞傷害性ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞、細胞傷害性ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞、ナイーブＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞、ナイーブＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞、ヘルパーＴ細胞、制御性Ｔ細胞、メモリーＴ細胞、及びγδＴ細胞からなる群から選択される、本発明１０１４の細胞。
[本発明１０２０]
細胞表面上に発現した受容体を選択的に活性化させるためのシステムであって、
（ａ）本発明１００１～１００６または１０１０～１０１２のいずれかのバリアントＧ－ＣＳＦと、
（ｂ）Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む受容体と
を含み、
前記バリアントＧ－ＣＳＦが、他の点では同一の野生型Ｇ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤと比較して、前記Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む前記受容体に優先的に結合し、前記Ｇ－ＣＳＦＲの前記バリアントＥＣＤを含む前記受容体が、他の点では同一の野生型Ｇ－ＣＳＦと比較して、前記バリアントＧ－ＣＳＦに優先的に結合する、
前記システム。
[本発明１０２１]
前記バリアントＧ－ＣＳＦが、表４ＡのＧ－ＣＳＦバリアント番号のサイトＩＩ及びサイトＩＩＩ界面の変異の組み合わせを含み、前記バリアントＧ－ＣＳＦの変異が、配列番号１に示す配列のアミノ酸位置に対応する、本発明１０１６のシステム。
[本発明１０２２]
前記バリアントＧ－ＣＳＦが、配列番号１に示す配列の対応するアミノ酸位置に対する変異Ｅ４６Ｒ、Ｌ１０８Ｋ、Ｄ１１２Ｒ、Ｅ１２２Ｒ、及びＥ１２３Ｒを含み、且つＧ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む前記受容体が、配列番号２に示す配列の対応するアミノ酸位置に対する変異Ｒ４１Ｅ、Ｒ１４１Ｅ、及びＲ１６７Ｄを含む、本発明１０１７のシステム。
[本発明１０２３]
前記バリアントＧ－ＣＳＦが、配列番号１に示す配列の対応するアミノ酸位置に対する変異Ｅ４６Ｒ、Ｌ１０８Ｋ、Ｄ１１２Ｒ、及びＥ１２２Ｋを含み、且つＧ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む前記受容体が、配列番号２に示す配列の対応するアミノ酸位置に対する変異Ｒ４１Ｅ、Ｒ１４１Ｅ、及びＲ１６７Ｄを含む、本発明１０１７のシステム。
[本発明１０２４]
前記バリアントＧ－ＣＳＦが、配列番号１に示す配列の対応するアミノ酸位置に対する変異Ｅ４６Ｒ、Ｌ１０８Ｋ、Ｄ１１２Ｒ、及びＥ１２３Ｋを含み、且つＧ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む前記受容体が、配列番号２に示す配列の対応するアミノ酸位置に対する変異Ｒ４１Ｅ、Ｒ１４１Ｅ、及びＲ１６７Ｄを含む、本発明１０１７のシステム。
[本発明１０２５]
前記バリアントＧ－ＣＳＦが、配列番号１に示す配列の対応するアミノ酸位置に対する変異Ｅ４６Ｒ、Ｌ１０８Ｋ、Ｄ１１２Ｒ、及びＥ１２２Ｒを含み、且つＧ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む前記受容体が、配列番号２に示す配列の対応するアミノ酸位置に対する変異Ｒ４１Ｅ、Ｒ１４１Ｅ、及びＲ１６７Ｄを含む、本発明１０１７のシステム。
[本発明１０２６]
前記バリアントＧ－ＣＳＦが、配列番号１に示す配列の対応するアミノ酸位置に対する変異Ｅ４６Ｒ、Ｌ１０８Ｋ、Ｄ１１２Ｒ、及びＥ１２３Ｒを含み、且つＧ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む前記受容体が、配列番号２に示す配列の対応するアミノ酸位置に対する変異Ｒ４１Ｅ、Ｒ１４１Ｅ、及びＲ１６７Ｄを含む、本発明１０１７のシステム。
[本発明１０２７]
前記バリアントＧ－ＣＳＦが、配列番号１に示す配列の対応するアミノ酸位置に対する変異Ｅ４６Ｒ、Ｌ１０８Ｋ、Ｄ１１２Ｒ、Ｅ１２２Ｋ、及びＥ１２３Ｋを含み、且つＧ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む前記受容体が、配列番号２に示す配列の対応するアミノ酸位置に対する変異Ｒ４１Ｅ、Ｒ１４１Ｅ、及びＲ１６７Ｄを含む、本発明１０１７の

システム。
[本発明１０２８]
前記バリアントＧ－ＣＳＦが化学修飾されている、本発明１０２０～１０２７のいずれかのシステム。
[本発明１０２９]
前記バリアントＧ－ＣＳＦの前記化学修飾が、ＰＥＧ化を含む、本発明１０２８のシステム。
[本発明１０３０]
前記バリアントＧ－ＣＳＦが、前記Ｇ－ＣＳＦのＮ末端またはＣ末端でＰＥＧ化されている、本発明１０２９のシステム。
[本発明１０３１]
１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質を更に含み、
任意選択で、前記１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質が、１つ以上のサイトカイン、ケモカイン、ホルモン、抗体、もしくはこれらの誘導体、または他の親和性試薬を含む、
本発明１０１６～１０３０のいずれかのシステム。
[本発明１０３２]
１つ以上の抗原結合性シグナル伝達受容体を更に含む、本発明１０１６～１０３１のいずれかのシステム。
[本発明１０３３]
前記１つ以上の抗原結合性シグナル伝達受容体が、天然のＴ細胞受容体、操作されたＴ細胞受容体（ＴＣＲ）、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、天然のＢ細胞受容体、操作されたＢ細胞受容体（ＢＣＲ）、ストレスリガンド受容体、パターン認識受容体、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される少なくとも１つの受容体を含む、本発明１０３２のシステム。
[本発明１０３４]
前記抗原結合性シグナル伝達受容体が、１つ以上のＣＡＲを含み、任意選択で、前記ＣＡＲがメソテリンＣＡＲである、本発明１０３３のシステム。
[本発明１０３５]
前記サイトカインまたはケモカインが、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、インターフェロンα、インターフェロンβ、インターフェロンγ、ＩＬ－１７、ＩＬ－２１、ＴＮＦ－α、ＣＸＣＬ１３、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１α）、ＣＣＬ４（ＭＩＰ－１β）、ＣＤ４０リガンド、Ｂ細胞活性化因子（ＢＡＦＦ）、Ｆｌｔ３リガンド、ＣＣＬ２１、ＣＣＬ５、ＸＣＬ１、ＣＣＬ１９、受容体ＮＫＧ２Ｄ、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、本発明１０３１のシステム。
[本発明１０３６]
前記サイトカインがＩＬ－１８である、本発明１０３５のシステム。
[本発明１０３７]
前記サイトカインがヒトのものである、本発明１０３５または１０３６のシステム。
[本発明１０３８]
細胞の表面上に発現した受容体を選択的に活性化させる方法であって、
Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む受容体を、本発明１００１～１００６または１０１０～１０１２のいずれかのバリアントＧ－ＣＳＦと接触させること
を含む、前記方法。
[本発明１０３９]
Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む前記受容体が、免疫細胞上で発現し、任意選択で、前記免疫細胞が、
Ｔ細胞であり、任意選択で、
ＮＫ細胞であり、任意選択で、
ＮＫＴ細胞であり、任意選択で、

Ｂ細胞であり、任意選択で、
形質細胞であり、任意選択で、
マクロファージであり、任意選択で、
樹状細胞であり、任意選択で、
前記細胞が幹細胞であり、任意選択で、
前記細胞が初代細胞であり、任意選択で、
前記細胞がヒト細胞である、
本発明１０３８の方法。
[本発明１０４０]
前記Ｔ細胞が、ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞、細胞傷害性ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞、細胞傷害性ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞、ナイーブＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞、ナイーブＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞、ヘルパーＴ細胞、制御性Ｔ細胞、メモリーＴ細胞、及びγδＴ細胞からなる群から選択される、本発明１０３９の方法。
[本発明１０４１]
前記免疫細胞の前記選択的活性化により、前記受容体を発現する細胞の、増殖、生存能力、持続性、細胞傷害性、サイトカイン分泌、記憶、及び活性増強のうち少なくとも１つを含む細胞応答が、引き起こされる、本発明１０３９の方法。
[本発明１０４２]
その必要がある対象において免疫応答を増加させる方法であって、
ＧーＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む受容体を発現する細胞を、前記対象に投与することと、
本発明１００１～１００６または１０１０～１０１２のいずれかのバリアントＧーＣＳＦを投与または提供することと
を含む、前記方法。
[本発明１０４３]
その必要がある対象において疾患を治療する方法であって、
ＧーＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む受容体を発現する細胞を、前記対象に投与することと、
本発明１００１～１００６または１０１０～１０１２のいずれかのバリアントＧーＣＳＦを投与または提供することと
を含む、前記方法。
[本発明１０４４]
がんを治療するために使用される、本発明１０４２または１０４３の方法。
[本発明１０４５]
炎症状態を治療するために使用される、本発明１０４２または１０４３の方法。
[本発明１０４６]
自己免疫疾患を治療するために使用される、本発明１０４２または１０４３の方法。
[本発明１０４７]
変性疾患を治療するために使用される、本発明１０４２または１０４３の方法。
[本発明１０４８]
移植のための、天然のまたは操作された細胞、組織、または器官を生成するために使用される、本発明１０４２または１０４３の方法。
[本発明１０４９]
移植片拒絶反応を予防または治療するために使用される、本発明１０４２または１０４３の方法。
[本発明１０５０]
感染性疾患を治療するために使用される、本発明１０４２または１０４３の方法。
[本発明１０５１]
１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質を投与または提供することを更に含み、
任意選択で、前記１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タ

ンパク質が、１つ以上のサイトカイン、ケモカイン、ホルモン、抗体、もしくはこれらの誘導体、または他の親和性試薬を含む、
本発明１０４２または１０４３の方法。
[本発明１０５２]
前記対象が、
（ｉ）Ｇ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤを含む別個のキメラ受容体または（ｉｉ）Ｇ－ＣＳＦの少なくとも１つの別個のバリアント型のうち一方または両方をそれぞれ発現する、２つ以上の細胞集団
を投与される、本発明１０４２～１０５１のいずれかの方法。
[本発明１０５３]
細胞の少なくとも１つの集団が、少なくとも１つの別個の抗原結合性シグナル伝達受容体を更に発現し、任意選択で、前記少なくとも１つの別個の抗原結合性シグナル伝達受容体が、少なくとも１つのＣＡＲを含む、本発明１０４２の方法。
[本発明１０５４]
免疫細胞の第１及び第２の集団のうち一方または両方が、
（ａ）少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質であって、任意選択で、前記少なくとも１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質が、１つ以上のサイトカイン、ケモカイン、ホルモン、抗体、もしくはこれらの誘導体、または他の親和性試薬を含む、前記少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質、及び
（ｂ）少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体
のうち一方または両方を更に発現する、本発明１０５２の方法。
[本発明１０５５]
１つ以上の追加の免疫細胞集団を更に含み、
各追加の免疫細胞集団が、
（ｉ）Ｇ－ＣＳＦＲの別個のバリアントＥＣＤを含む別個の受容体、
（ｉｉ）別個のバリアントＧ－ＣＳＦ、
（ｉｉｉ）別個のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質、及び
（ｉｖ）別個の抗原結合性シグナル伝達受容体
のうち少なくとも１つを発現する、
本発明１０５２～１０５４のいずれかの方法。
[本発明１０５６]
Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む少なくとも１つの受容体を発現する前記細胞が、少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体を更に発現する、本発明１０４２～１０５５のいずれかの方法。
[本発明１０５７]
前記抗原結合性シグナル伝達受容体が、天然のＴ細胞受容体、操作されたＴ細胞受容体（ＴＣＲ）、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、天然のＢ細胞受容体、操作されたＢ細胞受容体（ＢＣＲ）、ストレスリガンド受容体、パターン認識受容体、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される少なくとも１つの受容体を含む、本発明１０５６の方法。
[本発明１０５８]
前記抗原結合性シグナル伝達受容体がＣＡＲを含む、本発明１０５７の方法。
[本発明１０５９]
前記サイトカインまたはケモカインが、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、インターフェロンα、インターフェロンβ、インターフェロンγ、ＩＬ－１７、ＩＬ－２１、ＴＮＦ－α、ＣＸＣＬ１３、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１α）、ＣＣＬ４（ＭＩＰ－１β）、ＣＤ４０リガンド、Ｂ細胞活性化因子（ＢＡＦＦ）、Ｆｌｔ３リガンド、ＣＣＬ２１、ＣＣＬ５、ＸＣＬ１、ＣＣＬ１９、受容体ＮＫＧ２Ｄ、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、本発明１０５５の方法。
[本発明１０６０]

前記サイトカインがＩＬ－１８である、本発明１０５９の方法。
[本発明１０６１]
前記サイトカインがヒトのものである、本発明１０６１または１０６２の方法。
[本発明１０６２]
その必要がある対象を治療する方法であって、
（ｉ）免疫細胞含有試料を単離することと、
（ｉｉ）Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む受容体をコードする核酸配列で前記免疫細胞の形質導入またはトランスフェクションを行うことと、
（ｉｉｉ）（ｉｉ）の前記免疫細胞を前記対象に投与することと、
（ｉｖ）前記免疫細胞を、前記受容体に選択的に結合する本発明１００１～１００６または１０１０～１０１２のバリアントＧ－ＣＳＦと接触させることと
を含む、前記方法。
[本発明１０６３]
前記細胞を前記対象に投与する前に、前記対象が、免疫除去治療を受けている、本発明１０６２の方法。
[本発明１０６４]
前記免疫細胞含有試料が、前記細胞が投与されることになる対象から単離される、本発明１０６２の方法。
[本発明１０６５]
前記免疫細胞含有試料が、前記細胞が投与されることになる対象とは異なる対象から単離される、本発明１０６２の方法。
[本発明１０６６]
前記免疫細胞含有試料が、前記細胞が投与される対象由来の、または前記細胞が投与されることになる対象とは異なる対象由来の細胞から生成され、任意選択で、前記細胞が、幹細胞であり、任意選択で多能性幹細胞である、本発明１０６２の方法。
[本発明１０６７]
前記免疫細胞を前記対象に投与する前に、前記細胞がｉｎ　ｖｉｔｒｏで前記バリアントＧ－ＣＳＦと接触させられる、本発明１０６２の方法。
[本発明１０６８]
前記免疫細胞が、前記受容体に結合する前記バリアントＧ－ＣＳＦと、前記受容体からのシグナル伝達を活性化するのに十分な時間接触させられる、本発明１０６２の方法。
[本発明１０６９]
Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む受容体をコードする細胞と、使用説明書とを含む、キットであって、
前記キットが、本発明１００１～１００６または１０１０～１０１２のいずれかのバリアントＧ－ＣＳＦを含み、任意選択で、前記細胞が免疫細胞である、
前記キット。
[本発明１０７０]
（ａ）Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む受容体をコードする１つ以上の核酸配列と、
（ｂ）本発明１００１～１００６もしくは１０１０～１０１２のいずれかのバリアントＧ－ＣＳＦ、本発明１００７の核酸配列、または本発明１０１１の１つ以上の発現ベクターと、
（ｃ）使用説明書と
を含む、キット。
[本発明１０７１]
ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、インターフェロンα、インターフェロンβ、インターフェロンγ、ＩＬ－１７、ＩＬ－２１、ＴＮＦ－α、ＣＸＣＬ１３、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１α）、ＣＣＬ４（ＭＩＰ－１β）、ＣＤ４０リガンド、Ｂ細胞活性化因子（ＢＡＦＦ）、Ｆｌｔ３リガンド、ＣＣＬ２１、ＣＣＬ５、ＸＣＬ１、ＣＣＬ１９、受容体ＮＫＧ２Ｄ、及び

これらの組み合わせからなる群から選択される１つ以上のサイトカインまたはケモカインをコードする１つ以上の発現ベクターを更に含む、本発明１０７０のキット。

[本発明１０７２]

少なくとも１つの抗原結合性受容体をコードする１つ以上の発現ベクターを更に含む、本発明１０７０のキット。

[本発明１０７３]

前記少なくとも１つの抗原結合性受容体が、天然のＴ細胞受容体、操作されたＴ細胞受容体（ＴＣＲ）、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、天然のＢ細胞受容体、操作されたＢ細胞受容体（ＢＣＲ）、ストレスリガンド受容体、パターン認識受容体、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、本発明１０７０または１０７２のキット。

[本発明１０７４]

キメラ抗原受容体をコードする１つ以上の発現ベクターを更に含む、本発明１０７３のキット。

[本発明１０７５]

前記細胞が、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、インターフェロンα、インターフェロンβ、インターフェロンγ、ＩＬ－１７、ＩＬ－２１、ＴＮＦ－α、ＣＸＣＬ１３、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１α）、ＣＣＬ４（ＭＩＰ－１β）、ＣＣＬ１９、受容体ＮＫＧ２Ｄ、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される少なくとも１つのサイトカインまたはケモカインをコードする１つ以上の発現ベクターを更に含む、本発明１０６９のキット。

[本発明１０７６]

前記細胞が、少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体をコードする１つ以上の発現ベクターを更に含む、本発明１０６９または１０７５のキット。

[本発明１０７７]

前記少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体が、天然のＴ細胞受容体、操作されたＴ細胞受容体（ＴＣＲ）、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、天然のＢ細胞受容体、操作されたＢ細胞受容体（ＢＣＲ）、ストレスリガンド受容体、パターン認識受容体、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、本発明１０７６のキット。

[本発明１０７８]

前記細胞が、少なくとも１つのＣＡＲをコードする１つ以上の発現ベクターを更に含み、任意選択で、前記ＣＡＲがメソテリンＣＡＲである、本発明１０７７のキット。

[本発明１０７９]

以下を含む、キメラ受容体：

（ａ）少なくとも１つの第２のドメインに作動可能に連結された細胞外ドメイン（ＥＣＤ）；

ここで前記第２のドメインが、以下：

（ｂ）サイトカイン受容体の細胞内ドメインに由来する少なくとも１つのシグナル伝達分子結合部位を含む、細胞内ドメイン（ＩＣＤ）であって、

前記少なくとも１つのシグナル伝達分子結合部位が、インターロイキン（ＩＬ）－２Ｒβ のＳＨＣ結合部位、ＩＬ－２Ｒβ のＳＴＡＴ５結合部位、ＩＬ－４Ｒα のＩＲＳ－１もしくはＩＲＳ－２結合部位、ＩＬ－４Ｒα のＳＴＡＴ６結合部位、ｇｐ１３０のＳＨＰ－２結合部位、ｇｐ１３０のＳＴＡＴ３結合部位、ＥＰＯＲのＳＨＰ－１もしくはＳＨＰ－２結合部位、エリスロポイエチン受容体（ＥＰＯＲ）のＳＴＡＴ５結合部位、インターフェロンアルファ及びベータ受容体サブユニット２（ＩＦＮＡＲ２）のＳＴＡＴ１もしくはＳＴＡＴ２結合部位、ならびにインターフェロンガンマ受容体１（ＩＦＮγＲ１）のＳＴＡＴ１結合部位、またはこれらの組み合わせからなる群から選択され、

前記ＩＣＤが、Ｇ－ＣＳＦＲ、ｇｐ１３０、ＥＰＯＲ、及びインターフェロンガンマ受容体２（ＩＦＮγＲ２）、またはこれらの組み合わせからなる群から選択される少なくとも１つのタンパク質の少なくとも１つのＢｏｘ１領域及び少なくとも１つのＢｏｘ２領域を更に含む、

前記ＩＣＤ

を含み；
ならびに
（ｃ）膜貫通ドメイン（ＴＭＤ）を含む、少なくとも１つの第３のドメインであって、
前記ＥＣＤが前記ＴＭＤのＮ末端側であり、前記ＴＭＤが前記ＩＣＤのＮ末端側である、
前記少なくとも１つの第３のドメイン。
[本発明１０８０]
第２のドメインに作動可能に連結したＥＣＤ
を含む、キメラ受容体であって、
前記第２のドメインがＩＣＤを含み、前記ＩＣＤが、
（ｉ）
（ａ）Ｇ－ＣＳＦＲのＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）ＩＬ－４Ｒαの少なくとも１つのシグナル伝達分子結合部位、または
（ｉｉ）
（ａ）ｇｐ１３０のＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）ｇｐ１３０の少なくとも１つのシグナル伝達分子結合部位、または
（ｉｉｉ）
（ａ）エリスロポイエチン受容体（ＥＰＯＲ）のＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）ＥＰＯＲの少なくとも１つのシグナル伝達分子結合部位、または
（ｉｖ）
（ａ）Ｇ－ＣＳＦＲのＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）インターフェロンアルファ及びベータ受容体サブユニット２（ＩＦＮＡＲ２）
の少なくとも１つのシグナル伝達分子結合部位、または
（ｖ）
（ａ）インターフェロンガンマ受容体２（ＩＦＮγＲ２）のＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）インターフェロンガンマ受容体１（ＩＦＮγＲ１）の少なくとも１つのシグナル伝達分子結合部位
を含み、
前記ＥＣＤがＴＭＤのＮ末端側であり、前記ＴＭＤが前記ＩＣＤのＮ末端側である、
前記キメラ受容体。
[本発明１０８１]
前記ＥＣＤが、Ｇ－ＣＳＦＲ（顆粒球コロニー刺激因子受容体）のＥＣＤであり、任意選択で、前記Ｇ－ＣＳＦＲのＥＣＤが、本発明１００２～１０１０のいずれかのＧ－ＣＳＦＲのＥＣＤを含む、本発明１０７９または１０８０のキメラ受容体。
[本発明１０８２]
前記ＴＭＤがＧ－ＣＳＦＲのＴＭＤであり、任意選択で、前記ＴＭＤが野生型ＴＭＤである、本発明１０７９～１０８１のいずれかのキメラ受容体。
[本発明１０８３]
前記キメラ受容体の活性型がホモ二量体を形成し、任意選択で、
前記キメラ受容体の活性化により、前記受容体を発現する細胞の、増殖、生存能力、持続性、細胞傷害性、サイトカイン分泌、記憶、及び活性増強のうち少なくとも１つを含む細胞応答が、引き起こされ、任意選択で、前記キメラ受容体が、Ｇ－ＣＳＦに接触すると活性化され、任意選択で、
前記Ｇ－ＣＳＦが野生型Ｇ－ＣＳＦであり、任意選択で、
前記Ｇ－ＣＳＦＲの前記細胞外ドメインが野生型細胞外ドメインである、
本発明１０７９～１０８２のいずれかのキメラ受容体。
[本発明１０８４]
前記キメラ受容体が、細胞、任意選択で免疫細胞において発現し、任意選択で、前記免疫細胞が、
Ｔ細胞であり、任意選択で、

ＮＫ細胞であり、任意選択で、
ＮＫＴ細胞であり、任意選択で、
Ｂ細胞であり、任意選択で、
形質細胞であり、任意選択で、
マクロファージであり、任意選択で、
樹状細胞であり、任意選択で、
前記細胞が幹細胞であり、任意選択で、
前記細胞が初代細胞であり、任意選択で、
前記細胞がヒト細胞である、
本発明１０７９～１０８１のいずれかのキメラ受容体。

[本発明１０８５]
前記Ｔ細胞が、ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞、細胞傷害性ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞、ナイーブＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞、ナイーブＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞、ヘルパーＴ細胞、制御性Ｔ細胞、メモリーＴ細胞、及びγδＴ細胞からなる群から選択される、本発明１０８４のキメラ受容体。

[本発明１０８６]
前記ＩＣＤが、
（ａ）配列番号９０もしくは９１のうち一方もしくは両方のアミノ酸配列、または
（ｂ）配列番号９０もしくは９２のうち一方もしくは両方のアミノ酸配列、または
（ｃ）配列番号９３のアミノ酸配列、または
（ｄ）配列番号９４のアミノ酸配列、または
（ｅ）配列番号９５もしくは９６のうち一方もしくは両方のアミノ酸配列、または
（ｆ）配列番号９７もしくは９８のアミノ酸配列、または
（ｇ）配列番号９９もしくは１００のアミノ酸配列
を含む、前記本発明のいずれかのキメラ受容体。

[本発明１０８７]
前記膜貫通ドメインが、配列番号８８に記載される配列を含む、前記本発明のいずれかのキメラ受容体。

[本発明１０８８]
細胞表面上に発現した受容体を選択的に活性化させるためのシステムであって、
（ａ）本発明１００１～１００６または１０１０～１０１２のいずれかのバリアントＧ－ＣＳＦと、
（ｂ）本発明１０７９～１０８７のいずれかのＧ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む前記受容体と
を含み、
前記バリアントＧ－ＣＳＦが、他の点では同一の野生型Ｇ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤと比較して、前記Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む前記受容体に優先的に結合し、前記Ｇ－ＣＳＦＲの前記バリアントＥＣＤを含む前記受容体が、他の点では同一の野生型Ｇ－ＣＳＦと比較して、前記バリアントＧ－ＣＳＦに優先的に結合する、
前記システム。

[本発明１０８９]
前記本発明のいずれかのキメラ受容体をコードする、１つ以上の核酸配列。

[本発明１０９０]
前記Ｇ－ＣＳＦＲの前記ＥＣＤが、配列番号８５、８６、または８７のいずれか１つに記載される核酸配列によってコードされる、本発明１０８９の核酸配列。

[本発明１０９１]
本発明１０８９または１０９０の核酸配列を含む、１つ以上の発現ベクター。

[本発明１０９２]
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、及びプラスミドからなる群から選択される、本発明１０９１の発現ベクター。

[本発明１０９３]

キメラ受容体をコードする１つ以上の核酸配列であって、
前記キメラ受容体が、
第２のドメインに作動可能に連結されたＥＣＤ
を含み、
前記第２のドメインが、以下：
（ｉ）
（ａ）Ｇ－ＣＳＦＲのＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）ＩＬ－４Ｒαの少なくとも１つのシグナル伝達分子結合部位、または
（ｉｉ）
（ａ）ｇｐ１３０のＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）ｇｐ１３０の少なくとも１つのシグナル伝達分子結合部位、または
（ｉｉｉ）
（ａ）エリスロポイエチン受容体（ＥＰＯＲ）のＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）ＥＰＯＲの少なくとも１つのシグナル伝達分子結合部位、または
（ｉｖ）
（ａ）Ｇ－ＣＳＦＲのＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）インターフェロンアルファ及びベータ受容体サブユニット２（ＩＦＮＡＲ２）の少なくとも１つのシグナル伝達分子結合部位、または
（ｖ）
（ａ）インターフェロンガンマ受容体２（ＩＦＮγＲ２）のＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）インターフェロンガンマ受容体１（ＩＦＮγＲ１）の少なくとも１つのシグナル伝達分子結合部位
を含む、
核酸配列。
[本発明１０９４]
前記ＥＣＤが、Ｇ－ＣＳＦＲ（顆粒球コロニー刺激因子受容体）のＥＣＤである、本発明１０９３の核酸。
[本発明１０９５]
前記ＴＭＤがＧ－ＣＳＦＲのＴＭＤであり、任意選択で、前記ＴＭＤが野生型ＴＭＤである、本発明１０９３または１０９４の核酸。
[本発明１０９６]
前記Ｇ－ＣＳＦＲの前記ＥＣＤが、配列番号８５、８６、または８７のいずれか１つに記載される核酸配列によってコードされる、本発明１０９４または１０９５の核酸配列。
[本発明１０９７]
（ａ）配列番号９０もしくは９１のうち一方もしくは両方のアミノ酸配列を含むＩＣＤをコードする配列、または
（ｂ）配列番号９０もしくは９２のうち一方もしくは両方のアミノ酸配列を含むＩＣＤをコードする配列、または
（ｃ）配列番号９３のアミノ酸配列を含むＩＣＤをコードする配列、または
（ｄ）配列番号９４のアミノ酸配列を含むＩＣＤをコードする配列、または
（ｅ）配列番号９５もしくは９６のうち一方もしくは両方のアミノ酸配列を含むＩＣＤをコードする配列、または
（ｆ）配列番号９７または９８のアミノ酸配列を含むＩＣＤをコードする配列、または
（ｇ）配列番号９９または１００のアミノ酸配列を含むＩＣＤをコードする配列
を含む、本発明１０９３～１０９６のいずれかの核酸配列。
[本発明１０９８]
本発明１０９３～１０９７のいずれかの核酸配列を含む、１つ以上の発現ベクター。
[本発明１０９９]
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、及びプ

ラスミドからなる群から選択される、本発明１０９８の発現ベクター。
[本発明１１００]
本発明１０７９～１０８７のいずれかのキメラ受容体をコードする核酸配列を含む、細胞。
[本発明１１０１]
前記細胞が免疫細胞であり、任意選択で、前記免疫細胞が、
Ｔ細胞であり、任意選択で、
ＮＫ細胞であり、任意選択で、
ＮＫＴ細胞であり、任意選択で、
Ｂ細胞であり、任意選択で、
形質細胞であり、任意選択で、
マクロファージであり、任意選択で、
樹状細胞であり、任意選択で、
前記細胞が幹細胞であり、任意選択で、
前記細胞が初代細胞であり、任意選択で、
前記細胞がヒト細胞である、
本発明１１００の細胞。
[本発明１１０２]
前記Ｔ細胞が、ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞、細胞傷害性ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞、ナイーブＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞、ナイーブＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞、ヘルパーＴ細胞、制御性Ｔ細胞、メモリーＴ細胞、及びγδＴ細胞からなる群から選択される、本発明１１０１の細胞。
[本発明１１０３]
本発明１０９３～１０９７のいずれかの核酸配列を含む、細胞。
[本発明１１０４]
本発明１０９８または１０９９の発現ベクターを含む、細胞。
[本発明１１０５]
細胞の表面上に発現したキメラ受容体を選択的に活性化させる方法であって、
本発明１０７９～１０８７のいずれかのキメラ受容体を、前記キメラ受容体に選択的に結合するサイトカインと接触させること
を含む、前記方法。
[本発明１１０６]
前記キメラ受容体の活性型がホモ二量体を形成し、任意選択で、
前記キメラ受容体の活性化により、前記受容体を発現する細胞の、増殖、生存能力、持続性、細胞傷害性、サイトカイン分泌、記憶、及び活性増強のうち少なくとも１つを含む細胞応答が、引き起こされ、任意選択で、前記キメラ受容体が、前記サイトカインに接触すると活性化される、
本発明１１０５の方法。
[本発明１１０７]
前記キメラ受容体に選択的に結合する前記サイトカインがＧ－ＣＳＦであり、任意選択で、前記キメラ受容体が、Ｇ－ＣＳＦに接触すると活性化され、任意選択で、
前記Ｇ－ＣＳＦが野生型Ｇ－ＣＳＦであり、任意選択で、
前記Ｇ－ＣＳＦＲの前記細胞外ドメインが野生型細胞外ドメインである、
本発明１１０５または１１０６の方法。
[本発明１１０８]
前記キメラ受容体が、細胞、任意選択で免疫細胞において発現し、任意選択で、前記免疫細胞が、
Ｔ細胞であり、任意選択で、
ＮＫ細胞であり、任意選択で、
ＮＫＴ細胞であり、任意選択で、
Ｂ細胞であり、任意選択で、

形質細胞であり、任意選択で、
マクロファージであり、任意選択で、
樹状細胞であり、任意選択で、
前記細胞が幹細胞であり、任意選択で、
前記細胞が初代細胞であり、任意選択で、
前記細胞がヒト細胞である、
本発明１１０５～１１０７のいずれかの方法。
[本発明１１０９]
免疫細胞の第１の集団が前記キメラ受容体を発現し、免疫細胞の第２の集団が、前記キメラ受容体に結合するサイトカインを発現し、任意選択で、前記免疫細胞の第１及び第２の集団のうち一方または両方が、少なくとも１つの別個の抗原結合性シグナル伝達受容体を更に発現し、任意選択で、前記少なくとも１つの別個の抗原結合性シグナル伝達受容体が、少なくとも１つのＣＡＲを含む、本発明１１０８の方法。
[本発明１１１０]
前記免疫細胞の第１及び第２の集団のうち一方または両方が、
（ａ）少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質であって、任意選択で、前記少なくとも１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質が、１つ以上のサイトカイン、ケモカイン、ホルモン、抗体、もしくはこれらの誘導体、または他の親和性試薬を含む、前記少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質、及び
（ｂ）少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体
のうち一方または両方を更に発現する、本発明１１０９の方法。
[本発明１１１１]
前記免疫細胞の第１及び第２の集団のそれぞれが、Ｇ－ＣＳＦＲの別個のバリアントＥＣＤを含む別個のキメラ受容体と、別個のバリアントＧ－ＣＳＦとを発現する、本発明１１０９または１１１０の方法。
[本発明１１１２]
１つ以上の追加の免疫細胞集団を更に含み、
各追加の免疫細胞集団が、
（ｉ）Ｇ－ＣＳＦＲの別個のバリアントＥＣＤを含む別個の受容体、
（ｉｉ）別個のバリアントＧ－ＣＳＦ、
（ｉｉｉ）別個のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質、及び
（ｉｖ）別個の抗原結合性シグナル伝達受容体
のうち少なくとも１つを発現する、
本発明１１０９～１１１１のいずれかの方法。
[本発明１１１３]
本発明１０８９、１０９０、もしくは１０９３～１０９７のいずれかの核酸配列または本発明１０９１、１０９２、１０９８、もしくは１０９９のいずれかの発現ベクターを前記細胞に導入すること
を含む、細胞においてキメラ受容体を産生する方法であって、
任意選択で、前記方法が遺伝子編集を含み、任意選択で、
前記細胞が免疫細胞であり、任意選択で、前記免疫細胞が、
Ｔ細胞であり、任意選択で、
ＮＫ細胞であり、任意選択で、
ＮＫＴ細胞であり、任意選択で、
Ｂ細胞であり、任意選択で、
形質細胞であり、任意選択で、
マクロファージであり、任意選択で、
樹状細胞であり、任意選択で、
前記細胞が幹細胞であり、任意選択で、

前記細胞が初代細胞であり、任意選択で、
前記細胞がヒト細胞である、
前記方法。
[本発明１１１４]
その必要がある対象を治療する方法であって、
本発明１０７９～１０８７のいずれかのキメラ受容体を発現する細胞を、前記対象に投与することと、
前記キメラ受容体に特異的に結合するサイトカインを前記対象に提供することと
を含む、前記方法。
[本発明１１１５]
前記キメラ受容体の活性型がホモ二量体を形成し、任意選択で、
前記キメラ受容体の活性化により、前記受容体を発現する細胞の、増殖、生存能力、持続性、細胞傷害性、サイトカイン分泌、記憶、及び活性増強のうち少なくとも１つを含む細胞応答が、引き起こされ、任意選択で、前記キメラ受容体が、前記サイトカインに接触すると活性化される、
本発明１１１４の方法。
[本発明１１１６]
前記サイトカインがＧ－ＣＳＦであり、任意選択で、
前記Ｇ－ＣＳＦが野生型Ｇ－ＣＳＦであり、任意選択で、
前記Ｇ－ＣＳＦＲの前記細胞外ドメインが野生型細胞外ドメインである、
本発明１１１４または１１１５の方法。
[本発明１１１７]
前記キメラ受容体が、細胞、任意選択で免疫細胞において発現し、任意選択で、前記免疫細胞が、
Ｔ細胞であり、任意選択で、
ＮＫ細胞であり、任意選択で、
ＮＫＴ細胞であり、任意選択で、
Ｂ細胞であり、任意選択で、
形質細胞であり、任意選択で、
マクロファージであり、任意選択で、
樹状細胞であり、任意選択で、
前記細胞が幹細胞であり、任意選択で、
前記細胞が初代細胞であり、任意選択で、
前記細胞がヒト細胞である、
本発明１１１４～１１１６のいずれかの方法。
[本発明１１１８]
少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質を投与または提供することを更に含み、
任意選択で、前記１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質が、１つ以上のサイトカイン、ケモカイン、ホルモン、抗体、もしくはこれらの誘導体、または他の親和性試薬を含む、
本発明１１０６～１１１７のいずれかの方法。
[本発明１１１９]
前記対象が、
別個のキメラ受容体をそれぞれ発現し、且つサイトカインの別個のバリアント型をそれぞれ発現する、２つ以上の細胞集団
を投与される、本発明１１１４～１１１８のいずれかの方法。
[本発明１１２０]
前記キメラ受容体を発現する前記細胞が、少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体を更に発現する、本発明１１１４～１１１９のいずれかの方法。

[本発明１１２１]
前記抗原結合性シグナル伝達受容体が、天然のＴ細胞受容体、操作されたＴ細胞受容体（ＴＣＲ）、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、天然のＢ細胞受容体、操作されたＢ細胞受容体（ＢＣＲ）、ストレスリガンド受容体、パターン認識受容体、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される少なくとも１つの受容体を含む、本発明１１２０の方法。
[本発明１１２２]
前記抗原結合性シグナル伝達受容体がＣＡＲである、本発明１１２１の方法。
[本発明１１２３]
前記少なくとも１つのサイトカインまたはケモカインが、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、インターフェロンα、インターフェロンβ、インターフェロンγ、ＩＬ－１７、ＩＬ－２１、ＴＮＦ－α、ＣＸＣＬ１３、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１α）、ＣＣＬ４（ＭＩＰ－１β）、ＣＤ４０リガンド、Ｂ細胞活性化因子（ＢＡＦＦ）、Ｆｌｔ３リガンド、ＣＣＬ２１、ＣＣＬ５、ＸＣＬ１、もしくはＣＣＬ１９、または受容体ＮＫＧ２Ｄ、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、本発明１１１８の方法。
[本発明１１２４]
前記サイトカインがＩＬ－１８である、本発明１１２３の方法。
[本発明１１２５]
前記サイトカインがヒトのものである、本発明１１２３または１１２４の方法。
[本発明１１２６]
がんを治療するために使用される、本発明１１１４～１１２５のいずれかの方法。
[本発明１１２７]
自己免疫疾患を治療するために使用される、本発明１１１４～１１２５のいずれかの方法。
[本発明１１２８]
炎症状態を治療するために使用される、本発明１１１４～１１２５のいずれかの方法。
[本発明１１２９]
変性疾患を治療するために使用される、本発明１１１４～１１２５のいずれかの方法。
[本発明１１３０]
移植のための、天然のまたは操作された細胞、組織、または器官を生成するために使用される、本発明１１１４～１１２５のいずれかの方法。
[本発明１１３１]
同種移植片拒絶反応を予防または治療するために使用される、本発明１１１４～１１２５のいずれかの方法。
[本発明１１３２]
（ｉ）免疫細胞含有試料を単離することと、
（ｉｉ）前記キメラサイトカイン受容体をコードする核酸配列を前記免疫細胞に導入することと、
（ｉｉｉ）（ｉｉ）の前記免疫細胞を前記対象に投与することと、
（ｉｖ）前記免疫細胞を、前記キメラ受容体に結合する前記サイトカインと接触させることと
を含む、本発明１１１４の方法。
[本発明１１３３]
前記細胞を前記対象に投与または注入する前に、前記対象が、免疫除去治療を受けている、本発明１１３２の方法。
[本発明１１３４]
前記免疫細胞含有試料が、前記細胞が投与されることになる対象から単離される、本発明１１３２の方法。
[本発明１１３５]
前記免疫細胞含有試料が、前記細胞が投与されることになる対象とは異なる対象から単離される、本発明１１３２の方法。

[本発明１１３６]
前記免疫細胞含有試料が、前記細胞が投与されることになる対象に由来する、または前記細胞が投与されることになる対象とは異なる対象に由来する細胞から生成され、任意選択で、前記細胞が幹細胞であり、任意選択で多能性幹細胞である、本発明１１３２の方法。
[本発明１１３７]
前記免疫細胞を前記対象に投与または注入する前に、前記細胞がｉｎ　ｖｉｔｒｏで前記サイトカインと接触させられる、本発明１１３２の方法。
[本発明１１３８]
前記免疫細胞が、前記キメラ受容体からのシグナル伝達を活性化するのに十分な時間、前記サイトカインと接触させられる、本発明１１３２の方法。
[本発明１１３９]
前記サイトカインがＧ－ＣＳＦであり、任意選択で、
前記Ｇ－ＣＳＦが野生型Ｇ－ＣＳＦであり、任意選択で、
前記Ｇ－ＣＳＦＲの前記細胞外ドメインが野生型細胞外ドメインである、
本発明１１３２～１１３８のいずれかの方法。
[本発明１１４０]
本発明１０７９～１０８７のいずれかの１つ以上のキメラ受容体をコードする細胞であって、任意選択で、前記細胞が免疫細胞である、前記細胞と、
使用説明書と
を含む、キットであって、
任意選択で、前記キットが、前記キメラ受容体に結合する少なくとも１つのサイトカインを含む、
前記キット。
[本発明１１４１]
本発明１０７９～１０８７のいずれかの１つ以上のキメラ受容体をコードする少なくとも１つの発現ベクターと、
使用説明書と
を含む、キットであって、
任意選択で、前記キットが、前記キメラ受容体に結合する少なくとも１つのサイトカインを含む、
前記キット。
[本発明１１４２]
ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、インターフェロンα、インターフェロンβ、インターフェロンγ、ＩＬ－１７、ＩＬ－２１、ＴＮＦ－α、ＣＸＣＬ１３、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１α）、ＣＣＬ４（ＭＩＰ－１β）、ＣＤ４０リガンド、Ｂ細胞活性化因子（ＢＡＦＦ）、Ｆｌｔ３リガンド、ＣＣＬ２１、ＣＣＬ５、ＸＣＬ１、もしくはＣＣＬ１９、または受容体ＮＫＧ２Ｄ、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される１つ以上のサイトカインまたはケモカインをコードする１つ以上の発現ベクターを更に含む、本発明１１４１のキット。
[本発明１１４３]
少なくとも１つの抗原結合性受容体をコードする１つ以上の発現ベクターを更に含む、本発明１１４１または１１４２のキット。
[本発明１１４４]
前記少なくとも１つの抗原結合性受容体が、天然のＴ細胞受容体、操作されたＴ細胞受容体（ＴＣＲ）、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、天然のＢ細胞受容体、操作されたＢ細胞受容体（ＢＣＲ）、ストレスリガンド受容体、パターン認識受容体、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、本発明１１４２のキット。
[本発明１１４５]
少なくとも１つのＣＡＲをコードする発現ベクターを更に含み、

任意選択で、前記ＣＡＲがメソテリンＣＡＲである、
本発明１１４４のキット。
[本発明１１４６]
前記細胞が、少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質をコードする１つ以上の発現ベクターを更に含み、任意選択で、前記１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質が、１つ以上のサイトカイン、ケモカイン、ホルモン、抗体、もしくはこれらの誘導体、または他の親和性試薬を含む、本発明１１４０のキット。
[本発明１１４７]
前記細胞が、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、インターフェロンα、インターフェロンβ、インターフェロンγ、ＩＬ－１７、ＩＬ－２１、ＴＮＦ－α、ＣＸＣＬ１３、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１α）、ＣＣＬ４（ＭＩＰ－１β）、ＣＤ４０リガンド、Ｂ細胞活性化因子（ＢＡＦＦ）、Ｆｌｔ３リガンド、ＣＣＬ２１、ＣＣＬ５、ＸＣＬ１、もしくはＣＣＬ１９、または受容体ＮＫＧ２Ｄ、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される少なくとも１つのサイトカインまたはケモカインをコードする１つ以上の発現ベクターを更に含む、本発明１１４０のキット。
[本発明１１４８]
少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質をコードする１つ以上の発現ベクターを更に含み、
任意選択で、前記１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質が、１つ以上のサイトカイン、ケモカイン、ホルモン、抗体、もしくはこれらの誘導体、または他の親和性試薬を含む、
本発明１１４２のキット。
[本発明１１４９]
前記細胞が、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、インターフェロンα、インターフェロンβ、インターフェロンγ、ＩＬ－１７、ＩＬ－２１、ＴＮＦ－α、ＣＸＣＬ１３、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１α）、ＣＣＬ４（ＭＩＰ－１β）、ＣＤ４０リガンド、Ｂ細胞活性化因子（ＢＡＦＦ）、Ｆｌｔ３リガンド、ＣＣＬ２１、ＣＣＬ５、ＸＣＬ１、もしくはＣＣＬ１９、または受容体ＮＫＧ２Ｄ、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される少なくとも１つのサイトカインまたはケモカインをコードする１つ以上の発現ベクターを更に含む、本発明１１４８のキット。
[本発明１１５０]
前記細胞が、少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体をコードする１つ以上の発現ベクターを更に含む、本発明１１４０、１１４６、または１１４７のいずれかのキット。
[本発明１１５１]
前記少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体が、天然のＴ細胞受容体、操作されたＴ細胞受容体（ＴＣＲ）、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、天然のＢ細胞受容体、操作されたＢ細胞受容体（ＢＣＲ）、ストレスリガンド受容体、パターン認識受容体、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、本発明１１５０のキット。
[本発明１１５２]
前記細胞が、少なくとも１つのＣＡＲをコードする１つ以上の発現ベクターを更に含み、任意選択で、前記ＣＡＲがメソテリンＣＡＲである、本発明１１４０、１１４６、１１４７、１１５０、または１１５１のいずれかのキット。
[本発明１１５３]
前記細胞が、本発明１０７９～１０８７のいずれかの１つ以上の別個のキメラ受容体をコードする１つ以上の発現ベクターを更に含む、本発明１１４０、１１４６、１１４７、１１５０、または１１５１のいずれかのキット。
[本発明１１５４]
本発明１０７９～１０８７のいずれかの１つ以上の別個のキメラ受容体をコードする１

つ以上の発現ベクターを更に含む、本発明１１４１～１１４５、１１４８、または１１４９のいずれかのキット。

[本発明１１５５]

細胞を選択的に活性化させるためのシステムであって、

（ｉ）顆粒球コロニー刺激因子受容体（Ｇ－ＣＳＦＲ）のバリアント細胞外ドメイン（ＥＣＤ）を含む受容体、ならびに

（ｉｉ）（ｉ）の前記受容体に選択的に結合するバリアントＧ－ＣＳＦ、ならびに、以下：

（ａ）少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質であって、任意選択で、前記１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質が、１つ以上のサイトカイン、ケモカイン、ホルモン、抗体、もしくはこれらの誘導体、または他の親和性試薬を含む、前記少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質、

及び

（ｂ）少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体

のうちの一方または両方

を含む、前記システム。

[本発明１１５６]

前記バリアントＧ－ＣＳＦが、本発明１００１～１００６または１０１０～１０１２のいずれかを含む、本発明１１５５のシステム。

[本発明１１５７]

前記受容体が、本発明１０７９～１０８７のいずれかのＧ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む、本発明１１５５または１１５６のシステム。

[本発明１１５８]

前記少なくとも１つの追加のサイトカインまたはケモカインが、インターロイキン（ＩＬ）－１８、ＩＬ－２１、インターフェロンα、インターフェロンβ、インターフェロンγ、ＩＬ－１７、ＩＬ－２１、ＴＮＦ－α、ＣＸＣＬ１３、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１α）、ＣＣＬ４（ＭＩＰ－１β）、及びＣＣＬ１９、ならびに受容体ＮＫＧ２Ｄ、ならびにこれらの組み合わせのうち少なくとも１つを含む、本発明１１５５の細胞を選択的に活性化させるためのシステム。

[本発明１１５９]

前記少なくとも１つの追加のサイトカインが、ＩＬ－１８を含む、本発明１１５８の細胞を選択的に活性化させるためのシステム。

[本発明１１６０]

前記抗原結合性シグナル伝達受容体が、天然のＴ細胞受容体、操作されたＴ細胞受容体（ＴＣＲ）、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、天然のＢ細胞受容体、操作されたＢ細胞受容体（ＢＣＲ）、ストレスリガンド受容体、パターン認識受容体、及びこれらの組み合わせのうち少なくとも１つを含む、本発明１１５５～１１５９のいずれかの細胞を選択的に活性化させるためのシステム。

[本発明１１６１]

前記抗原結合性シグナル伝達受容体がＣＡＲを含み、任意選択で、前記ＣＡＲがメソテリンＣＡＲである、本発明１１６０の細胞を選択的に活性化させるためのシステム。

[本発明１１６２]

前記Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤが、サイトＩＩ界面領域における少なくとも１つの変異、サイトＩＩＩ界面領域における少なくとも１つの変異、またはそれらの組み合わせを含む、前記本発明のいずれかの細胞を選択的に活性化させるためのシステム。

[本発明１１６３]

前記サイトＩＩ界面領域における前記少なくとも１つの変異が、配列番号２に示す配列のアミノ酸位置１４１、１６７、１６８、１７１、１７２、１７３、１７４、１９７、１９９、２００、２０２、及び２８８からなる群から選択される前記Ｇ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤ

のアミノ酸位置に位置する、本発明１１６２の細胞を選択的に活性化させるためのシステム。

[本発明１１６４]

前記Ｇ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤの前記サイトＩＩＩ界面領域における前記少なくとも１つの変異が、配列番号２に示す配列のＲ１４１Ｅ、Ｒ１６７Ｄ、Ｋ１６８Ｄ、Ｋ１６８Ｅ、Ｌ１７１Ｅ、Ｌ１７２Ｅ、Ｙ１７３Ｋ、Ｑ１７４Ｅ、Ｄ１９７Ｋ、Ｄ１９７Ｒ、Ｍ１９９Ｄ、Ｄ２００Ｋ、Ｄ２００Ｒ、Ｖ２０２Ｄ、Ｒ２８８Ｄ、及びＲ２８８Ｅからなる群から選択される、本発明１１６２の細胞を選択的に活性化させるためのシステム。

[本発明１１６５]

前記Ｇ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤの前記サイトＩＩＩ界面領域における前記少なくとも１つの変異が、配列番号２に示す配列のアミノ酸２～３０８のアミノ酸位置３０、４１、７３、７５、７９、８６、８７、８８、８９、９１、及び９３からなる群から選択される、本発明１１６２の細胞を選択的に活性化させるためのシステム。

[本発明１１６６]

前記Ｇ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤの前記サイトＩＩＩ界面領域における前記少なくとも１つの変異が、配列番号２に示す配列のＳ３０Ｄ、Ｒ４１Ｅ、Ｑ７３Ｗ、Ｆ７５ＫＦ、Ｓ７９Ｄ、Ｌ８６Ｄ、Ｑ８７Ｄ、Ｉ８８Ｅ、Ｌ８９Ａ、Ｑ９１Ｄ、Ｑ９１Ｋ、及びＥ９３Ｋからなる群から選択される、本発明１１６２の細胞を選択的に活性化させるためのシステム。

[本発明１１６７]

前記Ｇ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤが、表４に示すデザイン番号の複数の変異の組み合わせを含み、前記変異が、配列番号２に示す配列のアミノ酸位置に対応する、前記本発明のいずれかの細胞を選択的に活性化させるためのシステム。

[本発明１１６８]

前記Ｇ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤが、配列番号２に示す配列の変異：Ｒ４１Ｅ、Ｒ１４１Ｅ、及びＲ１６７Ｄを含む、前記本発明のいずれかの細胞を選択的に活性化させるためのシステム。

[本発明１１６９]

Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む前記受容体が、キメラ受容体である、前記本発明のいずれかの細胞を選択的に活性化させるためのシステム。

[本発明１１７０]

前記キメラ受容体が、少なくとも１つの第２のドメインと作動可能に連結し、前記第２のドメインが、１つ以上のサイトカイン受容体の細胞内ドメイン（ＩＣＤ）由来の少なくとも１つのシグナル伝達分子結合部位を含み、

前記少なくとも１つのシグナル伝達分子結合部位が、Ｇ－ＣＳＦＲのＳＴＡＴ３結合部位、糖タンパク質１３０（ｇｐ１３０）のＳＴＡＴ３結合部位、ｇｐ１３０のＳＨＰ－２結合部位、ＩＬ－２Ｒβのホスファチジルイノシトール３－キナーゼ（ＰＩ３Ｋ）結合部位、ＩＬ－２Ｒβのホスファチジルイノシトール３－キナーゼ（ＰＩ３Ｋ）結合部位、ＩＬ－２Ｒβ$_2$のＳＴＡＴ４結合部位、ＩＬ－２Ｒβ$_2$のＳＴＡＴ５結合部位、ＩＬ－２Ｒβ$_2$のＳＴＡＴ３結合部位、ＩＬ－２１ＲのＳＴＡＴ５結合部位、ＩＬ－２１ＲのＳＴＡＴ３結合部位　ＩＬ－２１ＲのＳＴＡＴ１結合部位、ＩＬ－４ＲαのＩＲＳ－１またはＩＲＳ－２結合部位、ＩＬ－４ＲαのＳＴＡＴ６結合部位、エリスロポイエチン受容体（ＥＰＯＲ）のＳＨＰ－１またはＳＨＰ－２結合部位、ＥＰＯＲのＳＴＡＴ５結合部位、インターフェロンアルファ及びベータ受容体サブユニット２（ＩＦＮＡＲ２）のＳＴＡＴ１またはＳＴＡＴ２結合部位、ならびにインターフェロンガンマ受容体１（ＩＦＮγＲ１）のＳＴＡＴ１結合部位、またはこれらの組み合わせからなる群から選択され、

任意選択で、前記ＩＣＤが、Ｇ－ＣＳＦＲ、ｇｐ１３０ＥＰＯＲ、及びインターフェロンガンマ受容体２（ＩＦＮγＲ２）、またはこれらの組み合わせからなる群から選択されるタンパク質のＢｏｘ１領域及びＢｏｘ２領域を含み、

任意選択で、前記キメラ受容体が、Ｇ－ＣＳＦＲ、ｇｐ１３０（糖タンパク質１３０）、及びＩＬ－２Ｒからなる群から選択されるタンパク質の膜貫通ドメイン（ＴＭＤ）を含む第３のドメインを含み、任意選択で、前記ＴＭＤが野生型ＴＭＤである、
本発明１１６９の細胞を選択的に活性化させるためのシステム。
[本発明１１７１]
前記キメラ受容体が、少なくとも１つの第２のドメインと作動可能に連結し、前記第２のドメインが、以下：
（ｉ）
（ａ）ｇｐ１３０のＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、ならびに
（ｂ）ＩＬ－２Ｒβ のＣ末端領域、または
（ｉｉ）
（ａ）Ｇ－ＣＳＦＲのＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、ならびに
（ｂ）ＩＬ－２Ｒβ のＣ末端領域、または
（ｉｉｉ）
（ａ）Ｇ－ＣＳＦＲのＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、ならびに
（ｂ）ＩＬ－１２Ｒβ のＣ末端領域、または
（ｉｖ）
（ａ）Ｇ－ＣＳＦＲのＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、ならびに
（ｂ）ＩＬ－２１ＲのＣ末端領域、または
（ｖ）
（ａ）ＩＬ－２Ｒβ のＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、ならびに
（ｂ）ＩＬ－２Ｒβ のＣ末端領域、または
（ｖｉ）
（ａ）Ｇ－ＣＳＦＲのＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、ならびに
（ｂ）ＩＬ－７Ｒα のＣ末端領域、または
（ｖｉｉ）
（ａ）Ｇ－ＣＳＦＲのＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）ＩＬ－４Ｒα のＣ末端領域、または
（ｖｉｉｉ）
（ａ）ｇｐ１３０のＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）ｇｐ１３０のＣ末端領域、または
（ｉｘ）
（ａ）エリスロポイエチン受容体（ＥＰＯＲ）のＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）ＥＰＯＲのＣ末端領域、または
（ｘ）
（ａ）Ｇ－ＣＳＦＲのＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）インターフェロンアルファ及びベータ受容体サブユニット２（ＩＦＮＡＲ２）のＣ末端領域、または
（ｘｉ）
（ａ）インターフェロンガンマ受容体２（ＩＦＮγＲ２）のＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）インターフェロンガンマ受容体１（ＩＦＮγＲ１）のＣ末端領域
を含む、本発明１１６９の細胞を選択的に活性化させるためのシステム。
[本発明１１７２]
前記ＥＣＤが前記ＴＭＤのＮ末端側であり、ＴＭＤが前記ＩＣＤのＮ末端側である、本発明１１７０または１１７１の細胞を選択的に活性化させるためのシステム。
[本発明１１７３]
Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む前記受容体が、前記細胞上で発現する、前記本発明のいずれかの細胞を選択的に活性化させるためのシステム。
[本発明１１７４]

前記細胞が免疫細胞であり、任意選択で、前記免疫細胞が、
Ｔ細胞であり、任意選択で、
ＮＫ細胞であり、任意選択で、
ＮＫＴ細胞であり、任意選択で、
Ｂ細胞であり、任意選択で、
形質細胞であり、任意選択で、
マクロファージであり、任意選択で、
樹状細胞であり、任意選択で、
前記細胞が幹細胞であり、任意選択で、
前記細胞が初代細胞であり、任意選択で、
前記細胞がヒト細胞である、
前記本発明のいずれかの細胞を選択的に活性化させるためのシステム。

[本発明１１７５]

前記Ｔ細胞が、ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞、細胞傷害性ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞、細胞傷害性ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞、ナイーブＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞、ナイーブＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞、ヘルパーＴ細胞、制御性Ｔ細胞、メモリーＴ細胞、及びγδＴ細胞からなる群から選択される、本発明１１７４のシステム。

[本発明１１７６]

前記バリアントＧ－ＣＳＦによる、Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む前記受容体の活性化により、前記受容体を発現する細胞の、増殖、生存能力、持続性、細胞傷害性、サイトカイン分泌、記憶、活性増強、またはこれらの組み合わせのうち少なくとも１つを含む細胞応答が、引き起こされる、前記本発明のいずれかの細胞を選択的に活性化させるためのシステム。

[本発明１１７７]

前記バリアントＧ－ＣＳＦが、サイトＩＩ界面領域における少なくとも１つの変異、サイトＩＩＩ界面領域における少なくとも１つの変異、またはそれらの組み合わせを含む、前記本発明のいずれかの細胞を選択的に活性化させるためのシステム。

[本発明１１７８]

前記バリアントＧ－ＣＳＦの前記サイトＩＩ界面領域における前記少なくとも１つの変異が、配列番号１に示す配列のアミノ酸位置１２、１６、１９、２０、１０４、１０８、１０９、１１２、１１５、１１６、１１８、１１９、１２２、及び１２３からなる群から選択されるアミノ酸位置に位置する、本発明１１７７の細胞を選択的に活性化させるためのシステム。

[本発明１１７９]

前記バリアントＧ－ＣＳＦの前記サイトＩＩ界面領域における前記少なくとも１つの変異が、Ｓ１２Ｅ、Ｓ１２Ｋ、Ｓ１２Ｒ、Ｋ１６Ｄ、Ｌ１８Ｆ、Ｅ１９Ｋ、Ｑ２０Ｅ、Ｄ１０４Ｋ、Ｄ１０４Ｒ、Ｌ１０８Ｋ、Ｌ１０８Ｒ、Ｄ１０９Ｒ、Ｄ１１２Ｒ、Ｄ１１２Ｋ、Ｔ１１５Ｅ、Ｔ１１５Ｋ、Ｔ１１６Ｄ、Ｑ１１９Ｅ、Ｑ１１９Ｒ、Ｅ１２２Ｋ、Ｅ１２２Ｒ、及びＥ１２３Ｒからなる群から選択される変異の群から選択される、本発明１１７８の細胞を選択的に活性化させるためのシステム。

[本発明１１８０]

前記バリアントＧ－ＣＳＦの前記サイトＩＩＩ界面領域における前記少なくとも１つの変異が、配列番号１に示す配列の３８、３９、４０、４１、４６、４７、４８、４９、及び１４７からなる群から選択される変異の群から選択される、本発明１１７７～１１７９のいずれかの細胞を選択的に活性化させるためのシステム。

[本発明１１８１]

前記バリアントＧ－ＣＳＦの前記サイトＩＩＩ界面領域における前記少なくとも１つの変異が、Ｔ３８Ｒ、Ｙ３９Ｅ、Ｋ４０Ｄ、Ｋ４０Ｆ、Ｌ４１Ｄ、Ｌ４１Ｅ、Ｌ４１Ｋ、Ｅ４６Ｒ、Ｌ４７Ｄ、Ｖ４８Ｋ、Ｖ４８Ｒ、Ｌ４９Ｋ、及びＲ１４７Ｅからなる群から選択される変異の群から選択される、本発明１１８０の細胞を選択的に活性化させるためのシ

ステム。
[本発明１１８２]
前記細胞が、前記Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む前記受容体と、前記少なくとも１つの追加のサイトカインまたはケモカインとの両方を発現する、前記本発明のいずれかの細胞を選択的に活性化させるためのシステム。
[本発明１１８３]
２つ以上の細胞集団が、Ｇ－ＣＳＦＲ　ＥＣＤを含む別個のキメラ受容体をそれぞれ発現し、且つＧ－ＣＳＦの別個のバリアント型をそれぞれ発現する、本発明１１５５～１１８１のいずれかの細胞を選択的に活性化させるためのシステム。
[本発明１１８４]
前記免疫細胞の第１の集団が、
（ａ）少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質であって、任意選択で、前記１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質が、１つ以上のサイトカイン、ケモカイン、ホルモン、抗体、もしくはこれらの誘導体、または他の親和性試薬を含む、前記少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質、及び
（ｂ）少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体
のうち一方または両方を更に発現する、本発明１１８３のシステム。
[本発明１１８５]
前記細胞が免疫細胞であり、前記免疫細胞が少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体を更に発現し、前記抗原結合性シグナル伝達受容体が、第２の細胞の上に発現した抗原と選択的に結合する、本発明１１８２の細胞を選択的に活性化させるためのシステム。
[本発明１１８６]
前記抗原結合性シグナル伝達受容体がキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を含み、
任意選択で、前記ＣＡＲがメソテリンＣＡＲである、
本発明１１８４の細胞を選択的に活性化させるためのシステム。
[本発明１１８７]
前記追加のサイトカインがＩＬ－１８を含む、本発明１１８６の細胞を選択的に活性化させるためのシステム。
[本発明１１８８]
前記第２の細胞が、がん細胞である、本発明１１８４～１１８７のいずれかの細胞を選択的に活性化させるためのシステム。
[本発明１１８９]
前記本発明のいずれかのシステムをコードする、１つ以上の核酸配列。
[本発明１１９０]
本発明１１８９の核酸配列を含む、１つ以上の発現ベクター。
[本発明１１９１]
本発明１１５５～１１８８のいずれかのシステムを発現するように操作された、１つ以上の細胞。
[本発明１１９２]
前記細胞が免疫細胞であり、任意選択で、前記免疫細胞が、
Ｔ細胞であり、任意選択で、
ＮＫ細胞であり、任意選択で、
ＮＫＴ細胞であり、任意選択で、
Ｂ細胞であり、任意選択で、
形質細胞であり、任意選択で、
マクロファージであり、任意選択で、
樹状細胞であり、任意選択で、
前記細胞が幹細胞であり、任意選択で、

前記細胞が初代細胞であり、任意選択で、
前記細胞がヒト細胞である、
本発明１１９１の細胞。
[本発明１１９３]
前記Ｔ細胞が、ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞、細胞傷害性ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞、細胞傷害性ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞、ナイーブＣＤ８＋Ｔ細胞、ナイーブＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞、ヘルパーＴ細胞、制御性Ｔ細胞、メモリーＴ細胞、及びγδＴ細胞からなる群から選択される、本発明１１９２の細胞。
[本発明１１９４]
細胞の表面上に発現したＧ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む受容体を、選択的に活性化させる方法であって、
前記細胞中に、
本発明１１５５～１１８８のいずれかのシステムのＧ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む少なくとも１つの受容体と、
以下：
（ｉ）少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質であって、任意選択で、前記１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質が、本発明１１５５～１１８８のいずれかのシステムの、１つ以上のサイトカイン、ケモカイン、ホルモン、抗体、もしくはこれらの誘導体、または他の親和性試薬を含む、前記少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質、及び
（ｉｉ）本発明１１５５～１１８８のいずれかのシステムの、少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体
のうちの一方または両方と
をコードする１つ以上の核酸配列を導入することと、
前記Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む前記受容体を、バリアントＧ－ＣＳＦ、または本発明１１５５～１１８８のいずれかのバリアントＧ－ＣＳＦと接触させることと
を含む、前記方法。
[本発明１１９５]
前記受容体が免疫細胞上で発現し、任意選択で、前記免疫細胞が、
Ｔ細胞であり、任意選択で、
ＮＫ細胞であり、任意選択で、
ＮＫＴ細胞であり、任意選択で、
Ｂ細胞であり、任意選択で、
形質細胞であり、任意選択で、
マクロファージであり、任意選択で、
樹状細胞であり、任意選択で、
前記細胞が幹細胞であり、任意選択で、
前記細胞が初代細胞であり、任意選択で、
前記細胞がヒト細胞である、
本発明１１９４の方法
[本発明１１９６]
前記Ｔ細胞が、ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞、細胞傷害性ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞、細胞傷害性ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞、ナイーブＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞、ナイーブＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞、ヘルパーＴ細胞、制御性Ｔ細胞、メモリーＴ細胞、及びγδＴ細胞からなる群から選択される、本発明１１９５の方法。
[本発明１１９７]
前記免疫細胞上で発現した前記受容体の前記選択的活性化により、前記免疫細胞の増殖、生存能力、持続性、細胞傷害性、サイトカイン分泌、記憶、活性増強、またはこれらの組み合わせのうち少なくとも１つを含む細胞応答が引き起こされる、本発明１１９５の方法。
[本発明１１９８]

免疫細胞の第１の集団が、前記Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む１つ以上の受容体を発現し、免疫細胞の第２の集団が、１つ以上のバリアントＧ－ＣＳＦを発現し、任意選択で、前記免疫細胞の第１及び第２の集団のうち一方または両方が、少なくとも１つの別個の抗原結合性シグナル伝達受容体を更に発現し、任意選択で、前記少なくとも１つの別個の抗原結合性シグナル伝達受容体が、少なくとも１つのＣＡＲを含む、本発明１１９５の方法。

[本発明１１９９]

前記免疫細胞の第１及び第２の集団のうち一方または両方が、

（ａ）少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質であって、任意選択で、前記少なくとも１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質が、１つ以上のサイトカイン、ケモカイン、ホルモン、抗体、もしくはこれらの誘導体、または他の親和性試薬を含む、前記少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質、及び

（ｂ）少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体

のうち一方または両方を更に発現する、本発明１１９８の方法。

[本発明１２００]

前記免疫細胞の第１及び第２の集団のそれぞれが、Ｇ－ＣＳＦＲの別個のバリアントＥＣＤを含む少なくとも１つの別個の受容体と、少なくとも１つの別個のバリアントＧ－ＣＳＦとを発現する、本発明１１９８または１１９９の方法。

[本発明１２０１]

１つ以上の追加の免疫細胞集団を更に含み、

各追加の免疫細胞集団が、

（ｉ）Ｇ－ＣＳＦＲの別個のバリアントＥＣＤを含む別個の受容体、

（ｉｉ）別個のバリアントＧ－ＣＳＦ、

（ｉｉｉ）別個のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質、及び

（ｉｖ）別個の抗原結合性シグナル伝達受容体

のうち少なくとも１つを発現する、

本発明１１９８～１２００のいずれかの方法。

[本発明１２０２]

本発明１１５５～１１８８のいずれかのシステムのＧ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む受容体と、

以下：

（ｉ）少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質であって、任意選択で、前記少なくとも１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質が、本発明１１５５～１１８８のいずれかのシステムの、１つ以上のサイトカイン、ケモカイン、ホルモン、抗体、もしくはこれらの誘導体、または他の親和性試薬を含む、前記少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質、及び

（ｉｉ）本発明１１５５～１１８８のいずれかのシステムの、少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体

のうちの一方または両方と

を発現する細胞を産生する方法であって、

前記細胞に、前記受容体をコードする１つ以上の核酸または発現ベクターと、（ｉ）及び（ｉｉ）のうち一方または両方とを導入すること

を含む、前記方法。

[本発明１２０３]

免疫細胞の第１の集団が、前記Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む前記受容体を発現し、免疫細胞の第２の集団が、前記バリアントＧ－ＣＳＦを発現する、本発明１２００の方法。

[本発明１２０４]

前記免疫細胞の第１及び第２の集団のうち一方または両方が、
（ａ）少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質であって、任意選択で、前記少なくとも１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質が、１つ以上のサイトカイン、ケモカイン、ホルモン、抗体、もしくはこれらの誘導体、または他の親和性試薬を含む、前記少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質、及び
（ｂ）少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体
のうち一方または両方を更に発現する、本発明１２０３の方法。
[本発明１２０５]
その必要がある対象において免疫応答を増加させる方法であって、
本発明１１９２の免疫細胞を前記対象に投与すること
を含む、前記方法。
[本発明１２０６]
その必要がある対象において疾患を治療する方法であって、
本発明１１９２の免疫細胞を前記対象に投与すること
を含む、前記方法。
[本発明１２０７]
少なくとも１つのバリアントＧ－ＣＳＦを前記対象に投与または提供することを更に含む、本発明１２０４の方法。
[本発明１２０８]
がんを治療するために使用される、本発明１２０４～１２０７のいずれかの方法。
[本発明１２０９]
炎症状態を治療するために使用される、本発明１２０４～１２０７のいずれかの方法。
[本発明１２１０]
自己免疫疾患または状態を治療するために使用される、本発明１２０４～１２０７のいずれかの方法。
[本発明１２１１]
変性疾患を治療するために使用される、本発明１２０４～１２０７のいずれかの方法。
[本発明１２１２]
移植のための、天然のまたは操作された細胞、組織、または器官を生成するために使用される、本発明１２０４～１２０７のいずれかの方法。
[本発明１２１３]
移植片拒絶反応を予防または治療するために使用される、本発明１２０４～１２０７のいずれかの方法。
[本発明１２１４]
感染性疾患を治療するために使用される、本発明１２０４～１２０７のいずれかの方法。
[本発明１２１５]
少なくとも１つの追加の活性剤を投与または提供することを更に含み、
任意選択で、前記少なくとも１つの追加の活性剤が、少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質を含み、任意選択で、前記１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質が、１つ以上のサイトカイン、ケモカイン、ホルモン、抗体、もしくはこれらの誘導体、または他の親和性試薬を含む、
本発明１２０４～１２０７のいずれかの方法。
[本発明１２１６]
その必要がある対象を治療する方法であって、
（ｉ）免疫細胞含有試料を単離することと、
（ｉｉ）前記免疫細胞に、
本発明１１５５～１１８８のいずれかのシステムのＧ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む１つ以上の受容体と、

以下：
（ａ）少なくとも１つの追加の活性剤であって、任意選択で、前記少なくとも１つの追加の活性剤が、少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質を含み、任意選択で、前記１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質が、本発明１１５５～１１８８のいずれかのシステムの、１つ以上のサイトカイン、ケモカイン、ホルモン、抗体、もしくはこれらの誘導体、または他の親和性試薬を含む、前記少なくとも１つの追加の活性剤、及び、任意選択で、
（ｂ）本発明１１５５～１１８８のいずれかのシステムの、１つ以上の抗原結合性シグナル伝達受容体
のうちの一方または両方と
をコードする１つ以上の核酸配列を導入することと、
（ｉｉｉ）（ｉｉ）の前記免疫細胞を前記対象に投与することと、
（ｉｖ）前記免疫細胞を、前記Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む前記受容体と特異的に結合するバリアントＧ－ＣＳＦと接触させることと
を含む、前記方法。
[本発明１２１７]
前記免疫細胞を前記対象に投与または注入する前に、前記対象が、免疫除去治療を受けている、本発明１２１６の方法。
[本発明１２１８]
前記免疫細胞含有試料が、前記細胞が投与される対象から単離される、本発明１２１６の方法。
[本発明１２１９]
前記免疫細胞含有試料が、前記細胞が投与される対象とは異なる対象から単離される、本発明１２１６の方法。
[本発明１２２０]
前記免疫細胞含有試料が、前記細胞が投与される対象由来の、または前記細胞が投与されることになる対象とは異なる対象由来の供給源細胞から生成され、任意選択で、前記供給源細胞が、幹細胞であり、任意選択で多能性幹細胞である、本発明１２１６～１２１９のいずれかの方法。
[本発明１２２１]
前記免疫細胞を前記対象に投与する前に、前記細胞がｉｎ　ｖｉｔｒｏで前記バリアントＧ－ＣＳＦまたは追加のサイトカインもしくはケモカインと接触させられる、本発明１２１６の方法。
[本発明１２２２]
前記免疫細胞が、本発明１００１～１０３２のいずれかのシステムのＧ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む前記受容体からのシグナル伝達を活性化するのに十分な時間、前記バリアントＧ－ＣＳＦと接触させられる、本発明１２１６～１２２０のいずれかの方法。
[本発明１２２３]
本発明１１５５～１１８８のいずれかのシステムのＧ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む受容体、ならびに、以下：
（ａ）本発明１１５５～１１８８のいずれかのシステムの、少なくとも１つの追加のサイトカイン及びケモカイン、ならびに
（ｂ）本発明１１５５～１１８８のいずれかのシステムの、少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体
のうちの一方または両方
をコードする細胞と、
使用説明書と
を含む、キットであって、
任意選択で、前記細胞が免疫細胞である、
前記キット。

[本発明１２２４]
（ｉ）本発明１１５５～１１８８のいずれかのシステムのＧ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む受容体、ならびに、以下：
（ａ）少なくとも１つの追加の活性剤であって、任意選択で、前記少なくとも１つの追加の活性剤が、少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質を含み、任意選択で、前記１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質が、本発明１１５５～１１８８のいずれかのシステムの、１つ以上のサイトカイン、ケモカイン、ホルモン、抗体、もしくはこれらの誘導体、または他の親和性試薬を含む、前記少なくとも１つの追加の活性剤、及び
（ｂ）本発明１１５５～１１８８のいずれかのシステムの、少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体
のうちの一方または両方
をコードする１つ以上の核酸配列または発現ベクターと、
（ｉｉ）少なくとも１つのバリアントＧ－ＣＳＦと、
（ｉｉｉ）使用説明書と
を含む、キットであって、
前記受容体ならびに（ａ）及び（ｂ）のうち一方または両方が、同じまたは別の核酸配列または発現ベクター上に位置する、
前記キット。
[本発明１２２５]
（ｉ）本発明１１５５～１１８８のいずれかのシステムのＧ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む受容体、ならびに、以下：
（ａ）少なくとも１つの追加の活性剤であって、任意選択で、前記少なくとも１つの追加の活性剤が、少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質を含み、任意選択で、前記１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質が、本発明１１５５～１１８８のいずれかのシステムの、１つ以上のサイトカイン、ケモカイン、ホルモン、抗体、もしくはこれらの誘導体、または他の親和性試薬を含む、前記少なくとも１つの追加の活性剤、及び
（ｂ）本発明１１５５～１１８８のいずれかのシステムの、少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体
のうちの一方または両方
をコードする１つ以上の核酸配列または発現ベクターを含む細胞と、
（ｉｉ）使用説明書と
を含む、キットであって、
任意選択で、前記キットが、前記Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む前記受容体と特異的に結合するバリアントＧ－ＣＳＦを含む、
前記キット。
[本発明１２２６]
（ｉ）インターロイキン受容体アルファ（ＩＬ－７Ｒα）の細胞外ドメイン（ＥＣＤ）と、
（ｉｉ）膜貫通ドメイン（ＴＭＤ）と、
（ｉｉｉ）配列番号１０９に記載される野生型ヒトＩＬ－７Ｒα細胞内シグナル伝達ドメインとは異なるサイトカイン受容体の細胞内ドメイン（ＩＣＤ）と
を含む、キメラ受容体であって、
前記ＥＣＤ及びＴＭＤがそれぞれ前記ＩＣＤと作動可能に連結している、
前記キメラ受容体。
[本発明１２２７]
前記ＥＣＤのカルボキシ末端（Ｃ末端）が、前記ＴＭＤのアミノ末端（Ｎ末端）に連結し、前記ＴＭＤのＣ末端が、前記ＩＣＤのＮ末端に連結している、本発明１２２６のキメラ受容体。

[本発明１２２８]
前記ＥＣＤが、天然ヒトＩＬ－７ＲαのＥＣＤである、本発明１２２６または１２２７のキメラ受容体。
[本発明１２２９]
前記ＴＭＤが、ＩＬ－７ＲαのＴＭＤである、本発明１２２６～１２２８のいずれかのキメラ受容体。
[本発明１２３０]
前記ＴＭＤが、天然ヒトＩＬ－７ＲαのＴＭＤである、本発明１２２９のキメラ受容体。
[本発明１２３１]
前記ＩＣＤが、サイトカイン受容体の細胞内ドメイン由来の少なくとも１つのシグナル伝達分子結合部位を含み、任意選択で、前記少なくとも１つのシグナル伝達分子結合部位が、
（ａ）ＩＬ－２Ｒβ、ＩＬ－４Ｒα、ＩＬ－７Ｒａ、ＩＬ－２１Ｒ、もしくはｇｐ１３０のＪａｋ１結合部位（Ｂｏｘ１及び２領域）、
（ｂ）ＩＬ－２ＲβのＳＨＣ結合部位、
（ｃ）ＩＬ－２ＲβもしくはＩＬ－７ＲａのＳＴＡＴ５結合部位、
（ｄ）ＩＬ－２１Ｒもしくはｇｐ１３０のＳＴＡＴ３結合部位、
（ｅ）ＩＬ－１２Ｒβ２のＳＴＡＴ４結合部位、
（ｆ）ＩＬ－４ＲαのＳＴＡＴ６結合部位、
（ｇ）ＩＬ－４ＲαのＩＲＳ－１もしくはＩＲＳ－２結合部位、及び
（ｈ）ｇｐ１３０のＳＨＰ－２結合部位、
（ｉ）ＩＬ－７ＲαのＰＩ３Ｋ結合部位、
またはこれらの組み合わせ
を含む、本発明１２２６～１２３０のいずれかのキメラ受容体。
[本発明１２３２]
前記ＩＣＤが、共通のガンマ鎖（ｇｃ）でのヘテロ二量体化によって活性化される受容体の少なくとも細胞内シグナル伝達ドメインを含む、本発明１２２６～１２３１のいずれかのキメラ受容体。
[本発明１２３３]
前記ＩＣＤが、ＩＬ－２Ｒβ（インターロイキン－２受容体ベータ）、ＩＬ－４Ｒα（インターロイキン－４受容体アルファ）、ＩＬ－９Ｒα（インターロイキン－９受容体アルファ）、ＩＬ－１２Ｒ（インターロイキン－１２受容体）、ＩＬ－２１Ｒ（インターロイキン－２１受容体）、及び糖タンパク質１３０（ｇｐ１３０）、ならびにこれらの組み合わせからなる群から選択されるサイトカイン受容体の少なくとも細胞内シグナル伝達ドメインを含む、本発明１２２６～１２３１のいずれかのキメラ受容体。
[本発明１２３４]
ＩＣＤと作動可能に連結したＩＬ－７ＲαのＥＣＤ及びＴＭＤを含む、キメラ受容体であって、
前記ＩＣＤが、
（ｉ）
（ａ）ＩＬ－２ＲβのＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）ＩＬ－２ＲβのＳＨＣ結合部位、及び
（ｃ）ＩＬ－２ＲβのＳＴＡＴ５結合部位、または
（ｉｉ）
（ａ）ＩＬ－７ＲαのＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）ＩＬ－２ＲβのＳＨＣ結合部位、及び
（ｃ）ＩＬ－２ＲβのＳＴＡＴ５結合部位、または
（ｉｉｉ）
（ａ）ＩＬ－２ＲβのＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）ＩＬ－２ＲβのＳＨＣ結合部位、

（ｃ）ＩＬ－２Ｒβの ＳＴＡＴ５結合部位、及び
（ｄ）ＩＬ－１２Ｒβ２のＳＴＡＴ４結合部位、または
（ｉｖ）
（ａ）ＩＬ－７Ｒαの Ｂｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）ＩＬ－２Ｒβの ＳＨＣ結合部位、
（ｃ）ＩＬ－２Ｒβの ＳＴＡＴ５結合部位、及び
（ｄ）ＩＬ－１２Ｒβ２のＳＴＡＴ４結合部位、または
（ｖ）
（ａ）ＩＬ－２１Ｒの Ｂｏｘ１及びＢｏｘ２領域、及び
（ｂ）ＩＬ－２１Ｒの ＳＴＡＴ３結合部位、または
（ｖｉ）
（ａ）ＩＬ－７Ｒαの Ｂｏｘ１及びＢｏｘ２領域、及び
（ｂ）ＩＬ－２１Ｒの ＳＴＡＴ３結合部位、または
（ｖｉｉ）
（ａ）ＩＬ－２１Ｒの Ｂｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）ＩＬ－２１Ｒの ＳＴＡＴ３結合部位、及び
（ｃ）ＩＬ－７Ｒαの ＳＴＡＴ５及びＰＩ３キナーゼ結合部位、
（ｖｉｉｉ）
（ａ）ＩＬ－７Ｒαの Ｂｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）ＩＬ－２１Ｒの ＳＴＡＴ３結合部位、及び
（ｃ）ＩＬ－７Ｒαの ＳＴＡＴ５及びＰＩ３キナーゼ結合部位、
（ｉｘ）
（ａ）ＩＬ－２Ｒβの Ｂｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）ＩＬ－２Ｒβの ＳＨＣ結合部位、
（ｃ）ＩＬ－２Ｒβの ＳＴＡＴ５結合部位、及び
（ｄ）ＩＬ－２１Ｒの ＳＴＡＴ３結合部位、または
（ｘ）
（ａ）ＩＬ－７Ｒαの Ｂｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）ＩＬ－２Ｒβの ＳＨＣ結合部位、
（ｃ）ＩＬ－２Ｒβの ＳＴＡＴ５結合部位、及び
（ｄ）ＩＬ－２１Ｒの ＳＴＡＴ３結合部位、または
（ｘｉ）
（ａ）ＩＬ－２Ｒβの Ｂｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）ＩＬ－２Ｒβの ＳＨＣ結合部位、
（ｃ）ＩＬ－２Ｒβの ＳＴＡＴ５結合部位、
（ｄ）ＩＬ１２Ｒβ２のＳＴＡＴ４結合部位、及び
（ｅ）ＩＬ－２１Ｒの ＳＴＡＴ３結合部位、または
（ｘｉｉ）
（ａ）ＩＬ－７Ｒαの Ｂｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）ＩＬ－２Ｒβの ＳＨＣ結合部位、
（ｃ）ＩＬ－２Ｒβの ＳＴＡＴ５結合部位、
（ｄ）ＩＬ１２Ｒβ２のＳＴＡＴ４結合部位、及び
（ｅ）ＩＬ－２１Ｒの ＳＴＡＴ３結合部位、または
（ｘｉｉｉ）
（ａ）ＩＬ－４Ｒαの Ｂｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）ＩＬ－４Ｒαの ＩＲＳ－１もしくはＩＲＳ－２結合部位、及び
（ｃ）ＩＬ－４Ｒαの ＳＴＡＴ６結合部位、または
（ｘｉｖ）
（ａ）ＩＬ－７Ｒαの Ｂｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）ＩＬ－４αの ＩＲＳ－１もしくはＩＲＳ－２結合部位、及び

（ｃ）ＩＬ－４αのＳＴＡＴ６結合部位、または
（ｘｖ）
（ａ）ｇｐ１３０のＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）ｇｐ１３０のＳＨＰ－２結合部位、及び
（ｃ）ｇｐ１３０のＳＴＡＴ３結合部位、または
（ｘｖｉ）
（ａ）ＩＬ－７αのＢｏｘ１及びＢｏｘ２領域、
（ｂ）ｇｐ１３０のＳＨＰ－２結合部位、及び
（ｃ）ｇｐ１３０のＳＴＡＴ３結合部位
を含む、
前記キメラ受容体。
[本発明１２３５]
（ｂ）が（ｃ）のＮ末端側であるか、または
（ｃ）が（ｂ）のＮ末端側であるか、または
（ｃ）が（ｄ）のＮ末端側であるか、または
（ｄ）が（ｃ）のＮ末端側であるか、または
（ｄ）が（ｅ）のＮ末端側であるか、または
（ｅ）が（ｄ）のＮ末端側である、
本発明１２３４のキメラ受容体。
[本発明１２３６]
前記ＩＣＤが、配列番号８５～１０７のうち少なくとも１つに示す配列に対して少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％同一の配列を含む、前記本発明のいずれかのキメラ受容体。
[本発明１２３７]
前記キメラ受容体の活性型がヘテロ二量体を形成し、任意選択で、前記キメラ受容体の活性化により、前記キメラ受容体を発現する細胞の、増殖、生存能力、持続性、細胞傷害性、サイトカイン分泌、記憶、及び活性増強のうち少なくとも１つを含む細胞応答が、引き起こされ、任意選択で、
前記キメラ受容体が、インターロイキン（ＩＬ）－７に接触すると活性化される、
前記本発明のいずれかのキメラ受容体。
[本発明１２３８]
前記ＩＬ－７が、野生型ヒトＩＬ－７である、本発明１２３７のキメラ受容体。
[本発明１２３９]
前記ＩＬ－７が、野生型ＩＬ－７と比較して１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個の変異を含む、本発明１２３７のキメラ受容体。
[本発明１２４０]
前記ＩＬ－７が１つ以上の化学修飾を含む、本発明１２３７のキメラ受容体。
[本発明１２４１]
前記ＩＬ－７がＰＥＧ化によって修飾されている、本発明１２４０のキメラ受容体。
[本発明１２４２]
前記ＩＬ－７が、前記ＩＬ－７タンパク質のＮ末端またはＣ末端に対するポリエチレングリコール（ＰＥＧ）の薬剤添加によってＰＥＧ化されている、本発明１２４１のキメラ受容体。
[本発明１２４３]
前記キメラ受容体が細胞上で発現する、前記本発明のいずれかのキメラ受容体。
[本発明１２４４]
前記細胞が免疫細胞であり、任意選択で、前記免疫細胞が、
Ｔ細胞であり、任意選択で、

ＮＫ細胞であり、任意選択で、
ＮＫＴ細胞であり、任意選択で、
Ｂ細胞であり、任意選択で、
形質細胞であり、任意選択で、
マクロファージであり、任意選択で、
樹状細胞であり、任意選択で、
前記細胞が幹細胞であり、任意選択で、
前記細胞が初代細胞であり、任意選択で、
前記細胞がヒト細胞である、
本発明１２４３のキメラ受容体。

[本発明１２４５]
前記Ｔ細胞が、ＣＤ８$^{\pm}$Ｔ細胞、細胞傷害性ＣＤ８$^{\pm}$Ｔ細胞、ナイーブＣＤ４$^{\pm}$Ｔ細胞、ナイーブＣＤ８$^{\pm}$Ｔ細胞、ヘルパーＴ細胞、制御性Ｔ細胞、メモリーＴ細胞、及びγδＴ細胞からなる群から選択される、本発明１２４４のキメラ受容体。

[本発明１２４６]
ＩＬ－７による前記受容体の活性化により、前記受容体を発現する細胞の、増殖、生存能力、持続性、細胞傷害性、サイトカイン分泌、記憶、及び活性増強のうち少なくとも１つを含む細胞応答が、引き起こされる、前記本発明のいずれかのキメラ受容体。

[本発明１２４７]
前記本発明のいずれかの受容体をコードする、１つ以上の核酸配列。

[本発明１２４８]
本発明１０２０の核酸配列を含む、１つ以上の発現ベクター。

[本発明１２４９]
本発明１２４７の核酸配列または本発明１２４８の発現ベクターを含む、細胞。

[本発明１２５０]
前記細胞が免疫細胞であり、任意選択で、前記免疫細胞が、
Ｔ細胞であり、任意選択で、
ＮＫ細胞であり、任意選択で、
ＮＫＴ細胞であり、任意選択で、
Ｂ細胞であり、任意選択で、
形質細胞であり、任意選択で、
マクロファージであり、任意選択で、
樹状細胞であり、任意選択で、
前記細胞が幹細胞であり、任意選択で、
前記細胞が初代細胞であり、任意選択で、
前記細胞がヒト細胞である、
本発明１２４９の細胞。

[本発明１２５１]
前記Ｔ細胞が、ＣＤ８$^{\pm}$Ｔ細胞、細胞傷害性ＣＤ８$^{\pm}$Ｔ細胞、ナイーブＣＤ４$^{\pm}$Ｔ細胞、ナイーブＣＤ８$^{\pm}$Ｔ細胞、ヘルパーＴ細胞、制御性Ｔ細胞、メモリーＴ細胞、及びγδＴ細胞からなる群から選択される、本発明１２５０の細胞。

[本発明１２５２]
細胞表面上に発現した受容体を活性化させるためのシステムであって、
（ａ）本発明１２２６～１２４５のいずれかのキメラ受容体、及び
（ｂ）ＩＬ－７
を含む、前記システム。

[本発明１２５３]
免疫細胞を活性化させるためのシステムであって、
（ａ）本発明１２２６～１２４５のいずれかのキメラ受容体、
（ｂ）ＩＬ－７、及び

（ｃ）抗原結合性シグナル伝達受容体
を含む、前記システム。
[本発明１２５４]
免疫細胞を活性化させるためのシステムであって、
（ａ）本発明１２２６～１２４５のいずれかのキメラ受容体、
（ｂ）ＩＬ－７、及び
（ｃ）少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質であって、任意選択で、前記１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質が、１つ以上のサイトカイン、ケモカイン、ホルモン、抗体、もしくはこれらの誘導体、または他の親和性試薬を含む、前記少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質
を含む、前記システム。
[本発明１２５５]
少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体を更に含む、本発明１２５４のシステム。
[本発明１２５６]
前記少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体が、天然のＴ細胞受容体、操作されたＴ細胞受容体（ＴＣＲ）、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、天然のＢ細胞受容体、操作されたＢ細胞受容体（ＢＣＲ）、ストレスリガンド受容体、パターン認識受容体、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される少なくとも１つの受容体を含む、本発明１２５３または１２５５のシステム。
[本発明１２５７]
前記少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体がＣＡＲである、本発明１２５６のシステム。
[本発明１２５８]
前記サイトカインまたはケモカインが、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、インターフェロン－ａ、インターフェロン－ｂ、インターフェロン－ｇ、ＩＬ－１７、ＩＬ－２１、ＴＮＦ－ａ、ＣＸＣＬ１３、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１ａ）、ＣＣＬ４（ＭＩＰ－１ｂ）、ＣＣＬ１９、ＮＫＧ２Ｄ、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、本発明１２５４のシステム。
[本発明１２５９]
前記サイトカインがＩＬ－１８である、本発明１２５８のシステム。
[本発明１２６０]
前記サイトカインがヒトのものである、本発明１２５８または１２５９のシステム。
[本発明１２６１]
細胞の表面上に発現したキメラ受容体を活性化させる方法であって、
前記キメラ受容体を活性化させるために前記キメラ受容体をＩＬ－７と接触させることを含み、
前記キメラ受容体が、
（ｉ）ＩＬ－７Ｒαの細胞外ドメイン（ＥＣＤ）と、
（ｉｉ）膜貫通ドメイン（ＴＭＤ）と、
（ｉｉｉ）配列番号１０９に記載される野生型ヒトＩＬ－７Ｒα細胞内シグナル伝達ドメインとは異なるサイトカイン受容体の細胞内ドメイン（ＩＣＤ）と
を含み、前記ＥＣＤ及びＴＭＤがそれぞれ前記ＩＣＤと作動可能に連結している、
前記方法。
[本発明１２６２]
前記キメラ受容体が、本発明１２２７～１２４５のいずれかのキメラ受容体である、本発明１２５３の方法。
[本発明１２６３]
細胞においてキメラ受容体を産生する方法であって、

前記細胞に、本発明１２４７の核酸配列または本発明１２６２の発現ベクターを導入すること
を含む、前記方法。
[本発明１２６４]
前記配列または前記ベクターの配列を前記細胞のゲノム中へと編集することを更に含む、本発明１２６２の方法。
[本発明１２６５]
前記細胞が免疫細胞であり、任意選択で、前記免疫細胞が、
Ｔ細胞であり、任意選択で、
ＮＫ細胞であり、任意選択で、
ＮＫＴ細胞であり、任意選択で、
Ｂ細胞であり、任意選択で、
形質細胞であり、任意選択で、
マクロファージであり、任意選択で、
樹状細胞であり、任意選択で、
前記細胞が幹細胞であり、任意選択で、
前記細胞が初代細胞であり、任意選択で、
前記細胞がヒト細胞である、
本発明１２６２または１２６３の方法。
[本発明１２６６]
前記Ｔ細胞が、ＣＤ８$^{\pm}$Ｔ細胞、細胞傷害性ＣＤ８$^{\pm}$Ｔ細胞、ナイーブＣＤ４$^{\pm}$Ｔ細胞、ナイーブＣＤ８$^{\pm}$Ｔ細胞、ヘルパーＴ細胞、制御性Ｔ細胞、メモリーＴ細胞、及びγδＴ細胞からなる群から選択される、本発明１２６５の方法。
[本発明１２６７]
その必要がある対象において免疫応答を増加させる方法であって、
本発明１２２６～１２４５のいずれかのキメラ受容体を発現する細胞を、前記対象に投与することと、
ＩＬ－７を前記対象に投与または提供することと
を含む、前記方法。
[本発明１２６８]
その必要がある対象を治療する方法であって、
本発明１２２６～１２４５のいずれかのキメラ受容体を発現する細胞を、前記対象に投与することと、
ＩＬ－７を前記対象に投与または提供することと
を含む、前記方法。
[本発明１２６９]
がんを治療するために使用される、本発明１２６７または１２６８の方法。
[本発明１２７０]
自己免疫疾患を治療するために使用される、本発明１２６７または１２６８の方法。
[本発明１２７１]
炎症状態を治療するために使用される、本発明１２６７または１２６８の方法。
[本発明１２７２]
変性疾患を治療するために使用される、本発明１２６７または１２６８の方法。
[本発明１２７３]
移植のための、天然のまたは操作された細胞、組織、または器官を生成するために使用される、本発明１２６７または１２６８の方法。
[本発明１２７４]
移植片拒絶反応を予防または治療するために使用される、本発明１２６７または１２６８の方法。
[本発明１２７５]

感染性疾患を治療するために使用される、本発明１２６７または１２６８の方法。
[本発明１２７６]
少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質を投与または提供することを更に含み、
任意選択で、前記１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質が、１つ以上のサイトカイン、ケモカイン、ホルモン、抗体、もしくはこれらの誘導体、または他の親和性試薬を含む、
本発明１２６７または１２６８の方法。
[本発明１２７７]
前記対象が、少なくとも１つの追加の別個のキメラ受容体を発現する細胞を投与される、本発明１２６７または１２６８の方法。
[本発明１２７８]
前記少なくとも１つの追加の別個のキメラ受容体が、顆粒球細胞刺激因子受容体（Ｇ－ＣＳＦＲ）のバリアントＥＣＤを含むキメラ受容体である、本発明１２７７の方法。
[本発明１２７９]
Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む前記少なくとも１つの追加の別個のキメラ受容体を発現する前記細胞が、１つ以上のバリアントＧ－ＣＳＦと接触させられ、任意選択で、前記対象が、１つ以上のバリアントＧ－ＣＳＦを投与される、本発明１２７８の方法。
[本発明１２８０]
（ｉ）免疫細胞含有試料を単離することと、
（ｉｉ）前記キメラサイトカイン受容体をコードする核酸配列で前記免疫細胞の形質導入またはトランスフェクションを行うことと、
（ｉｉｉ）（ｉｉ）の前記免疫細胞を前記対象に投与することと、
（ｉｖ）前記免疫細胞をＩＬ－７と接触させることと
を含む、本発明１２７６～１２７９のいずれかの方法。
[本発明１２８１]
前記免疫細胞に、少なくとも１つの追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質をコードする核酸配列を導入することを更に含み、
任意選択で、前記１つ以上の追加のアゴニストまたはアンタゴニストシグナル伝達タンパク質が、１つ以上のサイトカイン、ケモカイン、ホルモン、抗体、もしくはこれらの誘導体、または他の親和性試薬を含む、
本発明１２７７の方法。
[本発明１２８２]
前記少なくとも１つのサイトカインまたはケモカインが、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、インターフェロン－ａ、インターフェロン－ｂ、インターフェロン－ｇ、ＩＬ－１７、ＩＬ－２１、ＴＮＦ－ａ、ＣＸＣＬ１３、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１ａ）、ＣＣＬ４（ＭＩＰ－１ｂ）、ＣＣＬ１９、ＮＫＧ２Ｄ、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、本発明１２８１の方法。
[本発明１２８３]
前記免疫細胞に、少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体をコードする核酸配列を導入することを更に含む、本発明１２８０の方法。
[本発明１２８４]
前記少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体が、天然のＴ細胞受容体、操作されたＴ細胞受容体（ＴＣＲ）、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、天然のＢ細胞受容体、操作されたＢ細胞受容体（ＢＣＲ）、ストレスリガンド受容体、パターン認識受容体、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、本発明１２８３の方法。
[本発明１２８５]
前記細胞を前記対象に投与する前に、前記対象が、免疫除去治療を受けている、本発明１２８０の方法。
[本発明１２８６]

前記免疫細胞含有試料が、前記細胞が投与される対象から単離される、本発明１２８０の方法。

[本発明１２８７]

前記免疫細胞含有試料が、前記細胞が投与されることになる対象とは異なる対象から単離される、本発明１２８０の方法。

[本発明１２８８]

前記免疫細胞含有試料が、前記細胞が投与される対象由来の、または前記細胞が投与されることになる対象とは異なる対象由来の細胞から生成され、任意選択で、前記細胞が、幹細胞であり、任意選択で多能性幹細胞である、本発明１２８０の方法。

[本発明１２８９]

前記免疫細胞を前記対象に投与する前に、前記細胞がｉｎ　ｖｉｔｒｏでＩＬ－７またはバリアントＧ－ＣＳＦのうち一方または両方と接触させられる、本発明１２８０の方法。

[本発明１２９０]

前記免疫細胞が、本発明１２２６～１２４６のいずれかのキメラ受容体からのシグナル伝達を活性化するのに十分な時間、ＩＬ－７またはバリアントＧ－ＣＳＦのうち一方または両方と接触させられる、本発明１２８０の方法。

[本発明１２９１]

前記対象に投与される前記細胞が、天然のＴ細胞受容体、操作されたＴ細胞受容体（ＴＣＲ）、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、天然のＢ細胞受容体、操作されたＢ細胞受容体（ＢＣＲ）、ストレスリガンド受容体、パターン認識受容体、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体を更に発現する、本発明１２６７～１２９０のいずれかの方法。

[本発明１２９２]

前記対象に投与された前記細胞が、Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤを含む受容体を更に発現する、本発明１２６７～１２９１のいずれかの方法。

[本発明１２９３]

前記Ｇ－ＣＳＦＲのバリアントＥＣＤが、サイトＩＩ界面領域における少なくとも１つの変異、サイトＩＩＩ界面領域における少なくとも１つの変異、またはそれらの組み合わせを含む、本発明１２９２の方法。

[本発明１２９４]

前記対象に投与された前記細胞が、ＩＬ－１８を更に発現する、本発明１２６７～１２９１のいずれかの方法。

[本発明１２９５]

本発明１２２６～１２４５のいずれかのキメラ受容体をコードする細胞であって、任意選択で、前記細胞が免疫細胞である、前記細胞と、

使用説明書と

を含む、キットであって、

任意選択で、前記キットがＩＬ－７を含み、任意選択で、任意選択で、前記キットがバリアントＧ－ＣＳＦを含む、

前記キット。

[本発明１２９６]

本発明１２２６～１２４５のいずれかのキメラ受容体をコードする核酸配列を含む１つ以上の発現ベクターと、

使用説明書と

を含む、キットであって、

任意選択で、前記キットがＩＬ－７を含み、任意選択で、前記キットがバリアントＧ－ＣＳＦを含む、

前記キット。

[本発明１２９７]

ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、インターフェロン－ａ、インターフェロン－ｂ、インターフェロン－ｇ、ＩＬ－１７、ＩＬ－２１、ＴＮＦ－ａ、ＣＸＣＬ１３、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１ａ）、ＣＣＬ４（ＭＩＰ－１ｂ）、ＣＣＬ１９、ＮＫＧ２Ｄ、及びこれらの組み合わせからなる群から選択されるサイトカインまたはケモカインをコードする１つ以上の発現ベクターを更に含む、本発明１２９６のキット。

[本発明１２９８]

天然のＴ細胞受容体、操作されたＴ細胞受容体（ＴＣＲ）、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、天然のＢ細胞受容体、操作されたＢ細胞受容体（ＢＣＲ）、ストレスリガンド受容体、パターン認識受容体、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される少なくとも１つの受容体をコードする１つ以上の発現ベクターを更に含む、本発明１２９６のキット。

[本発明１２９９]

キメラ抗原受容体をコードする発現ベクターを更に含む、本発明１２９８のキット。

[本発明１３００]

前記細胞が、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、インターフェロン－ａ、インターフェロン－ｂ、インターフェロン－ｇ、ＩＬ－１７、ＩＬ－２１、ＴＮＦ－ａ、ＣＸＣＬ１３、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１ａ）、ＣＣＬ４（ＭＩＰ－１ｂ）、ＣＣＬ１９、ＮＫＧ２Ｄ、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される少なくとも１つのサイトカインまたはケモカインをコードする１つ以上の発現ベクターを更に含む、本発明１２９５のキット。

[本発明１３０１]

前記細胞が、少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体をコードする１つ以上の発現ベクターを更に含む、本発明１２９５のキット。

[本発明１３０２]

前記少なくとも１つの抗原結合性シグナル伝達受容体が、天然のＴ細胞受容体、操作されたＴ細胞受容体（ＴＣＲ）、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、天然のＢ細胞受容体、操作されたＢ細胞受容体（ＢＣＲ）、ストレスリガンド受容体、パターン認識受容体、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、本発明１３０１のキット。

[本発明１３０３]

前記細胞が、少なくとも１つのＣＡＲをコードする１つ以上の発現ベクターを更に含む、本発明１３０２のキット。

【手続補正２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０１６２
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０１６２】
【図７５】（Ａ）ＧＩＦＮＧＲ－１　３０７　ＥＣＤ、（Ｂ）Ｇ２Ｒ３　１３４　ＥＣＤ、（Ｃ）ＧＩＦＮＧＲ－１　３０７　ＥＣＤ、及びＧ２Ｒ３　１３４　ＥＣＤ、または（Ｄ）非形質導入Ｔ細胞で形質導入されたヒトＰＢＭＣ由来Ｔ細胞の表面におけるＭｙｃタグ及びＦｌａｇタグの発現を示すフローサイトメトリーデータを表す。Ｇ２Ｒ３　１３４　ＥＣＤは、そのＮ末端にＭｙｃエピトープをタグ付けされ（ＥＱＫＬＩＳＥＥＤＬ）（配列番号２２７）、ＧＩＦＮＧＲ－１　３０７　ＥＣＤは、そのＮ末端にＦｌａｇエピトープをタグ付けされ（ＤＹＫＤＤＤＤＫ）（配列番号２２８）、これらのエピトープタグは、フローサイトメトリーによる検出を補助し、受容体の機能には影響を与えない。ＣＤ３＋細胞でプロットをゲートした。
【手続補正３】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０１６３
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０１６３】

【図７６】（Ａ）ＧＩＦＮＧＲ－２　３０７　ＥＣＤ、（Ｂ）Ｇ２Ｒ３　１３４　ＥＣＤ、（Ｃ）ＧＩＦＮＧＲ－２　３０７　ＥＣＤ、及びＧ２Ｒ３　１３４　ＥＣＤ、または（Ｄ）非形質導入Ｔ細胞で形質導入されたヒトＰＢＭＣ由来Ｔ細胞の表面におけるＭｙｃタグ及びＦｌａｇタグの発現を示すフローサイトメトリーデータを表す。Ｇ２Ｒ３　１３４　ＥＣＤは、そのＮ末端にＭｙｃエピトープをタグ付けされ（ＥＱＫＬＩＳＥＥＤＬ）（配列番号２２７）、ＧＩＦＮＧＲ－２　３０７　ＥＣＤは、そのＮ末端にＦｌａｇエピトープをタグ付けされ（ＤＹＫＤＤＤＤＫ）（配列番号２２８）、これらのエピトープタグは、フローサイトメトリーによる検出を補助し、受容体の機能には影響を与えない。ＣＤ３＋細胞でプロットをゲートした。

【手続補正４】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】０２５７

【補正方法】変更

【補正の内容】

【０２５７】

【表１】

表１：ヒトWT　G－CSF及びヒトWT　G－CSFR　Ig－CRHドメインの配列

タンパク質	Uniprot ID	残基番号	ポリペプチド配列	配列番号
G－CSF	A0A0B4U5E3	1－174	TPLGPASSLPQSFLLKCLEQ VRKIQGDGAALQEKLCATYK LCHPEELVLLGHSLGIPWAP LSSCPSQALQLAGCLSQLHS GLFLYQGLLQALEGISPELG PTLDTLQLDVADFATTIWQQ MEELGMAPALQPTQGAMPAF ASAFQRRAGGVLVASHLQSF LEVSYRVLRHLAQP	1
E．coliで組換え産生されたヒトG－CSF			MTPLGPASSLPQSFLLKCL EQVRKIQGDGAALQEKLCAT YKLCHPEELVLLGHSLGIPW APLSSCPSQALQLAGCLSQL HSGLFLYQGLLQALEGISPE LGPTLDTLQLDVADFATTIW QQMEELGMAPALQPTQGAMP AFASAFQRRAGGVLVASHLQ SFLEVSYRVLRHLAQP	229
G－CSFR（Ig－CRH）	Q99062	Ig：1－97 CRH：98－308	EECGHISVSAPIVHLGDPIT ASCIIKQNCSHLDPEPQILW RLGAELQPGGRQQRLSDGTQ ESIITLPHLNHTQAFLSCSL NWGNSLQILDQVELRAGYPP AIPHNLSCLMNLTTSSLICQ WEPGPETHLPTSFTLKSFKS RGNCQTQGDSILDCVPKDGQ SHCSIPRKHLLLYQNMGIWV QAENALGTSMSPQLCLDPMD VVKLEPPMLRTMDPSPEAAP PQAGCLQLSWEPWQPGLHIN QKCELRHKPQRGEASWALVG PLPLEALQYELCGLLPATAY TLQIRCIRWPLPGHWSDWSP SLELRTTE	2

【手続補正５】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０２９３
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０２９３】
バリアント受容体、または野生型もしくはバリアントＩＬ－７、もしくはバリアントＧ－ＣＳＦは、組み換えにより直接生成されるだけでなく、異種ポリペプチド、例えば、シグナル配列、または成熟タンパク質もしくはポリペプチドのＮ末端に特定の切断部位を有

する他のポリペプチドとの融合ポリペプチドとしても生成されてもよい。一般に、シグナル配列は、ベクターの構成要素であっても、ベクターに挿入されるコード配列の一部であってもよい。選択された異種シグナル配列は、好ましくは、宿主細胞によって認識及びプロセシングされる（すなわち、シグナルペプチダーゼによって切断される）ものである。哺乳動物細胞の発現では、天然シグナル配列が使用されても、他の哺乳動物のシグナル配列、例えば、同じ種または関連種の分泌ポリペプチド由来のシグナル配列、及びウイルス分泌リーダーが適していてもよい。特定の態様では、シグナル配列は、配列番号２、３、６、または８のＮ末端領域にシグナル配列を含むアミノ酸配列であり得る。特定の態様では、シグナル配列は、ＭＴＩＬＧＴＴＦＧＭＶＦＳＬＬＱＶＶＳＧ（配列番号１９０）のアミノ酸配列であり得る。特定の態様では、シグナル配列は、ＭＡＲＬＧＮＣＳＬＴＷＡＡＬＩＩＬＬＬＰＧＳＬＥ（配列番号１１）のアミノ酸配列であり得る。

【手続補正６】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０３８４
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０３８４】
方法

簡単に言えば、サイトＩＩ　Ｇ－ＣＳＦデザイン及び対応するペアのＧ－ＣＳＦＲ（ＣＲＨ）変異体は、昆虫細胞トランスフェクションベクターに別々にクローニングした。Ｇ－ＣＳＦ　ＷＴ（残基１－１７３、表１）及び変異体を、Ｎ末端分泌シグナル及びＣ末端ＴＥＶ切断可能Ｔｗｉｎ　Ｓｔｒｅｐタグ（配列
AAA**ENLYFQ/G**SA**WSHPQFEK**GGGSGGGSGGSA**WSHPQFEK**（配列番号２３０）

を有する）がインフレームに存在する修飾ｐＡｃＧＰ６７ｂトランスファーベクター（Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ）にクローニングした。受容体細胞外ドメインの中では、サイトＩＩデザイン変異体を有するＣＲＨドメイン（残基９８－３０８、表１）のみが、Ｎ末端分泌シグナル及び配列
HHHHHHSSG**RENLYFQ/G**SMG（配列番号２３１）

切断可能ヘキサヒスチジンタグがインフレームに存在する修飾ｐＡｃＧＰ６７ｂトランスファーベクターにクローニングされた。すべてのコンストラクトを合成し、昆虫細胞の発現のためにコドンを最適化した（Ｇｅｎｓｃｒｉｐｔ）。トランスファーベクターＤＮＡは、Ｍｉｄｉ－ｐｒｅｐ（ＴｈｅｒｍｏＳｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，ｃａｔ．Ｋ０４８１）により調製し、エンドトキシンを含まず、$A_{260/280}$吸光度比が１．８～２．０であった。組換えウイルス生成は、製造元（Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ）の説明に従って付着法を用いて、組換え、線状化バキュロウイルスＤＮＡとベクターＤＮＡを、Ｓｐｏｄｏｐｔｅｒａ　ｆｒｕｇｉｐｅｒｄａ　９（Ｓｆ９）細胞に、共トランスフェクションすることにより達成された。トランスフェクションの約１時間前に、0.46×10^{6}細胞ml^{-1}で、健康な対数期Ｓｆ９細胞２ｍＬを６ウェル組織培養プレート（Ｇｒｅｉｎｅｒ，ｃａｔ．６５７－１６０）のウェルごとに播種した。トランスフェクション混合物は以下のように調製した：１００μｌのトランスフェクション培地（Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ，ｃａｔ．９５－０２０－１００）を２本の滅菌１．５ｍｌマイクロチューブＡ及びＢのそれぞれに入れた。チューブＡには、０．４μｇの組換えＢｅｓｔＢａｃ　２．０Δ　ｖ－ｃａｔｈ／ｃｈｉＡ線状化ＤＮＡ（Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ，ｃａｔ．９１－００２）及び２μｇのベクターＤＮＡを加えた。チューブＢには、１．２μｌの５ＸのＥｘｐｒｅｓｓ^{2}ＴＲトランスフェクション試薬（Ｅｘｐｒｅｓ２ＩＯＮ，ｃａｔ．Ｓ２－５５Ａ－００１）を添加した。溶液Ａ及び溶液Ｂを約２４℃で５分間インキュベートした後、それらを合わせて、３０分間インキュベートした。インキュベーシ

ョン後、８００μｌのトランスフェクション培地を各トランスフェクション反応物に加え、容量を１ｍｌまで増加させた。古いＥＳＦ９２１培地をウェルから取り除き、細胞の単層を乱さないように滴下して１ｍＬのトランスフェクション混合液で置換した。プレート（複数可）を前後左右に穏やかに揺り動かして、トランスフェクション混合物を均一に分散させ、２７℃で４時間インキュベートした。４時間後、トランスフェクション混合物を共トランスフェクションプレート（複数可）から取り出し、ゲンタマイシンを１０μｇ／ｍｌ（ｃａｔ．１５７５０－０６０）で含有する２ｍＬの新鮮なＥＳＦ９２１昆虫細胞培養培地（Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ、ｃａｔ．９６－００１－０１）を滴下して加えた。蒸発を防ぐため、プレートをサランラップで包み、滅菌プラスチックボックスに入れ、２７℃で４～５日間インキュベートした。トランスフェクション後４日目または５日目に、Ｐ１上清を収集し、５０００ｒｐｍで５分間遠心分離して清澄化し、新しい滅菌チューブに移し、光から保護して４℃で保存した。

【手続補正７】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０６２６
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０６２６】
ヒトＴ細胞を、ＧＩＦＮＧＲ－１　３０７　ＥＣＤまたはＧＩＦＮＧＲ－２　３０７　ＥＣＤをコードするレンチウイルスベクターで形質導入した。更に、一部のＴ細胞は、ＧＩＦＮＧＲ－１　３０７　ＥＣＤ及びＧ２Ｒ－３　１３４　ＥＣＤ、またはＧＩＦＮＧＲ－２　３０７　ＥＣＤ及びＧ２Ｒ－３　１３４　ＥＣＤをコードするレンチウイルスベクターで共形質導入した。Ｇ２Ｒ－３　１３４　ＥＣＤは、Ｎ末端にＭｙｃエピトープ（ＥＱＫＬＩＳＥＥＤＬ）（配列番号２２７）をタグ付けされ、ＧＩＦＮＧＲ－１　３０７　ＥＣＤ及びＧＩＦＮＧＲ－２　３０７　ＥＣＤは、Ｎ末端にＦｌａｇエピトープ（ＤＹＫＤＤＤＤＫ）（配列番号２２８）をタグ付けされ、異なる受容体サブユニットがフローサイトメトリーによって識別されることが可能となった。

【手続補正８】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０６７９
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０６７９】
実施例４９：ＩＬ－７α受容体サブユニットからの細胞外ドメイン及び膜貫通ドメイン、ならびにＩＬ－２／ＩＬ－１５受容体βサブユニットからの細胞内ドメインを有するキメラ受容体の構築及び発現
ヒトＩＬ－２／ＩＬ－１５受容体βサブユニットの細胞内ドメインに融合したヒトＩＬ－７受容体αサブユニットの細胞外及び膜貫通ドメインを含む、７／２Ｒ－１と称されるキメラ受容体（図９２及び９３）が合成された。ＩＬ－７受容体αサブユニットは、そのＮ末端に標準Ｆｌａｇエピトープ（ＤＹＫＤＤＤＤＫ）（配列番号２２８）をタグ付けされ、同じくＴ細胞によって発現されることの多い天然のＩＬ－７受容体αサブユニットからこのキメラ受容体サブユニットを区別することが可能となった。キメラ受容体サブユニットは、ヒトＣＤ４＋及びＣＤ８＋Ｔ細胞に形質導入するために使用されるレンチウイルスベクター中でコードされた。１２日後、形質導入された細胞（及び非形質導入の対照細胞）をフローサイトメトリーで分析して、天然のＩＬ－７受容体αサブユニットと比較したキメラ受容体サブユニットの発現を検出した。

【手続補正９】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０７７９
【補正方法】変更

【補正の内容】
【０７７９】
【表１６】

表１６：Ｂｏｘ１及びサイトカイン受容体ＩＣＤ上のその他の結合部位

ネイティブＩＣＤ	Ｂｏｘ　１（ソース）	Ｓｈｃ	ＳＨＰ－２	ＳＴＡＴ５	ＳＴＡＴ４	ＳＴＡＴ３	ＳＴＡＴ１	ＰＩ３Ｋ
Ｇ－ＣＳＦＲ	ＬＷＰＳＶＰＤＰＡ(配列番号232)（Ｑ９９０６２）	該当なし	該当なし	該当なし	該当なし	Ｙ７０４	該当なし	該当なし
ｇｐ１３０	ＩＷＰＮＶＰＤＰＳ(配列番号233)（Ｐ４０１８９）	該当なし	Ｙ７５９	該当なし	該当なし	Ｙ７６７	該当なし	該当なし
ＩＬ－２Ｒβ	ＬＫＣＮＴＰＤＰＳ(配列番号234)（Ｐ１４７８４）	Ｙ３３８	該当なし	Ｙ３９２，Ｙ５１０	該当なし	Ｙ３９２，Ｙ５１０	Ｙ３９２，Ｙ５１０	該当なし
ＩＬ－２１Ｒ	ＫＩＷＡＶＰＳＰＥ(配列番号235)（Ｑ９ＨＢＥ５）	該当なし	該当なし	該当なし	該当なし	Ｙ５１０	Ｙ５１０	該当なし
ＩＬ－１２Ｒβ$_2$	ＣＳＲＥＩＰＤＰＡ(配列番号236)（Ｑ９９６６５）	該当なし	該当なし	Ｙ８００	Ｙ８００	Ｙ８００	該当なし	該当なし
ＩＬ－７Ｒα	ＶＷＰＳＬＰＤＨＫ(配列番号237)（Ｐ１６８７１）	該当なし	該当なし	Ｙ４４９	該当なし	該当なし	該当なし	Ｙ４４９

【手続補正１０】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０７９３
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０７９３】

【表３０】

表３０：サイトカイン、ケモカイン、及びその他のシグナル伝達タンパク質：

サイトカイン	Uniprot ID	ポリペプチド配列	配列番号
hIL-18: シグナルペプチドは下線付き	Q14116	MAAEPVEDNCINFVAMKFIDNTLYFIAEDDENLESDYFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISMYKDSQPRGMAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRSVPGHDNKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNED	102
hCXCL13: シグナルペプチドは下線付き	Q52X90	MKFISTSLLLMLLVSSLSPVQGVLEVYYTSLRCRCVQESSVFIPRRFIDRIQILPRGNGCPRKEIIVWKKNKSIVCVDPQAEWIQRMMEVLRKRSSSTLPVPVFKRKIP	103
hIL-21: シグナルペプチドは下線付き	Q9HBE4	MRSSPGNMERIVICLMVIFLGTLVHKSSSQGQDRHMIRMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVSIKKLKRKPPSTNAGRRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSSRTHGSEDS	104
hCCL3: シグナルペプチドは下線付き	P10147	MQVSTAALAVLLCTMALCNQFSASLAADTPTACCFSYTSRQIPQNFIADYFETSSQCSKPGVIFLTKRSRQVCADPSEEWVQKYVSDLELSA	105
hCCL4: シグナルペプチドは下線付き	P13236	MKLCVTVLSLLMLVAAFCSPALSAPMGSDPPTACCFSYTARKLPRNFVVDYYETSSLCSQPAVVFQTKRSKQVCADPSESWVQEYVYDLELN	106
hCCL19: シグナルペプチドは下線付き	Q99731	MALLLALSLLVLWTSPAPTLSGTNDAEDCCLSVTQKPIPGYIVRNFHYLLIKDGCRVPAVVFTTLRGRQLCAPPDQPWVERIIQRLQRTSAKMKRRSS	107
hIFNγ: シグナルペプチドは下線付き	P01579	MKYTSYILAFQLCIVLGSLGCYCQDPYVKEAENLKKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQRKAIHELIQVMAELSPAAKTGKRKRSQMLFRGRRASQ	108
hIFNα-1/13: シグナルペプチドは下線付き	P01562	MASPFALLMVLVVLSCKSSCSLGCDLPETHSLDNRRTLMLLAQMSRISPSSCLMDRHDFGFPQEEFDGNQFQKAPAISVLHELIQQIFNLFTTKDSSAAWDEDLLDKFCTELYQQLNDLEACVMQEERVGETPLMNADSILAVKKYFRRITLYLTEKKYSPCAWEVVRAEIMRSLSLSTNLQERLRRKE	109
hIL-17: シグナルペプチドは下線付き	Q16552	MTPGKTSLVSLLLLLSLEAIVKAGITIPRNPGCPNSEDKNFPRTVMVNLNIHNRNTNTNPKRSSDYYNRSTSPWNLHRNEDPERYPSVIWEAKCRHLGCINADGNVDYHMNSVPIQQEILVLRREPPHCPNSFRLEKILVSVGCTCVTPIVHHVA	110
hTNF-α: 膜結合部分は下線付き	P01357	MSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFLIVAGATTLFCLLHFGVIGPQREEFPRDLSLISPLAQAVRSSSRTPSDKPVAHVVANPQAEGQLQWLNRRANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGQGCPSTHVLLTHTISRIAVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL	215
hNKG2-D: ICD-TM-ECD	P26718	MGWIRGRRSRHSWEMSEFHNYNLDLKKSDFSTRWQKQRCPVVKSKCRENASPFFFCCFIAVAMGIRFIIMVAIWSAVFLNSLFNQEVQIPLTESYCGPCPKNWICYKNNCYQFFDESKNWYESQASCMSQNASLLKVYSKEDQDLLKLVKSYHWMGLVHIPTNGSWQWEDGSILSPNLLTIIEMQKGDCALYASSFKGYIENCSTPNTYICMQRTV	216

【手続補正１１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０７９４
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０７９４】

【表３１】

表３１：制御されたパラクリンシグナル伝達（ＣＰＳ）の例示的構築物のＤＮＡ配列

遺伝子	参照配列ＩＤ	残基番号	ＤＮＡ配列	配列番号
ＣＡＲ＿Ｐ２Ａ＿Ｇ１２－２Ｒ１－１３４＿Ｔ２Ａ＿ｈＩＬ－１８		１－４７５８	ＣＣＣＧＣＣＡＧＧＡＴＣＣＴＧＡＣＧＣＧＴＡＴＧＧＴＧＣＴＧＣＴＧＧＴＣＡＣＣＡＧＣＴＴＡＣＴＣＣＴＧＴＧＣＧＡＧＣＴＣＣＣＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＴＴＣＴＴＧＣＴＧＡＴＣＣＣＣＧＡＣＡＴＣＣＡＧＣＡＧＧＴＧＣＡＧＣＴＧＣＡＡＣＡＧＴＣＧＧＧＣＣＣＣＧＡＧＴＴＡＧＡＡＡＡＡＣＣＣＧＧＣＧＣＣＴＣＣＧＴＧＡＡＧＡＴＣＴＣＧＴＧＴＡＡＡＧＣＴＴＣＧＧＧＣＴＡＣＴＣＧＴＴＴＡＣＣＧＧＣＴＡＣＡＣＣＡＴＧＡＡＴＴＧＧＧＴＴＡＡＧＣＡＧＡＧＣＣＡＴＧＧＡＡＡＧＴＣＴＣＴＴＧＡＡＴＧＧＡＴＡＧＧＣＣＴＧＡＴＴＡＣＧＣＣＴＴＡＴＡＡＴＧＧＧＧＣＣＴＣＧＡＧＣＴＡＣＡＡＣＣＡＧＡＡＡＴＴＴＣＧＴＧＧＴＡＡＧＧＣＡＡＣＴＣＴＧＡＣＴＧＴＡＧＡＣＡＡＧＴＣＧＴＣＣＴＣＣＡＣＣＧＣＡＴＡＣＡＴＧＧＡＴＣＴＴＣＴＧＡＧＣＣＴＡＡＣＣＴＣＡＧＡＡＧＡＣＡＧＣＧＣＡＧＴＣＴＡＣＴＴＣＴＧＣＧＣＣＣＧＴＧＧＴＧＧＴＴＡＣＧＡＴＧＧＣＣＧＣＧＧＡＴＴＣＧＡＣＴＡＴＴＧＧＧＧＣＣＡＧＧＧＣＡＣＣＡＣＣＧＴＣＡＣＣＧＴＧＡＧＣＴＣＣＧＧＣＧＧＧＴＧＧＣＧＧＧＧＴＣＣＧＧＴＧＧＣＧＧＧＣＧＧＣＴＣＡＡＧＣＧＧＡＧＧＡＧＧＴＡＧＴＧＡＣＡＴＣＧＡＧＴＴＧＡＣＣＣＡＧＴＣＧＣＣＴＧＣＣＡＴＣＡＴＧＴＣＣＧＣＡＴＣＣＣＣＣＧＧＣＧＡＧＡＡＧＧＴＧＡＣＧＡＴＧＡＣＧＴＧＴＴＣＴＧＣＴＴＣＣＡＧＣＴＣＴＧＴＡＴＣＧＴＡＣＡＴＧＣＡＣＴＧＧＴＡＣＣＡＡＣＡＧＡＡＧＴＣＣＧＧＣＡＣＣＴＣＣＣＣＣＡＡＧＣＧＴＴＧＧＡＴＣＴＡＣＧＡＣＡＣＴＴＣＣＡＡＧＣＴＧＧＣＧＴＣＴＧＧＣＧＴＣＣＣＴＧＧＧＣＧＣＴＴＴＴＴＣＡＧＧＴＡＧＣＧＧＧＧＴＣＣＧＧＣＡＡＴＡＧＣＴＡＴＴＣＣＴＴＧＡＣＧＡＴＣＡＧＴＡＧＣＧＴＧＧＡＧＧＣＴＧＡＧＧＡＴＧＡＴＧＣＣＡＣＣＴＡＣＴＡＣＴＧＣＣＡＧＣＡＧＴＧＧＡＧＣＡＡＧＣＡＣＣＣＧＣＴＣＡＣＣＴＴＣＧＧＣＧＣＣＧＧＧＡＣＣＡＡＧＣＴＴＧＡＡＡＴＣＡＡＧＧＣＧＧＧＣＧＧＣＧＡＴＣＧＡＧＧＴＧＡＴＧＴＡＴＣＣＴＣＣＴＣＣＣＴＡ	217

			CCTGGACAACGAGAAATCCAATGG CACTATCATCCACGTGAAGGGGAA GCACCTGTGCCCGAGCCCCCTGTT CCCCGGCCCTTCCAAGCCTTTTTG GGTGCTTGTTGTGGTCGGCGGCGT GCTGGCCTGCTACTCTCTGCTGGT AACCGTAGCGTTCATCATCTTCTG GGTGCGATCTAAGCGGTCCCGGCT GTTGCACAGTGACTACATGAACAT GACCCCGCGCCGCCCCGGCCCAAC CCGCAAGCACTACCAGCCGTACGC TCCACCTCGCGACTTTGCCGCCTA CAGGTCGCGAGTGAAATTTTCGCG CTCCGCGGACGCGCCGGCCTATCA GCAGGGCCAGAACCAGCTTTACAA CGAGTTGAACCTCGGGGCGCAGGGA GGAGTACGACGTGCTGGATAAACG TAGAGGTCGGGACCCGGAGATGGG CGGCAAACCACGCCGCAAGAACCC TCAGGAAGGCCTGTACAACGAGCT CCAGAAGGACAAAATGGCTGAGGC GTACTCGGAGATTGGGATGAAAGG CGAGCGGCGCCGCGGCAAGGGCCA CGATGGCCTGTACCAGGGGCTATC TACCGCTACAAAGGACACCTACGA CGCCCTACATATGCAGGCCCTGCC ACCGCGTGGCTCTGGCGCAACCAA CTTCTCGCTTCTGAAGCAGGCCGG TGATGTGGAGGAAAACCCCAGGTCC TATGGCCCGCCTGGGCAACTGCTC GCTGACCTGGGCGGCCCTGATCAT CCTGCTGCTGCCCGGCTCTCTGGA GGAGTGTGGCCATATTTCCGTGTC AGCTCCAATCGTGCACCTGGGCGA CCCCATCACCGCTTCTTGCATCAT CAAGCAGAACTGCTCTCACCTCGA CCCTGAGCCCCAAATACTTTGGGA GCTGGGCGCGGAGCTCCAGCCTGG AGGACGCCAGCAGCGTTTGTCAGA CGGCACTCAGGAATCCATCATCAC CCTCCCACATCTGAATCACACCCA GGCGT	

10

20

30

40

50

			TCCTGTCTTGTTGTCTCAACTGG GGCAACTCCTTGCAGATACTGGA CCAGGTGGAGCTGAGAGCTGGCT ATCCCCCGGCAATTCCTCACAAC CTGTCCTGTCTGATGAACCTGAC CACCTCCAGTCTGATCTGTCAGT GGGAGCCCGGGCCAGAGACTCAC CTTCCCACCAGCTTCACCCTTAA GTCGTTCAAATCCGAGGGCAACT GCCAGACCCAGGGTGATTCTATT TTGGATTGCGTGCCCAAGGACGG GCAGTCTCACTGTTGTATTCCCG ACAAGCACCTCCTTTTATACCAG AATATGGGCATCTGGGTGCAGGC CGAGAATGCCCTGGGAACGTCTA TGTCTCCACAGCTATGCCTGGAT CCAATGGACGTAGTGAAGCTGGA GCCCCCCATGCTACGCACTATGG ATCCTAGCCCAGAGGCCGCTCCC CCTCAGGCGGGGTGCCTGCAGCT TTGTTGGGAACCCTGGCAACCCG GGTTGCACATTAACCAGAAGTGC GAGCTGCGCCACAAGCCCCAGAG AGGAGAGGCCTCCTGGGCCCTCG TGGGCCCTCTGCCGTTGGAGGCC TTGCAGTATGAGCTGTGCGGCCT CTTGCCCGCTACAGCTTATACTC TGCAAATCAGGTGTATTCGCTGG CCTTTGCCCGGACACTGGTCCGA CTGGTCCCCCCAGCCTTGAGCTGA GAACCACGGAGCGCGCCCCCACC GTACGCTTGGACACCTGGTGGCG CCAGAGGCAGCTGGACCCTCGCA CTGTGCAGCTGTTCTGGAAGCCG GTGCCCCTGG	

			AGGAGGACTCCGGACGCATCCAG GGCTACGTGGTCAGCTGGCGTCC GAGTGGGCAGGCCGGGGCCATCC TGCCCCTGTGCAACACGACTGAG CTGAGCTGCACTTTCCATCTGCC CAGCGAGGCTCAGGAGGTGGCGC TCGTGGCTTACAACTCCGCAGGC ACTTCTCGCCCAACCCCCGTGGT GTTCTCTGAGAGTCGGGGCCCCG CCCTGACGCGCCTTCACGCCATG GCGCGCGACCCGCATTCCCTTTG GGTCGGTTGGGAGCCACCTAACC CATGGCCGCAGGGCTACGTGATC GAGTGGGGCCTGGGCCCCCCGAG CGCATCGAACAGCAACAAGACCT GGAGAATGGAACAGAACGGCCGC GCAACCGGCTTCCTATTAAAGGA GAACATCCGCCCGTTCCAGCTGT ACGAGATCATCGTGACACCGCTG TACCAGGACACTATGGGGCCTTC TCAGCACGTTTACGCCTACTCCC AGGAGATGGCCCCGAGCCACGCA CCGGAACTGCACCTAAAGCACAT CGGTAAGACCTGGGCACAGCTCG AGTGGGTCCCCGAGCCTCCCGAG CTAGGCAAGTCGCCGCTGACCCA TTACACCATCTTCTGGACCAACG CGCAGAACCAGTCCTTTAGCGCG ATCCTCAATGCCTCCTCCCGCGG TTTCGTCTTGCACGGGCTGGAGC CAGCCTCCTTATACCACATCCAC CTGATGGCGGCTTCCCAGGCTG	

			GTGCTACCAACAGCACAGTTTT GACACTGATGACCCTGACCCCC GAGGGCTCGGAGCTCCACATCA TTTTGGGACTCTTCGGACTGCT GCTGCTGCTGACCTGCCTGTGC GGCACTGCTTGGCTCTGCTGTT CTCCCAACCGCAAGAACCCTCT TTGGCCCTCTGTCCCTGACCCG GCCCATTCTAGCCTGGGATCTT GGGTCCCGACCATCATGGAAGA AGACGCGTTCCAGCTCCCTGGG CTGGGCACCCCTCCGATCACGA AGCTCACGGTCCTGGAGGAGGA CGAGAAGAAGCCCGTACCGTGG GAGAGCCACTCCTCGAATCATA GCCTAACCTCCTGCTTTACAAA CCAGGGGTATTTTTTTTTCCAC TTGCCCGACGCTCTGGAGATCG AGGCCTGCCAGGTGTACTTCAC CTACGACCCCTACAGCGAGGAG GACCCTGCCGGTGATCTGCCCA CCCATGACGGCTATCTGCCATC AAACATTGACGACCTGCCGTCC GGAGGTCCCAGTCCTCCGTCCA CCGCCCCCGGCGGTTCTGGTGC CGGCGAAGAACGGATGCCTCCC TCCCTGCAGGAGCGTGTGCCAC GGGATTGGGACCCACAGCCCTT AGGGCCGCCTACCCCCGGCGTG CCCGACCTCGTCGATTTCCAGC CGCCTCCTGAGCTGGTTCTCCG AGAGGCAGGAGAGGAGGTGCCT GATGCTGGACCCCGTGAGGGCG TGAGCTTTCCTTGGTCTCGCCC GCCAGGAC	

			AGGGGGAGTTCCGTGCTCTCAA CGCGCGTCTGCCGTTGAACACT GATGCATACCTCAGTCTTCAGG AGCTGCAGGGCCAGGATCCAAC CCACCTCGTTGGCTCAGGGGAA GGTCGCGGCTCGCTGTTGACGT GTGGTGACGTGGAGGAGAACCC CGGCCCCGTACTTCGGTAAGCTG GAGTCTAAACTGTCGGTGATAC GGAACCTGAACGACCAGGTCCT GTTCATTGACCAGGGTAACCGC CCGCTGTTCGAGGACATGACTG ACTCCGATTGCCGCGACAATGC CCCCCGCACGATCTTCATTATC TCCATGTACAAGGATAGCCAAC CCCGTGGTATGGCCGTGACCAT TAGCGTCAAATGTGAGAAGATC TCTACTCTGTCCTGTGAGAATA AGATTATCTCCTTCAAGGAGAT GAACCCCCCTGATAACATCAAA GACACTAAATCGGACATCATTT TCTTTCAGAGGAGCGTGCCAGG CCACGACAACAAGATGCAGTTC GAGAGTTCTAGTTACGAGGGAT ATTTCCTGGCCTGCGAAAAAGA ACGTGACCTCTTCAAGCTAATC CTGAAGAAGGAGGACGAGCTCG GTGACAGGAGCATCATGTTTAC TGTCCAAAACGAGGACTGA	

10

20

30

40

50

Ｋｏｚａｋを含む５’上流配列		１－２１	ＣＣＣＧＣＣＡＧＧＡＴＣＣＴＧＡＣＧＣＧＴ	218
メソテリンＣＡＲ	該当なし	２２－１４８２	ＡＴＧＧＴＧＣＴＧＣＴＧＧＴＣＡＣＣＡＧＣＴＴＡ ＣＴＣＣＴＧＴＧＣＧＡＧＣＴＣＣＣＣＣＡＴＣＣＴ ＧＣＧＴＴＣＴＴＧＣＴＧＡＴＣＣＣＣＧＡＣＡＴＣ ＣＡＧＣＡＧＧＴＧＣＡＧＣＴＧＣＡＡＣＡＧＴＣＧ ＧＧＣＣＣＣＧＡＧＴＴＡＧＡＡＡＡＡＣＣＣＧＧＣ ＧＣＣＴＣＣＧＴＧＡＡＧＡＴＣＴＣＧＴＧＴＡＡＡ ＧＣＴＴＣＧＧＧＧＣＴＡＣＴＣＧＴＴＴＡＣＣＧＧＣ ＴＡＣＡＣＣＡＴＧＡＡＴＴＧＧＧＴＴＡＡＧＣＡＧ ＡＧＣＣＡＴＧＧＡＡＡＧＴＣＴＣＴＴＧＡＡＴＧＧ ＡＴＡＧＧＣＣＴＧＡＴＴＡＣＧＣＣＴＴＡＴＡＡＴ ＧＧＧＧＣＣＴＣＧＡＧＣＴＡＣＡＡＣＣＡＧＡＡＡ ＴＴＴＣＧＴＧＧＴＡＡＧＧＣＡＡＣＴＣＴＧＡＣＴ ＧＴＡＧＡＣＡＡＧＴＣＧＴＣＣＴＣＣＡＣＣＧＣＡ ＴＡＣＡＴＧＧＡＴＣＴＴＣＴＧＡＧＣＣＴＡＡＣＣ ＴＣＡＧＡＡＧＡＣＡＧＣＧＣＡＧＴＣＴＡＣＴＴＣ ＴＧＣＧＣＣＣＣＧＴＧＧＴＧＧＴＴＡＣＧＡＴＧＧＣ ＣＧＣＧＧＡＴＴＣＧＡＣＴＡＴＴＧＧＧＧＣＣＡＧ ＧＧＣＡＣＣＡＣＣＧＴＣＡＣＣＧＴＧＡＧＣＴＣＣ ＧＧＣＧＧＴＧＧＣＧＧＧＴＣＣＧＧＴＧＧＣＧＧＣ ＧＧＣＴＣＡＡＧＣＧＧＡＧＧＡＧＧＴＡＧＴＧＡＣ ＡＴＣＧＡＧＴＴＧＡＣＣＣＡＧＴＣＧＣＣＴＧＣＣ ＡＴＣＡＴＧＴＣＣＧＣＡＴＣＣＣＣＣＧＧＣＧＡＧ ＡＡＧＧＴＧＡＣＧＡＴＧＡＣＧＴＧＴＴＣＴＧＣＴ ＴＣＣＡＧＣＴＣＴＧＴＡＴＣＧＴＡＣＡＴＧＣＡＣ ＴＧＧＴＡＣＣＡＡＣＡＧＡＡＧＴＣＣＧＧＣＡＣＣ ＴＣＣＣＣＣＡＡＧＣＧＴＴＧＧＡＴＣＴＡＣＧＡＣ ＡＣＴＴＣＣＡＡＧＣＴＧＧＣＧＴＣＴＧＧＣＧＴＣ ＣＣＴＧＧＧＣＧＣＴＴＴＴＣＡＧＧＴＡＧＣＧＧＧ ＴＣＣＧＧＣＡＡＴＡＧＣＴＡＴＴＣＣＴＴＧＡＣＧ ＡＴＣＡＧＴＡＧＣＧＴＧＧＡＧＧＣＴＧＡＧＧＡＴ ＧＡＴＧＣＣＡＣＣＴＡＣＴＡＣＴＧＣＣＡＧＣＡＧ ＴＧＧＡＧＣＡＡＧＣＡＣＣＣＧＣＴＣＡＣＣＴＴＣ ＧＧＣＧＣＣＧＧＧＡＣＣＡＡＧＣＴＴＧＡＡＡＴＣ ＡＡＧＧＣＧＧＣＧＧＣＧＡ	219

			TCGAGGTGATGTATCCTCCTCCCT ACCTGGACAACGAGAAATCCAATG GCACTATCATCCACGTGAAGGGGA AGCACCTGTGCCCGAGCCCCCTGT TCCCCGGGCCCTTCCAAGCCTTTTTT GGGTGCTTGTTGTGGTCGGCGGCG TGCTGGCCCTGCTACTCTCTGCTGG TAACCGTAGCGTTCATCATCTTCT GGGTGCGATCTAAGCGGTCCCGGC TGTTGCACAGTGACTACATGAACA TGACCCCGCGCCGCCCCGGCCCAA CCCGCAAGCACTACCAGCCGTACG CTCCACCTCGCGACTTTGCCGCCT ACAGGTCGCGAGTGAAATTTTCGC GCTCCGCGGACGCGCCGGCCTATC AGCAGGGCCAGAACCAGCTTTACA ACGAGTTGAACCTCGGGCGCAGGG AGGAGTACGACGTGCTGGATAAAC GTAGAGGTCGGGACCCGGAGATGG GCGGCAAACCACGCCGCAAGAACC CTCAGGAAGGCCTGTACAACGAGC TCCAGAAGGACAAAATGGCTGAGG CGTACTCGGAGATTGGGATGAAAG GCGAGCGGCGCCGCGGCAAGGGCC ACGATGGCCTGTACCAGGGGCTAT CTACCGCTACAAAGGACACCTACG ACGCCCTACATATGCAGGCCCTGC CACCGCGT	

10

20

30

40

50

P 2 A		1 4 8 3 －1 5 4 8	G G C T C T G G C G C A A C C A A C T T C T C G C T T C T G A A G C A G G C C G G T G A T G T G G A G G A A A A C C C A G G T C C T	220
G 1 2 ／2 R －1 1 3 4 E C D		1 5 4 9 －4 2 2 1	A T G G C C C G C C T G G G C A A C T G C T C G C T G A C C T G G G C G G C C C T G A T C A T C C T G C T G C T G C C C G G C T C T C T G G A G G A G T G T G G C C A T A T T T C C G T G T C A G C T C C A A T C G T G C A C C T G G G C G A C C C C A T C A C C G C T T C T T G C A T C A T C A A G C A G A A C T G C T C T C A C C T C G A C C C T G A G C C C C A A A T A C T T T G G G A G C T G G G C G C G G A G C T C C A G C C T G G A G G A C G C C A G C A G C G T T T G T C A G A C G G C A C T C A G G A A T C C A T C A T C A C C C T C C C A C A T C T G A A T C A C A C C C A G G C G T T C C T G T C T T G T T G T C T C A A C T G G G G C A A C T C C T T G C A G A T A C T G G A C C A G G T G G A G C T G A G A G C T G G C T A T C C C C C C G G C A A T T C C T C A C A A C C T G T C C T G T C T G A T G A A C C T G A C C A C C T C C A G T C T G A T C T G T C A G T G G G A G C C C G G G C C A G A G A C T C A C C T T C C C A C C A G C T T C A C C C T T A A G T C G T T C A A A T C C G A G G G C A A C T G C C A G A C C C A G G G T G A T T C T A T T T T G G A T T G C G T G C C C A A G G A C G G G G C A G T C T C A C T G T T G T A T T C C C G A C A A G C A C C T C C T T T T A T A C C A G A A T A T G G G C A T C T G G G T G C A G G C C G A G A A T G C C C T G G G A A C G T C T A T G T C T C C A C A G C T A T G C C T G G A T C C A A T G G A C G T A G T G A A G C T G G A G C C C C C C A T G C T A C G C A C T A T G G A T C C T A G C C C A G A G G C C G C T C C C C C T C A G G C G G G G T G C C T G C A G C T T T G T T G G G A A C C C T G G C A A C C C G G G T T G C A C A T T A A C C A G A A G T G C G A G C T G C G C C A C A A G C C C C A G A G A G G A G A G G C C T C C T G G G C C C T C G T G G G C C C T C T G C C G T T G G A G G C C T T G C A G T	221

10

20

30

40

50

			ATGAGCTGTGCGGCCTCTTGCCCG CTACAGCTTATACTCTGCAAATCA GGTGTATTCGCTGGCCTTTGCCCG GACACTGGTCCGACTGGTCCCCCA GCCTTGAGCTGAGAACCACGGAGC GCGCCCCCACCGTACGCTTGGACA CCTGGTGGCGCCAGAGGCAGCTGG ACCCTCGCACTGTGCAGCTGTTCT GGAAGCCGGTGCCCCTGGAGGAGG ACTCCGGACGCATCCAGGGCTACG TGGTCAGCTGGCGTCCGAGTGGGC AGGCCGGGGCCATCCTGCCCCTGT GCAACACGACTGAGCTGAGCTGCA CTTTCCATCTGCCCAGCGAGGCTC AGGAGGTGGCGCTCGTGGCTTACA ACTCCGCAGGCACTTCTCGCCCAA CCCCCGTGGTGTTCTCTGAGAGTC GGGGCCCCGCCCTGACGCGCCTTC ACGCCATGGCGCGCGACCCGCATT CCCTTTGGGTCGGTTGGGAGCCAC CTAACCCATGGCCGCAGGGCTACG TGATCGAGTGGGGCCTGGGCCCCC CGAGCGCATCGAACAGCAACAAGA CCTGGAGAATGGAACAGAACGGCC GCGCAACCGGCTTCCTATTAAAGG AGAACATCCGCCCGTTCCAGCTGT ACGAGATCATCGTGACACCGCTGT ACCAGGACACTATGGGGCCTTCTC AGCACGTTTACGCCTACTCCCAGG AGATGGCCCCGAGCCACGCACCGG AACTGCACCTAAAGCACATCGGTA AGACCTGGGCACAGCTCGAGTGGG TCCCCCGAGCCTCCCCGAGCTAGGCA AGTCGCCGCTGACCCCATTACACCA TCTTCTGGACCAACGCGCAGAACC AGTCCTTTAGCGCGATCCTCAATG CCTCCTCCCGCGGTTTCGTCTTGC ACGGGCTGGAGCCAGCCTCCTTAT ACCACATCCACCTGATGGCGGCTT CCCAGGCTGGTGCTACCAACAGCA CAGTTTTGACACTGATGACCCTGA CCCCC	

			GAGGGCTCGGAGCTCCACATCATT TTGGGACTCTTCGGACTGCTGCTG CTGCTGACCTGCCTGTGCGGCACT GCTTGGCTCTGCTGTTCTCCCAAC CGCAAGAACCCTCTTTGGCCCTCT GTCCCTGACCCGGCCCATTCTAGC CTGGGATCTTGGGTCCCGACCATC ATGGAAGAAGACGCGTTCCAGCTC CCTGGGCTGGGCACCCCTCCGATC ACGAAGCTCACGGTCCTGGAGGAG GACGAGAAGAAGCCCGTACCGTGG GAGAGCCACTCCTCGAATCATAGC CTAACCTCCTGCTTTACAAACCAG GGGTATTTTTTTTTTCCACTTGCCC GACGCTCTGGAGATCGAGGCCTGC CAGGTGTACTTCACCTACGACCCC TACAGCGAGGAGGACCCTGCCGGT GATCTGCCCACCCATGACGGCTAT CTGCCATCAAACATTGACGACCTG CCGTCCGGAGGTCCCAGTCCTCCG TCCACCGCCCCCGGCGGTTCTGGT GCCGGCGAAGAACGGATGCCTCCC TCCCTGCAGGAGCGTGTGCCACGG GATTGGGACCCACAGCCCTTAGGG CCGCCTACCCCCGGCGTGCCCGAC CTCGTCGATTTCCAGCCGCCTCCT GAGCTGGTTCTCCGAGAGGCAGGA GAGGAGGTGCCTGATGCTGGACCC CGTGAGGGCGTGAGCTTTCCTTGG TCTCGCCCGCCAGGACAGGGGGAG TTCCGTGCTCTCAACGCGCGTCTG CCGTTGAACACTGATGCATACCTC AGTCTTCAGGAGCTGCAGGGCCAG GATCCAACCCACCTCGTT	

T2A		4222 −4284	GGCTCAGGGGAAGGTCGCGGCTCG CTGTTGACGTGTGGTGACGTGGAG GAGAACCCCGGCCCG	222
IL−18	NM_ 001 56 2．4	4285 −4758	TACTTCGGTAAGCTGGAGTCTAAA CTGTCGGTGATACGGAACCTGAAC GACCAGGTCCTGTTCATTGACCAG GGTAACCGCCCGCTGTTCGAGGAC ATGACTGACTCCGATTGCCGCGAC AATGCCCCCCCGCACGATCTTCATT ATCTCCATGTACAAGGATAGCCAA CCCCGTGGTATGGCCGTGACCATT AGCGTCAAATGTGAGAAGATCTCT ACTCTGTCCTGTGAGAATAAGATT ATCTCCTTCAAGGAGATGAACCCC CCTGATAACATCAAAGACACTAAA TCGGACATCATTTTCTTTCAGAGG AGCGTGCCAGGCCACGACAACAAG ATGCAGTTCGAGAGTTCTAGTTAC GAGGGATATTTCCTGGCCTGCGAA AAAGAACGTGACCTCTTCAAGCTA ATCCTGAAGAAGGAGGACGAGCTC GGTGACAGGAGCATCATGTTTACT GTCCAAAACGAGGACTGA	223

G12 −2R 1__1 34__ ECD __T2 A__h IL− 18		1−32 10	ATGGCTCGCCTCGGAAATTGTTCC CTGACCTGGGCAGCATTGATCATT CTCCTGCTACCAGGGAGTCTCGAA GAATGTGGCCATATCTCTGTAAGC GCCCCTATTGTGCACTTGGGAGAC CCAATCACAGCATCATGCATCATC AAGCAGAATTGCTCTCATCTCGAT CCAGAGCCACAGATACTCTGGGAG CTGGGGCGCAGAACTGCAACCCGGA GGGCGCCAGCAGAGACTGAGTGAT GGAACACAGGAGAGCATTATCACT TTACCTCATCTGAACCACACCCAG GCCTTTCTTAGCTGCTGTTTGAAC TGGGGCAACAGTCTCCAGATTCTG GACCAGGTGGAGCTGAGGGCGGGT TACCCGCCCGCCATTCCACACAAT TTGTCCTGTCTCATGAACCTGACA ACAAGTAGCCTGATATGCCAGTGG GAGCCAGGGCCGGAGACCCATCTC CCAACTAGTTTCACGCTCAAGAGC TTCAAGTCAGAGGGGAACTGCCAG ACACAAGGGGACAGCATTCTCGAC TGTGTGCCCAAGGACGGGCAGAGT CACTGTTGCATTCCAGACAAGCAT CTGCTGCTGTATCAGAACATGGGC ATTTGGGTTCAGGCCGAAAATGCC CTCGGTACTTCCATGAGTCCACAG TTGTGTCTTGACCCCATGGATGTG GTGAAGCTGGAACCGCCAATGCTG AGGACCATGGATCCCTCACCTGAG GCTGCTCCGCCACAGGCAGGGTGT CTGCAGCTGTGCTGGGAGCCCTGG CAGCCTGGATTGCACATAAACCAA AAATGTGAGCTGAGGCACAAGCCC CAGAGAGGTGAGGCGAGTTGGGCC CTGGTAGGGCCTCTTCCTCTAGAA GCCCTGCAGTATGAATTGTGTGGA TTACTTCCCGCAACCGCCTACACT CTTCAGAT	224

			CAGGTGTATCCGGTGGCCTCTGCC CGGCCACTGGAGCGACTGGTCTCC GAGCCTCGAATTGAGAACAACAGA ACGGGCTCCTACGGTGCGTCTGGA TACATGGTGGAGGCAGCGACAGTT GGACCCGCGTACAGTGCAGCTGTT CTGGAAGCCCGTACCTCTGGAAGA GGATAGTGGTCGGATTCAGGGATA TGTGGTCTCTTGGCGGCCTTCCGG TCAGGCTGGGGGCTATCCTTCCCCTT ATGCAACACTACAGAGCTCAGCTG TACCTTTCATTTACCCAGCGAAGC CCAGGAAGTGGCTCTCGTCGCCTA TAATTCCGCTGGAACGTCAAGACC CACCCCTGTCGTGTTCTCTGAGTC TCGGGGACCTGCCCTAACCAGGCT CCATGCAATGGCACGCGATCCTCA CAGTCTGTGGGTTGGCTGGGAACC ACCAAATCCCTGGCCTCAGGGCTA TGTCATCGAATGGGGCCTTGGCCC CCCATCAGCCTCCAATAGCAACAA GACCTGGAGAATGGAGCAAAATGG GAGAGCAACCGGGTTCCTGCTGAA GGAGAACATCCGACCGTTCCAGCT TTATGAAATTATTGTAACTCCACT GTACCAGGACACAATGGGACCATC TCAGCATGTCTACGCTTATTCCCA GGAGATGGCGCCTAGTCATGCTCC TGAATTACACTTGAAGCACATAGG GAAAACTTGGGCCCAATTAGAGTG GGTCCCGGAGCCTCCCGAGCTGGG GAAAAGCCCATTGACCCATTACAC GATATTTTGGACCAATGCTCAGAA CCAATCCTTTTTCTGCCATCCTGAA TGCCTCATCTCGAGGCTTTGTGCT GCATGGCCTAGAGCCTGCATCACT CTACCACATTCACCTGATGGCCGC CAGCCAGGCGGGTGCCACAAACTC CACAGTTC	

			TCACTTTAATGACTCTAACCCCAG AGGGCAGTGAACTGCACATCATAT TAGGGTTATTCGGATTGCTGCTTC TTTTGACTTGCCTCTGTGGCACTG CGTGGCTGTGCTGCTCCCCGAACC GAAAGAATCCTCTCTGGCCTAGCG TTCCCGATCCTGCTCACAGTTCAC TAGGATCATGGGTGCCAACCATCA TGGAAGAGGATGCCTTCCAGCTAC CAGGACTGGGTACGCCGCCCATAA CCAAATTAACGGTCCTTGAAGAGG ATGAGAAGAAACCAGTTCCATGGG AAAGCCACTCTTCCAATCATAGCC TCACCTCTTGCTTCACCAACCAAG GGTATTTTTTTTTCCACCTGCCCG ACGCTCTGGAAATTGAGGCCTGCC AAGTGTATTTCACCTACGACCCTT ACTCTGAAGAAGATCCGGCAGGCG ACCTACCCACTCATGATGGCTACC TGCCGTCAAACATCGACGACTTAC CGAGTGGAGGACCCTCCCCACCTT CTACAGCCCCTGGTGGCTCCGGTG CAGGGGAGGAAAGGATGCCTCCCT CACTGCAGGAGAGAGTCCCCAGAG ACTGGGATCCTCAGCCACTTGGAC CACCCACACCTGGTGTGCCTGACC TTGTGGATTTTCAGCCCCCTCCTG AGCTTGTTCTTCGAGAAGCAGGTG AGGAGGTTCCTGATGCAGGCCCAC GTGAGGGGGTCTCCTTTCCCTGGT CCAGGCCTCCTGGCCAAGGAGAGT TCCGCGCTCTGAATGCACGCTTGC CTCTGAACACAGATGCTTACCTGA GCCTACAAGAGTTACAAGGCCAGG ATCCGACACACCTGGTGGGATCTG GCGAGGGTAGAGGCAGCCTCCTAA CTTGTGGCGA	

			CGTGGAGGAGAACCCCGGTCCCTA CTTCGGTAAGCTGGAGTCTAAACT GTCGGTGATACGGAACCTGAACGA CCAGGTCCTGTTCATTGACCAGGG TAACCGCCCGCTGTTCGAGGACAT GACTGACTCCGATTGCCGCGACAA TGCCCCCCGCACGATCTTCATTAT CTCCATGTACAAGGATAGCCAACC CCGTGGTATGGCCGTGACCATTAG CGTCAAATGTGAGAAGATCTCTAC TCTGTCCTGTGAGAATAAGATTAT CTCCTTCAAGGAGATGAACCCCCC TGATAACATCAAAGACACTAAATC GGACATCATTTTCTTTCAGAGGAG CGTGCCAGGCCACGACAACAAGAT GCAGTTCGAGAGTTCTAGTTACGA GGGATATTTCCTGGCCTGCGAAAA AGAACGTGACCTCTTCAAGCTAAT CCTGAAGAAGGAGGACGAGCTCGG TGACAGGAGCATCATGTTTACTGT CCAAAACGAGGACTGATGA	

10

20

30

40

50

G12 ／2R －1 134 ECD		1－26 73	ATGGCTCGCCTCGGAAATTGTTCC CTGACCTGGGCAGCATTGATCATT CTCCTGCTACCAGGGAGTCTCGAA GAATGTGGCCATATCTCTGTAAGC GCCCCTATTGTGCACTTGGGAGAC CCAATCACAGCATCATGCATCATC AAGCAGAATTGCTCTCATCTCGAT CCAGAGCCACAGATACTCTGGGAG CTGGGCGCAGAACTGCAACCCGGA GGGCGCCAGCAGAGACTGAGTGAT GGAACACAGGAGAGCATTATCACT TTACCTCATCTGAACCACACCCAG GCCTTTCTTAGCTGCTGTTTGAAC TGGGGCAACAGTCTCCAGATTCTG GACCAGGTGGAGCTGAGGGCGGGT TACCCGCCCGCCATTCCACACAAT TTGTCCTGTCTCATGAACCTGACA ACAAGTAGCCTGATATGCCAGTGG GAGCCAGGGCCGGAGACCCATCTC CCAACTAGTTTCACGCTCAAGAGC TTCAAGTCAGAGGGGAACTGCCAG ACACAAGGGGACAGCATTCTCGAC TGTGTGCCCAAGGACGGGCAGAGT CACTGTTGCATTCCAGACAAGCAT CTGCTGCTGTATCAGAACATGGGC ATTTGGGTTCAGGCCGAAAATGCC CTCGGTACTTCCATGAGTCCACAG TTGTGTCTTGACCCCATGGATGTG GTGAAGCTGGAACCGCCAATGCTG AGGACCATGGATCCCTCACCTGAG GCTGCTCCGCCACAGGCAGGGTGT CTGCAGCTGTGCTGGGAGCCCTGG CAGCCTGGATTGCACATAAACCAA AAATGTGAGCTGAGGCACAAGCCC CAGAGAGGTGAGGCGAGTTGGGCC CTGGTAGGGCC	225

			TCTTCCTCTAGAAGCCCTGCAGTA TGAATTGTGTGGATTACTTCCCGC AACCGCCTACACTCTTCAGATCAG GTGTATCCGGTGGCCTCTGCCCGG CCACTGGAGCGACTGGTCTCCGAG CCTCGAATTGAGAACAACAGAACG GGCTCCTACGGTGCGTCTGGATAC ATGGTGGAGGCAGCGACAGTTGGA CCCGCGTACAGTGCAGCTGTTCTG GAAGCCCGTACCTCTGGAAGAGGA TAGTGGTCGGATTCAGGGATATGT GGTCTCTTGGCGGCCTTCCGGTCA GGCTGGGGCTATCCTTCCCTTATG CAACACTACAGAGCTCAGCTGTAC CTTTCATTTACCCAGCGAAGCCCA GGAAGTGGCTCTCGTCGCCTATAA TTCCGCTGGAACGTCAAGACCCAC CCCTGTCGTGTTCTCTGAGTCTCG GGGACCTGCCCTAACCAGGCTCCA TGCAATGGCACGCGATCCTCACAG TCTGTGGGTTGGCTGGGAACCACC AAATCCCTGGCCTCAGGGCTATGT CATCGAATGGGGCCTTGGCCCCCC ATCAGCCTCCAATAGCAACAAGAC CTGGAGAATGGAGCAAAATGGGAG AGCAACCGGGTTCCTGCTGAAGGA GAACATCCGACCGTTCCAGCTTTA TGAAATTATTGTAACTCCACTGTA CCAGGACACAATGGGACCATCTCA GCATGTCTACGCTTATTCCCAGGA GATGGCGCCTAGTCATGCTCCTGA ATTACACTTGAAGCACATAGGGAA AACTTGGGCCCAATTAGAGTGGGT CCCGGAGCCTCCCGAGCTGGGGAA AAGCCCATTGACCCATTACACGAT ATTTTGGACCAATGCTCAGAACCA ATCCTTTTCTGCCATCCTGAATGC CTCATCTCG	

			AGGCTTTGTGCTGCATGGCCTAGA GCCTGCATCACTCTACCACATTCA CCTGATGGCCGCCAGCCAGGCGGG TGCCACAAACTCCACAGTTCTCAC TTTAATGACTCTAACCCCAGAGGG CAGTGAACTGCACATCATATTAGG GTTATTCGGATTGCTGCTTCTTTT GACTTGCCTCTGTGGCACTGCGTG GCTGTGCTGCTCCCCGAACCGAAA GAATCCTCTCTGGCCTAGCGTTCC CGATCCTGCTCACAGTTCACTAGG ATCATGGGTGCCAACCATCATGGA AGAGGATGCCTTCCAGCTACCAGG ACTGGGTACGCCGCCCATAACCAA ATTAACGGTCCTTGAAGAGGATGA GAAGAAACCAGTTCCATGGGAAAG CCACTCTTCCAATCATAGCCTCAC CTCTTGCTTCACCAACCAAGGGTA TTTTTTTTTCCACCTGCCCGACGC TCTGGAAATTGAGGCCTGCCAAGT GTATTTCACCTACGACCCTTACTC TGAAGAAGATCCGGCAGGCGACCT ACCCACTCATGATGGCTACCTGCC GTCAAACATCGACGACTTACCGAG TGGAGGACCCTCCCCACCTTCTAC AGCCCCTGGTGGCTCCGGTGCAGG GGAGGAAAGGATGCCTCCCTCACT GCAGGAGAGAGTCCCCAGA	

10

20

30

40

50

			GACTGGGATCCTCAGCCACTTGGA CCACCCACACCTGGTGTGCCTGAC CTTGTGGATTTTCAGCCCCCTCCT GAGCTTGTTCTTCGAGAAGCAGGT GAGGAGGTTCCTGATGCAGGCCCA CGTGAGGGGGTCTCCTTTCCCTGG TCCAGGCCTCCTGGCCAAGGAGAG TTCCGCGCTCTGAATGCACGCTTG CCTCTGAACACAGATGCTTACCTG AGCCTACAAGAGTTACAAGGCCAG GATCCGACACACCTGGTG	
T2A		2674 －2736	GGATCTGGCGAGGGTAGAGGCAGC CTCCTAACTTGTGGCGACGTGGAG GAGAACCCCGGTCCC	226

【手続補正１２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】配列表
【補正方法】追加
【補正の内容】
【配列表】
202451557700000１.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2022/050540

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC: ***C07K 19/00*** (2006.01), ***A61K 35/14*** (2015.01), ***A61K 38/19*** (2006.01), ***A61K 38/20*** (2006.01), ***A61P 25/28*** (2006.01), ***A61P 35/00*** (2006.01), ***A61P 37/04*** (2006.01), ***A61P 37/06*** (2006.01), ***C07K 14/535*** (2006.01), ***C07K 14/705*** (2006.01), ***C07K 14/715*** (2006.01), ***C12N 5/07*** (2010.01), ***C12N 5/10*** (2006.01), ***C12N 15/27*** (2006.01), ***C12N 15/62*** (2006.01).

CPC: A61K 35/14 (2020.01), A61K 38/193 (2020.01), A61K 38/2046 (2020.01), A61P 25/28 (2020.01), A61P 35/00 (2020.01), A61P 37/04 (2020.01), A61P 37/06 (2020.01), C07K 14/535 (2020.01), C07K 14/705 (2020.01), C07K 14/715 (2020.01), C07K 14/7153 (2020.01), C12N 5/10 (2020.05), C07K 2319/32 (2020.01).

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)

IPC: C07K 19/00, A61K 35/14, A61K 38/19, A61K 38/20, A61P 25/28, A61P 35/00, A61P 37/04, A61P 37/06, C07K 14/535, C07K 14/705, C07K 14/715, C12N 5/07, C12N 5/10, C12N 15/27, C12N 15/62.

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

Electronic database(s) consulted during the international search (name of database(s) and, where practicable, search terms used)

Databases: Canadian Patent Database, Scopus, CAPlus, MEDLINE, BIOSIS, GenomeQuest, Genbank, Protein Data Bank, Genpept.
Keywords: granulocyte colony stimulating factor, g-csf, variant, mutant, chimeric receptor, site II interface, T cell, Provincial Health Services, UVIC Industry Partnerships, Martin Boulanger, Brad Nelson, Cameron Powell, Megan Fuller, SEQ ID NO: 1, L108R.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, Y	WO 2021/068068 A1 (NELSON et al.) 15 April 2021 (15-04-2021)	81-92, 100-102, 105-162, 169-177 & 182-225
P, X/ P, Y	WO 2021/068074 A1 (VOLKERS et al.) 15 April 2021 (15-04-2021)	1, 3-8, 10-20, 28-78, 81-92, 100-102, 105-164, 169-179, 182-225, 278, 279 & 289-303
A	US 5747292 (GREENBERG & NELSON) 05 May 1998 (05-05-1998)	31-78, 81-92, 100-102, 105-158, 160, 161, 169-176, 184-186, 188-193, 195-199 & 202-225

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"D" document cited by the applicant in the international application	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 13 June 2022 (13-06-2022)	Date of mailing of the international search report 16 June 2022 (16-06-2022)
Name and mailing address of the ISA/CA Canadian Intellectual Property Office Place du Portage I, C114 - 1st Floor, Box PCT 50 Victoria Street Gatineau, Quebec K1A 0C9 Facsimile No.: 819-953-2476	Authorized officer Serisha Moodley (819) 353-9056

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2022/050540

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LAYTON et al., "*Interaction of Granulocyte Colony-stimulating Factor (G-CSF) with Its Receptor*". The Journal of Biological Chemistry, 18 June 1999 (18-06-1999), Vol. 274(25), pp. 17445-17451, [online] [retrieved on 20 April 2022 (20-04-2022)]. Retrieved from the Internet: <doi: 10.1074/jbc.274.25.17445.>	1, 3-8, 10-20, 28-78, 81-92, 100-102, 105-164, 169-179 & 182-225
A	KOAY et al., "*Distinct region of the granulocyte colony-stimulating factor receptor mediates proliferative signaling through activation of Janus kinase 2 and p44/42 mitogen-activated protein kinase*". Cellular Signalling, 21 January 2002 (21-01-2002), Vol. 14(3), pp. 239-247, [online] [retrieved on 13 May 2022 (13-05-2022)]. Retrieved from the Internet: <https://doi.org/10.1016/S0898-6568(01)00237-6>	1, 3-8, 10-20, 28-78, 81-92, 100-102, 105-164, 169-179 & 182-225
A	WO 2019/169290 A1 (NAGER et al.) 06 September 2019 (06-09-2019)	31-78, 81-92, 100-102, 105-158, 160, 161, 169-176, 184-186, 188-193, 195-199 & 202-225

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2022/050540

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. ☐ forming part of the international application as filed:

☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

☐ on paper or in the form of an image file.

b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).

☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2022/050540

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of the first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claim Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claim Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claim Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
The claims are directed to a plurality of inventive concepts as follows:

Continued on extra sheet.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claim Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim Nos.:
1, 3-8, 10-20, 28-78, 81-92, 100-102, 105-164, 169-179, 182-225, 278, 279 and 289-303 with respect to the first invention directed to a variant G-CSF comprising the site II mutant L108R, which binds to a specific chimeric receptor comprising a corresponding ECD variant of G-CSFR and forms a system for selective activation of a T cell with IL-18.

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2022/050540

Continuation of: Box No. III

Reference is made to the following documents:

D1 US 5747292 (GREENBERG & NELSON) 5 May 1998 (05-05-1998).

D2 LAYTON et al., THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 18 June 1999 (18-06-1999), Vol. 274(25), pp. 17445-17451, [online] [retrieved on 20 April 2022 (20-04-2022)].

D1 discloses chimeric receptors comprised of an extracellular domain (ECD) from an alternative cytokine joined to a transmembrane domain (TM) and an intracellular domain (ICD) of a cytokine that enable activation of cytotoxic T lymphocytes in response to the alternative cytokine rather than the normally required cytokine (columns 4-6). Cytokines include both Granulocyte Colony-Stimulating Factor receptor (G-CSFR) and interleukin 7 receptor (IL-7R) (columns 9-10).

D2 discloses G-CSF variants comprised of mutations at E46 in the site III interface region and/ or D 112 in the site II interface region and a GCSFR R288A variant, as well as chimeric receptors comprised of said G-CSFR variant to determine binding of G-CSF variants to the cytokine receptor homologous module (CRHM) of the receptor (pages 17445-17446 and 17449-17450).

Lack of Unity
The claims are directed to a plurality of inventive concepts as follows:

Group A+ - Claims 1-78 and 155-225 (wholly) and 81-92, 100-102, 105-154, 278,279 and 289-303 (partially) are directed to a variant Granulocyte Colony-Stimulating Factor (G-CSF) comprising at least one mutation in a site II interface region selected from L108R, Dll2R, El22R, El22K, El23K and El23R and combinations thereof relative to the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 or at least one mutation in a site III interface region selected from E46R relative to the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 or combinations of the site II and site III interface region mutations recited above, and wherein the variant G-CSF binds selectively to a chimeric receptor comprising a variant extracellular domain (ECD) of G-CSF receptor (G-CSFR), wherein the variant G-CSF and chimeric receptor form a system with at least one additional agonistic or antagonistic signaling protein(s) as recited in claim 158 and/or at least one antigen binding signaling receptor(s) as recited in claim 160 for selective activation of a cell, as well as related subject matter;

Group B+ - Claims 79, 80, 93-99, 103 and 104 (wholly) and 81-92, 100-102 and 105-154 (partially) are directed to a chimeric receptor comprising an ECD of G-CSFR, gp130, EPOR or Interferon Gamma Receptor 2 (IFNyR2) linked to an intracellular domain (ICD), comprising at least one intracellular domain signaling molecule binding site of a cytokine receptor selected from the group as recited in claim 79, and a transmembrane domain (TMD) that is C-terminal to the ECD and N-terminal to the ICD, wherein the chimeric receptor is not comprised of a variant ECD of G-CSFR, as well as related subject matter;

Group C+ - Claims 226-247, 249-277 and 280-288 (wholly) and 278,279 and 289-303 (partially) are directed to a chimeric receptor comprising an ECD and TMD of interleukin-7 receptor alpha (IL-7Ra) and an ICD comprised of a intracellular signaling domain of any one cytokine receptor as recited in claim 23 3 that is distinct from the IL-7Ra intracellular signaling domain as set forth in SEQ ID NO: 109, wherein the ECD and TMD are each operatively linked to the ICD, as well as related subject matter.

(+)=plurality of groups.

Please note that the use of the expression "any one of the above claims" is understood to refer to the first independent claim immediately prior to the dependent claim which features the expression.

Each group of Group A+ relates to a single G-CSF variant that is comprised of either one site II mutant as recited in claim 1 or the site III mutant E46R or a combination of site II and site III mutants forming 127 possible combinations, wherein each G-CSF variant binds to a chimeric receptor comprising a corresponding variant ECD of G-CSFR. Further, each group relates to a system comprised of the G-CSF variant that binds to the chimeric receptor comprising the corresponding variant ECD of G-CSFR and at least one additional signaling protein of claim 158 and/or at least one antigen binding signaling receptor of claim 160. As the claims refer to "combinations thereof', at least 133 169 025 different combinations of systems for selective activation of a cell are possible. It should be noted that group A+ relates to a larger number of claims than some inventions encompassed by group A+ due to the plurality of possible combinations.

Further, the ISA206 (lack of unity) was mailed before receipt of a sequence listing (SL, requested by ISA225). Upon receipt of the SL, it was determined that group A1 does not relate to all of the claims of group A+. Consequently, group A1 relates to claims 1, 3-8, 10-20, 28-78, 81-92, 100-102, 105-164, 169-179, 182-225, 278, 279 and 289-303 (partially) featuring a variant G-CSF comprising the site II mutant L108R, which binds to a specific chimeric receptor comprising a corresponding ECD variant of G-CSFR and forms a system for selective activation of a T cell with IL-18.

Continued on next page.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2022/050540

Continuation of: Box No. III

Each group of Group B+ relates to a chimeric receptor comprised of an ECD and a TMD of any one cytokine linked to an ICD of any one intracellular domain signaling molecule binding site of a cytokine receptor as recited in claim 79, wherein the chimeric receptor is not comprised of a variant ECD of G-CSFR. As the claims refer to "combinations thereof', at least 122 865 different combinations of chimeric receptors are possible. Thus, group B1 would feature a chimeric receptor comprised of the ECD and TM of wildtype G-CSFR and an ICD comprised of a SHC binding site of interleukin (IL)-2Rβ and the Box 1 and Box 2 region of G-CSFR.

Each group of Group C+ relates to a chimeric receptor comprising an ECD and TMD of interleukin-7 receptor alpha (IL-7Ra) and an ICD comprised of a intracellular signaling domain of any one cytokine receptor as recited in claim 233 that is distinct from the IL-7Ra intracellular signaling domain as set forth in SEQ ID NO: 109. As the claims refer to "combinations thereof', at least 63 different combinations of systems for selective activation of a cell are possible. Thus, group C1 would feature a chimeric receptor comprising an ECD and TMD of interleukin-7 receptor alpha (IL-7Ra) and an ICD comprised of a intracellular signaling domain of IL-2Rβ.

Groups A-C relate to structurally distinct cytokine variants, chimeric cytokine receptors and/or systems comprised of said cytokine variants and chimeric receptors for selective activation of a cell. Further cytokine variants and chimeric receptors comprised of ECDs and ICDs of various cytokine receptors and/or variants, including G-CSFR and IL-7Ra, for selective activation of cytokine signalling in cells appear to be known (see D1 and D2), and the subject-matter of the claims is not linked as to form a single general inventive concept that defines a contribution over the prior art. Therefore the claims lack unity *a priori* and *a posteriori.*

Please note that there does not appear to be support for all the possible embodiments.

The claims must be limited to one inventive concept as set out in PCT Rule 13.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CA2022/050540

Patent Document Cited in Search Report	Publication Date	Patent Family Member(s)	Publication Date
WO2021068068A1	15 April 2021 (15-04-2021)	AU2020362554A1	12 May 2022 (12-05-2022)
		CA3151472A1	15 April 2021 (15-04-2021)
		IL291282D0	01 May 2022 (01-05-2022)
WO2021068074A1	15 April 2021 (15-04-2021)	AU2020362556A1	12 May 2022 (12-05-2022)
		CA3151471A1	15 April 2021 (15-04-2021)
US5747292A	05 May 1998 (05-05-1998)	AU6627194A	24 October 1994 (24-10-1994)
		AU695869B2	27 August 1998 (27-08-1998)
		CA2160011A1	13 October 1994 (13-10-1994)
		EP0693084A1	24 January 1996 (24-01-1996)
		EP0693084A4	02 June 1999 (02-06-1999)
		JPH08511000A	19 November 1996 (19-11-1996)
		WO9422914A1	13 October 1994 (13-10-1994)
WO2019169290A1	06 September 2019 (06-09-2019)	AR114273A1	12 August 2020 (12-08-2020)
		AU2019227979A1	27 August 2020 (27-08-2020)
		BR112020017734A2	29 December 2020 (29-12-2020)
		CA3091681A1	06 September 2019 (06-09-2019)
		CN111819192A	23 October 2020 (23-10-2020)
		EP3759132A1	06 January 2021 (06-01-2021)
		IL276831D0	29 October 2020 (29-10-2020)
		JP2021514677A	17 June 2021 (17-06-2021)
		KR20200128054A	11 November 2020 (11-11-2020)
		RU2020128082A	04 April 2022 (04-04-2022)
		SG11202007771VA	29 September 2020 (29-09-2020)
		TW201945402A	01 December 2019 (01-12-2019)
		US2019292533A1	26 September 2019 (26-09-2019)

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）
Ｃ０７Ｋ	*19/00*	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	19/00		
Ａ６１Ｋ	*38/16*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	38/16		
Ａ６１Ｋ	*38/19*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	38/19		
Ａ６１Ｋ	*45/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	45/00		
Ａ６１Ｋ	*35/17*	*(2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/17		
Ａ６１Ｐ	*35/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00		
Ａ６１Ｐ	*35/02*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/02		
Ａ６１Ｐ	*37/06*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/06		
Ａ６１Ｐ	*43/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	43/00	１２１	
Ａ６１Ｋ	*38/20*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	38/20		
Ａ６１Ｐ	*31/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/00		
Ａ６１Ｐ	*29/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	29/00		

(32)優先日　令和3年4月7日(2021.4.7)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/172,025
(32)優先日　令和3年4月7日(2021.4.7)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,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,MC,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,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,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

（特許庁注：以下のものは登録商標）
１．サランラップ
２．ＴＷＥＥＮ
３．ＴＲＩＴＯＮ

(74)代理人　100102978
弁理士　清水 初志
(74)代理人　100205707
弁理士　小寺 秀紀
(74)代理人　100160923
弁理士　山口 裕孝
(74)代理人　100119507
弁理士　刑部 俊
(74)代理人　100142929
弁理士　井上 隆一
(74)代理人　100148699
弁理士　佐藤 利光
(74)代理人　100188433
弁理士　梅村 幸輔
(74)代理人　100128048
弁理士　新見 浩一
(74)代理人　100129506

弁理士　小林 智彦
(74)代理人　100114340
弁理士　大関 雅人
(74)代理人　100214396
弁理士　塩田 真紀
(74)代理人　100121072
弁理士　川本 和弥
(74)代理人　100221741
弁理士　酒井 直子
(74)代理人　100114926
弁理士　枝松 義恵
(72)発明者　ブーランジェ マーティン ジェイ.
カナダ ブイ８ピー ５シー２ ブリティッシュ コロンビア州 ビクトリア フィナティー ロード ３８００ ペッチ ビルディング ユニバーシティ オブ ビクトリア
(72)発明者　ネルソン ブラッド
カナダ ブイ８ブイ ２ジー６ ブリティッシュ コロンビア州 ビクトリア メンジーズ ストリート ３１２－２２５
(72)発明者　パウエル キャメロン
カナダ ブイ８ピー ５シー２ ブリティッシュ コロンビア州 ビクトリア フィナティー ロード ３８００ ペッチ ビルディング ユニバーシティ オブ ビクトリア
(72)発明者　フラー ミーガン
カナダ ブイ８エヌ ２ビー３ ブリティッシュ コロンビア州 ビクトリア ジェファーソン アベニュー １７２１

Ｆターム（参考）　4B065　AA90X AB01 BA02 CA24 CA44
4C084　AA01 AA02 AA03 AA19 BA02 BA44 DA01 DA12 DA25 MA02 MA16 MA17 MA66 NA05 NA14 ZB081 ZB082 ZB111 ZB112 ZB261 ZB262 ZB271 ZB272 ZB311 ZB312 ZC751
4C087　AA01 AA02 BB64 BB65 MA02 MA16 MA17 MA66 NA05 NA14 ZB08 ZB11 ZB26 ZB27 ZB31 ZC75
4H045　AA10 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA11 DA50 EA20 FA72 FA74