

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7206214号

(P7206214)

(45)発行日 令和5年1月17日(2023.1.17)

(24)登録日 令和5年1月6日(2023.1.6)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/62 (2006.01)

C 1 2 N 15/62

Z Z N A

C 0 7 K 14/705 (2006.01)

C 0 7 K 14/705

C 0 7 K 19/00 (2006.01)

C 0 7 K 19/00

C 0 7 K 14/715 (2006.01)

C 0 7 K 14/715

C 1 2 N 15/63 (2006.01)

C 1 2 N 15/63

Z

請求項の数 29 (全72頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-551916(P2019-551916)

(86)(22)出願日 平成29年12月12日(2017.12.12)

(65)公表番号 特表2020-501605(P2020-501605  
A)

(43)公表日 令和2年1月23日(2020.1.23)

(86)国際出願番号 PCT/US2017/065746

(87)国際公開番号 WO2018/111834

(87)国際公開日 平成30年6月21日(2018.6.21)

審査請求日 令和2年12月10日(2020.12.10)

(31)優先権主張番号 62/433,540

(32)優先日 平成28年12月13日(2016.12.13)

(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

(73)特許権者 515045617

シアトル チルドレンズ ホスピタル (ディーピーエイ シアトル チルドレンズ  
リサーチ インスティテュート)  
アメリカ合衆国 9 8 1 0 1 ワシントン  
州 シアトル ナインス アベニュー 1 9  
0 0

(74)代理人 100077012

弁理士 岩谷 龍

(72)発明者 シャーレンバーグ, アンドリュー, エム  
アメリカ合衆国 ワシントン州 9 8 1 7  
7 シアトル, エヌダブリュー ノークロ  
ス ウェイ 1 2 2 2

審査官 山本 匡子

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 インビトロ及びインビボで操作された細胞において発現された化学誘導シグナル伝達複合体の外因性薬物活性化の方法

## (57)【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

遺伝子改変細胞を作製する方法であって、

第1の核酸及び第2の核酸を細胞に送達することを含み、

前記第1の核酸は、第1の細胞外結合ドメイン、第1の膜貫通ドメイン、及び第1のシグナル伝達ドメインを含む、第1のポリペプチドをコードし、

前記第2の核酸は、第2の細胞外結合ドメイン、第2の膜貫通ドメイン、及び第2のシグナル伝達ドメインを含む、第2のポリペプチドをコードし、

前記第1のシグナル伝達ドメインが、インターロイキン - 2 受容体サブユニットガンマ ( I L 2 R g ) 細胞質ドメインを含み、

前記第2のシグナル伝達ドメインが、インターロイキン - 2 受容体サブユニットベータ ( I L 2 R b ) 細胞質ドメインを含み、

前記第1のポリペプチド及び前記第2のポリペプチドは、発現されると、それらがリガンドの存在下で二量体化してシグナル伝達コンピテントポリペプチドヘテロ二量体を作り出すように配置され、

前記リガンドが、第1の細胞外結合ドメイン及び第2の細胞外結合ドメインに結合する方法。

## 【請求項 2】

前記第1の膜貫通ドメイン及び前記第2の膜貫通ドメインが、それぞれインターロイキン - 2 受容体膜貫通ドメインを含む、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記第 1 の細胞外結合ドメインが、F K 5 0 6 結合タンパク質 ( F K B P ) ドメインもしくはその一部及び / または F K B P ラパマイシン結合 ( F R B ) ドメインもしくはその一部を含み、かつ / または

前記第 2 の細胞外結合ドメインが、F K 5 0 6 結合タンパク質 ( F K B P ) ドメインもしくはその一部及び / または F K B P ラパマイシン結合 ( F R B ) ドメインもしくはその一部を含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

## 【請求項 4】

前記第 1 の細胞外結合ドメインが、F K 5 0 6 結合タンパク質 ( F K B P ) ドメインまたはその一部を含み、前記第 2 の細胞外結合ドメインが、F K B P ラパマイシン結合 ( F R B ) ドメインまたはその一部を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

## 【請求項 5】

前記第 1 のポリペプチドが、配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7 及び配列番号 1 1 のいずれか 1 つに示されるアミノ酸配列と、少なくとも 9 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、

前記第 2 のポリペプチドが、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6 及び配列番号 8 のいずれか 1 つに示されるアミノ酸配列と、少なくとも 9 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 6】

前記第 1 のポリペプチド及び / または前記第 2 のポリペプチドが、ヒンジドメインをさらに含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

## 【請求項 7】

前記細胞をリガンドと接触させることをさらに含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 8】

前記リガンドが小分子である、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 9】

前記リガンドが、

i ) ラパマイシン、

i i ) ラパログ、任意で、エベロリムス、C C I - 7 7 9、C 2 0 - メタリルラパマイシン、C 1 6 - ( S ) - 3 - メチルインドールラパマイシン、C 1 6 - i R a p、A P 2 1 9 6 7、ミコフェノール酸ナトリウム、塩酸ベニジピン、A P 1 9 0 3、もしくは A P 2 3 5 7 3、

30

i i i ) ラパマイシン代謝産物、または

i v ) I M I D クラスの薬物、任意で、サリドマイド、ボマリドマイド、レナリドマイドもしくは I M I D クラス薬物の類似体である、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 10】

前記リガンドが、0 . 0 5 n M ~ 1 0 0 n M の範囲の濃度で存在するか、または提供される、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

## 【請求項 11】

前記第 1 の核酸及び第 2 の核酸が別々のベクター上に含まれる、請求項 1 ~ 1 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 12】

前記第 1 の核酸及び第 2 の核酸が一つのベクター上にコードされる、請求項 1 ~ 1 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 13】

請求項 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の方法で作製された、細胞。

## 【請求項 14】

第 1 のポリペプチド及び第 2 のポリペプチドを含む細胞であって、

50

前記第 1 のポリペプチドが、第 1 の細胞外結合ドメイン、第 1 の膜貫通ドメイン、及び第 1 のシグナル伝達ドメインを含み、

前記第 2 のポリペプチドが、第 2 の細胞外結合ドメイン、第 2 の膜貫通ドメイン、及び第 2 のシグナル伝達ドメインを含み、

前記第 1 のシグナル伝達ドメインが、インターロイキン - 2 受容体サブユニットガンマ ( I L 2 R g ) 細胞質ドメインを含み、

前記第 2 のシグナル伝達ドメインが、インターロイキン - 2 受容体サブユニットベータ ( I L 2 R b ) 細胞質ドメインを含み、

前記第 1 のポリペプチド及び前記第 2 のポリペプチドは、発現されると、それらがリガンドの存在下で二量体化してシグナル伝達コンピテントポリペプチドヘテロ二量体を作り出すように配置され、

前記リガンドが、第 1 の細胞外結合ドメイン及び第 2 の細胞外結合ドメインに結合する、細胞。

【請求項 15】

T 細胞または前駆体 T 細胞である、請求項 13 または 14 に記載の細胞。

【請求項 16】

制御性 T 細胞である、請求項 15 に記載の細胞。

【請求項 17】

F O X P 3 + 制御性 T 細胞である、請求項 13 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の細胞。

【請求項 18】

ゲノムの F O X P 3 遺伝子座に組み込まれた外因性プロモーターを含み、任意で、前記外因性プロモーターが M N D プロモーターである、請求項 13 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の細胞。

【請求項 19】

治療薬として使用される、請求項 13 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の細胞。

【請求項 20】

インビトロで細胞の内部へのシグナルを活性化する方法であって、

( i ) 請求項 13 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の細胞を提供すること、ならびに

( i i ) 前記細胞をリガンドと接触させ、それによって前記第 1 及び第 2 のポリペプチドを二量体化させ、これが前記細胞の内部にシグナルを伝達することを含む、方法。

【請求項 21】

細胞をリガンドと接触させ、それによって前記第 1 及び第 2 のポリペプチドを二量体化させ、これが前記細胞の内部にシグナルを伝達することを含む、細胞の内部へのシグナルを活性化する方法に使用するための、請求項 13 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の細胞。

【請求項 22】

( a ) 前記シグナルが第 1 及び第 2 のポリペプチドを発現する細胞の増殖を誘導する、

( b ) 前記リガンドとの接触に続いて、前記第 1 及び第 2 のポリペプチドを発現する細胞が異種細胞集団から選択的に増幅される、かつ / または

( c ) 前記リガンドが前記第 1 及び第 2 のポリペプチドを発現しない細胞において抗増殖効果をもたらす、請求項 20 に記載の方法または請求項 21 に記載の細胞。

【請求項 23】

第 1 の核酸及び第 2 の核酸を含み、

前記第 1 の核酸は、第 1 の細胞外結合ドメイン、第 1 の膜貫通ドメイン、及び第 1 のシグナル伝達ドメインを含む、第 1 のポリペプチドをコードし、

前記第 2 の核酸は、第 2 の細胞外結合ドメイン、第 2 の膜貫通ドメイン、及び第 2 のシグナル伝達ドメインを含む、第 2 のポリペプチドをコードし、

前記第 1 のシグナル伝達ドメインが、インターロイキン - 2 受容体サブユニットガンマ ( I L 2 R g ) 細胞質ドメインを含み、

前記第 2 のシグナル伝達ドメインが、インターロイキン - 2 受容体サブユニットベータ ( I L 2 R b ) 細胞質ドメインを含み、

10

20

30

40

50

前記第 1 のポリペプチド及び前記第 2 のポリペプチドは、発現されると、それらがリガンドの存在下で二量体化してシグナル伝達コンピテントポリペプチドヘテロ二量体を作り出すように配置され、  
前記リガンドが、第 1 の細胞外結合ドメイン及び第 2 の細胞外結合ドメインに結合する、システム。

【請求項 2 4】

プロモーターをさらに含み、前記プロモーターが、前記第 1 の核酸、及び / または前記第 2 の核酸に作動可能に連結されている、請求項 2 3 に記載のシステム。

【請求項 2 5】

前記第 1 の核酸及び / または前記第 2 の核酸を含むベクターをさらに含む、請求項 2 3 または 2 4 に記載のシステム。

10

【請求項 2 6】

ウイルスベクターであり、前記ウイルスベクターが任意のレトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、フォーミーウイルスベクター、アデノウイルスベクターである、請求項 2 5 に記載のシステム。

【請求項 2 7】

前記ウイルスベクターがレンチウイルスベクターである、請求項 2 6 に記載のシステム。

【請求項 2 8】

請求項 2 3 ~ 2 7 のいずれか 1 項に記載の第 1 の核酸及び第 2 の核酸を含む、細胞。

【請求項 2 9】

20

リガンドをさらに含み、  
前記リガンドが、

i) ラパマイシン、

ii) ラパログ、任意で、エベロリムス、CCI - 779、C20 - メタリルラパマイシン、C16 - (S) - 3 - メチルインドールラパマイシン、C16 - iRap、AP21967、ミコフェノール酸ナトリウム、塩酸ベニジピン、AP1903、もしくはAP23573、

iii) ラパマイシン代謝産物、または

iv) IMiD クラスの薬物、任意で、サリドマイド、ポマリドマイド、レナリドマイド  
もしくはIMiD クラス薬物の類似体である、

30

請求項 2 3 ~ 2 7 のいずれか 1 項に記載のシステム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

優先出願への参照による組み込み

本出願は、2016年12月13日に提出された米国仮特許出願第62/433,540号に対する優先権の利益を主張する。上記出願の全開示は、その全体が参照により本明細書に明確に組み込まれる。

【0002】

配列表の参照

40

本出願は、電子フォーマットの配列表と共に提出されている。この配列表は、2017年12月8日に作成された、サイズが80kbのSCRI.130WO.TXTという名前のファイルとして提供されている。この情報は、配列表の電子フォーマットであり、その全体が参照により本明細書に明確に組み込まれている。

【0003】

本開示は、合成化学誘導シグナル伝達のための組成物及び方法に関する。特に、この組成物は、生理学的に機能的な合成化学誘導シグナル伝達複合体、ならびに機能的化学誘導シグナル伝達複合体を生成するための一般的な構造を含む。いくつかの実施形態は、通常モノマーとして存在する2つの構成要素がリガンドの存在下で一緒にされて、細胞の細胞質でシグナル伝達経路を活性化する、活性シグナル伝達複合体を生成する多成分タンパク

50



質を含む、化学誘導シグナル伝達複合体を提供する。細胞内の細胞シグナル伝達経路を活性化するためにそのような組成物を使用する方法がさらに提供される。細胞集団を選択的に増幅するための組成物の使用方法もまた提供される。

#### 【背景技術】

##### 【0004】

キメラ抗原受容体 (CAR) は、養子細胞免疫療法に使用するために T 細胞を遺伝子操作するために使用される遺伝子操作された受容体である (Pule et al., Cytother. 5: 3, 2003; Restifo et al., Nat. Rev. Immunol. 12: 269, 2012 を参照のこと)。抗原結合は、CAR の細胞内セグメント上のシグナル伝達ドメインを刺激し、それによってシグナル伝達経路を活性化する。CAR ベースの養子細胞免疫療法は、従来の標準治療法に抵抗性の腫瘍を有するがん患者を処置するために使用されてきた (Grupp et al., N. Engl. J. Med. 368: 1509, 2013; Kalos et al., Sci. Transl. Med. 3: 95ra73, 2011 を参照のこと)。

10

##### 【0005】

細胞は、細胞間連絡を含む細胞外シグナルに応答するためにそれらの表面上に様々な受容体を有する。受容体のシグナル伝達は、広く研究されており、そして受容体は多数のシグナル伝達経路に関与している。正常な生理学的経路では活性化することができない合成複合体を通して所望のシグナルを伝達することを可能にし、これによって所望のそして特別に操作された細胞集団においてのみシグナル伝達を活性化するための機構を提供する、新しい組成物及び方法が依然として必要である。

20

#### 【発明の概要】

##### 【0006】

二量体化活性化受容体開始複合体 (DARIC) が開発されており、それはそれぞれ別々の融合タンパク質として発現されるが、細胞表面上の 2 つの機能的構成要素の再結合のための細胞外多量体化機構 (架橋因子) を含む、結合構成要素及びシグナル伝達構成要素を提供する (その全体が参照により本明細書に明確に組み込まれる、米国特許出願第 2016/0311901 号を参照のこと)。重要なことに、DARIC システムの架橋因子は、ヘテロ二量体受容体複合体を形成し、それはそれ自体では有意なシグナル伝達を生じない。記載された DARIC 複合体は、他の DARIC 複合体とのさらなる共局在化後に生理学的に関連のあるシグナルを開始するだけである。したがって、それらは、DARIC 複合体のさらなる多量体化のための機構なしでは (例えば、DARIC 構成要素の 1 つに組み込まれた結合ドメインによって結合されたりガンドを発現する腫瘍細胞との接触によるなど)、所望の細胞型の選択的増幅を可能にしない。

30

##### 【0007】

したがって、本明細書に記載のいくつかの態様は、化学誘導シグナル伝達複合体 (CISC) を含む組成物及び方法に関する。いくつかの態様では、この組成物及び方法は、所望の細胞集団の選択的増幅のために使用され得る。

##### 【0008】

本明細書に記載のいくつかの実施形態は、化学誘導シグナル伝達複合体 (CISC) をコードするタンパク質配列に関する。いくつかの実施形態では、タンパク質配列は、第 1 の配列を含み、ここでこの第 1 の配列は第 1 の CISC 構成要素をコードする。いくつかの実施形態では、この第 1 の CISC 構成要素は、第 1 の細胞外結合ドメインまたはその一部、ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、及びシグナル伝達ドメインまたはその一部を含む。いくつかの実施形態では、このタンパク質配列は第 2 の配列を含む。いくつかの実施形態では、この第 2 の配列は第 2 の CISC 構成要素をコードする。いくつかの実施形態では、この第 2 の CISC 構成要素は、第 2 の細胞外結合ドメインまたはその一部、ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、及びシグナル伝達ドメインまたはその一部を含む。いくつかの実施形態では、この第 1 の CISC 構成要素及び第 2 の CISC 構成要素は、発現されたときにそれらがリガンドの存在下で二量体化するように配置される。いくつかの実施

40

50

形態では、この第1及び第2のCISC構成要素は二量体化してヘテロ二量体またはホモ二量体を形成する。いくつかの実施形態では、二量体CISCは合成CISCである。いくつかの実施形態では、この第1及び第2の細胞外ドメインは膜貫通ドメインのN末端にある。いくつかの実施形態では、この第1の細胞外結合ドメインまたはその一部は、FK506結合タンパク質(FKBP)ドメインを含む。いくつかの実施形態では、第2の細胞外結合ドメインまたはその一部は、FKBPラパマイシン結合(FRB)ドメインまたはその一部を含む。

【0009】

いくつかの実施形態では、第1及び第2のCISC構成要素の膜貫通ドメインは天然の膜貫通ドメインを含む。いくつかの実施形態では、この第1及び第2のCISC構成要素の膜貫通ドメインは、IL-2受容体膜貫通ドメインを含む。いくつかの実施形態では、この第1及び第2のCISC構成要素のシグナル伝達ドメインまたはその一部は、1つ以上の連結細胞質シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態では、この第1及び第2のCISC構成要素のシグナル伝達ドメインまたはその一部は、サイトカインシグナル伝達ドメインまたは抗原受容体シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態では、この第1のCISC構成要素のシグナル伝達ドメインは、インターロイキン-2受容体サブユニットガンマ(IL2R $\gamma$ )ドメインを含む。いくつかの実施形態では、第2のCISC構成要素のシグナル伝達ドメインは、インターロイキン-2受容体サブユニットベータ(IL2R $\beta$ )ドメインを含む。

【0010】

いくつかの実施形態では、細胞外結合ドメインの一方は、FKBPドメインを含み、他方の細胞外結合ドメインはFRBドメインを含む。いくつかの実施形態では、細胞外結合ドメインは、同時にリガンドに結合するように構成される。

【0011】

いくつかの実施形態では、一方の細胞外結合ドメインは、セレブロンサリドマイド結合ドメインを含み、他方の細胞外結合ドメインは、IMIDクラスの薬物(例えばサリドマイド、ボマリドマイド、レナリドマイドまたは関連類似体)に結合するとセレブロンサリドマイド結合ドメインと相互作用するドメインを含む。いくつかの実施形態では、細胞外結合ドメインは、同時にIMIDリガンドに結合するように構成されている。

【0012】

いくつかの実施形態では、細胞外結合ドメインの一方は、ヘテロ二量体化タンパク質ドメイン対の一方のメンバーを含み、他方の細胞外結合ドメインは、ヘテロ二量体化ドメイン対の他方の構成要素を含み、このドメインは、例えば、同時結合によってリガンドに結合するように構成されている。

【0013】

いくつかの実施形態では、リガンドは、抗体またはその一部、例えば結合断片、タンパク質、小分子、または薬物である。いくつかの実施形態では、リガンドはラパマイシンまたはラパログ、例えば、エベロリムス、CCI-779、C20-メタリルラパマイシン、C16-(S)-3-メチルインドールラパマイシン、C16-iRap、AP21967、ミコフェノール酸ナトリウム、塩酸ベニジピン、AP23573、AP1903、またはその代謝産物、誘導体、及び/または組み合わせである。いくつかの実施形態では、このリガンドは、IMIDクラスの薬物(例えば、サリドマイド、ボマリドマイド、レナリドマイドまたは関連類似体)である。いくつかの実施形態では、リガンドは、0.05 nM~100 nM、例えば0.05 nM、0.1 nM、0.5 nM、1.0 nM、5.0 nM、10.0 nM、15.0 nM、20.0 nM、25.0 nM、30.0 nM、35.0 nM、40.0 nM、45.0 nM、50.0 nM、55.0 nM、60.0 nM、65.0 nM、70.0 nM、75.0 nM、80.0 nM、90.0 nM、95.0 nM、もしくは100 nMなどの量で、または前述の量のうちのいずれか2つによって定義される範囲内の量で、存在するか、または提供される。

【0014】

いくつかの実施形態では、第 1 の配列は、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、第 1 の配列は、配列番号 3、5、または 7 に示されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、第 2 の配列は、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、第 2 の配列は、配列番号 4、6、8、または 9 に示されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態は、配列番号 1、2、3、4、5、6、7、8 及び 9 のアミノ酸配列をコードする核酸に関する。

#### 【0015】

本明細書に提供されるいくつかの実施形態は発現ベクターに関する。いくつかの実施形態では、この発現ベクターは、二量体化学誘導シグナル伝達複合体 (CISC) をコードするタンパク質配列をコードする核酸を含む。いくつかの実施形態では、この発現ベクターは、第 1 のタンパク質配列を含むタンパク質配列をコードする核酸を含み、ここでこの第 1 のタンパク質配列は第 1 の CISC 構成要素をコードする。いくつかの実施形態では、この第 1 の配列をコードする核酸は、第 1 の細胞外結合ドメインまたはその一部、ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、及びシグナル伝達ドメインまたはその一部をコードする配列を含む。いくつかの実施形態では、この発現ベクターは、第 2 のタンパク質配列を含むタンパク質配列をコードする核酸を含み、ここで第 2 のタンパク質配列は第 2 の CISC 構成要素をコードする。いくつかの実施形態では、この第 2 の配列をコードする核酸は、第 2 の細胞外結合ドメインまたはその一部、ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、及びシグナル伝達ドメインまたはその一部をコードする配列を含む。いくつかの実施形態では、この発現ベクターは、第 1 のタンパク質配列または第 2 のタンパク質配列をコードする核酸を含む。いくつかの実施形態では、この発現ベクターは、第 1 の配列及び第 2 のタンパク質配列をコードする核酸を含む。いくつかの実施形態では、このベクターは RNA または DNA である。いくつかの実施形態では、このベクターはレンチウイルスベクターまたはアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターである。いくつかの実施形態では、この発現ベクターは、配列番号 6、配列番号 7、または配列番号 8 に示される核酸配列である。

#### 【0016】

いくつかの実施形態では、この発現ベクターは、プロモーターをさらに含む核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、このプロモーターは誘導性プロモーターまたは構成的プロモーターである。

#### 【0017】

本明細書に提供されるいくつかの実施形態は、化学誘導シグナル伝達複合体発現のための、哺乳動物細胞などの細胞に関する。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞などの細胞は、本明細書に記載のタンパク質配列または本明細書に記載の発現ベクターを含む。したがって、いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞などの細胞は、化学誘導シグナル伝達複合体 (CISC) の構成要素をコードするタンパク質配列を含む。いくつかの実施形態では、このタンパク質配列は、第 1 の配列を含み、ここでこの第 1 の配列は CISC の第 1 の構成要素をコードする。いくつかの実施形態では、この CISC の第 1 の構成要素は、第 1 の細胞外結合ドメインまたはその一部、ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、及びシグナル伝達ドメインまたはその一部を含む。いくつかの実施形態では、このタンパク質配列は第 2 の配列を含む。いくつかの実施形態では、この第 2 の配列は CISC の第 2 の構成要素をコードする。いくつかの実施形態では、この第 2 の CISC 構成要素は、第 2 の細胞外結合ドメインまたはその一部、ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、及びシグナル伝達ドメインまたはその一部を含む。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞などの細胞は、CISC の構成要素をコードするタンパク質配列をコードする核酸を含む発現ベクターを含む。いくつかの実施形態では、この発現ベクターは、第 1 のタンパク質配列を含むタンパク質配列をコードする核酸を含み、ここでこの第 1 のタンパク質配列は CISC の第 1 の構成要素をコードする。いくつかの実施形態では、この第 1 の配列をコードする核酸は、第 1 の細胞外結合ドメインまたはその一部、ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、及びシグナル伝達ドメインまたはその一部をコードする配列を含む。いくつかの実施形態では、この発現ベクターは、第 2 のタンパク質配列を含むタンパク質配列をコードする核酸を

含み、ここでこの第2のタンパク質配列は、CISCの第2の構成要素をコードする。いくつかの実施形態では、この第2の配列をコードする核酸は、第2の細胞外結合ドメインまたはその一部、ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、及びシグナル伝達ドメインまたはその一部をコードする配列を含む。いくつかの実施形態では、この発現ベクターは、第1のタンパク質配列または第2のタンパク質配列をコードする核酸を含む。いくつかの実施形態では、この発現ベクターは、第1の配列及び第2のタンパク質配列をコードする核酸を含む。いくつかの実施形態では、このベクターはRNAまたはDNAである。いくつかの実施形態では、このベクターはレンチウイルスベクターまたはアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターである。

#### 【0018】

いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞などの細胞は、前駆体T細胞または制御性T細胞である。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞などの細胞は、造血幹細胞である。いくつかの実施形態では、この細胞はCD34+、CD8+、またはCD4+細胞である。いくつかの実施形態では、この細胞は、ナイーブCD8+T細胞、セントラルメモリーCD8+T細胞、エフェクターメモリーCD8+T細胞、及びバルクCD8+T細胞、またはそれらの任意の組み合わせからなる群より選択されるCD8+T細胞傷害性リンパ球細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、ナイーブCD4+T細胞、セントラルメモリーCD4+T細胞、エフェクターメモリーCD4+T細胞、及びバルクCD4+T細胞、またはそれらの任意の組み合わせからなる群より選択されるCD4+Tヘルパーリンパ球細胞である。

#### 【0019】

本明細書で提供されるいくつかの実施形態は、哺乳動物細胞などの細胞の内部へのシグナルを活性化する方法に関する。いくつかの実施形態では、この方法は、本明細書に記載の哺乳動物細胞などの細胞を提供すること、本明細書に記載の合成CISCの構成要素をコードするタンパク質配列を発現すること、または細胞内で本明細書に記載の発現ベクターを発現させること、ならびに細胞をリガンドと接触させ、それによって第1及び第2のCISC構成要素を二量体化させ、それによってシグナルを細胞の内部に伝達することを包含する。

#### 【0020】

したがって、いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞などの細胞の内部へのシグナルを活性化する方法は、CISCの構成要素をコードする1つ以上のタンパク質配列を含む哺乳動物細胞などの細胞を提供することを包含する。いくつかの実施形態では、タンパク質配列は、第1の配列を含み、ここでこの第1の配列はCISCの第1の構成要素をコードする。いくつかの実施形態では、CISCの第1の構成要素は、第1の細胞外結合ドメインまたはその一部、ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、及びシグナル伝達ドメインまたはその一部を含む。いくつかの実施形態では、このタンパク質配列は第2の配列を含む。いくつかの実施形態では、この第2の配列はCISCの第2の構成要素をコードする。いくつかの実施形態では、CISCの第2の構成要素は、第2の細胞外結合ドメインまたはその一部、ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、及びシグナル伝達ドメインまたはその一部を含む。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞などの細胞の内部へのシグナルを活性化する方法は、二量体CISCをコードするタンパク質配列をコードする核酸を含む発現ベクターを含む、哺乳動物細胞などの細胞を提供することを包含する。いくつかの実施形態では、この発現ベクターは、第1のタンパク質配列を含むタンパク質配列をコードする核酸を含み、ここで第1のタンパク質配列は、CISCの第1の構成要素をコードする。いくつかの実施形態では、第1の配列をコードする核酸は、第1の細胞外結合ドメインまたはその一部、ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、及びシグナル伝達ドメインまたはその一部をコードする配列を含む。いくつかの実施形態では、この発現ベクターは、第2のタンパク質配列を含むタンパク質配列をコードする核酸を含み、ここでこの第2のタンパク質配列はCISCの第2の構成要素をコードする。いくつかの実施形態では、第2の配列をコードする核酸は、第2の細胞外結合ドメインまたはその一部、ヒンジドメイン、膜貫通ド

10

20

30

40

50

メイン、及びシグナル伝達ドメインまたはその一部をコードする配列を含む。いくつかの実施形態では、この発現ベクターは、第1のタンパク質配列または第2のタンパク質配列をコードする核酸を含む。いくつかの実施形態では、この発現ベクターは、第1の配列及び第2のタンパク質配列をコードする核酸を含む。いくつかの実施形態では、このベクターはRNAまたはDNAである。いくつかの実施形態では、このベクターはレンチウイルスベクターまたはアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターである。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞などの細胞がタンパク質配列を含むか、または発現ベクターを含むかにかかわらず、この方法は、ヘテロ二量体CISCをコードするタンパク質配列を発現すること、または発現ベクターを発現すること、ならびに細胞をリガンドと接触させ、それによって、CISCの第1及び第2の構成要素を二量体化させ、それがシグナルを細胞の内部に伝達することをさらに包含する。

10

#### 【0021】

いくつかの実施形態では、リガンドは、抗体またはその結合部分、タンパク質、小分子、または薬物を含む。いくつかの実施形態では、このリガンドは、ラパマイシンまたはラパログ、例えば、エベロリムス、CCI-779、C20-メタリルラパマイシン、C16-(S)-3-メチルインドールラパマイシン、C16-iRap、AP21967、ミコフェノール酸ナトリウム、塩酸ベニジピン、AP23573、もしくはAP1903、またはその代謝産物、誘導体、及び/または組み合わせである。いくつかの実施形態では、このリガンドは、免疫調節イミド薬(IMiD)クラスの薬物(例えば、サリドマイド、ポマリドマイド、レナリドマイドまたは関連類似体)である。いくつかの実施形態では、このリガンドは、0.05 nM ~ 100 nM、例えば0.05 nM、0.1 nM、0.5 nM、1.0 nM、5.0 nM、10.0 nM、15.0 nM、20.0 nM、25.0 nM、30.0 nM、35.0 nM、40.0 nM、45.0 nM、50.0 nM、55.0 nM、60.0 nM、65.0 nM、70.0 nM、75.0 nM、80.0 nM、90.0 nM、95.0 nM、もしくは100 nMなどの量で、または前述の量のうちのいずれか2つによって定義される範囲内の量で存在するか、または提供される。いくつかの実施形態では、シグナルの伝達はサイトカインシグナル伝達に影響を及ぼす。いくつかの実施形態では、シグナルの伝達は、インターロイキン-2受容体(IL2R)シグナル伝達を表現型模写するシグナルをもたらす。いくつかの実施形態では、シグナルの伝達は、サイトカイン受容体の下流標的のリン酸化に影響を及ぼす。いくつかの実施形態では、リガンドとの接触に続いて、化学誘導シグナル伝達複合体を発現する哺乳動物細胞などの細胞は、異種細胞集団から選択的に増幅される。いくつかの実施形態では、このリガンドはラパマイシンを含み、化学誘導シグナル伝達複合体を発現する哺乳動物細胞などの細胞は、化学誘導シグナル伝達複合体発現細胞において増殖を選択的に誘導することによってインビトロまたはインビボで選択的に増幅されるが、ラパマイシンは、好ましくは同時に、哺乳動物細胞などの非化学誘導シグナル伝達複合体発現細胞において抗増殖効果を引き起こす。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞などの選択的に増幅する細胞は、2つの異なる遺伝子標的化事象を経験している。いくつかの実施形態では、各遺伝子標的化事象は、哺乳動物細胞などの細胞に化学誘導シグナル伝達複合体の対の一方の構成要素を与え、両方の遺伝子標的化事象を受けた細胞のみがリガンドとの接触後に増幅できるようにする。

20

30

40

#### 【0022】

本明細書に提供されるいくつかの実施形態は、ホモ二量体化のための化学誘導シグナル伝達複合体構成要素の構成要素をコードするタンパク質配列に関する。いくつかの実施形態では、このタンパク質配列は、第1の配列を含む。いくつかの実施形態では、この第1の配列は、ホモ二量体化ドメインまたはその一部、ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、及びインターロイキン-2受容体サブユニットガンマ(IL2Rg)シグナル伝達ドメインまたはその一部を含む第1の化学誘導シグナル伝達複合体構成要素をコードする。いくつかの実施形態では、このタンパク質配列は、第2の配列を含む。いくつかの実施形態では、この第2の配列は、ホモ二量体化ドメインまたはその一部、ヒンジドメイン、膜貫通ド

50

メイン、及びインターロイキン - 2 受容体サブユニットベータ ( I L 2 R b ) シグナル伝達ドメインまたはその一部を含む第 2 の化学誘導シグナル伝達複合体構成要素をコードする。いくつかの実施形態では、第 1 の化学誘導シグナル伝達複合体構成要素及び第 2 の化学誘導シグナル伝達複合体構成要素は、発現されると、それらが 25 % の第 1 の化学誘導シグナル伝達複合体ホモ二量体、25 % の第 2 の化学誘導シグナル伝達複合体ホモ二量体、及び 50 % の第 1 / 第 2 の化学誘導シグナル伝達複合体ヘテロ二量体という集団を、ホモ二量体化ドメインを架橋するように構成されたリガンドの存在下で形成するように配置される。

【 0 0 2 3 】

いくつかの実施形態では、第 1 の配列は、配列番号 11 に示されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、第 2 の配列は、配列番号 10 または 12 に示されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態は、配列番号 10、11、及び 12 のアミノ酸配列をコードする核酸に関する。

10

【 0 0 2 4 】

いくつかの実施形態では、第 1 及び第 2 の化学誘導シグナル伝達複合体構成要素のシグナル伝達ドメインまたはその一部は、1 つ以上の連結細胞質シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態では、ホモ二量体化ドメインは、好ましくは同時に、例えば A P 1 9 0 3 または関連のラパログ、ミコフェノール酸ナトリウム、塩酸ベニジピン、もしくは A P 2 3 5 7 3、またはその代謝産物、誘導体及び / または組み合わせなどのリガンドに結合するように構成された、F K B P ドメインまたはその変異体またはその部分を含む。いくつかの実施形態では、このリガンドは I M I D クラスの薬物 (例えば、サリドマイド、ポマリドマイド、レナリドマイドまたは関連類似体) である。

20

【 0 0 2 5 】

本明細書で提供されるいくつかの実施形態は、本明細書で提供されるようなタンパク質配列の第 1 及び / または第 2 の配列をコードする核酸を含む、ホモ二量体 C I S C 構成要素発現用の発現ベクターに関する。したがって、いくつかの実施形態では、この発現ベクターは、配列番号 10、11、及び 12 に示される化学誘導シグナル伝達複合体をコードするタンパク質配列をコードする核酸を含む。いくつかの実施形態では、この発現ベクターは、第 1 の配列をコードする。いくつかの実施形態では、この第 1 の配列は、ホモ二量体化ドメインまたはその一部、ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、及びインターロイキン - 2 受容体サブユニットガンマ ( I L 2 R g ) シグナル伝達ドメインまたはその一部を含む第 1 の化学誘導シグナル伝達複合体構成要素をコードする。いくつかの実施形態では、この発現ベクターは第 2 の配列をコードする。いくつかの実施形態では、この第 2 の配列は、ホモ二量体化ドメインまたはその一部、ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、及びインターロイキン - 2 受容体サブユニットベータ ( I L 2 R b ) シグナル伝達ドメインまたはその一部を含む第 2 の化学誘導シグナル伝達複合体構成要素をコードする。いくつかの実施形態では、ベクターは R N A または D N A である。いくつかの実施形態では、このベクターは、レンチウイルスベクターまたはアデノ随伴ウイルス ( A A V ) ベクターである。いくつかの実施形態では、この発現ベクターは、プロモーターをさらに含む。いくつかの実施形態では、このプロモーターは誘導性プロモーターまたは構成的プロモーターである。

30

40

【 0 0 2 6 】

本明細書に提供されるいくつかの実施形態は、ホモ二量体化学誘導シグナル伝達複合体発現のための、哺乳動物細胞などの細胞に関する。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞などの細胞は、ホモ二量体化構成要素発現について本明細書に記載のタンパク質配列、またはホモ二量体化構成要素発現について本明細書に記載の発現ベクターを含む。したがって、いくつかの実施形態では、ホモ二量体化のための化学誘導シグナル伝達複合体構成要素をコードするタンパク質配列を含む、哺乳動物細胞などの細胞が提供される。いくつかの実施形態では、タンパク質配列は第 1 の配列を含む。いくつかの実施形態では、第 1 の配列は、ホモ二量体化ドメインまたはその一部、ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、及びインターロイキン - 2 受容体サブユニットガンマ ( I L 2 R g ) シグナル伝達ドメイン

50

またはその一部を含む第1の化学誘導シグナル伝達複合体をコードする。いくつかの実施形態では、タンパク質配列は、第2の配列を含む。いくつかの実施形態では、この第2の配列は、ホモ二量体化ドメインまたはその一部、ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、及びインターロイキン-2受容体サブユニットベータ(IL2Rb)シグナル伝達ドメインまたはその一部を含む、第2の化学誘導シグナル伝達複合体構成要素をコードする。いくつかの実施形態では、第1の化学誘導シグナル伝達複合体構成要素及び第2の化学誘導シグナル伝達複合体構成要素は、発現されると、それらが約25%の第1の化学誘導シグナル伝達複合体ホモ二量体、25%の第2の化学誘導シグナル伝達複合体ホモ二量体、及び50%の第1/第2の化学誘導シグナル伝達複合体ヘテロ二量体という集団を、ホモ二量体化ドメインを架橋するように構成されたリガンドの存在下で形成するように配置される。いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるようなタンパク質配列の第1及び/または第2の配列をコードする核酸を含む、ホモ二量体化学誘導シグナル伝達複合体発現用の発現ベクターを含む、哺乳動物細胞などの細胞が提供される。したがって、いくつかの実施形態では、発現ベクターは、化学誘導シグナル伝達複合体をコードするタンパク質配列をコードする核酸を含む。いくつかの実施形態では、発現ベクターは、第1の配列をコードする。いくつかの実施形態では、第1の配列は、ホモ二量体化ドメインまたはその一部、ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、及びインターロイキン-2受容体サブユニットガンマ(IL2Rg)シグナル伝達ドメインまたはその一部を含む第1の化学誘導シグナル伝達複合体構成要素をコードする。いくつかの実施形態では、発現ベクターは、第2の配列をコードする。いくつかの実施形態では、この第2の配列は、ホモ二量体化ドメインまたはその一部、ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、及びインターロイキン-2受容体サブユニットベータ(IL2Rb)シグナル伝達ドメインまたはその一部を含む、第2の化学誘導シグナル伝達複合体構成要素をコードする。いくつかの実施形態では、このベクターはRNAまたはDNAである。いくつかの実施形態では、このベクターはレンチウイルスベクターまたはアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターである。

【0027】

いくつかの実施形態では、ホモ二量体化学誘導シグナル伝達複合体のタンパク質配列は、配列番号13または配列番号14に示されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態は、配列番号13及び配列番号14のアミノ酸配列をコードする核酸に関する。

【0028】

いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞などの化学誘導シグナル伝達複合体細胞は、前駆体T細胞または制御性T細胞である。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞などの細胞は造血幹細胞である。いくつかの実施形態では、細胞はCD34<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、またはCD4<sup>+</sup>細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、ナイーブCD8<sup>+</sup>T細胞、セントラルメモリーCD8<sup>+</sup>T細胞、エフェクターメモリーCD8<sup>+</sup>T細胞、及びバルクCD8<sup>+</sup>T細胞からなる群より選択されるCD8<sup>+</sup>T細胞傷害性リンパ球細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、ナイーブCD4<sup>+</sup>T細胞、セントラルメモリーCD4<sup>+</sup>T細胞、エフェクターメモリーCD4<sup>+</sup>T細胞、及びバルクCD4<sup>+</sup>T細胞からなる群より選択されるCD4<sup>+</sup>Tヘルパーリンパ球細胞である。

【0029】

本明細書で提供されるいくつかの実施形態は、ホモ二量体化化学誘導シグナル伝達複合体を用いる、哺乳動物細胞などの細胞の内部へのシグナルを活性化する方法に関する。いくつかの実施形態では、この方法は、本明細書に提供されるような哺乳動物細胞などの細胞を提供すること、本明細書に提供されるようなホモ二量体化学誘導シグナル伝達複合体をコードするタンパク質配列を発現すること、または本明細書に提供されるようなホモ二量体化学誘導シグナル伝達複合体の発現ベクターを発現すること、ならびにこの細胞を二量体化剤と接触させ、それにより第1及び第2の化学誘導シグナル伝達複合体を二量体化させ、これが細胞の内部にシグナルを伝達することを包含する。したがって、いくつかの実施形態では、この方法は、ホモ二量体CISC構成要素発現のための本明細書に記載のタンパク質配列、またはホモ二量体CISC構成要素発現のための本明細書に記載の発現ベ

10

20

30

40

50

クターを含む、哺乳動物細胞などの細胞を提供することを包含する。したがって、いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞などの細胞が提供され、ここでこの細胞はホモ二量体化のための化学誘導シグナル伝達複合体をコードするタンパク質配列を含む。いくつかの実施形態では、タンパク質配列は第1の配列を含む。いくつかの実施形態では、第1の配列は、ホモ二量体化ドメインまたはその一部、ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、及びインターロイキン-2受容体サブユニットガンマ (IL2R $\gamma$ ) シグナル伝達ドメインまたはその一部を含む第1の化学誘導シグナル伝達複合体構成要素をコードする。いくつかの実施形態では、このタンパク質配列は第2の配列を含む。いくつかの実施形態では、第2の配列は、ホモ二量体化ドメインまたはその一部、ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、及びインターロイキン-2受容体サブユニットベータ (IL2R $\beta$ ) シグナル伝達ドメインまたはその一部を含む第2の化学誘導シグナル伝達複合体構成要素をコードする。いくつかの実施形態では、第1の化学誘導シグナル伝達複合体構成要素及び第2の化学誘導シグナル伝達複合体構成要素は、発現されると、それらが約25%の第1の化学誘導シグナル伝達複合体ホモ二量体、25%の第2の化学誘導シグナル伝達複合体ホモ二量体、及び50%の第1/第2の化学誘導シグナル伝達複合体ヘテロ二量体という集団を、ホモ二量体化ドメインを架橋するように構成されたリガンドの存在下で形成するように配置される。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞などの細胞が提供され、ここでこの細胞は、本明細書で提供されるタンパク質配列の第1及び/または第2の配列をコードする核酸を含むホモ二量体CISC構成要素発現用の発現ベクターを含む。したがって、いくつかの実施形態では、発現ベクターは、化学誘導シグナル伝達複合体またはその構成要素をコードするタンパク質配列をコードする核酸を含む。いくつかの実施形態では、発現ベクターは、第1の配列をコードする。いくつかの実施形態では、第1の配列は、ホモ二量体化ドメインまたはその一部、ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、及びインターロイキン-2受容体サブユニットガンマ (IL2R $\gamma$ ) シグナル伝達ドメインまたはその一部を含む第1の化学誘導シグナル伝達複合体構成要素をコードする。いくつかの実施形態では、発現ベクターは、第2の配列をコードする。いくつかの実施形態では、この第2の配列は、ホモ二量体化ドメインまたはその一部、ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、及びインターロイキン-2受容体サブユニットベータ (IL2R $\beta$ ) シグナル伝達ドメインまたはその一部を含む、第2の化学誘導シグナル伝達複合体構成要素をコードする。いくつかの実施形態では、このベクターはRNAまたはDNAである。いくつかの実施形態では、ベクターは、レンチウイルスベクターまたはアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターである。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞などの上記細胞を提供した後、この方法は、本明細書で提供されるようなホモ二量体化学誘導シグナル伝達複合体構成要素をコードするタンパク質配列を発現すること、または本明細書に提供されるようなホモ二量体化学誘導シグナル伝達複合体構成要素の発現ベクターを発現すること、ならびにこの細胞を二量体化剤と接触させ、それにより第1及び第2の化学誘導シグナル伝達複合体構成要素を二量体化させ、それがシグナルを細胞の内部に伝達することを包含する。

#### 【0030】

いくつかの実施形態では、使用される二量体化剤は、リガンド、例えば、ラパマイシンまたはラパログ、例えば、エベロリムス、CCI-779、C20-メタリルラパマイシン、C16-(S)-3-メチルインドールラパマイシン、C16-iRap、AP21967、ミコフェノール酸ナトリウム、塩酸ベニジピン、もしくはAP23573、AP1903、またはそれらの代謝産物、誘導体、及び/または組み合わせである。いくつかの実施形態では、このリガンドは、IMiDクラスの薬物 (例えば、サリドマイド、ポマリドマイド、レナリドマイドまたは関連類似体) である。いくつかの実施形態では、シグナルの伝達は、サイトカインシグナル伝達に影響を及ぼす。いくつかの実施形態では、シグナルの伝達は、インターロイキン-2受容体 (IL2R) シグナル伝達を表現型模写する。いくつかの実施形態では、二量体化剤との接触に続いて、化学誘導シグナル伝達複合体を発現する哺乳動物細胞などの細胞が、異種細胞集団から選択的に増幅される。いくつかの実施形態では、ラパマイシンは二量体化剤であり、かつ化学誘導シグナル伝達複合体



発現細胞における増殖を選択的に誘導することによって哺乳動物細胞などの、細胞母集団をインピトロまたはインピボで選択的に増幅させ、一方で非化学誘導シグナル伝達複合体発現細胞においては、抗増殖効果を生じるように使用される。

#### 【 0 0 3 1 】

本明細書に提供されるいくつかの実施形態は、化学誘導シグナル伝達複合体構成要素をコードするタンパク質配列に関する。いくつかの実施形態では、タンパク質配列は、ホモ二量体化ドメインまたはその一部、ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、及びシグナル伝達ドメインまたはその一部を含む化学誘導シグナル伝達複合体構成要素をコードする配列を含む。いくつかの実施形態では、化学誘導シグナル伝達複合体構成要素は、発現されると、ホモ二量体化ドメインを架橋するように構成されたリガンドの存在下でホモ二量体 C I S C の集団を形成するように配置される。いくつかの実施形態では、シグナル伝達ドメインまたはその一部は、1つ以上の連結細胞質シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態では、ホモ二量体化ドメインは、好ましくは同時にラパマイシンなどのリガンドに結合するように構成された、F K B P ドメインまたは F R B またはその一部を含む。

10

#### 【 0 0 3 2 】

本明細書で提供されるいくつかの実施形態は、本明細書で提供されるように、タンパク質配列をコードする核酸を含む発現ベクターに関する。したがって、いくつかの実施形態では、この発現ベクターは、化学誘導シグナル伝達複合体をコードするタンパク質配列をコードする核酸を含む。いくつかの実施形態では、タンパク質配列は、ホモ二量体化ドメインまたはその一部、ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、及びシグナル伝達ドメインまたはその一部を含む化学誘導シグナル伝達複合体構成要素をコードする配列を含む。いくつかの実施形態では、化学誘導シグナル伝達複合体構成要素は、発現されると、ホモ二量体化ドメインを架橋するように構成されたリガンドの存在下で、ホモ二量体の集団を形成するように配置される。いくつかの実施形態では、シグナル伝達ドメインまたはその一部は、1つ以上の連結細胞質シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態では、ホモ二量体化ドメインは、好ましくは同時に、A P 1 9 0 3 などのリガンドに結合するように構成された、F K B P ドメインまたは F R B またはその一部を含む。いくつかの実施形態では、この発現ベクターはプロモーターをさらに含む。いくつかの実施形態では、このプロモーターは、誘導性プロモーターまたは構成的プロモーターである。いくつかの実施形態では、このベクターは R N A または D N A である。いくつかの実施形態では、このベクターはレンチウイルスベクターまたはアデノ随伴ウイルス ( A A V ) ベクターである。

20

30

#### 【 0 0 3 3 】

本明細書に提供されるいくつかの実施形態は、ホモ二量体化学誘導シグナル伝達複合体発現のための、哺乳動物細胞などの細胞に関する。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞などの細胞は、本明細書に記載のホモ二量体化 C I S C 構成要素タンパク質配列、または本明細書に記載のホモ二量体タンパク質配列の核酸配列をコードする発現ベクターを含む。したがって、いくつかの実施形態では、ホモ二量体化学誘導シグナル伝達複合体発現のための哺乳動物細胞などの細胞は、化学誘導シグナル伝達複合体をコードするタンパク質配列を含む。いくつかの実施形態では、タンパク質配列は、ホモ二量体化ドメインまたはその一部、ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、及びシグナル伝達ドメインまたはその一部を含む化学誘導シグナル伝達複合体構成要素をコードする配列を含む。いくつかの実施形態では、化学誘導シグナル伝達複合体は、発現されたときにホモ二量体化ドメインを架橋するように構成されたリガンドの存在下でホモ二量体の集団を形成するように配置される。いくつかの実施形態では、シグナル伝達ドメインまたはその一部は、1つ以上の連結細胞質シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態では、ホモ二量体化ドメインは、好ましくは同時に A P 1 9 0 3 などのリガンドに結合するように構成された、F K B P ドメインまたは F R B またはその一部を含む。いくつかの実施形態では、ホモ二量体化学誘導シグナル伝達複合体発現のための哺乳動物細胞などの細胞は、化学誘導シグナル伝達複合体構成要素をコードするタンパク質配列をコードする核酸を含む発現ベクターを含む。いくつかの実施形態では、タンパク質配列は、ホモ二量体化ドメインまたはその一部、

40

50

ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、及びシグナル伝達ドメインまたはその一部を含む化学誘導シグナル伝達複合体構成要素をコードする配列を含む。いくつかの実施形態では、化学誘導シグナル伝達複合体構成要素は、発現されると、ホモ二量体化ドメインを架橋するように構成されたりガンドの存在下でホモ二量体の集団を形成するように配置される。いくつかの実施形態では、シグナル伝達ドメインまたはその一部は、1つ以上の連結細胞質シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態では、ホモ二量体化ドメインは、好ましくは同時に A P 1 9 0 3 などのリガンドに結合するように構成された、F K B P ドメインまたは F R B またはその一部を含む。いくつかの実施形態では、この発現ベクターはプロモーターをさらに含む。いくつかの実施形態では、このプロモーターは誘導性プロモーターまたは構成的プロモーターである。いくつかの実施形態では、このベクターは R N A または D N A である。いくつかの実施形態では、このベクターはレンチウイルスベクターまたはアデノ随伴ウイルス ( A A V ) ベクターである。

10

#### 【 0 0 3 4 】

いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞などの細胞は、前駆体 T 細胞または制御性 T 細胞である。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞などの細胞は造血幹細胞である。いくつかの実施形態では、この細胞は C D 3 4 + 、C D 8 + 、または C D 4 + 細胞である。いくつかの実施形態では、この細胞は、ナイーブ C D 8 + T 細胞、セントラルメモリー C D 8 + T 細胞、エフェクターメモリー C D 8 + T 細胞、及びバルク C D 8 + T 細胞からなる群より選択される C D 8 + T 細胞傷害性リンパ球細胞である。いくつかの実施形態では、この細胞は、ナイーブ C D 4 + T 細胞、セントラルメモリー C D 4 + T 細胞、エフェクターメモリー C D 4 + T 細胞、及びバルク C D 4 + T 細胞からなる群より選択される C D 4 + T ヘルパーリンパ球細胞である。

20

#### 【 0 0 3 5 】

本明細書で提供されるいくつかの実施形態は、哺乳動物細胞などの細胞の内部へのシグナルを活性化する方法に関する。いくつかの実施形態では、この方法は、本明細書に記載のホモ二量体化学誘導シグナル伝達複合体構成要素のための哺乳動物細胞などの細胞を提供すること、本明細書に提供のホモ二量体化学誘導シグナル伝達複合体構成要素をコードするタンパク質配列を発現すること、または本明細書に記載のホモ二量体化学誘導シグナル伝達複合体構成要素発現のための核酸をコードする発現ベクターを発現すること、ならびにこの細胞を二量体化剤と接触させ、それによって第 1 及び第 2 の化学誘導シグナル伝達複合体構成要素を二量体化させ、これがシグナルを細胞の内部に伝達することを包含する。したがって、いくつかの実施形態では、この方法は、本明細書に記載のホモ二量体化 C I S C 構成要素タンパク質配列、または本明細書に記載のホモ二量体 C I S C 構成要素タンパク質配列の核酸配列をコードする発現ベクターを含む哺乳動物細胞のような細胞を提供することを包含する。したがって、いくつかの実施形態では、ホモ二量体化学誘導シグナル伝達複合体構成要素発現用の細胞は、化学誘導シグナル伝達複合体構成要素をコードするタンパク質配列を含む。いくつかの実施形態では、このタンパク質配列は、ホモ二量体化ドメインまたはその一部、ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、及びシグナル伝達ドメインまたはその一部を含む、化学誘導シグナル伝達複合体構成要素をコードする配列を含む。いくつかの実施形態では、化学誘導シグナル伝達複合体構成要素は、発現されると、ホモ二量体化ドメインを架橋するように構成されたりガンドの存在下でホモ二量体の集団を形成するように配置される。いくつかの実施形態では、シグナル伝達ドメインまたはその一部は、1つ以上の連結細胞質シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態では、ホモ二量体化ドメインは、好ましくは同時に A P 1 9 0 3 などのリガンドに結合するように構成された、F K B P ドメインまたは F R B またはその一部を含む。いくつかの実施形態では、このタンパク質配列はさらに第 2 の配列を含む。いくつかの実施形態では、ホモ二量体構成要素発現用の哺乳動物細胞などの細胞は、化学誘導シグナル伝達複合体構成要素をコードするタンパク質配列をコードする核酸を含む発現ベクターを含む。いくつかの実施形態では、このタンパク質配列は、ホモ二量体化ドメインまたはその一部、ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、及びシグナル伝達ドメインまたはその一部を含む化学誘導

30

40

50

シグナル伝達複合体構成要素をコードする配列を含む。いくつかの実施形態では、化学誘導シグナル伝達複合体構成要素は、発現されると、ホモ二量体化ドメインを架橋するように構成されたりリガンドの存在下でホモ二量体の集団を形成するように配置される。いくつかの実施形態では、シグナル伝達ドメインまたはその一部は、1つ以上の連結細胞質シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態では、ホモ二量体化ドメインは、好ましくは同時に A P 1 9 0 3 などのリガンドに結合するように構成された、F K B P ドメインまたは F R B またはその一部を含む。いくつかの実施形態では、この発現ベクターはプロモーターをコードする。いくつかの実施形態では、このプロモーターは誘導性プロモーターまたは構成的プロモーターである。いくつかの実施形態では、このベクターは、R N A または D N A である。いくつかの実施形態では、ベクターは、レンチウイルスベクターまたはアデノ随伴ウイルス ( A A V ) ベクターである。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞などの細胞を提供した後、この方法は、本明細書に記載のホモ二量体 C I S C をコードするタンパク質配列を発現すること、または本明細書に記載のホモ二量体 C I S C 発現用の核酸をコードする発現ベクターを発現すること、ならびにこの細胞を二量体化剤と接触させて、それにより、第 1 及び第 2 の C I S C を二量体化させ、それがシグナルを細胞の内部に伝達することをさらに包含する。

10

#### 【 0 0 3 6 】

いくつかの実施形態では、使用される二量体化剤は、リガンド、例えば、ラパマイシンまたはラパログ、例えば、エベロリムス、C C I - 7 7 9、C 2 0 - メタリルラパマイシン、C 1 6 - ( S ) - 3 - メチルインドールラパマイシン、C 1 6 - i R a p、A P 2 1 9 6 7、ミコフェノール酸ナトリウム、塩酸ベニジピン、A P 2 3 5 7 3、もしくは A P 1 9 0 3、またはそれらの代謝産物、誘導体、及び/または組み合わせである。いくつかの実施形態では、このリガンドは、I M I D クラスの薬物 (例えば、サリドマイド、ポマリドマイド、レナリドマイドまたは関連類似体) である。いくつかの実施形態では、シグナルの伝達は、サイトカインシグナル伝達に影響を及ぼす。いくつかの実施形態では、シグナルの伝達は、インターロイキン - 2 受容体 ( I L 2 R ) シグナル伝達に影響を及ぼす。いくつかの実施形態では、二量体化剤との接触後、C I S C を発現する細胞は、哺乳動物細胞などの異種細胞集団から選択的に増幅される。

20

#### 【 0 0 3 7 】

本明細書で提供されるいくつかの実施形態は、本明細書で説明される構成要素を含むキットまたはシステムに関する。したがって、いくつかの実施形態では、以下：本明細書に記載のタンパク質配列；本明細書に記載の発現ベクター；及び/または本明細書に記載の細胞、のうちの 1 つ以上を含むキットが提供される。いくつかの実施形態は、以下：本明細書に記載の細胞であって、本明細書に記載のタンパク質配列をコードする核酸を含む、本明細書に記載の発現ベクターをその細胞が含む、細胞の内部へのシグナルを選択的に活性化するためのシステムを包含する。

30

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【 0 0 3 8 】

【図 1】T 細胞増幅における I L - 2 シグナル伝達を説明する概略図である。この図は、下流シグナル伝達経路をもたらず、F R B - C D 2 5 (膜貫通 ( T M ) ドメイン及び細胞質ドメイン) ( I L 2 R ) 及び F K B P - C D 2 5 ( T M 及び細胞質ドメイン) ( I L 2 R ) を含む I L - 2 鎖のキメラ二量体化を示す。重要なことに、細胞外ドメインの大部分または全部の除去は、これらの化学誘導シグナル伝達複合体構成要素への I L 2 の結合を妨げ、したがってそれらは内因性 I L 2 に反応性ではない。

40

【図 2】化学誘導シグナル伝達複合体 ( C I S C ) による細胞増幅戦略を概略的に示す。この戦略では、ラパマイシンが 2 つの異なるタンパク質モチーフ ( F K B P 及び F R B ) を同時に結合して、適切にデザインされた C I S C 構成要素の対でタンパク質の二量体化及び活性化下流のシグナル伝達事象を誘導する能力を利用する。このようにして C I S C を使用すると、選択的細胞増幅が可能になる。

【図 3】I L 2 R - C I S C 構造の様々な実施形態を示す。図 3 に示す実施形態は、F R

50

B - I L 2 R 及び F K B P - I L 2 R の両方の構造を示しており、最大の可塑性 ( 1 2 1 0 - 本実施形態は、短いリンカー配列を組み込み、その全体は最初が I L 2 R の細胞外免疫グロブリンスーパーファミリー ( I g S F ) ドメインならびにその T M 及び細胞質テール領域である )、中程度の可塑性 ( 1 2 1 1 - この実施形態は全体で I L 2 R の最初の細胞外 I g S F ドメインならびにその T M 及び細胞質テール領域を組み込む )、そして最も可塑性が低い ( 1 2 3 3 - この実施形態は、I L 2 R T M 及び細胞質テール領域のみを組み込む ) ものを含む、様々な程度の可塑性についての概略図を示している。

【図 4】図 4 A 及び図 4 B は、ウエスタンブロットの画像を示す。I L 2 R - C I S C ヒト C D 4 + T 細胞を、形質導入の 2 日後に回収し、そして細胞質画分及び膜画分を単離した。上部パネルは、この方法が、サイトゾル及び膜を効率的に分画するために用いられたことを実証するための対照である：上部ゲルは I L 2 R を示し；中央のゲルは I L 2 R を示し；そして下部の 2 つのゲルは C D 3 及び E R K を示す対照ゲルである。図 4 B は、1 2 1 0、1 2 1 1、及び 1 2 3 3 を含む、それぞれの I L 2 R - C I S C についてのウエスタンブロットを示す。矢印は、C I S C 構成要素発現の検出を示す。重要なことに、1 2 3 3 構造は最高レベルで表現されているように見える。

10

【図 5】I L 2 R - C I S C についてのウエスタンブロットの画像を示す。I L 2 R - C I S C ヒト C D 4 + T 細胞を、1 n M の 1 5 日間のラパマイシン処理後に、続いて 4 8 時間のサイトカイン飢餓によって分析した。I L - 2 ( 5 0 n g ) またはラパマイシン ( 1 0 0 n M ) で 2 0 分間刺激した後、その細胞をウエスタンブロット用に回収した。ウエスタンブロットは A k t 活性化を示しており、これは化学誘導シグナル伝達複合体が細胞増幅を促進する能力を示している。

20

【図 6】細胞集団を選択的に増幅するための I L 2 R - C I S C の使用を実証する実験を概説する。I L 2 R - C I S C の各構造 ( すなわち、1 2 1 0、1 2 1 1、及び 1 2 3 3 ) を、2 A 配列を用いて G F P と一緒にシス連結させ、レンチウイルス発現カセット中の M N D プロモーターの制御下に置いた ( 図 5、下段に図式化されているとおり )。各 I L 2 R - C I S C 構造からのレンチウイルス粒子を作製し、これを用いて初代ヒト T 細胞を形質導入した。形質導入後、その細胞を I L 2 中で 2 日間成長させ、次いで半分に分け、示されているように、半分を I L 2 単独で、及び半分をラパマイシン単独で成長させた。

【図 7】図 7 A は、G F P 単独の発現を駆動するレンチウイルスベクターを用いた T 細胞の効率的な形質導入を示す。図 7 B は、ニセの及び M N D - G F P レトロウイルスベクターと比較した、図 3 の下部に概説されるベクター ( M N D - I L 2 R b - C I S C - 2 A - I L 2 R g - C I S C - 2 A - G F P ) を用いて発現された 1 2 1 0、1 2 1 1、及び 1 2 3 3 の発現を示す。T 細胞を、4 8 時間活性化し、次いで 2 8 時間インキュベートした。T 細胞を、I L - 2 / 7 / 1 5 と共にプレートした。レンチウイルス形質導入は、硫酸プロタミンを用いた M N D - G F P 対照の I L 2 - C I S C を含んだ。形質導入細胞を、サイトカイン ( I L - 2、5 0 n g / m L ; I L - 5、5 n g / m L ; I L - 1 7、5 n g / m L ) と共に 3 7 で 2 4 時間インキュベートした。I L 2 - C I S C 発現は、フローサイトメトリーを使用して G F P 発現によって決定した。

30

【図 8】細胞のフロー分析を示す。上のフローパネルは、2 日目 ( 細胞を I L 2 またはラパマイシン培養物に入れる直前 ) の G F P 発現 ( X 軸 ) 及び F R B 発現 ( I L 2 R g - C I S C 構成要素の細胞外ドメイン、Y 軸 ) についての細胞のフロー分析を示す。下の 2 つのフローパネルは、形質導入の 4 日後、I L 2 単独 ( 上のパネル )、またはラパマイシン ( 下のパネル ) 中で培養物に分割した 2 日後の G F P 発現 ( X 軸 ) 及び F R B 発現についての細胞のフロー分析を示す。特に 1 2 3 3 ( 右下のフローパネル ) については、ラパマイシン単独で培養した細胞は、シス連結の G F P マーカーによって読み出されるとおり、I L 2 R - C I S C 発現について富化し始めていることに留意されたい。

40

【図 9】細胞のフロー分析を示す。上の 2 つのフローパネルは、形質導入の 6 日後、I L 2 単独 ( 上のパネル )、またはラパマイシン ( 下のパネル ) 中での培養物への分割の 4 日後の G F P 発現 ( X 軸 ) 及び F R B 発現についての細胞のフロー分析を示す。1 2 3 3 についての G F P マーカーのさらなる富化に留意されたい。下の 2 つのフローパネルは、形

50

質導入の9日後、IL2単独（上のパネル）またはラパマイシン（下のパネル）での培養物への分割の7日後のGFP発現（X軸）及びFRB発現についての細胞のフロー分析を示す。1233 GFP+細胞のさらなる富化に留意のこと。

【図10】細胞のフロー分析を示す。上の2つのフローパネルは、形質導入の12日後、IL2単独（上のパネル）、またはラパマイシン（下のパネル）中での培養物の分割の10日後のGFP発現（X軸）及びFRB発現についての細胞のフロー分析を示す。下の2つのフローパネルは、形質導入の17日後、IL2単独（上のパネル）、またはラパマイシン（下のパネル）中の培養物に分割した15日後のGFP発現（X軸）及びFRB発現についての細胞のフロー分析を示す。1233 IL2R-CISCを発現する細胞は、今や細胞集団の97%まで富化されている（フローパネルの最も下の右側）。

10

【図11】図6に概説されているが25日間実施された実験の15日間の経過にわたるIL2R-CISC V3発現細胞の富化を示す。一番左の単一パネルは、ラパマイシン処理開始時の細胞を表す。パネルの各段は、異なる処理を表す。下の段に見られるように、15日までに、IL2R-CISC V3細胞は、ラパマイシン中で培養した場合に、64% mCherry陽性 ~> 93% mCherry陽性の出発形質導入集団から富化されていた。対照的に、ニセのIL-2処理は、mCherry陽性細胞の漸進的な減少をもたらした。

【図12】図6に概説したものと同一実験パラダイムを使用して、ただし25日間実施した、mCherry陽性細胞数の増幅を示す。細胞型は、各パネルの左上隅に太字で示されている。異なる記号によって示される各曲線は、25日間維持された異なる処理/培養条件を描写する。図12によって、実験の25日間の経過にわたって、IL2R-CISC V3を発現する細胞のみが有意なラパマイシン誘導性増幅を示したことが示される。

20

【図13】図6に概説したものと同一実験パラダイムを使用するが、30日間実施し、そして1nM及び10nMの2つの異なるラパマイシン用量を利用している、ニセの、GFP、またはIL2R-CISC V3発現細胞の増幅を示す。細胞型は、各パネルの左上隅に太字で示されている。異なる記号によって示される各曲線は、実験の過程にわたって維持された、異なる処理/培養条件を描写する。図13は、IL2R-CISC V3を発現する細胞が、実験の過程にわたって有意なラパマイシン誘導性増幅を示すこと、及び1nMラパマイシンが最も堅調な細胞増幅を誘発したことを示す。

【図14】各段に示された細胞型（示された条件で20日間培養した後）について、各列の上部に示された処理に応答したリン酸化STAT5シグナル伝達の分析を示す。見られるように、「ニセ(mock)」処理を受けた細胞（第1段）は、20日後に本質的に細胞が生存していないので、もはや応答性ではない。対照的に、他の全ての細胞はIL-2処理に強く反応するが、IL2R-CISC発現細胞のみが、STAT5のリン酸化を伴うラパマイシンに反応し、IL2R-CISC V3発現細胞は、最も強く反応し、V3構造が最も効率的にシグナル伝達することが確認される。

30

【図15】AP21967がIL2R-CISC活性化リガンドとして使用されたことを除いて、図11と同一の実験の15日の経過にわたるIL2R-CISC V3発現細胞の富化を示す。一番左の単一パネルは、AP21967処理の開始時の細胞を表す。パネルの各列は異なる処理を表す。最下段に見られるように、15日までに、IL2R-CISC V3細胞は、AP21967中で培養した場合、64% mCherry陽性 ~> 93% mCherry陽性の出発形質導入集団から富化された。対照的に、ニセのIL-2処理は、mCherry陽性細胞の漸進的な減少をもたらした。

40

【図16】図6に概説したものと同一実験パラダイムを使用するが、30日間実施し、そして10nM及び100nMの2つの異なるAP21967用量を使用する、ニセの、GFP、またはIL2R-CISC V3発現細胞の増幅を示す。この細胞型は、各パネルの左上隅に太字で示されている。異なる記号によって示される各曲線は、実験の過程にわたって維持された異なる処理/培養条件を描写する。図16によって、IL2R-CISC V3を発現する細胞が実験の過程にわたって有意なAP21967誘導性増幅を示すこと、そして100nMのAP21967が最も強い細胞増幅を誘導したことが実証され

50

る。

【図 17】図 6 の実験設定を使用して、指示された条件下で 15 日間、IL2R - CISC V3 発現細胞を増幅させた後の細胞溶解活性を示し、細胞を IL2R - CISC V3 レンチウイルスで形質導入し、そして 15 日間増幅させた。次いで細胞を、抗 CD3 を発現する K562 細胞と共にインキュベートした。標的 K562 細胞による抗 CD3 の発現は、K562 細胞との接触時に T 細胞上の CD3 のクラスター化を引き起こし、その結果、K562 細胞の細胞溶解性の死滅をもたらす。示された条件で増幅させた IL2R - CISC V3 発現 T 細胞を、異なる標的対キラー比でインキュベートし、そして細胞溶解を、K562 標的化細胞の生存率によって評価した。IL2R - CISC を介して増幅した細胞は、IL - 2 において増幅した細胞と統計的に区別がつかない細胞溶解活性を示した。

10

【図 18】500 ng / mL の抗 IL - 2 中和抗体が IL - 2 中の T 細胞の増幅を無効にすることを示す。この実験では、末梢血 T 細胞を、抗 CD3 / CD28 ビーズを用いて活性化し、IL - 2 または IL - 2 + 抗 IL2 抗体中で増幅させた。抗 IL - 2 抗体の使用は、T 細胞の増幅を著しく阻害する。

【図 19】500 ng / mL の抗 IL2 中和抗体が、IL2R - CISC リガンド（ラバマイシンまたは AP21967 のいずれか）中で培養された IL2R - CISC 発現 T 細胞の増幅を阻止することができないことを示す。末梢血 T 細胞を、抗 CD3 / CD28 ビーズを用いて活性化し、IL2R - CISC V3 レンチウイルスで形質導入し、そして示された IL2R - CISC リガンド + 抗 IL2 抗体中で増幅させた。抗 IL - 2 抗体の使用は、T 細胞の増幅を阻害せず、これは、IL2R - CISC が細胞を自律的に作用させて増幅シグナルを提供することを実証している。

20

【図 20】CISC V3 増幅細胞についての T 細胞マーカー分析である FACS アッセイを示す。末梢血 T 細胞を、IL - 2 または示された IL2R - CISC リガンドで 15 日間増幅させた、IL2R - CISC V3 レンチウイルスで形質導入した抗 CD3 / CD28 ビーズを用いて活性化した。IL - 2 で増幅させた細胞は、IL - 2 に応答した IL2R 代謝回転を反映して、一般に CD25、IL2R アルファサブユニットの発現が低い。対照的に、低培地の IL - 2 は天然の IL2R の最小の代謝回転を促進するので、それらの IL2R - CISC 受容体を介して増幅した細胞は高い CD25 発現を有する。

【図 21】IL2R 構成要素と化学的二量体化ドメイン（FRB、FKBP）との間のより長いセグメントを有するさらなる CISC 構造の試験の概略図を示す。

30

【図 22】より長い IL2R - CISC リンカー構造 V4 ~ V7 を用いてレンチウイルスストックによって形質導入された細胞を処理するためのタイムライン及び実験デザインを示す。

【図 23】図 22 のより長い IL2R - CISC リンカー構造 V4 ~ V7 を有するレンチウイルスストックの形質導入効率を示す。

【図 24】ラバマイシン誘導性増幅が、TM リンカーに対する増幅された EC ドメインを有する全ての CISC 構造について同様であることを示す。末梢血 T 細胞を、抗 CD3 / CD28 ビーズを用いて活性化し、それぞれ IL2R - CISC V3 - V7 レンチウイルスで形質導入し、そして示された IL2R - CISC リガンド中で増幅させた。V3 - V7 IL2R - CISC 構造は全て、同等の規模の T 細胞増幅を誘導できた。

40

【図 25】遺伝子標的化 T 細胞を富化 / 増幅するための MND プロモーター及び CISC の標的化ノックインの概略図を示す。記載された標的化アプローチは、天然 FOX P3 遺伝子への GFP 融合により、プロモーター及び IL2R - CISC V3 の両方の構成要素をインラインで FOX P3 遺伝子座に組み込む。この構造は、正確な遺伝子標的化事象を受けた細胞のリガンド誘導選択を可能にすることを意図している。

【図 26】MND プロモーター及び CISC の標的化ノックインの実験デザインを示す概略図を示す。これは、図 25 からのカセットの FOX P3 遺伝子座への標的組み込み、続いて示された IL2R - CISC リガンド中の遺伝子標的化細胞の増幅を誘導するために、CRISPR / Cas9ヌクレアーゼがどのように使用されるかという実験概略図を表す。

50

【図 2 7】遺伝子標的化細胞の富化をもたらす、15 日間のラパマイシン接触による MND プロモーター及び CISC の標的化ノックインの結果を示す。指示されたアプローチ（標的化なし、または図 2 5 に記載の RNP + 各カセット）を利用して FOX P 3 遺伝子座への標的組み込み後、細胞を指示された条件下で 15 日間培養し、次いでフローサイトメトリーによって GFP - FOX P 3 発現について分析した。ラパマイシンまたは AP 2 1 9 6 7 での増幅は、FOX P 3 発現細胞の実質的な富化をもたらし、これは、IL 2 R - CISC が、FOX P 3 が過剰発現されるものを含む、遺伝子標的化細胞集団のリガンド誘導富化を促進し得ることを示す。フローパネルは、ラパマイシン中で培養した細胞による IL 2 R - CISC GFP - FOX P 3 発現を表す。

【図 2 8】ラパマイシン + IL - 2 を 15 日間接触させた場合の、MND プロモーター及び CISC の標的化ノックインについての結果を示しており、遺伝子標的化細胞の富化は生じなかった。示されたアプローチを利用した FOX P 3 遺伝子座への標的組み込み後、細胞を、示された条件下で 15 日間培養し、次いで GFP - FOX P 3 発現についてフローサイトメトリーによって分析した。ラパマイシン + IL 2 の増幅は、未処理細胞に対して FOX P 3 発現細胞の検出可能な富化も、損失も生じず、これは、IL 2 R - CISC が FOX P 3 過剰発現細胞の機能に有害な影響を及ぼさないことを示している。フローパネルは、IL - 2 + ラパマイシン中で培養した細胞による IL 2 R - CISC GFP - FOX P 3 発現を代表するものである。

【発明を実施するための形態】

【0039】

本明細書に記載されているのは、化学誘導シグナル伝達複合体（CISC）の組成物、ならびにそれを製造及び使用する方法である。CISC は、細胞内のシグナル伝達経路を介してシグナルを活性化するため、及び細胞を選択的に増幅するために使用され得る。

【0040】

定義

他に定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、本開示が関連する分野の当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書で引用された全ての特許、出願、公開された出願及び他の刊行物は、特記しない限り、その全体が参照により明示的に組み込まれる。本明細書中の用語について複数の定義がある場合には、特記しない限り、このセクションのものが優先する。

【0041】

本明細書で使用される場合、「1 つの、ある（a または a n : 不定冠詞）」とは、1 つまたは 2 つ以上を意味し得る。

【0042】

「約」とは、本明細書に照らして読まれるとき、その明白かつ通常の意味を有し、例えば測定可能な値を指すときに使用され得、そして規定値から  $\pm 20\%$  または  $\pm 10\%$ 、より好ましくは  $\pm 5\%$ 、さらに好ましくは  $\pm 1\%$ 、さらにより好ましくは  $\pm 0.1\%$  の変動を包含することを意味し得る。

【0043】

本明細書中で使用される場合、「タンパク質配列」とは、タンパク質の一次構造であるアミノ酸のポリペプチド配列を指す。本明細書中で使用される場合、「上流」とは、ポリヌクレオチド上の位置の 5' 位、及びポリペプチド上の位置の N 末端側の位置を指す。本明細書中で使用される場合、「下流」とは、ヌクレオチド上の位置の 3' 位、及びポリペプチド上の位置の C 末端側の位置を指す。したがって、「N 末端」という用語は、ポリペプチド上の位置の N 末端に向かう、ポリヌクレオチド上のエレメントまたは位置の位置を指す。

【0044】

「核酸」または「核酸分子」とは、ポリヌクレオチド、例えば、デオキシリボ核酸（DNA）またはリボ核酸（RNA）、オリゴヌクレオチド、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって生成された断片、ならびに連結、切断、エンドヌクレアーゼ作用、及びエキソヌクレアーゼ作用のうちのいずれかによって生成された断片を指す。核酸分子は、天然に

10

20

30

40

50

存在するヌクレオチド（DNA及びRNAなど）、または天然に存在するヌクレオチドの類似体（例えば、天然に存在するヌクレオチドのエナンチオマー形態）、またはその両方の組み合わせであるモノマーから構成してもよい。修飾ヌクレオチドは糖部分及び/またはピリミジンもしくはプリン塩基部分に変化を有してもよい。糖修飾としては、例えば、ハロゲン、アルキル基、アミン、及びアジド基による1つ以上のヒドロキシル基の置換が挙げられ、または糖をエーテルもしくはエステルとして官能化してもよい。さらに、糖部分全体を、アザ糖及び炭素環式糖類似体などの、立体的及び電子的に類似の構造で置き換えてもよい。塩基部分の修飾の例としては、アルキル化プリン及びピリミジン、アシル化プリンもしくはピリミジン、または他の周知の複素環式置換基が挙げられる。核酸モノマーは、ホスホジエステル結合またはそのような結合の類似体によって結合されてもよい。ホスホジエステル結合の類似体としては、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロセレノエート、ホスホロジセレノエート、ホスホロアニロチオエート、ホスホラニリデート、ホスホルアミデートなどが挙げられる。「核酸分子」という用語はまた、ポリアミド骨格に結合した天然に存在するかまたは修飾された核酸塩基を含む、いわゆる「ペプチド核酸」も含む。核酸は、一本鎖または二本鎖のいずれであってもよい。いくつかの実施形態では、融合タンパク質をコードする核酸配列が提供される。いくつかの実施形態では、核酸は、RNAまたはDNAである。

10

#### 【0045】

「をコードする」または「コードする」は、本明細書で使用されており、アミノ酸の定義された配列など、他の高分子の合成のための鋳型として役立つ、遺伝子、cDNA、またはmRNAのようなポリヌクレオチド中のヌクレオチドの特定の配列の特性を指す。したがって、ある遺伝子は、その遺伝子に対応するmRNAの転写及び翻訳が細胞または他の生物学的な系においてタンパク質を産生する場合、そのタンパク質をコードしている。

20

#### 【0046】

「ポリペプチドをコードする核酸配列」は、互いの縮重型であり、そして同じアミノ酸配列をコードする全てのヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、核酸が提供され、ここでこの核酸は融合タンパク質をコードする。

#### 【0047】

「ベクター」、「発現ベクター」、または「構築物」とは、細胞内で異種核酸を発現させるための調節エレメントを有する、異種核酸を細胞に導入するために使用される核酸である。ベクターとしては、限定するものではないが、プラスミド、ミニサークル、酵母、及びウイルスゲノムが挙げられる。いくつかの実施形態では、このベクターはプラスミド、ミニサークル、酵母、またはウイルスゲノムである。いくつかの実施形態では、このベクターはウイルスベクターである。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、レンチウイルスである。いくつかの実施形態では、このベクターはアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターである。いくつかの実施形態では、このベクターは、E.coliなどの細菌系におけるタンパク質発現用である。本明細書中で使用される場合、「発現」または「タンパク質発現」という用語は、転写されたRNA分子のタンパク質分子への翻訳を指す。タンパク質発現は、その一時的、空間的、発生的、または形態学的性質によって、ならびに定量的または定性的指標によって特徴付けられ得る。いくつかの実施形態では、タンパク質（複数可）は、リガンドの存在下でタンパク質が二量体化のために配置されるように発現される。

30

40

#### 【0048】

本明細書中で使用される場合、「融合タンパク質」または「キメラタンパク質」とは、もともと別々のタンパク質またはタンパク質の一部をコードしていた2つ以上の遺伝子の連結を通して生成されたタンパク質である。融合タンパク質はまた、2つ以上の別々のタンパク質由来の特定のタンパク質ドメインから構成され得る。この融合遺伝子の翻訳は、もとのタンパク質の各々に由来する機能的特性を有する単一または複数のポリペプチドをもたらす得る。組換え融合タンパク質は、生物学的研究または治療に使用するための組換えDNA技術によって人工的に作製され得る。融合タンパク質を作製するためのそのよう

50



な方法は、当業者に公知である。いくつかの融合タンパク質は、全ペプチドを組み合わせしており、したがって元のタンパク質の全てのドメイン、特に機能的ドメインを含み得る。しかしながら、他の融合タンパク質、特に天然に存在しないタンパク質は、コード配列の一部のみを組み合わせ、したがって、それらを形成した親遺伝子の本来の機能を維持しない。いくつかの実施形態では、融合タンパク質が提供され、ここでこの融合タンパク質はインターフェロン及びPD-1タンパク質を含む。

#### 【0049】

本明細書中で使用される場合、「調節エレメント」という用語は、遺伝子調節活性を有するDNA分子、例えば作動可能に連結された転写可能なDNA分子の転写及び/または翻訳に影響を及ぼす能力を有するものを指す。プロモーター、リーダー、イントロン、及び転写終結領域などの調節エレメントは、遺伝子調節活性を有し、生細胞における遺伝子の全体的発現において不可欠な役割を果たすDNA分子である。したがって、植物において機能するプロモーターなどの単離された調節エレメントは、遺伝子工学の方法を通して植物の表現型を改変するのに有用である。

#### 【0050】

本明細書中で使用される場合、「作動可能に連結された」という用語は、第2の分子に結合した第1の分子であって、ここでこの分子は、第1の分子が第2の分子の機能に影響を及ぼすように配置されている分子を指す。2つの分子は、単一の隣接分子の一部であってもよく、そして隣接されてもよい。例えば、プロモーターが細胞内の目的の転写可能なDNA分子の転写を調節する場合、そのプロモーターは転写可能なDNA分子に作動可能に連結されている。

#### 【0051】

「プロモーター」とは、特定の遺伝子の転写を開始するDNAの領域である。プロモーターは、遺伝子の転写開始部位の近く、同じ鎖上、及びDNAの上流（センス鎖の5'領域）に配置されてもよい。プロモーターは、条件付きプロモーター、誘導性プロモーター、または構成的プロモーターであってもよい。プロモーターは、細菌、哺乳動物または昆虫細胞タンパク質発現に特異的であり得る。融合タンパク質をコードする核酸が提供されるいくつかの実施形態では、核酸はさらにプロモーター配列を含む。いくつかの実施形態では、プロモーターは細菌、哺乳動物または昆虫細胞タンパク質発現に特異的である。いくつかの実施形態では、このプロモーターは、条件付きプロモーター、誘導性プロモーター、または構成的プロモーターである。

#### 【0052】

本明細書で使用される「条件付き」または「誘導性」とは、インデューサーの存在下で遺伝子発現を提供し、インデューサーの非存在下で遺伝子発現を実質的に提供しないプロモーターを含む核酸構築物を指す。

#### 【0053】

本明細書で使用される「構成的」とは、構成的であり、したがって連続的に産生されるポリペプチドの発現をもたらすプロモーターを含む核酸構築物を指す。

#### 【0054】

いくつかの実施形態では、誘導性プロモーターは、低レベルの基礎活性を有する。レンチウイルスベクターが使用されるいくつかの実施形態では、非誘導細胞における基礎活性のレベルは、細胞が遺伝子を発現するように誘導されるときと比較して、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%以下（しかしゼロではない）であるか、または前述の値のうちのいずれか2つによって定義される範囲内にある。基礎活性のレベルは、フローサイトメトリーを用いてインデューサー（例えば薬物）の非存在下で導入遺伝子（例えばマーカー遺伝子）の発現量を測定することによって決定され得る。本明細書に記載のいくつかの実施形態では、Aktなどのマーカータンパク質が、発現の決定に使用される。

#### 【0055】

いくつかの実施形態では、誘導性プロモーターは、非誘導または基礎活性と比較して、

高レベルの誘導活性を提供する。いくつかの実施形態では、誘導状態における活性のレベルは、非誘導状態における活性のレベルの2、4、6、8、9もしくは10倍以上であるか、または前述の値のうちのいずれか2つによって定義される範囲内である。いくつかの実施形態では、誘導性プロモーターの制御下での導入遺伝子発現は、トランスアクチベーターの非存在下で、10、8、6、4、2、もしくは1日未満（0日を除く）または前述の期間のうちのいずれか2つによって定義される範囲内で停止される。

【0056】

いくつかの実施形態では、誘導性プロモーターは、低レベルの基礎活性、高レベルの誘導性、及び/または短時間（可逆性のため）を提供するようにデザイン及び/または改変される。

【0057】

「二量体化学誘導シグナル伝達複合体」、「二量体CISC」、または「二量体」とは、本明細書で使用される場合、互いに結合する融合タンパク質複合体であってもなくてもよい、CISCの2つの構成要素を指す。「二量体化」とは、2つの別々の実体を単一の実体に結合するプロセスを指す。いくつかの実施形態では、リガンドまたは因子は、二量体化を刺激する。いくつかの実施形態では、二量体化は、ホモ二量体化、または2つの同一の実体、例えば2つの同一のCISC構成要素の結合を指す。いくつかの実施形態では、二量体化とは、2つの異なりかつ別個のCISC構成要素などの2つの異なる実体の結合というヘテロ二量体化を指す。いくつかの実施形態では、CISC構成要素の二量体化は、細胞シグナル伝達経路をもたらす。いくつかの実施形態では、CISC構成要素の二量体化は、細胞または細胞集団の選択的増幅を可能にする。追加のCISCシステムは、CISCジベレリンCISC二量体化システム、またはSLF-TMP CISC二量体化システムを含み得る。他の化学的に誘導可能な二量体化（CID）システム及び構成要素パーツを使用してもよい。

【0058】

本明細書中で使用される場合、「化学誘導シグナル伝達複合体」または「CISC」とは、リガンド誘導二量体化の直接の結果として細胞の内部へのシグナルを開始する操作された複合体を指す。CISCとは、ホモ二量体（2つの同一構成要素の二量体化）であっても、またはヘテロ二量体（2つの異なる構成要素の二量体化）であってもよい。したがって、本明細書中で使用される場合、「ホモ二量体」という用語は、同一のアミノ酸配列を有する本明細書中に記載される2つのタンパク質構成要素の二量体を指す。「ヘテロ二量体」という用語は、同一ではないアミノ酸配列を有する本明細書に記載の2つのタンパク質構成要素の二量体を指す。

【0059】

CISCは、本明細書にさらに詳細に記載されているような合成複合体であってもよい。本明細書で使用される「合成の」とは、天然ではないか、または天然には見られない、本明細書に記載の複合体、タンパク質、二量体、または組成物を指す。いくつかの実施形態では、IL2R-CISCとは、インターロイキン-2受容体構成要素を含むシグナル伝達複合体を指す。いくつかの実施形態では、IL2/15-CISCは、インターロイキン-2及びインターロイキン-15によって共有されている受容体シグナル伝達サブユニットを含むシグナル伝達複合体を指す。いくつかの実施形態では、IL7-CISCは、インターロイキン-7受容体構成要素を含むシグナル伝達複合体を指す。したがって、CISCは、所与のCISCの構成要素を構成する構成要素部分に従って呼ばれてもよい。当業者は、化学誘導シグナル伝達複合体の構成要素部分が、CISCへの組み込みに有用な天然または合成の構成要素から構成され得ることを認識するであろう。したがって、本明細書に提供される実施例は限定的であることを意図しない。

【0060】

本明細書中で使用される場合、「サイトカイン受容体」とは、サイトカインを認識してそれに結合する受容体分子を指す。いくつかの実施形態では、サイトカイン受容体は、サイトカイン受容体アミノ酸及び/または核酸配列への置換、欠失、及び/または付加を有

10

20

30

40

50

するものを含む、修飾サイトカイン受容体分子（例えば「バリエーションサイトカイン受容体」）を包含する。したがって、サイトカイン受容体とは、野生型ならびに組換え型、合成的に産生された、及びバリエーションサイトカイン受容体を包含することが意図されている。いくつかの実施形態では、サイトカイン受容体は、細胞外結合ドメイン、ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、及びシグナル伝達ドメインを含む融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、受容体の構成要素（すなわち、受容体のドメイン）は、天然または合成のものである。いくつかの実施形態では、ドメインは、ヒト由来ドメインである。

#### 【0061】

本明細書で使用される「FKBP」とは、FK506結合タンパク質ドメインである。FKBPとは、アミノ酸配列ではないが、プロリルイソメラーゼ活性を有し、そして機能においてシクロフィリンに関連するタンパク質のファミリーを指す。FKBPは酵母からヒトまでの多くの真核生物において同定されており、そしてプロリン残基を含有するタンパク質のためのタンパク質フォールディングシャペロンとして機能する。シクロフィリンと共に、FKBPは、イムノフィリンファミリーに属する。用語FKBPは、例えば、FKBP12ならびに、遺伝子AIP; AIP1; FKBP1A; FKBP1B; FKBP2; FKBP3; FKBP5; FKBP6; FKBP7; FKBP8; FKBP9; FKBP9L; FKBP10; FKBP11; FKBP14; FKBP15; FKBP52; 及び/またはLOC541473によってコードされるタンパク質（それらの同族体及びそれらの機能的タンパク質断片を含む）を包含する。

#### 【0062】

本明細書で使用される「FRB」とは、FKBPラパマイシン結合ドメインである。FRBドメインは、FKBPタンパク質及びラパマイシンまたはそのラパログとの三者複合体を形成するように構成されているポリペプチド領域（タンパク質「ドメイン」）である。FRBドメインは、ヒト及び他の種由来のmTORタンパク質（文献中でFRAP、RAPT1、またはRAFTとも呼ばれる）; Tor1及び/またはTor2を含む酵母タンパク質; ならびにCandida FRAP相同体を含む、多数の天然に存在するタンパク質に存在する。FKBP及びFRBは両方とも、ラパマイシン（mTOR）シグナル伝達の哺乳動物標的における主要構成要素である。

#### 【0063】

セレブロンは、損傷したDNA結合タンパク質1と相互作用し、Cullin4とE3ユビキチンリガーゼ複合体を形成し、そこでセレブロンによって認識されるタンパク質がユビキチン化され、プロテアソームによって分解され得る基質受容体として機能する。不要なまたは損傷したタンパク質のプロテアソーム媒介分解は、細胞の生存、増殖及び/または成長などの細胞の調節機能を維持するのに極めて重要な役割を果たす。セレブロンに対する、免疫調節イミド薬（IMiD）、例えば、サリドマイドの結合は、催奇形性、さらにレナリドマイドを含むIMiDの細胞毒性とも関連している。セレブロンは、骨髄腫細胞の機能維持に関与する因子の結合、ユビキチン化、及び分解において重要な役割がある。

#### 【0064】

「セレブロンサリドマイド結合ドメイン」とは、例えば、サリドマイド、ポマリドマイド、レナリドマイド、アプレミラスト、または関連類似体を含む、IMiDと相互作用する細胞外結合ドメインである結合ドメインを指す。本明細書に提供されるいくつかの実施形態は、セレブロンサリドマイド結合ドメイン類似体またはそれらの変異体を利用する。いくつかの実施形態では、これらの細胞外結合ドメインは、同時にIMiDリガンドに結合するように構成される。

#### 【0065】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のアプローチで使用される免疫調節イミド薬は、以下を含んでもよい：

#### 【0066】

サリドマイド（類似体、誘導体を含み、及びそれらの薬学的に許容される塩を含む。サ

10

20

30

40

50

リドマイドは、イムノプリン (Immunopr in)、タロミド (Thalomid)、タリデックス (Talidex)、タライザー (Talizer)、ニューロセジン (Neurosedyn)、 $\alpha$  - (N - フタルイミド) グルタルイミド、2 - (2, 6 - ジオキソピペリジン - 3 - イル) - 2, 3 - ジヒドロ - 1H - イソインドール - 1, 3 - ジオンを含み得る) ;

【0067】

ポマリドマイド (類似体、誘導体を含み、及びそれらの薬学的に許容される塩を含む)。ポマリドマイドは、ポマリスト (Pomalyst)、イムノビド (Imnovid)、(RS) - 4 - アミノ - 2 - (2, 6 - ジオキソピペリジン - 3 - イル) イソインドール - 1, 3 - ジオンを含み得る) ;

10

【0068】

レナリドマイド (類似体、誘導体を含み、及びそれらの薬学的に許容される塩を含む)。レナリドマイドは、レプリミド、(RS) - 3 - (4 - アミノ - 1 - オキソ - 1, 3 - ジヒドロ - 2H - イソインドール - 2 - イル) ピペリジン - 2, 6 - ジオンを含み得る) ; または

【0069】

アプレミラスト (類似体、誘導体を含み、及びそれらの薬学的に許容される塩を含む)。アプレミラスト (Apremilast) は、オテラ (Otezla)、CC - 10004、N - {2 - [(1S) - 1 - (3 - エトキシ - 4 - メトキシフェニル) - 2 - メチルスルホニル) エチル] - 1, 3 - ジオキソ - 2, 3 - ジヒドロ - 1H - イソインドール - 4 - イル} アセトアミドを含み得る) ;

20

【0070】

またはその任意の組み合わせ。

【0071】

本明細書中で使用される場合、「細胞外結合ドメイン」という用語は、細胞の外側にあり、そして特定の原子または分子に結合するように構成されている複合体のドメインを指す。いくつかの実施形態では、CISCの細胞外結合ドメインは、FKBPドメインまたはその一部である。いくつかの実施形態では、この細胞外結合ドメインはFRBドメインまたはその一部である。いくつかの実施形態では、細胞外結合ドメインは、リガンドまたは因子を結合し、それによって2つのCISC構成要素の二量体化を刺激するように構成される。いくつかの実施形態では、細胞外結合ドメインは、サイトカイン受容体モジュレーターに結合するように構成されている。

30

【0072】

本明細書で使用される場合、「サイトカイン受容体モジュレーター」という用語は、サイトカイン受容体の下流標的のリン酸化、サイトカイン受容体に関連するシグナル伝達経路の活性化、及び/またはサイトカインなどの特定のタンパク質の発現を調節する因子を指す。そのような因子は、サイトカイン受容体の下流標的のリン酸化、サイトカイン受容体に関連するシグナル伝達経路の活性化、及び/またはサイトカインなどの特定のタンパク質の発現を直接的または間接的に調節し得る。したがって、サイトカイン受容体モジュレーターの例としては、限定するものではないが、サイトカイン、サイトカインの断片、融合タンパク質及び/またはサイトカイン受容体もしくはその断片に免疫特異的に結合する抗体もしくはその結合部分が挙げられる。さらに、サイトカイン受容体モジュレーターの例としては、限定するものではないが、サイトカイン、またはその断片に免疫特異的に結合するペプチド、ポリペプチド (例えば可溶性サイトカイン受容体)、融合タンパク質及び/または抗体もしくはそれらの結合部分が挙げられる。

40

【0073】

本明細書中で使用される場合、「活性化する」という用語は、目的のタンパク質の少なくとも1つの生物学的活性の増大を指す。同様に、「活性化」という用語は、活性が増大した状態にある目的のタンパク質の状態を指す。「活性化可能」という用語は、シグナル、因子、リガンド、化合物、または刺激の存在下で目的のタンパク質が活性化される能力

50

を指す。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の二量体は、シグナル、因子、リガンド、化合物、または刺激の存在下で活性化され、シグナル伝達コンピテント二量体になる。本明細書中で使用される場合、「シグナル伝達コンピテント」という用語は、下流のシグナル伝達経路を開始または持続させることができるようにするための二量体の能力または立体配置を指す。

【0074】

本明細書で使用される場合、「ヒンジドメイン」という用語は、細胞外結合ドメインを膜貫通ドメインに連結し、そして細胞外結合ドメインに可塑性を付与し得るドメインを指す。いくつかの実施形態では、ヒンジドメインは、細胞外ドメインを原形質膜の近くに配置して、抗体またはその結合断片による認識の可能性を最小限にする。いくつかの実施形態では、細胞外結合ドメインは、ヒンジドメインのN末端に位置する。いくつかの実施形態では、ヒンジドメインは天然のものであっても合成のものであってもよい。

【0075】

本明細書中で使用される場合、「膜貫通ドメイン」または「TMドメイン」という用語は、細胞膜内などの膜内で安定であるドメインを指す。「膜貫通スパン」、「内在性タンパク質」、及び「内在性ドメイン」という用語もまた本明細書で使用される。いくつかの実施形態では、ヒンジドメイン及び細胞外ドメインは、膜貫通ドメインのN末端に位置する。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、天然または合成ドメインである。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、IL-2膜貫通ドメインである。

【0076】

本明細書で使用される場合、「シグナル伝達ドメイン」という用語は、哺乳動物細胞などの細胞内のシグナル伝達カスケードに関与する融合タンパク質またはCISC構成要素のドメインを指す。シグナル伝達ドメインは、T細胞などの細胞に、例えばTCR/CD3複合体のCD3ゼータ鎖によって提供される一次シグナルに加えて、T細胞応答のような細胞応答（活性化、増殖、分化、及び/またはサイトカイン分泌を含むがこれらに限定されない）を媒介するシグナルを提供するシグナル伝達部分を指す。いくつかの実施形態では、シグナル伝達ドメインは、膜貫通ドメイン、ヒンジドメイン、及び細胞外ドメインのN末端にある。いくつかの実施形態では、シグナル伝達ドメインは、合成ドメインまたは天然ドメインである。いくつかの実施形態では、シグナル伝達ドメインは、連結細胞質シグナル伝達ドメインである。いくつかの実施形態では、シグナル伝達ドメインは、サイトカインシグナル伝達ドメインである。いくつかの実施形態では、シグナル伝達ドメインは、抗原シグナル伝達ドメインである。いくつかの実施形態では、シグナル伝達ドメインは、インターロイキン-2受容体サブユニットガンマ（IL2R またはIL2R $\gamma$ ）ドメインである。いくつかの実施形態では、シグナル伝達ドメインは、インターロイキン-2受容体サブユニットベータ（IL2R またはIL2R $\beta$ ）ドメインである。いくつかの実施形態では、細胞外結合ドメインへの因子またはリガンドの結合は、CISC構成要素の二量体化の結果として、シグナル伝達経路の活性化によってシグナル伝達ドメインを介したシグナル伝達を引き起こす。本明細書中で使用される場合、「シグナル伝達」という用語は、細胞外ドメインに結合するリガンドまたは因子によるシグナル伝達経路の活性化を指す。シグナルの活性化は、細胞外ドメインのリガンドまたは因子への結合の結果であり、CISC二量体化をもたらす。

【0077】

本明細書で使用される場合、「IL2R $\beta$ 」または「IL2R $\beta$ 」という用語は、インターロイキン-2受容体サブユニットベータを指す。同様に、「IL2R $\gamma$ 」または「IL2R $\gamma$ 」という用語はインターロイキン-2受容体サブユニットガンマを指し、そして「IL2R $\alpha$ 」または「IL2R $\alpha$ 」という用語はインターロイキン-2受容体サブユニットアルファを指す。IL-2受容体は、3つの形態、または鎖、アルファ、ベータ、及びガンマを有し、これらはまた、他のサイトカインに対する受容体のサブユニットでもある。IL2R $\beta$  及びIL2R $\gamma$  は、I型サイトカイン受容体ファミリーのメンバーである。本明細書で使用される「IL2R」とは、T細胞媒介免疫応答に関与しているインター

10

20

30

40

50

ロイキン - 2 受容体を指す。IL2R は、インターロイキン 2 からの分裂促進シグナルの受容体媒介エンドサイトーシス及び伝達に関与している。同様に、「IL - 2 / 15 R」という用語は、IL - 2 及び IL - 15 によって共有される受容体シグナル伝達サブユニットを指し、サブユニットアルファ (IL2 / 15 Ra または IL2 / 15 R )、ベータ (IL2 / 15 Rb または IL2 / 15 R )、またはガンマ (IL2 / 15 Rg または IL2 / 15 R ) を含み得る。

#### 【0078】

いくつかの実施形態では、化学誘導シグナル伝達複合体とは、2つの構成要素を含むヘテロ二量体化活性化シグナル伝達複合体である。いくつかの実施形態では、第1の構成要素は、ヘテロ二量体化対の一部である細胞外結合ドメイン、任意のヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、及び1つ以上の連結細胞質シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態では、第2の構成要素は、ヘテロ二量体化対の他の部分である細胞外結合ドメイン、任意のヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、及び1つ以上の連結細胞質シグナル伝達ドメインを含む。したがって、いくつかの実施形態では、2つの異なる修正事象がある。いくつかの実施形態では、2つのCISC構成要素は、哺乳動物細胞などの細胞内で発現される。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞などの細胞、または哺乳動物細胞集団などの細胞集団を、ヘテロ二量体化を引き起こすリガンドまたは因子と接触させ、それによってシグナルを開始する。いくつかの実施形態では、ホモ二量体化対が二量体化し、それによって単一のCISC構成要素が哺乳動物細胞などの細胞中で発現され、そしてCISC構成要素がホモ二量体化してシグナルを開始する。

#### 【0079】

本明細書中で使用される場合、「リガンド」または「因子 (agent)」という用語は、所望の生物学的効果を有する分子を指す。いくつかの実施形態では、リガンドは、細胞外結合ドメインによって認識され、それによって結合され、リガンドと2つの結合CISC構成要素とを含む三部複合体を形成する。リガンドとしては、限定するものではないが、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、翻訳後修飾タンパク質、抗体、それらの結合部分を含むタンパク質性分子；小分子 (1000ダルトン未満)、無機化合物または有機化合物；ならびに二本鎖もしくは一本鎖DNA、または二本鎖もしくは一本鎖RNA (例えば、アンチセンス、RNAi など)、アプタマー、ならびに三重らせん核酸分子を含むがこれらに限定されない核酸分子が挙げられる。リガンドは、任意の公知の生物 (動物 (例えば、哺乳動物 (ヒト及び非ヒト哺乳動物))、植物、細菌、真菌、及び原生生物、またはウイルスを含むがこれらに限定されない) または合成分子のライブラリーに由来してもよいし、またはそれから得られてもよい。いくつかの実施形態では、リガンドは、タンパク質、抗体またはその一部、小分子、または薬物である。いくつかの実施形態では、リガンドはラパマイシンまたはラパマイシン類似体 (ラパログ) である。いくつかの実施形態では、ラパログは、ラパマイシンに対して以下の修飾のうちの1つ以上を有するラパマイシンのバリエーションを含む：C7、C42及び/またはC29でのメトキシの脱メチル化、除去または置換；C13、C43及び/またはC28でのヒドロキシの除去、誘導体化または置換；C14、C24及び/またはC30でのケトンの還元、除去または誘導体化；5員のプロリル環による6員のピペコレート環の置換；ならびにシクロヘキシル環上の別の置換または置換シクロペンチル環によるシクロヘキシル環の置換。したがって、いくつかの実施形態では、ラパログは、エベロリムス、メリリムス、ノボリムス、ピメクロリムス、リダフォロリムス、タクロリムス、テムシロリムス、ウミロリムス、ゾタロリムス、CCI - 779、C20 - メタリルラパマイシン、C16 - (S) - 3 - メチルインドールラパマイシン、C16 - iRap、AP21967、ミコフェノール酸ナトリウム、塩酸ベニジピン、AP23573、もしくはAP1903、またはそれらの代謝産物、誘導体、及び/または組み合わせである。いくつかの実施形態では、リガンドは、IMiDクラスの薬物 (例えば、サリドマイド、ポマリドマイド、レナリドマイドまたは関連類似体) である。

#### 【0080】

10

20

30

40

50

したがって、いくつかの実施形態では、シグナル伝達複合体の化学的誘導のために本明細書に記載のアプローチで使用するリガンドまたは因子は、以下を含み得る：

【0081】

ラパマイシン（類似体、誘導体を含み、及びそれらの薬学的に許容される塩を含む。ラパマイシンは、シロリムス、ラパムネ（Rapamune）（3S, 6R, 7E, 9R, 10R, 12R, 14S, 15E, 17E, 19E, 21S, 23S, 26R, 27R, 34aS）- 9, 10, 12, 13, 14, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 32, 33, 34, 34a - ヘキサデカヒドロ - 9, 27 - ジヒドロキシ - 3 - [(1R) - 2 - [(1S, 3R, 4R) - 4 - ヒドロキシ - 3 - メトキシシクロヘキシル] - 1 - メチルエチル] - 10, 21 - ジメトキシ - 6, 8, 12, 14, 20, 26 - ヘキサメチル - 23, 27 - エポキシ - 3H - ピリド[2, 1 - c][1, 4]オキサアザシクロヘントリアコンチン - 1, 5, 11, 28, 29（4H, 6H, 31H） - ペントンを含み得る）；

10

【0082】

エベロリムス（類似体、誘導体を含み、及びそれらの薬学的に許容される塩を含む。エベロリムスは、RAD001、ゾートレス（Zortress）、セルチカン（Certican）、アフィニトール（Afinitor）、Votubia、42 - O - （2 - ヒドロキシエチル）ラパマイシン、（1R, 9S, 12S, 15R, 16E, 18R, 19R, 21R, 23S, 24E, 26E, 28E, 30S, 32S, 35R）- 1, 18 - ジヒドロキシ - 12 - [(2R) - 1 - [(1S, 3R, 4R) - 4 - （2 - ヒドロキシエトキシ） - 3 - メトキシシクロヘキシル]プロパン - 2 - イル] - 19, 30 - ジメトキシ - 15, 17, 21, 23, 29, 35 - ヘキサメチル - 11, 36 - ジオキサ - 4 - アザトリシクロ[30.3.1.0<sup>4,9</sup>]ヘキサトリアコンタ - 16, 24, 26, 28 - テトラエン - 2, 3, 10, 14, 20 - ペントンを含み得る）；

20

【0083】

メリリムス（類似体、誘導体を含み、及びそれらの薬学的に許容される塩を含む。メリリムスは、SAR943、42 - O - （テトラヒドロフラン - 3 - イル）ラパマイシン（メリリムス - 1）；42 - O - （オキセタン - 3 - イル）ラパマイシン（メリリムス - 2）；42 - O - （テトラヒドロピラン - 3 - イル）ラパマイシン（メリリムス - 3）；42 - O - （4 - メチル、テトラヒドロフラン - 3 - イル）ラパマイシン、42 - O - （2, 5, 5 - トリメチル、テトラヒドロフラン - 3 - イル）ラパマイシン、42 - O - （2, 5 - ジエチル - 2 - メチル、テトラヒドロフラン - 3 - イル）ラパマイシン、42 - O - （2H - ピラン - 3 - イル、テトラヒドロ - 6 - メトキシ - 2 - メチル）ラパマイシン、または42 - O - （2H - ピラン - 3 - イル、テトラヒドロ - 2, 2 - ジメチル - 6 - フェニル）ラパマイシンを含み得る）；

30

【0084】

ノボリムス（類似体、誘導体を含み、及びそれらの薬学的に許容される塩を含む。ノボリムスは、16 - O - デメチルラパマイシンを含み得る）；

【0085】

ピメクロリムス（類似体、誘導体を含み、及びそれらの薬学的に許容される塩を含む。ピメクロリムスは、エリデル（Elidel）、（3S, 4R, 5S, 8R, 9E, 12S, 14S, 15R, 16S, 18R, 19R, 26aS）- 3 - （（E）- 2 - （（1R, 3R, 4S）- 4 - クロロ - 3 - メトキシシクロヘキシル）- 1 - メチルビニル）- 8 - エチル5, 6, 8, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 24, 26, 26aヘキサデカヒドロ - 5, 19 - エポキシ - 3H - ピリド（2, 1 - c）（1, 4）オキサアザシクロトリコシン - 1, 17, 20, 21（4H, 23H） - テトロソン33 - エピ - クロロ - 33 - デスオキシアスコマイシンを含み得る）；

40

【0086】

リダフォロリムス（類似体、誘導体を含み、及びそれらの薬学的に許容される塩を含む。リダフォロリムスは、AP23573、MK - 8669、デフォロリムス、（1R, 9

50

S, 12 S, 15 R, 16 E, 18 R, 19 R, 21 R, 23 S, 24 E, 26 E, 28 E, 30 S, 32 S, 35 R) - 12 - ( (1 R) - 2 - ( (1 S, 3 R, 4 R) - 4 - ( (ジメチルホスフィノイル) オキシ) - 3 - メトキシシクロヘキシル) - 1 - メチルエチル) - 1, 18) - ジヒドロキシ - 19, 30 - ジメトキシ 15, 17, 21, 23, 29, 35 - ヘキサメチル - 11, 36 - ジオキサ - 4 - アザトリシクロ (30.3.1.04, 9) ヘキサトリアコンタ - 16, 24, 26, 28 - テトラエン - 2, 3, 10, 14, 20 - ペントンを含み得る) ;

#### 【0087】

タクロリムス (類似体、誘導体を含み、及びそれらの薬学的に許容される塩を含む。タクロリムスは、FK - 506、フジマイシン、プログラフ (Programaf)、アドバグラフ (Advagraf)、プロトピック (protopic)、3 S - [3 R\* [E (1 S\*, 3 S\*, 4 S\*)] , 4 S\*, 5 R\*, 8 S\*, 9 E, 12 R\*, 14 R\*, 15 S\*, 16 R\*, 18 S\*, 19 S\*, 26 a R\*, 5, 6, 8, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 24, 25, 26, 26 a - ヘキサデカヒドロ - 5, 19 - ジヒドロキシ - 3 - [2 - (4 - ヒドロキシ - 3 - メトキシシクロヘキシル) - 1 - メチルエチル] - 14, 16 - ジメトキシ - 4, 10, 12, 18 - テトラメチル - 8 - (2 - プロペニル) - 15, 19 - エポキシ - 3 H - ピリド [2, 1 - c] [1, 4] オキサアザシクロトリコシン - 1, 7, 20, 21 (4 H, 23 H) - テトロン、一水和物を含み得る) ;

#### 【0088】

テムシロリムス (類似体、誘導体を含み、及びそれらの薬学的に許容される塩を含む。テムシロリムスは、CCI - 779、CCL - 779、トリセル (Torisel)、(1 R, 2 R, 4 S) - 4 - { (2 R) - 2 - [ (3 S, 6 R, 7 E, 9 R, 10 R, 12 R, 14 S, 15 E, 17 E, 19 E, 21 S, 23 S, 26 R, 27 R, 34 a S) - 9, 27 - ジヒドロキシ - 10, 21 - ジメトキシ - 6, 8, 12, 14, 20, 26 - ヘキサメチル - 1, 5, 11, 28, 29 - ペンタオキソ - 1, 4, 5, 6, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 31, 32, 33, 34, 34 a - テトラコサヒドロ - 3 H - 23, 27 - エポキシピリド [2, 1 - c] [1, 4] オキサアザシクロヘントリアコンチン - 3 - イル] プロピル} - 2 - メトキシシクロヘキシル 3 - ヒドロキシ - 2 - (ヒドロキシメチル) - 2 - メチルプロパノエートを含み得る) ;

#### 【0089】

ウミロリムス (類似体、誘導体を含み、及びそれらの薬学的に許容される塩を含む。ウミロリムスは、ビオリムス (Biolimus)、ビオリムス A9、BA9、TRM - 986、42 - O - (2 - エトキシエチル) ラパマイシンを含み得る) ;

#### 【0090】

ゾタロリムス (類似体、誘導体を含み、及びそれらの薬学的に許容される塩を含む。ゾタロリムスは、ABT - 578、(42 S) - 42 - デオキシ - 42 - (1 H - テトラゾール - 1 - イル) - ラパマイシンを含み得る) ;

#### 【0091】

C20 - メタリルラパマイシン (類似体、誘導体を含み、及びそれらの薬学的に許容される塩を含む。C20 - メタリルラパマイシンは、C20 - Marap を含み得る) ;

#### 【0092】

C16 - (S) - 3 - メチルインドールラパマイシン (類似体、誘導体を含み五、及びそれらの薬学的に許容される塩を含む。C16 - (S) - 3 - メチルインドールラパマイシン) は、C16 - iRap を含み得る) ;

#### 【0093】

AP21967 (類似体、誘導体を含み、及びそれらの薬学的に許容される塩を含む。AP21967 は、C - 16 - (S) - 7 - メチルインドールラパマイシンを含み得る) ;

#### 【0094】

10

20

30

40

50



ミコフェノール酸ナトリウム（類似体、誘導体を含み、及びそれらの薬学的に許容される塩を含む。ミコフェノール酸ナトリウムは、セルセプト（Cellcept、）Myfortic、（4E）-6-（4-ヒドロキシ-6-メトキシ-7-メチル-3-オキソ）-1,3-ジヒドロ-2-ベンゾフラン-5-イル）-4-メチルヘキサ-4-エン酸を含み得る）；

【0095】

塩酸ベニジピン（その類似体、誘導体を含み、及びそれらの薬学的に許容される塩を含む。塩酸ベニジピンは、ベニジピナム（Benidipinum）、コニエル（Coniel）を含み得る）；または

【0096】

AP1903（類似体、誘導体を含み、及びそれらの薬学的に許容される塩を含む。AP1903は、リミドシド（Rimiducid）、[(1R)-3-(3,4-ジメトキシフェニル)-1-[3-[2-[2-[2-[3-[(1R)-3-(3,4-ジメトキシフェニル)-1-[(2S)-1-[(2S)-2-(3,4,5-トリメトキシフェニル)ブタノイル]ピペリジン-2-カルボニル]オキシプロピル]フェノキシ]アセチル]アミノ]エチルアミノ]-2-オキソエトキシ]フェニル]プロピル](2S)-1-[(2S)-2-(3,4,5-トリメトキシフェニル)ブタノイル]ピペリジン-2-カルボキシレートを含み得る）；

【0097】

またはその任意の組み合わせ。

【0098】

本明細書で使用される場合、「ジベレリン」という用語は、プラスチック中のテルペノイド経路によって合成され、次いでそれらがそれらの生物学的に活性な形態に達するまで小胞体及びサイトゾル中で修飾される、合成または天然に存在するジテルペノイド酸を指す。ジベレリンは、天然ジベレリンまたはその類似体、例えばent-ジベレラ骨格に由来するジベレリン、またはent-kaurenを介して合成されたジベレリンであってもよく、これには、ジベレリン1(GA1)、GA2、GA3...GA136、ならびにその類似体及び誘導体を含む。いくつかの実施形態では、ジベレリンまたはその類似体もしくは誘導体は、CISC二量体化に利用される。

【0099】

本明細書中で使用される場合、「SLF-TMP」または「トリメトプリムに結合したFKBPの合成リガンド」とは、CISC二量体化のための二量体化剤を指す。いくつかの実施形態では、SLF部分は、第1のCISC構成要素に結合し、TMP部分は第2のCISC構成要素に結合し、CISC二量体化を引き起こす。いくつかの実施形態では、SLFは、例えばFKBPに結合し得、TMPは、E.coliジヒドロ葉酸レダクターゼ(eDHF R)に結合し得る。

【0100】

本明細書で使用される場合、「同時結合」という用語は、同時にまたは場合によっては実質的に同時に2つ以上のCISC構成要素によるリガンドの結合を指し、CISC構成要素及びリガンド構成要素を含む多構成要素複合体を形成し、その後のシグナル活性化をもたらす。同時結合は、CISC構成要素が単一のリガンドに結合するように空間的に構成されること、そして両方のCISC構成要素が同じリガンド上の異なる部分を含む同じリガンドに結合するように構成されることを必要とする。

【0101】

本明細書中で使用される場合、「選択的増幅」という用語は、哺乳動物細胞のような所望の細胞、または哺乳動物細胞集団のような所望の細胞集団が増幅する能力を指す。いくつかの実施形態では、選択的増幅は、哺乳動物細胞などの2つの遺伝子改変事象を受けた純粋な細胞集団の生成または増幅を指す。二量体化CISCの一方の構成要素は、一方の修飾の一部であり、他方の構成要素は、他方の修飾である。したがって、ヘテロ二量体化CISCの一構成要素は、各遺伝子改変と関連している。細胞のリガンドへの曝露によっ

10

20

30

40

50

て、両方の所望の修飾を有する哺乳動物細胞などの細胞のみの選択的増幅が可能になる。したがって、いくつかの実施形態では、リガンドとの接触に応答することができる唯一の細胞、例えば哺乳動物細胞は、ヘテロ二量体化C I S Cの両方の構成要素を発現する細胞である。

#### 【0102】

本明細書中で使用される場合、「宿主細胞」は、核酸構築物またはベクターによる形質転換、トランスフェクション、または形質導入を受けやすい任意の細胞型、例えば哺乳動物細胞を含む。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞などの宿主細胞は、T細胞または制御性T細胞(Treg)である。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞などの宿主細胞は、造血幹細胞である。いくつかの実施形態では、宿主細胞はCD34+、CD8+、またはCD4+細胞である。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、ナイーブCD8+T細胞、セントラルメモリーCD8+T細胞、エフェクターメモリーCD8+T細胞、及びバルクCD8+T細胞からなる群より選択されるCD8+T細胞傷害性リンパ球細胞である。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、ナイーブCD4+T細胞、セントラルメモリーCD4+T細胞、エフェクターメモリーCD4+T細胞、及びバルクCD4+T細胞からなる群より選択されるCD4+Tヘルパーリンパ球細胞である。本明細書中で使用される場合、「細胞集団」という用語は、複数の細胞を含む、哺乳動物細胞などの細胞の群を指す。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞などの細胞が製造され、その細胞は本明細書に記載のタンパク質配列または本明細書に記載のタンパク質配列をコードする発現ベクターを含む。

#### 【0103】

本明細書中で使用される場合、「形質転換された」または「トランスフェクトされた」という用語は、構築物などの外来ポリヌクレオチド分子が導入された哺乳動物細胞などの細胞、組織、器官または生物を指す。導入されたポリヌクレオチド分子は、導入されたポリヌクレオチド分子がその後の子孫によって受け継がれるように、哺乳動物細胞などのレシピエント細胞、組織、器官、または生物のゲノムDNAに組み込まれてもよい。哺乳動物細胞などの「トランスジェニック」または「トランスフェクトされた」細胞、または生物体とはまた、その細胞または生物の子孫、及びそのようなトランスジェニック生物を親として交配で用い、及び外来ポリヌクレオチド分子の存在から生じる改変表現型を示す、育種プログラムから産生される子孫も含む。「トランスジェニック」という用語は、1つ以上の異種ポリ核酸分子を含む細菌、真菌、または植物を指す。「形質導入」とは、哺乳動物細胞などの細胞へのウイルス媒介遺伝子導入を指す。

#### 【0104】

本明細書中で使用される場合、「対象」とは、処置、観察または実験の対象である動物を指す。「動物」は、冷血及び温血の脊椎動物ならびに無脊椎動物、例えば、魚、貝、爬虫類、特に哺乳動物を含む。「哺乳動物」は、限定するものではないが、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、イヌ、ネコ、ヒツジ、ヤギ、ウシ、ウマ、霊長類、例えば、サル、チンパンジー、及び類人猿、特にヒトを含む。いくつかの代替例において、対象はヒトである。

#### 【0105】

いくつかの実施形態では、二量体化を誘導するために使用されるリガンドの有効量は、0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、もしくは100nMの量、または上述の値のいずれか2つによって定義される範囲内の濃度である。

#### 【0106】

本明細書に記載の「マーカー配列」は、目的のタンパク質を有するタンパク質または細

10

20

30

40

50

胞、例えば、哺乳動物細胞を選択または追跡するために使用されるタンパク質をコードする。本明細書中に記載される実施形態では、提供される融合タンパク質は、フローサイトメトリーなどの実験において選択され得るマーカー配列を含んでもよい。

【0107】

本明細書で使用される「キメラ受容体」または「キメラ抗原受容体」とは、疾患または障害に関連する分子に結合し、T細胞の1つ以上の細胞内シグナル伝達ドメインまたは共刺激ドメインのような他の受容体に対してスパーサドメインを介して結合される、抗体のリガンド結合ドメインまたは他のタンパク質配列を含む、合成的にデザインされた受容体を指す。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞などの細胞が製造され、その細胞は、融合タンパク質をコードする核酸を含み、その細胞はキメラ抗原受容体を含む。

10

【0108】

本明細書で使用される「細胞傷害性Tリンパ球」(CTL)は、その表面にCD8を発現するTリンパ球(例えば、CD8+T細胞)を指す。いくつかの実施形態では、そのような細胞は、抗原を経験している「メモリー」T細胞(T<sub>M</sub>細胞)であることが好ましい。いくつかの実施形態では、融合タンパク質分泌用の細胞が提供される。いくつかの実施形態では、細胞は、細胞傷害性Tリンパ球である。本明細書で使用される「セントラルメモリー」T細胞(または「T<sub>CM</sub>」)とは、その表面にCD62L、CCR-7及び/またはCD45ROを発現し、ナイーブ細胞と比較して、CD45RAを発現しないかまたはその発現が減少した抗原経験CTLを指す。いくつかの実施形態では、融合タンパク質分泌用の細胞が提供される。いくつかの実施形態では、細胞は、セントラルメモリーT細胞(T<sub>CM</sub>)である。いくつかの実施形態では、セントラルメモリー細胞は、CD62L、CCR7、CD28、CD127、CD45RO、及び/またはCD95の発現について陽性であり、ナイーブ細胞と比較して、CD54RAの発現が減少している場合がある。本明細書で使用される「エフェクターメモリー」T細胞(または「T<sub>EM</sub>」)とは、セントラルメモリー細胞と比較して、その表面上にCD62Lを発現しないかまたは発現が減少し、そしてナイーブ細胞と比較して、CD45RAを発現しないか、または発現が減少している抗原経験T細胞を指す。いくつかの実施形態では、融合タンパク質分泌用の細胞が提供される。いくつかの実施形態では、細胞は、エフェクターメモリーT細胞である。いくつかの実施形態では、エフェクターメモリー細胞は、ナイーブ細胞またはセントラルメモリー細胞と比較して、CD62L及び/またはCCR7の発現について陰性であり、そしてCD28及び/またはCD45RAの可変発現を有し得る。

20

30

【0109】

本明細書で使用される「ナイーブT細胞」とは、セントラルメモリー細胞またはエフェクターメモリー細胞と比較して、CD62L及び/またはCD45RAを発現し、CD45RO-を発現しない、抗原非経験Tリンパ球を指す。いくつかの実施形態では、融合タンパク質分泌用の哺乳動物細胞などの細胞が提供される。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞などの細胞はナイーブT細胞である。いくつかの実施形態では、ナイーブCD8+Tリンパ球は、CD62L、CCR7、CD28、CD127、及び/またはCD45RAを含むナイーブT細胞の表現型マーカーの発現によって特徴付けられる。

【0110】

40

本明細書で使用される「エフェクター」T細胞は、CD62L、CCR7、及び/またはCD28を発現しないかまたは発現が減少し、そしてセントラルメモリーまたはナイーブT細胞と比較して、グランザイムB及び/またはパーフォリンについて陽性である抗原経験細胞傷害性Tリンパ球細胞を指す。いくつかの実施形態では、融合タンパク質分泌用の哺乳動物細胞などの細胞が提供される。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞などの細胞は、エフェクターT細胞である。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞などの細胞は、セントラルメモリーまたはナイーブT細胞と比較して、CD62L、CCR7、及び/またはCD28を発現しないかまたは発現が減少しており、グランザイムB及び/またはパーフォリンについて陽性である。

【0111】

50

本明細書で使用される「エピトープ」とは、抗体、T細胞、及び/またはB細胞を含む免疫系によって認識される抗原または分子の一部を指す。エピトープは、通常少なくとも7個のアミノ酸を有し、直鎖状エピトープであっても、または立体配座エピトープであってもよい。いくつかの実施形態では、融合タンパク質を発現する哺乳動物細胞などの細胞が提供され、ここでこの細胞はキメラ抗原受容体をさらに含む。いくつかの実施形態では、キメラ抗原受容体は、がん細胞上のエピトープを認識し得るs c F vを含む。本明細書中に開示される様々なポリペプチドまたは核酸を記載するために使用されるとき「単離する」または「精製する」とは、その自然環境の構成要素から同定及び分離及び/または回収されたポリペプチドまたは核酸を指す。好ましくは、単離されたポリペプチドまたは核酸は、それが天然に会合している全ての構成要素と会合していない。その自然環境の汚染成分は、典型的にはポリペプチドまたは核酸の診断的または治療的使用を妨害する物質であり、そして酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様または非タンパク質様溶質を含み得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の実施形態のいずれか1つの核酸または本明細書に記載の実施形態のいずれか1つの発現ベクターを、細菌細胞、哺乳動物細胞または昆虫細胞に送達すること、この細胞を培養物中で成長させること、融合タンパク質の発現を誘導すること、及びこの融合タンパク質を処理のために精製することを包含する方法が提供される。

#### 【0112】

本明細書で同定されたCISC配列に関する「アミノ酸配列同一性パーセント(%)」とは、必要に応じて、最大パーセント配列同一性を達成するために、配列同一性の一部として保存的置換を考慮せずに、配列を整列させ、ギャップを導入した後、細胞外結合ドメイン、ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、及び/またはシグナル伝達ドメインの各配列について、参照配列中のアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセンテージとして定義される。アミノ酸配列同一性パーセントを決定する目的のためのアラインメントは、例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGN、ALIGN-2またはMegalign(DNASTAR)ソフトウェアのような公的に入手可能なコンピューターソフトウェアを用いて、当該分野の技術の範囲内である種々の方法で達成され得る。当業者は、比較される配列の全長にわたって最大のアラインメントを達成するために必要とされる任意のアルゴリズムを含む、アラインメントを測定するための適切なパラメータを決定し得る。例えば、WU-BLAST-2コンピュータープログラム(Altshuler et al., Methods in Enzymology, 266:460-480(1996))を使用して生成されたアミノ酸配列同一性値の%は、そのほとんどがデフォルト値に設定されている、いくつかの検索パラメータを使用する。デフォルト値に設定されていないもの(例えば、調整可能なパラメータ)は、以下の値に設定される: オーバーラップスパン=1、オーバーラップフラクション=0.125、ワード閾値(T)=11及びスコアリングマトリックス=BLOSUM62。CISCのいくつかの実施形態では、CISCは細胞外結合ドメイン、ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、及びシグナル伝達ドメインを含み、ここで各ドメインは天然型、合成型、または変異型もしくは切断型の天然ドメインを含む。いくつかの実施形態では、任意の所与のドメインの変異型または切断型は、100%、95%、90%、85%の配列同一性、または本明細書中に提供される配列に示される配列に示される配列に対する前述のいずれか2つの割合によって定義される範囲内の配列同一性パーセントを有するアミノ酸配列を含む。

#### 【0113】

本明細書で使用される「CISCバリエーションポリペプチド配列」または「CISCバリエーションアミノ酸配列」とは、細胞外結合ドメイン、ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン及び/またはシグナル伝達ドメインのタンパク質配列などの、本明細書で提供されるタンパク質配列またはその具体的に誘導された断片と、少なくとも80%、85%、90%、95%、98%または99%のアミノ酸配列同一性(または上記の割合のうちのいずれか2つによって定義される範囲内のアミノ酸配列同一性の割合)を有する下記に定義するタンパク質配列を指す。通常、CISCバリエーションポリペプチドまたはその断片は、アミノ酸配

10

20

30

40

50

列またはその誘導された断片と、少なくとも 80 % のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも 81 % のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも 82 % のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも 83 % のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも 84 % のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも 85 % のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも 86 % のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも 87 % のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも 88 % のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも 89 % のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも 90 % のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも 91 % のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも 92 % のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも 93 % のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも 94 % のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも 95 % のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも 96 % のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも 97 % のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも 98 % のアミノ酸配列同一性、及びさらにより好ましくは少なくとも 99 % のアミノ酸配列同一性を有するであろう。バリエーションは天然タンパク質配列を包含しない。

10

#### 【0114】

本明細書で使用される「T細胞」または「Tリンパ球」とは、サル、イヌ、及びヒトを含む、任意の哺乳動物、好ましくは霊長類の種に由来し得る。いくつかの実施形態では、T細胞は、レシピエント対象と同種異系（同種だがドナーが異なる）である；いくつかの実施形態では、T細胞は自己由来である（ドナーとレシピエントは同じ）；いくつかの実施形態では、T細胞は同質遺伝子的である（ドナーとレシピエントは異なるが同一の双子である）。

20

#### 【0115】

本明細書で使用される場合、過渡的な句であろうと、または請求項の本文であろうと、「含む」及び「含んでいる」という用語は、無制限の意味を有すると解釈されるべきである。すなわち、この用語は、「少なくとも有する」または「少なくとも含む」という句と同義的に解釈されるべきである。プロセスの文脈で使用される場合、「含む」という用語は、プロセスが少なくとも列挙されたステップを含むが、追加のステップも含んでもよいことを意味する。化合物、組成物またはデバイスの文脈で使用されるとき、「含む」という用語は、その化合物、組成物またはデバイスが少なくとも列挙された特徴または構成要素を含むが、追加の特徴または構成要素も含んでもよいことを意味する。

30

#### 【0116】

##### タンパク質配列

本明細書中に記載されるように、二量体 C I S C 構成要素をコードする 1 つ以上のタンパク質配列が提供される。1 つ以上のタンパク質配列は、第 1 及び第 2 の配列を有し得る。いくつかの実施形態では、第 1 の配列は、第 1 の細胞外結合ドメインまたはその一部、ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、及びシグナル伝達ドメインまたはその一部を含み得る第 1 の C I S C 構成要素をコードする。いくつかの実施形態では、第 2 の配列は、第 2 の細胞外結合ドメインまたはその一部、ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、及びシグナル伝達ドメインまたはその一部を含み得る第 2 の C I S C 構成要素をコードする。いくつかの実施形態では、第 1 及び第 2 の C I S C 構成要素は、発現されたときに、それらが好ましくは同時に、リガンドの存在下で二量体化するように配置されてもよい。化学誘導シグナル伝達複合体の実施形態は、図 1 ~ 2 に概略的に描かれており、これはまた、例えば R A S / M A P K / E R K シグナル伝達経路、A k t / P I 3 K シグナル伝達経路、m T O R C 1 シグナル伝達経路、または F O X P 3 シグナル伝達経路を含み得る、C I S C の活性化の結果としての下流シグナル伝達経路も表す。さらに、図 2 は、本明細書に記載のラパマイシンまたはその類似体などのリガンドの存在下での、F R B - F K B P 二量体化 I L 2 R b g による I L 2 R シグナル伝達を概略的に示す。

40

#### 【0117】

いくつかの実施形態では、ヘテロ二量体二構成要素 C I S C のタンパク質配列（複数可

50

）が提供される。いくつかの実施形態では、第1のCISC構成要素は、IL2R - CISC複合体である。図3は、膜貫通スパンから延びる様々なアミノ酸配列長を有するCISCを含む、CISC構築物デザインを概略的に示す。本明細書に記載され、図3に概略的に示されるように、アミノ酸配列の長さが変化することにより、様々な程度の可塑性が付与され得る。図3に示される概略図は、例として模式的な構築物の詳細を示しており、範囲を限定することを意図しない以下の配列に包含され得る。

【0118】

いくつかの実施形態では、IL2R - CISCは、配列番号1 (MPLGLLWLGLALLGALHAQAGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKFDSSSRDRNKPFFKFM LGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDIAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLGE GSNTSKENPFLFALEAVVISVGS MGLIISLLCVYFWLER TMPRIPTLKNLEDLVTEYHGNFSAWSGVSKGLAESLQPDYSERLCLVSEI PPKG GALGEGPGASPCNQHSPLYWAPP CYTLKPET ; 配列番号1) に示されるアミノ酸配列を含む。実施形態はまた、配列番号1のタンパク質配列をコードする核酸配列を含む。

10

【0119】

いくつかの実施形態では、IL2R - CISCは、配列番号3 (MPLGLLWLGLALLGALHAQAGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKFDSSSRDRNKPFFKFM LGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDIAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLGE GGSQNLVIPWAPENLT LHKLSSESQLELNWNNRFLNHCLEHLVQYRTDWDH SWTEQSVDYRHKFSLPSVDGQKRYTFRVRSR FNPLCGSAQH WSEW SHPIHWGSNTSKENPFLFALEAVVISVGS MGLIISLLCVYFWLER TMPRIPTLKNLEDLVTEYHGNFSAWSGVSKGLAESLQPDYSERLCLVSEI PPKG GALGEGPGASPCNQHSPLYWAPP CYTLKPET ; 配列番号3) に示されるアミノ酸配列を含む。実施形態はまた、配列番号3のタンパク質配列をコードする核酸配列を含む。

20

【0120】

いくつかの実施形態では、IL2R - CISCは、配列番号5 (MPLGLLWLGLALLGALHAQAGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKFDSSSRDRNKPFFKFM LGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDIAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLGE QNLVIPWAPENLT LHKLSSESQLELNWNNRFLNHCLEHLVQYRTDWDH SWTEQSVDYRHKFSLPSVDGQKRYTFRVRSR FNPLCGSAQH WSEW SHPIHWGSNTSKENPFLFALEAVVISVGS MGLIISLLCVYFWLER TMPRIPTLKNLEDLVTEYHGNFSAWSGVSKGLAESLQPDYSERLCLVSEI PPKG GALGEGPGASPCNQHSPLYWAPP CYTLKPET ; 配列番号5) に示されるアミノ酸配列を含む。実施形態はまた、配列番号5のタンパク質配列をコードする核酸配列も含む。

30

40

【0121】

いくつかの実施形態では、IL2R - CISCは、配列番号7 (MPLGLLWLGLALLGALHAQAGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKFDSSSRDRNKPFFKFM LGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDIAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLGE GSNTSKENPFLFALEAVVISVGS MGLIISLLCVYFWLER TMPRIPTLKNLEDLVTEYHGNFSAWSGVSKGLAESLQPDYSERLCLVSEI PPKG GALGEGPGASPCNQHSPLYWAPP CYTLKPET ; 配列番号7) に示されるアミノ酸配列を含む。実施形態はまた、配列番号7のタンパク質配列をコードする核酸配列も含む。

50

## 【 0 1 2 2 】

いくつかの実施形態では、第 1 の C I S C 構成要素のタンパク質配列は、細胞外結合ドメイン、ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、またはシグナル伝達ドメインをコードするタンパク質配列を含む。実施形態はまた、細胞外結合ドメイン、ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、またはシグナル伝達ドメインをコードする核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、第 1 の細胞外結合ドメイン、ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、及び / またはシグナル伝達ドメインを含む第 1 の C I S C 構成要素のタンパク質配列は、配列番号 1、3、5、もしくは 7 に示される配列に対して 100%、99%、98%、95%、90%、85%、もしくは 80% の配列同一性を含むか、または上述の割合のうちのいずれか 2 つによって定義される範囲内の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

10

## 【 0 1 2 3 】

いくつかの実施形態では、第 2 の C I S C 構成要素は、I L 2 R 複合体である。いくつかの実施形態では、I L 2 R - C I S C は、配列番号 2 ( M A L P V T A L L L P L A L L L H A A R P I L W H E M W H E G L E E A S R L Y F G E R N V K G M F E V L E P L H A M M E R G P Q T L K E T S F N Q A Y G R D L M E A Q E W C R K Y M K S G N V K D L L Q A W D L Y Y H V F R R I S K G K D T I P W L G H L L V G L S G A F G F I I L V Y L L I N C R N T G P W L K K V L K C N T P D P S K F F S Q L S S E H G G D V Q K W L S S P F P S S S F S P G G L A P E I S P L E V L E R D K V T Q L L L Q Q D K V P E P A S L S S N H S L T S C F T N Q G Y F F F H L P D A L E I E A C Q V Y F T Y D P Y S E E D P D E G V A G A P T G S S P Q P L Q P L S G E D D A Y C T F P S R D D L L L F S P S L L G G P S P P S T A P G G S G A G E E R M P P S L Q E R V P R D W D P Q P L G P P T P G V P D L V D F Q P P P E L V L R E A G E E V P D A G P R E G V S F P W S R P P G Q G E F R A L N A R L P L N T D A Y L S L Q E L Q G Q D P T H L V ; 配列番号 2 ) に示されるアミノ酸配列を含む。実施形態はまた、配列番号 2 のタンパク質配列をコードする核酸配列も含む。

20

## 【 0 1 2 4 】

いくつかの実施形態では、I L 2 R - C I S C は、配列番号 4 ( M A L P V T A L L L P L A L L L H A A R P I L W H E M W H E G L E E A S R L Y F G E R N V K G M F E V L E P L H A M M E R G P Q T L K E T S F N Q A Y G R D L M E A Q E W C R K Y M K S G N V K D L L Q A W D L Y Y H V F R R I S K G G S K P F E N L R L M A P I S L Q V V H V E T H R C N I S W E I S Q A S H Y F E R H L E F E A R T L S P G H T W E E A P L L T L K Q K Q E W I C L E T L T P D T Q Y E F Q V R V K P L Q G E F T T W S P W S Q P L A F R T K P A A L G K D T I P W L G H L L V G L S G A F G F I I L V Y L L I N C R N T G P W L K K V L K C N T P D P S K F F Q L S S E H G G D V Q K W L S S P F P S S S F S P G G L A P E I S P L E V L E R D K V T Q L L L Q Q D K V P E P A S L S S N H S L T S C F T N Q G Y F F F H L P D A L E I E A C Q V Y F T Y D P Y S E E D P D E G V A G A P T G S S P Q P L Q P L S G E D D A Y C T F P S R D D L L L F S P S L L G G P S P P S T A P G G S G A G E E R M P P S L Q E R V P R D W D P Q P L G P P T P G V P D L V D F Q P P P E L V L R E A G E E V P D A G P R E G V S F P W S R P P G Q G E F R A L N A R L P L N T D A Y L S L Q E L Q G Q D P T H L V ; 配列番号 4 ) に示されるアミノ酸配列を含む。実施形態はまた、配列番号 4 のタンパク質配列をコードする核酸配列も含む。

30

40

## 【 0 1 2 5 】

いくつかの実施形態では、I L 2 R - C I S C は、配列番号 6 ( M A L P V T A L L L P L A L L L H A A R P I L W H E M W H E G L E E A S R L Y F G E R N V K G M F E V L E P L H A M M E R G P Q T L K E T S F N Q A Y G R D L M E A Q E W C R K Y M K S G N V K D L L Q A W D L Y Y H V F R R I S K K P F E N L R L M A P I S L Q V V H V E T H R C N I S W E I S Q A S H Y F E R H L E F E A R T L S P G H T W E E A P L L T L K Q K Q E W I C L E T L T P D T Q Y E F Q V R V K P L Q G E F T T W S P W S Q P L A F R T K P A A L G K D T I P W L G H L L V G L S G A F G F I I

50

L V Y L L I N C R N T G P W L K K V L K C N T P D P S K F F S Q L S S E H G G D  
V Q K W L S S P F P S S S F S P G G L A P E I S P L E V L E R D K V T Q L L L Q  
Q D K V P E P A S L S S N H S L T S C F T N Q G Y F F F H L P D A L E I E A C Q  
V Y F T Y D P Y S E E D P D E G V A G A P T G S S P Q P L Q P L S G E D D A Y C  
T F P S R D D L L L F S P S L L G G P S P P S T A P G G S G A G E E R M P P S L  
Q E R V P R D W D P Q P L G P P T P G V P D L V D F Q P P P E L V L R E A G E E  
V P D A G P R E G V S F P W S R P P G Q G E F R A L N A R L P L N T D A Y L S L  
Q E L Q G Q D P T H L V ; 配列番号 6 ) に示されるアミノ酸配列を含む。実施形態はまた、配列番号 6 のタンパク質配列をコードする核酸配列も含む。

【 0 1 2 6 】

いくつかの実施形態では、I L 2 R - C I S C は、配列番号 8 ( M A L P V T A L L  
L P L A L L L H A A R P I L W H E M W H E G L E E A S R L Y F G E R N V K G M F  
E V L E P L H A M M E R G P Q T L K E T S W L G H L L V G L S G A F G F I I L V  
Y L L I N C R N T G P W L K K V L K C N T P D P S K F F S Q L S S E H G G D V Q  
K W L S S P F P S S S F S P G G L A P E I S P L E V L E R D K V T Q L L L Q Q D  
K V P E P A S L S S N H S L T S C F T N Q G Y F F F H L P D A L E I E A C Q V Y  
F T Y D P Y S E E D P D E G V A G A P T G S S P Q P L Q P L S G E D D A Y C T F  
P S R D D L L L F S P S L L G G P S P P S T A P G G S G A G E E R M P P S L Q E  
R V P R D W D P Q P L G P P T P G V P D L V D F Q P P P E L V L R E A G E E V P  
D A G P R E G V S F P W S R P P G Q G E F R A L N A R L P L N T D A Y L S L Q E  
L Q G Q D P T H L V ; 配列番号 8 ) に示されるアミノ酸配列を含む。実施形態はまた、配列番号 8 のタンパク質配列をコードする核酸配列も含む。

【 0 1 2 7 】

いくつかの実施形態では、第 2 の C I S C 構成要素は、I L 7 R 複合体である。いくつかの実施形態では、I L 7 R - C I S C は、配列番号 9 ( M A L P V T A L L L P L  
A L L L H A A R P I L W H E M W H E G L E E A S R L Y F G E R N V K G M F E V L  
E P L H A M M E R G P Q T L K E T S F N Q A Y G R D L M E A Q E W C R K Y M K S  
G N V K D L L Q A W D L Y Y H V F R R I S K G E I N N S S G E M D P I L L T I S  
I L S F F S V A L L V I L A C V L W K K R I K P I V W P S L P D H K K T L E H L  
C K K P R K N L N V S F N P E S F L D C Q I H R V D D I Q A R D E V E G F L Q D  
T F P Q Q L E E S E K Q R L G G D V Q S P N C P S E D V V I T P E S F G R D S S  
L T C L A G N V S A C D A P I L S S S R S L D C R E S G K N G P H V Y Q D L L L  
S L G T T N S T L P P P F S L Q S G I L T L N P V A Q G Q P I L T S L G S N Q E  
E A Y V T M S S F Y Q N Q ; 配列番号 9 ) に示されるアミノ酸配列を含む。実施形態はまた、配列番号 9 のタンパク質配列をコードする核酸配列も含む。

【 0 1 2 8 】

いくつかの実施形態では、第 2 の C I S C 構成要素のタンパク質配列は、細胞外結合ドメイン、ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、またはシグナル伝達ドメインをコードするタンパク質配列を含む。実施形態はまた、第 2 の C I S C 構成要素の細胞外結合ドメイン、ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、またはシグナル伝達ドメインをコードする核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、第 2 の細胞外結合ドメイン、ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、及び / またはシグナル伝達ドメインを含む第 2 の C I S C 構成要素のタンパク質配列は、配列番号 2、4、6、8 もしくは 9 に示される配列に対して 100%、99%、98%、95%、90%、85% もしくは 80% の配列同一性を含むか、または上述の割合のうちいずれか 2 つによって定義される範囲内の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【 0 1 2 9 】

いくつかの実施形態では、タンパク質配列はリンカーを含み得る。いくつかの実施形態では、リンカーは、グリシンなどの 1、2、3、4、5、6、7、8、9 もしくは 10 個のアミノ酸、またはグリシンなどの多数のアミノ酸を、上記の数字のうちのいずれか 2 つ

10

20

30

40

50



によって定義される範囲内で含む。いくつかの実施形態では、グリシンスペーサーは、少なくとも3つのグリシンを含む。いくつかの実施形態では、グリシンスペーサーは、配列番号15 (GGGS; 配列番号15)、配列番号16 (GGSGGG; 配列番号16) または配列番号17 (GGG; 配列番号17) に示される配列を含む。実施形態はまた、配列番号15~17をコードする核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、シグナル伝達ドメインのN末端に位置しており、ヒンジドメインは、膜貫通ドメインのN末端に位置しており、リンカーは、ヒンジドメインのN末端に位置し、そして細胞外結合ドメインは、リンカーのN末端に位置する。

#### 【0130】

いくつかの実施形態では、ホモ二量体の二構成要素CISCのタンパク質配列(複数可)が提供される。いくつかの実施形態では、第1のCISC構成要素は、IL2R - CISC複合体である。いくつかの実施形態では、IL2R - CISCは、配列番号11 (MPLGLLWLGLALLGALHAQAGVQVETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLEDGKKVDSSSRDRNKP FKFMLGKQEVIRGWE EGVAQMSVGQRAKLTISPDIAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLEGGSENTSKENPFLFALEAVVISVGSMLIISLLCVYFWLERTMPRIPTLKNLEDLVTEYHGNFSAWSGVSKGLAESLQPDYSERLCLVSEIPPKGGALGEGPGASPCNQHSPLYWAPPCYTLLKPET; 配列番号11) に示されるアミノ酸配列を含む。実施形態はまた、配列番号11のタンパク質配列をコードする核酸配列も含む。

#### 【0131】

いくつかの実施形態では、第1のCISC構成要素のタンパク質配列は、細胞外結合ドメイン、ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、またはシグナル伝達ドメインをコードするタンパク質配列を含む。実施形態はまた、細胞外結合ドメイン、ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、またはシグナル伝達ドメインをコードする核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、第1の細胞外結合ドメイン、ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、及び/またはシグナル伝達ドメインを含む第1のCISC構成要素のタンパク質配列は、配列番号11に示される配列に対して100%、99%、98%、95%、90%、85%、もしくは80%の配列同一性を有するか、または上述の割合のうちのいずれか2つによって定義される範囲内の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

#### 【0132】

いくつかの実施形態では、第2のCISC構成要素は、IL2R 複合体またはIL2R 複合体である。いくつかの実施形態では、IL2R - CISCは、配列番号10 (MPLGLLWLGLALLGALHAQAGVQVETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLEDGKKVDSSSRDRNKP FKFMLGKQEVIRGWE EGVAQMSVGQRAKLTISPDIAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLEGGKDTIPWLGHLLVGLSGAFGFIIILVYLLINCRNTGPWLKKVLLKCNTPDPSKFFSQLSSEHGGDVQKWLSSSPFPSSSFSPGGGLAPEISPLEVLERDKVTQLLLQQDKVPEPASLSSNHSLTSCFTNQGYFFFHLPDALEIEACQVYFTYDPYSEEDPDEGVAGAPTGS SPQLQLSGEDDAYCTFPSRDDLLLFSPSLLGGPSP PSTAPGGSGAGEERMPPSLQERVPRDWD PQPLGPPTPGVPDLVDFQPPPELVLRAGEEV PDAGPREGV SF PWSRPPGQGEFRA L NARLP LN T DAY L S L Q E L Q G Q D P T H L V ; 配列番号10) に示されるアミノ酸配列を含む。実施形態はまた、配列番号10のタンパク質配列をコードする核酸配列も含む。

#### 【0133】

いくつかの実施形態では、IL2R - CISCは、配列番号12 (MPLGLLWLGLALLGALHAQAGVQVETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLEDGKKVDSSSRDRNKP FKFMLGKQEVIRGWE EGVAQMSV

G Q R A K L T I S P D Y A Y G A T G H P G I I P P H A T L V F D V E L L K L E G  
E I N N S S G E M D P I L L T I S I L S F F S V A L L V I L A C V L W K K R I K  
P I V W P S L P D H K K T L E H L C K K P R K N L N V S F N P E S F L D C Q I H  
R V D D I Q A R D E V E G F L Q D T F P Q Q L E E S E K Q R L G G D V Q S P N C  
P S E D V V I T P E S F G R D S S L T C L A G N V S A C D A P I L S S S R S L D  
C R E S G K N G P H V Y Q D L L L S L G T T N S T L P P P F S L Q S G I L T L N  
P V A Q G Q P I L T S L G S N Q E E A Y V T M S S F Y Q N Q ; 配列番号 1 2 ) に示  
されるアミノ酸配列を含む。実施形態はまた、配列番号 1 2 のタンパク質配列をコードす  
る核酸配列も含む。

#### 【 0 1 3 4 】

10

いくつかの実施形態では、第 2 の C I S C 構成要素のタンパク質配列は、細胞外結合ド  
メイン、ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、またはシグナル伝達ドメインをコードするタ  
ンパク質配列を含む。実施形態はまた、第 2 の C I S C 構成要素の細胞外結合ドメイン、  
ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、またはシグナル伝達ドメインをコードする核酸配列を  
含む。いくつかの実施形態では、第 2 の細胞外結合ドメイン、ヒンジドメイン、膜貫通ド  
メイン、及び / またはシグナル伝達ドメインを含む第 2 の C I S C 構成要素のタンパク質  
配列は、配列番号 1 0 もしくは配列番号 1 2 に示される配列に対して 1 0 0 %、9 9 %、  
9 8 %、9 5 %、9 0 %、8 5 %、もしくは 8 0 % の配列同一性を含むか、または前述の  
割合のいずれか 2 つにより定義される範囲内の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

#### 【 0 1 3 5 】

20

いくつかの実施形態では、タンパク質配列はリンカーを含んでもよい。いくつかの実施  
形態では、リンカーは、グリシンなどの 1、2、3、4、5、6、7、8、9 もしくは 1  
0 個のアミノ酸、またはグリシンなどの多数のアミノ酸を、上述の数のうちいずれか 2 つ  
によって定義される範囲内で含む。いくつかの実施形態では、グリシンスペーサーは少な  
くとも 3 つのグリシンを含む。いくつかの実施形態では、グリシンスペーサーは、配列番  
号 1 5 ( G G G S ; 配列番号 1 5 )、配列番号 1 6 ( G G G S G G G ; 配列番号 1 6 ) ま  
たは配列番号 1 7 ( G G G ; 配列番号 1 7 ) に示される配列を含む。実施形態はまた、配  
列番号 1 5 ~ 1 7 をコードする核酸配列も含む。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメイ  
ンは、シグナル伝達ドメインの N 末端に位置し、ヒンジドメインは、膜貫通ドメインの N  
末端に位置し、リンカーは、ヒンジドメインの N 末端に位置し、そして細胞外結合ドメイ  
ンは、リンカーの N 末端に位置する。

30

#### 【 0 1 3 6 】

いくつかの実施形態では、ホモ二量体化二構成要素 C I S C の配列は、リガンド A P 1  
9 0 3 とのホモ二量体化のための F K B P F 3 6 V ドメインを組み込んでいる。

#### 【 0 1 3 7 】

いくつかの実施形態では、単一構成要素ホモ二量体化 C I S C のためのタンパク質配列  
( 複数可 ) が提供される。いくつかの実施形態では、単一構成要素 C I S C は、I L 7 R  
- C I S C 複合体である。いくつかの実施形態では、I L 7 R - C I S C は、配列番  
号 1 3 ( M P L G L L W L G L A L L G A L H A Q A G V Q V E T I S P G D G R T F P  
K R G Q T C V V H Y T G M L E D G K K V D S S R D R N K P F K F M L G K Q E V I  
R G W E E G V A Q M S V G Q R A K L T I S P D Y A Y G A T G H P G I I P P H A T  
L V F D V E L L K L E G E I N N S S G E M D P I L L T I S I L S F F S V A L L V  
I L A C V L W K K R I K P I V W P S L P D H K K T L E H L C K K P R K N L N V S  
F N P E S F L D C Q I H R V D D I Q A R D E V E G F L Q D T F P Q Q L E E S E K  
Q R L G G D V Q S P N C P S E D V V I T P E S F G R D S S L T C L A G N V S A C  
D A P I L S S S R S L D C R E S G K N G P H V Y Q D L L L S L G T T N S T L P P  
P F S L Q S G I L T L N P V A Q G Q P I L T S L G S N Q E E A Y V T M S S F Y Q  
N Q ; 配列番号 1 3 ) に示されるアミノ酸配列を含む。実施形態はまた、配列番号 1 3 の  
タンパク質配列をコードする核酸配列も含む。

40

#### 【 0 1 3 8 】

50

いくつかの実施形態では、単一構成要素 C I S C は、M P L - C I S C 複合体である。いくつかの実施形態では、M P L - C I S C は、配列番号 1 4 ( M P L G L L W L G L A L L G A L H A Q A G V Q V E T I S P G D G R T F P K R G Q T C V V H Y T G M L E D G K K V D S S R D R N K P F K F M L G K Q E V I R G W E E G V A Q M S V G Q R A K L T I S P D Y A Y G A T G H P G I I P P H A T L V F D V E L L K L G E E T A W I S L V T A L H L V L G L S A V L G L L L R W Q F P A H Y R R L R H A L W P S L P D L H R V L G Q Y L R D T A A L S P P K A T V S D T C E E V E P S L L E I L P K S S E R T P L P L C S S Q A Q M D Y R R L Q P S C L G T M P L S V C P P M A E S G S C C T T H I A N H S Y L P L S Y W Q Q P ; 配列番号 1 4 ) に示されるアミノ酸配列を含む。実施形態はまた、配列番号 1 4 のタンパク質配列をコードする核酸配列も含む。

10

#### 【 0 1 3 9 】

いくつかの実施形態では、単一構成要素 C I S C のタンパク質配列は、細胞外結合ドメイン、ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、またはシグナル伝達ドメインをコードするタンパク質配列を含む。実施形態はまた、細胞外結合ドメイン、ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、またはシグナル伝達ドメインをコードする核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、第 1 の細胞外結合ドメイン、ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、及び/またはシグナル伝達ドメインを含む第 1 の C I S C 構成要素のタンパク質配列は、配列番号 1 3 もしくは 1 4 に示される配列に対して 1 0 0 %、9 9 %、9 8 %、9 5 %、9 0 %、8 5 %、もしくは 8 0 % の配列同一性を含むか、または前述の割合のうちいずれか 2 つによって定義される範囲内の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

20

#### 【 0 1 4 0 】

いくつかの実施形態では、タンパク質配列は、リンカーを含み得る。いくつかの実施形態では、リンカーは、グリシンなどの 1、2、3、4、5、6、7、8、9 もしくは 1 0 個のアミノ酸、またはグリシンなどの多数のアミノ酸を、上述の数のいずれか 2 つによって定義される範囲内で含む。いくつかの実施形態では、グリシンスペースャーは少なくとも 3 つのグリシンを含む。いくつかの実施形態では、このグリシンスペースャーは、配列番号 1 5 ( G G G S ; 配列番号 1 5 )、配列番号 1 6 ( G G G S G G G ; 配列番号 1 6 ) または配列番号 1 7 ( G G G ; 配列番号 1 7 ) に示される配列を含む。実施形態はまた、配列番号 1 5 ~ 1 7 をコードする核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、シグナル伝達ドメインの N 末端に位置し、ヒンジドメインは、膜貫通ドメインの N 末端に位置し、リンカーは、ヒンジドメインの N 末端に位置し、そして細胞外結合ドメインはリンカーの N 末端に位置する。

30

#### 【 0 1 4 1 】

いくつかの実施形態では、ホモ二量体化単一構成要素 C I S C の配列は、リガンド A P 1 9 0 3 とのホモ二量体化のための F K B P F 3 6 V ドメインを組み込んでいる。

#### 【 0 1 4 2 】

二量体 C I S C 構成要素を発現するためのベクター

効率的な形質導入及び導入遺伝子の発現を提供するために様々なベクターの組み合わせを構築してもよい。いくつかの実施形態では、このベクターはウイルスベクターである。他の実施形態では、ベクターは、ウイルスベクターとプラスミドベクターの組み合わせを含んでもよい。他のウイルスベクターには、フォーミーウイルス、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス ( A A V ) ベクター、レトロウイルスベクター、及び/またはレンチウイルスベクターが挙げられる。いくつかの実施形態では、ベクターは、レンチウイルスベクターである。いくつかの実施形態では、ベクターは、フォーミーウイルスベクター、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクターである。いくつかの実施形態では、ベクターは、E . c o l i などの細菌系におけるタンパク質発現用である。他の実施形態では、第 1 のベクターは、第 1 の細胞外結合ドメインまたはその一部、ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、及びシグナル伝達ドメインまたはその一部を含む第 1 の C I S C 構成要素をコードし得るが、第 2 のベクターは、第 2 の細胞外

40

50

結合ドメインまたはその一部、ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、及びシグナル伝達ドメインまたはその一部を含む第2のCISC構成要素をコードし得る。

【0143】

いくつかの実施形態では、発現ベクターは、配列番号1、2、3、4、5、6、7、8、または9のタンパク質配列をコードする核酸を含む。いくつかの実施形態では、この発現ベクターは、配列番号20：

```
AGCTTAATGTAGTCTTATGCAATAC
TCTTGTAAGTCTTGCAACATGGTAACGATGAGTTAGCAACA
TGCCCTTACAAAGGAGAGAAAAAGCACCGTGCAATGCCGATTG
GTGGAAGTAAGGTGGTACGATCGTGCCCTTATTAGGAAGGC
AACAGACGGGTCTGACATGGATTGGACGAACCACTGAATT
GCCGCAATTGACAGAGATATTGTATTTAAGTGCCCTAGCTCGA
TACAATAAACGGGTCTCTCTGGTTTAGACCAGATCTGAGCC
TGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTTAAGC
CTCAATAAAGCTTGCCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTTGTC
CCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACCTAGAGATCCCTCAGA
CCCTTTTGTAGTCAAGTGTGGAAAAATCTCTAGCAGTGGCGCCC
GAACAGGGACTTTGAAAGCGGAAAGGGAAACAGAGGAGCTC
TCTCGACGCGAGGACTCGGCTTGCTGAAGCGCGCACGGCAA
GAGGCGAGGGGCGGCGACTGGTGAAGTACGCCAAAAATTTT
GACTAGCGGAGGCTAGAAAGGAGAGAGATGGGTGCGAGAGC
GTCAGTATTAAAGCGGGGGAGAAATTAGATCGCGATGGGAAA
AAATTCGGTTAAAGGCCAGGGGGAAAGAAAAAATATAAATT
AAAAACATATAGTATGGGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTC
GCAGTTAATCCTGGCCTGTTAGAAACATCAGAAAGGCTGTA
GACAAATACTGGGACAGCTACAAACCATCCCTTCAGACAGG
ATCAGAAAGAACTTAGATCATTATATAATACAGTAGCAACC
CTCTATTGTGTGCAATCAAAGGATAGAGATAAAAGACACCA
AGGAAGCTTTTAGACAAGATAGAGGAAGAGCAAAACAAAAG
TAAGACCACCGCACAGCAAGCGGCCGCTGATCTTCAGACC
TGGAGGAGGAGATATGAGGGGACAAATTGGAGAAAGTGAATTA
TATAAATATAAAGTAGTAATAAATTTGAACCATTAGGAGTAG
CACCCACCAAAGGCAAAGAGAAAGAGTGGTGCAGAGAGAAAA
AAGAGCAGTGGGAATAGGAGCTTTGTTCCTTGGGGTTCTTG
GGAGCAGCAGGAAGCACCTATGGGCGCAGCCTCAATGACGC
TGACGGGTACAGGCCAGACAAATTATTGTCTGGGTATAGTGCA
GCAGCAGAAACAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAG
CATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCC
AGGCAAGAAATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCA
ACAGCTCCTGGGGATTTGGGGTTGCTCTGGAAAACTCATTT
TGCACCACTGCTGTGCCCTTGGAAATGCTAGTTGGAGTAATA
AATCTCTGGAAACAGATTTGGAAATCACACGACCTGGATGGA
GTGGGGACAGAGAAATTAACAATTACACAAGCTTTAATACAC
TCCTTAATTGAAGAATCGCAAAACAGCAAGAAAAAGAAATG
AACAAAGAAATTAATTGGAATTAGATAAATGGGGCAAGTTTGTG
GAATTGGTTTAACATAACAAATTTGGCTGTGGGTATATAAAA
TTATTCATAAATGATAGTAGGAGGCTTGGTAGGTTTAAAGAA
TAGTTTTTTGCTGTACTTTCTATAGTGAATAGAGTTAGGGCA
GGGATATTACACCATTAATCGTTTTAGACCCACCTCCCAACC
CCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAGAAAGAAAGAA
GTGGAGAGAGAGACAGAGACAGATCCATTTCGATTAGTGAA
```

10

20

30

40

50

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

10

20

30

40

50

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

10

20

30

40

50

CTTCCGCGTCTTCGCCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCT  
CCCTTTGGGGCCGCCCTCCCCGCCCTGGAATTTCGAGCTCGGTA  
CCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTA  
GCCACTTTTAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGGCTAAT  
TCACTCCCAACGAAGACAAGATCTGCTTTTGTCTTGTACT  
GGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGGAGCTCT  
CTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAG  
CTTGCCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTG  
TGTGACTCTGGTAACCTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGT  
CAGTGTTGGAATACTCTAGCAGTAGTAGTTTCATGTCATCT  
TATTATTTCAGTATTTATAACTTTGCAAGAAATGAATATCA  
GAGAGTGAGAGGAACCTTGTTTATTGTCAGCTTATAATGGTT  
ACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGC  
ATTTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTC  
ATCAATGTATCTTATCATGTCTGGCTCTAGCTATCCCGCC  
CCTAACTCCGCCCCAGTTCCGCCCATTTCTCGCCCCCATGGC  
TGACTAATTTTTTTTATTTATGTCAGAGGCCGAGGCCGCCCT  
CGGCCCTCTGAGCTATTCCAGAAAGTAGTGAGGAGGGCTTTTT  
TGGAGGGCCTAGGGCTTTTGCCTCGAGACGTACCCCAATTTCGC  
CCTATAGTGAGTCGTATTACGCGCGCTCACTGGCCGTCGT  
TTTACAACGTCGTGACTGGGAAACCCCTGGCGTTACCCAA  
CTTAATCGCCCTTGTCAGCACATCCCCCTTTTCGCCAGCTGGC  
GTAATAGCGAAGAGGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACA  
GTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCGACGCGGCCCTGT  
AGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCA  
GCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCC  
TTTTCGCTTTCTTCCCTTCTCTCGCCACGTTTCGCCGGC  
TTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGT  
TCCGATTTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAAACT  
TGATTAGGGTGATGGTTTACGCTAGTGGGCCATCGCCCTGA  
TAGACGGTTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCT  
TTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACCTGGAACAACACTCAA  
CCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTG  
CCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAAC  
AAAAAATTTAACGCGAATTTTAAACAAAATATTAACGTTTAC  
AATTTCCAGGTGGCACCTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAA  
CCCCATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTA  
TCCGCTCATGAGACAATAACCCCTGATAAATGCTTCAATAA  
TATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTG  
TCGCCCTTATTCCCTTTTTTTCGGGCATTTTGCCTTCTCTGT  
TTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCT  
GAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGG  
ATCTCAACAGCGGTAAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGA  
AGAACGTTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTA  
TGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGGCAAGAGC  
AACTCGGTCGCCGCAACACTATTCTCAGAATGACTTGGT  
TGAGTACTCACCAAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGGATGGC  
ATGACAGTAAGAGAAATTATGTCAGTGCTGCCATAACCATGA  
GTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGG  
AGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTTGCACAACATGGGG

10

20

30

40

50

G A T C A T G T A A C T C G C C T T G A T C G T T G G G A A C C G G A G C T G A  
 A T G A A G C C A T A C C A A A C G A C G A G C G T G A C A C C A C G A T G C C  
 T G T A G C A A T G G C A A C A A C G T T G C G C A A A C T A T T A A C T G G C  
 G A A C T A C T T A C T C T A G C T T C C C G G C A A C A A T T A A T A G A C T  
 G G A T G G A G G C G G A T A A A G T T G C A G G A C C A C T T C T G C G C T C  
 G G C C C T T C C G G C T G G C T G G T T T A T T G C T G A T A A A T C T G G A  
 G C C G G T G A G C G T G G G T C T C G C G G T A T C A T T G C A G C A C T G G  
 G G C C A G A T G G T A A G C C C T C C C G T A T C G T A G T T A T C T A C A C  
 G A C G G G G A G T C A G G C A A C T A T G G A T G A A C G A A A T A G A C A G  
 A T C G C T G A G A T A G G T G C C T C A C T G A T T A A G C A T T G G T A A C  
 T G T C A G A C C A A G T T T A C T C A T A T A T A C T T T A G A T T G A T T T  
 A A A A C T T C A T T T T T A A T T T A A A A G G A T C T A G G T G A A G A T C  
 C T T T T T G A T A A T C T C A T G A C C A A A A T C C C T T A A C G T G A G T  
 T T T C G T T C C A C T G A G C G T C A G A C C C C G T A G A A A A G A T C A A  
 A G G A T C T T C T T G A G A T C C T T T T T T T C T G C G C G T A A T C T G C  
 T G C T T G C A A A C A A A A A A A C C A C C G C T A C C A G C G G T G G T T T  
 G T T T G C C G G A T C A A G A G C T A C C A A C T C T T T T T C C G A A G G T  
 A A C T G G C T T C A G C A G A G C G C A G A T A C C A A A T A C T G T C C T T  
 C T A G T G T A G C C G T A G T T A G G C C A C C A C T T C A A G A A C T C T G  
 T A G C A C C G C C T A C A T A C C T C G C T C T G C T A A T C C T G T T A C C  
 A G T G G C T G C T G C C A G T G G C G A T A A G T C G T G T C T T A C C G G G  
 T T G G A C T C A A G A C G A T A G T T A C C G G A T A A G G C G C A G C G G T  
 C G G G C T G A A C G G G G G G T T C G T G C A C A C A G C C C A G C T T G G A  
 G C G A A C G A C C T A C A C C G A A C T G A G A T A C C T A C A G C G T G A G  
 C T A T G A G A A A G C G C C A C G C T T C C C G A A G G G A G A A A G G C G G  
 A C A G G T A T C C G G T A A G C G G C A G G G T C G G A A C A G G A G A G C G  
 C A C G A G G G A G C T T C C A G G G G G A A A C G C C T G G T A T C T T T A T  
 A G T C C T G T C G G G T T T C G C C A C C T C T G A C T T G A G C G T C G A T  
 T T T T G T G A T G C T C G T C A G G G G G G C G G A G C C T A T G G A A A A A  
 C G C C A G C A A C G C G G C C T T T T T A C G G T T C C T G G C C T T T T G C  
 T G G C C T T T T G C T C A C A T G T T C T T T C C T G C G T T A T C C C C T G  
 A T T C T G T G G A T A A C C G T A T T A C C G C C T T T G A G T G A G C T G A  
 T A C C G C T C G C C G C A G C C G A A C G A C C G A G C G C A G C G A G T C A  
 G T G A G C G A G G A A G C G G A A G A G C G C C C A A T A C G C A A A C C G C  
 C T C T C C C C G C G C G T T G G C C G A T T C A T T A A T G C A G C T G G C A  
 C G A C A G G T T T C C C G A C T G G A A A G C G G G C A G T G A G C G C A A C  
 G C A A T T A A T G T G A G T T A G C T C A C T C A T T A G G C A C C C C A G G  
 C T T T A C A C T T T A T G C T T C C G G C T C G T A T G T T G T G T G G A A T  
 T G T G A G C G G A T A A C A A T T T C A C A C A G G A A A C A G C T A T G A C  
 C A T G A T T A C G C C A A G C G C G C A A T T A A C C C T C A C T A A A G G G  
 A A C A A A A G C T G G A G C T G C A ; 配列番号 20 ) に示される核酸配列を含む。  
 配列番号 20 は、配列番号 7 及び 8 に示されるタンパク質配列をコードする。

#### 【 0 1 4 4 】

いくつかの実施形態では、この発現ベクターは、配列番号 18 ( A G C T T A A T G T  
 A G T C T T A T G C A A T A C T C T T G T A G T C T T G C A A C A T G G T A A C  
 G A T G A G T T A G C A A C A T G C C T T A C A A G G A G A G A A A A A G C A C  
 C G T G C A T G C C G A T T G G T G G A A G T A A G G T G G T A C G A T C G T G  
 C C T T A T T A G G A A G G C A A C A G A C G G G T C T G A C A T G G A T T G G  
 A C G A A C C A C T G A A T T G C C G C A T T G C A G A G A T A T T G T A T T T  
 A A G T G C C T A G C T C G A T A C A A T A A A C G G G T C T C T C T G G T T A



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

10

20

30

40

50

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

10

20

30

40

50

ATCAATTGCGAGAAATACAGGCCCTTGGCTGAAAAAAGTGCT  
TCAAGTGTAATACCCCCGACCCAAGCAAGTTCTTCTCCCA  
GCTTTCTTTCAGAGCATGGAGGCGATGTGCGAGAAATGGCTC  
TCTTTCACCTTTTCCCTCCTCAAGCTTCTCCCCGGGAGGGC  
TGGCGCCCCGAGATTTACCTCTTGAGGTACTTGAACGAGGA  
CAAGGTTACCCAACCTTCTCCTTCAACAGGATAAGGTACCC  
GAACCTGCGAGCCTTAGCTCCAACCACTCTCTTACGAGCT  
GCTTTCACCAATCAGGGATACTTCTTTTTCACCTTCCCGA  
TGC GCTGGAAATCGAAGCTTGTCAAGTTTACTTTACCTAT  
GATCCATATAGCGAGGAAGATCCCCGACGAAGGAGTCTGCCG  
GTGCGCCCCACGGGTTCCTCACCCCCAACCTCTCCAGCCTCT  
CTCAGGAGAAAGATGATGCTTATTGCACTTTTCCCCAGTAGA  
GACGATCTCCTCCTCTTTTCTCCATCTCTTTTGGGGGGGAC  
CTTCCCCCCTTCTACGGCACCTGGCGGGTCTGGTGCTGG  
CGAGGAGCGGATGCCGCCGTCCTCCAGGAGCGAGTACCA  
CGAGATTGGGATCCCCAGCCACTTGGACCCCCCACCCCCG  
GCGTACCTGACCTTGTGATTTTCAACCTCCCCCTGAATT  
GGTGCTGCGAGAGGCTGGGGGAGGAAGTTCCGGACGCTGGG  
CCGAGGGGAGGGCGTGTCCTTTCCATGGAGTAGGCCCTCCAG  
GTCAAGGCGAGTTTAGGGCTCTCAACGCGCGGCTGCCGTT  
GAATACAGACGCTTATCTCTCACTGCAGGAACCTGCAAGGTC  
AGGACCCAAACACATCTTGTAGGATCTGGTGCTACTAATTT  
TTCTCTTTTGAAGCAAGCTGGAGATGTTGAAGAGAACCTT  
GGTCCAGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCAACCGGGGTGG  
TGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCA  
CAAGTTTCAGCGTGTCGCGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACC  
TACGGCAAGCTGACCTTGAAGTTTCATCTGCACCACCGGCA  
AGCTGCCCGTGCCCTGGCCCCACCTCTGTGACCACCTGAC  
CTACGGCGTGCAGTGCTTTCAGCCGCTACCCCCGACCACATG  
AAGCAGCACGACTTCTTTCAGATCCGCCATGCCCGAAGGCT  
ACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTTCAGGACGACGGCAA  
CTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTTCGAGGGCGACACC  
CTGGTGAAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGG  
AGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAAGCTGGAGTACAACCTA  
CAACAGCCACAAACGTCTATATCATGGCCGACAAAGCAGAA  
AACGGCATCAAGGTGAACCTTCAAGATCCGCCACAAACATCG  
AGGACGGCAGCGTGACGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAA  
CACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAAC  
CACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCA  
ACGAGAAAGCGCGATCACATGGTCCCTGCTGGAGTTCTGTGAC  
CGCCGCGGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAG  
TAAACTAGTGTCGACAAATCAACCTCTGGATTACAAAATTT  
GTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTT  
TACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCAT  
GCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTTCATTTTCTCCTCCTTGT  
ATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCC  
CGTTGTGAGGCAACGTGGCGGTGGTGTGCACTGTGTTTGTCT  
GACGCAACCCCCACTGGTTTGGGGCATTTGCCACCACCTGTCT  
AGCTCCTTTTCCGGGACTTTTCGCTTTTCCCCCTCCTATTGCT  
CACGGCGGAACTCATCGCCGCCCTGCCCTTGCCCGCTGCTGG

10

20

30

40

50

ACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGT  
TGTCGGGGGAAGCTGACGTCCTTTCCATGGCTGCTCGCCTG  
TGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTAC  
GTCCCTTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCCTTCCCGCG  
GCCTGCTGCGCGGCTCTGCGGCTCTTCCGCGTCTTTCGCCCT  
TCGCCCTCAGACGAGTCGGGATCTCCCTTTGGGGCCGCCCTCC  
CCGCCCTGGAATTCTGAGCTCGGTACCTTTAAGACCAATGAC  
TTACAAGGCAAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTTAAAAGAA  
AAGGGGGGGAAGCTGGAAGGGGCTAATTCCTCCCAACGAAGAC  
AAGATCTGCTTTTTTGTCTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGA  
CCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGGAAC  
CCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCCTTGAGTGCTTC  
AAGTAGTGTTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACCTA  
GAGATCCCTCAGACCCCTTTTAGTTCAGTGTGGAAAATCTCT  
AGCAGTAGTAGTTTCATGTCATCTTATTATTTCAGTATTTAT  
AACTTGCAAAGAAATGAATATCAGAGAGTGAGAGGGAACCTT  
GTTTATTGTCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGC  
ATCACAAATTTTCACAAATAAAGCATTTTTTTTCACTGCATT  
CTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCA  
TGTCTGGCTCTAGCTATCCCGCCCCCTAACTCCGCCCCAGTT  
CCGCCCATTTCTCCGCCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTAT  
TTATGTCAGAGGCCGAGGCCGCTCGGCCCTCTGAGCTATTC  
CAGAAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTTGGAGGCCCTAGGCTTTT  
GCGTCGAGACGTACCCAAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTAT  
TACGCGCGCTCACTGGCCGTCGTTTTTACAACGTCGTGACT  
GGGAAAACCCCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGC  
ACATCCCCCTTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCC  
CGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCCTGAATG  
GCGAATGGCGCGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGC  
GGCGGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTT  
GCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTT  
CCTTTCTCGCCACGTTTCGCGCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCT  
AAATCGGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTA  
CGGCACCTCGACCCCAAAAAAATTTGATTAGGGGTGATGGTT  
CACGTAGTGGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTTCGCC  
TTTTGACGTTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTG  
TTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCCTATCTCGGTCTATT  
CTTTTGAATTTATAAGGGATTTTTGCCGATTTTCGGCCCTATTG  
GTTAAAAAATGAGCTGATTTTAACAAAAATTTTAACGCGAAT  
TTTAACAAAAATATTAAACGTTTACAATTTCCCAGGTGGCAC  
TTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTT  
TTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAAT  
AACCCCTGATAAATGCTTCAATAATAATTGAAAAAGGAAGAG  
TATGAGTATTCACACATTTTCGCTGTCGCCCTTATTCCCTTT  
TTTGCGGCATTTTGCCTTCTCTGTTTTTGCTCACCCAGAAA  
CGCTGGTGAAAGTAAGAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGC  
ACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAG  
ATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTTCAATGA  
TGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATC  
CCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGCATA

10

20

30

40

50

C A C T A T T C T C A G A A T G A C T T G G T T G A G T A C T C A C C A G T C A  
 C A G A A A A G C A T C T T A C G G A T G G C A T G A C A G T A A G A G A A T T  
 A T G C A G T G C T G C C A T A A C C A T G A G T G A T A A C A C T G C G G C C  
 A A C T T A C T T C T G A C A A C G A T C G G A G G A C C G A A G G A G C T A A  
 C C G C T T T T T T G C A C A A C A T G G G G G A T C A T G T A A C T C G C C T  
 T G A T C G T T G G G A A C C G G A G C T G A A T G A A G C C A T A C C A A A C  
 G A C G A G C G T G A C A C C A C G A T G C C T G T A G C A A T G G C A A C A A  
 C G T T G C G C A A A C T A T T A A C T G G C G A A C T A C T T A C T C T A G C  
 T T C C C G G C A A C A A T T A A T A G A C T G G A T G G A G G C G G A T A A A  
 G T T G C A G G A C C A C T T C T G C G C T C G G C C C T T C C G G C T G G C T  
 G G T T T A T T G C T G A T A A A T C T G G A G C C G G T G A G C G T G G G T C  
 T C G C G G T A T C A T T G C A G C A C T G G G G C C A G A T G G T A A G C C C  
 T C C C G T A T C G T A G T T A T C T A C A C G A C G G G G A G T C A G G C A A  
 C T A T G G A T G A A C G A A A T A G A C A G A T C G C T G A G A T A G G T G C  
 C T C A C T G A T T A A G C A T T G G T A A C T G T C A G A C C A A G T T T A C  
 T C A T A T A T A C T T T A G A T T G A T T T A A A A C T T C A T T T T T A A T  
 T T A A A A G G A T C T A G G T G A A G A T C C T T T T T G A T A A T C T C A T  
 G A C C A A A A T C C C T T A A C G T G A G T T T T C G T T C C A C T G A G C G  
 T C A G A C C C C G T A G A A A A G A T C A A A G G A T C T T C T T G A G A T C  
 C T T T T T T T C T G C G C G T A A T C T G C T G C T T G C A A A C A A A A A A  
 A C C A C C G C T A C C A G C G G T G G T T T G T T T G C C G G A T C A A G A G  
 C T A C C A A C T C T T T T T C C G A A G G T A A C T G G C T T C A G C A G A G  
 C G C A G A T A C C A A A T A C T G T C C T T C T A G T G T A G C C G T A G T T  
 A G G C C A C C A C T T C A A G A A C T C T G T A G C A C C G C C T A C A T A C  
 C T C G C T C T G C T A A T C C T G T T A C C A G T G G C T G C T G C C A G T G  
 G C G A T A A G T C G T G T C T T A C C G G G T T G G A C T C A A G A C G A T A  
 G T T A C C G G A T A A G G C G C A G C G G T C G G G C T G A A C G G G G G G T  
 T C G T G C A C A C A G C C C A G C T T G G A G C G A A C G A C C T A C A C C G  
 A A C T G A G A T A C C T A C A G C G T G A G C T A T G A G A A A G C G C C A C  
 G C T T C C C G A A G G G A G A A A G G C G G A C A G G T A T C C G G T A A G C  
 G G C A G G G T C G G A A C A G G A G A G C G C A C G A G G G A G C T T C C A G  
 G G G G A A A C G C C T G G T A T C T T T A T A G T C C T G T C G G G T T T C G  
 C C A C C T C T G A C T T G A G C G T C G A T T T T T G T G A T G C T C G T C A  
 G G G G G G C G G A G C C T A T G G A A A A A C G C C A G C A A C G C G G C C T  
 T T T T A C G G T T C C T G G C C T T T T G C T G G C C T T T T G C T C A C A T  
 G T T C T T T C C T G C G T T A T C C C C T G A T T C T G T G G A T A A C C G T  
 A T T A C C G C C T T T G A G T G A G C T G A T A C C G C T C G C C G C A G C C  
 G A A C G A C C G A G C G C A G C G A G T C A G T G A G C G A G G A A G C G G A  
 A G A G C G C C C A A T A C G C A A A C C G C C T C T C C C C G C G C G T T G G  
 C C G A T T C A T T A A T G C A G C T G G C A C G A C A G G T T T C C C G A C T  
 G G A A A G C G G G C A G T G A G C G C A A C G C A A T T A A T G T G A G T T A  
 G C T C A C T C A T T A G G C A C C C C A G G C T T T A C A C T T T A T G C T T  
 C C G G C T C G T A T G T T G T G T G G A A T T G T G A G C G G A T A A C A A T  
 T T C A C A C A G G A A A C A G C T A T G A C C A T G A T T A C G C C A A G C G  
 C G C A A T T A A C C C T C A C T A A A G G G A A C A A A A G C T G G A G C T G  
 C A ; 配列番号 18) に示される配列番号 20 のバリエーションである。配列番号 18 は、配  
 列番号 3 及び 4 に示されるタンパク質配列をコードする。

【0145】

いくつかの実施形態では、この発現ベクターは、配列番号 19 ( A G C T T A A T G T  
 A G T C T T A T G C A A T A C T C T T G T A G T C T T G C A A C A T G G T A A C

10

20

30

40

50

GATGAGTTAGCAACATGCCCTTACAAAGGAGAGAAAAAGCAC  
CGTGCGATGCCGATTGGTGGAAAGTAAGGTGGTACGATCGTG  
CCTTATTAGGAAGGCAACAGACGGGTCTGACATGGATTGG  
ACGAACCACTGAATTGCCGCGATTGCGAGAGATATTGTATTT  
AAGTGCCCTAGCTCGATACAATAAACGGGTCTCTCTGGTTA  
GACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGA  
ACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCCTTGAGTGCT  
TCAAGTAGTGTTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAAC  
TAGAGATCCCTCAGACCCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAAATCT  
CTAGCAGTGGCGCCCGAACAGGGACTTGAAAGCGAAAGGG  
AAACCAGAGGAGCTCTCTCGACGCGAGGACTCGGCTTGCTG  
AAGCGCGCACGGCAAGAGGGCGAGGGGCGGCGACTGGTGAG  
TACGCCAAAAATTTTGA CTAGCGGAGGGCTAGAAGGAGAGA  
GATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGGGGAGAAATTA  
GATCGCGATGGGAAAAAAATTTCGGTTAAGGCCAGGGGGAAA  
GAAAAAATATAAATTAAAAACATATAGTATGGGGCAAGCAGG  
GAGCTAGAACGATTTCGCAGTTAATCCTGGCCTGTTAGAAA  
CATCAGAAAGGCTGTAGACAAATACTGGGACAGCTACAACC  
ATCCCTTCAGACAGGATCAGAAAGAACTTAGATCATTATAT  
AATACAGTAGCAACCCTCTATTGTGTGCATCAAAGGATAG  
AGATAAAAGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAGATAGAGGA  
AGAGCAAAACAAAAGTAAGACCACCGCACAGCAAGCGGCC  
GCTGATCTTCAGACCTGGAGGGAGGAGATATGAGGGGACAA  
TGGAGAAAGTGAATTATATAAATAATAAGTAGTAAAAAATTG  
AACCATTAGGAGTAGCACCCACCAAGGCAAGAGAGAAAGAGT  
GGTGCGAGAGAGAAAAAAGAGCAGTGGGAATAGGAGCTTTG  
TTCCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCG  
CAGCCTCAATGACGCTGACGGGTACAGGCCAGACAATTATT  
GTCTGGTATAGTGACAGCAGCAGAAACAATTTGCTGAGGGCT  
ATTGAGGCGCAACAGCATCTGTGTGCAACTCACAGTCTGGG  
GCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAAATCCTGGCTGTGGAAAG  
ATACCTAAAGGATCAACAGCTCCTGGGGATTTGGGGTTGC  
TCTGGAAAACTCATTTGCACCACTGCTGTGCCCTTGGAAATG  
CTAGTTGGAGTAATAAATCTCTGGAAACAGATTTGGAAATCA  
CACGACCTGGATGGAGTGGGACAGAGAAATTAACAATTAC  
ACAAGCTTAATAACACTCCTTAATTGAAGAATCGCAAAACC  
AGCAAGAAAAAGAAATGAACAAGAAATTAATTGGAATTAGATAA  
ATGGGGCAAGTTTGTGGAATTGGTTTAACATAACAATAATTGG  
CTGTGGTATATAAATAATTATTCATAATGATAGTAGGAGGCT  
TGGTAGGTTTAAAGAAATAGTTTTTGTCTGTACTTTCTATAGT  
GAATAGAGTTAGGCAAGGGATATTCAACCATTAATCGTTTTAG  
ACCCACCTCCCAACCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAG  
GAATAGAAAGAAAGAGGTTGGAGAGAGAGACAGAGACAGATC  
CATTCGATTAGTGAACGGATCTCGACGGTATCGGTTAACT  
TTTAAAGAAAAAGGGGGGATTTGGGGGGTACAGTGCAGGGG  
AAAGAAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAAACTAA  
AGAAATTACAAAAACAAATTACAAAAAATTCAAAAATTTTATC  
GATCACGAGACTAGCCTCGAGAAAGCTTGATATCGAATTCC  
CACGGGGTTGGACGCGTAGGAACAGAGAAACAGGAGAAATA  
TGGGCCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCCTGCCCC

10

20

30

40

50

GGCTCAGGGGCCAAGAACAGTTGGAAACAGCAGAATATGGGCG  
CAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTC  
AGGGCCAAAGAACAGATGGTCCCCAGATGCGGTCCCGCCCT  
CAGCAGTTTCTAGAGAACCATCAGATGTTTCCAGGGGTGCC  
CCAAGGACCTGAAATGACCCCTGTGCTTATTTGAACCTAAC  
CAATCAGTTTCGCTTCTCGCTTCTGTTCGCGCGCTTCTGCT  
CCCCGAGCTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAAACCGT  
CAGATCGCTAGCACCGGTGCCGCCACCATGCCTCTGGGGCC  
TGCTGTGGCTGGGGCCCTGCTGGGGCGCCCTGCAACGC  
CCAGGGCCGGCGTGCAGGTGGAGACAATCTCCCCAGGCGAC  
GGACGCGACATTCCCTAAGCGGGGGCCAGACCTGCGTGGTGC  
ACTATACAGGCAATGCTGGAGGATGGCAAGAAAGTTTGCAG  
CTCCCCGGGATAGAAACAAGCCATTCAAGTTTATGCTGGGC  
AAGCAGGAAGTGATCAGAGGGCTGGGAGGAGGGCGTGGCCC  
AGATGTCTGTGGGCCAGAGGGGCCAAGCTGACCATCAGCCC  
AGACTACGCTTATGGAGCAACAGGCCACCCAGGAATCATC  
CCACCTCACGCCACCCCTGGTGTTCGATGTGGAGCTGCTGA  
AGCTGGGGCGAGCAAAACTTTGGTGATTCTTTGGGGCCCCAGA  
AAATCTCACGCTTCAACAAGTTGTCCGAATCCCAGCTCGAG  
CTCAACTGGAATAATAGATTTCTTAATCATTTGTTTGGAAC  
ACCTGGTTCAATATAGAACGGATTGGGACCACTCATGGAC  
CGAGCAGTCAGTTGACTACCGCCACAAATTTTCACTTCCC  
AGCGTAGATGGGGCAGAAAGAGGTACACATTTAGGGTCAAGAT  
CCAGGTTTAAATCCTCTGTGTGGTTCTGCTCAACACTGGTCT  
TGAGTGGAGCCATCCGATCCACTGGGGCTCAAATACCTCT  
AAAGAAAATCCGTTCTCTTTGCGCTCGAAGCCGTTGTTA  
TCAGCGTCGGAAGCATGGGACTTATCATTTCCCTTCTCTG  
CGTGTACTTCTGGCTGGAGCGGACGATGCCGCGGGATTCCG  
ACGCTCAAAAAACCTGGAGGACCTTGTAACAGAATATCACG  
GTAATTTCTCCGCTTGGAGTGGCGTATCAAAGGGGGCTTGC  
TGAGTCCCTTCAACC GGATTACTCTGAGCGCCTCTGCTTG  
GTGTCCGAGATACCTCCCAAAGGAGGTGCACTTGGGGAGG  
GGCCAGGCGCGTCCCCCTTGCAATCAGCATAGTCCGTATTG  
GGCGCCCCCTGTTATACCCCTCAAACCGGAAACGGGGAAGC  
GGAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACG  
TGGAGGAGAAACCCTGGACCTATGGCACTGCCCGTGACCGC  
CCTGCTGCTGCCCTCTGGCCCTGCTGCTGCACGCAGCCCCGG  
CCTATCCTGTGGCACGAGATGTGGCACGAGGGCCTGGAGG  
AGGCCAGCAGGCTGTATTTTGGCGAGCGCAACGTGAAGGG  
CATGTTTCGAGGTGCTGGAGCCTCTGCACGCCATGATGGAG  
AGAGGCCCAACAGACCCCTGAAGGAGACATCCTTTAACCAGG  
CCTATGGACGGGGACCTGATGGAGGCAACAGGAGTGGTGCAG  
AAAGTACATGAAGTCTGGCAATGTGAAGGACCTGCTGCAG  
GCCTGGGATCTGTACTATCACGTGTTTTCGGAGAATCTCCA  
AGAAACCTTTTGGAGAACCTTAGACTGATGGCGCCCCATCTC  
TCTGCAGGTAGTTTACGTTGAGACCCATAGATGCAATATA  
AGCTGGGAAATCTCACAAAGCCAGCCATTACTTTGAACGGC  
ATTTGGGAATTCGAGGCCCGAACACTTTCCCCCGGTCTATAC  
GTGGGGAAGAAGCTCCTCTCTTTGACGCTGAAGCAGAAGCAG  
GAGTGGATTGTCTGGAGACTTTGACTCCTGATACTCAGT

10

20

30

40

50

ATGAGTTTCCAAGTTTCGGGTGAAACCACCTCCAAGGCGAGTT  
CACGACGTGGTCTCCGTGGAGTCAACCGTTGGCGTTCCGC  
ACGAAGCCCCGCTGCCCTTGGCAAAGACACGATTCCGTGGC  
TTGGGGCATCTGCTCGTTGGGGCTGAGTGGTGC GTTTGGTTT  
CATCATCTTGGTCTATCTCTTGTATCAATTGCAGAAATACA  
GGCCCTTGGCTGAAAAAAGTGTCTCAAGTGTAAATACCCCCG  
ACCCAAGCAAGTTCTTCTCCAGCTTTCTTCAGAGCATGG  
AGGCGATGTGCAAGAAATGGCTCTCTTTCACCTTTTCCCTCC  
TCAAGCTTCTCCCCGGGAGGGGCTGGCGCCCCGAGATTTCAC  
CTCTTGAGGTACTTGAACGAGACAAAGTTTACCCAACCTTCT  
CCTTCAACAGGATAAGGTACCCGAACCTGCGAGCCTTAGC  
TCCAACCACCTCTCTTACGAGCTGCTTTCACCAATCAGGGAT  
ACTTCTTTTTTCCACCTTCCCGATGCGCTGGAAATCGAAGC  
TTGTCAAGTTTACTTTACCTATGATCCATATAGCGAGGAA  
GATCCCGACGAAGGAGTCCGCCGGTGGCGCCACGGGTTCCT  
CACCCCAACCTCTCCAGCCTCTCTCAGGAGAAGATGATGC  
TTATTGCACCTTTTCCCAGTAGAGACGATCTCCTCCTCTTT  
TCTCCATCTCTTTTGGGGGGACCTTCCCCCCTTCTACGG  
CACCTGGCGGGTCTGGTGTGCGAGGAGCGGATGCCGCC  
GTCCCTCCAGGAGCGAGTACCACGAGATTGGGATCCCCAG  
CCACTTGGAACCCCCCACCCCCGGCGTACCTGACCTTGTCTG  
ATTTTCAACCTCCCCCTGAATTGGTGTGCGAGAGGCTGG  
GGAGGAAGTTCCGGACGCTGGGGCCGAGGGAGGGCGTGTCC  
TTTCCATGGAGTAGGCCCTCCAGGTCAAGGCGAGTTTAGGG  
CTCTCAACGCGCGGCTGCCGTTGAATACAGACGCTTATCT  
CTCACTGCAGGAACCTGCAAGGTTCAGGACCCAACACATCTTG  
TAGGATCTGGTGTACTAATTTTTTCTCTTTTGAAGCAAGC  
TGGAGATGTTGAAGAGAACCCCTGGTCCAGTGAGCAAGGGC  
GAGGAGCTGTTTACC CGGGGTGGTGGCCATCCTGGTTCGAGC  
TGGACGGCGACGTAAACGGGCCACAAGTTTCAGCGTGTCCGG  
CGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCCTG  
AAGTTTCATCTGCACCAACCGGCAAGCTGCCCGTGGCCCTGGC  
CCACCCCTCGTGACCAACCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTT  
CAGCCGCTACCCCGACCAACATGAAGCAGCACGACTTCTTTC  
AAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCA  
TCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGA  
GGTGAAGTTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAG  
CTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGG  
GGCACAAGCTGGAGTACAACCTACAACAGCCACAACGTCTA  
TATCATGGCCGACAAGCAGAAAGAACGGCATCAAGGTGAAC  
TTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGC  
TCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCCATCGGCGACGG  
CCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAG  
TCCGCCCTGAGCAAGAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACA  
TGGTCCCTGCTGGAGTTCTGTGACCGCCCGCGGGATCACTCT  
CGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAACTAGTGTGACAAAT  
CAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAGATTGACTGGTA  
TTCTTAACATATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGC  
TGCTTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATG  
GCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGT

10

20

30

40

50



CTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGG  
CGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGT  
TGGGGCATTGCCACCACTGTGCTCCTTTCCGGGACTT  
TCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGC  
CGCCTGCTTGGCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTG  
GGCACTGACAATTCCGTGGTGTGTGCTGGGGGAAGCTGACGT  
CCTTTCCATGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCT  
GCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAAT  
CCAGCGGGACCTTCCTTCCCGCGGGCCTGCTGCCGGCTCTGC  
GGCCTCTTCCGCGTCTTTCGCCCTTCAGACGAGTTCG  
GATCTCCCTTTGGGCGCGCCTCCCCGCTGGAATTGAGCT  
CGGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGA  
TCTTAGCCACTTTTTTAAAAGAAAAAGGGGGGACTGGAAGGG  
CTAATTCACTCCCAACGAAGACAAGATCTGCTTTTTTGTCT  
GTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGA  
GCTCTCTGGCTAACTAGGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAA  
TAAAGCTTGGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTC  
TGTTGTGTGACTCTGGTAACCTAGAGATCCCTCAGACCCTT  
TTAGTCAGTGTGGAATAATCTCTAGCAGTAGTAGTTTCATGT  
CATCTTATTATTCTAGTATTTATAACTTGC AAAGAAATGAA  
TATCAGAGAGTGAGAGGAACCTTGTTTATTGCAGCTTATAA  
TGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAAT  
AAAGCATTTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCA  
AACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGCTCTAGCTATC  
CCGCCCCCTAACTCCGCCCCAGTTCCGCCCATTTCTCGCCCC  
ATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGC  
CGCCTCGGCCCTCTGAGCTATTCCAGAAAGTAGTGAGGAGGC  
TTTTTTTGGAGGCCCTAGGCCTTTTGCGTCTGAGACGTACCCAA  
TTCGCCCTATAGTGAGTCTGATTTACGCGCGCTCACTGGCC  
GTCGTTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTTGCGCTTA  
CCCAACTTAATCGCCTTGCAAGCACATCCCCCTTTTCGCCAG  
CTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCC  
CAACAGTTGCGCGAGCCTGAATGGCGAATGGCGCGACGCGC  
CCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGGCGGGTGTGGTGGTTAC  
GCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCC  
GCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCTCTCGCCACGTTTCG  
CCGGCTTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTT  
AGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAA  
AAACTTTGATTAGGGTGATGGTTTACGTAGTGGGCCATCGC  
CCTGATAGACGGTTTTTTCGCCCTTTTGACGTTGGAGTCCAC  
GTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACCTGGAACAACA  
CTCAACCCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGA  
TTTTTGCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGAT  
TTAACA AAAAATTTAACGCGAATTTTAACA AAAAATATTAAAG  
TTTACAATTTCCAGGTGGCACCTTTTCGGGGGAATGTGCG  
CGGAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAAT  
ATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCCTGATAAATGCTTC  
AATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTT  
CCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTTGCGGCATTTTGCTT  
CCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAAG

10

20

30

40

50

ATGCTGAAGATCAGTTGGGTGACAGAGTGGGTACATCGA  
ACTGGATCTCAACAGCGGTAAAGATCCTTGAGAGTTTTCGC  
CCCGAAGAACGTTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTC  
TGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCA  
AGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAAATGAC  
TTGGTTGAGTACTCACAGTCACAGAAAAGCATCTTACGG  
ATGGCATGACAGTAAGAGAAATTATGCAGTGCTGCCATAAC  
CATGAGTGATAACAACCTGCGGCCAACCTTACTTCTGACAAACG  
ATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTTGCAACAACA  
TGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGA  
GCTGAATGAAGCCATACCAAAACGACGAGCGTGACACCACG  
ATGCCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAA  
CTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAAAT  
AGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAAGGACCACTTCTG  
CGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAAT  
CTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTTGCAGC  
ACTGGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATC  
TACACGACGGGGGAGTCAGGCCAACTATGGATGAACGAAATA  
GACAGATCGCTGAGATAGGTGCCCTCACTGATTAAAGCATTG  
GTAACCTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATT  
GATTTAAAACTTCATTTTTTAATTTAAAGGATCTAGGTGA  
AGATCCTTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACG  
TGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAAGACCCCGTAGAAAAG  
ATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAA  
TCTGCTGCTTGCAAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGT  
GGTTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTTCCG  
AAGGTAACCTGGCTTTCAGCAGAGCGCAGATACCAATACTG  
TCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAA  
CTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTG  
TTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTA  
CCGGGTTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCA  
GCGGTTCGGGCTGAACGGGGGGTTTCGTGCACACAGCCCAGC  
TTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGC  
GTGAGCTATGAGAAAGCGGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAA  
GGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCGAGGGTCGGAACAGGA  
GAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATC  
TTTATAGTCCCTGTCGGGTTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCG  
TCGATTTTTTGATGCTCGTCAAGGGGGGCGGAGCCTATGG  
AAAAACGCCAGCAACGCGGCCCTTTTTTACGGTTCTCTGGCCT  
TTTTGCTGGCCTTTTTGCTCACATGTTCTTCTCTGCGTTATC  
CCCTGATTCTGTGGATAAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGA  
GCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCG  
AGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAA  
ACCGCCTCTCCCCGCGCGTGGCCGATTCAATTAATGCAGC  
TGGCACGACAGGTTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGC  
GCAACGCAATTAAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACC  
CCAGGCTTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGT  
GGAATTGTGAGCGGATAACAATTTTACACAGGAAACAGCT  
ATGACCATGATTACGCCAAGCGCGCAATTAACCCCTCACTA  
AAGGGAACAAAAGCTGGAGCTGCA ; 配列番号 19 ) に示される配列番

10

20

30

40

50

号 20 のバリエーションである。配列番号 19 は、配列番号 5 及び 6 に示されるタンパク質配列をコードする。

【0146】

いくつかの実施形態では、発現ベクターは、本明細書で提供されるヌクレオチド配列またはその具体的に誘導された断片と、少なくとも 80%、85%、90%、95%、98% または 99% の核酸配列同一性（または上述の割合のうちいずれか 2 つによって定義される範囲内の核酸配列同一性の割合）を有する核酸を含む。いくつかの実施形態では、この発現ベクターは、プロモーターを含む。いくつかの実施形態では、この発現ベクターは、融合タンパク質をコードする核酸を含む。いくつかの実施形態では、このベクターは RNA または DNA である。

10

【0147】

細胞及び組成物：Tリンパ球集団

本明細書に記載の組成物は、本明細書に示され記載されている、タンパク質配列または発現ベクターを含む、哺乳動物細胞などの遺伝子改変細胞を提供する。したがって、本明細書に記載の実施形態のいずれか 1 つのタンパク質配列、または本明細書に記載の実施形態のいずれか 1 つの発現ベクターを細胞が含む、二量体 CISC 分泌用の哺乳動物細胞などの細胞が本明細書で提供される。いくつかの実施形態では、この細胞は、細菌細胞または哺乳動物細胞、例えばリンパ球である。いくつかの実施形態では、細胞は *E. coli* である。いくつかの実施形態では、細胞は、タンパク質発現を可能にする昆虫細胞である。いくつかの実施形態では、細胞はリンパ球である。

20

【0148】

いくつかの実施形態では、この細胞は、前駆体 T 細胞または制御性 T 細胞である。いくつかの実施形態では、この細胞は造血幹細胞などの幹細胞である。いくつかの実施形態では、この細胞は NK 細胞である。いくつかの実施形態では、この細胞は CD34+、CD8+、及び/または CD4+ Tリンパ球である。いくつかの実施形態では、この細胞は B 細胞である。いくつかの実施形態では、この細胞は神経幹細胞である。

【0149】

いくつかの実施形態では、この細胞は、ナイーブ CD8+ T 細胞、セントラルメモリー CD8+ T 細胞、エフェクターメモリー CD8+ T 細胞、またはバルク CD8+ T 細胞を含み得る CD8+ T 細胞傷害性リンパ球細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、CD4+ T ヘルパーリンパ球細胞であり、これにはナイーブ CD4+ T 細胞、セントラルメモリー CD4+ T 細胞、エフェクターメモリー CD4+ T 細胞、またはバルク CD4+ T 細胞が含まれ得る。

30

【0150】

リンパ球（Tリンパ球）は、公知の技術に従って収集され得、そしてフローサイトメトリー及び/または免疫磁気選択のような、抗体への親和性結合のような公知の技術によって富化または枯渇され得る。富化及び/または枯渇ステップの後、所望の Tリンパ球のインビトロでの増幅は、当業者には明らかであろう公知の技術またはその変形に従って実施され得る。いくつかの実施形態では、T細胞は、患者から得られた自己由来 T 細胞である。

【0151】

40

例えば、所望の T 細胞集団または亜集団は、インビトロで最初の Tリンパ球集団を培養培地に添加すること、次いで非分裂末梢血単核細胞（PBMC）などの培養培地フィーダー細胞に添加すること（例えば、結果として生じる細胞集団が、増幅されるべき最初の集団中の各 Tリンパ球について少なくとも 5、10、20、または 40 以上の PBMC フィーダー細胞を含むように）；及び培養物をインキュベートすること（例えば、T細胞の数を増幅するのに十分な時間）によって増幅され得る。非分裂フィーダー細胞は、ガンマ線照射 PBMC フィーダー細胞を含み得る。いくつかの実施形態では、細胞分裂を防ぐために、PBMC に 3000 から 3600 ラドの範囲のガンマ線を照射する。いくつかの実施形態では、PBMC は、細胞分裂を防ぐために、3000、3100、3200、3300、3400、3500 もしくは 3600 ラドのガンマ線、または列挙された値のいずれ

50

かのいずれか 2 つの終点の間の任意の値のラドで照射される。培養培地への T 細胞及びフィーダー細胞の添加の順序は、所望ならば逆にしてもよい。培養物は、典型的には、T リンパ球の成長に適した温度などの条件下でインキュベートしてもよい。例えば、ヒト T リンパ球の成長のためには、温度は、一般に少なくとも 25、好ましくは少なくとも 30、より好ましくは 37 であろう。いくつかの実施形態では、ヒト T リンパ球の成長のための温度は、22、24、26、28、30、32、34、36、37、または列挙された任意の値のうちのいずれか 2 つの終点の間の任意の他の温度である。

#### 【0152】

T リンパ球を単離した後、細胞傷害性及びヘルパー T リンパ球の両方を、増幅の前または後のいずれかに、ナイーブ、メモリー及びエフェクター T 細胞亜集団に分類してもよい。

10

#### 【0153】

CD8+細胞は、標準的な方法を使用することによって得てもよい。いくつかの実施形態では、CD8+細胞は、細胞表面抗原（それらの種類の CD8+細胞のそれぞれに関連する）を同定することによって、ナイーブ、セントラルメモリー、及びエフェクターメモリー細胞にさらに分類される。いくつかの実施形態では、メモリー T 細胞は、CD8+末梢血リンパ球の CD62L+及び CD62L-サブセットの両方に存在する。抗 CD8 抗体及び抗 CD62L 抗体で染色した後、PBM C を、CD62L-CD8+及び CD62L+CD8+画分に分類する。いくつかの実施形態では、セントラルメモリー T<sub>CM</sub> の表現型マーカーの発現は、CD45RO、CD62L、CCR7、CD28、CD3、及び/または CD127 を含み、グランザイム B について陰性であるかまたは低い。いくつかの実施形態では、セントラルメモリー T 細胞は、CD45RO+、CD62L+及び/または CD8+T 細胞である。いくつかの実施形態では、エフェクター T<sub>E</sub> は、CD62L、CCR7、CD28、及び/または CD127 について陰性であり、そしてグランザイム B 及び/またはパーフォリンについて陽性である。いくつかの実施形態では、ナイーブ CD8+T リンパ球は、CD62L、CCR7、CD28、CD3、CD127、及び/または CD45RA を含むナイーブ T 細胞の表現型マーカーの発現によって特徴付けられる。

20

#### 【0154】

CD4+Tヘルパー細胞は、細胞表面抗原を有する細胞集団を同定することによって、ナイーブ細胞、セントラルメモリー細胞、及びエフェクター細胞に分類される。CD4+リンパ球は、標準的方法により得てもよい。いくつかの実施形態では、ナイーブ CD4+T リンパ球は、CD45RO-、CD45RA+、CD62L+、及び/または CD4+T 細胞である。いくつかの実施形態では、セントラルメモリー CD4+細胞は、CD62L+及び/または CD45RO+である。いくつかの実施形態では、エフェクター CD4+細胞は、CD62L-及び/または CD45RO-である。

30

#### 【0155】

哺乳動物細胞のような細胞、または哺乳動物細胞集団のような細胞集団が増幅のために選択されるか否かは、その細胞または細胞集団が 2 つの異なる遺伝子改変事象を受けたか否かに依存する。哺乳動物細胞のような細胞、または哺乳動物細胞集団のような細胞集団が、1 つ以下の遺伝子改変事象を経験したならば、リガンドの添加は二量体化をもたらさないであろう。しかしながら、哺乳動物細胞のような細胞、または哺乳動物細胞集団のような細胞集団が、2 つの遺伝子改変事象を経験したならば、リガンドの添加は、CISC 構成要素の二量体化、及びその後のシグナル伝達カスケードにつながる。したがって、哺乳動物細胞などの細胞、または哺乳動物細胞集団などの細胞集団は、リガンドとの接触に対するその応答に基づいて選択され得る。いくつかの実施形態では、リガンドは、0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10、11、12、13、14、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70

40

50

、75、80、85、90、95、もしくは100 nMの量で、または上記の値のいずれか2つによって定義される範囲内の濃度で添加され得る。

【0156】

いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞などの細胞、または哺乳動物細胞集団などの細胞集団は、シグナル伝達経路の結果としてのマーカーの発現に基づいて二量体CISCについて陽性であり得る。したがって、二量体CISCについて陽性の細胞集団は、表面マーカーに対する特異的抗体及びアイソタイプが一致した対照抗体での染色を使用するフローサイトメトリーによって決定され得る。

【0157】

組成物

本開示に示される調製物である、哺乳動物細胞などの遺伝子改変細胞を含む組成物が本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞などの細胞は、本明細書の実施形態に記載のタンパク質配列を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、細胞外結合ドメイン、ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、及びシグナル伝達ドメインを含むCISCを有するCD4+T細胞を含む。いくつかの実施形態では、CISCはIL2R-CISCである。他の実施形態では、この組成物はさらに、哺乳動物細胞などの細胞、細胞外結合ドメイン、ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、及びシグナル伝達ドメインを含むCISCを有するCD8+T細胞を含む調製物を含む。いくつかの実施形態では、CISC構成要素はリガンドの存在下で、好ましくは同時に二量体化する。いくつかの実施形態では、これらの集団のそれぞれは、組成物を提供するために互いに組み合わせられてもまたは他の細胞型と組み合わせられてもよい。

【0158】

いくつかの実施形態では、組成物の細胞はCD4+細胞である。CD4+細胞は、Tヘルパーリンパ球細胞、ナイーブCD4+T細胞、セントラルメモリーCD4+T細胞、エフェクターメモリーCD4+T細胞、またはバルクCD4+T細胞であり得る。いくつかの実施形態では、CD4+ヘルパーリンパ球細胞は、ナイーブCD4+T細胞であり、ここでナイーブCD4+T細胞は、CD45RO-、CD45RA+を含むか、及び/またはCD62L+CD4+T細胞である。

【0159】

いくつかの実施形態では、組成物の細胞はCD8+細胞である。CD8+細胞は、T細胞傷害性リンパ球細胞、ナイーブCD8+T細胞、セントラルメモリーCD8+T細胞、エフェクターメモリーCD8+T細胞及び/またはバルクCD8+T細胞であってもよい。いくつかの実施形態では、CD8+細胞傷害性Tリンパ球細胞は、セントラルメモリーT細胞であり、ここでこのセントラルメモリーT細胞は、CD45RO+、CD62L+、及び/またはCD8+T細胞を含む。さらに他の実施形態では、CD8+細胞傷害性Tリンパ球細胞は、セントラルメモリーT細胞であり、CD4+ヘルパーTリンパ球細胞は、ナイーブまたはセントラルメモリーCD4+T細胞である。

【0160】

いくつかの実施形態では、上記組成物はT細胞前駆体を含む。いくつかの実施形態では、この組成物は造血幹細胞を含む。いくつかの実施形態では、この組成物は、宿主細胞であって、この宿主細胞は、ナイーブCD8+T細胞、セントラルメモリーCD8+T細胞、エフェクターメモリーCD8+T細胞及びバルクCD8+T細胞からなる群より選択されるCD8+T細胞傷害性リンパ球細胞であるか、またはナイーブCD4+T細胞、セントラルメモリーCD4+T細胞、エフェクターメモリーCD4+T細胞、及びバルクCD4+T細胞からなる群より選択されるCD4+Tヘルパーリンパ球細胞である宿主細胞、ならびに前駆体T細胞である第2の宿主細胞を含む。いくつかの実施形態では、前駆体T細胞は造血幹細胞である。

【0161】

いくつかの組成物において、細胞はNK細胞である。

【0162】

いくつかの実施形態では、細胞はCD8+またはCD4+細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、ナイーブCD8+T細胞、セントラルメモリーCD8+T細胞、エフェクターメモリーCD8+T細胞及びバルクCD8+T細胞からなる群より選択されるCD8+T細胞傷害性リンパ球細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、ナイーブCD4+T細胞、セントラルメモリーCD4+T細胞、エフェクターメモリーCD4+T細胞、及びバルクCD4+T細胞からなる群より選択されるCD4+Tヘルパーリンパ球細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、前駆体T細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は幹細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は造血幹細胞またはNK細胞である。いくつかの実施形態では、細胞はB細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は神経幹細胞である。いくつかの実施形態では、細胞はキメラ抗原受容体をさらに含む。

10

#### 【0163】

本明細書で提供及び記載される細胞、発現ベクター、及びタンパク質配列を含むキット及びシステムも本明細書で提供される。したがって、例えば、本明細書に記載のタンパク質配列；本明細書に記載の発現ベクター；及び/または本明細書に記載の細胞：のうちの1つ以上を備えるキットが本明細書に提供される。細胞の内部へのシグナルを選択的に活性化するためのシステムも提供され、このシステムは、本明細書に記載の細胞を含んでおり、この細胞は、本明細書に記載のタンパク質配列をコードする核酸を含む、本明細書に記載の発現ベクターを含む。

#### 【0164】

二量体CISC構成要素を発現する細胞を作製する方法

20

本明細書に記載のいくつかの実施形態では、薬物調節サイトカインシグナル伝達のために、及び/または二量体CISC構成要素を発現する細胞の選択的増幅のために使用される、哺乳動物細胞、例えばリンパ球などの宿主細胞に、タンパク質配列または発現ベクターを導入することが望ましい場合がある。例えば、二量体CISCは、リガンドとの接触時に、哺乳動物細胞などの細胞の内部にシグナルを伝達するための、導入CISC構成要素を有する細胞における、サイトカインシグナル伝達を可能にし得る。さらに、哺乳動物細胞などの細胞の選択的増幅は、本明細書に記載されるように、2つの特定の遺伝子改変事象を受けた細胞のみを選択するように制御され得る。これらの細胞の調製は、本開示に基づいて当業者に明らかとなるだろう公知の技術に従って実施され得る。

#### 【0165】

30

いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞などのCISC保有細胞を作製する方法が提供され、ここでこの細胞は、二量体CISCを発現する。この方法は、哺乳動物細胞などの細胞に対して、本明細書に記載の実施形態もしくは実施形態のいずれか1つのタンパク質配列、または本明細書に記載の実施形態もしくは実施形態の発現ベクターの送達、及び哺乳動物細胞などの細胞への送達を包含し得る。いくつかの実施形態では、このタンパク質配列は、第1及び第2の配列を含む。いくつかの実施形態では、この第1の配列は、第1の細胞外結合ドメイン、ヒンジドメイン、特定の長さ（好ましくは長さが最適化されている）のリンカー、膜貫通ドメイン、及びシグナル伝達ドメインを含む第1のCISC構成要素をコードする。いくつかの実施形態では、この第2の配列は、第2の細胞外結合ドメイン、ヒンジドメイン、特定の長さ（好ましくは長さが最適化されている）のリンカー、膜貫通ドメイン、及びシグナル伝達ドメインを含む第2のCISC構成要素をコードする。いくつかの実施形態では、このスペーサーは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14もしくは15アミノ酸長、または前述の長さのいずれか2つによって定義される範囲内の長さである。いくつかの実施形態では、シグナル伝達ドメインは、IL2R $\beta$ またはIL2R $\gamma$ ドメインなどのインターロイキン-2シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態では、細胞外結合ドメインは、FKBPまたはFRBまたはそれらの一部を含む、ラパマイシンまたはラパログに結合する結合ドメインである。いくつかの実施形態では、細胞は、CD8+またはCD4+細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、ナイーブCD8+T細胞、セントラルメモリーCD8+T細胞、エフェクターメモリーCD8+T細胞及びバルクCD8+T細胞からなる群より選択され

40

50

るCD8+T細胞傷害性リンパ球細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、ナイーブCD4+T細胞、セントラルメモリーCD4+T細胞、エフェクターメモリーCD4+T細胞、及びバルクCD4+T細胞からなる群より選択されるCD4+Tヘルパーリンパ球細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は前駆体T細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は幹細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は造血幹細胞である。いくつかの実施形態では、細胞はB細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は神経幹細胞である。いくつかの実施形態では、細胞はNK細胞である。

#### 【0166】

細胞の内部のシグナルを活性化する方法

いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞などの細胞の内部でシグナルを活性化する方法が提供される。この方法は、本明細書に記載の哺乳動物細胞などの細胞を提供することを包含し得、この細胞は本明細書に示されるタンパク質配列または本明細書に示される発現ベクターを含む。いくつかの実施形態では、この方法は、本明細書に記載の二量体CISCをコードするタンパク質配列を発現すること、または本明細書に記載のベクターを発現することをさらに包含する。いくつかの実施形態では、この方法は、哺乳動物細胞などの細胞をリガンドと接触させ、それが第1及び第2のCISC構成要素を二量体化させ、それがシグナルを細胞の内部に伝達することを包含する。いくつかの実施形態では、リガンドは、ラパマイシンまたはラパログである。いくつかの実施形態では、このリガンドは、IMIDクラスの薬物（例えば、サリドマイド、ポマリドマイド、レナリドマイドまたは関連類似体）である。いくつかの実施形態では、二量体化を誘導するためのリガンドの有効量は、0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10、11、12、13、14、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、もしくは100 nMの量で、または上記の値のいずれか2つによって定義される範囲内の濃度で提供される。

#### 【0167】

いくつかの実施形態では、これらのアプローチで使用されるリガンドは、ラパマイシンまたはラパログであり、これには、例えば、エベロリムス、CCI-779、C20-メタリルラパマイシン、C16-(S)-3-メチルインドールラパマイシン、C16-iRap、AP21967、ミコフェノール酸ナトリウム、塩酸ベニジピン、AP23573もしくはAP1903、またはそれらの代謝産物、誘導体、及び/または組み合わせを含む。さらなる有用なラパログとしては、例えば、ラパマイシンに対して以下の修飾のうちの1つ以上を有するラパマイシンのバリエーションが挙げられる：C7、C42及び/またはC29のメトキシでの脱メチル化、除去または置換；C13、C43及び/またはC28でのヒドロキシの除去、誘導体化または置換；C14、C24及び/またはC30でのケトンの還元、除去または誘導体化；5員のプロリル環による6員のピペコレート環の置換；及び/またはシクロヘキシル環上の別の置換もしくはシクロヘキシル環の置換シクロペンチル環での置換。さらなる有用なラパログとしては、ノボリムス、ピメクロリムス、リダフォロリムス、タクロリムス、テムシロリムス、ウミロリムス、もしくはゾタロリムス、またはそれらの代謝産物、誘導体、及び/または組み合わせが挙げられる。いくつかの実施形態では、リガンドは、IMIDクラスの薬物（例えば、サリドマイド、ポマリドマイド、レナリドマイドまたは関連類似体）である。

#### 【0168】

いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞などの細胞の内部のシグナルを検出することは、シグナル伝達経路の結果であるマーカーを検出する方法によって達成され得る。したがって、例えば、シグナルは、ウエスタンブロット、フローサイトメトリー、または他のタンパク質検出及び定量方法のプロセスを通して、哺乳動物細胞などの細胞中のAktまたは他のシグナル伝達マーカーのレベルを決定することによって検出され得る。検出のため

のマーカ―としては、例えば、J A K、A k t、S T A T、N F - 、M A P K、P I 3 K、J N K、E R K、もしくはR a s、または細胞シグナル伝達事象を示す他の細胞シグナル伝達マーカ―が挙げられる。

【 0 1 6 9 】

いくつかの実施形態では、シグナルの伝達は、サイトカインシグナル伝達に影響を及ぼす。いくつかの実施形態では、シグナルの伝達は、I L 2 Rシグナル伝達に影響を及ぼす。いくつかの実施形態では、シグナルの伝達は、サイトカイン受容体の下流標的のリン酸化に影響を及ぼす。いくつかの実施形態では、シグナルを活性化する方法は、哺乳動物細胞などのC I S C発現細胞における増殖、及び非C I S C発現細胞における付随する抗増殖を誘導する。

【 0 1 7 0 】

細胞シグナル伝達が起こるためには、サイトカイン受容体が二量体化またはヘテロ二量体化しなければならないだけでなく、それらは立体配座変化が起こるための適切な立体配置にななければならない( Kim, et al. NMR Structural Studies of Interaction of a Small, Nonpeptidyl Topo Mimic with the Thrombopoietin Receptor Extracellular Juxtamembrane and Transmembrane Domains, J Biol Chem, 282, 2007)。したがって、受容体二量体化またはヘテロ二量体化のみでは受容体活性化を促進するには不十分であるため、シグナル伝達ドメインの正しい立体配座配置と組み合わせた二量体化は、適切なシグナル伝達のための望ましいプロセスである。本明細書に記載の化学誘導シグナル伝達複合体は、好ましくは下流のシグナル伝達事象が起こるために正しい向きにある。図4 A ~ 4 B及び5のウエスタンブロットに示すように、本明細書に記載されるシグナル伝達複合体の首尾よい配向及び二量体化を示す特徴である両方のA k t活性化(細胞増殖を促進するために必要)を含む、複数の下流シグナル伝達事象がリガンドの存在下で起こる。

【 0 1 7 1 】

細胞集団の選択的増幅方法

いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞などの細胞集団を選択的に増幅する方法が本明細書で提供される。いくつかの実施形態では、この方法は、本明細書に記載の哺乳動物細胞などの細胞を提供することを包含し、この細胞は、本明細書に示されるタンパク質配列または本明細書に示される発現ベクターを含む。いくつかの実施形態では、この方法はさらに、本明細書に記載の二量体C I S Cをコードするタンパク質配列を発現すること、または本明細書に記載のベクターの発現をさらに包含する。いくつかの実施形態では、この方法は、哺乳動物細胞などの細胞をリガンドと接触させ、それが第1及び第2のC I S C構成要素を二量体化させ、それがシグナルを細胞の内部に伝達することを包含する。いくつかの実施形態では、リガンドはラパマイシンまたはラパログである。いくつかの実施形態では、二量体化を誘導するために提供されるリガンドの有効量は、0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10、11、12、13、14、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、もしくは100 nMの量、または上記の値のいずれか2つによって定義される範囲内の濃度である。

【 0 1 7 2 】

いくつかの実施形態では、使用されるリガンドは、ラパマイシンまたはラパログであり、これには、例えば、エペロリムス、C C I - 7 7 9、C 2 0 - メタリルラパマイシン、C 1 6 - ( S ) - 3 - メチルインドールラパマイシン、C 1 6 - i R a p、A P 2 1 9 6 7、ミコフェノール酸ナトリウム、塩酸ベニジピンもしくはA P 2 3 5 7 3、A P 1 9 0 3、またはそれらの代謝産物、誘導体、及び/または組み合わせを含む。さらなる有用な



ラパログには、例えば、ラパマイシンに対して以下の修飾のうちの1つ以上を有するラパマイシンのバリエーションが含まれ得る：C 7、C 4 2 及び / または C 2 9 でのメトキシの脱メチル化、除去または置換；C 1 3、C 4 3 及び / または C 2 8 でのヒドロキシの除去、誘導体化または置換；C 1 4、C 2 4 及び / または C 3 0 でのケトンの還元、除去または誘導体化；5 員のプロリル環による6 員のピペコレート環の置換；及び / またはシクロヘキシル環上の別の置換、またはシクロヘキシル環の置換シクロペンチル環での置換。さらなる有用なラパログとしては、ノボリムス、ピメクロリムス、リダフォロリムス、タクロリムス、テムシロリムス、ウミロリムス、もしくはゾタロリムス、またはそれらの代謝産物、誘導体、及び / または組み合わせが挙げられる。いくつかの実施形態では、リガンドは、I M I D クラスの薬物（例えば、サリドマイド、ボマリドマイド、レナリドマイドまたは関連類似体）である。

10

#### 【0173】

いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞などの細胞集団の選択的増幅は、2つの異なる遺伝子改変事象が起こったときにだけ起こる。一方の遺伝子改変事象は、二量体化学誘導シグナル伝達複合体の一構成要素であり、他方の遺伝子改変事象は、二量体化学誘導シグナル伝達複合体の他方の構成要素である。両方の事象が哺乳動物細胞集団のような細胞集団内で起こる場合、化学誘導シグナル伝達複合体構成要素はリガンドの存在下で二量体化し、活性な化学誘導シグナル伝達複合体及び細胞の内部へのシグナルの生成をもたらす。図5のウエスタンブロットに示されるように、A k t の活性化及びリン酸化は、両方の遺伝子改変事象を発現する細胞集団の有意な選択的増幅を達成するのに望ましい、完全増殖シグナルの達成の成功を示す。他のシグナル伝達マーカーもまた検出され得るが、A k t 活性化と組み合わせたこれらの事象の達成のみが、両方の遺伝子改変事象が哺乳動物細胞集団などの所定の細胞集団において生じた改変細胞集団の選択的増幅を可能にするのに十分な細胞増幅を達成し得る。

20

#### 【0174】

図6は、哺乳動物細胞集団などの細胞集団の選択的増幅のための例示的な方法を示す。図6に示すように、I L 2 R を含む C I S C を調製した。I L 2 R - C I S C の各構造（すなわち1 2 1 0、1 2 1 1、及び1 2 3 3）を、2 A 配列を用いて G F P と一緒にシス連結させ、そしてレンチウイルス発現カセット中の M N D プロモーターの制御下に置いた。

#### 【0175】

各 I L 2 R - C I S C 構造からのレンチウイルス粒子を作製し、初代ヒト T 細胞を形質導入するために使用した。C D 4 + T 細胞を60時間活性化した。次いで、その細胞を、I L 2 / 7 / 1 5 を含む1 m L の培地中に1ウェルあたり100万個の細胞をプレートすることによって24ウェルディッシュにプレートした。レンチウイルスを、ビーズの有無にかかわらず、24ウェルディッシュ中に4 µ g / m L の硫酸プロタミンを含む15 µ L の I L 2 R - C I S C 及び3 µ L の M N D - G F P 対照（0.5 m L 培地）を用いて形質導入した。次にこの細胞を33 ° で、30分間800 g で回転接種し、続いて4時間のインキュベーション後に1.5 m L の培地を添加した。形質導入したT細胞を、50 n g / m L の I L 2、5 n g / m L の I L 5、及び5 n g / m L の I L 1 7 を含むサイトカインと共に37 ° で48時間インキュベートした。G F P シグナルを決定し、そして形質導入されたT細胞の I L 2 R - C I S C レベルを決定した。形質導入効率は、I L 2 R - C I S C については10 ~ 30 %、そしてM N D - G F P については約80 %であった。

30

#### 【0176】

形質導入後、細胞をI L 2 中で2日間成長させ、次いで半分に分け、示されているように、半分をI L 2 単独で及び半分をラパマイシン単独で成長させた。T細胞を、ラパマイシン（1 n M）またはI L 2 で2日間処理し、細胞を2 m L の培地を含む24ウェルディッシュ中に100万細胞 / ウェルでプレートした。T細胞生存率を決定し、そしてG F P + 集団の発現及びI L 2 R - C I S C 発現を、抗 F R B 抗体及び二次A P C 抗体を使用することによって決定した。図7 A ~ 7 B、及び図8 ~ 1 1 は、それぞれの集団におけるG F P 及びF R B の発現のフローサイトメトリー結果を示す。図8に示されるように、1 2

40

50

3 3 構造に関して、ラパマイシン単独で培養された細胞を、シス連結 G F P マーカーによって読み出されるように、I L 2 R - C I S C 発現について富化する。

【 0 1 7 7 】

図 1 2 は、図 3 に示す C I S C 構築物についてのラパマイシンの存在下での細胞増殖の増大をグラフで示す。V 3 は、増殖にとって最も効率的な構造である。図 1 3 は、ラパマイシン処理に応答して I L 2 R - C I S C V 3 がヒト C D 4 + T 細胞増殖を支持することをグラフで示す。

【 0 1 7 8 】

上記の方法を使用して、I L 2 R - C I S C 発現 T 細胞はラパマイシンの存在下で S T A T 5 経路を誘導することも示した。図 1 4 のフローセルデータによって示されるように、V 3 構築物は S T A T 5 経路シグナル伝達のための最も効率的な構造である。

10

【 0 1 7 9 】

本明細書に記載されているのと同様の方法は、追加のラパマイシン類似体を用いて実施してもよい。例えば、本明細書に記載の方法は、A P 2 1 9 6 7 を用いて実施した。図 1 5 のフローセルデータに示すように、A P 2 1 9 6 7 に応答して、I L 2 R - C I S C V 3 構築物はヒト C D 4 + T 細胞の生存を促進する。さらに、I L 2 R - C I S C は、図 1 6 にグラフで示すように、A P 2 1 9 6 7 処理に応答して C D 4 + T 細胞の増殖を促進する。図 1 7 は、ラパマイシン及びその類似体を含む様々な処理による I L 2 R - C I S C で増幅させた C D 4 + T 細胞の細胞毒性を示しており、長期増幅後の正常な毒性を示している。

20

【 0 1 8 0 】

I L 2 R - C I S C 細胞を、細胞の成長及び増殖を中和した I L - 2 中和抗体に曝した ( 図 1 8 及び 1 9 ) 。これは、C I S C 誘導性増幅が自己分泌またはパラ分泌刺激によるものではないことを示している。

【 0 1 8 1 】

I L 2 - C I S C 誘導シグナル伝達経路を分析して、シグナル伝達経路の規模が臨床的に関連のある活性を生じるのに十分であるか否かを決定した。図 2 0 のフローセルデータに示すように、C I S C V 3 増幅細胞についての T 細胞マーカー分析を行った。

【 0 1 8 2 】

本明細書に記載の構造及び / または構築物は限定的ではないと意図していることが当業者によって理解されるべきである。したがって、本明細書に記載の V 1 、 V 2 、及び V 3 構築物、ならびに本明細書に記載の他の構造及び / または構築物に加えて、追加の構造を使用してもよい。例えば、図 2 1 に示されるように、F K B P 及び / または F R B ならびに I L 2 R g 及び I L 2 R b サブユニット配列に配置された種々のスパーサー及びリンカーを含む、V 4 、 V 5 、 V 6 及び V 7 と呼ばれるさらなる構築物を使用した。これらの比較の構造を用いるための実験的なプロトコール及びデザインを図 2 2 にまとめる。要するに、この方法は P B M C 3 フィーダー細胞を解凍することを包含し、そして C D 4 + 細胞は抗 C D 3 / C D 2 8 ビーズの存在下で単離された。このビーズを除去し、5 0 0  $\mu$  L 中 8 0 0  $\times$  g で V 4 、 V 5 、 V 6 、または V 7 の 1 つを用いて回転接種した。回転接種後、1 . 5 m L の T C M + サイトカインを添加した。次いで、各構築物を、無処理、1 0 0 n M の A P 2 1 9 6 7 、1 n M のラパマイシン、または 5 0 n g / m L の I L - 2 を含む様々な条件で処理した。次いで、各構築物を有する細胞の増幅を測定した。細胞の増幅は、図 2 3 に示すフローセルデータに示されている。図 2 4 は、様々な構築物を有する細胞の増幅をグラフで示し、ラパマイシン誘導性増幅が、T M リンカーに対して、増幅 E C ドメインで試験された全ての C I S C 構築物について同様であることを示す。

30

40

【 0 1 8 3 】

さらに、M N D プロモーター及び C I S C の標的化ノックインを試験して、遺伝子標的化 T 細胞を富化及び / または増幅させた。図 2 5 は、M N D プロモーターの標的化ノックインのための遺伝子構築物を示しており、そして図 2 6 は、標的化ノックインのために使用される方法プロトコールの一実施形態をグラフで示す。要するに、P B M C フィーダー

50

細胞を解凍し、CD4+細胞を、抗CD3/CD28ビーズの存在下で単離した。そのビーズを除去し、Cas9/gRNAリボ核タンパク質(RNP)を添加した。次いで、その構築物を、無処理、10nMのAP21967、10nMのラパマイシン、または10nMのラパマイシン+5ng/mLのIL-2を含む様々な条件で処理した。図27及び28に示されるように、ラパマイシンとの接触は、遺伝子標的化細胞の富化をもたらしたが、ラパマイシン及びIL-2との接触は、富化を示さなかった。

#### 【0184】

本開示は、特定の代替例を参照して上記で説明されてきた。しかしながら、本開示の範囲内で、上記以外の他の代替例も同様に可能である。上記のものとは異なる方法ステップが、本開示の範囲内で提供され得る。本明細書に記載の異なる特徴及びステップは、記載したもの以外の他の組み合わせで組み合わせてもよい。

10

#### 【0185】

本明細書における複数及び/または単数形の用語の使用に関して、当業者は、文脈及び/または用途に適切であるように、複数形から単数形に、及び/または単数形から複数形に翻訳し得る。明確にするために、様々な単数形/複数形の置換を本明細書に明示的に表してもよい。

#### 【0186】

一般に、本明細書、特に添付の特許請求の範囲(例えば、添付の特許請求の範囲の本文)で使用される用語は、一般に「公開」の用語として意図されることが当業者には理解されよう(例えば、「含んでいる」という用語は、「含むがこれらに限定されない」と解釈されるべきであり、「有する」という用語は、「少なくとも有する」と解釈されるべきであり、この「含む」という用語は、「含むがこれらに限定されない」などと解釈されるべきである)。

20

#### 【0187】

さらに、本開示の特徴または態様がマーカッシュ(Markush)グループに関して説明されている場合、当業者は、本開示がマーカッシュグループの任意の個々のメンバーまたはメンバーのサブグループに関しても説明されていることを認識するであろう。

#### 【0188】

第1から第11の態様の代替例の特徴のいずれも、本明細書で識別されている全ての態様及び代替例に適用可能である。さらに、第1から第11の態様の代替例の任意の特徴は独立して、本明細書に記載の他の代替例と、部分的または全体的に組み合わせ可能であり、例えば1つ、2つ、または3つ以上の代替例は、全体的または部分的に組み合わせ可能である。さらに、第1から第11の態様の代替例の特徴のいずれも、他の態様または代替例に対して必要に応じて作製され得る。様々な代替例及び実装に関して上述したが、1つ以上の個々の代替例に記載されている様々な特徴、態様、及び機能性は、それらが記載されている特定の代替例への適用性に限定されず、その代わりに、そのような代替例が記載されているか否か、及びそのような特徴が記載されている代替例の一部として提示されているか否かにかかわらず、単独でまたは様々な組み合わせで、本出願の他の代替例の1つ以上に適用されることが理解されるべきである。したがって、本出願の広さ及び範囲は、上述の代替例のいずれによっても限定されるべきではない。

30

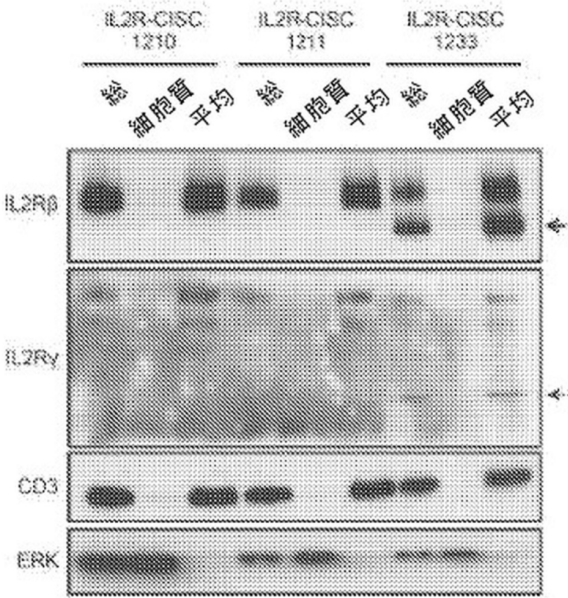
40

#### 【0189】

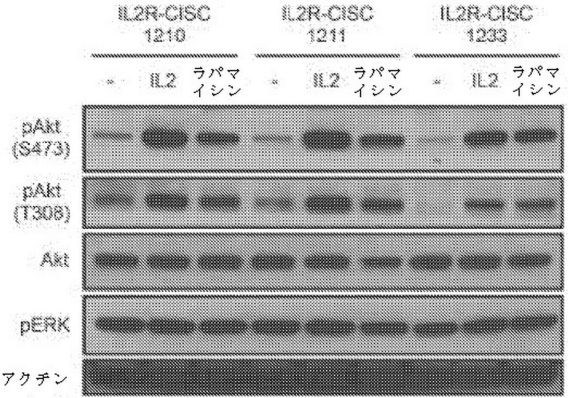
本明細書に引用された全ての参考文献は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。参照により組み込まれる刊行物及び特許または特許出願が本明細書に含まれる開示と矛盾する場合、本明細書は、そのような矛盾するいかなる資料よりも優先されるか及び/または優位であることを意図している。参照により本明細書に組み込まれる刊行物及び特許または特許出願が本明細書に含まれる開示と矛盾する場合、本明細書はそのような矛盾するいかなる資料よりも優先されるか及び/または優位であることを意図している。



【図 4 B】

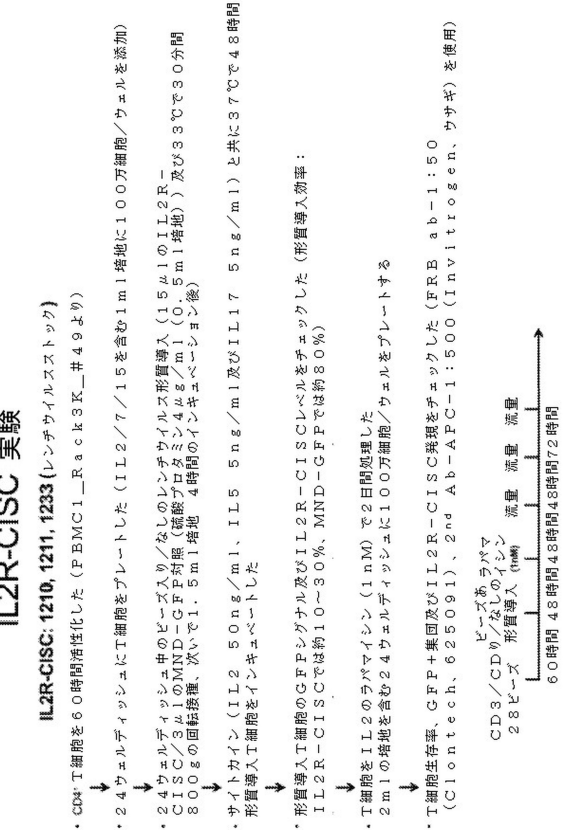


【図 5】

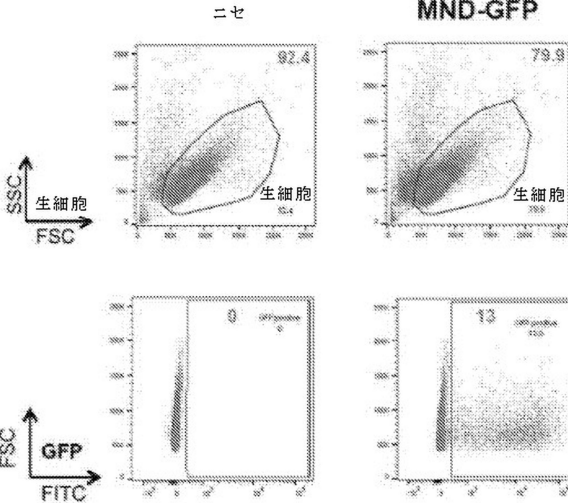


10

【図 6】



【図 7 A】



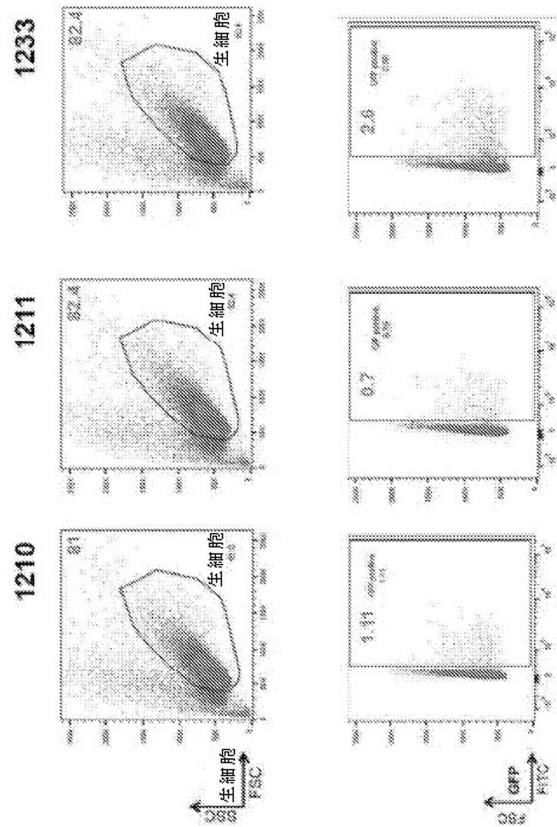
20

30

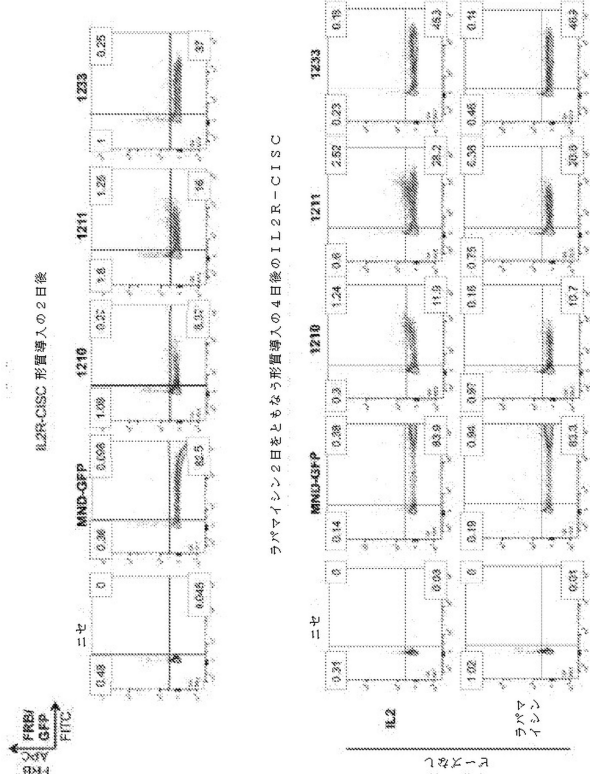
40

50

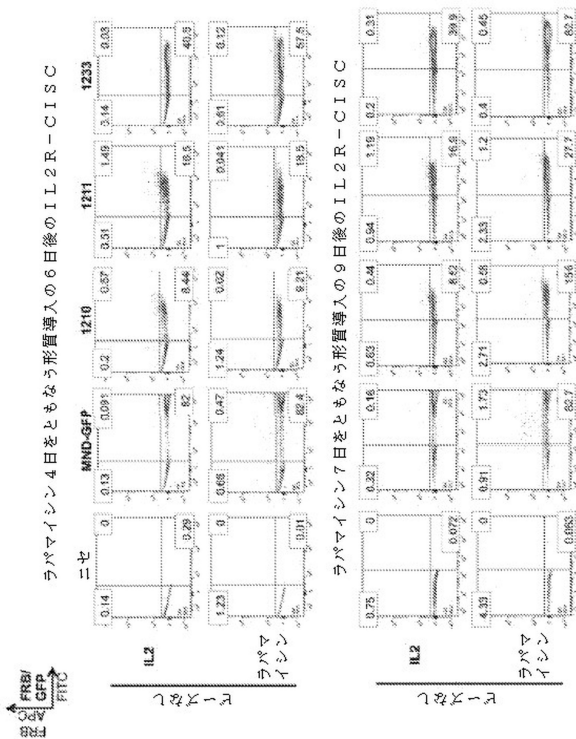
【図 7 B】



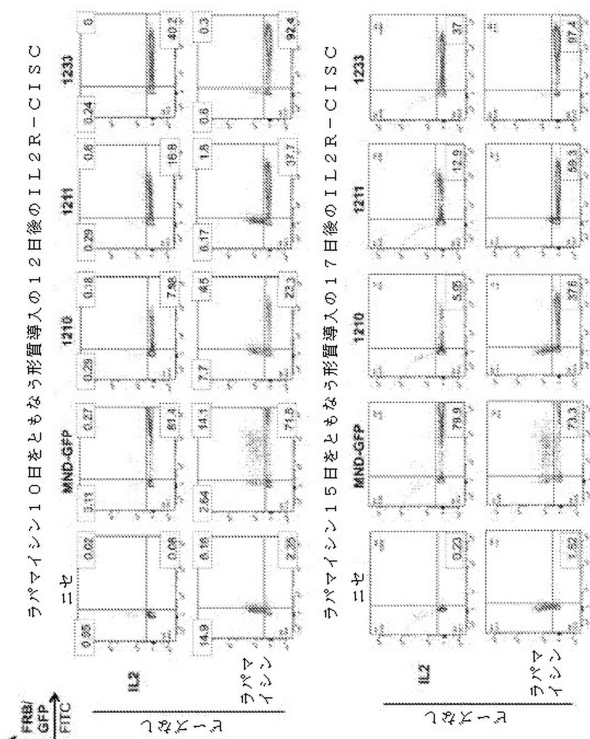
【図 8】



【図 9】



【図 10】



10

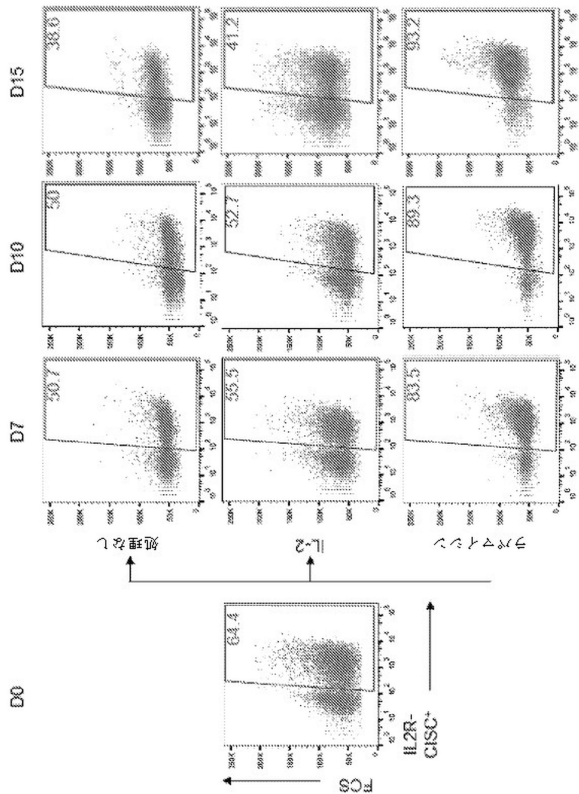
20

30

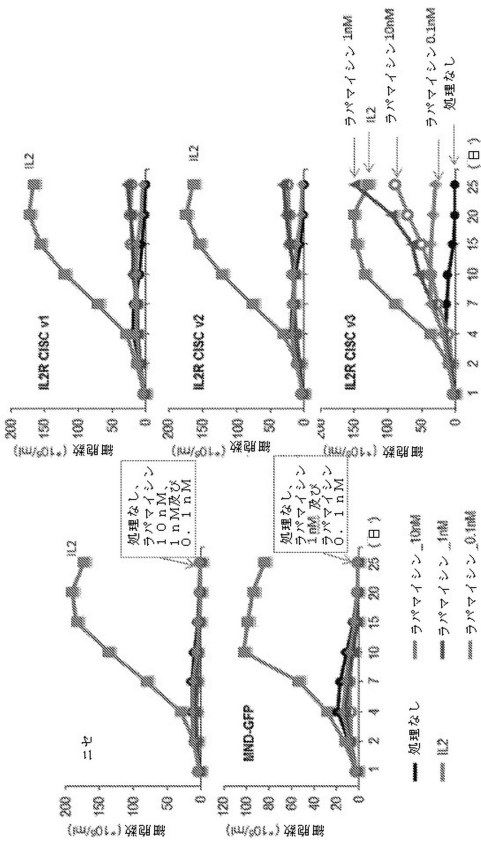
40

50

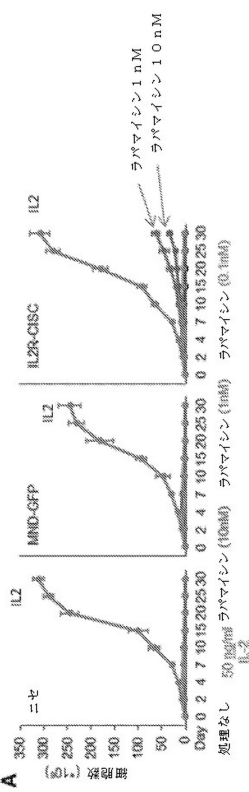
【図 1 1】



【図 1 2】

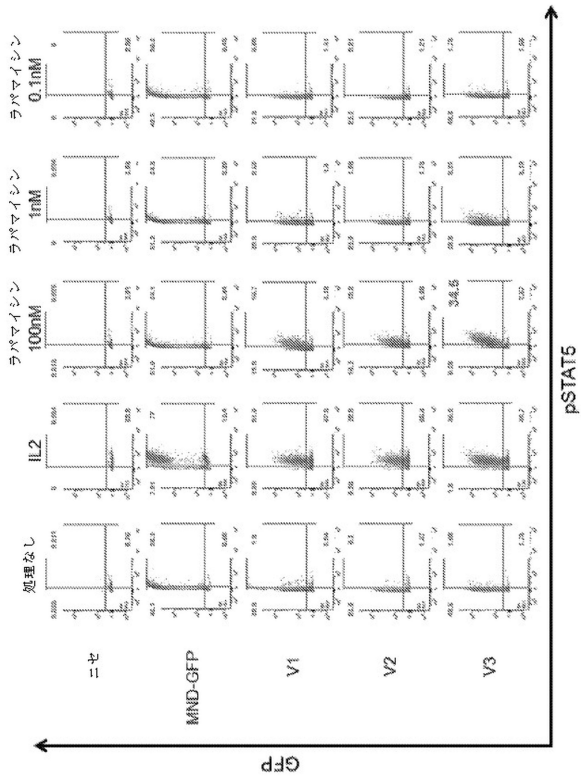


【図 1 3】



・プロトコル：ピーズ活性化、72時間でのレンチ形質導入、その後のIL2での培養  
・注：IL2群にはラバマイシンは存在しない

【図 1 4】



10

20

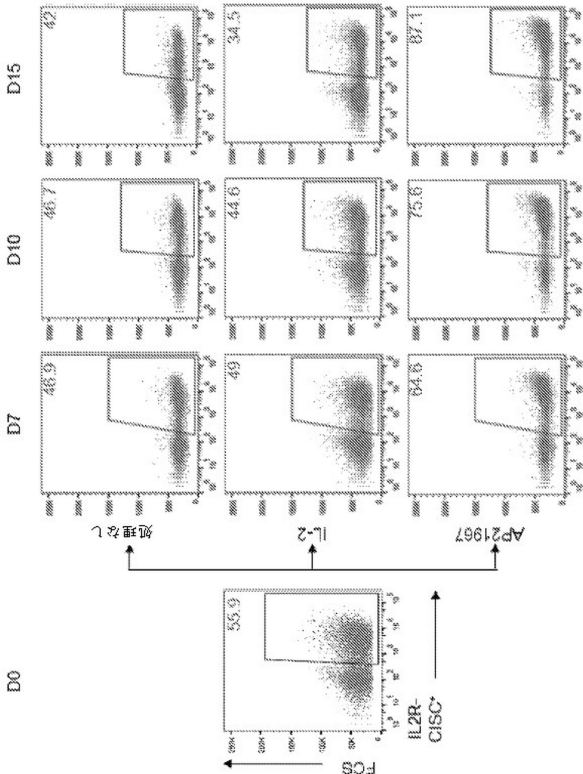
30

40

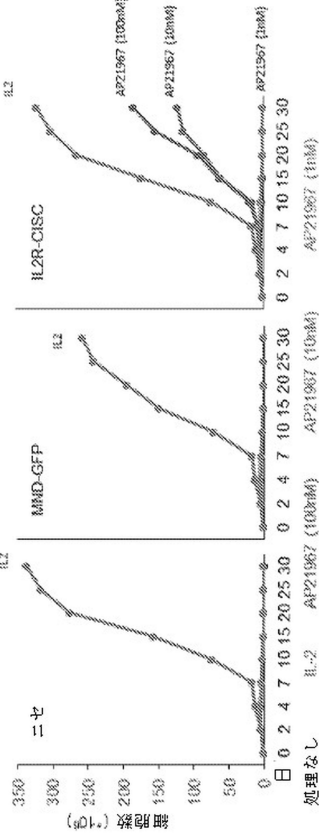
50



【図 15】



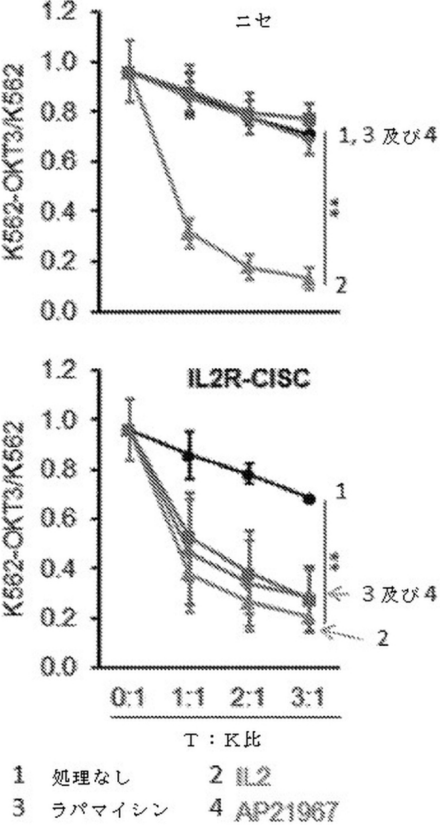
【図 16】



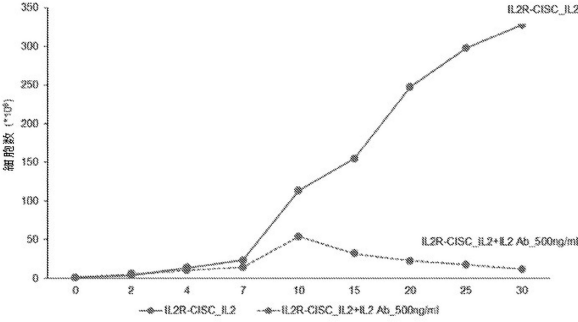
10

20

【図 17】



【図 18】



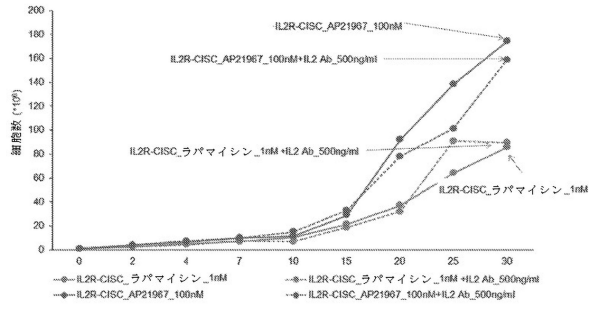
30

40

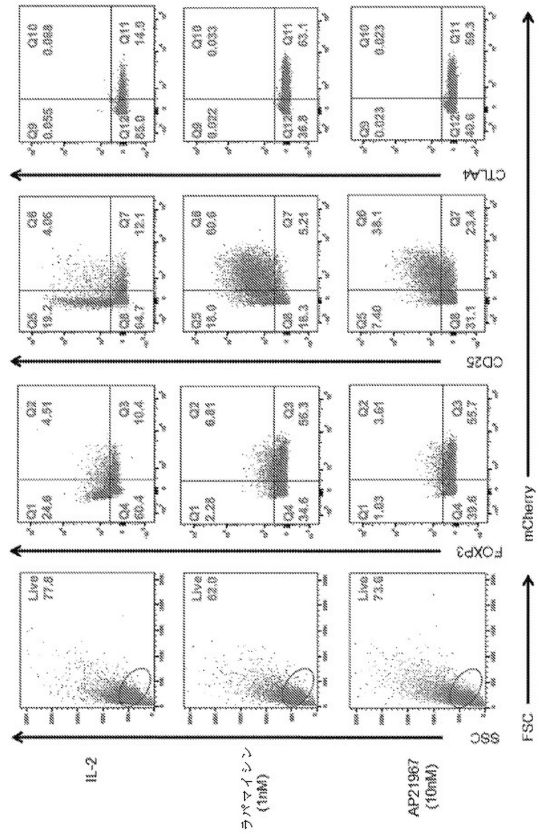
50



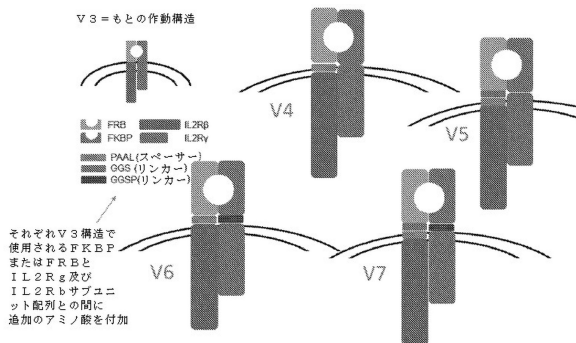
【図 19】



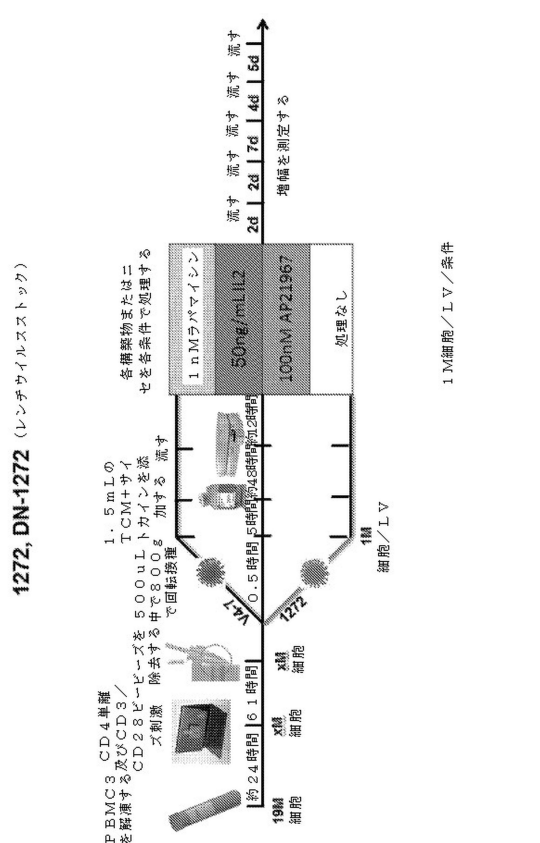
【図 20】



【図 21】



【図 22】



10

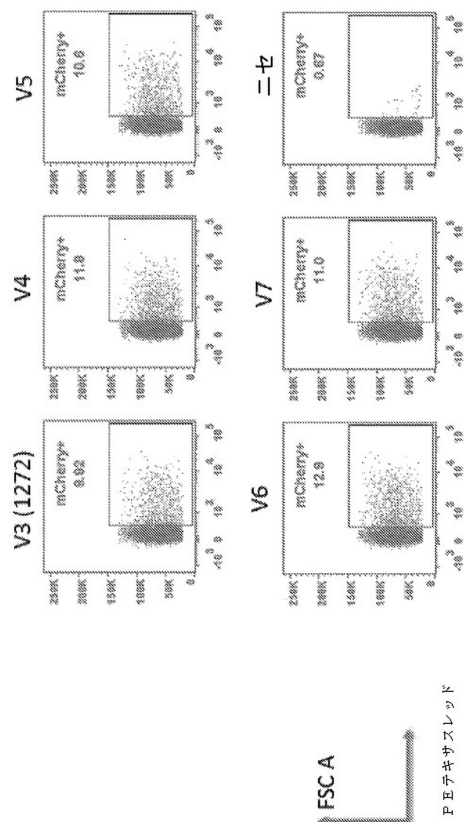
20

30

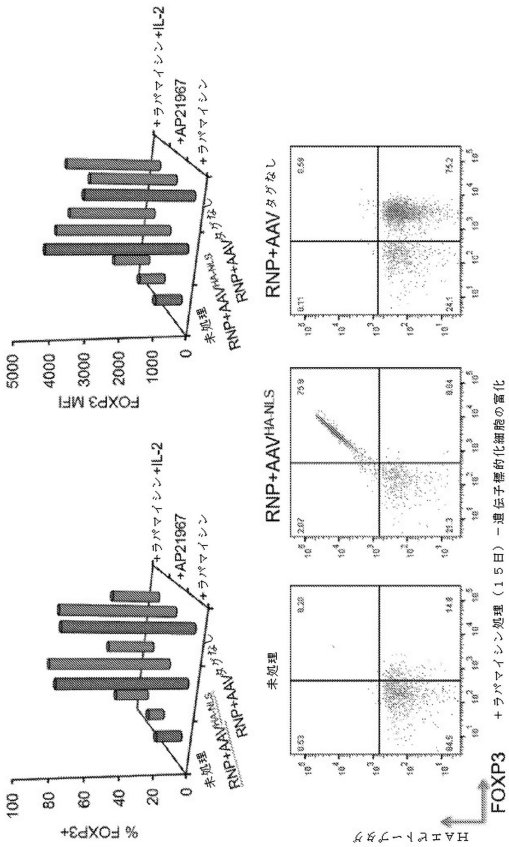
40

50

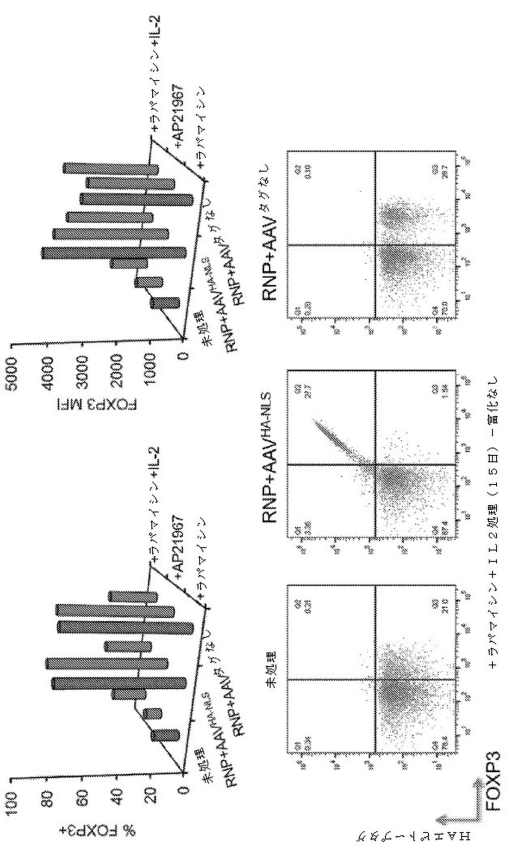
【 図 2 3 】



【図 27】



【図 28】



【配列表】

0007206214000001.app

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

F I

<b>C 1 2 N</b>	<b>15/864 (2006.01)</b>	<b>C 1 2 N</b>	<b>15/864</b>	<b>1 0 0 Z</b>
<b>C 1 2 N</b>	<b>15/867 (2006.01)</b>	<b>C 1 2 N</b>	<b>15/867</b>	<b>Z</b>
<b>C 1 2 N</b>	<b>5/10 (2006.01)</b>	<b>C 1 2 N</b>	<b>5/10</b>	
<b>C 1 2 Q</b>	<b>1/02 (2006.01)</b>	<b>C 1 2 Q</b>	<b>1/02</b>	

## (56)参考文献

国際公開第 2 0 1 6 / 0 9 8 0 7 8 ( W O , A 2 )

特表 2 0 1 5 - 5 1 3 3 9 4 ( J P , A )

特表 2 0 0 2 - 5 0 8 9 7 1 ( J P , A )

国際公開第 2 0 1 6 / 1 2 7 2 5 7 ( W O , A 1 )

国際公開第 2 0 1 5 / 0 9 0 2 2 9 ( W O , A 1 )

## (58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 9 0

C 0 7 K

C 1 2 Q

MEDLINE / EMBASE / BIOSIS / CAPLUS / REGISTRY ( S T N )

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