

(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

C 1 2 N	15/62 (2006.01)	F I	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 (デイビーエイ シアトル チルドレンズ リサーチ インスティテュート)
(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 98177 シアトル, エヌダブリュー ノークロ ス ウェイ 1222
審査官	山本 匡子

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 インピトロ及びインピ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、FK506結合タンパク質(FKBP)ドメインもしくはその一部及び／またはFKBPラパマイシン結合(FRB)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、FK506結合タンパク質(FKBP)ドメインもしくはその一部及び／またはFKBPラパマイシン結合(FRB)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、FK506結合タンパク質(FKBP)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、FKBPラパマイシン結合(FRB)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11のいずれか1つに示されるアミノ酸配列と、少なくとも90%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90%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、

ii) ラパログ、任意で、エベロリムス、C21-I-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、 30

iii) ラパマイシン代謝産物、または

iv) IMD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IMD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、0.05nM～100nM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1～10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1～10のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 13】

請求項1～12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つて、

(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24】

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23に記載のシステム。

【請求項25】

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23または24に記載のシステム。

10

【請求項26】

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25に記載のシステム。

【請求項27】

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26に記載のシステム。

【請求項28】

請求項23～27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。

20

【請求項29】

リガンドをさらに含み、

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 - 779、C 20 - メタリルラパマイシン、C 16 - (S) - 3 - メチルインドールラパマイシン、C 16 - i R a p、A P 21 967、ミコフェノール酸ナトリウム、塩酸ベニジピン、A P 1903、もしくはA P 23573、

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、ポマリドマイド、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、

30

請求項23～27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日に出願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S C R I . 1 3 0 W O . T X T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（その全体が参考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リ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C I S C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C I S Cは合成C I S C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、F K 5 0 6 結合タンパク質(F K B P)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、F K B P ラバマイシン結合(F R B)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C I S C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C I S C構成要素の膜貫通ドメインは、I L - 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C I S C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C I S C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C I S C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(I L 2 R g)ドメインを含む。いくつかの実施形態では、第2のC I S C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(I L 2 R b)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、F K B Pドメインを含み、他方の細胞外結合ドメインはF R B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、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)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I M I D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、リガンドはラバマイシンまたはラパログ、例えば、エペロリムス、C C I - 7 7 9、C 2 0 - メタリルラバマイシン、C 1 6 - (S) - 3 - メチルインドールラバマイシン、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、A P 1 9 0 3、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、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、リガンドは、0.05 nM~1 0 0 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1 0 0 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】

10

20

30

40

50

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

10

20

30

40

50

含み、ここでこの第2のタンパク質配列は、C I S C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。

【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、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、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、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C D 4 + 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C I S C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C I S C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、C I S C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C I S C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、C I S C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C I S C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、C I S C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C I S C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、C I S C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C I S C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CIS-C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、CIS-C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。

【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ゲ、例えば、エベロリムス、C21-779、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、0.05nM~100nM、例えば0.05nM、0.1nM、0.5nM、1.0nM、5.0nM、10.0nM、15.0nM、20.0nM、25.0nM、30.0nM、35.0nM、40.0nM、45.0nM、50.0nM、55.0nM、60.0nM、65.0nM、70.0nM、75.0nM、80.0nM、90.0nM、95.0nM、もしくは100nM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なる。

【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

10

20

30

40

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 1 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 2 の配列は、配列番号 1 0 または 1 2 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 0 、 1 1 、及び 1 2 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 1 0 、 1 1 、及び 1 2 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

【 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 40

10

20

30

40

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(IL2R_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(IL2R_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、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_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、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隨伴ウイルス(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+、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。

【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化学誘導シグナル伝達複合体の発現ベクター発現すること、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CIS-C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CIS-C構成要素発現のための本明細書に記載の発現ベ

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。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(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、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、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CIS-C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(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、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バログ、例えば、エベロリムス、C21-I-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

10

20

30

40

50

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、細胞母集団をインビトロまたはインビ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。

【0031】

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

【0032】

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

【0033】

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、

30

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。

【 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。

【 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

10

20

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。

【 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バログ、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、 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。

【 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。

【 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す、 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。

【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な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

10

20

30

40

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、ウエスタンプ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プロットを示す。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。

【図 5】 I L 2 R - C I S C についてのウエスタンプ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 での 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プロット用に回収した。ウエスタンプロットは 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。

【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力セット中の 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。

【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。

【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

10

20

30

40

50

質導入の9日後、IL2単独（上のパネル）またはラバマイシン（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）、またはラバマイシン（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）、またはラバマイシン（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。一番左の單一パネルは、ラバ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、ラバ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じ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バ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じ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つの異なるラバ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バマイシン誘導性増幅を示すこと、及び1nMラバ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バマイシンに反応し、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。一番左の單一パネルは、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じ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-CISCV3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-CISCV3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-CISCV3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。

【図18】500ng/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】500ng/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-CISCV3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。

【図20】CISCV3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-CISCV3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。

【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-CISCV3-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。

【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FOXP3遺伝子へのGFP融合により、プロモーター及びIL2R-CISCV3の両方の構成要素をインラインでFOXP3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FOXP3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、CRISP/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。

【図27】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CIS-C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25に記載のRNP+各カセット)を利用してFOXP3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-FOXP3発現について分析した。ラパマイシンまたはAP21967での増幅は、FOXP3発現細胞の実質的な富化をもたらし、これは、IL2R-CIS-Cが、FOXP3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IL2R-CIS-C GFP-FOXP3発現を表す。

【図28】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CIS-C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FOXP3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-FOXP3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+IL2の増幅は、未処理細胞に対してFOXP3発現細胞の検出可能な富化も、損失も生じず、これは、IL2R-CIS-CがFOXP3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IL2R-CIS-C GFP-FOXP3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(CIS-C)の組成物、ならびにそれを製造及び使用する方法である。CIS-C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an: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±20%または±10%、より好ましくは±5%、さらに好ましくは±1%、さらにより好ましくは±0.1%の変動を包含することを意味し得る。

【0043】

本明細書で使用される場合、「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リ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、ホスホセレノエート、ホスホロジセレノエート、ホスホアニロチオエート、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。

【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。

【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発現される。

【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し得る。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

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P D - 1タンパク質を含む。

【 0 0 4 9 】

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D N A分子、例えば作動可能に連結された転写可能なD N A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D N A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。

10

【 0 0 5 0 】

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D N A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D N A分子に作動可能に連結されている。

20

【 0 0 5 1 】

「プロモーター」とは、特定の遺伝子の転写を開始するD N A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D N A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。

30

【 0 0 5 2 】

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。

【 0 0 5 3 】

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。

【 0 0 5 4 】

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。レンチウイルスペ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、A k tなどのマーカータンパク質が、発現の決定に使用される。

40

【 0 0 5 5 】

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、

50

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、トランスクレッセプターの非存在下で、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いずれか 2 つによって定義される範囲内で停止される。

【 0 0 5 6 】

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。

10

【 0 0 5 7 】

「二量体化学誘導シグナル伝達複合体」、「二量体 C I S C」、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、C I S C の 2 つの構成要素を指す。「二量体化」とは、2 つの別々の実体を单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 C I S C 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 C I S C 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、C I S C 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、C I S C 構成要素の二量体化は、細胞または細胞集団の選択的增幅を可能にする。追加の C I S C システムは、C I S C ジベレリン C I S C 二量体化システム、または S L F - T M P C I S C 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（C I D）システム及び構成要素パートを使用してもよい。

20

【 0 0 5 8 】

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「C I S C」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。C I S C 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。

30

【 0 0 5 9 】

C I S C 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、I L 2 R - C I S C 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、I L 2 / 1 5 - C I S C は、インターロイキン - 2 及びインターロイキン - 1 5 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、I L 7 - C I S C 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、C I S C は、所与の C I S C 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、C I S C 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。

40

【 0 0 6 0 】

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

50

するものを含む、修飾サイトカイン受容体分子（例えば「バリアント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、合成的に產生された、及びバリアント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；AIPL1；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。

10

【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。

20

【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。

30

【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。

40

【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

50

リドマイドは、イムノプリン (Immunoprin)、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)、- (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、レブリミド、(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。

【 0 0 7 4 】

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。

10

【 0 0 7 5 】

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。

20

【 0 0 7 6 】

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する融合タンパク質またはCIS C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IL2Rg)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IL2Rb)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、CIS C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、CIS C二量体化をもたらす。

30

【 0 0 7 7 】

本明細書で使用される場合、「IL2Rb」または「IL2R 」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、「IL2Rg」または「IL2R 」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「IL2Ra」または「IL2R 」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もある。IL2R 及びIL2R 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

40

50

ロイキン - 2 受容体を指す。IL 2 R 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 (IL 2 / 15 R_a または IL 2 / 15 R_c) 、ベータ (IL 2 / 15 R_b または IL 2 / 15 R_d) 、またはガンマ (IL 2 / 15 R_g または IL 2 / 15 R_e) 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C I S C 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C I S C 構成要素が哺乳動物細胞などの細胞内で発現され、そしてC I S C 構成要素がホモ二量体化してシグナルを開始する。

10

【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C I S C 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）、アブタマー、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ントを含む：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リ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リ環の置換。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、C C I - 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。

20

【0080】

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され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）；

【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 (Affinitor)、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^{4, 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）；

【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）；

【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 (Elide)、(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）；

【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

10

20

30

40

50

S , 1 2 S , 1 5 R , 1 6 E , 1 8 R , 1 9 R , 2 1 R , 2 3 S , 2 4 E , 2 6 E , 2 8 E , 3 0 S , 3 2 S , 3 5 R) - 1 2 - ((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リ) - 1 - メチルエチル) - 1 , 1 8) - ジヒドロキシ - 1 9 , 3 0 - ジメトキシ 1 5 , 1 7 , 2 1 , 2 3 , 2 9 , 3 5 - ヘキサメチル - 1 1 , 3 6 - ジオキサ - 4 - アザトリシクロ (3 0 . 3 . 1 . 0 4 , 9) ヘキサトリアコンタ - 1 6 , 2 4 , 2 6 , 2 8 - テトラエン - 2 , 3 , 1 0 , 1 4 , 2 0 - ペントンを含み得る) ;

【 0 0 8 7 】

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、F K - 5 0 6 、フジマイシン、プログラフ (P r o g r a f) 、アドバグラフ (A d v a g r a f) 、プロトピック (p r o t o p i c) 、3 S - [3 R * [E (1 S * , 3 S * , 4 S *)] , 4 S * , 5 R * , 8 S * , 9 E , 1 2 R * , 1 4 R * , 1 5 S * , 1 6 R * , 1 8 S * , 1 9 S * , 2 6 a R * , 5 , 6 , 8 , 1 1 , 1 2 , 1 3 , 1 4 , 1 5 , 1 6 , 1 7 , 1 8 , 1 9 , 2 4 , 2 5 , 2 6 , 2 6 a - ヘキサデカヒドロ - 5 , 1 9 - 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リ) - 1 - メチルエテニル] - 1 4 , 1 6 - ジメトキシ - 4 , 1 0 , 1 2 , 1 8 - テトラメチル - 8 - (2 - プロペニル) - 1 5 , 1 9 - 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 , 2 0 , 2 1 (4 H , 2 3 H) - テトロン、一水和物を含み得る) ;

【 0 0 8 8 】

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、C C I - 7 7 9 、C C L - 7 7 9 、トリセル (T o r i s e l) 、(1 R , 2 R , 4 S) - 4 - { (2 R) - 2 - [(3 S , 6 R , 7 E , 9 R , 1 0 R , 1 2 R , 1 4 S , 1 5 E , 1 7 E , 1 9 E , 2 1 S , 2 3 S , 2 6 R , 2 7 R , 3 4 a S) - 9 , 2 7 - ジヒドロキシ - 1 0 , 2 1 - ジメトキシ - 6 , 8 , 1 2 , 1 4 , 2 0 , 2 6 - ヘキサメチル - 1 , 5 , 1 1 , 2 8 , 2 9 - ペンタオキソ - 1 , 4 , 5 , 6 , 9 , 1 0 , 1 1 , 1 2 , 1 3 , 1 4 , 2 1 , 2 2 , 2 3 , 2 4 , 2 5 , 2 6 , 2 7 , 2 8 , 2 9 , 3 1 , 3 2 , 3 3 , 3 4 , 3 4 a - テトラコサヒドロ - 3 H - 2 3 , 2 7 - 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リ 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) ;

【 0 0 8 9 】

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 (B i o l i m u s) 、ビオリムス A 9 、B A 9 、T R M - 9 8 6 、4 2 - O - (2 - エトキシエチル) ラパマイシンを含み得る) ;

【 0 0 9 0 】

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、A B T - 5 7 8 、(4 2 S) - 4 2 - デオキシ - 4 2 - (1 H - テトラゾール - 1 - イル) - ラパマイシンを含み得る) ;

【 0 0 9 1 】

C 2 0 - 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。C 2 0 - メタリルラパマイシンは、C 2 0 - M a r a p を含み得る) ;

【 0 0 9 2 】

C 1 6 - (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。C 1 6 - (S) - 3 - メチルインドールラパマイシン) は、C 1 6 - i R a p を含み得る) ;

【 0 0 9 3 】

A P 2 1 9 6 7 (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。A P 2 1 9 6 7 は、C - 1 6 - (S) - 7 - メチルインドールラパマイシンを含み得る) ;

【 0 0 9 4 】

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（C e l l C e p t、）Myf
o r t i c、（4 E）-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（B e n i d i p i n u m）、コニエル（C o n i e l）を含み得る）；または

【0096】

A P 1 9 0 3（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。A P 1 9 0 3は、リミドシド（R i m i d u c i d）、[（1 R）-3-（3，4-ジメトキシフェニル）-1-[3-[2-[2-[3-[（1 R）-3-（3，4-ジメトキシフェニル）-1-[（2 S）-1-[（2 S）-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]（2 S）-1-[（2 S）-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、プラスチド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e n t - ジベレラ骨格に由来するジベレリン、またはe n t - k a u r e n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（G A 1）、G A 2、G A 3 . . . G A 1 3 6、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、C I S C二量体化に利用される。

【0099】

本明細書中で使用される場合、「S L F - T M P」または「トリメトプリムに結合したF K B Pの合成リガンド」とは、C I S C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、S L F部分は、第1のC I S C構成要素に結合し、T M P部分は第2のC I S C構成要素に結合し、C I S C二量体化を引き起こす。いくつかの実施形態では、S L Fは、例えばF K B Pに結合し得、T M Pは、E . c o l iジヒドロ葉酸レダクターゼ（e D H F 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C I S C構成要素によるリガンドの結合を指し、C I S C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、C I S C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C I S C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C I S C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C I S C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つ

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(T reg)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。

10

【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產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。

20

【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、靈長類、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。

30

【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、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。

40

【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

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ペーサー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_M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_{CM}」)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_{CM})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_{EM}」)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

【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。

30

【0110】

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。

40

【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scFv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の「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(Altschul 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バリアントポリペプチド配列」または「CISCバリアントアミノ酸配列」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バリアント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。バリアントは天然タンパク質配列を包含しない。

【 0 1 1 4 】

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、好ましくは靈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）。

【 0 1 1 5 】

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。

【 0 1 1 6 】

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バ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。

【 0 1 1 7 】

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

10

20

30

40

50

) が提供される。いくつかの実施形態では、第 1 の C I S C 構成要素は、I L 2 R - C I S C 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 C I S C を含む、C I S C 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。

【 0 1 1 8 】

いくつかの実施形態では、I L 2 R - C I S C は、配列番号 1 (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 F 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 G S N T S K E N P F L F A L E A V V I S V G S M G L I I S L L C V Y F W L E R T M P R I P T L K N L E D L V T E Y H G N F S A W S G V S K G L A E S L Q P D Y S E R L C L V S E I P P K G G A L G E G P G A S P C N Q H S P Y W A P P C Y T L K P E T ; 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。

【 0 1 1 9 】

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

【 0 1 2 0 】

いくつかの実施形態では、I L 2 R - C I S C は、配列番号 5 (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 F 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 Q N L V I P W A P E N L T L H K L S E S Q L E L N W N N R F L N H C L E H L V Q Y R T D W D H S W T E Q S V D Y R H K F S L P S V D G Q K R Y T F R V R S R F N P L C G S A Q H W S E W S H P I H W G S N T S K E N P F L F A L E A V V I S V G S M G L I I S L L C V Y F W L E R T M P R I P T L K N L E D L V T E Y H G N F S A W S G V S K G L A E S L Q P D Y S E R L C L V S E I P P K G G A L G E G P G A S P C N Q H S P Y W A P P C Y T L K P E T ; 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。

【 0 1 2 1 】

いくつかの実施形態では、I L 2 R - C I S C は、配列番号 7 (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 F 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 G S N T S K E N P F L F A L E A V V I S V G S M G L I I S L L C V Y F W L E R T M P R I P T L K N L E D L V T E Y H G N F S A W S G V S K G L A E S L Q P D Y S E R L C L V S E I P P K G G A L G E G P G A S P C N Q H S P Y W A P P C Y T L K P E T ; 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。

10

20

30

40

50

【0122】

いくつかの実施形態では、第1のCIS-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CIS-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

【0123】

いくつかの実施形態では、第2のCIS-C構成要素は、IL2R複合体である。いくつかの実施形態では、IL2R-CIS-Cは、配列番号2(MALPVTA₁₁PLALLHAA₂₁RPI₂₂LWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKG₃₁MFEVL₃₂EPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKY₄₁MKS₄₂GNVKD₄₃LLQAWDLYYHVFRRI₄₄S₄₅KGKD₄₆TIPWLGH₄₇LVGLSGA₄₈F₄₉G₅₀F₅₁I₅₂I₅₃L₅₄V₅₅Y₅₆L₅₇INC₅₈RNT₅₉GPWLKKVLKC₆₀CNT₆₁PDP₆₂SKFFSQLSS₆₃E₆₄H₆₅GGD₆₆VQKWLSSPFPSSSFSPGGLAPEI₆₇S₆₈P₆₉L₇₀E₇₁V₇₂L₇₃ERDKV₇₄T₇₅QLLQ₇₆QDKV₇₇P₇₈E₇₉P₈₀A₈₁S₈₂S₈₃N₈₄H₈₅S₈₆L₈₇T₈₈S₈₉C₉₀F₉₁T₉₂N₉₃Q₉₄G₉₅Y₉₆FFF₉₇H₉₈L₉₉P₁₀₀D₁₀₁A₁₀₂L₁₀₃E₁₀₄A₁₀₅C₁₀₆Q₁₀₇V₁₀₈Y₁₀₉F₁₁₀T₁₁₁Y₁₁₂D₁₁₃P₁₁₄Y₁₁₅SE₁₁₆E₁₁₇D₁₁₈P₁₁₉D₁₂₀E₁₂₁G₁₂₂V₁₂₃A₁₂₄G₁₂₅P₁₂₆A₁₂₇T₁₂₈G₁₂₉A₁₃₀P₁₃₁T₁₃₂G₁₃₃S₁₃₄P₁₃₅Q₁₃₆P₁₃₇Q₁₃₈L₁₃₉S₁₄₀G₁₄₁E₁₄₂D₁₄₃D₁₄₄A₁₄₅E₁₄₆；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

【0124】

いくつかの実施形態では、IL2R-CIS-Cは、配列番号4(MALPVTA₁₁PLALLHAA₂₁RPI₂₂LWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKG₃₁MFEVL₃₂EPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKY₄₁MKS₄₂GNVKD₄₃LLQAWDLYYHVFRRI₄₄S₄₅KGKD₄₆TIPWLGH₄₇LVGLSGA₄₈F₄₉I₅₀I₅₁L₅₂V₅₃Y₅₄L₅₅INC₅₆RNT₅₇GPWLKKVLKC₅₈CNT₅₉PDP₆₀SKFFQLS₆₁SEHG₆₂G₆₃D₆₄V₆₅Q₆₆K₆₇WLSSPFPSSSFSPGGLAPEI₆₈S₆₉P₇₀L₇₁E₇₂V₇₃L₇₄ERDKV₇₅T₇₆QLQ₇₇QDKV₇₈P₇₉E₈₀P₈₁A₈₂S₈₃S₈₄N₈₅H₈₆S₈₇L₈₈T₈₉S₉₀C₉₁F₉₂T₉₃N₉₄Q₉₅G₉₆Y₉₇FFF₉₈H₉₉L₁₀₀P₁₀₁D₁₀₂A₁₀₃E₁₀₄C₁₀₅Q₁₀₆V₁₀₇Y₁₀₈F₁₀₉T₁₁₀Y₁₁₁D₁₁₂P₁₁₃Y₁₁₄SE₁₁₅E₁₁₆D₁₁₇P₁₁₈D₁₁₉E₁₂₀G₁₂₁V₁₂₂A₁₂₃G₁₂₄P₁₂₅R₁₂₆E₁₂₇M₁₂₈P₁₂₉S₁₃₀L₁₃₁Q₁₃₂E₁₃₃R₁₃₄V₁₃₅P₁₃₆R₁₃₇D₁₃₈W₁₃₉D₁₄₀P₁₄₁Q₁₄₂P₁₄₃L₁₄₄G₁₄₅P₁₄₆T₁₄₇PG₁₄₈V₁₄₉P₁₅₀D₁₅₁L₁₅₂V₁₅₃D₁₅₄F₁₅₅Q₁₅₆P₁₅₇P₁₅₈E₁₅₉L₁₆₀V₁₆₁L₁₆₂R₁₆₃E₁₆₄A₁₆₅G₁₆₆E₁₆₇D₁₆₈D₁₆₉A₁₇₀E₁₇₁I₁₇₂E₁₇₃A₁₇₄C₁₇₅Q₁₇₆V₁₇₇Y₁₇₈F₁₇₉T₁₈₀Y₁₈₁D₁₈₂P₁₈₃Y₁₈₄SE₁₈₅E₁₈₆D₁₈₇P₁₈₈D₁₈₉E₁₉₀G₁₉₁V₁₉₂A₁₉₃G₁₉₄P₁₉₅R₁₉₆E₁₉₇M₁₉₈P₁₉₉S₂₀₀L₂₀₁Q₂₀₂E₂₀₃L₂₀₄Q₂₀₅G₂₀₆Q₂₀₇D₂₀₈P₂₀₉T₂₁₀H₂₁₁L₂₁₂V₂₁₃；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

【0125】

いくつかの実施形態では、IL2R-CIS-Cは、配列番号6(MALPVTA₁₁PLALLHAA₂₁RPI₂₂LWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKG₃₁MFEVL₃₂EPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKY₄₁MKS₄₂GNVKD₄₃LLQAWDLYYHVFRRI₄₄S₄₅KGKD₄₆TIPWLGH₄₇LVGLSGA₄₈F₄₉I₅₀I₅₁L₅₂V₅₃Y₅₄L₅₅INC₅₆RNT₅₇GPWLKKVLKC₅₈CNT₅₉PDP₆₀SKFFQLS₆₁SEHG₆₂G₆₃D₆₄V₆₅Q₆₆K₆₇WLSSPFPSSSFSPGGLAPEI₆₈S₆₉P₇₀L₇₁E₇₂V₇₃L₇₄ERDKV₇₅T₇₆QLQ₇₇QDKV₇₈P₇₉E₈₀P₈₁A₈₂S₈₃S₈₄N₈₅H₈₆S₈₇L₈₈T₈₉S₉₀C₉₁F₉₂T₉₃N₉₄Q₉₅G₉₆Y₉₇FFF₉₈H₉₉L₁₀₀P₁₀₁D₁₀₂A₁₀₃E₁₀₄C₁₀₅Q₁₀₆V₁₀₇Y₁₀₈F₁₀₉T₁₁₀Y₁₁₁D₁₁₂P₁₁₃Y₁₁₄SE₁₁₅E₁₁₆D₁₁₇P₁₁₈D₁₁₉E₁₂₀G₁₂₁V₁₂₂A₁₂₃G₁₂₄P₁₂₅R₁₂₆E₁₂₇M₁₂₈P₁₂₉S₁₃₀L₁₃₁Q₁₃₂E₁₃₃R₁₃₄V₁₃₅P₁₃₆R₁₃₇D₁₃₈W₁₃₉D₁₄₀P₁₄₁Q₁₄₂P₁₄₃L₁₄₄G₁₄₅P₁₄₆T₁₄₇PG₁₄₈V₁₄₉P₁₅₀D₁₅₁L₁₅₂V₁₅₃D₁₅₄F₁₅₅Q₁₅₆P₁₅₇P₁₅₈E₁₅₉L₁₆₀V₁₆₁L₁₆₂R₁₆₃E₁₆₄A₁₆₅G₁₆₆E₁₆₇D₁₆₈D₁₆₉A₁₇₀E₁₇₁I₁₇₂E₁₇₃A₁₇₄C₁₇₅Q₁₇₆V₁₇₇Y₁₇₈F₁₇₉T₁₈₀Y₁₈₁D₁₈₂P₁₈₃Y₁₈₄SE₁₈₅E₁₈₆D₁₈₇P₁₈₈D₁₈₉E₁₉₀G₁₉₁V₁₉₂A₁₉₃G₁₉₄P₁₉₅R₁₉₆E₁₉₇M₁₉₈P₁₉₉S₂₀₀L₂₀₁Q₂₀₂E₂₀₃L₂₀₄Q₂₀₅G₂₀₆Q₂₀₇D₂₀₈P₂₀₉T₂₁₀H₂₁₁L₂₁₂V₂₁₃；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。

40

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 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 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 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 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(G G G S ; 配列番号15)、配列番号16(G G G S G G G ; 配列番号16)または配列番号17(G G G ; 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C I S C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C I S C構成要素は、I L 2 R - C I S C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11(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 G S N T S K E N P F L F A L E A V V I S V G S M G L I I S L L C V Y F W L E R T M P R I P T L K N L E D L V T E Y H G N F S A W S G V S K G L A E S L Q P D Y S E R L C L V S E I P P K G G A L G E G P G A S P C N Q H S P Y W A P P C Y T L K P E T ; 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。

10

【0131】

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。

20

【0132】

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 複合体または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10(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 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。

30

【0133】

いくつかの実施形態では、I L 2 R - C I S Cは、配列番号12(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

40

50

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 12) 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 12 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 】

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 10 もしくは配列番号 12 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 】

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 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 15 (G G G S ; 配列番号 15)、配列番号 16 (G G G S G G G ; 配列番号 16) または配列番号 17 (G G G ; 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。

【 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 13 (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 13) 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 13 のタンパク質配列をコードする核酸配列も含む。

【 0 1 3 8 】

10

20

30

40

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14(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14)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14のタンパク質配列をコードする核酸配列も含む。

【0139】

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13もしくは14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。

【0140】

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、このグリシンスペーサーは、配列番号15(G G G S ;配列番号15)、配列番号16(G G G S G G G ;配列番号16)または配列番号17(G G G ;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、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。

【0141】

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 1903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。

【0142】

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

10

20

30

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C I S C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：(AGCTTAATGTTAGTCTTATGCAATAC
TCTTGTTAGTCTTGCAACATGGTAACGATGAGTTAGCAACA
TGCCTTACAAGGAGAGAAAAAGCACCGTGCATGCCGATTG
GTGGAAGTAAGGTGGTACGATCGTGCCTTATTAGGAAGGC
AACAGACGGGTCTGACATGGATTGGACGAACCACTGAATT
GCCGCATTGCAGAGATAATTGTATTAAAGTGCCTAGCTCGA
TACAATAAACGGGTCTCTCTGGTTAGACCCAGATCTGAGCC
TGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGC
CTCAATAAACGCTTGCCTTGAGTGCTTCAGTAGTGTGTGC
CCGTCCTGTTGTGACTCTGGTAACTAGAGAGATCCCTCAGA
CCCTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCAGTGGCGCCC
GAACAGGGACTTGAAAGCGAAAGGGAAACCAAGAGGAGCTC
TCTCGACGCAGGACTCGGCTTGCTGAAGCGCGCACGGCAA
GAGGCGAGGGCGGGCGACTGGTGAGTACGCCAAAAATT
GACTAGCGGAGGCTAGAAGGGAGAGATGGGTGCGAGAGC
GTCAGTATTAAAGCGGGGGAGAATTAGATCGCGATGGAAA
AAATTCTGGTTAAGGCCAGGGGGAAAGAAAAAATATAAATT
AAAACATATAGTATGGGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATT
GCAGTTAACCTGGCCTGTTAGAAACATCAGAACGGCTGTA
GACAAATACTGGGACAGCTACAAACCATTCCCTCAGACAGG
ATCAGAAGAACTTAGATCATTATATAATACAGTAGCAACC
CTCTATTGTGTGCATCAAAGGATAGAGATAAAAGACACCA
AGGAAGCTTGTAGACAAGATAGAGGAAGAGAGCAAAACAAAAG
TAAGACCAACCGCACAGCAAGCGGCCGCTGATCTCAGACC
TGGAGGAGGAGATATGAGGGACAATTGGAGAAGTGAATT
TATAAAATATAAAGTAGTAAAGGATTGAACCATTAGGAGTAG
CACCCACCAAGGCAAAGAGAGAAGAGCTTGTCCCTGGGTTCT
GGAGCAGCAGGAAGCAGTATGGCGCAGCCTCAATGACGC
TGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGC
GCAGCAGAACAAATTGCTGAGGGCTATTGAGGGCGCAACAG
CATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCC
AGGCAAGAACATCCTGGCTGTGGAAAGATAACCTAAAGGATCA
ACAGCTCCTGGGATTGGGGTTGCTCTGGAAAACATCATT
TGCACCACTGCTGTGCCTTGGAAATGCTAGTTGGAGTAATA
AATCTCTGGAACAGATTGGAAATCACACAGACCTGGATGGA
GTGGGACAGAGAAATTAAACAATTACACAAAGCTTAATACAC
TCCTTAATTGAAGAACATCGCAAAACCAGCAAGAAAAGAATG
AACAAAGAATTATTGGAAATTAGATAAAATGGCAAGTTGTG
GAATTGGTTAACATAACAAATTGGCTGTGGTATATAAAA
TTATTCTAAATGATAGTAGGAGGCTTGGTAGGTTAAGAA
TAGTTTTGCTGTACTTTCTATAGTGAATAGAGTTAGGCA
GGGATATTCAACCATTATCGTTCAGACCCACCTCCCAACC
CGAGGGGACCCGACAGGCCGAAGGAATAGAAGAAGAAG
GTGGAGAGAGACAGAGACAGATCCATTGATTAGTGA
10 20 30 40 50

CGGATCTCGACGGTATCGGTTAACCTTTAAAAGAAAAAGGG
 GGGATTGGGGGTACAGTGCAGGGAAAGAATTAGTAGACA
 TAATAGCAACAGACATAACAAACTAAAGAATTACAAAAACA
 AATTACAAAAATTCAAAATTATCGATCACGAGACTAGC
 CTCGAGAAGCTTGATATCGAATTCCCACGGGTTGGACGC
 GTAGGAACAGAGAAACAGGAGAATATGGGCCAACAGGGAT
 ATCTGTGGTAAGCAGTTCCCTGCCCGGCTCAGGGCCAAGA
 ACAGTTGGAACAGCAGAACATATGGGCCAACAGGATATCTG
 TGGTAAGCAGTTCCCTGCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGA
 TGGTCCCCAGATCGGGTCCCCGCCCTCAGCAGTTCTAGAG
 AACCATCAGATGTTCCAGGGTCCCCAACGGACCTGAAAT
 GACCCCTGTGCCTTATTGAACTAACCAATCAGTTCGCTTC
 TCGCTTCTGTTCGCGCGCTTCTGCTCCCCGAGCTCTATAT
 AAGCAGAGCTCGTTAGTGAACCGTCAGATCGCTAGCAC
 GGTGCCGCCACCATGCCTCTGGGCTGCTGTGGCTGGCC
 TGGCCCTGCTGGCGCCCTGCACGCCAGGCCGGCGTGCA
 GGTGGAGACAATCTCCCCAGGCAGGGACGCACATTCCCT
 AAGCBBBBBCCAGACCTGCCTGGTGCACACTACAGGCATGC
 TGGAGGGATGGCAAGAAGTTGACAGCTCCGGATAGAAA
 CAAGCCATTCAAGTTATGCTGGGCAAGCAGGAAGTGATC
 AGAGGGCTGGGAGGGAGGGCGTGGCCAGATGTTCTGTGGCC
 AGAGGGCCAAGCTGACCATCAGCCCAGACTACGCCATTGG
 AGCAACACGCCACCCAGGAATCATCCACCTCACGCCACC
 CTGGTGTTCGATGTTGGAGCTGCTGAAGCTGGCGAGGGAT
 CCAACACATCAAAGAGAACCCCTTCTGTTCGCATTGG
 GGCGTAGTCATATCTGTTGGATCCATGGACTTATTATC
 TCCCTGTTGTGTGTACTTCTGGCTGGAACGGACTATGC
 CCAGGATCCCCACGCTCAAGAATCTGGAAAGATCTCGTCAC
 AGAATACCATGGTAATTTCAGCGCTGGAGCGGAGTCTCT
 AAGGGTCTGGCGAACCCCTCCAACCGATTATTCTGAAC
 GGTTGTGCCTCGTATCCGAAATACCAACAAAGGGGGGC
 TCTGGGTGAGGGCCCAGGGCGAGTCCGTGCAATCAACAC
 AGCCCCGTATTGGGCCCTCCCTGTTATACGTTGAAGCCC
 AAACCTGGAAGCGGAGCTACTAACCTCAGCCTGCTGAAGCA
 GGCTGGAGACGTGGAGGGAGAACCCCTGGACCTATGGCACTG
 CCCGTGACCGCCCTGCTGCTGCCTCTGGCCCTGCTGCTGC
 ACGCAGCCGGCTATCCTGTGGCACGAGATGTGGCACGA
 GGGCCTGGAGGGAGGCCAGCAGGGCTGTATTGGCGAGCGC
 AACGTGAAGGGCATGTTCGAGGTGCTGGAGCCTCTGCACG
 CCATGATGGAGAGAGAGGGCCACAGACCCCTGAAGGGAGACATC
 CTTTAACCAGGCCATGGACGGGACCTGATGGAGGGACAG
 GAGTGGTGCAGAAAGTACATGAAGTCTGGCAATGTGAAGG
 ACCTGCTGCAGGCCCTGGGATCTGTACTATCACGTGTTTG
 GAGAATCTCCAAGGGCAAAGACACGATTCCGTGGCTTGG
 CATCTGCTCGTTGGCTGAGTGGTGCCTTGGTTTCA
 TCTTGGTCTATCTCTTGATCAATTGCAGAAATACAGGCC
 TTGGCTGAAAAAAGTGCTCAAGTGTAAATACCCCCGACCC
 AGCAAGTTCTTCTCCAGCTTCTTCAACCTTTCCCTCCTCAAG
 CTTCTCCCCGGGAGGGCTGGGCCCGAGATTTCACCTCTT
10
20
30
40
50

CTTCCGCGTCTCGCCCTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCT
 CCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCCCTGGAATTCTGAGCTCGGT
 CCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTA
 GCCACTTTAAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAAT
 TCACTCCCACAGAACAGATCTGCTTTGCTTGTACT
 GGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGAGCTCT
 CTGGCTAACTAGGGAAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAG
 CTTGCCCTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCGTCTGTTG
 TGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCCTTTAGT
 CAGTGTGGAAAATCTCTAGCAGTAGTGTTCATGTCATCT 10
 TATTATTCACTGTTATAACTTGCAAAAGAAAATGAATATCA
 GAGAGTGAGAGGAACTTGTTATTGCAGCTTATAATGGTT
 ACAAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTCACAAATAAAGC
 ATTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTGTCCAAACTC
 ATCAATGTATCTTATCATGTCCTGGCTCTAGCTATCCC
 CCTAACTCCGCCAGTTCCGCCATTCTCCGCCCATGGC
 TGACTAATTTTTATTGAGCAGAGGCCGAGGCCGCCT
 CGGCCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGTGAGGAGGCTTTT
 TGGAGGCCCTAGGCTTTGCCTGAGACGTACCCAATTGCG
 CCTATAGTGAGTCGTATTACGCGCGCTCACTGGCCGT
 TTTACAACGTCGTGACTGGAAAACCTGGCGTTACCAA 20
 CTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTCGCCAGCTGGC
 GTAATAGCGAAGAGGCCGCACCGATCGCCCTTCCAACA
 GTTGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGGACGCGCCCTGT
 AGCGGGCGATTAAAGCGCGGGTGTGGTGGTACGCGCA
 GCGTGAACCGCTACACTTGCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCC
 TTTGCTTTCTCCCTTCTCGCCACGTTCGCCGGC
 TTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGT
 TCCGATTTAGTGCTTACGGCACCTCGACCCAAAAAAACT
 TGATTAGGGTGATGGTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGA 30
 TAGACGGTTTTCGCCCTTGTGACGTTGGAGTCCACGTTCT
 TTAATAGTGGACTCTTGTTCAAACTGGAAACAACACTCAA
 CCCTATCTGGTCTATTCTTGTGATTATAAGGGATTTG
 CCGATTTGGCCTATTGGTAAAAAAATGAGCTGATTAAAC
 AAAAATTAAACCGAATTAAACAAATATTAAACGTTTAC
 AATTCCCCAGGTGGCACTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAA
 CCCCTATTGTTATTCTAAATACATTCAAATATGTA
 TCCGCTCATGAGACAATAACCCCTGATAAATGCTTCAATAA
 TATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTCCGTG
 TCGCCCTTATTCCCTTTTGCAGCATTGCTTCCCTGT 40
 TTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAGATGCT
 GAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGTTACATCGAACTGG
 ATCTCAACAGCGTAAGATCCTTGAGAGTTCGCCCCGA
 AGAACGTTTCCAATGATGAGCAGCTTTAAAGTTCTGCTA
 TGTGGCGGGTATTATCCGTATTGACGCCGGCAAGAGC
 AACCTGGTCGCCAGTACACTATTCTCAGAATGACTTGGT
 TGAGTACTCACCAAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGC
 ATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGA
 GTGATAACACTTGCGGCCAACCTTACTTCTGACAAACGATCGG
 AGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTGACAAACATGGGG 50

GATCATGTAACTCGCC TTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGA
 ATGAAGCCATACCAAAACGACGAGCGTGACACACGATGCC
 TGTAGCAATGGCAACAACGTTGC GCAAACACTATTAACTGGC
 GAAC TACTTACTCTAGCTTCCC GGCAACAATTAACTAGACT
 GGATGGAGGGCGGATAAAGTTGCAGGGACCACTCTGCGCTC
 GGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTATTGCTGATAAAATCTGGA
 GCCGGTGAGCGTGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGG
 GGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACAC
 GACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAG
 ATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAAC 10
 TGTCAGACCAAGTTACTCATATATACTTTAGATTGATT
 AAAACTTCATTTAATTAAAAGGATCTAGGTGAAGATC
 CTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTAACGTGAGT
 TTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCCGTAGAAAAGATCAA
 AGGATCTTCTTGAGATCCTTTCTGCGCGTAATCTGC
 TGCTTGCAAACAAAAAACCAACCGCTACCAAGCGGTGGTT
 GTT TGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTCCGAAGGT
 AACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTT
 CTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTG
 TAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAACCTGTTACC 20
 AGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTTAACCGGG
 TTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGGCGAGCGGT
 CGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGG
 GCGAACGACCTACACCGAACCTGAGATAACCTACAGCGTGAG
 CTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCGAAGGGAGAAAGGGCGG
 ACAGGTATCCGGTAAGCGGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCG
 CACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCCTGGTATCTTAT 30
 AGTCCTGTCGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAAGCGCTCGAT
 TTTTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAA
 CGCCAGCAACGCCCTTTTACGGTTCTGGCCTTTGC
 TGGCCTTTGCTCACATGTTCTTCCCTGCGTTATCCCTG
 ATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTGTAGTGAGCTGA
 TACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTC
 GTGAGCGAGGAAGCGGGAGAGCGCCAAATACGCAAACCGC
 CTCTCCCCCGCGCTGGCCGATTCAATTAAATGCAAGCTGGCA
 CGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAAGCGCAAC
 GCAATTAAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGG
 CTTTACACTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAAAT
 TGTGAGCGGATAACAATTACACAGGAAACAGCTATGAC
 CATGATTACGCCAAGCGCGCAATTAAACCTCACTAAAGGG 40
 AACAAAAGCTGGAGCTGCA ; 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。

【0144】

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(AGCTTAATGTA
 AGTCTTATGCAATACTCTTGTAGTCTTGCAACATGGTAAC
 GATGAGTTAGCAACATGCCCTAACAGGAGAGAAAAAGCAC
 CGTGCATGCCGATTGGTGGAAAGTAAGGTGGTACGATCGTG
 CCTTATTAGGAAGGCAACAGACGGGTCTGACATGGATTGG
 ACGAACCACTGAATTGCCGCATTGCAGAGATATTGTATT
 AAGTGCCTAGCTGATACAATAACGGGTCTCTGGTTA 50

GACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGA
 ACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCT
 TCAAGTAGTGTGCCCCGTCTGTTGTGACTCTGGTAAC
 TAGAGATCCCTCAGACCCCTTTAGTCAGTGTGGAAAATCT
 CTAGCAGTGGCGCCCGAACAGGGACTTGAAAGCGAAAGGG
 AAACCCAGAGGGAGCTCTCGACGCAGGACTCGGCTTGCTG
 AAGCGCGCACGGCAAGAGGGCGAGGGGCGGCGACTGGTGAG
 TACGCCAAAAATTGACTAGCGGAGGGCTAGAAGGAGAGA
 GATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAAGCGGGGAGAATT
 GATCGCGATGGGAAAAATTCGGTTAAGGCCAGGGGAAA 10
 GAAAAAAATATAAATTAAACATATAGTATGGGCAAGCAGG
 GAGCTAGAACGATTGCGAGTTAACCTCTGGCCTGTTAGAAA
 CATCAGAAGGCTGTAGACAAATACTGGGACAGCTACAACC
 ATCCCCTTCAGACAGGATCAGAAGAACTTAGATCATTATAT
 AATACAGTAGCAACCCCTCTATTGTTGCACTAAAGGATAG
 AGATAAAAGACACCAAGGAAGCTTAGACAAAGATAGAGGA
 AGAGCAAAACAAAGTAAGACCACCGCACAGCAAGCGGCC
 GCTGATCTTCAGACCTGGAGGGAGATATGAGGGACAAT
 TGGAGAAGTGAATTATAAAATATAAAAGTAGTAAATTG
 AACCATTAAGGAGTAGCACCCACCAAGGCAAAGAGAGAG 20
 GGTGCAGAGAGAAAAAGAGCAGTGGGAATAGGAGCTTG
 TTCCTTGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGCG
 CAGCCTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATT
 GTCTGGTATAGTGCAGCAGCAGAACAAATTGCTGAGGGCT
 ATTGAGGCAGAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGG
 GCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAACCTGGCTGTGGAAAG 30
 ATACCTAAAGGATCAACAGCTCCTGGGATTGGGTTGC
 TCTGGAAAACTCATTGCAACACTGCTGTGCCTTGGAAATG
 CTAGTTGGAGTAATAATCTCTGGAACAGATTGGAAATCA
 CACGACCTGGATGGAGTGGACAGAGAAATTAAACAATTAC
 ACAAGCTTAATACACTCCTTAATTGAAGAACATCGCAAAACC
 AGCAAGAAAAGAACATGAACAAAGAACATTGGAAATTAGATAA
 ATGGGCAAGTTGTGGATTGGTTAACATAACAAATTGG
 CTGTGGTATATAAAATTATTCAATGATAGTAGGAGGCT
 TGGTAGGTTAACAGAATAGTTTGCTGTACTTTCTATAGT
 GAATAGAGTTAGGCAGGGATATTCAACATTATCGTTTCAG
 ACCCACCTCCCACACCCGAGGGGACCCGACAGGCCGAAG
 GAATAGAACAGAACAGGTGGAGAGAGAACAGAACAGATC
 CATTGATTAGTGAACGGATCTCGACGGTATCGGTTAACT
 TTTAAAAGAAAAGGGGGATTGGGGTACAGTGCAGGGG 40
 AAAGAACATAGTAGACATAATAGCAACAGACATAACAAACTAA
 AGAATTACAAAAACAAATTACAAAAATTCAAAATTATTC
 GATCACGAGACTAGCCTCGAGAACAGCTTGTATATCGAATTCC
 CACGGGGTTGGACGCGTAGGAAACAGAACAGGGAAATA
 TGGGCCAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCCTGCC
 GGCTCAGGCCAACAGAACAGTTGGAACAGCAGAACATATGGG
 CAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCCTGCC
 AGGGCCAAGAACAGATGGTCCCCAGATGCGGTCCCC
 CAGCAGTTCTAGAGAACCATCAGATGTTCCAGGGTGCC
 CCAAGGACCTGAAATGACCCGTGCCTTATTGAACTAAC 50

CAATCAGTTCGCTTCTCGCTTCTGTTCGCGCGCTTCTGCT
 CCCCAGAGCTCTATATAAGCAGAGCTCGTTAGTGAACCGT
 CAGATCGCTAGCACCGGTGCCGCCACCATGCCTCTGGCC
 TGCTGTGGCTGGGCCCTGGCCCTGCTGGCGCCCTGCACGC
 CCAGGCCGGCGTGCAGGTGGAGACAATCTCCCCAGGGCGAC
 GGACGCACATTCCCTAAGCAGGGCCAGACCTGCCTGGTGC
 ACTATAACAGGCATGCTGGAGGGATGGCAAGAAAGTTGACAG
 CTCCCCGGATAGAAACAAAGCATTCAAGTTATGCTGGC
 AAGCAGGAAGT GATCAGAGGCTGGGAGGGCGTGGCCC
 AGATGTCTGTGGGCCAGAGGGCCAAGCTGACCATCAGCCC 10
 AGACTACGCCATGGAGCAACAGGCCACCCAGGAATCATT
 CCACCTCACGCCACCCCTGGTGTTCGATGTGGAGCTGCTGA
 AGCTGGCGAGGGCGGTAGTCAGAACCTTGTGATACCATG
 GGCCCCAGAAAATCTCACACTTCATAAAACTTCCGAATCA
 CAACTCGAACTCAACTTGAATAACCGGTTCCGAATCACT
 GTCTTGAACACCTGGTACAATATCGGACCGACTGGGATCA
 CTCATGGACAGAACAAATCTGTGGACTATAGGCACAAATT
 TCACTCCCCAAGCGTAGACGCCAAAAAGATAACACTTTTC
 GCGTACGATCCGCTTTAATCCTCTGCGGCTCTGCTCA
 GCACTGGAGTGAATGGTCCCATTCCATTGGGATCC 20
 AACACATCAAAGAGAACCCCTTTCTGTTCGCATTGGAGG
 CCGTAGTCATATCTGTTGGATCCATTGGACTTATTATCTC
 CCTGTTGTGTGTACTTCTGGCTGGAACCGGACTATGCC
 AGGATCCCCACGCTCAAGAACATCTGGAAAGATCTGTCACAG
 AATACCATGGTAATTCAGCGCTGGAGCGGGAGTCTCTAA
 GGGTCTGGCGAATCCCTCCAACCCGATTATTCTGAACGG
 TTGTGCCCTCGTATCCGAAATACCAACCAAAAGGGCGGGGCTC
 TGGGTGAGGGCCAGGGCGAGTCCGTGCAATCAACACAG
 CCCGTATTGGGCCCTCCATTGTTACGTTGAAGGCCGAA
 ACTGGAAAGCGGAGCTACTAACCTCAGCCTGCTGAAGCAGG 30
 CTGGAGACGTGGAGGAGAACCCCTGGACCTATGGCACTGCC
 CGTGACCGCCCTGCTGCTGCCCTGGCCCTGCTGCTGCAC
 GCAGCCCAGCCTATCCTGTGGCACGAGATGTGGCACGAGG
 GCCTGGAGGGAGGCCAGCAGGCTGTATTGGCGAGCGCAA
 CGTGAAGGGCATGTTCGAGGTGCTGGAGCCTCTGCACGCC
 ATGATGGAGAGAGGGCCACAGACCCCTGAAGGGAGACATCCT
 TTAACCAGGCCTATGGACGGGACCTGATGGAGGGCACAGGA
 GTGGTGCAGAAAGTACATGAAGTCTGGCAATGTGAAGGAC
 CTGCTGCAGGCCCTGGGATCTGTACTATCACGTGTTCGGA
 GAATCTCCAAGGGAGGTTCAAAACCTTTGAGAACCTTAG 40
 ACTGATGGGCCATCTCTGCAAGGTAGTTCACGTTGAG
 ACCCATAGATGCAATATAAGCTGGAAATCTCACAGCCA
 GCCATTACTTGAACGGCATTGGAAATTGAGGGCCCGAAC
 ACTTTCCCCCGGTCACTACGTGGGAAGAACAGCTCCTCTTTG
 ACGCTGAAGCAGAAGCAGGAGTGGATTGTCTGGAGACTT
 TGACTCCTGATACTCAGTATGAGTTCCAAGTTCGGGTGAA
 ACCACTCCAAGGGAGTTCACGACGTGGCTCCGTGGAGT
 CAACCGTTGGCGTTCCGCACGAAGGCCGCTGCCCTGGCA
 AAGACACGATTCCGTGGCTTGGCATCTGCTCGTTGGCT
 GAGTGGTGCCTGGTTCATCATCTGGTCTATCTCTTG 50

ATCAATTGCAGAAATACAGGCCCTGGCTGAAAAAGTGC
 TCAAGTGTAAATACCCCCGACCCAAGCAAGTTCCTCTCCC
 GCTTTCTTCAGAGCATGGAGGCATGTGCAGAAATGGCTC
 TCTTCACCTTTCCCTCAAGCTCTCCCGGGAGGGC
 TGGCGCCCAGAGTTCACCTCTTGAAGGTACTTGAACGAGA
 CAAGGTTACCCAACCTCTCCCTCAACAGGATAAGGTACCC
 GAACCTGCGAGCCTTAGCTCCAACCACCTCTTACGAGCT
 GCTTCACCAATCAGGGATACTTCTTTCCACCTTCCGA
 TGCGCTGGAAATCGAACGCTTGTCAAGTTACTTACCTAT
 GATCCATATAGCGAGGAAGATCCCGACGAAGGGAGTCGCCG 10
 GTGCGCCCACGGGTTCTCACCCCCAACCTCTCCAGCCTCT
 CTCAGGAGAAGATGATGCTTATTGCACCTTCCCAGTAGA
 GACGATCTCCTCTCTTTCTCCATCTCTTTGGGGGAC
 CTTCCCCCTTCTACGGCACCTGGCGGGTCTGGTGCTGG
 CGAGGAGCGGATGCCGCCGTCCAGGAGCGAGTACCA
 CGAGATTGGATCCCCAGCCACTTGGACCCCCCACCCCCG
 GCGTACCTGACCTTGTGATTTCAACCTCCCCCTGAATT
 GGTGCTGCGAGAGGGCTGGGAGGAAGTTCCGGACGCTGG
 CCGAGGGAGGGCGTGTCTTCCATGGAGTAGGCCTCCAG
 GTCAAGGGAGTTAGGGCTCTCAACGCCGGCTGCCGT 20
 GAATACAGACGCTTATCTCACTGCAGGAAC TGCAAGGTC
 AGGACCCAACACATCTTGTAGGATCTGGTGCTACTAATT
 TTCTCTTTGAAGCAAGCTGGAGATGTTGAAGAGAACCC
 GGTCCAGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGG
 TGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCA
 CAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACC
 TACGGCAAGCTGACCCCTGAAGGTTCATCTGCACCAACGGCA
 AGCTGCCCGTGCCTGGCCCACCCCTCGTGACCAACCTGAC
 CTACGGCGTGCAGTGCCTCAGCCGCTACCCCCGACCACTG
 AAGCAGCACGACTTCTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCT 30
 ACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTCAAGGACGACGGCAA
 CTACAAGACCCGGCCGAGGTGAAGGTTCGAGGGCGACACC
 CTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGG
 AGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAAGCTGGAGTACAACTA
 CAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCGACAAAGCAGAAG
 AACGGCATCAAGGTGAACCTCAAGATCCGCCACAACATCG
 AGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAAGCAGAA
 CACCCCCATCGGGGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAAC
 CACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAAGACCCCC
 ACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCCTGCTGGAGTTCGTAC 40
 CGCCGCCGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAG
 TAAACTAGTGTGACAAATCAACCTCTGGATTACAAAATT
 GTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACATGTTGCTCCTTT
 TACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCCTTGATCAT
 GCTATTGCTTCCCGTATGGCTTCAATTCTCCCTCTTGT
 ATAATCCTGGTTGCTGTCTCTTATGAGGAGTTGTGGCC
 CGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACGTGTTGCT
 GACGCAACCCCCACTGGTTGGGCATTGCCACCACTGTC
 AGCTCCTTCCGGACCTTCGCTTCCCTCCCTATTGCA 50
 CACGGCGGAACTCATGCCCGCTGCCCTGCCCCGCTGCTGG

ACAGGGGCTCGGCTGTTGGCACTGACAATTCCGTGGTGT
 TGTCGGGAAAGCTGACGTCCTTCCATGGCTGCTCGCCTG
 TGTTGCCACCTGGATTCTGGCGGGACGTCCTCTGCTAC
 GTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCAGGACCTTCCTCCCGCG
 GCCTGCTGCCGGCTCTGCAGGCTCTTCCCGTCTTCGCCT
 TCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTGGGCCGCCTCC
 CGCCCTGGAATTCGAGCTCGGTACCTTTAAGACCAATGAC
 TTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTAAGAA
 AAGGGGGGACTGGAAGGGCTAATTCACTCCCCAACGAAGAC
 AAGATCTGCTTTTGCTTGTACTGGGCTCTCTGGTTAGA 10
 CAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTGGCTAACACTAGGGAAC
 CCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGGCCTTGAGTGCCTC
 AAGTAGTGTGCCCCGTCTGTTGTGACTCTGGTAACTA
 GAGATCCCTCAGACCCCTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCT
 AGCAGTAGTAGTTCATGTCATCTTATTATTCAAGTATTTAT
 AACTTGCAAAGAAATGAATATCAGAGAGTGAGAGGAACCT
 GTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAGCAATAGC
 ATCACAAATTCACAAATAAAGCATTTCACACTGCATT
 CTAGTTGTGGTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCA
 TGTCTGGCTCTAGCTATCCCCCCCCCTAACACTCCGCCAGTT
 CGCCCATTCTCGCCCCATGGCTGACTAACCTTTTTAT 20
 TTATGCAGAGGCCGAGGCCGCTCGGCCCTTGAGCTATT
 CAGAAGTAGTGAGGGAGGCCCTTTGGAGGCCCTAGGCTTT
 GCGTCGAGACGTACCCAAATTGCCCTATAGTGAGTCGTAT
 TACGCGCGCTCACTGGCCGTCGTTTACAACGTCGTGACT
 GGGAAAACCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCATTGCAGC
 ACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCC
 CGCACCGATGCCCTTCCAAACAGTTGCGCAGCCTGAATG
 GCGAATGGCGCGACGCCCTGTAGCGCGCATTAGCGC
 GCGGGTGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTT 30
 GCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTCGCTTTCTCCCT
 CCTTCTGCCACGTTGCCGGCTTCCCGTCAAGCTCT
 AAATCGGGGGCTCCCTTAAAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTA
 CGGCACCTCGACCCAAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTT
 CACGTAGTGGGCATGCCCTGATAGACGGTTTTCGCC
 TTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTAATAGTGGACTCTTG
 TTCCAAACTTGAACAAACACTCAACCCATCTCGGTCTATT
 CTTTGATTATAAGGGATTTCGCCGATTCGCCCTATTG
 GTTAAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTAAACGCGAAT
 TTTAACAAAATTTAACGTTACAATTCCCAGGTGGCAC 40
 TTTTGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTGTTTATT
 TTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAAT
 AACCCGTATAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAG
 TATGAGTATTCAACATTCGGTGTGCGCCCTTATTCCCTT
 TTTGCCGATTTGCCCTCTGTTTGCTCACCCAGAAA
 CGCTGGTGAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGTG
 ACGAGTGGTTACATCGAACCTGGATCTCAACAGCGGTAAG
 ATCCTTGAGAGTTTCGCCCGAACAGTTCCTAACATGA
 TGAGCACTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATC
 CGTATTGACGCCGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCGATA 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 G C A C A A C A T 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 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 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 10
 G G T T T A T T G C T G A T A A A T C T G G A G 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 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 A G A T T G A T T T A A A A C T T C A 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 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 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 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 20
 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 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 30
 T C G T G C A C A C A G G 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 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 40
 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 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 G C T G G C C 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 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 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 G A A A C A G 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 G A G C T G
 C A ; 配列番号 18) に示される配列番号 20 のバリエントである。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。

【 0 1 4 5 】

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

GATGAGTTAGCAACATGCCCTTACAAGGAGAGAAAAAGCAC
 CGTGCATGCCGATTGGTGGAAAGTAAGGTGGTACGATCGTG
 CCTTATTAGGAAGGCAACAGACGGTCTGACATGGATTGG
 ACGAACCACTGAATTGCCGCATTGCAGAGATATTGTATT
 AAGTGCCTAGCTGATACAATAAACGGTCTCTCTGGTTA
 GACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGA
 ACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAAGCTTGCCTTGAGTGCT
 TCAAGTAGTGTGCCCCGTCTGTTGTGACTCTGGTAAC
 TAGAGATCCCTCAGACCCCTTTAGTCAGTGTGGAAAATCT
 CTAGCAGTGGCGCCCCGAACAGGGACTTGAAGAGCGAAAGGG 10
 AAACCAAGAGGGAGCTCTCGACGCAGGACTCGGGCTTGCTG
 AAGCGCGCACGGCAAGAGGGCAGGGGGCGACTGGTGAG
 TACGCCAAAAATTGACTAGCGGGAGGCTAGAAGGAGAGA
 GATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAAGCGGGGAGAATT
 GATCGCGATGGGAAAAAATTCGGTTAAGGCCAGGGGGAAA
 GAAAAAAATATAAATTAAACATATAGTATGGGCAAGCAGG
 GAGCTAGAACGATTGCGAGTTAACCTGGCCCTGTTAGAAA
 CATCAGAACGGCTGTAGACAAATACTGGGACAGCTACAACC
 ATCCCTTCAGACAGGATCAGAAGAACTTAGATCATTATAT
 AATACAGTAGCAACCCCTCTATTGTGTGCATCAAAGGATAG
 AGATAAAAGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAAGATAGAGGA
 AGAGCAAAACAAAGTAAGACCAACCGCACAGCAAGCGGCC
 GCTGATCTTCAGACCTGGAGGGAGATATGAGGGACAAT
 TGGAGAAGTGAATTATATAAATATAAAGTAGTAAAGGATTG
 AACCATTAAGGAGTAGCACCCACCAAGGCAAAGAGAGAGT
 GGTGCAGAGAGAAAAAGAGCAGTGGGAATAGGAGCTTG
 TTCCCTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCAGTATGGCG
 CAGCCTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATT
 GTCTGGTATAGTGCAGCAGCAGAACAAATTGCTGAGGGCT
 ATTGAGGCGAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGG 20
 GCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAACCTGGCTGTGGAAAG
 ATACCTAAAGGATCAACACAGCTCCTGGGATTGGGTTGC
 TCTGGAAAACTCATTGCAACCAC TGCTGTGCCTTGGAAATG
 CTAGTTGGAGTAATAAATCTCTGGAACAGATTTGGAAATCA
 CACGACCTGGATGGAGTGGACAGAGAAATTAAACAATTAC
 ACAAGCTTAATACACTCCTTAATTGAAGAACATCGCAAAACC
 AGCAAGAAAAGAACATGAACAGAACATTATTGGAAATTAGATAA
 ATGGGCAAGTTGTGGAATTGGTTAACATAACAAATTGG
 CTGTGGTATATAAAATTATTCAATGATAGTAGGAGGGCT
 TGGTAGGTTAACAGAACATTGTTGCTGTACTTTCTATAGT
 GAATAGAGTTAGGCAGGGATATTCAACCATTATCGTTTCAG 30
 ACCCACCTCCCACCCCCGAGGGGACCCGACAGGCCGAAG
 GAATAGAACAGAACAGGTGGAGAGAGAGAACAGAGACAGATC
 CATTGCGATTAGTGAACGGATCTCGACGGTATCGGTTAACT
 TTTAAAAGAAAAGGGGGATTGGGGTACAGTGCAGGGG
 AAAGAACATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAAACTAA
 AGAACATTACAAAAACAAATTACAAAAATTCAAAATTTCATC
 GATCACGAGACTAGCCTCGAGAACAGAGAACAGGAGAATA
 CACGGGGTTGGACGCGTAGGAAACAGAGAACAGGAGAATA
 TGGGCCAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCCTGCCCC 40
 50

GGCTCAGGGCCAAGAACAGTTGGAACAGCAGAACATATGGGC
 CAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCCTGCCCGGGCTC
 AGGGCCAAGAACAGATGGTCCCCAGATGCGGTCCCCGCCCT
 CAGCAGTTCTAGAGAACCATCAGATGTTCCAGGGTGCC
 CCAAGGGACCTGAAATGACCCCTGTGCCTTATTGAACTAAC
 CAATCAGTTCGCTTCTCGCTTCTGTTCGCGCTTCTGCT
 CCCCGAGCTCTATATAAGCAGAGCTCGTTAGTGAACCGT
 CAGATCGCTAGCACCGGTGCCGCCACCATGCCTCTGGGCC
 TGCTGTGGCTGGGCCCTGGCCCTGCTGGCGCCCTGCACGC
 CCAGGGCGGCGTGCAGGTGGAGACAATCTCCCCAGGGCGAC 10
 GGACGCACATTCCCTAAGCGGGGCCAGACCTGCGTGGTGCG
 ACTATACAGGCATGCTGGAGGATGGCAAGAACAGTTGACAG
 CTCCCGGGATAGAAACAAAGCCATTCAAGTTATGCTGGGC
 AAGCAGGAAGTGATCAGAGGCTGGGAGGGAGGGCGTGGCCC
 AGATGTCTGTGGGCCAGAGGGCCAAGCTGACCATCAGCCC
 AGACTACGCCATTGGAGCAACAGGCCACCCAGGAATCATC
 CCACCTCACGCCACCCCTGGTGTTCGATGTTGGAGCTGCTGA
 AGCTGGCGAGCAAAACTTGGTGATTCCCTTGGGCCAGA 20
 AAATCTCACGCTTCACAAGTTGTCCGAATCCAGCTCGAG
 CTCAACTGGAATAATAGATTCTTAATCATTGTTGGAAC
 ACCTGGTTCAATATAGAACGGATTGGGACCACTCATGGAC
 CGAGCAGTCAGTTGACTACCGCCACAAATTTCACCTCCC
 AGCGTAGATGGGCAGAACAGAGGTACACATTAGGGTCAGAT
 CCAGGTTTAATCCTCTGTGTGGTTCTGCTCAACACTGGTC
 TGAGTGGAGGCCATCCGATCCACTGGGCTCAAATACCTCT
 AAAGAAAATCCGTTCCCTTTGCGCTCGAACGCCGTTGTTA
 TCAGCGTCGGAAGCATGGGACTTATCATTCCCTCTCTG
 CGTGTACTTCTGGCTGGAGCGGACGATGCCGGATTCCG
 ACGCTCAAAACCTGGAGGACCTTGTAAACAGAACATACAG
 GTAATTCTCCGTTGGAGTGGCGTATCAAAGGGGCTTGC 30
 TGAGTCCCTTCAACCAGGATTACTCTGAGCGCCTCTGCTTG
 GTGTCCGAGATAACCTCCAAAGGAGGTGCACTTGGGAGGG
 GGCCAGGCGCGTCCCCCTGCAATCAGCATAGTCCGTATTG
 GGCGCCCCCTGTTATACCCCTCAAACCGGAAACGGGAAGC
 GGAGCTACTAACCTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACG
 TGGAGGGAGAACCCCTGGACCTATGGCACTGCCCGTGACCGC
 CCTGCTGCTGCCCTGCCCCCTGCTGCAACGGGAGGG
 CCTATCCTGTGGCACGAGATGTGGCACGAGGGCCTGGAGG
 AGGCCAGCAGGCTGTATTGGCGAGCGCAACGTGAAGGG
 CATGTTCGAGGTGCTGGAGCCTCTGCACGCCATGATGGAG 40
 AGAGGGCCCACAGACCCCTGAAGGGAGACATCCTTTAACCAAGG
 CCTATGGACGGGACCTGATGGAGGGCACAGGAGTGGTGCGAG
 AAAGTACATGAAGTCTGGCAATGTGAAGGGACCTGCTGCAG
 GCCTGGGATCTGTACTATCACGTGTTGGAGAACATCTCCA
 AGAAACCTTTGAGAACCTTAGACTGATGGCGCCCATCTC
 TCTGCAGGTAGTTCACGTTGAGACCCATAGATGCAATATA
 AGCTGGAAAGAACGCTCCCTCTTGTGACGCTGAAGCAGAACAG
 ATTTGGAATTGAGGCCCCGAACACACTTCCCCCGGTACATAC
 GTGGGAAGAACGCTCCCTCTTGTGACGCTGAAGCAGAACAG
 GAGTGGATTGCTGGAGACCTTGACTCCTGATACTCAGT 50

ATGAGTTCCAAGTTGGGTGAAACCACCTCCAAGGGAGTT
 CACGACGTGGTCTCCGTGGAGTCAACCGTTGGCGTTCCGC
 ACGAAGCCCCGCTGCCCTTGGCAAAGACACGATTCCGTGGC
 TTGGGCATCTGCTCGTTGGGCTGAGTGGTGCCTTGGTT
 CATCATCTTGGTCTATCTCTTGATCAATTGCAGAAATACA
 GGCCCTTGGCTGAAAAAAAGTGCTCAAGTGTAAATACCCCCG
 ACCCAAGCAAGTTCTTCTCCCAGCTTCTTCAGAGCATGG
 AGGCAGATGTGAGAAATGGCTCTTACCTTTCCCTCC
 TCAAGCTTCTCCCCGGGAGGGCTGGCGCCCGAGATTTCAC
 CTCTTGAGGTACTTGAACGAGACAAGGTTACCCAACTTCT 10
 CCTTCAACAGGATAAGGTACCCGAACCTGCGAGCCTTAGC
 TCCAACCACCTCTTACGAGCTGCTTACCAATCAGGGAT
 ACTTCTTTTCCACCTTCCCAGTGCCTGGAAATCGAAC
 TTGTCAAGTTACTTACCTATGATCCATATAGCGAGGAA
 GATCCCAGGAAGGGAGTCGCCGGTGCGCCACGGGTTCT
 CACCCCAACCTCTCCAGCCTCTCAGGAGAAGATGATGC
 TTATTGCACTTTCCCAGTAGAGACGATCTCCTCCCTTT
 TCTCCATCTCTTTGGGGGGACCTTCCCCCTTCTACGG
 CACCTGGCGGGCTGGTGCTGGCGAGGAGCGGATGCCGCC
 GTCCCTCCAGGAGCGAGTACCAACGAGATTGGGATCCCCAG
 CCACTTGGACCCCCCACCCCCGGCGTACCTGACCTTGTG 20
 ATTTCACCTCCCCCTGAATTGGTGCTGCGAGAGGCTGG
 GGAGGAAGTTCCGGACGCTGGGCCGAGGGAGGGCGTGTCC
 TTTCCATGGAGTAGGCCTCCAGGTCAAGGCAGTTAGGG
 CTCTCAACGCGCGGCTGCCGTTGAATACAGACGCTTATCT
 CTCAC TGCAAGGAAC TGCAAGGTCAAGGACCCAAACACATCTTG
 TAGGATCTGGTGCTACTAATTCTCTTTGAAGCAAGC 30
 TGGAGATGTTGAAGAGAACCCCTGGTCCAGTGAGCAAGGGC
 GAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCATCCTGGTGCAGC
 TGGACGGCGACGTAAACGGCACAAAGTTCAAGCGTGTCCGG
 CGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGCCGTGCC
 AAGTTCATCTGCACCAACCGGCAAGCTGCCGTGCCCTGGC
 CCACCCCTCGTGACCAACCTGACCTACGGCGTGCAGTGTCT
 CAGCCGCTACCCGACCAACATGAAGCAGCACGACTTCTTC
 AAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCA
 TCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGGCGCCGA
 GGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAG
 CTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGGACGGCAACATCCTGG
 GGCACAAAGCTGGAGTACAACATACAAGGCCACAAACGTCTA
 TATCATGGCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAAC 40
 TTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGGACGGCAGCGTGCAGC
 TCGCCGACCACTACCAAGCAGAACACCCCATCGGCCACGG
 CCCCCGTGCTGCCGACAACCAACTACCTGAGCACCCAG
 TCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACA
 TGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGGCCGGATCACTCT
 CGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAACTAGTGTGACGACAAT
 CAACCTCTGGATTACAAAATTGTGAAAGATTGACTGGTA
 TTCTTAACATGTTGCTCCTTTACGCTATGTGGATAACGC
 TGCTTTAATGCCCTTGATCATGCTATTGCTTCCCGTATG
 GCTTTCATTTCTCCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGT 50

CTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGG
CGTGGTGTGCACTGTGTTGCTGACGCAACCCCCACTGGT
TGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTCCGGGACTT
TCGCCTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGC
CGCCTGCCTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTG
GGCACTGACAATTCCGTGGTGTTGTCGGGGAAAGCTGACGT
CCTTCCATGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCT
GCGGGGACGTCCTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAAT
CCAGCGGACCTTCCTCCCAGGGCTGCTGCCGGCTCTGC
GGCCTCTTCCCGCTTCCGCCCCCTCAGACGAGTCG
GATCTCCCTTGGGCCGCTCCCCGCTGGAATTGAGCT
CGGTACCTTAAGACCAATGACTTACAAGGAGCTGTAGA
TCTTAGCCACTTTTAAAAGAAAAGGGGGACTGGAAGGG
CTAATTCACTCCCAACGAAGACAAGATCTGCTTTGCTT
GTACTGGGTCTCTGGTTAGACCAAGATCTGAGCCTGGG
GCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAA
TAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGCCCCGTC
TGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCCT
TTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCAGTAGTAGTTCATGT
CATCTTATTATTCACTGATTATAACTTGCAAAGAAATGAA
TATCAGAGAGTGAGAGGAACCTGTTATTGCACTTATAA
TGGTTACAAATAAGCAATAGCATCACAAATTCAAAAT
AAAGCATTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTGTCCA
AACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGCTCTAGCTATC
CCGCCCCCTAACCTCCGCCAGTTCCGCCATTCTCCGCC
ATGGCTGACTAACCTTATTATGCAGAGGCCGAGGC
CGCCTCGGCCCTTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGTGAGGAGGC
TTTTTGGAGGCCCTAGGCTTTGCGTCGAGACGTACCCAA
TTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACGCGCGCTCACTGGCC
GTCGTTTACAACGTCGTGACTGGAAAACCCCTGGCGTTA
CCCAACTTAATGCCCTTGCAAGCACATCCCCCTTCGCCAG
CTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCGCCACCGATCGCCCTTCC
AACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCGACGCGC
CCTGTAGCGCGCATTAAAGCGGGCGGGTGTGGTGGTTAC
GCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGGCC
GCTCCTTTCGCTTCTCCCTTCTCGCCACGTTCG
CCGGCTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGCTCCCTT
AGGGTTCCGATTAGGGTGAATTGCTTACGGCACCTCGACCCAAA
AAACTTGATTAGGGTGAATTGCTTACGTAGTGGGCCATCGC
CCTGATAGACGGTTTTCGCCCTTGTACGTTGGAGTCCAC
GTTCTTTAATAGTGGAACCTTGTGTTCCAAACTGGAACAAACA
CTCAACCCATCTCGGTCTATTCTTTGATTATAAGGG
TTTGCGATTTCGGCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGAT
TTAACAAAAATTAAACGCGAATTAAACAAATATTAAACG
TTTACAATTCCCAGGGTGGCACTTTTCCGGGAAATGTGCG
CGGAACCCCTATTGTTATTCTAAATACATTCAAAT
ATGTATCCGCTCATGAGACAAATAACCCCTGATAAAATGCTTC
AATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATT
CCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTGCGGCATTTCGCC
CCTGTTTGTCAACCCAGAAACGCTGGTAAAGTAAAAG

ATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGA
 ACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTCGC
 CCCGAAGAACGTTTCCAATGATGAGCACTTTAAAGTTC
 TGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCCTATTGACGCCGGCA
 AGAGCAACTCGGTCGCCGCATAACACTATTCTCAGAACATGAC
 TTGGTTGAGTACTCACCCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGG
 ATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAAC
 CATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAAACG
 ATCGGAGGACCAGAAGGAGCTAACCGCTTTTGACACAACA
 TGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGA 10
 GCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCCACG
 ATGCCCTGTAGCAATGGCAACAAACGTTGCGCAAACATTAA
 CTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCGGCAACAAATTAA
 AGACTGGATGGAGGGCGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTG
 CGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTATTGCTGATAAAAT
 CTGGAGCCGGTGAGCGTGGTCTCGCGTATCATTGACGC
 ACTGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCGTATCGTAGTTATC
 TACACGACGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATA
 GACAGATGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTG
 GTAACCTGTCAGACCAAGTTACTCATATATACTTTAGATT
 GATTTAAAACCTTCATTTTAATTAAAAGGATCTAGGTGA 20
 AGATCCTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTAACG
 TGAGTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCCGTAGAAAAAG
 ATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTCTGCGCGTAA
 TCTGCTGTTGCAAACAAAAAACACCACCGCTACCAAGCGGT
 GGTTTGTGCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTCCG
 AAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTG
 TCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAA
 CTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAACCTG
 TTACCAAGTGGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTTA 30
 CCGGGTTGGACTCAAGACGATAAGTTACCGGATAAGGCGCA
 GCGGTCGGGCTGAACGGGGGTTCGTGCACACAGCCCCAGC
 TTGGAGCGAACGACCTACACCGAACCTGAGATAACCTACAGC
 GTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCGAAGGGAGAAA
 GGCAGGACAGGTATCCGGTAAGCGGGCAGGGTGGAAACAGGA
 GAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCCTGGTATC
 TTTATAGTCCCTGTCGGGTTTCCACCTCTGACTTGAGCG
 TCGATTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGAGCCTATGG
 AAAAACGCCAGCAACGCGGCCCTTTTACGGTTCCCTGGCCT
 TTTGCTGGCCTTTGCTCACATGTTCTTCCCTGCGTTATC
 CCCTGATTCTGTTGATAACCGTATTACCGCCCTTGAGTGA 40
 GCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCGAGCG
 AGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGAGCGCCCAATACGCAA
 ACCGCCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCAATTAAATGCAGC
 TGGCACGACAGGTTTCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGC
 GCAACGCAATTAAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACC
 CCAGGGTTTACACTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGT
 GGAATTGAGCGGATAACAATTTCACACAGGAAACAGCT
 ATGACCATGATTACGCCAACAGCGCGCAATTAAACCCCTCACTA
 AAGGGAAACAAAGCTGGAGCTGCA ; 配列番号 19) に示される配列番

10

20

30

40

50

号 2 0 のバリアントである。配列番号 1 9 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。

【 0 1 4 6 】

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 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 8 %または 9 9 % 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 R N A または D N A である。

10

【 0 1 4 7 】

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 C I S C 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 . c o l i . 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

【 0 1 4 8 】

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 N K 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 + 、及び / または C D 4 + 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。

【 0 1 4 9 】

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、またはバルク C D 8 + T 細胞を含み得る 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、細胞は、 C D 4 + T ヘルパーリンパ球細胞であり、これにはナイーブ 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、またはバルク C D 4 + T 細胞が含まれ得る。

30

【 0 1 5 0 】

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つ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 リンパ球のインピトロでの増幅は、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つて実施され得る。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。

【 0 1 5 1 】

例えば、所望の T 細胞集団または亜集団は、インピトロで最初の 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（ P B M C ）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 、 1 0 、 2 0 、または 4 0 以上の P B M C 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 P B M C 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、 P B M C に 3 0 0 0 から 3 6 0 0 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、 P B M C は、細胞分裂を防ぐために、 3 0 0 0 、 3 1 0 0 、 3 2 0 0 、 3 3 0 0 、 3 4 0 0 、 3 5 0 0 もしくは 3 6 0 0 ラドのガンマ線、または列挙された値のいずれ

40

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 】

C D 8 + 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、C D 8 + 細胞は、細胞表面抗原（それらの種類の C D 8 + 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、C D 8 + 末梢血リンパ球の C D 62 L + 及び C D 62 L - サブセットの両方に存在する。抗 C D 8 抗体及び抗 C D 62 L 抗体で染色した後、P B M C を、C D 62 L - C D 8 + 及び C D 62 L + C D 8 + 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 C M の表現型マーカーの発現は、C D 45 R O 、C D 62 L 、C C R 7 、C D 28 、C D 3 、及び / または C D 127 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、C D 45 R O + 、C D 62 L + 及び / または C D 8 + T 細胞である。いくつかの実施形態では、エフェクター T E は、C D 62 L 、C C R 7 、C D 28 、及び / または C D 127 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 C D 8 + T リンパ球は、C D 62 L 、C C R 7 、C D 28 、C D 3 、C D 127 、及び / または C D 45 R A 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 】

C D 4 + 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。C D 4 + 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 C D 4 + T リンパ球は、C D 45 R O - 、C D 45 R A + 、C D 62 L + 、及び / または C D 4 + 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 C D 4 + 細胞は、C D 62 L + 及び / または C D 45 R O + である。いくつかの実施形態では、エフェクター C D 4 + 細胞は、C D 62 L - 及び / または C D 45 R O - 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变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 つ以下の遺伝子改变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 つの遺伝子改变事象を経験したならば、リガンドの添加は、C I S C 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 . 0 1 、0 . 0 2 、0 . 0 3 、0 . 0 4 、0 . 0 5 、0 . 0 6 、0 . 0 7 、0 . 0 8 、0 . 0 9 、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 、1 0 、1 1 、1 2 、1 3 、1 4 、1 5 、2 0 、2 5 、3 0 、3 5 、4 0 、4 5 、5 0 、5 5 、6 0 、6 5 、7 0

40

50

、75、80、85、90、95、もしくは100nM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C1SCについて陽性であり得る。したがって、二量体C1SC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C1SCを有するCD4+T細胞を含む。いくつかの実施形態では、C1SCはIL2R-C1SC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C1SC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、C1SC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されてもまたは他の細胞型と組み合わされてもよい。

10

【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ヘルペリンパ球細胞、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+ヘルペリンパ球細胞は、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。

20

【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テ細胞であり、ここでこのセントラルメモリーテ細胞は、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テ細胞であり、CD4+ヘルペリンパ球細胞は、ナイーブまたはセントラルメモリーCD4+T細胞である。

30

【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ヘルペ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。

40

【0161】

いくつかの組成物において、細胞はNK細胞である。

【0162】

50

いくつかの実施形態では、細胞は 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、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、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。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 N K 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

【 0 1 6 3 】

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。

【 0 1 6 4 】

二量体 C I S C 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 C I S C 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 C I S C 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 C I S C 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变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。

【 0 1 6 5 】

30

いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞などの C I S C 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 C I S C 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 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、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 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、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、I L 2 R b または I L 2 R g 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、F K B P または F R B 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、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、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

40

50

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、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。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 N K 細胞である。

【 0 1 6 6 】

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 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 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、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、二量体化を誘導するためのリガンドの有効量は、0 . 0 1、0 . 0 2、0 . 0 3、0 . 0 4、0 . 0 5、0 . 0 6、0 . 0 7、0 . 0 8、0 . 0 9、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、1 0、1 1、1 2、1 3、1 4、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 1 0 0 n M 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。

【 0 1 6 7 】

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、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ントが挙げられる：C 7、C 4 2 及び / または C 2 9 のメトキシでの脱メチル化、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リル環上の別の置換もしくはシクロヘキシリ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、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。

【 0 1 6 8 】

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 A k t 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

10

20

30

40

50

のマーカーとしては、例えば、JAK、Akt、STAT、NF-、MAPK、PI3K、JNK、ERK、もしくはRas、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ーが挙げられる。

【0169】

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、IL2R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CISCA発現細胞における増殖、及び非CISCA発現細胞における付随する抗増殖を誘導する。

10

【0170】

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ければならない(Kim, et al. NMR Structural Studies of Interaction of a Small, Nonpeptidyl 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4A～4B及び5のウエスタンプ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Akt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。

20

【0171】

細胞集団の選択的增幅方法

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增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含むし、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CISCA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CISCA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ゲである。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、もしくは100nM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。

30

【0172】

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ゲであり、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/または組み合わせを含む。さらなる有用な

40

50

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ントが含まれ得る：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リ環上の別の置換、またはシクロヘキシリ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。

【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变事象が起こったときにだけ起こる。一方の遺伝子改变事象は、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、他方の遺伝子改变事象は、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のウエスタンプロットに示されるように、Aktの活性化及びリン酸化は、両方の遺伝子改变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、Akt活性化と組み合わせたこれらの事象の達成のみが、両方の遺伝子改变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变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。

【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、IL2Rを含むCISCを調製した。IL2R-CISCの各構造（すなわち1210、1211、及び1233）を、2A配列を用いてGFP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MNDプロモーターの制御下に置いた。

【0175】

各IL2R-CISC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。CD4+T細胞を60時間活性化した。次いで、その細胞を、IL2/7/15を含む1mL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4μg/mLの硫酸プロタミンを含む15μLのIL2R-CISC及び3μLのMND-GFP対照（0.5mL培地）を用いて形質導入した。次にこの細胞を33で、30分間800gで回転接種し、続いて4時間のインキュベーション後に1.5mLの培地を添加した。形質導入したT細胞を、50ng/mLのIL2、5ng/mLのIL5、及び5ng/mLのIL17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。GFPシグナルを決定し、そして形質導入されたT細胞のIL2R-CISCレベルを決定した。形質導入効率は、IL2R-CISCについては10~30%、そしてMND-GFPについては約80%であった。

【0176】

形質導入後、細胞をIL2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IL2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（1nM）またはIL2で2日間処理し、細胞を2mL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GFP+集団の発現及びIL2R-CISC発現を、抗FRB抗体及び二次APC抗体を使用することによって決定した。図7A~7B、及び図8~11は、それぞれの集団におけるGFP及びFRB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、12

10

20

30

40

50

33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GFPマーカーによって読み出されるように、IL2R-CISC発現について富化する。

【0177】

図12は、図3に示すCISC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。V3は、増殖にとって最も効率的な構造である。図13は、ラパマイシン処理に応答してIL2R-CISC V3がヒトCD4+T細胞増殖を支持することをグラフで示す。

【0178】

上記の方法を使用して、IL2R-CISC発現T細胞はラパマイシンの存在下でSTAT5経路を誘導することも示した。図14のフローセルデータによって示されるように、V3構築物はSTAT5経路シグナル伝達のための最も効率的な構造である。

10

【0179】

本明細書に記載されていると同様の方法は、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、AP21967を用いて実施した。図15のフローセルデータに示すように、AP21967に応答して、IL2R-CISC V3構築物はヒトCD4+T細胞の生存を促進する。さらに、IL2R-CISCは、図16にグラフで示すように、AP21967処理に応答してCD4+T細胞の増殖を促進する。図17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IL2R-CISCで増幅させたCD4+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

【0180】

IL2R-CISC細胞を、細胞の成長及び増殖を中和したIL-2中和抗体に曝した(図18及び19)。これは、CISC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。

【0181】

IL2-CISC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20のフローセルデータに示すように、CISC V3増幅細胞についてのT細胞マーカー分析を行った。

【0182】

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V1、V2、及びV3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21に示されるように、FKBP及び/またはFRBならびにIL2Rg及びIL2Rbサブユニット配列に配置された種々のスペーサー及びリンカーを含む、V4、V5、V6及びV7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22にまとめる。要するに、この方法はPBMC3フィーダー細胞を解凍することを包含し、そしてCD4+細胞は抗CD3/CD28ビーズの存在下で単離された。このビーズを除去し、500μL中800×gでV4、V5、V6、またはV7の1つを用いて回転接種した。回転接種後、1.5mLのTCM+サイトカインを添加した。次いで、各構築物を、無処理、100nMのAP21967、1nMのラパマイシン、または50ng/mLのIL-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23に示すフローセルデータに示されている。図24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、TMリンカーに対して、増幅ECドメインで試験された全てのCISC構造について同様であることを示す。

30

【0183】

さらに、MNDプロモーター及びCISC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25は、MND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26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、PBMCフィーダー

40

50

細胞を解凍し、C D 4 + 細胞を、抗 C D 3 / C D 2 8 ビーズの存在下で単離した。そのビーズを除去し、C a s 9 / g R N A リボ核タンパク質（R N P）を添加した。次いで、その構築物を、無処理、1 0 n M の A P 2 1 9 6 7、1 0 n M のラパマイシン、または1 0 n M のラパマイシン + 5 n g / m L の I L - 2 を含む様々な条件で処理した。図 2 7 及び 2 8 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 I L - 2 との接触は、富化を示さなかった。

【 0 1 8 4 】

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

【 0 1 8 5 】

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。

【 0 1 8 6 】

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

【 0 1 8 7 】

さらに、本開示の特徴または態様がマーカッシュ（M a r k u s h）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。

【 0 1 8 8 】

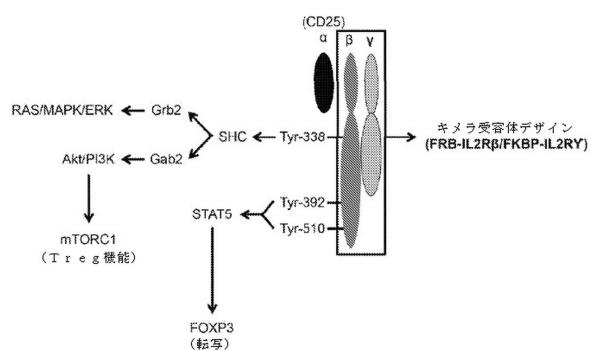
第 1 から第 1 1 の態様の代替例の特徴のいずれも、本明細書で識別されている全ての態様及び代替例に適用可能である。さらに、第 1 から第 1 1 の態様の代替例の任意の特徴は独立して、本明細書に記載の他の代替例と、部分的または全体的に組み合わせ可能である。例えば 1 つ、2 つ、または 3 つ以上の代替例は、全体的または部分的に組み合せ可能である。さらに、第 1 から第 1 1 の態様の代替例の特徴のいずれも、他の態様または代替例に対して必要に応じて作製され得る。様々な代替例及び実装に関して上述したが、1 つ以上の個々の代替例に記載されている様々な特徴、態様、及び機能性は、それらが記載され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 つ以上に適用され得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

【 0 1 8 9 】

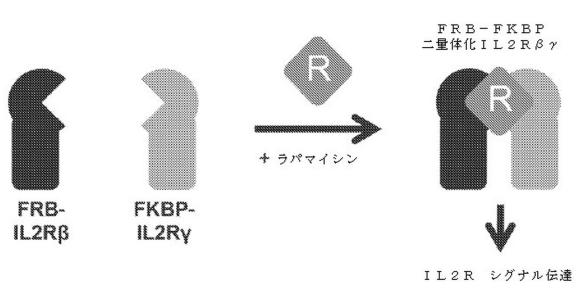
本明細書に引用された全ての参考文献は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。参照により組み込まれる刊行物及び特許または特許出願が本明細書に含まれる開示と矛盾する場合、本明細書は、そのような矛盾するいかなる資料よりも優先されるか及び / または優位であることを意図している。参照により本明細書に組み込まれる刊行物及び特許または特許出願が本明細書に含まれる開示と矛盾する場合、本明細書はそのような矛盾するいかなる資料よりも優先されるか及び / または優位であることを意図している。40

【図面】

【図 1】

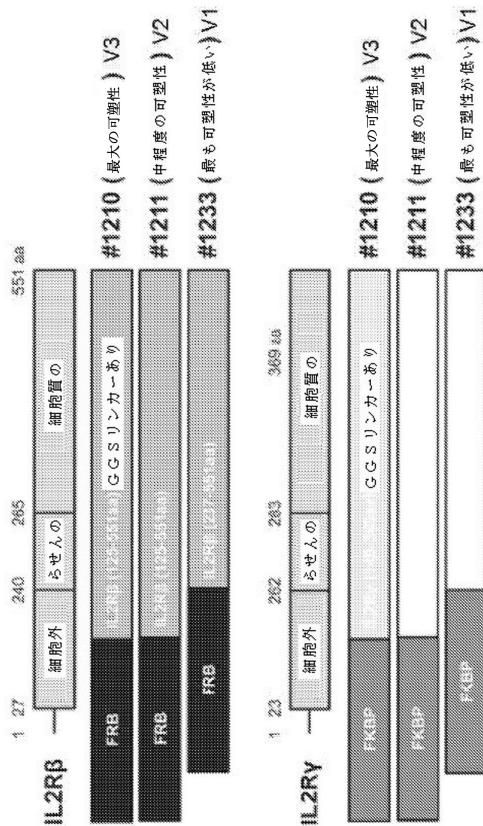


【図 2】

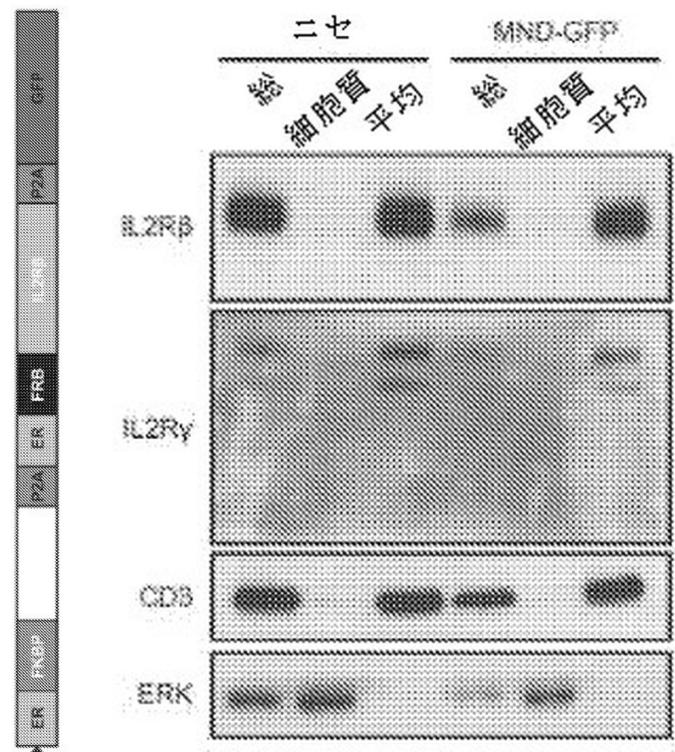


10

【図 3】



【図 4 A】



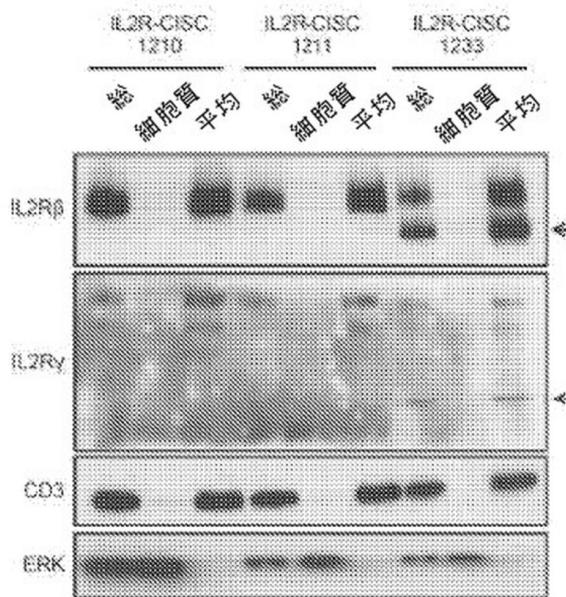
20

30

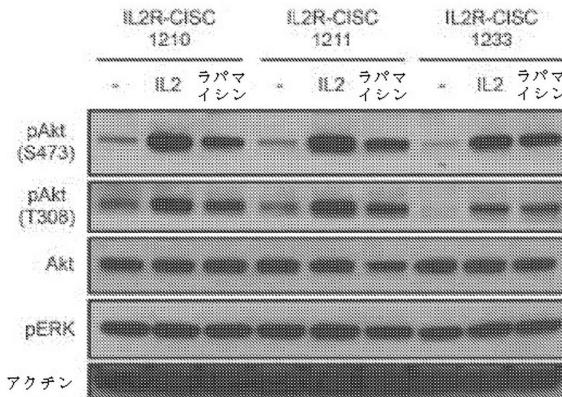
40

50

【図 4 B】



【図 5】



10

【図 6】

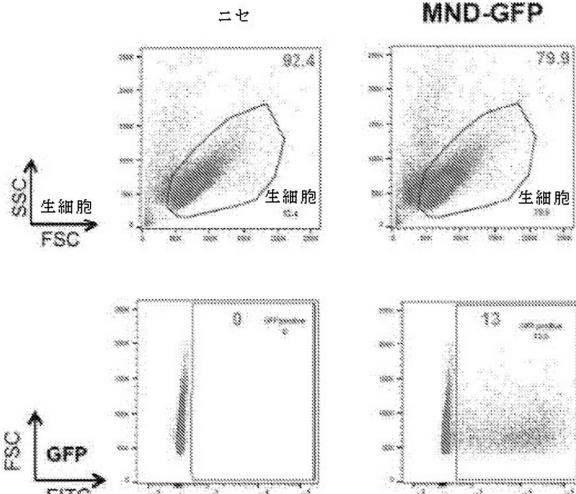
IL2R-CISC 実験

IL2R-CISC: 1210, 1211, 1233 (レンチウイルスストック)

- CD3+ T細胞を 6.0 時間活性化した (PBMNC1_Rack3K—# 49 より)
- 24 ウエルディッシュに T細胞をプレートした (IL2/7/15 を含む 1 ml 培地に 100 万細胞/ウェルを添加)
- 24 ウエルディッシュ中のビーズ入り／なしのレンチウイルス形質導入 (1.5 μ l の IL2R-CISC/3 μ l の MND-GFP 対照 (流酸プロミン 4 μ g/ml (0.5 ml 培地) 及び 3.3°C で 3 分間 800 g の回転振盪、次いで 1.5 ml 培地 4 時間のインキュベーション後)
- サイトカイン (IL2 5.0 ng/ml、IL5 5.0 ng/ml 及び IL17 5.0 ng/ml) と共に 3.7°C で 4.8 時間 形質導入 T細胞をインキュベートした
- 形質導入 T細胞の GFP シグナル及び IL2R-CISC レベルをチェックした (形質導入率 :

 - IL2R-CISC では約 1.0 ~ 3.0%、MND-GFP では約 8.0%)
 - T細胞を IL2 のラバマイン (1 nM) で 2 日間処理した
 - 2 ml の培地を含む 24 ウエルディッシュに 100 万細胞/ウェルをプレートする
 - T細胞生存率、GFP+集団及び IL2R-CISC 細胞をチェックした (FRE ab-1:50 (C1ontech, 625091)、2nd Ab-APC-1:500 (Invitrogen, サザギ) を使用 Cytometry: 2.8ビーズ 形質導入 (nm) 流量 流量 流量
 - 6.0 時間 4.8 時間 4.8 時間 7.2 時間

【図 7 A】



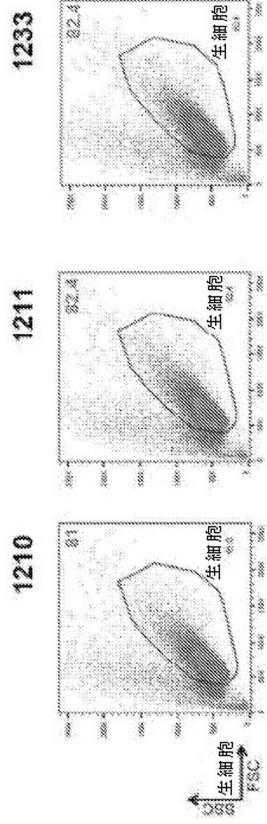
20

30

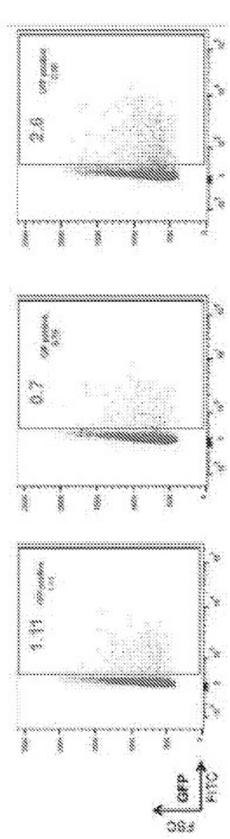
40

50

【図 7 B】



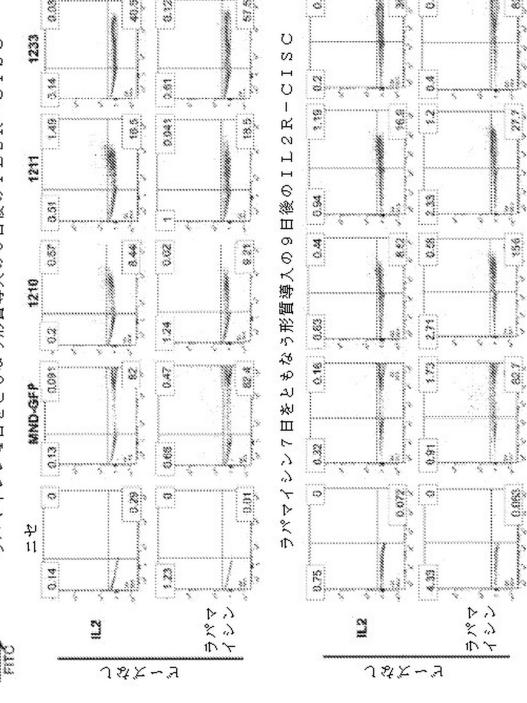
【図 8】



1210

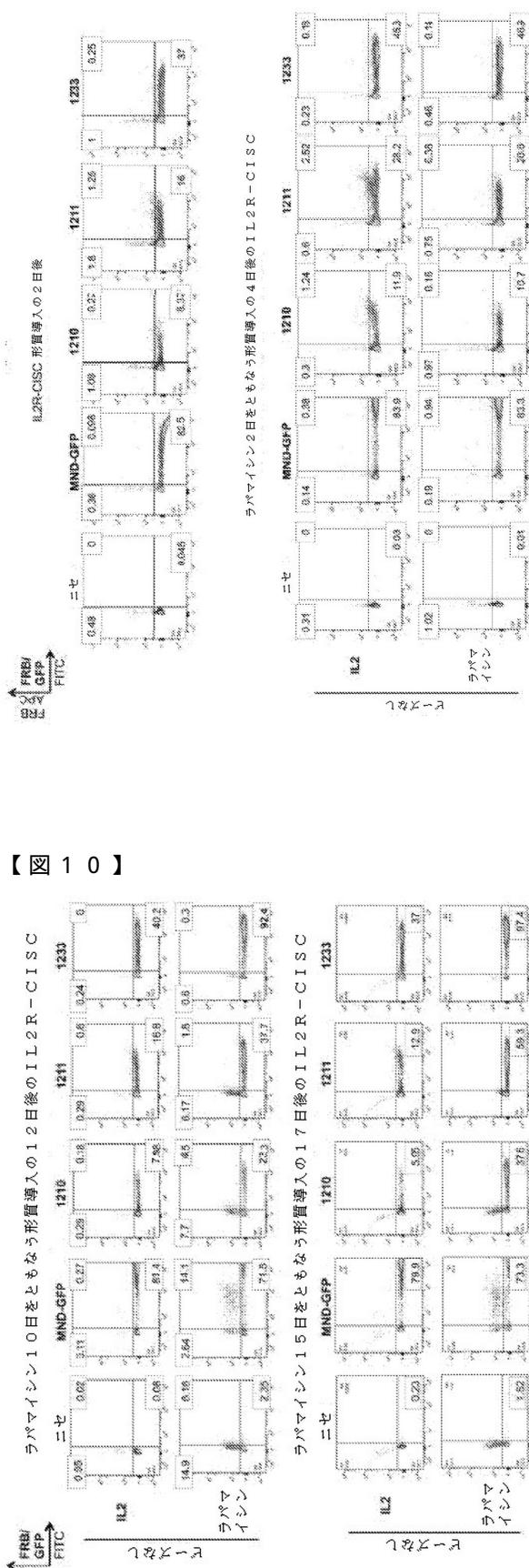
1211

1233



【図 9】

【図 10】



10

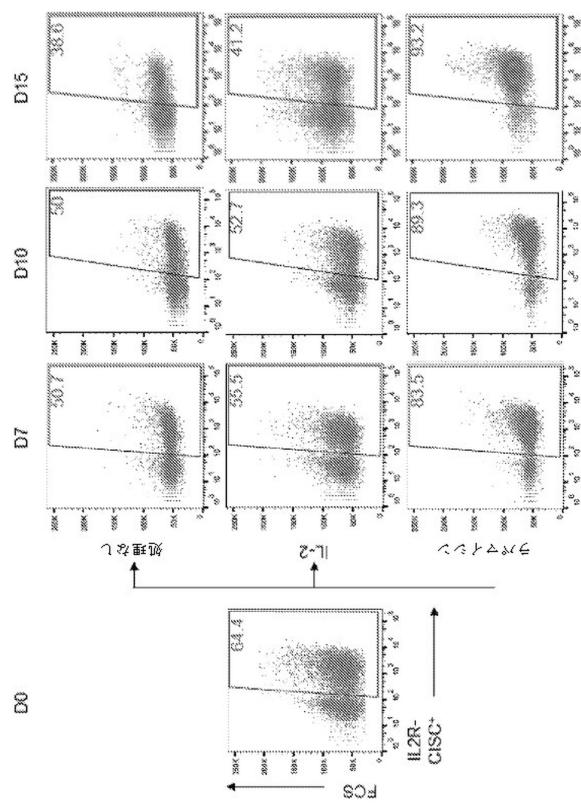
20

30

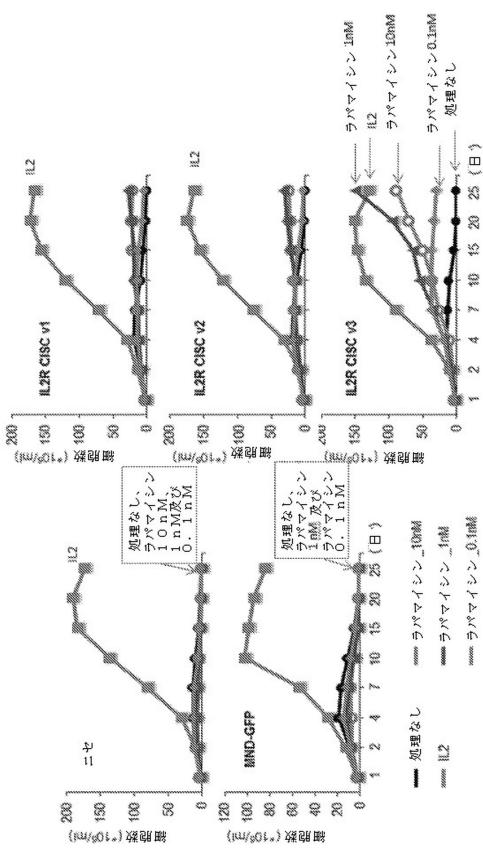
40

50

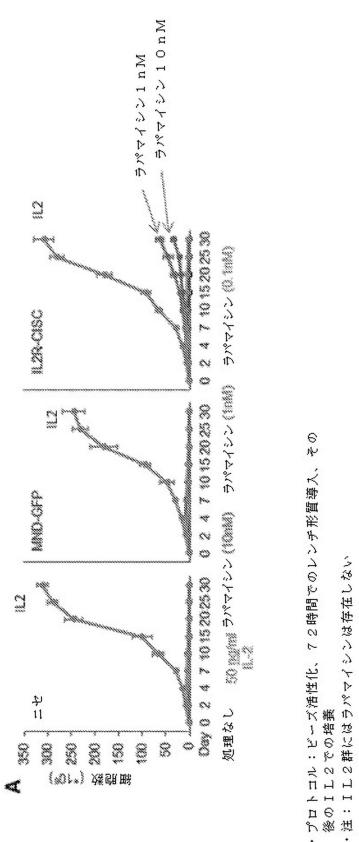
【図 1 1】



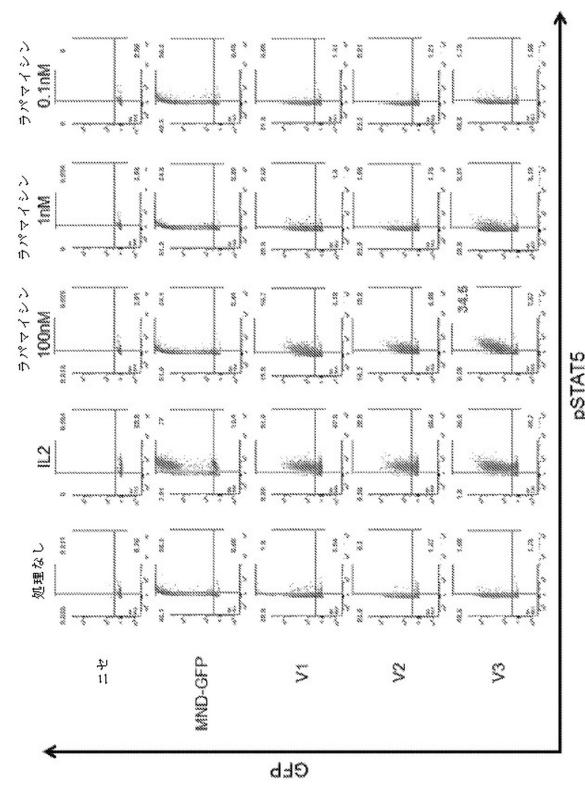
【図 1 2】



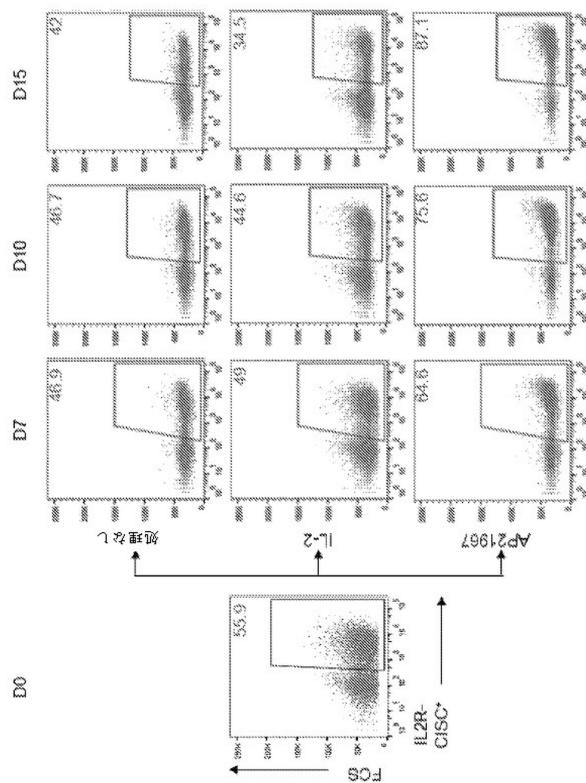
【図 1 3】



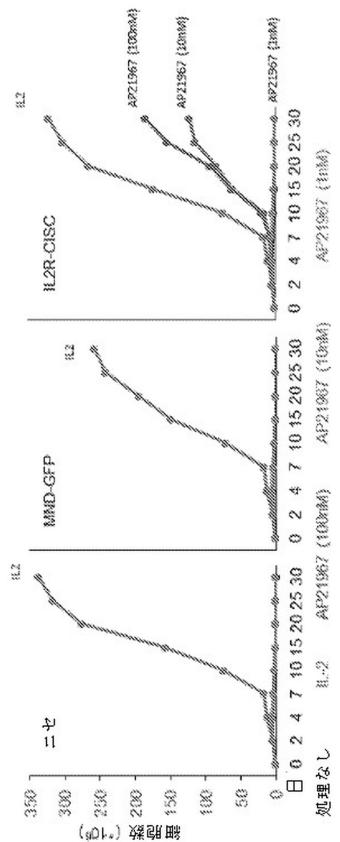
【図 1 4】



【図 15】



【図 16】



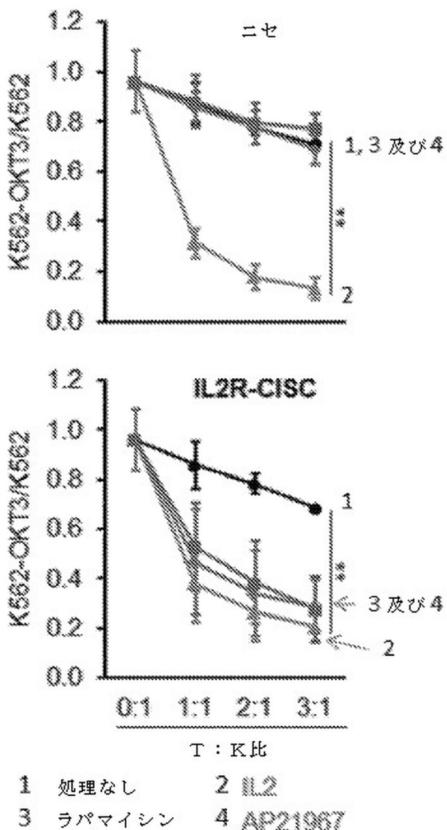
10

20

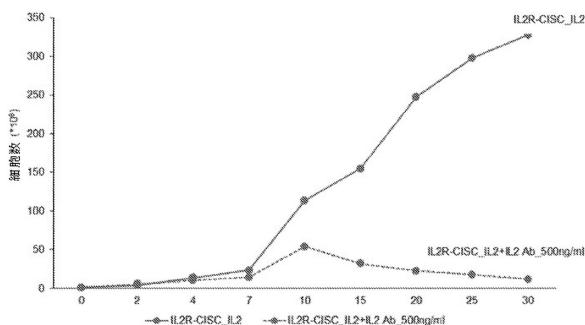
30

40

【図 17】

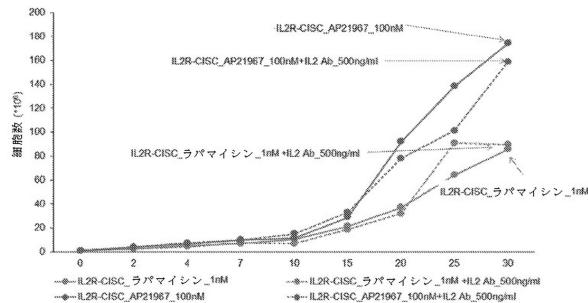


【図 18】

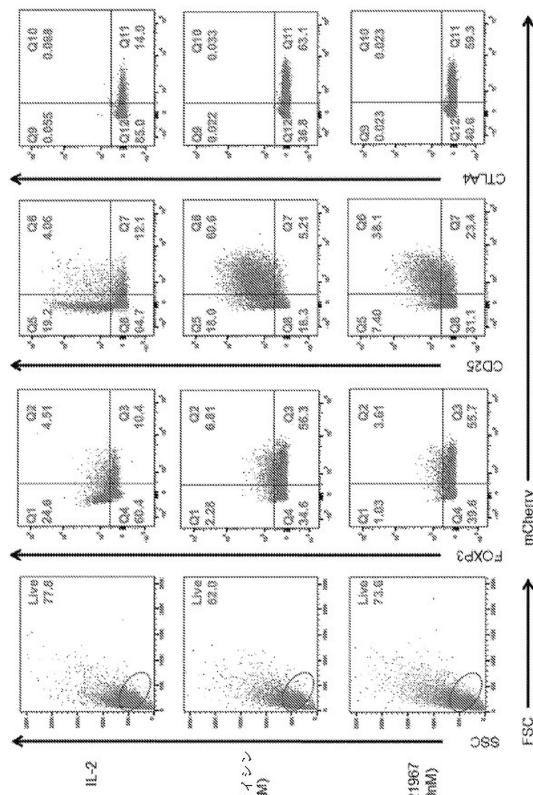


50

【図19】



【 図 2 0 】



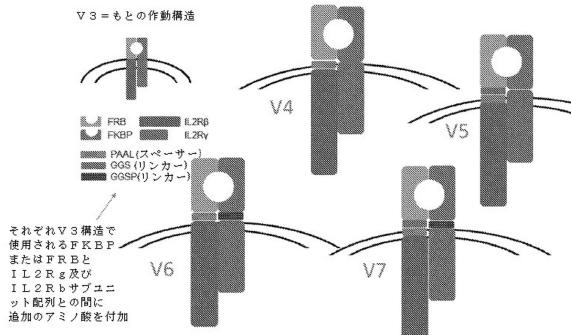
10

20

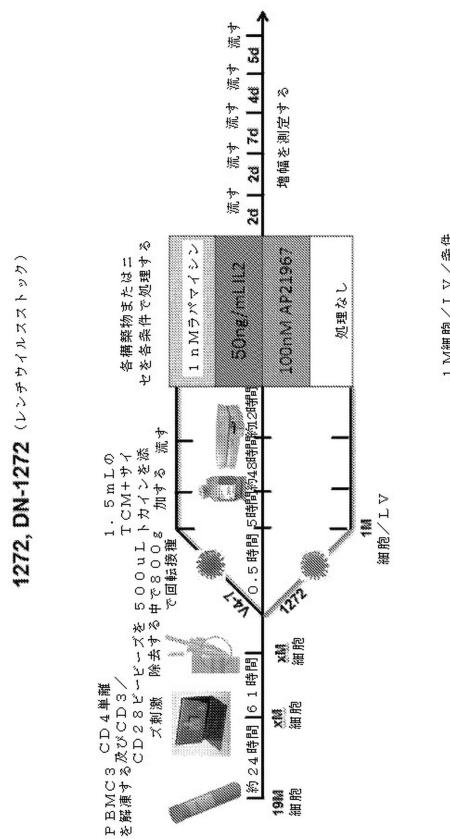
30

40

【図21】

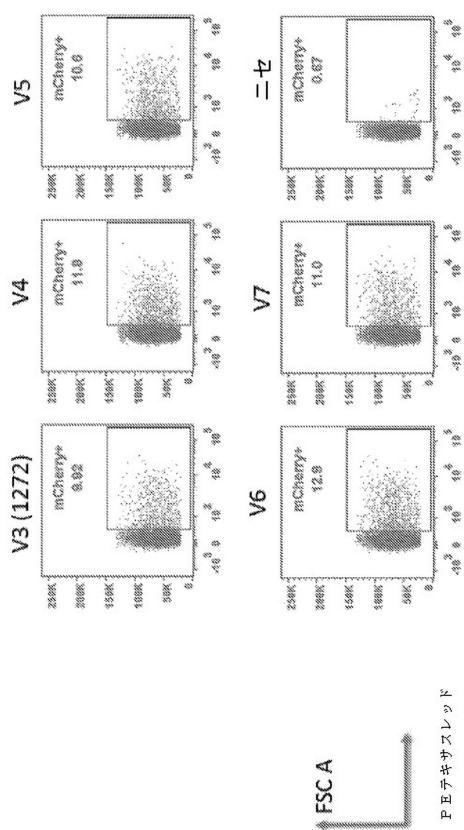


【 図 2 2 】

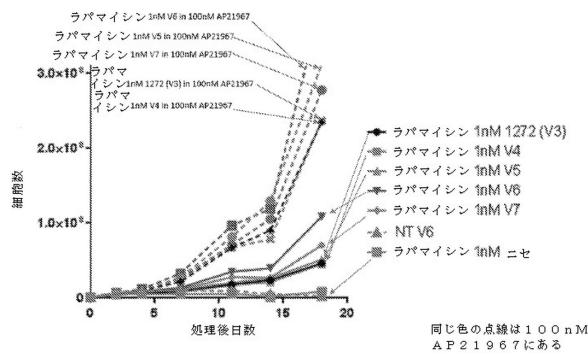


50

【図 2 3】

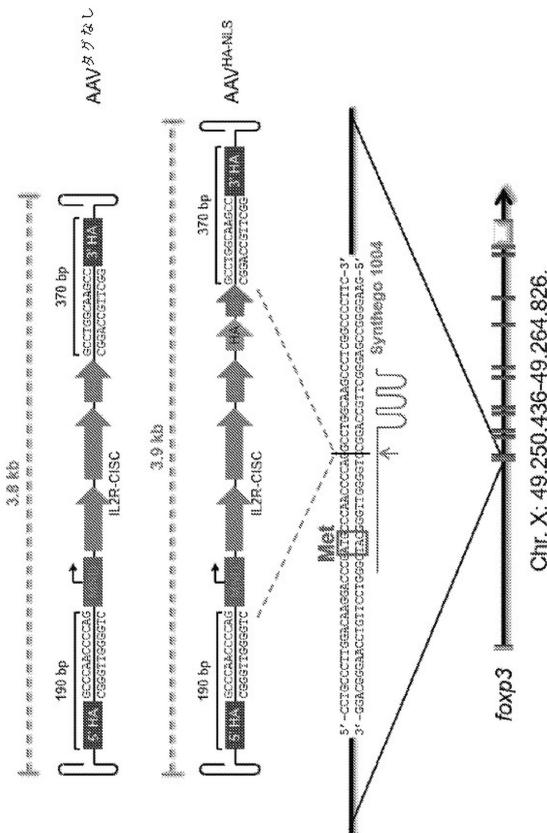


【図 2 4】

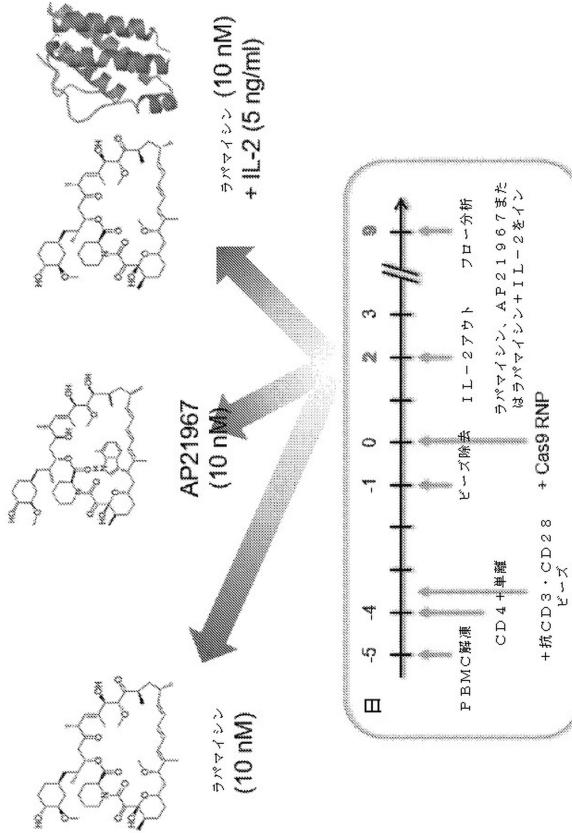


10

【図 2 5】



【図 2 6】



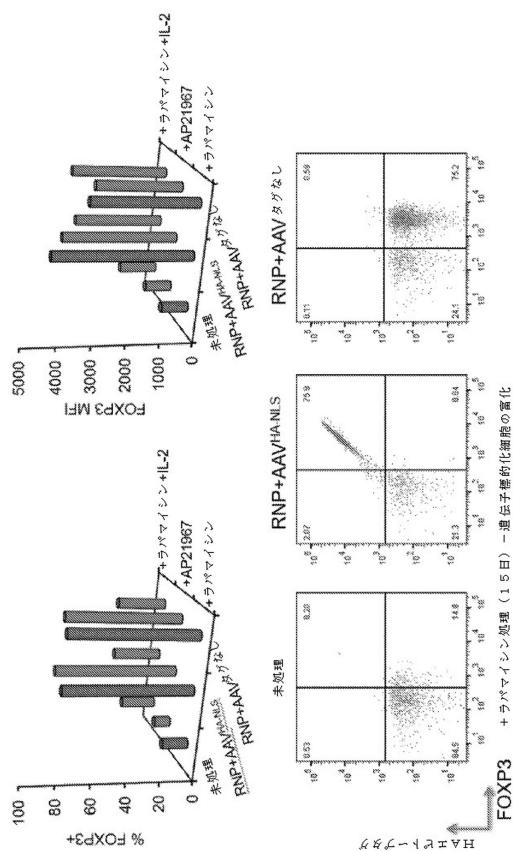
20

30

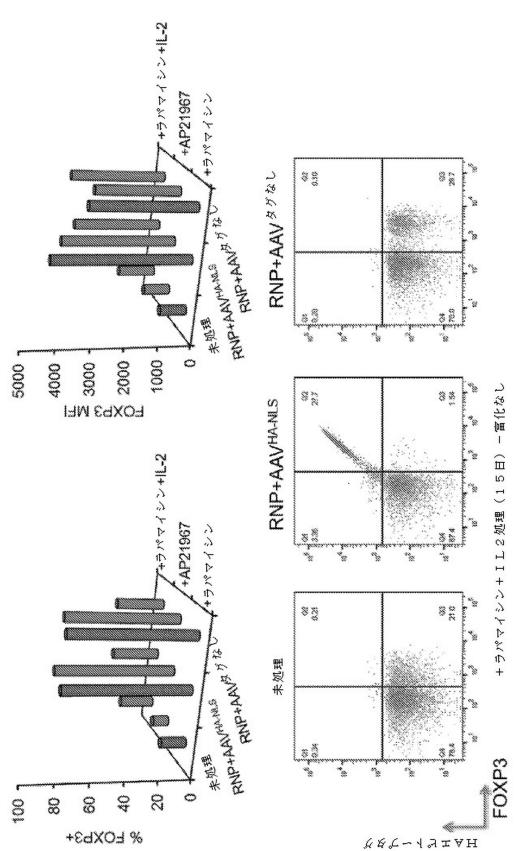
40

50

【図 2 7】



【図 2 8】



10

20

30

40

50

【配列表】

0007206214000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類

	F I		
C 12N 15/864 (2006.01)	C 12N	15/864	100Z
C 12N 15/867 (2006.01)	C 12N	15/867	Z
C 12N 5/10 (2006.01)	C 12N	5/10	
C 12Q 1/02 (2006.01)	C 12Q	1/02	

(56)参考文献 国際公開第2016/098078 (WO, A2)

特表2015-513394 (JP, A)

特表2002-508971 (JP, A)

国際公開第2016/127257 (WO, A1)

国際公開第2015/090229 (WO, A1)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 12N 15/00 - 90

C 07K

C 12Q

MEDLINE / EMBASE / BIOSIS / CAPLUS / REGISTRY (ST
N)

JSTPlus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamIII)