

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6836516号  
(P6836516)

(45) 発行日 令和3年3月3日(2021.3.3)

(24) 登録日 令和3年2月9日(2021.2.9)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N 15/09	(2006.01)	C 12 N	15/09	Z N A Z
C 12 N 1/15	(2006.01)	C 12 N	1/15	
C 12 N 1/19	(2006.01)	C 12 N	1/19	
C 12 N 1/21	(2006.01)	C 12 N	1/21	
C 12 N 5/10	(2006.01)	C 12 N	5/10	

請求項の数 18 (全 25 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-555767 (P2017-555767)  
 (86) (22) 出願日 平成28年4月26日 (2016.4.26)  
 (65) 公表番号 特表2018-514209 (P2018-514209A)  
 (43) 公表日 平成30年6月7日 (2018.6.7)  
 (86) 國際出願番号 PCT/GB2016/051165  
 (87) 國際公開番号 WO2016/174409  
 (87) 國際公開日 平成28年11月3日 (2016.11.3)  
 審査請求日 平成31年2月26日 (2019.2.26)  
 (31) 優先権主張番号 1507108.7  
 (32) 優先日 平成27年4月27日 (2015.4.27)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
 英国(GB)

(73) 特許権者 507299817  
 ユーシーエル ビジネス リミテッド  
 イギリス国 ダブリュー1ティー 4ティ  
 ーピー ロンドン, トッテナム コート  
 ロード 97, ザ ネットワーク ビ  
 ルディング  
 (74) 代理人 100078282  
 弁理士 山本 秀策  
 (74) 代理人 100113413  
 弁理士 森下 夏樹  
 (74) 代理人 100181674  
 弁理士 飯田 貴敏  
 (74) 代理人 100181641  
 弁理士 石川 大輔

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 核酸構築物

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

次の構造：

A - X - B

を含む核酸構築物であって、

式中

A は、第 1 のシグナルペプチドを含む第 1 のポリペプチドをコードする核酸配列であり、  
前記第 1 のシグナルペプチドは、n 領域および c 領域が隣接した疎水性コア領域 (h 領域)  
を含む三要素構造を有し； B は、第 2 のシグナルペプチドを含む第 2 のポリペプチドを  
コードする核酸配列であり、前記第 2 のシグナルペプチドは、n 領域および c 領域が隣接  
した疎水性コア領域 (h 領域) を含む三要素構造を有し； X は切断部位をコードする核酸  
配列であり、

前記第 1 のシグナルペプチドまたは前記第 2 のシグナルペプチドは、同じ配列に由来する  
が、一方のシグナルペプチドが他方のシグナルペプチドと比較して前記 h 領域において 1  
つまたは複数の疎水性アミノ酸を除去 / 置き換えるように 1 つまたは複数の欠失 / 置換を  
前記 h 領域に含み、それによってより少ない疎水性アミノ酸を前記 h 領域において有し、  
前記第 1 のシグナルペプチドおよび前記第 2 のシグナルペプチドは、実質的に同じ n 領域  
および c 領域を有する、

核酸構築物。

## 【請求項 2】

10

前記疎水性アミノ酸（複数可）が、群：アラニン（A）；バリン（V）；イソロイシン（I）；ロイシン（L）；メチオニン（M）；フェニルアラニン（P）；チロシン（Y）；トリプトファン（W）から選択される、請求項1に記載の核酸構築物。

【請求項3】

前記疎水性アミノ酸（複数可）が、群：バリン（V）；イソロイシン（I）；ロイシン（L）；およびトリプトファン（W）から選択される、請求項2に記載の核酸構築物。

【請求項4】

一方のシグナルペプチドが、他方のシグナルペプチドよりも最大で5つ多い疎水性アミノ酸を含む、請求項1から3のいずれか一項に記載の核酸構築物。

【請求項5】

前記第1のポリペプチドおよび前記第2のポリペプチドが、両方とも膜貫通タンパク質である、請求項1から4のいずれか一項に記載の核酸構築物。

【請求項6】

前記第1の膜貫通タンパク質および前記第2の膜貫通タンパク質が、両方ともキメラ抗原受容体（CAR）である、請求項5に記載の核酸構築物。

【請求項7】

前記第1のシグナルペプチドと前記第2のシグナルペプチドとの間の差異が、前記核酸構築物が細胞中で発現される場合に細胞表面での前記第1のポリペプチドおよび前記第2のポリペプチドの相対発現に差異が生じるような差異である、請求項5または6に記載の核酸構築物。

【請求項8】

Xが、自己切断ペプチド、フューリン切断部位またはタバコエッチウイルス切断部位をコードする核酸配列である、請求項1から7のいずれか一項に記載の核酸構築物。

【請求項9】

Xが、アフトもしくはカルジオウイルス由来2A自己切断ペプチドまたは2A様ペプチドをコードする、請求項8に記載の核酸構築物。

【請求項10】

請求項1から9のいずれか一項に記載の核酸構築物を含むベクター。

【請求項11】

請求項10に記載の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。

【請求項12】

請求項1から9のいずれか一項に記載の核酸構築物または請求項10または11に記載のベクターを含む細胞。

【請求項13】

異なるシグナルペプチドを有する2つのキメラ抗原受容体を含む細胞であって、前記シグナルペプチドは、n領域およびc領域が隣接した疎水性コア領域（h領域）を含む三要素構造を有し、前記シグナルペプチドは、前記h領域において異なる数の疎水性アミノ酸を有し、実質的に同じn領域およびc領域を有し、より多い数の疎水性アミノ酸を前記h領域に含むシグナルペプチドを有するキメラ抗原受容体が、より少ない数の疎水性アミノ酸を前記h領域に含むシグナルペプチドを有するキメラ抗原受容体よりも細胞表面で高度に発現される、細胞。

【請求項14】

異なるシグナルペプチドを有する2つのキメラ抗原受容体を含む細胞であって、前記シグナルペプチドは、n領域およびc領域が隣接した疎水性コア領域（h領域）を含む三要素構造を有し、一方のキメラ抗原の前記シグナルペプチドが、前記h領域においてより少ない疎水性アミノ酸を有するように1つまたは複数の欠失/置換を前記h領域に含み、前記シグナルペプチドは、実質的に同じn領域およびc領域を有する、細胞。

【請求項15】

変異されたシグナルペプチドを有する前記キメラ抗原受容体が、変異されていないシグナルペプチドを有する前記キメラ抗原受容体よりも細胞表面で低いレベルで発現される、

10

20

30

40

50

請求項 1 4 に記載の細胞。

【請求項 1 6】

T 細胞またはナチュラルキラー (NK) 細胞である、請求項 1 2 から 1 5 のいずれかに記載の細胞。

【請求項 1 7】

請求項 1 から 9 のいずれかに記載の核酸構築物または請求項 1 0 もしくは 1 1 に記載のベクターを単離された細胞に導入するステップを含む、請求項 1 2 から 1 6 のいずれかに記載の細胞を作製するための方法。

【請求項 1 8】

一方のタンパク質のシグナルペプチドをコードする核酸配列において、他方のタンパク質のシグナルペプチドと比較して 1 つまたは複数の疎水性アミノ酸を除去または置き換えるために 1 つまたは複数の疎水性アミノ酸を欠失 / 置換させる ステップを含む、第 2 のタンパク質を伴って单一の核酸構築物から発現される第 1 のタンパク質の相対的な細胞表面発現を調節するための方法であって、前記シグナルペプチドは、n 領域および c 領域が隣接した疎水性コア領域 (h 領域) を含む三要素構造を有し、前記 1 つまたは複数の疎水性アミノ酸の前記欠失 / 置換は、前記 h 領域におけるものであり、前記シグナルペプチドは、実質的に同じ n 領域および c 領域を有する、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

10

本発明は、单一のベクターから共発現されるポリペプチドの相対発現を調節するための構築物および手法に関する。具体的には本発明は、第 2 のポリペプチドを伴って单一のベクターから共発現される膜貫通タンパク質の発現を調節することに関する。

【背景技術】

【0002】

20

同じ細胞の複数回の形質導入が困難で費用がかかり予測不可能であることから、異なるタンパク質を同じベクターから発現することがしばしば望ましい。したがってさまざまな方法が单一のベクターからの 2 つのタンパク質の共発現を可能にするために開発された (図 1 を参照されたい)。

【0003】

30

最初の試みは、同じカセット内の 2 つの異なるプロモーターを使用した。これは、別々のタンパク質をそれぞれコードする 2 つの別々の転写物をもたらす。これは、多くの原因により困難な手法である。重要な課題は、一方のプロモーターが優位になり、第 2 のプロモーターのサイレンシングを生じる「プロモーター干渉」である。加えて異なるプロモーターは、異なる細胞コンテキストにおいて異なって作動し、これは各導入遺伝子の相対的発現の調和のとれた「調整」を達成することを困難にする。

【0004】

代替的手法は、配列内リボソーム侵入配列 (Internal Ribosome Entry Sequence) (IRES) を使用することである。ここで单一の転写物が生成される。転写物中の IRES 配列は、2 つの導入遺伝子のオープンリーディングフレームの間に置かれ、mRNA キャップ構造を模倣する。それによりリボソームは、5' キャップまたは IRES のいずれかで翻訳を開始し、2 つの別々のタンパク質の発現をもたらす。この手法の重要な制限は、相対的発現を制御できないことである。3' 転写物は、典型的には 5' のものより少なく発現されるが、発現の比を予測および調整することは困難である。

【0005】

さらなる手法は、口蹄疫ウイルス (FMDV) (および関連ウイルス) が单一のオープンリーディングフレーム (ORF) から複数のタンパク質を発現できるようにする口蹄疫ウイルス (FMDV) 2A ペプチドの役割の特徴付けに続いて提供された (Donnelly ら; J. Gen. Virol.; 82巻、1027 ~ 1041 頁 (2001 年))。2A ペプチド (お

40

50

およびホモログ)は、ORFの翻訳直後に非常に高い効率で切断され、単一のORFからの複数のペプチドの発現を可能にする。同じORF中の異なるペプチド間で切断する2Aペプチドの使用に伴う課題は、発現が1:1の比に限定されることである。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Donnellyら、J. Gen. Virol. (2001年)；82巻、1027～1041頁

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

10

【0007】

したがって、上に記載の不利益を伴わずに単一のベクターから1つより多いタンパク質を発現するための代替方法が必要である。

【0008】

本発明は、2つのシグナルペプチド含有タンパク質が翻訳後に切断されるポリタンパク質として共発現される場合に、シグナルペプチドの相対「強度」を改変することが可能であり、それにより2つのタンパク質の相対発現を制御できるという測定に基づいている。これは導入遺伝子の対に限定される必要はなく、ポリタンパク質として最初に翻訳される複数のタンパク質の相対発現の制御を可能にするために使用されてよい。

【0009】

20

本明細書において使用される「ポリタンパク質」は、単一の核酸構築物から単一の実体として翻訳されるが、次いで分離され、別々の実体(例えば別々のタンパク質)として機能するポリペプチド配列を含むポリペプチド配列を指す。

【0010】

したがって第一態様では本発明は、次の構造：

A-X-B

を含む核酸構築物であって、

式中

Aは、第1のシグナルペプチドを含む第1のポリペプチドをコードする核酸配列であり；

Bは、第2のシグナルペプチドを含む第2のポリペプチドをコードする核酸配列であり、

30

Xは切断部位をコードする核酸配列であり、

第1のシグナルペプチドまたは第2のシグナルペプチドが、より少ない疎水性アミノ酸を有するように1つまたは複数の変異(複数可)を含む、

核酸構築物を提供する。

【0011】

変異されたシグナルペプチドは、それが由来する「野生型」シグナルペプチド配列よりも少ない疎水性アミノ酸を有してよい。

【0012】

変異されたシグナルペプチドは、他のポリペプチドのシグナルペプチドよりも少ない疎水性アミノ酸を有してよい。

40

【0013】

疎水性アミノ酸(複数可)は、群：アラニン(A)；バリン(V)；イソロイシン(I)；ロイシン(L)；メチオニン(M)；フェニルアラニン(P)；チロシン(Y)；トリプトファン(W)から選択されてよい。

【0014】

第1のシグナルペプチドおよび第2のシグナルペプチドは同じ配列に由来してよいが、一方のシグナルペプチドは他方のシグナルペプチドと比較して1つまたは複数の疎水性アミノ酸を除去または置き換えるように1つまたは複数のアミノ酸欠失または置換を含んでよい。

【0015】

50

下により詳細に説明のとおり、シグナル配列は、n および c 領域が隣接した疎水性コア領域 (h 領域) からなる三要素構造 (tripartite structure) を有する。第 1 のシグナルペプチドおよび第 2 のシグナルペプチドは、同一の n および c 領域を有してよいが、h 領域において異なっていてよく：一方のシグナルペプチドの h 領域は、他方のシグナルペプチドよりも多い疎水性アミノ酸を有する。

【0016】

シグナルペプチドから欠失または置き換えられる疎水性アミノ酸（複数可）は、群：アラニン (A)；バリン (V)；イソロイシン (I)；ロイシン (L)；メチオニン (M)；フェニルアラニン (P)；チロシン (Y)；トリプトファン (W) から選択されてよい。

10

【0017】

シグナルペプチドから欠失または置き換えられる疎水性アミノ酸（複数可）は、群：バリン (V)；イソロイシン (I)；ロイシン (L)；およびトリプトファン (W) から選択されてよい。

【0018】

一方のポリペプチドのシグナルペプチドは、他方のシグナルペプチドよりも最大で 5 つ多い疎水性アミノ酸を含んでよい。変更されたシグナルペプチドは、その疎水性アミノ酸の 10 %まで、20 %まで、30 %まで、40 %までまたは 50 %までが置き換えられてよい、または除去されてよい。

【0019】

第 1 のおよび第 2 のポリペプチドは、分泌性タンパク質、膜貫通タンパク質または小器官タンパク質などのシグナルペプチド含有ポリペプチドであってよい。本発明は、タンパク質の相対発現、すなわち関連コンパートメントでのタンパク質の相対量を制御できるようにする。分泌性タンパク質について本発明は、細胞によって産生されるタンパク質の相対量を制御できるようにする。膜貫通タンパク質について、本発明は、2 つ（またはそれより多い）タンパク質の相対的な細胞表面発現を制御できるようにする。小器官タンパク質について、本発明は、問題の小器官の内、またはその膜上のタンパク質の相対発現を制御できるようにする。

20

【0020】

第 1 のおよび第 2 のポリペプチドは、両方とも T 細胞受容体またはキメラ抗原受容体 (CAR) などの膜貫通タンパク質であってよい。

30

【0021】

第 1 のおよび第 2 のタンパク質が膜貫通タンパク質である場合、第 1 のおよび第 2 のシグナルペプチドの間の差異は、核酸構築物が細胞内で発現される場合に細胞表面での第 1 のおよび第 2 のポリペプチドの相対発現に差異が生じるようなものであってよい。

【0022】

X は、自己切断ペプチド、フューリン切断部位またはタバコエッチウイルス切断部位をコードする核酸配列であってよい。

【0023】

X は、例えば、アフトもしくはカルジオウイルス由来 2A 自己切断ペプチドまたは 2A 様ペプチドをコードしてよい。

40

【0024】

第二の態様では本発明は、前記請求項のいずれかに記載の核酸構築物を含むベクターを提供する。

【0025】

ベクターは、例えば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ってよい。

【0026】

第三の態様では、本発明の第一の態様による核酸構築物または本発明の第二の態様によるベクター含む細胞が提供される。

50

## 【0027】

この第三の態様では、異なるシグナルペプチドを有する2つのキメラ抗原受容体を含む細胞も提供される。

## 【0028】

2つのシグナルペプチドは、異なる数の疎水性アミノ酸を有してよい。

## 【0029】

この態様では、より多い数の疎水性アミノ酸を含むシグナルペプチドを有するキメラ抗原受容体は、より少ない数の疎水性アミノ酸を含むシグナルペプチドを有するキメラ抗原受容体よりも細胞表面で高度に発現されてよい。

## 【0030】

10

異なるシグナルペプチドを有する2つのキメラ抗原受容体を含む細胞も提供され、一方のキメラ抗原のシグナルペプチドはより少ない疎水性アミノ酸を有するように1つまたは複数の変異を含む。

## 【0031】

変異されたシグナルペプチドを有するキメラ抗原受容体は、変異されていないシグナルペプチドを有するキメラ抗原受容体よりも細胞表面で低いレベルで発現されてよい。

## 【0032】

細胞は、T細胞またはナチュラルキラー（NK）細胞などの細胞溶解性免疫細胞であつてよい。

## 【0033】

20

第四の態様では、本発明の第一の態様による核酸構築物または本発明の第二の態様によるベクターを細胞に導入するステップを含む、本発明の第四の態様による細胞を作製するための方法が提供される。

## 【0034】

第五の態様では、一方のタンパク質のシグナルペプチドをコードする核酸配列を、他方のタンパク質のシグナルペプチドと比較して1つまたは複数の疎水性アミノ酸を除去または置き換えるために、変異させるステップを含む、単一の核酸構築物から第2のシグナルペプチド含有タンパク質を伴って発現される第1のシグナルペプチド含有タンパク質の相対的な細胞表面発現を調節するための方法が提供される。

## 【0035】

30

膜貫通タンパク質のシグナルペプチドからの疎水性アミノ酸の除去または置き換えは、未改変シグナルペプチドを有する膜貫通タンパク質と比較して、細胞表面上に発現される膜貫通タンパク質の量を低減する。そのように第2のポリペプチドを含むポリタンパク質由来の膜貫通タンパク質の相対発現レベルは、調節され得る。膜貫通タンパク質が細胞表面でだけ活性（または細胞表面で主に活性）である場合、タンパク質の相対的な細胞表面発現を低減すると、その相対活性も低減される。

## 【0036】

本発明は、連結されたポリペプチドとして発現され、切断部位によって分離される3つまたはそれを超えるタンパク質の相対発現およびさまざまな活性のシグナルシグナルによって決定される相対表面発現を調節するために拡張されてよい。

40

本発明は、例えば、以下の項目を提供する。

(項目1)

次の構造：

A - X - B

を含む核酸構築物であつて、

式中

Aは、第1のシグナルペプチドを含む第1のポリペプチドをコードする核酸配列であり；

Bは、第2のシグナルペプチドを含む第2のポリペプチドをコードする核酸配列であり、

Xは切断部位をコードする核酸配列であり、

前記第1のシグナルペプチドまたは前記第2のシグナルペプチドは、より少ない疎水性ア

50

ミノ酸を有するように 1 つまたは複数の変異 (複数可) を含む、核酸構築物。

(項目 2)

前記第 1 のシグナルペプチドおよび前記第 2 のシグナルペプチドと同じ配列に由来するが、一方のシグナルペプチドが他方のシグナルペプチドと比較して 1 つまたは複数の疎水性アミノ酸を除去 / 置き換えるように 1 つまたは複数のアミノ酸欠失 / 置換を含む、項目 1 に記載の核酸構築物。

(項目 3)

前記疎水性アミノ酸 (複数可) が、群 : アラニン (A) ; バリン (V) ; イソロイシン (I) ; ロイシン (L) ; メチオニン (M) ; フェニルアラニン (P) ; チロシン (Y) ; トリプトファン (W) から選択される、項目 2 に記載の核酸構築物。

10

(項目 4)

前記疎水性アミノ酸 (複数可) が、群 : バリン (V) ; イソロイシン (I) ; ロイシン (L) ; およびトリプトファン (W) から選択される、項目 3 に記載の核酸構築物。

(項目 5)

一方のシグナルペプチドが、他方のシグナルペプチドよりも最大で 5 つ多い疎水性アミノ酸を含む、前記項目のいずれかに記載の核酸構築物。

(項目 6)

前記第 1 のポリペプチドおよび前記第 2 のポリペプチドが、両方とも膜貫通タンパク質である、前記項目のいずれかに記載の核酸構築物。

20

(項目 7)

前記第 1 の膜貫通タンパク質および前記第 2 の膜貫通タンパク質が、両方ともキメラ抗原受容体 (CAR) である、項目 6 に記載の核酸構築物。

(項目 8)

前記第 1 のシグナルペプチドと前記第 2 のシグナルペプチドとの間の差異が、前記核酸構築物が細胞中で発現される場合に細胞表面での前記第 1 のポリペプチドおよび前記第 2 のポリペプチドの相対発現に差異が生じるような差異である、項目 6 または 7 に記載の核酸構築物。

(項目 9)

X が、自己切断ペプチド、フューリン切断部位またはタバコエッチウイルス切断部位をコードする核酸配列である、前記項目のいずれかに記載の核酸構築物。

30

(項目 10)

X が、アフトもしくはカルジオウイルス由来 2A 自己切断ペプチドまたは 2A 様ペプチドをコードする、項目 9 に記載の核酸構築物。

(項目 11)

前記項目のいずれかに記載の核酸構築物を含むベクター。

(項目 12)

項目 11 に記載の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。

(項目 13)

項目 1 から 10 のいずれか一項に記載の核酸構築物または項目 11 または 12 に記載のベクターを含む細胞。

40

(項目 14)

異なる数の疎水性アミノ酸を有する異なるシグナルペプチドを有する 2 つのキメラ抗原受容体を含む細胞であって、より多い数の疎水性アミノ酸を含むシグナルペプチドを有するキメラ抗原受容体が、より少ない数の疎水性アミノ酸を含むシグナルペプチドを有するキメラ抗原受容体よりも細胞表面で高度に発現される、細胞。

(項目 15)

異なるシグナルペプチドを有する 2 つのキメラ抗原受容体を含む細胞であって、一方のキメラ抗原の前記シグナルペプチドが、より少ない疎水性アミノ酸を有するように 1 つまたは複数の変異を含む、細胞。

50

(項目16)

変異されたシグナルペプチドを有する前記キメラ抗原受容体が、変異されていないシグナルペプチドを有する前記キメラ抗原受容体よりも細胞表面で低いレベルで発現される、項目15に記載の細胞。

(項目17)

T細胞またはナチュラルキラー(NK)細胞である、項目13から16のいずれかに記載の細胞。

(項目18)

項目1から10のいずれかに記載の核酸構築物または項目11もしくは12に記載のベクターを細胞に導入するステップを含む、項目13から17のいずれかに記載の細胞を作製するための方法。

10

(項目19)

一方のタンパク質のシグナルペプチドをコードする核酸配列を、他方のタンパク質のシグナルペプチドと比較して1つまたは複数の疎水性アミノ酸を除去または置き換えるために変異させるステップを含む、第2のタンパク質を伴って単一の核酸構築物から発現される第1のタンパク質の相対的な細胞表面発現を調節するための方法。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0037】

【図1】図1は、同じベクターから異なるタンパク質を発現するために利用される方法を示す図であり、(a)同じカセット内の2つの異なるプロモーターは、それぞれ別々のタンパク質をもたらす2つの異なる転写物を生じる。(b)配列内リボソーム侵入配列(IRES)の使用は、2つの別々のタンパク質に翻訳される単一の転写物をもたらす。(c)FMDV2Aペプチドの使用は、迅速に2つの別々のタンパク質に切断される単一の転写物および単一のポリタンパク質を生じる。

20

## 【0038】

【図2】図2は、タンパク質標的化におけるシグナル配列の機能を例示する模式図である。

## 【0039】

【図3】図3は、2つのCARをコードする核酸構築物の模式図である。

## 【0040】

30

【図4】図4は、置換されたシグナル配列の機能を検証する図である。PCT/GB2014/053452は、2つのキメラ抗原受容体(CAR)(1つはCD19に対するおよびもう1つはCD33に対する)をコードするベクター系を記載している。本研究においてCARのために使用されたシグナルペプチドは、ヒトCD8aシグナル配列由来のシグナルペプチドであった。本研究の目的のために、これは、配列：

## 【化1】

METDTLILWVLLLLVPGSTG

(疎水性残基は太字で強調されている)を有するマウスIgカッパ鎖V-I I I領域由来のシグナルペプチドで置換された。マウスIgカッパ鎖V-I I Iシグナル配列がヒトCD8a由来のシグナル配列と同様に機能することを確立するために比較研究が実施された。両シグナル配列について、抗CD33CARおよび抗CD19CARの機能的発現が観察された。

40

## 【0041】

【図5】図5は、マウスIgカッパ鎖V-I I I中の1アミノ酸欠失の効果の検査を示す図である。変異体1カッパ鎖は、次の欠失(灰色で示す)をh領域

## 【化2】

METDTILWVLLLLVPGSTG

中に有して作製され、抗CD33CARおよび抗CD19CARでの相対発現が観察された。

50

## 【0042】

【図6】図6は、マウスIgカッパ鎖V-I I I中の2アミノ酸欠失の効果の検査を示す図である。変異体2カッパ鎖は、次の欠失（灰色で示す）をh領域

## 【化3】

METDT~~I~~LWV~~LL~~VPGSTG

中に有して作製され、抗CD33CARおよび抗CD19CARでの相対発現が観察された。

## 【0043】

【図7】図7は、マウスIgカッパ鎖V-I I I中の3アミノ酸欠失の効果の検査を示す図である。変異体2カッパ鎖は、次の欠失（灰色で示す）をh領域

10

## 【化4】

METDT~~I~~LWV~~LLL~~VPGSTG

中に有して作製され、抗CD33CARおよび抗CD19CARでの相対発現が観察された。

## 【0044】

【図8】図8は、マウスIgカッパ鎖V-I I I中の5アミノ酸欠失の効果の検査を示す図である。変異体2カッパ鎖は、次の欠失（灰色で示す）をh領域

## 【化5】

METDT~~I~~LWV~~LLL~~VPGSTG

20

中に有して作製され、抗CD33CARおよび抗CD19CARでの相対発現が観察された。

## 【発明を実施するための形態】

## 【0045】

本発明は、次の構造：

A-X-B

を含む核酸構築物であって、

式中

Aは、第1のシグナルペプチドを含む第1のポリペプチドをコードする核酸配列であり；

Bは、第2のシグナルペプチドを含む第2のポリペプチドをコードする核酸配列であり、

30

Xは切断部位をコードする核酸配列であり、

第1のシグナルペプチドまたは第2のシグナルペプチドが、より少ない疎水性アミノ酸を有するように1つまたは複数の変異（複数可）を含む、

核酸構築物を提供する。

## 【0046】

核酸構築物

ポリペプチド

本発明の核酸構築物により作製されるポリペプチドは、分泌性タンパク質、膜貫通タンパク質または小器官タンパク質などのシグナルペプチド含有ポリペプチドである。

## 【0047】

40

シグナルペプチド

本発明の核酸構築物によってコードされるポリペプチドAおよびB（ならびに任意選択で他にC、Dなど）は、ポリペプチドが細胞内で発現される場合に新生タンパク質が小胞体（ER）へと方向付けられるように、それぞれシグナル配列を含んでよい（図2aを参照されたい）。

## 【0048】

用語「シグナルペプチド」は、「シグナル配列」と同義である。

## 【0049】

シグナルペプチドは、短いペプチド、通常5～30アミノ酸長であり、分泌経路に向かうことになる大部分の新たに合成されたタンパク質のN末端に存在する。これらのタンパ

50

ク質は、ある特定の 小器官 ( 例えは小胞体、ゴルジまたはエンドソーム ) のいずれかの内側に存在するもの、細胞から分泌されるものおよび膜貫通タンパク質を含む。

【 0 0 5 0 】

シグナルペプチドは、単一のアルファヘリックスを形成する傾向を有する疎水性アミノ酸の長いストレッチであるコア配列を通常含有する。シグナルペプチドは、トランスロケーションの際にポリペプチドの適切なトポロジーを強化することに役立つ正に荷電したアミノ酸の短いストレッチで始まる場合がある。シグナルペプチドの末端にシグナルペプチダーゼによって認識および切断されるアミノ酸のストレッチが典型的にはある。シグナルペプチダーゼは、トランスロケーションの際またはその完了後のいずれかで切断し、遊離シグナルペプチドおよび成熟タンパク質を生成することができる。次いで遊離シグナルペプチドは、特異的プロテアーゼによって消化される。

【 0 0 5 1 】

シグナルペプチドは、分子のアミノ末端に通常位置するが、一部のカルボキシ末端シグナルペプチドが公知である。

【 0 0 5 2 】

上述のとおり、シグナル配列は、n および c 領域が隣接する疎水性コア領域 ( h 領域 ) からなる三要素構造を有する。後者は、シグナルペプチダーゼ ( S P a s e ) コンセンサス切断部位を含有する。通常、シグナル配列は翻訳と同時に切断され、生じた切断型シグナル配列はシグナルペプチドと称される。

【 0 0 5 3 】

配列 :

【 化 6 】

METDTLILWVLLLLVPGSTG

を有するマウス Ig カッパ鎖 V - I I I 領域由来のシグナルペプチドでは、n 領域は配列

【 化 7 】

METD

を有し； h 領域 ( 太字で示されている ) は配列

【 化 8 】

TLILWVLLLLV

を有し； c 領域は配列

【 化 9 】

PGSTG

を有する。

【 0 0 5 4 】

本発明の核酸構築物では、2つ ( またはそれを超える ) ポリペプチドのシグナル配列はそれらの h 領域において異なっている。一方の ( より高い相対発現を有する ) ポリペプチドは、他方の ( より低い相対発現を有する ) ポリペプチドよりも h 領域中により多い数の疎水性アミノ酸を有する。より低い相対発現を有するポリペプチドのシグナルペプチドは、より低い相対発現を有するポリペプチドのシグナルペプチドよりも、h 領域中の疎水性アミノ酸の置換または欠失などの1つまたは複数のアミノ酸変異を含んでよい。

【 0 0 5 5 】

第1のシグナルペプチドおよび第2のシグナルペプチドは、実質的に同じ n および c 領域を含んでよいが、上に説明のとおり h 領域において異なり得る。「実質的に同じ」は、n および c 領域が第1のシグナルペプチドと第2のシグナルペプチドとの間で同一であつてよい、またはシグナルペプチドの機能に影響を与えることなく n もしくは c 鎖において1、2 もしくは 3 アミノ酸だけ異なつていてよいことを示している。

【 0 0 5 6 】

コア中の疎水性アミノ酸は、例えは：アラニン ( A ) ；バリン ( V ) ；イソロイシン (

10

20

30

40

50

I) ; ロイシン (L) ; メチオニン (M) ; フェニルアラニン (P) ; チロシン (Y) ; またはトリプトファン (W) であってよい。

【0057】

シグナルペプチド効率を変更するために変異される疎水性アミノ酸は、上記リスト、具体的には：バリン (V) ; イソロイシン (I) ; ロイシン (L) ; およびトリプトファン (W) のいずれであってもよい。

【0058】

h 領域中の残基の内、一方のシグナルペプチド（例えば変更されたシグナルペプチド）は、他方のシグナルペプチド（例えば変更されていないシグナルペプチド）より少なくとも 10 %、20 %、30 %、40 % または 50 % 少ない疎水性アミノ酸を含んでよい。

10

【0059】

h 領域が 5 ~ 15 アミノ酸を含む場合、一方のシグナルペプチドは、他方のシグナルペプチドより 1 つ、2 つ、3 つ、4 つまたは 5 つ多い疎水性アミノ酸を含んでよい。

【0060】

変更されたシグナルペプチドは、疎水性アミノ酸の 1 つ、2 つ、3 つ、4 つまたは 5 つのアミノ酸欠失または置換を含んでよい。疎水性アミノ酸は、親水性アミノ酸または中性アミノ酸などの非疎水性アミノ酸で置き換えられてよい。

【0061】

シグナル配列は、ソフトウェア技術（例えば、<http://www.predisi.de/> を参照されたい）を使用して検出または予測され得る。

20

【0062】

非常に多くのシグナル配列が公知であり、データベースで利用可能である。例えば、<http://www.signalpeptide.de/> は、2109 個の確認された哺乳動物のシグナルペプチドをそのデータベースに列挙している。

【0063】

表 1 は、単に例示的的目的のためにシグナル配列のリストを提供する。疎水性コアは太字で強調されている。これは、本発明の目的のために置換または除去されてよいアミノ酸の例を含んでいる。

【表 1 - 1】

表1

30

受託番号	登録名	タンパク質名	長さ	シグナル配列(疎水性コア)
P01730	CD4_HUMAN	T細胞表面糖タンパク質CD4	25	MNRGVFRHLLLVLQLALLPAATQG
P08575	CD45_HUMAN	白血球共通抗原	23	MYLWL <b>K</b> LLA <b>F</b> GF <b>A</b> FLD <b>T</b> E <b>V</b> FVTG
P01732	CD8A_HUMAN	T細胞表面糖タンパク質CD8アルファ鎖	21	MALPV <b>T</b> ALLLPL <b>A</b> LLHAARP
P10966	CD8B_HUMAN	T細胞表面糖タンパク質CD8ベータ鎖	21	MRPRLW <b>L</b> LLAAQLTVLHGNSV
P06729	CD2_HUMAN	T細胞表面抗原CD2	24	MSFPCK <b>F</b> VAS <b>F</b> LLIFNVSSKGAVS
P06127	CD5_HUMAN	T細胞表面糖タンパク質CD5	24	MPMGSLQPLATLYLLGMLVASCLG

【表1-2】

P09564	CD7_HUMAN	T細胞抗原CD7	25	MAGPPRLLLLPLLLALARGLPGALA
P17643	TYRPI_HUMAN	5,6-ジヒドロキシインドール-2-カルボン酸オキシダーゼ	24	MSAPKLLSLGCIFFPLLLQQARA
P00709	LALBA_HUMAN	アルファ-ラクトアルブミン	19	MRFFVPLFLVGILFPAILA
P16278	BGAL_HUMAN	ベータ-ガラクトシダーゼ	23	MPGFLVRLPLLLVLLLGPTRG
P31358	CD52_HUMAN	CAMPATH-1抗原	24	MKRFLFLLLTISLLVMVQIQTGLS
Q6YHK3	CD109_HUMAN	CD109抗原	21	MQGPPLLTAAFLLCVCTAALA
P01024	CO3_HUMAN	補体C3	22	MGPTSGPSLLLLLTHPLALG
P10144	GRAB_HUMAN	グランザイムB	18	MQPILLLAFLLLPRADA
P04434	KV310_HUMAN	Igカッパ鎖V-III領域VH	20	MEAPAAQLFLLLLWLPDTTR
P06312	KV401_HUMAN	Igカッパ鎖V-IV領域	20	MVLQTQVFISLLLWISGAYG
P06319	LV605_HUMAN	Igラムダ鎖V-VI領域EB4	19	MAWAPLLLTLAHLCTDCWA
P31785	IL2RG_HUMAN	サイトカイン受容体共通ガンマ鎖	22	MLKPSLPPFTSLLFLQLPLLGVG
Q8N4F0	BPIL1_HUMAN	殺菌性／透過性増強タンパク質様1	20	MAWASRLGLLLALLLPVVGA
P55899	FCGRN_HUMAN	IgG受容体FcRnラージサブユニットp51	23	MGVPRPQPWALGLLLFLLPGSLG

## 【0064】

変異されたシグナルペプチドは、それが由来する野生型シグナルペプチドよりも少ない疎水性アミノ酸を有するように、1つまたは複数の変異（複数可）を含む。用語「野生型」は、シグナルペプチドが由来する天然タンパク質に存在するシグナルペプチドの配列を意味する。例えば、実施例に記載のシグナルペプチドは、野生型配列：

## 【化10】

METDTLILWVLLLLVPGSTG

を有するマウスIgカッパ鎖V-III領域由来のシグナルペプチドである。

## 【0065】

用語「野生型」は、nまたはc領域に1つまたは複数のアミノ酸変異を含む天然に存在するタンパク質に由来するシグナルペプチドも含む。例えば天然シグナルペプチドを、制限部位を導入するためにN末端を保存的アミノ酸置換で改変することは一般的である。そのような改変シグナルペプチド配列（h領域にいかなる変異も含まない）は、本発明の目的のための「野生型」と考えられる。

## 【0066】

本発明は、野生型配列を参照して規定できない合成シグナルペプチド配列にも関する。本実施形態では、一方のポリペプチドのシグナルペプチドは、他方のポリペプチドのシグナル配列よりも少ない疎水性アミノ酸を含む。2つのシグナル配列は、同じ合成シグナルペプチド配列に由来してよいが、コア領域中の疎水性アミノ酸の数は異なり得る。

## 【0067】

## 膜貫通タンパク質

本発明は、膜貫通表面タンパク質の相対発現の調節を可能にする。膜貫通表面タンパク質は、細胞表面で発現されるタンパク質である。細胞表面で発現される場合、膜貫通タンパク質の少なくとも1つのドメインは外細胞質(exoplasmic)（すなわち細胞の外部）にある。

## 【0068】

膜貫通タンパク質は、1回貫通型膜貫通タンパク質であってよい、すなわち単一の膜貫通ドメインを含んでよい、または複数の膜貫通ドメインを含んでよい。

## 【0069】

膜貫通タンパク質は、トポロジーによって、すなわちNおよびC末端ドメインの位置に關して分類できる。I、IIおよびIII型膜貫通タンパク質が1回貫通型分子である一方で、IV型膜貫通タンパク質は複数回貫通型分子である。I型膜貫通タンパク質は輸送停止アンカー(stop-transfer anchor)配列で脂質膜に係留され、それらのN末端ドメインを合成の際にER内腔（および細胞外空間、成熟形態が細胞膜に位置する場合）へと標的化する。IIおよびIII型はシグナルアンカー配列で係留され、II型はC末端ドメ

10

20

30

40

50

インで E R 内腔へと標的化され、一方 I I I 型はそれらの N 末端ドメインが E R 内腔へと標的化されている。 I V 型は I V - A にさらに分類され、それらの N 末端ドメインはサイトゾルへと標的化され、 I V - B は内腔へと標的化された N 末端ドメインを有する。

#### 【 0 0 7 0 】

本発明の核酸構築物によって作製された本発明の膜貫通タンパク質（複数可）は、 I ~ I V 型のいずれかであってよい。

#### 【 0 0 7 1 】

膜貫通ドメインは、膜で熱力学的に安定である任意のタンパク質構造であってよい。これは、典型的にはいくつかの疎水性残基からなるアルファヘリックスである。任意の膜貫通タンパク質の膜貫通ドメインは、膜貫通部分を供給するために使用されてよい。タンパク質の膜貫通ドメインの存在および長さは TMHMM アルゴリズム (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) を使用して当業者によって決定され得る。さらに、タンパク質の膜貫通ドメインが比較的単純な構造、すなわち膜に及ぶ十分な長さの疎水性アルファヘリックスを形成すると予測されるポリペプチド配列であることを考慮すると、人工的に設計された TM ドメインも使用されてよい ( U S 7 0 5 2 9 0 6 B 1 は合成膜貫通構成成分を記載している)。

#### 【 0 0 7 2 】

膜貫通ドメインは、 C D 2 8 由来であってよく、良好な安定性をもたらす。

#### 【 0 0 7 3 】

20

I 型膜貫通タンパク質の構造およびプロセシングは、当技術分野において周知である。そのようなタンパク質は、典型的には細胞外ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞内エンドドメインを含み、細胞膜を通る単一の - ヘリックスを有する 1 回貫通型分子である。

#### 【 0 0 7 4 】

I 型膜貫通タンパク質は小胞体 ( E R ) によって迅速に認識されるシグナルペプチドを典型的には有し、したがって翻訳中のタンパク質は迅速に E R へと再方向付けされる。疎水性ヘリックスは、タンパク質を E R の膜にロックし、次いで係留する。

#### 【 0 0 7 5 】

上述のとおり I 型膜貫通タンパク質は、脂質膜に輸送停止アンカー配列で係留されている。輸送停止配列は、ポリペプチドのさらなるトランスロケーションを停止し、膜貫通アンカーとして作用する。

30

#### 【 0 0 7 6 】

本明細書において使用される用語 I 型膜貫通タンパク質は、 I 型膜貫通ドメインおよび輸送停止アンカー配列を含み、外因性細胞内保持シグナルの非存在下で細胞表面で発現されるように標的化されている任意のタンパク質を包含する。

#### 【 0 0 7 7 】

本発明における使用のために好適である種々の 1 型膜貫通タンパク質は、当技術分野において公知である。そのようなタンパク質として、これだけに限らないが抑制受容体、刺激受容体、サイトカイン受容体および G タンパク質が挙げられる。

#### 【 0 0 7 8 】

40

膜貫通タンパク質（複数可）は、 T 細胞受容体 または 鎖であってよい。

#### 【 0 0 7 9 】

膜貫通タンパク質（複数可）は、キメラ抗原受容体 ( C A R ) であってよい。

#### 【 0 0 8 0 】

C A R は、抗原結合ドメインを T 細胞のエフェクター機能に移植するタンパク質である。それらの通常形態は、 T 細胞生存および活性化シグナルを伝達する複合エンドドメインにすべて接続されている抗原認識アミノ末端、スペーサー、膜貫通ドメインを有する I 型膜貫通ドメインタンパク質のものである。

#### 【 0 0 8 1 】

抗原結合ドメインは、抗体もしくは抗体模倣物から誘導されてよく、またはリガンドな

50

ど抗原に特異的に結合する別の実体であってよい。

【0082】

これらの分子の最も一般的な形態は、標的抗原を認識するモノクローナル抗体から誘導され、スペーサーおよび膜貫通ドメインを介してシグナル伝達エンドドメインに融合されている1本鎖可変断片(s c F v)の融合体である。そのような分子は、その標的のs c F vによる認識に応答してT細胞の活性化を生じる。T細胞がそのようなCARを発現する場合、それらは標的抗原を発現している標的細胞を認識し、死滅させる。いくつかのCARが腫瘍関連抗原に対して開発されており、そのようなCAR発現T細胞を使用する養子移入手法が種々のがんの処置のために現在臨床試験中である。

【0083】

10

シグナル伝達エンドドメインが別の分子上に存在することも可能である。本発明と関連して用語「CAR」は、膜貫通ドメインに接続された抗原結合ドメインを含む分子も包含する。そのようなCARは、T細胞活性化を刺激するように別個の細胞内シグナル伝達ドメインと相互作用できる。

【0084】

本発明では核酸配列AまたはBのいずれかは、シグナルペプチドを含む膜貫通タンパク質をコードする核酸配列であってよい。

【0085】

目的の大部分の膜貫通タンパク質は、細胞膜においてのみ活性である、または細胞膜で主に活性である。したがって非効率的なシグナルペプチドの使用は、細胞表面でのタンパク質の相対発現を低減し、それによりタンパク質の相対活性を低減する。

20

【0086】

ポリタンパク質

本発明の核酸構築物は、第1のおよび第2のポリペプチドを含むポリタンパク質をコードしてよい。

【0087】

第1のおよび第2のポリペプチドは、キメラ抗原受容体(CAR)であってよい。

【0088】

実施例に記載される核酸構築物は、種々の構成要素をそれらが列挙されている順に含む次のポリタンパク質をコードしている：

30

マウスIgカッパ鎖V-III領域由来シグナルペプチド：

【化11】

METDTLILWVLLLLVPGSTG

(下を参照されたい)

s c F v a C D 1 9 :

【化12】

DIQMTQTTSSLASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRF  
SGSGSGTDYSLTISNL\_EQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGTKLEITKAGGGGSGGGGGGG  
GSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGV  
GSETTYYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDATIYYCAKHYGGSYAMDYWGQG  
TSVTVS

40

リンカー：

【化13】

SD

ヒトC D 8 a S T K :

【化14】

PTTTPAPRPPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI

ヒトCドメイン：

【化15】

FWWLVVVGGVLACYSLLVTVAFLIFW

ヒトCドメイン細胞内ドメイン：

【化16】

RRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREYDVLDRGRDPEMGGKPRRKNPQEG

LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

10

2Aペプチド：

【化17】

RAEGRGSLLTCDVVEENPGP

マウスIgカッパ由来シグナルペプチド：

【化18】

MAVPTQVLGLLLLWLTDA

scfvアーティフィシャルドメイン：

20

【化19】

RCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYFNLWYQQKPGKAPKLLIYDTNRLADGVPS

RFSGSGSGTQYTLTISSLQPEDFATYYCQHYKNYPLTFQQGTKLEIKRSGGGGGGGSG

GGGGGGGSRSEVQLVESGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSNYGMHWIRQAPGKGLEW

VSSISLNGGSTYYRDSVKGRFTISRDNAKSTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAQDAYTGGYFD

YWQQGTLTVVSSM

リンカー：

【化20】

DPA

30

FcRg会合を妨げる変異を有するヒトIgG1由来のヒンジおよびFc(HCH2CH3pvaaa)：

【化21】

EPKSPDKHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIAARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW

YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIK

AKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD

SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

40

リンカー：

【化22】

KDPK

ヒトCドメイン：

【化23】

AVFGCIFGALVIVTVGGFIFW

ヒトCドメイン細胞内ドメイン：

## 【化24】

RKKRKDAKNNEVSFSQIKPKKSKLIRVENFEAYFKKQQADSNCGFAEEYEDLKLV р G IS QPKY  
 AAE LAENRGKNRYNNVLPYDISRVKLSVQTHSTDDYINANYMPGYHSKKDFIATQGPLPNTL  
 KDFWRMVWEKNVYAIIMLTCKVEQGRTKCEEYWPSKQAQDYGDITVAMTSEIVLPEWTIRD  
 FTVKNIQTSESHPLRQFHFTSWPDHGVPDTDLLINFРYLVРDYMКQSPPESPILVHCSAGV  
 GRTGTFIAIDRLIYQIENENTVDVYGVYDLMHRPLMVQTEDQYVFLNQCVL DIVRSQKDSK  
 VDLIYQNTTAMTIYENLAPVTTFGKTNGYIA

## 【0089】

10

配列：

## 【化25】

METDT**LILWVLLLLVPGSTG**

(疎水性残基は太字で強調されている)を有するマウス Ig カッパ鎖 V - I I I 領域由来のシグナル配列は、実施例に記載のとおり変更される。疎水性残基は、抗 C D 1 9 C A R の発現レベルを低減するために疎水性コアから逐次的に欠失された。

## 【0090】

切断部位

本発明の第1の態様の核酸構築物は、第1のおよび第2のポリペプチドが別々の実体として発現され得るように、第1のおよび第2のポリペプチドをコードする核酸配列の間に位置する切断部位をコードする配列を含む。

20

## 【0091】

切断部位は、第1のおよび第2のポリペプチドを含むポリペプチドが分離され得るようにする任意の配列であってよい。

## 【0092】

用語「切断」は本明細書において便宜的に使用されるが、切断部位は古典的切断以外の機序によって第1のおよび第2のポリペプチドを個々の実体に分離させることができる。例えば口蹄疫ウイルス (FMDV) 2A自己切断ペプチド (下記を参照されたい)について、種々のモデルが、「切断」活性：宿主細胞プロテイナーゼによるタンパク質分解、自己タンパク質分解 (autoproteolysis) または翻訳効果の原因を説明するために提案されている (Donnellyら (2001年) J. Gen. Virol. 82巻: 1027 ~ 1041頁)。そのような「切断」の正確な機序は、切断部位が第1のおよび第2のポリペプチドをコードする核酸配列間に位置する場合に、第1のおよび第2のポリペプチドが別々の実体として発現されるようにする限り、本発明の目的のために重要ではない。

30

## 【0093】

切断部位はフューリン切断部位であってよい。

## 【0094】

フューリンは、サブチリシン様プロテインコンバターゼファミリーに属する酵素である。このファミリーのメンバーは、潜在型前駆体タンパク質をそれらの生物学的に活性な産生物にプロセシングするプロテインコンバターゼである。フューリンは、対合した塩基性アミノ酸プロセシング部位で前駆体タンパク質を効率的に切断できるカルシウム依存性セリンエンドプロテアーゼである。フューリン基質の例として、プロ副甲状腺ホルモン、トランスフォーミング増殖因子ベータ1前駆体、プロアルブミン、プロベータセクレターゼ、膜1型マトリクスメタロプロテイナーゼ、プロ神経増殖因子のベータサブユニットおよびフォン・ビルブランド因子が挙げられる。フューリンは、塩基性アミノ酸標的配列のすぐ下流 (標準的には、Arg - X - (Arg / Lys) - Arg') でタンパク質を切断し、ゴルジ装置で豊富である。

40

## 【0095】

切断部位は、タバコエッチウイルス (TEV) 切断部位であってよい。

## 【0096】

50

T E V プロテアーゼは、キモトリプシン様プロテアーゼである高度に配列特異的なシスティンプロテアーゼである。その標的切断部位に非常に特異的であり、したがって融合タンパク質の制御された切断のために *in vitro* および *in vivo* の両方で頻繁に使用される。コンセンサス T E V 切断部位は、E N L Y F Q \ S (式中「\」は切断されるペプチド結合を示す) である。ヒト細胞などの哺乳動物細胞は、T E V プロテアーゼを発現しない。したがって本核酸構築物が T E V 切断部位を含み、哺乳動物細胞において発現される実施形態では、外因性 T E V プロテアーゼも哺乳動物細胞において発現されなければならない。

## 【0097】

切断部位は、自己切断ペプチドをコードしてよい。

10

## 【0098】

「自己切断ペプチド」は、第 1 のおよび第 2 のポリペプチドを含むポリペプチドおよび自己切断ペプチドが產生されると、それがいかなる外部の切断活性も必要とすることなく別個の分離した第 1 のおよび第 2 のポリペプチドに直ちに「切断される」または分離されるように機能するペプチドを指す。

## 【0099】

自己切断ペプチドは、アフトまたはカルジオウイルス由来 2 A 自己切断ペプチドであつてよい。アフト (aptho) およびカルジオウイルスの主な 2 A / 2 B 切断は、それ自体の C 末端での 2 A 「切断」によって媒介される。口蹄疫ウイルス (F M D V) およびウマ鼻炎 A ウィルスなどのアフトウイルスでは、2 A 領域は、約 18 アミノ酸の短いセクションであり、これは、タンパク質 2 B の N 末端残基 (保存プロリン残基) と共にそれ自体の C 末端での「切断」を媒介できる自律的エレメントを表す。

20

## 【0100】

長いカルジオウイルスタンパク質の C 末端 19 アミノ酸は、2 B の N 末端プロリンと共に、アフトウイルス F M D V 2 a 配列とほぼ等しい効率で「切断」を媒介する。カルジオウイルスは、脳心筋炎ウイルス (E M C V) およびタイラーマウス脳炎ウイルス (T M E V) を含む。

30

## 【0101】

E M C V および F M D V 2 A の変異解析は、モチーフ D x E x N P G P が「切断」活性に本質的に関与していることを明らかにした (Donelli ら (2001 年) 上記)。

## 【0102】

本発明の切断部位は、アミノ酸配列：

D x<sub>1</sub> E x<sub>2</sub> N P G P、を含んでよく、式中 x<sub>1</sub> および x<sub>2</sub> は任意のアミノ酸である。x<sub>1</sub> は次の群：I、V、M および S から選択されてよい。x<sub>2</sub> は次の群：T、M、S、L、E、Q および F から選択されてよい。

## 【0103】

例えば切断部位は、表 2 に示すアミノ酸配列の 1 つを含んでよい。

## 【表2】

表2

モチーフ	以下に存在:	
DIETNPGP (配列番号 1)	ピコルナウイルス EMCB, EMCD, EMCPV21	
DVETNPGP (配列番号 2)	ピコルナウイルス MNGOおよび TMEBEAN; 昆虫ウイルス DCV, ABPV	10
DVEMNPGP (配列番号 3)	ピコルナウイルス TMEGD7および TMEBEAN	
DVESNPGP (配列番号 4)	ピコルナウイルス FMDA10, FMDA12, FMDC1, FMD01K, FMDSAT3, FMDVSAT2, ERAV; 昆虫ウイルス CrPV	
DMESNPGP (配列番号 5)	ピコルナウイルス FMDV01G	
DVELNPGP (配列番号 6)	ピコルナウイルス ERBV; ブタロタウイルス	20
DVEENPGP (配列番号 7)	ピコルナウイルス PTV-1; 昆虫ウイルス TaV; トリパノソーマ TSR1	
DIELNPGP (配列番号 8)	ウシロタウイルス, ヒトロタウイルス	
DIEQNPGP (配列番号 9)	トリパノソーマ AP エンドヌクレアーゼ	
DSEFNPGP (配列番号 10)	細菌性配列 <i>T. maritima</i>	30

## 【0104】

2 A 配列に基づく切断部位は、例えば長さ 15 ~ 22 アミノ酸であってよい。配列は、2 A タンパク質の C 末端を含んでよく、プロリン残基 (2 B の N 末端プロリンに相当する) が続く。

## 【0105】

変異研究は、天然に存在する 2 A 配列に加えて一部の改変体も活性であることを示した。切断部位は、1つ、2つまたは3つのアミノ酸置換を有し、2つまたはそれを超える別々のタンパク質へのポリタンパク質配列の「切断」を誘導する能力を保持している、天然に存在する 2 A ポリペプチド由来の改変体配列に相当する場合がある。

## 【0106】

切断配列は、全てある程度活性であることが示されている次のものから選択されてよい (Donnellyら (2001年) 上記) :

## 【化26】

LLNFDLLKLAGDVESNPGP (配列番号 11)  
 LLNFDLLKLAGDVQSNPGP (配列番号 12)  
 LLNFDLLKLAGDVEINPGP (配列番号 13)  
 LLNFDLLKLAGDVEFNPGP (配列番号 14)  
 LLNFDLLKLAGDVESHPGP (配列番号 15)  
 LLNFDLLKLAGDVESEPGP (配列番号 16)  
 LLNFDLLKLAGDVESQPGP (配列番号 17)  
 LLNFDLLKLAGDVESNPGG (配列番号 18)

10

## 【0107】

D x E x N P G P の配列に基づいて「モチーフ、「2A様」配列は、アフトまたはカルジオウイルス以外のピコルナウイルス、「ピコルナウイルス様」昆虫ウイルス、C型口タウイルスならびにトリパノソーマ種および細菌性配列内の反復配列において見出された (Donnellyら (2001年) 上記)。切断部位は：

## 【化27】

YHADYYKQRLIHDVEMNPGP (配列番号 19)  
 HYAGYFADLLIHDIEITNPGP (配列番号 20)  
 QCTNYALLKLAGDVESNPGP (配列番号 21)  
 ATNFSLLKQAGDVEENPGP (配列番号 22)  
 AARQMLLLLSGDVETNPGP (配列番号 23)  
 RAEGRGSLLTCGDVEENPGP (配列番号 24)  
 TRAEIEDELIRAGIESNPGP (配列番号 25)  
 TRAEIEDELIRADIESNPGP (配列番号 26)  
 AKFQIDKILISGDVELNPGP (配列番号 27)

20

## 【化28】

30

SSIIRTKMLVSGDVEENPGP (配列番号 28)  
 CDAQRQKLLLSDIEQNPGP (配列番号 29)  
 YPIDFGGFLVKADSEFNPGP (配列番号 30)

などのこれらの2A様配列の1つを含んでよい。

## 【0108】

切断部位は、

## 【化29】

配列番号24 (RAEGRGSLLTCGDVEENPGP)

40

として示す2A様配列を含んでよい。

## 【0109】

5から39アミノ酸の間のN末端「伸長」を含むことが活性を増加させることができる事が示された (Donnellyら (2001年) 上記)。具体的には切断配列は、次の配列の1つ、または例えば切断部位活性を保持して5つまでのアミノ酸変更を有するその改変体を含んでよい：

## 【化 3 0】

VTELLYRMKRAETYCPRPLAIHPTEARHKQKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP

(配列番号 31)

LLAIHPTEARHKQKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP (配列番号 32)

EARHKQKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP (配列番号 33)

APVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP (配列番号 34)

## 【0 1 1 0】

調整能力 ( tunability )

10

1つまたは複数のタンパク質（複数可）の相対発現は、異なる量または割合の疎水性アミノ酸を含むシグナルペプチドを使用することによる本発明の方法を使用して微細に調整され得る。

## 【0 1 1 1】

異なるシグナルペプチドを使用する調整能力は、それぞれそれら自体の相対発現を有する複数のタンパク質の発現を、検討する場合に特に有用である。例えば、次の構造：

A - X - B - Y - C

を有する核酸構築物であって、

式中

A、B および C はポリペプチドをコードする核酸配列であり、ならびに

20

X および Y は切断部位をコードする核酸配列である

核酸構築物を検討されたい。

## 【0 1 1 2】

核酸構築物は、3つのタンパク質 A、B および C をコードし、そのいずれかまたはすべては膜貫通タンパク質であってよい。A、B および C について相対レベルが A > B > C であるように発現されることが望ましい場合、核酸配列 A は最も多く疎水性アミノ酸を含むシグナルペプチドを有してよく、核酸配列 B は中程度の量の疎水性アミノ酸を含むシグナルペプチドを有してよく、核酸配列 C は最も少なく疎水性アミノ酸を含むシグナルペプチドを有してよい。

## 【0 1 1 3】

30

ベクター

本発明は、本発明の第一の態様による核酸構築物を含むベクターも提供する。

## 【0 1 1 4】

そのようなベクターは、第 1 のおよび第 2 のポリペプチドを発現するように宿主細胞に核酸構築物を導入するために使用されてよい。

## 【0 1 1 5】

ベクターは、例えばプラスミド、またはレトロウイルスベクターもしくはレンチウイルスベクターなどのウイルスベクター、またはトランスポゾンに基づくベクター、または合成 mRNA であってよい。

## 【0 1 1 6】

40

ベクターは、哺乳動物細胞、例えば T 細胞をトランスフェクトまたは形質導入することが可能であり得る。

## 【0 1 1 7】

細胞

本発明は、本発明の核酸構築物またはベクターを含む細胞であって、核酸配列によってコードされている第 1 のおよび第 2 のポリペプチドを発現する細胞をさらに提供する。

## 【0 1 1 8】

細胞は、免疫細胞などの、細胞表面に膜貫通タンパク質を発現できる任意の真核細胞であってよい。

## 【0 1 1 9】

50

細胞は、T細胞またはナチュラルキラー細胞などの細胞溶解性免疫細胞であってよい。

【0120】

方法

さらなる態様では、本発明は、本発明の核酸構築物またはベクターを細胞に導入するステップを含む本発明による細胞を作製するための方法を提供する。

【0121】

核酸構築物は、形質導入またはトランスフェクションによって導入されてよい。

【0122】

細胞は、被験体から単離された細胞、例えば被験体から単離されたT細胞またはNK細胞であってよい。

10

【0123】

本発明は、一方のタンパク質のシグナルペプチドをコードする核酸配列を、他方のタンパク質のシグナルペプチドと比較して1つまたは複数の疎水性アミノ酸を除去または置き換えるために変異させるステップを含む、第2のタンパク質を伴って单一の核酸構築物から発現される第1のタンパク質の相対的な細胞表面発現を調節するための方法も提供する。

【0124】

シグナルペプチドは、部位特異的変異誘発および組換え技術などの当技術分野において公知の技術によって変更されてよい。

【0125】

20

本発明は、本発明を実施する当業者を支援するように役立つことが目的とされ、本発明の範囲を限定することをいかなる方法でも意図しない実施例の方法によってここにさらに記載される。

【実施例】

【0126】

(実施例1 - マウスIgカッパ鎖V-I I Iシグナル配列の使用)

P C T / G B 2 0 1 4 / 0 5 3 4 5 2 は、1つはC D 1 9 に対するおよびもう1つはC D 3 3 に対する2つのキメラ抗原受容体(C A R)をコードするベクター系を記載している。研究においてC A Rに対して使用されたシグナルペプチドは、ヒトC D 8 aシグナル配列由来シグナルペプチドであった。本研究の目的のために、これを、配列：

30

【化31】

METDTLILWVLLLLVPGSTG

(疎水性残基は太字で強調されている)を有するマウスIgカッパ鎖V-I I I領域由来のシグナルペプチドで置換した。マウスIgカッパ鎖V-I I Iシグナル配列がヒトC D 8 a由来のシグナル配列と同様に機能したことを確立するために、比較研究を実施した。両シグナル配列について、抗C D 3 3 C A Rおよび抗C D 1 9 C A Rの機能性発現が観察された。この置換されたシグナル配列およびそのすべての続く変異を2 9 3 T細胞に一過的にトランスフェクトした。トランスフェクション3日後、2 9 3 T細胞をウサギF c鎖に融合した可溶性キメラC D 1 9 およびマウスF c鎖に融合した可溶性キメラC D 3 3 の両方で染色した。次いですべての細胞を抗ウサギF c-F I T Cおよび抗マウスF c-A P Cで染色した。フローサイトメトリーplotは、置換されたシグナル配列を非トランスフェクト(N T)およびC d 8シグナル配列を含む構築物と比較して示している(図4)。マウスIgカッパ鎖V-I I Iシグナル配列は、ヒトC D 8 a由来シグナル配列と同様に機能することが見出された。

40

【0127】

(実施例2 - シグナルペプチド中の疎水性残基を消失させることによる相対発現の変更)

疎水性残基は段階的様式で消失され、抗C D 3 3 C A Rおよび抗C D 1 9 C A Rの相対発現への効果を観察した。1つ、2つ、3つおよび4つのアミノ酸消失の影響を調査し、

50

結果を図5から8にそれぞれ示す。

【0128】

すべての変異体構築物は、抗CD33CARと比較して抗CD19CARの相対発現において減少を示した。抗CD19CAR発現の相対的減少は、アミノ酸欠失の数が1個から3個と大きくなるほど大きかったが、その後プラトーになった（欠失4個は発現において欠失3個と同様の減少であった）。

【0129】

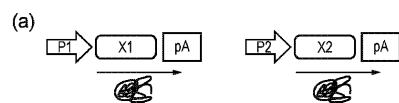
したがって、2つのポリペプチドをコードする核酸構築物中のシグナル配列の改変は、2つのポリペプチドの相対発現を制御するために使用できる。

【0130】

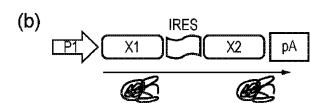
上記明細書に述べるすべての刊行物は、本明細書に参照により組み込まれる。本発明の記載の方法および系の種々の改変および変法は、本発明の範囲および精神から逸脱することなく当業者に明らかである。本発明は具体的な好ましい実施形態と関連して記載されているが、特許請求される本発明がそのような具体的な実施形態に過度に限定されるべきでないことは理解されるべきである。実際に、本発明を実行するために記載された様式の種々の改変は、分子生物学、細胞生物学または関連する分野の当業者に明らかであり、続く特許請求の範囲の範囲内であることが意図される。

10

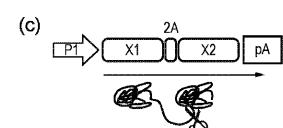
【図1(a)】



【図1(b)】



【図1(c)】



【図2】

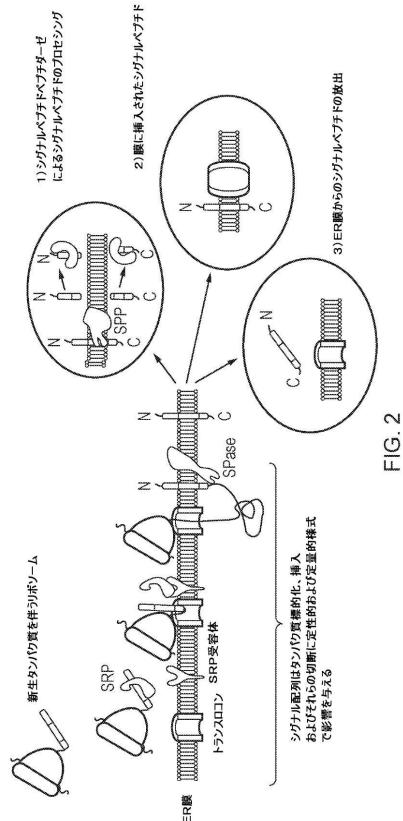


FIG. 2

【図3】

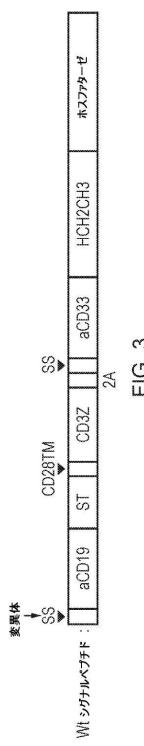


FIG. 3

【図4】

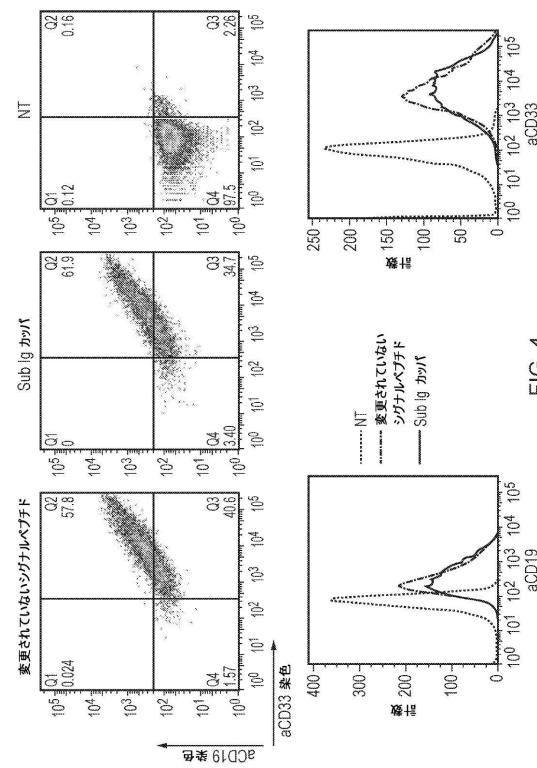
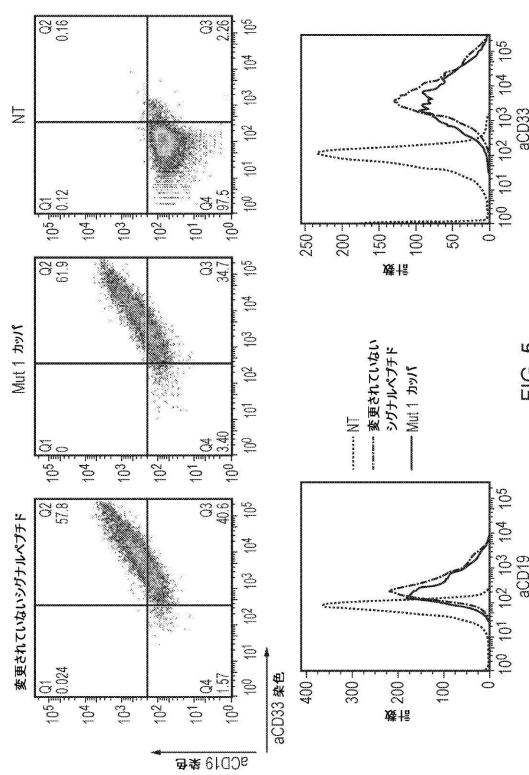
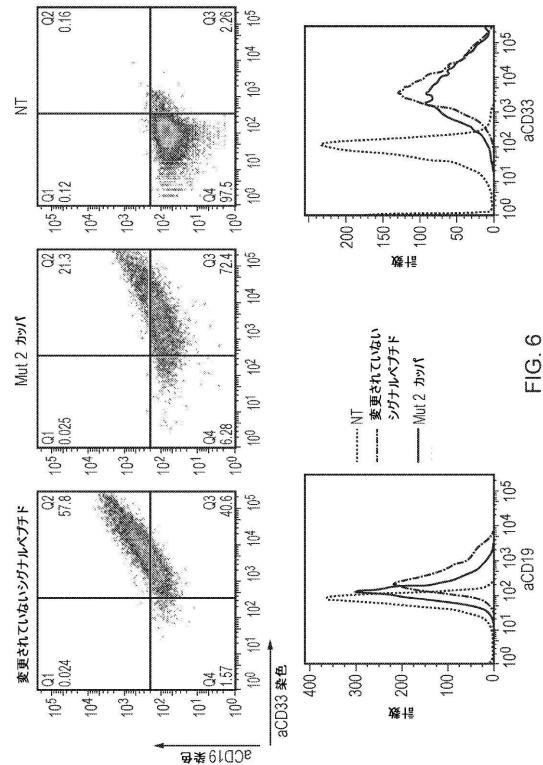


FIG. 4

【図5】



【図6】



【図7】

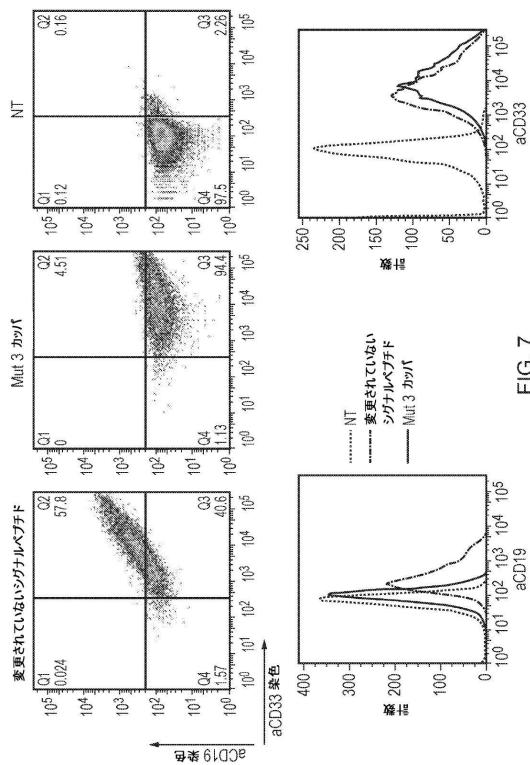


FIG. 7

【図8】

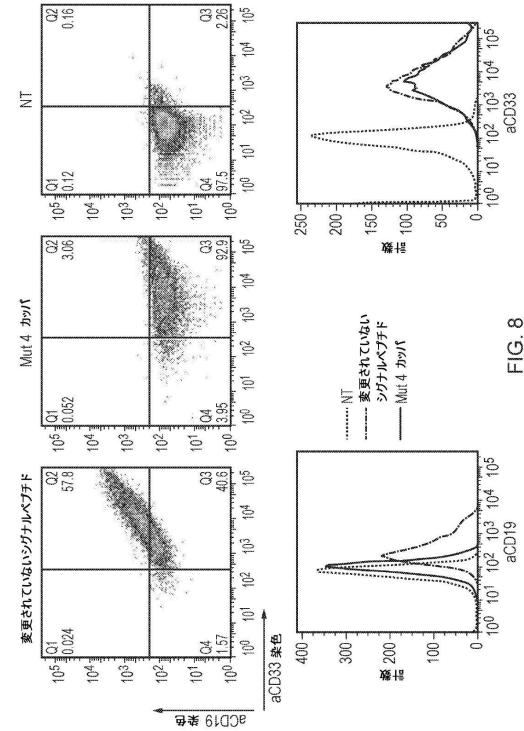


FIG. 8

## 【配列表】

0006836516000001.app

---

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

C 1 2 P 21/02 (2006.01)  
C 0 7 K 14/47 (2006.01)

C 1 2 P 21/02  
C 0 7 K 14/47

C

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ブーレ, マーティン

イギリス国 ダブリュー12 7アールピー ロンドン, デポット ロード, フォレスト ハウス, オートラス リミテッド 気付

(72)発明者 コルドバ, ショーン

イギリス国 ダブリュー12 7アールピー ロンドン, デポット ロード, フォレスト ハウス, オートラス リミテッド 気付

審査官 林 康子

(56)参考文献 国際公開第2013/185552 (WO, A1)

特表2009-508470 (JP, A)

Zhang L et al, Alteration in the IL-2 signal peptide affects secretion of proteins in vitro and in vivo, J Gene Med, 2005年, 7, 354-365

Nilsson I et al, The code for directing proteins for translocation across ER membrane: SRP cotranslationally recognizes specific features of a signal sequence, J Mol Biol, 2015年 3月27日, 427・600, 1191-1201

Wilkie S et al, Dual Targeting of ErbB2 and MUC1 in Breast Cancer Using Chimeric Antigen Receptors Engineered to Provide Complementary Signaling, J Clin Immunol, 2012年, 32, 1059-1070

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 15/00~15/90

Caplus / REGISTRY / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS / WPI / D S (STN)