

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-520790
(P2024-520790A)

(43)公表日 令和6年5月24日(2024.5.24)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z Z N A	4 B 0 6 3
C 1 2 N	15/57 (2006.01)	C 1 2 N	15/57		4 B 0 6 5
C 1 2 N	15/55 (2006.01)	C 1 2 N	15/55		4 H 0 4 5
C 1 2 N	15/86 (2006.01)	C 1 2 N	15/86	Z	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全46頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2023-575724(P2023-575724)				
(86)(22)出願日	令和4年6月8日(2022.6.8)				
(85)翻訳文提出日	令和5年12月28日(2023.12.28)				
(86)国際出願番号	PCT/IB2022/055355				
(87)国際公開番号	WO2022/259190				
(87)国際公開日	令和4年12月15日(2022.12.15)				
(31)優先権主張番号	63/209,019				
(32)優先日	令和3年6月10日(2021.6.10)				
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)				
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA, RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く				
(71)出願人	509087759 ヤンセン バイオテック, インコーポレ ーテッド アメリカ合衆国ペンシルベニア州190 44 ホーシャム・リτζジビユードライブ 800/850				
(74)代理人	100092783 弁理士 小林 浩				
(74)代理人	100095360 弁理士 片山 英二				
(74)代理人	100093676 弁理士 小林 純子				
(74)代理人	100120134 弁理士 大森 規雄				
(74)代理人	100209037				
					最終頁に続く

(54)【発明の名称】 K L K 2 - G P I 融合タンパク質をコードする核酸、組換え細胞、及びその使用

(57)【要約】

本発明は、カリクレイン-2 融合タンパク質をコードする組換え核酸構築物に関する。カリクレイン-2 融合タンパク質は、カリクレイン-2 (K L K 2) をコードする第1のヌクレオチド配列と、グリコシルホスファチジルイノシトール (G P I) 付着配列をコードする第2のヌクレオチド配列と、を含み、G P I 付着配列コード化ヌクレオチド配列は、K L K 2 コード化ヌクレオチド配列の3'側に位置する。また、ベクター、細胞の調製物、及びそれらの使用方法も開示される。

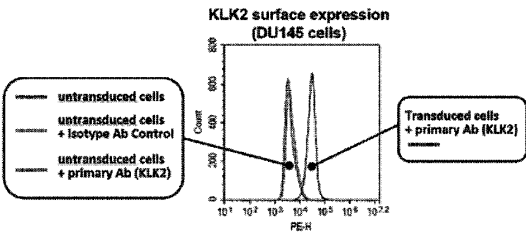


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

カリクレイン-2 融合タンパク質をコードする組換え核酸構築物であって、前記構築物は、

カリクレイン-2 (K L K 2) 又はその断片をコードする第 1 のヌクレオチド配列と、グリコシルホスファチジルイノシトール (G P I) 付着配列をコードする第 2 のヌクレオチド配列であって、前記 G P I 付着配列をコードする前記第 2 のヌクレオチド配列は、カリクレイン-2 をコードする前記第 1 のヌクレオチド配列の 3' 側に位置する、第 2 のヌクレオチド配列と、を含む、組換え核酸構築物。

10

【請求項 2】

カリクレイン-2 は、ヒトカリクレイン-2 である、請求項 1 に記載の構築物。

【請求項 3】

前記第 1 のヌクレオチド配列は、配列番号 4 のアミノ酸配列又はその断片を含むカリクレイン-2 をコードする、請求項 1 に記載の構築物。

【請求項 4】

カリクレイン-2 をコードする前記第 1 のヌクレオチド配列は、配列番号 1 のヌクレオチド配列又はその断片を含む、請求項 1 に記載の構築物。

【請求項 5】

前記 G P I 付着配列は、アルカリホスファターゼに由来する、請求項 1 に記載の構築物。

20

【請求項 6】

前記 G P I 付着配列は、ヒト胎盤アルカリホスファターゼに由来する、請求項 5 に記載の構築物。

【請求項 7】

前記第 2 のヌクレオチド配列は、配列番号 5 のアミノ酸配列又はその断片を含む G P I 付着配列をコードする、請求項 5 に記載の構築物。

【請求項 8】

前記 G P I 付着配列をコードする前記第 2 のヌクレオチド配列は、配列番号 2 のヌクレオチド配列を含む、請求項 7 に記載の構築物。

30

【請求項 9】

前記構築物の前記第 1 のヌクレオチド配列及び前記第 2 のヌクレオチド配列は、配列番号 6 又は配列番号 7 のアミノ酸配列を含むカリクレイン-2 融合タンパク質をコードする、請求項 1～8 のいずれか一項に記載の構築物。

【請求項 10】

前記構築物の前記第 1 のヌクレオチド配列及び前記第 2 のヌクレオチド配列は、配列番号 3 のヌクレオチド配列に対して少なくとも 90% の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、請求項 1～9 のいずれか一項に記載の構築物。

【請求項 11】

前記構築物は、配列番号 3 のヌクレオチド配列を含む、請求項 10 に記載の構築物。

40

【請求項 12】

カリクレイン-2 をコードする前記第 1 のヌクレオチド配列の 5' 側に位置するプロモーターヌクレオチド配列を更に含む、請求項 1～10 のいずれか一項に記載の構築物。

【請求項 13】

前記プロモーターヌクレオチド配列は、哺乳動物プロモーター配列である、請求項 12 に記載の構築物。

【請求項 14】

前記プロモーターヌクレオチド配列は、E F 1 α プロモーターヌクレオチド配列である、請求項 13 に記載の構築物。

【請求項 15】

50

請求項 1 ～ 1 4 のいずれか一項に記載の構築物を含む、ベクター。

【請求項 1 6】

前記ベクターは、ウイルスペクターである、請求項 1 5 に記載のベクター。

【請求項 1 7】

前記ウイルスペクターは、アデノウイルスペクター、アデノ随伴ウイルスペクター、レンチウイルスペクター、ワクシニアベクター、レトロウイルスペクター、及び単純ヘルペスウイルスペクターからなる群より選択される、請求項 1 6 に記載のベクター。

【請求項 1 8】

請求項 1 ～ 1 4 のいずれか一項に記載の組換え構築物又は請求項 1 5 ～ 1 7 のいずれか一項に記載のベクターを含む、細胞。

【請求項 1 9】

請求項 1 ～ 1 4 のいずれか一項に記載の構築物又は請求項 1 5 ～ 1 7 のいずれか一項に記載のベクターによってコードされる、カリクレイン-2 融合タンパク質。

【請求項 2 0】

前記融合タンパク質は、配列番号 6 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 1 9 に記載のカリクレイン-2 融合タンパク質。

【請求項 2 1】

細胞の調製物であって、前記調製物の細胞は、表面上に組換えカリクレイン-2 融合タンパク質を発現するように改変されており、前記融合タンパク質は、

カリクレイン-2 ポリペプチド配列と、

前記カリクレイン-2 ポリペプチド配列の C 末端で連結されたグリコシルホスファチジルイノシトール (G P I) 付着配列の一部と、

前記 G P I 付着配列の一部に結合された G P I アンカードメインと、を含む、調製物。

【請求項 2 2】

前記カリクレイン-2 ポリペプチド配列は、ヒトカリクレイン-2 ポリペプチド配列である、請求項 2 1 に記載の調製物。

【請求項 2 3】

前記カリクレイン-2 ポリペプチド配列は、配列番号 4 のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列又はその断片を含む、請求項 2 1 に記載の調製物。

【請求項 2 4】

前記カリクレイン-2 ポリペプチド配列は、配列番号 4 のアミノ酸配列又はその断片を含む、請求項 2 3 に記載の調製物。

【請求項 2 5】

前記 G P I 付着配列の一部は、アルカリホスファターゼに由来する、請求項 2 1 ～ 2 4 のいずれか一項に記載の調製物。

【請求項 2 6】

前記 G P I 付着配列の一部は、ヒト胎盤アルカリホスファターゼに由来する、請求項 2 1 ～ 2 5 のいずれか一項に記載の調製物。

【請求項 2 7】

前記 G P I 付着配列の一部は、配列番号 5 のアミノ酸配列の一部を含む、請求項 2 1 ～ 2 6 のいずれか一項に記載の調製物。

【請求項 2 8】

前記カリクレイン-2 融合タンパク質は、配列番号 7 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 2 1 ～ 2 7 のいずれか一項に記載の調製物。

【請求項 2 9】

前記カリクレイン-2 融合タンパク質は、配列番号 7 のアミノ酸配列を含む、請求項 2

10

20

30

40

50

8 に記載の調製物。

【請求項 3 0】

前記調製物の細胞は、請求項 1 ～ 1 4 のいずれか一項に記載の組換え構築物又は請求項 1 5 ～ 1 7 のいずれか一項に記載のベクターに由来する前記カリクレイン－2 融合タンパク質を発現する、請求項 2 1 ～ 2 9 のいずれか一項に記載の調製物。

【請求項 3 1】

前記調製物の細胞は、ゲノムに安定に組み込まれた前記組換え構築物を含む、請求項 3 0 に記載の調製物。

【請求項 3 2】

前記調製物の前記細胞は、哺乳動物細胞である、請求項 2 1 ～ 3 1 のいずれか一項に記載の調製物。 10

【請求項 3 3】

前記調製物の細胞は、ヒト細胞である、請求項 2 1 ～ 3 2 のいずれか一項に記載の調製物。

【請求項 3 4】

前記調製物の細胞は、齧歯類細胞である、請求項 2 1 ～ 3 2 のいずれか一項に記載の調製物。

【請求項 3 5】

前記齧歯類細胞は、マウス細胞である、請求項 3 4 に記載の調製物。

【請求項 3 6】

20

前記細胞は、前立腺細胞である、請求項 2 1 ～ 3 5 のいずれか一項に記載の調製物。

【請求項 3 7】

前記前立腺細胞は、前立腺癌細胞である、請求項 3 6 に記載の調製物。

【請求項 3 8】

前記調製物の細胞は、内因性カリクレイン－2 を発現しない、請求項 2 1 ～ 3 7 のいずれか一項に記載の調製物。

【請求項 3 9】

細胞の前記調製物は、細胞株である、請求項 2 1 ～ 3 8 のいずれか一項に記載の調製物。

【請求項 4 0】

30

請求項 2 1 ～ 3 9 のいずれか一項に記載の細胞の調製物を含む、非ヒト動物。

【請求項 4 1】

組換えカリクレイン－2 融合タンパク質を表面に発現する細胞を含む非ヒト動物であって、前記融合タンパク質は、

カリクレイン－2 ポリペプチド配列と、

前記カリクレイン－2 ポリペプチド配列の C 末端に連結されたグリコシルホスファチジルイノシトール（G P I）付着配列の一部と、

前記 G P I 付着配列の一部に結合された G P I アンカードメインと、を含む、非ヒト動物。

【請求項 4 2】

40

前記非ヒト動物の細胞は、請求項 1 ～ 1 4 のいずれか一項に記載の組換え構築物又は請求項 1 5 ～ 1 7 に記載のベクターで形質導入される、請求項 4 1 に記載の非ヒト動物。

【請求項 4 3】

請求項 1 ～ 1 1 のいずれか一項に記載の組換え構築物が、前記非ヒト動物のゲノムに安定に組み込まれている、請求項 4 1 に記載の非ヒト動物。

【請求項 4 4】

前記非ヒト動物は、齧歯類である、請求項 4 1 ～ 4 3 のいずれか一項に記載の非ヒト動物。

【請求項 4 5】

前記齧歯類は、マウスである、請求項 4 4 に記載の非ヒト動物。

50

【請求項 46】

カリクレイン-2 に結合する薬剤を同定する方法であって、前記方法は、
請求項 21～39 のいずれか一項に記載の細胞の調製物を提供することと、
候補薬剤を細胞の前記調製物に投与することと、
前記投与することに基づいて、前記候補薬剤がカリクレイン-2 に結合するかどうかを
決定することと、
を含む、方法。

【請求項 47】

カリクレイン-2 に結合する薬剤を同定する方法であって、前記方法は、
請求項 40～45 のいずれか一項に記載の非ヒト動物を提供することと、
候補薬剤を前記非ヒト動物に投与することと、
前記投与することに基づいて、前記候補薬剤がカリクレイン-2 に結合するかどうかを
決定することと、
を含む、方法。

【請求項 48】

細胞の前記調製物は、癌細胞の調製物である、請求項 46 に記載の方法。

【請求項 49】

細胞の前記調製物は、前立腺癌細胞の調製物である、請求項 48 に記載の方法。

【請求項 50】

前記候補薬剤は、候補カリクレイン-2 阻害剤である、請求項 46～49 のいずれか一
項に記載の方法。

【請求項 51】

前記候補薬剤は、抗カリクレイン-2 抗体である、請求項 46～49 のいずれか一項に
記載の方法。

【請求項 52】

前記候補薬剤は、カリクレイン-2 キメラ抗原受容体 (CAR) である、請求項 46～
49 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願の相互参照)

本出願は、2021年6月10日出願の米国特許仮出願第63/209,019号の利
益を主張するものであり、参照によりその全内容が本明細書に組み込まれる。

【0002】

(配列表)

本出願は、ASCIIフォーマットで電子的に提出済みの配列表を含み、参照によりそ
の全体が本明細書に組み込まれる。2022年4月21日に作成された当該ASCIIコ
ピーの名称は、JBI6578WO PCT1__SL.txtであり、サイズは、33,8
73バイトである。

【0003】

(発明の分野)

本発明は、カリクレイン-2 融合タンパク質をコードする核酸構築物、並びにそのベク
ター、細胞の調製物、及び使用方法に関する。

【背景技術】

【0004】

ヒトカリクレイン (kallikrein、KLK) のファミリーは、多様な生物学的機能及び
組織分布を有する15種類のセリンプロテアーゼから構成される (Thorek et
al., Thromb. Haemost. 110(30):4840-92(2013))。カリクレイン-2 (kallikrein-2、KLK2) は、正常前立腺、原発性前立腺癌、
及び転移性去勢抵抗性前立腺癌において高度かつ選択的に発現される。カリクレイン-2

10

20

30

40

50

の発現は、アンドロゲンによって調節され、アンドロゲン受容体発現と密接に相関する。その組織特異性により、カリクレイン-2は、前立腺癌を標的とする治療のための魅力的な標的となっている。しかしながら、KLK2 (hK2、UniProt P20151とも称される)は、その触媒的作用における分泌タンパク質であり、多くの場合、未知の機構を介して前立腺腫瘍細胞表面に付着する。KLK2は、正常な前立腺、原発性前立腺癌、及び転移性去勢抵抗性前立腺癌において高度かつ選択的に発現され、KLK2は、前立腺癌を標的とする治療のための魅力的な標的になっている。細胞表面上に内因性KLK2を発現する市販の前立腺腫瘍細胞は限られている。VCaP及びLNCaP前立腺腫瘍細胞株は、原発性腫瘍細胞と比較して非常に低いレベルではあるが、検出可能な細胞表面KLK2を発現する。適切な腫瘍細胞株の欠如は、KLK2経路に介入する潜在的な治療剤を同定及び検証することを困難にする。

10

【0005】

過去に、KLK2陰性前立腺腫瘍細胞株DU145及びPC3並びに多くの他の細胞株においてKLK2を過剰発現させる試みがなされてきた。しかしながら、それらの試みでは全て、KLK2タンパク質が細胞内で発現されるか又は細胞外マトリックスに分泌されるかのいずれかであったため、KLK2表面発現を有する腫瘍細胞株を産生することができなかった(例えば、CHO-K1、HEK293、NS0、LnCap)。

【発明の概要】

【0006】

本発明は、当技術分野におけるこれら及び他の欠陥を克服することを対象とする。

20

【0007】

本開示の第1の態様は、カリクレイン-2融合タンパク質をコードする組換え核酸構築物に関する。組換え核酸構築物は、カリクレイン-2 (KLK2)をコードする第1のヌクレオチド配列と、グリコシルホスファチジルイノシトール (glycosylphosphatidylinositol、GPI) 付着配列をコードする第2のヌクレオチド配列と、を含み、GPI付着配列をコードする当該第2のヌクレオチド配列は、カリクレイン-2をコードする第1のヌクレオチド配列の3'側に位置する。

【0008】

本開示の別の態様は、細胞の調製物であって、調製物の細胞は、表面上に組換えカリクレイン-2融合タンパク質を発現する、調製物を対象とする。融合タンパク質は、カリクレイン-2ポリペプチド配列と、カリクレイン-2ポリペプチド配列のC末端に連結されたグリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) 付着配列の一部と、GPI付着配列部分に結合されたGPIアンカードメインと、を含む。

30

【0009】

本開示の更なる態様は、表面上に組換えカリクレイン-2融合タンパク質を発現する細胞を含む非ヒト動物を対象とする。組換え融合タンパク質は、カリクレイン-2ポリペプチド配列と、カリクレイン-2ポリペプチド配列のC末端に連結されたグリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) 付着配列の一部と、GPI付着配列部分に結合されたGPIアンカードメインと、を含む。

【0010】

本開示の更なる態様は、カリクレイン-2に結合する薬剤を同定する方法を対象とする。本方法は、本開示による細胞の調製物を提供することと、細胞の調製物に候補薬剤を投与することと、当該投与することに基づいて、候補薬剤がカリクレイン-2に結合するかどうかを決定することと、を含む。

40

【0011】

本開示の別の態様は、カリクレイン-2に結合する薬剤を同定する方法を対象とする。本方法は、本開示による非ヒト動物を提供することと、候補薬剤を非ヒト動物に投与することと、当該投与することに基づいて、候補薬剤がカリクレイン-2に結合するかどうかを決定することと、を含む。

【0012】

50

本開示は、ヒト胎盤アルカリホスファターゼ (placental alkaline phosphatase、PLAP) のグリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) 付着配列を有するカリクレイン-2 融合タンパク質を作製することによって、細胞におけるカリクレイン-2 の表面発現を遺伝子操作する方法を含む。トランスフェクトされた細胞内でのタンパク質の発現は、EF1 α プロモーターによって駆動され、カリクレイン-2 融合タンパク質は、GPI 付着配列に結合した GPI アンカードメインによって細胞膜に固定される。本方法は、カリクレイン-2 を発現しない細胞における表面発現又は内因性カリクレイン-2 を発現する細胞における過剰発現を達成するために有用である。カリクレイン-2 を発現させる従来の方法は、細胞表面上に K L K 2 を提示することができず、細胞内発現若しくは細胞外発現のみを生じるか、又は全く発現しなかった。表面上に遺伝子操作された K L K 2 を有する細胞は、放出アッセイにおいて又はインビトロ若しくはインビボの実験系において、K L K 2 治療剤 (例えば、細胞療法生成物、C D 3 リダイレクト抗体、抗体依存性細胞傷害性 (antibody-dependent cellular cytotoxicity、ADCC) 媒介抗体など) をスクリーニング及び同定するための有用性を有する。

10

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】本明細書に記載の K L K 2 - GPI 融合構築物 (「K L K 2 _ GPI」) が形質導入された D U 1 4 5 細胞における K L K 2 表面発現を示すヒストグラムである。細胞をアイソタイプ対照又は P E に直接コンジュゲートした抗 K L K 2 クローン K L 2 B 1 で染色した。

20

【図2A】V C a P に対する h I g G 1 アイソタイプ対照 A b 又は抗 K L K 2 特異的 A b の結合を示すグラフである。

【図2B】D U 1 4 5 親細胞に対する h I g G 1 アイソタイプ対照 A b 又は抗 K L K 2 特異的 A b の結合を示すグラフである。

【図2C】D U 1 4 5 / K L K 2 _ GPI 腫瘍細胞に対する h I g G 1 アイソタイプ対照 A b 又は抗 K L K 2 特異的 A b の結合を示すグラフである。

【図3A】P C 3 親細胞に対する h I g G 1 アイソタイプ対照 A b 又は抗 K L K 2 特異的 A b の結合を示すグラフである。

【図3B】P C 3 / K L K 2 _ GPI に対する h I g G 1 アイソタイプ対照 A b 又は抗 K L K 2 特異的 A b の結合を示すグラフである。

30

【図3C】P C 3 / P S M A / K L K 2 _ GPI 腫瘍細胞に対する h I g G 1 アイソタイプ対照 A b 又は抗 K L K 2 特異的 A b の結合を示すグラフである。

【図4A】V C a P に対する抗体依存性細胞傷害性 (ADCC) を示すグラフである。P B - N K 細胞を腫瘍細胞と E : T 比 3 : 1 で共培養した。生存腫瘍標的細胞の数を I n c u C y t e を使用して 6 6 時間後に計数した。アッセイの終了時に残存する生存腫瘍標的の数を、腫瘍のみのウェルに対して正規化して生存腫瘍標的 % を生成した。

【図4B】D U 1 4 5 親細胞に対する抗体依存性細胞傷害性 (ADCC) を示すグラフである。P B - N K 細胞を腫瘍細胞と E : T 比 3 : 1 で共培養した。生存腫瘍標的細胞の数を I n c u C y t e を使用して 6 6 時間後に計数した。アッセイの終了時に残存する生存腫瘍標的の数を、腫瘍のみのウェルに対して正規化して生存腫瘍標的 % を生成した。

40

【図4C】D U 1 4 5 / K L K 2 _ GPI 腫瘍細胞に対する抗体依存性細胞傷害性 (ADCC) を示すグラフである。P B - N K 細胞を腫瘍細胞と E : T 比 3 : 1 で共培養した。生存腫瘍標的細胞の数を I n c u C y t e を使用して 6 6 時間後に計数した。アッセイの終了時に残存する生存腫瘍標的の数を、腫瘍のみのウェルに対して正規化して生存腫瘍標的 % を生成した。

【図5A】P C 3 親細胞に対する ADCC を示すグラフである。P B - N K 細胞を腫瘍細胞とエフェクター：腫瘍 (E : T) 比 3 : 1 で、抗 K L K 2 抗体又はアイソタイプ対照抗体の存在下で共培養した。生存腫瘍標的細胞の数を I n c u C y t e を使用して 6 6 時間後に計数した。アッセイの終了時に残存する生存腫瘍標的の数を、腫瘍のみのウェルに対して正規化して生存腫瘍標的 % を生成した。

50

【図5B】PC3／PSMA／KLK2__GPI腫瘍細胞に対するADCCを示すグラフである。PB-NK細胞を腫瘍細胞とエフェクター：腫瘍（E：T）比3：1で、抗KLK2抗体又はアイソタイプ対照抗体の存在下で共培養した。生存腫瘍標的細胞の数をIncucyteを使用して66時間後に計数した。アッセイの終了時に残存する生存腫瘍標的の数を、腫瘍のみのウェルに対して正規化して生存腫瘍標的%を生成した。

【図6】VCaP、LnCap／KLK2、又はDU145／KLK2__GPI腫瘍細胞に対するKLK2×CD3二重特異性抗体の細胞傷害性を示すグラフである。初代T細胞を腫瘍細胞とE：T比3：1で、抗KLK2抗体又はアイソタイプ対照抗体の存在下で共培養した。漸増濃度のKLK2×CD3二重特異性Abを腫瘍細胞及びT細胞と混合した。生存腫瘍標的細胞の数をIncucyteを使用して72時間後に計数した。アッセイの終了時に残存する生存腫瘍標的の数を、腫瘍のみのウェルに対して正規化して腫瘍溶解%を生成した。

10

【図7A】VCaPに対するCAR-T媒介性細胞傷害性を示すグラフである。非形質導入（UTD）T細胞又はKLK2 CAR形質導入T細胞を、腫瘍細胞とE：T比0.25：1で共培養した。生存腫瘍標的細胞の数をIncucyteを使用して時間0から開始して24時間ごとに計数した。それぞれの時点で残存した生存腫瘍標的の数を、腫瘍のみのウェルに対して正規化して、腫瘍生存腫瘍標的%を生成した。

【図7B】親DU145に対するCAR-T媒介性細胞傷害性を示すグラフである。非形質導入（UTD）T細胞又はKLK2 CAR形質導入T細胞を、腫瘍細胞とE：T比0.25：1で共培養した。生存腫瘍標的細胞の数をIncucyteを使用して時間0から開始して24時間ごとに計数した。それぞれの時点で残存した生存腫瘍標的の数を、腫瘍のみのウェルに対して正規化して、腫瘍生存腫瘍標的%を生成した。

20

【図7C】DU145／KLK2__GPI腫瘍細胞に対するCAR-T媒介性細胞傷害性を示すグラフである。非形質導入（UTD）T細胞又はKLK2 CAR形質導入T細胞を、腫瘍細胞とE：T比0.25：1で共培養した。生存腫瘍標的細胞の数をIncucyteを使用して時間0から開始して24時間ごとに計数した。それぞれの時点で残存した生存腫瘍標的の数を、腫瘍のみのウェルに対して正規化して、腫瘍生存腫瘍標的%を生成した。

【図8A】インビボでのDU145／KLK2__GPI及びPC3／PSMA／KLK2__GPI腫瘍細胞の適用を示すグラフである。図8Aは、DU145／KLK2__GPI及びPC3／PSMA／KLK2__GPIの増殖動態のグラフである。10×10⁶個のDU145／KLK2__GPI腫瘍細胞又は0.5×10⁶個のPC3／PSMA／KLK2__GPI腫瘍細胞を0日目に移植した。腫瘍を3日ごと又は4日ごとにノギスで測定した。

30

【図8B】インビボでのDU145／KLK2__GPI及びPC3／PSMA／KLK2__GPI腫瘍細胞の適用を示すグラフである。図8Bは、DU145／KLK2__GPI腫瘍モデルにおける抗KLK2 CAR T細胞の有効性のグラフである。10×10⁶個のKLK2 CAR T細胞を、腫瘍移植後11日目に注射した。腫瘍を3日ごと又は4日ごとにノギスで測定した。KLK2 CAR T細胞は、腫瘍進行を阻害し、完全な腫瘍退縮を引き起こした。

40

【図9A】CAR設計をスクリーニングするためにDU145+KLK2細胞をどのように使用することができるかを示すグラフである。CAR設計のパネル（CAR-a～CAR-bb）をNK-101細胞に形質導入した。これらの設計は全て、KLK2に特異的な同じscFv結合ドメイン、続いてCD8αヒンジ領域及び様々な異なるシグナル伝達ドメインモジュールを含有した。

【図9B】CAR設計をスクリーニングするためにDU145+KLK2細胞をどのように使用することができるかを示すグラフである。CAR設計のパネル（CAR-a～CAR-bb）をNK-101細胞に形質導入した。これらの設計は全て、KLK2に特異的な同じscFv結合ドメイン、続いてCD8αヒンジ領域及び様々な異なるシグナル伝達ドメインモジュールを含有した。

50

【図 9 C】 C A R 設計をスクリーニングするために D U 1 4 5 + K L K 2 細胞をどのように使用することができるかを示すグラフである。 C A R 設計のパネル (C A R - a ~ C A R - b b) を N K - 1 0 1 細胞に形質導入した。これらの設計は全て、 K L K 2 に特異的な同 j s c F v 結合ドメイン、続いて C D 8 α ヒンジ領域及び様々な異なるシグナル伝達ドメインモジュールを含有した。

【図 1 0 A】 本明細書に記載される K L K 2 - G P I 融合構築物 (「 K L K 2 _ G P I 」) で形質導入された L n C a p 細胞における K L K 2 表面発現を実証するヒストグラムである。細胞をアイソタイプ対照又は P E に直接コンジュゲートした抗 K L K 2 クローン K L 2 B 1 で染色した。

【図 1 0 B】 本明細書に記載される K L K 2 - G P I 融合構築物 (「 K L K 2 _ G P I 」) で形質導入された L n C a p 細胞における K L K 2 表面発現を実証するヒストグラムである。細胞をアイソタイプ対照又は P E に直接コンジュゲートした抗 K L K 2 クローン K L 2 B 1 で染色した。

【図 1 0 C】 様々な E : T 比で共培養した L n C a p 親 (非形質導入) 細胞又は L n C a p + K L K 2 標的細胞に対する K L K 2 C A R - N K 媒介性細胞傷害を示すグラフである。生存腫瘍標的細胞の数を I n c u C y t e を使用して時間 0 から開始して 4 時間ごとに計数した。それぞれの時点で残存する生存腫瘍標的の数を、腫瘍のみのウェルに対して正規化して、残存する生存腫瘍標的 % を生成した。166 時間にわたる生存腫瘍標的 % 曲線の A U C をそれぞれの E : T 比について決定し、用量反応曲線としてプロットした。自然死滅又は非 C A R 特異的死滅は、 L n C a p 親細胞から決定することができ、一方、 K L K 2 C A R 特異的死滅は、 L n C a p + K L K 2 標的細胞において評価することができる。

【発明を実施するための形態】

【0014】

本開示の第 1 の態様は、カリクレイン-2 融合タンパク質をコードする組換え核酸構築物を対象とする。組換え核酸構築物は、カリクレイン-2 (K L K 2) 又はその断片をコードする第 1 のヌクレオチド配列と、グリコシルホスファチジルイノシトール (G P I) 付着配列をコードする第 2 のヌクレオチド配列と、を含み、 G P I 付着配列をコードする当該第 2 のヌクレオチド配列は、カリクレイン-2 をコードする第 1 のヌクレオチド配列の 3 ' 側に位置する。

【0015】

カリクレイン-2 をコードする組換え構築物の第 1 のヌクレオチド配列は、哺乳動物カリクレイン-2 ポリペプチド配列、例えば、ヒト、ネズミ、ウシ、イヌ、ネコ、ヒツジ、ブタ、クマ、又はサルのカリクレイン-2 ポリペプチド配列をコードし得る。

【0016】

任意の実施形態では、組換え構築物のカリクレイン-2 をコードする第 1 のヌクレオチド配列は、ヒトカリクレイン-2 (h K L K 2) をコードする。本明細書に記載されるように、ヒトカリクレイン-2 (「 h K L K 2 」又は「 h K 2 」) は、前立腺癌特異的カリクレインである (例えば、Obiezu et al., 「Human Tissue Kallikrein Gene Family: Applications in Cancer,」 Cancer Letters 224 (1): 1-22 (2005) 及び Nasser et al., 「Human Tissue Kallikreins: Blood Levels and Response to Radiotherapy in Intermediate Risk Prostate Cancer,」 Radiother. Oncol. 124 (3): 427-432 (2017) を参照されたく、これらは参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる)。

【0017】

任意の実施形態では、第 1 のヌクレオチド配列は、配列番号 4 のアミノ酸配列に対して 80 %、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % 以

10

20

30

40

50

上の配列同一性を有するアミノ酸配列又はその機能的断片を含むヒトカリクレイン-2をコードする。

【0018】

【化1】

MWDLVLSIALSVGCTGAVPLIQSRIVGGWECEKHSQPWQVAVYSHGWAHCGGVLVHP
QWVLTAAHCLKKNSQVWLGRHNLFEPEDTGQRPVSHSFPHPLYNMSLLKHQSLRPDE
DSSHDLMLLRLSEPAKITDVVKVLGLPTQEPALGTTCTYASGWGSIEPEEFLRPRSLQCVS
LHLLSNDMCAAYSEKVFTEFMLCAGLWTGGKDTCCGDSGGPLVCNGVLQGITSWGPE
PCALPEKPAVYTKVVHYRKWIKDTIAANPEF (シグナル配列を二重下線で示す)

10

(配列番号4)。

【0019】

任意の実施形態では、第1のヌクレオチド配列は、配列番号4のアミノ酸配列又はその機能的断片を含むヒトカリクレイン-2をコードする。

【0020】

任意の実施形態では、カリクレイン-2をコードする第1のヌクレオチド配列は、配列番号1のヌクレオチド配列に対して80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上の配列同一性を有するヌクレオチド配列又はその任意の部分を含む。

20

【0021】

【化2】

ATGTGGGACCTGGTCTCTCCATCGCCTTGCTCTGTGGGGTGCCTGGTGCCGTGCCC
CTCATCCAGTCTCGGATCGTGGGGGGCTGGGAGTGCGAGAAGCACAGCCAGCCTTG
GCAAGTGGCAGTGTACTCCACGGTTGGGCGCACTGCGGTGGCGTGCTGGTGACACC
CACAATGGGTGCTCACCGCGGCCCACTGTCTGAAGAAGAATTCACAAGTCTGGCTG
GGACGCCATAACCTGTTCGAACCTGAAGATACTGGGCAGCGCGTGCCGGTGTCCTCA
TTCCTTCCCTCACCCATTGTACAACATGTCGCTGCTGAAGCACCAGTCTTTGAGGCCT
GATGAGGACAGCTCCCATGACCTCATGCTGCTTAGACTCTCGGAACCCGCAAAGATT
ACCGACGTCGTGAAAGTGCTTGGACTGCCGACGCAGGAACCCGCCTTGGGGACTAC
CTGTTATGCTTCCGGCTGGGGATCCATCGAGCCCGAAGAATTCCTGCGGCCGCGCAG
CCTGCAGTGCGTGTCCTCCATCTGCTGTCAAACGATATGTGCGCCAGAGCCTACTC
CGAAAAGGTCACCGAGTTTATGCTGTGCGCCGGACTGTGGACCGGGGGAAAGGACA
CTTGCGGCGGAGACAGCGGCGGCCCCCTGGTCTGCAACGGCGTGCTGCAGGGAATT
ACCTCGTGGGGTCCAGAGCCGTGTGCGCTGCCTGAAAAGCCCGCCGTGTACACTAA
GGTCGTGCACTACCGGAAGTGGATCAAGGACACCATCGCCGCGAACCCGGAATTC

30

40

(配列番号1)

【0022】

カリクレイン-2のシグナル配列をコードするヌクレオチド配列には、配列番号1において二重下線を付してある。したがって、任意の実施形態では、カリクレイン-2をコードするヌクレオチド配列は、配列番号1のヌクレオチド配列を含む。任意の実施形態では、カリクレイン-2をコードするヌクレオチド配列は、シグナル配列を含まない配列番号1のヌクレオチド配列を含む。任意の実施形態では、カリクレイン-2をコードするヌクレオチド配列は、配列番号1のヌクレオチド配列の一部又は断片を含む。

50

【0023】

グリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) は、多くの細胞表面タンパク質に対して膜アンカーとして機能し、真核生物に遍在する複合糖脂質である。本明細書に記載されるように、GPIアンカータンパク質のC末端は、ホスホエタノールアミン架橋を介してGPIアンカードメインに連結される。GPIアンカードメインは、マンノース ($\alpha 1-2$) マンノース ($\alpha 1-6$) マンノース ($\alpha 1-4$) グルコサミン ($\alpha 1-6$) myo-イノシトールを含む高度に保存されたコアグリカン構造を含む (Paulick & Bertozzi, 「The Glycosylphosphatidylinositol Anchor: A Complex Membrane-Anchoring Structure for Proteins,」 *Biochemistry* 47 (27): 6991-7000 (2008)、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。リン脂質テールは、GPIアンカーを細胞膜に付着させる。コアグリカンは、例えば、ホスホエタノールアミン基、マンノース、ガラクトース、シアル酸、又は他の糖を含む様々な側鎖で修飾され得る。

10

【0024】

本明細書中で使用される場合、「グリコシルホスファチジルイノシトール付着配列」又は「GPI付着配列」という用語は、GPIアンカーによるポリペプチド配列の共有結合修飾をシグナル伝達するアミノ酸配列を指す。任意の実施形態では、GPI付着配列は、翻訳後に切断され、アミド基転移反応を介してGPIアンカーで置換される疎水性アミノ酸のストレッチを含む (例えば、Kinoshita, T., 「Glycosylphosphatidylinositol (GPI) Anchors: Biochemistry and Cell Biology: Introduction to a Thematic Review Series,」 *J. Lipid Res.* 57 (1): 4-5 (2016) を参照されたく、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。

20

【0025】

本明細書に記載されるカリクレイン-2 融合タンパク質をコードする組換え核酸構築物は、GPI付着配列をコードする第2のヌクレオチド配列を含み、GPI付着配列をコードするヌクレオチド配列は、カリクレイン-2 コード化ヌクレオチド配列の3'側に位置する。好適なGPI付着配列としては、公知のGPIアンカータンパク質において見出される付着配列が挙げられるが、これらに限定されない。例えば、GPI付着配列は、アルカリホスファターゼのGPI付着配列、5'-ヌクレオチダーゼのGPI付着配列、アセチルコリンエステラーゼのGPI付着配列、ジペプチダーゼのGPI付着配列、LFA-3 (CD58) のGPI付着配列、神経細胞接着分子 (neural cell adhesion molecule、NCAM) のGPI付着配列、崩壊促進因子 (decay accelerating factor、DAF; CD55) のGPI付着配列、CD59のGPI付着配列、Thy-1 (CD90) のGPI付着配列、CD14のGPI付着配列、癌胎児性抗原 (carcinoembryonic antigen、CEA) のGPI付着配列、CD16 β のGPI付着配列、及び葉酸結合タンパク質のGPI付着配列であり得る (Paulick et al., 「The Glycosylphosphatidylinositol Anchor: A Complex Membrane-Anchoring Structure for Proteins,」 *Biochemistry* 47 (27): 6991-7000 (2008)、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。表1は、本明細書に記載される組換え構築物の第2のヌクレオチド配列によってコードされ得る様々な例示的なGPI付着配列を提供する。

30

40

【0026】

50

【表 1】

表 1. 例示的な G P I 付着配列

GPIアンカードメインタンパク質*	付着配列**	配列番号
ヒト胎盤アルカリホスファターゼ (PLAP)	TACDLAPPAGTTDAAHPGRSVVPALLPLLAGT LLLLETATAP	9
ヒト胎盤アルカリホスファターゼ (PLAP)	TTDAAHPGRSVVPALLPLLAGTLLLLETATAP	5
ヒト崩壊促進因子 (DAF; CD55)	HETTPNKGSGTTS GTTRLLSGHTCFTLTGLLGT LVTMGLLT	10
ヒトエフリンA4アイソフォーム (EFNA4)	PGESGTSGWRGGDTPSPLCLLLLLLLLLILRLLRI L	11
ヒトエフリンA5アイソフォーム (EFNA5)	ESAEPSRGENAAQTTPRIPSRLLAILLFLLAMLLT L	12
ヒト葉酸受容体1 (FOLR1)	YAAAMSGAGPWAAWPFLLSLALMLLWLLS	13
ヒトエフリンA1アイソフォーム (EFNA1)	PEVRVLHSIGHSAAPRLFPLAWTVLLLPLLLLQ TP	14
ヒト辺縁系関連膜タンパク質 (LSAMP)	SVRGINGSISLAVPLWLLAASLLCLLSKC	15
ヒトレチクロン4受容体 (RTN4R)	DSEGS GALPSLTCSLTPLGLALVLWTVLGPC	16
ヒトコンタクチン1 (CNTN1)	VSQVKISGAPTLSPSLLGLLLPAFGILVYLEF	17
ヒトエフリンA3アイソフォーム (EFNA3)	QVPKLEKSISGTSPKREHLPLAVGIAFFLMTFLA S	18
ヒトエフリンA2アイソフォーム (EFNA2)	EAEPIFTSNNSSSPGGCRLFLSTIPVLWTLGGS	19
CD24	TNATTKAAGGALQSTASLFFVVSLSLLHLYS	20

*例えば、Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. Essentials of Glycobiology [Internet]. 3rd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2015-2017. doi:10.1101/glycobiology.3e.012及び Galian et al., 「Efficient Glycosylphosphatidylinositol (GPI) Modification of Membrane Proteins Requires a C-Terminal Anchoring Signal of Marginal Hydrophobicity,」 J. Biol. Chem. 287 (20): 16399-16409 (2012) を参照されたく、これらは参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる)。**太字のアミノ酸は、GPIの結合部位である（スペースの右側の配列は、アンカー付加の際にタンパク質から切断される）。

【0027】

任意の実施形態では、組換え構築物の第2のヌクレオチド配列は、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、及び配列番号20のアミノ酸配列のいずれか1つに対して80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又はそれ以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むGPI付着配列をコードする。

【0028】

G P I 付着配列が由来し得る他の公知のヒト G P I アンカードメインタンパク質としては、メラノトランスフェリン、C D 1 0 9、カドヘリン 1 3 アイソフォーム 1 プレタンパク質、レチクロン (reticulon) 4 受容体様 1 前駆体、カルボニックアンヒドラーゼ 4 プレタンパク質、ニューロトリミン (neurotrimin) アイソフォーム 1 前駆体、メソセリンアイソフォーム 2 プレタンパク質、C D 4 8 抗原アイソフォーム 1 前駆体、精子アクトソーム膜関連タンパク質 4 前駆体、K a z a l モチーフアイソフォーム 1 前駆体を有するヒト復帰誘発性システインリッチタンパク質、癌胎児性抗原関連細胞接着分子 8 前駆体、U L 1 6 結合タンパク質 2 プレプロタンパク質、リンパ球機能関連抗原 3 アイソフォーム、ヒトデコイ受容体、カルボキシペプチダーゼ M 前駆体、エクトー A D P - リボシルトランスフェラーゼ 3 アイソフォーム a 前駆体、G D N F ファミリーレセプター α - 4 アイソフォーム b 前駆体、G D N F ファミリーレセプター α - 3 プレプロタンパク質、プレビカンコアタンパク質アイソフォーム 1 前駆体、セマフォリン - 7 A アイソフォーム 1 プレプロタンパク質、C D 1 7 7 抗原前駆体、オリゴデンドロサイト - ミエリン糖タンパク質前駆体、C D 1 6 0 抗原前駆体、及びインテレクチン - 1 前駆体 (例えば、P i e r l e o n i e t a l . , 「R - P r e d G P I : A G P I A n c h o r P r e d i c t o r , 」 B M C B i o i n f o r m a t i c s 9 : 3 9 2 (2 0 0 8) を参照されたく、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる) が挙げられるが、これらに限定されない。したがって、本明細書に記載の組換え構築物の第 2 のヌクレオチド配列は、前述の G P I アンカードメインタンパク質のいずれか 1 つに由来する G P I 付着配列をコードすることができる。

10

20

【0029】

任意の実施形態では、G P I 付着配列をコードする第 2 のヌクレオチド配列は、アルカリホスファターゼに由来する G P I 付着配列をコードする。任意の実施形態では、G P I 付着配列をコードする第 2 のヌクレオチド配列は、ヒトアルカリホスファターゼ、例えば、胎盤アルカリホスファターゼ、生殖細胞アルカリホスファターゼ、腸型アルカリホスファターゼ、又は組織非特異的アルカリホスファターゼに由来する G P I 付着配列をコードする。

【0030】

任意の実施形態では、組換え構築物の第 2 のヌクレオチド配列は、配列番号 5 のアミノ酸配列に対して 8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列又はその断片を含むヒト胎盤アルカリホスファターゼ G P I 付着配列をコードする。

30

【0031】

【化 3】

TTDAAHPGRSVVPALLPLLAGTLLLLLETATAP (配列番号 5)。

【0032】

任意の実施形態では、組換え構築物の第 2 のヌクレオチド配列は、配列番号 5 又はその断片のヒト胎盤アルカリホスファターゼ G P I 付着配列をコードする。

40

【0033】

任意の実施形態では、G P I 付着配列をコードするヌクレオチド配列は、ヒト胎盤アルカリホスファターゼに由来する。例えば、G P I 付着配列は、ヒト胎盤アルカリホスファターゼ (例えば、G e n B a n k アクセッション番号 A A A 5 1 7 0 6 . 1、A A A 5 1 7 0 8 . 1、又は A A A 5 1 7 0 9 . 1 を参照されたい) に由来し得る。任意の実施形態では、ヒト胎盤アルカリホスファターゼ G P I 付着配列をコードするヌクレオチド配列は、配列番号 2 のヌクレオチド配列に対して 8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % 又はそれ以上の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

50

A C C A C T G A T G C T G C C C A T C C T G G A A G G T C T G T G G T G C C T G
C C T T G C T G C C T C T G C T G G C T G G C A C T C T G C T G C T G C T G G A
G A C T G C C A C T G C T C C C (配列番号2)

【0034】

任意の実施形態では、構築物の第1のヌクレオチド配列及び第2のヌクレオチド配列は、以下のような配列番号6のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又はそれ以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むカリクレイン-2融合タンパク質をコードする。

【0035】

【化4】

MWDLVLSIALSVGCTGAVPLIQSRIVGGWECEKHSQPWQVAVYSHGWAHCGGVLVHP
QWVLTAAHCLKKNSQVWLGRHNLFEPEDTGQRVPVSHSFPHPLYNMSLLKHQSLRPDE
DSSHDLMLRLSEPAKITDVVKVLGLPTQEPALGTTCYASGWGSIEPEEFLRPRSLQCVS
LHLLSNDMCARAYSEKVTEFMLCAGLWTGGKDTCGGDSGGPLVCNGVLQGITSWGPE
PCALPEKPAVYTKVVHYRKWIKDTIAANPEFTTDAAHPGRSVVPALLP~~LL~~AGTLLLLLE
TATAP

(KLK2のシグナル配列を二重下線で示す；PLAP GPI付着配列を太字で示す；切断部位を太字下線で示す)。任意の実施形態では、構築物の第1のヌクレオチド配列及び第2のヌクレオチド配列は、配列番号6のアミノ酸配列に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むカリクレイン-2融合タンパク質をコードする。任意の実施形態では、構築物の第1のヌクレオチド配列及び第2のヌクレオチド配列は、配列番号6のアミノ酸配列をコードする。

【0036】

任意の実施形態では、組換え核酸構築物の第1のヌクレオチド配列及び第2のヌクレオチド配列は、以下のような配列番号3のヌクレオチド配列に対して少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又はそれ以上の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

【0037】

10

20

30

40

50

【化 5】

ATGTGGGACCTGGTTCTCTCCATCGCCTTGTCTGTGGGGTGCACTGGTGCCGTGCCC
CTCATCCAGTCTCGGATCGTGGGGGGGCTGGGAGTGCAGAGAAGCACAGCCAGCCTTG
GCAAGTGGCAGTGTACTCCACGGTTGGGCGCACTGCGGTGGCGTGCTGGTGCACC
CACAATGGGTGCTCACCGCGGCCCACTGTCTGAAGAAGAATTACAAAGTCTGGCTG
GGACGCCATAACCTGTTTGAACCTGAAGATACTGGGCAGCGCGTGCCGGTGTCCCA
TTCCTTCCCTCACCCATTGTACAACATGTGCTGCTGAAGCACCAGTCTTTGAGGCCT
GATGAGGACAGCTCCCATGACCTCATGCTGCTTAGACTCTCGGAACCCGCAAAGATT
ACCGACGTCGTGAAAGTGCTTGGACTGCCGACGCAGGAACCCGCCTTGGGGACTAC
CTGTTATGCTTCCGGCTGGGGATCCATCGAGCCCGAAGAATTCCTGCGGCCGCGCAG
CCTGCAGTGCCTGCTCCCTCCATCTGCTGTCAAACGATATGTGCGCCAGAGCCTACTC
CGAAAAGGTCACCGAGTTTATGCTGTGCGCCGGACTGTGGACCGGGGGAAAGGACA
CTTGCGGCGGAGACAGCGGCGGCCCCCTGGTCTGCAACGGCGTGCTGCAGGGAATT
ACCTCGTGGGGTCCAGAGCCGTGTGCGCTGCCTGAAAAGCCCGCCGTGTACACTAA
GGTCGTGCACTACCGGAAGTGGATCAAGGACACCATCGCCGCGAACCCGGAATTCA
CCACTGATGCTGCCCATCCTGGAAGGTCTGTGGTGCCTGCCTTGCTGCCTCTG
CTGGCTGGCACTCTGCTGCTGCTGGAGACTGCCACTGCTCCCTAATGA

10

20

（K L K 2 シグナル配列をコードする配列を二重下線で示す；P L A P G P I 付着配列コード配列を太字で示す；停止コドン进行イタリック体で示す）。任意の実施形態では、組換え核酸構築物は、配列番号 3 のヌクレオチド配列に対して少なくとも 90% の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。任意の実施形態では、組換え核酸構築物は、配列番号 3 のヌクレオチド配列を含む。

【0038】

本開示の組換え核酸構築物は、天然には一緒に存在しない 2 つ以上の遺伝要素の組み合わせを含有する核酸分子である。それぞれの組換え核酸構築物は、直鎖状 DNA、環状 DNA の形態であり得る、すなわち、ベクター（例えば、細菌ベクター、ウイルスベクター、プラスミドベクター）内に配置され得るか、又はゲノムに組み込まれ得る、天然に存在しないヌクレオチド配列を含み得る。したがって、本開示の核酸構築物は、K L K 2 コード化ヌクレオチド配列の 5' 側に位置するプロモーターヌクレオチド配列を更に含み得る。プロモーターは、RNA ポリメラーゼに対する結合部位を含有し、下流の核酸配列の転写を開始する DNA 配列である。したがって、任意の実施形態では、本明細書に記載される核酸構築物は、プロモーターヌクレオチド配列を含む。

30

【0039】

プロモーターは、構成的に活性なプロモーター（すなわち、構成的に活性状態又は「オン」状態にあるプロモーター）、誘導性プロモーター（すなわち、活性状態又は不活性状態であるその状態が、外部刺激、例えば、特定の温度、化合物、又はタンパク質の存在によって制御されるプロモーター）、空間的に制限されたプロモーター（すなわち、転写制御エレメント、エンハンサーなど）（例えば、組織特異的プロモーター、細胞型特異的プロモーターなど）、又は時間的に制限されたプロモーター（すなわち、プロモーターは、生物学的プロセスの特定の段階の間、「オン」状態若しくは「オフ」状態にある）であり得る。

40

【0040】

好適なプロモーターは、ウイルスに由来し得、したがって、ウイルスプロモーターと称され得るか、又は原核生物若しくは真核生物を含む任意の生物に由来し得る。好適なプロモーターを使用して、任意の RNA ポリメラーゼ（例えば、RNA ポリメラーゼ I、RNA

50

AポリメラーゼII、RNAポリメラーゼIII)によって発現を駆動することができる。プロモーターは、ウイルスプロモーターであってもよい。例示的なプロモーターとしては、SV40初期プロモーター、マウス乳癌ウイルス末端反復配列(long terminal repeat、LTR)プロモーター；アデノウイルス主要後期プロモーター(adenovirus major late promoter、Ad MLP)；単純ヘルペスウイルス(herpes simplex virus、HSV)プロモーター、CMV最初期プロモーター領域(CMV immediate early promoter region、CMV IE)などのサイトメガロウイルス(cytomegalovirus、CMV)プロモーター、ラウス肉腫ウイルス(rous sarcoma virus、RSV)プロモーター、ヒトU6小核プロモーター(human U6 small nuclear promoter)(U6)(Miyagishi et al.,「U6 Promoter-Driven siRNAs with Four Uridine 3' Overhangs Efficiently Suppress Targeted Gene Expression in Mammalian Cells,」Nat. Biotechnol., 20:497-500(2002)、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)、増強されたU6プロモーター(例えば、Xia et al.,「An Enhanced U6 Promoter for Synthesis of Short Hairpin RNA,」Nucleic Acids Res. 31(17):e100(2003)、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)、ヒトH1プロモーター(「H1」)などが挙げられるが、これらに限定されない。任意の実施形態では、プロモーターは、ファージプロモーター、例えば、哺乳動物細胞において発現されるように遺伝子操作されたT7プロモーターである。

10

20

【0041】

任意の実施形態では、プロモーターは、真核生物RNAポリメラーゼプロモーター又はその誘導体である。例示的なRNAポリメラーゼIIプロモーターとしては、サイトメガロウイルス(「CMV」)プロモーター、ホスホグリセリン酸キナーゼ-1(「PGK-1」)プロモーター、及び伸長因子1 α (「EF1 α 」)プロモーターが挙げられるが、これらに限定されない。更に別の実施形態では、プロモーターは、U6、H1、56、7SK、及びそれらの誘導体からなる群から選択される真核生物RNAポリメラーゼIIIプロモーターである。

【0042】

RNAポリメラーゼプロモーターは、哺乳動物由来であってもよい。好適な哺乳動物プロモーターは、当該分野で周知であり、ヒトプロモーター、ネズミプロモーター、ウシプロモーター、イヌプロモーター、ネコプロモーター、ヒツジプロモーター、ブタプロモーター、クマプロモーター、及びサルプロモーターが挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0043】

任意の実施形態では、プロモーターヌクレオチド配列は、伸長因子1 α (EF1 α)プロモーターヌクレオチド配列である。例示的なEF1 α プロモーターヌクレオチド配列は、以下の配列番号21として提供される。あるいは、好適なプロモーターヌクレオチド配列は、以下の表2に提供される。

40

【0044】

50

【表 2 - 1】

表 2. 例示的なプロモーターヌクレオチド配列

プロモーター	配列	配列番号
EF 1 a	GGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCC CGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAA GGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTAAGTGGCTCCGCC TTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCG TGAACGTTCTTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTG CCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTT GCGTGCCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCC CGAGCTTCGGGTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTGAGGCTTGCGCTTA AGGAGCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTG GGGCCGCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGC TTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACG CTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACA CTGGTATTTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCGT CCCAGCGCACATGTTTCGGCGAGGCGGGGCTGCGAGCGCGGCCACCG AGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCT GGTCTCGCGCCGCGGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGC CCGGTCGGCACCAAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCC CTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGG GCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCTCAGCC GTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCGCTCCAGGCACCTC GATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGGAGG GGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAG TTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTT GAGTTTGATCTTGTTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGTTCAAAGTT TTTTTCTTCCATTTTCAGGTGTCGTGA	21
CMV	TAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATAT ATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGA CCGCCCAACGACCCCCGCCCATTTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCC ATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATT TACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAA GTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATT ATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTTCTACTTGGCAGTACATCTA CGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATC AATGGGCGTGATAGCGGTTTGAATCACGGGGATTTCCAAGTCTCCAC CCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTGTGTTTGGCACCAAAATCAACGGGAC TTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGT AGGCGTGATCGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTAGTGAAC CGTCAGATC	22

【 0 0 4 5 】

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

(表 2 の続き)

プロモーター	配列	配列番号
CAGG	ACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCAT ATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCT GACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTT CCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGT ATTTACGGTAAACTGCCCCTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCC AAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCA TTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTTCTACTTGGCAGTACATC TACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCT GCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTT ATTTATTTTTTAATTATTTTGTGCGAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGG GGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGG GGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTC CGAAAGTTTTCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAA AAGCGAAGCGCGCGGCGGGGCGGGGAGTCGCTGCGACGCTGCCTTCGC CCGGTGCCCGCTCCGCCGCCGCCCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTG ACTGACCGCGTTACTCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTC CTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTTAATGACGGCTTGTTCCTTTCT GTGGCTGCGTGAAAGCCTTGAGGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCG GGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGTGCGTGGGGAGC GCCGCGTGCGGCTCCGCGCTGCCCGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCG CGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCAGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGG CCGGGGGCGGTGCCCGCGGTGCGGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAA AGGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGG GCGGCTCGGTGCGGCTGCAACCCCCCTGCACCCCCCTCCCCGAGTT GCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTACGGGGCGTGG CGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGGTG CCGGGCGGGGCGGGGCGCCCTCGGGCCGGGGAGGGCTCGGGGGAGG GGCGCGGCGGCCCGCGGAGCGCCGGCGGCTGTGAGGCGCGGCGAG CCGCAGCCATTGCCTTTTATGGTAATCGTGCGAGAGGGGCGCAGGGACT TCCTTTGTCCCAAATCTGTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGGC CACCCCTCTAGCGGGCGCGGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGCGCAGG AAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGCCGCGCCGCGCTCC CTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGGACGGCTGCCT TCGGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTTCGGCTTCTGGCGTGTGACCG GCGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTCT ACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGCTGTCTCATCATTTTGGC AAAGAATTC	23
PGK1	TTCTACCGGGTAGGGGAGGCGCTTTTCCCAAGGCAGTCTGGAGCATGC GCTTTAGCAGCCCCGCTGGGCACTTGGCGCTACACAAGTGGCCTCTGG CCTCGCACACATTCCACATCCACCGGTAGGCGCCAACCGGCTCCGTTT TTTGGTGGCCCCCTTCGCGCCACCTTCTACTCCTCCCCTAGTCAGGAAG TTCCCCCCCCGCCCCGAGCTCGCGTCGTGCAGGACGTGACAAATGGA AGTAGCACGTCTCACTAGTCTCGTGCGAGATGGACAGCACCGCTGAGCA ATGGAAGCGGGTAGGCCTTTGGGGCAGCGGCCAATAGCAGCTTTGCTC CTTGCTTTTCTGGGCTCAGAGGCTGGGAAGGGGTGGGTCCGGGGGCG GGCTCAGGGGCGGGCTCAGGGGCGGGGCGGGCGCCCGAAGGTCCTC CGGAGGCCCGGCATTCTGCACGCTTCAAAGCGCACGTCTGCCGCGC GTTCTCCTCTTCCTCATCTCCGGGCCTTTTCGACCT	24

【 0 0 4 6 】

10

20

30

40

【表 2 - 3】

(表 2 の続き)

プロモーター	配列	配列番号
SV40	CTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCA GCAGGCAGAAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGG TGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAAGTATGCAAAGCATG CATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCCTAACTCCGCCCATC CCGCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTTCTCCGCCCATGGCTGA CTAATTTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCTGCCTCTGAGC TATCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAA AAAGCT	25
UBC	GGTGCAGCGGCCTCCGCGCCGGGTTTTGGCGCCTCCCGCGGGCGCCC CCCTCCTCACGGCGAGCGCTGCCACGTCAGACGAAGGGCGCAGGAGC GTTCTGATCCTTCCGCCCGGACGCTCAGGACAGCGGCCCGCTGCTCA TAAGACTCGGCCTTAGAACCCCAAGTATCAGCAGAAGGACATTTTAGGA CGGGACTTGGGTGACTCTAGGGCACTGGTTTTCTTTCCAGAGAGCGGA ACAGGCGAGGAAAAGTAGTCCCTTCTCGGCGATTCTGCGGAGGGATCT CCGTGGGGCGGTGAACGCCGATGATTATATAAGGACGCGCCGGGTGT GGCACAGCTAGTTCCGTGCGAGCCGGGATTTGGGTGCGGTTCTTGT TGTGGATCGCTGTGATCGTCACTTGGTGAGTTGCGGGCTGCTGGGCTG GCCGGGGCTTTCTGTGGCCGCCGGGCCGCTCGGTGGGACGGAAGCGTG TGGAGAGACCGCCAAGGGCTGTAGTCTGGGTCCGCGAGCAAGGTTGC CCTGAACTGGGGGTTGGGGGGAGCGCACAAAATGGCGGCTGTTCCCG AGTCTTGAATGGAAGACGCTTGTAAAGCGGGCTGTGAGGTCGTTGAAA CAAGGTGGGGGGCATGGTGGGGCGCAAGAACCCAAGGTCTTGAGGCC TTCGCTAATGCGGGAAAGCTCTTATTCGGGTGAGATGGGCTGGGGCAC CATCTGGGGACCCTGACGTGAAGTTTGTCACTGACTGGAGAACTCGGG TTTGTCTGTGTTGCGGGGGCGGCAGTTATGCGGTGCCGTTGGGCAG TGCACCCGTACCTTTGGGAGCGCGCGCCTCGTCGTGTCGTGACGTCAC CCGTTCTGTTGGCTTATAATGCAGGGTGGGGCCACCTGCCGGTAGGTG TGCGGTAGGCTTTTCTCCGTGCGAGGACGCGAGGTTCCGGGCCTAGGGT AGGCTCTCCTGAATCGACAGGCGCCGGACCTCTGGTGAGGGGAGGGA TAAGTGAGGCGTCAGTTTCTTTGGTTCGTTTTATGTACCTATCTTCTTAA GTAGCTGAAGCTCCGGTTTTGAACTATGCGCTCGGGGTTGGCGAGTGT GTTTTGTGAAGTTTTTTAGGCACCTTTTGAAATGTAATCATTTGGGTCAA TATGTAATTTTCAGTGTTAGACTAGTAAA	26

10

20

30

【0047】

本開示のいくつかの実施形態は、本明細書に記載の組換え核酸構築物（すなわち、カリクレイン-2 融合タンパク質をコードする組換え核酸構築物であり、当該構築物は、カリクレイン-2（KLK2）をコードするヌクレオチド配列と、グリコシルホスファチジルイノシトール（GPI）付着配列をコードするヌクレオチド配列と、を含み、当該GPI付着配列コード化ヌクレオチド配列は、KLK2コード化ヌクレオチド配列の3'側に位置する）を含むベクターに関する。本明細書で使用される場合、ベクターという用語は、プラスミド、ファージ、トランスポゾン、コスミド、染色体、ウイルス、ビリオンなどの任意の遺伝要素を意味し、ベクターは、適切な制御要素と会合した場合に複製することができ、細胞間で遺伝子配列を移動させることができる。したがって、この用語は、クローニングベクター及び発現ベクター、並びにウイルスベクターを含む。したがって、いくつかの実施形態では、組換え核酸構築物は、適切なセンス（5'から3'）配向及び正しいリーディングフレームで発現系又はベクターに挿入され得る。ベクターは、本明細書中に開示されるようなカリクレイン-2 融合タンパク質の転写及び／又は翻訳に必要な要素を含むし得る。

40

【0048】

一実施形態では、ベクターは、プラスミドである。本明細書に開示される組換え核酸構築物を含有するのに好適な多数のベクターが当業者に公知であり、多くが市販されている。例えば、以下のベクターが提供されている。真核細胞の場合：pcDNA3.1（+），Tornado（Litke & Jaffrey，「Highly Efficient

50

nt Expression of Circular RNA Aptamer in Cells Using Autocatalytic Transcripts」, Nat. Biotechnol. 37 (6) : 667-675 (2019)、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)、pXT1、pSG5 (Stratagene)、pSVK3、pBPV、pMSG、及びpSVLSV40 (Pharmacia) が挙げられる。しかしながら、細胞と適合性である限り、任意の他のベクターが使用される。

【0049】

別の実施形態では、ベクターは、ウイルスベクターである。ウイルスベクターは、組換え核酸構築物の発現を促進するための任意の手段による、本明細書に記載される組換え核酸構築物の細胞への導入に好適な任意のベクターから選択され得る。好適なウイルスベクターとしては、ワクシニアウイルス；ポリオウイルス；アデノウイルス（例えば、Gregory et al. に対する国際公開第94/12649号、Crystal et al. に対する同第93/03769号、Haddada et al. に対する同第93/19191号、Wilson et al. に対する同第94/28938号、Gregory に対する同第95/11984号、Graham に対する同第95/00655号を参照されたく、これらは参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる）；アデノ随伴ウイルス（例えば、Flannery et al., 「Efficient Photoreceptor-Targeted Gene Expression In Vivo by Recombinant Adeno-Associated Virus」, PNAS 94:6916-6921 (1997) ; Bennett et al., 「Real-Time, Noninvasive In Vivo Assessment of Adeno-Associated Virus-Mediated Retinal Transduction」, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 38:2857-2863 (1997) ; Jomary et al., 「Nonviral Ocular Gene Transfer」, Gene Ther. 4:683-690 (1997) ; Rolling et al., 「Evaluation of Adeno-Associated Virus-Mediated Gene Transfer into the Rat Retina by Clinical Fluorescence Photography」, Hum. Gene Ther. 10:641-648 (1999) ; Ali et al., 「Gene Transfer Into the Mouse Retina Mediated by an Adeno-Associated Viral Vector」, Hum. Mol. Genet. 5:591-594 (1996) ; Samulski et al., 「Helper-Free Stocks of Recombinant Adeno-Associated Viruses: Normal Integration Does not Require Viral Gene Expression」, J. Vir. 63:3822-3828 (1989) ; Mendelson et al., 「Expression and Rescue of a Nonselected Marker from an Integrated AAV Vector」, Virol. 166:154-165 (1988) ; 及び Flotte et al., 「Stable In Vivo Expression of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator With an Adeno-Associated Virus Vector」, PNAS 90:10613-10617 (1993) を参照されたく、これらは参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる）；SV40；単純ヘルペスウイルス；ヒト免疫不全ウイルス（例えば、Miyoshi et al., 「Stable and Efficient Gene Transfer into the Retina Using an HIV-Based Lentiviral Vector」, PNAS 94:10319-10323 (1997) を参照されたく、これは

10

20

30

40

50

参照によりその全体が本明細書に組み込まれる) ; レトロウイルスベクター、例えば、ネズミ白血病ウイルス、脾臓壊死ウイルスに基づくウイルスベクター、並びにラウス肉腫ウイルス、ハーベイ肉腫ウイルス、トリ白血病ウイルス、レンチウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、骨髄増殖性肉腫ウイルス、及び乳癌ウイルスなどのレトロウイルスに由来するベクターなどが挙げられるが、これらに限定されない。したがって、いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レンチウイルスベクター、ワクシニアベクター、レトロウイルスベクター、及び単純ヘルペスウイルスベクターからなる群より選択される。

【0050】

K L K 2 - G P I 組換え構築物を含む例示的なウイルスベクターは、以下のような配列番号7の配列を有する。

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

10

20

30

40

50

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

10

20

30

40

50

TTCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTC
GTGAAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAA
CAACGTCTGTAGCGACCCCTTTGCAAGGCAGCGGAACCCCC
ACCTGGCGACAGGTGCTCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTA
TAAGATAACACCTGCAAAAGGCGGCACAACCCCAAGTGCCACG
TTGTGAGTTGGATAGTTGTGGAAAGAGTCAAATGGCTCTC
CTCAAAGCGTATTCAACAAGGGGGCTGAAGGATGCCCAGAAG
GTACCCCATTTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTGCA
CATGCTTTACATGTGTTTAGTTCGAGGTTAAAAAAACGTCT
AGGCCCCCCCGAACACCGGGGACGTGGTTTTTCTTTGAAAA
ACACGATGATAATATGGCCACAACCATGGCGTCCGGAATG
ATTGAACAAGATGGATTGCACGCGAGGTTCTCCGGCCGCTT
GGGTGGAGAGGCTATTCTGGCTATGACTGGGCGACAACAGAC
AATCGGGCTGCTCTGATGCCCGCCGTGTTCCGGGCTGTCA
GCGGCGCGCCCGGTTCTTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCG
GTGCCCTGAATGAACCTGCAGGACGAGGCGAGCGCGGCTATC
GTGGCTGGCCGCGACGGGCGTTCTCTTGCGCAGCTGTGCTC
GACGTTGTCACTGAAGCGGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGG
GCGAAGTGC CGGGGCGAGGATCTCCTGTCTCATCTCACCTTGC
TCCTGCGCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGTATGCAATGCGG
CGGCTGCATACGCTTGATCCGGGCTACCTGCCCATTCGACC
ACCAAGCGGAACATCGCATCGAGCGAGCACGTACTCGGAT
GGAAGCCGGTCTTTGTTCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAG
CATCAGGGGGCTCGCGGCCAGCCGAACTGTTCCGCCAGGCTCA
AGGCGCGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGTCTGTGACCCA
TGGCGATGCCCTGCTTTGCCGAATATCATGGGTGGAAAAATGGC
CGCTTTTTCTGGATTTCATCGACTGTGGCCCGGCTGGGTGTGG
CGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGGCTACCCCGTGATAT
TGCTGAAGAGCTTTGGCGGGCGAATGGGCTGACCGCTTCTCTC
GTGCTTTTACGGGTATCGCCGCTCCCGATTTCGCAGCGCATCG
CCTTCTATCGCCTTCTTTGACGAGTTCTTCTGAGTCTGACTC
GACAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAGATTGA
CTGGTATTCTTAACCTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGG
ATACGCTGCTTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCC
CGTATGGCTTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGT
TGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTGAGGCA
ACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGTCTGACGCAACCCCC
ACTGGTTTGGGGCATTTGCCACCACTGTCTAGCTCCTTTCCG
GGACTTTTCGCTTTTCCCCCTCCTATTGCGCACGGCGGAAC
C
ATCGCCGCGCTGCTTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGGCTCGGC
TGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTGTCGGGGGAAATC
ATCGTCCCTTTCTTTGGCTGCTCGCCCTGTGTTGCCACCTGG
ATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGGCC
TCAATCCAGCGGACCTTCTTCCCGCGGGCCTGCTGCCGGC
TCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCCGCTTCCGCTCAGACG
AGTCGGATCTCCCTTTGGGGCCGCTCCTCCCGCTGGTACCT
TTAAGACCAATGACTTACAAGGCGAGCTGTAGATCTTAGCC
ACTTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGGCTAATTCA
CTCCCAACGAAGATAAGATCTGCTTTTTTGTCTGTACTGGG

10

20

30

40

50

TCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGGCTCTCTG
GCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTT
GCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTTGCCCCGTCTGTTGTGT
GACTCTGGTAAC TAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCA
TGTGGAAAATCTCTAGCAGTAGTAGTTTCATGTCTCTTAT
TATTCAGTATTTATAACTTTGCAAAGAAATGAATATCAGAG
AGTGAGAGGAAC TTTGTTTATTG CAGCTTATAATGGTTACA
AATAAAGCAATAGCATCACAAATTT CACAAATAAAGCATT
TTTTTCACTGCATTTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATC
AATGTATCTTATCATGTCTGGCTCTAGCTATCCCGCCCCCT
AACTCCGCCCCATCCCGCCCCCTAACTCCGCCCCAGTTCCGCCC
CATTTCTCCGCCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTTTATTTATG
CAGAGGCCGAGGCCGCTCGGCCCTCTGAGCTATTCCAGAA
GTAGTGAGGAGGCTTTTTTTGGAGGCCCTAGACTTTTGCAGA
GACCAAATTCGTAAATCATGTCTAGCTGTTTCTCTGTGTGA
AATTGTTATCCGCTCACAAATTCACACACAAACATACGAGCCG
GAAGCATAAAGTGTAAGAGCCTGGGGTGCCCTAATGAGTGAG
CTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTC
CAGTCGGGAAACCTGTCTGCTGCCAGCTGCATTAATGAATCG
GCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTC
TTCCGCTTCTCTCGCTCACTGACTCGCTCGGCTCGGTCTGTT
CGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAA
TACGGTTATCCACAGAAATCAGGGGATAACGCGAGGAAAGAA
CATGTGAGCAAAGAGGCCAGCAAAGAGGCCAGGAACCGTAAA
AAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTTCATAGGCTCCGCCCCC
CTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTG
GCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCC
CCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCGACCCCTGC
CGCTTACC GGATACCTGTCCGCTTTTCTCCCTTTCGGGAAG
CGTGCGCTTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGT
TCGGTGTAGGTCTGTTCTGCTCCAAGCTGGGGCTGTGTGACG
AACCCCCCGTTTCAGCCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAA
CTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCG
CCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGA
GGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTTGAAGTGGTGGCC
TAACTACGGCTACACTAGAAAGGACAGTATTTGGTATCTGC
GCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTTCGGAAAAAGAGTTGGTA
GCTCTTGATCCGGCAAACAACCCGCTGGTAGCGGTGG
TTTTTTTTTGTTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAA
GGATCTCAAGAAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGGTCTG
ACGCTCAGTGGAACGA AAACTCACGTTAAGGGATTTTGGT
CATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACTAGATCCTTTTA
AATTA AAAATGAAGTTTTTA AATCAATCTAAAGTATATATG
AGTAAACTTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGA
GGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCTGTTTCATCCATA
GTTGCTGACTCCCCGTCTGTGTAGATAACTACGATACGGG
AGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCG
AGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAAATAAAC
CAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAAGTGGTCTCTGCAA
CTTTATCCGCTCTCATCCAGTCTATTAAATTGTTGCCGGGA

10

20

30

40

50

AGCTAGAGTAAGTAGTTTCGCCAGTTAATAGTTTTCGCCAAC
GTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTTGGTGTCAACGCTCGT
CGTTTGGTATGGCTTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATC
AAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCG
GTTAGCTCCTTTCGGTCCCTCCGATCGTTGTGCAAGTAAGT
TGGCCGCGAGTGTTCATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCA
TAATTCTCTTACTGTTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCT
GTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTTCTGAGAATAGT
GTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGGCCCGGCGTCAATACG
GGATAATAACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAAGTGCTC
ATCATTTGGAAAAACGTTCTTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGA
TCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTTCGATGTAACCCCACTCG
TGCACCCAACTGATCTTTCAGCATCTTTTACTTTTCAACCAGC
GTTTCTGGGTGAGCAAAAAACAGGAAGGCAAAAAATGCCGCA
AAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCAT
ACTCTTCTCTTTTCAATAATTATTGAAGCATTTATCAGGGT
TATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGA
AAAAATAAACAAATAGGGGGTTCGCGCGCACATTTCCCCGAAA
AGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTTATTTATCATGACA
TTAACCTATAAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCCCTTTCGTC
TCGCGCGTTTTCGGTGATGACGGTGAAAAACCTCTGACACAT
GCAGCTCCCCGGAGACGGTCAACAGCTTGTCTGTAAAGCGGAT
GCCGGGAGCAGACAAGCCCCGTCAAGGGCGCGTCAAGCGGGGTG
TTGGCGGGGTGTCTGGGGGCTGGCTTAACCTATGCGGGCATCAGA
GCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATA
CCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAAATACCGCATCAGGCGGCC
ATTTCGCCATTTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATC
GGTGCGGGGCCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGGAAAGGG
GGATGTGTCTGCAAGGCGGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGT
TTTCCCAGTCAACGACGTTGTAAAAACGACGGGCCAGTGCCAA
GCTG (huK L K 2 __ G P I をコードする p C D H N e o ベクター；配列番号 7)。

【0051】

本開示の別の態様は、本明細書に記載の組換え核酸構築物又は本開示による組換え核酸構築物を含むベクターによってコードされる、カリクレイン-2 融合タンパク質に関する。

【0052】

したがって、任意の実施形態では、本開示によるカリクレイン-2 融合タンパク質は、以下のような配列番号 6 のアミノ酸配列に対して少なくとも 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 又はそれ以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0053】

10

20

30

40

50

【化 6】

MWDLVLSIALSVGCTGAVPLIQSRIVGGWECEKHSQPWQVAVYSHGWAHCGGVLVHP
QWVLTAAHCLKKNSQVWLGRHNLFEPEDTGQRPVSHSFPHPLYNMSLLKHQSLRPDE
DSSHDLMLRLSEPAKITDVVKVLGLPTQEPALGTTTCYASGWGSIEPEEFLRPRSLQCVS
LHLLSNDMCARAYSEKVTEFMLCAGLWTGGKDTCCGGDSGGPLVCNGVLQGITSWGPE
PCALPEKPAVYTKVVHYRKWIKDTIAANPEFTTDAAHPGRSVVPALLPLLAGTLLLLLE
TATAP

10

（KLK2のシグナル配列を二重下線で示す；PLAP GPI 付着配列を太字で示す；切断部位を太字下線で示す）。任意の実施形態では、本明細書に開示されたカリクレイン-2 融合タンパク質は、配列番号6のアミノ酸配列に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、カリクレイン-2 融合タンパク質は、配列番号6のアミノ酸配列を含む。

【0054】

上記に記載されているように、グリコシルホスファチジルイノシトール（GPI）付着配列は、翻訳後に切断され、アミド基転移反応を介してGPIアンカーで置換される疎水性アミノ酸のストレッチを含む（例えば、Kinoshita, T., 「Glycosylphosphatidylinositol (GPI) Anchors: Biochemistry and Cell Biology: Introduction to a Thematic Review Series,」 J. Lipid Res. 57 (1): 4-5 (2016) を参照されたく、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。したがって、任意の実施形態では、本明細書に記載されるGPI付着配列は、切断部位を含む。そのような実施形態によれば、本開示によるカリクレイン-2 融合タンパク質は、切断部位の後にアミノ酸残基を含まない。例えば、いくつかの実施形態では、カリクレイン-2 融合タンパク質は、インビボで発現された場合、配列番号6のアミノ酸残基267~295を含まない。

20

【0055】

任意の実施形態では、本開示のタンパク質のカリクレイン融合タンパク質は、融合タンパク質のカリクレイン部分のアミノ末端シグナル配列を含まない。したがって、いくつかの実施形態では、カリクレイン融合タンパク質は、配列番号6のアミノ酸残基1~17を含まない。

30

【0056】

任意の実施形態では、カリクレイン-2 融合タンパク質は、配列番号7のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又はそれ以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。例えば、カリクレイン-2 融合タンパク質は、配列番号7のアミノ酸配列に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有し得る。任意の実施形態では、カリクレイン-2 融合タンパク質は、配列番号7のアミノ酸配列を有する。

40

【0057】

本開示の別の態様は、細胞の調製物に関し、調製物の細胞は、本明細書に記載の組換えカリクレイン-2 融合構築物を発現するように改変されている。調製物の細胞は、表面上に組換えカリクレイン-2 融合タンパク質を発現するように改変されており、カリクレイン-2 融合タンパク質は、カリクレイン-2 ポリペプチド配列と、カリクレイン-2 ポリペプチド配列のC末端に連結されたグリコシルホスファチジルイノシトール（GPI）付着配列の一部と、GPI付着配列部分に結合されたGPIアンカードメインと、を含む。

【0058】

上記に詳細に記載されるように、融合タンパク質のカリクレイン-2 部分は、任意の哺

50

乳動物カリクレインー２ポリペプチド配列、例えば、ヒト、ネズミ、ウシ、イヌ、ネコ、ヒツジ、ブタ、クマ、又はサルのカリクレインー２ポリペプチド配列を包含し得る。任意の実施形態では、融合タンパク質のカリクレインー２部分は、ヒトカリクレインー２タンパク質又はそのポリペプチド断片を含む。例えば、ヒトカリクレインー２ポリペプチド配列は、配列番号４のアミノ酸配列又は配列番号４のアミノ酸残基１８～２６３に対して少なくとも８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又はそれ以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を有し得る。

【００５９】

GPI 付着配列の一部は、公知の GPI アンカードメインタンパク質の GPI 付着配列に由来し得る。例示的な GPI アンカードメインタンパク質及び GPI 付着配列は、上記に提供されている。任意の実施形態では、GPI 付着配列の一部は、アルカリホスファターゼ、例えば、ヒト胎盤アルカリホスファターゼに由来する。

【００６０】

任意の実施形態では、GPI 付着配列の一部は、配列番号５のアミノ酸配列の一部であるか、又は配列番号５のアミノ酸配列に対して少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくはそれ以上の配列同一性を有するアミノ酸配列である。任意の実施形態では、本明細書に記載されるカリクレインー２融合タンパク質の GPI 付着配列部分は、配列番号５のアミノ酸残基１～３を含む。

【００６１】

任意の実施形態では、細胞の調製物は、配列番号６のアミノ酸配列又は配列番号７のアミノ酸配列に対して少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又はそれ以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する組換えカリクレインー２融合タンパク質を発現するように改変される。例えば、調製物の細胞は、表面上に配列番号６のアミノ酸配列又は配列番号７のアミノ酸配列に対して少なくとも９０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むカリクレインー２融合タンパク質を発現し得る。

【００６２】

他の実施形態では、細胞の調製物は、表面上に配列番号６の配列又は配列番号７のアミノ酸配列を有する組換えカリクレインー２融合タンパク質を発現するか、又はその組換えカリクレインー２融合タンパク質により改変される。

【００６３】

発現されたカリクレインー２融合タンパク質は、GPI アンカードメインを更に含む。GPI アンカードメインは、翻訳後にインビボで生じる GPI トランスアミダーゼ反応を介して GPI 付着配列に結合される。結合した GPI アンカードメインは、エタノールアミン-PO-6 Man α 1-2 Man α 1-6 Man α 1-4 GlcN α 1-6 myo-イノシトール-1-PO-脂質のコアグリカン構造を含む。

【００６４】

上述したように、調製物の細胞は、本開示による組換え核酸構築物（例えば、直鎖状構築物）又は本開示による組換え核酸構築物を含むベクターからカリクレインー２融合タンパク質を発現し得る。

【００６５】

本明細書に記載される組換え核酸構築物及び／又はベクターは、形質転換、特に形質導入、コンジュゲーション、リポフェクション、プロトプラスト融合、可動化、微粒子銃、マイクロインジェクション、トランスフェクション、又はエレクトロポレーションを介して細胞に導入され得る。任意の実施形態では、調製物の細胞は、本開示による核酸構築物又は本開示によるベクターを用いて安定的に形質導入される。任意の実施形態では、調製物の細胞は、ゲノムに安定に組み込まれた組換え核酸構築物を含む。

【００６６】

任意の実施形態では、調製物の細胞は、哺乳動物細胞である。適切な哺乳動物細胞とし

10

20

30

40

50

ては、齧歯類細胞（すなわち、マウス細胞若しくはラット細胞）、ウサギ細胞、モルモット細胞、ネコ細胞、イヌ細胞、ブタ細胞、ウマ細胞、ウシ細胞、ヒツジ細胞、サル細胞、非ヒト霊長類細胞、又はヒト細胞が挙げられるが、これらに限定されない。任意の実施形態では、調製物の細胞は、ヒト細胞である。

【0067】

本明細書に記載される組換え核酸構築物又はベクターを含む細胞の好適な調製物としては、それらの系統の任意の段階の、初代細胞、不死化細胞若しくは形質転換胚細胞、胎児細胞、又は成体細胞、例えば、全能性細胞、多能性細胞、多分化能細胞、又は分化細胞が挙げられる。細胞の更なる好適な調製物としては、細胞株由来の細胞が挙げられる。

【0068】

任意の実施形態では、調製物の細胞は、前立腺細胞、例えば、原発性前立腺細胞、原発性前立腺癌細胞、前立腺癌細胞株、又は非腫瘍前立腺細胞株である。

【0069】

好適な例示的な非腫瘍前立腺細胞株としては、pRNS-1-1、RWPE-1、BPH1、及びPIN細胞株が挙げられるが、これらに限定されない（Cunningham & You, 「In Vitro and In Vivo Model Systems Used in Prostate Cancer Research,」 J. Biol. Methods 2 (1) : e17 (2015)、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。RWPE-1細胞は、ヒトパピローマウイルス（human papilloma virus、HPV）18で不死化され、その後6～7週間にわたって単離及び増殖され、AR/PSA mRNA/タンパク質について陽性であり、アンドロゲン感受性である。BPH1細胞は、良性前立腺肥大又は過形成（benign prostatic hypertrophy or hyperplasia、BPH）と一致する尿路閉塞のための手技を受けている患者からの経尿道的切除によって得られたBPH組織から単離した。BPH1細胞は、SV40ラージT抗原で不死化されており、AR/PSA陰性及びWT p53陽性である。前立腺上皮内腫瘍（prostatic intraepithelial neoplasia、PIN）を有する患者からPIN細胞を単離し、HPV 18で不死化した。

【0070】

任意の実施形態では、前立腺細胞は、ホルモンのない前立腺癌（prostate cancer、PCa）細胞株である。好適なホルモンのないPCa細胞株としては、RWPE-2、LNCaP、LAPC-4、LAPC-9、VCaP、MDA PCa 2a/2b、及びLuCaPが挙げられるが、これらに限定されない（Cunningham & You, 「In Vitro and In Vivo Model Systems Used in Prostate Cancer Research,」 J. Biol. Methods 2 (1) : e17 (2015)、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。LNCaP細胞は、リンパ節に見られるヒト転移性前立腺癌から最初に単離され、AR及びPSA mRNA/タンパク質発現に対してアンドロゲン応答性である。VCaP細胞は、脊椎転移性病変の結果として、2001年に最初に単離された。VCaP細胞は、野生型AR mRNA/タンパク質を有するアンドロゲン感受性について陽性であり、PSA mRNA/タンパク質、前立腺酸性ホスファターゼ（prostatic acid phosphatase、PAP）、網膜芽細胞腫（retinoblastoma、Rb）、及びp53（A248W変異を有する）を発現する。MDA PCa 2a/2b細胞株は、後期疾患の間に脊椎転移を有する単一の患者に由来し、アンドロゲン感受性であり、マウスにおいて腫瘍形成性であり、AR mRNA/タンパク質を発現し、PSA mRNA/タンパク質を発現する。

【0071】

任意の実施形態では、前立腺癌細胞株は、去勢抵抗性細胞株である。好適な去勢抵抗性細胞株としては、C4-2、C4-2B、22Rv1、ARCaP（MDA PCa 1）、PC3、及びDU145細胞株が挙げられるが、これらに限定されない（Cunningham & You, 「In Vitro and In Vivo Model S

10

20

30

40

50

systems Used in Prostate Cancer Research, J. Biol. Methods 2 (1): e17 (2015)、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。PC3細胞は、脊椎転移性前立腺腫瘍から単離され、ホルモン非依存性であり、アンドロゲン受容体 (androgen receptor、AR) 又はPSAのmRNA／タンパク質を発現せず、コドン138におけるC欠失を有する異常p53を発現し、169におけるナンセンスコドンを引き起こす (ヘテロ接合性の喪失を引き起こす)。DU145細胞は、脳転移に由来し、ホルモン非依存性であり、アンドロゲン受容体 (AR) mRNA／タンパク質又はPSA mRNA／タンパク質を発現せず、ヘテロ接合型P223L／V274F p53発現パターンを含む。

【0072】

任意の実施形態では、調製物の細胞は、内因性KLK2を発現しない。すなわち、細胞は、本明細書に記載のカリクレイン-2融合タンパク質のみを発現する。任意の実施形態では、調製物の細胞は、内因性KLK2を発現し、かつ本明細書に記載されるカリクレイン-2融合タンパク質を発現する。

【0073】

本開示の更なる態様は、表面上に組換えカリクレイン-2融合タンパク質を発現する細胞を含む非ヒト動物であって、組換え融合タンパク質は、カリクレイン-2ポリペプチド配列と、カリクレイン-2ポリペプチド配列のC末端に連結されたグリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) 付着配列の一部と、GPI付着配列部分に結合されたGPIアンカードメインと、を含む、非ヒト動物を対象とする。

【0074】

一実施形態では、組換えカリクレイン-2融合タンパク質を発現する細胞は、非ヒト動物に移植される。一実施形態では、組換えカリクレイン-2融合タンパク質を発現する細胞は、齧歯類に移植される。一実施形態では、組換えカリクレイン-2融合タンパク質を発現する細胞は、マウスに移植される。一実施形態では、組換えカリクレイン-2融合タンパク質を発現するヒト細胞は、免疫無防備状態の齧歯類、例えば、免疫無防備状態のマウスに移植される。一実施形態では、組換えカリクレイン-2融合タンパク質を発現するマウス細胞は、同系マウスに移植される。

【0075】

別の実施形態では、カリクレイン-2融合タンパク質をコードする組換え核酸構築物を非ヒト動物のゲノムに安定に組み込んで、本明細書に記載の非ヒト動物の細胞の全て又は特定のサブタイプの表面上にカリクレイン-2融合タンパク質を発現することができるトランスジェニック非ヒト動物を作製する。

【0076】

上記に記載されるようなカリクレイン-2融合タンパク質をコードする組換え核酸構築物は、当業者に周知の任意の標準的な方法によって、非ヒト動物のゲノムに組み込むことができる。当該分野で公知の任意の種々の技術のいずれかを使用して、導入遺伝子を動物に導入して、トランスジェニック動物の樹立系統を作製することができる (例えば、Hogan et al., Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, 1986); Hogan et al., Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, 1994)、及びLazzariniに対する米国特許第5,602,299号; Krimpenfortに対する同第5,175,384号; Ginsburgに対する同第6,066,778号; 及びSato et al.に対する同第6,037,521号を参照されたく、これらは参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる)。このような技術としては、前核マイクロインジェクション (Wagner et al.に対する米国特許第4,873,191号、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)、生殖細胞系へのレトロウイルス媒介遺伝子導入 (Van der Putten et al. Proc.

10

20

30

40

50

Natl. Acad. Sci. USA 82:6148-6152 (1985)、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる) ; 胚性幹細胞における遺伝子標的化 (Thompson et al., Cell 56:313-321 (1989)、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる) ; 胚のエレクトロポレーション (Lo et al., Mol. Cell. Biol. 3:1803-1814 (1983)、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる) ; 及び精子媒介遺伝子導入 (Lavitrano et al., Cell 57:717-723 (1989)、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる) が挙げられるが、これらに限定されない。
【0077】

任意の実施形態では、様々な発生段階の胚細胞を使用して、トランスジェニック動物を作製するための導入遺伝子を導入することができる。胚細胞の発生段階に応じて異なる方法が使用される。接合体は、マイクロインジェクションの良好な標的であり、接合体をマイクロインジェクションする方法は、周知である (Wagner et al. に対する米国特許第 4, 873, 191 号を参照されたく、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。遺伝子導入のための標的として接合体を使用することは、ほとんどの場合、注入された DNA が最初の切断の前に宿主ゲノムに組み込まれることとなるという点で大きな利点を有する (Brinster et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:4438-4442 (1985) を参照されたく、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。結果として、トランスジェニック非ヒト動物の全ての細胞は、組み込まれた導入遺伝子を保有することとなる。

【0078】

本発明のトランスジェニック動物はまた、標的ベクターを胚性幹 (embryonic stem、ES) 細胞に導入することによって作製することもできる。ES 細胞は、着床前胚を適切な条件下でインビトロで培養することによって得られる (Evans et al., Nature 292:154-156 (1981) ; Bradley et al., Nature 309:255-258 (1984) ; Gossler et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:9065-9069 (1986) ; Robertson et al., Nature 322:445-448 (1986)、これらは参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる)。導入遺伝子は、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム共沈殿、プロトプラスト融合又はスフェロプラスト融合、リポフェクション及び DEAE-デキストラン媒介トランスフェクションを含む当該分野で公知の種々の方法を使用する DNA トランスフェクションによって、ES 細胞に効率的に導入され得る。導入遺伝子はまた、レトロウイルス媒介形質導入又はマイクロインジェクションによって ES 細胞に導入され得る。そのようなトランスフェクトされた ES 細胞は、その後、胚盤胞期胚の胞胚腔への導入後に胚に定着し、得られるキメラ動物の生殖系列に寄与することができる (Jaenisch, Science 240:1468-1474 (1988) に概説されており、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。トランスフェクトされた ES 細胞の胞胚腔への導入の前に、トランスフェクトされた ES 細胞は、導入遺伝子がこのような選択のための手段を提供する場合、導入遺伝子を組み込んだ ES 細胞について富化するために、種々の選択プロトコルに供され得る。

【0079】

更に、レトロウイルス感染もまた、導入遺伝子を非ヒト動物に導入するために使用することができる。発生中の非ヒト胚は、胚盤胞期までインビトロで培養することができる。この時間の間、分割細胞は、レトロウイルス感染の標的となり得る (Janenich, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73:1260-1264 (1976)、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。導入遺伝子を導入するために使用されるウイルスベクター系は、典型的には、導入遺伝子を保有する複製欠損レトロウイルスである (Jahner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:6927-6931 (1985) ; Van der Putten e

t a l . P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 82:6148-6152 (1985))。トランスフェクションは、ウイルス産生細胞の単層上で分割細胞を培養することによって、容易かつ効率的に得られる。あるいは、感染は、後の段階で行うことができる。当該分野で公知のトランスジェニック動物を作製するためにレトロウイルス又はレトロウイルスベクターを使用する更なる手段は、受精卵又は初期胚の卵胞腔へのレトロウイルス粒子又はレトロウイルスを産生するマイトマイシンC処理細胞のマイクロインジェクションを包含する（Onionsに対する国際公開第90/08832号、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。

【0080】

任意の実施形態では、トランスジェニック非ヒト動物は、細胞の全ての表面上にカリクレイン-2融合タンパク質を発現する。任意の実施形態では、トランスジェニック非ヒト動物は、それらの細胞の全てではないが一部においてカリクレイン-2融合タンパク質を発現する。すなわち、融合タンパク質の発現は、導入遺伝子の上流に配置された細胞特異的プロモーター及び／又はエンハンサーエレメントによって制御される。一実施形態では、トランスジェニック非ヒト動物は、前立腺細胞においてのみカリクレイン-2融合タンパク質を発現する。本開示のこの実施形態によれば、前立腺細胞特異的プロモーター配列は、カリクレイン-2融合タンパク質をコードする組換え核酸構築物に作動可能に連結される。好適な前立腺特異的プロモーターとしては、前立腺特異的抗原（prostate-specific antigen、PSA）プロモーター、プロバシンプロモーター、前立腺特異的膜抗原

（prostate-specific membrane antigen、PSMA）、及びマウス乳腺腫瘍ウイルス（MMTVLTR）プロモーターが挙げられるが、これらに限定されない。トランスジェニック動物において導入遺伝子発現を駆動するために好適な発現構築物又はクローニング構築物は、当該分野で周知である。発現構築物の他の成分としては、強力なポリアデニル化部位、適切な制限エンドヌクレアーゼ部位、及び転写物がスプライシングされることを確実にするためのイントロンが挙げられる。

【0081】

カリクレイン-2融合タンパク質をコードする組換え核酸構築物は、任意の非ヒト動物に挿入することができる。好ましくは、動物は、齧歯類であり、より好ましくは、動物は、マウスである。トランスジェニックモデルの作製において一般的に使用されるマウスの好適な系統としては、CD-1（登録商標）Nudeマウス、NU/NUマウス、BALB/C Nudeマウス、BALB/Cマウス、NIH-IIIマウス、SCID（登録商標）マウス、非近交系SCID（登録商標）マウス、SCID Beigeマウス、C3Hマウス、C57BL/6マウス、DBA/2マウス、FVBマウス、CB17マウス、129マウス、SJLマウス、B6C3F1マウス、BDF1マウス、CDF1マウス、CB6F1マウス、CF-1マウス、Swiss Websterマウス、SKH1マウス、PGPマウス、及びB6SJLマウスが挙げられるが、これらに限定されない。

【0082】

任意の実施形態では、カリクレイン-2融合タンパク質をコードする組換え核酸構築物は、ヒツジ、ヤギ、ブタ、イヌ、ネコ、サル、チンパンジー、ハムスター、ウサギ、ウシ、及びモルモットなどの非ネズミ哺乳動物に導入される（例えば、Kim et al., 「Development of a Positive Method for Male Stem-cell Mediated Gene-transfer in Mouse and Pig,」 Mol. Reprod. Dev. 46 (4): 515-526 (1997); Houdebine, 「The Production of Pharmaceutical Proteins from the Milk of Transgenic Animals,」 Reprod. Nutr. Dev. 35 (6): 609-617 (1995); Petters, 「Transgenic Livestock as Genetic Models of Human Disease,」 Reprod. Fertil. Dev. 6 (5): 643-645 (1994); Schnieke et al., 「Human Factor IX Transgen

ic Sheep Produced by Transfer of Nuclei from Transfected Fetal Fibroblasts,」Science 278 (5346): 2130-2133 (1997); Amoah & Gelaye, 「Biotechnology Advances in Goat Reproduction,」J. Animal Science 75 (2): 578-585 (1997) を参照されたく、これらは参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる)。

【0083】

トランスジェニック動物をスクリーニングして評価し、カリクレイン-2 融合タンパク質が全ての細胞又は細胞のサブセット、例えば、前立腺細胞で特異的に発現される表現型を有するトランスジェニック動物を選択する。最初のスクリーニングは、例えば、サザンブロット分析又はPCR技法を使用して実施することができ、動物細胞を分析して、導入遺伝子の組み込みが起こったことを確認する。トランスジェニック動物の細胞における導入遺伝子のmRNA発現のレベルはまた、動物から得られた組織サンプルのノーザンブロット分析、インサイチュハイブリダイゼーション分析、及び逆転写酵素-PCR (reverse PCR) が挙げられるがこれらに限定されない技法を使用して評価することができる。更に、カリクレイン-2 融合タンパク質の表面発現は、本明細書に記載のヒト特異的抗カリクレイン-2 抗体 (例えば、抗体KL2B1、KL2B53、及びKL2B30) を用いたフローサイトメトリーによって評価することができる。

【0084】

本開示の別の態様は、カリクレイン-2 標的化治療剤を同定する方法を対象とする。任意の実施形態では、治療用カリクレイン-2 標的化剤は、カリクレイン-2 に結合して治療エンドポイントを引き起こす (例えば、細胞死を誘導する) 標的化剤である。任意の実施形態では、治療用カリクレイン-2 標的化剤は、カリクレイン-2 に直接結合するか、又はそうでなければカリクレイン-2 と相互作用して、カリクレイン-2 の発現、活性、又は機能を調節する標的化剤である。任意の実施形態では、治療用カリクレイン-2 標的化剤は、カリクレイン-2 に結合するか、又はそうでなければカリクレイン-2 と相互作用して、表面にカリクレイン-2 を発現する細胞に活性薬剤を送達する標的化剤である。任意の実施形態では、治療用カリクレイン-2 標的化剤は、カリクレイン-2 及び免疫細胞 (例えば、Tリンパ球、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、iPSC由来T細胞又はiPSC由来NK細胞) に同時に結合して、表面にカリクレイン-2 を発現する細胞の免疫細胞による死滅を媒介する標的化剤である。

【0085】

本開示のこの態様によれば、カリクレイン-2 標的化剤を同定する方法は、本明細書に記載の細胞の調製物を提供することを含み、調製物の細胞は、表面上にカリクレイン-2 融合タンパク質 (例えば、カリクレイン-2 ポリペプチド配列と、カリクレイン-2 ポリペプチド配列のC末端に連結されたグリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) 付着配列の一部と、GPI付着配列部分に結合されたGPIアンカードメインと、を含む融合タンパク質) を発現する。本方法は、候補カリクレイン-2 標的化剤を細胞の調製物に投与することと、当該投与することに基づいて、候補薬剤がカリクレイン-2 に結合するか、又はそうでなければカリクレイン-2 の発現、機能、若しくは活性を改変するかどうかを決定することと、を更に包含する。

【0086】

任意の実施形態では、本方法は、細胞の第2の調製物を提供することを更に含み、第2の調製物の細胞は、本明細書に記載のカリクレイン-2 融合タンパク質を発現するように改変されていない。カリクレイン-2 融合タンパク質を発現するように改変された細胞調製物とカリクレイン-2 融合タンパク質を発現しない細胞調製物 (すなわち、対照細胞調製物) との間での、候補薬剤がカリクレイン-2 に結合するか、又はそうでなければカリクレイン-2 の機能、発現若しくは活性を改変するかどうかを決定するために利用されるエンドポイントの比較は、候補薬剤のカリクレイン-2 抗原特異性を実証する。任意の実

施形態では、第2の細胞調製物は、カリクレイン-2融合タンパク質を発現するように改変された細胞調製物と同質遺伝子型である。

【0087】

本明細書に記載される方法における使用のための細胞の好適な調製物は、上記に詳細に記載されている。任意の実施形態では、細胞の調製物は、癌細胞の調製物である。任意の実施形態では、細胞の調製物は、前立腺癌（P C a）細胞の調製物である。

【0088】

あるいは、本方法は、表面に組換えカリクレイン-2融合タンパク質を発現する細胞を含む非ヒト動物を提供することを包含する。上記に記載されるように、非ヒト動物のカリクレイン-2融合タンパク質は、カリクレイン-2ポリペプチド配列と、カリクレイン-2ポリペプチド配列のC末端に連結されたグリコシルホスファチジルイノシトール（G P I）付着配列の一部と、G P I付着配列部分に結合されたG P Iアンカードメインと、を含む。本方法は、候補カリクレイン-2標的化治療剤を非ヒト動物に投与することと、当該投与することに基づいて候補薬剤がカリクレイン-2に結合するかどうかを決定することと、を更に包含する。候補カリクレイン-2治療剤の非ヒト動物への投与は、任意の好適な手段を用いて、例えば、非経口、局所、経口、静脈内、皮下、腹腔内、鼻腔内又は腫瘍内投与手段によって行うことができる。

【0089】

任意の実施形態では、本方法は、本明細書に記載されるカリクレイン-2融合タンパク質を発現するように改変された細胞を含まない第2の非ヒト動物を提供することを更に含む。カリクレイン-2融合タンパク質を発現するように改変された細胞調製物を含む非ヒト動物と、このような改変細胞を欠く非ヒト動物との間での、候補薬剤がカリクレイン-2に結合するか、又はそうでなければカリクレイン-2の機能、発現又は活性を改変するかどうかを決定するために利用されるエンドポイントの比較は、候補薬剤のカリクレイン-2抗原特異性を実証する。任意の実施形態では、第2の非ヒト動物は、カリクレイン-2融合タンパク質を発現するように改変された細胞を含む非ヒト動物と同質遺伝子型である。

【0090】

本開示による好適な非ヒト動物は、上記により詳細に記載されている。

【0091】

これらの方法によれば、候補薬剤は、任意の候補カリクレイン-2標的化治療薬である。好適な候補標的化治療薬としては、任意の化学的実体又は薬学的実体（例えば、小分子カリクレイン-2結合剤）、生物学的カリクレイン-2結合分子（例えば、カリクレイン-2結合ペプチド、抗カリクレイン-2抗体、抗体断片、モノボディなど）、カリクレイン-2キメラ抗原受容体（C A R）T又はNK細胞療法が挙げられるが、これらに限定されない。

【0092】

任意の実施形態では、候補カリクレイン-2標的化剤は、検出可能な標識を含む（例えば、薬剤は、直接的又は間接的に検出可能であり得る）。場合によっては、候補カリクレイン-2標的化剤は、直接標識される（例えば、薬剤は、蛍光付加物などの直接検出可能な付加物を含むことができる）。場合によっては、候補薬剤は、間接的に標識される（例えば、薬剤は、ビオチンなどの間接的に検出可能な付加物を含むことができる）。

【0093】

任意の実施形態では、候補カリクレイン-2標的化剤がカリクレイン-2融合タンパク質に結合するか、又は他の方法で相互作用するかどうかの決定は、カリクレイン-2融合タンパク質を発現する細胞に結合した候補薬剤の量を測定することによって達成することができる。カリクレイン-2融合タンパク質を発現する細胞に結合した候補薬剤の量を測定することにより、定性的結果又は定量的結果を得ることができる。任意の実施形態では、測定は、フローサイトメトリー、E L I S A、又は存在するか若しくはカリクレイン-2融合タンパク質を発現する細胞に結合した候補薬剤の量を定量的に測定することができ

る任意の他の方法を用いて行うことができる。結合した候補薬剤の量（レベル）は、特定のアッセイに関連する任意の単位（例えば、蛍光単位、例えば、平均蛍光強度（mean fluorescence intensity、MFI））で表され得るか、又は規定された単位（例えば、分子の数（例えば、モル数）、タンパク質分子の数、薬剤の濃度など）による絶対値として表され得る。更に、定量的に測定された量（レベル）を参照値の量と比較して、正規化された測定量を表す正規化値を導き出すことができる。

【0094】

任意の実施形態では、候補薬剤がカリクレイン-2 標的化治療薬であるか、又はそうであればカリクレイン-2 融合タンパク質と相互作用するかどうかを決定することは、下流の治療エンドポイント、例えば、抗体依存性細胞傷害性又は補体依存性細胞傷害性を測定することによって達成することができる。細胞傷害性、細胞死、及び／又は細胞生存率を測定する方法は、当業者に周知である。

10

【0095】

本明細書において開示した実施形態のいくつかを更に説明するために、以下の実施例を提供する。これらの実施例は、例示を目的とするものであって、本開示の実施形態を制限するものではない。同様に、本発明は、本明細書に記載される任意の特定の好ましい実施形態に限定されない。実際に、本発明の多くの修正及び変形は、本明細書を読むことにより、当業者には明らかであり得、そのような変形は、趣旨又は範囲において本発明から逸脱することなくなされ得る。したがって、本発明は、添付の特許請求の範囲、及びこれら請求項の権利が与えられる均等物の全範囲によってのみ限定されるものである。

20

【実施例】

【0096】

実施例1－カリクレイン-2 融合タンパク質の細胞表面発現

huK L K 2 __G P I 遺伝子は、5' X b a I 及び3' B a m H I 制限部位で p C D H N e o ベクターに問題なくクローニングされた（配列番号7）。スケールアップしたプラスミドDNAの配列を確認した。レンチウイルスをH E K 2 9 3 T N 細胞において産生させ、T r a n s d u x（商標）を含有する完全培地（E M E M + 1 0 % F B S + 1 × M E M - N E A A + 1 × ビルビン酸ナトリウム）中のD U 1 4 5 細胞に形質導入した。K L K 2 - G P I 遺伝子で形質導入された細胞を、1 m g / m L の G e n e t i c i n 中で選択し、フローサイトメトリーによってK L K 2 表面発現について分析した。K L K 2 の表面発現を、フィコエリトリンとコンジュゲートしたK L 2 B 1 抗体（J a n s s e n）を用いて評価した。表面発現はまた、R & D S y s t e m s から入手したK L K 2 抗体（ヒトカリクレイン2 抗体；クローン4 2 6 7 2 3；R & D S y s t e m s；カタログ番号M A B 4 1 0 4）、続いてフィコエリトリンにコンジュゲートした二次ヤギ抗マウス検出抗体（S o u t h e r n B i o t e c h；カタログ番号1 0 3 0 - 0 9）によって評価した。K L K 2 - G P I の発現は、J a n s s e n 抗体（図1 及び表3）及びR & D S y s t e m s 抗体の両方によって形質導入細胞の細胞表面上で検出された。

30

【0097】

【表3】

表3. K L K 2 抗体で染色したD U 1 4 5 細胞における蛍光強度

40

試料	平均	中央値
非形質導入DU145細胞	4, 646	3, 832
非形質導入DU145細胞+アイソタイプ対照Ab	5, 342	4, 437
非形質導入DU145細胞+KLK-PE Ab	5, 329	4, 456
形質導入DU145細胞+KLK2-PE Ab(ウイルス希釈:1:2)	32, 745	31, 139
形質導入DU145細胞+KLK2-PE Ab(ウイルス希釈:1:5)	33, 432	31, 836

【0098】

実施例2－D U 1 4 5 / K L K 2 __G P I 及びP C 3 / K L K 2 __G P I 細胞株の評価

50

GPIアンカー型KLK2を、上記の実施例1に記載されるように、DU145又はPC3前立腺腫瘍細胞株に遺伝子操作で導入した。KLK2表面発現を、aKLK2特異的抗体(Ab)(クローンKL2B1、KL2B30又はKL2B53)を使用してフローサイトメトリーによって確認した(図2A~図2C)。KL2B1、KL2B30、及びKL2B53は、KLK2タンパク質上の異なるエピトープを認識し、VCaP細胞に対して異なる結合親和性を示す(図2A)。対照的に、これらのAbは、KLK2を発現しなかった親DU145又はPC3腫瘍細胞を認識しなかった(図2B及び図3A)。GPIアンカー型KLK2の発現は、遺伝子操作されたDU145/KLK2__GPI及びPC3/KLK2__GPI腫瘍細胞へのこれらのAbの結合をもたらした(図2C及び図3B)。KLK2__GPI及びPSMAの同時発現もまた可能であり、二重標的化治療戦略の検証に有用なKLK2及びPSMAの両方に対して陽性である細胞株を作製した(図3C)。

10

【0099】

3つの異なる治療様式-(1)aKLK2抗体依存性細胞傷害性(ADCC)、(2)KLK2×CD3二重特異性抗体、及び(3)aKLK2 CAR-T細胞を使用して、DU145/KLK2__GPI及びPC3/KLK2__GPI細胞株を評価した。

【0100】

aKLK2媒介ADCCアッセイ

aKLK2媒介ADCCアッセイのために、健常ドナー末梢血液NK細胞(PB-NK)を、KLK2発現を伴う又は伴わないVCaP、DU145、又はPC3前立腺腫瘍細胞と共培養した(図4A~図4C及び図5A~図5B)。VCaP腫瘍細胞株は、細胞表面上に内因性KLK2を発現する唯一の腫瘍株である。これらの腫瘍細胞は、hIgG1Fc又は低フコシル化Fc(LF)のいずれかの上にaKLK2抗体が存在するとき、PB-NKによって溶解することができる(図4A)。アイソタイプ対照(hIgG1 iso)又はサイレントFc上のaKLK2(aKLK2サイレント)は、VCaP細胞に対するADCCを媒介することができなかった。図4A~図4Cの結果は、hIgG1Fc又はLF上のaKLK2が、DU145/KLK2__GPIに対するADCCを用量依存的に媒介したが、KLK2を発現しないDU145親細胞に対しては媒介しなかったことを更に実証する。低フコシル化aKLK2(aKLK2 LF)Abは、VCaP又はDU145/KLK2__GPIに対する野生型ヒトIgG1 Fc(aKLK2 hIgG1)に対して同じ抗体よりも強力であり、LF Abが正常フコースhIgG1と比較してADCCを増強することを示した。アイソタイプ対照(hIgG1 iso)又はサイレントFc上のaKLK2(aKLK2サイレント)は、DU145/KLK2__GPI腫瘍細胞に対するADCCを媒介することができなかった。同様の結果が、PC3/KLK2__GPI前立腺腫瘍細胞において観察された(図5A~図5B)。これらの知見は、腫瘍標的のKLK2抗原指向性死滅及び同質遺伝子細胞株対の有用性を実証する。VCaP腫瘍細胞においてKLK2をノックアウトする複数の試みが失敗したので、新しい同質遺伝子細胞株対の使用は、KLK2標的化治療薬によるKLK2抗原特異的応答を実証するために重要である。

20

30

【0101】

KLK2×CD3二重特異性Ab媒介性死滅アッセイ

KLK2×CD3二重特異性Ab媒介性死滅アッセイのために、健常ドナー末梢血T細胞を、VCaP、LnCap/KLK2、又はDU145/KLK2__GPI腫瘍細胞と共培養した(図6)。KLK2×CD3二重特異性Abは、内因的に発現されたVCaP細胞に対して最も高い感受性で、3種類全ての標的細胞の用量依存的溶解を誘導した。DU145/KLK2__GPI腫瘍細胞に対する殺傷は、VCaPほど強力ではなかったが、殺傷の最大レベルは、2種類の細胞株の間で類似しており、GPIを介して固定されたKLK2が二重特異性Abによって認識されたことを示す。LnCap/KLK2に対する最大死滅は有意に低く、これは潜在的に、VCaP及びDU145/KLK2__GPIと比較してLnCap上に提示されるKLK2の発現レベルが比較的低いためである。L

40

50

nCap/KLK2細胞株におけるKLK2発現は、GPIアンカーではない。これは更に、GPIアンカー型KLK2が、細胞表面上に高レベルでKLK2を発現するための有用なツールであることを実証する。

【0102】

CAR-T機能性評価

CAR-T機能性評価のために、健常ドナーT細胞にKLK2 CARを形質導入し、VCaP、親DU145、又はDU145/KLK2__GPIと共培養した(図7A~図7C)。非形質導入T細胞(UTD)は、同種異系認識に起因して中程度のレベルでVCaP細胞を死滅させたが、KLK2 CAR-Tは、非形質導入T細胞よりも効果的にVCaP細胞を死滅させ、CAR媒介性細胞傷害性を実証した(図7A)。更に、KLK2 CAR-Tは、DU145/KLK2__GPIに対するKLK2特異的細胞溶解を示したが、親DU145腫瘍細胞に対しては示さなかった(図7B及び図7C)。再び、これらの知見は、GPIアンカー型KLK2発現前立腺細胞株が、KLK2特異性を実証するための重要なツールであることを示す。それはまた、KLK2標的化治療薬によるKLK2抗原特異的応答を実証するための同質遺伝子腫瘍細胞の重要性を更に強調する。

【0103】

DU145+KLK2細胞を使用して、CAR設計をスクリーニングすることができる。

【0104】

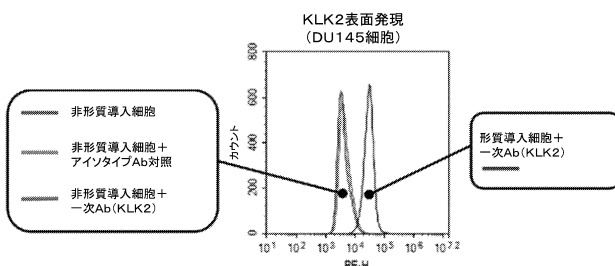
それぞれの設計を安定に発現するNK-101細胞を、CAR発現細胞の集団が86~99%純度の範囲となるように、CARの結合ドメインに対する抗体を用いて選別した。これらのエフェクターNK-101+CAR細胞を、E:T比0.5:1で、KLK2を発現する(図9A)又は発現しない(図9B)かのいずれかのDU145標的腫瘍細胞と共培養した。それぞれのウェルに残存する生存腫瘍標的細胞の数を、Incucyteを使用して5日間にわたって2時間ごとに計数し、腫瘍のみのウェルに対して正規化して、生存腫瘍標的細胞%を生成した。CARによって媒介されない自然殺傷の量を決定するために、KLK2を発現しないDU145親細胞もまた試験した。CAR特異的細胞傷害性を、式: CAR特異的細胞傷害性 = (AUC_{DU145親}) - (AUC_{DU145+KLK2}) によって決定し、(図9C)のようにプロットした。対照は、非形質導入NK-101細胞、及びKLK2又は標的細胞上の他のものに結合しなかった非特異的CAR(NSCAR-c)を発現するNK-101細胞もまた含んだ。

【0105】

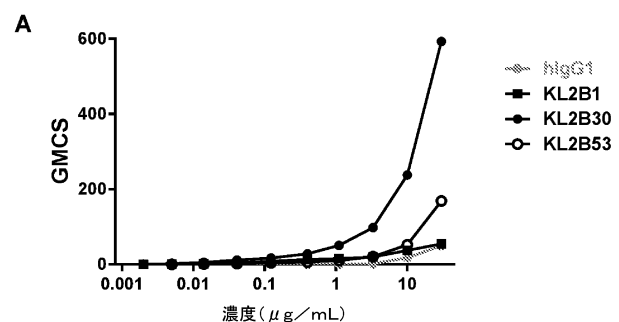
好ましい実施形態を本明細書で詳細に描写及び説明するが、本発明の趣旨から逸脱することなく様々な修正、追加、置換などを行うことができ、したがって、これらは以下の特許請求の範囲に定義される本発明の範囲内であると考えられることは、当業者には明らかであろう。

【図面】

【図1】



【図2A】



10

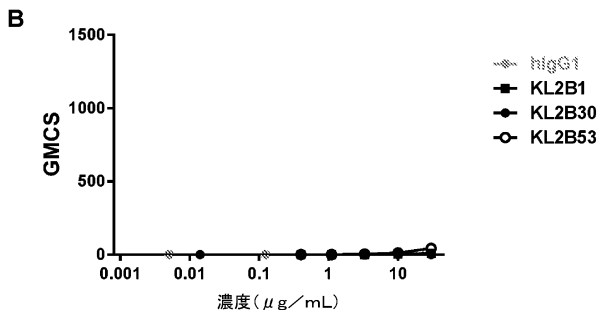
20

30

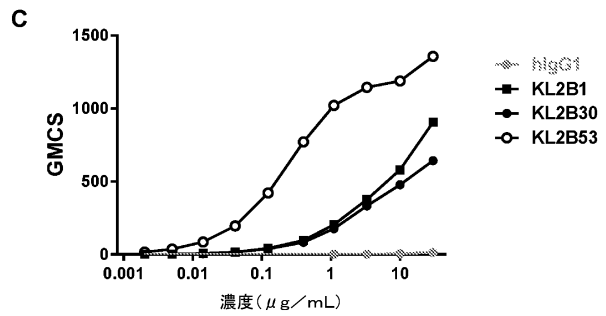
40

50

【図 2 B】

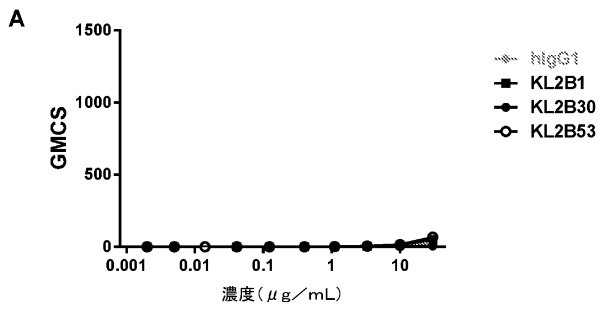


【図 2 C】

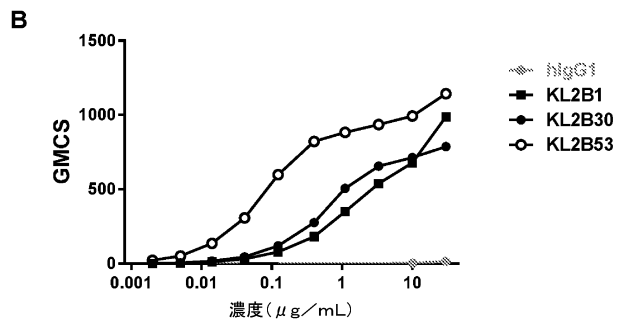


10

【図 3 A】

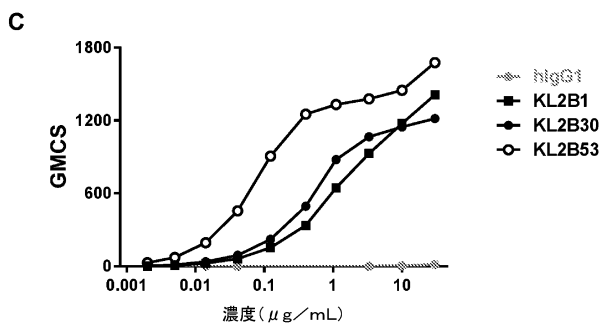


【図 3 B】

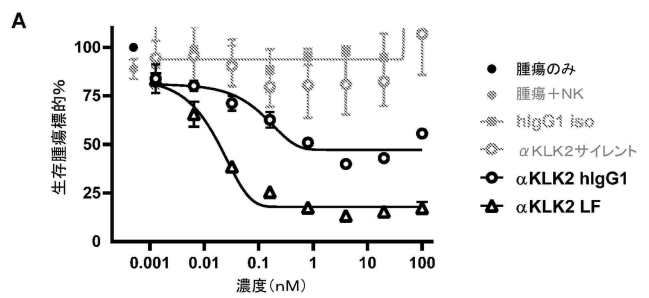


20

【図 3 C】



【図 4 A】

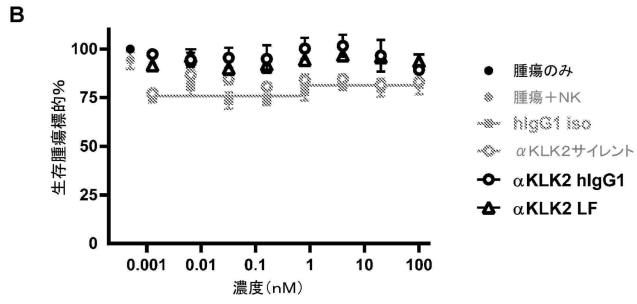


30

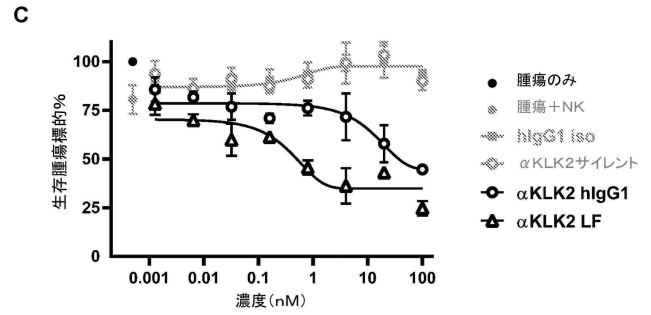
40

50

【図 4 B】

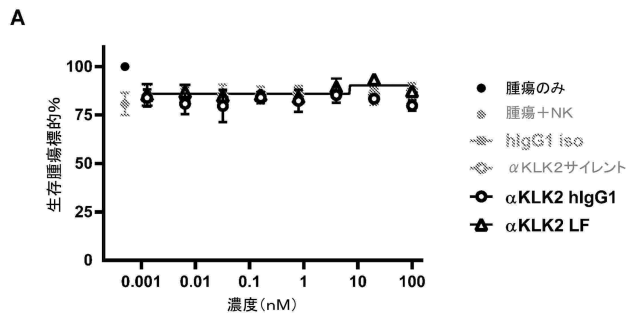


【図 4 C】

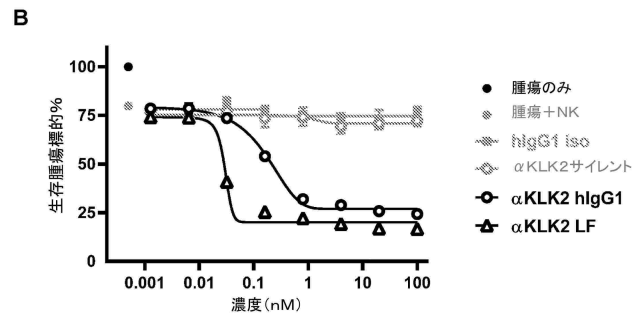


10

【図 5 A】

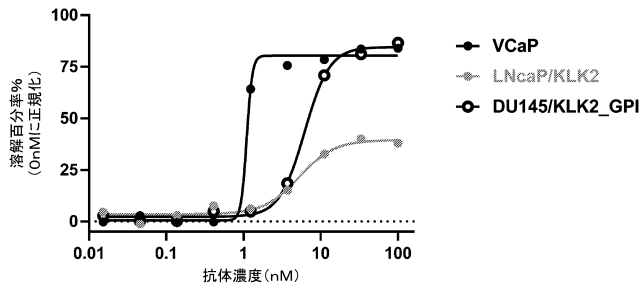


【図 5 B】

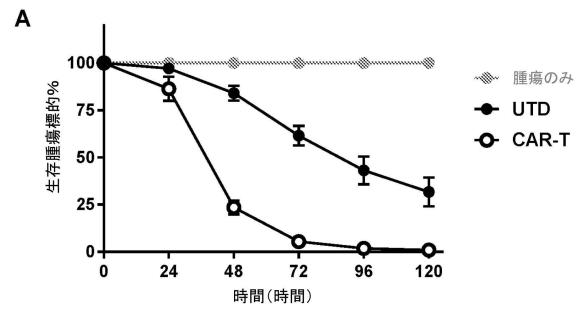


20

【図 6】



【図 7 A】

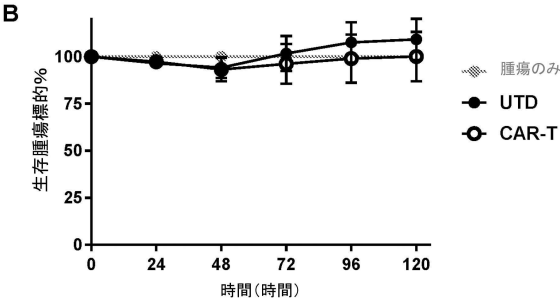


30

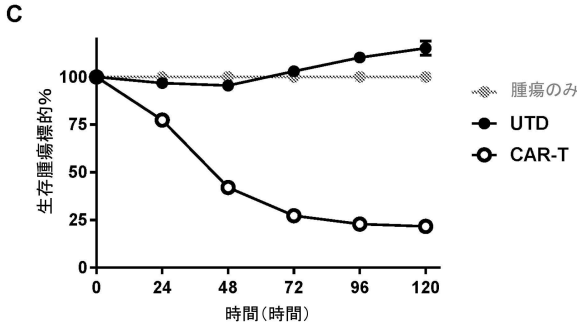
40

50

【図 7 B】

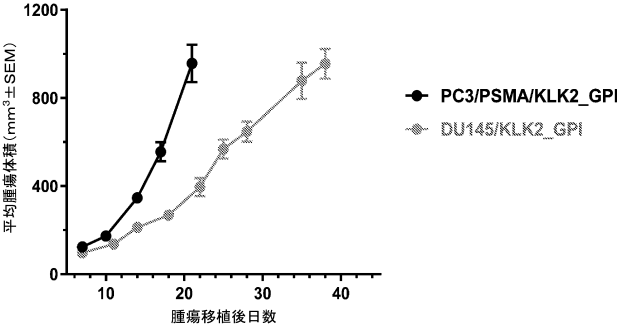


【図 7 C】

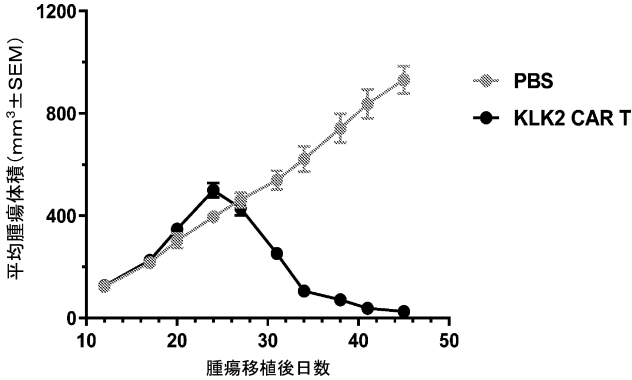


10

【図 8 A】

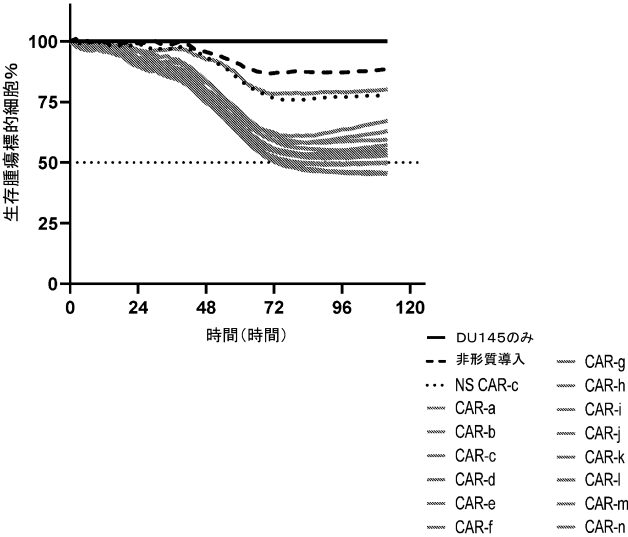


【図 8 B】

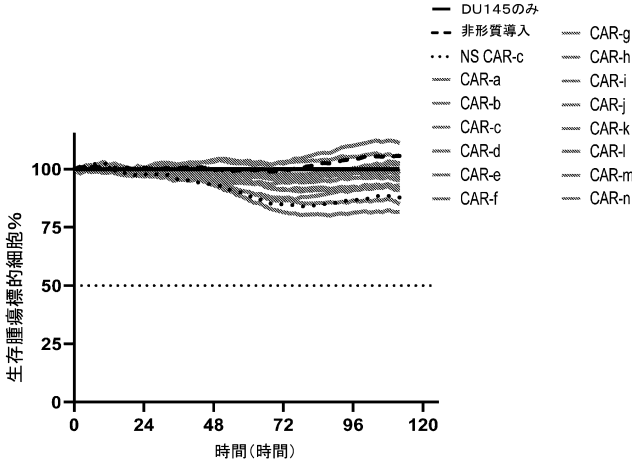


20

【図 9 A】



【図 9 B】

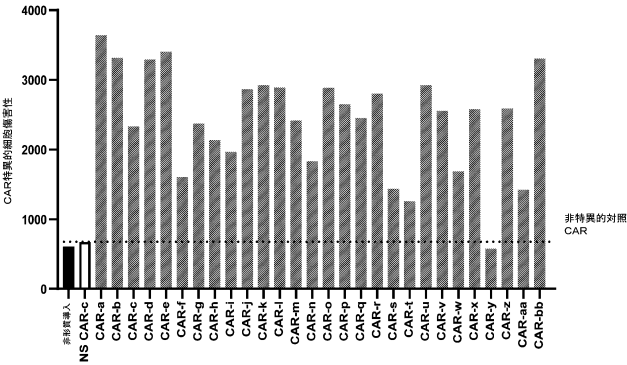


30

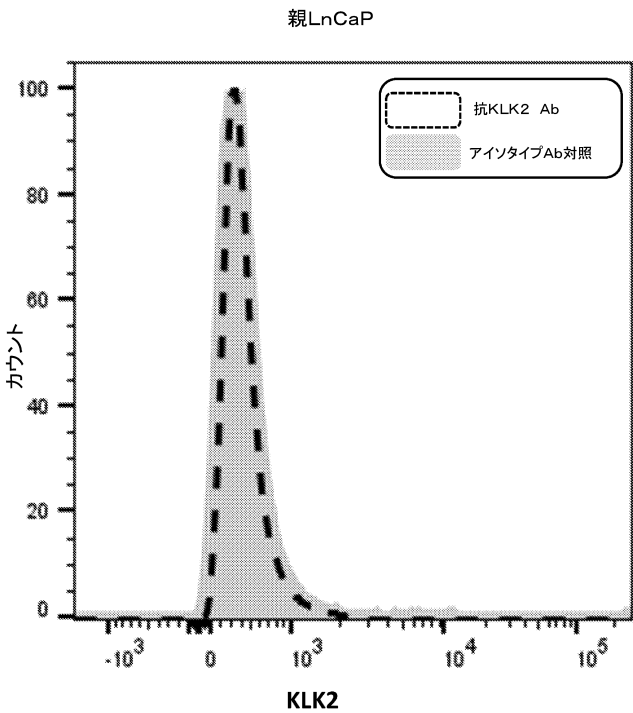
40

50

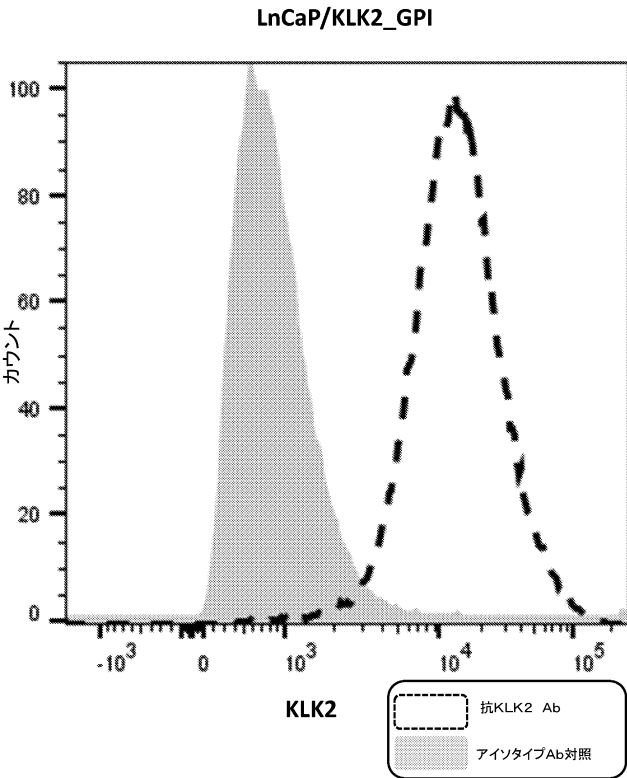
【図 9 C】



【図 10 A】

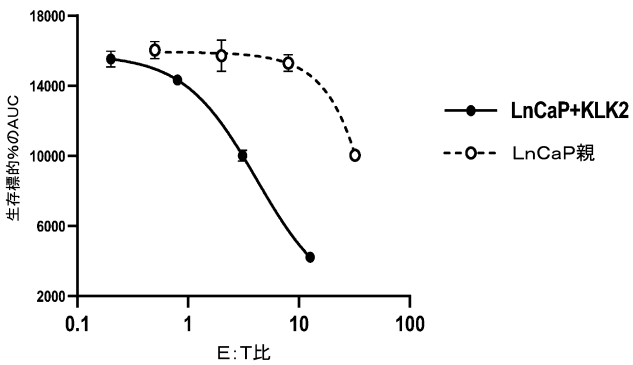


【図 10 B】



【図 10 C】

KLK2発現あり及び発現なしのLnCaP細胞に対する
KLK2標的化NK-CARの細胞傷害性



【配列表】

2024520790000001.app

10

20

30

40

50

【手続補正書】
【提出日】令和6年5月14日(2024.5.14)
【手続補正1】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】配列表
【補正方法】変更
【補正の内容】
【配列表】

2024520790000001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2022/055355

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12N9/64 C12N15/09

ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N C40B C07K

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2010/017257 A2 (UNIV ROCHESTER [US]; CHANG CHAWN SHANG [US]) 11 February 2010 (2010-02-11) page 83 - page 89; example 2 -----	1-52
A	MEDOF M EDWARD ET AL: "Cell-surface engineering with GPI-anchored proteins", THE FASEB JOURNAL, FEDERATION OF AMERICAN SOCIETIES FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY, US, vol. 10, no. 5, 1 January 1996 (1996-01-01), pages 574-586, XP002763532, ISSN: 0892-6638 abstract (page 584, sentence between 1st and 2nd column) ----- -/--	1-52

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 September 2022

Date of mailing of the international search report

11/10/2022

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2

NL - 2280 HV Rijswijk

Tel. (+31-70) 340-2040,

Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Voigt-Ritzer, Heike

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2022/055355

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	C. HEKIM: "Novel Peptide Inhibitors of Human Kallikrein 2", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 281, no. 18, 1 January 2006 (2006-01-01), pages 12555-12560, XP055056450, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M600014200 abstract page 12555, column 2, paragraph 2 -----	1-52
A	SMITH REBECCA ET AL: "Enzalutamide response in a panel of prostate cancer cell lines reveals a role for glucocorticoid receptor in enzalutamide resistant disease", SCIENTIFIC REPORTS, vol. 10, no. 1, 1 December 2020 (2020-12-01), XP055964840, DOI: 10.1038/s41598-020-78798-x Retrieved from the Internet: URL:http://www.nature.com/articles/s41598-020-78798-x> the whole document -----	1-52
A	KORENCHUK S ET AL.: "VCap, a cell-based model system of human prostate cancer", IN VIVO, vol. 15, no. 2, 1 May 2001 (2001-05-01), pages 163-168, XP9539383, ISSN: 0258-851X abstract page 164, column 1, paragraph 1 figure 2 paragraph bridging column 1 and 2 on page 166 -----	1-52

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/IB2022/055355
Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)		
1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing: a. ☒ forming part of the international application as filed: ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file. ☐ on paper or in the form of an image file. b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file. c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only: ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)). ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713). 2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished. 3. Additional comments:		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT			
Information on patent family members			International application No PCT/IB2022/055355
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010017257 A2	11-02-2010	EP 2315846 A2	04-05-2011
		US 2011177059 A1	21-07-2011
		WO 2010017257 A2	11-02-2010

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	
C 0 7 K 14/47 (2006.01)	C 0 7 K 14/47	
A 0 1 K 67/0278(2024.01)	A 0 1 K 67/0278	
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	

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

弁理士 猪狩 俊博

(72)発明者 エマニュエル, スチュアート エル.
アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 1 9 4 7 7, スプリング ハウス, ウェルシュ アンド マッキ
ーン ローズ 1 4 0 0

(72)発明者 ルトコスキ, トーマス ジェイ.
アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 1 9 4 7 7, スプリング ハウス, マッキーン ロード 1 4 0 0

F ターム (参考) 4B063 QA18 QQ02 QQ08 QQ44 QR32 QR72 QR77 QS15 QS32 QS36
QX02
4B065 AA93X AB01 AC14 AC20 BA02 CA24 CA44 CA46
4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA89 EA28 FA74