

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号
特許第6836515号
(P6836515)

(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 I

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

C 1 2 N 15/09 Z N A Z

C 1 2 N 1/15 (2006. 01)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19 (2006. 01)

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21 (2006. 01)

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 5/10 (2006. 01)

C 1 2 N 5/10

請求項の数 26 (全 39 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-555766 (P2017-555766)	(73) 特許権者	507299817
(86) (22) 出願日	平成28年4月26日 (2016. 4. 26)		ユーシーエル ビジネス リミテッド
(65) 公表番号	特表2018-514208 (P2018-514208A)		イギリス国 ダブリュー1ティー 4ティ
(43) 公表日	平成30年6月7日 (2018. 6. 7)		ービー ロンドン, トットナム コート
(86) 国際出願番号	PCT/GB2016/051164		ロード 97, ザ ネットワーク ビ
(87) 国際公開番号	W02016/174408		ルディング
(87) 国際公開日	平成28年11月3日 (2016. 11. 3)	(74) 代理人	100078282
審査請求日	平成31年2月26日 (2019. 2. 26)		弁理士 山本 秀策
(31) 優先権主張番号	1507104.6	(74) 代理人	100113413
(32) 優先日	平成27年4月27日 (2015. 4. 27)		弁理士 森下 夏樹
(33) 優先権主張国・地域又は機関	英国 (GB)	(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およびBはそれぞれ、第1の細胞表面膜貫通タンパク質および第2の細胞表面膜貫通タンパク質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の細胞表面膜貫通タンパク質または前記第2の細胞表面膜貫通タンパク質のいずれかが、前記タンパク質を細胞内コンパートメントへと方向付ける細胞内保持シグナルをさらに含む、核酸構築物。

【請求項 2】

前記細胞内保持シグナルを伴う前記細胞表面膜貫通タンパク質が前記細胞内保持シグナルを含むエンドドメインを含む、請求項1に記載の核酸構築物。

【請求項 3】

前記細胞内保持シグナルが前記細胞表面膜貫通タンパク質を分泌経路に向かわないように方向付ける、請求項1または2に記載の核酸構築物。

【請求項 4】

前記細胞内保持シグナルが前記細胞表面膜貫通タンパク質を膜結合細胞内コンパートメ

10

20

ントへと方向付ける、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】

前記細胞内保持シグナルが前記細胞表面膜貫通タンパク質をリソソーム、エンドソームまたはゴルジコンパートメントへと方向付ける、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】

前記細胞内保持シグナルが、次の群：エンドサイトーシスシグナル；ゴルジ保持シグナル；trans-ゴルジネットワーク(TGN)リサイクリングシグナル；小胞体(ER)保持シグナル；およびリソソームソーティングシグナルから選択される、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の核酸構築物。

10

【請求項 7】

前記細胞内保持シグナルが、チロシンベースソーティングシグナル、ジロイシンベースソーティングシグナル、酸性クラスターシグナル、リソソーム回避シグナル、NPFX'(1, 2)D型シグナル、KDEL、KKX'X'またはKX'KX'X'シグナル(式中X'は任意のアミノ酸である)である、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の核酸構築物。

【請求項 8】

前記細胞内保持シグナルが、NPX'Y、YX'X'Z、[DE]X'X'X'LL[LI]、DX'X'LL、DP[FW]、FX'DX'F、NPF、LZX'Z[DE]、LLDLL、PWDLW、KDEL、HDEL、KKX'X'またはKX'KX'X'の群から選択される配列を含み；式中X'は任意のアミノ酸であり、Z'はかさ高い疎水性側鎖を有するアミノ酸である、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の核酸構築物。

20

【請求項 9】

前記細胞内保持シグナルが、表 2 から 6 に示される任意の配列を含む、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の核酸構築物。

【請求項 10】

前記細胞内保持シグナルが、チロシナーゼ関連タンパク質(TYRP)-1細胞内保持シグナルまたはアデノウイルスE3/19K保持シグナルを含む、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の核酸構築物。

【請求項 11】

30

前記細胞内保持シグナルが、配列NQPLLTD(配列番号35)、KYKSRRSFIDEKKMP(配列番号36)またはDEKKMP(配列番号37)を含む、請求項 1 から 10 のいずれか一項に記載の核酸構築物。

【請求項 12】

前記細胞内保持シグナルが、前記細胞表面膜貫通タンパク質の膜貫通ドメインに対して近位である、請求項 1 から 11 のいずれか一項に記載の核酸構築物。

【請求項 13】

前記細胞内保持シグナルが、前記細胞表面膜貫通タンパク質の膜貫通ドメインに対して遠位である、請求項 1 から 11 のいずれかに記載の核酸構築物。

【請求項 14】

40

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 13 のいずれか一項に記載の核酸構築物。

【請求項 15】

Xが、アフトもしくはカルジオウイルス由来の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 14 に記載の核酸構築物。

【請求項 16】

前記細胞表面膜貫通タンパク質がキメラ抗原受容体(CAR)である、請求項 15 に記載の核酸構築物。

【請求項 17】

前記細胞表面膜貫通タンパク質の少なくとも1つが、請求項 3 から 11 のいずれかに記

50

載の細胞内保持シグナルを含む、請求項 1 から 16 のいずれか一項に記載の核酸構築物。

【請求項 18】

前記第 1 の細胞表面膜貫通タンパク質および前記第 2 の細胞表面膜貫通タンパク質の 1 つまたは両方が、1 回貫通型膜貫通タンパク質である、請求項 1 から 17 のいずれか一項に記載の核酸構築物。

【請求項 19】

前記第 1 の細胞表面膜貫通タンパク質および前記第 2 の細胞表面膜貫通タンパク質の 1 つまたは両方が、I 型膜貫通タンパク質である、請求項 18 に記載の核酸構築物。

【請求項 20】

次の構造：

A - X - B - Y - C

を含む核酸構築物であって、

式中

A、B および C はそれぞれ、第 1 の細胞表面膜貫通タンパク質、第 2 の細胞表面膜貫通タンパク質および第 3 の細胞表面膜貫通タンパク質をコードする核酸配列であり；

X および Y は、同じまたは異なっていてよい核酸配列であり、それぞれが切断部位をコードし、

前記細胞表面膜貫通タンパク質の少なくとも 2 つが、前記タンパク質を細胞内コンパートメントへと方向付ける細胞内保持シグナルをさらに含み、前記細胞表面膜貫通タンパク質は、前記細胞内保持シグナルの非存在下では細胞表面に発現される、核酸構築物。

【請求項 21】

細胞表面膜貫通タンパク質であり、細胞内保持シグナルを含む前記少なくとも 2 つが：

(a) 異なる細胞内保持シグナルを含む；および / または

(b) 前記核酸が細胞において発現される場合に、細胞表面での前記少なくとも 2 つの細胞表面膜貫通タンパク質の相対発現に差があるように前記細胞表面膜貫通タンパク質中の異なる位置に位置している前記細胞内保持シグナルを有する、

請求項 20 に記載の核酸構築物。

【請求項 22】

請求項 1 から 21 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 23】

請求項 22 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またはトランスポゾン。

【請求項 24】

請求項 1 から 21 のいずれか一項に記載の核酸構築物または請求項 22 もしくは 23 に記載のベクターを含む細胞。

【請求項 25】

第 1 の細胞表面膜貫通タンパク質をコードする核酸配列中に前記タンパク質を細胞内コンパートメントへと方向付ける細胞内保持シグナルを含めることによって、単離された細胞において、第 2 の細胞表面膜貫通タンパク質を伴って単一の核酸構築物から発現される前記第 1 の細胞表面膜貫通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。

【請求項 26】

前記核酸配列が、請求項 1 から 21 のいずれかにおいて規定される、請求項 25 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、単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単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】

10

20

30

40

50

【0002】

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単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】

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。

10

【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。ここで単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。

20

さらなる手法は、口蹄疫ウイルス(FMDV)(および関連ウイルス)が単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】

30

【0005】

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

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

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。

【課題を解決するための手段】

【0007】

40

本発明は、膜貫通タンパク質が第2のタンパク質と共に、翻訳後に、続いて切断されて両タンパク質が分離されるポリタンパク質として共発現される場合に、膜貫通タンパク質への細胞内保持シグナルの組み込みが、細胞表面への輸送を低減することによっておよび/または細胞表面でのその半減期を低減することによって、膜貫通タンパク質の細胞表面発現を第2のタンパク質と比較して調節できるようにな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。

【0008】

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

50

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。

【 0 0 0 9 】

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およびBは、第1のおよび第2の目的のタンパク質（P O I）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、

第1のまたは第2のP O Iのいずれかが細胞内保持シグナルを含む膜貫通タンパク質である、核酸構築物を提供する。

10

【 0 0 1 0 】

細胞内保持シグナルは、膜貫通タンパク質に対して異種である、すなわち膜貫通タンパク質（またはその一部）の「野生型」バージョンには存在せず、組換え手段によって導入される。細胞内保持シグナルは、合成または別の生物もしくは別のタンパク質から誘導可能であってよい。

【 0 0 1 1 】

膜貫通タンパク質のエンドドメインは、細胞内保持シグナルを含んでよい。

【 0 0 1 2 】

細胞内保持シグナルは、膜貫通タンパク質を分泌経路に向かわないように、および/またはリソソーム（lysozomal）、エンドソームもしくはゴルジコンパートメントなどの膜結合細胞内コンパートメントへと方向付けてよい。

20

【 0 0 1 3 】

細胞内保持シグナルは、例えばチロシンベースソーティングシグナル、ジロイシンベースソーティングシグナル、酸性クラスターシグナル、リソソーム回避シグナル、N P F X'（1, 2）D-型シグナル、K D E L、K K X' X'またはK X' K X' X'シグナル（X'は任意のアミノ酸である）であってよい。

【 0 0 1 4 】

細胞内保持シグナルは：N P X' Y、Y X' X' Z'、[D E] X' X' X' L [L I]、D X' X' L L、D P [F W]、F X' D X' F、N P F、L Z X' Z [D E]、L L D L L、P W D L W、K D E L、K K X' X'またはK X' K X' X'；の群から選択される配列を含んでよく、式中X'は任意のアミノ酸であり、Z'はかさ高い疎水性側鎖を有するアミノ酸である。

30

【 0 0 1 5 】

細胞内保持シグナルは、表1から5に示す配列のいずれかを含んでよい。

【 0 0 1 6 】

細胞内保持シグナルは、チロシナーゼ関連タンパク質（T Y R P）- 1細胞内保持シグナルを含んでよい。細胞内保持シグナルは、T Y R P - 1細胞内ドメインを含んでよい。細胞内保持シグナルは、配列N Q P L L T D（配列番号35）を含んでよい。

40

【 0 0 1 7 】

細胞内保持シグナルは、アデノウイルスE3 / 19 K細胞内保持シグナルを含んでよい。細胞内保持シグナルは、E3 / 19 Kサイトゾルドメインを含んでよい。細胞内保持シグナルは、配列K Y K S R R S F I D E K K M P（配列番号36）；またはD E K K M P（配列番号37）を含んでよい。

【 0 0 1 8 】

細胞内保持シグナルは、膜貫通タンパク質の膜貫通ドメインに対して近位または遠位であってよい。

【 0 0 1 9 】

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。

50

【 0 0 2 0 】

Xは、アフトもしくはカルジオウイルス由来2 A 自己切断ペプチドまたは2 A 様ペプチドをコードする核酸配列であってよい。

【 0 0 2 1 】

膜貫通タンパク質は、任意のトランスジェニックで発現される膜貫通タンパク質であってよい。

【 0 0 2 2 】

膜貫通タンパク質は：4 1 B B、O X 4 0、C D 2 7、C D 2 8 および関連分子などの興奮性受容体；またはP D 1、C T L A 4、L A I R 1、C D 2 2 および関連分子などの抑制性受容体；またはI L 1 R、I L 2 R、I L 7 R、I L 1 5 R および関連分子などのサイトカイン受容体分子；またはN - C A M、V - C A M、L 1 - C A M、L F A - 1、C D H 1 - 3、セレクチンもしくはインテグリンなどのホーミング分子；の一覧から選択されてよい。

10

【 0 0 2 3 】

膜貫通タンパク質は、自殺遺伝子またはマーカー遺伝子などの合成タンパク質であってよい。

【 0 0 2 4 】

膜貫通タンパク質は、T細胞受容体の および / または 鎖であるか、またはそれを含み得る。

【 0 0 2 5 】

膜貫通タンパク質は、キメラ抗原受容体 (C A R) であってよい。

20

【 0 0 2 6 】

第1のおよび第2のP O I のいずれかまたは両方は膜貫通タンパク質であってよく；膜貫通タンパク質のいずれかまたは両方は、本明細書で規定される細胞内保持シグナルを含んでよい。

【 0 0 2 7 】

第1のおよび第2のP O I のいずれかまたは両方は、I型膜貫通タンパク質などの1回貫通型膜貫通タンパク質であってよい。

【 0 0 2 8 】

細胞表面で発現される細胞内保持シグナルを含む膜貫通タンパク質の量は、細胞内保持シグナルを含まない同じ核酸構築物から発現される膜貫通タンパク質と比較して例えば90%、70%、50%または30%未満であってよい。

30

【 0 0 2 9 】

本発明は、2つより多い目的のタンパク質をコードする核酸構築物も提供する。例えば一実施形態では本発明は、次の構造：

A - X - B - Y - C

を含む核酸構築物であって、
式中

A、BおよびCは、第1の、第2のおよび第3の目的のポリペプチド (P O I) をコードする核酸配列であり；

40

XおよびYは同じまたは異なっていてよい核酸配列であり、それぞれが切断部位をコードし、

P O I の少なくとも2つが細胞内保持シグナルを含む膜貫通タンパク質である、核酸構築物を提供する。

【 0 0 3 0 】

本実施形態では少なくとも2つのP O I は：

(a) 異なる細胞内保持シグナルを含んでよい；および / または

(b) 核酸が細胞において発現される場合に細胞表面で少なくとも2つのP O I の相対発現に差があるように、P O I 中の異なる位置に位置する細胞内保持シグナルを有してよい。

50

【 0 0 3 1 】

第二の態様では本発明は、本発明の第一の態様による核酸構築物を含むベクターを提供する。

【 0 0 3 2 】

ベクターは、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またはトランスポゾンであってよい。

【 0 0 3 3 】

第三の態様では本発明は、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含む細胞を提供する。

【 0 0 3 4 】

本発明は、膜貫通タンパク質をコードする核酸配列中に細胞内保持シグナルを含めることによって、第2のタンパク質を伴ってポリタンパク質として単一の核酸から発現される膜貫通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にさらに関する。

【 0 0 3 5 】

膜貫通タンパク質中へ細胞内保持シグナルを含めると、細胞表面で発現される膜貫通タンパク質の量が低減される。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。

【 0 0 3 6 】

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保持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。

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って、

式中

A および B は、第 1 の目的のポリペプチド (P O I) および第 2 の P O I 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 P O I または前記第 2 の P O I のいずれかが細胞内保持シグナルを含む膜貫通タンパク質である、核酸構築物。

(項目 2)

前記膜貫通タンパク質が前記細胞内保持シグナルを含むエンドドメインを含む、項目 1 に記載の核酸構築物。

(項目 3)

前記細胞内保持シグナルが前記膜貫通タンパク質を分泌経路に向かわないように方向付ける、項目 1 または 2 に記載の核酸構築物。

(項目 4)

前記細胞内保持シグナルが前記膜貫通タンパク質を膜結合細胞内コンパートメントへと方向付ける、前記項目のいずれかに記載の核酸構築物。

(項目 5)

前記細胞内保持シグナルが前記膜貫通タンパク質をリソソーム、エンドソームまたはゴルジコンパートメントへと方向付ける、前記項目のいずれかに記載の核酸構築物。

(項目 6)

前記細胞内保持シグナルが、次の群：エンドサイトーシスシグナル；ゴルジ保持シグナル；trans-ゴルジネットワーク (T G N) リサイクリングシグナル；小胞体 (E R) 保持シグナル；およびリソソームソーティングシグナルから選択される、前記項目のい

10

20

30

40

50

いずれかに記載の核酸構築物。

(項目 7)

前記細胞内保持シグナルが、チロシンベースソーティングシグナル、ジロイシンベースソーティングシグナル、酸性クラスターシグナル、リソソーム回避シグナル、N P F X' (1, 2) D型シグナル、K D E L、K K X' X'またはK X' K X' X'シグナル(式中X'は任意のアミノ酸である)である、前記項目のいずれかに記載の核酸構築物。

(項目 8)

前記細胞内保持シグナルが、N P X' Y、Y X' X' Z、[D E] X' X' X' L [L I]、D X' X' L L、D P [F W]、F X' D X' F、N P F、L Z X' Z [D E]、L L D L L、P W D L W、K D E L、H D E L、K K X' X'またはK X' K X' X'の群から選択される配列を含み；式中X'は任意のアミノ酸であり、Z'はかさ高い疎水性側鎖を有するアミノ酸である、前記項目のいずれかに記載の核酸構築物。

10

(項目 9)

前記細胞内保持シグナルが、表 2 から 6 に示される任意の配列を含む、前記項目のいずれかに記載の核酸構築物。

(項目 10)

前記細胞内保持シグナルが、チロシナーゼ関連タンパク質(T Y R P) - 1細胞内保持シグナルまたはアデノウイルス E 3 / 19 K 保持シグナルを含む、前記項目のいずれかに記載の核酸構築物。

(項目 11)

前記細胞内保持シグナルが、配列 N Q P L L T D (配列番号 35)、K Y K S R R S F I D E K K M P (配列番号 36)またはD E K K M P (配列番号 37)を含む、前記項目のいずれかに記載の核酸構築物。

20

(項目 12)

前記細胞内保持シグナルが、前記膜貫通タンパク質の膜貫通ドメインに対して近位である、前記項目のいずれかに記載の核酸構築物。

(項目 13)

前記細胞内保持シグナルが、前記膜貫通タンパク質の膜貫通ドメインに対して遠位である、項目 1 から 11 のいずれかに記載の核酸構築物。

(項目 14)

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 15)

Xが、アフトもしくはカルジオウイルス由来の 2 A 自己切断ペプチドまたは 2 A 様ペプチドをコードする、項目 14 に記載の核酸構築物。

(項目 16)

前記膜貫通タンパク質がキメラ抗原受容体(C A R)である、項目 15 に記載の核酸構築物。

(項目 17)

前記第 1 の P O I および前記第 2 の P O I のそれぞれが膜貫通タンパク質であり、前記膜貫通タンパク質の少なくとも 1 つが、項目 3 から 11 のいずれかに記載の細胞内保持シグナルを含む、前記項目のいずれかに記載の核酸構築物。

40

(項目 18)

前記第 1 の P O I および前記第 2 の P O I の 1 つまたは両方が、1 回貫通型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。

(項目 19)

前記第 1 の P O I および前記第 2 の P O I の 1 つまたは両方が、I 型膜貫通タンパク質である、項目 18 に記載の核酸構築物。

(項目 20)

次の構造：

50

A - X - B - Y - C

を含む核酸構築物であって、
式中

A、BおよびCは、第1の目的のポリペプチド(P O I)、第2のP O Iおよび第3のP O Iをコードする核酸配列であり；

XおよびYは、同じまたは異なっていてよい核酸配列であり、それぞれが切断部位をコードし、

前記P O Iの少なくとも2つが細胞内保持シグナルを含む膜貫通タンパク質である、核酸構築物。

(項目21)

膜貫通タンパク質であり、細胞内保持シグナルを含む前記少なくとも2つが：

(a)異なる細胞内保持シグナルを含む；および/または

(b)前記核酸が細胞において発現される場合に、細胞表面での前記少なくとも2つのP O Iの相対発現に差があるように前記P O I中の異なる位置に位置している前記細胞内保持シグナルを有する、

項目20に記載の核酸構築物。

(項目22)

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23)

項目22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またはトランスポゾン。

(項目24)

項目1から21のいずれか一項に記載の核酸構築物または項目22もしくは23に記載のベクターを含む細胞。

(項目25)

膜貫通タンパク質をコードする核酸配列中に細胞内保持シグナルを含めることによって、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前記膜貫通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。

(項目26)

前記核酸配列が、項目1から21のいずれかにおいて規定される、項目25に記載の方法。

【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。

【0038】

【図2-1】図2は、TYRP1エンドドメインが、複合体エンドドメインを有する膜貫通タンパク質が保持されるように方向付けることができることを示す図である。Ty r p 1は、I型膜貫通タンパク質、537aa長である。タンパク質を細胞内コンパートメント内に保持するジロイシンモチーフは、細胞質ドメイン上の黒四角として示される。(A)Ty r p 1(w t)。野生型Ty r p 1は、ペプチドシグナル、内腔ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインからなる。細胞質ドメインはジロイシン保持シグナルを含有する。(B)Ty r p 1(w t) - S G リンカー - e G F P。この構築物は、セリン - グリシン - グリシン - グリシン - セリンリンカーを介してe G F Pに単純に融合された野生型Ty r p 1を含有する。Ty r p 1 - L - e G F Pは、細胞質近位Ty r p 1を表している。(C)Ty r p 1内腔(L M) - 膜貫通(T M) - S G リンカー - e G F P - T

10

20

30

40

50

y r p 1細胞質 (C P)。この構築物は、S G リンカー - e G F P が膜貫通ドメインと細胞質ドメインとの間に挿入されていることから、細胞質 - 遠位 T y r p 1 を構成する。D : T y r p 1 内腔 (L M) - 膜貫通 (T M) - S G リンカー - e G F P。保持シグナルを含有する細胞質ドメインが除外されたことから、この構築物は陽性対照として役立つ。すべての構築物は、I R E S . C D 3 4 と共発現される。形質導入 S u p T 1 細胞の染色は、細胞内および表面染色で、下左 / 右にそれぞれ示されている。

【図 2 - 2】同上

【図 2 - 3】同上

【 0 0 3 9 】

【図 3 - 1】図 3 は、初代細胞における T Y R P 1 保持シグナルの機能性を示す図である。F M D - 2 A 様ペプチドを使用して抗 C D 1 9 および抗 C D 3 3 C A R を共発現する構築物が生成された。この構築物の 2 つの改変体も生成された：第 1 の改変体では、T Y R P 1 由来ジロイシンモチーフが T M ドメインに対してすぐ近位の抗 C D 1 9 C A R エンドドメインに挿入された；第 2 の改変体では同じ T Y R P 1 ジロイシンモチーフが抗 C D 1 9 C A R エンドドメインのカルボキシ末端に付着された。P B M C は、血液から単離され、P H A および I L - 2 を使用して刺激された。2 日後、細胞はレトロネクチンコートプレート上でさまざまな C D 1 9 : C D 3 3 C A R 構築物を含有しているレトロウイルスで形質導入された。5 日目に構築物によって翻訳された 2 つの C A R の発現レベルは、組換え C D 1 9 - F c および C D 3 3 - F c 融合体を使用するフローサイトメトリーを介して評価された。A . 共発現を可能にするように構築された合成遺伝子の模式図を示す；B . 3 つの構築物によって生成されたタンパク質の続く対の模式図を示す；C . フローサイトメトリーによる 2 つの受容体の発現を示す。元の構築物では、両方の C A R は等しく発現される。抗 C D 1 9 C A R のエンドドメイン中の遠位でのジロイシンモチーフの組み込みでは、C D 3 3 C A R 発現は一定のままであるが C D 1 9 発現は中程度のレベルに降下する。抗 C D 1 9 C A R のエンドドメイン中の近位でのジロイシンモチーフの組み込みでは、C D 3 3 C A R 発現は一定のままであるが、C D 1 9 発現は低レベルに降下する。

【図 3 - 2】同上

【図 3 - 3】同上

【 0 0 4 0 】

【図 4】図 4 は、E 3 / 1 9 K のサイトゾルテール由来の保持シグナルを示す図である。F M D - 2 A 様ペプチドを使用して抗 C D 1 9 および抗 C D 3 3 C A R を共発現する構築物が生成された。この構築物の 2 つの改変体も生成された：第 1 の改変体では、そのゴルジ / E R 保持能力のために必須であることが見出された E 3 / 1 9 K 由来の最後の 6 a a (D E K K M P) は、抗 C D 3 3 C A R エンドドメインのカルボキシ末端に付着され；第 2 改変体では、アデノウイルス E 3 / 1 9 K タンパク質のサイトゾルテール全体は抗 C D 3 3 C A R エンドドメインのカルボキシ末端に付着された。

【 0 0 4 1 】

【図 5】図 5 は、E 3 / 1 9 K 保持シグナルの機能性を示す図である。図 4 に示す構築物は、2 9 3 T 細胞にトランスフェクトされ、構築物によって翻訳された 2 つの C A R の発現レベルは、組換え C D 1 9 - F c および C D 3 3 - F c 融合体を使用してフローサイトメトリーを介して評価された。全長アデノウイルス E 3 / 1 9 K タンパク質または D E K K M P モチーフが抗 C D 3 3 受容体に置かれた場合に明確な保持が観察された。抗 C D 1 9 受容体発現レベルは影響を受けなかった。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 4 2 】

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 および B は、第 1 のおよび第 2 の目的のポリペプチド (P O I) をコードする核酸配列

10

20

30

40

50

であり；

Xは切断部位をコードする核酸配列であり、

第1のまたは第2のPOIのいずれかが細胞内保持シグナルを含む膜貫通タンパク質である、核酸構築物を提供する。

【0043】

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、細胞内保持シグナルが存在しない場合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。

10

【0044】

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。

【0045】

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関して分類できる。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末端ドメインでER内腔へと標的化され、一方III型はそれらのN末端ドメインがER内腔へと標的化されている。IV型はIV-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、IV-Bは内腔へと標的化されたN末端ドメインを有する。

20

【0046】

本発明の膜貫通タンパク質(複数可)は、I~IV型のいずれかであってよい。

【0047】

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(US7052906 B1は合成膜貫通構成成分を記載している)。

30

【0048】

膜貫通ドメインは、CD28由来であってよく、良好な安定性をもたらす。

【0049】

I型膜貫通タンパク質の構造およびプロセッシングは、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。

40

【0050】

I型膜貫通タンパク質は小胞体(ER)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ER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ERの膜にロックし、次いで係留する。

【0051】

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。

【0052】

50

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。

【0053】

本発明における使用のために好適である種々のⅠ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。

【0054】

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。

【0055】

膜貫通タンパク質（複数可）は、キメラ抗原受容体（CAR）であってよい。

【0056】

CAR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、スパーサー、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。

【0057】

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、またはリガンドなど抗原に特異的に結合する別の実体であってよい。

【0058】

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、スパ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（scFv）の融合体である。そのような分子は、その標的のscFv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。

【0059】

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細胞内シグナル伝達ドメインと相互作用できる。

【0060】

本発明では核酸配列AまたはBのいずれかは、細胞内保持シグナル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。

【0061】

目的の大部分の膜貫通タンパク質は、細胞膜にある場合にかぎり活性であるまたは主に活性である。したがってある割合のタンパク質を細胞内に保持させることは、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。

【0062】

シグナル配列

膜貫通タンパク質は、膜貫通タンパク質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シグナル配列も含んでよい。

【0063】

シグナルペプチドのコアは、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を含有する場合がある。シグナルペプチドは、トランスロケーションの際の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

10

20

30

40

50

グナルペプチドおよび成熟タンパク質を生成する。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。

【0064】

シグナルペプチドは、分子のアミノ末端にあってよい。

【0065】

切断部位

本核酸構築物は、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。

【0066】

切断部位は、第1のおよび第2のPOI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。

【0067】

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POI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。

【0068】

切断部位はフューリン切断部位であってよい。

【0069】

フューリンは、サブチリシン様プロプロテインコンバー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ッシングするプロプロテインコンバーターゼである。フューリンは、対合した塩基性アミノ酸プロセッ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。

【0070】

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。

【0071】

TEV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イ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TEV切断部位は、ENLYFQ\ 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、TEVプロテアーゼを発現しない。したがって本核酸構築物がTEV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TEV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。

【0072】

切断部位は、自己切断ペプチドをコードしてよい。

【0073】

「自己切断ペプチド」は、第1のおよび第2のPOIを含むポリペプチドおよび自己切

10

20

30

40

50

断ペプチドが産生されると、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。

【0074】

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2A自己切断ペプチドであってよい。アフト (aptho) およびカルジオウイルスの主な2A/2B切断は、それ自体のC末端での2A「切断」によって媒介される。口蹄疫ウイルス (FMDV) およびウマ鼻炎Aウイルスなどのアフトウイルスでは、2A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2B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。

10

【0075】

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、2BのN末端プロリンと共に、アフトウイルスFMDV2a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 (EMCV) およびタイラマウス脳炎ウイルス (TMEV) を含む。

【0076】

EMCVおよびFMDV2Aの変異解析は、モチーフD×E×NPGP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 (Donnellyら (2001年) 上記)。

【0077】

本発明の切断部位は、アミノ酸配列：
D×₁E×₂NPGP、を含んでよく、式中×₁および×₂は任意のアミノ酸である。×₁は次の群：I、V、MおよびSから選択されてよい。×₂は次の群：T、M、S、L、E、QおよびFから選択されてよい。

20

【0078】

例えば切断部位は、表1に示すアミノ酸配列の1つを含んでよい。

【表1-1】

表 1

モチーフ	以下に存在:
DIETNPGP (配列番号 1)	ピコルナウイルス EMCB,

30

【表 1 - 2】

	EMCD, EMCPV21
DVETNPGP (配列番号 2)	ピコルナウイルス MENGGOおよび TMEBEAN; 昆虫 ウイルス DCV, ABPV
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
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.</i> <i>maritima</i>

10

20

【0079】

30

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。

【0080】

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。

【0081】

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) :

40

【化 1】

LLNFDLLKLAGDVESNPGP (配列番号 11)
 LLNFDLLKLAGDVQSNPGP (配列番号 12)
 LLNFDLLKLAGDVEINPGP (配列番号 13)
 LLNFDLLKLAGDVEFNPGP (配列番号 14)
 LLNFDLLKLAGDVESHPPGP (配列番号 15)
 LLNFDLLKLAGDVESEPPGP (配列番号 16)
 LLNFDLLKLAGDVESQPPGP (配列番号 17)
 LLNFDLLKLAGDVESNPPGP (配列番号 18)

10

【0082】

D x E x N P G P の配列に基づいて「モチーフ」、「2 A 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 型ロ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 2】

YHADYYKQRLIHDVEMNPGP (配列番号 19)
 HYAGYFADLLIHDITNPGP (配列番号 20)
 QCTNYALLKLAGDVESNPGP (配列番号 21)
 ATNFSLLKQAGDVEENPGP (配列番号 22)
 AARQMLLLSGDVETNPGP (配列番号 23)
 RAEGRGSLTTCGDVEENPGP (配列番号 24)
 TRAEIEDELIRAGIESNPGP (配列番号 25)
 TRAEIEDELIRADIESNPGP (配列番号 26)
 AKFQIDKILISGDVELNPGP (配列番号 27)
 SSIIRTKMLVSGDVEENPGP (配列番号 28)
 CDAQRQKLLLSGDIEQNPGP (配列番号 29)
 YPIDFGGFLVKADSEFNPGP (配列番号 30)

20

30

などのこれらの 2 A 様配列の 1 つを含んでよい。

【0083】

切断部位は、

【化 3】

配列番号 24 (RAEGRGSLTTCGDVEENPGP)
 として示す 2 A 様配列を含んでよい。

【0084】

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ことが示された (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：

40

【化 4】

VTELLYRMKRAETYCPRLAIHPTEARHKQKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP (配列番号 31)

LLAIHPTEARHKQKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP (配列番号 32)

EARHKQKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP (配列番号 33)

APVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP (配列番号 34)

【0085】

細胞内保持シグナル

10

本発明の核酸構築物は、細胞内保持シグナルを含む膜貫通タンパク質をコードする配列を含む。

【0086】

タンパク質標的化またはタンパク質ソーティングは、それによりタンパク質が細胞中またはその外の適切な目的地に輸送される生物学的機構である。タンパク質は、小器官の内部空間、さまざまな細胞内膜、細胞膜または分泌を介して細胞の外部へと標的化され得る。この送達工程は、タンパク質それ自体に含有される配列情報に基づいて実行される。

【0087】

真核細胞の粗面小胞体 (ER) で合成されたタンパク質は、それらの最終目的地への輸送のために細胞外経路 (exocytic pathway) を使用する。特別なソーティングシグナルを持たないタンパク質は、ER からゴルジおよび trans - ゴルジネットワーク (TGN) を介して細胞膜にベクトル的に輸送される。他のタンパク質は、エンドソームおよびリソソームなどの細胞外経路の特定の小器官への取り込みのための標的化シグナルを有する。

20

【0088】

リソソームは、そこで内因性および内部移行する高分子が内腔ヒドロラーゼ (hydrolase) によって分解される酸性小器官である。内因性高分子は、そこからそれらがエンドソームに、次いでリソソームに輸送される TGN においてソートされることによってリソソームに達する。

【0089】

30

タンパク質を正しい細胞内位置にソートするために細胞によって使用される標的化シグナルは、本発明によって活用され得る。シグナルは、次の種類に大まかに分類できる：

- i) エンドサイトーシスシグナル
- ii) ゴルジ保持シグナル
- iii) TGN リサイクリングシグナル
- iv) ER 保持シグナル
- v) リソソームソーティングシグナル

【0090】

「細胞内保持シグナル」は、それを含むタンパク質を細胞表面膜または細胞の外部ではなく細胞内コンパートメントへと方向付けるアミノ酸配列を指す。

40

【0091】

細胞内保持シグナルは、細胞内保持シグナルを含まない対応する対照膜貫通タンパク質と比較して細胞の表面上に発現される膜貫通タンパク質の量の低減を生じる。

【0092】

言い換えると、細胞内保持シグナルを含む翻訳された膜貫通タンパク質が細胞表面に発現される割合は、対応する量の、細胞内保持シグナルを含まない翻訳された対応する対照膜貫通タンパク質における割合より少ない。

【0093】

例えば、細胞内保持シグナルを含む膜貫通タンパク質の細胞の表面に発現される量は、細胞内保持シグナルを含まない対応する対照膜貫通タンパク質の量の 75% 未満、50%

50

未満、25%未満または10%未満である場合がある。

【0094】

プロテアーゼによって次に切断されるポリタンパク質を発現する構築物は、ポリタンパク質からのペプチドの発現が1:1の比に限定されるという事実によって一般に限定される。しかし本発明では、膜貫通タンパク質中の細胞内保持シグナルを含めることは、細胞表面上でのその発現が調節され得る（例えば細胞内保持シグナルを含まない対応する対照膜貫通タンパク質と比較して低減される）ことを意味する。このように、細胞内保持シグナルを含む細胞表面上に発現される膜貫通タンパク質とポリタンパク質中に発現される第2のタンパク質の発現とを比較した比は、1:1.5~1:2、1:2~1:3、1:3~1:4、1:4~1:5または1:5を超える、例えば約1:1.5であり得る。

10

【0095】

細胞の表面に発現される膜貫通タンパク質の量は、当技術分野において公知である方法、例えばフローサイトメトリーまたは蛍光顕微鏡を使用して決定され得る。

【0096】

細胞内保持シグナルは、膜貫通タンパク質をERからのトランスロケーションの際に分泌経路に向かわないように方向付けることができる。

【0097】

細胞内保持シグナルは、膜貫通タンパク質を細胞内コンパートメントまたは複合体へと方向付けることができる。細胞内保持シグナルは、膜貫通タンパク質を膜結合細胞内コンパートメントへと方向付けることができる。

20

【0098】

例えば細胞内保持シグナルは、タンパク質をリソソーム、エンドソームまたはゴルジコンパートメント(trans-ゴルジネットワーク、「TGN」)へと方向付けることができる。

【0099】

正常細胞内では、生物発生またはエンドサイトーシス経路から生じたタンパク質は、逐次的なセットのソーティング決定に続いて適切な細胞内コンパートメントにソートされる。細胞膜ではタンパク質は、細胞表面に留まるまたはエンドソームに内部移行される、のいずれかであり得る。TGNでは選択は、細胞膜に移行するまたはエンドソームに向けられる、のいずれかである。エンドソームではタンパク質は、細胞膜に再生されるまたはリソソームに行く、のいずれかであり得る。これらの決定は、タンパク質それ自体の上のソーティングシグナルによって管理されている。

30

【0100】

リソソームは、老廃物および細胞残渣を分解する酸性ヒドロラーゼ酵素を含有する細胞小器官である。リソソーム周囲の膜は、消化酵素がそれらが必要とするpHで作用できるようにする。リソソームは自己貪食空胞(ファゴソーム)と融合し、それらの酵素を自己貪食空胞に与え、それらの内容物を消化する。

【0101】

エンドソームは、真核細胞内の膜結合コンパートメントである。それは、細胞膜からリソソームへのエンドサイトーシス膜輸送経路のコンパートメントであり、物質が分解性リソソームに達する前にソートされるための環境を提供している。エンドソームは、形質膜陥入された物質がそれらに達するまでにかかる時間に応じて初期エンドソーム、後期エンドソームまたはリサイクリングエンドソームとして分類される場合がある。本発明において使用される細胞内保持シグナルは、タンパク質を後期エンドソームのコンパートメントへと方向付けることができる。

40

【0102】

ゴルジ装置は、細胞性内膜系の一部であり、ゴルジ装置はタンパク質をそれらの目的地に送られる前に細胞内にパッケージングする；それは、分泌のためのタンパク質のプロセシングにおいて特に重要である。

【0103】

50

公知のタンパク質に存在するソーティングシグナルおよびそれらの配列および/または分子内位置を変更する影響を調査する研究からもたらされた相当な知識体系がある (BonifacinoおよびTraub (2003年) *Ann. Rev. Biochem.* 72巻: 395 ~ 447頁; BraulkeおよびBonifacino (2009年) *Biochimica and Biophysica Acta* 1793巻: 605 ~ 614頁; Griffith (2001年) *Current Biology* 11巻: R226 ~ R228頁; MellmanおよびNelson (2008年) *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9巻: 833 ~ 845頁; Dell'AngelicaおよびPayne (2001年) *Cell* 106巻: 395 ~ 398頁; Schaferら (1995年) *EMBO J.* 14巻: 2424 ~ 2435頁; Trejo (2005年) *Mol. Pharmacol.* 67巻: 1388 ~ 1390頁)。多数の研究は、目的のタンパク質の細胞内位置を変更するために目的のタンパク質に1つまたは複数のソーティングシグナルを挿入することが可能であることを示している (Pelham (2000年) *Meth. Enzymol.* 327巻: 279 ~ 283頁)。

10

【0104】

したがって、所望の局所化特性を有するソーティングシグナルを選択し、タンパク質の細胞内位置を方向付けるために目的のタンパク質内にそれを含めることは完全に可能である。本出願に関連して、細胞膜での発現が所望の量だけ低減しているソーティングシグナルを選択することは可能である。

【0105】

目的の新生タンパク質でのソーティングシグナルの最適な位置は、膜貫通タンパク質の型 (すなわちI ~ IV型) およびC末端が膜の内腔側にあるまたは細胞質側にあるかどうかによって容易に決定され得る。

20

【0106】

エンドサイトーシスシグナルの例は、トランスフェリン受容体およびアシアロ糖タンパク質受容体由来のものを含む。

【0107】

TGN - エンドソームリサイクリングを生じるシグナルの例は、CI - およびCD - MPR、ソーティリン、LDL - 受容体関連タンパク質LRP3およびLRP10および - セクレターゼ、GGA1 - 3、LIMP - II、NCP1、ムコリピン (mucolipin) - 1、シアリン (sialin)、GLUT8およびインバリアント鎖などのタンパク質由来のものを含む。

30

【0108】

TGN保持シグナルの例は、TGNに局在化されている次のタンパク質由来のものを含む: プロホルモンプロセシング酵素フューリン、PC7、CPDおよびPAM; ヘルペスウイルス3の糖タンパク質EおよびTGN38。

【0109】

ER保持シグナルの例は、KDEL、KKXXまたはKXKXXなどのC末端シグナルおよびカリウムチャネルのRXR (R) モチーフを含む。公知のERタンパク質は、アデノウイルスE19タンパク質およびERGIC53を含む。

40

【0110】

リソソームソーティングシグナルの例は、LAMP - 1およびLAMP - 2、CD63、CD68、エンドリン (endolyn)、DC - LAMP、シスチノシン (cystinosin)、糖リン酸交換体 (sugar phosphate exchanger) 2および酸性ホスファターゼなどのリソソーム膜タンパク質において見出されるものを含む。

【0111】

細胞内保持シグナルは、アデノウイルスE19タンパク質由来であってよい。細胞内保持シグナルは、E3gp19kDa; E19またはGP19Kとしても公知であるタンパク質E3/19K由来であってよい。細胞内保持シグナルは、配列番号36としても示されるE3/19Kの全長サイトゾルテールまたは配列番号37として示されるこのテ

50

ルの最後の 6 アミノ酸を含んでよい。本発明者らは、最後の 6 アミノ酸が保持のために特に重要であることを示した（実施例 3 および図 5）。

【化 5】

配列番号 36: KYKSRRSFIDEKKMP

配列番号 37: DEKKMP

【0112】

調整能力（tunability）

1 つまたは複数のタンパク質（複数可）の相対発現は、

a) タンパク質分子中の細胞内保持シグナルの位置を変更すること；および / または

b) 特定の細胞内保持シグナルを選択すること

などの種々の方法による本発明の方法を使用して良好に調整され得る。

【0113】

選択肢 a) は、下により詳細に考察される。

選択肢 b) に関して、さまざまな細胞内保持シグナルは、真核細胞内の別個の細胞内位置にソートされる多数の天然に存在するタンパク質から利用可能である。天然に存在するタンパク質（次のセクションを参照されたい）に見出される 1 つまたは複数のモチーフを含み、同様のソーティングシグナル機能を有する「合成」細胞内保持シグナルを使用することもできる。

【0114】

シグナル強度のカスケードは、ソーティングシグナルが関連タンパク質を送る細胞内位置に応じて利用可能である。大まかに言うと、タンパク質の相対発現を低下させることに、ソーティングシグナルによって方向付けられる位置が「細胞内」であるほどシグナルは「強い」。

【0115】

ソーティングシグナルがタンパク質をリソソームコンパートメントへと方向付ける場合、タンパク質は細胞によって内部移行および分解され、細胞表面への比較的わずかな逃避を生じる。リソソームに侵入するとタンパク質は分解され、系から失われる。したがって LAMP1 などのリソソームソーティングシグナルは、細胞表面での相対発現を低減することに関して「最強」である。

【0116】

ソーティングシグナルがタンパク質を ER 内に保持されるように方向付ける場合、ごく少ない割合のタンパク質だけが細胞表面に達する。それにより ER - GIC - 53 および KKF シグナルなどの ER 保持またはリサイクリングシグナルは、細胞表面での相対発現を低減することに関して 2 番目に強い。

【0117】

ソーティングシグナルがタンパク質をエンドソーム、ゴルジまたは TGN コンパートメントへと方向付ける場合、次いでタンパク質は TGN、エンドソームコンパートメントおよび細胞膜の間である程度再循環される可能性がある。これらのシグナルは、相当な割合のタンパク質が細胞膜にまだ達することから発現のさらに限定された低減レベルをもたらす。

【0118】

一般に、公知のソーティングシグナルで見られる発現の低減は次のとおり要約され得る：

【0119】

リソソームソーティングシグナル > ER 保持 / リサイクリングシグナル > TGN 保持 / リサイクリングシグナル > エンドサイトーシスシグナル

【0120】

タンパク質内のさまざまなソーティングシグナルおよび / またはソーティングシグナル

10

20

30

40

50

のさまざまな位置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、検討する際に特に有用である。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；

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。

【0121】

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。例えばBおよびCは細胞内保持シグナルを含む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は細胞内保持シグナルを有さない場合があり、核酸配列Bは少ない割合のタンパク質Bが細胞中に保持される（すなわち細胞表面に発現されない）ようにする細胞内保持シグナルを有する場合があり、核酸配列Cは大部分のタンパク質Cが細胞中に保持される様にする細胞内保持シグナルを有する場合がある。

10

【0122】

下に説明するとおり、異なる量の細胞表面発現をもたらす、差次的な量の細胞内保持は：

(a) タンパク質に対して異なる細胞内保持シグナルを使用すること；および/または
(b) タンパク質において異なる位置に位置する細胞内保持シグナルを有すること
によって達成され得る。

20

【0123】

シグナル型

細胞内保持シグナルを含み、細胞内コンパートメントへと方向付けられる多数のタンパク質が当技術分野において公知である。

【0124】

細胞内保持シグナルは、リソソーム、エンドソームまたはゴルジコンパートメント中に存在するタンパク質由来の保持シグナルであってよい。

【0125】

細胞内保持シグナルは、当技術分野において周知である（例えばBonifacinoおよびTraub；Annu. Rev. Biochem.；2003年；72巻；395～447頁を参照されたい）。

30

【0126】

細胞内保持シグナルは、チロシンベースソーティングシグナル、ジロイシンベースソーティングシグナル、酸性クラスターシグナル、リソソーム回避シグナル、NPF X' （1, 2）D型シグナル、KDEL、KK X' X' またはK X' K X' X' シグナル（式中 X' は任意のアミノ酸である）であってよい。

【0127】

チロシンベースソーティングシグナルは、細胞膜からの膜貫通タンパク質の迅速な内部移行およびタンパク質のリソソームへの標的化を媒介する（BonifacinoおよびTraub；上記）。チロシンベースソーティングシグナルの2つの型は、NP X' YおよびY X' X' Z'コンセンサスモチーフ（式中Z'はかさ高い疎水性側鎖を有するアミノ酸である）によって表される。

40

【0128】

NP X' Yシグナルは、I型膜貫通タンパク質の迅速な内部移行を媒介することが示されており、それらはLDL受容体のメンバー、インテグリン および アミロイド前駆体タンパク質ファミリーなどのファミリーに存在する。

【0129】

NP X' Yシグナルの例は表2に提供されている。

【表 2 - 1】

表 2-NPX^Yシグナル

タンパク質	種	配列
LDL 受容体	ヒト	Tm-10--INF DNPV YQKTT-29
LRP1 (1)	ヒト	Tm-21--VEI GNP TYKMYE-64
LRP1 (2)	ヒト	Tm-55--TNFT NPV YATLY-33
LRP1	<i>Drosophila</i>	Tm-43--GNF ANP VYESMY-38
LRP1 (1)	<i>C. elegans</i>	Tm-54--TFT NPV YELED-91

【表 2 - 2】

LRP1 (2)	<i>C. elegans</i>	Tm-140--LRV DNP LYDPDS-4
メガリン (1)	ヒト	Tm-70--IIF ENP MXSARD-125
メガリン (2)	ヒト	Tm-144--TNF ENP IYAQME-53
インテグリン β-1 (1)	ヒト	Tm-18--DTG ENP IYKSAV-11
インテグリン β-1 (2)	ヒト	Tm-30--TTVV NP KYEGK
インテグリン β (1)	<i>Drosophila</i>	Tm-26--WDT ENP IYKQAT-11
インテグリン β (2)	<i>Drosophila</i>	Tm-35--STFK NP MYAGK
APLP1	ヒト	Tm-33--HGY ENP TYRFLE-3
APP	ヒト	Tm-32--NGY ENP TYKFFE-4
APP様	<i>Drosophila</i>	Tm-38--NGY ENP TYKYFE-3
インスリン受容体	ヒト	Tm-36--YASS NPE YLSAS-379
EGR 受容体 (1)	ヒト	Tm-434--GSV QNP VYHNQP-96
EGR 受容体 (2)	ヒト	Tm-462--TAVG NPE YLNVT-68
EGR 受容体 (3)	ヒト	Tm-496--ISLD NP YQQDF-34

括弧内の数字は同じタンパク質内で1コピーより多く存在するモチーフを示す。本表および他表でのシグナルは例として検討されるべきである。重要な残基は太字で示されている。シグナルの前(すなわちアミノ末端)および後(すなわちカルボキシ末端)のアミノ酸の数が示されている。略号:Tm、膜貫通;LDL、低密度リポタンパク質;LRP1、LDL受容体関連タンパク質1;APP、β-アミロイド前駆体タンパク質;APLP1、APP様タンパク質1

【0 1 3 0】

Y X ' X ' Z ' 型シグナルは、トランスフェリン受容体およびアシアロ糖タンパク質受容体などのエンドサイトーシス受容体、C I - および C D - M P R などの細胞内ソーティング受容体、L A M P - 1 および L A M P - 2 などのリソソーム膜タンパク質、ならびに T G N 3 8 およびフューリンなどの T G N タンパク質、ならびに抗原プロセッシングコンパートメント(例えば H L A - D M) および細胞傷害性顆粒(例えば G M P - 1 7) などの特殊化したエンドソーム-リソソーム小器官に局在化されたタンパク質において見出される。Y X ' X ' Z ' 型シグナルは、細胞膜からのタンパク質の迅速な内部移行に関与している。しかしそれらの機能は、同じモチーフが膜貫通タンパク質のリソソームおよびリソソーム関連小器官への標的化に関与していることから、エンドサイトーシスに限定されない。

【0 1 3 1】

Y X ' X ' Z ' 型シグナルの例は表 3 に提供される。

【表 3】

表 3 - YX'X'Z'-型シグナル

タンパク質	種	配列
LAMP-1	ヒト	Tm-RRRSYQTI
LAMP-2a	ヒト	Tm-KHHHAGYEQF
LAMP-2a	ニワトリ	Tm-KKHHNTGYEQF
LAMP-2b	ニワトリ	Tm-RRKSRTGYQSV
LAMP-2c	ニワトリ	Tm-RRKSRYGYQIL
LAMP	<i>Drosophila</i>	Tm-RRRSTSRGYMSF
LAMP	ミミズ	Tm-RRSRRGYESV
CD63	ヒト	Tm-KSIRSGYEVN
GMP-17	ヒト	Tm-HCGGPRPGYEL
GMP-17	マウス	Tm-HCRRRAEYEL
CD68	ヒト	Tm-RRRPSAYQAL
CD1b	ヒト	Tm-RRRSYQNIIP
CD1c	ヒト	Tm-KKHCSYQDIL
CD1d	マウス	Tm-RRRSAYQDIR
CD1	ラット	Tm-KKKKRSYQDIM
エンドリン	ラット	Tm-KFCKSKERNYHIL
エンドリン	<i>Drosophila</i>	Tm-KFYKARNERNYHIL
TSC403	ヒト	Tm-KIRLRQSSQYQRI
TSC403	マウス	Tm-KIRQRHQSSAYQRI
シスチノシン	ヒト	Tm-HFCLYRKRFQYDQLN
推定溶質担体	ヒト	Tm-12-SLSRGSQYKEI
TRP-2	ヒト	Tm-RRLRKGYTFLMET-11
HLA-DM	ヒト	Tm-RRAGHSSYTFPLPGS-9
LmpA	タマホコリカビ	Tm-KKLRQKQKQYQAIINNE
推定リソソームタンパク質	タマホコリカビ	Tm-RSKSNQNSQYINLIQL
LIMP-II	タマホコリカビ	Tm-RKTFYNNQYNGYNIIN
トランスフェリン受容体	ヒト	16-PLSYTRFSLA-35-Tm
アシアロ糖タンパク質受容体H1	ヒト	MTKEYQDLQHL-29-Tm
CI-MPR	ヒト	Tm-22-SYKYSKVNKE-132
CD-MPR	ヒト	Tm-40-PAAYRGVGGD-16
CTLA-4	ヒト	Tm-10-TGVYVKMPPT-16
フェーリン	ヒト	Tm-17-LISYKGLPPE-29
TGN38	ラット	Tm-23-ASDYQRLNLKL
gp41	HIV-1	Tm-13-RQGYSLSFQT-144
酸性ホスファターゼ	ヒト	Tm-RMQAQPFGYRHHVADGEDHA

シグナルフォーマットの説明について表1の凡例を参照されたい

【0132】

ジロイシンベースソーティングシグナル ([DE]X'X'X'LL[LI]) は、多数の I 型、II 型および複数回貫通型 (multispanning) 膜貫通タンパク質のソーティングにおいて非常に重要な役割を演じている。ジロイシンベースソーティングシグナルは、膜貫通タンパク質の迅速な内部移行およびリソソーム分解ならびにタンパク質の後期エンドソーム - リソソームコンパートメントへの標的化に参与している。このシグナルの構成的に活性な形態を含有する膜貫通タンパク質は、後期エンドソームおよびリソソームに主に局在化される。

【0133】

[DE]X'X'X'LL[LI] ソーティングシグナルの例は、表 4 に提供されている。

【表 4】

表 4 - [D E X X X L L L] ソーティングシグナル

タンパク質	種	シグナル
CD3-γ	ヒト	Tm-8-SDKQTLLPN-26
LIMP-II	ラット	Tm-11-DEKAPLLRT
Nmb	ヒト	Tm-37-QEKDFLLKN-7
QNR-71	ウズラ	Tm-37-TERNFLLKS-5
Pnc117	ヒト	Tm-33-GENSPLLSG-3
チロシナーゼ	ヒト	Tm-8-EKQPLLME-12
チロシナーゼ	メダカ	Tm-16-GERQPLLQS-13
チロシナーゼ	ニワトリ	Tm-8-PEIQPLLTE-13
TRP-1	キンギョ	Tm-7-EGRQPLLGD-15
TRP-1	ヒト	Tm-7-EANQPLLTD-20
TRP-1	ニワトリ	Tm-7-ELHQPLLTD-20
TRP-2	ゼブラフィッシュ	Tm-5-REFEPLLNA-11
VMAT2	ヒト	Tm-6-EKMAILMD-29
VMAT1	ヒト	Tm-6-EKLAILLSQ-32
VAchT	マウス	Tm-10-SERDVLLDE-42
VAMP4	ヒト	19-SERRNLLLED-88-Tm
新生児型 FcR	ラット	Tm-16-DDSGDLLPG-19
CD4	ヒト	Tm-12-SQIKRLLSE-17
CD4	ネコ	Tm-12-SHIKRLLE-17
GLUT4	マウス	Tm-17-RRTPSLLEQ-17
GLUT4	ヒト	Tm-17-HRTPSLLEQ-17
IRAP	ラット	46-EPRGSRLLVR-53-Tm
Ii	ヒト	MDDQRDLLSNNEQLPMLGR-11-Tm
Ii	マウス	MDDQRDLLSNHEQLPILGN-10-Tm
Ii	ニワトリ	MAEQRDLLSSDGSSGVLP-12-Tm
Ii-1	ゼブラフィッシュ	MEPDHQNESLIQRPVSAETILGR-12-Tm
Ii-2	ゼブラフィッシュ	MSSEGNETPLISDQSSVNMGPQP-8-Tm
Lamp	トリパノソーマ	Tm-RRRRTEDELLPEEAGGLIDPQN
メンケスタンパク質	ヒト	Tm-74-PDKHSLLVGDFREDDTAL
NPC1	ヒト	Tm-13-TEFERLLNF
AQP4	ヒト	Tm-32-VETDDLIL-29
RME-2	<i>C. elegans</i>	Tm-104-FENDSL
Vam3p	<i>S. cerevisiae</i>	153-NEQSPLLHN-121-Tm
ALP	<i>S. cerevisiae</i>	7-SEQTRLVP-18-Tm
Gap1p	<i>S. cerevisiae</i>	Tm-23-EVLDLILK-24

シグナルフォーマットの説明について表1の凡例を参照されたい

【0134】

D X ' X ' L L シグナルは、ジロイシンベースソーティングシグナルの異なる型を構成する。これらのシグナルは、C I - および C D - M P R、ソーティリン、L D L - 受容体関連タンパク質 L R P 3 および L R P 1 0 ならびに - セクレターゼなどのいくつかの膜貫通受容体および T G N とエンドソームとの間で循環する他のタンパク質に存在する。

【0135】

D X ' X ' L L ソーティングシグナルの例は表 5 に提供される。

10

20

30

40

【表 5】

表 5 - DX'X'LL ソーティングシグナル

タンパク質	種	配列
CI-MPR	ヒト	Tm-151--SFHDDS <u>DEDLLHI</u>
CI-MPR	ウシ	Tm-150--TFHDDS <u>DEDLLHV</u>
CI-MPR	ウサギ	Tm-151--SFHDDS <u>DEDLLNI</u>
CI-MPR	ニワトリ	Tm-148--SFHDDS <u>DEDLLNV</u>
CD-MPR	ヒト	Tm-54--EESERD <u>DDHLLPM</u>
CD-MPR	ニワトリ	Tm-54--DESEERD <u>DDHLLPM</u>
ソーティン	ヒト	Tm-41--GYHDDS <u>DEDLLE</u>
SorLA	ヒト	Tm-41--ITGFSD <u>DVPMVIA</u>
頭部活性化因子 BP	ヒドラ	Tm-41--INRFSD <u>DEPLVVA</u>
LRP3	ヒト	Tm-237--MLEASD <u>DEALLVC</u>
ST7	ヒト	Tm-330--KNETSD <u>DEALLLC</u>
LRP10	マウス	Tm-235--WVVEAE <u>DEPLLA</u>
LRP10	ヒト	Tm-237--WVAEAE <u>DEPLLT</u>
ベータセクレターゼ	ヒト	Tm-9--HDDFAD <u>DISILK</u>
ムコリピン-1	マウス	Tm-43--GRDSPED <u>HSLLVN</u>
非古典的 α MHC-I	シカネズミ	Tm-6--VRCHPED <u>DRLLG</u>
FLJ30532	ヒト	Tm-83--HRVSQD <u>DLDLTTS</u>
GGA1	ヒト	350--ASVSL <u>LDDELMSL</u> -275
GGA1	ヒト	415--ASSGLD <u>DLDLGK</u> -211
GGA2	ヒト	408--VQNPSA <u>DRNLLDL</u> -192
GGA3	ヒト	384--NALSWL <u>DEELLC</u> -326
GGA	<i>Drosophila</i>	447--TVDSID <u>DVPLLS</u> -116

シグナルフォーマットの説明について表1の凡例を参照されたい。

セリンおよびスレオニン残基は下線が付けられている。

【0 1 3 6】

ソーティングモチーフの別のファミリーは、C K I I によるリン酸化のための部位を含有している酸性残基のクラスターによって提供される。この種類のモチーフは、プロホルモンプロセシング酵素フューリン、P C 6 B、P C 7、C P D および P A M ならびにヘルペスウイルス 3 の糖タンパク質 E を含む、定常状態で T G N に局在化される膜貫通タンパク質においてしばしば見出される。

【0 1 3 7】

酸性クラスターシグナルの例は表 6 に提供されている。

10

20

30

【表 6】

表 6 - 酸性クラスターソーティングシグナル

タンパク質	種	配列
フーリン	マウス	Tm-31-QEECP <u>SD</u> EEDEG-14
PC6B (1) ^a	マウス	Tm-39-RDRDYDEDEDDI-36
PC6B (2)	マウス	Tm-69-LDE <u>TE</u> EDDELEYDDES-4
PC7	ヒト	Tm-38-KDPDEVETES-47
CPD	ヒト	Tm-36-REFQDETD <u>EEEE</u> T-6
PAM	ヒト	Tm-59-QEKEDDGSE <u>EEEE</u> V-12
VMAT2	ヒト	Tm-35-GEDEESES <u>D</u>
VMAT1	ヒト	Tm-35-GE <u>D</u> SDDEEPDREE
VAMP4	ヒト	25-LEDDSDDEEDF-81-Tm
糖タンパク質 B	HCMV	Tm-125-KD <u>SD</u> EEENV
糖タンパク質 E	ヘルペスウイルス 3	Tm-28-FEDSESTD <u>EEEE</u> F-21
Nef	HIV-1 (AAL65476)	55-LEAQ <u>EEEE</u> V-139
Kex1p (1)	<i>S. cerevisiae</i>	Tm-29-ADDLESGLGAEDDLEQDEQLEG-40
Kex1p (2)	<i>S. cerevisiae</i>	Tm-79-TEIDESP <u>EM</u> IDF
Kex2p	<i>S. cerevisiae</i>	Tm-36-TEPEEVEDFD <u>DL</u> SDDEDH-61
Vps10p	<i>S. cerevisiae</i>	Tm-112-FEIEEDDVPTLEESH-37

シグナルフォーマットの説明について表1の凡例を参照されたい。セリンおよびスレオニン残基は下線が付けられている。

^a括弧内の数字はモチーフ番号である。

【0138】

KDEL受容体は、ERゴルジ中間体コンパートメント中、または初期ゴルジ中のタンパク質に結合し、それらをERに戻す。一般的な哺乳動物シグナルはKDELであるが、KDEL受容体は配列HDELにより緊密に結合することが示されている (Scheelら; J. Biol. Chem. 268巻; 7465頁 (1993年))。細胞内保持シグナルはHDELであってよい。

【0139】

KKX'X'およびKX'KX'X'シグナルは、I型膜タンパク質の細胞質側に位置し得る回収シグナル (retrieval signal) である。これらのシグナルの配列要件は、TeasdaleおよびJackson (Annu. Rev. Cell Dev. Biol.; 12巻; 27頁 (1996年)) によって詳細に提供されている。

【0140】

細胞内保持シグナルは: NPX'Y、YX'X'Z、[DE]X'X'X'L[LI]、DX'X'LL、DP[FW]、FX'DX'F、NPF、LZX'Z[DE]、LLDLL、PWDLW、KDEL、HDEL、KKX'X'またはKX'KX'X'の群から選択されてよく; 式中X'は任意のアミノ酸であり、Z'はかさ高い疎水性側鎖を有するアミノ酸である。

【0141】

細胞内保持シグナルは、表2から6に示すいずれの配列であってよい。

【0142】

細胞内保持シグナルはチロシナーゼ関連タンパク質 (TYRP) - 1細胞内保持シグナルを含んでよい。細胞内保持シグナルはTYRP - 1細胞内ドメインを含んでよい。細胞内保持シグナルは配列

【化6】

NQPLTLD (配列番号 35).

を含んでよい。

【0143】

TYRP1は、メラノソーム (特殊化したリソソーム) に > 99% の効率で保持される

、十分に特徴付けられたメラノソーム (melanosomal) タンパク質である。T Y R P 1 は、内腔ドメイン (1 ~ 4 7 7 a a)、膜貫通ドメイン (4 7 8 ~ 5 0 1) および細胞質ドメイン (5 0 2 ~ 5 3 7) を有する 5 3 7 アミノ酸膜貫通タンパク質である。細胞質ドメインに存在するジロイシンシグナルは、タンパク質の保持を生じる。このジロイシンシグナルは、

【化 7】

配列番号 35 (NQPLLTD)

に示す配列を有する。

【 0 1 4 4 】

10

細胞内保持シグナルは、膜貫通タンパク質のエンドドメイン中であってよい。言い換えると細胞内保持シグナルは、タンパク質が細胞表面に正しく発現された場合に細胞膜の細胞内側にある膜貫通タンパク質のドメイン中であってよい。

【 0 1 4 5 】

膜貫通タンパク質のエンドドメインは、少なくとも 1 0 0、少なくとも 1 5 0、少なくとも 2 0 0、少なくとも 3 0 0 または少なくとも 5 0 0 アミノ酸を含んでよい。

【 0 1 4 6 】

細胞内保持シグナルを含むエンドドメインは、膜貫通タンパク質のカルボキシ末端に位置してよい。具体的には膜貫通タンパク質がペプチドのアミノ末端にシグナル配列を含む場合、細胞内保持シグナルを含むエンドドメインはカルボキシ末端に位置してよい。

20

【 0 1 4 7 】

細胞内保持シグナルは、膜貫通ドメインに対して近位、例えば直接接続されていてよい。細胞内保持シグナルは、膜貫通ドメインに対して遠位、例えばエンドドメインのカルボキシ末端であってよい。保持シグナルの位置付けは、その活性を調節し、2つのタンパク質の相対発現の「調整」を可能にする。例えば T Y R P 1 ジロイシンモチーフの場合、実施例に示すとおり近位配置は低レベル表面発現をもたらす、一方遠位配置は中程度の表面発現をもたらす。

【 0 1 4 8 】

目的のポリペプチド

本明細書で規定される構築物中の核酸配列の A もしくは B ; または A、B もしくは C のいずれかまたはすべては、細胞内保持シグナルを含む膜貫通タンパク質をコードしてよい。

30

【 0 1 4 9 】

他の核酸配列は、任意の目的のポリペプチド (P O I) をコードする場合がある。例えば他の P O I は、核タンパク質、細胞質タンパク質または膜結合コンパートメントに局在化されたタンパク質などの細胞内タンパク質 ; 分泌性タンパク質または膜貫通タンパク質であってよい。

【 0 1 5 0 】

本明細書で規定される構築物中の核酸配列の A もしくは B ; または A、B もしくは C のいずれかまたはすべては、キメラ抗原受容体 (C A R) をコードしてよい。実施例に記載の核酸構築物は、2つのキメラ抗原受容体をコードする。

40

【 0 1 5 1 】

実施例に記載される核酸構築物は、種々の構成成分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する。

【 0 1 5 2 】

1 . 抗 C D 1 9 C A R 上に近位 t y r p - 1 保持を有する抗 C D 1 9 C A R および抗 C D 3 3 C A R を含むポリタンパク質

ヒト C D 8 a 由来シグナルペプチド :

MSLPVTALLLPLALLLHAARP (配列番号 3 8)

s c F v a C D 1 9 :

50

【化 8】

DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRF
 SSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITKAGGGGSGGGGSGGG
 GSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWRQPAPRKGLEWLGVIW
 GSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQG
 TSVTVS (配列番号 39)

リンカー：

S D

ヒト C D 8 a S T K：

10

【化 9】

PTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI (配列番号 40)

ヒト C D 2 8 T M：

【化 10】

FWVLVVGGLVACYSLLVTVAFIIFWW (配列番号 41)

ヒト T y p r - 1 細胞内ドメイン (保持シグナル)：

【化 11】

RARRSMDEANQPLLTDQYQCYAEEYEKLQNPNSV (配列番号 42)

20

ヒト C D 3 ゼータ細胞内ドメイン：

【化 12】

RRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRGRDPEMGGKPRRKNPQEG
 LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
 (配列番号 43)

2 A ペプチド：

【化 13】

RAEGRGSLTTCGDVEENPGP (配列番号 24)

30

マウス I g カッパ由来シグナルペプチド：

【化 14】

MAVPTQVLGLLLLWLTD (配列番号 44)

s c F v a C D 3 3：

【化 15】

RCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYFNLVWYQQKPGKAPKLLIYDTNRLADGVPS
 RFSGSGSGTQYTLTISSLPEDFATYYCQHYKNYPLTFGGGTKLEIKRSGGGGSGGGGSGG
 GGGSGGGGSRSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSNYGMHWIRQAPGKLEW
 VSSISLNGGSTYYRDSVKGRFTISRDNASTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAQDAYTGGYFD
 YWGQGTLLTVSSM (配列番号 45)

40

リンカー：

D P A

F c R g 会合を妨げる変異を有するヒト I g G 1 由来のヒンジおよび F c (H C H 2 C H
 3 p v a a)：

【化 1 6】

EPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW
 YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
 AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD
 SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 46)

リンカー：

【化 1 7】

KDPK (配列番号 47)

ヒト C D 1 4 8 T M :

10

【化 1 8】

AVFGCIFGALVIVTVGGFIFW (配列番号 48)

ヒト C D 1 4 8 細胞内ドメイン：

【化 1 9】

RKKRKDAKNNEVSFSQIKPKKSKLIRVENFEAYFKKQQADSNCGFAEEYEDLKLVGISQPKY
 AAELAENRGKNRYNNVLPYDISRVKLSVQTHSTDDYINANYMPGYHKKDFIATQGGLPNTL
 KDFWRMVWEKNVYAIIMLTKEVEQGRKCEEYWPSKQAQDYGDITVAMTSEIVLPEWTIRD
 FTVKNIQTSESHPLRQFHFTSWPDHGVPTDITLLINFRYLVRDYMKSPPESPILVHCSAGV
 GRTGTFAIDRLIYQIENENTVDVYGIVYDLRMHRPLMVQTEDQYVFLNQCVLDIVRSQKDSK
 VDLIYQNTTAMTIYENLAPVTTFGKTNGYIA (配列番号 49)

20

【0 1 5 3】

2. 抗 C D 1 9 C A R 上に遠位 t y r p - 1 保持を含む抗 C D 1 9 C A R および抗 C D
 3 3 C A R を含むポリタンパク質

ヒト C D 8 a 由来シグナルペプチド：

【化 2 0】

MSLPVTALLPLALLLHAARP (配列番号 38)

s c F v a C D 1 9 :

30

【化 2 1】

DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRF
 SGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITKAGGGGSGGGGSGGG
 GSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVW
 GSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDITAIIYCAKHYYYGGSYAMDYWGQG
 TSVTVS (配列番号 39)

リンカー：

S D

ヒト C D 8 a S T K :

40

【化 2 2】

PTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI (配列番号 40)

ヒト C D 2 8 T M :

【化 2 3】

FWLVVVGGLVACYSLLVTVAFIIFWV (配列番号 41)

ヒト C D 3 ゼータ細胞内ドメイン：

【化 2 4】

RRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG
 LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
 (配列番号43)

ヒト T y p r - 1 細胞内ドメイン (保持シグナル) :

【化 2 5】

RARRSMDEANQPLLTDQYQCYAEEYEKLQNPQNQSVV (配列番号 42)

2 A ペプチド :

10

【化 2 6】

RAEGRGSLTTCGDVEENPGP (配列番号 24)

マウス I g カッパ由来シグナルペプチド :

【化 2 7】

MAVPTQVLGLLLLWLTD (配列番号 44)

s c F v a C D 3 3 :

【化 2 8】

RCDIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASEDIYFNLVWYQQKPGKAPKLLIYDTNRLADGVPS
 RFSGSGSGTQYTLTISSLQPEDFATYYCQHYKNYPLTFGGGTKLEIKRSGGGGSGGGGSGG
 GGGSGGGGSRSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSNYGMHWIRQAPGKGLEW
 VSSISLNGGSTYYRDSVKGRFTISRDNASTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAQDAYTGGYFD
 YWGQGTLLTVSSM (配列番号 45)

20

リンカー :

D P A

F c R g 会合を妨げる変異を有するヒト I g G 1 由来ヒンジおよび F c (H C H 2 C H
 3 p v a a) :

【化 2 9】

30

EPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
 YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
 AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD
 SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 46)

リンカー :

【化 3 0】

KDPK (配列番号 47)

ヒト C D 1 4 8 T M :

40

【化 3 1】

AVFGCIFGALVIVTVGGFIFW (配列番号 48)

ヒト C D 1 4 8 細胞内ドメイン :

【化 3 2】

RKKRKDAKNNEVSFSQIKPKKSKLIRVENFEAYFKKQQADSNCGFAEEYEDLKLVGISQPKY
AAELAENRGKNRYNNVLPYDISRVKLSVQTHSTDDYINANYMPGYHKKDFIATQGGLPNTL
KDFWRMVWEKNVYAIIMLTKEVEQGRTECEYWPSKQAQDYGDITVAMTSEIVLPEWTIRD
FTVKNIQTSESHPLRQFHFTSWPDHGVDPDTDLLINFRYLVRDYMKGSPPEPILVHCSAGV
GRTGTFFIAIDRLIYQIENENTVDVYGIVYDLRMHRPLMVQTEDQYVFLNQCVDIVRSQKDSK
VDLIYQNTTAMTIYENLAPVTTFGKTNGYIA (配列番号 49)

【0 1 5 4】

10

3. 抗CD33CAR上にE3/19K保持を有する抗CD19CARおよび抗CD33CARを含むポリタンパク質

ヒトCD8a由来シグナルペプチド:

【化 3 3】

MSLPVTALLPLALLHAARP (配列番号 38)

s c F v a C D 1 9 :

【化 3 4】

DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRF
SGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKEITKAGGGGSGGGGSGGG
GSGGGGSEVKLQESGPGVLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIW
GSETTYNSALKSRLTIKDNKSKQVFLKMNSLQTDATAIYYCAKHYYGGSYAMDYWGQG
TSVTVS (配列番号 39)

20

リンカー:

S D

ヒトCD8aSTK:

【化 3 5】

PTTTPAPRPPTPAPTASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI (配列番号 40)

30

ヒトCD28TM:

【化 3 6】

FWLWVVGGLVACYSLLVTVAFIIFW (配列番号 41)

ヒトCD3ゼータ細胞内ドメイン:

【化 3 7】

RRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRGRDPEMGGKPRRKNPQEG
LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
(配列番号 43)

40

2Aペプチド:

【化 3 8】

RAEGRGSLTTCGDVEENPGP (配列番号 24)

マウスIgカッパ由来シグナルペプチド:

【化 3 9】

MAVPTQVLGLLLLWLTDA (配列番号 44)

s c F v a C D 3 3 :

【化 4 0】

RCDIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASEDIYFNLVWYQQKPGKAPKLLIYDTNRLADGVPS
 RFSGSGSGTQYTLTISSLPEDFATYYCQHYKNYPLTFGGGTKLEIKRSGGGGSGGGGSG
 GGGSGGGGSRSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSNYGMHWIRQAPGKGLEW
 VSSISLNGGSTYYRDSVKGRFTISRDNASTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAQDAYTGGYFD
 YWGQGTLLTVSSM (配列番号 45)

リンカー：

D P A

F c R g 会合を妨げる変異を含むヒト I g G 1 由来ヒンジおよび F c (H C H 2 C H 3 p
 v a a) ： 10

【化 4 1】

EPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNW
 YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
 AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD
 SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 46)

リンカー：

【化 4 2】

KDPK (配列番号 47)

20

ヒト C D 1 4 8 T M :

【化 4 3】

AVFGCIFGALVIVTVGGFIFW (配列番号 48)

ヒト C D 1 4 8 細胞内ドメイン：

【化 4 4】

RKKRKDAKNNEVSFSQIKPKKSKLIRVENFEAYFKKQQADSNCGFEEYEDLKLVGISQPKY
 AAELAENRGKNRYNNVLPYDISRVKLSVQTHSTDDYINANYMPGYHKKDFIATQGPLPNTL
 KDFWRMVWEKNVYAIIMLTKEVEQGRTKCEEYWPSKQAQDYGDITVAMTSEIVLPEWTIRD
 FTVKNIQTSESHPLRQFHFTSWPDHGVPTDILLINFRYLVRDYMKGSPPEPILVHCSAGV
 GRTGTFIADRLIYQIENENTVDVYGIVYDLRMHRPLMVQTEDQYVFLNQCVDIVRSQKDSK
 VDLIYQNTTAMTIYENLAPVTTFGKTNGYIA (配列番号 49)

30

アデノウイルス E 3 / 1 9 K サイトゾルテール：

【化 4 5】

KYKSRRSFIDEKKMP (配列番号 36)

【0 1 5 5】

上記ポリタンパク質 3 では E 3 / 1 9 K サイトゾルテールは、配列：D E K K M P を有
 する切断型バージョンで置き換えられてよい。 40

【0 1 5 6】

実施例に示すとおり t y r p - 1 保持シグナルについて、低レベルの発現は上に示す配
 列中の「ヒト C D 2 8 T M」と「ヒト C D 3 ゼータ細胞内ドメイン」との間に保持シグナ
 ルを配置することによって達成できる一方で、中程度のレベルの発現は「ヒト C D 3 ゼ
 ータ細胞内ドメイン」と「2 A ペプチド」との間に保持シグナルを配置することによって達
 成できることが見出された。

【0 1 5 7】

E 3 / 1 9 K 保持シグナルは、抗 C D 3 3 C A R の C 末端に配置される場合に抗 C D 3
 3 C A R の発現の低減を生じた。 50

【0158】

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。

【0159】

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。

【0160】

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。

【0161】

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。

【0162】

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。

【0163】

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。

【0164】

タンパク質

本発明は、細胞外ドメイン、膜貫通ドメインおよびエンドドメインを含む膜貫通タンパク質であって、エンドドメインが本明細書で規定される外因性細胞内保持シグナルを含む膜貫通タンパク質も提供する。

【0165】

「外因性」は、細胞内保持シグナルが膜貫通タンパク質の野生型配列の一部ではないことを意味する。野生型配列は、天然に一般に存在するタンパク質のアミノ酸配列を指す。

【0166】

本発明者らは、膜貫通タンパク質のエンドドメイン中での外因性細胞内保持シグナルを含めると、膜貫通タンパク質の細胞内コンパートメントへの方向付けが生じることを実証した。それゆえ細胞表面に発現される膜貫通タンパク質の量は膜貫通ドメイン中に細胞内保持シグナルを含まない対応する膜貫通タンパク質と比較して低減されている。

【0167】

方法

さらなる態様では本発明は、膜貫通タンパク質をコードする核酸配列中に細胞内保持シグナルを含めることによって、第2のタンパク質を伴うポリタンパク質として単一の核酸構築物から発現される膜貫通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に関する。

【0168】

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】

【0169】

(実施例1 - TYRP1リソソーム保持シグナルの詳細な分析)

さらに複雑なエンドドメインの状況において、ポリペプチドの保持をもたらすチロシナーゼ - 関連タンパク質1 (TYRP1) 保持シグナルの能力を多数の構築物を使用して決定した (図2)。野生型構築物を、増強型緑蛍光タンパク質 (eGFP) を加えたまたはeGFPがTYRP1エンドドメインを置き換えた場合の構築物と比較した。eGFPを

10

20

30

40

50

加えた場合、天然エンドドメインの前または後ろのいずれかにそれを置き、それにより保持シグナルは、天然の位置（膜の直下）にあるまたはそれに対して遠位にある、いずれかであった。

【0170】

すべての構築物は、I R E S・C D 3 4 と共発現される。形質導入された S u p T 1 細胞の染色は、細胞内染色および表面染色で図 2 に示されている。

【0171】

エンドドメインを置き換えると、非常にはっきりした表面発現が生じ、保持シグナルの後に e G F P を導入すると、表面発現はほとんど生じず、保持シグナルの前に導入すると、中程度の表面発現が生じることを見出した（図 2）。

【0172】

（実施例 2 - 別々のタンパク質を含む単一の発現カセットから共発現される膜貫通タンパク質の相対発現の調節）

2 つの C A R 膜貫通タンパク質をコードする発現カセットを、C A R タンパク質の 1 つが膜に対して近位または遠位のいずれかで導入された T Y R P 1 由来リソソーム保持シグナルを有するように改変した。これら 2 つの新規改変体それぞれの細胞表面での発現を元の未改変 C A R タンパク質のものと比較した。

【0173】

P B M C を血液から単離し、P H A および I L - 2 を使用して刺激した。2 日後、細胞をレトロネクチンコートプレート上で C D 1 9 : C D 3 3 C A R 構築物を含有するレトロウイルスで形質導入した。5 日目に構築物によって翻訳された 2 つの C A R の発現レベルを、フローサイトメトリーを介して評価し、細胞から C D 5 6 + 細胞を枯渇させた（主に N K 細胞）。6 日目に P B M C を 1 : 2 のエフェクター対標的細胞比で標的細胞と共培養にした。8 日目に上清を回収し、E L I S A によって I F N - ガンマ分泌について分析した。

【0174】

T y r p 1 - e G F P 融合体で観察されたパターンは、遠位保持シグナルを有する改変膜貫通タンパク質の発現ではいくらかの低減を、近位保持シグナルの場合は顕著な低減を伴って観察された。予測されるとおり、カセットからの第 2 の膜貫通タンパク質の発現は変化しなかった（図 3）。

【0175】

（実施例 3 - アデノウイルス E 3 / 1 9 K タンパク質由来保持シグナルを使用する発現の調節）

ヒトアデノウイルス E 3 / 1 9 K タンパク質は、主要組織適合性複合体クラス I（M H C - I）および M H C - I 関連 A および B 鎖（M I C A / B）分子の細胞表面輸送を抑制する小胞体 / ゴルジの I 型膜貫通糖タンパク質である。保持モチーフをアデノウイルス E 3 / 1 9 K タンパク質のサイトゾルテールに応じて同定した。さらに詳細には最後の 6 a a D E K K M P が保持のために最も重要であることが見出された。最適な位置付けは、タンパク質の C 末端であることが見出された。

【0176】

実施例 2 に記載の 2 つの C A R 膜貫通タンパク質をコードする発現カセットを C A R タンパク質の 1 つがアデノウイルス E 3 / 1 9 K タンパク質由来の保持モチーフを有するように改変した。この実験では、発現カセット中の第 2 の C A R 上の保持モチーフ（抗 C D 3 3 抑制 C A R）。

【0177】

構築物をアデノウイルス E 3 / 1 9 K タンパク質のサイトゾルテール全体、またはそのゴルジ / E R 保持能力のために必須であることが見出された E 3 / 1 9 K 由来の最後の 6 a a（D E K K M P）だけのいずれかを含めて生成した（図 4）。これらの構築物を 2 9 3 T 細胞にトランスフェクトし、最初にキメラ可溶性 C D 1 9 ウサギ F c およびキメラ可溶性 C D 3 3 マウス F c タンパク質で染色した。次いでこれらの細胞を続いて抗ウサギ F

10

20

30

40

50

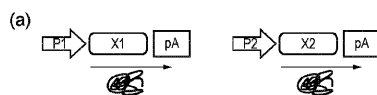
c - F I T C および抗マウス F c - A P C で染色した (図 5) 。これらの細胞は、全長アデノウイルス E 3 / 1 9 K タンパク質または D E K K M P モチーフが抗 C D 3 3 受容体上に配置される場合に明確な保持を示すが抗 C D 1 9 受容体発現レベルに影響を与えなかった。

【 0 1 7 8 】

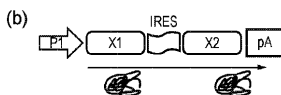
上記明細書に述べるすべての刊行物は、本明細書に参照により組み込まれる。本発明の記載の方法および系の種々の改変および変法は、本発明の範囲および精神から逸脱することなく当業者に明らかである。本発明は具体的な好ましい実施形態と関連して記載されているが、特許請求される本発明がそのような具体的な実施形態に過度に限定されるべきでないことは理解されるべきである。実際に、本発明を実行するために記載された様式の種々の改変は、分子生物学、細胞生物学または関連する分野の当業者に明らかであり、続く特許請求の範囲の範囲内であることが意図される。

10

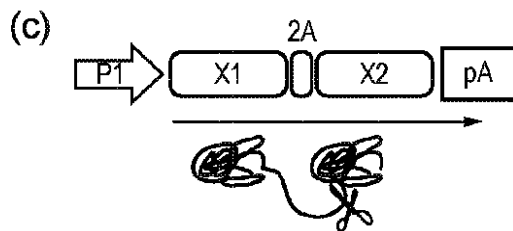
【 図 1 (a) 】



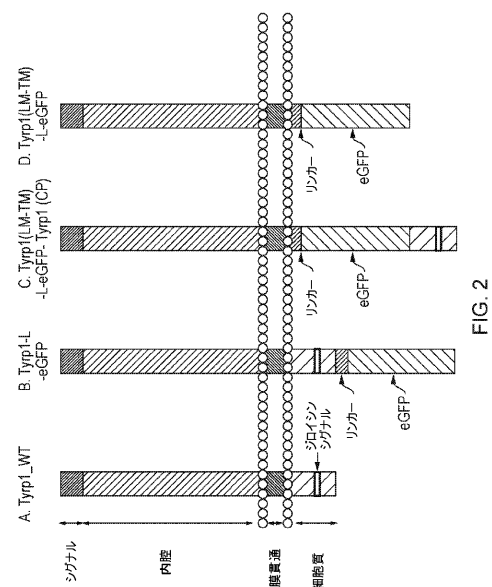
【 図 1 (b) 】



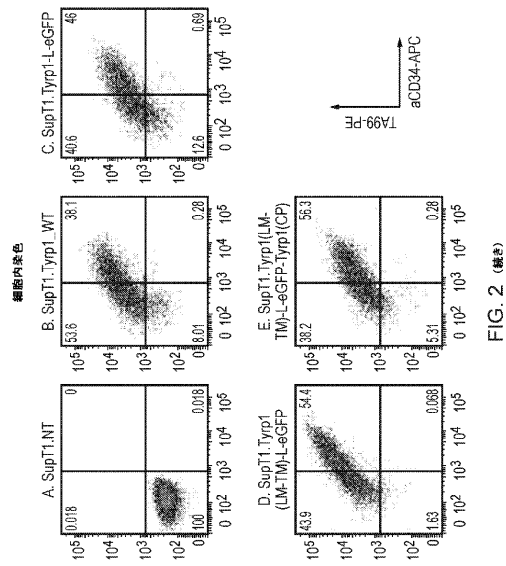
【 図 1 (c) 】



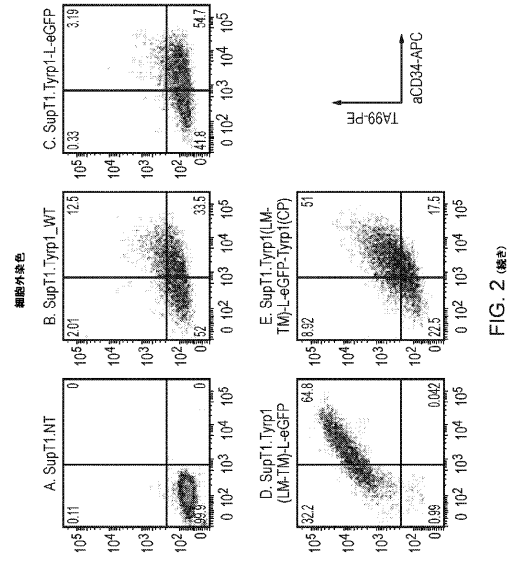
【 図 2 - 1 】



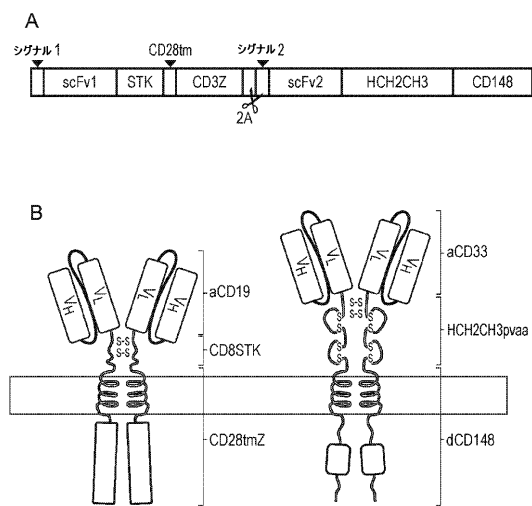
【図 2 - 2】



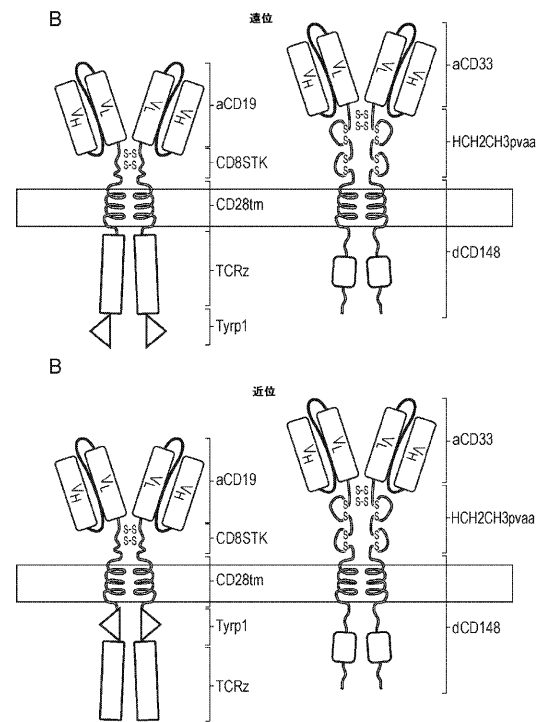
【図 2 - 3】



【図 3 - 1】



【図 3 - 2】



【配列表】

0006836515000001.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 1 2 P	21/02	C
C 0 7 K	19/00	(2006.01)	C 0 7 K	19/00	
C 0 7 K	14/075	(2006.01)	C 0 7 K	14/075	
C 0 7 K	7/00	(2006.01)	C 0 7 K	7/00	
C 0 7 K	14/09	(2006.01)	C 0 7 K	14/09	
C 0 7 K	14/085	(2006.01)	C 0 7 K	14/085	
C 0 7 K	14/705	(2006.01)	C 0 7 K	14/705	

(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, デボット 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, デボット 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 2 0 1 4 / 0 7 9 8 7 8 (W O , A 1)

特表 2 0 0 1 - 5 0 3 2 6 0 (J P , A)

de Felipe P et al , Targeting of proteins derived from self-processing polyproteins containing multiple signal sequences , Traffic , 2 0 0 4 年 , 5 , 616-626

Amrani A et al , Coordinate Expression and Independent Subcellular Targeting of Multiple Proteins from a Single Transgene , Plant Physiol , 2 0 0 4 年 , 135 , 16-24

de Felipe P , Skipping the co-expression problem: the new 2A "CHYSEL" technology , Genet Vaccines Ther , 2 0 0 4 年 , 2 , 13

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

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

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S
(S T N)