(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2025-519357
(P2025-519357A)
(43)公表日　令和7年6月26日(2025.6.26)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*15/11 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/11	Ｚ	４Ｂ０６５
Ｃ１２Ｎ	*1/15 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	1/15	ＺＮＡ	
Ｃ１２Ｎ	*1/19 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	1/19		
Ｃ１２Ｎ	*1/21 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	1/21		
Ｃ１２Ｎ	*5/10 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/10		

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全26頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-568785(P2024-568785)
(86)(22)出願日　令和5年6月11日(2023.6.11)
(85)翻訳文提出日　令和7年1月16日(2025.1.16)
(86)国際出願番号　PCT/RU2023/050148
(87)国際公開番号　WO2023/239267
(87)国際公開日　令和5年12月14日(2023.12.14)
(31)優先権主張番号　2022115853
(32)優先日　令和4年6月10日(2022.6.10)
(33)優先権主張国・地域又は機関
ロシア(RU)
(81)指定国・地域　AP(BW,CV,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,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV
最終頁に続く

(71)出願人　516261966
ジョイント・ストック・カンパニー “バイオキャド”
ロシア国 １９８５１５ サンクト・ペテルブルク，フン．テル．グ．ポセロク・ストレルナ，ウーリツァ．ズヴャジ，ディリエヴニャ ３８，ストラニスタ １，ポニシーニヤ ８９
(74)代理人　100118902
弁理士　山本 修
(74)代理人　100106208
弁理士　宮前 徹
(74)代理人　100196508
弁理士　松尾 淳一
(74)代理人　100107386
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　プロモーター活性を有する核酸およびその使用

(57)【要約】
本出願は、遺伝学、遺伝子療法、および分子生物学の分野に関する。より具体的には、本発明は、プロモーター活性を有する核酸（変異体）、それに基づく発現カセットおよびベクター、標的生成物または発現ベクターを生成させるための宿主細胞に関する。
【選択図】図１

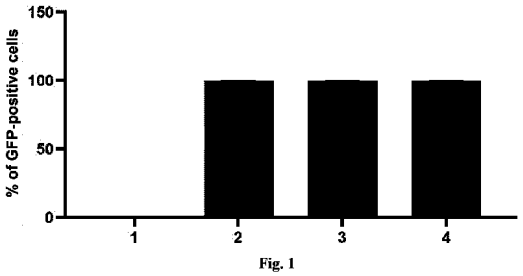


Fig. 1

【特許請求の範囲】
【請求項１】
配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４または１５を含む群から選択されるヌクレオチド配列を含む、プロモーター活性を有する核酸。
【請求項２】
請求項１に記載の核酸の分子および作動可能に連結された導入遺伝子を含む発現カセット。
【請求項３】
前記導入遺伝子がタンパク質または小分子阻害性核酸をコードする、請求項２に記載の発現カセット。
【請求項４】
前記導入遺伝子が、第ＶＩＩＩ因子もしくはその機能的変異体、第ＩＸ因子もしくはその機能的変異体、ＳＭＮ１タンパク質（生存運動ニューロンタンパク質）、ＳＡＲＳ－ｃｏｖ２のＲＢＤ－Ｓポリペプチド、または治療的抗体を含む群から選択されるタンパク質をコードする、請求項３に記載の発現カセット。
【請求項５】
請求項１に記載の核酸または請求項２から４のいずれか一項に記載の発現カセットを含む発現ベクター。
【請求項６】
プラスミド、ＡＡＶ、レンチウイルスまたはアデノウイルスである、請求項５に記載の発現ベクター。
【請求項７】
以下のＡＡＶ血清型：ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ１０　ＡＡＶ１１、ＡＡＶ１２、ＡＡＶ１３、ＡＡＶ１４、ＡＡＶ１５、ＡＡＶ１６、ｒＡＡＶ．ｒｈ８、ｒＡＡＶ．ｒｈｌＯ、ｒＡＡＶ．ｒｈ２０、ｒＡＡＶ．ｒｈ３９、ｒＡＡＶ．Ｒｈ７４、ｒＡＡＶ．ＲＨＭ４－１、ＡＡＶ．ｈｕ３７、ｒＡＡＶ．Ａｎｃ８０、ｒＡＡＶ．Ａｎｃ８０Ｌ６５、ｒＡＡＶ．７ｍ８、ｒＡＡＶ．ＰＨＰ．Ｂ、ｒＡＡＶ２．５、ｒＡＡＶ２．６、ｒＡＡＶ２．８、ｒＡＡＶ２．９、ｒＡＡＶ２ｔＹＦ、ｒＡＡＶ３Ｂ、ｒＡＡＶ．ＬＫ０３、ＡＡＶ．ＨＳＣ１、ＡＡＶ．ＨＳＣ２、ＡＡＶ．ＨＳＣ３、ＡＡＶ．ＨＳＣ４、ＡＡＶ．ＨＳＣ５、ＡＡＶ．ＨＳＣ６、ＡＡＶ．ＨＳＣ７、ＡＡＶ．ＨＳＣ８、ＡＡＶ．ＨＳＣ９、ＡＡＶ．ＨＳＣ１０、ＡＡＶ．ＨＳＣ１１、ＡＡＶ．ＨＳＣ１２、ＡＡＶ．ＨＳＣ１３、ＡＡＶ．ＨＳＣ１４、ＡＡＶ．ＨＳＣ１５またはＡＡＶ．ＨＳＣ１６を含む群から選択されるＡＡＶである、請求項６に記載の発現ベクター。
【請求項８】
請求項１に記載の核酸または請求項２から４のいずれか一項に記載の発現カセットを含む、標的生成物または請求項５から７のいずれか一項に記載の発現ベクターを生成させるための宿主細胞。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本出願は、遺伝学、遺伝子療法、および分子生物学の分野に関する。より具体的には、本発明は、プロモーター活性を有する核酸（変異体）、それに基づく発現カセットおよびベクター、標的生成物または発現ベクターを生成させるための宿主細胞に関する。
【背景技術】
【０００２】
プロモーターは、それに対してプロモーターが作動可能に連結されるポリヌクレオチドの転写を促進するＤＮＡエレメントである。プロモーターはまた、プロモーター／エンハンサーエレメントの一部分でもあり得る。プロモーターエレメントとエンハンサーエレメントとの間の物理的境界は常に明確ではないが、プロモーターとは、典型的には、それに

対してＲＮＡポリメラーゼおよび／またはいずれかの関連する因子が結合し、そこで転写が開始される核酸分子上の部位を意味する。エンハンサーは、時間的ならびに空間的にプロモーター活性を増強する。多数のプロモーターが、広範囲の細胞タイプにおいて転写活性であることが知られている。プロモーターは、構成的に機能するものおよび誘導または抑制解除により調節されるものの２つのクラスへと分けることができる。両方のクラスが、タンパク質発現に対して好適である。真核細胞における、特に哺乳動物細胞におけるポリペプチドの高レベル生成のために用いられるプロモーターは、強力であり、かつ好ましくは広範囲の細胞タイプにおいて活性であるべきである。多数の細胞タイプにおける発現を駆動することが可能である強力な構成的プロモーターが当技術分野で周知であり、したがって、本明細書中でそれらを詳細に説明する必要はない。

【０００３】

プロモーターおよび／またはエンハンサーの例は、レトロウイルスＬＴＲ、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）（例えば、ＣＭＶプロモーター／エンハンサー）、シミアンウイルス４０（ＳＶ４０）（例えば、ＳＶ４０プロモーター／エンハンサー）、アデノウイルス（例えば、アデノウイルス主要後期プロモーター（ＡｄＭＬＰ））に由来するプロモーターおよび／またはエンハンサー、ＣＡＧプロモーター、ならびにＴＴＲプロモーターまたはＥＦ１－αプロモーターなどの強力哺乳動物プロモーターである。

【０００４】

ＣＭＶプロモーターは、亜型に応じて、５８９～１６５０ｂｐの長さを有する（Ｃｈａｎｇｙｕ Ｚｈｅｎｇら、Ａｌｌ Ｈｕｍａｎ ＥＦ1α Ｐｒｏｍｏｔｅｒｓ Ａｒｅ Ｎｏｔ Ｅｑｕａｌ：Ｍａｒｋｅｄｌｙ Ａｆｆｅｃｔ Ｇｅｎｅ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ｉｎ Ｃｏｎｓｔｒｕｃｔｓ ｆｒｏｍ Ｄｉｆｆｅｒｅｎｔ Ｓｏｕｒｃｅｓ、Ｉｎｔ Ｊ Ｍｅｄ Ｓｃｉ．２０１４；１１（５）：４０４～４０８頁、ｄｏｉ：１０．７１５０／ｉｊｍｓ．８０３３）。ＣＡＧプロモーター（ＣＭＶ初期エンハンサー／ニワトリβアクチン）は、８６８ｂｐの長さを有する（Ｎｉｅｕｗｅｎｈｕｉｓ、Ｂ．、Ｈａｅｎｚｉ、Ｂ．、Ｈｉｌｔｏｎ、Ｓ．ら、Ｏｐｔｉｍｉｚａｔｉｏｎ ｏｆ ａｄｅｎｏ－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ｖｉｒａｌ ｖｅｃｔｏｒ－ｍｅｄｉａｔｅｄ ｔｒａｎｓｄｕｃｔｉｏｎ ｏｆ ｔｈｅ ｃｏｒｔｉｃｏｓｐｉｎａｌ ｔｒａｃｔ：ｃｏｍｐａｒｉｓｏｎ ｏｆ ｆｏｕｒ ｐｒｏｍｏｔｅｒｓ．Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．２０２１；２８：５６～７４頁、ｈｔｔｐｓ：／／ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１０３８／ｓ４１４３４－０２０－０１６９－１）。

【０００５】

上記のプロモーターのうちのすべてが、５８８ｂｐを超える長さを有する。発現カセット中で５８８ｂｐ超の長さを有するプロモーターは、多数の発現ベクターを用いる大型導入遺伝子の発現に対する最適な選択肢ではない。

【０００６】

つまり、短いプロモーターを作製する必要がある。

ＣＭＶプロモーターをはじめとする多数のプロモーターが組織特異的でなく、すなわち、特定の器官の細胞における治療的導入遺伝子の選択的な発現を提供せず、この事実は、遺伝子療法生成物を製造するために用いる場合にこれらのプロモーターの明らかな欠点である。

【０００７】

つまり、特定の器官の細胞における治療的導入遺伝子の選択的な発現を提供する組織特異的プロモーターを作製する必要がある。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【０００８】

本発明の著者らは、配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４または１５を含む群から選択されるヌクレオチド配列を有する核酸がプロモーター活性を有することを、驚くべきことに見出した。配列番号１、２、３、４、５、６

、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４または１５のヌクレオチド配列を有するプロモーターは、１２３～２５２ｂｐの範囲の長さを有する。さらに、本発明の著者らは、配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４または１５のヌクレオチド配列を有するプロモーターが肝細胞起源の細胞における組織特異的プロモーター活性を有することを、驚くべきことに見出した。

【０００９】

定義および一般的方法

本明細書中で別途定義されない限り、本発明との関連で用いられるすべての技術用語および科学用語は、当業者により一般的に理解されるのと同じ意味を有する。

【００１０】

さらに、文脈によりそうでないことが要求されない限り、単数形の用語は複数形の用語を含み、かつ複数形の用語は単数形の用語を含むであろう。典型的には、細胞培養、分子生物学、免疫学、微生物学、遺伝学、分析化学、有機合成化学、医化学および薬化学の現行の分類および方法、ならびに本明細書中に記載されるタンパク質および核酸のハイブリダイゼーションおよび化学は、当業者により周知され、かつ当技術分野において広く用いられる。酵素反応および精製法は、当技術分野で一般的である通りに、または本明細書中に記載される通りに、製造業者のガイドラインに従って行われる。

【００１１】

本説明および後続の特許請求の範囲において用いられる場合、文脈によりそうでないことが指示されない限り、単語「含む」（「ｉｎｃｌｕｄｅ」および「ｃｏｍｐｒｉｓｅ」）、または「ｉｎｃｌｕｄｅｓ」、「ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ」、「ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ」、もしくは「ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ」などのそれらの変形は、明記される整数または整数の群の包含を暗示するが、いずれかの他の整数または整数の群の除外を暗示しないことが理解されるであろう。

【００１２】

核酸分子

本説明中で相互に交換可能に用いられる用語「核酸」、「核配列」、「核酸配列」、「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」、「ポリヌクレオチド配列」および「ヌクレオチド配列」とは、核酸の断片または領域を決定し、非天然ヌクレオチドを含むかまたは含まず、かつ二本鎖ＤＮＡもしくはＲＮＡ、一本鎖ＤＮＡもしくはＲＮＡ、または前記ＤＮＡの転写生成物のいずれかである、修飾型であるかまたはそうでない、ヌクレオチドの正確な配列を意味する。

【００１３】

本説明中で用いる場合、ポリヌクレオチドは、非限定的な例として、組み換え手段、すなわち、通常のクローニング技術およびＰＣＲなどを用いる組み換えライブラリーまたは細胞ゲノムからの核酸配列のクローニングをはじめとする当技術分野で利用可能ないずれかの手段により、および合成手段により取得されるすべての核酸配列を、非限定的な例として含む。

【００１４】

本発明がその天然の染色体環境中、すなわち、天然状態でのヌクレオチド配列に関しないこともまた、ここで含められるべきである。本発明の配列は、単離および／または精製されており、すなわち、直接的または例えばコピー化により間接的にサンプル採取され、それらの環境が少なくとも部分的に改変されている。つまり、例えば、宿主細胞を用いる組み換え遺伝学により取得されるか、または化学合成により取得される単離された核酸もまた、ここで言及されるべきである。

【００１５】

別途示されない限り、ヌクレオチド配列との用語は、その相補体を包含する。つまり、特定の配列を有する核酸は、その相補配列を有するその相補鎖を包含するものとして理解されるべきである。

【００１６】

ベクター

本明細書中で用いる場合、用語「ベクター」とは、連結された別の核酸を輸送することが可能な核酸分子を意味する。さらに、本明細書中での用語「ベクター」は、核酸を輸送することが可能な組み換えウイルス粒子を意味する。

【００１７】

本説明中で用いる場合、用語「発現」は、そのプロモーターにより駆動される特定のヌクレオチド配列の転写および／または翻訳として定義される。

発明の詳細な説明

核酸

一側面では、本発明は、プロモーター活性を有し、かつ配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４または１５の群から選択されるヌクレオチド配列を含む核酸に関する。

【００１８】

本発明の一部の態様では、核酸は単離された核酸である。

「単離された」核酸分子は、少なくとも１種の核酸分子不純物から特定および分離されるものである。単離された核酸分子は、天然条件下で見出される形態またはセットとは異なる。つまり、単離された核酸分子は、天然条件下で細胞中に存在する核酸分子とは異なる。

【００１９】

配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４または１５のヌクレオチド配列を有するすべての核酸は、プロモーター活性を有する。

配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４または１５のヌクレオチド配列を有するすべてのプロモーターは、肝細胞起源の細胞における組織特異的プロモーター活性を有する。

【００２０】

配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４または１５のヌクレオチド配列を有するすべてのプロモーターは、強力プロモーターであり、発現ベクターの一部分としてのその使用は、標的タンパク質の生成および活性のレベルの増大をもたらす。

【００２１】

発現カセット．発現ベクター．

一側面では、本発明は、プロモーター活性を有する上記核酸のうちのいずれかを含む発現カセットに関する。

【００２２】

本明細書中で用いる場合、用語「～を発現するカセット」または「発現カセット」とは、特に、適切な設定において、その配列が前記発現カセット中に含められる目的のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの発現を生起することが可能であるＤＮＡ断片を意味する。宿主細胞へと導入された場合、発現カセットは、とりわけ、細胞機構に目的のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをＲＮＡへと転写させることが可能であり、ＲＮＡは、典型的には続いてさらにプロセシングされて、最終的には目的のポリペプチドへと翻訳される。発現カセットは、発現ベクター中に含められることができる。

【００２３】

一部の態様では、発現カセットは、５’末端から３’末端の方向で以下のエレメントを含む：

左側（第１）ＩＴＲ（逆位末端反復）；

プロモーター活性を有する上記核酸のうちのいずれか１つ；

導入遺伝子；

ポリアデニル化シグナル；

右側（第２）ＩＴＲ。

【００２４】

発現カセットの上記構造エレメントは、互いに作動可能に連結される。
本明細書中で用いる場合、用語「作動可能に連結される」とは、機能的関係になるポリヌクレオチド（またはポリペプチド）エレメントの連結を意味する。別の核酸配列との機能的関係条件で存在する場合に、核酸は「作動可能に連結」されている。例えば、コード配列の転写に影響を及ぼす場合に、転写調節配列はコード配列へと作動可能に連結されている。用語「作動可能に連結される」とは、連結されたＤＮＡ配列同士が典型的には連続的であり、２つのタンパク質コード領域を連結する必要がある場合にも連続的であり、かつリーディングフレーム中に存在することを意味する。

【００２５】

一部の態様では、発現カセットは、配列番号１６のヌクレオチド配列を有する左側（第１）ＩＴＲを含む。
一部の態様では、発現カセットは、配列番号１７のヌクレオチド配列を有するポリアデニル化シグナルを含む。

【００２６】

一部の態様では、発現カセットは、配列番号１８のヌクレオチド配列を有する右側（第２）ＩＴＲを含む。
一部の態様では、発現カセットは、５’末端から３’末端の方向で以下のエレメントを含む：
配列番号１６のヌクレオチド配列を有する左側（第１）ＩＴＲ（逆位末端反復）；
配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４または１５の群から選択されるヌクレオチド配列を有するプロモーター；
導入遺伝子；
配列番号１７のヌクレオチド配列を有するポリアデニル化シグナル；
配列番号１８のヌクレオチド配列を有する右側（第２）ＩＴＲ。

【００２７】

一部の態様では、発現カセットは、タンパク質または小分子阻害性核酸をコードする導入遺伝子を含む。
一部の態様では、発現カセットは、第ＶＩＩＩ因子もしくはその機能的変異体、第ＩＸ因子もしくはその機能的変異体、ＳＭＮ１タンパク質（生存運動ニューロンタンパク質）、ＳＡＲＳ－ｃｏｖ２のＲＢＤ－Ｓポリペプチド、または治療的抗体を含む群から選択されるタンパク質をコードする導入遺伝子を含む。

【００２８】

一側面では、本発明は、プロモーター活性を有する上記核酸のうちのいずれかまたは上記発現カセットのうちのいずれかを含む発現ベクターに関する。
本発明の一部の態様では、ベクターは、ベクターが導入される宿主細胞における自律的複製が可能である（例えば、細菌の複製起点部位を有する細菌ベクターおよびエピソームベクター）。本発明のさらなる態様では、ベクター（例えば、非エピソームベクター）は、宿主細胞への導入に際して宿主細胞のゲノムへとインテグレートされることができ、それにより、宿主ゲノムと共に複製される。さらに、一部のベクターは、ベクターが作動可能に連結される遺伝子の発現に向かわせることが可能である。そのようなベクターは、本明細書中で「組み換え発現ベクター」（または簡潔に「発現ベクター」）と称される。

【００２９】

発現ベクターとしては、プラスミド、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）、植物ウイルス、例えば、カリフラワーモザイクウイルス、タバコモザイクウイルス、コスミド、ＹＡＣ、ＥＢＶなどが挙げられる。ベクター内の転写および翻訳制御配列がＤＮＡの転写および翻訳を調節するそれらの意図される機能を果たすように、ＤＮＡ分子をベクター中へと挿入することができる。発現ベクターおよび発現制御配列は、用いられる発現宿主細胞と適合性であるように選択することができる。ＤＮＡ分子は、標準的方法（例えば、相補的制限部位のライゲーション、または制限部位が存在しない場合には平滑末端ライゲーション）により、発現ベクター中へと導入することができる。

【００３０】
本発明の一部の態様では、ベクターは、プラスミド、ＡＡＶ、アデノウイルスまたはレンチウイルスである。
本発明の一部の態様では、ベクターは、プラスミド、すなわち、中に追加のＤＮＡセグメントを挿入することができる、環状二本鎖ＤＮＡである。
【００３１】
本発明の一部の態様では、ベクターは、ウイルス（発現）ベクターであり、このとき、追加のＤＮＡセグメントを、ウイルスゲノム中へと挿入することができる。
一部の態様では、発現ベクターは、組み換えアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）である。
【００３２】
一部の態様では、ＡＡＶは、以下のＡＡＶ血清型をはじめとする群より選択される：ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ１０　ＡＡＶ１１、ＡＡＶ１２、ＡＡＶ１３、ＡＡＶ１４、ＡＡＶ１５、ＡＡＶ１６、ｒＡＡＶ．ｒｈ８、ｒＡＡＶ．ｒｈｌＯ、ｒＡＡＶ．ｒｈ２０、ｒＡＡＶ．ｒｈ３９、ｒＡＡＶ．Ｒｈ７４、ｒＡＡＶ．ＲＨＭ４－１、ＡＡＶ．ｈｕ３７、ｒＡＡＶ．Ａｎｃ８０、ｒＡＡＶ．Ａｎｃ８０Ｌ６５、ｒＡＡＶ．７ｍ８、ｒＡＡＶ．ＰＨＰ．Ｂ、ｒＡＡＶ２．５、ｒＡＡＶ２．６、ｒＡＡＶ２．８、ｒＡＡＶ２．９、ｒＡＡＶ２ｔＹＦ、ｒＡＡＶ３Ｂ、ｒＡＡＶ．ＬＫ０３、ＡＡＶ．ＨＳＣ１、ＡＡＶ．ＨＳＣ２、ＡＡＶ．ＨＳＣ３、ＡＡＶ．ＨＳＣ４、ＡＡＶ．ＨＳＣ５、ＡＡＶ．ＨＳＣ６、ＡＡＶ．ＨＳＣ７、ＡＡＶ．ＨＳＣ８、ＡＡＶ．ＨＳＣ９、ＡＡＶ．ＨＳＣ１０、ＡＡＶ．ＨＳＣ１１、ＡＡＶ．ＨＳＣ１２、ＡＡＶ．ＨＳＣ１３、ＡＡＶ．ＨＳＣ１４、ＡＡＶ．ＨＳＣ１５またはＡＡＶ．ＨＳＣ１６。
【００３３】
本発明の一部の態様では、ベクターまたはカセットは、プロモーターとは別に、他の発現制御配列を含むことができる。本説明中で用いる場合、用語「他の発現制御配列」とは、挿入されるコード配列の発現およびプロセシングを達成するために必要であるポリヌクレオチド配列を意味する。発現制御配列の選択をはじめとする発現ベクターまたはカセットの設計は、形質転換される宿主細胞のタイプの選択、タンパク質の発現の要求レベルなどの因子に依存し得ることが、当業者により理解されるであろう。発現制御配列としては、プロモーターとは別に、対応する転写開始配列、終結配列、およびエンハンサー配列；スプライシングおよびポリアデニル化シグナルなどの効率的ＲＮＡプロセシングシグナル；細胞質ｍＲＮＡを安定化する配列；翻訳効率を強化する配列（すなわち、Ｋｏｚａｋコンセンサス配列）；タンパク質安定性を強化する配列；ならびに、所望の場合、タンパク質分泌を強化する配列が挙げられる。そのような制御配列の性質は、宿主生物に応じて異なり；原核生物では、そのような制御配列は、一般的にプロモーター、リボソーム結合性部位、ならびに転写終結配列を含み；真核生物では、そのような制御配列は、典型的にはプロモーターおよび転写終結配列を含む。発現制御配列は、その存在が発現およびプロセシングに対して重要である少なくともすべての構成要素を包含する。
【００３４】
上記の遺伝子および発現制御配列に加えて、本発明に従う組み換え発現ベクターは、宿主細胞におけるベクターの複製を制御する配列（例えば、複製起点）および選択マーカー遺伝子などの追加の配列を担持することができる。選択マーカー遺伝子は、その中へとベクターまたはカセットが導入された宿主細胞の選択を促進する。
【００３５】
本発明の一態様では、発現ベクターは、目的の１つもしくは複数のポリヌクレオチド配列、目的の遺伝子、またはパルボウイルス配列もしくは逆位末端反復（ＩＴＲ）配列に隣接する導入遺伝子を含むベクターに関する。
【００３６】
本発明のカセットまたはベクターのいずれも、アデノ随伴ウイルスの非構造タンパク質（Ｒｅｐ）および構造タンパク質（Ｃａｐ）をコードする遺伝子のヌクレオチド配列を含

まない。
【００３７】
宿主細胞
一側面では、本発明は、プロモーター活性を有する上記核酸のうちのいずれか１つを含む、標的生成物を生成させるための、または上記発現ベクターのうちのいずれか１つを生成させるための宿主細胞に関する。
【００３８】
本明細書中で用いる場合、用語「宿主細胞」とは、中に本発明に従う組み換え発現ベクターまたはカセットが導入された細胞を意味する。「宿主細胞」とは、特定の対象細胞のみならず、そのような細胞の子孫も同様に意味することが理解されるべきである。突然変異または環境的影響のいずれかに起因する改変が後続世代において起こり得るので、そのような子孫は、実際には親細胞とは同一でない場合があるが；しかしながら、そのような細胞は、それでも本明細書中で用いる場合の用語「宿主細胞」の範囲内に含められる。
【００３９】
本発明に従う発現ベクターまたはカセットは、哺乳動物細胞、植物細胞、細菌または酵母宿主細胞のトランスフェクションのために用いることができる。トランスフェクションは、宿主細胞へとポリヌクレオチドを導入するいずれかの公知の方法により行うことができる。哺乳動物細胞へと異種ポリヌクレオチドを導入するための方法は、当技術分野で周知であり、かつデキストラン媒介トランスフェクション、カチオン性ポリマー－核酸複合体トランスフェクション、リン酸カルシウム沈殿、ポリブレン媒介トランスフェクション、プロトプラスト融合、リポソーム中へのポリヌクレオチドのカプセル封入、および核へのＤＮＡの直接的顕微注入が挙げられる。加えて、核酸分子は、ウイルス（発現）ベクターにより哺乳動物細胞へと導入することができる。
【００４０】
トランスフェクションに対する宿主として用いられる哺乳動物細胞株は当技術分野で周知であり、かつ入手可能な複数の不死化細胞株が挙げられる。これらとしては、例えば、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞、ＮＳ０細胞、ＳＰ２細胞、ＨＥＫ－２９３Ｔ細胞、ＦｒｅｅＳｔｙｌｅ２９３細胞（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）、ＮＩＨ－３Ｔ３細胞、ＨｅＬａ細胞、ベビーハムスター腎臓（ＢＨＫ）細胞、アフリカミドリザル腎臓細胞（ＣＯＳ）、ヒト肝細胞癌細胞（例えば、ＨｅｐＧ２）、Ａ５４９細胞、ＳＫ－ＨＥＰ１、ＨＵＨ７、Ｈｅｐ－ＲＧおよび多数の他の細胞株が挙げられる。細胞株は、細胞株が高発現レベルを有し、かつ生成対象のタンパク質の必要な特徴を提供することを決定することにより選択される。用いることができる他の細胞株は、Ｓｆ９またはＳｆ２１細胞などの昆虫細胞株である。本発明に従う組み換え発現ベクターが哺乳動物宿主細胞へと導入される場合、標的タンパク質は、宿主細胞において標的タンパク質を発現するか、または、より好ましくは、宿主細胞が培養される培養培地中へと標的タンパク質を分泌するために十分である期間にわたって宿主細胞を培養することにより生成される。標的タンパク質は、標準的なタンパク質精製技術を用いて培養培地から単離することができる。植物宿主細胞としては、例えば、タバコ属（Ｎｉｃｏｔｉａｎａ）、シロイヌナズナ属（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）、ウキクサ（ｄｕｃｋｗｅｅｄ）、トウモロコシ、コムギ、ジャガイモなどが挙げられる。細菌宿主細胞としては、エシェリキア属（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ）およびストレプトマイセス属（Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ）細菌種が挙げられる。酵母宿主細胞としては、シゾサッカロマイセス・ポンベ（Ｓｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｐｏｍｂｅ）、サッカロマイセス・セレビシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）およびピキア・パストリス（Ｐｉｃｈｉａ ｐａｓｔｏｒｉｓ）が挙げられる。
【００４１】
上記宿主細胞は、ヒト胚を用いて生成される宿主細胞に関しない。
上記宿主細胞は、ヒト生殖系列細胞の遺伝的完全性を改変することにより生成される宿主細胞に関しない。

【図面の簡単な説明】
【００４２】
【図１】図１は、配列番号１および２の核酸配列に対応するプロモーターの制御下でＥＧＦＰレポータータンパク質を発現する細胞の蛍光の割合の増大を示すグラフである。
トランスフェクション後のＥＧＦＰ発現細胞の割合：　１－ＥＧＦＰ導入遺伝子を含みかつプロモーター領域を含まない発現カセットを用いて（対照）；　２－ＥＧＦＰ導入遺伝子を含みかつサイトメガロウイルス（ＣＭＶ）ウイルスプロモーター領域を補われた発現カセットを用いて（対照）；　３－配列番号２の核酸配列に対応するプロモーターの制御下にＥＧＦＰ導入遺伝子を含む発現カセットを用いて；　４－配列番号１の核酸配列に対応するプロモーターの制御下にＥＧＦＰ導入遺伝子を含む発現カセットを用いて。
【図２】図２は、配列番号３～７および配列番号１１～１４の核酸配列に対応するプロモーターの制御下でＥＧＦＰレポータータンパク質を発現する細胞の蛍光の割合の増大を示すグラフである。
【００４３】
トランスフェクション後のＥＧＦＰ発現細胞の割合：
１－ＥＧＦＰ導入遺伝子を含みかつプロモーター領域を含まない発現カセットを用いて（対照）；
２－配列番号４の核酸配列に対応するプロモーターの制御下にＥＧＦＰ導入遺伝子を含む発現カセットを用いて；
３－配列番号５の核酸配列に対応するプロモーターの制御下にＥＧＦＰ導入遺伝子を含む発現カセットを用いて；
４－配列番号６の核酸配列に対応するプロモーターの制御下にＥＧＦＰ導入遺伝子を含む発現カセットを用いて；
５－配列番号７の核酸配列に対応するプロモーターの制御下にＥＧＦＰ導入遺伝子を含む発現カセットを用いて；
６－配列番号１３の核酸配列に対応するプロモーターの制御下にＥＧＦＰ導入遺伝子を含む発現カセットを用いて；
７－配列番号１４の核酸配列に対応するプロモーターの制御下にＥＧＦＰ導入遺伝子を含む発現カセットを用いて；
８－配列番号１１の核酸配列に対応するプロモーターの制御下にＥＧＦＰ導入遺伝子を含む発現カセットを用いて；
９－配列番号１２の核酸配列に対応するプロモーターの制御下にＥＧＦＰ導入遺伝子を含む発現カセットを用いて；
１０－配列番号３の核酸配列に対応するプロモーターの制御下にＥＧＦＰ導入遺伝子を含む発現カセットを用いて。
【図３】図３は、配列番号８～１０および１５の核酸配列に対応するプロモーターの制御下でＥＧＦＰレポータータンパク質を発現する細胞の蛍光の割合の増大を示すグラフである。
【００４４】
トランスフェクション後のＥＧＦＰ発現細胞の割合：
１－ＥＧＦＰ導入遺伝子を含みかつプロモーター領域を含まない発現カセットを用いて（対照）；
２－配列番号８の核酸配列に対応するプロモーターの制御下にＥＧＦＰ導入遺伝子を含む発現カセットを用いて；
３－配列番号１０の核酸配列に対応するプロモーターの制御下にＥＧＦＰ導入遺伝子を含む発現カセットを用いて；
４－配列番号９の核酸配列に対応するプロモーターの制御下にＥＧＦＰ導入遺伝子を含む発現カセットを用いて；
５－配列番号１５の核酸配列に対応するプロモーターの制御下にＥＧＦＰ導入遺伝子

を含む発現カセットを用いて。
【図４】図４は、配列番号３～７および配列番号１１～１４の核酸配列に対応するプロモーターの制御下でＥＧＦＰレポータータンパク質を発現する細胞の蛍光の強度の増大を示すグラフである。
【００４５】
トランスフェクション後のＥＧＦＰを発現する細胞の蛍光の強度：
１－ＥＧＦＰ導入遺伝子を含みかつプロモーター領域を含まない発現カセットを用いて（対照）；
２－配列番号４の核酸配列に対応するプロモーターの制御下にＥＧＦＰ導入遺伝子を含む発現カセットを用いて；
３－配列番号５の核酸配列に対応するプロモーターの制御下にＥＧＦＰ導入遺伝子を含む発現カセットを用いて；
４－配列番号６の核酸配列に対応するプロモーターの制御下にＥＧＦＰ導入遺伝子を含む発現カセットを用いて；
５－配列番号７の核酸配列に対応するプロモーターの制御下にＥＧＦＰ導入遺伝子を含む発現カセットを用いて；
６－配列番号１３の核酸配列に対応するプロモーターの制御下にＥＧＦＰ導入遺伝子を含む発現カセットを用いて；
７－配列番号１４の核酸配列に対応するプロモーターの制御下にＥＧＦＰ導入遺伝子を含む発現カセットを用いて；
８－配列番号１１の核酸配列に対応するプロモーターの制御下にＥＧＦＰ導入遺伝子を含む発現カセットを用いて；
９－配列番号１２の核酸配列に対応するプロモーターの制御下にＥＧＦＰ導入遺伝子を含む発現カセットを用いて；
１０－配列番号３の核酸配列に対応するプロモーターの制御下にＥＧＦＰ導入遺伝子を含む発現カセットを用いて。
【図５】図５は、配列番号８～１０および１５の核酸配列に対応するプロモーターの制御下でＥＧＦＰレポータータンパク質を発現する細胞の蛍光の強度の増大を示すグラフである。
【００４６】
トランスフェクション後のＥＧＦＰを発現する細胞の蛍光の強度：
１－ＥＧＦＰ導入遺伝子を含みかつプロモーター領域を含まない発現カセットを用いて（対照）；
２－配列番号８の核酸配列に対応するプロモーターの制御下にＥＧＦＰ導入遺伝子を含む発現カセットを用いて；
３－配列番号１０の核酸配列に対応するプロモーターの制御下にＥＧＦＰ導入遺伝子を含む発現カセットを用いて；
４－配列番号９の核酸配列に対応するプロモーターの制御下にＥＧＦＰ導入遺伝子を含む発現カセットを用いて；
５－配列番号１５の核酸配列に対応するプロモーターの制御下にＥＧＦＰ導入遺伝子を含む発現カセットを用いて。
【図６】図６は、プロモーター活性を示しかつ配列番号３、１１および１４の配列に対応する核酸を用いる間の凝固タンパク質の生成のレベルの増大を示すグラフである。
【００４７】
トランスフェクションの間の凝固タンパク質の生成のレベル：
１－凝固因子導入遺伝子を含みかつプロモーター領域を含まない発現カセットを用いて（対照）；
２－凝固因子導入遺伝子が配列番号３の核酸配列に対応するプロモーターの制御下にある発現カセットを用いて；
３－凝固因子導入遺伝子が配列番号１１の核酸配列に対応するプロモーターの制御下

にある発現カセットを用いて；
４－凝固因子導入遺伝子が配列番号１４の核酸配列に対応するプロモーターの制御下にある発現カセットを用いて。
【図７】図７は、プロモーター活性を示しかつ配列番号３、１１および１４の配列に対応する核酸を用いる間の凝固タンパク質の活性のレベルの増大を示すグラフである。
【００４８】
トランスフェクションの間の凝固タンパク質の活性のレベル：
１－凝固因子導入遺伝子を含みかつプロモーター領域を含まない発現カセットを用いて（対照）；
２－凝固因子導入遺伝子が配列番号３の核酸配列に対応するプロモーターの制御下にある発現カセットを用いて；
３－凝固因子導入遺伝子が配列番号１１の核酸配列に対応するプロモーターの制御下にある発現カセットを用いて；
４－凝固因子導入遺伝子が配列番号１４の核酸配列に対応するプロモーターの制御下にある発現カセットを用いて。
【図８】図８は、配列番号３～７および配列番号１１～１４の核酸配列に対応するプロモーターの制御下でＥＧＦＰレポータータンパク質を発現する細胞の割合の増大を示す、Ｈｕｈ７およびＵ８７細胞株に対する新規に生成された配列の組織特異性の測定のグラフである。
【００４９】
トランスフェクション後のＥＧＦＰ発現細胞の割合：
１－ＥＧＦＰ導入遺伝子を含みかつプロモーター領域を含まない発現カセットを用いて（対照）；
２－配列番号４の核酸配列に対応するプロモーターの制御下にＥＧＦＰ導入遺伝子を含む発現カセットを用いて；
３－配列番号５の核酸配列に対応するプロモーターの制御下にＥＧＦＰ導入遺伝子を含む発現カセットを用いて；
４－配列番号６の核酸配列に対応するプロモーターの制御下にＥＧＦＰ導入遺伝子を含む発現カセットを用いて；
５－配列番号７の核酸配列に対応するプロモーターの制御下にＥＧＦＰ導入遺伝子を含む発現カセットを用いて；
６－配列番号１３の核酸配列に対応するプロモーターの制御下にＥＧＦＰ導入遺伝子を含む発現カセットを用いて；
７－配列番号１４の核酸配列に対応するプロモーターの制御下にＥＧＦＰ導入遺伝子を含む発現カセットを用いて；
８－配列番号１１の核酸配列に対応するプロモーターの制御下にＥＧＦＰ導入遺伝子を含む発現カセットを用いて；
９－配列番号１２の核酸配列に対応するプロモーターの制御下にＥＧＦＰ導入遺伝子を含む発現カセットを用いて；
１０－配列番号３の核酸配列に対応するプロモーターの制御下にＥＧＦＰ導入遺伝子を含む発現カセットを用いて。
【図９】図９は、配列番号７および１１の核酸配列に対応するプロモーターの制御下でＥＧＦＰレポータータンパク質を発現する細胞の割合の増大を示す、Ｈｕｈ７、ＨｅｐＧ２およびＨＥＫ２９３細胞株に対する新規に生成された配列の組織特異性の測定のグラフである。
【００５０】
トランスフェクション後のＥＧＦＰ発現細胞の割合：
１－ＥＧＦＰ導入遺伝子を含みかつプロモーター領域を含まない発現カセットを用いて（対照）；
２－配列番号７の核酸配列に対応するプロモーターの制御下にＥＧＦＰ導入遺伝子を

含む発現カセットを用いて；
　３－配列番号１１の核酸配列に対応するプロモーターの制御下にＥＧＦＰ導入遺伝子を含む発現カセットを用いて。
【図１０】図１０は、配列番号１および２の核酸配列に対応するプロモーターの制御下でＥＧＦＰレポータータンパク質を発現する細胞の蛍光の強度の増大を示す、ＣＨＯ細胞株に対する生成された配列の組織特異性の測定のグラフである。
【００５１】
　トランスフェクション後のＥＧＦＰを発現する細胞の蛍光の強度：
　１－ＥＧＦＰ導入遺伝子を含みかつプロモーター領域を含まない発現カセットを用いて（対照）；
　２－ＥＧＦＰ導入遺伝子を含みかつサイトメガロウイルス（ＣＭＶ）ウイルスプロモーター領域を補われた発現カセットを用いて（対照）；
　３－配列番号２の核酸配列に対応するプロモーターの制御下にＥＧＦＰ導入遺伝子を含む発現カセットを用いて；
　４－配列番号１の核酸配列に対応するプロモーターの制御下にＥＧＦＰ導入遺伝子を含む発現カセットを用いて。
【図１１】図１１は、配列番号１および２の核酸配列に対応するプロモーターの制御下でＥＧＦＰレポータータンパク質を発現する細胞の蛍光の強度の増大を示す、ＨｅｐＧ２細胞株に対する生成された配列の組織特異性の測定のグラフである。
【００５２】
　トランスフェクション後のＥＧＦＰを発現する細胞の蛍光の強度：
　１－ＥＧＦＰ導入遺伝子を含みかつプロモーター領域を含まない発現カセットを用いて（対照）；
　２－ＥＧＦＰ導入遺伝子を含みかつサイトメガロウイルス（ＣＭＶ）ウイルスプロモーター領域を補われた発現カセットを用いて（対照）；
　３－配列番号２の核酸配列に対応するプロモーターの制御下にＥＧＦＰ導入遺伝子を含む発現カセットを用いて；
　４－配列番号１の核酸配列に対応するプロモーターの制御下にＥＧＦＰ導入遺伝子を含む発現カセットを用いて。
【図１２】図１２は、配列番号３～７および配列番号１１～１４の核酸配列に対応するプロモーターの制御下でＥＧＦＰレポータータンパク質を発現する細胞の蛍光の強度の増大を示す、Ｈｕｈ７およびＵ８７細胞株に対する生成された配列の組織特異性の測定のグラフである。
【００５３】
　トランスフェクション後のＥＧＦＰを発現する細胞の蛍光の強度：
　１－ＥＧＦＰ導入遺伝子を含みかつプロモーター領域を含まない発現カセットを用いて（対照）；
　２－配列番号４の核酸配列に対応するプロモーターの制御下にＥＧＦＰ導入遺伝子を含む発現カセットを用いて；
　３－配列番号５の核酸配列に対応するプロモーターの制御下にＥＧＦＰ導入遺伝子を含む発現カセットを用いて；
　４－配列番号６の核酸配列に対応するプロモーターの制御下にＥＧＦＰ導入遺伝子を含む発現カセットを用いて；
　５－配列番号７の核酸配列に対応するプロモーターの制御下にＥＧＦＰ導入遺伝子を含む発現カセットを用いて；
　６－配列番号１３の核酸配列に対応するプロモーターの制御下にＥＧＦＰ導入遺伝子を含む発現カセットを用いて；
　７－配列番号１４の核酸配列に対応するプロモーターの制御下にＥＧＦＰ導入遺伝子を含む発現カセットを用いて；
　８－配列番号１１の核酸配列に対応するプロモーターの制御下にＥＧＦＰ導入遺伝子

を含む発現カセットを用いて；
　９－配列番号１２の核酸配列に対応するプロモーターの制御下にＥＧＦＰ導入遺伝子を含む発現カセットを用いて；
　１０－配列番号３の核酸配列に対応するプロモーターの制御下にＥＧＦＰ導入遺伝子を含む発現カセットを用いて。
【図１３】図１３は、配列番号７および１１の核酸配列に対応するプロモーターの制御下でＥＧＦＰレポータータンパク質を発現する細胞の蛍光の強度の増大を示す、Ｈｕｈ７、ＨｅｐＧ２およびＨＥＫ２９３細胞株に対する生成された配列の組織特異性の測定のグラフである。トランスフェクション後のＥＧＦＰを発現する細胞の蛍光の強度：　１－ＥＧＦＰ導入遺伝子を含みかつプロモーター領域を含まない発現カセットを用いて（対照）；　２－配列番号７の核酸配列に対応するプロモーターの制御下にＥＧＦＰ導入遺伝子を含む発現カセットを用いて；　３－配列番号１１の核酸配列に対応するプロモーターの制御下にＥＧＦＰ導入遺伝子を含む発現カセットを用いて。
【図１４】図１４は、ＡＡＶに基づく発現ベクターの形態での、配列番号３、８、１１および１４に対応するプロモーター領域の制御下に凝固因子配列を含む発現カセットの送達の間の凝固タンパク質の生成のレベルの増大を示すグラフである。
【００５４】
　形質導入の間の凝固タンパク質の生成のレベル：
　１－凝固因子導入遺伝子を含みかつプロモーター領域を含まないカセットを含む発現ベクターを用いて（対照）；
　２－凝固因子導入遺伝子が配列番号８の核酸配列に対応するプロモーターの制御下にあるカセットを含む発現ベクターを用いて；
　３－凝固因子導入遺伝子が配列番号１１の核酸配列に対応するプロモーターの制御下にあるカセットを含む発現ベクターを用いて；
　４－凝固因子導入遺伝子が配列番号１４の核酸配列に対応するプロモーターの制御下にあるカセットを含む発現ベクターを用いて；
　５－凝固因子導入遺伝子が配列番号３の核酸配列に対応するプロモーターの制御下にあるカセットを含む発現ベクターを用いて；
【図１５】図１５は、ＡＡＶに基づく発現ベクターの形態での、配列番号３、８、１１および１４に対応するプロモーター領域の制御下に凝固因子配列を含む発現カセットの送達の間の凝固タンパク質の活性のレベルの増大を示すグラフである。
【００５５】
　形質導入の間の凝固タンパク質の活性のレベル：
　１－凝固因子導入遺伝子を含みかつプロモーター領域を含まないカセットを含む発現ベクターを用いて（対照）；
　２－凝固因子導入遺伝子が配列番号８の核酸配列に対応するプロモーターの制御下にあるカセットを含む発現ベクターを用いて；
　３－凝固因子導入遺伝子が配列番号１１の核酸配列に対応するプロモーターの制御下にあるカセットを含む発現ベクターを用いて；
　４－凝固因子導入遺伝子が配列番号１４の核酸配列に対応するプロモーターの制御下にあるカセットを含む発現ベクターを用いて；
　５－凝固因子導入遺伝子が配列番号３の核酸配列に対応するプロモーターの制御下にあるカセットを含む発現ベクターを用いて；
【図１６】図１６は、ｒＡＡＶ５またはｒＡＡＶ６に基づく発現ベクターの形態での、配列番号８および１１に対応するプロモーター領域の制御下に凝固因子配列を含む発現カセットの送達の間の凝固タンパク質の生成のレベルの増大を示すグラフである。
【００５６】
　形質導入の間の凝固タンパク質の生成のレベル：
　１－凝固因子導入遺伝子を含みかつプロモーター領域を含まないカセットを含む発現ベクターを用いて（対照）；

２－凝固因子導入遺伝子が配列番号１１の核酸配列に対応するプロモーターの制御下にあるカセットを含む発現ベクターを用いて；
３－凝固因子導入遺伝子が配列番号８の核酸配列に対応するプロモーターの制御下にあるカセットを含む発現ベクターを用いて。
【図１７】図１７は、ｒＡＡＶ５またはｒＡＡＶ６に基づく発現ベクターの形態での、配列番号８および１１に対応するプロモーター領域の制御下に凝固因子配列を含む発現カセットの送達の間の凝固タンパク質の活性のレベルの増大を示すグラフである。
【００５７】
形質導入の間の凝固タンパク質の活性のレベル：
１－凝固因子導入遺伝子を含みかつプロモーター領域を含まないカセットを含む発現ベクターを用いて（対照）；
２－凝固因子導入遺伝子が配列番号１１の核酸配列に対応するプロモーターの制御下にあるカセットを含む発現ベクターを用いて；
３－凝固因子導入遺伝子が配列番号８の核酸配列に対応するプロモーターの制御下にあるカセットを含む発現ベクターを用いて。
【図１８】図１８は、Ｂ６．１２９Ｓ－Ｆ８ｔｍ１Ｓｍｏｃマウスへとインビボで ＡＡＶに基づく発現ベクターとして送達される場合の、配列番号８および１１の核酸に対応するプロモーター領域の制御下での凝固因子タンパク質のレベルの増大を示すグラフである。
【００５８】
注入後の動物血漿中の凝固因子タンパク質のレベル：
１－ＡＡＶを含まない対照溶液（陰性対照）。
２－凝固因子導入遺伝子が配列番号８の核酸配列に対応するプロモーターの制御下にあるカセットを含むＡＡＶに基づく発現ベクターを用いて。
【００５９】
３－凝固因子導入遺伝子が配列番号１１の核酸配列に対応するプロモーターの制御下にあるカセットを含むＡＡＶに基づく発現ベクターを用いて。
【図１９】図１９は、Ｂ６．１２９Ｓ－Ｆ８ｔｍ１Ｓｍｏｃマウスへとインビボで ＡＡＶに基づく発現ベクターとして送達される場合の、配列番号８および１１の核酸に対応するプロモーター領域の制御下での凝固因子の活性のレベルの増大を示すグラフである。
【００６０】
注入後の動物血漿中の凝固因子タンパク質のレベル：
１－ＡＡＶを含まない対照溶液（陰性対照）。
２－凝固因子導入遺伝子が配列番号８の核酸配列に対応するプロモーターの制御下にあるカセットを含むＡＡＶに基づく発現ベクターを用いて。
【００６１】
３－凝固因子導入遺伝子が配列番号１１の核酸配列に対応するプロモーターの制御下にあるカセットを含むＡＡＶに基づく発現ベクターを用いて。
【発明を実施するための形態】
【００６２】
【実施例】
【００６３】
以下の実施例は、本発明のより良い理解のために提供される。これらの実施例は、例示のみの目的のためのものであり、いかなる様式でも本発明の範囲を限定すると解釈されるべきではない。
【００６４】
本明細書中で引用されるすべての刊行物、特許、および特許出願は、参照により本明細書中に組み入れられる。上述の発明は理解の明確性の目的のために例示および実施例によって幾分か詳細に説明されてきたが、添付の態様の精神または範囲から逸脱することなく、それに対してある程度の変更および改変を行うことができることが、本発明の教示に照らして当業者には容易に明らかになるであろう。

【００６５】
材料および一般的方法
組み換えＤＮＡ技術
Ｓａｍｂｒｏｏｋ，Ｊ．ら、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ ｍａｎｕａｌ；Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ社、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、２０１２に記載される通りに、ＤＮＡを操作するために標準的な方法を用いた。分子生物学の試薬は、製造業者のプロトコールに従って用いた。簡潔には、プラスミドが細胞集団において失われないように選択的抗生物質圧の下で生育された大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）細胞において、さらなる操作のためにプラスミドＤＮＡを生成させた。本発明者らは、市販のキットを用いて細胞からプラスミドＤＮＡを単離し、濃度を測定し、かつ制限エンドヌクレアーゼ処理またはＰＣＲ増幅によるクローニングのためにこれを用いた。リガーゼを用いてＤＮＡ断片を互いにライゲーションし、クローンの選択およびさらなる生成のために細菌細胞へと形質転換した。すべての得られた遺伝子構築物を、制限パターンおよび完全サンガーシーケンシングにより確認した。

【００６６】
ＤＮＡ配列決定
ＤＮＡ配列を、サンガーシーケンシングにより決定した。ＤＮＡおよびタンパク質配列を分析し、配列データを、配列作成、マッピング、解析、注釈付けおよび図示のために、ＳｎａｐＧｅｎｅ Ｖｉｅｗｅｒ４．２以上において処理した。

【００６７】
細胞培養物の培養
実験は、以下の細胞株を用いた：ＨＥＫ２９３（ヒト胎児腎臓クローン２９３細胞株）、ＨＵＨ７（ヒト肝細胞癌細胞株）、Ｕ８７－ＭＧ（ウプサラ８７悪性神経膠腫細胞株）、ＣＨＯ－Ｋ１－Ｓ（チャイニーズハムスター卵巣細胞株）およびＨｅｐＧ２（ヒト肝細胞癌細胞株）。ＡＡＶを生成させるために用いた懸濁化ＨＥＫ２９３細胞は、ＦＢＳおよび抗生物質を含まない完全培養培地において３７℃および５％CO_2での標準的条件下で培養した。ＥＧＦＰおよびＡＡＶ生成物の発現の有効性を試験するために用いた接着ＨＥＫ２９３、ＨＵＨ７およびＨｅｐＧ２細胞は、１０％ＦＢＳ、抗生物質／抗真菌剤を添加した完全ＤＭＥＭ培地において３７℃および５％CO_2での標準的条件下で培養した。組織特異性試験のために用いた接着Ｕ８７－ＭＧおよびＣＨＯ－Ｋ１－Ｓ細胞は、それぞれ、１０％ＦＢＳ、抗生物質／抗真菌剤を添加した完全ＥＭＥＭ栄養素培地、および５％ＦＢＳ、抗生物質／抗真菌剤を添加したＤＭＥＭ／Ｆ１２培地において３７℃および５％CO_2での標準的条件下で培養した。

【００６８】
細胞を、８０～９０％コンフルエンスに達した時点で継代培養した。細胞単層を分散するために、ＴｒｙｐＬＥ Ｓｅｌｅｃｔ酵素（１０×）を用いた。トリパンブルー染色および自動Ｃｏｕｎｔｅｓｓ ＩＩカウンターを用いるディスポーザブル細胞計数チャンバーを用いて、細胞生存率を評価した。

【００６９】
細胞培養物のトランスフェクション
トランスフェクションの間の新規プロモーター変異体の機能的活性を評価するために、本発明者らは、ＥＧＦＰおよび凝固因子の導入遺伝子の様々な変異体の発現のための発現カセットを含むプラスミドを用いた。モデル細胞株を、１００００細胞／cm^2の密度で１２ウェルプレートのウェル中へと事前播種した。１日間後、本発明者らは、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ３０００との複合体の一部分として、等しいコピー数の試験および対照サンプルのプラスミドＤＮＡを添加した。緑色蛍光タンパク質（ＥＧＦＰ）をコードする遺伝子に基づく導入遺伝子の変異体に関して、トランスフェクション後の３日目に、本発明者らは、フローサイトメトリーによりＥＧＦＰ発現細胞の割合および細胞蛍光の強度を決定した。凝固因子に基づく導入遺伝子の変異体に関して、トランスフェクション後の７

日目に、本発明者らは、ＥＬＩＳＡおよび発色アッセイにより、培養培地中の凝固タンパク質の含有量およびその活性を決定した。無傷のモデル細胞株を、陰性対照として用いた。

【００７０】

ＡＡＶ組み換えベクターのウイルス粒子の生成および精製

凝固因子に基づく導入遺伝子を含む組み換えＡＡＶウイルス粒子を生成させるために、本発明者らは、３種類のプラスミドを用いてトランスフェクトしたＨＥＫ２９３プロデューサー細胞を用いた：

・凝固因子の発現のためのＡＡＶ発現カセットを含むプラスミド；

・血清型ＡＡＶ６／ＡＡＶ５のＣａｐ遺伝子および血清型ＡＡＶ２のＲｅｐ遺伝子を含むプラスミド。選択的リーディングフレームを用いて、各遺伝子は、数種類のタンパク質産物をコードする；

・ＡＡＶカプシドのアセンブリおよびパッケージングに必要なＡｄ２アデノウイルス遺伝子を含むプラスミド。

【００７１】

トランスフェクションの７２時間後、細胞を溶解させ、続いてウイルス粒子を精製し、ろ過、クロマトグラフィーおよび超遠心分離法を用いて濃縮した。ウイルス粒子の力価を、組み換えウイルスゲノムの領域に対して特異的であったプライマーおよびサンプルを用いる定量的ＰＣＲにより決定し、１ｍＬ当たりのウイルスゲノムのコピー数として表した。

【００７２】

細胞培養物の形質導入

ＨＵＨ７細胞株を、１０，０００細胞／ｃｍ^{2}の密度で１２ウェルプレートのウェル中へと事前播種した。細胞が接着基材に付着した後、ＡＡＶ調製物を５００，０００ｖｇ／細胞のＭＯＩで導入した。形質導入後の７日目に、培養液中の凝固タンパク質のレベルおよび活性を、ＥＬＩＳＡおよび発色アッセイにより決定した。培養液中の凝固タンパク質のレベルおよび活性の評価を含む研究を、６回の独立した実験において行った。無傷の細胞を、陰性対照として用いた。

【００７３】

フローサイトメトリーを用いるＥＧＦＰレポータータンパク質を発現する細胞の割合および細胞蛍光の強度の決定

フローサイト蛍光光度計においてＥＧＦＰレポータータンパク質の発現を評価するために、トランスフェクション後の３日目に、バッファーおよびヨウ化プロピジウム（ＰＩ）の事前調製した混合物を、１ｍＬのバッファー当たり１０μｇ／ｍＬの濃度での１μＬのＰＩの比率で、細胞沈殿物へと添加した。ＰＩを用いて未染色かつプラスミドＤＮＡを用いてトランスフェクトされていない細胞（アイソタイプ）を、相殺を評価するために９６ウェルマイクロプレートのウェルへと移し、バッファー／ＰＩ混合物を、ＰＩを含む対照およびサンプルを測定するためにマイクロプレートの残余のウェルへと添加した。マイクロプレートへと細胞サンプルを移した後、それらを光の非存在下で５分間インキュベートした。インキュベーション後、試験細胞サンプルを含むマイクロプレートを、分析のためにフローサイトメーターへとロードした。フローサイトメトリーを用いて、ＥＧＦＰを含む細胞のパーセンテージ、ならびに蛍光シグナルの平均強度を決定した。各サンプルを、３回の技術的反復において測定した（分析した事象の数は、１０，０００以上である）。

【００７４】

ＥＬＩＳＡによる凝固因子タンパク質の量の決定

標的候補を用いるＨＵＨ７細胞トランスフェクションおよび形質導入後の培養培地中の凝固因子タンパク質の含有量を、非競合的固相酵素免疫アッセイ（ＥＬＩＳＡ）のサンドイッチ法により評価した。簡潔には、市販のバッファー中に希釈した培養液サンプルを、凝固因子特異的な一次抗体を用いて感作した９６ウェルマイクロプレートへと移した。同じマイクロプレートに、較正曲線をプロットするための標準、対照をロードした。プレー

トを３７℃の温度で１時間インキュベートした。ビオチン化抗体、西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲート化ストレプトアビジン溶液およびテトラメチルベンジジン（ＴＭＢ）基質の導入に先立って、バッファーを用いてマイクロプレートウェルを洗浄した。次に、凝固因子特異的なビオチン化検出抗体を含む溶液を導入し、マイクロプレートを３７℃の温度で３０分間インキュベートした。ストレプトアビジン西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲート溶液を得られた複合体に添加し、プレートを３７℃の温度で３０分間インキュベートした。酵素反応を可視化するために、ＴＭＢ溶液を導入した。必要な程度の染色強度が達成されたら、停止溶液をすべてのウェルに添加し、反応を停止させた。反応を停止させた後、光学密度を測定した。試験サンプル中の凝固因子の濃度を、事前希釈倍率を考慮して、標準サンプル較正曲線による発色染色の正規化によって測定した。

【００７５】

ＥＬＩＳＡによる凝固因子タンパク質の活性レベルの決定

標的候補および対照サンプルを用いるＨＵＨ７細胞トランスフェクションおよび形質導入後の培養培地中の凝固因子タンパク質の活性を、発色アッセイを用いて評価した。アッセイは、カルシウムイオン、リン脂質および第ＩＸａ因子の存在下では、第Ｘ因子が活性化型Ｘａへと変換し、第ＶＩＩＩ因子が反応における補因子として機能し、かつ第Ｘ因子活性化の速度は第ＶＩＩＩ因子のレベルと直線的に関連するという事実に基づく。簡潔には、市販のバッファー中に希釈した培養培地サンプル、較正曲線をプロットするための標準および対照を、９６ウェルマイクロプレートへと移した。次に、サンプルを３７℃の温度での３分間のインキュベーションに供し、その後、マイクロプレートウェルへと、第ＩＸａ因子、第Ｘ因子、トロンビン、$CaCl_2$およびリン脂質を含む因子試薬溶液を導入した。その後、マイクロプレートを３７℃の温度で４分間インキュベートし、その後、発色基質溶液Ｓ－２７６５＋Ｉ－２５８１をウェルへと導入した。続いて、プレートを３７℃の温度で７分間インキュベートした。必要な程度の染色強度が達成されたら、酢酸の２０％溶液をすべてのウェルに添加し、反応を停止させた。続いて、マイクロプレートウェル中の溶液の光学密度を測定した。試験サンプル中の凝固因子の活性を、予備的希釈を考慮して、標準サンプル較正曲線による発色染色の正規化によって決定した。

【００７６】

実験動物に対するインビボ研究

凝固因子に欠陥があるＢ６．１２９Ｓ－Ｆ８ｔｍ１Ｓｍｏｃマウス（雄性、６～８週齢）を実験に対して用いた。尾静脈への単回静脈内注入を用いて、生成物を動物に投与した。ＡＡＶを含まないバッファー溶液を、動物の陰性対照群へと投与した。血漿サンプル採取を、生成物の投与前の注入の日、続いて発現ベクターの導入後の７０日目に行った。すべての動物試験は、ＡＲＲＩＶＥガイドラインを完全に順守して行った。

【００７７】

統計学的データ解析

結果は平均値±標準偏差（ＳＤ）を示し、一元配置分散分析（ＡＮＯＶＡ）およびそれに続くダネットの多重ペアワイズ比較を用いて実験結果を比較し、統計学的に有意であることが決定された。

【００７８】

実施例１．

目的の遺伝子の発現のレベルを増大させるために、遺伝子構築物を設計しながら、本発明者らは、転写因子結合性部位に基づいて開発されたプロモーターのパネル（配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４または１５）を用いた。配列番号１６の配列に対応する左側（第１）ＩＴＲ（逆位末端反復）、配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４または１５を含む群から選択されるプロモーター、目的の遺伝子、ポリアデニル化シグナル（配列番号１７）、右側（第２）ＩＴＲ（配列番号１８）からなる発現カセットの一部分としてのこれらのヌクレオチド配列であって、目的の遺伝子は緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）配列または凝固カスケードタンパク質配列であり得るヌクレオチド配列を、モデル細胞株（ＨＥＫ２９３

、ＨＵＨ７、Ｕ８７－ＭＧ、ＣＨＯ－Ｋ１－ＳおよびＨｅｐＧ２）をトランスフェクトすることによって、インビトロで試験した。左側（第１）ＩＴＲ（配列番号１６）、目的の遺伝子、ポリアデニル化シグナル（配列番号１７）、右側（第２）ＩＴＲ（配列番号１８）を含む発現カセットを、対照として用いた。図１および図２はまた、構成的サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）ウイルスプロモーターを補われた発現カセットの同じエレメントを含む追加の対照も示す。

【００７９】

プロモーター領域である配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４または１５のすべての核酸は、緑色蛍光タンパク質配列を目的の遺伝子として用いる場合、ＥＧＦＰレポータータンパク質を発現する細胞の割合の増大（図１～図３）およびＥＧＦＰ蛍光の強度の増大（図４～図５）を提供する。凝固因子配列を目的の遺伝子として用いた場合、本発明者らはまた、プロモーター領域を含まない目的の遺伝子の核酸の使用と比較した場合に、凝固タンパク質の生成（図６）および活性（図７）のレベルの増大も観察した。つまり、核酸（配列番号１～１５）は、モデル細胞株（Ｈｕｈ７、ＣＨＯ－Ｋ１－ＳおよびＨｅｐＧ２）のトランスフェクションの間に、導入遺伝子の様々な変異体を含む発現カセットの一部分としてプロモーター活性を示す。

【００８０】

実施例２．

プロモーター活性を有する開発された核酸配列（配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４または１５）の組織特異性を測定するために、配列番号１６の配列に対応する左側（第１）ＩＴＲ（逆位末端反復）、プロモーター（配列番号１～１５）、目的の遺伝子、ポリアデニル化シグナル（配列番号１７）、右側（第２）ＩＴＲ（配列番号１８）からなる発現カセットの一部分として、インビトロでのモデル細胞株（ＨＥＫ２９３、ＨＵＨ７、Ｕ８７－ＭＧ、ＣＨＯ－Ｋ１－ＳおよびＨｅｐＧ２）に対するトランスフェクションの間にヌクレオチド配列を試験し、目的の遺伝子は、ＥＧＦＰタンパク質配列または凝固カスケードタンパク質をコードする核酸により代表され得る。左側（第１）ＩＴＲ（配列番号１６）、目的の遺伝子、ポリアデニル化シグナル（配列番号１７）、右側（第２）ＩＴＲ（配列番号１８）を含む発現カセットを、対照として用いた。また、図８、図１０、図１１および図１２において、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）ウイルスプロモーター領域を補われた発現カセットの同じエレメントを含む対照も用いた。

【００８１】

プロモーター領域である配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４または１５のすべての核酸は、プロモーター領域を含まない核酸の使用と比較した場合に、肝細胞起源の細胞株において、ＥＧＦＰレポータータンパク質を発現する細胞の割合の増大（図８および図９）、およびＥＧＦＰ蛍光の強度の増大（図１０～図１３）を提供する。つまり、核酸（配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４または１５）は、肝細胞起源の細胞における組織特異的プロモーター活性を有する。

【００８２】

実施例３．

本発明者らは、プロモーター活性を有する配列番号８、１１および１４の核酸の制御下に導入遺伝子（凝固因子）をコードする発現カセットを含むＡＡＶに基づく発現ベクターを生成させた。前記発現ベクターを、Ｈｕｈ７細胞をインビトロで形質導入することにより確認した。プロモーター領域を含まないＡＡＶに基づく発現ベクターを対照として用いた。

【００８３】

配列番号８、１１および１４の核酸を含む発現ベクターの使用は、プロモーター領域を含まない発現ベクターの使用と比較した場合に、凝固タンパク質の生成（図１４）および活性（図１５）のレベルの増大をもたらす。配列番号８および１１の核酸を含む様々な血

清型のＡＡＶに基づく発現ベクターの使用は、対照のものと比較した場合に凝固タンパク質の生成（図１６）および活性（図１７）のレベルの増大を示した。結果は、Ｈｕｈ７細胞のトランスフェクションの間に取得されたデータに対応する（図６および図７）。つまり、核酸（配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４または１５）は、モデル細胞株の形質導入の間に導入遺伝子の様々な変異体を含む発現ベクターとして送達される間にプロモーター活性を示す。

【００８４】

実施例４．

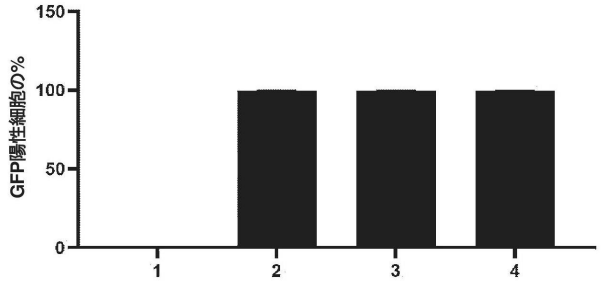
インビボでの発現ベクターの一部分としての配列番号８および１１の核酸のプロモーター活性を測定するために、本発明者らは、導入遺伝子が配列番号８または１１の核酸の制御下の凝固因子であるＡＡＶに基づく生成物を生成させた。次に、試験生成物を、Ｂ６．１２９Ｓ－Ｆ８ｔｍ１Ｓｍｏｃ実験マウスに投与した。ＡＡＶ粒子を含まないウイルス生成物の希釈用のバッファーを、陰性対照として用いた。ＡＡＶ生成物を、尾静脈への静脈内流体力学注入を用いて１回、動物へと投与した。血漿サンプル採取を、生成物の投与前の注入の日（０日目）、続いて投与後の７０日目に行った。

【００８５】

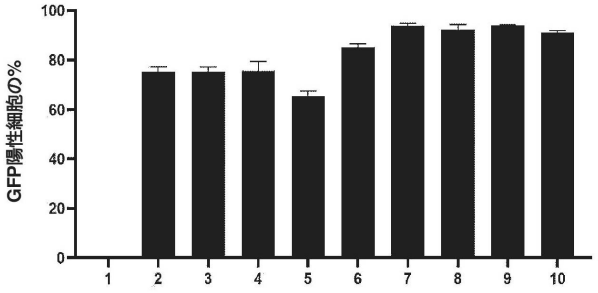
インビボ研究は、配列番号８および１１の核酸の制御下に凝固因子遺伝子配列を含む試験薬物を用いる場合に、生成物の投与後の７０日目に、動物の血漿中での凝固因子の量およびその活性の著しい増大が観察されたことを示した（図１８～図１９）。つまり、配列番号８および１１の核酸は、インビボでＡＡＶに基づく発現ベクターとして送達される場合にプロモーター活性を示す。

【図面】

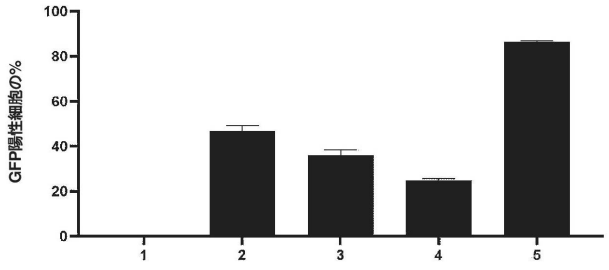
【図１】



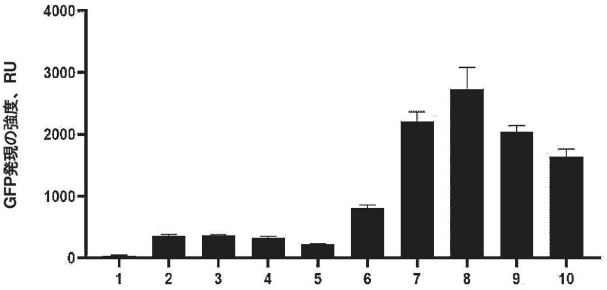
【図２】



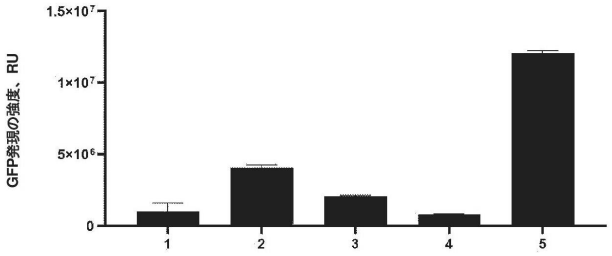
【図３】



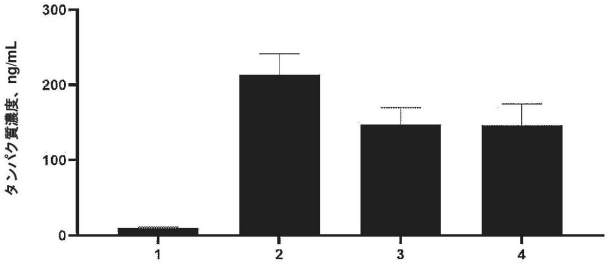
【図４】



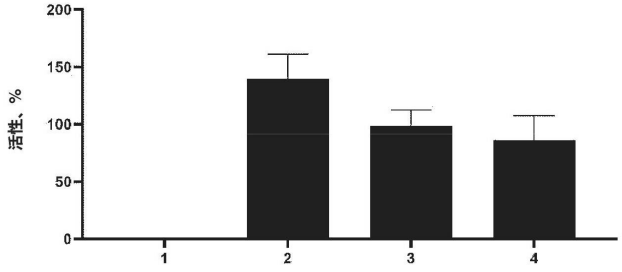
【図５】



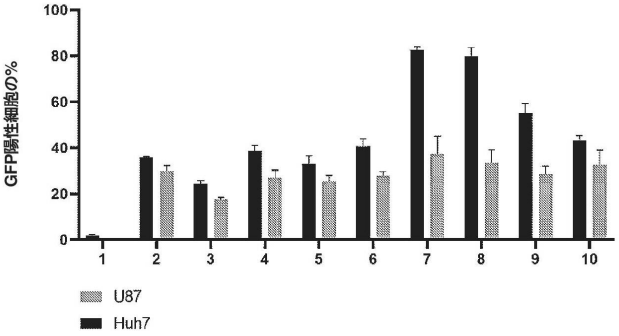
【図６】



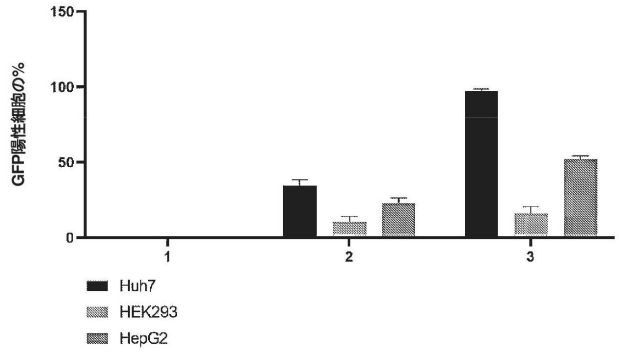
【図７】



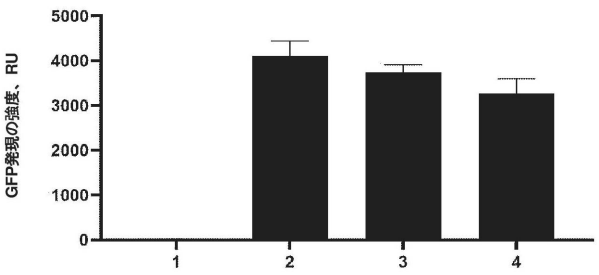
【図８】



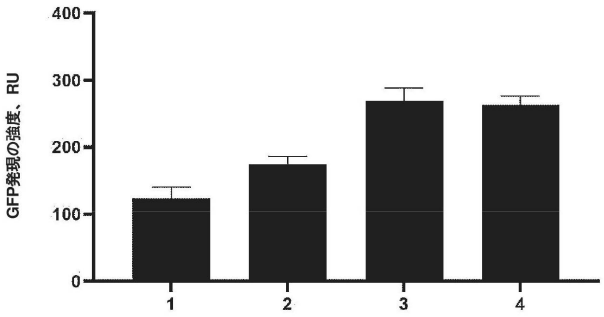
【図９】



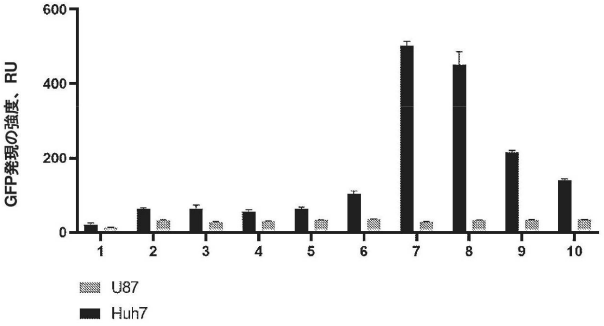
【図１０】



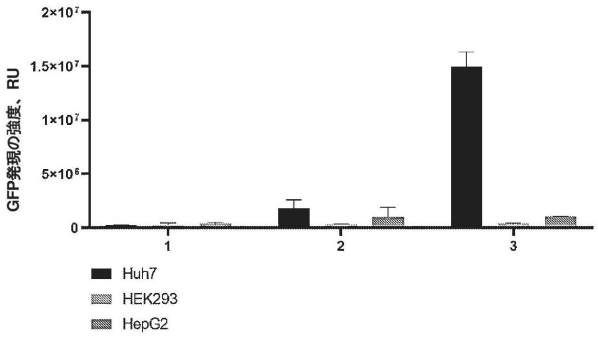
【図１１】



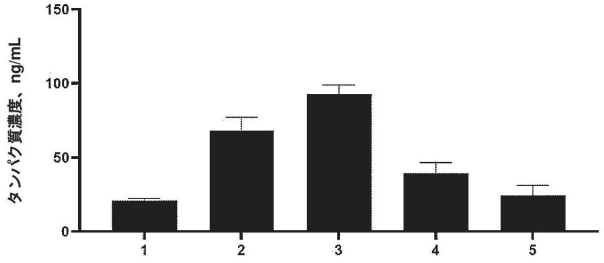
【図１２】



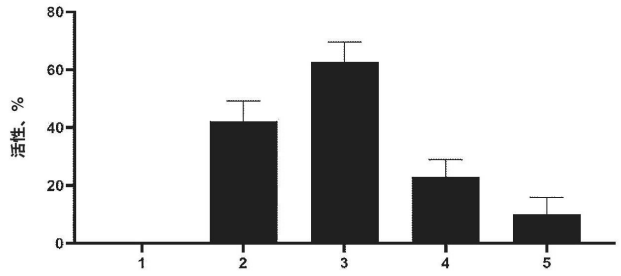
【図１３】



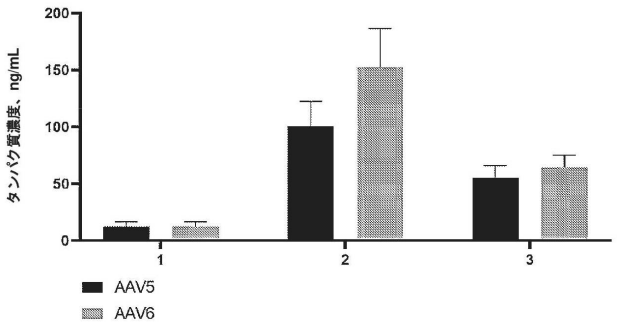
【図１４】



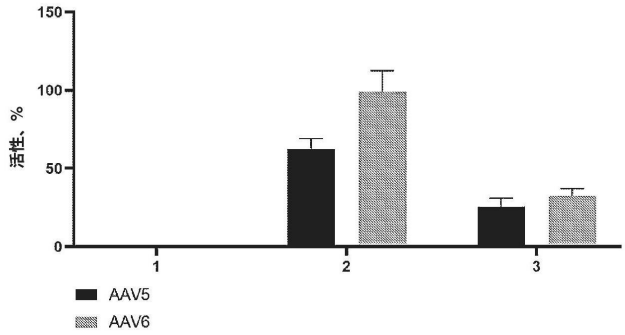
【図１５】



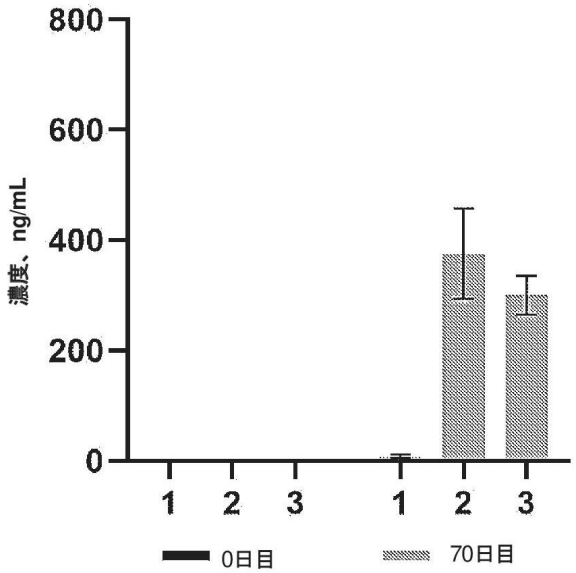
【図１６】



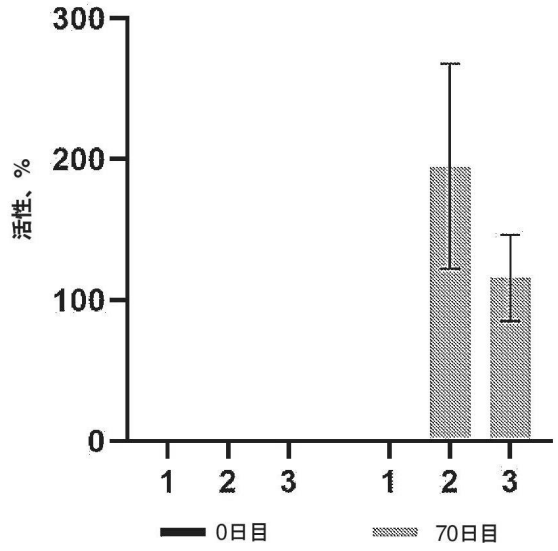
【図１７】



【図１８】



【図１９】



【配列表】

<u>２０２５５１９３５７０００００１．ｘｍｌ</u>

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/RU 2023/050148

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/86 (2006.01)
C12N 15/87 (2006.01)

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 15/86, 15/87

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)

E-Library, Espacenet, PatSearch, PATENTSCOPE, RUPTO, NCBI, EMBL-EBI, Google Scholar, PubMed, USPTO, ScienceDirect

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2021/209574 A1 (FONDAZIONE TELETHON) 21.10.2021, claims, example 3, SEQ ID NO: 44, example 1	1-8
Y		3-4, 6
X	GenBank: MQ259788.2, CONSTRUCTS COMPRISING INTEINS, PAT 03-NOV-2021	1
X	GenBank: MQ259804.1, CONSTRUCTS COMPRISING INTEINS, PAT 03-NOV-2021	1
X	GenBank: MQ201292.1, COMPOSITIONS AND METHODS FOR THE TREATMENT OF METABOLIC LIVER, PAT 30-SEP-2021	1
X	GenBank: OF304073.1, INTEIN PROTEINS AND USES THEREOF, PAT 21-MAY-2022	1

[X] 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
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier document 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	Date of mailing of the international search report
10 October 2023 (10.10.2023)	16 November 2023 (16.11.2023)
Name and mailing address of the ISA/RU: Federal Institute of Industrial Property, Berezhkovskaya nab., 30-1, Moscow, G-59, GSP-3, 125993, Russian Federation Phone No: +7(499)240-60-15, Fax +7(495)531-63-18	Authorized officer E. Smirnova Telephone No. 8(495)531-65-15

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/RU 2023/050148

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	RU 2020140209 A (UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS) 25.01.2021, claims	3
Y	RU 2017134578 A (GLYCOTOPE GMBH) 04.04.2019, claims	4
Y	RU 2760301 C1 (BIOCAD JOINT STOCK COMPANY) 23.11.2021, claims	4
Y	RU 2016143388 A (SEATTLE CHILDREN'S HOSPITAL (DBA SEATTLE CHILDREN'S RESEARCH INSTITUTE)) 14.05.2018, claims	6
A	RU 2742837 C1 (OBSCHESTVO S OGRANICHENNOI OTVETSTVENNOSTIYU "ANABION") 11.02.2021	1-8

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 2022)

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
C12N	*15/34 (2006.01)*	C12N	15/34		
C12N	*15/50 (2006.01)*	C12N	15/50		
C12N	*15/12 (2006.01)*	C12N	15/12		
C12N	*15/13 (2006.01)*	C12N	15/13		
C12N	*15/867(2006.01)*	C12N	15/867	Z	
C12N	*15/864(2006.01)*	C12N	15/864	100Z	
C12N	*15/63 (2006.01)*	C12N	15/63	Z	

,MC,ME,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,NE,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,CV,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,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MU,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,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　泉谷 玲子

(72)発明者　ブラソバ，エレナ・ベニアミノブナ
ロシア国 １８６７９１ レスプ．カレリヤ，ゲー・ソルタバラ，ウル．クイビシェバ， デー．１，カーベー ３

(72)発明者　ストレルコワ，アンナ・ニコラエブナ
ロシア国 ６１２２６１ キーロフスカヤ・オービーエル，ゲー，ヤランスク，ウル・ラグノフスカヤ，デー ６５アー，カーベー ６４

(72)発明者　ティスショク，コンスタンティン・イリイチ
ロシア国 １９４３５２ サンクトペテルブルク，ペーアール．フドズニコフ，デー．４１，カーベー ４３６

(72)発明者　ゲルショビッチ，パベル・ミクハリオビッチ
ロシア国 １９８３２８ サンクトペテルブルク，ペテルゴフスコエ・ショッセ，デー．４５，カーベー ６２７

(72)発明者　ペレペルキナ，マリヤ・パブロブナ
ロシア国 １９８３２８ サンクトペテルブルク，ウル．マルシャラ・ザクハロバ，デー．１６，コルプ．１，カーベー ６７

(72)発明者　イアコブレフ，パベル・アンドリービッチ
ロシア国 １９６１３５ サンクトペテルブルク，ペーエル－カーテー・ユリア・ガガリナ，デー．２８，コルプ ３，カーベー １７

(72)発明者　モロゾフ，ドミトリー・バレンチノビッチ
ロシア国 １９００００ サンクトペテルブルク，アドミラルテイスキー アール－エヌ，ウル・ポクタムツカヤ，デー．２０，カーベー ３

Ｆターム（参考）　4B065　AA01X AA57X AA72X AA90X AA95Y AA97Y AB01 BA02 CA44