

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6960409号
(P6960409)

(45) 発行日 令和3年11月5日 (2021.11.5)

(24) 登録日 令和3年10月13日 (2021.10.13)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/11 (2006.01)	C 1 2 N 15/11 Z N A Z
C 1 2 N 15/85 (2006.01)	C 1 2 N 15/85 Z
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10

請求項の数 15 (全 25 頁)

(21) 出願番号	特願2018-545660 (P2018-545660)	(73) 特許権者	518305392
(86) (22) 出願日	平成29年2月28日 (2017.2.28)		オックスフォード ジェネティクス リミテッド
(65) 公表番号	特表2019-506882 (P2019-506882A)		OXFORD GENETICS LIMITED
(43) 公表日	平成31年3月14日 (2019.3.14)		英国 オーエックス4 4エイチジー オックスフォードシャー、 オックスフォード、 ジ オックスフォード サイエンスパーク、 ロバート ロビンソン アヴェニュー、 1 メダワー、 ファーストフロア
(86) 国際出願番号	PCT/GB2017/050537		
(87) 国際公開番号	W02017/149292		
(87) 国際公開日	平成29年9月8日 (2017.9.8)		
審査請求日	令和2年2月27日 (2020.2.27)	(74) 代理人	100100181
(31) 優先権主張番号	1603577.6		弁理士 阿部 正博
(32) 優先日	平成28年3月1日 (2016.3.1)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	英国 (GB)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プロモーター

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 配列番号 1 または配列番号 2 に示されるヌクレオチド配列に対する少なくとも 9 5 % のヌクレオチド配列同一性を有する第 1 のポリヌクレオチド；および

(b) 配列番号 4 に示されるヌクレオチド配列に対する少なくとも 9 5 % のヌクレオチド配列同一性を有する第 2 のポリヌクレオチド；

を含む核酸分子であって、(a) と (b) が隣接してこの順番で 5' - 3' に連結されており、前記核酸分子が、哺乳動物細胞において、機能可能に連結された異種ポリヌクレオチドの転写を促進することが可能である、前記核酸分子。

【請求項 2】

前記第 1 のポリヌクレオチドが、配列番号 1 または配列番号 2 に示されるヌクレオチド配列のうちの 1 つに対する 少なくとも 9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 % のヌクレオチド配列同一性を有する、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 3】

前記第 2 のポリヌクレオチドが、配列番号 4 に示されるポリヌクレオチド配列に対する 少なくとも 9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 % のヌクレオチド配列同一性を有する、請求項 1 または 2 に記載の核酸分子。

【請求項 4】

前記核酸分子が、

(a) 配列番号 1 または配列番号 2 に示されるヌクレオチド配列を有する第 1 のポリヌ

10

20

クレオチド；および

(b) 配列番号 4 に示されるヌクレオチド配列を有する第 2 のポリヌクレオチド；を含む、請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の核酸分子。

【請求項 5】

前記核酸分子が、

(c) 配列番号 5 に示されるヌクレオチド配列に対する少なくとも 95 % のヌクレオチド配列同一性を有する第 3 のポリヌクレオチド；

をさらに含み、

(a)、(b) および (c) が隣接してこの順番で 5' - 3' に連結されており、前記核酸分子が、哺乳動物細胞において、機能可能に連結された異種ポリヌクレオチドの転写を促進することが可能である、

請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の核酸分子。

【請求項 6】

前記第 3 のポリヌクレオチドが、配列番号 5 に示されるヌクレオチド配列に対する少なくとも 96 %、97 %、98 %、99 % または 100 % のヌクレオチド配列同一性を有する、請求項 5 に記載の核酸分子。

【請求項 7】

前記核酸分子が、

(a) 配列番号 1 に示されるヌクレオチド配列を有する第 1 のポリヌクレオチド；

(b) 配列番号 4 に示されるヌクレオチド配列を有する第 2 のポリヌクレオチド；および

(c) 配列番号 5 に示されるヌクレオチド配列を有する第 3 のポリヌクレオチド；を含む、

(a)、(b) および (c) が隣接してこの順番で 5' - 3' に連結されている、請求項 5 または 6 に記載の核酸分子。

【請求項 8】

前記核酸分子が、誘導性エレメントをさらに含む、請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の核酸分子。

【請求項 9】

哺乳動物細胞が、マウス、ラット、ハムスター、サルまたはヒトの細胞である、請求項 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の核酸分子。

【請求項 10】

請求項 1 ～ 9 のいずれか 1 項に記載の核酸分子を含む、発現ベクター。

【請求項 11】

前記発現ベクターが、アデノウイルスベクター、pSV または pCMV のプラスミドベクター、ワクシニアまたはレトロウイルスのベクター、またはバキュロウイルスベクターである、請求項 10 に記載の発現ベクター。

【請求項 12】

前記核酸分子が、異種ポリヌクレオチドに機能可能に連結されている、請求項 10 または請求項 11 に記載の発現ベクター。

【請求項 13】

請求項 10 ～ 12 のいずれか 1 項に記載の発現ベクターを含む、哺乳動物宿主細胞。

【請求項 14】

そのゲノムが、請求項 1 ～ 9 のいずれか 1 項に記載の核酸分子または請求項 10 ～ 12 のいずれか 1 項に記載の発現ベクターを含む、非ヒト哺乳動物。

【請求項 15】

(i) ヘルパープラスミド；

(ii) ウイルスゲノムプラスミド；

(iii) 緩衝液；

(iv) 制限酵素；

10

20

30

40

50

(v) トランスフェクション培地；および

(vi) 哺乳動物細胞

からなる群より選択される1つ以上の追加の構成要素と共に、請求項10～12のいずれか1項に記載の発現ベクターおよび/または請求項13に記載の宿主細胞を含む、キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、哺乳動物細胞において機能可能に連結された異種ポリヌクレオチドの転写を促進することが可能である核酸分子に関する。本発明はまた、本発明の核酸分子を含む発現ベクターと宿主細胞にも関する。そのような発現ベクターは、組換えタンパク質（例えば、抗体およびレンチウイルスのポリペプチド）を生産するために使用されてもよい。

【背景技術】

【0002】

遺伝子の転写が起こるためには、RNAポリメラーゼが遺伝子プロモーターに結合し、転写を開始しなければならない。一般に、RNAポリメラーゼIは、リボソームRNAをコードする遺伝子を転写し、RNAポリメラーゼIIは、メッセンジャーRNA、いくつかの低分子核内RNAおよびマイクロRNAをコードする遺伝子を転写するが、RNAポリメラーゼIIIは、トランスファーRNAおよび他の低分子RNAをコードする遺伝子を転写する。

【0003】

転写は、いつ転写が起こるか、およびどのくらいのRNAが生成されるか、を制御するために調節される。RNAポリメラーゼによる遺伝子の転写は、少なくとも5つのメカニズムによって調節され得る：

(i) 特異性因子は、所与のプロモーターまたはプロモーターのセットに対するRNAポリメラーゼの特異性を変化させ、それらに結合する可能性を高くするか低くする（例えば、原核生物の転写において使用されるシグマ因子）。

(ii) リプレッサーは、オペレーター（プロモーター領域に近接するかプロモーター領域と重なっているDNA鎖上のコード配列）に結合し、鎖に沿ったRNAポリメラーゼの進行を妨げ、従って、遺伝子の発現を妨げる。

(iii) 転写因子は、タンパク質コード配列の開始点にRNAポリメラーゼを配置し、次いで、mRNAを転写するためにポリメラーゼを解放する。

(iv) アクチベーターは、RNAポリメラーゼと特定のプロモーターとの間の相互作用を増強し、遺伝子の発現を促進する。エンハンサーは、DNAを輪にして特定のプロモーターを開始複合体に導くためにアクチベーターによって結合されるDNAヘリックス上の部位である。

(v) サイレンサーは、特定の転写因子が結合すると、遺伝子の発現をサイレンスすることができるDNA配列の領域である。

【0004】

典型的な哺乳動物のプロモーターは、基本転写装置が結合する50～100塩基対のコア領域と、1種以上の転写アクチベータータンパク質（トランスアクチベーター）が結合し得るエンハンサー領域と、からなる。エンハンサーに結合することができるトランスアクチベーターの数とタイプは、どの特異的結合部位が存在するかに依存する。開始速度は、プロモーターのエンハンサーに実際に結合しているトランスアクチベーターの数とタイプによって決まる。エンハンサーに加えて、異なる転写因子が結合すると遺伝子発現を低下させるサイレンサーが存在する。

【0005】

コアプロモーターは、様々な異なるエレメントから構成され、これらには、標準的なものと非標準的なものという2つのカテゴリーが存在する。標準的なコアプロモーターエレメントには、TATAボックス、イニシエーター(Inr)、TFIIIB認識エレメント

10

20

30

40

50

(BRE)、下流プロモーターエレメント(DPE)および下流コアエレメント(DCE)が包含される。これらのエレメントは、全てではないが多くのタンパク質コード遺伝子のコアプロモーターの中に見出され得る。TATAボックス(配列TATAA)は通常、転写開始点(TSS)の20~30bp上流に見出され、TFIID基本転写因子の結合部位として働く。Inrエレメント(コンセンサス配列YYANT/AYY)が存在する場合、これは、コンセンサスの最初のAが転写物の最初の塩基となるようにTSSを包含する。BREエレメントは、TATAボックスの上流(BREu コンセンサス G/C G/C G/A CGCC)または下流(BREd コンセンサス G/A T T/A T/G T/G T/G T/G)の両方に見出され得る。技術的には標準的なコアプロモーターエレメントではないが、CCAATボックス(TSSの50~100bp上流に位置する)は、このカテゴリーに包含されることが多い。CCAATボックスはまた、基本転写因子(TF)の結合にも寄与する。

10

【0006】

非標準的なコアプロモーターエレメントには、CpGアイランド、ATGデザート(ATG desert)および転写開始プラットフォーム(TIP)が包含される。CpGアイランドは、一般的に、比較的高い割合のCpGジヌクレオチドを含むDNAのストレッチ500~2000bpに及ぶ。CpGジヌクレオチドは通常、C残基上でメチル化されて転写を減少させるが、CpGアイランド内では、それらはメチル化されないままであり、転写を促進する。ATGデザートは、周囲の領域よりもATGトリヌクレオチドの頻度が低いDNAの領域である。それらは、TSSの上流と下流の約1000bpに及び、一般的に、TATAボックスを含まないプロモーターを伴う。

20

【0007】

強力なプロモーターは、高い頻度で転写を開始するプロモーターであり、非常に有用なツールとなり得る。例えば生化学では、強力なプロモーターを、転写プロセスを研究するために、または組換えタンパク質の生産を駆動するために、用いることができる。強力なプロモーターはまた、遺伝学においても有用である。例えば、強力なプロモーターを、遺伝子のノックダウンのためのshRNAの発現を駆動するために、またはタンパク質の機能を推定するためのcDNAの過剰発現のために、用いることができる。

【0008】

特に強力なプロモーターはまた、医学的用途を有する可能性もある。例えば、組換えウイルスワクチンにおいて、より高い抗原の発現は、より良好な免疫応答をもたらす。

30

【発明の概要】

【0009】

哺乳動物系において使用される最も強力なプロモーターは、一般的に、恒常的に発現される細胞遺伝子に由来するか、あるいはウイルス遺伝子に由来する。しかし、付随する遺伝子の発現レベルに関して最も強力であるプロモーターは、最も細胞型に依存するプロモーターである(すなわち、それらが機能するであろう細胞のタイプが限られている)ことが多い。

【0010】

従って、本発明の目的は、高いレベルで、および/または様々な哺乳動物細胞において、機能可能に連結された異種ポリヌクレオチドの転写を促進することが可能である核酸分子を提供することである。

40

【0011】

本発明の別の目的は、本発明の核酸分子を含む発現ベクターを提供することである。そのような発現ベクターは、組換えポリペプチド(例えば、抗体およびレンチウイルスのポリペプチド)を高いレベルで生産するために使用されてもよい。

【0012】

一実施形態において、本発明は、

(a)配列番号1、配列番号2または配列番号3に示されるヌクレオチド配列に対する少なくとも80%のヌクレオチド配列同一性を有する第1のポリヌクレオチド、または当

50

該第 1 のポリヌクレオチドの機能的フラグメント；および

(b) 配列番号 4 に示されるヌクレオチド配列に対する少なくとも 80 % のヌクレオチド配列同一性を有する第 2 のポリヌクレオチド、または当該第 2 のポリヌクレオチドの機能的フラグメント；

を含む核酸分子であって、(a) と (b) が、この順番で 5' - 3' に連結されており、前記核酸分子が、哺乳動物細胞において、機能可能に連結された異種ポリヌクレオチドの転写を促進することが可能である、核酸分子を提供する。

【0013】

さらなる実施形態では、本発明は、本発明の核酸分子を含む発現ベクターを提供する。

【0014】

さらに別の実施形態では、本発明は、本発明の核酸分子を含む発現ベクターであって、核酸分子が異種ポリヌクレオチドに機能可能に連結されている、発現ベクターを提供する。

【0015】

本発明はまた、本発明の発現ベクターを含む哺乳動物宿主細胞も提供する。

【0016】

本発明はまた、本発明の発現ベクターを含むキットも提供する。

【発明を実施するための形態】

【0017】

一部の実施形態において、核酸分子は、単離された核酸分子である。本発明の核酸分子は、哺乳動物細胞において、機能可能に連結された異種ポリヌクレオチドの転写を促進することが可能であり、すなわち、プロモーターとして働いている。一部の実施形態において、本発明の核酸分子は、恒常的プロモーターとして働く。

【0018】

本発明の核酸分子は、(a) 配列番号 1、配列番号 2 または配列番号 3 に示されるヌクレオチド配列に対する少なくとも 80 % のヌクレオチド配列同一性を有する第 1 のポリヌクレオチドを含む。配列番号 1 ~ 3 の配列は、添付の「配列」のセクションに提示されている。第 1 のポリヌクレオチドは、好ましくは、配列番号 1、配列番号 2 または配列番号 3 に示されるヌクレオチド配列のうちの 1 つに対する少なくとも 85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % または 100 % のヌクレオチド配列同一性を有する。最も好ましくは、第 1 のポリヌクレオチドは、配列番号 1、配列番号 2 または配列番号 3 のヌクレオチド配列を有する。

【0019】

本発明の核酸分子は、代替的に、第 1 のポリヌクレオチドの機能的フラグメントを含んでもよい。本明細書で使用される場合、「当該第 1 のポリヌクレオチドの機能的フラグメント」なる用語は、機能可能に連結された異種ポリヌクレオチドの発現の促進において、完全な第 1 のポリヌクレオチドの活性の少なくとも 20 % (例えば、少なくとも 30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、98 %、99 % または 100 %) を保持する、第 1 のポリヌクレオチドの一部を指す。核酸配列のプロモーター活性を測定および比較するための方法は、以下で説明されるように、当技術分野において周知である。

【0020】

好ましくは、第 1 のポリヌクレオチドの機能的フラグメントは、配列番号 1、配列番号 2 または配列番号 3 に示されるポリヌクレオチド配列の長さの少なくとも 50 %、60 %、70 %、80 %、90 % または 95 % である。

【0021】

本発明の核酸分子はまた、(b) 配列番号 4 に示されるヌクレオチド配列に対する少なくとも 80 % のヌクレオチド配列同一性を有する第 2 のポリヌクレオチド、または当該第 2 のポリヌクレオチドの機能的フラグメント、を含む。配列番号 4 の配列は、添付の「配列」のセクションに提示されている。好ましくは、第 2 のポリヌクレオチドは、配列番号

4 に示されるポリヌクレオチド配列に対する少なくとも 85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % または 100 % のヌクレオチド配列同一性を有する。最も好ましくは、第 2 のポリヌクレオチドは、配列番号 4 のポリヌクレオチド配列を有する。

【0022】

本発明の核酸分子は、代替的に、第 2 のポリヌクレオチドの機能的フラグメントを含んでもよい。本明細書で使用される場合、「当該第 2 のポリヌクレオチドの機能的フラグメント」なる用語は、機能可能に連結された異種ポリヌクレオチドの発現の促進において、完全な第 2 のポリヌクレオチドの活性の少なくとも 20 %（例えば、少なくとも 30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、98 %、99 % または 100 %）を保持する、第 2 のポリヌクレオチドの一部を指す。核酸配列の
10 プロモーター活性を測定および比較するための方法は、以下で説明されるように、当技術分野において周知である。好ましくは、第 2 のポリヌクレオチドの機能的フラグメントは、配列番号 4 に示されるポリヌクレオチド配列の長さの少なくとも 50 %、60 %、70 %、80 %、90 % または 95 % である。

【0023】

配列番号 4 は、転写開始点（TSS）を含む。その +1 の部位（すなわち、転写される一番目の塩基）は、配列 T C A G A T C 中の一番目の T である。これは、配列番号 4 の 3' 末端に出現する。TSS の下流のあらゆるものが RNA に転写されることになる。

【0024】

従って、第 2 のポリヌクレオチドまたはその機能的フラグメントは配列 T C A G A T C
20 を含むことが好ましい。

【0025】

一部の好ましい実施形態では、核酸分子は、

（a）配列番号 1、配列番号 2 または配列番号 3 に示されるヌクレオチド配列を有する第 1 のポリヌクレオチド；および

（b）配列番号 4 に示されるヌクレオチド配列を有する第 2 のポリヌクレオチド；
を含み、ここで、（a）と（b）は、5' - 3' に連結されており、前記核酸分子は、哺乳動物細胞において、機能可能に連結された異種ポリヌクレオチドの転写を促進することが可能である。

【0026】

一部の好ましい実施形態では、核酸分子は、

（a）配列番号 1 に示されるヌクレオチド配列を有する第 1 のポリヌクレオチド；および

（b）配列番号 4 に示されるヌクレオチド配列を有する第 2 のポリヌクレオチド；
を含み、ここで、（a）と（b）は、この順番で隣接して 5' - 3' に連結されており、前記核酸分子は、哺乳動物細胞において、機能可能に連結された異種ポリヌクレオチドの転写を促進することが可能である。

【0027】

一部の好ましい実施形態では、核酸分子は、

（a）配列番号 2 に示されるヌクレオチド配列を有する第 1 のポリヌクレオチド；および

（b）配列番号 4 に示されるヌクレオチド配列を有する第 2 のポリヌクレオチド；
を含み、ここで、（a）と（b）は、この順番で隣接して 5' - 3' に連結されており、前記核酸分子は、哺乳動物細胞において、機能可能に連結された異種ポリヌクレオチドの転写を促進することが可能である。

【0028】

一部の好ましい実施形態では、核酸分子は、

（a）配列番号 3 に示されるヌクレオチド配列を有する第 1 のポリヌクレオチド；および

（b）配列番号 4 に示されるヌクレオチド配列を有する第 2 のポリヌクレオチド；

10

20

30

40

50

を含み、ここで、(a)と(b)は、この順番で隣接して5' - 3'に連結されており、前記核酸分子は、哺乳動物細胞において、機能可能に連結された異種ポリヌクレオチドの転写を促進することが可能である。

【0029】

本発明はまた、

(a) 配列番号1、配列番号2または配列番号3に示されるヌクレオチド配列に対する少なくとも80%のヌクレオチド配列同一性を有する第1のポリヌクレオチド、または当該第1のポリヌクレオチドの機能的フラグメント；

(b) 配列番号4に示されるヌクレオチド配列に対する少なくとも80%のヌクレオチド配列同一性を有する第2のポリヌクレオチド、または当該第2のポリヌクレオチドの機能的フラグメント；および

(c) 配列番号5、配列番号6または配列番号7に示されるヌクレオチド配列に対する少なくとも80%のヌクレオチド配列同一性を有する第3のポリヌクレオチド、または当該第3のポリヌクレオチドの機能的フラグメント；

を含む核酸分子であって、(a)、(b)および(c)が、この順番で5' - 3'に連結されており、前記核酸分子が、哺乳動物細胞において、機能可能に連結された異種ポリヌクレオチドの転写を促進することが可能である、核酸分子も提供する。

【0030】

配列番号5～7の配列は、添付の「配列」のセクションに提示されている。

【0031】

第3のポリヌクレオチドは、好ましくは、配列番号5、配列番号6または配列番号7に示されるヌクレオチド配列のうちの1つに対する少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%のヌクレオチド配列同一性を有する。最も好ましくは、第3のポリヌクレオチドは、配列番号5、配列番号6または配列番号7のヌクレオチド配列を有する。

【0032】

本発明の核酸分子は、代替的に、第3のポリヌクレオチドの機能的フラグメントを含んでもよい。本明細書で使用される場合、「当該第3のポリヌクレオチドの機能的フラグメント」なる用語は、機能可能に連結された異種ポリヌクレオチドの発現の促進において、完全な第3のポリヌクレオチドの活性の少なくとも20%（例えば、少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%または100%）を保持する、第3のポリヌクレオチドの一部を指す。核酸配列のプロモーター活性を測定および比較するための方法は、以下で説明されるように、当技術分野において周知である。

【0033】

好ましくは、第3のポリヌクレオチドの機能的フラグメントは、配列番号5、配列番号6または配列番号7に示されるポリヌクレオチド配列の長さの少なくとも50%、60%、70%、80%、90%または95%である。

【0034】

一部の好ましい実施形態では、核酸分子は、

(a) 配列番号1、配列番号2または配列番号3に示されるヌクレオチド配列を有する第1のポリヌクレオチド；

(b) 配列番号4に示されるヌクレオチド配列を有する第2のポリヌクレオチド；および

(c) 配列番号5、配列番号6または配列番号7に示されるヌクレオチド配列を有する第3のポリヌクレオチド；

を含み、ここで、(a)、(b)および(c)は、この順番で5' - 3'に連結されており、前記核酸分子は、哺乳動物細胞において、機能可能に連結された異種ポリヌクレオチドの転写を促進することが可能である。

【0035】

一部の好ましい実施形態では、核酸分子は、

(a) 配列番号 1 に示されるヌクレオチド配列を有する第 1 のポリヌクレオチド；

(b) 配列番号 4 に示されるヌクレオチド配列を有する第 2 のポリヌクレオチド；および

(c) 配列番号 5 に示されるヌクレオチド配列を有する第 3 のポリヌクレオチド；

を含み、ここで、(a)、(b) および (c) は、この順番で隣接して 5' - 3' に連結されており、前記核酸分子は、哺乳動物細胞において、機能可能に連結された異種ポリヌクレオチドの転写を促進することが可能である。

【0036】

一部の好ましい実施形態では、核酸分子は、

(a) 配列番号 2 に示されるヌクレオチド配列を有する第 1 のポリヌクレオチド；

(b) 配列番号 4 に示されるヌクレオチド配列を有する第 2 のポリヌクレオチド；および

(c) 配列番号 6 に示されるヌクレオチド配列を有する第 3 のポリヌクレオチド；

を含み、ここで、(a)、(b) および (c) は、この順番で隣接して 5' - 3' に連結されており、前記核酸分子は、哺乳動物細胞において、機能可能に連結された異種ポリヌクレオチドの転写を促進することが可能である。

【0037】

一部の好ましい実施形態では、核酸分子は、

(a) 配列番号 3 に示されるヌクレオチド配列を有する第 1 のポリヌクレオチド；

(b) 配列番号 4 に示されるヌクレオチド配列を有する第 2 のポリヌクレオチド；および

(c) 配列番号 7 に示されるヌクレオチド配列を有する第 3 のポリヌクレオチド；

を含み、ここで、(a)、(b) および (c) は、この順番で隣接して 5' - 3' に連結されており、前記核酸分子は、哺乳動物細胞において、機能可能に連結された異種ポリヌクレオチドの転写を促進することが可能である。

【0038】

本明細書で使用される場合、「異種ポリヌクレオチド」なる用語は、所望の mRNA またはポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを指す。異種ポリヌクレオチドの例としては、ポリペプチド（例えば、ウイルスまたは哺乳動物のポリペプチド）をコードするものが挙げられる。

【0039】

一部の好ましい実施形態では、異種ポリヌクレオチドは、分泌経路に入るタンパク質（例えば、膜結合タンパク質、分泌抗体または他の分泌タンパク質）をコードする。そのような異種ポリヌクレオチドを発現する細胞は、細胞を溶解することなく培養培地から生産物を回収できる、バイオリアクターまたは懸濁培養用容器における組換え分泌タンパク質の連続生産に特に適しているであろう。

【0040】

他の好ましい異種ポリヌクレオチドは、細胞全体という形で使用できるか、あるいは細胞溶解によって回収できる、細胞に付随したままであるタンパク質（膜タンパク質または細胞質タンパク質など）をコードするものである。一部の実施形態において、異種ポリヌクレオチドは、抗体をコードする。本発明の一部の他の好ましい実施形態では、異種ポリヌクレオチドは、ウイルスのポリペプチドをコードする。好ましくは、ウイルスのポリペプチドは、表面糖タンパク質（例えば、VSV G）である。VSV G ポリペプチドは、水疱性口内炎ウイルスに由来する 1 回膜貫通糖タンパク質である。それは、幅広い感染指向性を媒介する。他の実施形態では、ウイルスのポリペプチドは、Gag - Pol、Rev または Tat である。「Gag - Pol」なる用語は、タンパク質分解により切断されて、機能を有する逆転写酵素、インテグラーゼおよびプロテアーゼならびにウイルス構築に構造上重要である少なくとも 2 つのタンパク質を生じさせる、レトロウイルスのタンパク質を指す。好ましくは、Gag - Pol の配列は、レンチウイルスに由来し、最も好

10

20

30

40

50

ましくはH I Vに由来する。R e vタンパク質は、細胞質内へのウイルスゲノムの輸送を助ける。好ましくは、R e vポリペプチドの配列は、レンチウイルスに由来し、最も好ましくはH I Vに由来する。T a tタンパク質は、ウイルス転写の効率を高める。好ましくは、T a tポリペプチドの配列は、レンチウイルスに由来し、最も好ましくはH I Vに由来する。

【 0 0 4 1 】

第1のポリヌクレオチド、第2のポリヌクレオチド、第3のポリヌクレオチド（存在する場合）および異種ポリヌクレオチド（存在する場合）は、この順番で5' - 3' 方向に連結される。

【 0 0 4 2 】

第1のポリヌクレオチドと第2のポリヌクレオチドとの間に、第2のポリヌクレオチドと第3のポリヌクレオチドとの間に、第2のポリヌクレオチドと異種ポリヌクレオチドとの間に、および第3のポリヌクレオチドと異種ポリヌクレオチドとの間に、1つ以上のリンカーヌクレオチドが存在してもよい（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個のリンカーヌクレオチド）。存在する場合、そのようなリンカーポリヌクレオチドは、（例えば、ルシフェラーゼアッセイにおいて測定されるような）プロモーターフラグメントの効力に対する重大な有害作用を有するべきではない。好ましくは、リンカーヌクレオチドは存在せず、すなわち、好ましくは、第1のポリヌクレオチド、第2のポリヌクレオチド、第3のポリヌクレオチド（存在する場合）および異種ポリヌクレオチド（存在する場合）は、この順番で隣接して5' - 3' 方向に連結される。

【 0 0 4 3 】

核酸分子は、哺乳動物細胞において、機能可能に連結された異種ポリヌクレオチドの転写を促進することが可能である。

【 0 0 4 4 】

異種ポリヌクレオチドは、本発明の第1、第2および第3（存在する場合）のポリヌクレオチドに対して下流（すなわち、3'）の位置に機能可能に配置されるであろう。

【 0 0 4 5 】

本発明の状況下では、「転写を促進する」なる用語は、異種ポリヌクレオチドが本発明の第1、第2および第3（存在する場合）のポリヌクレオチドの下流に機能可能に結合または挿入されると異種ポリヌクレオチドの発現産物が得られるということを意味することが意図される。

【 0 0 4 6 】

本発明の一部の実施形態において、核酸分子は、誘導可能な様式で哺乳動物細胞において、機能可能に連結された異種ポリヌクレオチドの転写を促進することが可能であり、すなわち、核酸分子は誘導性プロモーターである。従って、核酸分子は、抑制可能であるか活性化可能であるエレメントを含んでもよい。例えば、本明細書で開示されるプロモーターのバージョンは、転写を抑制あるいは活性化できるタンパク質の結合部位を含むように改変されて誘導可能な形態を生じさせる可能性がある。これの一例では、本明細書で開示されるプロモーター（好ましくはp 5 6 5またはp 5 6 5 i）が、テトラサイクリンリプレッサータンパク質の結合部位を2～7個含むように改変される可能性がある（最も好ましくは2～3個の部位）。前記結合部位を挿入することによって、テトラサイクリンリプレッサータンパク質は、プロモーターに結合することが可能になり、そうすることで、プロモーター上での基本転写因子装置の構築を妨げ、それにより、転写と翻訳の両方を妨げる。これは、タンパク質の発現を抑止するであろう。ドキシサイクリンまたはテトラサイクリンの存在下では、テトラサイクリンリプレッサータンパク質は、もはやD N Aに結合することができず、従って、このリプレッサーは、もはやプロモーターに結合できず、転写と翻訳は、妨害されずに進むことができる。そのため、作製されたプロモーターの転写活性は、ドキシサイクリンまたはテトラサイクリンのいずれかの存在によって誘導されると言え、従って、誘導性プロモーターと分類されるであろう。

【 0 0 4 7 】

「発現産物」なる用語は、本明細書で使用される場合、(i) 異種ポリヌクレオチドの転写産物であるRNA（例えば、hnRNA、mRNA、siRNAまたはmiRNA）および(ii) 異種ポリヌクレオチドの翻訳産物であるポリペプチドのいずれかまたは両方を意味することが意図される。

【0048】

異種ポリヌクレオチドは、本発明の核酸分子の3'末端から500bp、400bp、300bp、200bp、100bp、50bp、30bpまたは10bp以内の領域に異種ポリヌクレオチドの5'末端が位置するように本発明の核酸分子の下流に機能可能に挿入されてもよい。

【0049】

本発明の核酸分子によって促進された転写のレベルは、任意の適切な方法によってアッセイされてよい。例えば、そのようなアッセイのために、異種ポリヌクレオチドは、選択マーカー遺伝子（例えば、ネオマイシン耐性遺伝子またはハイグロマイシンBホスホトランスフェラーゼ遺伝子）または発現レポーター遺伝子（例えば、Luciferase（緑色蛍光タンパク質）、ルシフェラーゼ遺伝子等）であってもよい。好ましくは、プロモーター活性の確認は、Luciferase遺伝子を用いて達成されてよい。

【0050】

本発明の核酸分子の転写活性は、本発明の核酸分子の下流にレポーター遺伝子（Luciferase遺伝子など）を機能可能に挿入することによって測定されてもよい。その後、ホタルルシフェラーゼタンパク質の発現レベルを用いて、得られる転写のレベルを示すことができる。これを達成するために、必要とされるDNA（Luciferase遺伝子上流に本発明の核酸を含む）をプラスミドに導入してよく、次いで、このプラスミドを、好適なレシピエント細胞（例えば、293A細胞）にトランスフェクトし、ホタルルシフェラーゼタンパク質を発現させる。24時間後、細胞を溶解してよく、その細胞溶解物中のルシフェラーゼを、ルミノメーターを用いてそのルシフェリン基質の存在下でのその光の出力を測定することによってモニタリングしてよい。

【0051】

核酸分子は、哺乳動物細胞において、機能可能に連結された異種ポリヌクレオチドの転写を促進することが可能である。好ましい哺乳動物細胞には、マウス、ラット、ハムスター、サルおよびヒトの細胞が包含される。そのような細胞の例としては、HEK細胞とその派生細胞（例えば、HEK293、HEK293T、HEK293A）、PerC6細胞、911細胞、CHO細胞、HCT116細胞、HeLa細胞、COS細胞およびVERO細胞；HepG2、A549およびMCF7などの癌細胞；ヒトまたは動物の生検から単離された初代細胞；ならびに幹細胞（胚性幹細胞および人工多能性幹（iPS）細胞などの多能性細胞、ならびに造血幹細胞、間葉系幹細胞等などの複能性幹細胞が包含される）が挙げられる。

【0052】

好ましいヒト細胞には、HEK293細胞、HEK293T細胞およびHEK293A細胞；ならびにヒト幹細胞（胚性幹細胞および人工多能性幹（iPS）細胞などの多能性細胞、ならびに造血幹細胞、間葉系幹細胞等などの複能性幹細胞が包含される）が包含される。

【0053】

さらなる実施形態では、本発明は、本発明の核酸分子を含む発現ベクターを提供する。好ましくは、発現ベクターは、プラスミドまたはウイルスベクターである。哺乳動物用発現ベクターの例としては、アデノウイルスベクター、pSVとpCMVのシリーズのプラスミドベクター、ワクシニアベクターとレトロウイルスベクター、ならびにバキュロウイルスが挙げられる。一部の実施形態において、発現ベクターは、レンチウイルスベクターである。

【0054】

発現ベクターは、以下のうちの1つ以上をさらに含んでもよい：複製開始点、選択マー

10

20

30

40

50

カーおよびマルチクローニングサイト。

【0055】

さらに別の実施形態では、本発明は、本発明の核酸分子を含む発現ベクターであって、核酸分子が異種ポリヌクレオチドに機能可能に連結されている、発現ベクターを提供する。

【0056】

本発明はまた、本発明の発現ベクターを含む哺乳動物宿主細胞も提供する。発現ベクターは、任意の適切な方法によって宿主細胞にトランスフェクトされてよい。好ましくは、宿主細胞は、上述されたものなどの哺乳動物細胞（例えば、ヒト細胞）である。そのような宿主細胞は、単離された細胞であってもよい。

10

【0057】

本発明はさらに、そのゲノムが本発明の核酸分子または本発明の発現ベクターを含む哺乳動物を提供する。好ましくは、本発明の核酸分子または本発明の発現ベクターは、本発明の前記核酸分子に機能可能に連結されているか本発明の前記発現ベクターに機能可能に挿入されている異種ポリヌクレオチドが哺乳動物の1つ以上の細胞において発現されるように哺乳動物のゲノム中に挿入される。好ましくは、哺乳動物は、マウスまたはラットである。一部の実施形態において、哺乳動物は、ヒトではない哺乳動物である。

【0058】

本発明はまた、必要に応じて

(i) ヘルパープラスミド（例えば、本発明のプロモーターの調節制御下にあるレンチウイルスのポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むもの）；

20

(ii) ウイルスゲノムプラスミド（例えば、必要とされる導入遺伝子の単純な挿入に適合していてもよいパッケージングシグナルを有するもの）；

(iii) 緩衝液；

(iv) 制限酵素；

(v) トランスフェクション培地；および

(vi) 哺乳動物細胞

からなる群より選択される1つ以上の追加の構成要素と共に、本発明の発現ベクターおよび/または宿主細胞を含むキットも提供する。

【0059】

30

百分率でのアミノ酸配列同一性およびヌクレオチド配列同一性は、BLASTのアライメント法を用いて取得されてもよい(Altschulら(1997), 「Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs」 Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; および <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)。好ましくは、標準またはデフォルトのアライメントパラメータが使用される。

【0060】

タンパク質データベースにおいて類似配列を見出すために、標準的なタンパク質-タンパク質BLAST(blastp)を用いてもよい。他のBLASTプログラムと同様に、blastpは、類似した局所領域を見出すように設計されている。配列の類似性が配列全体に及ぶ場合、blastpはまた、全体的なアライメントも報告し、これは、タンパク質の同定を目的とする場合には好ましい結果である。好ましくは、標準またはデフォルトのアライメントパラメータが使用される。場合によっては、「low complexity filter」がオフにされてもよい。

40

【0061】

また、BLASTXプログラム、score=50、wordlength=3によりBLASTタンパク質検索が実施されてもよい。比較を目的としてギャップアライメントを得るために、Altschulら(1997) Nucleic Acids Res. 25: 3389で説明されているように(BLAST2.0の)Gapped B

50

LASTを利用できる。あるいは、(BLAST2.0の)PSI-BLASTを用いて、分子間の距離関係を検出する反復検索を実施できる(上記のAltschulら(1997)を参照のこと)。BLAST、Gapped BLAST、PSI-BLASTを利用する際、それぞれのプログラムのデフォルトのパラメータが使用されてもよい。

【0062】

ヌクレオチド配列の比較に関しては、MEGABLAST、discontiguous-megablastおよびblastnを用いて、この目標を達成してもよい。好ましくは、標準またはデフォルトのアライメントパラメータが使用される。MEGABLASTは、非常に類似した配列間の長いアライメントを効率的に見出すように特別に設計されている。本発明の核酸と類似しているが同一ではないヌクレオチド配列を見出すためにDiscontiguous MEGABLASTを用いてもよい。

10

【0063】

BLASTヌクレオチドアルゴリズムは、クエリをワードと呼ばれる短いサブ配列に分解することによって類似配列を見出す。このプログラムは、最初にクエリワードとの正確な一致(ワードヒット)を特定する。次いで、BLASTプログラムは、これらのワードヒットを複数のステップで拡張して最終ギャップアライメントを生成する。一部の実施形態において、BLASTヌクレオチド検索は、BLASTNプログラム、score=100、wordlength=12を用いて実施できる。

【0064】

BLAST検索の感度を左右する重要なパラメータの1つは、ワードサイズである。blastnがMEGABLASTよりも高感度である最も重要な理由は、それが、より短いデフォルトのワードサイズ(11)を使用するということである。このために、blastnは、他の生物に由来する関連ヌクレオチド配列とのアライメントの発見においてMEGABLASTよりも優れている。ワードサイズは、blastnにおいて調整可能であり、デフォルト値から最小の7に減らして検索の感度を上げることができる。

20

【0065】

新しく導入されたdiscontiguous megablastのページ(www.ncbi.nlm.nih.gov/Web/Newsltr/FallWinter02/blastlab.html)を用いて、より高感度の検索を達成できる。このページは、Maら(Bioinformatics, 2002 Mar; 18(3): 440-5)によって報告されたものと類似するアルゴリズムを使用する。アライメントの拡張のためのシードとして正確なワードの一致を必要とするのではなく、discontiguous megablastは、テンプレートのより長いウィンドウ内の非連続ワード(non-contiguous word)を使用する。コーディングモードでは、コドンの一番目と二番目の位置における一致を見出すことに集中する一方で三番目の位置における不一致を無視することによって、三番目の塩基のゆらぎが考慮される。同じワードサイズを使用したdiscontiguous MEGABLASTでの検索は、同じワードサイズを使用した標準的なblastnよりも高感度かつ効率的である。discontiguous megablastに固有のパラメータは、word size: 11または12; template: 16、18、または21; template type: coding(0)、non-coding(1)、またはboth(2)である。

30

40

【図面の簡単な説明】

【0066】

【図1】pSF-SnapFast FLucレポーターベクターのバックグラウンドマップ。

【図2】組換えプロモーターフラグメントを様々な標準的プロモーターと比較したチャート。エラーバーは標準誤差を示す。実験は3連で実施した。

【図3】経時的アッセイにおいて、最も高性能の3種の組換えプロモーター(p565、p567およびp576)を様々な標準的高発現プロモーターと比較したグラフ。

【図4】組換えプロモーターp565によって駆動されたタンパク質発現レベル。

50

【図5】それぞれプラスミドベクター p c D N A 3 . 1 および S n a p F a s t P r o 1 v を用いた、C M V プロモーターおよび O x f o r d G e n e t i c s の「ハイブリッド」 p r o m - 5 6 5 プロモーターからの H E K 2 9 3 細胞におけるタンパク質過剰発現 (p c D N A 3 . 1 は、L i f e T e c h n o l o g i e s から入手可能なタンパク質発現ベクターである。このプラスミドベクターは、前初期 C M V プロモーター、T 7 プロモーター、一本鎖 D N A を作り出すための F 1 オリジンと並んだウシ成長因子 (B g H) ポリアデニル化シグナル、ならびにネオマイシン - カナマイシンホストランスフェラーゼ (アミノグリコシド - 3 ' - ホストランスフェラーゼ) の発現を駆動する S V 4 0 プロモーター、および S V 4 0 ポリアデニル化シグナルを含む。 p c D N A 3 . 1 ベクターを用いて目的の外因性タンパク質を発現させる場合、前記タンパク質のコード配列は、C M V プロモーターと T 7 プロモーターの下流 (3 ') に、しかし B g H ポリアデニル化シグナルの上流 (5 ') に、5 ' から 3 ' の向きで挿入される必要がある。このプラスミドはまた、細菌細胞における選択のためのアンピシリン耐性遺伝子も含む。S n a p F a s t P r o 1 v は、その後ろに S V 4 0 ポリアデニル化シグナルが続く本明細書で p 5 6 5 i と呼称されるプロモーターを含む、O x f o r d G e n e t i c s L t d によって設計されたタンパク質発現ベクターである。S n a p F a s t P r o 1 v ベクターを用いて目的の外因性タンパク質を発現させる場合、前記タンパク質のコード配列は、p 5 6 5 i プロモーターの下流 (3 ') に、しかし S V 4 0 ポリアデニル化シグナルの上流 (5 ') に、5 ' から 3 ' の向きで挿入される必要がある。このプラスミドはまた、細菌細胞における選択のためのカナマイシン耐性遺伝子も含む。) 。様々な F L A G タグ付き融合タンパク質を発現する p c D N A 3 . 1 または S n a p F a s t P r o 1 v のいずれかで H E K 2 9 3 細胞をトランスフェクトした。P r o t e i n S i m p l e W e s (商標) 自動ウェスタンブロットシステムを使用して、培養上清または細胞溶解物のタンパク質レベルをトランスフェクションから 7 2 時間後にウェスタンブロットによって決定した。マウス抗 F L A G 一次抗体および二次ウサギ抗マウス I g G - H R P で F L A G タグ付き融合タンパク質を検出した。

【図6】それぞれプラスミドベクター p c D N A 3 . 1 および S n a p F a s t P r o 1 v を用いた、C M V プロモーターおよび O x f o r d G e n e t i c s の「ハイブリッド」 p r o m - 5 6 5 プロモーターからの H E K 2 9 3 細胞におけるタンパク質過剰発現。様々な F L A G タグ付き融合タンパク質を発現する p c D N A 3 . 1 または S n a p F a s t P r o 1 v のいずれかで H E K 2 9 3 細胞をトランスフェクトした。P r o t e i n S i m p l e W e s (商標) 自動ウェスタンブロットシステムを使用して、培養上清または細胞溶解物のタンパク質レベルをトランスフェクションから 7 2 時間後にウェスタンブロットによって決定した。マウス抗 F L A G 一次抗体および二次ウサギ抗マウス I g G - H R P で F L A G タグ付き融合タンパク質を検出した。

【図7】それぞれプラスミドベクター p c D N A 3 . 1 および S n a p F a s t P r o 1 v を用いた、C M V プロモーターおよび O x f o r d G e n e t i c s の「ハイブリッド」 p r o m - 5 6 5 プロモーターからのチャイニーズハムスター卵巣 (C H O) 細胞におけるタンパク質過剰発現。様々な F L A G タグ付き融合タンパク質を発現する p c D N A 3 . 1 または S n a p F a s t P r o 1 v のいずれかで C H O 細胞をトランスフェクトした。P r o t e i n S i m p l e W e s (商標) 自動ウェスタンブロットシステムを使用して、培養上清または細胞溶解物のタンパク質レベルをトランスフェクションから 7 2 時間後にウェスタンブロットによって決定した。マウス抗 F L A G 一次抗体および二次ウサギ抗マウス I g G - H R P で F L A G タグ付き融合タンパク質を検出した。

【図8】それぞれプラスミドベクター p c D N A 3 . 1 および S n a p F a s t P r o 1 v を用いた、C M V プロモーターおよび O x f o r d G e n e t i c s の「ハイブリッド」 p r o m - 5 6 5 プロモーターからのチャイニーズハムスター卵巣 (C H O) 細胞におけるタンパク質過剰発現。様々な F L A G タグ付き融合タンパク質を発現する p c D N A 3 . 1 または S n a p F a s t P r o 1 v のいずれかで C H O 細胞をトランスフェクトした。P r o t e i n S i m p l e W e s (商標) 自動ウェスタンブロットシ

テムを使用して、培養上清または細胞溶解物のタンパク質レベルをトランスフェクションから72時間後にウェスタンブロットによって決定した。マウス抗FLAG一次抗体および二次ウサギ抗マウスIgG-HRPでFLAGタグ付き融合タンパク質を検出した。

【図9】HCT116細胞において本発明のプロモーターによって駆動されたGFPの発現レベル。

【図10】A549細胞において本発明のプロモーターによって駆動されたGFPの発現レベル。

【実施例】

【0067】

以下の実施例によって本発明をさらに説明するが、これらの実施例では、特に明記しない限り、部および百分率は、重量によるものであり、度はセ氏である。これらの実施例は、本発明の好ましい実施形態を示すが、説明を目的として提示されているに過ぎないということが理解されるべきである。上記の説明およびこれらの実施例から、当業者は、本発明の本質的な特徴を確認でき、その趣旨および範囲から逸脱することなく、本発明を様々な用途および条件に適合させるために本発明の様々な変更および改変を行うことができる。従って、本明細書で示され、説明されたものに加えて、本発明の様々な改変が、上記の説明から当業者には明らかであろう。そのような改変も、添付の特許請求の範囲に含まれることが意図される。

【0068】

本明細書に記載される各参考文献の開示は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0069】

実施例1：組換えプロモーターフラグメント

表1で特定されている配列からなる組換えプロモーターフラグメントを作製した。

【0070】

【表1】

表1：組換えプロモーターフラグメントの配列

プロモーター名	第1の ポリヌクレオチド	第2の ポリヌクレオチド	第3の ポリヌクレオチド
p567	配列番号3	配列番号4	
p567i	配列番号3	配列番号4	配列番号7
p576	配列番号2	配列番号4	
p576i	配列番号2	配列番号4	配列番号6
p565	配列番号1	配列番号4	
p565i	配列番号1	配列番号4	配列番号5

【0071】

上記のプロモーターフラグメントにおいて、第1のポリヌクレオチド、第2のポリヌクレオチドおよび第3のポリヌクレオチド（存在する場合）は、隣接して連結された。

【0072】

実施例2：プロモーターを含む発現ベクターの構築

ホタルルシフェラーゼアッセイで使用したレポーターベクターは、以下のように構築した。

【0073】

ベクターの調製

図1に示されるSnapFast(SF)ベクターを使用した。SnapFastベクターのバックボーンは、pUCの細菌の複製開始点、アンピシリン耐性遺伝子およびマルチクロニングサイトからなる。ホタルルシフェラーゼをコードする配列を、NcoI制限部位とXbaI制限部位の間でマルチクロニングサイトにクロニングした(図1を

参照のこと)。ルシフェラーゼをコードする配列は、K o z a k リボソーム結合部位を包含する。

【0074】

レポータープラスミドをB g l I Iで線状化した後、脱リン酸化して、ベクター骨格の再連結を防いだ。切断されたベクターを、ゲル抽出およびその後のカラムを利用した精製によって、切断されていないベクターから単離した。次いで、組換えプロモーターフラグメント（実施例1のもの）を、B g l I Iで切断したベクターに連結した。

【0075】

ベクターを標準的なE . c o l iのクローニング用株に形質転換し、LBカナマイシン選択プレート上にプレATINGして、1コロニーあたり1つの組換えプロモーターを得た。ミニスケールでのプラスミド調製のためにコロニーを採取した。これらのプロモーターのクローンを、HEK293細胞へのトランスフェクションおよびその後のルシフェラーゼ発現アッセイに使用した。

10

【0076】

実施例3：プロモーター活性のアッセイ

材料および方法

各組換えプロモーターに由来するコロニーからプラスミドDNAを精製した。組換えプロモーターを含むレポーターベクターを、いくつかの96ウェルプレートにおいてHEK293細胞に個々にトランスフェクトした。トランスフェクトした細胞を37℃で24時間インキュベートした。Luciferase Assay Systemキット（Promega、Wisconsin、USA）を用いて各ウェルをルシフェラーゼ活性についてアッセイした。

20

【0077】

簡単に説明すると、各アッセイを次のように実施した。培養培地を各ウェルから除去した。100μlのレポーター溶解バッファを各ウェルの細胞に添加した。マイクロタイタープレート（複数可）を-20℃で30分間インキュベートして細胞を溶解させた後、プレートを室温で30分間インキュベートすることにより解凍した。ピペティングによって細胞溶解物を均質化した。各溶解物のサンプル25μlをルミノメーター用チューブに移した。ルシフェラーゼアッセイ試薬は、それにルシフェラーゼアッセイバッファを添加することによって再構成した。サンプルをLumat LB 9507ルミノメーター（EG&G Berthold）で分析した。ルミノメーターは、25μlのルシフェラーゼアッセイ試薬を注入した後、2秒間にわたって発光された光を記録するように設定した。ルミノメーターのアウトプットは、相対的光ユニットで与えられた。

30

【0078】

組換えプロモーターを、標準的な高発現プロモーターのセクションと比較した。

【0079】

結果

結果を図2に示す。組換えプロモーターフラグメントp567およびp576は、このアッセイにおいてCMV（現在の至適基準）よりも良好に機能した。

【0080】

実施例4：経時的実験

経時的実験のために、3つの組換えプロモーター（p565、p567およびp576）を選択した。結果を図3に示す。

40

【0081】

これらの結果は、組換えプロモーターが、トランスフェクションの24時間後から72時間後までの間にわたって、一貫して高いルシフェラーゼ発現を生じさせたということを示す。

【0082】

実施例5：組換えプロモーターからの発現レベル

本発明の組換えプロモーターp565によって駆動されるタンパク質発現レベルを、対

50

照として示されるCMVプロモーターでの発現と共に図4に示す。商業的に有用である4つの異なる抗原(タンパク質「W」、「X」、「Y」および「Z」)の発現について、p565プロモーターを標準的なCMVプロモーターと比較した。各抗原について、コード配列を、図1に示すものと同様のベクターにおいてCMVプロモーターまたはp565プロモーターのいずれかの下流にクローニングした。

【0083】

1日目に、300 μ lという体積の血清不含培養培地で1ウェルあたり30,000細胞という密度にてHEK293Ad細胞を48ウェルマイクロタイタープレートに播種した。2日目に、発現ベクターの各々について、各ウェルの細胞を0.75 μ gのDNAでトランスフェクトした。DNA1 μ gあたり3 μ gという比率で分枝状ポリエチレンイミン(PEI)を用いて細胞をトランスフェクトした。DNAを細胞に添加する前に、DNAをPEIと共に室温で20分間インキュベートしてDNA:PEI複合体を形成させた。トランスフェクションが行われてから3日後に、各ウェルの上清を回収し、発現された抗原の量についてウェスタンブロットにより分析した。

10

【0084】

実施例6:HEK293細胞における発現レベル

分枝状PEI(25kDa)を用いた一過性トランスフェクションの方法によって、ヒト胎児腎臓細胞(HEK293)でCMVプロモーターまたはプロモーターp565iから様々なヒト遺伝子(表2を参照のこと)を過剰発現させた。

【0085】

20

【表 2】

表 2 : H E K 2 9 3 細胞において過剰発現させたヒト遺伝子

タンパク質	Ref	
KLF4	>sp O43474 KLF4_HUMAN Krueppel-like factor 4	
XIAP	>sp P98170 XIAP_HUMAN E3 ubiquitin-protein ligase XIAP	
CYP2C1	>sp P33261 CP2C1_HUMAN Cytochrome P450 2C19	
CD4	>sp P16070 CD44_HUMAN CD44 antigen	
Myc	>sp P01106 MYC_HUMAN Myc proto-oncogene protein	10
LOX	>sp P28300 LYOX_HUMAN Protein-lysine 6-oxidase	
RAN	>sp P62826 RAN_HUMAN GTP-binding nuclear protein Ran	
FEV	>sp Q99581 FEV_HUMAN Protein FEV	
ABO	>sp P16442 BGAT_HUMAN Histo-blood group ABO system transferase	
GAPDH	>sp P04406 G3P_HUMAN Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	
CDK	>sp P06493 CDK1_HUMAN Cyclin-dependent kinase 1	
MyD88	>sp Q99836 MYD88_HUMAN Myeloid differentiation primary response protein	20
CRP	>sp P02741 CRP_HUMAN C-reactive protein	
NRAS	>sp P01111 RASN_HUMAN GTPase NRas	
タンパク質	Ref	
IL10	>sp P22301 IL10_HUMAN Interleukin-10	
PTH	>sp P01270 PTHY_HUMAN Parathyroid hormone	
TNF	>sp P01375 TNFA_HUMAN Tumor necrosis factor	
INS	>sp P01308 INS_HUMAN Insulin	
CA1	>sp P00915 CAH1_HUMAN Carbonic anhydrase	30
JUN	>sp P05412 JUN_HUMAN Transcription factor AP-1	
KRAS	>sp P01116 RASK_HUMAN GTPase KRas	
CD68	>sp P34810 CD68_HUMAN Macrosialin	
CD14	>sp P08571 CD14_HUMAN Monocyte differentiation antigen CD14	
CD34	>sp P28906 CD34_HUMAN Hematopoietic progenitor cell antigen CD34	
PTEN	>sp P60484 PTEN_HUMAN Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase and dual-specificity protein phosphatase PTEN	40
TP53	>sp P04637 P53_HUMAN Cellular tumor antigen p53	
NANOG	>sp Q9H9S0 NANOG_HUMAN Homeobox protein NANOG	
RPE	> Q96AT9 RPE_HUMAN Ribulose-phosphate 3-epimerase	

【 0 0 8 6 】

1 ウェルあたり 25,000 細胞という密度にて 48 ウェルプレートのフォーマット (Sigma Aldrich) で H E K 2 9 3 細胞を播種して、プラスミド DNA のトランスフェクションの前に 24 時間、組織培養した。F L A G をタグ付けされたヒト遺伝子を C M V プロモーターまたはプロモーター P 5 6 5 i から発現する各プラスミド DNA (750 ng) を、1 : 3 という比率で分枝状 P E I (25 k D A) と混合し、この DNA

10

20

30

40

50

： P E I 複合体を、 H E K 2 9 3 細胞を播種した 4 8 ウェルプレートの各ウェルに一過的にトランスフェクトした。一過性トランスフェクションからの各 F L A G タグ付きヒトタンパク質の発現を、マウス抗 F L A G 一次抗体および二次ウサギ抗マウス I g G - H R P を用いてトランスフェクションから 7 2 時間後に自動ウェスタンブロッティング (W e s (商 標) P r o t e i n S i m p l e) により分析した。結果を図 5 および図 6 に示す。

【 0 0 8 7 】

実施例 7 : C H O 細胞における発現レベル

分枝状 P E I (2 5 k D a) を用いた一過性トランスフェクションの方法によって、 C H O K 1 細胞で C M V プロモーターまたはプロモーター P 5 6 5 i から様々なヒト遺伝子 (表 3 を参照のこと) を過剰発現させた。

【 0 0 8 8 】

【表 3】

表 3 : C H O 細胞において過剰発現させたヒト遺伝子

タンパク質	Ref
RAN	>sp P62826 RAN_HUMAN GTP-binding nuclear protein Ran
RPE	>sp Q96AT9 RPE_HUMAN Ribulose-phosphate 3-epimerase
FEV	>sp Q99581 FEV_HUMAN Protein FEV
BCL2	>sp P10415 BCL2_HUMAN Apoptosis regulator Bcl-2
CA1	>sp P00915 CAH1_HUMAN Carbonic anhydrase 1
STAR	>sp P49675 STAR_HUMAN Steroidogenic acute regulatory protein, mitochondrial
MYD88	>sp Q99836 MYD88_HUMAN Myeloid differentiation primary response protein
IGF1	>sp P05019 IGF1_HUMAN Insulin-like growth factor I
ANG	>sp P03950 ANG1_HUMAN Angiogenin
PI3	>sp P19957 ELAF_HUMAN Elafin
CXCL1	>sp P09341 GROA_HUMAN Growth-regulated alpha protein
INS1	>sp P01308 INS_HUMAN Insulin
PTMS	>sp P20962 PTMS_HUMAN Parathyrosin
タンパク質	Ref
CRP	>sp P02741 CRP_HUMAN C-reactive protein
TNF	>sp P01375 TNFA_HUMAN Tumor necrosis factor
BDNF	> P23560 BDNF_HUMAN Brain-derived neurotrophic factor
FGF23	>sp Q9GZV9 FGF23_HUMAN Fibroblast growth factor 23
APOE	>sp P02649 APOE_HUMAN Apolipoprotein
CCL2	>sp P13500 CCL2_HUMAN C-C motif chemokine 2
MAX	>sp P61244 MAX_HUMAN Protein max
KRAS	>sp P01116 RASK_HUMAN GTPase KRas
NRAS	>sp P01111 RASN_HUMAN GTPase NRas
BAX	>sp Q07812 BAX_HUMAN Apoptosis regulator BAX
RAC1	>sp P63000 RAC1_HUMAN Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RHOA	>sp P61586 RHOA_HUMAN Transforming protein RhoA
EPO	>sp P01588 EPO_HUMAN Erythropoietin
HMGB1	>sp P09429 HMGB1_HUMAN High mobility group protein B1

10

20

30

40

【 0 0 8 9 】

1 ウェルあたり 20,000 細胞という密度にて 48 ウェルプレートのフォーマット (Sigma Aldrich) で CHO K1 細胞を播種して、プラスミド DNA のトランスフェクションの前に 24 時間、組織培養した。FLAG をタグ付けされたヒト遺伝子を CMV プロモーターまたはプロモーター P565i から発現する各プラスミド DNA (750 ng) を、1:3 という比率で分枝状 PEI (25 kDa) と混合し、この DNA:PEI 複合体を、CHO K1 細胞を播種した 48 ウェルプレートの各ウェルに一過的

50

にトランスフェクトした。一過性トランスフェクションからの各FLAGタグ付きヒトタンパク質の発現を、マウス抗FLAG一次抗体および二次ウサギ抗マウスIgG-HRPを用いてトランスフェクションから72時間後に自動ウェスタンブロッティング(Wes (商標) Protein Simple)により分析した。結果を図7および図8に示す。

【0090】

実施例8：HCT116細胞における発現レベル

分枝状PEI(25kDa)を用いた一過性トランスフェクションの方法によって、HCT116細胞でCMVプロモーター、P565iプロモーター、P565プロモーター、P576プロモーター、P567プロモーターから緑色蛍光タンパク質(GFP)を発現させた。

10

【0091】

組織培養処理された48ウェルプレートのフォーマット(Sigma Aldrich)で1ウェルあたり25,000細胞という密度にてHCT116細胞を播種し、プラスミドDNAのトランスフェクションの前に24時間、培養した。高感度緑色蛍光タンパク質をCMVプロモーター、P565iプロモーター、P565プロモーター、P576プロモーターまたはP567プロモーターから発現する各プラスミドDNA(750ng)を、1:3という比率で分枝状PEI(25kDa)と混合し、このDNA:PEI複合体を、HCT116細胞に一過的にトランスフェクトした。HCT116細胞のMFIによって決定される高感度緑色タンパク質の発現を、トランスフェクションから48時間後にフローサイトメトリーにより測定した。結果を図9に示す。

20

【0092】

実施例9：A549細胞における発現レベル

【0093】

分枝状PEI(25kDa)を用いた一過性トランスフェクションの方法によって、A549細胞でCMVプロモーター、P565iプロモーター、P565プロモーター、P576プロモーター、P567プロモーターから緑色蛍光タンパク質(GFP)を発現させた。

【0094】

組織培養処理された48ウェルプレートのフォーマット(Sigma Aldrich)で1ウェルあたり25,000細胞という密度にてA549細胞を播種し、プラスミドDNAのトランスフェクションの前に24時間、培養した。高感度緑色蛍光タンパク質をCMVプロモーター、P565iプロモーター、P565プロモーター、P576プロモーターまたはP567プロモーターから発現する各プラスミドDNA(750ng)を、1:3という比率で分枝状PEI(25kDa)と混合し、このDNA:PEI複合体を、A549細胞に一過的にトランスフェクトした。A549細胞のMFIによって決定される高感度緑色タンパク質の発現を、トランスフェクションから48時間後にフローサイトメトリーにより測定した。結果を図10に示す。

30

【0095】

配列

40

配列番号3

AGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTTCATAGCCCATATAT
GGAGTTTCCGCGTTACATAAAGTTACGGTAAGTGGCCCGCCT
GGCTGACCGCCCAACGACCCCGCC

配列番号2

CTACCGGGTAGGGGAGGCGCTTTTCCCAAGGCAGTCTGGA
GCATGCGCTTTAGCAGCCCGCTGGGCAGTTGGCGCTACA
CAAGTGGCCTCTGGCCTCGCACACATTCACATCCACCGG
TAGGCGTCAATGGAAGTCCCTATTGGCGTTACTATGGGA

50

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

配列番号 1

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

10

配列番号 4

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

20

配列番号 7

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

配列番号 6

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

30

配列番号 5

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

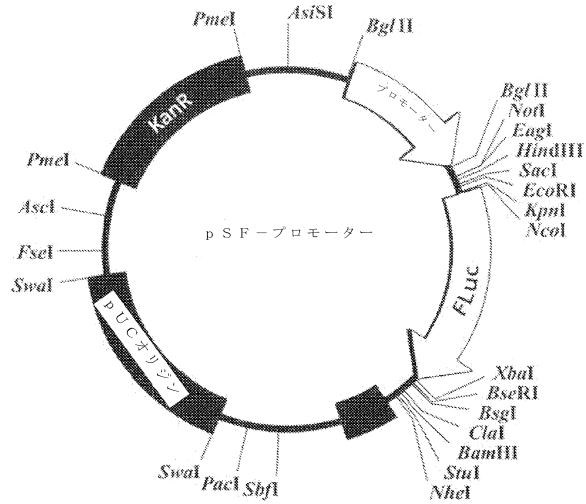
40

【配列表フリーテキスト】

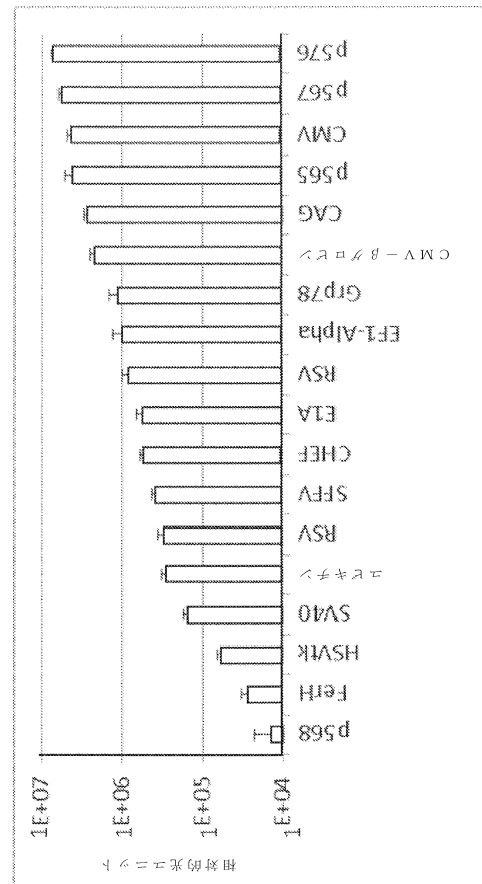
【0096】

< 2 2 3 > 合成プロモーターエレメント

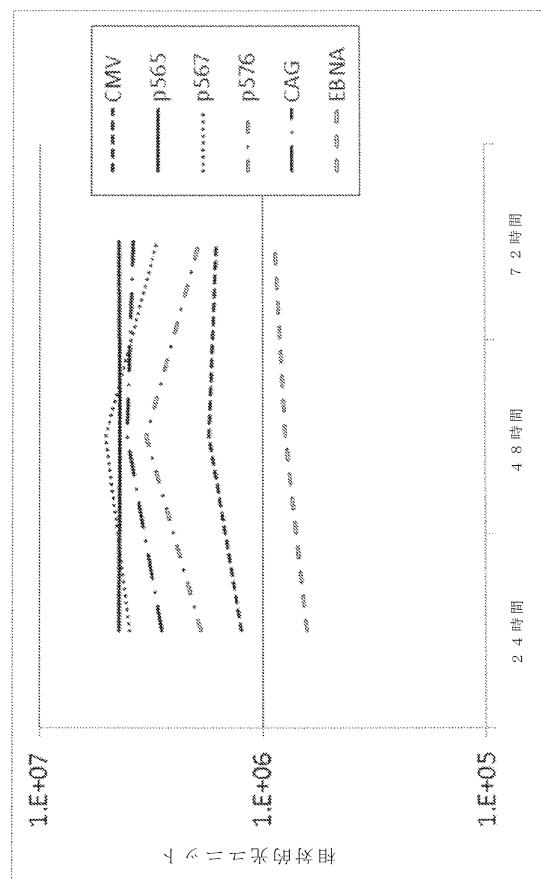
【図 1】



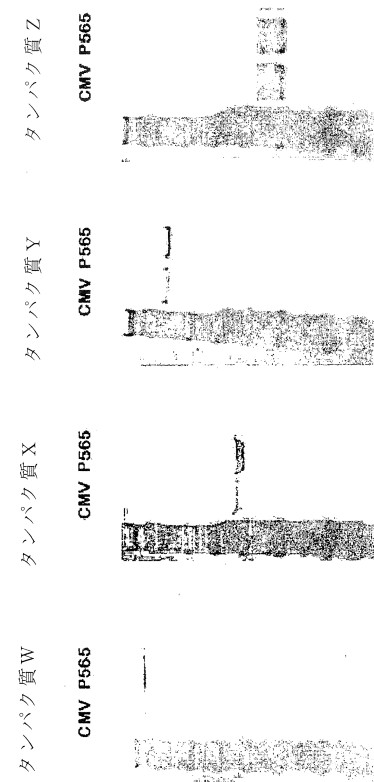
【図 2】



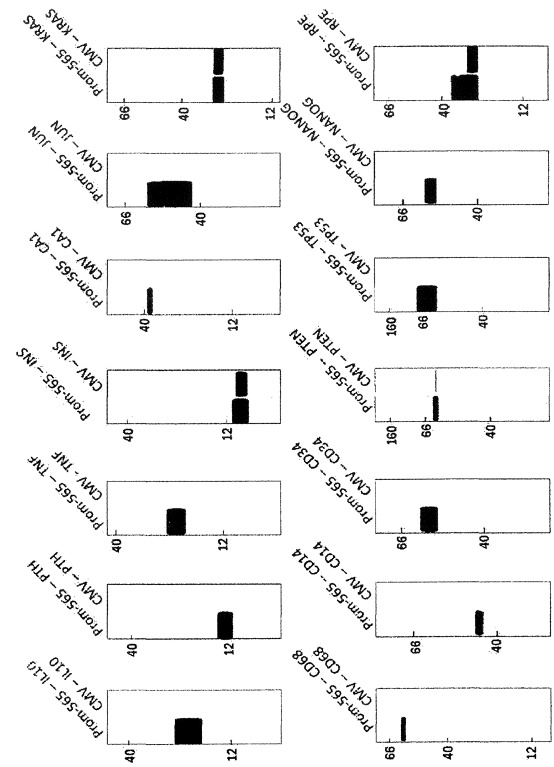
【図 3】



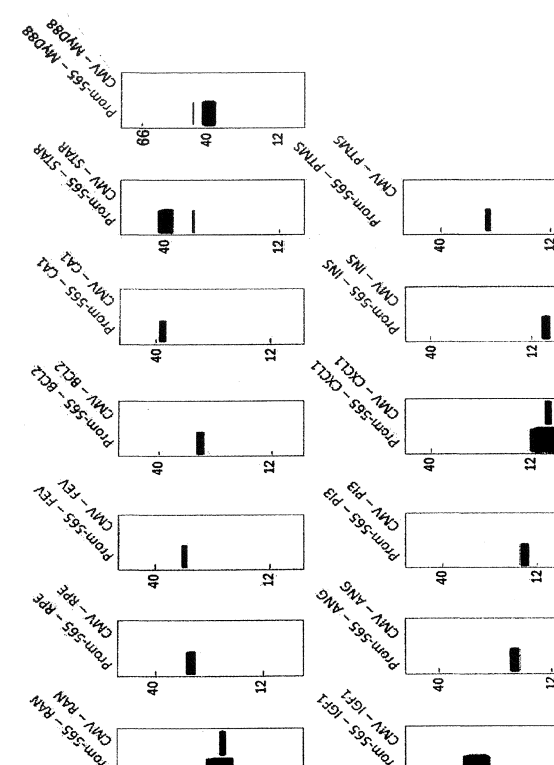
【図 4】



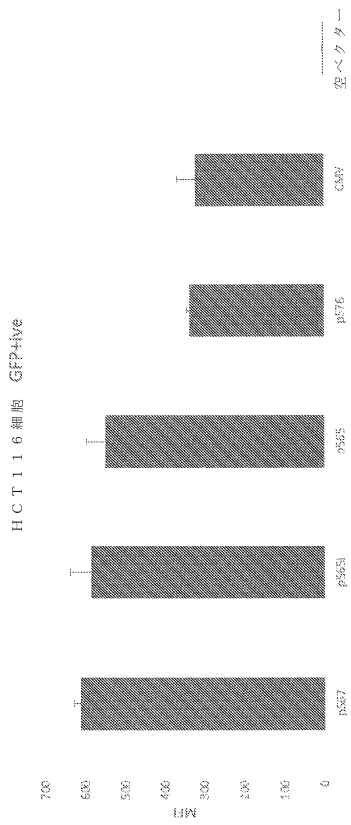
【 図 6 】



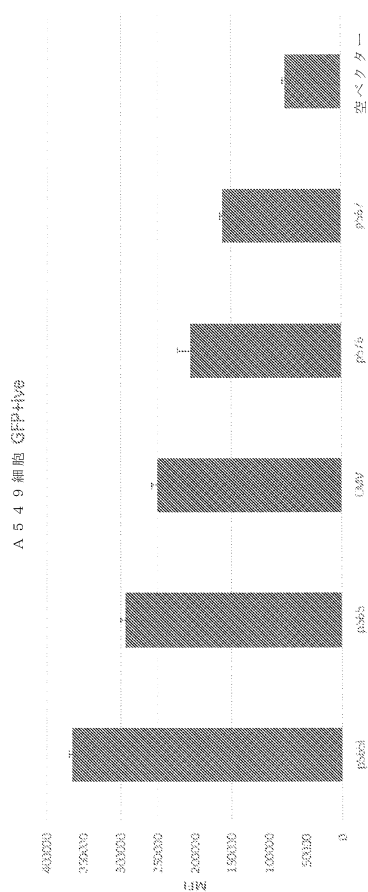
【 図 8 】



【図 9】



【図 10】



【配列表】

0006960409000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 ケイウッド ライアン

英国 オーエックス4 4ジーエイ オックスフォードシャー、 オックスフォード、 ジ オックスフォード サイエンス パーク、 ロバート ロビンソン アヴェニュー、 1 メダワー、 ファースト フロア、 ケア オヴ オックスフォード ジェネティクス リミテッド

(72)発明者 パーカー マヌエル リチャード

英国 オーエックス4 4ジーエイ オックスフォードシャー、 オックスフォード、 ジ オックスフォード サイエンス パーク、 ロバート ロビンソン アヴェニュー、 1 メダワー、 ファースト フロア、 ケア オヴ オックスフォード ジェネティクス リミテッド

(72)発明者 スー ウェイヘン

英国 オーエックス4 4ジーエイ オックスフォードシャー、 オックスフォード、 ジ オックスフォード サイエンス パーク、 ロバート ロビンソン アヴェニュー、 1 メダワー、 ファースト フロア、 ケア オヴ オックスフォード ジェネティクス リミテッド

審査官 川合 理恵

(56)参考文献 国際公開第2007/081336(WO, A1)

特表2015-532831(JP, A)

国際公開第2016/022075(WO, A1)

中国特許出願公開第104630267(CN, A)

J. Gene Med., 2009, Vol. 11, pp. 941-950

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq