(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2023-519925
(P2023-519925A)
(43)公表日　令和5年5月15日(2023.5.15)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
C12N	*15/113 (2010.01)*	C12N	15/113	Z ZNA	4B029
C12N	*15/63 (2006.01)*	C12N	15/63	Z	4B065
C12N	*5/10 (2006.01)*	C12N	5/10		4C084
C12N	*1/00 (2006.01)*	C12N	1/00	F	
C12M	*1/00 (2006.01)*	C12M	1/00	C	

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全160頁）　最終頁に続く

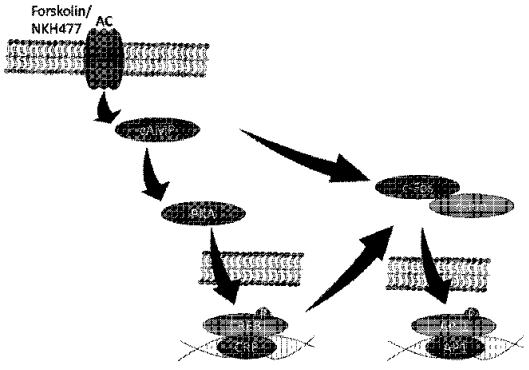
(21)出願番号　特願2022-558590(P2022-558590)
(86)(22)出願日　令和3年3月26日(2021.3.26)
(85)翻訳文提出日　令和4年11月25日(2022.11.25)
(86)国際出願番号　PCT/GB2021/050743
(87)国際公開番号　WO2021/191628
(87)国際公開日　令和3年9月30日(2021.9.30)
(31)優先権主張番号　63/000,155
(32)優先日　令和2年3月26日(2020.3.26)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/010,330
(32)優先日　令和2年4月15日(2020.4.15)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　2005473.0
最終頁に続く

(71)出願人　520375033
アスクレピオス バイオファーマシューティカル， インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 ノースカロライナ ２７７０９， リサーチ トライアングル パーク， ティー．ダブリュー． アレクサンダー ドライブ ２０， スイート １１０
(74)代理人　100108453
弁理士　村山 靖彦
(74)代理人　100110364
弁理士　実広 信哉
(74)代理人　100133400
弁理士　阿部 達彦
(72)発明者　グラハム・ホワイトサイド
イギリス・ミッドロージアン・ＥＨ２５
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　フォルスコリン誘導性プロモーター及び低酸素誘導性プロモーター

(57)【要約】
本発明は、フォルスコリン誘導性及び低酸素誘導性シス調節エレメント、プロモーター、及びベクター、並びにそれらの使用方法に関する。

Figure 1



【特許請求の範囲】
【請求項１】
CREB、AP1、及び/又はHIFに結合することが可能な合成誘導性シス調節エレメント(CRE)。
【請求項２】
フォルスコリン誘導性であり、CREB及び／又はＡＰ１に結合することが可能である、請求項１に記載の合成誘導性シス調節エレメント(CRE)。
【請求項３】
CREB及び/又はAP1に対する転写因子結合部位(TFBS)を少なくとも1つ、任意選択で少なくとも2、3、4つ、又はそれよりも多く含む、請求項2に記載の合成フォルスコリン誘導性CRE。
【請求項４】
CREB及びAP1の各々に対する少なくとも1つのTFBSを含む、請求項2に記載の合成フォルスコリン誘導性CRE。
【請求項５】
CREBに対するTFBSは、cAMPRE(配列番号1)を含むか又はそれからなる、請求項4に記載の合成フォルスコリン誘導性CRE。
【請求項６】
AP1に対するTFBSは、AP1コンセンサス配列(配列番号2)、AP1(1)(配列番号3)、AP1(3)(配列番号43)、及び/又はAP1(2)(配列番号4)を含むか又はそれからなる、請求項4に記載の合成フォルスコリン誘導性CRE。
【請求項７】
CREB及び/又はAP1以外の転写因子に対する少なくとも1つのTFBSを含む、請求項１～6のいずれか一項に記載の合成フォルスコリン誘導性CRE。
【請求項８】
ATF6及び/又はHIFに対する少なくとも1つのTFBSを含む、請求項１～7のいずれか一項に記載の合成フォルスコリン誘導性CRE。
【請求項９】
HIFに対するTFBSは、コンセンサス配列NCGTG(配列番号5)又はHRE1(配列番号7)を含むか又はそれからなる、請求項8に記載の合成フォルスコリン誘導性CRE。
【請求項１０】
ATF6に対するTFBSは、コンセンサス配列TGACGT(配列番号10)、任意選択でTGACGTG(配列番号11)を含むか又はそれからなる、請求項8又は9に記載の合成フォルスコリン誘導性CRE。
【請求項１１】
- CREBに対する5つのTFBS及びAP1に対する3つのTFBS;
- CREBに対する5つのTFBS及びAP1に対する4つのTFBS;
- AP1に対する8つのTFBS;
- ATF6に対する3つのTFBS、AP1に対する4つのTFBS、及びHIFに対する2つのTFBS;
- CREBに対する7つのTFBS及びAP1に対する6つのTFBS;又は
- ATF6に対する5つのTFBS、AP1に対する6つのTFBS、及びHIFに対する6つのTFBS

を含む、請求項１～10のいずれか一項に記載の合成フォルスコリン誘導性CRE。
【請求項１２】
隣接するTFBSは、スペーサー配列により隔てられている、請求項1～11のいずれか一項に記載の合成フォルスコリン誘導性CRE。
【請求項１３】
配列

【化１】

TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACTCAG-S-TGACTCAG-S-TGACTCAG

(配列番号18)を含み、ここで、Sは、任意選択のスペーサー配列を表す、請求項2に記載の合成フォルスコリン誘導性CRE。

【請求項１４】

配列

【化２】

TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACTCAG-S-TGACTCAG-S-TGACTCAG-S-TGACTCAG

(配列番号19)を含み、ここで、Sは、任意選択のスペーサー配列を表す、請求項2に記載の合成フォルスコリン誘導性CRE。

【請求項１５】

配列

【化３】

TGAGTCA-S-TGAGTCA-S-TGAGTCA-S-TGAGTCA-S-TGAGTCA-S-TGAGTCA-S-TGAGTCA-S-TGAGTCA

(配列番号20)を含み、ここで、Sは、任意選択のスペーサー配列を表す、請求項2に記載の合成フォルスコリン誘導性CRE。

【請求項１６】

配列

【化４】

TGACGTGCT-S-TGACGTGCT-S-TGACGTGCT-S-TGAGTCA-S-TGAGTCA-S-TGAGTCA-S-TGAGTCA-S-CTGCACGTA-S-CTGCACGTA-S-CTGCACGTA

(配列番号21)を含み、ここで、Sは、任意選択のスペーサー配列を表す、請求項2に記載の合成フォルスコリン誘導性CRE。

【請求項１７】

配列

【化５】

TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACTCA-S-TGACTCA-S-TGACTCA-S-TGACTCA

(配列番号２２)を含み、
ここで、Ｓは、任意選択のスペーサー配列を表す、請求項２に記載の合成フォルスコリン誘導性ＣＲＥ。
【請求項１８】
配列
【化６】

TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACTCA-S- TGACTCA-S- TGACTCA-S- TGACTCA-S- TGACTCA-S-TGACTCA

(配列番号５８)を含み、
ここで、Ｓは、任意選択のスペーサー配列を表す、請求項２に記載の合成フォルスコリン誘導性ＣＲＥ。
【請求項１９】
配列
【化７】

TGACGTGCT-S- TGACGTGCT-S- TGACGTGCT-S- TGACGTGCT-S- TGACGTGCT-S-TGAGTCA-S- TGAGTCA-S- TGAGTCA-S- TGAGTCA-S- TGAGTCA-S- TGAGTCA-S-CTGCACGTA-S- CTGCACGTA-S- CTGCACGTA-S- CTGCACGTA-S- CTGCACGTA-S-CTGCACGTA

(配列番号５９)を含み、
ここで、Ｓは、任意選択のスペーサー配列を表す、請求項２に記載の合成フォルスコリン誘導性ＣＲＥ。
【請求項２０】
配列
【化８】

TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACTCA-S- TGACTCA-S- TGACTCA-S- TGACTCA-S- TGACTCA-S-TGACTCA

(配列番号５８)
及び

【化９】

TGACGTGCT-S- TGACGTGCT-S- TGACGTGCT-S- TGACGTGCT-S- TGACGTGCT-S-
TGAGTCA-S- TGAGTCA-S- TGAGTCA-S- TGAGTCA-S- TGAGTCA-S- TGAGTCA-S-
CTGCACGTA-S- CTGCACGTA-S- CTGCACGTA-S- CTGCACGTA-S- CTGCACGTA-S-
CTGCACGTA

(配列番号59)を含み、
ここで、Sは、任意選択のスペーサー配列を表す、請求項2に記載の合成フォルスコリン誘導性CRE。
【請求項２１】
以下の配列:
-
【化１０】

TGACGTCACGATTACCATTGACGTCACGATTACCATTGACGTCACGATTACCATTGACGT
CACGATTACCATTGACGTCAGCGATTAAGATGACTCAGCGATTAAGATGACTCAGCGATT
AAGATGACTCAG

(配列番号23);
-
【化１１】

TGACGTCACGATTACCATTGACGTCACGATTACCATTGACGTCACGATTACCATTGACGT
CACGATTACCATTGACGTCAGCGATTAAGATGACTCAGCGATTAAGATGACTCAGCGATT
AAGATGACTCAGCGATTAAGATGACTCAG

(配列番号24);
-
【化１２】

TGAGTCAGATGATGCGTAGCTAGTAGTTGAGTCAGATGATGCGTAGCTAGTAGTTGAGT
CAGATGATGCGTAGCTAGTAGTTGAGTCAGATGATGCGTAGCTAGTAGTTGAGTCAGAT
GATGCGTAGCTAGTAGTTGAGTCAGATGATGCGTAGCTAGTAGTTGAGTCAGATGATGC
GTAGCTAGTAGTTGAGTCA

(配列番号25);
-

【化１３】

TGACGTGCTGATGATGCGTAGCTAGTAGTTGACGTGCTGATGATGCGTAGCTAGTAGTT
GACGTGCTGATGATGCGTAGCTAGTAGTTGAGTCAGATGATGCGTAGCTAGTAGTTGAG
TCAGATGATGCGTAGCTAGTAGTTGAGTCAGATGATGCGTAGCTAGTAGTTGAGTCAGAT
GATGCGTAGCTAGTAGTCTGCACGTAGATGATGCGTAGCTAGTAGTCTGCACGTAGATG
ATGCGTAGCTAGTAGTCTGCACGTA

(配列番号２６);

-

【化１４】

TGACGTCACGATTACCATTGACGTCACGATTACCATTGACGTCACGATTACCATTGACGT
CACGATTACCATTGACGTCAGCGATTAAGATGACTCAGCGATTAAGATGACTCAGCGATT
AAGATGACTCAGCGATTAAGATGACTCA

(配列番号２７);

-

【化１５】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGCCATTGACGTCAC
GATTTGACGTCAACCATTGACGTCACGATTTGACGTCAACCATTGACGTCACGATTTGAC
GTCACGATTTGACGTCAACCATTGACTCACGATTTGACTCAACCATTGACTCACGATTTG
ACTCAACCATTGACTCACGATTTGACTCACGATT

(配列番号６０);及び

-

【化１６】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGTGACGTGCTgataat
gcgtTGACGTGCTtgcgtgataaTGACGTGCTgataatgcgtTGACGTGCTtgcgtgataaTGACGTGCT
agctagtagtTGAGTCAgataatgcgtTGAGTCAtgcgtgataaTGAGTCAgataatgcgtTGAGTCAtgcgtga
taaTGAGTCAgataatgcgtTGAGTCAagctagtagtCTGCACGTAgataatgcgtCTGCACGTAtgcgtgat
aaCTGCACGTAgataatgcgtCTGCACGTAtgcgtgataaCTGCACGTAgataatgcgtCTGCACGTAag
ctagtagttgatctga

(配列番号６１);又はこれらと少なくとも８０％同一である配列を含む前記配列のいずれかの機能的バリアントのうちの１つを含む、請求項２に記載の合成フォルスコリン誘導性ＣＲＥ。

【請求項２２】

請求項２～２１のいずれか一項に記載の少なくとも１つの合成フォルスコリン誘導性シ

ス調節エレメント(CRE)を含むシス調節モジュール。
【請求項２３】
請求項2～21のいずれか一項に記載の少なくとも１つのCRE又は請求項22に記載の少なくとも1つのCRMを含む合成フォルスコリン誘導性プロモーター。
【請求項２４】
最小プロモーターに作動可能に連結した請求項2～21のいずれか一項に記載の少なくとも１つのCRE又は請求項22に記載の少なくとも1つのCRMを含む、請求項23に記載の合成フォルスコリン誘導性プロモーター。
【請求項２５】
以下の構造：
- cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-MP;
- cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-MP;
- AP1-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-MP;及び
- ATF6-S-ATF6-S-ATF6-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-HIF-S-HIF-S-HIF-S-MP;
- cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-MP;及び
ATF6-S-ATF6-S-ATF6-S-ATF6-S-ATF6-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-HIF-S-HIF-S-HIF-S-HIF-S-HIF-S-HIF-S-MP
のうちの1つを含み、ここで、Sは、任意選択だが好ましいスペーサー配列を表し、MPは最小プロモーターを表す、請求項23又は24に記載の合成フォルスコリン誘導性プロモーター。
【請求項２６】
以下の構造：
- cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-SV40-MP;
- cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-CMV-MP;
- AP1-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-(Min-TK又はG6PC MP又はCMV-MP);
- ATF6-S-ATF6-S-ATF6-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-HIF-S-HIF-S-HIF-S-CMV-MP;
- cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-YB-TATA;
- cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-(YB-Tata、CMV short、CMV53、MinTK、MLP、SV40、pJB42、又はTATAm6a MP);及び
ATF6-S-ATF6-S-ATF6-S-ATF6-S-ATF6-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-HIF-S-HIF-S-HIF-S-HIF-S-HIF-S-HIF-S-(YB-Tata、CMV short、CMV53、MinTK、MLP、SV40、pJB42、又はTATAm6a MP)
のうちの1つを含み、ここで、Sは、任意選択だが好ましいスペーサー配列を表す、請求項23～25のいずれか一項に記載の合成フォルスコリン誘導性プロモーター。
【請求項２７】
以下の配列：
-

【化１７】

TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGA[GC]TCA-S-
TGA[GC]TCA-S-TGA[GC]TCA-S-
TGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAACT
CCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATCGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCC
GAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAG
GCTTTTGCAAA

(配列番号５１);
-
【化１８】

TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S- TGA[GC]TCA -S-
TGA[GC]TCA-S-TGA[GC]TCA-S-TGA[GC]TCA-S-
AGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTAGATACGCCATCCACGC
TGTTTTGACCTCCATAGAAGATCGCCACC

(配列番号５２);
-
【化１９】

TGA[GC]TCA-S-TGA[GC]TCA-S-TGA[GC]TCA-S-TGA[GC]TCA-S-TGA[GC]TCA-S-
TGA[GC]TCA-S-TGA[GC]TCA-S-TGA[GC]TCA-S-
(TTCGCATATTAAGGTGACGCGTGTGGCCTCGAACACCGAGCGACCCTGCAGCGACCCGCT
TAA

(配列番号５３)又は
【化２０】

GGGCATATAAAACAGGGGCAAGGCACAGACTCATAGCAGAGCAATCACCACCAAGCCTGGA
ATAACTGCAGCCACC

(配列番号５４)又は
【化２１】

AGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTAGATACGCCATCCACGC
TGTTTTGACCTCCATAGAAGATCGCCACC)

(配列番号55);
-
【化２２】

TGACGT-S-TGACGT-S-TGACGT-S-TGA[GC]TCA-S-TGA[GC]TCA-S-TGA[GC]TCA-S-
TGA[GC]TCA-S-[AG]CGTG-S-[AG]CGTG-S-[AG]CGTG-S-
AGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTAGATACGCCATCCACGC
TGTTTTGACCTCCATAGAAGATCGCCACC

(配列番号56);
-
【化２３】

TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGA[GC]TCA-S-
TGA[GC]TCA-S-TGA[GC]TCA-S-TGA[GC]TCA-S-
GCGATTAATCCATATGCTCTAGAGGGTATATAATGGGGGCCACTAGTCTACTACCAGAAAGC
TTGGTACCGAGCTCGGATCCAGCCACC

(配列番号17);
-
【化２４】

TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-
TGACGTCA-S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S-
TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA- S-
GCGATTAATCCATATGCTCTAGAGGGTATATAATGGGGGCCACTAGTCTACTACCAGAAAGC
TTGGTACCGAGCTCGGATCCAGCCACC

(配列番号83);
-
【化２５】

TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-
TGACGTCA-S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S-
TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA- S- GTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCT

(配列番号84);
-

【化２６】

TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S-TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA- S-AAGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCT

(配列番号８５);

-

【化２７】

TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S-TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA- S-TTCGCATATTAAGGTGACGCGTGTGGCCTCGAACACCGAGCGACCCTGCAGCGACCCGCTTAA

(配列番号８６);

-

【化２８】

TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S-TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA- S-GGGGGGCTATAAAAGGGGGTGGGGGCGTTCGTCCTCACTCT

(配列番号８７);

-

【化２９】

TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S-TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA- S-TGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATCGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAA

(配列番号８８);

-

【化３０】

TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-
TGACGTCA-S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S-
TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA- S-
CTGACAAATTCAGTATAAAAGCTTGGGGCTGGGGCCGAGCACTGGGGACTTTGAGGGTGGC
CAGGCCAGCGTAGGAGGCCAGCGTAGGATCCTGCTGGGAGCGGGGAACTGAGGGAAGCG
ACGCCGAGAAAGCAGGCGTACCACGGAGGGAGAGAAAAGCTCCGGAAGCCCAGCAGCG

(配列番号８９);

-

【化３１】

TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-
TGACGTCA-S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S-
TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA- S-
TATAAAAGGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGaagcttggactaaagcggact

(配列番号９０);

-

【化３２】

TGACGT-S- TGACGT-S- TGACGT-S- TGACGT-S- TGACGT-S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA
-S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- [AG]CGTG -S-
[AG]CGTG -S- [AG]CGTG -S- [AG]CGTG -S- [AG]CGTG -S- [AG]CGTG-S-
GCGATTAATCCATATGCTCTAGAGGGTATATAATGGGGGCCACTAGTCTACTACCAGAAAGC
TTGGTACCGAGCTCGGATCCAGCCACC

(配列番号９１);

-

【化３３】

TGACGT-S- TGACGT-S- TGACGT-S- TGACGT-S- TGACGT-S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA
-S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- [AG]CGTG -S-
[AG]CGTG -S- [AG]CGTG -S- [AG]CGTG -S- [AG]CGTG -S- [AG]CGTG-S-
GTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCT

(配列番号９２);

-

【化３４】

TGACGT-S- TGACGT-S- TGACGT-S- TGACGT-S- TGACGT-S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- [AG]CGTG -S- [AG]CGTG -S- [AG]CGTG -S- [AG]CGTG -S- [AG]CGTG -S- [AG]CGTG-S- AAGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCT

(配列番号９３);

-

【化３５】

TGACGT-S- TGACGT-S- TGACGT-S- TGACGT-S- TGACGT-S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- [AG]CGTG -S- [AG]CGTG -S- [AG]CGTG -S- [AG]CGTG -S- [AG]CGTG -S- [AG]CGTG-S- TTCGCATATTAAGGTGACGCGTGTGGCCTCGAACACCGAGCGACCCTGCAGCGACCCGCTT AA

(配列番号９４);

-

【化３６】

TGACGT-S- TGACGT-S- TGACGT-S- TGACGT-S- TGACGT-S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- [AG]CGTG -S- [AG]CGTG -S- [AG]CGTG -S- [AG]CGTG -S- [AG]CGTG -S- [AG]CGTG-S- GGGGGGCTATAAAAGGGGGTGGGGGCGTTCGTCCTCACTCT

(配列番号９５);

-

【化３７】

TGACGT-S- TGACGT-S- TGACGT-S- TGACGT-S- TGACGT-S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- [AG]CGTG -S- [AG]CGTG -S- [AG]CGTG -S- [AG]CGTG -S- [AG]CGTG -S- [AG]CGTG-S- TGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAACT CCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATCGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCC GAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAG GCTTTTGCAAA

(配列番号９６);

-

【化３８】

TGACGT-S- TGACGT-S- TGACGT-S- TGACGT-S- TGACGT-S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- [AG]CGTG -S- [AG]CGTG -S- [AG]CGTG -S- [AG]CGTG -S- [AG]CGTG -S- [AG]CGTG-S- CTGACAAATTCAGTATAAAAGCTTGGGGCTGGGGCCGAGCACTGGGGACTTTGAGGGTGGC CAGGCCAGCGTAGGAGGCCAGCGTAGGATCCTGCTGGGAGCGGGGAACTGAGGGAAGCG ACGCCGAGAAAGCAGGCGTACCACGGAGGGAGAGAAAAGCTCCGGAAGCCCAGCAGCG

(配列番号９７);

【化３９】

TGACGT-S- TGACGT-S- TGACGT-S- TGACGT-S- TGACGT-S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- [AG]CGTG -S- [AG]CGTG -S- [AG]CGTG -S- [AG]CGTG -S- [AG]CGTG -S- [AG]CGTG-S- TATAAAAGGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGaagcttggactaaagcggact

(配列番号９８);

のうちの１つを含み、ここで、Ｓは、任意選択だが好ましいスペーサー配列を表す、請求項２３～２６のいずれか一項に記載の合成フォルスコリン誘導性プロモーター。

【請求項２８】

以下の配列：

-

【化４０】

TGACGTCACGATTACCATTGACGTCACGATTACCATTGACGTCACGATTACCATTGACGTCAC GATTACCATTGACGTCAGCGATTAAGATGACTCAGCGATTAAGATGACTCAGCGATTAAGAT GACTCAGCGATTAAGATGACTCACTAGCCCGGGCTCGAGATCTGCGATCTGCATCTCAATTA GTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTCC GCCCATTCTCCGCCCCATCGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTC GGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAA

(配列番号３９);

-

【化４１】

TGACGTCACGATTACCATTGACGTCACGATTACCATTGACGTCACGATTACCATTGACGTCAC
GATTACCATTGACGTCAGCGATTAAGATGACTCAGCGATTAAGATGACTCAGCGATTAAGAT
GACTCAGCGATTAAGATGACTCAGCGATTAATCCATATGCAGGTCTATATAAGCAGAGCTCG
TTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTAGATACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGAT
CGCCACC

(配列番号４０);

-

【化４２】

TGAGTCAGATGATGCGTAGCTAGTAGTTGAGTCAGATGATGCGTAGCTAGTAGTTGAGTCAG
ATGATGCGTAGCTAGTAGTTGAGTCAGATGATGCGTAGCTAGTAGTTGAGTCAGATGATGCG
TAGCTAGTAGTTGAGTCAGATGATGCGTAGCTAGTAGTTGAGTCAGATGATGCGTAGCTAGT
AGTTGAGTCAGTAGTCGTATGCTGATGCGCAGTTAGCGTAGCTGAGGTACCGTCGACGATAT
CGGATCCTTCGCATATTAAGGTGACGCGTGTGGCCTCGAACACCGAGCGACCCTGCAGCGA
CCCGCTTAA

(配列番号４１);

-

【化４３】

TGAGTCAGATGATGCGTAGCTAGTAGTTGAGTCAGATGATGCGTAGCTAGTAGTTGAGTCAG
ATGATGCGTAGCTAGTAGTTGAGTCAGATGATGCGTAGCTAGTAGTTGAGTCAGATGATGCG
TAGCTAGTAGTTGAGTCAGATGATGCGTAGCTAGTAGTTGAGTCAGATGATGCGTAGCTAGT
AGTTGAGTCAGTAGTCGTATGCTGATGCGCAGTTAGCGTAGCTGAGGTACCGTCGACGATAT
CGGATCCGGGCATATAAAACAGGGGCAAGGCACAGACTCATAGCAGAGCAATCACCACCAA
GCCTGGAATAACTGCAGCCACC

(配列番号４２);

-

【化４４】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGCCATTGACGTCACGA
TTTGACGTCAACCATTGACGTCACGATTTGACGTCAACCATTGACGTCACGATTTGACGTCAC
GATTTGACGTCAACCATTGACTCACGATTTGACTCAACCATTGACTCACGATTTGACTCAACC
ATTGACTCACGATTTGACTCACGATTGCGATTAATCCATATGCTCTAGAGGGTATATAATGGG
GGCCACTAGTCTACTACCAGAAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCAGCCACC

(配列番号６２);

-

【化４５】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGCCATTGACGTCACGA
TTTGACGTCAACCATTGACGTCACGATTTGACGTCAACCATTGACGTCACGATTTGACGTCAC
GATTTGACGTCAACCATTGACTCACGATTTGACTCAACCATTGACTCACGATTTGACTCAACC
ATTGACTCACGATTTGACTCACGATTGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAG
CTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCACC

(配列番号６８);

-

【化４６】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGCCATTGACGTCACGA
TTTGACGTCAACCATTGACGTCACGATTTGACGTCAACCATTGACGTCACGATTTGACGTCAC
GATTTGACGTCAACCATTGACTCACGATTTGACTCAACCATTGACTCACGATTTGACTCAACC
ATTGACTCACGATTTGACTCACGATTCAACAAAATGTCGTAACAAGGGCGGTAGGCGTGTAC
GGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGGCCACC

(配列番号６９);

-

【化４７】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGCCATTGACGTCACGA
TTTGACGTCAACCATTGACGTCACGATTTGACGTCAACCATTGACGTCACGATTTGACGTCAC
GATTTGACGTCAACCATTGACTCACGATTTGACTCAACCATTGACTCACGATTTGACTCAACC
ATTGACTCACGATTTGACTCACGATTTTCGCATATTAAGGTGACGCGTGTGGCCTCGAACAC
CGAGCGACCCTGCAGCGACCCGCTTAAGCCACC

(配列番号７０);

-

【化４８】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGCCATTGACGTCACGA
TTTGACGTCAACCATTGACGTCACGATTTGACGTCAACCATTGACGTCACGATTTGACGTCAC
GATTTGACGTCAACCATTGACTCACGATTTGACTCAACCATTGACTCACGATTTGACTCAACC
ATTGACTCACGATTTGACTCACGATTGGGGGGCTATAAAAGGGGGTGGGGGCGTTCGTCCT
CACTCTGCCACC

(配列番号７１);

-

【化４９】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGCCATTGACGTCACGA
TTTGACGTCAACCATTGACGTCACGATTTGACGTCAACCATTGACGTCACGATTTGACGTCAC
GATTTGACGTCAACCATTGACTCACGATTTGACTCAACCATTGACTCACGATTTGACTCAACC
ATTGACTCACGATTTGACTCACGATTTGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCT
AACTCCGCCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATCGCTGA
CTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTA
GTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTTGCCACC

(配列番号７２);

-

【化５０】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGCCATTGACGTCACGA
TTTGACGTCAACCATTGACGTCACGATTTGACGTCAACCATTGACGTCACGATTTGACGTCAC
GATTTGACGTCAACCATTGACTCACGATTTGACTCAACCATTGACTCACGATTTGACTCAACC
ATTGACTCACGATTTGACTCACGATTCTGACAAATTCAGTATAAAAGCTTGGGGCTGGGGCC
GAGCACTGGGGACTTTGAGGGTGGCCAGGCCAGCGTAGGAGGCCAGCGTAGGATCCTGCT
GGGAGCGGGGAACTGAGGGAAGCGACGCCGAGAAAGCAGGCGTACCACGGAGGGAGAGA
AAAGCTCCGGAAGCCCAGCAGCGGCCACC

(配列番号７３);

-

【化５１】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGCCATTGACGTCACGA
TTTGACGTCAACCATTGACGTCACGATTTGACGTCAACCATTGACGTCACGATTTGACGTCAC
GATTTGACGTCAACCATTGACTCACGATTTGACTCAACCATTGACTCACGATTTGACTCAACC
ATTGACTCACGATTTGACTCACGATTTATAAAAGGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGaagcttggac
taaagcggacttgtctcgag

(配列番号７４);

-

【化５２】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGTGACGTGCTgataatgcgt
TGACGTGCTtgcgtgataaTGACGTGCTgataatgcgtTGACGTGCTtgcgtgataaTGACGTGCTagctagta
gtTGAGTCAgataatgcgtTGAGTCAtgcgtgataaTGAGTCAgataatgcgtTGAGTCAtgcgtgataaTGAGTC
Agataatgcgt TGAGTCAagctagtagtCTGCACGTAgataatgcgtCTGCACGTAtgcgtgataaCTGCACGTA
gataatgcgtCTGCACGTAtgcgtgataaCTGCACGTAgataatgcgtCTGCACGTAagctagtagttgatctgaGTA
GGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATC

(配列番号７５);

-

【化５３】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGTGACGTGCTgataatgcgt
TGACGTGCTtgcgtgataaTGACGTGCTgataatgcgtTGACGTGCTtgcgtgataaTGACGTGCTagctagta
gtTGAGTCAgataatgcgtTGAGTCAtgcgtgataaTGAGTCAgataatgcgtTGAGTCAtgcgtgataaTGAGTC
Agataatgcgt TGAGTCAagctagtagtCTGCACGTAgataatgcgtCTGCACGTAtgcgtgataaCTGCACGTA
gataatgcgtCTGCACGTAtgcgtgataaCTGCACGTAgataatgcgtCTGCACGTAagctagtagttgatctgaTCT
AGAGGGTATATAATGGGGGCCA

(配列番号７６);

-

【化５４】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGTGACGTGCTgataatgcgt
TGACGTGCTtgcgtgataaTGACGTGCTgataatgcgtTGACGTGCTtgcgtgataaTGACGTGCTagctagta
gtTGAGTCAgataatgcgtTGAGTCAtgcgtgataaTGAGTCAgataatgcgtTGAGTCAtgcgtgataaTGAGTC
Agataatgcgt TGAGTCAagctagtagtCTGCACGTAgataatgcgtCTGCACGTAtgcgtgataaCTGCACGTA
gataatgcgtCTGCACGTAtgcgtgataaCTGCACGTAgataatgcgtCTGCACGTAagctagtagttgatctgaCAA
CAAAATGTCGTAACAAGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCG
TTTAGTGAACCG

(配列番号７７);

-

【化５５】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGTGACGTGCTgataatgcgt
TGACGTGCTtgcgtgataaTGACGTGCTgataatgcgtTGACGTGCTtgcgtgataaTGACGTGCTagctagta
gtTGAGTCAgataatgcgtTGAGTCAtgcgtgataaTGAGTCAgataatgcgtTGAGTCAtgcgtgataaTGAGTC
Agataatgcgt TGAGTCAagctagtagtCTGCACGTAgataatgcgtCTGCACGTAtgcgtgataaCTGCACGTA
gataatgcgtCTGCACGTAtgcgtgataaCTGCACGTAgataatgcgtCTGCACGTAagctagtagttgatctgaTTC
GCATATTAAGGTGACGCGTGTGGCCTCGAACACCGAGCGACCCTGCAGCGACCCGCTTAA

(配列番号７８)；

【化５６】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGTGACGTGCTgataatgcgt
TGACGTGCTtgcgtgataaTGACGTGCTgataatgcgtTGACGTGCTtgcgtgataaTGACGTGCTagctagta
gtTGAGTCAgataatgcgtTGAGTCAtgcgtgataaTGAGTCAgataatgcgtTGAGTCAtgcgtgataaTGAGTC
Agataatgcgt TGAGTCAagctagtagtCTGCACGTAgataatgcgtCTGCACGTAtgcgtgataaCTGCACGTA
gataatgcgtCTGCACGTAtgcgtgataaCTGCACGTAgataatgcgtCTGCACGTAagctagtagttgatctgaGG
GGGGCTATAAAAGGGGGTGGGGGCGTTCGTCCTCACTCT

(配列番号７９)；

【化５７】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGTGACGTGCTgataatgcgt
TGACGTGCTtgcgtgataaTGACGTGCTgataatgcgtTGACGTGCTtgcgtgataaTGACGTGCTagctagta
gtTGAGTCAgataatgcgtTGAGTCAtgcgtgataaTGAGTCAgataatgcgtTGAGTCAtgcgtgataaTGAGTC
Agataatgcgt TGAGTCAagctagtagtCTGCACGTAgataatgcgtCTGCACGTAtgcgtgataaCTGCACGTA
gataatgcgtCTGCACGTAtgcgtgataaCTGCACGTAgataatgcgtCTGCACGTAagctagtagttgatctgaCTG
ACAAATTCAGTATAAAAGCTTGGGGCTGGGGCCGAGCACTGGGGACTTTGAGGGTGGCCAG
GCCAGCGTAGGAGGCCAGCGTAGGATCCTGCTGGGAGCGGGGAACTGAGGGAAGCGACG
CCGAGAAAGCAGGCGTACCACGGAGGGAGAGAAAAGCTCCGGAAGCCCAGCAGCG

(配列番号８０)；

【化５８】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGTGACGTGCTgataatgcgt
TGACGTGCTtgcgtgataaTGACGTGCTgataatgcgtTGACGTGCTtgcgtgataaTGACGTGCTagctagta
gtTGAGTCAgataatgcgtTGAGTCAtgcgtgataaTGAGTCAgataatgcgtTGAGTCAtgcgtgataaTGAGTC
Agataatgcgt TGAGTCAagctagtagtCTGCACGTAgataatgcgtCTGCACGTAtgcgtgataaCTGCACGTA
gataatgcgtCTGCACGTAtgcgtgataaCTGCACGTAgataatgcgtCTGCACGTAagctagtagttgatctgaTAT
AAAAGGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGaagcttggactaaagcggacttgtctcgag

(配列番号８１);又は

-

【化５９】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGTGACGTGCTgataatgcgt
TGACGTGCTtgcgtgataaTGACGTGCTgataatgcgtTGACGTGCTtgcgtgataaTGACGTGCTagctagta
gtTGAGTCAgataatgcgtTGAGTCAtgcgtgataaTGAGTCAgataatgcgtTGAGTCAtgcgtgataaTGAGTC
Agataatgcgt TGAGTCAagctagtagtCTGCACGTAgataatgcgtCTGCACGTAtgcgtgataaCTGCACGTA
gataatgcgtCTGCACGTAtgcgtgataaCTGCACGTAgataatgcgtCTGCACGTAagctagtagttgatctgaTGC
ATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAACTCCG
CCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATCGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAG
GCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCT
TTTGCAAAAAGCTT

(配列番号８２)、
又は、それらと少なくとも８０％同一、任意選択でそれらと８５％、９０％、９５％、若しくは９９％同一である配列を含む前記配列のいずれかの機能的バリアントのうちの１つを含む、請求項２３～２７のいずれか一項に記載の合成フォルスコリン誘導性プロモーター。

【請求項２９】

導入遺伝子に作動可能に連結した請求項２３～２８のいずれか一項に記載の合成フォルスコリン誘導性プロモーターを含む発現カセット。

【請求項３０】

導入遺伝子は、治療用タンパク質又はポリペプチドをコードする、請求項２９に記載の発現カセット。

【請求項３１】

導入遺伝子は、遺伝子編集に有用な核酸をコードする、請求項２９又は３０に記載の発現カセット。

【請求項３２】

請求項２～２１のいずれか一項に記載の少なくとも１つのＣＲＥ、請求項２２に記載の少なくとも１つのＣＲＭ、請求項２３～２８のいずれか一項に記載の合成フォルスコリン誘導性プロモーター、又は請求項２９～３１のいずれか一項に記載の発現カセットを含むベクター。

【請求項３３】

請求項２～２１のいずれか一項に記載の少なくとも１つのＣＲＥ、請求項２２に記載の少なくとも１つのＣＲＭ、請求項２３～２８のいずれか一項に記載の合成フォルスコリン誘導性プロモーター、又は請求項２９～３１のいずれか一項に記載の発現カセットを含む遺伝子治療ベクター。

【請求項３４】

ＡＡＶベクターである、請求項３３に記載の遺伝子治療ベクター。

【請求項３５】

請求項３３又は３４に記載の遺伝子治療ベクターを含む組換えビリオン。

【請求項３６】
請求項33若しくは34に記載の遺伝子治療ベクター又は請求項35に記載のビリオンを含む医薬組成物。
【請求項３７】
請求項2～21のいずれか一項に記載の少なくとも1つのCRE、請求項22に記載の少なくとも1つのCRM、請求項23～28のいずれか一項に記載の合成フォルスコリン誘導性プロモーター、請求項29～31のいずれか一項に記載の発現カセット、又は請求項32～34のいずれか一項に記載のベクターを含む細胞。
【請求項３８】
ヒト肝細胞、任意選択でHuh7細胞;ヒト筋細胞、任意選択でC2C12細胞;ヒト胎児腎細胞、任意選択でHEK-293細胞、より任意選択でHEK-293-F細胞;又はCHO細胞である、請求項37に記載の細胞。
【請求項３９】
請求項37又は38に記載の細胞の集団。
【請求項４０】
請求項39に記載の細胞の集団、及び細胞の成長を支援するのに十分な培地を含む細胞培養物。
【請求項４１】
発現産物を産生するための方法であって、
a)導入遺伝子に作動可能に連結した請求項23～28のいずれか一項に記載の合成フォルスコリン誘導性プロモーターを含む発現カセットを含む細胞の集団を提供する工程;
b)前記細胞の集団を培養する工程;
c)発現カセットに存在する導入遺伝子の発現を誘導し、それにより発現産物が産生されるように、前記細胞の集団を処置する工程;及び
d)発現産物を前記細胞の集団から回収する工程
を含む方法。
【請求項４２】
工程c)は、細胞に誘導剤を投与することを含む、請求項41に記載の方法。
【請求項４３】
誘導剤は、アデニリルシクラーゼを活性化する作用剤である、請求項42に記載の方法。
【請求項４４】
誘導剤は、フォルスコリン又はNKH477である、請求項43に記載の方法。
【請求項４５】
請求項40に記載の細胞培養物を含む反応容器。
【請求項４６】
目的の産物、任意選択で治療用産物を製造するためのバイオプロセス法における、請求項32に記載のベクター又は請求項37に記載の細胞の使用。
【請求項４７】
それを必要とする対象、好ましくはヒトの遺伝子治療の方法であって、
a)治療用発現産物をコードする配列を含む請求項33に記載の遺伝子治療ベクターを含む医薬組成物を、遺伝子治療ベクターが核酸発現構築物を対象の標的細胞へと送達するように、対象内に導入する工程;及び
b)治療有効量の治療用発現産物が対象で発現されるように、誘導剤を対象に投与する工程
を含む方法。
【請求項４８】
誘導剤は、アデニリルシクラーゼを活性化する作用剤、任意選択でフォルスコリンである、請求項47に記載の方法。
【請求項４９】
処置又は治療の方法に使用するための、請求項29～31のいずれか一項に記載の発現カ

セット、請求項32～34のいずれか一項に記載のベクター、請求項35に記載のビリオン、請求項37若しくは38に記載の細胞、又は請求項36に記載の医薬組成物。

【請求項５０】

医薬組成物の製造に使用するための、請求項29～31のいずれか一項に記載の発現カセット、請求項32～34のいずれか一項に記載のベクター、請求項35に記載のビリオン、又は請求項37若しくは38に記載の細胞。

【請求項５１】

配列TATAAAAGGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGaagcttggactaaagcggacttgtctcgag(配列番号101)、又はそれと少なくとも80%同一、好ましくは85%、90%、95%、若しくは99%同一である配列を含むその機能的バリアントを含む最小プロモーター。

【請求項５２】

請求項51に記載の最小プロモーターに作動可能に連結した請求項2～21のいずれか一項に記載のCRE又は請求項22に記載のCRMを含む合成プロモーター。

【請求項５３】

低酸素誘導性であり、HIFに結合することが可能である、請求項１に記載の合成誘導性シス調節エレメント(CRE)。

【請求項５４】

低酸素応答エレメント(HRE)である、請求項53に記載の合成誘導性シス調節エレメント(CRE)。

【請求項５５】

発現カセットを含むバイオプロセスベクターであって、発現カセットは、導入遺伝子に作動可能に連結した合成低酸素誘導性プロモーターを含み、合成低酸素誘導性プロモーターは、請求項54に記載の少なくとも1つの低酸素応答エレメント(HRE)を含む、バイオプロセスベクター。

【請求項５６】

プロモーターは、最小プロモーターに作動可能に連結したHREを含む、請求項55に記載のバイオプロセスベクター。

【請求項５７】

HREは、複数のHIF結合部位(HBS)、任意選択で３つ又はそれよりも多くのHBS、任意選択で3～10個のHBS、任意選択で3～8個のHBS、任意選択で4～8個のHBSを含む、請求項55又は56に記載のバイオプロセスベクター。

【請求項５８】

HREに含まれているHBSは、コンセンサス配列NCGTG(配列番号5)、任意選択でコンセンサス配列[AG]CGTG(配列番号6)を含む、請求項55～57のいずれか一項に記載のバイオプロセスベクター。

【請求項５９】

隣接するHBSのコアコンセンサス配列間の間隔は、5～25ヌクレオチド、任意選択で約8～22ヌクレオチドである、請求項55～58のいずれか一項に記載のバイオプロセスベクター。

【請求項６０】

最後のHBSのコアコンセンサス配列と最小プロモーターのTATAボックス(又はTATAボックスが存在しない場合は同等の配列)との間の間隔は、0～100ヌクレオチド、任意選択で20～70ヌクレオチド、任意選択で20～50ヌクレオチド、任意選択で20～30ヌクレオチドである、請求項55～59のいずれか一項に記載のバイオプロセスベクター。

【請求項６１】

HREは、HRE1配列ACGTGC(配列番号8)を含むか又はそれからなる少なくとも1つのHBSを含み、好適には、HREに存在する全てのHBSは、HRE1配列を含むか又はそれからなる、請求項55～60のいずれか一項に記載のバイオプロセスベクター。

【請求項６２】

HREは、HRE2配列CTGCACGTA(配列番号3)を含むか又はそれからなる少なくとも1

つのHBSを含み、好適には、HREに存在する全てのHBSは、HRE2配列を含むか又はそれからなる、請求項55～61のいずれか一項に記載のバイオプロセスベクター。

【請求項６３】

HREは、HRE3配列ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATG(配列番号9)又はその機能的バリアントを含むか又はそれからなる少なくとも1つのHBSを含み、好適には、HREに存在する全てのHBSは、HRE3配列を含むか又はそれからなる、請求項55～62のいずれか一項に記載のバイオプロセスベクター。

【請求項６４】

HRE3の機能的バリアントは、以下の配列:

S1-ACGTG-S2-CTGCACGTA-S3(配列番号106)

を有し、

ここで、S1は、長さ8～10、任意選択で9のスペーサーであり、

ここで、S2は、長さ4～6、任意選択で5のスペーサーであり、

ここで、S3は、長さ1～3、任意選択で2のスペーサーである、請求項63に記載のバイオプロセスベクター。

【請求項６５】

HREは、以下の配列:

- $[ACGTGC\text{-}S]_n$-ACGTGC(配列番号108)

を含み、

ここで、Sはスペーサーであり、nは、2～9、任意選択で3～7である、請求項55～62のいずれか一項に記載のバイオプロセスベクター。

【請求項６６】

HREは、以下の配列:

ACGTGC-S-ACGTGC-S-ACGTGC-S-ACGTGC-S-ACGTGC(配列番号110)

を含み、

ここで、Sはスペーサーである、請求項65に記載のバイオプロセスベクター。

【請求項６７】

HREは、以下の配列:

【化６０】

ACGTGCGATGATGCGTAGCTAGTAGTGATGATGCGTAGCTAGTAGTACGTGCGATGATGCGTAG
CTAGTAGTGATGATGCGTAGCTAGTAGTACGTGCGATGATGCGTAGCTAGTAGTGATGATGCGT
AGCTAGTAGTACGTGCGATGATGCGTAGCTAGTAGTGATGATGCGTAGCTAGTAGTACGTGC

(配列番号112)、又はそれと少なくとも80%同一、任意選択でそれと85%、90%、95%、若しくは99%同一である機能的バリアントを含む、請求項65又は66に記載のバイオプロセスベクター。

【請求項６８】

HREは、以下の配列:

$[CTGCACGTA\text{-}S]_n$-CTGCACGTA(配列番号100);

を含み、

ここで、Sは、任意選択のスペーサーであり、nは、2～9、任意選択で3～7である、請求項55～62のいずれか一項に記載のバイオプロセスベクター。

【請求項６９】

HREは、以下の配列:

【化６１】

CTGCACGTA-S-CTGCACGTA-S-CTGCACGTA-S-CTGCACGTA-S-CTGCACGTA-S-
CTGCACGTA

(配列番号114)を含み、ここで、Sはスペーサーである、請求項68に記載のバイオプロセスベクター。

【請求項７０】

HREは、以下の配列:

【化６２】

CTGCACGTAGATGATGCGTAGCTAGTAGTCTGCACGTAGATGATGCGTAGCTAGTAGTCTGC
ACGTAGATGATGCGTAGCTAGTAGTCTGCACGTAGATGATGCGTAGCTAGTAGTCTGCACGT
AGATGATGCGTAGCTAGTAGTCTGCACGTA

(配列番号116)、又はそれと少なくとも80%同一、任意選択でそれと85%、90%、95%、若しくは99%同一である配列を含む機能的バリアントを含む、請求項68又は69に記載のバイオプロセスベクター。

【請求項７１】

HREは、以下の配列:

CTGCACGTACTGCACGTACTGCACGTACTGCACGTA(配列番号117)、又はそれと少なくとも80%同一、任意選択でそれと85%、90%、95%、若しくは99%同一である配列を含む機能的バリアントを含む、請求項55～62のいずれか一項に記載のバイオプロセスベクター。

【請求項７２】

HREは、3～6つ、好ましくは3～5つ、好ましくは4つ若しくは6つのHRE3配列、又はそれらの機能的バリアントを含み、隣接するHRE3配列又はそれらの機能的バリアントは、4～20ヌクレオチド、好ましくは6～15ヌクレオチド、より好ましくは5又は9ヌクレオチドの長さを有するスペーサーにより互いに隔てられている、請求項55～62のいずれか一項に記載のバイオプロセスベクター。

【請求項７３】

HREは、以下の配列:

【化６３】

$[ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATG\text{-}S]_n$-
ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATG

(配列番号118);
を含み、

ここで、Sは、任意選択のスペーサーであり、nは、2～7、任意選択で4～6、任意選択で4又は6である、請求項72に記載のバイオプロセスベクター。

【請求項７４】

HREは、以下の配列:

【化６４】

-ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATG-S-
ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATG-S-
ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATG-S-
ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATG-S-
ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATG-S

(配列番号１２１);
【化６５】

- ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATG-S-
ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATG-S-
ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATG-S-
ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATG-S

(配列番号１２０);又は
【化６６】

-ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATG-S-
ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATG-S-
ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATG-S-
ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATG-S-
ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATG-S-
ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATG

;(配列番号１２２)
を含み、
ここで、Ｓはスペーサーである、請求項７３に記載のバイオプロセスベクター。
【請求項７５】
ＨＲＥは、以下の配列:
-
【化６７】

ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGGCGATTAAGACCTTGAGTACGTGCGTC
TCTGCACGTATGGCGATTAAGACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGGCGATT
AAGACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATG

(配列番号１２６);
-

【化６８】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGACCTTGAGTA
CGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGtgcgt
ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGC
ACGTATGtgcgtACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGT
GCGTCTCTGCACGTATG

(配列番号１２８);又は

-

【化６９】

ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGC
ACGTATGtgcgtACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGT
GCGTCTCTGCACGTATGtgcgtACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACC
TTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATG

(配列番号１３９)、又はそれらと少なくとも８０％同一、任意選択でそれらと８５％、９０％、９５％、若しくは９９％同一である配列を含むその機能的バリアントを含む、請求項７４に記載のバイオプロセスベクター。

【請求項７６】

低酸素誘導性プロモーターは、ＣＭＶ最小プロモーター(ＣＭＶ-ＭＰ)、ＣＭＶ-ＭＰ ｓｈｏｒｔ、ＣＭＶ５３、ＭｉｎＴＫ、ＳＶ-４０、ＭＰ１、ＭＬＰ、ｐＪＢ４２、ＴＡＴＡ-ｍ６ａ、又はＹＢ-ＴＡＴＡ最小プロモーター(ＹＢ-ＴＡＢＡ)である最小プロモーターを含む、請求項５５～７５のいずれか一項に記載のバイオプロセスベクター。

【請求項７７】

低酸素誘導性プロモーターは、以下の配列:

-

【化７０】

ACGTGCGATGATGCGTAGCTAGTAGTGATGATGCGTAGCTAGTAGTACGTGCGATG
ATGCGTAGCTAGTAGTGATGATGCGTAGCTAGTAGTACGTGCGATGATGCGTAGCTA
GTAGTGATGATGCGTAGCTAGTAGTACGTGCGATGATGCGTAGCTAGTAGTGATGAT
GCGTAGCTAGTAGTACGTGCTTGGTACCATCCGGGCCGGCCGCTTAAGCGACGCCT
ATAAAAAATAGGTTGCATGCTAGGCCTAGCGCTGCCAGTCCATCTTCGCTAGCCTGT
GCTGCGTCAGTCCAGCGCTGCGCTGCGTAACGGCCGCC

(Ｓｙｎｐ-ＲＴＶ-０１５、配列番号１２９)、又はそれと少なくとも８０％同一、好ましくはそれと８５％、９０％、９５％、若しくは９９％同一である配列を含む機能的バリアント;

-

【化７１】

CTGCACGTACTGCACGTACTGCACGTACTGCACGTATGGGTACCGTCGACGATATC
GGATCCAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTAGATAC
GCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGATCGCCACC

(Synp-HYP-001、配列番号130)、又はそれと少なくとも80%同一、好ましくはそれと85%、90%、95%、若しくは99%同一である配列を含む機能的バリアント;

-

【化７２】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGACCTTGAGTA
CGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGtgcgt
ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGC
ACGTATGtgcgtACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGT
GCGTCTCTGCACGTATGTCTAGAGGGTATATAATGGGGGCCA

(Synp-HYPN、配列番号140)、又はそれと少なくとも80%同一、好ましくはそれと85%、90%、95%、若しくは99%同一である配列を含む機能的バリアント;

-

【化７３】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGACCTTGAGTA
CGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGtgcgt
ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGC
ACGTATGtgcgtACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGT
GCGTCTCTGCACGTATGGCGATTAATCCATATGCGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGT
CTATATAAGCAGAGCT

(Synp-HYBNC;配列番号141)、又はそれと少なくとも80%同一、好ましくはそれと85%、90%、95%、若しくは99%同一である配列を含む機能的バリアント;

-

【化７４】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGACCTTGAGTA
CGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGtgcgt
ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGC
ACGTATGtgcgtACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGT
GCGTCTCTGCACGTATGCAACAAAATGTCGTAACAAGGGCGGTAGGCGTGTACGGT
GGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCG

(Synp-HYBNC53;配列番号142)、又はそれと少なくとも80%同一、好ましくはそれと85%、90%、95%、若しくは99%同一である配列を含む機能的バリアント;

-

【化75】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGACCTTGAGTA
CGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGtgcgt
ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGC
ACGTATGtgcgtACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGT
GCGTCTCTGCACGTATGTTCGCATATTAAGGTGACGCGTGTGGCCTCGAACACCGA
GCGACCCTGCAGCGACCCGCTTAA

(Synp-HYBNMinTK;配列番号143)、又はそれと少なくとも80%同一、好ましくはそれと85%、90%、95%、若しくは99%同一である配列を含む機能的バリアント;

-

【化76】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGACCTTGAGTA
CGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGtgcgt
ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGC
ACGTATGtgcgtACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGT
GCGTCTCTGCACGTATGGGGGGGCTATAAAAGGGGGTGGGGGCGTTCGTCCTCAC
TCT

(Synp-HYBNMLP;配列番号144)、又はそれと少なくとも80%同一、好ましくはそれと85%、90%、95%、若しくは99%同一である配列を含む機能的バリアント;

-

【化77】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGACCTTGAGTA
CGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGtgcgt
ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGC
ACGTATGtgcgtACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGT
GCGTCTCTGCACGTATGTGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAAC
TCCGCCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATCGCT
GACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCC
AGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTT

(Synp-HYBNSV;配列番号145)、又はそれと少なくとも80%同一、好ましくはそれと85%、90%、95%、若しくは99%同一である配列を含む機能的バリアント;

-

【化７８】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGACCTTGAGTA
CGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGtgcgt
ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGC
ACGTATGtgcgtACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGT
GCGTCTCTGCACGTATGCTGACAAATTCAGTATAAAAGCTTGGGGCTGGGGCCGAG
CACTGGGGACTTTGAGGGTGGCCAGGCCAGCGTAGGAGGCCAGCGTAGGATCCTG
CTGGGAGCGGGGAACTGAGGGAAGCGACGCCGAGAAAGCAGGCGTACCACGGAG
GGAGAGAAAAGCTCCGGAAGCCCAGCAGCG

(Synp-HYBNpJB42、配列番号146)、又はそれと少なくとも80%同一、好ましくはそれと85%、90%、95%、若しくは99%同一である配列を含む機能的バリアント;及び

-

【化７９】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGACCTTGAGTA
CGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGtgcgt
ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGC
ACGTATGtgcgtACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGT
GCGTCTCTGCACGTATGTATAAAAGGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGaagcttggactaaa
gcggacttgtctcgag

(Synp-HYBNTATAm6a;配列番号147)、又はそれと少なくとも80%同一、好ましくはそれと85%、90%、95%、若しくは99%同一である配列を含む機能的バリアント
のうちの1つを含む、請求項55～76のいずれか一項に記載のバイオプロセスベクター。

【請求項７８】

導入遺伝子の発現レベルは、誘導時に、少なくとも2倍、3倍、4倍、5倍、任意選択で少なくとも10倍、15倍、10倍、20倍、30倍、又は50倍増加する、請求項55～77のいずれか一項に記載のバイオプロセスベクター。

【請求項７９】

導入遺伝子の発現レベルは、誘導時に、CMV-IEプロモーターにより提供される発現レベルの少なくとも50%である、請求項55～78のいずれか一項に記載のバイオプロセスベクター。

【請求項８０】

導入遺伝子は、抗体又はその断片、酵素又はその断片、サイトカイン、リンホカイン、接着分子、受容体又はその誘導体若しくは断片、タンパク質抗生物質、毒素融合タンパク質、炭水化物-タンパク質コンジュゲート、構造タンパク質、調節タンパク質、ワクチン又はワクチン様タンパク質又は粒子、プロセス酵素、成長因子、或いはホルモンをコードする、請求項55～79のいずれか一項に記載のバイオプロセスベクター。

【請求項８１】

請求項55～80のいずれか一項に記載のバイオプロセスベクターを含む細胞、好ましくは真核細胞。

【請求項８２】

発現産物を産生するための方法であって、
(a)請求項81に記載の真核細胞、任意選択で動物細胞、任意選択で哺乳動物細胞の集団を提供する工程;
(b)前記細胞の集団を培養する工程;及び
(c)細胞に低酸素を誘導して、低酸素誘導性プロモーターに連結した導入遺伝子からの発現が誘導され、発現産物が産生されるように、前記細胞の集団を処置する工程;及び
(d)発現産物を回収する工程
を含む方法。
【請求項８３】
工程(b)は、細胞の増殖に好適な条件下で前記細胞の集団を維持することを含む、請求項82に記載の方法。
【請求項８４】
請求項55～80のいずれか一項に記載のバイオプロセスベクターを細胞に導入する工程を含む、請求項82又は83に記載の方法。
【請求項８５】
工程(c)は、細胞に供給される酸素の量を、例えば、細胞の酸素分圧が5%又はそれよりも低くなるように低減することにより、細胞を処置することを含む、請求項82～84のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８６】
請求項81に記載の細胞を含む細胞培養物を含む反応容器。
【請求項８７】
目的の産物を製造するためのバイオプロセス法における、請求項55～80のいずれか一項に記載のバイオプロセスベクター、又は請求項81に記載の細胞の使用。
【請求項８８】
以下の配列:
a)[ACGTGC-S]$_n$-ACGTGC(配列番号108)(ここで、Sはスペーサーであり、nは2～9、好ましくは3～7である);
b)[CTGCACGTA-S]n-CTGCACGTA(配列番号100)(ここで、Sはスペーサーであり、nは2～9、好ましくは3～7である);及び
c)
【化８０】

[ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATG-S]$_n$-
ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATG

(配列番号118)(ここで、Sはスペーサーであり、nは2～7、任意選択で4～6、任意選択で4又は6である)
のうちの1つを含む合成HRE。
【請求項８９】
以下の配列：
a)

【化８１】

ACGTGCGATGATGCGTAGCTAGTAGTGATGATGCGTAGCTAGTAGTACGTGCGATGATGC
GTAGCTAGTAGTGATGATGCGTAGCTAGTAGTACGTGCGATGATGCGTAGCTAGTAGTGAT
GATGCGTAGCTAGTAGTACGTGCGATGATGCGTAGCTAGTAGTGATGATGCGTAGCTAGTA
GTACGTGC

(配列番号１１２)、又はそれと少なくとも８０％同一、好ましくはそれと８５％、９０％、９５％、若しくは９９％同一である機能的バリアント;

b)

【化８２】

CTGCACGTAGATGATGCGTAGCTAGTAGTCTGCACGTAGATGATGCGTAGCTAGTAGTCT
GCACGTAGATGATGCGTAGCTAGTAGTCTGCACGTAGATGATGCGTAGCTAGTAGTCTGCA
CGTAGATGATGCGTAGCTAGTAGTCTGCACGTA

(配列番号１１６)、又はそれと少なくとも８０％同一、好ましくはそれと８５％、９０％、９５％、若しくは９９％同一である配列を含む機能的バリアント;

c)

【化８３】

ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGGCGATTAAGACCTTGAGTACGTGCGTCTCT
GCACGTATGGCGATTAAGACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGGCGATTAAGACCT
TGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATG

(配列番号１２６)、又はそれと少なくとも８０％同一、任意選択でそれと８５％、９０％、９５％、若しくは９９％同一である配列を含む機能的バリアント;

d)

【化８４】

ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACG
TATGtgcgtACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCT
GCACGTATGtgcgtACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGC
GTCTCTGCACGTATG

(配列番号１３９)、又はそれと少なくとも８０％同一、任意選択でそれと８５％、９０％、９５％、若しくは９９％同一である配列を含む機能的バリアント;

e)

【化８５】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGACCTTGAGTACGTG
CGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGtgcgtACCTTGAGT
ACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGtgcgtACCT
TGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATG

(配列番号１２８)、又はそれと少なくとも８０％同一、任意選択でそれと８５％、９０％、９５％、若しくは９９％同一である配列を含む機能的バリアント;或いは
f)CTGCACGTACTGCACGTACTGCACGTACTGCACGTA(配列番号１１７)、又はそれと少なくとも８０％同一、好ましくはそれと８５％、９０％、９５％、若しくは９９％同一である配列を含む機能的バリアント
のうちの1つを含むか又はそれからなる、請求項８８に記載の合成ＨＲＥ。

【請求項９０】

最小プロモーターに作動可能にカップリングされている請求項８９に記載の少なくとも1つのＨＲＥを含む低酸素誘導性プロモーター。

【請求項９１】

以下の配列:

-

【化８６】

ACGTGCGATGATGCGTAGCTAGTAGTGATGATGCGTAGCTAGTAGTACGTGCGATG
ATGCGTAGCTAGTAGTGATGATGCGTAGCTAGTAGTACGTGCGATGATGCGTAGCT
AGTAGTGATGATGCGTAGCTAGTAGTACGTGCGATGATGCGTAGCTAGTAGTGATG
ATGCGTAGCTAGTAGTACGTGCTTGGTACCATCCGGGCCGGCCGCTTAAGCGACG
CCTATAAAAAATAGGTTGCATGCTAGGCCTAGCGCTGCCAGTCCATCTTCGCTAGC
CTGTGCTGCGTCAGTCCAGCGCTGCGCTGCGTAACGGCCGCC

(Synp-RTV-015、配列番号１２９)、又はそれと少なくとも８０％同一、任意選択でそれと８５％、９０％、９５％、若しくは９９％同一である配列を含む機能的バリアント;

-

【化８７】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGACCTTGAGTA
CGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGtgcg
tACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTG
CACGTATGtgcgtACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACG
TGCGTCTCTGCACGTATGTCTAGAGGGTATATAATGGGGGCCA

(Synp-HYPN;配列番号１４０)、又はそれと少なくとも８０％同一、任意選択でそれと８５％、９０％、９５％、若しくは９９％同一である配列を含む機能的バリアント;

-

【化８８】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGACCTTGAGTA
CGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGtgcg
tACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTG
CACGTATGtgcgtACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACG
TGCGTCTCTGCACGTATGGCGATTAATCCATATGCGTAGGCGTGTACGGTGGGAGG
TCTATATAAGCAGAGCT

(Synp-HYBNC;配列番号１４１)、又はそれと少なくとも８０％同一、任意選択でそれと８５％、９０％、９５％、若しくは９９％同一である配列を含む機能的バリアント;

-

【化８９】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGACCTTGAGTA
CGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGtgcg
tACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTG
CACGTATGtgcgtACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACG
TGCGTCTCTGCACGTATGCAACAAAATGTCGTAACAAGGGCGGTAGGCGTGTACGG
TGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCG

(Synp-HYBNC53;配列番号１４２)、又はそれと少なくとも８０％同一、任意選択でそれと８５％、９０％、９５％、若しくは９９％同一である配列を含む機能的バリアント;

-

【化９０】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGACCTTGAGTA
CGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGtgcg
tACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTG
CACGTATGtgcgtACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACG
TGCGTCTCTGCACGTATGTTCGCATATTAAGGTGACGCGTGTGGCCTCGAACACCG
AGCGACCCTGCAGCGACCCGCTTAA

(Synp-HYBNMinTK;配列番号１４３)、又はそれと少なくとも８０％同一、任意選択でそれと８５％、９０％、９５％、若しくは９９％同一である配列を含む機能的バリアント;

-

【化９１】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGACCTTGAGTA
CGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGtgcg
tACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTG
CACGTATGtgcgtACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACG
TGCGTCTCTGCACGTATGGGGGGGGCTATAAAAGGGGGTGGGGGCGTTCGTCCTCA
CTCT

(Synp-HYBNMLP;配列番号１４４)、又はそれと少なくとも８０％同一、任意選択でそれと８５％、９０％、９５％、若しくは９９％同一である配列を含む機能的バリアント;

【化９２】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGACCTTGAGTA
CGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGtgcg
tACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTG
CACGTATGtgcgtACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACG
TGCGTCTCTGCACGTATGTGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAA
CTCCGCCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATCGC
TGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTC
CAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTT

(Synp-HYBNSV;配列番号１４５)、又はそれと少なくとも８０％同一、任意選択でそれと８５％、９０％、９５％、若しくは９９％同一である配列を含む機能的バリアント;

【化９３】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGACCTTGAGTA
CGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGtgcg
tACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTG
CACGTATGtgcgtACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACG
TGCGTCTCTGCACGTATGCTGACAAATTCAGTATAAAAGCTTGGGGCTGGGGCCGA
GCACTGGGGACTTTGAGGGTGGCCAGGCCAGCGTAGGAGGCCAGCGTAGGATCC
TGCTGGGAGCGGGGAACTGAGGGAAGCGACGCCGAGAAAGCAGGCGTACCACGG
AGGGAGAGAAAAGCTCCGGAAGCCCAGCAGCG

(Synp-HYBNpJB42、配列番号１４６)、又はそれと少なくとも８０％同一、任意選択でそれと８５％、９０％、９５％、若しくは９９％同一である配列を含む機能的バリアント;

【化９４】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGACCTTGAGTA
CGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGtgcg
tACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTG
CACGTATGtgcgtACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACG
TGCGTCTCTGCACGTATGTATAAAAGGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGaagcttggacta
aagcggacttgtctcgag

(Synp-HYBNTATAm6a;配列番号１４７)、又はそれと少なくとも８０％同一、任意選択でそれと８５％、９０％、９５％、若しくは９９％同一である配列を含む機能的バリアント;又は

-

【化９５】

CTGCACGTACTGCACGTACTGCACGTACTGCACGTATGGGTACCGTCGACGATATC
GGATCCAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTAGATA
CGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGATCGCCACC

(Synp-HYP-001;配列番号１３０)、又はそれと少なくとも８０％同一、任意選択でそれと８５％、９０％、９５％、若しくは９９％同一である配列を含む機能的バリアント
のうちの1つを含むか又はそれからなる、請求項９０に記載の低酸素誘導性プロモーター。

【請求項９２】

治療用発現産物をコードする導入遺伝子に作動可能に連結した請求項８８若しくは８９に記載のＨＲＥ又は請求項９０若しくは９１に記載の低酸素誘導性プロモーターを含む遺伝子治療ベクター。

【請求項９３】

ＡＡＶベクター又はレンチウルスベクターである、請求項９２に記載の遺伝子治療ベクター。

【請求項９４】

請求項９２又は９３に記載の遺伝子治療ベクターを含む組換えビリオン。

【請求項９５】

請求項９２に記載の遺伝子治療ベクター又は請求項９４に記載のビリオンを含む医薬組成物。

【請求項９６】

請求項５１に記載の最小プロモーターに作動可能に連結した請求項８８～８９のいずれか一項に記載のＨＲＥを含む合成プロモーター。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、フォルスコリン誘導性シス調節エレメント、プロモーター、及びベクター、並びにそれらの使用方法に関する。また、本発明は、低酸素誘導性プロモーター及びベクター、特にバイオプロセスベクター、並びにそれらの使用方法に関する。

【背景技術】

【０００２】

以下の論述は、読者による本開示の理解を支援するために提供されており、先行技術の

内容又は関連性の承認を構成するものではない。

【０００３】

治療用タンパク質/ポリペプチド又は核酸は、製薬業界での使用が増加している。治療用タンパク質は、厳密に調節されたプロセスにおいて遺伝子改変生物により大量に生産される傾向がある。遺伝子改変は、細胞による組換え発現産物の発現を可能にするために実施される。他の形態の生物学的タンパク質(例えば、酵素、抗体、及び他の有用なタンパク質)が、同様のプロセスで生産される。

【０００４】

遺伝子改変は、一般に、プロモーターに作動可能に連結した、発現産物をコードするコード配列を含む、通常はベクターの形態である発現カセットを含むように細胞を改変することを含む。プロモーターは、構成的に活性であってもよく又は誘導性であってもよい。

【０００５】

誘導性プロモーターは、発現産物の産生が所望の時点で誘導されることを可能にし、これは多くの点で有用である。誘導性プロモーターを使用すると、発現産物の産生の誘導及び回収の前に細胞を特定の密度又は個数まで成長させることが可能になるため、細胞に対して毒性であるか又は細胞の成長を阻害することになる発現産物を産生することができる。また、誘導性プロモーターを使用すると、発現産物の収量、効力、又は安定性を増強する補因子を発現させることができる。誘導性プロモーターは有用であるため、好ましくは漏れが最小限である誘導性プロモーターには需要が存在する。

【０００６】

当技術分野で公知の誘導性プロモーターにとしては、ラムノースプロモーター(ＷＯ ２００６/０６１１７４Ａ２)等の糖誘導性プロモーター及びｐＧ１(ＷＯ ２０１３/０５０５５１Ａ１)等の炭素源枯渇誘導性プロモーターが挙げられる。こうしたプロモーターは、物質(ラムノース等)の包含、又はその時点まで培養中に存在していた物質(炭素源等)の除去を必要とする。

【０００７】

こうした手法には潜在的な欠点がある。大規模培養のためには、添加又は除去される物質が大量に必要とされる可能性があり、これには費用がかさむ可能性がある。加えて、例えば、ヒト消費に安全でない場合は、物質が最終医薬製品に存在することは望ましくない可能性があり、したがって物質の完全な除去を保証する必要があるだろう。また、こうした手法は、新たな物質を大規模培養物に均一に混合するか、培養物に既に存在する物質をある特定の閾値未満に枯渇させる必要があるため、時間がかかる可能性がある。次いで、この物質は、遺伝子発現に影響を及ぼすことができるように細胞内に取り込まれる必要があるか、又は遺伝子発現の抑制を解除することができるように細胞から枯渇される必要があるだろう。こうした欠点の一部又は全てを克服する誘導性プロモーターを提供することが望ましい。

【０００８】

同様に、遺伝子治療では、遺伝子の発現を駆動してタンパク質又は核酸発現産物を体内で産生させることが可能な調節核酸配列を提供することが望ましい。必要に応じて遺伝子発現を誘導することができるように、遺伝子発現の誘導系を提供するという要望も存在する。誘導性とは、治療用遺伝子発現産物の発現を、必要な時に誘導することができることを意味する。更に、誘導が用量依存性である場合、治療用遺伝子発現産物の発現レベルを、投与される誘導剤の量を調整することによりモジュレートすることができる。こうした特徴の一部又は全てを有する誘導性プロモーターを提供することが望ましい。

【０００９】

したがって、多くの状況において、特に遺伝子治療での治療用遺伝子発現及び/又はバイオプロセスでの治療用発現産物の生産において、遺伝子発現を制御するための誘導性調節配列が必要とされている。

【００１０】

誘導性プロモーターは、ｃＡＭＰＲＥ及び/又はＡＰ１ ＴＦＢＳを使用することにより、アデニル酸シクラーゼの活性化剤で誘導可能であってもよい。ＡＴＰ誘導体環状アデノシン一リ

ン酸(cAMP、環状AMP、又は3',5'-環状アデノシンーリン酸としても知られている)は、多くの生物学的プロセスに重要な二次メッセンジャーである。その主な機能は、多くの異なる生物の細胞内シグナル伝達におけるものである。cAMP依存性経路は、十分に研究されており、(Yanら、2016年)に概説されている。

【００１１】

環状AMPは、アデニリルシクラーゼ(アデニルシクラーゼ及びアデニル酸シクラーゼとしても広く知られており、ACと略される)の活性化により産生される。アデニリルシクラーゼの活性化は、タンパク質キナーゼAを介して、cAMPREと呼ばれ、配列TGACGTCA(配列番号1)を有する特定のTFBSに結合する転写因子CREBの活性化に結び付き、遺伝子発現をモジュレートするカスケードを駆動する。

【００１２】

アデニリルシクラーゼの活性化の別の間接的効果は、転写因子AP1のその後の活性化である。AP1は、多くの形態が存在するFos及びJunタンパク質の変化型で構成される二量体である。こうしたタンパク質は、多くのタンパク質キナーゼが関与する複雑な調節経路を有するが、cAMPレベルの上昇は、タンパク質c-Fosを安定化し、その転写を上方制御して、AP1の活性化に結び付くと考えられている。例えば、(Hessら、2004年)及び(Sharma & Richards、2000年)を参照されたい。AP1は、AP1部位と呼ばれ、コンセンサス配列TGA[GC]TCA(配列番号2)を有する特定のTFBSと結合して、遺伝子発現をモジュレートする。

【００１３】

本発明は、cAMPRE及び/又はAP1 TFBSを使用することにより、アデニル酸シクラーゼの活性化剤で誘導可能な新規合成CREを提供する。

【００１４】

誘導性プロモーターは、低酸素により誘導することができる。低酸素条件に対する細胞応答は、全ての真核生物にわたって保存されている。低酸素ストレスに対する応答は、HIF1及びHIF2を含む低酸素誘導性因子(HIF)として一般に知られている転写因子により媒介される。こうした因子は、細胞内の酸素濃度の低減に感受性である。酸素感受性は、正常酸素ではHIF1、HIF1αの2つのサブユニットの一方が分解され、低酸素中では安定であることにより達成される。低酸素では、HIF1αの安定化は、HIF1α及びHIF1βの二量体化をもたらし、それによりHIF1複合体は遺伝子の転写を上方制御して、このストレスを軽減することができる。

【００１５】

遺伝子発現をモジュレートするために、HIF1は、HIF結合部位(HBS)を有する低酸素応答エレメント(HRE)に結合する。HIF結合部位は、コンセンサス配列、NCGTG(配列番号5)を有する傾向がある(Schodelら、2011年)。低酸素応答エレメントを使用して、低酸素条件では目的の産物の発現を駆動するが正常酸素では駆動しない合成低酸素応答プロモーターを作出することができる。低酸素誘導性プロモーターは、遺伝子治療において、特にがんにおいて探究されている(Javan & Shanbazi, 2017)。

【００１６】

本発明は、バイオプロセス応用に現行で使用されている誘導性プロモーターに関連付けられる欠点を克服する合成低酸素誘導性バイオプロセスプロモーターを提供する。

【００１７】

誘導剤の要件は、遺伝子治療とバイオプロセスとで幾らか異なる。遺伝子治療では、誘導剤がヒトに安全及び無毒性であり、様々な組織に浸透することできることが最も重要である。バイオプロセスでは、誘導剤は、細胞培養への分散に好適でなければならず、最終製品中に存在することが望ましくない場合は、好ましくは、洗い流すか又は別様に除去することが容易でなければならない。本発明の目的は、遺伝子治療に好適な誘導剤及びバイオプロセスに好適な誘導剤の両方により活性化することができる、AC活性化又は低酸素により誘導可能な合成プロモーターを提供することである。

【先行技術文献】

【特許文献】
【００１８】
【特許文献１】ＷＯ ２００６/０６１１７４Ａ２
【特許文献２】ＷＯ ２０１３/０５０５５１Ａ１
【特許文献３】米国特許出願公開第２０１３/０２８０７９７号
【特許文献４】米国特許出願公開第２０１２/００７７４２９号
【特許文献５】米国特許出願公開第２０１１/０２８０７９７号
【特許文献６】米国特許出願公開第２００９/０３０５６２６号
【特許文献７】米国特許第８,２９８,０５４号
【特許文献８】米国特許第７,６２９,１６７号
【特許文献９】米国特許第５,６５６,４９１号
【特許文献１０】特許第４,６８３,１９５号
【非特許文献】
【００１９】
【非特許文献１】「Therapeutic potentials of short interfering RNAs」、Appl Microbiol Biotechnol、DOI 10.1007/s00253-017-8433-z
【非特許文献２】「MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases」、Nature Reviews Drug Discovery; 16、２０３～２２２頁(２０１７年)
【非特許文献３】Urlaubら、Cell ３３巻(２号)、４０５～４１２頁、１９８３年
【非特許文献４】Stanley P.ら、Ann. Rev. Genetics １８巻、５２５～５５２頁、１９８４年
【非特許文献５】Fallaux, F.J.ら、Human Gene Therapy ９巻(１３号)、１９０９～１９１７頁、１９９
【非特許文献６】Current Protocols in Molecular Biology(Ausubel、２０００年、Wiley and son Inc社、国会図書館、米国)
【非特許文献７】Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第三版(Sambrookら、２００１年、コールドスプリングハーバー、ニューヨーク:Cold Spring Harbor Laboratory Press社)
【非特許文献８】Oligonucleotide Synthesis(M. J. Gait編、１９８４年)
【非特許文献９】Nucleic Acid Hybridization(Harries及びHiggins編、１９８４年)
【非特許文献１０】Transcription and Translation(Hames and Higgins編、１９８４年)
【非特許文献１１】Culture of Animal Cells(Freshney、Alan R. Liss, Inc.社、１９８７年)
【非特許文献１２】Immobilized Cells and Enzymes(IRL Press社、１９８６年)
【非特許文献１３】Perbal、A Practical Guide to Molecular Cloning(１９８４年)
【非特許文献１４】Methods in Enzymologyシリーズ(主編集者Abelson及びSimon、Academic Press, Inc.社、ニューヨーク)、特に１５４巻及び１５５巻(Wuら編)並びに１８５巻、「Gene Expression Technology」(Goeddel編)
【非特許文献１５】Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells(Miller及びCalos編、１９８７年、Cold Spring Harbor Laboratory社)
【非特許文献１６】Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology(Mayer及びWalker編、Academic Press社、ロンドン、１９８７年)
【非特許文献１７】Handbook of Experimental Immunology、I～IV巻(Weir及びBlackwell編、１９８６年)
【非特許文献１８】Manipulating the Mouse Embryo(Cold Spring Harbor Laboratory Press社、コールドスプリングハーバー、ニューヨーク州、１９８６年)
【非特許文献１９】Hellman及びFried, Nat Protoc.、２００７年;２巻(８号):１８４９～１８６１頁
【非特許文献２０】Wenger RH、Stiehl DP、Camenish G.、Integration of oxy

gen signalling at the consensus HRE. Sci STKE 2005年;306巻:re12.[PubMed:16234508]
【非特許文献２１】Stanbridgeら、Rational design of minimal hypoxia-inducible enhancers Biochem Biophys Res Commun. 2008年6月13日;370巻(4号):613～618頁
【非特許文献２２】Ebert BL、Bunn HF. Regulation of transcription by hypoxia requires a multiprotein complex that includes hypoxia-inducible factor 1, an adjacent transcription factor, and p300/CREB binding protein. Mol Cell Biol 1998年;18巻:4089～4096頁
【非特許文献２３】Tatusova及びMadden 1999年(FEMS Microbiol Lett 174巻:247～250頁)
【非特許文献２４】Altschulら、1990年(J Mol Biol 215巻:403～10頁)
【非特許文献２５】Smith及びWaterman(1981年)Adv. Appl. Math. 2巻:482頁
【非特許文献２６】Needleman及びWunsch(1970年)J. Mol. Biol. 48巻:443頁
【非特許文献２７】Pearson及びLipman(1988年)Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85巻:2444頁
【非特許文献２８】Higgins及びSharp(1988年)Gene 73巻:237～44頁
【非特許文献２９】Higgins及びSharp(1989年)CABIOS 5巻:151～3頁
【非特許文献３０】Corpetら(1988年)Nucleic Acids Res. 16巻:10881～90頁
【非特許文献３１】Huangら(1992年)Comp. Appl. Biosci. 8巻:155～65頁
【非特許文献３２】Pearsonら(1994年)Methods Mol. Biol. 24巻:307～31頁
【非特許文献３３】Tatianaら(1999)FEMS Microbiol. Lett. 174巻:247～50頁
【非特許文献３４】Frommら(1986年)Nature 319巻:791～3頁
【非特許文献３５】Feignerら(1987年)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84巻:7413～7頁
【非特許文献３６】Muellerら(1978年)Cell 15巻:579～85頁
【非特許文献３７】Fraleyら(1983年)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80巻:4803～7頁
【非特許文献３８】Kleinら(1987年)Nature 327巻:70頁
【非特許文献３９】Yanら、MOLECULAR MEDICINE REPORTS 13巻:3715～3723頁、2016年
【非特許文献４０】Hessら、Journal of Cell Science 117巻、5965～5973頁
【非特許文献４１】Sharma及びRichards、J. Biol. Chem. 2000巻、275巻:33718～33728頁
【非特許文献４２】Schodelら、2011年、Blood. 2011年6月9日;117巻(23号):e207～17頁
【非特許文献４３】Kaluzら、2008年、Biochem Biophys Res Commun. 2008年6月13日;370巻(4号):613～8頁
【非特許文献４４】Edeら、2016年、ACS Synth. Biol.、2016年、5巻(5号)、395～404頁

【発明の概要】
【課題を解決するための手段】
【００２０】
本発明の第1の態様によると、CREB及び/又はAP1に結合することが可能な合成フォルスコリン誘導性シス調節エレメント(CRE)が提供される。
【００２１】
CREはフォルスコリン誘導性と呼ばれるが、下記でより詳細に論じられているように、他の作用剤によっても誘導することができる。フォルスコリンによる誘導の機序は、アデニリルシクラーゼの活性化、及びその結果としての細胞内cAMPの増加によるものである。したがって、CREは、アデニリルシクラーゼの他の活性化剤又は細胞内cAMPを増加させる因子によっても誘導可能である。

【００２２】
好ましくは、CREは、CREB及び/又はAP1に対する少なくとも2つ、より好ましくは少なくとも3つの転写因子結合部位(TFBS)を含む(本明細書で使用される場合、「Xに対するTFBS」という用語は、転写因子Xに結合することが可能なTFBSを意味する)。
【００２３】
好ましくは、CREは、CREB及び/又はAP1に対する少なくとも4つのTFBSを含む。好適には、CREは、CREB及び/又はAP1に対する、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、又は15個のTFBSを含む。
【００２４】
CREB及び/又はAP1に対するTFBSの個数に特定の上限はないが、一般に、CREは、CREB及び/又はAP1に対する、15個若しくはそれよりも少ないTFBS、任意選択でCREB及び/又はAP1に対する、10個若しくはそれよりも少ないTFBSを含むことが好ましい。
【００２５】
一部の実施形態では、CREは、CREB及びAP1の各々に対する、少なくとも1つのTFBSを含む。一部の実施形態では、CREは、CREB及びAP1の各々に対する、少なくとも2、3、4、5、6、又は7つのTFBSを含む。
【００２６】
CREBに対するTFBSは、典型的には、高度に保存されたコンセンサス配列TGACGTCA(配列番号1)を含むか又はそれからなる。この配列は、cAMP応答エレメント(又はcAMPRE若しくはCRE；シス調節エレメントとの混同を避けるために、本明細書では略語cAMPREが使用されることになる)として知られている。
【００２７】
AP1に対するTFBSは、典型的には、コンセンサス配列TGA[GC]TCA(配列番号2)を含むか又はそれからなる。本発明の特定の例では、配列TGAGTCA(AP1(1)と称する。配列番号3)、TGACTCAG(AP1(2)と称する。配列番号4)、及びTGACTCA(AP1(3)と称する。配列番号43)が使用された。したがって、AP1(1)、AP1(3)、及びAP1(2)は、AP1に対する好ましいTFBSであるとみなすことができる。TFBSに関するAP1という一般用語は、上記コンセンサス配列を含むTFBSを指し、AP1(1)、AP1(3)、及びAP1(2)を包含する。
【００２８】
本発明の一部の好ましい実施形態では、CREは、CREB及び/又はAP1以外の転写因子に対する少なくとも1つのTFBSを含む。本発明の一部の好ましい実施形態では、CREは、ATF6及び/又は低酸素誘導性因子(HIF)に対する少なくとも1つのTFBSを含む。CREは、CREB及び/又はAP1以外の転写因子に対する、例えばATF6及び/又はHIFに対する、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10個のTFBSを含んでいてもよい。本発明の一部の実施形態では、CREは、ATF6及びHIFの各々に対する少なくとも1つのTFBS、例えば、ATF6及びHIFの各々に対する3つ又は5つのTFBSを含む。
【００２９】
HIFに対するTFBSは、コンセンサス配列NCGTG(配列番号5)、より好ましくは[AG]CGTG(配列番号6)を含むか又はそれからなる。この配列は、HIF結合配列(HBS)と呼ばれる。本発明の特定の例では、HBS配列CTGCACGTA(HRE1と称する。配列番号7)が使用された。したがって、HRE1は、HIFに対する好ましいTFBSであるとみなすことができる。しかしながら、HIFに対する他のTFBSが公知であり、例えば、ACGTGC(配列番号8)又は
【化１】

ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATG

(配列番号9)を本発明で使用することができる。

【００３０】
ＡＴＦ６に対するＴＦＢＳは、コンセンサス配列ＴＧＡＣＧＴ(配列番号１０)、より好ましくはＴＧＡＣＧＴＧ(配列番号１１)を含むか又はそれからなる。本発明の特定の例では、ＴＦＢＳ配列ＴＧＡＣＧＴＧＣＴ(配列番号１２)が使用された。これは、ＡＴＦ６に対する好ましいＴＦＢＳとみなすことができる。しかしながら、一般に、コンセンサス配列ＴＧＡＣＧＴ(配列番号１０)、より好ましくはＴＧＡＣＧＴＧ(配列番号１１)を含む任意の配列を使用することができる。
【００３１】
上記で論じられているＴＦＢＳの各々は、いずれの方向性で存在してもよい(つまり、ＴＦＢＳは、二本鎖ＤＮＡのいずれの鎖に存在しても機能することができる)。したがって、ＴＦＢＳはいずれも、一方の鎖にある逆相補性コンセンサス配列により表すことができ、この場合、ＴＦＢＳ配列は対応する相補鎖に存在することが示されることは明らかであろう(そのような場合、ＴＦＢＳは、「逆方向」又は「反対方向」であると記述することができる)。一般に、ＴＦＢＳへの言及は、名称によるものであるか又はＴＦＢＳの配列の記載によるものであるかに関わらず、ＴＦＢＳがいずれかの方向性で存在することを指すとみなされるべきである。ＴＦＢＳの配列が記載されている場合、示されている方向性は、具体的に開示されており、典型的には好ましい実施形態を表すことが理解されるべきである。
【００３２】
本発明の一部の実施形態では、ＣＲＥは、
- ＣＲＥＢに対する５つのＴＦＢＳ及びＡＰ１に対する３つのＴＦＢＳ;
- ＣＲＥＢに対する５つのＴＦＢＳ及びＡＰ１に対する４つのＴＦＢＳ；
- ＡＰ１に対する８つのＴＦＢＳ;
- ＡＴＦ６に対する３つのＴＦＢＳ、ＡＰ１に対する４つのＴＦＢＳ、及びＨＩＦに対する３つのＴＦＢＳ;
- ＣＲＥＢに対する７つのＴＦＢＳ及びＡＰ１に対する６つのＴＦＢＳ；又は
- ＡＴＦ６に対する５つのＴＦＢＳ、ＡＰ１に対する６つのＴＦＢＳ、及びＨＩＦに対する６つのＴＦＢＳを含み、隣接するＴＦＢＳは、任意選択で、しかしながら好ましくは、スペーサー配列により隔てられている。
【００３３】
スペーサー配列は、任意の好適な長さであってもよい。典型的には、スペーサーは、２～１００ヌクレオチド長、５～５０ヌクレオチド長、６～４０ヌクレオチド長、７～３０ヌクレオチド長、８～２５ヌクレオチド長、又は１０～２０ヌクレオチド長である。本発明の一部の特定の実施形態では、５、１０、２０、及び５０ヌクレオチド長のスペーサーが使用されており、これらは良好に機能するが、他の長さのスペーサーを使用してもよい。一部の実施形態では、スペーサーは、５ヌクレオチド長の倍数であることが好ましい。当業者であれば、スペーサーの好適な長さを容易に決定することができる。
【００３４】
スペーサーの配列及び長さは様々であってもよいこと；換言すると、配列内の各スペーサーは、任意の他のスペーサーと同じ配列又は長さを有する必要はないことが留意されるべきである。便宜上、ＣＲＥにおけるＴＦＢＳ間のスペーサーの一部又は全ては、同じ配列及び長さを有することが多いが、これは、好ましい場合があるとは言え、必要ではない。
【００３５】
ＴＦＢＳは、好適には任意の順序であってもよいが、好ましい実施形態では、ＴＦＢＳは、記載されている順序で提供される。つまり、上記のリストの最初の実施形態では、上流から下流方向に、ｃＡＭＰＲＥに対する４つのＴＦＢＳが存在し、次いでＡＰ１に対する３つのＴＦＢＳが存在する。
【００３６】
本発明の一部の実施形態では、ＣＲＥは、
- ＣＲＥＢに対する５つのＴＦＢＳ及びＡＰ１に対する３つのＴＦＢＳ;
- ＣＲＥＢに対する５つのＴＦＢＳ及びＡＰ１に対する４つのＴＦＢＳ;
- ＡＰ１に対する８つのＴＦＢＳ;

- ATF6に対する3つのTFBS、AP1に対する4つのTFBS、及びHIFに対する3つのTFBS;
- CREBに対する7つのTFBS及びAP1に対する6つのTFBS；又は
- ATF6に対する5つのTFBS、AP1に対する6つのTFBS、及びHIFに対する6つのTFBSからなり、隣接するTFBSは、任意選択で、しかしながら好ましくは、スペーサー配列により隔てられている。スペーサーの好適な長さは、上記で論じられている。

【００３７】

この場合も、TFBSは、好適には任意の順序であってもよいが、好ましい実施形態では、TFBSは、記載されている順序で提供される。

【００３８】

本発明の一部の実施形態では、CREは、以下の構造:

- cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-AP1-S-AP1-S-AP1(5×cAMPRE及び3×AP1 TFBSを含むCRE);
- cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-AP1(2)-S-AP1(2)-S-AP1(2)(5×cAMPRE及び3×AP1(2) TFBSを含むCRE);
- cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-AP1(5×cAMPRE及び4×AP1 TFBSを含むCRE);
- cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-AP1(2)-S-AP1(2)-S-AP1(2)-S-AP1(2)(5×cAMPRE及び4×AP1(2) TFBSを含むCRE);
- AP1-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-AP1(8×AP1 TFBSを含むCRE);
- AP1(1)-S-AP1(1)-S-AP1(1)-S-AP1(1)-S-AP1(1)-S-AP1(1)-S-AP1(1)-S-AP1(1)(8×AP1(1) TFBSを含むCRE);
- ATF6-S-ATF6-S-ATF6-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-HIF-S-HIF-S-HIF(3×ATF6、4×AP1、及び3×HIF TFBSを含むCRE);
- ATF6-S-ATF6-S-ATF6-S-AP1(1)-S-AP1(1)-S-AP1(1)-S-AP1(1)-S-HRE1-S-HRE1-S-HRE1-S-HRE1(3×ATF6、4×AP1(1)及び3×HRE1 TFBSを含むCRE);
- cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-AP1(5×cAMPRE 4×AP1 TFBSを含むCRE);
- cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-AP1(1)-S-AP1(1)-S-AP1(1)-S-AP1(1)(5×cAMPRE 4×AP1(1) TFBSを含むCRE);
- cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-AP1(3)-S-AP1(3)-S-AP1(3)-S-AP1(3)-S-AP1(3)-S-AP1(3)(7×cAMPRE及び6×AP1(3)を含むCRE);及び

ATF6-S-ATF6-S-ATF6-S-ATF6-S-ATF6-S-AP1(1)-S-AP1(1)-S-AP1(1)-S-AP1(1)-S-AP1(1)-S-AP1(1)-S-HRE1-S-HRE1-S-HRE1-S-HRE1-S-HRE1-S-HRE1(5×ATF6、6×AP1(1)及び6×HRE1を含むCRE)のうちの１つを含み、ここで、Sは、任意選択だが好ましいスペーサー配列である。スペーサーの好適な長さは、上記で論じられている。

【００３９】

こうした構造では、TFへの参照は、そのTFに対するTFBSの存在を表す。cAMPREは、CREBに対するTFBSを参照するために使用される。HREは、HIFに対するTFBSを参照するために使用される。

【００４０】

本発明の一部の特定の実施形態では、CREは、以下の構造:

- cAMPRE-S_{10}-cAMPRE-S_{10}-cAMPRE-S_{10}-cAMPRE-S_{10}-cAMPRE-S_{10}-AP1-S_{10}-AP1-S_{10}-AP1(5×cAMPRE及び3×AP1 TFBSを含むCRE);
- cAMPRE-S_{10}-cAMPRE-S_{10}-cAMPRE-S_{10}-cAMPRE-S_{10}-cAMPRE-S_{10}-AP1(2)-S_{10}-AP1(2)-S_{10}-AP1(2)(5×cAMPRE及び3×AP1(2) TFBSを含むCRE);
- cAMPRE-S_{10}-cAMPRE-S_{10}-cAMPRE-S_{10}-cAMPRE-S_{10}-cAMPRE-S_{10}-AP1-

S_{10}-AP1-S_{10}-AP1-S_{10}-AP1(５×cAMPRE及び４×AP1 TFBSを含むCRE);
- cAMPRE-S_{10}-cAMPRE-S_{10}-cAMPRE-S_{10}-cAMPRE-S_{10}-cAMPRE-S_{10}-AP1(2)-S_{10}-AP1(2)-S_{10}-AP1(2)-S_{10}-AP1(2)(５×cAMPRE及び４×AP1(2) TFBSを含むCRE);
- AP1-S_{20}-AP1-S_{20}-AP1-S_{20}-AP1-S_{20}-AP1-S_{20}-AP1-S_{20}-AP1-S_{20}-AP1(８×AP1 TFBSを含むCRE);
- AP1(1)-S_{20}-AP1(1)-S_{20}-AP1(1)-S_{20}-AP1(1)-S_{20}-AP1(1)-S_{20}-AP1(1)-S_{20}-AP1(1)-S_{20}-AP1(1)(８×AP1(1) TFBSを含むCRE);
- ATF6-S_{20}-ATF6-S_{20}-ATF6-S_{20}-AP1-S_{20}-AP1-S_{20}-AP1-S_{20}-AP1-S_{20}-HIF-S_{20}-HIF-S_{20}-HIF(３×ATF6、４×AP1及び３×HIF TFBSを含むCRE);及び
- ATF6-S_{20}-ATF6-S_{20}-ATF6-S_{20}-AP1(1)-S_{20}-AP1(1)-S_{20}-AP1(1)-S_{20}-AP1(1)-S_{20}-HRE1-S_{20}-HRE1-S_{20}-HRE1(３×ATF6、４×AP1(1)及び３×HRE1 TFBSを含むCRE);
- cAMPRE-S_{10}-cAMPRE-S_{10}-cAMPRE-S_{10}-cAMPRE-S_{10}-cAMPRE-S_{10}-AP1-S_{10}-AP1-S_{10}-AP1-S_{10}-AP1(５×cAMPRE ４×AP1 TFBSを含むCRE);及び
- cAMPRE-S_{10}-cAMPRE-S_{10}-cAMPRE-S_{10}-cAMPRE-S_{10}-cAMPRE-S_{10}-AP1(1)-S_{10}-AP1(1)-S_{10}-AP1(1)-S_{10}-AP1(1)(５×cAMPRE ４×AP1(1) TFBSを含むCRE);
- cAMPRE-S_5-cAMPRE-S_5-cAMPRE-S_5-cAMPRE-S_5-cAMPRE-S_5-cAMPRE-S_5-cAMPRE-S_5-AP1(3)-S_5-AP1(3)-S_5-AP1(3)-S_5-AP1(3)-S_5-AP1(3)-S_5-AP1(3)(７×cAMPRE及び６×AP1(3)を含むCRE);及び
ATF6-S_{10}-ATF6-S_{10}-ATF6-S_{10}-ATF6-S_{10}-ATF6-S_{10}-AP1(1)-S_{10}-AP1(1)-S_{10}-AP1(1)-S_{10}-AP1(1)-S_{10}-AP1(1)-S_{10}-AP1(1)-S_{10}-HRE1-S_{10}-HRE1-S_{10}-HRE1-S_{10}-HRE1-S_{10}-HRE1-S_{10}-HRE1(５×ATF6、６×AP1(1)及び６×HRE1を含むCRE)のうちの１つを含み、ここで、S_Xは、Xヌクレオチド長のスペーサー配列を表す。

【００４１】

上記で指定されているスペーサーの長さは、下記に論じられている特定の例において有効であることが見出されている。他の長さのスペーサーも機能することが予想されるが、それらも好ましいスペーサー長である。これは、下記に示されているように、こうしたTFBSを含む本発明の全ての態様及び実施形態に該当する。

【００４２】

本発明の一部の特定の実施形態では、CREは、以下の配列:
-

【化２】

TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGA[GC]TCA-S-TGA[GC]TCA-S-TGA[GC]TCA

(配列番号１３、５×cAMPRE及び３×AP1 TFBSを含むCRE);
-

【化３】

TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGA[GC]TCA-S-TGA[GC]TCA-S-TGA[GC]TCA-S-TGA[GC]TCA

(配列番号１４、５×cAMPRE及び４×AP1 TFBSを含むCRE);
-

【化４】

TGA[GC]TCA-S-TGA[GC]TCA-S-TGA[GC]TCA-S-TGA[GC]TCA-S-TGA[GC]TCA-S-TGA[GC]TCA-S-TGA[GC]TCA-S-TGA[GC]TCA

(配列番号15、8×AP1 TFBSを含むCRE);

-

【化５】

TGACGT-S-TGACGT-S-TGACGT-S-TGA[GC]TCA-S-TGA[GC]TCA-S-TGA[GC]TCA-S-TGA[GC]TCA-S-[AG]CGTG-S-[AG]CGTG-S-[AG]CGTG

(配列番号16、3×ATF6、4×AP1及び3×HIF TFBSを含むCRE);

-

【化６】

TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S- - TGACGTCA-S-TGACGTCA-S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S-TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA

(配列番号44、7×cAMPRE及び6×AP1を含むCRE);及び

【化７】

TGACGT-S- TGACGT-S- TGACGT-S- TGACGT-S- TGACGT-S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- [AG]CGTG -S- [AG]CGTG -S- [AG]CGTG -S- [AG]CGTG -S- [AG]CGTG -S- [AG]CGTG

(配列番号45、5×ATF6、6×AP1及び6×HIF TFBSを含むCRE)のうちの１つを含み、ここで、Sは、任意選択だが好ましいスペーサー配列を表す。スペーサーの好適な長さは、上記で論じられている。

【００４３】

本発明の一部の特定の実施形態では、CREは、以下の配列:

-

【化８】

TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACTCAG-S-TGACTCAG-S-TGACTCAG

(配列番号18、5×cAMPRE及び3×AP1(2)TFBSを含むSynp-FORCSV-10由来のCRE);

-

【化９】

TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACTCAG-S-TGACTCAG-S-TGACTCAG-S-TGACTCAG

(配列番号19、5×cAMPRE及び4×AP1(2)TFBSを含むSynp-FORCMV-09由来のCRE);

-

【化１０】

TGAGTCA-S-TGAGTCA-S-TGAGTCA-S-TGAGTCA-S-TGAGTCA-S-TGAGTCA-S-TGAGTCA-S-TGAGTCA

(配列番号20、8×AP1(1)TFBSを含むSynp-FMP-02、及びSynp-FLP-01由来のCRE);

-

【化１１】

TGACGTGCT-S-TGACGTGCT-S-TGACGTGCT-S-TGAGTCA-S-TGAGTCA-S-TGAGTCA-S-TGAGTCA-S-CTGCACGTA-S-CTGCACGTA-S-CTGCACGTA

(配列番号21、3×ATF6、4×AP1(1)及び3×HRE1 TFBSを含むCRE);

-

【化１２】

TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACTCA-S-TGACTCA-S-TGACTCA-S-TGACTCA

(配列番号22、5×cAMPRE及び4×AP1(1)TFBSを含むCRE);

-

【化１３】

TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S- TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACTCA-S- TGACTCA-S- TGACTCA-S- TGACTCA-S- TGACTCA-S-TGACTCA

(配列番号58、7×cAMPRE及び6×AP1(3)を含む、FORNEW、FORNCMV、FORNCMV53、FORNMinTK、FORNMLP、FORNSV40、FORNpJB42、FORNTATAm6A由来のCRE);及び

【化１４】

TGACGTGCT-S- TGACGTGCT-S- TGACGTGCT-S- TGACGTGCT-S- TGACGTGCT-S-
TGAGTCA-S- TGAGTCA-S- TGAGTCA-S- TGAGTCA-S- TGAGTCA-S- TGAGTCA-S-
CTGCACGTA-S- CTGCACGTA-S- CTGCACGTA-S- CTGCACGTA-S- CTGCACGTA-S-
CTGCACGTA

(配列番号５９、５×ＡＴＦ６、６×ＡＰ１(１)及び６×ＨＲＥ１を含む、ＲＴＶ２０、ＲＴＶ２０ＹＢ、ＲＴＶ２０Ｃ５３、ＲＴＶ２０ＭｉｎＴＫ、ＲＴＶ２０ＭＬＰ、ＲＴＶ２０ｐＪＢ４２、ＲＴＶ２０ＴＡＴＡｍ６ａ由来のＣＲＥ)のうちの１つを含み、ここで、Ｓは、任意選択だが好ましいスペーサー配列を表す。スペーサーの好適な長さは、上記で論じられている。

【００４４】

本発明の一部の特定の実施形態では、ＣＲＥは、以下の配列:

-

【化１５】

TGACGTCACGATTACCATTGACGTCACGATTACCATTGACGTCACGATTACCATTGACGTCAC
GATTACCATTGACGTCAGCGATTAAGATGACTCAGCGATTAAGATGACTCAGCGATTAAGAT
GACTCAG

(配列番号２３、５×ｃＡＭＰＲＥ及び３×ＡＰ１(２)ＴＦＢＳを含むＳｙｎｐ-ＦＯＲＣＳＶ-１０由来のＣＲＥ)；

-

【化１６】

TGACGTCACGATTACCATTGACGTCACGATTACCATTGACGTCACGATTACCATTGACGTCAC
GATTACCATTGACGTCAGCGATTAAGATGACTCAGCGATTAAGATGACTCAGCGATTAAGAT
GACTCAGCGATTAAGATGACTCAG

(配列番号２４、５×ｃＡＭＰＲＥ及び４×ＡＰ１(２)ＴＦＢＳを含むＳｙｎｐ-ＦＯＲＣＭＶ-０９由来のＣＲＥ)；

-

【化１７】

TGAGTCAGATGATGCGTAGCTAGTAGTTGAGTCAGATGATGCGTAGCTAGTAGTTGAGTCAG
ATGATGCGTAGCTAGTAGTTGAGTCAGATGATGCGTAGCTAGTAGTTGAGTCAGATGATGCG
TAGCTAGTAGTTGAGTCAGATGATGCGTAGCTAGTAGTTGAGTCAGATGATGCGTAGCTAGT
AGTTGAGTCA

(配列番号２５、８×ＡＰ１(１)ＴＦＢＳを含むＳｙｎｐ-ＦＭＰ-０２及びＳｙｎｐ-ＦＬＰ-０１由来のＣＲＥ);

-

【化１８】

TGACGTGCTGATGATGCGTAGCTAGTAGTTGACGTGCTGATGATGCGTAGCTAGTAGTTGAC
GTGCTGATGATGCGTAGCTAGTAGTTGAGTCAGATGATGCGTAGCTAGTAGTTGAGTCAGAT
GATGCGTAGCTAGTAGTTGAGTCAGATGATGCGTAGCTAGTAGTTGAGTCAGATGATGCGTA
GCTAGTAGTCTGCACGTAGATGATGCGTAGCTAGTAGTCTGCACGTAGATGATGCGTAGCTA
GTAGTCTGCACGTA

(配列番号２６、３×ＡＴＦ６、４×ＡＰ１(１)及び３×ＨＲＥ１ ＴＦＢＳを含むＣＲＥ);

【化１９】

TGACGTCACGATTACCATTGACGTCACGATTACCATTGACGTCACGATTACCATTGACGTCAC
GATTACCATTGACGTCAGCGATTAAGATGACTCAGCGATTAAGATGACTCAGCGATTAAGAT
GACTCAGCGATTAAGATGACTCA

(配列番号２７、５×ｃＡＭＰＲＥ及び４×ＡＰ１(１)ＴＦＢＳを含むＣＲＥ);

【化２０】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGCCATTGACGTCACGA
TTTGACGTCAACCATTGACGTCACGATTTGACGTCAACCATTGACGTCACGATTTGACGTCAC
GATTTGACGTCAACCATTGACTCACGATTTGACTCAACCATTGACTCACGATTTGACTCAACC
ATTGACTCACGATTTGACTCACGATT

(配列番号６０、７×ｃＡＭＰＲＥ及び６×ＡＰ１(３)を含む、ＦＯＲＮＥＷ、ＦＯＲＮＣＭＶ、ＦＯＲＮＣＭＶ５３、ＦＯＲＮＭｉｎＴＫ、ＦＯＲＮＭＬＰ、ＦＯＲＮＳＶ４０、ＦＯＲＮｐＪＢ４２、ＦＯＲＮＴＡＴＡｍ６ａ由来のＣＲＥ);及び

【化２１】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGTGACGTGCTgataatgcgt
TGACGTGCTtgcgtgataaTGACGTGCTgataatgcgtTGACGTGCTtgcgtgataaTGACGTGCTagctagta
gtTGAGTCAgataatgcgtTGAGTCAtgcgtgataaTGAGTCAgataatgcgtTGAGTCAtgcgtgataaTGAGTC
AgataatgcgtTGAGTCAagctagtagtCTGCACGTAgataatgcgtCTGCACGTAtgcgtgataaCTGCACGTA
gataatgcgtCTGCACGTAtgcgtgataaCTGCACGTAgataatgcgtCTGCACGTAagctagtagttgatctga

(配列番号６１、５×ＡＴＦ６、６×ＡＰ１(１)及び６×ＨＲＥ１を含む、ＲＴＶ２０、ＲＴＶ２０ＹＢ、ＲＴＶ２０Ｃ５３、ＲＴＶ２０ＭｉｎＴＫ、ＲＴＶ２０ＭＬＰ、ＲＴＶ２０ｐＪＢ４２、ＲＴＶ２０ＴＡＴＡｍ６ａ由来のＣＲＥ)、又は、それらと少なくとも８０％同一、好ましくはそれらと８５％、９０％、９５％、

若しくは99%同一である配列を含む、前記配列のいずれかの機能的バリアントのうちの１つを含む。

【００４５】

典型的には、そのような機能的バリアントでは、存在するTFBS配列は参照配列と同一であり、実質的に全ての変異が、それらの間にあるスペーサー配列に生じていることが好ましい。

【００４６】

上述のCREは、誘導性プロモーターにために最小プロモーターと組み合わせると、良好なレベルの誘導性及び誘導時の強力な発現並びに低レベルのバックグラウンド発現を提供することが示された。したがって、上述のCREは全て、フォルスコリン誘導性プロモーターの提供に有用である。CREは、誘導性及び誘導時の発現レベルに関してある程度の変動性を示し、そのため、所望の特性を有するプロモーターを選択することが可能になる。

【００４７】

以下の構造cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-AP1を有するCRE(並びに配列番号14、17、19、22、27、及び34により例示されるもの)は、最小プロモーターにカップリングすると、誘導性及び発現に関して優れた特性を提供することが示された。したがって、そのようなCREは、本発明の特に好ましい実施形態を表す。

【００４８】

以下の構造cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-AP1を有するCRE(並びに配列番号44、58、及び60により例示されるもの)は、最小プロモーターにカップリングすると、誘導性及び発現に関して優れた特性を提供することが示された。したがって、そのようなCREは、本発明の特に好ましい実施形態を表す。

【００４９】

以下の構造ATF6-S-ATF6-S-ATF6-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-HIF-S-HIF-S-HIFを有するCRE(並びに配列番号16、21、及び26により例示されるもの)は、最小プロモーターにカップリングすると、誘導性及び発現に関して特に優れた特性を提供することが示された。したがって、そのようなCREは、本発明の特に好ましい実施形態を表す。

【００５０】

以下の構造ATF6-S-ATF6-S-ATF6-S-ATF6-S-ATF6-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-HIF-S-HIF-S-HIF-S-HIF-S-HIF-S-HIFを有するCRE(並びに配列番号45、59、及び61により例示されるもの)は、最小プロモーターにカップリングすると、誘導性及び発現に関して特に優れた特性を提供することが示された。したがって、そのようなCREは、本発明の特に好ましい実施形態を表す。

【００５１】

このようなCREは、フォルスコリンにより誘導されることが知られていないか又は予想されていない幾つかのTFBSを含み、誘導性がより低く強力ではない一部の他のCREよりも少数の、フォルスコリンにより誘導されるTFBSを含むことを考慮すると、このようなCREが非常に良好に機能するはずであることは驚くべきことである。CREに存在するTFBSの組合せに照らして、予想外の相乗効果が生じていると考えられる。

【００５２】

第2の態様では、本発明は、本発明の第1の態様によるCREを含むシス調節モジュール(CRM)を提供する。CRMの他のCREは、フォルスコリン誘導性CREであってもよく、又は任意の他の機能を有してもよい。

【００５３】

第3の態様では、本発明は、上記で規定されている本発明の第1の態様によるCRE又は本発明の第2の態様によるCRMを含む合成フォルスコリン誘導性プロモーターを提供する。好ましくは、合成誘導性プロモーターは、最小プロモーター又は近位プロモーター、

好ましくは最小プロモーター(ＭＰ)に作動可能に連結したＣＲＥ又はＣＲＭを含む。

【００５４】

最小プロモーターは、任意の好適な最小プロモーターであってもよい。幅広い範囲の最小プロモーターが当技術分野で公知である。限定ではないが、好適な最小プロモーターとしては、ＣＭＶ最小プロモーター(ＣＭＶ-ＭＰ、ＣＭＶ-ＭＰ ｓｈｏｒｔ、又はＣＭＶ５３)、ＹＢ-ＴＡＴＡ最小プロモーター(ＹＢ-ＴＡＢＡ又はｓＹＢ-ＴＡＴＡ)、ＨＳＶチミジンキナーゼ最小プロモーター(ＭｉｎＴＫ)、ＳＶ４０最小プロモーター(ＳＶ４０-ＭＰ)、ＭＰ１、ＭＬＰ、ｐＪＢ４２、又はＧ６ＰＣ-ＭＰ(肝臓由来非ＴＡＴＡボックスＭＰである)が挙げられる。最小プロモーターは、合成最小プロモーターであってもよい。特に好ましい最小プロモーターは、ＣＭＶ最小プロモーター(ＣＭＶ-ＭＰ)及びＹＢ-ＴＡＴＡ最小プロモーター(ＹＢ-ＴＡＢＡ)である。

【００５５】

ＣＭＶ-ＭＰの配列は、

【化２２】

AGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTAGATACGCCATCCACGC
TGTTTTGACCTCCATAGAAGATCGCCACC

(配列番号２８)である。

【００５６】

ＣＭＶ-ＭＰの異なるバリアント(本明細書では、ＣＭＶ-ＭＰ ｓｈｏｒｔと呼ばれる)は、ＧＴＡＧＧＣＧＴＧＴＡＣＧＧＴＧＧＧＡＧＧＴＣＴＡＴＡＴＡＡＧＣＡＧＡＧＣＴ(配列番号６３)である。

【００５７】

ＣＭＶ-ＭＰの別のバリアント(本明細書では、ＣＭＶ５３と呼ばれる)は、ＡＡＧＧＧＣＧＧＴＡＧＧＣＧＴＧＴＡＣＧＧＴＧＧＧＡＧＧＴＣＴＡＴＡＴＡＡＧＣＡＧＡＧＣＴ(配列番号６４)である。

【００５８】

ＹＢ-ＴＡＴＡの配列は、

【化２３】

GCGATTAATCCATATGCTCTAGAGGGTATATAATGGGGGCCACTAGTCTACTACCAGAAAGC
TTGGTACCGAGCTCGGATCCAGCCACC

(配列番号２９)である。

【００５９】

しかしながら、より短い型のＹＢ-ＴＡＴＡ ＭＰが当技術分野で公知であり、これは、上記に記載のＹＢ-ＴＡＴＡ ＭＰ配列の効果的な代替物を提供するはずである。このより短いＹＢ-ＴＡＴＡ ＭＰ(ｓＹＢ-ＴＡＴＡと呼ばれる)の配列は、ＴＣＴＡＧＡＧＧＧＴＡＴＡＴＡＡＴＧＧＧＧＧＣＣＡ(配列番号５７)である。したがって、ＹＢ-ＴＡＴＡが本明細書の誘導性プロモーターの成分として参照される場合は常に、ＹＢ-ＴＡＴＡの代わりにｓＹＢ-ＴＡＴＡに置換された同等の配列も、本発明の代替的な実施形態であるとみなされる。言い換えれば、そのような代替物では、ｓＹＢ-ＴＡＴＡの配列は保持されているが、ＹＢ-ＴＡＴＡの残りの部分は、他の配列、典型的にはスペーサー配列で置き換えられていてもよい。最後のＨＢＳとＭＰのＴＡＴＡボックスとの間の間隔は、好ましくは保持されている。

【００６０】

ＭｉｎＴＫ ＭＰの配列は、

【化２４】

TTCGCATATTAAGGTGACGCGTGTGGCCTCGAACACCGAGCGACCCTGCAGCGACCCGCTT
AA

(配列番号３０)である。

【００６１】

ＳＶ４０-ＭＰの配列は、

【化２５】

TGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAACT
CCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATCGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCC
GAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAG
GCTTTTGCAAA

(配列番号３１)である。

【００６２】

ＭＰ１の配列は、

【化２６】

TTGGTACCATCCGGGCCGGCCGCTTAAGCGACGCCTATAAAAAATAGGTTGCATGCTAGGC
CTAGCGCTGCCAGTCCATCTTCGCTAGCCTGTGCTGCGTCAGTCCAGCGCTGCGCTGCGTA
ACGGCCGCC

(配列番号１５０)である。

【００６３】

Ｇ６ＰＣ-ＭＰの配列は、

【化２７】

GGGCATATAAAACAGGGGCAAGGCACAGACTCATAGCAGAGCAATCACCACCAAGCCTGGA
ATAACTGCAGCCACC

(配列番号３２)である。

【００６４】

ＭＬＰの配列は、ＧＧＧＧＧＧＣＴＡＴＡＡＡＡＧＧＧＧＧＴＧＧＧＧＧＣＧＴＴＣＧＴＣＣＴＣＡＣＴＣＴ(配列番号６５)である。

【００６５】

ｐＪＢ４２の配列は、

【化２８】

CTGACAAATTCAGTATAAAAGCTTGGGGCTGGGGCCGAGCACTGGGGACTTTGAGGGTGGC
CAGGCCAGCGTAGGAGGCCAGCGTAGGATCCTGCTGGGAGCGGGGAACTGAGGGAAGCG
ACGCCGAGAAAGCAGGCGTACCACGGAGGGAGAGAAAAGCTCCGGAAGCCCAGCAGCG

(配列番号66)である。

【００６６】

他の実施形態では、好適な最小プロモーターは、新規TATAm6Aプロモーターであってもよい。TATAm6Aの配列は、TATAAAAGGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGaagcttggactaaagcggacttgtctcgag(配列番号101)である。

【００６７】

本発明の第4の態様では、配列TATAAAAGGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGaagcttggactaaagcggacttgtctcgag(配列番号101)、又はそれと少なくとも80%同一、好ましくは85%、90%、95%、若しくは99%同一である配列を含むその機能的バリアントを含む最小プロモーターが提供される。第5の態様では、本発明は、この最小プロモーターを含む合成フォルスコリン誘導性プロモーターを提供する。一部の実施形態では、合成フォルスコリン誘導性プロモーターは、上記で規定のCRE又はCRMを更に含んでもよい。

【００６８】

本発明の好ましい実施形態では、合成フォルスコリン誘導性プロモーターは、好適には、最小プロモーター又は近位プロモーター、好ましくは最小プロモーター、好ましくは本明細書で規定の最小プロモーターに作動可能に連結した、本発明の第1の態様に示されているCRE配列のいずれか1つを含む。本発明の第1の態様のCREは、好ましくは、スペーサーを介してMPにカップリングされているが、一部の場合では、それらの間に別のCREが提供されていてもよい。また、本発明の第1の態様のCREは、スペーサー無しで、MPに作動可能に連結していてもよい。

【００６９】

CREと最小プロモーターとの間のスペーサー配列は、任意の好適な長さであってもよい。典型的には、スペーサーは、5～100ヌクレオチド長、20～80ヌクレオチド長、又は30～70ヌクレオチド長である。例えば、本発明の特定の非限定的な例では、5、10、18、20、21、42、50、59、65、及び66ヌクレオチド長のスペーサーが使用されており、これらは良好に機能する。しかしながら、他の長さのスペーサーを使用することができ、当業者であれば、好適なスペーサーの長さを容易に決定することができる。

【００７０】

本発明の一部の好ましい実施形態では、合成フォルスコリン誘導性プロモーターは、好適には、以下の構造:

- cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-MP(つまり、5×cAMPRE及び3×AP1 TFBSを含むCRE並びにMP);
- cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-MP(つまり、5×cAMPRE及び4×AP1 TFBSを含むCRE並びにMP);
- AP1-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-MP(つまり、8×AP1 TFBSを含むCRE及びMP);
- ATF6-S-ATF6-S-ATF6-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-HIF-S-HIF-S-HIF-S-MP(つまり、3×ATF6、4×AP1及び3×HIF TFBSを含むCRE並びにMP);
- cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-MP(つまり、5×cAMPRE 4×AP1 TFBS含むCRE及びMP);
- cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-AP1(3)-S-AP1(3)-S-AP1(3)-S-AP1(3)-S-AP1(3)-S-AP1(3)-S-MP(7×cA

MPRE及び6×AP1(3)を含むCRE並びにMP);及び
- ATF6-S-ATF6-S-ATF6-S-ATF6-S-ATF6-S-AP1(1)-S-AP1(1)-S-AP1(1)-S-AP1(1)-S-AP1(1)-S-AP1(1)-S-HRE1-S-HRE1-S-HRE1-S-HRE1-S-HRE1-S-HRE1-S-MP(5×ATF6、6×AP1(1)及び6×HRE1を含むCRE並びにMP)のうちの１つを含み、

ここで、Sは、任意選択だが好ましいスペーサー配列を表し、MPは、最小プロモーターを表す。スペーサーの好適な長さは、上記で論じられている。

【００７１】

本発明の特に好ましい実施形態では、合成フォルスコリン誘導性プロモーターは、以下の構造ATF6-S-ATF6-S-ATF6-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-HIF-S-HIF-S-HIF-S-MPを含み、ここで、Sは、任意選択だが好ましいスペーサー配列を表し、MPは、最小プロモーターを表す。より好ましくは、MPは、CMV-MPである。

【００７２】

本発明の一部の好ましい実施形態では、合成フォルスコリン誘導性プロモーターは、好適には、以下の構造:
- cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-SV40-MP(つまり、5×cAMPRE及び3×AP1 TFBSを含むCRE並びにSV40-MP);
- cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-CMV-MP(つまり、5×cAMPRE及び4×AP1 TFBSを含むCRE並びにCMV-MP);
- AP1-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-(Min-TK又はG6PC MP又はCMV-MP)(つまり、8×AP1 TFBSを含むCRE及びMin-TK又はG6PC MP又はCMV-MP);
- ATF6-S-ATF6-S-ATF6-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-HIF-S-HIF-S-HIF-S-CMV-MP(つまり、3×ATF6、4×AP1及び3×HIF TFBSを含むCRE並びにCMV-MP);
- cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-YB-TATA(つまり、5×cAMPRE、4×AP1 TFBSを含むCRE及びYB-TATA);
- cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-AP1(3)-S-AP1(3)-S-AP1(3)-S-AP1(3)-S-AP1(3)-S-AP1(3)-S-YB TATA(7×cAMPRE及び6×AP1(3)を含むCRE並びにYB TATA);
- cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-AP1(3)-S-AP1(3)-S-AP1(3)-S-AP1(3)-S-AP1(3)-S-AP1(3)-S-短CMV MP(7×cAMPRE及び6×AP1(3)を含むCRE並びに短CMV MP);
- cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-AP1(3)-S-AP1(3)-S-AP1(3)-S-AP1(3)-S-AP1(3)-S-AP1(3)-S-CMV53(7×cAMPRE及び6×AP1(3)を含むCRE並びにCMV53);
- cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-AP1(3)-S-AP1(3)-S-AP1(3)-S-AP1(3)-S-AP1(3)-S-AP1(3)-S-MinTK(7×cAMPRE及び6×AP1(3)を含むCRE並びにMinTK);
- cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-AP1(3)-S-AP1(3)-S-AP1(3)-S-AP1(3)-S-AP1(3)-S-AP1(3)-S-MLP(7×cAMPRE及び6×AP1(3)を含むCRE並びにMLP);
- cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-AP1(3)-S-AP1(3)-S-AP1(3)-S-AP1(3)-S-AP1(3)-S-AP1(3)-S-SV40(7×cAMPRE及び6×AP1(3)を含むCRE並びにSV40);
- cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-AP1(3)-S-AP1(3)-S-AP1(3)-S-AP1(3)-S-AP1(3)-S-AP1(3)-S-pJB42(7×cAMPRE及び6×AP1(3)を含むCRE並びにpJB42);
- cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMP

RE-S-AP1(3)-S-AP1(3)-S-AP1(3)-S-AP1(3)-S-AP1(3)-S-AP1(3)-S-TATAm6A(7×cAMPRE及び6×AP1(3)を含むCRE並びにTATAm6a);

- ATF6-S-ATF6-S-ATF6-S-ATF6-S-ATF6-S-AP1(1)-S-AP1(1)-S-AP1(1)-S-AP1(1)-S-AP1(1)-S-AP1(1)-S-HRE1-S-HRE1-S-HRE1-S-HRE1-S-HRE1-S-HRE1-S-YB TATA(5×ATF6、6×AP1(1)及び6×HRE1を含むCRE並びにYB TATA);

- ATF6-S-ATF6-S-ATF6-S-ATF6-S-ATF6-S-AP1(1)-S-AP1(1)-S-AP1(1)-S-AP1(1)-S-AP1(1)-S-AP1(1)-S-HRE1-S-HRE1-S-HRE1-S-HRE1-S-HRE1-S-HRE1-S-短CMV MP(5×ATF6、6×AP1(1)及び6×HRE1を含むCRE並びに短CMV MP);

- ATF6-S-ATF6-S-ATF6-S-ATF6-S-ATF6-S-AP1(1)-S-AP1(1)-S-AP1(1)-S-AP1(1)-S-AP1(1)-S-AP1(1)-S-HRE1-S-HRE1-S-HRE1-S-HRE1-S-HRE1-S-HRE1-S-CMV53(5×ATF6、6×AP1(1)及び6×HRE1を含むCRE並びにCMV53);

- ATF6-S-ATF6-S-ATF6-S-ATF6-S-ATF6-S-AP1(1)-S-AP1(1)-S-AP1(1)-S-AP1(1)-S-AP1(1)-S-AP1(1)-S-HRE1-S-HRE1-S-HRE1-S-HRE1-S-HRE1-S-HRE1-S-MinTK(5×ATF6、6×AP1(1)及び6×HRE1を含むCRE並びにMinTK);

- ATF6-S-ATF6-S-ATF6-S-ATF6-S-ATF6-S-AP1(1)-S-AP1(1)-S-AP1(1)-S-AP1(1)-S-AP1(1)-S-AP1(1)-S-HRE1-S-HRE1-S-HRE1-S-HRE1-S-HRE1-S-HRE1-S-MLP(5×ATF6、6×AP1(1)及び6×HRE1を含むCRE並びにMLP);

- ATF6-S-ATF6-S-ATF6-S-ATF6-S-ATF6-S-AP1(1)-S-AP1(1)-S-AP1(1)-S-AP1(1)-S-AP1(1)-S-AP1(1)-S-HRE1-S-HRE1-S-HRE1-S-HRE1-S-HRE1-S-HRE1-S-SV40(5×ATF6、6×AP1(1)及び6×HRE1を含むCRE並びにSV40);

- ATF6-S-ATF6-S-ATF6-S-ATF6-S-ATF6-S-AP1(1)-S-AP1(1)-S-AP1(1)-S-AP1(1)-S-AP1(1)-S-AP1(1)-S-HRE1-S-HRE1-S-HRE1-S-HRE1-S-HRE1-S-HRE1-S-pJB42(5×ATF6、6×AP1(1)及び6×HRE1を含むCRE並びにpJB42);及び ATF6-S-ATF6-S-ATF6-S-ATF6-S-ATF6-S-AP1(1)-S-AP1(1)-S-AP1(1)-S-AP1(1)-S-AP1(1)-S-AP1(1)-S-HRE1-S-HRE1-S-HRE1-S-HRE1-S-HRE1-S-HRE1-S-TATAm6a(5×ATF6、6×AP1(1)及び6×HRE1を含むCRE並びにTATAm6a)のうちの１つを含み、ここで、Sは、任意選択だが好ましいスペーサー配列を表す。スペーサーの好適な長さは、上記で論じられている。

【００７３】

本発明の好ましい実施形態では、合成フォルスコリン誘導性プロモーターは、好適には、以下の配列:

-

【化２９】

TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGA[GC]TCA-S-TGA[GC]TCA-S-TGA[GC]TCA-S-TGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATCGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAA

(配列番号33、5×cAMPRE及び3×AP1 TFBSを含むCRE並びにSV40-MP);

-

【化３０】

TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S- TGA[GC]TCA -S-
TGA[GC]TCA-S-TGA[GC]TCA-S-TGA[GC]TCA-S-
AGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTAGATACGCCATCCACGC
TGTTTTGACCTCCATAGAAGATCGCCACC

(配列番号３４、５×ｃＡＭＰＲＥ及び４×ＡＰ１ ＴＦＢＳを含むＣＲＥＳ並びにＣＭＶ-ＭＰ);
-

【化３１】

TGA[GC]TCA-S-TGA[GC]TCA-S-TGA[GC]TCA-S-TGA[GC]TCA-S-TGA[GC]TCA-S-
TGA[GC]TCA-S-TGA[GC]TCA-S-TGA[GC]TCA-S-
(TTCGCATATTAAGGTGACGCGTGTGGCCTCGAACACCGAGCGACCCTGCAGCGACCCGCT
TAA

(配列番号５３)、又は
【化３２】

GGGCATATAAAACAGGGGCAAGGCACAGACTCATAGCAGAGCAATCACCACCAAGCCTGGA
ATAACTGCAGCCACC

(配列番号５４)、又は
【化３３】

AGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTAGATACGCCATCCACGC
TGTTTTGACCTCCATAGAAGATCGCCACC

(配列番号５５)、(８×ＡＰ１ ＴＦＢＳを含むＣＲＥ及びＭｉｎ-ＴＫ又はＧ６ＰＣ ＭＰ又はＣＭＶ-ＭＰ);
-

【化３４】

TGACGT-S-TGACGT-S-TGACGT-S-TGA[GC]TCA-S-TGA[GC]TCA-S-TGA[GC]TCA-S-
TGA[GC]TCA-S-[AG]CGTG-S-[AG]CGTG-S-[AG]CGTG-S-
AGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTAGATACGCCATCCACGC
TGTTTTGACCTCCATAGAAGATCGCCACC

(配列番号３６、ＣＲＥ ３×ＡＴＦ６、４×ＡＰ１及び３×ＨＩＦ ＴＦＢＳ並びにＣＭＶ-ＭＰ);
-

【化３５】

TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGA[GC]TCA-S-
TGA[GC]TCA-S-TGA[GC]TCA-S-TGA[GC]TCA-S-
GCGATTAATCCATATGCTCTAGAGGGTATATAATGGGGGCCACTAGTCTACTACCAGAAAGC
TTGGTACCGAGCTCGGATCCAGCCACC

(配列番号３７、５×ｃＡＭＰＲＥ及び４×ＡＰ１ ＴＦＢＳを含むＣＲＥ並びにＹＢ-ＴＡＴＡ);
-

【化３６】

TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S- - TGACGTCA-S-
TGACGTCA-S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S-
TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA- S-
GCGATTAATCCATATGCTCTAGAGGGTATATAATGGGGGCCACTAGTCTACTACCAGAAAGC
TTGGTACCGAGCTCGGATCCAGCCACC

(配列番号８３、７×ｃＡＭＰＲＥ及び６×ＡＰ１を含むＣＲＥ並びにＹＢ-ＴＡＴＡ);
-

【化３７】

TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S- - TGACGTCA-S-
TGACGTCA-S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S-
TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA- S- GTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCT

(配列番号８４、７×ｃＡＭＰＲＥ及び６×ＡＰ１を含むＣＲＥ並びにＣＭＶ-ＭＰ ｓｈｏｒｔ);
-

【化３８】

TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S- - TGACGTCA-S-
TGACGTCA-S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S-
TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA- S-
AAGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCT

(配列番号８５、７×ｃＡＭＰＲＥ及び６×ＡＰ１を含むＣＲＥ並びにＣＭＶ５３);
-

【化３９】

TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S- - TGACGTCA-S-TGACGTCA-S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S-TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA- S-TTCGCATATTAAGGTGACGCGTGTGGCCTCGAACACCGAGCGACCCTGCAGCGACCCGCTTAA

(配列番号８６、７×ｃＡＭＰＲＥ及び６×ＡＰ１を含むＣＲＥ並びにＭｉｎＴＫ);

-

【化４０】

TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S- - TGACGTCA-S-TGACGTCA-S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S-TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA- S-GGGGGGCTATAAAAGGGGGTGGGGGCGTTCGTCCTCACTCT

(配列番号８７、７×ｃＡＭＰＲＥ及び６×ＡＰ１を含むＣＲＥ並びにＭＬＰ);

-

【化４１】

TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S- - TGACGTCA-S-TGACGTCA-S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S-TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA- S-TGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATCGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAA

(配列番号８８、７×ｃＡＭＰＲＥ及び６×ＡＰ１を含むＣＲＥ並びにＳＶ４０);

-

【化４２】

TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S- - TGACGTCA-S-TGACGTCA-S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S-TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA- S-CTGACAAATTCAGTATAAAAGCTTGGGGCTGGGGCCGAGCACTGGGGACTTTGAGGGTGGCCAGGCCAGCGTAGGAGGCCAGCGTAGGATCCTGCTGGGAGCGGGGAACTGAGGGAAGCGACGCCGAGAAAGCAGGCGTACCACGGAGGGAGAGAAAAGCTCCGGAAGCCCAGCAGCG

(配列番号８９、７×ｃＡＭＰＲＥ及び６×ＡＰ１を含むＣＲＥ並びにｐＪＢ４２);

-

【化４３】

TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S-TGACGTCA-S- - TGACGTCA-S-
TGACGTCA-S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S-
TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA- S-
TATAAAAGGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGaagcttggactaaagcggact

(配列番号９０、７×ｃＡＭＰＲＥ及び６×ＡＰ１を含むＣＲＥ並びにＴＡＴＡｍ６ａ);

-

【化４４】

TGACGT-S- TGACGT-S- TGACGT-S- TGACGT-S- TGACGT-S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA
-S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- [AG]CGTG -S-
[AG]CGTG -S- [AG]CGTG -S- [AG]CGTG -S- [AG]CGTG -S- [AG]CGTG-S-
GCGATTAATCCATATGCTCTAGAGGGTATATAATGGGGGCCACTAGTCTACTACCAGAAAGC
TTGGTACCGAGCTCGGATCCAGCCACC

(配列番号９１、５×ＡＴＦ６、６×ＡＰ１及び６×ＨＩＦ ＴＦＢＳを含むＣＲＥ並びにＹＢ-ＴＡＴＡ);

-

【化４５】

TGACGT-S- TGACGT-S- TGACGT-S- TGACGT-S- TGACGT-S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA
-S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- [AG]CGTG -S-
[AG]CGTG -S- [AG]CGTG -S- [AG]CGTG -S- [AG]CGTG -S- [AG]CGTG-S-
GTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCT

(配列番号９２、５×ＡＴＦ６、６×ＡＰ１及び６×ＨＩＦ ＴＦＢＳを含むＣＲＥ並びにＣＭＶ-ＭＰ ｓｈｏｒｔ);

-

【化４６】

TGACGT-S- TGACGT-S- TGACGT-S- TGACGT-S- TGACGT-S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA
-S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- [AG]CGTG -S-
[AG]CGTG -S- [AG]CGTG -S- [AG]CGTG -S- [AG]CGTG -S- [AG]CGTG-S-
AAGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCT

(配列番号９３、５×ＡＴＦ６、６×ＡＰ１及び６×ＨＩＦ ＴＦＢＳを含むＣＲＥ並びにＣＭＶ５３);

-

【化４７】

TGACGT-S- TGACGT-S- TGACGT-S- TGACGT-S- TGACGT-S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- [AG]CGTG -S- [AG]CGTG -S- [AG]CGTG -S- [AG]CGTG -S- [AG]CGTG -S- [AG]CGTG-S- TTCGCATATTAAGGTGACGCGTGTGGCCTCGAACACCGAGCGACCCTGCAGCGACCCGCTTAA

(配列番号９４、５×ＡＴＦ６、６×ＡＰ１及び６×ＨＩＦ ＴＦＢＳを含むＣＲＥ並びにＭｉｎＴＫ);

【化４８】

TGACGT-S- TGACGT-S- TGACGT-S- TGACGT-S- TGACGT-S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- [AG]CGTG -S- [AG]CGTG -S- [AG]CGTG -S- [AG]CGTG -S- [AG]CGTG -S- [AG]CGTG-S- GGGGGGCTATAAAAGGGGGTGGGGGCGTTCGTCCTCACTCT

(配列番号９５、５×ＡＴＦ６、６×ＡＰ１及び６×ＨＩＦ ＴＦＢＳを含むＣＲＥ並びにＭＬＰ);

【化４９】

TGACGT-S- TGACGT-S- TGACGT-S- TGACGT-S- TGACGT-S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- [AG]CGTG -S- [AG]CGTG -S- [AG]CGTG -S- [AG]CGTG -S- [AG]CGTG -S- [AG]CGTG-S- TGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATCGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAA

(配列番号９６、５×ＡＴＦ６、６×ＡＰ１及び６×ＨＩＦ ＴＦＢＳを含むＣＲＥ並びにＳＶ４０);

【化５０】

TGACGT-S- TGACGT-S- TGACGT-S- TGACGT-S- TGACGT-S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- [AG]CGTG -S- [AG]CGTG -S- [AG]CGTG -S- [AG]CGTG -S- [AG]CGTG -S- [AG]CGTG-S- CTGACAAATTCAGTATAAAAGCTTGGGGCTGGGGCCGAGCACTGGGGACTTTGAGGGTGGCCAGGCCAGCGTAGGAGGCCAGCGTAGGATCCTGCTGGGAGCGGGGAACTGAGGGAAGCGACGCCGAGAAAGCAGGCGTACCACGGAGGGAGAGAAAAGCTCCGGAAGCCCAGCAGCG

(配列番号９７、５×ＡＴＦ６、６×ＡＰ１及び６×ＨＩＦ ＴＦＢＳを含むＣＲＥ並びにｐＪＢ４２);及び

【化５１】

TGACGT-S- TGACGT-S- TGACGT-S- TGACGT-S- TGACGT-S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- TGA[GC]TCA -S- [AG]CGTG -S- [AG]CGTG -S- [AG]CGTG -S- [AG]CGTG -S- [AG]CGTG -S- [AG]CGTG-S- TATAAAAGGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGaagcttggactaaagcggact

(配列番号９８、５×ＡＴＦ６、６×ＡＰ１及び６×ＨＩＦ ＴＦＢＳを含むＣＲＥ並びにＴＡＴＡｍ６ａ)のうちの１つを含み、ここで、Ｓは、任意選択だが好ましいスペーサー配列を表す。スペーサーの好適な長さは、上記で論じられている。

【００７４】

本発明の一部の好ましい実施形態では、合成フォルスコリン誘導性プロモーターは、好適には、以下の配列(ＴＦＢＳ配列には下線がひかれており、最小プロモーター配列は太字で示されている):

-

【化５２】

TGACGTCACGATTACCATTGACGTCACGATTACCATTGACGTCACGATTACCATTGACGTCACGATTACCATTGACGTCAGCGATTAAGATGACTCAGCGATTAAGATGACTCAGCGATTAAGATGACTCAGCGATTAAGATGACTCACTAGCCCGGGCTCGAGATCTGCGATC**TGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATCGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAA**

(Ｓｙｎｐ-ＦＯＲＣＳＶ-１０、配列番号３９);

-

【化５３】

TGACGTCACGATTACCATTGACGTCACGATTACCATTGACGTCACGATTACCATTGACGTCACGATTACCATTGACGTCAGCGATTAAGATGACTCAGCGATTAAGATGACTCAGCGATTAAGATGACTCAGCGATTAAGATGACTCAGCGATTAATCCATATGC**AGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTAGATACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGATCGCCACC**

(Ｓｙｎｐ-ＦＯＲＣＭＶ-０９、配列番号４０);

-

【化５４】

TGAGTCAGATGATGCGTAGCTAGTAGTTGAGTCAGATGATGCGTAGCTAGTAGTTGAGTCAG
ATGATGCGTAGCTAGTAGTTGAGTCAGATGATGCGTAGCTAGTAGTTGAGTCAGATGATGCG
TAGCTAGTAGTTGAGTCAGATGATGCGTAGCTAGTAGTTGAGTCAGATGATGCGTAGCTAGT
AGTTGAGTCAGTAGTCGTATGCTGATGCGCAGTTAGCGTAGCTGAGGTACCGTCGACGATAT
CGGATCC**TTCGCATATTAAGGTGACGCGTGTGGCCTCGAACACCGAGCGACCCTGCAGCG**
ACCCGCTTAA

(Synp-FMP-02、配列番号41);

-

【化５５】

TGAGTCAGATGATGCGTAGCTAGTAGTTGAGTCAGATGATGCGTAGCTAGTAGTTGAGTCAG
ATGATGCGTAGCTAGTAGTTGAGTCAGATGATGCGTAGCTAGTAGTTGAGTCAGATGATGCG
TAGCTAGTAGTTGAGTCAGATGATGCGTAGCTAGTAGTTGAGTCAGATGATGCGTAGCTAGT
AGTTGAGTCAGTAGTCGTATGCTGATGCGCAGTTAGCGTAGCTGAGGTACCGTCGACGATAT
CGGATCC**GGGCATATAAAACAGGGGCAAGGCACAGACTCATAGCAGAGCAATCACCACC**
AAGCCTGGAATAACTGCAGCCACC

(Synp-FLP-01、配列番号42);

-

【化５６】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGCCATTGACGTCACGA
TTTGACGTCAACCATTGACGTCACGATTTGACGTCAACCATTGACGTCACGATTTGACGTCAC
GATTTGACGTCAACCATTGACTCACGATTTGACTCAACCATTGACTCACGATTTGACTCAACC
ATTGACTCACGATTTGACTCACGATT**GCGATTAATCCATATGCTCTAGAGGGTATATAATGG**
GGGCCACTAGTCTACTACCAGAAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCAGCCACC

(Synp-FORNEW、配列番号62);

-

【化５７】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGCCATTGACGTCACGA
TTTGACGTCAACCATTGACGTCACGATTTGACGTCAACCATTGACGTCACGATTTGACGTCAC
GATTTGACGTCAACCATTGACTCACGATTTGACTCAACCATTGACTCACGATTTGACTCAACC
ATTGACTCACGATTTGACTCACGATT**GTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGA**
GCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCACC

(Synp-FORNCMV、配列番号68);

-

【化５８】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGCCATTGACGTCACGA
TTTGACGTCAACCATTGACGTCACGATTTGACGTCAACCATTGACGTCACGATTTGACGTCAC
GATTTGACGTCAACCATTGACTCACGATTTGACTCAACCATTGACTCACGATTTGACTCAACC
ATTGACTCACGATTTGACTCACGATTCAACAAAATGTCGTAAC**AAGGGCGGTAGGCGTGTAC**
GGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGGCCACC

(Synp-FORNCMV53、配列番号69);

【化５９】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGCCATTGACGTCACGA
TTTGACGTCAACCATTGACGTCACGATTTGACGTCAACCATTGACGTCACGATTTGACGTCAC
GATTTGACGTCAACCATTGACTCACGATTTGACTCAACCATTGACTCACGATTTGACTCAACC
ATTGACTCACGATTTGACTCACGATT**TTCGCATATTAAGGTGACGCGTGTGGCCTCGAACAC**
CGAGCGACCCTGCAGCGACCCGCTTAAGCCACC

(Synp-FORNMinTK、配列番号70);

【化６０】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGCCATTGACGTCACGA
TTTGACGTCAACCATTGACGTCACGATTTGACGTCAACCATTGACGTCACGATTTGACGTCAC
GATTTGACGTCAACCATTGACTCACGATTTGACTCAACCATTGACTCACGATTTGACTCAACC
ATTGACTCACGATTTGACTCACGATT**GGGGGGCTATAAAAGGGGGTGGGGGCGTTCGTCCT**
CACTCTGCCACC

(Synp-FORNMLP、配列番号71);

【化６１】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGCCATTGACGTCACGA
TTTGACGTCAACCATTGACGTCACGATTTGACGTCAACCATTGACGTCACGATTTGACGTCAC
GATTTGACGTCAACCATTGACTCACGATTTGACTCAACCATTGACTCACGATTTGACTCAACC
ATTGACTCACGATTTGACTCACGATT**TGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCC**
TAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATCGCTG
ACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGT
AGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTTGCCACC

(Synp-FORNSV40、配列番号72);

-

【化６２】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGCCATTGACGTCACGA
TTTGACGTCAACCATTGACGTCACGATTTGACGTCAACCATTGACGTCACGATTTGACGTCAC
GATTTGACGTCAACCATTGACTCACGATTTGACTCAACCATTGACTCACGATTTGACTCAACC
ATTGACTCACGATTTGACTCACGATT**CTGACAAATTCAGTATAAAAGCTTGGGGCTGGGGC**
CGAGCACTGGGGACTTTGAGGGTGGCCAGGCCAGCGTAGGAGGCCAGCGTAGGATCCTG
CTGGGAGCGGGGAACTGAGGGAAGCGACGCCGAGAAAGCAGGCGTACCACGGAGGGAG
AGAAAAGCTCCGGAAGCCCAGCAGCGGCCACC

(Ｓｙｎｐ-ＦＯＲＮｐＪＢ４２、配列番号７３);

-

【化６３】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGCCATTGACGTCACGA
TTTGACGTCAACCATTGACGTCACGATTTGACGTCAACCATTGACGTCACGATTTGACGTCAC
GATTTGACGTCAACCATTGACTCACGATTTGACTCAACCATTGACTCACGATTTGACTCAACC
ATTGACTCACGATTTGACTCACGATT**TATAAAAGGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGaagcttgg**
actaaagcggacttgtctcgag

(Ｓｙｎｐ-ＦＯＲＮＴＡＴＡｍ６ａ、配列番号７４);

-

【化６４】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGTGACGTGCTgataatgcgt
TGACGTGCTtgcgtgataaTGACGTGCTgataatgcgtTGACGTGCTtgcgtgataaTGACGTGCTagctagta
gtTGAGTCAgataatgcgtTGAGTCAtgcgtgataaTGAGTCAgataatgcgtTGAGTCAtgcgtgataaTGAGTC
AgataatgcgtTGAGTCAagctagtagtCTGCACGTAgataatgcgtCTGCACGTAtgcgtgataaCTGCACGTA
gataatgcgtCTGCACGTAtgcgtgataaCTGCACGTAgataatgcgtCTGCACGTAagctagtagttgatctga**GTA**
GGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATC

(Ｓｙｎｐ-ＲＴＶ-０２０、配列番号７５);

-

【化６５】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGTGACGTGCTgataatgcgt
TGACGTGCTtgcgtgataaTGACGTGCTgataatgcgtTGACGTGCTtgcgtgataaTGACGTGCTagctagta
gtTGAGTCAgataatgcgtTGAGTCAtgcgtgataaTGAGTCAgataatgcgtTGAGTCAtgcgtgataaTGAGTC
Agataatgcgt TGAGTCAagctagtagtCTGCACGTAgataatgcgtCTGCACGTAtgcgtgataaCTGCACGTA
gataatgcgtCTGCACGTAtgcgtgataaCTGCACGTAgataatgcgtCTGCACGTAagctagtagttgatctga**TCT**
AGAGGGTATATAATGGGGGCCA

(Synp-RTV-020YB、配列番号７６);

【化６６】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGTGACGTGCTgataatgcgt
TGACGTGCTtgcgtgataaTGACGTGCTgataatgcgtTGACGTGCTtgcgtgataaTGACGTGCTagctagta
gtTGAGTCAgataatgcgtTGAGTCAtgcgtgataaTGAGTCAgataatgcgtTGAGTCAtgcgtgataaTGAGTC
Agataatgcgt TGAGTCAagctagtagtCTGCACGTAgataatgcgtCTGCACGTAtgcgtgataaCTGCACGTA
gataatgcgtCTGCACGTAtgcgtgataaCTGCACGTAgataatgcgtCTGCACGTAagctagtagttgatctgaCAA
CAAAATGTCGTAAC**AAGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCT**C
GTTTAGTGAACCG

(Synp-RTV-020C53、配列番号７７);

【化６７】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGTGACGTGCTgataatgcgt
TGACGTGCTtgcgtgataaTGACGTGCTgataatgcgtTGACGTGCTtgcgtgataaTGACGTGCTagctagta
gtTGAGTCAgataatgcgtTGAGTCAtgcgtgataaTGAGTCAgataatgcgtTGAGTCAtgcgtgataaTGAGTC
Agataatgcgt TGAGTCAagctagtagtCTGCACGTAgataatgcgtCTGCACGTAtgcgtgataaCTGCACGTA
gataatgcgtCTGCACGTAtgcgtgataaCTGCACGTAgataatgcgtCTGCACGTAagctagtagttgatctga**TTC**
GCATATTAAGGTGACGCGTGTGGCCTCGAACACCGAGCGACCCTGCAGCGACCCGCTTAA

(Synp-RTV-020MinTK、配列番号７８);

【化６８】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGTGACGTGCTgataatgcgt
TGACGTGCTtgcgtgataaTGACGTGCTgataatgcgtTGACGTGCTtgcgtgataaTGACGTGCTagctagta
gtTGAGTCAgataatgcgtTGAGTCAtgcgtgataaTGAGTCAgataatgcgtTGAGTCAtgcgtgataaTGAGTC
AgataatgcgtTGAGTCAagctagtagtCTGCACGTAgataatgcgtCTGCACGTAtgcgtgataaCTGCACGTA
gataatgcgtCTGCACGTAtgcgtgataaCTGCACGTAgataatgcgtCTGCACGTAagctagtagttgatctga**GG**
GGGGCTATAAAAGGGGGTGGGGGCGTTCGTCCTCACTCT

(Synp-RTV0-20MLP、配列番号７９);

-

【化６９】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGTGACGTGCTgataatgcgt
TGACGTGCTtgcgtgataaTGACGTGCTgataatgcgtTGACGTGCTtgcgtgataaTGACGTGCTagctagta
gtTGAGTCAgataatgcgtTGAGTCAtgcgtgataaTGAGTCAgataatgcgtTGAGTCAtgcgtgataaTGAGTC
AgataatgcgtTGAGTCAagctagtagtCTGCACGTAgataatgcgtCTGCACGTAtgcgtgataaCTGCACGTA
gataatgcgtCTGCACGTAtgcgtgataaCTGCACGTAgataatgcgtCTGCACGTAagctagtagttgatctga**CTG**
ACAAATTCAGTATAAAAGCTTGGGGCTGGGGCCGAGCACTGGGGACTTTGAGGGTGGCCA
GGCCAGCGTAGGAGGCCAGCGTAGGATCCTGCTGGGAGCGGGGAACTGAGGGAAGCGA
CGCCGAGAAAGCAGGCGTACCACGGAGGGAGAGAAAAGCTCCGGAAGCCCAGCAGCG

(Synp-RTV-020pJB42、配列番号８０);

-

【化７０】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGTGACGTGCTgataatgcgt
TGACGTGCTtgcgtgataaTGACGTGCTgataatgcgtTGACGTGCTtgcgtgataaTGACGTGCTagctagta
gtTGAGTCAgataatgcgtTGAGTCAtgcgtgataaTGAGTCAgataatgcgtTGAGTCAtgcgtgataaTGAGTC
AgataatgcgtTGAGTCAagctagtagtCTGCACGTAgataatgcgtCTGCACGTAtgcgtgataaCTGCACGTA
gataatgcgtCTGCACGTAtgcgtgataaCTGCACGTAgataatgcgtCTGCACGTAagctagtagttgatctga**TAT**
AAAAGGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGaagcttggactaaagcggacttgtctcgag

(Synpr-RTV-020TATAm6a、配列番号８１);及び

-

【化７１】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGTGACGTGCTgataatgcgt
TGACGTGCTtgcgtgataaTGACGTGCTgataatgcgtTGACGTGCTtgcgtgataaTGACGTGCTagctagta
gtTGAGTCAgataatgcgtTGAGTCAtgcgtgataaTGAGTCAgataatgcgtTGAGTCAtgcgtgataaTGAGTC
Agataatgcgt TGAGTCAagctagtagtCTGCACGTAgataatgcgtCTGCACGTAtgcgtgataaCTGCACGTA
gataatgcgtCTGCACGTAtgcgtgataaCTGCACGTAgataatgcgtCTGCACGTAagctagtagttgatctga**TGC**
ATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAACTCC
GCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATCGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCG
AGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAG
GCTTTTGCAAAAAGCTT

(Synp-RTV-020SV、配列番号82)、

又は、これらと少なくとも80%同一、好ましくはこれらと85%、90%、95%、若しくは99%同一である配列を含む、前記配列のいずれかの機能的バリアントのうちの１つを含む。

【００７５】

典型的には、そのような機能的バリアントでは、存在するTFBS配列及びMP配列は参照配列と同一であり、実質的に全ての配列変異は、それらの間にあるスペーサー配列に生じていることが好ましい。

【００７６】

上述のフォルスコリン誘導性プロモーターは、良好なレベルの誘導性及び誘導時の強力な発現並びに低レベルのバックグラウンド発現を提供することが示された。こうしたプロモーターは、誘導性及び誘導時の発現レベルに関してある程度の変動性を示し、それにより、所望の特性を有するプロモーターを選択することが可能になる。

【００７７】

構造ATF6-S-ATF6-S-ATF6-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-AP1-S-HIF-S-HIF-S-HIF-S-MPを含み、好ましくはここでMPはCMV-MPである、合成フォルスコリン誘導性プロモーターは、誘導性及び発現に関して特に優れた特性を提供することが示された。したがって、そのようなプロモーターは、本発明の特に好ましい実施形態を表す。上記に言及されているように、そのようなCREは、フォルスコリンにより誘導されることが知られていないか又は予想されていない幾つかのTFBSを含み、誘導性がより低く強力ではない一部の他のCREよりも少数の、フォルスコリンにより誘導されるTFBSを含むことを考慮すると、そのようなCREが非常に良好に機能するはずであることは驚くべきことである。CREに存在するTFBSの組合せに照らして、予想外の相乗効果が生じたと考えられる。

【００７８】

構造cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-cAMPRE-S-AP1(3)-S-AP1(3)-S-AP1(3)-S-AP1(3)-S-AP1(3)-S-AP1(3)-S-MPを含み、好ましくはここでMPはpJB42である、合成フォルスコリン誘導性プロモーターは、誘導性及び発現に関して特に優れた特性を提供することが示された。したがって、そのようなプロモーターは、本発明の特に好ましい実施形態を表す。CREに存在するTFBSの組合せに照らして、特定の相乗効果が生じたと考えられる。本発明の１つの特に好ましい実施形態では、合成フォルスコリン誘導性プロモーターは、配列:

【化７２】

TGACGTCA- S_5-TGACGTCA- S_5-TGACGTCA- S_5-TGACGTCA- S_5- TGACGTCA- S_5-TGACGTCA- S_5-TGACTCA- S_5- TGACTCA-S_5- TGACTCA- S_5- TGACTCA- S_5- TGACTCA- S_5- TGACTCA- S_5- pJB42

(配列番号99)を含む。ここで、S_Xは、Xヌクレオチド長のスペーサーを表す。

【００７９】

本発明の好ましい実施形態では、プロモーターの誘導性は、誘導時に(例えば、細胞、例えばCHO-K1SV細胞を、１８μＭのフォルスコリンに5時間暴露した後)、プロモーターの制御下にある導入遺伝子の発現レベルが、少なくとも3倍、より好ましくは5倍、１０倍、１５倍、２０倍、３０倍、又は50倍増加する。

【００８０】

本発明の好ましい実施形態では、誘導時(例えば、細胞、例えばCHO-K1SV細胞を、１８μＭのフォルスコリンに5時間暴露した後)、プロモーターの制御下にある導入遺伝子の発現レベルが、CMV-IEプロモーターにより提供される発現レベル(つまり、同じ条件下の同じ細胞において他の点では同一であるが、導入遺伝子の発現が、フォルスコリン誘導性プロモーターではなくCMV-IEの制御下にあるベクター)の少なくとも50％である。より好ましくは、導入遺伝子の発現レベルは、CMV-IEプロモーターにより提供される発現レベルの少なくとも75％、１００％、１５０％、２００％、３００％、４００％、５００％、７５０％、又は1000％である。

【００８１】

第6の態様では、本発明の第1の態様によるCRE、本発明の第2の態様によるCRM、又は導入遺伝子に作動可能に連結した本発明の第3の態様によるプロモーターを含む発現カセットが提供される。

【００８２】

導入遺伝子は、典型的には、目的のタンパク質又は目的のポリペプチドであってもよい目的の産物をコードする。目的のタンパク質又は目的のポリペプチドは、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、融合タンパク質であってもよく、それらは全て宿主細胞で発現させることができ、任意選択でそこから分泌させることができる。一部の実施形態では、導入遺伝子は、毒性の又は有害なタンパク質をコードする毒性遺伝子であってもよい。したがって、好適には、そのような遺伝子の発現は、厳密に調節される必要があり得る。毒性遺伝子の好適な発現は、一過性に調節される必要があり得る。好適には、そのような遺伝子の発現を調節するために、本発明の誘導性プロモーターを使用することができる。1つの例は、Repタンパク質を必要とする組換えAAVの産生であり、Repタンパク質の一部は宿主細胞に対して毒性であり、発現の調節が必要である。

【００８３】

目的のタンパク質又はポリペプチドは、例えば、抗体、酵素、又はそれらの断片、サイトカイン、リンホカイン、接着分子、受容体及びそれらの誘導体又は断片、タンパク質抗生物質、毒素融合タンパク質、炭水化物-タンパク質コンジュゲート、構造タンパク質、調節タンパク質、ワクチン及びワクチン様タンパク質又は粒子、プロセス酵素、成長因子、ホルモン、並びにアゴニスト若しくはアンタゴニストとしての役目を果たすことができ、及び/又は治療若しくは診断に使用することができる任意の他のポリペプチドであってもよい。特に好ましい実施形態によると、組換えタンパク質は、免疫グロブリン、好ましくは抗体又は抗体断片、最も好ましくはFab又はscFV抗体である。

【００８４】

目的の好ましいタンパク質又はポリペプチドは、治療用タンパク質又はポリペプチドである。

【００８５】
具体的な目的のタンパク質又はポリペプチドとしては、例えば、これらに限定されないが、インスリン、インスリン様成長因子、hGH、tPA、インターロイキン(IL)、例えば、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、インターフェロン(IFN)アルファ、IFNベータ、IFNガンマ、IFNオメガ、又はIFNタウ、TNFアルファ及びTNFベータ、TNFガンマ等の腫瘍壊死因子(TNF)、TRAIL等のサイトカイン;G-CSF、GM-CSF、M-CSF、MCP-1、VEGF、アファミン(AFM)、a1-アンチトリプシン、a-ガラクトシダーゼA、α-L-イズロニダーゼ、ATP7b、オルニチントランスカルバミラーゼ、フェニルアラニンヒドロキシラーゼ、芳香族アミノ酸デカルボキシラーゼ(AADC)、ATPase筋小胞体/小胞体Ca2+輸送2(ATP2A2)、嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子(CTFR)、グルタミン酸デカルボキシラーゼ65kDaタンパク質(GAD65)、グルタミン酸デカルボキシラーゼ67kDaタンパク質(GAD67)、リポタンパク質リパーゼ(LPL)、神経成長因子(NGF)、ニュールツリン(NTN)、ポルホビリノーゲンデアミナーゼ(PBGD)、サルコグリカンアルファ(SGCA)、可溶性fms様チロシンキナーゼ-1(sFLT-1)、アポリタンパク質、低密度リポタンパク質受容体(LDL-R)、アルブミン、グルコース-6-ホスファターゼ、抗体、ナノボディ、アプタマー、抗ウイルスドミナントネガティブタンパク質、及びそれらの機能的断片、サブユニット、又は突然変異体が挙げられる。また、エリスロポエチン又は任意の他のホルモン成長因子、並びにアゴニスト若しくはアンタゴニストとしての役目を果たすことができ、及び/又は治療若しくは診断に使用することができる任意の他のポリペプチドの産生も含まれる。特に好ましい目的のタンパク質としては、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多特異性抗体、及び単鎖抗体等の抗体、又はそれらの断片、例えば、Fab、Fab'、$F(ab')_2$、Fc及びFc'断片、免疫グロブリン重鎖及び軽鎖並びにそれらの定常領域、可変領域、又は超可変領域、並びにFv断片及びFd断片が挙げられる。好ましくは、目的のタンパク質は、霊長類タンパク質、より好ましくはヒトタンパク質である。

【００８６】
更なる実施形態では、目的のタンパク質は、例えば、BOTOX、yobloc、Neurobloc、Dysport(又はボツリヌス神経毒の他の血清型)、アルグルコシダーゼアルファ、ダプトマイシン、YH-16、絨毛性ゴナドトロピンアルファ、フィルグラスチム、セトロレリックス、インターロイキン-2、アルデスロイキン、テセロイリン(teceleulin)、デニロイキンジフチトクス、インターフェロンアルファ-n3（注射）、インターフェロンアルファ-nl、DL-8234、インターフェロン、スントリー(Suntory)(ガンマ-1a)、インターフェロンガンマ、チモシンアルファ1、タソネルミン、DigiFab、ViperaTAb、EchiTAb、CroFab、ネシリチド、アバタセプト、アレファセプト、レビフ、エプトテルミンアルファ、テリパラチド（骨粗鬆症）、カルシトニン注射剤（骨疾患）、カルシトニン（経鼻、骨粗鬆症）、エタネルセプト、ヘモグロビングルタマー250(ウシ)、ドロトレコギンアルファ、コラゲナーゼ、カルペリチド、組換えヒト上皮成長因子(局所ゲル、創傷治癒)、DWP401、ダルベポエチンアルファ、エポエチンオメガ、エポエチンベータ、エポエチンアルファ、デシルジン、レピルジン、ビバリルジン、ノナコグアルファ、モノニン(Mononine)、エプタコグアルファ(活性化)、組換え第VIII因子+VWF、リコネイト、組換え第VIII因子、第VIII因子(組換え)、アルファネート、オクトコグアルファ、第VIII因子、パリフェルミン、インディキナーゼ(indikinase)、テネクテプラーゼ、アルテプラーゼ、パミテプラーゼ、レテプラーゼ、ナテプラーゼ、モンテプラーゼ、フォリトロピンアルファ、rFSH、hpFSH、ミカファンギン、ペグフィルグラスチム、レノグラスチム、ナルトグラスチム、セルモレリン、グルカゴン、エキセナチド、プラムリンチド、イニグルセラーゼ(iniglucerase)、ガルスルファーゼ、ロイコトロピン(Leucotropin)、モルグラモスチム、酢酸トリプトレリン、ヒストレリン(皮下インプラント、Hydron)、デスロレリン、ヒストレリン、ナファレリン、ロイプロリド徐放性デポー(ATRIGEL)、ロイプロリドインプラント(DUROS)、ゴセレリン、Eutropin、KP-102プログラ

ム、ソマトロピン、メカセルミン(成長不全)、エンルファビルチド(enlfavirtide)、Org-33408、インスリングラルギン、インスリングルリジン、インスリン(吸入)、インスリンリスプロ、インスリンデテルニル(deternir)、インスリン(頬側、RapidMist)、メカセルミンリンファバート、アナキンラ、セルモロイキン、99mTc-アプシチド注射、ミエロピド(myelopid)、Betaseron、酢酸グラチラマー、Gepon、サルグラモスチム、オプレルベキン、ヒト白血球由来アルファインターフェロン、Bilive、インスリン(組換え)、組換えヒトインスリン、インスリンアスパルト、メカセルミン(mecasenin)、ロフェロン-A、インターフェロン-アルファ2、Alfaferone、インターフェロンアルファコン-1、インターフェロンアルファ、アボネックス組換えヒト黄体形成ホルモン、ドルナーゼアルファ、トラフェルミン、ジコノチド、タルチレリン、ジボテルミンアルファ、アトシバン、ベカプレルミン、エプチフィバチド、Zemaira、CTC-1 1 1、Shanvac-B、HPVワクチン(4価)、オクトレオチド、ランレオチド、アンセスチム、アガルシダーゼベータ、アガルシダーゼアルファ、ラロニダーゼ、酢酸プレザチド銅(局所ゲル)、ラスブリカーゼ、ラニビズマブ、アクチミューン、PEG-イントロン、トリコミン、組換えイエダニアレルギー減感作注射、組換えヒト副甲状腺ホルモン(PTH)1-84(sc、骨粗鬆症)、エポエチンデルタ、トランスジェニックアンチトロンビンIII、Granditropin、Vitrase、組換えインスリン、インターフェロン-アルファ(経口ロゼンジ)、GEM-21S、バプレオチド、イズルスルファーゼ、オムナパトリラト(omnapatrilat)、組換え血清アルブミン、セルトリズマブペゴル、グルカルピダーゼ、ヒト組換えC1エステラーゼ阻害剤(血管浮腫)、ラノテプラーゼ、組換えヒト成長ホルモン、エンフビルチド(無針注射、Bioject or 2000)、VGV-1、インターフェロン(アルファ)、ルシナクタント、アビプタジル(aviptadil)(吸入、肺疾患)、イカチバント、エカランチド、オミガナン、Aurograb、酢酸ペキシガナン、ADI-PEG-20、LDI-200、デガレリクス、シントレデリンベスドトクス(cintredelinbesudotox)、Favld、MDX-1379、ISAtx-247、リラグルチド、テリパラチド(骨粗鬆症)、チファコギン、AA4500、T4N5リポソームローション、カツマキソマブ、DWP413、ART-123、Chrysalin、デスモテプラーゼ、アメジプラーゼ(amediplase)、コリフォリトロピンアルファ、TH-9507、テデュグルチド、Diamyd、DWP-412、成長ホルモン(徐放注射)、組換えG-CSF、インスリン(吸入、AIR)、インスリン(吸引、テクノスフェア)、インスリン(吸入、AERx)、RGN-303、DiaPep277、インターフェロンベータ(C型肝炎ウイルス感染(HCV))、インターフェロンアルファ-n3(経口)、ベラタセプト、経皮インスリン貼付剤、AMG-531、MBP-8298、Xerecept、オペバカン、AIDS VAX、GV-1001、LymphoScan、ランピルナーゼ、Lipoxysan、ルスプルチド、MP52(ベータ-リン酸三カルシウム担体、骨再生)、黒色腫ワクチン、シプロイセル-T、CTP-37、Insegia、ビテスペン、ヒトトロンビン(凍結、外科出血)、トロンビン、TransMID、アルフィメプラーゼ、Puricase、テルリプレシン(静脈内、肝腎症候群)、EUR-1008M、組換えFGF-I(注射剤、血管疾患)、BDM-E、ロチガプチド、ETC-216、P-1 13、MBI-594AN、デュラマイシン(吸入、嚢胞性線維症)、SCV-07、OPI-45、エンドスタチン、アンギオスタチン、ABT-510、ボーマン-バーク阻害剤濃縮物、XMP-629、99mTc-Hynic-アネキシンV、カハラリドF、CTCE-9908、テベレリクス(持続放出)、オザレリクス、ロミデプシン、BAY-504798、インターロイキン4、PRX-321、Pepscan、イボクタデキン、rhラクトフェリン、TRU-015、IL-21、ATN-161、シレンギチド、アルブフェロン、Biphasix、IRX-2、オメガインターフェロン、PCK-3145、CAP-232、パシレオチド、huN901-DMI、卵巣がん免疫療法ワクチン、SB-249553、Oncovax-CL、OncoVax-P、BLP-25、CerVax-16、多エピトープペプチド黒色腫ワクチン(MART-1、gp100、チロシナーゼ)、ネミフィチド、rAAT(吸入)、rAAT(皮膚科)、CGRP(吸入、喘息)、ペグスネルセプト、チモシンベータ4、プリチデプシン、GTP-200、ラモプラニン、GRASPA、OBI-1、AC-100、サケカルシトニン(経口、eligen)、カルシトニン(経口、骨粗鬆症)、エキサモレリン(examorelin)、カプロモレリン、Cardeva、ベラフェルミン、131 I-TM-601、KK-220、T-10、ウラリチド、デペレスタット、ヘマタイド、Chrysalin(局所)、rNAPc2、組換え第V

111因子(ペグ化リポソーム)、bFGF、ペグ化組換えスタフィロキナーゼバリアント、V-10153、SonoLysis Prolyse、NeuroVax、CZEN-002、島細胞新生療法、rGLP-1、BIM-51077、LY-548806、エキセナチド(制御放出、Medisorb)、AVE-0010、GA-GCB、アボレリン、ACM-9604、酢酸リナクロチド(linaclotid eacetate)、CETi-1、Hemospan、VAL(注射剤)、即効性インスリン(注射剤、Viadel)、鼻腔内インスリン、インスリン(吸入)、インスリン(経口、eligen)、組換えメチオニルヒトレプチン、ピトラキンラ(皮下注射、湿疹)、ピトラキンラ(吸入乾燥散剤、喘息)、マルチカイン、RG-1068、MM-093、NBI-6024、AT-001、PI-0824、Org-39141、Cpn10(自己免疫疾患/炎症)、タラクトフェリン(局所)、rEV-131(オフタルミン酸)、rEV-131(呼吸器疾患)、経口組換えヒトインスリン(糖尿病)、RPI-78M、オプレルベキン(経口)、CYT-99007 CTLA4-Ig、DTY-001、バラテグラスト、インターフェロンアルファ-n3(局所)、IRX-3、RDP-58、Tauferon、胆汁酸塩刺激リパーゼ、Merispase、アラリンホスファターゼ(alaline phosphatase)、EP-2104R、Melanotan-ll、ブレメラノチド、ATL-104、組換えヒトマイクロプラスミン、AX-200、SEMAX、ACV-1、Xen-2174、CJC-1008、ダイノルフィンA、SI-6603、LAB GHRH、AER-002、BGC-728、マラリアワクチン(ビロソーム、PeviPRO)、ALTU-135、パルボウイルスB19ワクチン、インフルエンザワクチン(組換えノイラミニダーゼ)、マラリア/HBVワクチン、炭疽ワクチン、Vacc-5q、Vacc-4x、HIVワクチン(経口)、HPVワクチン、Tatトキソイド、YSPSL、CHS-13340、PTH(1-34)リポソームクリーム(Novasome)、Ostabolin-C、PTHアナログ(局所、乾癬)、MBRI-93.02、MTB72Fワクチン(結核)、MVA-Ag85Aワクチン(結核)、FARA04、BA-210、組換えペストFIVワクチン、AG-702、OxSODrol、rBetVI、Der-p1/Der-p2/Der-p7アレルゲン標的指向性ワクチン(イエダニアレルギー)、PR1ペプチド抗原(白血病)、突然変異体rasワクチン、HPV-16 E7リポペプチドワクチン、ラビリンチンワクチン(labyrinthin vaccine)(腺癌)、CMLワクチン、WT1-ペプチドワクチン(がん)、IDD-5、CDX-1 10、Pentrys、Norelin、CytoFab、P-9808、VT-1 1 1、イクロカプチド(icrocaptide)、テルベルミン(皮膚科、糖尿病性足部潰瘍)、ルピントリビル、レチクロース(reticulose)、rGRF、HA、アルファ-ガラクトシダーゼA、ACE-01 1、ALTU-140、CGX-1 160、アンギオテンシン療法ワクチン、D-4F、ETC-642、APP-018、rhMBL、SCV-07(経口、結核)、DRF-7295、ABT-828、ErbB2特異的免疫毒素(抗がん)、DT3SSIL-3、TST-10088、PRO-1762、Combotox、コレシストキニン-B/ガストリン受容体結合ペプチド、1 1 1 In-hEGF、AE-37、トラスニズマブ-DM1(trasnizumab-DM1)、アンタゴニストG、IL-12(組換え)、PM-02734、IMP-321、rhlGF-BP3、BLX-883、CUV-1647(局所)、L-19ベースの放射免疫治療薬(がん)、Re-188-P-2045、AMG-386、DC/1540/KLHワクチン(がん)、VX-001、AVE-9633、AC-9301、NY-ESO-1ワクチン(ペプチド)、NA17.A2ペプチド、黒色腫ワクチン(パルス抗原治療薬)、前立腺がんワクチン、CBP-501、組換えヒトラクトフェリン(ドライアイ)、FX-06、AP-214、WAP-8294A(注射剤)、ACP-HIP、SUN-1 1031、ペプチドYY[3-36](肥満、鼻腔内)、FGLL、アタシセプト、BR3-Fc、BN-003、BA-058、ヒト副甲状腺ホルモン1-34(経鼻、骨粗鬆症)、F-18-CCR1、AT-1 100(セリアック病/糖尿病)、JPD-003、PTH(7-34)リポソームクリーム(Novasome)、デュラマイシン(眼科、ドライアイ)、CAB-2、CTCE-0214、糖ペグ化エリスロポエチン、EPO-Fc、CNTO-528、AMG-1 14、JR-013、第XIII因子、アミノカンジン(aminocandin)、PN-951、716155、SUN-E7001、TH-0318、BAY-73-7977、テベレイイキス(tevereiix)(即時放出)、EP-51216、hGH(制御放出、Biosphere)、OGP-I、シフビルチド(sifuvirtide)、TV4710、ALG-889、Org-41259、rhCCI O、F-991、チモペンチン(肺疾患)、r(m)CRP、肝選択的インスリン、スバリン(subalin)、L19-IL-2融合タンパク質、エラフィン(elafin)、NMK-150、ALTU-139、EN-122004、rhTPO、トロンボポエチン受容体アゴニスト(血小板減少障害)、AL-108、AL-208、神経成長因子アンタゴニスト(疼痛)、SLV-317、CGX-1007、INNO-105、経口テリパラチド(eligen)、GEM-OS1、AC-162352、PRX-3

02、LFn-p24融合ワクチン(Therapore)、EP-1043、S.ニューモニエ(S pneumoniae)小児ワクチン、マラリアワクチン、ナイセリア・メニンギティディス(Neisseria meningitidis)B群ワクチン、新生児B群連鎖球菌(B streptococcal)ワクチン、炭疽菌ワクチン、HCVワクチン(gpE1+gpE2+MF-59)、中耳炎療法、HCVワクチン(コア抗原+ISCOMATRIX)、hPTH(1-34)(経皮、ViaDerm)、768974、SYN-101、PGN-0052、アビスクムニン(aviscumnine)、BIM-23190、結核ワクチン、多エピトープチロシナーゼペプチド、がんワクチン、エンカスチム(enkastim)、APC-8024、Gl-5005、ACC-001、TTS-CD3、血管標的TNF(固形腫瘍)、デスモプレシン(頬側制御放出)、オネルセプト(onercept)、又はTP-9201である。

【００８７】

また、目的の産物(POI)は、核酸、例えば、RNA、例えば、アンチセンスRNA、マイクロRNA、siRNA、tRNA、rRNA、又は任意の他の調節性、治療用、若しくは別様に有用なRNAであってもよい。種々の治療用siRNAが当技術分野に記載されており、非限定的な例として、siRNAは、FTDP-17(前頭側頭型認知症)、DYT1ジストニア、成長ホルモン欠乏症、アルツハイマーのBACE1、白血病(例えば、c-raf、bcl-2を標的とする)、黒色腫(例えば、ATF2、BRAFを標的とする)、前立腺がん(例えば、P110Bを標的とする)、及び膵臓癌(例えば、K-Rasを標的とする）を処置することが意図されているものであってもよい。siRNA療法は、「Therapeutic potentials of short interfering RNAs」、Appl Microbiol Biotechnol、DOI 10.1007/s00253-017-8433-zに要約されている。同様に、miRNAの場合、本発明に従って実施することができる種々のmiRNA治療手法は、「MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases」、Nature Reviews Drug Discovery;16、203～222頁(2017年)に要約されている。

【００８８】

本発明の一部の実施形態では、導入遺伝子、例えば、メガヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)、転写活性化因子様エフェクターベースヌクレアーゼ(TALEN)、又はクラスター化規則的間隔短鎖回文反復配列系(CRISPR-Cas)等の部位特異的ヌクレアーゼをコードする遺伝子は、遺伝子編集に有用であり得る。好適には、部位特異的ヌクレアーゼは、切断(典型的には、部位特異的二本鎖切断）を作り出し、次いで切断は非相同末端結合(NHEJ)又は相同性依存性修復(HDR)により修復され、所望の編集がもたらされることにより、所望の標的ゲノム遺伝子座を編集するように構成されている。編集は、機能不全であるか又は機能的遺伝子がノックダウン若しくはノックアウトされた遺伝子の部分的又は完全な修復であってもよい。

【００８９】

第7の態様では、本発明の第1の態様によるCRE、本発明の第2の態様によるCRM、本発明の第3の態様によるプロモーター、又は本発明の第6の態様による発現カセットを含むベクターが提供される。

【００９０】

ベクターは、細胞における核酸の取り込み、増殖、発現、又は伝達に好適な任意の天然に存在するか又は合成的に生成された構築物、例えば、プラスミド、ミニサークル、ファージミド、コスミド、人工染色体/ミニ染色体、バクテリオファージ、バキュロウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス(AAV)、単純ヘルペスウイルス、又はバクテリオファージ等のウイルスであってもよい。ベクターを構築するための方法は、当業者に周知であり、種々の刊行物及び参考文献に記載されている。特に、プロモーター、エンハンサー、終止及びポリアデニル化シグナル、選択マーカー、複製起点、並びにスプライシングシグナル等の機能性及び調節性成分の説明を含む、好適なベクターを構築するための技法は、当業者に公知である。好ましい実施形態では、ベクターは、真核生物発現ベクターであってもよい。また、真核生物発現ベクターは、典型的には、複製起点及び細菌での選択のための抗生物質耐性遺伝子等、細菌でのベクターの繁殖を容易にする原核生物配列を含むことになる。ポリヌクレオチドをそこに作動可能に連結することが

できるクローニング部位を含む様々な真核生物発現ベクターが、当技術分野で周知であり、幾つかは、Stratagene社、ラホーヤ、カリフォルニア州;Invitrogen社、カールズバッド、カリフォルニア州;及びPromega社、マディソン、ウィスコンシン州等の会社から市販されている。

【００９１】

本発明の一部の実施形態では、ベクターは、真核細胞での発現のための発現ベクターである。真核生物発現ベクターの例としては、これらに限定されないが、Stratagene社から入手可能なpW-LNEO、pSV2CAT、pOG44、pXT1、及びpSG;Amersham Pharmacia Biotech社から入手可能なpSVK3、pBPV、pMSG、及びpSVL;並びにClontech社から入手可能なpCMVDsRed2-express、pIRES2-DsRed2、pDsRed2-Mito、pCMV-EGFPが挙げられる。多くの他のベクターが周知であり、市販されている。哺乳動物細胞アデノウイルスベクターでは、pSV及びpCMV系統のベクターが、特に周知の非限定的な例である。限定ではないが、酵母組込みプラスミド(YIp)及び酵母複製プラスミド(YRp)を含む、多くの周知の酵母発現ベクターが存在する。植物の場合、例示的な発現ベクターは、アグロバクテリウムのTiプラスミドであり、植物ウイルスも、好適な発現ベクター、例えば、タバコモザイクウイルス(TMV)、ジャガイモウイルスX、及びササゲモザイクウイルスを提供する。

【００９２】

本発明の一部の実施形態では、ベクターはプラスミドである。そのようなプラスミドは、1つ又は複数の選択可能なマーカー、1つ又は複数の複製起点、及び多クローニング部位等の、様々な他の機能的核酸配列を含んでいてもよい。

【００９３】

本発明の一部の実施形態では、ベクターは、エピソーム性であるか、又は細胞のゲノムに組み込まれてもよい。

【００９４】

第8の態様では、発現カセットを含むバイオプロセスベクターであって、発現カセットは、導入遺伝子に作動可能に連結した合成低酸素誘導性プロモーターを含み、合成低酸素誘導性プロモーターは、低酸素誘導剤(HIF)に結合して活性化され得る少なくとも1つの低酸素応答エレメント(HRE)を含む、バイオプロセスベクターが提供される。

【００９５】

HIFは、細胞内の酸素レベルの減少により活性化される転写因子のファミリーである。通常の酸素条件下では、HIFは、ヒドロキシル化後に分解される。低酸素条件はHIFを安定させ、その分解を防止する。それにより、HIFが核に移行し、HREに結合し、HRE応答遺伝子を活性化することが可能になる。

【００９６】

低酸素誘導性プロモーターは、典型的には、最小プロモーターに作動可能に連結したHIFにより結合及び活性化され得るHREを含む。しかしながら、一部の場合では、HIFにより結合及び活性化され得るHREは、最小プロモーター以外のプロモーター(例えば、組織特異的近位プロモーター等の近位プロモーター)に作動可能に連結している。状況に応じて、HREに関連付けられる特定のプロモーターを選択することができるが、特にバックグラウンド発現レベルを最小限に抑えることが所望の場合は、典型的には、最小プロモーターが好ましい。

【００９７】

HREは、一般に、HIF結合部位(HBS)と呼ばれる短い保存された配列の多量体で構成される。名前が示唆するように、HBSは、HIFに結合し、その際にHREが活性化されて転写が駆動される。したがって、本発明のHREは、複数のHBS、好ましくは3つ又はそれよりも多くのHBS、より好ましくは3～10個のHBS、より好ましくは3～8つのHBS、より好ましくは4～8つのHBSを含む。本発明の一部の好ましい実施形態では、HREは、5、6、又は8つのHBSを含む。

【００９８】

HBSのコアコンセンサス配列を決定した。コアコンセンサス配列は、NCGTG(配列番号5、Nは任意のヌクレオチドを表す)である。最初の位置ではA又はGが最適であることが示されているため、一般に好ましいコンセンサス配列は、[AG]CGTG(配列番号6)である。HBSは、二本鎖DNAのいずれの鎖に(つまり、いずれの方向で)存在していても機能性であることが留意されるべきである。したがって、例えば、HBSは、一方の鎖の逆補体コンセンサス配列CACG[CT](配列番号102)により表すことができ、これは、対応する相補鎖に配列[AG]CGTG(配列番号6)が存在することを示す(そのような場合、HBSは「逆方向」又は「反対方向」にあると記述することができる)。

【００９９】

本発明のHREに含まれるHBSは各々、好ましくは、コンセンサス配列NCGTG(配列番号5)を含み、任意選択でコンセンサス配列[AG]CGTG(配列番号6)を含む。コンセンサス配列にフランキングする追加の配列が存在してもよく、それらは、HBSに対するHIFの親和性に何らかの効果を及ぼす。本発明の一部の実施形態に好ましいHBSは、下記で論じられている。

【０１００】

隣接するHBSは、典型的には、しかしながら常にではないが、スペーサー配列により隔てられている。HREのHBS間の間隔は、プロモーターの誘導性及び/又は全体的な能力に著しい効果を及ぼす可能性がある。一部の場合では、プロモーターの誘導性及び能力を最大化するために、隣接するHBS間の間隔を最適化することが望ましい可能性がある。他の場合では、プロモーターの誘導性及び/又は全体的な能力がより低いプロモーターを提供するために、準最適な間隔を使用することが望ましい可能性がある。本発明の好ましい実施形態に存在するHBS間の特定の間隔は、下記で論じられることになる。しかしながら、一般に、典型的には、隣接するHBSの隣接するコアコンセンサス配列間の間隔は、3～50ヌクレオチドであることが好ましい。高レベルの発現に寄与するためには、典型的には、隣接するHBSのコアコンセンサス配列間の間隔は、7～25ヌクレオチド、好ましくは約8～22ヌクレオチドであることが好ましい。中レベルの発現のためには、典型的には、隣接するHBSのコアコンセンサス配列間の間隔は、5～6ヌクレオチド又は26～32ヌクレオチドであることが好ましい。低レベルの発現のためには、典型的には、隣接するHBSのコアコンセンサス配列間の間隔は、2～4ヌクレオチド又は33～50ヌクレオチドであることが好ましい。隣接するHBS間の間隔を変化させ、それによりHREの特性を調整する余地があることが理解されるだろう。

【０１０１】

HREは、典型的には、プロモーター(例えば、最小プロモーター)から離間されているが、そうである必要はない。間隔は、プロモーターの誘導性及び/又は全体的な能力に影響を及ぼす可能性がある。一般に、最後のHBSのコアコンセンサス配列(つまり、最小プロモーターに最も近位にある配列)と最小プロモーターのTATAボックス(又はTATAボックスが存在しない場合は同等の配列)との間の間隔は、0～200ヌクレオチドであることが好ましく、より好ましくは10～100ヌクレオチド、更により好ましくは20～70ヌクレオチド、更により好ましくは20～50ヌクレオチド、更により好ましくは20～30ヌクレオチドである。高レベルの発現に寄与するためには、典型的には、最後のHBSと最小プロモーターのTATAボックス(又はTATAボックスが存在しない場合は同等の配列)との間の間隔は、20～30であることが好ましく、これよりも著しく上まわる間隔及び下まわる間隔は、発現レベルの低下に結び付く。好適には、最後のHBSのコアコンセンサス配列(つまり、最小プロモーターに最も近位であるもの)と最小プロモーターのTATAボックス(又はTATAボックスが存在しない場合は同等の配列)との間に間隔がないことが好ましくてもよい。最後のHBSとMPとの間の間隔を変化させ、それによりHREの特性を調整する余地があることが理解されるだろう。

【０１０２】

本発明の一部の実施形態では、HIFにより結合及び活性化され得るHREは、HRE1配列を含むか又はそれからなる少なくとも1つのHBSを含む。HRE1 HBS配列はACGTGC(配

列番号8)である。無論、HRE1は、核酸のいずれの鎖に存在してもよく、したがって、そのような場合、逆方向HRE1は、逆相補体配列GCACGT(配列番号103)の存在により示されることになる。

【０１０３】

本発明の一部の実施形態では、HREに存在する全てのHBSは、HRE1配列を含むか又はそれからなる。HREに存在するHRE1配列は、各々独立していずれの方向で存在してもよい。一部の実施形態では、HREに存在するHRE1配列は全てが同じ方向であることが好ましい。

【０１０４】

本発明の一部の実施形態では、HIFにより結合及び活性化され得るHREは、HRE2配列を含むか又はそれからなる少なくとも1つのHBSを含む。HRE2の配列はCTGCACGTA(配列番号7)である。HRE2では、HBSは、HRE1と比較して逆方向で存在し、したがって、HRE2配列は、HRE1配列の逆相補体を含む。HRE2は、核酸のいずれの鎖に存在してもよく、したがって、そのような場合、逆方向HRE2は、逆相補体配列TACGTGCAG(配列番号104)の存在により示すことができる。

【０１０５】

HRE2配列は、追加のフランキング配列を含み、HRE1よりも強くHIFに結合する最適化HBSであると考えられる。したがって、高レベルのプロモーター誘導性及び能力が所望の場合、HRE2は、HRE1よりも好ましいと考えることができる。本発明の一部の実施形態では、HREに存在するHBSは全てが、HRE2配列を含むか又はそれからなる。HRE2配列は事実上HRE1配列を含むため、HRE2が提供される場合、HRE1も必然的に存在することになることは明らかであろう。HREに存在するHRE2配列は、各々独立していずれの方向で存在してもよい。一部の実施形態では、HREに存在するHRE2配列は全てが同じ方向であることが好ましい。

【０１０６】

本発明の一部の実施形態では、HIFにより結合及び活性化され得るHREは、HRE3配列又はその機能的バリアントを含むか又はそれからなる少なくとも1つのHBSを含む。

【０１０７】

HRE3配列は、

【化７３】

ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATG

(配列番号9、下線部はHBS)である。HRE3は、スペーサーにより隔てられている2つの個々のHBS(つまり、HIFに対する結合部位、下線部)を含み、各末端に更なるスペーサーを有する複合HBSを表す。HRE3は、各方向に1つのHBSを含むことを理解することができる(1つはHRE1を含み、1つはHRE2を含み、HRE1配列は、HRE2配列に対して5'に位置する)。各HRE3配列が2つの個々のHBSを含む場合、本発明の目的では、各HRE3配列又はその機能的バリアントは、HREに存在するHBSの総数に対して2つの個々のHBSに寄与する。

【０１０８】

HRE3又はその機能的バリアントは、核酸のいずれの鎖に存在してもよく、したがって、そのような場合、逆方向のHRE3は、逆相補体配列CATACGTGCAGAGACGCACGTACTCAAGGT(配列番号105)の存在により示すことができる。

【０１０９】

上記に言及されている通り、HRE3の機能的バリアントも本発明の実施形態を形成する。そのようなバリアントは、HIFに結合して活性化に至る能力を保持している場合、機能性である。HRE3の好ましい機能的バリアントは、HRE3と同じHBSを、実質的に同じ位置及び方向に保持するが、異なるスペーサー配列を含む。したがって、一部の好ましい実

施形態では、HRE3の機能的バリアントは、好適には、以下の配列:
(S_1-ACGTG-S_2-CTGCACGTA-S_3、配列番号106);
を有し、
ここで、S_1は、長さ8～10、好ましくは9のスペーサーであり、
ここで、S_2は、長さ4～6、好ましくは5のスペーサーであり、
ここで、S_3は、長さ1～3、好ましくは2のスペーサーである。
【0110】
本発明の一部の実施形態では、HRE3の機能的バリアントは、配列NNNNNNNNNACGTGNNNNNCTGCACGTANN(配列番号107)を含む。
【0111】
一部の好ましい実施形態では、HRE3の機能的バリアントは、HRE3と少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%同一の、HRE3に対する全体的配列同一性を有し、HBS配列はHRE3と完全に同一である。
HRE3は、HIFと強力に結合する特に最適な配列であると考えられる。したがって、高レベルのプロモーター誘導性及び能力が所望の場合、同様の特性を維持するHRE3又はその機能的バリアントの存在が好ましいと考えられる。
【0112】
本発明の一部の実施形態では、HREに存在するHBSは全て、HRE3配列又はその機能的バリアントを含むか又はそれからなる。HREに存在するHRE3配列又はその機能的バリアントは、各々独立していずれの方向で存在してもよい。一部の実施形態では、HREに存在するHRE3配列又はその機能的バリアントは全てが同じ方向であることが好ましい。
【0113】
本発明の一部の実施形態では、HREは、HRE1、HRE2、及び/又はHRE3の2つ又はそれよりも多くの組合せを含んでいてもよい。
【0114】
本発明の一部の実施形態では、HIFにより結合及び活性化され得るHREは、好適には、以下の配列:
- [ACGTGC-S]$_n$-ACGTGC(配列番号108);
を含み、
ここで、Sは、スペーサーであり、nは、2～9、好ましくは3～7である。スペーサーの配列は様々であってもよいこと、つまり、各反復単位[ACGTGC-S]$_n$(配列番号109)中のスペーサーは、同じ配列又は長さを有してもよく又は有していなくてもよいことが留意されるべきである。
【0115】
スペーサーの長さは、プロモーターの所望の誘導性及び能力に応じて様々であってもよい。
【0116】
したがって、プロモーターの誘導性及び能力を最大化することが所望である実施形態では、スペーサーは、隣接するHBSのコアコンセンサス配列間の間隔が7～18ヌクレオチド、好ましくは約8～12ヌクレオチド、より好ましくは約10ヌクレオチドとなるように提供される。プロモーターの誘導性及び能力を最大化することが望ましいことが多いが、一部の場合では、より低いレベルの誘導性及び能力が所望である可能性がある。より低いレベルの誘導性及び能力が所望である実施形態では、スペーサーは、隣接するHBSが、より少ない量又は多い量で、例えば、4～6ヌクレオチド又は19～50ヌクレオチドで離間されるように提供されていてもよい。HRE1 HBSは、コアコンセンサス配列にフランキングする1つのヌクレオチド(下線部 -
【化74】

ACGTGC

、配列番号8)を含むため、そうした実施形態のスペーサーでは、これを考慮に入れて所望の間隔が提供されることは自明であろう。

【０１１７】

本発明の一部の実施形態では、HIFにより結合及び活性化され得るHREは、好適には、以下の配列:

ACGTGC-S-ACGTGC-S-ACGTGC-S-ACGTGC-S-ACGTGC(配列番号１１０)

を含み、ここで、Sはスペーサーである。スペーサーの好適な長さは、上記で論じられている。本発明の一部の実施形態では、スペーサーは各々、30～50、好ましくは40ヌクレオチドの長さを有する。そのような場合、例示的であるが非限定的なスペーサーは、以下の配列:GATGATGCGTAGCTAGTAGTGATGATGCGTAGCTAGTAGT(配列番号１１１)を有する。

【０１１８】

本発明の一実施形態では、HIFにより結合及び活性化され得るHREは、好適には以下の配列:

【化７５】

ACGTGCGATGATGCGTAGCTAGTAGTGATGATGCGTAGCTAGTAGTACGTGCGATGATGCGTAG
CTAGTAGTGATGATGCGTAGCTAGTAGTACGTGCGATGATGCGTAGCTAGTAGTGATGATGCGT
AGCTAGTAGTACGTGCGATGATGCGTAGCTAGTAGTGATGATGCGTAGCTAGTAGTACGTGC

(配列番号１１２、下線部はHBS)、又はそれと少なくとも80%同一、好ましくはそれと85%、90%、95%、若しくは99%同一である機能的バリアントを含む。典型的には、そのような機能的バリアントでは、HRE1配列は、参照配列と実質的又は完全に同一であり、実質的に全ての配列変異は、スペーサー配列に生じていることが好ましい。

【０１１９】

そのようなHREは、一般に、誘導時に非常に低いレベルの誘導性及び低い発現レベルを示す。これは、バックグラウンド発現を最小限に抑える必要があり、誘導時に高レベルの発現が必要ではない状況において望ましい可能性がある。無論、HBSの最適化間隔は、誘導時により高いレベルの誘導性及び発現をもたらすことができる。

【０１２０】

本発明の一部の好ましい実施形態では、HIFにより結合及び活性化され得るHREは、好適には、以下の配列:

$[CTGCACGTA\text{-}S]_n$-CTGCACGTA(配列番号１００);

を含み、ここで、Sは、任意のスペーサーであり、nは、2～9、好ましくは3～7である。スペーサーの配列は、存在する場合、様々であってもよいこと、つまり、各反復配列$[CTGCACGTA\text{-}S]_n$(配列番号１１３)のスペーサーは、同じ配列又は長さを有してもよく又は有していなくてもよいことが留意されるべきである。

【０１２１】

隣接するHBSのコアコンセンサス配列間の好適な間隔の詳細は、前述の実施形態について上記で論じられており、こうした考慮事項は、こうした実施形態に等しく適用される。HRE2 HBSは、コアコンセンサス配列にフランキングする4つのヌクレオチド(下線部

【化７６】

CTGCACGTA

、配列番号7)を含むため、こうした実施形態のスペーサーでは、これを考慮に入れて所望の間隔が提供されることは自明であろう。

【０１２２】
本発明の一部の実施形態では、HIFにより結合及び活性化され得るHREは、好適には、以下の配列:
CTGCACGTA-S-CTGCACGTA-S-CTGCACGTA-S-CTGCACGTA-S-CTGCACGTA-S-CTGCACGTA(配列番号１１４)を含み、ここで、Sはスペーサーである。スペーサーの好適な長さは、上記で論じられている。
【０１２３】
本発明の一部の実施形態では、スペーサーは各々、２０ヌクレオチドの長さを有する。そのような場合、例示的であるが非限定的なスペーサーは、以下の配列:GATGATGCGTAGCTAGTAGT(配列番号１１５)を有する。
【０１２４】
本発明の一実施形態では、HIFにより結合及び活性化され得るHREは、好適には、以下の配列:
【化７７】

CTGCACGTAGATGATGCGTAGCTAGTAGTCTGCACGTAGATGATGCGTAGCTAGTAGTCTGCACGTAGATGATGCGTAGCTAGTAGTCTGCACGTAGATGATGCGTAGCTAGTAGTCTGCACGTA

(配列番号１１６、下線部はHBS)、又はそれと少なくとも８０％同一、好ましくはそれと８５％、９０％、９５％、若しくは９９％同一である配列を含む機能的バリアントを含む。典型的には、そのような機能的バリアントでは、HRE2配列は参照配列と実質的に又は完全に同一であり、実質的に全ての配列変異は、それらの間にあるスペーサー配列に生じていることが好ましい。そのようなHREは、一般に、誘導時に中レベルの誘導性及び低い発現レベルを示す。これは、バックグラウンド発現を最小限に抑える必要があり、誘導時に中程度レベルの発現が必要である状況において望ましい可能性がある。更に、HBS間隔の最適化は、無論、誘導時により高いレベルの誘導性及び発現をもたらすことができる。同様に、最適化の解除は、誘導時により低いレベルの誘導性及び発現をもたらすことができる。
【０１２５】
本発明の一部の実施形態では、HIFにより結合及び活性化され得るHREは、好適には以下の配列:
【化７８】

CTGCACGTACTGCACGTACTGCACGTACTGCACGTA

(配列番号１１７、下線部はHBS)、又はそれと少なくとも８０％同一、好ましくはそれと８５％、９０％、９５％、若しくは９９％同一である配列を含む機能的バリアントを含む。このHREは、隣接するHRE2エレメント間に追加のスペーサーを含まないことを理解することができる。しかしながら、HRE2のコアコンセンサス配列を取り囲む4つのフランキングヌクレオチドを考慮すると、コアコンセンサス配列は、4ヌクレオチドの有効間隔を有する。
【０１２６】
そのようなHREは、一般に、誘導時に中レベルの誘導性及び低い発現レベルを示す。これは、バックグラウンド発現を最小限に抑える必要があり、誘導時に中程度レベルの発現が必要である状況において望ましい可能性がある。更に、HBS間隔の最適化は、無論、誘導時により高いレベルの誘導性及び発現をもたらすことができる。同様に、最適化の

解除は、誘導時により低いレベルの誘導性及び発現をもたらすことができる。

【０１２７】

本発明の一部の好ましい実施形態では、HIFにより結合及び活性化され得るHREは、好適には、3～6つ、好ましくは3～5つ、好ましくは4つ若しくは6つのHRE3配列、又はそれらの機能的バリアントを含み、隣接するHRE3配列又はそれらの機能的バリアントは、4～20ヌクレオチド、好ましくは6～15ヌクレオチド、より好ましくは5又は9ヌクレオチドの長さを有するスペーサーにより互いに隔てられている。

【０１２８】

本発明の好ましい実施形態では、HIFにより結合及び活性化され得るHREは、好適には以下の配列:

【化７９】

$$[ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATG\text{-}S]_n\text{-}ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATG$$

(配列番号118)

を含み、

ここで、Sは、任意のスペーサーであり、nは、2～7、好ましくは4～6、好ましくは4又は6である。スペーサーの配列は、存在する場合、様々であってもよいこと、つまり、各反復単位$[ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATG\text{-}S]_n$(配列番号119)中のスペーサーは、同じ配列又は長さを有してもよく又は有していなくてもよいことが留意されるべきである。上記に示されているHRE3配列は、一部の又は全ての場合で、その機能的バリアントに置き換えることができることが理解されるだろう。

【０１２９】

隣接するHBSのコアコンセンサス配列間の好適な間隔の詳細は、前述の実施形態について上記で論じられており、こうした考慮事項は、こうした実施形態に等しく適用される。HRE3複合HBSは、2つのコアコンセンサス配列を含む領域に隣接する11個のヌクレオチド(下線部 -

【化８０】

$$\underline{ACCTTGAGT}ACGTGCGTCTCTGCACGTA\underline{TG}$$

、配列番号9)を含むため、こうした実施形態のスペーサーでは、これを考慮に入れて所望の間隔が提供されることは自明であろう。一部の実施形態では、スペーサーSは、好適には、4～20ヌクレオチド、好ましくは7～15ヌクレオチド、より好ましくは5又は9ヌクレオチドの長さを有する。

【０１３０】

本発明の一部の実施形態では、HIFにより結合及び活性化され得るHREは、好適には、以下の配列:

【化８１】

$$ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATG\text{-}S\text{-}\,ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATG\text{-}S\text{-}ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATG\text{-}S\text{-}\,ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATG\text{-}S$$

、(配列番号120)を含み、ここで、Sはスペーサーである。スペーサーの好適な長さは、

上記で論じられている。ここに示されているHRE3配列は、一部の又は全ての場合で、その機能的バリアントに置き換えることができることが理解されるだろう。

【０１３１】

本発明の一部の実施形態では、HIFにより結合及び活性化され得るHREは、好適には以下の配列:

【化８２】

ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATG-S- ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATG-S-
ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATG-S- ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATG-S-
ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATG-S

、(配列番号121)を含み、ここで、Sはスペーサーである。スペーサーの好適な長さは、上記で論じられている。ここに示されているHRE3配列は、一部の又は全ての場合で、その機能的バリアントに置き換えることができることが理解されるだろう。

【０１３２】

本発明の一部の実施形態では、HIFにより結合及び活性化され得るHREは、好適には、以下の配列:

【化８３】

ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATG-S- ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATG-S-
ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATG-S- ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATG-S-
ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATG-S-ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATG

、(配列番号122)を含み、Sはスペーサーである。スペーサーの好適な長さは、上記で論じられている。ここに示されているHRE3配列は、一部の又は全ての場合で、その機能的バリアントに置き換えることができることが理解されるだろう。

【０１３３】

本発明の一部の実施形態では、スペーサーは各々、9ヌクレオチドの長さを有する。そのような場合、例示的であるが非限定的なスペーサーは、以下の配列:GCGATTAAG(配列番号123)を有する。

【０１３４】

本発明の一部の実施形態では、スペーサーは各々、5ヌクレオチドの長さを有する。そのような場合、例示的であるが非限定的なスペーサーは、以下の配列:gataa(配列番号124)又は以下の配列:tgcgt(配列番号125)を有する。

【０１３５】

好適には、スペーサーの配列は様々であってもよく、つまり、各反復単位のスペーサーは、同じ配列又は長さを有してもよく又は有していなくてもよい。一実施形態では、スペーサーは全て、5ヌクレオチドの長さを有してもよいが、例えば、異なる配列を有してもよい。例えば、一実施形態では、HREは、2つの異なるスペーサー配列、
好適には第1及び第2のスペーサー配列が存在する配列を含んでいてもよい。 好適には、第1及び第2のスペーサー配列は各々、任意の数及び任意のパターンで配列内に存在してもよい。好適には、第1及び第2のスペーサー配列は交互に存在してもよい。一実施形態では、HREは、第1のスペーサー配列がgataa(配列番号124)であり、第2のスペーサー配列がtgcgt(配列番号125)である配列を含む。一実施形態では、こうしたスペーサーは交互に存在する。

【０１３６】

本発明の好ましい一実施形態では、HIFにより結合及び活性化され得るHREは、好適には、以下の配列:

【化８４】

ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGGCGATTAAGACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCAC
GTATGGCGATTAAGACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGGCGATTAAGACCTTGAGTAC
GTGCGTCTCTGCACGTATG

(配列番号１２６、下線部はＨＢＳ)、又はそれと少なくとも８０％同一、好ましくはそれと８５％、９０％、９５％、若しくは９９％同一である配列を含む機能的バリアントを含む。典型的には、そのような機能的バリアントでは、ＨＲＥ３配列に存在するＨＲＥ１及びＨＲＥ２配列は、参照配列と実質的に又は完全に同一であり、実質的に全ての配列変異は、それらの間にあるスペーサー配列に生じていることが好ましい。

【０１３７】

そのようなＨＲＥは、一般に、誘導時に高レベルの誘導性及び高い発現レベルを示す。これは、誘導時に高レベルの発現が必要である状況において望ましい可能性がある。更に、ＨＢＳ間隔の最適化は、潜在的に、誘導時により高いレベルの誘導性及び発現をもたらすことができる。同様に、最適化の解除は、より低いレベルの誘導性及び誘導時の発現をもたらすことができる。

【０１３８】

本発明の好ましい一実施形態では、ＨＩＦにより結合及び活性化され得るＨＲＥは、好適には、以下の配列:

【化８５】

GTGTGACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACG
TATGtgcgtACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCA
CGTATGtgcgtACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTG
CACGTATG

(配列番号１２７、下線部はＨＢＳ)、又はそれと少なくとも８０％同一、好ましくはそれと８５％、９０％、９５％、若しくは９９％同一である配列を含む機能的バリアントを含む。典型的には、そのような機能的バリアントでは、ＨＲＥ３配列に存在するＨＲＥ１及びＨＲＥ２配列は、参照配列と実質的に又は完全に同一であり、実質的に全ての配列変異は、それらの間にあるスペーサー配列に生じていることが好ましい。

【０１３９】

本発明の好ましい一実施形態では、ＨＩＦにより結合及び活性化され得るＨＲＥは、好適には、以下の配列:

【化８６】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGACCTTGAGTACGTGCGTC
TCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGtgcgtACCTTGAGTACGTGCG
TCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGtgcgtACCTTGAGTACGTG
CGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATG

(配列番号１２８、下線部はＨＢＳ)、又はそれと少なくとも８０％同一、好ましくはそれと８５％、９０％、９５％、若しくは９９％同一である配列を含む機能的バリアントを含む。典型的には、そのような機能的バリアントでは、ＨＲＥ３配列に存在するＨＲＥ１及びＨＲＥ２配列は、参照配列と実質的に又は完全に同一であり、実質的に全ての配列変異は、それらの間にあるスペーサー配列に生じていることが好ましい。

【０１４０】
以前に言及されている通り、低酸素誘導性プロモーターは、典型的には、最小プロモーター又は近位プロモーターに作動可能に連結した、HIFにより結合及び活性化され得るHREを含む。HREに作動可能に連結したプロモーターは、最小プロモーターであることが好ましい。
【０１４１】
最小プロモーターは、任意の好適な最小プロモーターであってもよい。幅広い範囲の最小プロモーターが当技術分野で公知である。限定ではないが、好適な最小プロモーターとしては、CMV最小プロモーター(CMV-MP)、YB-TATA最小プロモーター(YB-TABA)、HSVチミジンキナーゼ最小プロモーター(MinTK)、及びSV40最小プロモーター(SV40-MP)が挙げられる。最小プロモーターは、合成最小プロモーターであってもよい。特に好ましい最小プロモーターは、CMV最小プロモーター(CMV-MP)及びYB-TATA最小プロモーター(YB-TABA)である。適切な最小プロモーターは、本発明の第3の態様及び本発明の第4の態様に関して上記に提示されている。好適には、低酸素誘導性プロモーターは、典型的には、配列番号28～32、57、63～66、101、及び150のいずれか１つによる最小プロモーターに作動可能に連結した、HIFにより結合及び活性化され得るHREを含む。
【０１４２】
したがって、本発明の好ましい実施形態は、上述の最小プロモーターの1つ、より好ましくはCMV-MP又はYB-TATA、最も好ましくはCMV-MPに作動可能に連結した、HIFにより結合及び活性化され得るHREを含む。CMV-MPは、本発明のHREと組み合わせると、非常に高いレベルの誘導性及び高いプロモーター強度を提供することが示された。低いバックグラウンド発現レベルも観察された。
【０１４３】
HREは、好ましくは、スペーサー配列により最小プロモーター(又は使用されている場合は、他のタイプのプロモーター)から離間されている。HREと最小プロモーターとの間の間隔は、低酸素誘導性プロモーターの誘導性及び能力に影響を及ぼす可能性がある。一般に、最後のHBSのコアコンセンサス配列(つまり、最小プロモーターに最も近位にある配列)と最小プロモーターのTATAボックス(又はTATAボックスが存在しない場合は同等の配列)との間の間隔は、10～100ヌクレオチド、より好ましくは20～70ヌクレオチド、更により好ましくは20～50ヌクレオチド、更により好ましくは20～30ヌクレオチドであることが好ましい。低酸素誘導性プロモーターの誘導性及び能力を最適化することが所望である実施形態では、最後のHBSと最小プロモーターのTATAボックス(又はTATAボックスが存在しない場合は同等の配列)との間の間隔は、好ましくは20～30ヌクレオチドである。幾らかより低いレベルの誘導性及び能力が所望である実施形態では、最後のHBSとTATAボックス(又はTATAボックスが存在しない場合は同等の配列)との間の間隔は、より小さくてもよく又はより大きくてもよく、例えば、0～10ヌクレオチド又は31～100ヌクレオチドであってもよい。一部の実施形態では、最後のHBSのコアコンセンサス配列(つまり、最小プロモーターに最も近位であるもの)と最小プロモーターのTATAボックス(又はTATAボックスが存在しない場合は同等の配列)との間に間隔がないことが好ましい。プロモーターの誘導性及び能力を最大化することが望ましいことが多いが、一部の場合では、より低いレベルの誘導性及び能力が所望である可能性がある。
【０１４４】
本発明の一部の特定の好ましい実施形態では、低酸素誘導性プロモーターは、好適には、以下の配列のうちの1つを含む(HBS配列には下線が引かれており、最小プロモーター配列は太字で示されている):
-

【化８７】

ACGTGCGATGATGCGTAGCTAGTAGTGATGATGCGTAGCTAGTAGTACGTGCGATGATGCG
TAGCTAGTAGTGATGATGCGTAGCTAGTAGTACGTGCGATGATGCGTAGCTAGTAGTGATGA
TGCGTAGCTAGTAGTACGTGCGATGATGCGTAGCTAGTAGTGATGATGCGTAGCTAGTAGTA
CGTGC**TTGGTACCATCCGGGCCGGCCGCTTAAGCGACGCCTATAAAAAATAGGTTGCATG**
CTAGGCCTAGCGCTGCCAGTCCATCTTCGCTAGCCTGTGCTGCGTCAGTCCAGCGCTGCG
CTGCGTAACGGCCGCC

(Synp-RTV-015;配列番号１２９)、又はそれと少なくとも８０％同一、好ましくはそれと８５％、９０％、９５％、若しくは９９％同一である配列を含む機能的バリアント;

-

【化８８】

CTGCACGTACTGCACGTACTGCACGTACTGCACGTATGGGTACCGTCGACGATATCGGATC
C**AGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTAGATACGCCATCCAC**
GCTGTTTTGACCTCCATAGAAGATCGCCACC

(Synp-HYP-001、配列番号１３０)、又はそれと少なくとも８０％同一、好ましくはそれと８５％、９０％、９５％、若しくは９９％同一である配列を含む機能的バリアント;

-

【化８９】

ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTA
TGtgcgtACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGC
ACGTATGtgcgtACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTC
TCTGCACGTATG**TCTAGAGGGTATATAATGGGGGCCA**

(Synp-HYPNの一部、配列番号１３１)、又はそれと少なくとも８０％同一、好ましくはそれと８５％、９０％、９５％、若しくは９９％同一である配列を含む機能的バリアント;

-

【化９０】

ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTA
TGtgcgtACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGC
ACGTATGtgcgtACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTC
TCTGCACGTATGGCGATTAATCCATATGC**GTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGC**
AGAGCT

(Synp-HYBNCの一部、配列番号１３２)、又はそれと少なくとも８０％同一、好ましくはそれと８５％、９０％、９５％、若しくは９９％同一である配列を含む機能的バリアント;

-

【化９１】

ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTA
TGtgcgtACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGC
ACGTATGtgcgtACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTC
TCTGCACGTATGCAACAAAATGTCGTAAC**AAGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTA**
TATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCG

(Synp-HYBNC53の一部、配列番号133)、又はそれと少なくとも80%同一、好ましくはそれと85%、90%、95%、若しくは99%同一である配列を含む機能的バリアント;

-

【化９２】

ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTA
TGtgcgtACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGC
ACGTATGtgcgtACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTC
TCTGCACGTATG**TTCGCATATTAAGGTGACGCGTGTGGCCTCGAACACCGAGCGACCCTGC**
AGCGACCCGCTTAA

(Synp-HYBNMinTKの一部、配列番号134)、又はそれと少なくとも80%同一、好ましくはそれと85%、90%、95%、若しくは99%同一である配列を含む機能的バリアント;

-

【化９３】

ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTA
TGtgcgtACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGC
ACGTATGtgcgtACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTC
TCTGCACGTATG**GGGGGGCTATAAAAGGGGGTGGGGGCGTTCGTCCTCACTCT**

(Synp-HYBNMLPの一部、配列番号135)、又はそれと少なくとも80%同一、好ましくはそれと85%、90%、95%、若しくは99%同一である配列を含む機能的バリアント;

-

【化９４】

ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTA
TGtgcgtACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGC
ACGTATGtgcgtACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTC
TCTGCACGTATGT**GCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCAT**
CCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATCGCTGACTAATTTTTTTTA
TTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCT
TTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTT

(Synp-HYBNSVの一部、配列番号136)、又はそれと少なくとも80%同一、好ましくはそれと85%、90%、95%、若しくは99%同一である配列を含む機能的バリアント;

-

【化95】

ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGtgcgtACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGtgcgtACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATG**CTGACAAATTCAGTATAAAAGCTTGGGGCTGGGGCCGAGCACTGGGGACTTTGAGGGTGGCCAGGCCAGCGTAGGAGGCCAGCGTAGGATCCTGCTGGGAGCGGGGAACTGAGGGAAGCGACGCCGAGAAAGCAGGCGTACCACGGAGGGAGAGAAAAGCTCCGGAAGCCCAGCAGCG**

(Synp-HYBNpJB42の一部、配列番号137)、又はそれと少なくとも80%同一、好ましくはそれと85%、90%、95%、若しくは99%同一である配列を含む機能的バリアント;或いは

-

【化96】

ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGtgcgtACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGtgcgtACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATG**TATAAAAGGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGaagcttggactaaagcggacttgtctcgag**

(Synp-HYBNTATAm6aの一部、配列番号138)、又はそれと少なくとも80%同一、好ましくはそれと85%、90%、95%、若しくは99%同一である配列を含む機能的バリアント。

【0145】

典型的には、そのような機能的バリアントでは、HRE1、HRE2、HRE3、及びMP配列は、参照配列と実質的に同一であり、実質的に全ての配列変異は、スペーサー配列に生じていることが好ましい。

【0146】

本発明の一部の好ましい実施形態では、細胞を低酸素にすることによる誘導時に(例えば、以前は正常酸素だった、例えば20%酸素に曝露されていた細胞を5%酸素に5時間曝露した後)、導入遺伝子の発現レベルは、少なくとも5倍、より好ましくは10倍、15倍、20倍、30倍、又は50倍増加する。

【0147】

本発明の一部の好ましい実施形態では、誘導時(例えば、以前は正常酸素だった、例えば20%酸素に曝露されていた細胞を5%酸素に5時間曝露した後)、導入遺伝子の発現レベルは、CMV-IEプロモーターにより提供される発現レベル(つまり、同じ条件下の同じ細胞において他の点では同一であるが、導入遺伝子の発現が、低酸素誘導性プロモーターではなくCMV-IEの制御下にあるベクター)の少なくとも50%である。より好ましくは、導入遺伝子の発現レベルは、CMV-IEプロモーターにより提供される発現レベルの少なくとも75%、100%、150%、200%、300%、400%、又は500%である。

【0148】

導入遺伝子は、典型的には、目的のタンパク質又は目的のポリペプチドであってもよい目的の産物をコードする。目的のタンパク質又は目的のポリペプチドは、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、融合タンパク質であってもよく、それらは全て宿主細胞で発現させることができ、任意選択でそこから分泌させることができる。

【０１４９】

好適な目的のタンパク質及びポリペプチドは、本発明の第6の態様に関して上記に提示されている。

【０１５０】

また、目的の産物は、核酸、例えば、RNA、例えば、アンチセンスRNA、マイクロRNA、siRNA、tRNA、rRNA、又は任意の他の調節性、治療用、若しくは別様に有用なRNAであってもよい。

【０１５１】

バイオプロセスベクターは、細胞における核酸の取り込み、増殖、発現、又は伝達に好適な任意の天然に存在するか又は合成的に生成された構築物、例えば、プラスミド、ミニサークル、ファージミド、コスミド、人工染色体/ミニ染色体、バクテリオファージ、バキュロウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス(AAV)、単純ヘルペスウイルス、又はバクテリオファージ等のウイルスであってもよい。ベクターを構築するための方法は、当業者に周知であり、種々の刊行物及び参考文献に記載されている。特に、プロモーター、エンハンサー、終止及びポリアデニル化シグナル、選択マーカー、複製起点、並びにスプライシングシグナル等の機能性及び調節性成分の説明を含む、好適なベクターを構築するための技法は、当業者に公知である。好ましい実施形態では、ベクターは、真核生物発現ベクターであってもよい。また、真核生物発現ベクターは、典型的には、複製起点及び細菌での選択のための抗生物質耐性遺伝子等、細菌でのベクターの繁殖を容易にする原核生物配列を含むことになる。ポリヌクレオチドをそこに作動可能に連結することができるクローニング部位を含む様々な真核生物発現ベクターは、当技術分野で周知であり、幾つかは、Stratagene社、ラホーヤ、カリフォルニア州;Invitrogen社、カールズバッド、カリフォルニア州;及びPromega社、マディソン、ウィスコンシン州等の会社から市販されている。

【０１５２】

本発明の一部の実施形態では、バイオプロセスベクターは、真核細胞での発現のための発現ベクターである。真核生物発現ベクターの例としては、これらに限定されないが、Stratagene社から入手可能なpW-LNEO、pSV2CAT、pOG44、pXT1、及びpSG;Amersham Pharmacia Biotech社から入手可能なpSVK3、pBPV、pMSG、及びpSVL;並びにClontech社から入手可能なpCMVDsRed2-express、pIRES2-DsRed2、pDsRed2-Mito、pCMV-EGFPが挙げられる。多くの他のベクターが周知であり、市販されている。哺乳動物細胞アデノウイルスベクターでは、pSV及びpCMV系統のベクターが、特に周知の非限定的な例である。限定ではないが、酵母組込みプラスミド(YIp)及び酵母複製プラスミド(YRp)を含む、多くの周知の酵母発現ベクターが存在する。植物の場合、例示的な発現ベクターは、アグロバクテリウムのTiプラスミドであり、植物ウイルスも、好適な発現ベクター、例えば、タバコモザイクウイルス(TMV)、ジャガイモウイルスX、及びササゲモザイクウイルスを提供する。

【０１５３】

本発明の一部の実施形態では、ベクターはプラスミドである。そのようなプラスミドは、1つ又は複数の選択可能なマーカー、1つ又は複数の複製起点、及び多クローニング部位等の、様々な他の機能的核酸配列を含んでいてもよい。

【０１５４】

本発明の一部の実施形態では、ベクターは、エピソーム性であリ、又は細胞のゲノムに組み込まれてもよい。

【０１５５】

第9の態様では、本発明の第1の態様によるCRE、本発明の第2の態様によるCRM、本

発明の第3の態様によるプロモーター、又は本発明の第6の態様による発現カセットを含む遺伝子治療ベクターが提供される。

【０１５６】

遺伝子治療ベクターは、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、又はアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター等のウイルスベクターであることが一般に好ましいが、他の形態の遺伝子治療ベクターも企図される。一部の好ましい実施形態では、ベクターは、AAVベクターである。一部の好ましい実施形態では、AAVは、肝臓形質導入に好適な血清型を有する。一部の実施形態では、AAVは、AAV2、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、又はそれらの誘導体からなる群から選択される。AAVベクターは、好適には、AAV形質導入における制限工程の1つ(つまり、一本鎖から二本鎖AAVへの変換)を克服するために、自己相補的な二本鎖AAVベクター(scAAV)として使用されるが、一本鎖AAVベクター(ssAAV)の使用も本明細書に包含される。本発明の一部の実施形態では、AAVベクターはキメラであり、これは、AAV2のITR及びAAV5のカプシドタンパク質等、少なくとも2つのAAV血清型に由来する成分を含むことを意味する。

【０１５７】

第10の態様では、本発明の第9の態様による遺伝子治療ベクターを含む組換えビリオン(ウイルス粒子)が提供される。ビリオンは、当業者に公知の従来技法を使用して産生することができる。

【０１５８】

第11の態様では、本発明の第9の態様による遺伝子治療ベクター又は本発明の第10の態様によるビリオンを含む医薬組成物が提供される。

【０１５９】

医薬組成物は、薬学的に許容される賦形剤、つまり、1つ又は複数の薬学的に許容される担体物質及び/又は添加剤、例えば、緩衝剤、担体、賦形剤、安定剤等を用いて製剤化されていてもよい。医薬組成物は、キットの形態で提供することができる。「薬学的に許容される」という用語は、本明細書で使用される場合、当技術分野と一致し、医薬組成物の他の成分と適合性であり、そのレシピエントに有害でないことを意味する。

【０１６０】

第12の態様では、本発明の第1の態様によるCRE、本発明の第2の態様によるCRM、本発明の第3の態様によるプロモーター、本発明の第6の態様による発現カセット、若しくは本発明の第7、第8、若しくは第9の態様によるベクターを含む細胞が提供される。細胞は、例えば、細胞培養中に存在してもよく、又はin vivoに存在してもよい。

【０１６１】

本発明の第1の態様によるCRE、本発明の第2の態様によるCRM、本発明の第3の態様によるプロモーター、本発明の第6の態様による発現カセット、又は本発明の第7、第8、若しくは第9の態様によるベクターは、エピソーム性であってもよく、又は細胞のゲノムに組み込まれていてもよい。

【０１６２】

細胞は、例えば、細胞培養中に存在してもよく、又はin vivoに存在してもよい。

【０１６３】

好適な細胞としては、これらに限定されないが、酵母細胞、植物細胞、昆虫細胞、又は哺乳動物細胞等の真核細胞が挙げられる。例えば、細胞は、任意のタイプの分化細胞であってもよく、又は卵母細胞、胚性幹細胞、造血幹細胞、若しくは他の形態であってもよい。一部の好ましい実施形態では、細胞は、動物(後生動物)細胞(例えば、哺乳動物細胞)である。一部の好ましい実施形態では、細胞は、哺乳動物細胞である。一部の好ましい実施形態では、哺乳動物細胞は、ヒト、サル、ネズミ、ラット、ウサギ、ハムスター、ヤギ、ウシ、ヒツジ、又はブタの細胞である。目的の産物の産生に特に好ましい細胞又は「宿主細胞」は、ヒト、マウス、ラット、サル、又はげっ歯動物の細胞株である。一部の実施形態では、ハムスター細胞、例えば、BHK21、BHK TK^{-}、CHO、CHO-K1、CHO-DUK

X、CHO-DUKX B1、CHO-S、CHO-K1SV、CHO-K1SV GSノックアウト、及びCHO-DG44細胞、又はそのような細胞株のいずれかの派生物/子孫が好ましい。代替的な実施形態では、細胞は、ヒト細胞であってもよい。一部の好ましい実施形態では、ヒト細胞は、ヒト胎児腎臓(HEK)細胞、好ましくはHEK 293F細胞であってもよい。本発明の別の好ましい実施形態では、細胞は、網膜細胞、例えば網膜色素上皮(RPE)細胞、例えば、ARPE-19(ATCC CRL-2302)であってもよい。更に、マウスミエローマ細胞、好ましくは、NS0及びSP2/0細胞、又はそのような細胞株のいずれかの派生物/子孫も、バイオ医薬品タンパク質の産生細胞株として周知である。本発明で使用することができる細胞株及びそれらを入手することができる供給源の非限定的な例は、Table 1(表1)にまとめられている。好適な宿主細胞は、DSMZ(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen and Zeilkuituren GmbH社、ブラウンシュワイク、ドイツ)、又はアメリカ培養細胞系統保存機関(ATCC)等の細胞系統保存機関から商業的に入手可能である。

【０１６４】

【表１】

TABLE 1: 本発明での使用に好適な細胞株の供給源。

細胞株	供給源
NS0	ECACC No.85110503
Sp2/0-Ag14	ATCC CRL-1581
BHK21	ATCC CCL-10
BHK TK$^-$	ECACC No.85011423
HaK	ATCC CCL-15
2254-62.2 (BHK-21 誘導体)	ATCC CRL-8544
CHO	ECACC No.8505302
CHO 野生型	ECACC 00102307
CHO-K1	ATCC CCL-61
CHO-DUKX (また CHO duk$^-$, CHO/dhfr$^-$)	ATCC CRL-9096
CHO-DUKX B11	ATCC CRL-9010
CHO-DG44	Urlaub ら、Cell 33 巻(2 号)、405～412 頁、1983 年
CHO Pro-5	ATCC CRL-1781
CHO-S	Invitrogen 社カタログ番号 10743-029
Led 3	Stanley P.ら、Ann. Rev. Genetics 18 巻、525～552 頁、1984 年
V79	ATCC CCC-93
B14AF28-G3	ATCC CCL-14
HEK 293	ATCC CRL-1573
COS-7	ATCC CRL-1651
U266	ATCC TIB-196
HuNSI	ATCC CRL-8644
Per.C6	Fallaux, F.J.ら、Human Gene Therapy 9 巻(13 号)、1909～1917 頁、199
CHL	ECACC No.87111906

【０１６５】

特に好ましい細胞は、ヒト肝細胞(特にHuh7細胞)、ヒト筋肉細胞(特にC2C12細胞)、ヒト胎児腎臓細胞(特にHEK-293細胞、及び特にHEK-293-F細胞)、CHO細胞(特にCHO-K1SV細胞)である。

【０１６６】
バイオプロセスでは、無血清条件下で、任意選択で、動物由来のタンパク質/ペプチドを一切含まない培地中で、細胞を樹立、適応、及び完全培養することが好ましい場合がある。ハムF12(Sigma社、ダイゼンホーフェン、ドイツ)、RPMI-1640(Sigma社)、ダルベッコ変法イーグル培地(DMEM;Sigma社)、最小必須培地(MEM;Sigma社)、Iscove変法ダルベッコ培地(IMDM;Sigma社)、CD-CHO(Invitrogen社、カールズバッド、カリフォルニア州)、CHO-S-SFMII(Invtirogen社)、無血清CHO培地(Sigma社)、無タンパク質CHO培地(Sigma社)、EX-CELL培地(SAFC社)、CDM4CHO及びSFM4CHO(HyClone社)等の市販の培地は、例示的な適切な栄養溶液である。培地はいずれも、必要に応じて、様々な化合物で補完されていてもよく、そうした化合物の例は、ホルモン及び/又は他の成長因子(インスリン、トランスフェリン、上皮成長因子、インスリン様成長因子等)、塩(塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム、リン酸塩等)、緩衝剤(HEPES等)、ヌクレオシド(アデノシン、チミジン等)、グルタミン、グルコース、又は他の同等のエネルギー源、抗生物質、微量元素である。また、任意の他の必要な補完剤は、適切な濃度で含まれていてもよく、適切な濃度は当業者に公知であろう。本発明では、無血清培地の使用が好ましいが、宿主細胞の培養には、好適な量の血清で補完された培地を使用することもできる。選択可能な遺伝子を発現する遺伝子改変細胞の成長及び選択のために、好適な選択剤が培養培地に添加される。

【０１６７】
細胞は、原核細胞、例えば、細菌細胞であってもよい。本発明の一部の実施形態では、細胞は原核細胞であってもよい。原核細胞は、本発明に関連付けられる誘導系を有していないが、原核細胞は、バイオプロセスベクターの産生に、又はバイオプロセスベクターの取り扱い、輸送、若しくは保管における他の工程に有用であってもよい。

【０１６８】
第13の態様では、本発明の第12の態様の細胞集団、及び細胞の成長を支援するのに十分な培地を含む細胞培養物が提供される。

【０１６９】
更なる第14の態様では、発現産物を産生するための方法であって、
a)本発明の第6の態様による発現カセット又は本発明の第7、第8、若しくは第9の態様によるベクターを含む真核細胞の集団を提供する工程;
b)前記細胞の集団を培養する工程;
c)発現カセット又はベクターに存在する導入遺伝子の発現を誘導し、それにより発現産物が産生されるように、前記細胞の集団を処置する工程;及び
d)発現産物を前記細胞の集団から回収する工程
を含む方法が提供される。

【０１７０】
一部の実施形態では、発現産物を産生するための方法であって、
a)本発明の第6の態様による合成発現カセットを含む真核細胞の集団を提供する工程;
b)前記細胞の集団を培養する工程;
c)発現カセットに存在する導入遺伝子の発現を誘導し、それにより発現産物が産生されるように、前記細胞の集団を処置する工程;及び
d)発現産物を前記細胞の集団から回収する工程
を含む方法が提供される。

【０１７１】
一部の実施形態では、細胞の集団は、誘導剤を、好適には、アデニリルシクラーゼ又は低酸素を活性化する誘導剤を細胞に投与することにより導入遺伝子の発現が誘導されるように処置される。

【０１７２】
一部の実施形態では、本発明は、発現産物を産生するための方法であって、
(a)本発明の第8の態様によるバイオプロセスベクターを含む真核細胞、好ましくは動

物細胞、最も好ましくは哺乳動物細胞の集団を提供する工程;
(b)前記細胞の集団を培養する工程;及び
(c)細胞に低酸素を誘導して、低酸素誘導性プロモーターに連結した導入遺伝子からの発現が誘導され、発現産物が産生されるように、前記細胞の集団を処置する工程;及び
(d)発現産物を回収する工程
を含む方法を提供する。

【０１７３】

この方法は、好適には、細胞培養法である。一部の実施形態では、この方法は、バイオプロセス法、つまり、生細胞を使用して所望の産物を得るプロセスである。好ましい導入遺伝子及びそれらがコードする目的の産物は、上記で論じられている。発現産物は、治療、美容、研究、又は他の産業プロセスに有用であってもよい。

【０１７４】

工程(b)は、典型的には、細胞の増殖に好適な条件下で前記細胞の集団を維持することを含む。こうした条件により、典型的には、工程(c)での誘導時に導入遺伝子から発現産物が発現されるように細胞が提供される。したがって、細胞は、使用されている細胞のタイプに好適な細胞培養条件で提供してもよい。種々の細胞タイプに好適な細胞培養条件は、当業者に周知であるか、又は文献から容易に特定することができる。

【０１７５】

合成発現カセットは、ゲノムに存在してもよく、又はエピソーム性であってもよい。合成発現カセットは、細胞内で安定であってもよく、又は一過性であってもよい。

【０１７６】

本発明は、発現産物の産生を細胞培養プロセスの所望の時点まで遅延させることを可能することは自明であろう。これにより、例えば、所望の細胞数若しくは濃度に達する時点まで、又は所望の成長期に達する時点まで、細胞の集団を拡大増殖させることができる。これは多くの理由で、例えば、成長を阻害する可能性のある導入遺伝子の発現前に最適条件下での細胞の成長を可能にするために、望ましい可能性がある。例えば、毒性タンパク質の場合、細胞培養系が所望の段階になるまで、毒性発現産物の産生を回避することができる。毒性タンパク質が発現すると、細胞は、無論、悪影響を受けるか又は死滅する。しかしながら、非毒性発現産物の場合であっても、所望の時点まで導入遺伝子の発現を遅延させることには、効率上かなり有利であり得る。

【０１７７】

この方法は、好適には、導入遺伝子の発現を誘導するように(例えば、低酸素により、又はアデニリルシクラーゼを活性化する誘導剤により)前記細胞の集団を処置する工程(c)の前に、細胞の成長に好適な条件下で前記細胞の集団をインキュベートする工程を含む。

【０１７８】

一部の実施形態では、細胞の集団は、細胞を低酸素状態に導く任意の手段で細胞を処置することにより導入遺伝子の発現を誘導するように処置される。

【０１７９】

好適には、工程(c)は、細胞を低酸素状態に導く任意の手段で細胞を処置することを含む。当業者であれば、任意の特定の細胞タイプ毎の好適な手法は明らかであろう。一般に、真核細胞は好気条件下で培養され、当技術分野では、種々の細胞及び培養タイプ毎にこれを達成するための多くの手法が公知である。低酸素条件は、細胞に供給される酸素の量を低減することにより達成することができる。例えば、細胞は、低酸素を誘導するために、より少ない酸素を含むか又は酸素を含まないガス混合物に切り替える前に、正常酸素条件下(例えば、約20％酸素)で成長させることができる。例えば、5％酸素を含むガスを使用して、細胞に低酸素を誘導することができる。細胞培養にて低酸素条件の誘導に使用するための例示的な好適なガス混合物は、5％酸素、10％二酸化炭素、及び85％窒素であるが、他のガス混合物を使用することができる。

【０１８０】

代替的な手法では、細胞培養での低酸素は、細胞に低酸素を誘導することができる作用

剤を導入することにより誘導することができる。例えば、$COCl_2$を、好適な濃度で、例えば、細胞培養培地中およそ100μMの最終濃度で使用して、低酸素を誘導することができる。一般に、本発明では、低酸素は、費用がかさむような作用剤を添加せずに達成されることが好ましく、多くの場合では、作用剤は望ましいものではなく、除去するのが難しい可能性がある。

【０１８１】

一部の場合では、所望の発現産物の発現を最適化するか又はそうでなければモジュレートするために、細胞が低酸素条件にある間に細胞に供給される酸素の量を変更することが望ましい場合がある。例えば、まず、高度な低酸素条件を確立して、低酸素条件を強力に誘導し、続いて、細胞の健康及び活性に対して悪影響がより少ない、あまり低酸素でない条件下で細胞を一定期間培養することが望ましい場合がある。したがって、工程(c)は、細胞が供される低酸素のレベルを変化させることを含んでいてもよい。

【０１８２】

本明細書で論じられている低酸素誘導性プロモーターからの発現は、プロモーターを含む細胞が曝露される酸素のレベルを変更することにより調整(例えば非誘導、抑制、又はモジュレート)することができる。例えば、低酸素による発現誘導は、細胞を正常酸素条件に曝露(例えば、20％酸素に暴露)することにより、スイッチをオフ(非誘導)にすることができる。

【０１８３】

一部の実施形態では、細胞の集団は、アデニリルシクラーゼの活性化に結び付く任意の手段で細胞を処置することにより導入遺伝子の発現を誘導するように処置される。

【０１８４】

工程(c)は、好ましくは、細胞のアデニル酸シクラーゼを活性化して、細胞内cAMPのレベル上昇をもたらすことを含む。

【０１８５】

工程(c)は、典型的には、誘導剤を細胞に投与することを含む。誘導剤は、アデニリルシクラーゼを活性化する任意の作用剤であってもよい。無論、誘導剤は、細胞に対して著しく毒性でないか又はそうでなければ有害でないことが好ましい。

【０１８６】

アデニリルシクラーゼを活性化することができる好適な誘導剤としては、これらに限定されないが、以下のものが挙げられる:

- フォルスコリン(強力なアデニリルシクラーゼ活性化剤(CAS番号66575-29-9));
- NKH 477(フォルスコリンの水溶性アナログ(CAS番号138605-00));
- PACAP-27(アデニル酸シクラーゼを刺激する神経ペプチド(CAS番号127317-03-7));
- PACAP-38(アデニル酸シクラーゼを刺激する神経ペプチド(CAS番号137061-48-4));
- 百日咳毒素　CAS番号70323-44-3;及び
- コレラ毒素(CAS番号9012-63-9)。

【０１８７】

上記は全て、Sigma-Aldrich, Inc社(現在は、Merck KGaA社の一部)から市販されている。

【０１８８】

本発明の特に好ましい実施形態では、誘導剤は、フォルスコリン又はNKH477を含む。

【０１８９】

フォルスコリンは、一般に安全であるとみなされていると分類されており(GRAS)、これは、安全性の観点で一般に望ましい。フォルスコリン(コレノールとも呼ばれる)は、インドコリウス植物(プレクトランサス・バルバツス(Plectranthus barbatus)により産生されるラブダン型ジテルペンである。フォルスコリンは、環状AMPのレベルを増加させるために、材料研究において広く使用されている。フォルスコリンは、伝統医学でも使

用されている。フォルスコリンはGRASであるため、遺伝子治療応用において、本発明によるプロモーターの好ましい誘導剤である。

【０１９０】

NKH477は、フォルスコリンの水溶性アナログであるため、特に細胞培養での使い易さの点で有利であり得る。NKH477は水溶性であるため、バイオプロセス応用において、本発明によるプロモーターの好ましい誘導剤である。

【０１９１】

誘導剤は、任意の好適な様式で細胞に投与することができる。例えば、誘導剤は、必要に応じて、好適な担体又は界面活性剤等と共に、培養培地に添加することができる。

【０１９２】

任意の所与の誘導剤の好適な投与速度は、当業者であれば容易に決定することができる。したがって、当業者であれば、任意の誘導剤毎に、その誘導剤を細胞に送達するための適切な方法、及び好適な使用濃度を容易に決定することができる。一般論として、誘導剤は、1nM～1000μMの範囲、任意選択で0.1μM～100μMの範囲の任意の好適な濃度で投与することができる。

【０１９３】

フォルスコリンは、好適には、0.1μM～1000μM、より好ましくは1μM～100μM、更により好ましくは5μM～30μMの濃度で、細胞に投与することができる。例えば、約18μMの濃度での細胞への投与は、HEK-293細胞での発現を誘導するのに最適であると決定された。

【０１９４】

NKH477は、好適には、0.1μM～1000μM、より好ましくは1μM～100μM、更により好ましくは2μM～20μMの濃度で細胞に投与することができる。例えば、約8μMの濃度での細胞への投与は、HEK-293細胞での発現を誘導するのに最適であると決定された。

【０１９５】

この方法は、好適には、誘導剤の投与を中止する工程を含んでいてよい。誘導剤の投与中止は、発現産物の発現の少なくとも低減に結び付くことになる。典型的には、発現産物の発現は、経時的に基線レベルへと戻ることになる。

【０１９６】

この方法は、好適には、細胞に投与される誘導剤の濃度を経時的に変化させる工程を含んでいてもよい。この工程を使用して、発現産物の発現レベルをモジュレートすることができる。

【０１９７】

一部の実施形態では、この方法は、細胞に、発現産物の発現を低減又は遮断するように作用する、アデニリルシクラーゼの阻害剤を投与する工程を含んでいてもよい。アデニリルシクラーゼの阻害剤としては、これらに限定されないが、以下のものが挙げられる:

- NB001 - アデニリルシクラーゼ1(AC1)の阻害剤;
- 9-シクロペンチルアデニンモノメタンスルホネート - 安定細胞透過性非競合性アデニリルシクラーゼ阻害剤;
- SQ22,536 - 細胞透過性アデニリルシクラーゼ阻害剤;
- MDL-12,330A塩酸塩 - アデニリルシクラーゼ阻害剤;
- 2',5'-ジデオキシアデノシン - 細胞透過性アデニリルシクラーゼ阻害剤;
- 2',5'-ジデオキシアデノシン3'-三リン酸四ナトリウム塩 - アデニリルシクラーゼの強力な阻害剤;
- MANT-GTPγS - 強力な競合性アデニリルシクラーゼ阻害剤;
- 2',3'-ジデオキシアデノシン - 特異的アデニリルシクラーゼ阻害剤;
- NKY80 - 選択的アデニリルシクラーゼ-V阻害剤;及び
- KH7 - 可溶性アデニリルシクラーゼの選択的阻害剤。

【０１９８】

上記は全て、Sigma-Aldrich, Inc社(現在はMerck KGaA社の一部)から市販されている。

【０１９９】

真核細胞の集団は、細胞培養に好適な任意のタイプの細胞であってもよい。一部の好ましい実施形態では、真核細胞の集団は、哺乳動物細胞の集団である。幅広い範囲の哺乳動物細胞を使用することができ、それらの多くは上記で論じられている。好ましい哺乳動物細胞としては、限定ではないが、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)、ヒト肝細胞、ヒト筋肉細胞、ヒト胎児腎臓(HEK)細胞、ヒト胎児網膜細胞、ヒト羊膜細胞、及びマウスミエローマリンパ芽球様細胞が挙げられる。特に好ましい細胞は、ヒト肝細胞(特にHuh7細胞)、ヒト筋肉細胞(特にC2C12細胞)、ヒト胎児腎臓細胞(特にHEK-293細胞、及び特にHEK-293-F細胞)、CHO細胞(特にCHO-K1SV細胞)である。

【０２００】

工程(d)、つまり、前記細胞の集団からの発現産物の回収は、当技術分野で周知の従来技法を使用して実施することができる。工程(d)は、典型的には、前記細胞の集団から、一部の場合では細胞培養培地の他の成分から、発現産物を分離することを含む。この方法は、好ましくは、発現産物を精製する工程を含む。発現産物を回収及び/又は精製するための好適な方法は、当技術分野ではありふれたものであり、選択される方法は、発現産物の特定の性質に依存することになる。

【０２０１】

一部の実施形態では、この方法は、好適には、発現カセットを細胞内に導入する工程を含んでいてもよい。真核細胞をトランスフェクトする周知の方法は数多く存在し、当業者であれば、任意の細胞タイプに好適な方法を容易に選択することができる。発現カセットは、無論、上記で論じられている任意の好適なベクター内に提供することができる。一部の実施形態では、この方法は、本明細書に記載のバイオプロセスベクターを細胞内に導入する工程を含む。本発明での使用に好適な種々の細胞内にベクターを導入するための方法は、当技術分野で周知である。

【０２０２】

こうした方法は、これらに限定されないが、撹拌タンク、エアリフト(airlift)、繊維、マイクロファイバー、中空繊維、セラミックマトリックス、流動床、固定床、及び/又は噴出床バイオリアクターを含む、任意の好適な反応器内で実施することができる。本明細書で使用される場合、「反応器」は、発酵槽若しくは発酵ユニット、又は任意の他の反応容器を含むことができ、「反応器」という用語は、「発酵槽」と同義的に使用される。例えば、一部の態様では、例示的なバイオリアクターユニットでは、以下のうちの1つ若しくは複数又は全てを実施することができる:栄養素及び/又は炭素源の供給、好適なガス(例えば、酸素)の注入、発酵物若しくは細胞培養培地の入口流及び出口流、気相及び液相の分離、温度の維持、酸素及びCO_2レベルの維持、pHレベルの維持、撹拌(例えば、かき混ぜること)、及び/又は洗浄/滅菌。発酵ユニット等の反応器ユニットの例は、ユニット内に複数のリアクターを含んでいてもよく、例えば、ユニットは、各ユニットに1～10個又はそれよりも多くのバイオリアクターを有してもよい。種々の実施形態では、バイオリアクターは、バッチプロセス、半流加バッチプロセス、流加バッチプロセス、灌流プロセス、及び/又は連続発酵プロセスに好適であってもよい。一部の実施形態では、バイオリアクターは、約100ml～約50,000リットル、好ましくは10リットル又はそれよりも多くの容積を有してもよい。加えて、好適な反応器は、複数回使用、単回使用、使い捨て、又は非使い捨てであってもよく、任意の好適な材料で形成されていてもよい。米国特許出願公開第2013/0280797号、第2012/0077429号、第2011/0280797号、第2009/0305626号、及び米国特許第8,298,054号、第7,629,167号、及び第5,656,491号(これらの全体は参照により本明細書に組み込まれる)には、本発明で使用することができる例示的なシステムが記載されている。

【０２０３】

第15の態様では、本発明は、本発明の第12の態様による細胞を含む細胞培養物、及び

細胞の成長を支援するのに十分な培地を含む反応容器を提供する。

【０２０４】

本発明に好適な種々の反応器は、上記に記載されている。細胞が低酸素により誘導される実施形態では、反応器は、好ましくは、例えば、細胞培養物に提供される酸素ガスの量を制御することにより、正常酸素条件及び低酸素条件の両方を細胞培養物に適用することが可能なように構成されている。

【０２０５】

第16の態様では、本発明は、目的の産物、例えば、治療用産物を製造するためのバイオプロセス法における、本発明の第7、第8、又は第9の態様によるベクター又は本発明の第12の態様による細胞の使用を提供する。好適な方法は、上記で論じられている。

【０２０６】

第17の態様では、本発明は、それを必要とする対象、好ましくはヒトの遺伝子治療の方法であって、

- 治療用発現産物をコードする配列を含む、本発明の第9の態様による遺伝子治療ベクターを含む医薬組成物を、遺伝子治療ベクターが核酸発現構築物を対象の標的細胞へと送達するように対象に導入する工程;及び
- 治療有効量の治療用発現産物が対象で発現されるように、誘導剤を対象に投与する工程

を含む方法を提供する。

【０２０７】

遺伝子治療プロトコールは、当技術分野で広範に記載されている。遺伝子治療プロトコールとしては、これらに限定されないが、好適なベクターの筋肉内注射、筋肉を含む種々の組織での流体力学的遺伝子送達、間質注射、気道での点滴、内皮への塗布、肝内実質、及び静脈内若しくは動脈内投与が挙げられる。標的細胞へのDNAの利用能を増強するために、種々のデバイスが開発されている。簡易な手法は、DNAを含むカテーテル又は移植可能な材料を標的細胞と物理的に接触させることである。別の手法は、柱状の液体を高圧下で標的組織内に直接射出する無針ジェット注射デバイスを使用することである。こうした送達パラダイムは、ベクターの送達にも使用することができる。標的化遺伝子送達の別の手法は、細胞に対する核酸の特異的標的化のための核酸結合剤又はDNA結合剤が付着しているタンパク質又は合成リガンドで構成される分子コンジュゲートの使用である(Cristianoら、1993年）。

【０２０８】

発現産物(例えば、タンパク質)の発現レベルは、例えば、発現産物の治療的発現が達成されたか否かを評価するための抗体ベースアッセイ、例えば、ウェスタンブロット又はELISAアッセイ等の、種々の従来手段により測定することができる。発現産物の発現は、遺伝子産物の酵素活性又は生物学的活性を検出するバイオアッセイで測定することもできる。

【０２０９】

治療用産物は、対象の任意の好適な位置で治療的効果を示すことができる。例えば、治療用産物は、それを発現している細胞、近隣の細胞若しくは組織に効果を示してもよく、又は治療用産物は、分泌されて血流に進入し、体内の他所で状態を処置してもよい。

【０２１０】

本発明で使用することができる種々の誘導剤は、上記で論じられている。フォルスコリンは、GRASであり、安全にヒトに投与することができるため、特に好ましい誘導剤である。しかしながら、他の薬学的に許容される誘導剤を使用することができる。

【０２１１】

誘導剤は、標的部位(target suite)に直接送達してもよく(例えば、注射により)又は全身投与してもよい。任意の所与の誘導剤の好適な投与速度は、当業者であれば容易に決定することができる。したがって、当業者であれば、任意の誘導剤毎に、その誘導剤を細胞に送達するための適切な方法、及び好適な使用濃度を容易に決定することができる。

【０２１２】
この方法は、好適には、対象への誘導剤の投与を中止する工程を含んでいてよい。誘導剤の投与中止は、発現産物の発現の少なくとも低減に結び付くことになる。典型的には、発現産物の発現は、経時的に基線レベルへと戻ることになる。誘導剤の投与は、例えば、好適な治療的利益が達成された後で中止してもよい。
【０２１３】
この方法は、好適には、対象に投与される誘導剤の量を経時的に変化させる工程を含んでいてもよい。これは、対象に提供される治療用産物の発現レベルをモジュレートするために使用することができる。対象に投与される誘導剤の量は、所望の量(用量)の治療用産物の発現を得るために調整することができる。したがって、治療用産物の量を増加させる臨床上の必要性がある場合(例えば、対象における応答が不十分であるため)、対象に投与される誘導剤の量を増加させることができ、逆もまた同様である(例えば、過剰な応答又は望ましくない副作用のため)。量は、対象の状態の変化、対象におけるバイオマーカーのレベル、又は任意の他の理由に応答して様々であってもよい。したがって、本発明の一部の好ましい実施形態では、対象に提供される治療用産物の投与量をモジュレートするために、対象に投与される誘導剤の濃度を経時的に変化させる。
【０２１４】
一部の実施形態では、この方法は、
- 対象にて発現された治療用産物の量を決定するか又は治療用産物に対する対象の応答を評価する工程、及び
a)対象においてより多くの量の治療用産物が所望の場合、対象に投与される誘導剤の量を増加させる工程、又は
a)対象においてより少ない量の治療用産物が所望の場合、対象に投与される誘導剤の量を減少させる工程
を含んでいてもよい。
【０２１５】
対象に投与される誘導剤の量を経時的に変化させることができることを考慮すると、誘導剤は、無論、典型的には患者に連続投与されるのではなく、むしろ典型的には所与の投与量レベルにて所与の時間間隔で投与されることになることが理解されるだろう。したがって、本発明では、用量を調整すること、用量間の期間を調整すること、又はその両方により、対象に投与される誘導剤の量を経時的に変化させることが企図される。したがって、例えば、対象に投与される誘導剤の量を増加させるために、用量間の期間を一定に保ちながら用量を増加させてもよく、用量を一定に保ちながら用量間の期間を低減してもよく、又は用量を増加させかつ用量間の期間を低減させてもよい。対象に投与される誘導剤の量を減少させるために、用量間の期間を一定に保ちながら用量を減少させてもよく、用量を一定に保ちながら用量間の期間を低減してもよく、又は用量を減少させ、かつ用量間の期間を増加させてもよい。
【０２１６】
その代わりに又はそれに加えて、この方法は、対象における治療用産物の量を変化させるために、誘導剤を変更する工程を含んでいてもよい。例えば、弱い誘導剤をより強力な誘導剤に置き換えてもよく、又はその逆でもよい。
【０２１７】
また、この方法は、例えば、対象が誘導剤に対して有害反応を示すか、又は誘導剤が対象において有効でないことが見出された場合、誘導剤を変更する工程を含んでいてもよい。
【０２１８】
一部の実施形態では、この方法は、細胞に、発現産物の発現を低減又は遮断するように作用する、アデニリルシクラーゼの阻害剤を投与する工程を含んでいてもよい。アデニリルシクラーゼの阻害剤は、上記で論じられている。誘導剤に関して、アデニリルシクラーゼの阻害剤は、薬学的に許容されるものであるべきである。

【０２１９】
好適な治療用遺伝子産物をコードする遺伝子は、上記で論じられている。
【０２２０】
好適には、遺伝子治療ベクターは、ウイルス遺伝子治療ベクター、好ましくはＡＡＶベクターである。
【０２２１】
一部の実施形態では、この方法は、遺伝子治療ベクターを全身性投与する工程を含む。全身性投与は、経腸(例えば、経口、舌下、及び直腸)であってもよく又は非経口(例えば、注射)であってもよい。好ましい注射経路としては、静脈内注射、筋肉内注射、皮下注射、動脈内注射、関節内注射、髄腔内注射、及び皮内注射が挙げられる。
【０２２２】
一部の実施形態では、遺伝子治療ベクターは、1つ若しくは複数の追加の治療剤、又は細網内皮系によるベクターのクリアランスを防止するように設計された1つ若しくは複数の飽和剤と同時に又は順次に投与してもよい。
【０２２３】
遺伝子治療ベクターがＡＡＶベクターである場合、ベクターの投与量は、1×10^{10}gc/kg～$1x10^{15}$gc/kg又はそれよりも多く、好適には1×10^{12}gc/kg～1×10^{14}gc/kg、好適には5×10^{12}gc/kg～$5x10^{13}$gc/kgであってもよい。
【０２２４】
一般に、それを必要とする対象は、哺乳動物、好ましくは霊長類、より好ましくはヒトであるだろう。典型的には、それを必要とする対象は、疾患の特徴的な症状を示すだろう。この方法は、典型的には、治療量の治療用産物を発現させることにより、それを必要とする対象が示す症状を改善する工程を含む。
【０２２５】
第18の態様では、本発明は、処置又は治療の方法に使用するための、本発明の第6の態様による発現カセット、本発明の第7、第8、若しくは第9の態様によるベクター、本発明の第10の態様によるビリオン、本発明の第12の態様による細胞、又は本発明の第11の態様による医薬組成物を提供する。治療の好適な方法は、上記で論じられている。
【０２２６】
第19の態様では、医薬組成物の製造に使用するための、任意選択で、目的の産物、例えば、治療用産物を製造するためのバイオプロセス法に使用するための、本発明の第6の態様による発現カセット、本発明の第7、第8、又は第9の態様によるベクター、本発明の第10の態様によるビリオン、又は本発明の第12の態様による細胞が提供される。
【０２２７】
本発明の第20の態様では、以下の配列:
a)[ＡＣＧＴＧＣ-Ｓ]$_n$-ＡＣＧＴＧＣ（配列番号108)(ここで、Ｓはスペーサーであり、ｎは2～9、好ましくは3～7である);
b)[ＣＴＧＣＡＣＧＴＡ-Ｓ]$_n$-ＣＴＧＣＡＣＧＴＡ（配列番号100)(ここで、Ｓはスペーサーであり、ｎは2～9、好ましくは3～7である)；及び
c)
【化９７】

[ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATG-S]$_n$-
ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATG

(配列番号118)(ここで、Ｓはスペーサーであり、ｎは2～7、好ましくは4～6、好ましくは4又は6である)
のうちの1つを含む合成ＨＲＥが提供される。

【０２２８】
HREの種々の任意選択で好ましい特徴は、本発明の第8の態様に関して詳細に論じられており、それらは、無論、本発明のこの態様に等しく適用される(簡潔性のために、繰り返さないものとする)。特に、スペーサーの好ましい長さは、上記に示されている。
【０２２９】
本発明のこの第20の態様の一部の好ましい実施形態では、以下の配列:
a)
【化９８】

ACGTGCGATGATGCGTAGCTAGTAGTGATGATGCGTAGCTAGTAGTACGTGCGATGATGCG
TAGCTAGTAGTGATGATGCGTAGCTAGTAGTACGTGCGATGATGCGTAGCTAGTAGTGATGA
TGCGTAGCTAGTAGTACGTGCGATGATGCGTAGCTAGTAGTGATGATGCGTAGCTAGTAGTA
CGTGC

(配列番号112)、又はそれと少なくとも80%同一、好ましくはそれと85%、90%、95%、若しくは99%同一である機能的バリアント;
b)
【化９９】

CTGCACGTAGATGATGCGTAGCTAGTAGTCTGCACGTAGATGATGCGTAGCTAGTAGTCTGC
ACGTAGATGATGCGTAGCTAGTAGTCTGCACGTAGATGATGCGTAGCTAGTAGTCTGCACGT
AGATGATGCGTAGCTAGTAGTCTGCACGTA

(配列番号116)、又はそれと少なくとも80%同一、好ましくはそれと85%、90%、95%、若しくは99%同一である配列を含む機能的バリアント;或いは
c)
【化１００】

ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGGCGATTAAGACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGC
ACGTATGGCGATTAAGACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGGCGATTAAGACCTTGA
GTACGTGCGTCTCTGCACGTATG

(配列番号126)、又はそれと少なくとも80%同一、好ましくはそれと85%、90%、95%、若しくは99%同一である配列を含む機能的バリアント;
d)
【化１０１】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGACCTTGAGTACGTGC
GTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGtgcgtACCTTGAGTA
CGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGtgcgtACCTT
GAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATG

(配列番号128)、又はそれと少なくとも80%同一、好ましくはそれと85%、90%、95%

、若しくは99%同一である配列を含む機能的バリアント;及び
e)
【化１０２】

ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTA
TGtgcgtACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGC
ACGTATGtgcgtACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTC
TCTGCACGTATG

(配列番号139)、又はそれと少なくとも80%同一、好ましくはそれと85%、90%、95%、若しくは99%同一である配列を含む機能的バリアント;或いは
f)CTGCACGTACTGCACGTACTGCACGTACTGCACGTA(配列番号117)、又はそれと少なくとも80%同一、好ましくはそれと85%、90%、95%、若しくは99%同一である配列を含む機能的バリアント
のうちの1つを含むか又はそれからなる合成HREが提供される。
【０２３０】
典型的には、そのような機能的バリアントでは、HRE1、HRE2、及びHRE3配列は、実質的に同一であり、実質的に全ての変異は、スペーサー配列に生じていることが好ましい。
【０２３１】
本発明の第21の態様では、最小プロモーター又は近位プロモーター、好ましくは最小プロモーターに作動可能に連結した、本発明の第20の態様の少なくとも1つのHREを含む低酸素誘導性プロモーターが提供される。
【０２３２】
低酸素誘導性プロモーターの種々の任意選択で好ましい特徴(例えば、好ましい最小プロモーター及びHREとプロモーターとの間の間隔)は、本発明の第8の態様に関して詳細に論じられており、これらは、無論、本発明のこの態様に等しく適用される(簡潔性のため、繰り返さないものとする)。
【０２３３】
本発明の一部の好ましい実施形態では、低酸素誘導性プロモーターは、好適には、以下の配列:
-
【化１０３】

ACGTGCGATGATGCGTAGCTAGTAGTGATGATGCGTAGCTAGTAGTACGTGCGATGATGCG
TAGCTAGTAGTGATGATGCGTAGCTAGTAGTACGTGCGATGATGCGTAGCTAGTAGTGATGA
TGCGTAGCTAGTAGTACGTGCGATGATGCGTAGCTAGTAGTGATGATGCGTAGCTAGTAGTA
CGTGC**TTGGTACCATCCGGGCCGGCCGCTTAAGCGACGCCTATAAAAAATAGGTTGCATG**
CTAGGCCTAGCGCTGCCAGTCCATCTTCGCTAGCCTGTGCTGCGTCAGTCCAGCGCTGCG
CTGCGTAACGGCCGCC

(Synp-RTV-015;配列番号129)、又はそれと少なくとも80%同一、好ましくはそれと85%、90%、95%、若しくは99%同一である配列を含む機能的バリアント;
-

【化１０４】

CTGCACGTACTGCACGTACTGCACGTACTGCACGTATGGGTACCGTCGACGATATCGGATC
C**AGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTAGATACGCCATCCAC**
GCTGTTTTGACCTCCATAGAAGATCGCCACC

(Synp-HYP-001;配列番号１３０)、又はそれと少なくとも８０％同一、好ましくはそれと８５％、９０％、９５％、若しくは９９％同一である配列を含む機能的バリアント;

-

【化１０５】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGACCTTGAGTACGTGC
GTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGtgcgtACCTTGAGTA
CGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGtgcgtACCTT
GAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATG**TCT**
AGAGGGTATATAATGGGGGCCA

(Synp-HYPN;配列番号１４０)、又はそれと少なくとも８０％同一、好ましくはそれと８５％、９０％、９５％、若しくは９９％同一である配列を含む機能的バリアント;

-

【化１０６】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGACCTTGAGTACGTGC
GTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGtgcgtACCTTGAGTA
CGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGtgcgtACCTT
GAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGGCG
ATTAATCCATATGC**GTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCT**

(Synp-HYBNC;配列番号１４１)、又はそれと少なくとも８０％同一、好ましくはそれと８５％、９０％、９５％、若しくは９９％同一である配列を含む機能的バリアント;

-

【化１０７】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGACCTTGAGTACGTGC
GTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGtgcgtACCTTGAGTA
CGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGtgcgtACCTT
GAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGCAA
CAAAATGTCGTAAC**AAGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCT**C
GTTTAGTGAACCG

(Synp-HYBNC53;配列番号１４２)、又はそれと少なくとも８０％同一、好ましくはそれと８５％、９０％、９５％、若しくは９９％同一である配列を含む機能的バリアント;

-

【化１０８】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGACCTTGAGTACGTGC
GTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGtgcgtACCTTGAGTA
CGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGtgcgtACCTT
GAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATG**TTC**
GCATATTAAGGTGACGCGTGTGGCCTCGAACACCGAGCGACCCTGCAGCGACCCGCTTAA

(Synp-HYBNMinTK;配列番号１４３)、又はそれと少なくとも８０％同一、好ましくはそれと８５％、９０％、９５％、若しくは９９％同一である配列を含む機能的バリアント;

-

【化１０９】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGACCTTGAGTACGTGC
GTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGtgcgtACCTTGAGTA
CGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGtgcgtACCTT
GAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATG**GGG**
GGGCTATAAAAGGGGGTGGGGGCGTTCGTCCTCACTCT

(Synp-HYBNMLP;配列番号１４４)、又はそれと少なくとも８０％同一、好ましくはそれと８５％、９０％、９５％、若しくは９９％同一である配列を含む機能的バリアント;

-

【化１１０】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGACCTTGAGTACGTGC
GTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGtgcgtACCTTGAGTA
CGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGtgcgtACCTT
GAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATG**TGC**
ATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAACTCC
GCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATCGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCG
AGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAG
GCTTTTGCAAAAAGCTT

(Synp-HYBNSV;配列番号１４５)、又はそれと少なくとも８０％同一、好ましくはそれと８５％、９０％、９５％、若しくは９９％同一である配列を含む機能的バリアント;

-

【化１１１】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGACCTTGAGTACGTGC
GTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGtgcgtACCTTGAGTA
CGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGtgcgtACCTT
GAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATG**CTG**
ACAAATTCAGTATAAAAGCTTGGGGCTGGGGCCGAGCACTGGGGACTTTGAGGGTGGCCA
GGCCAGCGTAGGAGGCCAGCGTAGGATCCTGCTGGGAGCGGGGAACTGAGGGAAGCGA
CGCCGAGAAAGCAGGCGTACCACGGAGGGAGAGAAAAGCTCCGGAAGCCCAGCAGCG

(Synp-HYBNpJB42;配列番号１４６)、又はそれと少なくとも８０％同一、好ましくはそれと８５％、９０％、９５％、若しくは９９％同一である配列を含む機能的バリアント;或いは

-

【化１１２】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGACCTTGAGTACGTGC
GTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGtgcgtACCTTGAGTA
CGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGtgcgtACCTT
GAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATG**TAT**
AAAAGGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGaagcttggactaaagcggacttgtctcgag

(Synp-HYBNTATAm6a;配列番号１４７)、又はそれと少なくとも８０％同一、好ましくはそれと８５％、９０％、９５％、又は９９％同一である配列を含む機能的バリアント
のうちの1つを含む(HBS配列には下線がひかれており、最小プロモーター配列は太字で示されている)。

【０２３４】

典型的には、そのような機能的バリアントでは、HRE1、HRE2、HRE3、及びMP配列は、実質的に同一であり、実質的に全ての変異は、スペーサー配列に生じていることが好ましい。

【０２３５】

本発明の第22の態様では、治療用発現産物をコードする導入遺伝子に作動可能に連結した本発明の第20の態様によるHRE又は本発明の第21の態様による低酸素誘導性プロモーターを含む遺伝子治療ベクターが提供される。好適な治療用産物は、上記で論じられている。

【０２３６】

本発明の一部の実施形態では、導入遺伝子、例えば、メガヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)、転写活性化因子様エフェクターベースヌクレアーゼ(TALEN)、又はクラスター化規則的間隔短鎖回文反復配列系(CRISPR-Cas)等の部位特異的ヌクレアーゼをコードする遺伝子は、遺伝子編集に有用であり得る。好適には、部位特異的ヌクレアーゼは、切断(典型的には、部位特異的二本鎖切断）を作り出し、次いで切断が非相同末端結合(NHEJ)又は相同性依存性修復(HDR)により修復され、所望の編集がもたらされることにより、所望の標的ゲノム遺伝子座を編集するように構成されている。編集は、機能不全であるか、又は機能的遺伝子がノックダウン若しくはノックアウトされた遺伝子の部分的又は完全な修復であってもよい。

【０２３７】

本発明の一部の好ましい実施形態では、遺伝子治療ベクターは、レトロウイルスベクタ

ー、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、又はアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター等のウイルスベクターであるが、他の形態の遺伝子治療ベクターも企図される。一部の実施形態では、ベクターは、AAVベクターである。一部の実施形態では、AAVは、AAV2、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、又はそれらの誘導体からなる群から選択される。AAVベクターは、好適には、AAV形質導入における制限工程の1つ(つまり、一本鎖から二本鎖AAVへの変換)を克服するために、自己相補的な二本鎖AAVベクター(scAAV)として使用されるが、一本鎖AAVベクター(ssAAV)の使用も本明細書に包含される。本発明の一部の実施形態では、AAVベクターはキメラであり、これは、AAV2のITR及びAAV5のカプシドタンパク質等、少なくとも2つのAAV血清型に由来する成分を含むことを意味する。

【０２３８】

第23の態様では、本発明は、本発明による遺伝子治療ベクターを含む組換えビリオン（ウイルス粒子）を提供する。

【０２３９】

本発明の遺伝子治療ベクター又はビリオンは、薬学的に許容される賦形剤、つまり、1つ又は複数の薬学的に許容される担体物質及び/又は添加剤、例えば、緩衝剤、担体、賦形剤、安定剤等を用いて医薬組成物に製剤化することができる。医薬組成物は、キットの形態で提供することができる。

【０２４０】

したがって、第24の態様では、本発明は、上記に示されている遺伝子治療ベクター又はビリオンを含む医薬組成物を提供する。

【０２４１】

一部の実施形態では、低酸素誘導性プロモーター又はフォルスコリン誘導性プロモーターは、以下の構造:

-

【化１１３】

TGAGTCA-S_{20}-TGAGTCA-S_{20}-TGAGTCA-S_{20}-TGAGTCA-S_{20}-TGAGTCA-S_{20}-TGAGTCA-S_{20}-TGAGTCA-S_{20}-TGAGTCA-S_{59}-CMV-MP;

- TGACGTGCT-S_{20}- TGACGTGCT -S_{20}- TGACGTGCT -S_{20}- TGAGTCA -S_{20}- TGAGTCA -S_{20}- TGAGTCA -S_{20}- TGAGTCA -S_{20}-CTGCACGTA-S_{20}- CTGCACGTA -S_{20}- CTGCACGTA -S_{61}-CMV-MP;

- TGACGTCA-S_{10}- TGACGTCA -S_{10}- TGACGTCA -S_{10}- TGACGTCA -S_{10}- TGACGTCA -S_{10}- TGAGTCA -S_{10}- TGAGTCA -S_{10}- TGAGTCA -S_{10}- TGAGTCA - YB-TATA;

- CTGCACGTA-S_{20}-CTGCACGTA-S_{20}-CTGCACGTA-S_{20}- CTGCACGTA-S_{20}-CTGCACGTA-S_{20}-CTGCACGTA-S_{59}-CMV-MP;

- ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATG-S_{9}-
ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATG-S_{9}-
ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATG-S_{9}-
ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATG-S_{17}-YB-TATA; 又は

- ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATG-S_{9}-
ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATG-S_{9}-
ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATG-S_{9}-
ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATG-S_{17}-CMV-MP

のうちの1つを含まないか又はそれからなるものではなく、ここで、S_Xは、Xヌクレオチド長のスペーサー配列を表す。

【０２４２】
一部の実施形態では、低酸素誘導性プロモーター又はフォルスコリン誘導性プロモーターは、以下の配列:
-
【化１１４】

TGAGTCAGATGATGCGTAGCTAGTAGTTGAGTCAGATGATGCGTAGCTAGTAGTTGAGTCAG
ATGATGCGTAGCTAGTAGTTGAGTCAGATGATGCGTAGCTAGTAGTTGAGTCAGATGATGCG
TAGCTAGTAGTTGAGTCAGATGATGCGTAGCTAGTAGTTGAGTCAGATGATGCGTAGCTAGT
AGTTGAGTCAGTAGTCGTATGCTGATGCGCAGTTAGCGTAGCTGAGGTACCGTCGACGATAT
CGGATCCAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTAGATACGCCA
TCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGATCGCCACC

(配列番号１５１);
-
【化１１５】

TGACGTGCTGATGATGCGTAGCTAGTAGTTGACGTGCTGATGATGCGTAGCTAGTAGTTGAC
GTGCTGATGATGCGTAGCTAGTAGTTGAGTCAGATGATGCGTAGCTAGTAGTTGAGTCAGAT
GATGCGTAGCTAGTAGTTGAGTCAGATGATGCGTAGCTAGTAGTTGAGTCAGATGATGCGTA
GCTAGTAGTCTGCACGTAGATGATGCGTAGCTAGTAGTCTGCACGTAGATGATGCGTAGCTA
GTAGTCTGCACGTAGATGATGCGTAGCTAGTAGTGCAGTTAGCGTAGCTGAGGTACCGTCG
ACGATATCGGATCCAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTAGA
TACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGATCGCCACC

(配列番号１５２);
-
【化１１６】

TGACGTCACGATTACCATTGACGTCACGATTACCATTGACGTCACGATTACCATTGACGTCAC
GATTACCATTGACGTCAGCGATTAAGATGACTCAGCGATTAAGATGACTCAGCGATTAAGAT
GACTCAGCGATTAAGATGACTCAGCGATTAATCCATATGCTCTAGAGGGTATATAATGGGGG
CCACTAGTCTACTACCAGAAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCAGCCACC

(配列番号１５３);
-

【化１１７】

CTGCACGTAGATGATGCGTAGCTAGTAGTCTGCACGTAGATGATGCGTAGCTAGTAGTCTGC
ACGTAGATGATGCGTAGCTAGTAGTCTGCACGTAGATGATGCGTAGCTAGTAGTCTGCACGT
AGATGATGCGTAGCTAGTAGTCTGCACGTAGTAGTCGTATGCTGATGCGCAGTTAGCGTAGC
TGAGGTACCGTCGACGATATCGGATCCAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGT
CAGATCGCCTAGATACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGATCGCCACC

(配列番号１５４);

-

【化１１８】

ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGGCGATTAAGACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGC
ACGTATGGCGATTAAGACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGGCGATTAAGACCTTGA
GTACGTGCGTCTCTGCACGTATGGCGATTAATCCATATGCTCTAGAGGGTATATAATGGGGG
CCA

(配列番号１５５);

-

【化１１９】

ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGGCGATTAAGACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGC
ACGTATGGCGATTAAGACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGGCGATTAAGACCTTGA
GTACGTGCGTCTCTGCACGTATGGCGATTAATCCATATGCAGGTCTATATAAGCAGAGCTCG
TTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTAGATACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGAT
CGCCACC

(配列番号１５６);

-

【化１２０】

GATCTTTGTATTTAATTAAGACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGGCGATTAAGACCT
TGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGGCGATTAAGACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGT
ATGGCGATTAAGACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGGCGATTAATCCATATGCTCT
AGAGGGTATATAATGGGGGCCACTAGTCTACTACCAGAAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATC
CAGCCACC

(配列番号３８);又は

-

【化１２１】

GATCTTTGTATTTAATTAAGACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGGCGATTAAGACCT
TGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGGCGATTAAGACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGT
ATGGCGATTAAGACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGGCGATTAATCCATATGCAGG
TCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTAGATACGCCATCCACGCTGT
TTTGACCTCCATAGAAGATCGCCACC

(配列番号67)

のうちの1つを含まないか又はそれからなるものではない。

【図面の簡単な説明】

【０２４３】

【図１】フォルスコリン及び他のアデニリルシクラーゼ活性化剤の作用機序の説明図である。

【図２】懸濁細胞株HEK293-Fへの一過性トランスフェクション後のフォルスコリン誘導性プロモーターの活性を示す図である。細胞を20μMフォルスコリンで誘導し(0時間の時点にて)、ルシフェラーゼ発現を、0時間、3時間、5時間、及び24時間時に測定した。構築物は全て、活性の増加を示したが(程度は様々である)、CMV-IEの活性は一定のままであった。

【図３】20μMのフォルスコリンによる誘導を行った及び行わなかった、懸濁細胞株CHO-K1SVへの一過性トランスフェクション後のプロモーターの活性を示す図である。ルシフェラーゼ発現を、誘導の24時間後に測定した。構築物は全て、誘導後に活性の増加を示した(程度は様々である)。

【図４】20μMのフォルスコリン及び7.2μMのNKH477による誘導を行った及び行わなかった、安定的にトランスフェクトされた細胞株CHO-K1SVにおけるプロモーターからのSEAP発現を示す図である。

【図５】図４と同じデータを示す図であるが、活性はCMV-IEと比較して表されている。

【図６Ａ】図に列挙されているプロモーターによるRep78の発現をウェスタンブロットで示す図である。「+」は、10μMのフォルスコリンが細胞に添加されたことを示す。「-」は、DMSOが細胞に添加されたことを示す。

【図６Ｂ】フォルスコリンの非存在下、フォルスコリンの存在下、pHelperの存在下だがフォルスコリンの非存在下、並びにフォルスコリン及びpHelperの両方の存在下での、FORN-pJB42によるRep78の発現をウェスタンブロットで示す図である。

【図７】HEK293細胞へのトランスフェクション後の、第2世代フォルスコリン誘導性プロモーターの幾つかの活性を示す図である。構築物は全て、誘導剤の非存在下では活性をほとんど示さず、誘導剤の添加後に活性の増加を示したが(程度は様々である)、CMV-IEの活性は一定のままだった。

【図８Ａ】低酸素誘導性遺伝子発現の模式図を示す図である。転写因子HIF1A(HIF1α)は、正常酸素条件下では分解されるが、低酸素条件下では安定化され、HIF1B(HIF1β)と二量体化してHIF1を形成し、核内へと移行する。核内では、HIF1複合体は、低酸素応答エレメントに結合し、目的の遺伝子の発現を開始させることができる。

【図８Ｂ】HIF1α及びHIF1βの構造的組織化の模式図を示す図である。HIF1α及びHIF1βは両方とも、DNA結合のためのbHLHドメインを有する。HIF1βは、中央ヘテロ二量体化のためのPer-ARNT-Sim(PAS)ドメインを有し、HIF1αのC末端ドメイン(TAD N/TAD C)は、転写共調節タンパク質を動員する。HIF1α及びHIF1βは、二量体化すると、核内に移行し、低酸素応答エレメントに結合した後、低酸素調節遺伝子の発現をオンにする。

【図９】プロモーターRTV-015、Synp-HYP-001、HYPN、HYBNC、HYBNC53、HYBNMinTK、HYBNMLP、HYBNSV、HYBNpJB42、及びHYBNTATAm6aの模式図

を示す図である。RTV-015プロモーターは、5つのHRE1及び合成最小プロモーターMP1で構成されている。こうしたエレメントは、スペーサー(図示せず)で離間されている。Synp-HYP-001は、4つのHRE2及びCMV最小プロモーターで構成されている。HRE2エレメントはスペーサーで離間されていないが、最後のHRE2エレメントとCMV最小プロモーターとの間にはスペーサーが存在する(図示せず)。HYPNは、6つのHRE3及び最小プロモーターYB-TATAで構成されている。こうしたエレメントは、スペーサー(図示せず)で離間されている。HYBNCは、6つのHRE3及び最小プロモーターCMV shortで構成されている。こうしたエレメントは、スペーサー(図示せず)で離間されている。HYBNC53は、6つのHRE3及び合成最小プロモーターCMV53で構成されている。こうしたエレメントは、スペーサー(図示せず)で離間されている。HYBNMinTKは、6つのHRE3及び最小プロモーターMinTKで構成されている。こうしたエレメントは、スペーサー(図示せず)で離間されている。HYBNMLPは、6つのHRE3及び最小プロモーターMLPで構成されている。こうしたエレメントは、スペーサー(図示せず)で離間されている。HYBNSVは、6つのHRE3及び最小プロモーターSV40で構成されている。こうしたエレメントは、スペーサー(図示せず)で離間されている。HYBNpJB42は、6つのHRE3及び最小プロモーターpJB42で構成されている。こうしたエレメントは、スペーサー(図示せず)で離間されている。HYBNTATAm6aは、6つのHRE3及び最小プロモーターTATA-m6Aで構成されている。こうしたエレメントは、スペーサー(図示せず)で離間されている。

【図１０】低酸素下における、一過性に形質導入されたHEK293-F細胞におけるRTV-015、SYNP-HYP-011、及びCMV-IE構築物からのルシフェラーゼ発現の時間経過を示す図である。0時間時に細胞を低酸素下に置き、次いでルシフェラーゼ活性をモニターした。対照として使用したCMV最小プロモーターからのルシフェラーゼ発現は変化しないが、構築物の残りは、時間と共にルシフェラーゼ活性の増加を示す。

【図１１】正常酸素条件での及び低酸素で24時間後の、一過性に形質導入されたHEK293-TにおけるRTV-015及びCMV-IE構築物からのルシフェラーゼ発現の測定値を示す図である。CMV-IEプロモーターからのルシフェラーゼ発現は、正常酸素及び低酸素で同じである。RTV-015構築物は、正常酸素ではルシフェラーゼ活性をほとんど示さないが、低酸素では24時間後に様々なレベルに誘導される。

【図１２】正常酸素条件での及び低酸素で24時間後の、一過性に形質導入されたCHO_GS懸濁細胞株におけるRTV-015及びCMV-IE構築物からのルシフェラーゼ発現の測定値を示す図である。CMV-IEからのルシフェラーゼ発現は、正常酸素及び低酸素で同じである。図4に示されている結果と同様に、RTV-015構築物は、正常酸素ではルシフェラーゼ活性をほとんど示さないが、低酸素では24時間後に誘導される。

【図１３】正常酸素で24時間後又は低酸素で24時間後の、安定的に組み込まれたCHO-GSK1SV細胞株におけるRTV-015及びCMV-IE構築物からの、正常酸素における(播種の24時間後 - 0時と示されている)SEAP発現の測定値を示す図である。CMV-IE構築物からのSEAP発現は、正常酸素及び低酸素で同じである。図11及び12に示されている結果と同様に、RTV-015構築物は、正常酸素ではSEAP活性をほとんど示さないが、低酸素では24時間後に誘導される。

【図１４】RTV-015及びCMV-IE構築物が安定的に組み込まれたCHO-GSK1SVの細胞数を示す図である。SEAP発現を、それぞれの条件での細胞数に対して正規化した。

【図１５】正常酸素条件での及び低酸素で24時間後の、一過性に形質導入されたHEK293におけるHYBN-TATAm6a、HYBN-minTk、HYBN-C53、HYBN-MLP-HYBN-pJB42、HYBN-SV、HYBN-YB、HYBN-C、及びCMV-IE構築物からのルシフェラーゼ発現の測定値を示す図である。CMV-IEプロモーターからのルシフェラーゼ発現は、正常酸素及び低酸素で同じである。HYBN-TATAm6a、HYBN-minTk、HYBN-C53、HYBN-MLP-HYBN-pJB42、HYBN-SV、HYBN-YB、HYBN-C構築物は、正常酸素ではルシフェラーゼ活性をほとんど示さないが、低酸素では24時間後に誘導される(N=3)。

【発明を実施するための形態】

【０２４４】

本発明の実施形態の詳細な説明及び実施例

本発明の種々の実施形態の作製及び使用が下記で詳細に論じられているが、本発明は、幅広く様々な特定の状況で具現化することができる多くの適用可能な発明概念を提供することが理解されるべきである。本明細書で論じられている特定の実施形態は、本発明を作製及び使用するための特定の方法を例示するものに過ぎず、本発明の範囲を限定するものではない。

【０２４５】

本発明の実施では、別様の指示がない限り、当技術分野の技術内である、細胞生物学、細胞培養、分子生物学、トランスジェニック生物学、微生物学、組換えDNA、及び免疫学の従来技法が使用されることになる。そのような技法は、文献において十分に説明されている。例えば、Current Protocols in Molecular Biology(Ausubel、2000年、Wiley and son Inc社、国会図書館、米国);Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第三版(Sambrookら、2001年、コールドスプリングハーバー、ニューヨーク:Cold Spring Harbor Laboratory Press社);Oligonucleotide Synthesis(M. J. Gait編、1984年);米国特許第4,683,195号;Nucleic Acid Hybridization(Harries及びHiggins編、1984年);Transcription and Translation(Hames and Higgins編、1984年);Culture of Animal Cells(Freshney、Alan R. Liss, Inc.社、1987年);Immobilized Cells and Enzymes(IRL Press社、1986年);Perbal、A Practical Guide to Molecular Cloning(1984年);Methods in Enzymologyシリーズ(主編集者Abelson及びSimon、Academic Press, Inc.社、ニューヨーク)、特に154巻及び155巻(Wuら編)並びに185巻、「Gene Expression Technology」(Goeddel編);Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells(Miller及びCalos編、1987年、Cold Spring Harbor Laboratory社);Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology(Mayer及びWalker編、Academic Press社、ロンドン、1987年);Handbook of Experimental Immunology、I～IV巻(Weir及びBlackwell編、1986年);並びにManipulating the Mouse Embryo(Cold Spring Harbor Laboratory Press社、コールドスプリングハーバー、ニューヨーク州、1986年)を参照されたい。

【０２４６】

本発明の理解を容易にするために、少なからぬ用語を下記で定義する。本明細書で定義されている用語は、本発明に関する分野の当業者により一般的に理解される意味を有する。「a」、「an」、及び「the」等の用語は、単数の実体のみを指すことを意図するものではなく、その特定の例を説明のために使用することができる一般的な種類を含むことが意図されている。本明細書の用語は、本発明の特定の実施形態を説明するために使用されるが、それらの用法は、特許請求の範囲に概説されている場合を除き、本発明を限定するものではない。

【０２４７】

「含むこと(comprising)」、「含む(comprises)」、及び「で構成される(comprised of)」という用語は、本明細書で使用される場合、「含むこと(including)」、「含む(includes)」、又は「含有すること(containing)」、「含有する(contains)」と同義であり、包括的又は非限定的であり、追加の、記載されていない特徴、要素、又は方法工程を除外しない。

【０２４８】

端点による数値範囲の記載は、記載されている端点だけでなく、それぞれの範囲内に包括される全ての数値及び端数を含む。

【０２４９】

「シス調節エレメント」又は「CRE」という用語は、当業者に周知の用語であり、エンハンサー、プロモーター、インスレーター、又はサイレンサー等の、近隣の遺伝子(つまり、シス位にある)の転写を調節又はモジュレートすることができる核酸配列を意味する。CREは、それらが調節する遺伝子の近傍に見出される。CREは、典型的には、TFに

結合することにより遺伝子転写を調節し、つまり、CREはTFBSを含む。単一のTFは、多数のCREに結合することができ、したがって多数の遺伝子の発現を制御する(多面発現性)。CREは、通常は、しかしながら常にではないが、CREが調節する遺伝子の転写開始部位(TSS)の上流に位置している。「エンハンサー」は、作動可能に付随した遺伝子の転写を増強する(つまり、上方制御する)CREであり、CREが調節する遺伝子の上流、下流、及びイントロン内にさえ見出すことができる。複数のエンハンサーが協調して作用して、1つの遺伝子の転写を調節することができる。この状況における「サイレンサー」は、遺伝子の転写を防止又は下方制御するように作用するリプレッサーと呼ばれるTFに結合するCREに関する。また、「サイレンサー」という用語は、mRNA分子の翻訳を抑制するタンパク質に結合する、メッセンジャーRNAの3'非翻訳領域中の領域を指す場合もあるが、この用法は、CREを説明する際の使用法とは異なる。基本的に、本発明では、CREは、フォルスコリン誘導性エンハンサー又は低酸素誘導性エンハンサーである。本状況では、CREは、転写開始部位(TSS)から1500個又はそれよりも少ないヌクレオチド、より好ましくはTSSから1000個又はそれよりも少ないヌクレオチド、より好ましくはTSSから500個又はそれよりも少ないヌクレオチド、好適にはTSSから250、200、150、又は100個、又はそれよりも少ないヌクレオチドの位置にあることが好ましい。本発明のCREは、好ましくは長さが比較的短く、好ましくは50ヌクレオチド長又はそれよりも短く、例えば、本発明のCREは、40、30、20、10、又は5ヌクレオチド長、又はそれよりも短くてもよい。

【０２５０】

「シス調節モジュール」又は「CRM」という用語は、2つ又はそれよりも多くのCREで作られている機能性モジュールを意味する。本発明では、CREは、典型的には、フォルスコリン誘導性エンハンサー又は低酸素誘導性エンハンサーである。したがって、本出願では、CRMは、典型的には、複数のフォルスコリン誘導性CRE又は低酸素誘導性CREを含む。典型的には、CRM内の複数のCREが一緒に作用して(例えば、相加的又は相乗的に)、CRMが作動可能に付随した遺伝子の転写を増強する。CRM内のCREのシャッフル(つまり、並べ替え)、反転(つまり、逆方向)、及び間隔の変更には、保存可能な範囲が存在する。したがって、本発明のCRMの機能的バリアントは、それら内のCREがシャッフル及び/又は反転されており、及び/又はCRE間の間隔が変更されている、参照CRMのバリアントを含む。

【０２５１】

本発明の状況では、シス調節エレメント、シス調節モジュール、プロモーター、又は他の核酸配列の「機能的バリアント」は、参照配列と同じように、例えば、フォルスコリン誘導性又は低酸素誘導性エレメント又はプロモーターとして機能する能力を保持する、参照配列のバリアントである。そのような機能的バリアントの代替的な用語には、「生物学的同等物」又は「同等物」が挙げられる。

【０２５２】

CREは、好適なプロモーターに配置されていると(本明細書でより詳細に論じられているように)、前記プロモーターを含む真核細胞(好ましくは、哺乳動物細胞)にフォルスコリンを投与することにより、前記プロモーターに作動可能に連結した遺伝子の発現を誘導することができる場合、フォルスコリン誘導性であるとみなすことができる。

【０２５３】

所与のCREがフォルスコリン誘導性エンハンサーとして機能する能力は、原理的に、CREB及び/又はAP1と結合して(アデニリルシクラーゼの活性化剤により誘導され、細胞性cAMPレベルの増加がもたらされた後)、作動可能に連結した遺伝子の発現を誘導する配列の能力により決定されることが理解されるだろう。したがって、CREの機能的バリアントは、CREB及び/又はAP1(他のTFBSも寄与する可能性があるが)に対する好適な結合部位を含むことになる。CREB、AP1、及び他のTFに対する好適TFBSは、上記で論じられている。

【０２５４】

所与のCREに結合するCREB及び/又はAP1(又は任意の他のTF)の能力は、これらに限定されないが、電気移動度シフトアッセイ(EMSA)、結合アッセイ、クロマチン免疫沈降(ChIP)、ChIP配列決定(ChIP-seq)を含む、当技術分野で公知の任意の関連手段により決定することができる。一部の実施形態では、所与の機能的バリアントに結合するCREB及び/又はAP1の能力は、EMSAにより決定される。EMSAを実施する方法は、当技術分野で周知である。好適な手法は、上記で引用されているSambrookらに記載されている。この手順が記載されている多数の関連論文、例えば、Hellman及びFried, Nat Proto c.、2007年;2巻(8号):1849～1861頁が利用可能である。

【0255】

フォルスコリン誘導性エレメントとして機能する任意の所与のCREの能力は、当業者であれば実験的に容易に評価することができる。したがって、当業者であれば、任意の所与のCRE又はプロモーター(例えば、上記に記載の特定のフォルスコリン誘導性プロモーター又はCREのバリアント)が機能性であるか否か(つまり、それを機能的なフォルスコリン誘導性プロモーター若しくはCREであるとみなすことができるか否か、又はそれを本明細書に記載の特定のプロモーター若しくはCREの機能的バリアントであるとみなすことができるか否か)を容易に決定することができる。例えば、任意の所与の推定フォルスコリン誘導性プロモーターを、遺伝子(典型的には、レポーター遺伝子)に連結することができ、フォルスコリンにより誘導された際にその特性を評価する。同様に、評価しようとする任意の所与のCREを、最小プロモーターに作動可能に連結する(例えば、MPの上流に配置する)ことができ、フォルスコリンにより誘導された際に遺伝子(典型的には、レポーター遺伝子)の発現を駆動するシス調節エレメントの能力を測定する。フォルスコリン誘導性CRE又はフォルスコリン誘導性プロモーターの機能活性を評価するための好適な構築物は、容易に構築することができ、下記に示されている例には好適な方法論が示されている。例えば、任意の所与の推定フォルスコリン誘導性CREを、下記で論じられているプロモーターSynp-FORCSV-10、Synp-FORCMV-09、Synp-FMP-02、Synp-FLP-01、SYNP-FORNEW、又はSYNP-RTV-20のいずれかにおいて、現存するCREの代わりに代用して、レポーター遺伝子(例えば、ルシフェラーゼ又はSEAP)に連結することができ、その誘導性及び誘導時の発現強度を評価することができる。誘導性に関して、細胞、例えばCHO-K1SV細胞を、18μMのフォルスコリンに5時間曝露した後のレポーターの誘導レベルは、好適には、少なくとも3倍の発現増加、より好ましくは5倍、10倍、15倍、20倍、30倍、又は50倍の発現増加である。プロモーターの強度に関して、誘導時(例えば、細胞、例えばCHO-K1SV細胞を、18μMのフォルスコリンに5時間暴露した後)のレポーターの発現レベルは、CMV-IEプロモーターにより提供される発現レベルの少なくとも50%である(つまり、同じ条件下の同じ細胞において他の点では同一であるが、導入遺伝子の発現が、フォルスコリン誘導性プロモーターではなくCMV-IEの制御下にあるベクターと比較して)。より好ましくは、導入遺伝子の発現レベルは、CMV-IEプロモーターにより提供される発現レベルの少なくとも75%、100%、150%、200%、300%、400%、500%、750%、又は1000%である。同様に、任意の推定フォルスコリン誘導性プロモーターを、実施例1、2、又は3の構築物において、プロモーターSynp-FORCSV-10、Synp-FORCMV-09、Synp-FMP-02、Synp-FLP-01、SYNP-FORNEW、又はSYNP-RTV-20の代わりに用いて、誘導性及び能力を評価することができる（同じ条件並びに好ましいレベルの誘導性及び強度が適用される）。

【0256】

低酸素応答エレメント(HRE)は、シス調節エレメント(CRE)の一種である。より詳細には、低酸素応答エレメントは、エンハンサーが存在する細胞が低酸素状態に供された際に誘導される誘導性エンハンサーである。HREは、複数の低酸素誘導性因子結合部位(HBS)を含む。他所に記載の通り、低酸素条件下では、細胞内でHIFヘテロ二量体が形成され、HBSに結合し、HBSを含む遺伝子の発現が駆動される。これは、文献に詳細に記載されている。例えば、Wenger RH、Stiehl DP、Camenish G.、Integration of oxygen signalling at the consensus HRE. Sci STKE 2005年;306巻:re12.[Pu

bMed:16234508]を参照されたい。1つよりも多くのHREが本発明のベクターに存在してもよく、したがって、低酸素応答性シス調節モジュール(CRM)が提供される。

【０２５７】

低酸素誘性導因子(HIF)は、低酸素、つまり細胞環境にて利用可能な酸素の減少に応答する転写因子である。一般に、HIFは、発生に必須である。哺乳動物では、HIF-1遺伝子の欠失は、周産期死亡をもたらす。HIF-1は、低酸素応答における顕著な役割を考慮すると、本発明に特に有意義であり、したがって、本発明のHREはHIF-1の標的であることが好ましい。しかしながら、他のHIF(例えば、HIF-2又はHIF-3)もHREに結合することができるため、それらも有意義である。HIF-1は、α-サブユニット(HIF-1α)及びβ-サブユニット(HIF-1β)で構成されるヘテロ二量体であり、後者は、構成的に発現されるアリール炭化水素受容体核輸送体(ARNT)である。HIFのアルファサブユニットは、HIFプロリル-ヒドロキシラーゼにより、保存されたプロリン残基でヒドロキシル化され、VHL E3ユビキチンリガーゼによる認識及びユビキチン化を可能にし、プロテアソームによる迅速な分解のためにそれらが標識される。これは、正常酸素条件でのみ生じる。HIFプロリル-ヒドロキシラーゼは、補基質として酸素を使用するため、低酸素条件では阻害される。HIF-1は、低酸素条件で安定化されると、幾つかの遺伝子を上方制御して、低酸素条件での生存を促進する。同様に、HIF-2又はHIF-3は、文献に詳細に記載されている通り、α-サブユニット及びβ-サブユニットで形成される。低酸素によるHIF1α及び2αの調節は類似しており、両方とも同じコアモチーフに結合する。

【０２５８】

低酸素誘導性因子結合部位(HBS)は、HIFに対する結合部位として作用する核酸配列である。内因性遺伝子では、HBSは、保存されたコア配列([AG]CGTG、配列番号6)及び高度に可変性のフランキング配列を含む。

【０２５９】

所与のHREが低酸素誘導性エンハンサーとして機能する能力は、原理的には、低酸素条件下でHIF(例えば、HIF-1)に結合して、作動可能に連結した遺伝子の発現を誘導する配列の能力により決定されることが理解されるだろう。したがって、HREの機能的バリアントは、HIFに対する好適な結合部位を含むことになる。一般に、コンセンサスHBSの存在が必要とされる。

【０２６０】

所与のHREに結合するHIFの能力は、これらに限定されないが、電気移動度シフトアッセイ(EMSA)、結合アッセイ、クロマチン免疫沈降(ChIP)、及びChIP配列決定(ChIP-seq)を含む、当技術分野で公知の任意の関連手段により決定することができる。一部の実施形態では、所与の機能的バリアントに結合するHIFの能力は、EMSAにより決定される。EMSAを実施する方法は、当技術分野で周知である。好適な手法は、上記で引用されているSambrookらに記載されている。この手順が記載されている多数の関連論文、例えば、Hellman及びFried、Nat Protoc. 2007年;2巻(8号):1849～1861頁が利用可能である。好ましい方法では、バリアントがHIFに結合する能力は、プルダウン実験で決定することができる。例えば、プルダウン実験は、バリアントHRE及び参照HREを有するビオチン化された二本鎖プローブで使用して実施することができる。高度にストリンジェントな洗浄を使用して[6]、低酸素細胞から調製した核抽出物のHIFの量(例えば、HIF-1αの量に関して評価された)を、バリアントHREと参照HREとの間で比較することができる。好適な方法は、Stanbridgeら、Rational design of minimal hypoxia-inducible enhancers Biochem Biophys Res Commun. 2008年6月13日;370巻(4号):613～618頁及びEbert BL、Bunn HF. Regulation of transcription by hypoxia requires a multiprotein complex that includes hypoxia-inducible factor 1, an adjacent transcription factor, and p300/CREB binding protein. Mol Cell Biol 1998年;18巻:4089～4096頁に記載されている。

【０２６１】

上記に示されている特定のCRE又はプロモーター配列のいずれかのバリアントに関し

て、それらの機能性は、実施例1～7の関連構築物中の所与のCRE又はプロモーターの代わりにバリアントを代用し、バリアントを含む構築物の結果を、元の構築物の結果と比較することにより評価することができる。好ましくは、機能的バリアントは、親構築物の誘導性の少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、又は100%を維持する(誘導の結果としての発現の増加倍数の点で測定され、つまり、誘導時のレポーター遺伝子の発現の2倍増加は、4倍増加の50%の誘導性であるとみなされる)。好ましくは、機能的バリアントは、誘導時の参照構築物の発現強度の少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、又は100%を維持する。また、機能的バリアントは、好ましくは、参照構築物と比較して、3倍以下、好ましくは2倍以下、及び好ましくは1.5倍以下の高さであるバックグラウンド発現レベル(つまり、一切の誘導の非存在)をもたらす。

【０２６２】

低酸素誘導性エレメントとして機能する任意の所与のHREの能力は、当業者であれば実験的に容易に評価することができる。したがって、当業者であれば、上記に記載の特定の低酸素誘導性プロモーター又はHREの任意のバリアントが機能性のままであるか否か(つまり、それが機能的な低酸素誘導性プロモーター若しくはHREであるか否か、又はそれを機能的バリアントであるとみなすことができるか否か)を容易に決定することができる。例えば、任意の所与の推定低酸素誘導性プロモーターを、遺伝子(典型的には、レポーター遺伝子)に連結することができ、低酸素により誘導された際のその誘導特性を評価する。同様に、評価しようとする任意の所与のHREを、最小プロモーターに作動可能に連結する(例えば、MPの上流に配置する)ことができ、低酸素により誘導された際に遺伝子(典型的には、レポーター遺伝子)の発現を駆動するシス調節エレメントの能力を測定する。HRE又は低酸素誘導性プロモーターの活性を評価するための好適な構築物は、容易に構築することができ、下記に示されている例には好適な方法論が示されている。例えば、任意の所与の推定HREを、下記で論じられているプロモーターSynp-RTV-015Synp-HYPN、Synp-HYBNC、Synp-HYBNC53、Synp-HYBNMinTK、Synp-HYBNMLP、Synp-HYBNSV、Synp-HYBNpJB42、Synp-HYBNTATAm6a、又はSynp-Hyp-001のいずれかにおいて、現存するHREの代わりに配置して、レポーター遺伝子(例えば、ルシフェラーゼ又はSEAP)に連結することができ、その誘導性及び能力を評価することができる。例えば、誘導性に関しては、低酸素条件に供されると(例えば、20%酸素から5%酸素への移行)、細胞における5時間後の誘導レベルは、好適には、少なくとも5倍の発現増加、より好ましくは10、15、20、30、又は50倍の発現増加である。例えば、能力に関しては、低酸素条件に供されると(例えば、20%酸素から5%酸素への移行)、細胞における発現レベルは、好適には、CMV-IEプロモーターが使用されており、他の点では同一である構築物により達成される発現レベルの少なくとも10%であり、より好ましくは、CMV-IEにより駆動される発現レベルの少なくとも25%、50%、75%、100%、150%、又は200%である。同様に、任意の推定低酸素誘導性プロモーターを、実施例4、5、6、又は7の構築物において、プロモーターSynp-RTV-015、Synp-HYPN、Synp-HYBNC、Synp-HYBNC53、Synp-HYBNMinTK、Synp-HYBNMLP、Synp-HYBNSV、Synp-HYBNpJB42、Synp-HYBNTATAm6a、又はSynp-Hyp-001の代わりに用いて、誘導性及び能力を評価することができる(誘導性及び能力の同じ好ましいレベルが適用される)。

【０２６３】

1つの特定の例では、HRE3のバリアントは、HRE3を含む任意の構築物においてHRE3の代わりにバリアントを代用し、例えば、実施例4、5、6、又は7に記載の好適な発現レポーターアッセイを実施し、バリアントを含む構築物の結果を元の構築物の結果と比較することにより評価することができる。好ましくは、機能的バリアントは、親構築物の誘導性の少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、又は100%を維持し、好ましくは、機能的バリアントは、親構築物の能力の少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、又は100%を維持する。

【０２６４】

また、機能的バリアントと参照配列との間の配列同一性のレベルは、保持された機能性の指標であり得る。TFBS又はHBSにおける高レベルの配列同一性及びTFBS又はHBS間の間隔は、一般に、スペーサー配列における配列同一性よりも重要である(スペーサー配列では、配列のいかなる保存もほとんど又は全く必要とされない)。

【０２６５】

本明細書で使用される場合、「プロモーター」という用語は、一般に、転写される核酸配列の上流に位置し、転写が生じるのに必要である、つまり転写を開始させるDNAの領域を指す。プロモーターは、それらの制御下にあるコード配列の転写の適切な活性化又は抑制を可能にする。プロモーターは、典型的には、複数のTFにより認識されて結合する特異的な配列を含む。TFはプロモーター配列に結合し、遺伝子のコード領域からRNAを合成する酵素であるRNAポリメラーゼの動員をもたらす。非常に数多くのプロモーターが当技術分野で公知である。本発明の誘導性プロモーターは、典型的には、誘導される前は発現をほとんど全く駆動しないか又は低い発現を駆動し、誘導されると著しくより高いレベルの発現を駆動する(例えば、誘導後の発現は、5、10、20、50、100、150、500、700、又は1000倍にも増加する)。

【０２６６】

本発明のプロモーターは、合成プロモーターである。「合成プロモーター」という用語は、本明細書で使用される場合、天然には存在しないプロモーターに関する。本状況では、合成プロモーターは、典型的には、最小(又はコア)プロモーターに作動可能に連結した本発明の合成CRE及び/又はCRMを含む。本発明のCRE及び/又はCRMは、プロモーターに作動可能に連結した遺伝子のフォルスコリン誘導性又は低酸素誘導性転写を提供する役目を果たす。合成プロモーターの一部は、天然に存在してもよいが（例えば最小プロモーター又はプロモーター中の1つ若しくは複数のCRE）、完全な実体としての合成プロモーターは天然には存在しない。

【０２６７】

本明細書で使用される場合、「最小プロモーター」(「コアプロモーター」としても知られている)は、それ自体では不活性であるか又はほとんど不活性であるが、他の転写調節エレメントと組み合わせると転写を媒介することができる短いDNAセグメントを指す。最小プロモーター配列は、原核生物遺伝子及び真核生物遺伝子を含む種々の異なる供給源に由来してもよく、又は合成してもよい。最小プロモーターの例は上記で論じられており、合成MP1プロモーター、サイトメガロウイルス(CMV)前初期遺伝子最小プロモーター(CMV-MP)、及びYB-TATAが挙げられる。最小プロモーターは、典型的には、すぐ上流の転写開始部位(TSS)及びエレメント、RNAポリメラーゼIIに対する結合部位、並びに一般的な転写因子結合部位(多くの場合はTATAボックス)を含む。

【０２６８】

本明細書で使用される場合、「近位プロモーター」は、一次調節エレメントを含む傾向がある遺伝子の上流にある近位配列を伴う最小プロモーターに関する。近位プロモーターは、TSS上流のおよそ250塩基対に延在し、特定のTFBSを含むことが多い。本発明の場合、近位プロモーターは、好適には、本発明の1つ又は複数のCRE又はCRMと組み合わせることができる天然に存在する近位プロモーターである。しかしながら、近位プロモーターは合成であってもよい。

【０２６９】

「核酸」という用語は、本明細書で使用される場合、典型的には、ヌクレオチドで本質的に構成されている任意の長さのオリゴマー又はポリマー（好ましくは、直鎖状ポリマー）を指す。ヌクレオチド単位は、基本的に、複素環塩基、糖基、及び修飾又は置換リン酸基を含む、少なくとも1つの、例えば、1、2、又は3つのリン酸基を含む。複素環式塩基としては、特に、アデニン(A)、グアニン(G)、シトシン(C)、チミン(T)、及びウラシル(U)等の、天然に存在する核酸に広く存在するプリン塩基及びピリミジン塩基、他の天然に存在する塩基(例えば、キサンチン、イノシン、ヒポキサンチン)、並びに化学的又は生化学的に修飾された(例えば、メチル化された)非天然又は誘導体化塩基を挙げることがで

きる。糖基としては、特に、好ましくは、天然に存在する核酸に共通するリボース及び/若しくは2-デオキシリボース等のペントース(ペントフラノース)基、又はアラビノース糖基、2-デオキシアラビノース糖基、トレオース糖基、若しくはヘキソース糖基、並びに修飾又は置換糖基を挙げることができる。本明細書で意図されている核酸としては、天然に存在するヌクレオチド、修飾ヌクレオチド、又はそれらの混合物を挙げることができる。修飾ヌクレオチドは、修飾複素環塩基、修飾糖部分、修飾リン酸基、又はそれらの組合せを含んでいてもよい。リン酸基又は糖の修飾を導入して、安定性、酵素分解に対する抵抗性、又は何らかの他の有用な特性を向上させることができる。「核酸」という用語は、好ましくは、DNA、RNA、及びDNA RNAハイブリッド分子を更に包含し、具体的には、hnRNA、pre-mRNA、mRNA、cDNA、ゲノムDNA、増幅産物、オリゴヌクレオチド、及び合成(例えば、化学合成)DNA、RNA、又はDNA RNAハイブリッドを含む。核酸は、天然に存在してもよく、例えば、自然界に存在してもよく若しくは自然界から単離してもよく、又は天然に存在していなくともよく、例えば、組換えであってもよく、つまり、組換えDNA技術により産生してもよく、及び/又は部分的若しくは完全に化学的若しくは生化学的に合成してもよい。「核酸」は、二本鎖、部分的に二本鎖、又は一本鎖であってもよい。一本鎖の場合、核酸は、センス鎖であってもよく又はアンチセンス鎖であってもよい。加えて、核酸は、環状
であってもよく又は直鎖状であってもよい。

【０２７０】

「同一性」及び「同一の」等の用語は、2つのポリマー分子間、例えば、2つのDNA分子間等の、2つの核酸分子間の配列類似性を指す。配列アラインメント及び配列同一性の決定は、例えば、Tatusova及びMadden 1999年(FEMS Microbiol Lett 174巻:247～250頁)に記載の「Blast 2 sequences」アルゴリズム等、Altschulら、1990年(J Mol Biol 215巻:403～10頁)に最初に記載された基本局所アラインメント検索ツール(BLAST、Basic Local Alignment Search Tool)を使用して行うことができる。

【０２７１】

比較のために配列をアラインするための方法は、当技術分野で周知である。例えば、Smith及びWaterman(1981年)Adv. Appl. Math. 2巻:482頁;Needleman及びWunsch(1970年)J. Mol. Biol. 48巻:443頁;Pearson及びLipman(1988年)Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85巻:2444頁;Higgins及びSharp(1988年)Gene 73巻:237～44頁;Higgins及びSharp(1989年)CABIOS 5巻:151～3頁;Corpetら(1988年)Nucleic Acids Res. 16巻:10881～90頁;Huangら(1992年)Comp. Appl. Biosci. 8巻:155～65頁;Pearsonら(1994年)Methods Mol. Biol. 24巻:307～31頁;Tatianaら(1999)FEMS Microbiol. Lett. 174巻:247～50頁には、種々のプログラム及びアラインメントアルゴリズムが記載されている。配列アラインメント法及び相同性計算の詳細な考察は、例えば、Altschulら(1990年)J. Mol. Biol. 215巻:403～10頁に見出すことができる。

【０２７２】

国立バイオテクノロジー情報センター(NCBI)基本局所アラインメント検索ツール(BLAST(商標);Altschulら(1990年))は、国立バイオテクノロジー情報センター(ベセスダ、メリーランド州)を含む、幾つかの供給元から入手可能であり、インターネットでは、幾つかの配列分析プログラムと併せて使用することできる。このプログラムを使用して配列同一性を決定する方法に関する説明は、インターネット上で、BLAST(商標)の「ヘルプ」セクションにて入手可能である。核酸配列の比較には、BLAST(商標)(Blastn)プログラムの「Blast 2 sequences」機能を、初期設定パラメーターを用いて使用することができる。参照配列との類似性が更により高い核酸配列は、この方法で評価した場合、同一性パーセンテージの増加を示すことになる。典型的には、配列同一性パーセンテージは、配列の長さ全体にわたって計算される。

【０２７３】

例えば、グローバル最適アラインメントは、Needleman-Wunschアルゴリズムによ

り、以下のスコア化パラメーターを用いて好適に見出される:一致スコア:+2、不一致スコア:-3;ギャップペナルティ:ギャップオープン5、ギャップエクステンション2。得られる最適なグローバルアラインメントの同一性パーセンテージは、アラインされた塩基の個数の、アラインメントの全長に対する比に100をかけることにより好適に算出され、アラインメント長は、一致及び不一致を両方とも含む。

【０２７４】

本出願における「合成」は、自然界には存在しない核酸分子を意味する。本発明の合成核酸発現構築物は、人工的に、典型的には組換え技術により産生される。そのような合成核酸は、天然に存在する配列(例えば、プロモーター、エンハンサー、イントロン、及び他のそのような調節配列)を含んでいてもよいが、それらは天然に存在しない状況で存在する。例えば、合成遺伝子(又は遺伝子の部分)は、典型的には、本来は隣接していない1つ又は複数の核酸配列(キメラ配列)を含み、並びに/又は置換、挿入、及び欠失、並びにそれらの組合せを包含していてもよい。

【０２７５】

本出願における「トランスフェクション」は、核酸を意図的に細胞内に導入する任意のプロセスを幅広く指し、ウイルスベクター及び非ウイルスベクターの導入を包含し、形質転換、形質導入、並びに類似の用語及びプロセスを含む。例としては、これらに限定されないが、ウイルスベクターによるトランスフェクション;プラスミドベクターによる形質転換;エレクトロポレーション(Frommら(1986年)Nature 319巻:791～3頁);リポフェクション(Feignerら(1987年)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84巻:7413～7頁);マイクロインジェクション(Muellerら(1978年)Cell 15巻:579～85頁);アグロバクテリウム媒介性移入(Fraleyら(1983年)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80巻:4803～7頁);直接DNA取り込み; whiskers媒介性形質転換;及び微粒子銃(Kleinら(1987年)Nature 327巻:70頁)が挙げられる。

【０２７６】

「ベクター」という用語は当技術分野で周知であり、本明細書で使用される場合、本発明による核酸配列が挿入されていてもよい核酸分子、例えば、二本鎖DNAを指す。ベクターは、挿入された核酸分子を好適な宿主細胞内へと移行させるために好適に使用される。ベクターは、典型的には、インサート核酸分子の転写、及び好ましくは転写物のポリペプチドへの翻訳を可能にする必要なエレメントを全て含む。ベクターは、典型的には、必要なエレメントを全て含んでおり、ベクターが宿主細胞に入ると、ベクターは、宿主染色体DNAとは独立して又は同時に複製することができ、ベクター及びその挿入核酸分子の幾つかのコピーを生成することができる。本発明のベクターは、エピソームベクター(つまり、宿主細胞のゲノムに組み込まれないベクター)であってもよく、又は宿主細胞ゲノムに組み込まれるベクターであってもよい。この定義には、非ウイルスベクター及びウイルスベクターの両方が含まれる。非ウイルスベクターとしては、これらに限定されないが、プラスミドベクター(例えば、pMA-RQ、pUCベクター、bluescriptベクター(pBS)、及びpBR322、又は細菌配列を欠くそれらの誘導体(ミニサークル))、トランスポゾンベースのベクター(例えば、PiggyBac(PB)ベクター又はSleeping Beauty(SB)ベクター)等が挙げられる。人工染色体(細菌(BAC)、酵母(YAC)、又はヒト(HAC))等のより大きなベクターを使用して、より大きなインサートを収容することができる。ウイルスベクターは、ウイルスに由来し、これらに限定されないが、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノ随伴ウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、又は肝炎ウイルスベクター等が挙げられる。典型的には、しかしながら必ずしも必要ではないが、ウイルスベクターは、複製に不可欠なウイルス遺伝子がウイルスベクターから排除されているため、所与の細胞内で繁殖する能力を失っており、複製欠損である。しかしながら、一部のウイルスベクターは、例えばがん細胞等の所与の細胞で特異的に複製するように構成することもでき、典型的には、(がん)細胞特異的(腫瘍)溶解を引き起こすために使用される。ビロソームは、ウイルスエレメント及び非ウイルスエレメントを両方とも含むベクターの非限定的な例であり、特

に、リポソームを、不活性化されたHIV又はインフルエンザウイルスと一緒にしたものである(Yamadaら、2003年)。別の例は、カチオン性脂質と混合されたウイルスベクターを包含する。

【０２７７】

「作動可能に連結した」、「作動可能に接続された」という用語、又は同等の表現は、本明細書で使用される場合、種々の核酸エレメントが、機能的に接続され、意図されている様式で互いに相互作用することができるように、種々の核酸エレメントを互いに対して配置することを指す。このようなエレメントとしては、限定ではないが、プロモーター、エンハンサー、及び/又は調節エレメント、ポリアデニル化配列、1つ又は複数のイントロン及び/又はエキソン、並びに発現させようとする目的の遺伝子のコード配列を挙げることができる。核酸配列エレメントは、適切に配向されているか又は作動可能に連結している場合、共に作用して互いの活性をモジュレートし、最終的には、発現産物の発現レベルに影響を及ぼすことができる。モジュレートとは、特定のエレメントの活性レベルを増加、減少、又は維持することを意味する。他のエレメントに対する各エレメントの位置は、各エレメントの5'末端及び3'末端に対して表すことができ、任意の特定のエレメント間の距離は、エレメント間の介在ヌクレオチド又は塩基対の数により参照することができる。当業者であれば理解するように、「作動可能に連結した」は、機能的に活性であることを意味し、天然の位置的連結に関するとは必ずしも限らない。実際、核酸発現カセットに使用される場合、シス調節エレメントは、典型的には、プロモーターのすぐ上流に位置することになるが(これは、一般的にはそうであるが、核酸発現カセット内の位置を限定又は除外するものとして解釈されるべきでは絶対にない)、これはin vivoではそうである必要はなく、例えば、その転写が影響を及ぼす遺伝子の下流に天然に存在する調節エレメント配列は、プロモーターの上流に位置する場合と同じように機能することができる。したがって、特定の実施形態によると、調節エレメントの調節効果又は増強効果は、位置非依存性である。

【０２７８】

「スペーサー配列」又は「スペーサー」は、本明細書で使用される場合、2つの機能的核酸配列(例えば、TFBS、CRE、CRM、最小プロモーター等)を隔てる核酸配列である。「スペーサー配列」又は「スペーサー」は、機能的核酸配列(例えば、シス調節エレメント）が所望のように機能することを妨げない限り、本質的に任意の配列を有することができる(例えば、これは、「スペーサー配列」又は「スペーサー」が、サイレンサー配列を含み、所望の転写因子の結合を妨げる場合等に起こり得る）。典型的には、隣接する機能的核酸配列を互いに離間させるためにのみ存在するため、非機能性である。

【０２７９】

「細胞培養物」は、本明細書で使用される場合、未分化状態又は分化状態のいずれであってもよい細胞の増殖塊を指す。

【０２８０】

「コンセンサス配列」 - コンセンサス配列の意味は、当技術分野で周知である。本出願では、状況が別様に指示しない限り、コンセンサス配列には以下の表記が使用される。以下の例示的なDNA配列:

A[CT]N{A}YR

を考慮すると、Aは、その位置にAが常に見出されることを意味し、[CT]は、その位置にはC又はTが見出されることを表し、Nは、その位置が任意の塩基であることを表し、{A}は、A以外の任意の塩基がその位置に見出されることを意味する。Yは、任意のピリミジンを表し、Rは、任意のプリンを表す。

【０２８１】

「相補的」又は「相補性」は、本明細書で使用される場合、2つの核酸配列のワトソン-クリック塩基対合を意味する。例えば、配列5'-AGT-3'は、相補的配列3'-TCA-5'に結合する。2つの核酸配列間の相補性は、塩基の一部のみがそれらの相補体に結合する「部分的」であってもよく、配列内の全ての塩基がその相補的塩基に結合する場合のように完

全であってもよい。核酸鎖間の相補性の度合いは、核酸鎖間のハイブリダイゼーションの効率及び強度に著しい効果を及ぼす。

【０２８２】

本明細書で使用される場合、「導入遺伝子」という語句は、外因性核酸配列を指す。一例では、導入遺伝子は、遺伝子配列、工業的に若しくは薬学的に有用な化合物をコードする遺伝子、又は望ましい形質をコードする遺伝子である。更に別の例では、導入遺伝子は、アンチセンス核酸配列であり、アンチセンス核酸配列の発現は、標的核酸配列の発現を阻害する。

【０２８３】

「対象」及び「患者」という用語は、本明細書では同義的に使用され、動物、好ましくは脊椎動物、より好ましくは哺乳動物を指し、特に、ヒト患者及び非ヒト哺乳動物を含む。「哺乳動物」対象としては、これに限定されないが、ヒトが挙げられる。好ましい患者又は対象は、ヒト対象である。

【０２８４】

「治療量」又は「治療有効量」は、本明細書で使用される場合、対象の疾患又は障害を処置するのに有効な、つまり所望の局所効果又は全身効果を得るのに有効な発現産物の量を指す。したがって、この用語は、研究者、獣医師、医師、又は他の臨床医により求められている、組織、系、動物、又はヒトにおいて生物学的又は医学的応答を誘発する発現産物の量を指す。そのような量は、典型的には、遺伝子産物及び疾患の重症度に依存することになるが、当業者であれば、おそらくは日常的な実験作業により決定することができる。

【０２８５】

本明細書で使用される場合、「処置する」又は「処置」という用語は、治療的処置及び防止的若しくは予防的措置の両方を指す。有益な又は所望の臨床結果としては、これらに限定されないが、検出可能であるか又は検出不能であるかに関わらず、望ましくない臨床状態若しくは障害の予防、障害の発生率の低減、障害に関連付けられる症状の緩和、障害の範囲の縮小、障害の安定化された(つまり、悪化しない)状態、障害の進行の遅延又は緩徐、障害の状態の改善又は緩解、寛解(部分的又は全体的に関わらず)、又はそれらの組合せが挙げられる。「処置」は、処置を受けていない場合に予想される生存と比較して、生存が延長されることを意味する場合もある。

【０２８６】

本明細書で使用される場合、「治療的処置」又は「治療」等の用語は、対象の身体又はその要素を、望ましくない生理学的変化若しくは障害から重度がより低いか若しくはより不快ではない状態等の所望の状態にすること(例えば、改善又は緩解)、又は通常の健康な状態に戻すこと(例えば、対象の健康、身体的完全性、及び身体的健全性を回復すること)、又は前記望ましくない生理学的変化若しくは障害をそのまま維持すること（例えば、安定化すること又は悪化させないこと）、又は前記望ましくない生理学的変化若しくは障害と比較してより重度の若しくはより悪化した状態への進行を防止若しくは減速させることが目的である処置を指す。

【０２８７】

本明細書で使用される場合、「予防」、「予防的処置」、又は「防止的処置」等の用語は、前記疾患又は障害に罹患する前に、疾患若しくは障害の重症度又はそれに伴う症状を低減することを含む、疾患又は障害の発症を予防することを包含する。罹患前のそのような予防又は低減は、本明細書に記載の核酸発現構築物、ベクター、又は医薬組成物を、投与時に疾患又は障害の明らかな症状を罹患していない患者に投与することを指す。また、「予防すること」は、例えば、改善期間後の疾患又は障害の再発を予防すること又は再発防止することを包含する。実施形態では、本明細書に記載の核酸発現構築物、ベクター、又は医薬組成物は、遺伝子治療に使用するためのものであってもよい。

【０２８８】

「低酸素」、「低酸素性の」、又は関連用語は、酸素分圧が低い状態であり、典型的に

は1～5% O_2の範囲である。このような条件下では、真核細胞は、種々の細胞応答を誘導することにより応答するが、それらの多くは、HIFにより媒介される。臨床的状況では、低酸素条件は、血管新生の不良又は血液供給の中断により、腫瘍又は他の組織の中心領域に見出されることが多い。本発明の第20の態様によるCRE、本発明の第21の態様による低酸素誘導性プロモーター、又は本発明の第22の態様による遺伝子治療ベクターは、治療を必要とする組織が低酸素性である遺伝子治療において特に有用であり得る。これは、がん、腫瘍の中心領域、及びリンパ節に当てはまることが多い。「正常酸素」又は「正常酸素性の」は、10～20%の酸素分圧を記述するために使用され、20%を上まわる場合は「酸素過剰」と呼ばれる。O_2が5～10%の領域では、細胞は、低酸素の何らかの中程度の影響を示し始める可能性がある。本状況では、低酸素は、細胞を5%又はそれよりも低い酸素分圧に曝露することにより便利に誘導することができる。

【0289】

緒言

ATP誘導体環状アデノシン一リン酸(cAMP、環状AMP、又は3',5'-環状アデノシン一リン酸)は、多くの生物学的プロセスに重要な二次メッセンジャーである。その主な機能は、多くの異なる生物の細胞内シグナル伝達において、cAMP依存性経路を伝達することである。この経路は、十分に研究されており、Yanら、MOLECULAR MEDICINE REPORTS 13巻:3715～3723頁、2016年に概説されている。

【0290】

アデニリルシクラーゼ(一般的には、アデニルシクラーゼ及びアデニル酸シクラーゼとしても知られており、ACと略される)の活性化は、タンパク質キナーゼAを介して、特定のTFBS(cAMPRE:TGACGTCA)に結合して遺伝子発現をモジュレートする転写因子CREBの活性化に結び付くカスケードを駆動する。

【0291】

更に、AP1は、多くの形態が存在するFosタンパク質及びJunタンパク質の変化型で構成されるTF複合体(二量体)である。こうしたタンパク質は、多くのタンパク質キナーゼが関与する複雑な調節経路を有する。フォルスコリン及びアデニリルシクラーゼの他の活性化剤によるAP1部位(コンセンサス配列TGA[GC]TCA)の活性化が、記録されており、タンパク質c-Fosを安定化し、その転写を上方制御することが可能なcAMPレベルの上昇に関連していると考えられている。したがって、AP1部位により誘導される遺伝子発現は、アデニリルシクラーゼの活性化の間接的な効果である。例えば、Hessら、Journal of Cell Science 117巻、5965～5973頁並びにSharma及びRichards、J. Biol. Chem. 2000年、275巻:33718～33728頁を参照されたい。

【0292】

本発明では、cAMPRE及びAP1 TFBSを使用して、フォルスコリン及びアデニリルシクラーゼの他の活性化剤により誘導可能な新規合成CRE及びプロモーターが生成される。

【0293】

cAMPREは、CREBに対する原型的な標的配列である(Craigら、2001年)。

【0294】

AP1は、AP1転写因子結合配列のコンセンサス配列であり、AP1(1)、AP1(3)、及びAP1(2)は、コンセンサス配列のバリアントである(Hessら、2004年)(Sharma & Richards、2000年)。

【0295】

加えて、他のTFBSを、アデニリルシクラーゼの活性化剤により誘導可能な新規合成CRE及びプロモーターの生成に使用した。

【0296】

HRE1は、(Schodelら、2011年)の低酸素応答エレメントのコンセンサス配列である。

【0297】

ATF6は、シス調節エレメントである小胞体ストレス応答エレメントの活性化転写因子

6(ATF6)のコンセンサス結合配列である(Samaliら、2010年)。

【0298】

全てのプロモーターを、ルシフェラーゼ遺伝子(実施例1)又はSEAP遺伝子(実施例2)の上流に配置した。

【0299】

実験間で比較するために、誘導性プロモーターの強度を、他の構築物と同じ遺伝子を駆動していたCMV-IEプロモーターと比較した。

【0300】

ルシフェラーゼ読出し値を、β-ガラクトシダーゼに対して正規化して、正規化相対ルミノメーター単位(RLU)を生成した。pcDNA6プラスミドを含むβ-ガラクトシダーゼを、トランスフェクション効率の内部対照として使用した(Thermofisher社、V22020)。β-ガラクトシダーゼ活性を、25μlのライセートを使用して、製造元の説明書に従って測定した(哺乳動物βガラクトシダーゼアッセイキット、75707/75710、Thermo Scientific社)。25μlのライセートをマイクロプレートウェルに移し、室温に平衡化した25μlのβ-ガラクトシダーゼアッセイ試薬と混合した。混合物を37℃で30分間インキュベートし、405nmの吸光度を測定した。

【0301】

合成プロモーターは、GeneArt社が合成した。

【実施例1】

【0302】

次いで、フォルスコリン誘導性プロモーターFORCSV-10、FOR-CMV-009、FMP-02、及びFLP-01を使用して、懸濁細胞株HEK293-FにおいてPM-RQベクターからのルシフェラーゼの発現を駆動した。また、フォルスコリン誘導性プロモーターFORCSV-10、FOR-CMV-009、FMP-02、及びFLP-01を使用して、懸濁細胞株CHO-K1SVにおいてPM-RQベクターからのルシフェラーゼの発現を駆動した。試験したプロモーターを、PM-RQプラスミドのATGのすぐ上流に合成し、懸濁細胞株に、PM-RQプラスミドを一過性にトランスフェクトした。

【0303】

HEK293-F細胞のトランスフェクション

40mlの細胞を、250mlの通気式エルレンマイヤーフラスコ(Sigma-Aldrich社 CLS431144)にて100rpmで撹拌しながら、37℃、20% O_2、8% CO_2で成長させた。細胞を、製造元の説明書に記載の通りに播種した(300,000細胞/ml)。HEK293-Fは、Thermofisher社、R79007から入手した。

【0304】

トランスフェクションの1日前に、血球計を使用して細胞を計数し、500,000細胞/mlに分割した。

【0305】

トランスフェクション当日に、細胞を、24ウェルプレートの適切な培地(Freestyle 293発現培地、12338002)500μlに1,000,000細胞/mlで播種する。次いで、1ウェル当たり0.625μgのDNAを、10μlのOptiMem培地(Thermofisher社;11058021)に添加し、室温で5分間インキュベートした。

【0306】

同時に、OptiMemを添加することにより0.625μlのMax試薬(Thermofisher社、16447100)を10μlとし、室温で5分間インキュベートした。このインキュベーション後、両混合物を同じチューブに添加し、室温で25～30分間インキュベートした。次いで、DNA/Max試薬混合物(20μl/ウェル)を細胞に直接添加し、細胞を100rpmで撹拌しながら37℃、8% CO_2にてインキュベートした。

【0307】

トランスフェクションの24時間後に、20μMのフォルスコリンを添加することによりプロモーターを誘導し、誘導の0、3、5、及び24時間後にルシフェラーゼ活性を測定し

た。ルシフェラーゼ活性を、下記に記載の通りに測定した。

【０３０８】

ルシフェラーゼ活性の測定

- LARII(Dual Luciferase Reporter 1000アッセイ系、Promega社、E1980)を使用してルシフェラーゼ活性を測定した。
- 誘導の24時間後、培地を細胞から除去した。
- 細胞を300μlのDPBSで1回洗浄した。
- 100μlの受動溶解緩衝液を使用して細胞を溶解し、揺動させながら15分間インキュベートした。
- 卓上遠心機でプレートを最大速度で1分間遠心分離することにより、細胞残渣をペレット化した。
- ルシフェラーゼの場合、10μlの試料を白色96ウェルプレートに移し、50μlのLARII基質を注入することにより発光を測定した。

【０３０９】

CHO-K1SV細胞の一過性トランスフェクション

40mlの細胞を、250mlの通気式エルレンマイヤーフラスコ(Sigma-Aldrich社 CLS431144)にて100rpmで撹拌しながら、37℃、20% O_2、8% CO_2で成長させた。細胞を300,000細胞/mlで播種した。

【０３１０】

トランスフェクションの1日前に、血球計を使用して細胞を計数し、500,000細胞/mlに分割した。

【０３１１】

トランスフェクション当日に、細胞を、24ウェルプレートの適切な培地(Thermofisher社、CD-CHO 10743029)500μlに1,000,000細胞/mlで播種する。次いで、1ウェル当たり0.625μgのDNAを、10μlのOptiMem培地(Thermofisher社;11058021)に添加し、室温で5分間インキュベートした。

【０３１２】

同時に、OptiMemを添加することにより0.625μlのFreestyle Max試薬(Thermofisher社、16447100)を10μlとし、室温で5分間インキュベートした。このインキュベーション後、両混合物を同じチューブに添加し、室温で25～30分間インキュベートした。次いで、DNA/Max試薬混合物(20μl/ウェル)を細胞に直接添加し、細胞を100rpmで撹拌しながら37℃、8% CO_2にてインキュベートした。

【０３１３】

20μMのフォルスコリンを添加することによりプロモーターを誘導し、24時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。ルシフェラーゼ活性を、下記に記載の通りに測定した。

【０３１４】

結果

フォルスコリン誘導性プロモーターを使用して、懸濁細胞株HEK293-F(図2)及びCHO-K1SV(図3)におけるルシフェラーゼの発現を駆動した。

【０３１５】

誘導後の時間経過では、プロモーターは、バックグラウンドが低く、急速な活性の増加を示し、5時間後に最大活性が見られる。この活性は、24時間まで維持される。プロモーターの誘導倍数は、50倍～100倍と様々であり、FMP-02が最も弱く、FLP-01が最も強力である。プロモーターのダイナミックレンジも非常に幅広く、最大活性時には5倍の範囲である。こうした結果により、こうしたプロモーターは、制御が厳密であり、ダイナミックレンジ(最も強力なプロモーター強度の、最も弱いプロモーター強度に対する比)が幅広いため、バイオプロセス応用に有望であり得ることが示されている。

【実施例２】

【０３１６】

次いで、フォルスコリン誘導性プロモーターを、安定的にトランスフェクトされたCH

O-GS-KSV1細胞株で試験した。

【０３１７】

CHO-GS-KSV1安定細胞株の生成

物質

- CD-CHO培地(Life technologies社、カタログ番号10743029)
- Corning社製125mLポリカーボネートエルレンマイヤーフラスコ、ベントキャップ付き(カタログ番号734-1885)
- Gene Pulser(登録商標)エレクトロポレーションキュベット、0.4cmギャップ(BioRad社、カタログ番号165-2088)
- Gene Pulser Xcell Totalシステム(BioRad社、カタログ番号1652660)
- Sca1で線形化されたGS-ベクターDNA(100μLのTE緩衝液中40μg)
- CHOK1SV GS-KO宿主細胞の懸濁培養物

【０３１８】

1mL当たり6×10^5細胞の細胞懸濁物を、8% CO_2、20% O_2、37℃、85%相対湿度、及び140rpmに設定したオービタルシェーカーで一晩インキュベートした。2.86×10^7細胞を、200gで3分間遠心分離した。次いで、培地を吸引し、細胞ペレットを2mLの新たなCD-CHO培地に再懸濁して、1mL当たり1.43×10^7細胞の濃度を得た。700μLの細胞懸濁物を、各々が100μLの滅菌TE緩衝液(Thermofisher社、12090015)中に40gの線形化DNAを含む2つのエレクトロポレーションキュベットの各々に添加した。各キュベットをエレクトロポレーションし、抵抗を無限大にして300V、900μFの単一パルスを送達した。パルスを送達した直後、エレクトロポレーション細胞を、37℃に予熱した20mLのCD-CHO培地を含むエルレンマイヤー125mLフラスコに移した。2つのキュベットのエレクトロポレーション細胞を、単一の125mLフラスコ内で一緒にして、細胞の1つのプールを生成する。細胞を、8% CO_2、20% O_2、37℃、85%相対湿度、及び140rpmに設定されたオービタルシェーカーで培養する。トランスフェクションの24時間後に細胞を新たなCD-CHO培地に移し、細胞培養物をモニターし、2～4日毎に新たなCD-CHO培地を与える。通常、約10～14日後に、細胞数は、継代の開始に十分になるだろう。

【０３１９】

トランスフェクトしたDNAは、プロモーター構築物の1つ(又は対照プロモーター(CMV-IE))が、ベクター発現カセット内のマルチクローニング部位にクローニングされている分泌型アルカリホスファターゼ(SEAP)遺伝子の上流にクローニングされているpXC-17.4発現ベクター(Lonza Biologics plc社)だった。Gibsonアセンブリを使用して、プロモーターをpXC-17.4ベクターにクローニングした(closed)。pXC-17.4発現ベクターは、この細胞株からノックアウトされているグルタミン酸シンターゼ遺伝子を含むため、CHO-GSK1SV細胞株で安定細胞株を作製するために設計されている。したがって、グルタミンドロップアウト培地で細胞を選択すると、プラスミドが安定的に組み込まれた細胞が選択されることになる。

【０３２０】

また、FMP-02、FORCSV-10、FOR-CMC-009、及びFLP-01のプロモーター活性及び誘導性を、安定的にトランスフェクトされたCHO-GS-KSV1細胞株で試験した。この目的のため、安定的にトランスフェクトされたCHO-GS細胞を500,000細胞/mlで播種し、24時間成長させた。この時点で、細胞を、20μMのフォルスコリン又は7.2μMのNKH477に24時間曝露した。この時点の後で、培地中のSEAP活性を下記に記載の通りに評価した。

【０３２１】

SEAPアッセイ

SEAPレポーター遺伝子アッセイ、化学発光(Roche社、カタログ番号11 779 842 001)を製造元のプロトコールに従って使用して、SEAP活性を測定した。全ての試薬及び試料を、室温で十分に事前平衡化した。特定の時点（0時間及び24時間）で、安定的に

トランスフェクトされたCHO-GSから培養上清を収集した。上清を、希釈緩衝液で1:4に希釈し、65℃で30分間熱処理した。次いで、熱処理した試料を、最大速度で30秒間遠心分離した。次いで、熱処理した試料50μlを5μlの不活化緩衝液に添加し、室温で5分間インキュベートした。次いで、50μlの基質試薬を添加し、室温で10分間インキュベートした。次いで、シグナルを477nmで読み取り、較正曲線と比較する。活性の増加が細胞数の増加によるものではなく、真の誘導であったことを確認するため、SEAP発現を細胞数に対して正規化した。

【０３２２】

結果

安定的にトランスフェクトされたCHO-GS-KSV1細胞株における20μMのフォルスコリン又は7.2μMのNKH477に対するプロモーターの応答を、図4及び図5に示す。図4にはプロモーターの活性が示されており、図5には、各プロモーターが到達した最大活性がCMV-IEと比較して示されている。プロモーターは全て、フォルスコリン又はNKH477のいずれかを添加すると発現の増加を示す。以前と同様に、FMP-02が最も弱く、FLP-01が最も強力である。この系では、最大で30倍の誘導が見られ、最も弱いエクスプレッサーと最も強力なエクスプレッサーとの間の範囲は5倍である。この実験では、NKH477が、プロモーターのわずかにより強力な誘導剤であったと考えられる。NKH477は、水溶性であり、精製工程中により容易に洗い流されることになるため、バイオプロセスの好ましい誘導剤である。

【０３２３】

全体として、こうしたプロモーターは、両バイオプロセス(CHO-K1SV、HEK293-F)での使用に非常に有望であることを示す。プロモーターは、低いバックグラウンドを維持しつつ、良好な誘導性及び強度を示す複数の細胞タイプでロバストである。

【実施例３】

【０３２４】

様々な誘導性を示す幅広い範囲のプロモーターを得るために、第2世代フォルスコリン誘導性プロモーター設計を作出した。rAAV産生中にそれらをRepタンパク質に作動可能に連結することにより第2世代設計の有効性を試験した。

【０３２５】

FORNプロモーター設計

AP1及びCRE(cAMP応答エレメント)、cAMPRE、上記に記載のエレメントを使用して、プロモーターを設計した。こうしたプロモーターを、基本エンハンサーエレメント:

【化１２２】

TGACGTCACGATT**TGACGTCA**ACCAT**TGACGTCA**CGATT**TGACGTCA**ACCAT**TGACGTCA**CGAT
T**TGACGTCA**CGATT**TGACGTCA**ACCATTGACTCACGATTTGACTCAACCATTGACTCACGATTTG
ACTCAACCATTGACTCACGATTTGACTCA

(配列番号100)の付近に設計した。

cAMPREは太字で示されており、AP1部位には下線が引かれている。

【０３２６】

部位間の空間は、スペーサー、例えば中立的なDNAである。この配列から理解することができるように、エンハンサーエレメントは、7つのcAMPREエレメント及び6つのAP1エレメントで構成されており、エレメント間に5bpのスペーサーがある。このエンハンサーを、エンハンサーと最小プロモーターとの間の5bpスペーサーを介して、以下の最小プロモーターに作動可能に連結した。

YB-Tata(FORNYB)

短CMV(FORNCMV)

CMV53(FORCMV53)
MinTK(FORNMinTK)
MLP(FORNMLP)
SV40(FORNSV40)
pJB42(FORNJB42)

【０３２７】

こうした最小プロモーターの説明は、Edeら、２０１６年に記載されている。

【０３２８】

このエンハンサーは、TATA-m6A(FORNTATAm6a):

【化１２３】

TATAAAGGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGaagcttggactaaagcggacttgtctcgag

(配列番号１０１)

という名称の別の最小プロモーターにも作動可能に連結している(operably liked)。

【０３２９】

この最小プロモーターは、太字で示されているコンセンサス配列TATAボックス及び下線が引かれているm6a配列で構成されている。TATAボックスは、エンハンサーからの転写を安定させるために必要な最小配列であるが、m6A配列は、mRNAをメチル化するためのシグナルである。mRNAのこの化学修飾及び他の化学修飾は、そのうちの少なくとも１６０種が公知であるが、遺伝子発現中に別の層の転写後制御を作出すると考えられている。これらのうち、m6aが最も良好に理解されており、スプライシング、搬出、翻訳、及び安定性等、多数のmRNA機能に関与していることが研究により示されている。また、全ての真核生物mRNAの約1/4は、少なくとも1つのm6a部位を有しており、したがってmRNA修飾の最も多く見られる形態であることが観察されている(Hanら、２０２０年)。m6aメチル化に関する1つのそのような研究では、ATGの前のmRNAの5'末端にメチル化配列を配置することにより、転写産物の翻訳を増強することできることが示さた(Meyerら、２０１５年)。本発明者らは、こうした知見に変更を加えて、本発明者らのTATA最小プロモーターにm6a配列を追加し、弱いが非常に小型の最小プロモーターからの翻訳効率を後押しした。これにより、プロモーターの全体的なサイズを低減させつつ高発現を達成し、新規の最小プロモーターを生成することが可能になるはずである。

【０３３０】

細胞トランスフェクション

HEK293-T(ATCC-CRL-3216)細胞株を、HEK293細胞で説明したように、１０％ FBSを加えたDMEMで維持した。トランスフェクトしようとするプラスミドを、線形化し、リポフェクタミン2000(Invitrogen社、11668027)を製造元の説明書に従って使用してトランスフェクトした。次いで、細胞を非選択培地で48時間培養してから、選択培地(ブラストサイジン5μg/ml(Thermofisher社、A1113902)を加えた標準培地)に切り替えた。

【０３３１】

プロモーターの各々を、Rep78タンパク質の発現を誘導する能力について試験した。Rep52の発現を排除するために、本発明者らは、Rep52のATG開始コドンをAGGに突然変異させた。構築物は全て、Genewiz社が合成した。Pro10細胞を培養し、以前に記載のように、リポフェクタミン2000を使用してトランスフェクトした。トランスフェクションの24時間後、１０μMのフォルスコリンを細胞に添加した。この担体にはフォルスコリンが溶解していたため、対照ウェルにはDMSOを加えた。更に24時間後、細胞を溶解し、溶解物をRep78発現についてウェスタンブロットで分析した。結果は図6Aに示されている。

【０３３２】

ウエスタンブロットプロトコール

細胞をEppendorfチューブに収集し、卓上遠心機で5分間300gにて遠心分離する。上清を破棄し、細胞ペレットを、RIPA溶解&抽出緩衝液(Thermofisher社、英国、89900)、100×Haltプロテアーゼ阻害剤(Thermofisher社、英国、78445)で作られている1×放射性免疫沈降アッセイ(RIPA)緩衝液に溶解する。細胞溶解緩衝液を添加した後は、全ての試料を常に氷上で維持した。試料をボルテックスし、-20℃で一晩保管するか又は氷上で30分間維持した後、一切の不溶性物質を除去するために、卓上遠心機により20分間4℃にて最高速度(21,130g)で遠心分離する。細胞ライセートを4×LDS負荷試料緩衝液及び10×試料還元剤(ThermoFisher社、英国、NP0007及びNP0004)と混合する。それらを、手短にスピンダウンし、95℃で10分間加熱し、10℃に冷却し、再び手短にスピンダウンし、次いで、使用前に室温に戻したポリアクリルアミドゲル(NuPAGE Novex 4-12% Bis-Trisゲル、1.0mm;ThermoFisher UK社、NP0324BOX)で分離する。PageRuler(商標)前染色NIRタンパク質ラダー(ThermoFisher社、英国、26635)を、サイズ比較の目的で細胞ライセートと一緒に流す。ThermoFisher社のXCell SureLock Mini-Cellシステムを使用して、ゲルを150Vで1時間15分間流す。次いでゲルを、iBlot 2 Dryブロッティングシステム、p0プログラム(ThermoFisher社、英国)を製造元の説明書に従って使用して、ニトロセルロース膜に転写する。まず、製造元の説明書に従って全タンパク質染色を実施し(Revert(商標)700 Total Protein Stain for Western Blot Normalization;Licor社、英国、926-11011)、続いて膜をイムノブロッティングする。具体的には、膜をファルコンチューブに移し、最初にLicor Odyssey(登録商標)ブロッキング緩衝液で1時間室温にてブロッキングし、続いてLicor Odyssey(登録商標)ブロッキング緩衝液に再懸濁した好適な一次抗体を用いて、4℃に設定した低温室にて一晩プローブする。翌日、膜を、3×PBS-T(0.05%)で各回5分間ずつ3回洗浄し、次いで室温で1.5時間、好適な二次抗体でプローブする。二次抗体は、典型的には、可視化の目的ための蛍光タグを含む。膜を再びPBS-T(0.05%)で各回5分間ずつ2回洗浄し、続いて1×PBSで5分間最終洗浄する。Odyssey(登録商標)Fc Licor画像化システムを使用して膜を画像化する。

【0333】

この実験で使用した抗体は、一次抗体:抗Rep抗体303.9クローン(Progen社、61069)及び二次抗体:LICOR抗マウス800nm(LICOR社、926-32210)だった。

【0334】

また、本発明者らは、AAVヘルパー機能が、性能が最も良好なプロモーターFORN-pJB42の活性を誘導する能力も試験した。トランスフェクションを、以前に記載の通りに実施した。条件は以下の通りである。Rep78の発現を制御するFORN-pJB42を、アデノウイルスヘルパー機能を用いて又は用いずにトランスフェクトした。また、加えて、トランスフェクトされた細胞を、10μMのフォルスコリン又はビヒクルDMSO対照で処置した。活性の分析は、以前のセクションで説明した通りである。この実験の結果は、図6Bに見ることができる。

【0335】

結果

図6Aは、上記のCREを、TATA-m6a、YB、及びpJB42に作動可能に連結した場合に性能が最も良好であることを示す。この図から、こうしたプロモーターは、フォルスコリンの非存在下ではRep78の発現を示さないが、フォルスコリンの存在下では強力な発現を示すことを理解することができ、こうしたプロモーターがフォルスコリン誘導性であり、バックグラウンド活性が低い(漏れがない)ことが確認される。合成プロモーターの残り(MPがTATA-m6a、YB、及びpJB42ではない)、発現が漏れ易いことを示すある程度のレベルのバックグラウンドを示している。このデータは、こうしたプロモーターを使用して、Rep等の目的の遺伝子の発現を厳密に制御することができることを強く示している。Repの発現を厳密に制御することは、この毒性タンパク質を有する安定細胞株を生成する可能性を増加させると共に、発現レベルをrAAV産生に最適なレベルまで上昇させるこ

とも可能にするために重要である。

【０３３６】

図6Bは、FORN-pJB42プロモーターが、フォルスコリンの非存在下でさえヘルパー機能の存在により活性化されることを示し、このプロモーターが、ヘルパー機能により誘導され得ることを示している。しかしながら、アデノウイルスヘルパー機能及び10μMのフォルスコリンの両方が存在するまで完全な活性が得られないことに留意すべきである。更なるフォルスコリン誘導性プロモーターも同様に試験したところ、それらはヘルパー機能の存在により活性化された(データ非表示)。こうした結果は、このプロモーター及び類似のプロモーターが、ヘルパー機能により誘導されることを示している。

【０３３７】

加えて、こうした新しい設計を、上記に記載の通りHEK293細胞にトランスフェクトし、誘導剤の存在下又は非存在下での発現の結果を図7に示す。誘導剤が存在しない場合、全てのプロモーターは発現をほとんど示さなかったが、誘導剤(20μMのフォルスコリン)の存在下では強力に誘導される。

【０３３８】

低酸素及びHIF

HIFシグナル伝達カスケードの重要性は、周産期死亡に結び付いた、哺乳動物でのノックアウト研究により示されている。これは、血管系の発生及び軟骨細胞生存におけるその役割によるものである。加えて、HIF1は、呼吸及びエネルギー生産に関連しているため、ヒト代謝に中心的な役割を果たしている。更に、このカスケードは、低酸素条件での生存に重要な遺伝子を上方制御することにより、低酸素の効果を媒介する。例えば、低酸素は血管の形成を促進する。これは発生に不可欠である正常な応答である。しかしながら、がんでは、低酸素は、腫瘍の血管新生にも結び付く可能性がある。

【０３３９】

低酸素ストレス応答に関与する遺伝子の感知及び上方制御のための主な応答エレメントは、転写複合体HIF1である。この複合体は、真核生物にわたって高度に保存されており、2つのサブユニットα及びβの二量体化により形成される。β-サブユニットは、構成的に発現され、核への複合体の移行に不可欠なアリール炭化水素受容体核トランスロケーター(ARNT)である。αサブユニット及びβサブユニットは両方とも、転写因子の基本的なヘリックス-ループ-ヘリックスファミリーに属し、以下のドメインを含む。

- N末端:DNA結合のためのbHLHドメイン
- 中央ヘテロ二量体化ドメイン:Per-ARNT-Sim(PAS)ドメイン
- C末端:転写共調節タンパク質を動員する

【０３４０】

HIF作用機序

正常酸素条件下では、HIF1αサブユニットは、保存されたプロリン残基でヒドロキシル化される。HIFプロリル-ヒドロキシラーゼによるこのヒドロキシル化は、VHL E3ユビキチンリガーゼによる認識及びユビキチン化、並びにプロテアソームによるその後の分解のため、このサブユニットを標的にする。しかしながら、酸素はこの酵素にとって必須の補基質であるため、低酸素条件下では、酸素制限によりHIFプロリル-ヒドロキシラーゼが阻害される。安定化されると、HIF-1αサブユニットは、HIF-1βサブユニットとヘテロ二量体化し、核に移行して、そこで少なからぬ遺伝子の発現を上方制御することができる。これは、HBS配列NCGTG(配列番号5)(ここで、Nは好ましくはA又はGのいずれかである)又はその逆補体を含むプロモーター中のHIF応答エレメント(HRE)にHIF複合体が結合することにより達成される。HIF1複合体により上方制御される遺伝子は、酸素非依存性様式でATP合成を可能にする解糖酵素等の中枢代謝に又は血管内皮成長因子(VEGF)等の血管新生に関与する。

【０３４１】

偽性低酸素

HIF1複合体を活性化するための代替的な方法が存在する。コハク酸デヒドロゲナーゼ

を形成する4つのタンパク質サブユニットの1つであるSDHBに対する突然変異は、コハク酸デヒドロゲナーゼ複合体の電子伝達を阻害することにより、コハク酸の蓄積を引き起こす。この過剰なコハク酸は、HIFプロリル-ヒドロキシラーゼを阻害し、HIF-1αを安定化する。

【０３４２】

また、NF-κBは、正常酸素条件下でHIF1調節を直接モジュレートすることができる。HIF-1αレベルの増加は、NF-κB発現の増加と相関していたため、NF-κBは、基礎的HIF-1α発現を調節することができると考えられる。

【０３４３】

低酸素応答エレメント

低酸素応答エレメントは、保存されたHIF1結合コンセンサス配列NCGTG(配列番号5)を有する傾向があり、ここで、Nは好ましくはA又はGのいずれかである(Schodelら、2011年、Blood. 2011年6月9日;117巻(23号):e207～17頁)。このフランキング配列は可変性であることが知られているが、それでもプロモーターの活性に寄与する。

【０３４４】

以下の例示的なHIF結合配列(HBS)が、以下の例で使用されている。

- HRE1(ACGTGC(配列番号8))。これは、低酸素応答エレメントのHIF結合部位に見出されるコンセンサス配列([AG]CGTG、配列番号6)のバリアントである(Schodelら、2011)。
- HRE2(CTGCACGTA(配列番号7))。これは、優れた高活性低酸素誘導性モチーフであると記載されていた(Kaluzら、2008年、Biochem Biophys Res Commun. 2008年6月13日;370巻(4号):613～8頁)。
- HRE3(ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATG(配列番号9))。これは、強力に誘導されるエレメントであると記載されていた(Edeら、2016年、ACS Synth. Biol.、2016年、5巻(5号)、395～404頁)。HRE3は、HRE1及びHRE2を両方とも含む複合HBSであり、このエレメントを使用することにより、誘導の強度を増加させることが可能であり得るという仮説を立てた。

【０３４５】

こうしたHBS配列を含む合成プロモーターを調製し、下記に記載の通りに試験した。

- Synp-HYP-001構築物(配列番号130)は、スペーサーを含まない4つのHRE2エレメント、及び最後のHRE2のコアとCMV最小プロモーターのTATAボックスとの間の32塩基対長のスペーサーを含む。この構築物は、HRE2エレメント間に及び最後のHBSと最小プロモーターとの間に準最適な間隔を用いて設計した。
- Synp-RTV-015構築物(配列番号129)は、40bpスペーサーにより離間された5つのHRE1エレメント、続いてその後直ぐに合成最小プロモーターTATAボックス(MP1)を含む。このプロモーターは、HRE1エレメント間の40bpの準最適な間隔、及び最後のHRE1 HBSのコアからMP1のTATAボックスまでの36bpの間隔により、低酸素で弱くしか誘導されないように設計した。
- Synp-HYPN構築物(配列番号131;配列番号140)は、5bpスペーサーにより離間された6つのHRE3エレメント、続いてその後直ぐにYB-TATAを含む。
- Synp-HYBNC構築物(配列番号132;配列番号141)は、5bpスペーサーにより離間された6つのHRE3エレメント、続いてその後直ぐにCMV-MP shortを含む。
- Synp-HYBNC53構築物(配列番号133;配列番号142)は、5bpスペーサーにより離間された6つのHRE3エレメント、続いてその後直ぐにCMV53を含む。
- Synp-HYBNMinTK構築物(配列番号134;配列番号143)は、5bpスペーサーにより離間された6つのHRE3エレメント、続いてその後直ぐにMinTKを含む。
- Synp-HYBNMLP構築物(配列番号135;配列番号144)は、5bpスペーサーにより離間された6つのHRE3エレメント、続いてその後直ぐにMLPを含む。
- Synp-HYBNSV構築物(配列番号136;配列番号145)は、5bpスペーサーにより離間された6つのHRE3エレメント、続いてその後直ぐにSV40を含む。

- Synp-HYBNpJB42構築物(配列番号137;配列番号146)は、5bpスペーサーにより離間された6つのHRE3エレメント、続いてその後直ぐにpJB42を含む。
- Synp-HYBNTATAm6a構築物(配列番号138;配列番号147)は、5bpスペーサーにより離間された6つのHRE3エレメント、続いてその後直ぐにTATAm6aを含む。

【０３４６】

全てのプロモーターを、ルシフェラーゼ遺伝子(実施例4及び実施例5)又はSEAP遺伝子(実施例6)の上流に配置した。

【０３４７】

実験間で比較するために、誘導性プロモーターの強度を、他の構築物と同じ遺伝子を駆動していたCMV-IEプロモーターと比較した。

【０３４８】

合成プロモーターは、Geneart社が合成した。別様の記載がない限り、プロモーター構築物を使用して、pMQプラスミドにあるルシフェラーゼの発現を駆動した。

【実施例４】

【０３４９】

まず、構築物を使用して、低酸素でHEK293-F及びHEK293-Tでのルシフェラーゼ発現を駆動した。

【０３５０】

24ウェル形式でのHEK293-F細胞のトランスフェクション

40mlの細胞を、250mlの通気式エルレンマイヤーフラスコ(Sigma-Aldrich社　CLS431144)にて100rpmで撹拌しながら、37℃、20 %O_2、8% CO_2で成長させた。細胞を、製造元の説明書に記載の通りに播種した(300,000細胞/ml)。HEK293-Fは、Thermofisher社、R79007から入手した。

【０３５１】

トランスフェクションの1日前に、血球計を使用して細胞を計数し、500,000細胞/mlに分割した。

【０３５２】

トランスフェクション当日に、細胞を、24ウェルプレートの適切な培地(Freestyle 293発現培地、12338002)500μlに1,000,000細胞/mlで播種する。次いで、1ウェル当たり0.625μgのDNAを、10μlのOptiMem培地(Thermofisher社;11058021)に添加し、室温で5分間インキュベートした。

【０３５３】

同時に、OptiMemを添加することにより0.625μlのMax試薬(Thermofisher社、16447100)を10μlとし、室温で5分間インキュベートした。このインキュベーション後、両混合物を同じチューブに添加し、室温で25～30分間インキュベートした。次いで、DNA/Max試薬混合物(20μl/ウェル)を細胞に直接添加し、細胞を100rpmで撹拌しながら37℃、8% CO_2にてインキュベートした。トランスフェクトしたDNAは、プロモーター構築物(RTV-015、Synp-HYP-001)又は対照プロモーター(CMV-IE)を使用してルシフェラーゼ発現を駆動したベクター及びβ-ガラクトシダーゼ含有pcDNA6プラスミドのうちの1つだった。β-ガラクトシダーゼ含有プラスミドを、トランスフェクション効率の内部対照として使用した(Thermofisher社、V22020)。

【０３５４】

トランスフェクション後、細胞を、正常酸素条件(20%酸素)で24時間インキュベートしてから、5%酸素、10%二酸化炭素、及び85%窒素(低酸素)の混合ガスに切り替えた。これは、密閉された低酸素チャンバー内でのガス置換により達成された。プロモーターの誘導は、低酸素で3、5、及び24時間後にルシフェラーゼ活性を使用して評価した。こうした結果は、図10に示されている。

【０３５５】

HEK293-T細胞のトランスフェクション

HEK293-Tを、20%の密度で播種する。60～80%のコンフルエンスに到達したら、

培地を、10% FBS(Gibco社、26140)で補完されたDMEM(#21885-025 - Thermo Scientific社)と交換する。3時間後、細胞をトランスフェクションミックスでトランスフェクトした。トランスフェクションミックスは、DNA(6ウェルプレート1つ当たり2μg)及びPEI 25 kDA(#23966-1 - Polyscience社)を、滅菌DPBS(#14190169 - ThermoFisher Scientific社)に1:3の比で添加することにより調製する。混合後、トランスフェクションミックスを室温で30分間インキュベートし、次いで細胞に直接添加する。トランスフェクションの16～18時間後、培地をDMEM+2% FBSに変更する。トランスフェクトしたDNAは、プロモーター構築物(RTV-015)又は対照プロモーター(CMV-IE)を使用してルシフェラーゼ発現を駆動したベクター及びβ-ガラクトシダーゼ含有pcDNA6プラスミドのうちの1つだった。β-ガラクトシダーゼ含有プラスミドを、トランスフェクション効率の内部対照として使用した(Thermofisher社、V22020)。

【0356】

トランスフェクション後、細胞を正常酸素条件(20%酸素)で24時間インキュベートした。プロモーターの誘導を、正常酸素又は低酸素(5%酸素、10%二酸化炭素、及び85%窒素)で24時間後にルシフェラーゼ活性を使用して評価した。低酸素は、密閉された低酸素チャンバー内でのガス置換により達成された。結果は、図11に示されている。

【0357】

ルシフェラーゼ活性の測定

LARII(Dual Luciferase Reporter 1000アッセイ系、Promega社、E1980)を使用してルシフェラーゼ活性を測定した。

【0358】

それぞれの時点(誘導後0、3、5、24時間)で細胞から培地を除去した。細胞を300μlのDPBSで1回洗浄した。100μlの受動溶解緩衝液を細胞に添加することにより細胞を溶解し、揺動させながら15分間インキュベートした。プレートを卓上遠心機で1分間最大速度にて遠心分離することにより、細胞残渣をペレット化した。10μlの上清を白色96ウェルプレートにピペットで移し、50μlのLARII基質を添加することにより発光を測定した。

【0359】

25μlのライセートを使用し、製造元の説明書(哺乳動物βガラクトシダーゼアッセイキット、75707/75710、Thermo Scientific社)に従って、β-ガラクトシダーゼ活性を測定した。25μlのライセートをマイクロプレートウェルに移し、室温に平衡化した25μlのβ-ガラクトシダーゼアッセイ試薬と混合した。混合物を37℃で30分間インキュベートし、405nmの吸光度を測定した。

【0360】

ルシフェラーゼ読出し値を、β-ガラクトシダーゼに対して正規化して、正規化相対ルミノメーター単位(RLU)を生成した。

【0361】

結果

記載のプロモーターを、懸濁細胞株HEK293-F細胞株(図10)又は付着HEK293-T細胞株(図11)のいずれかに一過性にトランスフェクトし、プロモーターの活性を、ルシフェラーゼアッセイを使用して評価した。

【0362】

図10では、HEK293-F細胞の全てのプロモーターが、低酸素条件への切替え時に急速な活性増加を示し、3時間後にルシフェラーゼ活性の増加が観察された。試験したプロモーターの全てで5時間後に最大活性が観察され、24時間の時点では活性に有意な増加はなかった。対照的に、低酸素への切替えは、CMV-IEプロモーターの活性に効果を示さず、ルシフェラーゼ活性は変化しない。

【0363】

図11では、低酸素で24時間後のプロモーターの発現を、正常酸素で24時間後のプロモーターの発現と比較した。HEK293-T細胞では、発現パターンは、HEK293-F細胞と

非常に類似しており、RTV-015が低酸素で誘導されている。この場合も、正常酸素条件と低酸素条件との間でCMV-IEプロモーターに変化はない。

【０３６４】

こうした結果により、本発明者らの設計原理が検証されたと考えられ、プロモーターの強度は、理論上の相対強度に相関している。

【実施例５】

【０３６５】

CHO-GS細胞の一過性トランスフェクション

40mlの細胞を、250mlの通気式エルレンマイヤーフラスコ(Sigma-Aldrich社　CLS431144)にて100rpmで撹拌しながら、37℃、20 %O_2、8% CO_2で成長させた。細胞を300,000細胞/mlで播種した。

【０３６６】

トランスフェクションの1日前に、血球計を使用して細胞を計数し、500,000細胞/mlに分割した。

【０３６７】

トランスフェクション当日に、細胞を、24ウェルプレートの適切な培地(Thermofisher社、CD-CHO 10743029)500μlに1,000,000細胞/mlで播種する。次いで、1ウェル当たり0.625μgのDNAを、10μlのOptiMem培地(Thermofisher社;11058021)に添加し、室温で5分間インキュベートした。

【０３６８】

同時に、OptiMemを添加することにより0.625μlのFreestyle Max試薬(Thermofisher社、16447100)を10μlとし、室温で5分間インキュベートした。このインキュベーション後、両混合物を同じチューブに添加し、室温で25～30分間インキュベートした。次いで、DNA/Max試薬混合物(20μl/ウェル)を細胞に直接添加し、細胞を100rpmで撹拌しながら37℃、8% CO_2にてインキュベートした。

【０３６９】

トランスフェクトしたDNAは、プロモーター構築物(RTV-015)又は対照プロモーター(CMV-IE)を使用してルシフェラーゼ発現を駆動したベクター及びβ-ガラクトシダーゼ含有pcDNA6プラスミドのうちの1つだった。β-ガラクトシダーゼ含有プラスミドを、トランスフェクション効率の内部対照として使用した(Thermofisher社、V22020)。

【０３７０】

トランスフェクション後、細胞を正常酸素条件(20%酸素)で24時間インキュベートした。プロモーターの誘導は、正常酸素又は低酸素(5%酸素、10%二酸化炭素、及び85%窒素)で24時間後にルシフェラーゼ活性を使用して評価した。低酸素は、密閉された低酸素チャンバー内でのガス置換により達成された。ルシフェラーゼ活性は、下記に記載の通りに測定した。結果は、図12に示されている。

【０３７１】

結果

産業的に関連するCHO系統での機能性を試験するために、プロモーターRTV-015からのルシフェラーゼ発現を、一過性にトランスフェクトされたCHO懸濁株CHO-GSK1SVで評価した。

【０３７２】

図12から理解することができるように、このプロモーターは、HEK293細胞での場合と同様に、こうした細胞でも同様に挙動する。この場合も、低酸素への切替えはCMV-IEプロモーターの活性に対して効果を示さず、このプロモーターからのルシフェラーゼ活性は、低酸素でも正常酸素でも異ならない。

【０３７３】

これは、このプロモーターが複数の細胞株にわたってロバストであることを示している。

【実施例６】

【０３７４】
CHO-GS-KSV1安定細胞株の生成
物質
CD-CHO培地(Life technologies社、カタログ番号10743029)
Corning社製125mLポリカーボネートエルレンマイヤーフラスコ、ベントキャップ付き(カタログ番号734-1885)
Gene Pulser(登録商標)エレクトロポレーションキュベット、0.4cmギャップ(BioRad社、カタログ番号165-2088)
Gene Pulser Xcell Totalシステム(BioRad社、カタログ番号1652660)
Sca1で線形化されたGS-ベクターDNA(100μLのTE緩衝液中40μg)
CHOK1SV GS-KO宿主細胞の懸濁培養物
【０３７５】
1mL当たり6×10^{5}細胞の細胞懸濁物を、8% CO_2、20% O_2、37℃、85%相対湿度、及び140rpmに設定したオービタルシェーカーで一晩インキュベートした。2.86×10^{7}細胞を、200gで3分間遠心分離した。次いで、培地を吸引し、細胞ペレットを2mLの新たなCD-CHO培地に再懸濁して、1mL当たり1.43×10^{7}細胞の濃度を得た。700μLの細胞懸濁物を、各々が100μLの滅菌TE緩衝液(Thermofisher社、12090015)中に40gの線形化DNAを含む2つのエレクトロポレーションキュベットの各々に添加した。各キュベットをエレクトロポレーションし、抵抗を無限大にして300V、900μFの単一パルスを送達した。パルスを送達した直後、エレクトロポレーション細胞を、37℃に予熱した20mLのCD-CHO培地を含むエルレンマイヤー125mLフラスコに移した。2つのキュベットのエレクトロポレーション細胞を、単一の125mLフラスコ内で一緒にして、細胞の1つのプールを生成する。細胞を、8% CO_2、20% O_2、37℃、85%相対湿度、及び140rpmに設定したオービタルシェーカーで培養する。トランスフェクションの24時間後に細胞を新たなCD-CHO培地に移し、細胞培養物をモニターし、2～4日毎に新たなCD-CHO培地を与える。通常、約10～14日後、細胞数は、継代の開始に十分になるだろう。14日目に細胞を選択し、次いで拡大増殖させた。倍加時間がおよそ24時間に戻ってから、誘導を実施した。この例でアッセイした細胞は、継代数が15、17、19、及び21回だった。
【０３７６】
トランスフェクトしたDNAは、プロモーター構築物の1つ(RTV-015)又は対照プロモーター(CMV-IE)が、ベクター発現カセット内のマルチクローニング部位にクローニングされているSEAP遺伝子の上流にクローニングされているpXC-17.4発現ベクター(Lonza Biologics plc社)だった。Gibsonアセンブリを使用して、プロモーターをpXC-17.4ベクターにクローニングした(closed)。pXC-17.4発現ベクターは、CHO-GSK1SV細胞株で安定細胞株を作製するために設計されたものであり、この細胞株からノックアウトされているグルタミン酸シンターゼ遺伝子を含む。したがって、グルタミンドロップアウト培地で細胞を選択すると、プラスミドが安定的に組み込まれた細胞が選択されることになる。
【０３７７】
安定的にトランスフェクトされたCHO-GS細胞を500,000細胞/mlで播種し、24時間成長させ、この時点で細胞を計数し、以前に記載の通り低酸素条件下に置いた。24時間後、細胞数及びSEAPの発現を測定した。
【０３７８】
SEAPアッセイ
SEAPレポーター遺伝子アッセイ、化学発光(Roche社、カタログ番号11 779 842 001)を製造元のプロトコールに従って使用して、SEAP活性を測定した。全ての試薬及び試料を、室温で十分に事前平衡化した。特定の時点(0時間及び24時間)で、安定的にトランスフェクトされたCHO-GSから培養上清を収集した。上清を、希釈緩衝液で1:4に希釈し、65℃で30分間熱処理した。次いで、熱処理した試料を、最大速度で30秒間遠心

分離した。次いで、熱処理した試料50μlを5μlの不活化緩衝液に添加し、室温で5分間インキュベートした。次いで、50μlの基質試薬を添加し、室温で10分間インキュベートした。次いで、シグナルを477nmで読み取り、較正曲線と比較する。活性の増加が細胞数の増加によるものではなく、真の誘導であったことを確認するため、SEAP発現を細胞数に対して正規化した。この実験の結果は、図13及び図14に見ることができる。

【0379】

結果

製造の状況でタンパク質を生産するための有用なツールであるためには、プロモーターは、標的細胞内に安定的に組み込まれた後で機能しなければならない。これを試験するために、プロモーターを、CHO-GS細胞内のベクターpXC-17.4のSEAP遺伝子の上流にクローニングし、こうした細胞を低酸素による誘導について評価した。

【0380】

低酸素で0時間時、24時間時の、及び正常酸素で24時間時のSEAPの活性が、図6に示されている。このグラフは、プロモーターが、低酸素条件により誘導され、相対発現レベルが、一過性トランスフェクションアッセイと同様の傾向に従うことを示している。安定細胞株では、プロモーターのダイナミックレンジは10倍であり、誘導の最大倍数は20倍である。図14は、異なる条件下での細胞の成長には差異がないことを示し、観察された活性が、プロモーターの誘導によるものであり、細胞の成長によるものではないことが確認される。

【0381】

安定細胞株でのプロモーターの活性により、設計原理が検証され、バイオマニュファクチャリングにおけるそれらの使用が実施可能であることが示されている。

【実施例7】

【0382】

新しいプロモーター設計

上記に記載のHRE3(配列番号9)を使用してプロモーターを設計した。こうしたプロモーターを、基本エンハンサーエレメント:

【化124】

ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCAC
GTATGtgcgtACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGT
CTCTGCACGTATGtgcgtACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGT
ACGTGCGTCTCTGCACGTATG

(配列番号139)の付近に設計した。

HRE3は大文字である。

【0383】

HRE3間の空間は、スペーサー、例えば中立的なDNAである。この配列から理解することができるように、エンハンサーエレメントは、6つのHRE3エレメントで構成されており、エレメント間に5bpスペーサーがある。

【0384】

このエンハンサーを、エンハンサーと最小プロモーターとの間の5bpスペーサーを介して、以下の最小プロモーターに作動可能に連結した。

YB-Tata(HYPN)

短CMV(HYBNC)

CMV53(HYBNC53)

MinTK(HYBNMinTK)

MLP(HYBNMLP)

SV40(HYBNSV)
pJB42(HYBNpJB42)
【０３８５】
こうした最小プロモーターの説明は、Edeら、２０１６年に見出すことができる。
【０３８６】
このエンハンサーは、TATA-m6A(HYBNTATAm6a)という名称の別の最小プロモーター:TATAAAAGGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGaagcttggactaaagcggacttgtctcgag(配列番号１０１)にも作動可能に連結していた(operably liked)。
【０３８７】
この最小プロモーターは、太字で表されているコンセンサス配列TATAボックス及び下線が引かれているm6a配列で構成されている。TATAボックスは、エンハンサーからの転写を安定させるために必要な最小配列であるが、m6A配列は、mRNAをメチル化するためのシグナルである。mRNAのこの化学修飾及び他の化学修飾は、そのうちの少なくとも１６０個が公知であるが、遺伝子発現中に別の層の転写後制御を作出すると考えられている。これらのうち、m6aが最も良好に理解されており、スプライシング、搬出、翻訳、及び安定性等、多数のmRNA機能に関与していることが研究により示されている。また、全ての真核生物mRNAの約1/4は、少なくとも1つのm6a部位を有しており、したがってmRNA修飾の最も多く見られる形態であることが観察されている(Hanら、２０２０年)。m6aメチル化に関する1つのそのような研究では、ATGの前のmRNAの5'末端にメチル化配列を配置することにより、転写産物の翻訳を増強することできることが示さた(Meyerら、２０１５年)。本発明者らは、こうした知見に変更を加えて、本発明者らのTATA最小プロモーターにm6a配列を追加して、弱いが非常に小型の最小プロモーターからの翻訳効率を後押しした。これにより、プロモーターの全体的なサイズを低減させつつ高発現を達成し、新規の最小プロモーターを生成することが可能になるはずである。
【０３８８】
こうした新しい設計を、上記に記載のHEK293細胞にトランスフェクトし、低酸素及び正常酸素でのそれらの発現の結果を図15に示す。全てのプロモーターは、正常酸素では発現をほとんど示さなかったが、低酸素では強力に誘導される。
【０３８９】
配列
Synp-RTV-015
【化１２５】

ACGTGCGATGATGCGTAGCTAGTAGTGATGATGCGTAGCTAGTAGTACGTGCGATGAT
GCGTAGCTAGTAGTGATGATGCGTAGCTAGTAGTACGTGCGATGATGCGTAGCTAGTA
GTGATGATGCGTAGCTAGTAGTACGTGCGATGATGCGTAGCTAGTAGTGATGATGCGT
AGCTAGTAGTACGTGC**TTGGTACCATCCGGGCCGGCCGCTTAAGCGACGCCTATAAA**
AAATAGGTTGCATGCTAGGCCTAGCGCTGCCAGTCCATCTTCGCTAGCCTGTGCTGC
GTCAGTCCAGCGCTGCGCTGCGTAACGGCCGCC

(配列番号１２９)
下線はHRE1、太字はMP1最小プロモーターである。
Synp-HYP-001

【化１２６】

CTGCACGTACTGCACGTACTGCACGTACTGCACGTATGGGTACCGTCGACGATATCGG
ATCC**AGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTAGATACGCC**
ATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGATCGCCACC

(配列番号１３０)
下線はＨＲＥ２、太字は最小プロモーターである。
Ｓｙｎｐ-ＨＹＰＮ
【化１２７】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGACCTTGAGTACG
TGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGtgcgtACCT
TGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTAT
GtgcgtACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCT
GCACGTATG**TCTAGAGGGTATATAATGGGGGCCA**

(配列番号１４０)
下線はＨＲＥ３、太字はＹＢ-ＴＡＴＡ最小プロモーターである。
Ｓｙｎｐ-ＨＹＢＮＣ
【化１２８】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGACCTTGAGTACG
TGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGtgcgtACCT
TGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTAT
GtgcgtACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCT
GCACGTATGGCGATTAATCCATATGC**GTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGC**
AGAGCT

(配列番号１４１)
下線はＨＲＥ３、太字はＣＭＶ ｓｈｏｒｔ最小プロモーターである。
Ｓｙｎｐ-ＨＹＢＮＣ５３
【化１２９】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGACCTTGAGTACG
TGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGtgcgtACCT
TGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTAT
GtgcgtACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCT
GCACGTATGCAACAAAATGTCGTAAC**AAGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCT**
ATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCG

(配列番号１４２)
下線はＨＲＥ３、太字はＣＭＶ５３最小プロモーターである。
Ｓｙｎｐ-ＨＹＢＮＭｉｎＴＫ
【化１３０】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGACCTTGAGTACG
TGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGtgcgtACCT
TGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTAT
GtgcgtACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCT
GCACGTATG**TTCGCATATTAAGGTGACGCGTGTGGCCTCGAACACCGAGCGACCCTG**
CAGCGACCCGCTTAA

(配列番号１４３)
下線はＨＲＥ３、太字はＭｉｎＴＫ最小プロモーターである。
Ｓｙｎｐ- ＨＹＢＮＭＬＰ
【化１３１】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGACCTTGAGTACG
TGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGtgcgtACCT
TGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTAT
GtgcgtACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCT
GCACGTATG**GGGGGGCTATAAAAGGGGGTGGGGGCGTTCGTCCTCACTCT**

(配列番号１４４)
下線はＨＲＥ３、太字はＭＬＰ最小プロモーターである。
Ｓｙｎｐ-ＨＹＢＮＳＶ
【化１３２】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGACCTTGAGTACG
TGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGtgcgtACCT
TGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTAT
GtgcgtACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCT
GCACGTATG**TGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCAT**
CCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATCGCTGACTAATTTTT
TTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGA
GGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTT

(配列番号１４５)
下線はＨＲＥ３、太字はＳＶ４０最小プロモーターである。
Ｓｙｎｐ-ＨＹＢＮｐＪＢ４２

【化１３３】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGACCTTGAGTACG
TGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGtgcgtACCT
TGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTAT
Gtgcgt ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCT
GCACGTATG**CTGACAAATTCAGTATAAAAGCTTGGGGCTGGGGCCGAGCACTGGGGA**
CTTTGAGGGTGGCCAGGCCAGCGTAGGAGGCCAGCGTAGGATCCTGCTGGGAGCGG
GGAACTGAGGGAAGCGACGCCGAGAAAGCAGGCGTACCACGGAGGGAGAGAAAAG
CTCCGGAAGCCCAGCAGCG

(配列番号１４６)
下線はＨＲＥ３、太字はｐＪＢ４２最小プロモーターである。
Ｓｙｎｐ-ＨＹＢＮＴＡＴＡｍ６ａ
【化１３４】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGACCTTGAGTACG
TGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGtgcgtACCT
TGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTAT
Gtgcgt ACCTTGAGTACGTGCGTCTCTGCACGTATGgataaACCTTGAGTACGTGCGTCTCT
GCACGTATG**TATAAAAGGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGaagcttggactaaagcggacttgtct**
cgag

(配列番号１４７)
下線はＨＲＥ３、太字はＴＡＴＡ-ｍ６ａ最小プロモーターである。
ｐＭＡ-ＲＱルシフェラーゼベクター - ＲＴＶ-０１５

【化１３５Ａ】

ACGTGCGATGAGCTCCCCGGGTTAATTAACATATGACTAGTGAATTCATTGATCATAATC
AGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTTACTTGCTTTAAAAAACCTCCCACACCTCCCCCTG
AACCTGAAACATAAAATGAATGCAATTGTTGTTGTTAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATG
GTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTCACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTC
TAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGCGGCCGCGACCTG
CAGGCGCAGAACTGGTAGGTATGGAAGATCCCTCGAGATCCATTGTGCTGGCGGTAGG
CGAGCAGCGCCTGCCTGAAGCTGCGGGCATTCCCGATCAGAAATGAGCGCCAGTCGT
CGTCGGCTCTCGGCACCGAATGCGTATGATTCTCCGCCAGCATGGCTTCGGCCAGTGC
GTCGAGCAGCGCCCGCTTGTTCCTGAAGTGCCAGTAAAGCGCCGGCTGCTGAACCCC
CAACCGTTCCGCCAGTTTGCGTGTCGTCAGACCGTCTACGCCGACCTCGTTCAACAGG
TCCAGGGCGGCACGGATCACTGTATTCGGCTGCAACTTTGTCATGCTTGACACTTTATC
ACTGATAAACATAATATGTCCACCAACTTATCAGTGATAAAGAATCCGCGCCAGCACAAT
GGATCTCGAGGTCGAGGGATCTCTAGAGGATCCTCTACGCCGGACGCATCGTGGCCG
GCATCACCGGCGCCACAGGTGCGGTTGCTGGCGCCTATATCGCCGACATCACCGATG
GGGAAGATCGGGCTCGCCACTTCGGGCTCATGAGCGCTTGTTTCGGCGTGGGTATGG
TGGCAGGCCCCGTGGCCGGGGGACTGTTGGGCGCCATCTCCTTGCATGCACCATTCC
TTGCGGCGGCGGTGCTCAACGGCCTCAACCTACTACTGGGCTGCTTCCTAATGCAGGA

【化１３５Ｂ】

GTCGCATAAGGGAGAGCGTCGACCTCGGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTC
CGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGA
CAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGT
TCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCG
CTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCGCTCCAAGCT
GGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTAT
CGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTA
ACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCC
TAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTA
CCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGG
TGGTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATC
CTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATT
TTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTT
TTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCA
GTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCGTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCC
GTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGA
TACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGG
AAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATT
GTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCC
ATTGCTACAGGCATCGTGGTGTCACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGG
TTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCT
CCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTT
ATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACT
GGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTG
CCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCA
TTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGT
TCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTT
TCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACAC
GGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTA
TTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCC
GCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACAT
TAACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTGATGGCTCTTTGCGGCACCCATCGTT
CGTAATGTTCCGTGGCACCGAGGACAACCCTCAAGAGAAAATGTAATCACACTGGCTC
ACCTTCGGGTGGGCCTTTCTGCGTTTATAAGGAGACACTTTATGTTTAAGAAGGTTGGT
AAATTCCTTGCGGCTTTGGCAGCCAAGCTAGATCCGGCTGTGGAATGTGTGTCAGTTA
GGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCA
ATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCA

【化１３５Ｃ】

AAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGC
CCCTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTT
ATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCT
TTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTAGCTTGGGGCCACCGCTCAGAGCACCT
TCCACCATGGCCACCTCAGCAAGTTCCCACTTGAACAAAAACATCAAGCAAATGTACTT
GTGCCTGCCCCAGGGTGAGAAAGTCCAAGCCATGTATATCTGGGTTGATGGTACTGGA
GAAGGACTGCGCTGCAAAACCCGCACCCTGGACTGTGAGCCCAAGTGTGTAGAAGAGT
TACCTGAGTGGAATTTTGATGGCTCTAGTACCTTTCAGTCTGAGGGCTCCAACAGTGAC
ATGTATCTCAGCCCTGTTGCCATGTTTCGGGACCCCTTCCGCAGAGATCCCAACAAGCT
GGTGTTCTGTGAAGTTTTCAAGTACAACCGGAAGCCTGCAGAGACCAATTTAAGGCACT
CGTGTAAACGGATAATGGACATGGTGAGCAACCAGCACCCCTGGTTTGGAATGGAACA
GGAGTATACTCTGATGGGAACAGATGGGCACCCTTTTGGTTGGCCTTCCAATGGCTTTC
CTGGGCCCCAAGGTCCGTATTACTGTGGTGTGGGCGCAGACAAAGCCTATGGCAGGG
ATATCGTGGAGGCTCACTACCGCGCCTGCTTGTATGCTGGGGTCAAGATTACAGGAAC
AAATGCTGAGGTCATGCCTGCCCAGTGGGAGTTCCAAATAGGACCCTGTGAAGGAATC
CGCATGGGAGATCATCTCTGGGTGGCCCGTTTCATCTTGCATCGAGTATGTGAAGACTT
TGGGGTAATAGCAACCTTTGACCCCAAGCCCATTCCTGGGAACTGGAATGGTGCAGGC
TGCCATACCAACTTTAGCACCAAGGCCATGCGGGAGGAGAATGGTCTGAAGCACATCG
AGGAGGCCATCGAGAAACTAAGCAAGCGGCACCGGTACCACATTCGAGCCTACGATCC
CAAGGGGGGCCTGGACAATGCCCGTCGTCTGACTGGGTTCCACGAAACGTCCAACATC
AACGACTTTTCTGCTGGTGTCGCCAATCGCAGTGCCAGCATCCGCATTCCCCGGACTG
TCGGCCAGGAGAAGAAAGGTTACTTTGAAGACCGCCGCCCCTCTGCCAATTGTGACCC
CTTTGCAGTGACAGAAGCCATCGTCCGCACATGCCTTCTCAATGAGACTGGCGACGAG
CCCTTCCAATACAAAAACTAATTAGACTTTGAGTGATCTTGAGCCTTTCCTAGTTCATCC
CACCCCGCCCCAGAGAGATCTTTGTGAAGGAACCTTACTTCTGTGGTGTGACATAATTG
GACAAACTACCTACAGAGATTTAAAGCTCTAAGGTAAATATAAAATTTTTAAGTGTATAAT
GTGTTAAACTACTGATTCTAATTGTTTGTGTATTTTAGATTCCAACCTATGGAACTGATGA
ATGGGAGCAGTGGTGGAATGCCTTTAATGAGGAAAACCTGTTTTGCTCAGAAGAAATGC
CATCTAGTGATGATGAGGCTACTGCTGACTCTCAACATTCTACTCCTCCAAAAAAGAAG
AGAAAGGTAGAAGACCCCAAGGACTTTCCTTCAGAATTGCTAAGTTTTTTGAGTCATGC
TGTGTTTAGTAATAGAACTCTTGCTTGCTTTGCTATTTACACCACAAAGGAAAAAGCTGC
ACTGCTATACAAGAAAATTATGGAAAAATATTCTGTAACCTTTATAAGTAGGCATAACAG
TTATAATCATAACATACTGTTTTTTCTTACTCCACACAGGCATAGAGTGTCTGCTATTAAT
AACTATGCTCAAAAATTGTGTACCTTTAGCTTTTTAATTTGTAAAGGGGTTAATAAGGAAT
ATTTGATGTATAGTGCCTTGACTAGAGATCATAATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTT
TTACTTGCTTTAAAAAACCTCCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAATGCA
ATTGTTGTTGTTAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCA

【化１３５Ｄ】

CAAATTTCACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCAT
CAATGTATCTTATCATGTCTGGATCTCTAGCTTCGTGTCAAGGACGGTGAGG

(配列番号１４８)
ｐＭＡ-ＲＱルシフェラーゼベクター - Ｓｙｎｐ-ＨＹＰ-００１

【化１３６Ａ】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGCTGCACGTACTG
CACGTACTGCACGTACTGCACGTATGGGTACCGTCGACGATATCGGATCCAGGTCTAT
ATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTAGATACGCCATCCACGCTGTTT
TGACCTCCATAGAAGATCGCCACCATGGAAGATGCCAAAAACATTAAGAAGGGCCCAG
CGCCATTCTACCCACTCGAAGACGGGACCGCCGGCGAGCAGCTGCACAAAGCCATGA
AGCGCTACGCCCTGGTGCCCGGCACCATCGCCTTTACCGACGCACATATCGAGGTGG
ACATTACCTACGCCGAGTACTTCGAGATGAGCGTTCGGCTGGCAGAAGCTATGAAGCG
CTATGGGCTGAATACAAACCATCGGATCGTGGTGTGCAGCGAGAATAGCTTGCAGTTC
TTCATGCCCGTGTTGGGTGCCCTGTTCATCGGTGTGGCTGTGGCCCCAGCTAACGACA
TCTACAACGAGCGCGAGCTGCTGAACAGCATGGGCATCAGCCAGCCCACCGTCGTATT
CGTGAGCAAGAAAGGGCTGCAAAAGATCCTCAACGTGCAAAAGAAGCTACCGATCATA
CAAAAGATCATCATCATGGATAGCAAGACCGACTACCAGGGCTTCCAAAGCATGTACAC
CTTCGTGACTTCCCATTTGCCACCCGGCTTCAACGAGTACGACTTCGTGCCCGAGAGC
TTCGACCGGGACAAAACCATCGCCCTGATCATGAACAGTAGTGGCAGTACCGGATTGC
CCAAGGGCGTAGCCCTACCGCACCGCACCGCTTGTGTCCGATTCAGTCATGCCCGCG
ACCCCATCTTCGGCAACCAGATCATCCCCGACACCGCTATCCTCAGCGTGGTGCCATT
TCACCACGGCTTCGGCATGTTCACCACGCTGGGCTACTTGATCTGCGGCTTTCGGGTC
GTGCTCATGTACCGCTTCGAGGAGGAGCTATTCTTGCGCAGCTTGCAAGACTATAAGAT
TCAATCTGCCCTGCTGGTGCCCACACTATTTAGCTTCTTCGCTAAGAGCACTCTCATCG
ACAAGTACGACCTAAGCAACTTGCACGAGATCGCCAGCGGCGGGGCGCCGCTCAGCA
AGGAGGTAGGTGAGGCCGTGGCCAAACGCTTCCACCTACCAGGCATCCGCCAGGGCT
ACGGCCTGACAGAAACAACCAGCGCCATTCTGATCACCCCCGAAGGGGACGACAAGC
CTGGCGCAGTAGGCAAGGTGGTGCCCTTCTTCGAGGCTAAGGTGGTGGACTTGGACA
CCGGTAAGACACTGGGTGTGAACCAGCGCGGCGAGCTGTGCGTCCGTGGCCCCATGA
TCATGAGCGGCTACGTTAACAACCCCGAGGCTACAAACGCTCTCATCGACAAGGACGG
CTGGCTGCACAGCGGCGACATCGCCTACTGGGACGAGGACGAGCACTTCTTCATCGT
GGACCGGCTGAAGAGCCTGATCAAATACAAGGGCTACCAGGTAGCCCCAGCCGAACT
GGAGAGCATCCTGCTGCAACACCCCAACATCTTCGACGCCGGGGTCGCCGGCCTGCC
CGACGACGATGCCGGCGAGCTGCCCGCCGCAGTCGTCGTGCTGGAACACGGTAAAAC
CATGACCGAGAAGGAGATCGTGGACTATGTGGCCAGCCAGGTTACAACCGCCAAGAAG
CTGCGCGGTGGTGTTGTGTTCGTGGACGAGGTGCCTAAAGGACTGACCGGCAAGTTG
GACGCCCGCAAGATCCGCGAGATTCTCATTAAGGCCAAGAAGGGCGGCAAGATCGCC

【化１３６Ｂ】

GTGTAATGAAAGCTTGGTCTCTACGAGTAATAGACGCCCAGTTGAATTCCTTCGAGCAG
ACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAACTAGAATGCAGTGAAAAAAAT
GCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAA
ACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCATTTTATGTTTCAGGTTCAGGGGGAGGTGTGGG
AGGTTTTTTAAAGCAAGTAAAACCTCTACAAATGTGGTAAAATCGATAAGGATCCGTCTG
GGCCTCATGGGCCTTCCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAG
CTGCATTAACATGGTCATAGCTGTTTCCTTGCGTATTGGGCGCTCTCCGCTTCCTCGCT
CACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCGGGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGCAAAAG
GCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCT
CCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCC
GACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCT
GTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGG
CGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCGCTCCAAG
CTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACT
ATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGG
TAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGG
CCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGT
TACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGC
GGTGGTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGA
TCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGA
TTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAG
TTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATC
AGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCGTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCC
CGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATG
ATACCGCGAGAACCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCG
GAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAA
TTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTG
CCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTCACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCC
GGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTA
GCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATG
GTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTG
ACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTC
TTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCA
TCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCC
AGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGC
GTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGA
CACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGG

【化１３６Ｃ】

TTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGT
TCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTTAAAA
TTCGCGTTAAATTTTTGTTAAATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCGAA

(配列番号149)
Synp-FORCSV-10
【化１３７】

CCATTGACGTCACGATTACCATTGACGTCACGATTACCATTGACGTCACGATTACCATTGACGTC
ACGATTACCATTGACGTCAGCGATTAAGATGACTCAGCGATTAAGATGACTCAGCGATTAAGATG
ACTCAGCGATTAAGATGACTCACTAGCCCGGGCTCGAGATCTGCGATC**TGCATCTCAATTAGTC**
AGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCA
TTCTCCGCCCCATCGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCT
GAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTTGGC
ATTCCGGTACTGTTGGTAAAGCCACC

(配列番号46)
下線はcAMPRE及びAP1、太字は最小プロモーターである。
Synp-FORCMV-09
【化１３８】

CCATTGACGTCACGATTACCATTGACGTCACGATTACCATTGACGTCACGATTACCATTGACGTC
ACGATTACCATTGACGTCAGCGATTAAGATGACTCAGCGATTAAGATGACTCAGCGATTAAGATG
ACTCAGCGATTAAGATGACTCAGCGATTAATCCATATGCAGGTC**TATATAAGCAGAGCTCGTTTA**
GTGAACCGTCAGATCGCCTAGATACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGATCGCCA
CC

(配列番号47)
下線はcAMPRE及びAP1、太字は最小プロモーターである。
Synp-FMP-02
【化１３９】

TGAGTCAGATGATGCGTAGCTAGTAGTTGAGTCAGATGATGCGTAGCTAGTAGTTGAGTCAGATG
ATGCGTAGCTAGTAGTTGAGTCAGATGATGCGTAGCTAGTAGTTGAGTCAGATGATGCGTAGCTA
GTAGTTGAGTCAGATGATGCGTAGCTAGTAGTTGAGTCAGATGATGCGTAGCTAGTAGTTGAGTC
AGTAGTCGTATGCTGATGCGCAGTTAGCGTAGCTGAGGTACCGTCGACGATATCGGATCC**TTCG**
CATATTAAGGTGACGCGTGTGGCCTCGAACACCGAGCGACCCTGCAGCGACCCGCTTAA

(配列番号41)
下線はAP1、太字は最小プロモーターである。
Synp-FLP-01

【化１４０】

TGAGTCAGATGATGCGTAGCTAGTAGTTGAGTCAGATGATGCGTAGCTAGTAGTTGAGTCAGATG
ATGCGTAGCTAGTAGTTGAGTCAGATGATGCGTAGCTAGTAGTTGAGTCAGATGATGCGTAGCTA
GTAGTTGAGTCAGATGATGCGTAGCTAGTAGTTGAGTCAGATGATGCGTAGCTAGTAGTTGAGTC
AGTAGTCGTATGCTGATGCGCAGTTAGCGTAGCTGAGGTACCGTCGACGATATCGGATCC**GGGC**
ATATAAAACAGGGGCAAGGCACAGACTCATAGCAGAGCAATCACCACCAAGCCTGGAATAAC
TGCAGCCACC

(配列番号４２)
下線はＡＰ１、太字は最小プロモーターである。
Ｓｙｎｐ-ＦＯＲＮＥＷ
【化１４１】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGCCATTGACGTCACGATTT
GACGTCAACCATTGACGTCACGATTTGACGTCAACCATTGACGTCACGATTTGACGTCACGATTT
GACGTCAACCATTGACTCACGATTTGACTCAACCATTGACTCACGATTTGACTCAACCATTGACTC
ACGATTTGACTCACGATT**GCGATTAATCCATATGCTCTAGAGGGTATATAATGGGGGCCACTAG**
TCTACTACCAGAAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCAGCCACC

(配列番号６２)
下線はｃＡＭＰＲＥ及びＡＰ１、太字はＹＢ-ＴＡＴＡ最小プロモーターである。
Ｓｙｎｐ-ＦＯＲＮＣＭＶ
【化１４２】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGCCATTGACGTCACGATTT
GACGTCAACCATTGACGTCACGATTTGACGTCAACCATTGACGTCACGATTTGACGTCACGATTT
GACGTCAACCATTGACTCACGATTTGACTCAACCATTGACTCACGATTTGACTCAACCATTGACTC
ACGATTTGACTCACGATT**GTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCT**CGTTTAGT
GAACCGTCAGATCGCCACC

(配列番号６８)
下線はｃＡＭＰＲＥ及びＡＰ１、太字は短ＣＭＶ最小プロモーターである。
Ｓｙｎｐ-ＦＯＲＮＣＭＶ５３
【化１４３】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGCCATTGACGTCACGATTT
GACGTCAACCATTGACGTCACGATTTGACGTCAACCATTGACGTCACGATTTGACGTCACGATTT
GACGTCAACCATTGACTCACGATTTGACTCAACCATTGACTCACGATTTGACTCAACCATTGACTC
ACGATTTGACTCACGATTCAACAAAATGTCGTAAC**AAGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGT**
CTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGGCCACC

(配列番号６９)

下線はcAMPRE及びAP1、太字はCMV53最小プロモーターである。
Synp-FORNMinTK
【化１４４】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGCCATTGACGTCACGATTT
GACGTCAACCATTGACGTCACGATTTGACGTCAACCATTGACGTCACGATTTGACGTCACGATTT
GACGTCAACCATTGACTCACGATTTGACTCAACCATTGACTCACGATTTGACTCAACCATTGACTC
ACGATTTGACTCACGATT**TTCGCATATTAAGGTGACGCGTGTGGCCTCGAACACCGAGCGACC**
CTGCAGCGACCCGCTTAAGCCACC

(配列番号70)
下線はcAMPRE及びAP1、太字はMinTK最小プロモーターである。
Synp-FORNMLP
【化１４５】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGCCATTGACGTCACGATTT
GACGTCAACCATTGACGTCACGATTTGACGTCAACCATTGACGTCACGATTTGACGTCACGATTT
GACGTCAACCATTGACTCACGATTTGACTCAACCATTGACTCACGATTTGACTCAACCATTGACTC
ACGATTTGACTCACGATT**GGGGGGCTATAAAAGGGGGTGGGGGCGTTCGTCCTCACTCT**GCCA
CC

(配列番号71)
下線はcAMPRE及びAP1、太字はMLP最小プロモーターである。
Synp-FORNSV40
【化１４６】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGCCATTGACGTCACGATTT
GACGTCAACCATTGACGTCACGATTTGACGTCAACCATTGACGTCACGATTTGACGTCACGATTT
GACGTCAACCATTGACTCACGATTTGACTCAACCATTGACTCACGATTTGACTCAACCATTGACTC
ACGATTTGACTCACGATT**TGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCC**
CATCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATCGCTGACTAATTTTTTTT
ATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTT
TTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTTGCCACC

(配列番号72)
下線はcAMPRE及びAP1、太字はSV40最小プロモーターである。
Synp-FORNpJB42

【化１４７】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGCCATTGACGTCACGATTT
GACGTCAACCATTGACGTCACGATTTGACGTCAACCATTGACGTCACGATTTGACGTCACGATTT
GACGTCAACCATTGACTCACGATTTGACTCAACCATTGACTCACGATTTGACTCAACCATTGACTC
ACGATTTGACTCACGATT**CTGACAAATTCAGTATAAAAGCTTGGGGCTGGGGCCGAGCACTGG**
GGACTTTGAGGGTGGCCAGGCCAGCGTAGGAGGCCAGCGTAGGATCCTGCTGGGAGCGGGG
AACTGAGGGAAGCGACGCCGAGAAAGCAGGCGTACCACGGAGGGAGAGAAAAGCTCCGGAA
GCCCAGCAGCGGCCACC

(配列番号７３)
下線はｃＡＭＰＲＥ及びＡＰ１、太字はｐＪＢ４２最小プロモーターである。
Ｓｙｎｐ-ＦＯＲＮＴＡＴＡｍ６ａ
【化１４８】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGCCATTGACGTCACGATTT
GACGTCAACCATTGACGTCACGATTTGACGTCAACCATTGACGTCACGATTTGACGTCACGATTT
GACGTCAACCATTGACTCACGATTTGACTCAACCATTGACTCACGATTTGACTCAACCATTGACTC
ACGATTTGACTCACGATT**TATAAAAGGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGaagcttggactaaagcggactt**
gtctcgag

(配列番号７４)
下線はｃＡＭＰＲＥ及びＡＰ１、太字はＴＡＴＡｍ６ａ最小プロモーターである。
Ｓｙｎｐ-ＲＴＶ-０２０
【化１４９】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGTGACGTGCTgataatgcgtTG
ACGTGCTtgcgtgataaTGACGTGCTgataatgcgtTGACGTGCTtgcgtgataaTGACGTGCTagctagtagtTGA
GTCAgataatgcgtTGAGTCAtgcgtgataaTGAGTCAgataatgcgtTGAGTCAtgcgtgataaTGAGTCAgataatgc
gtTGAGTCAagctagtagtCTGCACGTAgataatgcgtCTGCACGTAtgcgtgataaCTGCACGTAgataatgcgtCT
GCACGTAtgcgtgataaCTGCACGTAgataatgcgtCTGCACGTAagctagtagttgatctga**GTAGGCGTGTACG**
GTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATC

(配列番号７５)
下線は、ＡＴＦ６、ＡＰ１、及びＨＲＥ１、太字は短ＣＭＶ最小プロモーターである。
Ｓｙｎｐ-ＲＴＶ-０２０ＹＢ

【化１５０】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGTGACGTGCTgataatgcgtTG
ACGTGCTtgcgtgataaTGACGTGCTgataatgcgtTGACGTGCTtgcgtgataaTGACGTGCTagctagtagtTGA
GTCAgataatgcgtTGAGTCAtgcgtgataaTGAGTCAgataatgcgtTGAGTCAtgcgtgataaTGAGTCAgataatgc
gtTGAGTCAagctagtagtCTGCACGTAgataatgcgtCTGCACGTAtgcgtgataaCTGCACGTAgataatgcgtCT
GCACGTAtgcgtgataaCTGCACGTAgataatgcgtCTGCACGTAagctagtagttgatctga**TCTAGAGGGTATAT**
AATGGGGGCCA

(配列番号７６)
下線は、ＡＴＦ６、ＡＰ１、及びＨＲＥ１、太字は短ＹＢ-ＴＡＴＡ最小プロモーターである。
Ｓｙｎｐ-ＲＴＶ-０２０Ｃ５３
【化１５１】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGTGACGTGCTgataatgcgtTG
ACGTGCTtgcgtgataaTGACGTGCTgataatgcgtTGACGTGCTtgcgtgataaTGACGTGCTagctagtagtTGA
GTCAgataatgcgtTGAGTCAtgcgtgataaTGAGTCAgataatgcgtTGAGTCAtgcgtgataaTGAGTCAgataatgc
gtTGAGTCAagctagtagtCTGCACGTAgataatgcgtCTGCACGTAtgcgtgataaCTGCACGTAgataatgcgtCT
GCACGTAtgcgtgataaCTGCACGTAgataatgcgtCTGCACGTAagctagtagttgatctgaCAACAAAATGTCGT
AAC**AAGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCT**CGTTTAGTGAACCG

(配列番号７７)
下線は、ＡＴＦ６、ＡＰ１、及びＨＲＥ１、太字はＣＭＶ５３最小プロモーターである。
Ｓｙｎｐ-ＲＴＶ-０２０ＭｉｎＴＫ
【化１５２】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGTGACGTGCTgataatgcgtTG
ACGTGCTtgcgtgataaTGACGTGCTgataatgcgtTGACGTGCTtgcgtgataaTGACGTGCTagctagtagtTGA
GTCAgataatgcgtTGAGTCAtgcgtgataaTGAGTCAgataatgcgtTGAGTCAtgcgtgataaTGAGTCAgataatgc
gtTGAGTCAagctagtagtCTGCACGTAgataatgcgtCTGCACGTAtgcgtgataaCTGCACGTAgataatgcgtCT
GCACGTAtgcgtgataaCTGCACGTAgataatgcgtCTGCACGTAagctagtagttgatctga**TTCGCATATTAAGG**
TGACGCGTGTGGCCTCGAACACCGAGCGACCCTGCAGCGACCCGCTTAA

(配列番号７８)
下線は、ＡＴＦ６、ＡＰ１、及びＨＲＥ１、太字はＭｉｎＴＫ最小プロモーターである。
Ｓｙｎｐ-ＲＴＶ０-２０ＭＬＰ

【化１５３】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGTGACGTGCTgataatgcgtTG
ACGTGCTtgcgtgataaTGACGTGCTgataatgcgtTGACGTGCTtgcgtgataaTGACGTGCTagctagtagtTGA
GTCAgataatgcgtTGAGTCAtgcgtgataaTGAGTCAgataatgcgtTGAGTCAtgcgtgataaTGAGTCAgataatgc
gtTGAGTCAagctagtagtCTGCACGTAgataatgcgtCTGCACGTAtgcgtgataaCTGCACGTAgataatgcgtCT
GCACGTAtgcgtgataaCTGCACGTAgataatgcgtCTGCACGTAagctagtagttgatctga**GGGGGGCTATAAA**
AGGGGGTGGGGGCGTTCGTCCTCACTCT

(配列番号７９)
下線は、ＡＴＦ６、ＡＰ１、及びＨＲＥ１、太字はＭＬＰ最小プロモーターである。
Ｓｙｎｐ-ＲＴＶ-０２０ｐＪＢ４２
【化１５４】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGTGACGTGCTgataatgcgtTG
ACGTGCTtgcgtgataaTGACGTGCTgataatgcgtTGACGTGCTtgcgtgataaTGACGTGCTagctagtagtTGA
GTCAgataatgcgtTGAGTCAtgcgtgataaTGAGTCAgataatgcgtTGAGTCAtgcgtgataaTGAGTCAgataatgc
gtTGAGTCAagctagtagtCTGCACGTAgataatgcgtCTGCACGTAtgcgtgataaCTGCACGTAgataatgcgtCT
GCACGTAtgcgtgataaCTGCACGTAgataatgcgtCTGCACGTAagctagtagttgatctga**CTGACAAATTCAGT**
ATAAAAGCTTGGGGCTGGGGCCGAGCACTGGGGACTTTGAGGGTGGCCAGGCCAGCGTAGG
AGGCCAGCGTAGGATCCTGCTGGGAGCGGGGAACTGAGGGAAGCGACGCCGAGAAAGCAGG
CGTACCACGGAGGGAGAGAAAAGCTCCGGAAGCCCAGCAGCG

(配列番号８０)
下線は、ＡＴＦ６、ＡＰ１、及びＨＲＥ１、太字はｐＪＢ４２最小プロモーターである。
Ｓｙｎｐｒ-ＲＴＶ-０２０ＴＡＴＡｍ６ａ
【化１５５】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGTGACGTGCTgataatgcgtTG
ACGTGCTtgcgtgataaTGACGTGCTgataatgcgtTGACGTGCTtgcgtgataaTGACGTGCTagctagtagtTGA
GTCAgataatgcgtTGAGTCAtgcgtgataaTGAGTCAgataatgcgtTGAGTCAtgcgtgataaTGAGTCAgataatgc
gtTGAGTCAagctagtagtCTGCACGTAgataatgcgtCTGCACGTAtgcgtgataaCTGCACGTAgataatgcgtCT
GCACGTAtgcgtgataaCTGCACGTAgataatgcgtCTGCACGTAagctagtagttgatctga**TATAAAAGGCAGA**
GCTCGTTTAGTGAACCGaagcttggactaaagcggacttgtctcgag

(配列番号８１)
下線は、ＡＴＦ６、ＡＰ１、及びＨＲＥ１、太字はＴＡＴＡｍ６ａ最小プロモーターである。
Ｓｙｎｐ-ＲＴＶ-０２０ＳＶ

【化１５６】

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGTGACGTGCTgataatgcgtTG
ACGTGCTtgcgtgataaTGACGTGCTgataatgcgtTGACGTGCTtgcgtgataaTGACGTGCTagctagtagtTGA
GTCAgataatgcgtTGAGTCAtgcgtgataaTGAGTCAgataatgcgtTGAGTCAtgcgtgataaTGAGTCAgataatgc
gtTGAGTCAagctagtagtCTGCACGTAgataatgcgtCTGCACGTAtgcgtgataaCTGCACGTAgataatgcgtCT
GCACGTAtgcgtgataaCTGCACGTAgataatgcgtCTGCACGTAagctagtagttgatctga**TGCATCTCAATTAG**
TCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGCC
CATTCTCCGCCCCATCGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCT
CTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTT

(配列番号８２)
下線は、ＡＴＦ６、ＡＰ１、及びＨＲＥ１、太字はＳＶ４０最小プロモーターである。
ＰＭ-ＲＱベクター
【化１５７Ａ】

ATGGAAGATGCCAAAAACATTAAGAAGGGCCCAGCGCCATTCTACCCACTCGAAGACGGGACCG
CCGGCGAGCAGCTGCACAAAGCCATGAAGCGCTACGCCCTGGTGCCCGGCACCATCGCCTTTA
CCGACGCACATATCGAGGTGGACATTACCTACGCCGAGTACTTCGAGATGAGCGTTCGGCTGGC
AGAAGCTATGAAGCGCTATGGGCTGAATACAAACCATCGGATCGTGGTGTGCAGCGAGAATAGC
TTGCAGTTCTTCATGCCCGTGTTGGGTGCCCTGTTCATCGGTGTGGCTGTGGCCCCAGCTAACG
ACATCTACAACGAGCGCGAGCTGCTGAACAGCATGGGCATCAGCCAGCCCACCGTCGTATTCGT
GAGCAAGAAAGGGCTGCAAAAGATCCTCAACGTGCAAAAGAAGCTACCGATCATACAAAAGATC
ATCATCATGGATAGCAAGACCGACTACCAGGGCTTCCAAAGCATGTACACCTTCGTGACTTCCCA
TTTGCCACCCGGCTTCAACGAGTACGACTTCGTGCCCGAGAGCTTCGACCGGGACAAAACCATC
GCCCTGATCATGAACAGTAGTGGCAGTACCGGATTGCCCAAGGGCGTAGCCCTACCGCACCGC
ACCGCTTGTGTCCGATTCAGTCATGCCCGCGACCCCATCTTCGGCAACCAGATCATCCCCGACA

【化１５７Ｂ】

CCGCTATCCTCAGCGTGGTGCCATTTCACCACGGCTTCGGCATGTTCACCACGCTGGGCTACTT
GATCTGCGGCTTTCGGGTCGTGCTCATGTACCGCTTCGAGGAGGAGCTATTCTTGCGCAGCTTG
CAAGACTATAAGATTCAATCTGCCCTGCTGGTGCCCACACTATTTAGCTTCTTCGCTAAGAGCAC
TCTCATCGACAAGTACGACCTAAGCAACTTGCACGAGATCGCCAGCGGCGGGGCGCCGCTCAG
CAAGGAGGTAGGTGAGGCCGTGGCCAAACGCTTCCACCTACCAGGCATCCGCCAGGGCTACGG
CCTGACAGAAACAACCAGCGCCATTCTGATCACCCCCGAAGGGGACGACAAGCCTGGCGCAGT
AGGCAAGGTGGTGCCCTTCTTCGAGGCTAAGGTGGTGGACTTGGACACCGGTAAGACACTGGG
TGTGAACCAGCGCGGCGAGCTGTGCGTCCGTGGCCCCATGATCATGAGCGGCTACGTTAACAA
CCCCGAGGCTACAAACGCTCTCATCGACAAGGACGGCTGGCTGCACAGCGGCGACATCGCCTA
CTGGGACGAGGACGAGCACTTCTTCATCGTGGACCGGCTGAAGAGCCTGATCAAATACAAGGG
CTACCAGGTAGCCCCAGCCGAACTGGAGAGCATCCTGCTGCAACACCCCAACATCTTCGACGCC
GGGGTCGCCGGCCTGCCCGACGACGATGCCGGCGAGCTGCCCGCCGCAGTCGTCGTGCTGGA
ACACGGTAAAACCATGACCGAGAAGGAGATCGTGGACTATGTGGCCAGCCAGGTTACAACCGCC
AAGAAGCTGCGCGGTGGTGTTGTGTTCGTGGACGAGGTGCCTAAAGGACTGACCGGCAAGTTG
GACGCCCGCAAGATCCGCGAGATTCTCATTAAGGCCAAGAAGGGCGGCAAGATCGCCGTGTAA
GTGTAATGAAAGCTTGGTCTCTACGAGTAATAGACGCCCAGTTGAATTCCTTCGAGCAGACATGA
TAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAACTAGAATGCAGTGAAAAAAATGCTTTATTTGTG
AAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAA
TTGCATTCATTTTATGTTTCAGGTTCAGGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTTAAAGCAAGTAAAACC
TCTACAAATGTGGTAAAATCGATAAGGATCCGTAACAACAACAATTGCATTCATTTTATGTTTCAG
GTTCAGGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTTAAAGCAAGTAAAACCTCTACAAATGTGGTAAAATCGA
TAAGGATCCGTCTGGGCCTCATGGGCCTTCCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGT
CGTGCCAGCTGCATTAACATGGTCATAGCTGTTTCCTTGCGTATTGGGCGCTCTCCGCTTCCTCG
CTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCGGGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGCAAAAGGCC
AGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCC
TGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGA
TACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCG
GATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTAT
CTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCC
GACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGC
CACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGT
TCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTG
AAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTA
GCGGTGGTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCT
TTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCAT
GAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAA
AGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGC
GATCTGTCTATTTCGTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGG
AGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGAACCACGCTCACCGGCTCCAG
ATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATC

【化１５７Ｃ】

CGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTT
TGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTCACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTC
ATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCG
GTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGT
TATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGA
GTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCA
ATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTC
GGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCA
CCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCA
AAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTC
AATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAA
AAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCAC

(配列番号４８)
SEAPコード配列
【化１５８】

ATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGGGCCTGAGGCTACAGCTCTCCCTGGGCATCATCCCAGTTG
AGGAGGAGAACCCGGACTTCTGGAACCGCGAGGCAGCCGAGGCCCTGGGTGCCGCCAAGAAG
CTGCAGCCTGCACAGACAGCCGCCAAGAACCTCATCATCTTCCTGGGCGATGGGATGGGGGTG
TCTACGGTGACAGCTGCCAGGATCCTAAAAGGGCAGAAGAAGGACAAACTGGGGCCTGAGATA
CCC

(配列番号４９)
pAAVベクター:

【化１５９Ａ】

CGATAGATCTAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCA
CTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGC
GAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGGCAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACT
GGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCG
TAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATG
GCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTCACACCGCATACGTCAAAGCA
ACCATAGTACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGT
GACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCA
CGTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGC
TTTACGGCACCTCGACCCCAAAAAACTTGATTTGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCC
TGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAA
ACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGGCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTCG
GCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGT
TTACAATTTTATGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGA
CACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGA
CAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTCACCGTCATCACCGAAACGCG
CGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTT
AGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATA
CATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGG

【化１５９Ｂ】

AAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCT
GTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAG
TGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACG
TTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCG
GGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGT
CACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGA
GTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTT
TTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCC
ATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTAT
TAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAA
GTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAG
CCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTA
TCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGA
GATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGAT
TGATTTAAAACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACC
AAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATC
TTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGC
GGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAG
CGCAGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTA
GCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGT
CGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAA
CGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTAC
AGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAA
GCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTT
TATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGG
GGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCC
TTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGA
GTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAG
CGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTG
GCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTC
ACTCATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAG
CGGATAACAATTTCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAATTGCCTGCAGGCAGCTGC
GCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGC
CCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTC
CTATC

（配列番号５０）

【０３９０】

（参考文献）

Craig, J. C. et al., 2001. Consensus and Variant cAMP-regulated Enhancers Have Distinct CREB-binding Properties. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY,* 276(15), pp. 11719-11728.

Ede, C., Chen, X., Lin, M.-Y. & Chen, Y. Y., 2016. Quantitative Analyses of Core Promoters Enable Precise Engineering of Regulated Gene Expression in Mammalian Cells. ACS Synth Biol., 5(5), p. 395–404.

Hess, H., Angel, P. & Schorpp-Kistner, M., 2004. AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *Journal of Cell Science,* Volume 117, pp. 5965-5973.

Javan, B. & Shanbazi, M., 2017. Hypoxia-inducible tumour-specific promoters as a dual-targeting transcriptional regulation system for cancer gene therapy. Ecancer, 11(751), pp. 1-10.

Kaluz, S., Kaluzová, M. & Stanbridge, E. J., 2008. Rational design of minimal hypoxia-inducible enhancers. Biochem Biophys Res Commun., 370(4), p. 613–618.

Samali, A., FitzGerald, U., Deegan, S. & Gupta, S., 2010. Methods for Monitoring Endoplasmic Reticulum Stress and the Unfolded Protein Response. *International Journal of Cell Biology,* pp. 1-11.

Schödel, J. et al., 2011. High-resolution genome-wide mapping of HIF-binding sites by ChIP-seq. *Blood,* 117(23), pp. e207-e217.

Sharma, C. S. & Richards, J. S., 2000. Regulation of AP1 (Jun/Fos) Factor Expression and Activation in. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY,* 275(43), p. 33718–33728.

Yan, K. et al., 2016. The cyclic AMP signaling pathway: Exploring targets for successful drug discovery (Review). *MOLECULAR MEDICINE REPORTS,* Volume 13, pp. 3715-3723.

【図面】

【図１】

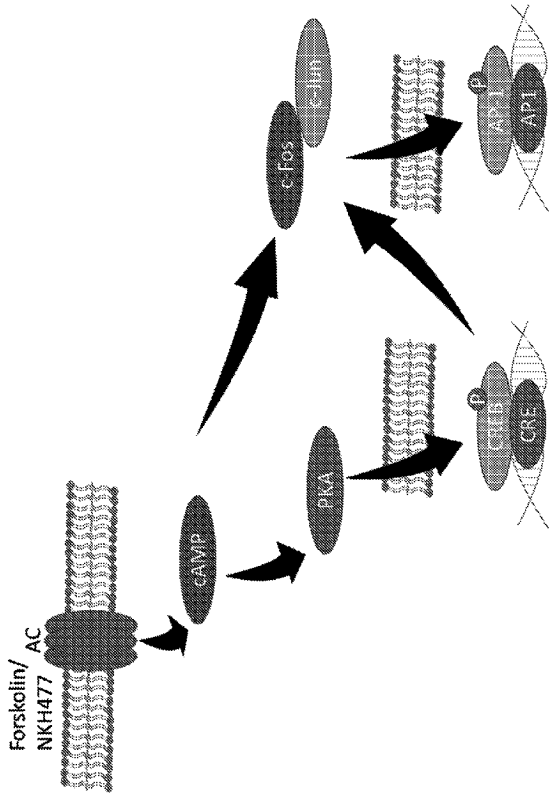


Figure 1

【図２】

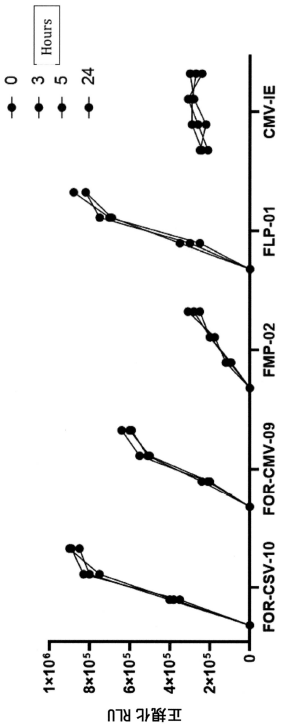


Figure 2

【図３】

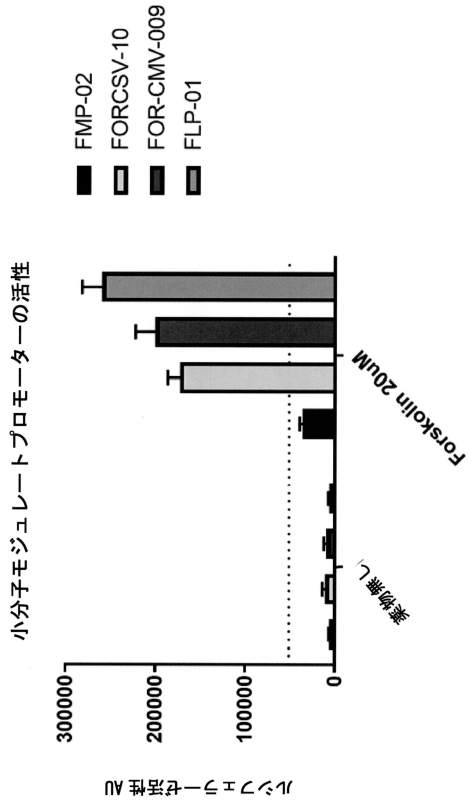


Figure 3

【図４】

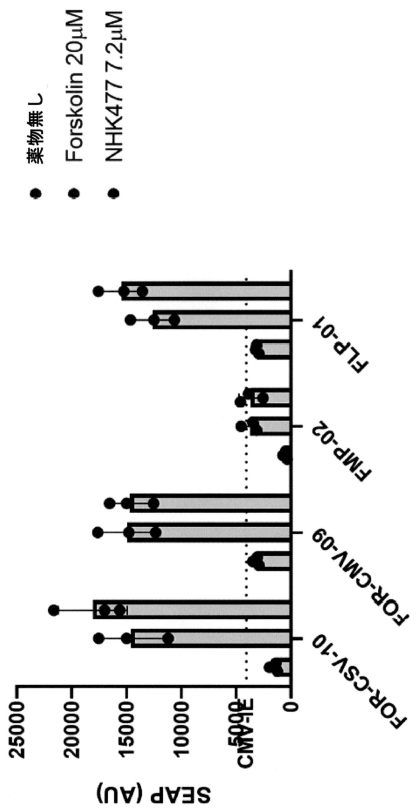


Figure 4

【図５】

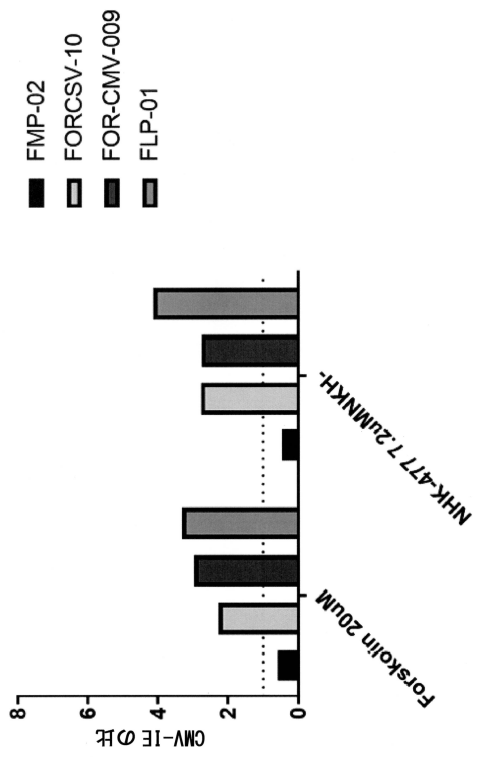


Figure 5

【図６Ａ】

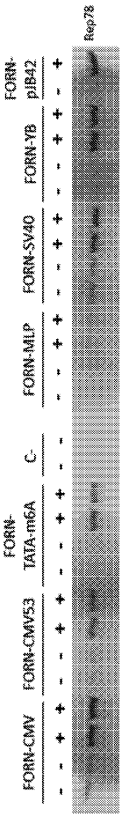


Figure 6A

【図６Ｂ】

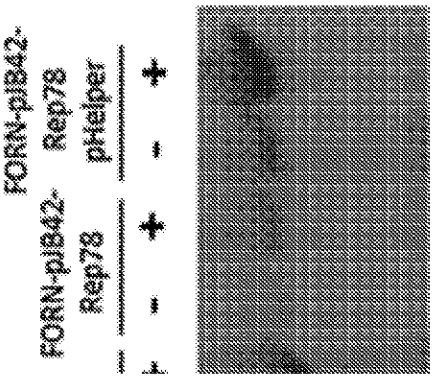


Figure 6B

【図７】

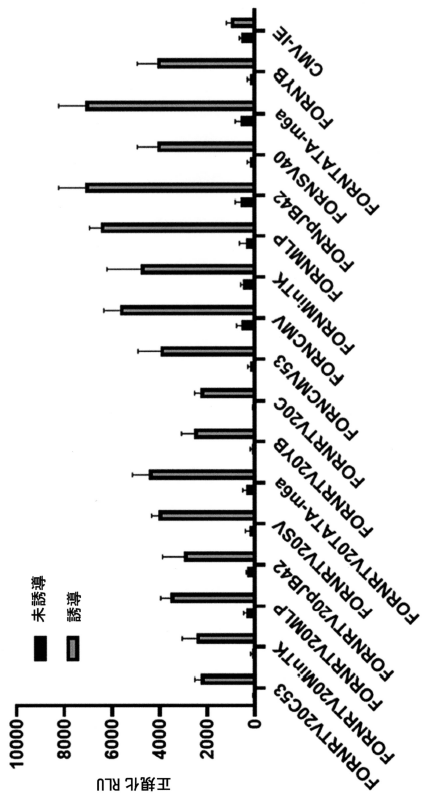
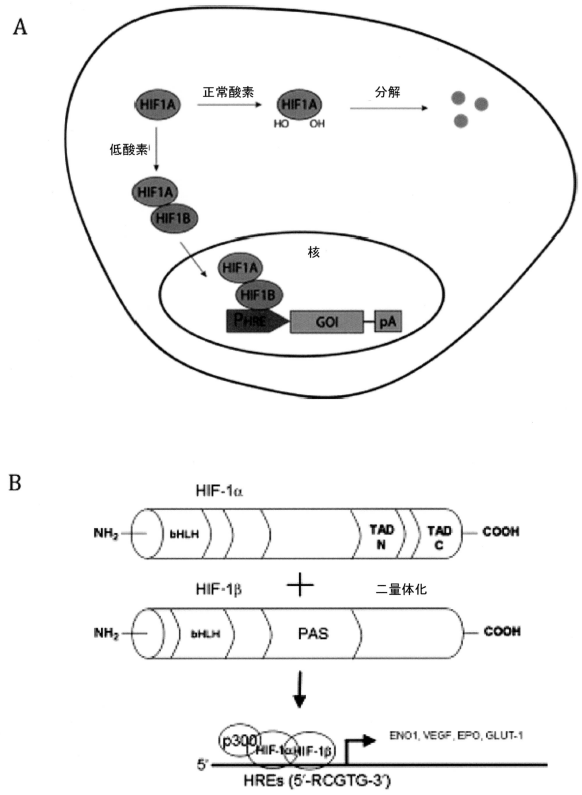


Figure 7

【図８】



【図９】

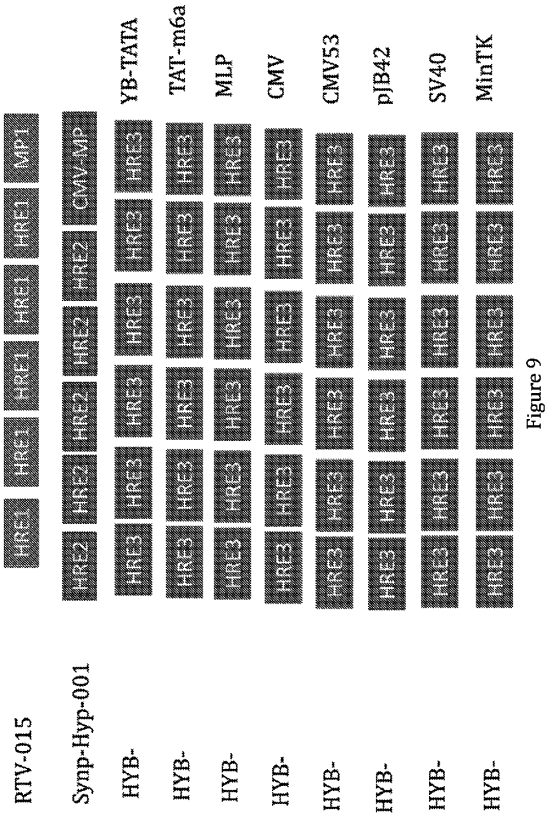


Figure 9

【図１０】

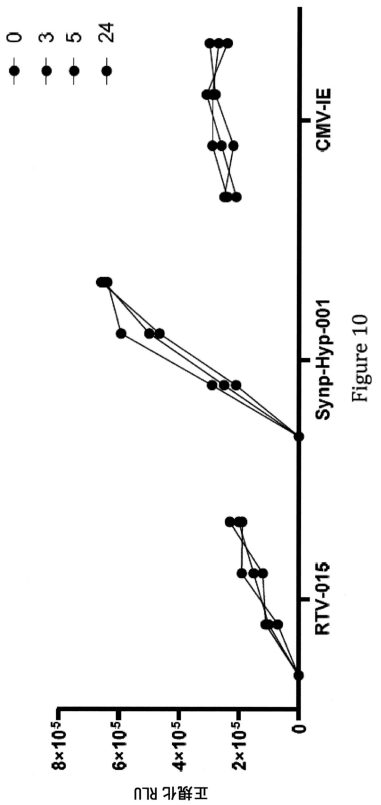


Figure 10

【図１１】

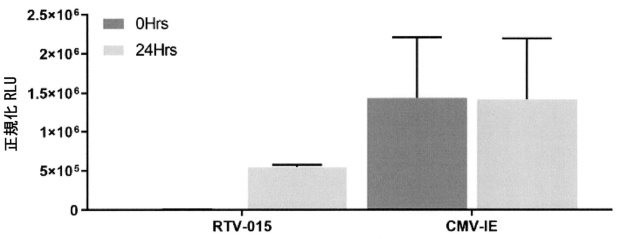


Figure 11

【図１２】

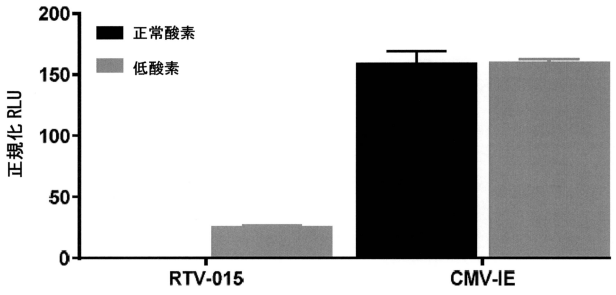


Figure 12

【図１３】

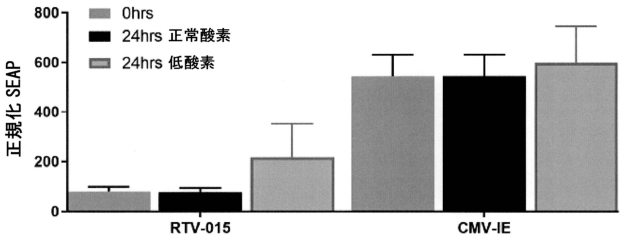


Figure 13

【図１４】

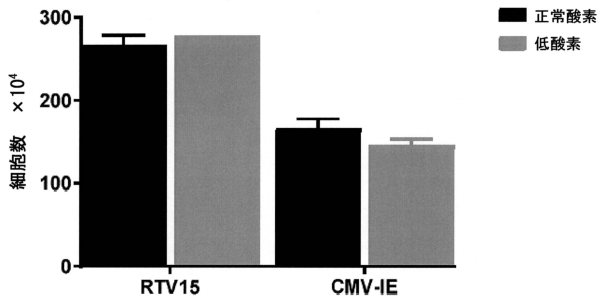


Figure 14

【図１５】

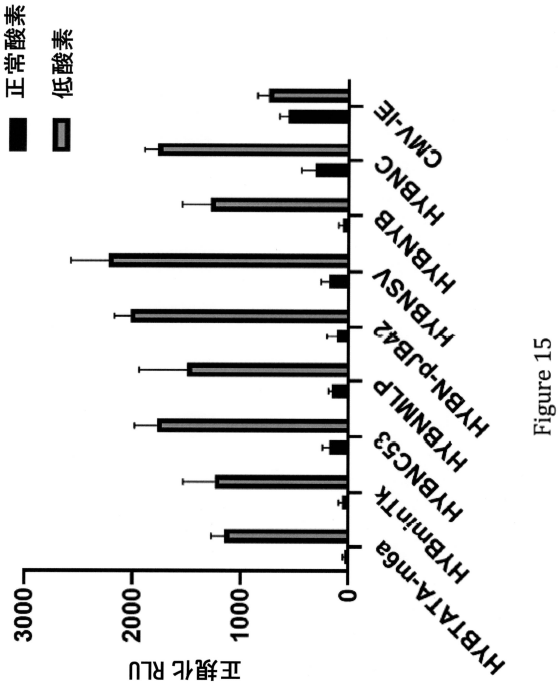


Figure 15

【配列表】

<u>20235199250000001.app</u>

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2021/050743

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N15/63 A61K48/00 C12N15/79
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N A61K

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	NAKAYAMA KOH ET AL: "Regulation of Gene Expression under Hypoxic Conditions", INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES, vol. 20, no. 13, 3 July 2019 (2019-07-03), page 3278, XP055806711, DOI: 10.3390/ijms20133278 see abstract, Fig. 1 and pages 2-6, 8-9 ----- -/--	1-96

[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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
31 May 2021	15/06/2021

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Vix, Olivier

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/GB2021/050743

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. [x] forming part of the international application as filed:

      [x] in the form of an Annex C/ST.25 text file.

      [ ] on paper or in the form of an image file.

   b. [ ] furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

   c. [ ] furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

      [ ] in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).

      [ ] on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. [ ] In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2021/050743

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SCHÖDEL JOHANNES ET AL: "High resolution genome wide mapping of HIF binding sites from ChIP-seq", BLOOD, vol. 117, no. 23, 9 June 2011 (2011-06-09), pages e207-e217, XP055808173, US ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/blood-2010-10-314427 Retrieved from the Internet: URL:http://ashpublications.org/blood/article-pdf/117/23/e207/1341334/zh80231100e207.pdf> cited in the application the whole document	1-96
Y	CHOUDHRY HANI ET AL: "Advances in Hypoxia-Inducible Factor Biology", CELL METABOLISM, vol. 27, no. 2, 1 February 2018 (2018-02-01), pages 281-298, XP055806074, United States ISSN: 1550-4131, DOI: 10.1016/j.cmet.2017.10.005 Retrieved from the Internet: URL:https://www.cell.com/cell-metabolism/pdf/S1550-4131(17)30617-4.pdf> the whole document	1-96
Y	SLEMC LUCIJA ET AL: "Transcription factor HIF1A: downstream targets, associated pathways, polymorphic hypoxia response element (HRE) sites, and initiative for standardization of reporting in scientific literature", TUMOR BIOLOGY, KARGER, BASEL, CH, vol. 37, no. 11, 19 September 2016 (2016-09-19), pages 14851-14861, XP036109620, ISSN: 1010-4283, DOI: 10.1007/S13277-016-5331-4 [retrieved on 2016-09-19] the whole document	1-96

-/--

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2021/050743

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JOHANNESSEN MONA ET AL: "Synergistic activation of CREB-mediated transcription by forskolin and phorbol ester requires PKC and depends on the glutamine-rich Q2 transactivation domain", CELLULAR SIGNALLING., vol. 16, no. 10, 1 October 2004 (2004-10-01), pages 1187-1199, XP055806509, GB ISSN: 0898-6568, DOI: 10.1016/j.cellsig.2004.03.009 the whole document -----	1-96
Y	LAM BRIAN YEE HONG ET AL: "CREB-dependent Nur77 induction following depolarization in PC12 cells and neurons is modulated by MEF2 transcription factors", JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY, vol. 112, no. 4, 20 January 2010 (2010-01-20), pages 1065-1073, XP055806513, GB ISSN: 0022-3042, DOI: 10.1111/j.1471-4159.2009.06521.x the whole document -----	1-96
Y	LI YIFENG ET AL: "Genome-wide prediction of cis-regulatory regions using supervised deep learning methods", BMC BIOINFORMATICS, vol. 19, no. 1, 31 May 2018 (2018-05-31), page 202, XP055806519, DOI: 10.1186/s12859-018-2187-1 Retrieved from the Internet: URL:https://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/s12859-018-2187-1.pdf> the whole document -----	1-96
X	J-Y LEE ET AL: "A novel chimeric promoter that is highly responsive to hypoxia and metals", GENE THERAPY, vol. 13, no. 10, 9 February 2006 (2006-02-09), pages 857-868, XP055595597, GB ISSN: 0969-7128, DOI: 10.1038/sj.gt.3302728 the whole document -----	53-96

-/--

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2021/050743

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JAVAN BITA ET AL: "Hypoxia-inducible tumour-specific promoters as a dual-targeting transcriptional regulation system for cancer gene therapy", ECANCERMEDICALSCIENCE, vol. 11, 6 July 2017 (2017-07-06), XP055806484, DOI: 10.3332/ecancer.2017.751 Retrieved from the Internet: URL:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5533602/pdf/can-11-751.pdf> cited in the application the whole document -----	1-96
Y	BOEVA VALENTINA: "Analysis of Genomic Sequence Motifs for Deciphering Transcription Factor Binding and Transcriptional Regulation in Eukaryotic Cells", FRONTIERS IN GENETICS, vol. 7, 23 February 2016 (2016-02-23), XP055806594, DOI: 10.3389/fgene.2016.00024 the whole document -----	1-96
Y	VILLAR DIEGO ET AL: "Cooperativity of Stress-Responsive Transcription Factors in Core Hypoxia-Inducible Factor Binding Regions", PLOS ONE, vol. 7, no. 9, 24 September 2012 (2012-09-24), page e45708, XP055808308, DOI: 10.1371/journal.pone.0045708 Retrieved from the Internet: URL:https://storage.googleapis.com/plos-corpus-prod/10.1371/journal.pone.0045708/1/pone.0045708.pdf?X-Goog-Algorithm=GOOG4-RSA-SHA256&X-Goog-Credential=wombat-sa@plos-prod.iam.gserviceaccount.com/20210527/auto/storage/goog4_request&X-Goog-Date=20210527T131041Z&X-Goog-Expires=86400&X-Goog-SignedHeaders=h> the whole document -----	1-96

-/--

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2021/050743

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	K. CHAKRABORTY ET AL: "cAMP Stringently Regulates Human Cathelicidin Antimicrobial Peptide Expression in the Mucosal Epithelial Cells by Activating cAMP-response Element-binding Protein, AP-1, and Inducible cAMP Early Repressor", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 284, no. 33, 14 August 2009 (2009-08-14), pages 21810-21827, XP055282566, US ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M109.001180 the whole document -----	1-96
Y	CHRISTOPHER EDE ET AL: "Quantitative Analyses of Core Promoters Enable Precise Engineering of Regulated Gene Expression in Mammalian Cells", ACS SYNTHETIC BIOLOGY, vol. 5, no. 5, 1 March 2016 (2016-03-01), pages 395-404, XP055513376, Washington DC ,USA ISSN: 2161-5063, DOI: 10.1021/acssynbio.5b00266 cited in the application the whole document -----	1-96
Y	RODRIGUEZ GEORGIALINA ET AL: "Forskolin-inducible cAMP Pathway Negatively Regulates T-cell Proliferation by Uncoupling the Interleukin-2 Receptor Complex", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 288, no. 10, 22 January 2013 (2013-01-22), pages 7137-7146, XP055806062, US ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M112.408765 the whole document -----	1-96
Y	Encode Project: "Transcription factor motifs ENCODE discovers many new transcription-factor-binding-site motifs and explores their properties", , 1 January 2019 (2019-01-01), XP055806595, Retrieved from the Internet: URL:https://www.nature.com/articles/nature28170.pdf [retrieved on 2021-05-21] the whole document -----	1-27
	-/--	

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2021/050743

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CRAIG JOHANNA C. ET AL: "Consensus and Variant cAMP-regulated Enhancers Have Distinct CREB-binding Properties", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 276, no. 15, 13 April 2001 (2001-04-13), pages 11719-11728, XP055806472, US ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M010263200 cited in the application the whole document -----	1-96
A	YAN KUO ET AL: "The cyclic AMP signaling pathway: Exploring targets for successful drug discovery (Review)", MOLECULAR MEDICINE REPORTS, vol. 13, no. 5, 1 May 2016 (2016-05-01), pages 3715-3723, XP055806468, GR ISSN: 1791-2997, DOI: 10.3892/mmr.2016.5005 Retrieved from the Internet: URL:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4838136/pdf/mmr-13-05-3715.pdf> cited in the application the whole document -----	1-96

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

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）
Ａ６１Ｋ　48/00　(2006.01)	Ｃ１２Ｎ	15/63	１００Ｚ	
	Ａ６１Ｋ	48/00		

(32)優先日　令和2年4月15日(2020.4.15)
(33)優先権主張国・地域又は機関
英国(GB)
(31)優先権主張番号　2005475.5
(32)優先日　令和2年4月15日(2020.4.15)
(33)優先権主張国・地域又は機関
英国(GB)
(31)優先権主張番号　2101969.0
(32)優先日　令和3年2月12日(2021.2.12)
(33)優先権主張国・地域又は機関
英国(GB)
(31)優先権主張番号　2101972.4
(32)優先日　令和3年2月12日(2021.2.12)
(33)優先権主張国・地域又は機関
英国(GB)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,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,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

・９ＲＧ・イースター・ブッシュ・キャンパス・ロスリン・イノベーション・センター・シンプロミクス・リミテッド内
(72)発明者　ヴィクトリア・フィオナ・トーランス
イギリス・ミッドロージアン・ＥＨ２５・９ＲＧ・イースター・ブッシュ・キャンパス・ロスリン・イノベーション・センター・シンプロミクス・リミテッド内
(72)発明者　マイケル・エル・ロバーツ
イギリス・ミッドロージアン・ＥＨ２５・９ＲＧ・イースター・ブッシュ・キャンパス・ロスリン・イノベーション・センター・シンプロミクス・リミテッド内

Ｆターム（参考）　4B029　AA02 BB11
4B065　AA90X AA93X AB01 AC14 BA02 CA44
4C084　AA13 NA05 NA13 ZB211 ZB212