

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-534946  
(P2018-534946A)

(43) 公表日 平成30年11月29日(2018.11.29)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)		
<b>C 12 N 15/113</b> (2010.01)	C 12 N	15/113	Z N A Z	4 B 0 6 5
<b>C 12 N 1/15</b> (2006.01)	C 12 N	1/15		
<b>C 12 N 1/19</b> (2006.01)	C 12 N	1/19		
<b>C 12 N 1/21</b> (2006.01)	C 12 N	1/21		
<b>C 12 N 5/10</b> (2006.01)	C 12 N	5/10		

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 33 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-542687 (P2018-542687)	(71) 出願人	518150644 セルテオン コーポレイション アメリカ合衆国、94587 カリフォルニア州、ユニオン シティー スイート 826、アルヴァラドーナイルズ ロード 32980
(86) (22) 出願日	平成28年10月27日 (2016.10.27)	(74) 代理人	110000877 龍華国際特許業務法人
(85) 翻訳文提出日	平成30年6月11日 (2018.6.11)	(72) 発明者	ゴエル、ニヒル アメリカ合衆国、94587 カリフォルニア州、ユニオン シティー スイート 826、アルヴァラドーナイルズ ロード 32980 セルテオン コーポレイション内
(86) 國際出願番号	PCT/US2016/059151		
(87) 國際公開番号	W02017/075237		
(87) 國際公開日	平成29年5月4日 (2017.5.4)		
(31) 優先権主張番号	62/246,841		
(32) 優先日	平成27年10月27日 (2015.10.27)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】キメラ転写後調節要素

## (57) 【要約】

本開示は、細胞においてタンパク質を発現させるために有用なキメラ転写後調節要素 (P R E ) およびベクターに関する。P R E は、複数の異なる天然型 P R E 配列から選択された、アルファ、ベータ、および、任意でガンマサブエレメントを含み、それらの天然型の対応物より強力であることが判明した。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

(a) SEQ ID NO:14の核酸配列、または、SEQ ID NO:14と少なくとも95%の配列同一性を有する核酸配列から成る第1フラグメントと、

(b) SEQ ID NO:3の核酸配列、または、SEQ ID NO:3と少なくとも95%の配列同一性を有する核酸配列から成る第2フラグメントと  
を備えるポリヌクレオチド。

**【請求項 2】**

前記第1フラグメントは、前記第2フラグメントから20ヌクレオチドより遠く離れて  
いない、請求項1に記載のポリヌクレオチド。 10

**【請求項 3】**

(c) 転写後調節要素(PRE)のガンマサブエレメントから成る第3フラグメントを  
更に含む、請求項1に記載のポリヌクレオチド。

**【請求項 4】**

前記ガンマサブエレメントは、SEQ ID NO:7、12、16もしくは20の核  
酸配列、または、SEQ ID NO:7、12、16もしくは20と少なくとも95%  
の配列同一性を有する核酸配列を含む、請求項3に記載のポリヌクレオチド。

**【請求項 5】**

前記ガンマサブエレメントは、SEQ ID NO:7の核酸配列、または、SEQ  
ID NO:7と少なくとも95%の配列同一性を有する核酸配列を含む、請求項3に記  
載のポリヌクレオチド。 20

**【請求項 6】**

前記ガンマサブエレメントは、SEQ ID NO:16の核酸配列、または、SEQ  
ID NO:16と少なくとも95%の配列同一性を有する核酸配列を含む、請求項3  
に記載のポリヌクレオチド。

**【請求項 7】**

前記第1フラグメントは、前記第3フラグメントと前記第2フラグメントとの間にある  
、請求項3から6のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

**【請求項 8】**

前記第3フラグメントは、前記第1フラグメントから20ヌクレオチドより遠く離れて  
いない、請求項7に記載のポリヌクレオチド。 30

**【請求項 9】**

SEQ ID NO:7、14および3を連続的に備える、請求項5に記載のポリヌク  
レオチド。

**【請求項 10】**

SEQ ID NO:26の核酸配列を備える、請求項9に記載のポリヌクレオチド。

**【請求項 11】**

SEQ ID NO:25の核酸配列を備える、請求項6に記載のポリヌクレオチド。

**【請求項 12】**

(a) SEQ ID NO:7の核酸配列、または、SEQ ID NO:7と少なく  
とも95%の配列同一性を有する核酸配列から成る第1フラグメントと、 40

(b) 転写後調節要素(PRE)のアルファサブエレメントから成る第2フラグメント  
と、

(c) SEQ ID NO:3の核酸配列、または、SEQ ID NO:3と少な  
くとも95%の配列同一性を有する核酸配列から成る第3フラグメントと  
を備えるポリヌクレオチド。

**【請求項 13】**

前記アルファサブエレメントは、SEQ ID NO:2、5、9、14もしくは18  
の核酸配列、または、SEQ ID NO:2、5、9、14もしくは18と少な  
くとも95%の配列同一性を有する核酸配列を含む、請求項12に記載のポリヌクレオチド。 50

## 【請求項 14】

前記アルファサブエレメントは、SEQ ID NO:2の核酸配列、または、SEQ ID NO:2と少なくとも95%の配列同一性を有する核酸配列を含む、請求項12に記載のポリヌクレオチド。

## 【請求項 15】

前記第2フラグメントは、前記第1フラグメントと前記第3フラグメントとの間にあり、各フラグメントは、隣接するフラグメントから20ヌクレオチドより遠く離れていない、請求項12から14のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

## 【請求項 16】

(a) SEQ ID NO:5、9もしくは18の核酸配列、または、SEQ ID NO:5、9もしくは18と少なくとも95%の配列同一性を有する核酸配列から成る第1フラグメントと、10

(b) SEQ ID NO:3の核酸配列、または、SEQ ID NO:3と少なくとも95%の配列同一性を有する核酸配列から成る第2フラグメントとを備えるポリヌクレオチド。

## 【請求項 17】

(c) 転写後調節要素(PRE)のガンマサブエレメントから成る第3フラグメントを更に含む、請求項16に記載のポリヌクレオチド。

## 【請求項 18】

請求項1から17のいずれか一項のポリヌクレオチド、および、タンパク質コード配列を備えるポリヌクレオチド構築物。20

## 【請求項 19】

(a) SEQ ID NO:14の核酸配列、または、SEQ ID NO:14と少なくとも95%の配列同一性を有する核酸配列から成る第1フラグメントと、

(b) SEQ ID NO:3の核酸配列、または、SEQ ID NO:3と少なくとも95%の配列同一性を有する核酸配列から成る第2フラグメントと、

(c) タンパク質コード配列と  
を備えるポリヌクレオチド構築物。

## 【請求項 20】

(a) SEQ ID NO:7の核酸配列、または、SEQ ID NO:7と少なくとも95%の配列同一性を有する核酸配列から成る第1フラグメントと、30

(b) 転写後調節要素(PRE)のアルファサブエレメントから成る第2フラグメントと、

(c) SEQ ID NO:3の核酸配列、または、SEQ ID NO:3と少なくとも95%の配列同一性を有する核酸配列から成る第3フラグメントと、

(d) タンパク質コード配列と  
を備えるポリヌクレオチド構築物。

## 【請求項 21】

(a) SEQ ID NO:5、9もしくは18の核酸配列、または、SEQ ID NO:5、9もしくは18と少なくとも95%の配列同一性を有する核酸配列から成る第1フラグメントと、40

(b) SEQ ID NO:3の核酸配列、または、SEQ ID NO:3と少なくとも95%の配列同一性を有する核酸配列から成る第2フラグメントと、

(c) タンパク質コード配列と  
を備えるポリヌクレオチド構築物。

## 【請求項 22】

前記タンパク質コード配列は、前記第1フラグメントと前記第2フラグメントとの間に位置する、請求項19から21のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物。

## 【請求項 23】

3' UTRを更に備える、請求項19から22のいずれか一項に記載のポリヌクレオ

50

チド構築物。

【請求項 24】

前記 3' UTR は、前記第 1 フラグメントと前記第 2 フラグメントとの間に位置する、請求項 23 に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 25】

ポリ (A) 配列を更に備える、請求項 18 から 24 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 26】

請求項 18 から 25 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物を含む細胞。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

[関連出願の相互参照]

本出願は、米国特許法第 119 条 (e) に基づき、参照によって内容が本明細書に組み込まれる、2015 年 10 月 27 日に出願された米国仮特許出願第 62/246,841 号の利益を主張するものである。

【0002】

遺伝子配列の転写 ( すなわち、mRNA の生成 ) は、多くの異なるレベルで制御される。転写開始部位またはプロモーターは、複数の異なる強度を有し、所与の遺伝子の転写の開始の頻度は、エンハンサー配列によって増加させることもできる。転写中の一時停止は、転写の速度、ひいては、所与の期間内に生産される転写産物の量に影響を及ぼし得る。また、mRNA 前駆体のスプライシング、ポリアデニル化および切断の速度は、転写単位によって生産される mRNA の量に影響を及ぼし得る。更に、mRNA 分子内の配列は、核から細胞質への mRNA の輸送、および、mRNA のターンオーバーの速度 ( すなわち、細胞質内安定性 ) を調節し得る。

【0003】

細胞質内蓄積および mRNA の安定性を調節する、mRNA 分子内の特定の配列が同定され、転写後調節 (PRE) 要素と称される。PRE 配列は、ヒト B 型肝炎ウイルス (HPRE) のゲノム、および、ウッドチャック肝炎ウイルス (WPRE) のゲノムの中において同定された。例えば、Done 110 et al. (1998) J. Virol. 72: 5085-5092 を参照されたい。

【0004】

インビトロにおけるポリペプチド ( 例えば、治療用抗体、成長因子 ) の発現は、医薬品業界にとって重要であり、タンパク質発現を最大化する方法が必要とされている。

【発明の概要】

【0005】

本開示は、安定性および発現効率が改善された発現構築物を生成するのに有用なキメラ PRE 配列を提供する。一実施形態において、(a) SEQ ID NO: 14 の核酸配列、または、SEQ ID NO: 14 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する核酸配列から成る第 1 フラグメントと、(b) SEQ ID NO: 3 の核酸配列、または、SEQ ID NO: 3 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する核酸配列から成る第 2 フラグメントとを備えるポリヌクレオチドが提供される。

【0006】

いくつかの態様において、第 1 フラグメントは、第 2 フラグメントから 20 ヌクレオチドより遠く離れていない。いくつかの態様において、第 1 フラグメントは、第 2 フラグメントから 15、10、9、8、7、6、5、4、3、2 または 1 ヌクレオチドより遠く離れていない。

【0007】

いくつかの態様において、ポリヌクレオチドは、転写後調節要素 (PRE) のガンマサブエレメントから成る第 3 フラグメントを更に含む。いくつかの態様において、ガンマサ

10

20

30

40

50

プレメントは、SEQ ID NO:7、12、16もしくは20の核酸配列、または、SEQ ID NO:7、12、16もしくは20と少なくとも95%の配列同一性を有する核酸配列を含む。いくつかの態様において、ガンマサブプレメントは、SEQ ID NO:7の核酸配列、または、SEQ ID NO:7と少なくとも95%の配列同一性を有する核酸配列を含む。いくつかの態様において、ガンマサブプレメントは、SEQ ID NO:16の核酸配列、または、SEQ ID NO:16と少なくとも95%の配列同一性を有する核酸配列を含む。

#### 【0008】

いくつかの態様において、第1フラグメントは、第3フラグメントと第2フラグメントとの間にある。いくつかの態様において、第3フラグメントは、第1フラグメントから20ヌクレオチドより遠く離れていないか、または、代替的に、第1フラグメントから15、10、9、8、7、6、5、4、3、2もしくは1ヌクレオチドより遠く離れていない。

10

#### 【0009】

いくつかの態様において、ポリヌクレオチドは、SEQ ID NO:7、14および3を連続的に含む。いくつかの態様において、ポリヌクレオチドは、SEQ ID NO:26の核酸配列を含む。いくつかの態様において、ポリヌクレオチドは、SEQ ID NO:25の核酸配列を含む。

#### 【0010】

また、一実施形態において、(a) SEQ ID NO:7の核酸配列、または、SEQ ID NO:7と少なくとも95%の配列同一性を有する核酸配列から成る第1フラグメントと、(b) 転写後調節要素(PRE)のアルファサブプレメントから成る第2フラグメントと、(c) SEQ ID NO:3の核酸配列、または、SEQ ID NO:3と少なくとも95%の配列同一性を有する核酸配列から成る第3フラグメントとを備えるポリヌクレオチドが提供される。

20

#### 【0011】

いくつかの態様において、アルファサブプレメントは、SEQ ID NO:2、5、9、14もしくは18の核酸配列、または、SEQ ID NO:2、5、9、14もしくは18と少なくとも95%の配列同一性を有する核酸配列を含む。いくつかの態様において、アルファサブプレメントは、SEQ ID NO:2の核酸配列、または、SEQ ID NO:2と少なくとも95%の配列同一性を有する核酸配列を含む。いくつかの態様において、第2フラグメントは、第1フラグメントと第3フラグメントとの間にあり、各フラグメントは、隣接するフラグメントから20ヌクレオチドより遠く離れていないか、または、代替的に、隣接するフラグメントから15、10、9、8、7、6、5、4、3、2もしくは1ヌクレオチドより遠く離れていない。

30

#### 【0012】

更に別の実施形態において、本開示は、(a) SEQ ID NO:5、9もしくは18の核酸配列、または、SEQ ID NO:5、9もしくは18と少なくとも95%の配列同一性を有する核酸配列から成る第1フラグメントと、(b) SEQ ID NO:3の核酸配列、または、SEQ ID NO:3と少なくとも95%の配列同一性を有する核酸配列から成る第2フラグメントとを備えるポリヌクレオチドを提供する。いくつかの態様において、ポリヌクレオチドは、(c) 転写後調節要素(PRE)のガンマサブプレメントから成る第3フラグメントを更に含む。

40

#### 【0013】

また、一実施形態において、本開示のポリヌクレオチドおよびタンパク質コード配列を備えるポリヌクレオチド構築物が提供される。

#### 【0014】

また、一実施形態において、(a) SEQ ID NO:14の核酸配列、または、SEQ ID NO:14と少なくとも95%の配列同一性を有する核酸配列から成る第1フラグメントと、(b) SEQ ID NO:3の核酸配列、または、SEQ ID N

50

O : 3と少なくとも95%の配列同一性を有する核酸配列から成る第2フラグメントと、(c)タンパク質コード配列とを備えるポリヌクレオチド構築物が提供される。

【0015】

更に、一実施形態において、(a)SEQ ID NO:7の核酸配列、または、SEQ ID NO:7と少なくとも95%の配列同一性を有する核酸配列から成る第1フラグメントと、(b)転写後調節要素(PRE)のアルファサブエレメントから成る第2フラグメントと、(c)SEQ ID NO:3の核酸配列、または、SEQ ID NO:3と少なくとも95%の配列同一性を有する核酸配列から成る第3フラグメントと、(d)タンパク質コード配列とを備えるポリヌクレオチド構築物が更に提供される。

【0016】

更に、一実施形態において、(a)SEQ ID NO:5、9もしくは18の核酸配列、または、SEQ ID NO:5、9もしくは18と少なくとも95%の配列同一性を有する核酸配列から成る第1フラグメントと、(b)SEQ ID NO:3の核酸配列、または、SEQ ID NO:3と少なくとも95%の配列同一性を有する核酸配列から成る第2フラグメントと、(c)タンパク質コード配列とを備えるポリヌクレオチド構築物が更に提供される。

【0017】

これらの実施形態のいずれかの一態様において、タンパク質コード配列は、第1フラグメントと第2フラグメントとの間に位置する。一態様において、構築物は、3' UTRを更に含む。一態様において、3' UTRは第1フラグメントと第2フラグメントとの間に位置する。一態様において、構築物は、ポリ(A)配列を更に含む。

【0018】

また、一実施形態において、本開示のポリヌクレオチド構築物を含む細胞が提供される。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】様々なサブエレメントの多重整列を示す。

【0020】

【図2】様々なサブエレメントの多重整列を示す。

【0021】

【図3】様々なサブエレメントの多重整列を示す。

【0022】

【図4】PRE要素の試験に使用されるプラスミド(pCT2.1)の概略図を示す。異なる複数のPREをリツキシマブ軽鎖コード配列とBGHポリアデニル化シグナルとの間のBamHI部位にクローニングした。

【0023】

【図5】いくつかのPRE構築物の2つのアッセイ(2日目および4日目)における力価(μg/mL)を示す。

【0024】

【図6】多くのPRE構築物の発現量の相対的な倍率変化(fold change)を示す(棒線:試験1、試験2、平均)。

【0025】

【図7A】示された多くのPRE構築物の発現量の相対的な倍率変化を示す。

【図7B】示された多くのPRE構築物の発現量の相対的な倍率変化を示す。

【0026】

【図8A】2日目における構築物pCT2.52の強度をWPRE(pCT2.0)および対照であるpCT2.1と比較している。

【図8B】4日目における構築物pCT2.52の強度をWPRE(pCT2.0)および対照であるpCT2.1と比較している。

【0027】

10

20

30

40

50

【図9A】示されている構築物の各々についての一過性発現量の相対的な倍率変化を示す。

【図9B】示されている構築物の各々についての一過性発現量の相対的な倍率変化を示す。

【発明を実施するための形態】

【0028】

[1. 定義]

すべての数字の表示、例えば、pH、温度、時間、濃度および分子量（範囲を含む）は、0.1の変化量で+または-に変動する近似値である。常に明示的に記述されるわけではないが、すべての数字の表示には、「約」という用語が先行することを理解されたい。常に明示的に記述されるわけではないが、本明細書に記載される試薬は例に過ぎず、そのような試薬の同等物は当技術分野において周知であることも理解されたい。

10

【0029】

文脈上の別段の明確な記載がある場合を除き、明細書および請求項において使用される単数形「a」、「an」、「the」は、複数のものに対する言及を含む。例えば、「ポリヌクレオチド」という用語は、複数のポリヌクレオチド（それらの混合物を含む）を含む。

【0030】

「ポリヌクレオチド」および「オリゴヌクレオチド」という用語は、交換可能に使用され、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドまたはその類似体のいずれかである、任意の長さの高分子形のヌクレオチドを指す。ポリヌクレオチドは、メチル化ヌクレオチドおよびヌクレオチド類似体などの修飾されたヌクレオチドを含み得る。ヌクレオチド構造への修飾は、もある場合、ポリヌクレオチドの構築の前または後に付与することができる。ヌクレオチドの配列は、非ヌクレオチド成分によって割り込まれ得る。ポリヌクレオチドは重合後、標識部分への連結などにより、更に修飾され得る。また、この用語は、二本鎖および一本鎖の分子両方を指す。別段の記載がある場合、または、必要である場合を除き、本開示の任意の実施形態のポリヌクレオチドは、二本鎖形と、二本鎖形を形成することが知られている、または、予想される、2つの相補的な一本鎖形の各々とを含む。

20

【0031】

[2. キメラ転写後調節要素（P R E）]

DNAウイルスである、ヒトB型肝炎ウイルス（HBV）などのヘパドナウイルス科は、イントロンを含まないヘパドナウイルスゲノム由来の表面抗原転写産物の細胞質内蓄積を促す、転写後調節要素（P R E）と名付けられたRNA核外輸送要素を含む。同様の、より強力な三成分P R Eがウッドチャック肝炎ウイルス（WHV）に存在し、WHV P R EまたはW P R Eとして知られている。同様に、ヒトB型肝炎ウイルスP R Eは、H P R Eと呼ばれている。W P R Eは、多種多様なウイルスベクターからの導入遺伝子発現を増加させる。一般的に、P R E配列は、一過性遺伝子発現を増進するのに有用である。

30

【0032】

一部のP R E配列（例えばH P R E）は、2つの個別かつ連結されたサブエレメントである、サブエレメント（P R E）およびサブエレメント（P R E）を含み（従って二成分）、一方、他の配列（例えばW P R E）は、追加のサブエレメントであるサブエレメント（P R E）を含む（従って「三成分」）。これらのサブエレメントの各々は、複数の種に跨って非常に良く保存されている。図1～3における、整列された複数の配列を参照されたい。

40

【0033】

P R E配列がどのように遺伝子発現に影響を及ぼすかについての機構は、完全に分かっているわけではない。Doneollo et al.は、「H P R E およびH P R Eの順序を切り替えられることは、サブエレメントがモジュールであること、ひいては、サブエレメントが細胞RNA結合タンパク質の別個の結合部位を表している可能性がもつと

50

も高いことを示唆している」と説明している (Doneollo et al., J Virol. 1998 Jun; 72 (6): 5085-5092 at 5085)。Doneolloは更に、「三成分WPREが二成分HBVPREより著しく強い活性を示すことは、転写後調節効果 (post transcriptional effect) の強度は、RNAにおけるサブエレメントの数によって決定されることを実証している」(同出典)ことを発見した。従って、この研究は、任意の個別のサブエレメントの有効性ではなく、むしろ、サブエレメントの数が、PRE配列の強度を決定するための主な因子であることを示唆している。

## 【0034】

しかしながら、驚くべきことに、および、意外なことに、本開示の実験は、個別のサブエレメントの各々の強度が、PRE配列の全体的な強度を決定する上で重要な役割を果たすことを示している。更に、サブエレメントのある特定の組み合わせは、他のものより効果的であり得る。従って、複数の異なるPRE配列に由来するサブエレメントの特定の組み合わせを有するキメラPREが提供され、これらの組み合わせを含む構築物の安定性および/または発現量を増加させる上で驚くほど高い活性を有する。

10

## 【0035】

WPREおよびHPREに加えて、他のPRE配列が、コウモリ (BPRE)、ジリス (GSPRE)、ホッキョクジリス (ASPRE)、アヒル (DPRE)、チンパンジー (CPRE) およびウーリーモンキー (WMPRE) から発見されている。PRE配列は、典型的には、高度に保存されている (表1を参照されたい)。

20

[表1: WPREとの配列同一性]

## 【表1】

PREの供給源	配列同一性
ジリス	84%
ホッキョクジリス	82%
コウモリ	74%
ヒト	69%
ウーリーモンキー	69%
チンパンジー	67%
アヒル	有意な同一性なし

30

## 【0036】

下の表2は、天然型PRE配列およびキメラPRE配列を含む、複数の異なるPRE配列の相対的な活性をまとめている。

[表2: PRE配列の相対的な活性]

## 【表2】

構築物	$\gamma$	$\alpha$	$\beta$	相対的活性 (対照に対する倍率)
2.52	WPRE	GSPRE	HPRE	2.5
2.23	GSPRE	GSPRE	HPRE	2.16
2.5	-	WPRE	HPRE	2.12
2.4	WPRE	GSPRE	GSPRE	1.94
2.21	-	BPRE	HPRE	1.72
2.8 (GSPRE)	GSPRE	GSPRE	GSPRE	1.63
2.0 (WPRE)	WPRE	WPRE	WPRE	1.57
2.10 (ASPRE)	ASPRE	ASPRE	ASPRE	1.52
2.7	-	HPRE	WPRE	1.27
2.9 (BPRE)	BPRE	BPRE	BPRE	1.21
2.1 (Control)	-	-	-	1

40

50

## 【0037】

表2から分かるように、GSPRE由来のサブエレメント、HPRE由来のサブエレメント、およびWPRE由来のサブエレメントは、それらの種類の中で、より活性が高いサブエレメントである。更に、以下の組み合わせは優れた活性を示す。

(1) GSPREのサブエレメント、HPREのサブエレメント、任意でHPREのサブエレメント、(2) WPREのサブエレメント、HPREのサブエレメント、(3) WPRE、BPREまたはASPREのサブエレメント、HPREのサブエレメント、任意でサブエレメント。

## 【0038】

従って、本開示の一実施形態によれば、GSPREのサブエレメント(GSPRE)およびHPREのサブエレメント(HPRE)、任意でサブエレメントを含むキメラPREが提供され、それらの各々は、生物学的同等物で置き換えることができる。

10

## 【0039】

本明細書において使用される、基準ポリヌクレオチドの「生物学的同等物」とは、基準ポリヌクレオチドに対して特定の配列同一性を有する、または、限定的なヌクレオチドの追加、削除および/または置換によって基準ポリヌクレオチドから修飾された、核酸配列を指す。一実施形態において、特定の配列同一性は、少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、または、代替的に、99%である。一実施形態において、生物学的同等物は、1、2、3、4、または、代替的に5つより多くないヌクレオチドの追加、削除、置換、または、それらの組み合わせによって基準ポリヌクレオチドから修飾されたものである。

20

## 【0040】

この組み合わせの任意のサブエレメントは、いずれかのPREに由来する任意のサブエレメント、または、その生物学的同等物であり得る。一態様において、サブエレメントは、WPRE、GSPRE、BPREまたはASPREに由来する。一態様において、サブエレメントは、WPREまたはGSPREに由来する。一態様において、サブエレメントはWPREである。

20

## 【0041】

別の実施形態において、キメラPREは、WPREに由来するサブエレメント(WPRE)、任意のPREに由来するサブエレメント、HPREに由来するサブエレメント(HPRE)を含み、それらの各々は、生物学的同等物と置き換えることができる。いくつかの態様において、サブエレメントは、GSPRE、HPRE、WPRE、BPREもしくはASPREに由来するか、または、そのようなサブエレメントの生物学的同等物である。

30

## 【0042】

別の実施形態において、キメラPREは、WPRE、BPREまたはASPREのサブエレメント、および、HPREのサブエレメント(HPRE)、任意で、サブエレメントを含む。一態様において、サブエレメントはWPREに由来する。一態様において、サブエレメントはBPREに由来する。一態様において、サブエレメントはASPREに由来する。一態様において、サブエレメントはWPREに由来する。一態様において、サブエレメントはGSPREに由来する。

40

## 【0043】

キメラPREがサブエレメントおよびサブエレメントのみを有するとき、いくつかの態様において、サブエレメントは、サブエレメントと同一の方向であり、その下流にある。いくつかの態様において、サブエレメントは、サブエレメントと同一の方向であり、その上流にある。いくつかの態様において、サブエレメントは、サブエレメントと比べて反対の方向であり、その上流にある。いくつかの態様において、サブエレメントは、サブエレメントと比べて反対の方向であり、その下流にある。

## 【0044】

キメラPREが3つのサブエレメントを全部有するとき、いくつかの態様において、3

50

【 0 0 4 5 】

上記の実施形態のいずれかにおいて、任意で、追加的な サブエレメント、 サブエレメント、 および／または、 サブエレメントが任意で存在し得て、これらは、自身の種類のサブエレメントに隣接して配置されてよく、 または、 異なる種類のサブエレメントによって隔てられててもよい。

〔 0 0 4 6 〕

いくつかの態様において、2つの隣接するサブエレメントの間に異なる転写調節要素が挿入され得る。例えば、5' UTRもしくは3' UTRが、サブエレメントとサブエレメントとの間に、または、サブエレメントとサブエレメントとの間に挿入され得る。

【 0 0 4 7 】

上の構成の各々において、各サブエレメントの間、または、サブエレメントと隣接 UTR との間の距離は調整できる。一態様において、任意の隣接するサブエレメントの間の距離は、50 ヌクレオチドより大きくない。一態様において、任意の隣接するサブエレメントの間の距離は、40、30、25、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2 または 1 ヌクレオチドより大きくない。一態様において、任意の隣接するサブエレメントの間の距離は、少なくとも 1、2、3、4、5 または 10 ヌクレオチドである。

【 0 0 4 8 】

更に、本開示のキメラ P R E のサブエレメントの各々は、互いに隣接している必要はない、発現構築物の他の要素の隣に配置され得ることが想定される。例えば、サブエレメントおよびサブエレメントは、目的遺伝子または 3' UTR に隣接し得る。一態様において、サブエレメントは、プロモーターと目的遺伝子との間にあり、サブエレメントは、目的遺伝子と 3' UTR との間、または、3' UTR の後にいる。別の態様において、サブエレメントは、プロモーターと目的遺伝子との間にあり、サブエレメントは、目的遺伝子と 3' UTR との間、または、3' UTR の後にいる。一態様において、サブエレメントおよびサブエレメントの両方は、プロモーターと目的遺伝子との間、または、目的遺伝子と 3' UTR との間にいる。サブエレメントが使用されるとき、上記の位置のいずれかに配置され得て、プロモーターの前、プロモーターと目的遺伝子との間、目的遺伝子と 3' UTR との間、または、3' UTR の後であり得る。

〔 0 0 4 9 〕

H P R E、W P R E、G S P R E、B P R E および A S P R E の配列、ならびに、修飾されたバージョンを有するそれらの個別のサブエレメントが、下の表 3 に示されている。一般的に、サブエレメントのヌクレオチドは下線付きであり、サブエレメントのヌクレオチドは太線であり、サブエレメントのヌクレオチドはイタリックである。

[表3：天然型のH P R E、W P R E、G S P R E、B P R EおよびA S P R E、ならびに、天然型または修飾された個別のサブエレメントの配列]

【表3】

HPRE (SEQ ID NO: 1)	1 AACAGGCCT ATTGATTGGA AAGTTGTCA ACGAATTGTG GGTCTTTGG 51 GGTGTTGCTGC CCCTTTTACG CAATGTTGGAT ATCCTGCTTT AATGCCTTTA 101 TATGCATGTA TACAAGCAAA ACAGGGCTTT ACTTTCTCGC CAACTTACAA 151 GGCCTTTCTC AGTAAACAGT ATATGACCT TTACCCCGTT GCTGGGCAAC 201 GGCCTGGTCT GTGCCAAGTG TTGCTGACG CAACCCCCAC TGGTGGGGC 251 TTGGCCATAG GCCATCAGCG CATCGTGGGA ACCTTGCTG CTCCCTGCC 301 GATCCATACT GCGGAACCTC TAGCCGCTTG TTTGCTGCC AGCAGGCTG 351 GAGCAAACCT CATCGGGACC GACAATTCTC TCGTACTCTC CGCAAGTAT 401 ACATCGTTTC CATGGCTGCT AGGTGTTGCT GCCAACTGGT ACCTGGCGG 451 GACGTCCTTT GTTACGTCG CGTCGGGGT GAATCCGGG GACGACCCCT 501 CCGGGGGCGG CTGGGGGCTC TACCGCCGCT TTCTCCGCT GCCGTAACCGT 551 CGGACACCGG GGCGCACCTC TCTTACGGG GACTCCCCGT CTGTGCCCTC 601 TCATCTGCCG GACCGTGTGC ACTTCGCTTC ACCTCTGCAC GTCGCATGGG 651 GACCAACCGTG AACCCCCAAC GGAACTGCGC CAAGGTCTTG CATAAGAGGA 701 CTCTTGGACT TTCAGCAATG TC
HPRE $\alpha$ (SEQ ID NO: 2)	1 GTTGCTCGGC AACGGCCTGG TCTGTGCCAA GTGTTGCTG ACGCAACCC 51 CACTGGTTGG GGCTTGGCCA TAGGCCATCA GCGCATGCGT GGACACCTTG 101 TGTCTCCTCT GCGGATCCAT ACTGCGGAAC TCTAGCCG TTGTTTGTG 151 CGCAGCAGGT CTGGAGCAA CCTCATCGGG ACCGACAATT CTGTGTA 201 CTCCCGCAAG TATACATCGT TTCCATGGCT GCTAGGCTGT GCTGCCAACT 251 GGTACACTGCG C
HPRE $\beta$ (SEQ ID NO: 3)	1 GGGACGTCCT TTGTTTACGT CCCGTCGGCG CTGAATCCCG CGGACGACCC 51 CTCCCGGGGC CGCTTGGGGC TCTACCGCC GCTTCTCCGT CTGCCGTACC 101 GTCCGACCAC GGGGCGCACC TCTCTTAAAG CGGACTCCCC GTCGTGCGCT 151 TCTCATCTGC CGGACCGTGT GC

10

20

次頁に続く

【表4】

前頁から続く

WPRE (SEQ ID NO: 4)	1 GATCCAATCA ACCTCTGGAT TACAAAATTT GTGAAAGATT GACTGGTATT 51 CTTAACTATG TTGCTCCTT TACCGCTATGT GGATACGCTG CTTTAATGCC 101 TTTGTATCAT GCTATTGCTT CCGCTATGGC TTTCATTTTC TCTCCCTGT 151 ATAAATCCTG GTTGCTGTCT CTTTATGAGG AGTTGTTGGCC CGTTGTCAGG 201 CAACGTTGGCG TGGTGTGCAAC TGTGTTTGT GACGCAACCC CCACTGGTTG 251 GGGCATTGCC ACCAACCTGTC AGCTCTTTG CGGGACTTTG GCTTCCCGC 301 TCCCTATTGC CACGGCGGAA CTCATCGCG CCGCTCTGCG CGGCTGCTGG 351 ACAGGGGCTC GCGTGTGGGG CACTGACAAT TCCGTGGTGT TGTGGGGAA 401 GCTGACGTCC TTTCATGGC TGCTGCGCTG TTTGCGCACC TGGAACTGCG 451 CGGGGACGTC CTTCTGCTAC GTCCCTCGG CCCTCAATCC AGCGGACCTT 501 CCTCCCGGG GCCTGCTGCC GGCTCTGCCG CCTCTCCGC GTCCTCCGCT 551 TCGCCCTCAAG ACAGTGGAA TCTCCCTTG GCGCGCTCC CGGCGCTGGGA 601 TC
WPRE $\alpha$ (SEQ ID NO: 5)	1 GTTGTCAGGC AACGTGGCGT GGTGTTGCACT GTGTTTGTG ACGCAACCC 51 CACTGGTTGG GCGATTGCCA CCACCTGTC A GCTCCCTTCC GGGACTTTG 101 CTTTCCCCCT CCCTATTGCC ACGGCGGAAC TCACTGCCGC CTGCCCTGCC 151 CGCTGCTGGC CAGGGGCTCG GCTGTTGGGC ACTGACAATT CGGTGGTGT 201 GTCGGGGAAAG CTGACGTCTT TTCCATGGCT GCTGCGCTGT GTTGCACCT 251 GGATTCTGCG C
WPRE $\beta$ (SEQ ID NO: 6)	1 GGGACGTCCT TCTGCTACGT CCCTCGGCC CTCAATCCAG CGGACCTTCC 51 TTCCCGGGC CTGCTGCCGG CTCTGCCGCC TCTTCGCGCT CTTCGCCCTC 101 GCGCTCAGAC GAGTCGGATC TCCCTTTGGG CGCGCTCCCC CGCTGGGATC
WPRE $\gamma$ (SEQ ID NO: 7)	1 AATCRAACCTC TGGATTACAA AATTTGTGAA AGATTGACTG GTATTCTTA 51 CTATGTTGCT CCTTTTACGC TATGTTGGATA CGCTGCTTTA ATGCCCTTGT 101 ATCATGCTAT TGCTTCCGT ATGGCTTTCA TTTTCTCCCTC CTTGTATARA 151 TCGTGGTTGC TGCTCTTTA TGAGGGAGTTG TGCCCC

30

40

次頁に続く

## 【表5】

前頁から続く

BPRe (SEQ ID NO: 8)	1 AACAAAGCCTT TGGATTGGAA AATCCTTCAG CGCATTACGG GTCTCCTGGG 51 GTTTCTTGCA CCCTTCACGA CCTGTGGCTA TCCAGCCCTA ATGCCTTGT 101 ACCATGCCAT TACCCGGCGC CAGGCCTAA AAATTCTTG GCCCTTTAAG 151 ACCTTCTT ACAGCCTGTA CAAGCAACCT TTGCCCCTTA TCAGGCAGAA 201 CGGGGCACATC TGCCAGGTGT TTGCTGACGC AACCCCCACT GGTTGGGGCC 251 TGGTTAATCA TTCCCTCGCGA TGGTGGCGA GGGGACCGGT TCCCGCGCCC 301 TTGCTTATCC ATTGCGCGGA ACTTATTGCC GCCTGCCTTG CTGCGCGCTG 351 GACGGGAGCT CGGGTTATTG GAACTGACRA TTCCATTGTG GCTTCGGGAA 401 AGCGGACATC TTUCCCATGG CTGCTCGGTG CGGTTGCUAA CTGGATGCTT 451 CGGGGAACGT CGTTCTGCTT CGTCCCCTCT GCATTGAATC CGGCGGACGC 501 CCCGTCGCGC GGACTGCTCG SCATTCGGT CGCGCCGCGC CCTCTCCCGT 551 TCCGACCTTC TACGGGGCCG ACGTCACTCT TCAGCCGTC CCCATGTC
BPRe $\alpha$ (SEQ ID NO: 9)	1 GTTATCAGGC AGAAGCGGGC AATCTGCCAG GTGTTGCTG ACGCAACCCC 51 CACTGGTTGG GGCGCTGGTTA ATCATTCCTC CGCATGGTTG CGCAGGGGAC 101 GTTTTCCCCG CCCCTTGCCT ATCCATTGCC CGGAACTTAT TGCCGCGCTGC 151 CTTGCTCGCC GCTGGACGGG AGCTCGGGTT ATTGGAACTG ACAATTCCAT 201 TGTGGCTTCG GAAAAGCGGA CATTTTCCC ATGGCTGCTC GGCTGCGTTG 251 CCAACTGGAT GCTTCGGGC
BPRe $\alpha$ modified (SEQ ID NO: 10)	1 GTTATCAGGC AGAAGCGGGC AATCTGCCAG GTGTTGCTG ACGCAACCCC 51 CACTGGTTGG GGCGCTGGTTA ATCATTCCTC CGCATGGTTG CGCAGGGGAC 101 GTTTTCCCCG CCCCTTGCCT ATCCATTGCC CGGAACTTAT TGCCGCGCTGC 151 CTTGCTCGCC GCTGGACGGG AGCTCGGGTT ATTGGAACTG ACAATTCCAT 201 TGTGGCTTCG GAAAAGGGGA CATTTTCCC ATGGCTGCTC GGCTGCGTTG 251 CCAACTGGAT GCTTCGGGC
BPRe $\beta$ (SEQ ID NO: 11)	1 GAAACGTCGTT CTGCTTCGTC CCCTCTGCAT TGAATCCGGC GGACGCCCG 51 TCGCGCGAC TGCTCGGCAT TCCCGTCGCG CGCGCCGCTC TCCCGTTCCG 101 ACCTTCTACG GGCGCGACGT CACTCTTCGCG CGTCTCCCCA TCTG

次頁に続く

10

20

30

40

## 【表6】

前頁から続く

BPReY (SEQ ID NO: 12)	1 AACAAAGCCTT TGGATTGGAA AATCCTTCAG CGCATTACGG GTCTCCTGGG 51 GTTTCTTGCA CCCTTCACGA CCTGTGGCTA TCCAGCCCTA ATGCCTTGT 101 ACCATGCCAT TACCCGGCGC CAGGCCTAA AAATTCTTG GCCCTTTAAG 151 ACCTTCTT ACAGCCTGTA CAAGCAACCT TTGCCCC
GSPRe (SEQ ID NO: 13)	1 AATCAACCC TAGATTATAA AATATGTGAA AGGTTGACGG GCATTCTTAA 51 TTATGTTGCT CCTTTTACCA AATGTGGTTA TGCTGCTTTA CTGCTTTAT 101 ATCAAGCTAT TCTTCTCAT ACTGCTTTG TTTCTCTC CTTATATAAA 151 AACTGGTAC TGTCACTTAA TGGTGGATG TGGCCCGTGT CGAGACAAACG 201 TGTGTGGTG TCTCTGTGT TGCTGACGC AACTCCACT GGTTGGGCA 251 TTGCAACAC CTGTCACACTC ATTCCGGTA CTTCCGGTT CTCACTCCG 301 ATGCTACCG CGAGACTTAT AGCCCGCTGC TTGCTGCGC GTGGSACAGG 351 AGCTCGGTG TTGGGACTG ATAACTCCGT GGTCCCTCTCC GTTAAGCTAA 401 ATTCGTTTCC ATGGCTGCTC GGCTGTGTG CCAACTGGAT TCTTCGGGG 451 AGCTCCCTCTC GTTACGTCCC CTCCGGGAC AACCCAGCGG ACCTCCGTC 501 TCGGGGACTT CTGCGGGTC TCCGTCCTC GGCGTTCTC CGTTTGGTC 551 CGGTACCAA GCGGATATCC CTGTTGGCG CGTCCCCCGC TG
GSPRe $\alpha$ (SEQ ID NO: 14)	1 GTTGCACAGAC AACGTGGTGT GGTTGCTCT GTGTTGCTG ACGCAACTCC 51 CACTGGTTGG GGCATTTGCA CCACCTGTCA ACTCATTTCC GGTACTTTCG 101 GTTCTCACT TCCGATTGCT ACCCGCGGAGC TTATAGCCGC CTGCGCTGCT 151 CGCTGCTGGA CAGGAGCTCG GTTGTGGGC ACTGATAACT CGGTGGTCT 201 CTCCGGTAAG CTAACCTGTT TTCATGGCT GCTCGCTGT GTTGCACACT 251 GGATTCTTCG C
GSPRe $\beta$ (SEQ ID NO: 15)	1 GGGACGTCCT TCTGTTACGT CCCTCCCGCG GACRACCCAG CGGACCTTCC 51 GTCTCGGGGA CTTCCTGCGCG CTCTCCGCTC TCTGCGCGTT CTGGCTTTTC 101 GTCCGGTCAC CAAGCGGATA TCCCTGTGGG CGCGCTCCCC GCCTG

次頁に続く

## 【表7】

前頁から続く

GSPREY (SEQ ID NO: 16)	1 AATCAACCT TAGATTATAA AATATGTGAA AGGTTGACGG GCATTCTTAA 51 TTATGTTGCT CCTTTTACCA AATGTGGTTA TGCTGCTTTA CTGCCTTTAT 101 ATCAAGCTAT TGCTTCTCAT ACTGCTTTTG TTTTCCTC CTTATATAAA 151 AACTGGTTAC TGTCACTTTA TGGTGAGTTG TGGCCC
ASPRE (SEQ ID NO: 17)	1 AACCTTTAGA TTATAAAATC TGTGAAAGGT TAACAGGCAT TCTGAATTAT 51 GTTGCTCCTT TTACTAAATG TGGTTATGCT GCTCTCCTTC CTTTGTATCA 101 AGCTACTTCG CGTACGGCAT TTGTGTTTC TTCTCTCTAC CACAGCTGGT 151 TGCTGTCCTT TTATGCTGAG TTGTGGCCTG TTGUCAGGCA AGTGGCGTGC 201 GTGTGCTCTG TGCTGACGC AACCCCCACT GGTTGGGGCA TTTGCACAC 251 CTATCAACTC ATTTCCCCGA CGGGCGCTTT TGCCCTGCCG ATCGCCACCG 301 CGGACGTCA CGGGCGCTGC TTGCTCGTGT GCTGGACAGG AGCTCGGCTG 351 TTGGGCAACTG ACAAATCCGT GGTTCTTTG GGCACAACTGA CTTCCTATCC 401 ATGGCTGCTC GCCTGTGTTG CCAACTGGAT TCTTCGCGGG AGCTCGTTCT 451 GCTACGTCCC TTGGGAGCG AATCCGGCGG ACCTGGCGTC TCGAGGGCTT 501 CTGCGGGCTC TGCATCCCGT GCGACTCTC CGCTTCCGTC CGCAGCTGAG 551 TCGCATCTCC CTTTGGGGCG CCTCCCCGCC TG
ASPRE $\alpha$ (SEQ ID NO: 18)	1 GTTGCAGGC AACGTGGCGT GGTGTGCTCT GTGTCTGACG CAACCCCCAC 51 TGGTTGGGGC ATTGCAACCA CCTATCAACT CATTCCCCG ACGGGCGCTT 101 TTGCGCTGCC GATCGCCACCG CGGGACGCTCA TCGCCGCGCTG CCTTGCTCGC 151 TGCTGGACAG GAGCTCGGCT GTGGGCGACT GACAACCTCG TGTTCTTC 201 GGGCAAACCTG ACTTCCTATC CATGGCTGCT CGCCTGTGTT GCAAACGTGGA 251 TTCTTCGCG
ASPRE $\beta$ (SEQ ID NO: 19)	1 GGGACGCTGTC TCGCTACTGT CCCTCGGCA GCGAATCCGG CGGACGCTGCC 51 GTCTCGAGGC CTCTGCGCGG CTCTGCACTCC CGTGCCTGACT CTCCGCTTCC 101 GTCGCGAGCT GAGTCGCATC TCCCTTGCGG CGGCCTCCCC GCCTG

ASPREY (SEQ ID NO: 20)	1 AACCTTTAGA TTATAAAATC TGTGAAAGGT TAACAGGCAT TCTGAATTAT 51 GTTGCTCCTT TTACTAAATG TGGTTATGCT GCTCTCCTTC CTTTGTATCA 101 AGCTACTTCG CGTACGGCAT TTGTGTTTC TTCTCTCTAC CACAGCTGGT 151 TGCTGTCCTT TTATGCTGAG TTGTGGCGTGC
------------------------	---

## 【0050】

上の表における配列の SEQ ID NO : が下の表4にまとめられている。

## [表4 : SEQ ID NO : のまとめ]

## 【表8】

PRE	全体	$\gamma$	$\alpha$	$\beta$
HPRE	1	-	2	3
WPRE	4	7	5	6
BPRE	8	12	9	11
GSPRE	13	16	14	15
ASPRE	17	20	18	19

## 【0051】

試験された一部のキメラPRE配列の配列が下の表5に示されている。

## [表5 : キメラPREの配列]

10

20

30

【表9】

WPRE $\gamma$ /SPRE $\alpha$ /SPRE $\beta$ (PCT 2.4) (SEQ ID NO: 21)	1 AATCAACCTC TGGATTACAA AATTGTGAA AGATTGACTG GTATTCTTAA 51 CTATGTTGCT CCTTTTACGC TATGTGATA CGCTGCTTTA ATGCCTTGT 101 ATCATGCTAT TGCTTCCGT ATGGCTTCA TTTCTCCTC CTTGTATAAA 151 TCTGGTTGC TGCTCTTTA TGAGGAGTTG TGGCCCGTTG CCAGACACCG 201 TGGTGTGGT TGCTCTGTGT TTGCTGACGC AACTCCACT GGGTGGGCA 251 TTTGCACAC CGTGCACCTC ATTCGGTGA CTTTGGTTT CTCACCTCCG 301 ATTGCTACCG CGGAGCTTAT AGCGCGCTGC CTTGCTCGCT GCTGGACAGG 351 AGCTCGGTTG TTGGGACTG ATAATCCGT GGTOCTCTCC GGTAAGCTAA 401 CTTGCTTCC ATGGCTGCTC GGCTGTGTTG CCAAACGGAT TCTTCGGGG 451 ACGTCCTCT GTTACGTCCC CTCCGGGAC AACCCAGCGG ACCTTCGGC 501 TCGGGGACTT CTGCCGGCTC TCCCTCGCTC GCCCTCTCTG CGTTTTCGTC 551 CGGTCACCAA CGGGATATCC TTGTTGGCGG CCTCCCCGCC TG
HPRE $\alpha$ /WPRE $\beta$ (PCT 2.7) (SEQ ID NO: 22)	1 GTTGTCTGGC AACGGCCTGG TCTGTGCCA GTGTTTGTG ACGCAACCCC 51 CACTGGTTGG GGCTTGGCCA TAGGCCATCA GCGCATGCGT GGAACCTTTG 101 TGTCTCTCTG CGCGATCCAT ACTCGGAAAC TCTAGCCGC TTGTTTGTG 151 CGCAGCAGGT CTGGAGCAA CTCATCGGG ACCGACAAATT CTGTCGTACT 201 CTCCCCAAG TATACATCGT TTCCATGGT GCTAGGTGT GCTGCCAACT 251 GGTACCTGCG CGGGACGTCC TTCTGCTAG TCCCTCGGC CCTCAATCCA 301 GCGGACCTTC CTCCCCCGG CCTCTCGCTG GCTCTGCGG CTCTCCGCG 351 TCTTCGCTT CGCCCTCAGA CGAGTCGGAT CTCCCTTGG GCCGCCTCCC 401 CGCCTGGGAT C
WPRE $\alpha$ /HPRE $\beta$ short (PCT 2.5) (SEQ ID NO: 39)	1 GTTGTCAAGGC AACGTGGCGT GGTGTGCACT GTGTTTGTG ACGCAACCCC 51 CACTGGTTGG GGCTTGGCCA CCACATGCTCA GCTCTTTCC GGGACTTTG 101 CTTTCCCCCT CCCTATTGCC ACGGCGGAAC TCATCGCCGC CTGCTTGGCC 151 CGCTGCTGGC CAGGGGCTCG GCTGTTGGGC ACTGACAAATT CGTGGTGT 201 GTGCGGGAAAG CTGACGTCTC TTCCATGGT GCTCGCTGT GTGCCCACCT 251 GGATCTGCG CGGGACGTCC TTGTTTACG TCCCTCGGC GCTGAATACCC 301 GGGGACTACC CCTCCCCGGG CGGTTGGGG CTCTACCGCC CGCTTCTCCG 351 TCTCCGCTAC CGTCCGACCA CGGGGCGCAC CTCTCTTAC GCGGACTCCC 401 CGTCTGTGCC TTCTCATCTG CGGACCGGTG TGC

次頁に続く

10

20

30

40

【表10】

BPRE $\alpha$ /HPRE $\beta$ (PCT 2.21) (SEQ ID NO: 23)	1 GTTATCAGGC AGAAGCGGGC AATCTGCCAG GTGTTTGTG ACGCAACCCC 51 CACTGGTTGG GGCTTGGTTA ATCATTCCTC CGCATGGTGC CGCAGGGGAC 101 GGTTTCCCCG CCCTTGCCT ATCCATTGCG CGGAACCTTAT TGCCGCTTGC 151 CTTGCTCGCC GCTGGACGGG AGCTCGGGTT ATTGGAACTG ACAATTCCAT 201 GTGCGCTCGG GAAAAGCGGA CATTTTCCC ATGGCTGCTC GGCTGGGTTG 251 CCAACTGGAT GCTTCGGCGG GGACGTCCTT GTTTACGTC CGTCCGGCGC 301 TGAATCCCGC GGACGACCCCG TCCCGGGGCC GCTTGGGGCT CTACCGCCCG 351 CTTTCGCTC TGCGGTACCG TCCGACCAAG GGGCGCACCT CTCTTACGCC 401 GGACTCCCCG TCTGTGCTT CTATCTGCC GGACCGTGTG CACTTCGCTT 451 CACCTCTGCA CGTGCATGG AGACCACCGT GAACGCCAC CGGAACCTGCG 501 CCAAGGTCTT GCATAAGAGG ACTCTTGGAC TTTCAGCAAT GTC
BPRE $\alpha$ mod/HPRE $\beta$ (PCT 2.22) (SEQ ID NO: 24)	1 GTTATCAGGC AGAAGCGGGC AATCTGCCAG GTGTTTGTG ACGGAACCCC 51 CACTGGTTGG GGCTTGGTTA ATCATTCCTC CGCATGGTGC CGCAGGGGAC 101 GGTTTCCCCG CCCTTGCCT ATCCATTGCG CGGAACCTTAT TGCCGCTTGC 151 CTTGCTCGCC GCTGGACGGG AGCTCGGGTT ATTGGAACTG ACAATTCCAT 201 GTGCGCTCGG GAAAAGCGGA CATTTTCCC ATGGCTGCTC GGCTGGGTTG 251 CCAACTGGAT GCTTCGGCGG GGACGTCCTT GTTTACGTC CGTCCGGCGC 301 TGAATCCCGC GGACGACCCCG TCCCGGGGCC GCTTGGGGCT CTACCGCCCG 351 CTTTCGCTC TGCGGTACCG TCCGACCAAG GGGCGCACCT CTCTTACGCC 401 GGACTCCCCG TCTGTGCTT CTATCTGCC GGACCGTGTG CACTTCGCTT 451 CACCTCTGCA CGTGCATGG AGACCACCGT GAACGCCAC CGGAACCTGCG 501 CCAAGGTCTT GCATAAGAGG ACTCTTGGAC TTTCAGCAAT GTC

次頁に続く

## 【表 1 1】

前頁から続く	
GSPREY/GSPRE $\alpha$ /HPREB (PCT 2.28) (SEQ ID NO: 28)	1 AATCACCCCT TAGATATATAA AATATGIGAAA AGGTGACGG GCATGTAA 51 TTATGTTGCT CCTTTTACCA AATATGGTTA TGTGCTTTA CTGGCTTTAT 101 ATCAAGGTAT TGCTCTCTA ACTGCTTTG TTCTCTCTC CTTATATAAA 151 AACTGTTAC TGTCACCTTA TGCTGAGTTG TGGCCCGTTC CGAGACAACG 201 TGGTGTGGTG TGCTGTGTG TTGCTGACGC AACTCCACT GGTGGGGCA 251 TTGGACCAAC CTCGAACTA ATTCCGGATA CTTCGGTT CTCACTTCG 301 ATTGCTAACG CGGAGCTTAT AGGGCGCTGC CTGGCTGCT GCTGGACAGG 351 AGCTGGTTG TTGGGACACTA AIAACTCGGT GGTGCTCTCC GTTAAGCTAA 401 CTGGCTTCTC ATGGCTGCTC GCCTGTTG TGCAACTGGAT TCTCGCGGG 451 GAGGCTCCCT GTTACGTCG CGTGGGGGTG AAATCCGGG GACGACCCCT 501 CCGGGGGGGCGG CTGGGGGCTC TACCGGGCGG TCTCTCGGTG GCGCTACCGT 551 CGGACCAACG CGGGGACACTC TTGTTACGGG GACTCCCGT CTGTCCTTC 601 TCATCTGGCG GACGGTTCG ACTTCGTCG ACCCTTGACG GTGGCATGGA 651 GACCAAGCTG AAGGCGAACG GGAACGTGCG CAAGGCTCTG CATAAGGAGGA 701 CTCTGGGACT TTGAGCAATG TC
WPREY/GSPRE $\alpha$ /HPREB (PCT 2.62) (SEQ ID NO: 26)	1 GATCCAACTCA ACCTCTGGAT TACAAATTT GTGAAAAGATT GACTGGATT 51 CTAACTATAT TTGCTCTCTT TACGCTATATG GGATACGCTG CTAAATGCC 101 TTGTTATCAT GCTATGCTG CCTGGTATGGC TTGCAATTG TCTCTCTTGT 151 ATAAATCCTG GTGGCTGCTT CTTATGAGG AGTGTGGGG CGTGGCAGA 201 CAACGGTGTG TGCTGTGCTC TGTTGTTGCT GACGCCACTC CGAACCTGGTG 251 GGGGATTGAC ACCACCTGCA AACTCATTC CGGTACTTC GTTCTCTCAC 301 TCTGGATGTC TACCGGGAGG CTATAGCGG CTCGCTTGTG TGCTGCTGG 351 ACAGGAGCTC GGTTGTTGGG CACTGATAAC TCGTGGGCC TCTCCGGTAA 401 GCTAACTCG TTGCTGCTG TGCTGCTG TGTTGCAAC TGGATTCTTC 451 GGGGGAGCTC TTGTTGTTAC GTCGGTGTGG CGCTGAATCC CGGGGACGAC 501 CCTCTGGGGG CGCGCTTGGG GCTCTACCGG CGCGCTCTCC GTCTGCGTA 551 CGCTCGAACG ACGGGGGCGCA CCTCTCTTAA CGCGGACTCC CGGTCTGTG 601 CTCTCTCATC CGGGGACCGT GGGGACTTCG CTTCACCTCT GTACGTGCGA 651 TGAGGACCA CGTGGACGCC CAACGGGAACG TGCCCAAGGT CTTCGATAAG 701 AGGACTCTTG GACTTTCAGC AATGTC

10

20

30

40

## 【0052】

下の表 6 は、一部の追加の P R E 配列およびそれらのサブエレメントの配列を示す。これらは、本開示のキメラ P R E を生成するために使用され得る。

## [表 6 : 追加の天然型 P R E の配列 ]

## 【表 1 2】

アヒル PRE (DPRE) (SEQ ID NO: 27)	1 AAGATTGTT GGGCATTTGA ACTTTGTGTT ACCATTTACT AAAGGTAACA 51 TTGAARTGTT AAAACCAATG TATGCTGCTA TTACTAACAA AGTTAACCTT 101 AGCTTCTCTT CAGCTTATAG GACTTTATG TACAATTTAA CTATGGGTGT 151 TTGTAATTAATG GCAATTCGAC CAAAGTCCTC TGTACCTTTG CCACGTTGAG 201 CCACAGATGC TACTCCAAACA CATGGGGCAA TATCCCATAT CACCGGGGG 251 AGGCCAGTGT TTGCTTTCTC AAAGGTCAAGG GATATACTATA TACAGGAATT 301 CCTGATGTTA TGTTTGTGCTA AGATAATGAT TAAACCCAGA TGTACTACTCT 351 CCGATTCTAC TTTGTTGTC CACAAACGTT ATCAGACGTT ACCATGGCAT 401 TTGCTATGTT TGCGCAAACAA ACTGCTATGAT CCTATACAGT TGTACTTTGT 451 TCCAACTAAA TACAACTCTG CTGACGGGCC ATCCAGGCAC AGACCCGCTG 501 ATTGGACGGC TCTTACATAC ACCCCCTCTCT CGAAGCAAT ATATATCCCA 551 CATAGGCTAT G
DPRE $\alpha$ (SEQ ID NO: 28)	1 GTCCTCTGTA CCTTTGCCAC GTGAGGCCAC AGATGCTACT CCAACACATG 51 CGCAATATC CCTATATCACC GGCGGGAGCG CAGTGTGTTGC TTTTCAAG 101 GTCAGGGATA TACATATACA GGAATTGCTG ATGGTATGTT TAGCTAAGAT 151 AATGATTAAA CCCAGATGTA TACTCTCCGA TTCTACTTTT GTTGGCCACA 201 AACGTTATCA GACGTTACCA TGGCATTGTT CTATGTTGGC CAAACAACTG 251 CTATCT
DPRE $\beta$ (SEQ ID NO: 29)	1 CCTATACAGT TGACTTTGT TCCAACTAAA TACAATCTG CTGACGGCCC 51 ATCCAGGCAC AGACCCGCTG ATGGGACGGC TCTTACATAC ACCCCCTCTCT 101 CGAAAGCAAT ATATATCCCA CATAGGCTAT G
DPRE $\gamma$ (SEQ ID NO: 30)	1 AAGATTGTT GGGCATTTGA ACTTTGTGTT ACCATTTACT AAAGGTAACA 51 TTGAARTGTT AAAACCAATG TATGCTGCTA TTACTAACAA AGTTAACCTT 101 AGCTTCTCTT CAGCTTATAG GACTTTATG TACAATTTAA CTATGGGTGT 151 TTGTAATTAATG GCAATTCGAC CAAAGTCCTC TGTACCTTTG CCACGTTG

次頁に続く

## 【表13】

前頁から続く

チンパンジー (CPRE) (SEQ ID NO: 31)	1 AACAGACCTA TAGATTGGAA AGTATGTCAA AGAATTGTGG GTCTTTGGG 51 ATTTGCTGCC CCTTTTACGC AATGTGTTA TCCTGCTTAA ATGCCATG 101 ATGCATGTAT ACAAGCAAAA CAGGCTTTCA CTTTCTCGCC AACCTATAAG 151 GCCTTTCTAA GTCAACAAATA TTCGACCCCTT TACCCCGTTG CCCGGCAACG 201 GTCGGGTCG TGCCAAAGTGT TTGCTGACGC AACCCCCACT GGCTGGGGCT 251 TGGTCATGGG CCATCAGCAGC ATGCGTGGAA CCTTTGTGGC TCCTCTGCCG 301 ATCCATACTG CGGAACTCTG AGCAGCTTGT TTTGCTGCA GCCGGTCTGG 351 AGCAAAACTT ATCGGAACCTG ACAATTCTGT CGTCTCTCT CGGAAATATA 401 CATTTTTCC ATGGCTGCTA GGTGTTGCTG CCACCTGGAT ACTTCGGGG 451 ACGTCCTTGT TTACGTCCTG GTCGGCGCTG AATCCTCGGG AGCACCCCTC 501 CGGGGGCGCG TTAGGGCTT ACCGCCCCCT CATCCGCTCG CTCTTCCAAAC 551 CGACTACGGG CGGACCTCT CTTAACCGGG TCTCCCGCTG TGCTTCTCTCA 601 TCTCCCGTGC CGTGTGCACT TCGGTTCAAC TCTGCAACGTT GCATGGAGAC 651 CACCGTGAAC GCCCCACGGG ACCTGCCAAA AGTGTGCAAT AGAGGAGACTC 701 TTGGACTTTG AGCAATGTC
CPRE $\alpha$ (SEQ ID NO: 32)	1 CGTTGCCCGG CAACGGTCCG GTCTGTGCCA AGTGTGTTGCT GACGCAACCC 51 CCACCTGGCTG GGCTTGGTC ATGGGCCATC AGCGCATGCG TGGAACCTTT 101 TGCGCTCTC TGCGGATCCA TACTGCGGAA CTCCCTAGCAG CTTGTTTGC 151 TCGCAGCCGG TCTGGAGCAA AACCTATCGG AACTGACAAT TCTGTCGTC 201 TCTCTCGGAA ATATACATCT TTTCATGGC TGCTAGGTTG TGCTGCCAAC 251 TGGGACTTTG GC
CPRE $\beta$ (SEQ ID NO: 33)	1 GGGACGCTCT TTGTTTACGT CCCGTCGGCG CTGATCTG CGGACGACCC 51 TTCTCGGGGC CGCTTACGGC TCTACCGGCC TCTCATCGCT CTGCTCTGCC 101 AACCGACTAC GGGCGCACC TCTTTTACG CGGTCTGCCCT GTCTGTGCC 151 TCTCATCTGC CGGTCCTGCTG GCACTTGCCT TCACCTCTGC ACGTTGCATG 201 GAGACACCG TGAAACGCC ACAGAACCTG CCACAAAGTCT TGCTAAAGAG 251 GACTCTGGAA CTTTCAGCAA TGTC
CPRE $\gamma$ (SEQ ID NO: 34)	1 AACAGACCTA TAGATTGGAA AGTATGTCAA AGAATTGTGG GTCTTTGGG 51 ATTTGCTGCC CCTTTTACGC AATGTGTTA TCCTGCTTAA ATGCCATG 101 ATGCATGTAT ACAAGCAAAA CAGGCTTTCA CTTTCTCGCC AACCTATAAG 151 GCCTTTCTAA GTCAACAAATA TTCGACCCCTT TACCC

次頁に続く

10

20

30

40

## 【表14】

前頁から続く

ウーリーモンキー (WMFRE) (SEQ ID NO: 35)	1 AATCGACCTA TTGATTGGAA AGTCTGTCAG AGAATTGTTG GTTTATTGGG 51 CTTTGTGCT CCTTTTACAC AATGTGGATA CGCTGCTTAA ATGCCATAT 101 ATACATGCAT CCAAAACAT CAGGCCCTTA CTTTCTCTCT TGTGTACAAG 151 ACCTTTTGA AAGATCAATA CATGCACCTT TACCCCGTTG CTAGGCAACG 201 AGCTGGGCAC TGCCCAAGTGT TTGCTGACGC AACCCCCACT GGCTGGGGCT 251 TGGTATGTGG CAATCAGCAGC ATGGTGGGTA CATTGTTGTC CCCCCGCGCT 301 ATCCATACTG CGGAACTCTC TGCGACCTGT TTTGCTCGT GCTGGTCAGG 351 CGCAAAACTC ATCGGCACTG ACACGCTGT TGTGCTGCTT CGGAAGTAAC 401 ACACTTCCA TGGGTGCTAG GCTGTGCTGC TACCTGGATC CTGAGAGGG 451 CGTGTGTTGT TTACGTCCTC TCCAAGCTGA ACCCAGCGGA CGACCCCTCT 501 CGGGGGTGTG TGCGGCTGCTG GAAATCGCTG CGCGCGCTGC TGTTCCAGGC 551 TTCCACCGGG CGCACCTCTC TCTACCGGGT CTCCCTCTCT G
WMFRE $\alpha$ (SEQ ID NO: 36)	1 AATCGACCTA TTGATTGGAA AGTCTGTCAG AGAATTGTTG GTTTATTGGG 51 CTTTGTGCT CCTTTTACAC AATGTGGATA CGCTGCTTAA ATGCCATAT 101 ATACATGCAT CCAAAACAT CAGGCCCTTA CTTTCTCTCT TGTGTACAAG 151 ACCTTTTGA AAGATCAATA CATGCACCTT TACCC
WMFRE $\beta$ (SEQ ID NO: 37)	1 GTTGTAGGC AACGAGCTGG GCACGACCAA GTGTTGCTG AGCACAACCC 51 CACTGGCTGG GGCTTGGTAT GTGCGAATCA GCGCATGCGT GGTACATTT 101 TGTCCTCGCT GCCTATCTAC ACTGCGGAAC TCTTGCAGC CTGTTTTGCT 151 CGCTGCTGGT CAGGGGGAAA ACTCATCGGC ACTGACAAACG CTGTTGTGCT 201 GTCTCGGAAG TATACACACT TCCCATGGCT GCTAGGCTGT GCTGCTACCT 251 GGATCCTGAG A
WMFRE $\gamma$ (SEQ ID NO: 38)	1 GGGACGCTGT TTGTTTACGT CCTCTCCAAG CTGAAACCCAG CGGACGACCC 51 TTCTCGGGGT TGCTCGGGCC TGCTGAAACCC GCTCCCGCGG CTGCTGTTCC 101 AGCCTTCCAC CGGGCGCACC TCTCTCTACG CGGTCCTCCCGG TCTCTG

## 【0053】

## [3. ポリヌクレオチド構築物 / ベクター]

本開示の任意のキメラ P R E を含むポリヌクレオチド構築物（またはベクター）も提供される。ベクターは、真核細胞（例えば哺乳類細胞）において組み換えポリペプチドを発現するのに有用である。ベクターは、1または複数の目的遺伝子（G O I）をコードする配列を含み得る。本開示の目的のために、目的遺伝子は、導入遺伝子とも呼ばれる。

## 【0054】

50

転写および転写後調節配列、ならびに、任意で翻訳調節配列は、ベクターにおいて目的遺伝子と関連付けられ得る（すなわち、作動可能に連結される）。転写調節配列は、例えば、プロモーター、エンハンサーおよびポリアデニル化シグナルを含む。転写後調節配列は、例えば、イントロンおよびP R Eを含む。翻訳調節配列は、例えば、リボソーム結合部位（例えば、コザック配列）を含む。

#### 【0055】

特定の実施形態において、異種配列の挿入を促進するために、「ポリリンカー」としても知られているマルチクローニングサイト（M C S）がベクター内に存在する。例えば、M C Sは、導入遺伝子配列の挿入を促すために、プロモーターとポリアデニル化シグナルとの間に配置され得る。導入遺伝子配列を含むベクターにおいて、プロモーター、導入遺伝子配列およびポリアデニル化シグナルを含むベクターの部分は、「発現力セット」と称される。

10

#### 【0056】

真核細胞において活性のあるプロモーターは、当技術分野において周知である。例示的な真核生物プロモーターは、例えば、S V 4 0 早期プロモーター、S V 4 0 後期プロモーター、サイトメガロウイルス主要最初期（M I E）プロモーター、E F 1 アルファ（翻訳伸長因子 1 サブユニット）プロモーター、U b c（ユビキチンC）プロモーター、P G K（ホスホグリセリン酸キナーゼ）プロモーター、アクチンプロモーターなどを含む。また、B o s h a r t e t a l . , G e n B a n k A c c e s s i o n N o . K 0 3 1 0 4 、 U e t s u k i e t a l . ( 1 9 8 9 ) J . B i o l . C h e m . 2 6 4 : 5 7 9 1 - 5 7 9 8 、 S c h o r p p e t a l . ( 1 9 9 6 ) N u c l e i c A c i d s R e s . 2 4 : 1 7 8 7 - 1 7 8 8 、 H a m a g u c h i e t a l . ( 2 0 0 0 ) J . V i r o l o g y 7 4 : 1 0 7 7 8 - 1 0 7 8 4 ； D r e o s e t a l . ( 2 0 1 3 ) N u c l e i c A c i d s R e s . 4 1 ( D 1 ) : D 1 5 7 - D 1 6 4 、および、2 0 1 4 年 7 月 1 6 日にアクセスされた、真核生物プロモーターのデータベース（[h t t p : / / e p d . v i t a l - i t . c h](http://epd.vital-it.ch)）も参照されたい。

20

#### 【0057】

また、エンハンサーがベクター上に含まれ得る。非限定的な例には、C M V プロモーターおよびイントロンA配列の中のものが含まれる。過去に、5個の胚性幹細胞（E S C）転写因子（O c t 4 、 S o x 2 、 N a n o g 、 K l f 4 、 E s r r b ）がスーパーエンハンサーを占有することが示され、E S Cの制御に貢献する多くの追加の転写因子がある。6個の追加の転写因子（N r 5 a 2 、 P r d m 1 4 、 T c f c p 2 1 1 、 S m a d 3 、 S t a t 3 、 T c f 3 ）は、典型的なエンハンサーおよびスーパーエンハンサーの両方を占有し、これらはすべて、スーパーエンハンサーにおいて多く存在する。これらのいずれか、または、更に当技術分野において周知のものが本明細書において使用され得る。

30

#### 【0058】

真核細胞において活性のあるポリアデニル化シグナルが当技術分野において周知であり、これらに限定されないが、S V 4 0 ポリアデニル化シグナル、ウシ成長ホルモン（B G H）ポリアデニル化シグナル、および、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子ポリアデニル化シグナルが含まれる。ポリアデニル化シグナルは、m R N A 前駆体の3'末端切断、切断部位におけるm R N A 前駆体のポリアデニル化、および、ポリアデニル化シグナルの下流における転写の終了を指令する。一般的に、ポリアデニル化シグナルにはコア配列A A U A A Aが存在する。また、C o l e e t a l . ( 1 9 8 5 ) M o l . C e l l . B i o l . 5 : 2 1 0 4 - 2 1 1 3 を参照されたい。

40

#### 【0059】

本明細書において開示されるベクターにおいて使用され得る例示的なイントロンには、グロブリンイントロン、および、「イントロンA」としても知られている、ヒト/マウス/ラット/他の種のサイトメガロウイルス主要最初期（M I E）遺伝子の第1イントロンが含まれる。

50

## 【0060】

本開示のベクターに含まれ得る更なる転写後調節要素には、これらに限定されないが、CMV MIEの5'未翻訳領域、ヒトHsp70遺伝子、血管内皮成長因子(VEG)遺伝子のSP163配列、および、アデノウイルス後期mRNAに関連付けられた三成分リーダー配列が含まれる。例えば、Mariati et al. (2010) Protein Expression and Purification 69: 9-15を参照されたい。

## 【0061】

更なる実施形態において、本明細書において開示されるベクターは、足場付着領域(SAR)としても知られているマトリックス付着領域(MAR)を含む。MAR(クロマチンを開く)およびSAR配列は、特に、隣接配列のクロマチン構造(インスレーター)を隔離するように働く。従って、異種配列がしばしば染色体上に組み込まれる安定形質転換細胞において、MARまたはSAR配列は、抑制クロマチン構造(例えば、ヘテロクロマチン)を有する細胞ゲノムの領域に組み込まれた導入遺伝子の転写の抑制を防止し得る。従って、1または複数のMARまたはSAR配列をベクター内に含めることによって、安定形質転換細胞において、ベクターからの導入遺伝子の発現が促され得る。

10

## 【0062】

例示的なMARおよびSAR要素は、インターフェロンベータ遺伝子、ニワトリリゾーム遺伝子、インターフェロンアルファ2遺伝子、X29遺伝子MARおよびS4MARに由来するものを含む。MARまたはSAR配列は、ベクター内の任意の位置に配置され得る。特定の実施形態において、MARおよび/またはSAR要素は、目的遺伝子の(転写的な意味で)上流にある発現力セット内に配置され得る。

20

## 【0063】

特定の実施形態において、本明細書において開示されているベクターは、真核細胞において機能する選択マーカー(すなわち、真核選択マーカー)をコードするヌクレオチド配列を含むので、適切な選択が適用されたとき、選択マーカーを含まない細胞は、死ぬか、または、選択マーカーを含む細胞より明らかにゆっくりと増殖する。真核細胞において機能する例示的な選択マーカーは、グルタミンシンセターゼ(GS)遺伝子であり、選択は、グルタミンを含まない培地において細胞を培養することによって適用されるか、または、L-メチオニンスルホキシミンを用いて選択されるか、または、その両方である。真核細胞において機能する別の例示的な選択マーカーは、ネオマイシン(neo)に対する抵抗性をコードする遺伝子であり、選択は、ネオマイシン、ゲンタマイシンまたはG418を含む培地において細胞を培養することによって適用される。追加の選択マーカーには、ジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFRとも称され、メトトレキサートに対する抵抗性を付与する)、ピューロマイシンNアセチルトランスフェラーゼ(ピューロマイシンに対する抵抗性を提供する)、および、ハイグロマイシンキナーゼ(ハイグロマイシンBに対する抵抗性を提供する)が含まれる。真核細胞において機能する更なる追加の選択マーカーが当技術分野において周知である。

30

## 【0064】

上記の1または複数の選択マーカーをコードする配列は、プロモーターおよびポリアデニル化シグナルに作動可能に連結されている。上記のように、真核細胞において機能するプロモーターおよびポリアデニル化シグナルは、当技術分野において周知である。

40

## 【0065】

特定の実施形態において、本明細書において開示されるベクターは、2またはより多くの発現力セットを含み得る。例えば、一方が抗体重鎖をコードし、他方が抗体軽鎖をコードする2つの発現力セットを含むベクターが、機能的な抗体分子の生成のために使用され得る。

## 【0066】

また、本明細書において開示されるベクターは、原核細胞において機能する複製起点(すなわち、原核複製起点)を含む。原核細胞において機能する複製起点が当技術分野にお

50

いて周知であり、これらに限定されないが、大腸菌のoriC起点と、例えばpSC101起点、pBR322起点(rep)およびpUC起点などのプラスミド起点と、ウイルス(すなわちバクテリオファージ)複製起点とを含む。原核複製起点を同定するための方法が、例えば、Sernova & Gefland (2008) Brief. Bioinformatics 9(5):376-391において提供されている。

#### 【0067】

また、本明細書において開示されるベクターは、原核細胞において機能する選択マーカー(すなわち原核選択マーカー)を含む。原核細胞において機能する選択マーカーが当技術分野において周知であり、例えば、アンピシリン、カナマイシン、クロラムフェニコールまたはテトラサイクリンのいずれか1つに対する抵抗性を付与するポリペプチドをコードする配列を含む。アンピシリン(および他のベータラクタム系抗生物質)に対する抵抗性を付与するポリペプチドの例は、ベータラクタマーゼ(bla)酵素である。カナマイシン抵抗性は、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子の活性によってもたらされ得て、クロラムフェニコール抵抗性は、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼによってもたらされ得る。

10

#### 【0068】

例示的な導入遺伝子には、任意の組み換えタンパク質、または、例えば、ホルモン(例えば成長ホルモンなど)エリスロポエチン、抗体、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体(例えば、リツキシマブ)、抗体複合体、融合タンパク質(例えば、IgG融合タンパク質)、インターロイキン、CDタンパク質、MHCタンパク質、酵素および凝固因子が含まれる。抗体重鎖および抗体軽鎖は、別個のベクターから、または、2つの発現力セットを含む同一のベクターから発現され得る。

20

#### 【0069】

一実施形態において、本開示のポリヌクレオチドまたはベクターは、本開示のPRE配列に加えて、以下の要素のうちの1または複数、または、全部を含む。(a)下流UTRの逆相補鎖(RC-dUTR)下流配列(例えばウイルス配列由来)、(b)プロモーター(例えばウイルスのプロモーター)、(c)未翻訳領域(UTR)上流配列(例えばウイルス配列由来)、(d)イントロンA(例えばEFIGIアルファイントロン、または、ウイルス配列由来)、(e)UTR下流配列(例えば、ウイルスの3'UTR)。

30

#### 【0070】

一実施形態において、本開示のポリヌクレオチドまたはベクターは、本開示のPRE配列に加えて、(b)および(c)、(b)および(d)、(b)および(e)、(a)および(b)、(c)および(d)、(c)および(e)、または、(d)および(e)など、そのような要素のうちの少なくとも2つを含む。

#### 【0071】

一実施形態において、本開示のポリヌクレオチドまたはベクターは、本開示のPRE配列に加えて、(b)および(c)および(d)、(b)および(c)および(e)、(b)および(d)および(e)、(a)および(b)および(c)および(e)、(a)および(b)および(d)および(e)、(a)および(c)および(d)、(a)および(d)および(e)など、そのような要素のうちの少なくとも3つを含む。

40

#### 【0072】

一実施形態において、本開示のポリヌクレオチドまたはベクターは、本開示のPRE配列に加えて、(a)および(b)および(c)および(d)、(a)および(b)および(c)および(e)、(a)および(d)および(e)、(b)および(d)および(e)、(b)および(c)および(d)および(e)など、そのような要素のうちの少なくとも4つを含む。

#### 【0073】

上記の実施形態のいずれかにおいて、ポリアデニル化シグナルが任意で含まれ得る。

#### 【0074】

50

P R E 配列は、ベクターにおける任意の位置に配置され得るが、目的遺伝子と同一の方向であることが好ましい。一態様において、P R E 配列は、目的遺伝子の上流にある。別の態様において、P R E 配列は、目的遺伝子の下流にある。一態様において、P R E 配列は、目的遺伝子とポリアデニル化シグナルとの間に位置する。別の態様において、P R E 配列は、ポリアデニル化シグナルの下流にある。一態様において、P R E 配列は、目的遺伝子と3' UTRとの間に位置する。別の態様において、P R E 配列は3' UTRの下流にある。

## 【0075】

## [4. 細胞および細胞培養]

本開示は、細胞において組み換えポリペプチドを発現するための方法を提供する。方法は、本明細書に記載されているようなベクターを細胞内に導入する段階と、ベクターが一過的にまたは安定的に細胞内に維持される条件下で細胞を培養する段階とを備える。細胞は、CRISP/Cas9を用いた特異的挿入によって生成された安定的な細胞株などの、原核性または真核性の細胞であり得る。組み換えポリペプチドの発現に使用できる培養真核細胞は、当技術分野において周知である。そのような細胞には、真菌細胞（例えば酵母）、昆虫細胞、植物細胞および哺乳類細胞が含まれる。従って、本開示は、本明細書に記載されているようなベクターを含む細胞を提供する。

10

## 【0076】

例示的な酵母細胞には、これらに限定されないが、トリコデルマ・エスピ（*Trichoderma* sp.）、ピキア・パストリス（*Pichia pastoris*）、シゾサッカロミケス・ポンベ（*Schizosaccharomyces pombe*）、および、サッカロマイセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）が含まれる。例示的な昆虫細胞株には、これらに限定されないが、Sf9、Sf21、および、ドロソフィラS2（*Drosophila S2*）細胞が含まれる。例示的な植物細胞には、これらに限定されないが、アラビドブシス（*Arabidopsis*）細胞およびタバコBY2細胞が含まれる。

20

## 【0077】

組み換えポリペプチドの発現に有用な培養哺乳類細胞株には、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、ヒト胎児由来腎臓（HEK）細胞、ウイルス性形質転換HEK細胞（例えばHEK293細胞）、NS0細胞、SP20細胞、CV1細胞、ベビーハムスター腎臓（BHK）細胞、3T3細胞、Jurkat細胞、HeLa細胞、COS細胞、PERC.6細胞、CAP（登録商標）細胞、CAP-T（登録商標）細胞（後者の2つの細胞株は、ドイツ、ケルンのCevec Pharmaceuticalsによって市販されている）が含まれる。また、CHO細胞の多くの派生細胞、例えば、CHO-DXB11、CHO-DG-44、CHO-K1、CHO-Sなど、または、CHO-M、CK1SVCHO、CHOZNなどの操作されたCHO細胞が利用可能である。また、哺乳類初代細胞を使用できる。

30

## 【0078】

特定の実施形態において、細胞は無血清培地において培養される。例えば、患者に投与するための治療用タンパク質を製造するために、無血清培地において発現細胞を増殖させる必要がある。更なる実施形態において、細胞は、ポリペプチド発現に使用される前に、無血清培地における増殖のために事前に適応された。

40

## 【0079】

本明細書に記載されているようなベクターは、当技術分野において周知である方法を使用して、上記の細胞のいずれかに導入することができる。そのような方法には、これらに限定されないが、ポリエチレンギリコール（PEG）媒介法、電気穿孔、バイオリスティックデリバリ（すなわち、微粒子射出）、プロトプラスト融合、DEAEデキストララン媒介法、リン酸カルシウム共沈が含まれる。また、Sambrook et al.の「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」、Third Edition, Cold Spring Harbor Laborat

50

ory Press, 2001、ならびに、Ausubel et al. の「Current Protocols in Molecular Biology」、John Wiley & Sons, New York, 1987、および、定期的最新情報を参照されたい。

#### 【0080】

細胞培養のための標準的方法は、当技術分野において周知である。例えば、R. I. Freshney の「Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique」、Fifth Edition, Wiley, New York, 2005 を参照されたい。

#### 【0081】

##### [例]

本開示は、以下の例を参照することによって更に理解されるが、これらの例は本発明の単なる例示に過ぎないものとする。本発明の範囲は、例示されている実施形態によって限定されない。これらの実施形態は、発明の一態様の説明に過ぎないものとする。機能的に同等である任意の方法は、本発明の範囲内にある。本明細書に記載のものに加えて、本発明の様々な修正形態が、上記の説明および付属図面から、当業者にとって明らかとなるであろう。そのような修正形態は、添付の特許請求の範囲に属する。

#### 【0082】

##### [例1: P R E配列を試験するためのベクター]

この例において、抗CD20抗体リツキシマブの軽鎖をコードする配列を含むベクター(pCT2.1)を使用して、トランスフェクションされた細胞におけるmRNA量に対する複数の異なるP R E配列の影響を試験した。

#### 【0083】

pCT2.1ベクターの概略図を図4に示す。軽鎖遺伝子の上流において、ベクターは、ヒトサイトメガロウイルスの主要最初期(MIE)プロモーター、5'未翻訳領域およびインtron Aを含む。軽鎖遺伝子の下流において、ベクターは、ウシ成長ホルモン(BGH)ポリアデニル化シグナルを含む。また、ベクターは、原核生物の複製起点(ori)、および、原核細胞における選択のためのマーカー(bla)、ならびに、真核生物の選択カセットを含む。真核生物の選択カセットは、SV40早期プロモーターおよびSV40早期ポリアデニル化シグナルの転写制御下にある選択可能マーカー(GS/puro/DHFR/Neo)を含む。

#### 【0084】

##### [例2: P R E機能を試験するためのアッセイシステム]

軽鎖発現量に対する、複数の異なるP R E、修飾されたP R E、および、ハイブリッドP R Eの影響は、軽鎖濃度の測定前に電気穿孔によって、リツキシマブ軽鎖を発現する、P R Eを含むプラスミドをCHO細胞の中に導入することによって試験された。試験された各P R Eについて、P R Eの配列が化学的に合成され、次に、軽鎖配列とBGHポリアデニル化シグナルとの間に位置するpCT2.1ベクターにおけるBamHI部位に挿入された(図4を参照されたい)。

#### 【0085】

これらの実験のために、CHO K1細胞が無血清培地に適応され、電気穿孔を使用してトランスフェクションされた。各トランスフェクションについて、Gene Pulser IIエレクトロポレーター(BioRad, カリフォルニア州ハーキュリーズ)を使用し、製造元によって推奨される条件を使用して、pMax GFPプラスミドをP R E試験ベクターと共に(各プラスミドの比率は1:10)トランスフェクションさせた。

#### 【0086】

電気穿孔の後、細胞をT25フラスコまたは6ウェルプレート無血清培地(Gibco/Life Technologies、ニューヨーク州グランドアイランド)へ移した。37度24時間培養後、ViCellカウンタ(Beckman Coulter、インディアナ州インディアナポリス)を使用して生細胞密度(VCD)および細胞生存率

10

20

30

40

50

を決定した。24時間後、Accuric 6 Reader (Becton Dickinson son、ニュージャージー州フランクリンレイクス)を使用してGFP発現を測定し、リツキシマブ軽鎖の濃度を決定するためにサンプルを保存した。

#### 【0087】

リツキシマブ軽鎖の濃度は、トランスフェクションの24時間後および48時間後にサンドイッチELISAによって決定された。ELISAのために、プレートをヤギ・ポリクローナル抗ヒトIgG捕捉抗体 (Jackson Immuno Research、ペンシルベニア州ウェストグローブ)でコーティングした。ホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) 標識ヤギ・モノクローナル抗ヒトカッパ軽鎖Cat. No. AP502P (Millipore) を検出抗体として使用した。ペルオキシダーゼ活性を測定するために、o-フェニレンジアミン (OPD) が基質として使用され、BMG POLAR Starマイクロプレートリーダー (MTX Lab Systems、バージニア州ヴィーナ) を用いて480 nmにおける吸光度が測定された。

10

#### 【0088】

##### [例3: PRE配列の比較]

表3に示されている多くの異なるPRE配列を試験するために、例2に記載のアッセイシステムを使用した。試験PRE配列は、リツキシマブ軽鎖配列とBGHポリアデニル化部位との間に位置するBamHI部位で、pCT2.1ベクター (上の例1) 内に挿入された。

20

#### 【0089】

プラスミドの各々は、例2に記載されているように、電気穿孔によって、浮遊培養された無血清培地適応CHOK1細胞にトランスフェクションされ、トランスフェクションの24時間後および48時間後の両方に、リツキシマブ軽鎖の濃度が測定された。ELISAアッセイから得られた抗体濃度をGFPの平均蛍光強度で割ることによって、異なるサンプル間で軽鎖発現を標準化され、標準化された軽鎖発現量が測定された。

#### 【0090】

表7は、例において試験されたPREのサブエレメント構造を示す。

[表7: 例において試験されたPRE (''は、サブエレメントが無いことを示す)]

30

#### 【表15】

構築物	$\gamma$	$\alpha$	$\beta$
2.1(対照)	-	-	-
2.0(WPRE)	WPRE	WPRE	WPRE
2.10(ASPRE)	ASPRE	ASPRE	ASPRE
2.21	-	BPRE	HPRE
2.22	-	BPRE*	HPRE
2.23	GSPRE	GSPRE	HPRE
2.24	GSPRE*	GSPRE*	HPRE
2.4	WPRE	GSPRE	GSPRE
2.5	-	WPRE	HPRE
2.52	WPRE	GSPRE	HPRE
2.7	-	HPRE	WPRE
2.8(GSPRE)	GSPRE	GSPRE	GSPRE
2.9(BPRE)	BPRE	BPRE	BPRE

40

\*変異サブエレメント

#### 【0091】

図5は、トランスフェクションの2日後および4日後に、多くのPRE構築物を比較した結果を示す。構築物2.0(WPRE)および2.8(GSPRE)は、同様の効力を有する。しかしながら、GSPREにおけるサブエレメントがWPREのサブエレメントと置き換えられたとき、融合構築物(2.4)は、WPREまたはGSPREのいず

50

れかより 33% 強力であった。このことは、WPRE のサブエレメントが GSPRE より強く、一方、GSPRE の他のサブエレメント（例えば、サブエレメント）が WPRE より強い可能性があることを実証している。

【0092】

BPRE (2.9) は、3つの要素を全部含んでいるが、それでも BPRE は WPRE より遙かに弱い。このことは、三成分である（すなわち、3つのサブエレメントを全部含む）からといって PRE 要素が強力になるわけではないことを示唆している。むしろ、その強度の大部分は、各個別のサブエレメントの強度に依存する。同様に、二成分構築物 2.5 は、三成分構築物 2.8、2.9 および 2.10 より強い。

【0093】

上記の発見に基づき、この例では、構築物 2.21 (BPRE のサブエレメントを削除し、そのサブエレメントを HPRE のものと置き換えた)、2.22 (サブエレメントに点変異を導入した)、2.23 (GSPRE のサブエレメントを HPRE のものと置き換えた)、および、2.24 (2.23 のおよび サブエレメントの各々に点変異がある) を更に設計した。

【0094】

比較を図 6 に示す。構築物 2.21、2.5、2.6 および 2.7 は、任意のサブエレメントが欠如した PRE であるが、それでもすべて、サブエレメントを含む WPRE と同じくらい良いか、または、より優れている。従って、この実験から、PRE 要素の強度がサブエレメントの数より、各サブエレメントの強度に依存することが更に確認された。

【0095】

これらの PRE 構築物は再度、8 回繰り返して試験された。その結果は、図 7A および図 7B に示されている。BPRE および HPRE (2.21) の組み合わせは、発現量がもっとも高いものの 1 つであり、発現量が 72% 増加した。しかしながら、(2.22) における点変異は、発現量を 19% だけ増加させる構築物をもたらす。更に、2.21 のサブエレメントをノックアウトすると、構築物の有効性が 26% になる。このことは、BPRE サブエレメントの重要性を示唆している。

【0096】

GSPRE のサブエレメントを HPRE のサブエレメントで置き換えたもの (2.23) は、発現量が 46.6% 増加し、一方、WPRE ガンマ置換 (2.4) では、発現量が 33% 増加した。従って、HPRE のサブエレメントは、WPRE のサブエレメントより強力である。

【0097】

従来は、「転写後調節効果の強度は、RNA におけるサブエレメントの数によって決定される」 (Doneollo et al., J Virol. 1998 Jun; 72 (6): 5085-5092 at 5085) と考えられていた。しかしながら、本実験はここで、BPRE のアルファ、HPRE のベータ、および、WPRE のガンマ要素の各々を、それぞれの分子の機能におけるもっとも重要な部分として示している (2.21 および 2.22、2.23 および 2.8、2.4 および 2.8)。従って、従来の理解とは対照的に、本研究は、PRE の強度はサブエレメントの数に依存せず、各サブエレメントの強度に依存することを示している。

【0098】

図 8A および図 8B は、構築物 2.52 を 2.0 および 2.1 と比較する、2 つの実験の集計データを示している。4 日目において、pCT2.52 (WPRE ガンマ + GSPRE アルファ + HPRE ベータ) は、2.0 (WPRE) より 2 倍強い。また、pCT2.0 (WPRE) は、発現量が最高に到達した後に発現量が一定に留まるので、対照に対する優位性を次第に失うが (図 8B における 4 日目を図 8A における 2 日目と比較)、一方、新しく設計されたキメラ pCT2.52PRE は、対照と併せて発現量が増加し続けたことに留意することも興味深い。

10

20

30

40

50

## 【0099】

P R E 構築物は全部、8回反復して再度試験され、最終データは、上の表2に示されている。

## 【0100】

[例4：天然型P R Eと他の調節要素との間の相互作用]

この実験では、P R Eと他の調節要素との間の関係を試験した。下の表8に列挙された構築物は、示されているプロモーターまたは他の調節要素を含んでいる。更に、構築物2.52、2.53および2.54は、2.52について表2に示されているようなP R Eサブエレメントを含む。これらには、W P R Eのサブエレメント、G S P R Eのサブエレメント、H P R Eのサブエレメントが含まれる。構築物2.0、2.36、2.39および2.50は、天然型W P R E（すなわち、全部W P R Eに由来する、サブエレメント）を含み、構築物2.1、2.32、2.37および2.51は、任意のP R E要素を含まない。

10

[表8：例において試験された構築物（「」は、要素が欠如していることを示す）]

## 【表16】

構築物	d-UTR の RC	CMVプロモーター	U-UTR	イントロン A	d-UTR
2.52	有	有	有	有	有
2.53	-	有	有	-	-
2.54	-	有	-	-	-
2.0/2.1	有	有	有	有	有
2.36/2.32	有	有	有	-	-
2.39/2.37	有	有	-	-	-
2.50/2.51	-	有	-	-	-

20

## 【0101】

図9Aは、R C - d U T R、U - U T R、イントロンAおよび/またはd - U T Rが構築物から除去されたとき、構築物2.52（すなわち、W P R Eのサブエレメント、G S P R Eのサブエレメント、H P R Eのサブエレメント）のキメラP R Eの有効性が減少したことを示す。驚くべきことに、そのような除去は、W P R Eについて顕著な負の影響を示さなかった（図9Bにおける構築物2.0、2.32、2.37、2.50を比較）。対照として、P R E要素が使用されなかったとき、これらの更なる調節要素の除去は、負の影響を与えた（図9Bの左半分を参照）。

30

## 【0102】

従って、この実験は、天然型W P R E要素が、更なる調節要素、R C - d U T R、U - U T R、イントロンAまたはd - U T Rのうちの1または複数の存在による恩恵を受けなかつたことを示唆する。天然型W P R E、および、これらの調節要素のうちの1または複数は、冗長な機能を有し得ると考えられる。また、これらの調節要素のうちの1または複数と天然型W P R E要素との間の他の種類の相互作用もあり得る。そのような非生産的相互作用が、試験されたキメラP R E要素では観察されなかつたことも、そのようなキメラP R E要素の予想外の利点を更に強調する。

40

## 【0103】

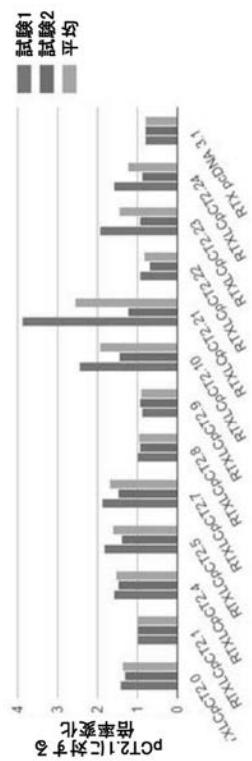
本発明は、上記の実施形態と併せて説明されたが、上記の説明は例に過ぎず、本発明の範囲を限定するものではなく説明することを意図していることを理解されたい。本発明の範囲における、他の態様、利点および修正形態は、本発明に関連する当業者にとって明らかであろう。

## 【0104】

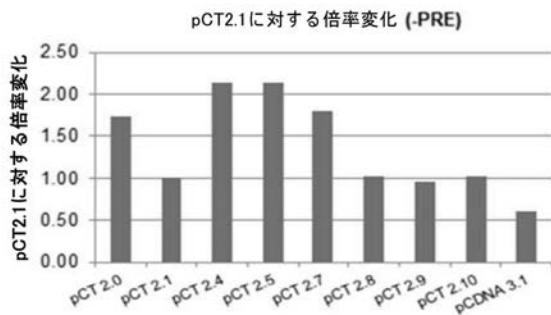
50



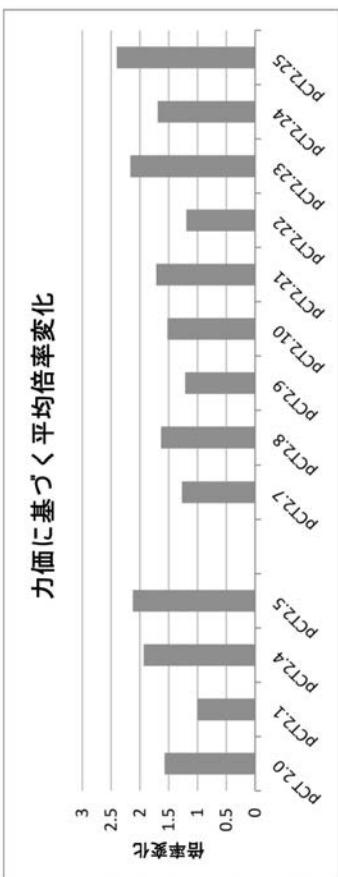
【図6】



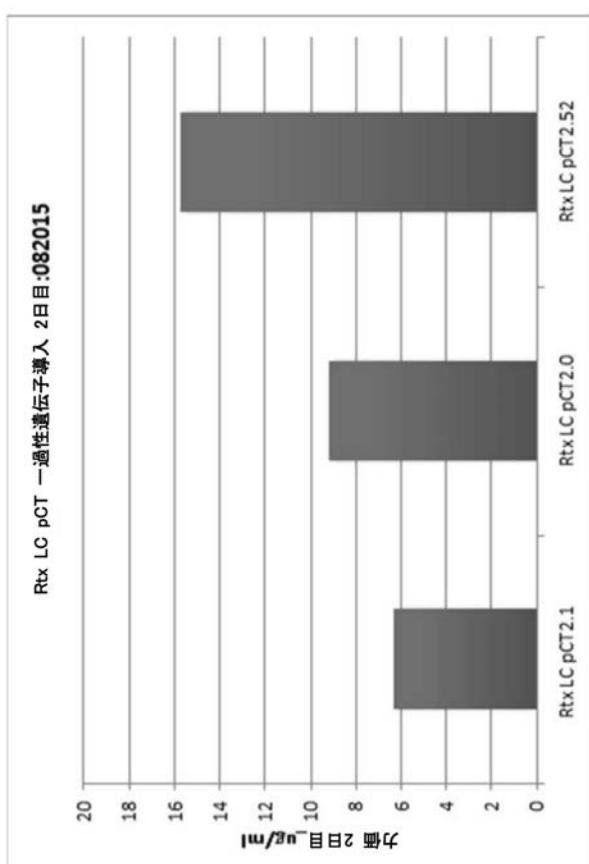
【図7 A】



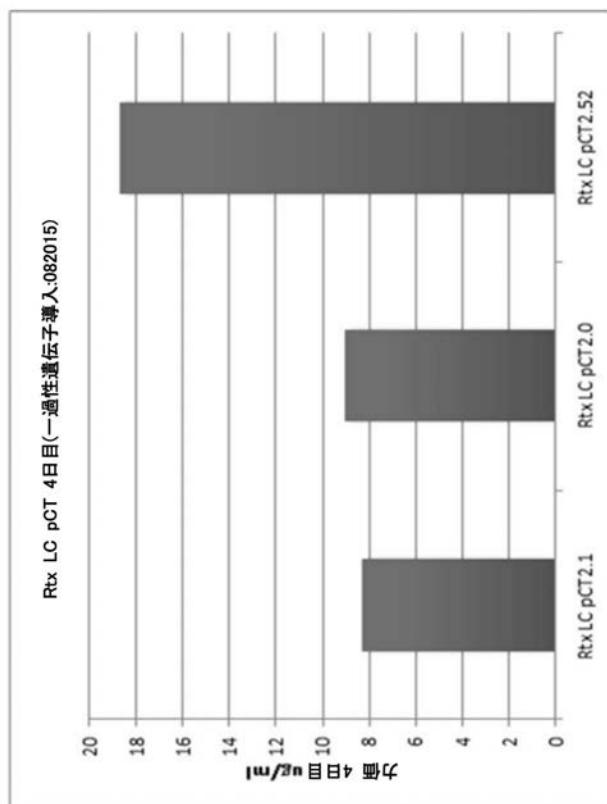
【図7 B】



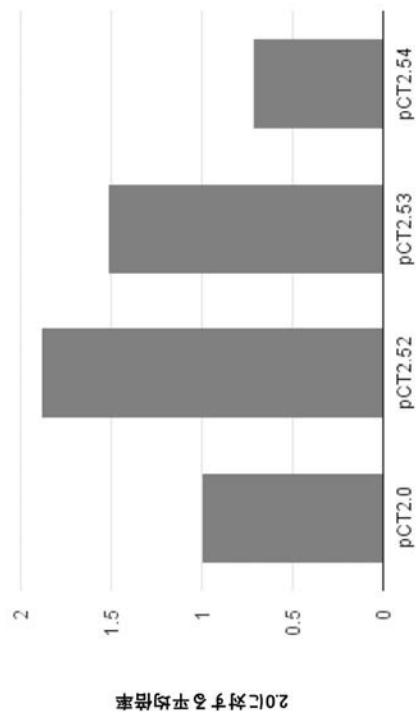
【図8 A】



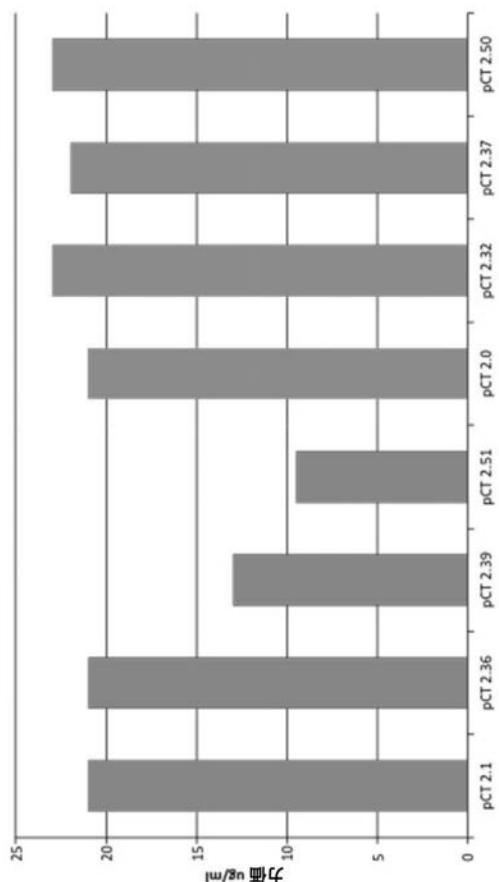
【図 8 B】



【図 9 A】



【図 9 B】



【配列表】

2018534946000001.app

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/US 16/59151
--

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - C12N 15/36, 15/86, 15/85; C07K 14/02; C12Q 1/68 (2017.01) CPC - C12N 2830/00, 2830/48, 2730/10043, 15/85, 15/86, C12Q 1/6897
--

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

<b>B. FIELDS SEARCHED</b>
---------------------------

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
---

See Search History Document
-----------------------------

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

See Search History Document
-----------------------------

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

See Search History Document
-----------------------------

<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>
---

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y --- A	US 6,287,814 B1 (Hope et al.) 11 September 2001 (11.09.2001). Especially col 4 ln 8-9, sheet 1 fig 1B, sheet 2 fig 1C, sheet 11 fig 8A, SEQ ID NO: 1	12, 13, 15(12,13), 20, 22/20 1-5, (7,8)/(3-5), 9, 10, 19, 22/19
Y --- A	US 2015/0291975 A1 (DNA2.0 Inc.) 15 October 2015 (15.10.2015). Especially SEQ ID NO: 104	12, 13, 15(12,13), 20, 22/20 1-5, (7,8)/(3-5), 9, 10, 19, 22/19
A	GenBank Accession K02715.1 Ground squirrel hepatitis virus (GSHV), complete genome [online] 10 February 1994 [retrieved 24 January 2017]. Available on the internet: < <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/K02715">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/K02715</a> >. Especially pg 2.	1-5, (7,8)/(3-5), 9, 10, 19, 22/19

<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.	<input type="checkbox"/>
---	--------------------------

* 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 28 March 2017	Date of mailing of the international search report 05 MAY 2017
--	---

Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774
---	--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 16/59151
Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)		
<p>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:</p> <p>a. <input type="checkbox"/> forming part of the international application as filed: <input checked="" type="checkbox"/> in the form of an Annex C/ST.25 text file. <input type="checkbox"/> on paper or in the form of an image file.</p> <p>b. <input type="checkbox"/> furnished together with the international application under PCT Rule 13<i>ter</i>.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.</p> <p>c. <input checked="" type="checkbox"/> furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only: <input checked="" type="checkbox"/> in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13<i>ter</i>.1(a)). <input type="checkbox"/> on paper or in the form of an image file (Rule 13<i>ter</i>.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).</p> <p>2. <input checked="" type="checkbox"/> 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.</p> <p>3. Additional comments: GenCore ver 6.4.1 SEQ ID NOS: 3, 7, 14</p>		

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 16/59151

## Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
  
  
  
  
2.  Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
  
  
  
  
3.  Claims Nos.: 18, 23-26 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:  
----Go to Extra Sheet for continuation----

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
  
  
  
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-5, (7-8) (in part), 9, 10, 12, 13, 15 (in part), 19, 20, 22 (in part) limited to SEQ ID NOS: 14, 3, 7

## Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 16/59151

----continued from Box III (Lack of Unity of Invention)-----

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

**Group I+:** Claims 1-17, 19-22, drawn to a polynucleotide having first, second and third fragments. The polynucleotide will be searched to the extent that the first, second and third fragment encompass SEQ ID NOs: 14, 3, and 7, respectively. It is believed that claims 1-5, (7-8) (in part), 9, 10, 12, 13, 15 (in part), 19, 20, 22 (in part) read on this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass a nucleic acid consisting of SEQ ID NOs: 14, 3, 7. Additional polynucleotide(s) will be searched upon payment of additional fees. Applicant must specify the claims that encompass any additional elected polynucleotide(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which read on the first named invention if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An exemplary election would be: a polynucleotide having first, second and third fragment comprising SEQ ID NOs: 5, 3, and 7, respectively (claims 12, 13, 15 (in part), 16, 17, 20, 21, 22 (in part)).

The inventions listed as Group I+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

## Special Technical Features:

Among the Inventions listed as Groups I+ are the specific polynucleotide fragments, recited therein. The inventions do not share a special technical feature, because no significant structural similarities can readily be ascertained among polynucleotide fragment sequences.

## Common Technical Features:

1. Group I+ claims share the common technical feature of a polynucleotide comprising:  
(a) a first fragment consisting of the nucleic acid sequence and (b) a second fragment consisting of the nucleic acid sequence.
2. Groups I+ claims further comprise a post-transcriptional regulatory element (PRE). Some claims include an alpha PRE and other claims include a gamma PRE.
3. In Group I+, some claims share the common technical feature of a protein coding sequence.

However, said common technical feature does not represent a contribution over the prior art, and is anticipated by the publication titled "Woodchuck hepatitis virus contains a tripartite posttranscriptional regulatory element" by Donello et al. (hereinafter "Donello") [published June 1998 in J Virol Vol 72 No 6 Pages 5085-5092].

As to common technical features #1, #2, and #3, Donello teaches (abstract; We find that the closely related woodchuck hepatitis virus (WHV), which has been shown to lack a functional enhancer I, also contains a posttranscriptional regulatory element (WPRE). Deletion analysis suggests that the WPRE consists of three independent subelements. Comparison of the bipartite HBVPRE and tripartite WPRE activities reveals that the tripartite WPRE is two to three times more active than the bipartite HBVPRE"; pg 5086 fig 1B; Comparison of the PRE and enhancer I regions of HBV and WHV. The darkened regions correspond to the open reading frames of the polymerase (Pol) and X proteins. The regions containing the HPRE.alpha and HBVPRE.beta subelements are indicated. Homologous nucleotides (nt) are aligned, and the fragments are drawn to scale"; pg 5091, fig 6A; FIG. 6. Tripartite PRE are stronger than bipartite elements. (A) Schematic representation of transfected constructs. Fragments, chimeric elements, and WPRE.alpha (Wa), WPRE.beta (Wb), and WPRE.gamma (Wg) subelements are marked').

As the common technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered common special technical feature that would otherwise unify the groups. The Inventions lack unity with one another.

Therefore, Groups I+ lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. F I テーマコード(参考)  
C 1 2 N 15/63 (2006.01) C 1 2 N 15/63 Z

(81) 指定国 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,R0,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,JP,KE,KG,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,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA

(72) 発明者 ゴエル、アミタ

アメリカ合衆国、9 4 5 8 7 カリフォルニア州、ユニオン シティー スイート 8 2 6、ア  
ルヴァラド - ナイルズ ロード 3 2 9 8 0 セルテオン コーポレイション内

F ターム(参考) 4B065 AA01X AA57X AA72X AA87X AA96Y AB01 AC03 BA02 CA24 CA44