

(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 I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/113 Z N A Z	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
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
(86) (22) 出願日	平成28年10月27日 (2016.10.27)		セルテオン コーポレイション
(85) 翻訳文提出日	平成30年6月11日 (2018.6.11)		アメリカ合衆国、94587 カリフォル
(86) 国際出願番号	PCT/US2016/059151		ニア州、ユニオン シティー スイート
(87) 国際公開番号	W02017/075237		826、アルヴァラドーナイルズ ロー
(87) 国際公開日	平成29年5月4日 (2017.5.4)		ド 32980
(31) 優先権主張番号	62/246,841	(74) 代理人	110000877
(32) 優先日	平成27年10月27日 (2015.10.27)		龍華国際特許業務法人
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(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
			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 (PRE) およびベクターに関する。PREは、複数の異なる天然型PRE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、

(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。

【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、

(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、

(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

チド構築物。

【請求項 2 4】

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 2 3 に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 2 5】

ポリ(A)配列を更に備える、請求項 1 8 から 2 4 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 2 6】

請求項 1 8 から 2 5 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】

10

【背景技術】

【0001】

〔関連出願の相互参照〕

本出願は、米国特許法第 1 1 9 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 日に提出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。

20

【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、Donello et al. (1998) J. Virol 72: 5085 - 5092 を参照されたい。

30

【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。

40

【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

50

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。いくつかの態様において、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。いくつかの態様において、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。

【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。いくつかの態様において、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。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)のガンマサブエ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。

【 0 0 1 5 】

更に、一実施形態において、(a) S E Q I D N O : 7 の核酸配列、または、S E Q I D N O : 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 (P R E) 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) S E Q I D N O : 3 の核酸配列、または、S E Q I D N 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 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。

【 0 0 1 6 】

10

更に、一実施形態において、(a) S E Q I D N O : 5、9 もしくは 18 の核酸配列、または、S E Q I D N O : 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) S E Q I D N O : 3 の核酸配列、または、S E Q I D N 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更に提供される。

【 0 0 1 7 】

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' U T R を更に含む。一態様において、3' U T R 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。

20

【 0 0 1 8 】

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 】

【 0 0 1 9 】

【 図 1 】 様々な サブエレメントの多重整列を示す。

【 0 0 2 0 】

【 図 2 】 様々な サブエレメントの多重整列を示す。

【 0 0 2 1 】

30

【 図 3 】 様々な サブエレメントの多重整列を示す。

【 0 0 2 2 】

【 図 4 】 P R E 要素の試験に使用されるプラスミド (p C T 2 . 1) の概略図を示す。異なる複数の P R E をリツキシマブ軽鎖コード配列と B G H ポリアデニル化シグナルとの間の B a m H I 部位にクローニングした。

【 0 0 2 3 】

【 図 5 】 いくつかの P R E 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 ($\mu\text{g} / \text{mL}$) を示す。

【 0 0 2 4 】

【 図 6 】 多くの P R E 構築物の発現量の相対的な倍率変化 (f o l d c h a n g e) を示す (棒線 : 試験 1、試験 2、平均)。

40

【 0 0 2 5 】

【 図 7 A 】 示された多くの P R E 構築物の発現量の相対的な倍率変化を示す。

【 図 7 B 】 示された多くの P R E 構築物の発現量の相対的な倍率変化を示す。

【 0 0 2 6 】

【 図 8 A 】 2 日目における構築物 p C T 2 . 5 2 の強度を W P R E (p C T 2 . 0) および対照である p C T 2 . 1 と比較している。

【 図 8 B 】 4 日目における構築物 p C T 2 . 5 2 の強度を W P R E (p C T 2 . 0) および対照である p C T 2 . 1 と比較している。

【 0 0 2 7 】

50

【図 9 A】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 9 B】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、もしある場合、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を含む。

20

【0031】

[2 . キメラ転写後調節要素 (PRE)]

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 (PRE) 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 PRE がウッドチャック肝炎ウイルス (WHV) に存在し、WHV PRE または WPRE として知られている。同様に、ヒト B 型肝炎ウイルス PRE は、HPRE と呼ばれている。WPRE 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、PRE 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 PRE 配列（例えば HPRE）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 (PRE) および サブエレメント (PRE) を含み（従って二成分）、一方、他の配列（例えば WPRE）は、追加のサブエレメントである サブエレメント (PRE) 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】

PRE 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。Donello et al. は、「HPRE および HPRE 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っと

50

も高いことを示唆している」と説明している (Donello et al., J Virol. 1998 Jun; 72(6): 5085-5092 at 5085)。Donello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 (posttranscriptional 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。

【0035】

WPREおよびHPREに加えて、他のPRE配列が、コウモリ (BPRES)、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)。

[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

【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	γ	α	β	相対的活性 (対照に対する倍率)
2.52	WPRES	GSPRES	HPRES	2.5
2.23	GSPRES	GSPRES	HPRES	2.16
2.5	-	WPRES	HPRES	2.12
2.4	WPRES	GSPRES	GSPRES	1.94
2.21	-	BPRES	HPRES	1.72
2.8 (GSPRES)	GSPRES	GSPRES	GSPRES	1.63
2.0 (WPRES)	WPRES	WPRES	WPRES	1.57
2.10 (ASPRE)	ASPRE	ASPRE	ASPRE	1.52
2.7	-	HPRES	WPRES	1.27
2.9 (BPRES)	BPRES	BPRES	BPRES	1.21
2.1 (Control)	-	-	-	1

【 0 0 3 7 】

表 2 から分かるように、G S P R E 由来の サブエレメント、H P R E 由来の サブエレメント、および、W P R E 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) 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、任意で H P R E の サブエレメント、(2) W P R E の サブエレメント、H P R E の サブエレメント、(3) W P R E 、B P R E または A S P R E の サブエレメント、H P R E の サブエレメント、任意で サブエレメント。

【 0 0 3 8 】

従って、本開示の一実施形態によれば、G S P R E の サブエレメント (G S P R E) および H P R E の サブエレメント (H P R E) 、任意で サブエレメントを含むキメラ P R E 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。

【 0 0 3 9 】

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 6 0 % 、 6 5 % 、 7 0 % 、 7 5 % 、 8 0 % 、 8 5 % 、 9 0 % 、 9 5 % 、 9 8 % 、または、代替的に、9 9 % 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。

【 0 0 4 0 】

この組み合わせの任意の サブエレメントは、いずれかの P R E 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、W P R E 、G S P R E 、B P R E または A S P R E に由来する。一態様において、サブエレメントは、W P R E または G S P R E に由来する。一態様において、サブエレメントは W P R E である。

【 0 0 4 1 】

別の実施形態において、キメラ P R E は、W P R E に由来する サブエレメント (W P R E) 、任意の P R E に由来する サブエレメント、H P R E に由来する サブエレメント (H P R E) 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、G S P R E 、H P R E 、W P R E 、B P R E もしくは A S P R E 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。

【 0 0 4 2 】

別の実施形態において、キメラ P R E は、W P R E 、B P R E または A S P R E の サブエレメント、および、H P R E の サブエレメント (H P R E) 、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 W P R E に由来する。一態様において、サブエレメントは B P R E に由来する。一態様において、サブエレメントは A S P R E に由来する。一態様において、サブエレメントは W P R E に由来する。一態様において、サブエレメントは G S P R E に由来する。

【 0 0 4 3 】

キメラ P R E 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。

【 0 0 4 4 】

キメラ P R E 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

10

20

30

40

50

つのサブエレメントは全部、同一の方向である。一態様において、サブエレメントの順序は、上流から下流の順に、

または、である。一態様において、上記の順序のいずれかにおいて、サブエレメントのみが逆方向である。一態様において、上記の順序のいずれかにおいて、サブエレメントのみが逆方向である。一態様において、上記の順序のいずれかにおいて、サブエレメントのみが逆方向である。

【0045】

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もよい。

10

【0046】

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。

【0047】

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。

20

【0048】

更に、本開示のキメラPRE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く、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の後にある。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の後にある。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との間にある。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。

30

【0049】

HPRE、WPRE、GSPRE、BPREおよびASPRE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。

40

[表3：天然型のHPRE、WPRE、GSPRE、BPREおよびASPRE、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 AAACAGGCOCT ATTGATTGGA AAGTTTGTC ACGAATTGTG GGTCTTTTGG 51 GGTTTGCTGC CCCTTTTACG CAATGTGGAT ATCCTGCTTT AATGCCTTTA 101 TATGCATGTA TACAAGCAAA ACAGGCTTTT ACTTCTCTGC CAACTTACAA 151 GGCTTTTCTC AGTAACAGT ATATGACCOCT TTACCCCGTT GTCGCGCAAC 201 <u>GGCTGGGTCT GTGCCAAGTG TTTGCTGACG CAACCCCAAC TGGTTGGGGC</u> 251 <u>TGCGCCATAG GCCATCAGCG CATGCGTGGA ACCTTTGTGT CTCTCTGCCC</u> 301 <u>GATCCATACT GCGGAACCTC TAGCCGCTTG TTTTGCTGCG AGCAGGTCTG</u> 351 <u>GAGCAACCT CATCGGGACC GACAATTCTG TCGTACTCTC CGCAAGTAT</u> 401 <u>ACATCGTTTC CATGGCTGCT AGGCTGTGCT GCGAAGTGGT ACCTGCGCGG</u> 451 <u>GACGTCCTTT GTTTACGTCC CGTCGGCGCT GAATCCCGCG GACGACCCCT</u> 501 <u>CCCGGGGCGG CTGGGGGCTC TACCGCCCGG TTCTCCGTCT GCGTACCGCT</u> 551 <u>CCGACCCACG GCGGCACCTC TCTTTACGGG GACTCCCGGT CTGTGCCTTC</u> 601 <u>TCATCTGCGG GACCGTGTGC ACTTCGCTTC ACCTCTGCAC GTGCGATGGA</u> 651 <u>GACCAACCGT AACGCCCAAC GGAACTCTGC CAAGGTCTTG CATAAGAGGA</u> 701 <u>CTCTTGGAAT TTCAGCAATG TC</u>
HPRE α (SEQ ID NO: 2)	1 GTTGCTCGGC AACGGCOCTG TCTGTGCCAA GTGTTTGCTG ACGCAACCCC 51 CACTGGTTGG GGCTTGGCCA TAGGCCATCA GCGCATGCGT GGAACCTTTG 101 TGCTCTCTCT GCGATCCAT ACTCGGGAAC TCCTAGCCCG TTGTTTGTCT 151 CGCAGCAGGT CTGGAGCAAA CCTCATCGGG ACGACAATT CTGCTGTAAT 201 CTCCCGCAAG TATACATGCT TTCCATGGCT GTAGGCTGT GTGCGCAACT 251 GGTACCTGCG C
HPRE β (SEQ ID NO: 3)	1 GGGACGTCTT TGTTTACGT CCCCTCGGCG CTGAATCCCG CGGACGACCC 51 CTCCCGGGGG CGCTTGGGGG TCTACCGCCC GCTCTCCGCT CTGCGCTACC 101 GTCCGACCAC GGGGCGCAAC TCTCTTTACG CGGACTCCCC GTCTGTGCTT 151 TCTCATCTGC CGGACCGGCT GC

次頁に続く

10

20

【表 4】

前頁から続く

WPRE (SEQ ID NO: 4)	1 GATCCAATCA ACCTCTGGAT TACAAAATTT GTGAAAGATT GACTGGTATT 51 <u>CTTAACATATG TTGCTCCTTT TACGCTATGT GGATACGCTG CTTTAATGCC</u> 101 <u>TTTGTATCAT GCTATTGCTT CCCGTATGGC TTTCAATTTT TCCTCCTTGT</u> 151 <u>ATAAACTCCTG GTTGCTGTCT CTTTATGAGG AGTTGTGGCC CGTTGTACAG</u> 201 <u>CAACGTGGCG TGSTGTGCAC TGTGTTTGCT GACGCAACCC CCACTGGTTG</u> 251 <u>GGGCATTGCC ACCACCTGTC AGCTCCTTTC CGGACTTTTC GCTTCCCCC</u> 301 <u>TCCCTATTGC CACGGCGGAA CTCATCGCGG CCGCTCTGCG CCGTGTGCTG</u> 351 <u>ACAGGGGCTC GGCTGTTGGG CACTGACAAT TCCGTGCTGT TGTGGGGGAA</u> 401 <u>GCTGACGTCC TTTCCATGGC TGCTCGCCTG TGTGCGCACC TGGATTCTGC</u> 451 <u>GCGGGACGTC CTTCTGCTAC GTCCCTTCGG CCCTCAATCC AGCGGACCTT</u> 501 <u>CCTTCCCGCG GCCTCTGCGC GGCTCTGCGG CCTCTTCGCG GTCTTGCCTT</u> 551 <u>TGCGCCCTCAG ACGAGTCGGA TCTCCCTTTG GGCGCGCTCC CCGCTGGGA</u> 601 <u>TC</u>
WPRE α (SEQ ID NO: 5)	1 GTTGTCAGGC AACGTGGCCT GGTGTGCACT GTGTTTGCTG ACGCAACCCC 51 CACTGGTTGG GGCATTGCCA CCACCTGTCA GTCCTTTTCC GGGACTTTCC 101 CTTTCCCCCT CCCTATTGCC ACGGGGGAAC TCATCGCCCG CTGCGCTTGC 151 CGCTGCTGGA CAGGGGCTCG GCTGTTGGG ACTGACAATT CCGTGGTGT 201 GTCGGGGAAG CTGACGTCTT TTCCATGGCT GTCGCGCTGT GTTGCCACCT 251 GGATTCTGCG C
WPRE β (SEQ ID NO: 6)	1 GGGACGTCTT TCTGCTACGT CCCTTCGGCG CTCATCCAG CGGACCTTCC 51 TTCCCGCGGC CTGCTGCGCG CTCTGCGGCG TCTTCCCGCT CTTGCGCTTC 101 GCGCTCAGAC GAGTCGGATC TCCCTTTGGG CGGCTCCCC GCGTGGGATC
WPRE γ (SEQ ID NO: 7)	1 AATCAACCTC TGGATTACAA AATTTGTGAA AGATTGACTG GTATTCTTAA 51 CTATGTTGCT CTTTATAGCG TATGTGATA CGCTGCTTTA ATGCGTTTGT 101 ATCATGCTAT TGCTTCCCGT ATGGCTTTCA TTTTCTCCTC CTGTATATAA 151 TCCTGGTTGC TGTCTCTTTA TGAGGAGTTG TGGCCC

次頁に続く

30

40

【表 5】

前頁から続く

BPRE (SEQ ID NO: 8)	1	AACAAGCCTT TGGATTGGAA AATCCTTCAG CGCATTACGG GTCTCCTGGG
	51	GTTTCTTGCA CCCTTCACGA CCGTGGGCTA TCCAGCCCTA ATGCTTTTGT
	101	ACCATGCCAT TACCCGGGCG CAGGCCTTAA AAATTTCTCG GCCCTTTAAG
	151	ACCTTTCTTT ACAGCCTGTA CAAGCAACCT TTGCCGCTTA TCAGGCAGAA
	201	GCGGGCAATC TGCCAGGTGT TTGCTGACGC AACCCCACT GGTGGGGGCC
	251	TGGTTAATCA TTCCTCCGCA TGGTTGCGCA GGGGACGGTT TCCCGGCCCC
	301	TTGCCATATCC ATTGCGCGGA ACTTATTGCC GCGTGCCTTG CTCGCCGCTG
	351	GACGGGAGCT CGGGTTATTG GAACTGACAA TTCCATTGTG GCTTCGGGAA
	401	AGCGGACATC TTTCCCATGG CTGCTGGGCT GCGTTGCCAA CTGGATGCTT
	451	CGGGGAACGT CGTTCTGCTT CGTCCCTCTC GCATTGAATC CGCGGACGCG
BPRE α (SEQ ID NO: 9)	1	GTTATCAGGC AGAAGCGGGC AATCTGCCAG GTGTTTGCTG ACGCAACCCC
	51	CACTGGTTGG GGCCTGGTTA ATCATTCCCTC CGCATGGTTG CGCAGGGGAC
	101	GGTTTCCCCG CCGCTTGCTT ATCCATTGCG CGGAATTAT TGCCGCGCTGC
	151	CTTGCTCGCC GCTGGACGGG AGCTCGGGTT ATTGGAACTG ACAATTCCAT
	201	TGTGGCTTCG GGAAGCGGA CATCTTTCCC ATGGCTGCTC GGCTGCGTTG
	251	CCAACTGGAT GCTTCGGGC
BPRE α modified (SEQ ID NO: 10)	1	GTTATCAGGC AGAAGCGGGC AATCTGCCAG GTGTTTGCTG ACGGAACCCC
	51	CACTGGTTGG GGCCTGGTTA ATCATTCCCTC CGCATGGTTC CGCAGGGGAC
	101	GGTTTCCCCG CCGCTTGCTT ATCCATTGCG CGGAATTAT TGCCGCGCTGC
	151	CTTGCTCGCC GCTGGACGGG AGCTCGGGTT ATTGGAACTG ACAATTCCAT
	201	TGTGGCTTCG GGAAGCGGA CATCTTTCCC ATGGCTGCTC GGCTGCGTTG
	251	CCAACTGGAT GCTTCGGGC
BPRE β (SEQ ID NO: 11)	1	GAACGTCGTT CTGCTTCGTC CCGTCTGCAT TGAATCCGCG GAGCGCCCG
	51	TCGCGCGGAC TGCTCGGCAT TCCCGTCGCG CCGCCGCTC TCCCGTTCCG
	101	ACCTTCTACG GGCCGCACT CACTCTTCGC CGTCTCCCA TCTG
	151	
	201	
	251	
	301	
	351	
	401	
	451	

次頁に続く

【表 6】

前頁から続く

BPRE γ (SEQ ID NO: 12)	1	AACAAGCCTT TGGATTGGAA AATCCTTCAG CGCATTACGG GTCTCCTGGG
	51	GTTTCTTGCA CCCTTCACGA CCGTGGGCTA TCCAGCCCTA ATGCTTTTGT
	101	ACCATGCCAT TACCCGGGCG CAGGCCTTAA AAATTTCTCG GCCCTTTAAG
	151	ACCTTTCTTT ACAGCCTGTA CAAGCAACCT TTGCCC
GSPRE (SEQ ID NO: 13)	1	AATCAACCCCT TAGATTATAA AATATGTGAA AGGTTGACGG GCATTCTTAA
	51	TTATGTTGCT CTTTTACCA AATGTGGTTA TGCTGCTTTA TGCCCTTTAT
	101	ATCAAGCTAT TGCTTCTCAT ACTGCTTTTG TTTCTCCTC CTATATATAA
	151	AATGGTTAC TGTCACCTTA TGGTGAGTTG TGGCCCGTTG CCAGACAAAG
	201	TGGTGTGGTG TGCTCTGTGT TTGCTGACGC AACTCCCACT GGTGGGGCA
	251	TTTGACCAAC CTGTCAACTC ATTTCCGGTA CTTGCGTTT CTCACTTCCG
	301	ATTGCTACCG CGGAGCTTAT AGCCGCGCTGC CTGCTCGCT GCTGGACAGG
	351	AGCTCGGTTG TTGGGCACTG ATAACTCCGT GGTCCCTCTC GGTAAAGCTAA
	401	CTTCGTTTCC ATGGCTGCTC GCTGTGTTG CCAACTGGAT TCTTCGCGGG
	451	ACGTCCTTCT GTTACGTCCG CTCGCGGAG AACCCAGCGG ACCTTCGCTC
GSPRE α (SEQ ID NO: 14)	1	GTTGCCAGAC AACGTGGTGT GGTGTGCTCT GTGTTTGCTG ACGCAACTCC
	51	CACTGGTTGG GGCATTTGCA CCACCTGTCA ACTCAATTTCC GGTACTTTCC
	101	GTTTCTCACT TCCGATTGCT ACCGCGGAGC TTATAGCCGC CTGCGCTTGT
	151	CGCTGCTGGA CAGGAGCTCG GTTGTGGGC ACTGATAACT CCGTGGTCTT
	201	CTCCGGTAAG CTAACCTGCT TTCCATGGCT GCTCGCTGCT GTTGCCAACT
	251	GGATTCTTCC C
GSPRE β (SEQ ID NO: 15)	1	GGGACGTCCT TCTGTTACGT CCGCTCCGCG GACAAACCCG CGGACCTTCC
	51	GTCTCGGGGA CTTCTGCGCG CTCTCCGCTC TCTGCGCGCT CTGCGTTTTT
	101	GTCCGGTAC CAAGCGGATA TCCCTGTGGG CCGCCTCCCC GCCTG
	151	
	201	
	251	
	301	
	351	
	401	
	451	

次頁に続く

10

20

30

40

【表 7】

前頁から続く

GSPREY (SEQ ID NO: 16)	1 AATCAACCCCT TAGATTATAA AATATGTGAA AGGTGACGG GCATTCTTAA 51 TTATGTTGCT CCTTTACCA AATGTGGTTA TGCTGCTTAA CTGCCTTTAT 101 ATCAAGCTAT TGCTTCTCAT ACTGCTTTTG TTTCTCCTC CTTATATAAA 151 AACTGGTTAC TGTCACCTTA TGGTGAGTTG TGGCCC
ASPRE (SEQ ID NO: 17)	1 AACCTTTAGA TTATAAAATC TGTGAAAGGT TAACAGGCAT TCTGAATTAT 51 GTTGCTCCTT TTAATAAATG TGGTTATGCT GCTCTCCTTC CTTGTATCA 101 AGCTACTTCG CGTACGGCAT TTGTGTTTC TTCTCTCTAC CACAGCTGGT 151 TGCTGTCCCT TTATGCTGAG TTGTGGCCTG TTGOCAGGCA ACGTGGCGTG 201 GTGTGCTCTG TGCTGACGC AACCCCACT GGTGGGGCA TTGCAACCAC 251 CTATCAACTC ATTTCCCGCA CGGGCGCTT TGCCCTGCCG ATGCCACCG 301 CGGACGTCAT CGCCGCTGC CTTGCTGCT GCTGGACAG AGCTCGGCTG 351 TTGGGCACTG ACRACTCCGT GGTCTCTTCG GGCAAACTGA CTTCTATCC 401 ATGGCTGCTC GCCTGTGTTG CCAACTGGAT TCTTCGGGG ACGTCGTCTT 451 GCTACGTCCC TTCGGCAGCG AATCGGGCG ACCTGCCCTC TCGAGGCTTT 501 CTGCGGGCTC TGCATCCCGT GCGACTCTC CGCTCCGTC CGCAGCTGAG 551 TCGCATCTCC CTTGGGGCG CCTCCCGCC TG
ASPRE α (SEQ ID NO: 18)	1 GTTGCCAGGC AACGTGGCGT GGTGTGCTCT GTGTGTGACG CAACCCCCAC 51 TGGTTGGGGC ATTTGCACCA CCTATCAACT CATTTCCCGG ACGGGCGGTT 101 TTGCCCTGCC GATGCCACCC GCGGACGTCA TCGCCGCGCTG CTTGCTCGC 151 TGCTGGACAG GAGCTCGGCT GTTGGGCACT GACAACTCCG TGGTCTTTTC 201 GGGCAAACTG ACTTCCTATC CATGGGTGCT CGCCTGTGTT GCGAACTGGA 251 TTCTTCGC
ASPRE β (SEQ ID NO: 19)	1 GGGAGTGGT TGTGCTAGT CCCTTCGGCA GCGAATCCGG CGGACCTGCC 51 GTCTCGAGGC CTTCTGCGG CTCTGCATCC CGTGCGCACT CTCGCTTCC 101 GTCCGCACTG GAGTCGCATC TCCCTTTGGG CGGCTCCTCC GCTG
ASPREY (SEQ ID NO: 20)	1 AACCTTTAGA TTATAAAATC TGTGAAAGGT TAACAGGCAT TCTGAATTAT 51 GTTGCTCCTT TTAATAAATG TGGTTATGCT GCTCTCCTTC CTTGTATCA 101 AGCTACTTCG CGTACGGCAT TTGTGTTTC TTCTCTCTAC CACAGCTGGT 151 TGCTGTCCCT TTATGCTGAG TTGTGGCCT

10

20

【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	γ	α	β
HPRE	1	-	2	3
WPRE	4	7	5	6
BPRE	8	12	9	11
GSPRE	13	16	14	15
ASPRE	17	20	18	19

30

【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]

【表 9】

WPFEY/GSPREα /GSPREβ (PCT 2.4) (SEQ ID NO: 21)	1	AATCAACCTC TGGATTACAA AATTTGTGAA AGATTGACTG GTATTCTTAA
	51	CTATGTTGCT CCTTTACGC TATGTGGATA CGCTGCTTTA ATGCCCTTGT
	101	ATCATGCTAT TGCTTCCCGT ATGGCTTTCA TTTCTCCTC CTTGTATAAA
	151	TCCTGGTTGC TGTCTCTTTA TGAGGAGTTG TGGCCCGTTG CCAGACAACG
	201	TGGTGTGGTG TGCTCTGTGT TTGCTGACGC AACTCCCACT GGTGGGGCA
	251	TTTGACACAC CTGTCAACTC ATTCCCGGTA CTTTCGGTTT CTCACCTCCG
	301	ATTGCTACCG CGGAGCTTAT AGCCGCGTGC CTTGCTCGCT GCTGGACAGG
	351	AGCTCGGTTG TTGGGCACTG ATAACCTCGT GGTCTCTCTC GGTAAAGCTAA
	401	CTTCGTTTCC ATGGCTGCTC GCTGTGTTG CCAACTGGAT TCTTCGCGGG
	451	ACGTCCTTCT GTTACGTCCC CTCGCGGAC AACCCAGCGG ACCTTCGCTC
	501	TGGGGGACTT CTGCGGCTC TCGTCTCTCT GCCGCTTCTG CGTTCCTGTC
	551	CGGTCAACAA GGGATATCC CTGTGGGCG CCTCCCGCC TG
HPREα/WPREβ (PCT 2.7) (SEQ ID NO: 22)	1	GTGTGCTGGC AACGGCTGG TGTGTGCCAA GTGTTTGCTG ACGCAACCCC
	51	CACTGGTTGG GGCCTGGCCA TAGGCCATCA GGCATGCGT GGAACCTTTC
	101	TGTCTCTCTT GCGGATCCAT ACTGCGGAAC TCCTAGCCGC TTGTTTGTCT
	151	CGCAGCAGGT CTGGAGCAAA COTCATCGGG ACCGACAATT CTGTCTACT
	201	CTCCCGCAAG TATACATCGT TTCCATGGCT GCTAGGCTGT GGTGCCAAT
	251	GGTACCTCGG CGGGACGTCC TTCTGTACG TCCTTCGGC COTCAATCCA
	301	GCGGACCTTC CTTCGCGCG COTGCTGCGC GCTCTGCGGC CTCTTCGCG
	351	TCTTCGCTTT CGCCCTCAGA CGAGTCGGAT CTCCTTTTGG GCGGCTCTCC
	401	CGCTGGGAT C
WPFEα/HPREβ short (PCT 2.5) (SEQ ID NO: 39)	1	GTGTGACGGC AACGTGGGCT GGTGTGCACT GTGTTTGCTG ACGCAACCCC
	51	CACTGGTTGG GGCATTGCCA CCACTGTGCA GTCCTTTTCC GGGACTTTTC
	101	CTTTCCCTCT CCGTATTGCC ACGGCGGAAC TCATCGCCGC CTGCTTTGCC
	151	CGCTGTGGA CAGGGGCTCG GCTGTGGGC ACTGACAATT CCGTGGTGT
	201	GTGCGGGAAG CTGACGTCTT TTCCATGGCT GCTCGCTGT GTTGCCACCT
	251	GGATTCTGCG CGGGACGTCC TTTGTTTACG TCCGCTCGGC GCTGAATCCC
	301	GCGGACGACC COTCCGGGG CGGCTTGGGG CTCTACCGCC CGCTTCTCCG
	351	TCTGCGGTAC CGTCCGACCA CGGGGCGCAC CTCTCTTTAC GCGGACTCCC
	401	CGCTGTGACC TTCTCATCTG CCGGACCGTG TGC

次頁に続く

【表 10】

前頁から続く

BPFEα/HPREβ (PCT 2.21) (SEQ ID NO: 23)	1	GTATCAGGC AGAAGCGGGC AATCTGCCAG GTGTTTGCTG ACGCAACCCC
	51	CACTGGTTGG GGCCTGGTTA ATCATTCCTC CGCATGGTTC CGCAGGGGAC
	101	GSTTTCCCGG CCGCTTGCTT ATCCATTGCG CGGAACCTAT TGCCGCTGCT
	151	CTTGCTCGCC GGTGGACGGG AGCTCGGGTT ATTGGAACCT ACAATTCCAT
	201	TGTGCTCTCG GGAAGCGGA CATCTTTCCC ATGGCTGCTC GGTGCGGTG
	251	CCAACTGGAT GCTTCGGGGG GGAAGTCTTT TGTTCAGTC CCGTCCGCGC
	301	TGAATCCCGC GGAAGACCCC TCCGCGGGCC GCTTGGGGCT CTACCGCCCG
	351	CTTCTCCGTC TGCCGTACCG TCCGACCAAG GGGCGCACCT CTCTTTACGC
	401	GGAATCCCGG TCTGTGCTTT CTCATCTGCG GGAAGCTGTG CACTTCGCTT
	451	CACCTCTGCA CGTGCATGG AGAACACCGT GAACGCCAC CGGAACCTGC
	501	CCAAGGTCTT GCATAAGAGG ACTCTTGGAC TTTACGCAAT GTC
BPFEα mod/HPREβ (PCT 2.22) (SEQ ID NO: 24)	1	GTATCAGGC AGAAGCGGGC AATCTGCCAG GTGTTTGCTG ACGCAACCCC
	51	CACTGGTTGG GGCCTGGTTA ATCATTCCTC CGCATGGTTC CGCAGGGGAC
	101	GSTTTCCCGG CCGCTTGCTT ATCCATTGCG CGGAACCTAT TGCCGCTGCT
	151	CTTGCTCGCC GGTGGACGGG AGCTCGGGTT ATTGGAACCT ACAATTCCAT
	201	TGTGCTCTCG GGAAGCGGA CATCTTTCCC ATGGCTGCTC GGTGCGGTG
	251	CCAACTGGAT GCTTCGGGGG GGAAGTCTTT TGTTCAGTC CCGTCCGCGC
	301	TGAATCCCGC GGAAGACCCC TCCGCGGGCC GCTTGGGGCT CTACCGCCCG
	351	CTTCTCCGTC TGCCGTACCG TCCGACCAAG GGGCGCACCT CTCTTTACGC
	401	GGAATCCCGG TCTGTGCTTT CTCATCTGCG GGAAGCTGTG CACTTCGCTT
	451	CACCTCTGCA CGTGCATGG AGAACACCGT GAACGCCAC CGGAACCTGC
	501	CCAAGGTCTT GCATAAGAGG ACTCTTGGAC TTTACGCAAT GTC

次頁に続く

【表 1 1】

前頁から続く

GSPREY/GSPREα /HPREβ (PCT 2.23) (SEQ ID NO: 25)	1 AATCAACCCCT TAGATTATAA AATATGTGAA AGGTGACGG GCATTCTTAA
	51 TTATGTGTGCT CTTTTACCA AATGTGGTTA TGCTGCTTAA CTGCTTTAT
101 ATCAAGCTAT TGCTTCTCAT ACTGCTTTG TTTCTCTCTC CITATATATAA	151 AACTGGTTAC TGTCACTTTA TGGTGAATTG TGGGCGGTTG CCAGACAAAG
	201 TGGTGTGGTG TGCTGTGTGT TTGCTGACGC AACTCCCACT GGTGGGGCA
251 TTGACACAC CTGTCAACTC ATTTCCGGTA CTTTGGGTTT CTCACTTCGG	301 ATTGCTAAGG CGGAGCTTAT AGCGGCGTGC CTGCTCTGCT GTGGACAGG
	351 AGCTCGGTTG TTGGGCACTG ATAACTCCGT GGTCTCTCTC GGTAAAGTAA
401 CTGTGTTTCC ATGGGTGCTC GCTGTGTGTG CCAACTGGAT TGTTCGCGG	451 GAAGTCTTTT GTTTACGTCC CGTGGGCGCT GAATCCCGGG GACGACCCCT
	501 CCGGCGGGGG CTTGGGGCTC TACCGCGCGG TTTCTCTCTT GCGTAACGCT
551 CCGACCAAGG GCGGCACTTC TCATTACGGG GACTCCCGGT CTGTGCTTC	601 TCATCTGGGG GACCGGTGTC ACTTGGCTTC AACTCTGCAC GTGCGATGGA
	651 GACCAACGCTG AACGCGCACG GGAACCTTGC CAGGCTCTTG CATAGAGGGA
	701 CTCTTGGACT TTAGGCAATG TC

10

【0 0 5 2】

20

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 AAGATTGTGT GGGCATTGA ACTTTGTGTT ACCATTTACT AAAGGTAACA
	51 TTGAATGTT AAAACCAATG TATGCTGCTA TTACTAACAA AGTTAACTTT
101 AGCTTCTCTT CAGCTTATAG GACTTTATTG TACAAATTAA CTATGGGTGT	151 TTGTAAATTA GCCATTGAC CAAAGTCCCT TGTACCTTGG CCACGTGTAG
	201 CCACAGATGC TACTCCAAAC CATGGCGCAA TATCCATAT CACCGCGGG
251 AGCGCAGTGT TTGCTTTTTC AAAGGTCAGG GATATACATA TACAGGAATT	301 GCTGATGGTA TGTTTAGCTA AGATAATGAT TAAACCCAGA TGTATACTCT
	351 CCGATTCTAC TTTTGTGTC CACAAACGTT ATCAGACGTT ACCATGGCAT
401 TTTGCTATGT TGGCCAAACA ACTGCTATCT CCTATACAGT TGTACTTTGT	451 TCCAAAGTAA TACAATCCCTG CTGACGGGCC ATCCAGGCAC AGACCGGCTG
	501 ATTGGACGGC TCTTACATAC ACCCTCTCTT CGAAAGCAAT ATATATTCCA
	551 CATAGGCTAT G

30

DPREα (SEQ ID NO: 28)	1 GTCTCTGTGA CCTTTGCCAC GTGTAGCCAC AGATGCTACT CCAACACATG
	51 GCGCAATATC CCATATACCC GCGGGGAGCG CAGTGTTTGC TTTTCAAG
101 GTCAGGGATA TACATATACA GGAATTGCTG ATGGTATGTT TAGCTAAGAT	151 AATGATTAAA CCCAGATGTA TACTCTCCGA TTCTACTTTT GTTTGCCACA
	201 AACGTTATCA GACGTTACCA TGGCATTTTG CTATGTGTGC CAACCAACTG
	251 CTATCT

DPREβ (SEQ ID NO: 29)	1 CCTATACAGT TGTACTTTGT TCCAAAGTAA TACAATCCCTG CTGACGGGCC
	51 ATCCAGGCAC AGACCGGCTG ATTGGACGSC TCTTACATAC ACCCTCTCT
	101 CGAAAGCAAT ATATATTCCA CATAGGCTAT G

DPREY (SEQ ID NO: 30)	1 AAGATTGTGT GGGCATTGA ACTTTGTGTT ACCATTTACT AAAGGTAACA
	51 TTGAATGTT AAAACCAATG TATGCTGCTA TTACTAACAA AGTTAACTTT
101 AGCTTCTCTT CAGCTTATAG GACTTTATTG TACAAATTAA CTATGGGTGT	151 TTGTAAATTA GCCATTGAC CAAA

40

次頁に続く

【表 1 3】

前頁から続く

チンパンジー (CPRE) (SEQ ID NO: 31)	1	AACAGACCTA TAGATTGGAA AGTATGTCAA AGAATTGTGG GTCTTTTGGG
	51	ATTTGCTGCC CCTTTACGC AATGTGGTTA TCCTGCGTTA ATGCCATTGT
	101	ATGCATGTAT ACAAGCAAAA CAGGCTTTCA CTTTCTCGCC AACTTATAAG
	151	GCCTTTCTAA GTCAACAATA TTCGACCCCT TACCCCGTTG CCGGCAACG
	201	GTCCGGTCTG TGCCAAGTGT TTGTGACGC AACCCCCACT GGCTGGGGCT
	251	TGGTCATGGG CCATCAGCGC ATGCGTGGAA CTTTGTGGC TCCTCTGCCG
	301	ATCCATACTG CGGAACCTCT AGCAGCTTGT TTTGTGCGCA GCGGTCTGG
	351	AGCAAAACTT ATCGGAACGT ACAATTCTGT CGTCTCTCT CGGAAATATA
	401	CATCTTTTCC ATGGCTGCTA GGTGTGCTG CCAACTGGAT ACTTCGCGG
	451	ACGTCTTTG TTTACGTCCC GTCCGCGCTG AATCCTGGGG ACGACCCCTC
	501	TCGGGGCGCG TTAGGGCTCT ACCGCCCTCT CATCGTCTG CTCTTCCAAC
	551	CGACTACGGG GCGCACTCTT CTTACGCGG TCTCCGCGT TGCCCTTCTCA
	601	TCTGCCGCTC CGTGTGACT TCGCTTCAAC TCTGCAAGT GCATGGAGAC
	651	CACCGTGAAC GCCCAACGGA ACCTGCAAAA AGTCTTGCAT AAGAGGACTC
	701	TTGGACTTTC AGCAATGTC
CPREα (SEQ ID NO: 32)	1	CGTTGCCCGG CAACGGTCCG GTCTGTGCCA AGTGTTTGCT GACGCAACCC
	51	CCACTGGGCTG GGGCTTGGTC ATGGGCGATC AGCGCATGCG TGGAACCTTT
	101	GTGGCTCCTC TGCCGATCCA TACTGCGGAA CTCCTAGCAG CTGTGTTTGC
	151	TGCGAGCCGG TCTGGAGCAA AACTTATCGG AACTGACAA TCTGTCTGCC
	201	TCTCTCGGAA ATATACATCT TTTCCATGGC TGCTAGGTTG TGCTGCCAAC
	251	TGGATACTTC GC
CPREβ (SEQ ID NO: 33)	1	GGGACGTCTT TTGTTTACGT CCGCTCGGCG CTGAATCTCG CGGACGACCC
	51	TTCTCGGGGC CGCTTAGGGC TCTACGCGCC TCTCATCCGT CTGCTCTTCC
	101	AACCGACTAC GGGGCGCAAC TCTCTTTACG CGTCTCTCCC GTCTGTGCTC
	151	TCTCATCTGC CGGTCCGTGT GCACTCTGCT TCACCTCTGC ACGTTGCTAG
	201	GAGACCAACG TGAACGCCCC ACGGAACCTG CCAAAAGTCT TGCATAAGAG
	251	GACTCTTGGA CTTTCAGCAA TGTC
CPREγ (SEQ ID NO: 34)	1	AACAGACCTA TAGATTGGAA AGTATGTCAA AGAATTGTGG GTCTTTTGGG
	51	ATTTGCTGCC CCTTTACGC AATGTGGTTA TCCTGCGTTA ATGCCATTGT
	101	ATGCATGTAT ACAAGCAAAA CAGGCTTTCA CTTTCTCGCC AACTTATAAG
	151	GCCTTTCTAA GTCAACAATA TTCGACCCCT TACCCC

次頁に続く

10

20

【表 1 4】

前頁から続く

ウーリーモンキー (WMPRE) (SEQ ID NO: 35)	1	AATCGACCTA TTGATTGGAA AGTCTGTGAG AGAATTGTGG GTTTATTGGG
	51	CTTTGTGTCT CCCTTTACAC AATGTGGATA CGCTGCTTTA ATGCCATATAT
	101	ATACATGCAAT CCAAAACAT CAGGCTTTTA CTTTCTCTCT TGTGTACAAG
	151	ACCTTTTGA AAGATCAATA CATGCACCTT TACCCCGTTG CTAGGCAACG
	201	AGCTGGGAC TGCCAAGTGT TTGTGACGC AACCCCCACT GGCTGGGGCT
	251	TGGTATGTGG CAATCAGCGC ATGCGTGGTA CATTTTGTG CCGCTGCGCT
	301	ATCCATACTG CGGAACCTCT TGACGCTGT TTTGTGCTGT GCTGCTCAGG
	351	GGCAAAACTC ATCGGCACTG ACAACGCTGT TGTGCTGTCT CGGAAGTAAC
	401	ACACTTCCCA TGGCTGTAGT GCTGTGTGTC TACCTGGATC CTGAGAGGGA
	451	CGTGCTTTGT TTAGCTCCCC TCCAAGTGA ACCCAGCGGA CGACCCCTCT
	501	CGGGGTGTG TCGGCTGTCT GAAACGCTG CCGCGGCTGC TGTCCAGCC
	551	TTCCACGGGG CGCACCTCTC TCTACGCGGT CTCCTCTCT G
	601	
WMPREα (SEQ ID NO: 36)	1	AATCGACCTA TTGATTGGAA AGTCTGTGAG AGAATTGTGG GTTTATTGGG
	51	CTTTGTGTCT CCCTTTACAC AATGTGGATA CGCTGCTTTA ATGCCATATAT
	101	ATACATGCAAT CCAAAACAT CAGGCTTTTA CTTTCTCTCT TGTGTACAAG
	151	ACCTTTTGA AAGATCAATA CATGCACCTT TACCCC
WMPREβ (SEQ ID NO: 37)	1	GTGTGATAGG AACGAGCTGG GCACTGCCAA GTGTTGTGT ACGCAACCCC
	51	CACTGGCTGG GGCTTGGTAT GTGGCAATCA GCGCATGCGT GGTACATTTT
	101	TGTCCCGGCT GCCTATCCAT ACTGCGGAAC TCCTTGACAG CTGTTTGTCT
	151	CGTGCTGGT CAGGGGCAAA ACTCATCGGC ACTGACAAAG CTGTTGTGCT
	201	GCTCGGAAG TATACACACT TCCATGGCT GCTAGGCTGT GCTGTACCT
	251	GGATCCTGAG A
WMPREγ (SEQ ID NO: 38)	1	GGGACGTGCT TTGTTTACGT CCGCTCCAG CTGAACCGG CGGACGACCC
	51	TTCTCGGGGT TGTCTCGGCC TGCTGAACCC GCTGCCGCG CTGCTGTCTC
	101	AGCCTTCCAC GGGGCGCAC TCTCTACG CGGTCTCCCC TCCTG

30

40

【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PRE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（GOI）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PRE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ニングサイト（MCS）がベクター内に存在する。例えば、MCS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

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、SV40早期プロモーター、SV40後期プロモーター、サイトメガロウイルス主要最初期（MIE）プロモーター、EF1 アルファ（翻訳伸長因子 1 サブユニット）プロモーター、Ubc（ユビキチンC）プロモーター、PGK（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、Boshart et al., GenBank Accession No. K03104、Uetsuki et al. (1989) J. Biol. Chem. 264:5791-5798、Schorpp et al. (1996) Nucleic Acids Res. 24:1787-1788、Hamaguchi et al. (2000) J. Virology 74:10778-10784; Dreos et al. (2013) Nucleic Acids Res. 41(D1):D157-D164、および、2014年7月16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（<http://epd.vital-ity.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、CMV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（ESC）転写因子（Oct4、Sox2、Nanog、Klf4、Esrrb）がスーパーエンハンサーを占有することが示され、ESC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（Nr5a2、Prdm14、Tcfcp2l1、Smad3、Stat3、Tcf3）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、SV40ポリアデニル化シグナル、ウシ成長ホルモン（BGH）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、mRNA前駆体の3'末端切断、切断部位におけるmRNA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AAUAAAが存在する。また、Cole et al. (1985) Mol. Cell. Biol. 5:2104-2113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（MIE）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' 末翻訳領域、ヒトHsp70遺伝子、血管内皮成長因子(VEGF)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。

【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、ニワトリリゾチーム遺伝子、インターフェロンアルファ2遺伝子、X29遺伝子MARおよびS4 MAR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)上流にある発現カセット内に配置され得る。

【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。

【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ダ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ダニル化シグナルは、当技術分野において周知である。

【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カセットを含み得る。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つの発現カ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

10

20

30

40

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 & Gelfand (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 つの発現カ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 EF1 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)、(a) および (b) および (d)、(a) および (b) および (e)、(a) および (c) 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 (b) および (d) および (e)、(a) および (c) 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、目的遺伝子上流にある。別の態様において、P R E 配列は、目的遺伝子下流にある。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' U T Rとの間に位置する。別の態様において、P R E 配列は3' U T Rの下流にある。

【 0 0 7 5 】

[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、C R I S P / C a s 9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

【 0 0 7 6 】

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・エスピー (*Trichoderma* sp.)、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*)、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、および、サッカロマイセス・セレビスエ (*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、S f 9、S f 2 1、および、ドロソフィラ S 2 (*Drosophila* S 2) 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、アラビドプシス (*Arabidopsis*) 細胞およびタバコ B Y 2 細胞が含まれる。

20

【 0 0 7 7 】

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 (C H O) 細胞、ヒト胎児由来腎臓 (H E K) 細胞、ウイルス性形質転換 H E K 細胞（例えば H E K 2 9 3 細胞）、N S 0 細胞、S P 2 0 細胞、C V 1 細胞、ベビーハムスター腎臓 (B H K) 細胞、3 T 3 細胞、J u r k a t 細胞、H e L a 細胞、C O S 細胞、P E R C . 6 細胞、C A P (登録商標) 細胞、C A P T (登録商標) 細胞（後者の2つの細胞株は、ドイツ、ケルンの C e v e c P h a r m a c e u t i c a l s によって市販されている）が含まれる。また、C H O 細胞の多くの派生物、例えば、C H O - D X B 1 1、C H O - D G - 4 4、C H O - K 1、C H O - S など、または、C H O - M、C K 1 S V C H O、C H O Z N などの操作された C H O 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

【 0 0 7 8 】

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

【 0 0 7 9 】

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、ポリエチレングリコール (P E G) 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、D E A E デキストラン媒介法、リン酸カルシウム共沈が含まれる。また、S a m b r o o k e t a l . の「M o l e c u l a r C l o n i n g : A L a b o r a t o r y M a n u a l」、T h i r d E d i t i o n , C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t

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】

10

[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: PRE 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PRE配列の影響を試験した。

20

【0083】

pCT2.1ベクターの概略図を図4に示す。軽鎖遺伝子上流において、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'末翻訳領域およびイントロンAを含む。軽鎖遺伝子下流において、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。

30

【0084】

[例2: PRE 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PRE、修飾されたPRE、および、ハイブリッドPRE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、PRE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PREについて、PRE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】

40

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PRE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 で24時間培養後、ViCellカウンター(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

50

を決定した。24時間後、AccuriC6 Reader (Becton Dickinson、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 ImmunoResearch、ペンシルベニア州ウェストグロブ)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480nmにおける吸光度が測定された。

【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。

【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CHO K1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)]

【表15】

構築物	γ	α	β
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

* 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

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 より遥かに弱い。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」(Donello 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、pCT 2.52 (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、pCT 2.0 (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 pCT 2.52 PRE 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

【 0 0 9 9 】

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。

【 0 1 0 0 】

[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 . 5 2、2 . 5 3 および 2 . 5 4 は、2 . 5 2 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 . 3 6、2 . 3 9 および 2 . 5 0 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 . 3 2、2 . 3 7 および 2 . 5 1 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 1 6 】

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

【 0 1 0 1 】

図 9 A 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 . 5 2 (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 9 B における構築物 2 . 0、2 . 3 2、2 . 3 7、2 . 5 0 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 9 B の左半分を参照)。

30

【 0 1 0 2 】

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ったことを示唆する。天然型 W P R E、および、これらの調節要素のうちの 1 または複数の、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 または複数のと天然型 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ったことも、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

【 0 1 0 3 】

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。

【 0 1 0 4 】

50

【 図 2 】

[illegible]

FIG. 1

HPRPβ
 DBRPβ
 GSPRβ
 WPRPβ
 ASPRβ

```

GGGACGCTCTTGTCTTACGTCCTCCGCGCGGTGAATCCGGCGAGCAGCCGCTCCCGGGC
-GAGAGCTCTTGTCTGCTTCCCTCTGATTAATACGGCGCGAGCCGCTCGGGCGAG
GGGACGCTCTTGTCTTACGTCCTCCGCGAGCAACAGCGACGACTCTTCGTCGGGAG
GGGACGCTCTTGTCTGATCTCCCTCGCCTCTCAATACAGCGACGACTCTTCGCGGCG
GGGACGCTCTTGTCTGATCTCCCTCGCAGCAAGTAACGGCGAGCCTCGGCTCTCGAGCG
  *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
CGCTTGGGGCTCTACGGCGCGCTCTTCGCTCTGGCATCTCGACAGCGGGCGCGGACG
HPRPβ      TCGCGCGTCCGCGCGCGCGCGCGCGCTCTTCGCTCTTCGACGCGCGAGC
GSPRβ      CTTCGCGGCTCTCGCTCTCTCGCGCTCTTCGCTTCGCTCGCTACCAAGCGGATC
WPRPβ      CTGCTCGGCTCTCGCGCTCTCTTCGCGCTCTTCGCTTCGCTCAGACAGTCGATC
ASPRβ      CTTCGCGGCGCTCTGATCGCTTCGCGCTCTTCGCTTCGCTCGCGAGCTGATCGATC
  *           *           *           *           *           *           *

```

HPRPβ
 DBRPβ
 GSPRβ
 WPRPβ
 ASPRβ

```

TCTCTTTACCGGAGCTCCCGCTGTGTGCTCTGATCTGCACGAGCGGTGCTG
TCACTCTTCGCGGTGTGCTCCGCTG-----
CTCTTTGGGCGCGCTCCCGCGCTG-----
TCCCTTTGGGCGCGCTCCCGCGTGGATC-----
TCCCTTTGGGCGCGCTCCCGCGCTG-----

```

FIG. 2

【 図 3 】

```

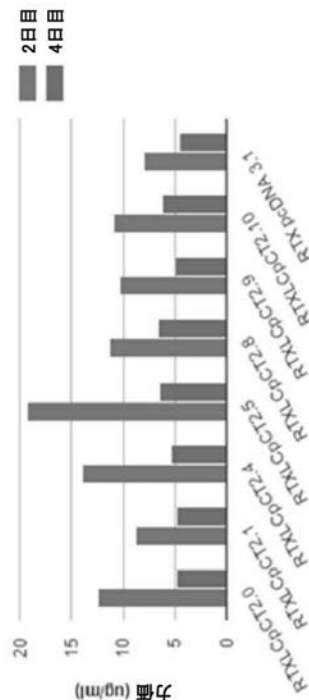
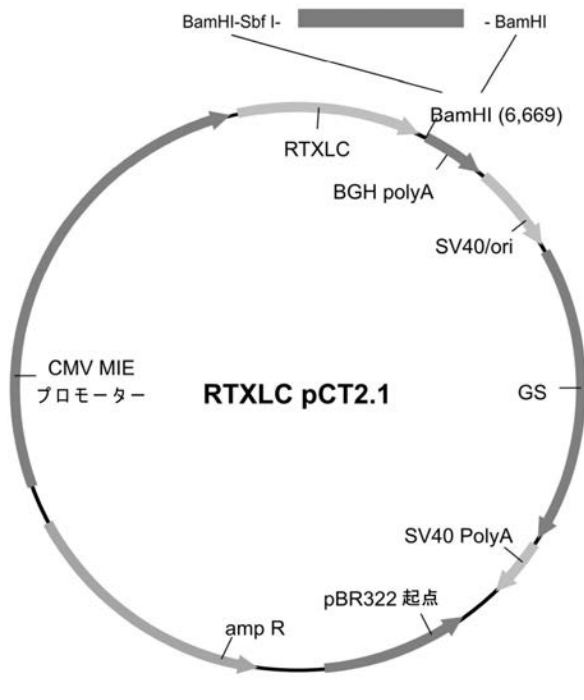
BPR2y      ACACAGCCTTTGAGATTGAAATGCTCCACCGCATACCGGGTCTCTGGGGTCTCTTGCA
ASPR2y     ----AACCTTTATATTAATATGCTGTAAGAGGTTACACGGCATCTGATATATGGTCT
WRP2y      AATCACCTCTCGGATATCAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATCTTCAATATGTGTCT
GSPR2y     AATCACCTCTGAGATTATAAATATGTGAAAGGTTGACGGGCACTCTTAATATGTGTCT
          * * * * *
BPR2y      CCTCTACAGGATCTGSGCATACGACGCTTAAGCCTTTTGTACATAGCCATTACCGGGCCG
ASPR2y     CCTCTTACAGTAATGCTATATGCTGCTGCTCTCTCTTGTACATGACATCTTCGG----GT
WRP2y      CCTCTTACGCTATGTGAGACGAGCTCTTAAGCGCTTTGTACATGACATCTGCTCCGCT
GSPR2y     CCTCTTACAAATGTGCTGTATGCTCTTACTGCTCTTATATACAGCTATTGCTTCTCAT
          * * * * *
BPR2y      CAGCGCTTAAAAATTTCTCTGGGCTTTTAAGACCTTTCTTTACAGCCTGTACAGCAACCT
ASPR2y     ACGGCATTTGTGTTTCTCTCTGTACACAGCGTGTGCTGCTCTTATGAGTAGTG
WRP2y      ATGGCTTTCAITTTCTGTCTGTATAAATCTTGGTSGTGTCTCTTATAGAGAGATG
GSPR2y     ACTGCTTTTGTTTCTCTCTCTATATAAAAGTGGTACTGTCACTTATAGTAGAGTG
          * * * * *
BPR2y      TGTGCC
ASPR2y     TGGCCT
WRP2y      TGTGCC
GSPR2y     TGGCC

```

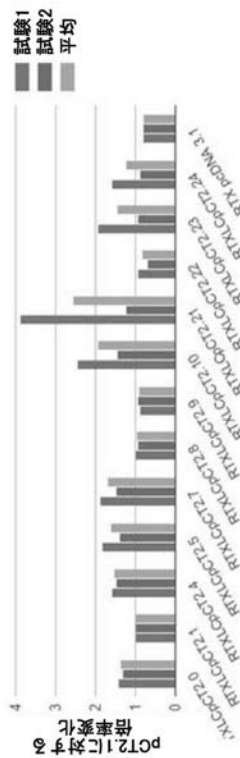
FIG. 3

【 図 4 】

【 図 5 】



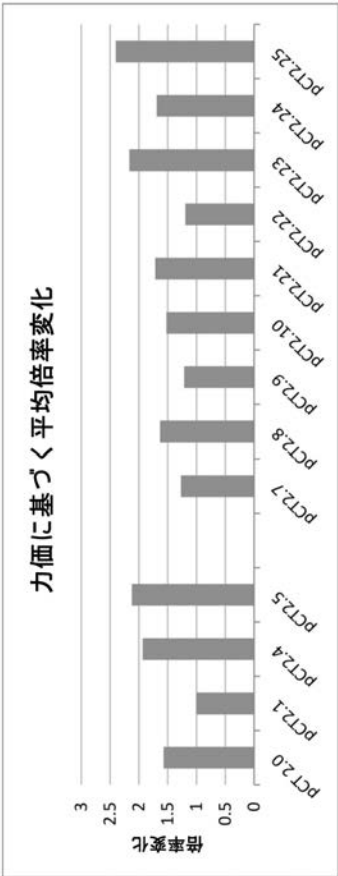
【 図 6 】



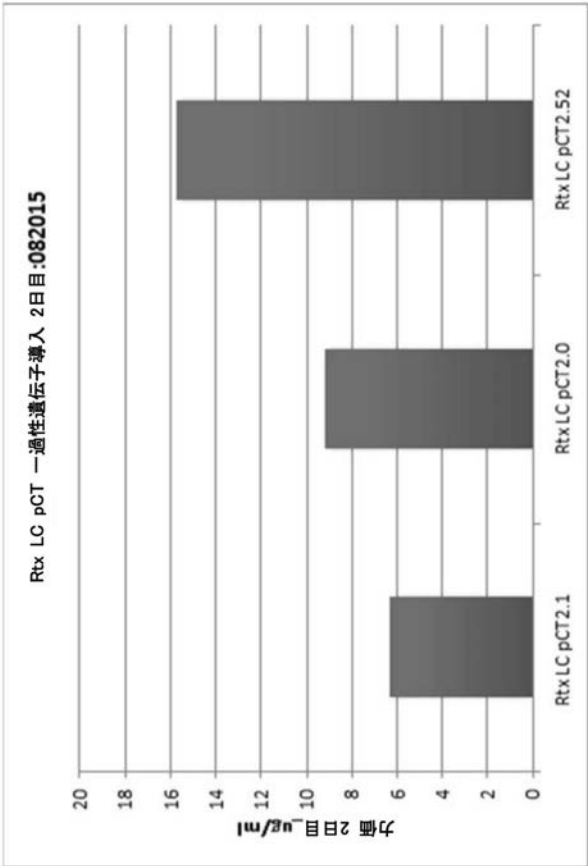
【 図 7 A 】



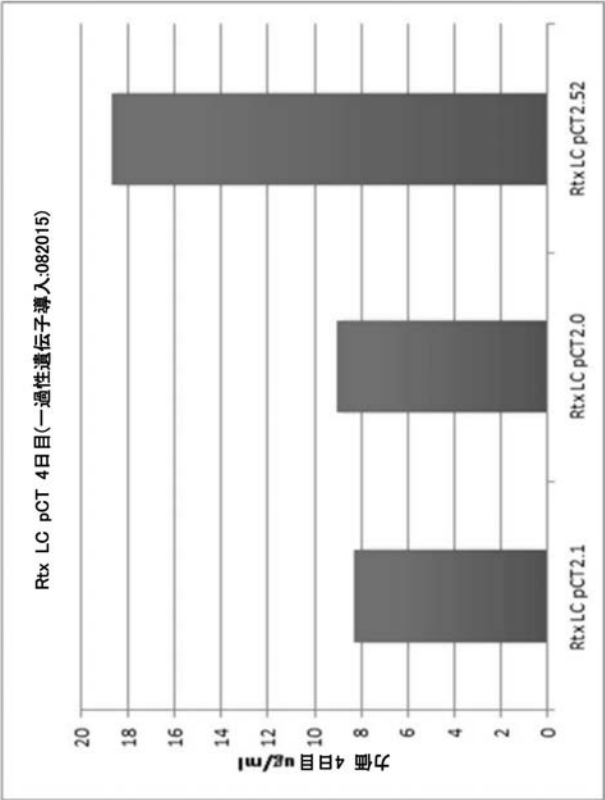
【 図 7 B 】



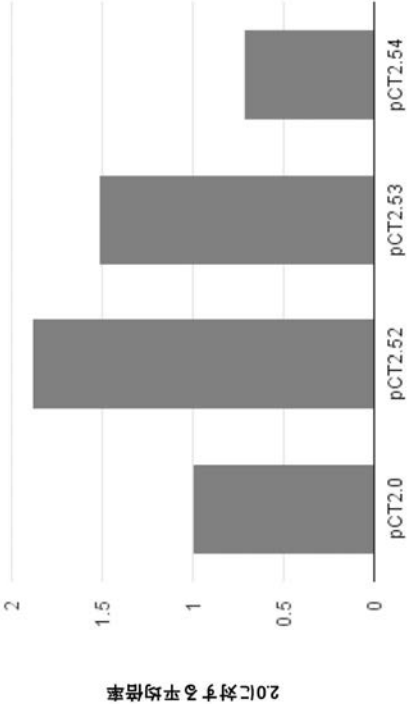
【 図 8 A 】



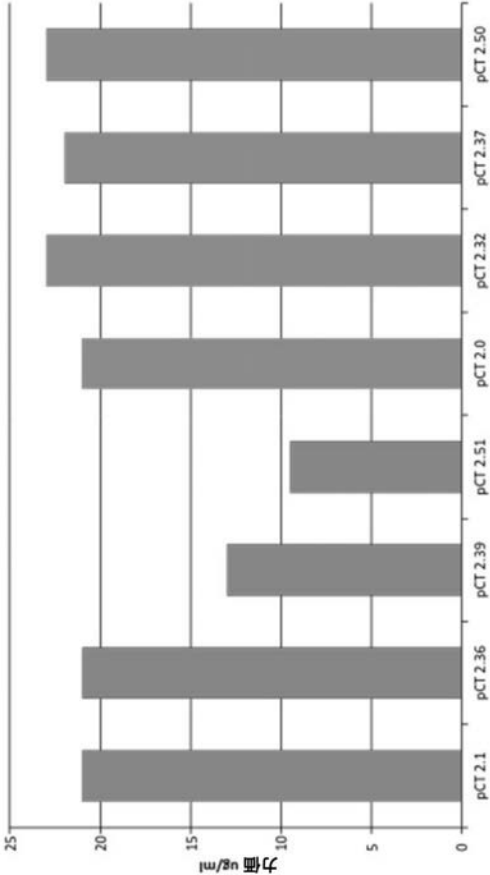
【 図 8 B 】



【 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

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

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. FIELDS SEARCHED

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

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: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/K02715>. Especially pg 2.	1-5, (7,8)/(3-5), 9, 10, 19, 22/19

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

* 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

"Z" 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)

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. ☐ forming part of the international application as filed:
☐ 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 13ter. 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 13ter. 1(a)).
☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter. 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:

GenCore ver 6.4.1 SEQ ID NOs: 3, 7, 14

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:

- 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.
- Groups I+ claims further comprise a post-transcriptional regulatory element (PRE). Some claims include an alpha PRE and other claims include a gamma PRE.
- 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 features 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, 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, 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 コーポレーション内
Fターム(参考) 4B065 AA01X AA57X AA72X AA87X AA96Y AB01 AC03 BA02 CA24 CA44