

(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2015-501642
(P2015-501642A)

(43) 公表日 平成27年1月19日(2015.1.19)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C 12 N 15/09 (2006.01)	C 12 N 15/00 Z N A A	4 B 0 2 4
C 12 N 1/15 (2006.01)	C 12 N 1/15	4 B 0 6 4
C 12 N 1/19 (2006.01)	C 12 N 1/19	4 B 0 6 5
C 12 N 1/21 (2006.01)	C 12 N 1/21	4 C 0 8 4
C 12 N 5/10 (2006.01)	C 12 N 5/00 1 O 1	4 C 0 8 6

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 65 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-545423 (P2014-545423)	(71) 出願人	510168852 グレンマーク ファーマシューティカルズ , エセ. アー. イスラエル・ツェーハー 2300 ラ・シ ヨードーフォン, シュマン・ド・ラ コンペタ 5
(86) (22) 出願日	平成24年12月5日 (2012.12.5)	(74) 代理人	230104019 弁護士 大野 聖二
(85) 翻訳文提出日	平成26年8月1日 (2014.8.1)	(74) 代理人	100105991 弁理士 田中 玲子
(86) 國際出願番号	PCT/IB2012/056977	(74) 代理人	100119183 弁理士 松任谷 優子
(87) 國際公開番号	W02013/084157	(74) 代理人	100114465 弁理士 北野 健
(87) 國際公開日	平成25年6月13日 (2013.6.13)		
(31) 優先権主張番号	61/567,675		
(32) 優先日	平成23年12月7日 (2011.12.7)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 発現力セット

(57) 【要約】

本発明は、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を発現させるのに有用な発現力セットに関する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

プロモーター、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、および発現増強エレメントを含む発現カセットであって、発現増強エレメントが、真核生物グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)プロモーターの下流の非翻訳ゲノムDNA配列を含み、前記ポリヌクレオチド配列によりコードされる前記ポリペプチドがGAPDHではなく、前記真核生物GAPDHプロモーターの下流の前記非翻訳ゲノムDNA配列が、+1近傍のヌクレオチド位置～+7000近傍のヌクレオチド位置にわたる領域内で開始され、前記ヌクレオチド位置が、GAPDH mRNAの転写開始点に照らした位置であり、前記真核生物GAPDHプロモーターの下流の前記非翻訳ゲノムDNA配列の長さが約100～約15000ヌクレオチドである、発現カセット。

【請求項 2】

真核生物GAPDHプロモーターの上流の非翻訳ゲノムDNA配列をさらに含み、前記真核生物GAPDHプロモーターの上流の前記非翻訳ゲノムDNA配列が、前記真核生物GAPDHプロモーターの5'端近傍～-3500近傍のヌクレオチド位置にわたる領域内で開始され、前記ヌクレオチド位置が、GAPDH mRNAの転写開始点に照らした位置であり、前記真核生物GAPDHプロモーターの上流の前記非翻訳ゲノムDNA配列の長さが約100～約15000ヌクレオチドである、請求項1に記載の発現カセット。

【請求項 3】

真核生物GAPDHプロモーターまたはその断片を含まないという条件で、プロモーター、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、および真核生物GAPDHプロモーターの上流の非翻訳ゲノムDNA配列を含む発現カセットであって、前記ポリヌクレオチド配列によりコードされる前記ポリペプチドがGAPDHではなく、前記真核生物GAPDHプロモーターの上流の前記非翻訳ゲノムDNA配列が、前記真核生物GAPDHプロモーターの5'端近傍～-3500近傍のヌクレオチド位置にわたる領域内で開始され、前記ヌクレオチド位置が、GAPDH mRNAの転写開始点に照らした位置であり、前記真核生物GAPDHプロモーターの上流の前記非翻訳ゲノムDNA配列の長さが100～約15000ヌクレオチドである、発現カセット。

【請求項 4】

真核生物GAPDHプロモーターの下流の非翻訳ゲノムDNA配列をさらに含み、前記真核生物GAPDHプロモーターの下流の前記非翻訳ゲノムDNA配列が、+1近傍のヌクレオチド位置～+7000近傍のヌクレオチド位置にわたる領域内で開始され、前記ヌクレオチド位置が、GAPDH mRNAの転写開始点に照らした位置であり、前記真核生物GAPDHプロモーターの下流の前記非翻訳ゲノムDNA配列の長さが約100～約15000ヌクレオチドである、請求項3に記載の発現カセット。

【請求項 5】

前記真核生物GAPDHプロモーターの下流および/または上流の前記非翻訳ゲノムDNA配列が、前記ポリペプチドをコードする前記ポリヌクレオチド配列に作動可能に連結されていない、請求項1から4のいずれか一項に記載の発現カセット。

【請求項 6】

ポリアデニル化部位をさらに含む、請求項1から4のいずれか一項に記載の発現カセット。

【請求項 7】

前記真核生物GAPDHプロモーターの下流の前記非翻訳ゲノムDNA配列の長さが約10ヌクレオチドであり、その最長の場合で、IFFO1遺伝子の最後から2番目のインtronまたはその一部まで伸びる、請求項1または4に記載の発現カセット。

【請求項 8】

前記真核生物GAPDHプロモーターの下流の前記非翻訳ゲノムDNA配列が、前記真核生物のGAPDHのポリアデニル化部位の下流で開始され、前記真核生物GAPDHプロモーターの下流の前記非翻訳ゲノムDNA配列の長さが、少なくとも約100ヌクレオ

10

20

30

40

50

チドであり、その最長の場合で、I F F 0 1 遺伝子の最後から 2 番目のイントロンまで伸びる、請求項 1 または 4 に記載の発現力セット。

【請求項 9】

前記真核生物 G A P D H プロモーターの上流の前記非翻訳ゲノム D N A 配列の長さが、少なくとも約 1 0 0 ヌクレオチドであり、その最長の場合で、N C A P D 2 遺伝子の開始コドンまで伸びる、請求項 2 に記載の発現力セット。

【請求項 10】

前記真核生物 G A P D H プロモーターの上流の前記非翻訳ゲノム D N A 配列の長さが、少なくとも約 1 0 0 ヌクレオチドであり、その最長の場合で、N C A P D 2 遺伝子の最後から 3 番目のイントロンまで伸びる、請求項 2 に記載の発現力セット。 10

【請求項 11】

前記真核生物 G A P D H プロモーターの上流の前記非翻訳ゲノム D N A 配列の長さが、少なくとも 1 0 0 ヌクレオチドであり、その最長の場合で、N C A P D 2 遺伝子の開始コドンまで伸びる、請求項 3 に記載の発現力セット。

【請求項 12】

前記真核生物 G A P D H プロモーターの上流の前記非翻訳ゲノム D N A 配列の長さが、少なくとも 1 0 0 ヌクレオチドであり、その最長の場合で、N C A P D 2 遺伝子の最後から 3 番目のイントロンまで伸びる、請求項 3 に記載の発現力セット。

【請求項 13】

前記真核生物 G A P D H プロモーターの下流および / または上流の前記非翻訳ゲノム D N A 配列が哺乳動物に由来する、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の発現力セット。 20

【請求項 14】

前記真核生物 G A P D H プロモーターの下流および / または上流の前記非翻訳ゲノム D N A 配列が齧歯動物またはヒトに由来する、請求項 1 3 に記載の発現力セット。

【請求項 15】

前記真核生物 G A P D H プロモーターの下流の前記非翻訳ゲノム D N A 配列が、配列番号 8 および 2 1 またはその断片からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項 1 または 4 に記載の発現力セット。

【請求項 16】

前記真核生物 G A P D H プロモーターの下流の前記非翻訳ゲノム D N A 配列が、配列番号 8 および 2 1 またはその断片からなる群から選択されるヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 または 4 に記載の発現力セット。 30

【請求項 17】

前記真核生物 G A P D H プロモーターの下流の前記非翻訳ゲノム D N A 配列が、配列番号 8 および 2 1 またはその断片からなる群から選択されるヌクレオチド配列と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 または 4 に記載の発現力セット。

【請求項 18】

前記真核生物 G A P D H プロモーターの上流の前記非翻訳ゲノム D N A 配列が、配列番号 7 、 9 、 1 0 、 1 1 、 1 2 、 1 3 、 1 4 、 1 5 、 1 6 、 2 0 、 2 2 、 2 3 、 2 4 、 2 5 、 2 6 、 2 7 、 および 2 8 またはその断片からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項 2 または 3 に記載の発現力セット。 40

【請求項 19】

配列番号 7 、 9 、 1 0 、 1 1 、 1 2 、 1 3 、 1 4 、 1 5 、 1 6 、 2 0 、 2 2 、 2 3 、 2 4 、 2 5 、 2 6 、 2 7 、 および 2 8 またはその断片からなる群から選択される前記ヌクレオチド配列が、5 力所以下の核酸修飾を含む、請求項 1 8 に記載の発現力セット。

【請求項 20】

前記真核生物 G A P D H プロモーターの上流の前記非翻訳ゲノム D N A 配列が、配列番号 7 、 9 、 1 0 、 1 1 、 1 2 、 1 3 、 1 4 、 1 5 、 1 6 、 2 0 、 2 2 、 2 3 、 2 4 、 2 5 、 2 6 、 2 7 、 および 2 8 またはその断片からなる群から選択されるヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列を含む、請求項 2 または 3 に記載の発現力セット。 50

【請求項 2 1】

前記真核生物 G A P D H プロモーターの上流の前記非翻訳ゲノム D N A 配列が、配列番号 7、9、10、11、12、13、14、15、16、20、22、23、24、25、26、27、および 28 またはその断片からなる群から選択されるヌクレオチド配列と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 2 または 3 に記載の発現カセット。

【請求項 2 2】

前記プロモーターと、ポリペプチドをコードする前記ポリヌクレオチド配列とが、作動的に連結されている、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の発現カセット。

【請求項 2 3】

前記真核生物 G A P D H プロモーターの下流の前記非翻訳ゲノム D N A 配列が、ポリペプチドをコードする前記ポリヌクレオチド配列と同方向に配向している、請求項 1 または 4 に記載の発現カセット。

10

【請求項 2 4】

前記真核生物 G A P D H プロモーターの下流の前記非翻訳ゲノム D N A 配列が、ポリペプチドをコードする前記ポリヌクレオチド配列と逆方向に配向している、請求項 1 または 4 に記載の発現カセット。

【請求項 2 5】

前記真核生物 G A P D H プロモーターの上流の前記非翻訳ゲノム D N A 配列が、ポリペプチドをコードする前記ポリヌクレオチド配列と同方向に配向している、請求項 2 または 3 に記載の発現カセット。

20

【請求項 2 6】

前記真核生物 G A P D H プロモーターの上流の前記非翻訳ゲノム D N A 配列が、ポリペプチドをコードする前記ポリヌクレオチド配列と逆方向に配向している、請求項 2 または 3 に記載の発現カセット。

【請求項 2 7】

前記プロモーターが、S V 4 0 プロモーター、M P S V プロモーター、マウス C M V 、ヒト t k 、ヒト C M V 、ラット C M V 、ヒト E F 1 アルファ、チャイニーズハムスター E F 1 アルファ、ヒト G A P D H 、M Y C プロモーター、H Y K プロモーター、および C X プロモーターを組み入れたハイブリッドプロモーターからなる群から選択される、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の発現カセット。

30

【請求項 2 8】

前記ポリペプチドが、抗体、抗体断片、または抗体誘導体からなる群から選択される、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の発現カセット。

【請求項 2 9】

前記ポリアデニル化部位が、B G H p o l y (A) および S V 4 0 p o l y (A) からなる群から選択される、請求項 6 に記載の発現カセット。

【請求項 3 0】

さらなるプロモーター、エンハンサー、転写制御エレメント、および選択マーカーからなる群から選択される遺伝子エレメントをさらに含む、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の発現カセット。

40

【請求項 3 1】

前記遺伝子エレメントが選択マーカーであり、前記選択マーカーをコードするポリヌクレオチド配列中に含有される C p G 部位の含量が 45 以下である、請求項 3 0 に記載の発現カセット。

【請求項 3 2】

請求項 1 から 2 9 のいずれか一項に記載の発現カセットを含む発現ベクター。

【請求項 3 3】

a) 真核生物 G A P D H プロモーターの上流および / もしくは下流の非翻訳ゲノム D N A 配列

50

- b) プロモーター
 c) ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列
 d) ポリアデニル化部位
 e) エンハンサー
 f) 真核生物 GAPDH プロモーターの下流および / もしくは上流の非翻訳ゲノム DNA 配列、または
 a) 真核生物 GAPDH プロモーターの上流および / もしくは下流の非翻訳ゲノム DNA 配列
 b) エンハンサー
 c) プロモーター
 d) ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列
 e) ポリアデニル化部位
 f) 真核生物 GAPDH プロモーターの下流および / もしくは上流の非翻訳ゲノム DNA 配列、または
 a) エンハンサー
 b) 真核生物 GAPDH の上流および / もしくは下流の非翻訳ゲノム DNA 配列
 c) プロモーター
 d) ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列
 e) ポリアデニル化部位
 f) 真核生物 GAPDH の下流および / もしくは上流の非翻訳ゲノム DNA 配列
 を、 a) または b) が、真核生物 GAPDH の上流の非翻訳ゲノム DNA 配列である場合は、 f) が、真核生物 GAPDH の下流の非翻訳ゲノム DNA 配列であり、 a) または b) が、真核生物 GAPDH の下流の非翻訳ゲノム DNA 配列である場合は、 f) が、真核生物 GAPDH の上流の非翻訳ゲノム DNA 配列であるという条件で、順に含む発現ベクターであって、前記エンハンサーの組入れが任意選択であり、前記ポリヌクレオチド配列によりコードされる前記ポリペプチドが GAPDH ではなく、前記真核生物 GAPDH プロモーターの下流の前記非翻訳ゲノム DNA 配列が、 +1 近傍のヌクレオチド位置 ~ +7000 近傍のヌクレオチド位置にわたる領域内で開始され、前記ヌクレオチド位置が、 GAPDH mRNA の転写開始点に照らした位置であり、前記真核生物 GAPDH プロモーターの下流の前記非翻訳ゲノム DNA 配列の長さが、約 100 ~ 約 15000 ヌクレオチドであり、前記真核生物 GAPDH プロモーターの上流の前記非翻訳ゲノム DNA 配列が、真核生物 GAPDH プロモーターの 5' 端近傍 ~ -3500 近傍のヌクレオチド位置にわたる領域内で開始され、前記ヌクレオチド位置が、 GAPDH mRNA の転写開始点に照らした位置であり、前記真核生物 GAPDH プロモーターの上流の前記非翻訳ゲノム DNA 配列の長さが約 100 ~ 約 15000 ヌクレオチドである、発現ベクター。
【請求項 34】
 前記発現ベクターが、さらなるプロモーター、エンハンサー、転写制御エレメント、複製起点、および選択マーカーからなる群から選択される遺伝子エレメントをさらに含む、請求項 32 または 33 に記載の発現ベクター。
【請求項 35】
 前記発現ベクターが複製起点および選択マーカーをさらに含み、前記複製起点および前記選択マーカーをコードする前記発現ベクターのポリヌクレオチド配列中に含有される CpG 部位の含量が 200 以下である、請求項 32 または 33 に記載の発現ベクター。
【請求項 36】
 請求項 1 から 31 のいずれか一項に記載の発現カセット、または請求項 32 から 35 のいずれか一項に記載の発現ベクターを含む宿主細胞。
【請求項 37】
 障害を処置するための医薬として用いられる、請求項 1 から 31 のいずれか一項に記載の発現カセット、または請求項 32 から 35 のいずれか一項に記載の発現ベクター。
【請求項 38】

10

20

30

40

50

遺伝子治療で使用するための、請求項 1 から 3 1 のいずれか一項に記載の発現カセット、または請求項 3 2 から 3 5 のいずれか一項に記載の発現ベクター。

【請求項 3 9】

ポリペプチドを発現させるための *in vitro* 法であって、宿主細胞を、請求項 1 から 3 1 のいずれか一項に記載の発現カセット、または請求項 3 2 から 3 5 のいずれか一項に記載の発現ベクターでトランスフェクトするステップと、前記ポリペプチドを回収するステップとを含む *in vitro* 法。

【請求項 4 0】

前記発現カセットまたは前記発現ベクターを、安定的にトランスフェクトする、請求項 3 9 に記載の方法。
10

【請求項 4 1】

前記発現カセットまたは前記発現ベクターを、一過性にトランスフェクトする、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 2】

哺乳動物の宿主細胞から異種ポリペプチドを発現させるための、請求項 1 から 3 1 のいずれか一項に記載の発現カセット、または請求項 3 2 から 3 5 のいずれか一項に記載の発現ベクターの使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願

本出願は、その全てが、参照によりそれらの全体において本明細書に組み込まれる 20
11 年 12 月 7 日に出願された米国仮出願第 61/567,675 号の利益を主張する。

【0 0 0 2】

本発明は、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を発現させるのに有用な発現カセットに関する。本発明はまた、発現カセットを含むベクターおよび宿主細胞、ならびにポリペプチドを宿主細胞から產生させるための発現カセットの使用も対象とする。

【背景技術】

【0 0 0 3】

組換えポリペプチドを產生するための発現系は、現況の技術水準においてよく知られており、例えば、Marino M H (1989)、Biopharm, 2:18~33; Goeddeel D V ら (1990)、Methods Enzymol, 185:3~7; Wurm F および Bernard A (1999)、Curr Opin Biotechnol, 10:156~159により記載されている。医薬への適用において用いられるポリペプチドは、CHO 細胞、NSO 細胞、SP2/0 細胞、COS 細胞、HEK 細胞、BHK 細胞などの哺乳動物細胞内で產生させることが好ましい。この目的で用いられる発現ベクターの不可欠なエレメントは通常、原核生物の複製起点および原核生物の選択マーカーを含む、原核生物、例えば *E. coli* のプラスミド増殖ユニットから選択されるが、任意選択で、真核生物の選択マーカーからも選択され、対象の(1 または複数の)構造遺伝子を発現させるための 1 または複数の発現カセットは各々、プロモーター、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含み、任意選択で、ポリアデニル化シグナルを含めた転写ターミネーターも含む。哺乳動物細胞における一過性発現では、SV40 Or i または SV40 Or iP など、哺乳動物の複製起点も組み入れることができる。プロモーターとしては、構成的プロモーターまたは誘導的プロモーターを選択することができる。転写を最適化するには、5' 側非翻訳領域にコザック配列を組み入れることができる。mRNA のプロセシング、特に、mRNA のスプライシングおよび転写終結のためには、構造遺伝子の構成(エクソン/イントロン構成)に応じて、mRNA のスプライシングシグナルのほか、ポリアデニル化シグナルも組み入れができる。遺伝子の発現は、一過性発現で行うか、または安定細胞系を用いて行う。產生細胞系における安定的で高度なポリペプチドの発現レベルは、組換えポリペプチド產生の全体的プロセス

10

20

30

40

50

にとってきわめて重要である。タンパク質、とりわけ、抗体または抗体断片などの生物学的分子に対する需要は、最近数年間で著明に増大している。高額な費用および収率の低さは、生物学的分子の利用可能性における制限因子となっており、所望の生物学的分子の収率を産業的スケールで増大させる頑健なプロセスを開発することが、大きな課題となっている。したがって、組換えポリペプチドの产生において高度な発現を得るには、発現ベクターの効率を改善することが依然として必要とされている。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0004】

本発明は一般に、組換えポリペプチドの产生において発現の増大を得るのに用いうる、10
発現力セットおよび発現ベクターなどの発現系に関する。一態様では、本開示は、プロモーター、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、および真核生物グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)プロモーターの下流の非翻訳ゲノムDNA配列を含む発現力セットであって、ポリヌクレオチド配列によりコードされるポリペプチドが、GAPDHではなく、真核生物GAPDHプロモーターの下流の非翻訳ゲノムDNA配列が、+1近傍のヌクレオチド位置～+7000近傍のヌクレオチド位置にわたる領域内で開始され、ヌクレオチド位置が、GAPDH mRNAの転写開始点に照らした位置であり、真核生物GAPDHプロモーターの下流の非翻訳ゲノムDNA配列の長さが、約100～約15000ヌクレオチドである発現力セットを提供する。

【0005】

さらなる態様では、本開示は、発現力セットが、真核生物GAPDHプロモーターまたはその断片を含まないという条件で、プロモーター、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、および真核生物GAPDHプロモーターの上流の非翻訳ゲノムDNA配列を含む発現力セットであって、ポリヌクレオチド配列によりコードされるポリペプチドがGAPDHではなく、真核生物GAPDHプロモーターの上流の非翻訳ゲノムDNA配列が、真核生物GAPDHプロモーターの5'端近傍～-3500近傍のヌクレオチド位置にわたる領域内で開始され、ヌクレオチド位置が、GAPDH mRNAの転写開始点に照らした位置であり、真核生物GAPDHプロモーターの上流の非翻訳ゲノムDNA配列の長さが100～約15000ヌクレオチドである発現力セットを提供する。さらなる態様では、本開示は、発現力セットおよび発現力セットまたは発現力セットを含む発現ベクターを含む宿主細胞を含む発現ベクターを提供する。30

【0006】

なおさらなる態様では、本開示は、ポリペプチドを発現させるためのin vitro法であって、宿主細胞を、発現力セットまたは発現ベクターでトランスフェクトするステップと、ポリペプチドを回収するステップとを含むin vitro法、および哺乳動物の宿主細胞から異種ポリペプチドを発現させるための、発現力セットまたは発現ベクターの使用を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0007】

【図1】マウスサイトメガロウイルスプロモーター(mCMV)、1番目のイントロンを含有するIgDナーアクセプター断片(IgDA)、IgG1抗体の軽鎖(IgG1LC)、脳心筋炎ウイルスに由来する配列内リボソーム進入部位(IRES)、IgG1抗体の重鎖(IgG1HC)、緑色蛍光タンパク質(GFP)、およびサルウイルス40ポリアデニル化シグナル(poly(A))からなるレポーター発現構築物(REP)を示す図である。40

【図2】トランスフェクションの5日後のCHO-S細胞におけるIgG1抗体の一過性発現を示す図である(2回にわたる独立のトランスフェクションについて、IgG1力値の平均をプロットする)。GAPDH_AベクターおよびGAPDH_Bベクター(GAPDH_AおよびGAPDH_B)、GAPDHの上流および下流のエレメントを伴わない同じベクター(AおよびB)、ならびに対照としてのpGLEX41ベクター(pGLE)

10

20

30

40

50

X 4 1) を用いて、細胞にトランスフェクトした。Octet測定器(Fortebio、Menlo、CA、USA)を用いて、上清中に蓄積されたIgG1抗体の濃度を決定した。

【図3】HEK293 EBNA細胞におけるIgG1抗体発現を示す図である。GAPDH_AベクターおよびGAPDH_Bベクター(GAPDH_AおよびGAPDH_B)ならびに対照としてのpGLEX41ベクター(pGLEX41)を用いて、細胞にトランスフェクトした。上清を採取し、トランスフェクションの10日後に、Octet測定器を用いて解析した。データは、TubeSpinベクター1つ当たりN=3の独立のトランスフェクションを表す。

【図4】細胞プールを用いるバッチ産生についての発現レベル研究を示す図である。細胞にトランスフェクトし、GAPDH_AベクターおよびGAPDH_Bベクター(GAPDH_A(1)、GAPDH_A(2)、GAPDH_B(1)およびGAPDH_B(2))、GAPDHの上流および下流のエレメントを伴わない同じベクター(A(1)およびA(2))、ならびに対照としてのpGLEX41ベクター(pGLEX41)を用いて、安定細胞のプールを創出した。培養の7日後に、Octet測定器を用いて、上清中に蓄積された抗体について、上清を解析した。各プールについて、IgG力価の平均を示す(μg/ml)。データは、プール1つ当たりN=2のバッチを表す。

【図5】安定的トランスフェクションおよび限界希釈により創出した集団についての発現レベル研究を示す図である。GAPDH_AベクターおよびGAPDH_Bベクター(GAPDH_AおよびGAPDH_B)、GAPDHの上流および下流のエレメントを伴わない同じベクター(AおよびB)、ならびに対照としてのpGLEX41ベクター(pGLEX41)を用いて、細胞にトランスフェクトした。クローンおよびミニプールにより安定的トランスフェクションから発現させたGFP蛍光の平均値は、トランスフェクションの14日後に読み取った。細胞は、96ウェルプレート内の選択圧下で培養した。データは、ベクター1つ当たりN=48のクローンまたはミニプールを表す。

【図6】培地添加物であるインスリンおよびPMA(フォルボール12-ミリステート13-アセテート；フォルボールエステル)の、上清中のIgG1抗体発現に対する効果を示す図である。GAPDH_Aベクター(GAPDH_A)によるトランスフェクションおよび対照であるpGLEX41ベクター(pGLEX41)によるトランスフェクション後、細胞を、PowerCHO2培地、4mMのGln±インスリン；およびPowerCHO2、4mMのGln、PMA±インスリンのいずれかに希釈した。pGLEX41(黒色バー)またはGAPDH_A(白色バー)については、基準培地と比較した発現の差違を観察することができなかった。

【図7】ヒトGAPDH遺伝子座についての概観を示す図である。GAPDH遺伝子は、遺伝子であるNCAPD2とIFFO1とに挟まれている。

【図8】ヒトGAPDH遺伝子、GAPDHの上流の断片化研究の解析のために創出された、GAPDHの上流および下流のエレメントおよび断片についての詳細を示す図である。NruI制限部位は、クローニングステップを容易にするために導入されたものであり、ゲノムの5'側GAPDHの上流の配列の部分ではない(したがって、アステリスクを用いて強調される)。断片のサイズは、断片1(配列番号9):511bp、断片2(配列番号10):2653bp、断片3(配列番号11):1966bp、断片4(配列番号12):1198bp、断片8(配列番号13):259bp、断片9(配列番号14):1947bp、断片11(配列番号15):1436bp、および断片17(配列番号16):1177bpである。

【図9】GAPDHの上流および下流のエレメントの断片化の発現結果を示す図である。発現結果は、トランスフェクションの10日後のCHO細胞における、一過性トランスフェクションにより得られた。定量化は、Octet測定器を用いて行った。ベクターであるpGLEX41は、陰性対照として用いられる。pGLEX41-ampAはまた、GAPDHフランкиングエレメントを伴わないベクターの基底の発現を示す陰性対照である。pGLEX41-up/downは、全長フランкиング(上流および下流の)領域

10

20

30

40

50

を含有し、陽性対照として用いられる。p G L E X 4 1 - u p は、上流のフランкиング領域だけを含有し、p G L E X 4 1 - d o w n は、下流のフランкиング領域だけを含有する。他の全ての構築物は、図8において記載される断片を含有する。断片2および3は、I g G 1 LC および I g G 1 HC と同方向でクローニングされるか、または I g G 1 LC および I g G 1 HC に対して逆方向でクローニングされた(AS)。

【図10】トランスフェクションの8日後のCHO-S細胞におけるIgG1抗体の一過性発現を示す図である(3回の独立のトランスフェクションについて、IgG力価の平均をプロットする;エラーバー:SD±)。マウスCMVプロモーター(A_GAPDH_UP)またはチャイニーズハムスターGAPDHプロモーター(A_GAPDH_UP_PR)と組み合わせて、チャイニーズハムスターGAPDHの上流のエレメントを伴うベクターを用いて、細胞にトランスフェクトした。マウスCMVプロモーター(A)またはチャイニーズハムスターGAPDHプロモーター(A_PR)だけを伴うプラスミドを、対照としてトランスフェクトした。Octet QK測定器(Fortebio, Menlo、CA、USA)を用いて、上清中に蓄積されたIgG1抗体の濃度を決定した。

10

【発明を実施するための形態】

【0008】

本開示は、プロモーター、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、および真核生物グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)プロモーターの下流の非翻訳ゲノムDNA配列を含む発現カセットおよび発現ベクターであって、ポリヌクレオチド配列によりコードされるポリペプチドがGAPDHではなく、真核生物GAPDHプロモーターの下流の非翻訳ゲノムDNA配列が、+1近傍のヌクレオチド位置～+7000近傍のヌクレオチド位置にわたる領域内で開始され、ヌクレオチド位置が、GAPDH mRNAの転写開始点に照らした位置であり、真核生物GAPDHプロモーターの下流の非翻訳ゲノムDNA配列の長さが約100～約15000ヌクレオチドである、発現カセットおよび発現ベクターに関する。

20

【0009】

本開示は、さらに、発現カセットが、真核生物GAPDHプロモーターまたはその断片を含まないという条件で、プロモーター、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、および真核生物GAPDHプロモーターの上流の非翻訳ゲノムDNA配列を含む発現カセットであって、ポリヌクレオチド配列によりコードされるポリペプチドがGAPDHではなく、真核生物GAPDHプロモーターの上流の非翻訳ゲノムDNA配列が、真核生物GAPDHプロモーターの5'端近傍～-3500近傍のヌクレオチド位置にわたる領域内で開始され、ヌクレオチド位置が、GAPDH mRNAの転写開始点に照らした位置であり、真核生物GAPDHプロモーターの上流の非翻訳ゲノムDNA配列の長さが100～約15000ヌクレオチドである、発現カセットに関する。

30

【0010】

本明細書で用いられる「発現カセット」という用語は、発現させるポリペプチドと、シス作用型転写制御エレメントの任意の組合せを含めた、プロモーター、任意選択で、エンハンサー配列など、その発現を制御する配列とをコードするポリヌクレオチド配列を包含する。遺伝子の発現、すなわち、その転写および転写産物の翻訳を制御する配列を一般に、調節単位と称する。調節単位の大部分は、遺伝子のコード配列の上流に位置し、それへと作動可能に連結されている。発現カセットはまた、ポリアデニル化部位を含む下流の3'側非翻訳領域も含有しうる。本発明の調節単位は、発現させる遺伝子、すなわち、転写単位に作動可能に連結されているか、または、例えば、異種遺伝子の5'側非翻訳領域によるなど、介在DNAによりそこから隔てられている。発現カセットのベクターへの挿入および/またはベクターからのその切出しを可能とするために、発現カセットを、適切な1または複数の制限部位で挟むことが好ましい。したがって、本発明に従う発現カセットは、発現ベクター、特に、哺乳動物の発現ベクターを構築するために用いることができる。本発明の発現カセットは、真核生物GAPDHプロモーターもしくはその断片の下流の、1もしくは複数の、例えば、2つ、3つ、もしくはこれをなお超える非翻訳ゲノムDN

40

50

A配列、および／または真核生物GAPDHプロモーターもしくはその断片の上流の、1もしくは複数の、例えば、2つ、3つ、もしくはこれをなお超える非翻訳ゲノムDNA配列を含みうる。本発明の発現カセットが、真核生物GAPDHプロモーターまたはその断片の下流および／または上流の複数のDNA配列を含む場合、これらのDNA配列は、直接連結することができる、すなわち、リンカー配列、例えば、5'端および3'端に付けられ、配列またはその断片の容易な逐次的クローニングを可能とする、制限部位を含有するリンカー配列を含みうる。代替的に、真核生物GAPDHプロモーターまたはその断片の下流および／または上流のDNA配列を直接連結しない場合もある、すなわち、介在DNA配列と共にクローニングすることもできる。

【0011】

10

本明細書で用いられる「ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列」という用語は、ポリペプチドを発現させる遺伝子、好ましくは、異種遺伝子をコードするDNAを包含する。

【0012】

20

「異種コード配列」、「異種遺伝子配列」、「異種遺伝子」、「組換え遺伝子」、または「遺伝子」という用語は、互換的に用いられる。これらの用語は、宿主細胞において、好ましくは、哺乳動物細胞において発現させ、採取することが求められる組換え産物、特に、組換え異種タンパク質産物をコードするDNA配列を指す。遺伝子産物は、ポリペプチドでありうる。異種遺伝子配列は、天然では宿主細胞内に存在せず、同じ種または異なる種の生物に由来し、遺伝子改変されている場合がある。

【0013】

「タンパク質」および「ポリペプチド」という用語は、隣接する残基のアルファ-アミノ基とカルボキシ基との間のペプチド結合により他の残基に付けられる一連のアミノ酸残基を包含するように互換的に用いられる。

【0014】

30

本明細書で用いられる「非翻訳ゲノムDNA配列」という用語は、生物の遺伝情報を構成するDNAを包含する。ほとんど全ての生物のゲノムはDNAであり、唯一の例外は、RNAゲノムを有する一部のウイルスである。大半の生物におけるゲノムDNA分子は、染色体と呼ばれるDNA-タンパク質複合体へと組織立てられている。染色体のサイズ、数、およびゲノムDNAの性質は、異なる生物の間で変化する。ウイルスDNAゲノムは、一本鎖の場合もあり、二本鎖の場合もあり、直鎖状の場合もあり、環状の場合もある。他の全ての生物は、二本鎖DNAゲノムを有する。細菌は、単一の環状染色体を有する。真核生物では、大半のゲノムDNAが、サイズの異なる複数の直鎖状染色体として核内に配置される（核DNA）。真核細胞は、ゲノムDNAを、ミトコンドリアにもさらに含有し、植物および下等真核生物では、葉緑体にもさらに含有する。このDNAは通常環状分子であり、これらの細胞小器官内に複数のコピーとして存在する。非翻訳ゲノムDNA配列は通常、プロモーターに作動可能に連結されておらず、したがって、翻訳されない。非翻訳ゲノムDNA配列は、翻訳されない（1または複数の）遺伝子、したがって、例えば、発現しないタンパク質をコードする（1または複数の）遺伝子を含有する場合がある。

【0015】

40

本明細書で用いられる「真核生物GAPDHプロモーターの下流の非翻訳ゲノムDNA配列」という用語は、真核生物GAPDHプロモーターの3'側の非翻訳真核生物ゲノムDNAに対応する。真核生物GAPDHプロモーターの下流の非翻訳ゲノムDNA配列は通常、+1近傍のヌクレオチド位置において、好ましくは、ヌクレオチド位置+1において開始され、ヌクレオチド位置が、GAPDH mRNAの転写開始点に照らした位置であり、すなわち、GAPDHをコードする真核生物遺伝子の転写開始起点に照らした位置である。真核生物GAPDHプロモーターと同じ由来である。例えば、GAPDHプロモーターがヒト由来である場合、ヒトGAPDHプロモーターの下流の非翻訳ゲノムDNA配列も同様にヒト由来であり、ヒトGAPDHプロモーターの下流の自然発生のヒトゲノムDNA配列

50

に対応する。

【0016】

本明細書で用いられる「真核生物GAPDHプロモーターの上流の非翻訳ゲノムDNA配列」という用語は、真核生物GAPDHプロモーターの5'側の非翻訳真核生物ゲノムDNAに対応する。真核生物GAPDHプロモーターの上流の非翻訳ゲノムDNA配列は通常、真核生物GAPDHプロモーターの5'端近傍のヌクレオチド位置において、好ましくは、真核生物GAPDHプロモーターの5'端にすぐ後続するヌクレオチド位置において開始される。真核生物GAPDHプロモーターの上流の非翻訳ゲノムDNA配列は通例、真核生物GAPDHプロモーターと同じ由来である、例えば、GAPDHプロモーターがヒト由来である場合、ヒトGAPDHプロモーターの上流の非翻訳ゲノムDNA配列も同様にヒト由来であり、ヒトGAPDHプロモーターの上流の自然発生のヒトゲノムDNA配列に対応する。
10

【0017】

本明細書で示される真核生物GAPDHプロモーター、真核生物GAPDHプロモーターの下流または上流の非翻訳ゲノムDNA配列、および他のDNA配列の位置は、GAPDH mRNAの転写開始点に照らした位置であり、例えば、とりわけ、別段に示されない限りにおいて、真核生物のGAPDHの転写開始起点に照らした位置である。

【0018】

「真核生物GAPDHプロモーターの上流の非翻訳ゲノムDNA配列が～まで伸びる」または「真核生物GAPDHプロモーターの下流の非翻訳ゲノムDNA配列が～まで伸びる」という用語は、真核生物GAPDHプロモーターの上流および／または下流の非翻訳ゲノムDNA配列の全長のうち、始点から特定の遺伝子エレメントまでの伸長部分、例えば、イントロンまでの伸長部分を定義するのに用いられる。この伸長部分は、遺伝子エレメント、例えば、イントロンまたはその一部をコードするDNA配列の全長を包含する。
20

【0019】

ヒト、ラット、およびマウスについては、真核生物GAPDHプロモーターならびにGAPDHプロモーターの上流および／または下流の真核生物ゲノムDNAを、NCBI公開データバンクにおいて見出すことができ（ヒト、マウス、ラット、およびチャイニーズハムスターのGAPDH遺伝子のエントリーは、それぞれ、Gene ID 2597（mRNA：NM_002046.3）、Gene ID 14433（mRNA：NM_008084.2）、Gene ID 24383（mRNA：NM_017008.3）、およびGene ID 100736557（mRNA：NM_001244854.2）である；National Center for Biotechnology Information（NCBI）：<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>）、ヒトGAPDH遺伝子については、図7および8に例示的に示されている。
30

【0020】

真核生物GAPDHプロモーターは通例、GAPDH mRNAの転写開始点に照らして、bp - 500近傍～+50近傍に及ぶと考えられている。ヒトGAPDHプロモーターは、第12染色体上に位置する。Gravenら（Gravenら（1999）、Biochimica et Biophysica Acta、147：203～218）は、断片化研究に基づき、ヒトGAPDHプロモーターが、GAPDH mRNAの転写開始点に照らして、bp - 488～+20に及ぶと考えている。NCBI公開データバンクに従うと、ヒトGAPDHプロモーターは、NCBI公開データバンクにより定義されるGAPDH mRNAの転写開始点に照らして、bp - 462～+46に及ぶ。とりわけ、別段に示されない限り、本明細書で言及されるヒトGAPDHプロモーターは、GAPDH mRNAの転写開始点に照らして、-462～+46位に及び、これは、配列番号17のbp 4071～4578に及ぶ配列に対応する。
40

【0021】

本明細書で言及されるヒト、マウス、およびラット由来のGAPDH遺伝子、IFFO1遺伝子、およびNCAPD2遺伝子のDNAに用いられる番号付けは、NCBI公開デ
50

ータバンク（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>）においてこれらの遺伝子に用いられる番号付けに対応する。

【0022】

本明細書で用いられる「プロモーター」という用語は、一般に遺伝子の上流に位置する調節DNA配列であって、RNAポリメラーゼをDNAに結合するように指示し、RNAの合成を誘発することにより転写の開始を媒介する、調節DNA配列を定義する。

【0023】

本明細書で用いられる「エンハンサー」という用語は、遺伝子の転写を強化するように作用するヌクレオチド配列であって、遺伝子の同一性、遺伝子に照らした配列の位置、または配列の配向とは独立のヌクレオチド配列を定義する。本発明のベクターは、任意選択で、エンハンサーを含む。

10

【0024】

「機能的に連結された」という用語と「作動可能に連結された」という用語とは、互換的に用いられ、2つ以上のDNAセグメント、特に、発現させる遺伝子配列とそれらの発現を制御する配列との間の機能的な関係を指す。例えば、それが適切な宿主細胞または他の発現系におけるコード配列の転写を刺激または調節する場合は、シス作用型転写制御エレメントの任意の組合せを含めたプロモーター配列および／またはエンハンサー配列を、コード配列に作動可能に連結する。転写される遺伝子配列に作動可能に連結されたプロモーター調節配列は、転写される配列と物理的に隣接する。

20

【0025】

「配向」とは、所与のDNA配列におけるヌクレオチドの順序を指す。例えば、別のDNA配列に対して逆方向にあるDNA配列の配向とは、別の配列に照らした、配列の5'側～3'側の順序が、配列が得られたDNA中の基準点と対照して反転される配向である。このような基準点には、供給源であるDNAの他の指定されたDNA配列の転写方向、および／またはこの配列を含有する複製可能なベクターの複製起点が含まれる。

30

【0026】

本明細書で用いられる「発現ベクター」という用語は、適切な宿主細胞へとトランスフェクションされると、宿主細胞内で高レベルの組換え遺伝子産物を発現させる単離DNA分子および精製DNA分子を包含する。組換え遺伝子産物をコードするDNA配列に加えて、発現ベクターは、宿主細胞系における、DNAコード配列のmRNAへの効率的な転写およびmRNAのタンパク質への効率的な翻訳に要請される調節性DNA配列を含む。

【0027】

本明細書で用いられる「宿主細胞」または「宿主細胞系」という用語は、任意の細胞、特に、培養物中で成長し、所望の組換え産物タンパク質を発現させることが可能な哺乳動物細胞を包含する。

【0028】

本明細書で用いられる「断片」という用語は、それぞれのヌクレオチド配列の部分、例えば、真核生物GAPDHプロモーターの下流および／または上流の非翻訳ゲノムDNA配列の部分、またはプロモーターなど、特定の遺伝子エレメントをコードするヌクレオチド配列の部分を包含する。真核生物GAPDHプロモーターの下流および／または上流の非翻訳ゲノムDNA配列の断片は、生物学的活性を保持することが可能であり、よって、プロモーターに作動可能に連結されたコード配列の発現パターンを変化させる、例えば、増大させることができる。真核生物GAPDHプロモーターの下流および／または上流の非翻訳ゲノムDNA配列の断片は、少なくとも約100～3000bp近傍、好ましくは約200～2800bp近傍、より好ましくは約300～2000bp近傍のヌクレオチド、特に、約500～1500bp近傍のヌクレオチドの範囲にわたりうる。真核生物GAPDHプロモーターの下流および／または上流の非翻訳ゲノムDNA配列の断片を、本発明の発現カセット内にクローニングするためには、容易なクローニングを可能とする制限部位を含有するリンカー配列を、断片の5'端および3'端に付けるのが通例である。

40

50

【0029】

本明細書で用いられる「ヌクレオチド配列の同一性」または「同一なヌクレオチド配列」という用語は、最大の配列同一性パーセントに達するように配列をアライニングし、必要な場合はギャップを導入した後における、例えば、真核生物GAPDHプロモーターの下流および／または上流の非翻訳ゲノムDNA配列のヌクレオチド配列と同一な、候補配列中のヌクレオチドの百分率を包含する。したがって、配列同一性は、2つのヌクレオチド配列のヌクレオチド位置の類似性を比較するのに一般に用いられる標準的な方法により決定することができる。通例、候補配列の、真核生物GAPDHプロモーターの下流および／または上流の非翻訳ゲノムDNA配列との、ヌクレオチド配列の同一性は、例えば、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、および100%を含め、少なくとも80%、好ましくは、少なくとも85%、より好ましくは、少なくとも90%であり、最も好ましくは、少なくとも95%、特定すると96%、より特定すると97%、なおより特定すると98%、最も特定すると99%である。

10

【0030】

本明細書で用いられる「CpG部位」という用語は、直鎖状の塩基配列中のその長さに沿って、グアニンヌクレオチドの隣にシトシンヌクレオチドが現れるDNAの領域を包含する。「CpG」とは、「-C-リン酸-G-」、すなわち、1つのリン酸だけで隔てられたシトシンおよびグアニンの略称であり、リン酸により、任意の2つのヌクレオシドが、DNA中で一体に連結されている。「CpG」という表記は、この直鎖状配列を、シトシンとグアニンとによるCG塩基対合から識別するのに用いられる。

20

【0031】

本明細書で用いられる「代替的なコドン使用」という用語は、CpG配列モチーフを回避するための、同じアミノ酸をコードする代替的なコドンの使用を包含する。この用語は、好ましくは、内部のCpG部位を有さないコドン（例えば、アラニンをコードし、CpG部位を含有するGCGは、GCT、GCC、またはGCAで置きかえることができる）を用いることのほか、2つのコドンが接続されて新たなCpG部位をもたらすのを回避することも包含する。

【0032】

DNA配列の長さに関して本明細書で用いられ、かつ、GAPDH mRNAの転写開始点に照らしたヌクレオチド位置、例えば、真核生物のGAPDHの転写開始起点に照らしたヌクレオチド位置に関しても本明細書で用いられる「約または近傍」という用語は、言明された値に対して最大で±50%、通例は最大で±10%の偏差を伴う値を包含し、例えば、「約3000ヌクレオチド」には、2700～3300ヌクレオチド、好ましくは2900～3100ヌクレオチド、より好ましくは2995～3005ヌクレオチドの値が含まれ、「約100ヌクレオチド」には、50～150ヌクレオチド、好ましくは90～110ヌクレオチド、より好ましくは95～105ヌクレオチドの値が含まれ、「約15000ヌクレオチド」には、13500～16500ヌクレオチド、好ましくは14500～15500ヌクレオチド、より好ましくは14990～15010ヌクレオチド、最も好ましくは14995～15005ヌクレオチドの値が含まれ、「約200ヌクレオチド」には、150～250ヌクレオチド、好ましくは190～210ヌクレオチド、より好ましくは195～205ヌクレオチドの値が含まれ、「約8000ヌクレオチド」には、7200～8800ヌクレオチド、好ましくは7500～8500ヌクレオチド、より好ましくは7990～8010ヌクレオチド、最も好ましくは7995～8005ヌクレオチドの値が含まれ、「約500ヌクレオチド」には、450～550ヌクレオチド、好ましくは475～525ヌクレオチド、より好ましくは490～510ヌクレオチド、最も好ましくは495～505ヌクレオチドの値が含まれ、「約5000ヌクレオチド」には、4500～5500ヌクレオチド、好ましくは4750～5250ヌクレオチド、より好ましくは4990～5010ヌクレオチド、最も好ましくは4995～5005ヌクレオチドの値が含まれ、「約1000ヌクレオチド」には、900～1100ヌクレ

30

40

50

オチド、好ましくは 950 ~ 1050 ヌクレオチド、より好ましくは 990 ~ 1010 ヌクレオチド、最も好ましくは 995 ~ 1005 ヌクレオチドの値が含まれ、「約 4500 ヌクレオチド」には、4050 ~ 4950 ヌクレオチド、好ましくは 4250 ~ 4750 ヌクレオチド、より好ましくは 4490 ~ 4510 ヌクレオチド、最も好ましくは 4495 ~ 4505 ヌクレオチドの値が含まれ、「約 1500 ヌクレオチド」には、1350 ~ 1650 ヌクレオチド、好ましくは 1450 ~ 1550 ヌクレオチド、より好ましくは 1490 ~ 1510 ヌクレオチド、最も好ましくは 1495 ~ 1505 ヌクレオチドの値が含まれ、「約 4000 ヌクレオチド」には、3600 ~ 4400 ヌクレオチド、好ましくは 3800 ~ 4200 ヌクレオチド、より好ましくは 3990 ~ 4010 ヌクレオチド、より好ましくは 3995 ~ 4005 ヌクレオチドの値が含まれ、「約 2000 ヌクレオチド」には、1800 ~ 2200 ヌクレオチド、好ましくは 1900 ~ 2100 ヌクレオチド、より好ましくは 1990 ~ 2010 ヌクレオチド、最も好ましくは 1995 ~ 2005 ヌクレオチドの値が含まれ、「約 3500 ヌクレオチド」には、3150 ~ 3850 ヌクレオチド、好ましくは 3300 ~ 3700 ヌクレオチド、より好ましくは 3490 ~ 3510 ヌクレオチド、最も好ましくは 3495 ~ 3505 ヌクレオチドの値が含まれ、「約 2700 ヌクレオチド」には、2430 ~ 2970 ヌクレオチド、好ましくは 2600 ~ 2800 ヌクレオチド、より好ましくは 2690 ~ 2710 ヌクレオチド、最も好ましくは 2695 ~ 2705 ヌクレオチドの値が含まれ、「約 3300 ヌクレオチド」には、2970 ~ 3630 ヌクレオチド、好ましくは 3100 ~ 3500 ヌクレオチド、より好ましくは 3290 ~ 3310 ヌクレオチド、最も好ましくは 3295 ~ 3305 ヌクレオチドの値が含まれ、「約 3200 ヌクレオチド」には、2880 ~ 3520 ヌクレオチド、好ましくは 3000 ~ 3400 ヌクレオチド、より好ましくは 3190 ~ 3210 ヌクレオチド、最も好ましくは 3195 ~ 3205 ヌクレオチドの値が含まれ、+7000 近傍または +7000 位近傍には、+6300 ~ +7700 位、好ましくは +6700 ~ +7300 位、より好ましくは +6990 ~ +7010 位、最も好ましくは +6995 ~ +7005 位が含まれ、+1 近傍または +1 位近傍には、-10 ~ +10 位、好ましくは -5 ~ +5 位、より好ましくは -1 ~ +2 位が含まれ、-3500 近傍または -3500 位近傍には、-3150 ~ -3850 位、好ましくは -3300 ~ -3700 位、より好ましくは -3490 ~ -5010 位、最も好ましくは -3495 ~ -3505 位が含まれる。本明細書で言及されるヒト、マウス、およびラット由来の GAPDH 遺伝子、IFFO1 遺伝子、および NCAPD2 遺伝子の DNA に用いられる番号付けに関して本明細書で用いられるか、またはある配列番号の配列内の位置に関して本明細書で用いられる「近傍」という用語は、最大で ±500 bp、好ましくは ±100 bp、より好ましくは ±10 bp、最も好ましくは ±5 bp の偏差を伴う値を包含する。

【0033】

一実施形態では、本開示は、プロモーター、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、および真核生物 GAPDH プロモーターの下流の非翻訳ゲノム DNA 配列を含む発現カセットであって、ポリヌクレオチド配列によりコードされるポリペプチドが GAPDH ではなく、真核生物 GAPDH プロモーターの下流の非翻訳ゲノム DNA 配列が、+1 近傍のヌクレオチド位置 ~ +7000 近傍のヌクレオチド位置にわたる領域内で開始され、ヌクレオチド位置が、GAPDH mRNA の転写開始点に照らした位置であり、真核生物 GAPDH プロモーターの下流の非翻訳ゲノム DNA 配列の長さが約 100 ~ 約 15000 ヌクレオチドである、発現カセットを提供する。一実施形態では、真核生物 GAPDH プロモーターの下流の非翻訳ゲノム DNA 配列の長さが、少なくとも約 100 ヌクレオチドであり、その最長の場合で、IFFO1 遺伝子の最後から 2 番目のイントロンまたはその一部まで伸びる。一実施形態では、真核生物 GAPDH プロモーターの下流の非翻訳ゲノム DNA 配列の長さが、少なくとも約 100 ヌクレオチドであり、その最長の場合で、IFFO1 遺伝子の最後のイントロンまで伸びる。

【0034】

ヒト IFFO1 遺伝子は、第 12 染色体の bp 6665249 ~ 6648694 近傍

10

20

30

40

50

のヒトDNAに位置する(N C B I G e n e I D : 2 5 9 0 0)。一実施形態では、その最長の場合で、ヒトにおけるI F F 0 1遺伝子の最後のイントロンまで伸びる真核生物G A P D Hプロモーターの下流の非翻訳ゲノムDNA配列の長さが、その最長の場合で、ヒトにおけるI F F 0 1遺伝子をコードする第12染色体のb p 6 6 5 0 6 7 7 (+ 7 0 2 1位)近傍まで及ぶ。一実施形態では、その最長の場合で、ヒトにおけるI F F 0 1遺伝子の最後から2番目のイントロンまで伸びる真核生物G A P D Hプロモーターの下流の非翻訳ゲノムDNA配列の長さが、その最長の場合で、ヒトにおけるI F F 0 1遺伝子をコードする第12染色体のb p 6 6 5 7 2 3 0 (+ 1 3 5 7 4位)近傍まで及ぶ。その最長の場合で、それぞれ、ヒトにおけるI F F 0 1遺伝子の最後のイントロンまで伸びる真核生物G A P D Hプロモーターの下流の非翻訳ゲノムDNA配列、およびヒトにおけるI F F 0 1遺伝子の最後から2番目のイントロンまで伸びる真核生物G A P D Hプロモーターの下流の非翻訳ゲノムDNA配列が、第12染色体のb p 6 6 5 7 2 3 0 ~ 6 6 3 9 1 2 5 を示す配列番号17に含まれている(N C B I G e n e I D : 2 5 9 0 0)。最後のイントロンまで伸びる真核生物G A P D Hプロモーターの下流の非翻訳ゲノムDNA配列は、配列番号17により示されるヌクレオチド配列のb p 1 1 5 5 3 近傍まで及び、最後から2番目のイントロンまで伸びる真核生物G A P D Hプロモーターの下流の非翻訳ゲノムDNA配列は、配列番号17により示されるヌクレオチド配列のb p 1 8 1 0 6 近傍まで及ぶ。

10

【0 0 3 5】

マウスI F F 0 1遺伝子(N C B I G e n e I D : 3 2 0 6 7 8)は、第6染色体のb p 1 2 5 0 9 5 2 5 9 ~ 1 2 5 1 1 1 8 0 0 近傍のマウスDNAに位置する。一実施形態では、その最長の場合で、マウスにおけるI F F 0 1遺伝子の最後のイントロンまで伸びる真核生物G A P D Hプロモーターの下流の非翻訳ゲノムDNA配列の長さが、その最長の場合で、マウスにおけるI F F 0 1遺伝子をコードする第6染色体のb p 1 2 5 1 0 9 2 1 1 (+ 6 3 9 1位)近傍まで及ぶ。一実施形態では、その最長の場合で、マウスにおけるI F F 0 1遺伝子の最後から2番目のイントロンまで伸びる真核生物G A P D Hプロモーターの下流の非翻訳ゲノムDNA配列の長さが、その最長の場合で、マウスにおけるI F F 0 1遺伝子をコードする第6染色体のb p 1 2 5 1 0 3 5 2 1 (+ 1 2 0 8 1位)近傍まで及ぶ。その最長の場合で、マウスにおけるI F F 0 1遺伝子の、それぞれ、最後のイントロンまで伸びる真核生物G A P D Hプロモーターの下流の非翻訳ゲノムDNA配列、および最後から2番目のイントロンまで伸びる真核生物G A P D Hプロモーターの下流の非翻訳ゲノムDNA配列が、第6染色体のb p 1 2 5 1 0 3 5 2 1 ~ 1 2 5 1 1 9 8 3 2 を示す配列番号18に含まれている(N C B I G e n e I D : 3 2 0 6 7 8)。マウスにおけるI F F 0 1遺伝子の最後のイントロンまで伸びる真核生物G A P D Hプロモーターの下流の非翻訳ゲノムDNA配列は、配列番号18により示されるヌクレオチド配列のb p 1 0 6 2 2 近傍まで及び、マウスにおけるI F F 0 1遺伝子の最後から2番目のイントロンまで伸びる真核生物G A P D Hプロモーターの下流の非翻訳ゲノムDNA配列は、配列番号18により示されるヌクレオチド配列のb p 1 6 3 1 2 近傍まで及ぶ。

20

30

【0 0 3 6】

ラットI F F 0 1遺伝子(N C B I G e n e I D : 3 6 2 4 3 7)は、第4染色体のb p 1 6 1 2 6 4 9 6 6 ~ 1 6 1 2 8 2 1 5 0 近傍のラットDNAに位置する。一実施形態では、その最長の場合で、ラットにおけるI F F 0 1遺伝子の最後のイントロンまで伸びる真核生物G A P D Hプロモーターの下流の非翻訳ゲノムDNA配列の長さが、その最長の場合で、ラットにおけるI F F 0 1遺伝子をコードする第4染色体のb p 1 6 1 2 8 0 9 3 7 (+ 5 1 5 4位)近傍まで及ぶ。一実施形態では、その最長の場合で、ラットにおけるI F F 0 1遺伝子の最後から2番目のイントロンまで伸びる真核生物G A P D Hプロモーターの下流の非翻訳ゲノムDNA配列の長さが、その最長の場合で、ラットにおけるI F F 0 1遺伝子をコードする第4染色体のb p 1 6 1 2 7 9 4 5 1 (+ 6 6 4 0位)近傍まで及ぶ。

40

50

【0037】

その最長の場合で、それぞれ、ラットにおけるIFFO1遺伝子の最後のイントロンまで伸びる真核生物GAPDHプロモーターの下流の非翻訳ゲノムDNA配列、および最後から2番目のイントロンまで伸びる真核生物GAPDHプロモーターの下流の非翻訳ゲノムDNA配列が、第4染色体のbp 161279451~161290508を示す配列番号19に含まれている(NCBI Gene ID: 362437)。IFFO1遺伝子の最後のイントロンまで伸びる真核生物GAPDHプロモーターの下流の非翻訳ゲノムDNA配列は、配列番号19により示されるヌクレオチド配列のbp 9572近傍まで及び、IFFO1遺伝子の最後から2番目のイントロンまで伸びる真核生物GAPDHプロモーターの下流の非翻訳ゲノムDNA配列は、配列番号19により示されるヌクレオチド配列のbp 11058近傍まで及ぶ。

10

【0038】

チャイニーズハムスターIFFO1遺伝子(NCBI Gene ID: 100753382)は、bp 3577293~3593683近傍のチャイニーズハムスターDNAに位置する。一実施形態では、その最長の場合で、チャイニーズハムスターにおけるIFFO1遺伝子の最後のイントロンまで伸びる真核生物GAPDHプロモーターの下流の非翻訳ゲノムDNA配列の長さが、その最長の場合で、チャイニーズハムスターにおけるIFFO1遺伝子をコードするbp 3579014(+6883位)近傍まで及ぶ。一実施形態では、その最長の場合で、チャイニーズハムスターにおけるIFFO1遺伝子の最後から2番目のイントロンまで伸びる真核生物GAPDHプロモーターの下流の非翻訳ゲノムDNA配列の長さが、その最長の場合で、チャイニーズハムスターにおけるIFFO1遺伝子をコードするbp 3585061(+12930位)近傍まで及ぶ。NCBIデータバンクでは、染色体の位置がいまだ注記されておらず、最新の配列情報も、多くの未知の塩基を含有する。したがって、境界についての精密な注記は、より正確な配列情報が入手可能となるのに従い変化する可能性がある。

20

【0039】

その最長の場合で、チャイニーズハムスターにおけるIFFO1遺伝子のそれぞれ、最後のイントロンまで伸びる、真核生物GAPDHプロモーターの下流の非翻訳ゲノムDNA配列、および最後から2番目のイントロンまで伸びる、真核生物GAPDHプロモーターの下流の非翻訳ゲノムDNA配列は、bp 3567932~3585061を示す配列番号29に包含される。IFFO1遺伝子の最後のイントロンまで伸びる、真核生物GAPDHプロモーターの下流の非翻訳ゲノムDNA配列は、配列番号29により示されるヌクレオチド配列のbp 11083近傍まで及び、IFFO1遺伝子の最後から2番目のイントロンまで伸びる、真核生物GAPDHプロモーターの下流の非翻訳ゲノムDNA配列は、配列番号29により示されるヌクレオチド配列のbp 17130近傍まで及ぶ。

30

【0040】

さらなる実施形態では、真核生物GAPDHプロモーターの下流の非翻訳ゲノムDNA配列が、真核生物のGAPDHのポリアデニル化部位において開始される、例えば、真核生物のGAPDHのポリアデニル化部位をコードする最初のヌクレオチドにおいて開始される。真核生物GAPDHプロモーターの下流の非翻訳ゲノムDNA配列は、真核生物のGAPDHのポリアデニル化部位の下流で開始される、例えば、真核生物のGAPDHのポリアデニル化部位をコードする最後のヌクレオチドにすぐ後続して開始されることが好ましい。真核生物GAPDHプロモーターの下流の非翻訳ゲノムDNA配列は、真核生物のGAPDHのポリアデニル化部位の下流で開始され、真核生物GAPDHプロモーターの下流の非翻訳ゲノムDNA配列の長さは、少なくとも約100ヌクレオチドであり、その最長の場合で、IFFO1遺伝子の最後から2番目のイントロンまで伸びることがなおより好ましい。

40

【0041】

一実施形態では、真核生物GAPDHプロモーターの下流の非翻訳ゲノムDNA配列が

50

、 + 3 8 8 1 近傍のヌクレオチド位置 ~ + 5 0 0 0 近傍のヌクレオチド位置にわたる領域内で、好ましくは + 3 9 3 1 近傍のヌクレオチド位置 ~ + 5 0 0 0 近傍のヌクレオチド位置にわたる領域内で、より好ましくは + 4 0 7 0 近傍のヌクレオチド位置 ~ + 5 0 0 0 近傍のヌクレオチド位置にわたる領域内で開始され、ヌクレオチド位置が、 G A P D H m R N A の転写開始点に照らした位置である。例えば、本発明で用いられる真核生物の G A P D H のポリアデニル化部位の下流で開始される真核生物 G A P D H プロモーターの下流の非翻訳ゲノム D N A 配列は通例、 + 3 9 3 1 位近傍のヌクレオチド位置において、好ましくは + 4 0 7 0 近傍のヌクレオチド位置において開始され、ヌクレオチド位置が、 G A P D H m R N A の転写開始点に照らした位置である。

【 0 0 4 2 】

10

ヒトでは、ヒト G A P D H ポリアデニル化部位の下流の非翻訳ゲノム D N A 配列が、ヌクレオチド位置 + 3 9 3 1 の近傍（配列番号 17 に示される b p 8 4 6 3 に対応する G A P D H m R N A の転写開始点に照らして）において開始される。G A P D H ポリアデニル化部位の下流の非翻訳ゲノム D N A 配列がヒトに由来する場合は、G A P D H ポリアデニル化部位の下流の非翻訳ゲノム D N A 配列が、 + 3 9 3 1 近傍（配列番号 17 に示される b p 8 4 6 3 に対応する G A P D H m R N A の転写開始点に照らして）において開始され、その長さが、配列番号 17 に示される b p 8 4 6 3 近傍 ~ 1 1 8 1 9 近傍の配列に対応する 3 3 5 7 b p 近傍であることが好ましく、G A P D H ポリアデニル化部位の下流の非翻訳ゲノム D N A 配列が、 + 4 0 7 0 近傍（配列番号 17 に示される b p 8 6 0 2 に対応する G A P D H m R N A の転写開始点に照らして）において開始され、その長さが、配列番号 17 に示される b p 8 6 0 2 近傍 ~ 1 1 8 1 9 近傍の配列に対応する 3 2 1 8 b p 近傍であることがより好ましい。

20

【 0 0 4 3 】

さらなる実施形態では、真核生物 G A P D H プロモーターの下流の非翻訳ゲノム D N A 配列が、配列番号 8 および 2 1 またはその断片からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む。

【 0 0 4 4 】

さらなる実施形態では、真核生物 G A P D H プロモーターの下流の非翻訳ゲノム D N A 配列が、配列番号 8 および 2 1 またはその断片からなる群から選択されるヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列を含む。

30

【 0 0 4 5 】

さらなる実施形態では、真核生物 G A P D H プロモーターの下流の非翻訳ゲノム D N A 配列が、配列番号 8 および 2 1 またはその断片からなる群から選択されるヌクレオチド配列と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む。

【 0 0 4 6 】

一部の実施形態では、配列番号 8 および 2 1 またはその断片からなる群から選択されるヌクレオチド配列が、5 力所以下、好ましくは 4 力所以下、より好ましくは 3 力所以下、最も好ましくは 2 力所以下、特に、1 力所の核酸修飾を含み、（1 または複数の）核酸修飾は、核酸置換であることが好ましい。

【 0 0 4 7 】

40

さらなる実施形態では、真核生物 G A P D H プロモーターの下流の非翻訳ゲノム D N A 配列の長さが、好ましくは約 2 0 0 ~ 約 8 0 0 0 ヌクレオチド、より好ましくは約 5 0 0 ~ 約 5 0 0 0 ヌクレオチド、なにより好ましくは約 1 0 0 0 ~ 約 4 5 0 0 ヌクレオチド、最も好ましくは約 1 5 0 0 ~ 約 4 0 0 0 ヌクレオチド、特に、約 2 0 0 0 ~ 約 3 5 0 0 ヌクレオチド、より特定すると約 2 7 0 0 ~ 約 3 3 0 0 、なにより特定すると約 3 2 0 0 、最も特定すると 3 2 1 8 ヌクレオチドである。本明細書で規定される真核生物 G A P D H プロモーターの下流の非翻訳ゲノム D N A 配列の長さには、非翻訳ゲノム D N A 配列へと付加されるリンカー配列を組み入れない。

【 0 0 4 8 】

さらなる実施形態では、真核生物 G A P D H プロモーターの下流の非翻訳ゲノム D N A

50

配列が、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列と同方向に配向している。

【0049】

さらなる実施形態では、真核生物GAPDHプロモーターの下流の非翻訳ゲノムDNA配列が、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列と逆方向に配向している。

【0050】

一部の実施形態では、プロモーター、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、および真核生物GAPDHプロモーターの下流の非翻訳ゲノムDNA配列を含む発現力セットが、真核生物GAPDHプロモーターの上流の非翻訳ゲノムDNA配列をさらに含み、真核生物GAPDHプロモーターの上流の非翻訳ゲノムDNA配列が、真核生物GAPDHプロモーターの5'端近傍～-3500近傍のヌクレオチド位置にわたる領域内で開始され、ヌクレオチド位置が、GAPDH mRNAの転写開始点に照らした位置であり、真核生物GAPDHプロモーターの上流の非翻訳ゲノムDNA配列の長さが、約100～約15000ヌクレオチドである。10

【0051】

別の実施形態では、発現力セットが、真核生物GAPDHプロモーターまたはその断片を含まないという条件で、発現力セットが、プロモーター、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、および真核生物GAPDHプロモーターの上流の非翻訳ゲノムDNA配列を含み、ポリヌクレオチド配列によりコードされるポリペプチドがGAPDHではなく、真核生物GAPDHプロモーターの上流の非翻訳ゲノムDNA配列が、真核生物GAPDHプロモーターの5'端近傍～-3500近傍のヌクレオチド位置にわたる領域内で開始され、ヌクレオチド位置が、GAPDH mRNAの転写開始点に照らした位置であり、真核生物GAPDHプロモーターの上流の非翻訳ゲノムDNA配列の長さが100～約15000ヌクレオチドである。20

【0052】

一部の実施形態では、発現力セットが、真核生物GAPDHプロモーターの下流の非翻訳ゲノムDNA配列をさらに含み、真核生物GAPDHプロモーターの下流の非翻訳ゲノムDNA配列が、+1近傍のヌクレオチド位置～+7000近傍のヌクレオチド位置にわたる領域内で開始され、ヌクレオチド位置が、GAPDH mRNAの転写開始点に照らした位置であり、真核生物GAPDHプロモーターの下流の非翻訳ゲノムDNA配列の長さが約100～約15000ヌクレオチドである。これらの実施形態では、用いられる真核生物GAPDHプロモーターの下流の非翻訳ゲノムDNA配列が、例えば、前出で記載されている。30

【0053】

一部の実施形態では、真核生物GAPDHプロモーターの上流の非翻訳ゲノムDNA配列の長さが、好ましくは約200～約8000ヌクレオチド、より好ましくは約500～約5000ヌクレオチド、なにより好ましくは約1000～約4500ヌクレオチド、最も好ましくは約1500～約4000ヌクレオチド、特に、約2000～約3500ヌクレオチド、より特定すると約2700～約3300、なにより特定すると約3200、最も特定すると3158ヌクレオチドの長さである。本明細書で規定される真核生物GAPDHプロモーターの上流の非翻訳ゲノムDNA配列の長さには、非翻訳ゲノムDNA配列へと付加されるリンカー配列を組み入れない。40

【0054】

さらなる実施形態では、真核生物GAPDHプロモーターの上流の非翻訳ゲノムDNA配列の長さが、少なくとも約100ヌクレオチドであり、その最長の場合で、NCA PD 2遺伝子の開始コドンまで伸びる。さらなる実施形態では、真核生物GAPDHプロモーターの上流の非翻訳ゲノムDNA配列の長さが、少なくとも約100ヌクレオチドであり、その最長の場合で、NCA PD 2遺伝子の最後から3番目のイントロンまで伸びる。さらなる実施形態では、真核生物GAPDHプロモーターの上流の非翻訳ゲノムDNA配列の長さが、少なくとも約100ヌクレオチドであり、その最長の場合で、NCA PD 2遺伝子の最後から2番目のイントロンまで伸びる。さらなる実施形態では、真核生物GAP50

D H プロモーターの上流の非翻訳ゲノムDNA配列の長さが、少なくとも約100ヌクレオチドであり、その最長の場合で、N C A P D 2 遺伝子の最後のイントロンまで伸びる。

【0055】

ヒトN C A P D 2 遺伝子 (N C B I G e n e I D : 9 9 1 8) は、第12染色体の b p 6 6 0 3 2 9 8 ~ 6 6 4 1 1 3 2 近傍のヒトDNAに位置する。一実施形態では、その最長の場合で、ヒトにおけるN C A P D 2 遺伝子の最後のイントロンまで伸びる真核生物G A P D H プロモーターの上流の非翻訳ゲノムDNA配列の長さが、その最長の場合で、ヒトにおけるN C A P D 2 遺伝子をコードする第12染色体の 6 6 4 0 2 4 3 b p (配列番号 1 7 における b p 1 1 1 9 に対応する G A P D H 遺伝子の転写開始点に照らした - 3 4 1 4 位) 近傍まで及ぶ。

10

【0056】

一実施形態では、その最長の場合で、ヒトにおけるN C A P D 2 遺伝子の最後から2番目のイントロンまで伸びる真核生物G A P D H プロモーターの上流の非翻訳ゲノムDNA配列の長さが、その最長の場合で、ヒトにおけるN C A P D 2 遺伝子をコードする第12染色体の 6 6 3 9 9 8 4 b p (配列番号 1 7 における b p 8 6 0 に対応する G A P D H 遺伝子の転写開始点に照らした - 3 6 7 3 位) 近傍まで及ぶ。

【0057】

一実施形態では、その最長の場合で、ヒトにおけるN C A P D 2 遺伝子の最後から3番目のイントロンまで伸びる真核生物G A P D H プロモーターの上流の非翻訳ゲノムDNA配列の長さが、その最長の場合で、ヒトにおけるN C A P D 2 遺伝子をコードする第12染色体の 6 6 3 9 1 2 5 b p (配列番号 1 7 における b p 1 に対応する G A P D H 遺伝子の転写開始点に照らした - 4 5 3 2 位) 近傍まで及ぶ。

20

【0058】

その最長の場合で、ヒトにおけるN C A P D 2 遺伝子の、それぞれ、最後のイントロンまで伸びる真核生物G A P D H プロモーターの上流の非翻訳ゲノムDNA配列、最後から2番目のイントロンまで伸びる真核生物G A P D H プロモーターの上流の非翻訳ゲノムDNA配列、および最後から3番目のイントロンまで伸びる真核生物G A P D H プロモーターの上流の非翻訳ゲノムDNA配列は、第12染色体の b p 6 6 5 7 2 3 0 ~ 6 6 3 9 1 2 5 を示す配列番号 1 7 に包含される (N C B I G e n e I D : 9 9 1 8) 。

【0059】

マウスN C A P D 2 遺伝子 (G e n e I D : 6 8 2 9 8) は、第6染色体の 1 2 5 1 1 8 0 2 5 ~ 1 2 5 1 4 1 6 0 4 位近傍のマウスDNAに位置する。一実施形態では、その最長の場合で、マウスにおけるN C A P D 2 遺伝子の最後のイントロンまで伸びる真核生物G A P D H プロモーターの上流の非翻訳ゲノムDNA配列の長さ（転写開始点の上流において、5 0 0 b p の長さであると推定される）が、その最長の場合で、マウスにおけるN C A P D 2 遺伝子をコードする第6染色体の b p 1 2 5 1 1 8 6 0 7 近傍まで及ぶ。

30

【0060】

一実施形態では、その最長の場合で、マウスにおけるN C A P D 2 遺伝子の最後から2番目のイントロンまで伸びる真核生物G A P D H プロモーターの上流の非翻訳ゲノムDNA配列の長さが、その最長の場合で、マウスにおけるN C A P D 2 遺伝子をコードする第6染色体の 1 2 5 1 1 8 8 8 0 b p 近傍まで及ぶ。

40

【0061】

一実施形態では、その最長の場合で、マウスにおけるN C A P D 2 遺伝子の最後から3番目のイントロンまで伸びる真核生物G A P D H プロモーターの上流の非翻訳ゲノムDNA配列の長さが、その最長の場合で、マウスにおけるN C A P D 2 遺伝子をコードする第6染色体の 1 2 5 1 1 9 8 3 2 b p 近傍まで及ぶ。

【0062】

その最長の場合で、マウスにおけるN C A P D 2 遺伝子の、それぞれ、最後のイントロンまで伸びる真核生物G A P D H プロモーターの上流の非翻訳ゲノムDNA配列、最後か

50

ら 2 番目のイントロンまで伸びる真核生物 GAPDH プロモーターの上流の非翻訳ゲノム DNA 配列、および最後から 3 番目のイントロンまで伸びる真核生物 GAPDH プロモーターの上流の非翻訳ゲノム DNA 配列は、第 6 染色体の bp 125103521 ~ 125119832 を示す配列番号 18 に包含される (NCB I Gene ID : 68298)。最後のイントロンまで伸びる真核生物 GAPDH プロモーターの上流の非翻訳ゲノム DNA 配列は、配列番号 18 により示されるヌクレオチド配列の bp 1226 (マウス GAPDH mRNA の転写開始点に照らした -3006) 近傍まで及ぶ。最後から 2 番目のイントロンまで伸びる真核生物 GAPDH プロモーターの下流の非翻訳ゲノム DNA 配列は、配列番号 18 により示されるヌクレオチド配列の bp 953 (マウス GAPDH mRNA の転写開始点に照らした -3279) 近傍まで及ぶ。最後から 3 番目のイントロンまで伸びる真核生物 GAPDH プロモーターの下流の非翻訳ゲノム DNA 配列は、配列番号 18 により示されるヌクレオチド配列の bp 1 (マウス GAPDH mRNA の転写開始点に照らした -4231) 近傍まで及ぶ。

10

20

30

40

50

【0063】

ラット N CAPD2 遺伝子 (Gene ID : 362438) は、第 4 染色体の 161288671 ~ 161310417 位近傍の真核生物 DNA に位置する。一実施形態では、その最長の場合で、ラットにおける N CAPD2 遺伝子の最後のイントロンまで伸びる真核生物 GAPDH プロモーターの上流の非翻訳ゲノム DNA 配列の長さが、その最長の場合で、ラットにおける N CAPD2 遺伝子をコードする第 4 染色体の 161289191 bp 近傍まで及ぶ。一実施形態では、その最長の場合で、ラットにおける N CAPD2 遺伝子の最後から 2 番目のイントロンまで伸びる真核生物 GAPDH プロモーターの上流の非翻訳ゲノム DNA 配列の長さが、その最長の場合で、ラットにおける N CAPD2 遺伝子をコードする第 4 染色体の 161289446 bp 近傍まで及ぶ。一実施形態では、その最長の場合で、ラットにおける N CAPD2 遺伝子の最後から 3 番目のイントロンまで伸びる真核生物 GAPDH プロモーターの上流の非翻訳ゲノム DNA 配列の長さが、その最長の場合で、ラットにおける N CAPD2 遺伝子をコードする第 4 染色体の 161290508 bp 近傍まで及ぶ。

【0064】

その最長の場合で、ラットにおける N CAPD2 遺伝子の、それぞれ、最後のイントロンまで伸びる真核生物 GAPDH プロモーターの上流の非翻訳ゲノム DNA 配列、最後から 2 番目のイントロンまで伸びる真核生物 GAPDH プロモーターの上流の非翻訳ゲノム DNA 配列、および最後から 3 番目のイントロンまで伸びる真核生物 GAPDH プロモーターの上流の非翻訳ゲノム DNA 配列は、第 4 染色体の bp 161279451 ~ 161290508 を示す配列番号 19 に包含される (NCB I Gene ID : 362438)。最後のイントロンまで伸びる真核生物 GAPDH プロモーターの上流の非翻訳ゲノム DNA 配列は、配列番号 19 により示されるヌクレオチド配列の bp 1318 (ラット GAPDH mRNA の転写開始点に照らした -3101) 近傍まで及ぶ。最後から 2 番目のイントロンまで伸びる真核生物 GAPDH プロモーターの下流の非翻訳ゲノム DNA 配列は、配列番号 19 により示されるヌクレオチド配列の bp 1063 (ラット GAPDH mRNA の転写開始点に照らした -3356 位) 近傍まで及ぶ。最後から 3 番目のイントロンまで伸びる真核生物 GAPDH プロモーターの下流の非翻訳ゲノム DNA 配列は、配列番号 19 により示されるヌクレオチド配列の bp 1 (ラット GAPDH mRNA の転写開始点に照らした -4418 位) 近傍まで及ぶ。

【0065】

チャイニーズハムスター N CAPD2 遺伝子 (Gene ID : 100753087) は、3544184 ~ 3569879 位近傍の真核生物 DNA に位置する。NCB I データベースでは、染色体の位置が検索可能でない。一実施形態では、その最長の場合で、チャイニーズハムスターにおける N CAPD2 遺伝子の最後のイントロンまで伸びる真核生物 GAPDH プロモーターの上流の非翻訳ゲノム DNA 配列の長さが、その最長の場合で、チャイニーズハムスターにおける 3569380 bp 近傍まで及ぶ。一実施形態では、

その最長の場合で、チャイニーズハムスターにおけるN C A P D 2 遺伝子の最後から2番目のイントロンまで伸びる真核生物G A P D H プロモーターの上流の非翻訳ゲノムDNA配列の長さが、その最長の場合で、チャイニーズハムスターにおける3 5 6 9 1 3 1 b p近傍まで及ぶ。一実施形態では、その最長の場合で、チャイニーズハムスターにおけるN C A P D 2 遺伝子の最後から3番目のイントロンまで伸びる真核生物G A P D H プロモーターの上流の非翻訳ゲノムDNA配列の長さが、その最長の場合で、チャイニーズハムスターにおける3 5 6 7 9 3 2 b p近傍まで及ぶ。

【0 0 6 6】

その最長の場合で、チャイニーズハムスターにおけるN C A P D 2 遺伝子の、それぞれ、最後のイントロンまで伸びる真核生物G A P D H プロモーターの上流の非翻訳ゲノムDNA配列、最後から2番目のイントロンまで伸びる真核生物G A P D H プロモーターの上流の非翻訳ゲノムDNA配列、および最後から3番目のイントロンまで伸びる真核生物G A P D H プロモーターの上流の非翻訳ゲノムDNA配列は、b p 3 5 6 7 9 3 2 ~ 3 5 8 5 0 6 1を示す配列番号29に包含される。最後のイントロンまで伸びる真核生物G A P D H プロモーターの上流の非翻訳ゲノムDNA配列は、配列番号29により示されるヌクレオチド配列のb p 1 4 4 9(チャイニーズハムスター-G A P D H mRNAの転写開始点に照らした-2 7 5 2)近傍まで及ぶ。最後から2番目のイントロンまで伸びる真核生物G A P D H プロモーターの下流の非翻訳ゲノムDNA配列は、配列番号29により示されるヌクレオチド配列のb p 1 2 0 0(チャイニーズハムスター-G A P D H mRNAの転写開始点に照らした-3 0 0 1位)近傍まで及ぶ。最後から3番目のイントロンまで伸びる真核生物G A P D H プロモーターの下流の非翻訳ゲノムDNA配列は、配列番号29により示されるヌクレオチド配列のb p 1(チャイニーズハムスター-G A P D H mRNAの転写開始点に照らした-4 2 0 0位)近傍まで及ぶ。

10

20

30

【0 0 6 7】

一部の実施形態では、真核生物G A P D H プロモーターの上流の非翻訳ゲノムDNA配列が通例、-5 0 0 近傍のヌクレオチド位置~-3 5 0 0 近傍のヌクレオチド位置にわたる領域内で、好ましくは、-5 7 6 近傍のヌクレオチド位置~-3 5 0 0 近傍のヌクレオチド位置にわたる領域内で開始され、ヌクレオチド位置は、G A P D H mRNAの転写開始点に照らした位置である。

【0 0 6 8】

一部の実施形態では、真核生物G A P D H プロモーターの上流の非翻訳ゲノムDNA配列が通例、-5 0 0 位近傍のヌクレオチド位置において、好ましくは、-5 7 6 近傍のヌクレオチド位置において開始され、ヌクレオチド位置は、G A P D H mRNAの転写開始点に照らした位置である。

【0 0 6 9】

ヒトでは、ヒトG A P D H プロモーターの上流の非翻訳ゲノムDNA配列が、ヌクレオチド位置-4 6 3の近傍(配列番号17に示されるb p 4 5 3 3)に対応するG A P D H mRNAの転写開始点に照らして)において開始される。G A P D H プロモーターの上流の非翻訳ゲノムDNA配列がヒトに由来する場合は、G A P D H プロモーターの上流の非翻訳ゲノムDNA配列が、-5 0 0 近傍(配列番号17に示されるb p 4 5 3 3)に対応するG A P D H mRNAの転写開始点に照らして)において開始されることが好ましい。G A P D H プロモーターの上流の非翻訳ゲノムDNA配列がヒトに由来する場合は、G A P D H プロモーターの上流の非翻訳ゲノムDNA配列が、-5 7 6 近傍(配列番号17に示されるb p 4 5 3 3)に対応するG A P D H mRNAの転写開始点に照らして)において開始され、その長さが、配列番号17に示されるb p 8 0 0 近傍~3 9 5 7 近傍の配列に対応する約3 1 5 8 b pであることがより好ましい。

40

【0 0 7 0】

さらなる実施形態では、真核生物G A P D H プロモーターの上流の非翻訳ゲノムDNA配列が、配列番号7、9、10、11、12、13、14、15、16、20、22、23、24、25、26、27、および28からなる群から選択されるヌクレオチド配列も

50

しくはその断片、好ましくは、配列番号 7、9、10、11、12、13、14、15、および 16 からなる群から選択されるヌクレオチド配列もしくはその断片、または配列番号 20、22、23、24、25、26、27、28、および 16 からなる群から選択されるヌクレオチド配列もしくはその断片を含む。配列番号 10、12、15、および 16 からなる群から選択されるヌクレオチド配列またはその断片、より好ましくは、配列番号 10、12、15、および 16 からなる群から選択されるヌクレオチド配列またはその断片であって、配列番号 10 および / または 16 を含むヌクレオチド配列が、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列に対して逆方向に配向し、配列番号 12 および / または 15 を含むヌクレオチド配列が、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列と同方向に配向しているヌクレオチド配列またはその断片がより好ましい。配列番号 23、25、28、および 16 からなる群から選択されるヌクレオチド配列またはその断片、より好ましくは、配列番号 23、25、28、および 16 からなる群から選択されるヌクレオチド配列またはその断片であって、配列番号 23 および / または 16 を含むヌクレオチド配列が、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列に対して逆方向に配向し、配列番号 25 および / または 28 を含むヌクレオチド配列が、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列と同方向に配向しているヌクレオチド配列またはその断片も同様により好ましい。

10

20

30

40

50

【0071】

さらなる実施形態では、真核生物 GAPDH プロモーターの上流の非翻訳ゲノム DNA 配列が、配列番号 7、9、10、11、12、13、14、15、16、20、22、23、24、25、26、27、および 28 もしくはその断片からなる群から選択されるヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列、好ましくは、配列番号 7、9、10、11、12、13、14、15、および 16 もしくはその断片からなる群から選択されるヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列、または配列番号 20、22、23、24、25、26、27、28、および 16 もしくはその断片からなる群から選択されるヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列を含む。配列番号 10、12、15、および 16 もしくはその断片からなる群から選択されるヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列がより好ましい。配列番号 23、25、28、および 16 もしくはその断片からなる群から選択されるヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列も同様により好ましい。

30

【0072】

さらなる実施形態では、真核生物 GAPDH プロモーターの上流の非翻訳ゲノム DNA 配列が、配列番号 7、9、10、11、12、13、14、15、16、20、22、23、24、25、26、27、および 28 もしくはその断片からなる群から選択されるヌクレオチド配列と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列、好ましくは、配列番号 7、9、10、11、12、13、14、15、および 16 もしくはその断片からなる群から選択されるヌクレオチド配列と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列、または配列番号 20、22、23、24、25、26、27、28、および 16 もしくはその断片からなる群から選択されるヌクレオチド配列と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列を含む。配列番号 10、12、15、および 16 またはその断片からなる群から選択されるヌクレオチド配列と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列、より好ましくは、配列番号 10、12、15、および 16 またはその断片からなる群から選択されるヌクレオチド配列と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列であって、配列番号 10 および / または 16 を含むヌクレオチド配列が、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列に対して逆方向に配向し、配列番号 12 および / または 15 を含むヌクレオチド配列が、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列と同方向に配向しているヌクレオチド配列またはその断片がより好ましい。配列番号 23、25、28、および 16 からなる群から選択されるヌクレオチド配列と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列またはその断片、より好ましくは、配列番号 23、25、28、および 16 からなる群から選択されるヌクレオチド配列と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列またはその断片であって、配列番号 23 および / または 16 を含むヌクレオチド配列が、ポリペプチドをコードするポリヌク

レオチド配列に対して逆方向に配向し、配列番号 25 および / または 28 を含むヌクレオチド配列が、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列と同方向に配向しているヌクレオチド配列またはその断片も同様により好ましい。

【 0073 】

一部の実施形態では、配列番号 7、9、10、11、12、13、14、15、16、20、22、23、24、25、26、27、および 28 もしくはその断片からなる群から選択されるヌクレオチド配列が、5 力所以下、好ましくは 4 力所以下、より好ましくは 3 力所以下、最も好ましくは 2 力所以下、特に、1 力所の核酸修飾を含み、(1 または複数の) 核酸修飾は、核酸置換であることが好ましい。

【 0074 】

一部の実施形態では、配列番号 7、9、11、14、20、22、24、および 27 またはその断片からなる群から選択されるヌクレオチド配列が、5 力所以下、好ましくは 4 力所以下、より好ましくは 3 力所以下、最も好ましくは 2 力所以下、特に、1 力所の核酸修飾を含み、(1 または複数の) 核酸修飾は、核酸置換であることが好ましい。

【 0075 】

一部の実施形態では、配列番号 7、9、11、14 またはその断片からなる群から選択されるヌクレオチド配列が、配列番号 7、9、11、14 のヌクレオチド配列の開始点に照らした 16 位において、1 力所の核酸置換を含む。ヌクレオチド配列の開始点に照らした 16 位における G を、T で置きかえることが好ましい。

【 0076 】

一部の実施形態では、配列番号 20、22、24、および 27 またはその断片からなる群から選択されるヌクレオチド配列が、配列番号 20、22、24、および 27 のヌクレオチド配列の開始点に照らした 13 位において、1 力所の核酸置換を含む。ヌクレオチド配列の開始点に照らした 13 位における G を、T で置きかえることが好ましい。

【 0077 】

さらなる実施形態では、真核生物 GAPDH プロモーターの上流の非翻訳ゲノム DNA 配列が、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列と同方向に配向している。

【 0078 】

さらなる実施形態では、真核生物 GAPDH プロモーターの上流の非翻訳ゲノム DNA 配列が、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列と逆方向に配向している。

【 0079 】

好ましい実施形態では、発現カセットが、プロモーター、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、ならびに前出で記載した真核生物 GAPDH プロモーターの下流の非翻訳ゲノム DNA 配列および真核生物 GAPDH プロモーターの上流の非翻訳ゲノム DNA 配列を含む。真核生物 GAPDH プロモーターの下流の非翻訳ゲノム DNA 配列の由来と、真核生物 GAPDH プロモーターの上流の非翻訳ゲノム DNA 配列の由来とが同じである、すなわち、同じ種の由来であることが好ましい。真核生物 GAPDH プロモーターの下流の非翻訳ゲノム DNA 配列の由来と、真核生物 GAPDH プロモーターの上流の非翻訳ゲノム DNA 配列の由来と、宿主細胞の由来とが、同じである、すなわち、同じ種の由来であることがより好ましい。例えば、真核生物 GAPDH プロモーターの下流の非翻訳ゲノム DNA 配列の由来と、真核生物 GAPDH プロモーターの上流の非翻訳ゲノム DNA 配列の由来と、宿主細胞の由来とが、同じ哺乳動物由来、例えば、ヒト由来である。

【 0080 】

一部の実施形態では、真核生物 GAPDH プロモーターの下流および / または上流の非翻訳ゲノム DNA 配列が、1 つの種に由来する非翻訳ゲノム DNA 配列である場合、発現カセットのプロモーターは、同じ種に由来する GAPDH プロモーターではない。

【 0081 】

一部の実施形態では、真核生物 GAPDH プロモーターの下流および / または上流の非翻訳ゲノム DNA 配列が、ヒト由来の下流および / または上流の非翻訳ゲノム DNA 配列

10

20

30

40

50

である場合、発現カセットのプロモーターは、ヒト G A P D H プロモーターではない。

【 0 0 8 2 】

一部の実施形態では、発現カセットのプロモーターが、G A P D H プロモーターではない。一実施形態では、発現カセットが、プロモーター、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、および真核生物グリセルアルデヒド 3 - リン酸デヒドロゲナーゼ (G A P D H) プロモーターの下流の非翻訳ゲノム DNA 配列を含み、ポリヌクレオチド配列によりコードされるポリペプチドが G A P D H ではなく、真核生物 G A P D H プロモーターの下流の非翻訳ゲノム DNA 配列が、+ 1 近傍のヌクレオチド位置 ~ + 7 0 0 0 近傍のヌクレオチド位置にわたる領域内で開始され、ヌクレオチド位置が、G A P D H mRNA の転写開始点に照らした位置であり、真核生物 G A P D H プロモーターの下流の非翻訳ゲノム DNA 配列の長さが約 1 0 0 ~ 約 1 5 0 0 0 ヌクレオチドであり、発現カセットが真核生物 G A P D H プロモーターの上流の非翻訳ゲノム DNA 配列をさらに含み、真核生物 G A P D H プロモーターの上流の非翻訳ゲノム DNA 配列が、真核生物 G A P D H プロモーターの 5' 端近傍 ~ - 3 5 0 0 近傍のヌクレオチド位置にわたる領域内で開始され、ヌクレオチド位置が、G A P D H mRNA の転写開始点に照らした位置であり、真核生物 G A P D H プロモーターの上流の非翻訳ゲノム DNA 配列の長さが約 1 0 0 ~ 約 1 5 0 0 0 ヌクレオチドである場合、発現カセットのプロモーターは、真核生物 G A P D H プロモーター、好ましくは、哺乳動物 G A P D H プロモーター、より好ましくは、齧歯動物 G A P D H プロモーターまたはヒト G A P D H プロモーターでありうる。この実施形態では、真核生物 G A P D H プロモーターの 5' 端近傍 ~ - 3 5 0 0 近傍のヌクレオチド位置にわたる領域内で開始される、真核生物 G A P D H プロモーターの上流の非翻訳ゲノム DNA 配列が、真核生物 G A P D H プロモーターのすぐ上流に位置することが好ましく、この実施形態では、発現カセットが、真核生物 G A P D H プロモーターを含み、- 3 5 0 0 近傍のヌクレオチド位置まで伸びる自然発生のゲノム DNA 配列を含むことがより好ましく、ヌクレオチド位置は、G A P D H mRNA の転写開始点に照らした位置である。

【 0 0 8 3 】

一部の実施形態では、真核生物 G A P D H プロモーターの下流および / または上流の非翻訳ゲノム DNA 配列が、哺乳動物に由来する、例えば、真核生物 G A P D H プロモーターが、哺乳動物 G A P D H プロモーターであり、哺乳動物 G A P D H プロモーターの下流および / または上流の非翻訳ゲノム DNA 配列を、本明細書で記載される通りに用いる。

【 0 0 8 4 】

一部の実施形態では、真核生物 G A P D H プロモーターの下流および / または上流の非翻訳ゲノム DNA 配列が、齧歯動物またはヒトに由来する、例えば、真核生物 G A P D H プロモーターが齧歯動物 G A P D H プロモーターまたはヒト G A P D H プロモーターであり、齧歯動物 G A P D H プロモーターまたはヒト G A P D H プロモーターの下流および / または上流の非翻訳ゲノム DNA 配列を本明細書で記載される通りに用いる。

【 0 0 8 5 】

真核生物 G A P D H プロモーターの下流および / または上流の非翻訳ゲノム DNA 配列は、ヒト由来の配列、ラット由来の配列、またはマウス由来の配列から選択されることが好ましく、ヒト由来の配列またはマウス由来の配列から選択されることがより好ましく、ヒト由来の配列から選択されることが最も好ましい。

【 0 0 8 6 】

一部の実施形態では、真核生物 G A P D H プロモーターの下流および / または上流の非翻訳ゲノム DNA 配列が、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列に作動可能に連結していない。

【 0 0 8 7 】

一部の実施形態では、発現カセットが、ポリアデニル化部位を含む。ポリアデニル化部位は、S V 4 0 p o l y (A) および B G H (ウシ成長ホルモン) p o l y (A) からなる群から選択されることが好ましい。

【 0 0 8 8 】

10

20

30

40

50

一部の実施形態では、発現力セットのプロモーターとポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列とが作動可能に連結している。

【0089】

一部の実施形態では、発現力セットのプロモーターが、S V 4 0 プロモーター、ヒト t k プロモーター、M P S V プロモーター、マウス C M V 、ヒト C M V 、ラット C M V 、ヒト E F 1 アルファ、チャイニーズハムスター E F 1 アルファ、ヒト G A P D H 、M Y C プロモーター、H Y K プロモーター、および C X プロモーターを組み入れたハイブリッドプロモーターからなる群から選択される。

【0090】

一部の実施形態では、発現力セットによりコードされるポリペプチドが、非グリコシリ化ポリペプチドおよびグリコシリ化ポリペプチドでありうる。グリコシリ化ポリペプチドとは、少なくとも1つのオリゴ糖鎖を有するポリペプチドを指す。

10

【0091】

非グリコシリ化タンパク質の例は、例えば、非グリコシリ化ホルモン；非グリコシリ化酵素；神経成長因子（N G F ）ファミリー、上皮成長因子（E G F ）、および線維芽細胞成長因子（F G F ）ファミリーの非グリコシリ化成長因子；ならびにホルモンおよび成長因子の非グリコシリ化受容体である。

【0092】

グリコシリ化タンパク質の例は、ホルモンおよびホルモン放出因子、凝血因子、抗凝血因子、ホルモンまたは成長因子の受容体、神経栄養因子、サイトカインおよびそれらの受容体、T 細胞受容体、表面膜タンパク質、輸送タンパク質、ホーミング受容体、アドレッシン、調節タンパク質、抗体、イムノアドヘシンなどのキメラタンパク質、およびグリコシリ化タンパク質のうちのいずれかの断片である。ポリペプチドは、抗体、抗体断片、または抗体誘導体（例えば、F c 融合タンパク質および二重特異的抗体など、特定の抗体フォーマット）からなる群から選択されることが好ましい。本明細書で用いられる抗体断片には、(i) ドメイン、(i i) F a b ' および F a b ' - S H を含めた、V L ドメイン、V H ドメイン、C L ドメインまたはC K ドメイン、およびC H 1 ドメインからなる F a b 断片、(i i i) V H ドメインおよびC H 1 ドメインからなる F d 断片、(i v) 単一の可変ドメインからなる d A b 断片（Ward E S ら（1989）、Nature、341（6242）：544～6）、(v) 連結された2つの F a b 断片を含む二価断片である F (a b ') 2 断片、(v i) 2 つのドメインが会合して抗原結合部位を形成することを可能とするペプチドリンカーにより、V H ドメインとV L ドメインとが連結された単鎖 F v 分子（s c F v ）（Bird R E ら（1988）、Science、242（4877）：423～6；Huston J S ら（1988）、Proc Natl Acad Sci U S A 、85（16）：5879～83）、(v i i) 遺伝子融合により構築される「ダイアボディー」または「トリアボディー」、多価断片または多重特異的断片（Holliger P ら（1993）、Proc Natl Acad Sci U S A 、90（14）：6444～8；Holliger P ら（2000）、Methods Enzymol 、326：461～79）、(v i i i) F c 領域へと融合させた s c F v 、ダイアボディー、またはドメイン抗体、および(i x) 同じ抗体または異なる抗体へと融合させた s c F v が含まれるがこれらに限定されない。

20

30

40

【0093】

一部の実施形態では、発現力セットが、さらなるプロモーター、エンハンサー、転写制御エレメント、および選択マーカー、好ましくは、動物細胞内で発現する選択マーカーからなる群から選択される遺伝子エレメントをさらに含む。転写制御エレメントは、例えば、コザック配列または転写ターミネーターエレメントである。

【0094】

一実施形態では、遺伝子エレメントが、選択マーカーであり、選択マーカーをコードするポリヌクレオチド配列中に含有されるC p G 部位の含量が45以下、好ましくは40以下、より好ましくは20以下、特に、10以下、より特定すると5以下、最も特定すると

50

0である（C p G部位は、完全に除去されている）。

【0095】

さらなる態様では、本開示は、発現ベクター、好ましくは、前出で記載した発現カセットを含む哺乳動物の発現ベクターを提供する。一部の実施形態では、発現ベクターが、少なくとも2つの個別の転写単位を含む。2つの個別の転写単位を伴う発現ベクターはまた、二重遺伝子ベクターとも称する。その例は、第1の転写単位が、抗体またはその断片の重鎖をコードし、第2の転写単位が、抗体の軽鎖をコードするベクターである。別の例は、2つの転写単位が、酵素などのタンパク質の2つの異なるサブユニットをコードする二重遺伝子ベクターである。しかしながら、本発明の発現ベクターが、2つを超える個別の転写単位、例えば、それらの各々が、異なるポリペプチド鎖をコードする異なるヌクレオチド配列を含む、3つ、4つ、またはこれをなお超える個別の転写単位を含むことも可能である。したがって、例は、それらの各々が、4つの異なるサブユニットからなる酵素の1つのサブユニットをコードする異なるヌクレオチド配列を含有する、4つの個別の転写単位を伴うベクターである。

10

【0096】

一部の実施形態では、発現ベクターが、さらなるプロモーター、エンハンサー、転写制御エレメント、複製起点、および選択マーカーからなる群から選択される遺伝子エレメントをさらに含む。

【0097】

一部の実施形態では、発現ベクターが、複製起点および選択マーカーをさらに含み、複製起点および選択マーカーをコードする発現ベクターのポリヌクレオチド配列中に含有されるC p G部位の含量が200以下、好ましくは150以下、特に、100以下、より特定すると50以下、最も特定すると30以下である。

20

【0098】

本発明の発現カセットまたは発現ベクターには、チミジンキナーゼ（t k）、ジヒドロ葉酸レダクターゼ（D H F R）、ピューロマイシン、ネオマイシン、またはグルタミンセターゼ（G S）など、一般に使用される任意の選択マーカーを用いることができる。本発明の発現ベクターはまた、本発明の異種タンパク質を分泌させるための発現のカセットを挿入するのに有用な限定数の制限部位も含むことが好ましい。特に、一過性／エピソーム発現だけに用いる場合、本発明の発現ベクターは、真核生物の宿主細胞における自己複製／エピソーム維持のために、エブスタインバーウイルス（E B V）またはS V 4 0ウイルスに由来するo r i Pなどの複製起点をさらに含みうるが、選択マーカーを欠いていてもよい。また、ベクターの複製を容易にする関与性の因子を欠く細胞における一過性発現も可能である。発現カセットを保有する発現ベクターは、蛍光マーカーをコードする発現カセット、n c R N Aをコードする発現カセット、抗アポトーシスタンパク質をコードする発現カセット、または分泌経路の能力を増大させるタンパク質をコードする発現カセットをさらに含みうる。

30

【0099】

さらなる態様では、本開示は、a)またはb)が、真核生物G A P D Hの上流の非翻訳ゲノムD N A配列である場合は、f)が、真核生物G A P D Hの下流の非翻訳ゲノムD N A配列であり、a)またはb)が、真核生物G A P D Hの下流の非翻訳ゲノムD N A配列である場合は、f)が、真核生物G A P D Hの上流の非翻訳ゲノムD N A配列であるという条件で、

40

a) 真核生物G A P D Hプロモーターの上流および／もしくは下流の非翻訳ゲノムD N A配列

b) プロモーター

c) ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列

d) ポリアデニル化部位

e) エンハンサー

f) 真核生物G A P D Hプロモーターの下流および／もしくは上流の非翻訳ゲノムD N A

50

配列、または

a) 真核生物 G A P D H プロモーターの上流および／もしくは下流の非翻訳ゲノム D N A 配列

b) エンハンサー

c) プロモーター

d) ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列

e) ポリアデニル化部位

f) 真核生物 G A P D H プロモーターの下流および／もしくは上流の非翻訳ゲノム D N A 配列

配列、または

a) エンハンサー

b) 真核生物 G A P D H の上流および／もしくは下流の非翻訳ゲノム D N A 配列

c) プロモーター

d) ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列

e) ポリアデニル化部位

f) 真核生物 G A P D H の下流および／もしくは上流の非翻訳ゲノム D N A 配列

を順に含む発現ベクターであって、エンハンサーの組入れが任意選択であり、ポリヌクレオチド配列によりコードされるポリペプチドが、G A P D H ではなく、真核生物 G A P D H プロモーターの下流の非翻訳ゲノム D N A 配列が、+ 1 近傍のヌクレオチド位置～+ 7 0 0 0 近傍のヌクレオチド位置にわたる領域内で開始され、ヌクレオチド位置が、G A P D H m R N A の転写開始点に照らした位置であり、真核生物 G A P D H プロモーターの下流の非翻訳ゲノム D N A 配列の長さが、約 1 0 0 ～ 約 1 5 0 0 0 ヌクレオチドであり、真核生物 G A P D H プロモーターの上流の非翻訳ゲノム D N A 配列が、真核生物 G A P D H プロモーターの 5' 端近傍～- 3 5 0 0 近傍のヌクレオチド位置にわたる領域内で開始され、ヌクレオチド位置が、G A P D H m R N A の転写開始点に照らした位置であり、真核生物 G A P D H プロモーターの上流の非翻訳ゲノム D N A 配列の長さが、約 1 0 0 ～ 約 1 5 0 0 0 ヌクレオチドである発現ベクターを提供する。

【 0 1 0 0 】

一部の実施形態では、本開示は、

a) 真核生物 G A P D H プロモーターの上流の非翻訳ゲノム D N A 配列

b) プロモーター

c) ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列

d) ポリアデニル化部位

e) エンハンサー

f) エンハンサーの組入れが任意選択である、真核生物 G A P D H プロモーターの下流の非翻訳ゲノム D N A 配列

を順に含む発現ベクターを提供する。

【 0 1 0 1 】

さらなる態様では、本開示は、

a) 真核生物 G A P D H プロモーターの上流の非翻訳ゲノム D N A 配列

b) エンハンサー

c) プロモーター

d) ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列

e) ポリアデニル化部位

f) エンハンサーの組入れが任意選択である、真核生物 G A P D H の下流の非翻訳ゲノム D N A 配列

を順に含む発現ベクターを提供する。

【 0 1 0 2 】

さらなる態様では、本開示は、

a) エンハンサー

b) 真核生物 G A P D H の上流の非翻訳ゲノム D N A 配列

10

20

30

40

50

c) プロモーター

d) ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列

e) ポリアデニル化部位

f) エンハンサーの組入れが任意選択である、真核生物 G A P D H の下流の非翻訳ゲノム DNA 配列

を順に含む発現ベクターを提供する。

【 0 1 0 3 】

さらなる態様では、本開示は、

a) 真核生物 G A P D H プロモーターの下流の非翻訳ゲノム DNA 配列

b) プロモーター

c) ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列

d) ポリアデニル化部位

e) エンハンサー

f) エンハンサーの組入れが任意選択である、真核生物 G A P D H プロモーターの上流の非翻訳ゲノム DNA 配列

を順に含む発現ベクターを提供する。

【 0 1 0 4 】

さらなる態様では、本開示は、

a) 真核生物 G A P D H プロモーターの下流の非翻訳ゲノム DNA 配列

b) エンハンサー

c) プロモーター

d) ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列

e) ポリアデニル化部位

f) エンハンサーの組入れが任意選択である、真核生物 G A P D H の上流の非翻訳ゲノム DNA 配列

を順に含む発現ベクターを提供する。

【 0 1 0 5 】

さらなる態様では、本開示は、

a) エンハンサー

b) 真核生物 G A P D H の下流の非翻訳ゲノム DNA 配列

c) プロモーター

d) ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列

e) ポリアデニル化部位

f) エンハンサーの組入れが任意選択である、真核生物 G A P D H の上流の非翻訳ゲノム DNA 配列

を順に含む発現ベクターを提供する。

【 0 1 0 6 】

発現ベクターの、真核生物 G A P D H の上流の非翻訳ゲノム DNA 配列、エンハンサー、プロモーター、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、ポリアデニル化部位、および真核生物 G A P D H プロモーターの下流の非翻訳ゲノム DNA 配列は、例えば、前出で記載した通りである。

【 0 1 0 7 】

さらなる態様では、本開示は、前出で記載した発現カセットまたは発現ベクターを含む宿主細胞を提供する。宿主細胞は、ヒト細胞の場合もあり、非ヒト細胞の場合もある。好ましい宿主細胞は、哺乳動物細胞である。哺乳動物宿主細胞の好ましい例には、ヒト胎児由来腎臓細胞 (G r a h a m F L ら、J . G e n . V i r o l . 3 6 : 5 9 ~ 7 4) 、 M R C 5 ヒト線維芽細胞、 9 8 3 M ヒト黒色腫細胞、 M D C K イヌ腎臓細胞、 S p r a g u e - D a w l e y ラットから単離された R F 培養ラット肺線維芽細胞、 B 1 6 B L 6 マウス黒色腫細胞、 P 8 1 5 マウス肥満細胞腫細胞、 M T 1 A 2 マウス乳腺がん細胞、 P E R : C 6 細胞 (L e i d e n , N e t h e r l a n d s) 、およびチャイニーズハムス

10

20

30

40

50

ター卵巣(CHO)細胞またはCHO細胞系(Puckら、1958、J. Exp. Med.、108:945~955)が含まれるがこれらに制約されない。

【0108】

特定の好ましい実施形態では、宿主細胞が、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞またはCHO細胞系である。適するCHO細胞系には、例えば、CHO-S(Invitrogen、Carlsbad、CA、USA)、CHO-K1(ATCC CCL-61)、CHO pro3-、CHO DG44、CHO P12、またはdhfr-CHO細胞系であるDUK-BII(Chasinら、PNAS 77、1980、4216~4220)、DUXBI-1(Simonsenら、PNAS 80、1983、2495~2499)、またはCHO-K1SV(Lonza、Basel、Switzerland)が含まれる。10

【0109】

さらなる態様では、本開示は、ポリペプチドを発現させるためのin vitro法であって、宿主細胞に、前出で記載した発現カセットまたは発現ベクターをトランスフェクトするステップと、ポリペプチドを回収するステップとを含むin vitro法を提供する。ポリペプチドは、異種ポリペプチド、より好ましくは、ヒトポリペプチドであることが好ましい。

【0110】

発現カセットまたは発現ベクターを、本発明に従う宿主細胞へとトランスフェクトするために、所与の宿主細胞型に適切であれば、当技術分野で周知のトランスフェクション法、例えば、電気穿孔、リン酸カルシウム共沈殿、DEAE-デキストラントransfection、リボフェクションなど、任意のトランスフェクション法を使用することができる。本発明の発現カセットまたは発現ベクターをトランスフェクトされた宿主細胞は、一過性にまたは安定的にトランスフェクトされた細胞系として見なされるべきことに注意されたい。したがって、本発明に従えば、本発現カセットまたは本発現ベクターは、エピソームとして維持する、すなわち、一過性にトランスフェクトすることもでき、宿主細胞のゲノム内に安定的に組み込む、すなわち、安定的にトランスフェクトすることもできる。20

【0111】

一過性トランスフェクションは、ベクターが保有する選択マーカーについての選択圧の非適用を特徴とする。一般に、トランスフェクション後2~最大で10日間にわたり続く一過性発現実験では、トランスフェクトされた発現カセットまたは発現ベクターを、エピソームエレメントとして維持し、いまだゲノムには組み込まない。すなわち、トランスフェクトされたDNAは通例、宿主細胞ゲノムへと組み込まれない。一過性にトランスフェクトされた細胞プールを培養すると、宿主細胞は、トランスフェクトされたDNAを喪失し、トランスフェクトされた細胞を集団内で過剰成長させる傾向がある。したがって、発現は、トランスフェクション直後の時期において最も強く、時間と共に低減される。本発明に従う一過性トランスフェクト細胞は、選択圧の非存在下にある細胞培養物中で、トランスフェクションの2~10日後の時点まで維持される細胞として理解されることが好ましい。30

【0112】

本発明の好ましい実施形態では、宿主細胞、例えば、CHO宿主細胞に、本発明の発現カセットまたは発現ベクターを安定的にトランスフェクトする。安定的トランスフェクションとは、ベクターDNAなど、新たに導入された外来DNAが、通例では、ランダムな非相同組換えイベントによりゲノムDNAへと組み込まれることを意味する。宿主細胞のDNAへの組込み後にベクター配列が増幅された細胞系を選択することにより、ベクターDNAのコピー数と遺伝子産物の量とを共時的に増大させることができる。したがって、このような安定的組込みは、遺伝子増幅についての選択圧のさらなる増大へと曝露されると、CHO細胞において、微細な二重染色体をもたらすことが可能である。さらに、安定的トランスフェクションは、例えば、ゲノムへと組み込まれると余分なものとなる細菌性のコピー数制御領域など、組換え遺伝子産物の発現と直接には関連しないベクター配列部4050

分の喪失を結果としてもたらしうる。したがって、トランスフェクトされた宿主細胞のゲノムには、発現カセットまたは発現ベクターの少なくとも一部分または異なる部分が組み込まれている。

【0113】

さらなる態様では、本開示は、哺乳動物の宿主細胞に由来する異種ポリペプチドを発現させるための、前出で記載した発現カセットまたは発現ベクターの使用、特に、哺乳動物の宿主細胞に由来する異種ポリペプチドを *in vitro* において発現させるための、前出で記載した発現カセットまたは発現ベクターの使用を提供する。

【0114】

タンパク質の発現および回収は、当業者に公知の方法に従い実行することができる。

10

【0115】

ポリペプチドを発現させるためには、前出で記載した発現カセットまたは発現ベクターの、真核生物 G A P D H プロモーターの下流および / または上流の非翻訳ゲノム DNA 配列と、前出で記載した宿主細胞とを用いるが、これらは通例は同じ由来である。驚くべきことに、発現の増大は、発現カセットまたは発現ベクターの、真核生物 G A P D H プロモーターの下流および / または上流の非翻訳ゲノム DNA 配列と、宿主細胞とが異なる由来である場合、例えば、真核生物 G A P D H プロモーターの下流および / または上流のヒト DNA 配列が、C H O 細胞において用いられる場合に得られることが見出されている。

【0116】

さらなる態様では、本開示は、前出で記載した発現カセットまたは発現ベクターの、障害を処置するための医薬を調製するための使用を提供する。

20

【0117】

さらなる態様では、本開示は、障害を処置するための医薬として用いられる、前出で記載した発現カセットまたは発現ベクターを提供する。

【0118】

さらなる態様では、本開示は、遺伝子治療で使用するための、前出で記載した発現カセットまたは発現ベクターを提供する。

【実施例 1】

【0119】

発現ベクターのクローニング

30

I . 材料および方法

I . 1 プラスミド構築物

I . 1 . 1 . L B 培養プレート

500 ml の水を混合し、16 g の L B 寒天 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) (1 リットルの L B は、10 g のトリプトン、5 g の酵母抽出物、および 10 g の NaCl を含有する) と共に煮沸した。冷却後、それぞれの抗生剤を溶液へと添加し、次いで、これを播種した (アンピシリンプレートには 100 µg / ml で播種し、カナマイシンプレートには 50 µg / ml で播種した)。

【0120】

I . 1 . 2 . ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)

全ての PCR は、50 µl の最終容量中に 1 µl の dNTP (各 dNTP につき 1.0 mM; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)、2 単位の Phusio n (登録商標) DNA ポリメラーゼ (Finnzymes Oy, Espoo, Finland)、25 ナノモルのプライマー A (Microsynth, Balgach, Switzerland)、25 ナノモルのプライマー B (Microsynth, Balgach, Switzerland)、10 µl の 5 倍濃度の HF 緩衝液 (7.5 mM の MgCl₂; Finnzymes, Espoo, Finland)、1.5 µl のジメチルスルホキシド (DMSO; Finnzymes, Espoo, Finland)、および 1 ~ 3 µl の錫型 (1 ~ 2 µg) を用いて実施した。用いられる全てのプライマーを、表 1 に列挙する。

40

50

【0121】

PCRは、98で3分間にわたる初期変性によって開始し、続いて、98で30秒間にわたる変性、プライマー特異的温度(CGの含量に従う)で30秒間にわたるアニーリング、および72で2分間にわたる伸長による35サイクルを行った。72で10分間にわたる最終伸長は、冷却および4における保存の前に実施した。

【0122】

【表1】

表1:PCRにおいて用いられるプライマーの概要。GAPDH:グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼの配列:5':上流の配列、3':下流の配列。プライマーGlnPr1172内の「T」(下線を付す)は、プライマーニ量体の形成を回避するために導入した。

プライマー	プライマーの配列	增幅された配列	配列番号
GlnPr 1171	ATTATTCGCGATGGCTCCTGGCA TCTCTGGGACCGAGGC	5'側 GAPDH	配列番号1
GlnPr 1172	ATCGTCGCGAAGCTTGAGATTGT CCAAGCAGGTAGCCAG		配列番号2
GlnPr 1173	AGCAAGTACTTCTGAGCCTTCA GTAATGGCTGCCTG	3'側 GAPDH	配列番号3
GlnPr 1174	TGGCAGTACTAAGCTGGCACCA CTACTTCAGAGAACAAAG		配列番号4

【0123】

I . 1 . 3 . 制限消化

全ての制限消化では、約1μgのプラスミドDNA(NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer(Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA)で定量化した)を、10~20単位の各酵素、4μlの対応する10倍濃度のNEBuffer(NEB、 Ipswich, MA, USA)と混合し、無菌のH₂Oで容量を40μlの満量とした。さらに表示しない限り、消化物は、37で1時間にわたりインキュベートした。

【0124】

各骨格の調製的消化後、1単位のCalf Intestinal Alkaline Phosphatase(CIP; NEB, Ipswich, MA, USA)を添加し、混合物を37で30分間にわたりインキュベートした。NEBuffer3(NEB, Ipswich, MA, USA)中で消化を行った場合は、この酵素が、この緩衝液中で強力な活性を有し、また、ヌクレオチドの一部も末端で消化しうるために、CIPを添加する前に、緩衝液を、NEB緩衝液4へと交換した。

【0125】

I . 1 . 4 . PCR産物の精製およびアガロースゲルによる電気泳動

I . 1 . 4 . 1 . PCR産物の清浄化

消化を可能とするために、制限消化の前に、製造元のマニュアルに従い、40μlの溶出緩衝液を用いるMacherey Nagel Extract IIキット(Macherey Nagel, Oensingen, Switzerland)を用いて、全

10

20

30

40

50

てのPCR断片を除去した。このプロトコールはまた、DNA試料の緩衝液を交換するのにも用いた。

【0126】

I.1.4.2. DNAの抽出

ゲル電気泳動のために、UltraPur e (商標) Agarose (Invitrogen、Carlsbad、CA、USA) および50倍濃度のTris Acetic Acid EDTA緩衝液 (TAE、pH 8.3; Bio RAD、Munich、Germany) を用いて、1%のゲルを調製した。DNAを染色するために、1μlのGel Red Dye (Biotum、Hayward、CA、USA) を、100mlのアガロースゲルへと添加した。サイズマーカーとして、1kbのDNAラダー (NEB、Ipswich、MA、USA) 2μgを用いた。電気泳動は、125ボルトで約1時間にわたり行った。対象のバンドをアガロースゲルから切り出し、製造元のマニュアルに従い、40μlの溶出緩衝液を用いるキットであるExtract II (Macherey-Nagel、Oensingen、Switzerland) を用いて精製した。

10

【0127】

I.1.5. ライゲーション

各ライゲーションのために、4μlの挿入配列を、10μlの容量中に1μlのベクター、400単位のリガーゼ (T4 DNAリガーゼ、NEB、Ipswich、MA、USA) 、1μlの10倍濃度のリガーゼ緩衝液 (T4 DNAリガーゼ緩衝液; NEB、Ipswich、MA、USA) へと混合した。混合物を、室温で1~2時間にわたりインキュベートした。

20

【0128】

I.1.6. ライゲーション産物のコンピテント細菌への形質転換

pGLEX41-[REP]をクローニングし、基準の複製起点を含有するpCR-Bluntベクターを伴う構築物を作製するために、TOP 10 (One Shot (登録商標) TOP 10 Competent E. coli; Invitrogen、Carlsbad、CA、USA) を用いた。

20

【0129】

R6K複製起点を含有するプラスミドの複製を開始させるには、PIR配列によりコードされるタンパク質の発現が要請される。タンパク質は、One Shot (登録商標) PIR1コンピテントE. coli (Invitrogen、Carlsbad、CA、USA) に発現させる。これらの細菌を、R6K配列を含有する全てのベクターに用いた。

30

【0130】

コンピテント細菌に、ライゲーション産物を形質転換するために、25~50μlの細菌を、氷上で5分間にわたり融解させた。次いで、3~5μlのライゲーション産物を、コンピテント細菌へと添加し、氷上で20~30分間にわたりインキュベートしてから、42℃で1分間にわたる熱ショックにかけた。次いで、チューブを介して、500μlのS.O.C培地 (Invitrogen、Carlsbad、CA、USA) を添加し、攪拌下、37℃で1時間にわたりインキュベートした。最後に、細菌を、アンピシリンを伴うLBプレート (Sigma-Aldrich、St. Louis、MO、USA) 上に置き、37℃で一晩にわたりインキュベートした。pCR-Bluntベクターにおけるクローニングのためには、カナマイシンを伴うプレート (Sigma-Aldrich、St. Louis、MO、USA) を用いた。

40

【0131】

I.1.7. 小スケール(ミニ)および中程度スケール(ミディ)におけるプラスミドの調製

I.1.7.1. ミニプレバレーション

ミニプレバレーションのために、形質転換された細菌のコロニーを、2.5mlのLBおよびアンピシリンまたはカナマイシン中、37℃、200rpmで6~16時間にわた

50

り成長させた。DNAは、提供されるマニュアルに従い、E. coli用のプラスミド精製キット(Quick Pure、Macherey Nagel、Oensingen、Switzerland)により抽出した。

【0132】

ミニプレパレーションに由来するプラスミドDNAは、NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer(Thermo Scientific、Wilmington、DE、USA)で、260nmにおける吸光度を測定し、1.8~2の間でなくてはならないOD_{260 nm}/OD_{280 nm}の比を評価することにより、1回定量化した。対照の消化は、配列を確認するために、試料をFasteris SA(Geneva、Switzerland)へと送付する前に実施した。

10

【0133】

BAC抽出のためには、プロトコールを以下の通りに改変して、Quick Pureキット(Macherey Nagel、Oensingen、Switzerland)を用いた。10mlのLBおよびクロラムフェニコール(12.5μg/ml)(Sigma-Aldrich、St. Louis、MO、USA)に、pBACE3.6ベクターを含有する細菌を播種した。振とうプラットフォーム上、37で一晩にわたるインキュベーション後、培養物を、13300rpmで5分間にわたり遠心分離してから、500μlのA1緩衝液中に再懸濁させた。500μlのA2溶解緩衝液を添加し、溶液を、室温で5分間にわたりインキュベートした。次いで、溶液を、600μlのA3緩衝液で中和し、13300rpmで10分間にわたり遠心分離した。上清をカラムに投入し、このステップ以降、Quick Pureミニプレップキットの標準プロトコールを用いた。

20

【0134】

I.1.7.2. ミディプレパレーション

ミディプレパレーションのために、形質転換された細菌を、200~400mlのLBおよびアンビシリン(またはカナマイシン)中、37で一晩にわたり成長させた。次いで、培養物を、725gで20分間にわたり遠心分離し、製造元のマニュアルにおいて提示される低量プラスミドプロトコールに従い、市販のキット(NucleoBond Xtra Midi; Macherey Nagel、Oensingen、Switzerland)を用いて、プラスミドを精製した。

30

【0135】

ミディプレパレーションに由来するプラスミドDNAを、NanoDrop ND-1000 Spectrophotometerで3回にわたり定量化し、制限消化により確認し、最後に、配列決定のために送付した(Fasteris SA、Geneva、Switzerland)。

【0136】

II. 結果および考察

II.1. GAPDH発現力セットの上流および下流(GAPDHの5'側および3'側)におけるDNA領域のクローニング

BACクローンであるRPCIB753F11841Qを、Imagene(Berlin、Germany)で注文した。このクローンは、クロラムフェニコール耐性遺伝子を含有するpBACE3.6ベクター骨格内に、ヒトGAPDH配列を含有する。ミニプレパレーションによるDNAの抽出後、ベクター濃度を、NanoDropにより、27ng/μlと決定した。

40

【0137】

プロモーターの上流およびポリアデニル化部位の下流において、GAPDH発現力セットをじかに取り囲むDNA配列を、27ngの精製クローンであるRPCIB753F11841Qを鋳型として用いるPCRで増幅した。プロモーターの上流の3kbの断片は、プライマーGlnPr1171(配列番号1)およびGlnPr1172(配列番号2)で増幅して、配列番号5を伴う単位複製配列をもたらした。プライマーGlnPr1172(配列番号2)は、鋳型配列に照らした塩基変化(GからTへの)を保有するので、

50

このPCR反応に由来する全ての配列もまた、この塩基変化を保有することになる。変化は、GAPDH遺伝子の転写開始点に照らした-3721位（配列番号17のbp 812、配列番号5の始点に照らした23位）に位置する。ポリアデニル化部位の下流の3kbの断片は、プライマーG1nPr1173（配列番号3）およびG1nPr1174（配列番号4）で増幅して、配列番号6を伴う単位複製配列をもたらした（表1）。これらのPCRに用いられたアニーリング温度は、72℃であった。

【0138】

5'側および3'側のGAPDH断片（配列番号5および6）は、市販のPCR産物クローニングベクターであるpCR-Blunt（pCR-Blunt、PCR Zero Bluntクローニングキット、In vitrorogen）内でクローニングした。ライゲーション産物は、TOP10コンピテント細菌へと形質転換し、カナマイシンLB寒天プレート上に播種した。コロニーを増幅し、プラスミドを、ミニプレップにより単離した。対照の消化を実施して、pCR-Blunt-5'GAPDH構築物およびpCR-Blunt-3'GAPDH構築物をもたらす陽性クローンを同定した。10

【0139】

II.2. レポータータンパク質であるGFPおよび組換えIgG1モノクローナル抗体をコードするDNA断片（LC-IRES-HC-IRES-GFP）の調製

本研究において用いられるレポーター構築物（REP）：IgG1モノクローナル抗体の軽鎖（LC）-IRES-IgG1モノクローナル抗体の重鎖（HC）-IRES-緑色蛍光タンパク質（GFP）は、ポリシストロニック遺伝子内に存在させた。脳心筋炎ウイルスに由来する配列内リボソーム進入部位（IRES）の存在（Gurtuら、Biochem Biophys Res Commun.、229(1)：295～298、1996）は、3つのペプチドであるIgG1モノクローナル抗体の軽鎖（LC）、IgG1モノクローナル抗体の重鎖（HC）、およびGFPの翻訳を可能とする（図1）。したがって、トランスフェクトされた細胞は、IgG1モノクローナル抗体を分泌し、細胞内GFPを依存的な形で蓄積することになる。しかし、真核細胞では、ポリシストロニックのmRNAが一般的でなく、それらの翻訳は、それほど効率的でなく、比較的低力値のIgG1およびGFPの発現をもたらす。20

【0140】

REP構築物を含有するベクターは、制限酵素であるNheIおよびBstBIを用いて（BstBIは、65bpで用いる）消化した。発現構築物を含有するREP断片を切り出し、精製し、さらなるクローニングステップのために用いた。30

【0141】

II.3. 発現ベクターのクローニング

pCDNA3.1 (+)に由来する発現ベクターであるpGLEX41ベクター（In vitrorogen、Carlsbad、CA）を、安定的な細胞系を作製するために用いた。pGLEX41ベクターは、GAPDH配列を伴う第2世代のベクターAおよびGAPDH配列を伴わない第2世代のベクターBを創出するように改変された初期骨格として用いた。全てのベクターに、同じプロモーター-インtronの組合せ（mCMVおよび1番目のインtronをコードするドナー-アクセプター断片（IgDA））を用いた（Gormanら（1990）、Proc Natl Acad Sci USA、87：5459～5463）。

【0142】

中間体ベクターであるpGLEX41-HM-MCS-ampicillinのクローニング：

pGLEX41から、新たなベクター世代の開発を開始した。アンピシリン耐性カセットを放出するために、このベクターを、制限酵素であるNruIおよびBspHIを用いて切斷した。骨格断片は、CIP処理して、ゲル電気泳動により精製した。アンピシリン耐性遺伝子（blaプロモーターを含めた）のコドン最適化（E.coliにおける発現について）形をコードするDNA断片は、GeneArtから注文した。制限酵素であるNruIおよびBspHI（骨格のために用いた酵素と同じ酵素）を用いて、挿入配列を40

50

、GeneArtクローニングベクターである#1013237から切り出し、精製し、骨格へとクローニングした。制限消化により、ミニプレップを解析した。クローンであるpGLEX41-HM-MCS-ampiA#2は、予測される制限プロファイルを有し、適正な断片の組込みは、配列決定により確認した。

【0143】

中間体ベクターであるpGLEX41-MCS-R6K-ampiAのクローニング

ベクターであるpGLEX41-HM-MCS-ampiA#2の複製起点であるpUCを交換するために、ベクターを、PvuIおよびBspHIを用いて消化した。骨格断片は、CIP処理して、精製した。新たな挿入配列断片は、R6K複製起点と、発現力セットの部分としての、改変SV40 pol y(A)配列とを含有する。SV40 pol y(A)近傍の不要な細菌性骨格配列またはウイルス性骨格配列は取り除いた(下記の表2を参照されたい)。挿入配列断片は、GeneArtから注文し、酵素であるPvuIおよびBspHI(骨格のために用いた酵素と同じ酵素)を用いて、GeneArtクローニングベクターである#1013238から切り出し、精製し、骨格断片へとクローニングした。ミニプレップを調製し、配列解析により確認した。クローンであるpGLEX41-MCS-R6K-ampiA#1は、適正な配列を有した。

10

【0144】

【表2】

表2:異なるベクター内のCpG含量

20

	発現ベクター内のCpG含量		
	pGLEX41	コドン最適化 ベクター「A」	CpGを低減した ベクター「B」
アンピシリン耐性カセット	49	43	19
ピューロマイシン耐性	93	36	1
ジェネティシン耐性	74	51	0
複製起点	45	9	9
合計:	261	139	29

30

【0145】

中間体ベクターであるpGLEX41-MCS-R6K-ampiBのクローニング

ベクターであるpGLEX41-MCS-R6K-ampiA#1を、制限酵素であるBspHIを用いて切断し、アンピシリン耐性カセットを放出するためにCIP処理した。新たな挿入配列断片は、E.coliにおける発現について最適化されたアンピシリン耐性コドンは含有するが、代替的なコドン使用により取り除くことのできた全てのCpG配列は置きかえられていた(上記の表2を参照されたい)。この断片は、GeneArtで注文した。挿入配列断片を放出するために、GeneArtクローニングベクターである#1016138を、BspHIを用いて消化した。挿入配列および骨格断片のいずれも、ゲル電気泳動により精製した後でライゲーションし、PIR1細菌へと形質転換した。ミニプレップは、配列決定のために直接送付した。pGLEX41-R6K-MCS-ampiB#1は、適正な配列を有し、さらなるクローニングステップのために用いられた。

40

50

【0146】

p G L E X 4 1 から導出された発現ベクターにおけるレポーター構築物のクローニング レポーター構築物である R E P を、発現ベクターである p G L E X 4 1 - M C S - R 6 K - a m p i A および p G L E X 4 1 - M C S - R 6 K - a m p i B においてクローニングするために、制限酵素である N h e I および C l a I を用いて、ベクターを切断した。発現ベクターである p G L E X 4 1 - H M - M C S を、制限酵素である N h e I および B s t B I を用いて切断した(65で)。消化後、全てのベクター骨格を、C I P で処理し、骨格を、ゲル電気泳動により精製した。骨格を、レポーター構築物である R E P をコードする N h e I / B s t B I (B s t B I は、C l a I と適合性である)断片とライゲーションした。ライゲーション産物は、P I R 1 コンピテント細菌または T O P 10 コンピテント細菌へと形質転換し、アンピシリン L B 寒天プレート上に播種した。コロニーを増幅し、プラスミドを、ミニプレップにより単離した。陽性クローンは、ミニプレップの制限消化および F a s t e r i s S A によるその後の配列確認を介して同定することができた。

10

【0147】

p G L E X 4 1 から導出した発現ベクターにおける G A P D H フランキング配列の付加 本段落の全ての制限消化は、80 μl の最終容量中で実施し、37で一晩にわたりインキュベートした。

【0148】

5' 側 G A P D H 配列(配列番号7)は、制限酵素である N r u I を用いて、p C R - B l u n t - 5' G A P D H から切り取られ、N r u I を用いて直鎖化され、再環状化を回避するために C I P で処理された発現ベクターである、p G L E X 4 1 - R 6 K - a m p i A - [R E P] および p G L E X 4 1 - R 6 K - a m p i B - [R E P] においてライゲーションした。P I R 1 コロニー(ライゲーション産物の形質転換により得られる)の増幅後、制限消化により、ミニプレップを解析した。クローンである p G L E X 4 1 - R 6 K - a m p i A - 5' G A P D H - [R E P] # 2 および p G L E X 4 1 - R 6 K - a m p i B - 5' G A P D H - [R E P] # 1 は、制限解析において、予測されるサイズのバンドを示したが、これは、その後、配列決定により確認され、さらなるクローニングステップのために用いられた。次いで、これらの新たなベクターを、S c a I で切断し、C I P で処理した。3' 側 G A P D H 断片(配列番号8)は、同じ酵素を用いて p C R - B l u n t - 3' G A P D H から切り取り、発現ベクターである p G L E X 4 1 - R 6 K - a m p i A - G A P D H - [R E P] および p G L E X 4 1 - R 6 K - a m p i B - G A P D H - [R E P] を創出するために、2つの骨格へとライゲーションした。

20

【0149】

クローンである p G L E X 4 1 - R 6 K - a m p i A - G A P D H - [R E P] # 2 および p G L E X 4 1 - R 6 K - a m p i B - G A P D H - [R E P] # 8 に対する対照の消化は、制限解析において、予測されるサイズのバンドを示した。適正な配向における3' 側 G A P D H 断片の挿入は、その後、配列決定(F a s t e r i s)により確認した。

30

【0150】

I I . 4 . 耐性ベクターのクローニング

40

耐性ベクターをクローニングするための出発点は、ベクター p G L E X - M C S - R 6 K - a m p i A # 1 であった。耐性遺伝子の発現については、弱いプロモーターで十分であり、m C M V プロモーターを、S V 4 0 プロモーターで置きかえた。耐性遺伝子をコードする遺伝子は、G e n e A r t S A (R e g e n s b u r g, G e r m a n y) から注文し、チャイニーズハムスターにおける発現について最適化(ピューロマイシン: p u r o A およびネオマイシン: n e o A)するか、または選択的コドン使用により C p G 含量を低減(ピューロマイシン: p u r o B およびネオマイシン: n e o B)した。

【0151】

p G L E X - R 6 K - A m p i A - P u r o A / P u r o B のクローニング:

50

発現カセットにおいてピューロマイシン耐性をクローニングするために、制限酵素であ

るN r u I およびX b a I を用いて、ベクターであるp G L E X 4 1 - M C S - R 6 K - a m p i A # 1 を切斷した後、C I Pで処理した。挿入配列断片をGeneArtから注文し、GeneArtクローニングベクターである# 1 0 1 3 2 3 9 における挿入配列として用意した。挿入配列は、ピューロマイシン耐性のためのS V 4 0 プロモーターおよびコドン最適化遺伝子（CHO細胞によるコドン使用について）を含有する。挿入配列を、酵素であるN r u I およびX b a I （骨格のために用いた酵素と同じ酵素）を用いて、GeneArtクローニングベクターから切り出し、精製し、骨格断片へとクローニングした。ミニプレップを調製し、制限消化により解析した。クローンであるp G L E X - M C S - R 6 K - a m p i A - p u r o A # 1 は、適正なプロファイルを示し、これは、配列決定により確認することができた。

10

【0152】

このベクターを、S V 4 0 プロモーターはそのままにして、コード領域をピューロマイシン耐性遺伝子と交換することにより、ベクターであるp G L E X - M C S - R 6 K - a m p i A - p u r o B をクローニングするために用いた。新たな挿入配列断片は、代替的なコドン使用のために取り除くことのできた全てのC p G 配列が置きかえられた、ピューロマイシン遺伝子のコドン最適化形を含有する。断片は、GeneArtから注文し、クローニングベクターである# 1 0 1 6 1 3 9 内に送達した。挿入配列断片を放出するために、GeneArtベクターを、制限酵素であるX b a I およびN o t I を用いて消化した。挿入配列断片を、ゲル電気泳動により精製し、X b a I およびN o t I を用いる制限消化による、ピューロマイシンのオープンリーディングフレームを放出した後で、p G L E X - M C S - R 6 K - a m p i A - p u r o A の骨格へとクローニングした後、C I Pで処理した。結果として得られるベクターであるp G L E X - M C S - R 6 K - a m p i A - p u r o B # 1 は、配列解析により直接確認した。

20

【0153】

ベクターであるp G L E X - R 6 K - a m p i A - N e o A およびp G L E X - R 6 K - a m p i A - N e o B のクローニング

ネオマイシン耐性を、発現カセットにおいてクローニングするために、制限酵素であるX b a I およびN o t I を用いて、ベクターであるp G L E X - R 6 K - p u r o A # 1 を切斷した後、C I Pで処理した。挿入配列断片は、GeneArtから注文し、GeneArtクローニングベクターである# 1 0 1 3 2 4 2 (n e o A) および# 1 0 2 6 8 9 4 (n e o B) における挿入配列として用意した。挿入配列断片はそれぞれ、ネオマイシン耐性のための、CHO細胞によるコドン使用についてのコドン最適化遺伝子およびネオマイシン耐性のC p G 低減形を含有する。挿入配列を、酵素であるX b a I およびN o t I （骨格のために用いた酵素と同じ酵素）を用いて、GeneArtクローニングベクターから切り出し、精製し、骨格断片へとクローニングした。ミニプレップを調製し、クローンを配列決定により確認した。

30

【0154】

ベクターであるp G L E X - R 6 K - a m p i B - N e o B およびp G L E X 4 1 - R 6 K - a m p i B - p u r o B のクローニング：

ベクターであるp G L E X 4 1 - R 6 K - p u r o B # 1 を、制限酵素であるB s p H I を用いて切断し、その後、C I P処理した。挿入配列断片は、E . c o l i における発現についてコドン最適化されたアンピシリン耐性遺伝子を含有する一方で、代替的なコドン使用のために取り除くことのできた全てのC p G 配列が置きかえられていた。この断片は、GeneArtに注文され、クローニングベクターである# 1 0 1 6 1 3 8 により着荷した。挿入配列断片を放出するために、GeneArtクローニングベクターを、B s p H I を用いて消化した。挿入配列および骨格断片のいずれも、ゲル電気泳動により精製した後でライゲーションし、P I R 1 細菌へと形質転換した。ミニプレップは、配列決定のために直接送付し、確認することができた（p G L E X 4 1 - a m p i B - R 6 K - p u r o B # 1 ）。

40

【0155】

50

骨格断片を創り出すために、制限酵素であるBspHIを用いて、pGLEX-R6K-neoB-ampiAを切断することにより、ベクターであるpGLEX-R6K-neoB-ampiBをもたらすクローニングを行った。同じ制限酵素の組合せを用いるpGLEX-R6K-ampiB-hygroBの消化により、ampiBをコードする挿入配列断片がもたらされた。ampiB挿入配列を、骨格であるpGLEX-R6K-neoB-ampiAへとクローニングした。

【0156】

I I . 5 ヒト GAPDH 遺伝子の上流および下流の配列の、耐性ベクターへの付加

5' 側 GAPDH 挿入配列 (3164 bp) を得るために、ベクターである pCR-blunt - 5' GAPDH を、NruI で消化した。耐性遺伝子をコードするベクターを NruI で消化し、その後、骨格断片を調製するために、CIP (Calf Intestinal Phosphatase; NEB、Ipswich、MA) で処理した。4 つの異なる骨格断片 (pGLEX-R6K-neoA-ampiA、pGLEX-R6K-neoB-ampiB、pGLEX-R6K-puroA-ampiA、および pGLEX-puroB-ampiB) を、3164 bp の 5' 側 GAPDH 挿入配列とライゲーションし、PIR1 コンピテント細菌へと形質転換した。ApalI を用いるミニプレップの制限消化は、クローンである pGLEX-R6K-neoB-ampiB-5' GAPDH #5、pGLEX-R6K-neoA-ampiA-5' GAPDH #6、pGLEX-R6K-puroA-ampiA-5' GAPDH #16、および pGLEX-puroB-ampiB-5' GAPDH #5 の同定を可能とした。

【0157】

次いで、ライゲーションのための骨格を調製するために、これらの中間体ベクターを、制限酵素であるScaIで切断し、CIPで処理した。GAPDHの下流のフランкиング領域である、挿入配列断片 (3224 bp) を放出するために、ScaIを用いて、第2の挿入配列断片であるpCR-Blunt-3' GAPDHを保有するベクターを切断した。4つの異なる骨格分子を、精製された3224 bp の挿入配列断片とライゲーションし、PIR1 コンピテント細胞へと形質転換した。制限消化により、ミニプレップを解析した。予測されるサイズの制限断片を示すクローンは、pGLEX-R6K-neoB-ampiB-GAPDH #8、pGLEX-R6K-neoA-ampiA-GAPDH #1、pGLEX-R6K-puroA-ampiA-GAPDH #1、および pGLEX-puroB-ampiB-GAPDH #4 であった。その後、クローンを配列決定解析により確認した (Fasteris, Geneva, Switzerland)。

【0158】

I I . 1 . 5 . トランスフェクション用にクローニングされたプラスミドのミディプレパレーション

十分量のプラスミドをもたらすために、Macherey Nagel キット (NucleoBond Xtra Midi; Macherey Nagel, Oensingen, Switzerland) を用いて、ミディプレップを調製した。制限消化および配列決定による確認後、プラスミドを直鎖化し、CHO-S 細胞におけるトランスフェクションのために用いた。表3は、ミディプレパレーションにおいて得られるプラスミドDNAバッチの濃度、トランスフェクション用に調製された直鎖化DNAプレップ、直鎖化のために用いた酵素、および Fasteris SA による、それぞれのプラスミドの同一性および配列情報を確認する配列ファイルについてまとめる。全てのミディプレップは、配列決定により確認してから、トランスフェクション用に用いた。

【0159】

10

20

30

40

【表3】

表3:クローニングされたプラスミドの概要。DNA ミディプレバレーションおよび DNA 直鎖化ミディプレバレーションの濃度(対応する酵素を伴う)。GSC 番号は、それぞれのプラスミドをコードし、関与性の配列決定ファイルを同定することを可能とする。

プラスミド	ミディプレバレーションの濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	直鎖化のための酵素	直鎖化プラスミドの濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Glenmark プラスミドコード
pGLEX41-R6K-AmpiA-[REP]-GAPDH	1538	EcoRV	1019	GSC 2774
pGLEX41-R6K-AmpiB-[REP]-GAPDH	1243	EcoRV	1233	GSC 2775
pGLEX-R6K-AmpiA-neoA-GAPDH	890	AseI	766	GSC 2776
pGLEX-R6K-AmpiB-neoB-GAPDH	594	AseI	979	GSC 2777
pGLEX-R6K-AmpiA-puroA-GAPDH	917	AseI	859	GSC 2778
pGLEX-AmpiB-puroB-GAPDH	869	AseI	1049	GSC 2779
pGLEX41-[REP]	2119	BspHI	868	GSC 2239
pGLEX41-R6K-AmpiA-[REP]	865	BspHI	779	GSC 2240
pGLEX41-R6K-AmpiB-[REP]	1751	BspHI	806	GSC 2249
pGLEX-R6K-AmpiA-neoA	890	BspHI	764	GSC 2214
pGLEX-R6K-AmpiB-neoB	767	BspHI	654	GSC 2244
pGLEX-R6K-AmpiA-puroA	708	BspHI	659	GSC 2220
pGLEX-R6K-AmpiB-puroB	574	BspHI	746	GSC 2213

【実施例2】

【0160】

発現ベクターによる細胞のトランスフェクション：

1. 材料および方法

C H O - S 細胞およびH E K 2 9 3 細胞

10

20

30

40

50

哺乳動物細胞は、組換えタンパク質の適正なフォールディング、アセンブリー、および転写後修飾が可能であるために、タンパク質を発現させるのに好ましい宿主である。十分に特徴付けられており、大半のヒト病原性ウイルスの宿主として用いられないことから、安定的な治療用タンパク質の産生のための比較的安全な宿主となっているために、CHO細胞系を用いた。チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO-S, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)は、4 mMのL-グルタミン(Applichem, Germany)を補充したPowerCHO-2CD培地(Lonza, Verviers, Belgium)中に懸濁させて培養し、37、5%のCO₂、および湿度80%の振とう(2.5 cmの環状ストロークを伴う200 rpm)インキュベーター内でインキュベートした。HEK293細胞は、トランスフェクトするのが容易であり、組換えタンパク質の低グラム量までの迅速な産生を可能するために用いる。用いられる細胞は、HEK293-EBNA細胞(ATCC, Manassas, VA)であり、Ex-cell 293培地(Sigma-Aldrich, St. Louis, MI)中に懸濁させて日常的に培養される。

10

【0161】

CHO-S細胞およびHEK293 EBNA細胞の継代培養は、新鮮な培地中に1 ml当たり0.5 × 10⁶個の生細胞の播種密度を用いて、3~4日間ごとに日常的に実行した。細胞は、ガス交換を可能とする透過性フィルターを含有する50 mlのバイオリアクターチューブ(TubeSpin Bioreactor 50; TPP, Transadingen, Switzerland)内で10 mlの培地を用いて培養した。細胞の生存可能性および細胞濃度は、トリパンブルー細胞除外法を用いて、Countess自動式細胞カウンター(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)により決定した。細胞濃度は、CHO-S細胞用のPCVチューブ(TPP, Transadingen, Switzerland)を用いて、ヘマトクリット値(PCV)を決定することにより確認した。

20

【0162】

ヘマトクリット値(PCV)

PCV法は、ミニPCVチューブ(PCV Packed Cell Volume Tube; TPP, Transadingen, Switzerland)内で、5000 rpmで1分間にわたる、特定容量の培養液の遠心分離に基づく。遠心分離時において、細胞は、チューブ底部の目盛り付き毛細管内でペレット化する。次いで、ペレットの容量を、遠心分離された細胞培養物流体の量との関係で評価することにより、ヘマトクリット値の百分率を決定する。例えば、1%のPCVは、10 μlの細胞ペレットが1 mlの培養物流体中に存在することを示した。

30

【0163】

細胞に対して日常的な細胞カウンティングを施すため、200 μlの各試料を、PCVチューブ内にピペティングし、対応するペレットの容量(μl単位)を、ルーラー(「読み取りの容易な」測定デバイス; TPP, Transadingen, Switzerland)で読み取った。この容量に5を乗じて、1 mlに応じる値を求め、次いで、これに細胞特異的な相関係数を用いて乗算を施し、生細胞濃度の推定値(1 ml当たりの細胞百万個の単位の)を得た。

40

【0164】

「自動式」細胞カウンティング

試料を同じ量のトリパンブルーと混合して、細胞濃度および細胞の生存可能性を、Countess(登録商標)自動式細胞カウンター(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)により決定した。次いで、溶液を、Countess(登録商標)のチャンバースライドへとピペティングしてから、測定器に読み取らせた。この測定器は、較正後に細胞の生存可能性ならびに死細胞および生細胞の濃度を決定するNeubauerチャンバーの自動式読み取りを可能とする。

【0165】

50

フローサイトメトリー解析

フローサイトメトリーとは、個別の細胞の複数のパラメータを解析するための技法である。この技法は、互いと表現型的に異なる細胞、例えば、生細胞と異なる死細胞（細胞のサイズおよび粒度に従う）の定量的解析および定性的解析を可能とする。フローサイトメトリーはまた、GFPなど、対象のタンパク質を発現させる細胞の定量化も可能とする。細胞は、 $300\mu l$ の試料の無菌のピペティングにより培養物から回収し、 488nm で発光する空冷式アルゴンレーザーを装備した蛍光活性化細胞分取（FACS）Caliburフローサイトメーター（Becton、Dickinson and Company、Franklin Lakes、NJ、USA）により解析した。解析は、Cell Questソフトウェアにより行った。GFPによる発光は、 $530/30\text{nm}$ のバンドパスフィルターを用いるFL-1により検出した。

【0166】

第1のゲートでは、細胞破碎物のほか、均等目盛り上のSSC/FSCドットプロット内の死細胞を解析から除外した。次いで、生細胞によるGFP蛍光を、対数目盛り上のヒストグラムに表した。蛍光分布の中央値を用いて、解析された細胞集団のGFP発現レベルを評価した。

【0167】

IgGの定量化法：Octet QK

Octet QKシステム（Fortebio、Menlo Park、CA、USA）は、抗体、タンパク質、ペプチド、DNA、および他の生体分子に対する無標識の定量化を実行し、生体分子の結合相互作用についての速度論的特徴付けをもたらす。試料の結合率（nm）と蓄積されたIgG1濃度（ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）との間の相関は、検量線によるIgG力価の定量化を可能とする。

【0168】

細胞試料を、 300g で5分間にわたり遠心分離した。次いで、上清を、 96 ウェルプレート内でOctet緩衝液により希釈して（IgG1抗体について $1/5$ ）から、プロテインAバイオセンサー（Protein A DIP and READ（商標）Biosensor、Fortebio、USA）を用いるOctetにより解析して、ウェル1つ当たりの抗体濃度を得た。

【0169】

JetPEIを用いる一過性トランスフェクション

ポリエチレンイミン（PEI；JetPEI、Polyplus-transfection、Illkirch、France）を用いて、CHO-S細胞およびHEK293EBNA細胞の一過性トランスフェクションおよび安定的トランスフェクションを実施した。PEIとは、DNAなど、負に帯電した分子と複合体化しうるカチオン性ポリマーである。正に帯電したDNA-PEI複合体は、負に帯電した細胞表面に結合し、エンドサイトーシスにより内部化される。DNA-PEI複合体は、リソソームコンパートメントに到達し、そこから溶解により核へと放出される。DNA-PEI複合体による高いトランスフェクション効率は、DNAをリソソーム分解から保護するPEIの能力に起因する。細胞は、製造元により提供されるマニュアルに従ってトランスフェクトした。

【0170】

全てのプラスミドは、直鎖化してから、安定的トランスフェクションにかけた（ $100\mu\text{l}$ のトリス-EDTA、pH 7.5中に再懸濁させた $100\mu\text{g}$ のDNA）。一過性トランスフェクションのためには、ミディプレバレーションDNAに由来する環状プラスミドを直接用いた。本研究では、一過性トランスフェクションを、 $50\text{m}\text{l}$ のバイオリアクターチューブ内で維持し、抗生素は添加しなかった。

【0171】

IgG1を発現させる安定的なCHO-SクローンおよびGFPは、1つの発現ベクターと、2つの耐性ベクター（それぞれ、ピューロマイシン耐性またはネオマイシン耐性をコードする）を共トランスフェクトすることにより得た。

10

20

30

40

50

【0172】

安定プールおよび安定ミニプールの選択

フローサイトメトリー (BD FACS Calibur サイトメーター、#1293) を介して細胞内 GFP の発現を解析することにより、トランスフェクションの 24 時間後におけるトランスフェクション効率を決定した。GPF 陽性細胞の百分率が、20% より高い場合は、トランスフェクトされた細胞を、選択培地で希釈し、96 ウェルプレート（単離安定ミニプールを創出する限界希釈のために）、または T 型フラスコ（安定プールを創出するために）へと分配した。用いられた選択培地は、異なる濃度のジェネティシンおよびピューロマイシンを補充した、Power CHO - 2、4 mM のグルタミンであった。

10

【0173】

トランスフェクションの 7 日後、選択培地を細胞へと添加することにより、選択の厳密性を更新した。96 ウェルプレート内のコロニーがコンフルエントになったらすぐに、蛍光リーダーを用いてプレートを読み取った。

【0174】

T 型フラスコ内のプールは、抗生素非含有 Power CHO - 2、4 mM の L - グルタミンを用いて、Tube Spin スケールまで増やした。それらの生存可能性および濃度は、Countess 自動式細胞カウンター (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) により評価した。細胞密度によりそれが可能となったらすぐに、50 ml のバイオリアクターチューブ内 (5% の CO₂、37°、および湿度 80% のシェーカー (200 rpm) 内でインキュベートする) の 10 ml の培地中に、1 ml 当たりの細胞 0.5 × 10⁶ 個の密度で細胞を播種することにより、全てのプールについてシードトレインを開始した。各シードトレインは、成長培地中に 1 ml 当たりの細胞 0.5 × 10⁶ 個 (PCV 解析により細胞濃度を決定した) で細胞を播種することにより、毎週 2 回継代培養した。シードトレインは、全ての生産実施 (バッチ) の接種のために用いた。

20

【0175】

続く 4 ~ 5 週間にわたり、生産実施を、毎週 1 回 2 連で播種した。クローン集団について、プールの安定性を、上記の通り、FACS および IgG 発現により評価した。

【0176】

生産実施 (バッチ発酵)

30

バッチ実施の細胞プールを、接種のために、シードトレインを用いて、1 ml 当たりの細胞 0.5 × 10⁶ 個の濃度で播種し、次いで、Feed 培地中で 7 日間にわたり細胞を培養した。4 および 8 日目において、200 μl の細胞を、300 g で 5 分間にわたり遠心分離し、Octet を用いて、上清を、蓄積された IgG について解析した。加えて、各バッチの GFP 発現を、FACS により解析した。

【0177】

2. 結果

2.1 CHO 細胞における一過性発現：

本研究で比較されるベクターは、主にそれらの骨格において異なる。発現カセットの全体 (プロモーター、1 番目のイントロン、発現構築物、pol y (A)) は、全てのベクターについて全く同じである。ベクターは、実施例 1 で記載される通り、ベクターである pGLEX41 から導出する。1 つのベクターでは、アンピシリン耐性遺伝子を、E. coli における発現についてコドン最適化し、細菌骨格を最小限まで低減した：pGLEX41 - R6K - Amp iA - [REP] (A と略称する)。第 2 のベクターでは、アンピシリン耐性遺伝子を、E. coli における発現についてコドン最適化したが、代替的コドンを用いる (可能な場合) ことにより、全ての CpG 配列を回避した：このベクターを、pGLEX41 - R6K - Amp iB - [REP] と呼ぶ (B と略称する)。第 3 の改変には、ベクターである pGLEX41 - R6K - Amp iA - [REP] - GAPDH (GAPDH_A と略称する)、および pGLEX41 - R6K - Amp iB - [REP] - GAPDH (GAPDH_B と略称する) をもたらすベクター A および B の発現力

40

50

セットの上流および下流においてクローニングされた、GAPDH フランкиング配列の使用を組み入れた。

【0178】

発現したレポータータンパク質の発現レベルを、異なるプラスミド骨格の文脈で比較するために、CHO-S 細胞 (Invitrogen) の一過性トランスフェクションを行った。トランスフェクション (2連の) は、50ml のバイオリアクターチューブ (TPP、Transadingen、Switzerland) 内で、10ml の最終培地容量を用いて実施し、トランスフェクションの5日後に、Octetにより解析した (図2)。

【0179】

骨格を適正化された全てのベクター (A および B) は、対照ベクターである pGLEX41 よりわずかに高い発現レベルを示す。ベクター A とベクター Bとの間には、わずかな差違しか見られない。骨格内の唯一の差違が、一過性発現に対して影響を及ぼさないはずのアンピシリン耐性であるために、これは予測されたことである。

【0180】

最も目覚ましい観察は、GAPDH 配列の、発現に対する正の効果である。GAPDH フランкиング配列を保有するプラスミドでは、GAPDH 配列を伴わないプラスミドと比較して2倍の発現レベルが得られる。これは、A構築物およびB構築物のいずれにも当てはまる。pGLEX41ベクターと比較して、3倍の発現を観察することができる。プラスミドのサイズを考慮すると、これは、なおいっそう驚くべきことである。ベクター A (7048bp) は、ベクターである GAPDH-A (13436bp) と比較してほとんど半分のサイズである。したがって、一過性トランスフェクションプロセスにおいて送達されるDNAの量が全てのプラスミドについて同じであると仮定すると、核へと送達されるのは、GAPDH-A のモル量のうちの半分だけとなる。

【0181】

2.2 HEK293 細胞における一過性発現

発現したレポータータンパク質の発現レベルを、異なるプラスミド骨格の文脈で比較するために、HEK293 EBNA 細胞の一過性トランスフェクションを行った。トランスフェクション (2連の) は、50ml のバイオリアクターチューブ (TPP、Transadingen、Switzerland) 内で、10ml の最終培地容量を用いて実施し、トランスフェクションの10日後に、Octetにより解析した (図3)。

【0182】

図3に示される結果は、HEK293 EBNA 細胞内で GAPDH フランキング領域を用いて得ることのできる発現の有意な増大を示す。GAPDH-Bベクターが、発現の3倍の増大を示す一方、GAPDH-Aベクターは、なにより大きな、発現の5倍の増大を示す。これらのベクターは、ori Pエレメントを含有せず、したがって、なにより大きな力価への潜在的 possibility を有しうるであろう。

【0183】

2.3 安定 CHO 細胞系における発現

安定的にトランスフェクトされた細胞の確立

安定集団は、発現ベクターと耐性遺伝子をコードするベクターとを共トランスフェクトした後で、抗生素により媒介される選択圧にかけることにより創出した。選択圧は、トランスフェクションの14日後に除去した。これらのステップにより、異なる構築物のレポータータンパク質 (IgG1抗体、および GFP) の発現レベルおよび発現の安定性を比較するための、生産実施において定期的な間隔で培養される安定ミニプールおよび安定プールの作製が可能となった。

【0184】

細胞プールを用いて行われる生産実施におけるレポータータンパク質発現研究

安定的トランスフェクションによりプールを創出した。選択手順時 (トランスフェクション後の最初の14日間) に、FACSによりプールを解析した。GFP陽性細胞画分の

10

20

30

40

50

増大を、培養物の生存可能性と併せて、時間経過にわたり観察することができた。抗生剤により媒介される選択圧は、14日後にプールから除去した。この手法を用いても、「B」プラスミドをトランスフェクトされた細胞プールを得ることはできなかった。創出したプールの発現レベルは、50mlのバイオリアクターチューブ内で細胞を培養できたらすぐにアッセイした。バッチは、2連で行った。FACSにより、GFPの発現について細胞を解析し、発現の8日後に、Octetにより、上清中のIgGの蓄積についてアッセイした。

【0185】

プールのIgG力価とプールのGFP発現との間では、比例関係を観察することができた。したがって、図4には、IgGデータだけを示す。GAPDH配列を含有するベクターをトランスフェクトされた全てのプールは、ベクターであるpGLEX41またはGAPDH配列を伴わない同じベクターと比較してより高度な発現を示す(AとA-GAPDHとの間で2.8倍である。Bプールは生存しなかったので、BとB-GAPDHとの間では、結論を引き出すことはできなかった)。A-GAPDHおよびB-GADPHにより行われたトランスフェクションは、pGLEX41によるトランスフェクション(バッチ2について)より高度な(それぞれ、2.7および3.5倍の)IgG発現を誘導した。したがって、プール内では、GAPDHフランкиング配列が、タンパク質を産生させるのに好適であると考えられる。最後に、B-GADPHベクターにより行われたトランスフェクションは、A-GAPDHにより行われたトランスフェクションより高度なIgGの(1.25倍の)発現を誘導した。したがって、耐性遺伝子内のCpGの低減もまた、タンパク質の安定的な産生に好適であると考えられる。

10

20

20

【0186】

クローン集団についての発現レベル研究

クローン集団またはオリゴクローン集団を得るために、細胞にトランスフェクトし、96ウェルプレート内の選択培地中に分配した。7日後に、選択培地を細胞へと添加することにより、選択圧を更新した。GFPの発現は、トランスフェクションの14日後に、ELISA-プレートリーダーを用いることにより、評価した。結果を図5に示す。

30

【0187】

細胞プール内で得られた結果を確認したところ、GAPDHフランキング配列を含有するベクターをトランスフェクトされた細胞は、GFPを、GAPDHの上流および下流の配列を伴わない同じ骨格(1.7~2倍)または対照として用いられた他のベクター(pGLEX41:2.5倍)より著明に発現させた(図5)。加えて、CpGを低減した耐性配列を含有するベクター(B)を伴う集団は、コドン最適化だけを施された対応するベクター(A)より高度な発現を誘導した。(AとBとの間で1.5倍; BとB-GAPDHとの間で1.2倍)。

30

【0188】

発現研究からは、複数の結論を引き出すことができた。第1に、GAPDHの上流および下流の配列は、基準として用いられた基準ベクター(pGLEX41)より高度な発現を可能とする。また、細胞に、GAPDH配列を伴わない同じベクター骨格をトランスフェクトしたところ、低い発現レベルが得られることから、発現に対する有益な効果が、挿入されたGAPDHフランキング配列と関連することも確認される。加えて、発現プラスミドおよび選択プラスミドにおけるCpG数の低減もまた、発現にわずかに好適であると考えられる。

40

【実施例3】

【0189】

新たにデザインされたベクターをトランスフェクトされたCHO-S GMP細胞の一過性発現レベル

文献では、GAPDHプロモーターの5'側領域が、潜在的なインスリン応答エレメントのほか、フォルボールエステル応答エレメントを保有することが記載されている(Alexander-Bridgesら(1992)、Advanced Enzyme Regu

50

1、32：149～159）。フォルボールエステル応答エレメント（-1040～-1010 bp）は、通例 GAPDH プロモーター（-488～+20）と称する配列の上流に位置する。安定 H35 肝がん細胞系において実施された欠失研究において、著者らは、塩基対 -1200～-488（転写開始点に照らした）の欠失の有意な効果を実証することができなかった。したがって、フォルボールエステル応答エレメントは、GAPDH プロモーターにより駆動される発現へと機能的に連結されていない可能性があろう。にもかかわらず、GAPDH フランкиングエレメントを含有するプラスミドを用いて観察された一過性発現および安定的発現の増大における、インスリンおよび PMA（最も一般的なフォルボールエステルである、フォルボール-12-ミリストート-13-アセテート）の寄与を評価するために、一過性トランスフェクション実験を実施した。

10

【0190】

インスリン非含有成長培地を得るために、Power CHO 2 を、粉末培地から調製し、インスリンは添加しなかった。PMA は、Sigma (St. Louis, MO) から購入し、Power CHO 2 (インスリンを伴う / 伴わない) 中に 1.6 μM の最終濃度 (Alexander-Bridges により、H35 肝がん細胞系に対して用いられた濃度に対応する) で投与した。

【0191】

トランスフェクションは、既に記載されている通りに、50 ml のバイオリアクターチューブ (TubeSpin, TPP, Trasadingen, Switzerland) 内で実施した。インスリンの存在を回避するために、トランスフェクション培地を、4 mM の Gln および 25 mM の HEPES を補充した RPMI 1640 (PAA, Pasching, Austria) へと交換した。トランスフェクション後、細胞を 12 ウェルプレート内に分配し、1 ml ずつの 4 つの異なる培地 (Power CHO 2, 4 mM の Gln、インスリンを伴う / 伴わない; Power CHO 2, 4 mM の Gln, 1.6 μM の PMA、インスリンを伴う / 伴わない) を添加した。ここでもまた、2 つの IRES を用いる、IGG1 および GFP を発現させるレポーター構築物 (実施例 2 において記載した) を用いた。このベクターは、トランスフェクション効率の検証を可能とした。トランスフェクトされた細胞の百分率および生存可能性は、全ての 4 つの異なる培地調製物において同様であることが見出された。

20

【0192】

図 6 において示される通り、この実験では、インスリン枯渇および / または PMA 添加の有意な効果を観察することができなかった。発現のために用いられた全ての培地において、同様な効率が得られた。これは、GAPDH 遺伝子の上流のフランキング配列に存在する潜在的なフォルボールエステル応答エレメントおよびインスリン応答エレメントが、一過性のトランス遺伝子の発現に影響を及ぼさないことを示唆する。

30

【実施例 4】

【0193】

レポーター遺伝子の発現に対する効果を研究するための、プロモーターの上流にあり、かつ、poly A 部位の下流にある、GAPDH 発現カセットを挟む DNA についての断片化解析

40

ヒト GAPDH 遺伝子座は、ヒトゲノムの第 12 染色体上に位置する。GAPDH は、グルコースの代謝において鍵となる役割を果たすので、哺乳動物に由来する全ての細胞において構成的に活性であることが記載されている。プロモーターの上流において、GAPDH 遺伝子は、30000 bp 超にわたり及ぶ遺伝子である NCAPD2 と隣接する。ポリアデニル化部位の下流において、GAPDH 遺伝子は、IFFO1 と隣接する (詳細については、図 7 を参照されたい)。

【0194】

GAPDH およびプロモーターだけでなく、フランキング領域もまた、異なる種の間で十分に保存されている (表 4 を参照されたい)。

【0195】

50

【表4】

表4:ヒト GAPDH フランкиング領域、ラット GAPDH フランкиング領域、およびマウス GAPDH フランкиング領域の間の高度な相同性の連なり。Clone Manager 9(ScieED、Cary、NC、USA)を用いて解析を行った。番号付けは、上流または下流それぞれのフランкиングエレメント(それぞれ、配列番号 7 および配列番号 8)の最初の塩基に照らした番号付けである。アライメントのために用いた配列は、マウス塩基 532~3731(上流)および 8164~11364(下流)が配列番号 18 であり、ラット塩基 719~3918(上流)および 8495~11058(下流)が配列番号 19 であった。

上流の領域				下流			
相同性を有する配列[ラット]		相同性を有する配列[マウス]		相同性を有する配列[ラット]		相同性を有する配列[マウス]	
>80%	>90%	>80%	>90%	>80%	>90%	>80%	>90%
161-249	279-331	15-69	278-329	1608-1764	1706-1764	1614-1671	1904-2061
256-338	554-623	159-249	546-626	1894-2067	1912-2061	1888-2072	2927-3071
515-659		273-342				2918-3082	
2296-234 9		515-647					
2381-251 3		1143-1223					
2736-281 8		1957-2009					
		2029-2080					
		2375-2485					
		2730-2821					

【0196】

齧歯動物とヒトとの間のDNA相同性の比較は、DNA保存が最小の38%であることを示す。プロモーター領域または遺伝子をコードする領域の外側に保存されたDNAの連なりの存在は、細胞に対して、DNA配列を維持するか、または特定の変化／わずかな変化だけを可能とする選択圧がかかっている可能性があることを示す。本発明者らの特定の場合において、GAPDH フランкиング領域は、それらが GAPDH 遺伝子の高度な発現レベルを維持するために、細胞にとって重要であろう。発現の低減をもたらすDNA配列の変化は、選択により排除されるであろう。

【0197】

上流および下流のGAPDH エレメントの、観察される発現の増大への寄与を評価するために、上流のGAPDH フランкиング領域(配列番号 7)、上流のGAPDH フランキング領域の断片、または下流のGAPDH フランキング領域(配列番号 8)だけを含有する構築物を產生した。レポーター IgG1 型抗体は、IREs 構築物(軽鎖 - IRES - 重鎖)を介して発現させ、これにより、複数のプラスミドの共トランスフェクションを回避した。GAPDH の上流における断片の断片化についての詳細を図8に示す。以下の上流におけるGAPDH フランキング領域の断片：断片1(配列番号 9)、断片2(配列番号 10)、断片3(配列番号 11)、断片4(配列番号 12)、断片8(配列番号 13)、断片9(配列番号 14)、断片11(配列番号 15)、断片17(配列番号 16)を用いた。

【0198】

用いられる上流のGAPDH フランキング領域(配列番号 7)は、NruI 制限部位の

10

20

30

40

50

2 × 3 (合計で 6) のヌクレオチドであって、そのうちの 3 つが、その 5' 端において、ゲノム DNA へと連結され、3 つが、その 3' 端において、ゲノム DNA へと連結されるヌクレオチドを含有する。用いられる下流の GAPDH フランкиング領域 (配列番号 8) は、ScalI 制限部位の 2 × 3 (合計で 6) のヌクレオチドであって、そのうちの 3 つが、その 5' 端において、ゲノム DNA へと連結され、3 つが、その 3' 端において、ゲノム DNA へと連結されるヌクレオチドを含有する。それぞれの制限部位のヌクレオチドを伴わない、上流の GAPDH フランкиング領域および下流の GAPDH フランкиング領域を、配列番号 20 (制限部位を伴わない上流の GAPDH フランкиング領域)、および配列番号 21 (制限部位を伴わない下流の GAPDH フランкиング領域) に示す。用いられる上流の GAPDH フランкиング領域の断片の各々は、その 5' 端および / またはその 3' 端において、ゲノム DNA へと連結された、それぞれの制限部位の 3 つずつのヌクレオチドを含有する (断片 1 は、その 5' 端において、NruI 制限部位の 3 つのヌクレオチドを含有し ; 断片 2 は、その 3' 端において、NruI 制限部位の 3 つのヌクレオチドを含有し ; 断片 3 は、その 5' 端において、NruI 制限部位の 3 つのヌクレオチドを含有し ; 断片 4 は、その 3' 端において、NruI 制限部位の 3 つのヌクレオチドを含有し ; 断片 8 は、その 3' 端において、NruI 制限部位の 3 つのヌクレオチドを含有し ; 断片 9 は、その 5' 端において、NruI 制限部位の 3 つのヌクレオチドを含有し、その 3' 端において、NruI 制限部位の 3 つのヌクレオチドを含有し ; 断片 11 は、その 3' 端において、NruI 制限部位の 3 つのヌクレオチドを含有する)。断片 17 は、制限部位のヌクレオチドを含有しない。それぞれの制限部位のヌクレオチドを伴わない、上流の GAPDH フランкиング領域の断片を、配列番号 22 (制限部位を伴わない断片 1)、配列番号 23 (制限部位を伴わない断片 2)、配列番号 24 (制限部位を伴わない断片 3)、配列番号 25 (制限部位を伴わない断片 4)、配列番号 26 (制限部位を伴わない断片 8)、配列番号 27 (制限部位を伴わない断片 9)、配列番号 28 (制限部位を伴わない断片 11) に示す。

【0199】

上清中に分泌される IgG1 の量を定量化するために、トランスフェクションの 10 日後に、Octet (Fortebio, Menlo, CA, USA) を用いて、上流および下流の GAPDH エレメントの発現に対する効果を評価した (図 9 を参照されたい)。元のベクターである pGLEX41 は、骨格である pGLEX41-ampiA において用いられる、改善された新たなベクターデザインと比較して低度な発現結果 (80%) を示している。元の骨格である pGLEX41 と比較して、新たなデザインでは、E.coli における、アンピシリン耐性カセットに必要な ampA 遺伝子のコドン最適化、異なる複製起点 (pUC 複製起点ではなく、R6K 複製起点)、および細菌由来の不要なリンカー (またはスペーサー) 配列の除去が組み入れられている。いずれのベクターも、ほぼ同じサイズを有する。

【0200】

驚くべきことに、上流のエレメント (配列番号 7) および下流のエレメント (配列番号 8) を組み入れた pGLEX41-ampiA (発現結果を示す図 9 では、pGLEX41-up/down と称する) は、上流および下流の配列を伴わない同じベクターと比較して、より高度な (1.5 倍) 発現を示している。サイズの差違 (up/down 断片は、プラスミドのサイズを 6000 bp 近傍増大させる) を考慮し、したがって、トランスフェクション時において送達されるプラスミドコピーの差違を考慮する場合、効果は、プラスミド 1 つ当たりのベースでないっそう重要となりうる。

【0201】

上流の断片 (up) だけを含有するベクターは、元の発現構築物である pGLEX41-ampiA と同様な発現レベルを示している。下流の断片 (down) だけを含有するベクターは、元の発現構築物である pGLEX41-ampiA と比較した発現の有意な増大 (1.2 倍) を示している。上流および下流の断片の両方が存在する場合は、さらなる発現の増大を観察することができる。これは、上流の断片の断片化により確認される。

10

20

30

40

50

断片 9 およびプロモーター近位の断片 8 は、p G L E X 4 1 - a m p i A と比較した発現の差違を示さない。断片 1、11、および 17 は、発現の増大を示す。最高の増大は、断片 4 について観察された。プロモーター近位の断片 8 が、効果を示していないことを強調すべきである。したがって、発現の増大を、既に公表されている (Alexander-Bridgesら (1992)、Advan Enzyme Regul, 32: 149 ~ 159); Gravenら (1999)、Biochimica et Biophysica Acta, 147: 203 ~ 218) 配列によって説明することはできない。

【0202】

興味深いことに、断片 2 および 3 は、有意な発現の低減をもたらす。これは、とりわけ、逆方向 (図 9 におけるアンチセンス (AS)) でクローニングされたこれらの断片が、この効果を引き起こさないという事実に照らして予測外である。断片 1、8、9、11、および 17 では、センス配向またはアンチセンス配向で組み込まれた断片 (データは示さない) について発現の差違が観察されなかった。断片 11 は、断片 2 の部分であるが、この効果を示さない。したがって、発現にとって有害であると考えられる配列エレメントは、少なくとも部分的に、断片 11 を得るために、断片 2 において欠失させた B s t B I - B s t B I 断片上にあるはずである。

【0203】

加えて、負のエレメントが B s t B I - B s t B I 断片上に位置する (少なくとも部分的に) という仮説は、断片 3 (B s t B I - B s t B I 断片を組み入れる) と断片 1 との間で観察される発現の増大により裏付けられている。

【0204】

この研究からは、負の効果を及ぼす断片 (B s t B I - B s t B I) を位置特定することは容易であると考えられるが、断片 2 および 3 について観察されたこの負の効果が、完全な上流の断片において存在する配列エレメントによりいかにして補完されるのかは、それほど明らかでない。この負の効果が、断片 1 および断片 4 により観察された小さな正の効果 (しかし、断片 1 で観察される発現の増大は、断片 4 の場合より小さい) により相殺されている可能性はあろう。にもかかわらず、断片 4 で観察される正の効果 (1.25 倍) は、負の効果 (0.4 倍) と比較してそれほど重要ではないと考えられる。さらに、B s t B I - B s t B I 断片を伴わない上流の領域全体である断片 9 は、G A P D H の上流のランキング領域全体と比較した発現の増大を示さない (にもかかわらず、断片 9 は、断片 2 および 3 の部分である E c o R V - B s t B I 断片を組み入れ、発現に対して負の効果を及ぼしうるであろう)。

【0205】

観察された効果の背後の機構について可能なのは推測に限られる。断片 2 および 3 について観察された、発現に対する負の効果の配向依存性は、1つの配向だけの発現を誘発するプロモーターが周囲に存在しないために、同定されていないオープンリーディングフレームの発現 (例えば、n c R N A の発現) を除外する。発現が基底レベルを下回って低減されるという事実は、正の効果 (例えば、エンハンサー活性) の非存在だけでなく、配向依存的な負の効果の存在も示す。

【0206】

まとめると、上流および下流の両方のランキング領域が発現プラスミド内に存在する場合は、C H O 細胞における一過性発現の驚くべき増大が観察される。断片 4 は、発現に対する有意な正の効果を及ぼすと考えられるが、観察された発現の増大全体の原因となる単一の断片を同定することはできなかった。発現ベクターである p G L E X 4 1 - a m p i A (up / down) の発現の増大は、上流および下流のランキング領域両方の総体的効果であると考えられる。

【実施例 5】

【0207】

チャイニーズハムスター G A P D H 遺伝子の上流の非翻訳ゲノム D N A 配列およびチャイニーズハムスター プロモーターのクローニング

10

20

30

40

50

1.1 チャイニーズハムスター GAPDH 遺伝子の上流の非翻訳ゲノム DNA 配列の、発現ベクターへのクローニング

チャイニーズハムスター GAPDH 遺伝子の上流の非翻訳ゲノム DNA 配列を、CHO - S 細胞 (Life Technologies) のゲノム DNA から、PCR により増幅した。ゲノム DNA は、実施例 1 で記載した通りに抽出した。構築物は、実施例 1 において記載したレポーター遺伝子構築物 [REP] を発現させるための、マウス CMV プロモーターまたはチャイニーズハムスター GAPDH プロモーターを用いて調製した。

【0208】

チャイニーズハムスター GAPDH 遺伝子の上流のゲノム DNA 配列を、マウス CMV プロモーターと組み合わせてクローニングするために、実施例 1 において記載した PCR プロトコールを用いて 3 kb の断片（配列番号 29 の bp 672 ~ 3671）を増幅するためのプライマー GlnPr1896 および GlnPr1897 を用いて、配列番号 30 を伴う単位複製配列をもたらした。単位複製配列は、チャイニーズハムスター GAPDH 遺伝子の上流のゲノム DNA 配列と、プライマーにより導入された 5' 側および 3' 側の制限部位とを含有する。

10

【0209】

チャイニーズハムスター GAPDH 遺伝子の上流のゲノム DNA 配列を、チャイニーズハムスター GAPDH プロモーターと組み合わせてクローニングするために、チャイニーズハムスター GAPDH 遺伝子の上流のゲノム DNA 配列と、GAPDH プロモーター（配列番号 29 の bp 672 ~ 4179）とを組み入れたゲノム DNA 配列を含有する 3508 bp の断片を増幅するためのプライマー GlnPr1902 および GlnPr1905 を用いて、配列番号 31 を伴う単位複製配列をもたらした。第 2 の PCR では、プロモーター領域（配列番号 29 の bp 3672 ~ 4179）だけを含有する 508 bp の断片を増幅するための GlnPr1901 および GlnPr1902 を用いて、配列番号 32 をもたらした。ベクター「A」（実施例 1 において記載した）において用いられるインtron は、プライマー GlnPr1903 および GlnPr1904 を用いて増幅した。

20

【0210】

第 1 のフュージョン PCR は、配列番号 32 を伴う単位複製配列と、インtron 配列を伴う単位複製配列とを鋳型として用いるプライマー GlnPr1904 および GlnPr1901 により実施した。単位複製配列は、プライマーにより導入された、チャイニーズハムスター GAPDH プロモーター、インtron、ならびに 5' 側および 3' 側の制限部位を含有する。全てのプライマーを表 5 に示す。

30

【0211】

第 2 のフュージョン PCR は、配列番号 31 を伴う単位複製配列と、インtron 配列を伴う単位複製配列とを鋳型として用いるプライマー GlnPr1905 および GlnPr1904 により実施した。単位複製配列は、プライマーにより導入された、チャイニーズハムスター GAPDH 遺伝子の上流のゲノム DNA 配列、チャイニーズハムスター GAPDH プロモーター、インtron、ならびに 5' 側および 3' 側の制限部位を含有する。

40

【0212】

1% のアガロースゲル上における精製後、対象のバンドを切り出し、キットである「Nucleospin Gel and PCR Clean-up」(Macherey Nagel、Oensingen、Switzerland) を用いて精製した。精製された断片は、Zero Blunt PCR クローニングキット (Invitrogen、Carlsbad、CA、USA) を用いて、プラスミドである pCR_Blunt へとクローニングした。ライゲーション産物は、コンピテント E. coli TOP10 (One Shot (登録商標) TOP 10 Competent E. coli; Invitrogen、Carlsbad、CA、USA) へと形質転換し、ミニプレップを制限解析することにより解析した。これにより、チャイニーズハムスター GAPDH 遺伝子の上流のゲノム DNA 配列を含有するプラスミドである pCR_blunt [CHO

50

- up stream GAPDH]、チャイニーズハムスター GAPDH 遺伝子の上流のゲノム DNA 配列と、GAPDH プロモーターと、ベクター「A」に由来するイントロンとを含有する pCR_Blunt [CHO-up stream GAPDH_GAPDH プロモーター]、ならびに GAPDH プロモーター、およびベクター「A」に由来するイントロンを含有する pCR_Blunt [CHO-GAPDH プロモーター] がもたらされた。

【0213】

単位複製配列を、それらの分泌される遺伝子の発現に対する効果について評価するために、ベクター「A」(実施例 1 において記載した)を用いた。既に記載されている通り、このベクターにおいて用いられる発現カセットは、分泌される IgG1 および GFP をコードするポリシストロニック遺伝子を含有する(実施例 1 を参照されたい)。したがって、トランスフェクトされた細胞は、IgG1 モノクローナル抗体を分泌し、細胞内 GFP を依存的な形で蓄積する。

【0214】

チャイニーズハムスター GAPDH 遺伝子の上流のゲノム DNA 配列を含有する 3 kb の挿入配列断片を放出するために、プラスミド pCR_Blunt [CHO-up stream GAPDH] を、制限酵素である NaeI を用いて消化した。この挿入配列を、「A」の骨格内にクローニングし、制限酵素である NruI を用いて消化し、CIP 处理した(CIP; NEB、Ipswich、MA、USA)。骨格と挿入配列とを、T4 DNA リガーゼ(T4 DNA リガーゼ、NEB、Ipswich、MA、USA)を用いて併せてライゲーションし、その後、コンピテント E. coli PIR1 へと形質転換した。ミニプレップ調製およびその後の制限解析のためにクローンを採取した。結果として得られるプラスミドを、「A_GAPDH_UP」と称し、配列決定解析により確認し、NucleoBond Xtra Midi キット(Macherey Nagel、Oensingen、Switzerland)を用いて、ミニプレップスケールで產生した。

【0215】

チャイニーズハムスター GAPDH プロモーターを用いて、発現構築物をクローニングするために、制限酵素である NheI および NruI を用いる消化により、挿入配列断片を、プラスミド pCR_Blunt [CHO-up stream GAPDH_GAPDH プロモーター] および pCR_Blunt [CHO-GAPDH プロモーター] から放出させた。結果として得られる断片をベクター「A」の骨格内にクローニングし、同じ酵素を用いて切断し、CIP 处理した。T4 DNA リガーゼによるライゲーションおよびコンピテント E. coli PIR1 への形質転換後、ミニプレップ制限解析のためにクローンを採取した。結果として得られるプラスミドを、「A_GAPDH_UP_Prom」(チャイニーズハムスター GAPDH およびプロモーターの上流の非翻訳ゲノム DNA 配列を伴うプラスミド) および「A_PR」(プロモーターだけを伴うプラスミド)と称し、配列決定解析により確認し、キットである NucleoBond Xtra Midi (Macherey Nagel、Oensingen、Switzerland) を用いて、ミニプレップスケールで產生した。

【0216】

2. チャイニーズハムスター GAPDH 遺伝子の上流の非翻訳ゲノム DNA 配列のレポーター遺伝子構築物の発現に対する効果の評価

CHO-S 細胞を、TubeSpin バイオリアクター内で、10 ml の培地容量を用いてトランスフェクトした(実施例 2 で記載される通り)。トランスフェクトされた細胞は、37 度、5% の CO₂、および湿度 80% の、200 rpm の搅拌を伴う振とうインキュベーター内でインキュベートした。プロテイン A バイオセンサー(Fortebio、Menlo Park、CA、USA)を伴う Octet QK システムを用いて、細胞の上清を、IgG1 の発現について解析した。結果を図 10 に示す。

【0217】

10

20

30

40

50

マウスCMVプロモーターを含有するプラスミド(「A」)の発現レベルと比較して、GAPDHプロモーターを含有するプラスミド(「A_PR」)の発現レベルが50%低減されることから、チャイニーズハムスターGAPDHプロモーターは、ウイルス性プロモーターほど強力ではないことが示される。チャイニーズハムスターGAPDHプロモーターと組み合わせた、チャイニーズハムスターGAPDH遺伝子の上流の非翻訳ゲノムDNA配列を含有するプラスミド(「A_GAPDH_UP_Prom」)は、GAPDHプロモーターだけを有する構築物(「A_PR」)と比較して、発現の2倍の増大を示す。チャイニーズハムスターGAPDH遺伝子の上流の非翻訳ゲノムDNA配列と、マウスCMVプロモーターとを含有するプラスミド(「A_GAPDH_UP」)は、最高の発現を示し、マウスCMVプロモーターだけを含有するプラスミド(「A」)を40%超える増大を示す。これにより、チャイニーズハムスターGAPDH遺伝子の上流の非翻訳ゲノムDNA配列は、レポータータンパク質の発現に対するエンハンサー効果を有することが確認される。

【0218】

【表5】

表5:実施例5におけるクローニングに用いられたプライマー

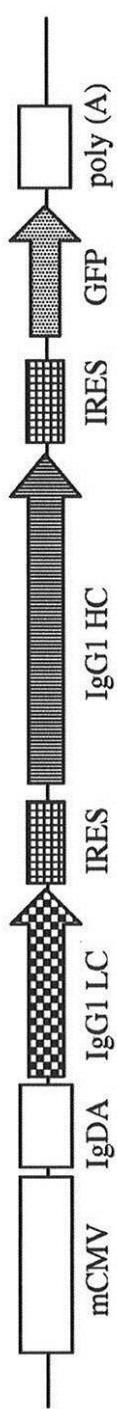
プライマー	配列番号	配列	配向	制限部位
GlnPr 1896	配列番号33	TACGGCCGGCTTCACTGTACAGTGGCACAT	フォワード	Nael
GlnPr 1897	配列番号34	TCAGGCCGGCCGTGGTTCTCGGTAGTGAC	リバース	Nael
GlnPr 1901	配列番号35	TACTCGCGAAGAAGATCCTCAACTTTCCACAGCC	フォワード	NruI
GlnPr 1902	配列番号36	GTTCACTAACGAGCTCTGCTATTATAGGAACGGGGTG	リバース	/
GlnPr 1903	配列番号37	CACCCCAGTTCCCTATAAATAGCAGAGCTCGTTAGTGAAC	フォワード	/
GlnPr 1904	配列番号38	CGCTAGCACCGGTCGATCGA	リバース	NheI
GlnPr 1905	配列番号39	TACTCGCGATTCACTGTACAGTGGCACATAC	フォワード	NruI

10

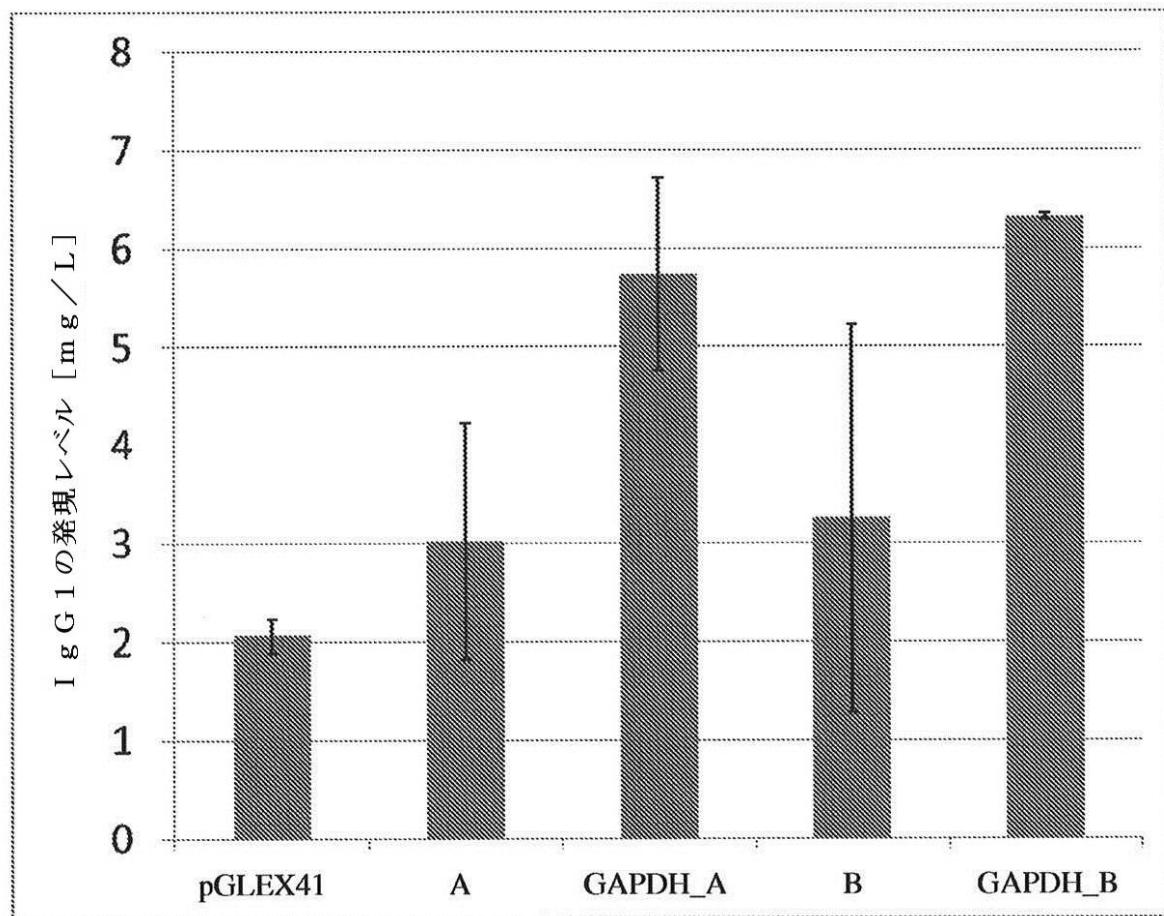
20

30

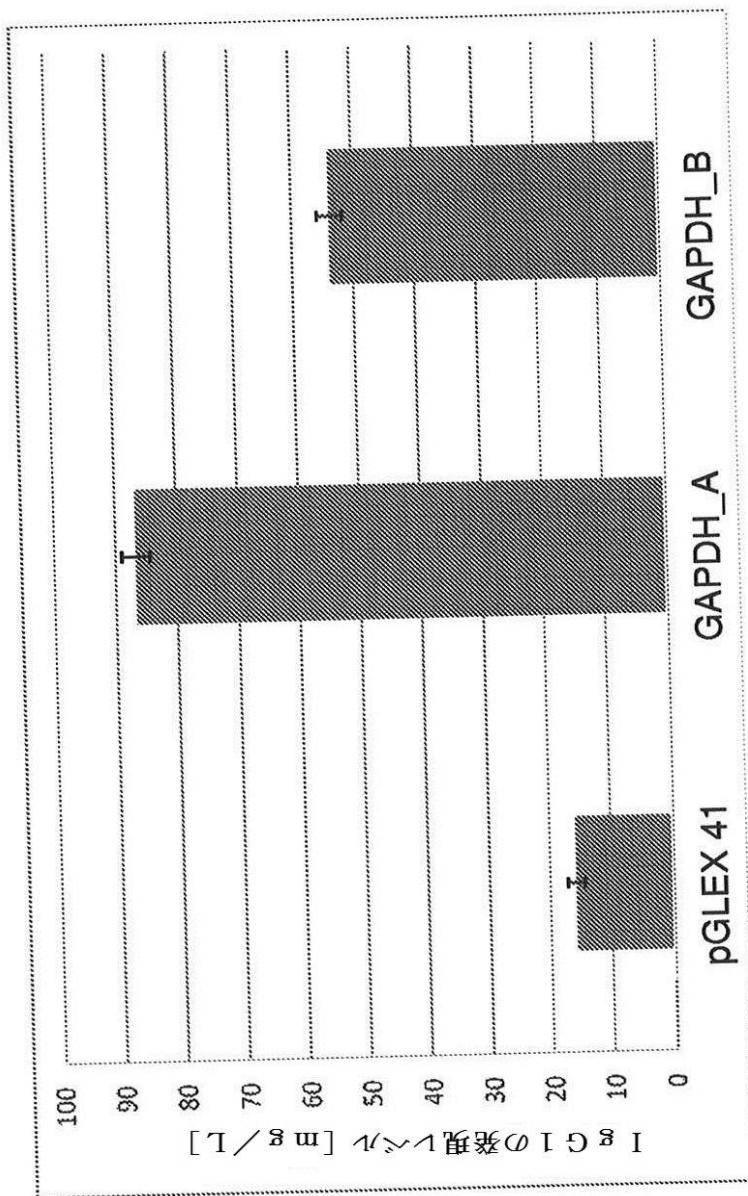
【図 1】



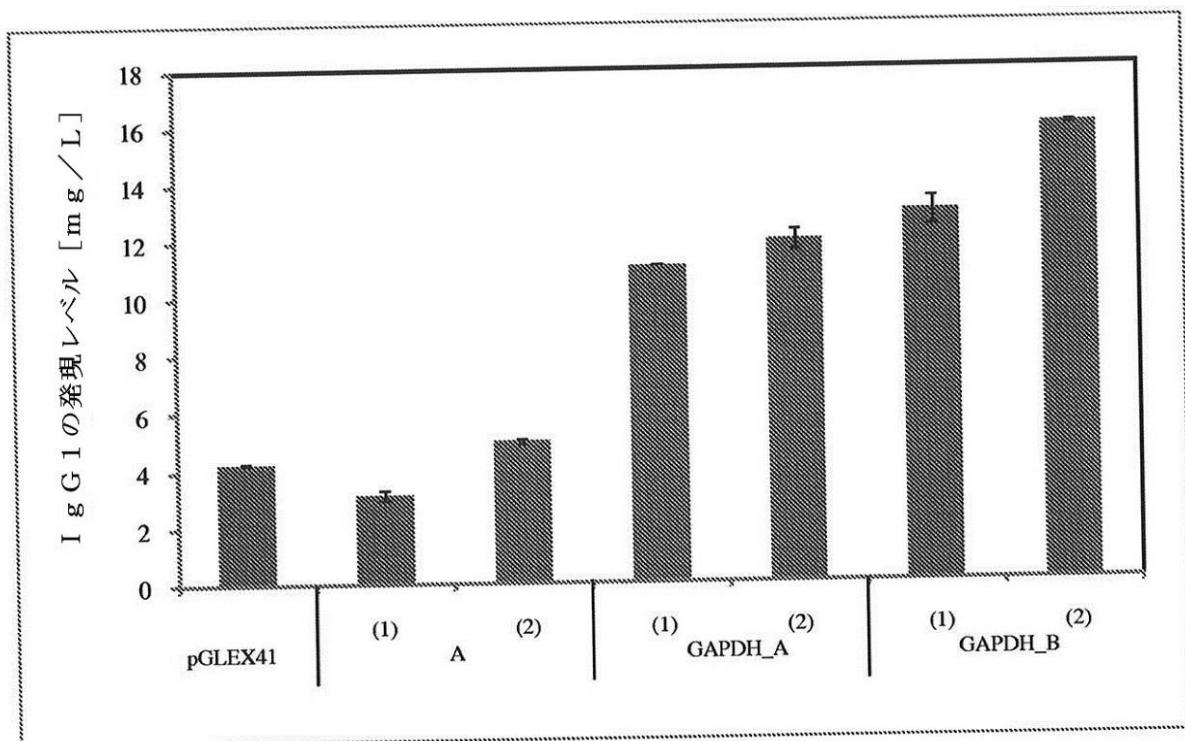
【図2】



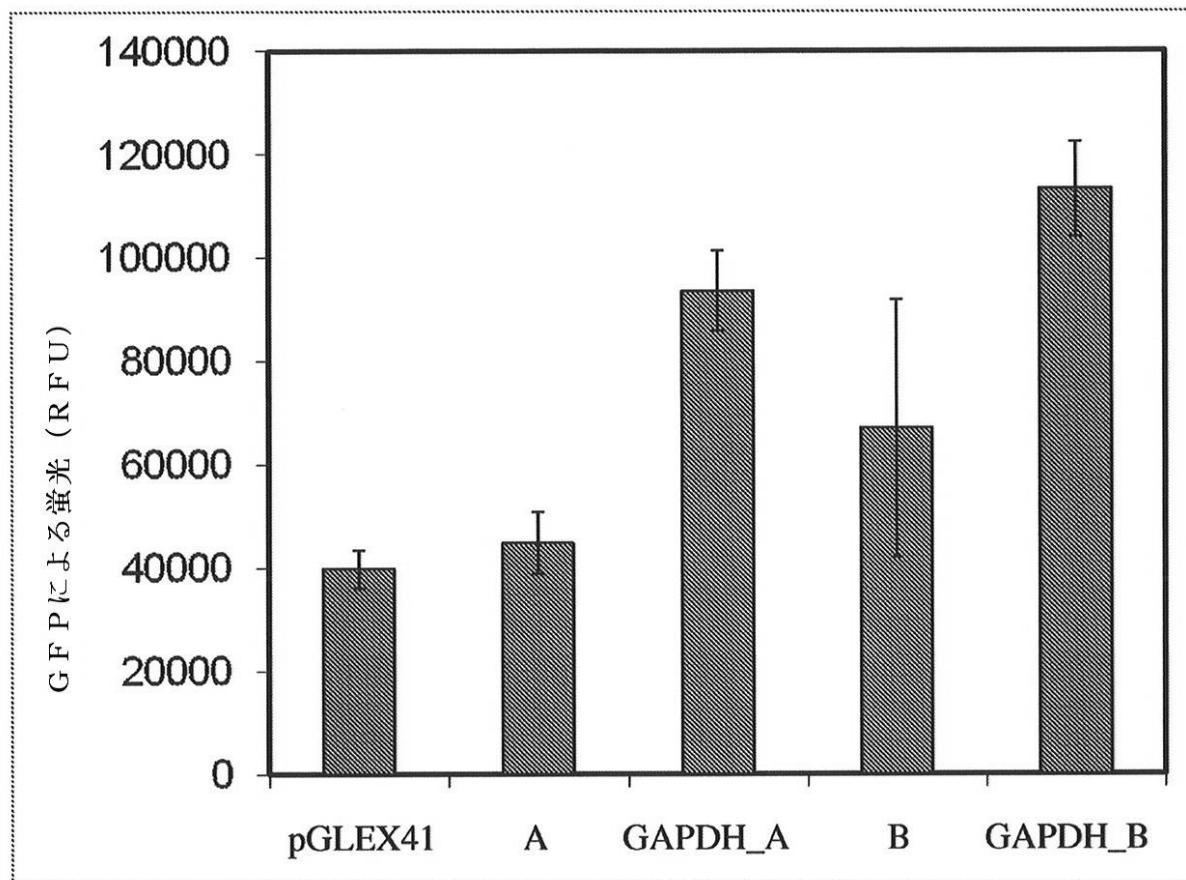
【図3】



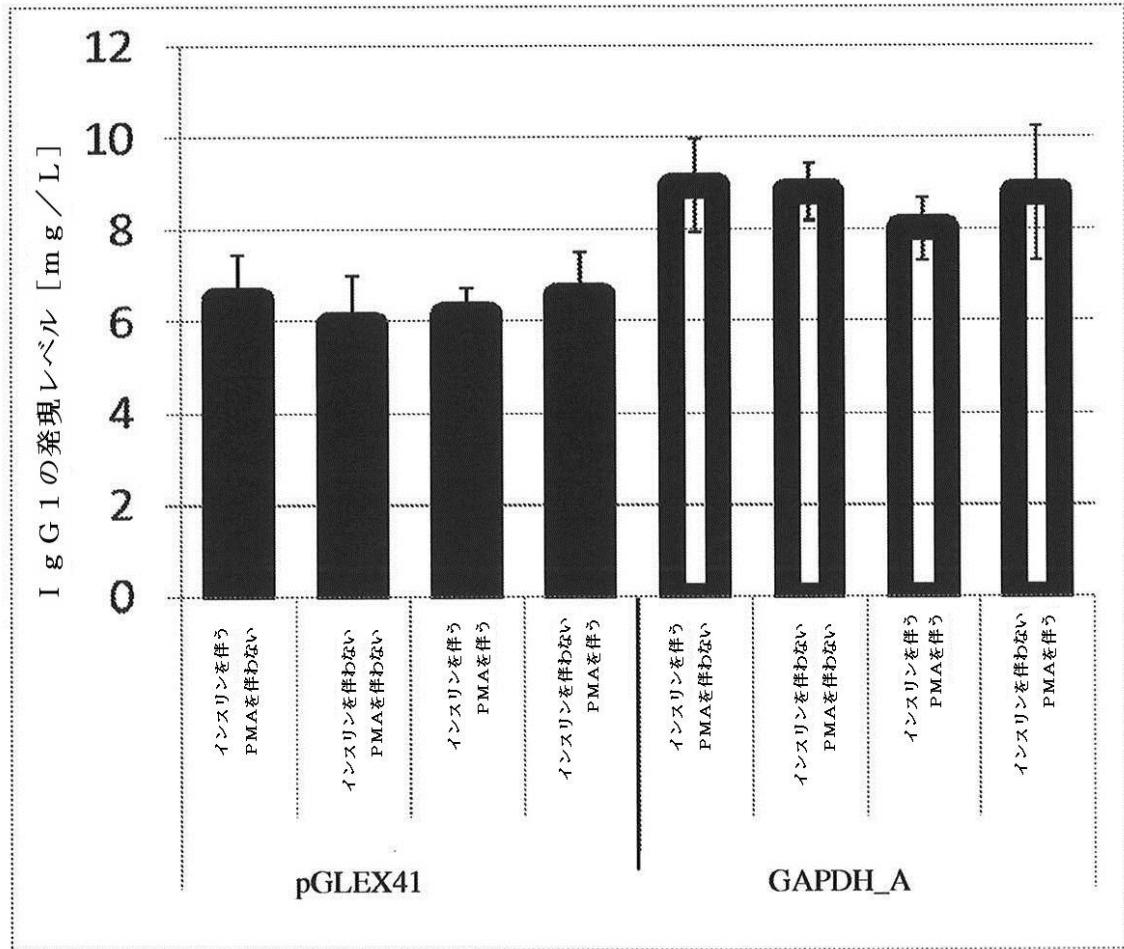
【図4】



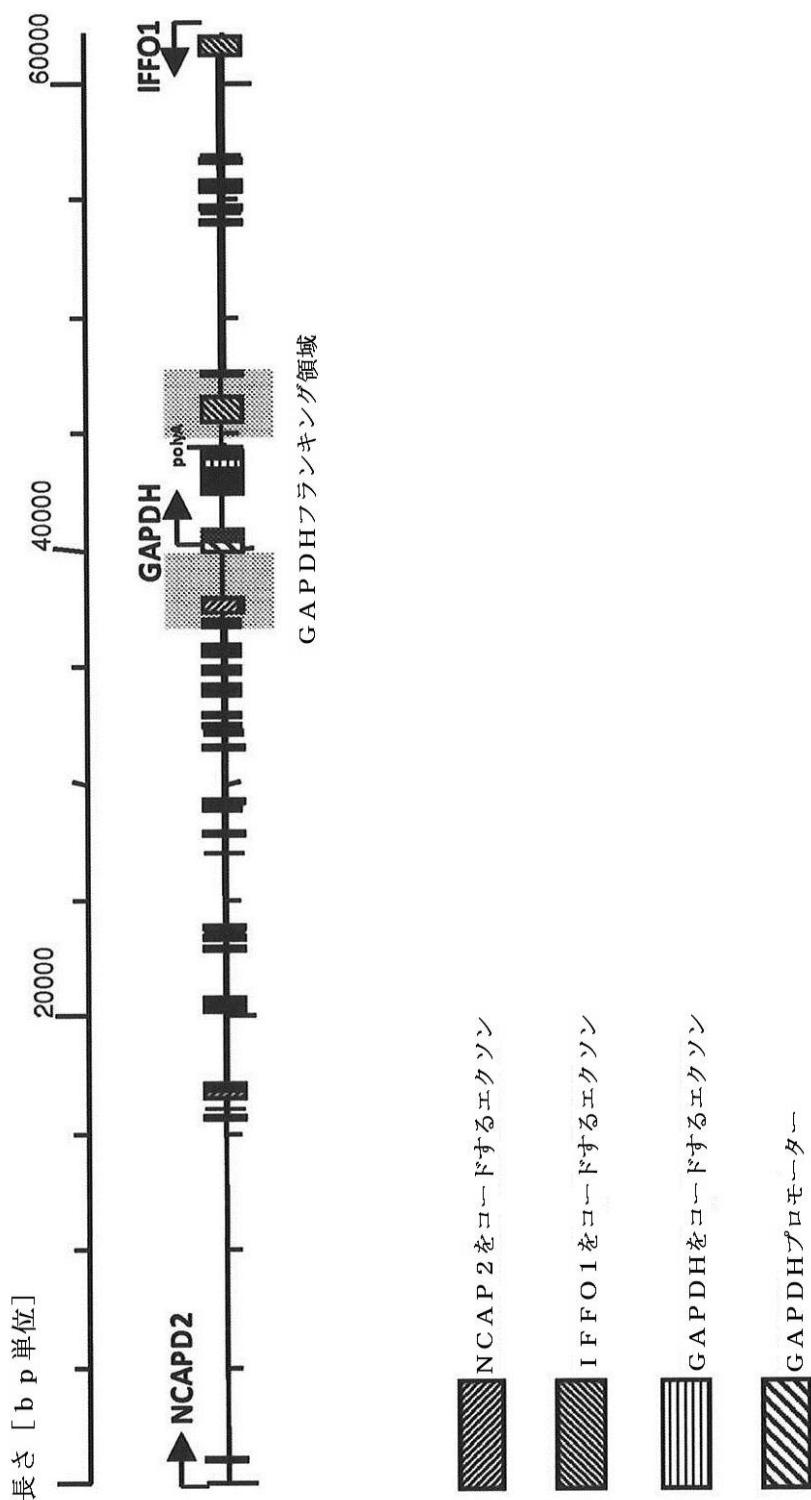
【図5】



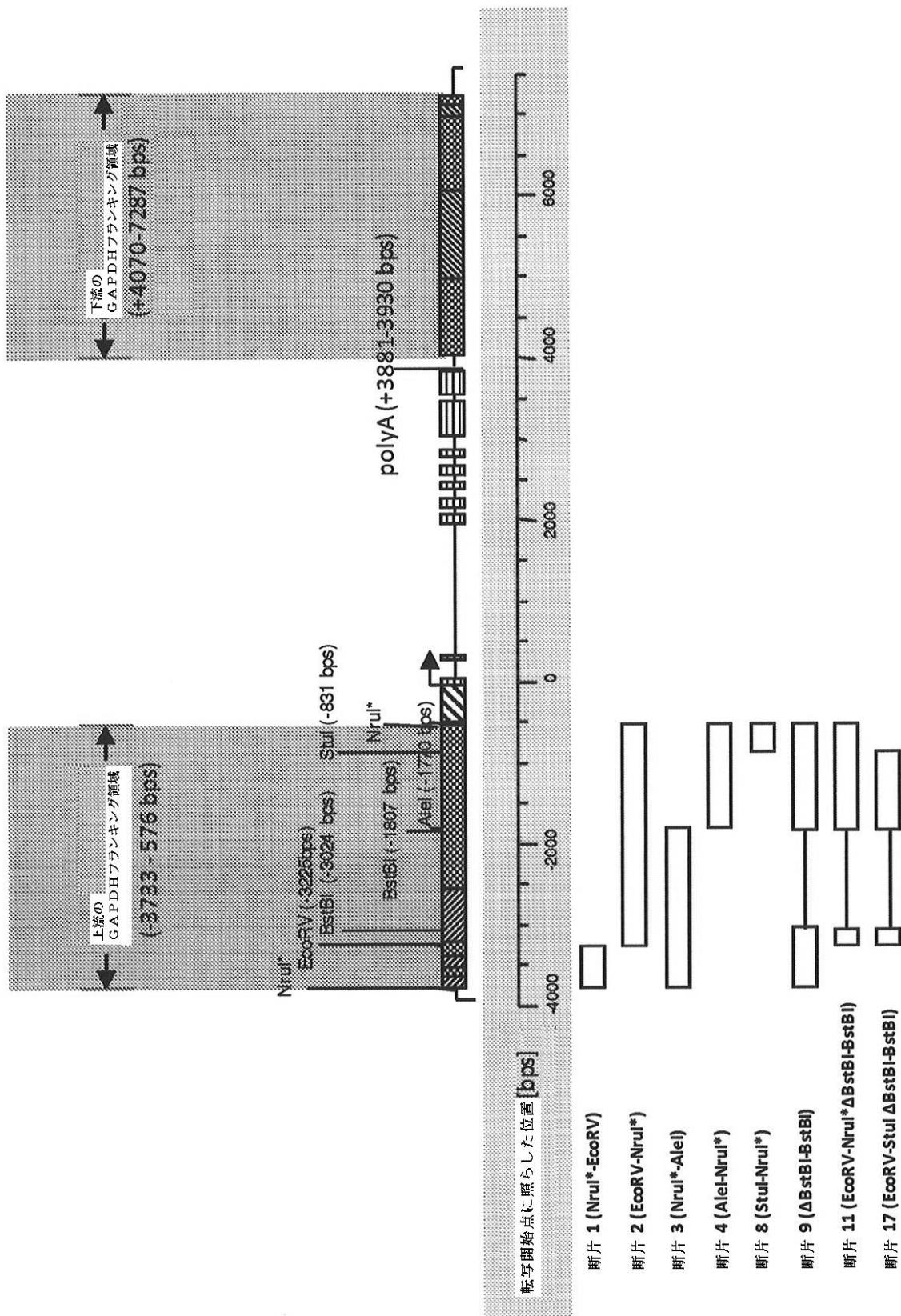
【図6】



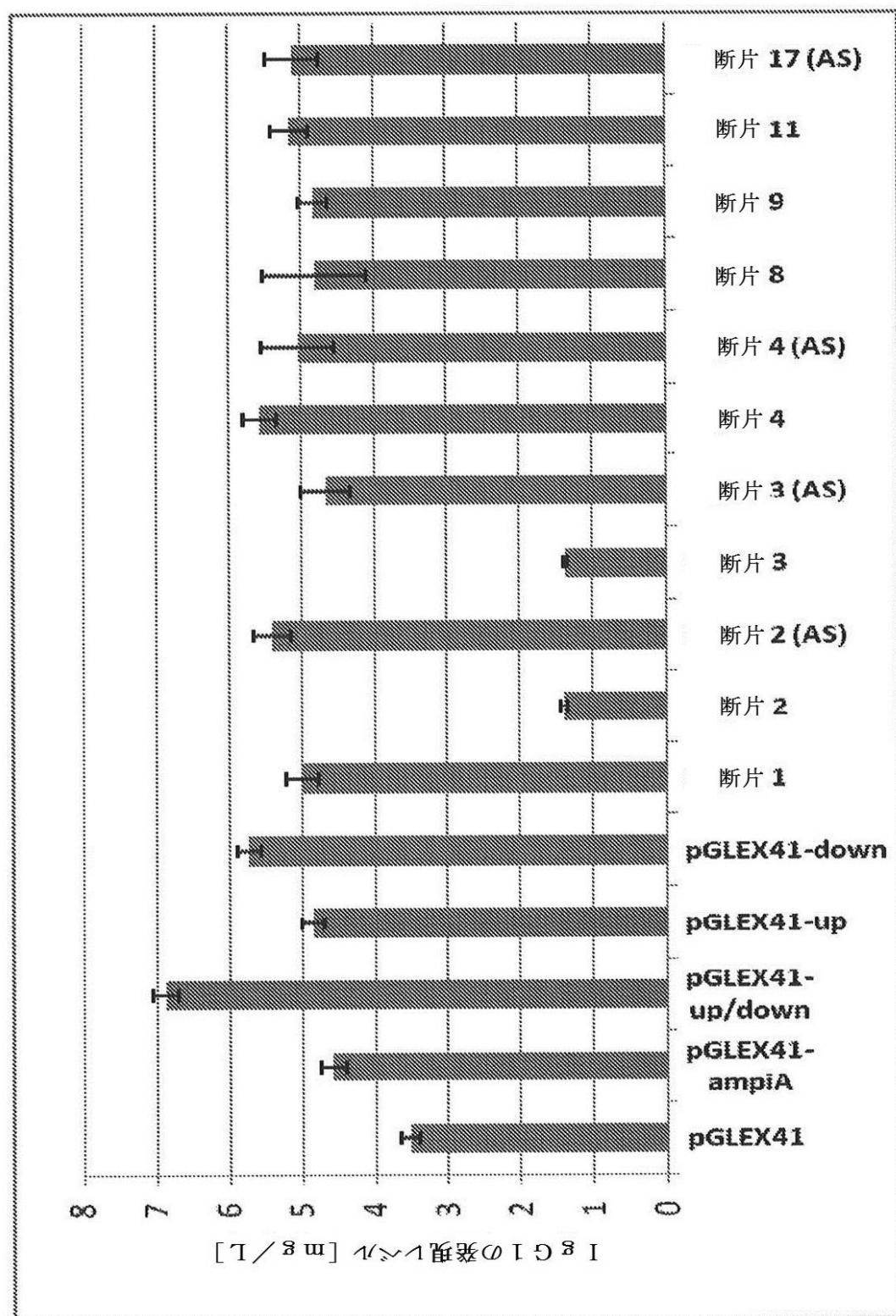
【図7】



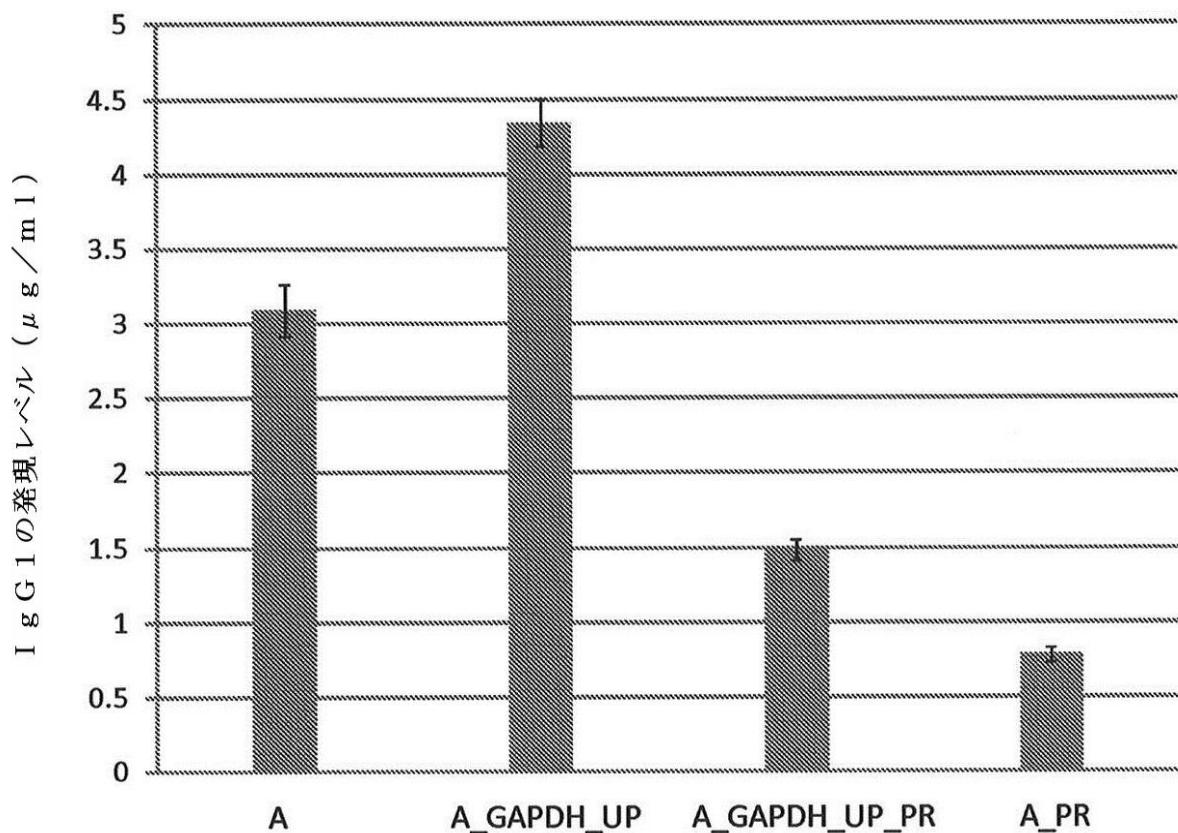
【図 8】



【図9】



【図10】



【配列表】

2015501642000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/IB2012/056977									
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N15/09 ADD.											
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC											
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N											
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched											
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data											
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category*</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px;">EP 1 308 510 A1 (ONO PHARMACEUTICAL CO [JP]) 7 May 2003 (2003-05-07) the whole document -----</td> <td style="padding: 2px;">1-42</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">A</td> <td style="padding: 2px;">GRAVEN KRISTA K ET AL: "Identification of an oxygen responsive enhancer element in the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene", BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol. 1447, no. 2-3, 28 October 1999 (1999-10-28), pages 208-218, XP002694451, ISSN: 0006-3002 the whole document ----- -/-</td> <td style="padding: 2px;">1-42</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	EP 1 308 510 A1 (ONO PHARMACEUTICAL CO [JP]) 7 May 2003 (2003-05-07) the whole document -----	1-42	A	GRAVEN KRISTA K ET AL: "Identification of an oxygen responsive enhancer element in the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene", BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol. 1447, no. 2-3, 28 October 1999 (1999-10-28), pages 208-218, XP002694451, ISSN: 0006-3002 the whole document ----- -/-	1-42
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.									
X	EP 1 308 510 A1 (ONO PHARMACEUTICAL CO [JP]) 7 May 2003 (2003-05-07) the whole document -----	1-42									
A	GRAVEN KRISTA K ET AL: "Identification of an oxygen responsive enhancer element in the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene", BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol. 1447, no. 2-3, 28 October 1999 (1999-10-28), pages 208-218, XP002694451, ISSN: 0006-3002 the whole document ----- -/-	1-42									
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.									
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed											
Date of the actual completion of the international search 2 April 2013		Date of mailing of the international search report 15/04/2013									
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Young, Craig									

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2012/056977

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>LIMA JULIANA O ET AL: "The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene of <i>Moniliophthora perniciosa</i>, the causal agent of witches' broom disease of <i>Theobroma cacao</i>", GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY, vol. 32, no. 2, 2009, pages 362-366, XP002694452, ISSN: 1415-4757</p> <p>-----</p> <p>ERCOLANI L ET AL: "ISOLATION AND COMPLETE SEQUENCE OF A FUNCTIONAL HUMAN GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE GENE", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, US, vol. 263, no. 30, 25 October 1988 (1988-10-25), pages 15335-15341, XP000020878, ISSN: 0021-9258</p> <p>the whole document</p> <p>-----</p> <p>SEIDLER NORBERT W: "Basic biology of GAPDH.", ADVANCES IN EXPERIMENTAL MEDICINE AND BIOLOGY 2013, vol. 985, 2013, pages 1-36, XP009168347, ISSN: 0065-2598</p> <p>the whole document</p> <p>-----</p>	1-42
A		1-42
T		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/IB2012/056977

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP 1308510	A1 07-05-2003	AU	7773501 A	25-02-2002
		CA	2418777 A1	10-02-2003
		EP	1308510 A1	07-05-2003
		US	2004005639 A1	08-01-2004
		WO	0214509 A1	21-02-2002

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 P 21/00 (2006.01)	C 1 2 P 21/00	C
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 K 31/713	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	

(81) 指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,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,R,S,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,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,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,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,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC

(74) 代理人 100156915

弁理士 伊藤 奈月

(74) 代理人 100149076

弁理士 梅田 慎介

(74) 代理人 230111590

弁護士 金本 恵子

(72) 発明者 ルーシェル, ダニエル

スイス連邦 ツェーハー - 2300 ラ ショー - ドゥ - フォン, シュマン ドゥ ラ コンベタ
5

(72) 発明者 アビス - シエル - ガミー, クリストル

スイス連邦 ツェーハー - 2300 ラ ショー - ドゥ - フォン, シュマン ドゥ ラ コンベタ
5

(72) 発明者 モレッティ, ピエール

スイス連邦 ツェーハー - 2300 ラ ショー - ドゥ - フォン, シュマン ドゥ ラ コンベタ
5

(72) 発明者 ベルトシンガー, マルタン

スイス連邦 ツェーハー - 2300 ラ ショー - ドゥ - フォン, シュマン ドゥ ラ コンベタ
5

F ターム(参考) 4B024 AA01 DA05 EA04 GA11

4B064 AG01 CA10 CA19 DA01

4B065 AA90X AB01 AC14 BA02 CA24 CA44

4C084 AA13

4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14