

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5080452号  
(P5080452)

(45) 発行日 平成24年11月21日(2012.11.21)

(24) 登録日 平成24年9月7日(2012.9.7)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/00 1 O 2

C 1 2 P 21/02 (2006.01)

C 1 2 P 21/02 C

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 K 48/00

A 6 1 K 31/7088 (2006.01)

A 6 1 K 31/7088

請求項の数 23 (全 20 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2008-511772 (P2008-511772)  
 (86) (22) 出願日 平成18年5月9日(2006.5.9)  
 (65) 公表番号 特表2008-539781 (P2008-539781A)  
 (43) 公表日 平成20年11月20日(2008.11.20)  
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2006/001656  
 (87) 国際公開番号 W02006/123097  
 (87) 国際公開日 平成18年11月23日(2006.11.23)  
 審査請求日 平成21年4月24日(2009.4.24)  
 (31) 優先権主張番号 0509965.0  
 (32) 優先日 平成17年5月17日(2005.5.17)  
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)  
 (31) 優先権主張番号 60/682, 277  
 (32) 優先日 平成17年5月18日(2005.5.18)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 504115013  
 イー・エム・デー・ミリポア・コーポレ  
 イション  
 アメリカ合衆国 O 1 8 2 1 マサチュー  
 セッツ州 ビレリカ コンコード ロード  
 2 9 0  
 (74) 代理人 100078282  
 弁理士 山本 秀策  
 (74) 代理人 100062409  
 弁理士 安村 高明  
 (74) 代理人 100113413  
 弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 改良された発現エレメント

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

単離されたポリヌクレオチドであって、

a) 哺乳動物 r p s 3 遺伝子のプロモーター領域からの 3 0 0 0 より多い連続するヌクレオチドを含む拡大されたメチル化のない C p G アイランド、

b) 異種プロモーター、

c) 該異種プロモーターに隣接する転写可能な核酸配列を含み、

ここで、該転写可能な核酸配列の該異種プロモーターからの転写が、該拡大されたメチル化のない C p G アイランドの存在下で、該拡大されたメチル化のない C p G アイランドの不存在下に比べて増大される、ポリヌクレオチド。

【請求項 2】

前記拡大されたメチル化のない C p G アイランドが、前記哺乳動物 r p s 3 遺伝子の 1 つ以上のエキソンをさらに含む、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 3】

前記哺乳動物 r p s 3 遺伝子はヒト r p s 3 遺伝子である、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 4】

前記哺乳動物 r p s 3 遺伝子はげっ歯類 r p s 3 遺伝子である、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 5】

前記げっ歯類 r p s 3 遺伝子はマウスの r p s 遺伝子である、請求項 4 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 6】

配列番号 1 のヌクレオチド配列を含む、請求項 5 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 7】

前記異種プロモーターが構成的プロモーターである、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 8】

前記構成的プロモーターが、サイトメガロウイルス初期 / 即時プロモーター、SV40、EF-1、ラウスザルコマウイルス (RSV) LTR および HIV2 LTR からなるリストから選択される、請求項 7 に記載のポリヌクレオチド。

10

【請求項 9】

前記構成的プロモーターが、サイトメガロウイルス初期 / 即時プロモーターである、請求項 8 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 10】

前記構成的プロモーターが、モルモットサイトメガロウイルス初期 / 即時プロモーターである、請求項 9 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 11】

前記構成的プロモーターが、マウスサイトメガロウイルス初期 / 即時プロモーターである、請求項 9 に記載のポリヌクレオチド。

20

【請求項 12】

前記異種プロモーターが、組織特異的プロモーターである、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 13】

前記異種プロモーターが、腫瘍特異的プロモーターである、請求項 12 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 14】

前記プロモーターが、癌胎児抗原 (CEA)、前立腺特異的抗原 (PSA)、シクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2)、α-フェトプロテイン (AFP)、チロシナーゼ、および T 細胞因子 1-4 (TCF) を基礎にしたプロモーターからなるリストから選択される、請求項 13 に記載のポリヌクレオチド。

30

【請求項 15】

前記転写可能な核酸が、抗体、抗体の機能的エピトープ結合性フラグメント、成長因子、サイトカイン、プロテインキナーゼ、可溶性レセプター、膜結合レセプター、血液凝固因子などから選択されるポリペプチドをコードする、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 16】

請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 17】

請求項 16 に記載の真核生物発現ベクター。

【請求項 18】

40

真核生物発現ベクターであって、

a) 哺乳動物 r p s 3 遺伝子のプロモーター領域からの 3000 より多い連続するヌクレオチドを含む拡大されたメチル化のない CpG アイランド、

b) 異種プロモーター、

c) 複数クローニング部位、を含み、

ここで、該複数クローニング部位中に挿入された転写可能な核酸が、該異種プロモーターから転写され得、そして該転写のレベルが該拡大されたメチル化のない CpG アイランドによって増大される、ベクター。

【請求項 19】

請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の単離されたポリヌクレオチド、または請求項 16

50

、17または18に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項20】

前記細胞が、CHO、NSO、BHK、HeLa、HepG2からなるリストから選択される、請求項19に記載の宿主細胞。

【請求項21】

転写可能な核酸によってコードされるポリペプチドを発現する方法であって、該方法は、請求項16～18のいずれかに記載の発現ベクターを適切な宿主細胞に挿入する工程、および該宿主細胞を該ポリペプチドの発現を可能にするに適切な条件で培養する工程、を含む、方法。

【請求項22】

請求項1～15のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド、請求項16～18のいずれか1項に記載のベクター、または請求項19もしくは請求項20のいずれか1項に記載の宿主細胞、および薬学的に受容可能なキャリアを含む、薬学的組成物。

【請求項23】

請求項1～15のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド、請求項16～18のいずれか1項に記載のベクター、または請求項19もしくは請求項20のいずれか1項に記載の宿主細胞を含む、医薬として使用するための組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(背景)

本発明は、作動可能に連結された転写ユニットに対して改良された発現を与えるエレメントを含むポリヌクレオチドに関する。これらのエレメントは、リボソームタンパク質遺伝子のプロモーター領域と自然に連結され、そして組み換えDNA構築物において、高く、かつ再現性あるレベルの遺伝子発現を与える。本発明はまた、細胞培養およびその他の生物学適用における組み換えタンパク質の産生のための、このようなポリヌクレオチド配列を含むベクター、このようなベクターを含む宿主細胞、およびこのようなポリヌクレオチド、ベクターまたは宿主細胞の治療における使用に関する。

【背景技術】

【0002】

高等真核生物におけるクロマチン構造の現在のモデルは、遺伝子が「ドメイン」中に組織化されていると仮定している（非特許文献1；非特許文献2）。クロマチンドメインは、圧縮され、「閉鎖された」、転写サイレントな状態か、または圧縮を解かれた「開放され」そして転写能力のある形態のいずれかで存在すると認識されている。増加したDNアーゼI感受性、DNA低メチル化およびヒストン高アセチル化によって特徴付けられる開放クロマチン構造の確立は、遺伝子発現の開始の必要条件と考えられる。

【0003】

クロマチン領域の開放および閉鎖性質は、宿主細胞ゲノム中にランダムに組み込まれる導入遺伝子の挙動に反映される。同一の構築物は、マウスゲノム中の異なる位置に組み込まれるとき、組織特異的および発生ステージ特異的な発現の異なるパターンを与える（非特許文献3；非特許文献4；非特許文献5）。

【0004】

遺伝子組織化のクロマチンドメインモデルは、転写能力のある開放クロマチン構造を確立および維持し得る遺伝子制御エレメントは、ゲノムの活性領域と連結されるべきであることを示唆している。

【0005】

遺伝子座制御領域（LCR）は、長い範囲のクロマチン再構築（remodeling）能力を備えた転写調節エレメントのクラスである。LCRは、トランスジェニックマウスにおいて、シスで連結される遺伝子、特に単一コピー導入遺伝子に対し、組み込みの部位に独立で導入遺伝子コピー数に依存する発現の生理学的レベルを与えるそれらの能力

10

20

30

40

50

によって機能的に規定される。非特許文献 6；非特許文献 7。決定的に、このような発現は組織特異的である。LCR は、ヘテロクロマチンの拡がりを妨害し得、PEVを防ぎ（非特許文献 8）、そしてそれらが調節する遺伝子の 5' または 3' のいずれかに位置され得る一連の DNアーゼ I 超感受性（HS）部位からなる（非特許文献 9）。

#### 【0006】

高レベルの治療タンパク質産物を産生する培養された哺乳動物細胞株の生成は、主要な開発中の産業である。クロマチン位置効果は、それを困難な時間を浪費し、そして高価なプロセスにする。このような哺乳動物「細胞工場」の産生への最も一般的に用いられるアプローチは、薬物耐性遺伝子（例えば、DHFR、グルタミンシンセターゼ）（非特許文献 10）とストリンジェントな選択圧との組み合わせによって誘導される遺伝子増幅に依

10

#### 【0007】

しかし、LCR の組織特異性は、いくつかの状況では有用であるが、多くの適用にはまた主要な制限であり、例えば、LCR が、発現が要求されている組織について未知である場合、または多くの、もしくはすべての組織で発現が要求されている場合である。

#### 【0008】

本明細書中に参考として援用される特許文献 1 および同時継続中の特許文献 2 は、専ら遍在的に発現されるハウスキーピング遺伝子からなる遺伝子座を横切る開放クロマチン構造を確立するために、それらの天然の染色体の脈絡で応答性であるエレメントを記載している。これらのエレメントは、LCR に由来せず、そして拡大されたメチル化のない CpG アイランドを含む。

20

#### 【0009】

哺乳動物 DNA において、ジヌクレオチド CpG は、シトシンを 5 - メチルシトシンにメチル化する DNA メチルトランスフェラーゼ酵素によって認識される。しかし、5 - メチルシトシンは不安定であり、そしてチミンに変換される。結果として、CpG ジヌクレオチドは、偶然に予期され得るよりかなりより低い頻度で生じる。それにもかかわらず、ゲノム DNA のいくつかのセクションは、予期されるのにより近い CpG の頻度を有し、そしてこれらの配列は、「CpG アイランド」として知られている。本明細書で用いられるとき「CpG アイランド」は、少なくとも 50 % の GC 含量を有し、そして少なくとも 0.6 の観察 / 期待 CpG 含量比（すなわち、偶然に予期され得る CpG ジヌクレオチド含量の少なくとも 60 % の CpG ジヌクレオチド含量）（非特許文献 13；非特許文献 14）を有する、少なくとも 200 bp の DNA の配列として規定される。

30

#### 【0010】

メチル化のない CpG アイランドは、当該技術分野で周知であり（非特許文献 15；非特許文献 16）、そしてシトシン残基の実質的部分がメチル化されておらず、そして、通常、2 つの緊密に間隔を置かれた（0.1 ~ 3 kb）多様に転写される遺伝子の 5' 末端上に延びる CpG アイランドとして規定され得る。DNA のこれらの領域は、発生を通じてすべての組織でメチル化の程度が低いままであると報告されている（非特許文献 17）。これらはしばしば、遍在的に発現される遺伝子の 5' 末端と結合し、そして遺伝子の推定される 40 % が組織に限定される発現プロファイルを示し（非特許文献 18；非特許文献 19）、そして活性クロマチンの局在化された領域であることが知られている（特許文献 20）。

40

#### 【0011】

「拡大された」メチル化のない CpG アイランドは、1 つ以上の転写開始部位を包含する領域を横切って延び、そして / または 300 bp を超え、そして好ましくは 500 bp を超えて延びるメチル化のない CpG アイランドである。拡大されたメチル化のない CpG アイランドの境界は、認識配列における DNA を消化（切断）するそれらの能力が、存在する任意の CpG 残基のメチル化状態に感受性である制限エンドヌクレアーゼ酵素と組

50

み合わせ、その領域上のPCRの使用を通じて機能的に規定される。1つのこのような酵素はHpaIIであり、これは、CpGアイランド内で共通して見出される部位CCGGを認識し、そして消化するが、これは、中央CG残基がメチル化されていない場合のみである。それ故、HpaII消化DNAとともに、HpaII部位を宿す領域上で行われるPCRは、DNAがメチル化されていない場合HpaII消化に起因して増幅産物を与えない。このPCRは、DNAがメチル化されている場合に増幅された産物を与えるに過ぎない。それ故、メチル化のない領域を超えて、HpaIIは、このDNAを消化せず、PCR増幅産物が観察され、それによって「拡大された、メチル化のないCpGアイランド」の境界を規定する。

#### 【0012】

ヒトTATA結合タンパク質(TBP)/プロテオソーム成分-B1(PSMB1)から二重に分岐して転写されるプロモーターおよび異質各リボヌクレオタンパク質A2/B1(hnRNPA2)/ヘテロクロマチンタンパク質1Hs(HP1<sup>Hs</sup>)遺伝子の遺伝子座を包含するメチル化のないCpGアイランドに広がる領域は、再現性のある生理学的レベルの遺伝子発現を与え、しかも、それらは、多彩な発現パターン、およびセントロメアヘテロクロマチン内の導入遺伝子組み込みとともに通常生じるサイレンシングを防ぎ得ることが示されている(特許文献2)。

#### 【0013】

活性に転写するプロモーターと連結されるメチル化のないCpGアイランドは、クロマチンを再構築する能力を有し、そしてそれ故、ハウスキーピング遺伝子における開放ドメインを確立し、そして維持する主な決定因子であり(特許文献2)、しかも、このようなエレメントは、導入遺伝子発現のレベルおよび安定性における改良とともに増加した比率の生産的遺伝子送達を与えることが知られている。

#### 【0014】

リボソームは、mRNAのポリペプチドへの翻訳を担う大きなRNAとタンパク質との複合体である。各リボソームは、4つのリボソームRNA(rRNA)分子と多数のリボソームタンパク質(現在哺乳動物細胞では79であると考えられている)を含む。リボソームタンパク質は、rRNA折り畳みの促進、細胞リボヌクレアーゼからの保護、および協調するタンパク質合成を含む機能を有する。いくつかのリボソームタンパク質は、さらなる特別のリボソーム機能を有している(非特許文献21)。種を横切るリボソームの構造および機能的類似性を考えると、リボソームタンパク質のアミノ酸配列保存性が高く、そして哺乳動物の間で、大部分のリボソームタンパク質の配列がほとんど同じである(非特許文献22)ことは驚くことではない。

#### 【0015】

2つのリボソームタンパク質は、それらが、ユビキチンに融合されたプロペプチド(カルボキシ-伸長タンパク質)の形態で発現される点で異型性に見える。ユビキチンは、細胞内タンパク質分解、細胞周期調節およびストレス応答を含む種々の細胞機能に關与する高度に保存された76残基のポリペプチドである(非特許文献23; 非特許文献24)。

#### 【0016】

ユビキチンは、2つの別個のクラスの遺伝子によってコードされる。1つは、ユビキチン繰り返し線の線状ポリマーをコードするポリユビキチン遺伝子である。他方は、単一のユビキチン分子がリボソームタンパク質rps27Aまたはrpl40に連結される天然の融合タンパク質をコードする遺伝子を含む(非特許文献25; 特許文献26; 特許文献27)。

#### 【0017】

リボソームタンパク質プロモーターの共通の構造的特徴は、Perry(非特許文献28)によって論議されている。これらのプロモーターは、TATAボックス成分の性質、転写因子結合部位の数およびタイプ、ならびにAUG開始コドンの位置に従って分類され得る。しかし、このような分類は、プロモーター強度を予見するようには見えず、そして証拠は、試験されたいくつかのこのようなプロモーターは、連結されたレポーター遺伝子

10

20

30

40

50

の発現によって測定されるとき等価な転写活性を有することを示唆している（非特許文献29）。

【0018】

特許文献3は、ハムスター-ユビキチン/S27aプロモーターの組み換えタンパク質の高レベル産生を駆動するその使用を開示している。しかし、さらなるプロモーター（すなわち、ハムスター-ユビキチン/S27aプロモーター以外のプロモーター）から主に転写される遺伝子の発現を増大するためのその使用の示唆はない。

【0019】

米国特許出願第2004/0148647号は、目的の産物のための遺伝子および蛍光タンパク質レポーターに機能的に連結されたハムスターユビキチン/S27Aプロモーターを含む発現ベクターを用いるレポーターアッセイを開示する。ここで再び、この出願は、目的の遺伝子の転写が、ハムスターユビキチン/S27aプロモーター自体からである構築物を開示しているに過ぎない。

【特許文献1】米国特許第6,689,606号明細書

【特許文献2】国際公開第00/0539号パンフレット

【特許文献3】米国特許第6,063,598号明細書

【非特許文献1】Dillon, N. & Grosved, F., 真核生物遺伝子機能の潜在的なユニットとしてクロマチンドメイン。Curr. Opin. Genet. Dev. 4, 260~264 (1994)

【非特許文献2】Higgs, D. R., LCRは、クロマチンドメインを開くのか? Cell 95, 299~302 (1998)

【非特許文献3】Palmiter, R. D. & Brinster, R. L., Ann. Ref. Genet. 20, 465~499 (1986)

【非特許文献4】Allen, N. D.ら, Nature 333, 852~855 (1988)

【非特許文献5】Bonnerot, C., Grimmer, G. Briand, P. & Nicolas, J. F., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 6331~6335 (1990)

【非特許文献6】Fraser, P. & Grosved, F., Curr. Opin. Cell Biol. 10, 361~365 (1998)

【非特許文献7】Li, Q., Harju, S. & Peterson, K. R. Trends Genet. 15: 403~408 (1999)

【非特許文献8】Kioussis, D. & Festenstein, R. Curr. Genet. Dev. 7, 614~619 (1997)

【非特許文献9】Li, Q., Harju, S. & Peterson, K. R. Trends Genet. 15: 403~408 (1999)

【非特許文献10】Kaufman R. J. Method Enzymol 185, 537~566 (1990)

【非特許文献11】Needham M, Gooding C, Hudson K, Antoniou M, Grosveld FおよびHollis M., Nucleic Acids Res 20, 997~1003 (1992)

【非特許文献12】Needham M, Egerton M, Millett A, Evans S, Popplewell M, Cerillo G, McPheat J, Monk A, Jack A, Johnstone DおよびHollis M. Protein Purif 6, 124~131 (1995)

【非特許文献13】Gardiner-Green MおよびFrommer M. J Mol Biol 196, 261~282 (1987)

【非特許文献14】Rice P, Longden IおよびBleasby A Trends Genet 16, 276~277 (2000)

【非特許文献15】Birdら (1985) Cell 40: 91~99

10

20

30

40

50

【非特許文献16】TaziおよびBird(1990)Cell 60:909~920

【非特許文献17】WiseおよびPravtcheva(1999)Genomics 60:258~271

【非特許文献18】Antequera、F. & Bird、A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90、1195~11999(1993)

【非特許文献19】Corss、S. H. & Bird、A. P. Curr. Opin. Genet. Dev. 5、309~314(1995)

【非特許文献20】Tazi、J. & Bird、A. Cell 60、909~920(1990)

10

【非特許文献21】Wool、1996、TIBS 21:164~165

【非特許文献22】Woolら、1995、Biochem Cell Biol 73:933~947

【非特許文献23】Hershko & Ciechanover、1992、Annu Rev Biochem 61:761~807

【非特許文献24】Couxら、1996、Annu Rev Biochem 65:801~847

【非特許文献25】Finleyら、1989、Nature 338:394~401

【非特許文献26】Chanら、1995、Biochem Biophys Res Commun 215:682~690

20

【非特許文献27】Redman & Burris、1996、Biochem J 315:315~321

【非特許文献28】2005、BMC Evolutionary Biology 5:15

【非特許文献29】Hariharanら、1989、Genes Dev 3:1789~800

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0020】

特にインビボおよびエクソビボ治療適用のため、およびインビトロ組み換えタンパク質産生のために、より高く、そしてより信頼性のあるレベルの発現を得るための組み換え遺伝子発現の分野で目的が残っている。

30

【課題を解決するための手段】

【0021】

(開示の要旨)

本明細書の説明および請求項全体で、用語「包含する(comprise)」および「含む(contain)」およびこれら用語の改変例、例えば、「包含している(comprising)」および「包含する(comprises)」は、「制限されずに含むこと」を意味し、そしてその他の成分、添加物、構成要素、完全体または工程を排除することは意図されない(そしてされない)。

40

【0022】

本明細書の説明および請求項全体で、単数は、文脈がそうでないことを要求しなければ複数を包含する。特に、不定冠詞が用いられる場合、この説明は、文脈がそうでないことを要求しなければ、複数および単数を企図するとして理解されるべきである。

【0023】

本発明の特定の局面、実施形態または例と組み合わせて記載される特徴、完全体、特徴、化合物、化学的成分または基は、これらと適合しないのであれば、本明細書中に記載される任意のその他の局面、実施形態または例に適用かのうであることが理解されるべきである。

【0024】

50

## (定義)

本明細書で用いられるとき、プロモーター領域は、プロモーター、および転写開始部位の5'配列の上流の5 kbおよび最初のエキソンの遠位端の下流の500 bp 3'配列と一緒に転写開始部位であるとして規定される。

## 【0025】

5'非翻訳領域は、ゲノムまたはcDNA配列中にコードされる翻訳開始の領域5'を意味する。それは、すべての上流調節エレメントを含むとされる。5'上流配列は、ゲノム配列中にコードされる転写開始の配列5'を意味するために用いられる。

## 【0026】

本明細書で用いられるとき、「転写可能な核酸」は、機能的プロモーターおよびその他の調節配列に作動可能に連結されるとき、mRNAのような機能的RNA分子を与えるよう転写され得る核酸を意味する。このような配列は、翻訳可能なポリペプチド配列をコードするオープンリーディングフレームを含み得る。あるいは、この機能的は、リボソームRNA、リボザイムまたはアンチセンスRNAのような別の機能を有し得る。

## 【0027】

「遺伝子」は、一般に、それからそれが転写されるプロモーター、ならびにエンハンサーおよび3'ポリアデニル化シグナルのようなその他の調節配列とともに、転写可能な核酸のコード領域の組み合わせを意味するとされる。ゲノムDNA遺伝子には、イントロンがまた含まれる。「転写ユニット」は、ときどき、少なくとも、プロモーターと、しばしばシントロンがスプライスされたcDNAに由来する転写可能な核酸をともなう最小調節配列との機能的組み合わせを記載するために用いられる。「シストロン」は、機能的開始シグナルおよび停止シグナルをもつ単一のポリペプチドをコードする核酸として規定される。「導入遺伝子」は、1つのゲノムから別のゲノムまで移された遺伝子を意味するが、この用語は、任意の遺伝子、またはベクターのような組み換えDNA構築物中に含まれる転写可能な核酸さえにより緩く適用され得る。

## 【0028】

プロモーターおよびエンハンサーは、当該技術分野で周知であり、そして制限によるのではなく、例示のみによって提供される以下の特徴を含む。プロモーターは、転写の開始に直接連結された5'、シス作用調節配列である。プロモーターエレメントは、転写開始の部位を選択するために機能する、いわゆるTATAボックスおよびRNAポリメラーゼ開始選択(RIS)配列を含む。これらの配列はまた、それ自体、RNAポリメラーゼによる転写開始選択を促進するために機能するポリペプチドを結合する。

## 【0029】

単純な用語では、プロモーターは、100より少ない(そして通常50より少ない)ヌクレオチド塩基対(bp)の下流に位置する配列の転写を開始するよう作用する方向性エレメントである。それらは、転写の開始および開始前複合体(McKnightおよびTjian、1987、Cell 46:795~805)として知られる複数サブユニット複合体のアセンブリに参加する種々のタンパク質の結合部位として作用する多くの短いコンセンサスヌクレオチド配列を含む。大部分の遺伝子では、これは、TATAボックス(TATAAA)として知られ、それにTATAボックス結合タンパク質(TBP、一般転写因子TFIIDのサブユニット)が結合する、非常に広く保存された配列にある。最終的にPol IIホロ酵素複合体を形成する10以上のさらなる転写因子の整列されたアセンブリが続く。RNA転写は、TBPがまた結合する約25~30塩基下流の開始部位で実際に開始する(BreathnachおよびChambon、1981、Annu Rev Biochem 50:349~393)。

## 【0030】

大部分の機能的プロモーターは、約70~200 bp上流の、その最も高度に保存されるのはCAATボックス(CCAAT、転写因子CBF、C/EBPおよびNF-1のための結合部位)、および同様の距離だけ上流にあるGCボックス(GGGCGG、一般転写因子Sp-1のための結合部位)である、さらなる上流プロモーターエレメント(UP

10

20

30

40

50



E)を含む。転写の基礎的レベルは、このTATAボックス単独から生じるけれども、大部分のプロモーターにとって、少なくともCAATボックスおよびGCボックスが、最適レベルの転写に要求される。

#### 【0031】

エンハンサーは、局在してではあるが、必ずしもすぐ隣接して位置する必要のない(数キロ塩基離れて位置する(Kadonaga(2004)Cell 116:247~257)プロモーターからの転写を増大する非方向的に作用する配列である。エンハンサーは、これもまたプロモーターエレメントと関連するNF-1およびSP-1のような広範な範囲の転写アクティベータータンパク質(Ondekら、1988、Science 236:1237~1244)のための結合部位を提示する短い(8~12bp)コンセンサス配列を含む。これらの配列は、しばしば、タンデムまたは反転繰り返して二重になっている。

10

#### 【0032】

サイトメガロウイルスのような多くのDNAウイルスの非常に活性な即時/初期遺伝子転写ユニットを含む、いくつかの天然の転写ユニットでは、エンハンサーおよびプロモーターエレメントは、1つの拡大された上流エレメントであるものに機能的に結合され得る。

#### 【0033】

プロモーターは、細胞タイプ、温度、金属イオンまたはその他の因子に応答性であるか；または構成的で、これらの因子に非応答性である転写を与えて調節され得る。多くの目的のために、すべてではないが多くの細胞タイプで一貫して高いレベルの転写を与える強力な構成的プロモーターが有利である。多年の間、ヒトサイトメガロウイルスにおける即時/初期遺伝子発現を駆動するエンハンサー/プロモーターエレメントが、真核生物発現ベクター中の異種遺伝子のこのような発現を駆動するために非常に広く用いられている(Foecking & Hoffstetter、1986、Gene 45:101~105)。

20

#### 【0034】

リボソームタンパク質遺伝子のプロモーター領域が、連結された導入遺伝子の発現を高め、そして安定化することで有用な活性を有し得、しかも、高度に発現される遺伝子からの調節領域がクロマチンを転写が活性な立体配座に維持することで非常に有効であるエレメントを含む可能性が高いと仮定された。異質プロモーターへのこのようなエレメントの連結は、次いで、そのプロモーターの周りでより開いたクロマチン環境を生成し、増加した発現を生じ得る。リボソームタンパク質遺伝子由来のプロモーターが、rRNAが転写されるRNAポリメラーゼタイプI依存性プロモーターであるリボソームプロモーターから区別され得ることは当業者によって理解される。

30

#### 【0035】

この仮説を試験するために、RNAを、指数的に増殖するCHO-K1およびNSO細胞株から得、そして13,443マウス遺伝子に対するマイクロアレイ分析を実施した。本発明者らは、本発明者らの分析を、高CpGアイランド含量および二方向性プロモーターを有するエレメントに限定した。hnRNPA2調節領域からの最小有効配列に基づく規準を用い、これら遺伝子の選択から約3kbのDNAを、NSOゲノムDNAからPCRによって増幅した。これらの配列を、次いで、EGFP発現ベクター中にクローン化し、そして同じベクターのRNPA2コントロールバージョンとともにCHO-K1中にトランスフェクトした。

40

#### 【0036】

2つのリボソームタンパク質のプロモーター領域由来の配列は、用いたアッセイにおいて異質レポーター配列の一貫して高レベルの発現を与えたことが見出された。各々の場合において、このプロモーター領域は、実際のプロモーターエレメントの上流の5'領域から第1のエキソン中に良く、実際に第1のイントロン中に延びるGCリッチな配列を含んでいた。このGCリッチな配列は、300bpを超えて延びるとして、本明細書で規定さ

50

れるような拡大されたCpGアイランドである規準を満たす。

【発明を実施するための最良の形態】

【0037】

従って、本発明は、

a) リボソームタンパク質遺伝子のプロモーター領域からの少なくとも500の連続するヌクレオチドを含むエレメント、

b) 異質プロモーター、

c) この異質プロモーターに隣接する転写可能な核酸配列を含む、単離されたポリヌクレオチドを提供し、

ここで、上記転写可能な核酸配列は、上記異質プロモーターから転写され、そしてこの転写のレベルが上記エレメントによって増大される。好ましくは、上記エレメントは、1 kbを超え、そして最も好ましくは3 kbを超えるリボソームタンパク質遺伝子の5' 非翻訳配列を含む。

【0038】

上記連続するヌクレオチドは、上記プロモーター領域から選択され、これは、転写開始部位の5 kb上流（センスストランドに対し5'）の点から、最初のエキソンの遠位（3'）端の下流（センスストランドに対し3'）500 bpの点まで延びる。

【0039】

好ましくは、上記リボソームタンパク質遺伝子は、RPSA、RPS2、RPS3、RPS3A、RPS4、RPS5、RPS6、RPS7、RPS8、RPS9、RPS10、RPS11、RPS12、RPS13、RPS14、RPS15、RPS15A、RPS16、RPS17、RPS18、RPS19、RPS20、RPS21、RPS23、RPS24、RPS25、RPS26、RPS27、RPS28、RPS29、RPS30、RPL3、RPL4、RPL5、RPL6、RPL7、RPL7A、RPL8、RPL9、RPL10、RPL10A、RPL11、RPL12、RPL13A、RPL14、RPL15、RPL17、RPL18、RPL18A、RPL19、RPL21、RPL22、RPL23、RPL23A、RPL24、RPL26、RPL27、RPL28、RPL29、RPL30、RPL31、RPL32、RPL34、RPL35、RPL35A、RPL36、RPL36A、RPL37、RPL37A、RPL38、RPL39、RPL41、RPLP0、RPLP1、RPLP2およびそれらのオルトログからなるリストから選択される。より好ましくは、それは、RPS3またはRPS11である。

【0040】

1つの好ましい実施形態では、上記エレメントはCpGアイランド、好ましくは、少なくとも300 bpそしてより好ましくは500 bpの拡大されたCpGアイランドを含む。好ましくは、このCpGアイランドはメチル化されていない。上記エレメントがリボソームタンパク質遺伝子からのプロモーターを含み、そしてそれからのこのリボソームタンパク質遺伝子の転写が自然に開始されることがまた好ましい。このようなプロモーターは、しばしば、内因性プロモーターと称される。好ましい実施形態において、上記エレメントは、上記リボソームタンパク質遺伝子またはその1つ以上のエキソンをさらに含む。

【0041】

上記リボソームタンパク質遺伝子は、哺乳動物遺伝子であることが好ましいが、このような遺伝子、およびそれらのプロモーターおよび5' 上流配列は、種を横切って高度に保存され、そしてそれに代わって、昆虫、線虫または酵母遺伝子であり得る。好ましくは、しかし、それは、ヒトまたは齧歯類遺伝子であり、そして最も好ましくは、それはマウス遺伝子である。

【0042】

高度に好ましい実施形態では、本発明の単離されたポリヌクレオチドは、配列番号1に描写されるマウスrps3ヌクレオチド配列のヌクレオチド38~3154を含む。あるいは、それは、配列番号2に列挙されるようなマウスrps11ヌクレオチド配列のヌクレオチド12~3032を含む。

## 【 0 0 4 3 】

1つの局面では、記載されるエレメントに加え、上記ポリヌクレオチドは、リボソームタンパク質遺伝子からの上記エレメントと天然には連結されないプロモーターをさらに含む。この実施形態では、異質プロモーター（第1のエレメント中に存在しても良いし、または存在していなくても良い内因性プロモーターとは別個）が、リボソームタンパク質遺伝子由来の5'配列を含む上記エレメントに隣接し、そしてそれから下流の作動可能な位置に位置される。この配列では、この異質プロモーターによって取り扱われる発現は、このリボソームタンパク質遺伝子エレメントの影響によって増大される。

## 【 0 0 4 4 】

1つの実施形態では、このプロモーターは、構成的プロモーターであり、より好ましくは、サイトメガロウイルス初期/即時プロモーター、SV40、EF-1、ラウスザルコマウイルス(RSV)LTR、またはHIV2 LTRまたはそれら由来の配列の組み合わせからなるリストから選択される。最も好ましいのは、マウスまたはモルモットCMV即時/初期プロモーターである。

## 【 0 0 4 5 】

あるいは、上記プロモーターは、組織特異的プロモーターであり得、これは、限られた範囲の組織中で発現を行う。このようなプロモーターは、当該技術分野で周知であり、そして - グロビン、および免疫グロブリン軽鎖、免疫グロブリン重鎖、デスミン、チロシナーゼ、CD2、IL-3、ミオシン軽鎖、ヒトメラノーマ阻害活性遺伝子プロモーターおよびケラチンからのプロモーターを含む。特に好ましい実施形態では、このプロモーターは、腫瘍選択的プロモーターであり、これは、1つ以上の腫瘍タイプで優先的に発現を行う。このようなプロモーターの例は、癌胎児抗原(CEA)、前立腺特異的抗原(PSA)、シクロオキシゲナーゼ-2(COX-2)、 - フェトプロテイン(AFP)、チロシナーゼ、およびT細胞因子1-4(TCF) - を基礎にしたプロモーターからのプロモーターを含む。

## 【 0 0 4 6 】

上記転写可能な核酸は、インビトロ発現のための任意の有用なポリペプチドをコードし得、そして好ましくは、抗体、抗体の機能的エピトープ結合性フラグメント、成長因子、サイトカイン、プロテインキナーゼ、可溶性レセプター、膜結合レセプター、血液凝固因子からなるリストから選択される。あるいは、この転写可能な核酸は、インビボまたはエクスピボ遺伝子治療のための使用の治療遺伝子をコードし得る。このような治療的核酸は、嚢胞性線維症、サラセミア、鎌形貧血症、ファンコーニ貧血、血友病、重篤な組み合わせ免疫不全症(SCID)、フェニルケトン尿症、 - 1アンチトリプシン欠損症、デュシェンヌ筋ジストロフィ、オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症または骨形成不全症を引き起こす欠陥遺伝子の機能を置換または補充することによって作用し得る。あるいは、それは、悪性癌細胞のような標的細胞中でそれを殺傷するために選択的に発現される、細胞傷害性薬剤、またはプロドラッグ転換酵素をコードし得る。このような適用、および多くのその他は、当業者に周知であり、そして治療的核酸の発現を増大することにおける本発明の妥当性は、このような当業者に明瞭である。

## 【 0 0 4 7 】

別の局面では、本発明は、上記で開示されたような本発明のポリペプチドを含むベクターを提供する。好ましくは、このベクターは、真核生物遺伝子発現のために適合された発現ベクターである。

## 【 0 0 4 8 】

代表的には、このような適合は、制限するのではなく、例示により、細胞/組織特異的発現を仲介する転写制御配列(プロモーター配列)の提供を含む。適合はまた、両方が、真核生物細胞または原核生物宿主いずれかで上記ベクターの維持を容易にする選択マーカーおよび自律複製配列の提供を含む。自律的に維持されるベクターは、エピソームベクターと称される。エピソームベクターが望ましい。なぜなら、それらは、自己複製し、そしてそれ故、組み込みの必要性なくして持続するからである。このタイプのエピソームベク

10

20

30

40

50

ターは、WO 98 / 0 7 8 7 6 に記載されている。

【 0 0 4 9 】

ベクターでコードされる遺伝子の発現を容易にする適合は、転写終結 / ポリアデニル化配列の提供を含む。これはまた、ニシストロン性または複数シストロン性発現カセット中に配列されたベクターでコードされる遺伝子の発現を最大にするよう機能する内部リボソーム侵入部位 ( I R E S ) の提供を含む。

【 0 0 5 0 】

これらの適合は、当該技術分野では周知である。発現ベクター構築および組み換え DNA 技法一般に関する顕著な量の刊行された文献がある。Sambrook ら ( 1 9 8 9 ) Molecular Cloning : A Laboratory Manual、Cold Spring Harbour Laboratory、Cold Spring Harbour、NY およびその中の参考文献 ; Marston、F ( 1 9 8 7 ) DNA Cloning Techniques : A Practical Approach Vol III IRL Press、Oxford UK ; DNA Cloning : F M Ausubel ら、Current Protocols in Molecular Biology、John Wiley & Sons、Inc. ( 1 9 9 4 ) を参照のこと。

【 0 0 5 1 】

上記ベクターは、エピソームベクターまたは組み込みベクターであり得る。好ましくは、上記ベクターはプラスミドである。あるいは、上記ベクターは、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、レンチウイルスまたはその他のウイルスのようなウイルスであり得る。

【 0 0 5 2 】

あるいは、このようなベクターは、

- a ) リボソームタンパク質遺伝子のプロモーター領域からの少なくとも 5 0 0 の連続するヌクレオチドを含むエレメント、
- b ) 異質プロモーター、
- c ) 複数クローニング部位、を含み、

ここで、上記複数クローニング部位中に挿入された転写可能な核酸が、上記異質プロモーターから転写され得、そしてこの転写のレベルは上記エレメントによって増大される。

【 0 0 5 3 】

さらなる局面では、本発明は、本明細書中に記載されるような単離されたポリヌクレオチドまたはベクターを含む宿主細胞を提供する。好ましくは、この宿主細胞は、哺乳動物細胞であり、より好ましくは、CHO、NS0、BHK、HeLa、HepG2 からなるリストから選択される。

【 0 0 5 4 】

本発明によってまた提供されるのは、本発明のポリヌクレオチドを含む発現ベクターを適切な宿主細胞に挿入する工程、およびこの宿主細胞を発現を可能にするに適切な条件で培養する工程を包含するポリペプチドを発現する方法である。好ましくは、このポリペプチドは、治療に有用なポリペプチドである。

【 0 0 5 5 】

本発明のさらなる局面は、本明細書中に記載されたようなポリヌクレオチド、ベクターまたは宿主細胞、および薬学的に受容可能なキャリア、賦形剤、緩衝物または培地を含む薬学的調製物を提供することである

【 実施例 】

【 0 0 5 6 】

( 詳細な説明 )

( 材料および方法 )

( マイクロアレイ分析 )

総 RNA を、RNeasy RNA 抽出キット ( Qiagen、Crawley、UK )

10

20

30

40

50

を用い、製造業者のプロトコールに従って、約80%集密のCHO-K1細胞から抽出した。総RNA(2µg/µl)を、13,443の公知の転写物を提示するマウス70マールオリゴヌクレオチドライブラリー(オペロンV.1)を用いるマイクロアレイ発現分析に供した。Cincinnati大学、Genomics and Microarray Laboratoryが、参照プロトコール(<http://microarray.uc.edu>)に従って、マイクロアレイ分析を請け負った。

#### 【0057】

遺伝子転写物配列は、増加する蛍光に従ってランク付けされた。本発明者らの先の研究は、クロマチン改築エレメントおよびhCMVに与える利益としてHNRP A2 B1/CBX3遺伝子座を詳述したので、HNRP A2転写物をベースライン発現レベルとして識別した。しかし、利用可能なマイクロアレイ分析を用いては、HNRP A2転写物は、ほとんど検出可能ではなかった。HNRP A2転写物の発現レベルは最小であったので、本発明者らの対照としてHNRP A2を用いることは、可能な分析について3829配列を識別し得た。それ故、順序付けたトップの2%(76配列)からの7配列は、発現された転写物が、CpGアイランドおよび1つ以上の推定/既知転写開始部位を含む規準に従って同定された(表1を参照のこと)。CpGアイランド位置、サイズおよびGC:CG比は、GraiEXP(<http://combio.ornl.gov>)を用いて実証された。推定/既知転写開始部位は、NIXプラス分析(<http://www.hgmp.mrc.ac.uk>)およびEnsemblデータベース(<http://www.ensembl.org>)から同定された。

#### 【0058】

(CpGアイランド含有フラグメントのPCR増幅)

PCRオリゴヌクレオチドは、完全なCpGアイランドが包埋されたプロモーター領域を包含し、その一方、公知または推定されるコード配列構造に従って約500bpのコード配列を含む約3kbのフラグメントを増幅するように設計された(表2を参照のこと)。

#### 【0059】

PCR反応は、各ゲノムフラグメントに特異的なオリゴヌクレオチドセット(各プライマーの2pmol;表2)を含んでいた。PCR増幅は、Fail safe<sup>TM</sup> PCRプレミックスA-F(Cambio、UK)、1ユニットのTaq DNAポリメラーゼ(Promega、UK)および200ngのテンプレートDNAを用いた達成された。初期変性は96℃で2分間であり、その一方PCR増幅は、35サイクル(94℃1分間、55~60℃1分間、72℃5分間実施された。)最終伸長ステップ(72℃10分間)が含まれた。

#### 【0060】

PCR産物は、GFX DNA精製カラム(Amersham、UK)を用い、製造業者のプロトコールに従ってゲル精製され、そして製造業者(TOPO;Invitrogen、UK)のプロトコールに従ってTOPO TA cloning(登録商標)に供した。センスおよびアンチセンス配向を、TOPOベクター(Invitrogen、UK)中にクローン化された各CpGアイランド含有フラグメントについて得た。

#### 【0061】

(発現ベクター構築)

コントロール発現ベクター(CET1005EGFP、配列番号20と指定される)を、pEGFP-N1からのhCMV/EGFP/sv40pA(NheI/AgeI欠失複数クローニング部位)のCET900中への挿入により、次いで、このベクターからのAscIカセットのCET1005のAscI部位中への挿入により構築した。

#### 【0062】

そうでないことが陳述されていなければ、すべてのCpGアイランドフラグメントを、TOPO2.1(Invitrogen、UK)から除去した。Terf2ip Acc651/EcoRVフラグメントを、1005のAcc651/SwaI中に挿入した。

GAPDH SpeI/SnaBIを、1005のPmeI/XbaI中に挿入した。RPS3XbaI/SpeIフラグメントを1005のXbaI中に挿入した。RPS11およびTUBAEcoRI平滑フラグメントを、TOPO4.0およびTOPO2.1 (Invitrogen、UK) からそれぞれ除去し、そして1005のPmeI中に挿入した。最後に、A430106P18Rik (EcoRV) および2510006D16Rik (BstXI) フラグメントをまた、1005のPmeI中に挿入した。すべてのCpGアイランド含有フラグメントを、hCMVプロモーターのすぐ上流にセンスおよびアンチセンス配向の両方で挿入した。

#### 【0063】

(細胞株およびトランスフェクション)

CHO-K1細胞を、HAMS F12 (Invitrogen、UK) プラス4500mg/l L-アナニル-L-グルタミン、10μg/mlの各々ペニシリンおよびストレプトマイシン、および10% (v/v) 熱不活性化ウシ胎児血清 (FCS; Invitrogen、Paisley、UK) 中で増殖した。トランスフェクションは、80%の集密培養からの約 $10^7$ 細胞、および250Vで975μFの単一パルスを送達するためのBioRad Gene Pulser I<sup>TM</sup> セットを用いるエレクトロポレーションによって実施した。トランスフェクションは、2μgの線状化CET1005EGFPプラスミド、および異なるサイズの発現ベクターに対して当モル量を用いた。安定にトランスフェクションされた細胞を選択し、そして12.5μ/mlの硫酸ピューロマイシン (Sigma、UK) を含む増殖培地中に維持した。

#### 【0064】

(導入遺伝子発現の定性)

EGFPレポーター構築物でトランスフェクトされた細胞の分析は、Becton-Dickinson FACScanで、親CHO-K1細胞株をバックグラウンドの自動蛍光コントロールとして用いた。

#### 【0065】

10

20

## 【表 1】

表 1. 分析された配列

遺伝子座	Acc. # <sup>a</sup>	説明 <sup>b</sup>	CpG アイランド <sup>c</sup>		
			bp	% CG	GC/CG
<i>Terf2ip</i>	AB041557	テロメア反復結合因子2相互作用タンパク質1 (TRF2-相互作用テロメアタンパク質 Rap1)	968	64.56	0.90
<i>Gapd</i> <sup>d</sup>	M32599	グリセロアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ	1187	60.50	0.84
<i>RPS3</i>	NM012052	<i>RPS3</i> - 40Sリボソームタンパク質 S3.	419	60.39	0.87
<i>TUBA1</i>	M13445	チューブリン $\alpha$ -1鎖 ( $\alpha$ -チューブリン1 ).	850	66.30	0.91
<i>RPS11</i>	AK011207	<i>RPS11</i> - 40Sリボソームタンパク質 S11.	957	59.71	0.95
<i>A430106P18Rik</i>	AK020778	発現された配列 tag	982	63.62	0.93
<i>2510006D16Rik</i>	AK010915	発現された配列 tag	679	67.69	0.75

<sup>a</sup>Genbank 受託<sup>b</sup>Ensembl の記載 (<http://www.ensembl.org/>)<sup>c</sup>Grailexp (<http://compbio.ornl.gov/grailxp>)<sup>d</sup>Gapd - ヒト配列由来

【 0 0 6 6 】

10

20

【表 2】

表 2. PCR オリゴヌクレオチドおよびアンプリコンサイズ

遺伝子座	センス	アンチセンス	アンプリコン
<i>Terf2ip</i>	gtagtttctgacttggaatgt ( 配列番号 3)	aactgacctgccatgccattc ( 配列番号 4)	2995 bp
<i>Gapd</i>	gagcagtcggtgtcacta ( 配列番号 5)	gcagagaagcagacagttatg ( 配列番号 6)	3096 bp
<i>RPS3</i>	cagagcatcaagtacctgtga ( 配列番号 7)	taaccactaagccatctctcc ( 配列番号 8)	3056 bp
<i>TUBA1</i>	caagaacaaggaagctggcc ( 配列番号 9)	taaaaccacagcactgtaggg ( 配列番号 10)	3049 bp
<i>RPS11</i>	aagactgttgcctcatgcc ( 配列番号 11)	ggatgacaatgtcctctgc ( 配列番号 12)	3020 bp
<i>A430106P18Rik</i>	atggtgttaggtcacgtcc ( 配列番号 13)	atccctcacattgccaagcc ( 配列番号 14)	3128 bp
<i>2510006D16Rik</i>	acttaagacctgatgcctcc ( 配列番号 15)	gctagcttacataggcagcc ( 配列番号 16)	2997 bp

( 実施例 1 : r p s 3 エlement 駆動発現 )

配列番号 1 は、R P S 3 クローン化配列 (ヌクレオチド 3 8 ~ 3 1 5 4 ) を示し ; 配列番号 1 7 は、p R P S 3 - 1 0 0 5 - E G F P の完全プラスミド配列を示し ; 配列番号 1 8 は、p C E T 1 0 1 5 - E G F P の完全プラスミド配列を示す。

【 0 0 6 7 】

トランスフェクション 8 日後の E G F P 発現レベルは、h C M V 単独 ( コントロール構築物 ; トランスフェクション前に P m e I で線状化されたプラスミド p C E T 1 0 0 5 ) 、 8 k b R N P A 2 フラグメントを含む構築物 ( プラスミド p C E T 1 0 1 5 、 トランスフェクション前に P m e I で線状化 ) および R p s 3 ( プラスミド p R P S 3 - 1 0 0 5 - E G F P ; トランスフェクション前に P m e I で線状化 ) を含む C H O - K 1 プール内で調査された。

【 0 0 6 8 】

構築物を含む R p s 3 で生成されたプールは、コントロール構築物と比較して E G F P 発現レベルで有意な増加を示す。h C M V プロモーターの上流の R p s 3 配列の付加は、コントロールまたは構築物をそれぞれ含む h n R N P A 2 エlement に対する平均蛍光強度において 5 . 5 倍または 1 . 5 倍の増加を生じた ( 図 3 A ) 。

【 0 0 6 9 】

これら構築物の活性は、N S 0 細胞で調査された。h C M V プロモーター単独と比較して、R P S 3 エlement または h n R N P A 2 エlement がこれら構築物に含められたとき、安定プール中の平均蛍光強度における増加は、各々 2 8 倍または 1 8 倍であった。

【 0 0 7 0 】

C H O - K 1 細胞および N S 0 細胞の両方で、陽性細胞の % は h n R N P A 2 エlement とともに有意に増加したが、この増加は、R P S 3 エlement でより大きかった ( 図 3 B および 5 B ) 。

【 0 0 7 1 】

( 実施例 2 : r p s 1 1 エlement で駆動される発現 )

配列番号 2 は、R P S 1 1 のクローン化された配列 (ヌクレオチド 1 2 ~ 3 0 3 2 ) を



示し；配列番号19は、pRPS11-1005-EGFPの完全配列を示す。

【0072】

RPS含有ベクターおよびコントロールベクター（PmeIで線状化）を、CHO-K1およびNS0細胞株中にトランスフェクトし、そして安定プールをピューロマイシン選択によって生成した。平均EGFP発現レベルは、FACS走査分析によって評価された。

【0073】

hCMVの上流のRps11エレメントの付加は、先に記載されたRNPA2フラグメントを含む構築物と比較して、CHO-K1プールで平均EGFP発現レベルで1.2倍の増加を生じた（図4A）。

【0074】

構築物を含むRps11で安定にトランスフェクトされたNS0細胞株は、hCMVおよびRNPA2構築物と比較された平均EGFP発現レベルで1.8および1.5倍（各々）の増加を示した（図6A）。

【0075】

陽性細胞の%における増加が、RNPA2構築物と比較されるRps11構築物でトランスフェクトされたCHO-K1細胞株について観察された（図4B）。さらに、陽性細胞の%における増加が、hCMVおよびRNPA2の両方と比較されるRps11構築物でトランスフェクトされたNS0プール中で観察された（図6B）。

【図面の簡単な説明】

【0076】

【図1】図1は、ベクターrps3-1005-EGFP（実施例1）のプラスミドマップを示す。

【図2】図2は、ベクターrps11-1005-EGFP（実施例1）のプラスミドマップを示す。

【図3】図3は、トランスフェクション8日後、FACS分析によって分析されたCHO-K1細胞中の種々のrps3構築物によって発現されたときのEGFPレポーターの発現を示す。図Aは平均の蛍光を示し、そして図Bは検出可能なレベルまでレポーター遺伝子を発現する細胞の%（%陽性細胞）を示す。実施例1を参照のこと。

【図4】図4は、トランスフェクション7日後のrps11構築物のレポーター遺伝子発現を示す（FACSによって分析された）。AおよびCは、合計カウントであり、B～Eは集団内のまさに発現する細胞に基づく結果である。図Aは安定して選択されたプール中の細胞の平均蛍光を示し、そして図Bは陽性細胞の百分率（%）を示す。

【図5】図5は、安定にトランスフェクトされたNS0細胞中の、それが存在するさらなるエレメントなしのhCMVプロモーターによって駆動されるとき、または8kbのhnRNPA2または3kbのRPS3いずれかのエレメントがhCMVプロモーターのすぐ5'に配置されるとき、レポーター遺伝子の発現レベルを示す。図Aは、28日における安定プールの平均蛍光強度を示し、そして図Bは、陽性細胞百分率（%）を示す。

【図6】図6は、rps11構築物について図5に類似のデータを示す。図Aは、hCMVで駆動される構築物、またはこのプロモーターのすぐ5'の8kbのhnRNPA2または3kbのRPS3エレメントを備えた同一の構築物いずれかで生成された安定プールに対する平均蛍光強度を示す。図Bは、レポーター遺伝子を発現するプール内の細胞の百分率を示す（陽性細胞百分率（%））。

10

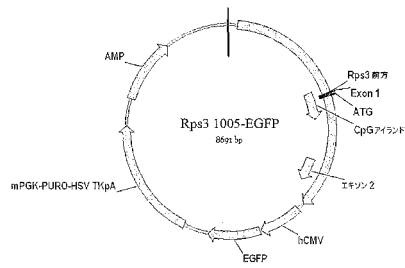
20

30

40

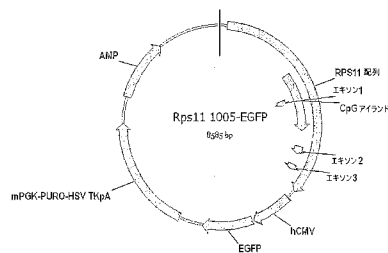
【図 1】

Figure 1



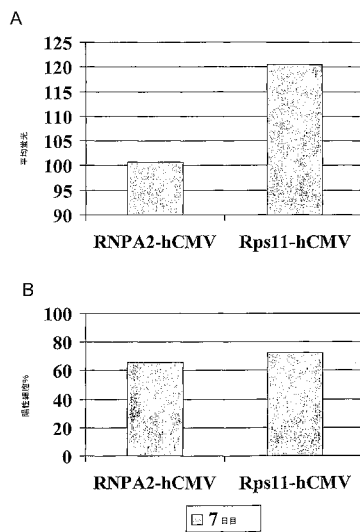
【図 2】

Figure 2



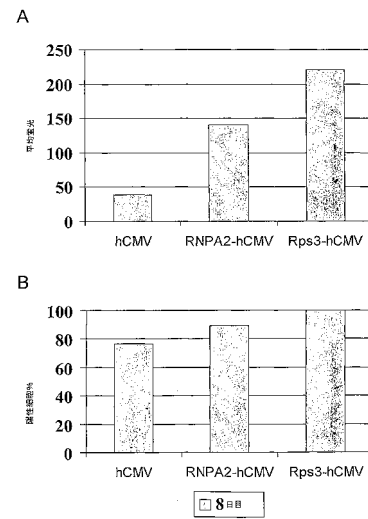
【図 4】

Figure 4.



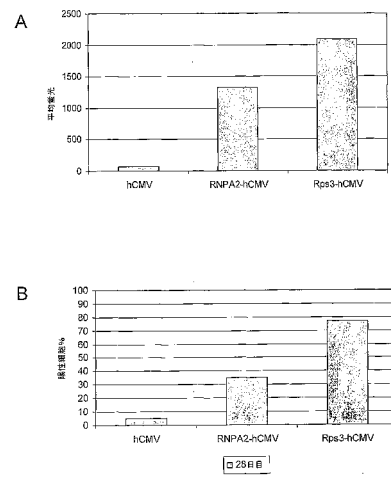
【図 3】

Figure 3.



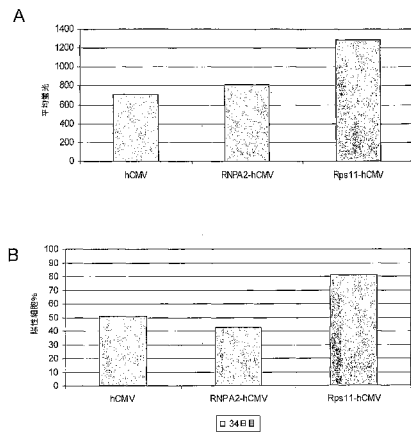
【図 5】

Figure 5.



## 【図 6】

Figure 6.



## 【配列表】

0005080452000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
**A 6 1 P 43/00 (2006.01)** A 6 1 P 43/00

- (72)発明者 シンプソン, デイビッド ジョン  
 イギリス国 エスティー 3 7ジーエフ スタッフォードシャー, ストーク - オン - トレント,  
 メイア パーク, ピカソ ドライブ 4  
 (72)発明者 ウィリアムス, スティーブン ジェレイント  
 イギリス国 シーダブリュー 2 5アールイー チェシャー, ニア クルー, ハフ, チャイ  
 ルドロー クローズ 17  
 (72)発明者 アービン, アリステア シンプソン  
 イギリス国 ディーイー 6 5エルユー ダービーシャー, ダブリッジ, メイブル クローズ  
 4

審査官 小川 明日香

- (56)参考文献 特表 2 0 0 2 - 5 2 2 0 2 7 ( J P , A )  
 特表 2 0 0 4 - 5 3 5 1 8 9 ( J P , A )  
 特表 2 0 0 5 - 5 0 0 0 1 9 ( J P , A )  
 特表平 1 1 - 5 1 3 5 7 2 ( J P , A )  
 Biochem J. , 1 9 9 8 年, Vol.336, p.327-335  
 Apoptosis , 2 0 0 0 年, Vol.5, p.379-388

## (58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

C12N 15/09  
 A61K 31/7088  
 A61K 48/00  
 A61P 43/00  
 C12N 5/10  
 C12P 21/02  
 CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)  
 GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq