

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成29年2月16日(2017.2.16)

【公表番号】特表2016-504922(P2016-504922A)

【公表日】平成28年2月18日(2016.2.18)

【年通号数】公開・登録公報2016-011

【出願番号】特願2015-555816(P2015-555816)

【国際特許分類】

C 12 N 15/113 (2010.01)

C 07 K 14/47 (2006.01)

C 12 N 5/10 (2006.01)

【F I】

C 12 N 15/00 G

C 07 K 14/47 Z N A

C 12 N 5/10

【手続補正書】

【提出日】平成29年1月4日(2017.1.4)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

5'および3'トランスポゾン特異的逆位末端反復配列(I TR)と、

前記5'I TRと3'I TRの間に位置し且つプロモーターの制御下にある、導入遺伝子発現プロセシング(TEP)タンパク質またはTEP機能性RNAをコードする少なくとも1つの核酸配列と、

前記5'I TRと3'I TRの間に位置する少なくとも1つのマトリックス結合領域(MAR)エレメントと、

を含む組換え核酸分子であって、

前記TEPタンパク質は、

タンパク質分泌経路のタンパク質の以下のアミノ酸配列：配列番号13を有するhSRP14、配列番号15を有するhSec61_1、配列番号17を有するhSec61_2、配列番号19を有するhSec61_3、配列番号21を有するhSRP54、配列番号23を有するhSRP9、配列番号25を有するhSRPR_2、配列番号27を有するhSRP_2、および配列番号29を有するhCANX、ならびに、特定された配列と80%、90%、95%または98%を超える配列同一性を有するアミノ酸配列、

のうちの1つ以上であるか、または

以下のタンパク質プロセシングまたは代謝に係るタンパク質：hUCP4、hCMPSAT、rST6Gal1、hCOMSC、hT-シンターゼ、hP4HA1、hP4HB、hGILZ、hCypB、hNRF2、hHk1、hPDI、hPIN1、hSEP1、hCALR、hDDOST、hHSP40、hATP5A1、hSER-CA2、hPDI_A4、hHSC70/HSPA8、hHYOU1、hCMP-SAS、hベクリン-1、hERdj3、CHO-Age、hWip1、hRTP4、hREEP2、hDPM1およびhDRIP78、

のうちの1つ以上であるか、または

シャペロン、具体的には、BiPタンパク質、より具体的には、配列番号60と80

%、90%、95%または100%の配列同一性を有する合成BIPタンパク質誘導体(DroBIP)であり、または

前記TEP機能性RNA、好ましくはmiRNAまたはshRNAは、限定されるものではないがRad51、Rad51B、Rad51C、Rad51D、Xrcc2、Xrcc3、Rad52、Rad54、Brca1、Brca2、サイクリンD1、Ercc、MDC1、Bard1、リガーゼ1、Mre11および/または53BP1などの、少なくとも1つの組換え経路のタンパク質の発現を妨げ、

前記MARエレメントは、配列番号1(MAR 1-68)、配列番号2(MAR 1-6)、配列番号3(MAR X-S29)、配列番号4(MAR S4)、配列番号5(ニワトリリゾームMAR)から選択されるか、遺伝子操作された対応物、特に再構成された対応物であるか、および/または配列番号1~5のいずれか1つと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%もしくは100%の配列同一性を有する、組換え核酸分子。

【請求項2】

前記5'ITRと3'ITRの間に位置する少なくとも1つの導入遺伝子をさらに含み、前記導入遺伝子が導入遺伝子プロモーターの制御下にある、請求項1に記載の組換え核酸分子。

【請求項3】

前記組換え核酸分子がベクターの一部である、請求項1または2に記載の組換え核酸分子。

【請求項4】

前記ベクターが、単一MARエレメント、または2つ以上のMARエレメントを含み、前記エレメント(複数可)が前記5'ITRと3'ITRの間に位置する、請求項3に記載の組換え核酸分子。

【請求項5】

前記ベクターが、2つのMARエレメントを含み、第1のMARエレメントがTEPまたはTEP機能性RNAの上流側に位置し、第2のMARエレメントがTEPまたはTEP機能性RNAの下流側に位置し、前記第1のMARエレメントが、MAR 1-6エレメントおよび/または配列番号2と少なくとも80%、90%、95%、98%、99%または100%の配列同一性を有するエレメント、具体的には、MAR 1-6に基づく再構成MAR、より具体的には、配列番号8(MAR 1-6R2)と少なくとも80%、90%、95%、98%、99%または100%の配列同一性を有するエレメントを含み、前記第2のMARエレメントが、MAR 1-68エレメントおよび/または配列番号1と少なくとも80%、90%、95%、98%、99%もしくは100%の配列同一性を有するエレメントを含む、請求項3に記載の組換え核酸分子。

【請求項6】

前記ベクターが、前記単一MARエレメントを含み、前記単一MARエレメントが、TEPまたはTEP機能性RNAの下流側に位置し、前記単一MARエレメントが、MAR 1-68もしくはMAR X-29エレメントおよび/または配列番号1もしくは3と少なくとも80%、90%、95%、98%、99%もしくは100%の配列同一性を有するエレメント、具体的には、MAR 1-68もしくはMAR X-29に基づく再構成MAR、具体的には、配列番号6、配列番号7もしくは配列番号10(MAR 1-68R、MAR 1-68R2もしくはMAR X-29R3)または配列番号9と少なくとも80%、90%、95%、98%、99%もしくは100%の配列同一性を有するエレメントであり、好ましくは、MAR X-29エレメントおよび/または配列番号3と少なくとも80%、90%、95%、98%、99%もしくは100%の配列同一性を有するエレメントである、請求項3に記載の組換え核酸分子。

【請求項7】

導入遺伝子発現プロセシング(TEP)タンパク質またはTEP機能性RNAを発現させるための方法であって、

導入遺伝子を含む組換え非ヒト哺乳類細胞をインビトロで提供することを含み、前記ベクターがT E PまたはT E P機能性RNAを発現する請求項3～6のいずれか一項に記載のベクターであり、任意選択で、前記ベクターによって発現した前記T E PまたはT E P機能性RNAが、前記非ヒト哺乳類細胞において導入遺伝子の発現を少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%または少なくとも70%増加させる、方法。

【請求項8】

前記ベクターが、単一M A R X_29エレメントおよび/または配列番号3と少なくとも80%、90%、95%、98%、99%もしくは100%の配列同一性を有する核酸配列を含み、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13または14週を超える培養後に、前記ベクターによって発現した前記T E PまたはT E P機能性RNAが、目的の遺伝子の発現を少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%または少なくとも70%増加させる、請求項7に記載の方法。

【請求項9】

好ましくは、單一コピーとして細胞のゲノムに組込まれた20、15、10または5以下の請求項1または2に記載の組換え核酸分子を含む組換え非ヒト哺乳類細胞。

【請求項10】

a) 少なくとも1つの導入遺伝子発現プロセシング(T E P)機能性RNA、および/または、T E Pタンパク質もしくはT E P機能性RNAをコードする少なくとも1つの組換え核酸配列、ならびに、

b) (i) 少なくとも1つの目的の導入遺伝子と、(ii) M A Rエレメントと、を含む組換え核酸分子、

を含む組換え非ヒト哺乳類細胞であって、

前記T E Pタンパク質は、

タンパク質分泌経路のタンパク質の以下のアミノ酸配列：配列番号13を有するh S R P 1 4、配列番号15を有するh S e c 6 1 _ 1、配列番号17を有するh S e c 6 1 _ 、配列番号19を有するh S e c 6 1 _ 、配列番号21を有するh S R P 5 4、配列番号23を有するh S R P 9、配列番号25を有するh S R P R _ 、配列番号27を有するh S R P _ 、および配列番号29を有するh C A N X、ならびに、特定された配列と80%、90%、95%または98%を超える配列同一性を有するアミノ酸配列、のうちの1つ以上であるか、または

以下のタンパク質プロセシングまたは代謝に係るタンパク質：h U C P 4、h C M P S A T、r S T 6 G a l 1 1、h C O M S C、h T - シンターゼ、h P 4 H A 1、h P 4 H B、h G I L Z、h C y P B、h N R F 2、h H K 1、h P D I、h P I N 1、h S E P W 1、h C A L R、h D D O S T、h H S P 4 0、h A T P 5 A 1、h S E R - C A 2、h P D I A 4、h H S C 7 0 / H S P A 8、h H Y O U 1、h C M P - S A S、h ベクリン-1、h E R d j 3、C H O - A G E、h W i p 1、h R T P 4、h R E E P 2、h D P M 1およびh D R i P 7 8、

のうちの1つ以上であるか、または

シャペロン、具体的には、B i Pタンパク質、より具体的には、配列番号60と80%、90%、95%または100%の配列同一性を有する合成B I Pタンパク質誘導体(D r o B i P)であり、または

前記T E P機能性RNA、好ましくはm i RNAまたはs h RNAは、限定されるものではないがR a d 5 1、R a d 5 1 B、R a d 5 1 C、R a d 5 1 D、X r c c 2、X r c c 3、R a d 5 2、R a d 5 4、B r c a 1、B r c a 2、サイクリンD 1、E r c c 、M D C 1、B a r d 1、リガーゼ1、M r e 1 1および/または5 3 B P 1などの、少なくとも1つの組換え経路のタンパク質の発現を妨げ、

前記M A Rエレメントは、配列番号1(M A R _ 1 - 6 8)、配列番号2(M A R _ 1

6）、配列番号3（M A R X S 2 9）、配列番号4（M A R S 4）、配列番号5（ニワトリリゾームM A R）から選択されるか、遺伝子操作された対応物、特に再構成された対応物であるか、および／または配列番号1～5のいずれか1つと少なくとも80%、90%、95%、98%、99%もしくは100%の配列同一性を有する、組換え非ヒト哺乳類細胞。

【請求項11】

非ヒト哺乳類細胞、具体的には、ハムスター細胞をインビトロでトランスフェクトするための方法であって、任意選択で第1のトランスフェクションにおいて、

少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つまたは少なくとも4つの請求項1または2に記載の組換え核酸分子、および／または、

少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つまたは少なくとも4つの単離された導入遺伝子発現プロセシング（T E P）機能性RNAおよび少なくとも1つの導入遺伝子（ここで、任意選択で該導入遺伝子は組換え核酸分子の一部であり、任意選択で該組換え核酸分子は、任意選択で単離核酸またはmRNAと共に、その後の第2のトランスフェクションにおいてトランスフェクトされ、該単離核酸または該mRNAは、上記5' ITRおよび3' ITRを認識するトランスポゼースを発現する）

で前記非ヒト哺乳類細胞をトランスフェクトすることを含む、方法。

【請求項12】

請求項1または2に記載の組換え核酸分子を含む少なくとも1つのベクターを1つの容器内に含み、互換性のあるトランスポゼースをコードするベクターを第2の任意の容器内に含み、前記ベクター（複数可）の使用法についての説明書をさらに別の容器内に含むキット。

【請求項13】

好ましくは、導入遺伝子の組換えおよび／または発現を増加させるための、請求項1または2に記載の組換え核酸および／または請求項9または10に記載の組換え非ヒト哺乳類細胞の使用。

【請求項14】

(a) 上流側でプロモーターと、下流側でポリアデニル化シグナルと隣接する導入遺伝子、

(b) ポリアデニル化シグナルの下流側の単一M A Rエレメント、または

(c) 目的の導入遺伝子の上流側の第1のM A Rエレメントおよび前記導入遺伝子の組込み部位の下流側の第2のM A Rエレメント、

を含む発現ベクターであって、

单一または第1および第2のM A Rエレメントが、M A Rエレメント1_68、1_6、1_6R2、1_68R、1_68R2、X_29R3もしくはX_29または配列番号1、2、3、6、7、8、9もしくは10と少なくとも80%、90%、95%、98%、99%または100%の配列同一性を有するエレメントから選択されるか；または再構成したM A Rエレメント1_6R2、1_68R、1_68R2もしくはX_29R3または配列番号6、7、8、もしくは10と少なくとも80%、90%、95%、98%、99%もしくは100%の配列同一性を有するエレメントから選択され、

任意選択で、M A Rエレメント（複数可）が、それらの再構成していない対応物と比較して、目的の導入遺伝子の発現を少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%または少なくとも70%増加させる、発現ベクター。

【請求項15】

導入遺伝子を発現させるための方法であって、

前記導入遺伝子を含む請求項14に記載のベクターのうちの1つを含む組換え非ヒト哺乳類細胞をインビトロで提供することと、導入遺伝子を発現させることと、を含み、

前記M A Rエレメント（複数可）が、前記導入遺伝子の発現を好ましくは少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少

なくとも 60% または少なくとも 70% 増加させる、方法。