

【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】令和3年9月24日(2021.9.24)

【公表番号】特表2020-533019(P2020-533019A)

【公表日】令和2年11月19日(2020.11.19)

【年通号数】公開・登録公報2020-047

【出願番号】特願2020-531824(P2020-531824)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/85 (2006.01)

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 P 21/02 (2006.01)

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 31/00 (2006.01)

A 6 1 P 31/12 (2006.01)

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 K 35/76 (2015.01)

【F I】

C 1 2 N 15/85 Z N A Z

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 5/10

C 1 2 P 21/02 C

A 6 1 P 35/00

A 6 1 P 31/00

A 6 1 P 31/12

A 6 1 K 48/00

A 6 1 K 35/76

【手続補正書】

【提出日】令和3年8月13日(2021.8.13)

【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】

細胞において発現産物を産生するための合成核酸発現構築物であって、前記核酸発現構築物が、前記発現産物をコードする核酸配列と作動可能に連結したプロモーター配列を含み、前記発現産物をコードする核酸配列が、制御可能なイントロンをコードする配列を含み、前記制御可能なイントロンが、細胞におけるアンフォールディング型タンパク質応答(UPR)系により前記合成発現構築物から産生された転写産物からスプライシングで切り出される能力があり、それにより、結果として、機能性発現産物をコードする転写産物を生じる、切除可能な配列を含むイントロンであり、任意選択で発現産物がタンパク質である、合成核酸発現構築物。

【請求項2】

制御可能なイントロンが、IRE1タンパク質又はそのホモログ若しくはオルソログによりスプライシングで切り出される能力がある、請求項1に記載の合成核酸発現構築物。

【請求項3】

制御可能なイントロンの切除可能な配列のスプライシングでの切り出しが、発現産物をコードする核酸配列からの転写産物の正しい翻訳を可能にし、それにより、所望の発現産物が産生されるのを可能にし、任意選択で、
発現産物をコードする核酸配列からの転写産物におけるイントロンの存在が、結果として、非機能性である前記転写産物からタンパク質が翻訳されることになる、あるいは
制御可能なイントロンの切除可能な配列のスプライシングでの切り出しが、転写産物において中途での停止コドンを除く、あるいは
制御可能なイントロンの切除可能な配列のスプライシングでの切り出しが、制御可能なイントロンの下流に位置する転写産物における配列についてリーディングフレームのシフトを生じる、あるいは
切除可能な配列のヌクレオチド長が3で割り切れない、請求項1又は2に記載の合成核酸発現構築物。

【請求項4】

制御可能なイントロンが、配列CNG/CNG-Xn-CNG/CNGを含み、ただし、Xnが長さn塩基の配列を表し、/が切断部位を表し、配列CNG-Xn-CNGが転写産物から切除され、
任意選択で、Xnが、10ヌクレオチドから500ヌクレオチドまで、より好ましくは15～350ヌクレオチド、更により好ましくは15～100ヌクレオチド、更により好ましくは15～35ヌクレオチド、更により好ましくは20～25ヌクレオチドの長さを有し、
好ましくは、制御可能なイントロンが、配列CNG/CNG-Xn-CNG/CNG[CG]を含み、ただし、Xnが長さnヌクレオチドの配列を表し、/が、切除可能な配列CNG-Xn-CNGがスプライシングにより転写産物から切除されるような切断部位を表し、配列Xnの5'末端におけるヌクレオチドがC又はGである、請求項1～3のいずれか一項に記載の合成核酸発現構築物。

【請求項5】

Xnが配列CACUCAGACUACGUGCACCU(配列番号1)又はそれと少なくとも60%同一である配列を含み、
任意選択で、Xnが以下の配列の1つを含む、又はそれからなる、請求項4に記載の合成核酸発現構築物：

- CACUCAGACUACGUGCACCU(配列番号1);
- CACUCAGACUACGUGCUCU(配列番号2);
- CACUCAGACUACGUGCCCCU(配列番号3);
- CACUCAGACUACGUGCGCCU(配列番号4);及び
- CACUCAGACUAUGUGCACCU(配列番号5)。

【請求項6】

制御可能なイントロンが、配列CNG/CNGCAGACUACGUGCACCUCNG/CNGC(配列番号6)又はそれと少なくとも60%同一である配列を含む、あるいは
制御可能なイントロンが、配列CAG/CAGCACUACGUGCACCUCUG/CUGC(配列番号7)又はそれと少なくとも60%同一である配列を含み、又はそれからなる、あるいは
制御可能なイントロンが以下の配列：

- CNG/CAGCACUACGUGCACCUCUG/CNG(配列番号8);
- CNG/CAGCACUACGUGCACCUCUG/CNG(配列番号9);
- CNG/CAGCACUACGUGCCCCUCUG/CNG(配列番号10);
- CNG/CAGCACUACGUGCGCCUCUG/CNG(配列番号11);及び
- CNG/CAGCACUACGUGCACCUCUG/CNG(配列番号12)

の1つを含み、又はそれからなる、あるいは
制御可能なイントロンが以下の配列：

- CAG/CAGCACUACGUGCACCUCUG/CUGC(配列番号7);
- CAG/CAGCACUACGUGCACCUCUG/CUGC(配列番号13);
- CAG/CAGCACUACGUGCCCCUCUG/CUGC(配列番号14);
- CAG/CAGCACUACGUGCGCCUCUG/CUGC(配列番号15);及び
- CAG/CAGCACUACGUGCACCUCUG/CUGC(配列番号16)

の1つを含み、又はそれからなる、あるいは
制御可能なイントロンが、配列CAG/CUGCAGCACUCAGACUACGUGCACCUCUG/CUG(配列番号17)又は
CAG/CUGCAGCACUCAGACUACGUGCACCUCUG/CUGG(配列番号27)を含み、ただし、/が切断部位
を表す、

請求項1～5のいずれか一項に記載の合成核酸発現構築物。

【請求項7】

発現産物をコードする核酸配列と作動可能に連結した誘導性プロモーターを含み、任意
選択で、

誘導性プロモーターがアンフォールディング型タンパク質応答(UPR)誘導性プロモーター
であり、及び/又は

発現産物をコードする核酸配列が導入遺伝子であり、

好ましくは、発現産物をコードする核酸配列がタンパク質をコードし、適切には、前記タ
ンパク質が酵素、抗体若しくは抗体断片、ウイルスタンパク質、治療用タンパク質、又は
毒性タンパク質である、請求項1～6のいずれか一項に記載の合成核酸発現構築物。

【請求項8】

発現産物をコードする配列を含む核酸であって、前記発現産物をコードする配列が制御可能なイントロンをコードする配列を含み、前記制御可能なイントロンが、細胞におけるアンフォールディング型タンパク質応答(UPR)系により合成発現構築物から産生された転写産物からスプライシングで切り出さる能力があり、それにより、結果として、機能性発現産物をコードする転写産物を生じる、切除可能な配列を含むイントロンであり、前記発現産物が、XBP1タンパク質でも、Hac1タンパク質でも、bZIP60タンパク質でも、そのホモログでもない、核酸。

【請求項9】

請求項1～7のいずれか一項に記載の合成核酸発現構築物又は請求項8に記載の核酸を含むベクター。

【請求項10】

請求項1～7のいずれか一項に記載の核酸発現構築物、請求項8に記載の核酸、又は請求項9に記載のベクターを含む薬学的組成物。

【請求項11】

請求項1～7のいずれか一項に記載の核酸発現構築物、請求項8に記載の核酸、又は請求項9に記載のベクターを含む細胞であって、

任意選択で、真核細胞、適切には、真菌細胞(例えば、酵母細胞)、動物(後生動物)細胞(
例えば、哺乳類細胞)、又は植物細胞であり、

任意選択で、請求項1～7のいずれか一項に記載の核酸発現構築物、請求項8に記載の核酸
、又は請求項9に記載のベクターが、細胞への毒性がある発現産物をコードする、細胞。

【請求項12】

a) 請求項1～7のいずれか一項に記載の合成核酸発現産物を含む真核細胞集団、好ましくは哺乳類細胞集団を供給する工程；

b) アンフォールディング型タンパク質応答を誘導するように前記細胞集団を処理して、それにより制御可能なイントロンからの切除可能な配列のスプライシングを誘導する工程；

c) 前記発現産物の産生についての最適な条件下で前記細胞集団をインキュベートする工程；及び

d) 前記細胞集団から前記発現産物を単離する工程
を含む、発現産物を産生するための方法。

【請求項13】

工程b)が、前記細胞にストレスを加えることを含み、前記ストレスがUPRを誘導するのに適している、あるいは、

工程b)が、前記細胞においてUPRを誘導することができる化学物質を投与することを含み、
適切には、

前記細胞においてUPRを誘導することができる化学物質が、フォルスコリン、ジチオスレイトール (DTT)、ツニカマイシン、タプシガルジン、飽和脂肪酸、ステアロイル-CoAデサチュラーゼ酵素活性を下方制御することができる作用物質の1つ又は複数を含む、あるいは

工程b)が、細胞集団においてUPR応答を誘導するために、前記真核細胞集団において誘導タンパク質を発現することを含み、任意選択で、

工程b)が、前記細胞において誘導タンパク質、好ましくは異種性タンパク質を発現する能力がある発現ベクターを前記細胞集団にトランスフェクションすることを含み、又は工程b)が、すでに細胞へ導入された発現ベクターから誘導タンパク質の発現を誘導することを含む、あるいは

工程b)が、細胞を低酸素又は糖質欠乏に曝すことを含む、請求項12に記載の方法。

【請求項 14】

処置又は治療の方法における使用のための、請求項1～7のいずれか一項に記載の核酸発現構築物、請求項8に記載の核酸、請求項9に記載のベクター、請求項10に記載の薬学的組成物、又は請求項11に記載の細胞。

【請求項 15】

合成のUPR応答性シス制御性エレメントを含む合成UPR誘導性プロモーターであって、前記UPR応答性シス制御性エレメントが、ATF6、XBP1、若しくはbZIP60、又はUPRの一部として遺伝子発現を駆動させるホモログ若しくは別途等価の転写因子に対する少なくとも1つの結合部位を含み、

任意選択で、最小プロモーター又は近位プロモーターと作動可能に連結した少なくとも1つの合成UPR応答性シス制御性エレメントを含み、

任意選択で、以下の転写因子標的配列：

- TGACGTG;
- TGACGTGCT;
- TGACGTG[TG];
- CCAAT-N9-CCACG(ERSE1部位として知られている)(配列番号18);及び
- ATTGG-N-CCACG(ERSE2部位として知られている)(配列番号19)

の少なくとも1つの1つ又は複数のコピーを含むUPR応答性シス制御性エレメントを含み、任意選択で、転写因子標的配列TGACGTGの1つ又は複数のコピー、好ましくは転写因子標的配列TGACGTGの3つ又はそれ以上のコピー、及び好ましくは転写因子標的配列TGACGTGの5つ又はそれ以上のコピー、例えば、転写因子標的配列TGACGTGの6つ又はそれ以上のコピーを含む、UPR応答性シス制御性エレメントを含み、

任意選択で、UPR応答性シス制御性エレメントが、配列

TGACGTG-S-TGACGTG-S-TGACGTG-S-TGACGTG-S-TGACGTG-S-TGACGTG(配列番号54)を含み、ただし、Sが任意選択のスペーサー配列を表し、

任意選択で、UPR応答性シス制御性エレメントが、配列TGACGTGCT-S-TGACGTGCT-S-TGACGTGCT-S-TGACGTGCT-S-TGACGTGCT-S-TGACGTGCT(配列番号55)を含み、ただし、Sが任意選択のスペーサー配列を表し、

任意選択で、UPR応答性シス制御性エレメントが、配列TGACGTGCTTGACGTGCTTGACGTGCTTGACGTGCTTGACGTGCTTGACGTGCT(配列番号20)を含み、

任意選択で、UPR応答性シス制御性エレメントが、配列

TGACGTGCTGATGATGCGTAGCTAGTAGTTGACGTGCTGATGATGCGTAGCTAGTAGTTGACGTGCTGATGATGCGTAGC
TAGTAGTTGACGTGCTGATGATGCGTAGCTAGTAGTTGACGTGCTGATGATGCGTAGCTAGTAGTTGACGTGCT (配列
番号56) 又はそれと少なくとも50%同一である配列を含み、

任意選択で、以下の配列：

- TGACGTGCTTGACGTGCTTGACGTGCTTGACGTGCTTGACGTGCTTGACGTGCTGGTACCGTCGACGATATCGGATC
CAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTAGATACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAG
AAGATCGCCACC (配列番号22) 又はそれと少なくとも70%同一である配列；
- TGACGTGCTGATGATGCGTAGCTAGTAGTTGACGTGCTGATGATGCGTAGCTAGTAGTTGACGTGCTGATGATGCGT

AGCTAGTAGTTGACGTGCTGATGATGCGTAGCTAGTAGTTGACGTGCTGATGATGCGTAGCTAGTAGTTGACGTGCTGAT
GATGCGTAGCTAGTAGTGCAGTTAGCGTAGCTGAGGTACCGTCGACGATATCGGATCCAGGTCTATATAAGCAGAGCTCG
TTTAGTGAACCGTCAGAT(配列番号57)又はそれと少なくとも50%同一である配列;及び
- TGACGTGCTGATGATGCGTAGCTAGTAGTTGACGTGCTGATGATGCGTAGCTAGTAGTTGACGTGCTGATGATGCGT
AGCTAGTAGTTGACGTGCTGATGATGCGTAGCTAGTAGTTGACGTGCTGATGATGCGTAGCTAGTAGTTGACGTGCTGAT
GATGCGTAGCTAGTAGTGCAGTTAGCGTAGCTGAGGTACCGTCGACGATATCGGATCCTTCGCATATTAAGGTGACGCGT
GTGGCCTCGAACACCGAG(配列番号58)又はそれと少なくとも50%同一である配列
の1つを含む、合成UPR誘導性プロモーター。