

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4958905号
(P4958905)

(45) 発行日 平成24年6月20日(2012.6.20)

(24) 登録日 平成24年3月30日(2012.3.30)

(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 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/00 1 O 1

C 1 2 N 9/06 (2006.01)

C 1 2 N 9/06 Z

請求項の数 8 (全 23 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2008-526258 (P2008-526258)
 (86) (22) 出願日 平成18年8月11日(2006.8.11)
 (65) 公表番号 特表2009-504160 (P2009-504160A)
 (43) 公表日 平成21年2月5日(2009.2.5)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2006/031506
 (87) 国際公開番号 W02007/022009
 (87) 国際公開日 平成19年2月22日(2007.2.22)
 審査請求日 平成21年7月10日(2009.7.10)
 (31) 優先権主張番号 60/707,564
 (32) 優先日 平成17年8月11日(2005.8.11)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 503054122
 セントカー・インコーポレーテッド
 アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 3 5
 5 マルバーン・グレートバレイパークウエ
 イ 2 0 0
 (74) 代理人 110000741
 特許業務法人小田島特許事務所
 (72) 発明者 ネルソン, パメラ・エイチ
 アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 3 3
 5 ダウニングタウン・ファイルマンロード 4
 8 3
 (72) 発明者 ムーア, ゴードン
 アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 0 8
 7 ウエイン・ペンブローックアベニュー 2 4
 9

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ペプチド鎖発現を増大させるための物質および方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 および配列番号 2 に示される配列を有する核酸を含んでなる単離された DNA。

【請求項 2】

配列番号 1 に示される配列を有する核酸が、ペプチド鎖をコードする組換え DNA の 3' 側に作動可能に連結される、請求項 1 に記載の DNA。

【請求項 3】

グルタミン合成酵素をコードする DNA をさらに含んでなる、請求項 2 に記載の DNA。

【請求項 4】

ペプチド鎖をコードする組換え DNA に作動可能に連結される、配列番号 1 および配列番号 2 に示される配列を有する核酸を含んでなる単離された DNA。

【請求項 5】

組換え DNA が cDNA である、請求項 4 に記載の DNA。

【請求項 6】

配列番号 1 に示される配列を有する核酸が、組換え DNA の 3' 側に作動可能に連結され、かつ、配列番号 2 に示される配列を有する核酸が、組換え DNA の 5' 側に作動可能に連結される、請求項 4 に記載の DNA。

【請求項 7】

グルタミン合成酵素をコードするDNAをさらに含んでなる、請求項6に記載のDNA。

【請求項8】

ペプチド鎖が抗体フラグメントである、請求項7に記載のDNA。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ペプチド鎖をコードする遺伝子に作動可能に連結される場合にペプチド鎖発現を増大させるDNA配列、および前述を使用するペプチド鎖発現宿主細胞の生成方法に関する。本発明はペプチド鎖発現宿主細胞にもまた関する。

10

【背景技術】

【0002】

抗体のような組換えタンパク質の大スケール生産は、典型的には培養産生細胞株からのタンパク質の発現に頼る。培養細胞により発現されるタンパク質は、標準的ベンチ若しくは工業スケールの精製技術を使用して容易に回収かつ精製し得る。

【0003】

抗体産生細胞株は、H鎖およびL鎖抗体発現構築物の宿主細胞のゲノムDNA中への無作為組込みにより創製し得る。この無作為組込みは比較的低レベルの抗体発現を有する安定クローンの高い比率を生じる。この現象は、多くの組込みが、高レベルの発現に対し伝導性でない凝縮クロマチンの領域に導入遺伝子を挿入するという事実によりうる（非特許文献1）。

20

【0004】

タンパク質発現レベルは、バイオリアクター若しくは他の系からのこうしたタンパク質の製造および精製に影響を及ぼす重要なパラメータである。一般に、より高い精製タンパク質収量は、発現レベルが相対的に高い場合に達成され得る。逆に、発現レベルが低い場合、収量は低いことがあり、そしてタンパク質精製は経済的に実行可能でないことがある。

【0005】

低タンパク質発現を伴う細胞の問題を回避することへの1アプローチは、低発現細胞の一集団から高発現細胞をサブクロニングしかつ単離することであった。典型的に、これは、高発現細胞株の制限連続希釈、スクリーニングおよび選択の数回のかつ労働集約的な繰り返しを必要とする。あるいは、タンパク質を産生する全く新たな細胞株を、該新たな細胞株が高発現株であることができるという意図をもって生成する。

30

【0006】

しかしながら、これらのアプローチのいずれも、成功のいかなる保証も提供せず、かつ、双方は重大な制限を有する。例えば、低発現細胞の一集団からサブクロニングすることにより高発現細胞株を同定することは、該集団中の高発現細胞の相対的希少性、ならびにいずれかの高発現細胞の同定に必要とされる大量の時間および労働により制限される。さらに、抗体若しくは目的のタンパク質を産生する新たな細胞株は、該細胞株の増殖および成長の間の導入遺伝子発現のサイレンシング、または他の形態の遺伝的若しくは後成的不安定性により、高発現であることを継続しないかも知れない。（インスレーターは役立たないとみられる）

40

【0007】

従って、ペプチド鎖発現を効果的に増大させる組成物、方法および細胞に対する必要性が存在する。

【非特許文献1】Furthら、Nucleic Acids Res.、19、6205 - 6208（1991）

【発明の開示】

【0008】

[発明の要約]

50

本発明の一局面は、配列番号 1 および配列番号 2 に示される配列を有する核酸を含んでなる単離された DNA である。

【 0 0 0 9 】

本発明の別の局面は、配列番号 1、2、3、4、5、6、7 若しくは 8 に示される配列を有する核酸より本質的になる単離された DNA である。

【 0 0 1 0 】

本発明の別の局面は、ペプチド鎖をコードする組換え DNA に作動可能に連結される、配列番号 1、2、3、4、5、6、7 若しくは 8 に示される配列を有する核酸を含んでなる単離された DNA である。

【 0 0 1 1 】

本発明の別の局面は、ペプチド鎖をコードする組換え DNA に作動可能に連結される、配列番号 1 および配列番号 2 に示される配列を有する核酸を含んでなる単離された DNA である。

【 0 0 1 2 】

本発明のなお別の局面は、真核生物細胞を提供する工程；配列番号 1、2、3、4、5、6、7 若しくは 8 または配列番号 1 および配列番号 2 双方に示される配列を有する核酸を含んでなる DNA を細胞に導入する工程；ならびに、導入された DNA がペプチド鎖をコードする DNA に作動可能に連結されている細胞を同定する工程を含んでなる、ペプチド鎖発現宿主細胞の製造方法である。

【 0 0 1 3 】

本発明の別の局面は、真核生物細胞を提供する工程；ならびに、ペプチド鎖をコードする DNA に作動可能に連結される、配列番号 1、2、3、4、5、6、7 若しくは 8 または配列番号 1 および 2 に示される配列を有する核酸を含んでなる DNA を細胞に導入する工程を含んでなる、ペプチド鎖発現宿主細胞の製造方法である。

【 0 0 1 4 】

本発明の別の局面は、配列番号 1、2、3、4、5、6、7 若しくは 8 または配列番号 1 および配列番号 2 に示される配列を有する核酸を含有する真核生物細胞を提供する工程；ペプチド鎖をコードする DNA を細胞に導入する工程；ならびに、導入された DNA が配列番号 1、2、3、4、5、6、7 若しくは 8 または配列番号 1 および 2 に作動可能に連結されている細胞を同定する工程を含んでなる、ペプチド鎖発現宿主細胞の製造方法である。

【 0 0 1 5 】

[発明の詳細な記述]

本明細で引用される、限定されるものでないが特許および特許出願を挙げることができる全部の刊行物は、完全に示されるかのように引用することにより本明細書に組み込まれる。

【 0 0 1 6 】

本明細書および請求の範囲で使用されるところの、単数形の形態「ある (a)」、「および (and ,)」、「および「該 (the)」は、文脈が別の方法で明瞭に指図しない限り、複数の参照を包含する。従って、例えば「ある細胞 (a c e l l)」への言及は 1 個若しくはそれ以上の細胞への言及であり、そして当業者に既知のそれらの同等物を包含する。

【 0 0 1 7 】

別の方法で定義されない限り、本明細書で使用される全部の技術および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者に一般に理解されると同一の意味を有する。本明細書に記述されるものに類似若しくは同等のいかなる方法、装置および物質も本発明の実務若しくは試験で使用し得るとは言え、例示的方法、装置および物質を今や記述する。

【 0 0 1 8 】

「作動可能に連結される」という用語は、第一の配列若しくは配列の組に、第二の配列によりコードされるペプチド鎖の発現を増大させるように連結が機能する、向き若しくは

10

20

30

40

50

距離に関係しない、核酸配列間のいかなる連結も意味しているが、但し、該第二の配列はマウス系統 C 5 7 B L / 6 J の染色体 6 若しくは 1 2 からのゲノム DNA でない。こうした連結は物理的連結を包含し得る。

【 0 0 1 9 】

「組換え DNA」という用語は、その天然の状況から取り出されているか若しくは天然に存在しない DNA である DNA を意味している。組換え DNA は、下で定義されるところの組換えペプチド鎖を発現するのに使用し得る。

【 0 0 2 0 】

「ペプチド鎖」という用語は、ペプチド結合により連結されて鎖を形成する最低 2 個のアミノ酸残基を含んでなる分子を意味している。50 アミノ酸以上の大型ペプチド鎖は「ポリペプチド」若しくは「タンパク質」と称されうる。50 アミノ酸未満の小型ペプチド鎖は「ペプチド」と称されうる。

10

【 0 0 2 1 】

本明細書で使用されるところの「抗体」という用語は、広範な意味で意味しており、そして、ポリクローナル抗体、マウス、ヒト、ヒト化およびキメラモノクローナル抗体を包含するモノクローナル抗体、組換え工作されたモノクローナル抗体を包含する免疫グロブリンすなわち抗体分子、ならびに抗体フラグメントを包含する。

【 0 0 2 2 】

一般に、抗体は、特異的抗原に対する結合特異性を表すタンパク質若しくはポリペプチドである。無傷の抗体は、2 本の同一の L 鎖 (L C) および 2 本の同一の H 鎖 (H C) から構成されるヘテロ四量体の糖タンパク質である。典型的には、各 L 鎖は 1 個の共有ジスルフィド結合により H 鎖に連結される一方、ジスルフィド結合の数は異なる免疫グロブリンアイソタイプの H 鎖間で変動する。各 H および L 鎖は規則的に空間を空けられた鎖間ジスルフィド架橋もまた有する。各 H 鎖は一端に 1 個の変域ドメイン (V_H) 次いで多数の定常ドメインを有する。各 L 鎖は、一端の 1 個の変域ドメイン (V_L) および他端に 1 個の定常ドメインを有し；L 鎖の定常ドメインは H 鎖の第一の定常ドメインと整列され、また、L 鎖変域ドメインは H 鎖の変域ドメインと整列される。いかなる脊椎動物種の抗体 L 鎖も、それらの定常ドメインのアミノ酸配列に基づき、2 種の明瞭に異なるタイプすなわち および の一方に割り当てられ得る。免疫グロブリンは、H 鎖定常ドメインのアミノ酸配列に依存して、5 種の主要なクラス、すなわち I g A、I g D、I g E、I g G および I g M に割り当てられ得る。I g A および I g G はアイソタイプ I g A₁、I g A₂、I g G₁、I g G₂、I g G₃ および I g G₄ としてさらに下位分類される。

20

30

【 0 0 2 3 】

「抗体フラグメント」という用語は無傷の抗体の一部分を意味している。この部分は、無傷の抗体の H 鎖配列、L 鎖配列、抗原結合すなわち変域領域でありうる。抗体フラグメントの例は、F a b、F a b' F (a b')₂ および F v フラグメント、二重特異性抗体、一本鎖抗体分子、ならびに最低 2 種の無傷の抗体から形成される多特異性抗体を包含する。

【 0 0 2 4 】

「発現宿主細胞」という用語は特定のペプチド鎖を発現する細胞を意味している。

40

【 0 0 2 5 】

本発明は、ペプチド鎖をコードする遺伝子に作動可能に連結される場合にペプチド鎖発現を増大させる DNA に関する。該 DNA は単独で若しくは相互と組合せて使用し得る。本発明は、前述を使用するペプチド鎖発現宿主細胞の生成方法および該方法により生成した宿主細胞にもまた関する。

【 0 0 2 6 】

本発明の一面は、配列番号 1、および配列番号 2、3、4、5、6、7 若しくは 8 に示される核酸配列を含んでなる単離された DNA である。本発明の別の局面は、配列番号 1、2、3、4、5、6、7 若しくは 8 に示される核酸配列よりなる若しくはより本質的になる単離された DNA である。これらの DNA は、それらが作動可能に連結されている

50

遺伝子の発現を増大させるのに使用しうる。それぞれ図6および9に示されるプラスミド p 2 1 0 6 - D V 6 / 1 2 H y b - Z s G r e e n および p D G - G S - 6 R / 1 2 R はこうしたDNAの例である。

【0027】

本発明の別の局面は、ペプチド鎖をコードする組換えDNAに作動可能に連結される、配列番号1、2、3、4、5、6、7若しくは8に示される核酸配列を含んでなる単離されたDNAである。こうしたDNAは、該組換えDNAによりコードされるペプチド鎖の発現を増大させるのに使用しうる。組換えDNAの例は、ゲノムDNAおよびcDNAのような人工DNAである。ゲノムDNAはいずれかの種若しくは細胞型のDNAから単離しうる。ゲノムDNAは染色体およびオルガネラDNAを包含する。人工DNAは、例えば、イントロンエンハンサー要素のようなイントロンにスプライシングされたcDNA配列、合理的設計の結果であるDNA、若しくは異なる生物体から発する配列を含んでなる人工DNAを含有しうる。こうした配列の部分は、例えばヒト (H o m o s a p i e n s) (ヒト) 若しくはハツカネズミ (M u s m u s c u l u s) (マウス) 起源のような異なる生物体から発しうる。当業者は、本発明の範囲内の他の組換えDNAもまた認識するであろう。

10

【0028】

本発明の一態様において、配列番号1、2、3、4、5、6、7若しくは8に示される配列を有する核酸に作動可能に連結される組換えDNAはcDNAである。こうしたcDNAはペプチド鎖をコードすることができかつイントロンを含有しないことができる。しかしながら、いくつかの例においては、イントロン要素をコードするDNAを伴うcDNAの部分に隣接することが望ましいことができる。プラスミド p 2 1 0 6 - D V 6 - Z s G r e e n (図6に示される) は、cDNAがイントロン要素により隣接されている組換えDNAの一例である。cDNAはいかなる種の核酸にも由来しうる。例えばcDNAはヒト起源若しくはマウス起源のものでありうる。

20

【0029】

別の態様において、配列番号1、2、3、4、5、6、7若しくは8に示される配列を有する核酸配列に作動可能に連結される組換えDNAは、BALB/c若しくはNAKED系統のようなハツカネズミ (M u s m u s c u l u s) 系統のゲノムから得られるゲノムDNAでありうる。これらの組換えDNAは、イエハツカネズミ (M u s d o m e s t i c u s) およびインドハツカネズミ (M u s b o o d u g a) のようなハツカネズミ属 (M u s) の他の緊密に関係するメンバーからのゲノムDNA、若しくはヒトのような他の種のゲノムでもまたありうる。あるいは、こうしたDNAはcDNA若しくは他の人工DNAを包含する組換えDNAでありうる。当業者は、本発明の本態様の範囲内の他の組換えDNAを認識するであろう。

30

【0030】

本発明の別の態様において、配列番号1に示される配列を有する核酸は、ペプチド鎖をコードする組換えDNAの3'側に作動可能に連結される。該核酸は、それが同一DNA鎖上かつ組換えDNAのセンスコーディング配列の3'側に配置される場合に、該組換えDNAの3'側に連結されているとみなしうるか；あるいは、それは、それが組換えDNAを含有する鎖の3'部分に相補的なDNA鎖上に配置される場合に、該組換えDNAの3'側に連結されているともまたみなしうる。こうした連結は、介在配列を伴わず直接、若しくは存在するいずれかの型の介在配列を伴う間接的でありうる。

40

【0031】

本発明の別の態様において、ペプチド鎖をコードする組換えDNAに作動可能に連結される、配列番号1、2、3、4、5、6、7若しくは8に示される配列を有する核酸を含んでなる単離されたDNAは、グルタミン合成酵素をコードする単離されたDNAをさらに含んでなる。グルタミン合成酵素をコードするこうしたDNAはいかなる生物体由来でもありうるが、但し、それらは宿主細胞のグルタミン代謝欠損を是正することが可能である。こうした代謝欠損を、本発明のDNAを含有する細胞の選択の基礎として使用し得る

50

。当業者が認識するであろうとおり、Lonza Biologics plc (英国スラウ) により供給される「GS発現系」が1種のこうしたグルタミン代謝欠損の選択および発現系である。本発明の一実施様式において、グルタミン合成酵素遺伝子はこの「GS発現系」由来である。

【0032】

本発明の別の態様において、配列番号1、2、3、4、5、6、7若しくは8に示される配列を有する核酸に作動可能に連結される組換えDNAは、抗体フラグメントであるペプチド鎖をコードする。こうした抗体フラグメントは、IgGアイソタイプ治療抗体からのHC若しくはLCフラグメント、またはFabのような他の治療抗体フラグメントでありうる。当業者は、本発明の範囲内にまたある診断抗体のような他の抗体からの他の抗体フラグメントを認識するであろう。

10

【0033】

本発明の別の態様において、配列番号1、2、3、4、5、6、7若しくは8に示される配列を有する核酸は、ペプチド鎖をコードする組換えDNAの5'側に作動可能に連結される。配列番号2に示される配列を有する核酸は、それが同一DNA鎖上かつ組換えDNAの5'側に配置される場合に、該組換えDNAの5'側に連結されているとみなしうるか；あるいは、該核酸は、それが組換えDNAを含有する鎖の5'部分に相補的なDNA鎖上に配置される場合に、該組換えDNAの5'側に連結されているともまたみなしうる。こうした連結は、介在配列を伴わず直接、若しくは存在するいずれかの型の介在配列を伴い間接的でありうる。

20

【0034】

本発明の別の局面は、ペプチド鎖をコードする組換えDNAに作動可能に連結される、配列番号1および配列番号2に示される配列を有する核酸を含んでなる単離されたDNAである。こうしたDNAは、該組換えDNAによりコードされるペプチド鎖の発現を増大させるのに使用しうる。組換えDNA、および本発明の範囲内の組換えDNAの特定の例は上に論考されている。

【0035】

本発明の一態様において、配列番号1および配列番号2に示される配列を有する核酸に作動可能に連結される組換えDNAはcDNAである。本発明の範囲内のcDNAは上述されている。

30

【0036】

本発明の別の態様において、配列番号1に示される配列を有する核酸は、該組換えDNAの3'側に作動可能に連結され、また、配列番号2、3、4、5、6、7若しくは8に示される配列を有する核酸は、ペプチド鎖をコードする組換えDNAの5'側に作動可能に連結される。組換えDNAの3'側の配列番号1に示される配列を有する核酸の作動可能な連結は上述されている。組換えDNAの5'側の配列番号2、3、4、5、6、7若しくは8に示される配列を有する核酸の作動可能な連結もまた上述されている。

【0037】

本発明の別の態様において、ペプチド鎖をコードする組換えDNAに作動可能に連結される、配列番号1および配列番号2に示される配列を有する核酸を含んでなる単離されたDNAは、グルタミン合成酵素をコードする単離されたDNAをさらに含んでなる。グルタミン合成酵素をコードするこうしたDNAは上で記述かつ論考されている。上述されたとおり、本発明の一実施様式において、グルタミン合成酵素遺伝子は「GS発現系」由来である。

40

【0038】

本発明の別の態様において、配列番号1および配列番号2に示される配列を有する核酸に作動可能に連結される組換えDNAは、抗体フラグメントであるペプチド鎖をコードする。こうした抗体フラグメントおよびそれらの例は上述されている。

【0039】

本発明の別の局面は、真核生物細胞を提供する工程；配列番号1、2、3、4、5、6

50

、7若しくは8または配列番号1および配列番号2双方に示される配列を有する核酸を含んでなるDNAを細胞に導入する工程；ならびに、導入されたDNAがペプチド鎖をコードするDNAに作動可能に連結されている細胞を同定する工程を含んでなる、ペプチド鎖発現宿主細胞の製造方法である。

【0040】

本発明の方法で有用な真核生物細胞はいかなる起源のものでもありうる。例示的真核生物細胞は、ヒト、ならびにハツカネズミ (*Mus musculus*) (ハツカネズミ) およびモンゴルキヌゲネズミ (*Cricetulus griseus*) (チャイニーズハムスター) のようなげっ歯類起源のもの、または昆虫のような他の真核生物種の細胞でありうる。HEK-293細胞 (ATCC: CRL-1573^{T M}) はヒト由来細胞の一例である。CHO-K1 (ATCC: CRL-9618^{T M}) 細胞はチャイニーズハムスター由来細胞の一例である。Sp2/0細胞 (ATCC: CRL-1851^{T M}) はマウス系統BALB/c由来細胞の一例である。当業者は、本発明の方法で有用な他の真核生物細胞を認識するであろう。

10

【0041】

本発明の方法での使用のため提供される真核生物細胞は、単離された細胞若しくは細胞の一集団の一部でありうる。真核生物細胞のこうした集団はクローン性(均質)若しくは不均質でありうる。均質若しくは不均質な細胞の一集団の一部である真核生物細胞は、組織若しくは器官の一部でありうる。

【0042】

20

真核生物細胞は、既知組成培地若しくは血清含有培地のようないずれの適する培地中でも維持しうる。細胞は、フラスコ、バイオリアクター、ウェーブバッグ (wave bag) および他の容器のようないずれの適する培養系容器中でも培養しうる。当業者は、本発明の方法で有用な他の培地、培養系容器および関係する方法を認識するであろう。

【0043】

配列番号1、2、3、4、5、6、7若しくは8または配列番号1および配列番号2双方に示される配列を有する核酸を含んでなるDNAは、トランスフェクション、または、プラスミド、トランスポゾン、DNAウイルス若しくは別の融合パートナー細胞のような当業者に公知のベクターを使用するウイルス感染のような多数の多様な方法により細胞中に導入しうる。これらのDNAは、ベクターの使用を伴わない裸のDNAとしてもまた細胞に導入しうる。こうしたDNAは、ウイルス宿主細胞の内側で、配列番号1、2、3、4、5、6、7若しくは8または配列番号1および2に示される配列を有する核酸に逆転写され得る核酸配列を含有するRNAウイルスによってもまた細胞に導入しうる。トランスフェクション方法は例えばポフェクションおよび電気穿孔法を包含する。ウイルス感染方法は、例えば第二のウイルスによる感染を可能にするためのヘルパーウイルスの使用を包含する。ウイルスに基づくDNA導入方法は、単離された細胞または細胞の均質若しくは不均質な集団にDNAを導入するのに使用しうる。当業者は、細胞中にDNAを導入するための多くの他の方法およびベクターを認識するであろう。

30

【0044】

配列番号1、2、3、4、5、6、7若しくは8または配列番号1および2に示される配列を有する核酸に連結されるか、あるいはこれらのDNAとともに細胞に共導入されるマーカーを、これらのDNAが導入された細胞についてスクリーニングするのに使用し得る。こうしたマーカーは、特定のマーカー配列が導入された細胞を同定するのに使用し得るいずれの核酸配列でもあり得る。マーカーは、例えば、特定の遺伝子と関連する表現型を有する細胞を同定するのに使用し得る遺伝子でありうる。こうしたマーカーを、マーカー関連の表現型に基づく細胞のスクリーニング若しくは選択に使用しうる。薬剤耐性遺伝子は当該技術分野で公知であるマーカーの一分類である。代謝、温度感受性若しくは他の欠損を伴う細胞が生存することを可能にするレスキュー遺伝子は、別の分類のマーカーの一例である。マーカーは、特定の表現型の発現を転写レベルで制御する遺伝子でもまたあることができ；誘導可能なプロモーターはこの分類のマーカーの一例である。容易に検出

40

50

可能なポリペプチド、若しくはレクチンのような他の生体分子を発現する遺伝子は別の分類のマーカーである。ルシフェラーゼ若しくは蛍光タンパク質のような光を発射することが可能な抗体若しくはタンパク質をコードする遺伝子は、この分類のマーカーの例である。マーカーは、該核酸配列と関連する特定の表現型の非存在下でさえ、特定の配列が導入された細胞を同定するために使用し得る核酸配列でもまたありうる。当業者が認識するであろうとおり、こうしたマーカー配列に特異的なプライマーを用いるPCRを、この型のマーカーが導入された細胞を同定するのに使用し得る。当業者は、蛍光標示式細胞分取(FACS)のような細胞分取に基づく技術を使用して、マーカーを持つ細胞の同定を容易にしうることを認識するであろう。当業者は、他のマーカーおよび関係技術もまた認識するであろう。

10

【0045】

配列番号1、2、3、4、5、6、7若しくは8または配列番号1および配列番号2双方に示される配列を有する導入されたDNAがペプチド鎖をコードするDNAに作動可能に連結されている細胞の同定は、容易に達成し得る。これは、対照細胞によるペプチド鎖の発現を、配列番号1、2、3、4、5、6、7若しくは8または配列番号1および配列番号2に示される配列を有する核酸を含んでなるDNAの細胞への導入後の細胞中でのペプチド鎖発現レベルと比較することによりなし得る。配列番号1、2、3、4、5、6、7若しくは8または配列番号1および配列番号2に示される配列を有する核酸を含んでなるDNAは、こうしたDNAを受領する細胞中でのペプチド鎖発現が対照細胞に関して増大される場合に、ペプチド鎖をコードするDNAに作動可能に連結されている。この表現型は作動可能な連結を診断する。

20

【0046】

配列番号1、2、3、4、5、6、7若しくは8または配列番号1および配列番号2に示される配列を有する核酸を含んでなるDNAは、最低2種の異なる方法で、ペプチド鎖をコードするDNAに作動可能に連結されたようになることができる。作動可能な連結は、細胞への導入前に、配列番号1、2、3、4、5、6、7若しくは8または配列番号1および配列番号2に示される配列を有する核酸を含んでなるDNAを、作動可能な連結を生じることが既知の若しくは合理的にありそうなコンホメーションのペプチド鎖をコードするDNAに物理的に連結することにより遂げ得る。あるいは、作動可能な連結は、配列番号1、2、3、4、5、6、7若しくは8または配列番号1および配列番号2に示される配列を有する核酸を含んでなるDNAの細胞への導入後に遂げ得る。これは、これらのDNA間で作動可能な連結を生じるin vivo組換え事象を介して達成し得る。

30

【0047】

こうした組換え事象は、特定のDNA配列で起こるように標的を定め得るか、若しくは無作為なDNA配列で起こることを可能にし得る。組換え事象は、染色体若しくはオルガネラDNAのようなゲノムDNA、または染色体外で維持されるプラスミドDNA若しくは人工染色体のようなゲノム以外DNAを必要とし得る。組換え事象は、配列番号1、2、3、4、5、6、7若しくは8または配列番号1および配列番号2に示される配列を有する核酸を含んでなるDNAに加えて、標的DNAに同一の数キロ塩基の配列を含有する直鎖状DNAを使用することにより、特定のDNA配列で起こるように標的を定め得る。異種DNA配列を導入するために特定のDNA配列に組換え事象の標的を定めるための戦略および関連方法は当該技術分野で公知であり(例えばHarrisら、Exp. Cell Res. 253、523-532(1999)を参照されたい)、そして、トランスジェニック動物、細胞および細胞株の生成で慣例に使用される。無作為組換え事象は、標的DNA配列を欠く直鎖状DNAを導入すること、若しくは非直鎖状の環状プラスミドDNAを細胞に単に導入することにより発生し得る。当業者は、DNA間で作動可能な連結を生じるin vivo組換え事象を達成するための他の方法および戦略を認識するであろう。

40

【0048】

本発明の別の局面は、真核生物細胞を提供する工程；ならびに、ペプチド鎖をコードす

50

るDNAに作動可能に連結される配列番号1、2、3、4、5、6、7若しくは8または配列番号1および配列番号2双方に示される配列を有する核酸を含んでなるDNAを細胞に導入する工程を含んでなる、ペプチド鎖発現宿主細胞の製造方法である。真核生物細胞は上述されたとおりでありうる。本発明の本局面において、作動可能な連結は、細胞への導入前に、配列番号1、2、3、4、5、6、7若しくは8または配列番号1および配列番号2に示される配列を有する核酸を含んでなるDNAを、作動可能な連結を生じることが既知若しくは合理的にありそうなコンホメーションのペプチド鎖をコードするDNAに物理的に連結することにより遂げられる。

【0049】

本発明の別の局面は、配列番号1、2、3、4、5、6、7若しくは8または配列番号1および配列番号2に示される配列を有する核酸を含んでなる真核生物細胞を提供する工程；ペプチド鎖をコードするDNAを該細胞に導入する工程；ならびに、導入されたDNAが配列番号1、2、3、4、5、6、7若しくは8または配列番号1および配列番号2に示される配列を有する核酸に作動可能に連結されている細胞を同定する工程を含んでなる、ペプチド鎖発現宿主細胞の製造方法である。配列番号1、2、3、4、5、6、7若しくは8または配列番号1および2に示される配列を有する核酸を含有する細胞は、PCRに基づく技術、蛍光in situハイブリダイゼーション(FISH)、若しくはサザンブロッティングのような当該技術分野で公知の他のハイブリダイゼーションに基づく技術により容易に同定し得る。核酸配列決定とともにの分子クローニング技術もまた、これらの配列を含有する細胞を同定するのに使用し得る。

【0050】

本発明の本局面において、ペプチド鎖をコードするDNAは、上で論考された方法若しくは当該技術分野で公知の他の方法のいずれかにより細胞に導入しうる。こうした導入されたDNAは、これらのDNA間で作動可能な連結を生じるin vivo組換え事象を介して、配列番号1、2、3、4、5、6、7若しくは8または配列番号1および配列番号2に示される配列を有する核酸に作動可能に連結されたようになり得る。こうした組換え事象は特定のDNA配列で発生するよう標的を定め得るか、若しくは無作為のDNA配列で発生することを可能にし得る。

【0051】

本発明の別の態様は、本発明の方法により製造される細胞である、本発明のなお別の態様は、本発明の方法により製造される細胞を培養することを含んでなるペプチド鎖の製造方法である。

【0052】

本発明は今や、以下の特定の制限しない実施例を参照して記述されることができる。

【実施例1】

【0053】

C128D細胞で高度に発現される2種の組換え遺伝子に隣接する染色体DNA配列の単離

C128D細胞株は、ヒト/マウスキメラ抗体全体の発現を可能にするように2種の組換えDNA構築物で安定にトランスフェクトされているSp2/0ハツカネズミ(Mus musculus)系統BALB/c骨髓腫由来細胞株である。第一の構築物はヒトG1定常領域とともにマウス抗CD4 HC可変領域をコードした。第二の構築物はヒト定常領域とともにマウス抗CD4 LC可変領域をコードした。C128D細胞中で、HおよびL鎖ポリペプチドは極めて高レベル(消費済み(spent)振とうフラスコ中158mg/L；灌流バイオリアクター中1g/L/日)で発現された。加えて、最低1コピーのLC遺伝子および最低1コピーのHC遺伝子構築物が、C128D細胞株のゲノムDNA中に相互にすぐ隣接して組込んでいる。図1を参照されたい。

【0054】

C128D細胞株で組換えHCおよびLC遺伝子に隣接するゲノム領域を、標準的ライゲーション媒介性PCR技術によりクローン化した。257bpのLC遺伝子組込み部位

10

20

30

40

50

の3'側に隣接するマウスゲノム配列をクローン化した。226bpのHC遺伝子組込み部位の5'側に隣接するマウスゲノム配列もまたクローン化した。図1および2を参照されたい。

【0055】

BLASTN分析は、該257bpのフラグメントが、受託番号CAAA01122220.1を有するハツカネズミ(Mus musculus)系統C57BL/6Jゲノムの染色体6の一部分に一致したことを示した。BLASTN分析は、226bpのフラグメントが、受託番号CAAA01060907を有するハツカネズミ(Mus musculus)系統C57BL/6Jの染色体12の一部分に一致したこともまた示した。全BLASTN分析は、フィルタリングをオフにしてデフォルトの設定を使用して実施した。蛍光in situハイブリダイゼーション(FISH)分析は、染色体トランスロケーションが、高発現C128D細胞株でHCおよびLC組込みの部位で相互に隣接するマウス染色体6およびマウス染色体12の一片をもたらしたことを示した。

10

【0056】

標準的PCR技術をその後使用して、組換え遺伝子組込み部位に隣接する4152bpの染色体6DNA(6R;配列番号1)、およびトランスロケーションの非存在下で該組込み部位に隣接していたとみられるおよそ4900bpのDNA(6L)を別個にクローン化した。6Rおよび6L双方のPCRクローニングのためのプライマーを設計するのに、受託番号CAAA01122220.1を部分的に使用した。

【0057】

クローン化した6R配列(配列番号1)は、受託番号CAAA01122220.1の4152bpの部分に対する99%の同一性を有した。受託番号CAAA01122220.1は、染色体6の12538bpを含有するハツカネズミ(Mus musculus)C57BL/6J系統のゲノムショットガン集成コンティグ全体である。クローン化した6Rおよび6Lフラグメントに対応する受託番号CAAA01122220.1の部分は、遺伝子発現を増大させることが可能なDNA配列を含有することは報告されていない。

20

【0058】

標準的PCR技術を、組換え遺伝子組込み部位に隣接する2304bpの染色体12DNA(12R;配列番号2)、およびトランスロケーションの非存在下で該組換え遺伝子組込み部位に隣接していたとみられるおよそ1500bpのDNA(12L)をクローン化するのにもまた使用した。12Rおよび12L双方のPCRクローニングのためのプライマーを設計するために、受託番号CAAA01060907を部分的に使用した。

30

【0059】

クローン化した12R配列(配列番号2)は、受託番号CAAA01060907の4152bpの部分に対する99%の同一性を有した。受託番号CAAA01060907は、染色体6の18296bpを含有するハツカネズミ(Mus musculus)C57BL/6J系統のゲノムショットガン集成コンティグ全体である。クローン化した6Rおよび6Lフラグメントに対応する受託番号CAAA01122220.1の部分は、遺伝子発現を増大させることが可能なDNA配列を含有することは報告されていない。

40

【0060】

6Lおよび12LのPCRクローニング、ならびにFISHデータは、C128D細胞が組換え遺伝子組込みの部位に6Lおよび12L DNAを含有しないことを示したが、しかしこれらの要素はC128D細胞のDNAの別の場所に存在した。重要なことに、FISHおよびPCR分析により生成されるデータは、C128D細胞中での組換え遺伝子組込みの部位のDNA要素の順序が5'-12R-HC-LC-6R-3'であったことを示した(図1を参照されたい)。これらのデータは、6Lおよび12L DNAがC128D細胞中の増大された組換え遺伝子発現に寄与しないことを示す。

【実施例2】

【0061】

50

6 Rおよび12 R DNAは、安定にトランスフェクトした真核生物細胞中の組換えレポーター遺伝子発現を増大する

緑色蛍光タンパク質 (GFP) レポーター遺伝子に連結された6 R、6 L、12 Rおよび12 L DNAを含有するベクター構築物を、組換え遺伝子発現を増大させる要素の同定を容易にするために作成した。全ベクターは標準的分子生物学的技術を使用して構築し、そしてプラスミド地図を全部図6に示す。

【0062】

p2106-DVBase-ZsGreen (DV-BASE) ベクターは、スナギンチャク (*Zoanthus* sp.) のサンゴ由来のZsGreen GFPレポーター遺伝子 (Matzら、*Nature Biotechnology*、17、969-973 (1999) をコードするcDNAを含有する。DV-BASE中のレポーター遺伝子は、6 R、6 L、12 R若しくは12 L DNAに連結されていない。p2106-DV6-ZsGreen (DV-6) ベクター中では、6 L DNAがGFPレポーター遺伝子の5'側に連結され、また、6 R DNAがGFP遺伝子の3'側に連結されている。p2106-DV12-ZsGreen (DV-12) ベクター中では、12 R DNAがGFPレポーター遺伝子の3'側に連結され、また、12 L DNAがGFP遺伝子の5'側に連結されている。p2106-DV6/12Hyb-ZsGreen (DV-6/12) ベクターでは、12 R DNAがGFPレポーター遺伝子の5'側に連結され、また、6 R DNAがGFP遺伝子の3'側に連結されている。DV-6/12は、C128D細胞に見出される6 Rおよび12 RのDNA要素の5'-12 R-組換え遺伝子-6 R-3'型の配置を表す。C128D細胞は組換え遺伝子組込みの部位に6 Lおよび12 L DNAを含有しない。DV-6、DV-12およびDV-6/12ベクターは、それ以外はDV-BASEベクターに同一である。

【0063】

CHOK1-SV若しくはHEK-293細胞を、DV-BASE、DV-6、DV-12若しくはDV-6/12ベクターで安定にトランスフェクトした。6 R、6 L、12 Rおよび12 L隣接DNAがGFP発現を増大させたかどうかを決定するために、その後GFP発現を評価した。CHOK1-SV細胞はチャイニーズハムスター卵巣細胞由来である。HEK-293細胞はヒト腎細胞由来である。安定なトランスフェクタントを、バルク培養物 (bulk culture) 中で400 µg/mlのG418を含有する培地中での増殖について選択し、そして限界希釈により96ウェルプレートにサブクローニングした。HEK-293細胞はFreestyle 293発現培地 (カタログ番号12338-018、Invitrogen, Corp. カリフォルニア州カールズバッド) 中で培養した。CHOK1-SV細胞は、標準的細胞培養技術を使用し、5% CO₂ 雰囲気中37 °CでDMEM+10% FBS+6 mMグルタミン中で培養した。

【0064】

図3および4に示されるデータは、6 Rおよび12 R DNAがGFPレポーター遺伝子に連結されているベクターで安定にトランスフェクトしたCHOK1-SV細胞中で、GFP発現が対照に関して増大されることを示す。GFP発現を評価するため、DV-BASE、DV-6、DV-12若しくはDV-6/12で安定にトランスフェクトしたCHOK1-SV細胞のバルク集団で、標準的方法および器具類を使用するフローサイトメトリー分析を実施した。このフローサイトメトリー分析は、DV-BASEでトランスフェクトした細胞に関して、6 Rおよび12 R DNAをGFPレポーター遺伝子に連結することにより、DV-6、DV-12若しくはDV-6/12でトランスフェクトしたCHOK1-SV細胞中でGFP発現の中央値がおよそ2ないし3倍増大したことを示した。

【0065】

個々の安定にトランスフェクトしたCHOK1-SV由来細胞をその後、標準的方法を使用して単離し、そして生じるクローン集団を96ウェルプレートで培養した。安定にトランスフェクトした細胞のそれぞれ独立に派生したクローン集団で蛍光画像化分析を実施

し、そして集団をGFP発現の順序で等級付けした(図4)。この分析は、再度、6Rおよび12R DNAをGFPレポーター遺伝子に連結することにより、DV-6、DV-12若しくはDV-6/12でトランスフェクトしたCHO K1-SV細胞中でGFP発現がおよそ2ないし3倍増大したことを示した。蛍光画像化分析は標準的方法および器具類を使用して実施した。

【0066】

図5のデータは、GFP発現が、6Rおよび12R DNAがGFPレポーター遺伝子に連結されているベクターで安定にトランスフェクトしたHEK-293細胞中で対照に関してまた増大されることを示す。フローサイトメトリー分析は、DV-BASEでトランスフェクトした細胞に関して、6Rおよび12R DNAをGFPレポーター遺伝子に連結することにより、DV-6、DV-12若しくはDV-6/12でトランスフェクトしたHEK-293細胞中でGFP発現の中央値がおよそ2ないし4倍増大したことを示した。細胞のバルク集団でのフローサイトメトリー分析は上述されたとおり実施した。

【0067】

一緒に、これらの結果は、6Rおよび12R DNAが、多様な種および組織由来の真核生物細胞での組換え遺伝子発現を増大させ得ることを示す。

【実施例3】

【0068】

6Rおよび12R DNAは、安定にトランスフェクトしたヒト細胞中の組換え抗体遺伝子発現を増大させる

IL-6に対するヒトIgG1K抗体をコードするHCおよびLC遺伝子に連結した6Rおよび12R DNAを含有するベクター構築物を作成した。1構築物はp2106-DVBase-Antibody(DV-BASE-Ab)であった。DV-BASE-Abは、GFPレポーター遺伝子が抗体HC遺伝子で置換されかつLC遺伝子が該ベクターに存在するウサギ グロビンイントロンII要素に対し5'に挿入されたことを除き、p2106-DVBASE-ZsGreen(図6に示される)に本質的に同一である。第二の構築物はp2106-DV6/12Hyb-Antibody(DV6/12-Ab)であった。DV6/12-Abは、GFPレポーター遺伝子がHC遺伝子で置換されかつLC遺伝子が該ベクターに存在するウサギ グロビンイントロンII要素に対し5'に挿入されたことを除き、p2106-DV6/12Hyb-ZsGreen(図6に示される)に本質的に同一である。DV6/12-Ab中で、12R DNAはHC遺伝子の5'側に連結され、また、6R DNAはLC遺伝子の3'側に連結される。DV6/12は、C128D細胞中に見出される6Rおよび12R DNA要素の配置を表す。全ベクターは標準的分子生物学技術を使用して構築した。

【0069】

HEK-293細胞をDV-BASE-AbおよびDV-6/12-Abで安定にトランスフェクトした。安定なトランスフェクタントのバルク集団および生じるクローン集団での抗体発現を、6Rおよび12R隣接DNAが組換え抗体遺伝子発現を増大させたかどうかを決定するために評価した。安定なトランスフェクタントを、上の実施例2に記述されるとおり選択し、培養しかつサブクロニングした。培地中の抗体力価は標準的方法を使用して測定した。比生産性(細胞あたりに基づく抗体分泌の速度の尺度)もまた、標準的方法を使用して決定した。

【0070】

組換え抗体遺伝子発現は、DV-6/12-Abで安定にトランスフェクトしたHEK-293細胞中で対照に関して増大される(図7および表1)。DV-6/12-Abでトランスフェクトした細胞のバルク細胞集団で、培養22日後の抗体濃度は、DV-BASE-Abでトランスフェクトした細胞に関して数倍増大した(図7)。抗体発現の速度もまた、DV-6/12-Abでトランスフェクトした細胞のバルク集団で、DV-BASE-Abでトランスフェクト細胞に関しておよそ2.6倍増大した(表1)。

【0071】

【表 1】

表1: p2106-DVBase-Antibody若しくはp2106-DV6/12Hyb-Antibodyで安定にトランスフェクトしたHEK-293細胞の集団による治療抗体発現の力価および比生産性分析。

| 発現プラスミド | 治療抗体力価 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) | 治療抗体比生産性 ($\text{pg}/\text{細胞}/\text{日}$) |
|--------------------------|---------------------------------------|--|
| P2106-DVBase-Antibody | 17 | 1.1 |
| p2106-DV6/12Hyb-Antibody | 47 | 2.9 |
| | 増加倍数 : 2.8 | 増加倍数 : 2.6 |

10

【0072】

個々のDV-6/12-AbおよびDV-Base-Abで安定にトランスフェクトしたHEK-293由来細胞をその後、標準的方法を使用して単離し、そして生じるクローン集団を96ウェルプレートで培養した。各ウェル中の抗体力価を、安定にトランスフェクトした細胞の各独立に派生したクローン集団について決定し、そして集団をAb発現の順序で等級付けした(図7)。この分析は、再度、6Rおよび12R DNAをGFPLポーター遺伝子に連結することにより、DV6/12-AbでトランスフェクトしたHEK-293細胞中でAb発現が数倍増大したことを示した(図7)。

20

【0073】

上の実施例のデータと一緒にすれば、これらの結果は、6Rおよび12R DNAが、本質的に異なる型のタンパク質をコードする組換え遺伝子の発現を増大し得ることを示す。さらに、これらの結果は、組換え遺伝子発現を増大させる6Rおよび12R DNAの能力が、特定のレポーター、抗体若しくは他の組換え遺伝子に制限されないようであることを示す。

【実施例4】

【0074】

12R DNAは、安定にトランスフェクトした真核生物細胞中の組換え抗体遺伝子発現を増大させ得る

30

組織因子に対するヒト抗体をコードするHおよびL鎖遺伝子に連結された6Rおよび12R DNAを含有するベクター構築物を、示されるとおり作成した(プラスミド地図を図9に示す)。全ベクターは標準的分子生物学技術を使用して構築した。

【0075】

pDG-GS構築物中で、治療抗体LCをコードする遺伝子は同一抗体のHCをコードする遺伝子に対し5'に配置した。第二の構築物pDG-GS-12Rは、12R DNAがLC遺伝子の5'側に配置されることを除きpDG-GSに本質的に同一である(図9)。第三の構築物pDG-GS-6R/12Rは、6R DNAがHC遺伝子の3'側に配置されることを除きpDG-GS-12Rに同一である(図9)。全ベクターはグルタミン合成酵素(GS)選択マーカ含有する。

40

【0076】

CHOK1-SV細胞を各構築物でトランスフェクトし、そして、安定なトランスフェクタントを、50 μM メチオニンスルホキシミン(MSX)を含有するDMEM+10% FBS+6 mMグルタミン中での増殖および抗体産生について選択した。安定なトランスフェクタントを、上の実施例2に記述されたとおりサブクロニングした。培地中の抗体力価は、標準的方法を使用して測定した。

【0077】

個々のpDG-GS、pDG-GS-12R若しくはpDG-GS-6R/12Rで安定にトランスフェクトしたCHOK1-SV由来細胞を、標準的方法を使用して単離し、

50

そして生じるクローン集団を96ウェルプレートで培養した。各ウェル中の抗体力価を、安定にトランスフェクトした細胞の各独立に派生したクローン集団について決定し、そして、最高のAbレベルを産生する15個のクローン集団を抗体発現の順序で等級付けした。

【0078】

図8に示すデータは、pDG-GS-12RおよびpDG-GS-6R/12Rでトランスフェクトした細胞中の組換え抗体遺伝子発現および分泌速度が、対照のpDG-GSでトランスフェクトした細胞に関して増大されたことを示す。この分析は、12R DNA単独が対照に関して抗体発現を増大し得ることを示す。

【実施例5】

【0079】

6R DNAは、安定にトランスフェクトした真核生物細胞中の組換え抗体遺伝子発現を増大し得る

IL-6に対するマウス可変/ヒト定常キメラ抗体をコードするHCおよびLC遺伝子に連結した6R DNAを含有するベクター構築物を、示されるとおり作成した(プラスミド地図を図11に示す)。全ベクターは標準的分子生物学技術を使用して構築した。

【0080】

p2299-HC-Ab構築物はHCをコードするcDNAを含有する。第二の構築物p2299-LC-AbはLCをコードするcDNAを含有する。第三の構築物p2299-HC-Ab-6Rは、単一の6R DNA要素がHC遺伝子の3'側に配置されることを除き、p2299-HC-Abに本質的に同一である(図11)。第四の構築物p2299-LC-Ab-6Rは、単一の6R DNA要素がLC遺伝子の3'側に配置されることを除き、p2299-LC-Abに本質的に同一である(図11)。追加の6R要素がトランスフェクションの間にトランスで提供される。全ベクターは、グアニン-ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ(GPT)選択マーカを含有する。

【0081】

C884C細胞を、p2299-HC-Abおよびp2299-LC-Ab若しくはp2299-HC-Ab-6R、p2299-LC-Ab-6R、ならびにいずれかの他のDNAに連結されない直鎖状6R DNAいずれかでコトランスフェクトした。C884C細胞は、既知組成培地中での増殖について適合されたNS/0由来細胞株である。該NS/0細胞株はハツカネズミ(*Mus musculus*)(マウス)骨髓腫細胞株である。安定なトランスフェクタントを、1×MHX(1mlあたり10μgのミコフェノール酸、15μgのヒポキサンチンおよび25μgのキサンチン)、8mMのL-グルタミンならびに1g/Lの重炭酸ナトリウムを含有するCD-ハイブリドーマタンパク質を含まない既知組成培地(カタログ番号11279-023、Invitrogen Corp.)、若しくはGPT選択培地中での増殖、ならびに抗体産生について選択した。安定なトランスフェクタントは上の実施例2で記述されたとおりサブクローニングした。培地中の抗体力価は標準的方法を使用して測定した。

【0082】

個々のp2299-HC-Ab/p2299-LC-Ab若しくはp2299-HC-Ab-6R/p2299-LC-Ab-6R/6Rで安定にトランスフェクトした細胞を、標準的方法を使用して単離し、そして生じる初代クローン集団を24ウェルプレートで培養した。二次クローンをその後、さらなるGPT選択後に初代クローンから単離し、そして24ウェルプレートで培養した。初代(データは表2に示される)若しくは二次クローン(データは表3に示される)の独立に派生した集団を含有する各ウェル中の抗体力価を測定し、そして最高のAbレベルを産生するクローンからの力価を表にした。

【0083】

10

20

30

40

【表 2】

表2: p2299-HC-Abおよびp2299-LC-Ab(対照)若しくはp2299-HC-Ab-6R、p2299-LC-Ab-6R、ならびにいずれかの他のDNAに連結されない直鎖状6R DNA(6R-6R)で安定にコトランスフェクトしたC884C細胞の初代クローン集団による抗体発現の力価分析。

| コトランスフェクトした DNAs | 抗体力価 (μg/ml) | |
|------------------|---------------------|----------------|
| | 24 ウェルプレート 懸濁培養物 | 振とうフラスコ 懸濁液 |
| 対照 | 64 | 55 |
| 6R-6R | 151 | 168 |
| | 増加倍数 : 2.4 | 増加倍数 : 3.1 |

10

【 0 0 8 4 】

【表 3】

表3: p2299-HC-Abおよびp2299-LC-Ab(対照)若しくはp2299-HC-Ab-6R、p2299-LC-Ab-6R、ならびにいずれかの他のDNAに連結されない直鎖状6R DNA(6R-6R)で安定にコトランスフェクトしたC884C細胞の二次クローン集団による抗体発現の力価分析。

| コトランスフェクトした DNAs | 抗体力価 (μg/ml) | |
|------------------|--------------------------|---|
| | 既知組成培地中の 24ウェルプレート培養物 | ダイズ抽出物を補充した 既知組成培地中の 24ウェルプレート培養物 |
| 対照 | 151 | 271 |
| 6R-6R | 282 | 457 |
| | 増加倍数 : 1.87 | 増加倍数 : 1.69 |

20

30

【 0 0 8 5 】

表2および3に示されるデータは、p2299-HC-Ab-6R/p2299-LC-Ab-6R/6Rで安定にコトランスフェクトした細胞中の組換え抗体遺伝子発現が、対照のp2299-HC-Ab/p2299-LC-Abでトランスフェクトした細胞に関しておよそ2ないし3倍増大されたことを示す。これらの結果は、抗体をコードする組換え遺伝子に6R DNA単独を連結することが、12R DNAからのいかなる寄与も伴わずに対照に関して抗体発現および分泌速度を増大し得ることを示す。

【実施例 6】

【 0 0 8 6 】

12R DNAおよびそのフラグメントの核マトリックス結合活性

図10に示されるデータは、12R DNAおよびそのフラグメントが核マトリックス結合活性を有することを示す。核マトリックス結合活性は、マトリックス付着領域(MAR)を含んでなるDNAと一般に関連する。MARは、転写エンハンサーおよび障壁型インスレーターDNA要素としばしば緊密に関連しかつ頻繁にそれらに隣接する。「障壁型インスレーター」は、隣接する凝縮クロマチンがそれ以外は転写的に活性の遺伝子の遺伝子座に侵食しかつ抑制することを予防する障壁として作用することにより、遺伝子発現を増大させ得る。

【 0 0 8 7 】

核マトリックスは、真核生物細胞の核から調製される染色体外の生化学的画分である。

40

50

顕微鏡技術を使用して見る場合、核マトリックスは、核膜およびゲノムDNAのループと会合した線維顆粒状(fibrogular)構造の広範囲に分枝した網として見える。DNAのこれらのループは凝縮し、クロマチンと会合し、そしておそらくは転写的に抑制若しくは拡大されかつおそらくは転写的に活性でありうる。

【0088】

C463A Sp2/0マウス骨髓腫細胞からの核マトリックスを調製し、そして、核マトリックス結合アッセイを、MAR要素を含有するDNAを同定するためのYusufzaiとFelsenfeldの方法(YusufzaiとFelsenfeld、Proc Natl Acad Sci U.S.A.、101:8620-8624(2004))を使用して実施した。6Rおよび12R DNAをこれらの実験のため蛍光標識した。A(配列番号3)、B(配列番号4)、C(配列番号5)、D(配列番号6)、E(配列番号7)およびF(配列番号8)と称される12Rの制限フラグメントもまた調製し、そして標準的方法を使用して蛍光標識した。MARを含有することが既知のIgHイントロンエンハンサー要素を含有する真核生物DNAもまた放射標識し、そして陽性対照として使用した。

【0089】

蛍光標識したDNAをその後核マトリックスとインキュベートした。核マトリックス、およびいかなる会合したDNAも高速遠心分離によりペレットにした。マトリックス会合領域を含有する共沈殿したDNAをその後、プロテイナーゼK消化、次いで標準的フェノール/クロロホルム抽出およびエタノール沈殿により核マトリクスタンパク質から分離した。沈殿したDNAペレットをその後緩衝液に再懸濁し、そして1.2%アガロースゲル上で分離しかつ蛍光バンドを定量した。

【0090】

図11に示される核マトリックス結合アッセイのデータは、12R DNA、ならびに12RのAおよびCフラグメントが、転写エンハンサーおよび障壁型インスレーターDNA要素に典型的に隣接するMAR DNA要素を含有することをはっきりと示す。この結果は、MARに隣接する配列はしばしば転写的に活性でありかつ遺伝子発現で重要な役割を演じているため、AおよびCフラグメントに隣接するBおよびDフラグメントもまた遺伝子発現に重要でありうることもまた示唆する。加えて、これらのデータは、AおよびCフラグメントを含有するMARを包含するより大きなEおよびFフラグメントが遺伝子発現で重要な役割を演じているかもしれないことを示唆する。一緒に、これらの結果は、12R、制限フラグメントA、制限フラグメントB、制限フラグメントC、制限フラグメントD、制限フラグメントEおよび制限フラグメントFが、遺伝子発現で重要な中核DNA要素を含有することを示す。これらの中核DNA要素は、これらの要素が連結されている遺伝子の転写および究極的には発現を増大させるためのエンハンサー若しくは障壁型インスレーターとして機能するか、または他の方法で遺伝子発現を調節するよう機能することが可能でありうる。

【実施例7】

【0091】

組換え遺伝子発現を増大させる中核6Rおよび12R DNA要素の同定

組換え遺伝子発現を増大させかつ6Rおよび12R DNA中に存在する中核DNA要素は容易に同定し得る。最初に、6Rおよび12R DNAのフラグメントを生成しかつサブクローニングすることができる。6Rおよび12R DNAフラグメントは制限酵素消化若しくはPCRのような技術を使用して生成し得る。こうしたフラグメントは、いずれかの大きさの5'、3'若しくは内部に配置された欠失をもつ6Rおよび12R DNAを包含しうる。フラグメントは、5'、3'若しくは内部的に配置された挿入若しくは置換をもつ6Rおよび12R DNAもまた包含しうる。必要な場合は、当業者に公知の技術を使用して、制限フラグメントのようなフラグメントから5'若しくは3' DNAオーバーハングを排除し得る。

【0092】

個々のサブクローニングした6Rおよび12R DNAフラグメントをその後、核酸構築物中でレポーター遺伝子に連結することができる。上述されたp2106-DVBase-ZsGreen(DV-BASE)は、6Rおよび12R DNAフラグメントをレポーター遺伝子に連結し得る核酸構築物の一例である。フラグメントは、単独若しくは組合せで、いずれの方向でもレポーター遺伝子に対し5'若しくは3'で連結することができ、また、位置の効果を取り扱うためにレポーター遺伝子から変動する距離に挿入しうる。レポーター遺伝子はタンパク質を発現するいかなる遺伝子でもありうる。

【0093】

6R若しくは12R DNAフラグメントを含有するレポーター核酸構築物、およびこれらのフラグメントを欠く親構築物からのレポーター遺伝子発現をその後測定することができる。レポーター核酸構築物からの遺伝子発現は、例えば適切な細胞を該構築物でトランスフェクトすることにより*in vivo*で達成し得る。p2106-DVBase-ZsGreen(DV-BASE)型構築物を使用する場合、CHOK1-SV細胞をトランスフェクトし得る。安定なトランスフェクタントが、組換え遺伝子発現を増大する中核6Rおよび12R DNA要素の同定に最も適することができるが、しかし一過性トランスフェクションもまた適切でありうる。

【0094】

レポーター遺伝子の発現をその後、レポーター遺伝子にコードされるタンパク質の発現若しくは活性をアッセイすることによりモニターしうる。p2106-DVBase-ZsGreen(DV-BASE)型構築物については、標準的な蛍光に基づくアッセイを使用してGFP発現をモニターし得る。いくつかの例では、レポーター遺伝子転写物レベルをアッセイすることができ、そして、レポーター遺伝子タンパク質発現の代用品として使用しうる。

【0095】

レポーター遺伝子発現を増大させることが可能な中核要素を含有する6Rおよび12R DNAフラグメントは、これらのフラグメントを欠く親レポーター核酸構築物より高レベルの発現を生じることができる。こうした中核DNA要素を、本明細書に記述される組成物、方法および細胞で配列番号1若しくは配列番号2と互換性に使用しうる。こうした中核要素は、多様な異なる機構により発現を増大させることができ、そして、例えば転写エンハンサー要素若しくは障壁型インスレーター要素でありうる。

【0096】

本発明は今や完全に記述されたので、付随する請求の範囲の技術思想若しくは範囲から離れることなくそれに対し多くの変更および改変がなされ得ることが当業者に明らかであろう。

【図面の簡単な説明】

【0097】

【図1】C128D細胞中のH鎖およびL鎖組換え部位に隣接する257bpおよび226bpのDNAを単離するのに使用したPCRに基づくクローニング戦略を示す。

【図2】C128D細胞からポリヌクレオチド6R(配列番号1)、6L、12R(配列番号2)および12Lを単離するのに使用したPCRに基づくクローニング戦略を示す。

【図3】プラスミドp2106-DVBase-ZsGreen、p2106-DV6-ZsGreen、p2106-DV12-ZsGreen若しくはp2106-DV6/12Hyb-ZsGreenで安定にトランスフェクトしたCHOK1-SV細胞の集団による緑色蛍光タンパク質発現のフローサイトメトリー分析を示す。

【図4】プラスミドp2106-DVBase-ZsGreen、p2106-DV6-ZsGreen、p2106-DV12-ZsGreen若しくはp2106-DV6/12Hyb-ZsGreenで安定にトランスフェクトした個々のCHOK1-SV細胞による緑色蛍光タンパク質発現の蛍光画像化分析を示す。

【図5】プラスミドp2106-DVBase-Antibody、p2106-DV6-Antibody、p2106-DV12-Antibody若しくはp2106-D

10

20

30

40

50

V6/12Hyb - Antibodyで安定にトランスフェクトしたHEK-293細胞の集団による治療抗体発現のフローサイトメトリー分析を示す。

【図6】プラスミドp2106-DVBase-ZsGreen、p2106-DV6-ZsGreen、p2106-DV12-ZsGreenおよびp2106-DV6/12Hyb-ZsGreenのベクター地図を示す。

【図7】プラスミドp2106-DVBase-Antibody若しくはp2106-DV6-Antibodyで安定にトランスフェクトした個々のHEK-293細胞による治療抗体発現の抗体力価分析を示す。

【図8】プラスミドpDG-GS、pDG-GS-12R若しくはpDG-GS-6R/12Rで安定にトランスフェクトした個々のHEK-293細胞の抗体力価分析を示す。

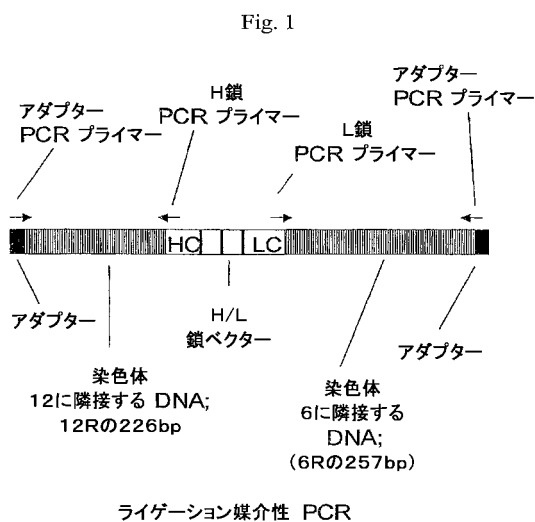
【図9】プラスミドpDG-GS、pDG-GS-12RおよびpDG-GS-6R/12Rのベクター地図を示す。

【図10】12R DNA、ならびにA（配列番号3）、B（配列番号4）、C（配列番号5）、D（配列番号6）、E（配列番号7）およびF（配列番号8）と称されるそのフラグメントの核マトリックス結合活性を示す。

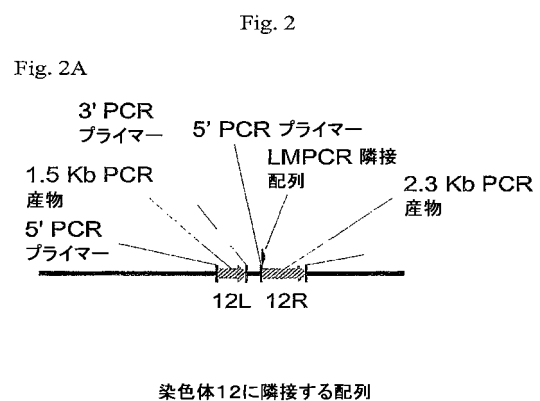
【図11】プラスミドp2299-HC-Ab-6Rおよびp2299-LC-Ab-6Rのベクター地図を示す。

10

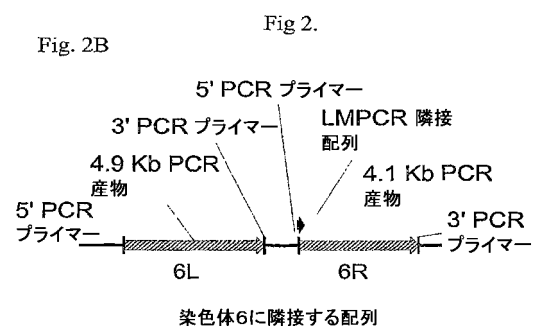
【図1】



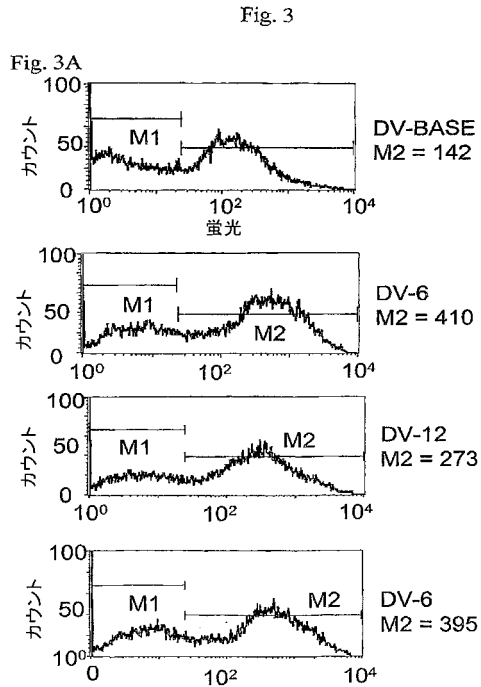
【図2A】



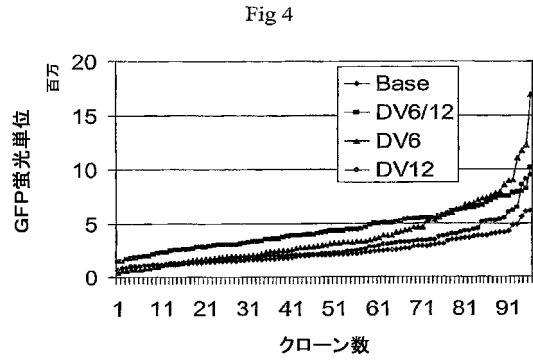
【図2B】



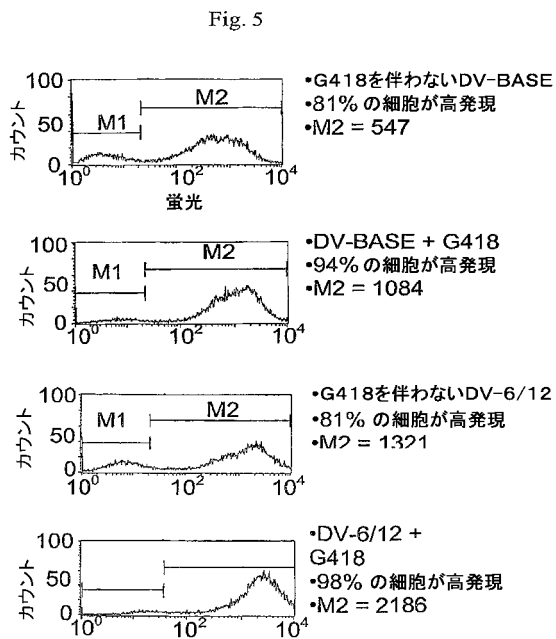
【図 3】



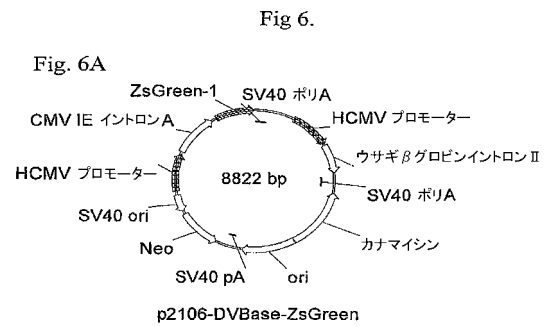
【図 4】



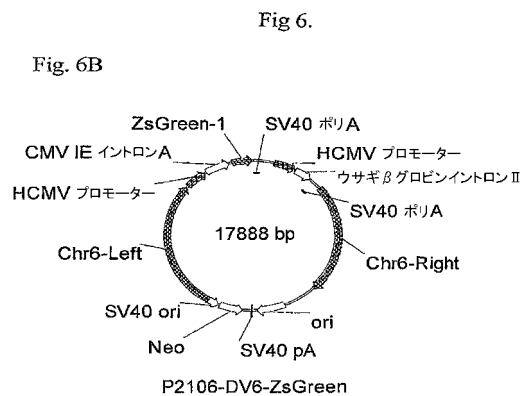
【図 5】



【図 6 A】



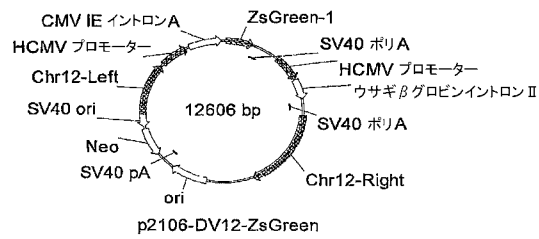
【図 6 B】



【図 6 C】

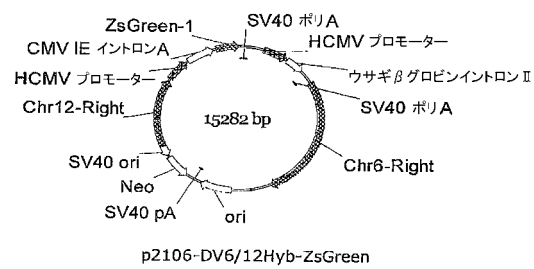
Fig. 6.

Fig. 6C



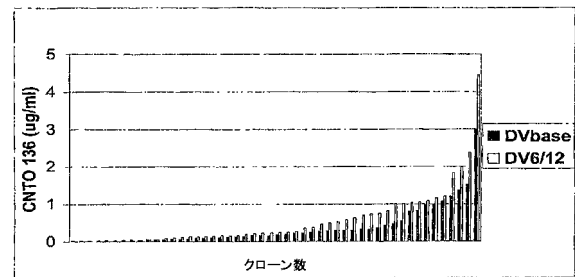
【図 6 D】

Fig. 6D



【図 7】

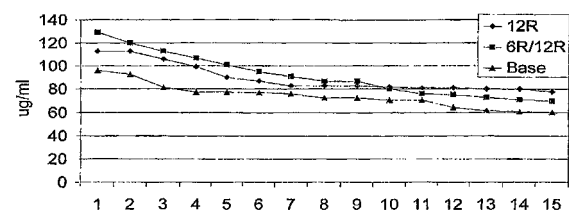
Fig. 7



【図 8】

Fig. 8

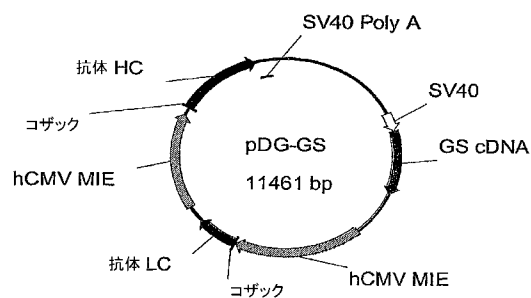
上位15クローン-24ウェルで消費された力価
(240個の96ウェルプレートからのBaseの上位クローン)
(各30個の96ウェルプレートからの12Rおよび6R/12Rの上位クローン)



【図 9 A】

Fig. 9

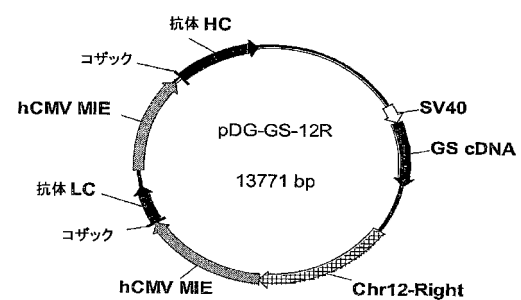
Fig. 9A



【図 9 B】

Fig. 9

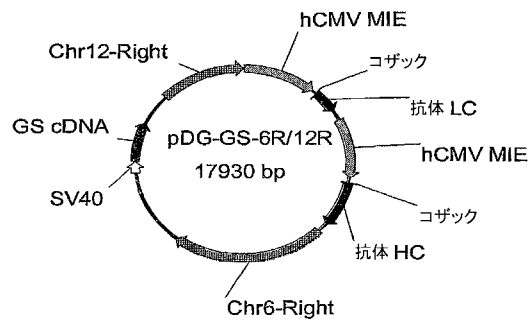
Fig. 9B



【図 9 C】

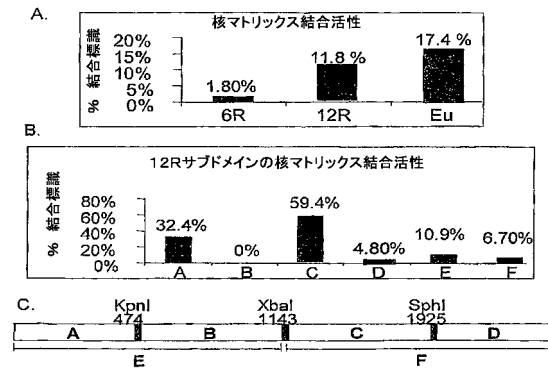
Fig. 9

Fig. 9C



【図 10】

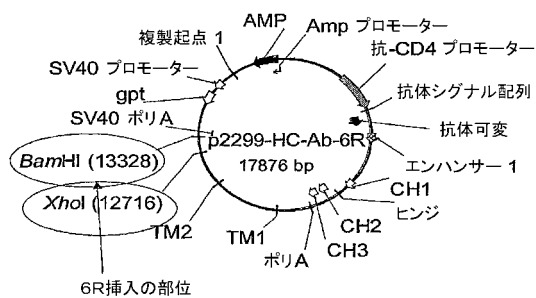
Fig. 10



【図 11 A】

Fig. 11

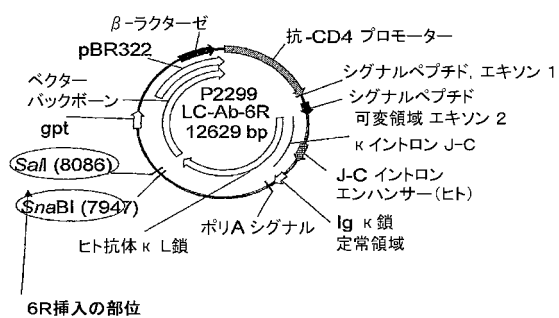
Fig. 11A



【図 11 B】

Fig. 11

Fig. 11B



【配列表】

0004958905000001.xml

 フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 0 7 K 16/00 (2006.01) C 0 7 K 16/00

- (72)発明者 モース, バリー・エイ
アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 0 8 3 ハバータウン・ローズウッドレーン 2 4 1 6
- (72)発明者 ドレイ, ハイマンテイ
アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 3 4 1 エクストン・ロングリツジレーン 3 4 0
- (72)発明者 スカロン, バーナード
アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 0 8 7 ウエイン・アウトポストサークル 7 3 0
- (72)発明者 ヘンドリクス, リンダ
アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 4 4 6 ランスデイル・エルムドライブ 2 0 8

審査官 渡邊 潤也

- (56)参考文献 Muzny,D.et al., "Accession:AC158684 REGION:82000..87000 [gi:73760431],Definition:Mus musculus 6 BAC RP23-332N21 (Roswell Park Cancer Institute (C57BL/6J Female) Mouse BAC Library) complete sequence.", NCBI Entrez Nucleotide[online];25-AUG-2005 uploaded,NCBI, [retrieved on 7 October 2011], Retrieved from the Internet:<URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AC158684>

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

PubMed

WPI

CPlus(STN)