(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第6751402号
(P6751402)

(45)発行日　令和2年9月2日(2020.9.2)　(24)登録日　令和2年8月18日(2020.8.18)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/10	
C12N 15/55	(2006.01)	C12N	15/55	ZNA
C07K 1/22	(2006.01)	C07K	1/22	
C07K 1/18	(2006.01)	C07K	1/18	
C12P 21/02	(2006.01)	C12P	21/02	C

請求項の数 17　(全 29 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2017-545231(P2017-545231)
(86)(22)出願日　平成28年2月26日(2016.2.26)
(65)公表番号　特表2018-506295(P2018-506295A)
(43)公表日　平成30年3月8日(2018.3.8)
(86)国際出願番号　PCT/US2016/019915
(87)国際公開番号　WO2016/138467
(87)国際公開日　平成28年9月1日(2016.9.1)
審査請求日　平成31年2月22日(2019.2.22)
(31)優先権主張番号　62/126,213
(32)優先日　平成27年2月27日(2015.2.27)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　62/298,869
(32)優先日　平成28年2月23日(2016.2.23)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者　507302748
リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　ニューヨーク州　タリタウン　オールド　ソー　ミル　リバー　ロード　７７７
(74)代理人　100102978
弁理士　清水　初志
(74)代理人　100102118
弁理士　春名　雅夫
(74)代理人　100160923
弁理士　山口　裕孝
(74)代理人　100119507
弁理士　刑部　俊

最終頁に続く

(54)【発明の名称】宿主細胞タンパク質の改変方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

ホスホリパーゼB様2(PLBD2)タンパク質をコードするポリヌクレオチドのコード配列中に改変を含み、該改変が、改変を欠いた細胞におけるPLBD2タンパク質の発現レベルと比べてPLBD2タンパク質の発現レベルを低下させる、組換え哺乳動物宿主細胞であって、検出可能なPLBD2タンパク質を発現せず、かつ関心対象の外来性タンパク質をコードするポリヌクレオチドをさらに含む、組換え哺乳動物宿主細胞。

【請求項２】

ホスホリパーゼB様2(PLBD2)タンパク質をコードするポリヌクレオチドのコード配列の対立遺伝子すべてが改変を含む、請求項1記載の宿主細胞。

【請求項３】

改変が、PLBD2タンパク質をコードするポリヌクレオチドのコード配列のエキソン1内のヌクレオチドの挿入または欠失を含む、請求項1または2記載の宿主細胞。

【請求項４】

PLBD2タンパク質が、SEQ ID NO:32のアミノ酸配列全体と少なくとも80％同一であるアミノ酸配列を含む、請求項1～3のいずれか一項記載の宿主細胞。

【請求項５】

PLBD2タンパク質が、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、およびSEQ ID NO:36からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項1～3のいずれか一項記載の宿主細胞。

【請求項６】
改変が、SEQ ID NO:47内のヌクレオチドの挿入または欠失を含む、請求項1～5のいずれか一項記載の宿主細胞。
【請求項７】
関心対象の外来性タンパク質が、抗体重鎖、抗体軽鎖、抗原結合断片、およびFc融合タンパク質からなる群より選択される、請求項1記載の宿主細胞。
【請求項８】
検出可能なエステラーゼ活性を有していないプロテインA結合画分を産生する、請求項1～7のいずれか一項記載の宿主細胞。
【請求項９】
(a)ホスホリパーゼB様2(PLBD2)タンパク質の発現を低下または消失させるために、哺乳動物宿主細胞を改変する段階、
(b)関心対象の外来性タンパク質をコードするポリヌクレオチドを該宿主細胞にトランスフェクトする段階、
(c)該宿主細胞から該関心対象のタンパク質を含むタンパク質画分を抽出する段階、
(d)該タンパク質画分を、プロテインAアフィニティー(PA)、陽イオン交換(CEX)、および陰イオン交換(AEX)からなる群より選択されるクロマトグラフィーカラムと接触させる段階、
(e)該関心対象のタンパク質を該カラムから回収する段階、ならびに
(f)該関心対象のタンパク質を脂肪酸エステル、任意で緩衝液および熱安定剤と混合する段階
を含む、タンパク質製剤中のエステラーゼ活性を低下させるための方法。
【請求項１０】
ホスホリパーゼB様2(PLBD2)タンパク質の発現を低下または消失させるために、哺乳動物宿主細胞を改変する段階が、少なくとも1つのヌクレオチドを、該PLBD2タンパク質をコードするポリヌクレオチドのエキソン1内に挿入することまたはエキソン1内で欠失させることを含む、請求項9記載の方法。
【請求項１１】
PLBD2タンパク質をコードするポリヌクレオチドが、SEQ ID NO:33のヌクレオチド配列全体と少なくとも80％同一である核酸配列を含む、請求項10記載の方法。
【請求項１２】
PLBD2遺伝子改変が両アレル改変を含む、請求項1～7のいずれか一項記載の宿主細胞。
【請求項１３】
PLBD2遺伝子改変が、PLBD2遺伝子の1個もしくは複数の塩基対、2個もしくはそれ以上の塩基対、3個もしくはそれ以上の塩基対、4個もしくはそれ以上の塩基対、5個もしくはそれ以上の塩基対、6個もしくはそれ以上の塩基対、7個もしくはそれ以上の塩基対、8個もしくはそれ以上の塩基対、9個もしくはそれ以上の塩基対、10個もしくはそれ以上の塩基対、11個もしくはそれ以上の塩基対、12個もしくはそれ以上の塩基対、13個もしくはそれ以上の塩基対、14個もしくはそれ以上の塩基対、15個もしくはそれ以上の塩基対、16個もしくはそれ以上の塩基対、17個もしくはそれ以上の塩基対、18個もしくはそれ以上の塩基対、19個もしくはそれ以上の塩基対、または20個もしくはそれ以上の塩基対の欠失を含む、請求項1～7のいずれか一項記載の宿主細胞。
【請求項１４】
PLBD2遺伝子改変が、翻訳されるPLBD2タンパク質のフレームシフトをもたらす、請求項1～7のいずれか一項記載の宿主細胞。
【請求項１５】
改変が、標的部位における標的破壊であり、該標的部位は、SEQ ID NO:33の37～56、44～56、33～62、40～69、110～139、198～227、182～211、および242～271番の位置にまたがるヌクレオチドからなる群より選択される、請求項1～7のいずれか一項記載の宿主細胞。

【請求項１６】
哺乳動物細胞が、CHO K1細胞、DXB-11 CHO細胞、ベジーCHO細胞、COS-7細胞、Vero細胞、CV1細胞、HEK293細胞、293EBNA細胞、MSR293細胞、MDCK細胞、HaK細胞、BHK21細胞、HeLa細胞、HepG2細胞、WI38細胞、MRC5細胞、Colo25細胞、HB8065細胞、HL-60細胞、ジャーカット(Jurkat)細胞、ダウディ(Daudi)細胞、A431細胞、U937細胞、3T3細胞、L細胞、C127細胞、SP2/0細胞、NS-0細胞、およびMMT細胞からなる群より選択される、請求項1～7のいずれか一項記載の宿主細胞。
【請求項１７】
CHO細胞である、請求項1～7のいずれか一項記載の宿主細胞。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
配列表
本出願は、2016年2月26日に作成した10143US01_ST25.txtという名称のファイル(41,768バイト)中のコンピューターで読み取り可能な形態の配列表を含み、これは参照により本明細書に組み入れられる。
【０００２】
発明の分野
本発明は、真核細胞における組換えタンパク質の発現および精製のための細胞および方法を提供する。具体的には、本発明は、内在性タンパク質の遺伝子発現を、そのような望まれない「粘着性」宿主細胞タンパク質の産生を制御するために下方制御することを使用する、真核細胞、特にチャイニーズハムスター(モンゴルキヌゲネズミ(Cricetulus griseus))細胞株においてタンパク質を発現させるための方法および構成物(composition)を含む。本発明は、関心対象の外来性組換えタンパク質の精製を容易にする、ポリヌクレオチドおよび改変細胞を含む。本発明の方法は、改変細胞によって発現される組換えタンパク質の増強された安定な発現を促進するために、チャイニーズハムスター細胞ゲノム中の宿主細胞タンパク質を効率的に標的とする。
【背景技術】
【０００３】
背景
細胞発現系は、治療用途用のバイオ医薬製品を製造するための信頼性が高く効率的な供給源を提供することを狙いとする。このような系において真核細胞または原核細胞のいずれかによって産生された任意の組換えタンパク質の精製は、例えば、最終的な医薬品グレードの製品から除去する必要がある多量の宿主細胞タンパク質および核酸分子が原因で、常に難題である。
【０００４】
不純な副産物とみなされる宿主細胞タンパク質のいくつかの動態が、バイオプロセシングの様々な段階にわたって調査されている。細胞培養によって作製されたペプチボディに付随する大腸菌(E. coli)HCPを検出およびモニターするために、高度な液体クロマトグラフィー/質量分析(LC/MS)が実施された(Schenauer, MR. , et al, 2013, Biotechnol Prog 29(4) :951 -7（非特許文献1）)。HCPプロファイルによって得られる情報は、工程開発をモニターするのに、かつ任意の1種または複数種のHCPによって引き起こされる安全性リスクを評価するために製品の品質および純度を評価するのに、有用である。
【０００５】
真核細胞の細胞培養条件の変更は、下流のバイオプロセシングの変化によってCHO細胞のHCP量が増えることによって分かるように、製造されるタンパク質の純度に強い影響を与えることが示されている(Tait, et al, 2013, Biotechnol Prog 29(3) :688-696（非特許文献2）)。任意の製品中の残留HCPによる有害な作用は、全体的な質もしくは量、またはその製品の質と量の両方に影響を与え得る。現在のプロトコールは、細胞によって産生される関心対象のタンパク質(例えば治療的抗体)を改変して、関心対象のタンパク質と宿

主細胞タンパク質との特異な(differential)結合または相互作用をなくそうと努力している(Zhang, Q. et al, mAbs, Published online: 11 Feb 2014（非特許文献3）)。

【０００６】

多数の細胞発現系が利用可能であるものの、発現される関心対象のタンパク質の生物学的特性に悪い影響を与えない操作された細胞株および細胞系が、特に有利である。したがって、下流のバイオプロセシング、続いて商業的使用のために良質のタンパク質試料を調製するための改良された方法が、当技術分野において必要である。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【０００７】

【非特許文献１】Schenauer, MR. , et al, 2013, Biotechnol Prog 29(4) :951 -7
【非特許文献２】Tait, et al, 2013, Biotechnol Prog 29(3) :688-696
【非特許文献３】Zhang, Q. et al, mAbs, Published online: 11 Feb 2014

【発明の概要】

【０００８】

簡潔な概要

混入宿主細胞タンパク質を排除するための遺伝子編集ツールの使用が企図され、したがって、タンパク質のより効率的な製造加工のための操作された宿主細胞が提供される。

【０００９】

1つの局面において、本発明は、未改変細胞でのエステラーゼの発現レベルと比べてエステラーゼの発現レベルを低下させるように改変された組換え宿主細胞を提供する。

【００１０】

別の局面において、本発明は、標的エステラーゼを発現しないように改変された組換え宿主細胞を提供する。

【００１１】

いくつかの態様において、エステラーゼはホスホリパーゼ、特に、ホスホリパーゼB様タンパク質である。別の態様において、ホスホリパーゼは、ホスホリパーゼB様2タンパク質である。

【００１２】

いくつかの態様において、関心対象の遺伝子は、外部から組換え宿主細胞に加えられる。他の態様において、外部から加えられる遺伝子は、関心対象のタンパク質(POI)をコードし、例えば、POIは、抗体重鎖、抗体軽鎖、抗原結合断片、およびFc融合タンパク質からなる群より選択される。

【００１３】

本発明は、非機能性PLBD2タンパク質を含む細胞を提供する。

【００１４】

本発明は、PLBD2標的破壊によって細胞を作製することを提供する。いくつかの態様において、方法は、標的部位または標的配列の位置で細胞ゲノムを破壊または編集するための部位特異的ヌクレアーゼを含む。いくつかの態様において、PLBD2標的部位は、SEQ ID NO:33の1～20、10～30、20～40、30～50、30～60、30～70、40～60、40～70、50～70、60～80、70～90、80～100、90～110、110～140、120～140、130～150、140～160、150～170、160～180、160～180、170～190、180～200、180～220、190～230、190～210、200～220、210～230、220～240、230～250、240～260、および250～270番の位置にまたがるヌクレオチドからなる群より選択される、SEQ ID NO:33内の、またはSEQ ID NO:33内の位置に隣接した位置を含む。

【００１５】

別の態様において、SEQ ID NO:33内の、またはSEQ ID NO:33内の位置に隣接した位置の標的部位は、SEQ ID NO:33の37～56、44～56、33～62、40～69、110～139、198～227、182～211、および242～271番の位置にまたがるヌクレオチドからなる群より選択される。この点に関して、PLBD2標的部位は、部分的にまたは全面的に、本明細書において提供するS

EQ ID NO:33のヌクレオチド位置内にあるか、またはSEQ ID NO:33のヌクレオチド位置によって含まれ、標的部位または標的配列の位置で細胞ゲノムを破壊または編集する段階は、本明細書において提供するSEQ ID NO:33のヌクレオチド位置内で1つまたは複数のヌクレオチドを欠失させる段階または挿入する段階からなり得る。一方、破壊または編集する段階は、野生型細胞(すなわち、ゲノム破壊も遺伝子編集も行われていない細胞)から転写されるものと比べて、結果として生じる転写物を変化させる。いくつかの態様において、改変遺伝子の結果として生じる転写物は、翻訳されるタンパク質のフレームシフトをもたらす。いくつかの態様において、改変遺伝子の結果として生じる転写物は、分解しやすいか、質量分析法のような標準的方法によって検出不可能であるか、または検出可能な活性を有していない改変タンパク質をもたらす。いくつかの態様において、標的破壊または標的編集は、遺伝子の両方の対立遺伝子上で起こる(すなわち、両アレル破壊または両アレル改変)。

【００１６】

特定の態様において、細胞は、外来性核酸配列をさらに組み込む。他の態様において、細胞は、関心対象の外来性タンパク質を産生することができる。さらに別の態様において、破壊された遺伝子から生じる改変タンパク質は、細胞によって産生される関心対象のタンパク質に結合しない。

【００１７】

別の局面において、PLBD2遺伝子の変異体(例えばSEQ ID NO:33の変異体)を含む操作された核酸配列を含む単離されたチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞が提供される。1つの態様において、PLBD2遺伝子は、

GACAGTCACG TGGCCCGACT GAGGCACGCG

、すなわちSEQ ID NO:33のヌクレオチド1～30(SEQ ID NO:44)を含む。別の態様において、PLBD2遺伝子は、オープンリーディングフレームの発現を妨害するように操作される。他の態様において、本発明は、(a)

GACAGTCACG TGGCCCGACT GAGGCACGCG

(SEQ ID NO:44、すなわち(also)SEQ ID NO:33のヌクレオチド1～30)を含む破壊されたPLBD2遺伝子、(b)表1のアミノ酸配列のいずれか1つをコードするヌクレオチドを含む破壊されたエステラーゼ遺伝子、または(c)破壊されたPLBD2遺伝子によって発現される表1のタンパク質断片;および関心対象の遺伝子を含む外来性核酸配列を含む、単離されたCHO細胞を提供する。

【００１８】

別の局面において、未改変細胞でのエステラーゼの発現レベルと比べてエステラーゼの発現レベルを低下させるように改変された組換え宿主細胞を用いて、関心対象のタンパク質を作製する方法が、提供される。

【００１９】

別の態様において、この方法は、エステラーゼ発現が低下しており、かつ関心対象の遺伝子(GOI)を含む外来性核酸配列を有している、改変宿主細胞を含む。

【００２０】

特定の態様において、外来性核酸配列は、1つまたは複数の関心対象の遺伝子を含む。いくつかの態様において、1つまたは複数の関心対象の遺伝子は、第1のGOI、第2のGOI、および第3のGOIからなる群より選択される。

【００２１】

別の局面において、本発明は、改変エステラーゼまたは非機能性エステラーゼを含む組換え宿主細胞を含む発現系を提供する。

【００２２】

さらに別の態様において、細胞は、GOI発現を推進することができるプロモーターに機能的に連結されたGOIを含み、このプロモーターは、活性化因子または阻害因子によって調節され得る真核生物プロモーターを含む。他の態様において、真核生物プロモーターは、原核生物オペレーターに機能的に連結されており、真核細胞は、任意で、原核生物リプ

レッサータンパク質をさらに含む。

【００２３】

別の態様において、1つまたは複数の選択マーカーが、改変宿主細胞によって発現される。いくつかの態様において、関心対象の遺伝子および/または1つもしくは複数の選択マーカーは、プロモーターに機能的に連結されており、このプロモーターは、同じものでも異なるものでもよい。別の態様において、プロモーターは、原核生物オペレーター(例えばtetオペレーター)によって任意で制御される、真核生物プロモーター(例えば、CMVプロモーターまたはSV40後期プロモーター)を含む。他の態様において、細胞は、原核生物リプレッサー(例えばtetリプレッサー)をコードする遺伝子もさらに含む。

【００２４】

1つの局面において、リコンビナーゼ認識部位を含むCHO宿主細胞が提供される。いくつかの態様において、リコンビナーゼ認識部位は、LoxP部位、Lox511部位、Lox2272部位、Lox2372、Lox5171、およびfrt部位より選択される。

【００２５】

別の態様において、細胞は、リコンビナーゼを発現することができる遺伝子をさらに含む。いくつかの態様において、リコンビナーゼは、Creリコンビナーゼである。

【００２６】

1つの態様において、選択マーカー遺伝子は、薬物耐性遺伝子である。別の態様において、薬物耐性遺伝子は、ネオマイシン耐性遺伝子またはヒグロマイシン耐性遺伝子である。別の態様において、第2の選択マーカー遺伝子および第3の選択マーカー遺伝子は、2種の異なる蛍光タンパク質をコードする。1つの態様において、2種の異なる蛍光タンパク質は、ディスコソマ・コーラル(Discosoma coral)(DsRed)、緑色蛍光タンパク質(GFP)、高感度緑色蛍光タンパク質(eGFP)、シアノ蛍光タンパク質(CFP)、高感度シアノ蛍光タンパク質(eCFP)、黄色蛍光タンパク質(YFP)、高感度黄色蛍光タンパク質(eYFP)、および遠赤色蛍光タンパク質(mKate)からなる群より選択される。

【００２７】

1つの態様において、第1のプロモーター、第2のプロモーター、および第3のプロモーターは、同じである。別の態様において、第1のプロモーター、第2のプロモーター、および第3のプロモーターは、互いに異なる。別の態様において、第1のプロモーターは、第2のプロモーターおよび第3のプロモーターと異なり、第2のプロモーターおよび第3のプロモーターは、同じである。より多くの態様において、第1のプロモーターはSV40後期プロモーターであり、第2のプロモーターおよび第3のプロモーターは、それぞれヒトCMVプロモーターである。他の態様において、第1のプロモーターおよび第2のプロモーターは、原核生物オペレーターに機能的に連結される。

【００２８】

1つの態様において、宿主細胞株は、そのゲノムに組み込まれ、プロモーターに機能的に連結された、リコンビナーゼをコードする外部から加えられた遺伝子を有している。別の態様において、リコンビナーゼは、Creリコンビナーゼである。別の態様において、宿主細胞は、そのゲノムに組み込まれ、プロモーターに機能的に連結された、調節タンパク質をコードする遺伝子を有している。より多くの態様において、調節タンパク質は、tetリプレッサータンパク質である。

【００２９】

1つの態様において、第1のGOIおよび第2のGOIは、抗体の軽鎖もしくはその断片、または抗体の重鎖もしくはその断片をコードする。別の態様において、第1のGOIは、抗体の軽鎖をコードし、第2のGOIは、抗体の重鎖をコードする。

【００３０】

特定の態様において、第1のGOI、第2のGOI、および第3のGOIは、第1の軽鎖またはその断片、第2の軽鎖またはその断片、および重鎖またはその断片からなる群より選択されるポリペプチドをコードする。さらに別の態様において、第1のGOI、第2のGOI、および第3のGOIは、軽鎖またはその断片、第1の重鎖またはその断片、および第2の重鎖またはその

断片からなる群より選択されるポリペプチドをコードする。

【００３１】

1つの局面において、(a)関心対象の遺伝子(GOI)をCHO宿主細胞に導入する段階であって、GOIが、2010年8月10日に発行された米国特許第7771997B2号で説明されている座位または他の安定な組込みおよび/もしくは発現増強座位などの特定の座位に組み込まれる、段階；(b)GOIの発現を可能にする条件下で(a)の細胞を培養する段階；ならびに(c)関心対象のタンパク質を回収する段階を含む、関心対象のタンパク質を作製するための方法が提供される。1つの態様において、関心対象のタンパク質は、免疫グロブリンのサブユニットまたはその断片、および受容体またはそのリガンド結合断片からなる群より選択される。特定の態様において、関心対象のタンパク質は、抗体軽鎖またはその抗原結合断片および抗体重鎖またはその抗原結合断片からなる群より選択される。

【００３２】

特定の態様において、CHO宿主細胞ゲノムは、さらなる改変を含み、かつ前述の1つまたは複数のリコンビナーゼ認識部位を含み、GOIは、リコンビナーゼ認識部位を認識するリコンビナーゼの作用によって特定の座位に導入される。

【００３３】

いくつかの態様において、CHO宿主細胞ゲノムが特定の座位内に少なくとも1つの外来性認識配列を含む場合、GOIは、リコンビナーゼ仲介カセット交換(RMCE)のためのターゲティングベクターを用いて細胞中に導入される。

【００３４】

別の態様において、GOIは、相同組換えのためのターゲティングベクターを用いて細胞中に導入され、このターゲティングベクターは、特定の座位中に存在するある配列に相同な5'ホモロジーアーム、GOI、および特定の座位中に存在するある配列に相同な3'ホモロジーアームを含む。別の態様において、ターゲティングベクターは、2つ、3つ、4つ、または5つもしくはそれ以上の関心対象の遺伝子をさらに含む。別の態様において、関心対象の遺伝子のうちの1つまたは複数は、プロモーターに機能的に連結される。

【００３５】

別の局面において、外来性核酸配列を含む運搬体(vehicle)を細胞に導入する段階であって、外来性核酸がゲノムのある座位内に組み込まれる段階を含む、CHO細胞ゲノムを改変して外来性核酸配列を組み込むための方法が、提供される。

【００３６】

さらに別の局面において、本発明は、(a)エステラーゼの発現が低下または消失した本発明の改変宿主細胞からタンパク質画分を抽出する段階、(b)関心対象のタンパク質を含むタンパク質画分を、プロテインAアフィニティー(PA)クロマトグラフィー、陽イオン交換(CEX)クロマトグラフィー、および陰イオン交換(AEX)クロマトグラフィーからなる群より選択されるカラムと接触させる段階、(c)関心対象のタンパク質を媒体から回収する段階を含み、低下したレベルのエステラーゼ活性が、段階(c)で回収されるタンパク質画分と関連しており、したがって安定なタンパク質製剤を提供する、安定なタンパク質製剤を製造するための方法を提供する。

【００３７】

さらに別の局面において、本発明は、(a)エステラーゼの発現を低下または消失させるために、宿主細胞を改変する段階、(b)関心対象のタンパク質を宿主細胞にトランスフェクトする段階、(c)改変宿主細胞からタンパク質画分を抽出する段階、(c)関心対象のタンパク質を含むタンパク質画分を、プロテインAアフィニティー(PA)クロマトグラフィー、陽イオン交換(CEX)クロマトグラフィー、および陰イオン交換(AEX)クロマトグラフィーからなる群より選択されるカラムと接触させる段階、(d)関心対象のタンパク質を媒体から回収する段階、ならびに(e)関心対象のタンパク質を脂肪酸エステル、任意で緩衝液および熱安定剤と混合し、そのようにして、検出可能なエステラーゼ活性が本質的にないタンパク質製剤を提供する段階を含む、タンパク質製剤中のエステラーゼ活性を低下させるための方法を提供する。いくつかの態様において、タンパク質製剤は、本質的にPLBD2タン

パク質も含まず、PLBD2活性もない。

【００３８】

さらに別の局面において、CHO細胞ゲノムを改変して治療物質を発現させるための方法であって、治療物質を発現させるための配列を含む外来性核酸をゲノム中に導入するための運搬体を含み、この運搬体が、SEQ ID NO:33のヌクレオチド配列中に存在するある配列に相同な5'ホモロジーアーム、治療物質をコードする核酸、およびSEQ ID NO:33のヌクレオチド配列中に存在するある配列に相同な3'ホモロジーアームを含む、方法が提供される。

【００３９】

もう1つの局面において、本発明は、SEQ ID NO:33と少なくとも90％同一のヌクレオチド配列内の標的配列を破壊することによってCHOゲノムが改変される、改変CHOゲノムを含む改変CHO宿主細胞を提供する。

【００４０】

別の局面において、本発明は、真核生物ゲノムが、PLBD2遺伝子のコード領域中の標的配列の位置で部位特異的ヌクレアーゼによって改変される、改変真核生物ゲノムを含む改変真核宿主細胞を提供する。いくつかの態様において、部位特異的ヌクレアーゼは、亜鉛フィンガーヌクレアーゼ(ZFN)、ZFN二量体、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)、TALエフェクタードメイン融合タンパク質、またはRNAによって導かれるDNAエンドヌクレアーゼを含む。本発明はまた、このような改変真核宿主細胞を作製する方法も提供する。

【００４１】

前述した局面および態様のいずれかにおいて、標的配列は、SEQ ID NO:33で示された向きに、またはSEQ ID NO:33の向きと逆に、配置されていてよい。

【００４２】

別の局面において、改変PLBD2遺伝子を含む組換え宿主細胞が提供される。いくつかの態様において、コード領域の破壊によってPLBD2遺伝子が改変されている組換え宿主細胞が提供される。他の態様において、破壊されるコード領域は、エキソン1、エキソン2、エキソン3、エキソン4、エキソン5、エキソン6、エキソン7、エキソン8、エキソン9、エキソン10、エキソン11、およびエキソン12からなる群より選択されるエキソンヌクレオチド配列内にある。特定の態様において、破壊されるコード領域は、エキソン1およびエキソン2からなる群より選択されるエキソンヌクレオチド配列内にある。

【００４３】

1つの態様において、PLBD2遺伝子改変が両アレル改変を含む組換え宿主細胞が、提供される。

【００４４】

別の態様において、PLBD2遺伝子改変が、1個もしくは複数の塩基対、2個もしくはそれ以上の塩基対、3個もしくはそれ以上の塩基対、4個もしくはそれ以上の塩基対、5個もしくはそれ以上の塩基対、6個もしくはそれ以上の塩基対、7個もしくはそれ以上の塩基対、8個もしくはそれ以上の塩基対、9個もしくはそれ以上の塩基対、10個もしくはそれ以上の塩基対、11個もしくはそれ以上の塩基対、12個もしくはそれ以上の塩基対、13個もしくはそれ以上の塩基対、14個もしくはそれ以上の塩基対、15個もしくはそれ以上の塩基対、16個もしくはそれ以上の塩基対、17個もしくはそれ以上の塩基対、18個もしくはそれ以上の塩基対、19個もしくはそれ以上の塩基対、または20個もしくはそれ以上の塩基対の欠失を含む、組換え宿主細胞が提供される。

【００４５】

別段の指定がない限り、または文脈から明らかでない限り、本発明の局面および態様のいずれかは、本発明の他の任意の局面または態様と組み合わせて使用することができる。

【００４６】

[本発明1001]

ホスホリパーゼB様2(PLBD2)タンパク質をコードするポリヌクレオチドのコード配列中

に改変を含み、該改変が、改変を欠いた細胞におけるPLBD2タンパク質の発現レベルと比べてPLBD2タンパク質の発現レベルを低下させる、組換え宿主細胞。

[本発明1002]

ホスホリパーゼB様2(PLBD2)タンパク質をコードするポリヌクレオチドのコード配列の対立遺伝子すべてが改変を含む、本発明1001の宿主細胞。

[本発明1003]

検出可能なホスホリパーゼB様2タンパク質を発現しない、本発明1001または1002の宿主細胞。

[本発明1004]

改変が、PLBD2タンパク質をコードするポリヌクレオチドのコード配列のエキソン1内のヌクレオチドの挿入または欠失を含む、本発明1001～1003のいずれかの宿主細胞。

[本発明1005]

PLBD2タンパク質が、SEQ ID NO:32と少なくとも80％同一であるアミノ酸配列を含む、本発明1001～1004のいずれかの宿主細胞。

[本発明1006]

PLBD2タンパク質が、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、およびSEQ ID NO:36からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、本発明1001～1004のいずれかの宿主細胞。

[本発明1007]

改変が、SEQ ID NO:47内のヌクレオチドの挿入または欠失を含む、本発明1001～1006のいずれかの宿主細胞。

[本発明1008]

関心対象の外来性タンパク質をコードするポリヌクレオチドをさらに含む、本発明1001～1007のいずれかの宿主細胞。

[本発明1009]

関心対象の外来性タンパク質が、抗体重鎖、抗体軽鎖、抗原結合断片、抗原結合タンパク質、およびFc融合タンパク質からなる群より選択される、本発明1008の宿主細胞。

[本発明1010]

検出可能なエステラーゼ活性を有していないプロテインA結合画分を産生する、本発明1001～1009のいずれかの宿主細胞。

[本発明1011]

(a)未改変細胞と比べて低下したレベルのエステラーゼを産生するように改変された宿主細胞から、組換えタンパク質および複数の宿主細胞タンパク質を含む試料を得て;

(b)該試料を少なくとも1回の精製段階に供して、少なくとも1種の宿主細胞タンパク質を除去し、

組換えタンパク質を作製する方法。

[本発明1012]

複数の宿主細胞タンパク質が、検出可能な量のホスホリパーゼB様2(PLBD2)タンパク質を含まない、本発明1011の方法。

[本発明1013]

宿主細胞が、ホスホリパーゼB様2(PLBD2)タンパク質をコードするポリヌクレオチドのコード配列中に改変を含む、本発明1011または1012の方法。

[本発明1014]

精製段階が、プロテインAアフィニティー(PA)クロマトグラフィー、陽イオン交換(CEX)クロマトグラフィー、および陰イオン交換(AEX)クロマトグラフィーからなる群より選択される、本発明1011～1013のいずれかの方法。

[本発明1015]

精製段階が疎水性相互作用クロマトグラフィーを含まない、本発明1011～1014のいずれかの方法。

[本発明1016]

(a)ホスホリパーゼB様2(PLBD2)タンパク質の発現を低下または消失させるために、宿主細胞を改変する段階、(b)関心対象のタンパク質をコードするポリヌクレオチドを該宿主細胞にトランスフェクトする段階、(c)該宿主細胞から該関心対象のタンパク質を含むタンパク質画分を抽出する段階、(c)該タンパク質画分を、プロテインAアフィニティー(PA)媒体、陽イオン交換(CEX)媒体、および陰イオン交換(AEX)媒体からなる群より選択されるクロマトグラフィー媒体と接触させる段階、(d)該関心対象のタンパク質を該媒体から回収する段階、ならびに(e)該関心対象のタンパク質を脂肪酸エステル、任意で緩衝液および熱安定剤と混合する段階を含む、タンパク質製剤中のエステラーゼ活性を低下させるための方法。

[本発明1017]

ホスホリパーゼB様2(PLBD2)タンパク質の発現を低下または消失させるために、宿主細胞を改変する段階が、少なくとも1つのヌクレオチドを、該PLBD2タンパク質をコードするポリヌクレオチドのエキソン1内に挿入することまたはエキソン1内で欠失させることを含む、本発明1016の方法。

[本発明1018]

PLBD2タンパク質をコードするポリヌクレオチドが、SEQ ID NO:32と少なくとも80％同一である核酸配列を含む、本発明1017の方法。

[本発明1019]

改変されたPLBD2遺伝子を含む、組換え宿主細胞。

[本発明1020]

コード領域の破壊によってPLBD2遺伝子が改変されている、本発明1019の組換え宿主細胞。

[本発明1021]

PLBD2遺伝子改変が両アレル改変を含む、本発明1018または1019の組換え宿主細胞。

[本発明1022]

PLBD2遺伝子改変が、PLBD2遺伝子の1個もしくは複数の塩基対、2個もしくはそれ以上の塩基対、3個もしくはそれ以上の塩基対、4個もしくはそれ以上の塩基対、5個もしくはそれ以上の塩基対、6個もしくはそれ以上の塩基対、7個もしくはそれ以上の塩基対、8個もしくはそれ以上の塩基対、9個もしくはそれ以上の塩基対、10個もしくはそれ以上の塩基対、11個もしくはそれ以上の塩基対、12個もしくはそれ以上の塩基対、13個もしくはそれ以上の塩基対、14個もしくはそれ以上の塩基対、15個もしくはそれ以上の塩基対、16個もしくはそれ以上の塩基対、17個もしくはそれ以上の塩基対、18個もしくはそれ以上の塩基対、19個もしくはそれ以上の塩基対、または20個もしくはそれ以上の塩基対の欠失を含む、本発明1019～1021のいずれかの組換え宿主細胞。

他の目的および利点は、以下の詳細な説明を再検討することによって明らかになると考えられる。

【図面の簡単な説明】

【００４７】

【図１】改変クローンのゲノム(gDNA)または転写物(mRNA)を検出するためのTaqman(登録商標)定量ポリメラーゼ連鎖反応(qPCR)実験の結果を示す。プライマーおよびプローブは、SEQ ID NO:33のヌクレオチド37から始まるか(sgRNA1)、またはヌクレオチド44から始まる(sgRNA2)、エキソン1内の標的破壊の影響を受けると予測されるいずれかの配列に隣接するように設計した。sgRNA1またはsgRNA2のいずれかによって標的とされるクローンからのアンプリコンの相対量(すなわち、sgRNAなし、または非対応のsgRNAの影響を受けた陰性対照トランスフェクションクローンに由来するアンプリコンを基準とする)をグラフで表している。例えばクローン1は、相対的にみて、標的エキソン1領域のqPCRによって増幅されたgDNAもmRNAも有していない。クローン1およびいくつかの他のクローンを、引き続いての解析のために選択した。

【図２】図2Aおよび図2Bは、野生型チャイニーズハムスター卵巣(overy)(CHO)細胞と比べた、クローン1細胞集団のさらなるPCR解析の結果を示す。図2Aは、野生型細胞のゲノムDN

Aからのアンプリコンと比べて長さ(bp)が短い、クローン1からのPCRアンプリコンを示す。図2Bは、野生型細胞のmRNAからのアンプリコンと比べて長さ(bp)が短い、クローン1からのPCRアンプリコンを示す。配列決定によって、クローン1のPLBD2遺伝子中の11bpの欠失が確認された。

【図３】同じ流加培養条件下に12日間置かれた、モノクローナル抗体1(mAb1)を発現するクローン1細胞(RS001)またはmAb1を発現する野生型CHO細胞(RS0WT)の相対的タンパク質力価を示す。0日目、3日目、5日目、7日目、10日目、および13日目に、馴化培地の試料を各培養物から取り出し(extracted)、プロテインA結合画分を定量した。

【図４】生産培養ならびにプロテインA(PA)のみ、またはPAおよび陰イオン交換(AEX)クロマトグラフィーのいずれかを用いるタンパク質精製の後のRS001細胞またはRS0WT細胞の結果を示す。トリプシン消化質量分析法を用いて、RS001およびRS0WTに由来するPAで精製したmAb1のリパーゼ存在量を解析した。したがって、RS001およびRS0WTが産生したmAb1のトリプシン消化物を、特定のPLBD2産物断片(表1で示す)をモニターするように設定された三重四重極型質量分析計と連結された逆相液体クロマトグラフィーカラムに注入した。様々な量の組換えPLBD2を添加したmAb1参照試料(内在性PLBD2を含まない)を含む対照反応もまた、解析しプロットした。これらの実験で検出されたシグナルを対照反応と比較して、PLBD2の濃度を明らかにした。クローン1から産生されたmAb1は、PAのみを用いて精製した場合、検出可能な量のPLBD2を示さない。

【発明を実施するための形態】

【００４８】

詳細な説明

本発明の方法を説明する前に、本発明は、説明される特定の方法および実験条件に限定されず、したがって、方法および条件は変化し得ることを理解すべきである。また、本発明の範囲は添付の特許請求の範囲によってのみ限定されるため、本明細書において使用される専門用語は、特定の態様を説明することだけを目的とし、限定することを意図しないことも理解すべきである。

【００４９】

本明細書および添付の特許請求の範囲において使用される場合、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」、および「その(the)」は、文脈において特に規定がない限り、複数の指示内容を含む。したがって、例えば、「1つの方法」への言及は、本明細書において説明する、かつ/または本開示を読むと当業者に明らかになると考えられるタイプの、1つまたは複数の方法および/または段階を含む。

【００５０】

他に規定されない限り、または別段の指定がない限り、本明細書で使用される技術用語および科学用語はすべて、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有している。

【００５１】

本明細書において説明されるものと同様または等価な任意の方法および材料を、本発明の実践または試験において使用することができるが、具体的な方法および材料を以下に説明する。本明細書において言及される刊行物はすべて、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【００５２】

定義

「外部から加えられる遺伝子」または「外部から加えられる核酸」という語句は、自然界で見出される細胞ゲノム内に存在しない任意のDNA配列または遺伝子を意味する。例えば、CHOゲノム内の「外部から加えられる遺伝子」は、他の任意の種に由来する遺伝子(例えばヒト遺伝子)、キメラ遺伝子(例えばヒト/マウス)、もしくは挿入される場である特定のCHO座位内に自然界では見出されないハムスター遺伝子(すなわち、ハムスターゲノム中の別の座位に由来するハムスター遺伝子)、または自然界では関心対象のCHO座位内に存在することが見出されていない他の任意の遺伝子であることができる。

【００５３】
エステラーゼ、例えば、それぞれSEQ ID NO:32またはSEQ ID NO:33のようなホスホリパーゼのタンパク質または遺伝子を説明する際の同一性パーセントとは、ひと続きの相同な領域に沿って挙げられた同一性を示す相同配列を含むことを意図するが、比較される配列中にホモログを有していないギャップ、欠失、または挿入の存在は、同一性パーセントを計算する際に考慮に入れられない。
【００５４】
例えば、SEQ ID NO:32と種ホモログとの「同一性パーセント」測定は、種ホモログがアライメント中で比較するための相同配列を有していない(すなわち、場合により、その断片と比較されるSEQ ID NO:32または種ホモログがギャップまたは欠失を有している)配列比較を含まない。したがって、「同一性パーセント」は、ギャップ、欠失、および挿入に関するペナルティーを含まない。
【００５５】
遺伝子または核酸配列の「標的破壊」とは、ゲノムDNAの切断または破損(例えば二本鎖破損)を指示し、それによって、そのような遺伝子または核酸配列のコード配列に改変を引き起こす遺伝子ターゲティング方法を意味する。遺伝子標的部位は、ヌクレアーゼによる切断または破損のために選択される部位である。通常、DNA破損は、非相同末端結合(NHEJ)DNA修復経路によって修復される。NHEJ修復の間、挿入または欠失(InDel)が起こる場合があり、よって、少数のヌクレオチドが、破損部位においてランダムに挿入されるか、または欠失し、これらのInDelは、標的遺伝子のオープンリーディングフレーム(ORF)を移動させるか、または破壊する可能性がある。ORFの移動は、DNA破損の下流で得られるアミノ酸配列に著しい変化を引き起こす可能性があるか、または未成熟終止コドンを導く可能性があり、したがって、発現されるタンパク質は、あったとしても非機能性になるか、または分解しやすい。
【００５６】
「標的挿入」とは、ゲノム上の特定の位置への遺伝子または核酸配列の挿入または組込みを指示する、すなわち、連続したポリヌクレオチド鎖中の2つのヌクレオチド間の特定の部位にDNAを導くのに使用される遺伝子ターゲティング方法を意味する。標的挿入は、少数のヌクレオチドを導入するために、または複数の遺伝子、調節エレメント、および/もしくは核酸配列を含む遺伝子カセット全体を導入するために、実施されてもよい。「挿入」および「組込み」は、同義的に使用される。
【００５７】
「認識部位」または「認識配列」とは、DNA骨格に結合し部位特異的切断を指示するヌクレアーゼまたは他の酵素によって認識される、特異的DNA配列である。エンドヌクレアーゼは、DNA分子内のDNAを切断する。当技術分野において、認識部位は、認識標的部位とも呼ばれる。
【００５８】
ポリソルベートは、ソルビタンまたはイソソルビドの脂肪酸エステル(ポリオキシエチレンソルビタンまたはイソソルビドのモノエステルもしくはジエステル)である。ポリオキシエチレンは、親水性の頭部基としての機能を果たし、脂肪酸は、親油性疎水性尾部としての機能を果たす。ポリソルベートの界面活性剤としての有効性は、(単一分子中に)親水性頭部および疎水性尾部の両方が存在している分子の両親媒性の性質に応じて変わる。ポリソルベートは、その構成要素である頭部基および脂肪酸尾部に分解(加水分解)すると、タンパク質安定化剤としてのその有効性を失って凝集を許容する可能性があり、肉眼不可視粒子(SVP)がその後に形成されることは、このような分解の指標である。SVPは、免疫原性の原因となり得る。米国食品医薬品局(USFDA)のような規制当局は、薬学的製剤中で許容される肉眼不可視粒子(SVP)の数に制限を与えている。米国薬局方(USP)は、薬物および薬物成分、ならびに食品成分および栄養補助食品の強度、純度、および品質に関する基準を公表している。
【００５９】

「エステラーゼ活性」という語句は、脂肪酸エステルのようなエステルを切断(加水分解)して酸(すなわち遊離脂肪酸)およびアルコール(すなわち、エステルを含む化合物)にする、ヒドロラーゼ酵素の酵素活性を意味する。

【００６０】

プロテインA結合画分とは、関心対象のタンパク質を発現する培養細胞から得られた細胞溶解物の、プロテインAアフィニティー形式に結合する画分を意味する。Fcを含むタンパク質はプロテインAに対する親和性があるため、プロテインAアフィニティークロマトグラフィー、例えば、樹脂、ビーズ、およびカラムなどのプロテインAクロマトグラフィー媒体が、Fcを含むタンパク質を捕捉するのに利用されることは、当技術分野において十分に理解されている。

【００６１】

ホスホリパーゼB様2(PLBD2)とは、NCBI RefSeq. XM_003510812.2として公知のホスホリパーゼ遺伝子(SEQ ID NO:33)の、またはNCBI RefSeq. XP_003510860.1として公知のタンパク質(SEQ ID NO:32)の、および本明細書においてさらに説明する、ホモログを意味する。当技術分野において、PLBD2はまた、推定上のホスホリパーゼB様2(PLBL2)、76kDaタンパク質、LAMA様タンパク質2、PLBホモログ2、ラミナ祖先ホモログ2、マンノース-6-リン酸タンパク質関連タンパク質p76、p76、ホスホリパーゼB様2(32kDa型)、ホスホリパーゼB様2(45kDa型)、またはリソソーム66.3kDaタンパク質とも呼ばれる。

【００６２】

「細胞」または「細胞株」という用語は、組換え核酸配列を発現するのに適している任意の細胞を含む。細胞には、原核生物および真核生物のもの(単細胞もしくは多細胞)、細菌細胞(例えば、大腸菌、バチルス属の種(Bacillus spp.)、ストレプトマイセス属の種(Streptomyces spp.)の株など)、マイコバクテリア細胞、真菌細胞、酵母細胞(例えば、S.セレビシエ(S. cerevisiae)、S.ポンベ(S. pombe)、P.パストリス(P. partoris)、P.メタノリカ(P. methanolica)など)、植物細胞、昆虫細胞(例えば、SF-9、SF-21、バキュロウイルスを感染させた昆虫細胞、イラクサギンウワバ(Trichoplusia ni)など)、非ヒト動物細胞、哺乳動物細胞、ヒト細胞、または細胞融合物、例えば、ハイブリドーマもしくはクアドローマが含まれる。特定の態様において、細胞は、ヒト、サル、類人猿、ハムスター、ラット、またはマウスの細胞である。特定の態様において、細胞は、真核性であり、次の細胞:CHO(例えば、CHO K1、DXB-11 CHO、ベジーCHO)、COS(例えばCOS-7)、網膜細胞、Vero、CV1、腎臓(例えば、HEK293、293EBNA、MSR293、MDCK、HaK、BHK21)、HeLa、HepG2、WI38、MRC5、Colo25、HB8065、HL-60、ジャーカット(Jurkat)、ダウディ(Daudi)、A431(表皮)、CV-1、U937、3T3、L細胞、C127細胞、SP2/0、NS-0、MMT細胞、腫瘍細胞、および前述の細胞に由来する細胞株より選択される。いくつかの態様において、細胞は、1つまたは複数のウイルス遺伝子を含み、例えば、ウイルス遺伝子を発現する網膜細胞(例えばPER.C6(登録商標)細胞)である。

【００６３】

概要

本発明は、内在性の宿主細胞ホスホリパーゼタンパク質の発現を低下させるか、内在性の宿主細胞ホスホリパーゼタンパク質の酵素機能もしくは結合能を低下させるか、または内在性の宿主細胞ホスホリパーゼタンパク質が検出可能ではない、組換え宿主細胞およびその細胞発現系に、少なくともある程度基づいている。本発明者らは、PLBD2タンパク質の発現を妨害すると、そのような発現系においてバイオ医薬製品を最適かつ効率的に精製することが可能になることを発見した。本発明は、1)遺伝子編集ツールを利用して、ホスホリパーゼ発現を完全に失わせること(したがって、ホスホリパーゼ遺伝子の破壊が原因で、測定可能な完全長ホスホリパーゼは細胞中で発現されない)；2)遺伝子編集ツールを利用して、酵素活性を消失もしくは低下させること(したがって、ホスホリパーゼタンパク質は発現されるが、遺伝子の破壊が原因で、非機能性になる)；および3)遺伝子編集ツールを利用して、細胞によって産生される外来性組換えタンパク質に内在性の宿主細胞ホスホリパーゼタンパク質が結合する能力を消失もしくは低下させることなどのいくつかの

方法で使用されてよい。エステラーゼ活性が、いくつかの抗体産生細胞のタンパク質画分において測定された。1種の特定のエステラーゼ、すなわちホスホリパーゼB様(PLBD2)が、これらのタンパク質画分中の混入物として測定された。ハムスター細胞(すなわちCHO)ゲノム中の遺伝子の標的破壊を可能にする遺伝子編集標的部位が、ハムスターPLBD2遺伝子において特定された。

【００６４】

改変PLBD2遺伝子を含む最適化された宿主細胞は、高品質タンパク質をバイオプロセスで作るのに有用であり、いくつかの精製段階という負担を減らし、それによって時間および費用を軽減し、同時に生産収率を高めると想像されている。

【００６５】

本発明はまた、組込み部位への外来遺伝子の特異的ターゲティングにも基づいている。本発明の方法は、細胞ゲノムの効率的な改変を可能にし、したがって、治療用または他の商業用のタンパク質製品をバイオプロセスで作るための細胞発現系として有用な改変宿主細胞または組換え宿主細胞を作製する。このために、本発明の方法は、さもなければ組換えタンパク質製剤の品質を落とすか、もしくは汚染するか、または複数の精製段階を必要とする可能性がある関心対象の特定の遺伝子を改変するために、細胞ゲノム遺伝子編集戦略を使用する。

【００６６】

本発明の構成物、例えば遺伝子編集ツールはまた、発現構築物中に、例えば、新しい細胞株をクローニングおよび操作するための発現ベクター中に含まれてもよい。これらの細胞株は、本明細書において説明する改変を含み、タンパク質発現を目的として発現構築物を最適に組み込むためのさらなる改変が、想定される。ポリヌクレオチドを含む発現ベクターは、関心対象のタンパク質を一過性に発現させるために使用されてもよく、またはランダム組換えもしくは標的組換え、例えば、相同組換えもしくは特異的組換え部位を認識するリコンビナーゼを介した組換え(例えばCre-loxを介した組換え)によって細胞ゲノム中に組み込まれてもよい。

【００６７】

典型的には、DNAを破壊または挿入するための標的部位は、遺伝子の破壊または挿入の効果が最大になるように意図して特定される。例えば、標的配列は、関心対象の遺伝子のコード領域のN末端の近くに選んでもよく、一方、DNA破損は、遺伝子の第1のエキソンまたは第2のエキソン内に導入される。典型的には、イントロン(非コード領域)は、この領域のDNA破損の修復によって標的遺伝子が破壊されない可能性があるため、破壊の標的とされない。これらの改変によって導入される変化は、生物のゲノムDNAにとって恒久的である。

【００６８】

本質的には、SEQ ID NO:33の標的部位の特定後、遺伝子編集プロトコールを用いて、非機能性遺伝子を与えた。混入宿主細胞タンパク質を除去した後に、多サブユニット抗体のような関心対象の発現可能な遺伝子(GOI)を、他の任意の望ましいエレメント、例えば、プロモーター、エンハンサー、マーカー、オペレーター、リボソーム結合部位(例えば配列内リボソーム進入部位)などと共に導入するための当技術分野において公知のプロトコールもまた、使用される。

【００６９】

好都合なことに、結果として生じる組換え細胞株は、混入宿主細胞タンパク質がないおかげで関心対象の外来性タンパク質の精製段階が省かれるという理由で、発現可能な関心対象の外来遺伝子(GOI)に関して、より効率的な下流のバイオプロセス方法を提供する。また、精製手順の省略または改良によって、回収される関心対象のタンパク質の量(力価)も増す。

【００７０】

改変CHO細胞の物理的および機能的な特徴付け

出願人らは、ポリソルベート(ポリソルベート20およびポリソルベート80を含む)の不安

定化に関連している酵素活性を発見した。この活性は、エステラーゼ、例えば、表1に挙げる配列より選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドに関連していることが判明した。これらのペプチド配列のBLAST検索によって、推定上のホスホリパーゼB様2(PLBD2、PLBL2とも呼ばれる)との同一性が明らかになった。PLBD2は、ハムスター(SEQ ID NO:32)、マウス(SEQ ID NO:34)、ラット(SEQ ID NO:35)、ヒト(SEQ ID NO:36)、およびウシ(SEQ ID NO:37)において高度に保存されている。出願人らは、哺乳動物細胞株中で製造されるいくつかのクラスの関心対象のタンパク質と一緒に特定の工程下で同時に精製されるPLBD2が、ポリソルベート20および80の加水分解を担うエステラーゼ活性を有していることを発見した。出願人らは、PLBD2が一例である他のエステラーゼ種が、個々の関心対象のタンパク質および/または宿主細胞の遺伝的/後成的背景に応じて、ポリソルベートの不安定性の一因となり得ると想像している。複数の種間で同一性を有している、哺乳動物エステラーゼ、特にPLBD2の断片を、表1に例示する。

【００７１】

（表１）

配列識別子	アミノ酸配列	配列識別子	アミノ酸配列
SEQ ID NO:1	DLLVAHNTWNSYQNMLR	SEQ ID NO:16	LTLLQLKGLEDSYEGR
SEQ ID NO:2	LIRYNNFLHDPLSLCEACIPKP	SEQ ID NO:17	MSMLAASGPTWDQLPPFQ
SEQ ID NO:3	SVLLDAASGQLR	SEQ ID NO:18	VTSFSLAKR
SEQ ID NO:4	DQSLVEDMNSMVR	SEQ ID NO:19	QNLDPPVSR
SEQ ID NO:5	QFNSGTYNNQWMIVDYK	SEQ ID NO:20	IIKKYQLQFR
SEQ ID NO:6	QGPQEAYPLIAGNNLVFSSY	SEQ ID NO:21	AQIFQRDQSLVEDMNSMVR
SEQ ID NO:7	SMLHMGQPDLWTFSPISVP	SEQ ID NO:22	LIRYNNFLHDPLSLCEACIPKP
SEQ ID NO:8	YNNFLHDPLSLCEACIPKPNA	SEQ ID NO:23	SVLLDAASGQLR
SEQ ID NO:9	LALDGATWADIFK	SEQ ID NO:24	DQSLVEDMNSMVR
SEQ ID NO:10	LSLGSGSCSAIIK	SEQ ID NO:25	DLLVAHNTWNSYQNMLR
SEQ ID NO:11	YVQPQGCVLEWIR	SEQ ID NO:26	YNNFLHDPLSLCEACIPKPNA
SEQ ID NO:12	RMSMLAASGPTWDQLPPFQ	SEQ ID NO:27	RMSMLAASGPTWDQLPPFQ
SEQ ID NO:13	SFLEINLEWMQR	SEQ ID NO:28	SMLHMGQPDLWTFSPISVP
SEQ ID NO:14	VLTILEQIPGMVVVADADKTED	SEQ ID NO:29	MSMLAASGPTWDQLPPFQ
SEQ ID NO:15	VRSVLLDAASGQLR	SEQ ID NO:30	VRSVLLDAASGQLR
		SEQ ID NO:31	QNLDPPVSR

【００７２】

ポリソルベート80のエステル加水分解が、最近報告された(Labrenz, S.R., "Ester hydrolysis of polysorbate 80 in mAb drug product: evidence in support of the hypothesized risk after observation of visible particulate in mAb formulations, " J. Pharma. Sci. 103(8):2268-77 (2014)を参照されたい)。この論文は、IgGを含む製剤中での可視粒子の形成を報告した。この筆者は、ポリソルベート80のオレイン酸エステルの酵素的加水分解が原因で、コロイド状IgG粒子が形成すると仮定した。エステラーゼは直接的に同定されなかったが、この筆者は、ポリソルベート80を分解するのに関与しているリパーゼまたはツイーナーゼ(tweenase)がIgGと同時に精製されたと推測している。興味深

いことに、ポリソルベート20と一緒に製剤化したIgGは粒子を形成せず、推定上のエステラーゼはポリソルベート20を加水分解しなかった。この筆者は、IgGに付随する推定上のリパーゼが、C12飽和脂肪酸(すなわちラウリン酸)に影響を及ぼさないことを報告した(同書、7ページ)。

【００７３】

ホスホリパーゼは、リン脂質の切断を触媒するエステラーゼ酵素のファミリーである。各ホスホリパーゼサブクラスは、その標的切断部位に基づく異なる基質特異性を有している。ホスホリパーゼB(PLB)は、高度に保存されたアミノ酸配列モチーフGly-Asp-Ser-Leu(GDSL)が存在することから、原核生物および真核生物のリパーゼタンパク質のグループに関係していることが確認された(Upton, C, and Buckley, JT. A new family of lipolytic enzymes? Trends Biochem Sci. 1995; 20:178-179)。しかし、ホスホリパーゼBはまた、公知のGDSL(S)ヒドロラーゼと一緒に分類され、真のリパーゼとの配列相同性はほとんどなく、セリンを含むモチーフを他のリパーゼよりもN末端近くに有することによって、ホスホリパーゼと構造的に別のものになっている。したがって、ホスホリパーゼB様タンパク質は、N末端求核(Ntn)ヒドロラーゼとしても分類される。機能的には、ホスホリパーゼB様酵素は、他のホスホリパーゼと同様の様式で、標的基質(ジアシルグリセロリン脂質のような脂肪酸エステル)を加水分解して、遊離脂肪酸およびエステル含有化合物を生成する(例えば、グリセロホスホコリンを生成する)。ホスホリパーゼB様タンパク質1(PLBD1)およびホスホリパーゼB様タンパク質2(PLBD2)などのPLB様タンパク質はまた、他のNtnヒドロラーゼと同様にアミダーゼ活性も有していることが示唆されている(Repo, H. et al, Proteins 2014; 82:300-311)。

【００７４】

エステラーゼ、より具体的にはホスホリパーゼB様タンパク質2のような宿主細胞遺伝子のノックアウトは、いくつかの方法で達成することができる。ホスホリパーゼ遺伝子を非機能性にすること、または標的ホスホリパーゼの機能活性を低下させることは、ホスホリパーゼゲノム配列中、特にエキソン(コード領域)中に点変異を導入することによって行うことができる。SEQ ID NO:33の核酸配列を確認しておき、標的部位の上流および下流の配列(すなわち相同アーム)を利用して、変異遺伝子を含む発現カセットを相同組換えによって組み込むことができる。本発明に従うその他の遺伝子編集ツールが、本明細書において説明される。

【００７５】

エステラーゼ活性、特にPLBD2活性を欠く細胞株は、精製し長期保存される治療的タンパク質を作製するのに有用であり、このような細胞株により、タンパク質安定性を維持し、肉眼不可視粒子(SVP)形成を減少させることによって、脂肪酸エステル界面活性剤を含む製剤中での薬学的組成物の長期保存に関連する問題が解決される(本明細書において、そっくりそのまま本明細書に組み入れられる2015年10月8日に出願されたPCT国際出願PCT/US15/54600も参照されたい)。

【００７６】

ホスホリパーゼの酵素活性を検出するためのアッセイ法には、ポリソルベート分解(推定上のエステラーゼ活性)測定が含まれる。CHO細胞から得た未精製のタンパク質上清または画分、および連続的な精製段階に供される場合には各段階または一連の段階における上清を、ポリソルベート20または80などのポリソルベートの安定性について試験する。報告された未変化(intact)ポリソルベート率(%)測定値は、混入エステラーゼ活性の量に反比例している。タンパク質試料中のエステラーゼ活性またはエステラーゼの存在を検出するための他の測定法は、当技術分野において公知である。エステラーゼ(例えば、リパーゼ、ホスホリパーゼ、またはPLBD2)の検出は、トリプシン消化質量分析法によって実施することができる。

【００７７】

タンパク質(例えば抗体)製剤中での非イオン性洗浄剤、すなわちポリソルベートのような界面活性剤の安定性は、肉眼不可視粒子の形成に直接的に相関しているという仮説が立

てられている。すなわち、ポリソルベートの分解は、界面活性剤活性の減少を招き、したがって、タンパク質が凝集し肉眼不可視粒子を形成するのを許容してしまう。さらにまたはその代わりに、分解中のソルビタン脂肪酸エステルによって放出される脂肪酸もまた、不混和性の脂肪酸液体粒子として、肉眼不可視粒子形成の一因となり得る。したがって、エステラーゼ活性を検出するために、タンパク質製剤中の直径≧10マイクロメートルの肉眼不可視粒子のレベルを数えてもよい。

【００７８】

ホスホリパーゼ活性を検出するための他のアッセイ法が、当技術分野において公知である。例えば、ホスファチジル[^{3}H]コリンおよびタンパク質上清をインキュベーションした後のホスファチジル[3H]コリンからのグリセロホスホ[^{3}H]コリン形成は、(Kanoh, H. et al. 1991 Comp Biochem Physiol 102B(2):367-369による同様のプロトコールに従う)薄層クロマトグラフによって測定することができる。

【００７９】

本明細書において開示するSEQ ID NO:32は、CHO細胞で発現されるタンパク質から同定された。他の哺乳動物種(例えば、ヒト、ラット、マウス)が、同定されたこのエステラーゼに対して高い相同性を有していることが判明した。相同配列はまた、モンゴルキヌゲネズミの他の組織型または他の同属種に由来する細胞株にも存在する可能性があり、当技術分野において周知である技術によって同定および単離することができる。例えば、異種間ハイブリダイゼーションまたはPCRに基づく技術によって、他の相同配列を同定することができる。さらに、PLBD2の変異体を、本明細書において説明するようにエステラーゼ活性について次いで試験することもできる。SEQ ID NO:32またはその変異体との核酸同一性が少なくとも約80％同一であり、かつエステラーゼ活性を有しているDNAは、バイオ医薬組成物に対してエステラーゼ活性を示すと予想され、操作された細胞株における標的破壊のための候補である。したがって、SEQ ID NO:32またはその変異体のホモログ、およびそのようなホモログを発現する細胞もまた、本発明の態様に包含される。

【００８０】

哺乳動物PLBD2配列(核酸およびアミノ酸)は、ハムスター、ヒト、マウス、およびラットのゲノム間で保存されている。表2は、例示的な哺乳動物PLBD2タンパク質およびそれらの相同性の程度を明らかにするものである。

【００８１】

（表２）PLBD2ホモログのアミノ酸同一性

哺乳動物	SEQ ID NO:	ヒトとの同一性パーセント	マウスとの同一性パーセント	ラットとの同一性パーセント	ハムスターとの同一性パーセント
ハムスター	32	80	89.7	89	-
マウス	34	80.8	-	92.6	89.7
ラット	35	-	92.6	-	89
ヒト	36	-	80.8	-	80

【００８２】

いくつかの態様において、SEQ ID NO:33の標的破壊は、SEQ ID NO:33の1～20、10～30、20～40、30～50、30～60、30～70、40～60、40～70、50～70、60～80、70～90、80～100、90～110、110～140、120～140、130～150、140～160、150～170、160～180、160～180、170～190、180～200、180～220、190～210、190～230、200～220、210～230、220～240、230～250、240～260、250～270、33～62、37～56、40～69、44～63、110～139、198～227、182～211、および242～271番の位置にまたがるヌクレオチドからなる群より選択される領域を対象とする。

【００８３】

別の態様において、標的配列は、SEQ ID NO:33の1～20、10～30、20～40、30～50、30～60、30～70、40～60、40～70、50～70、60～80、70～90、80～100、90～110、110～140、120～140、130～150、140～160、150～170、160～180、160～180、170～190、180～200

、180～220、190～210、190～230、200～220、210～230、220～240、230～250、240～260、250～270、33～62、37～56、40～69、44～63、110～139、198～227、182～211、および242～271番の位置にまたがるヌクレオチドからなる群より選択される領域内に、全面的にまたは部分的に存在する。

【００８４】

別の態様において、エステラーゼ核酸配列は、SEQ ID NO:33の配列またはその標的配列と、少なくとも約80％同一、少なくとも約81％同一、少なくとも約82％同一、少なくとも約83％同一、少なくとも約84％同一、少なくとも約85％同一、少なくとも約86％同一、少なくとも約87％同一、少なくとも約88％同一、または少なくとも約89％同一、少なくとも約90％同一、少なくとも約91％同一、少なくとも約92％同一、少なくとも約93％同一、少なくとも約94％同一、少なくとも約95％同一、少なくとも約96％同一、少なくとも約97％同一、少なくとも約98％同一、または少なくとも約99％同一である。

【００８５】

関心対象のタンパク質を高レベルで発現する細胞集団を、本明細書において提供される細胞株および方法を用いて開発することができる。本発明の細胞によって産生され単離された商業用タンパク質、タンパク質上清、またはその画分は、検出可能なエステラーゼもエステラーゼ活性も有していない。本発明の改変細胞のゲノム内に組み込まれる外来性配列によってさらに改変された細胞プールは、長期にわたって安定であると予想され、ほとんどの目的に適した細胞株として扱うことができる。組換え段階はまた、本発明の細胞株を開発する過程の後期まで遅らせることもできる。

【００８６】

標的宿主細胞タンパク質の遺伝的改変

宿主細胞ゲノムの特定の座位(すなわち、標的宿主細胞タンパク質)を遺伝的に操作するための方法は、いくつかの方法で実現することができる。遺伝子編集技術を用いて、真核細胞中の核酸配列を改変した。この核酸配列は、このような細胞中に通常存在し、混入宿主細胞タンパク質を発現する内在性配列である。細胞子孫が、操作された細胞株と同一の遺伝子型および表現型特徴を確実に共有するようにするには、クローン増殖が必要である。いくつかの例において、天然の(native)細胞は、SEQ ID NO:33の変異体のような、宿主細胞タンパク質をコードする非機能性標的核酸配列または変異標的核酸配列を組み込むための相同組換え技術によって改変される。

【００８７】

CHO PLBD2ゲノム配列を編集する1つのこのような方法は、PLBD2エキソンを特異的に標的とするためのガイドRNAおよびII型Cas酵素の使用を伴う。CHO PLBD2のエキソン1を対象とする特異的ガイドRNAが、本明細書において説明する部位特異的ヌクレアーゼ編集方法において使用された(例えば、表4を参照されたい)。PLBD2遺伝子を改変するための標的ゲノム編集の他の方法、例えば、ヌクレアーゼ、組換えに基づく方法、またはRNA干渉が、CHOゲノムの標的破壊のために使用され得る。

【００８８】

1つの局面において、SEQ ID NO:33またはその抗体結合変異体と90％同一である、宿主細胞タンパク質をコードする核酸分子をノックアウトまたは下方制御するための方法および構成物は、相同組換えを介する。例えば関心対象のエステラーゼをコードする核酸分子は、相同組換えによって、または宿主細胞ゲノムのエステラーゼ発現部位の配列を特異的に標的とする部位特異的ヌクレアーゼ方法を用いることによって、標的とすることができる。相同組換えの場合、相同なポリヌクレオチド分子(すなわち相同アーム)が整列し、それらの配列のある区間を交換する。導入遺伝子が相同なゲノム配列にはさまれている場合、この交換の間に導入遺伝子を導入することができる。1つの例において、リコンビナーゼ認識部位を、宿主細胞ゲノムの組込み部位に導入することもできる。

【００８９】

真核細胞における相同組換えは、染色体DNAの組込み部位に破損を導入することによって促進することができる。モデルの系において、染色体標的配列内に二本鎖破損が導入さ

れた場合、遺伝子ターゲティング中の相同組換えの頻度が上昇することが実証された。これは、特定のヌクレアーゼを特異的組込み部位に導くことによって達成することができる。標的遺伝子のDNA配列を認識するDNA結合タンパク質は、当技術分野において公知である。遺伝子ターゲティングベクターもまた、相同組換えを促進するのに使用される。相同組換え修復(homology directed repair)のための遺伝子ターゲティングベクターがない場合、細胞は、非相同末端結合(NHEJ)によって二本鎖破損をふさぐ(close)ことが多く、これは、切断部位において複数のヌクレオチドの欠失または挿入を招く場合がある。遺伝子ターゲティングベクターの構築およびヌクレアーゼ選択は、本発明が関連する当業者の技能の範囲内である。

【００９０】

いくつかの例において、モジュール式の構造を有し、個々の亜鉛フィンガードメインを含む亜鉛フィンガーヌクレアーゼ(ZFN)は、標的配列中の特定の3ヌクレオチドの配列を認識する。いくつかの態様では、複数の標的配列を標的とする個々の亜鉛フィンガードメインの組合せと共にZFNを利用することができる。PLBD2遺伝子(例えば、エキソン1またはエキソン2の位置)を標的破壊するためのZFN方法もまた、本発明に包含される。

【００９１】

転写活性化因子様(TAL)エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)もまた、部位特異的ゲノム編集のために使用することができる。典型的には、TALエフェクタータンパク質DNA結合ドメインは、FokIのような制限ヌクレアーゼの非特異的切断ドメインと組み合わせて利用される。いくつかの態様において、TALエフェクタータンパク質DNA結合ドメインおよび制限ヌクレアーゼ切断ドメインを含む融合タンパク質は、標的宿主細胞タンパク質、例えば、ホスホリパーゼB様2タンパク質または他の哺乳動物ホスホリパーゼなどのエステラーゼをコードする遺伝子のエキソン内の標的配列の位置でDNAを認識し切断するのに使用される。SEQ ID NO:33にコードされるCHOタンパク質の特定のエキソンに対する標的破壊または外来性配列の挿入は、エステラーゼゲノムDNAのエキソン1、エキソン2、エキソン3などの内部の位置を標的とするTALEヌクレアーゼ(TALEN)を用いることによって実施することできる(表3および4を参照されたい)。SEQ ID NO:33内のTALEN標的切断部位は、ZiFit.partners.org (ZiFit Targeter バージョン4.2)に基づいて選択することができ、次いで、公知の方法に基づいてTALENを設計する(Boch J et al., 2009 Science 326:1509-1512; Bogdanove, A. J. & Voytas, D. F. 2011 Science 333, 1843-1846; Miller, J. C. et al., 2011 Nat Biotechnol 29, 143-148)。PLBD2遺伝子(例えば、エキソン1またはエキソン2)を標的破壊するためのTALEN方法もまた、本発明に包含される。

【００９２】

RNAによって導かれるエンドヌクレアーゼ(RGEN)は、細菌の適応免疫機構から開発されたプログラム可能なゲノム工学ツールである。この系－規則的な間隔をもってクラスター化された短鎖反復回文配列(CRISPR)/CRISPR関連(Cas)免疫応答－では、タンパク質Cas9が、2つのRNAとの複合体を形成すると、配列特異的エンドヌクレアーゼを形成し、2つのRNAのうちの1つが標的選択を導く。RGENは、構成要素(Cas9およびtracrRNA)ならびに標的特異的CRISPR RNA(crRNA)からなる。DNA標的切断の効率と切断部位の位置の両方とも、標的認識のための追加要件であるプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)の位置によって変わる(Chen, H. et al, J. Biol. Chem. published online March 14, 2014, as Manuscript M113.539726)。PLBD2遺伝子(例えば、エキソン1またはエキソン2)を標的破壊するためのCRISPR-Cas9方法もまた、本発明に包含される。

【００９３】

さらに別の相同組換え方法が当業者にとって利用可能であり、例えば、正確なDNA結合特異性を有しているBuD由来ヌクレアーゼ(BuDN)(Stella, S. et al. Acta Cryst. 2014, D70, 2042-2052)がある。単一の残基対ヌクレオチドコード(single residue-to-nucleotide code)が、BuDNをSEQ ID NO:33内の特異的DNA標的へと導く。

【００９４】

配列特異的エンドヌクレアーゼまたは任意の相同組換え技術は、例えば、CHO-K1ゲノム

、すなわちNCBI参照配列NW_003614971.1中の、PLBD2をコードするエキソンのいずれか1つにおける標的配列を対象としてよく、これらのエキソンは、ヌクレオチド(nt)175367～175644の範囲のエキソン1(SEQ ID NO:47);nt168958～169051の範囲のエキソン2(SEQ ID NO:48);nt166451～166609の範囲のエキソン3(SEQ ID NO:49);nt164966～165066の範囲のエキソン4(SEQ ID NO:50);nt164564～164778の範囲のエキソン5(SEQ ID NO:51);nt162682～162779の範囲のエキソン6(SEQ ID NO:52);nt160036～160196の範囲のエキソン7(SEQ ID NO:53);nt159733～159828の範囲のエキソン8(SEQ ID NO:54);nt159491～159562の範囲のエキソン9(SEQ ID NO:55);nt158726～158878の範囲のエキソン10(SEQ ID NO:56);nt158082～158244の範囲のエキソン11(SEQ ID NO:57);またはヌクレオチド(nt)157747～157914の位置(at)のエキソン12(SEQ ID NO:58)であり、ここで、PLBD2エキソン1～12は、マイナス鎖遺伝子に基づいて説明しており、各配列の相補物もまた、これと共に組み入れられる。

【００９５】

的確なゲノム改変方法は、細胞表現型の混乱が回避されるように、SEQ ID NO:33内の独特な標的配列に適合する利用可能なツールに基づいて選択する。

【００９６】

関心対象のタンパク質

原核細胞または真核細胞において発現させるのに適した任意の関心対象のタンパク質を、提供される操作された宿主細胞系において使用することができる。例えば、関心対象のタンパク質には、抗体もしくはその抗原結合断片、キメラ抗体もしくはその抗原結合断片、ScFvもしくはその断片、Fc融合タンパク質もしくはその断片、増殖因子もしくはその断片、サイトカインもしくはその断片、または細胞表面受容体の細胞外ドメインもしくはその断片が含まれるが、それらに限定されるわけではない。関心対象のタンパク質は、単一のサブユニットからなる単純なポリペプチド、または2つもしくはそれ以上のサブユニットを含む複雑な多サブユニットタンパク質であってよい。関心対象のタンパク質は、バイオ医薬製品、食品添加物もしくは保存剤、または精製および品質規格に従うことを条件とする任意のタンパク質製品であってよい。

【００９７】

宿主細胞およびトランスフェクション

本発明の方法で使用される宿主細胞は、例えば、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、ヒト細胞、ラット細胞、およびマウス細胞を含む、真核宿主細胞である。好ましい態様において、本発明は、SEQ ID NO:33の破壊された核酸配列断片を含む細胞を提供する。

【００９８】

本発明は、関心対象の外来遺伝子、例えばバイオ医薬製品をコードする遺伝子を含む発現ベクターでさらにトランスフェクトされた、操作された哺乳動物宿主細胞を含む。任意の哺乳動物細胞を使用してよいが、1つの特定の態様において、宿主細胞はCHO細胞である。

【００９９】

トランスフェクトされた宿主細胞には、タンパク質またはポリペプチドをコードする配列を含む発現ベクターでトランスフェクトされた細胞が含まれる。発現されたタンパク質は、選択された核酸配列に応じて、好ましくは、本発明で使用するための培地に分泌されるが、細胞中に留まるか、または細胞膜中に蓄積する場合もある。組換えタンパク質を発現させるために、様々な哺乳動物細胞培養系を使用することができる。SEQ ID NO:33に対して少なくとも80％の相同性を有しているエステラーゼ遺伝子が、本発明に従って、下方制御されているか、ノックアウトされているか、または別の方法で破壊されていることを条件として、特定の選択または増幅計画のために開発された他の細胞株もまた、本明細書において提供される方法および構成物と共に有用である。具体的な細胞株は、K1と呼ばれるCHO細胞株である。組換えタンパク質の大量生産を実現するために、適切な容器に入れたバイオリアクター培地に宿主細胞株を予め順応させてもよい。

【０１００】

いくつかのトランスフェクションプロトコールが当技術分野において公知であり、Kauf

man (1988) Meth. Enzymology 185:537に総説がある。選択されるトランスフェクションプロトコールは、宿主細胞のタイプおよびGOIの性質によって決まると考えられ、ごく普通の実験法に基づいて選択することができる。任意のこのようなプロトコールの基本的要件は、最初に、関心対象のタンパク質をコードするDNAを適切な宿主細胞に導入すること、次いで、比較的安定で発現可能な様式で異種DNAを取り込んだ宿主細胞を同定し単離することである。

【０１０１】

異種DNAを細胞に導入する1つのよく使用される方法は、例えば、Wigler et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:3567, 1980)によって説明されているようなリン酸カルシウム沈殿法である。この方法によって宿主細胞に導入されたDNAは、しばしば再配列を経ることから、この手順は、独立した遺伝子を同時トランスフェクションするのに有用になっている。

【０１０２】

ポリエチレンによって誘導する細菌プロトプラストと哺乳動物細胞の融合(Schaffner et al., (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2163)は、別の有用な異種DNA導入方法である。しばしば、プロトプラスト融合プロトコールは、哺乳動物宿主細胞ゲノムに組み込まれたプラスミドDNAの複数のコピーを生じ、この技術は、選択および増幅マーカーがGOIと同じプラスミド上に存在することを必要とする。

【０１０３】

例えば、Potter et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:7161, 1988)またはShigekawa et al. (BioTechniques 6:742, 1988)によって説明されているように、エレクトロポレーションを用いて、宿主細胞の細胞質にDNAを直接的に導入することもできる。プロトプラスト融合とは違って、エレクトロポレーションは選択マーカーおよびGOIが同じプラスミド上に存在することを必要としない。

【０１０４】

哺乳動物細胞に異種DNAを導入するのに有用な他の試薬、例えば、Lipofectin(商標)試薬およびLipofectamine(商標)試薬(Gibco BRL, Gaithersburg, Md.)が説明されている。これらの市販試薬のどちらも、培養細胞に添加された場合に細胞中への核酸の取込みを促進する脂質-核酸複合体(またはリポソーム)を形成させるために使用される。

【０１０５】

GOIを増幅するための方法はまた、関心対象の組換えタンパク質を発現させるのにも望ましく、典型的には、選択マーカーの使用を伴う(前記Kaufmanの文献で概説されている)。細胞障害性薬物に対する耐性が、選択マーカーとして最も頻繁に使用される特質であり、(例えば、宿主細胞のタイプに関係なく使用することができる)優性形質または(例えば、選択の根拠となる(selected for)何らかの活性が欠損している特定の宿主細胞タイプにおいて有用である)劣性形質のいずれかの結果であり得る。いくつかの増幅マーカーが、本発明の細胞株において使用するのに適しており、当技術分野において周知の発現ベクターおよび技術によって導入され得る(例えば、Sambrook, Molecular Biology: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1989; pgs 16.9-16.14において説明されている)。

【０１０６】

当技術分野において以前に説明されているか、または公知である、有用な選択マーカーおよび遺伝子増幅のための他のツール、例えば調節エレメントもまた、哺乳動物細胞をトランスフェクトするの使用される核酸構築物に含まれてよい。選択されるトランスフェクションプロトコールおよびその際に使用するために選択されるエレメントは、使用される宿主細胞のタイプによって決まる。当業者は、本発明を具体的な用途に適応させるための多数の様々なプロトコールおよび宿主細胞を知っており、細胞培養系の要件に基づいて、所望のタンパク質を発現させるための適切な系を選択することができる。

【０１０７】

本発明の他の特徴は、本発明の例として与えられ本発明を限定することを意図しない例

示的態様を以下に説明する過程で明らかになるであろう。

【実施例】

【０１０８】

以下の例は、本明細書において説明する方法および構成物を作製および使用する方法を当業者に提供するために発表され、本発明の範囲を限定することを意図しない。使用する数値(例えば、量、温度など)に関しては正確性を徹底するよう努力を払ったが、多少の実験上の誤差およびずれは考慮されるべきである。別段の定めが無い限り、部は重量部であり、分子量は重量平均分子量であり、温度の単位は摂氏温度であり、圧力は、大気圧またはほぼ大気圧である。

【０１０９】

実施例1　宿主細胞のエステラーゼ遺伝子の標的破壊

CHO細胞に由来する標的エステラーゼ遺伝子、すなわちホスホリパーゼB様2遺伝子の破壊を使用するために、キメラRNA(すなわちガイドRNA)とそのゲノム標的との間に少なくとも20ヌクレオチド(nt)の相同性を必要とするII型CRISPR/Cas系を使用した。CHOホスホリパーゼB様2(PLBD2)核酸(SEQ ID NO:33)内のエキソンを特異的に標的とするためのガイドRNA配列を設計した。これらは、(ゲノムにおけるオフターゲット作用を最小限にするために)独特とみなされる。表3に挙げるPLBD2の以下のゲノムセグメントを標的とするゲノム編集手順で使用するために、多数の小型ガイドRNA(sgRNA)を合成した。

【０１１０】

（表３）

SEQ ID NO:	SEQ ID NO:33 ヌクレオチド番号	SEQ ID NO:47 (ゲノム座位におけるエキソン1のヌクレオチド番号)	ゲノムDNA配列
38	110-139	170-199	5'-CTGAGGTGTTGCTGAATTGCCCGGCGGGCG-3'
39	227-198	82-111	5'-GACGCGGCGTCCAGCAGCACCGAGCGGACG-3'
40	182-211	98-127	5'-ACCCGCCGGTCTCCCGCGTCCGCTCGGTGC-3'
41	242-271	212-241	5'-TGGTGGACGGCATCCATCCCTACGCGGTGG-3'
42	33-62	3-32	5'-GGCGGCCCCCATGGACCGGAGCCCCGGCGG-3'
43	40-69	10-39	5'-CCCATGGACCGGAGCCCCGGCGGCCGGGCG-3'

【０１１１】

sgRNA発現プラスミド(System Biosciences, CAS940A-1)は、小型ガイドRNAおよびsgRNAに続くtracrRNAの発現を推進するヒトH1プロモーターを含む。不死化チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞を、Cas9-H1酵素とそれに続くsgRNA配列の内の1つ(例えば、CHO PLBD2の第1のエキソンを標的とするように設計されたsgRNA1(SEQ ID NO:45)またはsgRNA2(SEQ ID NO:46))をコードするプラスミドでトランスフェクトした。sgRNA1およびsgRNA2は、それぞれSEQ ID NO:33のヌクレオチド53および59の位置またはその近くに二本鎖破損(DSB)を生じさせると予測された。したがって、DSBは、PLBD2開始コドンの約23または29ヌクレオチド下流で生じると予測された。(SEQ ID NO:33のヌクレオチド1～30がシグナルペプチドをコードすることに留意されたい)。Cas9-H1酵素をコードし、それに続く(proceeding)sgRNAを含まないプラスミド、またはCHOゲノム中に存在しない遺伝子配列をコードするsgRNAを親CHO株にトランスフェクトする陰性対照トランスフェクションを実施した。

【０１１２】

（表４）

sgRNA 名称	SEQ ID NO:	SEQ ID NO:33 ヌクレオチド番号	SEQ ID NO:47 (ゲノム座位におけるエキソン1のヌクレオチド番号)	sgRNA (ターゲティングベクターのヌクレオチド配列)
sgRNA1	45	37-56	7-26	5'- GCCCCCATGGACCGGAGCCC -3'
sgRNA2	46	44-63	14-33	5'- TGGACCGGAGCCCCGGCGGC -3'

【０１１３】

トランスフェクション後、無血清培地中で細胞を6日間培養し、次いで、フローサイトメトリーを用いて単細胞クローニングした。12日間培養した後、所望の増殖特性を有している安定なクローンを単離し、無血清培地中で増殖させ、遺伝子タイピングのために細胞ペレットを回収し、クローン細胞株を保存した。

【０１１４】

クローン細胞ペレットからゲノムDNA(gDNA)およびメッセンジャーRNA(mRNA)を単離し、定量的PCR(qPCR)によって解析した。qPCRのプライマーおよびプローブは、ゲノムDNAおよびその転写の妨害を検出するために、二本鎖破損ターゲティング事象のために使用されるsgRNA配列と部分的に重なるように設計した。候補クローン中のPLBD2遺伝子または転写物の相対存在量を相対的qPCR法によって測定した。その際、陰性対照トランスフェクションに由来するクローンを標準物質として使用した。図1を参照されたい。qPCRのプライマーおよびプローブは、PLBD2エキソン1中のsgRNA1位置またはsgRNA2位置のいずれかの配列を検出するように設計した。クローン1から単離したgDNAとRNAの両方において、PLBD2エキソン1のqPCR増幅がsgRNA1領域でもsgRNA2領域でも裏付けられなかったが、ハウスキーピング遺伝子であるGAPDHの増幅は検出された。このデータに基づいて、クローン1は、エキソン1のPLBD2の両方のゲノム対立遺伝子が破壊されている潜在的なPLBD2ノックアウトであると同定された。sgRNA2と重複するプライマーを用いるクローン8ではゲノムDNAおよびmRNAの増幅が検出されなかったが、sgRNA1プライマー/プローブの場合、対照の値を上回るゲノムDNAが検出されたことに留意されたい。部位特異的ヌクレアーゼ方法の性能を理解するために、クローン8および他のクローンをさらに解析した。

【０１１５】

クローン1中のPLBD2エキソン1全体の大きさを、gDNAまたはRNAのいずれかに由来する鋳型からのPCRによって解析し、野生型CHO細胞から増幅したものと比較した。Caliper GX機器を用いて、増幅断片の長さを測定した(図2)。クローン1からのgDNA増幅およびmRNA増幅のどちらからも、野生型対照細胞から増幅されたものより短い単一のPCR断片が生じた。

【０１１６】

増幅産物を配列決定した結果、クローン1はPLBD2ノックアウトとして同定され、PLBD2遺伝子が、フレームシフトをもたらす11bpの欠失を有していることが判明した。

【０１１７】

本発明者らはまた、sgRNA1配列と重複するqPCRプライマーによってゲノムDNA断片が同定されたことにもかかわらず、予想外に、クローン8をPLBD2ノックアウトとして同定した。検出可能なホスホリパーゼ活性を有していない、または検出可能ホスホリパーゼタンパク質を有していないクローンの同定は、技術的に困難であり時間がかかった。部位特異的ヌクレアーゼ技術は、使い勝手の良さを与え得るが、注意深いスクリーニングおよび偽陽性の排除が必要であり、2つの破壊された対立遺伝子を有している単一クローンを特定する情報(identity)に関して、予測不可能な結果が依然として起こり得る。驚くべきことに、前述の技術を用いてスクリーニングしたクローンの内の1%しか、生存能力があるPLBD2ノックアウトクローンとして同定されなかった。表5を参照されたい。

【０１１８】

（表５）

		クローンの数	全体に対する%
試験したクローン	全クローン	191	100.0%
	sgRNA1クローン	96	50.3%
	sgRNA2クローン	95	49.7%
qPCR	試験した191個のクローンからの陽性ヒット	14	7.3%
	sgRNA1ヒット	7	3.7%
	sgRNA2ヒット	7	3.7%
PCRによるエキソン1の大きさ	全qPCRヒット	14	7.3%
	qPCR偽陽性	6	3.1%
	sgRNA1ヒット	5	2.6%
	sgRNA2ヒット	3	1.6%
配列決定	全ヒット	8	4.2%
	KO + WT	1	0.5%
	不確かなヘテロ接合性	3	1.6%
	インフレーム破壊	2	1.0%
	KO破壊	2	1.0%

【０１１９】

実施例2　候補クローン細胞株におけるモノクローナル抗体(mAb1)の導入および発現

EESYR座位への組換えを介したカセット交換(RMCE)を容易にするためのCreリコンビナーゼの存在下で、クローン1および野生型対照宿主細胞株を、mAb1の軽鎖および重鎖、完全ヒトIgGをコードするプラスミドでトランスフェクトした(2010年8月10日に発行された米国特許第7771997B2号)。トランスフェクトされた培養物を、400ug/mLヒグロマイシンを含む無血清培地中で11日間、選択した。RMCEを経た細胞をフローサイトメトリーによって単離した。PLBD2ノックアウトクローン1および野生型宿主細胞株から生じた、同等の組換え集団が観察された(データ不掲載)。mAb1を発現するクローン1由来の同質遺伝子細胞株をRS001と呼び、PLBD2野生型宿主に由来するmAb1発現細胞株をRS0WTと呼んだ。

【０１２０】

RS001またはRS0WTからのmAb1の流加培養生産を、標準的な12日間の工程で実施した。0日目、3日目、5日目、7日目、10日目、および13日目に、各生産培養物の馴化培地を試料採取し、プロテインA結合画分を定量した(図3)。RS001培養物からのmAb1のタンパク質力価は、RS0WTから生産されたものと同等であり、かつ予想外に、これら2種の培養物に関して細胞の挙動に観察可能な差異はなかった。CHO宿主細胞中のPLBD2または任意の内在性遺伝子の破壊が外来性組換えタンパク質、特に治療的モノクローナル抗体の生産に観察可能な有害作用を有しているかどうかは、予測することができない。

【０１２１】

実施例3　未改変CHO細胞におけるエステラーゼ活性検出

PLBD2変異体の上清における推定上のエステラーゼ活性を検出するために、ポリソルベート20またはポリソルベート80の分解を測定した。CHO細胞から得た未精製のタンパク質上清、および連続的な精製段階に供される場合には各段階または一連の段階で採取された上清を、ポリソルベートの安定性について試験した。報告された未変化ポリソルベートのパーセントは、混入物であるエステラーゼの活性の量に反比例していた。CHO細胞から得た未精製のタンパク質上清、および連続的な精製段階に供される場合には各段階または一

連の段階での上清を、ポリソルベート分解を測定するアッセイ法において試験した。報告された未変化ポリソルベートの相対的レベルは、混入物であるエステラーゼの活性のレベルに反比例している。

【０１２２】

ポリソルベート20の分解を調査して、モノクローナル抗体製剤におけるポリソルベート20分解の原因である原因物質を明らかにした。10kDaろ過によって緩衝化抗体(150mg/mL)を2つの画分、すなわちタンパク質画分および緩衝液画分に分けた。これら2つの画分、ならびに処置されていない緩衝化抗体に0.2%(w/v)の高度に精製されたポリソルベート20(PS20-B)を添加し、最長で14日間、45℃でストレスを加えた。この研究により、タンパク質画分はラウリン酸ソルビタン(すなわち、ポリソルベート20の主成分)の分解に関する作用を有しているが、緩衝液画分は有していないこと(表6、パートA、1～2列)およびポリソルベート20の分解は抗体濃度と相関関係があること(表6、パートB、3～4列)が示された。

【０１２３】

（表６）

パートA

画分	残存エステル(%) (45℃で14日間)
原薬	75%
タンパク質画分	75%
緩衝液画分	100%

パートB

抗体濃度 (mg/mL)	残存エステル(%) (45℃で12日間)
150	82%
75	92%
25	98%

【０１２４】

表7に示すように、モノクローナル抗体を未改変CHO細胞において作製し、様々な工程によって精製し、未変化ポリソルベート20のパーセントに基づいてエステラーゼ活性を測定した。

【０１２５】

（表７）

工程番号	精製段階	未変化ポリソルベート20のパーセント
1	プロテインAアフィニティー捕捉 (PA)	54%
2	PA > 陽イオン交換 (CEX)	25%
3	PA > CEX > 陰イオン交換 (AEX)	86%
4	PA > CEX > 疎水性相互作用 (HIC)	90%
5	PA > AEX	83%
6	PA > AEX > HIC	92%

【０１２６】

疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC)が、残存PLBD2を除去するのに最も効率的であった。いくつかの状況において、精製段階の数を減らし、費用を少なくすることを実現させることができる。したがって、ホスホリパーゼの発現レベルが低下した改変CHO細胞が、精製段階を減らし、例えば、HIC精製の必要をなくし得ることが予期された。

【０１２７】

実施例4　未改変CHO細胞と比べた、改変CHO細胞から精製されたmAb1におけるエステラーゼタンパク質の存在量および活性の検出。

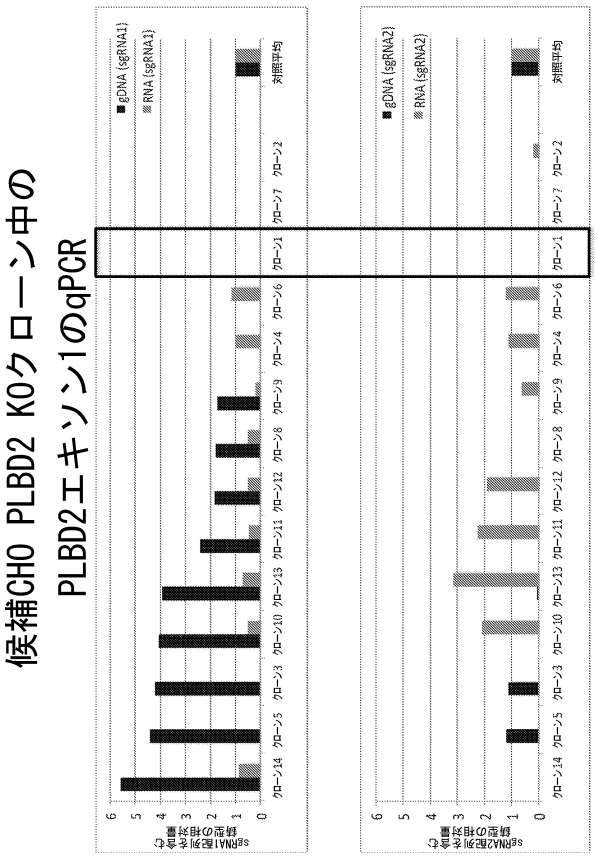
mAb1をRS001およびRS0WTから生産させ、PAのみ、またはPAおよびAEXクロマトグラフィーのいずれかを用いて、馴化培地から精製した。トリプシン消化質量分析法を用いて、RS001およびRS0WTに由来するPAで精製したmAB1のリパーゼ存在量を解析した。RS001およびRS0WTのmAb1のトリプシン消化物を、SEQ ID NO:32に由来するイオン断片化された特定の産

物をモニターするように設定された三重四重極型質量分析計と連結された逆相液体クロマトグラフィーカラムに注入した。並行して、内在性PLBD2を含まないmAb1に様々な量の組換えPLBD2を添加することによって、一連のPLBD2標準物質を調製した。実験反応および対照反応のシグナルを用いて、RS001およびRS0WTに由来するmAb1中のPLBD2の存在量を定量した(図4)。PAのみを用いて精製した場合、クローン8によって産生されたmAb1の精製試料では、検出可能な量のPLBD2タンパク質は観察されなかった(データ不掲載)。

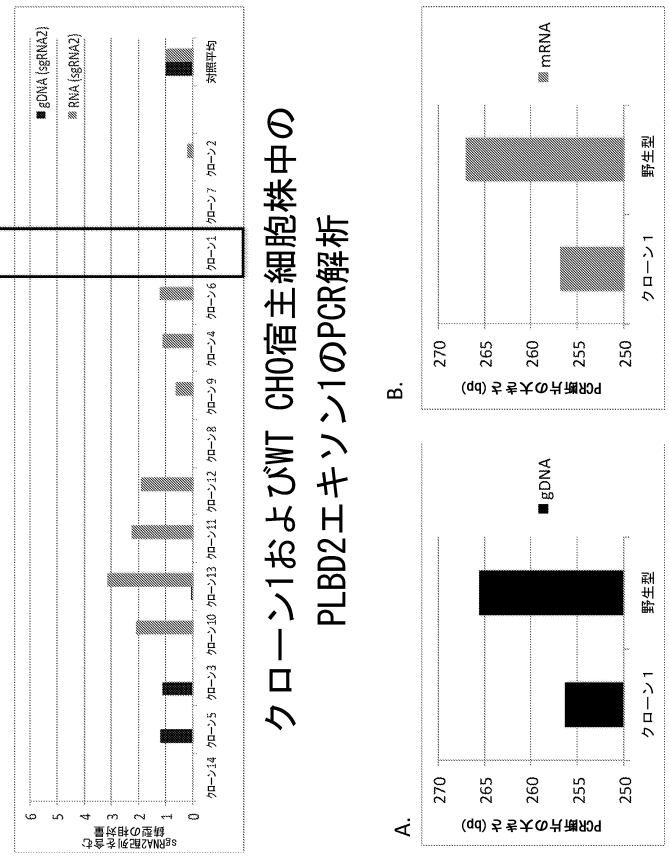
【０１２８】

本発明は、他の具体的な態様に包含され得る。

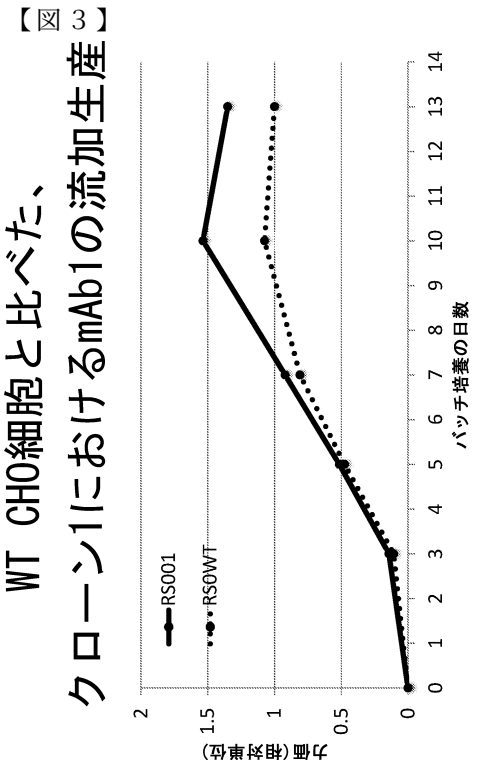
【図１】



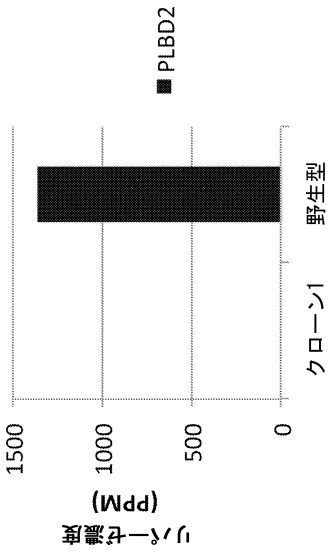
【図２】



【図３】



【図４】



【配列表】

0006751402000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
Ｃ１２Ｐ 21/08 (2006.01) Ｃ１２Ｐ 21/08

(74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一
(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
(74)代理人 100205707
弁理士 小寺 秀紀
(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
(74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘
(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
(72)発明者 ブラコフ ダリア
アメリカ合衆国 １０５９１ ニューヨーク州 タリタウン オールド ソー ミル リバー ロード ７７７ リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド内
(72)発明者 ゴーレン マイケル
アメリカ合衆国 １０５９１ ニューヨーク州 タリタウン オールド ソー ミル リバー ロード ７７７ リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド内
(72)発明者 チェン ゲング
アメリカ合衆国 １０５９１ ニューヨーク州 タリタウン オールド ソー ミル リバー ロード ７７７ リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド内

審査官 西 賢二

(56)参考文献 Vanderlaan, M. et al., "Hamster phospholipase B-like 2 (PLBL2): A host-cell protein impurity in therapeutic monoclonal antibodies derived from chinese hamster ovary cells", BioProcess International, ２０１５年 ４月, Vol. 13, pp. 18-29, 55
Bogarapu, S. et al., "PHENOTYPE OF A PATIENT WITH CONTIGUOUS DELETION OF TBX5 AND TBX3 : EXPANDING THE DISEASE SPECTRUM", Am. J. Med. Genet. Part A, ２０１４年, Vol. 164A, pp. 1304-1309, ＵＲＬ, http://dx.doi.org/10.1002/ajmg.a.36447
Labrenz, S. R., "Ester hydrolysis of polysorbate 80 in mAb drug product: evidence in support of the hypothesized risk after the observation of visible particulate in mAb formulations", J. Pharm. Sci., ２０１４年, Vol. 103, pp. 2268-2277
Repo, H. et al., "Is the bovine lysosomal phospholipase B-like protein an amidase?", Proteins, ２０１４年, Vol. 82, pp. 300-311
Lakomek, K. et al., "Initial insight into the function of the lysosomal 66.3 kDa protein from mouse by means of X-ray crystallography", BMC Struct. Biol., ２００９年, Vol. 9: 56, pp. 1-17

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ １５／００－１５／９０

C12N 9/00-9/99
C07K 1/00-7/08
C12P 1/00-41/00
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
UniProt/GeneSeq