

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2013年10月31日(31.10.2013)

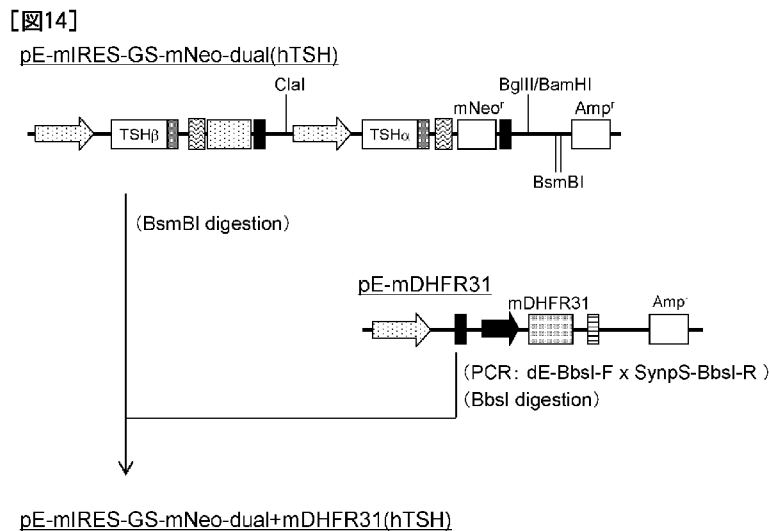


(10) 国際公開番号  
WO 2013/161958 A1

- (51) 国際特許分類:  
C12N 15/09 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)
  - (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/062251
  - (22) 国際出願日: 2013年4月25日(25.04.2013)
  - (25) 国際出願の言語: 日本語
  - (26) 国際公開の言語: 日本語
  - (30) 優先権データ:  
特願 2012-102796 2012年4月27日(27.04.2012) JP
  - (71) 出願人: 日本ケミカルリサーチ株式会社 (JCR PHARMACEUTICALS CO., LTD.) [JP/JP]; 〒6590021 兵庫県芦屋市春日町三番十九号 Hyogo (JP).
  - (72) 発明者: 高橋 健一 (TAKAHASHI, Kenichi); 〒6512241 兵庫県神戸市西区室谷2-2-10 日本ケミカルリサーチ株式会社内 Hyogo (JP). 柿本 真司 (KAKIMOTO, Shinji); 〒6512241 兵庫県神戸市西区室谷2-2-10 日本ケミカルリサーチ株式会社内 Hyogo (JP).
  - (74) 代理人: 早坂 巧, 外 (HAYASAKA, Takumi et al.); 〒5410041 大阪府大阪市中央区北浜2丁目5番13号 北浜平和ビル7階 早坂国際特許事務所 Osaka (JP).
  - (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
  - (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
 — 国際調査報告 (条約第21条(3))  
 — 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: NOVEL EXPRESSION VECTOR

(54) 発明の名称: 新規な発現ベクター



(57) Abstract: Disclosed is a novel expression vector that effectively expresses a recombinant protein in a mammalian cell, a mammalian cell that is transformed into the vector, and a method for producing the mammalian cell. The expression vector that is an expression vector which expresses a protein contains a gene expression control region, a gene that encodes the protein downstream thereof, an internal ribosome binding site further downstream thereof, and a gene that encodes a glutamine synthetase further downstream thereof, and further contains a dihydrofolate reductase gene downstream of the gene expression control region or another gene expression control region other than the gene expression control region.

(57) 要約:

[続葉有]

WO 2013/161958 A1



---

組換え体蛋白質を哺乳動物細胞内で効率よく発現させるための新規な発現ベクター、該ベクターで形質転換された哺乳動物細胞、及び該哺乳動物細胞の製造方法が開示されている。当該発現ベクターは、蛋白質を発現させるための発現ベクターであって、遺伝子発現制御部位、並びに、その下流に該蛋白質をコードする遺伝子、更に下流に内部リボソーム結合部位、及び更に下流にグルタミン合成酵素をコードする遺伝子を含み、且つ、該遺伝子発現制御部位の又は該遺伝子発現制御部位とは別の遺伝子発現制御部位の下流にジヒドロ葉酸レダクターゼ遺伝子を更に含んでなる。

## 明 細 書

発明の名称： 新規な発現ベクター

### 技術分野

[0001] 本発明は、組換え体蛋白質を哺乳動物細胞内で効率よく発現させるための新規な発現ベクターに関し、詳しくは、遺伝子発現制御部位、その下流に所望の蛋白質をコードする遺伝子、更に下流に内部リボソーム結合部位、及び更に下流にグルタミン合成酵素をコードする遺伝子を含み、且つ該遺伝子発現制御部位又は該遺伝子発現制御部位とは別の遺伝子発現制御部位の下流に、ジヒドロ葉酸レダクターゼ遺伝子を更に含んでなる、発現ベクターに関する。

### 背景技術

[0002] 所望の蛋白質をコードする遺伝子を組み込んだ発現ベクターで形質転換された哺乳動物細胞を用いて、組換え体蛋白質を製造する方法は、医薬品製造等の産業分野で広く普及した技術であり、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼA、イズロン酸2-スルファターゼ、グルコセレブロシダーゼ、ガルスルファターゼ、 $\alpha$ -L-イズロニダーゼ、酸性 $\alpha$ -グルコシダーゼ等のリソソーム酵素、組織プラスミノゲンアクチベーター（t-PA）、血液凝固第VII因子、血液凝固第VIII因子、血液凝固第IX因子等の血液凝固因子、エリスロポエチン、インターフェロン、トロンボモジュリン、卵胞刺激ホルモン、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、各種抗体医薬等がこの技術を用いて製造され、医薬品として市販されている。

[0003] このとき、発現ベクターとして、強力な遺伝子発現を誘導する遺伝子制御部位、例えば、サイトメガロウイルス（CMV）由来のプロモーター、SV40初期プロモーター（SV40エンハンサー／プロモーター）、伸長因子1 $\alpha$ （EF-1）プロモーターなどの下流に、所望の蛋白質をコードする遺伝子を組み込んだものを用いるのが一般的である。このような発現ベクターが導入された哺乳動物細胞は、発現ベクターに組み込んだ所望の蛋白質を発

現するようになるが、その発現量は個々の細胞により異なり一様ではない。従って、組換え体蛋白質を効率よく生産するためには、発現ベクターが導入された哺乳動物細胞から、所望の蛋白質の発現レベルが高い細胞を選択するステップが必要となる。この選択ステップを行うために、発現ベクターには選択マーカーとして働く遺伝子が組み込まれている。

[0004] 選択マーカーとして最も一般的なものはピューロマイシン、ネオマイシン等の薬剤を分解する酵素（薬剤耐性マーカー）である。哺乳動物細胞は一定濃度以上の上記薬剤の存在下で死滅する。しかし、発現ベクターが導入された哺乳動物細胞は、発現ベクターに組み込んだ薬剤選択マーカーにより上記薬剤を分解し、これを無毒化又は弱毒化することができるので、上記薬剤存在下でも生存可能となる。従って、発現ベクターが導入された細胞を、上記薬剤をある一定濃度含む培地中で培養すると、薬剤選択マーカーを高レベルで発現する細胞のみが増殖して、それらが選択される結果となる。薬剤選択マーカーを高レベルで発現する細胞は、発現ベクターに同時に組み込んだ所望の蛋白質をコードする遺伝子も高レベルに発現する傾向があるので、結果として、所望の蛋白質を高レベルで発現する哺乳動物細胞が得られる。

[0005] 所望の蛋白質を高レベルで発現する哺乳動物細胞を得る方法として、ジヒドロ葉酸レダクターゼ（DHFR）を選択マーカーとして利用する方法も知られている（非特許文献1）。ジヒドロ葉酸レダクターゼは、ジヒドロ葉酸をテトラヒドロ葉酸に還元する酵素である。哺乳動物細胞をDHFRの阻害剤である一定濃度以上のメトトレキサート（MTX）存在下で、チミジン・ヒポキサンチン欠乏培地で培養すると、細胞は死滅する。しかし、選択マーカーとしてDHFR遺伝子が組み込まれた発現ベクターを哺乳動物細胞に導入すると、該細胞では、DHFRの発現レベルが上昇するようになるので、より高濃度のMTX存在下でも増殖可能となる。このとき、MTXの濃度を徐々に上昇させながら培養を続けると、一層高濃度のMTX存在下でも増殖可能な細胞が得られる。この現象は、哺乳動物細胞のゲノム内に組み込まれた該発現ベクターが、ゲノム内で重複してコピー数を増やすことにより引き起こされると考

えられている。すなわち、該発現ベクターのコピー数が増えることにより、一つの細胞中のゲノム内にあるDHFRの遺伝子数が増加することになり、相対的にDHFRの発現量が増加する。このとき、発現ベクターに同時に組み込んだ所望の蛋白質をコードする遺伝子のコピー数も重複して増加するので、所望の蛋白質を高レベルで発現する哺乳動物細胞が得られる。

[0006] 選択マーカーとして、グルタミン合成酵素（GS）を用いる発現ベクターも知られている（特許文献1，2）。グルタミン合成酵素は、グルタミン酸とアンモニアからグルタミンを合成する酵素である。哺乳動物細胞をグルタミン合成酵素の阻害剤である一定濃度以上のメチオニンスルホキシミン（MSX）存在下で、グルタミン欠乏培地で培養すると、細胞は死滅する。しかし、選択マーカーとしてグルタミン合成酵素が組み込まれた発現ベクターを哺乳動物細胞に導入すると、該細胞では、グルタミン合成酵素の発現レベルが上昇するようになるので、より高濃度のMSX存在下でも増殖可能となる。このとき、MSXの濃度を徐々に上昇させながら培養を続けると、より高濃度のMSX存在下でも増殖可能な細胞が得られる。この現象は、選択マーカーとしてDHFRを利用したときと同様の機構により起こる。従って、発現ベクターに、GS遺伝子とともに所望の蛋白質をコードする遺伝子を組み込むことにより、所望の蛋白質を高レベルで発現する哺乳動物細胞が得られる。例えば、特許文献1には、GS遺伝子とメチオニンスルホキシミン（MSX）を用いることにより、DHFR遺伝子とメトトレキセート（MTX）を使用する場合よりも、ベクターDNAのコピー数を増加し得ることが記載されている。また、特許文献2には、GS遺伝子とMSXを用いることにより、宿主細胞のDNA中で、GS遺伝子のコピー数の増加に付随して、これと異なる異系遺伝子のコピー数をも増加させることができ、かくして所望のポリペプチドの生産のレベルを増大できることが記載されている。

[0007] このように、選択マーカーを含む発現ベクターは、効率の良い組換え体蛋白質の製造に適しており、広く用いられている。発現ベクター上で、所望の蛋白質をコードする遺伝子と選択マーカーをコードする遺伝子は、一般に、

それぞれ別の遺伝子制御部位下に組み込まれる（特許文献3）。しかし、一つの遺伝子制御部位下に、所望の蛋白質と選択マーカをコードする遺伝子を直列に組み込んで発現させる方法も知られており（特許文献4～7）、このとき、所望の蛋白質と選択マーカをコードする遺伝子の間には、内部リボソーム結合部位（IRES: internal ribosome entry site）などが挿入され、これにより、一つの遺伝子制御部位から2つの遺伝子の発現が可能となる。内部リボソーム結合部位は種々知られており、例えば、ピコルナウイルス、ポリオウイルス、脳心筋炎ウイルス、鶏伝染性ファブリキウス囊病ウイルス、由来のものがある（特許文献8～10）。

[0008] 内部リボソーム結合部位を応用した発現ベクターとして、内部リボソーム結合部位の下流に選択マーカとして単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼを組み込んだ発現ベクター（特許文献11）、2以上の内部リボソーム結合部位を用いて3種以上の遺伝子を結合させた発現ベクター（特許文献12）が知られている。

[0009] 上記のように、種々の発現ベクターの開発により、哺乳動物細胞を用いて組換え体蛋白質を製造する方法が、エリスロポエチン等の医薬品の製造において実用化されているが、その製造コストを低減するため、より効率のよい発現ベクターの開発が常に求められている。

## 先行技術文献

### 特許文献

- [0010] 特許文献1：特表昭63-502955号公報  
特許文献2：特表平5-504050号公報  
特許文献3：特開2009-273427号公報  
特許文献4：特開昭59-173096号公報  
特許文献5：特開昭60-199387号公報  
特許文献6：特表平4-500004号公報  
特許文献7：特開平8-256776号公報  
特許文献8：特表平6-509713号公報

特許文献9：特表平8-502644号公報

特許文献10：特開平10-327871号公報

特許文献11：特表2008-539785号公報

特許文献12：特表2004-520016号公報

### 非特許文献

[0011] 非特許文献1：Kaufman RJ. et al., Mol Cel Biol. 2, 1304-19 (1982)

### 発明の概要

#### 発明が解決しようとする課題

[0012] 組換え体蛋白質を哺乳動物細胞内で効率よく発現させるための新規な発現ベクター、該ベクターで形質転換された哺乳動物細胞、及び該哺乳動物細胞の製造方法を提供することを目的とする。

#### 課題を解決するための手段

[0013] 上記目的に向けた研究において、本発明者らは、遺伝子発現制御部位、並びに、その下流にヒト甲状腺刺激ホルモン（hTSH）等の所望の蛋白質をコードする遺伝子、更に下流に内部リボソーム結合部位、及び更に下流にグルタミン合成酵素をコードする遺伝子を含み、且つ該遺伝子発現制御部位の又は別の遺伝子発現制御部位の下流にジヒドロ葉酸レダクターゼをコードする遺伝子を更に含んだ発現ベクターを用いて、哺乳動物細胞を形質転換させることにより、該蛋白質をコードする遺伝子を高レベルで発現させることができることを見出し、本発明を完成した。すなわち、本発明は以下を提供する。

1. 蛋白質を発現させるための発現ベクターであって、遺伝子発現制御部位（A）、並びに、その下流に該蛋白質をコードする遺伝子、更に下流に内部リボソーム結合部位、及び更に下流にグルタミン合成酵素をコードする遺伝子を含み、且つ、該遺伝子発現制御部位（A）の又は該遺伝子発現制御部位（A）とは別の遺伝子発現制御部位（B）の下流にジヒドロ葉酸レダクターゼ遺伝子を更に含んでなる、発現ベクター。

2. 該遺伝子発現制御部位（A）及び／又は該遺伝子発現制御部位（B）

が、サイトメガロウイルス由来のプロモーター、SV40初期プロモーター、伸長因子1プロモーターからなる群から選択されるものである、上記1の発現ベクター。

3. 該内部リボソーム結合部位が、ピコルナウイルス科のウイルス、口蹄疫ウイルス、A型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、コロナウイルス、ウシ腸内ウイルス、サイラーのネズミ脳脊髄炎ウイルス、コクサッキーB型ウイルス、ヒト免疫グロブリン重鎖結合蛋白質遺伝子、ショウジョウバエアンテナペディア遺伝子、ショウジョウバエウルトラビトラックス遺伝子からなる群から選択されるウイルス又は遺伝子の5'非翻訳領域に由来するものである、上記1又は2の発現ベクター。

4. 該内部リボソーム結合部位が、ピコルナウイルス科のウイルスの5'非翻訳領域に由来するものである、上記1又は2の発現ベクター、

5. 該内部リボソーム結合部位が、マウス脳心筋炎ウイルスの5'非翻訳領域に由来するものである、上記1又は2の発現ベクター。

6. 該内部リボソーム結合部位が、野生型の内部リボソーム結合部位の塩基配列に、1又は2以上の変異を加えたものである、上記1ないし5の何れかの発現ベクター、

7. 該野生型の内部リボソーム結合部位の塩基配列が複数の開始コドンを含み、該変異により、それら複数の開始コドンのうち一部が破壊されたものである、上記6の発現ベクター。

8. 該内部リボソーム結合部位が、配列番号1の塩基配列を含むものである、上記5の発現ベクター。

9. 該内部リボソーム結合部位が、配列番号2の塩基配列を含むものである、上記5の発現ベクター。

10. 該内部リボソーム結合部位が、配列番号3の塩基配列を含むものである、上記5の発現ベクター。

11. 該内部リボソーム結合部位が、配列番号4の塩基配列を含むものである、上記5の発現ベクター。

12. 該内部リボソーム結合部位が、配列番号5の塩基配列を含むものである、上記5の発現ベクター。

13. 該内部リボソーム結合部位が、配列番号6の塩基配列を含むものである、上記5の発現ベクター。

14. 該蛋白質をコードする該遺伝子と該内部リボソーム結合部位との間の領域又はグルタミン合成酵素をコードする該遺伝子の下流の領域において、該内部リボソーム結合部位とは別の内部リボソーム結合部位及びその下流に薬剤耐性遺伝子を更に含んでなる、上記1ないし13の何れかの発現ベクター。

15. 該遺伝子発現制御部位(A)及び遺伝子発現制御部位(B)とは別に、更なる遺伝子発現制御部位(C)及びその下流に薬剤耐性遺伝子を更に含んでなる、上記1ないし13の何れかの発現ベクター。

16. 該薬剤耐性遺伝子が、ピューロマイシン又はネオマイシン耐性遺伝子である、上記14又は15の発現ベクター。

17. 該蛋白質をコードする該遺伝子が、ヒト由来の遺伝子である上記1ないし16の何れかの発現ベクター。

18. ヒト由来の該遺伝子が、リソソーム酵素、組織プラスミノゲンアクチベーター(t-PA)、血液凝固因子、エリスロポエチン、インターフェロン、トロンボモジュリン、甲状腺刺激ホルモン(TSH)、卵胞刺激ホルモン、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、及び抗体をコードする遺伝子からなる群から選択されるものである、上記17の発現ベクター。

19. ヒト由来の該遺伝子が、リソソーム酵素をコードする遺伝子である、上記17の発現ベクター。

20. 該リソソーム酵素が、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼA、イズロン酸2-スルファターゼ、グルコセレブロシダーゼ、ガルスルファラーゼ、 $\alpha$ -L-イズロニダーゼ、及び酸性 $\alpha$ -グルコシダーゼからなる群から選択されるものである、上記19の発現ベクター。

21. ヒト由来の該遺伝子が、エリスロポエチンをコードする遺伝子であ

る上記 17 の発現ベクター。

22. 上記 1 ないし 21 の何れかの発現ベクターで形質転換された哺乳動物細胞。

23. 該哺乳動物細胞が、内因性のジヒドロ葉酸レダクターゼ遺伝子を欠損したものである、上記 22 の細胞。

24. 該哺乳動物細胞が、CHO 細胞である、上記 22 又は 23 の細胞。

25. (a) 上記 1 ないし 21 の何れかの発現ベクターを、哺乳動物細胞に導入するステップ、

(b) 該発現ベクターが導入された哺乳動物細胞を、ジヒドロ葉酸レダクターゼ阻害剤の存在下で選択培養するステップ、及び

(c) 該選択培養により選択された細胞を、グルタミン合成酵素阻害剤の存在下で更に選択培養するステップ

を含む、該蛋白質をコードする遺伝子を発現する形質転換細胞の製造方法。

26. (a) 上記 14 ないし 16 の何れかの発現ベクターを、哺乳動物細胞に導入するステップ、

(b) 該発現ベクターが導入された哺乳動物細胞を、ジヒドロ葉酸レダクターゼ阻害剤の存在下で選択培養するステップ、及び

(c) 該選択培養により選択された細胞を、グルタミン合成酵素阻害剤の存在下で更に選択培養するステップ

を含む、該蛋白質をコードする遺伝子を発現する形質転換細胞の製造方法であって、該ステップ (a) と該ステップ (b) の間、又は該ステップ (b) と該ステップ (c) の間に、該発現ベクターが導入された哺乳動物細胞を、該薬剤耐性遺伝子に対応する薬剤の存在下で選択培養するステップを更に含む、製造方法。

## 発明の効果

[0014] 本発明によれば、哺乳動物細胞内で、所望の組換え体蛋白質を効率よく発現させるための、発現ベクターを得ることができる。該発現ベクターを哺乳動物細胞に導入し、次いで選択培養することにより、該組換え体蛋白質を効

率よく生産する形質転換細胞を得ることができる。こうして得た形質転換細胞を用いれば、該組換え体蛋白質の製造コストを大幅に低減することができる。

### 図面の簡単な説明

- [0015] [図1-1] pE-neoベクターの構築方法を示す流れ図。  
[図1-2] pE-neoベクターの構築方法を示す流れ図。  
[図2-1] pE-hygrベクターの構築方法を示す流れ図。  
[図2-2] pE-hygrベクターの構築方法を示す流れ図。  
[図2-3] pE-hygrベクターの構築方法を示す流れ図。  
[図3-1] pE-IRES-GS-puroの構築方法を示す流れ図。  
[図3-2] pE-IRES-GS-puroの構築方法を示す流れ図。  
[図3-3] pE-IRES-GS-puroの構築方法を示す流れ図。  
[図3-4] pE-IRES-GS-puroの構築方法を示す流れ図。  
[図3-5] pE-IRES-GS-puroの構築方法を示す流れ図。  
[図3-6] pE-IRES-GS-puroの構築方法を示す流れ図。  
[図3-7] pE-IRES-GS-puroの構築方法を示す流れ図。  
[図3-8] pE-IRES-GS-puroの構築方法を示す流れ図。  
[図3-9] pE-IRES-GS-puroの構築方法を示す流れ図。  
[図4] pE-mIRES-GS-puroの構築方法を示す流れ図。  
[図5] pE-mIRES-GSの構築方法を示す流れ図。  
[図6] pE-mIRES-GS-mNeoの構築方法を示す流れ図。  
[図7] pBlue-EF1/mIRES-mNeoの構築方法を示す流れ図。  
[図8] pBlue-EF1/SVpAの構築方法を示す流れ図。  
[図9] pE-mDHFR31の構築方法を示す流れ図。  
[図10-1] pCI-neo(TSH $\alpha$ -WAP3' UTR)の構築方法を示す流れ図。  
[図10-2] pCI-neo(TSH $\beta$ -WAP3' UTR)の構築方法を示す流れ図。  
[図11] pE-mIRES-GS-mNeo(hTSH $\beta$ )の構築方法を示す流れ図。  
[図12] pBlue-EF1/mIRES-mNeo(hTSH $\alpha$ )の構築方法を示す流れ図。

[図13]pE-mIRES-GS-mNeo-dual(hTSH)の構築方法を示す流れ図。

[図14]pE-mIRES-GS-mNeo-dual+mDHFR31(hTSH)の構築方法を示す流れ図。

[図15]pE-mIRES-GS-mNeo(RTX-H)の構築方法を示す流れ図。

[図16]pBlue-EF1/mIRES-mNeo(RTX-L)の構築方法を示す流れ図。

[図17]pE-mIRES-GS-mNeo-dual(RTX)の構築方法を示す流れ図。

[図18-1]pBlue-EF1/SVpA(RTX-L)の構築方法を示す流れ図。

[図18-2]pE-mIRES-GS-dual(RTX)の構築方法を示す流れ図。

[図18-3]pE-mIRES-GS-dual+mDHFR31(RTX)の構築方法を示す流れ図。

### 発明を実施するための形態

[0016] 本発明において、「遺伝子」の語は、構造遺伝子を意味する。また、「遺伝子発現制御部位」とは、その下流に存在する遺伝子の転写の頻度を制御（調節）することができるDNA上の領域のことであり、一般にプロモーター又はプロモーター遺伝子と称されるものである。遺伝子発現制御部位は、生体内で発現する遺伝子のほぼ全ての上流側に存在し、その転写の頻度を制御（調節）するものであり、その塩基配列は多様である。本発明において用いることのできる遺伝子発現制御部位は、その下流に組み込んだ遺伝子の転写を、哺乳動物細胞内において強力に誘導することができるものである限り特に限定はないが、好ましくはサイトメガロウイルス（CMV）由来のプロモーター、SV40 初期プロモーター等のウイルス由来のプロモーター、及び伸長因子1 $\alpha$  (EF-1)プロモーターなどである。

[0017] 本発明において、「内部リボソーム結合部位」とは、mRNA鎖の内部に存在する、リボソームが直接結合し且つキャップ構造非依存性に翻訳を開始し得る領域（構造）、又は転写されることにより該領域を生じるDNA鎖の領域（構造）である。また、本発明において、「内部リボソーム結合部位をコードする遺伝子」とは、転写されることにより該領域を生じるDNA鎖の領域（構造）である。内部リボソーム結合部位は、一般に、IRES (internal ribosome entry site) と称され、ピコルナウイルス科のウイルス（ポリオウイルス、ライノウイルス、マウス脳心筋炎ウイルスなど）、口蹄疫ウイルス、A型肝炎ウ

イルス、C型肝炎ウイルス、コロナウイルス、ウシ腸内ウイルス、サイラーのネズミ脳脊髄炎ウイルス、コクサッキーB型ウイルス等のウイルスの5'非翻訳領域、ヒト免疫グロブリン重鎖結合蛋白質、ショウジョウバエアンテナペディア、ショウジョウバエウルトラビトラックス等の遺伝子の5'非翻訳領域に見出されている。ピコルナウイルスの場合、そのIRESは、mRNAの5'非翻訳領域に存在する約450bpからなる領域である。ここで「ウイルスの5'非翻訳領域」とは、ウイルスのmRNAの5'非翻訳領域、又は転写されることにより該領域を生じるDNA鎖の領域（構造）である。

[0018] 本発明において、内部リボソーム結合部位は、哺乳動物細胞内、特にチャイニーズハムスターの卵巣に由来する細胞（CHO細胞）内で、内部リボソーム結合部位として機能するものである限り特に限定はなく、何れのものをも使用することができる。それらのうち、好ましくはウイルスの5'非翻訳領域に由来する内部リボソーム結合部位、より好ましくはピコルナウイルス科のウイルスの5'非翻訳領域に由来する内部リボソーム結合部位、更に好ましくはマウス脳心筋炎ウイルスの5'非翻訳領域に由来する内部リボソーム結合部位が挙げられる。

[0019] 本発明において、内部リボソーム結合部位は、野生型の塩基配列を有するものをそのまま使用することができる。また、これら野生型の内部リボソーム結合部位の塩基配列に、1又は2以上の変異（例えば、置換、欠損、又は／及び挿入などをいう。）を加えた変異型の内部リボソーム結合部位も、哺乳動物細胞内（特にCHO細胞内）で内部リボソーム結合部位として機能するものである限り、何れのものをも使用することができる。また、2以上の内部リボソーム結合部位を融合させたキメラ型の内部リボソーム結合部位も、使用することができる。

[0020] また、本発明においては、内部リボソーム結合部位の制御下に、グルタミン合成酵素をコードする遺伝子（GS遺伝子）を配置することにより、GS遺伝子の発現量が制御される。GS遺伝子の発現量を、内部リボソーム結合部位下で制御することにより、後述するように、組換え体蛋白質を高レベル

で発現する哺乳動物細胞を選択することが可能となる。

- [0021] なお、本発明において、GS遺伝子の導入された細胞に限らず、選択マーカーの導入された細胞を選択するための培養を「選択培養」といい、導入された細胞を選択するために使用される培地を「選択培地」という。
- [0022] 内部リボソーム結合部位下でGS遺伝子の発現量を制御する場合、種々の内部リボソーム結合部位の中から、好適なものが適宜選択して使用される。また、野生型の内部リボソーム結合部位に変異を加えたものも使用することもできる。
- [0023] 例えば、野生型の内部リボソーム結合部位に翻訳開始点として使用し得る開始コドン(ATG)が複数個存在する場合、これら開始コドンの一部を破壊した内部リボソーム結合部位が使用できる。ここに、「破壊」とは、ある遺伝子配列に変異を加えることにより、当該遺伝子配列が本来有する機能を発揮させないようにすることをいう。例えば、野生型のマウス脳心筋炎ウイルスの内部リボソーム結合部位の3'末端領域には、3つの開始コドン(ATG)が存在しており、その領域の塩基配列を配列番号1(5'-ATGataatATGgccacaaccATG-3':開始コドンは、明示のため、大文字で表す。以下同じ。)で示す。この内部リボソーム結合部位の下流に存在するGS遺伝子の発現量を減少させる場合、変異を加えて破壊する開始コドンは、好ましくは5'側から2番目及び3番目の開始コドンであり、より好ましくは2番目の開始コドンである。したがって、このような変異を加えた内部リボソーム結合部位としては、例えば、その3'末端が配列番号2(5'-ATGataatnnngccacaaccnnn-3':nは任意の塩基、但し3個のnが開始コドンATGを構成する場合を除く。以下同じ。)若しくは配列番号7(5'-ATGataannngccacaaccnnn-3')の塩基配列であるもの、又は配列番号3(5'-ATGataatnnngccacaaccATG-3')若しくは配列番号8(5'-ATGataannngccacaaccATG-3')の塩基配列であるものが挙げられる。より具体的には、その3'末端が配列番号4(5'-ATGataagcttgccacaaccATG-3')の塩基配列である内部リボソーム結合部位であり、変異により5'側から2番目の開始コドンが破壊されたものである。更に詳しくは、野生型のマウス脳心筋

炎ウイルスの内部リボソーム結合部位は、配列番号5の塩基配列を含むものである。また、該塩基配列に変異を加えたものとしては、配列番号6の塩基配列が挙げられる。

[0024] また、野生型及び／又は変異型の内部リボソーム結合部位の下流に配置したGS遺伝子の発現量を、別の方法で更に調節することもできる。例えば、GS遺伝子を内部リボソーム結合部位の開始コドンに対してアウトオブフレームに組み込むことにより、あるいは内部リボソーム結合部位とGS遺伝子との間に、転写若しくは翻訳を阻害する塩基配列を導入することによって、GS遺伝子の発現量を減少させることができる。転写を阻害する塩基配列は、特に限定はないが、例えば、ポリメラーゼ付加シグナル(5'-aataaa-3')等がある。また、翻訳を阻害する塩基配列には、例えばリーディングスルーを誘導するストップコドン等がある。

[0025] 本発明において、「グルタミン合成酵素」というときは、グルタミン酸とアンモニアからグルタミンを合成することができるものである限り特に限定はなく、哺乳動物、爬虫類、鳥類、両生類、鱗翅目(Lepidoptera)に属するカイコ(Bombyx mori)、夜盗蛾(Spodoptera frugiperda)、シャクトリムシ(Geometridae)等、双翅目(Diptera)に属するショウジョウバエ(Drosophila)等の昆虫、原核生物、線虫、酵母、放線菌、糸状菌、子囊菌、担子菌及び植物由来を含め如何なる生物由来のものでもよいが、好ましくは哺乳動物のものであり、ヒト又はチャイニーズハムスター由来のもの(特に、CHO細胞由来のもの)が好適に使用できる。

[0026] また、本発明において、「内因性GS遺伝子」というときは、発現ベクターが導入される細胞のゲノム上にもともと固有に存在するグルタミン合成酵素遺伝子のことをいい、「外因性GS遺伝子」というときは、発現ベクターにより細胞に導入されるグルタミン合成酵素遺伝子のことをいう。

[0027] また、「グルタミン合成酵素阻害剤」というときは、上記グルタミン合成酵素の活性を阻害することができるものである限り特に限定はなく、何れのものも用いることができるが、好ましくはメチオニンスルホキシミン(MSX)

が挙げられる。

[0028] 本発明の発現ベクターを導入した細胞をグルタミン合成酵素阻害剤（GS阻害剤）の存在下で培養すると、グルタミン合成酵素の発現量の低い細胞はグルタミンが合成できずに死滅するので、グルタミン合成酵素の発現量が相対的に高い細胞が選択的に得られることとなる。GS阻害剤の濃度を段階的に上昇させることにより、よりグルタミン合成酵素の発現量の高い細胞が得られる。グルタミン合成酵素の発現量の上昇は、主に、染色体上に組み込まれたGS遺伝子が、遺伝子重複によりコピー数を増加させることによる。このとき、グルタミン合成酵素と共に発現ベクターに組み込んでおいた所望の蛋白質をコードする遺伝子も、遺伝子重複によりコピー数を増し、その結果、上記所望の蛋白質を高発現する細胞が得られる。

[0029] しかし、CHO細胞は、内因性のGS遺伝子を有するので、グルタミン合成酵素阻害剤により、この内因性GS遺伝子が重複によりコピー数を増加させる可能性がある。この場合、発現ベクターに組み込まれたGS遺伝子の重複が起こらなくとも、グルタミン合成酵素阻害剤の存在下で細胞が増殖することになり、上記所望の蛋白質を高発現する細胞を得ることができない。この問題は、GS遺伝子とは別の第2の選択マーカー遺伝子を発現ベクターに更に組み込み、この第2の選択マーカーにより細胞を選択することで、解消できる。

[0030] まず、GS遺伝子と、GS遺伝子は異なる第2の選択マーカー遺伝子とを含む発現ベクターを細胞に導入する。次いで発現ベクターが導入された細胞を、GS遺伝子により選択培養する前に、第2の選択マーカーによって選択培養する。第2の選択マーカーによる選択においては、GS遺伝子は選択圧を受けないので、内因性GS遺伝子の影響を受けることなく、発現ベクターに組み込まれた当該第2の選択マーカー、ひいては発現ベクターに組み込まれた上記所望の蛋白質をコードする遺伝子及びGS遺伝子を重複により増加させることができる。その結果、上記所望の蛋白質をある程度の高レベルで発現する細胞を得ることができる。この時点までの過程で、外因性GS遺伝

子のコピー数は重複により増加するが、内因性GS遺伝子は、重複により増加することはない。

[0031] 第2の選択マーカーによる選択の際に用いられる選択培地（第2の選択培地）は、第2の選択マーカーのコードする遺伝子産物の活性を阻害する薬剤、細胞毒性を有し且つ第2の選択マーカーのコードする遺伝子産物によって無毒化又は弱毒化される物質等の、第2の選択マーカーにより細胞を選択するための物質が選択物質として添加されたものであるか、又は第2の選択マーカー導入後の細胞が栄養要求性を示さなくなる物質（即ち、第2の選択マーカー導入前の細胞のみが栄養要求性を示す物質）が選択物質として除去されたものである。第2の選択マーカーがDHFRの場合、培地に添加される選択物質の例としては、メトトレキサート（MTX）及びアミノプテリンが挙げられる。また、第2の選択マーカーがDHFRの場合、培地から除去される選択物質は、ヒポキサンチン及びチミジンである。

[0032] 第2の選択マーカーによる選択が選択物質を含有させた培地を用いて行われる場合、選択物質の濃度を段階的に上昇させることにより、第2の選択マーカーの発現量を一層高めた細胞を得ることができる。第2の選択マーカーの発現量の上昇は、主に第2の選択マーカーが遺伝子の重複によりコピー数を増加させることによるので、かかる手法により、発現ベクターに組み込まれた他の遺伝子、すなわちGS遺伝子及び上記所望の蛋白質をコードする遺伝子を、重複により更に効率よく増加させることができる。

[0033] 次いで、選択マーカーをGS遺伝子に切り替えて細胞の選択を行う。GS遺伝子を選択マーカーとする選択開始時において、外因性GS遺伝子のコピー数は内因性GS遺伝子のそれと比較して増加した状態となっている。従って、この時点で、選択マーカーをGS遺伝子に切り替えて細胞の選択をすることにより、数の上で優勢な外因性GS遺伝子が、内因性GS遺伝子と比較して、重複により増幅される可能性が確率的に高くなる。このように、GS遺伝子とは異なる第2の選択マーカーにより細胞を予め選択することにより、GS遺伝子による選択時において、内因性GS遺伝子の重複を抑制し、外

因性GS遺伝子の重複を促進することができる。その結果、上記所望の蛋白質を高発現する細胞を効率よく取得することができる。

[0034] 本発明において、第2の選択マーカーは、上記の組換え体蛋白質の発現を制御する遺伝子発現制御部位とは別の遺伝子発現制御部位（第2の遺伝子発現制御部位）を設けて、その下流に組み込んでよい。また、本発明において、第2の選択マーカーは、その上流に第2の内部リボソーム結合部位を設けてこれを介して、上記所望の組換え体蛋白質をコードする遺伝子とその下流の内部リボソーム結合部位との間の領域に、又はGS遺伝子の下流の領域に、組み込んでよい。これにより、第2の選択マーカーの発現量を、第2の内部リボソーム結合部位により制御することも可能となる。この場合、第2の内部リボソーム結合部位として、GS遺伝子の上流の内部リボソーム結合部位と同一の塩基配列のものを使用してもよく、また異なる塩基配列のものを使用してもよい。また、第2の内部リボソーム結合部位は、上記の種々の内部リボソーム結合部位から任意に選択し得る。

[0035] 本発明において、第2の選択マーカーは、GS遺伝子とは別の選択マーカーである限り特に限定はないが、哺乳動物細胞に薬剤耐性を付与する遺伝子（薬剤耐性遺伝子）は、原則として第2の選択マーカーに含まれない。但し、後述する第3の選択マーカー遺伝子を発現ベクターに組み込み、これを用いて哺乳動物細胞の選択を更に行う場合は、第2の選択マーカーとして薬剤耐性遺伝子を使用し得る。ジヒドロ葉酸レダクターゼ（DHFR）遺伝子は、第2の選択マーカーとして好適に使用できる。

[0036] 本発明において、「ジヒドロ葉酸レダクターゼ」（DHFR）というときは、NADPHを電子供与体として、ジヒドロ葉酸をテトラヒドロ葉酸に還元する反応に与る酵素をいい、そのような機能を有する酵素である限り、その起源に限定はなく、哺乳動物、爬虫類、鳥類、両生類、鱗翅目（Lepidoptera）に属するカイコ（*Bombyx mori*）、夜盗蛾（*Spodoptera frugiperda*）、シャクトリムシ（Geometridae）等、双翅目（Diptera）に属するショウジョウバエ（*Drosophila*）等の昆虫、原核生物、線虫、酵母、放線菌、糸状菌、子囊菌、担子

菌及び植物由来を含め如何なる生物由来のものでもよいが、好ましくは哺乳動物のものであり、ヒト、マウス又はチャイニーズハムスター由来のもの（特に、CHO細胞由来のもの）が好適に使用できる。また、上記生物種の野生型酵素の他に、これら野生型酵素に変異が導入された変異型酵素も、酵素活性を有する限り使用することができ、それらも「ジヒドロ葉酸レダクターゼ」に包含される。かかる変異型酵素は、例えば、野生型酵素と比較して、酵素活性が異なるもの、ジヒドロ葉酸レダクターゼ阻害剤に対する感受性が異なるものがある。好適に使用できるジヒドロ葉酸レダクターゼの例として、マウスの野生型DHFR、マウスの野生型DHFRのN末端から31位のフェニルアラニンがトリプトファンに置換された変異型DHFRがある (McIvor RS et al., Nucleic Acids Research, 18(23), 7025-32 (1990))。マウスの野生型DHFRの塩基配列及びアミノ酸配列を、配列番号9及び配列番号10に、上記変異型DHFRの塩基配列及びアミノ酸配列を、配列番号11及び配列番号12に示す。

[0037] また、本発明において、「内因性DHFR遺伝子」というときは、発現ベクターが導入される細胞のゲノム上にもともと固有に存在するDHFR遺伝子のことをいい、「外因性DHFR遺伝子」というときは、発現ベクターにより細胞に導入されるDHFR遺伝子のことをいう。また、本発明において、「ジヒドロ葉酸レダクターゼ阻害剤」というときは、上記ジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR) の活性を阻害することができるものである限り特に限定はなく、何れのものも用いることができるが、好ましくは葉酸拮抗剤であり、更に好ましくはメトトレキセート (MTX)、アミノプテリンが挙げられる。

[0038] 本発明において、第2の選択マーカーとしてDHFR遺伝子を含む発現ベクターを導入した細胞をジヒドロ葉酸レダクターゼ阻害剤 (DHFR阻害剤) の存在下で培養すると、DHFRの発現量の低い細胞はテトラヒドロ葉酸が合成できずに死滅するので、DHFRの発現量が相対的に高い細胞が選択的に得られることとなる。DHFR阻害剤の濃度を段階的に上昇させることにより、よりDHFRの発現量の高い細胞が得られる。DHFRの発現量の

上昇は、主に、染色体上に組み込まれたDHFR遺伝子が、遺伝子の重複によりコピー数を増加させることによる。このとき、発現ベクターに組み込まれた他の遺伝子、すなわちGS遺伝子及び所望の蛋白質をコードする遺伝子も遺伝子重複によりコピー数を増す。その結果、所望の蛋白質をある程度高発現するとともに、外因性GS遺伝子のコピー数が、内因性GS遺伝子のそれと比較して増加した細胞が得られる。この時点で、選択マーカーをGS遺伝子に切り替えて細胞の選択をすることにより、数のうえで優勢な外因性GS遺伝子が、内因性GS遺伝子と比較して、重複により増幅される可能性が確率的に高くなる。その結果、所望の蛋白質を高発現する細胞を効率よく取得することができる。

[0039] 選択培地中に添加されるDHFR阻害剤を段階的に上昇させる場合、その最大濃度は、DHFR阻害剤がメトトレキサートの場合、好ましくは0.25~5  $\mu\text{M}$ であり、より好ましくは0.5~1.5  $\mu\text{M}$ であり、更に好ましくは約1.0  $\mu\text{M}$ である。

[0040] 本発明においては、発現ベクターに、GS遺伝子と第2の選択マーカーに加えて、更に第3の選択マーカーを導入してもよい。薬剤耐性遺伝子は、第3の選択マーカー遺伝子として好適に使用できる。本発明において、第3の選択マーカーとして使用できる薬剤耐性遺伝子は、哺乳動物細胞に薬剤耐性を付与することのできる遺伝子である限り特に限定はないが、好ましくは、細胞にピューロマイシン、ハイグロマイシン、ブラストサイジン、ネオマイシン等の薬剤に対する耐性を付与することのできる遺伝子である。ここにおいて、ピューロマイシン、ハイグロマイシン、ブラストサイジン、ネオマイシン等の薬剤は、それぞれ、「薬剤耐性遺伝子に対応する薬剤」である。これらの薬剤耐性遺伝子として、ピューロマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子、ブラストサイジン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子が挙げられる。

[0041] 本発明において、第3の選択マーカーは、組換え体蛋白質が制御を受ける遺伝子発現制御部位とは別の遺伝子発現制御部位（第3の遺伝子発現制御部

位)を設けて、その下流に組み込むことにより、発現量を制御することができる。

[0042] また、本発明において、第3の選択マーカーは、その上流に第2の内部リボソーム結合部位（第2の選択マーカーの上流に第2の内部のリボソーム結合部位を設けてある場合は、第3の内部リボソーム結合部位。以下同じ。）を介して、組換え体蛋白質をコードする遺伝子と内部リボソーム結合部位との間の領域又はGS遺伝子の下流の領域等に、組み込んでよい。これにより、第3の選択マーカーの発現量を、第2の内部リボソーム結合部位により制御することができる。この場合、第2の内部リボソーム結合部位として、GS遺伝子の上流の内部リボソーム結合部位及び第2の選択マーカーの上流の内部リボソーム結合部位（設けた場合）と同一のものを使用してもよく、また別のものを使用してもよい。また、第3の選択マーカーの上流の第2の内部リボソーム結合部位は、上記の種々の内部リボソーム結合部位から任意に選択し得る。また、この第2の内部リボソーム結合部位に関しても、上述と同様に、適宜変異を加えて最適化させてもよい。

[0043] 上記の第2の選択マーカーが薬剤耐性遺伝子である場合、ここでいう第3の選択マーカー遺伝子として用いられる薬剤耐性遺伝子は、第2の選択マーカー以外の薬剤耐性遺伝子から選択される。第3の選択マーカーは、第2の選択マーカーと同様に、内因性GS遺伝子を重複させることなく、GS遺伝子を増幅させることができる。従って、第2の選択マーカーによる選択に先立って、若しくは当該選択の後に、第3の選択マーカーにより細胞の選択をすることにより、内因性GS遺伝子を重複させることなく、外因性GS遺伝子を重複させることができる。その結果、所望の蛋白質を高発現する細胞を更に効率よく取得することができる。

[0044] 本発明において、発現ベクターに組み込まれる組換え体蛋白質をコードする遺伝子の動物種は、ヒトを含む哺乳動物由来のものを含め、特に限定はない。例えば、該遺伝子としては、本発明のベクターを医療用医薬品の製造に使用するとき、一般的にはヒト由来のものが用いられ、家畜用の医薬品の

製造に使用するとき、一般的には治療対象と同種の家畜由来の遺伝子のもものとなる。また、該組換え体蛋白質をコードする遺伝子の種類にも特に限定はないが、好ましくは、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼA、イズロン酸2-スルファターゼ、グルコセレブロシダーゼ、ガルスルファラーゼ、 $\alpha$ -L-イズロニダーゼ、酸性 $\alpha$ -グルコシダーゼ等のリソソーム酵素、組織プラスミノゲンアクチベーター（t-PA）、血液凝固第VII因子、血液凝固第VIII因子、血液凝固第IX因子等の血液凝固因子、エリスロポエチン、インターフェロン、トロンボモジュリン、卵胞刺激ホルモン、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、DNase I、甲状腺刺激ホルモン（TSH）又は各種抗体医薬をコードする遺伝子である。抗体医薬としては、マウス抗体、ヒト化マウス抗体、ヒト・マウスキメラ抗体、ヒト抗体等があり、例えば、ヒト・マウスキメラ抗ヒトCD20抗体であるリツキシマブがある。

[0045] 本発明において、抗体を発現させる場合、抗体重鎖又は抗体軽鎖の何れかをコードする遺伝子が、GS遺伝子の発現を制御する遺伝子発現制御部位により、その発現が制御されるようにベクターに組込まれる一方、もう一方の鎖をコードする遺伝子は、これとは別に当該ベクター中に配置された遺伝子発現制御部位によりその発現が制御されるように組込まれる。このとき用いられる遺伝子発現部位は、抗体重鎖と抗体軽鎖が同等レベル発現するように、同じ種類の遺伝子発現部位を使用することが好ましい。

[0046] また、本発明において、ヘテロダイマーを形成する蛋白質を発現させる場合、ヘテロダイマーを形成する何れかのサブユニットをコードする遺伝子が、GS遺伝子の発現を制御する遺伝子発現制御部位によりその発現が制御されるように組込まれる一方、もう一方のサブユニットをコードする遺伝子は、これとは別に当該ベクター中に配置された遺伝子発現制御部位によりその発現が制御されるように組込まれる。このとき用いられる遺伝子発現部位は、2種のサブユニットが同等レベル発現するように、同じ種類の遺伝子発現部位を使用することが好ましい。このようなヘテロダイマーを形成する蛋白質としては、卵胞刺激ホルモン、甲状腺刺激ホルモン（TSH）がある。

- [0047] 本発明において、発現ベクターの哺乳動物細胞への導入は、哺乳動物細胞内において組換え体蛋白質をコードする遺伝子が発現されるようにする目的で行うものであり、この目的が達成できる限り如何なる方法を用いてもよい。発現ベクターは、通常環状のプラスミドであるが、これは、環状のままであっても、又は制限酵素で切断して直鎖状にしてからであっても、細胞に導入することができる。
- [0048] 本発明において、発現ベクターが導入される哺乳動物細胞は、目的の組換え体蛋白質が発現できるものである限り特に限定はないが、生体から取り出した臓器、筋組織、皮膚組織、結合組織、神経組織、血液、骨髄等から採取された細胞の初代培養細胞、継代培養細胞、及び継代培養しても形質が安定であるように株化された細胞の何れであってもよい。また、細胞は正常細胞、癌化細胞の何れであってもよい。特に好適に使用できる細胞は、チャイニーズハムスターの卵巣に由来するCHO細胞、ヒトの繊維芽細胞、及びアフリカミドリザルの腎線維芽細胞に由来するCOS細胞である。
- [0049] また、発現ベクターが導入される哺乳動物細胞は、第2の選択マーカーに対応する内因性遺伝子に、変異を有する細胞であってもよい。
- [0050] 第2の選択マーカーに対応する内因性遺伝子の変異が、当該遺伝子の発現を減少又は欠損させるものであるか、又は内因性遺伝子がコードする蛋白質の機能を低下又は喪失させるものである場合、第2の選択マーカーによる選択時において、選択物質による選択圧が、外因性の第2の選択マーカーに強くかかり、第2の選択マーカーの重複がより促進される。例えば、第2の選択マーカーがDHFR遺伝子の場合、内因性DHFR遺伝子の変異が、ジヒドロ葉酸レダクターゼの発現量を減少させ又はジヒドロ葉酸レダクターゼを欠損させるものである場合、DHFR遺伝子による選択時において、DHFR阻害剤による選択圧が専ら外因性DHFR遺伝子にかかり、外因性DHFR遺伝子の重複がより促進される。
- [0051] 従って、第2の選択マーカーに対応する内因性遺伝子に変異を有する細胞を使用することによって、所望の蛋白質を高発現する細胞を、より効率よく

取得することができる。

[0052] 発現ベクターが導入された哺乳動物細胞（発現ベクター導入細胞）は、G S 遺伝子による選択に先立ち、細胞を第2の選択マーカーにより選択するための選択培地で培養される。このときの培地は、第2の選択マーカーがD H F R の場合、D H F R 阻害剤を添加した培地である。このとき、アミノプテリン、メトトレキセート（MTX）がD H F R 阻害剤として好適に用いられる。また、第2の選択マーカーが薬剤耐性遺伝子の場合、その薬剤耐性遺伝子に対応する薬剤である。

[0053] 第2の選択マーカーとしてD H F R を使用する場合、発現ベクターを導入する哺乳動物細胞として、内因性D H F R 遺伝子に、D H F R の発現量を減少又は欠損させるものである変異を有するものを使用できる。このような細胞には、例えばDG44株がある。DG44株は、内因性D H F R 遺伝子を発現しておらず、従って当該細胞株を用いた場合、選択培養における選択圧が外因性D H F R 遺伝子にのみかかるので、外因性D H F R 遺伝子を重複により効率よく増加させることができる。選択培養は、アミノプテリン、メトトレキセート（MTX）等のD H F R 阻害剤を含有する選択培地で行うことができる。このとき、D H F R 阻害剤を段階的に上昇させることにより、よりD H F R の発現量が高い細胞が得られる。選択培地中に添加されるD H F R 阻害剤を段階的に上昇させる場合、その最大濃度は、D H F R 阻害剤がメトトレキセートの場合、好ましくは0.25~5 $\mu$ Mであり、より好ましくは0.5~1.5 $\mu$ Mであり、更に好ましくは約1.0 $\mu$ Mである。

[0054] また、D H F R 遺伝子を欠損する細胞株は、ヒポキサンチン及びチミジンに対する栄養要求性を有するので、細胞を維持し又は増殖させるための培養はこれらを添加した培地で行われる。一方、外因性D H F R 遺伝子を導入した細胞は、ヒポキサンチン及びチミジンに対する栄養要求性がないので、これらを培地に添加する必要はない。従って、第2の選択マーカーとしてD H F R 遺伝子を含む発現ベクターを、内因性D H F R 遺伝子の欠損等により内因性D H F R 遺伝子に由来するD H F R 活性を持たないか又はほとんど持た

ない細胞に導入した場合、選択培地として、ヒポキサンチン及びチミジン不含培地を用いることによっても、外因性DHFR遺伝子が導入された細胞を選択培養できる。また、ヒポキサンチン及びチミジン不含培地にDHFR阻害剤を添加した培地を、選択培地として使用することもできる。

[0055] 次いで、発現ベクター導入細胞は、GS遺伝子の導入された細胞を選択するための培地で培養される。このときの培地は、グルタミン合成酵素阻害剤（例えば、MSXなど）を添加したグルタミン不含又は低グルタミン培地中である。

[0056] 選択培地中に添加されるGS阻害剤の濃度を段階的に上昇させることにより、GS遺伝子の発現量がより多い発現ベクター導入細胞を選択することができる。これは、選択培養の過程で、発現ベクター導入細胞のゲノム中に組み込まれたGS遺伝子の数が重複により増加し、GS遺伝子の発現量が相対的に増加した発現ベクター導入細胞のみが選択的に増殖することなどに起因する。このとき、発現ベクターに組み込んだ組換え体蛋白質をコードする遺伝子のコピー数も増加するので、該遺伝子の発現量も増加する。従って、発現ベクター導入細胞をこのように選択培養することにより、所望の組換え体蛋白質の発現量が相対的に多い発現ベクター導入細胞を選択することができる。本明細書においては、このように選択された発現ベクター導入細胞を、形質転換細胞という。

[0057] 本発明において、選択培地中に添加されるGS阻害剤の濃度を段階的に上昇させる場合において、その最大濃度は、GS阻害剤がメチオニンスルホキシミン（MSX）の場合、好ましくは100～1000 $\mu$ Mであり、より好ましくは200～500 $\mu$ Mであり、更に好ましくは約300 $\mu$ Mである。

[0058] 本発明において、GS遺伝子を選択マーカーによる選択培養をする前に、発現ベクターを導入した細胞を、第2の選択培養による選択培養に加えて、第3の選択マーカーにより選択するための選択培地で選択培養することもできる。この場合、第3の選択マーカーによる選択培養は、第2の選択培養の前後の何れで行ってもよい。第3の選択マーカーは薬剤耐性遺伝子である。

従って、選択培地には、薬剤耐性遺伝子に対応する薬剤が添加される。このとき、選択培地の当該薬剤の濃度を段階的に上昇させることにより、より薬剤耐性遺伝子の発現量が高い細胞が得られる。選択培地中に添加される薬剤耐性遺伝子に対応する薬剤の濃度を段階的に上昇させる場合において、薬剤がピューロマイシンの場合、その最大濃度は、好ましくは3~30  $\mu\text{M}$ であり、より好ましくは5~20  $\mu\text{M}$ であり、更に好ましくは約10  $\mu\text{M}$ である。また、薬剤がG418の場合、その最大濃度は、好ましくは0.4~1.5 mg/mLであり、より好ましくは0.8~1.2 mg/mLであり、更に好ましくは約1 mg/mLである。

## 実施例

[0059] 以下、実施例を参照して本発明を更に詳細に説明するが、本発明が実施例に限定されることは意図しない。

[0060] [pE-neoベクター及びpE-hygrベクターの構築]

pEF/myc/nucベクター（インビトロジェン社）を、KpnIとNcoIで消化し、EF-1プロモーター及びその第一イントロンを含む領域を切り出し、これをT4 DNAポリメラーゼで平滑末端化処理した。別に、pCI-neo（インビトロジェン社）を、BglIII及びEcoRIで消化して、CMVのエンハンサー／プロモーター及びイントロンを含む領域を切除した後に、T4 DNAポリメラーゼで平滑末端化処理した。これに、上記のEF-1  $\alpha$ プロモーター及びその第一イントロンを含む領域（平滑末端化処理後のもの）を挿入して、pE-neoベクターを構築した（図1-1及び図1-2）。

[0061] pE-neoベクターを、SfiI及びBstXIで消化し、ネオマイシン耐性遺伝子を含む約1 kbpの領域を切除した（図2-1）。pcDNA3.1/Hygro(+)（インビトロジェン社）を鋳型にしてプライマーHyg-Sfi5'（配列番号13）及びプライマーHyg-BstX3'（配列番号14）を用いて、PCR反応によりハイグロマイシン遺伝子を増幅した（図2-2）。増幅したハイグロマイシン遺伝子を、SfiI及びBstXIで消化し、上記のpE-neoベクターに挿入して、pE-hygrベクターを構築した（図2-3）。

[0062] [pE-IRES-GS-puroの構築]

発現ベクター-pPGKIH (Miyahara M. et.al., J. Biol. Chem. 275,613-618(2000)) を制限酵素 (XhoI及びBamHI) で消化し, マウス脳心筋炎ウイルス (EMCV) に由来する内部リボソーム結合部位 (IRES), ハイグロマイシン耐性遺伝子 (Hygr遺伝子) 及びマウスホスホグリセリン酸キナーゼ (mPGK) のポリアデニル化領域 (mPGKpA) を含む塩基配列 IRES-Hygr-mPGKpA (配列番号 15。5' 末端から, 塩基1~6からなる領域が「XhoIサイト」, 塩基120~715及びこれに続く塩基716~718 (atg) からなる領域が「マウス脳心筋炎ウイルスの5' 非翻訳領域に由来する内部リボソーム結合部位を含む塩基配列」, 該塩基716~718 (atg) を含む塩基716~1741からなる領域が「ハイグロマイシン耐性遺伝子をコードする塩基配列」, 塩基1747~2210からなる領域が「マウスホスホグリセリン酸キナーゼ (mPGK) のポリアデニル化領域を含む塩基配列」, 及び3' 末端の6個の塩基 (塩基2211~2216) からなる領域が「BamHIサイト」である。) よりなるDNA断片を切り出した (なお, Hygr<sup>r</sup> 遺伝子に対応するアミノ酸配列は, 配列番号 16 で示されたものである。) 。このDNA断片をpBluescript SK(-) (Stratagene社) のXhoI及びBamHIサイト間に挿入し, これをpBSK (IRES-Hygr-mPGKpA) とした (図3-1) 。

[0063] pBSK (IRES-Hygr-mPGKpA) を鋳型とし, プライマー IRES5' (配列番号 17) 及びプライマー IRES3' (配列番号 18) を用いて, PCRによりEMCVのIRESの一部を含むDNA断片を増幅させた。このDNA断片を制限酵素 (XhoI及びHindIII) で消化し, pBSK (IRES-Hygr-mPGKpA) のXhoI及びHindIIIサイト間に挿入し, これをpBSK (NotI-IRES-Hygr-mPGKpA) とした (図3-2) 。pBSK (NotI-IRES-Hygr-mPGKpA) を制限酵素 (NotI及びBamHI) で消化し, pE-hygrベクターのNotI及びBamHIサイト間に挿入し, これをプラスミドpE-IRES-Hygrとした (図3-3) 。

[0064] 発現ベクター-pPGKIHを鋳型とし, プライマー-mPGKP5' (配列番号 19) 及びプライマー-mPGKP3' (配列番号 20) を用いて, PCRによりmPGKのプロモーター領域 (mPGKp) を含む塩基配列 (配列番号 21。5' 末端から, 塩基4~9が「BgIIIサイト」, これに続く塩基10~516からなる領域が「マウスホスホグリセ

リン酸キナーゼ遺伝子のプロモーター領域 (mPGKp) を含む塩基配列」, これに続く塩基524~529からなる領域が「EcoRIサイト」である。) よりなるDNA断片を増幅させた。このDNA断片を制限酵素 (BglII及びEcoRI) で消化し, pCI-neo (Promega社) のBglII及びEcoRIサイト間に挿入し, これをpPGK-neoとした (図3-4)。pE-IRES-Hygrを制限酵素 (NotI及びBamHI) で消化してDNA断片 (IRES-Hygr) を切り出し, pPGK-neoのNotI及びBamHIサイト間に挿入し, これをpPGK-IRES-Hygrとした (図3-5)。

[0065] CHO-K1細胞からcDNAを調製し, これを鋳型とし, プライマーGS5' (配列番号22) 及びプライマーGS3' (配列番号23) を用いて, PCRによりGS遺伝子を含むDNA断片を増幅させた。このDNA断片を制限酵素 (BamHI及びBclI) で消化し, pPGK-IRES-HygrのBamHI及びBclIサイト間に挿入し, これをpPGK-IRES-GS- $\Delta$ polyAとした (図3-6)。

[0066] pCAGIPuro (Miyahara

M. et.al., J. Biol. Chem. 275,613-618(2000)) を鋳型とし, プライマーpuro5' (配列番号24) 及びプライマーpuro3' (配列番号25) を用いて, PCRによりピューロマイシン耐性遺伝子 (puro<sup>r</sup>遺伝子) を含む塩基配列 (配列番号26。5'末端から, 塩基2~7からなる領域が「AflIIサイト」, これに続く塩基8~607からなる領域が「ピューロマイシン耐性遺伝子 (puro<sup>r</sup>遺伝子) をコードする塩基配列」, 及び, その次の塩基608~619からなる領域が「BstXIサイト」である。) よりなるDNA断片を増幅させた (なお, puro<sup>r</sup>遺伝子に対応するアミノ酸配列は, 配列番号27で示されたものである。)。このDNA断片を制限酵素 (AflII及びBstXI) で消化し, 発現ベクターpE-neoのAflII及びBstXIサイト間に挿入し, これをpE-puroとした (図3-7)。

[0067] pE-puroを鋳型とし, プライマーSV40polyA5' (配列番号28) 及びプライマーSV40polyA3' (配列番号29) を用いて, PCRによりSV40後期ポリアデニル化領域を含むDNA断片を増幅させた。このDNA断片を制限酵素 (NotI及びHpaI) で消化し, 発現ベクターpE-puroのNotI及びHpaIサイト間に挿入し, これをpE-puro (XhoI) とした (図3-8)。pPGK-IRES-GS- $\Delta$ polyAを制限酵素 (

NotI及びXhoI)で消化し、IRES-GS領域を含むDNA断片を切り出し、これを発現ベクター-pE-puro (XhoI)のNotI及びXhoIサイト間に挿入し、これをpE-IRES-GS-puroとした(図3-9)。

[0068] [pE-mIRES-GS-puroの構築]

発現ベクター-pE-IRES-GS-puroを鋳型とし、プライマー-mIRES-GS5' (配列番号30)及びプライマー-mIRES-GS3' (配列番号31)を用いて、PCRにより、EMCVのIRESからGSにかけての領域を増幅させ、EMCVのIRESの5'側から2番目に位置する開始コドン(ATG)に変異を加えて破壊したDNA断片を増幅させた。発現ベクター-pE-IRES-GS-puroを鋳型として、このDNA断片と上記のプライマー-mIRES5'を用いて、PCRによりIRESからGSにかけての上記領域を含むDNA断片を増幅させた。このDNA断片を制限酵素(NotI及びPstI)で消化し、切り出されたDNA断片を、発現ベクター-pE-IRES-GS-puroのNotI及びPstIサイト間に挿入し、これをpE-mIRES-GS-puroとした(図4)。

[0069] [pE-mIRES-GSの構築]

発現ベクター-pE-neoを鋳型とし、プライマー-SV40polyA5'-2 (配列番号32)及びプライマー-SV40polyA3'-2 (配列番号33)を用いて、PCRによりSV40後期polyA領域を含むDNA断片を増幅させた。このDNA断片を制限酵素(XhoI及びBamHI)で消化し、pE-mIRES-GS-puroのXhoI及びBamHIサイト間に挿入し、これをpE-mIRES-GSとした(図5)。

[0070] [ヒト甲状腺刺激ホルモン(hTSH)発現ベクターの構築]

[pE-mIRES-GS-mNeoの構築]

pCI-neo(インビトロジェン社)を鋳型とし、プライマー-mNeoA5' (配列番号34)及びプライマー-mNeoA3' (配列番号35)を用いて、PCRによりこのプラスミド全長を増幅させ、セルフライゲーションによりE182D変異型ネオマイシン耐性遺伝子(mNeo<sup>r</sup>遺伝子)を含むプラスミドpCI-mNeoを構築した。pCI-mNeoベクターを鋳型としてプライマー-mNeoB5' (配列番号36)及びプライマー-mNeoB3' (配列番号37)を用いてPCRによりmNeo<sup>r</sup>遺伝子を含むDNA断片を増幅させた。このDNA断片を制限酵素(EagI)で消化し、pUC57-IE1 (Gene

Script社)のNotIに挿入し、これをpUC57-IE1-mNeoとした。pCI-neoを鋳型とし、プライマーmNeoC5' (配列番号38)及びプライマーmNeoC3' (配列番号39)を用いて、PCRによりネオマイシン耐性遺伝子(neo<sup>r</sup>遺伝子)の3'領域及び合成ポリAシグナルを含む領域を増幅させ、これをメガプライマー(neo-polyA)とした。次に、pUC57-IE1-mNeoを鋳型とし、プライマーmNeoD5' (配列番号40)及びメガプライマー(neo-polyA)を用いて、PCRによりmNeo<sup>r</sup>遺伝子及び合成ポリAシグナルを含む領域を増幅させた。得られたDNA断片を制限酵素(AflIII及びBamHI)で消化し、pE-mIRES-GS-puroのAflIII及びBamHIサイト間に挿入し、これをpE-mIRES-GS-mNeoとした(図6)。

[0071] [pBlue-EF1/mIRES-mNeoの構築]

pE-mIRES-GS-mNeoを制限酵素(EcoRI)で消化し、伸長因子1プロモーター(EF-1p)、変異型内部リボソーム結合部位(mIRES)及びグルタミン合成酵素(GS)の一部を含むDNA断片を切り出した。このDNA断片をpBluescript SK(+) (Stratagene社)のEcoRIサイトに挿入し、これをpBlue-EF1/mIRESとした(図7)。

[0072] pE-mIRES-GS-mNeoを制限酵素(PvuI)で消化し、変異型ネオマイシン耐性遺伝子(mNeo<sup>r</sup>遺伝子)を含むDNA断片、及び、SV40後期polyA領域を含むDNA断片を切り出した。このSV40後期polyA領域を含むDNA断片を鋳型として、プライマーSVpA-Mega-F (配列番号41)及びプライマーSVpA-BstXI-R (配列番号42)を用い、PCRによりSV40後期polyA領域を含む当該DNA断片を増幅させた。この遺伝子断片と上記mNeo<sup>r</sup>遺伝子を含むDNA断片とをPCRにより繋ぎ合わせて、mNeo<sup>r</sup>遺伝子の下流にSV40後期polyA領域を含むDNA断片を作製した。このDNA断片を制限酵素(BstXI)で消化し、pBlue-EF1/mIRESのBstXIサイトに挿入し、これをpBlue-EF1/mIRES-mNeoとした(図7)。

[0073] [pBlue-EF1/SVpAの構築]

発現ベクターpE-mIRES-GS-mNeoを鋳型とし、プライマーSVpA-Not-F (配列番号43)及びプライマーSVpA-BstXI-R (配列番号44)を用いて、PCRによりSV40後期polyA領域を含むDNA断片を増幅させた。このDNA断片を制限酵素

(NotI及びBstXI)で消化し、pBlue-EF1/mIRESのNotI及びBstXIサイト間に挿入し、これをpBlue-EF1/SVpAとした(図8)。

[0074] [pE-mDHFR31の構築]

マウスの野生型DHFRのN末端から31位のフェニルアラニンがトリプトファンに置換されたものである配列番号11の変異型DHFR(F31W)遺伝子(mDHFR31)を含むDNA(配列番号45)を合成した。このDNAをpGEM-T easy vector(Promega社)の3'-T overhangs箇所に挿入し、これをpGEM(mDHFR31)とした。pGEM(mDHFR31)を制限酵素(AflII及びBstXI)で消化し、変異型DHFR(F31W)を含むDNA断片を切り出し、このDNA断片をpE-neoのAflII及びBstXIサイト間に挿入し、これをpE-mDHFR31とした(図9)。

[0075] [pCI-neo(hTSH $\alpha$ -WAP3' UTR)及びpCI-neo(hTSH $\beta$ -WAP3' UTR)の構築]

ヒト甲状腺刺激ホルモンの $\alpha$ 鎖(hTSH $\alpha$ )遺伝子を含むDNA(配列番号46。5'末端から、塩基1~6からなる領域が「MluIサイト」、塩基14~364からなる領域が「hTSH $\alpha$ 鎖をコードする塩基配列」、及び、これに続く塩基365~372からなる領域が「NotIサイト」である。)、及びヒト甲状腺刺激ホルモンの $\beta$ 鎖(hTSH $\beta$ )遺伝子を含むDNA(配列番号47。5'末端から、塩基1~6からなる領域が「MluIサイト」、塩基14~433からなる領域が「TSH $\beta$ 鎖をコードする塩基配列」、及び、これに続く塩基434~441からなる領域が「NotIサイト」である。)を合成し、それぞれpUC57に組み込んで、pUC57-hTSH $\alpha$ 、pUC57-hTSH $\beta$ とした(Shanghai ShineGene Molecular Biotech社)。また、ウサギ乳清酸性タンパク質(WAP)の3'側非翻訳領域(WAP3' UTR)を含むDNA(配列番号48)を合成し、pUC57に組み込んで、pUC57-WAP3' UTRとした(Shanghai ShineGene Molecular Biotech社)。

[0076] hTSH $\alpha$ 遺伝子を含むpUC57-hTSH $\alpha$ を鋳型とし、プライマーTSH $\alpha$ 5'(配列番号49)及びプライマーTSH $\alpha$ 3'(配列番号50)を用いて、PCRによりTSH $\alpha$ 遺伝子を含むDNA断片を増幅させ、得られたDNA断片をメガプライマーTSH $\alpha$ とした。また、hTSH $\beta$ 遺伝子を含むDNAを鋳型とし、プライマーTSH $\beta$ 5'(配列番号51)及びプライマーTSH $\beta$ 3'(配列番号52)を用いて、PCRによりTSH

$\beta$  遺伝子を含むDNA断片を増幅させ、得られたDNA断片をメガプライマー-TSH $\beta$  とした。

[0077] WAP3' UTRを含むpUC57-

WAP3' UTRを鋳型とし、メガプライマー-TSH $\alpha$ とプライマー-WAP3' (配列番号53)を用いて、PCRによりTSH $\alpha$ 遺伝子とその下流にWAP3' UTRを有するDNA断片を増幅させた(hTSH $\alpha$ -WAP3' UTR)。また、WAP3' UTRを含むpUC57-WAP3' UTRを鋳型とし、メガプライマー-TSH $\beta$ とプライマー-WAP3'を用いて、PCRによりTSH $\beta$ 遺伝子とその下流にWAP3' UTRを有するDNA断片を増幅させた(hTSH $\beta$ -WAP3' UTR)。得られた各DNA断片を制限酵素(MluI及びNotI)で消化し、pCI-neoのMluI及びNotIサイト間に挿入し、それぞれpCI-neo(hTSH $\alpha$ -WAP3' UTR)及びpCI-neo(hTSH $\beta$ -WAP3' UTR)とした(図10-1及び図10-2)。

[0078] [pE-mIRES-GS-mNeo(hTSH $\beta$ )の構築]

pCI-neo(hTSH $\beta$ -WAP3' UTR)を制限酵素(MluI及びNotI)で消化し、hTSH $\beta$ 遺伝子及びWAP3' UTRを含むDNA断片を切り出した。このDNA断片をpE-mIRES-GS-mNeoのMluI及びNotIサイト間に挿入し、これをpE-mIRES-GS-mNeo(hTSH $\beta$ )とした(図11)。

[0079] [pBlue-EF1/mIRES-mNeo(hTSH $\alpha$ )の構築]

pCI-neo(hTSH $\alpha$ -WAP3' UTR)を制限酵素(MluI及びNotI)で消化し、hTSH $\alpha$ 遺伝子及びWAP3' UTRを含むDNA断片を切り出した。このDNA断片をpBlue-EF1/mIRES-mNeoのMluI及びNotIサイト間に挿入し、これをpBlue-EF1/mIRES-mNeo(hTSH $\alpha$ )とした(図12)。

[0080] [pE-mIRES-GS-mNeo-dual(hTSH)の構築]

pBlue-EF1/mIRES-mNeo(hTSH $\alpha$ )を制限酵素(ClaI及びBglII)で消化し、伸長因子1プロモーター(EF-1p)、hTSH $\alpha$ 遺伝子、mIRES及び変異型ネオマイシン耐性遺伝子(mNeo<sup>r</sup>遺伝子)を含むDNA断片を切り出した。このDNA断片をpE-mIRES-GS-mNeo(hTSH $\beta$ )のClaI及びBamHIサイト間に挿入し、これをヒト甲状腺刺激ホルモン(hTSH)発現用ベクターのpE-mIRES-GS-mNeo-dual(hTSH)とした(図13)。

## [0081] [pE-mIRES-GS-mNeo-dual+mDHFR31(hTSH)の構築]

pE-mDHFR31を鋳型として、プライマーdE-BbsI-F（配列番号54）及びプライマーSynpA-BbsI-R（配列番号55）を用いてPCRによりSV40初期プロモーター（SV40エンハンサー／プロモーター）、変異型DHFR（F31W）及び合成ポリアデニレーションシグナル（合成ポリアデニル化領域）を含むDNA断片を増幅させた。得られたDNA断片を制限酵素（BbsI）で消化し、pE-mIRES-GS-mNeo-dual(hTSH)のBsmBIサイト間に挿入し、これをヒト甲状腺刺激ホルモン（hTSH）発現用ベクターのpE-mIRES-GS-mNeo-dual+mDHFR31(hTSH)とした（図14）。

## [0082] [pE-mIRES-GS-mNeo(RTX-H)の構築]

リツキシマブ重鎖遺伝子を含むDNA（配列番号56。5'末端から、塩基1～6からなる領域が「MluIサイト」、塩基18～1430からなる領域が「リツキシマブ重鎖をコードする塩基配列」、及び、これに続く塩基1431～1438からなる領域が「NotIサイト」である。）を合成した。このDNAを制限酵素（MluI及びNotI）で消化し、得られたDNA断片をpE-mIRES-GS-mNeoのMluI及びNotIサイト間に挿入し、これをpE-mIRES-GS-mNeo(RTX-H)とした（図15）。

## [0083] [pBlue-EF1/mIRES-mNeo(RTX-L)の構築]

リツキシマブ軽鎖遺伝子を含むDNA（配列番号57。5'末端から、塩基1～6からなる領域が「MluIサイト」、塩基18～725からなる領域が「リツキシマブ軽鎖をコードする塩基配列」、及び、これに続く塩基726～733からなる領域が「NotIサイト」である。）を合成した。このDNAを制限酵素（MluI及びNotI）で消化し、得られたDNA断片をpBlue-EF1/mIRES-mNeoのMluI及びNotIサイト間に挿入し、これをpBlue-EF1/mIRES-mNeo(RTX-L)とした（図16）。

## [0084] [pE-mIRES-GS-mNeo-dual(RTX)の構築]

pBlue-EF1/mIRES-mNeo(RTX-L)を制限酵素（ClaI及びBglII）で消化し、得られたDNA断片をpE-mIRES-GS-mNeo(RTX-H)のClaI及びBamHIサイト間に挿入し、これをリツキシマブ発現用ベクターのpE-mIRES-GS-mNeo-dual(RTX)とした（図17）。

## [0085] [pE-mIRES-GS-dual+mDHFR31(RTX)の構築]

配列番号57のリツキシマブ軽鎖遺伝子を含むDNAを含む合成DNAを、制限酵素(MluI及びNotI)で消化し、得られたDNA断片をpBlue-EF1/SVpAのMluI及びNotIサイト間に挿入し、これをpBlue-EF1/SVpA(RTX-L)とした(図18-1)。

## [0086] pBlue-EF1/SVpA(RTX-L)を、制限酵素(ClaI及びBglII)で消化し、得られたDNA断片をpE-mIRES-GS-mNeo(RTX-H)のClaI及びBamHIサイト間に挿入し、これをpE-mIRES-GS-dual(RTX)とした(図18-2)。

pE-mDHFR31を鋳型として、プライマーdE-BbsI-F(配列番号58)及びプライマーSynpA-BbsI-R(配列番号59)を用いてPCRによりSV40初期プロモーター(SV40エンハンサー/プロモーター、変異型DHFR(F31W)及び合成ポリアデニレーションシグナルを含むDNA断片を増幅させた。このDNA断片を制限酵素(BbsI)で消化し、pE-mIRES-GS-dual(RTX)のBsmBIサイト間に挿入し、これをリツキシマブ発現用ベクターのpE-mIRES-GS-dual+mDHFR31(RTX)とした(図18-3)。

## [0087] [hTSH発現細胞及びリツキシマブ発現細胞の作成]

チャイニーズハムスターの卵巣に由来する細胞のCHO-K1細胞をエレクトロポレーション(Invitrogen社)により、pE-mIRES-GS-mNeo-dual(hTSH)、pE-mIRES-GS-mNeo-dual+mDHFR31(hTSH)、pE-mIRES-GS-mNeo-dual(RTX)及びpE-mIRES-GS-dual+mDHFR31(RTX)でそれぞれ形質転換した。形質転換後の細胞を、選択培地を用いて選択培養を行い、hTSH発現細胞及びRTX発現細胞を得た。

[0088] pE-mIRES-GS-mNeo-dual+mDHFR31(TSH)及びpE-mIRES-GS-dual+mDHFR31(RTX)で形質転換させた細胞の選択培養においては、まず細胞を、メトトレキセート(WAKO社)を含むCD Opti CHO培地(Invitrogen社)で、培地中に含まれるメトトレキセートの濃度を段階的に上昇させながら培養し、最終的にメトトレキセートを0.5 $\mu$ Mで含む培地で培養し、メトトレキセートに耐性を示す細胞を選択的に増殖させた。次いで、培地をメチオニンスルホキシミン(SIGMA社)を含むCD Opti CHO培地(Invitrogen社)に置き換えて、培地中に含まれ

るメチオニンスルホキシミンの濃度を段階的に上昇させながら培養し、最終的にメチオニンスルホキシミンを $300\ \mu\text{M}$ の濃度で含む培地で培養し、メチオニンスルホキシミンに耐性を示す細胞を選択的に増殖させた。ここで得られた細胞をバルク細胞とした。

[0089] pE-mIRES-GS-mNeo-dual(TSH)及びpE-mIRES-GS-mNeo-dual(RTX)で形質転換させた細胞の選択培養においては、細胞を、メチオニンスルホキシミン及びG418を含むCD Opti CHO培地 (Invitrogen社) で、培地中に含まれるメトトレキセート及びG418の濃度を段階的に上昇させながら培養し、最終的にメチオニンスルホキシミンを $300\ \mu\text{M}$ 、G418を $1\text{mg/mL}$ の濃度で含む培地で培養し、これらの薬剤に耐性を示す細胞を選択的に増殖させた。ここで得られた細胞をバルク細胞とした。

[0090] 上記の選択培養により得たバルク細胞を1~3個/ウェルとなるように96ウェルプレートに播種し、CD Opti CHO培地 (Invitrogen社) でコロニーが形成されるまで、約2週間培養した。培養上清中のhTSH、RTXの濃度を測定し、高発現のクローン細胞を得た。このとき、メチオニンスルホキシミンを $300\ \mu\text{M}$ の濃度で培地に添加した。このようにして得られた高発現のクローン細胞を、hTSH発現細胞及びRTX発現細胞として、以下の実験に供した。

[0091] [hTSH発現細胞のhTSH発現量の測定]

選択培養して得たhTSH発現細胞を $2 \times 10^5$ 個/mLの細胞密度で $300\ \mu\text{M}$ のメチオニンスルホキシミンを含有する5mLのCD Opti CHO培地で、 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 存在下で10日間培養した。培養、3、7及び10日目に培養上清をサンプリングした。

[0092] マウス抗hTSH-betaモノクローナル抗体 (Leinco Technologies社) 溶液を96ウェルプレートに $100\ \mu\text{L}$ ずつ加え、室温で1時間静置して抗体をプレートに固定させた。液を捨て、プレートをTBS-T液 (Tris :  $0.05\text{M}$ , NaCl :  $0.138\ \text{M}$ , KCl :  $0.0027\text{M}$ ,  $0.05\%$  Tween20, pH 8.0) で3回洗浄した後、1%BSA/TBS-T液をプレートに $200\ \mu\text{L}$ ずつ加え、室温で1時間静置してプレートをブロッキング

グした。液を捨て、プレートにTBS-T液で3回洗浄後、サンプリングした培養上清を検体としてプレートに100 $\mu$ Lずつ加え、室温で1時間静置した。このとき、必要に応じて、培養上清をTBS-T液で希釈した。また、hTSH (NIBSC社) をTBS-T液で0.244~62.5 ng/mLの濃度に希釈したものを標準溶液として、検体と同様にプレートに加えて静置した。液を捨て、プレートにTBS-T液で3回洗浄後、HRP標識したマウス抗hTSH-alphaモノクローナル抗体 (Leinco Technologies社) を2次抗体としてプレートに100 $\mu$ Lずつ加え、室温で1時間静置した。プレートをTBS-T液で3回洗浄後、HRP基質 (WAKO社) を加え、室温で15分間静置した後、硫酸を加えて反応を停止した。マイクロウエルプレートリーダーで490nmにおける吸光度を測定して、標準溶液の吸光度の測定値から得られた検量線に、検体の測定値を内挿し、検体に含まれるhTSHの濃度を求めた。

[0093] [RTX発現細胞のリツキシマブ発現量の測定]

選択培養して得たRTX発現細胞を $2 \times 10^5$ 個/mLの細胞密度で300 $\mu$ Mのメチオニンスルホキシミンを含有する5mLのCD Opti CHO培地で、37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>存在下で10日間培養した。培養、3、7及び10日目に培養上清をサンプリングした。

[0094] リツキシマブ発現量の測定はHuman IgG ELISA Quantitation Set (Bethyl Laboratories社) を用いて行った。ヤギ抗hIgG抗体 (Bethyl Laboratories社) 溶液を96ウェルプレートに100 $\mu$ Lずつ加え、室温で1時間静置して抗体をプレートに固定させた。液を捨て、プレートをTBS-T液で3回洗浄した後、1%B SA/TBS-T液をプレートに200 $\mu$ Lずつ加え、室温で1時間静置してプレートをブロッキングした。液を捨て、プレートをTBS-T液で3回洗浄後、サンプリングした培養上清を検体としてプレートに100 $\mu$ Lずつ加え、室温で1時間静置した。このとき、必要に応じて、培養上清をTBS-T液で希釈した。また、リツキシマブ (中外製薬社) をTBS-T液で3.9~500 ng/mLの濃度に希釈したものを標準溶液として、検体と同様にプレートに加えて静置した。液を捨て、プレー

トをTBS-T液で3回洗浄後、HRP標識したヤギ抗hIgG抗体（Bethyl Laboratories社）を2次抗体としてプレートに100 $\mu$ Lずつ加え、室温で1時間静置した。プレートをTBS-T液で3回洗浄後、HRP基質（WAKO社）を加え、室温で15分間静置した後、硫酸を加えて反応を停止した。マイクロエルプレートリーダーで490nmにおける吸光度を測定して、標準溶液の吸光度の測定値から得られた検量線に、検体の測定値を内挿し、検体に含まれるリツキシマブの濃度を求めた。

[0095] [結果（hTSH発現細胞のhTSH発現量）]

ヒト甲状腺刺激ホルモン（hTSH）発現用ベクターのpE-mIRES-GS-mNeo-dual（hTSH）で形質転換させたCHO細胞では、培養開始後10日目の培地中のhTSHの濃度は、バルク細胞では22.0 $\mu$ g/mL、クローン細胞では29.2 $\mu$ g/mLであった。一方、第2の選択マーカーとしてDHFR遺伝子を組み込んだhTSH発現用ベクターであるpE-mIRES-GS-mNeo-dual+mDHFR31（hTSH）で形質転換させたCHO細胞では、培養開始後10日目の培地中のhTSHの濃度は、バルク細胞では35.3 $\mu$ g/mL、クローン細胞では85.2 $\mu$ g/mLであった（表1）。

すなわち、伸長因子1プロモーター（EF-1p）、hTSH遺伝子、変異型内部リボソーム結合部位（mIRES）、及び第1の選択マーカーとしてGS遺伝子をこの順で含むhTSH発現用ベクターであるpE-mIRES-GS-mNeo-dual（hTSH）と比較して、更に第2の選択マーカーとしてDHFR遺伝子を組み込んだhTSH発現用ベクターであるpE-mIRES-GS-mNeo-dual+mDHFR31（hTSH）で形質転換させたCHO細胞では、hTSHの発現量が、バルク細胞間で約1.6倍に、クローン細胞間で約2.9倍と、飛躍的に増加した。

[0096] [表1]

表1. ヒト甲状腺刺激ホルモン（hTSH）の発現量（培地中hTSH濃度： $\mu$ g/mL）

ベクター名		培養期間(日)		
		3	7	10
pE-mIRES-GS-mNeo-dual(hTSH)	バルク細胞	7.4	15.6	22.0
	クローン細胞	12.2	20.6	29.2
pE-mIRES-GS-mNeo-dual+mDHFR31(hTSH)	バルク細胞	13.5	25.4	35.3
	クローン細胞	21.5	63.2	85.2

## [0097] [結果 (RTX発現細胞のリツキシマブ発現量) ]

RTX発現用ベクターのpE-mIRES-GS-mNeo-dual(RTX)で形質転換させたCHO細胞では、培養開始後10日目の培地中のリツキシマブの濃度は、バルク細胞では188.6  $\mu\text{g/mL}$ 、クローン細胞では318.9  $\mu\text{g/mL}$ であった。一方、第2の選択マーカとしてDHFR遺伝子を組み込んだRTX発現用ベクターであるpE-mIRES-GS-dual+mDHFR31(RTX)で形質転換させたCHO細胞では、培養開始後10日目の培地中のリツキシマブの濃度は、バルク細胞では174.1  $\mu\text{g/mL}$ 、クローン細胞では401.5  $\mu\text{g/mL}$ であった (表2)。

すなわち、伸長因子1プロモーター (EF-1p) , リツキシマブ遺伝子, 変異型内部リボソーム結合部位 (mIRES) , 及び第1の選択マーカとしてGS遺伝子をこの順で含むRTX発現用ベクターであるpE-mIRES-GS-mNeo-dual(RTX)と比較して、更に第2の選択マーカとしてDHFR遺伝子を組み込んだRTX発現用ベクターであるpE-mIRES-GS-dual+mDHFR31(RTX)で形質転換させた細胞では、RTXの発現量が、バルク細胞間ではほとんど同レベルであるものの、クローン細胞間では約1.26倍に増加した。

## [0098] [表2]

表2. リツキシマブの発現量 (培地中リツキシマブ濃度 :  $\mu\text{g/mL}$ )

ベクター名		培養期間 (日)		
		3	7	10
pE-mIRES-GS-mNeo-dual(RTX)	バルク細胞	37.5	123.1	188.6
	クローン細胞	81.3	198.2	318.9
pE-mIRES-GS-dual+mDHFR31(RTX)	バルク細胞	37.3	84.2	174.1
	クローン細胞	99.6	350.6	401.5

## [0099] [結果 (まとめ) ]

これらの結果は、遺伝子発現制御部位の下流に、外来遺伝子, 変異型内部リボソーム結合部位, 及び第1の選択マーカとしてグルタミン合成酵素をこの順で組み込み、更に、第2の選択マーカとしてジヒドロ葉酸レダクターゼ遺伝子を組み込んだ発現ベクターが、外来遺伝子を高レベルで発現させる

ことができる発現ベクターとして機能することを示すものである。

### 産業上の利用可能性

[0100] 本発明は、哺乳動物細胞を用いて組換え体蛋白質を高レベルで発現させることができるため、組換え体蛋白質を含む製品、例えば、組換え体蛋白質を含有する医薬品の製造コストの低減に利用することができる。

### 符号の説明

- [0101] 1 LacZプロモーター  
 2 mPGKプロモーター  
 3 配列番号1に示す塩基配列を含む野生型マウス脳心筋炎ウイルス由来の内部リボソーム結合部位 (EMCV-IRES)  
 3a 配列番号4に示す塩基配列を含む変異型マウス脳心筋炎ウイルス由来の内部リボソーム結合部位 (EMCV-mIRES)  
 4 mPGKのポリアデニル化領域(mPGKpA)  
 5 EF-1p及び第一イントロンを含む塩基配列  
 6 SV40後期ポリポリアデニル化領域  
 7 SV40初期プロモーター (SV40エンハンサー/プロモーター) を含む領域  
 8 合成ポリポリアデニル化領域  
 9 サイトメガロウイルスプロモーターを含む領域  
 10 グルタミン合成酵素遺伝子

### 配列表フリーテキスト

- [0102] 配列番号2 : Modified murine  
 encephalomyocarditis virus; n is a, c, g, or t  
 配列番号3 : Modified murine  
 encephalomyocarditis virus; n is a, c, g, or t  
 配列番号4 : Modified murine  
 encephalomyocarditis virus  
 配列番号6 : Modified murine

encephalomyocarditis virus

配列番号 7 : Modified murine encephalomyocarditis virus; n is a, c, g, or t

配列番号 8 : Modified murine encephalomyocarditis virus; n is a, c, g, or t

配列番号 1 1 : Modified Mus musculus DHFR

配列番号 1 2 : Synthetic Construct

配列番号 1 3 : Primer Hyg-Sfi5', synthetic sequence

配列番号 1 4 : Primer Hyg-BstX3', synthetic sequence

配列番号 1 5 : IRES-Hygr-mPGKpA, synthetic sequence

配列番号 1 6 : Synthetic Construct

配列番号 1 7 : Primer IRES5', synthetic sequence

配列番号 1 8 : Primer IRES3', synthetic sequence

配列番号 1 9 : Primer mPGKP5', synthetic sequence

配列番号 2 0 : Primer mPGKP3', synthetic sequence

配列番号 2 1 : mPGKp, synthetic sequence

配列番号 2 2 : Primer GS5', synthetic sequence

配列番号 2 3 : Primer GS3', synthetic sequence

配列番号 2 4 : Primer puro5', synthetic sequence

配列番号 2 5 : Primer puro3', synthetic  
sequence

配列番号 2 6 : Synthetic sequence containing  
puromycin resistance gene

配列番号 2 7 : Synthetic Construct

配列番号 2 8 : Primer SV40polyA5', synthetic  
sequence

配列番号 2 9 : Primer SV40polyA3', synthetic  
sequence

配列番号 3 0 : Primer mIRES-GS5', synthetic  
sequence

配列番号 3 1 : Primer mIRES-GS3', synthetic  
sequence

配列番号 3 2 : Primer SV40polyA5' -2,  
synthetic sequence

配列番号 3 3 : Primer SV40polyA3' -2,  
synthetic sequence

配列番号 3 4 : Primer mNeoA5', synthetic  
sequence

配列番号 3 5 : Primer mNeoA3', synthetic  
sequence

配列番号 3 6 : Primer mNeoB5', synthetic  
sequence

配列番号 3 7 : Primer mNeoB3', synthetic  
sequence

配列番号 3 8 : Primer mNeoC5', synthetic  
sequence

配列番号 3 9 : Primer mNeoC3', synthetic

sequence

配列番号 4 0 : Primer mNeoD5', synthetic

sequence

配列番号 4 1 : Primer SVpA-Mega-F, synthetic

sequence

配列番号 4 2 : Primer SVpA-BstXI-R, synthetic

sequence

配列番号 4 3 : Primer SVpA-Not-F, synthetic

sequence

配列番号 4 4 : Primer SVpA-BstXI-R, synthetic

sequence

配列番号 4 5 : Synthetic sequence containing  
Modified DHFR(F31W)

配列番号 4 6 : Synthetic sequence containing  
human TSH alpha

配列番号 4 7 : Synthetic sequence containing  
human TSH beta

配列番号 4 8 : Synthetic sequence containing  
WAP3' UTR

配列番号 4 9 : Primer TSHalpha5', synthetic  
sequence

配列番号 5 0 : Primer TSHalpha3', synthetic  
sequence

配列番号 5 1 : Primer TSHbeta5', synthetic  
sequence

配列番号 5 2 : Primer TSHbeta3', synthetic  
sequence

配列番号 5 3 : Primer WAP3', synthetic

sequence

配列番号 5 4 : Primer dE-BbsI-F, synthetic

sequence

配列番号 5 5 : Primer SynpA-BbsI-R, synthetic

sequence

配列番号 5 6 : Rituximab heavy chain,

synthetic sequence

配列番号 5 7 : Rituximab light chain,

synthetic sequence

配列番号 5 8 : Primer dE-BbsI-F, synthetic

sequence

配列番号 5 9 : Primer SynpA-BbsI-R, synthetic

sequence

## 請求の範囲

- [請求項1] 蛋白質を発現させるための発現ベクターであって、遺伝子発現制御部位（A）、並びに、その下流に該蛋白質をコードする遺伝子、更に下流に内部リボソーム結合部位、及び更に下流にグルタミン合成酵素をコードする遺伝子を含み、且つ、該遺伝子発現制御部位（A）の又は該遺伝子発現制御部位（A）とは別の遺伝子発現制御部位（B）の下流にジヒドロ葉酸レダクターゼ遺伝子を更に含んでなる、発現ベクター。
- [請求項2] 該遺伝子発現制御部位（A）及び／又は該遺伝子発現制御部位（B）が、サイトメガロウイルス由来のプロモーター、SV40初期プロモーター、伸長因子1プロモーターからなる群から選択されるものである、請求項1の発現ベクター。
- [請求項3] 該内部リボソーム結合部位が、ピコルナウイルス科のウイルス、口蹄疫ウイルス、A型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、コロナウイルス、ウシ腸内ウイルス、サイラーのネズミ脳脊髄炎ウイルス、コクサッキーB型ウイルス、ヒト免疫グロブリン重鎖結合蛋白質遺伝子、ショウジョウバエアンテナペディア遺伝子、ショウジョウバエウルトラビトラックス遺伝子からなる群から選択されるウイルス又は遺伝子の5'非翻訳領域に由来するものである、請求項1又は2の発現ベクター。
- [請求項4] 該内部リボソーム結合部位が、ピコルナウイルス科のウイルスの5'非翻訳領域に由来するものである、請求項1又は2の発現ベクター、
- [請求項5] 該内部リボソーム結合部位が、マウス脳心筋炎ウイルスの5'非翻訳領域に由来するものである、請求項1又は2の発現ベクター。
- [請求項6] 該内部リボソーム結合部位が、野生型の内部リボソーム結合部位の塩基配列に、1又は2以上の変異を加えたものである、請求項1ないし5の何れかの発現ベクター、
- [請求項7] 該野生型の内部リボソーム結合部位の塩基配列が複数の開始コドン

を含み、該変異により、それら複数の開始コドンのうち一部が破壊されたものである、請求項6の発現ベクター。

[請求項8] 該内部リボソーム結合部位が、配列番号1の塩基配列を含むものである、請求項5の発現ベクター。

[請求項9] 該内部リボソーム結合部位が、配列番号2の塩基配列を含むものである、請求項5の発現ベクター。

[請求項10] 該内部リボソーム結合部位が、配列番号3の塩基配列を含むものである、請求項5の発現ベクター。

[請求項11] 該内部リボソーム結合部位が、配列番号4の塩基配列を含むものである、請求項5の発現ベクター。

[請求項12] 該内部リボソーム結合部位が、配列番号5の塩基配列を含むものである、請求項5の発現ベクター。

[請求項13] 該内部リボソーム結合部位が、配列番号6の塩基配列を含むものである、請求項5の発現ベクター。

[請求項14] 該蛋白質をコードする該遺伝子と該内部リボソーム結合部位との間の領域又はグルタミン合成酵素をコードする該遺伝子の下流の領域において、該内部リボソーム結合部位とは別の内部リボソーム結合部位及びその下流に薬剤耐性遺伝子を更に含んでなる、請求項1ないし13の何れかの発現ベクター。

[請求項15] 該遺伝子発現制御部位（A）及び遺伝子発現制御部位（B）とは別に、更なる遺伝子発現制御部位（C）及びその下流に薬剤耐性遺伝子を更に含んでなる、請求項1ないし13の何れかの発現ベクター。

[請求項16] 該薬剤耐性遺伝子が、ピューロマイシン又はネオマイシン耐性遺伝子である、請求項14又は15の発現ベクター。

[請求項17] 該蛋白質をコードする該遺伝子が、ヒト由来の遺伝子である請求項1ないし16の何れかの発現ベクター。

[請求項18] ヒト由来の該遺伝子が、リソソーム酵素、組織プラスミノーゲンアクチベーター（t-PA）、血液凝固因子、エリスロポエチン、インタ

ーフェロン， トロンボモジュリン， 甲状腺刺激ホルモン（TSH）， 卵胞刺激ホルモン， 顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）， 及び抗体をコードする遺伝子からなる群から選択されるものである， 請求項 17 の発現ベクター。

[請求項19] ヒト由来の該遺伝子が， リソソーム酵素をコードする遺伝子である， 請求項 17 の発現ベクター。

[請求項20] 該リソソーム酵素が，  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ A， イズロン酸2-スルファターゼ， グルコセレブロシダーゼ， ガルスルファラーゼ，  $\alpha$ -L-イズロニダーゼ， 及び酸性  $\alpha$ -グルコシダーゼからなる群から選択されるものである， 請求項 19 の発現ベクター。

[請求項21] ヒト由来の該遺伝子が， エリスロポエチンをコードする遺伝子である請求項 17 の発現ベクター。

[請求項22] 請求項 1 ないし 21 の何れかの発現ベクターで形質転換された哺乳動物細胞。

[請求項23] 該哺乳動物細胞が， 内因性のジヒドロ葉酸レダクターゼ遺伝子を欠損したものである， 請求項 22 の細胞。

[請求項24] 該哺乳動物細胞が， CHO細胞である， 請求項 22 又は 23 の細胞。

[請求項25] (a) 請求項 1 ないし 21 の何れかの発現ベクターを， 哺乳動物細胞に導入するステップ，

(b) 該発現ベクターが導入された哺乳動物細胞を， ジヒドロ葉酸レダクターゼ阻害剤の存在下で選択培養するステップ， 及び

(c) 該選択培養により選択された細胞を， グルタミン合成酵素阻害剤の存在下で更に選択培養するステップ  
を含む， 該蛋白質をコードする遺伝子を発現する形質転換細胞の製造方法。

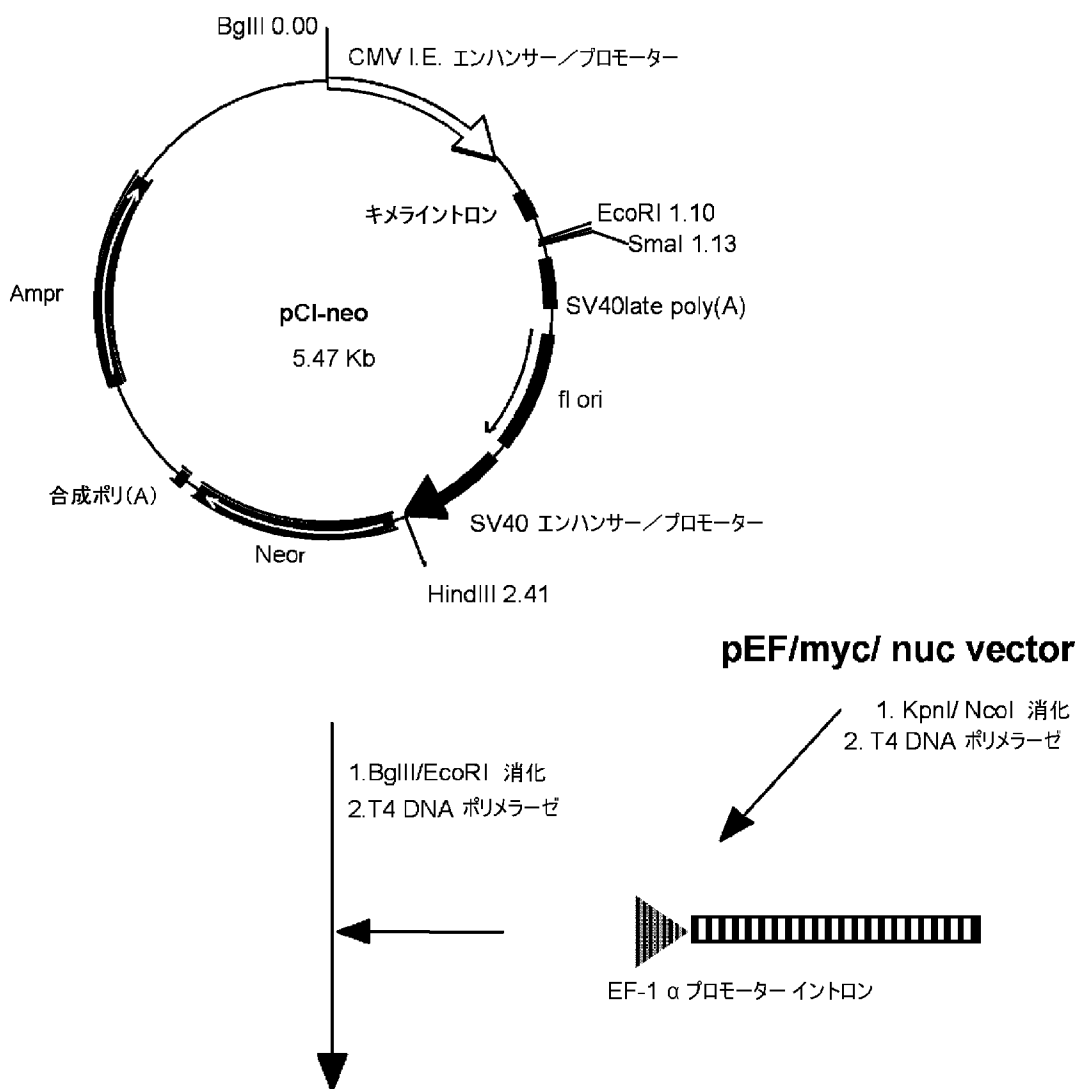
[請求項26] (a) 請求項 14 ないし 16 の何れかの発現ベクターを， 哺乳動物細胞に導入するステップ，

(b) 該発現ベクターが導入された哺乳動物細胞を、ジヒドロ葉酸レダクターゼ阻害剤の存在下で選択培養するステップ、及び

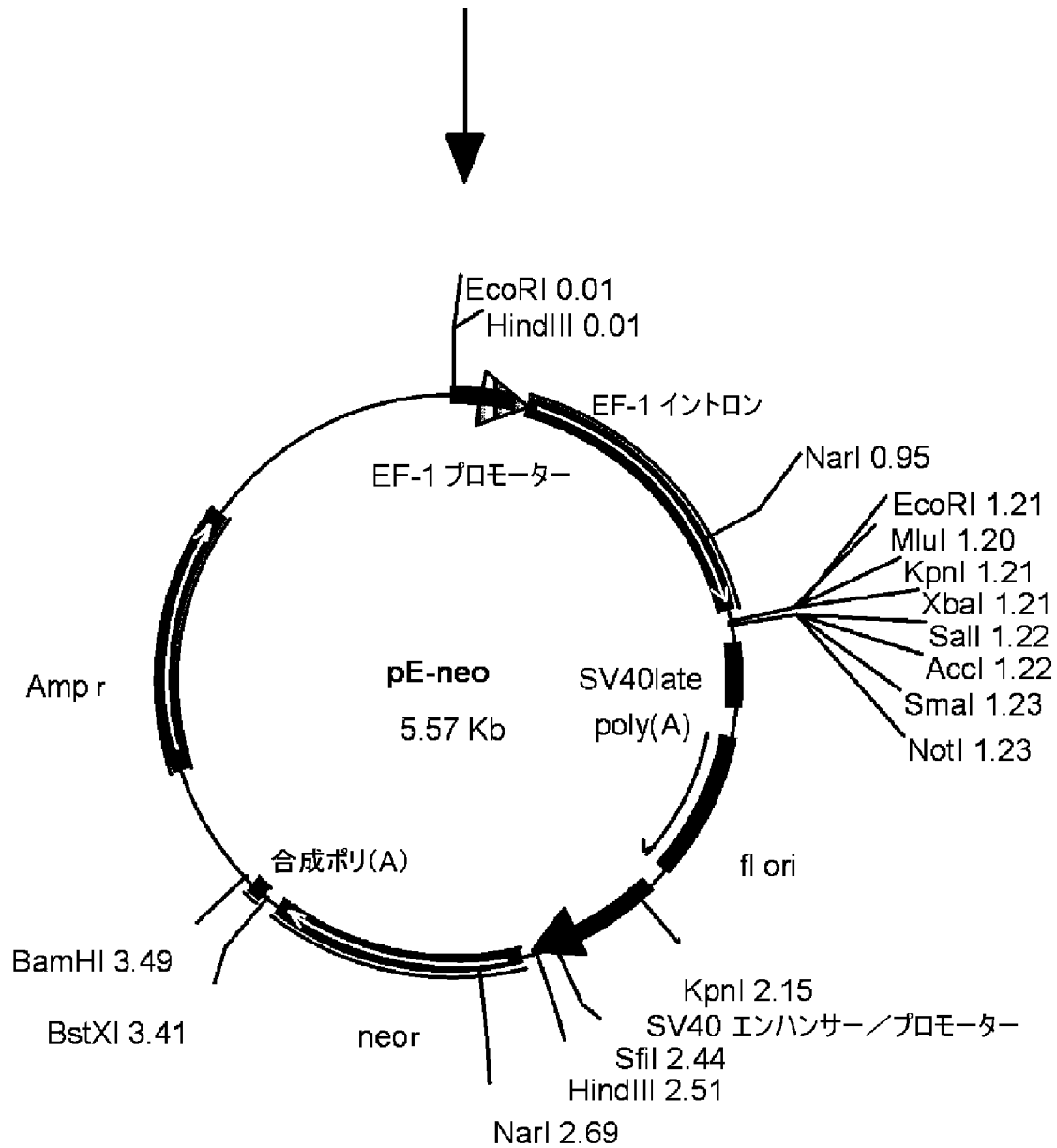
(c) 該選択培養により選択された細胞を、グルタミン合成酵素阻害剤の存在下で更に選択培養するステップ

を含む、該蛋白質をコードする遺伝子を発現する形質転換細胞の製造方法であって、該ステップ (a) と該ステップ (b) の間、又は該ステップ (b) と該ステップ (c) の間に、該発現ベクターが導入された哺乳動物細胞を、該薬剤耐性遺伝子に対応する薬剤の存在下で選択培養するステップを更に含む、製造方法。

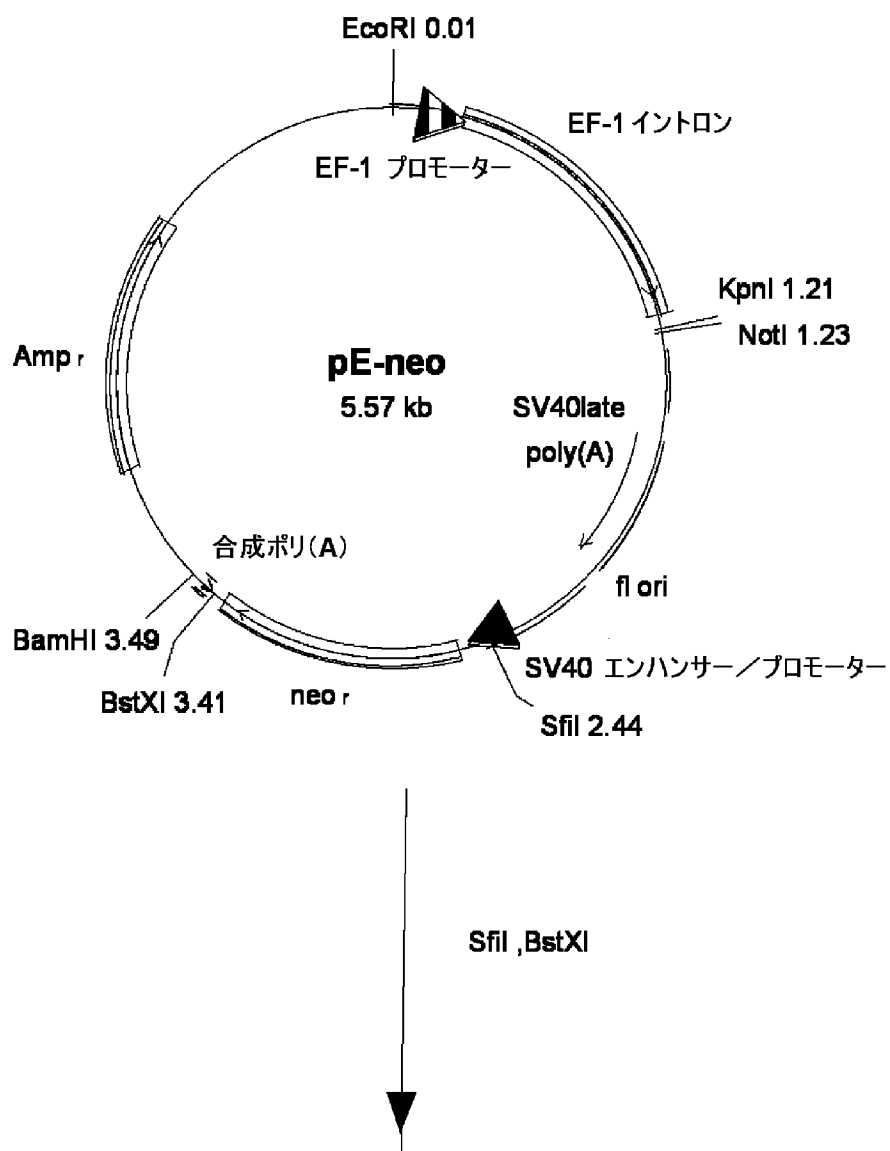
[図1-1]



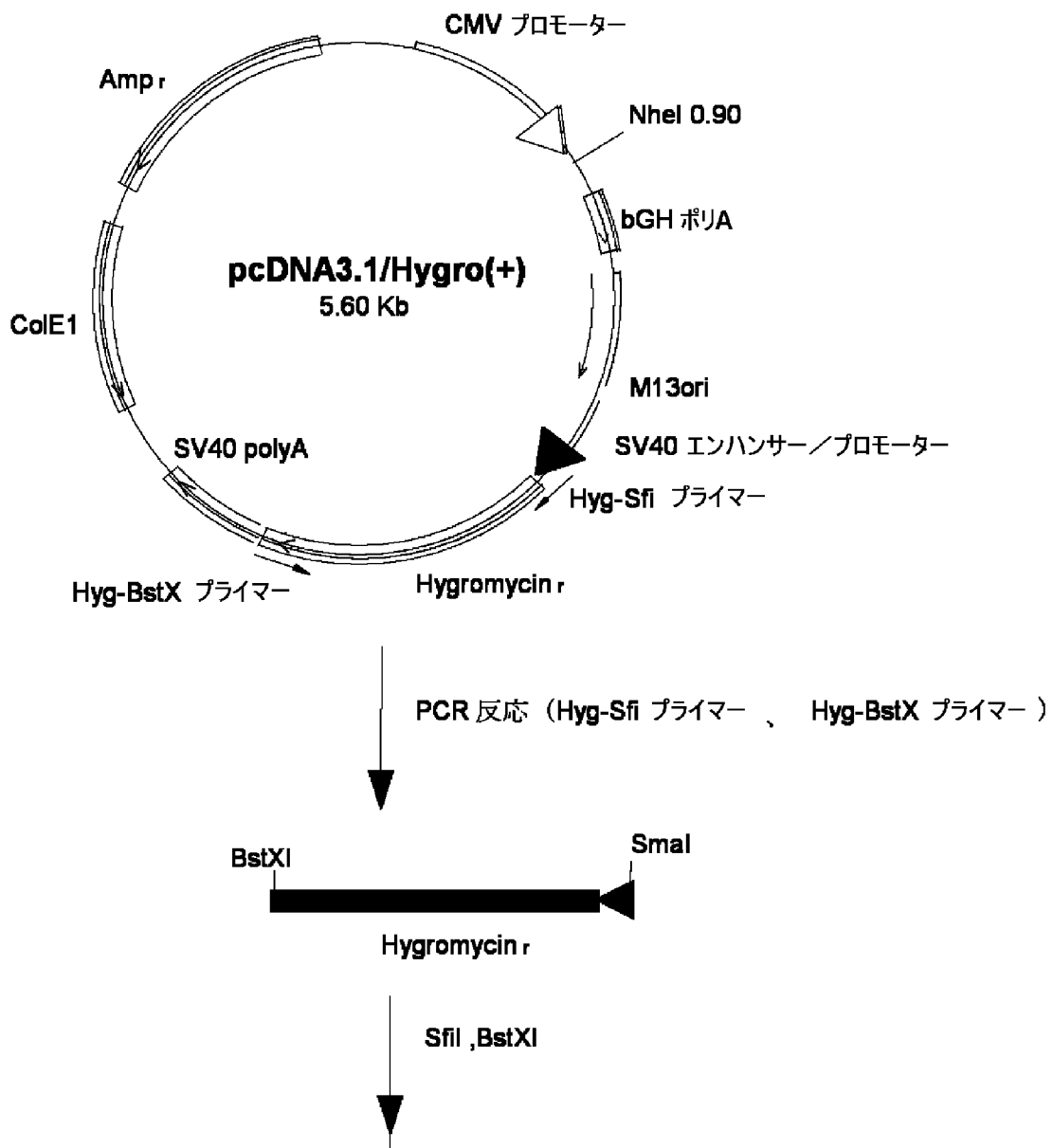
[図1-2]



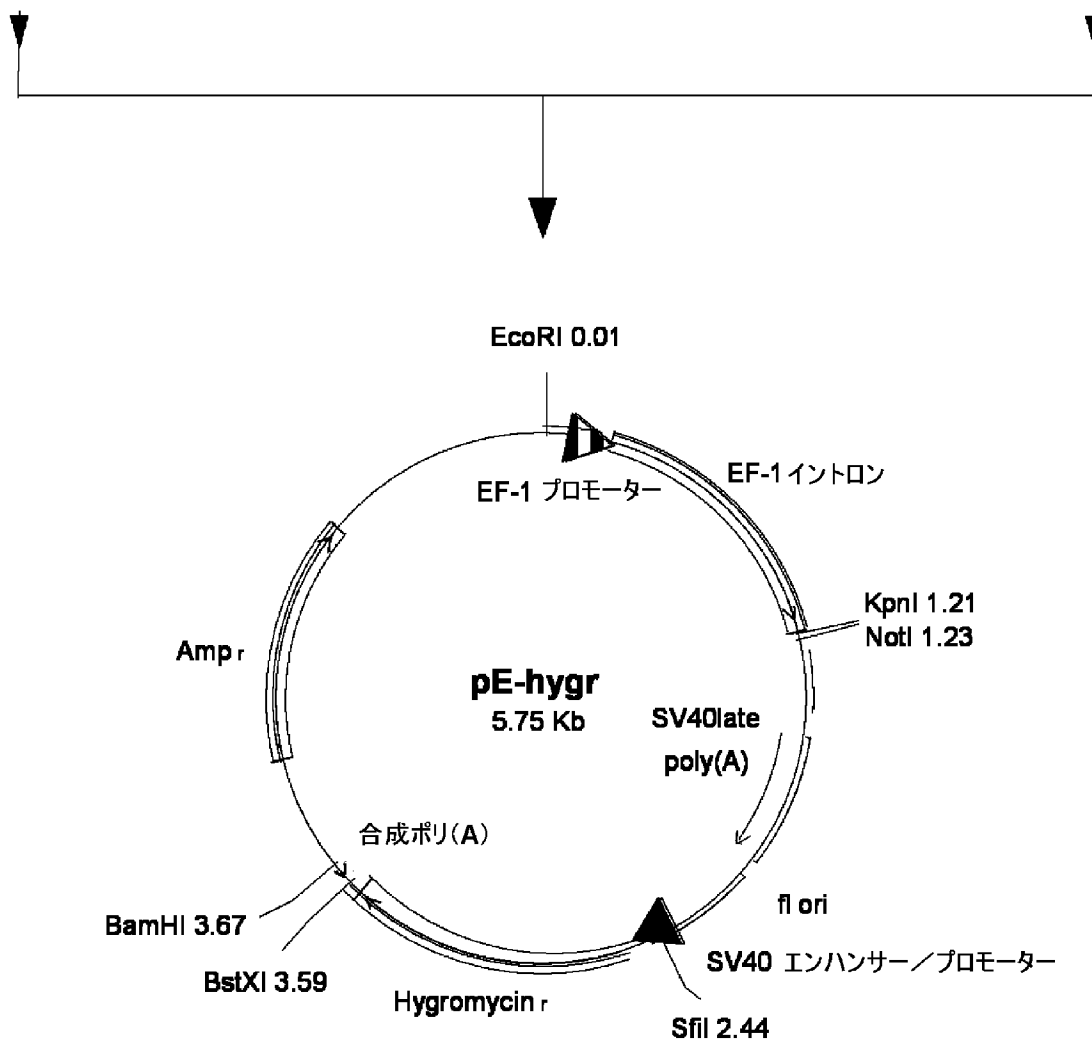
[図2-1]



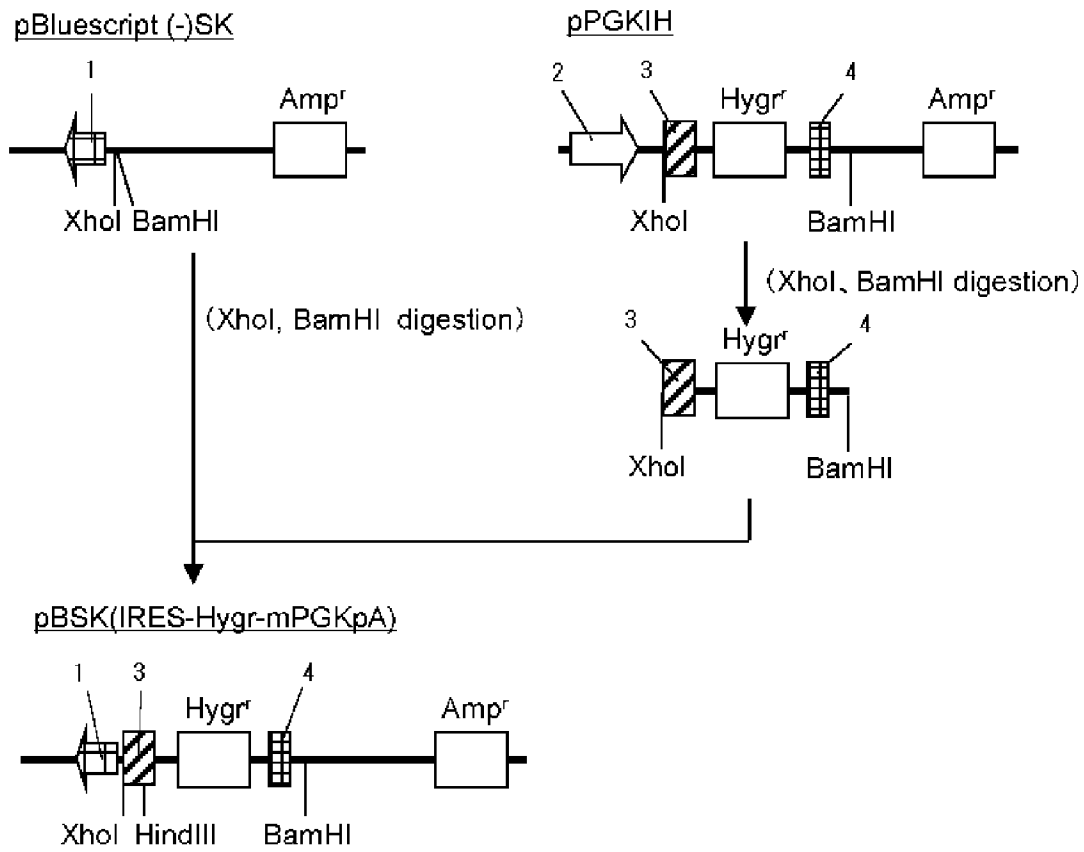
[図2-2]



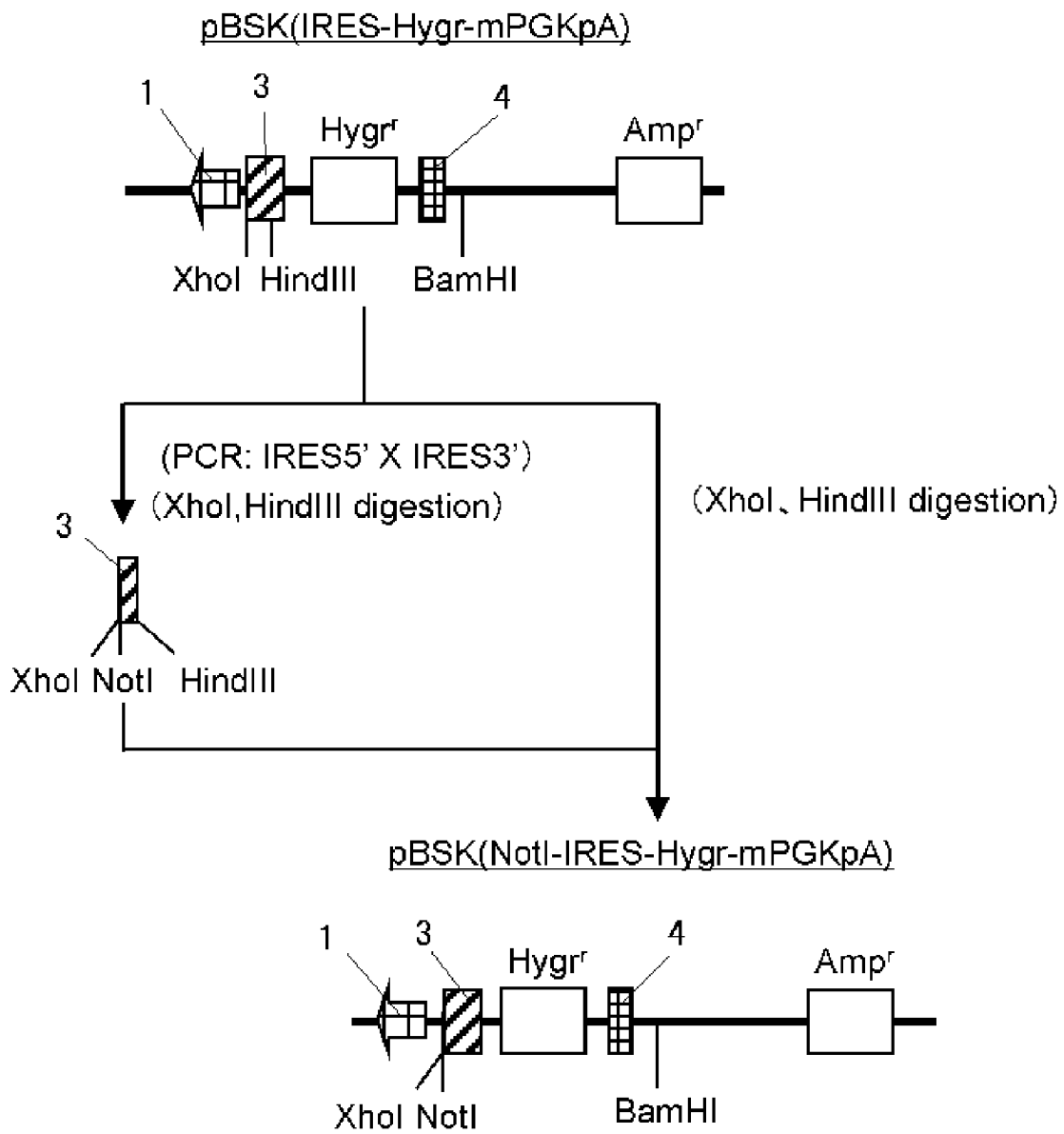
[図2-3]



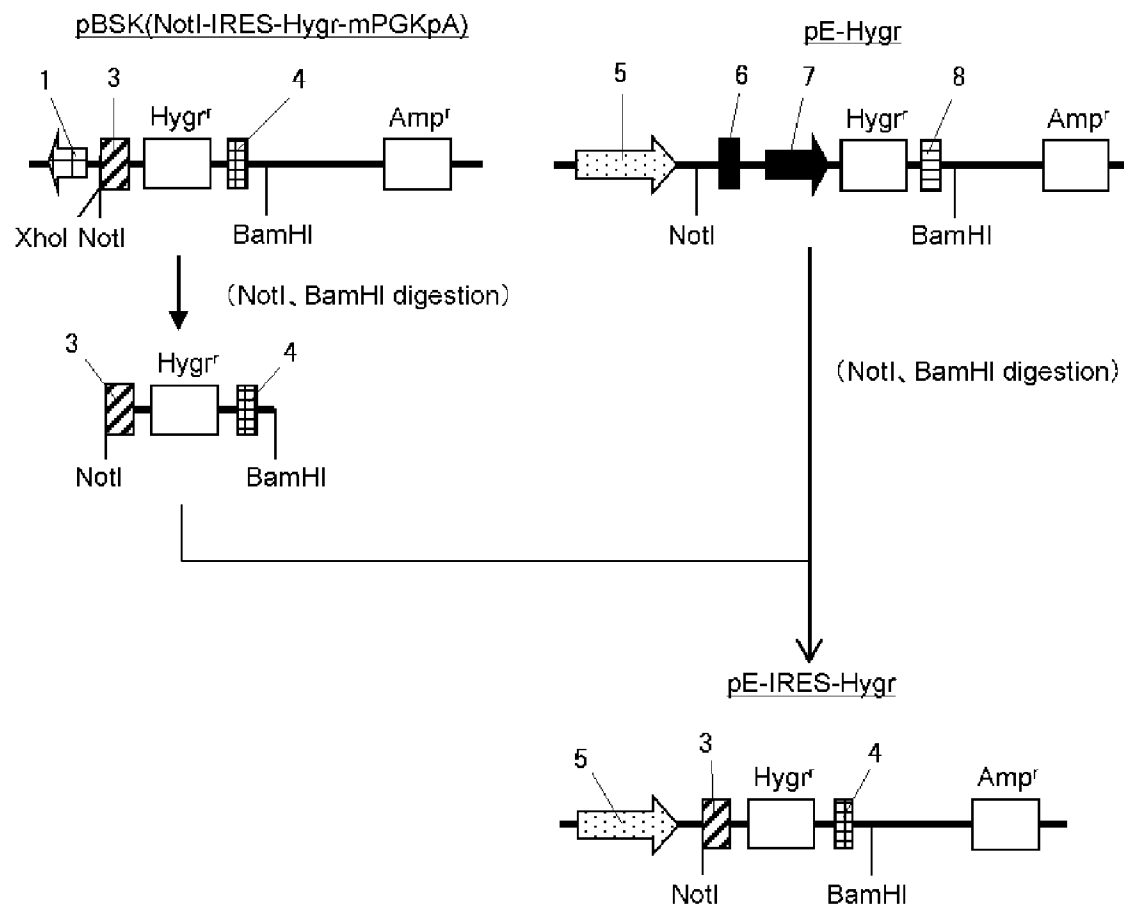
[図3-1]



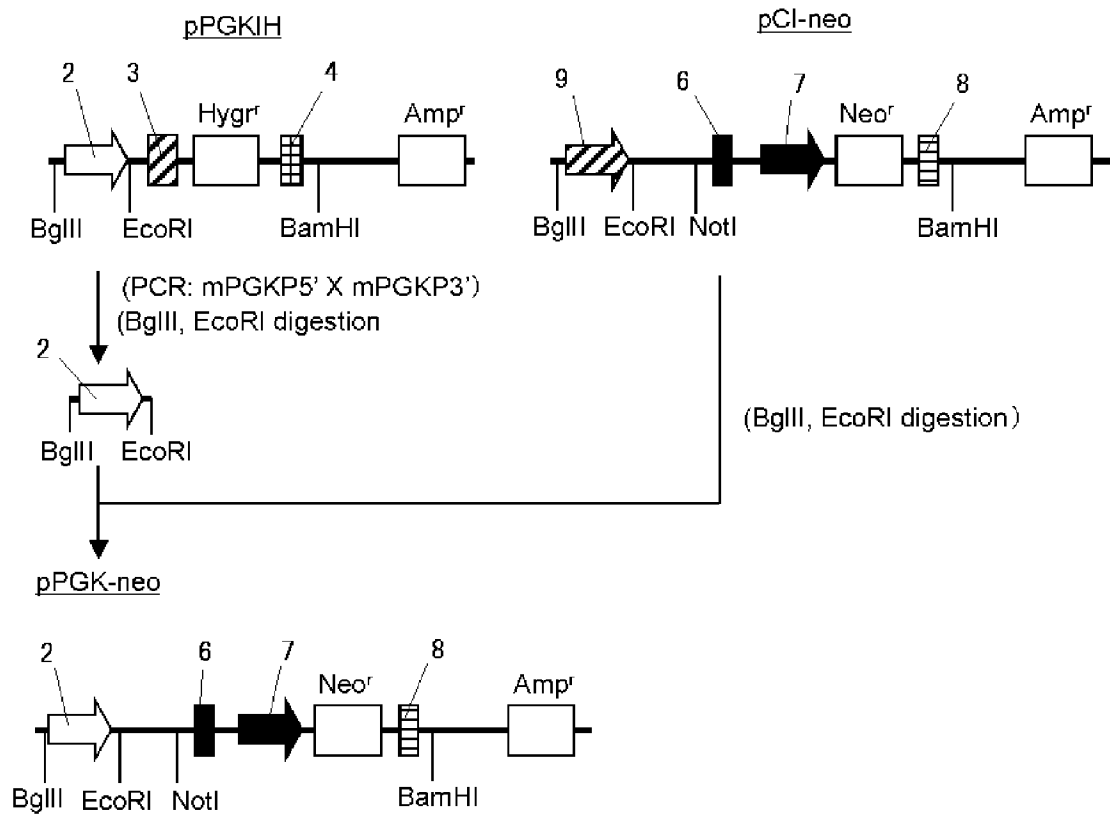
[図3-2]



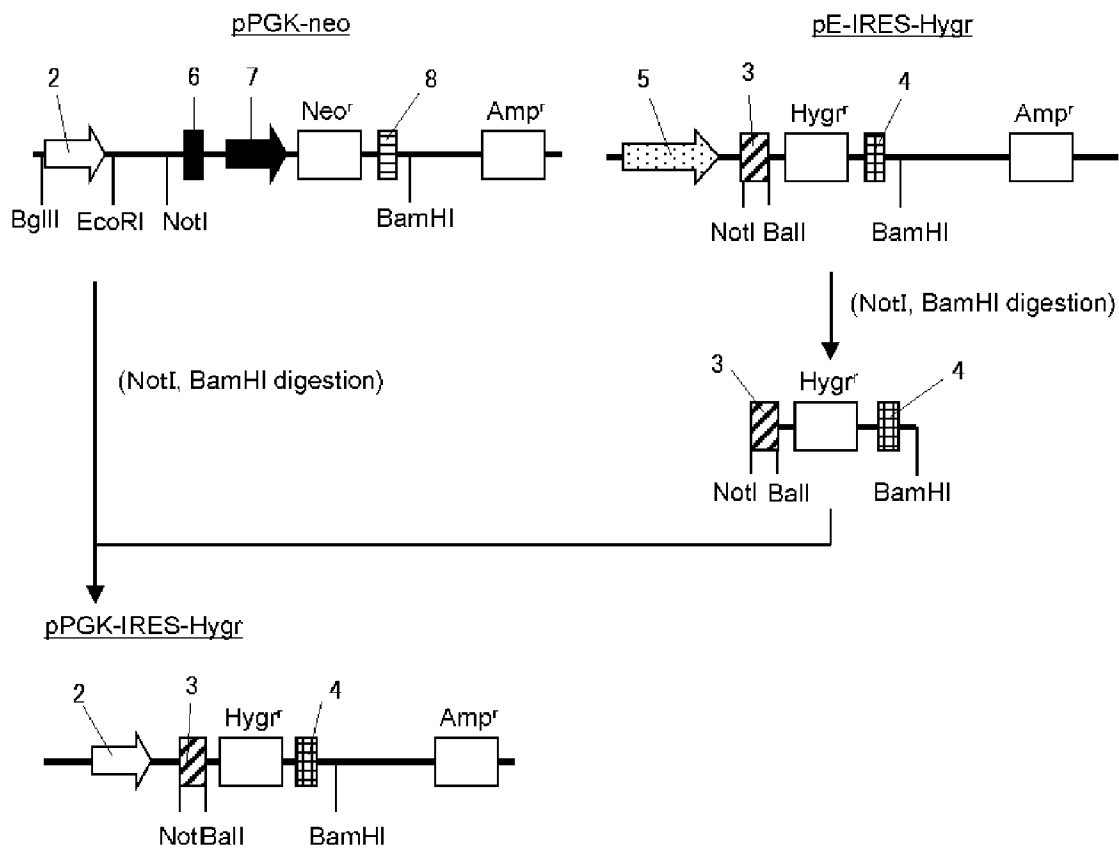
[図3-3]



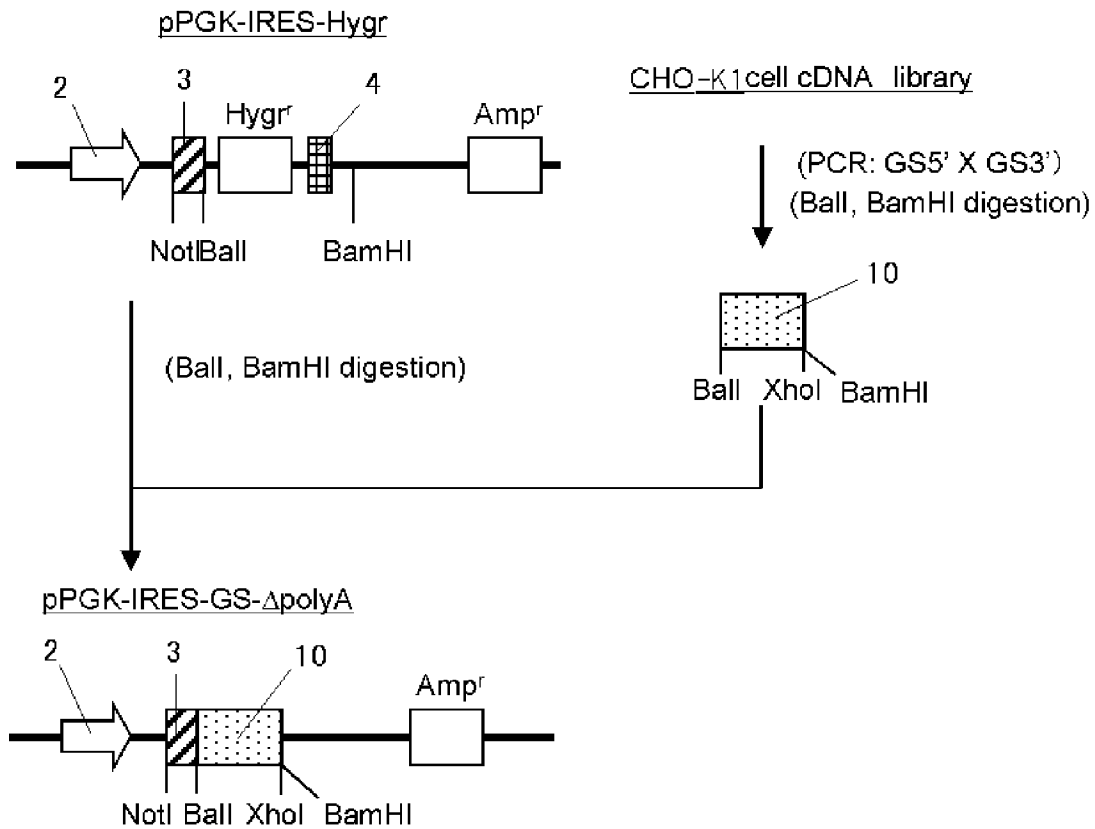
[図3-4]



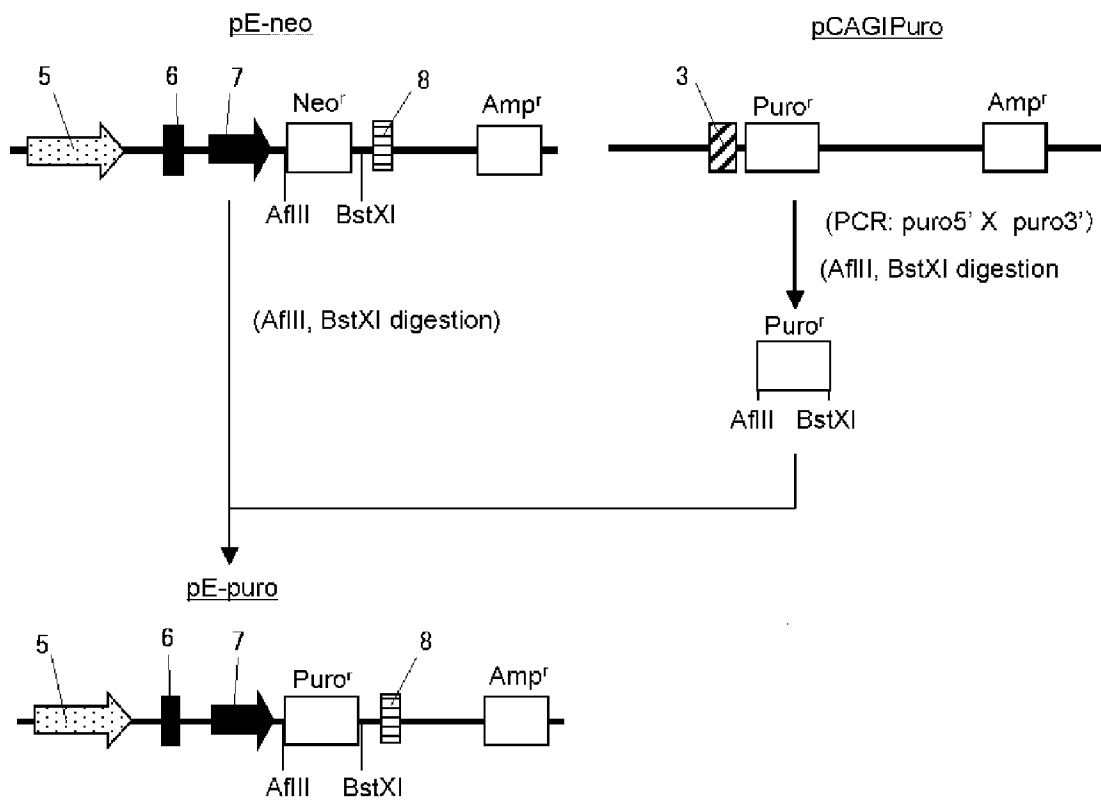
[図3-5]



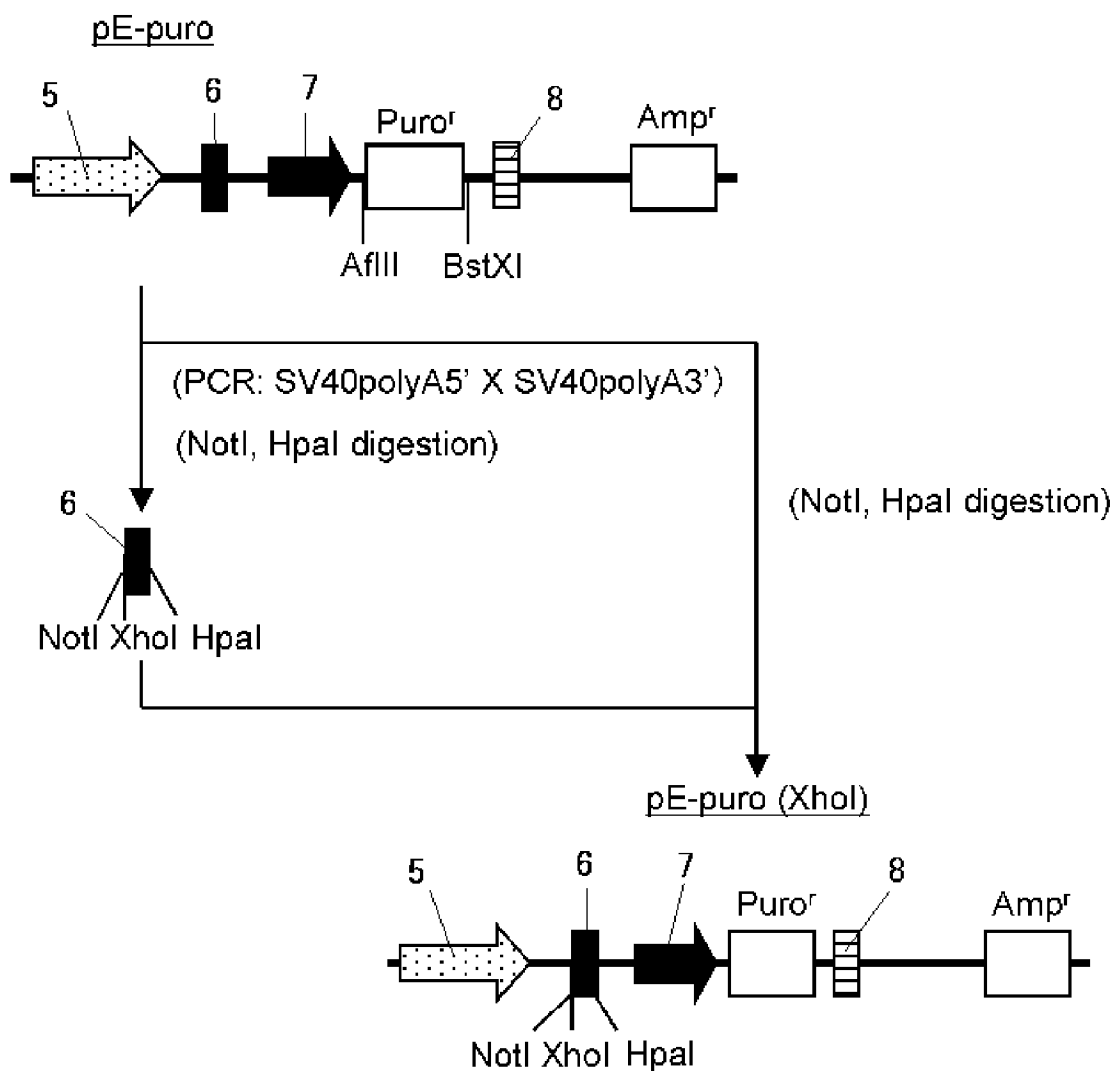
[図3-6]



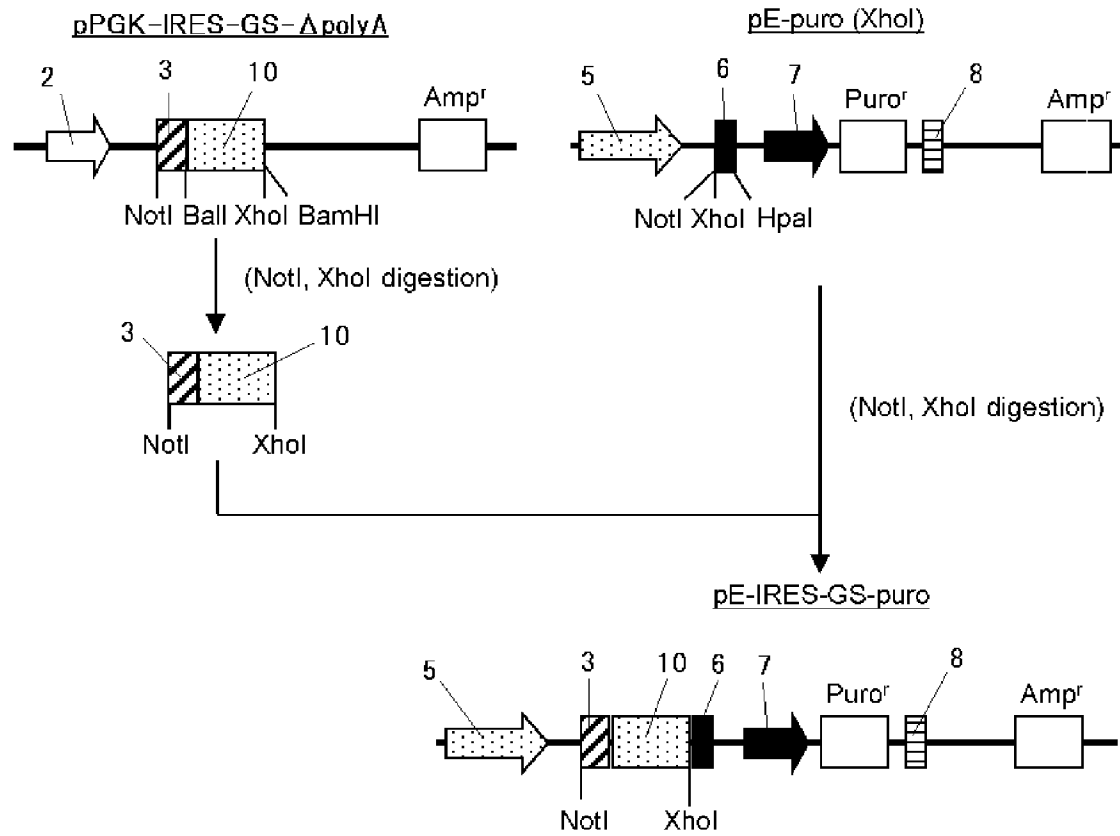
[図3-7]



[図3-8]

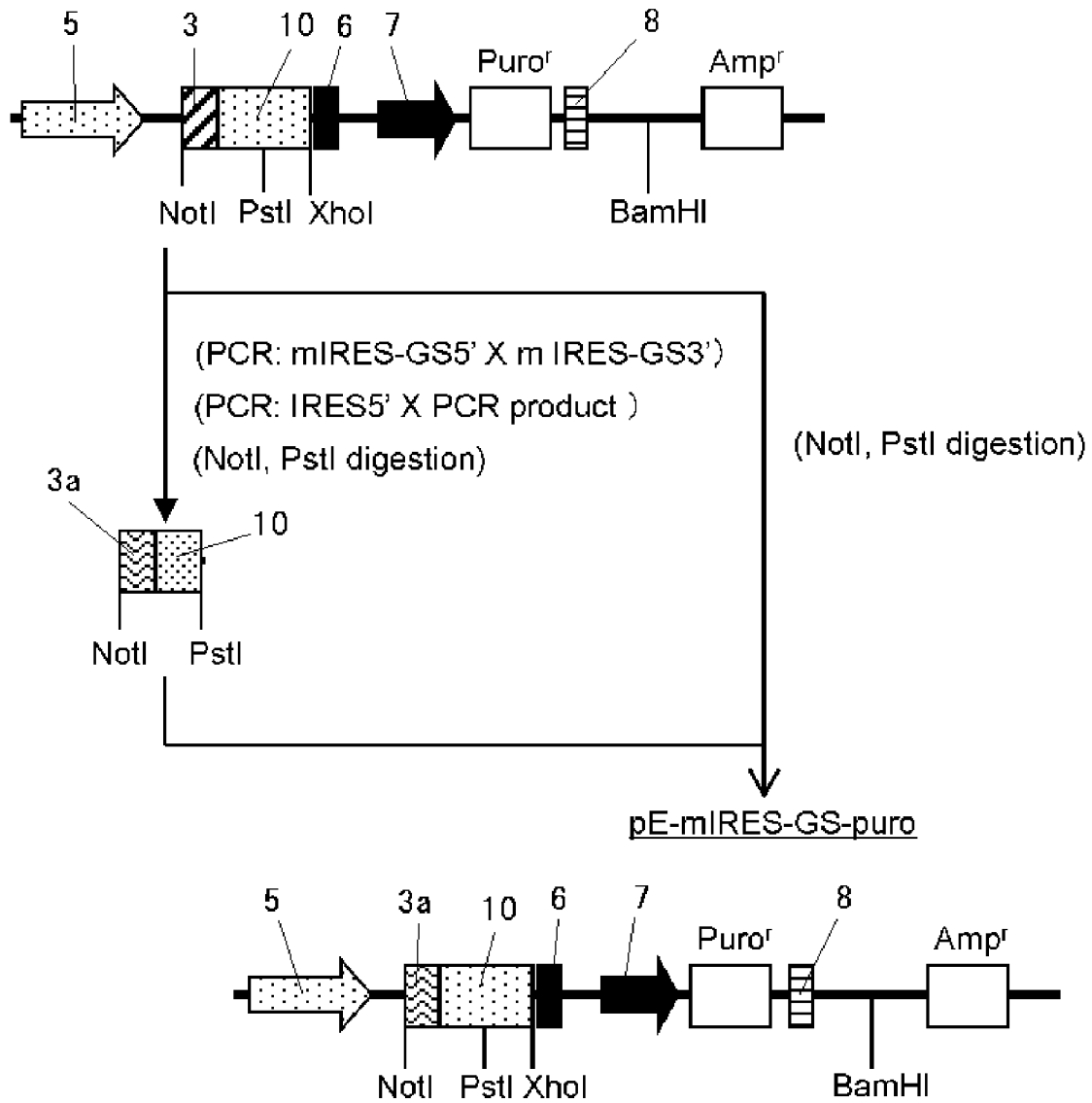


[図3-9]

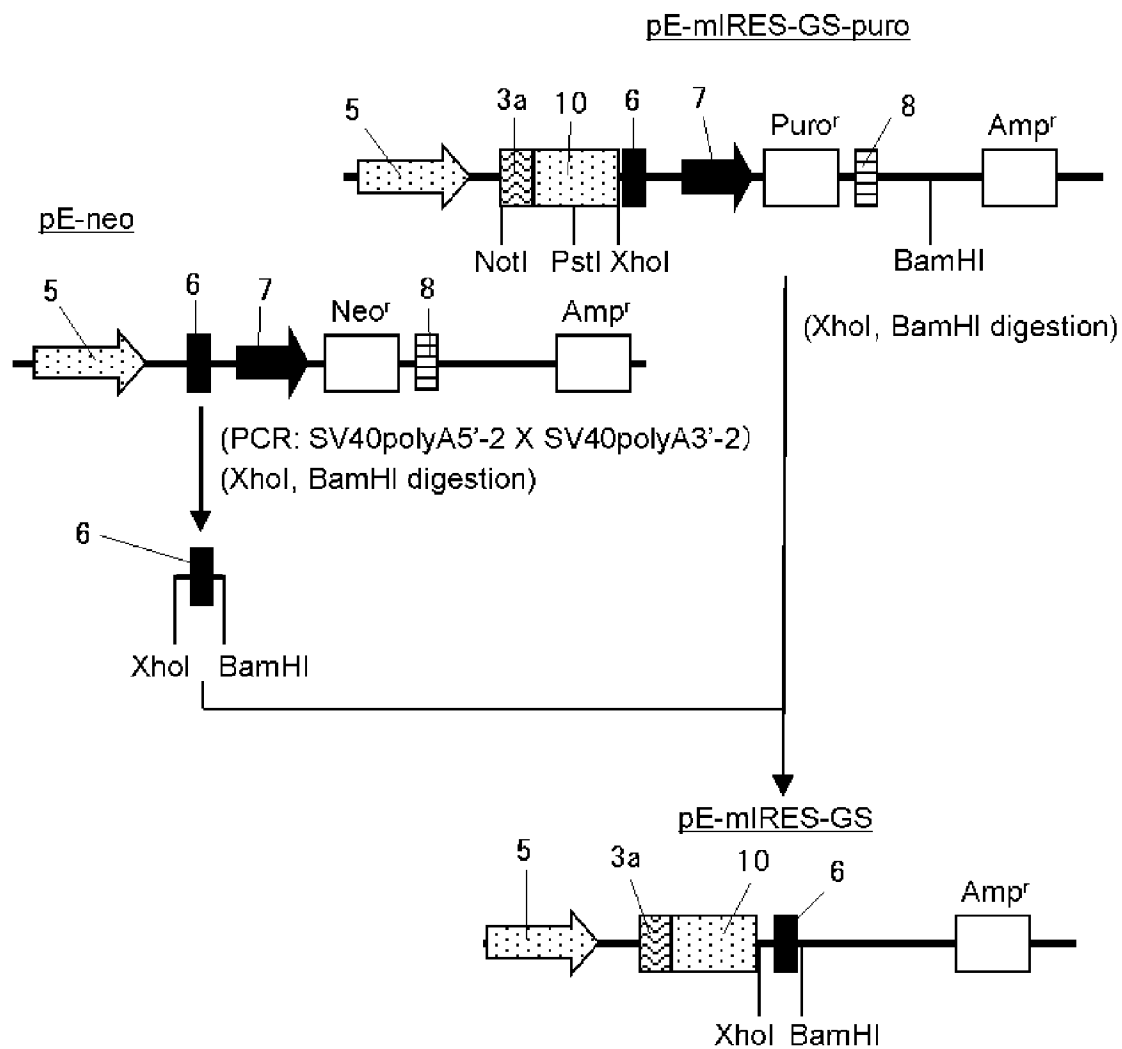


[図4]

pE-IRES-GS-puro

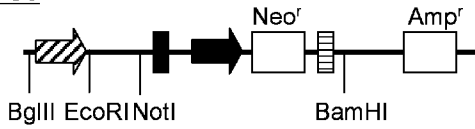


[図5]

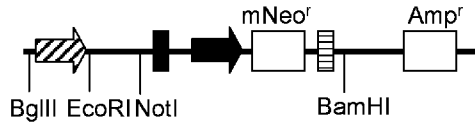


[図6]

pCI-neo



pCI-mNeo

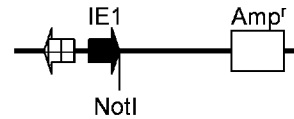


(PCR: mNeoA5' X mNeoA3')  
(Self ligation)



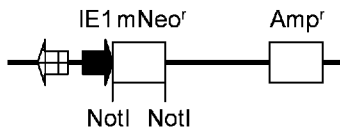
NotI NotI

pUC57-IE1



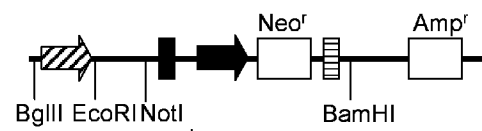
(NotI digestion)

pUC57-IE1-mNeo



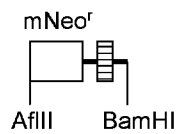
NotI NotI

pCI-neo



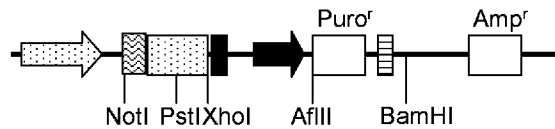
(PCR: mNeoC5' X mNeoC3')  
Mega-primer

(PCR: mNeoD5' X Mega-primer)  
(AflIII, BamHI digestion)



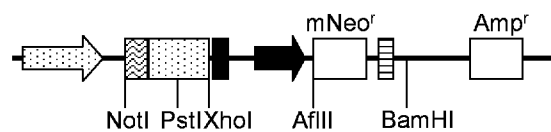
AflIII BamHI

pE-mIRES-GS-puro



(AflIII, BamHI digestion)

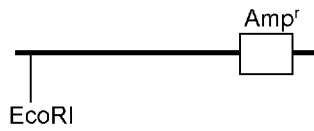
pE-mIRES-GS-mNeo



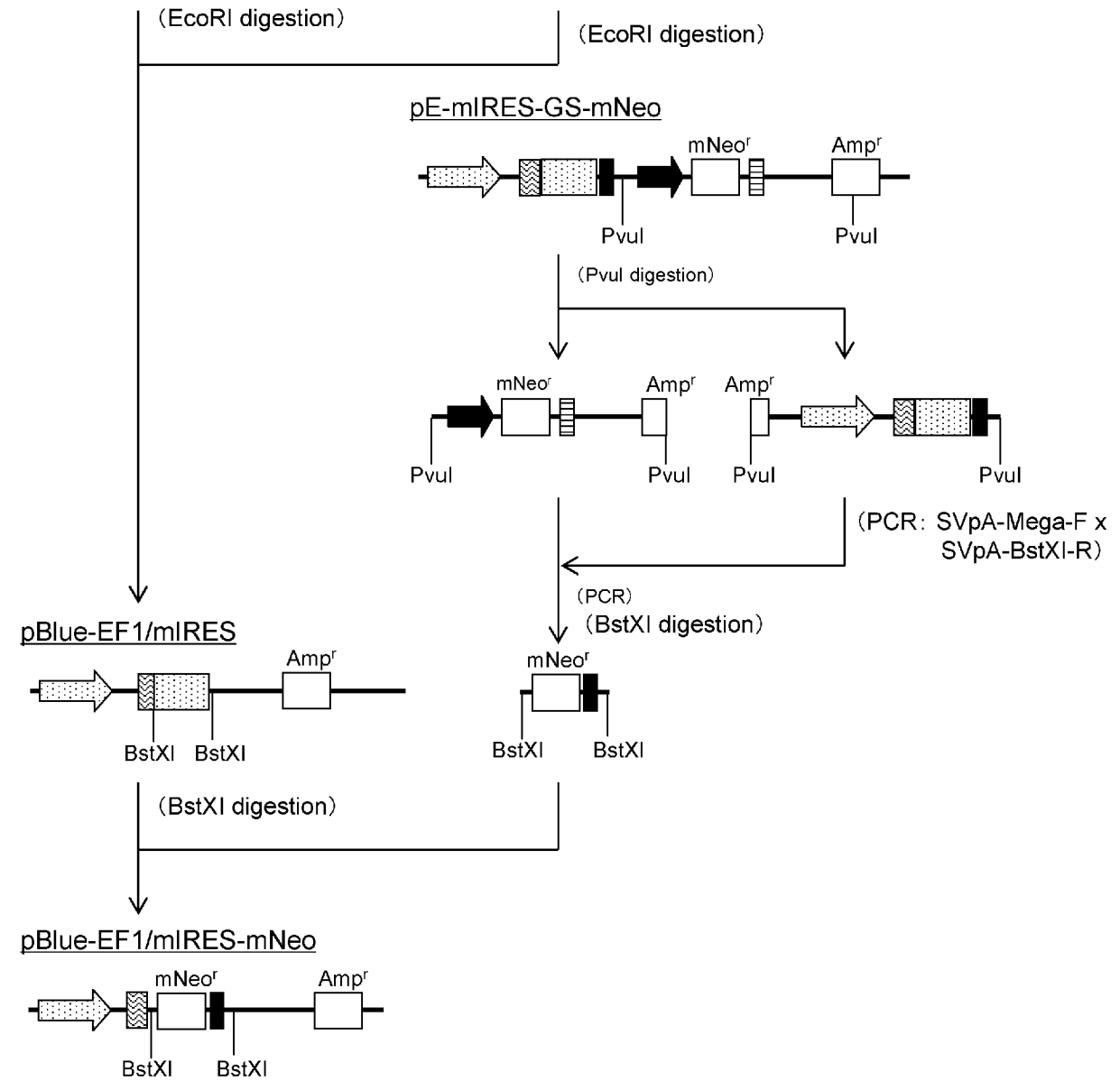
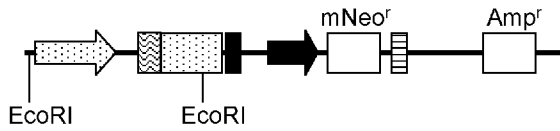
NotI PstIXhoI AflIII BamHI

[図7]

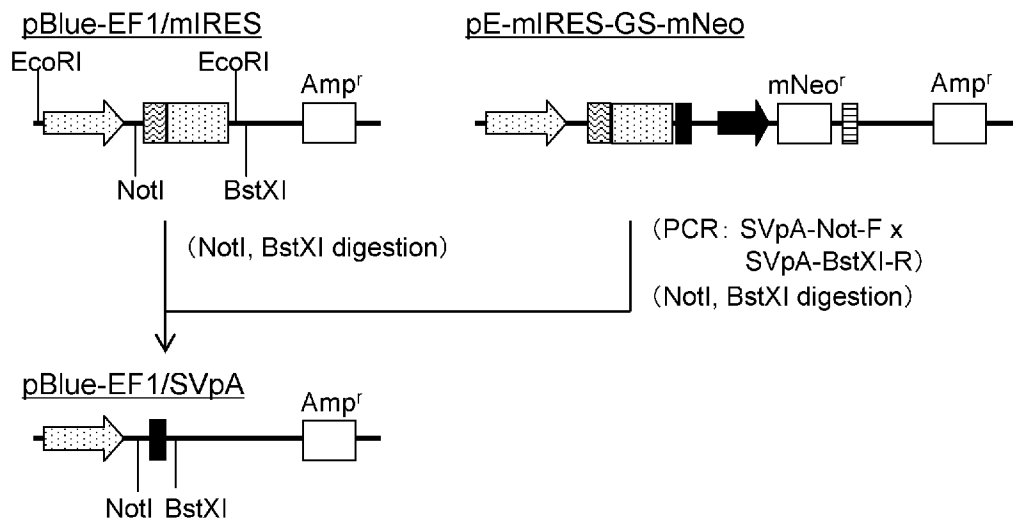
pBluescript SK(+)



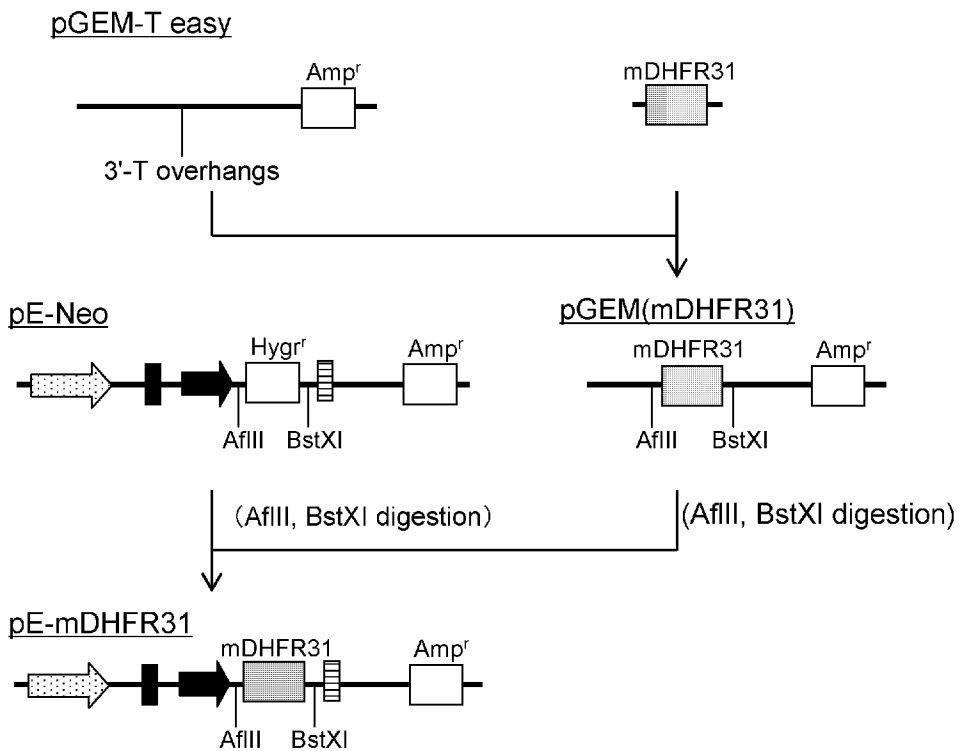
pE-mIRES-GS-mNeo



[図8]

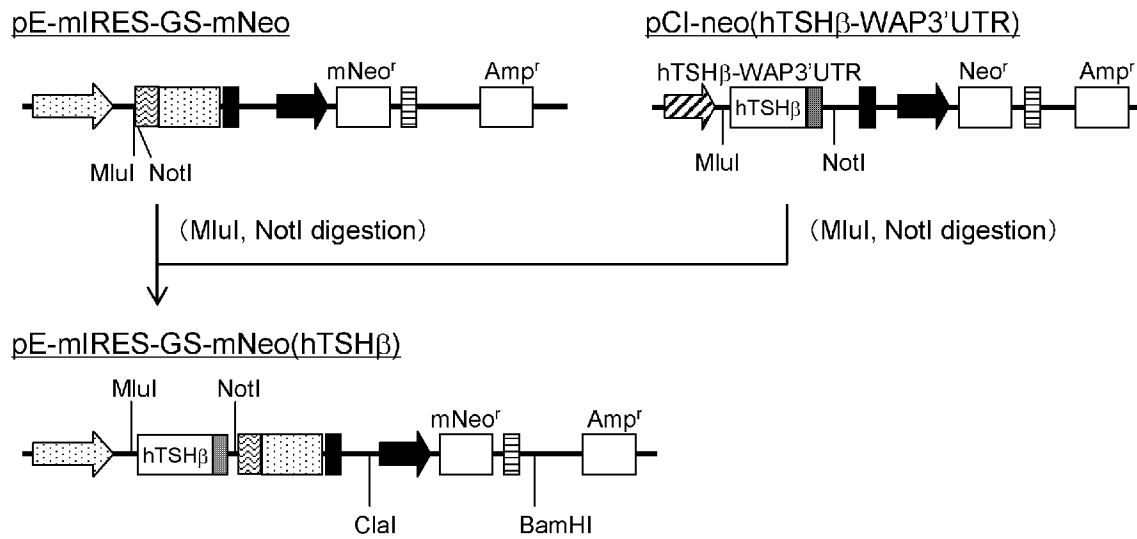


[図9]

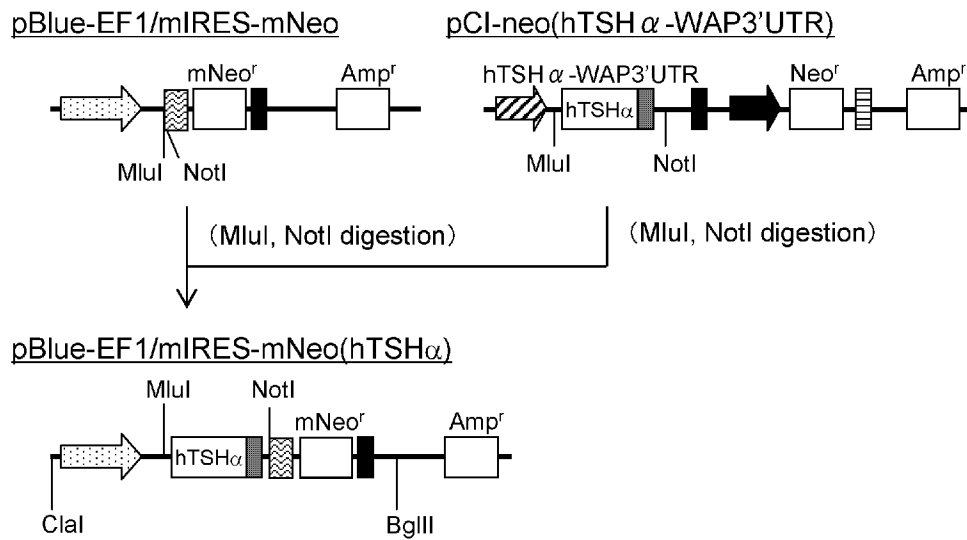




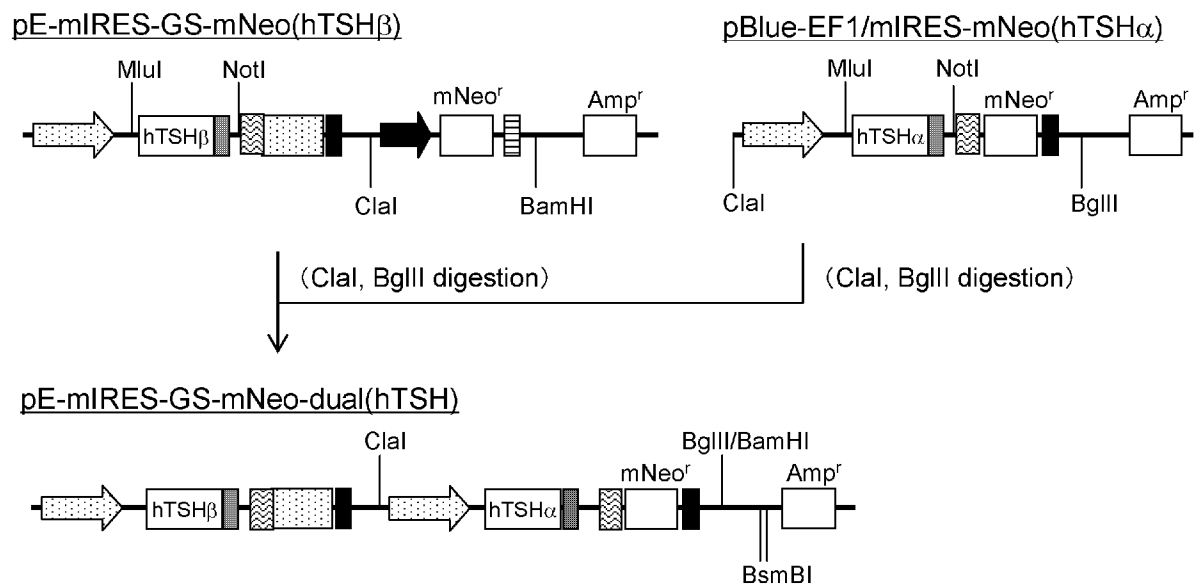
[圖11]



[圖12]

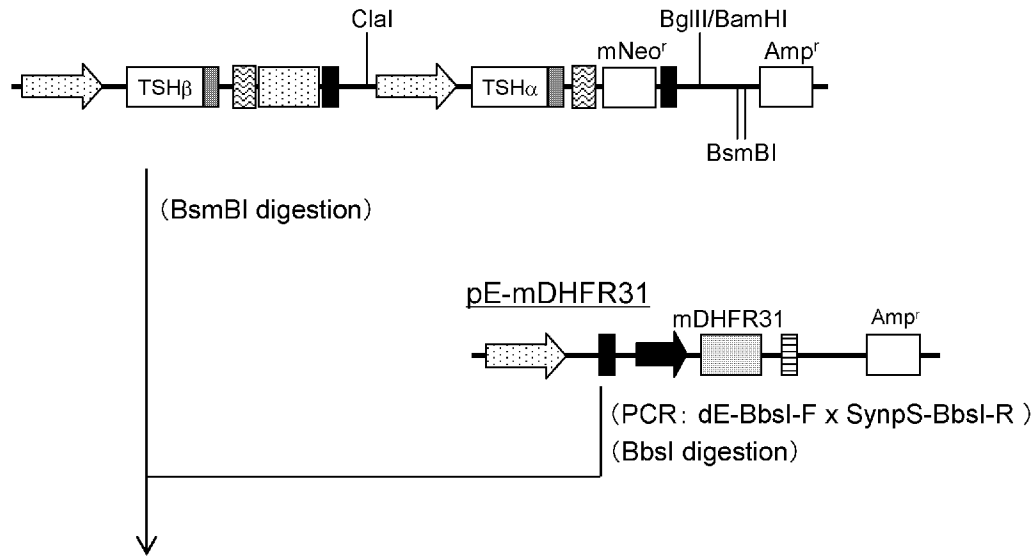


[圖13]

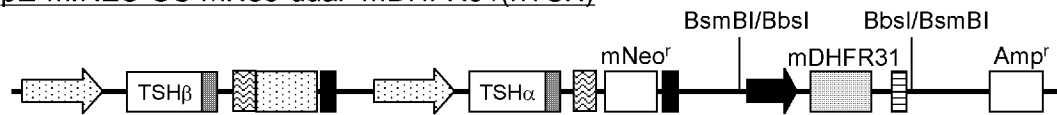


[圖14]

pE-mIRES-GS-mNeo-dual(hTSH)

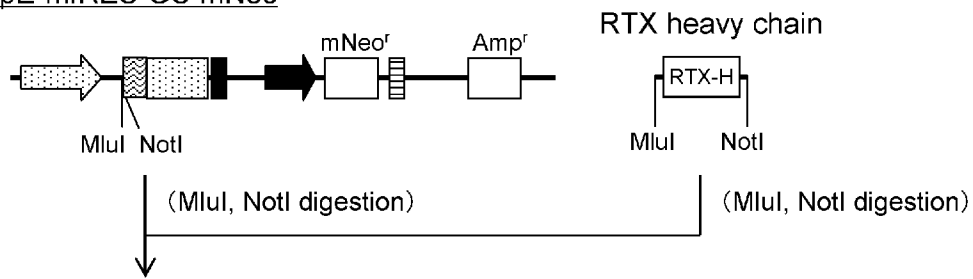


pE-mIRES-GS-mNeo-dual+mDHFR31(hTSH)

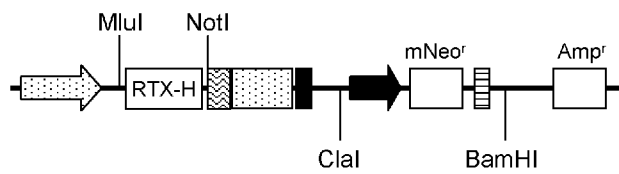


[圖15]

pE-mIRES-GS-mNeo

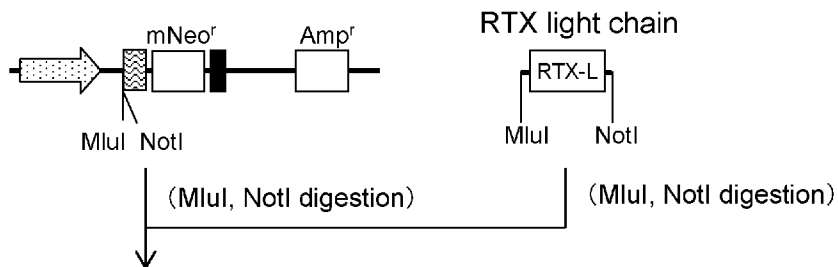


pE-mIRES-GS-mNeo(RTX-H)

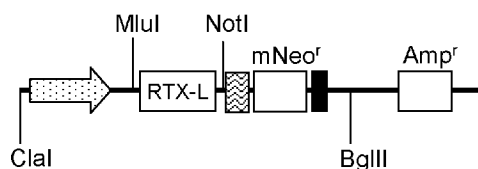


[圖16]

pBlue-EF1/mIRES-mNeo



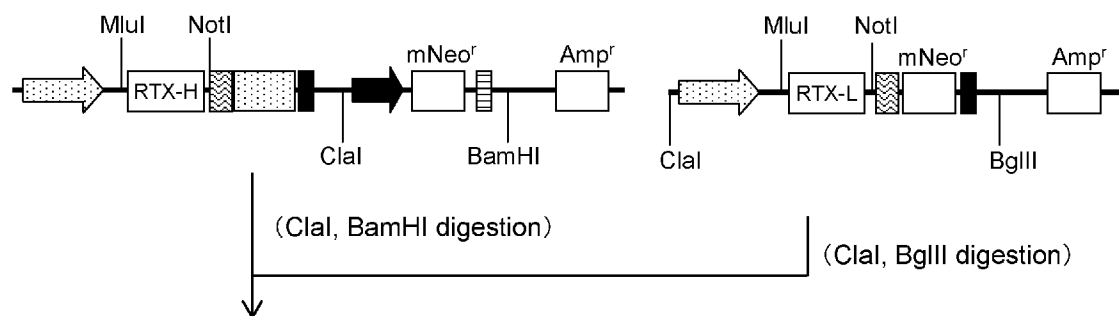
pBlue-EF1/mIRES-mNeo(RTX-L)



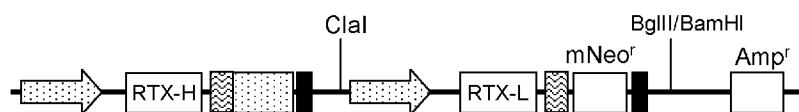
[圖17]

pE-mIRES-GS-mNeo(RTX-H)

pBlue-EF1/mIRES-mNeo(RTX-L)



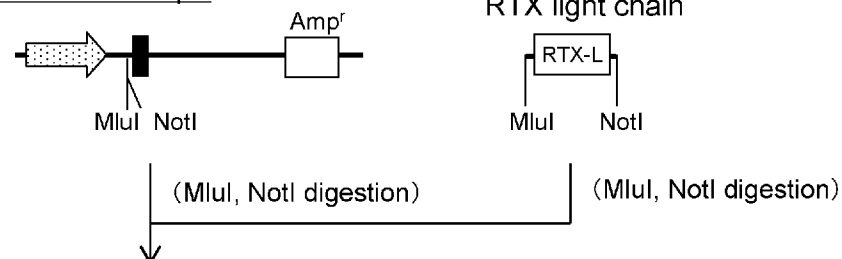
pE-mIRES-GS-mNeo-dual(RTX)



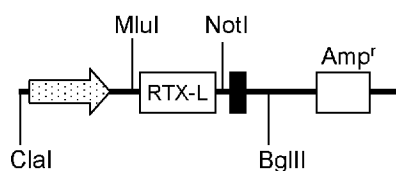
[圖18-1]

pBlue-EF1/SVpA

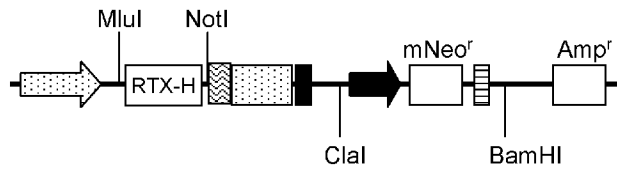
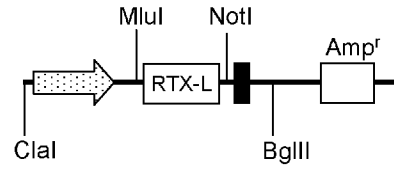
RTX light chain



pBlue-EF1/SVpA(RTX-L)

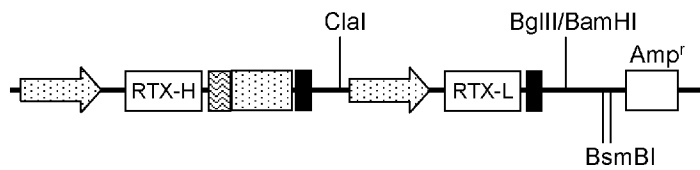


## [図18-2]

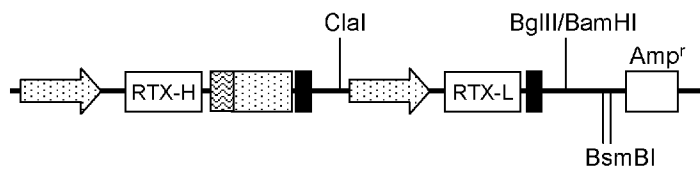
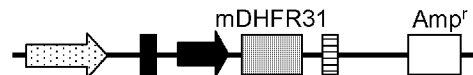
pE-mIRES-GS-mNeo(RTX-H)pBlue-EF1/SVpA(RTX-L)

(ClaI, BamHI digestion)

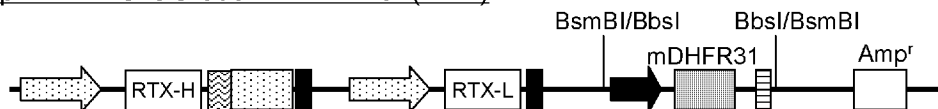
(ClaI, BglII digestion)

pE-mIRES-GS-dual(RTX)

## [図18-3]

pE-mIRES-GS-dual(RTX)pE-mDHFR31

(BsmBI digestion)

(PCR: dE-BbsI-F x SynpS-BbsI-R)  
(BbsI digestion)pE-mIRES-GS-dual+mDHFR31(RTX)

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/JP2013/062251

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
C12N15/09(2006.01) i, C12N5/10(2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
C12N15/09, C12N5/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2013
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2013	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2013

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 102409060 A (Pekin Kaan Kaso Seibutsu Gijutsu Yugen Koshi), 11 April 2012 (11.04.2012), entire text (Family: none)	1-26
Y	JP 63-502955 A (Celltech Ltd.), 02 November 1988 (02.11.1988), examples & US 5770359 A & EP 256055 A1 & WO 1987/004462 A1	1-26
Y/A	MARTIN, P. et al., Development of a new bicistronic retroviral vector with strong IRES activity., BMC Biotechnol., 2006, Vol.6 No.4, pages 1-9, Table I, Figure 3	6, 7, 9-11, 13, 15-26/1-5, 8, 12, 14

Further documents are listed in the continuation of Box C.       See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 19 July, 2013 (19.07.13)	Date of mailing of the international search report 30 July, 2013 (30.07.13)
---	--

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/062251

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y/A	WO 2005/040364 A1 (The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute), 06 May 2005 (06.05.2005), claims; paragraph [0034] & US 2009/0099338 A1 & EP 1676911 A1	14-17, 22-26/ 1-13, 18-21
Y/A	CACCIATOREA, J.J. et al., Gene amplification and vector engineering to achieve rapid and high-level therapeutic protein production using the Dhfr-based CHO cell selection system., Biotechnol. Adv., 2010, Vol.28 No.6, pages 673-681, p.674 11-p.677 14	18-26/1-17
A	WANG, Z. et al., Dual gene amplification and selection system with dihydrofolate reductase and glutamine synthetase genes effectively increase the foreign gene expression., Chinese J. Exp. Clin. Virol., 2002, Vol.16 No.1, pages 59-61, Abstract	1-26
P,A	WO 2012/063799 A1 (JCR Pharmaceuticals Co., Ltd.), 18 May 2012 (18.05.2012), entire text (Family: none)	1-26

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N15/09, C12N5/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2013年
日本国実用新案登録公報	1996-2013年
日本国登録実用新案公報	1994-2013年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTplus/JMEDplus/JST7580(JDreamIII)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	CN 102409060 A (北京華安科創生物技術有限公司) 2012.04.11, 全文 (ファミリーなし)	1-26
Y	JP 63-502955 A (セルテック・リミテッド) 1988.11.02, 実施例 & US 5770359 A & EP 256055 A1 & WO 1987/004462 A1	1-26
Y/A	MARTIN, P. et al., Development of a new bicistronic retroviral vector with strong IRES activity., BMC Biotechnol., 2006, Vol.6 No.4, pages 1-9, Table I, Figure 3	6, 7, 9-11, 13, 15-26 /1-5, 8, 12, 14

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献  
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

19.07.2013

国際調査報告の発送日

30.07.2013

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)  
郵便番号100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鶴 剛史

4B

4670

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y/A	WO 2005/040364 A1 (財団法人化学及血清療法研究所) 2005.05.06, 特許請求の範囲、段落[0034] & US 2009/0099338 A1 & EP 1676911 A1	14-17, 22-26 /1-13, 18-21
Y/A	CACCIATOREA, J.J. et al., Gene amplification and vector engineering to achieve rapid and high-level therapeutic protein production using the Dhfr-based CHO cell selection system., Biotechnol. Adv., 2010, Vol.28 No.6, pages 673-681, p.674 11- p.677 14	18-26 /1-17
A	WANG, Z. et al., Dual gene amplification and selection system with dihydrofolate reductase and glutamine synthetase genes effectively increase the foreign gene expression., Chinese J. Exp. Clin. Virol., 2002, Vol.16 No.1, pages 59-61, Abstract	1-26
P, A	WO 2012/063799 A1 (日本ケミカルリサーチ株式会社) 2012.05.18, 全文 (ファミリーなし)	1-26