

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】令和6年1月23日(2024.1.23)

【国際公開番号】WO2020/204055

【出願番号】特願2021-512163(P2021-512163)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/90(2006.01)

C 1 2 N 5/10(2006.01)

C 1 2 P 21/00(2006.01)

C 1 2 P 21/08(2006.01)

C 1 2 N 15/11(2006.01)

C 1 2 N 15/13(2006.01)

C 0 7 K 16/00(2006.01)

10

【F I】

C 1 2 N 15/90 1 0 4 Z

C 1 2 N 5/10 Z N A

C 1 2 P 21/00 C

C 1 2 P 21/08

C 1 2 N 15/11

C 1 2 N 15/13

C 0 7 K 16/00

20

【手続補正書】

【提出日】令和6年1月15日(2024.1.15)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0028

【補正方法】変更

【補正の内容】

30

【0028】

核酸／ポリヌクレオチド

「単離された」核酸／ポリヌクレオチドは、そのもともとの環境の成分から分離された核酸／ポリヌクレオチド分子のことをいう。単離された核酸／ポリヌクレオチドは、その核酸／ポリヌクレオチド分子を通常含む細胞の中に含まれた核酸／ポリヌクレオチド分子を含むが、その核酸／ポリヌクレオチドは染色体外に存在しているかまたは本来の染色体上の位置とは異なる染色体上の位置に存在している。本開示において、核酸／ポリヌクレオチドが、人工的に構築されたものや、あるいは天然に存在したものであっても、宿主細胞(endogenous)以外の環境から得たものである場合、その核酸／ポリヌクレオチドは、当該宿主細胞にとって、外来性である。したがって、たとえば、核酸／ポリヌクレオチドが、cDNAを含む場合、当該核酸／ポリヌクレオチドは、通常、宿主細胞にとっては外来性である。

40

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0029

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0029】

本開示の外来性核酸／ポリヌクレオチドが、DNAを含む場合、特に「外来性DNA」(exogenous DNA)と記載する。外来性DNAは、必要とされる遺伝情報

50

を保持している限り、DNA以外の成分を含むこともできる。たとえば、ウイルス粒子を構成するタンパク質やリポソーム等のDNA以外の成分と複合化したDNAも、外来性DNAである。本開示においては、宿主細胞はChinese Hamster (チャイニーズハムスター; *Cricetulus griseus*、和名はモンゴルキヌネズミ)である。したがって、そのゲノムに通常は含まれていない塩基配列情報を含むDNAを「外来性DNA」ということができる。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0035

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0035】

本開示において、ホットスポットとして同定されたゲノム領域は、CHO細胞のゲノムのNCBI accession number NW_003614838.1によって特定される。NW_003614838.1は、ホールゲノムショットガンシーケンス法 (whole genome shotgun sequence) によって明らかにされたCHO細胞のゲノム塩基配列で、約465.6 kbpからなっている。したがって、本開示において、外来性のDNAを導入する領域は、当該約465.6 kbp内の任意の場所であって良い。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0037

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0037】

ここで、ゲノムの塩基配列上にCCDC91遺伝子を構成する塩基配列をマッピングすると、ゲノム配列から見て逆向き相補配列 (すなわちアンチセンス配列) に位置している。そのため、CCDC91遺伝子の塩基配列中、第1イントロンは、配列番号: 2の5'末端を含む領域 (配列番号: 2中の1-6454位) から配列番号: 1の3'末端を含む領域 (配列番号: 1中の3190-5040) にかけて、マッピングされる。両者を連結した第1イントロンの塩基配列を配列番号: 3に示した。したがって、本開示の好ましい態様において、外来性のDNAの部位特異的な導入位置は、CHO細胞ゲノム上の配列番号: 3の塩基配列 (逆向き相補配列) で特定される領域から選択することができる。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0049

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0049】

本開示にしたがってゲノムのホットスポットにドナーベクターのDNAカセットを導入するとき、DNAカセットには、更に付加的に、組み換え酵素の認識配列を付加することができる。組換え酵素としてはCreリコンビナーゼやFLPリコンビナーゼが知られている。これらの組換え酵素は、それぞれの認識配列であるLoxPやFRTを認識する。したがって、DNAカセットの両端にこれらの認識配列を付加しておけば、DNAカセットによって導入された外来性核酸/ポリヌクレオチドを、組換え反応によって容易に、かつ選択的に他のDNAに置換することができる。いったんゲノムに導入された外来性DNAを、異なるDNAカセットと組み替える (置換する) ことを、交換反応という。そして、交換反応に携わる組み換え酵素が選択的に認識する塩基配列は、組み換え標的配列 (recombination targeting sequence) ということができる。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

10

20

30

40

50

【補正対象項目名】 0 0 6 4

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【 0 0 6 4 】

〔実施例 4〕 カセット交換反応による TI 宿主細胞への抗体遺伝子の導入および評価

実施例 3 にて樹立した TI 宿主細胞候補を用いて抗体遺伝子の導入および評価を行った。Nucleofector 2b を用いて mAb-A の抗体遺伝子（H 鎖および L 鎖それぞれ 1 コピー）を搭載した組換えプラスミドおよび Cre 発現プラスミドを各 TI 宿主細胞へ共導入し、カセット交換反応を実施した。カセット交換反応によって、TI 宿主細胞ゲノムに導入されていた DNA カセットは、mAb-A の抗体遺伝子を含む DNA カセットによって置換される。トランスフェクション実施 4 時間後に培地交換を行い、約 2 週間後に GFP 蛍光を有さない細胞を分画取得して、各 TI 宿主由来の抗体発現細胞を樹立した。この時、いくつかの TI 宿主細胞からはカセット交換反応後に生存細胞を得ることができなかつた。樹立した抗体発現細胞クローンを用いて 2 週間の生産培養を行い、抗体産生能を評価した。その結果、3 種類の TI 宿主由来（TI-J, L および M）の抗体発現細胞クローンが生産培養 14 日目において 1000 mg/L 以上の抗体産生量を示した（図 3）。

10

20

30

40

50