

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7108036号

(P7108036)

(45)発行日 令和4年7月27日(2022.7.27)

(24)登録日 令和4年7月19日(2022.7.19)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/10

C 1 2 Q 1/6897(2018.01)

C 1 2 Q 1/6897 Z

C 1 2 N 15/53 (2006.01)

C 1 2 N 15/53

C 1 2 Q 1/04 (2006.01)

C 1 2 Q 1/04

C 1 2 N 15/63 (2006.01)

C 1 2 N 15/63 Z

請求項の数 12 (全124頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2020-536104(P2020-536104)

(86)(22)出願日 平成31年2月1日(2019.2.1)

(65)公表番号 特表2021-511781(P2021-511781
A)

(43)公表日 令和3年5月13日(2021.5.13)

(86)国際出願番号 PCT/US2019/016403

(87)国際公開番号 WO2019/152876

(87)国際公開日 令和1年8月8日(2019.8.8)

審査請求日 令和4年1月26日(2022.1.26)

(31)優先権主張番号 62/625,773

(32)優先日 平成30年2月2日(2018.2.2)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

早期審査対象出願

(73)特許権者 391003864

ロンザ リミテッド

LONZA LIMITED

スイス国、3 9 3 0 フィスプ、ロンザ
シュトラッセ (番地なし)

(74)代理人 100107456

弁理士 池田 成人

(74)代理人 100162352

弁理士 酒巻 順一郎

(74)代理人 100123995

弁理士 野田 雅一

(72)発明者 ヤン, ロバート

スイス, 3 9 3 0 フィスプ, ロンザ
シュトラッセ(72)発明者 スメールズ, クリストファー, マーク
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 細胞選択方法及び細胞代謝改変方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

対象核酸を含む細胞を特定、選択又は培養するインビトロの方法であって、

a) (i) 前記対象核酸の配列と、

(ii) ピロリン-5-カルボン酸シンターゼ(P5CS)分子をコードする核酸配列とを含む異種の核酸を含む細胞を用意するステップと、

b) 前記核酸を含む前記細胞を、前記核酸を含む細胞の成長を可能にするために十分な条件下で、P5CS分子をコードする前記核酸を有しない前記細胞と同じである細胞の成長を支持するためには不十分なレベルのプロリンを有する培地の存在下で培養するステップであって、前記培地が前記酵素の活性の阻害剤をさらに含むステップとを含み、それによって、前記異種の核酸を含む細胞を特定、選択又は培養する方法。

【請求項2】

前記異種の核酸が、ベクターである、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記阻害剤が、プロリンのアナログである、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】

前記阻害剤が、L-アゼチジン-2-カルボン酸、3,4-デヒドロ-L-プロリン又はL-4-チアゾリジンカルボン酸である、請求項3に記載の方法。

【請求項5】

前記異種の核酸を含む細胞を選択するステップを含む、請求項1~4のいずれか一項に記

載の方法。

【請求項 6】

前記異種の核酸が、前記細胞のゲノムに統合される、請求項 1～5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

成長を示す細胞を選択するステップをさらに含む、請求項 1～6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記細胞が、哺乳動物細胞である、請求項 1～7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記細胞が、CHO 細胞である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記酵素をコードする核酸の内因性コピーが、不活性化されている、請求項 1～9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

前記対象核酸が、異種のポリペプチド分子をコードする、請求項 1～10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

前記細胞又は培地から生成物を回収するステップを含む、請求項 1～11 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は、対象核酸配列を含む細胞を特定、選択又は培養するための方法及び組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

成長に必要な必須化合物について栄養要求性である真核細胞は、生成物の発現を、必須化合物の合成を可能にする異所性酵素の発現とカップリングさせることによって、異種の生成物の発現のために利用することができる。例えば、チミジン栄養要求性である変異マウス細胞は、外的に供給されたチミジンの非存在下では成長することができない (Ayusawa ら (1981) Somatic Cell Genet. 7 (5) : 523～534)。チミジル酸シンターゼ活性が回復した復帰変異体は、チミジン枯渇条件下で成長することができた。

【0003】

哺乳動物細胞発現系は、治療用生物製剤等の組換え生物由来生成物の産生のために通常使用される。しかしながら、そのような生成物のラージスケール産生は、大量の所望の生成物を効率的に発現する安定な細胞株を効率的に生成することの困難のために、高い初期コストを伴う。したがって、組換え生物由来生成物を産生するために使用され得る細胞の産生のための方法及び組成物の改善について、当該技術分野において要求が存在している。

【0004】

〔発明の概要〕

目的の対象核酸配列 (例えば、1 つ又は複数の目的の対象核酸配列) を含む細胞を特定、選択又は培養するための組成物及び方法が、本明細書で説明される。一般的に、対象核酸とアミノ酸の生合成に関与する酵素分子をコードする配列とを含む核酸を、細胞に導入する。その後、導入された核酸を含む細胞が成長できるように、細胞を、アミノ酸を欠く培地で成長させる。一部の場合、細胞は、選択の厳密性を増大させるために酵素分子の阻害剤をさらに含む。アミノ酸以外の化合物 (例えば、微量金属、小分子、核酸又は当該技術分野で公知の他の代謝産物) についての栄養要求性は、本明細書で説明される選択方法において使用することができることが企図される。

10

20

30

40

50

【0005】

一態様では、本発明は、対象核酸配列を含む細胞を特定、選択又は培養する方法であって、
a) (i) 対象核酸配列と、

(ii) 発現した場合、アミノ酸の合成経路、例えばプロリン合成経路の酵素の高レベルの活性をもたらす核酸配列、例えば活性を含む酵素分子をコードする核酸配列とを含む核酸、例えばベクター、例えば複製可能ベクター又は統合ベクターを含む細胞を用意するステップと、

b) 核酸配列を含む細胞を、核酸配列を含む細胞の成長を可能にするために十分な条件下で、高活性を有しない細胞と同じである細胞の成長を支持するためには不十分なレベルのアミノ酸、例えばプロリンを有する培地の存在下で培養するステップと
を含み、それによって、異種の核酸配列を含む細胞を特定、選択又は培養する方法を特徴とする。

10

一態様では、本発明は、対象核酸配列を含む細胞を特定、選択又は培養する方法であって、
a) (i) 対象核酸配列と、

(ii) 発現した場合、アミノ酸の合成経路、例えばプロリン合成経路の酵素の高レベルの活性をもたらす核酸配列、例えば活性を含む酵素分子をコードする核酸配列と

を含む核酸、例えばベクター、例えば複製可能ベクターを含む細胞を用意するステップと、

b) 核酸配列を含む細胞を、核酸配列を含む細胞の成長を可能にするために十分な条件下で、高活性を有しない対象細胞と同じである細胞の成長を支持するためには不十分なレベルのアミノ酸、例えばプロリンを有する培地（及び酵素の阻害剤を任意選択で含む培地）
の存在下で培養するステップと、

20

c) 核酸配列を含む細胞を、核酸配列を含む細胞の成長を可能にするために十分な条件下で、高活性を有しない対象細胞と同じである細胞の成長を支持するためには不十分なレベルの第2のアミノ酸、例えばチロシンを有する第2の培地（及び第2の酵素の阻害剤を任意選択で含む培地）の存在下で培養するステップと
を含み、それによって、異種の核酸配列を含む細胞を特定、選択又は培養する方法を特徴とする。

【0006】

一態様では、本発明は、SV40プロモーター配列、mCMVプロモーター配列又はPGKプロモーター配列のうちのいずれかからの制御領域を含む配列、例えばプロモーター配列に作動可能に連結された異種の脂質代謝変更因子（LMM: lipid metabolism modifier）をコードする配列を含む細胞を特徴とする。

30

【図面の簡単な説明】

【0007】

【図1】図1は、哺乳動物プロリン合成経路の律速段階を示す概略図である。疑問符は、グルタミン酸塩のグルタミン酸5-セミアルデヒドへの変換を阻害するために使用され得る可能性のある阻害剤を指す。

【図2】図2は、P5CS及びeGFP遺伝子を保有する例示的なベクターのプラスミドマップを示す図である。

【図3A】図3A～3Bは、様々な培地（完全培地（6mMグルタミン）、グルタミン欠損培地（グルタミンなし）及びプロリン欠損培地（プロリンなし））で培養されたGSKO細胞の成長プロファイルを示す一連のグラフである。図3Aは、生細胞濃度を示し、図3Bは、培養物生存率を示す。

40

【図3B】図3A～3Bは、様々な培地（完全培地（6mMグルタミン）、グルタミン欠損培地（グルタミンなし）及びプロリン欠損培地（プロリンなし））で培養されたGSKO細胞の成長プロファイルを示す一連のグラフである。図3Aは、生細胞濃度を示し、図3Bは、培養物生存率を示す。

【図4A】図4A～4Cは、エタネルセプト遺伝子（図4A）、グルタミンシンターゼ（GS: glutamine synthetase）及びeGFP遺伝子（図4B）又はP5CS及びeGFP遺伝子（図4C）を含む例示的なベクターのプラスミドマップを

50

示す一連のグラフである。

【図 4 B】図 4 A～4 C は、エタネルセプト遺伝子（図 4 A）、グルタミンシンテターゼ（GS: glutamine synthetase）及び eGFP 遺伝子（図 4 B）又は P5CS 及び eGFP 遺伝子（図 4 C）を含む例示的なベクターのプラスミドマップを示す一連のグラフである。

【図 4 C】図 4 A～4 C は、エタネルセプト遺伝子（図 4 A）、グルタミンシンテターゼ（GS: glutamine synthetase）及び eGFP 遺伝子（図 4 B）又は P5CS 及び eGFP 遺伝子（図 4 C）を含む例示的なベクターのプラスミドマップを示す一連のグラフである。

【図 5 A】図 5 A～5 D は、図 4 で示される例示的なベクターのうちの 1 つを一過的にトランスフェクトし、その後、CD-CHO（6 mM L-グルタミンを含有するように補完されている）、チロシン非含有（チロシンなし）又はプロリン非含有（プロリンなし）培地で培養した細胞培養物の効果を示す一連のグラフである。トランスフェクション後 72 時間及び 168 時間における、生細胞濃度（図 5 A）、培養物生存率（図 5 B）、eGFP 蛍光シグナル平均値（図 5 C）及び所定の eGFP 蛍光強度閾値を超える細胞の百分率（図 5 D）が示される。エラーバーは、平均値の標準偏差（n=3）を表す。

【図 5 B】図 5 A～5 D は、図 4 で示される例示的なベクターのうちの 1 つを一過的にトランスフェクトし、その後、CD-CHO（6 mM L-グルタミンを含有するように補完されている）、チロシン非含有（チロシンなし）又はプロリン非含有（プロリンなし）培地で培養した細胞培養物の効果を示す一連のグラフである。トランスフェクション後 72 時間及び 168 時間における、生細胞濃度（図 5 A）、培養物生存率（図 5 B）、eGFP 蛍光シグナル平均値（図 5 C）及び所定の eGFP 蛍光強度閾値を超える細胞の百分率（図 5 D）が示される。エラーバーは、平均値の標準偏差（n=3）を表す。

【図 5 C】図 5 A～5 D は、図 4 で示される例示的なベクターのうちの 1 つを一過的にトランスフェクトし、その後、CD-CHO（6 mM L-グルタミンを含有するように補完されている）、チロシン非含有（チロシンなし）又はプロリン非含有（プロリンなし）培地で培養した細胞培養物の効果を示す一連のグラフである。トランスフェクション後 72 時間及び 168 時間における、生細胞濃度（図 5 A）、培養物生存率（図 5 B）、eGFP 蛍光シグナル平均値（図 5 C）及び所定の eGFP 蛍光強度閾値を超える細胞の百分率（図 5 D）が示される。エラーバーは、平均値の標準偏差（n=3）を表す。

【図 5 D】図 5 A～5 D は、図 4 で示される例示的なベクターのうちの 1 つを一過的にトランスフェクトし、その後、CD-CHO（6 mM L-グルタミンを含有するように補完されている）、チロシン非含有（チロシンなし）又はプロリン非含有（プロリンなし）培地で培養した細胞培養物の効果を示す一連のグラフである。トランスフェクション後 72 時間及び 168 時間における、生細胞濃度（図 5 A）、培養物生存率（図 5 B）、eGFP 蛍光シグナル平均値（図 5 C）及び所定の eGFP 蛍光強度閾値を超える細胞の百分率（図 5 D）が示される。エラーバーは、平均値の標準偏差（n=3）を表す。

【図 6 A】図 6 A～6 C は、P5CS 過剰発現を使用して生成し、プロリンの非存在下で培養した細胞プールの分析を示す一連の図である。図 6 A は、フローサイトメトリー分析を使用して得られたヒストグラムを示す。図 6 B 及び 6 C 各々は、共焦点顕微鏡により生成した蛍光画像を示し；示されるチャンネルは、DAPI、P5CS:TRITC 及び eGFP である。図 6 C は、P5CS 生成プールと GSKO 宿主との間の比較を示す。

【図 6 B】図 6 A～6 C は、P5CS 過剰発現を使用して生成し、プロリンの非存在下で培養した細胞プールの分析を示す一連の図である。図 6 A は、フローサイトメトリー分析を使用して得られたヒストグラムを示す。図 6 B 及び 6 C 各々は、共焦点顕微鏡により生成した蛍光画像を示し；示されるチャンネルは、DAPI、P5CS:TRITC 及び eGFP である。図 6 C は、P5CS 生成プールと GSKO 宿主との間の比較を示す。

【図 6 C】図 6 A～6 C は、P5CS 過剰発現を使用して生成し、プロリンの非存在下で培養した細胞プールの分析を示す一連の図である。図 6 A は、フローサイトメトリー分析を使用して得られたヒストグラムを示す。図 6 B 及び 6 C 各々は、共焦点顕微鏡により生

10

20

30

40

50

成した蛍光画像を示し；示されるチャンネルは、DAPI、P5CS:TRITC及びeGFPである。図6Cは、P5CS生成プールとGSKO宿主との間の比較を示す。

【図7】図7は、P5CS過剰発現を使用して生成し、プロリンの非存在下で培養した細胞プールの分析を示す一連のウェスタンブロット画像である。また、細胞プール構築に使用されるベクターは、eGFP遺伝子(eGFP)、発現がSV40プロモーターによって駆動されるSCD1遺伝子(SV40 SCD1)、又は発現がmCMVプロモーターによって駆動されるSCD1遺伝子(mCMV SCD1)のいずれかを含有した。ウェスタンブロット分析を行って、P5CS、TAT及びSCD1(目的の遺伝子)の発現を特定した。

【図8A】図8A～8Fは、P5CS過剰発現を使用して生成し、プロリンの非存在下、
且つP5CS阻害剤であるL-アゼチジン-2-カルボン酸の存在下で培養した細胞プ
ールを示す一連の図である。L-アゼチジン-2-カルボン酸を様々な異なる濃度で添加し
、細胞を96ウェル深型プレートで9日間培養した。これらの細胞を、生細胞濃度(図8
A)及び培養物生存率(図8B)によって測定して、細胞成長について分析した。また、
細胞を、培養物蛍光平均値(図8C)、及び 10^2 (図8D)及び 10^3 (図8E)の所
定の閾値を超える細胞の百分率について分析した。図8Fは、指定された時点で回収し、
且つP5CS、 β -アクチン及びeGFPタンパク質を強調するためにプローブした可溶
化液のウェスタンブロット分析を示す。

【図8B】図8A～8Fは、P5CS過剰発現を使用して生成し、プロリンの非存在下、
且つP5CS阻害剤であるL-アゼチジン-2-カルボン酸の存在下で培養した細胞プ
ールを示す一連の図である。L-アゼチジン-2-カルボン酸を様々な異なる濃度で添加し
、細胞を96ウェル深型プレートで9日間培養した。これらの細胞を、生細胞濃度(図8
A)及び培養物生存率(図8B)によって測定して、細胞成長について分析した。また、
細胞を、培養物蛍光平均値(図8C)、及び 10^2 (図8D)及び 10^3 (図8E)の所
定の閾値を超える細胞の百分率について分析した。図8Fは、指定された時点で回収し、
且つP5CS、 β -アクチン及びeGFPタンパク質を強調するためにプローブした可溶
化液のウェスタンブロット分析を示す。

【図8C】図8A～8Fは、P5CS過剰発現を使用して生成し、プロリンの非存在下、
且つP5CS阻害剤であるL-アゼチジン-2-カルボン酸の存在下で培養した細胞プ
ールを示す一連の図である。L-アゼチジン-2-カルボン酸を様々な異なる濃度で添加し
、細胞を96ウェル深型プレートで9日間培養した。これらの細胞を、生細胞濃度(図8
A)及び培養物生存率(図8B)によって測定して、細胞成長について分析した。また、
細胞を、培養物蛍光平均値(図8C)、及び 10^2 (図8D)及び 10^3 (図8E)の所
定の閾値を超える細胞の百分率について分析した。図8Fは、指定された時点で回収し、
且つP5CS、 β -アクチン及びeGFPタンパク質を強調するためにプローブした可溶
化液のウェスタンブロット分析を示す。

【図8D】図8A～8Fは、P5CS過剰発現を使用して生成し、プロリンの非存在下、
且つP5CS阻害剤であるL-アゼチジン-2-カルボン酸の存在下で培養した細胞プ
ールを示す一連の図である。L-アゼチジン-2-カルボン酸を様々な異なる濃度で添加し
、細胞を96ウェル深型プレートで9日間培養した。これらの細胞を、生細胞濃度(図8
A)及び培養物生存率(図8B)によって測定して、細胞成長について分析した。また、
細胞を、培養物蛍光平均値(図8C)、及び 10^2 (図8D)及び 10^3 (図8E)の所
定の閾値を超える細胞の百分率について分析した。図8Fは、指定された時点で回収し、
且つP5CS、 β -アクチン及びeGFPタンパク質を強調するためにプローブした可溶
化液のウェスタンブロット分析を示す。

【図8E】図8A～8Fは、P5CS過剰発現を使用して生成し、プロリンの非存在下、
且つP5CS阻害剤であるL-アゼチジン-2-カルボン酸の存在下で培養した細胞プ
ールを示す一連の図である。L-アゼチジン-2-カルボン酸を様々な異なる濃度で添加し
、細胞を96ウェル深型プレートで9日間培養した。これらの細胞を、生細胞濃度(図8
A)及び培養物生存率(図8B)によって測定して、細胞成長について分析した。また、

10

20

30

40

50

細胞を、培養物蛍光平均値（図 8 C）、及び 10²（図 8 D）及び 10³（図 8 E）の所定の閾値を超える細胞の百分率について分析した。図 8 F は、指定された時点で回収し、且つ P 5 C S、β-アクトチン及び e G F P タンパク質を強調するためにプローブした可溶化液のウェスタンブロット分析を示す。

【図 8 F】図 8 A～8 F は、P 5 C S 過剰発現を使用して生成し、プロリンの非存在下、且つ P 5 C S 阻害剤である L-アゼチジン-2-カルボン酸の存在下で培養した細胞プールを示す一連の図である。L-アゼチジン-2-カルボン酸を様々な異なる濃度で添加し、細胞を 96 ウェル深型プレートで 9 日間培養した。これらの細胞を、生細胞濃度（図 8 A）及び培養物生存率（図 8 B）によって測定して、細胞成長について分析した。また、細胞を、培養物蛍光平均値（図 8 C）、及び 10²（図 8 D）及び 10³（図 8 E）の所定の閾値を超える細胞の百分率について分析した。図 8 F は、指定された時点で回収し、且つ P 5 C S、β-アクトチン及び e G F P タンパク質を強調するためにプローブした可溶化液のウェスタンブロット分析を示す。

10

【図 9 A】図 9 A～9 F は、P 5 C S 過剰発現を使用して生成し、プロリンの非存在下、且つ P 5 C S 阻害剤である 3, 4-デヒドロ-L-プロリンの存在下で培養した細胞プールを示す一連の図である。3, 4-デヒドロ-L-プロリンを様々な異なる濃度で添加し、細胞を 96 ウェル深型プレートで 9 日間培養した。これらの細胞を、生細胞濃度（図 9 A）及び培養物生存率（図 9 B）によって測定して、細胞成長について分析した。また、細胞を、培養物蛍光平均値（図 9 C）、及び 10²（図 9 D）及び 10³（図 9 E）の所定の閾値を超える細胞の百分率について分析した。図 9 F は、指定された時点で回収し、且つ P 5 C S、β-アクトチン及び e G F P タンパク質を強調するためにプローブした可溶化液のウェスタンブロット分析を示す。

20

【図 9 B】図 9 A～9 F は、P 5 C S 過剰発現を使用して生成し、プロリンの非存在下、且つ P 5 C S 阻害剤である 3, 4-デヒドロ-L-プロリンの存在下で培養した細胞プールを示す一連の図である。3, 4-デヒドロ-L-プロリンを様々な異なる濃度で添加し、細胞を 96 ウェル深型プレートで 9 日間培養した。これらの細胞を、生細胞濃度（図 9 A）及び培養物生存率（図 9 B）によって測定して、細胞成長について分析した。また、細胞を、培養物蛍光平均値（図 9 C）、及び 10²（図 9 D）及び 10³（図 9 E）の所定の閾値を超える細胞の百分率について分析した。図 9 F は、指定された時点で回収し、且つ P 5 C S、β-アクトチン及び e G F P タンパク質を強調するためにプローブした可溶化液のウェスタンブロット分析を示す。

30

【図 9 C】図 9 A～9 F は、P 5 C S 過剰発現を使用して生成し、プロリンの非存在下、且つ P 5 C S 阻害剤である 3, 4-デヒドロ-L-プロリンの存在下で培養した細胞プールを示す一連の図である。3, 4-デヒドロ-L-プロリンを様々な異なる濃度で添加し、細胞を 96 ウェル深型プレートで 9 日間培養した。これらの細胞を、生細胞濃度（図 9 A）及び培養物生存率（図 9 B）によって測定して、細胞成長について分析した。また、細胞を、培養物蛍光平均値（図 9 C）、及び 10²（図 9 D）及び 10³（図 9 E）の所定の閾値を超える細胞の百分率について分析した。図 9 F は、指定された時点で回収し、且つ P 5 C S、β-アクトチン及び e G F P タンパク質を強調するためにプローブした可溶化液のウェスタンブロット分析を示す。

40

【図 9 D】図 9 A～9 F は、P 5 C S 過剰発現を使用して生成し、プロリンの非存在下、且つ P 5 C S 阻害剤である 3, 4-デヒドロ-L-プロリンの存在下で培養した細胞プールを示す一連の図である。3, 4-デヒドロ-L-プロリンを様々な異なる濃度で添加し、細胞を 96 ウェル深型プレートで 9 日間培養した。これらの細胞を、生細胞濃度（図 9 A）及び培養物生存率（図 9 B）によって測定して、細胞成長について分析した。また、細胞を、培養物蛍光平均値（図 9 C）、及び 10²（図 9 D）及び 10³（図 9 E）の所定の閾値を超える細胞の百分率について分析した。図 9 F は、指定された時点で回収し、且つ P 5 C S、β-アクトチン及び e G F P タンパク質を強調するためにプローブした可溶化液のウェスタンブロット分析を示す。

【図 9 E】図 9 A～9 F は、P 5 C S 過剰発現を使用して生成し、プロリンの非存在下、

50

且つP5CS阻害剤である3,4-デヒドロ-L-プロリンの存在下で培養した細胞プールを示す一連の図である。3,4-デヒドロ-L-プロリンを様々な異なる濃度で添加し、細胞を96ウェル深型プレートで9日間培養した。これらの細胞を、生細胞濃度(図9A)及び培養物生存率(図9B)によって測定して、細胞成長について分析した。また、細胞を、培養物蛍光平均値(図9C)、及び10²(図9D)及び10³(図9E)の所定の閾値を超える細胞の百分率について分析した。図9Fは、指定された時点で回収し、且つP5CS、β-アクチン及びeGFPタンパク質を強調するためにプローブした可溶化液のウェスタンブロット分析を示す。

【図9F】図9A～9Fは、P5CS過剰発現を使用して生成し、プロリンの非存在下、且つP5CS阻害剤である3,4-デヒドロ-L-プロリンの存在下で培養した細胞プールを示す一連の図である。3,4-デヒドロ-L-プロリンを様々な異なる濃度で添加し、細胞を96ウェル深型プレートで9日間培養した。これらの細胞を、生細胞濃度(図9A)及び培養物生存率(図9B)によって測定して、細胞成長について分析した。また、細胞を、培養物蛍光平均値(図9C)、及び10²(図9D)及び10³(図9E)の所定の閾値を超える細胞の百分率について分析した。図9Fは、指定された時点で回収し、且つP5CS、β-アクチン及びeGFPタンパク質を強調するためにプローブした可溶化液のウェスタンブロット分析を示す。

【図10A】図10A～10Fは、P5CS過剰発現を使用して生成し、プロリンの非存在下、且つP5CS阻害剤であるL-4-チアゾリジンカルボン酸の存在下で培養した細胞プールを示す一連の図である。L-4-チアゾリジンカルボン酸を様々な異なる濃度で添加し、細胞を96ウェル深型プレートで9日間培養した。これらの細胞を、生細胞濃度(図10A)及び培養物生存率(図10B)によって測定して、細胞成長について分析した。また、細胞を、培養物蛍光平均値(図10C)、及び10²(図10D)及び10³(図10E)の所定の閾値を超える細胞の百分率について分析した。図10Fは、指定された時点で回収し、且つP5CS、β-アクチン及びeGFPタンパク質を強調するためにプローブした可溶化液のウェスタンブロット分析を示す。

【図10B】図10A～10Fは、P5CS過剰発現を使用して生成し、プロリンの非存在下、且つP5CS阻害剤であるL-4-チアゾリジンカルボン酸の存在下で培養した細胞プールを示す一連の図である。L-4-チアゾリジンカルボン酸を様々な異なる濃度で添加し、細胞を96ウェル深型プレートで9日間培養した。これらの細胞を、生細胞濃度(図10A)及び培養物生存率(図10B)によって測定して、細胞成長について分析した。また、細胞を、培養物蛍光平均値(図10C)、及び10²(図10D)及び10³(図10E)の所定の閾値を超える細胞の百分率について分析した。図10Fは、指定された時点で回収し、且つP5CS、β-アクチン及びeGFPタンパク質を強調するためにプローブした可溶化液のウェスタンブロット分析を示す。

【図10C】図10A～10Fは、P5CS過剰発現を使用して生成し、プロリンの非存在下、且つP5CS阻害剤であるL-4-チアゾリジンカルボン酸の存在下で培養した細胞プールを示す一連の図である。L-4-チアゾリジンカルボン酸を様々な異なる濃度で添加し、細胞を96ウェル深型プレートで9日間培養した。これらの細胞を、生細胞濃度(図10A)及び培養物生存率(図10B)によって測定して、細胞成長について分析した。また、細胞を、培養物蛍光平均値(図10C)、及び10²(図10D)及び10³(図10E)の所定の閾値を超える細胞の百分率について分析した。図10Fは、指定された時点で回収し、且つP5CS、β-アクチン及びeGFPタンパク質を強調するためにプローブした可溶化液のウェスタンブロット分析を示す。

【図10D】図10A～10Fは、P5CS過剰発現を使用して生成し、プロリンの非存在下、且つP5CS阻害剤であるL-4-チアゾリジンカルボン酸の存在下で培養した細胞プールを示す一連の図である。L-4-チアゾリジンカルボン酸を様々な異なる濃度で添加し、細胞を96ウェル深型プレートで9日間培養した。これらの細胞を、生細胞濃度(図10A)及び培養物生存率(図10B)によって測定して、細胞成長について分析した。また、細胞を、培養物蛍光平均値(図10C)、及び10²(図10D)及び10³

(図10E)の所定の閾値を超える細胞の百分率について分析した。図10Fは、指定された時点で回収し、且つP5CS、 β -アクチン及びeGFPタンパク質を強調するためにプローブした可溶化液のウェスタンブロット分析を示す。

【図10E】図10A～10Fは、P5CS過剰発現を使用して生成し、プロリンの非存在下、且つP5CS阻害剤であるL-4-チアゾリジンカルボン酸の存在下で培養した細胞プールを示す一連の図である。L-4-チアゾリジンカルボン酸を様々な異なる濃度で添加し、細胞を96ウェル深型プレートで9日間培養した。これらの細胞を、生細胞濃度(図10A)及び培養物生存率(図10B)によって測定して、細胞成長について分析した。また、細胞を、培養物蛍光平均値(図10C)、及び10²(図10D)及び10³(図10E)の所定の閾値を超える細胞の百分率について分析した。図10Fは、指定された時点で回収し、且つP5CS、 β -アクチン及びeGFPタンパク質を強調するためにプローブした可溶化液のウェスタンブロット分析を示す。

10

【図10F】図10A～10Fは、P5CS過剰発現を使用して生成し、プロリンの非存在下、且つP5CS阻害剤であるL-4-チアゾリジンカルボン酸の存在下で培養した細胞プールを示す一連の図である。L-4-チアゾリジンカルボン酸を様々な異なる濃度で添加し、細胞を96ウェル深型プレートで9日間培養した。これらの細胞を、生細胞濃度(図10A)及び培養物生存率(図10B)によって測定して、細胞成長について分析した。また、細胞を、培養物蛍光平均値(図10C)、及び10²(図10D)及び10³(図10E)の所定の閾値を超える細胞の百分率について分析した。図10Fは、指定された時点で回収し、且つP5CS、 β -アクチン及びeGFPタンパク質を強調するためにプローブした可溶化液のウェスタンブロット分析を示す。

20

【図11A】図11A～11Eは、P5CS過剰発現を使用して生成し、プロリンの非存在下、且つP5CS阻害剤であるL-アゼチジン-2-カルボン酸の存在下で培養した細胞プールの分析を示す一連の図である。L-アゼチジン-2-カルボン酸を様々な異なる濃度で添加し、細胞を静置用24ウェルプレートで9日間培養した。これらの細胞を、生細胞濃度(図11A)及び培養物生存率(図11B)によって測定して、細胞成長について分析した。また、細胞を、培養物蛍光平均値(図11C)、及び10²(図11D)及び10³(図11E)の所定の閾値を超える細胞の百分率について分析した。

【図11B】図11A～11Eは、P5CS過剰発現を使用して生成し、プロリンの非存在下、且つP5CS阻害剤であるL-アゼチジン-2-カルボン酸の存在下で培養した細胞プールの分析を示す一連の図である。L-アゼチジン-2-カルボン酸を様々な異なる濃度で添加し、細胞を静置用24ウェルプレートで9日間培養した。これらの細胞を、生細胞濃度(図11A)及び培養物生存率(図11B)によって測定して、細胞成長について分析した。また、細胞を、培養物蛍光平均値(図11C)、及び10²(図11D)及び10³(図11E)の所定の閾値を超える細胞の百分率について分析した。

30

【図11C】図11A～11Eは、P5CS過剰発現を使用して生成し、プロリンの非存在下、且つP5CS阻害剤であるL-アゼチジン-2-カルボン酸の存在下で培養した細胞プールの分析を示す一連の図である。L-アゼチジン-2-カルボン酸を様々な異なる濃度で添加し、細胞を静置用24ウェルプレートで9日間培養した。これらの細胞を、生細胞濃度(図11A)及び培養物生存率(図11B)によって測定して、細胞成長について分析した。また、細胞を、培養物蛍光平均値(図11C)、及び10²(図11D)及び10³(図11E)の所定の閾値を超える細胞の百分率について分析した。

40

【図11D】図11A～11Eは、P5CS過剰発現を使用して生成し、プロリンの非存在下、且つP5CS阻害剤であるL-アゼチジン-2-カルボン酸の存在下で培養した細胞プールの分析を示す一連の図である。L-アゼチジン-2-カルボン酸を様々な異なる濃度で添加し、細胞を静置用24ウェルプレートで9日間培養した。これらの細胞を、生細胞濃度(図11A)及び培養物生存率(図11B)によって測定して、細胞成長について分析した。また、細胞を、培養物蛍光平均値(図11C)、及び10²(図11D)及び10³(図11E)の所定の閾値を超える細胞の百分率について分析した。

【図11E】図11A～11Eは、P5CS過剰発現を使用して生成し、プロリンの非存

50

在下、且つP5CS阻害剤であるL-アゼチジン-2-カルボン酸の存在下で培養した細胞プールの分析を示す一連の図である。L-アゼチジン-2-カルボン酸を様々な異なる濃度で添加し、細胞を静置用24ウェルプレートで9日間培養した。これらの細胞を、生細胞濃度(図11A)及び培養物生存率(図11B)によって測定して、細胞成長について分析した。また、細胞を、培養物蛍光平均値(図11C)、及び 10^2 (図11D)及び 10^3 (図11E)の所定の閾値を超える細胞の百分率について分析した。

【図12A】図12A~12Eは、P5CS過剰発現を使用して生成し、プロリンの非存在下、且つP5CS阻害剤である3,4-デヒドロ-L-プロリンの存在下で培養した細胞プールの分析を示す一連の図である。3,4-デヒドロ-L-プロリンを様々な異なる濃度で添加し、細胞を静置用24ウェルプレートで9日間培養した。これらの細胞を、生細胞濃度(図12A)及び培養物生存率(図12B)によって測定して、細胞成長について分析した。また、細胞を、培養物蛍光平均値(図12C)、及び 10^2 (図12D)及び 10^3 (図12E)の所定の閾値を超える細胞の百分率について分析した。

10

【図12B】図12A~12Eは、P5CS過剰発現を使用して生成し、プロリンの非存在下、且つP5CS阻害剤である3,4-デヒドロ-L-プロリンの存在下で培養した細胞プールの分析を示す一連の図である。3,4-デヒドロ-L-プロリンを様々な異なる濃度で添加し、細胞を静置用24ウェルプレートで9日間培養した。これらの細胞を、生細胞濃度(図12A)及び培養物生存率(図12B)によって測定して、細胞成長について分析した。また、細胞を、培養物蛍光平均値(図12C)、及び 10^2 (図12D)及び 10^3 (図12E)の所定の閾値を超える細胞の百分率について分析した。

20

【図12C】図12A~12Eは、P5CS過剰発現を使用して生成し、プロリンの非存在下、且つP5CS阻害剤である3,4-デヒドロ-L-プロリンの存在下で培養した細胞プールの分析を示す一連の図である。3,4-デヒドロ-L-プロリンを様々な異なる濃度で添加し、細胞を静置用24ウェルプレートで9日間培養した。これらの細胞を、生細胞濃度(図12A)及び培養物生存率(図12B)によって測定して、細胞成長について分析した。また、細胞を、培養物蛍光平均値(図12C)、及び 10^2 (図12D)及び 10^3 (図12E)の所定の閾値を超える細胞の百分率について分析した。

【図12D】図12A~12Eは、P5CS過剰発現を使用して生成し、プロリンの非存在下、且つP5CS阻害剤である3,4-デヒドロ-L-プロリンの存在下で培養した細胞プールの分析を示す一連の図である。3,4-デヒドロ-L-プロリンを様々な異なる濃度で添加し、細胞を静置用24ウェルプレートで9日間培養した。これらの細胞を、生細胞濃度(図12A)及び培養物生存率(図12B)によって測定して、細胞成長について分析した。また、細胞を、培養物蛍光平均値(図12C)、及び 10^2 (図12D)及び 10^3 (図12E)の所定の閾値を超える細胞の百分率について分析した。

30

【図12E】図12A~12Eは、P5CS過剰発現を使用して生成し、プロリンの非存在下、且つP5CS阻害剤である3,4-デヒドロ-L-プロリンの存在下で培養した細胞プールの分析を示す一連の図である。3,4-デヒドロ-L-プロリンを様々な異なる濃度で添加し、細胞を静置用24ウェルプレートで9日間培養した。これらの細胞を、生細胞濃度(図12A)及び培養物生存率(図12B)によって測定して、細胞成長について分析した。また、細胞を、培養物蛍光平均値(図12C)、及び 10^2 (図12D)及び 10^3 (図12E)の所定の閾値を超える細胞の百分率について分析した。

40

【図13】図13は、示されるプロモーター(SV40、mCMV又はPGKプロモーター)の制御下の示される脂質代謝変更因子(LMM)遺伝子(SCD1、SREBF1又はSREB411)を有する例示的なベクター、及び示される目的の組換えタンパク質(エタネルセプト、セルグツズマブ(Cergutzumab)、インフリキシマブ又はcB72.3)をコードする遺伝子を有する第2の例示的なベクターをコトランスフェクトした培養物の回復速度(日)を示す図である。

【図14A】図14A~14Dは、示されるプロモーターの制御下の示されるLMM遺伝子、及びエタネルセプト(図14A)、セルグツズマブ(図14B)、インフリキシマブ(図14C)又はcB72.3(図14D)をコードする遺伝子をトランスフェクトした

50

細胞の $10^6/\text{ml}$ での平均生細胞濃度 (VCC: viable cell concentration) を示す一連のグラフである。細胞培養物を深型ウェルプレートで成長させ、各培養物/ウェルのCeli go細胞カウントによりVCCを測定した。

【図14B】図14A~14Dは、示されるプロモーターの制御下の示されるLMM遺伝子、及びエタネルセプト (図14A)、セルグツズマブ (図14B)、インフリキシマブ (図14C) 又はcB72.3 (図14D) をコードする遺伝子をトランスフェクトした細胞の $10^6/\text{ml}$ での平均生細胞濃度 (VCC: viable cell concentration) を示す一連のグラフである。細胞培養物を深型ウェルプレートで成長させ、各培養物/ウェルのCeli go細胞カウントによりVCCを測定した。

【図14C】図14A~14Dは、示されるプロモーターの制御下の示されるLMM遺伝子、及びエタネルセプト (図14A)、セルグツズマブ (図14B)、インフリキシマブ (図14C) 又はcB72.3 (図14D) をコードする遺伝子をトランスフェクトした細胞の $10^6/\text{ml}$ での平均生細胞濃度 (VCC: viable cell concentration) を示す一連のグラフである。細胞培養物を深型ウェルプレートで成長させ、各培養物/ウェルのCeli go細胞カウントによりVCCを測定した。

【図14D】図14A~14Dは、示されるプロモーターの制御下の示されるLMM遺伝子、及びエタネルセプト (図14A)、セルグツズマブ (図14B)、インフリキシマブ (図14C) 又はcB72.3 (図14D) をコードする遺伝子をトランスフェクトした細胞の $10^6/\text{ml}$ での平均生細胞濃度 (VCC: viable cell concentration) を示す一連のグラフである。細胞培養物を深型ウェルプレートで成長させ、各培養物/ウェルのCeli go細胞カウントによりVCCを測定した。

【図15A】図15A~15Dは、簡易的流加回分過剰成長 (aFOG: a bridged fed-batch overgrow) 中の細胞の $10^6/\text{ml}$ での平均生細胞濃度 (VCC) を示す一連のグラフである。細胞に、示されるプロモーターの制御下の示されるLMM遺伝子、及びエタネルセプト (図15A)、セルグツズマブ (図15B)、インフリキシマブ (図15C) 又はcB72.3 (図15D) をコードする遺伝子をトランスフェクトした。細胞培養物を深型ウェルプレートで成長させ、各培養物/ウェルのCeli go細胞カウントによりVCCを測定した。

【図15B】図15A~15Dは、簡易的流加回分過剰成長 (aFOG: a bridged fed-batch overgrow) 中の細胞の $10^6/\text{ml}$ での平均生細胞濃度 (VCC) を示す一連のグラフである。細胞に、示されるプロモーターの制御下の示されるLMM遺伝子、及びエタネルセプト (図15A)、セルグツズマブ (図15B)、インフリキシマブ (図15C) 又はcB72.3 (図15D) をコードする遺伝子をトランスフェクトした。細胞培養物を深型ウェルプレートで成長させ、各培養物/ウェルのCeli go細胞カウントによりVCCを測定した。

【図15C】図15A~15Dは、簡易的流加回分過剰成長 (aFOG: a bridged fed-batch overgrow) 中の細胞の $10^6/\text{ml}$ での平均生細胞濃度 (VCC) を示す一連のグラフである。細胞に、示されるプロモーターの制御下の示されるLMM遺伝子、及びエタネルセプト (図15A)、セルグツズマブ (図15B)、インフリキシマブ (図15C) 又はcB72.3 (図15D) をコードする遺伝子をトランスフェクトした。細胞培養物を深型ウェルプレートで成長させ、各培養物/ウェルのCeli go細胞カウントによりVCCを測定した。

【図15D】図15A~15Dは、簡易的流加回分過剰成長 (aFOG: a bridged fed-batch overgrow) 中の細胞の $10^6/\text{ml}$ での平均生細胞濃度 (VCC) を示す一連のグラフである。細胞に、示されるプロモーターの制御下の示されるLMM遺伝子、及びエタネルセプト (図15A)、セルグツズマブ (図15B)、インフリキシマブ (図15C) 又はcB72.3 (図15D) をコードする遺伝子をトランスフェクトした。細胞培養物を深型ウェルプレートで成長させ、各培養物/ウェルのCeli go細胞カウントによりVCCを測定した。

【図16A】図16A~16Dは、aFOG中のLMM遺伝子及び目的の遺伝子を発現す

る細胞培養物の特定の生産性のバブルプロットを示す一連のグラフである。細胞に、示されるプロモーターの制御下の示されるLMM遺伝子、及びエタネルセプト（図16A）、セルグツズマブ（図16B）、インフリキシマブ（図16C）又はcB72.3（図16D）をコードする遺伝子をトランスフェクトした。培養物を深型ウェルプレートで成長させ、各培養物／ウェルのCeliGo細胞カウントによりVCCを測定した。タンパク質Aバイオセンサーを伴うOctet器具を使用して、生産性を測定した。示される各データ点は、個々の培養物に対応し；各データ点の直径は、その培養物について達成された生成物濃度を示す。

【図16B】図16A～16Dは、aFOG中のLMM遺伝子及び目的の遺伝子を発現する細胞培養物の特定の生産性のバブルプロットを示す一連のグラフである。細胞に、示されるプロモーターの制御下の示されるLMM遺伝子、及びエタネルセプト（図16A）、セルグツズマブ（図16B）、インフリキシマブ（図16C）又はcB72.3（図16D）をコードする遺伝子をトランスフェクトした。培養物を深型ウェルプレートで成長させ、各培養物／ウェルのCeliGo細胞カウントによりVCCを測定した。タンパク質Aバイオセンサーを伴うOctet器具を使用して、生産性を測定した。示される各データ点は、個々の培養物に対応し；各データ点の直径は、その培養物について達成された生成物濃度を示す。

10

【図16C】図16A～16Dは、aFOG中のLMM遺伝子及び目的の遺伝子を発現する細胞培養物の特定の生産性のバブルプロットを示す一連のグラフである。細胞に、示されるプロモーターの制御下の示されるLMM遺伝子、及びエタネルセプト（図16A）、セルグツズマブ（図16B）、インフリキシマブ（図16C）又はcB72.3（図16D）をコードする遺伝子をトランスフェクトした。培養物を深型ウェルプレートで成長させ、各培養物／ウェルのCeliGo細胞カウントによりVCCを測定した。タンパク質Aバイオセンサーを伴うOctet器具を使用して、生産性を測定した。示される各データ点は、個々の培養物に対応し；各データ点の直径は、その培養物について達成された生成物濃度を示す。

20

【図16D】図16A～16Dは、aFOG中のLMM遺伝子及び目的の遺伝子を発現する細胞培養物の特定の生産性のバブルプロットを示す一連のグラフである。細胞に、示されるプロモーターの制御下の示されるLMM遺伝子、及びエタネルセプト（図16A）、セルグツズマブ（図16B）、インフリキシマブ（図16C）又はcB72.3（図16D）をコードする遺伝子をトランスフェクトした。培養物を深型ウェルプレートで成長させ、各培養物／ウェルのCeliGo細胞カウントによりVCCを測定した。タンパク質Aバイオセンサーを伴うOctet器具を使用して、生産性を測定した。示される各データ点は、個々の培養物に対応し；各データ点の直径は、その培養物について達成された生成物濃度を示す。

30

【図17A】図17A～17Dは、aFOG中のLMM遺伝子及び目的の遺伝子を発現する細胞培養物の生成物濃度の95%信頼区間プロットを示す一連のグラフである。細胞に、示されるプロモーターの制御下の示されるLMM遺伝子、及びエタネルセプト（図17A）、セルグツズマブ（図17B）、インフリキシマブ（図17C）又はcB72.3（図17D）をコードする遺伝子をトランスフェクトした。タンパク質Aバイオセンサーを伴うOctetを使用して、生産性を測定した。各データ点は、 $p = 0.95$ の信頼区間での示される培養物の生産性の平均値を示す。

40

【図17B】図17A～17Dは、aFOG中のLMM遺伝子及び目的の遺伝子を発現する細胞培養物の生成物濃度の95%信頼区間プロットを示す一連のグラフである。細胞に、示されるプロモーターの制御下の示されるLMM遺伝子、及びエタネルセプト（図17A）、セルグツズマブ（図17B）、インフリキシマブ（図17C）又はcB72.3（図17D）をコードする遺伝子をトランスフェクトした。タンパク質Aバイオセンサーを伴うOctetを使用して、生産性を測定した。各データ点は、 $p = 0.95$ の信頼区間での示される培養物の生産性の平均値を示す。

【図17C】図17A～17Dは、aFOG中のLMM遺伝子及び目的の遺伝子を発現す

50

る細胞培養物の生成物濃度の95%信頼区間プロットを示す一連のグラフである。細胞に、示されるプロモーターの制御下の示されるLMM遺伝子、及びエタネルセプト（図17A）、セルグツズマブ（図17B）、インフリキシマブ（図17C）又はcB72.3（図17D）をコードする遺伝子をトランスフェクトした。タンパク質Aバイオセンサーを伴うOctetを使用して、生産性を測定した。各データ点は、 $p = 0.95$ の信頼区間での示される培養物の生産性の平均値を示す。

【図17D】図17A～17Dは、aF0G中のLMM遺伝子及び目的の遺伝子を発現する細胞培養物の生成物濃度の95%信頼区間プロットを示す一連のグラフである。細胞に、示されるプロモーターの制御下の示されるLMM遺伝子、及びエタネルセプト（図17A）、セルグツズマブ（図17B）、インフリキシマブ（図17C）又はcB72.3（図17D）をコードする遺伝子をトランスフェクトした。タンパク質Aバイオセンサーを伴うOctetを使用して、生産性を測定した。各データ点は、 $p = 0.95$ の信頼区間での示される培養物の生産性の平均値を示す。

【図18】図18は、P5CS代謝選択系を使用して単離したSCD1又はSREBF1操作導入CHO細胞、及び培地中のプロリンの非存在下で成長させた細胞からの細胞可溶化液の一連のウェスタンプロットである。

【図19A】図19A～19Dは、これらの脂質代謝変更（LMM）遺伝子の様々な量の発現を有し、次に選択マーカーグルタミシンテターゼとともにエタネルセプト又はインフリキシマブのいずれか及び組換えタンパク質分子の分泌発現についての遺伝子をトランスフェクトした、SREBF1又はSCD1操作導入CHO細胞プールの、グルタミン又はプロリンの非存在下の流加回分条件下でミニチュアバイオリアクターにてアセスメントした、IVCに対する細胞特異的生産性（Qp）の一連のグラフを示す。

【図19B】図19A～19Dは、これらの脂質代謝変更（LMM）遺伝子の様々な量の発現を有し、次に選択マーカーグルタミシンテターゼとともにエタネルセプト又はインフリキシマブのいずれか及び組換えタンパク質分子の分泌発現についての遺伝子をトランスフェクトした、SREBF1又はSCD1操作導入CHO細胞プールの、グルタミン又はプロリンの非存在下の流加回分条件下でミニチュアバイオリアクターにてアセスメントした、IVCに対する細胞特異的生産性（Qp）の一連のグラフを示す。

【図19C】図19A～19Dは、これらの脂質代謝変更（LMM）遺伝子の様々な量の発現を有し、次に選択マーカーグルタミシンテターゼとともにエタネルセプト又はインフリキシマブのいずれか及び組換えタンパク質分子の分泌発現についての遺伝子をトランスフェクトした、SREBF1又はSCD1操作導入CHO細胞プールの、グルタミン又はプロリンの非存在下の流加回分条件下でミニチュアバイオリアクターにてアセスメントした、IVCに対する細胞特異的生産性（Qp）の一連のグラフを示す。

【図19D】図19A～19Dは、これらの脂質代謝変更（LMM）遺伝子の様々な量の発現を有し、次に選択マーカーグルタミシンテターゼとともにエタネルセプト又はインフリキシマブのいずれか及び組換えタンパク質分子の分泌発現についての遺伝子をトランスフェクトした、SREBF1又はSCD1操作導入CHO細胞プールの、グルタミン又はプロリンの非存在下の流加回分条件下でミニチュアバイオリアクターにてアセスメントした、IVCに対する細胞特異的生産性（Qp）の一連のグラフを示す。

【発明を実施するための形態】

【0008】

定義

別に定義しない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、本発明が属する分野の当業者によって通常理解される意味と同じ意味を有する。本明細書で説明される方法及び材料と同様又は均等の方法及び材料は、本発明の実施又は試験において使用することができるが、好適な方法及び材料は、以下に説明される。本明細書で言及される全ての出版物、特許出願、特許及び他の参考文献は、それらを全体として参照により組み込む。加えて、材料、方法及び例は、単に例示であり、限定であるとは意図されない。見出し、副見出し又は番号要素若しくは文字要素、例えば（a）、（b）、（i）等は、単に

10

20

30

40

50

読み易さのために示される。この文書中の見出し又は番号要素若しくは文字要素の使用は、ステップ又は要素がアルファベット順に行われること、又はステップ又は要素が必ずしも互いに分離されることを必要としない。本発明の他の特徴、目的及び利点は、説明及び図面、並びに特許請求の範囲から明らかである。また、本明細書で使用される用語は、特定の実施形態を説明する目的のためのみであり、限定であるとは意図されないことが理解されるべきである。

【0009】

冠詞「a」及び「an」は、冠詞の文法的目的物のうちの1つ又は1つよりも多く（すなわち、少なくとも1つ）を指すために本明細書で使用される。一部の実施形態では、冠詞「a」又は「an」は、冠詞の文法的目的物のうちの単一の1つを指す。一部の実施形態では、冠詞「a」又は「an」は、複数の（例えば1つよりも多い、例えば2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100又はそれよりも多い）冠詞の文法的目的物を指す。例として、「a cell（細胞）」は、1つの細胞又は1つよりも多い（例えば2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100又はそれよりも多い）細胞を意味し得る。

10

【0010】

「約」という用語は、量、一時的な持続期間等の測定可能な値について言及する場合、変動が、開示される方法を行うために適切であるとき、指定された値からの±20%、又は一部の場合±10%、又は一部の場合±5%、又は一部の場合±1%、又は一部の場合±0.1%のそのような変動を包含することを意味する。

20

【0011】

本明細書で使用される場合、「複数（plurality）」という用語は、冠詞の文法的目的物のうちの1つよりも多く（例えば2つ又はそれよりも多く）を指す。例として、「複数の細胞」とは、2つの細胞又は2つよりも多い細胞を意味し得る。

【0012】

本明細書で使用される場合、「内因性」という用語は、生物、細胞、組織又は系からの任意の材料、又はこれらの内側で天然に産生された任意の材料を指す。

【0013】

本明細書で使用される場合、「異種の」という用語は、生物、細胞、組織又は系に導入された任意の材料、及び／又はこれらの外側で産生された任意の材料を指す。したがって、「異種の核酸」とは、生物、細胞、組織又は系に導入された核酸、及び／又はこれらの外側で産生された核酸を指す。一部の実施形態では、異種の核酸の配列は、異種の核酸が導入される生物、細胞、組織又は系の内側で天然に産生されないか、又は天然に見出すことができない。一部の実施形態では、異種の核酸の配列は、生物、細胞、組織又は系の内側で天然に見出すことができる（例えば、細胞で天然に見られる、例えば本明細書で説明される酵素又はLMMをコードする核酸（ここでは、その後、核酸は細胞内で発現して、酵素又はLMMの追加のコピーを産生する））。同様に、「異種のポリペプチド」とは、生物、細胞、組織又は系に導入されたポリペプチド、及び／又はこれらの外側で産生されたポリペプチドを指す。一部の実施形態では、ポリペプチドは、例えば異種の核酸配列からの発現によって、異種のポリペプチドが導入される生物、細胞、組織又は系の内側で天然に産生されないか、又は天然に見出すことができない。一部の実施形態では、異種のポリペプチドは、生物、細胞、組織又は系の内側で天然に見出すことができる（例えば、細胞で異所的にも発現される、細胞で天然に見られる、例えば本明細書で説明される酵素又はLMM）。ある特定の実施形態では、異種の核酸又はポリペプチドは、同じポリペプチド又は核酸の内因性コピーを含む生物、細胞、組織又は系に導入され、それによって、生物、細胞、組織又は系におけるポリペプチド又は核酸の量を増大する。ある特定の場合、「異種の」という用語は、異なる種からの生物、細胞、組織又は系に導入された場合の1つの種からの任意の材料を指し得る。一部の場合、「異種の」と及び「外因性」という用語は

30

40

50

、互換的に使用される。

【0014】

本明細書で使用される場合、「酵素分子」という用語は、目的の酵素活性を有するポリペプチドを指す。酵素分子は、目的の酵素活性を有する酵素と構造的類似性（例えば配列相同性）を共有し得る。一部の場合、酵素分子は、目的の酵素活性を有する酵素に対する少なくとも50%のアミノ酸配列同一性（例えば少なくとも約50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%の配列同一性）を有する。一部の場合、「分子」という用語は、酵素（例えばピロリン-5-カルボン酸シンターゼ（P5CS: pyrrolidine-5-carboxylate synthase））についての識別子で使用される場合、特定された酵素の酵素活性を有するポリペプチドを指す。例として、「P5CS分子」という用語は、本明細書で使用される場合、P5CSの酵素活性を有するポリペプチドを指す。一部の場合、P5CS分子は、P5CS酵素（例えば哺乳動物P5CS）に対する少なくとも50%のアミノ酸配列同一性（例えば少なくとも約50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%の配列同一性）を有する。

10

【0015】

本明細書で使用される場合、「核酸」、「ポリヌクレオチド」又は「核酸分子」という用語は、互換的に使用され、一本鎖又は二本鎖形態のいずれかの、デオキシリボ核酸（DNA: deoxyribonucleic acid）若しくはリボ核酸（RNA: ribonucleic acid）又はそのDNA若しくはRNAの組合せ及びそのポリマーを指す。「核酸」という用語には、遺伝子、cDNA又はRNA配列（例えばmRNA）が含まれるが、これらに限定されない。一実施形態では、核酸分子は、合成（例えば化学合成又は人工）又は組換えである。特に限定しない限り、この用語は、参照核酸と類似する結合特性を有し、天然又は非天然ヌクレオチドと類似する様式で代謝される天然ヌクレオチドのアナログ又は誘導体を含有する分子を包含する。別に示さない限り、また、特定の核酸配列は、明確に示される配列はもちろん、その保存的改変バリエーション（例えば縮重コドン置換）、対立遺伝子、オルソログ、SNP及び相補配列を暗に包含する。特に、縮重コドン置換は、1つ又は複数の選択される（又は全ての）コドンの第3番目の位置が混合塩基及び／又はデオキシイノシン残基により置換されている配列を生成することによって達成され得る（Batzlerら、Nucleic Acid Res. 19:5081（1991）；Ohtsukaら、J. Biol. Chem. 260:2605～2608（1985）；及びRossoliniら、Mol. Cell. Probes 8:91～98（1994））。本明細書で使用される場合、「対象核酸」により、本明細書で説明されるように細胞内に望ましく導入され得るか、又は細胞内に存在し得る、例えば本明細書で説明される生成物をコードする配列を含む、任意の目的の核酸を意味する。

20

30

【0016】

本明細書で使用される場合、「ペプチド」、「ポリペプチド」及び「タンパク質」という用語は、互換的に使用され、ペプチド結合によって、又はペプチド結合以外の手段によって共有結合されたアミノ酸残基からなる化合物を指す。タンパク質又はペプチドは、少なくとも2つのアミノ酸を含有しなければならず、タンパク質の配列又はペプチドの配列を構成し得るアミノ酸の最大数についての限定はない。一実施形態では、タンパク質は、1つよりも多い、例えば2、3、4、5つ又はそれよりも多いポリペプチドからなる場合があり、各ポリペプチドは、共有結合又は非共有結合／相互作用のいずれかによって別のポリペプチドと会合している。ポリペプチドは、ペプチド結合によって、又はペプチド結合以外の手段によって互いに接合された2つ又はそれよりも多いアミノ酸を含む任意のペプチド又はタンパク質を含む。本明細書で使用される場合、この用語は、当該技術分野で例えばペプチド、オリゴペプチド及びオリゴマーとも通常呼ばれる短鎖、及び当該技術分野でタンパク質と一般的に呼ばれ、タンパク質には多くの種類がある長鎖の両方を指す。「ポリペプチド」には、数ある中で、例えば、生物学的に活性な断片、実質的に相同のポリ

40

50

ペプチド、オリゴペプチド、ホモダイマー、ヘテロダイマー、ポリペプチドのバリエーション、改変ポリペプチド、誘導体、アナログ、融合タンパク質が含まれる。

【0017】

「生成物」とは、その用語が本明細書で使用される場合、細胞、例えば生成物を産生するように改変又は操作された細胞によって産生される、例えば発現される分子、例えばポリペプチド、例えばタンパク質、例えば糖タンパク質、核酸、脂質、糖、多糖又はそれらの任意のハイブリッドを指す。一実施形態では、生成物は、タンパク質又はポリペプチド生成物である。一実施形態では、生成物は、天然生成物を含む。一実施形態では、生成物は、非天然生成物を含む。一実施形態では、生成物の一部分は天然であり、一方で、生成物の別の部分は非天然である。一実施形態では、生成物は、ポリペプチド、例えば組換えポリペプチドである。一実施形態では、生成物は、診断的使用又は前臨床使用に好適である。別の実施形態では、生成物は、治療的使用のため、例えば疾患の治療のために好適である。一部の実施形態では、生成物は、タンパク質生成物である。一部の実施形態では、生成物は、本明細書で説明される、例えば表5～8の、組換えタンパク質又は治療用タンパク質である。

【0018】

本明細書で使用される場合、「プロモーター」という用語は、コード配列をプロモーターに作動可能に連結することがコード配列の発現をもたらすような十分な配列、例えば天然プロモーター又は操作されたプロモーターからの十分な配列を有する配列を指す。例えば、サイトメガロウイルス（CMV: cytomegalovirus）プロモーターは、CMVプロモーターの全て又は活性断片、例えば任意選択でイントロンA及び／又はUTR配列を含むCMVプロモーターの全て又は活性断片を含む。一実施形態では、CMVプロモーターは、天然又は操作されたバリエーションCMVプロモーターとは5、10、20、30、50又は100個以下のヌクレオチドにおいて異なる。一実施形態では、CMVプロモーターは、天然又は操作されたバリエーションCMVプロモーターとはそのヌクレオチドの1、5、10又は50%以下において異なる。プロモーターは、本明細書で使用される場合、プロモーターが含むプロモーター配列の構成的特性、調節された特性、抑制特性、強い特性、弱い特性又は他の特性であり得る。一実施形態では、プロモーターは、コード配列、例えば組換えポリペプチド、治療用ポリペプチド又はリプレッサーポリペプチドのコード配列の5'又は3'配列を含み得る。一実施形態では、プロモーターは、遺伝子、例えば組換えポリペプチド、治療用ポリペプチド又はリプレッサーポリペプチドをコードする遺伝子の1つ又は複数のイントロン内の配列を含み得る。一実施形態では、プロモーターは、部分的に、又はその全体として、コード配列、例えば組換えポリペプチド、治療用ポリペプチド又はリプレッサーポリペプチドのコード配列の5'又は3'配列内に含まれ得る。一実施形態では、プロモーターは、部分的に、又はその全体として、コード配列、例えば組換えポリペプチド、治療用ポリペプチド又はリプレッサーポリペプチドのコード配列内に含まれ得る。一実施形態では、プロモーターは、部分的に、又はその全体として、遺伝子、例えば組換えポリペプチド、治療用ポリペプチド又はリプレッサーポリペプチドをコードする遺伝子の1つ又は複数のイントロン内に含まれ得る。

【0019】

本明細書で使用される場合、「作動可能に連結された」という用語は、ポリペプチドをコードする配列及び制御エレメントが、制御エレメントが生成物（例えばポリペプチド）をコードする配列の発現を調節するために好適な様式で配置されている場合、それらが作動可能に連結されている、生成物（例えばポリペプチド）をコードする核酸配列と制御エレメントとの間の関係を指す。したがって、様々な制御エレメントについて、作動可能に連結されたものは、制御エレメントに対する生成物（例えばポリペプチド）をコードする配列の様々な配置を構成する。例えば、プロモーターエレメント及び生成物（例えばポリペプチド）をコードする配列が互いに近位に、且つ同じ核酸上に配置されている場合、生成物（例えばポリペプチド）をコードする配列は、プロモーターエレメントを含む制御エレメントに作動可能に連結され得る。別の例では、エンハンサー配列及び生成物（例えばポ

リペプチド)をコードする配列が同じ核酸上で好適な塩基数離れているか、又はさらには別個及び別々の核酸上に配置されている場合、生成物(例えばポリペプチド)をコードする配列は、遠位に作動するエンハンサー配列を含む制御エレメントに作動可能に連結され得る。

【0020】

本明細書で使用される場合、「制御エレメント」という用語は、コード配列、例えば遺伝子の発現を調節する(例えば増大又は減少させる)ために好適な核酸を指す。制御エレメントは、プロモーター配列、エンハンサー配列、又はプロモーター配列及びエンハンサー配列の両方を含み得る。制御エレメントは、連続核酸配列、非連続核酸配列(他のコード又は非コード核酸配列によって中断された配列)又はこれらの両方を含み得る。単一の制御エレメントは、単一の核酸又は1つよりも多い核酸に含まれ得る。一実施形態では、制御エレメントは、コード配列、例えば組換えポリペプチド、治療用ポリペプチド又はリプレッサーポリペプチドのコード配列の5'又は3'配列を含み得る。一実施形態では、制御エレメントは、遺伝子、例えば組換えポリペプチド、治療用ポリペプチド又はリプレッサーポリペプチドをコードする遺伝子の1つ又は複数のイントロン内の配列を含み得る。一実施形態では、制御エレメントは、部分的に、又はその全体として、コード配列、例えば組換えポリペプチド、治療用ポリペプチド又はリプレッサーポリペプチドのコード配列の5'又は3'配列内に含まれ得る。一実施形態では、制御エレメントは、部分的に、又はその全体として、コード配列、例えば組換えポリペプチド、治療用ポリペプチド又はリプレッサーポリペプチドのコード配列内に含まれ得る。一実施形態では、制御エレメントは、部分的に、又はその全体として、遺伝子、例えば組換えポリペプチド、治療用ポリペプチド又はリプレッサーポリペプチドをコードする遺伝子の1つ又は複数のイントロン内に含まれ得る。一実施形態では、単一の制御エレメントは、i) 遺伝子、例えば組換えポリペプチド、治療用ポリペプチド又はリプレッサーポリペプチドをコードする遺伝子に近位の(例えば遺伝子に隣接するか、又は遺伝子内に含有される)核酸配列、又はii) 遺伝子、例えば組換えポリペプチド、治療用ポリペプチド又はリプレッサーポリペプチドをコードする遺伝子に遠位の(例えば10若しくはそれよりも多い、100若しくはそれよりも多い、1000若しくはそれよりも多い又は10,000若しくはそれよりも多い塩基によって分離されているか、又は別個又は別々の核酸に配置されている)核酸配列を含み得る。

【0021】

「脂質代謝変更因子」又は「LMM」は、本明細書で使用される場合、以下のこと：脂質代謝経路に關与する成分の発現(例えば転写又は翻訳)；脂質代謝経路に關与する成分、例えば遺伝子産物の活性(例えば酵素活性)；細胞内に存在する脂質のレベル若しくは量；脂質ラフトのレベル若しくは量又は脂質ラフト形成速度；細胞膜、例えば形質膜若しくは細胞小器官膜の流動性、浸透性若しくは厚さ；飽和脂質の不飽和脂質への変換若しくはその逆の変換；細胞内の飽和脂質若しくは不飽和脂質、例えば一不飽和脂質のレベル若しくは量；ERの活性に好ましい影響を有する好ましい脂質組成を達成するための脂質組成；ERの拡張；ゴルジ体の拡張；分泌小胞若しくは分泌小胞形成のレベル若しくは量；分泌のレベル若しくは速度；膜受容体(例えばATR(例えばThe increase of cell-membranous phosphatidylcholines containing polyunsaturated fatty acid residues induces phosphorylation of p53 through activation of ATR. Zhang XH, Zhao C, Ma ZA. J Cell Sci. 2007年12月1日;120(Pt23):4134~43 PMID:18032786;ATR(ataxia telangiectasia mutated- and Rad3-related kinase) is activated by mild hypothermia in mammalian cells and subsequently activates p53. Roobol A, Roobol J, Carden MJ, Bastide A, Willis AE, D

unn WB、Goodacre R、Smales CM. Biochem J. 2011年4月15日; 435 (2) : 499~508. doi:10.1042/BJ20101303. PMID: 21284603を参照のこと) 及びSREPB (例えばInt J Biol Sci. 2016年3月21日; 12 (5) : 569~79. doi:10.7150/ijbs.14027. eCollection 2016. Dysregulation of the Low-Density Lipoprotein Receptor Pathway Is Involved in Lipid Disorder-Mediated Organ Injury. Zhang Y、Ma KL、Ruan XZ、Liu BCを参照のこと) 並びに追加の受容体 (例えばBiochim Biophys Acta. 2016年3月17日 pii:S1388~1981 (16) 30071~3. doi:10.1016/j.bbailip.2016.03.019を参照のこと) の活性化若しくは不活性化; 並びに/又は小胞体ストレス応答 (UPR: unfolded protein response) のうちの1つ又は複数を変更する、例えば増大又は減少させる分子、遺伝子産物、ポリペプチド又は酵素を指す。一実施形態では、LMMは、ポリペプチドを含む。一実施形態では、LMMは、転写レギュレーター、例えば転写因子を含む。一実施形態では、LMMは、SREBF1又はその機能的断片 (例えばSREBF-410) を含む。一実施形態では、LMMは、酵素を含む。一実施形態では、LMMは、SCD1又はその機能的断片を含む。

【0022】

細胞を特定、選択又は培養する方法

一態様では、本開示の発明は、細胞を特定、選択及び/又は培養する方法に関する。一部の実施形態では、本方法は、

a) (i) 対象核酸配列と、

(ii) 発現した場合、アミノ酸の合成経路の酵素の高レベルの活性をもたらす核酸配列、例えば活性を含む酵素分子をコードする核酸配列とを含む核酸、例えばベクター、例えば複製可能ベクター又は統合ベクターを含む細胞を用意するステップと、

b) 核酸配列を含む細胞を、核酸配列を含む細胞の成長を可能にするために十分な条件下で、高活性を有しない細胞と同じである細胞の成長を支持するためには不十分なレベルのアミノ酸を有する培地の存在下で培養するステップと

を含み、それによって、異種の核酸配列を含む細胞を特定、選択又は培養する。

【0023】

一部の実施形態では、酵素分子は、アミノ酸の生合成経路の律速段階を触媒する。他の実施形態では、酵素分子は、アミノ酸の生合成経路の非律速段階を触媒する。実施形態では、アミノ酸は、プロリン、チロシン又はトリプトファンである。

【0024】

一部の実施形態では、細胞は、酵素分子の活性の阻害剤をさらに含む。阻害剤は、例えば、対象核酸配列を含む核酸を取り込まない細胞が低レベル又は検出不能なレベルの内因性酵素分子活性を示すように、内因性酵素分子活性を低減又は防止することによって、選択プロセスの厳密性を増大させるために使用され得る。低レベル又は検出不能なレベルの内因性酵素分子活性を示す細胞は、合成に酵素分子の活性を必要とするアミノ酸 (例えばプロリン、チロシン又はトリプトファン) の外部供給の非存在下では成長及び/又は生存することができない場合がある。一部の実施形態では、阻害剤は、酵素分子に結合し、例えば阻害剤は、酵素分子に結合し、これを阻害する。実施形態では、阻害剤は、酵素分子のアロステリック阻害剤である。実施形態では、阻害剤は、酵素分子の競合的阻害剤である。一部の実施形態では、阻害剤は、酵素分子の転写又は翻訳、例えば酵素分子の内因性転写又は翻訳を阻害する。一部の実施形態では、阻害剤は、プロリン、チロシン又はトリプトファンの生合成経路の酵素分子を阻害する。実施形態では、阻害剤は、ピロリン-5-カルボン酸シンターゼ (P5CS) 分子の活性を阻害する。実施形態では、阻害剤は、P5CSの活性を阻害する。実施形態では、阻害剤は、プロリンアナログである。実施形態

では、阻害剤は、L-アゼチジン-2-カルボン酸、3,4-デヒドロ-L-プロリン又はL-4-チアゾリジンカルボン酸である。

【0025】

一部の実施形態では、本方法は、1つ又は複数の追加の培養ステップをさらに含む。一部の実施形態では、1つ又は複数の追加の培養ステップは、第2の培地（例えば第1の培養ステップで使用された培地組成と同じ培地組成、又は第1の培養ステップで使用された培地とは異なる培地）の存在下で細胞を培養することを含む。実施形態では、第1の培養ステップは、不十分なレベルの第1のアミノ酸（例えばプロリン）を含む培地、例えば第1のアミノ酸を欠く培地を利用し、第2の培養ステップは、不十分なレベルの第2のアミノ酸（例えばチロシン又はトリプトファン）を含む培地、例えば第2のアミノ酸を欠く培地を利用する。実施形態では、細胞が目的の対象核酸をさらに含む場合のみ、細胞は、第1のアミノ酸の産生を救済する酵素分子及び／又は第2のアミノ酸の産生を救済する酵素分子を含む。この手法は、追加の培養ステップに拡張することができ、各培養ステップは、不十分なレベルのアミノ酸（例えば第1又は第2の培養培地に含まれないアミノ酸と同じ又は異なるアミノ酸）を含む培地、例えばアミノ酸を欠く培地、及びアミノ酸（例えば第1又は第2の培養培地に含まれないアミノ酸と同じ又は異なるアミノ酸）の産生を救済することができる酵素分子を含む細胞を含むことが企図される。実施形態では、追加の培養ステップで使用される培地は、追加の培養ステップで使用される培養物に含まれないアミノ酸の阻害剤を含む。一部の実施形態では、培養ステップは、同時に、例えば不十分なレベルの複数のアミノ酸を含む培地、例えば複数のアミノ酸を欠く培地を使用して、行われ得る。一部の実施形態では、1サブセットの培養ステップのみが、酵素分子の阻害剤を使用することを含む。例えば、第1の培養ステップは、酵素分子の阻害剤を使用することを含み、酵素分子の阻害剤を使用することを含まない培養ステップがこれに続いてよい。

【0026】

一部の実施形態では、本方法は、異種の核酸を含む細胞、例えば生成物、例えばポリペプチド生成物、例えば抗体を産生するために有用な細胞を生成するために使用することができる。

【0027】

酵素分子及びその阻害剤

本発明は一般には、アミノ酸の生合成に関与する酵素分子の発現を選択することによって、核酸が導入された細胞を選択するための方法及び組成物を特徴とする。酵素分子は、対象核酸とともに細胞に導入され得る。例えば、酵素分子が細胞内で発現されるように、対象核酸及び酵素分子をコードする遺伝子の両方を含む核酸が、細胞に導入され得る。一部の実施形態では、対象核酸を含む細胞は、対象核酸を欠く細胞と比較して、高い酵素分子活性を示す。一部の実施形態では、酵素分子活性のレベルは、対象核酸を欠く細胞において検出可能な酵素分子活性と比較して、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、500%、1000%又はそれよりも高く増大する。一部の実施形態では、高活性を有する細胞は、対象核酸を欠く細胞よりも迅速に成長し得る。一部の実施形態では、細胞は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、500、1000、5000、10,000コピー又はそれよりも多いコピーの、酵素をコードする核酸を含む。実施形態では、高活性を有する細胞は、アミノ酸を欠く培地で、対象核酸を欠く細胞よりも少なくとも約1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、400、500、600、700、800、900、1000、1500、2000、5000又は10,000倍迅速に成長する。その後、細胞は、対象核酸を取り込んだ細胞を選択するためにアミノ酸を欠く培地で成長させることができる。一部の実施形態では、選択は、アミノ酸を欠く培地で成長を示す1つ又は複数の細胞を選択することを含む。

【0028】

酵素分子阻害剤

本明細書で説明される細胞は、一部の実施形態では、細胞に導入された核酸（例えば対象核酸又は第2の核酸）によって発現される酵素分子の阻害剤をさらに含み得る。阻害剤は、例えば、細胞によって内因的に産生される酵素分子の活性を低減若しくは封鎖するため、及び／又は復帰変異細胞の成長を低減若しくは封鎖するためにはたらき、それによって、例えば本明細書で説明される選択方法の厳密性を増大させるように作用し得る。一部の実施形態では、細胞内の阻害剤のレベルは、内因性酵素分子活性を、阻害剤を欠く細胞で観察される活性の約0.001%、0.01%、0.1%、1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、25%、30%、40%又は50%未満に低減させるために十分である。一部の実施形態では、アミノ酸を欠く培地における成長に基づいて選択された細胞の約0.001%、0.01%、0.1%、1%、5%又は10%未満が対象核酸を含まない。一部の実施形態では、細胞内の酵素分子と阻害剤分子との比は、約1:1000、1:500、1:250、1:200、1:100、1:90、1:80、1:70、1:60、1:50、1:40、1:30、1:20、1:10、1:9、1:8、1:7、1:6、1:5、1:4、1:3、1:2、1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、15:1、20:1、30:1、40:1、50:1、60:1、70:1、80:1、90:1、100:1、200:1、250:1、500:1又は1000:1である。

【0029】

阻害剤は、例えばアミノ酸若しくはそのアナログ、ポリペプチド、核酸又は小分子であり得る。一部の実施形態では、阻害剤は、酵素分子が参加する生合成経路によって産生されたアミノ酸のアナログである。一部の実施形態では、阻害剤は、抗体分子（例えば、例えば本明細書で説明される、抗体又は抗体断片）、融合タンパク質、ホルモン、サイトカイン、成長因子、酵素、糖タンパク質、リポタンパク質、レポータータンパク質、治療用ペプチド、アプタマー又はこれらのいずれかの構造的断片及び／若しくは機能的断片又はハイブリッドである。一部の実施形態では、阻害剤は、アンチセンスRNA、siRNA、tRNA、リボソームRNA、マイクロRNA、piRNA、snoRNA、snRNA、exRNA、scRNA又は長鎖非コードRNAである。

【0030】

本明細書で説明される組成物及び方法で使用され得る酵素分子及びその阻害剤の非限定的な例は、表1で列挙される酵素分子及びその阻害剤を含む。

【0031】

10

20

30

40

50

【表 1】

表 1. アミノ酸生合成に関与する例示的な酵素分子及びその例示的な阻害剤

アミノ酸	酵素分子	阻害剤
アラニン	グルタミン酸デヒドロゲナーゼ	
	アミノトランスフェラーゼ	
ロイシン	アセト乳酸シンターゼ	
	アセトヒドロキシ酸レダクトイソメラーゼ (Acetohydroxy acid isomeroreductase)	
	ジヒドロキシ酸デヒドラターゼ(Dihydroxyacid dehydratase)	
	α -イソプロピルリンゴ酸シンターゼ(α -Isopropylmalate synthase)	
	α -イソプロピルリンゴ酸イソメラーゼ(α -Isopropylmalate isomerase)	
	ロイシンアミノトランスフェラーゼ	
イソロイシン	アセト乳酸シンターゼ	

10

20

30

40

50

	アセトヒドロキシ酸レダ クトイソメラーゼ	
	ジヒドロキシ酸デヒドラ ターゼ	
	バリンアミノトランスフ ェラーゼ	
メチオニン	Cys/Met 代謝 PLP-依存性 酵素	
	シスタチオニン-γ-シンタ ーゼ	β-シアノアラニン(例えば 14±0.2μM で) プロパルギルグリシン(例えば 40±8μM で) アミノオキシ酢酸(例えば 1.1±0.1μM で) L-アミノエトキシビニルグリ シン
	シスタチオニン-β-リアー ゼ	
	O-アセチルホモセリンア ミノカルボキシプロピル トランスフェラーゼ	

10

20

30

40

50

	メチオニンシンターゼ(例えば 5-メチルテトラヒドロ葉酸ホモシステインメチルトランスフェラーゼ)	
	アスパルトキナーゼ	
	アスパラギン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ	
	ホモセリンデヒドロゲナーゼ	
	ホモセリン O-トランススクシニラーゼ(Homoserine O-transsuccinylase)	
バリン	アセト乳酸シンターゼ	
	アセトヒドロキシ酸レダクトイソメラーゼ	
	ジヒドロキシ酸デヒドラターゼ	
	バリンアミノトランスフェラーゼ	
フェニルアラニン	コリスミ酸ムターゼ	
	プレフェン酸デヒドラターゼ	

10

20

30

40

50

	芳香族アミノトランスフェラーゼ I	
	芳香族アミノトランスフェラーゼ II	
	プレチロシンデヒドラターゼ	
トリプトファン	アントラニル酸シンターゼ	
	アントラニル酸 PR トランスフェラーゼ	
	ホスホリボシルアントラニル酸イソメラーゼ	
	IGP シンターゼ	
	3-ホスホ-グリセルアルデヒド(glyceraldehyde)	
チロシン	フェニルアラニンヒドロキシラーゼ	
	コリスミ酸ムターゼ	
	プレフェン酸アミノトランスフェラーゼ	
	プレチロシンデヒドロゲナーゼ	
アスパラギン	トランスアミナーゼ	

10

20

30

40

50

	アスパラギンシンターゼ	
システイン	シスタチオニンベータシンターゼ	
	シスタチオニンガンマリアーゼ	
	セリントランスアセチラーゼ	
	O-アセチルセリン(チオール)-リアーゼ	
グルタミン	グルタミンシンターゼ	
セリン	ホスホグリセリン酸デヒドロゲナーゼ	O-アセチル-L-セリン(例えば 1.4mM で) L-アロトレオニン(例えば 1.5mM で) グリシン(例えば 1.8mM で) L-アラニン(例えば 3.0mM で) L-セリンアミド(例えば 3.8mM で) L-システイン(例えば 4.1mM で) L-ホモセリン(例えば 5.1mM で)

10

20

30

40

50

		N-Cbz-L-セリン(例えば 15.0mM で) L-又は-アミノ酪酸(例えば 18.5mM で) L-トレオニン(例えば 27.0mM で) N-又は-ベンジル-L-セリン(例 えば50.0mMで)	10
	ホスホセリントランスア ミナーゼ		
	ホスホセリンホスファタ ーゼ		20
	セリンヒドロキシメチル トランスフェラーゼ		
トレオニン	アスパルトキナーゼ		
	β -アスパラギン酸セミアル デヒドデヒドロゲナーゼ		30
	ホモセリンデヒドロゲナ ーゼ		
	ホモセリンキナーゼ		
	トレオニンシンターゼ		
アスパラギン 酸	ピルビン酸カルボキシラ ーゼ		40

	ミトコンドリアアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ	
	細胞質アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ	
グルタミン酸	グルタミナーゼ	
	N-アセチル-グルタミン酸シンターゼ	
	グルタミン酸デヒドロゲナーゼ	
	アルデヒドデヒドロゲナーゼ ALDH4A1	
	ホルムイミドイルトランスフェラーゼシクロデアミナーゼ	
	グルタミン酸カルボキシペプチダーゼ II	
アルギニン	アルギニノコハク酸シンテターゼ	
	アルギニノコハク酸リアーゼ	
	オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ	

10

20

30

40

50

	ミトコンドリアオルニチンアセチルトランスフェラーゼ	
	アセチルオルニチンアミノトランスフェラーゼ	
	アセチルグルタミン酸キナーゼ	
	N-アセチル-ガンマ-グルタミル-リン酸レダクターゼ	
	アセチルグルタミン酸シンターゼ	
ヒスチジン	ATP ホスホリボシルトランスフェラーゼ	
	三官能性ヒスチジノールデヒドロゲナーゼ/ホスホリボシル-AMP シクロヒドロラーゼ/ホスホリボシル-ATP ジホスファターゼ	
	1-(5-ホスホリボシル)-5-((5-ホスホリボシルアミノ)メチリデンアミノ)イミダゾール-4-カルボキサミドイソメラーゼ	

10

20

30

40

50

	イミダゾールグリセロールリン酸シンターゼ	
	ヒスチジノール-リン酸アミノトランスフェラーゼ	
	ヒスチジノールホスファターゼ	
リジン	アスパルトキナーゼ	
	β -アスパラギン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ	
	4-ヒドロキシ-テトラヒドロジピコリン酸シンターゼ	
	4-ヒドロキシ-テトラヒドロジピコリン酸レダクターゼ	
	テトラヒドロジピコリン酸 N-アセチルトランスフェラーゼ	
	スクシニルジアミノピメリン酸アミノトランスフェラーゼ	
	スクシニルジアミノピメリン酸デスクシニラーゼ	

10

20

30

40

50

	ジアミノピメリン酸エピ メラーゼ	
	ジアミノピメリン酸デカ ルボキシラーゼ	
グリシン	セリンヒドロキシメチル トランスフェラーゼ	
	グリシンシンターゼ	
プロリン	ピロリン-5-カルボン酸シ ンターゼ(P5CS)	プロリン プロリンアナログ(例えば L-ア ゼチジン-2-カルボン酸、3,4- デヒドロ-L-プロリン又は L-4- チアゾリジンカルボン酸)
	グルタミン酸 5-キナーゼ	
	ピロリン-5-カルボン酸レ ダクターゼ	

10

20

【0032】

一部の実施形態では、阻害剤は、アミノ酸、例えばプロリン、チロシン又はトリプトファンの生合成経路の酵素分子を阻害する。実施形態では、阻害剤は、アミノ酸の生合成経路の律速段階を触媒する酵素分子を阻害する。

30

【0033】

一部の実施形態では、阻害剤は、プロリン生合成経路の酵素分子、例えばプロリン生合成経路の律速段階を触媒する酵素分子を阻害する。実施形態では、阻害剤は、ピロリン-5-カルボン酸シンターゼ(P5CS)分子の活性を阻害する。実施形態では、阻害剤は、P5CSの活性を阻害する。実施形態では、阻害剤は、プロリン又はプロリンアナログである。実施形態では、阻害剤は、L-アゼチジン-2-カルボン酸、3,4-デヒドロ-L-プロリン又はL-4-チアゾリジンカルボン酸である。

40

【0034】

一部の実施形態では、阻害剤は、チロシン生合成経路の酵素分子、例えばチロシン生合成経路の律速段階を触媒する酵素分子を阻害する。実施形態では、阻害剤は、チロシンアナログである。

【0035】

一部の実施形態では、阻害剤は、トリプトファン生合成経路の酵素分子、例えばトリプトファン生合成経路の律速段階を触媒する酵素分子を阻害する。実施形態では、阻害剤は、トリプトファンアナログである。

【0036】

脂質代謝変更因子

50

本開示は、異種の核酸を含む細胞を産生するための方法及び組成物を特徴とする。一部の
場合、細胞は、細胞内で脂質代謝を変更することができる、一般にプロモーターの制御下
の脂質代謝変更因子（LMM）をさらに含む。実施形態では、LMMは、脂質代謝、例え
ば新規脂質生成、脂肪酸再エステル化、脂肪酸飽和化又は不飽和化、脂肪酸伸長及びリン
脂質生合成経路に関与する経路又はプロセスの多数の局面に影響を及ぼす包括的レギュレ
ーターを含む。例として、包括的レギュレーターがいくつかの、例えば2つ又はそれより
も多い脂質代謝の下流プロセス又は下流成分に影響を及ぼすように、包括的レギュレー
ターは1つ又は複数の脂質代謝経路又はプロセスの上流に存在する。一実施形態では、包括
的レギュレーターは、異なる脂質代謝プロセス又は経路に関与する1つよりも多い、例え
ば2つ又はそれよりも多い標的遺伝子の発現を活性化し得る転写因子である。したがって
、任意の理論に束縛されるものではないが、本明細書で説明される包括的レギュレーター
の使用は、脂質代謝の単一の標的又は他の成分のみを変更する下流エフェクターの使用と
比較して、細胞の産生能、頑健性及び生存のより大きな増大をもたらし得る。任意の理論
に束縛されるものではないが、多数の脂質代謝経路の包括的又はより広範な変更は、細胞
の産生能、生成物品質及び頑健性の改善に関与するより多くのプロセスに影響を及ぼすこ
とによって、細胞の産生能を増大させると考えられる。

10

【0037】

本明細書で説明される脂質代謝経路は、脂質又は脂質関連分子の合成、分解、変換又は改
変に関するプロセスを指す。脂質分子には、脂肪酸、グリセロ脂質、グリセロリン脂質、
リン脂質、サッカロリピド（saccharolipids）、スフィンゴリピド及びステ
ロール脂質、例えばコレステロール、並びにポリケチドが含まれるが、これらに限定さ
れない。脂質代謝経路の例には、新規脂質生成、脂肪酸再エステル化、脂肪酸飽和化、脂
肪酸不飽和化、脂肪酸伸長及びリン脂質生合成が含まれるが、これらに限定されない。一
実施形態では、本明細書で説明される方法は、脂質代謝を変更する改変を含む細胞を提供
する。脂質代謝を変更する改変は、脂質代謝に関与する成分の発現を増大又は減少させる
剤であり得る。一実施形態では、脂質代謝を変更する改変は、脂質代謝変更因子（LMM
）をコードする外因性核酸を含む。そのような実施形態では、LMMをコードする外因性
核酸は、本明細書で説明される核酸送達方法又は技術のいずれか、例えば形質導入又はト
ランスフェクションによって細胞に導入される。

20

【0038】

一部の実施形態では、本明細書で説明される方法は、脂質代謝を変更する1つ又は複数、
例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10個の改変を含む細胞を提供する。細胞
が脂質代謝を変更する2つ又はそれよりも多い改変を含む実施形態では、脂質代謝を変
更する各改変は、LMMをコードする外因性核酸を含む。一実施形態では、LMMをコー
ドする2つ又はそれよりも多い外因性核酸の各々は、同じ核酸分子内に位置してもよく、
又は2つ又はそれよりも多い異なる核酸分子に位置する。細胞がLMMをコードする2つ
又はそれよりも多い核酸配列を含むそのような実施形態では、LMMは互いに異なり、例
えば異なるポリペプチド配列をコードするか、又は異なる機能を有する。一部の実施形態
では、複数の様々な異種のLMM（例えば2、3、4、5、6、7、8、9、10、11
、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、
70、80、90、100個又はそれよりも多い、例えば本明細書で説明されるLMM）
が細胞内で発現される。ある特定の実施形態では、異種のLMMのうちの1つ又は複数
は、細胞によって天然に発現される。ある特定の実施形態では、異種のLMMのうちの1つ
又は複数は、細胞によって天然に発現されない。

30

40

【0039】

一実施形態では、脂質代謝を変更する改変は、1つ又は複数の脂質代謝経路に関与する成
分の発現又は活性を増大又は減少させる。一部の実施形態では、細胞の脂質代謝の変更は
、細胞内の脂質の空間的分布、例えば細胞膜（例えば脂質ラフト内）、細胞小器官（例
えば小胞体、ゴルジ体、核、リソソーム、ペルオキシソーム、液胞及び／又はミトコンドリ
ア）、エキソソーム、液滴、又は脂質を含む細胞の他の任意の領域若しくは区画内の脂質

50

の空間的分布の変更をもたらす。脂質代謝を変更する改変が発現、例えば転写又は翻訳の増大、又は脂質代謝経路の成分の活性の増大をもたらす実施形態では、成分は、脂質代謝経路の正のレギュレーターである。脂質代謝を変更する改変が発現、例えば転写、翻訳、ターンオーバー及び／又は分解の減少、又は脂質代謝経路の成分の活性の減少をもたらす実施形態では、成分は、脂質代謝経路の負のレギュレーターである。脂質代謝経路の遺伝子の発現、例えば転写及び／又は翻訳を定量するためのアッセイは、当該技術分野で公知であり、遺伝子をコードするmRNAの量の定量；若しくは遺伝子産物若しくはポリペプチドの量の定量；PCRベースアッセイ、例えば定量的リアルタイムPCR；ノーザンブロット；又はマイクロアレイを含む。脂質代謝経路の成分、例えば脂質代謝経路の酵素の活性を定量するためのアッセイは、脂質代謝経路の特定の成分に特異的である。

10

【0040】

細胞の脂質代謝の変更が細胞内の脂質のレベル又は量の増大をもたらす実施形態では、細胞内の脂質の全レベル又は全量は、増大され得る。一部の実施形態では、細胞の脂質代謝の変更は、細胞内の脂質の空間的分布、例えば細胞膜（例えば脂質ラフト内）、細胞小器官（例えば小胞体、ゴルジ体、核、リソソーム、ペルオキシソーム、液胞及び／又はミトコンドリア）、エキソソーム、液滴、又は脂質を含む細胞の他の任意の領域若しくは区画内の脂質の空間的分布の変更をもたらす。一実施形態では、脂質代謝を変更する改変は、細胞生存の増大をもたらす。一実施形態では、脂質代謝を変更する改変は、培養物生存率の増大をもたらす。一実施形態では、脂質代謝を変更する改変は、細胞増殖の増大をもたらす。一実施形態では、脂質代謝を変更する改変は、産生能、例えば産生される生成物の量（amount）、量（quantity）若しくは収率又は産生速度の増大をもたらす。一実施形態では、脂質代謝を変更する改変は、生成物の品質、例えば凝集、糖鎖付加状態若しくは異種性、断片化、適切な折り畳み若しくはアセンブリ、翻訳後修飾又はジスルフィド結合スクランプリングの増大をもたらす。

20

【0041】

一実施形態では、LMMは、例えばLMMをコードする異種の核酸（例えば細胞外に由来する核酸、例えばLMMをコードする遺伝子を含む核酸構築物）を導入することによって、又はプロモーターエレメント又は他の調節性転写エレメントを導入することにより発現を増大させることによって、細胞内で過剰発現される。一部の実施形態では、細胞は、細胞内で過剰発現されたLMMの内因性コピーを含む。他の実施形態では、細胞は、細胞内で過剰発現されたLMMの内因性コピーを含まない。別の実施形態では、LMMの発現又は活性は、例えばLMMの阻害剤又は外因性阻害性核酸、例えばRNA干渉剤を導入することによって、阻害又は減少される。阻害性核酸の例には、LMMをターゲットにする短干渉RNA（siRNA: short interfering RNA）及び短ヘアピンRNA（shRNA: short hairpin RNA）、例えばLMMをコードするmRNAが含まれる。一実施形態では、LMMの活性又は発現は、翻訳後修飾、又はLMM活性又は発現を調節する他の内因性調節機構を変更することによって増大又は減少される。翻訳後修飾による調節には、LMM発現又は活性を増大又は減少し得るリン酸化、SUMO化、ユビキチン化、アセチル化、メチル化又は糖鎖付加が含まれるが、これらに限定されない。例として、翻訳後修飾の調節は、翻訳後修飾がより頻繁に、又は構造的に起こり得ないような、又は起こるような、LMMを変更する酵素又は分子の変更、又はLMMの改変を通して達成され得る。また、LMMの調節は、LMM発現又は活性を増大又は減少させ得る、例えばmiRNA調節、タンパク質切断、特異的アイソフォームの発現、選択的スプライシング及び分解のうちの1つ又は複数を増大又は減少させ得る、内因性調節機構を変更することを含み得る。一実施形態では、LMMは、脂質代謝経路の成分の発現、例えば転写、又は活性を変更する、例えば増大又は減少させる。別の実施形態では、LMMは、脂質又は脂質関連分子の合成、分解、伸長又は構造的コンフォメーション（例えば飽和化若しくは不飽和化又はエステル化）を変更する、例えば増大又は減少させる。例示的なLMM及び／又は脂質代謝経路の成分を列挙するが、表2に列挙されるものに限

30

40

50

【 0 0 4 2 】

【表 2】

表 2. 脂質代謝経路及びその成分/遺伝子産物

経路	成分/遺伝子産物
包括的脂質代謝レギュレーター	SREBF1(ステロール調節エレメント結合転写因子 1)、例えば切断型 SREBF1 アイソフォーム c(SREB411) SREBF2(ステロール調節エレメント結合転写因子 2) PRMT5
新規脂質生成	FAS(脂肪酸シンターゼ) ACC(アセチル-coA カルボキシラーゼ) ACL(ATP クエン酸リアーゼ)
脂肪酸再エステル化	DGAT(ジグリセリドアシルトランスフェラーゼ) GPAT(グリセロール 3-リン酸アシルトランスフェラーゼ) LPL(リポタンパク質リパーゼ)
リン脂質生合成	AGPAT(1-アクチル-sn-グリセロール-3-リン酸 O-アシルトランスフェラーゼ) AGNPR(アシル/アルキルグリセロン-リン酸レダクターゼ) CCT(ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼ) CDS(ホスファチジン酸シチジリルトランスフェラーゼ) CEPT(ジアシルグリセロールコリン/エタノールアミンホスホトランスフェラーゼ) CERT(セラミド輸送タンパク質) CGT(N-アシルスフィンゴシンガラクトシルトランスフェラーゼ) CPT(ジアシルグリセロールコリンホスホトランスフェラーゼ) CLS(カルジオリピンシンターゼ) CRD(セラミダーゼ) GNPAT(グリセロン-リン酸O-アシルトランスフェラーゼ)

10

20

30

40

50

	KDSR(3-ケトスフィンガニンレダクターゼ) LCS(ポリペプチド N-アセチルガラクトサミニルトランスフェラーゼ) PAP(ホスファチジン酸ホスファターゼ) PEMT(ホスファチジルエタノールアミン N-メチルトランスフェラーゼ) PGP(ホスファチジルグリセロホスファターゼ) PGS(CDP-ジアシルグリセロール-グリセロール-3-リン酸 3-ホスファチジルトランスフェラーゼ) PIS(CDP-ジアシルグリセロール-イノシトール 3-ホスファチジルトランスフェラーゼ) PSD(ホスファチジルセリンデカルボキシラーゼ) PSS1(ホスファチジルセリンシンターゼ 1) PSS2(ホスファチジルセリンシンターゼ 2) SGMS(セラミドコリンホスホトランスフェラーゼ) SNAT(スフィンゴシン N-アシルトランスフェラーゼ) SPK(スフィンガニンキナーゼ) SPP(スフィンゴシン-1-リン酸ホスファターゼ) SPT(セリンCo-パルミトイルトランスフェラーゼ)	10
脂肪酸不飽和化	SCD1(ステアロイル CoA デサチュラーゼ-1) SCD2(ステアロイル CoA デサチュラーゼ-2) SCD3(ステアロイル CoA デサチュラーゼ-3) SCD4(ステアロイル CoA デサチュラーゼ-4) SCD5(ステアロイル(Stearyl)CoA デサチュラーゼ-5) PED(プラズマニルエタノールアミンデサチュラーゼ)	20
		30
		40
		50

SREBF1 及び他の経路の調節	S1P(サイト-1 プロテアーゼ) S2P(サイト-2 プロテアーゼ) SCAP(SREBF 切断活性化タンパク質) INSIG1(インスリン誘発遺伝子 1) INSIG2(インスリン誘発遺伝子 2) HMG CoA レダクターゼ(2-ヒドロキシ-3-メチル グルタリル(methylglutaryl)-CoA レダクターゼ) PPAR 受容体、例えば PPAR α 、PPAR γ
------------------	--

10

【0043】

実施形態では、LMMは、例えば表2に提供される、脂質代謝経路に関与する成分、例えば遺伝子産物と少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%のアミノ酸配列同一性又は相同性を含むか；又は例えば表2に提供される、脂質代謝経路に関与する成分、例えば遺伝子産物のアミノ酸配列とは1、2若しくは3つ又はそれよりも多いアミノ酸残基分、ただし、50、40、30、20、15又は10個以下のアミノ酸残基分異なる。

【0044】

実施形態では、LMMは、例えば表2に提供される、脂質代謝経路に関与する成分の機能的断片を含む。本明細書で説明されるLMMの機能的断片は、LMMの1つ又は複数の機能的ドメインを含み得る。例として、転写因子であるLMMの機能的断片は、DNA結合ドメイン及びトランス活性化ドメインを含む。例として、酵素であるLMMの機能的断片は、酵素活性を有するドメインを含む。本明細書で説明されるLMMの機能的断片は、全長LMMの機能的活性、例えば少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%又は90%の機能的活性を保持する。LMMの機能的断片は、当業者が実験的に決定してもよく、又は機能的ドメインの配列相同性に基づくアルゴリズムを使用して予測してもよい。例示的なLMMを、以下にさらに説明する。

20

【0045】

本明細書で説明される方法の実施形態のいずれかにおいて、LMMは、転写レギュレーターであり得る。実施形態では、LMMは、DNAに結合するか、又はDNAに結合する複合体において会合し、脂質代謝に関与する1つ又は複数の遺伝子産物の転写のためのRNAポリメラーゼを動員するか、又はこれを動員する複合体において会合する転写因子又は転写アクチベーターである。実施形態では、LMMは、ステロール結合エレメント及び／又はE-boxプロモーター配列に結合する。実施形態では、LMMは、ステロール調節エレメント結合因子1(SREBF1:sterol regulatory element binding factor 1)若しくはステロール調節エレメント結合因子2(SREBF2:sterol regulatory element binding factor 2)又はその機能的断片若しくはアイソフォームを含む。

30

【0046】

一部の実施形態では、LMMは、包括的転写アクチベーター又は転写因子を含む。実施形態では、LMMは、例えば表3又は4のいずれかにおいて提供される、脂質代謝経路の2つ又はそれよりも多い、例えば2、3、4、5、6つ又はそれよりも多い成分の転写を変更することができる。実施形態では、LMMは、2つ又はそれよりも多い脂質代謝経路の1つ又は複数の、例えば1、2、3、4若しくは5つ又はそれよりも多い成分、例えば表2に提供される成分及び経路の転写を変更することができる。

40

【0047】

ステロール調節エレメント結合因子1(SREBF1)は、標的遺伝子のプロモーター領域に存在するステロール調節エレメント(SRE:sterol regulatory element)及びE-boxプロモーター配列(Hagen、Rodriguez-

50

Cuencaら 2010) に結合することによって、脂質生成、脂肪酸再エステル化、脂肪酸不飽和化及び伸長、並びにリン脂質生合成に関与する遺伝子の転写をアップレギュレートする包括的転写アクチベーターである。SREBF1 遺伝子それ自体の転写は、遺伝子のプロモーター領域の他の転写調節エレメントの中で、ステロール調節エレメント (SRE) の存在によって内因的に調節される。この上、リン酸化、ユビキチン化、SUMO化、アセチル化、脂肪酸媒介改変及びタンパク質分解プロセッシングを含む多数の翻訳後調節機構は、SREBF1 の周囲に固定された、堅固に制御されているが、適応可能なホメオスタシス系に資する。

【0048】

実施形態では、LMMは、酵素を含む。実施形態では、LMMは、飽和脂肪酸を不飽和脂肪酸に変換する酵素を含む。実施形態では、LMMは、飽和脂肪酸を一不飽和脂肪酸、例えば1つの二重結合を有する脂肪酸に変換する酵素を含む。実施形態では、LMMは、飽和脂肪酸を多不飽和脂肪酸、例えば1つよりも多い、例えば2、3、4、5つ又はそれよりも多い二重結合を有する脂肪酸に変換する酵素を含む。実施形態では、LMMは、ステアロイルCoAデサチュラーゼ1 (SCD1: stearoyl CoA desaturase 1)、ステアロイルCoAデサチュラーゼ2 (SCD2)、ステアロイルCoAデサチュラーゼ3 (SCD3)、ステアロイルCoAデサチュラーゼ4 (SCD4)、ステアロイルCoAデサチュラーゼ5 (SCD5)、そのアイソフォーム又はその機能的断片を含む。

【0049】

一部の実施形態では、本明細書で説明される細胞内に存在するLMMは、プロモーターの制御下にある。プロモーターは、細胞によるLMMの産生を最大限にするためにLMM遺伝子と適合されることが望ましい。LMMの発現を調節するために使用され得るプロモーターの非限定的な例には、SV40、mCMV及びPGKプロモーターが含まれる。例えば、例えば本明細書で説明される方法又は組成物（例えば細胞）のいずれかにおいて使用され得る、プロモーターとLMM遺伝子との組合せの非限定的な例は、表3に示される。これらの組合せの各々は、例えば本明細書で説明される方法に従って細胞に導入された場合、P5CSを含む細胞内に存在し得ることが企図される。

【0050】

【表3】

表3. 例示的なプロモーターとLMMとの組合せ

プロモーター	脂質代謝変更因子
SV40	SCD1 (マウス)
SV40	SCD1 (CHO)
SV40	SREBF1 (CHO)
SV40	SREB411 (CHO)
mCMV	SCD1 (マウス)
mCMV	SCD1 (CHO)
mCMV	SREBF1 (CHO)
mCMV	SREB411 (CHO)
hCMV	SCD1 (マウス)
hCMV	SCD1 (CHO)
hCMV	SREBF1 (CHO)
hCMV	SREB411 (CHO)
PGK	SCD1 (マウス)
PGK	SCD1 (CHO)
PGK	SREBF1 (CHO)
PGK	SREB411 (CHO)

【0051】

本明細書で説明されるプロモーターとLMMとの組合せのいずれかは、例えば、本明細書で説明される細胞、核酸又は他の組成物のいずれかにおいて、酵素分子をコードする遺伝子とのさらなる組合せで存在し得る。例えば、本明細書で説明されるプロモーターとLMMとの組合せのいずれかは、P5CS分子をコードし、且つ本明細書で説明される対象核酸を含む核酸をさらに含む細胞内に存在し得る。さらに、本明細書で説明されるプロモーターとLMMとの組合せのいずれかは、アミノ酸生合成酵素分子（例えば酵素分子もまた細胞内に存在する）の阻害剤を有する細胞内に存在し得る。例えば、本明細書で説明されるプロモーターとLMMとの組合せのいずれかは、(i) P5CS分子をコードし、且つ本明細書で説明される対象核酸を含む核酸、及び(ii) P5CS阻害剤、例えばL-アゼチジン-2-カルボン酸、3,4-デヒドロ-L-プロリン又はL-4-チアゾリジンカルボン酸をさらに含む細胞内に存在し得る。例えば、例えば本明細書で説明される方法又は組成物（例えば細胞）のいずれかにおいて使用され得るプロモーターとLMMとP5CS阻害剤との組合せの非限定的な例は、表4に示される。これらの組合せの各々は、例えば本明細書で説明される方法に従って細胞に導入された場合、P5CSを含む細胞内に存在し得ることが企図される。

【0052】

10

20

30

40

50

【表 4】

表 4. 例示的なプロモーターと LMM と P5CS 阻害剤との組合せ(例えば本明細書で説明される P5CS を含む細胞において)

プロモーター	脂質代謝変更因子	P5CS 阻害剤
SV40	SCD1 (マウス)	L-アゼチジン-2-カルボン酸
		3,4-デヒドロ-L-プロリン
		L-4-チアゾリジンカルボン酸
SV40	SCD1 (CHO)	L-アゼチジン-2-カルボン酸
		3,4-デヒドロ-L-プロリン
		L-4-チアゾリジンカルボン酸
SV40	SREBF1 (CHO)	L-アゼチジン-2-カルボン酸
		3,4-デヒドロ-L-プロリン
		L-4-チアゾリジンカルボン酸
SV40	SREB411 (CHO)	L-アゼチジン-2-カルボン酸
		3,4-デヒドロ-L-プロリン
		L-4-チアゾリジンカルボン酸
mCMV	SCD1 (マウス)	L-アゼチジン-2-カルボン酸
		3,4-デヒドロ-L-プロリン
		L-4-チアゾリジンカルボン酸
mCMV	SCD1 (CHO)	L-アゼチジン-2-カルボン酸
		3,4-デヒドロ-L-プロリン
		L-4-チアゾリジンカルボン酸
mCMV	SREBF1 (CHO)	L-アゼチジン-2-カルボン酸
		3,4-デヒドロ-L-プロリン
		L-4-チアゾリジンカルボン酸
mCMV	SREB411 (CHO)	L-アゼチジン-2-カルボン酸
		3,4-デヒドロ-L-プロリン
		L-4-チアゾリジンカルボン酸

10

20

30

40

50

hCMV	SCD1 (マウス)	L-アゼチジン-2-カルボン酸
		3,4-デヒドロ-L-プロリン
		L-4-チアゾリジンカルボン酸
hCMV	SCD1 (CHO)	L-アゼチジン-2-カルボン酸
		3,4-デヒドロ-L-プロリン
		L-4-チアゾリジンカルボン酸
hCMV	SREBF1 (CHO)	L-アゼチジン-2-カルボン酸
		3,4-デヒドロ-L-プロリン
		L-4-チアゾリジンカルボン酸
hCMV	SREB411 (CHO)	L-アゼチジン-2-カルボン酸
		3,4-デヒドロ-L-プロリン
		L-4-チアゾリジンカルボン酸
PGK	SCD1 (マウス)	L-アゼチジン-2-カルボン酸
		3,4-デヒドロ-L-プロリン
		L-4-チアゾリジンカルボン酸
PGK	SCD1 (CHO)	L-アゼチジン-2-カルボン酸
		3,4-デヒドロ-L-プロリン
		L-4-チアゾリジンカルボン酸
PGK	SREBF1 (CHO)	L-アゼチジン-2-カルボン酸
		3,4-デヒドロ-L-プロリン
		L-4-チアゾリジンカルボン酸
PGK	SREB411 (CHO)	L-アゼチジン-2-カルボン酸
		3,4-デヒドロ-L-プロリン
		L-4-チアゾリジンカルボン酸

10

20

30

【0053】

細胞及び細胞培養

一態様では、本開示は、生成物、例えば本明細書で説明される組換えポリペプチド若しくは治療用ポリペプチド又は核酸分子を産生する細胞又は細胞株を評価、分類、特定、選択又は製造するための方法に関する。別の態様では、本開示は、生産性及び生成物品質の改善、例えば増大を有する細胞又は細胞株を評価、分類、特定、選択又は製造するための方法及び組成物に関する。一般には、本明細書の方法は、(i) 目的の生成物をコードする対象核酸配列と(ii) アミノ酸の生合成経路に参加する酵素分子をコードする核酸配列とを含む核酸構築物（例えばゲノムに統合されたベクター又は異種の核酸）を含む細胞又は細胞株を産生するために使用することができ、細胞又は細胞株は、酵素分子を内因的に発現しない。

【0054】

40

50

実施形態では、細胞は、哺乳動物細胞である。他の実施形態では、細胞は、哺乳動物細胞以外の細胞である。一実施形態では、細胞は、マウス、ラット、チャイニーズハムスター、シリアンハムスター、サル、類人猿、イヌ、ウマ、フェレット又はネコからの細胞である。実施形態では、細胞は、哺乳動物細胞、例えばヒト細胞、又はげっ歯類細胞、例えばハムスター細胞、マウス細胞若しくはラット細胞である。別の実施形態では、細胞は、アヒル、オウム、魚類、昆虫、植物、真菌又は酵母からの細胞である。

【0055】

実施形態では、細胞は、チャイニーズハムスター卵巣（CHO: Chinese hamster ovary）細胞である。一実施形態では、細胞は、CHO-K1細胞、CHOK1SV細胞、DG44 CHO細胞、DUXB11 CHO細胞、CHO-S、CHO GSノックアウト細胞、CHOK1SV FUT8ノックアウト細胞、CHOZN又はCHO由来細胞である。CHO GSノックアウト細胞（例えばGSKO細胞）は、例えばCHO-K1SV GSノックアウト細胞（Lonza Biologics, Inc.）である。CHO FUT8ノックアウト細胞は、例えばポテリジェント（Potelligent）（登録商標）CHOK1SV FUT8ノックアウト（Lonza Biologics, Inc.）である。

10

【0056】

実施形態では、細胞は、HeLa、HEK293、HT1080、H9、HepG2、MCF7、Jurkat、NIH3T3、PC12、PER.C6、BHK（仔ハムスター腎細胞）、VERO、SP2/O、NS0、YB2/O、Y0、EB66、C127、L細胞、COS、例えばCOS1及びCOS7、QC1-3、CHOK1、CHOK1SV、ポテリジェント（商標）（CHOK1SV FUT8-KO）、CHO GSノックアウト、エクシード（Xceed）（商標）（CHOK1SV GS-KO）、CHOS、CHO DG44、CHO DUXB11及びCHOZN又はそれらに由来する任意の細胞である。

20

【0057】

実施形態では、真核細胞は、幹細胞である。幹細胞は、例えば、胚性幹細胞（ESC: embryonic stem cell）、成体幹細胞、人工多能性幹細胞（iPSC: induced pluripotent stem cell）、組織特異的幹細胞（例えば造血幹細胞）及び間葉系幹細胞（MSC: mesenchymal stem cell）を含む多能性幹細胞であり得る。

30

【0058】

実施形態では、細胞は、本明細書で説明される細胞のうちのいずれかの分化した形態である。一実施形態では、細胞は、培養物中の任意の初代細胞に由来する細胞である。

【0059】

実施形態では、細胞は、ヒト肝細胞、動物肝細胞又は非実質細胞等の肝細胞である。例えば、細胞は、播種可能代謝用ヒト肝細胞、播種可能誘導用ヒト肝細胞、播種可能クオリストランスポーターサーティファイド（Qualyst Transporter Certified）（商標）ヒト肝細胞、懸濁用ヒト肝細胞（10人のドナー及び20人のドナーからプールした肝細胞を含む）、ヒト肝クッパー細胞、ヒト肝星細胞、イヌ肝細胞（単一の、及びプールしたビーグル肝細胞を含む）、マウス肝細胞（CD-1及びC57BL/6肝細胞を含む）、ラット肝細胞（Sprague-Dawley、Wistar Han及びWistar肝細胞を含む）、サル肝細胞（カニクイザル又はアカゲザル肝細胞を含む）、ネコ肝細胞（イエネコ短毛種肝細胞を含む）及びウサギ肝細胞（ニュージランドホワイト種肝細胞を含む）であり得る。例示的な肝細胞は、Triangle Research Labs, LLC、6 Davis Drive Research Triangle Park, North Carolina, USA 27709から市販されている。

40

【0060】

一部の実施形態では、細胞は、グルタミン合成酵素（GS）のノックアウトを含む。実施

50

形態では、細胞は、機能的GS遺伝子を含まない。実施形態では、細胞は、GS遺伝子を含まない。実施形態では、細胞内のGS遺伝子は、遺伝子が機能的GSTタンパク質をコードすることができないようにする変異を含む。

【0061】

実施形態では、真核細胞は、例えば酵母細胞（例えばピキア (*Pichia*) 属（例えばピキア・パストリス (*Pichia pastoris*)、ピキア・メタノリカ (*Pichia methanolica*)、ピキア・クルイベリ (*Pichia kluyveri*) 及びピキア・アンガスタ (*Pichia angusta*)）、コマガタエラ (*Komagataella*) 属（例えばコマガタエラ・パストリス (*Komagataella pastoris*)、コマガタエラ・シュードパストリス (*Komagataella pseudopastoris*) 又はコマガタエラ・ファフィ (*Komagataella phaffii*)）、サッカロマイセス (*Saccharomyces*) 属（例えば出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、出芽酵母、サッカロマイセス・クルイベリ (*Saccharomyces kluyveri*)、サッカロマイセス・ウバラム (*Saccharomyces uvarum*)）、クルイベロマイセス (*Kluyveromyces*) 属（例えばクルイベロマイセス・ラクティス (*Kluyveromyces lactis*)、クルイベロマイセス・マルキシアヌス (*Kluyveromyces marxianus*)）、キャンディダ (*Candida*) 属（例えばトルラ酵母 (*Candida utilis*)、キャンディダ・カカオイ (*Candida cacaoi*)、キャンディダ・ボイディニ (*Candida boidinii*)）、ゲオトリクム (*Geotrichum*) 属（例えばゲオトリクム・ファーマンタンス (*Geotrichum fermentans*)）、ハンセヌラ・ポリモルファ (*Hansenula polymorpha*)、ヤロウイア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) 又は分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*)）等の低級真核細胞である。ピキア・パストリス種は好ましい。ピキア・パストリス系統の例は、X33、GS115、KM71、KM71H及びCBS7435である。

【0062】

実施形態では、真核細胞は、真菌細胞（例えばコウジカビ菌種 (*Aspergillus* sp.)（クロコウジカビ (*A. niger*)、アスペルギルス・フミガータス (*A. fumigatus*)、ニホンコウジカビ (*A. oryzae*)、偽巢性コウジ菌 (*A. nidulans*) 等）、アクレモニウム菌種 (*Acremonium* sp.)（アクレモニウム・サーモフィラム (*A. thermophilum*) 等）、ケタマカビ菌種 (*Chaetomium* sp.)（ケトミウム・サーモフィラム (*C. thermophilum*) 等）、クリソスポリウム菌種 (*Chrysosporium* sp.)（クリソスポリウム・サーモフィラム (*C. thermophilum*) 等）、冬虫夏草菌種 (*Cordyceps* sp.)（サナギタケ (*C. militaris*) 等）、コリナスカス菌種 (*Corynascus* sp.)、クテノマイセス菌種 (*Ctenomyces* sp.)、フサリウム菌種 (*Fusarium* sp.)（フサリウム・オキシスポラム (*F. oxysporum*) 等）、グロメラ菌種 (*Glomerella* sp.)（イネ科炭疽病菌 (*G. graminicola*) 等）、ボタンタケ菌種 (*Hypocrea* sp.)（ハイボクレア・ジェコリーナ (*H. jecorina*) 等）、マグナポルテ菌種 (*Magnaporthe* sp.)（イモチ病菌 (*M. oryzae*) 等）、マイセリオフトーラ菌種 (*Myceliophthora* sp.)（マイセリオフトーラ・サーモフィル (*M. thermophile*) 等）、アカツブタケ菌種 (*Nectria* sp.)（ネクトリア・ヘマトコッカ (*N. heamatococca*) 等）、アカパンカビ菌種 (*Neurospora* sp.)（アカパンカビ (*N. crassa*) 等）、アオカビ菌種 (*Penicillium* sp.)、スポロトリクム菌種 (*Sporotrichum* sp.)（スポロトリクム・サーモフィル (*S. thermophile*) 等）、ティエラビア菌種 (*Thielavia* sp.)（ティエラビア・テレス

トリス (*T. terrestris*)、ティエラビア・ヘテロタリカ (*T. heterothallica*) 等)、トリコデルマ菌種 (*Trichoderma* sp.) (トリコデルマ・リーセイ (*T. reesei*) 等) 又はバーティシリウム菌種 (*Verticillium* sp.) (バーティシリウム・ダリエ (*V. dahliae*) 等)) である。

【0063】

実施形態では、真核細胞は、昆虫細胞 (例えば Sf9、ミミック (*Mimic*) (商標) Sf9、Sf21、ハイファイブ (*High Five*) (商標) (BT1-TN-5B1-4) 又は BT1-Ea88 細胞)、藻類細胞 (例えばアンフォラ属種 (*Amphora* sp.)、珪藻類の属種 (*Bacillariophyceae* sp.)、ドナリエラ属種 (*Dunaliella* sp.)、クロレラ属種 (*Chlorella* sp.)、コナミドリムシ属種 (*Chlamydomonas* sp.)、藍藻類の属種 (*Cyanophyta* sp.) (シアノバクテリア)、ナンノクロロプシス属種 (*Nannochloropsis* sp.)、スピルリナ属種 (*Spirulina* sp.) 又はオクロモナス属種 (*Ochromonas* sp.) の細胞) 又は植物細胞 (例えば単子葉植物 (例えばトウモロコシ、イネ、コムギ又はエノコログサ種 (*Setaria* sp.)) から、又は双子葉植物 (例えばキャッサバ、ジャガイモ、ダイズ、トマト、タバコ、アルファルファ、ニセツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*) 又はシロイヌナズナ種 (*Arabidopsis* sp.)) からの細胞) である。

【0064】

実施形態では、細胞は、細菌又は原核細胞である。

【0065】

実施形態では、原核細胞は、桿菌種 (*Bacillus* sp.)、ストレプトマイセス種 (*Streptomyces* sp.)、連鎖状球菌種 (*Streptococcus* sp.)、ブドウ球菌種 (*Staphylococcus* sp.) 又は乳酸桿菌種 (*Lactobacillus* sp.) 等のグラム陽性細胞である。使用され得る桿菌種は、例えば枯草菌 (*B. subtilis*)、バチルス・アミロリケファシエンス (*B. amyloliquefaciens*)、バチルス・リケニホルミス (*B. licheniformis*)、納豆菌 (*B. natto*) 又は巨大菌 (*B. megaterium*) である。実施形態では、細胞は、枯草菌 3NA 及び枯草菌 168 等の枯草菌である。桿菌種は、例えば *Bacillus Genetic Stock Center*、*Biological Sciences* 556、484 West 12th Avenue、Columbus OH 43210-1214 から得ることができる。

【0066】

実施形態では、原核細胞は、サルモネラ菌種 (*Salmonella* sp.) 又は大腸菌 (*Escherichia coli*) 等のグラム陰性細胞、例えば TG1、TG2、W3110、DH1、DHB4、DH5a、HMS174、HMS174 (DE3)、NM533、C600、HB101、JM109、MC4100、XL1-Blue 及び *Origami* 等、並びに大腸菌 B 系統由来のもの、例えば BL-21 又は BL21 (DE3) 若しくは BL21 (DE3) pLysS 等であり、それらの全ては市販されている。

【0067】

好適な宿主細胞は、例えば、DSMZ (*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen and Zellkulturen GmbH*、Braunschweig、Germany) 又は ATCC (米国培養細胞系統保存機関 (*American Type Culture Collection*)) 等の微生物株保存機関から市販されている。

【0068】

実施形態では、細胞は、異種の核酸、例えば、組換えポリペプチド、例えば表 5~8 から選択される組換えポリペプチドをコードする対象核酸を含む本明細書で説明される細胞のうちの任意の 1 つである。

【0069】

本明細書で説明される細胞は、当該技術分野で公知の任意の方法に従って培養され得る。一部の実施形態では、培養培地は、アミノ酸（例えば表1に列挙されるアミノ酸のうちの1つ又は複数）を欠く。実施形態では、培養培地は、細胞が対象核酸を取り込んだ場合生合成が救済され得るアミノ酸を欠く。実施形態では、細胞培養は、回分培養、流加回分培養、簡易的流加回分過剰成長（a F O G）、ドロー・アンド・フィル培養又は連続培養として行われる。一実施形態では、細胞培養は、懸濁培養である。一実施形態では、細胞又は細胞培養物は、組換えポリペプチドの発現のために *in vivo* に置かれ、例えばモデル生物又はヒト対象に置かれる。

【0070】

一実施形態では、培養培地は、血清を含まない。血清非含有、タンパク質非含有及び既知組成動物成分非含有（C D A C F : c h e m i c a l l y - d e f i n e d a n i m a l c o m p o n e n t - f r e e）培地は、例えば Lonza Biologics から市販されている。

【0071】

一部の実施形態では、脂質添加物（例えばコレステロール、オレイン酸、リノール酸又はこれらの組合せを含む）は、培養培地に添加され得る。

【0072】

哺乳動物細胞株のための好適な培地及び培養法は、例えば米国特許第5633162号で説明されるように、当該技術分野で周知である。研究用フラスコ又は低密度細胞培養のための、且つ特定の細胞種の要求に適合させた標準の細胞培養培地の例は、例えばロズウェルパーク記念研究所（RPMI : R o s w e l l P a r k M e m o r i a l I n s t i t u t e）1640培地（Morre, G.、The Journal of the American Medical Association、199、519ページ f f . 1967）、L-15培地（Leibovitz, A. ら、Amer. J. of Hygiene、78、1ページ 173 f f .、1963）、ダルベッコ改変イーグル培地（DMEM : D u l b e c c o ' s m o d i f i e d E a g l e ' s m e d i u m）、イーグル最小必須培地（MEM : E a g l e ' s m i n i m a l e s s e n t i a l m e d i u m）、ハムF12培地（Ham, R. ら、Proc. Natl. Acad. S c . 53、288ページ f f . 1965）又はアルブミン、トランスフェリン及びレシチン非含有イスコフ改変DMEM（I s c o v e s ら、J. Exp. med. 1、923ページ f f .、1978）である。例えば、ハムF10又はF12培地は、CHO細胞培養のために特別に設計された。CHO細胞培養に特別に適合された他の培地は、EP-481791で説明されている。そのような培養培地は、ウシ胎児血清（FBS（f e t a l b o v i n e s e r u m））、ウシ胎児血清FCS（f e t a l c a l f s e r u m）とも呼ばれる）を補充してもよく、ウシ胎児血清は、過剰のホルモン及び成長因子の天然供給源を提供することが公知である。哺乳動物細胞の細胞培養は、今日、科学教本及びマニュアルにおいて十分に説明されているルーチン作業であり、それは、例えば、R . I a n F r e s n e y、C u l t u r e o f A n i m a l c e l l s , a m a n u a l、第4版、Wiley-Liss/N. Y.、2000で詳細に扱われている。本明細書で説明される細胞培養培地のうちのいずれかは、特定のアミノ酸（例えば表1に列挙されるアミノ酸）、例えば細胞が対象核酸を取り込んだ場合生合成が救済され得るアミノ酸を欠くように調合され得る。

【0073】

他の好適な培養法は、当業者に公知であり、組換えポリペプチド生成物及び利用される宿主細胞に依存し得る。細胞によって発現される組換えポリペプチド又は治療用ポリペプチドの発現及び産生に好適な条件を決定又は最適化することは、当業者の技術の範囲内である。

【0074】

所望のポリペプチド又はタンパク質を発現するように細胞を遺伝子改変又は遺伝子操作す

10

20

30

40

50

るための方法は、当該技術分野で周知であり、例えば、例えば核酸、例えばベクターの細胞へのトランスフェクション、形質導入（例えばウイルス形質導入）又はエレクトロポレーションを含む。核酸、例えば本明細書で説明される異種の核酸又はベクターを宿主細胞に導入するための物理的方法の例には、リン酸カルシウム沈殿、リポフェクション、微粒子銃、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション等が含まれるが、これらに限定されない。ベクター及び／又は外因性核酸を含む細胞を産生するための方法は、当該技術分野で周知である。例えば Sambrookら、2012、MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL、1～4巻、Cold Spring Harbor Press、NY）を参照されたい。核酸、例えば本明細書で説明される異種の核酸又はベクターを宿主細胞に導入するための化学的手段の例には、高分子複合体等のコロイド分散系；ナノカプセル；ミクロスフェア；ビーズ；及び水中油エマルション、ミセル、混合ミセル及びリポソームを含む脂質ベース系が含まれるが、これらに限定されない。in vitro及びin vivoでの送達媒体としての使用のための例示的なコロイド系は、リポソーム（例えば人工膜小胞）である。ターゲティングナノ粒子又は他の好適なミクロン以下の大きさの送達系によるポリヌクレオチドの送達等の最先端の核酸ターゲティング送達の他の方法が、使用可能である。

【0075】

核酸

本明細書で説明される生成物、例えば組換えポリペプチドをコードする核酸、例えば対象核酸も、本明細書で提供される。所望の組換えポリペプチドをコードする核酸配列は、標準の技法を使用して、例えば所望の核酸配列、例えば遺伝子を発現する細胞からのライブラリーをスクリーニングすることによる、所望の核酸配列を含むことが公知のベクターから核酸配列を派生させることによる、又は所望の核酸配列を含有する細胞及び組織から直接単離することによる等の当該技術分野で公知の組換え法を使用して、得ることができる。或いは、組換えポリペプチドをコードする核酸は、クローニングではなく、合成で産生され得る。組換えDNA技法及び技術は、当該技術分野で高度に進行しており、十分に確立されている。したがって、本明細書で説明される組換えポリペプチドのアミノ酸配列を知っている当業者は、組換えポリペプチドをコードし得る核酸配列を容易に想起又は生成し得る。

【0076】

組換えポリペプチドの発現は典型的に、組換えポリペプチド又はその部分をコードする核酸をプロモーターに作動可能に連結し、構築物を発現ベクターに組み込むことによって達成される。ベクターは、真核生物又は原核生物での複製及び統合に好適であり得る。典型的なクローニングベクターは、所望の核酸配列の発現の調節に有用な転写及び翻訳ターミネーター、開始配列並びにプロモーター等の他の調節エレメントを含有する。

【0077】

実施形態では、生成物、例えば異種の治療用ポリペプチドは、多数のポリペプチド鎖、例えば重鎖及び軽鎖を含む抗体又は抗体断片を含む。多数のポリペプチド鎖をコードする核酸配列は、ともに配置されてもよく（例えば、配列をコードする各ポリペプチド鎖が同じ核酸に配置されている）、別々に配置されてもよい（例えば、配列をコードする各ポリペプチド鎖が異なる核酸に配置されている）。多数のポリペプチド鎖を含む異種の治療用ポリペプチドをコードする配列は、単一の制御エレメント、例えば第1の制御エレメントに作動可能に連結されてもよく、別個の別々の制御エレメントに作動可能に連結されてもよい（例えば、配列をコードする各ポリペプチド鎖が、それ自体の第1の制御エレメントに作動可能に連結されている）。多数のポリペプチド鎖を含む異種の治療用ポリペプチドをコードする配列が別個の別々の制御エレメントに作動可能に連結されている一実施形態では、制御エレメントのうちの1つ又は複数（例えば1、2、3、4、5、6つ又は全て）は、第1の条件下での第1のレベルの活性及び第2の条件下での第2のレベルの活性を有する場合があり、制御エレメントのうちの1つ又は複数（例えば1、2、3、4、5、6つ又はそれよりも多く）は、構成的であり得る。

【0078】

組換えポリペプチドをコードする核酸配列は、いくつかの種類のベクターにクローニングすることができる。例えば、核酸は、非限定的にプラスミド、ファージミド、ファージ誘導体、動物ウイルス及びコスミドを含むベクターにクローニングされ得る。特定の目的のベクターは、発現ベクター、複製ベクター、プローブ生成ベクター及びシークエンシングベクターを含む。実施形態では、発現ベクターは、ウイルスベクターの形態で細胞に提供され得る。ウイルスベクター技術は、当該技術分野で周知であり、例えば Sambrook 等、2012、MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL、1~4巻、Cold Spring Harbor Press、NY並びに他のウイルス学及び分子生物学マニュアルにおいて説明されている。ベクターとして有用なウイルスには、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス及びレンチウイルスが含まれるが、これらに限定されない。一般に、好適なベクターは、少なくとも1つの生物において機能的な複製起点、プロモーターエレメントと任意選択でエンハンサーエレメントとを含む制御エレメント、便利な制限エンドヌクレアーゼ部位及び1つ又は複数の選択可能マーカーを含有する（例えば国際公開第01/96584号、同第01/29058号及び米国特許第6326193号）。ウイルス由来のベクターは導入遺伝子の長期安定統合及び娘細胞におけるその成長を可能にするので、ウイルス由来のベクターは長期遺伝子移行を達成するために好適なツールである。

10

【0079】

また、ベクターは、例えば分泌を促進するシグナル配列、ポリアデニル化シグナル及び転写ターミネーター（例えばウシ成長ホルモン（BGH: Bovine Growth Hormone）遺伝子から）、エピソーム複製及び原核生物における複製を可能にするエレメント（例えばSV40起点及びColE1又は当該技術分野で公知のその他のもの）並びに／又は選択を可能にするエレメント、例えば選択マーカー若しくはレポーター遺伝子を含んでもよい。

20

【0080】

企図されるベクターは、ポリペプチド、例えば外因性治療用ポリペプチド又はリプレッサーポリペプチドをコードする配列を挿入するために好適な挿入部位を含み得る。

【0081】

挿入部位は、制限エンドヌクレアーゼ部位を含み得る。

30

【0082】

挿入部位は、組換え標的部位を含む場合があり、組換え標的部位は、ポリペプチド、例えば外因性治療用ポリペプチド又はリプレッサーポリペプチドをコードする配列に隣接する。一実施形態では、組換え標的部位は、lox部位である。組換え標的部位がlox部位である場合、宿主細胞は、乗換え又は組換え事象を達成するためにCreリコンビナーゼの存在及び発現を必要とする。

【0083】

実施形態では、本明細書で説明される生成物、例えばポリペプチド、例えば組換えポリペプチドをコードする核酸配列を含むベクターは、選択マーカーをコードする核酸配列をさらに含む。実施形態では、選択マーカーは、グルタミンシンテターゼ（GS）；ジヒドロ葉酸レダクターゼ（DHFR: dihydrofolate reductase）、例えばメトトレキサート（MTX: methotrexate）に対する抵抗性を与える酵素；プロリン；又は抗生物質マーカー、例えばハイグロマイシン、ネオマイシン（G418）、ゼオシン、ピューロマイシン又はブラストサイジン等の抗生物質に対する抵抗性を与える酵素を含む。実施形態では、選択マーカーは、セレキシス（Selexis）選択系（例えばSelexis SAから市販されているシュアテクノロジープラットフォーム（SURE technology Platform）（商標）及びセレキシスジェネティックエレメント（Selexis Genetic Elements）（商標））又はカタラント（Catalant）選択系を含むか、又はこれらと適合性である。

40

【0084】

50

実施形態では、本明細書で説明される組換え生成物をコードする核酸配列を含むベクターは、本明細書で説明される組換え生成物をコードする核酸を含む細胞（単数又は複数）の特定において有用な選択マーカーを含む。別の実施形態では、選択マーカーは、本明細書で説明される通り、組換え生成物をコードする核酸配列のゲノムへの統合を含む細胞（単数又は複数）の特定において有用である。組換えタンパク質をコードする核酸配列を統合した細胞（単数又は複数）の特定は、生成物を安定に発現する細胞又は細胞株の選択及び操作に有用であり得る。

【0085】

生成物

高収率の生成物、例えばポリペプチド、例えば治療用ポリペプチドを産生することができる細胞又は細胞株を特定、選択又は培養するための組成物及び方法が、本明細書で提供される。本開示により包含される生成物には、例えば細胞における発現によって産生される分子、核酸（例えば非コード核酸、例えば非コードRNA分子、例えばアンチセンスRNA、siRNA、tRNA、リボソームRNA、マイクロRNA、piRNA、snRNA、snRNA、exRNA、scarRNA又は長鎖非コードRNA、例えばイグジスト（Xist）又はホットエア（HOTAIR））、ポリペプチド（例えば組換えポリペプチド及び／又は治療用ポリペプチド）又はそれらのハイブリッドが含まれるが、これらに限定されない。一部の実施形態では、細胞は、生成物を産生するように操作又は改変される。そのような改変は、生成物の産生を制御するか、又はもたらす分子の導入を含む。例えば、細胞は、ポリペプチド、例えば組換えポリペプチドをコードする異種の核酸を導入することによって改変され、細胞は、ポリペプチド、例えば組換えポリペプチドの産生、例えば発現及び分泌に好適な条件下で培養される。別の例では、細胞が、例えば非改変細胞で内因的に産生されるレベル又は量より高レベル又はより高い量のポリペプチドを産生するように、細胞は、細胞によって内因的に発現されるポリペプチドの発現を制御する、例えば増大させる異種の核酸を導入することによって改変される。実施形態では、本明細書で説明される方法によって特定、選択又は生成される細胞又は細胞株は、健康状態、障害又は疾患の治療において有用な生成物、例えば組換えポリペプチドを産生する。健康状態、障害又は疾患の例には、代謝疾患又は障害（例えば代謝酵素欠陥）、内分泌障害（例えばホルモン欠陥）、止血、血栓症、造血障害、肺障害、胃腸障害、免疫調節（例えば免疫欠陥）、不妊症、移植、がん及び感染性疾患が含まれるが、これらに限定されない。

【0086】

ポリペプチド

一部の実施形態では、生成物は、ポリペプチド、例えば組換えポリペプチドである。ポリペプチド生成物は、一部の実施形態では、本明細書で説明される組成物（例えば細胞）及び方法のうちのいずれかにおいて使用され得る。一部の実施形態では、ポリペプチドは、例えば本明細書で説明される通り、例えば酵素分子の、阻害剤を含む培地において成長した細胞によって産生される。一部の実施形態では、ポリペプチドは、例えば本明細書で説明される通り、LMMを含む細胞によって産生される。実施形態では、LMMは、例えば本明細書で説明される通り、プロモーターの制御下で発現される。一部の実施形態では、ポリペプチドは、例えば本明細書で説明される通り、LMMを含む培地において成長した細胞によって産生される。

【0087】

実施形態では、ポリペプチドは、異種のポリペプチド、例えば異種のタンパク質、例えば細胞によって天然に発現されないタンパク質である。ポリペプチドは、例えば薬物スクリーニングに有用な、治療用タンパク質又は診断用タンパク質であり得る。治療用タンパク質又は診断用タンパク質は、抗体分子、例えば抗体若しくは抗体断片、融合タンパク質、ホルモン、サイトカイン、成長因子、酵素、糖タンパク質、リボタンパク質、レポータータンパク質、治療用ペプチド、アプタマー又は構造的断片及び／若しくは機能的断片、又はこれらのうちのいずれかのハイブリッドであり得る。実施形態では、生成物、例えば異種の治療用ポリペプチドは、多数のポリペプチド鎖、例えば重鎖及び軽鎖を含む抗体又は

抗体断片を含む。

【0088】

一部の実施形態では、生成物、例えば組換えポリペプチドは、抗体分子である。本明細書に包含される生成物は、画像化技法に有用な診断用抗体分子、例えばモノクローナル抗体又はその抗体断片、及び例えば疾患又は障害の治療に有用な、対象への投与に好適な治療用抗体分子である。抗体分子は、抗原に特異的に結合する免疫グロブリン分子に由来するタンパク質又はポリペプチド配列である。一実施形態では、抗体分子は、全長抗体又は抗体断片である。抗体及び多様式タンパク質は、ポリクローナル若しくはモノクローナル、多数鎖若しくは単鎖又はインタクトな免疫グロブリンであってもよく、天然供給源に由来しても、組換え供給源に由来してもよい。抗体は、免疫グロブリン分子の四量体であり得る。一実施形態では、抗体は、モノクローナル抗体である。抗体は、ヒト又はヒト化抗体であり得る。一実施形態では、抗体は、IgA、IgG、IgD又はIgE抗体である。一実施形態では、抗体は、IgG1、IgG2、IgG3又はIgG4抗体である。

【0089】

「抗体断片」とは、インタクトな抗体の少なくとも一部分、又はその組換えバリエーションを指し、抗体断片の、抗原等の標的についての認識及び特異的結合を与えるために十分な、インタクトな抗体の抗原結合ドメイン、例えば抗原決定可変領域を指す。抗体断片の例には、Fab、Fab'、F(ab')₂及びFv断片、scFv抗体断片、直鎖抗体、sdAb（VL又はVHのいずれか）等のシングルドメイン抗体、ラクダ類VHHドメイン、及びヒンジ領域でジスルフィド架橋によって連結された2つのFab断片を含む二価断片等の抗体断片から形成された多特異的抗体、並びに抗体の単離されたCDR又は他のエпитープ結合断片が含まれるが、これらに限定されない。また、抗原結合断片は、シングルドメイン抗体、マキシボディ、ミニボディ、ナノボディ、細胞内抗体、二重特異性抗体、三重特異性抗体、四重特異性抗体、v-NAR及びビス-scFvに組み込まれ得る（例えばHollinger及びHudson、Nature Biotechnology 23:1126~1136、2005を参照のこと）。また、抗原結合断片は、フィブロネクチンIII型（Fn3）等のポリペプチドに基づくスキャフォールドにグラフト化され得る（フィブロネクチンポリペプチドミニボディを説明している米国特許第6703199号を参照のこと）。

【0090】

実施形態では、ポリペプチド（例えば細胞によって産生されるポリペプチド及び／又は本明細書で説明される方法に従って産生されるポリペプチド）は、例えばボトックス（BOTOX）、マイオブロック（Myobloc）、ニューロブロック（Neurobloc）、ディスポート（Dysport）（又はボツリヌス神経毒の他の血清型）、アルグルコシダーゼアルファ、ダプトマイシン、YH-16、絨毛性ゴナドトロピンアルファ、フィルグラスチム、セトロレリクス、インターロイキン-2、アルデスロイキン、テセロイキン（teceleulin）、デニロイキンジフチトクス、インターフェロンアルファ-n3（注射）、インターフェロンアルファ-n1、DL-8234、インターフェロン、サントリー（Suntory）（ガンマー1a）、インターフェロンガンマ、チモシンアルファ1、タソネルミン、ディジファブ（Digifab）、ビペラタブ（Viperatab）、エチタブ（Echitab）、クロファブ（Crofab）、ネシリチド、アバタセプト、アレファセプト、レビフ（Rebif）、エプトテルミンアルファ、テリパラチド、カルシトニン、エタネルセプト、ヘモグロビングルタマー250（ウシ）、ドロトレコギンアルファ、コラゲナーゼ、カルペリチド、組換えヒト上皮成長因子、DWP401、ダルベポエチンアルファ、エポエチンオメガ、エポエチンベータ、エポエチンアルファ、デシルジン、レピルジン、ビバリルジン、ノナコグアルファ、モノナイン（Mononine）、エプタコグアルファ（活性化）、組換え第VIIII因子+VWF、リコネイト（Recombine）、組換え第VIIII因子、第VIIII因子（組換え）、アルファネート（Alphnmate）、オクトコグアルファ（octocogal pha）、第VIIII因子、パリフェルミン、インジキナーゼ（Indikinas）

、テネクテブラーゼ、アルテブラーゼ、パミテブラーゼ、レテブラーゼ、ナテブラーゼ、モンテブラーゼ、フォリトロピンアルファ、rFSH、hpFSH、ミカファンギン、ペグフィルグラスチム、レノグラスチム、ナルトグラスチム、セルモレリン、グルカゴン、エキセナチド、プラムリンチド、イミグルセラーゼ (iniglucerase)、ガルスルファーゼ、リユーコトロピン (Leucotropin)、モルグラモスチム (molgramostirn)、トリプトレリンアセテート、ヒストレリン (ヒドロ (Hydron))、デスロレリン、ヒストレリン、ナファレリン、ロイプロリド (アトリゲル (ATRIGEL))、ロイプロリド (デュロス (DUROS))、ゴセレリン、ユートロピン (Eutropin)、ソマトロピン、メカセルミン、エンフビルチド (enlfavirtide)、Org-33408、インスリングラルギン、インスリングルリジン、インスリン (吸入型)、インスリンリスプロ、インスリンデテミル (determir)、インスリン (ラピッドミスト (RapidMist))、メカセルミンリンファベート、アナキンラ、セレモロイキン、99mTc-アプシタイド、ミエロピド、ベタセロン (Betaseron)、グラチラマーアセテート、ジェポン (Gepon)、サルグラモスチム、オブレルベキン、ヒト白血球由来アルファインターフェロン、ビリブ (Bilive)、インスリン (組換え)、組換えヒトインスリン、インスリンアスパルト、メカセルミン (mecasenin)、ロフェロン (Roferon) - A、インターフェロン-アルファ2、アルファフェロン (Alfaferone)、インターフェロンアルファコン-1、インターフェロンアルファ、アボネックス (Avonex) 組換えヒト黄体形成ホルモン、ドルナーゼアルファ、トラフェルミン、ジコノチド、タルチレリン、ジボテルミンアルファ、アトシバン、ベカプレルミン、エプチフィバチド、ゼマイラ (Zemaira)、CTC-111、シャンバック (Shanvac) - B、オクトレオチド、ランレオチド、アンセスチム (ancestirn)、アガルシダーゼベータ、アガルシダーゼアルファ、ラロニダーゼ、プレザチド (prezotide) 酢酸銅、ラスブリカーゼ、ラニビズマブ、アクティミューン (Actimmune)、ペグイントロン (PEG-Intron)、トリコミン (Tricomine)、組換えヒト副甲状腺ホルモン (PTH: parathyroid hormone) 1~84、エポエチンデルタ、トランスジェニックアンチトロピンIII、グランディトロピン (Granditropin)、ビトラーゼ (Vitraser)、組換えインスリン、インターフェロン-アルファ、GEM-21S、バプレオチド、イデュルスルファーゼ、オマパトリラト (omnapatrilat)、組換え血清アルブミン、セルトリズマブベゴル、グルカルピダーゼ、ヒト組換えC1エステラーゼ阻害剤、ラノテブラーゼ、組換えヒト成長ホルモン、エンフビルチド、VGV-1、インターフェロン (アルファ)、ルシナクタント、アビプタジル、イカチバント、エカランチド、オミガナン、オーログラブ (Aurograb)、ペキシガナンアセテート、ADI-PEG-20、LDI-200、デガレリクス、シントレデキンベスドトクス (cintredelinsbesudotox)、ファブイド (Favld)、MDX-1379、ISAtx-247、リラグルチド、テリパラチド、チファコギン、AA4500、T4N5リポソームローション、カツマキソマブ、DWP413、ART-123、クリサリン (Chrysalin)、デスモテブラーゼ、アメジブラーゼ (amediplase)、コリフォリトロピンアルファ、TH-9507、デデュグルチド、ダイアミド (Diamyd)、DWP-412、成長ホルモン、組換えG-CSF、インスリン、インスリン (テクノスフィア (Technosphere))、インスリン (AERx)、RGN-303、ディアペップ (DiaPep) 277、インターフェロンベータ、インターフェロンアルファ-n3、ベラタセプト、経皮インスリンパッチ、AMG-531、MBP-8298、ゼレセプト (Xerecept)、オペバカン (opebacan)、エイズバックス (AIDSVAX)、GV-1001、リンフォスキャン (LymphoScan)、ランピルナーゼ、リボキシサン (Lipoxysan)、ルスブルチド、MP52、シプロイセル-T、CTP-37、インセジア (Insegia)、ビテスペン、ヒトトロピン、トロピン、トランスミド (TransMID)、アルフィメブラーゼ (alfimeprase)、プリカーゼ (Purica

10

20

30

40

50

se)、テルリプレシン、EUR-1008M、組換えFGF-I、BDM-E、ロチガ
 プチド、ETC-216、P-113、MBI-594AN、デュラマイシン、SCV-
 07、OPI-45、エンドスタチン(Endostatin)、アンギオスタチン(A
 ngiostatine)、ABT-510、ボーマン・バーク(Bowman Birk
)型阻害剤、XMP-629、99mTc-Hynic-アネキシン(Annexin)
 V、カハラリドF、CTCE-9908、テベレリックス(teverelix)、オザ
 レリックス、ロミデプシン(rornidepsin)、BAY-504798、インタ
 ーロイキン4、PRX-321、ペプスキャン(Pepscan)、イボクタデキン、r
 hラクトフェリン、TRU-015、IL-21、ATN-161、シレンジタイド、ア
 ルブフェロン(Albiferon)、バイファシックス(Biphaxis)、IRX
 -2、オメガインターフェロン、PCK-3145、CAP-232、パシレオチド、h
 uN901-DMI、SB-249553、オンコバックス(Oncovax)-CL、
 オンコバックス-P、BLP-25、サーバックス(Cervax)-16、マート(M
 ART)-1、gp100、チロシナーゼ、ネミフィチド、rAAT、CGRP、ペグス
 ネルセプト、チモシンベータ4、プリチデプシン(plitidepsin)、GTP-
 200、ラモプラニン、グラスパ(GRASPA)、OBI-1、AC-100、サケカ
 ルシトニン(エリゲン(eligen))、エキサモレリン(examorelin)、
 カプロモレリン(capromorelin)、カルデバ(Cardeva)、ベラフェ
 ルミン、131I-TM-601、KK-220、T-10、ウラリチド、デペレスタッ
 ト(depelestat)、ヘマタイド、クリサリン、rNAPc2、組換え第VII
 I因子(PEG化リポソーム)、bFGF、PEG化組換えスタフィロキナーゼバリアン
 ト、V-10153、ソノリシスプロライズ(SonoLysis Prolyse)、
 ニューロバックス(NeuroVax)、CZEN-002、rGLP-1、BIM-5
 1077、LY-548806、エキセナチド(制御放出、メディソープ(Medis
 orb))、AVE-0010、GA-GCB、アボレリン(avorelin)、ACM
 -9604、リナクロチドアセテート、CETi-1、ヘモスパン(Hemospan)
 、VAL、速効性インスリン(注射用、ヴィアデル(Viadell))、インスリン(エ
 リゲン)、組換えメチオニルヒトレプチン、ピトラキンラ、マルチカイン(Multik
 ine)、RG-1068、MM-093、NBI-6024、AT-001、PI-0
 824、Org-39141、Cpn10、タラクトフェリン(talactoferr
 in)、rEV-131、rEV-131、組換えヒトインスリン、RPI-78M、オ
 プレルベキン、CYT-99007、CTLA4-Ig、DTY-001、バラテグラ
 スト(valategrast)、インターフェロンアルファ-n3、IRX-3、RDP
 -58、タウフェロン(Tauferon)、胆汁酸塩刺激リパーゼ、メリスパーゼ(M
 erispase)、アルカリフォスファターゼ(alaline phosphata
 se)、EP-2104R、メラノタン(Melanotan)-II、ブレメラノチド
 (bremelanotide)、ATL-104、組換えヒトマイクログラスミン、A
 X-200、セマックス(SEMAX)、ACV-1、Xen-2174、CJC-10
 08、ダイノルフィンA、SI-6603、LAB GHRH、AER-002、BGC
 -728、ALTU-135、組換えノイラミニダーゼ、Vacc-5q、Vacc-4
 x、Tatトキシド、YSPSL、CHS-13340、PTH(1~34)(Nov
 asome)、オスタボリン(Ostabolin)-C、PTHアナログ、MBRI-
 93.02、MTB72F、MVA-Ag85A、FARA04、BA-210、組換え
 ペストFIV、AG-702、OxSODrol、rBetV1、Der-p1/Der
 -p2/Der-p7、PR1ペプチド抗原、変異体rasワクチン、HPV-16 E
 7リポペプチドワクチン、ラビリンチン(labyrinthin)、WT1-ペプチド
 、IDD-5、CDX-110、ペントリス(Pentrys)、ノレリン(Norel
 in)、サイトファブ(CytoFab)、P-9808、VT-111、イクロカプチ
 ド(icrocaptide)、テルベルミン(telbermin)、ルピントリビル
 、レティキュロース(reticulose)、rGRF、HA、アルファ-ガラクトシ

10

20

30

40

50

ダーゼA、ACE-011、ALTU-140、CGX-1160、アンギオテンシン、D-4F、ETC-642、APP-018、rhMBL、SCV-07、DRF-7295、ABT-828、ErbB2-特異的免疫毒素、DT3SSIL-3、TST-10088、PRO-1762、コンボトックス(Combotox)、コレシストキニン-B/ガストリン受容体結合ペプチド、111In-hEGF、AE-37、トラスツズマブ(trasnizumab)-DM1、アンタゴニストG、IL-12、PM-02734、IMP-321、rhIGF-BP3、BLX-883、CUV-1647、L-19ベースのra、Re-188-P-2045、AMG-386、DC/1540/KLH、VX-001、AVE-9633、AC-9301、NY-ESO-1(ペプチド)、NA17、A2ペプチド、CBP-501、組換えヒトラクトフェリン、FX-06、AP-214、WAP-8294A、ACP-HIP、SUN-11031、ペプチドYY[3~36]、FGLL、アタシセプト、BR3-Fc、BN-003、BA-058、ヒト副甲状腺ホルモン1~34、F-18-CCR1、AT-1100、JPD-003、PTH(7~34)(Novasome)、デュラマイシン、CAB-2、CTCE-0214、GlycoPEG化エリスロポエチン、EPO-Fc、CNTO-528、AMG-114、JR-013、第XIII因子、アミノカンジン(aminocandin)、PN-951、716155、SUN-E7001、TH-0318、BAY-73-7977、テベレリックス、EP-51216、hGH、OGP-I、シフビルチド、TV4710、ALG-889、Org-41259、rhCC10、F-991、チモペンチン、r(m)CRP、肝選択的インスリン、スバリン(subalin)、L19-IL-2融合タンパク質、エラフィン、NMK-150、ALTU-139、EN-122004、rhTPO、トロンボポエチン受容体アゴニスト、AL-108、AL-208、神経成長因子アンタゴニスト、SLV-317、CGX-1007、INNO-105、テリパラチド(エリゲン)、GEM-OS1、AC-162352、PRX-302、LFn-p24融合、EP-1043、gpE1、gpE2、MF-59、hPTH(1~34)、768974、SYN-101、PGN-0052、アビスクミン(aviscumnine)、BIM-23190、多エピトープチロシナーゼペプチド、エンカstim(enkastim)、APC-8024、GI-5005、ACC-001、TTS-CD3、血管ターゲティングTNF、デスモプレシン、オネルセプト(onercept)及びTP-9201である。

【0091】

一部の実施形態では、ポリペプチド(例えば細胞によって産生されるポリペプチド及び/又は本明細書で説明される方法に従って産生されるポリペプチド)は、アダリムマブ(ヒュミラ(HUMIRA))、インフリキシマブ(レミケード(REMICADE)(商標))、リツキシマブ(リツキサン(RITUXAN)(商標)/マブセラ(MAB THERA)(商標))、エタネルセプト(エンブレル(ENBREL)(商標))、ペバシズマブ(アバスタチン(AVASTIN)(商標))、トラスツズマブ(ハーセプチン(HERCEPTIN)(商標))、ペグフィルグラスチム(pegrilgrastim)(ニューラスト(NEULASTA)(商標))又はバイオ後続品及びバイオ改良品を含む他の任意の好適なポリペプチドである。

【0092】

他の好適なポリペプチド(例えば細胞によって産生されるポリペプチド及び/又は本明細書で説明される方法に従って産生されるポリペプチド)には、以下の表5及び米国特許出願公開第2016/0097074号の表1に列挙されるポリペプチドが含まれるが、これらに限定されない。

【0093】

10

20

30

40

50

【表 5】

表5. 例示的なポリペプチド

タンパク質生成物	参照列举される薬物
インターフェロンガンマ-1b	アクティミューン(登録商標)
アルテプララーゼ;組織プラスミノーゲン アクチベーター	アクチバーゼ(Activase)(登録商 標)/キャトフロ(Cathflo)(登録商 標)
組換え抗血友病因子	アドベイト(Advate)
ヒトアルブミン	アルブテイン(Albutein)(登録商標)
ラロニダーゼ	アルデュラザイム (Aldurazyme)(登録商標)
インターフェロンアルファ-N3,ヒト白 血球由来	アルフェロン N(Alferon N)(登録 商標)
ヒト抗血友病因子	アルファネート(Alphanate)(登録 商標)
ウイルス濾過済みヒト第 IX 凝固因子	アルファナイン(AlphaNine)(登録 商標)SD
アレファセプト;組換え二量体融合タン パク質 LFA3-Ig	アメビブ(Amevive)(登録商標)
ビバリルジン	アンジオマックス(Angiomax)(登 録商標)
ダルベポエチンアルファ	アラネस्प(Aranesp)(商標)
ベバシズマブ	アバスチン(商標)
インターフェロンベータ-1a;組換え	アボネックス(Avonex)(登録商標)
第 IX 凝固因子	ベネフィックス(BeneFix)(商標)
インターフェロンベータ-1b	ベタセロン(Betaseron)(登録商標)
トシツモマブ	ベキサール(BEXXAR)(登録商標)
抗血友病因子	バイオクレート(Bioclate)(商標)
ヒト成長ホルモン	バイオトロピン(BioTropin)(商標)
ボツリヌス毒素 A 型	ボトックス(登録商標)
アレムツズマブ	キャンパス(Campath)(登録商標)
アルシツモマブ(acritumomab);テクネ チウム-99 標識	CEA-スキャン(CEA-Scan)(登録商 標)
アルグルセラーゼ;ベータ-グルコセレブ ロシダーゼの改変形態	セレダーゼ(Ceredase)(登録商標)
イミグルセラーゼ;ベータ-グルコセレブ ロシダーゼの組換え形態	セレザイム(Cerezyme)(登録商標)
ガラガラヘビ多価免疫 Fab, ヒツジ	クロファブ(商標)

10

20

30

40

タンパク質生成物	参照列挙される薬物
ジゴキシン免疫 fab[ヒツジ]	ディジファブ(商標)
ラスブリカーゼ	エリテック(Elitek)(登録商標)
エタネルセプト	エンブレル(登録商標)
エポエチンアルファ	エポゲン(Epogen)(登録商標)
セツキシマブ	アービタックス(Erbitux)(商標)
アガルシダーゼ(algasidase)ベータ	ファブラザイム(Fabrazyme)(登録商標)
ウロフォリトロピン	ファーティネックス(Fertinex)(商標)
フォリトロピンベータ	フォルスチム(Follistim)(商標)
テリパラチド	フォルテオ(FORTEO)(登録商標)
ヒトソマトロピン	ジェノトロピン(Geno Tropin)(登録商標)
グルカゴン	グルカゲン(GlucaGen)(登録商標)
フォリトロピンアルファ	ゴナール(Gonal)-F(登録商標)
抗血友病因子	ヘリキセート(Helixate)(登録商標)
抗血友病因子;第ⅩⅠⅠⅠ因子	ヘモフィル(HEMOFIL)
アデフォビルジピボキシル	ヘプセラ(Hepsera)(商標)
トラスツズマブ	ハーセプチン(登録商標)
インスリン	ヒューマログ(Humalog)(登録商標)
抗血友病因子/フォンビルブラント因子複合体-ヒト	ヒューメイト(Humate)-P(登録商標)
ソマトトロピン	ヒューマトロープ(Humatrope)(登録商標)
アダリムマブ	ヒュミラ(商標)
ヒトインスリン	ヒューマリン(Humulin)(登録商標)
組換えヒトヒアルロニダーゼ	ハイレネックス(Hylenex)(商標)
インターフェロンアルファコン-1	インファーゲン(Infergen)(登録商標)
エプチフィバチド	インテグリリン(Integrilin)(商標)
アルファ-インターフェロン	イントロン A(Intron A)(登録商標)
パリフェルミン	ケピバンス(Kepivance)
アナキンラ	キネレット(Kineret)(商標)
抗血友病因子	コージネイト(Kogenate)(登録商標)FS

10

20

30

40

50

インスリングルルギン	ランタス(Lantus)(登録商標)
顆粒球マクロファージコロニー刺激因子	リユーカイン(Leukine)(登録商標)/リユーカイン(登録商標)液
注射用ルトロピンアルファ	ルベリス(Luveris)
OspA リポタンパク質	リメリクス(LYMErix)(商標)
ラニズマブ	ルセンチス(LUCENTIS)(登録商標)
ゲムツズマブオゾガマイシン	マイロターグ(Mylotarg)(商標)
ガルスルファーズ	ナグラザイム(Naglazyme)(商標)
ネシリチド	ナトレコール(Natrecor)(登録商標)
ペグフィルグラスチム	ニューラスト(Neulasta)(商標)
オブレルベキン	ニューメガ(Neumega)(登録商標)
フィルグラスチム	ニューボジェン(Neupogen)(登録商標)
ファノレソマブ	ニュートロスペック (NeutroSpec)(商標)(以前のロイテック(LeuTech)(登録商標))
ソマトロピン[rDNA]	ノルディトロピン(Norditropin)(登録商標)/ノルディトロピンノルディフレックス(Norditropin Nordiflex)(登録商標)
ミトキサントロン	ノバントロン(Novantrone)(登録商標)
インスリン;亜鉛懸濁液;	ノボリン(Novolin)L(登録商標)
インスリン;イソフェン懸濁液	ノボリン N(登録商標)
インスリン;正規;	ノボリン R(登録商標)
インスリン	ノボリン(登録商標)
第 VIIa 凝固因子	ノボセブン(NovoSeven)(登録商標)
ソマトロピン	ニュートロピン(Nutropin)(登録商標)
免疫グロブリン 静脈内	オクタガム(Octagam)(登録商標)
PEG-L-アスパラギナーゼ	オンキャスパー(Oncaspar)(登録商標)
アバタセプト,完全ヒト可溶性融合タンパク質	オレンシア(Orencia)(商標)

10

20

30

40

50

ムロモナブ(muromomab)-CD3	オルソクロン (Orthoclone)OKT3(登録商標)
高分子量ヒアルロナン	オルトビスク(Orthovisc)(登録商標)
ヒト絨毛性ゴナドトロピン	オビドレル(Ovidrel)(登録商標)
弱毒生カルメット・ゲラン桿菌	パシス(Pacis)(登録商標)
アバタセプト,完全ヒト可溶性融合タンパク質	オレンシア(商標)
ムロモナブ-CD3	オルソクロン OKT3(登録商標)
高分子量ヒアルロナン	オルトビスク(登録商標)
ヒト絨毛性ゴナドトロピン	オビドレル(登録商標)
弱毒生カルメット・ゲラン桿菌	パシス(登録商標)

10

タンパク質生成物	参照列挙される薬物
ペグインターフェロンアルファ-2a	ペガシス(Pegasys)(登録商標)
インターフェロンアルファ-2b のペグ化バージョン	ペグイントロン(商標)
アバレリックス(注射用懸濁液);ゴナドトロピン放出ホルモンアンタゴニスト	プレナキシス(Plenaxis)(商標)
エポエチンアルファ	プロクリット(Procrit)(登録商標)
アルデスロイキン	プロロイキン(Proleukin),IL-2(登録商標)
ソマトレム	プロトロピン(Protropin)(登録商標)
ドルナーゼアルファ	プルモザイム(Pulmozyme)(登録商標)
エファリズマブ;選択的可逆的 T 細胞ブロッカー	ラプティバ(RAPTIVA)(商標)
リバビリンとアルファインターフェロンとの組合せ	レベトロン(Rebetron)(商標)
インターフェロンベータ 1a	レビフ(登録商標)
抗血友病因子	リコネイト(登録商標)rAHF/
抗血友病因子	リファクト(ReFacto)(登録商標)
レピルジン	リフルダン(Refludan)(登録商標)
インフリキシマブ	レミケード(登録商標)
アブシキシマブ	レオプロ(ReoPro)(商標)
レテプララーゼ	レタヴァーゼ(Retavase)(商標)

20

30

40

50

リツキシマブ(Rituxima)	リツキサン(商標)
インターフェロンアルファ-2 ^a	ロフェロン-A(登録商標)
ソマトロピン	サイゼン(Saizen)(登録商標)
合成ブタセクレチン	セクレフロ(SecreFlo)(商標)
バシリキシマブ	シムレクト(Simulect)(登録商標)
エクリズマブ	ソリリス(SOLIRIS)(R)
ペグビソマント	ソマバート(SOMAVERT)(登録商標)
パリーブズマブ;組換え産生ヒト化 mAb	シナジス(Synagis)(商標)
サイロトロピンアルファ	タイロゲン(Thyrogen)(登録商標)
テネクテプラーゼ	TNK アーゼ(商標)
ナタリズマブ	タイサブリ(TYSABRI)(登録商標)
ヒト免疫グロブリン静脈内 5%及び10%溶液	ヴェノグロブリン(Venoglobulin)-S(登録商標)
インターフェロンアルファ-n1,リンパ芽球様	ウェルフェロン(Wellferon)(登録商標)
ドロトレコギンアルファ	ザイグリス(Xigris)(商標)
オマリズマブ;免疫グロブリン E をターゲティングする組換え DNA 由来ヒト化モノクローナル抗体	ゾレア(Xolair)(登録商標)
ダクリズマブ	ゼナパックス(Zenapax)(登録商標)
イブリツモマブチウキセタン	ゼヴァリン(Zevalin)(商標)
ソマトトロピン	ゾルブチヴ(Zorbtive)(商標)(セロスティム(Serostim)(登録商標))

【0094】

実施形態では、ポリペプチド（例えば細胞によって産生されるポリペプチド及び／又は本明細書で説明される方法に従って産生されるポリペプチド）は、例えば表6で示される通り、ホルモン、凝血／血液凝固因子、サイトカイン／成長因子、抗体分子、融合タンパク質、タンパク質ワクチン又はペプチドである。

【0095】

10

20

30

40

50

【表 6】

表6. 例示的な生成物

治療用生成物の種類	生成物	商品名
ホルモン	エリスロポエチン、エポエチン(Epoein)- α	エポゲン, プロクリット
	ダルベポエチン- α	アラネスプ
	成長ホルモン(GH), ソマトトロピン	ジェノトロピン, ヒューマトロープ, ノルディトロピン, ノヴィヴィトロピン(NovlVotropin), ニュートロピン, オムニトロロープ(Omnitrope), プロトロピン, サイゼン(Siazen), セロスティム, ヴァルトロピン(Valtropin)
	ヒト卵胞刺激ホルモン(FSH)	ゴナール-F, フォリスチム
	ヒト絨毛性ゴナドトロピン	オビドレル
	ルトロピン- α	ルベリス
	グルカゴン	グルカゲン(GlcaGen)
	成長ホルモン放出ホルモン(GHRH)	ジェレフ(Geref)
	セクレチン	キロスティム(ChiRhoStim)(ヒトペプチド), セクレフロ(ブタペプチド)
	甲状腺刺激ホルモン(TSH), サイロトロピン	タイロゲン

10

20

30

40

50

凝血/血液 凝固因子	第VIIa因子 第VIII因子 第IX因子 アンチトロンビンIII(AT-III) タンパク質C濃縮物	ノボセブン バイオクレート,ヘリキセート, コージネイト(Kogenate),リコネ イト,リファクト ベネフィックス トロンベート(Thrombate)III セプロチン(Ceprothin)
サイトカイン/増殖因子	I型アルファ-インターフェ ロン インターフェロン- α 3(IFN α 3) インターフェロン- β 1a(rIF N- β) インターフェロン- β 1b(rIF N- β) インターフェロン- γ 1b(IFN γ) アルデスロイキン(インタ ーロイキン2(IL2)),上皮胸 腺細胞(thymocyte)活性化 因子;ETAF パリフェルミン(ケラチノ サイト増殖因子;KGF) ベカプレルミン(Becaplemi n)(血小板由来増殖因子;PD GF)	インファージェン アルフェロンN アボネックス,レビフ ベタセロン アクティミューン プロロイキン ケピバンス レグラネクス(Regranex)

10

20

30

40

50

	アナキンラ(組換えIL1アン タゴニスト)	アンリル(Anril),キネレット
抗体分子	ベバシズマブ(VEGFA mA b)	アバスチン
	セツキシマブ(EGFR mAb)	アービタックス
	パニツムマブ(EGFR mAb)	ベクティビックス(Vectibix)
	アレムツズマブ(CD52 mA b)	キャンパス
	リツキシマブ(CD20キメラ Ab)	リツキサン
	トラスツズマブ(HER2/Ne u mAb)	ハーセプチン
	アバタセプト(CTLA Ab/Fc 融合)	オレンシア
	アダリムマブ(TNFαmAb)	ヒュミラ
	エタネルセプト(TNF受容 体/Fc融合)	エンブレル
	インフリキシマブ(TNFαキ メラmAb)	レミケード
	アレファセプト(CD2融合 タンパク質)	アメビブ
	エファリズマブ(CD11a m Ab)	ラプティバ
	ナタリズマブ(インテグリ ンα4サブユニットmAb)	タイサブリ

10

20

30

40

50

	エクリズマブ(C5mAb) ムロモナブ-CD3	ソリリス オルソクロン,OKT3
その他: 融合タンパク質/タンパク質ワクチン/ペプチド	インスリン B型肝炎表面抗原(HBsAg) HPVワクチン OspA 抗アカゲザル(Rh)免疫グロブリンG エンフビルチド 蜘蛛糸,例えばフィブリオン	ヒューマリン,ノボリン エンジェリクス(Engerix),リコンビヴァクス(Recombivax)HB ガーダシル(Gardasil) リメリクス(LYMERix) ロフィラック(Rhophylac) フゼオン(Fuzeon) クモノス(QMONOS)

10

20

【0096】

実施形態では、ポリペプチド（例えば細胞によって産生されるポリペプチド及び／又は本明細書で説明される方法に従って産生されるポリペプチド）は、多重特異性タンパク質、例えば二重特異性抗体である。実施形態では、多重特異性タンパク質は、表7で示される通りである。

【0097】

30

40

50

【表 7】

表7. 例示的な二重特異性形式

名称(他の名称,提供組織)	BsAb 形式	標的	提案されている作用機構	開発段階	疾患(又は健康なボランティア)
カツマキシマブ (レモバブ (Removab)(登録 商標), Fresenius Biotech, Trion Pharma, Neopharm)	BsIgG: ト リオマブ (Triomab)	CD3, EpCAM	T 細胞の腫瘍への再ターゲティング, Fc 媒介エフェクター機能	EU において承認されている	EpCAM 陽性腫瘍における悪性腹水
エルツマキシマブ (Ertumaxomab)(Neovii Biotech, Fresenius Biotech)	BsIgG: ト リオマブ	CD3, HER2	T 細胞の腫瘍への再ターゲティング	フェーズ I/II	後期固形腫瘍

10

20

30

40

50

ブリナツモマブ (Blinatumomab)(ブリンサイト (Blincyto)(登録商 標),AMG 103, MT 103, MEDI 538, Amgen)	BiTE	CD3, CD19	T細胞の腫瘍へ の再ターゲテ ィング	米国におい て承認され ている フェーズⅡ 及びⅢ フェーズⅡ フェーズⅠ	B前駆細胞 ALL ALL DLBCL NHL
REGN1979 (Regeneron)	BsAb	CD3, CD20			
ソリトマブ (Solitomab)(AM G 110, MT110, Amgen)	BiTE	CD3, EpCAM	T細胞の腫瘍へ の再ターゲテ ィング	フェーズⅠ	固形腫瘍
MEDI 565 (AMG 211, MedImmune, Amgen)	BiTE	CD3, CEA	T細胞の腫瘍へ の再ターゲテ ィング	フェーズⅠ	胃腸管腺癌 (adenocanci noma)
RO6958688 (Roche)	BsAb	CD3, CEA			

10

20

30

40

50

BAY2010112 (AMG 212, Bayer; Amgen)	BiTE	CD3, PSMA	T 細胞の腫瘍への再ターゲティング	フェーズ I	前立腺がん
MGD006 (Macrogenics)	DART	CD3, CD123	T 細胞の腫瘍への再ターゲティング	フェーズ I	AML
MGD007 (Macrogenics)	DART	CD3, gpA33	T 細胞の腫瘍への再ターゲティング	フェーズ I	結腸直腸がん
MGD011 (Macrogenics)	DART	CD19, CD3			
スコープオン (SCORPION)(Emergent Biosolutions, Trubion)	BsAb	CD3, CD19	T 細胞の腫瘍への再ターゲティング		
AFM11 (Affimed Therapeutics)	TandAb	CD3, CD19	T 細胞の腫瘍への再ターゲティング	フェーズ I	NHL 及び ALL

10

20

30

40

50

AFM12 (Affimed Therapeutics)	TandAb	CD19, CD16	NK 細胞の腫瘍細胞への再ターゲティング		
AFM13 (Affimed Therapeutics)	TandAb	CD30, CD16A	NK 細胞の腫瘍細胞への再ターゲティング	フェーズ II	ホジキンリンパ腫
GD2 (Barbara Ann Karmanos Cancer Institute)	BsAb を事前ロードした T 細胞	CD3, GD2	T 細胞の腫瘍への再ターゲティング	フェーズ I/II	神経芽細胞腫及び骨肉腫
pGD2 (Barbara Ann Karmanos Cancer Institute)	BsAb を事前ロードした T 細胞	CD3, Her2	T 細胞の腫瘍への再ターゲティング	フェーズ II	転移性乳がん
EGFRBi を備えた自己活性化 T 細胞(Roger Williams Medical Center)	BsAb を事前ロードした T 細胞	CD3, EGFR	自己活性化 T 細胞を EGFR 陽性腫瘍へ	フェーズ I	肺及び他の固形腫瘍

10

20

30

40

50

抗 EGFR を備えた活性化 T 細胞 (Barbara Ann Karmanos Cancer Institute)	BsAb を事前ロードした T 細胞	CD3, EGFR	自己活性化 T 細胞を EGFR 陽性腫瘍へ	フェーズ I	結腸がん及び膵がん
rM28(チュービンゲン大学病院)	タンデム scFv	CD28, MAPG	T 細胞の腫瘍への再ターゲティング	フェーズ II	転移性黒色腫
IMCgp100 (Immunocore)	ImmTAC	CD3, ペプチド MHC	T 細胞の腫瘍への再ターゲティング	フェーズ I/II	転移性黒色腫
DT2219ARL(NCI, ミネソタ大学)	ジフテリア毒素に連結された 2 つの scFv	CD19, CD22	タンパク質毒素の腫瘍へのターゲティング	フェーズ I	B 細胞白血病又はリンパ腫
XmAb5871 (Xencor)	BsAb	CD19, CD32b			

10

20

30

40

50

NI-1701 (NovImmune)	BsAb	CD47, CD19			
MM-111 (Merrimack)	BsAb	ErbB2, ErbB3			
MM-141 (Merrimack)	BsAb	IGF-1R, ErbB3			
NA (Merus)	BsAb	HER2, HER3			
NA (Merus)	BsAb	CD3, CLEC12 A			
NA (Merus)	BsAb	EGFR, HER3			
NA (Merus)	BsAb	PD1,非 開示			
NA (Merus)	BsAb	CD3,非 開示			

10

20

30

40

50

デュリゴツズマブ (Duligotuzumab) (MEHD7945A, Genentech, Roche)	DAF	EGFR, HER3	2つの受容体の遮断, ADCC	フェーズⅠ及びⅡ フェーズⅡ	頭頸部がん 結腸直腸がん
LY3164530 (Eli Lilly)	開示されていない	EGFR, MET	2つの受容体の遮断	フェーズⅠ	後期又は転移性がん
MM-111 (Merrimack Pharmaceuticals)	HSA ボディ	HER2, HER3	2つの受容体の遮断	フェーズⅡ フェーズⅠ	胃がん及び食道がん 乳がん
MM-141, (Merrimack Pharmaceuticals)	IgG-scFv	IGF-1R, HER3	2つの受容体の遮断	フェーズⅠ	後期固形腫瘍
RG7221 (RO5520985, Roche)	CrossMab	Ang2, VEGF A	2つの血管新生刺激の遮断	フェーズⅠ	固形腫瘍

10

20

30

40

50

RG7716 (Roche)	CrossMa b	Ang2, VEGF A	2つの血管新生 刺激の遮断	フェーズ I	滲出型 AMD
OMP-305B83 (OncoMed)	BsAb	DLL4/VE GF			
TF2 (Immunomedics)	ドック・ アンド・ ロック式	CEA, HSG	PET 又は放射 性物質画像法 のための腫瘍 の事前ターゲ ティング	フェーズ II	結腸直腸が ん、乳がん及 び肺がん
ABT-981 (AbbVie)	DVD-Ig	IL-1 α , IL- 1 β	2つの炎症促進 性サイトカイ ンの遮断	フェーズ II	骨関節炎
ABT-122 (AbbVie)	DVD-Ig	TNF, IL- 17A	2つの炎症促進 性サイトカイ ンの遮断	フェーズ II	リウマチ性 関節炎
COVA322	IgG-フィ ノマー	TNF, IL17A	2つの炎症促進 性サイトカイ ンの遮断	フェーズ I/II	尋常性乾癬

10

20

30

40

50

SAR156597 (Sanofi)	四価二重 特異性タ ンデム IgG	IL-13, IL- 4	2つの炎症促進 性サイトカイ ンの遮断	フェーズI	特発性肺線 維症
GSK2434735 (GSK)	二重ター ゲティン グドメイ ン	IL-13, IL- 4	2つの炎症促進 性サイトカイ ンの遮断	フェーズI	(健康なボラ ンティア)
オゾラリズマブ (Ozoralizumab) (ATN103, Ablynx)	ナノボデ ィ	TNF, HSA	炎症促進性サ イトカインの 遮断,HSA に結 合して半減期 を増大する	フェーズII	リウマチ性 関節炎
ALX-0761 (Merck Serono, Ablynx)	ナノボデ ィ	IL- 17A/F, HSA	2つの炎症促進 性サイトカイ ンの遮断,HSA に結合して半 減期を増大す る	フェーズI	(健康なボラ ンティア)

10

20

30

40

50

ALX-0061 (AbbVie, Ablynx;	ナノボデ ィ	IL-6R, HSA	炎症促進性サ イトカインの 遮断,HSA に結 合して半減期 を増大する	フェーズ I/II	リウマチ性 関節炎
ALX-0141 (Ablynx, Eddingpharm)	ナノボデ ィ	RANKL, HSA	骨吸収の遮 断,HSA に結合 して半減期を 増大する	フェーズ I	閉経後骨量 減少
RG6013/ACE91 0 (Chugai, Roche)	ART-Ig	第 IXa 因 子,第 X 因子	血漿凝固	フェーズ II	血友病

【 0 0 9 8 】

実施形態では、ポリペプチド（例えば細胞によって産生されるポリペプチド及び／又は本明細書で説明される方法に従って産生されるポリペプチド）は、表 8 で列挙されるポリペプチドである。

【 0 0 9 9 】

10

20

30

40

50

【表 8】

表 8

タンパク質生成物	参照列挙される薬物
インターフェロンガンマ-1b	アクティミューン(登録商標)
アルテプラゼ;組織プラスミノー ゲンアクチベーター	アクチバーゼ(登録商標)/キ ャトフロ(登録商標)
組換え抗血友病因子	アドベイト
ヒトアルブミン	アルブテイン(登録商標)
ラロニダーゼ	アルデュラザイム(登録商標)
インターフェロンアルファ-N3,ヒト 白血球由来	アルフェロン N(登録商標)
ヒト抗血友病因子	アルファネート(登録商標)
ウイルス濾過済みヒト第 IX 凝固因 子	アルファナイン(登録商 標)SD
アレファセプト;組換え二量体融合 タンパク質 LFA3-Ig	アメビブ(登録商標)
ビバリルジン	アンジオマックス(登録商標)
ダルベポエチンアルファ	アラネスプ(商標)
ベバシズマブ	アバスチン(商標)
インターフェロンベータ-1a;組換え	アボネックス(登録商標)
第 IX 凝固因子	ベネフィックス(商標)

10

20

30

40

50

インターフェロンベータ-1b	ベタセロン(登録商標)
トシツモマブ	ベキサール(登録商標)
抗血友病因子	バイオクレート(商標)
ヒト成長ホルモン	バイオトロピン(商標)
ボツリヌス毒素 A 型	ボトックス(登録商標)
アレムツズマブ	キャンパス(登録商標)
アルシツモマブ;テクネチウム-99 標識	CEA-スキャン(登録商標)
アルグルセラゼ;ベータ-グルコセ レブリンダーゼの改変形態	セレダーゼ(登録商標)
イミグルセラゼ;ベータ-グルコセ レブリンダーゼの組換え形態	セレザイム(登録商標)
ガラガラヘビ多価免疫 Fab, ヒツジ	クロファブ(商標)
ジゴキシン免疫 fab[ヒツジ]	ディジファブ(商標)
ラスブリカーゼ	エリテック(登録商標)
エタネルセプト	エンブレル(登録商標)
エポエチンアルファ	エポゲン(登録商標)
セツキシマブ	アービタックス(商標)
アガルシダーゼベータ	ファブラザイム(登録商標)
ウロフォリトロピン	ファーティネックス(商標)
フォリトロピンベータ	フォリスチム(商標)
テリパラチド	フォルテオ(登録商標)

10

20

30

40

50

ヒトソマトロピン	ジェノトロピン(登録商標)
グルカゴン	グルカゲン(登録商標)
フォリトロピンアルファ	ゴナール-F(登録商標)
抗血友病因子	ヘリキセート(登録商標)
抗血友病因子;第 XIII 因子	ヘモフィル
アデフォビルジピボキシル	ヘプセラ(商標)
トラスツズマブ	ハーセプチン(登録商標)
インスリン	ヒューマログ(登録商標)
抗血友病因子/フォンビルブラント 因子複合体-ヒト	ヒューメイト-P(登録商標)
ソマトロピン	ヒューマトロープ(登録商標)
アダリムマブ	ヒュミラ(商標)
ヒトインスリン	ヒューマリン(登録商標)
組換えヒトヒアルロニダーゼ	ハイレネックス(商標)
インターフェロンアルファコン-1	インファージェン(登録商標)
エプチフィバチド	インテグリリン(商標)
アルファ-インターフェロン	イントロン A(登録商標)
パリフェルミン	ケピバンス
アナキンラ	キネレット(商標)
抗血友病因子	コージネイト(登録商標)FS
インスリングラルギン	ランタス(登録商標)

10

20

30

40

50

顆粒球マクロファージコロニー刺 激因子	リューカイン(登録商標)/リ ューカイン(登録商標)液
注射用ルトロピンアルファ	ルベリス
OspA リポタンパク質	リメリクス(商標)
ラニズマブ	ルセンチス(登録商標)
ゲムツズマブオゾガマイシン	マイロターグ(商標)
ガルスルファーゼ	ナグラザイム(商標)
ネシリチド	ナトレコール(登録商標)
ペグフィルグラスチム	ニューラスタ(商標)
オプレルベキン	ニューメガ(登録商標)
フィルグラスチム	ニューボジェン(登録商標)
ファノレソマブ	ニュートロスペック(商 標)(以前のロイテック(登録商標))
ソマトロピン[rDNA]	ノルディトロピン(登録商 標)/ノルディトロピンノルディフ レックス(登録商標)
ミトキサントロン	ノバントロン(登録商標)
インスリン;亜鉛懸濁液;	ノボリンL(登録商標)
インスリン;イソフェン懸濁液	ノボリンN(登録商標)
インスリン,正規;	ノボリンR(登録商標)
インスリン	ノボリン(登録商標)
第 VIIa 凝固因子	ノボセブン(登録商標)

10

20

30

40

50

ソマトロピン	ニュートロピン(登録商標)
免疫グロブリン 静脈内	オクタガム(登録商標)
PEG-L-アスパラギナーゼ	オンキャスパー(登録商標)
アバタセプト,完全ヒト可溶性融合タンパク質	オレンシア(商標)
ムロモナブ-CD3	オルソクロン OKT3(登録商標)
高分子量ヒアルロナン	オルトビスク(登録商標)
ヒト絨毛性ゴナドトロピン	オビドレル(登録商標)
弱毒生カルメット・ゲラン桿菌	パシス(登録商標)
ペグインターフェロンアルファ-2a	ペガシス(登録商標)
インターフェロンアルファ-2b のペグ化バージョン	ペグイントロン(商標)
アバレリックス(注射用懸濁液);ゴナドトロピン放出ホルモン	プレナキシス(商標)
アンタゴニスト	
エポエチンアルファ	プロクリット(登録商標)
アルデスロイキン	プロロイキン,IL-2(登録商標)
ソマトレム	プロトロピン(登録商標)
ドルナーゼアルファ	プルモザイム(登録商標)
エファリズマブ;選択的可逆的T細胞ブロッカー	ラプティバ(商標)

10

20

30

40

50

リバビリンとアルファインターフェロンとの組合せ	レベトロン(商標)
インターフェロンベータ 1a	レビフ(登録商標)
抗血友病因子	リコネイト(登録商標)rAHF/
抗血友病因子	リファクト(登録商標)
レピルジン	リフルダン(登録商標)
インフリキシマブ	レミケード(登録商標)
アブシキシマブ	レオプロ(商標)
レテプララーゼ	レタヴァーゼ(商標)
リツキシマブ	リツキサン(商標)
インターフェロンアルファ-2 ^a	ロフェロン-A(登録商標)
ソマトロピン	サイゼン(登録商標)
合成ブタセクレチン	セクレフロ(商標)
バシリキシマブ	シムレクト(登録商標)
エクリズマブ	ソリリス(R)
ペグビソマント	ソマバート(登録商標)
パリビズマブ;組換え産生ヒト化mAb	シナジス(商標)
サイロトロピンアルファ	タイロゲン(登録商標)
テネクテプララーゼ	TNK アーゼ(商標)
ナタリズマブ	タイサブリ(登録商標)

10

20

30

40

50

ヒト免疫グロブリン静脈内 5%及び 10%溶液	ヴェノグロブリン-S(登録商 標)
インターフェロンアルファ-n1,リン パ芽球様	ウェルフェロン(登録商標)
ドロトレコギンアルファ	ザイグリス(商標)
オマリズマブ;組換え DNA 由来ヒト 化モノクローナル	ゾレア(登録商標)
免疫グロブリン E をターゲティン グする抗体	
ダクリズマブ	ゼナパックス(登録商標)
イブリツモマブチウキセタン	ゼヴァリン(商標)
ソマトトロピン	ゾルブチヴ(商標)(セロステ ィム(登録商標))

10

20

【0100】

一部の実施形態では、ポリペプチド（例えば細胞によって産生されるポリペプチド及び／
 又は本明細書で説明される方法に従って産生されるポリペプチド）は、がん細胞によって
 発現される抗原である。一部の実施形態では、組換えポリペプチド又は治療用ポリペプチ
 ドは、腫瘍関連抗原又は腫瘍特異的抗原である。一部の実施形態では、組換えポリペプチ
 ド又は治療用ポリペプチドは、HER2、CD20、9-O-アセチル-GD3、βhCG、A33抗原、CA19-9マーカー、CA-125マーカー、カルレティキュリン、
 炭酸脱水酵素IX（MN/CA IX）、CCR5、CCR8、CD19、CD22、CD25、CD27、CD30、CD33、CD38、CD44v6、CD63、CD70、
 CC123、CD138、癌腫胎児性抗原（CEA：carcinoma embry
 onic antigen；CD66e）、デスモグレイン4、E-カドヘリンネオエピ
 トープ、エンドシアリン、エフリンA2（EphA2：ephrin A2）、上皮成長
 因子受容体（EGFR：epidermal growth factor recept
 or）、上皮細胞接着分子（EpCAM：epithelial cell adhesi
 on molecule）、ErbB2、胎児性アセチルコリン受容体、線維芽細胞活性
 化抗原（FAP：fibroblast activation antigen）、フコ
 シルGM1、GD2、GD3、GM2、ガングリオシドGD3、グロボH、糖タンパク質
 100、HER2/neu、HER3、HER4、インスリン様成長因子受容体1、Le
 wis-Y、LG、Ly-6、黒色腫特異的コンドロイチン硫酸プロテオグリカン（MC
 SCP：melanoma-specific chondroitin-sulfate
 proteoglycan）、メソセリン、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、
 MUC5AC、MUC5B、MUC7、MUC16、ミューラー管抑制因子（MIS：Mu
 llerian inhibitory substance）受容体II型、血漿細胞抗
 原、ポリSA、PSCA、PSMA、ソニックヘッジホッグ（SHH：sonic he
 dgehog）、SAS、STEAP、sTn抗原、TNF-アルファ前駆体及びこれら

30

40

50

の組合せから選択される。

【0101】

一部の実施形態では、ポリペプチド（例えば細胞によって産生されるポリペプチド及び／又は本明細書で説明される方法に従って産生されるポリペプチド）は、活性化受容体であり、2B4（CD244）、 $\alpha_4\beta_1$ インテグリン、 β_2 インテグリン、CD2、CD16、CD27、CD38、CD96、CD100、CD160、CD137、CEACAM1（CD66）、CRTAM、CS1（CD319）、DNAM-1（CD226）、GITR（TNFRSF18）、KIRの活性化形態、NKG2C、NKG2D、NKG2E、1つ又は複数の自然細胞傷害性受容体、NTB-A、PEN-5及びこれらの組合せから選択され、任意選択で β_2 インテグリンは、CD11a-CD18、CD11b-CD18又はCD11c-CD18を含み、任意選択でKIRの活性化形態は、KIR2DS1、KIR2DS4又はKIR-Sを含み、任意選択で自然細胞傷害性受容体は、NKP30、NKP44、NKP46又はNKP80を含む。

10

【0102】

一部の実施形態では、ポリペプチド（例えば細胞によって産生されるポリペプチド及び／又は本明細書で説明される方法に従って産生されるポリペプチド）は、阻害性受容体であり、KIR、ILT2/LIR-1/CD85j、KIRの阻害性形態、KLRG1、LAIR-1、NKG2A、NKR-PIA、Siglec-3、Siglec-7、Siglec-9及びこれらの組合せから選択され、任意選択でKIRの阻害性形態は、KIR2DL1、KIR2DL2、KIR2DL3、KIR3DL1、KIR3DL2又はKIR-Lを含む。

20

【0103】

一部の実施形態では、ポリペプチド（例えば細胞によって産生されるポリペプチド及び／又は本明細書で説明される方法に従って産生されるポリペプチド）は、活性化受容体であり、CD3、CD2（LFA2、OX34）、CD5、CD27（TNFRSF7）、CD28、CD30（TNFRSF8）、CD40L、CD84（SLAMF5）、CD137（4-1BB）、CD226、CD229（Ly9、SLAMF3）、CD244（2B4、SLAMF4）、CD319（CRACC、BLAME）、CD352（Ly108、NTBA、SLAMF6）、CRTAM（CD355）、DR3（TNFRSF25）、GITR（CD357）、HVEM（CD270）、ICOS、LIGHT、LT β R（TNFRSF3）、OX40（CD134）、NKG2D、SLAM（CD150、SLAMF1）、TCR α 、TCR β 、TCR $\delta\gamma$ 、TIM1（HAVCR、KIM1）及びこれらの組合せから選択される。

30

【0104】

一部の実施形態では、ポリペプチド（例えば細胞によって産生されるポリペプチド及び／又は本明細書で説明される方法に従って産生されるポリペプチド）は、阻害性受容体であり、PD-1（CD279）、2B4（CD244、SLAMF4）、B71（CD80）、B7H1（CD274、PD-L1）、BTLA（CD272）、CD160（BY55、NK28）、CD352（Ly108、NTBA、SLAMF6）、CD358（DR6）、CTLA-4（CD152）、LAG3、LAIR1、PD-1H（VISTA）、TIGIT（VSIG9、VSTM3）、TIM2（TIMD2）、TIM3（HAVCR2、KIM3）及びこれらの組合せから選択される。

40

【0105】

他の例示的なポリペプチド（例えば細胞によって産生されるポリペプチド及び／又は本明細書で説明される方法に従って産生されるポリペプチド）には、Leaderら、「Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification」、Nature Reviews Drug Discovery、2008、7:21~39（参照により本明細書に組み込む）の表1~10に記載される任意のタンパク質；又は本明細書で説明される組換えポリペプチドの任意のコンジュゲート、バリエーション、アナログ若しくは機能的断片が含まれるが

50

、これらに限定されない。

【0106】

他の組換えタンパク質生成物（例えば細胞によって産生される生成物及び／又は本明細書で説明される方法に従って産生される生成物）には、非限定的に、DARPin、アフィボディ（affibody）及びアドネクチン（adnectin）等の非抗体スキファールド又は足場タンパク質代用品が含まれる。そのような非抗体スキファールド又は足場タンパク質代用品は、1つ若しくは2つ又はそれよりも多い、例えば1、2、3、4若しくは5つ又はそれよりも多い様々な標的又は抗原を認識するか、又はこれに結合するように操作され得る。

【0107】

適用

本明細書で開示される細胞を特定、選択及び／又は培養する方法は、様々な生成物を産生するために有用な細胞を生成し、様々な細胞株を評価するため、又はバイオリアクター又は加工容器若しくはタンクにおける、又はより一般には任意の供給源による使用のための様々な細胞株の産生を評価するために使用され得る。本明細書で説明される組成物及び方法は、例えば原核細胞株及び／又は真核細胞株を含む、任意の所望の細胞株を培養するために好適である。さらに、実施形態では、本明細書で説明される組成物及び方法は、懸濁細胞又は足場依存性（接着性）細胞を培養するために好適であり、ポリペプチド生成物、核酸生成物（例えばDNA又はRNA）、又は細胞療法及び／若しくはウイルス療法で使用されるもの等の細胞及び／若しくはウイルス等の医薬製品及びバイオ医薬製品の産生のために構成された産生作業に好適である。

【0108】

実施形態では、細胞は、組換え治療用生成物又は診断用生成物等の生成物を発現又は産生する。以下により詳細に説明される通り、細胞によって産生される生成物の例には、抗体分子（例えばモノクローナル抗体、二重特異性抗体）、抗体ミメティックス（例えばDARPin、アフィボディ、アドネクチン又はIgNAR等の、抗原に特異的に結合するが、抗体に構造的に関連しないポリペプチド分子）、融合タンパク質（例えばFc融合タンパク質、キメラサイトカイン）、他の組換えタンパク質（例えば糖鎖付加タンパク質、酵素、ホルモン）、ウイルス治療薬（例えば抗がん腫瘍溶解性ウイルス、遺伝子療法及びウイルス免疫療法のためのウイルスベクター）、細胞治療薬（例えば多能性幹細胞、間葉系幹細胞及び成体幹細胞）、ワクチン若しくは脂質被包粒子（例えばエキソソーム、ウイルス様粒子）、RNA（例えばsiRNA等）若しくはDNA（例えばプラスミドDNA等）、抗生物質又はアミノ酸が含まれるが、これらに限定されない。実施形態では、本明細書で説明される組成物及び方法は、バイオ後続品を産生するために使用され得る。

【0109】

言及される通り、実施形態では、本明細書で説明される組成物及び方法は、真核細胞、例えば哺乳動物細胞、又は例えば酵母細胞又は糸状菌細胞等の下等真核細胞、又はグラム陽性又はグラム陰性細胞等の原核細胞の産生、及び／又は真核細胞又は原核細胞の生成物、例えばタンパク質、ペプチド、抗生物質、アミノ酸、核酸（DNA又はRNA等）がラージスケール様式で真核細胞によって合成されることを可能にする。本明細書で別に示さない限り、本明細書で説明される組成物及び方法は、非限定的にベンチスケール、パイロットスケール及び完全産生スケール容量を含む、任意の所望の体積又は産生容量を含み得る。

【0110】

さらに、且つ本明細書で別に示さない限り、本明細書で説明される組成物及び方法は、非限定的に攪拌タンク、気泡ポンプ、繊維、マイクロファイバー、中空繊維、セラミックマトリックス、流動床、固定床及び／又は噴流床バイオリアクターを含む任意の好適なリアクター（複数可）により使用され得る。本明細書で使用されるとき、「リアクター」とは、発酵槽若しくは発酵ユニット又は他の任意の反応容器を含む場合があり、「リアクター」という用語は、「発酵槽」と互換的に使用される。例えば、一部の態様では、バイオリアクターユニットは、以下のこと：栄養素及び／又は炭素供給源の供給、好適な気体（例

10

20

30

40

50

例えば酸素)の注入、発酵又は細胞培養培地の出入口流動、気相と液相との分離、温度の維持、酸素及びCO₂レベルの維持、pHレベルの維持、かき混ぜ(例えば攪拌)及び／又は清浄化／滅菌のうちの1つ若しくは複数又は全てを行い得る。発酵ユニット等の例のリアクターユニットが、ユニット内に多数のリアクターを含有する場合、例えばユニットが、各ユニットに1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90若しくは100個又はそれよりも多いバイオリアクターを有する場合、及び／又は設備が、設備内に単一又は多数のリアクターを有する多数のユニットを含有する場合がある。様々な実施形態では、バイオリアクターは、回分、半流加回分、流加回分、灌流及び／又は連続発酵プロセスに好適であり得る。任意の好適なリアクター直径を使用することができる。実施形態では、バイオリアクターは、約100mL〜約50,000Lの体積を有し得る。非限定的な例には、100mL、250mL、500mL、750mL、1リットル、2リットル、3リットル、4リットル、5リットル、6リットル、7リットル、8リットル、9リットル、10リットル、15リットル、20リットル、25リットル、30リットル、40リットル、50リットル、60リットル、70リットル、80リットル、90リットル、100リットル、150リットル、200リットル、250リットル、300リットル、350リットル、400リットル、450リットル、500リットル、550リットル、600リットル、650リットル、700リットル、750リットル、800リットル、850リットル、900リットル、950リットル、1000リットル、1500リットル、2000リットル、2500リットル、3000リットル、3500リットル、4000リットル、4500リットル、5000リットル、6000リットル、7000リットル、8000リットル、9000リットル、10,000リットル、15,000リットル、20,000リットル及び／又は50,000リットルの体積が含まれる。加えて、好適なリアクターは、多数回使用、単回使用、使い捨て又は非使い捨てであってもよく、ステンレススチール(例えば316L又は他の任意の好適なステンレススチール)及びインコネル等の金属合金、プラスチック及び／又はガラスを含む任意の好適な材料から形成され得る。一部の実施形態では、好適なリアクターは、円形、例えば円筒形であり得る。一部の実施形態では、好適なリアクターは、四角形、例えば長方形であり得る。四角形のリアクターは、一部の場合、使用(例えば技術者によるローディング及び設定)の容易さ、リアクター内容物のより大きな混合及び均一性並びにより少ない占有床面積等の円形リアクターに優る利点を提供し得る。

【0111】

実施形態では、且つ本明細書で別に示さない限り、本明細書で説明される組成物及び方法は、そのような生成物の分離、精製及び単離のための操作及び／又は機器等の、別に言及されていない任意の好適な単位操作及び／又は機器により使用され得る。伝統的な現場組立設備、モジュール式、移動式及び一時的設備又は他の任意の好適な構築物、設備及び／若しくはレイアウト等の任意の好適な設備及び環境を使用することができる。例えば、一部の実施形態では、モジュール式クリーンルームを使用することができる。加えて、且つ別に示さない限り、本明細書で説明される組成物及び方法は、単一の場所若しくは設備で収容及び／若しくは実施されるか、又は或いは、別々の、若しくは多数の場所及び／若しくは設備で収容及び／若しくは実施され得る。

【0112】

非限定的な例として、且つ限定ではなく、米国特許出願公開第2013/0280797号、同第2012/0077429号、同第2011/0280797号、同第2009/0305626号並びに米国特許第8298054号、同第7629167号及び同第5656491号は、本明細書で説明される組成物及び方法での使用に好適であり得る例示的な設備、機器及び／又は系を説明し、当該特許及び特許出願はその全体を参照により本明細書に組み込む。

【0113】

本明細書で説明される組成物及び方法は、広範なスペクトルの細胞を利用することができる。実施形態では、細胞は、真核細胞、例えば哺乳動物細胞である。哺乳動物細胞は、例

例えばヒト又はげっ歯類若しくはウシ細胞株又は細胞系統であり得る。そのような細胞、細胞株又は細胞系統の例は、例えばマウス骨髄腫（NS0）細胞株、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞株、HT1080、H9、HepG2、MCF7、MDBK Jurkat、NIH3T3、PC12、BHK（仔ハムスター腎細胞）、VERO、SP2／0、YB2／0、Y0、C127、L細胞、COS、例えばCOS1及びCOS7、QC1-3、HEK-293、VERO、PER.C6、HeLa、EB1、EB2、EB3、腫瘍溶解細胞株又はハイブリドーマ細胞株である。好ましくは、哺乳動物細胞は、CHO細胞株である。一実施形態では、細胞は、CHO細胞である。一実施形態では、細胞は、CHO-K1細胞、CHO-K1 SV細胞、DG44 CHO細胞、DUXB11 CHO細胞、CHOS、CHO GSノックアウト細胞、CHO FUT8 GSノックアウト細胞、CHOZN又はCHO由来細胞である。CHO GSノックアウト細胞（例えばGSKO細胞）は、例えばCHO-K1 SV GSノックアウト細胞である。CHO FUT8ノックアウト細胞は、例えばポテリジェント（登録商標）CHOK1 SV（Lonza Biologics, Inc.）である。また、真核細胞は、例えばEBx（登録商標）細胞、EB14、EB24、EB26、EB66又はEBv13等の鳥類細胞、細胞株又は細胞系統であり得る。

10

【0114】

一実施形態では、真核細胞は、幹細胞である。幹細胞は、例えば、胚性幹細胞（ESC）、成体幹細胞、人工多能性幹細胞（iPSC）、組織特異的幹細胞（例えば造血幹細胞）及び間葉系幹細胞（MSC）を含む多能性幹細胞であり得る。

20

【0115】

一実施形態では、細胞は、本明細書で説明される細胞のうちのいずれかの分化した形態である。一実施形態では、細胞は、培養物中の任意の初代細胞に由来する細胞である。

【0116】

実施形態では、細胞は、ヒト肝細胞、動物肝細胞又は非実質細胞等の肝細胞である。例えば、細胞は、播種可能代謝用ヒト肝細胞、播種可能誘導用ヒト肝細胞、播種可能クオリストトランスポーターサーティファイド（商標）ヒト肝細胞、懸濁用ヒト肝細胞（10人のドナー及び20人のドナーからプールした肝細胞を含む）、ヒト肝クッパー細胞、ヒト肝星細胞、イヌ肝細胞（単一の、及びプールしたビーグル肝細胞を含む）、マウス肝細胞（CD-1及びC57BL／6肝細胞を含む）、ラット肝細胞（Sprague-Dawley、Wistar Han及びWistar肝細胞を含む）、サル肝細胞（カニクイザル又はアカゲザル肝細胞を含む）、ネコ肝細胞（イエネコ短毛種肝細胞を含む）及びウサギ肝細胞（ニュージーランドホワイト種肝細胞を含む）であり得る。例の肝細胞は、Triangle Research Labs、LLC、6 Davis Drive Research Triangle Park、North Carolina、USA 27709から市販されている。

30

【0117】

一実施形態では、真核細胞は、例えば酵母細胞（例えばピキア属（例えばピキア・パストリス、ピキア・メタノリカ、ピキア・クスイベリ及びピキア・アンガスタ）、コマガタエラ属（例えばコマガタエラ・パストリス、コマガタエラ・シュードパストリス又はコマガタエラ・ファフィ）、サッカロマイセス属（例えば出芽酵母、出芽酵母、サッカロマイセス・クスイベリ、サッカロマイセス・ウバラム）、クスイベロマイセス属（例えばクスイベロマイセス・ラクティス、クスイベロマイセス・マルキシアヌス）、キャンディダ属（例えばトルラ酵母、キャンディダ・カカオイ、キャンディダ・ボイディニ）、ゲオトリクム属（例えばゲオトリクム・ファーマンタンス）、ハンセヌラ・ポリモルファ、ヤロウイア・リポリティカ又は分裂酵母）等の低級真核細胞である。ピキア・パストリス種は好ましい。ピキア・パストリス系統の例は、X33、GS115、KM71、KM71H及びCBS7435である。

40

【0118】

一実施形態では、真核細胞は、真菌細胞（例えばコウジカビ属（クロコウジカビ、アスペ

50

ルギルス・フミガータス、ニホンコウジカビ、偽巢性コウジ菌等）、アクレモニウム属（アクレモニウム・サーモフィラム等）、ケタマカビ属（ケトミウム・サーモフィラム等）、クリソスポリウム属（クリソスポリウム・サーモフィラム等）、冬虫夏草属（サナギタケ等）、コリナスカス属、クテノマイセス属、フサリウム属（フサリウム・オキシスポラム等）、グロメラ属（イネ科炭疽病菌等）、ボタントケ属（ハイポクレア・ジェコリーナ等）、マグナポルテ属（イモチ病菌等）、マイセリオフトーラ属（マイセリオフトーラ・サーモフィル等）、アカツブタケ属（ネクトリア・ヘマトコッカ等）、アカパンカビ属（アカパンカビ等）、アオカビ属、スポロトリウム属（スポロトリウム・サーモフィル等）、ティエラピア属（ティエラピア・テレストリス、ティエラピア・ヘテロタリカ等）、トリコデルマ属（トリコデルマ・リーセイ等）又はバーティシリウム属（バーティシリウム・ダリエ等）である。

10

【0119】

一実施形態では、真核細胞は、昆虫細胞（例えば Sf 9、ミミック（商標）Sf 9、Sf 21、ハイファイブ（商標）（BT1-TN-5B1-4）又は BT1-Ea88 細胞）、藻類細胞（例えばアンフォラ属、珪藻類の属、ドナリエラ属、クロレラ属、コナミドリムシ属、藍藻類の属（シアノバクテリア）、ナンノクロロプシス属、スピルリナ属又はオクロモナス属の細胞）又は植物細胞（例えば単子葉植物（例えばトウモロコシ、イネ、コムギ又はエノコログサ属）から、又は双子葉植物（例えばキャッサバ、ジャガイモ、ダイズ、トマト、タバコ、アルファルファ、ニセツリガネゴケ又はシロイヌナズナ属）からの細胞）である。

20

【0120】

実施形態では、培養細胞は、治療的使用のための、タンパク質、例えば抗体、例えばモノクローナル抗体及び／又は組換えタンパク質を産生するために使用される。実施形態では、培養細胞は、ペプチド、アミノ酸、脂肪酸又は他の有用な生化学中間体若しくは代謝産物を産生する。例えば、実施形態では、約 4000 ダルトン～約 140,000 ダルトンを超える分子量を有する分子が産生され得る。実施形態では、これらの分子は、ある程度の複雑さを有する場合があり、糖鎖付加を含む翻訳後修飾を含み得る。

【0121】

番号付き実施形態

本発明は、例えば以下の番号付き段落のうちのいずれかにおいて定義される通り、定義され得る。

30

1. 対象核酸配列を含む細胞を特定、選択又は培養する方法であって、

a) (i) 対象核酸配列と、

(ii) 発現した場合、アミノ酸の合成経路、例えばプロリン合成経路の酵素の高レベルの活性をもたらす核酸配列、例えば活性を含む酵素分子をコードする核酸配列とを含む異種の核酸、例えばベクター、例えば複製可能ベクター又は統合ベクターを含む細胞を用意するステップと、

b) 核酸配列を含む細胞を、核酸配列を含む細胞の成長を可能にするために十分な条件下で、高活性を有しない細胞と同じである細胞の成長を支持するためには不十分なレベルのアミノ酸、例えばプロリンを有する培地の存在下で培養するステップとを含む、それによって、異種の核酸配列を含む細胞を特定、選択又は培養する方法。

40

【0122】

2. 異種の核酸が、ベクターを含む、実施形態 1 に記載の方法。

【0123】

3. 異種の核酸が、複製可能ベクター、例えば自己複製可能ベクターを含む、実施形態 1 又は 2 に記載の方法。

【0124】

4. 異種の核酸が、統合ベクターを含む、前記実施形態のいずれか 1 つに記載の方法。

【0125】

5. 培地が、酵素の活性の阻害剤をさらに含む、前記実施形態のいずれか 1 つに記載の方

50

法。

【0126】

6．阻害剤が、アミノ酸である、実施形態5に記載の方法。

【0127】

7．阻害剤が、アミノ酸ではない、実施形態5に記載の方法。

【0128】

8．異種の核酸配列を含む細胞を特定するステップを含む前記実施形態のいずれか1つに記載の方法。

【0129】

9．異種の核酸配列を含む細胞を選択するステップを含む前記実施形態のいずれか1つに記載の方法。

10

【0130】

10．異種の核酸配列を含む細胞を培養するステップを含む前記実施形態のいずれか1つに記載の方法。

【0131】

11．異種の核酸が、複数のベクターを含む（例えば、対象核酸及び酵素の高レベルの活性をもたらす核酸が複数のベクターに、例えば異なるベクターに含まれる）、前記実施形態のいずれか1つに記載の方法。

【0132】

12．異種の核酸が、複数の統合ベクターを含む（例えば、対象核酸及び酵素の高レベルの活性をもたらす核酸が複数の統合ベクターに、例えば異なるベクターに含まれる）、前記実施形態のいずれか1つに記載の方法。

20

【0133】

13．異種の核酸が、複数の自己複製ベクターを含む（例えば、対象核酸及び酵素の高レベルの活性をもたらす核酸が複数の自己複製ベクターに、例えば異なるベクターに含まれる）、前記実施形態のいずれか1つに記載の方法。

【0134】

14．異種の核酸が、細胞のゲノム、例えば染色体ゲノムに統合される、前記実施形態のいずれか1つに記載の方法。

【0135】

15．アミノ酸が、天然アミノ酸を含む、前記実施形態のいずれか1つに記載の方法。

30

【0136】

16．アミノ酸が、表1に列挙されるアミノ酸を含む、前記実施形態のいずれか1つに記載の方法。

【0137】

17．アミノ酸が、アラニンである、実施形態16に記載の方法。

【0138】

18．アミノ酸が、ロイシンである、実施形態16に記載の方法。

【0139】

19．アミノ酸が、イソロイシンである、実施形態16に記載の方法。

40

【0140】

20．アミノ酸が、メチオニンである、実施形態16に記載の方法。

【0141】

21．アミノ酸が、バリンである、実施形態16に記載の方法。

【0142】

22．アミノ酸が、フェニルアラニンである、実施形態16に記載の方法。

【0143】

23．アミノ酸が、アスパラギンである、実施形態16に記載の方法。

【0144】

24．アミノ酸が、システインである、実施形態16に記載の方法。

50

【0145】

25. アミノ酸が、グルタミンである、実施形態16に記載の方法。

【0146】

26. アミノ酸が、セリンである、実施形態16に記載の方法。

【0147】

27. アミノ酸が、トレオニンである、実施形態16に記載の方法。

【0148】

28. アミノ酸が、アスパラギン酸である、実施形態16に記載の方法。

【0149】

29. アミノ酸が、グルタミン酸である、実施形態16に記載の方法。

10

【0150】

30. アミノ酸が、アルギニンである、実施形態16に記載の方法。

【0151】

31. アミノ酸が、ヒスチジンである、実施形態16に記載の方法。

【0152】

32. アミノ酸が、リジンである、実施形態16に記載の方法。

【0153】

33. アミノ酸が、グリシンである、実施形態16に記載の方法。

【0154】

34. アミノ酸が、プロリン、チロシン及びトリプトファンから選択される、実施形態1～16のいずれか1つに記載の方法。

20

【0155】

35. アミノ酸が、プロリンである、実施形態34に記載の方法。

【0156】

36. アミノ酸が、チロシンである、実施形態34に記載の方法。

【0157】

37. アミノ酸が、トリプトファンである、実施形態34に記載の方法。

【0158】

38. 阻害剤が、酵素に結合する、例えば、阻害剤が、酵素に結合し、これを阻害する、実施形態5～37のいずれか1つに記載の方法。

30

【0159】

39. 阻害剤が、酵素の転写を阻害する、実施形態5～38のいずれか1つに記載の方法。

【0160】

40. 阻害剤が、酵素の翻訳を阻害する、実施形態5～39のいずれか1つに記載の方法。

【0161】

41. 阻害剤が、核酸、例えばRNA、例えばアンチセンス又はsiRNAを含む、実施形態5～40のいずれか1つに記載の方法。

【0162】

42. 阻害剤が、アプタマーを含む、実施形態5～41のいずれか1つに記載の方法。

【0163】

43. 阻害剤が、小分子を含む、実施形態5～42のいずれか1つに記載の方法。

40

【0164】

44. 阻害剤が、酵素の基質のアナログである、実施形態5～43のいずれか1つに記載の方法。

【0165】

45. 阻害剤が、アミノ酸のアナログ、例えばプロリン、チロシン又はトリプトファンのアナログである、実施形態5～44のいずれか1つに記載の方法。

【0166】

46. 阻害剤が、競合的阻害剤を含む、実施形態5～45のいずれか1つに記載の方法。

【0167】

50

47. 阻害剤が、アミノ酸の合成の律速酵素を阻害する、例えば、阻害剤が、培地でのアミノ酸の合成のための律速酵素を阻害する、実施形態5～46のいずれか1つに記載の方法。

【0168】

48. アミノ酸が、プロリンを含む、前記実施形態のいずれか1つに記載の方法。

【0169】

49. 酵素が、ピロリン-5-カルボン酸シンターゼ（P5CS）分子を含む、前記実施形態のいずれか1つに記載の方法。

【0170】

50. 異種の核酸配列が、P5CS分子をコードする配列を含む、前記実施形態のいずれか1つに記載の方法。

10

【0171】

51. 阻害剤が、酵素の基質、又はそのアナログ、バリエーション若しくは誘導体である、実施形態5～50のいずれか1つに記載の方法。

【0172】

52. 阻害剤が、プロリンのアナログ、例えばL-アゼチジン-2-カルボン酸、3,4-デヒドロ-L-プロリン又はL-4-チアゾリジンカルボン酸である、前記実施形態のいずれか1つに記載の方法。

【0173】

53. アミノ酸が、プロリンを含み、酵素及び阻害剤が、表1から選択される、実施形態5～52のいずれか1つに記載の方法。

20

【0174】

54. アミノ酸が、チロシンを含み、酵素及び／又は阻害剤が、表1から選択される、実施形態5～16、34又は38～47のいずれか1つに記載の方法。

【0175】

55. 異種の核酸配列が、ポリペプチド及び／又はチロシン生合成酵素の阻害剤をコードする配列を含む、実施形態5～16、34、38～47又は54のいずれか1つに記載の方法。

【0176】

56. 阻害剤が、酵素の基質のアナログである、実施形態54又は55に記載の方法。

30

【0177】

57. 阻害剤が、チロシンのアナログである、実施形態5～16、34、38～47又は54～56のいずれか1つに記載の方法。

【0178】

58. アミノ酸が、チロシンを含み、酵素及び阻害剤が、表1から選択される、実施形態5～16、34、38～47又は54～57のいずれか1つに記載の方法。

【0179】

59. アミノ酸が、トリプトファンを含み、酵素及び／又は阻害剤が、表1から選択される、実施形態5～16、34又は38～47のいずれか1つに記載の方法。

【0180】

60. 異種の核酸配列が、ポリペプチド及び／又はトリプトファン生合成酵素の阻害剤をコードする配列を含む、実施形態5～16、34、38～47又は59のいずれか1つに記載の方法。

40

【0181】

61. 阻害剤が、酵素の基質のアナログである、実施形態59又は60に記載の方法。

【0182】

62. 阻害剤が、トリプトファンのアナログである、実施形態5～16、34、38～47又は59～61のいずれか1つに記載の方法。

【0183】

63. アミノ酸が、トリプトファンを含み、酵素及び阻害剤が、表1から選択される、実

50

施形態 5～16、34、38～47 又は 59～62 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0184】

64．高酵素活性を有しない細胞を、高活性を有する細胞と共に培養するステップを含む前記実施形態のいずれか 1 つに記載の方法。

【0185】

65．高活性を有する細胞が、高活性を有しない細胞よりも迅速に、例えば約 2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、75、100、150、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000 又は 10,000 倍迅速に成長する、前記実施形態のいずれか 1 つに記載の方法。

10

【0186】

66．選択された、例えば成長に基づいて選択された細胞の約 0.01、0.1、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40 又は 50 パーセント未満が、核酸を欠く、前記実施形態のいずれか 1 つに記載の方法。

【0187】

67．成長を示す細胞を選択するステップをさらに含む前記実施形態のいずれか 1 つに記載の方法。

【0188】

68．細胞が、真核細胞を含む、前記実施形態のいずれか 1 つに記載の方法。

【0189】

69．細胞が、動物細胞を含む、前記実施形態のいずれか 1 つに記載の方法。

20

【0190】

70．細胞が、哺乳動物細胞を含む、前記実施形態のいずれか 1 つに記載の方法。

【0191】

71．細胞が、げっ歯類細胞を含む、前記実施形態のいずれか 1 つに記載の方法。

【0192】

72．細胞が、CHO 細胞を含む、前記実施形態のいずれか 1 つに記載の方法。

【0193】

73．細胞が、GSKO CHO 細胞を含む、前記実施形態のいずれか 1 つに記載の方法。

【0194】

74．酵素をコードする配列の内因性コピーが、不活性化されている、例えば構造領域又は制御領域の欠失を含む、前記実施形態のいずれか 1 つに記載の方法。

30

【0195】

75．第 2 のアミノ酸合成酵素をコードする配列の内因性コピーが、不活性化されている、例えば構造領域又は制御領域の欠失を含む、前記実施形態のいずれか 1 つに記載の方法。

【0196】

76．GS をコードする配列の内因性コピーが、不活性化されている、例えば構造領域又は制御領域の欠失を含む、前記実施形態のいずれか 1 つに記載の方法。

【0197】

77．対象核酸配列が、ペプチド分子をコードする、前記実施形態のいずれか 1 つに記載の方法。

40

【0198】

78．対象核酸配列が、異種である、前記実施形態のいずれか 1 つに記載の方法。

【0199】

79．異種のペプチド分子が、表 5～8 のうちのいずれかから選択される、前記実施形態のいずれか 1 つに記載の方法。

【0200】

80．培地で成長する細胞を選択するステップを含む前記実施形態のいずれか 1 つに記載の方法。

【0201】

50

81. 培地が、阻害剤を含む、実施形態80に記載の方法。

【0202】

82. 1) 培地で成長する細胞を選択するステップと、

2) 培養条件の第2のセット下で、例えば第2の培地で細胞を培養する、例えば選択した細胞を第2の選択に供するステップと

を含む前記実施形態のいずれか1つに記載の方法。

【0203】

83. 1) の培地が、阻害剤を含み、

2) の第2の培地が、阻害剤を含む、

実施形態82に記載の方法。

【0204】

84. 1) 培地で成長する細胞を選択するステップと、

2) 培養条件の第2のセット下で、例えば第2の培地で細胞を培養する、例えば選択した細胞を第2の選択に供するステップと

を含み、1) 及び2) のうちの一方の培地の阻害剤の濃度が、1) 及び2) のうちの他方の阻害剤の濃度よりも大きい、前記実施形態のいずれか1つに記載の方法。

【0205】

85. 1) の阻害剤の濃度が、2) の阻害剤の濃度よりも大きい、実施形態84に記載の方法。

【0206】

86. 1) の阻害剤の濃度が、2) の阻害剤の濃度よりも大きい、実施形態84に記載の方法。

【0207】

87. より低い濃度の阻害剤を有するステップの培地が、本質的に阻害剤を含まない、実施形態84～86のいずれか1つに記載の方法。

【0208】

88. (ii) の核酸配列が、制御配列、例えばプロモーターに作動可能に連結されている、前記実施形態のいずれか1つに記載の方法。

【0209】

89. 制御配列が、SV40、mCMV、hCMV若しくはPGKプロモーター又はそれらのバリエーションから選択される配列を含む、実施形態88に記載の方法。

【0210】

90. 制御配列が、LMMの発現を制御する、実施形態88に記載の方法。

【0211】

91. 制御配列及びLMMが、表3の任意の単一の行に列挙される通りである、実施形態90に記載の方法。

【0212】

92. 制御配列が、SV40プロモーターを含み、LMMが、マウスSCD1である、実施形態90に記載の方法。

【0213】

93. 制御配列が、SV40プロモーターを含み、LMMが、SCD1、例えばCHO SCD1である、実施形態90に記載の方法。

【0214】

94. 制御配列が、SV40プロモーターを含み、LMMが、SREBF1、例えばCHO SREBF1である、実施形態90に記載の方法。

【0215】

95. 制御配列が、SV40プロモーターを含み、LMMが、SREB411、例えばCHO SREB411である、実施形態90に記載の方法。

【0216】

96. 制御配列が、mCMVプロモーターを含み、LMMが、マウスSCD1である、実

10

20

30

40

50

施形態 90 に記載の方法。

【0217】

97. 制御配列が、mCMVプロモーターを含み、LMMが、SCD1、例えばCHO SCD1である、実施形態90に記載の方法。

【0218】

98. 制御配列が、mCMVプロモーターを含み、LMMが、SREBF1、例えばCHO SREBF1である、実施形態90に記載の方法。

【0219】

99. 制御配列が、mCMVプロモーターを含み、LMMが、SREB411、例えばCHO SREB411である、実施形態90に記載の方法。

【0220】

100. 制御配列が、hCMVプロモーターを含み、LMMが、マウスSCD1である、実施形態90に記載の方法。

【0221】

101. 制御配列が、hCMVプロモーターを含み、LMMが、SCD1、例えばCHO SCD1である、実施形態90に記載の方法。

【0222】

102. 制御配列が、hCMVプロモーターを含み、LMMが、SREBF1、例えばCHO SREBF1である、実施形態90に記載の方法。

【0223】

103. 制御配列が、hCMVプロモーターを含み、LMMが、SREB411、例えばCHO SREB411である、実施形態90に記載の方法。

【0224】

104. 制御配列が、PGKプロモーターを含み、LMMが、マウスSCD1である、実施形態90に記載の方法。

【0225】

105. 制御配列が、PGKプロモーターを含み、LMMが、SCD1、例えばCHO SCD1である、実施形態90に記載の方法。

【0226】

106. 制御配列が、PGKプロモーターを含み、LMMが、SREBF1、例えばCHO SREBF1である、実施形態90に記載の方法。

【0227】

107. 制御配列が、PGKプロモーターを含み、LMMが、SREB411、例えばCHO SREB411である、実施形態90に記載の方法。

【0228】

108. 制御配列が、LMMの発現を制御し、培地が、酵素の活性の阻害剤を含む、実施形態88に記載の方法。

【0229】

109. 制御配列、LMM及び阻害剤（例えばP5CS阻害剤）が、表4の任意の単一の行に列挙される通りである、実施形態108に記載の方法。

【0230】

110. 培地が、L-アゼチジン-2-カルボン酸を含む、実施形態88～109のいずれか1つに記載の方法。

【0231】

111. 培地が、3,4-デヒドロ-L-プロリンを含む、実施形態88～110のいずれか1つに記載の方法。

【0232】

112. 培地が、L-4-チアゾリジンカルボン酸を含む、実施形態88～111のいずれか1つに記載の方法。

【0233】

10

20

30

40

50

113. 対象核酸配列の生成物を回復するステップをさらに含む前記実施形態のいずれか1つに記載の方法。

【0234】

114. 培地から生成物を回復するステップを含む前記実施形態のいずれか1つに記載の方法。

【0235】

115. 細胞から生成物を回復するステップを含む前記実施形態のいずれか1つに記載の方法。

【0236】

116. i) 培地で成長する細胞を選択するステップと、

ii) 培養条件の第2のセット下で、例えば第2の培地で細胞を培養する、例えば選択した細胞を第2の選択に供するステップと、

iii) 細胞又は第2の培地から生成物を回復するステップとを含む前記実施形態のいずれか1つに記載の方法。

【0237】

117. 対象核酸配列を含む細胞を特定、選択又は培養する方法であって、

a) (i) 対象核酸配列と、

(ii) 発現した場合、アミノ酸の合成経路、例えばプロリン合成経路の酵素の高レベルの活性をもたらす核酸配列、例えば活性を含む酵素分子をコードする核酸配列と

を含む核酸、例えばベクター、例えば複製可能ベクターを含む細胞を用意するステップと、

b) 核酸配列を含む細胞を、核酸配列を含む細胞の成長を可能にするために十分な条件下で、高活性を有しない対象細胞と同じである細胞の成長を支持するためには不十分なレベルのアミノ酸、例えばプロリンを有する第1の培地（及び酵素の阻害剤を任意選択で含む第1の培地）の存在下で培養するステップと、

c) 核酸配列を含む細胞を、核酸配列を含む細胞の成長を可能にするために十分な条件下で、高活性を有しない対象細胞と同じである細胞の成長を支持するためには不十分なレベルの第2のアミノ酸、例えばチロシンを含む第2の培地（及び第2の酵素の阻害剤を任意選択で含む第2の培地）の存在下で培養するステップと

を含み、それによって、異種の核酸配列を含む細胞を特定、選択又は培養する方法。

【0238】

118. ステップbが、ステップcの開始前に開始される、実施形態117に記載の方法。

【0239】

119. ステップbが、ステップcの前に行われる、実施形態117又は118に記載の方法。

【0240】

120. ステップb及びステップcが、同時に行われる、実施形態117又は118に記載の方法。

【0241】

121. ステップb及びステップcが、同じ培地で行われる、実施形態117～120のいずれか1つに記載の方法。

【0242】

122. ステップb及びステップcが、同じ容器内で行われる、実施形態117～121のいずれか1つに記載の方法。

【0243】

123. ステップbの選択及びステップcの選択が、同じ培地で行われ、培地が、

(a) 高活性を有しない対象細胞と同じである細胞の成長を支持するためには不十分なレベルのアミノ酸、例えばプロリンを有し、

(b) 第2の酵素の高活性を有しない対象細胞と同じである細胞の成長を支持するためには不十分なレベルの第2のアミノ酸、例えばチロシンを有する、

実施形態117～122のいずれか1つに記載の方法。

10

20

30

40

50

【0244】

124. 細胞が、

(iii) 発現した場合、アミノ酸の合成経路の第2の酵素の高レベルの活性をもたらす核酸配列、例えば活性を含む酵素分子をコードする核酸配列をさらに含む、実施形態117～123のいずれか1つに記載の方法。

【0245】

125. 細胞が、酵素の活性の阻害剤を有する培地で培養される、実施形態117～124のいずれか1つに記載の方法。

【0246】

126. 細胞が、第2の酵素の活性の阻害剤を有する培地で培養される、実施形態117～125のいずれか1つに記載の方法。

【0247】

127. 第2の酵素が、(ii)の酵素と同じ経路、例えばプロリン合成経路に存在する、実施形態117～126のいずれか1つに記載の方法。

【0248】

128. 第2の酵素が、同じアミノ酸の合成経路に存在する、例えば活性を含む酵素分子をコードする核酸配列であり、

b) の培地が、

iv) 第2の酵素の活性の阻害剤

をさらに含む、

実施形態127に記載の方法。

【0249】

129. 第2の酵素が、(ii)の酵素とは異なる経路に存在する、例えば、酵素が、プロリン合成経路に存在し、第2の酵素が、プロリン以外の経路、例えばチロシン又はトリプトファン経路に存在する、実施形態117～128のいずれか1つに記載の方法。

【0250】

130. 第2の酵素が、第2のアミノ酸の合成経路に存在し、例えば活性を含む酵素分子をコードする核酸配列であり、

b) の培地が、

iii) 高活性を有しない対象細胞と同じである細胞の成長を支持するためには不十分なレベルの第2のアミノ酸、例えばプロリン以外のアミノ酸と、

iv) 第2の酵素の活性の阻害剤と

をさらに含む、

実施形態129に記載の方法。

【0251】

131. SV40プロモーター配列、mCMVプロモーター配列又はPGKプロモーター配列のうちのいずれかからの制御領域を含む配列、例えばプロモーター配列に作動可能に連結された異種の脂質代謝変更因子(LMM)をコードする配列を含む細胞。

【0252】

132. LMMが、表2に列挙される経路を変更する、実施形態131に記載の細胞。

【0253】

133. LMMが、ステロイル-CoAデサチュラーゼ1(SCD1)を含む、実施形態131又は132に記載の細胞。

【0254】

134. LMMが、ステロール調節エレメント結合転写因子1(SREBF1)を含む、実施形態131又は132に記載の細胞。

【0255】

135. LMMが、SREBF1の切断型アイソフォーム(例えば調節ドメインを欠くSREBF1の切断型アイソフォーム、例えばSREB411)を含む、実施形態131又は132に記載の細胞。

10

20

30

40

50

【0256】

136. 異種の脂質代謝変更因子 (LMM) をコードする配列が、ベクターに配置されている、前記実施形態のいずれか1つに記載の細胞。

【0257】

137. ベクターが、選択可能マーカー、例えば、存在する場合、規定の培地での生存又は成長を可能にするマーカーをコードする配列をさらに含む、前記実施形態のいずれか1つに記載の細胞。

【0258】

138. ベクターが、存在する場合、栄養素、例えばアミノ酸を欠く培地での生存又は成長を可能にする選択可能マーカーをコードする配列をさらに含む、前記実施形態のいずれか1つに記載の細胞。

10

【0259】

139. 栄養素が、アミノ酸、例えば表1に列挙されるアミノ酸から選択されるアミノ酸である、実施形態138に記載の細胞。

【0260】

140. 栄養素が、プロリンを含む、実施形態139に記載の細胞。

【0261】

141. マーカーが、ピロリン-5-カルボン酸シンターゼ (P5CS) 分子を含む、実施形態137~140のいずれか1つに記載の方法。

【0262】

142. 栄養素が、チロシンを含む、実施形態138~141のいずれか1つに記載の細胞。

20

【0263】

143. 栄養素が、トリプトファンを含む、実施形態138~142のいずれか1つに記載の細胞。

【0264】

144. マーカーが、表1から選択される、実施形態131~143のいずれか1つに記載の細胞。

【0265】

145. マーカーが、グルタミンシンターゼを含む、実施形態137~144のいずれか1つに記載の細胞。

30

【0266】

146. LMMをコードする配列が、SV40プロモーター配列をコードする配列に作動可能に連結されている、実施形態131~145のいずれか1つに記載の細胞。

【0267】

147. LMMをコードする配列が、mCMVプロモーター配列をコードする配列に作動可能に連結されている、実施形態131~145のいずれか1つに記載の細胞。

【0268】

148. LMMをコードする配列が、PGKプロモーター配列をコードする配列に作動可能に連結されている、実施形態131~145のいずれか1つに記載の細胞。

40

【0269】

149. LMMが、SCD1である、実施形態131~148のいずれか1つに記載の細胞。

【0270】

150. LMMが、マウスSCD1である、実施形態149に記載の細胞。

【0271】

151. LMMが、CHO SCD1である、実施形態149に記載の細胞。

【0272】

152. LMMが、SREBF1である、実施形態131~148のいずれか1つに記載の細胞。

50

【0273】

153. LMMが、CHO SREBF1である、実施形態131～148のいずれか1つに記載の細胞。

【0274】

154. LMMが、SREB411である、実施形態131～148のいずれか1つに記載の細胞。

【0275】

155. LMMが、CHO SREB411である、実施形態131～148のいずれか1つに記載の細胞。

【0276】

156. LMMが、ステロイル-CoAデサチュラーゼ-1 (SCD1)を含み、プロモーターが、SV40プロモーター配列を含む、実施形態131～148のいずれか1つに記載の細胞。

【0277】

157. LMMが、ステロイル-CoAデサチュラーゼ-1 (SCD1)を含み、プロモーターが、mCMVプロモーター配列を含む、実施形態131～148のいずれか1つに記載の細胞。

【0278】

158. LMMが、ステロイル-CoAデサチュラーゼ-1 (SCD1)を含み、プロモーターが、PGKプロモーター配列を含む、実施形態131～148のいずれか1つに記載の細胞。

【0279】

159. LMMが、ステロール調節エレメント結合転写因子1 (SREBF1)を含み、プロモーターが、SV40プロモーター配列を含む、実施形態131～148のいずれか1つに記載の細胞。

【0280】

160. LMMが、ステロール調節エレメント結合転写因子1 (SREBF1)を含み、プロモーターが、mCMVプロモーター配列を含む、実施形態131～148のいずれか1つに記載の細胞。

【0281】

161. LMMが、ステロール調節エレメント結合転写因子1 (SREBF1)を含み、プロモーターが、PGKプロモーター配列を含む、実施形態131～148のいずれか1つに記載の細胞。

【0282】

162. LMMが、SREB411を含み、プロモーターが、SV40プロモーター配列を含む、実施形態131～148のいずれか1つに記載の細胞。

【0283】

163. LMMが、SREB411を含み、プロモーターが、mCMVプロモーター配列を含む、実施形態131～148のいずれか1つに記載の細胞。

【0284】

164. LMMが、ステロールSREB411を含み、プロモーターが、PGKプロモーター配列を含む、実施形態131～148のいずれか1つに記載の細胞。

【0285】

165. 培地が、表1又は4に列挙される阻害剤を含む、実施形態131～148のいずれか1つに記載の細胞。

【0286】

166. 培地が、P5CS阻害剤を含む、実施形態131～148のいずれか1つに記載の細胞。

【0287】

167. P5CS阻害剤が、L-アゼチジン-2-カルボン酸である、実施形態166に

10

20

30

40

50

記載の細胞。

【0288】

168. P5CS阻害剤が、3,4-デヒドロ-L-プロリンである、実施形態166に記載の細胞。

【0289】

169. P5CS阻害剤が、L-4-チアゾリジンカルボン酸である、実施形態166に記載の細胞。

【実施例】

【0290】

実施例1：ピロリン-5-カルボン酸シンターゼ発現及びプロリン代謝哺乳動物選択系における使用のための阻害剤の調査

10

ピロリン-5-カルボン酸シンターゼ (P5CS) は、グルタミン酸塩からのプロリン合成の原因である律速酵素である。この経路を単純化した図を、図1に示す。プロリン代謝は、細胞生存にとって必須であるので、プロリン非含有培地で培養した細胞は、生存することができないはずである。或いは、豊富なP5CS発現及びしたがって、グルタミン酸塩からプロリンを効率的に生成する能力を有する細胞は、これらの条件下での細胞生存を可能にし、したがって所望の細胞の適切な選択を促進するはずである。

【0291】

この仮説を評価するために、P5CS遺伝子を保有するベクターを最初に合成し、この目的の遺伝子及びeGFPレポーター遺伝子を包含する構築物を生成するためにクローニングした (図2)。トランスフェクションに際して、このベクターは、CHO細胞で内因的に観察される発現レベルを超えるP5CS発現レベルを誘導し、高率のプロリン合成を可能にし、したがって通常は培地に存在する外的プロリンの非存在下での細胞生存を促進するはずである。理論では、構築物のトランスフェクションのために豊富なP5CSを発現するそれらの細胞は、eGFP遺伝子も発現するはずである。

20

【0292】

P5CSの過剰発現は、プロリンの非存在下で細胞を選択するために十分であり得るが、この酵素の阻害剤は、この系の厳密性を改善し得る。プロリンは、CHO細胞における内因性フィードバックループの部分であるので、プロリンそれ自体が、P5CSの有効な阻害剤である。この系における使用に特定された阻害剤は、プロリンのアナログを含む。P5CSの*in vitro*活性の有効な阻害剤として例示的な阻害剤を、本明細書に示す。

30

【0293】

プロリンの非存在下での細胞成長

一実験では、内因性グルタミンシンターゼ発現をノックアウトするように操作した細胞 (GSKO細胞) を、このことが成長に対して有する効果を決定するためにプロリンの非存在下で培養した。GSKO細胞を、125mlのエrlenmeyer (Erlenmeyer) フラスコ中に20mlの全培養体積で0.2 x 10⁶個の細胞/mlにて播種した。細胞を、L-グルタミンを伴う (6mM Glut)、若しくは伴わない (Glutなし) CD-CHOを使用して、又はプロリンを伴わない (Proなし) が、6mM L-グルタミンを伴うCM76培地で培養した。ViceLL器具を使用して24時間毎に生細胞カウント及び培養物生存率を測定した。

40

【0294】

GSKO細胞は、プロリンの非存在下で培養した場合、成長することができなかった (図3)。しかしながら、L-グルタミンの非存在下で培養した細胞は、経時的に培養物生存率の減少を示した。これらの細胞は、グルタミン生成の律速酵素であるグルタミンシンターゼの内因的発現をノックアウトするように操作されていたので、このことは予測されていた。

【0295】

プロリンの非存在下で培養した細胞の復帰速度

プロリン非含有培地でインキュベートした培養物から生じる復帰変異細胞数を決定して、

50

選択系における使用にプロリン代謝を利用する適合性を評価した。簡潔に説明すると、L o n z a の G S K O 細胞を、6 m M L - グルタミンを伴う C D - C H O、L - グルタミンを伴わない C D - C H O、又は 6 m M L - グルタミンを伴い、プロリンを伴わない C M 7 6 に、9 6 ウェルプレート中の 1 ウェル当たり 1, 0 0 0 又は 5, 0 0 0 個の細胞のいずれかで、培養体積が 1 ウェル当たり 2 0 0 μ l に等しくなるように播種した。全部で 3 0 枚のプレートの各培地に播種し、1 5 枚は 1 ウェル当たり 1, 0 0 0 個の細胞で培養し、1 5 枚は 1 ウェル当たり 5, 0 0 0 個の細胞で培養した。顕微鏡を使用して 1 1 日後に観察して、復帰変異コロニーを特定した。

【0296】

6 m M L - グルタミンを伴う C D C H O に播種したウェルの 1 0 0 % が、1 1 日後にコンフルエントであったが、L - グルタミン非含有培地で培養した場合、復帰変異コロニーは観察されなかった。プロリンの非存在下で培養した全部で 8.64×10^6 個の細胞のうち、1 5 個の復帰変異コロニーが観察され、1 3 個は 1 ウェル当たり 5, 0 0 0 個の細胞で播種したプレートで観察され、2 個のコロニーは 1 ウェル当たり 1, 0 0 0 個の細胞で播種したプレートで観察された。

【0297】

目的の遺伝子を発現する細胞を選択するための P 5 C S の過剰発現

培養培地からのプロリンの除外は、G S K O 細胞の成長の欠損をもたらすことが上記で示された。内因性プロリン合成の律速酵素であるピロリン-5-カルボン酸シンターゼ (P 5 C S) の過剰発現は、外因性プロリンの非存在下での成長を回復させるために十分であり、それによって、有効な選択系を提供すると仮定した。この仮定を評価するために、細胞に P 5 C S 遺伝子を保有するプラスミドをトランスフェクトして、その過剰発現を促進し、プロリンの非存在下で培養した。簡潔に説明すると、プラスミドを、グルタミンシンターゼ (G S) 又は P 5 C S のいずれか、及び e G F P レポーター遺伝子を含むように構築した。任意の「選択」遺伝子又はレポーターを含有しない対照ベクターも含めた；対照ベクターは、この実験に含まれる他のプラスミドと同様の細胞負荷を誘導するためのエタネルセプト遺伝子のみのベクターを含む。使用したベクターの概略図を、図 4 に示す。構築したプラスミドをエレクトロポレーションにより一過的に G S K O 細胞にトランスフェクトし、様々な培地；C D - C H O、チロシンを伴わない C M 7 6 培地、又はプロリンを伴わない C M 7 6 培地（これらの全てを最終濃度 6 m M の L - グルタミンを含むように補充した）で培養した。3 7 °C で 1 4 0 r p m にて振盪する 1 2 5 m l エルレンマイヤーフラスコ中の全培養体積は 2 0 m l であり（元々、 0.2×10^6 個の細胞 / m l で播種した）、トランスフェクション後 7 2 及び 1 6 8 時間で、フローサイトメトリーによるカウント及び分析のために試料を採取した。

【0298】

図 5 は、図 4 で概略されるベクターを一過的にトランスフェクトし、次に特定の培地で培養した G S K O 細胞のトランスフェクション後に得られたデータを示す。チロシン非含有又はプロリン非含有培地のいずれかで培養した細胞は、どのプラスミドを導入したかにかかわらず、C D - C H O で培養した細胞と比較してトランスフェクション後 7 2 時間で成長速度の低減を示す（図 5 A）。この観察は、上記に概略されるパターンと一致する。しかしながら、P 5 C S 含有ベクターによるトランスフェクション後 1 6 8 時間でプロリン非含有培地において、他の任意のベクターが使用された場合と比較して、生細胞濃度の増大が観察された。さらに、このベクターの導入は、チロシン非含有培地で達成される生細胞数の増大はもたらさず、P 5 C S は、特に外因性プロリンの非存在を補うことができることを示唆した。

【0299】

生細胞濃度における観察可能な差にもかかわらず、培養物生存率は、概して様々な培地での培養に際して有意に影響を受けなかった（図 5 B）。P 5 C S 含有構築物によるトランスフェクション、及びその後の次の 7 2 時間の培養は、同じ培地で培養した別のトランスフェクションで得られた値よりも低かったことは、注目に値する。これは、使用可能なチ

ロシンの欠損に加えてプロリン合成の増大のためにこれらの細胞に対して課された追加の細胞負荷のためであった可能性がある。この傾向は、168時間の時点では観察されなかった。CD-CHOで培養した細胞の生存率は概して、168時間の時点でより低かったが、これは、これらの細胞の典型的な成長プロファイルのためであるようであり、これらの細胞は、典型的な成長傾向に従わなかった他の培地で培養した細胞とは対照的に、この時点で減退相にあると予想される。

【0300】

フローサイトメトリーを使用した分析は、P5CS含有プラスミドによるトランスフェクションと次のプロリン非含有培地での培養との組合せは、両方の時点にわたり測定された条件の中で最も高い蛍光平均値をもたらすことを示した(図5C)。一般に、プロリンの非存在下で培養した細胞は、外因性チロシンを伴わずに培養した細胞よりも高い蛍光平均値を示し、一過性プラスミドにおけるP5CSの包含及び次のチロシン非含有培地での培養は、代わりにGSが包含された場合よりも高い蛍光平均値を示し、このことは、P5CSの過剰発現は、eGFP発現の増大に対して広範な影響を有し得ることを示唆する。しかしながら、P5CS過剰発現の組合せは、次にプロリン非含有培地で培養した細胞に対してより大きな効果を有することが明らかであり、このことは、蛍光平均値の大きな増大により確認され、所定の蛍光強度閾値を超える細胞の百分率において観察された大きく増大した値により補強される(図5D)。

【0301】

これらのデータをまとめると、GSKO細胞をプロリンの非存在下で培養した場合に観察される抑止された細胞成長は、P5CS遺伝子の過剰発現を通して回復することができるという仮説を支持する。さらに、これは、全体的な発現及び一過性集団内のレポーター遺伝子を発現する細胞の百分率の両方の点で、レポーター遺伝子の発現に対して有意な効果を有し得る。

目的の遺伝子を発現する安定な細胞プールの生成

プロリン/P5CS系の組換え細胞プールを生成する能力をアセスメントするために、組換え細胞プールを生成する試みで、P5CS遺伝子及び目的の遺伝子を含むベクターを細胞にトランスフェクトし、次にプロリンの非存在下で培養した。簡潔に説明すると、最初にPvuI制限酵素(NEB)を使用して直鎖化し、酢酸ナトリウム及びエタノール沈殿を使用して精製した20µgのプラスミドを、 1×10^7 個のLonzaのGSKO細胞にエレクトロポレーションした。使用した構築物は、選択マーカーとしての評価のためのP5CS遺伝子、及びレポーター遺伝子としてのeGFPの両方を含有した。プロリンの非存在下であるが、6mMの最終濃度を達成するようにL-グルタミンを補充したCM76培地で、トランスフェクションを行った。その後、細胞をT75フラスコ中で25mLのこの培地にて10日間培養し、その後、ここでもまたプロリン非含有培地での10mL懸濁培養に移した。得られたプールを、フローサイトメトリーを使用して分析した。細胞試料を最初に1,000rpmで5分間遠心分離し、500µLのPBSに再懸濁した。その後、試料をファクスカリバー(FACScalibur)(商標)(BD Biosciences)のプロープ上にロードし、細胞カウントと関連して蛍光強度を測定した。E-1増幅器を使用して前方散乱(FSC: forward scatter)を測定し、側方散乱(SSC: side scatter)を465に、一方でFL1記録細胞を473に設定し;全ての設定はログスケールに変換した。懸濁細胞の付着性を促進するために、カバーガラスを最初にポリ-L-リジンに浸し、室温で15分間インキュベートした。その後、カバーガラスを除去し、滅菌環境下で乾燥させ、その後、24ウェルプレートに移した。細胞を37℃で一晩培養して、細胞のカバーガラスへの付着を促進し、その後、培地を吸引し、250µLのPBS中の4%パラホルムアルデヒドを添加し、37℃で20分間インキュベートして細胞を固定した。次に、1mLのPBS洗浄を2回行い、その後、250µLのPBS中の0.1%トライトンX100を添加し、室温で5分間インキュベートして、細胞を透過処理した。固定し、透過処理した細胞を、1ウェル当たり250µLのPBS中の3%BSAを添加することによって封鎖し、室温で30分間イ

10

20

30

40

50

ンキュベートした。これを吸引し、カバーガラスをウェルから外し、以前に調製した100 μ lのPBSの液滴上に表を下にして置き、これをさらに3回繰り返した。カバーガラスを、縁をティッシュペーパーに接触させることによって乾燥させ、25 μ lの適切な一次抗体の液滴に移した。これを、4℃で一晩インキュベートした。適切な二次抗体をPBS中の3%BSA中に適宜に希釈した。カバーガラスを、100 μ lのPBS中の0.1%ツイーン(Tween)液滴上に表を下にして置き、5分間置いた。その後、これらを新しい液滴に4回移し、最後の2回の移行間は10分間置いた。その後、それらを、25 μ lの二次抗体液滴上に置き、2時間そのままにし、4℃の暗室に置いた。5つの逐次的な100 μ lの液滴を使用して5回の最終洗浄を行った。DAPI染色が必要な場合、カバーガラスを各々、第2のPBS液滴と第3のPBS液滴との間で50 μ lの10mg/mlのDAPI液滴に移した。最後に、細胞をProLong Gold褐色防止台紙(ThermoScientific)を使用して細胞スライドに乗せ、一晩置いて定着させた。Zeiss共焦点顕微鏡を使用して画像を収集した。宿主細胞が 10^1 蛍光強度値を超えないようにフローサイトメーター器具を校正し、したがって、この所定の閾値を超える細胞は、eGFPを発現していると考えられる。

【0302】

図6Aは、P5CSベース選択系を使用して生成したプールからフローサイトメトリーを使用して得られたヒストグラムを示す。多くの細胞は、 10^1 閾値を超える蛍光強度を有するので、P5CS選択系は、目的の遺伝子を発現する細胞を選択することができることが明らかである。しかしながら、 10^1 未満の蛍光強度値を有する細胞集団が存在しており、このことは、プール中に非発現細胞がまだ存在していることを示唆する。系の厳密性を増大させることが重要であり得る。図6Bは、蛍光顕微鏡を使用して得た、合成したプールの画像を示す。様々なeGFP発現レベルを有する細胞集団が存在しており、存在している全ての細胞が必ずしもeGFPレポーター遺伝子を発現しているわけではないので、この画像は、図6Aで示されるデータを支持する。

【0303】

図6B及び6Cの両方は、P5CS遺伝子の発現パターンを示す。これらの画像は、以前に文献で報告されたミトコンドリアにおけるP5CSの局在化と一致する点状スポットを示す。さらに、図6Cは、P5CS/eGFPプールのGSKO宿主との比較を示す。画像は、選択したプールが、宿主よりも高いP5CS発現レベルを有することを示すが、この観察は、eGFPレポーター遺伝子を発現する細胞について排他的ではない。宿主細胞の一部分は、プロリンの非存在下で復帰変異することができることが示されたので、トランスフェクトされたベクターを含有しない細胞が、P5CSの過剰発現を必要とすることなく概略される選択プロセスを生き残ることができた可能性がある。また、おそらく、プロリンの非存在は、十分なP5CSを内因的に発現する細胞を選択する。

【0304】

P5CS系を使用して構築した細胞プールを、細胞プールから採取した可溶化試料のウェスタンブロット分析によって調べた。これらのプールを生成するために使用したベクターは全て、P5CS、及び標識される通りeGFP又はSCD1(SV40又はmCMVプロモーターのいずれかによって駆動される)のいずれかのうちの1つの遺伝子を含有し、対照試料は、P5CSのみを含有するベクターを使用して構築した。GSKO細胞に、エレクトロポレーションにより上記に挙げた直鎖化ベクターをトランスフェクトし、次にプロリンの非存在下で2週間培養し、その後、懸濁培養に移した。図7で示される通り、得られた細胞プールからの可溶化液のウェスタンブロットは、eGFP及び空対照と比較して、SCD1が関連細胞プール(SV40 SCD1及びmCMV SCD1)で過剰発現していることを示し、P5CS系が細胞株構築プロセスに好適であることを示した。加えて、P5CS遺伝子を欠く対照ベクターもトランスフェクトしたが、得られた細胞は、プロリンの非存在下で成長せず、P5CSの過剰発現は、細胞の生存にきわめて重要であることを示した。

【0305】

P 5 C S 阻害剤の存在下で成長させた細胞プール

深型 9 6 ウェルプレートで成長させた細胞プール

P 5 C S / e G F P ベクターを使用して構築した（上記に概略される通り）細胞プールから、プロリンを欠くが、様々な濃度の P 5 C S 阻害剤 L - アゼチジン - 2 - カルボン酸を補充した培地で培養した場合のデータを得た。細胞を深型 9 6 ウェルプレートで培養し、 0.2×10^6 個の細胞 / ml で懸濁液に播種した。生細胞数（図 8 A）、培養物生存率（図 8 B）、蛍光平均値（図 8 C）、 10^2 の所定の蛍光閾値を超えて発現する細胞（図 8 D）及び 10^3 の所定の蛍光閾値を超えて発現する細胞（図 8 E）を全て、24、96、168 及び 216 培養時間で決定した。阻害剤濃度の増大は、より遅い細胞成長をもたらしたが、より高い蛍光平均値も観察され、阻害剤の添加は、既存のポリクローナル集団からの e G F P 発現を富化することができることを示した。図 8 F は、同じ時点で採取した可溶化試料からのウェスタンブロット分析を示す。P 5 C S、 β - アクチン及び e G F P を強調するためにブロットをプローブした。

【0306】

P 5 C S / e G F P ベクターを使用して構築した（上記に概略される通り）細胞プールから、プロリンを欠くが、様々な濃度の P 5 C S 阻害剤 3, 4 - デヒドロ - L - プロリンを補充した培地で培養した場合のデータを得た。細胞を深型 9 6 ウェルプレートで培養し、 0.2×10^6 個の細胞 / ml で懸濁液に播種した。生細胞数（図 9 A）、培養物生存率（図 9 B）、蛍光平均値（図 9 C）、 10^2 の所定の蛍光閾値を超えて発現する細胞（図 9 D）及び 10^3 の所定の蛍光閾値を超えて発現する細胞（図 9 E）を全て、24、96、168 及び 216 培養時間で決定した。阻害剤濃度の増大は、より遅い細胞成長をもたらしたが、より高い蛍光平均値も観察され、阻害剤の添加は、既存のポリクローナル集団からの e G F P 発現を富化することができることを示した。図 9 F は、同じ時点で採取した可溶化試料からのウェスタンブロット分析を示す。P 5 C S、 β - アクチン及び e G F P を強調するためにブロットをプローブした。

【0307】

P 5 C S / e G F P ベクターを使用して構築した（上記に概略される通り）細胞プールから、プロリンを欠くが、様々な濃度の P 5 C S 阻害剤 L - 4 - チアゾリジンカルボン酸を補充した培地で培養した場合のデータを得た。細胞を深型 9 6 ウェルプレートで培養し、 0.2×10^6 個の細胞 / ml で懸濁液に播種した。生細胞数（図 10 A）、培養物生存率（図 10 B）、蛍光平均値（図 10 C）、 10^2 の所定の蛍光閾値を超えて発現する細胞（図 10 D）及び 10^3 の所定の蛍光閾値を超えて発現する細胞（図 10 E）を全て、24、96、168 及び 216 培養時間で決定した。阻害剤濃度の増大は、より遅い細胞成長をもたらしたが、より高い蛍光平均値も観察され、阻害剤の添加は、既存のポリクローナル集団からの e G F P 発現を富化することができることを示した。図 10 F は、同じ時点で採取した可溶化試料からのウェスタンブロット分析を示す。P 5 C S、 β - アクチン及び e G F P を強調するためにブロットをプローブした。

【0308】

24 ウェルプレートで成長させた細胞プール

P 5 C S / e G F P ベクターを使用して構築した（上記に概略される通り）細胞プールから、プロリンを欠くが、様々な濃度の P 5 C S 阻害剤 L - アゼチジン - 2 - カルボン酸を補充した培地で培養した場合のデータを得た。細胞を固定 24 ウェルプレートで培養し、最初に 0.2×10^6 個の細胞 / ml で播種した。生細胞数（図 11 A）、培養物生存率（図 11 B）、蛍光平均値（図 11 C）、 10^2 の所定の蛍光閾値を超えて発現する細胞（図 11 D）及び 10^3 の所定の蛍光閾値を超えて発現する細胞（図 11 E）を全て、24、96、168 及び 216 培養時間で決定した。阻害剤濃度の増大は、より遅い細胞成長をもたらしたが、より高い蛍光平均値も観察され、阻害剤の添加は、既存のポリクローナル集団からの e G F P 発現を富化することができることを示した。

【0309】

P 5 C S / e G F P ベクターを使用して構築した（上記に概略される通り）細胞プールか

ら、プロリンを欠くが、様々な濃度のP5CS阻害剤3,4-デヒドロ-L-プロリンを補充した培地で培養した場合のデータを得た。細胞を固定24ウェルプレートで培養し、最初に 0.2×10^6 個の細胞/mlで播種した。生細胞数(図12A)、培養物生存率(図12B)、蛍光平均値(図12C)、 10^2 の所定の蛍光閾値を超えて発現する細胞(図12D)及び 10^3 の所定の蛍光閾値を超えて発現する細胞(図12E)を全て、24、96、168及び216培養時間で決定した。阻害剤濃度の増大は、より遅い細胞成長をもたらしたが、より高い蛍光平均値も観察され、阻害剤の添加は、既存のポリクローナル集団からのeGFP発現を富化することができることを示した。

【0310】

実施例2：宿主細胞抗体産生を改善するための脂質代謝変更因子

脂質代謝変更因子(LMM)ステアロイル-CoAデサチュラーゼ1(SCD1)、ステロール調節エレメント結合転写因子1(SREBF1)、及び核に遊走するSREBF1の部分を含み、SREBF1の調節ドメインを欠く切断型SREBF1アイソフォームであるSREB411の操作は、CHOK1SV GS-KO宿主産生、及び複合体タンパク質及び標準mAbの生成物品質を改善することが示されている。

【0311】

これらのLMMの発現が産業現行cGMP様式でCHOK1SV GS-KO宿主において改変された場合、それは、生成物タイター及び品質の有意な改善をもたらし得ると仮定された。目的は、所望のLMM遺伝子を既存の細胞株に挿入すること、又は市販のGS選択系はインタクトのままでLMM遺伝子のうちの1つを発現する新しい宿主細胞株を創出することができることである。

【0312】

この目的を達成し、仮説を検定するために、発現レベル、及びLMM遺伝子のうちのどれが最も適用可能であり得るかを決定しなければならなかった。この目標を達成するために、いくつかのベクター：組換えタンパク質及びGS選択マーカーを発現する4つのベクター(A~D)、及び特定のプロモーター+LMM遺伝子の組合せを発現する10個のベクター(1~10)を産生した(表9)。

【0313】

10

20

30

40

50

【表 9】

表 9. 組換え分子を含有し、LMM を過剰発現する細胞プールの概念証明を生成するために使用されるベクター

ベクター	選択	組換え分子
A	グルタミンシンターゼ	B72.3
B	グルタミンシンターゼ	インフリキシマブ
C	グルタミンシンターゼ	セルグツズマブ (Cergutuzumab)
D	グルタミンシンターゼ	エタネルセプト
ベクター	プロモーター	脂質代謝変更因子(LMM)
1	SV40	SCD1
2	SV40	SREBF1 (CHO)
3	SV40	SREB411 (CHO)
4	mCMV	SCD1
5	mCMV	SREBF1 (CHO)
6	mCMV	SREB411 (CHO)
7	PGK	SCD1
8	PGK	SREBF1 (CHO)
9	PGK	SREB411 (CHO)
10	mCMV	N/A

【0314】

その後、これらのベクターの全ての組合せは、1つの組換え分子ベクター及び1つのプロモーター+LMM遺伝子ベクターをコトランスフェクトすることによって、スクリーニングされ得る。トランスフェクションは、4D-ヌクレオフェクター (Nucleofector) (Lonza) 及び後続の標準プロトコルを使用して行った；これは、1条件 (コトランスフェクション) 当たり96個の反復培養物を産生し得る。その後、これらのトランスフェクト細胞の反復プールを、培養中の細胞成長及び流加回分条件における組換えタンパク質産生についてアセスメントし得る。その後、これらのデータを分析して、どのプロモーター+LMMの組合せがさらなる分析及び／又は細胞株構築のための好適な候補になり得るかを決定し得る。

GSKO細胞の成長及びトランスフェクション

GS-KO CHO細胞を、CD-CHO+6mM L-グルタミンで培養した。4日毎に、培養物を継代し；0.6mLの各親培養物をViceL-XR機を使用してカウントし、1つの培養物当たり50枚の画像を記録した。娘培養物は0.2x10⁶個の生細胞/mLで播種し；その後、培養物に5%CO₂を注入し、36.5℃、140rpmでインキュベートした。

【0315】

継代2又は3日目に、GS-KO細胞をViceL-XRを使用してカウントし；その後、2x10⁷個の生細胞/mLに等しい体積を採取し、100gで10分間スピニングに供した。遠心分離後、ピペティングにより上清を捨て、ペレットを200μLのSF溶液 (4D-ヌクレオフェクターキットで提供される) に再懸濁した。その後、トランスフェクションからの所望のベクターを、1ベクター (LMMベクター及び組換えタンパク質) 当たり6μgを与える体積で200μLの細胞/SF懸濁液に添加した。その後、DNA/細胞/SF懸濁液を等しく半分に分け、キュベット内に任意の泡沫の形成を引き起こさ

ないように注意して4 Dヌクレオフェクターキュベットにピペットで入れた。キュベットに添加された体積は、DNAベクターの添加後の全体積に依存した（通常、103～108 μ lの間）。

【0316】

その後、キュベットを4 D-ヌクレオフェクターに入れ、パルスコードDU158を使用してパルスに供した。両方のパルスが失敗した場合（ディスプレイ上に赤色の「-」により示される）、新しい2×10⁷個の細胞の体積を採取し、方法を再開始した。パルスが通過した場合（ディスプレイ上に緑色の「+」により示される）、事前に温めた（37℃）40 mlのトランスフェクション培地（40 ml CD-CHO、0.4 ml SP4、0.04 ml濃縮（×1000）フェノールレッド）の約500 μ lをキュベットにピペットで入れ、その後、培養物の全体積を40 mlのトランスフェクション培地に移し；その後、パストールピペットを使用して、トランスフェクション培地を使用してキュベットから任意の残留の細胞を「フラッシュ」した。その後、トランスフェクタント細胞培養物を2つの96ウェルプレートに移し（1ウェル当たり100 μ lの培養物）、36.5℃、10%CO₂で一晩インキュベートした。

【0317】

トランスフェクション後1日目に、1ウェル当たり100 μ lのトランスフェクション培地+100 μ M MSXを、トランスフェクトした培養物の各プレートに添加した。その後、プレート／培養物を36.5℃、10%CO₂で6日間インキュベートした。トランスフェクション後7日目に、1ウェル／培養物当たり150 μ lをトランスフェクトした培養物の各プレートから慎重に除去し、新鮮なトランスフェクション培地+50 μ M MSXを各ウェル／培養物に添加した。その後、培養物をトランスフェクション後の回復についてモニターした。

【0318】

トランスフェクション後約10日から、トランスフェクション後の細胞回復を観察した。これは、目視検査によって各ウェルのコンフルエンスをアセスメントするために、トランスフェクション培地の色を観察すること、及びクローニングミラーを使用することによって行った。細胞が成長したウェルの底は、不透明に見える場合があり、トランスフェクション培地中のフェノールレッドは、乳酸の産生に際して黄色に変わる場合があり、これを、細胞成長の指標として使用した。培養物の75%よりも多くが、75～80%を超えるコンフルエントと考えられると、プレート中の培養物は回復したと考えられ、深型ウェルプレートに移した。

【0319】

図13で示される通り、組換えタンパク質間の回復速度は、セルグツズマブを除いては、同様であるように見えた。これは、セルグツズマブの構造の性質のためであった可能性があり；セルグツズマブは、抗体構造のFc領域に結合したIL-2（インターロイキン-2）分子を有する。このIL-2は、トランスフェクト細胞の成長速度を阻害している可能性がある（おそらく、セルグツズマブ分子が細胞から分泌された後の細胞に対するその分子作用によって）。また、それはmAb-IL-2の構築が細胞リソースを制限し、このことが回復速度を遅延させるためであることもあり得る。

【0320】

深型ウェルプレートでのトランスフェクト細胞プールの成長

培養物が回復すると、各ウェルをピペッティングにより混合して、底に沈んだ細胞を懸濁した。細胞を培養物中で懸濁すると、150 μ lを、DWP中の150 μ lの新鮮な培地（CD CHO、1% SP4、50 μ M MSX）に移した。その後、細胞培養物を有する深型ウェルプレートを36.5℃、5%CO₂、200 rpm及び90%湿度でインキュベートした。

【0321】

培養物の成長速度に依存して、4、5又は6日目のいずれかに最初のDWP継代を行った。細胞をCelligoによりカウントし；その後、細胞を、0.5×10⁶個の生細胞／

10

20

30

40

50

mlの濃度で300 μ lのCM66+50 μ M MSXに播種した。その後、娘DWPを36.5℃、5%CO₂、200rpm及び90%湿度でインキュベートした。その後、4日スケジュールで次の継代を行った。CeliGo系を使用して、個々の培養物／ウェルをカウントし；その後、カウントを条件にわたり平均化して、図14の結果を生成した。第1の継代で、培地をトランスフェクション培地から成長培地に変え、継代3代目で、成長培地を産生培地に変えて、簡易的流加回分過剰成長（aFOG）を開始させた。

【0322】

図14A～14Dは、深型ウェルプレート培養物中の全ての回復したトランスフェクト細胞の平均生細胞濃度（VCC）を示す。エタネルセプト+mCMV SREB411及びエタネルセプト+mCMV SREBF1（図14A）は、他の条件よりも遅い速度で回復した。他の条件を継代する実務的な理由のために、1回の余分の時間により、全ての条件が同じ時間にaFOGに入ることを可能にすることを決定した。これが、エタネルセプト+LMM条件について記録された余分の継代の理由であった。

【0323】

概して、条件にわたる培養物の平均VCCは、およそ第3継代で安定化／同等化するように見え、全ての条件で平均VCCは寄り集まった。

【0324】

トランスフェクタントプールの簡易的流加回分過剰成長

LMM細胞プールの生産性をアセスメントするために、プールを流加回分過剰成長に供して、バイオリアクタースケールでの条件をシミュレートした。簡潔に説明すると、DWP中での第3継代に際して、細胞を、CeliGoを使用してカウントし、次に300 μ lのCM71に0.3 $\times$ 10⁶個の生細胞/mlの濃度で播種した。細胞を36.5℃、5%CO₂、200rpm及び90%湿度で12日間インキュベートした。4日目及び8日目に、培養物に流加し、細胞濃度をCeliGoによりカウントした。12日目に、プレートを300rpmで10分間遠心分離し；200 μ lの上清を収集して滅菌96ウェルプレートに入れた。残留の細胞ペレット上清を200 μ lのPBSで洗浄し、500rpmで10分間遠心分離し；その後、PBS洗浄の可能な限り多く（約200 μ l）を除去し、細胞ペレットを-20℃に移した。収集した上清を3000rpmで遠心分離し、その後、180 μ lを新しい96ウェルプレートに移した。その後、収集した上清を4℃で一晩保存し、翌日Octet器具により分析した。

【0325】

細胞を、ルーチン継代よりも低い細胞密度（0.3 $\times$ 10⁶ VCC/ml：aFOG；0.5 $\times$ 10⁶ VCC/ml：継代）で、継代成長培地に非常に類似する産生培地に播種し、それゆえ、培地の変化のための成長プロファイルの任意の変化は最小限であるはずである（図15A～15D）。流加及び回収と同日にVCCの測定を取り；これは、産生中の条件の各々の成長プロファイルの大まかな概略を可能にした。この方法は、限定的な成長データを提供し、それゆえ、条件のうちの一部について成長ピークを逃している可能性がある。これらの欠損データは、IVC（1ミリリットル当たりの1時間当たりの培養物中の生細胞濃度の時間積分）及びQp（pg／細胞／時としての特異的生産性）の計算に影響を及ぼし；全ての培養物及び条件は同じ限定を有するので、データは同等であると考えられ得る。

【0326】

エタネルセプト及びインフリキシマブでの条件のうちのいくつかの成長プロファイルは、VCCが4～8日目の間にピークに達することを示唆する。SREBF1の発現は、4日目の後培養物の成長を遅延させ得る。これは、SV40／PGK SREBF1条件の成長によって示唆される。

【0327】

各時点での変動は多分、カウントされた培養物が各々、トランスフェクト細胞のプールであるという事実のためであり；それゆえ、両方のベクターのコピー数は変動し、これは細胞成長に影響を及ぼす。1つの条件当たり96個の個々の培養物を使用し、平均を取るこ

10

20

30

40

50

とによって、変動の軽減を達成した。これにより、プロモーター、LMM遺伝子及び組換えタンパク質の組合せが、有意な影響を有した場合、その条件の変動全体はシフトし得ることが期待される。

a F O G後の生成物濃度の測定

【0328】

O c t e tでタンパク質Aバイオセンサーを使用して、生成物濃度を測定した。O c t e tは、96ウェルフォーマットの個々のウェルを探索することができるが、2つの列はプレート標準及び対照のために必要とされ；そのゆえ、1回のO c t e tラン当たり最多で80個の試料を測定することが可能であった。100～5mg/Lの間で標準を調製し、プレート間対照を25mg/Lに希釈し、各プールの回収上清をC D C H Oで希釈して、作出した標準曲線にフィットさせた。

【0329】

試料は、タンパク質Aバイオセンサーに結合した生成物を定量するためにO c t e tセンサーについての最小濃度を必要とする。定量可能な培養物数は、各条件間で変動し；定量した培養物の総数は、表10に列挙される。これらのデータは、組換えタンパク質条件にわたる一部のLMM遺伝子条件における定量可能な全培養物の変化を示す、すなわち、SV40 S R E B 4 1 1は、全ての組換えタンパク質条件にわたり定量可能な培養物の減少を示し；SV40 S R E B F 1条件も変化を示し、定量可能な培養物の同等の数又は改善した数を示す。

【0330】

【表10】

表 11. Octet 及びタンパク質 A バイオセンサーを使用して定量した、プロモーター+LMM 遺伝子+組換え分子(cB72.3;Infl:インフリキシマブ;Cerg:セルグツズマブ;Etan:エタネルセプト)の各条件についての生産性平均値(mg/L)、生産性平均値の標準偏差及び培養物数(n)

	生産性平均値(mg/L)				標準偏差				n			
	cB72.3	Infl	Cerg	Etan	cB72.3	Infl	Cerg	Etan	cB72.3	Infl	Cerg	Etan
プロモーター+LMM												
SV40 SCD1	753	304	1020	515	611	376	831	273	75	45	63	75
SV40 SREBF1	1399	438	1070	660	829	456	635	281	79	60	52	77
SV40 SREB411	n/a	548	1460	443	n/a	490	933	277	n/a	14	29	54
mCMV SCD1	808	277	1028	464	710	278	750	246	64	33	35	68
mCMV SREBF1	n/a	n/a	n/a	644	n/a	n/a	n/a	278	n/a	n/a	n/a	48
PGK SCD1	1175	230	1238	n/a	731	198	926	n/a	77	45	59	n/a
PGK SREBF1	1743	475	1181	787	834	453	818	259	79	50	56	80
PGK SREB411	843	254	1077	418	718	174	1057	234	69	31	58	71
空のベクター	845	345	890	663	653	434	665	255	78	44	43	78

【0331】

トランスフェクト細胞のプールを使用したので、各プールの1細胞当たりの各トランスフ

エクトされたベクターのコピー数及び固有の生産性の差があり得ることが予想されうる。この変動性を軽減し、且つ各条件における細胞成長及び生産性のより正確な状況を得るために、1条件当たり最多で80個の細胞プールを産生した。定量可能な反復の数は、14～80プールの間で変動した。

【0332】

特定の生産性の計算

全てのタンパク質A及び成長データを集めると、各培養物についての特定の生産性を計算することが可能であった。これは、1時間当たりの1細胞当たりのピクトグラム（Qp）、及び1ミリリットル当たりの1時間当たりの培養物中の生細胞濃度の時間積分（IVC）を計算することによって行い、IVCは培養物の各々についての成長曲線下面積を解くことによって計算した。その後、これらのデータは、Qp対IVCのバブルプロットで表現することができ、各バブル（データ点）は、バブルの直径によって生成物タイターを示す。得られたプロットは、図16A～16Dで見ることができる。

【0333】

表11に示される生産性平均値データについての95%信頼区間を、各RPLC（組換えタンパク質+プロモーター+LMM条件）の平均値について分析し；これらのデータは表12に示し、得られた区間は表13に示す。

【0334】

【表11】

表 12. 生産性平均値の周囲の 95%信頼区間を得るための、タンパク質 A バ

イオセンサーを使用して測定した生産性データの統計解析

プロモーター +LMM	t(n-1)				t.stat (p=0.95)				X (t.stat*s)/√t(n-1)			
	cB7 2.3	Infl	Ce rg	Et an	cB72 .3	Infl	Cerg	Etan	cB72.3	Infl	Cerg	Etan
SV40 SCD1	74	44	62	74	1.666	1.68	1.67	1.666	118.224	95.2266	176.269	52.822
SV40 SREBF1	78	59	51	76	1.665	1.671	1.675	1.665	156.266	99.2402	149.005	53.586
SV40 SREB411	n/a	13	28	53	n/a	1.771	1.701	1.674	n/a	240.777	299.881	63.637
mCMV SCD1	63	32	34	67	1.669	1.694	1.691	1.668	149.319	83.2512	217.483	50.101
mCMV SREBF1	n/a	n/a	n/a	47	n/a	n/a	n/a	1.678	n/a	n/a	n/a	67.941
PGK SCD1	76	44	58	n/a	1.665	1.68	1.672	n/a	139.631	50.0515	203.198	n/a
PGK SREBF1	78	49	55	79	1.665	1.677	1.673	1.664	157.159	108.584	184.573	48.569
PGK SREB411	68	30	57	70	1.668	1.697	1.672	1.667	145.284	54.0411	234.012	46.613
空のベク ター	77	43	42	77	1.665	1.681	1.682	1.665	123.916	111.331	172.553	48.419

【0335】

10

20

30

40

50

【表 12】

表 13. 組換えタンパク質+プロモーター+LMM 条件の各々の生産性平均値の
95%信頼区間について計算した最終値

プロモーター+LMM	最高				平均				最低			
	cB72.3	Infl	Cerg	Etan	cB72.3	Infl	Cerg	Etan	cB72.3	Infl	Cerg	Etan
SV40 SCD1	871	399	1196	568	753	304	1020	515	635	209	844	462
SV40 SREBF1	1555	537	1219	714	1399	438	1070	660	1243	339	921	606
SV40 SREB411	n/a	789	1760	507	n/a	548	1460	443	n/a	307	1160	379
mCMV SCD1	957	360	1245	514	808	277	1028	464	659	194	811	414
mCMV SREBF1	n/a	n/a	n/a	712	n/a	n/a	n/a	644	n/a	n/a	n/a	576
PGK SCD1	1315	280	1441	n/a	1175	230	1238	n/a	1035	180	1035	n/a
PGK SREBF1	1900	584	1366	836	1743	475	1181	787	1586	366	996	738
PGK SREB411	988	308	1311	465	843	254	1077	418	698	200	843	371
空のベクター	969	456	1063	711	845	345	890	663	721	234	717	615

【0336】

その後、図 17A～17D に示す通り、表 13 に示すデータを、各組換えタンパク質トランスフェクションについてプロットした。

【0337】

考察

特定の生産性プロット及び 95%信頼区間プロット (CIP: confidence interval plot) の両方を考慮することによって、これらの条件下で組換えタンパク質発現の改善を示すプロモーター+LMM の組合せを特定することが可能であった。

【0338】

エタネルセプト

これらのデータは、平均して PGK+SREBF1 条件が、エタネルセプトタイターを増大することを示した。これは、トランスフェクト細胞の 80 個のプールの平均から観察された。

【0339】

セルグツズマブ

SV40+SREB411 条件は、95% CIP でタイターの増大を示した。

【0340】

インフリキシマブ

インフリキシマブについての測定可能な培養物数は概して、エタネルセプト及び cB72.3 条件と比較した場合、より低かった。

【0341】

PGK/SV40+SREBF1 は、インフリキシマブのタイターの増大を示した。インフリキシマブバブルプロットにおいて、 $Q_p = 1$ を超えるデータ点の大多数が、それらの条件からのデータ点であるように見えた。PGK+SREBF1 条件は、SV40+SREBF1 条件よりも低い IVC を有したが、PGK+SREBF1 条件は、より大きな平均タイターを有し、このことは $Q_p = 1$ を超えるデータ点の数の比較によっても見ること

ができる。また、これらの2つの条件は、測定可能な反復の数の増大を示し、これらのレベルでのSREBF1の発現は、インフリキシマブを発現する場合、細胞生存可能性を増大することを示唆した。

【0342】

cB72.3

cB72.3組換えタンパク質は、標準モノクローナル抗体であり、本明細書で考察される他の組換えタンパク質と比較して細胞が発現することがより容易であった。

【0343】

95% CIPは、SREBF1の発現を増大することが、これらの条件下での最終タイターを増大し得ることを示唆した。SV40/PGK+SREBF1条件の両方は、タイターの有意な増大を示した。PGK+SCD1条件も、タイターの増大を示した。cB72.3バブルプロットSV40+SREBF1データは、より高いQp及びより低いIVCへ向かう傾向があり、一方で、PGK+SREBF1条件についてはその逆が真実であった。SCD1条件は、Qp=0.5~3及びIVC=500~1250の間にグループ化できるように見えた。対照条件は、より低いQp及びより高いIVCへ向かう傾向があった。

【0344】

プロモーターとLMMとの組合せ選択

SV40/PGK+SREBF1の組合せは、それらがトランスフェクトされた培養物の生成物タイター及びQp又はIVCのいずれかの改善を示した。SCD1についてのマウス配列とCHO配列との間の差は、hCMV又はmCMV等の強いプロモーターで望ましく探索することができる。これらのプロモーターの組合せは、生成物タイターを改善することが企図される。

【0345】

実施例3：安定にLMMを操作導入したGS-KO CHO細胞プールの生成のためのピロリン-5-カルボン酸シンターゼピロリン代謝選択系の適用

脂質代謝変更因子(LMM)ステアロイル-CoAデサチュラーゼ1(SCD1)、ステロール調節エレメント結合転写因子1(SREBF1)、及び核に遊走するSREBF1の部分を含み、SREBF1の調節ドメインを欠く切断型SREBF1アイソフォームであるSREB411の操作は、上記の例によって、CHOK1SV GS-KO宿主産生、及び複合体タンパク質及び標準mAbの生成物品質を改善することが示されている。それゆえ、様々なプロモーターの制御下でSCD1又はSREBF1のいずれかを過剰発現する安定的発現LMM改変GS-KO CHO細胞プールを生成するために、P5CSピロリン代謝選択を利用した。

【0346】

ピロリンを欠くLonza専売既知組成タンパク質非含有培地で、P5CS選択系を使用してPGK SCD1(CHO)若しくはPGK SREBF1、又はPGK SCD1(マウス)若しくはSV40 SREBF1のいずれかを、GS-KO CHO宿主にエレクトロポレーションによってトランスフェクトした。その後、トランスフェクト細胞を、3つの96ウェルプレートに播種し(1ウェル当たり100µlの培養物)、36.5℃、10%CO₂でインキュベートした。トランスフェクション後7日目に、トランスフェクトした培養物の各プレートから1ウェル/培養物当たり150µlを除去し、ピロリンを欠く新鮮な培地を各ウェル/培養物に添加した。その後、培養物をトランスフェクション後の成長及び回復についてモニターした。トランスフェクション後およそ14日から、トランスフェクション後の細胞回復が観察された。培養物の75%よりも多くが、75~80%を超えるコンフルエントと考えられると、プレート中の培養物は回復したと考えられ、深型96ウェルプレートに移した。

【0347】

深型96ウェルプレートでの継代後、細胞ペレット試料を収集し、タンパク質可溶化液を生成し、P5CS発現及び対照として作用するβ-アクチンと共に、標的LMM(SCD

10

20

30

40

50

1又はSREBF1)の発現についてウェスタンブロットによって分析した。得られた分析から、各ウェルの細胞プールを、互いに、及び対照と比較して「高」、「中」又は「低」量の標的LMMを発現するものとして分類した。その後「最も高い」10個の発現細胞ウェルを組み合わせ、「高」発現細胞プールを生成し、「中」発現体にあたる10～15個のウェルを集めて「中」発現LMMプールを生成し、「低」発現体にあたる10～15個のウェルを組み合わせ、「低」発現LMMプールを生成した。中及び低プールの場合、3つのプレートの各々からウェルを採取した。その後、これらのLMM操作導入細胞プールを、振盪フラスコに拡張し、プロリンを含まないLonza専売培地で成長させた。その後、細胞可溶化液を収集して、操作導入細胞プールのLMM及びP5CS発現をアセスメントした。

10

【0348】

図18は、生成した細胞プールのウェスタンブロット分析を示し、宿主対照GS-KO CHO細胞株におけるP5CS発現がないか、又は非常に低いこと、及び様々なLMMプールにおけるP5CS発現の同様の量を確認する。これは、P5CS選択系がP5CS酵素を発現する細胞の単離をもたらすことを確認する。チューブリンを、ローディング対照として使用した。図18に示される通り、SCD1量は、低プールと比較して、中及び高PGK SCD1 CHOプールにおいて上昇することが示され、一方で、細胞に操作導入された前駆体SREBF1分子は、低プールと比較して、中及び高PGK SREBF1プールにおいて上昇した。PGK SCD1マウス及びSV40 SREBF1操作導入細胞について同様の観察がなされた。したがって、図18は、LMM発現とカップリングさせたP5CSに基づくプロリン代謝選択系は、LMM量の増大を伴う、プロリンを欠く培地で成長するP5CS発現細胞の単離の成功をもたらしたことを示す。

20

【0349】

その後、様々なLMM発現プールに、組換え生物由来治療薬(エタネルセプト及びインフリキシマブ)及びGSのベクターをトランスフェクトし、上記実施例2に説明される通りにトランスフェクトし、その後、96ウェルプレートにおいてプロリン及びグルタミン非含有培地で回復させた。トランスフェクション後およそ14日から、トランスフェクション後の細胞回復が観察された。培養物の75%よりも多くが、75～80%を超えるコンフルエントと考えられると、プレート中の培養物は回復したと考えられ、深型ウェルプレートに移した。次に細胞を継代し、Octet器具を使用してタイターをアセスメントし、その後、LMMを操作導入したトランスフェクトした各プールからの最も高い10個のウェルを組み合わせ、振盪フラスコで成長させた。その後、ミニチュアバイオリアクターにおいて流加回分培養条件下で、これらの生産性及び成長特徴をアセスメントした。

30

【0350】

図19A～19Dは、LMMを操作導入し、次に組換え分子をトランスフェクトし、ambir(商標)15ミニチュアバイオリアクターにおける流加回分条件下での培養9日目の二重培養物での生産性及び成長についてアセスメントした各プールについての、積分細胞濃度(IVC)に対するQpのプロットを示す(IVC, 1ミリリットル当たりの1時間当たりの培養物中の生細胞濃度の時間積分、及びQp, pg/細胞/時としての特異的生産性)。

40

【0351】

図19A上部の凡例は、(上から下へ)対照E1、対照E2、SV40-SBF1高E1、SV40-SBF1高E2、SV40-SBF1中E1、SV40-SBF1中E2、SV40-SBF1低E1、SV40-SBF1低E2を示す。y軸は、下から0で始まり、Qp(pg/細胞/時)と標識される0.1、0.2、0.3、0.4、0.5及び0.6に進む。x軸は、左から0で始まり、IVC(10⁶個の細胞x時/ml)と標識される500、1000、1500、2000、2500、3000及び3500に進む。図19A下部の凡例は、(上から下へ)対照I1、対照I2、SV40-SBF1高I1*、SV40-SBF1高I2、SV40-SBF1中I1*、SV40-SBF1低I1、SV40-SBF1低I2を示す。y軸は、下から0で始まり、Qp(pg/細胞

50

／時)と標識される0.05、0.1、0.15、0.2、0.25及び0.3に進む。x軸は、左から0で始まり、IVC(10⁶個の細胞x時/ml)と標識される500、1000、1500、2000、2500、3000、3500及び4000に進む。図19B上部の凡例は、(上から下へ)対照E1、対照E2、PGK-SBF1高E1、PGK-SBF1高E2、PGK-SBF1中E1**、PGK-SBF1中E2、PGK-SBF1低E1、PGK-SBF1低E2を示す。y軸は、下から0で始まり、Qp(pg/細胞/時)と標識される0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6及び0.7に進む。x軸は、左から0で始まり、IVC(10⁶個の細胞x時/ml)と標識される500、1000、1500、2000、2500、3000及び3500に進む。図19B下部の凡例は、(上から下へ)対照I1、対照I2、PGK-SBF1高I2、PGK-SBF1高I1、PGK-SBF1中I1、PGK-SBF1低I2、PGK-SBF1低I1、PGK-SBF1中I2を示す。y軸は、下から-0.05で始まり、Qp(pg/細胞/時)と標識される0、0.05、0.1、0.15、0.2、0.25、0.3及び0.35に進む。x軸は、左から0で始まり、IVC(10⁶個の細胞x時/ml)と標識される500、1000、1500、2000、2500、3000、3500及び4000に進む。図19C上部の凡例は、(上から下へ)対照E1、対照E2、PGK-MSCD高E1、PGK-MSCD高E2、PGK-MSCD中E1、PGK-MSCD中E2、PGK-MSCD低E1、PGK-MSCD低E2を示す。y軸は、下から0で始まり、Qp(pg/細胞/時)と標識される0.1、0.2、0.3、0.4、0.5及び0.6に進む。x軸は、左から0で始まり、IVC(10⁶個の細胞x時/ml)と標識される500、1000、1500、2000、2500、3000及び3500に進む。図19C下部の凡例は、(上から下へ)対照I1、対照I2、PGK-MSCD中I2*、PGK-MSCD低I2、PGK-MSCD高I1を示す。y軸は、下から0で始まり、Qp(pg/細胞/時)と標識される0.05、0.1、0.15、0.2、0.25、0.3、0.35及び0.4に進む。x軸は、左から0で始まり、IVC(10⁶個の細胞x時/ml)と標識される500、1000、1500、2000、2500、3000、3500及び4000に進む。図19D上部の凡例は、(上から下へ)対照E1、対照E2、PGK-SCD高E1、PGK-SCD高E2、PGK-SCD中E1、PGK-SCD中E2、PGK-SCD低E1、PGK-SCD低E2を示す。y軸は、下から0で始まり、Qp(pg/細胞/時)と標識される0.05、0.1、0.15、0.2、0.25、0.3、0.35、0.4及び0.45に進む。x軸は、左から0で始まり、IVC(10⁶個の細胞x時/ml)と標識される500、1000、1500、2000、2500、3000、3500及び4000に進む。図19D下部の凡例は、(上から下へ)対照I1、対照I2、PGK-SCD中I1*、PGK-SCD中I2、PGK-SCD高I1、PGK-SCD高I2、PGK-SCD低I1、PGK-SCD低I2を示す。y軸は、下から0で始まり、Qp(pg/細胞/時)と標識される0.05、0.1、0.15、0.2、0.25及び0.3に進む。x軸は、左から0で始まり、IVC(10⁶個の細胞x時/ml)と標識される500、1000、1500、2000、2500、3000、3500及び4000に進む。

【0352】

対照細胞(黒丸、図19、非LMM操作導入)のIVCは概して、最も高いIVCの中の1つであったが、各場合に、タンパク質を発現することが困難なモデルを発現する場合に、対照よりも高いQp及び対照と同様のIVCを有するいくつかのLMMプールがあった(「*」は、容器が12日目に回収されたことを示し、「**」は、14日目に回収されたことを示す)。これは、P5CS選択法を使用して産生及び培養したLMM操作導入細胞は、発現することが困難なタンパク質を産生する場合のQpの増大、及び同様の条件下での非LMM操作導入細胞に匹敵するIVCを有し得るという見解と一致する。

【0353】

本明細書で引用される各特許、特許出願及び出版物並びにどの特許、特許出願及び出版物の開示も、それらの全体を参照により本明細書に組み込む。本発明は、特定の態様に関し

て開示されているが、本発明の他の態様及び変形は、本発明の真の趣旨及び範囲から逸脱することなく、当業者によって考案され得ることが明らかである。附属の特許請求の範囲は、全てのそのような態様及び均等な変形を含むと解釈されることが意図される。

【 0 3 5 4 】

〔関連出願の相互参照〕

本出願は、米国特許仮出願第 6 2 / 6 2 5 7 7 3 号（2 0 1 8 年 2 月 2 日出願）の優先権及び利益を主張し、当該出願の内容は、その全体を参照により本明細書に組み込む。

10

20

30

40

50

【図 4 A】

【図 4 B】

FIG. 4A

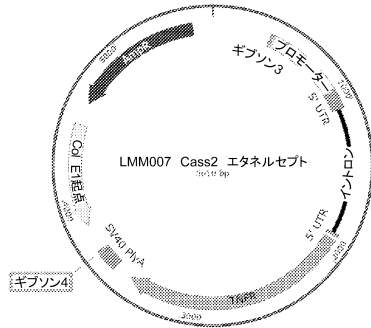
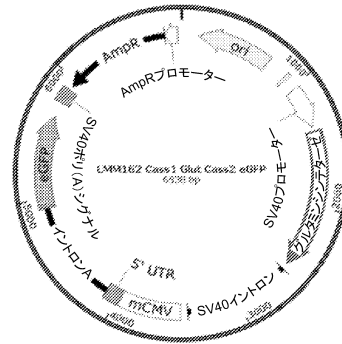


FIG. 4B



10

20

【図 4 C】

【図 5 A】

FIG. 4C

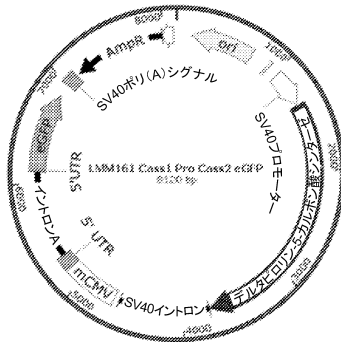
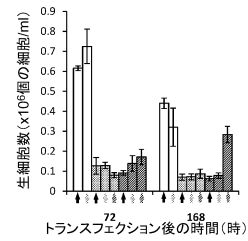


FIG. 5A



30

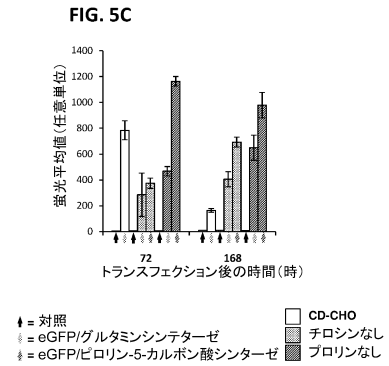
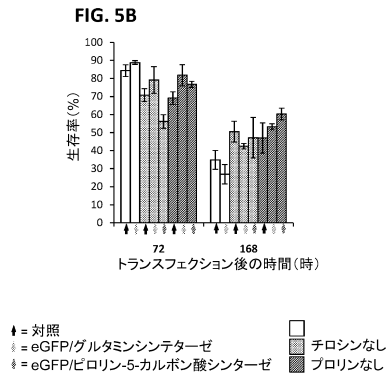
40

↑ = 対照
↑ = eGFP/グルタミンシンターゼ
↑ = eGFP/ピロリン-5-カルボン酸シンターゼ
□ = CD-CHO
■ = チロシンなし
■ = プロリンなし

50

【図 5 B】

【図 5 C】

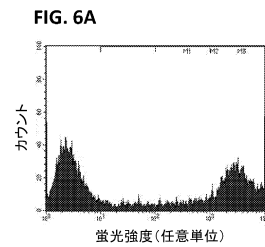
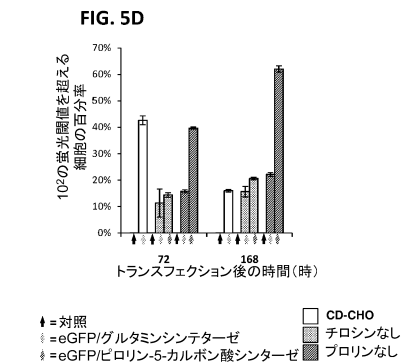


10

20

【図 5 D】

【図 6 A】



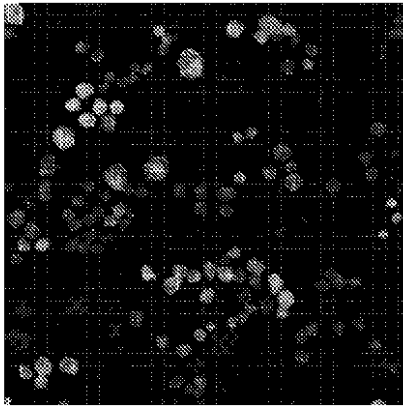
30

40

50

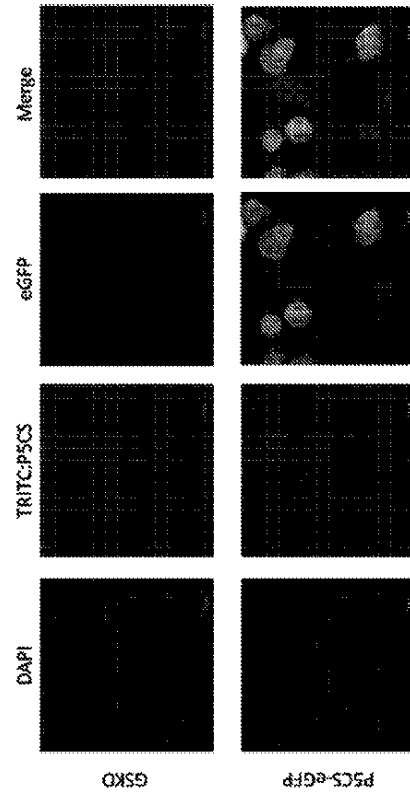
【図 6 B】

FIG. 6B



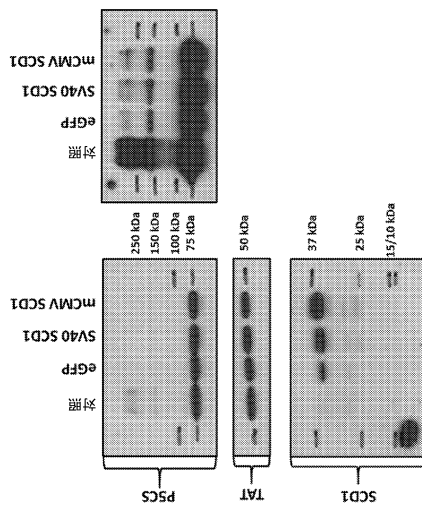
【図 6 C】

FIG. 6C



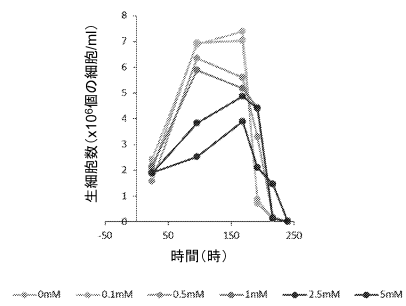
【図 7】

FIG. 7



【図 8 A】

FIG. 8A



10

20

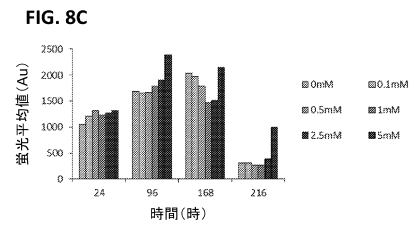
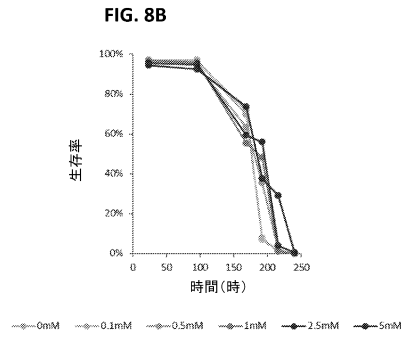
30

40

50

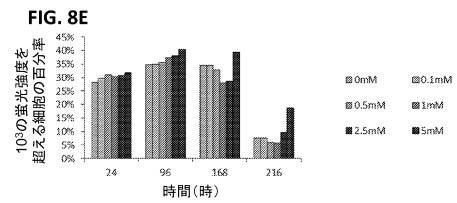
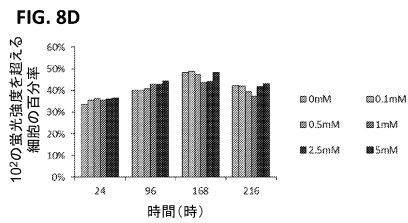
【図 8 B】

【図 8 C】



【図 8 D】

【図 8 E】



10

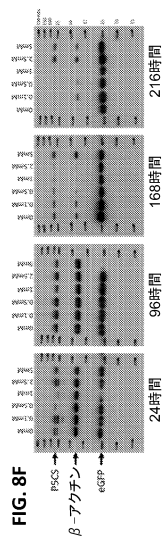
20

30

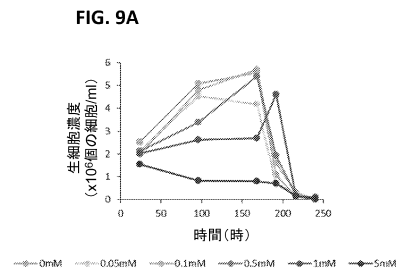
40

50

【図 8 F】



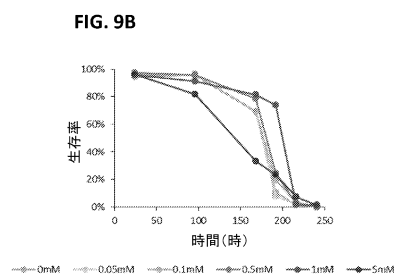
【図 9 A】



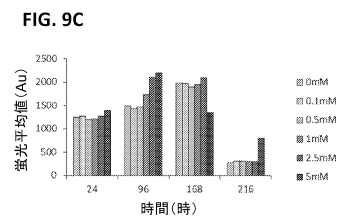
10

20

【図 9 B】



【図 9 C】



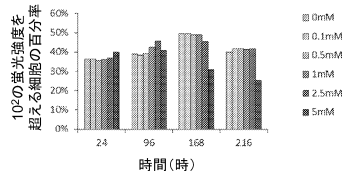
30

40

50

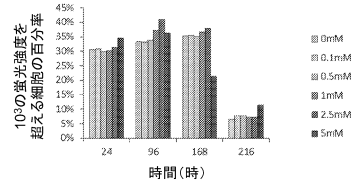
【図 9 D】

FIG. 9D

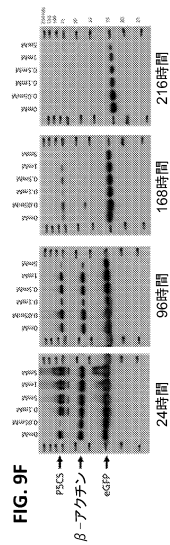


【図 9 E】

FIG. 9E

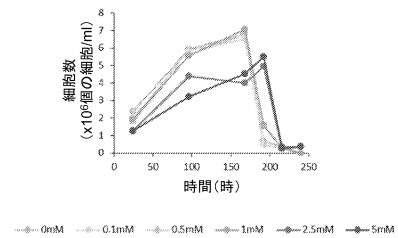


【図 9 F】



【図 10 A】

FIG. 10A



10

20

30

40

50

【図 10 B】

【図 10 C】

FIG. 10B

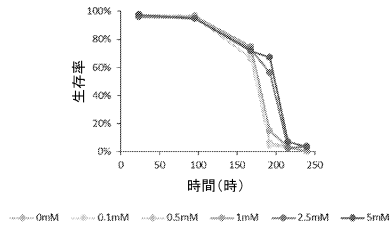
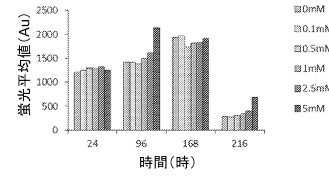


FIG. 10C



10

20

【図 10 D】

【図 10 E】

FIG. 10D

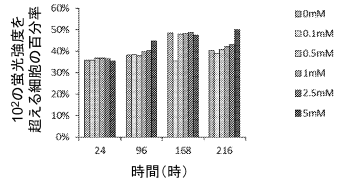
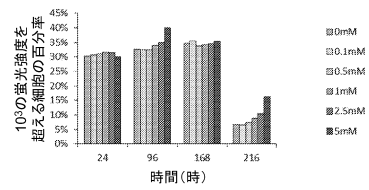


FIG. 10E

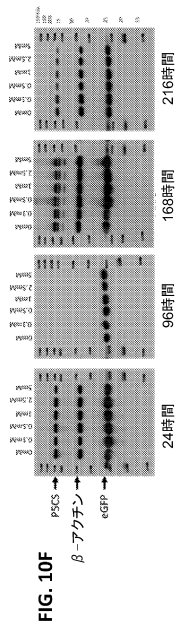


30

40

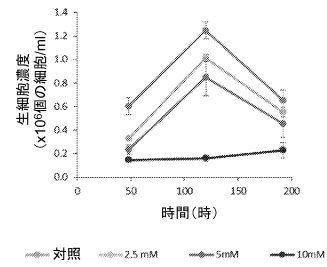
50

【図 10 F】



【図 11 A】

FIG. 11A

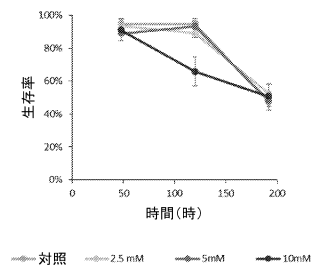


10

20

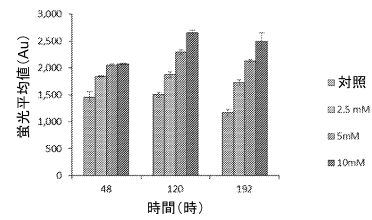
【図 11 B】

FIG. 11B



【図 11 C】

FIG. 11C



30

40

50

【図 1 1 D】

【図 1 1 E】

FIG. 11D

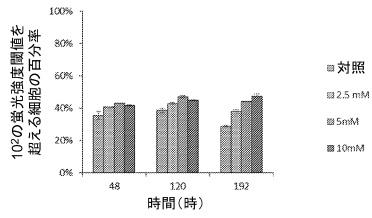
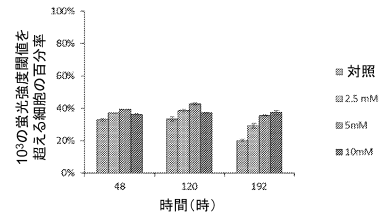


FIG. 11E



10

20

【図 1 2 A】

【図 1 2 B】

FIG. 12A

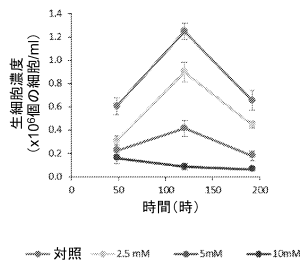
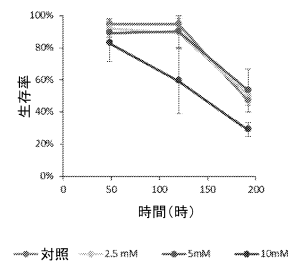


FIG. 12B

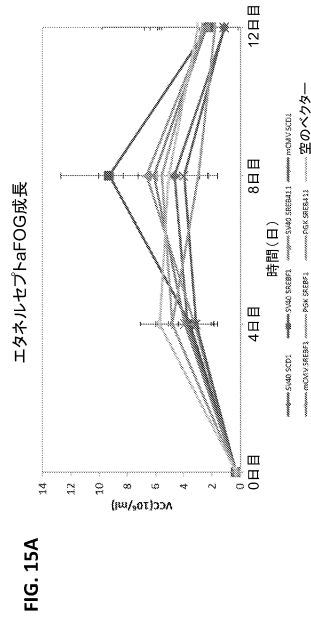


30

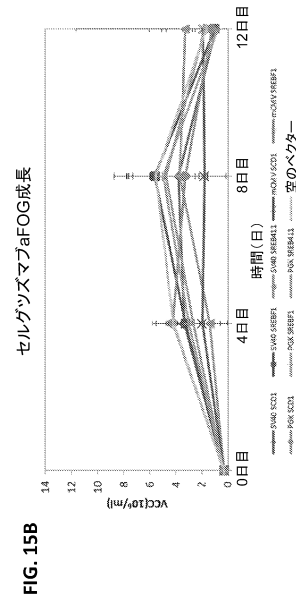
40

50

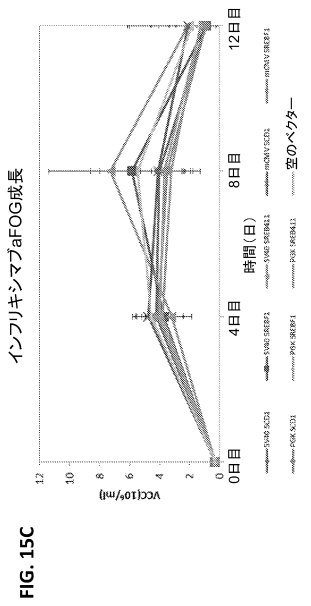
【図 1 5 A】



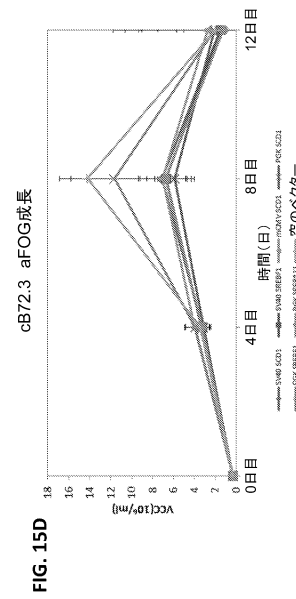
【図 1 5 B】



【図 1 5 C】



【図 1 5 D】



10

20

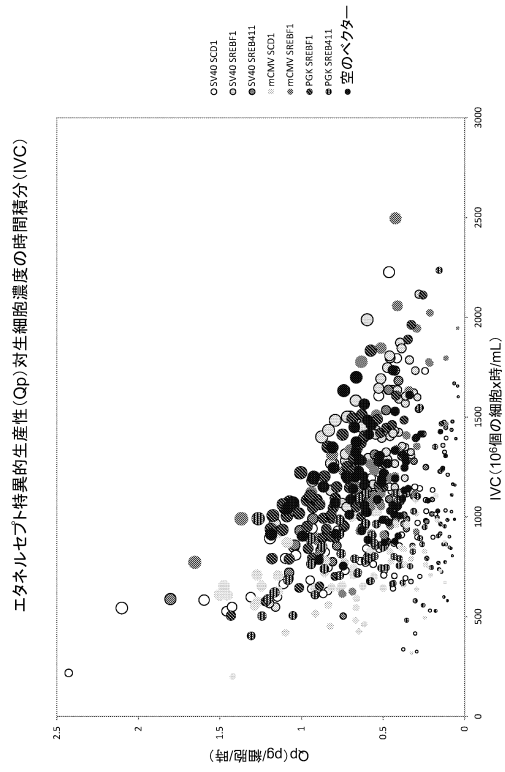
30

40

50

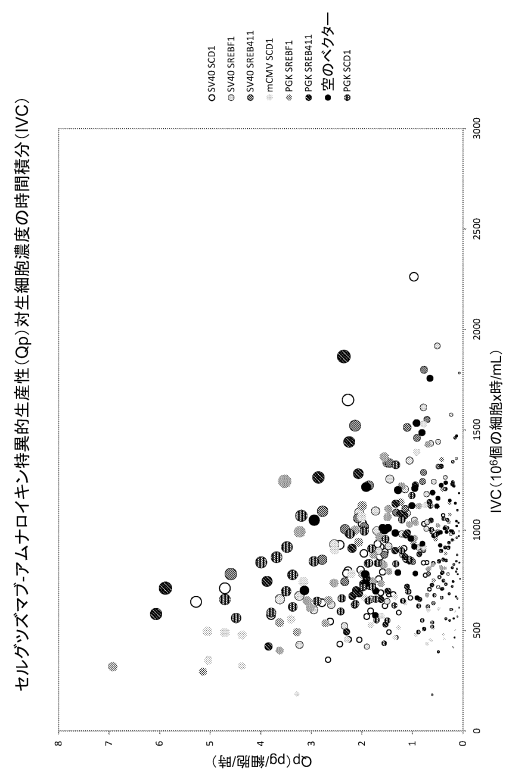
【図 1 6 A】

FIG. 16A



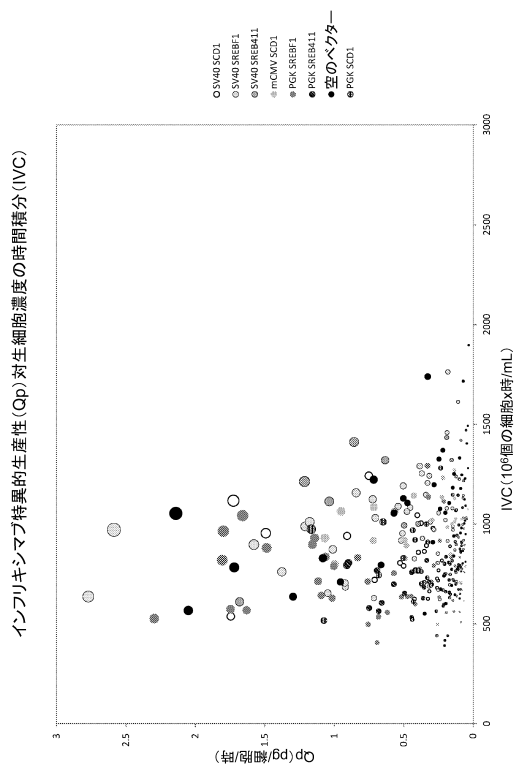
【図 1 6 B】

FIG. 16B



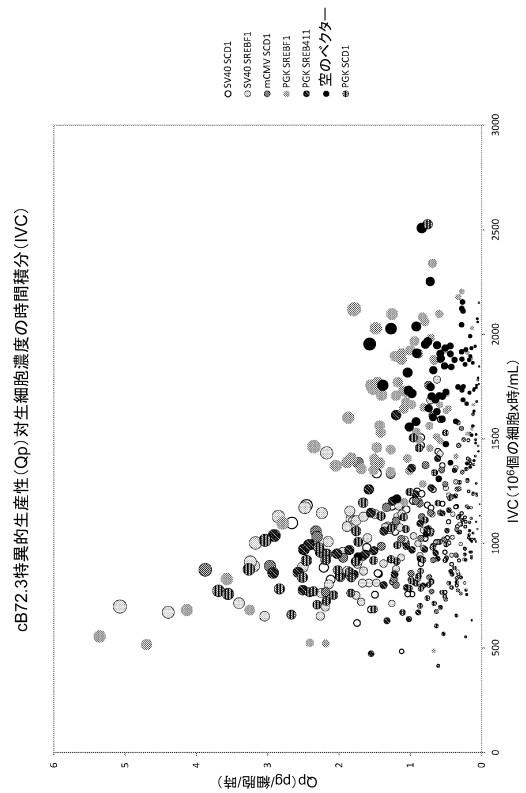
【図 1 6 C】

FIG. 16C



【図 1 6 D】

FIG. 16D



10

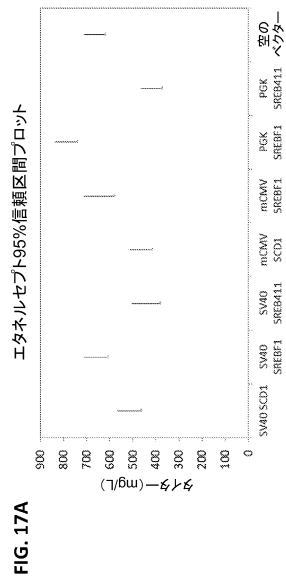
20

30

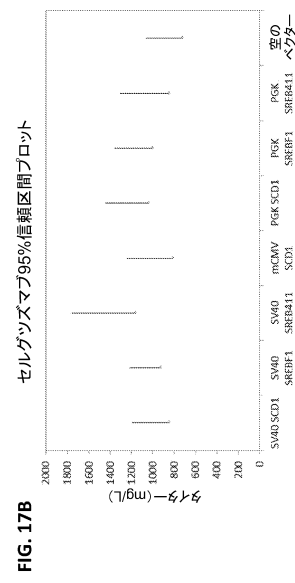
40

50

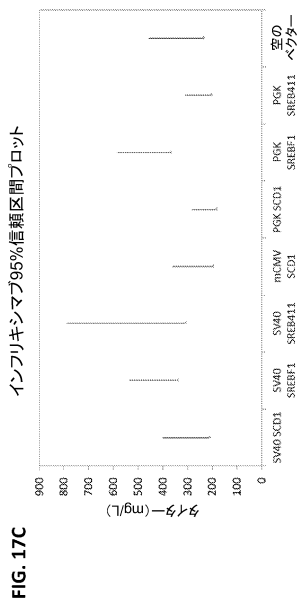
【図 1 7 A】



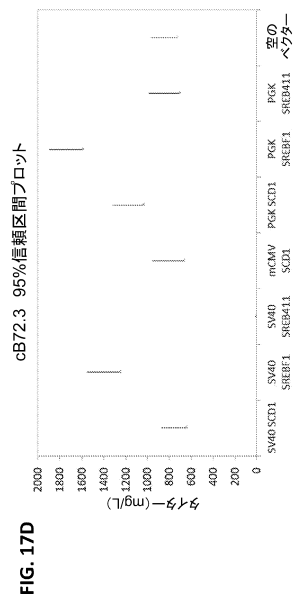
【図 1 7 B】



【図 1 7 C】



【図 1 7 D】



10

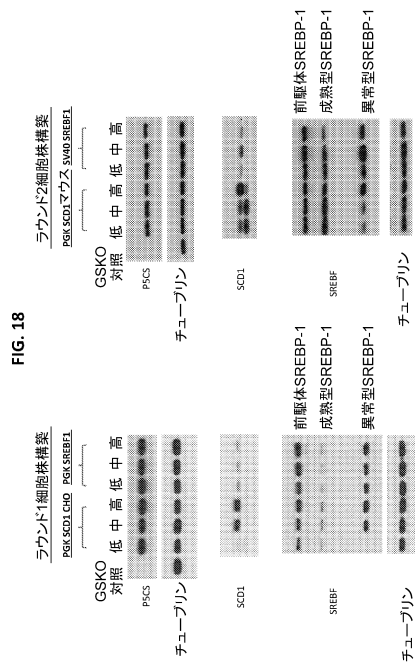
20

30

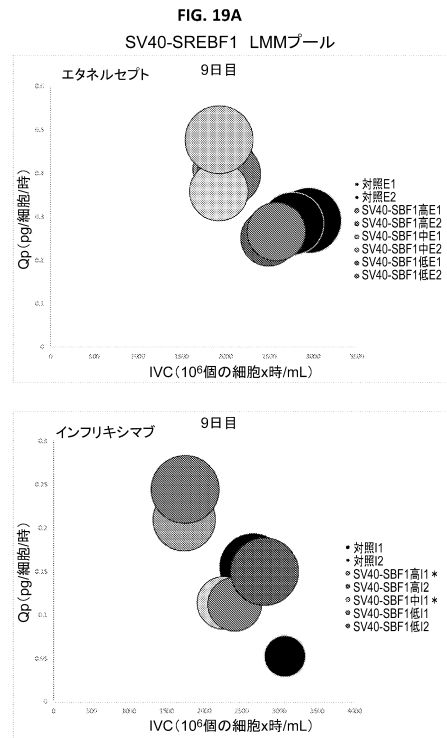
40

50

【図 18】



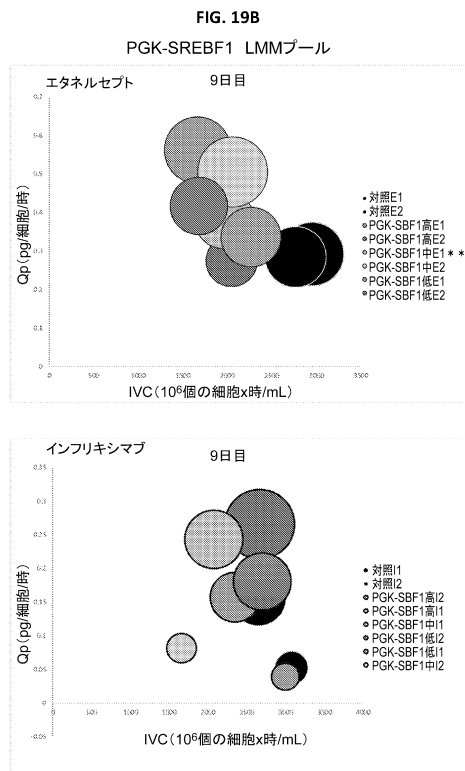
【図 19 A】



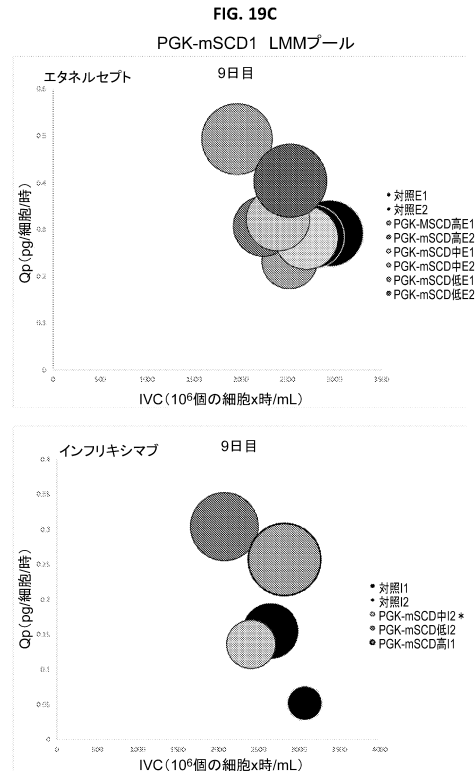
10

20

【図 19 B】



【図 19 C】

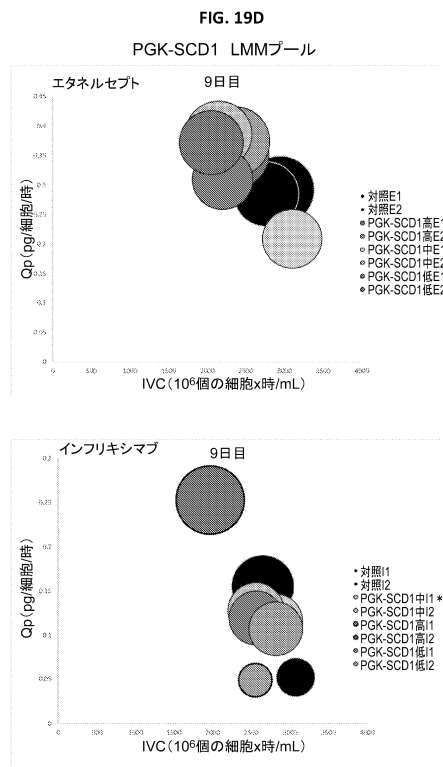


30

40

50

【図 19 D】



10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12	
C 1 2 N	15/113 (2010.01)	C 1 2 N	15/113	Z
C 1 2 N	15/52 (2006.01)	C 1 2 N	15/52	Z
C 1 2 N	15/115 (2010.01)	C 1 2 N	15/115	Z

(72)発明者 スイス, 3930 フィスプ, ロンザシュトラーク
 ジェイクス, コリン, マーク
 スイス, 3930 フィスプ, ロンザシュトラーク
 (72)発明者 ラチャー, アンドリュウ, ジェイ.
 スイス, 3930 フィスプ, ロンザシュトラーク
 (72)発明者 シン, ガーディーブ
 スイス, 3930 フィスプ, ロンザシュトラーク
 (72)発明者 バッジ, ジェームズ
 スイス, 3930 フィスプ, ロンザシュトラーク
 (72)発明者 ロブール, ジョアン
 スイス, 3930 フィスプ, ロンザシュトラーク

審査官 小林 薫

(56)参考文献 米国特許出願公開第2014/0073007 (US, A1)
 特開2002-300874 (JP, A)
 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992, Vol.89, pp.9354-9358
 Archaea, 2015, Vol.2015, Article ID 483194, pp.1-16
 Microbial Cell Factories, 2014, Vol.13, 126 (pp.1-15)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1/00-7/08
 C 1 2 N 15/00-15/90
 C 1 2 P 1/00-41/00
 C 1 2 Q 1/00-3/00
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
 Caplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)