

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3674686号

(P3674686)

(45) 発行日 平成17年7月20日(2005.7.20)

(24) 登録日 平成17年5月13日(2005.5.13)

(51) Int.Cl.⁷

C 1 2 N 15/09

C 1 2 N 5/10

F I

C 1 2 N 15/00

A

C 1 2 N 5/00

B

請求項の数 23 (全 32 頁)

(21) 出願番号	特願2000-591210 (P2000-591210)	(73) 特許権者	596168317
(86) (22) 出願日	平成11年12月20日 (1999.12.20)		ジェネンテック・インコーポレーテッド
(65) 公表番号	特表2002-533131 (P2002-533131A)		GENENTECH, INC.
(43) 公表日	平成14年10月8日 (2002.10.8)		アメリカ合衆国カリフォルニア・9408
(86) 国際出願番号	PCT/US1999/030478		0-4990・サウス・サン・フランシス
(87) 国際公開番号	W02000/039320		コ・ディーエヌエー・ウェイ・1
(87) 国際公開日	平成12年7月6日 (2000.7.6)	(74) 代理人	100109726
審査請求日	平成13年6月25日 (2001.6.25)		弁理士 園田 吉隆
(31) 優先権主張番号	60/113,614	(74) 代理人	100101199
(32) 優先日	平成10年12月23日 (1998.12.23)		弁理士 小林 義敦
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	コーエン, ダリアン, エル.
前置審査			アメリカ合衆国 カリフォルニア 946
			06, オークランド, パーク ブールバード 2408
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 リン酸カルシウム及び核酸を含むトランスフェクタコン

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

リン酸カルシウム及び所望の核酸のトランスフェクタコンを調製する方法であって：

a. カルシウム二価カチオン、リン酸多価アニオン、及び所望の核酸を混合して沈殿混合物を形成し、当該沈殿混合物が0.2～0.3mMの初期リン酸アニオン濃度を有し；次いで

b. 沈殿混合物を10～60分間インキュベートしてリン酸カルシウム及び所望の核酸を含むトランスフェクタコンを形成することを含んでなる方法。

【請求項2】

沈殿混合物が宿主細胞培地において形成される請求項1に記載の方法。

10

【請求項3】

インキュベーションの後に宿主細胞培地が希釈され、そこでトランスフェクタコンが沈殿混合物中より低速で成長し、希釈の後に宿主細胞がインキュベートされる請求項2に記載の方法。

【請求項4】

核酸が、それに対するコントロール配列と作用可能に結合したポリペプチドをコードする断片を含む請求項1に記載の方法。

【請求項5】

コントロール配列が、少なくとも1つのプロモーターであり、ポリペプチドが真核生物のものであり、回収されたトランスフェクタコンが真核生物組織又は細胞に運ばれる請求

20

項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

ポリペプチドが哺乳動物ポリペプチドであり、組織又は細胞が哺乳動物のものである請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

ポリペプチドがヒトポリペプチドであり、組織又は細胞がヒトのものである請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

所望の核酸を真核生物組織又は細胞に運ぶ方法であって、請求項 1 に記載の方法によりリン酸カルシウム及び所望の核酸のトランスフェクタコンを調製し、前記組織又は細胞に該トランスフェクタコンを導入することを含んでなる方法。

10

【請求項 9】

所望の核酸を真核生物宿主細胞に導入する方法であって：

a) カルシウム二価カチオン、リン酸多価アニオン、及び所望の核酸を混合して沈殿混合物を形成し、当該沈殿混合物が $0.2 \sim 0.3 \text{ mM}$ の初期リン酸アニオン濃度を有し；

b) 沈殿混合物を $10 \sim 60$ 分間インキュベートしてリン酸カルシウム及び所望の核酸を含むトランスフェクタコンを形成し；

c) 沈殿混合物を希釈し、それを細胞壁を欠く真核生物宿主細胞と混合してトランスフェクション混合物を形成し；そして

d) トランスフェクション混合物をインキュベートして真核生物宿主細胞にトランスフェクタコンを取り込ませてトランスフェクトされた細胞を形成することを含んでなる方法。

20

【請求項 10】

真核生物宿主細胞が哺乳動物細胞である請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

細胞がチャイニーズハムスター卵巣細胞である請求項 9 に記載の方法。

【請求項 12】

所望の核酸が DNA である請求項 9 に記載の方法。

【請求項 13】

所望の核酸が哺乳動物ポリペプチドをコードする請求項 9 に記載の方法。

【請求項 14】

ポリペプチドがヒトポリペプチドである請求項 13 に記載の方法。

30

【請求項 15】

ポリペプチドが VEGF、DNase、t-PA、t-PA のグリコシル化変異体、又は IgE 又は HER-2 に対する抗体である請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

工程 (b) における沈殿混合物が $15 \sim 30$ 分間インキュベートされる請求項 9 に記載の方法。

【請求項 17】

工程 (a) における沈殿混合物が少なくとも $30 \sim 100 \mu\text{g/ml}$ の初期濃度で所望の核酸を含有する請求項 9 に記載の方法。

40

【請求項 18】

工程 (a) における沈殿混合物が $180 \sim 300 \text{ mM}$ のカルシウムカチオン初期濃度を有する請求項 9 に記載の方法。

【請求項 19】

工程 (a) における沈殿混合物が $40 \sim 60 \mu\text{g/ml}$ の所望の核酸初期濃度及び $180 \sim 270 \text{ mM}$ のカルシウムカチオン初期濃度を有する請求項 9 に記載の方法。

【請求項 20】

工程 (c) において希釈と混合が同時に行われる請求項 9 に記載の方法。

【請求項 21】

工程 (c) において希釈が混合の前に行われる請求項 9 に記載の方法。

50

【請求項 2 2】

細胞が接着性細胞である請求項 9 に記載の方法。

【請求項 2 3】

細胞が浮遊適合性細胞である請求項 9 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の分野)

本発明は核酸トランスフェクションの分野、より詳細には、ここでトランスフェクタコンと呼ばれるリン酸カルシウム及び核酸の沈殿複合体の調製方法、及びリン酸カルシウム共沈殿による真核細胞の核酸トランスフェクション法に関する。

10

【0002】

(関連する開示)

真核生物宿主細胞に外来 DNA を導入する能力は、組換え DNA 技術の本質的手段の 1 つである。真核宿主細胞の外来 DNA によるトランスフェクション法は大きく以下の 4 つのカテゴリーに分けることができる。(1) マイクロインジェクションまたは微小粒子衝撃法によるクローン化 DNA の直接導入、(2) ウイルスベクターの使用、(3) キャリアー系へのカプセル化、及び(4) リン酸カルシウム及びジエチルアミノエチル(DEAE)-デキストランのような形質移入剤の使用。

【0003】

種々の形質移入剤を用いた哺乳動物細胞の一過性トランスフェクションを改良するための種々の試みがなされており、それはカチオン性脂質、DEAE-デキストラン(又はその関連類似物)、及びリン酸カルシウム(Itani等, Gene, 56: 267-276 (1987); Hofland等, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 93: 7305-7309 (1996); Smyth-Templeton等, Nature Biotechnology, 15: 647-652 (1997); McCutchan及びPagano, J. Natl. Cancer Inst., 41: 351 (1968); Parker及びStark, J. Virol., 31: 360 (1979); Graham等, Nature (London), 251: 687-691 (1974); Bachetti及びGraham, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 74(4): 1590-1594 (1977); Wigler等, Cell, 14: 725-731 (1978)) を含む。DNA トランスフェクションの促進剤として使用される試薬のうち、リン酸カルシウムはその単純さと種々の細胞タイプ全般に対して効果があることから依然として最も広く用いられている。従って、形質移入剤としてリン酸カルシウム/DNA (CaPi/DNA) 粒子を使用した一過性トランスフェクションの改良に対して重大な関心が払われている。この後、CaPi 等の形質移入剤と、選択した宿主細胞に導入されるプラスミド又は核酸との間で形成された複合体をトランスフェクタコン(transfectacon)と称する。

20

30

【0004】

CaPi トランスフェクタコンを介して哺乳動物細胞に核酸配列を導入する方法は、Graham 及び van der Eb, Virology, 52:456-467(1973)に最初に記載された。この方法はWigler 等, Cell, 14: 725-731(1978)及びChen 及びOkayama, Mol. Cell. Biol., 7: 2745-2752 (1987) によって改良され、細胞表面に接着し、引き続きエンドサイトーシスを介して細胞質内に運ばれる小さな不溶性のCaPi トランスフェクタコンの形成に基づいている(Loyter 等, Proc Natl. Acad. Sci. (USA), 79: 422-426 (1982); Loyter 等, Exp. Cell Res., 139: 223-234 (1982))。一度内部移行すると、これらの核酸分子はエンドソーム-リソソーム小胞輸送システムによって核に運ばれる(Orrantia 等, Somat. Cell Mol. Gen., 16: 305-310 (1990); Orrantia 等, Exper. Cell Res., 190: 170-174 (1990); Coonrod 等, Gene Therapy, 4: 1313-1321 (1997))。

40

【0005】

哺乳動物細胞のCaPi/DNA 一過性トランスフェクションのために最も広く用いられているプロトコル(Sambrook 等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd Ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, New York, 1989) は、pH 7.05 でのCaPi トランスフェクタコンの形成及び室温で20~30分間インキュベートされるCaCl₂、Na₂HPO₄、及びDNAの標準的な濃縮を含む。このプロ

50

トコールは、殆どの実験室において、安定性及び一過性トランスフェクションの生成に容易に実施されるが、この方法を用いる場合に経験する幾つかの問題がある（Sambrook等、上掲）：1）このプロトコールは、トランスフェクションからトランスフェクションにかけて高度に変化しうること；2）反応における変数についての規格が無いいため、このプロセスのスケージング(scaling)が極めて困難であること；及び3）到達した力価が他のトランスフェクション系に比較して低いことである。

【0006】

哺乳動物細胞のCaPiトランスフェクションを改良する努力において、その細胞への添加に先行する別工程及び接着性細胞又は浮遊適合性(suspension-adapted)細胞の存在下でトランスフェクタコンが形成される同時工程の両方としてのトランスフェクタコン形成の種々の態様に特別な注意が払われていた（Song及びLahiri, Nucleic Acids Res., 23(17): 3609-3611 (1995); Jordan等, Nucleic Acids Res., 24(4): 596-601 (1996); Jordan等, Cytotechnology, 26: 39-47 (1998)）。トランスフェクション受容性のCaPiトランスフェクタコンの形成は0.1 pH単位未満のpH変化に感受性であることが示された（Chen及びOkayama, 上掲; O'Mahoney及びAdams, DNA Cell Biol., 13: 1227-1232 (1994); Jordan等, Nucleic Acids Res., 上掲）。この感受性の基礎は完全に理解されていないが、最近の報告は沈殿反応のpHが、それらの実験で使用した反応物についての標準的な濃度下でCaPiトランスフェクタコンの凝結係数及びゼータ電位に影響することを示唆している（Yang及びYang, Drug Delivery, 3: 173-179 (1996); Yang及びYang, Drug Delivery, 3: 181-186 (1996)）。

【0007】

共沈殿反応における反応物の濃度の意義を試験することを意図した実験において、現存するプロトコールの改良が達成された（Chen及びOkayama, 上掲; Song及びLahiri, 上掲; Jordan等, Nucleic Acids Res., 上掲; Wilson等, Anal. Biol. 226: 212-220 (1995)）。これらの実験では、一つの変数は各実験間で変化させたが、残りの変数は一定に保たれ、それにより変数間の相互作用の評価が極めて困難になった。

【0008】

CaPiトランスフェクタコンの共沈殿を促進するために必要とされる時間の長さについて多くの実験がなされた。これらの研究は、カルシウム、リン酸、及びDNAの標準又は標準近傍の濃度では、沈殿時間が短いと、トランスフェクション効率及び／又は発現力価が標準的なプロトコールに従うものより高くなった（O'Mahoney及びAdams, 上掲; Jordan等, Nucleic Acids Res., 上掲; Coonrod等, 上掲）。これらの短い沈殿時間は、おそらく沈殿物の粒子サイズがより小さいため、細胞により取り込まれやすいCaPiトランスフェクタコンを生成させた。粒子を、それらが約300nmの平均長まで成長させるようなインキュベーションを記載した米国特許第5,633,156号、第5,593,875号、第5,686,263号、及び第5,484,720号も参照のこと。今日まで、これらの粒子の正確な測定及び粒子サイズとトランスフェクション効率又はタンパク質発現との間の関係は報告されていない（Parasrampuria, BioPharm., 3: 38-45 (1998)）。

【0009】

さらに、全ての文献において、標準又は標準近傍の共沈殿条件は、異なる日に実施されたトランスフェクション間で高度に変わりうる力価を生ずることにおいて、それほど強力(robust)ではない（Sambrook等、上掲）。

元の及び改変したプロトコールは、一過性又は安定性トランスフェクションに適合させた実験において比較的低いトランスフェクション効率及び発現を生じるので、リン酸カルシウムトランスフェクションの改良した強力な方法及び組換えタンパク質の向上した力価の必要性が未だに存在する。さらに、現在では存在しない、浮遊培養、特に大規模な浮遊培養の領域におけるリン酸カルシウム法が必要性とされている。

【0010】

（発明の概要）

従って、本発明は、リン酸カルシウム及び所望の核酸のトランスフェクタコンを調製する

10

20

30

40

50

方法を提供し、それは：

a) カルシウム二価カチオン、リン酸多価アニオン、及び所望の核酸を混合して沈殿混合物を形成し、当該沈殿混合物が約0.2～0.5 mMの初期リン酸アニオン濃度を有し；
次いで

b) 沈殿混合物を約10～60分間インキュベートしてリン酸カルシウム及び所望の核酸を含むトランスフェクタコンを形成することを含んでなる。

また、上記方法によって調製されたトランスフェクタコンも提供される。

さらなる実施態様では、本発明は、所望の核酸を真核生物組織又は細胞に運ぶ方法であって、当該組織又は細胞に上記のトランスフェクタコンを導入することを含んでなる方法を提供する。

10

【0011】

他の実施態様では、本発明は、所望の核酸を真核生物宿主細胞に導入する方法を提供し、当該方法は：

a) カルシウム二価カチオン、リン酸多価アニオン、及び所望の核酸を混合して沈殿混合物を形成し、当該沈殿混合物が約0.2～0.5 mMの初期リン酸アニオン濃度を有し；

b) 沈殿混合物を約10～60分間インキュベートしてリン酸カルシウム及び所望の核酸を含むトランスフェクタコンを形成し；

c) 沈殿混合物を希釈し、それを細胞壁を欠く真核宿主細胞と混合してトランスフェクション混合物を形成し；次いで

d) トランスフェクション混合物をインキュベートして真核宿主細胞にトランスフェクタコンを取り込ませてトランスフェクトされた細胞を形成することを含んでなる。

20

【0012】

核酸を哺乳動物細胞に導入するためにCaPiと核酸の共沈殿が20年以上に渡って使用されてきたという事実にもかかわらず、CaPiトランスフェクションにおいて達成されるタンパク質発現及びトランスフェクション効率は非常に変化する。さらに、この実験で決定された約1分間という好ましい沈殿時間は、液体取扱い上の制限から、それ自体大容量に容易に適合しない。この発明は、このタイプのトランスフェクションにおけるタンパク質の一過性発現に影響する主要な要因が反応中のリン酸濃度及び沈殿時間の長さであり、これらの変数は相互作用するが、これらの反応中の核酸濃度の発現への影響の程度は少ないという発見に基づいている。これらの反応中のカルシウム濃度は一過性力価に有意な影響を与える要因ではない。

30

【0013】

CaPiトランスフェクタコン形成についての、この新たな条件の組み合わせは、タンパク質力価の有意な増大を生ずる強力な方法を提供し、タンパク質発現の再現性を高め、共沈殿反応を制御する時間が長くなることにより、より大きな規模の方法に適合可能とする。また、予期しなかったことだが、CaPiと核酸の共沈殿に含まれるリン酸濃度及び共沈殿反応の長さは相互作用し、一過性トランスフェクション実験で得られる力価を向上させる。

ここで本発明は、接着細胞培養及び大規模浮遊培養の両方、好ましくは接着性培養におけるリン酸カルシウムトランスフェクションの改良された方法を提供する。ここに提供される方法は、大規模な浮遊培養、例えば少なくとも約0.5リットル(L)の容量、好ましくは約0.5～50Lの浮遊培養におけるトランスフェクションに有用である。

40

【0014】

(好ましい実施態様の詳細な説明)

定義：

本明細書中で用いている用語「トランスフェクション」は、リン酸カルシウム共沈殿、ウイルスによる形質導入、リポソーム融合、マイクロインジェクション、微小粒子衝撃、及びエレクトロポレーションなどを含む当該技術分野で知られたあらゆる方法によって宿主細胞に細胞外核酸を導入することと定義される。用語「宿主細胞による核酸の取り込み (uptake)」、「宿主細胞による核酸の取り込み (taking up)」、「宿主細胞による核酸

50

含有粒子の取り込み (uptake)」、及び「宿主細胞による核酸含有粒子の取り込み (taking up)」は、付随する物質を有するかまたは有しない細胞外核酸が宿主細胞に入る任意の方法を表す。

ここで使用される「トランスフェクタコン(transfectacon)」は、トランスフェクション又は形質移入剤 (例えば、カチオン性脂質、市販のポリマー、DEAE、CaPi、など) と、選択した宿主細胞に導入されるプラスミド又は核酸との間で形成された複合体、粒子、及び／又は沈殿物を指す。

【0015】

本明細書で用いる用語「核酸ーリン酸カルシウム共沈殿」および「リン酸カルシウム共沈殿」は、溶液中の核酸、Ca、及び PO_4 が、ここで「リン酸カルシウム」とも呼ばれるヒドロキシアパタイトと核酸との複合体を含むCaPiトランスフェクタコンを形成する方法を表す。この定義には、さらに沈殿させるか又はそのようなトランスフェクタコンを凝集および／または再配列させることによる当該トランスフェクタコンの成長も含まれる。

10

ここで使用される場合の用語「リン酸カルシウムトランスフェクション」は、核酸の宿主細胞による取り込みを促進するのにリン酸カルシウムが用いられる任意の宿主細胞のトランスフェクション法を意味する。

【0016】

ここで用いられる場合の用語「形質転換」は、核酸を染色体統合物または染色体外成分として複製可能とするように核酸を宿主細胞に導入することを表す。

20

ここで用いられる場合の用語「多価(multivalent)」又は「多価(polyvalent)」は、ジ-、トリ-、又はより高い価数のイオン、好ましくはリン酸の二価アニオンを意味する。

ここで用いられる場合の用語「接着性」細胞は、単層として成長する細胞、例えば、2%のウシ胎児血清を添加したダルベッコの改変イーグル培地 (DMEM) において、インキュベータ内で 35°C において5% CO_2 雰囲気下で成長するものを意味する。

ここで用いられる場合の用語「浮遊適合性細胞」は、3～6日毎に新鮮培地で継代するなどにより、対数成長相に維持されたスピナーフラスコ又はバイオリアクター内で成長する細胞を意味する。この成長過程のための標準的な技術、方法、及び装置は、Lubinieccki, 編, Large Scale Mammalian Cell Culture Technology (Marcel Dekker: New York and Basle, 1990)に概説されている。

30

【0017】

ここで用いられる場合の用語「細胞壁を欠く真核生物宿主細胞」は、哺乳動物細胞、鳥類細胞、は虫類細胞、両生類細胞、および魚類細胞などの任意の脊椎動物細胞、ならびに昆虫細胞、甲殻類細胞および軟体動物細胞、および原生動物細胞などの多細胞無脊椎動物細胞を含む、その細胞の無傷の状態において細胞壁を持たないあらゆる有核細胞、ならびにその天然の細胞壁が取り除かれているかもしくはプロトプラストを形成することができるかまたはプロトプラストを形成するために処理されることができるすべての植物細胞を含む細胞壁が存在しない天然または人工的に誘導された状態にあるあらゆる有核細胞を表す。

【0018】

ここで用いられる場合の用語「所望の核酸」は、あらゆる所望のDNA、RNAまたはDNA/RNAハイブリッドを表し、プラスミドなどのベクターに含有されたものを含む。ここで用いられる場合、用語「所望のDNA」は、例えば、2本鎖DNA、1本鎖DNA、鎖の一方または両方が2またはそれ以上の断片からなる2本鎖DNA、鎖の一方または両方が連続したホスホジエステル骨格を有する2本鎖DNA、1またはそれ以上の1本鎖部分および1またはそれ以上の2本鎖部分を含むDNA、DNA鎖が完全に相補性である2本鎖DNA、DNA鎖の一部のみが相補性である2本鎖DNA、環状、共有結合的に閉じたDNA、直鎖状DNA、共有結合的に架橋したDNA、cDNA、化学的に合成されたDNA、半合成DNA、生合成DNA、天然の単離DNA、酵素消化されたDNA、切断されたDNA、プラスミドDNA、染色体DNA、放射性標識DNAや蛍光色素標識D

40

50

NAのような標識DNA、1またはそれ以上の非天然に生じる核酸を含むDNAなどを含み、宿主細胞をトランスフェクトするために選ばれる任意のポリデオキシヌクレオチドと定義される。

【0019】

ここで用いられる場合、用語「所望のRNA」は、例えば、1本鎖RNA、2本鎖RNA、鎖の一方または両方が2またはそれ以上の断片からなる2本鎖RNA、鎖の一方または両方が連続したホスホジエステル骨格を有する2本鎖RNA、1またはそれ以上の1本鎖部分および1またはそれ以上の2本鎖部分を含むRNA、RNA鎖が完全に相補性である2本鎖RNA、RNA鎖の一部のみが相補性である2本鎖RNA、共有結合的に架橋したRNA、酵素消化されたRNA、切断されたRNA、mRNA、hnRNA、荷電および非荷電のtRNAを含むtRNA、rRNA、すべての形のウイルスゲノムRNA、化学的に合成されたRNA、半合成RNA、生合成RNA、天然の単離RNA、放射性標識RNAや蛍光色素標識RNAのような標識RNA、1またはそれ以上の非天然に生じる核酸を含むRNAなどを含む、宿主細胞をトランスフェクトするために選ばれる任意のポリリボヌクレオチドと定義される。

10

【0020】

ここで使用される場合の用語「所望のDNA/RNAハイブリッド」および「所望のハイブリッドDNA/RNA」は、DNA鎖とRNA鎖が、DNA鎖がRNA鎖と完全に相補性または一部のみが相補性であるハイブリッド、DNA鎖および/またはRNA鎖が不連続ホスホジエステルバックボーンを有するハイブリッド、DNA鎖および/またはRNA鎖が2またはそれ以上のフラグメントからなるハイブリッド、1またはそれ以上の1本鎖部分および1またはそれ以上の2本鎖部分を含むハイブリッド、相補性または部分的相補性DNAおよびRNAのアニーリングによって作製されるハイブリッド、共有結合的に架橋したハイブリッド、化学的に合成されたハイブリッド、半合成ハイブリッド、生合成ハイブリッド、天然に単離されたハイブリッド、放射標識ハイブリッドや蛍光色素標識ハイブリッドのような標識ハイブリッド、1またはそれ以上の非天然に生じる核酸を含むハイブリッドなどを含むあらゆるハイブリッド核酸であると定義される。

20

【0021】

ここで用いられる場合の「ポリペプチド」又は「対象とするポリペプチド」は、一般的に約10アミノ酸以上を有するペプチド及びタンパク質を指す。ポリペプチドは宿主にとって「同種」（即ち、利用する宿主に内在性）、又は「異種」（即ち、宿主細胞に外来性）、例えば酵母菌によって産生されるヒトタンパク質などであってよい。ポリペプチドは不溶性凝集物として、又は可溶性ポリペプチドとして細胞周辺腔又は細胞質中に産生される。ここで好ましいポリペプチドは、真核細胞性、より好ましくは哺乳類性、最も好ましくはヒト性である。

30

【0022】

哺乳類ポリペプチドの例は、例えば、レニン、ヒト成長ホルモン；ウシ成長ホルモンを含む成長ホルモン；成長ホルモン放出因子；副甲状腺ホルモン；甲状腺刺激ホルモン；リボタンパク質； $\alpha 1$ -アンチトリプシン；インシュリンA鎖；インシュリンB鎖；プロインシュリン；トロンボポエチン；濾胞刺激ホルモン；カルシトニン；黄体形成ホルモン；グルカゴン；因子V I I I C、因子I X、組織因子、及びウィルブランズ(Willbrands)因子などの凝固因子；プロテインCなどの抗-凝固因子；心房性ナトリウム利尿因子；肺表面活性剤；プラスミノゲン活性化剤、例えばウロキナーゼ又はヒト尿素又は組織型プラスミノゲンアクチベータ(t-PA)であって、グリコシル化変異体、例えば、T103N、N117Q、TNKとしても知られるK H R R 2 9 6 - 2 9 9 A A A A（米国特許第5,612,029号；1993年12月9日発行のW093/24635）等の変異体を含むもの；ボンベシン；トロンビン；造血成長因子；腫瘍壊死因子-アルファ及びベータ；エンケファリン分解酵素；ヒト血清アルブミンなどの血清アルブミン；ミューラー阻害物質；レラキシンA鎖；レラキシンB鎖；プロレラキシン；マウスゴナドトロピン関連ペプチド；微生物タンパク質；例えばベータ-ラクタマーゼ；DNA分解酵素；インヒビン；アクチビン；血管内皮成

40

50

長因子 (VEGF) ; ホルモン又は成長因子のレセプター ; インテグリン ; プロテインA
又はD ; リウマチ因子 ; 神経栄養因子、例えば脳誘導神経栄養因子 (BDNF)、ニュー
ロトロフィン-3、-4、-5又は-6 (NT-3、NT-4、NT-5、又はNT-6)、又は
神経成長因子、例えばNGF- β ; 心臓栄養因子 (心臓肥大因子)、例えばカーディオト
ロフィン-1 (CT-1) ; 血小板誘導成長因子 (PDGF) ; 繊維芽成長因子、例えばa
FGF及びbFGF ; 表皮成長因子 (EGF) ; トランスフォーミング成長因子 (TGF
)、例えばTGF- α 及びTGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、TGF- β 4
、又はTGF- β 5を含むTGF-ベータ ; インシュリン様成長因子-I及び-II (IGF
-I及びIGF-II) ; des(1-3)-IGF-I (脳IGF-I)、インシュリン様成長
因子結合性タンパク質 ; CDタンパク質、例えばCD-3、CD-4、CD-8、及びCD-
19 ; エリスロポエチン ; 骨誘導因子 ; 免疫毒素 ; 骨形態発生タンパク質 (BMP) ; イン
ターフェロン、例えばインターフェロン- α 、- β 及び- γ ; コロニー刺
激因子 (CSFs) ; 例えばM-CSF、GM-CSF、及びG-CSF ; インターロイキ
ン (ILs)、例えばIL-1からIL-10 ; 抗-HER-2抗体 ; スーパーオキシドジス
ムターゼ ; T細胞レセプター ; 表面膜タンパク質 ; 減衰促進因子 ; ウイルス抗原、例えば
、AIDS外膜の部分 ; 輸送タンパク質 ; ホーミングレセプター ; アドレシン ; 調節タン
パク質 ; 抗体 ; 及び上記のポリペプチドの任意の断片などの分子を含む。

10

【0023】

ここで特に好ましい対象とするポリペプチドは、t-PA、TNK、VEGF、gp120、抗-HER-2、抗-IGF、抗-CD11a、抗-CD18、DNase、IGF-I、
IGF-II、脳IGF-I、成長ホルモン、リラキシン鎖、成長ホルモン放出因子、イン
シュリン鎖又はプロインシュリン、ウロキナーゼ、イムノトキシン、好中球、及び抗原で
ある。特に最も好ましい哺乳動物ポリペプチドは、例えば、抗-HER-2、E25等のI
gEに対する抗体、t-PA、TNK、DNase、及びVEGFを含む。

20

【0024】

用語「コントロール配列」は、特定の宿主生物において作用可能に結合したコード化配列
を発現するために必要なDNA配列を指す。真核細胞に好適なコントロール配列は、プロ
モータ、ポリアデニル化シグナル、及びエンハンサーを含む。

【0025】

核酸は、他の核酸配列と機能的な関係にあるときに「作用可能に結合し」ている。例えば
、プレ配列あるいは分泌リーダーのDNAは、ポリペプチドの分泌に参画するプレタンパ
ク質として発現されているなら、そのポリペプチドのDNAに作用可能に結合している ;
プロモーター又はエンハンサーは、配列の転写に影響を及ぼすならば、コード化配列に作
用可能に結合している ; 又はリボソーム結合部位は、もしそれが翻訳を促進するような位
置にあるなら、コード配列と作用可能に結合している。一般的に、「作用可能に結合して
いる」とは、DNA配列が結合し隣接しており、分泌リーダーの場合には隣接していて読
み枠にあることを意味する。結合は簡便な制限部位でのライゲーションにより達成される
。そのような部位が存在しない場合は、従来の手法に従って、合成オリゴヌクレオチドア
ダプターあるいはリンカーが使用される。

30

【0026】

ここで使用される場合、「細胞」、「細胞系」及び「細胞培養」という表現は、互いに交
換可能に使用され、そのような名称は全て子孫を含んでいる。従って、「形質転換体」及
び「形質転換された細胞」は初代の対象細胞及び、植え継ぎ回数には関係無く、それに由
来する培養物を含んでいる。また、故意又は偶然の変異のために、全ての産物はDNA含
量が正確に一致しないかもしれないことも理解される。最初に形質転換された細胞におい
てスクリーニングされるのと同じ機能又は生物学的活性を有する突然変異子孫が含まれる
。明確な規定が意図される場合には、それは文脈から明らかになるだろう。ここでの細胞
は、一般的には真核細胞、好ましくは哺乳動物である。

40

ここで使用される場合の「組織」は、任意の供給源、好ましくは真核生物、最も好ましく
は哺乳動物からの任意の組織であってよい。

50

【0027】

(発明の実施の形態)

ここに開示する方法の一つは、リン酸カルシウムと所望の核酸のトランスフェクタコンの調製のため、特にドラッグデリバリー又は遺伝子治療形式で組織を標的化するための輸送のために改良されたものである。トランスフェクタコンは、カルシウム二価カチオン、リン酸多価アニオン、及び所望の核酸を混合して沈殿混合物を形成し、ここで、沈殿混合物は約0.2～0.5 mMの初期リン酸アニオン濃度を有しており；次いで沈殿混合物を約10～60分間インキュベートしてトランスフェクタコンを形成することにより調製される。

【0028】

好ましい実施態様では、この方法は、共沈殿混合物を培養培地で希釈し、次いで希釈した混合物を細胞上に配置する工程を更に必要とする。また、好ましくは核酸は、一又は複数のコントロール配列と作用可能に結合した、ポリペプチド、好ましくは真核生物ポリペプチドをコードする断片を含み、回収されたトランスフェクタコンは真核生物組織又は細胞、より好ましくはCHO又はヒト細胞などの哺乳動物組織又は細胞に運ばれる。

【0029】

好ましくは、ポリペプチドをコードする核酸に作用可能に結合したコントロール配列はプロモーターである。酵母宿主と共に用いて好適なプロモーター配列の例としては、3-ホスホグリセラートキナーゼ (Hitzeman 等, J. Biol. Chem., 255:2073 (1980)) 又は他の糖分解酵素 (Hess 等, J. Adv. Enzyme Reg., 7:149 (1968); Holland, Biochemistry, 17:4900(1987))、例えばエノラーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ、3-ホスホグリセレートムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオセリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、及びグルコキナーゼが含まれる。

【0030】

他の酵母プロモーターとしては、成長条件によって転写が制御される付加的効果を有する誘発的プロモーターであり、アルコールデヒドロゲナーゼ2、イソチトクロムC、酸ホスファターゼ、窒素代謝に関連する分解性酵素、メタロチオネイン、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、及びマルトース及びガラクトースの利用を支配する酵素のプロモーター領域がある。酵母菌での発現に好適に用いられるベクターとプロモーターはEP 73,657に更に記載されている。

【0031】

哺乳動物の宿主細胞におけるベクターからポリペプチドの転写は、例えば、ポリオーマウイルス、伝染性上皮腫ウイルス(1989年7月5日公開のUK 2,211,504)、アデノウイルス(例えばアデノウイルス2)、ウシ乳頭腫ウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルス及びサルウイルス40 (SV40)のようなウイルスのゲノムから得られるプロモーター、異種性哺乳動物プロモーター、例えばアクチンプロモーター又は免疫グロブリンプロモーター、及び熱衝撃プロモーターから得られるプロモーターによって、このようなプロモーターが宿主細胞系に適合し得る限り制御される。

【0032】

より高等の真核生物によるポリペプチドをコードするDNAの転写は、ベクター中にエンハンサー配列を挿入することによって増強され得る。エンハンサーは、通常は約10から300塩基対で、プロモーターに作用してその転写を増強するDNAのシス作用要素である。哺乳動物遺伝子由来の多くのエンハンサー配列が現在知られている(グロビン、エラストラーゼ、アルブミン、 α -フェトプロテイン及びインスリン)。しかしながら、典型的には、真核細胞ウイルス由来のエンハンサーが用いられるであろう。例としては、複製起点の後期側のSV40エンハンサー(100-270塩基対)、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期側のポリオーマエンハンサー及びアデノウイルスエンハンサーが含まれる。エンハンサーは、所望のコード化配列の5'又は3'位でベク

10

20

30

40

50

ター中にスプライシングされ得るが、好ましくはプロモーターから5'位に位置している。

【0033】

また真核生物宿主細胞(酵母、真菌、昆虫、植物、動物、ヒト、又は他の多細胞生物由来の有核細胞)に用いられる発現ベクターは、転写の終結及びmRNAの安定化に必要な配列も含む。このような配列は、真核生物又はウィルスのDNA又はcDNAの通常は5'、時には3'の非翻訳領域から取得できる。これらの領域は、ポリペプチドをコードするmRNAの非翻訳部分にポリアデニル化断片として転写されるヌクレオチドセグメントを含む。これら全ての核酸エレメントは、その最終用途に応じて、ここで所望の核酸に導入してよい。

10

【0034】

また本発明は、所望の核酸を組織又は細胞へ運ぶ方法も提供し、それは、当該組織m細胞に上記のように調製したトランスフェクタコンを導入することを含む。これは、遺伝子治療又は組織又は細胞への遺伝子輸送のための任意の適切な手法によって行われる。生存可能な細胞にトランスフェクタコンを導入するために利用可能な種々の技術が存在する。これらの技術は、核酸が培養細胞にインビトロで移行されるか、あるいは意図する宿主の細胞においてインビボ又はインビトロで移行されるかに依存する。

【0035】

核酸(場合によってはベクター内に含まれたもの)を患者の細胞に入れるために:インビボ及びエキソビボという2つの主要な方法がある。インビボ送達では、トランスフェクタコン中の核酸は、通常は核酸によってコードされるポリペプチドが必要とされている部位に、患者に直接注入される。エキソビボ処理では、患者の細胞を取り出し、核酸をこれらの単離された細胞に導入し、修飾された細胞を患者に、直接、又は例えば患者に埋め込まれる多孔性膜にカプセル化して投与する(米国特許第4,892,538号及び第5,283,187号参照)。

20

【0036】

現在好ましいインビボ核酸移入技術は、ウイルス又は非ウイルスベクター(アデノウイルス、単純ヘルペスIウイルス、又はアデノ関連ウイルス)、及び脂質ベースの系(遺伝子の脂質媒介移入に有用な脂質は、例えば、DOTMA、DOPE、及びDC-Cholである;例えば、Tonkinson等, Cancer Investigation, 14(1): 54-65 (1996) 参照)での形質移入を含む。幾つかの状況では、核酸供給源を標的細胞をターゲティングする試薬、例えば細胞表面膜タンパク質に特異的な抗体又は標的細胞、標的細胞上のレセプターのリガンドなどとともに提供するのが望ましい。リボソームが用いられる場合、エンドサイトーシスを伴って細胞表面膜タンパク質に結合するタンパク質が、ターゲティング及び/又は取り込みの促進のために用いられ、例えば、特定の細胞型向性のキャプシドタンパク質又はそのフラグメント、サイクリングにおいて内部移行を受けるタンパク質の抗体、及び細胞内局在化をターゲティングし細胞内半減期を向上させるタンパク質である。レセプター媒介エンドサイトーシスの技術は、例えば、Wu等, J. Biol. Chem., 262:4429-4432 (1987)及びWagner等, Proc. Natl. Acad. Sci., 87: 3410-3414 (1990)に記載されている。現在知られている遺伝子標識化及び遺伝子治療プロトコルの概説については、Anderson等, Science, 256:808-813 (1992)を参照のこと。また、W0 93/25673及びそこに引用された参考文献、及び米国特許第5,681,746号も参照。

30

40

【0037】

所望の核酸は、細胞性移植に適したインプラント可能な装置(例えば、Baxter製のTheraCyte(商品名)バッグ)を介して、当該ポリペプチドを産生するよう設計された哺乳動物の非自己細胞への移植により導入してもよい。これらの非自己細胞は、好ましくはヒト細胞であり、好ましくは当該ポリペプチドを発現又は産生するようにエキソビボで修飾されている。これらのインプラントのための技術は、例えば米国特許第5,421,923号、第5,453,278号、第5,314,471号、第5,344,454号、第5,545,223号、及び第5,549,675号に記載されている。簡単には、インプラントアセンブリは、インプラントされる細胞無しで宿主内にイ

50

ンプラントしてもよい。好ましくは、アセンブリは血管新生前とされる。インプラントアセンブリの脈管形成の後、ここでのトランスフェクタコンでトランスフェクトされたインプラントされる細胞が、アセンブリに添加される。

【0038】

トランスフェクタコンは、典型的には核酸をインビトロで哺乳動物細胞に移行させるために使用される。宿主細胞は、インビボ又はインビトロで、少なくとも3つの方法でトランスフェクタコンに曝露される：(1)トランスフェクタコン(DNA-リン酸カルシウム共沈殿物)を形成し、次いでトランスフェクタコンを宿主細胞培地と混合することにより一工程でトランスフェクタコンを希釈して宿主細胞に接触させる；(2)トランスフェクタコンを形成し、トランスフェクタコンを希釈し、次いで希釈したトランスフェクタコンを宿主細胞培地と混合する；そして(3)宿主細胞培地でトランスフェクタコンを形成し、次いで宿主細胞培地を希釈する。

10

【0039】

I. トランスフェクタコンの希釈と同時の宿主細胞への曝露

a. 宿主細胞の調製

本発明の方法では、細胞壁を欠く任意の真核宿主細胞を用いることができる。本発明の方法では哺乳動物細胞を用いることが好ましい。有用な哺乳動物細胞系の例には、SV40によって形質転換されたサル腎CV1系(COS-7、ACTT CRL 1651)、ヒト胎児腎系(293細胞または浮遊培養中で増殖させるためにサブクローンされた293細胞、Graham等, J. Gen Virol., 36: 59(1977))、赤子ハムスター腎細胞(BHK、ACTT CCL10)、チャイニーズハムスター卵巣細胞/DHFR(CHO、UrlaubとChasinの、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4216(1980))、マウスセルトリ細胞(TM4、Matherの、Biol. Repord., 23: 241-251(1980))、サル腎細胞(CV1、ACTT CCL 70)、アフリカミドリザル腎細胞(VERO-76、ATCC CRL-1587)、ヒト子宮頸癌細胞(HELA、ACTT CCL2)、イヌ腎細胞(MDCK、ACTT CCL34)、パッファローラット肝細胞(BRL3A、ATCC CRL 1442)、ヒト肺細胞(W138、ACTT CCL 75)、ヒト肝細胞(Hep G2、HB 8065)、マウス乳癌(MMT 060562、ATCC CCL51)、TRI細胞(Mther等, Annuals N.Y. Acad. Sci., 383: 44-68(1982))、MRC5細胞、FS4細胞、およびヒト肝癌細胞系(Hep G2)が含まれる。

20

【0040】

選ばれた哺乳動物宿主細胞は、例えば35℃、5%CO₂大気下、孵卵器中で、10%子ウシ血清添加ダルベッコ改良イーグル培地(DMEM)を用いて細胞を単層で増殖させるような当該技術分野で知られたあらゆる方法によって培養することができる。特定の細胞タイプには他の方法を用いることができる。例えば、Drosophila細胞系は、Di NoceraおよびDawidの、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 7095-7098(1983)の記載に従って増殖させることができ、魚細胞系はAraki等, Bull. Res. Inst. Aquaculture, 20: 1-9(1991)の記載に従って増殖させることができる。

30

【0041】

あるいはまた、浮遊細胞培養を用いることができる。浮遊液中の細胞はスピナーフラスコ中、100mLから10Lの容量範囲で、またはバイオリアクター中、0.5L~10,000Lの容量範囲で増殖させることができる。浮遊培養中の細胞は、当該技術分野で知られた多くの方法によって達成できる指数増殖期に保つ必要があり、その最も普通の方法は3~6日ごとに新鮮培地で継代培養することである。標準的技術、方法、および装置については、上掲のLubinieckiに概説されている。

40

【0042】

植物細胞宿主の場合、本発明に使用するのに適した植物細胞プロトプラスト培養は、LichtensteinとDraplerの、「Genetic Engineering of Plants」、DNA Cloning Volume III: A Practical Approach, Glover編、IRL Press(1985)中、67-119頁に従って製造することができる。

【0043】

50

b. DNAの調製

本発明の方法に用いるあらゆる所望のDNAは、当該技術分野で知られた種々の方法により製造することができる。これらの方法には、Engels等, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 28: 716-734(1989)に記載の、トリエステル、ホスファイト、ホスホラミジト、およびH-ホスホネート法のようなあらゆる方法（これらの内容は本明細書の一部を構成する）によって化学的に合成されるがこれらに限定されるものではない。あるいはまた、所望のDNA配列は存在するクローンからか、または利用できるクローンがないときはDNAライブラリーをスクリーニングし、該ライブラリークローンから所望のDNA配列を構築することによって得ることができる。

【0044】

10

本発明で使用するDNA鋳型の適切な量は、ほとんどのグラム陰性細菌宿主中で自己複製するための複製のpPB322起源を保有するプラスミドベクター、Bacillusおよび他のグラム陽性細菌宿主中で自己複製するための複製のpC194 (Ehrlichの、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75: 1433-1436(1978))起源を保有するプラスミドベクター、またはほとんどの酵母宿主中で自己複製するための複製の起源を保有する2-ミクロン環状(2 μ プラスミド)ベクターのようなよく知られたクローニングベクターおよび宿主中で該DNAを増幅させることによって製造することができる。

【0045】

あるいはまた、該DNA鋳型は、Saiki等, Science, 230: 1350(1985)、Mullis等, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 51: 263(1986)、MullisとFaloonaの、Methods Enzymol., 155: 335(1987)、およびSaiki等, Science, 239: 487(1988)に記載のポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって増幅させることができる。

20

【0046】

c. RNAの調製

本発明の方法に用いるあらゆる所望のRNAは、当該技術分野で知られた種々の方法によって製造することができる。これらの方法には、Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience, New York(1990)に一般に記載されているRNAの化学的合成法およびDNA鋳型のin vitro翻訳法が含まれるがこれらに限定されるものではない。

【0047】

あるいはまた、所望のRNAは宿主細胞培養から抽出された全細胞RNAから単離することができる。全細胞RNAは、哺乳動物細胞中で産生されるRNAの場合はFavaloro等, Methods Enzymol., 65: 718(1980)、StallcupとWashingtonの、J. Biol. Chem., 258: 2802(1983)、Birnboimの、Nucleic Acids Res., 16: 1487(1988)、Gilsin等, Biochemistry, 13: 2633(1974)、Ullrich等, Science, 196: 1313(1977)、Strohman等, Cell, 10: 265(1977)、およびMacDonald等, Methods Enzymol., 152: 219(1987)に記載の方法のような当該技術分野で知られたあらゆる方法によって宿主細胞培養から単離することができる。

30

【0048】

所望のRNAが全細胞RNAのポリアデニル化mRNA分画である場合は、該ポリアデニル化mRNAは、Edmonds等, Proc. Natl. Acad. Sci., 68: 1336(1971)に記載の方法やA vivとLederの、Proc. Natl. Acad. Sci., 69: 1408(1972)に記載の方法のような当該技術分野で知られたあらゆる方法を用いてオリゴデオキシチミジレート(オリゴ(dT))-セルロースカラム・アフィニティークロマトグラフィーによって細胞RNAの大部分から分けることができる。

40

【0049】

所望のmRNAのサイズが知られている場合は、Lemischka等, J. Mol. Biol., 151: 101(1981)の記載に従って、メチル水酸化水銀の存在下でRNAをアガロースゲル電気泳動するか、またはSchweinfest等, Proc. Natl. Acad. Sci., 79: 4997(1982)の記載に従ってメチル水酸化水銀存在下でショ糖濃度勾配遠心することによって、該mRNA調製物をさらに精製し、特定サイズのmRNA分子を得ることができる。

【0050】

50

さらに、所望のRNAは、レトロウイルス、タバコモザイクウイルス、インフルエンザウイルス、ニューカッスル病ウイルスのような1本鎖RNAウイルス、およびロタウイルスやイネ萎病(rice dwarf)ウイルスのような2本鎖RNAウイルスを含むRNAウイルスの組換えまたは非組換えゲノムから得ることができる。所望のRNAは適切な宿主細胞培養中で選ばれたRNAウイルスを増殖させ、ウイルス粒子を回収し、次いで該ウイルス粒子から所望のRNAを抽出することによって単離することができる。例えば、Moloneyネズミ白血病ウイルスのゲノムRNAはSchwartzberg等, Cell, 37: 1043(1984)に記載の方法に従って得ることができる。

【0051】

d. DNA/RNAハイブリッドの調製

本発明の方法に用いるのに適したDNA/RNAハイブリッドは、当該技術分野で知られたあらゆる方法によって製造することができる。ある態様において、DNA鎖またはフラグメントは上記I(b)項の記載に従って製造され、RNA鎖またはRNAフラグメントは上記I(c)項の記載に従って製造され、DNAおよびRNA鎖またはフラグメントは一緒に混合され、アニールする。別の態様では、DNA/RNAハイブリッドは、上記の所望のDNA鎖を得、該DNA鎖を鋳型に用いてDNA指向性RNAポリメラーゼにより相補性RNA鎖を合成し、次いで転写反応が終了したらDNA/RNAハイブリッドを回収することによって製造することができる。あるいはまた、DNA/RNAハイブリッドは、上記の所望のRNA鎖を得、該RNA鎖を鋳型に用いてRNA指向性DNAポリメラーゼにより相補性RNA鎖を合成し、次いで逆転写反応が終了したらDNA/RNAハイブリッドを回収することによって製造することができる。

【0052】

e. リン酸カルシウムトランスフェクションの手法

本発明には、所望の核酸を真核生物宿主細胞に導入する方法も含まれ、そこでは、所望の核酸、Ca、および PO_4 を混合して沈殿混合物を形成し、当該混合物中のリン酸アニオンの初期濃度が約0.2~0.5mMであり、沈殿混合物を約10~60分の時間インキュベートしてリン酸カルシウムと所望の核酸とを含むトランスフェクタコンを形成し、沈殿混合物を同時に希釈して細胞壁を欠く真核生物宿主細胞と混合してトランスフェクション混合物を形成し、次いでトランスフェクション混合物をインキュベートして宿主細胞にトランスフェクタコンを取り込ませてトランスフェクトされた細胞を形成する。

【0053】

1. 沈殿混合物の形成

Ca、 PO_4 、及び所望の核酸を任意の順序で混合することにより、当該核酸がリン酸カルシウムと共沈殿している沈殿混合物を形成させることができる。一実施態様では、Caと PO_4 を混合する前または同時に核酸を沈殿混合物と混合することにより、当該沈殿混合物中に形成される核酸及びリン酸カルシウムを含むトランスフェクタコンの数を最大にする。核酸をCa及び PO_4 を欠くバッファー中に懸濁させ、次いでCa及び PO_4 を連続的または同時に当該核酸懸濁液と混合することができる。あるいは、核酸をCaまたは PO_4 を含むバッファー中に懸濁させ、次いで適切な対イオンと当該核酸懸濁液を混合して共沈殿を開始することができる。

【0054】

選択した範囲のリン酸濃度(PO_4 濃度)が極めて優れた特性を与えることが見いだされた。 PO_4 は、約0.2mMから約0.5mM、好ましくは約0.2~0.3mM。最も好ましくは約0.25mMの初期濃度で存在する。与えられた PO_4 濃度で、Ca濃度が高くなると、トランスフェクタコンがより大きな速度及び頻度で形成される。沈殿混合物のCa濃度、 PO_4 濃度、pH、及び温度は、混合物中の実際のCa濃度と PO_4 濃度より十分に低いリン酸カルシウム溶解度を与え、よってCa及び PO_4 イオンの過飽和をもたらし、リン酸カルシウムと核酸の共沈殿を誘導するように選ばれる。

【0055】

沈殿混合物において、Caは約125mM~約375mM、好ましくは約180mM~約

10

20

30

40

50

300 mM、より好ましくは約180 mM～約270 mM、最も好ましくは約230 mM～約270 mMの初期濃度で存在することができる。核酸濃度は沈殿混合物中のCa又は PO_4 濃度で変化し、約25～100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、好ましくは約30～100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、より好ましくは約40～60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、最も好ましくは約45～55 $\mu\text{g}/\text{mL}$ としてよい。

【0056】

大規模浮遊培養でのトランスフェクションにおける容量的制約のために、沈殿混合物を接種する前に該浮遊液中のCa濃度を上昇させることが好ましい。この環境下では、浮遊培養中のCa濃度の上昇を補償するために沈殿混合物のCa濃度を低下させるのが好都合である。

10

【0057】

沈殿混合物のpHは、約6.8～約7.6、好ましくは約7.05とすることができる。沈殿混合物の温度は、約0℃～約37℃、好ましくは約20℃～約37℃、より好ましくは約20℃～約25℃であり得る。しかしながら、本発明の方法において、前記の温度範囲以外の任意の温度を含む任意の沈殿混合物のインキュベーション温度を、所望のトランスフェクタコン形成速度を生じる他の反応パラメーターと組み合わせて本発明で使用するものが考えられる。

【0058】

沈殿混合物に望ましいpHを含むpH範囲で有効な任意のpHバッファーを用いて沈殿混合物の反応体を懸濁させることができる。ここで使用するのに適したバッファーには、25 mM HEPES及び140 mM NaClのような適切な濃度のN-3-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-3-エタンスルホン酸(HEPES)緩衝食塩液、及び25 mM BES及び140 mM NaClのようなN,N-bis(3-ヒドロキシエチル)-3-アミノエタンスルホン酸(BES)緩衝塩液が含まれる。

20

【0059】

一般的に、沈殿混合物は、ここで望まれる特性を最大にするように、約10～60分、好ましくは約15～30分間インキュベートする。沈殿混合物のために選択される特定のリン酸初期濃度と特定のインキュベーション時間は、相互に関連していることに注意すべきである。インキュベーション時間を長くすると、一般的に沈殿反応に最初に用いられるリン酸濃度は低くなる。

30

最終的に得られるトランスフェクタコンのサイズに関して、トランスフェクタコンは合理的なサイズまで成長でき、好ましくは、それらは約300 nm未満、最も好ましくは250 nm未満の平均長まで成長させる。

【0060】

2. トランスフェクション混合物の形成

リン酸カルシウムと所望の核酸を含むトランスフェクタコンを沈殿混合物中でいつような時間インキュベートした後、該沈殿混合物を希釈すると同時に細胞壁を欠く真核宿主細胞と混合し、トランスフェクション混合物を形成する。真核細胞は、上記I(a)項に記載の浮遊細胞培養または接着細胞培養の形で得られる。ここで提供されるように、沈殿混合物は、トランスフェクタコンを再溶解させることなく、沈殿混合物中のトランスフェクタコンの成長速度に比べてトランスフェクション混合物中のトランスフェクタコンの成長速度が実質的に遅くなるように宿主細胞培養と混合することによって希釈され、それによりトランスフェクタコンの宿主細胞への曝露を最大とする。

40

細胞のトランスフェクタコンへの曝露は、一般的に3時間から24時間、より好ましくは3時間から約12時間行われる。

【0061】

浮遊細胞培養を用いる好ましい態様では、沈殿および希釈工程は、核酸、Ca、及び PO_4 を培養容器に流通した取り込みパイプに供給する自動化システム中で達成される。核酸、Ca、及び PO_4 は、任意の好都合な順序で取り込みパイプに供給することができる。好ましくは、核酸は、リン酸カルシウム沈殿形成の開始点の上流で取り込みパイプに供給

50

される。あるいは、核酸、Ca、及び PO_4 はほぼ同じ地点で取り込みパイプに供給される。一実施態様では、核酸および1または2種類のイオンを含む溶液および対イオンを含む溶液を取り込みパイプに合流する別のチューブラインを通して供給される。取り込みパイプを通過する流速と取り込みパイプの長さは、取り込みパイプ内で核酸-リン酸カルシウム共沈殿を生じるのに望まれるインキュベーション時間を達成するように調節することができる。好ましくは、浮遊培養は、宿主細胞とリン酸カルシウムと核酸とのトランスフェクタコンの接触を最大にするように攪拌される。

【0062】

本発明の方法は、任意のサイズの浮遊培養中の細胞をトランスフェクトするのに使用することができる。好ましくは、本発明の方法は、総容量少なくとも約0.5リットル、より好ましくは総容量少なくとも約0.5-50リットルを含む浮遊培養をトランスフェクションするのに使用される。

10

浮遊培養中でトランスフェクションするための望ましい細胞密度は、例えば、所定量の種培養を特定の細胞密度まで増殖させることによって達成することができる。あるいは、種培養からの細胞を濾過および/または遠心によって回収し、所望の密度に再懸濁する。別の実施態様において、所望の細胞密度は種培養を希釈することによって達成される。

【0063】

浮遊培養中でトランスフェクションするための細胞密度は、約0.2%~約5%パック細胞容量(PCV)であり得る。しかしながら、本発明は浮遊培養中でのトランスフェクションの許容されるレベルをもたらし、それより高いまたは低い密度を使用することも含まれる。例えば、本発明は、バイオリアクターから細胞を濃縮し、高密度細胞スラリーを得、次いで沈殿混合物をこの細胞スラリーと混合することによって実施することができる。ある態様において、約 10^8 個/mL以上の細胞密度が用いられる。別の態様では約 10^8 個/mL~約 10^9 個/mLの細胞密度が用いられる。濃縮スラリーは、細胞浮遊液をバイオリアクターからHereaus Sepatech Contifuge (登録商標) 17RS (1994 Hereaus Instruments Catalog No. 75003571, Hereaus Instruments GmbH, D63405, Hanau, Germany) のような半連続無菌遠心器にポンプで供給し、該細胞浮遊液を約 $500 \times g$ ~約 $6000 \times g$ 、好ましくは約 $5300 \times g$ で遠心し、無菌ローターボールに細胞を捕らえることにより得られる。バイオリアクター中の細胞培養の細胞密度に依存して、約100リットルまでの浮遊培養を遠心ローターボール中に回収することができる。次に、高密度細胞スラリーを該ボールから取り出し、DNA-リン酸カルシウム共沈殿物と混合してトランスフェクション混合物を形成する。ある態様では、高密度細胞スラリーを、取り込みパイプ中でDNA-リン酸カルシウム共沈殿物と混合することにより、バイオリアクターに入る前にトランスフェクション混合物インラインが形成される。あるいは、DNA-リン酸カルシウム共沈殿および高密度細胞スラリーを、それぞれ供給および接種ポートから別々にバイオリアクター中に導入することができる。本発明では、トランスフェクション混合物を形成する前に、高密度細胞スラリー中の細胞濃度を、例えば新鮮増殖培地を加えて補正し、トランスフェクションのための最適濃度とする態様も提供される。特定の宿主細胞をトランスフェクションするのに有用な細胞濃度は日常的試験により容易に決定することができることは理解されよう。

20

30

40

【0064】

浮遊細胞培養を用いる別の態様では、前のI(e)(1)項の記載に従って沈殿混合物を接種する前に、浮遊培養のCa濃度を上昇させる。好ましい態様では、沈殿混合物を接種する前に浮遊培養中のCa濃度を約7.5mMに上昇させる。

【0065】

トランスフェクタコン成長速度を、トランスフェクション混合物中に血清またはウシ血清アルブミンのような血清タンパク質を添加することによって実質的に低下させるのが望ましい。タンパク質は、核酸と同様に、リン酸カルシウムトランスフェクタコン表面と強く結合することによりトランスフェクタコンの成長を妨げる。一実施態様では、トランスフェクション混合物はウシ胎児血清のような血清を約2%~約10%含む。別の実施態様で

50

は、トランスフェクション混合物はウシ血清アルブミンのような血清アルブミンを1リットル当たり約0.2グラム (g/L) ~ 約4 g/L 含む。

【0066】

トランスフェクション混合物のpHと温度は宿主細胞が耐える生理的レベルに維持される。哺乳動物宿主細胞の場合は、pHを約6.0~約8.0、好ましくは約7.2~約7.5の範囲に、温度を約15℃~約39℃、好ましくは約32℃~約37℃の範囲に維持することが好ましい。同様に、トランスフェクション混合物は特定の宿主細胞に最も適するように容易に調節された時間インキュベーションされる。

【0067】

浮遊細胞培養中でトランスフェクションする場合は、リン酸カルシウムと所望の核酸を含むトランスフェクタコンを再溶解させないようにトランスフェクタコンの溶解性を可能な限り低くするように、pH、Ca濃度、PO₄濃度、及び温度を正確に調節することができる。

10

【0068】

リン酸カルシウム沈殿物は宿主細胞によっては毒性となる場合がある。したがって、所望のトランスフェクションの所望のインキュベーション期間後に該沈殿物を溶解させることが好都合であり得る。トランスフェクション混合物中のリン酸カルシウムトランスフェクタコンは、例えばトランスフェクション混合物中のpHを低下させ、及び/又はCa濃度を低下させることにより溶解させることができる。Ca濃度は、新鮮培養培地をトランスフェクション混合物に加えることによって好都合に低下させることができる。ある浮遊培養の実施態様では、トランスフェクション混合物は約3時間~約24時間、好ましくは約3時間~約12時間インキュベートされ、次いで約1容量~約500容量の細胞培養培地で希釈され、約1日間~約14日間インキュベートされる。

20

【0069】

或る宿主細胞では、細胞のトランスフェクションへの曝露の終了時にトランスフェクタコンを含む細胞にグリセロール又はジメチルスルホキシド (DMSO) で衝撃を与えることによりトランスフェクション率の向上が得られる。典型的には、トランスフェクション混合物を約10~20%容量/容量の濃度のグリセロールに特定の宿主細胞に応じて約30秒間から約3分間曝露し、次いでグリセロールを除去して新鮮培地中で約1~6日間インキュベートする。あるいは、トランスフェクションに続いて、宿主細胞をグリセロール衝撃を与えることなく新鮮培地中で所望の時間培養することができる。

30

【0070】

I I. トランスフェクタコンの希釈に続く宿主細胞への曝露
また本発明には、所望の核酸を真核宿主細胞に導入する方法が包含され、そこでは、所望の核酸、Ca、及びPO₄を混合して共沈殿混合物を形成し、沈殿混合物をインキュベートしてリン酸カルシウム及び所望の核酸を含むトランスフェクタコンを形成し、沈殿混合物を希釈して、希釈沈殿混合物を形成し、希釈沈殿混合物を細胞壁を欠く真核宿主細胞と混合してトランスフェクション混合物を形成し、ここで、トランスフェクタコンは、当該トランスフェクタコンが沈殿混合物中で成長する速度より実質的に遅い速度で成長でき、次いでトランスフェクション混合物をインキュベートして真核宿主細胞にトランスフェクタコンを取り込ませてトランスフェクトされた細胞を形成する。

40

【0071】

a. 沈殿混合物の形成
沈殿混合物は上記I(e)(1)項の記載に従って得てインキュベーションされる。所望のリン酸カルシウムトランスフェクタコンが形成された後、沈殿混合物を、任意の好都合な手段、例えば、トランスフェクションに用いられる適切なバッファーを加えるか又は細胞培養培地を加えることによって希釈することができる。本発明に使用するのに適したバッファーおよび培地は、上記I(a)及びI(e)(1)項に記載されている。希釈剤は、トランスフェクタコンの成長速度を低下させるのに十分な量が添加されるが、得られる希釈沈殿混合物中でそのようなトランスフェクタコンを再溶解させない。

50

それを宿主細胞と混合してトランスフェクション混合物が形成されるまで、希釈沈殿混合物はリン酸カルシウムトランスフェクタコンが遅いが連続して成長する条件下に維持される。遅いトランスフェクタコン成長速度を得るのに適した条件は、上記 I (e) (2) 項のトランスフェクション混合物に関する説明中に示した。

【0072】

b. トランスフェクション混合物の形成

ここに提供されるように、希釈沈殿混合物を細胞壁を欠く真核宿主細胞と混合し、トランスフェクション混合物を形成させるが、ここで、CaPiトランスフェクタコンは沈殿混合物中の該トランスフェクタコン成長速度より実質的に遅い速度で成長する。真核細胞は上記 I (a) 項に記載の接着細胞培養または浮遊細胞培養の形で得られ、該細胞培養を希釈沈殿混合物と混合して上記 I (e) (2) に記載のトランスフェクション混合物を形成させる。

10

【0073】

希釈沈殿混合物中のトランスフェクタコンの希釈およびトランスフェクション混合物中のトランスフェクタコンの希釈は、全体の希釈がトランスフェクタコンを溶解させることなくトランスフェクタコンの成長速度を実質的に低下させるように選択される。好ましい実施態様では、全体の希釈は、沈殿混合物中の初期 Ca 濃度より少なくとも 10 倍低いトランスフェクション混合物中の初期 Ca 濃度を与える。

【0074】

あるいは、希釈沈殿混合物の形成において行う全体の希釈のパーセンテージおよびトランスフェクション混合物の形成において行う全体の希釈のパーセンテージは、これら 2 工程間の時間の長さに応じて変化させることができる。短い時間間隔では希釈沈殿混合物においてより小さな希釈を使用できるであろうが、より長い時間間隔ではトランスフェクション活性の過度の損失を防ぐために希釈沈殿混合物においてより大きな希釈を使用する必要がある。

20

【0075】

好ましくは、希釈沈殿混合物は、宿主細胞のリン酸カルシウムトランスフェクタコンへの曝露を最大にするために宿主細胞と速やかに混合される。しかしながら、本発明には、トランスフェクション混合物が形成される時点で希釈沈殿混合物が宿主細胞に対するいくらかのトランスフェクト能を維持しているという条件で、希釈沈殿混合物が宿主細胞と混合される前に任意の時間維持されるという実施態様も含まれる。

30

【0076】

浮遊細胞培養を用いる好ましい実施態様では、沈殿および希釈工程は、核酸、Ca、及び PO_4 を取り込みパイプに供給して核酸-リン酸カルシウム共沈殿を生じさせ、核酸、Ca 及び PO_4 の取り込みの下流の或る地点で別の取り込みパイプを介して沈殿混合物に希釈剤を供給し、その後、希釈沈殿混合物を培養容器に注入する自動化システムによって達成される。核酸、Ca 及び PO_4 は上記 I (e) (2) 項に記載の任意の好都合な順序で取り込みパイプに供給することができる。沈殿混合物を含む取り込みパイプの流速と希釈剤取り込みパイプ及び培養容器の取り込みの下流の位置を調節し、該沈殿混合物の所望のインキュベーション時間と培養容器中での沈殿混合物の希釈と宿主細胞との混合との間の所望の遅れを達成することができる。好ましくは、該浮遊培養を攪拌し、宿主細胞とリン酸カルシウム及び核酸のトランスフェクタコンとの接触を最大にする。

40

それが形成された後、トランスフェクション混合物を上記 I (e) (2) 項に記載の条件下でインキュベーションすることができる。

【0077】

III. 宿主細胞培養におけるトランスフェクタコンの形成

本発明には、所望の核酸を真核宿主細胞に導入するための任意の方法が含まれ、そこでは、Ca、 PO_4 、核酸及び細胞壁を欠く真核宿主細胞を混合してCaPiトランスフェクタコン懸濁液を形成させ、沈殿混合物をインキュベーションしてリン酸カルシウムと所望の核酸を含むトランスフェクタコンを形成させ、沈殿混合物を希釈してトランスフェクシ

50

ョン混合物を形成させ、ここで、トランスフェクタコンは沈殿混合物中で該トランスフェクタコンが成長したより実質的に遅い速度で成長することができ、次いでトランスフェクション混合物をインキュベーションして宿主細胞に該粒子を取り込ませてトランスフェクトされた細胞を形成する。

【0078】

a. CaPiトランスフェクタコンの形成

適切な宿主細胞培養は上記I(a)項に記載のごとく得ることができる。成長培地を細胞から除去し、この細胞を、上記I(e)(1)項に記載の適切な濃度の核酸、Ca及びPO₄に曝露してCaPiトランスフェクタコンを形成させる。本発明の実施において、核酸、Ca及びPO₄を混合する順序は重要でないことは理解されよう。細胞は、核酸、Ca及びPO₄成分またはそれらの組み合わせのいずれかを含む混合物と接触させるか又は懸濁させることができ、次いで沈殿混合物の完成に必要なが含まれていない成分が添加される。あるいは、細胞は核酸、Ca及びPO₄の全ての成分と同時に混合することができる。

10

【0079】

好ましい態様では、沈殿混合物は、宿主細胞を、所望の濃度の核酸、Ca及びPO₄を含む適切な無血清成長培地と接触させることによって形成される。タンパク質はリン酸カルシウムトランスフェクタコンの成長を実質的に低下させるので、血清または他のタンパク質を含む培地を該沈殿混合物に使用するの望ましくない。

沈殿混合物の反応条件とインキュベーション時間は、上記I(e)(1)項に記載のリン酸カルシウムと核酸を含むトランスフェクタコンを形成するように選択される。

20

【0080】

b. トランスフェクション混合物の形成

リン酸カルシウムトランスフェクタコンが形成される適切な時間の後、沈殿混合物を希釈してトランスフェクション混合物を形成させ、ここで、トランスフェクタコンは沈殿混合物中のトランスフェクタコン成長速度より実質的に遅い速度で成長する。一実施態様において、沈殿混合物は、宿主細胞に適した血清添加成長培地を加えることによって希釈される。得られたトランスフェクション混合物を、宿主細胞がリン酸カルシウムトランスフェクタコンを取り込む条件下でインキュベーションしてトランスフェクトされた細胞を形成させる。そのような手法は上記I(e)(2)項に記載されている。

本発明のさらなる詳細は、本発明の範囲をさらに定義する以下の実施例に見いだすことができる。本明細書に記載のすべての引用例及びその中のすべての参考文献は、それらの全体をここに取り込むものとする。

30

【0081】

実施例1

材料と方法

プラスミドの単離。 血管内皮成長因子(VEGF)、DNase、E-25(抗-IgEモノクローナル抗体)、又は抗-HER-2(α-HER-2モノクローナル抗体)は、各々、Leung等, Science, 246: 1306-1309 (1989); Shak等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 9188-9192 (1990); Presta等, J. Immunol., 151: 2623-2632 (1993); Shalaby等, J. Ex. Med., 175: 271-225 (1992)に記載されている。形質転換受容性のDH5α細胞(Gibco-BRL)をこれらのアンピシリン耐性(Amp^R)プラスミドの増幅についての製造者のプロトコールに従ってトランスフェクトした。コロニーの終夜培地をLB/カルベニシリン(50μg/mL)培地中で増殖させた。これらの培地からプラスミドDNAを、Birnboim及びDoly, Nucleic Acids Res., 7(6): 1513-23 (1979)のものに基づく改変アルカリ溶解プロトコール、又はQiagenプラスミドDNA精製キット(Qiagen Inc.)のいずれかを用いて回収した。

40

【0082】

細胞培養。 DP12、)ジヒドロ葉酸レダクターゼポジティブ(DHFR+)のチャイニーズハムスター卵巣細胞系を、全てのトランスフェクション実験のレシピエント細胞として使用した。細胞は、500-mLスピナー又はソレラのいずれかに維持し、その中で細胞は

50

増殖の対数期にある。接着培養には1-2%のダイアフィルトレーションしたFCS (Gibco-BRL) を添加したDMEM/F12ベースの培地を使用し、浮遊細胞培養には添加無しのDMEM/F12を使用した。

【0083】

トランスフェクション。全てのトランスフェクションは、以下のプロトコールに従って実施した。トランスフェクションの24時間前に、100-mmペトリ皿に、トランスフェクション当日に70%コンフルエントとなるよう播種した($1.0-1.4 \times 10^6$ 細胞)。トランスフェクションの1時間前に、新鮮培地をプレートに添加し、プレートをCO₂ インキュベーターに戻した。全ての共沈殿反応は別々に20-25°Cで実施した。各共沈殿反応は、50mMTri s -Cl (pH7.5) に溶解させた25-100 μgのプラスミドDNAに2.5又は5.0mMいずれかのCaCl₂ を添加することで開始させた。これらの反応の最終的なカルシウム濃度は、12.5mM~250mMの範囲であった。反応物の最終容量は、0.1XTE (1mMTri s -Cl、0.1mMEDTA) を添加して0.5mLに調節した。これらの溶液を、0.5~2.0mMの種々のNa₂HPO₄ を有する等量の2XHe p e s緩衝塩水(280mMのNaCl、50mMのHe p e s、pH7.05) に添加した。共沈殿反応におけるpHの一過性発現されたタンパク質の結果的な力価に対する影響が試験されたトランスフェクションについては、2XHe p e sバッファー(0.5mMのNa₂HPO₄) のpHは、0.1pH単位で6.75と7.35の範囲とした。共沈殿反応は特定の時間続けさせ、その後反応物を新鮮培地で1:5に希釈し、次いで5mLの培地を含むプレートに直接添加し、それにより沈殿反応物の10X希釈物を生成させた。プレートをCO₂ インキュベーターに3時間戻し、その後吸引により培地を除去し、予温した20%グリセロール/DMEM F12培地(37°C) を各プレートに1分間添加した。グリセロール曝露の後、グリセロールをプレートから除去し、新鮮培地を各プレートに添加し、次いでインキュベーターに戻した。トランスフェクションの36、60、84、108及び132時間後に細胞培養液試料を回収し、即座に-20°Cで凍結させて保存した。

【0084】

実験設計及び統計的分析。リン酸カルシウムトランスフェクタコンの形成において試験した変数は、カルシウム、リン酸、及びDNAの濃度並びに共沈殿反応のpH及び反応の長さである。カルシウムカチオン[Ca]、リン酸アニオン[Pi]、及びDNA[DNA]の濃度、及び沈殿時間は、これら4つの変数の全ての組み合わせが低、中、及び高レベルで試験され、それにより全部で3⁴、即ち81通りの条件の組が生み出される3-レベル要因設計の作成に使用された。得られたデータは、JMP統計分析ソフトウェア(SAS Institute, Inc., Cary, NC) を用いて分析した。リン酸濃度及び共沈殿時間を一過性発現されたタンパク質力価に影響を与える主変数として特定した後、DNA及びカルシウム濃度を特定値に固定し、好ましいリン酸濃度及び共沈殿の長さを中心複合設計(central composite design)を用いて決定した。この設計では、3つの変数が5つの異なるレベルで試験され、それは0.50mMのリン酸、20分の共沈殿時間、及び3時間の細胞のトランスフェクタコンへの曝露という中心値の近傍で変化する。このラウンドの分析で集めたデータを表面反応(surface response)ダイアグラムの作成に使用した。最後に、ここで選択される条件を用いて得た一過性発現タンパク質力価に対する共沈殿反応物のpH変化の影響は、pH範囲6.75-7.35で実験した。

【0085】

タンパク質アッセイ。収穫した細胞培養液(HCCF)の力価を、VEGF、DNase、E-25、又は抗-HER-2の存在について、Prince等, Clin. Exp. Immunol., 113: 289-296 (1998); Shifren等, J. Clin. Endo. Metab., 81: 3112-3118 (1996); Fox等, J. Pharm. Exp. Thera., 279: 1000-1008 (1996)に記載された各ELISAアッセイを用いて検定した。試料はアッセイ希釈剤(PBS/0.5%BSA/0.05%P20/0.01%チメリソール; PBS/0.5%BSA/0.05%P20; 又はPBS/0.5%BSA/0.01%P80/0.01%チメリソール)中に直接希釈した。最初の抗-HER-2分析では、トランスフェクションの各組について実施した対照トランスフェクションに対して力価を規格化した。これらの対照は、1分間の沈殿時間での標準CaPiプロトコールを用いて実施した。

【0086】

結果

要因実験設計の変数。形質移入剤としてリン酸カルシウムを使用する高度に改良された一過性トランスフェクションのための実験設計の開発において、次の変数：共沈殿反応の長さ、及びカルシウム、リン酸、及びDNAの濃度を、得られた発現タンパク質産物の力価に与えるそれらの影響について評価した。これらの変数は、3つのレベル（表1）で試験し、それは重要な変数の最初のスクリーニングのために合計81の条件組み合わせの組を生じた（表2A-C）。変数の異なる組み合わせから得た力価を評価するのに200 µg/mLという発現の閾値レベルを用いた場合、共沈殿条件の2つの組（実施番号31及び34、表2B）を除いて、発現の閾値レベルに合致する全ての条件の組が、0.75mMnリン酸濃度という標準的濃度に対してリン酸濃度が低下した（0.5mM）ことが観察された（図1）。

10

【0087】

表2A-2Cに含まれる全ての共沈殿反応は、1.0mlスケールで実施した。特定の沈殿時間の後、反応物を培地で5Xに希釈し、次いで即座に接着性CHO細胞を被覆する5mlの培地をさらに含む100-mmプレートに添加した。トランスフェクションは、共沈殿反応におけるリン酸濃度に従ってグループ分けした。対照トランスフェクションは次の条件を具備する：125mMのカルシウム、0.75mMのリン酸、25 µg/mLのプラスミドDNA、及び1分間の沈殿時間。これらの対照を各トランスフェクション条件の組について3回実施し、異なる日数で抗-HER2の発現の規格化に使用した。

【0088】

20

表1

Ca²⁺/DNAを形質移入剤として用いたCHO細胞の一過性トランスフェクション
についての要因実験設計^a

変数*			
	低	中	高
インキュベーション時間	1 分間	5 分間	20 分間
DNA 濃度 (µg/ml)	25	50	100
[Ca ²⁺] (mM)	125	188	250
[Pi] (mM)	0.5	0.75	1.0

30

^a 3つの異なるレベルでの4つの変数を含む要因についての実験の組み合わせ合計数は3

⁴ 即ち81の別々の共沈殿反応である。

【0089】

表 2A
共沈殿反応において0.50mMのリン酸を用いて実施された
規格化された抗-HER-2 発現^a

実施番号	[Ca ⁺⁺] (mM)	[Pi] (mM)	[DNA] (μ g/ml)	時 間 (分)	規格化された 抗-HER-2 (μ g/L)
(1)	125	0.5	25	1	133.2
(2)	125	0.5	25	5	196.6
(3)	125	0.5	25	20	251.9
(4)	125	0.5	50	1	229.1
(5)	125	0.5	50	5	241.2
(6)	125	0.5	50	20	198.1
(7)	125	0.5	100	1	298.7
(8)	125	0.5	100	5	152.8
(9)	125	0.5	100	20	247.9
(10)	188	0.5	25	1	209.3
(11)	188	0.5	25	5	188.9
(12)	188	0.5	25	20	108.8
(13)	188	0.5	50	1	293.6
(14)	188	0.5	50	5	318.0
(15)	188	0.5	50	20	227.7
(16)	188	0.5	100	1	167.1
(17)	188	0.5	100	5	160.2
(18)	188	0.5	100	20	166.4
(19)	250	0.5	25	1	108.3
(20)	250	0.5	25	5	140.0
(21)	250	0.5	25	20	306.5
(22)	250	0.5	50	1	297.9
(23)	250	0.5	50	5	495.7
(24)	250	0.5	50	20	139.7
(25)	250	0.5	100	1	244.6
(26)	250	0.5	100	5	293.4
(27)	250	0.5	100	20	592.4

^a 0.5mMのリン酸を含む共沈殿反応及びトランスフェクションについての規格化因子を1.0として計算した。0.5mMの P i を含む共沈殿反応 1 - 27 についての発現結果は、各々図 1 の反応 1 - 27 (斜線棒) と相互参照できる。

【0090】

表 2B

共沈殿反応において0.75mMのリン酸を用いて実施されたトランスフェクションについての
規格化された抗-HER-2発現^a

実施番号	[Ca++] (mM)	[Pi] (mM)	[DNA] (μ g/ml)	時 間 (分)	規格化された 抗-HER-2 (μ g/L)
(28)	125	0.75	25	1	159.15
(29)	125	0.75	25	5	44.93
(30)	125	0.75	25	20	00.00
(31)	125	0.75	50	1	289.49
(32)	125	0.75	50	5	146.11
(33)	125	0.75	50	20	50.07
(34)	125	0.75	100	1	953.54
(35)	125	0.75	100	5	00.00
(36)	125	0.75	100	20	114.90
(37)	188	0.75	25	1	63.11
(38)	188	0.75	25	5	82.32
(39)	188	0.75	25	20	27.44
(40)	188	0.75	50	1	116.62
(41)	188	0.75	50	5	91.92
(42)	188	0.75	50	20	30.52
(43)	188	0.75	100	1	95.01
(44)	188	0.75	100	5	101.52
(45)	188	0.75	100	20	69.97
(46)	250	0.75	25	1	53.16
(47)	250	0.75	25	5	43.90
(48)	250	0.75	25	20	00.00
(49)	250	0.75	50	1	139.94
(50)	250	0.75	50	5	71.00
(51)	250	0.75	50	20	31.21
(52)	250	0.75	100	1	104.95
(53)	250	0.75	100	5	92.61
(54)	250	0.75	100	20	63.45

^a 0.75mMのリン酸を含む共沈殿反応及びトランスフェクションについての規格化因子を3.4として計算した。上記の共沈殿反応28-54についての発現結果は、各々図1の反応1-27（黒棒）と相互参照できる。

【0091】

表 2C
共沈殿反応において1.0mMのリン酸を用いて実施されたトランスフェクションについての規格化された抗-HER-2 発現^a

実施番号	[Ca++] (mM)	[Pi] (mM)	[DNA] (μ g/ml)	時 間 (分)	規格化された 抗-HER-2 (μ g/L)
(55)	125	1.0	25	1	77.49
(56)	125	1.0	25	5	45.41
(57)	125	1.0	25	20	31.9
(58)	125	1.0	50	1	134.1
(59)	125	1.0	50	5	59.26
(60)	125	1.0	50	20	39.90
(61)	125	1.0	100	1	82.50
(62)	125	1.0	100	5	94.18
(63)	125	1.0	100	20	45.89
(64)	188	1.0	25	1	65.70
(65)	188	1.0	25	5	51.00
(66)	188	1.0	25	20	40.08
(67)	188	1.0	50	1	98.12
(68)	188	1.0	50	5	74.51
(69)	188	1.0	50	20	43.43
(70)	188	1.0	100	1	82.31
(71)	188	1.0	100	5	55.16
(72)	188	1.0	100	20	41.68
(73)	250	1.0	25	1	85.33
(74)	250	1.0	25	5	63.48
(75)	250	1.0	25	20	55.69
(76)	250	1.0	50	1	39.33
(77)	250	1.0	50	5	29.31
(78)	250	1.0	50	20	28.51
(79)	250	1.0	100	1	49.67
(80)	250	1.0	100	5	83.57
(81)	250	1.0	100	20	30.64

^a 1.0mMのリン酸を含む共沈殿反応及びトランスフェクションについての規格化因子を0.5として計算した。上記の共沈殿反応55-81についての発現結果は、各々図1の反応1-27（傍点棒）と相互参照できる。

【0092】

全ての要因の統計的分析を行い、各変数の実験設計において得られた力価に対する効果についてのP-値を計算した。小さなP-値、一般的には0.05未満は、要因分析の結果が変数の意義から生じ、データ収集中に得られた値の無作為な変化からではないことを示し得る。結果（表3A）は、共沈殿反応において試験した変数の中で一過性発現されたタンパク質力価に影響するリン酸濃度（P-値、 <0.001 ）及び共沈殿反応の長さ（P-値、 <0.004 ）は主変数であるが、反応のDNA濃度はトランスフェクションの結果における重要な決定要因ではない（P-値、0.047）ことを示している。より重要なのは、統計的分析も、CaPi/DNA共沈殿反応におけるリン酸濃度と共沈殿の長さとの間に相互作用が存在し（P-値、0.024）、最高レベルの発現を達成するためにはリン酸濃度における任意の変化は共沈殿反応の長さの変化を必要とすることが明らかになったことである。この新たな発見は、ここでの性質の実験において要因分析を使用することの力を明確に示している。この実験で試験した変数についてのレベルの詳細な分析は表3Cに含まれ、抗-HER-2の力価に対するリン酸の影響並びにより高い力価を得ることの時間依存性を示している。これらの平均力価を計算するのに使用したデータは、実験した各時点についての低、中、及び高レベルでの反応を含んでいた。このデータをリン酸及び時間のグループに更に細分すると、共沈殿反応におけるリン酸濃度とHER-2発現の力価との間の時間依存的関係は0.5mMを越えるリン酸濃度での共沈殿反応についてのみ観察されることに注意すべきである（表3D）。

【0093】

共沈殿条件の或る組で得られた大きな値（表2B、反応34）が統計的分析をゆがめる可能性を排除するため、分析は、当該データ点有り（表3A）及び無し（表3B）の両方で行い、要因分析の結果を変化させないことが見いだされた。

【0094】

表 3

抗-HER-2一過性トランスフェクションについての

表 3A

要因実験設計の分析^a

953.54という規格化抗-HER-2値を除外したlog変換されたデータのANOVA分析

出所	DF	部分的 SS	F 値	P-値
CA	2	0.39130663	0.28	0.7553
**Pi	2	36.62125549	26.42	0.0001
**DNA	2	4.29519617	3.10	0.0544
**時間	2	7.42162944	5.35	0.0080
CA*Pi	4	1.95379599	0.70	0.5927
CA*DNA	4	2.00271464	0.72	0.5810
CA*時間	4	1.99727483	0.72	0.5823
Pi*DNA	4	3.99468760	1.44	0.2354
**Pi*時間	4	6.47755342	2.34	0.0690
DNA*時間	4	4.73782161	1.71	0.1639

表 3B

953.54という規格化抗-HER-2値を含めたlog変換されたデータのANOVA分析

出所	DF	部分的 SS	F 値	P-値
CA	2	0.26645383	0.18	0.8367
**Pi	2	34.68900632	23.29	0.0001
**DNA	2	4.84507914	3.25	0.0473
**時間	2	9.42692073	6.33	0.0036
CA*Pi	4	1.43529663	0.48	0.7489
CA*DNA	4	1.39771761	0.47	0.7580
CA*時間	4	3.59275307	1.21	0.3204
Pi*DNA	4	4.46915969	1.50	0.2169
**Pi*時間	4	9.25132564	3.11	0.0237
DNA*時間	4	4.47420783	1.50	0.2164

a要因実験設計についての規格化された抗-HER-2力価のlog変換を、群変動のANOVA分析を用いて分析した。重要性について試験した変数は、カルシウム濃度（CA）、リン酸濃度（Pi）、DNA濃度（DNA）、及び共沈殿の長さ（時間）である。これらの変数は2通りの相互作用でも試験した。表3A：反応34（表2B）についての値を除外して実施したlog変換された抗-HER-2力価のANOVA分析。Pi及び時間は、一過性発現されたタンパク質力価の決定に最も影響のある因子であるが、重大なPi*時間相互作用によって示されるように一方の因子の効果は他方の範囲と相対して変化する（2つの星印領域）。DNAも影響を与えうるが、その程度は小さい。表3B反応34（表2B）についての値を含めてlog変換した規格化抗-HER-2力価に対して行ったANOVA分析は、このデータ点が実験設計の結果に有意な影響を与えないことを確認した。DF、自由度；部分的SS、自乗の部分。

【0095】

表 3C

Log変換した規格化HER-2発現に対する主な効果

因子／レベル	平均	元の尺度**	因子／レベル	平均	元の尺度**
Ca (mM)			DNA (μg/mL)		
125	4.46	86.90	25	4.12	61.55
188	4.53	93.17	50	4.66	106.05
250	4.39	80.95	100	4.61	100.40
(P-値 = 0.837)*			(P-値 = 0.047)*		
Pi (mM)			時間 (分)		
0.5	5.38	218.97	1	4.88	131.80
0.75	3.97	52.83	5	4.47	87.01
1	4.04	56.65	20	4.05	57.15
(P-値 < 0.001)*			(P-値 < 0.004)*		

*各因子の平均log変換規格化一過性抗-HER-2発現に与える影響の試験。

**累乗により元の尺度に再変換した平均。

10

20

30

40

50

【0096】

因子／レベル組み合わせ			平均	元の尺度**
Pi	時間			
0.5	1		5.34	209.38
0.5	5		5.42	225.07
0.5	20		5.41	222.80
0.75	1		4.97	143.62
0.75	5		3.89	48.98
0.75	20		3.04	20.96
1	1		4.33	76.14
1	5		4.09	59.75
1	20		3.69	39.97
(P-値 = 0.024)*				

10

*平均 log 変換規格化一過性抗-HER-2 発現に与える影響における時間の Pi 濃度依存性の試験。

**累乗により元の尺度に再変換した平均。

【0097】

トランスフェクションの強さは低いリン酸濃度で向上する。上記のように、標準又は標準近傍の共沈殿条件は、同じ試薬で異なる日に実施したトランスフェクションについて高度に変化する力価を生ずると多くの報告が文献に存在する (Sambrook等, 上掲)。
> 200 µg/L の一過性力価を生ずる共沈殿の組み合わせの組が、トランスフェクション
条件の頑強さの程度を決定することを意図して再実行された。強さは、第2のトランスフェクションの一過性力価として測定され、実験設計のスクリーニング形式で達成された最初の力価のパーセントとして表現した。

20

【0098】

表4に示すように、2つの星印を付した領域は、共沈殿の組み合わせの部分集合が2つの独立したトランスフェクションのあいだで匹敵する力価を生ずることを示した。特に興味深いのは、各々125mM及び0.75mMの標準レベルに対して、高い力価(約300-550 µg/L)、強さ(104-134%)、増加したカルシウムレベル(250mM)及び低下したリン酸濃度(0.5mM)の集団化(表4、実施番号22、23、26)である。共沈殿の組み合わせの他の組(表4、実施番号3、7、13、14、31、58、67)も強いが、これらの組み合わせの組は最高の力価を達成しないか、又はスケーリングに実用的ではないことに注意することが重要である。

30

【0099】

表 4
カルシウム-リン酸/DNA共沈殿条件の
選択された組み合わせについての抗-HER-2発現

実施番号	[Ca++] (mM)	[Pi] (mM)	[DNA] (µg/mL)	時 間 (分)	1回目の発現 データ(µg/L)	2回目の発現 データ (µg/L)	最初の 発現組 の%
(28)	125	0.75	25	1	46.4	112.7	242
** (31)	125	0.75	50	1	84.4	111.5	132
(34)	125	0.75	100	1	279.8	39.6	14
** (3)	125	0.50	25	20	252	211.3	83.7
** (7)	125	0.50	100	1	299	345.7	115
(9)	125	0.50	100	20	248	122.4	49
** (13)	188	0.50	50	1	294	264.3	89.7
** (14)	188	0.50	50	5	318	287.8	90.5
(21)	250	0.50	25	20	306	155.3	50.6
** (22)	250	0.50	50	1	298	401.5	134
** (23)	250	0.50	50	5	496	549.6	110
** (26)	250	0.50	100	5	293	307.4	104
(27)	250	0.50	100	20	592	365.9	61.8
** (58)	125	1.0	50	1	251	214.7	85
** (67)	188	1.0	50	1	184	197.6	107

40

^a 強さを試験するために、抗-HER-2発現において観察結果を日毎の変化について規格化

50

しなかった。実施番号の下に括弧内の数字は、表 2 A - C に含まれる反応番号を意味する。2つの星印を付した領域は、2つの観察の間で少なくとも84-134%の強さをもたらした条件の組を表す。

【0100】

共沈殿反応における低いリン酸と長い沈殿時間の組み合わせは、より高い一過性タンパク質力価を生ずる。共沈殿反応における低いリン酸濃度が一過性発現されたタンパク質について高い力価を導くという観察は、この変数のさらなる分析を促した。リン酸濃度と沈殿時間の長さとの相互作用が、それらのタンパク質力価に対する効果を定量化することにより分析された。これらの変数は、曝露時間（細胞がトランスフェクタコンに曝露される時間の長さ）とともに、中心複合設計において実験され、そこでは、変数5つの異なるレベルに固定され、それはリン酸、共沈殿の長さ、細胞のトランスフェクタコンへの曝露の長さについての中心値の周辺で変化させた（表 5 A）。

10

【0101】

一過性発現されたタンパク質力価に影響する主要な因子のスクリーニング形式で観察されたように、リン酸濃度が標準値0.75mMから0.25mMに低下することにより、抗-HER-2の発現が増加することが観察された（表 5 B）。共沈殿反応におけるリン酸濃度のみ相違する2つの反応が表 5 B（反応 9 及び 10）に示される。この実験において、リン酸濃度の相違（0.25mMリン酸対0.75mMリン酸）が、抗-HER-2の一過性発現について10倍の違いをもたらすことが観察された。反応 9 におけるリン酸濃度の極めて低い (VL) 値に加えて、表 5 B における0.40mMという低いリン酸 (L)、反応 2 も、0.75mMという標準リン酸濃度に比較して高い力価をもたらした。

20

【0102】

表 5
形質移入剤としてのリン酸カルシウムでの
抗-HER-2 発現の中心複合設計^a

表 5 A
中心複合設計の変数

	<u>VL</u>	<u>L</u>	<u>M</u>	<u>H</u>	<u>VH</u>
[Pi] (mM)	0.25	0.40	0.50	0.60	0.75
沈 殿 (分)	5	10	20	30	40
曝露時間 (時間)	0*	1	3	5	6

30

表 5 B

実施番号	[Ca ⁺⁺] (mM)	[DNA] (μg/mL)	[Pi] (mM)	曝露時間 (時間)	沈殿時間 (分)	抗-HER-2 (μg/L) (4.5 日)
(1)	250	50	0.40	1	10	370.1
(2)	250	50	0.40	1	30	549.8
(3)	250	50	0.40	5	10	290.0
(4)	250	50	0.40	5	30	230.8
(5)	250	50	0.60	1	10	531.0
(6)	250	50	0.60	1	30	455.2
(7)	250	50	0.60	5	10	205.6
(8)	250	50	0.60	5	30	205.3
** (9)	250	50	0.25	3	20	547.5
** (10)	250	50	0.75	3	20	53.5
(11)	250	50	0.50	0	20	27.1
(12)	250	50	0.50	6	20	395.8
(13)	250	50	0.50	3	5	334.6
(14)	250	50	0.50	3	40	170.3
(15)	250	50	0.50	3	20	465.8
(16)	250	50	0.50	3	20	272.1
(17)	250	50	0.50	3	20	308.6
(18)	250	50	0.50	0	20	39.9
(19)	250	50	0.50	0	20	57.6
(20)	250	50	0.50	0	20	61.3

40

^a 固定したカルシウム濃度 (250mM) 及びDNA濃度 (50 μg/mL) での一過性抗-HER-2 発現が中心複合設計で分析され、それは、リン酸濃度 (Pi)、共沈殿の長さ (沈殿)、及

50

び細胞のトランスフェクタコンへの曝露の長さ（曝露時間）を5つのレベル：VL-極めて低い；L-低い；M-中間；H-高い；及びVH-極めて高いで実験する。表5Aは、この設計で使用された偏す魚レベルを示す。表5Bは、トランスフェクションの4、5後の抗-H E R - 2 E L I S Aについて収集され提出されたH C C Fを示す。2つの星印を付した領域は、[P i] が0.25mMである反応を強調し、1つの星印を付した領域は[P i] が標準レベルの0.75mMである同じ反応を強調している。

【0103】

この実施例で同定された条件の組は、組換え分子の最も高い一過性発現に最も好ましいとされる短い沈殿時間を支持していない。図2Aは、C a P i / D N A 共沈殿反応における共沈殿時間とリン酸濃度との間の関係を、それらが一過性タンパク質発現レベルに関連するとして示している。標準的リン酸濃度の0.75mMでは、最大の力価を達成するにはより短い共沈殿時間が必要であるが、これらの反応でリン酸濃度が低下すると、高い力価を得るためには共沈殿の長さを増大させなければならない（0.25mMでは、標準的リン酸濃度で達成可能なものを遙かに越える発現レベルが達成される）。リン酸濃度と共沈殿時間との間の関係に加えて、曝露時間及びリン酸濃度の変化の一過性抗-H E R - 2 発現に対する効果も試験した。図3は、0.25mMリン酸における高度に改善された一過性発現のために、最も好ましい曝露時間の範囲が3.0から4.5時間の間であることを示している。この範囲は、標準的なプロトコールで使用されるものに極めて類似している。

【0104】

この共沈殿条件で実施された一過性トランスフェクションはpH変化に対する感受性が低い。試験分子の一過性発現を促進するために提供された条件の組の同定に続いて、pH範囲6.75-7.35で形成されたC a P i トランスフェクタコンで実施したトランスフェクションを試験して、それらが上掲のChen及びOkayamaに報告されている極めて小さなpH変化（>0.06pH単位）に対する鋭い感受性を示すか否かを示す。図4は、抗-H E R - 2 及びE - 2 5 の両方の一過性発現が6.85-7.05の範囲に渡って腸沈殿反応のpHに耐性であることを示す。これは、pH単位未満のpH変化が一過性発現における6倍の低下をもたらすという文献（O'Mahoney及びAdams, 上掲）の報告に対して顕著な改善である。この範囲に渡る抗-H E R - 2 発現のパーセント変化は27%以下であり、E - 2 5 発現は同じ範囲で多くとも33%しか変化しない（図4）。

【0105】

ここでの条件の新たな組の最終試験は、それらが他の組換えタンパク質の一過性発現を以前のプロトコールより促進するか否かの決定である。表6は、この共沈殿条件が、標準又は標準近傍の共沈殿条件を用いて実施したトランスフェクションに対して、試験した全ての発現ベクターについて1.5から3.8倍の発現レベルの増加をもたらしたことを示す。これらの結果は、D N a s e を除く試験した全てのベクターについて高度な再現性を示した。

【0106】

10

20

30

表 6
形質移入剤としてリン酸カルシウムを用いた接着性CHO細胞での
種々のタンパク質の一過性発現

産生プラスミド	標準共沈殿条件での HCCFにおける 平均 $\mu\text{g/L}$	本発明の共沈殿条件 でのHCCFにおける 平均 $\mu\text{g/L}$	力価の増加倍数
VEGF (範囲)	10 (8.3-15)	15.35 (15-15.7)	1.53
DNase (範囲)	118 (42-200)	255 (190-320)	2.16
E-25 (範囲)	113 (94-124)	412 (410-414)	3.64
抗-HER-2 (範囲)	132 (18-265)	508 (470-547)	3.84

^a 一過性トランスフェクションは、共沈殿条件の2つの組を用いて実施した：（標準条件）125mMカルシウム、0.75mMリン酸、25 $\mu\text{g/mL}$ プラスミドDNA、及び1分間の沈殿時間；（新たな条件）250mMカルシウム、0.25mMリン酸、50 $\mu\text{g/mL}$ プラスミドDNA、及び20分間の沈殿時間。これらの条件は、4つの試験分子：VEGF、DNase、E-25、及び抗-HER-2の（異なる日の）2つのトランスフェクションのためのトランスフェクタコン調製に使用した。HCCFは、トランスフェクションの5.5日後に回収し、ELISAにかけた。

【0107】

議論

高度に改善されたプロセスパラメータを達成するための従来の手法の使用は、多くの生化学的プロセスについてかなりの情報を提供し、並びに、細胞及び細胞性プロセスの内部作用に見識を与えた（Box等，編集，Statistics for Experimenters: A Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building (John Wiley and Sons: New York, New York, 1978)）。古典的な一度に一変数という戦略は極めて有用であるが或る種の制限を持つ：1) 変数間の相互作用を決定できないこと；2) 最も好ましい条件の組を正確に決定できないこと；及び3) データの不正確な外挿を導くことである。この実施例では、形質移入剤としてリン酸カルシウムを用いたCHO細胞の一過性トランスフェクションの選択的改善を達成するために要因実験設計が採用された。リン酸カルシウムは20年以上形質移入剤として使用されているが、プロセスの大規模化が困難であり、並びにタンパク質力価が日毎に大きく変化することにより、組換えタンパク質の大規模な生産に広く使用されてこなかった。プロセス改善のための要因実験設計の使用は、組換えタンパク質の一過性発現についての反応表面及び実験した変数の領域の外挿を可能にしたが、これまでに実験されていなかった。

【0108】

組換え分子の一過性発現に影響を与える共沈殿反応の主な因子は、反応物中のリン酸濃度及び共沈殿の長さであり、DNA濃度が得られる力価に与える影響の程度は小さいことが認められた。実験設計における変数からpHを除外する決定は、以前の研究によりCaPiトランスフェクションが共沈殿反応の小さなpH変化に鋭敏に感受性であり（Yang及びYang，ともに上掲；O'Mahoney及びAdams，上掲；Chen及びOkayama，上掲）、観察される他の効果を隠してしまうpHとしないのが好ましい（Wilson等，上掲）ことが示されたためになされた。

【0109】

新たに同定されたレベルを用いた共沈殿反応の相対的な非感受性は、これらの反応で使用する2XHepe緩衝塩水について ± 0.1 のpH規格を設定することを可能にするので大きな突破口を意味する。標準的条件を用いて実施される共沈殿反応についての ± 0.1 p

10

20

30

40

50

H単位のpH規格は高度に予測不可能な結果を生じ、ここでの共沈殿条件の新たな組は、より予測可能な力価をもたらす。大規模な一過性トランスフェクションに実施可能なオプションを考えるリン酸カルシウムについては、プロセスは好ましくは条件範囲に渡って実施され、狭く特定されたパラメータの組では実施しない。これらのデータは、大規模化に良く適合し、形質移入剤としてのリン酸カルシウムでのタンパク質の強力な一過性発現を与える新たな条件の組の同定を導く。

【0110】

本発明でここに同定された条件の組は、規模変更可能(scaleable)であり、結果は強く、力価は一過性トランスフェクションのためのCaPiトランスフェクタコン生成の従来の条件より3.8倍まで増大する。条件は浮遊適合性哺乳動物細胞のトランスフェクションに適用できる。新たなプロセスは、哺乳動物細胞のCaPiトランスフェクションについて報告されたものよりpH変化に対して感受性が小さい。より高い一過性力価を生ずる共沈殿について短い時点を示したプロトコール(0'Mahoney及びAdams, 上掲; Jordan等, Nucleic Acids Res., 上掲; Jordan等, Cytotechnology, 上掲)は、より大きな容量の共沈殿反応を取り扱う場合に容易に大規模化できなかった。長い沈殿時間を含むプロトコールでは、強さの欠如及び得られる力価の極端な変わりやすさがしばしば観察された(Sambrook等, 上掲)。文献に現れた他の好ましいプロトコールも、一過性発現されたタンパク質について変化しやすい力価を生じた(Wigler等, Cell, 上掲; Strain及びWyllie, Biochem. J., 218: 475, 482 (1984); Gaunitz等, Biotechniques, 20(5): 826-30, 32 (1996); Seelos, Anal. Biochem., 245(1): 109-111 (1997))。少なくとも10分の長さ、好ましくは15分の長さの共沈殿条件の同定は、より制御され再現性のあるプロセスを可能にする。

【0111】

新たな有望なヒト薬品の探索において、クローンを同定して即座にタンパク質発現し、それらを機能を明確にするバイオアッセイに供することができるようになるのが必要である。活性の同定に成功した後、動物モデルでの試験のためにこれらの分子のミリグラムからグラム量を生成する必要がある。速度が大事である場合、これらの分子の生成のために大規模の一過性システムが非常に望ましい。本発明の発見によって、他のトランスフェクタコン形成試薬でかかる費用の一部で大規模化可能で組換えポリペプチドの強い生産を提供する条件の組の同定により、CaPiの核酸との共沈殿は、ポリペプチドの一過性発現のためのより魅力ある選択肢となる。

【図面の簡単な説明】

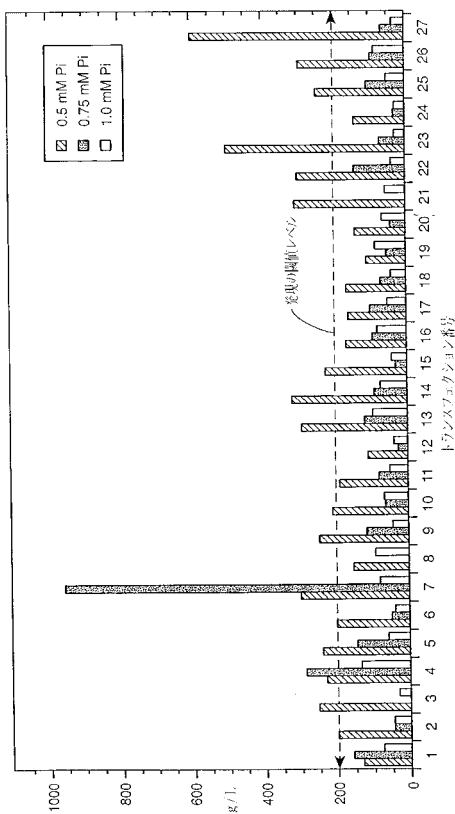
【図1】 共沈殿反応において0.5、0.75、及び1.0mMのリン酸濃度での抗-HER-2の規格化された一過性発現を示すグラフである。抗-HER-2発現は、各々が変化したカルシウム、DNA、及びリン酸濃度と変化した沈殿時間を含む81の各共沈殿反応について測定した。共沈殿条件は反応におけるリン酸濃度に従ってグループ分けした: 0.5mM—斜線棒; 0.75mM—黒棒; 1.0mM—傍点棒。トランストランスフェクションの132時間後の収穫した細胞培養液(HCCF)中の抗-HER-2濃度は、抗-HER-2 ELISAによって測定し、試験トランスフェクションの各組と平行して実施した3回の対照トランスフェクション(125mMカルシウム、0.75mMリン酸、25µg/mLプラスミドDNA、及び1分の沈殿時間)を用いて規格化した。発現の任意の閾値(200µg/L)は、中程度のレベルの一過性タンパク質発現を生ずる条件の組を評価するために選択した。

【図2】 共沈殿反応における共沈殿時間及びリン酸濃度の関数としての抗-HER-2発現についての表面反応曲線を示すグラフである。一過性発現は、中心複合設計に概略を示したように実施した。トランスフェクションの108時間後に得られた力価を表面反応曲線の作成に使用し、それは共沈殿反応中のリン酸濃度と共沈殿時間の長さとの間の関係を表す。

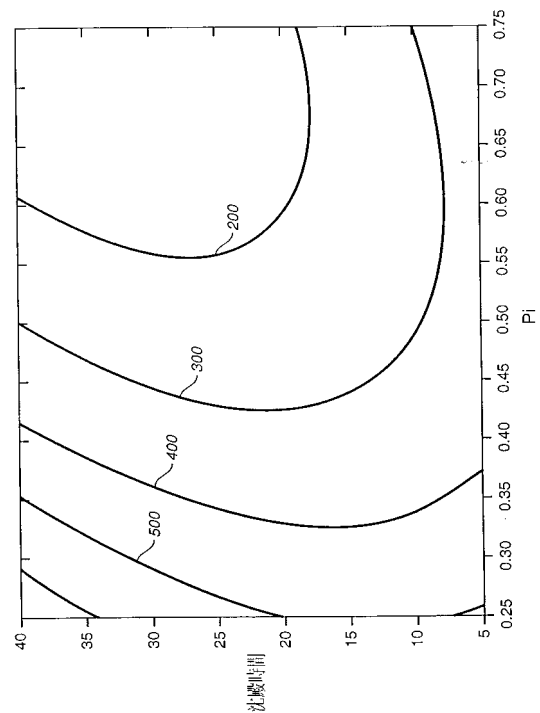
【図3】 抗-HER-2発現及び曝露時間についての表面反応曲線を示すグラフである。一過性発現は、中心複合設計に概略を示したように実施し、トランスフェクションの108時間後に得られた力価を表面反応曲線の作成に使用した。

【図4】 共沈殿反応におけるpH変化の抗-H E R - 2 及び抗-I g E 抗体 E - 2 5 の一過性発現に対する影響を示すグラフである。トランスフェクションは、共沈殿変数について新た同定したレベル（250mMカルシウム、0.25mMリン酸、50 μ g/mL D N A、及び20分の共沈殿時間）を用いて種々のpHで実施した。7つの反応をpH6.75-7.35の範囲に渡って0.1のpH単位増分で実施した。トランスフェクションの132時間（5.5日）後の抗-H E R - 2（黒四角）及びE - 2 5（黒菱形）力価を μ g/Lで表した。

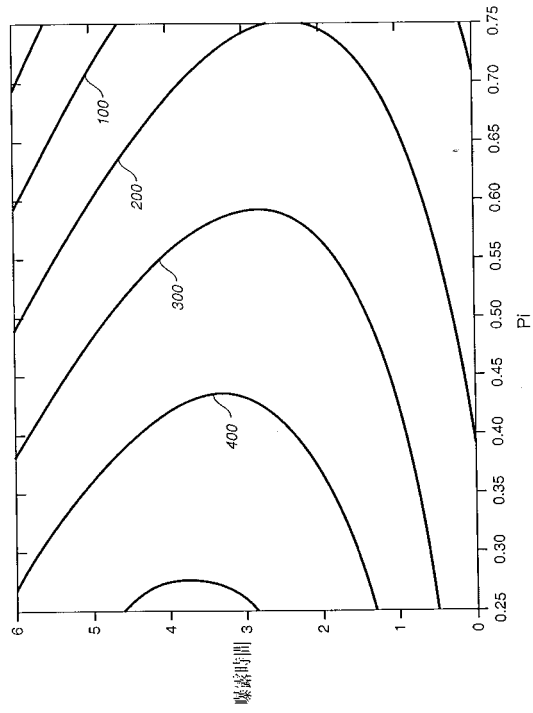
【図1】



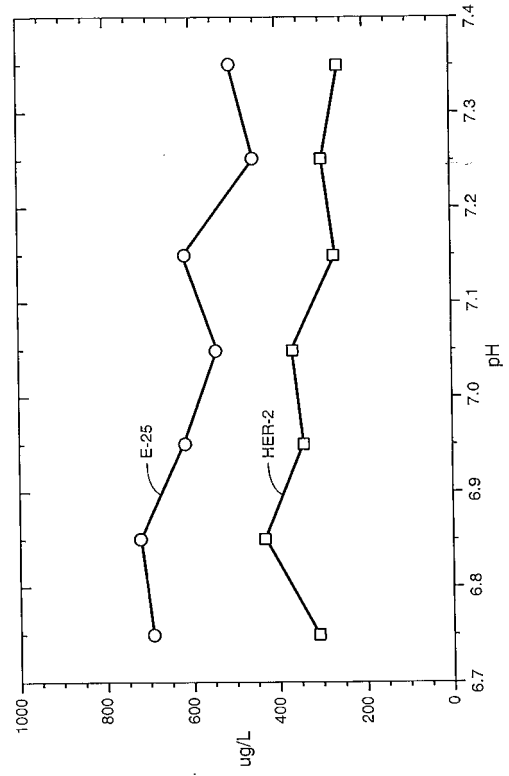
【図2】



【図 3】



【図 4】



フロントページの続き

(72)発明者 カーン, デービッド, ダブリュー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94404, フォスターシティー, ゴールドハンター コート
109

(72)発明者 ウィンクラー, マジョリー, イー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94010, バーリンゲーム, キャニオン ロード 2884

審査官 高堀 栄二

(56)参考文献 特表平10-508462 (JP, A)
Cytotechnology, Vol.26, No.1(1998.Feb.)p.39-47
Nucleic Acids Res., Vol.24, No.4(1996)p.596-601
Mol.Cell.Biol., Vol.7, No.8(1987)p.2745-2752
Anal.Biochem., Vol.226, No.2(1995)p.212-220
DNA Cell Biol., Vol.13, No.12(1994)p.1227-1232
Drug Deliv., Vol.3, No.3(1996)p.173-179
Drug Deliv., Vol.3, No.3(1996)p.181-186

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)
BIOSIS/WPI(DIALOG)
PubMed
CA(STN)
REGISTRY(STN)