

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2010-536396

(P2010-536396A)

(43) 公表日 平成22年12月2日 (2010.12.2)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 15/02 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 C	4 B O 6 4
C O 7 K 16/18 (2006.01)	C O 7 K 16/18	4 B O 6 5
C O 7 K 19/00 (2006.01)	C O 7 K 19/00	4 H O 4 5
C O 7 K 14/505 (2006.01)	C O 7 K 14/505	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 40 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2010-522371 (P2010-522371)
 (86) (22) 出願日 平成20年8月28日 (2008.8.28)
 (85) 翻訳文提出日 平成22年2月24日 (2010.2.24)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2008/061310
 (87) 国際公開番号 W02009/027471
 (87) 国際公開日 平成21年3月5日 (2009.3.5)
 (31) 優先権主張番号 07115227.6
 (32) 優先日 平成19年8月29日 (2007.8.29)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 503137975
 ベーリンガー インゲルハイム ファルマ
 ゲゼルシャフト ミット ベシュレンク
 テル ハフツング ウント コンパニー
 コマンディトゲゼルシャフト
 ドイツ連邦共和国 5 5 2 1 6 インゲル
 ハイム ビンガー シュトラーセ 1 7 3
 (74) 代理人 100092093
 弁理士 辻居 幸一
 (74) 代理人 100082005
 弁理士 熊倉 禎男
 (74) 代理人 100084009
 弁理士 小川 信夫
 (74) 代理人 100084663
 弁理士 箱田 篤

最終頁に続く

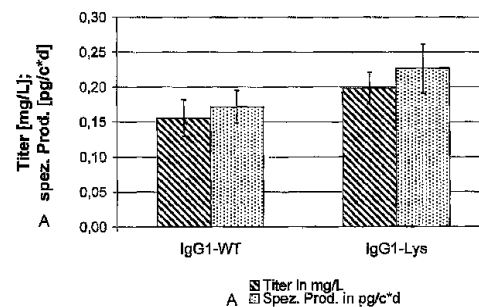
(54) 【発明の名称】 タンパク質力価を増加させる方法

(57) 【要約】

本発明は、細胞の目的とするタンパク質の力価を増加させる方法に関し、特に構成要素が C_{H3} ドメインである最適化された生体分子の製造および精製の改善に関する。生体分子において、しばしばC末端アミノ酸(単数または複数)、例えばC末端リジンが切断される。例えば、抗体の重鎖の不完全なプロセッシングは通例不均一な産物をもたらす。前記産物の不均一性を防ぐために、抗体重鎖のC末端リジンの対応するコドンを経換えDNA技術により欠失させる。前記の最適化された抗体は、野生型におけるよりも産物力価の増加をもたらす。加えて、前記の最適化された抗体は、低下した電荷不均一性による溶出挙動の改善の結果として精製過程に有利である。

【選択図】 図3

ABBILDUNG 3



A... specific productivity

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞の目的とするタンパク質の力価を増加させる方法であって、

- a. 目的とするタンパク質をコードする核酸配列において、少なくともC末端アミノ酸をコードするコドンに欠失させ、
 - b. a) からの改変核酸を含むベクターで細胞をトランスフェクトし、
 - c. 前記目的とするタンパク質の製造を可能にする条件下で細胞を培養すること
- を特徴とする前記方法。

【請求項 2】

C末端アミノ酸が欠失していないタンパク質の比較値に対して少なくとも10%、20%、50% 10
、好ましくは75%力価が増加することを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項 3】

C末端アミノ酸が欠失していないタンパク質の比較値に対して少なくとも10%、20%、50%
、好ましくは75%細胞の比生産性が増加することを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項 4】

目的とするタンパク質の産生を増加させるための発現ベクターを調製する方法であって、

- a. 目的とするタンパク質をコードする核酸配列において、少なくともC末端アミノ酸をコードするコドンに欠失させ、
 - b. このように改変したa) からの核酸配列を発現ベクターに挿入すること 20
- を特徴とする前記方法。

【請求項 5】

目的とするタンパク質の力価が増加した細胞を調製する方法であって、

- a. 請求項1記載の方法で細胞群を処理し、
 - b. 次に単一細胞クローニングを行うこと
- を特徴とする前記方法。

【請求項 6】

細胞内で目的とするタンパク質を製造する方法であって、

- a. 請求項1記載の方法で細胞群を処理し、
 - b. 少なくとも1つの選択圧力の存在下でa) からこれらの細胞を選択し、 30
 - c. 場合により単一細胞クローニングを行い、
 - d. 細胞または培養上清から目的とするタンパク質を得ること
- を特徴とする前記方法。

【請求項 7】

請求項6記載の少なくとも1つの目的とするタンパク質を製造する方法であって、段階b)を行った後に、製造に用いる細胞をさらに遺伝子増幅段階にかけることを特徴とする前記方法。

【請求項 8】

C末端アミノ酸がリジン(Lys)またはアルギニン(Arg)であり、好ましくはLysであることを特徴とする、請求項1～7の1つに記載の方法。 40

【請求項 9】

目的とするタンパク質が抗体、Fc融合タンパク質、EPOまたはtPAであることを特徴とする、請求項1～8のいずれか1項記載の方法。

【請求項 10】

目的とするタンパク質が抗体の重鎖であり、C末端アミノ酸がリジン(Lys)であることを特徴とする、請求項1～7のいずれか1項記載の方法。

【請求項 11】

抗体の重鎖がIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4型に属し、好ましくはIgG1、IgG2またはIgG4型に属することを特徴とする請求項10記載の方法。

【請求項 12】

目的とするタンパク質が、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、哺乳動物抗体、マウス抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、霊長類抗体またはヒト抗体または免疫グロブリン抗体の重鎖またはFab、F(ab')₂、Fc、Fc-Fc融合タンパク質、Fv、一本鎖Fv、単ドメインFv、四価一本鎖Fv、ジスルフィド結合したFv、ドメイン欠失抗体、ミニボディ、ダイアボディの抗体フラグメントもしくは誘導体または前記のフラグメントの1つと他のペプチドもしくはポリペプチドとの融合ポリペプチドまたはFc-ペプチド融合タンパク質であるFc-毒素融合タンパク質もしくは足場タンパク質であることを特徴とする、請求項1～11の1つに記載の方法。

【請求項13】

懸濁培養で細胞を培養することを特徴とする、請求項1～12のいずれか1項記載の方法。

10

【請求項14】

無血清条件下で細胞を培養することを特徴とする、請求項1～12のいずれか1項記載の方法。

【請求項15】

細胞が真核細胞であり、例えば酵母、植物、虫、昆虫、鳥、魚、爬虫類または哺乳動物由来の細胞であることを特徴とする、請求項1～14のいずれか1項記載の方法。

【請求項16】

細胞が哺乳動物細胞であることを特徴とする請求項15記載の方法。

【請求項17】

細胞がCHO細胞であり、好ましくはCHO DG44細胞であることを特徴とする、請求項16記載の方法。

20

【請求項18】

請求項4記載の方法により調製できる、目的とする遺伝子の発現を増加させる発現ベクター。

【請求項19】

請求項5記載の方法により調製できる細胞。

【請求項20】

目的とするタンパク質を製造し精製する方法であって、

- a. 目的とするタンパク質をコードする核酸配列において、少なくともC末端アミノ酸をコードするコドンに欠失させ、
 - b. C末端アミノ酸が欠失していないタンパク質と比較して得られた前記目的とするタンパク質の不均一性が低下していること
- を特徴とする前記方法。

30

【請求項21】

C末端アミノ酸がリジン(Lys)またはアルギニン(Arg)であり、好ましくはLysであることを特徴とする請求項20記載の方法。

【請求項22】

目的とするタンパク質が抗体、Fc融合タンパク質、EPOまたはtPAであることを特徴とする、請求項20または21に記載の方法。

40

【請求項23】

目的とするタンパク質が抗体の重鎖であり、C末端アミノ酸がリジン(Lys)であることを特徴とする、請求項20～22のいずれか1項記載の方法。

【請求項24】

抗体の重鎖がIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4型に属し、好ましくはIgG1、IgG2またはIgG4型に属することを特徴とする請求項23記載の方法。

【請求項25】

目的とするタンパク質の精製中に、C末端アミノ酸の欠失を含まないタンパク質の精製と比較して低い塩濃度が用いられることを特徴とする、請求項20～24のいずれか1項記載の方法。

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、最適化されたタンパク質、特に抗体FcフラグメントまたはFc融合タンパク質に関し、かつこれらの最適化された抗体および活性が増強したFc融合タンパク質の製造方法またはバイオ医薬品製造方法に関するばかりでなく、製造される生体分子がC末端リジンに関して完全に均一なタンパク質を製造し精製する方法にも関する。

タンパク質、ポリヌクレオチド、多糖などの生体分子は、医薬として、診断剤として、食品添加剤、界面活性剤などとして、研究試薬として、また多くの他の用途に関して、ますます重要性が増しつつある。これらの生体分子の必要性は、例えばタンパク質の場合は、通常自然源から分子を単離することによってはもはや満たすことはできず、バイオテクノロジーによる製造方法の使用を必要とする。

バイオテクノロジーによるタンパク質の製造は、一般的には、所望のタンパク質をコードするDNAの単離と適切な発現ベクターへのそれらのクローニングにより開始される。適切な原核または真核発現細胞への組換え発現ベクターのトランスフェクションとそれに続くトランスフェクトされた組換え細胞の選択後、後者を発酵槽内で培養し、所望のタンパク質を発現させる。次いで細胞または培養上清を採取し、それに含有されるタンパク質を後処理し精製する。

【0002】

バイオ医薬品、例えば治療抗体などの医薬として用いられるタンパク質の場合は、産物の収率が重要である。不純物の分離もまた重要である。工程由来および産物由来不純物の区別を付けることができる。工程由来不純物は、タンパク質および核酸などの宿主細胞成分あるいは細胞培養由来成分(例えば培地成分)および後処理由来成分(例えば塩または溶解クロマトグラフィーリガンド)を含む。加えて、産物由来不純物もまた存在する。これらは、異なる特性を有する、産物の分子バリエーションである。これらは、例えば、前駆体およびタンパク質のC末端アミノ酸基の酵素的切断による加水分解産物などの短縮形ばかりでなく、例えば脱アミノ化、異なるグリコシル化パターンまたは間違っ結合したジスルフィド架橋によって生じた修飾体もまた含む。産物由来バリエーションは、ポリマーおよび凝集体を含む。用語汚染物質は、製造方法には直接属さない、すべての他の化学的、生化学的または微生物学的物質のことを言う。さらなる汚染物質には、例えば細胞培養物中に望まないので存在する場合のあるウイルスがある。

新規バイオ医薬品の製造のための、哺乳動物における組換え抗体またはFc融合タンパク質の過剰発現においてしばしば観察される産物バリエーションは、C末端リジンの酵素的切断による、免疫グロブリン重鎖C末端における不均一性に基づく。この不均一性を正確に測定するためには、高分解能分析法を開発する必要があった。電荷不均一性の検出および定量のために、以下の方法が医薬産業における品質管理に用いられている:カチオンイオン交換クロマトグラフィー(CIEX)、等電点電気泳動(IEF)(検出のみ)、キャピラリー等電点電気泳動(cIEF)および液体クロマトグラフィー質量分析法(LCMS)。特にこの修飾に関して、製造される各バッチは評価され合格しなければならない。

市販されているこのカテゴリーの分子において、重鎖のC末端におけるこれらの産物の不均一性が観察されている。重鎖のC末端において、リジンが完全に切断された抗体モノマー(Lys0)と1つのリジンが切断された抗体モノマー(Lys1)とリジンが切断されていない抗体モノマー(Lys2)とが区別される。不完全にプロセッシングされた異なる分子(Lys1およびLys2)は、電荷の内30%までを説明することができる(Santora et al. (1999) Analytical Biochemistry, 275(1): p. 98-108)。Remicade(登録商標)(インフリキシマブ)の製造方法において、発酵における不均一性はおおよそ20%(Lys0およびLys1)および80%(Lys2)であった(FDA, Product Review on Remicade, 1998)。モノクローナル抗体におけるC末端リジンプロセッシングのさらなる例は、以下の表において見出すことができる(Harris, R.J., (1995) Journal of Chromatography A, 705 (1), pp. 129-134)。

【0003】

タンパク質	アミノ酸	細胞株/供給源	文献	
rCD4-IgG	Lys	トランスフェクトされたCHO	R.J. Harris, K.L. Wagner and M.W. Spellman, Eur. J. Biochem., 194 (1990) 611-620	
rhu MabHER2	Lys	トランスフェクトされたCHO	R.J. Harris, A.A. Murnane, S.L. Utter, K.L. Wagner, E.T. Cox, G. Polastri, J.C. Helder and M.B. Sliwkowski, Bio/Technology, 11 (1993) 1293-1297	
OKT3 Mab	Lys	ハイブリドーマ	P. Rao, A. Williams, A. Baldwin-Ferro, E. Hanigan, D. Kroon, M. Makowski, E. Meyer, V. Numsuwan, E. Rubin and A. Tran, BioPharm, 4 (1991) 38-43.	10
OKT3 Mab	Lys	ハイブリドーマ	P. Rao, A. Williams, A. Baldwin-Ferro, E. Hanigan, D. Kroon, M. Makowski, E. Meyer, V. Numsuwan, E. Rubin and A. Tran, BioPharm, 4 (1991) 38-43.	
CEM231 Mab	Lys	ハイブリドーマ	J.P. McDonough, T.C. Furman, R.M. Bartholomew and R.A. Jue, US Pat. 5 126 250 (1992)	20
CEM231 Mab	Lys	ハイブリドーマ	J.P. McDonough, T.C. Furman, R.M. Bartholomew and R.A. Jue, US Pat. 5 126 250 (1992)	
Hu-anti-Tac Mab	Lys	トランスフェクトされたSP2/0	D.A. Lewis, A.W. Guzzetta, W.S. Hancock and M. Costello, Anal. Chem., 66 (1994) 585-595.	
2-Chain tPA	Arg	トランスフェクトされたCHO		
2-Chain tPA	Arg	黒色腫		
hu EPO	Arg	ヒト尿	M.A. Recny, H.A. Scoble and Y. Kim, J. Biol. Chem., 262 (1987) 17156-17163	30
rhu EPO	Arg	トランスフェクトされたCHO	M.A. Recny, H.A. Scoble and Y. Kim, J. Biol. Chem., 262 (1987) 17156-17163	

出典: Harris, R.J. (1995) Journal of Chromatography A, 705 (1), pp. 129-134

【 0 0 0 4 】

40

現在のところ、この産物不均一性の原因は知られていない。主に影響を有するのが、鎖の構造か、宿主細胞か、発酵条件、従って細胞における異なる代謝過程かは不明である。同様に、リジンの切断が細胞の産物製造におけるどの時点でなされるか(翻訳と同時、翻訳後)、どこで、どのカルボキシペプチダーゼを用いてなされるかも現在不明である。その結果バッチ間で起こりうる変化は防ぐことができず、従って標的カウンタ制御は不可能である。

産物不均一性は、他のC末端アミノ酸欠失、例えばタンパク質tPAまたはEPOにおけるC末端アルギニン欠失によっても生じうる(Harris, R.J., (1995) Journal of Chromatography A, 705 (1), pp. 129-134)。

製造バッチを評価するための出発点は、産物の物理化学的性質、純度、均一性および有

50

効性・安全性である。

産物の純度および不均一性を評価するために、電気泳動(IEF)またはクロマトグラフィー(IEC、SEC、RP)による分離法および質量分析法(MS、ESI、MALDI)を用いる。

【0005】

産物純度をモニタリングすることにより、不純物の十分な除去および酵素的、機械的または化学的過程により生成される切断産物および凝集タンパク質分子の除去が保証される。産物の均一性は、主としてグリコシル化パターンにおける偏向および電荷不均一性によって評価される。産物の有効性はその生物活性を表し、抗体の場合、生物活性はその抗原結合能、エフェクター機能の誘導、血清半減期などの特性で構成されている。産物の安全性の決定要因は、特に産物のバッチの無菌性および細菌エンドトキシン量を含む。

10

製造バッチにおいて、その発売を可能にするために保証し固守しなければならない管理値の数が多いため、管理値数の縮小、例えばバッチに影響するパラメータの除去が望ましい。

さらに、バイオテクノロジーによるタンパク質の製造において、細胞における高い産物力価および高い比生産性が望ましい。

このように製造方法の改善についての問題が生じる。産物発現、産物の精製および産物の安定性に関しては、製造中、負の影響が生じてはならない。

驚くべきことに、本発明は、DNAレベルでC末端をコードするコドン(例えばリジン)を除去し、終止コドンを挿入することにより収率を増加させることを可能にするタンパク質製造方法を用いてこの問題を解決する。本方法により、タンパク質力価、特に重鎖におけるC末端リジン欠失を有する抗体の力価を増加させることが可能になる。

20

【発明の概要】

【0006】

本発明は、C末端リジン欠失を含むタンパク質、特にIgG1、IgG2、IgG3、IgG4などの抗体分子およびFc融合構築物に対する組換えDNA構築物に関する。発現構築物に関するこの変化およびC末端Lysコードンの欠失は、均一な重鎖C末端を有する分子のみが製造されることを意味する。

新規バイオ医薬品分子を製造するための、哺乳動物細胞組換え抗体またはFc融合タンパク質などの過剰発現において、しばしば、重鎖のC末端における不均一性が認められる。重鎖のC末端に関して、精製最終産物には3つの種が含まれる:1)DNA配列どおりのC末端リジンを有する完全な鎖(Lys2)または2)不完全な鎖(Lys1)および3)両方の鎖におけるC末端リジン欠失(Lys0)。2つの種の割合は予測できない。従って、細胞、発酵条件および製造バッチに応じて差異が生じうる。細胞内におけるこのリジンの酵素的切断に抗体構造が影響を及ぼすかどうかは不明である。

30

現在までに市販されているこれらの分子に関する手順は、重鎖の完全なDNA配列を発現し、多大な費用を用いてC末端に存在するどのような不均一性も分析し記録するというものであった。従って、産物を解析するために、C末端を分析する正確な方法が開発されなければならない、この特徴に関してすべてのバッチが分析されなければならない(Alexandru C. Lazar et al; Rapid Commun. Mass Spectrum. 2004; 18: 239-244, Lintao Wang et al; Pharmaceutical Research, Vol. 22, No .8, 2005)。従って、存在する産物の不均一性を分析するための費用は大きい。分析のための努力および費用を切り詰めることが望まれる。

40

【0007】

前記の産物不均一性の原因は現在知られていない。主な影響を有するのが、鎖の構造が、宿主細胞か、発酵条件、従って細胞における異なる代謝過程かは不明である。同様に、リジンの切断が細胞の産物製造におけるどの時点でなされるか(翻訳と同時、翻訳後)、どこで、どの酵素を用いてなされるかも現在不明である。その結果バッチ間で起こりうる変動は防ぐことができず、従って標的カウンタ制御は不可能である。

これまでに、C末端における不均一性の結果として免疫病理学的副作用などの有害な影響をこれらの産物の使用が引き起こすという指摘はなされていない。従って、C末端リジ

50

ンのない非天然配列もまた、臨床上の有効性および認容性に関して許容され、天然配列と等価であると考えられる。

しかしながら、IgGの重鎖におけるC末端リジンは高度に保存されているので、現在までに、C末端Lysコドンの欠失を有する治療用タンパク質の構築物、特に抗体またはFc融合構築物は記載されていない。

【0008】

先行技術から逸脱して、本発明において、3'末端において、抗体の重鎖のための発現構築物におけるリジンのコドンはDNAレベルですでに欠失している。すべてのIgG亜型において、重鎖のC末端は高度に保存されており、例えばヒトおよびマウス抗体の両方において、C末端のリジンは常に存在している。この状況を考慮すれば、発現、フォールディングまたは分泌にリジンは特に重要であることが予想される。しかしながら、驚くべきことに、異なるカテゴリーのIgGを用いる我々の実験により、C末端リジン欠失にもかかわらず、動物細胞培養系においてこれらの分子は発現され、培地中に天然タンパク質構造体が分泌されることが初めて示された。特に驚くべき側面は、これらの構築物が用いられる場合に観察される産物力価における完全に予想外の増加である。好ましくはヒト免疫グロブリンにおけるC末端リジン位置の高保存性を考慮すれば、これは予想外である。これらの発現構築物が用いられる場合、産物力価は少なくとも10%、好ましくは少なくとも20%、特に好ましくは少なくとも50%増加する。

製造される抗体アイソタイプを分析することにより、Lysコドンの欠失の結果としての産物不均一性の回避の定性的および定量的根拠を提供することもまた可能であった。2つの異なるアイソタイプ(IgG1およびIgG4)に関して、比較のために、野生型抗体および対応するリジン欠失変異体を発現し精製した。次にタンパク質の解析を行った。さらに、予想に反して、産物力価を少なくとも10~20%増加させることができることが示された。産物の後処理(プロテインAアフィニティークロマトグラフィー)およびタンパク質の解析において、リジンコドンの欠失は、なんら有害な影響を示さなかった。精製プロセスおよび産物の解析のさらなる分析(産物収率、凝集特性)においても、同様に、Lys欠失変異体はなんら負の影響を示さなかった。製造方法に関するより優れた頑健性、分析作業の削減および産物力価の増加を考慮すれば、この新規方法は明らかに先行技術よりも優れている。

【0009】

現行の先行技術よりも優れた主な利点は、これらの構築物が用いられるとき、重鎖に関してリジンのないC末端のパリアントのみが生じうることである。従って、バッチ間の変動および多大な産物解析作業の可能性はない。本発明の特に驚くべき点は、C末端リジンのない構築物が産物力価の増加をもたらすことであり、これは特に高収率に有利である。

本発明は、好ましくは、組換え抗体および/またはFc融合タンパク質の製造方法に適用できる。しかしながら、本発明はまた、C末端アミノ酸欠失を含む他の分子にも適用できる。これらの例には、C末端アルギニン欠失を有するEPOおよびtPAがある。

【0010】

本発明は、最適化されたタンパク質の製造および精製の改善に関する。その中の1成分は、特に、免疫グロブリンドメインC_H3である。しばしば観察されるこれらのタンパク質の結果はC末端リジンの切断である。これは、通例、産物不均一性をもたらす重鎖の不完全なプロセッシングである。この産物不均一性を避けるために、抗体重鎖のC末端リジンに対応するコドンを組換えDNA技術により欠失させた。驚くべきことに、最適化された抗体におけるこの欠失は、発現または細胞内でのタンパク質のプロセッシングに不都合をもたらさなかったばかりでなく、野生型と比較して産物力価の増加をもたらした。加えて、最適化された抗体は、電荷の不均一性の減少によるより優れた溶離過程により精製に有利であることが明らかとなり、均一性の改善により特徴づけられる。もう1つの利点は、目的とするタンパク質の精製において、C末端アミノ酸欠失を含まないタンパク質の精製と比較して低い塩濃度が用いられることである。

本発明は、先行技術からは自明ではない。現在、各製造バッチに関して、その発売が可能になる前に、産物不均一性を分析しなければならない。重鎖のC末端におけるリジン

基の不均一性の定性的および定量的測定のために、労働集約的で費用のかかる分析方法を用いなければならない。

【 0 0 1 1 】

抗体アイソフォームの定量的測定のために用いられる確立された方法は、医薬産業における品質管理に用いられる方法、例えば場合により質量分析法(LC-MS)と共に用いるカラムクロマトグラフィーによる分離方法(弱陽イオン交換樹脂、WCX)または電気泳動法による分離法(キャピラリー等電点電気泳動、CIEF)である。ゲル等電点電気泳動はリジンの不均一性の定性的評価のみを可能にする。

抗体重鎖のC末端リジン基により電荷の不均一性を低下させるための1つのアプローチが、モノクローナル抗体の不均一性を低下させる既存の方法に記載されている(EP0361902、US5126250)。本明細書において、不均一性の低下は、異なる方法、例えばpHを低下させること、カルボキシペプチダーゼによるC末端リジン基の酵素的切断または腹水添加により達成される。

酵素的な方法において、酵素カルボキシペプチダーゼを用いて免疫グロブリン抗体の重鎖のC末端リジン基の切断により電荷不均一性の低下が得られる。しかしながら、この方法では、抗体の95%を均一な抗体形(Lys0)に変換できるのみである。他の方法は、不均一な抗体形と腹水とを種々の比率(2:1~1:10)でインキュベーションすることまたは培地のpHを低下させることからなる。これらのC末端リジン切断方法の効率もまたおおそ95%にすぎない。また、これらの方法はすべて時間がかかる(>24h)。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 1 2 】

【 図 1 】組換えベクターの概略図である。この図に示したベクターは、CHO-DG44細胞におけるIgG1およびIgG4アイソタイプのモノクローナル抗体の発現に用いられる。“P/E”はCMVエンハンサーとハムスターUb/S27a-プロモーターの組み合わせを意味し、“CMV”はCMVエンハンサーとCMVプロモーターの組み合わせを意味し、“P”は単にプロモーター配列を意味し、“T”は、転写されたmRNAのポリアデニル化に必要な転写の終結シグナルである。各転写ユニット内の転写開始位置および方向は矢印で示してある。増幅可能選択マーカーであるジヒドロ葉酸還元酵素は“dhfr”という略語で示される。選択マーカーであるネオマイシンホスホトランスフェラーゼは“npt”で示され、点変異F240Iにより生成されるネオマイシンホスホトランスフェラーゼ変異体は“npt F240I”と呼ばれる。“IgG1 HC”は、IgG1アイソタイプの野生型F19抗体の重鎖をコードし、“IgG1-Lys”は、C末端リジン欠失を有するこの抗体の重鎖をコードする。“IgG4 HC”は、IgG4野生型の重鎖の遺伝子を意味し、他方では“IgG4-Lys”は、C末端リジン欠失を有するIgG4の重鎖を意味する。“LC”は、IgG1またはIgG4抗体の軽鎖をコードする。

【 図 2 】IgG1抗体の一過性発現に対するC末端リジン欠失の影響を示す図である。保存された重鎖のC末端リジンがIgG1分子の発現または分泌に影響を有するかどうかをチェックするために、プラスミドの組み合わせpBID/F19HCおよびpBIN/F19LC(C末端リジンを有するIgG1、網目棒)またはBID/IgG1-LysおよびpBIN/F19LC(C末端リジン欠失を有するIgG1、点付き棒)でCHO-DG44細胞の同時トランスフェクションを行う。同時に、トランスフェクション効率を比較するために、SEAP発現プラスミド(=分泌型アルカリホスファターゼ)で同時トランスフェクトする。48時間のトランスフェクション後、細胞培養上清を除去し、ELISAによりIgG1力価を測定し、SEAP活性を測定する。トランスフェクション効率に関してIgG1力価を補正する。図は、いずれの場合にも10並行プールの平均値を示すが、両バリエーションに関して同等の産物量が認められる。

【 図 3 】安定非増幅細胞プールにおけるIgG1野生型およびIgG1-リジン欠失変異体の発現を示す図である。安定的にトランスフェクトされた細胞において、IgG1抗体の発現に対するC末端リジン欠失の影響を研究する。このために、CHO-DG44細胞をプラスミドの組み合わせpBID/F19HCおよびpBIN/F19LC(C末端リジンを有するIgG1=IgG1-WT)またはBID/IgG1-LysおよびpBIN/F19LC(C末端リジン欠失を有するIgG1=IgG1-Lys)でトランスフェクトする。G418を添加したヒポキサンチン/チミジン無添加培地でのトランスフェクトされた細胞プー

10

20

30

40

50

ルの2~3週間の選択後(プラスミドの組み合わせあたりいずれの場合にも10プール)、製造されたIgG1抗体の細胞培養上清の濃度をELISAにより測定し、1日1細胞あたりの比生産性を算出する。棒は、いずれの場合にも、75cm²細胞培養フラスコにおける3~4培養継代からなる試験における、全プールの比生産性(点付き棒)または力価(縞のある棒)の平均値を示す。

【図4】安定増幅細胞プールにおけるIgG1野生型およびIgG1-リジン欠失変異体の発現を示す図である。CHO-DG44細胞をプラスミドの組み合わせpBID/F19HCおよびpBIN/F19LC(C末端リジンを有するIgG1=IgG1-WT)またはBID/IgG1-LysおよびpBIN/F19LC(C末端リジン欠失を有するIgG1=IgG1-リジン)でトランスフェクトする。G418を添加したヒポキサンチン/チミジン無添加培地でのトランスフェクトされた細胞プールの2~3週間の選択後(いずれの場合にもプラスミドの組み合わせあたり10プール)、次に培養培地に100nMメトトレキセート(MTX)を添加してDHFR媒介遺伝子増幅を行う。製造されたIgG1抗体の細胞培養上清における濃度をELISAにより測定し、1日1細胞あたりの比生産性を算出する。棒は、一方では、それぞれ75cm²細胞培養フラスコにおける6培養継代を含む試験における、個々のプールの比生産性(点付き棒)または力価(縞のある棒)の平均値を示す。他方では、全プールデータの平均値(MW)もまた示されている。図4Aは、IgG1野生型でトランスフェクトされた細胞プールのデータを示し、図4BはIgG1-リジン欠失バリエーションでトランスフェクトされた細胞プールのデータを示す。後者は、IgG1野生型でトランスフェクトされた細胞プールよりも、平均して120%高い比生産性を有し抗体を86%多く産生する。

【図5】IgG4抗体の一過性発現に対するC末端リジン欠失の影響を示す図である。保存された重鎖のC末端リジンがIgG4分子の発現または分泌に影響を有するかどうかをチェックするために、プラスミドの組み合わせpBIDa/IgG4 HCおよびpBIN8a/IgG4 LC(C末端リジンを有するIgG4、網目棒)またはBIDa/IgG4-LysおよびpBIN8a/IgG4 LC(C末端リジン欠失を有するIgG4、点付き棒)でCHO-DG44細胞の同時トランスフェクションを行う。同時に、トランスフェクション効率を比較するために、SEAP発現プラスミド(=分泌型アルカリホスファターゼ)で同時トランスフェクトする。48時間のトランスフェクション後、細胞培養上清を除去し、ELISAによりIgG4力価を測定し、SEAP活性を測定する。トランスフェクション効率に関してIgG4力価を補正する。図は、いずれの場合にも10並行プールの平均値を示すが、C末端リジン欠失を有するIgG4抗体に関してやや高い産物力価が認められる。

【図6】安定増幅細胞プールにおけるIgG4野生型およびIgG4リジン欠失変異体の発現を示す図である。CHO-DG44細胞をプラスミドの組み合わせpBIDa/IgG4 HCおよびpBIN8a/IgG4 LC(C末端リジンを有するIgG4=IgG4野生型)またはBIDa/IgG4-LysおよびpBIN8a/IgG4LC(C末端リジン欠失を有するIgG4=IgG4-リジン)でトランスフェクトする。G418を添加したヒポキサンチン/チミジン無添加培地でのトランスフェクトされた細胞プールの2~3週間の選択後(いずれの場合にもプラスミドの組み合わせあたり10プール)、次に培養培地に100nMメトトレキセート(MTX)を添加してDHFR媒介遺伝子増幅を行い、IgG4野生型4つおよびIgG4リジン欠失バリエーション6つに対する増幅細胞プールを得ることに成功する。製造されたIgG4抗体の細胞培養上清における濃度をELISAにより測定し、1日1細胞あたりの比生産性を算出する。棒は、一方では、それぞれ75cm²細胞培養フラスコにおける6培養継代を含む試験における、個々のプールの比生産性(点付き棒)または力価(縞のある棒)の平均値を示す。他方では、全プールデータの平均値(MW)もまた示されている。図6Aは、IgG4野生型でトランスフェクトされた細胞プールのデータを示し、図6BはIgG4-リジン欠失バリエーションでトランスフェクトされた細胞プールのデータを示す。後者は、IgG4野生型でトランスフェクトされた細胞プールよりも、平均して70%高い比生産性を有し63%多い抗体を産生する。

【図7】遺伝子増幅の第2ラウンド後の、細胞プールにおけるIgG4野生型およびIgG4リジン欠失変異体の発現を示す図である。CHO-DG44細胞をプラスミドの組み合わせpBIDa/IgG4 HCおよびpBIN8a/IgG4 LC(C末端リジンを有するIgG4=IgG4野生型)またはBIDa/IgG4-LysおよびpBIN8a/IgG4LC(C末端リジン欠失を有するIgG4=IgG4-リジン)でトランスフェクトする。まず第1に、G418を添加したヒポキサンチン/チミジン無添加培地でのトランスフェクトされた細胞プールの2~3週間の選択(いずれの場合にもプラスミドの組み合わせあたり10

10

20

30

40

50

プール)を行う。次に段階的なDHFR媒介遺伝子増幅を行う。第1段階において、培養培地に100nMメトトレキセート(MTX)を添加する。この遺伝子増幅から得られるこれらの安定細胞プールを用いて、培養培地に400nM MTXを添加することにより、遺伝子増幅の第2ラウンドを行う。IgG4野生型に関して6つの増幅細胞プールを得ることに成功し、IgG4リジン欠失バリエーションに関して4つの増幅細胞プールを得ることに成功する。製造されるIgG4抗体の細胞培養上清における濃度をELISAにより測定し、1日1細胞あたりの比生産性を算出する。棒は、一方では、いずれの場合にも75cm²細胞培養フラスコにおける4培養継代を含む試験における、個々のプールの比生産性(点付き棒)または力価(縞のある棒)の平均値を示す。他方では、全プールデータの平均値(MW)もまた示されている。図7Aは、IgG4野生型でトランスフェクトされた細胞プールのデータを示し、図7BはIgG4-リジン欠失バリエーションでトランスフェクトされた細胞プールのデータを示す。後者は、IgG4野生型でトランスフェクトされた細胞プールよりも、平均して66%高い比生産性を有し53%多い抗体を産生する。

【図8】プロテインA HPLCによる産物収率の定量を示す図である。IgG1およびIgG4の産物収率の測定値はリジン欠失にかかわらず90%以上である。アイソタイプのモノマーおよび対応するリジン欠失バリエーションの割合は89.23~97.93%の範囲である。収率およびモノマー含量の両方に関して、IgG1-Lysは、そのWTバリエーションよりも高い。

【図9】アイソタイプIgG1およびIgG4の等電点電気泳動(IEF)を示す図である。存在するすべてのC末端リジンを切断するために、in vitroでカルボキシペプチダーゼBを用いて抗体をインキュベートした。アイソタイプIgG1(+リジン)(=IgG1野生型)はカルボキシペプチダーゼBでのインキュベーション後により少ないタンパク質バンド数を示す(Lys2およびLys1におけるC末端リジンの切断=>Lys0)。アイソタイプIgG1(-リジン)(=C末端リジン欠失バリエーション)は、カルボキシペプチダーゼBによるインキュベーションとは無関係に同じバンドパターンを示す。IEFマーカーバンドは8.8kDaおよび8.6kDaにおいて観察される。

【図10】LC-MSによるC末端リジンの検出を示す図である。アイソタイプIgG4(+リジン)(=IgG4野生型)に関しては、C末端リジンを有する重鎖(HC)の割合は20%であり(ライトグレー棒 リジンを有するHC)、バリエーションIgG4(-リジン)(=C末端リジン欠失バリエーション)においては、それは0%である。ダークグレー棒は、リジンを有さない重鎖(HC)の割合を示す。

【図11】WCXによる抗体の分離を示す図である。弱陽イオン交換(WCX)によるIgG1-WT(A)とIgG1リジン(B)の分離。カルボキシペプチダーゼBを用いるリジンの酵素的切断は、WT IgG1における塩基性ピーク1および2の減少を示す。IgG1 WT CpB処理なし(上部の線)とIgG1 WT CpB処理(下部の線)とのオーバーレイ(C)により、塩基性ピーク面積の合計9.8%の減少が見られる。IgG1-Lys CpB処理なし(上部の線)とIgG1-Lys CpB処理(下部の線)とのオーバーレイ(D)により、塩基性ピーク面積の減少が見られない(~1%以下)。

【図12】LC-MSによるC末端リジンの定量を示す図である。LC-MSによるIgG4の抗体重鎖におけるC末端リジンの割合の定量(IgG4WT:点線(上部)およびIgG4-Lys:実線(下部))。還元およびクロマトグラフィーによる分離の後、C末端リジンを有する重鎖(リジンを有するHC1-447)またはリジンを有さない重鎖(リジンを有さないHC1-446)の定量値を測定した。矢印は、グリコシル化状態によって、リジン切断により引き起こされる質量シフトを示す。しるしを付けたピークにより、重鎖のグリコシル化が特徴づけられる(黒:C末端リジンを有するHC、灰色の背景:C末端リジンを有さないHC)。

【発明を実施するための形態】

【0013】

発明の詳細な説明

定義

発明の詳細な説明の範囲内で用いられる用語および名称は、以下で定義される意味を有する。一般的用語“含んでなる”または“含む”は、より具体的な用語“からなる”を含む。さらに、用語“単数”および“複数”は、限定的に使用されない。

用語“力価”は、規定量中の産物濃度、例えばng/mL、mg/mL、mg/L、g/Lの表示である。

用語“比生産性”は、1日1細胞あたりのpgで表した細胞により製造されるタンパク質の

10

20

30

40

50

量のことを言う。これは、式 $pg/((Ct-Co)t/\ln(Ct-Co))$ (式中、CoおよびCtは播種時または採取時の細胞数を示し、tは培養期間を示す)を用いて算出される。

用語“収率”は、マトリックス、例えばプロテインAマトリックスによるクロマトグラフィーによる分離後の種々の産物パリアントの回収率のことを言う。

選択されたヌクレオチド配列によりコードされるタンパク質の産物濃度はELISAを用いて測定できるが、他の方法、例えばプロテインA HPLC、ウェスタンブロット、ラジオイムノアッセイ、免疫沈降、タンパク質の生物活性の検出、タンパク質免疫染色とそれに続くFACS分析もしくは蛍光顕微鏡検査、FACS分析による蛍光タンパク質の直接検出または分光光度計によっても測定できる。

【0014】

目的とする遺伝子:

本発明記載の発現ベクターに含まれる目的とする遺伝子は、目的とする産物をコードする任意の長さのヌクレオチド配列を含む。遺伝子産物または“目的とする産物”は、一般にタンパク質、ポリペプチド、ペプチドもしくはフラグメントまたはそれらの誘導体である。しかしながら、それは、RNAまたはアンチセンスRNAであることもできる。目的とする遺伝子は、その完全長形または短縮形で存在することができ、融合遺伝子または標識遺伝子として存在することもできる。目的とする遺伝子は、ゲノムDNAであることができ、あるいは好ましくはcDNAまたは対応するフラグメントまたは融合体であることができる。目的とする遺伝子は天然遺伝子配列であることもでき、あるいは変異または別なふうに修飾されていることもできる。このような修飾は、特定の宿主細胞およびヒト化に適合する最適化されたコドンを含む。目的とする遺伝子は、例えば、分泌型、細胞質、核内局在、膜結合型または細胞表面結合型ポリペプチドをコードすることができる。

【0015】

用語“核酸”、“ヌクレオチド配列”または“核酸配列”は、一本鎖または二本鎖として存在し、遺伝子のコード鎖または非コード鎖を表すことができるゲノムまたは合成起源のDNAまたはRNAばかりでなく、オリゴヌクレオチド、ヌクレオチド、ポリヌクレオチドおよびそれらのフラグメントを示す。核酸配列は、部位特異的変異誘発またはPCR媒介変異誘発などの標準法を用いて修飾することができる。

“コードする”とは、生物過程において、他のポリマーおよび高分子、例えばrRNA、tRNA、mRNA、他のRNA分子、cDNAまたはポリペプチドなどの合成のための鋳型としての機能を果たす核酸、例えば染色体上の遺伝子またはmRNAにおけるヌクレオチドの特異的配列の特性または能力を意味する。よって、転写とその後のmRNAの翻訳により細胞または他の生物系において所望のタンパク質が製造される場合、遺伝子がタンパク質をコードするという。ヌクレオチド配列がmRNA配列と同一であり、また通常、配列データバンク、例えばEMBLまたはGenBankで供給されるコード鎖ばかりでなく、転写の鋳型として機能する遺伝子またはcDNAの非コード鎖もまた産物またはタンパク質をコードすることができる。タンパク質をコードする核酸はまた、縮重遺伝コードに基づく、異なる順序のヌクレオチド配列を有するが同じアミノ酸配列のタンパク質をもたらす核酸も含む。タンパク質をコードする核酸配列は、イントロンを含むことができる。

用語“cDNA”は、遺伝子から調製されるmRNAまたは他のRNAからの2番目のDNA鎖の逆転写および合成により調製されるデオキシリボ核酸を意味する。cDNAが二本鎖DNA分子として存在する場合、それはコード鎖および非コード鎖の両方を含む。

【0016】

目的とするタンパク質/産物

バイオ医薬品としての重要性を有するタンパク質/ポリペプチドは、限定するものではないが、例えば抗体または免疫グロブリン、酵素、サイトカイン、リンホカイン、接着分子、受容体およびそれらの誘導体またはフラグメントを含む。一般に、アゴニストまたはアンタゴニストとしての機能を果たす、および/または治療または診断用途を有するすべてのポリペプチドを使用することができる。目的とする他のタンパク質には、限定するものではないが、例えば、いわゆる“細胞工学”の領域で宿主細胞の特性を変えるために用

10

20

30

40

50

いられるタンパク質/ポリペプチド、例えば抗アポトーシスタンパク質、シャペロン、代謝酵素、グリコシル化酵素およびそれらの誘導体またはフラグメントがある。

【0017】

用“ポリペプチド”は、アミノ酸配列またはタンパク質に用いられる任意の長さのアミノ酸のポリマーのことを言う。この用語はまた、グリコシル化、リン酸化、アセチル化またはタンパク質のプロセッシングなどの反応により翻訳後修飾を受けたタンパク質を含む。ポリペプチドの生物活性を維持したままで、例えばアミノ酸の置換、欠失または挿入および他のタンパク質との融合によりポリペプチドの構造を修飾することができる。加えて、ポリペプチドは多量体化してホモマーおよびヘテロマーを形成することができる。

【0018】

“免疫グロブリン”または“抗体”は、外来物質(=抗原)に対する宿主生物の反応として分化したBリンパ球(形質細胞)から生成されるグロブリンの中から選択されるタンパク質である。それらは、これらの外来物質に対して特異的に防御するのに役立つ。種々の免疫グロブリンクラス:IgA、IgD、IgE、IgG、IgM、IgY、IgWが存在する。用語免疫グロブリンおよび抗体は同義で使用される。

治療抗体の例には、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体および一本鎖抗体または免疫グロブリンならびにそれらのフラグメント例えばFab、Fab'、F(ab')₂、Fc and Fc'フラグメント、軽鎖(L)および重鎖(H)免疫グロブリンならびにそれらの定常領域、可変領域または超可変領域ばかりでなくFvおよびFdフラグメントがある。抗体はヒト起源または非ヒト起源のものであることができる。ヒト化抗体およびキメラ抗体もまた可能である。

Fabフラグメント(抗原結合フラグメント=Fab)は、隣接する定常領域に結合された両鎖の可変領域からなる。Fabフラグメントは、例えばパパインなどのプロテアーゼでの処理またはDNAクローニングにより製造できる。他の抗体フラグメントには、ペプシンによるタンパク質消化により製造できるF(ab')₂フラグメントがある。

【0019】

遺伝子クローニングを用いれば、重鎖(VH)および軽鎖(VL)の可変領域のみからなる短縮抗体フラグメントを製造することも可能である。これらはFvフラグメント(可変フラグメント=可変部分のフラグメント)として知られている。これらのFvフラグメントにおいて、定常鎖のシステイン基による共有結合は不可能なので、これらは他の何らかの方法により安定化される。このために、重鎖および軽鎖の可変領域は、しばしば、約10~30アミノ酸、好ましくは15アミノ酸の短いペプチドフラグメントにより結合される。これにより、ペプチドリinkerによりVHおよびVLが結合された1本のポリペプチド鎖が生じる。これらの抗体フラグメントは、一本鎖Fvフラグメント(scFv)とも呼ばれる。scFv抗体の例は公知であり、記載されている。

過去において、多量体化scFv誘導体を製造するための種々の戦略が開発されてきた。その意図は、改善された薬物動態学的性質および増加した結合アビディティを示す組換え抗体を製造することである。scFvフラグメントの多量体化を達成するために、scFvフラグメントは、多量体化ドメインを有する融合タンパク質として製造される。多量体化ドメインは、例えばIgGのCH3領域またはロイシンジッパードメインなどのらせん構造体(“コイルドコイル構造”)であることができる。他の戦略において、多量体化(例えばダイアボディ、トリアボディおよびペンタボディ)のために、scFvフラグメントのVH領域とVL領域との相互作用が用いられる。

【0020】

当該技術分野で、用語“ダイアボディ”は、二価ホモ二量体scFv誘導体を意味するために用いられる。scFv分子におけるペプチドリinkerを5~10アミノ酸に縮めることにより、VH/VL軽鎖の重ね合わせによるホモダイマーの形成が生じる。ジスルフィド架橋の挿入により、ダイアボディをさらに安定化させることができる。ダイアボディの例は、文献中に見出すことができる。

当該技術分野で、用語“ミニボディ”は、二価のホモ二量体scFv誘導体を意味するため

10

20

30

40

50

に用いられる。ミニボディは、二量体化領域として、免疫グロブリン、好ましくはIgG、最も好ましくはIgG1のCH3領域を含む融合タンパク質からなる。ミニボディは、同様にIgGのヒンジ領域とリンカー領域とによりscFvフラグメントを結合させる。

当該技術分野で、用語“トリアボディ”は、3価のホモ三量体scFv誘導体を意味するために用いられる。リンカー配列を使わずにVH-VLを直接融合させることにより三量体が生成する。

二価、三価または四価構造を有する、当該技術分野でミニ抗体として知られるフラグメントもまたscFvフラグメントの誘導体である。二量体、三量体または四量体コイルドコイル構造により多量体化が達成される。

【0021】

本発明記載の発現ベクターの調製

本発明記載の発現ベクターは、理論上は、当該技術分野で公知の慣用法により調製できる。ベクターの機能的構成要素、例えば適切なプロモーター、エンハンサー、終結シグナル、ポリアデニル化シグナル、抗生物質耐性遺伝子、選択マーカー、複製開始点およびスプライシングシグナルの記載もまたなされている。従来のクローニングベクター、例えばプラスミド、バクテリオファージ、ファージミド、コスミドまたは、例えばバキュロウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルスおよび単純ヘルペスウイルスなどのウイルスベクターばかりでなく、合成もしくは人工染色体またはミニ染色体を本発明記載の発現ベクターの調製に使用できる。真核発現ベクターは、一般的には、細菌におけるベクターの複製および選択を可能にする原核性配列、例えば複製起点および抗生物質耐性遺伝子もまた含む。ポリヌクレオチド配列導入のためのマルチクローニング部位を含む多くの真核発現ベクターも既知であり、一部は種々の会社、例えばStratagene社(米国カリフォルニア州ラホヤ); Invitrogen社(米国カリフォルニア州カールスバート); Promega社(米国ウィスコンシン州マディソン)またはBD Biosciences Clontech社(米国カリフォルニア州パロアルト)から商業的に入手できる。

【0022】

基本的には、発現ベクター内の遺伝子の発現は、1以上の転写ユニットから出発して引き起こすことができる。用語転写ユニットは、転写される1以上の遺伝子を含む領域として定義される。転写ユニット内の遺伝子は、このようなユニット内のすべての遺伝子が同じプロモーターまたはプロモーター/エンハンサーの転写調節下にあるように互いに機能的に連結されている。このような遺伝子の転写連関性の結果として、2以上のタンパク質または産物を1つの転写ユニットから転写して発現することができる。各転写ユニットは、それに含まれる遺伝子配列の転写および翻訳に必要な調節因子を含む。各転写ユニットは同一または異なる調節因子を含むことができる。転写ユニット内の遺伝子の機能的結合のために、IRESエレメントまたはイントロンを用いることができる。

発現ベクターは、例えば、目的とする遺伝子(単数または複数)および選択マーカー遺伝子を発現する単一の転写ユニットを含むことができる。あるいは、これらの遺伝子は、2以上の転写ユニット中に配置することもできる。転写ユニット内の遺伝子の種々の組み合わせが可能である。本発明の他の実施形態において、1以上の転写ユニットからなる2以上の発現ベクターを、同時トランスフェクションまたは任意の所望の順序での連続トランスフェクションで宿主細胞に挿入することができる。転写ユニットの十分な発現が確実にされるという条件で、各ベクター上の調節因子および遺伝子の任意の組み合わせを選択することができる。必要に応じて、他の調節因子および遺伝子、例えばさらなる目的とする遺伝子または選択マーカーを発現ベクターに挿入することができる。

【0023】

宿主細胞:

本発明記載の発現ベクターを用いるトランスフェクションのために、真核宿主細胞、好ましくは哺乳動物細胞、より具体的にはげっ歯類細胞、例えばマウス、ラットおよびハムスター細胞株が用いられる。本発明記載の発現ベクターを用いる対応する細胞のトランスフェクションの成功は、形質転換細胞、遺伝子改変細胞、組換え細胞またはトランスジェ

10

20

30

40

50

ニック細胞をもたらし、これらもまた本発明の対象である。

【0024】

本発明の目的のための好ましい宿主細胞は、BHK21、BHK TK⁻、CHO、CHO-K1、CHO-DUKX、CHO-DUKX B1およびCHO-DG44細胞などのハムスター細胞またはこれらの細胞株の派生物/子孫である。特に好ましいものはCHO-DG44、CHO-DUKX、CHO-K1およびBHK21細胞であり、特別にはCHO-DG44およびCHO-DUKX細胞である。同様に、マウス由来の骨髓腫細胞、好ましくはNS0およびSp2/0細胞ならびにこれらの細胞株の派生物/子孫もまた適切である。しかしながら、これらの細胞の派生物および子孫、ヒト、マウス、ラット、サル、げっ歯動物の細胞株（これらに限定されない）を含む他の哺乳動物細胞または酵母、昆虫、鳥および植物細胞（これらに限定されない）を含む真核細胞の派生物および子孫もまた生物医薬品タンパク質の製造のための宿主細胞として使用できる。

10

ポリヌクレオチドまたは本発明記載の発現ベクターの1つを用いる真核宿主細胞のトランスフェクションは慣用法により行われる。トランスフェクションの適切な方法は、例えばリポソーム媒介トランスフェクション、リン酸カルシウム共沈法、エレクトロポレーション、ポリカチオン（例えばDEAEデキストラン）媒介トランスフェクション、プロトプラスト融合、マイクロインジェクションおよびウイルス感染を含む。本発明によれば、好ましくは、構築物を宿主細胞のゲノムまたは人工染色体/ミニ染色体に組み込むかまたは宿主細胞内にエピソームとして安定に含ませて安定なトランスフェクションを行う。当該の宿主細胞内で異種遺伝子の最大のトランスフェクション頻度および発現を示すトランスフェクション法が好ましい。定義により、宿主細胞に挿入されるあらゆる配列またはあらゆる遺伝子は、宿主細胞に関して“異種配列”または“異種遺伝子”と呼ばれる。このことは、たとえ挿入される配列または挿入される遺伝子が宿主細胞の内因性配列または内在性遺伝子と同一であっても適用される。例えば、ハムスター宿主細胞に挿入されるハムスターアクチン遺伝子は、定義により異種遺伝子である。

20

【0025】

ヘテロ多量体タンパク質、例えばモノクローナル抗体(mAb)の組換え産生において、適切な宿主細胞のトランスフェクションは、理論上は、2つの異なる方法で行うことができる。この種のmAbは、複数のサブユニット、重鎖および軽鎖で構成される。1つのプラスミド上の独立した転写ユニットまたは複数シストロン性の転写ユニットにこれらのサブユニットをコードする遺伝子を挿入し、次にこれで宿主細胞をトランスフェクトすることができる。これは、宿主細胞のゲノムへの組み込み後に遺伝子の化学量論的発現量を確実にすることを目的としている。しかしながら、独立した転写ユニットの場合は、これによって異なるタンパク質をコードするmRNAが同じ安定性および転写・翻訳効率を示すことが確実にされなければならない。第2の場合においては、遺伝子の発現は、複数シストロン性の転写ユニット内で1つのプロモーターにより行われ、1つの転写産物のみが生成される。

30

IRESエレメントを用いれば、2番目以降のシストロンにおいて高い効率の遺伝子の内部翻訳開始が得られる。しかしながら、これらのシストロンの発現速度は第1シストロンの発現速度よりも低く、いわゆる“キャップ”依存的転写開始前複合体による翻訳開始は、IRES依存的翻訳開始よりも実質的により効率的である。シストロンの真の等モル発現を達成するために、さらなるシストロン間エレメント、例えばIRESエレメントと共に均一な発現速度を確実にするものを挿入することができる。

40

【0026】

本発明に好ましい、複数の異種タンパク質を同時に産生することが可能な他の方法は、遺伝子が別々に異なる発現ベクターに組み込まれる同時トランスフェクションである。これは、互いに一定の割合の遺伝子および遺伝子産物を含むという利点を有し、それによってmRNAの安定性および転写・翻訳効率における差異が相殺される。加えて、発現ベクターが小型であるためより安定であり、クローニングおよびトランスフェクションにおける取り扱いがより容易である。

従って、本発明の特定の一実施形態において、宿主細胞は、1以上の目的とする他のタンパク質をコードする遺伝子を有する1以上のベクターでさらにトランスフェクトされ、

50

好ましくは同時トランスフェクトされる。同時トランスフェクションに用いられる他のベクター(単数または複数)は、例えば、同じプロモーターの調節下(好ましくは、同じプロモーター/エンハンサーの組み合わせの調節下)にある目的とする他のタンパク質(単数または複数)および少なくとも1つの選択マーカー、例えばジヒドロ葉酸還元酵素をコードする。

本発明の他の特定の実施形態において、宿主細胞は少なくとも2つの真核発現ベクターを用いて同時トランスフェクトされ、2つのベクターの少なくとも1つは少なくとも目的とするタンパク質をコードする少なくとも1つの遺伝子を含み、他のベクターは本発明記載の1以上の核酸を任意の組み合わせ、位置および配向で含み、場合により少なくとも1つの目的とする遺伝子もコードし、本発明記載のこれらの核酸は、他のベクターを用いる同時組み込みにより、他の同時トランスフェクトしたベクターに位置する目的とする遺伝子に転写または発現促進活性を付与する。

【0027】

本発明によれば、宿主細胞は、好ましくは、樹立され、適応され、無血清条件下で、場合により動物タンパク質/ペプチドを含まない培地で培養される。市販の培地の例は、ハムF12培地(Sigma社、ドイツ・ダイゼンホーフエン)、RPMI-1640(Sigma社)、ダルベッコ改変イーグル培地(DMEM;Sigma社)、最小必須培地(MEM;Sigma社)、イスコフ修飾ダルベッコ培地(IMDM;Sigma社)、CD-CHO(Invitrogen社、米国カリフォルニア州カールスバート)、CHO-S-SFMII(Invitrogen社)、無血清CHO培地(Sigma社)およびCHO無タンパク質培地(Sigma社)を含む。これらの培地のそれぞれに、場合により、種々の化合物、例えばホルモンおよび/または他の増殖因子(例えばインスリン、トランスフェリン、上皮増殖因子、インスリン様成長因子)、塩(例えば塩化ナトリウム、塩化カルシウム、塩化マグネシウム、リン酸塩)、緩衝液(例えばHEPES)、ヌクレオシド(例えばアデノシン、チミジン)、グルタミン、グルコースまたは他の同等の栄養素、抗生物質および/または微量元素を加えることもできる。本発明記載の無血清培地が好ましいが、適切な量の血清と混合した培地を用いて宿主細胞を培養することもできる。1以上の選択マーカー遺伝子を発現する遺伝子改変細胞を選択するために、1以上の選択剤が培地に添加される。

【0028】

用語“選択剤”は、当該の選択マーカー遺伝子が欠損した宿主細胞の増殖または生存に影響を与える物質のことを言う。本発明の範囲において、野生型または好ましくは修飾ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子を含む異種宿主細胞の選択のための培地添加剤として、好ましくはジェネティシン(G418)が用いられる。複数の発現ベクターで宿主細胞がトランスフェクトされた場合、例えば複数の目的とする遺伝子が別々に宿主細胞に挿入された場合、宿主細胞は一般に異なる選択マーカー遺伝子を有する。

“選択マーカー遺伝子”は、対応する選択剤を培養培地に添加することにより、この遺伝子を含む細胞の特異的選択を可能にする遺伝子である。例として、正の選択マーカーとして抗生物質耐性遺伝子を使用することができる。この遺伝子で形質転換された細胞のみが、対応する抗生物質の存在下で増殖でき、従って選択される。他方では非形質転換細胞は、これらの選択条件下では増殖または生存できない。正、負および2機能性の選択マーカーが存在する。正の選択マーカーは、選択剤に対する耐性を付与することにより、あるいは宿主細胞における代謝または異化異常を補うことにより選択を可能にし、従って形質転換細胞の増殖を可能にする。一方、選択マーカー遺伝子を含んだ細胞は、負の選択マーカーにより選択的に除去できる。この例は、単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ遺伝子であり、アシクロビルまたはガンシクロビルを同時に添加して細胞内でそれを発現させることによりその除去をもたらす。増幅可能選択マーカーを含む本発明に用いられる選択マーカーは、その選択マーカーがその選択特性を保持するという条件で、遺伝子改変した変異体およびバリエーション、フラグメント、機能的等価物、誘導体、ホモログならびに他のタンパク質またはペプチドとの融合体を含む。このような誘導体は、選択を示すと考えられる領域またはドメインにおけるアミノ酸配列にかなりの相同性を示す。文献には、2機能性(正/負の)マーカーを含む多数の選択マーカー遺伝子が記載されている。真核細胞

に通例用いられる選択マーカーの例は、アミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ (APH)、ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ (HYG)、ジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR)、チミジンキナーゼ (TK)、グルタミン合成酵素、アスパラギンシンターゼの遺伝子ならびにネオマイシン (G418)、ピューロマイシン、ヒスチジノールD、ブレオマイシン、フレオマイシンおよびゼオシンに耐性を付与する遺伝子を含む。

【0029】

増幅可能選択マーカー遺伝子:

加えて、本発明記載の細胞は、場合により、増幅可能選択マーカー遺伝子の増幅をもたらす選択剤の存在下で培養される、1以上の遺伝子増幅段階にかけることもできる。

宿主細胞が、さらに、増幅可能選択マーカーをコードする遺伝子でトランスフェクトされることが必要条件である。増幅可能選択マーカーをコードする遺伝子が本発明記載の発現ベクターに存在するか、または他のベクターを用いて宿主細胞に挿入されることが考えられる。

増幅可能選択マーカー遺伝子は、通例、特定の培養条件下で真核細胞の増殖に必要な酵素をコードする。例えば、増幅可能選択マーカー遺伝子はジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) をコードすることができる。この場合は、それでトランスフェクトされた宿主細胞が、選択剤メトトレキセート (MTX) の存在下で培養される場合、この遺伝子は増幅される。

DHFRマーカーは、CHO-DG44またはCHO-DUKXなどのdhfr陰性基本細胞を用いるとき、選択およびそれに続く増幅に特に適している。なぜなら、これらの細胞は内因性DHFRを発現せず、従ってプリンを含まない培地では増殖しない。その結果としてDHFR遺伝子は、本明細書では主要な選択マーカーとして使用することができ、形質転換細胞はヒポキサンチン/チミジンを含まない培地で選択できる。

本発明に用いることができる他の増幅可能選択マーカー遺伝子は、例えば、グルタミン合成酵素、メタロチオネイン、アデノシンデアミナーゼ、AMPデアミナーゼ、UMP-シンターゼ、キサンチン-グアニン-ホスホリボシルトランスフェラーゼおよびチミジル酸合成酵素である。

【0030】

高生産性宿主細胞の遺伝子発現および選択:

用語“遺伝子発現”または“発現”は、宿主細胞における異種遺伝子配列の転写および/または翻訳に関する。発現速度は、一般に、宿主細胞内に存在する対応するmRNAの量または目的とする遺伝子によりコードされる製造される遺伝子産物の量のいずれかに基づいて測定できる。選択されたヌクレオチド配列の転写により製造されるmRNAの量は、例えば、細胞RNAのノーザンブロットハイブリダイゼーション、リボヌクレアーゼ・RNAプロテクション、in situハイブリダイゼーションにより、またはPCR法(例えば定量PCR)により測定できる。選択されたヌクレオチド配列によりコードされるタンパク質は、種々の方法、例えば、ELISA、プロテインA HPLC、ウェスタンブロット、ラジオイムノアッセイ、免疫沈降、タンパク質の生物活性の検出、タンパク質の免疫染色に続くFACS分析もしくは蛍光顕微鏡検査、FACS分析による蛍光タンパク質の直接検出または蛍光顕微鏡検査によっても測定できる。

【0031】

“力価または生産性の増加”は、適切な対照との比較における、例えば野生型タンパク質に対する変異タンパク質における、宿主細胞に挿入された異種配列、例えば治療用タンパク質をコードする遺伝子の発現、合成または分泌における増加を意味する。本発明記載の方法により本発明記載の細胞が培養され、この細胞が比生産性または力価の少なくとも10%の増加を示す場合、力価または生産性の増加が認められたとする。本発明記載の方法により本発明記載の細胞が培養され、この細胞が比生産性または力価の少なくとも20%または少なくとも50%または少なくとも75%の増加を示す場合もまた、力価または生産性の増加が認められたとする。本発明記載の方法により本発明記載の細胞が培養され、この細胞が比生産性または力価の少なくとも10~500%、好ましくは20~300%、特に好ましくは50~200%の増加を示す場合もまた、力価または生産性の特別の増加が認められたとする。

力価または生産性の増加は、本発明記載の発現ベクターの1つの使用ばかりでなく、本発明記載の方法の1つの使用によってもまた得ることができる。

【0032】

付随する方法を、さらなる選択マーカーとして1以上の蛍光タンパク質(例えばGFP)または細胞表面マーカーを含む組換え宿主細胞のFACSによる選択と組み合わせることができる。発現増加および異なる方法の組み合わせを得るための他の方法もまた使用でき、例えば、クロマチン構造を制御するシス作用性エレメント(例えばLCR、UCOE、EASE、アイソレーター、S/MAR、STARエレメント)の使用、(人工の)転写因子の使用、内因性または異種遺伝子発現のアップレギュレーションのための天然または合成の薬剤での細胞の処理、mRNAまたはタンパク質の安定性(半減期)の改善、mRNA翻訳開始の改善、エピソードプラスミドの使用による遺伝子量の増加(例えばSV40、ポリオーマ、アデノウイルス、EBVまたはBPVのウイルス配列の複製起点としての使用に基づく)、増幅促進配列またはDNAコンカテマーに基づくin vitro増幅系の使用に基づく。

10

【0033】

産生細胞が複製され、コードする目的とする遺伝子産物の製造に使用される本発明記載の方法もまた好ましい。このために、選択された高産生細胞を、好ましくは無血清培地で培養し、好ましくは目的とする遺伝子の発現を可能にする条件下で浮遊培養で培養する。目的とするタンパク質/産物は、好ましくは、分泌される遺伝子産物として細胞培養培地から得られる。しかしながら、タンパク質が分泌シグナルなしで発現される場合、細胞溶解物から遺伝子産物を単離することもできる。他の組換えタンパク質および宿主細胞タンパク質を実質的に含まない、純粋で均一な産物を得るためには、従来の精製方法が用いられる。まず第1に、細胞および細胞破片を培地または溶解物から取り除く。次に、例えばイムノアフィニティおよびイオン交換カラム、エタノール沈殿、逆相HPLCまたはSephadexクロマトグラフィー、シリカまたはDEAEなどの陽イオン交換樹脂による分画により、混在する可溶性タンパク質、ポリペプチドおよび核酸から所望の遺伝子産物を精製することができる。組換え宿主細胞により発現された異種タンパク質を精製する方法は当業者には公知であり、文献に記載されている。

20

【0034】

本発明の実施形態

本発明は、細胞の目的とするタンパク質の力価を増加させる方法であって、

30

- a. 目的とするタンパク質をコードする核酸配列において、少なくともC末端アミノ酸をコードするコドンに欠失させ、
 - b. a)からの改変核酸を含むベクターで細胞をトランスフェクトし、
 - c. 目的とするタンパク質の製造を可能にする条件下で細胞を培養すること
- を特徴とする前記方法に関する。

【0035】

特に、本発明は、細胞の抗体力価を増加させる方法であって、抗体の重鎖をコードする核酸配列において、少なくともC末端アミノ酸リジンをコードするコドンに欠失させ、改変核酸を含むベクターで細胞をトランスフェクトし、目的とする抗体の製造を可能にする条件下で細胞を培養することを特徴とする前記方法に関する。

40

本発明は、好ましくは、細胞の目的とするタンパク質の比生産性を増加させる方法であって、目的とするタンパク質をコードする核酸配列において、少なくともC末端アミノ酸をコードするコドンに欠失させ、改変核酸を含むベクターで細胞をトランスフェクトし、目的とするタンパク質の製造を可能にする条件下で細胞を培養することを特徴とする前記方法に関する。

【0036】

特に好ましい実施形態において、本発明は、細胞の抗体の比生産性を増加させる方法であって、抗体の重鎖をコードする核酸配列において、少なくともC末端アミノ酸リジンをコードするコドンに欠失させ、改変核酸を含む第1ベクターで細胞をトランスフェクトし、抗体軽鎖を含む第2ベクターで細胞を同時トランスフェクトし、抗体の製造を可能にす

50

る条件下で細胞を培養することを特徴とする前記方法に関する。

他の好ましい方法において、修飾重鎖および軽鎖またはヘテロ多量体タンパク質のサブユニットが、任意の所望の順序の連続トランスフェクションで組み込まれる。

他の好ましい実施形態において、本発明は、細胞の抗体または任意のヘテロ多量体目的タンパク質の比生産性を増加させる方法であって、抗体重鎖をコードする核酸配列において、少なくともC末端アミノ酸リジンをコードするコドンに欠失させ、抗体重鎖ばかりでなく抗体軽鎖の改変核酸も共に含むベクターで細胞をトランスフェクトし、抗体の製造を可能にする条件下で細胞を培養することを特徴とする前記方法に関する。本方法の好ましい実施形態において、細胞のトランスフェクションに用いるベクターはニシストロン性または複数シストロン性のベクターである。本方法の他の好ましい実施形態において、細胞のトランスフェクションに用いるベクターは、抗体重鎖および抗体軽鎖を異なる転写ユニットとして含むベクターである。

10

【0037】

驚くべきことに、例えば、IgG1分子は、C末端リジンが欠失しているにもかかわらずCHO細胞において発現および分泌され、その産物量は、IgG1野生型でトランスフェクトされた細胞の産物量に匹敵することを示すことができる(図2)。同様に、驚くべきことに、IgG1のリジン欠失バリエーションを発現する細胞は、IgG1野生型を発現する細胞よりも、平均して27%高い力価または32%高い比生産性さえも達成することが示された(図3)。リジン欠失バリエーションのこの製造上の利点は、100nM MTXの添加によりこれらの細胞プールにDHFRベースの遺伝子増幅を誘導するときにもなお存在する。力価および比生産性は、平均して86%または120%高い(図4)。

20

驚くべきことに、IgG4分子に関して同様な結果を示すこともできる。C末端リジン欠失にもかかわらず、CHO細胞において、IgG4分子はIgG4野生型よりもむしろより多く発現および分泌される(図5)。驚くべきことに、IgG4のリジン欠失バリエーションを発現する細胞は、IgG4野生型を発現する細胞よりも、平均して63%高い力価または70%高い比生産性さえも達成することが見出される(図6)。リジン欠失バリエーションのこの製造上の利点は、400nM MTXでの増幅段階後にも存在する。平均して53%高い力価および66%高い比生産性が得られる(図7)。

【0038】

本発明記載の方法の特別な実施形態において、力価および/または比生産性は、C末端アミノ酸が欠失していないタンパク質の対照値に基づいて、10~500%、好ましくは20~300%、特に好ましくは50~200%増加する。本発明記載の方法の他の特別な実施形態において、力価および/または比生産性は、C末端アミノ酸が欠失していないタンパク質の比較値に基づいて、少なくとも10%、好ましくは少なくとも20%、より好ましくは少なくとも50%、特に好ましくは少なくとも75%増加する。

30

本発明記載の方法の他の特別な実施形態において、比生産性は少なくとも5pg/細胞/日である。

本発明はまた、目的とするタンパク質の産生を増加させる発現ベクターを調製する方法であって、目的とするタンパク質をコードする核酸配列において、少なくともC末端アミノ酸をコードするコドンに欠失させ、このように修飾した核酸配列を発現ベクターに挿入することを特徴とする前記方法に関する。

40

本発明はまた、目的とするタンパク質の増加した力価および/または増加した比生産性を有する細胞を調製する方法であって、本発明記載の方法を用いて細胞を処理し、次に例えば希釈クローニングまたはFACSベース単一細胞分取により単一細胞クローニングを行うことを特徴とする前記方法に関する。

【0039】

本発明はまた、細胞において目的とするタンパク質を製造する方法であって、本発明記載の方法を用いて細胞群を処理し、少なくとも1つの選択圧力の存在下でこれらの細胞を選択し、場合により単一細胞クローニングを行い、細胞または培養上清から目的とするタンパク質を得ることを特徴とする前記方法に関する。

50

少なくとも1つの目的とするタンパク質を製造するための本発明記載の方法の特定の実施形態において、選択剤を用いる選択ステップ後に、製造に用いる細胞を遺伝子増幅段階にさらにかけることを特徴とする。

本発明記載のすべての方法の特定の実施形態は、C末端アミノ酸リジン(Lys)またはアルギニン(Arg)であり、好ましくはLysであることを特徴とする。

本発明記載のすべての方法の他の特定の実施形態は、目的とするタンパク質が抗体、Fc融合タンパク質、EPOまたはtPAであることを特徴とする。

【0040】

本発明記載のすべての方法の好ましい実施形態は、目的とするタンパク質が抗体の重鎖であり、C末端アミノ酸がリジン(Lys)であることを特徴とする。

本発明記載のすべての方法の特定の実施形態は、抗体の重鎖がIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4型に属し、好ましくはIgG1、IgG4またはIgG2型に属することを特徴とする。

本発明記載のすべての方法の特定の実施形態は、目的とするタンパク質が、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、哺乳動物抗体、マウス抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、霊長類抗体またはヒト抗体または免疫グロブリン抗体の重鎖またはFab、F(ab')₂、Fc、Fc-Fc融合タンパク質、Fv、一本鎖Fv、単ドメインFv、四価一本鎖Fv、ジスルフィド結合したFv、ドメイン欠失抗体、ミニボディ、ダイアボディの抗体フラグメントもしくは誘導体または前記のフラグメントの1つと他のペプチドもしくはポリペプチドとの融合ポリペプチドまたはFc-ペプチド融合タンパク質であるFc-毒素融合タンパク質もしくは足場タンパク質であることを特徴とする。

本発明記載のすべての方法の他の特定の実施形態は、細胞を懸濁培養で培養することを特徴とする。本発明記載のすべての方法の特別な実施形態は、細胞を無血清条件下で培養することを特徴とする。本発明記載のすべての方法の他の特別な実施形態は、化学的に定義された培地中で細胞を培養することを特徴とする。本発明記載のすべての方法の好ましい実施形態は、タンパク質を含まない培地中で細胞を培養することを特徴とする。

本発明記載のすべての方法の好ましい実施形態は、細胞が真核細胞であり、例えば酵母、植物、虫、昆虫、鳥、魚、爬虫類または哺乳動物由来の細胞であることを特徴とする。本発明記載のすべての方法の他の好ましい実施形態は、細胞が哺乳動物細胞であることを特徴とする。本発明記載のすべての方法の特に好ましい実施形態は、細胞がCHO細胞であることを特徴とする。本発明記載の方法の他の特定の実施形態は、CHO細胞が群:CHO野生型、CHO K1、CHO DG44、CHO DUKX-B11およびCHO per-5から選択されることを特徴とする。特に好ましくは、CHO細胞はCHO DG44細胞である。

【0041】

本発明はまた、本発明記載の方法の1つにより調製できる、目的とする遺伝子の発現を増加させる発現ベクターにも関する。

本発明はまた、本発明記載の方法の1つにより調製できる細胞にも関する。

本発明はまた、目的とするタンパク質を製造し精製する方法であって、対応する目的とする遺伝子の少なくとも1つのC末端アミノ酸を欠失させ、欠失を含まない野生型タンパク質と比較して得られた目的とするタンパク質の不均一性が低下していることを特徴とする前記方法にも関する。

本発明記載の方法の特別な実施形態は、C末端アミノ酸がリジン(Lys)またはアルギニン(Arg)であり、好ましくはLysであることを特徴とする。

本発明記載の方法の他の特別な実施形態は、目的とするタンパク質が抗体、Fc融合タンパク質、EPOまたはtPAであることを特徴とする。

本発明記載の方法の好ましい実施形態は、目的とするタンパク質が抗体の重鎖であり、C末端アミノ酸がリジン(Lys)であることを特徴とする。

本発明記載の方法の他の好ましい実施形態は、抗体の重鎖がIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4型に属し、好ましくはIgG1、IgG2またはIgG4型に属することを特徴とする。

【0042】

本発明記載の方法の特別な実施形態は、製造のために、懸濁培養で細胞を培養すること

を特徴とする。本発明記載の方法の他の特別な実施形態は、製造のために、無血清条件下で細胞を培養することを特徴とする。本発明記載のすべての方法の他の特別な実施形態は、化学的に定義された培地中で細胞を培養することを特徴とする。本発明記載のすべての方法の好ましい実施形態は、タンパク質を含まない培地中で細胞を培養することを特徴とする。

本発明記載の方法の好ましい実施形態は、細胞が哺乳動物細胞であることを特徴とする。

本発明記載の方法の他の好ましい実施形態は、細胞がCHO細胞であり、好ましくはCHO D G44細胞であることを特徴とする。

本発明記載の方法の特に好ましい実施形態は、目的とするタンパク質の精製中に、欠失を含まない野生型タンパク質の精製と比較して低い塩濃度が用いられることを特徴とする。

本発明はまた、抗体を製造する方法であって、抗体重鎖をコードする核酸において、少なくともC末端アミノ酸リジンをコードするコドンに欠失させ、このように修飾した核酸を含むベクターで細胞をトランスフェクトし、抗体の発現を可能にする条件下で細胞を培養することを特徴とする前記方法にも関する。

【 0 0 4 3 】

以下に、限定するものではない実施形態を例として、本発明をさらに詳細に説明する。
略語

AP: アルカリホスファターゼ

Asp(=D): アスパラギン酸

bp: 塩基対

CHO: チャイニーズハムスター卵巣

CpB: カルボキシペプチダーゼB

DHFR: ジヒドロ葉酸還元酵素

ELISA: 酵素免疫抗体法

HT: ヒポキサンチン/チミジン

IgG: 免疫グロブリンG

Ile(=I): イソロイシン

kb: キロベース

Lys: リジン

mAk: モノクローナル抗体

MTX: メトトレキサート

MW: 平均値

NPT: ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ

PCR: ポリメラーゼ連鎖反応

phe(=F): フェニルアラニン

SEAP: 分泌型アルカリホスファターゼ

WT: 野生型

【 0 0 4 4 】

方法

細胞培養およびトランスフェクション

細胞培養フラスコ中、湿った雰囲気および5%CO₂下37℃で、ヒポキサンチンおよびチミジン(HT)(Invitrogen GmbH社、ドイツ・カールスルーエ)を加えた無血清CHO-S-SFMII培地中で懸濁細胞として細胞CHO-DG44/dhfr^{-/-}を永続培養する。Cedex(Innovatis社)を用いて細胞数および生存率を測定し、次にこの細胞を1~3x10⁵/mLの濃度で播種し、2~3日毎に継代培養する。

CHO-DG44のトランスフェクションのために、リポフェクタミンプラス試薬(Invitrogen社)を用いる。各トランスフェクションパッチのために、製造業者による使用説明書に従って、全部でプラスミドDNA 1.0~1.1 μg、リポフェクタミン4 μLおよびプラス試薬(Plus

10

20

30

40

50

Reagent)を混合し、その200 μ L量を、 6×10^5 細胞を含むHT添加CHO-S-SFMII培地0.8mlに添加する。細胞インキュベーターにおいて37℃で3時間インキュベーションを行った後、HT添加CHO-S-SFMII培地2mLを加える。48時間の培養期間後に、トランスフェクション混合物を採取するか(一過性トランスフェクション)または選択にかける。1つの発現ベクターがDHFR選択マーカを含み、もう1つの発現ベクターがNPT選択マーカを含むので、トランスフェクション2日後に、DHFRおよびNPTベース選択のために、ヒポキサンチンおよびチミジンを添加してないCHO-S-SFMII培地に同時トランスフェクトされた細胞を移し、この培地に400 μ g/mLの濃度でG418(Invitrogen社)も加える。

HT無添加CHO-S-SFMII培地に5~2000nMの濃度で選択剤MTX(Sigma社、ドイツ・ダイゼンホーフェン)を添加することにより、組み込まれた異種遺伝子のDHFRベース遺伝子増幅を行う。

【0045】

発現ベクター

発現分析のために、pAD-CMVベクターをベースとし、CMVエンハンサー/ハムスターユビキチン/S27aプロモーター(WO97/15664)またはCMVエンハンサー/CMVプロモーターの組み合わせにより、異種遺伝子の発現を媒介する真核発現ベクターを用いる。ベースベクターpBIDが増幅可能選択マーカとしてdhfrミニ遺伝子を含むのに対して、ベクターpBINにおいては、dhfrミニ遺伝子はNPT遺伝子により置換されている。このために、SV40初期プロモーターおよびTKポリアデニル化シグナルを含むNPT選択マーカを、市販プラスミドpBK-CMV(Stratagene社、米国カリフォルニア州ラホヤ)から1640bp Bsu36Iフラグメントとして単離した。Klenow DNAポリメラーゼでこのフラグメントの末端を平滑化した後、Klenow DNAポリメラーゼで同様に処理したベクターpBIDの3750bp Bsu36I/StuIフラグメントとこのフラグメントとを連結した。両ベクターにおいて、異種遺伝子の発現は、CMVエンハンサー/ハムスターユビキチン/S27aプロモーターの組み合わせにより調節される。

ベクターpBIN8aは、ベクターpBINの誘導体であり、修飾NPT遺伝子を含む。これはNPTバリエーションF240I(Phe240Ile)であり、そのクローニングはWO2004/050884に記載されている。このベクターにおいて、またベクターpBIDの誘導体であるベクターpBIDaにおいても、異種遺伝子の発現はCMVエンハンサー/プロモーターの組み合わせの調節下にある。

【0046】

ELISA(酵素免疫抗体法)

安定的にトランスフェクトされたCHO-DG44細胞の上清における発現された抗体(IgG1、IgG2またはIgG4)の定量は、1つにはヤギ抗ヒトIgG Fcフラグメント(Dianova社、ドイツ・ハンプルク)を用い、もう1つにはAP標識ヤギ抗ヒト軽鎖()抗体(Sigma社)を用いる標準的方法によるELISAを用いて行う。用いられる標準品は、いずれの場合にも、発現された抗体と同じアイソタイプの精製抗体である。

生産性(pg/細胞/日)は、式 $pg/((Ct-Co)t/\ln(Ct-Co))$ (式中、CoおよびCtは播種時または採取時の細胞数を示し、tは培養期間を示す)を用いて算出される。

【0047】

SEAPアッセイ

一過性にトランスフェクトされたCHO-DG44細胞からの培養上清におけるSEAP力価は、製造業者の使用説明書(Roche Diagnostics GmbH社、ドイツ・マンハイム)に従い、SEAPレポータージーンアッセイを用いて定量する。

【実施例1】

【0048】

C末端リジン欠失を有するIgG1のクローニングおよび発現

モノクローナルヒト化F19抗体重鎖(IgG1/)を、プラスミドpG1D105F19HC(NAGENESEQ:AAZ32786)から1.5kb NaeI/HindIIIフラグメントとして単離し、ベクターpBIDにクローニングし、EcoRI(Klenow-DNAポリメラーゼで平滑化)およびHindIIIで消化し、ベクターpBID/F19HCを調製する(図1)。他方では、プラスミドpKN100F19LC(NAGENESEQ:AAZ32784)から1.3kb HindIII/EcoRIフラグメントとして軽鎖を単離し、ベクターpBINの対応する切断部位に

10

20

30

40

50

クローニングし、このようにしてベクターpBIN/F19LCを調製する(図1)。

F19の重鎖におけるC末端リジンの欠失は、C末端領域における重鎖の最終アミノ酸をコードする遺伝子配列に対する相補配列を有する変異導入プライマーF19HC-Lys rev gacgtc taga tcaaccgga gacagggaga ggc(配列番号1)を用いるPCRにより行う。確かに、C末端リジンのコドンは終止コドンにより置換されている。加えて、これは次に、後のクローニングに用いられるXbaI制限酵素切断部位に続いている。この変異導入プライマーは、重鎖の定常領域のさらに上流に位置する他の配列と相補性を有するプライマーF19heavy4atctgca acg tgaatcacaa gc(配列番号2)と共に用いられる。ベクターpBID/F19 HCはPCR変異導入の鑄型として役立つ。得られた757bpのPCR産物をBmgBI(プライマー位置F19heavy4の下流にある内因性切断部位)およびXbaIで消化し、この547bp制限フラグメントをベクターpBID/F19HCにおける対応する配列領域を置換するために用いる。これにより、C末端アミノ酸リジンが欠失したF19抗体の重鎖をコードするベクターpBID/IgG1-Lysが得られる(図1)。

【0049】

まず第1に、すべてのIgG亜型において高度に保存されたアミノ酸であるC末端リジンを欠失させることが、IgG1分子の発現または分泌に本質的な意義を有するかどうかを見出すために、CHO-DG44細胞の一過性トランスフェクションによるチェックを行う。以下のプラスミドの組み合わせを用いて同時トランスフェクションを行う：

- a) 対照プラスミドpBID/F19HCおよびpBIN/F19LC。これらのプラスミドは野生型構造、すなわち重鎖におけるC末端リジンを含む構造のモノクローナル抗体F19をコードする。
- b) pBID/IgG1-LysおよびpBIN/F19LC。これらのプラスミドは重鎖がC末端リジン欠失を含むF19抗体をコードする。

組み合わせごとに10プールをトランスフェクトし、それぞれの同時トランスフェクションには等モル量の2つのプラスミドを用いる。全量3mLで48時間培養した後、採取し、ELISAにより細胞培養上清におけるIgG1力価の測定を行う。SEAP発現プラスミドでの同時トランスフェクション(いずれの場合にも、トランスフェクション混合物に対してプラスミドDNA100ngを添加する)およびそれに続くSEAP活性の測定によりトランスフェクション効率の差異を補正する。

【0050】

驚くべきことに、C末端リジンが欠失しているにもかかわらずCHO細胞においてIgG1分子が発現および分泌され、そのその産物量は、IgG1野生型でトランスフェクトされた細胞の産物量に匹敵することを示すことができる(図2)。

CHO-DG44細胞の安定なトランスフェクションのために、前述と同じプラスミドの組み合わせを用いて同時トランスフェクションを行い、各組み合わせについて10プールを作成する。陰性対照として、2つの偽トランスフェクトされたプール、すなわち、トランスフェクション混合物にDNAを加えずに同様に処理したプールもまた作成する。トランスフェクション2日後に、HT無添加培地において400 μ g/mLのG418を添加して、安定的にトランスフェクトされた細胞の選択を行う。選択を行った後に細胞プールのIgG1力価および比生産性を3~4継代(継代間隔2-2-3日間)にわたって測定する。驚くべきことに、IgG1のリジン欠失バリエーションを発現する細胞は、IgG1野生型を発現する細胞よりも平均して27%高い力価または32%高い比生産性さえも達成することが見出される(図3)。リジン欠失バリエーションのこの製造上の利点は、100nM MTXの添加によりこれらの細胞プールにDHFRベースの遺伝子増幅を誘導するときにもなお得られる。力価および比生産性は、それぞれ平均して86%および120%高い(図4)。

【実施例2】

【0051】

C末端リジン欠失を有するIgG4のクローニングおよび発現

モノクローナルヒト化IgG4抗体(IgG4/)を発現するために、重鎖を2.2kb BamHI/SmaIフラグメントにプラスミドpBIDaにクローニングし、EcoRI(Klenow-DNAポリメラーゼによる処理により平滑化される切断部位)およびBamHIで消化し、プラスミドpBIDa/IgG4 HCを得る(図1)。他方では、軽鎖はプラスミドpBINaのBamHI/EcoRI切断部位に1.1kb BamHI/EcoR

Iフラグメントとしてクローニングされ、それによりプラスミドpBIN8a/IgG4 LCが調製される(図1))。

IgG4抗体の重鎖におけるC末端リジンの欠失は、C末端領域における重鎖の最終アミノ酸をコードする配列に相補的な配列を有する変異導入プライマーIgG4HC-Lys rev gacgtctag a tcaacccaga gacaggga ggct(配列番号3)を用いるPCRにより行う。しかしながら、C末端リジンのコドンは終止コドンにより置換されている。加えて、これは後のクローニングに用いられるXbaI制限酵素切断部位に続いている。この変異導入プライマーは、重鎖の定常領域のさらに上流に位置する配列と相補性を有するプライマーHC for8cccctgacct aagccaccc(配列番号4)と共に用いられる。ベクターpBIDa/IgG4 HCはPCR変異導入の鋳型として役立つ。得られた1013bpのPCR産物をBmgBI(プライマー位置HC for8の下流にある内因性切断部位)およびXbaIで消化し、この644bp制限フラグメントをベクターpBIDa/IgG4 HCにおける対応する配列領域を置換するために用いる。これにより、C末端アミノ酸リジンが欠失したF19抗体の重鎖をコードするベクターpBIDa/IgG4-Lysが得られる(図1)。

【0052】

まず第1に、すべてのIgG重型において高度に保存されたアミノ酸であるC末端リジンを欠失させることが、この分子の発現または分泌に本質的な意義を有するかどうかを見出すために、CHO-DG44細胞の一過性トランスフェクションによるチェックを行う。以下のプラスミドの組み合わせを用いて同時トランスフェクションを行う：

- a) 対照プラスミドpBIDa/IgG4HCおよびpBIN8a/IgG4LC。これらのプラスミドは野生型構造、すなわち重鎖におけるC末端リジンを含む構造のモノクローナルIgG4抗体をコードする。
- b) pBIDa/IgG4-LysおよびpBIN8a/IgG4 LC。これらのプラスミドは重鎖がC末端リジン欠失を含むモノクローナルIgG4抗体をコードする。

組み合わせごとに10プールをトランスフェクトし、それぞれの同時トランスフェクションには等モル量の2つのプラスミドを用いる。全量3mLで48時間培養した後、採取し、ELISAにより細胞培養上清におけるIgG4力価の測定を行う。SEAP発現プラスミドでの同時トランスフェクション(いずれの場合にも、トランスフェクション混合物に対してプラスミドDNA100ngを添加する)およびそれに続くSEAP活性の測定によりトランスフェクション効率の差異を補正する。

驚くべきことに、C末端リジン欠失にもかかわらず、CHO細胞において、IgG4分子はIgG4野生型よりもむしろより多く発現および分泌されることを示すことができる(図5)。

【0053】

CHO-DG44細胞の安定なトランスフェクションのために、前述と同じプラスミドの組み合わせを用いて同時トランスフェクションを行い、各組み合わせについて10プールを作成する。陰性対照として、2つの偽トランスフェクトされたプール、すなわち、トランスフェクション混合物にDNAを加えずに同様に処理したプールもまた作成する。トランスフェクション2日後に、HT無添加培地において400 µg/mLのG418を添加して、安定的にトランスフェクトされた細胞の選択を行う。選択を行った後、100nMのMTXに添加によりDHFRベース遺伝子増幅を誘導する。細胞プールのIgG4力価および比生産性を3~4継代(継代間隔2-2-3日間)にわたって測定する。全部で、IgG4野生型でトランスフェクトされた細胞から、選択および増幅後に、4つの安定的に発現する細胞プールが得られ、リジン欠失バリエーションでトランスフェクトされた細胞から6つの安定的に発現する細胞プールが得られる。驚くべきことに、IgG4のリジン欠失バリエーションを発現する細胞は、IgG4野生型を発現する細胞よりも平均して63%高い力価または70%高い比生産性さえも達成することが見出される(図6)。リジン欠失バリエーションのこの製造上の利点は、それに続く400nM MTXでの増幅段階においてもなお得られる。平均して53%高い力価および66%高い比生産性が得られる(図7)。

【実施例3】

【0054】

C末端アミノ酸欠失を有するIgG2、IgG3、Fc融合タンパク質および他の生体分子のクローニングおよび発現

10

20

30

40

50

アイソタイプ1および4に関して実施例1および2において前述したように、抗体アイソタイプIgG2およびIgG3の重鎖におけるC末端リジンを欠失させるためにPCR変異導入を用いる。同様に、サイトカイン、可溶性受容体などの生体分子がFc融合タンパク質の成分である(例:アレファセプト、LFA-3-Fc、エタネルセプト TNFR-Fc)Fc融合タンパク質(二価または2重特異性)についてもC末端リジン欠失を行う。

【0055】

C末端アルギニンのタンパク質切断が公知である生体分子、例えばエリスロポエチン(EP0)および組織プラスミノゲンアクチベーター(tPA)にC末端アミノ酸のコドン欠失の概念を広げることが考えられる(M.A. Recny, H.A. Scoble and Y. Kim, J. Biol. Chem., 262 (1987) 17156-17163; Harris, R.J. (1995) Journal of Chromatography A, 705 (1), p. 129-134)。必要条件は、生物活性が維持されるか、またはtPAの場合のように、例えばタンパク質分解プロセッシングが損なわれないままでいることである。一過性トランスフェクションにおいて、まず第1に、C末端アミノ酸の欠失が発現および分泌に影響を与えるかどうかを見出すために試験が行われる。次に安定なトランスフェクションを行い、変異タンパク質または野生型タンパク質を発現する細胞プールの異的生産性および力価を互いに比較する。

【実施例4】

【0056】

IgG1 WTおよびIgG1-LYSの精製

後処理はアイソタイプIgG1またはWTおよびリジン欠失バリエーションと同じである。製造業者の使用説明書に従ってプロテインAアフィニティークロマトグラフィー(MabSelect、ドイツ)を行う。

プロテインA HPLCを用いて、プロテインAクロマトグラフィー後の産物収率の定量を行う。リジンコドン欠失とは無関係にアイソタイプIgG1の両バリエーションの収率は90%以上である(図8)。リジン欠失はアフィニティークロマトグラフィーまたは産物収率に悪影響を及ぼさない。C末端リジンに関する産物不均一性は、定性的には等電点電気泳動(IEF)で測定され、弱陽イオン交換(WCX)によって定量的にも定量される(図9および11参照)。C末端リジンによって引き起こされる電荷不均一性をIEFを用いて定性的に測定するために、抗体をカルボキシペプチダーゼBと共にインキュベートする。37℃において、カルボキシペプチダーゼB 10 µg/100 µLを抗体濃度1mg/mLで2時間インキュベートする。図9において、カルボキシペプチダーゼB(CpB)での酵素的切断後に、WT抗体(IgG1)のバンド数の減少が見られる。

【0057】

流速1mL/min、濃度勾配5~10%で40分間かけて(緩衝液A 20mM MES緩衝液 pH6.7; 緩衝液B: 20mM、1M NaCl pH6.7) 陽イオン交換クロマトグラフィー(ProPac WCX-10/4x250mm)を行う。いずれの場合にも、抗体40 µgをカラムに負荷する。CpB酵素処理の有り無しで、WTおよび-Lysバリエーションをそれぞれ分析する。

IgG1 WTの溶離プロファイルまたはオーバーレイにおいて、Lys1およびLys2の状態は塩基性ピーク1および2で示される。産物の割合は~10%である。リジン欠失を有するバリエーションの溶離プロファイルまたはオーバーレイは、塩基性領域においてほとんど不均一性を示さない。産物の割合は1%未満である(図11)。

【実施例5】

【0058】

IgG4 WTおよびIgG4-Lysの精製

アイソタイプIgG4またはWTおよびリジン欠失バリエーションに関して、後処理はIgG1と同一である。製造業者の使用説明書に従ってプロテインAアフィニティークロマトグラフィー(MabSelect、ドイツ)を行う。

プロテインA HPLCを用いて、プロテインAクロマトグラフィー後の産物収率の定量を行う。リジンコドン欠失とは無関係にアイソタイプIgG4の両バリエーションの収率は同様に90%以上である(図8)。アイソタイプIgG4およびそのリジンコドン欠失に関しては、IgG1にお

けると同様に、アフィニティークロマトグラフィーまたは産物収率に悪影響を及ぼさないことが確認される。C末端リジンに関する産物不均一性はLC-MSにより定量的に測定される(図10および12参照)。C末端リジン分布を測定するために、最初に抗体試料をDTTで還元する。次に還元された軽鎖と還元された重鎖(Lysを有さないHC1-446またはLysを有するHC1-447)をHPSECで分離し、続いて(インライン)ESI-TOF-MSで分析する。C末端リジンの分布はHC 1-446またはHC 1-447のピーク面積に基づく。重鎖の質量スペクトログラムは、グリコシル化機能としてリジンにより引き起こされる質量シフトを示す(G0、G1、G2)(図12)。重鎖においてC末端リジンを有する(Lys1およびLys2)ことが測定される抗体分子(IgG4 WT)の産物割合はおおよそ20%である(図10)。

【実施例6】

【0059】

熱安定性

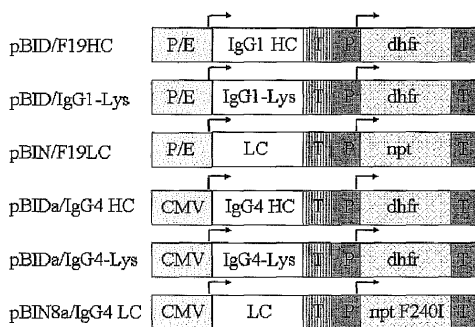
内因性蛍光(トリプトファン)を用いる熱安定性の測定は、C末端リジンの部分に影響を示さない(IgG1 WTおよび-Lys Tm 69 ;またはIgG4 WTおよび-Lys 64)。励起波長は295nmである。25 ~ 85 の範囲で、1 の増分で特定の発光スペクトルを測定する。300nm~450nmの波長範囲で発光スペクトルを記録する。他の技術データ:蛍光スペクトロメータ LS 55Perkin Elmer、スリット幅4nm励起側と発光側試料の温度測定/PT100。

PBS緩衝液中のタンパク質濃度は0.1mg/mLであった。抗体重鎖のC末端リジンは、抗体分子の熱安定性に影響を及ぼさないことを研究は示している。

抗体重鎖のC末端リジンは抗体分子の熱安定性に影響を及ぼさないことは、以前の研究により既に示されている(Liu et al. Immunol. Lett. 2006, 106 (2), 144-153)。

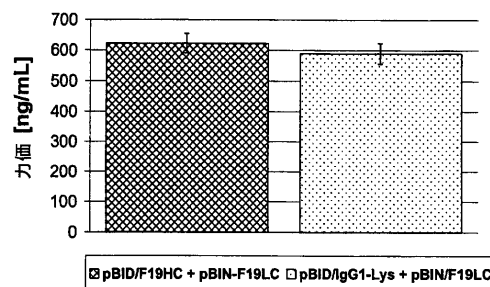
【図1】

ABBILDUNG 1



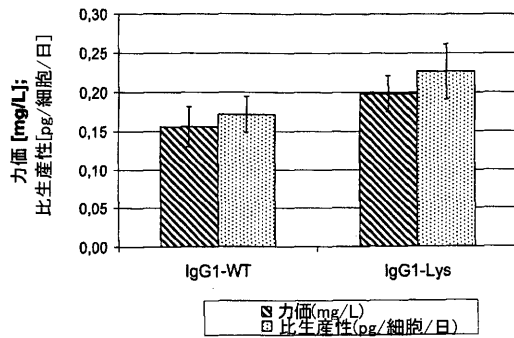
【図2】

FIGURE 2



【 図 3 】

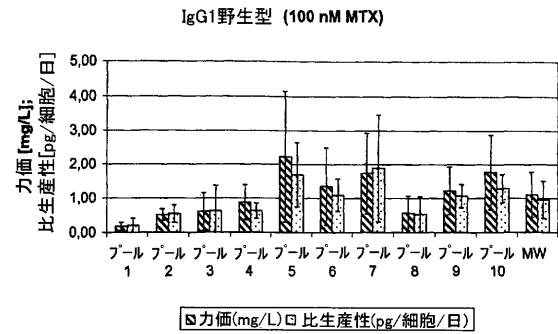
FIGURE 3



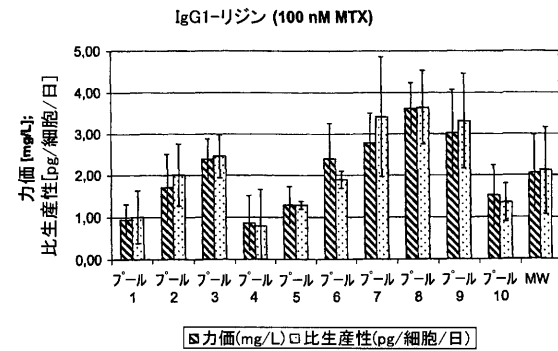
【 図 4 】

FIGURE 4

A)

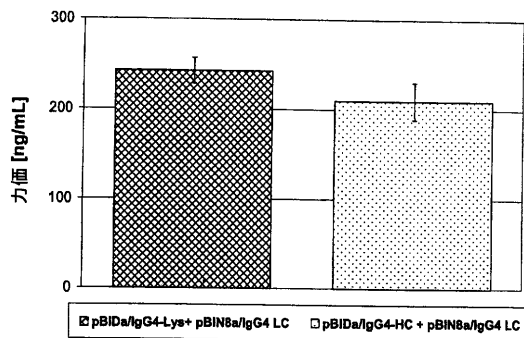


B)



【 図 5 】

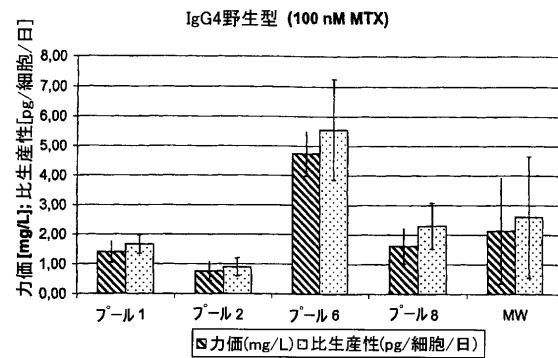
FIGURE 5



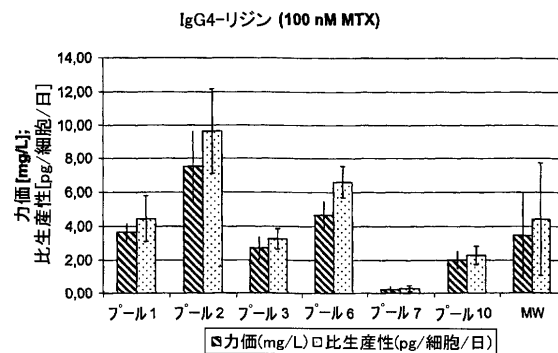
【 図 6 】

FIGURE 6

A)

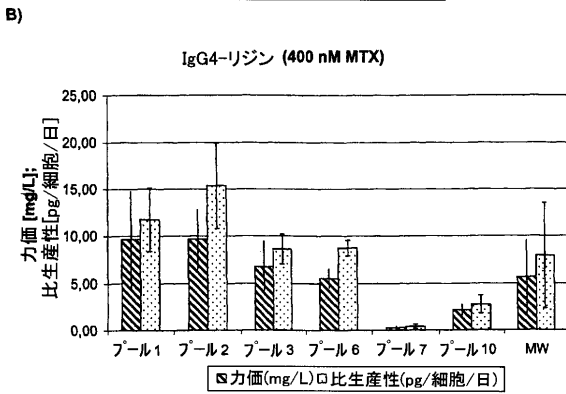
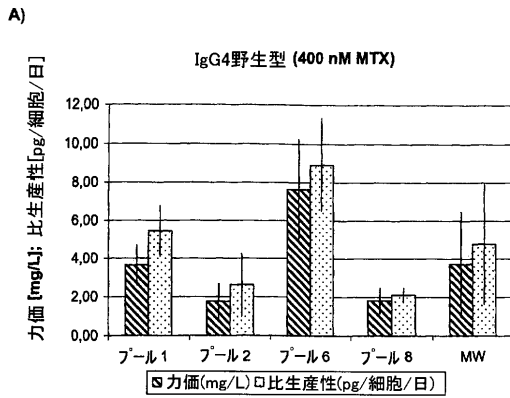


B)



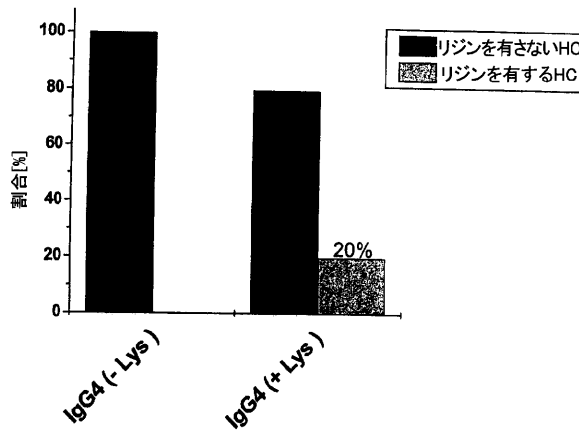
【 図 7 】

FIGURE 7



【 図 1 0 】

FIGURE 10



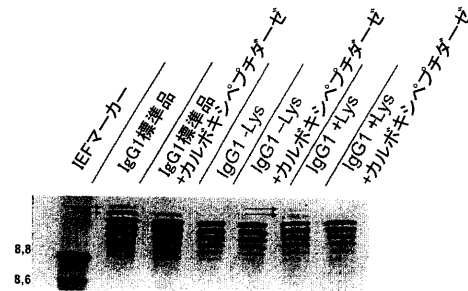
【 図 8 】

FIGURE 8

アイソタイプ	収率 [%]	アイソタイプ	モノマーの割合 [%]
IgG1 +Lys	90,8	IgG1 +Lys	94,59
IgG1 -Lys	93,2	IgG1 -Lys	97,93
IgG4 +Lys	91,9	IgG4 +Lys	91,03
IgG4 -Lys	90,2	IgG4 -Lys	89,23

【 図 9 】

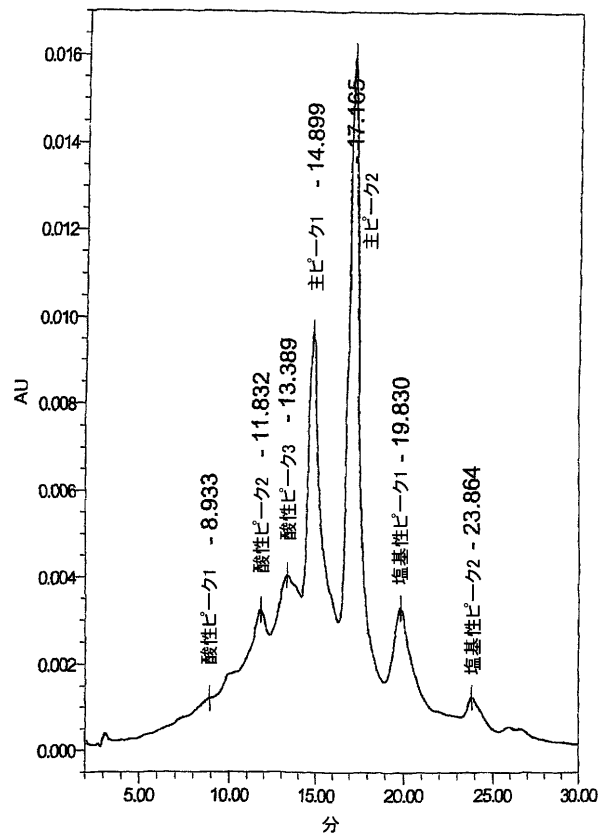
FIGURE 9



【 図 1 1 A 】

FIGURE 11

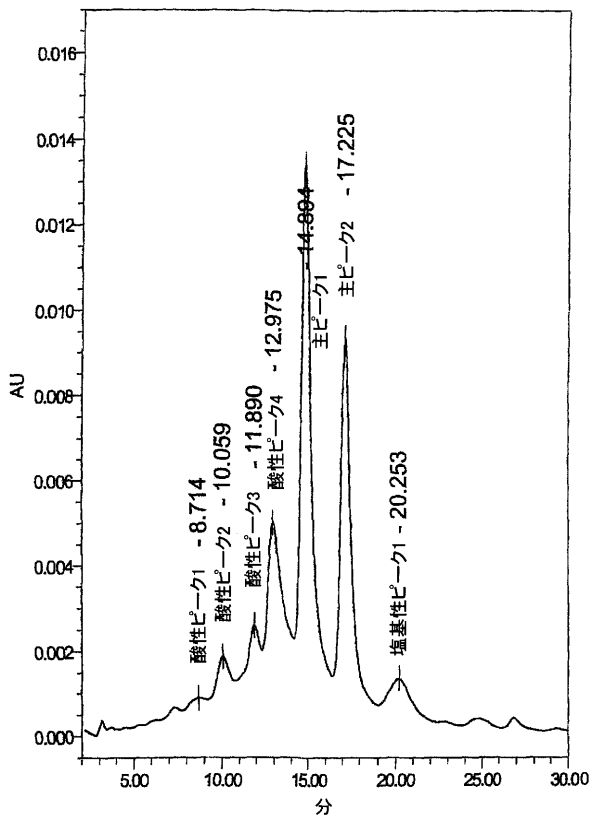
A) IgG1 wt



【図 1 1 B】

FIGURE 11

B) IgG1-Lys



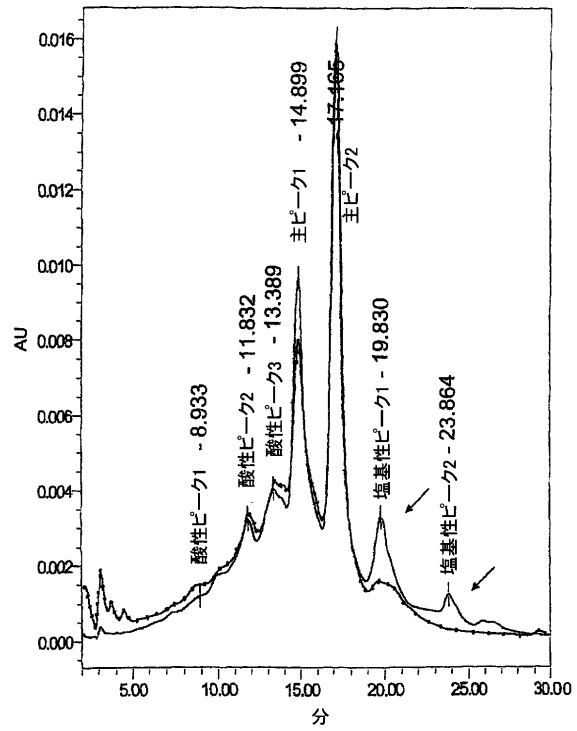
【図 1 1 C】

FIGURE 11

C) IgG1 wt

CpB処理なし(上部の線) —

CpB処理(下部の線) ⇄



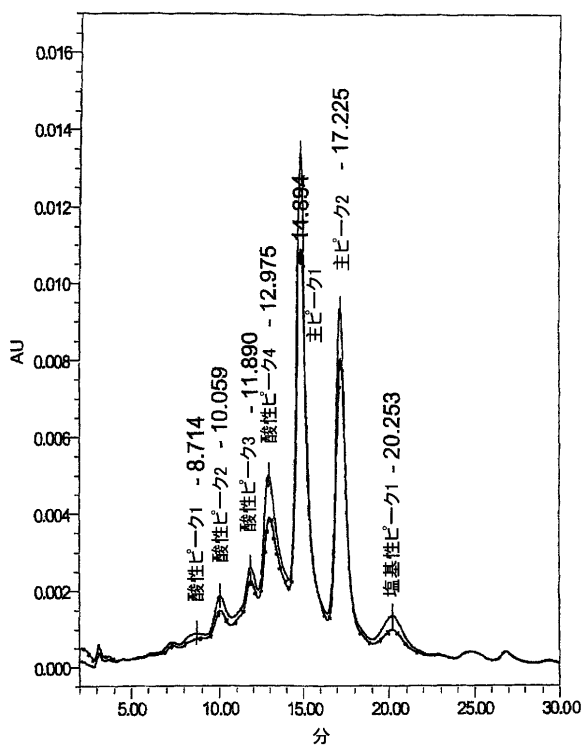
【図 1 1 D】

FIGURE 11

D) IgG1-Lys

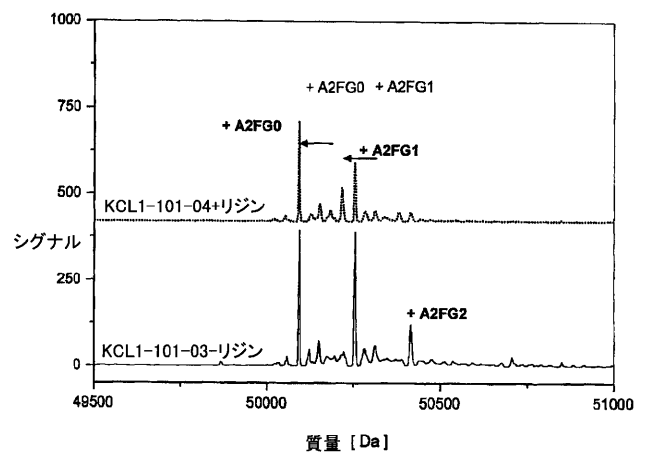
CpB処理なし(上部の線) —

CpB処理(下部の線) ⇄



【図 1 2】

ABBILDUNG 12



【配列表】

2010536396000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2008/061310

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N15/13 C12N15/85 C07K16/00 C07K14/505 C12N9/72		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PARKER E M ET AL: "Truncation of the extended carboxyl-terminal domain increases the expression and regulatory activity of the avian beta-adrenergic receptor." THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 25 MAY 1991, vol. 266, no. 15, 25 May 1991 (1991-05-25), pages 9987-9996, XP002471092 ISSN: 0021-9258 figure 1 table 1 page 9989 ----- -/--	1-7, 13-16, 18,19
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
29 Oktober 2008		14/01/2009
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Bumb, Peter

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2008/061310

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TAKAI T ET AL: "Expression of humanized Fab fragments that recognize the IgE-binding domain of human Fc(epsilon)RIalpha in COS and CHO cells." JOURNAL OF BIOCHEMISTRY JAN 2001, vol. 129, no. 1, January 2001 (2001-01), pages 5-12, XP002471093 ISSN: 0021-924X page 6 page 8 - page 10 figure 5	1-19
A	US 2004/081651 A1 (KARPUSAS MICHAEL [US] ET AL) 29 April 2004 (2004-04-29) paragraph [0291]	
A	LUND J ET AL: "Expression and characterization of truncated forms of humanized L243 IgG1. Architectural features can influence synthesis of its oligosaccharide chains and affect superoxide production triggered through human Fcgamma receptor I" EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, BERLIN, DE, vol. 267, no. 24, December 2000 (2000-12), pages 7246-7257, XP003002553 ISSN: 0014-2956 figures 1,4 page 7251, left-hand column	1-19
A	LAPPIN T R J ET AL: "STRUCTURE-FUNCTION RELATIONSHIPS OF THE ERYTHROPOIETIN MOLECULE" ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES, NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES, NEW YORK, NY, US, vol. 718, 26 April 1993 (1993-04-26), pages 191-202, XP001095413 ISSN: 0077-8923 table 2 page 195	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2008/061310

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
see annex

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2008/061310

The International Searching Authority has found that the international application contains multiple (groups of) inventions, as follows:

1. Claims 1-9, 13-19 (all in part); 10-12 (in full)

Method for increasing the titer or the specific production of an antibody or Fc fusion protein of interest, or an antibody fragment or antibody derivative, characterized in that at least the codon of the C-terminal lysine is deleted in the nucleic acid sequence coding therefor.

2. Claims 1-9, 13-19 (all in part)

Method for increasing the titer or the specific production of an EPO protein, characterized in that at least the codon of the C-terminal arginine is deleted in the nucleic acid sequence coding therefor.

3. Claims 20-22, 25 (all in part); 23-24 (in full)

Method for reducing the heterogeneity of an antibody or Fc fusion protein of interest, or an antibody fragment or antibody derivative, characterized in that at least the codon of the C-terminal lysine is deleted in the nucleic acid sequence coding therefor.

4. Claims 20-22, 25 (all in part)

Method for increasing the heterogeneity of an EPO protein, characterized in that at least the C-terminal codon is deleted in the nucleic acid sequence coding therefor.

5. Claims 1-9, 13-22, 25 (all in part)

Method for increasing the titer, the specific production or for reducing the heterogeneity of a tPA protein, characterized in that at least the C-terminal codon is deleted in the nucleic acid sequence coding therefor.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2008/061310

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2004081651 A1	29-04-2004	AU 2002258778 A2	28-10-2002
		BG 108340 A	29-10-2004
		BR 0209792 A	26-04-2005
		CA 2443903 A1	24-10-2002
		CN 1561345 A	05-01-2005
		CZ 20033039 A3	17-03-2004
		EE 200300509 A	16-08-2004
		EP 1423431 A2	02-06-2004
		HU 0402250 A2	28-01-2005
		IS 6982 A	08-10-2003
		JP 2004536580 T	09-12-2004
		MX PA03009390 A	29-01-2004
		NO 20034554 A	15-12-2003
		NZ 529494 A	26-08-2005
		PL 367324 A1	21-02-2005
		SK 13742003 A3	07-07-2004
		WO 02083854 A2	24-10-2002
		YU 80903 A	25-05-2006

INTERNATIONALER RESEARCHBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2008/061310

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES INV. C12N15/13 C12N15/85 C07K16/00 C07K14/505 C12N9/72		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
B. RESEARCHIERTE GEBIETE Researchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) C12N C07K		
Researchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die researchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwandte Suchbegriffe) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	PARKER E M ET AL: "Truncation of the extended carboxyl-terminal domain increases the expression and regulatory activity of the avian beta-adrenergic receptor." THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 25 MAY 1991, Bd. 266, Nr. 15, 25. Mai 1991 (1991-05-25), Seiten 9987-9996, XP002471092 ISSN: 0021-9258 Abbildung 1 Tabelle 1 Seite 9989 ----- -/-	1-7, 13-16, 18,19
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist *E* Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Researchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist *Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 29. Oktober 2008		Absenddatum des internationalen Researchenberichts 14/01/2009
Name und Postanschrift der internationalen Researchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Beauftragter Bumb, Peter

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2008/061310

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	TAKAI T ET AL: "Expression of humanized Fab fragments that recognize the IgE-binding domain of human Fc(epsilon)RIalpha in COS and CHO cells." JOURNAL OF BIOCHEMISTRY JAN 2001, Bd. 129, Nr. 1, Januar 2001 (2001-01), Seiten 5-12, XP002471093 ISSN: 0021-924X Seite 6 Seite 8 - Seite 10 Abbildung 5	1-19
A	US 2004/081651 A1 (KARPUSAS MICHAEL [US] ET AL) 29. April 2004 (2004-04-29) Absatz [0291]	
A	LUND J ET AL: "Expression and characterization of truncated forms of humanized L243 IgG1. Architectural features can influence synthesis of its oligosaccharide chains and affect superoxide production triggered through human Fcgamma receptor I" EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, BERLIN, DE, Bd. 267, Nr. 24, Dezember 2000 (2000-12), Seiten 7246-7257, XP003002553 ISSN: 0014-2956 Abbildungen 1,4 Seite 7251, linke Spalte	1-19
A	LAPPIN T R J ET AL: "STRUCTURE-FUNCTION RELATIONSHIPS OF THE ERYTHROPOIETIN MOLECULE" ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES, NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES, NEW YORK, NY, US, Bd. 718, 26. April 1993 (1993-04-26), Seiten 191-202, XP001095413 ISSN: 0077-8923 Tabelle 2 Seite 195	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2008/061310

Feld Nr. II Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein internationaler Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr. _____
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche diese Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich _____
2. ☐ Ansprüche Nr. _____
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, dass eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich _____
3. ☐ Ansprüche Nr. _____
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefasst sind.

Feld Nr. III Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Diese Internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, dass diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung solcher Gebühren aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr. _____
4. ☒ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Dieser internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfasst:
see annex

Bemerkungen hinsichtlich
eines Widerspruchs

- ☐ Der Anmelder hat die zusätzlichen Recherchegebühren unter Widerspruch entrichtet und die gegebenenfalls erforderliche Widerspruchsgebühr gezahlt.
- ☐ Die zusätzlichen Recherchegebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt, jedoch wurde die entsprechende Widerspruchsgebühr nicht innerhalb der in der Aufforderung angegebenen Frist entrichtet.
- ☐ Die Zahlung der zusätzlichen Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

Internationales Aktenzeichen PCT/EP2008/061310

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, dass diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 1-9, 13-19 (alle teilweise); 10-12 (ganz);

Verfahren zur Steigerung des Titors oder der spezifischen Produktion eines Antikörpers oder Fc-Fusionsproteins von Interesse, bzw. eines Antikörperfragmentes oder -derivats, dadurch gekennzeichnet, dass in der dafür kodierenden Nukleinsäuresequenz mindestens das C-terminale Lysin-Kodon deletiert wird

2. Ansprüche: 1-9, 13-19 (alle teilweise)

Verfahren zur Steigerung des Titors oder der spezifischen Produktion eines EPO-Proteins, dadurch gekennzeichnet, dass in der dafür kodierenden Nukleinsäuresequenz mindestens das C-terminale Arginin-Kodon deletiert wird

3. Ansprüche: 20-22, 25 (alle teilweise); 23-24 (ganz);

Verfahren zur Verringerung der Heterogenität eines Antikörpers oder Fc-Fusionsproteins von Interesse, bzw. eines Antikörperfragmentes oder -derivats, dadurch gekennzeichnet, dass in der dafür kodierenden Nukleinsäuresequenz mindestens das C-terminale Lysin-Kodon deletiert wird

4. Ansprüche: 20-22, 25 (alle teilweise);

Verfahren zur Verringerung der Heterogenität eines EPO-Proteins, dadurch gekennzeichnet, dass in der dafür kodierenden Nukleinsäuresequenz mindestens das C-terminale Kodon deletiert wird

5. Ansprüche: 1-9, 13-22, 25 (alle teilweise);

Verfahren zur Steigerung des Titors, zur Steigerung der spezifischen Produktion oder zur Verringerung der Heterogenität eines tPA-Proteins, dadurch gekennzeichnet, dass in der dafür kodierenden Nukleinsäuresequenz mindestens das C-terminale Kodon deletiert wird

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2008/061310

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 2004081651 A1	29-04-2004	AU 2002258778 A2	28-10-2002
		BG 108340 A	29-10-2004
		BR 0209792 A	26-04-2005
		CA 2443903 A1	24-10-2002
		CN 1561345 A	05-01-2005
		CZ 20033039 A3	17-03-2004
		EE 200300509 A	16-08-2004
		EP 1423431 A2	02-06-2004
		HU 0402250 A2	28-01-2005
		IS 6982 A	08-10-2003
		JP 2004536580 T	09-12-2004
		MX PA03009390 A	29-01-2004
		NO 20034554 A	15-12-2003
		NZ 529494 A	26-08-2005
		PL 367324 A1	21-02-2005
		SK 13742003 A3	07-07-2004
		WO 02083854 A2	24-10-2002
		YU 80903 A	25-05-2006

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 14/745 (2006.01)	C 0 7 K 14/745	
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	1 0 1
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	1 0 2
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 P 21/00 (2006.01)	C 0 7 K 16/46	
	C 1 2 P 21/00	C

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100093300

弁理士 浅井 賢治

(74)代理人 100119013

弁理士 山崎 一夫

(74)代理人 100111501

弁理士 滝澤 敏雄

(72)発明者 アムプロジウス ドロテー

ドイツ連邦共和国 5 5 2 1 6 インゲルハイム アム ライン ピンガー シュトラーセ 1 7
3 ベーリンガー インゲルハイム ゲゼルシャフト ミット ベシュレンクテル ハフツング
ツェーデー パテンツ内

(72)発明者 エネンケル パーバラ

ドイツ連邦共和国 5 5 2 1 6 インゲルハイム アム ライン ピンガー シュトラーセ 1 7
3 ベーリンガー インゲルハイム ゲゼルシャフト ミット ベシュレンクテル ハフツング
ツェーデー パテンツ内

(72)発明者 エッカーマン クリシュティアン

ドイツ連邦共和国 5 5 2 1 6 インゲルハイム アム ライン ピンガー シュトラーセ 1 7
3 ベーリンガー インゲルハイム ゲゼルシャフト ミット ベシュレンクテル ハフツング
ツェーデー パテンツ内

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA44 CA04 CA05 CA06 CA09 CA10 DA02 EA04 FA02

FA07 FA10 GA11 GA18 HA03 HA08 HA14

4B064 AG01 AG18 AG27 CA10 CA19 CE12 DA01

4B065 AA90X AA93Y AB01 AC14 BA02 BA25 CA24 CA25 CA44

4H045 AA10 AA20 BA10 BA41 CA40 DA13 DA76 EA20 FA72 FA74

GA26