

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6438387号
(P6438387)

(45) 発行日 平成30年12月12日 (2018.12.12)

(24) 登録日 平成30年11月22日 (2018.11.22)

(51) Int.Cl.	F I	
C 1 2 N 5/04 (2006.01)	C 1 2 N 5/04	
C 1 2 N 5/071 (2010.01)	C 1 2 N 5/071	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09	Z N A Z
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02	C
請求項の数 12 (全 27 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2015-506206 (P2015-506206)	(73) 特許権者	504359293
(86) (22) 出願日	平成25年4月16日 (2013.4.16)		レック・ファーマシューティカルズ・デー
(65) 公表番号	特表2015-519884 (P2015-519884A)		・デー
(43) 公表日	平成27年7月16日 (2015.7.16)		スロベニア国、1 5 2 6・リュブリヤナ、
(86) 国際出願番号	PCT/EP2013/057866		ペロブスコバ・5 7
(87) 国際公開番号	W02013/156458	(74) 代理人	110000109
(87) 国際公開日	平成25年10月24日 (2013.10.24)		特許業務法人特許事務所サイクス
審査請求日	平成27年9月1日 (2015.9.1)	(72) 発明者	シュクリ ミハエラ
審査番号	不服2017-12292 (P2017-12292/J1)		スロベニア 1 2 3 4 メンゲシュ コロ
審査請求日	平成29年8月18日 (2017.8.18)		ドゥヴォスカ 2 7 レック・ファーマシ
(31) 優先権主張番号	12164264.9		ユーティカルズ・デー・デー
(32) 優先日	平成24年4月16日 (2012.4.16)	(72) 発明者	ゲイザー ドミニク
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		スロベニア 1 2 3 4 メンゲシュ コロ
			ドゥヴォスカ 2 7 レック・ファーマシ
			ユーティカルズ・デー・デー
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 タンパク質発現のための細胞株におけるアミド化アミノ酸形成の減少

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

異種タンパク質を発現する細胞であって、前記細胞は、ペプチドアミド化活性が減少しており、前記ペプチドアミド化活性減少が、

a) ペプチド α -アミド化を触媒する酵素をコードする内因性の (e n d o g e n o u s) 遺伝子の遺伝子発現の阻害または減少；および/または、

b) 内因性のコード遺伝子 (e n d o g e n o u s c o d i n g g e n e) 内において、部位特異的 (s i t e s p e c i f i c) またはランダムな、突然変異、挿入または欠失による、ペプチド α -アミド化を触媒する機能不全または不活性酵素、あるいは、活性が減少している、ペプチドアミド化を触媒する酵素、の発現；

によって、達成されている、細胞。

【請求項 2】

異種タンパク質を発現する細胞において、ペプチドアミド化活性を減少させる方法であって、以下からなる群より選択される少なくとも1つの工程を含む、前記方法。

a) ペプチド α -アミド化を触媒する酵素をコードする内因性の (e n d o g e n o u s) 遺伝子の遺伝子発現の阻害または減少；および

b) 内因性のコード遺伝子 (e n d o g e n o u s c o d i n g g e n e) 内において、部位特異的 (s i t e s p e c i f i c) またはランダムな、突然変異、挿入または欠失による、ペプチド α -アミド化を触媒する機能不全または不活性酵素、あるいは、活性が減少している、ペプチドアミド化を触媒する酵素、の発現。

【請求項 3】

ペプチドアミド化活性減少が、ペプチド α -アミド化を触媒する酵素をコードする遺伝子に関する；

- ・遺伝子サイレンシング、
- ・遺伝子ノックダウン、
- ・遺伝子ノックアウト、
- ・ドミナントネガティブ構築物の送達、
- ・条件付き遺伝子ノックアウト、および／または
- ・遺伝子改変

からなる群より選択される少なくとも1つの工程によって達成されている、請求項2に記載の方法。 10

【請求項 4】

細胞が真核細胞である、請求項1に記載の細胞。

【請求項 5】

細胞が動物細胞および／または植物細胞である、請求項1または4に記載の細胞。

【請求項 6】

細胞が哺乳動物細胞である、請求項1，4または5のいずれかに記載の細胞。

【請求項 7】

細胞が組換え細胞である、請求項1および4乃至6のいずれかに記載の細胞。

【請求項 8】

細胞が：

- ・ベビーハムスター腎臓細胞（例えばBHK21）
- ・チャイニーズハムスター卵巣細胞（例えばCHO-K1、CHO-DG44、CHO-DXB、またはCHO-dhf^r）
- ・マウス骨髄腫細胞（例えばSP2/0またはNS0）
- ・ヒト胚性腎臓細胞（例えばHEK-293）
- ・ヒト網膜由来細胞（例えばPER-C6）、および／または
- ・羊膜細胞（例えばCAP）

からなる群より選択される少なくとも1つである、請求項1，4乃至7のいずれかに記載の細胞。 30

【請求項 9】

ペプチドアミド化を触媒する酵素が、ペプチジルグリシン・アルファ-アミド化モノオキシゲナーゼ（PAM）である、請求項1，4乃至8のいずれかに記載の細胞。

【請求項 10】

ペプチドアミド化を触媒する前記酵素をコードする遺伝子の遺伝子発現が、RNA干渉（RNAi）によって阻害されるかまたは減少している、請求項1，4乃至9のいずれかに記載の細胞。

【請求項 11】

ペプチドアミド化を触媒する酵素が、C末端プロリンアミド残基の形成を触媒する、請求項1，4乃至10のいずれかに記載の細胞。 40

【請求項 12】

前記タンパク質が：

- ・抗体、あるいはその断片または誘導体
- ・融合タンパク質、
- ・抗体模倣体、および／または
- ・非抗体タンパク質

からなる群より選択される少なくとも1つのタンパク質である、請求項1，4乃至11のいずれか一項に記載の細胞。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【 0 0 0 1 】

本発明は、タンパク質発現のための細胞株におけるアミド化アミノ酸形成の減少に関する。

【 背景技術 】

【 0 0 0 2 】

タンパク質は主に、そのアミノ酸配列（一次構造）によって特徴付けられるが、翻訳後修飾などの他の側面もまた、例えば二次、三次および四次構造に影響を及ぼすことによって、タンパク質の特性に寄与する。これらの翻訳後修飾のいくつかは、生物薬剤の安全性および有効性を含む、後のタンパク質活性に重要な役割を果たす。

【 0 0 0 3 】

タンパク質の不均一性に関する１つの主要な側面は、例えばアスパラギンのようなアミノ酸の脱アミド化によるか、グリコシル化によるか、またはN末端グルタミンのピログルタメートへのプロセッシングによって形成される酸性変異体、および例えばアミド化アミノ酸、特にC末端プロリンアミド残基を含む塩基性変異体を含む、電荷パターンである。

【 0 0 0 4 】

しかし、C末端プロリンアミドのようなアミド化アミノ酸の形成は、いくつかの場合、例えば望ましくない不均一性の供給源として、あるいは前記変異体がタンパク質活性または免疫原性に潜在的に影響を及ぼす場合、あるいは産生しようとするタンパク質中のアミド化アミノ酸、例えばプロリンアミドの量が参照タンパク質よりもより高いかまたはより低い場合、望ましくない。

【 0 0 0 5 】

非常に制御可能な物理化学的条件下で産生される低分子薬剤とは対照的に、タンパク質、特に生物療法として用いられるタンパク質（生物薬剤）の産生は、該産生に生存細胞培養系を利用するため、非常に複雑な事柄であり、制御が困難である。したがって、一定の製品品質および一定の高収率を提供して、産生プロセスの効率を増加させ、産生されるタンパク質の生理学的活性および得られる薬剤の安全性を増加させ、そして／または微調整し、そして／または産生されるタンパク質の翻訳後特徴を参照タンパク質のものとマッチさせるためには、産生されるタンパク質の特に翻訳後修飾を制御することを可能にするツールボックスが手近にあることが重要である。

【 0 0 0 6 】

本発明の目的は、これらの必要性に取り組む手段および方法を提供することである。

【 0 0 0 7 】

目的は、本発明の独立クレームにしたがった方法および手段で叶えられる。従属クレームは、好ましい態様に関する。数値によって区切られた値の範囲は、前記の区切りの値を含むことが理解されると理解されるものとする。

【 発明の概要 】

【 0 0 0 8 】

本発明を詳細に記載する前に、本発明は、記載するデバイスまたは手段の特定の構成要素部分、あるいは記載する方法のプロセス工程に限定されないことが理解されるものとし、これはこうしたデバイスまたは手段および方法が多様でありうるためである。本明細書で用いる専門用語は、特定の態様のみを記載する目的のためのものであり、そして限定されることを意図しないことが理解されるものとする。本明細書および付随する請求項において用いられるような、単数形「a」、「an」、および「the」には、背景が明らかに別に指示しない限り、単数および／または複数の指示対象が含まれることに留意すべきである。数値によって区切られたパラメータ範囲が与えられている場合、範囲はこれらの限界値を含むと考えられることがさらに理解されるものとする。

【 0 0 0 9 】

本発明の第一の側面にしたがって、ペプチドアミド化活性が減少している、タンパク質発現のための細胞を提供する。

【 0 0 1 0 】

本明細書において、用語「細胞」はまた、そこから得られる細胞株も含むものとする。さらに、こうした細胞または細胞株から得られる動物、細胞に基づく発現プラットフォームは、こうした用語によって提供される保護に含まれるものとする。

【0011】

本明細書において、用語「タンパク質発現のための」は、本発明の細胞が、産業プロセスにおけるタンパク質発現に適していることを示す。これには、同種および/または異種タンパク質発現が含まれる。本発明の細胞が産業プロセスにおけるタンパク質発現に適しているという事実は、元々、ペプチドアミド化活性が減少しているが、それ自体、そしてさらなる修飾、単離または処理を伴わずには、産業プロセスにおけるタンパク質発現に適していない、天然環境で生じる細胞が、存在していたとしても、本発明の細胞の新規性を予測しないことを意味する。

10

【0012】

ペプチドアミド化は、多くの生物活性ペプチドが経る、広範で、しばしば本質的な翻訳後修飾である。ペプチドアミド化は、例えば、神経内分泌ペプチドを活性 α -アミド化産物に触媒するよう働く。

【0013】

しかし、ペプチドアミド化は、いくつかの場合、例えば望ましくない不均一性の供給源として、あるいは前記変異体がタンパク質活性または免疫原性に潜在的に影響を及ぼす場合、あるいは産生しようとするタンパク質中のアミド化アミノ酸、例えばプロリンアミドの量が参照タンパク質よりもより高いかまたはより低い場合、望ましくない。

20

【0014】

本発明の細胞の好ましい態様において、ペプチドアミド化活性減少は

a) ペプチド α -アミド化を触媒する酵素をコードする遺伝子の遺伝子発現の阻害または減少；

b) ペプチド α -アミド化を触媒する機能不全または不活性酵素、あるいは活性が減少している、ペプチドアミド化を触媒する酵素の発現；および/または

c) ペプチド α -アミド化を触媒する酵素の活性の阻害または減少によって達成されている。

【0015】

本発明の別の側面にしたがって、所定の細胞において、ペプチドアミド化活性を減少させる方法であって

30

a) ペプチド α -アミド化を触媒する酵素をコードする遺伝子の遺伝子発現の阻害または減少；

b) ペプチド α -アミド化を触媒する機能不全または不活性酵素、あるいは活性が減少している、ペプチドアミド化を触媒する酵素の発現；および/または

c) ペプチド α -アミド化を触媒する酵素の活性の阻害または減少からなる群より選択される少なくとも1つの工程を含む、前記方法を提供する。

【0016】

本発明の好ましい態様にしたがって、ペプチドアミド化活性減少は、ペプチド α -アミド化を触媒する酵素をコードする遺伝子に関する

40

- ・ 遺伝子サイレンシング、
- ・ 遺伝子ノックダウン、
- ・ 遺伝子ノックアウト、
- ・ ドミナントネガティブ構築物の送達、
- ・ 条件付き遺伝子ノックアウト、および/または
- ・ 遺伝子改変

からなる群より選択される少なくとも1つの工程によって達成されているか、または達成可能である。

【0017】

用語「遺伝子発現」は、本明細書において、mRNAへのDNA転写、mRNAプロセ

50

シング、非コードmRNA成熟、mRNA排出、翻訳、タンパク質フォールディングおよび/またはタンパク質輸送からなる群より選択される少なくとも1つの工程を含むよう意図される。

【0018】

遺伝子の遺伝子発現の阻害または減少は、限定されるわけではないが、例えば特異的プロモーター関連リプレッサーの使用による、所定のプロモーターの部位特異的突然変異誘発による、プロモーター交換による、DNA転写の阻害または減少、あるいは例えばRNAi誘導性転写後遺伝子サイレンシングによる、翻訳の阻害または減少を含む、遺伝子発現に直接干渉する方法を指す。

【0019】

ペプチド α -アミド化を触媒する機能不全または不活性酵素、あるいは活性が減少している、ペプチドアミド化を触媒する酵素の発現は、例えば、コード遺伝子内の部位特異的またはランダム突然変異誘発、挿入または欠失によって達成可能である。

【0020】

ペプチドアミド化を触媒する酵素の活性の阻害または減少は、例えば、タンパク質発現前の、またはそれと同時の、それぞれの酵素に対する阻害剤の投与またはこうした阻害剤とのインキュベーションによって達成可能である。こうした阻害剤の例には、限定されるわけではないが、阻害性ペプチド、抗体、アプタマー、融合タンパク質、または前記酵素に対する抗体模倣体、あるいはそのリガンドまたは受容体、あるいは阻害性ペプチドまたは核酸、あるいは類似の結合活性を持つ小分子が含まれる。

【0021】

酵素を阻害する他の方法は、培地中の酵素の特定の補因子の減少であり、例えば、PAM特異的イオン補因子（例えば CuSO_4 の形で）である銅、PAMの電子供与体として作用するアスコルベート、分子酸素、カタラーゼおよび当業者に今日知られる他のもの、または将来発見されるであろうものがある。

【0022】

遺伝子サイレンシング、遺伝子ノックダウンおよび遺伝子ノックアウトは、遺伝子修飾を通じるか、あるいはmRNA転写物または遺伝子のいずれかに相補的な配列を持つオリゴヌクレオチドでの処理によるいずれかで、遺伝子の発現を減少させる技術を指す。DNAの遺伝子修飾を行う場合、結果はノックダウンまたはノックアウト生物である。遺伝子発現変化が、mRNAへのオリゴヌクレオチド結合または遺伝子への一時的結合によって引き起こされる場合、これは染色体DNAの修飾を伴わない遺伝子発現の一時的変化を生じ、そして一過性ノックダウンと呼ばれる。

【0023】

上記用語によってもまた含まれる一過性ノックダウンにおいて、活性遺伝子または転写物へのこのオリゴヌクレオチドの結合は、転写のブロッキングを通じた発現減少（遺伝子結合の場合）、mRNA転写物の分解（例えば小分子干渉RNA（siRNA）またはRNAアーゼH依存性アンチセンス）、あるいはmiRNAなどの、他の機能性RNAの成熟に用いられるmRNA翻訳、プレ-mRNAスプライシング部位またはヌクレアーゼ切断部位のいずれかのブロッキング（例えばモルホリノオリゴまたは他のRNAアーゼH独立アンチセンスによる）を通じた発現減少を引き起こす。他のアプローチは、shRNA（RNA干渉を通じて、遺伝子発現をサイレンシングするために使用可能な堅固なヘアピンターンを作製するRNA配列である、低分子ヘアピンRNA）、esiRNA（エンドリボヌクレアーゼでの長い二本鎖RNA（dsRNA）の切断から生じるsiRNAオリゴの混合物である、エンドリボヌクレアーゼが調製するsiRNA）の使用、またはRNA誘導性サイレンシング複合体（RISC）の活性化を伴う。

【0024】

遺伝子サイレンシング、ノックダウンまたはノックアウトを実行する他のアプローチが、それぞれの文献から当業者に知られ、そして本発明の背景において、これらの適用はルーチンと見なされる。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 5 】

遺伝子ロックアウトは、遺伝子発現が完全にブロックされる、すなわちそれぞれの遺伝子が動作不能であるか、またはさらに除去される技術を指す。この目的を達成する方法論的アプローチは多様であり、そして当業者に知られる。例は、所定の遺伝子に関してドミナントネガティブである突然変異体の産生である。こうした突然変異体は、部位特異的突然変異誘発（例えば欠失、部分的欠失、挿入または核酸置換）によって、適切なトランスポゾンの利用によって、またはそれぞれの文献から当業者に知られ、したがって本発明の背景におけるその適用がルーチンと見なされる他のアプローチによって、産生可能である。当業者が本発明の背景において有用と見なすであろう新規開発技術の1つの例は、ターゲティング化ジンクフィンガーヌクレアーゼの使用によるロックアウトである。それぞれのキットは、シグマ・アルドリッチ（Sigma Aldrich）によって、「コンボZRロックアウトZFN」として提供される。別のアプローチは、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）の使用を含む。

10

【 0 0 2 6 】

ドミナントネガティブ構築物の送達は、例えばトランスフェクションによる、機能不全酵素をコードする配列の導入を伴う。機能不全酵素の遺伝子発現が野生型酵素の天然発現を封じ、次に、それぞれの酵素活性の有効な生理学的欠損を導くように、前記コード配列は、強いプロモーターに機能的にカップリングされる。

【 0 0 2 7 】

条件付き遺伝子ロックアウトは、組織または時間特異的方式で、遺伝子発現のブロックを可能にする。これは、例えば、関心対象の遺伝子周囲に、10xP部位と呼ばれる短い配列を導入することによって行われる。再び、他のアプローチがそれぞれの文献から当業者に知られ、そして本発明の背景において、これらの適用はルーチンと見なされる。

20

【 0 0 2 8 】

1つの他のアプローチは、機能不全遺伝子産物または活性が減少した遺伝子産物を導きうる、遺伝子改変である。このアプローチは、フレームシフト突然変異、ナンセンス突然変異（すなわち未成熟停止コドンの導入）、あるいは全遺伝子産物を機能不全にするか、または活性減少を引き起こす、アミノ酸置換を導く突然変異を伴う。こうした遺伝子改変は、例えば、非特異的（ランダム）突然変異誘発または部位特異的突然変異誘発のいずれかの突然変異誘発（例えば欠失、部分的欠失、挿入または核酸置換）によって産生可能である。

30

【 0 0 2 9 】

遺伝子サイレンシング、遺伝子ロックダウン、遺伝子ロックアウト、ドミナントネガティブ構築物の送達、条件付き遺伝子ロックアウト、および/または遺伝子改変の実際の適用を記載するプロトコルは、当業者に一般に入手可能であり、そしてそのルーチン内である。本明細書に提供する技術的解説は、したがって、ペプチド α -アミド化を触媒する酵素をコードする遺伝子の遺伝子発現の阻害または減少を、あるいはペプチド α -アミド化を触媒する機能不全もしくは不活性酵素、または減少した活性でペプチドアミド化を触媒する酵素の発現を導く、すべてのありうる方法に関して、完全に有効となる。

【 0 0 3 0 】

本発明の別の好ましい態様にしたがって、細胞は真核細胞である。用語「真核細胞」は、限定されるわけではないが、例えば昆虫細胞のような動物細胞、植物細胞および真菌細胞を含む。したがって、本発明の好ましい態様は、細胞が動物細胞および/または植物細胞であると規定する。

40

【 0 0 3 1 】

本発明のさらに別の好ましい態様にしたがって、細胞は哺乳動物細胞である。本発明のさらに別の好ましい態様にしたがって、細胞は：

- ・ベビーハムスター腎臓細胞（例えばBHK21）
- ・チャイニーズハムスター卵巣細胞（例えばCHO-K1、CHO-DG44、CHO-DXB、またはCHO-dhfr⁻）

50

- ・マウス骨髄腫細胞（例えばS P 2 / 0またはN S 0）
- ・ヒト胚性腎臓細胞（例えばH E K - 2 9 3）
- ・ヒト網膜由来細胞（例えばP E R - C 6）、および／または
- ・羊膜細胞（例えばC A P）

からなる群より選択される少なくとも1つである。

【0032】

別の好ましい態様にしたがって、細胞は組換え細胞である。本明細書において、用語「組換え細胞」は、細胞のクローン拡大において取り込まれたままであるように安定に取り込まれているか、または細胞（または細胞集団）内に一過性に導入されているかいずれかの、外因性および／または異種核酸が取り込まれている細胞を指す。こうした外因性および／または異種核酸は、発現しようとする異種タンパク質をコードしてもよいし、あるいはペプチド α -アミド化を触媒する酵素をコードする遺伝子の遺伝子発現の阻害もしくは減少、またはペプチド α -アミド化を触媒する機能不全もしくは不活性酵素、もしくは活性が減少したペプチドアミド化を触媒する酵素の発現を達成してもよい。

【0033】

好ましくは、ペプチドアミド化を触媒する酵素は、ペプチジルグリシン・アルファ・アミド化モノオキシゲナーゼ（PAM）である。PAMは、連続して作用してペプチドのC末端一部切除（truncation）およびアルファ・アミド化を触媒する2つの酵素活性を含有する、多機能タンパク質である。ペプチジルグリシン・アルファ・ヒドロキシ化モノオキシゲナーゼ（PHM）は、反応の第一の段階を触媒し、そして銅（Cu）、または銅イオン、アスコルベート、および分子酸素に依存する。亜鉛依存性ペプチジルアミド・グリコール酸リアーゼ（PAL）は、反応の第二の段階、この時点でC末端にあるプロリンのプロリンアミドへのアミド化を触媒する。両酵素によって触媒されるプロセスの反応スキームに関しては、図9を参照されたい。実際の遺伝子または酵素は、もちろん、タンパク質発現に用いられる細胞に応じる。

【0034】

こうした遺伝子または酵素の一例は、ヒト・ペプチジルグリシン・アルファ・アミド化モノオキシゲナーゼ（NCBI遺伝子データベースによる遺伝子ID：5006）であり、この遺伝子は、触媒活性を持つ2つの酵素活性ドメイン：（i）ペプチジルグリシン・アルファ・ヒドロキシ化モノオキシゲナーゼ（PHM）および（ii）ペプチジル・アルファ・ヒドロキシグリシン・アルファ・アミド化リアーゼ（PAL）を有する多機能タンパク質をコードする。これらの触媒ドメインは連続して働いて、神経内分泌ペプチドを活性アルファ・アミド化産物に触媒する。異なるアイソフォームをコードする多数の選択的スプライシング転写物変異体がこの遺伝子に関して記載されてきているが、その全長配列のいくつかは未だに知られていない。該遺伝子は、5q14-q21に位置する。タンパク質発現のために用いられる細胞がヒト細胞（例えばHEK、PER-C6またはCAP）である場合、好ましくは、（i）前記遺伝子の遺伝子発現が阻害されるかまたは減少するか、あるいは（ii）機能不全もしくは不活性酵素、または活性が減少した酵素が発現されるか、あるいは（iii）前記酵素の活性が阻害されるかまたは減少すると規定される。

【0035】

こうした遺伝子または酵素の別の例は、CHO細胞（チャイニーズハムスター卵巣細胞）が得られうるチャイニーズハムスター（クリセツルス・グリセウス（Cricketulus griseus））のようなハムスターのペプチジルグリシン・アルファ・アミド化モノオキシゲナーゼである。それぞれの遺伝子配列は、公的データベースに未だに公表されていないが、それぞれの発現配列タグ（EST）が列挙される、私有データベースが存在する。

【0036】

タンパク質発現のために用いる細胞がハムスター細胞（例えばBHKまたはCHOまたはCAP）である場合、好ましくは、（i）前記遺伝子の遺伝子発現が阻害されるかまた

10

20

30

40

50

は減少するか、あるいは (i i) 機能不全もしくは不活性酵素、または活性が減少した酵素が発現されるか、あるいは (i i i) 前記酵素の活性が阻害されるかまたは減少すると規定される。

【 0 0 3 7 】

こうした遺伝子または酵素の別の例は、ネズミ・ペプチジルグリシン・アルファ - アミド化モノオキシゲナーゼ (遺伝子 I D : 1 8 4 8 4) であり、その遺伝子は、触媒活性を持つ 2 つの酵素的に活性であるドメイン : (i) ペプチジルグリシン・アルファ - ヒドロキシ化モノオキシゲナーゼ (P H M) および (i i) ペプチジル - アルファ - ヒドロキシグリシン・アルファ - アミド化リアーゼ (P A L) を有する、多機能タンパク質をコードする。これらの触媒ドメインは、連続して働いて、神経内分泌ペプチドを活性アルファ - アミド化産物に触媒する。異なるアイソフォームをコードする多数の選択的スプライシング転写物変異体がこの遺伝子に関して記載されてきているが、その全長配列のいくつかは未だに知られていない。該遺伝子は、1 D ; 1 5 7 . 5 c M に位置する。

10

【 0 0 3 8 】

タンパク質発現のために用いる細胞がマウス細胞 (例えば S P 2 / 0 または N S 0) である場合、好ましくは、(i) 前記遺伝子の遺伝子発現が阻害されるかまたは減少するか、あるいは (i i) 機能不全もしくは不活性酵素、または活性が減少した酵素が発現されるか、あるいは (i i i) 前記酵素の活性が阻害されるかまたは減少すると規定される。

【 0 0 3 9 】

他の例は、タンパク質発現のために用いる細胞が昆虫細胞である場合の、昆虫ペプチジルグリシン・アルファ - アミド化モノオキシゲナーゼ C O O H 末端相互作用タンパク質 - 1 (遺伝子 I D は、例えば、5 5 6 7 8 7 6 、 6 0 5 3 6 1 8 または 6 0 4 3 2 9 3) を含む。

20

【 0 0 4 0 】

タンパク質発現のための他の潜在的な細胞に (例えば酵母、植物、糸状菌、またはさらに細菌に) 存在するペプチジルグリシン・アルファ - アミド化モノオキシゲナーゼもまた、本発明の範囲内に含まれるものとする。同様に、ペプチドアミド化が可能な、特にプロリンアミド形成が可能な他の酵素もまた、本発明の範囲内に含まれるものとする。これらの酵素に対する本発明の解説の移行は、いかなるさらなる発明工程も伴わない。

【 0 0 4 1 】

30

ペプチドアミド化を触媒する前記酵素をコードする遺伝子の遺伝子発現が、RNA 干渉 (R N A i) によって阻害されるかまたは減少する、本発明の前述の側面および態様いずれか記載の細胞または方法。RNA i は、RNA 誘導性サイレンシング複合体 (R I S C) によって制御され、そして細胞の細胞質中にある短い二本鎖 RNA 分子によって開始され、細胞質で該分子が触媒性 R I S C 構成要素アルゴノートと相互作用する、RNA 依存性遺伝子サイレンシングプロセスである。RNA i 経路は、動物を含む多くの真核生物で見られ、そして酵素ダイサーによって開始され、ダイサーは、長い二本鎖 RNA (d s R N A) 分子を、s i R N A と呼ばれる ~ 2 0 ヌクレオチドの短い断片に切断する。各 s i R N A は、2 つの一本鎖 s s R N A 、すなわちパッセンジャー鎖およびガイド鎖に巻き戻される。パッセンジャー鎖は、分解され、そしてガイド鎖は RNA 誘導性サイレンシング複合体に取り込まれる。

40

【 0 0 4 2 】

遺伝子操作における遺伝子サイレンシング目的のため、RNA は細胞質に直接移入され、そして酵素によって短い断片に切断される。開始 d s R N A はまたゲノムにおける RNA コード遺伝子から発現されるプレマイクロ RNA におけるように、内因性 (細胞で生じる) であってもよい。こうした遺伝子からの一次転写物はまず、プロセシングされて、核においてプレ m i R N A の特徴的なステム - ループ構造を形成し、そして次いで、ダイサーによって切断されるよう、細胞質に排出される。したがって、2 つの d s R N A 経路、外因性および内因性の経路が、R I S C 複合体で収束する。

【 0 0 4 3 】

50

好ましくは、長い二本鎖RNA (dsRNA:典型的には>200nt)を用いて、ペプチド α -アミド化を触媒する前記酵素をコードする遺伝子の発現をサイレンシングする。導入に際して、dsRNAは、ダイサーによって、20~25ヌクレオチドの低分子干渉RNA (siRNA)に切断される(開始工程)。次いで、siRNAは、プロセスにおいてほどこけてRISCに組み立てられる。

【0044】

siRNA鎖は、続いて、相補的RNA分子にRISCを導き、RISCは、同族RNAを切断し、そして破壊する(エフェクター工程)。同族RNAの切断は、siRNA鎖によって結合される領域の中央で起こる。哺乳動物培養細胞において、RNAiは、典型的には、siRNAの使用によって誘導される。培養細胞においては、siRNAを産生するための2つの一般的な方法:合成siRNAの送達、および細胞内でsiRNAにプロセシングされる短いヘアピンRNA配列(shRNA)を発現するDNA構築物の導入がある。本発明の背景で用いられるそれぞれのsiRNAおよびshRNAを実験セクションに示す。

【0045】

RNA干渉(RNAi)が、次の世代の細胞においてもまた、それぞれの細胞株で確立可能である遺伝子発現の非一過性阻害を導く場合、結果は細胞または細胞株のノックダウンまたはノックアウトである。

【0046】

本発明のさらに別の好ましい態様にしたがって、ペプチドアミド化を触媒する酵素は、C末端プロリンアミド残基の形成を触媒する。

【0047】

多くのヒト免疫グロブリンの重鎖は、そのC末端(例えば定常領域)に、-Pro-Gly-Lys-COOH(一文字コード:PGK)からなる配列モチーフを有し、ここで、C末端Lysは、しばしば、塩基性カルボキシペプチダーゼによる除去の対象であり、したがって、C末端にPro-Gly-COOHが残る。

【0048】

多くのタンパク質発現系において、この配列モチーフは、ペプチジルグリシン・アルファ・アミド化モノオキシゲナーゼのような、ペプチド α -アミド化を触媒する酵素のターゲットであり、該酵素は例えば、C末端ペプチジル-プロリル-グリシンをペプチジル-プロリル- α -ヒドロキシグリシンに変換し、そして次いで、ペプチジル-プロリン- α -アミドおよびグリオキシレートに変換する(図9およびそれぞれの説明を参照されたい)。

【0049】

C末端プロリンアミド残基の形成は、したがって、モノクローナル抗体および重鎖定常領域を含むその誘導体、例えばIgG、ヒト免疫グロブリンのFc領域を有する受容体-免疫グロブリン融合タンパク質、例えばエタネルセプトまたはアフリベルセプト、または免疫毒素およびFc領域を有する三官能性抗体のタンパク質発現に頻繁に見られる。

【0050】

本発明の別の側面にしたがって、相同性タンパク質発現に関する前述の請求項のいずれか記載の細胞の使用を提供する。

【0051】

本発明のさらに別の側面にしたがって、異種タンパク質発現に関する前述の請求項のいずれか記載の細胞の使用を提供する

【0052】

用語「異種タンパク質発現」は、本明細書において、発現が起こる細胞(「宿主細胞」または「発現系」)にとって外来性(foreign)である、遺伝子、核酸またはcDNAのタンパク質発現を指すものとする。異種(「異なる生物由来」を意味する)は、しばしば、トランスファーするタンパク質を、まず、異なる細胞タイプまたは異なる種からクローンするかまたは得て、そしてコード遺伝物質(「cDNA」)を得て、これを次い

10

20

30

40

50

で宿主細胞にトランスファーするという事実を指す。トランスファーされる遺伝物質は、典型的にはレシピエント細胞がcDNAをタンパク質として発現することを促進する形式でなければならない(すなわち発現ベクターに入れられる)。レシピエント細胞に外来遺伝物質をトランスファーするための方法には、トランスフェクションおよび形質導入が含まれる。レシピエント細胞タイプの選択は、しばしば、タンパク質の機能を詳細に調べる実験的必要性に基づき、そして異種発現系として知られる最も普及しているレシピエントを、とりわけ(i)DNAをトランスファーする容易さ、(ii)薬学的に有効な型、機能のタンパク質を生成する能力、(iii)タンパク質収量等に関して選択する。

【0053】

用語「組換えタンパク質発現」は、用語「異種タンパク質発現」と大部分重複する。用語「組換え」は、「新規の」コード遺伝物質が発現系、例えば細胞に導入されているという事実を示唆する。こうしたプロセスは、組換え核酸(例えば組換えDNA)の形成を生じ、そして宿主はしたがって、組換え宿主、例えば組換え細胞と呼ばれる。このプロセスの背後にある1つのアイディアは、別の生物において、例えば細胞に基づくタンパク質発現系、例えばCHO細胞において、1つの生物由来のタンパク質(例えばヒトタンパク質)を産生することである。

【0054】

好ましくは、前記タンパク質は：

- ・抗体、あるいはその断片または誘導体
- ・融合タンパク質、
- ・抗体模倣体、および/または
- ・非抗体タンパク質

からなる群より選択される少なくとも1つのタンパク質である。

【0055】

用語「抗体」は、本明細書において、免疫グロブリン、あるいはその断片または誘導体に関連するものとする。特に好ましくは、こうした抗体は、IgG、IgD、IgE、IgAおよび/またはIgM、あるいはその断片または誘導体からなる群より選択される。本明細書において、用語「断片」は、いくつかの場合、ターゲット結合能を保持するこうした抗体の断片、例えば

- ・CDR(相補性決定領域)
- ・超可変領域、
- ・可変ドメイン(Fv)
- ・IgG重鎖(VH、CH1、ヒンジ、CH2およびCH3領域からなる)
- ・IgG軽鎖(VLおよびCL領域からなる)、および/または
- ・Fabおよび/またはF(ab)₂

を指すものとする。

【0056】

本明細書において、用語「誘導体」は、一般的な抗体概念とは構造的に異なるが、なお何らかの構造的関連を有するタンパク質構築物、例えばscFv、ならびに二重特異性、三重特異性またはより高次の特異性の抗体構築物、抗体に基づく融合タンパク質、抗体-薬剤コンジュゲート、免疫毒素等を指すものとする。

【0057】

用語「抗体模倣体」は、免疫グロブリンに基づかないターゲット結合性タンパク質分子に関する。こうした抗体模倣体は、例えば、アンキリンリピートタンパク質、C型レクチン、黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)のAドメインタンパク質、トランスフェリン、リボカリン、フィブロネクチン、クニッツドメインプロテアーゼ阻害剤、ユビキチン、システインノットまたはノッティン、チオレドキシンA等由来し、そしてそれぞれの文献から当業者に知られる。

【0058】

用語「融合タンパク質」は、本明細書において、主に、例えばヒト免疫グロブリンのF

10

20

30

40

50

c 領域を有する受容体 - 免疫グロブリン融合タンパク質に関するものとする。

【0059】

好ましくは、本発明の細胞および方法は、以下のタンパク質の1つのすべてまたは一部に同一であるかまたは実質的に類似であるアミノ酸配列を含むタンパク質の(組換え)産生に適している: Flt3リガンド、CD40リガンド、エリスロポエチン(EPO)、ダルベポエチン・アルファを含むダルベポエチン、およびトロポポエチンのような赤血球生成刺激タンパク質、カルシトニン、レプチン、Fasリガンド、NF- κ Bの受容体活性化因子に関するリガンド(RANKL)、腫瘍壊死因子(TNF)関連アポトーシス誘導リガンド(TRAIL)、胸腺間質由来リンホポエチン、顆粒球コロニー刺激因子、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、マスト細胞増殖因子、幹細胞増殖因子、上皮増殖因子、角化細胞増殖因子、巨核球増殖および発生因子、RANTES、成長ホルモン、インスリン、インスリノトロピン、インスリン様増殖因子、副甲状腺ホルモン、 α -インターフェロン、 β -インターフェロン、および γ -インターフェロンを含むインターフェロン、神経増殖因子、脳由来神経栄養因子、シナプトタグミン様タンパク質(SLP1-5)、ニューロトロフィン-3、グルカゴン、IL-1、IL-1a、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、およびIL-18を含むインターロイキン、コロニー刺激因子、リンホトキシン-p、腫瘍壊死因子(TNF)、白血病阻害因子、オンコスタチン-M、ならびに細胞表面分子ELKおよびHckに関する多様なリガンド(例えば、eph関連キナーゼまたはLERKSのリガンド)。

【0060】

本発明の方法および手段を用いて産生可能なさらなるタンパク質には、上述のタンパク質いずれかに対する受容体、上述のタンパク質のいずれかのこうした受容体に対するアンタゴニスト、およびこうした受容体またはアンタゴニストに実質的に類似であるタンパク質のアミノ酸配列のすべてまたは一部を含むタンパク質が含まれる。

【0061】

また、本発明の方法および手段を用いて産生可能なタンパク質にはまた、分化抗原(CDタンパク質と称される)またはそのリガンドあるいはこれらのいずれかに実質的に類似であるタンパク質のアミノ酸配列のすべてまたは一部を含むタンパク質が含まれる。こうした抗原の例は、CD20、CD22、CD27、CD30、CD39、CD40を含む分化抗原、およびそれに対するリガンドである。

【0062】

酵素的に活性であるタンパク質またはそのリガンドもまた、本発明の方法および手段を用いて産生可能である。例には、以下のタンパク質またはそのリガンド、あるいはこれらの一方に実質的に類似であるタンパク質の1つのすべてまたは部分を含むタンパク質が含まれる: メタロプロテイナーゼ-ディスインテグリン・ファミリーメンバー、キナーゼ、グルコセレブロシダーゼ、スーパーオキシドジスムターゼ、組織プラスミノゲン活性化因子、因子VIIII、因子IX、アポリポタンパク質E、アポリポタンパク質A-1、グロビン、IL-2アンタゴニスト、アルファ-1アンチトリプシン、TNF-アルファ変換酵素、上述の酵素いずれかのリガンド、ならびに多くの他の酵素およびそのリガンド。

免責事項

【0063】

上述の態様において、要素および特徴の特定の組み合わせは例示的のみであり; 本出願において、これらの解説を他の解説と交換しそして置換することをもまた、明らかに意図される。当業者が認識するであろうように、本明細書記載のものの変動、修飾、および他の実行は、請求されるような本発明の範囲の精神および範囲から逸脱することなく、一般の当業者が思いつく可能性もある。したがって、前述の説明は例のみのためであり、そして限定と意図されない。本発明の範囲は、以下の請求項およびその同等物に定義される。さらに、説明および請求項中に用いられていた参照サインは、請求されるような本発明の範

10

20

30

40

50

図を限定しない。

【 0 0 6 4 】

本発明の目的のさらなる詳細、特徴、特性および利点を、下位クレーム、ならびに例示的な様式で本発明の好ましい態様を示すそれぞれの図および実施例の以下の説明に開示する。しかし、これらの図は、いかなる意味でも、本発明の範囲を限定すると理解してはならない。

【 0 0 6 5 】

全ての図において、エラーバーは標準偏差を示す。全ての示す結果をさらに、スチューデントT検定で分析した（以下を参照されたい）。

【図面の簡単な説明】

10

【 0 0 6 6 】

【図1】CHO K1 PD細胞に対するsiRNA（インビトロジェン（Invitrogen））を用いたPAM mRNAのサイレンシング。/ 1：平行1、/ 2：平行2、- K：非トランスフェクションCHO K1 PD細胞、+ K：スクランブル化siRNA（アンピオン（Ambion））でトランスフェクションしたCHO K1 PD細胞。

【図2】CHO K1 PD細胞に対するsiRNA（アンピオン）を用いたPAM mRNAのサイレンシング。/ 1：平行1、/ 2：平行2、- K：非トランスフェクションCHO K1 PD細胞、+ K：スクランブル化siRNA（アンピオン）でトランスフェクションしたCHO K1 PD細胞。図1および2に示す実験は、インビトロジェンまたはアンピオンによって提供されるsiRNAによるPAM遺伝子に対するサイレンシング効果を評価するよう設計された。CHO K1 PD細胞をsiRNAによってトランスフェクションして、最も強力なサイレンシング効果を持つ配列を決定した。これはまた、PAM mRNAの発現の%減少を計算し（表9）、そしてスチューデントt検定を用いる（表10）ことによって証明された。

20

【図3】クローンK25に対するshRNAを用いたPAM mRNAのサイレンシング。/ 1：平行1、/ 2：平行2、- K：非トランスフェクションK25細胞。

【図4】クローンK62に対するshRNAを用いたPAM mRNAのサイレンシング。/ 1：平行1、/ 2：平行2、- K：非トランスフェクションK62細胞。

【図5】CHO K1 PD親細胞株に対するshRNAを用いたPAM mRNAのサイレンシング。/ 1：平行1、/ 2：平行2、- K：非トランスフェクションCHO K1 PD細胞。

30

【図6】CHO SSF3親細胞株に対するshRNAを用いたPAM mRNAのサイレンシング。/ 1：平行1、/ 2：平行2、- K：非トランスフェクションCHO SSF3細胞。図3～6に示す実験は、試験した細胞株に対して、異なるshRNAおよび異なる濃度のピューロマイシン（ピューロ）を用いて、PAMのmRNA発現レベルを評価するよう設計された。sh6（単独で用いるかまたはsh5と混合した場合）を、それぞれすべての細胞株に対して用いると、最高のサイレンシング効果が観察された。これはまた、PAM mRNAの発現の%減少を計算し（表11）、そしてスチューデントt検定を用いる（表12）ことによって証明された。5 μg/mlピューロマイシンを用いると、発現レベルのわずかな減少のみが観察された。mRNAおよびタンパク質レベルに関するPAMのサイレンシングを、それぞれ決定した。

40

【図7】PAM mRNA発現レベルおよびmAbプロリンアミド含量間の相関。/ 1：平行1、/ 2：平行2、- K：非トランスフェクションK25およびK62細胞。

【図8】pサイレンサー2.1-U6ピューロベクターの図。

【図9】ペプチジルグリシン・アルファ・アミド化モノオキシゲナーゼ（PAM）によって触媒される反応。PAMは、連続して作用してペプチドのC末端一部切除およびアルファアミド化を触媒する2つの酵素活性を含有する、多機能タンパク質である。ペプチジルグリシン・アルファ・ヒドロキシル化モノオキシゲナーゼ（PHM）は、反応の第一の段階（ペプチジルグリシン（C末端）→ペプチジル-α-ヒドロオキシグリシン）を触媒し

50

、そして銅（Cu）、または銅イオン、アスコルベート、および分子酸素に依存する。亜鉛依存性ペプチジルアミド-グリコール酸リアーゼ（PAL）は、反応の第二の段階（ペプチジル- α -ヒドロキシグリシン→ペプチド- α -アミドおよびグリオキシレート）を触媒する。図は、プリッグ（Prigge）ら、Science（1997）278，1300-1305から採った。

【実施例】

【0067】

1. siRNAに基づく遺伝子サイレンシング

【0068】

チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞は、チャイニーズハムスター（クリセツルス・グリセウス）の卵巣由来の細胞株である。これらはしばしば、生物学および医学的研究で用いられ、そして療法タンパク質の産生において商業的に用いられる。このため、CHO細胞株において、ペプチドアミド化活性を減少させることが実験的に示された。

【0069】

CHO細胞におけるプロリンアミド形成に關与する酵素の正確な配列は、文献または公的データベースにおいて公表されていない。潜在的なヌクレオチド配列を私有CHO ESTデータベースから抽出した。この配列情報に基づいて、siRNAを構築し、そしてそのサイレンシング効果を評価した。siRNA結果に基づいて短いヘアピンRNA（shRNA）を構築し、そしてmRNAおよびタンパク質レベルに対して遺伝子抑制を評価した。

【0070】

C. グリセウス・ペプチジルグリシン・アルファ-アミド化モノオキシゲナーゼヌクレオチド配列（表1）を決定した後、9および6のsiRNA配列を設計した。それぞれ、一方は高いプロリンアミドレベルを含有する産物を産生し、そして一方は低いプロリンアミドレベルを持つ産物を産生する、2つのCHO親細胞株および2つのmAb産生CHO細胞株をトランスフェクションし、そして培養した後、サイレンシング効果を試験した。培養後、qPCRによってPAM mRNAレベルを決定し、そして最も強力な効果を持つ2つのサイレンサーをshRNA設計のために選択した。shRNAを用いた細胞のトランスフェクションおよび続く細胞培養後、mRNAおよびPAMレベルの両方を分析した。実験詳細を以下に提示する。

【表1】

表1：私有CHO ESTデータベースから抽出されたPAM遺伝子配列

siRNA構築に用いた、私有CHO ESTデータベースから抽出されたPAM遺伝子配列（配列番号1）：
GGGAGTGCCTCCTAAGCCAGGCCAGTTCAGTGTTCCTCACAGTTTGGCCCTTGTGCCTCATTGACAGTTG TGTGTGGCAGACAGGGAAATGGCCGGATCCAATGTTTCAGAACTGACACCAAAGAATTTGTGAGAGAGATT AAACATGCGTCATTTGGGAGAAATGTATTTCGAATTTTCATATATATCAGGTTTGCTCTTTGCAGTAAATGGG AAGCCTTACTTTGGAGACCATGAACCTGTGCAAGGCTTTGTGATGAACTTTCCAGTGGGGAAATTATAGAT GTCTTCAAGCCAGTACGCAAGCACTTTGACATGCCTCACGATGTGGTTGCCCTTGACGATGGGAATGTGTAC ATTGGAGACGCACACACGAACACGGTGTGGAAGTTTACCCTGACTGAAAAAATGGAGCATCGATCGGTTAAA AAGGCAGGCATTGAGGCTCAGGAAATCAAAGAAACCGAGGCAGTTGTTGAATCCAAAATGGAGAACAACCC ACCTCCTCAGAATTGCAGAAGATGCAAGAGAAACAGAACTGATCAAAGAGCCAGGTTCCGGAGTGCCCGTG GTTCTCATTACAACCTTCTGGTTATTCTGTGGTTGTCCTGCTGGCCATTGTCATGTTTATTCGGTGGAAA AAATCAAGGGCCTTTGGAGGAAAA

siRNAおよびshRNA設計および調製

【0071】

それぞれの設計ツールを利用して、ペプチジルグリシン・アルファ - アミド化モノオキシゲナーゼ（PAM）遺伝子に対する siRNA 配列を設計した。遺伝子配列に基づいて、異なる配列および長さの siRNA を設計した（9 つはインビトロジェンにより、そして 6 つはアンピオンによる）（表 2）。siRNA 評価後、アンピオンのオンライン設計ツールを用いて、shRNA を設計した。各 shRNA の 2 つの相補的オリゴヌクレオチドをメタピオン（Methabion）によって合成し（表 3）、そして次いで、アニーリングさせて、社内で二本鎖オリゴヌクレオチドを生成した。続いて、アニーリングしたオリゴヌクレオチドを pサイレンサー 2 . 1 - U6 プューロベクター（図 8）にクローニングした。DNA 配列決定を実行して、オリゴヌクレオチド挿入物の配列を検証した。

【表 2】

表 2：siRNA のヌクレオチド配列

名称	siRNA_オリゴヌクレオチド	配列番号
siRNA_1	CAGUUGUGUGUGGCAGACAGGGAAA	2
siRNA_2	CGGAUCCAAUGUUUCAGAACUGACA	3
siRNA_3	CCAAUGUUUCAGAACUGACACCAAA	4
siRNA_4	GAGAGAGAUUAAACAUGCGUCAUUU	5
siRNA_5	CAUGCGUCAUUUGGGAGAAAUGUAU	6
siRNA_6	UGGGAGAAAUGUAUUCGCAAUUUCA	7
siRNA_7	GGGAGAAAUGUAUUCGCAAUUUCAU	8
siRNA_8	CACACGAACACGGUGUGGAAGUUCA	9
siRNA_9	CAAAGAAACCGAGGCAGUUGUUGAA	10
siRNA_1	CAGUAAAUGGGAAGCCUUATT	11
siRNA_2	AGGCAGUUGUUGAAUCCAATT	12
siRNA_3	AACAGAAACUGAUCAAAGATT	13
siRNA_4	CAAGAGAAACAGAAACUGATT	14
siRNA_5	GAACUGACACCAAAGAAUUTT	15
siRNA_6	UUUCAGAACUGACACCAAATT	16

【表 3】

表 3 : s h R N A のヌクレオチド配列

名称	shRNA_センス鎖 オリゴヌクレオチド	配列 番号	shRNA_アンチセンス鎖 オリゴヌクレオチド	配列 番号
SH5_HL PAM	5'GATCCGAACTGACACCA AAGAATTCTCAAGAGAAAT TCTTTGGTGTCTAGTTCTGT TTTTTGGAAA-3'	17	5'AGCTTTTCCAAAAACAGAAC TGACACCAAAGAATTTCTCTTGA GAATTCCTTTGGTGTCTAGTTCTG-3'	19
SH6_HL PAM	5'GATCCGTTTCAGAACTG ACACCAAACCTCAAGAGATT TGGTGTCTAGTTCTGAAACA TTTTTTGGAAA-3'	18	5'AGCTTTTCCAAAAATGTTTC AGAACTGACACCAAATCTCTTGA GTTTGGTGTCTAGTTCTGAAACG- 3'	20

10

s i R N A の再構成

【 0 0 7 2 】

s i R N A を D E P C 水中で再構成して、最終 4 0 μ M 濃度にした。3 0 p m o l の s i R N A を各平行ヌクレオフェクションに用いた。

20

p サイレンサーベクターへのヘアピン s i R N A 挿入物のクローニング

【 0 0 7 3 】

各 s h R N A に関する 2 つの相補的オリゴヌクレオチドをアニーリングさせて、二本鎖オリゴヌクレオチドを生成した。続いて、B a m H I および H i n d I I I 制限部位を用いて、アニーリングしたオリゴヌクレオチドを p サイレンサー 2 . 1 - U 6 ピューロベクター内にクローニングした。全方法を以下のように行った：

1 . およそ 1 0 0 μ l のヌクレアーゼ不含水中に、ヘアピン s i R N A テンプレートオリゴヌクレオチドを溶解する。

2 . オリゴヌクレオチドを T E 中、およそ 1 μ g / μ l に希釈する。

30

3 . 以下のように 5 0 μ l アニーリング混合物を合わせる（表 4 ）：

【表 4】

表 4 : s i R N A のアニーリング

量	構成要素
2 μ l	センス siRNA テンプレートオリゴヌクレオチド
2 μ l	アンチセンス siRNA テンプレートオリゴヌクレオチド
46 μ l	1×DNA アニーリング溶液

4 . 9 0 で 3 分間加熱し、次いで、3 7 インキュベーターに入れ、そして 1 時間インキュベーションする。

40

5 . 5 μ l のアニーリングしたヘアピン s i R N A テンプレート挿入物を 4 5 μ l のヌクレアーゼ不含水で希釈して、最終濃度 8 n g / μ l にする。

6 . 2 つの 1 0 μ l 連結反応；挿入物を加えた連結および挿入物を加えない陰性対照をセットアップする。

各試験管に、以下の試薬（表 5 ）を添加する：

【表 5】

表 5：連結反応

挿入物を加える	挿入物を加えない	構成要素
1 μ l	--	希釈したアニーリング siRNA 挿入物
--	1 μ l	1×DNA アニーリング溶液
6 μ l	6 μ l	ヌクレアーゼ不含有水
1 μ l	1 μ l	10×T4 DNA リガーゼ緩衝剤
1 μ l	1 μ l	p サイレンサーベクター
1 μ l	1 μ l	T4 DNA リガーゼ (5 U/ μ l)

10

7. 16 で一晩インキュベーションする。

8. 形質転換のため、pGEM-T イージーベクター系（プロメガ（Promega）・カタログ番号：A13801）を用いる：

a) 融解するまで、大腸菌（E. coli）JM109 コンピテント細胞を氷槽中に置く。

b) 50 μ l の細胞を連結反応試験管に移し、そして 3 μ l の連結反応を各試験管に添加する。試験管を穏やかにはじいて、そして 20 分間インキュベーションする。

c) 細胞を 42 の水槽中で 50 秒間熱ショック処理する。試験管を氷に直ちに 2 分間戻す。

20

d) 950 μ l の LB 培地を形質転換反応に添加し、そして 37 で振盪しながら 1.5 時間インキュベーションする（225 rpm）。

e) 100 μ l の各形質転換培養物を LB / アンピシリンプレート上にプレーティングし、そして 37 で一晩インキュベーションする。

f) siRNA テンプレート挿入物ピッキングでクローンを同定するため、プラスミド DNA を単離し、そして BamHI および HindIII で消化して、~ 65 bp siRNA テンプレート挿入物の存在を確認する。

9. 以下の配列決定プライマーを用いて挿入物を配列決定する（表 6）：

【表 6】

30

表 6：配列決定プライマー

順方向配列決定プライマー (配列番号 21)	逆方向配列決定プライマー (配列番号 22)
5'-AGGCGATTAAGTTGGGTA-3'	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'

【0074】

shRNA 発現構築物の単離および検証後、単一カッター制限エンドヌクレアーゼ SspI (AAT/ATT) を用いて、これらを直線化した。3 U/ μ g DNA (ニュー・イングランド・バイオラボ (New England Biolabs)、カタログ番号：R0132L) で SspI 酵素を用いて、反応あたり最大 50 μ g のプラスミド DNA を消化した。およその量の 10× 反応緩衝液および H₂O を反応に添加した。反応を 37 で 3 時間インキュベーションした。消化後、層流キャピネットで、以下のプロトコルに記載するように、DNA 沈殿を行った：

40

1. 1 体積のイソプロパノール (300 μ l) を添加する

2. 完全にボルテックスする

3. 21,000 g、4 で 30 分間遠心分離する

4. 上清を廃棄する

50

5. 1体積の無菌氷冷70%エタノールを注意深く添加する
6. 最大速度で1分間、4 で遠心分離する
7. 上清を廃棄する
8. ペレットを室温で5～30分間風乾する(層流キャビネット中)
9. 50 µl 無菌水中にDNAを再懸濁する

【0075】

次に、ナノドロップND-1000を用いて、直鎖DNAの純度(O.D. 260/280 nm)および濃度を決定した。

宿主細胞

【0076】

研究中、4つの異なる細胞株(親CHO K1 PDおよびSSF3細胞株、ならびに2つのmAb産生クローン、K25およびK62)を用いた。CHO K1 PD細胞株は、ATCC(カタログ番号CCL-61.3)から生じるCHO K1細胞株の下位集団である。元来の細胞株を血清不含懸濁培養に適應させ、そして3回連続して次第に希釈した植え付け密度での選択を経て、DM122培地中の血清不含サブクロニングの頻度を改善した。CHO SSF3細胞株は、DUKXB1由来の血清不含適應細胞株である。DUKXB1は、CHO K1細胞由来であった。機能性dhfrアレルはどちらもCHO K1中で連続して不活性化された。しかし、結果は、アレルの一方が不可逆的に不活性化されていないことを示した。連続血清不含培養は、予期せぬことに、元来、ジヒドロ葉酸レダクターゼ不全(dhfr⁻)であるCHO細胞において、低いジヒドロ葉酸レダクターゼ活性の発現を誘導した。

【0077】

pBW2017プラスミドベクターでのSSF3親細胞のトランスフェクションによって、K25およびK62を調製した。先の実験において、両クローンは、望ましくないプロリンアミド構造を含有するmAb産物を発現していることが示された。それぞれのmAb産物は、プロリンアミドの2つの極値を含有し、すなわちK25によって産生されるmAbに関しては低いプロリンアミド含量(4%)であり、そしてK62によって産生されるmAbに関しては高いプロリンアミド含量(14%)であったため、K25およびK62を、サイレンシング実験に含めた。

ヌクレオフェクション

【0078】

アマクサ(Amaxa)ヌクレオフェクション系を、細胞トランスフェクション(ヌクレオフェクターキットV、カタログ番号:VCA-1003)に用いた。一度に5プール以下をトランスフェクションして、すべての必要な細胞操作に十分な時間があることを可能にした。詳細なプロトコルを以下に記載する:

1. トランスフェクション時、細胞は、生存度 90%で、最大2E6/mlでなければならない。
2. ヌクレオフェクションあたり5E6細胞を用いる。
3. 細胞を計数し、そして50 ml 遠心管中、90 x g、室温で10分間遠心分離する。
4. 残りの培地を注意深く取り除き、そして溶液V(トランスフェクションあたり100 µl)中に細胞ペレットを再懸濁する。
5. DNA(30 pmol siRNA/ヌクレオフェクションまたは3 µg/ヌクレオフェクションshRNA)を添加し、そして穏やかに混合する。
6. DNAと混合した100 µlの細胞懸濁物をトランスフェクションキュベットに添加し、アマクサ・ヌクレオフェクター・デバイスに入れる。
7. アマクサ・プログラムU23を用いたヌクレオフェクションを通じて、細胞をトランスフェクションする。
8. キュベット内にいくつかの増殖培地を添加し、そして20 ml 培地を含む125 ml 振盪フラスコ中に、細胞を注意深く移す。キュベットを新鮮な培地で1～2回リンス

10

20

30

40

50

し、そして振盪フラスコに添加する。振盪装置 (1 2 0 r p m) 中、3 7 、1 0 % C O₂ で 2 4 ~ 4 8 時間、細胞をインキュベーションする。

増殖培地

【 0 0 7 9 】

C H O K 1 P D 細胞を、哺乳動物細胞培養に適した培地、例えば 8 m M L - グルタミン (シグマ、カタログ番号 : G 7 5 1 3) を補った D M 1 2 2 増殖培地中で培養した。C H O S S F 3 細胞を、8 m M L - グルタミン (シグマ、カタログ番号 : G 7 5 1 3) および 1 m g / L インスリン (ミリポア (M i l l i p o r e) 、カタログ番号 : 1 0 1 3 1 - 0 2 7) を補った D M 1 2 2 増殖培地中で培養した。K 2 5 および K 6 2 を、8 m M L - グルタミン (シグマ、カタログ番号 : G 7 5 1 3) 、1 m g / L インスリン (ミリポア、カタログ番号 : 1 0 1 3 1 - 0 2 7) および 1 5 0 n M メトトレキサート (メトトレキサート水和物、シグマ、カタログ番号 : M 8 4 0 7) を補った D M 1 2 2 増殖培地中で培養した。さらに 3 μ g / m l および続いて 5 μ g / m l のピューロマイシン (ギブコ (G i b c o) 、カタログ番号 : A 1 1 1 3 8 - 0 2) をさらに補った同じ培地中で、細胞選択工程を行った。

10

細胞の融解 / 凍結

【 0 0 8 0 】

7 0 % エタノール中、3 7 でバイアルを融解した。1 m l あたりおよそ 1 E 5 生存細胞の最初の細胞密度で、5 0 m l のあらかじめ温めた培地を含有する 2 5 0 m l 振盪フラスコに、細胞を 1 滴ずつ直接接種した。細胞を 3 7 、1 0 % C O₂ 、1 2 0 r p m で培養した。細胞を、生存度 > 9 0 % の指数関数的増殖期に凍結した。バイアルあたり 5 ~ 1 0 E 6 生存細胞を、7 . 5 % D M S O を含有する馴化培地中で凍結した。まず、細胞培養を 1 8 0 g 、室温で 5 分間、遠心分離し、余分な上清を廃棄した。続いて、D M S O を最終濃度 7 . 5 % まで添加した。細胞ペレットを穏やかに再懸濁した。凍結バイアルに 1 m l の細胞懸濁物を満たし、そしてミスター・フロスティ (M r . F r o s t y) 凍結ボックス中、- 8 0 ディープフリーザーに移した。1 ヶ月以内に、凍結バイアルを液体窒素容器に移した。

20

細胞の培養および取り扱い

【 0 0 8 1 】

s i R N A 実験のため、ヌクレオフェクションを用いて、C H O K 1 P D 細胞を s i R N A でトランスフェクションし、そして 4 日間培養した。第 4 日、q P C R 分析のため、細胞ペレットを収集した。s h R N A 実験のため、ヌクレオフェクションを用いて、すべての 4 つの細胞株 (C H O K 1 P D 、C H O S S F 3 、K 2 5 および K 6 2) を s h R N A でトランスフェクションした。2 - 2 - 3 日スケジュールで、適切なあらかじめ温めた培地中、1 m l あたり 2 ~ 3 E 5 細胞で細胞をスプリットして、指数関数的細胞増殖を維持した。適切な細胞密度および生存度に到達した後、細胞を分割し、そしてさらに 4 つの別個の工程でプロセッシングした :

30

- 1 . q P C R のため、試料を収集した (細胞ペレット)
- 2 . 3 μ g / m l のピューロマイシンを含有する 1 0 日バッチを接種した (1 0 日後、C E X 分析のため、上清を収集した)
- 3 . 各細胞培養の 3 つの細胞バイアルを凍結した
- 4 . 5 μ g / m l のピューロマイシンを含有する培地中で、細胞をさらに培養した。

40

【 0 0 8 2 】

5 μ g / m l のピューロマイシンを用いて、適切な細胞密度および生存度に到達した後、工程 1 、2 、3 を反復した。

【 0 0 8 3 】

1 2 5 m l 振盪フラスコ中で細胞を培養した。インキュベーション条件 : D M 1 2 2 培地に関して、3 7 、1 2 5 および 2 5 0 m l 振盪フラスコに関して、9 0 ~ 1 1 0 r p m 、および 1 0 % C O₂

ピューロマイシン選択

50

【 0 0 8 4 】

ピューロマイシンを用いた抗生物質選択が、トランスフェクション後の第一の選択工程であった。最終濃度 3 m g / m l で、ピューロマイシンを用いて、すべてのトランスフェクションプールを選択した。細胞生存度が 6 0 % を超えたトランスフェクション 2 日後に、ピューロマイシンを細胞培養に添加した。各プールが少なくとも 8 5 % 細胞生存度に到達した後、本発明者らは、5 m g / m l のピューロマイシンを用いた選択に進行した。

R N A 単離および c D N A 合成

【 0 0 8 5 】

R N A 単離前に、1 0 n g のルシフェラーゼ R N A (プロメガ、カタログ番号 : L 4 5 6 1) を 5 E 6 細胞に添加した。自動化ワークステーション Q I A キューブ上で、R N イー
 10
 ージミニキット (キアゲン (Q i a g e n) 、カタログ番号 : 7 4 1 0 4) を用いて、総 R N A (t o t R N A) を単離した。単離後、ナノドロップ上で、t o t R N A 濃度を測定した。続いて、D N アーゼ I (アンピオン、カタログ番号 : A M 1 9 0 6) を 5 μ g の t o t R N A (表 7) に添加し、そしてインキュベーションした (2 5 分 3 7 、 1 0 分 7 5) 。D N アーゼ処理後、スーパースクリプト V I L O キット (インビトロジェン、カタログ番号 : 1 1 7 5 4 - 0 5 0) を用いて、R N A を c D N A に転写した。

【 表 7 】

表 7 : D N アーゼ I 処理および c D N A 合成

D N アーゼ処理		c D N A 合成	
5 μ g totRNA	X μL	D N アーゼ処理 totRNA	5 μL
10× D N アーゼ I 緩衝剤	5 μL	5× V I L O 反応混合物	4 μL
D N アーゼ I	5 μg	10×スーパースクリプト酵素	2 μL
NF 水	50 μL まで	DEPC 水	9 μL

20

q P C R

【 0 0 8 6 】

m R N A レベル決定のため、タックマン (T a q M a n) 化学反応に基づく q P C R 法を用いた (タックマン・マスターミックス、アプライドバイオシステムズ (A p p l i e d B i o s y s t e m s) 、カタログ番号 : 4 3 2 6 7 0 8 およびアッセイバイデザイン、アプライドバイオシステムズ、カタログ番号 : 4 3 3 1 3 4 8 、表 8 を参照されたい) 。絶対定量を用いて P A M m R N A 発現レベルを計算し、そして細胞あたり、ならびに参照遺伝子 A C T B (β - アクチン) あたりの m R N A 転写物の数として表した。A C T B 遺伝子あたりの計算の場合、単離ゲノム D N A を用いて標準曲線を構築し、そして A C T B m R N A コピー数の決定に用いた。P A M および A C T B の m R N A の間の比を決定した。細胞あたりの m R N A コピー数を計算した際、ルシフェラーゼ D N A を用いて標準曲線を構築し、そしてルシフェラーゼに対する m R N A コピー数を決定した。次いで、P A M および L U C の m R N A の間の比を計算し、そして細胞あたりの P A M の m R N A レベルを決定した (図 1 ~ 6 を参照されたい)

30

【表 8】

表 8 : qPCRプライマーおよびプローブのヌクレオチド配列

	順方向 プライマー	配列 番号	逆方向 プライマー	配列 番号	プローブ	配列 番号
PAM	GGCCGGATC CAATGTTTC AGAA	23	TCCCAAATGA CGCATGTTTA ATCTCT	26	FAM-CTGACA CCAAAGAATT T	29
ACTB	AGCCACGCT CGGTCAG	24	CATCCTGCGT CTGGACCT	27	FAM-CCGGGA CCTGACAGAC T	30
LUC	CTGATTTTT CTTGCGTCG AGTTT	25	GAGTTGTGTT TGTGGACGAA GTAC	28	FAM-TCCGGT AAGACCTTTC G	31

10

カチオン交換クロマトグラフィ (CEX)

【0087】

20

分析HPLCクロマトグラフィ系を用いて、CEXによって、プロテインA精製したmAbを分析した。この方法を用いると、Lysおよびプロリンアミドは同じピークに溶出した。カルボキシペプチダーゼを用いた産物C末端処理によって、プロリンアミドの量をさらに決定した。同じCEX分析を続けて、残ったピークはプロリンアミドの量を示す。

実験結果

【0088】

この研究の目的は、siRNAおよびshRNAによって、PAM遺伝子に対するサイレンシング効果を評価することであった。それぞれ、mRNAおよびタンパク質レベルに対するPAMのサイレンシングを決定した。CHO K1 PD細胞をsiRNAによってトランスフェクションして、最も強力なサイレンシング効果を持つ配列を決定した(図1~2および表9~10)。

30

【表 9】

表 9 : A C T B あたりまたは L U C あたりで計算した際の % 相違でのサイレンシング効果

siRNA インビトロジェン			siRNA アンピオン		
	ACTB あたりの サイレンシング [%]	LUC あたりの サイレンシング [%]		ACTB あたりの サイレンシン グ [%]	LUC あたりの サイレンシング [%]
si1	60.5	50.2	si1	31.9	32.1
si2	79.7	78.4	si2	56.1	62.4
si3	85.7	83.8	si3	45.2	50.6
si4	68.0	64.7	si4	52.0	56.5
si5	78.0	73.3	si5	73.2	74.1
si6	89.6	89.1	si6	71.9	74.0
si7	87.9	85.6			
si8	85.5	83.9			
si9	55.0	51.8			

【表 10】

表 10 : スチューデント t 検定

siRNA インビトロジェン			siRNA アンピオン		
	p 値	p 値		p 値	p 値
si1	0.11	0.09	si1	0.58	0.16
si2	0.06	0.11	si2	0.32	0.04
si3	0.06	0.03	si3	0.44	0.03
si4	0.09	0.06	si4	0.36	0.03
si5	0.07	0.04	si5	0.22	0.01
si6	0.05	0.03	si6	0.23	0.02
si7	0.05	0.03			
si8	0.06	0.03			
si9	0.13	0.08			

【 0 0 8 9 】

上に示す結果から（図 1 ~ 2 および表 9）、本発明者らは、インビトロジェン s i R N A を用いると P A M m R N A 発現の最大 9 0 % の減少があり、そしてアンピオン s i R N A を用いると最大 7 5 % の減少があると結論づけ可能であった。スチューデント t 検定（表 10）を実行して、どの s i R N A が陰性対照と有意に異なるかを決定した。結果は、パーセント相違の計算後に得られるものと同じ観察を示す（より低い P 値は、陰性対照に比較した発現の相違がより大きいことを示す）。これらの結果に基づいて、2 つの s i R N A 配列を選択し、そして s h R N A ベクターを構築した（P A M に関して、s i 5、s i 6）。s h R N A 設計限界のため、アンピオン s i R N A 由来の配列のみを s h R N A 構築に用いた。P A M のサイレンシングを評価するため、2 つの親細胞株 C H O K 1 P D および S S F 3、ならびに 2 つの m A b 産生クローン（産物に関して低いプロリンアミド含量の K 2 5 および高い含量の K 6 2）をそれぞれ 2 つの s h R N A 各々で、そして両方の混合物でトランスフェクションした。2 つの異なる濃度のピューロマイシンで、

連続して、トランスフェクション細胞の選択を行った（図 3 ～ 6）。産生された m A b の C E X 分析によってタンパク質レベルに関して P A M のサイレンシングをさらに評価し、そして m R N A レベルへの相関を決定した（図 7）。

【 0 0 9 0 】

図 3 ～ 6 に関する結果は、試験する細胞株に対する異なる s h R N A および異なる濃度のピューロマイシン（ピューロ）を用いた、P A M の m R N A 発現レベルを示す。最高のサイレンシング効果は、それぞれ、すべての細胞株に対して、s h 6（単独で用いた場合または s h 5 と混合して）を用いると観察された。これはまた、P A M m R N A の発現の % 減少を計算し（表 1 1）、そしてスチューデント t 検定を用いる（表 1 2）ことによっても証明された。5 μ g / m l ピューロマイシンを用いると、発現レベルの小規模な減少のみが観察された。

【表 1 1】

表 1 1 : A C T B あたりまたは L U C あたりで計算した際の % 相違でのサイレンシング 効果

		ACTB あたり のサイレン シング[%]	LUC あたり のサイレン シング[%]			ACTB あたり のサイレン シング[%]	LUC あたり のサイレン シング[%]
K25 3 μ g ピューロ	sh5/1	-50.8	-18.8	K62 3 μ g ピューロ	sh6	44.9	38.8
	sh6/1	58.6	56.9		sh5+6	55.1	66.5
	sh5+6/1	45.2	48.6				
K25 5 μ g ピューロ	sh5/1	16.2	47.0	K62 5 μ g ピューロ	sh6	38.8	52.0
	sh6/1	63.7	76.6		sh5+6	41.9	47.3
	sh5+6/1	27.0	45.9				
PD 3 μ g ピューロ	sh5	32.1	37.7	SSF3 3 μ g ピューロ	sh5	2.0	18.5
	sh6	63.2	65.1		sh6	30.5	20.8
PD 5 μ g ピューロ	sh5	48.9	55.7	SSF3 5 μ g ピューロ	sh5	38.8	55.4
	sh6	80.3	83.1		sh6	56.8	67.9

【表 1 2】

表 1 2 : スチューデント t 検定

		ACTB あたり のサイレン シング[%]	LUC あたり のサイレン シング[%]			ACTB あたり のサイレン シング[%]	LUC あたり のサイレン シング[%]
K25 3 μ g ピュロ	sh5/1	0.06	0.67	K62 3 μ g ピュロ	sh5	0.02	0.27
	sh6/1	0.04	0.27		sh6	0.01	0.01
	sh5+6/1	0.04	0.33				
K25 5 μ g ピュロ	sh5/1	0.56	0.35	K62 5 μ g ピュロ	sh5	0.09	0.24
	sh6/1	0.04	0.18		sh6	0.02	0.05
	sh5+6/1	0.17	0.35				
PD 3 μ g ピュロ	sh5	0.17	0.01	SSF3 3 μ g ピュロ	sh5	0.94	0.68
	sh6	0.03	0.00		sh6	0.51	0.70
PD 5 μ g ピュロ	sh5	0.07	0.00	SSF3 5 μ g ピュロ	sh5	0.06	0.12
	sh6	0.01	0.00		sh6	0.17	0.16

10

20

【 0 0 9 1】

図 7 の結果は、mRNA および PAM 修飾 mRNA の間の相関を示す。この相関はまた、ピアソン関数（ピアソン相関係数は 0.55 と決定された）を計算することによってまた示された。

2. ジンクフィンガーヌクレアーゼを用いることによる、CHO 細胞におけるターゲティング化遺伝子ノックアウト

【 0 0 9 2】

ZFN を設計して、高い特異性で選択した遺伝子座をターゲティングすることも可能である。これらのヌクレアーゼの一過性発現に際して、ターゲット遺伝子はまず ZFN によって切断され、そして次いで、天然であるが不完全な DNA 修復プロセスである非同源末端連結によって修復される。これはしばしば、突然変異体（ヌル）アレルの生成を生じる。こうしたアプローチは、例えば、サンティアゴ（Santiago）ら、2008（「操作ジンクフィンガーヌクレアーゼを用いることによる、哺乳動物細胞におけるターゲティング化遺伝子ノックアウト」、PNAS 2008 年 4 月 15 日、105 巻 15 号）に記載される。

30

【 0 0 9 3】

PAM 遺伝子座をターゲティングする部位特異的ジンクフィンガーヌクレアーゼを設計し、そしてそのターゲット部位への DNA 結合に関してインビトロでスクリーニングする。ZFN のヌクレアーゼ機能は、DNA 結合性ジンクフィンガータンパク質に連結されたエンドヌクレアーゼ FokI の触媒ドメインによって与えられる。

40

【 0 0 9 4】

ZFN の各対を発現するプラスミドを CHO 細胞にトランスフェクションする。各細胞プールにおける、ターゲット部位での ZFN 仲介性破壊の頻度を、CEL-I ヌクレアーゼを用いることによって決定する。

【 0 0 9 5】

CHO-S 細胞を ZFN 対でトランスフェクションして、そして次いで、限界希釈でプレートングして、単細胞由来 PAM 不全細胞株を得ることによって、PAM^{-/-}細胞株を生成する。希釈クローニング（平均 1 ウェルあたり 1 つの細胞）後、CEL-I アッセ

50

イを用いて、PAM遺伝子破壊に関して単離体を分析する。各細胞株における突然変異体アレルの正確な配列、およびしたがって遺伝子型は、ターゲット遺伝子座をPCR増幅し、そしてPCR産物をクローニングすることによって、決定される。

3. TALENでの遺伝子ターゲティング

【0096】

TALENは、FokIヌクレアーゼにカップリングした、集合したDNA結合モチーフからなる、新規融合タンパク質である。DNA結合モチーフは、細菌、キサントモナス属(*Xanthomonas*)中の植物病原体によって分泌されるタンパク質に由来する。

【0097】

カスタムTALEN、またはTALEフェクター構築物の集合は、例えばセルマック(Cermak)ら、2011(DNAターゲティングのためのカスタムTALENおよび他のTALEフェクターに基づく構築物の効率的な設計および集合)に記載され、そして2つの工程を伴う:(i)リピートモジュールを、1~10リピートの中間アレイに集合させ、そして(ii)中間アレイを、最終構築物を作るバックボーンに参加させる。このプロセスの詳細は、セルマックら、2011に記載される。

【0098】

TALENを設計するソフトウェアが、オンラインツール(TALEフェクター-ヌクレオチドターゲット、TALE-NT;<http://boglabx.plp.iastate.edu/TALENT/>)として使用のために利用可能である。該ツールは、ターゲティングしようとする関心対象の遺伝子、例えばPAM遺伝子のDNA配列を入力するためのウィンドウを提供する。該ソフトウェアは、長さ15~30bpの間であり、そしてスパーサーによって分離されているTALEN認識部位のセットを同定する。デフォルトスパーサー長は、15bpおよび18~30bpであるが、他の長さが使用者によって特定されてもよい。さらに、ボタンによって、使用者が設計指針を個々に除外することが可能である。

【0099】

PAM遺伝子をターゲティングするTALEN対の1つを、XhoIおよびAflIIを用いて、哺乳動物発現ベクターpCDNA3.1(-)(インビトロジェン)にサブクローニングする。これらの酵素は、pTAL3またはpTAL4から全TALENを切除し、そしてコード配列をCMV(サイトメガロウイルス)プロモーターの調節下に置く。製造者のプロトコルにしたがって、リポフェクタミン2000(インビトロジェン)を用いたトランスフェクションによって、生じたプラスミドをHEK293T細胞に導入する。トランスフェクション72時間後に細胞を収集し、そしてゲノムDNAを単離し、そしてTALENターゲット部位のスパーサー配列中で切断するHpy188Iで消化する。消化後、ターゲット部位を含む染色体断片を、PCRによって増幅する。完了後、4μlのTaq DNAポリメラーゼと、反応を72で20分間インキュベーションする。次いで、PCR産物をHpy188Iで消化し、そしてTOPO-TAベクター(インビトロジェン)中にクローニングした。全長PCR産物を含有する独立クローンを配列決定して、切断部位での突然変異を評価した。

10

20

30

40

【図 1】

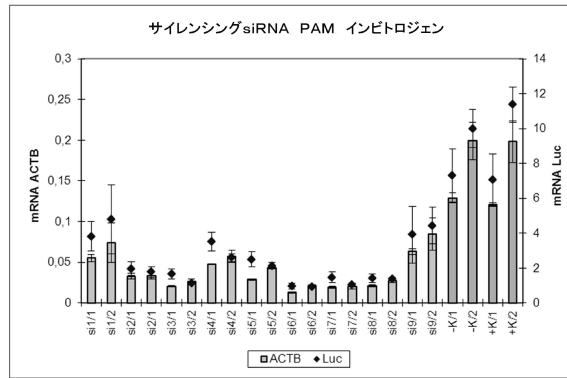


図 1

【図 2】

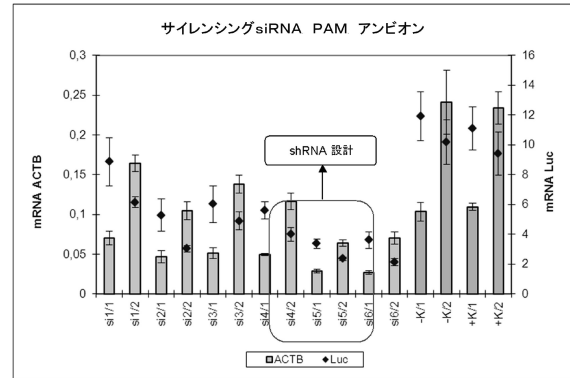


図 2

【図 3】

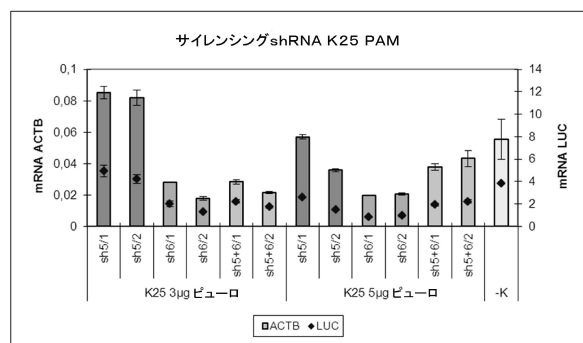


図 3

【図 4】

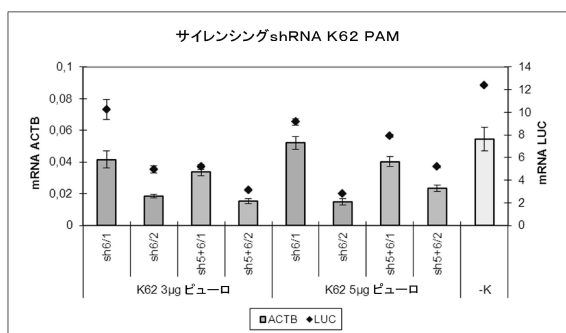


図 4

【図 6】

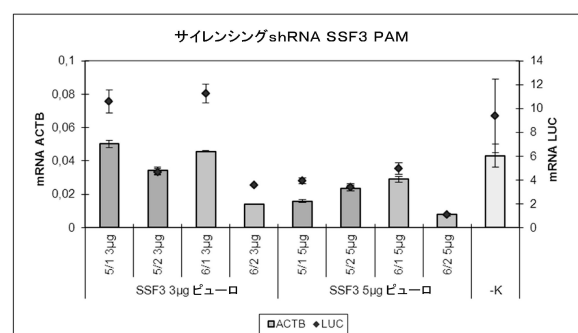


図 6

【図 5】

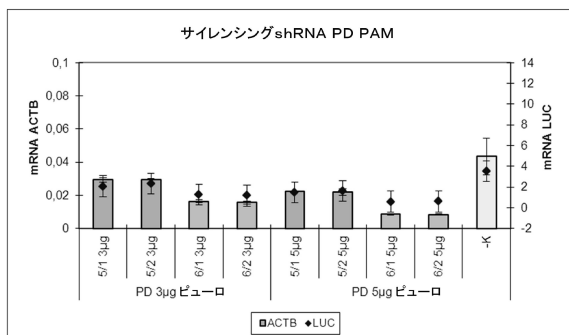


図 5

【図 7】

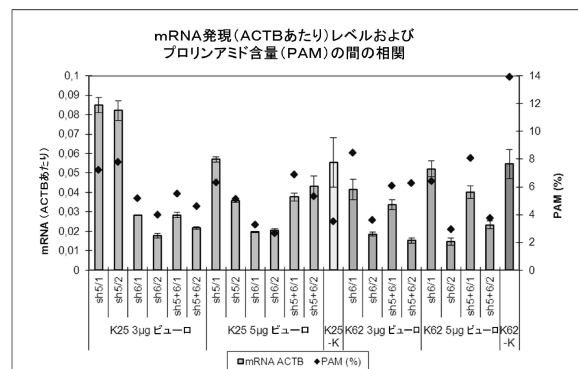


図 7

【 図 8 】

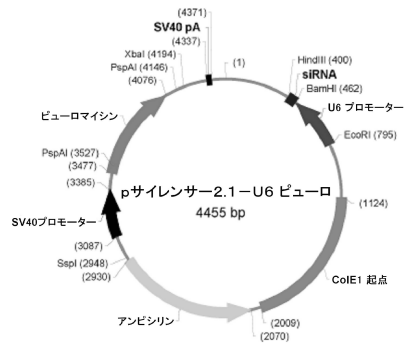


図 8

【 図 9 】

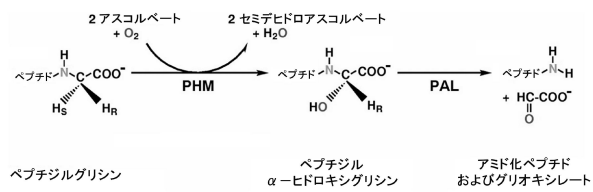


図 9

【 配列表 】

0006438387000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 P 21/08 (2006.01) C 1 2 P 21/08

合議体

審判長 長井 啓子

審判官 山中 隆幸

審判官 小暮 道明

(56)参考文献 国際公開第2012/062810(WO,A1)
国際公開第2007/087253(WO,A1)

(58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)

C12N5/10

C12N15/09

C12P21/02

C12N5/04

C12N5/071

C12P21/08