

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6587696号
(P6587696)

(45) 発行日 令和1年10月9日 (2019. 10. 9)

(24) 登録日 令和1年9月20日 (2019. 9. 20)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

C 1 2 N 15/09 1 0 0

C 1 2 N 5/10 (2006. 01)

C 1 2 N 5/10 Z N A

C 1 2 N 1/19 (2006. 01)

C 1 2 N 1/19

C 1 2 P 21/00 (2006. 01)

C 1 2 P 21/00 C

C 1 2 P 21/08 (2006. 01)

C 1 2 P 21/08

請求項の数 9 (全 71 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-559426 (P2017-559426)
 (86) (22) 出願日 平成28年5月13日 (2016. 5. 13)
 (65) 公表番号 特表2018-515105 (P2018-515105A)
 (43) 公表日 平成30年6月14日 (2018. 6. 14)
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2016/052774
 (87) 国際公開番号 W02016/181357
 (87) 国際公開日 平成28年11月17日 (2016. 11. 17)
 審査請求日 平成30年1月18日 (2018. 1. 18)
 (31) 優先権主張番号 194/CHE/2015
 (32) 優先日 平成27年5月13日 (2015. 5. 13)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 インド (IN)

(73) 特許権者 517169861
 ズムツール バイオロジクス、インコーポ
 レイテッド
 アメリカ合衆国 01801 マサチュー
 セッツ、ウーバン、トレード センター
 100、センチュリー スイーツ、スイ
 ト ジー - 700
 (74) 代理人 110000855
 特許業務法人浅村特許事務所
 (72) 発明者 チャッテルジー、ソハング
 インド国、バンガロール、ヘッパル、ゴー
 ドレージ ウッズマン エステート、タワ
 - 5 リンデン、ビー903

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アフコシル化タンパク質、前記タンパク質を発現する細胞、及び関連する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗体依存性細胞媒介性細胞障害 (ADCC) 活性を有する抗体をコードする遺伝子と、
 配列番号 11 及び配列番号 13 からなる CRISPR DNA 結合ドメイン、tracrRNA
 をコードする核酸配列、及び Cas9nヌクレアーゼをコードする配列番号 3 を
 含むベクターと
 を含む抗体産生細胞。

【請求項 2】

前記抗体が、抗 CD20 抗体、抗 EGFR 抗体、抗 Her2 抗体、抗 CD19 抗体、抗
 LAG3 抗体、抗 CD40 抗体、抗 EphA3 抗体、抗 HIV 中和抗体、抗 HCV 中和抗
 体、及び抗 Dengue 熱中和抗体からなる群より選択される、
 請求項 1 に記載の細胞。

【請求項 3】

COS、CHO-S、CHO-K1、CHO-K1 GS (-/-)、CHO-DG4
 4、CHO-DUXB11、CHO-DUKX、CHOK1SV、VERO、MDCK
 、W138、V79、B14AF28-G3、BHK、HaK、NS0、SP2/O-A
 g14、HeLa、HEK293-F、HEK293-H、HEK293-T、YB23
 HL.P2.G11.16Ag.20、perC6、抗体産生ハイブリドーマ細胞、胚性
 幹細胞、ナマルバ細胞、スポドプテラ・フルギペルダ (Spodoptera fugi
 perda) (Sf) 由来の昆虫細胞系、ピキア属、サッカロミセス属、及びシゾサッカ

10

20

ロミセス属からなる群より選択される、請求項 1 に記載の細胞。

【請求項 4】

CHO 細胞であり、
前記抗体が、抗 Her 2 抗体である、
請求項 2 に記載の細胞。

【請求項 5】

請求項 1 に記載の抗体産生細胞を得る方法であって、
配列番号 1 1 及び配列番号 1 3 からなる CRISPR DNA 結合ドメイン、tracrRNA をコードする核酸配列、及び Cas 9 ヌクレアーゼをコードする配列番号 3 を含むベクターを、抗体依存性細胞媒介性細胞障害 (ADCC) 活性を有する抗体をコードする遺伝子を有する細胞にトランスフェクトして、フコースノックアウト細胞を得るステップを含む、
上記方法。

10

【請求項 6】

前記細胞が、抗体依存性細胞媒介性細胞障害 (ADCC) を有する抗体をコードする遺伝子を含み、

前記抗体が、抗 CD 20 抗体、抗 EGFR 抗体、抗 Her 2 抗体、抗 CD 19 抗体、抗 LAG 3 抗体、抗 CD 40 抗体、抗 EpHA 3 抗体、抗 HIV 中和抗体、抗 HCV 中和抗体、及び抗 Dengue 熱中和抗体からなる群より選択され、

Cas 9 ヌクレアーゼが細胞の Fut 8 遺伝子を破壊し、Fut 8 遺伝子の配列が、
エクソン 7 における切断により破壊され、そして

20

細胞が、COS、CHO-S、CHO-K1、CHO-K1 GS (-/-)、CHO-DG44、CHO-DUXB11、CHO-DUKX、CHOK1SV、VERO、MDCK、W138、V79、B14AF28-G3、BHK、HaK、NS0、SP2/0-Ag14、HeLa、HEK293-F、HEK293-H、HEK293-T、YB23HL、P2.G11.16Ag.20、perC6、抗体産生ハイブリドーマ細胞、胚性幹細胞、ナマルバ細胞、スポドプテラ・フルギペルダ (Spodoptera fugiperda) (Sf) 由来の昆虫細胞系、ピキア属、サッカロミセス属、及びシゾサッカロミセス属からなる群より選択される、
請求項 5 に記載の方法。

30

【請求項 7】

アフコシル化タンパク質を得る方法であって、請求項 5 に記載の方法により得られたフコースノックアウト細胞により発現されるタンパク質を得るステップを含む上記方法。

【請求項 8】

前記タンパク質が、抗体依存性細胞媒介性細胞障害 (ADCC) に関与する抗体であり、

前記抗体が、抗 CD 20 抗体、抗 EGFR 抗体、抗 Her 2 抗体、抗 CD 19 抗体、抗 LAG 3 抗体、抗 CD 40 抗体、抗 EpHA 3 抗体、抗 HIV 中和抗体、抗 HCV 中和抗体、及び抗 Dengue 熱中和抗体からなる群より選択される、

請求項 7 に記載の方法。

40

【請求項 9】

フコースノックアウト細胞が、COS、CHO-S、CHO-K1、CHO-K1 GS (-/-)、CHO-DG44、CHO-DUXB11、CHO-DUKX、CHOK1SV、VERO、MDCK、W138、V79、B14AF28-G3、BHK、HaK、NS0、SP2/0-Ag14、HeLa、HEK293-F、HEK293-H、HEK293-T、YB23HL、P2.G11.16Ag.20、perC6、抗体産生ハイブリドーマ細胞、胚性幹細胞、ナマルバ細胞、スポドプテラ・フルギペルダ (Spodoptera fugiperda) (Sf) 由来の昆虫細胞系、ピキア属、サッカロミセス属、及びシゾサッカロミセス属からなる群より選択される、請求項 7 に記載の方法。

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は、バイオテクノロジー、遺伝子工学、及び免疫学の分野に関する。特に、本開示は、特定の生物学的経路が改変される細胞系の開発に関する。そのような改変は、細胞の酵素、特にタンパク質のグリコシル化に関与する酵素内に存在する。本開示によれば、タンパク質グリカン鎖の特異的改変を実現するタンパク質発現系が開発される。グリカン鎖の特異的改変により、抗体を含め、アフコシル化タンパク質が生成する。本開示は、タンパク質産生細胞系、特に抗体産生細胞系において、規則的な間隔をもってクラスター化された短鎖反復回文配列（C R I S P R）技術を利用する。得られたモノクロナール抗体は、完全にアフコシル化されており、より高度の抗体依存性細胞傷害を示す。

10

【背景技術】

【0002】

本開示の背景及び先行技術

真核生物におけるグリコシル化は、最も一般的な共有結合性の翻訳後タンパク質修飾機構として、数十年にわたり集中的に試験されてきた。ヒトトランスクリプトーム（約250～500個の糖鎖遺伝子）の約1～2%が、グリコシル化に関与するタンパク質を翻訳するものと予測されている（Campbell及びYarema、2005年）。細胞タンパク質のグリコシル化は、多くの生物学的機能、例えばタンパク質フォールディング、安定性、細胞内及び細胞間の輸送、細胞-細胞相互作用及び細胞マトリックス相互作用等において重要な役割を演じている。

20

【0003】

糖タンパク質には4つの異なる群：N-結合型、O-結合型、グリコサミノグリカン、及びグリコシルフォスファチジルイノシトールアンカー型タンパク質が存在する。N-結合型のグリコシル化は、アスパラギン残基の側鎖アミド窒素を介して生じ、Asn-X-Ser/Thrのアミノ酸配列内で行われるが、この場合、Xは、プロリン及びアスパラギン酸を除く任意のアミノ酸であり得る（Helenius及びAebi、2004年）。O-結合型のグリコシル化は、セリン又はトレオニン残基の側鎖内の酸素原子を利用する。

30

【0004】

フコース（6-デオキシ-L-ガラクトース）は、脊椎動物、無脊椎動物、植物、及び細菌内に存在する多くの糖タンパク質及び糖脂質中に存在する単糖である。フコシル化は、フコース残基を様々なタンパク質及びオリゴ糖に転移させるプロセスである。フコシル化は、フコシルトランスフェラーゼ、グアノシンジホスファート（GDP）-フコース合成酵素、及びGDP-フコーストランスポーター（複数可）を含むいくつかの分子により制御される。フコシル化糖タンパク質の多数は、細胞表面上の分泌タンパク質又は膜タンパク質である。

40

【0005】

過去20年における抗腫瘍薬開発の最も顕著な変化は、古典的な細胞傷害性薬から、「モノクロナール抗体」又はmAbとして知られている、癌に関わるシグナリング路に影響を及ぼす薬物への移行であった。本明細書に記載する技術を介してモノクロナール抗体治療を改善すれば、そのような改善は、患者にとってより良好な臨床転帰をもたらす道標となる。

【0006】

ヒトIgG1抗体は、高度にフコシル化した糖タンパク質である。フコース、ガラクトース、バイセクティングN-アセチルグルコサミン、及びシアル酸が様々な付加したコアヘプタサッカライドからなる2つのN-結合型二分岐オリゴ糖が、IgG1のAsn-2

50

97に存在する。抗体のグリコシル化は、「エフェクター機能」-抗体依存性細胞傷害(ADCC)及び補体依存性細胞傷害(CDC)として知られている特有の生物学的機能をもたらす。

【0007】

IgG分子のエフェクター機能は、抗体Fc領域とFcRとして知られている白血球受容体との相互作用、又は補体成分との相互作用により定義される。オリゴ糖構造の構成は、FcR結合を介したエフェクター機能にとってきわめて重要である(Shieldsら、2002年;Shinkawaraら、2003年;Niwarら、2004年;Niwa、Shoji-Hosakaraら、2004年;Yamane-Ohnukiら、2004年)。ヒトIgG1の結晶構造解析により、オリゴ糖鎖とCH2ドメインとの複雑な相互作用が明らかにされた(Harrisら、1998年;Radaevら、2001年)。

10

【0008】

ADCC機構の効率は、抗体のフコシル化レベルに顕著に依存する。フコシル化度が低いほど、ADCCの速度は高まる。したがって、フコシル化の喪失は、重大な生物学的結果を引き起こす。喪失は、フコシルトランスフェラーゼ酵素の機能欠如に起因し、その結果、細胞タンパク質の非フコシル化を引き起こす。プライマリーN-アセチルグルコサミン由来のフコースが存在しないと、結果として、FcRIII受容体に対する結合親和力が高まったIgG1抗体が得られ、その結果ADCCの効率が50~100倍高まる。非フコシル化IgGによるADCCの改善は、FcRIIIに対するアフィニティーの上昇と直接比例し、非フコシル化IgGのFcが正常血清中の高濃度のフコシル化IgGとの競合を克服できるようにする。非フコシル化IgGのFcのFcRIIIaに対するアフィニティー上昇に関する妥当な根拠として、受容体-リガンド界面における立体障害の低下又は欠如を挙げることができる(Harris、1998年;Radaev、2001年)。

20

【0009】

哺乳動物発現系では、フコシル化に必須の基質であるGDP-フコースが、デノボ経路及びサルベージ経路を介して細胞質内で合成される。フコシル化のデノボ経路では、GDP-フコースが、GDP-マンノースからGDP-4-ケト-6-デオキシマンノースへの変換を介して合成されるが、この合成は、酵素GDP-マンノース-4,6-デヒドラターゼ(GMD)により触媒される。このGDP-フコースは、次にゴルジ内部に輸送され、そして酵素-1,6-フコシルトランスフェラーゼ(FUT8遺伝子によりコードされる)によりタンパク質をフコシル化するための基質として用いられる。

30

【0010】

哺乳動物プラットフォームにおいて開発された治療抗体の非フコシル化形態は、フコースの生合成に障害が生じた場合に生ずるが、標的腫瘍細胞に対するADCCの効率強化に起因して、フコシル化した形態よりも臨床的長所を有し得る。

【0011】

歴史的には、遺伝子ロックアウトシステムは、相同的組換え(HR)により媒介される標的突然変異である欠損、及び/又は挿入に完全に依存した。HRシステムは非常に特異的であるものの、1つの突然変異したクローンを見つけ出すのに数千ものクローンをスクリーニングする必要があるので非常に非効率的である。更に、対立遺伝子変異を除去するには、一層多くの時間がかかり、より大規模なスクリーニングとなる。

40

【0012】

ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)は、遺伝子破壊において最も頻繁に用いられる技術の1つである。同酵素は、ジンクフィンガータンデムアレイ毎に、DNAレベルの3つの塩基を必要とする。更に、ジンクフィンガーアレイ内の個々のフィンガー間で標的部位が重なり合い、そして相互応答するので、配列特異的ZFNの生成は顕著に複雑化する。更に、ZFNの主な欠点として、特異的DNA配列認識に関するZFNモチーフを識別するための、労力と時間のかかる実験的選択プロセスが挙げられる。

50

【0013】

F u t 8 ゲノム座位を破壊する方法が、先行技術に認められる。但し、そのいずれの方法も、アフコシル化タンパク質のためにコードする細胞からアフコシル化タンパク質を生成するために、C R I S P R 技術により、F U T 8 ゲノム座位上の特定箇所を標的とするものではない。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

本開示は、C R I S P R 技術を用いて、F U T 8 ゲノム座位上の特異的箇所を標的とすることにより、先行技術の方法と関連した欠点又は限界を克服するが、その結果、遺伝子及び関連機能が完全に破壊され、非フコシル化タンパク質を産生する細胞が得られる。

【課題を解決するための手段】

【0015】

本開示の記載事項

したがって、本開示は、抗体依存性細胞媒介性細胞障害 (A D C C) に関与する抗体をコードする遺伝子を含む細胞、並びに配列番号 1 1 及び配列番号 1 3、又はその組合せからなる群より選択される C R I S P R の D N A 結合ドメインを含むベクター；フコースノックアウト細胞を得る方法であって、C R I S P R ヌクレアーゼ構築物を細胞にトランスフェクトして、フコースノックアウト細胞を得るステップを含む上記方法；アフコシル化タンパク質を得る方法であって、上記のような方法により得られたフコースノックアウト細胞が発現したタンパク質を得るステップを含む上記方法；アフコシル化タンパク質；任意選択的に薬学的に許容される添加剤と共に、上記のようなタンパク質を含む組成物；がん、自己免疫障害、ウイルス感染性疾患、細菌感染性疾患、炎症、及び腫瘍、又はその組合せからなる群より選択される障害の管理における使用のための上記のようなアフコシル化タンパク質；並びにがん、自己免疫障害、ウイルス感染性疾患、細菌感染性疾患、炎症、及び腫瘍、又はその組合せからなる群より選択される障害を管理する方法であって、上記のようなアフコシル化タンパク質を、それを必要としている対象に投与するステップを含む上記方法に関する。

【0016】

本開示の特徴は、添付図面を参照しながら、以下の記載から十分に明らかとなる。図面は、本開示に従っていくつかの実施形態を示すに過ぎないこと、したがってその範囲の制限とはみなされないことを念頭に置きつつ、本開示は、添付図面の使用を介して、更なる特殊性及び詳細について記載する。

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図 1 A】F u t 8 遺伝子ゲノム構造を示す図である。

【図 1 B】F u t 8 エクソン 7 ゲノム座位、それぞれのアミノ酸配列、及び重要な構造的モチーフの位置、及び C R I S P R 標的箇所を示す図である。

【図 2】F U T 8 遺伝子の C H O - S ゲノム分析を示す図である。各エクソンを矢印で表す。

【図 3 A】F U T 8 遺伝子のエクソン 7 を標的とする、F U T 8 C R I S P R / C a s 構築物の p D 1 4 0 1 (g R N A 5 1 4 ~ 5 5 3) を示す図である。

【図 3 B】F U T 8 エクソン 7 の標的配列を示す図であり、C R I S P R 認識配列は下線を引く。

【図 4】赤色蛍光タンパク質発現プラスミドによる C H O S 細胞系のトランスフェクション効率を示す図である。データは、高レベルのトランスフェクション効率を示唆する。パネル A は、明視野顕微鏡画像を表す。パネル B は、蛍光画像を表す。パネル C は、多数の赤色蛍光細胞を示す、オーバーレイ画像を表す。

【図 5 A】F U T 8 遺伝子を標的とする C R I S P R / C a s システムをトランスフェクトした C H O S 細胞の L C A - F I T C アッセイにおいて観察された蛍光シフトを示す

図である。複数の単一のクローン細胞系、及びミニプール細胞系のプロファイルは、フコースノックアウト表現型を示唆する。

【図5B】FUT8遺伝子を標的とするCRISPR/CasシステムをトランスフェクトしたCHO-S細胞のLCA-FITCアッセイにおいて観察された蛍光シフトを示す図である。単一細胞由来のクローン細胞系、及びミニプール細胞系は、1/4～1/5への蛍光低下を示し、これら細胞系のフコースノックアウト表現型を示す。

【図6】複数世代にわたるフコースノックアウト表現型の安定性を示す、トランスフェクトしたプールの複数回継代したときのLCA-FITC結合プロファイルを示す図である。

【図7】親CHO-S細胞系と比較して、アフコシル化抗Her2抗体を過剰発現する代表的なフコースノックアウトCHO-S細胞系の増殖プロファイルを示す図である。

【図8A】FUT8座位を標的とするCRISPR/CasシステムをトランスフェクトしたフコースノックアウトCHO-S細胞系の対立遺伝子におけるヌクレオチドの長い挿入及び欠損を示す、FUT8座位におけるゲノムデータ分析を示す図である。

【図8B】FUT8座位を標的とするCRISPR/CasシステムをトランスフェクトしたフコースノックアウトCHO-S細胞系の対立遺伝子におけるヌクレオチドの欠損を示す、FUT8座位におけるゲノムデータ分析を示す図である。

【図9】フレームシフト突然変異及び終止コドンの導入を示す、FUT8座位を標的とするCRISPR/CasシステムをトランスフェクトしたフコースノックアウトCHO-S細胞系の対立遺伝子に関するアミノ酸配列分析を示す図である。これらの突然変異は、非機能的FUT8遺伝子をもたらした。

【図10】図10Aは、2リットルバイオリアクターフェッドバッチ培養における、アフコシル化抗Her2抗体を産生するCHO-Sクローン細胞系の細胞数プロファイルを示す図である。図10Bは、2リットルバイオリアクターフェッドバッチ培養物中で、アフコシル化抗Her2抗体を産生するCHO-Sクローン細胞系の生存率プロファイルを示す図である。

【図11】図11Aは、2リットルバイオリアクターフェッドバッチ培養における、アフコシル化抗Her2抗体を産生するCHO-Sクローン細胞系の浸透圧プロファイルを示す図である。図11Bは、2リットルバイオリアクターフェッドバッチ培養における、アフコシル化抗Her2抗体を産生するCHO-Sクローン細胞系の抗体力価プロファイルを示す図である。

【図12】図12Aは、2リットルバイオリアクターフェッドバッチ培養における、アフコシル化抗Her2抗体を産生するCHO-Sクローン細胞系のグルコースプロファイルを示す図である。図12Bは、2リットルバイオリアクターフェッドバッチ培養における、アフコシル化抗Her2抗体を産生するCHO-Sクローン細胞系のグルタミンプロファイルを示す図である。

【図13】図13Aは、2リットルバイオリアクターフェッドバッチ培養における、アフコシル化抗Her2抗体を産生するCHO-Sクローン細胞系のアンモニアプロファイルを示す図である。図13Bは、2リットルバイオリアクターフェッドバッチ培養における、アフコシル化抗Her2抗体を産生するCHO-Sクローン細胞系の乳酸プロファイルを示す図である。

【図14】フコースノックアウトCHO-S細胞クローンの2リットルバイオリアクターフェッドバッチ培養からのアフコシル化抗Her2抗体精製を示す図である。パネルAは、プロテインA精製によるアフィニティークロマトグラフィーを表す。パネルBは、陰イオン交換クロマトグラフィーを表す。パネルCは、陽イオン交換クロマトグラフィーを表す。

【図15】トラスツズマブ、及びフコースノックアウトCHO-Sクローンから産生されたアフコシル化抗Her2抗体のIEF試験の比較を示す図である。

【図16】トラスツズマブ、及びフコースノックアウトCHO-Sクローンから産生されたアフコシル化抗Her2抗体のSDS-PAGE試験の比較を示す図である。

10

20

30

40

50

【図17】トラスツズマブ、及びフコースノックアウトCHOスクロークから産生されたアフコシル化抗Her2抗体のウェスタンブロット分析の比較を示す図である。

【図18】トラスツズマブ、及びフコースノックアウトCHOスクロークから産生されたアフコシル化抗Her2抗体のHer2結合ELISA試験の比較を示す図である。データは、非常に類似したHER2抗原結合プロファイルを示唆する。

【図19】トラスツズマブ、及びフコースノックアウトCHOスクロークから産生されたアフコシル化抗Her2抗体の細胞に基づくELISA試験の比較を示す図である。パネルAは、SKBR3細胞系による実験を表す。パネルBは、BT474細胞系による実験を表す。

【図20】トラスツズマブ、及びフコースノックアウトCHOスクロークから産生されたアフコシル化抗Her2抗体による、タンパク質A液体クロマトグラフィーの比較を示す図である。データは、非常に類似したクロマトグラムを示唆する。

【図21】トラスツズマブ、及びフコースノックアウトCHOスクロークから産生されたアフコシル化抗Her2抗体のイオン交換クロマトグラフィーの比較を示す図である。データは、いずれの場合においても、非常に類似した主要ピーク、酸性及び塩基性変異体を示唆する。

【図22】トラスツズマブ、及びフコースノックアウトCHOスクロークから産生されたアフコシル化抗Her2抗体のグリカン分析の比較を示す図である。主要なグリカンピークを識別及び比較する。下段パネルにおいて、ピークがアフコシル化グリカン位置まで完全にシフトしていることにより表されるように、アフコシル化抗Her2抗体産物のグリカン分析は、主要なグリカンが完全にアフコシル化されたことを示す。

【図23】アフコシル化抗Her2抗体及びトラスツズマブ産物のフローサイトメトリー分析を示す図である。データより、両産物とHer2抗原との結合は同等であることが明らかであり、抗体をアフコシル化しても、産物によるHer2抗原認識は変化しなかったことを示す。

【図24】アフコシル化抗Her2抗体及びトラスツズマブ産物の表面プラズモン共鳴(SPR)分析を示す図である。パネルAは、アフコシル化抗Her2抗体及びトラスツズマブ産物のHer2リガンドとの結合反応速度を示す。パネルBは、アフコシル化抗Her2抗体及びトラスツズマブ産物とCD16aリガンドとの結合反応速度を示す。

【図25】BT474細胞系を使用する、アフコシル化抗Her2抗体及びトラスツズマブ産物の抗増殖アッセイを示す図である。データは、アフコシル化抗Her2抗体産物の相対的細胞増殖抑制効力は、トラスツズマブに匹敵することを示唆する。

【図26】標的細胞系としてBT474細胞系、及びエフェクターとして単離されたPBMcを1:20の比で使用する、アフコシル化抗Her2抗体及びトラスツズマブ産物の抗体依存性細胞傷害(ADCC)アッセイを示す図である。データは、アフコシル化抗Her2抗体産物のADCC効率において、約9倍の改善を示唆する。

【発明を実施するための形態】

【0018】

本開示は、抗体依存性細胞媒介性細胞障害(ADCC)に関与する抗体をコードする遺伝子を含む細胞、並びに配列番号11及び配列番号13、又はその組合せからなる群より選択されるCRISPR-DNA結合ドメインを含むベクターに関する。

【0019】

本開示の一実施形態では、ベクターは、ヌクレアーゼを更に含む。

【0020】

本開示の別の実施形態では、細胞は、抗体産生細胞である；並びに抗体は、抗CD20抗体、抗EGFR抗体、抗Her2抗体、抗CD19抗体、抗LAG3抗体、抗CD40抗体、抗EPHA3抗体、抗HIV中和抗体、抗HCV中和抗体、及び抗デング熱中和抗体からなる群より選択される。

【0021】

本開示のなおも別の一実施形態では、細胞は、COS、CHO-S、CHO-K1、C

10

20

30

40

50

HO-K1 GS(-/-)、CHO-DG44、CHO-DUXB11、CHO-DUKX、CHOK1SV、VERO、MDCK、W138、V79、B14AF28-G3、BHK、HaK、NS0、SP2/0-Ag14、HeLa、HEK293-F、HEK293-H、HEK293-T、YB23HL.P2.G11.16Ag.20、perC6、抗体産生ハイブリドーマ細胞、胚性幹細胞、ナマルバ細胞、スポドプテラ・フルギペルダ(*Spodoptera fugiperda*)(Sf)、ピキア属、サッカロミセス属、及びシゾサッカロミセス属由来の昆虫細胞系からなる群より選択される。

【0022】

本開示のまた別の実施形態では、細胞はCHO細胞であり、また抗体は抗Her2抗体である。

10

【0023】

本開示は、フコースノックアウト細胞を得る方法とも関連し、前記方法は、CRISPRヌクレアーゼ構築物を細胞にトランスフェクトして、フコースノックアウト細胞を得るステップを含む。

【0024】

本開示の一実施形態では、細胞は、抗体依存性細胞媒介性細胞障害(ADCC)に関与する抗体をコードする遺伝子を含む。

【0025】

本開示の別の実施形態では、抗体は、抗CD20抗体、抗EGFR抗体、抗Her2抗体、抗CD19抗体、抗LAG3抗体、抗CD40抗体、抗EpHA3抗体、抗HIV中和抗体、抗HCV中和抗体、及び抗デング熱中和抗体からなる群より選択される。

20

【0026】

本開示のなおも別の実施形態では、CRISPRヌクレアーゼ構築物は、配列番号11及び配列番号13、又はその組合せからなる群より選択されるCRISPR DNA結合ドメインを含む。

【0027】

本開示のまた別の実施形態では、CRISPR-ヌクレアーゼ構築物は、細胞のFut8遺伝子を破壊し、またFut8遺伝子配列は、エクソン7における切断により破壊される。

【0028】

30

本開示のまた別の実施形態では、細胞は、COS、CHO-S、CHO-K1、CHO-K1 GS(-/-)、CHO-DG44、CHO-DUXB11、CHO-DUKX、CHOK1SV、VERO、MDCK、W138、V79、B14AF28-G3、BHK、HaK、NS0、SP2/0-Ag14、HeLa、HEK293-F、HEK293-H、HEK293-T、YB23HL.P2.G11.16Ag.20、perC6、抗体産生ハイブリドーマ細胞、胚性幹細胞、ナマルバ細胞、スポドプテラ・フルギペルダ、ピキア属、サッカロミセス属、及びシゾサッカロミセス属由来の昆虫細胞系からなる群より選択される。

【0029】

本開示は、アフコシル化タンパク質を得る方法とも関連し、前記方法は、上記のような方法により得られたフコースノックアウト細胞により発現されるタンパク質を得るステップを含む。

40

【0030】

本開示の一実施形態では、タンパク質は、抗体依存性細胞媒介性細胞障害(ADCC)に関与する抗体である。

【0031】

本開示の別の実施形態では、抗体は、抗CD20抗体、抗EGFR抗体、抗Her2抗体、抗CD19抗体、抗LAG3抗体、抗CD40抗体、抗EpHA3抗体、抗HIV中和抗体、抗HCV中和抗体、及び抗デング熱中和抗体からなる群より選択される。

【0032】

50

本開示のなおも別の実施形態では、抗体は、抗H e r 2抗体である。

【0033】

本開示のまた別の実施形態では、細胞は、C O S、C H O - S、C H O - K 1、C H O - K 1 G S (- / -)、C H O - D G 4 4、C H O - D U X B 1 1、C H O - D U K X、C H O K 1 S V、V E R O、M D C K、W 1 3 8、V 7 9、B 1 4 A F 2 8 - G 3、B H K、H a K、N S 0、S P 2 / 0 - A g 1 4、H e L a、H E K 2 9 3 - F、H E K 2 9 3 - H、H E K 2 9 3 - T、Y B 2 3 H L . P 2 . G 1 1 . 1 6 A g . 2 0、p e r C 6、抗体産生ハイブリドーマ細胞、胚性幹細胞、ナマルバ細胞、スポドプテラ・フルギペルダ (S p o d o p t e r a f u g i p e r d a) (S f) 由来の昆虫細胞系、ピキア属、サッカロミセス属、及びシゾサッカロミセス属からなる群より選択される。

10

【0034】

本開示は、アフコシル化タンパク質とも関連する。

【0035】

本開示の一実施形態では、タンパク質は、抗体依存性細胞媒介性細胞障害 (A D C C) に関与する抗体である。

【0036】

本開示の別の実施形態では、タンパク質は、抗C D 2 0抗体、抗E G F R抗体、抗H e r 2抗体、抗C D 1 9抗体、抗L A G 3抗体、抗C D 4 0抗体、抗E p H A 3抗体、抗H I V中和抗体、抗H C V中和抗体、及び抗 Dengue 熱中和抗体からなる群より選択される抗体である。

20

【0037】

本開示のなおも別の実施形態では、抗体は、抗H e r 2抗体である。

【0038】

本開示のまた別の実施形態では、タンパク質は、上記のような方法より得られる。

【0039】

本開示は、任意選択的に薬学的に許容される添加剤と共に、上記のようなタンパク質を含む組成物とも関連する。

【0040】

本開示は、がん、自己免疫障害、ウイルス感染性疾患、細菌感染性疾患、炎症、及び腫瘍、又はその組合せからなる群より選択される障害の管理における使用のための、上記のようなアフコシル化タンパク質とも関連する。

30

【0041】

本開示は、がん、自己免疫障害、ウイルス感染性疾患、細菌感染性疾患、炎症、及び腫瘍、又はその組合せからなる群より選択される障害を管理する方法とも関連し、前記方法は、上記のようなアフコシル化タンパク質を、それを必要としている対象に投与するステップを含む。

【0042】

本開示の一実施形態では、障害を管理する方法、及び障害を管理する際の使用は、ヒトを含む好適な対象におけるものである。

【0043】

本開示では、フコシル化活性を有さない細胞は、「フコースノックアウト」又は「F K O」細胞とも呼ばれる。

40

【0044】

用語「非フコシル化抗体」、「アフコシル化抗体」、「0%フコシル化抗体」、「アフコシル化モノクローナル抗体」、「アフコシル化M a b」、及び「100%非フコシル化抗体」は、同一の範囲と意味を有し、本開示全体を通じて交換可能に用いられる。

【0045】

本開示は、非フコシル化又はアフコシル化タンパク質を、前記タンパク質をコードする細胞から生成することに関する。

【0046】

50

一実施形態では、細胞は、非フコシル化モノクローナル抗体を産生する。

【0047】

非限定的な実施形態では、非フコシル化抗体は、IgG1モノクローナル抗体である。

【0048】

非限定的な実施形態では、非フコシル化抗体は、抗Her2モノクローナル抗体である。

【0049】

用語「イノベーター」、「Herclon」、「トラスツズマブイノベーター」、「イノベーターHerclon」は、同一の意味と範囲を有し、交換可能に用いられる。全ての用語は抗Her2抗体に関連し、同抗体は、乳がんでの使用を目的として最初に利用可能な商品化抗体である。

10

【0050】

本開示は、Fut8遺伝子を破壊し、非フコシル化タンパク質を生成するのに、CRISPR技術を利用する。

【0051】

CRISPR（規則的な間隔をもって、クラスター化された、短鎖反復回文配列）システムは、順応性のある天然の免疫機構であり、多くの細菌で、ウイルス又はプラスミド等の外来核酸からその身を守るために用いられている。CRISPRは、塩基配列の短い反復を含有する原核生物DNAのセグメントであり、「スペーサーDNA」の短いセグメントがそれに続く。このスペーサーDNAは、細菌ウイルス又はプラスミドに過去に曝露して得られた外来のDNAである。Cas（CRISPR関連タンパク質）酵素と呼ばれる一連の酵素は、これらのCRISPR配列に関連して見出され、Casは、DNAを正確に切断できるヌクレアーゼである。

20

【0052】

バクテリアは、各スペーサーDNA内の遺伝物質をRNA分子にコピーする。Cas酵素は、次にガイドRNA（gRNA）と呼ばれるRNA分子のうちの1つを取り込む。これらは共に、CRISPR-Casシステムを形成する。システムが、CRISPR RNAと一致するウイルスに由来するDNAに遭遇すると、RNAは、該DNA配列とハイブリダイズし、次にCas酵素はDNAを2つに切断し、ウイルスの複製を阻止する。

【0053】

CRISPRと連携して働く様々なCas酵素が存在するが、最も周知され、遺伝子工学で頻繁に利用されるのはCas9ヌクレアーゼであり、化膿性連鎖球菌（Streptococcus pyogenes）に由来する。CRISPRとCas酵素は、共にII型CRISPRシステムと呼ばれるCRISPR/Cas9システムを形成する。

30

【0054】

Cas9は、特定のCRISPR機構、特に1つのCasタンパク質のみを必要とするII型CRISPRシステムにおいて重要な役割を演じていることが明らかにされている。このシステムでは、エンドヌクレアーゼCas9が、標的DNAの切断に関与する。Cas9の機能は、2つのヌクレアーゼドメイン、すなわちタンパク質のアミノ末端に位置するRuvC様ヌクレアーゼドメイン、及び中間領域内に存在するHNH様ヌクレアーゼドメインの存在に依存する。

40

【0055】

部位特異的なDNAの認識及び切断の場合、ヌクレアーゼCas9は、2つのRNA配列、すなわちcrRNA（CRISPR RNA）、及びcrRNAに対して部分的に相補的な、別のトランス活性化crRNA（tracrRNA又はtrRNA）と複合体形成しなければならない。tracrRNAは、複数のprecrRNAをコードする一次転写物がcrRNAに成熟するのに必要とされる。これは、RNase III及びCas9の存在下で生ずる。標的DNAの切断期間中に、Cas9ヌクレアーゼのHNH及びRuvC様のヌクレアーゼドメインが、DNA鎖を両方切断し、二本鎖切断物（DSB）が生成する。認識部位は、関連するcrRNA転写物内の20個のヌクレオチド標的配列によ

50

り定義される。HNHドメインは、相補鎖を切断する一方、RuvCドメインは、非相補鎖を切断する。Cas9の二本鎖エンドヌクレアーゼ活性は、プロトスペーサー関連モチーフ(PAM)として知られている短い保存性の配列、(2~5nt)が、標的DNA内のcrRNA相補配列の3'側の直後に続くことも要件とする。PAM配列要件は、CRISPR/Cas機能にとって必須である。

【0056】

一般的に、2つのベクターシステム、1) Cas9エンドヌクレアーゼ、並びに2) crRNA(CRISPR RNA)及びtracrRNA(トランス活性化crRNA)からなる複合体が、CRISPRが関係する遺伝子編集に用いられる。これら2つの構築物が、哺乳動物細胞内で同時発現すると、複合体を形成し、標的DNA配列に動員される。crRNA及びtracrRNAは、合体してキメラガイドRNA(gRNA)を形成するが、これは、Cas9が遺伝子配列を標的とするようにガイドするという機能と同じ機能を有する。

【0057】

相同的組換えが関係する遺伝子編集技術は、遺伝子編集で用いられるその種の技術として最初に挙げられる。但し、HRを用いたときの成功事象頻度は非常に稀であり、細胞 3×10^4 個につき1回である。

【0058】

今日では、ジンクフィンガーヌクレアーゼが、より高い標的特異性を可能とし、突然変異体成功事象の頻度もより高いので、一般的となってきた。この方法は、DNAに結合し、部位特異的DSBを形成するヌクレアーゼ活性を備えるDNA結合タンパク質を利用する。有効ではあるが、このような方法は、成功させるために多岐にわたるタンパク質工学ツールを必要とし、これにより複雑なゲノム配列を標的とする際の自由度が制限される。CRISPRを哺乳動物細胞に適合させることにより、ゲノム編集は一新され、正確性は一層高まり、設計も容易となった。ZFNとは異なり、CRISPR/Casは、標的とされる遺伝子毎にタンパク質工学を必要としない。

【0059】

CRISPRシステムは、gRNA及びCas9をコードするのに、いくつかの単純なDNA構築物を必要とするのみである。

【0060】

20bpのgRNA配列が、ゲノム全体を通じて複数の部位で100%の相同性を有するのは稀であるが、sgRNA-Cas9複合体は、その標的内のいくつかのミスマッチについて寛容である。Cas9は、ゲノム内の複数箇所ですべて特異的に結合することが報告されているが、但しそのような部位のごく一部においてのみDNA二本鎖切断が形成される。また、実験データより、DNA標的部位にある程度のミスマッチが生じて、DNA二本鎖切断が可能であることも示唆される。したがって、CRISPR/Casの特異性を高める戦略が迫られる。

【0061】

1つのそのような観察所見として、RuvC触媒ドメインにおけるアスパラギン酸からアラニン(D10A)への突然変異という点突然変異が挙げられ、二本鎖切断ではなく、一本鎖切断(ニック)を引き起こす。Cas9突然変異体は、Cas9nとして公知である。2つの隣接するDNA標的部位でCas9nを用いることにより、近接したDNAニックの形成が可能となり、また、標的部位に適切な間隔が置かれる場合には、Cas9nは二本鎖切断を形成する。

【0062】

したがって、DSB形成の特異性はより高くなるが、該DSBは、NHEJ機構により最終的に修復される。非特異的に結合したCas9nは、ニックのみを形成するが、該ニックは、HRにより媒介される修復を介して一般的に修復され、また稀に突然変異又はオフターゲット効果を引き起こす。本開示では、Cas9n及びCRISPRは、Fut8遺伝子をノックアウトするのに用いられる。

【 0 0 6 3 】

本開示の一実施形態では、C R I S P R 複合体で使用されるヌクレアーゼは、C a s ヌクレアーゼである。

【 0 0 6 4 】

本開示の一実施形態では、C R I S P R 複合体で使用されるヌクレアーゼは、C a s 9 ヌクレアーゼである。

【 0 0 6 5 】

本開示の一実施形態では、C R I S P R 複合体で使用されるヌクレアーゼは、C a s 9 n ヌクレアーゼである。

【 0 0 6 6 】

本開示の一実施形態では、C R I S P R - ヌクレアーゼ構築物は、C R I S P R C a s 構築物である。

【 0 0 6 7 】

本開示では、細胞内での発現で得られるC R I S P R - C a s 構築物は、C R I S P R - C a s 複合体を提供する。

【 0 0 6 8 】

本開示では、用語C R I S P R - C a s 複合体及びC R I S P R - C a s システムは、同一の意味と範囲を有し、交換可能に用いられる。

【 0 0 6 9 】

本開示は、細胞内のフコシル化機構を破壊又は不活性化することにより、非フコシル化タンパク質を得る方法に関する。

【 0 0 7 0 】

一実施形態では、タンパク質は、抗体である。

【 0 0 7 1 】

好ましい、但し非限定的な実施形態では、抗体は、モノクローナル抗体である。

【 0 0 7 2 】

最も好ましい実施形態では、抗体は、抗H e r 2 モノクローナル抗体である。

【 0 0 7 3 】

本開示は、細胞内のF U T 8 遺伝子の破壊又は不活性化と特に関連する。F U T 8 遺伝子は、酵素 - 1 , 6 - フコシルトランスフェラーゼをコードする。

【 0 0 7 4 】

本開示の一実施形態では、細胞は、タンパク質をすでに発現する細胞である。

【 0 0 7 5 】

本開示の一実施形態では、細胞は、抗体をすでに発現する細胞である。

【 0 0 7 6 】

本開示の一実施形態では、細胞は、タンパク質を発現することが公知の細胞である。

【 0 0 7 7 】

本開示の一実施形態では、細胞は、抗体を発現することが公知の細胞である。

【 0 0 7 8 】

本開示の一実施形態では、細胞は、抗体を発現する細胞であり、また抗体をコードする遺伝子が該細胞に導入される。

【 0 0 7 9 】

一実施形態では、本開示の方法により産生される抗体は、治療抗体である。

【 0 0 8 0 】

一実施形態では、細胞は、真核細胞である。

【 0 0 8 1 】

一実施形態では、細胞は、哺乳動物細胞である。

【 0 0 8 2 】

本開示の実施形態では、細胞系は、C O S 、C H O - S 、C H O - K 1 、C H O - D G 4 4 、C H O - D U X B 1 1 、C H O - D U K X 、C H O K 1 S V 、V E R O 、M D C K

10

20

30

40

50

、W138、V79、B14AF28-G3、BHK、HaK、NS0、SP2/0-Ag14、HeLa、HEK293-F、HEK293-H、HEK293-T、YB23HL.P2.G11.16Ag.20、perC6、抗体を産生するハイブリドーマ細胞、胚性幹細胞、ナマルバ細胞、スポドプテラ・フルギペルダ(Sf)、ピキア属、サッカロミセス属、及びシゾサッカロミセス属由来の昆虫細胞系からなる群より選択される。

【0083】

非限定的な実施形態では、細胞は、チャイニーズハムスター卵巣細胞である。

【0084】

非限定的な実施形態では、細胞は、チャイニーズハムスター卵巣S(CHO-S)細胞である。

10

【0085】

本開示の非限定的な実施形態では、細胞は、グルタミンシンターゼがノックアウトされた(GS-/ -)細胞、好ましくはグルタミンシンターゼがノックアウトされた(GS-/ -)CHO-S細胞である。

【0086】

一実施形態では、CHO-S細胞は、抗体産生細胞である。

【0087】

一実施形態では、CHO-S細胞は、抗Her2モノクローナル抗体を産生する。

【0088】

本開示の実施形態で使用されるGPEX(登録商標)技術は、周知の技術であり、標的細胞を100%トランスフェクトする、非常に効率的なレトロウイルスベクターに基づく。GPEX(登録商標)の長所として、

20

- ・ベクターのコピー毎に単一の組み込み部位を有すること
 - ・選択マーカーを必要としないこと
- が挙げられる。

【0089】

当業者は、本開示の方法と共にGPEX(登録商標)技術を使用する方法を知っている。

【0090】

一実施形態では、本開示の方法は、フコースKO細胞系を得るために、抗Her2抗体を過剰発現する親CHO-S細胞系を使用すること、及びその後アフコシル化された抗Her2抗体製品を開発することに関し、方法は、

30

a)CRISP Rヌクレアーゼ構築物のトランスフェクションにより、フコースノックアウト細胞系を得るステップと、

b)フローサイトメトリーアッセイを介して、細胞系のフコースノックアウト状態を確認するステップと、

c)最適化培地及びフィード組成物を使用して、発酵装置中で抗Her2モノクローナル抗体を発現するフコースノックアウト細胞系を増殖させるステップと、

d)フコースノックアウトクローン細胞系から産生された抗Her2モノクローナル抗体を精製するステップと、

40

e)精製されたアフコシル化抗Her2抗体を分析するステップとを含む。

【0091】

本開示の方法は、機能性のためにADCCを必要とする標的に対して開発された任意のモノクローナル抗体を開発するのに有用である。これらの標的のいずれかが、CHO-S(又はその他の細胞型)内で産生される場合、本開示の方法で認められるような、類似したフコースノックアウト戦略が採用され得る。

【0092】

抗体依存性細胞媒介性細胞障害(ADCC)は細胞媒介型の免疫系であり、免疫細胞(ナチュラルキラー細胞等)が、細胞表面抗原に対する抗体を介して識別された標的細胞を

50

溶解する。当業者は、どの抗体がA D C C機構に關与しているか知っている。

【0093】

本開示の方法を使用して生成され得る特異的抗体の例は、腫瘍学分野に該当し、すなわちC D 2 0、E G F R、H e r 2、C D 1 9、L A G 3、C D 4 0、E p H A 3等の標的に対するモノクローナル抗体である。

【0094】

モノクローナル抗体は、自己免疫障害であるリウマチ性関節炎の治療を目的として生成される場合もある。

【0095】

また、H I V、H C V、デング熱、及び感染性生物がA D C C機構を介して除去されるその他の疾患の抗原に対する中和抗体も、本開示の方法により産生され得る。

10

【0096】

本開示では、障害を「管理すること(m a n a g i n g)」、又はその「管理(m a n a g e m e n t)」、又はそれを「管理する(m a n a g e)」という用語は、治療的及び予防的活性を含む。同用語は、疾患若しくは障害、又は疾患若しくは障害の弊害若しくは副作用の治療及び治癒を含む。また、同用語は、疾患若しくは障害、又は疾患若しくは障害の弊害若しくは副作用の更なる進行予防も含む。同用語は、個人の最適な状態の維持を更に含む。

【0097】

本開示の一実施形態では、本開示のアフコシル化モノクローナル抗体は、
・ A D C Cを介して腫瘍細胞死を標的とする任意のモノクローナル抗体を用いた併用療法、
・ 二重特異性抗体に基づく療法、
・ キメラ抗原受容体(C A R)媒体を用いた、異質遺伝子的N K細胞に基づく療法、
・ 自己N K細胞移植、
・ サイトカイン刺激性N K細胞に基づく療法、及び
・ キメラ抗原受容体-T細胞療法による併用療法(C A R-T細胞療法)

20

で用いられる。

【0098】

一実施形態では、細胞は、「フコースノックアウト」細胞若しくは「F K O」細胞、又は「フコースノックアウト」プラットフォーム若しくは「F K O」プラットフォームと呼ばれる。

30

【0099】

一実施形態では、細胞は、組換え細胞と呼ばれる。

【0100】

一実施形態では、C R I S P R(規則的な間隔をもってクラスター化された短鎖反復回文配列)-C a s複合体が、細胞のフコシル化経路を破壊又は不活性化するのに用いられる。

【0101】

フコシル化のデノボ経路では、G D P-フコースは、G D P-マンノースからG D P-4-ケト-6-デオキシマンノースへの変換を介して合成されるが、この合成は、酵素G D P-マンノース-4,6-デヒドラターゼ(G M D)により触媒される。このG D P-フコースは、次にゴルジ内部に輸送され、そして酵素-1,6-フコシルトランスフェラーゼによりタンパク質をフコシル化するための基質として用いられる。該酵素は、フコース部分をG D P-フコースからN-グリカン鎖のN-アセチルグルコサミンに転移させる。

40

【0102】

一実施形態では、C R I S P R(規則的な間隔をもってクラスター化された短鎖反復回文配列)-C a s複合体が、-1,6-フコシルトランスフェラーゼ酵素をコードするF u t 8遺伝子を破壊するのに用いられる。

50

【0103】

本開示の一実施形態では、フコシルトランスフェラーゼ酵素のN末端触媒領域が、CRISPR/Cas複合体による標的とされる。

【0104】

特定の実施形態では、Fut8の遺伝子配列のエクソン7が、CRISPR（規則的な間隔をもってクラスター化された短鎖反復回文配列）-Cas複合体による標的とされる。

【0105】

本開示の一実施形態では、フコシルトランスフェラーゼ酵素が、2鎖のアミノ酸配列、及び3H2ヘリックス領域のアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸位置で突然変異するが、いずれの配列もエクソン7コーディング配列によりコードされる。

10

【0106】

得られたクローンは、翻訳が未成熟終止する場合があります、したがって下流のアミノ酸、例えばArg-365、Arg-366、Asp-368、Lys-369、Glu-373、Tyr-382、Asp-409、Asp-410、Asp-453、Ser-469、及びその組合せ等は存在せず、Fut8遺伝子は機能しない。

【0107】

CRISPR/Cas構築物は、一般的に2つのベクターシステムとして設計される。1つの構築物はCas9エンドヌクレアーゼ発現をコードし、また第2のベクターは、crRNA及びtracrRNAからなるgRNAを発現する。tracrRNA、PAM配列、及びcrRNA-Cas9-tracrRNAの機能的複合体が正しく配置すると、それに応じて標的配列を認識する、長さがヌクレオチド20個の断片として、crRNAは通常設計される。場合によっては、1つの単一ベクターが、より高い活性及び利便性が得られるように、gRNA及びCas9タンパク質の両方を発現する。標的認識特異性は、crRNA設計に由来する。

20

【0108】

本開示の実施形態では、DNA結合ドメインは、DNA認識ドメインとも呼ばれる。

【0109】

本開示の一実施形態では、前記CRISPR/Cas複合体をコードするポリヌクレオチドも、前記ポリヌクレオチドを含む細胞と同様に提供される。

30

【0110】

特定の実施形態では、CRISPR/Cas9複合体のDNA結合ドメインをコードするヌクレオチドが提供される。別の実施形態では、CRISPR/Cas9複合体のヌクレアーゼドメインをコードするヌクレオチドが提供される。

【0111】

一実施形態では、ヌクレアーゼは、Cas9である。

【0112】

別の実施形態では、ヌクレアーゼは、Cas9n（ニックアーゼ）D10A突然変異体である。

【0113】

本開示の一実施形態では、CRISPR/Cas複合体は、FUT8遺伝子内の標的部位を認識する。本開示の一実施形態では、ヌクレアーゼは、ホーミングエンドヌクレアーゼである。別の実施形態では、ヌクレアーゼは、メガヌクレアーゼである。ホーミングエンドヌクレアーゼ及びメガヌクレアーゼの特異性は、非天然の標的部位に結合するように工学的に作出可能であることも公知である。更に、代表的な実施形態では、ホーミングエンドヌクレアーゼとして、I-SceI、I-CeuI、PI-PspI、PI-Sce、I-SceIY、I-CsmI、I-PanI、I-SceII、I-PpoI、I-SceIII、I-CreI、I-TevI、I-TevII、及びI-TevIIIが挙げられる。その認識配列は公知である。

40

【0114】

50

－実施形態では、上記ヌクレアーゼのうちの1つ又は複数の組合せが、C R I S P R - C a s タンパク質複合体のDNA結合ドメインと共に用いられる。

【0115】

－実施形態では、C R I S P R / C a s 複合体を細胞に導入するのに、トランスフェクションが用いられる。リポフェクションプロトコルが、代表的な実施形態として提供されるが、当業者にとって公知の任意のトランスフェクション法が、本開示の方法に同じように適用可能である。

【0116】

別の実施形態では、本開示は、任意の宿主細胞内で組換えタンパク質を生成する方法を提供し、該宿主細胞は内因性のF U T 8 遺伝子を発現しており、これがC R I S P R / C a s 技術により標的とされ、本明細書に記載するように、内因性のF U T 8 遺伝子は破壊される。得られた細胞系は、F U T 8 遺伝子の発現につき無効化されており、また対象とする遺伝子を発現させるために更に用いられる。

【0117】

本開示では、p D 1 4 0 1 (g R N A 5 1 4 ~ 5 5 3) C R I S P R / C a s 複合体でトランスフェクトした後に生成した120例に満たないクローン細胞系のスクリーニングから、17例のF U T 8 ノックアウトクローン細胞系が生み出される。比較として、当技術分野の報告によれば、約120,000個のクローン細胞系から、たった3例のF U T 8 - / - 細胞系が選択可能であった。

【0118】

特異性、安全、及びプロトコルの単純性は、本開示のC R I S P R / C a s 複合体及び方法によりもたらされる、先行技術の方法に勝る長所の一部である。C R I S P R により媒介される遺伝子破壊により、カスタマイズされたC R I S P R / C a s 複合体が、複雑性の度合いを問わずユーザー定義の標的配列を認識できるようにする、標的座位の特異性という特有の長所が得られる。C R I S P R / C a s 複合体は、ゲノム編集効率に関してZ F N よりも効率的であり、また毒性は有意に低く、これにより特定の座位に対してより高い突然変異体クローン生成効率を可能にする。本開示では、F U T 8 ゲノム座位は、C R I S P R g R N A を介して配列特異的改変を行うための標的となる。

【0119】

本明細書に記載する方法は、抗H e r 2 抗体を発現するF U T 8 ノックアウトC H O - S 細胞系の生成において、成功率3%を超える効率を実現した。本開示の方法及び特異的C R I S P R 構築物に続くこのような予期しない成果により、F U T 8 ノックアウト細胞系の開発は大いに改善された。

【0120】

また、一実施形態では、本開示は、抗H e r 2 抗体発現細胞系のF U T 8 DNA 配列内の非常に特異的な遺伝子位置を標的とする一揃いのC R I S P R 構築物のみを使用した。驚くべきことに、C R I S P R / C a s 複合体は、標的とされたアミノ酸の破壊を引き起こすだけでなく、長い欠損も生成し、そのような欠損によりフレームシフト突然変異及び未成熟終止コドンが導入された。これにより、本開示は、標的座位ではDNA 改変が極めて少ない一方、標的とされたF U T 8 ではゲノムレベルで大規模に改変されたF U T 8 ノックアウト細胞系を、抗H e r 2 抗体発現細胞系から実現した。フコースノックアウト表現型についてスクリーニングされたクローン集団の数が少数であったことを考慮すれば、そのように多数のF U T 8 ノックアウト細胞系が生成するとは予想されない。この驚くべき成果により、任意のモノクローナル抗体発現細胞系が、フコースノックアウト細胞系の生成に使用可能であり、これによりアフコシル化モノクローナル抗体産物が生成可能である独自の方法が提供される。該方法により、ほんのわずかな細胞系をスクリーニングさえすれば、複数のF U T 8 ノックアウト細胞系が実現し、アフコシル化モノクローナル抗体を過剰発現するための最良のクローン系を確立することが可能となる。

【0121】

いくつかの実施形態では、細胞系のF U T 8 遺伝子を不活性化すると、タンパク質をよ

10

20

30

40

50

り高いレベルで生成する細胞系が得られる。

【 0 1 2 2 】

特定の実施形態では、F U T 8 遺伝子を不活性化すると、F U T 8 遺伝子が不活性化されていない細胞内で産生されたタンパク質と比較して、タンパク質の 1 つ又は複数の活性（機能）が高まった細胞系が得られる。

【 0 1 2 3 】

一実施形態では、非フコシル化抗体は、対応するフコシル化抗体よりも優れたエフェクター機能を示す。

【 0 1 2 4 】

一実施形態では、非フコシル化抗体は、対応するフコシル化抗体よりも有効な治療特性を示す。

10

【 0 1 2 5 】

一実施形態では、非フコシル化抗体は、対応するフコシル化抗体よりも高い抗体依存性細胞傷害作用（A D C C）を示す。

【 0 1 2 6 】

一実施形態では、非フコシル化抗体は、対応するフコシル化抗体よりも最大約 7 ~ 2 0 倍高い抗体依存性細胞傷害（A D C C）を示す。

【 0 1 2 7 】

非限定的な実施形態では、非フコシル化抗体は、対応するフコシル化抗体よりも約 8 . 9 5 倍高い抗体依存性細胞傷害（A D C C）を示す。

20

【 0 1 2 8 】

本開示において、開示されるタンパク質に関する方法、調製、及び使用では、別途明示しない限り、分子生物学、生化学、計算化学、細胞培養、組換え D N A 技術、ポリメラーゼ連鎖反応（P C R）、及び関連分野における従来技術が利用される。このような技術、その原理、及び要件は、文献で説明されており、当業者にとって公知である。核酸及びアミノ酸配列の同一性を判断する技術は当業者にとって公知である。

【 0 1 2 9 】

本開示において、フコシル化機構が破壊された細胞は、抗体を自然に産生する細胞である。

【 0 1 3 0 】

30

タンパク質、ポリペプチド、又は核酸の「機能的断片」とは、その配列が完全長タンパク質、ポリペプチド、又は核酸とは同一ではないが、完全長タンパク質、ポリペプチド、又は核酸と同一の機能をなおも保持するタンパク質、ポリペプチド、又は核酸である。

【 0 1 3 1 】

本明細書で用いられる用語「抗体」には、ポリクロナール抗体調製物及びモノクロナール抗体調製物の両方が含まれ、またキメラ抗体分子、F (a b ') 2 及び F (a b) 断片、F v 分子、一本鎖 F v 分子（S c F v）、二量体及び三量体抗体断片、ミニボディ、ヒト化モノクロナール抗体分子、ヒト抗体、抗体の F c 領域を含む融合タンパク質、並びにこれらの分子から派生したあらゆる機能的断片も含まれ、この場合、派生分子は、親抗体分子の免疫学的機能性を保持する。

40

【 0 1 3 2 】

本開示内の用語「モノクロナール抗体」は、均質な抗体母集団を有する抗体組成物を意味する。抗体は、抗体の種若しくは起源に、又は抗体の作製方式により制限を受けない。この用語には、免疫グロブリン全体その他、断片、例えば F a b、F (a b ') 2、F v、及びその他の断片等、並びに親モノクロナール抗体分子の免疫学的結合特性を示すキメラ及びヒト化均質抗体母集団が含まれる。

【 0 1 3 3 】

本開示のクローン / 細胞は、C R 2 T M C H O 1 A、C R 2 T M C H O 1 B 等の用語で呼ばれるが、それは内部の名称であり、また細胞の何らかの具体的特性を表すものではないことに留意されたい。これらの細胞系は、p D 1 4 0 1 (g R N A 5 1 4 ~ 5 5 3) C

50

R I S P R / C a s 複合体を用いて開発される。

【 0 1 3 4 】

一実施形態では、非フコシル化抗体を含む組成物は、任意選択的に、薬学的に許容される担体、又は添加物、又は添加剤と共に提供される。薬学的に許容される担体、又は添加物、又は添加剤は、投与される組成物により、並びに組成物を投与するのに用いられる具体的方法により決定されるが、また当業者にとって公知である。

【 0 1 3 5 】

本開示に提示する全ての配列は、別途記載しない限り、5'から3'の方向で表記される。

【 0 1 3 6 】

添加剤は、タンパク質の安定化を実現し、また生物学的製剤のその他の品質を改善する上で重要である。様々な添加剤が、タンパク質の安定化、抗菌剤としての作用、剤形の製造支援、薬物送達の制御又は標的化、及び注射時の疼痛を最低限に抑えることを目的として組成物に添加される。

【 0 1 3 7 】

添加剤は、その作用機序に基づき、大きく5つのカテゴリーに分けることができる：

1．タンパク質安定剤：この添加剤は、タンパク質の本来の立体構造を安定化する。例として、ポリオール、糖、アミノ酸、アミン、及び塩析用の塩が挙げられる。スクロース及びトレハロースが、最も頻繁に用いられる糖であり、また大型のポリオールが、小型のポリオールよりも良好な安定剤である。

2．ポリマー及びタンパク質：親水性ポリマー、例えばポリエチレングリコール（PEG）、多糖類、及び不活性タンパク質等が、タンパク質を安定化するのに非限定的に用いられ、またタンパク質の会合を増強する。例として、デキストラン、ヒドロキシルエチルスターチ（HETA）、PEG-4000、及びゼラチンが挙げられる。

3．界面活性剤：非イオン性界面活性剤が、タンパク質の安定化、凝集の抑制、またタンパク質のリフォールディング支援を目的として幅広く用いられる。ポリソルベート80及びポリソルベート20は、それぞれツイーン80及びツイーン20として知られており、mAb治療薬で一般的に用いられる。その他の例として、Brij 35、トリトンX-10、プルロニックF127、及びドデシル硫酸ナトリウム（SDS）が挙げられる。

4．アミノ酸：この添加剤は、様々な機構によりタンパク質を安定化させる。例としてヒスチジン、アルギニン、及びグリシンが挙げられる。処方物添加剤として用いられるその他のアミノ酸には、メチオニン、プロリン、リシン、グルタミン酸、及びアルギニン混合物が含まれる。

5．防腐剤：この化合物は、微生物の増殖を防止するために、処方物に含まれる。例として、ベンジルアルコール、m-クレゾール、及びフェノールが挙げられる。

【 0 1 3 8 】

本開示で用いられる生体物質は、インド国外から得られる。

【 0 1 3 9 】

F U T 8 座位内の特定ゲノム配列を標的とする根拠

F U T 8 は、3つのドメイン、すなわちN末端コイルドコイルドメイン、触媒ドメイン、及びC末端SH3ドメインを含む。

【 0 1 4 0 】

F u t 8 タンパク質構造は、酵素のアミノ酸配列の機能的ドメインを理解するために、広範に研究されている。F U T 8 酵素の3次元結晶構造から、15個の鎖及び16個のヘリックスが明らかにされた。少なくとも3つの領域、すなわちN末端（68～107番残基）、C末端（573～575）、及び不規則な368～372番残基が存在する。

【 0 1 4 1 】

F U T 8 酵素の推定触媒ドメインは、2つのドメイン、すなわちオープンシート / ドメイン、及びヌクレオチド結合領域として幅広く知られているロスマンフォールドから構成される。 / ドメインは、5つのヘリックス及び3つの鎖から構成され、それぞ

10

20

30

40

50

れ 4、3 H 1、3 H 2、3 H 3、 1、 2、及び 3 鎖である。ドメインは、タンパク質配列の N 末端に位置する。N 末端触媒ドメインがどのように酵素の機能性に関わるか、その様式について明確なエビデンスは存在しない。

【 0 1 4 2 】

ロスマンフォールドは、3 5 9 ~ 4 9 2 番残基の下流に位置し、いくつかの ヘリックス及び 鎖を含有する。一連の残基、A r g 3 6 5、A r g 3 6 6、A s p - 3 6 8、L y s - 3 6 9、G l u - 3 7 3、T y r - 3 8 2、A s p - 4 0 9、A s p - 4 1 0、A s p - 4 5 3、及び S e r - 4 6 9 が、F U T 8 酵素の触媒ドメインにおいて重要な役割を演ずる。

【 0 1 4 3 】

ヒト F U T 8 酵素タンパク質の 1 0 個のアミノ酸残基、A r g 3 6 5、A r g 3 6 6、A s p - 3 6 8、L y s - 3 6 9、G l u - 3 7 3、T y r - 3 8 2、A s p - 4 0 9、A s p - 4 1 0、A s p - 4 5 3、及び S e r - 4 6 9 が、脊椎動物、昆虫、線虫、及びホヤ類を含む様々な種の間で保存される。

【 0 1 4 4 】

C H O S 細胞系内の F U T 8 遺伝子を標的とする根拠

フコースノックアウトプラットフォームは、非フコシル化モノクローナル抗体の分子を実現するのに有用である。多くの事例では、完全に非フコシル化された抗体を開発することが好ましい結果であり、したがって、フコース生合成経路遺伝子の完全ノックアウトを生み出す戦略が、本開示において策定される。

【 0 1 4 5 】

F u t 8 酵素は、G D P - フコース生合成ステップの下流で機能し、またゴルジ内での細胞タンパク質のフコシル化における最後の酵素ステップである。デノボ経路及びサルベージ経路の両方に由来するフコシル化前駆体は、最終的なフコース部分の転移において F U T 8 酵素を利用する。したがって、F u t 8 遺伝子をノックアウトすると、細胞タンパク質のフコシル化におけるデノボ経路及びサルベージ経路の両方が実質的に停止する。このアプローチは、F u t 8 ノックアウト細胞系内で産生されたモノクローナル抗体を含め、タンパク質の 1 0 0 % 脱フコシル化を引き起こす。

【 0 1 4 6 】

C R I S P R / C a s 標的配列が、この領域において標的化される。F u t 8 エクソン 7 ゲノム座位、各アミノ酸配列、及び重要な構造的モチーフの位置、及び C R I S P R 標的箇所を図 1 B に示す。

【 0 1 4 7 】

この標的化は、無作為選択ではなく、本開示では、トランケートされた又は部分的に機能を有する酵素により引き起こされる部分的フコシル化が回避されることそこを破壊するとが確実となる、遺伝子又は酵素上の極めて特異的な箇所を決定する実験法により見出された。

【 0 1 4 8 】

一方、ロスマンフォールドは、3 5 9 ~ 4 9 2 番残基の下流に位置し、いくつかの ヘリックス及び 鎖を含有する。一連の残基 A r g 3 6 5、A r g 3 6 6、A s p - 3 6 8、L y s - 3 6 9、G l u - 3 7 3、T y r - 3 8 2、A s p - 4 0 9、A s p - 4 1 0、A s p - 4 5 3、及び S e r - 4 6 9 が、F U T 8 酵素の触媒ドメインにおいて重要な役割を演ずる。

【 0 1 4 9 】

したがって、酵素活性部位と同等の領域を標的とすれば F u t 8 遺伝子の完全破壊が確実となり、F u t 8 遺伝子上の正確な箇所を標的とすることが不可能な技術、又は F u t 8 遺伝子上の別の箇所を標的とするような技術は、F u t 8 遺伝子及び酵素活性の部分的破壊を引き起こすおそれがあるが、そのような技術と比較して、それよりも効率的な結果が得られる。フコシル化機構が部分的に機能的である細胞は、非フコシル化タンパク質と比較して、それよりも低い治療機能を示す部分的フコシル化タンパク質を生成する。

10

20

30

40

50

【0150】

本開示の方法により生み出された細胞は、100%非フコシル化された抗体を含む、完全に又は100%非フコシル化されたタンパク質を産生する。

【0151】

本開示は、CRISPR/Cas複合体を介して、FUT8コドン配列の触媒部位に存在する重要なアミノ酸位置に突然変異を導入する。CRISPRデザインの狙いは、一本鎖切断を組み込むことにより、N末端触媒ドメイン、特に2鎖及び3H2ヘリックス領域を主に標的とすることにある。細胞のDNA修復システムは、一本鎖切断の修復を行う間にヌクレオチド変化を導入し、非機能的FUT8酵素を生ずる。

【0152】

CRISPRシステムは、局所的に欠損及び挿入を引き起こすことが周知であり、したがって標的とされるエクソン7においてフレームシフト突然変異が生じ、また終止コドンが挿入される。終止コドンが挿入されると、未成熟の翻訳終止が確実となり、下流のロスマンフォールドが酵素構造から除去され、その結果、非機能的FUT8酵素が生み出される。

【0153】

本開示の一実施形態では、改変されたCHO-S細胞系について、後続するゲノムDNA分析を行うことにより、欠損、挿入、終止コドン、並びにフレームシフト突然変異が明らかとなる。したがって、本開示は、欠損、挿入、及び/又はフレームシフト突然変異を介して、2鎖及び3H2ヘリックス内のアミノ酸位置を標的とすることによりFut8遺伝子及びフコシルトランスフェラーゼ酵素が破壊されるものと予想する。

【0154】

得られたクローンは、未成熟の翻訳終止を引き起こすと考えられ、したがって重要な下流配列、例えばArg-365、Arg-366、Asp-368、Lys-369、Glu-373、Tyr-382、Asp-409、Asp-410、Asp-453、Ser-469、及びその組合せ等において大規模な変化を引き起こす。

【0155】

本開示では、CHO-Sゲノムデータベースから入手したFUT8アミノ酸配列を分析し、これらの重要なアミノ酸は、CHO-S細胞系に由来するFUT8遺伝子内でもやはり保存されていることを確認している。配列特異的なCRISPR/Cas複合体が、これらのアミノ酸モチーフの上流にある遺伝子配列を標的として、ゲノム改変が導入されるように設計される。重要なFUT8酵素触媒ドメインの上流にあるアミノ酸配列を変化させると、酵素機能がどのように破壊されるか分析される。

【0156】

これらの重要なアミノ酸が突然変異すると、FUT8遺伝子の機能性が完全に破壊されることが記載されている。CRISPR/Cas技術を利用する遺伝子標的化は、フコースノックアウト細胞系プラットフォームを形成するための新規アプローチである。CRISPR/Casがトランスフェクトされた細胞について、FUT8遺伝子の機能性アッセイ法を介してスクリーニングする。選択されたクローンは、突然変異についてゲノムFUT8座位を配列決定することにより確認される。突然変異体フコースノックアウトCHO-S細胞系は、次に非フコシル化治療用モノクローナル抗体又は抗体の一部を含め、非フコシル化治療用タンパク質を発現するのに用いられる。

【0157】

遺伝子位置内のアミノ酸コドン配列を特異的に標的とするCRISPR/Cas構築物が設計され、及びCas9遺伝子の種類に応じて、発現ベクター、例えばpD1401又はpD1301にクローン化される。CRISPR/Cas複合体は、CHO-S細胞中に一時的にトランスフェクトされ、該細胞は、単一コロニーを生成させるために96ウェルプレートに播種される。各クローンは、次にレンズマメアグルチニンアッセイ法(LCA)に基づく蛍光を用いて、細胞タンパク質のフコシル化についてスクリーニングされる。FUT8遺伝子の破壊についてクローン陽性であれば、FUT8遺伝子に関する突然変

10

20

30

40

50

異体対立遺伝子の酵素アッセイ法及び反応速度論分析によって更に試験される。最終的に、FUT8座位におけるゲノム配列が、CRISPR/Casを介して生じたあらゆる突然変異について分析される。この突然変異は、欠損又は挿入を含み、これによりFUT8コドン配列のフレームシフト突然変異が導入され、配列は破壊され、酵素は機能を失う。

【0158】

本開示の方法から得られるフコースノックアウト抗Her2抗体発現細胞系は、治療及び任意のその他の使用を目的としてアフコシル化抗Her2抗体産物を発現させるための細胞系として用いられる。該方法は、アフコシル化抗Her2抗体産物を開発するのに用いられてきた。

【0159】

より高い力価で抗Her2抗体を産生する任意のCHO細胞系が、開始細胞系として選択される。前記細胞系は、FUT8遺伝子に対するCRISPR-Cas複合体がトランスフェクトされ、またレンズマメアグルチニンアッセイ法に基づく蛍光を介してアフコシル化について選択される。レンズマメアグルチニンアッセイ法に基づく蛍光について陽性のクローン細胞系が開発され、そしてアフコシル化抗Her2抗体産物の発現で用いられる。

【0160】

本開示は、完全にアフコシル化された抗Her2抗体産物の特徴付け及びその生物学的重要性について記載する。本開示は、イノベータートラスツズマブ分子と比較して、アフコシル化抗Her2抗体では、FcRII受容体との相互作用が有意に改善されることについて記載する。対応する抗体依存性細胞傷害(ADCC)アッセイにより、アフコシル化抗Her2抗体の有効性改善が明確に立証された。この改善は、Her2を過剰発現する乳がん細胞系において、トラスツズマブと比較して、9倍を超える細胞毒性に相当した。このアフコシル化抗Her2抗体産物は、患者の乳がん治療においてより有効であるので、そのような結果は有意な改善である。

【0161】

したがって、アフコシル化抗Her2抗体は、下記事項に関連して、乳がん患者のための治療選択肢の改善に対するより有効な分子を代表する。

1. 乳がん患者の早期段階における治療選択肢 - アフコシル化抗Her2抗体産物は、低レベルの腫瘍抗原、この場合Her2抗原を発現する腫瘍を有するがん患者で使用可能である。

2. 低用量の薬物を用いた治療選択肢 - アフコシル化抗Her2抗体産物は、乳がん患者を有効に治療するために、低用量で使用可能である。

3. この薬物による有害な副作用がより少ない治療選択肢 - アフコシル化抗Her2抗体産物では、乳がん患者を有効に治療するのに必要とされる用量はより少なく、したがって生成する有害な副作用もより少ない。

4. この薬物による免疫原性効果がより小さい治療選択肢 - アフコシル化抗Her2抗体産物は、グリカン鎖にフコースを一切有しない点を除き、アフコシル化抗Her2抗体産物は、イノベータートラスツズマブ産物と構造的に厳密に類似する。アフコシル化抗Her2抗体産物は、より低用量で使用可能であり、したがって産物が引き起こす免疫原性は低い。

5. 治療コストが低い治療選択肢 - アフコシル化抗Her2抗体産物による治療が必要とする用量は、トラスツズマブと比較してはるかに少ない。したがって、この産物は、患者一人当たりの治療コスト削減を実現する。

【0162】

本開示は、下記の実施例を参照しながら更に記載されるが、実施例は本質的に説明目的に限定され、いかなる場合でも、本開示の範囲に制限を加えるものと解釈されるべきではない。

【0163】

試薬の調製

10

20

30

40

50

Advanced DMEM完全増殖培地 - 500 ml

1. 50 ml FBS (終濃度10%)を500 mlフィルターユニットの上部チャンバーに添加する。
2. 10 mlの200 mMグルタミン (終濃度4 mM)を添加する。
3. 5 mlの100 X Pen - strep 溶液 (終濃度1 X)を添加する。
4. 容積をadvanced DMEM培地で500 mlにする。
5. 完全培地を、0.22 µmフィルターに通し濾過する。
6. 上部チャンバーを解体し、リザーバー又は培地ピンを閉める。
7. 培地は調製の30日以内に使用できる。
8. 培地は2 ~ 8 に保存し、連続的な感光を避ける。
9. LCA選択培地を調製する場合、10 mlの10 mg / mlストックLCA試薬を500 mlの調製したDMEM培地と混合し、DMEM培地中終濃度200 µg / mlのLCAにする。

10

【0164】試薬の調製

1. パワーCHO - 2CD完全増殖培地 - 500 mlを採取する。
2. 10 mlの200 mMグルタミン (終濃度4 mM)を、500 mlフィルターユニットの上部チャンバーに添加する。
3. 5 mlの100 x Pen - strep 溶液 (終濃度1 x)を添加する。
4. 容積をパワーCHO - 2CD培地で500 mlにする。
5. 完全培地を0.22 µmフィルターを通し濾過する。
6. 上部チャンバーを解体し、リザーバー又は培地ピンを閉める。
7. 培地は調製の30日以内に使用できる。
8. 培地は2 ~ 8 に保存し、連続的な感光を避ける。

20

【0165】材料&道具

1. バイオセーフティーキャビネット
2. Sorvall ST 16R遠心分離機
3. ウォーターバス
4. 倒立位相差顕微鏡
5. Millipore GUAVA 8HT easy Cyteベンチトップフローサイトメーター
6. Vi-cell XR生死細胞オートアナライザー
7. 血球計算盤
8. 冷蔵庫
9. Eppendorf minispin遠心分離機
10. マイクロピペット
11. マイクロチップ
12. 96ウェル組織培養プレート
13. 12ウェル組織培養プレート
14. 6ウェル組織培養プレート
15. Serologicalピペット (10 ml、25 ml、及び50 ml)
16. 1000 ml濾過ユニット - 孔径0.22 µm
17. 70%エタノール
18. Advanced DMEM
19. DPBS
20. ウシ胎仔血清
21. Pen strep
22. グルタミン
23. 0.05%トリプシンEDTA

30

40

50

24. 0.4%トリパンブルー

25. マイクロチューブ (1.5 ml 及び 2 ml)

26. ファルコンチューブ (15 ml 及び 50 ml)

27. ウシ血清アルブミン画分 V

28. フルオレセインレンズマメアグルチニン (L C A - F I T C)

29. フルオレセインストレプトアビジン (S t r e p - F I T C)

【表 1】

表 1:本開示で使用する試薬

S.No.	試薬	組成
1	アガロース	アガロース(SIGMA, Cat- A9539)
2	1 kb DNA ladder	1 kb ladder (Thermoscientific Cat-SM0311)
3	100 bp DNA ladder	100 bp ladder (Thermoscientific, Cat-SM0322)
4	QIAGEN ゲノム DNA 単離キット	DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Cat-69504)
5	Taq DNA ポリメラーゼ	thermopol を含む Taq DNA ポリメラーゼ(NEB, Cat-M0267 & M0273L)
6	Phusion ハイフィデリティ DNA ポリメラーゼ	Phusion ハイフィデリティ DNA ポリメラーゼ(Thermo Scientific, Cat-F530L)
7	InsTAclone PCR クローニング	TA クローニングベクターpTZ57R/T(Thermo Scientific, Cat-K1214)
8	コンピテントセル DH10B 細胞	Max Efficiency DH10B コンピテントセル(Invitrogen, Cat-18297-010)
9	コンピテントセル DH5 アルファ 細胞	NEB 5-アルファ コンピテントセル(NEB, Cat-C2987P)
10	無水エタノール(99.9%)	Sdfine chem, Cat- 58051 L05
11	プラスミド DNA 単離	QiaPrep spin miniprep Kit (QIAGEN, Cat-27104)
12	DNA 溶出キット	QIAGEN ゲル抽出キット(Cat-20021 及び 20051)
13	制限酵素	EcoRI-HF (NEB, Cat-R3101) Hind III-HF (NEB, Cat- R3104)
14	T4 リガーゼ	T4 DNA リガーゼ(NEB, Cat-M0202)

10

20

30

40

【表 2】

表 2:本開示で使用する培地及び緩衝液

S.No.	培地/緩衝液	組成
1	6×ローディング DNA 色素	スクロース 4g、ブロモフェノールブルー0.025g、 精製水を使用して 10mL にする。
3	50×TAE 緩衝液	トリス塩基 121g、氷酢酸 28.6mL、EDTA(0.5M) pH8 50mL、精製水により 500mL の容積にする。

10

【実施例】

【0166】

(例 1)

C R I S P R / C a s 構築物の設計

本実施例の目的は、F U T 8 対立遺伝子の特異的な不活性化のための C R I S P R / C a s 複合体を設計することである。

【0167】

1.1 - C R I S P R 構築物

C R I S P R は、化膿性連鎖球菌において見出された微生物の適応免疫系由来の C a s 9 として公知の R N A 誘導型エンドヌクレアーゼのクラスに基づく。C a s 9 ヌクレアーゼはガイド R N A (g R N A) によってゲノム上の特異的部位へと導かれる。C a s 9 / g R N A 複合体は、編集する必要がある特異的遺伝子上の 3 b p のプロトスペーサー活性化モチーフ (P A M) N G G 又は N A G が続く 2 0 b p の標的配列に結合する (J i n e k 、 2 0 1 2 年 ; M a l i 、 2 0 1 3 年) 。したがって、この全複合体の結合は二本鎖切断 (D S B) を生成する。

20

【0168】

改変する必要があるゲノム座位における標的ゲノム編集の重要なステップは、これらの D S B の導入である。いったん、D S B が導入されると、それらは、非相同末端結合 (N H E J) 又は組換え D N A 修復 (H D R) のいずれかによって修復される。

30

【0169】

N H E J は、挿入 / 欠失突然変異 (インデル) の効果的な導入が公知であり、続いて、標的コード配列の翻訳の読み枠又はプロモーター若しくはエンハンサーにおけるトランス作用因子の結合部位の破壊を引き起こす。一方、H D R 媒介型修復は、標的座位に特定の点突然変異又は配列を挿入し得る。したがって、C a s 9 ヌクレアーゼを発現するベクター及び特異的遺伝子座位を標的とする g R N A を細胞型にコトランスフェクションすると、標的遺伝子の発現を効果的にノックダウンすることができる。これらの特異的部位における突然変異の予期される頻度は、1 % 超 ~ 5 0 % の範囲である (S a n d e r 2 0 1 4 年) 。

40

【0170】

突然変異体の選択は、薬剤耐性マーカー選択を使用せず、配列決定を使用する単純なスクリーニングによって実施する。遺伝子破壊の特異性を増加するため、本開示は、単一遺伝子座位のための 2 つのガイド R N A によって誘導され、2 つの一本鎖切断又はニックを導入する突然変異体 C a s 9 (D 1 0 A) を使用する。これはまた、その他のランダムな部位での非特異的な結合の機会も減らす。C a s 9 - D 1 0 A 及び 2 つの g R N A をコードするベクターを使用し、効果的な遺伝子ノックアウトを引き起こす。

【0171】

F u t 8 ゲノム座位は、C R I S P R / C A S 9 技術によって配列特異的欠失の標的とされ、脱フコシル化哺乳動物発現システムを生成する。

50

【 0 1 7 2 】

本開示の図 1 A は、F u t 8 コード配列及びタンパク質配列を示す。F U T 8 ゲノム配列はデータベース配列、配列 I D NW__0 0 3 6 1 3 8 6 0 から分析する。F U T 8 ゲノム配列は 5 7 0 1 7 1 ~ 7 3 1 8 0 4 塩基にわたり、図中、E 1 ~ E 1 1 として示す 1 1 個のエクソンを含有する。各エクソンの塩基対位置も示す。E 1、E 2、及び E 3 の一部は上流配列における非翻訳領域を構成し、E 1 1 の一部も非翻訳領域の一部である。翻訳領域は C D S 1 ~ C D S 9 として記載される。各 C D S の長さは、C D S 番号の下に示す。アミノ酸配列をコードする C D S 1 ~ C D S 9 は、3 8 個のアミノ酸 ~ 1 0 5 個のアミノ酸と様々である。

【 0 1 7 3 】

チャイニーズハムスター (*C r i c e t u l u s g r i s e u s*) 又はチャイニーズハムスターフコシルトランスフェラーゼ 8 (F u t 8) m R N A (3 1 2 6 b p) は、N C B I 参照配列 : X M__0 0 3 5 0 1 3 7 5 . 1 に由来し、本開示の配列番号 1 によっても表す。

```
C A G G T T G C T G C T C T G G C T T A G G C C A T C T A T G A C C C T G G T G
G T G T T T T C A T T C A C T A T A A G T C C T T C C C A T C T T T A T T A A C
T G A G C A A G T T C A G c t a g t a a t t t t a g a g a c c g a g g t t c a a
g c a a t a a c a c c t a t c t c t g c a a t a c c g t g t g g c t t t c t t c
a a t g t c t t a c a t c c t a a g g a a a g g a a g C A T G T A G A G C C C A
G G A A G C A C A G G A C A A G A A A G C T G C C T C C T T G T A T C A C C A G
G A A G A T C T T T T T G T A A G A G T C A T C A C A G T A T A C C A G A G A G
A C T A A T T T T G T C T G A A G C A T C A T G T G T T G A A A C A A C A G A A
A C T T A T T T T C C T G T G T G G C T A A C T A G A A C C A G A G T A C A A T
G T T T C C A A T T C T T T G A G C T C C G A G A A G A C A G A A G G G A G T T
G A A A C T C T G A A A A T G C G G G C A T G G A C T G G T T C C T G G C G T T
G G A T T A T G C T C A T T C T T T T T G C C T G G G G A C C T T A T T G T T
T T A T A T A G G T G G T C A T T T G G T T C G A G A T A A T G A C C A C C C T
G A C C A T T T C T A G C A G A G A A C T C T C C A A G A T T C T T G C A A A G C
T G G A G C G C T T A A A A C A A C A A A A T G A A A G A C T T G A G G A G A A T
G G C T G A G T C T C T C C G a a t a c c a g a a a g g c c c t a t t g a t c a g
g g g a c a g c t a c a g g a a g a g t c c g t g t t t t a g a a g a a c a g c
t t g t t a a g g c c a a a g a a c a g a t t g a a a a t t a c a a g a a a c a
a g c t a g g a a t g A T C T G G G A A A G G A T C A T G A A A T C T T A A G G
A G G A G G A T T G A A A A T G G A G C T A A A G A G C T C T G G T T T T T T C
T A C A A A G T G A A T T G A A G A A A T T A A A G A A A T T A G A A G G A A A
C G A A C T C C A A A G A C A T G C A G A T G A A A T T C T T T T G G A T T T A
G G A C A T C A T G A A A G g t c t a t c a t g a c a g a t c t a t a c t a c c
t c a g t c a a a c a g a t g g a g c a g g t g a g t g g c g g g a a a a a g a
a g c c a a a g a t c t g a c a g a g c t g g t c c a g c g g a g a a t a a c a
t a t c t g c a g A A T C C C A A G G A C T G C A G C A A A G C C A G A A A G C
T G G T A T G T A A T A T C A A C A A A G G C T G T G G C T A T G G A T G T C A
A C T C C A T C A T G T G G T T T A C T G C T T C A T G A T T G C T T A T G G C
A C C C A G C G A A C A C T C A T C T T G G A A T C T C A G A A T T G G C G C T
A T G C T A C T G G A G G A T G G G A G A C T G T G T T T A G A C C T G T A A G
T G A G A C A T G C A C A G A C A G G T C T G G C C T C T C C A C T G G A C A C
T G G T C A G g t g a a g t g a a g g a c a a a a a t g t t c a a g t g g t c g
a g c t c c c c a t t g t a g a c a g c c t c c a t c c t c g t c c t c c t t a
c t t a c c c t t g g c t g t a c c a g a a g a c c t t g c a g a t c g a c t c
c t g a g a g t c c a t g g t g a t c c t g c a g t g t g g t g g g t a t c c c
a g t t t g t c a a a t a c t t g a t c c g t c c a c a a c c t t g g c t g g a
```

10

20

30

40

50

a a g g g a a a t a g a a g a a a c c a c c a a g a a g c t t g g c t t c a a a
 c a t c c a g t t a t t g g A G T C C A T G T C A G A C G C A C T G A C A A A G
 T G G G A A C A G A A G C A G C C T T C C A T C C C A T T G A G G A A T A C A T
 G G T A C A C G T T G A A G A A C A T T T T C A G C T T C T C G A A C G C A G A
 A T G A A A G T G G A T A A A A A A A G A G T G T A T C T G G C C A C T G A T G
 A C C C T T T C T T T G T T A A A G G A G G C A A A G A C A A A g t a c t c c a a
 t t a t g a a t t t a t t a g t g a t a a c t c t a t t t c t t g g t c a g c t
 g g a c t a c a c a a c c g a t a c a c a g a a a a t t c a c t t c g g g g c g
 t g a t c c t g g a t a t a c a c t t t c t c t c c c a g g c t g a c t t c c t
 t g t g t g t a c t t t t t c a t c c c a g G T C T G T A G G G T T G C T T A T 10
 G A A A T C A T G C A A A C A C T G C A T C C T G A T G C C T C T G C A A A C T
 T C C A T T C T T T A G A T G A C A T C T A C T A T T T T G G A G G C C A A A A
 T G C C C A C A A C C A G A T T G C A G T T T A T C C T C A C C A A C C T C G A
 A C T A A A G A G G A A A T C C C C A T G G A A C C T G G A G A T A T C A T T G
 G T G T G G C T G G A A A C C A T T G G A A T G G T T A C T C T A A A G G T G T
 C A A C A G A A A A C T A G G A A A A A C A G G C C T G T A C C C T T C C T A C
 A A A G T C C G A G A G A A G A T A G A A A C A G T C A A A T A C C C T A C A T
 A T C C T G A A G C T G A A A A A T A G A G A T G G A G T G T A A G A G A T T A
 A C A A C A G A A T T T A G T T C A G A C C A T C T C A G C C A A G C A G A A G
 A C C C A G A C T A A C A T A T G G T T C A T T G A C A G A C A T G C T C C G C 20
 A C C A A G A G C A A G T G G G A A C C C T C A G A T G C T G C A C T G G T G G
 A A C G C C T C T T T G T G A A G G G C T G C T G T G C C C T C A A G C C C A T
 G C A C A G T A A A A T A A T G T A C T C A C A C A T A A C A T A C A A A T G G
 A T T A T T T T C T A C T T T G C C C T T T A A A T A T T C T G T C C C C A T G
 A A A C A A A C A C T G C C A C A T T A T G T A A T T T A A G T G A C A C A G A
 C G T T T T G T G T G A G A C T T C A A A C A T G G T G C C T A T A T C T G A G
 A G A C C T C T G T G A T T T A C T G A G A A G A T G A G A A C A G C T C C C T
 T C T G T G G G G A A G T T G G T T C T T A G T C A G T G G T G G A C T G G C C
 A C T G A A T T C A C T G C A A T C A A C A G A T T C A G A A T G A G A A T G G
 A T G T T T T T C C T T T A T A T G G T T G T C T G G A T T T T T T T A A A G 30
 T A A T T T C A T C A G T T C A G T T C A T C C A C C T C A T T A A T A A A T G
 A A G G A A T A T A C C A A T A A A A T C A A A T G A A A T A T T C A C T G T C
 C A T T A G G A A G T T T T A T A A A A C A A T G C C A T G A A C A A A A A A T
 T C T T T A G T A C T C A A T G T T T C T G G A C A T T C T C T T T G A T A A C
 A A A A A T A A A T T T T A A A A A G G A A T T T T G T A A A G T T T C T G G G
 A T T C T G T A T C A C T G G A T G A T G T A G T T A T A A G C T T T G T A G T
 A G A A A T A T G G G A A G T G G G T T T A T A G C T T T T A A G A T T T T T
 T C T A C T T T T G T C C T A C T T T T T C T A T T T C T G A T A G A A T A A T
 C A T A T T T C A A G A G A A G C A T T G G T C C C C T C T A A T A C T A G T A
 A C T G C C T T T A G T C A T G C A T A T T A T A T G A A G T T G C T A A G A A 40
 C A C G C T T T G G G G G A G G T G T T C A C T C T C T T A G T T T G A T A T T
 G T T G A C T T G A T A T A A T T G A A T G A A A T A G T C A T T C T C T T G C
 T T C C A G

選択的エクソンは大文字及び小文字で表す。

【 0 1 7 4 】

F u t 8 タンパク質構造は、酵素の機能ドメインを理解するために広く研究されている。
F U T 8 酵素の三次元結晶構造は 1 5 個の鎖及び 1 6 個のヘリックスを明らかにした。

【 0 1 7 5 】

F U T 8 遺伝子のアミノ酸配列を図 2 に示す。

【 0 1 7 6 】

C R I S P R / C a s 結合領域は、部位認識の特異性が高く、同時にC R I S P R / C a s 複合体が意図したD N A一本鎖切断を実行するように設計される。

【 0 1 7 7 】

一実施形態では、C a s 9 n (C a s 9 エンドヌクレアーゼのD 1 0 A 突然変異体) が C R I S P R / C a s 複合体に使用される。C a s 9 n エンドヌクレアーゼは、一本鎖D N A 切断を引き起こす。2つのC R I S P R 認識部位 (5 ' 認識部位と3 ' 認識部位は5塩基対距離で間隔を取り、近接した2つの一本鎖切断を可能にする)。生じる切断によりD N A 切断修復のN H E J プロセスが可能になり、この領域に突然変異を導入する。

【 0 1 7 8 】

C R I S P R 構築物は、g R N A 配列の効果的な発現のためのU 6 プロモーターエレメントと縦列にg R N A 足場を両側に配置する、2つの特有の20塩基対のC R I S P R 認識配列を有する。特有の設計は、1つの単一のベクターが、ゲノムD N A 上の2つの別々のg R N A 足場及び2つの特有のC R I S P R 認識配列を発現することを可能にする。

【 0 1 7 9 】

野生型C a s 9 遺伝子のヌクレオチド配列は、配列番号2で示す。

【 0 1 8 0 】

C a s 9 n エンドヌクレアーゼのヌクレオチド配列は、配列番号3で示す。

【 0 1 8 1 】

C R I S P R / C a s 設計は、一本鎖切断を組み入れることにより、標的ベータ2鎖及び3 H 2 ヘリックス領域に特有に配置される。この設計は、近接した2つの一本鎖切断に対応し、それにより、これらの標的化ゲノム位置においてのみ起こるN H E J 修復メカニズムとして、標的認識のより高い特異性を与える。非特異的一本鎖切断は、生成された場合、正確であり、ほとんど任意の突然変異を生成しない相同組換えによって通常修復される。

【 0 1 8 2 】

本開示の主な標的は、N末端触媒ドメイン、ベータ2鎖、及び3 H 2 ヘリックスに突然変異を生成することである。この位置でのC R I S P R / C a s による挿入及び欠失は、F U T 8 酵素を非機能的にする。更に、フレームシフト突然変異も中途翻訳終止コドンを引き起こし、そうすると、この領域の下流にあるロスマンフォールドが発現しない。A r g 3 6 5、A r g 3 6 6、A s p - 3 6 8、L y s - 3 6 9、G l u - 3 7 3、T y r - 3 8 2、A s p - 4 0 9、A s p - 4 1 0、A s p - 4 5 3、及びS e r - 4 6 9など、ロスマンフォールドのアミノ酸残基は、F U T 8 の機能性に非常に重要である。トランケートされた酵素は非機能的であり、フコースノックアウト細胞系をもたらす。

【 0 1 8 3 】

本開示の図2は、C H O - S F u t 8 アミノ酸配列を示す。F U T 8 遺伝子の全アミノ酸配列を示す。各C D S からのアミノ酸配列は、大きな矢印で示す。小さな矢印は、C R I S P R 構築物によってF u t 8 遺伝子において標的とされるエクソン7 (C D S 5) に存在する重要なアミノ酸を示す。

【 0 1 8 4 】

F u t 8 遺伝子の受入番号N W _ 0 0 3 6 1 3 8 6 0 を有するC H O 全細胞ゲノムのショットガン配列決定データは全部で1 6 1 6 3 4 b p に対応する。F u t 8 遺伝子のコード領域又はm R N A のP u b m e d 受入番号はX M _ 0 0 3 5 0 1 7 3 5 . 1 である。図1 A に示すように、m R N A 配列は、 - 1 , 6 フコシルトランスフェラーゼである、F U T 8 遺伝子産物の発現のための全コード配列を包含する。

【 0 1 8 5 】

S p i d e y アライメントツール (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/spidey/spideyweb.cgi>) を使用して、m R N A 配列をゲノムD N A 配列とアラインすることによってゲノムD N A におけるエクソンを同定する。表3に示すように、境界を有する全部で11個のエクソンが同定される。

10

20

30

40

【表 3】

表 3:Fut8 mRNA の特徴

エクソン	ゲノム座標	mRNA 座標	長さ (ヌクレオチド)
エクソン 1	570171-570263	1-93	93
エクソン 2	593436-593529	94-187	94
エクソン 3	608623-609050	188-615	428
エクソン 4	634802-634917	616-731	116
エクソン 5	635025-635187	732-894	163
エクソン 6	657197-657311	895-1009	115
エクソン 7	673387-673624	1010-1247	238
エクソン 8	709381-709627	1248-1494	247
エクソン 9	710960-711136	1495-1671	177
エクソン 10	721655-721805	1672-1822	151
エクソン 11	730501-731804	1823-3126	1304

【 0 1 8 6 】

触媒ドメインの非常に重要なアミノ酸残基の部位特異的突然変異誘発研究により、F U T 8 酵素の機能性が確かめられた。

【 0 1 8 7 】

ゲノムDNAとmRNA配列の間に100%同一性が観察された。11個のエクソン全て及びエクソン7を標的とするgRNAの位置を示すF u t 8 遺伝子の構造は、本開示の図1Aに示す。突然変異体C a s 9ヌクレアーゼ(C a s 9 n)を有する構築物を設計し、標的部位に一本鎖切断(ニック)を生成する。2つの別々のgRNAが近接した形でエクソン7中において設計され、最終的なDNA修復のための2つのニックを生成する。

【 0 1 8 8 】

本開示において、C R I S P R / C a s 9技術の標的部位は、F u t 8 遺伝子の最初のいくつかのエクソンに局在する。これは、トランケートされた又は部分的に機能を有する酵素によって引き起こされ得る部分的なフコシル化を回避するために行われる。

【 0 1 8 9 】

F u t 8 のエクソン - 7 (C D S - 5)ヌクレオチド配列は、本開示の配列番号4によって表す。

A A T C C C A A G G A C T G C A G C A A A G C C A G A A A G C T G G T A T G T A
A T A T C A A C A A A G G C T G T G G C T A T G G A T G T C A A C T C C A T C A

TGTGGTTTACTGCTTCATGATTGCTTATGGCACCCAGCGA
 AACTCATCTTGGAATCTCAGAAATTGGCGCTATGCTACTG
 GAGGATGGGAGACTGTGTTTAGACCTGTAAGTGAGACATG
 CACAGACAGGTCTGGCCTCTCCACTGGACACTGGTTCAG
 【0190】

CHO細胞のFut8のエクソン - 7 (CDS - 5) のアミノ酸配列は、本開示の配列番号5によって表される。タンパク質/ペプチド配列における標的アミノ酸位置は下線を引く。

【数1】

NPKDCSKARKLVCNINKGCGYGCQLHHVVYCFMIAYGTQ
RTLILESQNWRYATGGWETVFRPVSETCTDRSGLSTGHWS

10

【0191】

1. 2 - CRSPRを使用して標的とされる、Fut8遺伝子中の対象とする配列

Fut8遺伝子のエクソン7において、以下に示す配列はCRISPR - Cas複合体への結合に使用される。

【0192】

Fut8遺伝子上のCRISPR認識配列1は、配列番号6により表す。

AATTGGCGCTATGCTACTGGAGG

【0193】

gRNA1は、配列番号 - 7によって表す。

AAUUGGCGCUAUGCUCUGGAGG

【0194】

Fut8遺伝子上のCRISPR認識配列2は、配列番号 - 8によって表す。

CCAGCGAACAACCTCATCTTGGAAT

【0195】

gRNA2は、配列番号 - 9によって表す。

CCAGCGAACAACUCAUCUUGGAU

【0196】

本方法の実施形態で使用されるFut8遺伝子における標的配列は、本開示の図3Bに示す。切断の部位は矢印で示す。2つのgRNA間の距離は5塩基である。gRNA認識配列は、図3Bにおいて下線を引く。対応する合成断片をpD1401ベクターに組み入れ(図3A)、pD1401gRNA514~553と名付け、その特徴は本開示に続いて記載する。

30

【0197】

本開示の方法は、CRISPR/CasシステムによるFut8ゲノム配列、エクソン7の標的化においてCas9n(ニックーゼ突然変異体)を使用する。Cas9nエンドヌクレアーゼは、DNAの逆鎖において一本鎖切断(SSB)を生成する。上鎖及び下鎖のCRISPR/Cas認識配列は下線を引く。対応する一本鎖切断部位は黒い矢印で示す。3つのヌクレオチドPAM配列は太字で示す。

40

【0198】

この設計のためのCRISPR/Casベクター構築物は、pD1401gRNA(514~553)と呼ばれる。

【0199】

5'及び3'CRISPR認識配列は小文字のイタリック体で示し、この認識配列に相補的な2つの別々の部位はFUT8ゲノム配列で認識される。太字で表した配列は、CRISPR/Cas複合体が結合するgRNA足場配列を示す。

【0200】

配列番号10 - gRNA + Fut8エクソン7の足場

【数 2】

a t t c c a a g a t g a g t g t t c g c G T T T T A G A G C T A G A A A T A G
 C A A G T T A A A A T A A G G C T A G T C C G T T A T C A A C T T G A A A A A
 G T G G C A C C G A G T C G G T G C T T T T T T G C T C C G C G G C A C G A G
 A A C T C A A A G C C C C G G G G C C T G G G T C C C A C G C G G G G T C C C T
 T A C C C A G G G T G C C C C G G G C G C T C A T T T G C A T G T C C C A C C C
 A A C A G G T A A A C C T G A C A G G T C A T C G C G G C C A G G T A C G A C C
 T G G C G G T C A G A G C A C C A A A C A T A C G A G C C T T G T G A T G A G T
 T C C G T T G C A T G A A A T T C T C C C A A A G G C T C C A A G A T G G A C A
 G G A A A G G G C G C G G T T C G G T C A C C G T A A G T A G A A T A G G T G A
 A A G A C T C C C G T G C C T T A T A A G G C C T G T G G G T G A C T T C T T C
 T C A C C G a a t t g g c g c t a t g c t a c t g g G T T T T A G A G C T A G
 A A A T A G C A A G T T A A A A T A A G G C T A G T C C G T T A T C A A C T T
 G A A A A A G T G G C A C C G A G T C G G T G C

10

【0201】

DNA 2.0 又は DNA 結合ドメイン 1 からの合成 DNA における 5' CRISPR 認識配列 - 配列番号 11

A T T C C A A G A T G A G T G T T C G C

【0202】

標的特異的 crRNA 配列 (5' から 3' 方向) - 配列番号 12

A U U C C A A G A U G A G U G U U C G C

20

【0203】

DNA 2.0 からの合成 DNA 又は DNA 結合領域 2 における 3' CRISPR 認識配列 - 配列番号 13

A A T T G G C G C T A T G C T A C T G G

【0204】

標的特異的 crRNA 配列 (5' から 3' 方向) - 配列番号 14

A A U U G G C G C U A U G C U A C U G G

【0205】

DNA 2.0 からの gRNA 足場 - 配列番号 15

30

【数 3】

G T T T T A G A G C T A G A A A T A G C A A G T T A A A A T A A G G C T A G T
 C C G T T A T C A A C T T G A A A A A G T G G C A C C G A G T C G G T G C

【0206】

構築マップを図 3A に示し、重要な配列領域をマークする。

【0207】

1.3 - CRISPR / Cas 複合体合成

2つの成分が細胞又は生物に導入及び/又は発現して、CRISPRに基づくゲノム編集を実行しなければならない: Cas9ヌクレアーゼ; 及び「ガイドRNA」(gRNA)。

40

【0208】

gRNAの5'端における長さヌクレオチド20個分の認識配列は、標準的なRNA-DNA相補性塩基対合則を使用して、Cas9を特異的標的DNA部位に導く。これらの標的部位は、限界構造5-NGGにマッチするPAM配列のすぐ5'側にあるべきである。

【0209】

Cas9nとして公知の突然変異体Cas9ヌクレアーゼ(D10A)をFut8エクソン7座位の標的化に使用し、構築物は二本鎖DNA切断の代わりに一本鎖切断を生成す

50

る。この設計は、C R I S P R / C a s 構築物の特異性を改善することを目的とする。

【 0 2 1 0 】

一本鎖切断の場合、2つのDNA標的部位は近接した形で標的とされ、一本鎖切断又はニックは逆DNA鎖で生じる。それにより、DNA修復機構(NHEJ)を導入し、DNA損傷を修復する。DNA修復を開始する特定の間隔で2つのgRNA/Cas9n複合体を導入することは、標的部位への特異性を改善する。gRNA/Cas9n複合体が1つだけ無関係な部位に非特異的に結合する場合、突然変異の頻度が非常に低い相同組換えに基づく修復によって通常修復されるニックを引き起こす。したがって、このアプローチは、Fut8遺伝子を標的とする特異性を上げる。

【 0 2 1 1 】

FUT8遺伝子の特有の領域は、酵素の触媒機能を廃止するように酵素の構造情報に基づき、又は高次構造を破壊することにより標的とされる。

【 0 2 1 2 】

ベクターの重要な特徴は：

a) Cas9 - 化膿性連鎖球菌のCRISPRシステムの成分として最初に発見され、哺乳動物細胞での利用に適用されてきたヌクレアーゼである。RNA誘導型Cas9ヌクレアーゼは、高い効率で哺乳動物細胞の内因性ゲノム座位に正確な二本鎖切断を効果的に導入することができる。

b) Cas9 - D10A - Cas9ヌクレアーゼのD10A突然変異体(Cas9n)は一本鎖にニックを入れ、標的ゲノム座位の逆鎖に相補的な一対のオフセットガイドRNAと組み合わせる。これは、野生型Cas9に見られる非特異的な活性を減らすのに役立つ。

c) キメラgRNA足場 - キメラガイドRNA(gRNA)足場は、20個のヌクレオチドの標的特異的な相補性領域、42個のヌクレオチドのCas9結合RNA構造、及びゲノム改変のための標的部位へCas9ヌクレアーゼを導く、化膿性連鎖球菌(S. pyogenes)由来の40個のヌクレオチドの転写ターミネーターからなる。この場合、2つのgRNA足場があり、それぞれ各gRNA用である。

d) カナマイシン - r - それによりミスコードを引き起こすリボソーム転位を阻害する有効な抗細菌剤である。カナマイシン耐性をコードする遺伝子はネオマイシンリン酸転移酵素II(NPT II/Neo)である。カナマイシン耐性遺伝子を含有するプラスミドでトランスフォームした大腸菌は、25 µg/mlのカナマイシンを含有する培地で増殖することができる。

e) P_{CMV} - CMVプロモーターは、構成的な哺乳動物プロモーターであり、様々な細胞システムで強い発現を媒介する。

f) P_{hU6.1} - RNA発現のためのヒトAタイプ3コアプロモーター。

【 0 2 1 3 】

1. 4 - CRISPR構築物を得る全プロセスは以下のステップからなる：

1. CRISPR標的の設計。

2. ベクター骨格を有するベクター構築物、すなわちgRNAインサートを有するpD1401ベクター。

3. CRISPR構築物pD1401(gRNA514~553)による、大腸菌コンピテントセル(DH10B又はDH5アルファ)のトランスフォーメーション、及びカナマイシンを補足したLB(Luria Bertani) - アガーへのプレーティング。

4. カナマイシンを含むLBブロス中へのトランスフォームした細胞(CRISPR構築物を含む)の接種。

5. DH10B又はDH5アルファ細胞からのプラスミドDNA pD1401(gRNA514~553)の単離。

6. CHO-S細胞のトランスフェクション；LCAアッセイによるスクリーニング及び選択。

7. QIAGEN DNeasy Blood & Tissue Kitを使用する選択し

10

20

30

40

50

たクローンのゲノムDNA単離。

8．分光光度法による定量。

9．PCR条件の最適化。

10．PCRによるゲノムDNA試料のクロスチェック。

11．アガロースゲルでの電気泳動。

12．Phusionポリメラーゼを使用するPCR増幅及びTaqポリメラーゼを使用するテーリング。

13．QIAGENキットを使用するPCR産物のゲル溶出。

14．pTZ57R/Tベクターを使用するTAクローニング。

15．DH10B又はDH5アルファ細胞のライゲートした試料pTZ57R/T+CRISPR(PCR)によるトランスフォーメーション。

16．アンピシリンブロスを含むLBへのトランスフォームした細胞(pTZ57R/T+CRISPR(PCR))の接種。

17．QIAGENプラスミドDNA単離キットを使用するDH5アルファ及びDH10B細胞からのプラスミドDNA(pTZ57R/T+CRISPR(PCR))の単離。

18．制限酵素消化によるインサートの存在のクロスチェック。

19．配列決定プライマー；及び

20．配列決定によるINDELの確認。

【0214】

(例2)

高力価の抗Her2抗体を発現するCHO-S細胞系

モノクローナル抗体産物は、任意の技術を使用して、任意のチャイニーズハムスター卵巣細胞系において産生可能である。そのような技術の例として、GPEX(商標)、UCOE(商標)、SURE(商標)技術、Light Path(商標)技術、及びその他の多くの技術が挙げられるが、これらに限定されない。この特定の例では、抗Her2抗体遺伝子が、GPEX技術を利用してチャイニーズハムスター卵巣(CHO-S)細胞系内で発現される。GPEX(登録商標)は、標的細胞を100%トランスフェクトする非常に効率的なレトロウイルスベクターに基づく。GPEX(登録商標)の長所として、

- ・ベクターのコピー毎に単一の組み込み部位を有すること
- ・選択マーカーを必要としないこと

が挙げられる。

【0215】

抗Her2抗体の重鎖及び軽鎖タンパク質配列は、オープンアクセスパブリックソースから得られる。対応する重鎖及び軽鎖遺伝子配列は、独自開発のコドン強化システムを使用してコドン最適化されている。抗体の重鎖及び軽鎖遺伝子に対するコドン最適化配列は、商業的ベンダーにより合成され、pUC57ベクターにクローン化される。重鎖及び軽鎖配列は、配列番号16及び17により表される。

【0216】

抗Her2抗体の重鎖アミノ酸配列 - 配列番号16

```

MGWSCIIILFLVATATGVHSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS
CAASGFGNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARITYPTNGYTRYA
DSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLR AEDTAVYYCSRWGG
DGFYAMDYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK
SCDKTHTCTPCPAPELLGGPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
TYRVVSVLTVHLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKISK
AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQ

```

Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K .

【 0 2 1 7 】

抗 H e r 2 抗体の軽鎖アミノ酸配列 - 配列番号 1 7

M G W S C I I L F L V A T A T G V H S D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I
T C R A S Q D V N T A V A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y S A S F L Y S G V P S R
F S G S R S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q H Y T T P P T F G Q G
T K V E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P
R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L
S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C .

【 0 2 1 8 】

DNA 配列をコードする (C D S) 遺伝子はいずれも、クローニングを促進するために、隣接する H i n d I I I 及び X h o I クローニング部位と共に合成される。p U C 5 7 の重鎖及び軽鎖をコードするプラスミドは、2 つの C D S に単離するために、H i n d I I I 及び X h o I 制限酵素により消化される。抗 H e r 2 抗体の重鎖及び軽鎖 DNA 断片は、G P E x (登録商標) プラスミド p C S - n e w M C S - W P R E にクローン化され、レトロウイルスベクターに基づく発現のために、同じ 2 つの酵素により消化される。完全長抗 H e r 2 抗体の軽鎖 C D S をコードする新規プラスミドは、p C S - H i g h w a y L C - W P R E と呼ばれ、また両構築物の C D S の妥当性は、DNA 配列決定により確認される。

【 0 2 1 9 】

これらの 2 つのレトロウイルス発現ベクターが、抗 H e r 2 抗体発現プロデューサー細胞系を開発するのに使用される。製造用細胞系は、チャイニーズハムスター卵巣 (C H O - S) 親細胞系に、軽鎖 (L C) 及び重鎖 (H C) をコードする抗 H e r 2 抗体配列を含有するレトロウイルスベクターを形質導入するラウンドを複数回実施することにより作成する。全部で 6 回の形質導入を実施する。プールされた集団を 9 6 ウェル細胞培養プレートに播種して、単一細胞に由来するクローン細胞系を確立する。クローン細胞系を、E L I S A によりタンパク質力価についてスクリーニングする。トップから 3 0 個のクローンを増殖させ、増殖及び生産性について T 1 7 5 フラスコ中で三通り試験し、凍結保存する。トップのクローンを、振盪フラスコ中、フェッドバッチ分析により生産性について試験する。

【 0 2 2 0 】

親 C H O - S 細胞系の F U T 8 遺伝子、特に F u t 8 遺伝子のエクソン 7 を標的とする C R I S P R / C a s 構築物を使用して、アフコシル化抗 H e r 2 抗体を生成するのに、抗 H e r 2 抗体プロデューサー細胞系を使用する。本実施例では、高生産性のクローン細胞系の 1 つが、アフコシル化抗 H e r 2 を得るのに用いられる。

【 0 2 2 1 】

(例 3)

C R I S P R 構築物による細胞のトランスフェクション

本実施例は、抗 H e r 2 抗体を過剰発現する C H O - S 細胞系のトランスフェクションの手順を含む。これまでの節に記載されている、F U T 8 遺伝子を標的とする C R I S P R / C a s 構築物を、C H O - S 細胞系にトランスフェクトする。また、本実施例は、C R I S P R / C a s 技術を使用して、抗 H e r 2 抗体を過剰発現する F U T 8 ノックアウト C H O - S 細胞系を開発するために、単一細胞の安定な細胞系を選択及び確認する方法、並びにフローサイトメトリーに基づく機能アッセイにより陽性クローンを選択する方法について記載する。

【 0 2 2 2 】

3 . 1 - C R I S P R 構築物による C H O 細胞系のトランスフェクション

本実施例は、C R I S P R 構築物による抗 H e r 2 抗体を過剰発現する C H O - S 細胞系のトランスフェクションの手順を含む。0 . 5 μ g ~ 5 μ g の範囲の DNA 濃度を、様々なインキュベーション時間、例えば 4 時間、2 4 時間、及び 4 8 時間について試験する

10

20

30

40

50

。リポソーム及び修飾リポソーム媒介型トランスフェクション試薬は、例えばLipofectamine 2000、Lipofectamine 3000、PlusTM試薬とLipofectamine LTX、MIRUS TransIT X2、MIRUS TransIT 2020、MIRUS TransIT 293、MIRUS TransIT CHOトランスフェクションキットについて試験する。複数のDNA対トランスフェクション試薬の比(μg:μl)も試験する。最適なトランスフェクション効率は、1:5のDNA対トランスフェクション試薬の比、24時間のインキュベーション、及びPlusTM試薬とLipofectamine LTXを使用して達成される。最適化実験は、RFP発現プラスミドDNAで実施した。

【0223】

10

図4は、本開示に記載の方法を使用してCHO-S細胞系のトランスフェクション効率を示す。トランスフェクション効率は、緑色蛍光タンパク質発現プラスミド構築物を使用して決定する。トランスフェクション後に観察された赤色蛍光細胞の数を全生存細胞数と比較し、確立されたプロトコルのトランスフェクション効率を決定する。パネルAは明視野像を表し、パネルBは赤色チャネル蛍光の同じ顕微鏡視野を表す。図4は、赤色蛍光タンパク質発現プラスミドをトランスフェクトしたCHO-S細胞は、高レベルのトランスフェクション効率を示したことを提示する。本開示の方法は、したがって、浮遊細胞のトランスフェクションに適する。

【0224】

トランスフェクション効率は以下の式によって計算する：

20

トランスフェクション効率 = (RFP発現細胞の数 / 全細胞数) * 100

【0225】

最適化した一過性トランスフェクション効率は、抗Her2抗体発現CHO-S細胞系において約50～70%である。

【0226】

トランスフェクションプロトコル：

CHO-S細胞は、90%より高い生存率、6ウェル組織培養プレート中 2×10^6 個の細胞/ウェルの密度で播種し、24時間接着させる。Plus(商標)試薬と共にLipofectamine LTXを使用して、pD1401(gRNA 514～553) CRISPR Cas構築物をトランスフェクトする。10μgの構築物を1:5のDNA対トランスフェクション試薬の比で使用する。細胞を、トランスフェクション後20～24時間インキュベートする。トランスフェクションの前に、DNAの量及び質を紫外分光光度法によって概算する。 A_{260}/A_{280} 値DNAは、質及びタンパク質の夾雑を表す。260nm及び280nmでの吸光度の比を使用して、DNAの純度を評価する。 $A_{260}/A_{280} > 1.8$ は通常「純粋」又は質の良いDNAとして許容される。3～4μlのDNA試料をマイクロキュベット上に置き、DNA濃度をEppendorf Biophotometer D30を使用して、好適な対照に対して概算する。

30

【表4】

表4-CRISPR DNA 希釈:

40

nウェルにつき	
pD1401(gRNA514～553)	10 μg * n
Plus TM 試薬	10* n
無血清 Opti MEM 培地	1.5 ml にするための量*n

【表 5】

表 5-Lipofectamine LTX 希釈:

Lipofectamine LTX	15 μ l*n
無血清 Opti MEM 培地	1.5ml にするための量*n

【0227】

C R I S P R DNA及びLipofectamine LTX溶液を希釈し、優しく混合し、20～25℃で5～10分間インキュベートする。DNA及びトランスフェクション試薬の希釈物(3ml)を混合し、複合体形成のため、室温で20～30分間インキュベートする。培地をウェルから吸引する。3mlのDNA及びトランスフェクション試薬複合体をプレートした細胞に滴下添加する。

10

【0228】

細胞は、5%CO₂インキュベーター中、37℃で24時間インキュベートする。細胞は、1400rpmで4分間遠心分離し、消費した培地を除去する。ペレットを、完全培地5～10ml/125mlエルレンマイヤー振盪フラスコに再懸濁し、5%CO₂インキュベーター中、37℃でインキュベートする。細胞数は2～3日毎に数え、生存率をモニターする。新鮮な培地への交換を、2～3日毎に実施する。細胞が生存率95%に到達したら、RCB(リサーチセルバンク)を調製する。

20

【0229】

3.2-単一細胞のクローニング

段階希釈及びプレーティング:

細胞は、クローニングする1日前に、0.25×10⁶個の細胞/mlの密度に分裂させる。細胞数をVice11XR自動細胞カウンターにより数え、プレーティング当日に生存率が90%を超えるように保証する。細胞懸濁液を段階的に希釈して、細胞密度を1細胞/ウェルとする。各ステップにおいて、1:10の比で希釈を行う。未処理96ウェル丸底プレート中の、10%FBS、4mMグルタミン、1×PenStrep、及び1×ClonaCellCHOACF(動物成分を含まない)が補充されたパワーCHO2CD培地内に、細胞を100 μ l/ウェルでプレーティングする。プレートを倒立位相差顕微鏡下でスキャンして単一細胞を同定する。単一細胞を含有するウェルを目視で確認し、更にモニターするためにマークする。細胞2個及び細胞6個を含有するウェルもマークし、増幅用として保存する。プレートを5%CO₂インキュベーター中、37℃、相対湿度75%で、10～15日間インキュベートする。

30

【0230】

3.3-24ウェルプレート中でのクローン及びミニプールの増幅:

10～15日後、96ウェルプレートの1ウェルから24ウェルプレートの1ウェルへと、培養容積1ml中でクローンを増幅する。増幅で用いられる培地は、10%FBS、4mMグルタミン、及び1×PenStrepを含むパワーCHO2CDである。24ウェルプレートを、5%CO₂インキュベーター中、37℃、75%相対湿度で2～3日間インキュベートする。

40

【0231】

3.4-6ウェルプレート中でのクローン及びミニプールの増幅:

次いで、クローン及びミニプールを、24ウェルプレートの1ウェルから6ウェルプレートの1ウェルへと、培養容積3ml中で増幅する。6ウェルプレートを5%CO₂インキュベーター中、37℃、75%相対湿度で4～5日間インキュベートする。増幅で用いられる培地は、4mMグルタミン及び1×PenStrepを含むパワーCHO2CDである。このステップ以降、FBSフリー培地を増幅用として使用する。

【0232】

50

3.5 - フローサイトメトリーによるスクリーニング

それぞれのクローンの L C A - F I T C 結合プロファイルを決定し、2つの細胞6個のミニプール (C R 2 T M C H O 6 A、C R 2 T M C H O 6 B)、及び2つの単一細胞クローン (C R 2 T M C H O 1 A、C R 2 T M C H O 1 B) を、更なる試験用として選択する。L C A - F I T C 結合アッセイの詳細は、以下の節に記載されている。

【0233】

3.6 - 125 ml エルレンマイヤー振盪フラスコ中でのクローン及びミニプールの増幅
クローン及びミニプールを、平底125 ml エルレンマイヤー振盪フラスコ中で、培養容積10 ml に更に増幅する。フラスコを5% CO₂ インキュベーターシェイカー中、37、120 rpm、75% 相対湿度で4~5日間インキュベートする。その後、クローンを、125 ml エルレンマイヤー振盪フラスコ中で、培養容積30 ml まで増幅し、5% CO₂ インキュベーターシェイカー中、37、120 rpm、75% 相対湿度で、4~5日間インキュベートする。パワーCHO2 CD 培地は、4 mM グルタミン及び1 x Pen Stre p 溶液と共に増幅するのに使用する。最終的に、細胞数、生存率、及び L C A - F I T C 結合プロファイルを決定する。細胞上清を1400 rpm で4分間遠心分離して回収し、プロテインA精製用及び更なる特徴付け用として使用する。リサーチセルバンクを調製し、確立されたプロトコールに従い凍結保存する。

【0234】

(例4)

L C A - F I T C (レンズマメアグルチン - フルオレセインイソチオシアネート) 結合アッセイ

フルオレセインイソチオシアネート (F I T C) は L C A にコンジュゲートする蛍光色素である。したがって、対照の C H O S 細胞の細胞膜上のフコシル化タンパク質の存在は、フルオレセインコンジュゲート L C A によって認識される。これらの細胞は、特定のフローサイトメーターチャンネルでより明るい蛍光を発する。観察される蛍光は、蛍光単位として表す。フコース経路が破壊された細胞、ノックアウト系は、フコシル化細胞タンパク質を産生することができず、したがって細胞膜タンパク質はフコシル化されていない。これらの細胞をフルオレセイン - L C A コンジュゲートで試験すると、バックグラウンドと同等の蛍光をもたらす。したがって、フコースノックアウト細胞は、対照の C H O S 細胞系と比較してより低いレベルの蛍光を発する。

【0235】

フルオレセインレンズマメアグルチニン (L C A - F I T C) ストック5 mg / ml を希釈し、アッセイ緩衝液 (2 % B S A を含有する D P B S) 中2 µ g / ml の終濃度を得る。細胞は、E p p e n d o r f m i n i s p i n 遠心分離機を使用して4分間1400 rpm でスピンする。培地を吸引し、ペレットを2 µ g / ml L C A - F I T C を含有する0.25 ~ 1 ml のアッセイ緩衝液中で再懸濁する。C H O S 対照細胞は、0.25 ~ 1 ml のアッセイ緩衝液のみ (未染色対照) 及び2 µ g / ml L C A - F I T C を含有する0.25 ~ 1 ml のアッセイ緩衝液 (染色対照) 中で再懸濁する。全ての試料を希釈し、最終アッセイ緩衝液中0.1 ~ 0.2 x 10⁶ 個の細胞 / ml を得る。次いで、試料は30分間氷上、暗所でインキュベートする。次いで、データ取得のために、B D A c c u r i C 6 ペンチトップフローサイトメーターにより各試料を分析する。データ分析は、A c c u r i C 6 ソフトウェアを使用して行う。

【0236】

フルオレセイン - ストレプトアビジン (S t r e p - F I T C) 陰性染色も実施する。フルオレセインストレプトアビジン (S t r e p - F I T C) ストック1 mg / ml を希釈し、アッセイ緩衝液 (2 % B S A を含有する D P B S) 中2 µ g / ml の終濃度を得る。細胞は、E p p e n d o r f m i n i s p i n 遠心分離機を使用して4分間1400 rpm でスピンする。培地を吸引し、ペレットを、2 µ g / ml S t r e p - F I T C を含有するアッセイ緩衝液中で再懸濁する。C H O S 対照細胞は、アッセイ緩衝液のみ (未染色対照)、2 µ g / ml L C A - F I T C を含有するアッセイ緩衝液 (染色対照

10

20

30

40

50

)、及び $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ Strep-FITC を含有するアッセイ緩衝液中で再懸濁する。全ての試料を希釈し、 $0.25 \sim 1 \text{ ml}$ のアッセイ緩衝液中 $0.1 \sim 0.2 \times 10^6$ 個の細胞 $/\text{ml}$ を得る。次いで、データ取得のために、各試料を BD Accuri C6 ベンチトップフローサイトメーターにより分析する。データ分析は、Accuri C6 ソフトウェアを使用して行う。蛍光データは下記の表 6 に示す。

【表 6】

表 6

試料 ID	RFU の平均値
未染色 TMCHO	1715.50
TMCHO LCA FITC	130805.50
CR2TMCHO 6A LCA FITC	30972.00
CR2TMCHO 6B LCA FITC	24749.50
CR2TMCHO 1A LCA FITC	29624.00
CR2TMCHO 1B LCA FITC	29463.00

【0237】

単一細胞クローン及びミニプール集団の LCA-FITC 結合プロファイル：

図 5 A 及び 5 B は、抗 Her 2 抗体を過剰発現し、FUT 8 遺伝子を標的とする CRISPR/Cas システムをトランスフェクトした CHO S 細胞に観察された蛍光シフトを示す。蛍光シフトは、抗 Her 2 抗体を過剰発現する CHO S 細胞における FUT 8 遺伝子ノックアウト表現型の成功を示す。試料 CR2TMCHO 1A 及び CR2TMCHO 1B は、FUT 8 遺伝子を標的とする CRISPR/Cas システムをトランスフェクトした、抗 Her 2 抗体を過剰発現する CHO S 細胞に由来する代表的な単一細胞クローン細胞系を示す。試料 CR2TMCHO 6A 及び CR2TMCHO 6B は、FUT 8 遺伝子を標的とする CRISPR/Cas システムをトランスフェクトした、抗 Her 2 抗体を過剰発現する CHO S 細胞に由来する細胞集団から得られた代表的なミニプールを示す。

【0238】

複数回継代したときのトランスフェクトしたプールの LCA-FITC 結合プロファイル：

抗 Her 2 抗体を発現する CHO S 細胞系を、CRISPR/Cas 構築物でトランスフェクトし、フコースノックアウト表現型について分析する。トランスフェクトした細胞系のプールを、フコースノックアウト表現型の安定性を理解するために、複数回継代した場合について分析する。

【0239】

データよりトランスフェクトしたプールは、複数世代にわたり、フコースノックアウト表現型を維持することが示唆される（図 6）。82% よりも多く CHO S 細胞が、フコースノックアウト表現型を維持したことが観察される。これは、予期せぬ観察所見である。82% を超えるフコースノックアウト表現型が維持されるという観察所見は、複数世代にわたり一貫している。

【0240】

結果は、本開示で設計及び使用した独自の CRISPR/Cas システムは、多数の細胞（82% を超える細胞）をフコースノックアウト細胞にトランスフォームする能力を有することを示している。該方法及び CRISPR/Cas システムは、新規のアフコシル

化抗体産物を作成するために、任意の抗体過剰発現細胞系において使用可能であるので、構築物の独自性、及び特有の方法は有用である。これは、アフコシル化モノクローナル抗体を作成するための、より単純で、非常に迅速且つ高度に強固な新規のアプローチである。この驚くべき成果は、この方法及びC R I S P R / C a sシステムによる、任意の標的抗原に対する新規アフコシル化抗体産物の開発を可能にする。

【0241】

比較として、アフコシル化モノクローナル抗体を開発する場合、当該プラットフォームにおいてモノクローナル抗体遺伝子を発現させる前に、特別なフコースノックアウトプラットフォームを作成し、そして完全に特徴付けする必要がある。そのようなフコースノックアウトプラットフォームを開発するプロセスは非常に複雑であり、時間がかかり、成功率は極めて低い。

10

【0242】

このプロセスを単純化すれば、任意のモノクローナル抗体を発現する任意のC H O S細胞系から、アフコシル化モノクローナル抗体を、非常に短期間で開発することが可能となる。したがって、ここに記載する方法、並びに本開示で設計及び開発するC R I S P R / C a sシステムは有効であると考えられる。

【0243】

(例5)

F U T 8 ノックアウトクローンの増殖曲線決定：

0.5 X 10⁶ 個の細胞 / m l を 125 m l エルレンマイヤー振盪フラスコ内に播種する。生存細胞の計測は、1、2、3、及び4日目に、V i - c e l l X R 生死細胞オートアナライザーを使用して実施する。それぞれの増殖曲線を作成し、図7に示す。データより、親C H O S細胞系、及びアフコシル化抗H e r 2抗体を過剰発現するフコースノックアウトC H O S細胞系の増殖曲線は同等であることが示唆された。親C H O S細胞系についてC R I S P R / C a sにより媒介されるトランスフォーメーションを行っても、増殖曲線及び生存率プロファイルに影響を及ぼさない。このデータから、C R I S P R / C a sの設計は、細胞増殖、及びここに記載するトランスフェクトした細胞系内でのモノクローナル抗体産生に影響を及ぼすその他の細胞生物学パラメーターに対して有害効果を有さないことが示唆される。

20

【0244】

(例6)

F U T 8 遺伝子を標的とするC R I S P R / C A Sシステムをトランスフェクトした、抗H e r 2抗体を過剰発現するC H O S細胞系のゲノム配列決定分析

機能アッセイ、主にL C A - F I T C フローサイトメトリーアッセイによって選択した、C R I S P R / C a s をトランスフェクトしたC H O S細胞系をゲノム配列分析で使用する。チャイニーズハムスターのF U T 8ゲノム座位は文献(NW__003613860)に十分に報告されており、各細胞系クローンにおいて遺伝子改変の型を理解するために野生型配列として使用される。本実施例の目的は、C R I S P R / C a s システムをトランスフェクトし、アフコシル化抗H e r 2抗体産物を発現するC H O S細胞系から得られるゲノムDNA配列決定結果を分析することである。本明細書で報告する全ての細胞系は、クローン細胞系であり、L C A - F I T C フローサイトメトリーアッセイから選択される。

30

40

【0245】

簡潔に言えば、選択したクローン細胞系は、ゲノムDNA単離に適した増殖条件下で増殖し、精製したゲノムDNAは、F U T 8 標的座位の両側のプライマーを使用するP C R 増幅に使用し、次いでP C R 増幅産物を精製し、大腸菌コンピテントセルを使用して好適なベクターにクローン化し、生じるアンピシリン耐性大腸菌コロニーを選択及び培養し、各細菌クローンからプラスミドDNAを単離し、およそ5 ~ 10 個の個々の細菌コロニーを自動配列決定によってクローン細胞系ごとに試験し、F U T 8 標的ゲノム座位において改変の型を理解する。

50

【0246】

以下の試薬及び溶液を使用し、選択したクローンのゲノム配列決定を実行する。

【0247】

全ゲノム配列決定プロトコールは以下の4つのプロセスに分けられる。

- A．選択したクローンからのゲノムDNA単離
- B．各細胞系の特定のゲノム座位を増幅するPCR戦略
- C．配列決定ベクターへのPCR産物のクローニング
- D．配列データ分析及びINDELの同定

【0248】

選択したクローンからのゲノムDNA単離

クローンCHO S細胞系は、振盪フラスコで4 mMグルタミン、100ユニット/ml ペニシリン及び100 µg/ml ストレプトマイシンを含むパワーCHO2 CD培地中、制御した条件のインキュベーター内で、5% CO₂ 及び75% 相対湿度の存在下、120 rpm、37 °C で増殖する。細胞の増殖は、毎日観察し、生存率をモニターする。生存率が90%を上回ったときに細胞を回収する。単離の日、細胞集団を遠心分離することにより培養培地を除去する。次いで細胞を10 mlのDPBSと混合し、1500 rpmで5分間遠心分離する。使用した培地を除去し、細胞ペレットを10 ml DPBS中に再懸濁する。細胞は、1500 rpmで5分間の遠心分離を使用して再び洗浄する。DPBSを吸引により完全に除去する。最後の細胞ペレットをゲノムDNA単離に使用する。

【0249】

ゲノムDNAは、CHO S親細胞、及びアフコシル化抗Her2抗体を発現するCRISPR/Casシステムをトランスフェクトし、LCAフローサイトメトリーアッセイによって選択したCHO S細胞系から、単離する。製造業者のプロトコールに従って、ゲノムDNAを単離するために市販のQIAGEN gDNA抽出キットを使用する。

【0250】

PCR戦略設計

チャイニーズハムスターのゲノムDNA配列を、一般に利用可能なデータベース配列NW_003613860から分析する。FUT8エクソン7 DNA配列及び部分的なイントロン配列を、FUT8 標的座位を増幅するPCR戦略を設計するために使用する。

【0251】

プライマーは、プライマー長、PCR産物長、GC含量、融解温度、並びに候補ホモ二重鎖及びヘテロ二重鎖形成に基づいて設計する。以下に示すように、プライマーは、FUT8 標的座位の両側に設計する。増幅したPCR産物は、CRISPR媒介型SSB及び続くDNA修復による突然変異分析を意図する。以下のヌクレオチド配列は太字のプライマー配列による対象の領域を表す。

【0252】

PCRプライマー設計に使用するFut8エクソン7及び関連イントロン配列：配列番号20

【数4】

a a g a a a t a a g c t g a a t c a g c t c t g a c t t a t t g t g t g a t t t
t c a a t a c c t g t g a c c a a a a t g a g a a g t t a a c t c c t t a t a t
c t t t a t c t t a t t t g t t t c t c t g g a a g A A T C C C A A G G A C T G
C A G C A A A G C C A G A A A G C T G G T A T G T A A T A T C A A C A A A G G C
T G T G G C T A T G G A T G T C A A C T C C A T C A T G T G G T T T A C T G C T
T C A T G A T T G C T T A T G G C A C C C A G C G A A C A C T C A T C T T G G A
A T C T C A G A A T T G G C G C T A T G C T A C T G G A G G A T G G G A G A C T
G T G T T T A G A C C T G T A A G T G A G A C A T G C A C A G A C A G G T C T G
G C C T C T C C A C T G G A C A C T G G T C A G g t a a g g a g c a t g t g c a
c c a t g a a a g a t c t c t g g t t a g g t c a g a t t a g c a c

10

20

30

40

50

【 0 2 5 3 】

イントロンは、塩基 2 1 ~ 塩基 1 0 6 及び塩基 3 4 5 ~ 塩基 3 7 1 に小文字で表す。エクソン 7 は塩基 1 0 7 ~ 塩基 3 4 4 に大文字で表す。左及び右のプライマー結合部位は下線を引く。

【 0 2 5 4 】

PCR によって INDEL を同定するためのプライマー設計

ゲノム PCR は、表 7 に記載の以下のプライマーを使用する Q I A G E N g D N A 抽出キットを使用して実施する。

【表 7】

表 7

PCR セット	プライマー名	プライマー配列(5'から3')	PCR 産物サイズ	塩基	T _m	%GC
FUT8 エクソン 7 の CRISPR プライマー	CRP_P1_Fw	AAGAAATAAGCTGAATCAG CTCTGAC 配列番号 18	394 bp	26	55.2	38
	CRP_P1_Rv	GTGCTAATCTGACCTAACC AGAG 配列番号 19		23	54.7	47.8

【 0 2 5 5 】

以下の節は、対照細胞系及びアフコシル化抗 H e r 2 抗体を発現する C H O S クローン細胞系由来の C H O S ゲノム DNA からの PCR 産物の生成、大腸菌コンピテントセルへの PCR 産物のクローニング、並びにクローン化 PCR 産物の配列決定に関する実験の詳細を提供する。

【 0 2 5 6 】

PCR 条件の最適化 -

実験を設計し、PCR 条件を標準化する。試験したパラメーターは、ゲノム DNA 濃度 (1 0 0 n g ~ 1 0 0 0 n g)、プライマー濃度 (2 n m o l e ~ 2 0 n m o l e)、PCR アニリング温度 (5 5 . 8 ~ 6 2 . 9)、及び時間 (2 0 秒 ~ 5 0 秒)、PCR 産物の伸長時間 (3 0 秒 ~ 6 0 秒) を含み、PCR サイクル数を 3 0 サイクルに設定する。到達した最適化条件は以下の節に記載する。

【 0 2 5 7 】

PCR 反応は、ブルーフリーディングポリメラーゼ P h u s i o n ポリメラーゼを使用して実行し、PCR 媒介型突然変異の制限を確実にする。PCR 増幅サイクルに続き、T a q ポリメラーゼ酵素をテーリングの混合物に添加する。テーリングステップは重要である。PCR 産物に追加された余分な塩基が、次の節に記載する配列決定ベクターへの直接クローニングを可能にするからである。T A クローニングベクターへのクローニングのために、PCR 産物に d A T P オーバーハングを付加するため、P h u s i o n ポリメラーゼ増幅産物を、7 2 で 2 0 分間 T a q DNA ポリメラーゼとインキュベートする。

【 0 2 5 8 】

PCR によるゲノム DNA 試料のクロスチェック -

ゲノム DNA PCR 産物をアガロースゲル電気泳動で分析し、産物長は分子量標準を使用して確認する。はっきりとした増幅プロファイルを有する PCR 試料を、次の処理ステップに使用する。

【 0 2 5 9 】

Q I A G E N キットを使用する P C R 産物のゲル溶出 -

増幅した P C R 産物を、新しく調製した 1 % アガロースゲルにロードし、1 0 0 V で 1 時間電気泳動して、増幅した P C R 産物を、未使用のプライマー及び増幅プロセス中に生成された任意のその他の二量体から分離する。増幅した産物をゲルから切り取り、市販の Q i a g e n ゲル溶出キットを使用して溶出する。D N A は、高純度の分子生物学等級の水で溶出する。

【 0 2 6 0 】

配列決定ベクターへの P C R 産物のクローニング -

アガロースゲルで精製した P C R 増幅産物は、次いで D N A ライゲーションプロセスによって市販の p T Z 5 7 R / T ベクターにクローニングするために使用する。D N A ライゲーションの条件は、以前に標準化されている。

【 0 2 6 1 】

D H 5 アルファ大腸菌コンピテントセルの、ライゲートした試料 p T Z 5 7 R / T + C R I S P R (P C R) によるトランスフォーメーション -

ライゲートした D N A により、市販の大腸菌 D H 5 アルファ コンピテントセルをトランスフォームする。製造業者によって記載されるトランスフォーメーションプロトコールに従って、高レベルのトランスフォーメーション効率を達成する。トランスフォーメーション後、大腸菌細胞は、トランスフォームしたコロニーの増殖のため、アンピシリン抗生物質の存在下で増殖する。

【 0 2 6 2 】

トランスフォームした細胞 (p T Z 5 7 R / T + C R I S P R (P C R)) のアンピシリンを含む L B 培地への接種 -

各別々のコロニーを、5 m l 培養容積の L B + アンピシリンブロス中に接種し、プラスミド D N A 単離のため一晩増殖する。

【 0 2 6 3 】

D H 5 アルファのトランスフォームした細胞からのプラスミド D N A (p T Z 5 7 R / T + C R I S P R (P C R)) の単離 -

4 . 5 m l の一晩増殖した培養物を、製造業者のプロトコールに従って、市販の Q I A G E N プラスミド D N A 単離キットを使用するプラスミド D N A 単離のために使用する。プラスミド D N A は、高純度の分子生物学等級の水で溶出する。

【 0 2 6 4 】

インサートの存在に関してプラスミドのクロスチェック -

各プラスミド調製物は、好適な制限酵素消化後、続いてアガロースゲル電気泳動を使用して、インサートの存在を試験する。インサートのサイズは、好適な分子量標準と比較する。

【 0 2 6 5 】

P C R 反応

まず、二本鎖 D N A 鋳型を 9 4 ° C の高温で変性する。次いで、表 7 に記載の配列特異的プライマーを標的配列の両側の部位にアニールする (6 0 ° C) 。熱安定性の D N A ポリメラーゼ (P h u s i o n ポリメラーゼ) によりアニールしたプライマーを伸長し (7 2 ° C) 、それにより最初の D N A 配列の量を倍にする。次いでこの新しく合成された産物は、増幅の続くサイクルの更なる鋳型になる。これらの 3 ステップを 3 0 サイクル反復し、標的 D N A 濃度の 1 0 ⁹ 倍の増加をもたらす。T A クローニングベクターへのクローニングのために、P C R 産物に d A T P オーバーハングを付加するため、P C R P h u s i o n ポリメラーゼ増幅産物を 7 2 ° C で 2 0 分間 T a q ポリメラーゼとインキュベートする。

10

20

30

40

【表 8】

表 8-PCR 反応条件

初期変性	94°C	3 分	
変性	94°C	30 秒	30 サイクル
アニーリング	60.4 °C	50 秒	
伸長	72 °C	1 分	
最終伸長	72 °C	10 分	
プロセス終了後	4°C		

10

【表 9】

表 9-PCR 反応混合物

試薬	試料	対照
鋳型	それぞれ	0.0 μL
dNTPs	1 μL	1 μL
Fw プライマー	1 μL	1 μL
Rv プライマー	1 μL	1 μL
Phusion ポリメラーゼ	1 μL	1 μL
Phusion 緩衝液 HF (5×)	10 μL	10 μL
精製水	それぞれ	36 μL
全反応混合物	50 μL	50 μL

20

30

【 0 2 6 6 】

PCR 産物は更に、テーリングのための Taq DNA ポリメラーゼによって修飾する。最終 PCR 産物は、次いで、増幅断片の溶出のためにアガロースゲルで電気泳動する。増幅断片を、次いで QIAEX II ゲル抽出キットを使用してゲル溶出する。

40

【 0 2 6 7 】

ライゲーション

PCR 増幅及びゲル溶出産物は市販の pTZ57R/T ベクターにライゲートする。ライゲーションプロトコルを以下に記載する。

【表 10】

表 10-ライゲーション混合物

DNA (pTZ57R/T)	1 μ L
DNA (CRISPR(PCR 産物))	4 μ L
T4 DNA リガーゼ	1 μ L
T4 DNA リガーゼ緩衝液(10 \times)	1 μ L
精製水	10 μ L にする
合計	10 μ L

10

【0268】

上記のライゲーション混合物を 4 で一晩インキュベートし、ライゲートした混合物の 50% はヒートショック法によって DH5 アルファ大腸菌コンピテントセルをトランスフォームする。

【0269】

ヒートショック法によって、ライゲートした試料による細菌細胞のトランスフォーメーション

20

細菌細胞をトランスフォームする目的は、プラスミド DNA をクローン化し増やすことである。コンピテント大腸菌セル (DH5 アルファ) の 20 μ L 分取物を -80 の冷凍庫から取り出し、5 分間氷上で溶かす。ライゲートした試料 (pTZ57R/T + CRISPR (PCR)) の 50% をコンピテントセルに添加し、優しく混合し、20 分間氷上でインキュベートする。混合物を含有するチューブを 50 秒間 42 でウォーターバス / ドライバスに置く。チューブを 2 分間氷上に戻す。0.950 ml の 37 に温めた LB プロス (アンピシリン抗生物質なし) を、シェイカー中 220 rpm で 1 時間、37 でインキュベートする。生じた培養物の 100 μ L を温めた LB + アンピシリン培養プレート上に広げる。プレートは 37 のインキュベーターで一晩インキュベートする。

30

【0270】

QIA Prep spin miniprep を使用する細菌細胞からのプラスミド DNA 単離

本手順の目的は、以下の実験に使用する特異的 DNA プラスミドを含有する細菌を増殖 / 培養することである。5 ml の LB + アンピシリンプロスを、オートクレーブ処理したチューブに添加し、単離した細菌コロニーを培養プレートから LB プロス + アンピシリン培養チューブに接種する。チューブは、220 rpm、37 で一晩インキュベートする (細菌の増殖に応じて、およそ 16 ~ 18 時間)。4.5 ml の一晩培養した培養物を 13 rpm で 1 分間遠心分離する。プラスミド DNA は、市販の QIAGEN プラスミド単離キットを使用して単離する。プラスミド DNA は、高純度の分子生物学等級の水で溶出し、更なる使用まで、-20 の冷凍庫に保管する。

40

【0271】

EcoRI - HF 及び HindIII - HF 酵素による制限消化を使用する陽性クローンの選択

したがって、単離したプラスミド DNA はインサート、この場合は PCR 増幅断片の存在を試験する。pTZ57R/T ベクターは、クローン化 PCR 産物の両側に複数の制限酵素部位を含有する。制限部位 EcoRI 及び HindIII を以下の表に記載するように制限消化のために選択する。反応は、プラスミド DNA の完全な消化のために 37 で 2 時間実行する。制限消化に続いて、混合物を 1% アガロースゲルで 1 時間電気泳動する。PCR 産物インサートは、存在する場合、pTZ57R/T ベクター骨格から分離され

50

、確認された細菌クローンをDNA配列決定のために使用する。

【表 1 1】

表 11-制限酵素消化-反応混合物

DNA (pTZ57R/T+CRISPR(PCR 産物))	2 µg
<i>EcoRI</i> -HF	1 µL
<i>Hind III</i> -HF	1 µL
New England Biolabs の Cut smart 緩衝液(10×)	2 µL
精製水	20 µL まで
合計	20 µL

10

【 0 2 7 2 】

本開示は、pTZ57R/TベクターにおけるPCR増幅産物の代表的な制限酵素消化を示し、異なるCHO-S細胞系由来のインサートの存在を確認する。別々の細菌クローンからのプラスミドDNA調製物は、ベクターにクローン化したPCR断片の両側のEcoRI及びHindIII制限酵素によって消化し、混合物は1%アガロースゲルで電気泳動する。生じたDNA断片のサイズはDNA分子量標準から推定する。異なるCHO-S細胞系内でFUT8座位の状態を把握するための自動化配列決定のために、細菌クローンを使用する。

20

【 0 2 7 3 】

(例 7)

配列データ分析及びINDELの同定

配列決定 - 確認したプラスミドは、次いでpTZ57R/Tベクター骨格に存在する特異的な配列決定プライマーによって配列決定する。配列データは、適切なプロトコールに従って自動DNA配列決定機器で生成する。配列決定は、フォワード及びリバース配列決定プライマー両方で実行し、正確な配列情報を確かめる。

30

【 0 2 7 4 】

DNA配列分析 - 全てのプラスミドからのDNA配列決定データを分析する。CHO-S親細胞系及び様々なCRISPR/Cas媒介型FUT8ノックアウトCHO-Sクローン細胞系由来のプラスミドDNAからのDNA配列を比較し、DNA配列の違いを同定する。各CHO-S細胞系クローンから、PCR産物を生成し、大腸菌へクローニングする。複数の大腸菌クローンは配列決定し、標的ゲノム座位において、ヌクレオチド配列の改変を確認する。

【 0 2 7 5 】

CHO-S親細胞系 - FUT8遺伝子のエクソン - 7の配列(配列番号20)は大文字である。イントロン配列は小文字であり、下線を引く。

a a g a a a t a a g c t g a a t c a g c t c t g a c t t a t t g t g t g a t t t
t c a a t a c c t g t g a c c a a a a t g a g a a g t t a a c t c c t t a t a t
c t t t a t c t t a t t t g t t t c t c t g g a a g A A T C C C A A G G A C T G
C A G C A A A G C C A G A A A G C T G G T A T G T A A T A T C A A C A A A G G C
T G T G G C T A T G G A T G T C A A C T C C A T C A T G T G G T T T A C T G C T
T C A T G A T T G C T T A T G G C A C C C A G C G A A C A C T C A T C T T G G A
A T C T C A G A A T T G G C G C T A T G C T A C T G G A G G A T G G G A G A C T
G T G T T T A G A C C T G T A A G T G A G A C A T G C A C A G A C A G G T C T G

40

50

G C C T C T C C A C T G G A C A C T G G T C A G g t a a g g a g c a t g t g c a
c c a t g a a a g a t c t c t g g t t a g g t c a g a t t a g c a c

【0276】

CHO S FUT8ノックアウトクローン細胞系の配列を以下に示す。エクソン7の配列は細胞系において突然変異されることが観察される。

【0277】

クローンCR2TMCHO 1A対立遺伝子バージョン：配列番号21

A A T C C C A A G G A C T G C A G C A A A G C C A G A A A G C T G G T A T G T A
A T A T C A A C A A A G G C T G T G G C T A T G G A T G T C A A C T C C A T C A
T G T G G T T T A C T G C T T C A T G A T T G C T T A T G G C A C C C A G C G A
A C A C T C T G T T T A G A C C T G T A A G T G A G A C A T G C A C A G A C A G
G T C T G G C C T C T C C A C T G G A C A C T G G T C A G

10

【0278】

クローンCR2TMCHO 1A対立遺伝子バージョン：配列番号22

A A T C C C A A G G A C T G C A G C A A A G C C A G A A A G C T G G T A T G T A
A T A T C A A C A A A G G C T G T G G C T A T G G A T G T C A A C T C C A T C A
T G T G G T T T A C T G C T T C A T G A C T C A C G G G G A T T T C C A A G T C
T C C A C C C C A T T G A C G T C A A T G G G A G T T T G T T T T G G C A C C A
A A A T C A A C G G G A C T T T C C A A A A T G T C G T A A T A A C C C C G C C
C C G T T G A C G C A A A T G G G C G G T A G G C G T G T A C G G T G G G A G G
T C T A T A T A A G C A G A G C T C G T T T A G T G A A C C G T C A G A T C A C
T A G A A G C T T T A T T G C G G T A G T T T A T C A C A G T T A A A T T G C T
A A C G C A G T C A G G C C A A C A G A G A C C A C A C C C A A G C T G G C C G
C C A C C A T G G C C C C A A A G A A G A A G C G G A A G G T C G G T A T C C A
C G G A G T C C C A G C A G C C G A C A A G A A G T A C A G C A T C G G C C T G
G C C A T C G G C A C C A A C T C T G T G G G C T G G G C C G T G A T C A C C G
A C G A G T A C A A G G T G C C C A G C A A G A A A T T C A A G G T G C T G G G
C A A C A C C G A C C G G C A C A G C A T C A A G A A G A A C C T G A T C G G A
G C C C T G C T G T T C G A C A G C G G C G A A A C A G C C G A G G C C A C C C
G G C T G A A G A G A A C C G C C A G A A G G A T G G G A G A C T G T G T T T A
G A C C T G T A A G T G A G A C A T G C A C A G A C A G G T C T G G C C T C T C
C A C T G G A C A C T G G T C A G

20

30

【0279】

クローンCR2TMCHO 1B対立遺伝子バージョン：配列番号23

A A T C C C A A G G A C T G C A G C A A A G C C A G A A A G C T G G T A T G T A
A T A T C A A C A A A G G C T G T G G C T A T G G A T G T C A A C T C C A T C A
T G T G G T T T A C T G C T T C A T G A T T G C T T A T G G C A C C C A G C G A
A C A C T C A T C T G G A G G A T G G G A G A C T G T G T T T A G A C C T G T A
A G T G A G A C A T G C A C A G A C A G G T C T G G C C T C T C C A C T G G A C
A C T G G T C A A A T C C C A A G G A C T G C A G C A A A G C C A G A A A G C T
G G T A T G T A A T A T C A A C A A A G G C T G T G G C T A T G G A T G T C A A
C T C C A T C A T G T G G T T T A C T G C T T C A T G A T T G C T T A T G G C A
C C C A G C G A A C A C T C A T C T G G A G G A T G G G A G A C T G T G T T T A
G A C C T G T A A G T G A G A C A T G C A C A G A C A G G T C T G G C C T C T C
C A C T G G A C A C T G G T C A G

40

【0280】

クローンCR2TMCHO 1B対立遺伝子バージョン：配列番号24

A A T C C C A A G G A C T G C A G C A A A G C C A G A A A G C T G G T A T G T A
A T A T C A A C A A A G G C T G T G G C T A T G G A T G T C A A C T C C A T C A
T G T G G T T T A C T G C T T C A T G A T T G C T T A T G G C A C C C A G T T G

50

C C T A A T A G A A C A A C C T T T G C C T G G T T G T T A C A A A A T A T A T
T C T C T G T A C C A G T A T C T A G T T T T A C A A T G A G C T A T G G A A T
G T T A A T G A T T T A T T T G T C T A C A T T A T A A A T T A T A T T G C T T
T G A T T T G C T C T A A G T G G A A C A A A C A C T C A T C T T G G A A T C T
C A G A A T T G G C G C T A T G C T A C T G G A G G A T G G G A G A C T G T G T
T T A G A C C T G T A A G T G A G A C A T G C A C A G A C A G G T C T G G C C T
C T C C A C T G G A C A C T G G T C

【0281】

フォワード及びリバース配列決定プライマー両方によって配列決定した5～15個の別々の細菌クローンの分析から配列データを収集する。配列決定データは、CHO S親細胞系と比較した複数のクローンにおける様々な長さの欠失を示唆する。塩基の欠失が、クローンCR2TMCHO 1A及びCR2TMCHO 1B対立遺伝子バージョンにおいて観察される。全ての欠失はCRISPR/Cas標的部位に位置する。

10

【0282】

データは、FUT8遺伝子を標的とするCRISPR/Casシステムをトランスフェクトした、アフコシル化抗Her2抗体を過剰発現するCHO S細胞系内のFUT8ゲノム座位に存在する様々なINDELを示唆する。多くの場合、標的塩基に改変があることが観察される。CRISPR/Cas複合体によるゲノム改変のそのような多様性は、近接した内因性DNA一本鎖切断及び非相同末端結合による修復によって可能である。これらの細胞系の全ては、機能スクリーニングアッセイ、主にLCA-FITCフローサイトメトリーアッセイによって選択する。結果は、抗Her2抗体を過剰発現するCHO S FUT8ノックアウト細胞系を単離及び同定する高効率の機能アッセイも意味する。

20

【0283】

Cas9nエンドヌクレアーゼを含むこの一对のCRISPR/Cas複合体が、CHO S細胞系内の標的FUT8座位において非常に配列特異的な遺伝子変化をもたらすので、本開示に示すCRISPR/Cas複合体の設計は非常に効率的であることも明らかである。

【0284】

配列データの合成分析を使用して、FUT8ゲノム標的座位が欠失及び/又は挿入によって改変されている(INDEL)候補FUT8ノックアウトCHO S細胞系を同定する。次いで、顕著な差異を明確にするために、DNA配列をアラインする。図8A及び8Bは、CHO S対照細胞系、及びFUT8ノックアウトされたアフコシル化抗Her2抗体発現CHO S細胞系のヌクレオチド配列のアライメントを示す。DNA配列情報を使用し、FUT8遺伝子(エクソン7)のアミノ酸配列を割り当てる。次いで、アミノ酸配列をアラインし、特定の位置での欠失、フレームシフト突然変異、終止コドンの挿入、並びにアミノ酸置換を同定する。図8A及び8Bは、CHO S親細胞系と比較した場合、CHO S FUT8ノックアウト細胞系において観察されるヌクレオチド改変の程度を示す。データは、CHO S FUT8ノックアウト細胞系中のFUT8ゲノムDNA構造を表したものを提示する。

30

【0285】

FUT8遺伝子を標的とするCRISPR/Casシステムをトランスフェクトした、抗Her2抗体を過剰発現するCHO S細胞系のアミノ酸配列分析

40

CHO S親細胞系、及び抗Her2抗体を過剰発現し、FUT8遺伝子を標的とするCRISPR/CasシステムをトランスフェクトしたCHO S細胞系のFUT8座位におけるゲノムDNA配列を更に分析し、FUT8タンパク質の状態に対してDNA配列INDELの影響を理解する。標的FUT8座位のDNA配列は、脊椎動物のコドンバイアスを使用してアミノ酸配列へと翻訳される。エクソン7領域のアミノ酸配列を厳密に研究し、結果は以下の表12に要約する。CHO S親細胞系と比較すると、FUT8ノックアウト細胞系では、フレームシフト突然変異及び終止コドンの導入を含む改変が判明した。

50

【 0 2 8 6 】

多くの例では、F U T 8 タンパク質のC末端領域を変更し、それを非機能的な酵素にするフレームシフト突然変異が観察される。更に、終止コドンは、フレームシフト突然変異の影響で導入され、それによりF U T 8 タンパク質がトランケートされ、これらのクローンにおいて非機能的である。

【表 1 2】

表 12-CHO S クローン細胞系のアミノ酸配列データ

細胞系情報	FUT8 標的ゲノム 遺伝子座の遺伝子 構造	DNA 配列決定データ由来のアミノ酸配列
CHO S 親細胞系	野生型 FUT8 アミノ酸配列	NPKDCSKARKLVCNINKGCGYGCQLHHVV YCFMIAYGTQRTLILESQNWRYATGGWETV FRPVSETCTDRSGLSTGHWS (配列番号 5)
CR2TMCHO 1A; 対立遺伝子 バージョン	終止コドンを含む フレームシフト	NPKDCSKARKLVCNINKGCGYGCQLHHVV YCFMIAYGTQRTLCLDL* (配列番号 25)
CR2TMCHO 1A; 対立遺伝子 バージョン	終止コドンを含む フレームシフト	NPKDCSKARKLVCNINKGCGYGCQLHHVV YCFMTHGDFQVSTPLTSMGVCFGTKINGTF QNVVITPPR* (配列番号 26)
CR2TMCHO 1B; 対立遺伝子 バージョン	終止コドンを含む フレームシフト	NPKDCSKARKLVCNINKGCGYGCQLHHVV YCFMIAYGTQRTLIIWRMGDCV* (配列番号 27)
CR2TMCHO 1B; 対立遺伝子 バージョン	終止コドンを含む フレームシフト	NPKDCSKARKLVCNINKGCGYGCQLHHVV YCFMIAYGTQLPNRTTFAWLLQNIFSVPVSS FTMSYGMLMIYLLSTL* (配列番号 28)

10

20

30

40

【 0 2 8 7 】

更に、FUT8タンパク質配列における標的アミノ酸の選択が非常に有効であることが観察される。1対のみのCRISPR/Cas複合体による野生型FUT8タンパク質の位置に保存されたアミノ酸の標的化は、複数のロックアウト細胞系において標的座位に突然変異を生成する(図9)。

【 0 2 8 8 】

50

アフコシル化抗H e r 2抗体を過剰発現し、そして上記ゲノム配列決定プロトコルを介して確認された全てのフコースノックアウトクローンC H O S細胞系を、リサーチセルバンク及びワーキングセルバンクとして、液体窒素保存法で保存する。リサーチセルバンク及びワーキングセルバンクの複数のバイアルを、将来使用するために液体窒素保存法で保存する。

【0289】

(例8)

アフコシル化抗H e r 2抗体産物を発現する単一細胞クローン細胞系からの上流プロセスの開発：

アフコシル化抗H e r 2抗体を過剰発現するフコースノックアウトクローンC H O S細胞系を含有するワーキングセルバンクのバイアルを、2リットルバイオリアクター培養プロトコルを開始するのに使用する。細胞を解凍し、シードトレイン培養を、150mlバッフル付き振盪フラスコ内で開始する。2Lバイオリアクターの接種用として11日間にわたり、250mlバッフル付き振盪フラスコまで培養物を更に増やす。接種ステップ毎に、1ミリリットル当たり約0.3~約0.5×10⁶個の生存細胞の開始細胞密度を使用する。

【0290】

製造用バイオリアクターは、フェッドバッチモードで稼働させる。バイオリアクターは、作業容積が約1.3L~約2Lの攪拌タンク型の反応装置である。使用する培地は、市販の化学的に定義された培地である。通気は、スパーキングにより実施する。プロセスパラメーター、例えばpH、温度、溶存酸素、及び攪拌速度等は、自動的に制御される。いくつかの培地成分は、別の無菌溶液としてバイオリアクターに供給する。この溶液は、グルコース、アミノ酸、ビタミン、及び微量元素を含む。多くの工程内制御パラメーター、例えば細胞密度、生存率、pH、溶存酸素、及び代謝物レベル、例えばグルコース、グルタミン、乳酸、アンモニア、グルタミン酸塩、IgG、及びLDH等を継続的にモニターしながら発酵を数日行った後、10日目に生存率が約80%のバッチを回収する。未変化の細胞及び細胞デブリを、遠心分離により培養プロセスから除去する。工程内パラメーターのプロファイルを以下に示す。

【0291】

図10Aに示すように、細胞数は、0日目から5日目まで一定増加を開始したが、得られる最大カウントは、約6×10⁶個の細胞/mlであり、次に産生段階に入ると徐々に減少を開始した。回収の日、細胞数は、4.5×10⁶個の細胞/mlである。生存率プロファイルを図10Bに示した。細胞が健康且つ活動的なまま存続するように、発酵培養物の生存率を、80%を上回り維持することが不可欠である。フィード供給により、生存率を、増殖段階全体を通じて90%を上回り維持し、10日目に、生存率が80%の培養物を回収する。哺乳動物細胞は、浸透圧が300~500mOsm/kgの範囲の条件下で通常培養する。浸透圧が高いほど、組換えタンパク質の比生産性を増加させることができる；但し、これは多くの場合、細胞増殖に対する影響を伴う。したがって、図11Aに示すように、浸透圧は、発酵バッチ全体を通じて500mOsm/kg未満に維持する。図11Bに示すように、基本培地及びフィードの組成物は、抗体力価に対して実質的な効果を有した。10日間の培養物の増殖において、アフコシル化抗H e r 2抗体産物の最高濃度1.8g/Lを実現する。

【0292】

培養した哺乳動物細胞、例えばC H O S細胞系培養物等は、その化学量論的ニーズを超えてグルコース及びグルタミン等の栄養分を頻繁に消費すること、並びに組換えC H O S細胞系内で老廃物の乳酸及びアンモニアを分泌することは周知である。炭水化物が、培地内の主要なエネルギー源である。哺乳動物細胞培養中で最も一般的に使用される炭水化物は、グルコースである。グルコースは、細胞にエネルギーを提供し、タンパク質を合成するための主要な炭素源として作用する。タンパク質を生成するために、細胞が必要とする構成ブロックを形成するアミノ酸は、重要な構成成分を形成する。培地内のアミノ酸

の濃度は、培養が実現し得る最大細胞密度に多大な影響を及ぼす。L - グルタミン等の必須アミノ酸は、ヌクレオチドの窒素源として、また代謝の二次供給源としても作用する。発酵実施期間中のグルコース及びグルタミン消費プロファイルは、図 1 2 A 及び図 1 2 B にそれぞれ示した。グルコースプロファイルは、発酵装置稼働期間中に約 2 g / L に維持する。グルタミンレベルも、フェッドバッチ期間中に 1 m m o l / L 未満に維持する。

【 0 2 9 3 】

高濃度のアンモニウムイオンは、増殖を阻害し、生産性を損なうおそれがあるので、アンモニウムイオンは、細胞培養物に対して乳酸よりも強い影響を有する。細胞におけるアンモニウムイオン毒性の正確な機構は、この効果は pH 依存性であることが示されているものの明確ではない。発酵実施の際、アンモニウム濃度は、図 1 3 A に示すように約 8 m m o l / L として得られる。乳酸も、細胞増殖を阻害する培地 pH の有意な低下を引き起こすおそれがある。乳酸濃度は 5 日目まで上昇したが、バッチが回収される 1 0 日目には約 0 . 7 5 g / L まで徐々に低下した (図 1 3 B) 。

【 0 2 9 4 】

本開示は、2 リットルフェッドバッチバイオリアクターにおいてアフコシル化抗 H e r 2 抗体産物の過剰発現に必要とされる最適な増殖条件について記載する。結果より、C R I S P R / C a s システムのトランスフェクションを介して開発されたこれらの特有の細胞系は、2 リットルフェッドバッチバイオリアクター製造期間中にモニターされる主要な生化学パラメーターを維持することが明らかであった。特有の C R I S P R / C a s システムを使用して、本方法は、抗 H e r 2 抗体を過剰発現する C H O S 細胞系から新規の

【 0 2 9 5 】

本明細書に記載する C R I S P R / C a s システム及び方法は、任意のモノクロナール抗体を過剰発現する任意の C H O S 細胞系から、アフコシル化モノクロナール抗体を開発する能力を有する。

【 0 2 9 6 】

(例 9)

単一細胞クローン細胞系のフェッドバッチ培養からのアフコシル化抗 H e r 2 抗体の精製

F U T 8 ゲノム座位を標的とする C R I S P R / C a s システムを使用して、フコース生合成経路を破壊するように、抗 H e r 2 抗体を過剰発現する C H O S 細胞系を遺伝的に改変する。2 リットルフェッドバッチバイオリアクター製造から得られた細胞培養材料は、生存率が 8 0 % を超える 1 0 日間の培養後に回収する。アフコシル化抗 H e r 2 抗体を精製するために培養物を処理するが、その手順を以下に記載する。

【 0 2 9 7 】

モノクロナール抗体又はバイオ治療用タンパク質の品質特性は、プロセス及び生成物関連の不純物の両方により多大な影響を受ける。今日の下流精製プロセスは、経済的要因により益々動かされやすい。製品を市場に届ける時間を短縮することが使命であるが、それは、プロセス開発は、品質を損なうことなく、迅速且つ安価でなければならないことを意味する。これを念頭に置き、製品開発ワークフローが適正であることが非常に不可欠であり、重要なパラメーターが識別されており、制御されている強固なプロセスを保証する。上流及び下流の両方の初期段階プロセス開発において、プロセス分析技術 (P A T) の支援を受けるクオリティ・バイ・デザイン (Q b D) の概念が、近年多くのバイオ医薬品会社で採用されている。

【 0 2 9 8 】

モノクロナール抗体の下流プロセス開発 (一般的に、ラボスケールでの) には、所望の純度、製品品質、スループット、及び収率を提供するいくつかのユニット操作の最適化及び一体化が含まれる。化学的に定義された培地を使用して、フェッドバッチモードでタンパク質を発現させるモノクロナール抗体の製造において、C H O (チャイニーズハムスター卵巣) 細胞が幅広く使用されている。治療用モノクロナール抗体の製造で使用するそ

の他の細胞系として、NS0、SP2/0、及びPER.C6が挙げられる。

【0299】

CHO細胞は、いくつかのmAb産物の製造で最も一般的に使用される。近年、発酵プロセスパラメーターの制御及び効率的なフィーディング戦略による生産性向上に対する努力がなされている。CHO細胞培養物を回収したら、回収物を清澄化に供して、細胞、細胞デブリ、培地成分、及び不純物を除去する。これは、任意の方法、すなわち遠心分離、深層濾過、又はタンジェント流濾過（精密濾過）により実現する。各清澄化法は、その固有の長所並びに欠点を有する。清澄化の初期段階では、遠心分離ステップが用いられた。遠心分離プロセスの清澄化効率は、多くの要因に依存し、そのような要因として、遠心分離フィード率、G力、ボウルの幾何学的形状、作動圧力、排出頻度、及び細胞培養物を遠心分離機に移すのに使用される付属機器が挙げられる。細胞培養物特性、例えば培養プロセス期間中、及び回収時の総細胞密度及び培養物の生存率等も、分離性能に影響を及ぼす。次に最良の方法はタンジェント流濾過であり、この場合細胞培養物は、細胞、細胞デブリ、及び不溶性粒子の分離を引き起こす設定圧力限界未満で、微多孔性膜に対して接線方向に流れる。細胞分離では、一連の濃縮及び透析濾過ステップが後続する。圧力は、細胞内タンパク質、宿主細胞DNA、プロテアーゼ等の放出増加を引き起こす細胞溶解を生じさせるおそれがあるので、圧力制御は非常に重要である。最も一般的に使用される孔径は、0.22ミクロンであり、0.11ミクロンも近年使用される。

10

【0300】

深層濾過は、最も一般的に使用される清澄化ツールである。運動電位吸着、粒径排除、及び疎水的相互作用等の複数の機構に起因して、この種の清澄化ステップは、細胞、細胞デブリ、プロセス汚染物質、並びに可溶性及び不溶性不純物を分離又は除去するために、広範に使用されている。また、深層濾過は、宿主細胞DNAの除去にも役立つ。今日では、細胞培養液の沈殿/フロキュレーションに基づく前処理が、清澄化段階に対する負荷軽減のために採用されている。ラボスケールで最初にフィルターの種類、孔径、表面積、及びフラックスの最適化が行われ、次いでパイロットスケールにスケールアップされる。

20

【0301】

清澄化後、清澄化済みの試料を、孔径0.22µmのフィルターを使用して濾過に供する。濾過済みの試料をプロテインAアフィニティークロマトグラフィーカラムにロードし、結合した分子を低pH緩衝液により溶出する。プロテインAアフィニティークロマトグラフィーは、最高回収率で95%を上回る純度を実現する十分に確立された捕捉ステップである。モノクロナール抗体の溶出に最適な酸性pHは、mAbsは低pHで凝集する傾向を有するので、実験的に試験すべきである。溶出したタンパク質は、ウイルス不活性化（低pH）に供し、中和してウイルスを除去する。いくつかのプロテインA樹脂が市販されており、いくつかはアルカリ耐性で、高いタンパク質結合能力を有する。市販のプロテインA樹脂は、様々な供給業者、すなわちGE Healthcare、Repligen、Merck Millipore、Tosoh Bioscience等から入手可能である。

30

【0302】

1つ又は2つのクロマトグラフィーポリッシングステップは、生成物関連の不純物、例えば生成物アイソフォーム、短縮された種、電荷変異体等、及びプロセス関連の不純物、例えば宿主細胞タンパク質（HCP）、宿主細胞DNA（HCD）、エンドトキシン、外来ウイルス、プロテインA浸出液等の両方を除去するために一般的に採用される。一般的に、陰イオン又は陽イオン交換クロマトグラフィーのいずれかが、第2のクロマトグラフィーステップとして採用される。但し、疎水性相互作用クロマトグラフィー、混合式クロマトグラフィー、及びヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーが、いくつかの場合で用いられる。精製プロセスフローには、2つのウイルス除去ステップ、第1のステップは、Pro Aクロマトグラフィー捕捉段階後の低pH不活性化、及び第2のステップは、最終ポリッシングクロマトグラフィー後のナノフィルトレーション（ウイルスの濾過）ステップが含まれる。近年、Pro Aクロマトグラフィーの代わりに、捕捉ステップとして

40

50

、イオン交換クロマトグラフィー又は混合式クロマトグラフィーのいずれかを使用する努力がなされてきた。陰イオン膜吸収材も、タンパク質が通過画分に溶出し、不純物が膜に結合する陰性結合モードとして、m A b sの下流処理で使用される。最後に、最終ポリッシングクロマトグラフィーステップ後の精製された生成物を濃縮し、タンジェント流濾過を使用して最終処方緩衝液内で透析濾過する。

【0303】

本開示は、プロテインA捕捉クロマトグラフィー及びその他の精製技術を使用して、C R I S P R / C a sにより媒介されるF U T 8ノックアウト細胞系でトランスフォームしたC H O S細胞から産生されるアフコシル化抗H e r 2抗体を精製する方法について記載する。

10

1. 2リットルバイオリアクターから得られた細胞培養試料を含有するアフコシル化抗H e r 2抗体

2. 清澄化(遠心分離及び深層濾過)

3. アフィニティークロマトグラフィー

4. 低p Hウイルス不活性化

5. A E Xクロマトグラフィー(N B)

6. C E Xクロマトグラフィー

7. アフコシル化抗H e r 2抗体の分析

【0304】

清澄化:

20

生存率が79.7%のK O C H O細胞培養回収物、約1410mlを遠心分離に供して、細胞及び細胞デブリを除去する。濁度が22.5NTUの上清を慎重に収集し、Z e t t a P l u s B C 2 5深度フィルター(面積25cm²)を通過させて、宿主細胞タンパク質及び懸濁状態の固体粒子を除去する。二次的な清澄化試料を、0.22µmフィルター(面積47mm)を使用して濾過し、無菌ビン内に収集した濾過液を、プロテインAアフィニティークラムにロードする。

【0305】

アフィニティークロマトグラフィー:

カルボキシペプチダーゼB、12ミリグラムを、清澄化済みの試料、約1400ミリリットル(2400ミリグラム)に添加し、37で1時間インキュベートして、C末端リシン変異体を除去する。インキュベーション後、清澄化済みの試料を、平衡緩衝液(30mMリン酸ナトリウム緩衝液、150mM NaCl、pH7.20±0.20)内で事前平衡化したM a b S e l e c t S u r e、約70mlのX K 2 6 / 2 0カラムに、流速8.8ml/分でロードする。約1550mlの通過画分を収集する。次の通過ステップは、弱く結合した不純物及び宿主細胞タンパク質を除去するために、平衡緩衝液を経由する。次の通過ステップは、不純物を除去するために、1カラム容積の高塩濃度i s h緩衝液(30mMリン酸ナトリウム緩衝液、1M NaCl、pH7.20±0.20)、その後3カラム容積の低p H I s h緩衝液(30mMリン酸ナトリウム緩衝液、50mM NaCl、pH6.0±0.20)を経由する。結合したタンパク質を溶出緩衝液(30mMリン酸緩衝液、50mM NaCl、pH3.0±0.20)により溶出させる。

30

40

【0306】

ウイルス不活性化:

ウイルス不活性化のために、プロテインA溶出物のpHを3.0±0.2に調整し、試料を24±2で30分間インキュベートする。試料を、次いで1Mトリスを使用してpH6.0±0.2に中和して、更に精製する。

【0307】

陰イオン交換クロマトグラフィー:

ウイルス不活性化後、pH6.0の試料を、精製水を使用して希釈し、電導度を低下させ、pHを6±0.2に再度調整する。希釈した試料(約1000ミリリットル)を事前

50

平衡化したX K 1 6 / 4 0 Qセファロース6 F Fカラムにロードし、通過画分を収集するが、このクロマトグラフィーステップは陰性結合モードに設定されるので、生成物は通過画分に溶出する。このステップには、単一ステップ(100%の濃度B)での溶出緩衝液(30 mMリン酸ナトリウム緩衝液、1 M NaCl、pH 7.20 ± 0.20)による、結合した不純物、宿主細胞DNA、及びトランケートされた種の溶出が後続する。溶出物を単一の画分として収集する。

【0308】

陽イオン交換クロマトグラフィー：

A E Xクロマトグラフィーから得た通過画分を、平衡緩衝液(50 mMヒスチジン緩衝液、pH 6.0、約2.23ミリジーメンズ)内で事前平衡化したX K 2 6 / 4 0 C a p t o Sカラムにロードする。通過画分試料を収集する。次の通過ステップは、痕跡量の不純物を除去するために、約2カラム容積の平衡緩衝液を経由する。溶出は、0%から開始して、単一ステップで20%の濃度B(溶出緩衝液：50 mMヒスチジン緩衝液、pH 6.0、約14.50ミリジーメンズ)に至り(約2.5 mS ~ 約7.30ミリジーメンズ)、単一ステップで20 ~ 22.5%(約7.30ミリジーメンズ ~ 約7.50ミリジーメンズ)が後続する。グラジエント溶出は、22.5%から開始して、グラジエント方式で80%に至る(20カラム容積のグラジエント長さ)。約6 mlサイズの画分を収集する。次いで、100%の濃度Bを通過させ、高塩濃度の溶出緩衝液(30 mMリン酸ナトリウム緩衝液、1 M NaCl、pH 7.20)が後続する。

【0309】

データ分析

二次的な清澄化試料は、深層濾過による清澄化後、5比濁計濁度単位(NTU)未満の濁度を示す。プロテインAアフィニティークロマトグラフィープロファイル(図14A)より、高塩濃度ishで、いくつかの宿主細胞タンパク質(HCP)が除去されることが明らかであり、低pH緩衝液(pH 3.0)を使用して、結合したタンパク質を溶出させると、プロテインA溶出において、合理的な収率が観察される。プロテインA溶出プロファイルに基づけば、その他のテーリングピークは観察されないが、これは、溶出期間中に生成物の凝集が認められないことを示す。プロテインA溶出試料のA₂₈₀分析に基づけば、回収物からの回収率は約95%を超えることが観察される。

【0310】

A E Xクロマトグラフィー(図14B)は、通過画分モードで作動させるが、このモードでは生成物が樹脂に結合せず、低pHで負荷するとより多くの正味の正電荷が得られる。このクロマトグラフィーステップでは、観察された生成物は、A E Xクロマトグラフィーの通過画分に完全に溶出し、生成物は、期待通りカラムに結合せず、宿主細胞DNA(HCD)、宿主細胞タンパク質(HCP)及びいくつかのトランケートされた種のみが樹脂に結合する。結合した不純物又は汚染物質は、高塩濃度の溶出緩衝液を使用してカラムから溶出させる。

【0311】

C E Xクロマトグラフィーステップ(図14C)では、タンパク質の溶出は、通過画分には観察されず、アフコシル化抗Her2抗体産物が樹脂に完全に結合する。1つのピークが洗浄ステップ期間中に、C E Xクロマトグラフィーにおいて低塩濃度で観察され、グラジエント溶出により、幅広い溶出ピークが得られ、溶出の際に20カラム容積のグラジエント長さを採用した場合、電荷変異体についてより良好な分離が観察される。生成物は、200 mM NaCl濃度内で完全に溶出した。アフコシル化抗Her2抗体産物の溶出後、高塩濃度の溶出条件で小さな溶出ピークが観察されるが、それは200 mM NaClの濃度内で完全に精製されたことを示す。

【0312】

(例10)

アフコシル化抗Her2抗体産物の特徴付け

F U T 8 遺伝子ノックアウトを標的とするC R I S P R / C a s システムでトランスフォ

10

20

30

40

50

ームしたCHO S細胞系から産生されるアフコシル化抗Her2抗体産物を特徴付けるために、複数の分析方法を使用する。

【0313】

以下の方法が、アフコシル化抗Her2抗体産物の特徴付けで使用される。

1. 抗体産物の等電点電気泳動
2. アフコシル化抗Her2抗体産物のSDS PAGE分析
3. アフコシル化抗Her2抗体産物の免疫ブロッティング
4. アフコシル化抗Her2抗体産物によるHER2抗原結合ELISA
5. 細胞表面上のHer2抗原認識を示す、細胞に基づくELISAアッセイ
6. FUT8遺伝子を標的とするCRISPR/CasシステムでトランスフォームしたCHO S細胞系から得られた、精製済みのアフコシル化抗Her2抗体産物のタンパク質濃度
7. アフコシル化抗Her2抗体の弱陽イオン交換による電荷変異体分析
8. 100%アフコシル化を立証する、アフコシル化抗Her2抗体産物のN-グリカンプロファイリング
9. 用量依存様式のHer2抗原認識を明らかにする、アフコシル化抗Her2抗体産物のフローサイトメトリー分析
10. アフコシル化抗Her2抗体によるFc RII結合改善を確かめるSPR結合反応速度
11. アフコシル化抗Her2抗体産物の生物学的機能性を確かめるHer2過剰発現細胞系の抗増殖アッセイ
12. 腫瘍細胞の細胞毒性の改善を立証する、アフコシル化抗Her2抗体産物によるADCCアッセイ

【0314】

1. 等電点電気泳動

等電点電気泳動法は、タンパク質の電荷の差異に基づくタンパク質分離で幅広く適用される。等電点電気泳動(IEF)は、タンパク質の等電点(pI)に基づき、タンパク質を分離するための電気泳動技術である。等電点電気泳動の原理はpHグラジエントにあり、試料成分が、その正味電荷がゼロとなるpH値(試料成分のpI)まで、アノード又はカソードに向かって移動する。

【0315】

方法プロトコール

電荷変異体を識別する試験で使用される試料は、トラスツズマブ(Rocheから得られる)、及びFUT8遺伝子を標的とするCRISPR/CasシステムをトランスフェクトしたCHO S細胞系から開発したアフコシル化抗Her2抗体である。全ての試料を希釈し、希釈剤として超純粋のミリQ水を使用して1mg/mlの濃度に保ち、そしてタンパク質試料20µgをIEF試料アプリケーターにロードする。標準的なIEF条件を使用する。1M水酸化ナトリウム及び1Mオルトリン酸をカソード緩衝液及びアノード緩衝液としてそれぞれ使用する。この試験で使用するゲル混合物は5%である。泳動後、ゲルを2%トリクロル酢酸で30分間固定する。クマシーブリリアントブルー溶液を、溶液の染色に使用する。

【0316】

2. SDS PAGE分析

10%(v/v)分離ゲルを使用して、還元及び非還元条件下で、抗体試料をSDS-PAGEにより分析する。トリスグリシンSDS PAGEは、供給業者のプロトコール(Biorad)により実施する。アクリルアミド及びビス-アクリルアミドストック溶液(29:1)、スタッキング緩衝液(1Mトリス-HCl、pH6.8)、分離緩衝液(2Mトリス-HCl、pH8.8)、10%SDS、APS、並びに触媒としてTEMEDからポリアクリルアミドゲルを調製する。スタッキングゲルは、4%濃度で使用する。

【0317】

抗体試料5 µgを、5×試料緩衝液(1Mトリス-HCl、pH6.8、10%SDS、β-メルカプトエタノール(還元条件の場合)、50%グリセロール、2%(w/v)ブロモフェノールブルー)と混合する。混合物を、次いで5分間加熱し、ゲル上にロードする。抗体試料のSDS-PAGEを、電圧150ボルトで60分間実施する。分子量が10~250kDaの範囲のタンパク質マーカー標準(Biorad)を使用する。タンパク質の染色を、0.2%(w/v)クマシーブリリアントブルーを用いて実施する。染色したゲルを、次いでメタノール：酢酸溶液(40%：10%)の混合物で洗浄し、次いでキャノンデジタルカメラにより写真撮影してタンパク質バンドを視覚化する。

【0318】

10

3. 免疫ブロッティング

SDS-ポリアクリルアミドゲルに溶解した抗体試料をPVDF膜に転写する。0.05%ツイーン/PBS(PBST)中1%(w/v)BSAで30分間ブロッキングした後、膜を、PBSTを用いて1回、10分間ishし、1:5000希釈のヤギ抗マウスIgG二次抗体HRPコンジュゲート抗体を用いて、室温で30分間更にインキュベートし、DAB基質を使用して検出する。

【0319】

4. HER2結合ELISAによるアフコシル化抗Her2抗体の定量

ヒト化抗ヒト上皮増殖因子受容体-2(HER2)モノクローナル抗体である、抗HER2 IgG1トラスツズマブは、腫瘍細胞上でHER2を過剰発現する転移性乳がん患者の治療で用いられる。抗HER2モノクローナル抗体の定量は、異なる方法、例えばELISAに基づく方法を使用して実施可能である。ACROBiosystemsのヒト293細胞(HEK293)内で産生されるヒトHer2/ErbB2タンパク質(ヒトHer2、His Tag)Thr23-Thr652(受託番号AAA75493)を用いて、96ウェルプレートにコーティングする。受容体はヒトHer2である；His Tagは、C端でポリ-ヒスチジンタグと融合しており、70.2kDaのMWを計算上有する。予測されるN端はThr23である。DTT還元型タンパク質は、グリコシル化により、110~115kDaとしてSDS-PAGE内を移動する。

20

【0320】

方法プロトコール

30

濃度1 µg/ml(100mM重炭酸緩衝液、pH9.6で希釈)のHER2タンパク質(Acro bio systems、米国)、100 µlを96ウェルプレートにコーティングする(細胞培養デルタ表面処理プレート)。プレートを2~4、一晚インキュベートを継続し、その後、洗浄緩衝液(PBS+0.05%ツイーン20)2×200 µlで洗浄する。非特異的結合を、ブロッキング緩衝液(洗浄緩衝液+0.1%BSA)で2時間(200 µl)ブロックし、洗浄緩衝液で2回洗浄する。標準/試料、100 µlを添加し、インキュベーションを1.5時間継続する。試料及び標準を2倍ずつ連続希釈して、1.953~250 ng/mlの範囲にする。二次抗体をプレートに添加し、インキュベーションを1時間継続する。TMBを基質として使用する。プレートを、620 nmをバックグラウンドとして450 nmで読み取る。全ての測定を2回行う。測定した試料/標準の濃度を、4パラメーター非線形回帰曲線近似プログラムを使用して決定して、結合曲線を生成する(Gen5)。

40

【0321】

5. 細胞に基づく結合ELISA

細胞に基づくELISAは、特異的受容体発現細胞を用いて特異的標的分子の結合能力を見積もる方法の1つである。SKBR3及びBT474細胞系(ATCCから得られる)は、細胞表面上でHER2受容体を過剰発現する。抗Her2抗体の結合能力を評価するのに、該細胞系を使用する。細胞に基づくELISAアッセイでは、下記のプロトコールに従う、

1. 細胞をマイクロタイタープレートに播種する；

50

2. CO₂ インキュベーター中、37℃、一晩インキュベーション；
3. 細胞を10%ホルマリンで固定する；
4. 表面をice wash及びブロックする；
5. 標的抗HER2抗体を添加する；
6. ice washし、酵素コンジュゲート抗体を添加する；
7. 基質を添加し、読み取りを行う。

【0322】

方法プロトコール

2つの細胞系、すなわちSKBR3及びBT474細胞をこの試験で使用する。SKBR3及びBT474細胞を継代し、10%FBSが補充されたRPMI1640及びDMEM培地内でそれぞれ37℃及び5%CO₂で維持する。細胞を、1ウェル当たり5000個の細胞(100μL)の密度で、96ウェルプレートデルタ処理表面にプレーティングし、接着させたまま、37℃及び5%CO₂で、一晩放置する。翌日、2×200μLの冷却PBSで細胞を洗浄して、非接着粒子を除去する。次に、細胞を10%ホルマリン、100μLで固定し、室温で10分間インキュベートする。固定溶液を除去し、2×200μLの冷却PBSで洗浄し、ブロッキング溶液[PBS+ツイーン20(0.05%)+0.1%BSA]、200μLで、プレートを1時間ブロックする。2×200μLの洗浄緩衝液(PBS+0.05%ツイーン20)でプレートを洗浄して、過剰のブロッキング溶液を除去する。試料/標準、100μLを各ウェルに添加し、プレートシェイカー内で30分間インキュベートする。2×200μLのice wash緩衝液(PBS+0.05%ツイーン20)でプレートをice washして非特異的相互作用を除去する。二次抗体(抗ヒトFc IgG1)、100μLを添加し、1時間インキュベートする。TMB基質100μLを添加し、620nmをバックグラウンドとして、450nmで発色した色を読み取る。全ての試料/標準について2回行う。測定した試料/標準の濃度を、4パラメーター非線形回帰曲線近似プログラムを使用して決定し、結合曲線を生成する(Gen5)。表13は、両細胞系(BT474及びSKBR3)で使用する試料/標準の濃度を示す。

10

20

【表 13】

表 13-細胞に基づく ELISA 実験で使用する試料又は標準の濃度

試料番号	試料/標準の濃度(μg/ml)
1	200.000000
2	50.000000
3	12.500000
4	3.125000
5	0.781250
6	0.195313
7	0.048828
8	0.012207
9	0.003052
10	0.000763
11	0.000191

10

20

【0323】

6. タンパク質濃度測定

タンパク質濃度は、Shimadzu Prominence-i HPLC上で、M Ab Pac プロテイン A カラム(12 μm; 4 × 35 mm)を使用して、プロテイン A アフィニティークロマトグラフィーにより決定する。移動相は、流速が2.5 mL/分のDulbecco's 酸緩衝液である。モノクローナル抗体を3%氷酢酸グラジエントで溶出させる。カラム温度は、25 °Cであり、検出は280 nmで行う。ラボソリューションソフトウェアを使用してクロマトグラムを統合し、公知の標準の濃度に対して、ピーク下面積をプロットした標準曲線を使用して濃度を見積もる。

30

【0324】

7. イオン交換クロマトグラフィー

電荷変異体を、4.0 × 250 mmのDionex Pro Pac陽イオン交換(IEC)カラムWCX-10上で分離する。移動相Aは、10 mM MES緩衝液、pH 6.8であり、移動相Bは、250 mM塩化ナトリウムを含む10 mM MES緩衝液、pH 6.8であり、流速は1.0 mL/分、稼働時間は21分間である。カラム温度は30 °Cであり、検出は280 nmで行う。ラボソリューションソフトウェアを使用してクロマトグラムを統合し、ピーク面積の相対割合を得る。

40

【0325】

8. 酵素的N-グリカン放出及びGLYCOWORKS RAPIFLUOR-MS N-グリカンキットによるラベリング

N-グリカンをプロファイリングするための試料調製は、GlycoWorks RapiFluor-MS N-グリカンキット(Waters、Milford、MA、米国)を使用して実施する。キットは4ステップを有する。

ステップ1: 高速脱グリコシル化、

ステップ2: グリコシルアミンの高速ラベリング、

50

ステップ3：ラベリングしたグリコシルアミンのHILIC Clean-Up、
ステップ4：HILIC-FLR UPLC分析用の、ラベリングしたグリカンの調製。

【0326】

9. UPLC - 蛍光HILICによるN - グリカンのプロファイリング

2 - AB誘導型N - グリカンは、Empower 3クロマトグラフィーワークステーションソフトウェアの制御下に置かれた、クオターナリーソルベントマネージャー、試料マネージャー、及び蛍光検出器からなるWaters Acquity (商標) UPLC H - クラス装置 (Waters、Milford、MA、米国) 上で、蛍光検出機能を有する超高性能液体クロマトグラフィー (UPLC) により分離する。1 mL / 分、26分
10
で80 ~ 60 %アセトニトリルのリニアグラジエントを使用するThermo Accucore - 150 - アミド - HILICカラム、100 x 2.1 mm i.d.、2.6 µm粒子を使用して、HILIC分離を実施する。溶媒Aは、アンモニア溶液を用いてpH 4.4に調整した50 mMギ酸アンモニウムであり、溶媒Bは、アセトニトリルである。試料の注入容積は、10 µLである。注入前に試料を5 に維持し、カラム温度は60である。蛍光検出励起 / 発光波長は、それぞれex = 265 nm及びem = 425 nmである。

【0327】

10. フローサイトメトリー分析

mAb試料のHER2抗原への特異的結合を、間接的フローサイトメトリー法を使用して調査する。細胞表面上で高レベルのHER2受容体を発現するBT - 474細胞系を、ATCCから得る。10 % FBSを含有するDMEM / F12増殖培地内で、BT - 474細胞を培養する。
20

【0328】

実験の場合、0.25 %トリプシン - EDTAで細胞をトリプシン処理する。1000 rpmで3分間遠心分離した後、ペレットを、DPBS緩衝液中2 % BSAに懸濁し、所望の濃度、0.1百万個の細胞 / mlとする。次いで様々な濃度、すなわち0.05 mg / ml、0.025 mg / ml、及び0.00125 mg / mlのビオチン標識Innovator Herclon及び抗Her2抗体で細胞を処理する。抗体試料のビオチン化を、EZ SulfoLinkビオチン化キット (Thermo Scientific)
30
(c) を使用して実施する。

【0329】

抗体試料と細胞の容積を1 : 1の比で維持し、室温で1時間インキュベートする。0.1 mg / mlのStrept-FITC、20 µlを反応混合物に添加し、氷浴上で30分間インキュベートする。処理した全ての試料を、BD Accuriフローサイトメーター (BD Biosciences) を用いて分析する。

【0330】

11. SPR結合反応速度

異なる電荷変異体に関する結合反応速度試験を、Biacore 3000装置を使用して、表面プラズモン共鳴 (SPR) により実施する。HER2結合反応速度及びFcガンマRIII (CD16a) 結合反応速度について、変異体及び主要な種を分析する。HER2及びCD16aリガンドを、製造業者のプロトコールに記載されている標準アミンカップリング手順を使用してCM5チップ (GE Healthcare) 上に固定する。
40

【0331】

12. HER2結合反応速度

HER2は、neu及びc - erbB2としても公知であり、上皮増殖因子 (EGF) 受容体のメンバー、又はHER1 (EGFR / c - erbB1)、HER3 (c - erbB3)、及びHER4 (c - erbB4) も含まれるチロシンキナーゼ受容体のHERファミリーである。HER2の過剰発現は、乳がん及び卵巣がんで頻繁に観察され、不良な予後と関連する。
50

【0332】

HER2外部ドメイン受容体(Sino Biologicals)を、酢酸緩衝液、pH5.0中で $2\mu\text{g/mL}$ に希釈し、アミンカップリングプロトコルは、GEアミンカップリング手順の記載に従う。リガンドの固定化は、フローセル2(FC2)を備える500RUのためであり、フローセル1(FC1)は、リガンドを一切含まないバックグラウンドとして機能する。全ての抗HER2 Mabを、ランニング緩衝液(GE Healthcare製HBS-P+1×緩衝液)で、2倍希釈により、 $100\text{nM}\sim 6.25\text{nM}$ の異なる濃度に希釈する。これらの個々の濃度を、会合速度では、5分間、2回注入し、次いで解離速度では、ランニング緩衝液のみを15分間通過させ、表面の再生は、グリシン緩衝液pH1.5を30秒間、グリシン緩衝液pH2.0を90秒間注入して行い、ランニング緩衝液安定化時間は1分間とする。

10

【0333】

治療用抗体は、一般的にIgGクラスの分子であり、腫瘍細胞抗原と結合する抗原結合断片(Fab)、及びナチュラルキラー(NK)細胞、単球、又はマクロファージ等のエフェクター細胞上のFcガンマ受容体(FcR)と結合する結晶性の断片(Fc)を含む。Fc受容体は、抗体依存性の細胞毒性(ADCC)に関与する免疫グロブリンスーパーファミリーの周知の分子である。ADCCにおいてIgG-Fc媒介型のエフェクター機能が寄付することから、治療用抗体の開発及び製造のために、Fcガンマ受容体(FcR)との相互作用強化を図る努力の動機付けとなってきた。

【0334】

20

FcRIII(CD16a V158)バリン変異体が本試験で用いられ、CD16a受容体の外部ドメインは、Acrobiosystems、米国から調達される。全てのアフコシル化抗Her2抗体を、ランニング緩衝液(GE Healthcare製HBS-EP+1×緩衝液)で、 $0.833\mu\text{M}\sim 0.05\mu\text{M}$ の異なる濃度に連続希釈する(2倍希釈)。分析物の反応速度を、ラングミュア結合キネティクスを使用して決定する(1:1結合モデル)。

【0335】

13. 抗増殖アッセイ

BT474細胞系を本試験で使用し、10%FBSが補充されたDMEM培地を使用して細胞を、37℃及び5%CO₂で増殖及び維持する。1ウェル当たり2000個の細胞を本試験で使用する。試料/標準の希釈を、DMEMアッセイ培地(2%FBSを含有)内で実施する。試料/標準、100μLを、細胞100μLと共に96ウェルプレートに添加し、インキュベーションを37℃、5%CO₂で6日間継続する。6日後、アラマーブルー30μLを添加し、インキュベーションを6時間継続する。次いで、プレートを530nmの励起波長及び590nmの励起波長で読み取る。4点非線形回帰曲線を、PLAソフトウェアから得る。下記の表14は、BT474抗増殖アッセイで使用する試料/標準の濃度を示す。

30

【表 14】

表 14-抗増殖アッセイで使用される試料及び標準の濃度

試料番号	試料/標準の濃度(μ g/ml)
1	10.000000
2	2.500000
3	0.625000
4	0.156250
5	0.039063
6	0.009766
7	0.002441
8	0.000610
9	0.000153

10

20

【0336】

エフェクター細胞の単離

末梢血液単核球 (PBM C) を、フィコールグラジエント遠心分離により、ヘパリン添加血から単離する。細胞を D P B S (1×) 内で、次いで完全培地内で再度 i s h し、次いで最適なエフェクター：標的 (E：T) 比を得るのに必要とされる細胞濃度に調整する。

【0337】

14. A D C C アッセイ

B T - 4 7 4 標的細胞 (1 ウェル当たり 1 0 , 0 0 0 個の細胞) を、アフコシル化モノクローナル抗体試料と R P M I 1 6 4 0 アッセイ培地内で混合し、9 6 ウェルプレートに分配する。3 0 分間のインキュベーション後、エフェクター細胞を 1：2 0 (B T 4 7 4 細胞のエフェクター細胞に対する) の比で、細胞及び薬物反応混合物に添加する。アッセイプレートを、C O₂ インキュベーター内、3 7 °C で 7 時間インキュベートする。細胞より放出された死亡細胞プロテアーゼレベル (細胞死の指標) を、C y t o t o x g l o アッセイキット (P r o m e g a) を使用して測定する。インキュベーション後、均一に混合するために、プレートを 3 0 分間シェイカー上で維持する。最大細胞毒性レベルを決定するために、溶解緩衝液 2 0 μ l を対照ウェルに添加する。C y t o t o x g l o 試薬 2 0 μ l を各試料及び対照ウェルに添加し、室温で 1 5 分間インキュベートする。発光を、B i o t e k E L I S A リーダーを使用して測定する。細胞毒性割合の値を以下の通り計算する：[(試験試料 - 低対照) / (最大対照 - 低対照)] × 1 0 0。低対照は、自発細胞死を表し、最大対照は、完全細胞死を表す。

30

40

【0338】

結果及び考察

アフコシル化抗 H e r 2 抗体の見通しについて、一連の分析実験により試験及び特徴付けを行う。アフコシル化抗 H e r 2 抗体とトラスツズマブとの比較により、生物活性を比較する。

【0339】

I E F

I E F を実施して、存在する電荷変異体 (酸性及び塩基性の種) を識別する。4 つのバ

50

ンドが、イノベーターにおいて明らかに目視可能である。主要なバンド（図15）が、トラスツズマブ及びアフコシル化抗Her2抗体産物の両方に観察される。

【0340】

SDS PAGE

非還元条件下では、未変化の抗体を示す、分子量（MW）150kDaに対応する単一の主要なバンドが観察される（図16）。還元条件下で、2つのバンドが、25kDa及び50kDaにおいて明らかであるが、それぞれ、抗体の軽鎖及び重鎖に関連する。アフコシル化抗Her2抗体産物について観察されたバンドパターンは、トラスツズマブのバンドパターンと類似する。

【0341】

ウェスタンブロットティング

ウェスタンブロットティング分析は、抗体試料を特異的に検出するために実施する。トラスツズマブは、タンパク質パターンを評価及び比較するのに使用する。非還元型抗体試料は、二次抗体でプローブしたとき、単一の異なるバンドを示す。但し、還元型の試料の場合、重鎖（約50kDa）の単一バンドのみが検出され、モノクローナル抗体の軽鎖は検出されない。これは、使用される二次抗体は、抗体のFc領域に対してのみ特異的であり、軽鎖領域に対しては特異的でないことによる。図17において、アフコシル化抗Her2抗体産物は、ウェスタンブロット実験においてまったく同一のバンドニングパターンを示す。

【0342】

抗HER2結合ELISA

連続希釈して得られた異なる濃度（60ng/mL～0.48ng/mL）のトラスツズマブ及びアフコシル化抗Her2抗体を、結合効率についてHER2コーティングELISAプレートにおいて分析する。観察された結果（図18）より、トラスツズマブと比較して、アフコシル化抗Her2抗体は、固定化したHER2ドメインに対して類似した相互作用を有することが示される。

【0343】

細胞に基づくELISA

細胞に基づくELISA（図19A及び19B）より、アフコシル化抗Her2抗体とトラスツズマブは同等の活性を有することが明らかである。この方法は、乳がん細胞上で発現するHER2抗原と、アフコシル化抗Her2抗体及びトラスツズマブとの間の結合活性を決定する。理想的には、表面上でのHER2抗原の発現量は、SKBR3細胞と比較したとき、BT474細胞では、それよりも高い。アフコシル化抗Her2抗体分子は、両細胞系において同等の結合能力を示す。SKBR3及びBT474細胞に対するアフコシル化抗Her2抗体の結合能力は、それぞれ89.1%及び80.3%である。細胞に基づくELISAに関する結合能力基準は、平行線定量法計算ソフトウェア（PLAソフトウェア）において75～125%に設定する。

【0344】

タンパク質濃度測定

プロトタイププロテインAカラムを、回収後の細胞培養物（HCC）から医薬品段階まで、モノクローナル抗体力価を測定するのに使用する。クロマトグラム（図20）では、各試料50μLをプロトタイププロテインAカラムに注入する。本方法の初期部分において溶出した最初のピークは、未結合物質に該当する。モノクローナル抗体は、低pHの3%氷酢酸を通過させることにより放出される。モノクローナル抗体力価を、これまでに作成した校正曲線を使用して決定する。各試料の代表的なクロマトグラムを図20に示し、各試料の力価を以下の表にまとめる（表15）。

10

20

30

40

【表 15】

表 15-プロテイン A 濃度測定から得られた結果

試料詳細	終濃度(mg/ml)
イノベーター	22.44
抗 HER2 抗体.1 試料	5.20

【0345】

10

イオン交換クロマトグラフィー

イオン交換プロファイルのピークは、一般的に 3 つの異なる成分に対応する。初期及び後期の溶出ピークは、酸性及び塩基性変異体とそれぞれ呼ばれる。最も大きなピークは、主要ピークと呼ぶ。図 21 に示すように、Propac WCX-10 カラムは、モノクロナール抗体の酸性及び塩基性変異体分析において、優れたピーク効率及び高分解能を提供するが、酸性、塩基性及び主要のピークを、21 分間の稼働時間内で分解し、それぞれの割合を下記の表 16 にまとめる。

【表 16】

表 16-イオン交換クロマトグラフィーの結果

20

試料名	酸性変異体	主要ピーク		塩基性変異体
	面積%	室温	面積%	面積%
抗 HER2 抗体.1 試料	17.22	7.05	57.45	25.33
イノベーター	32.57	7.03	53.44	13.99

【0346】

30

HILIC N - グリカンのプロファイリング

治療用モノクロナール抗体に関する重要な品質特性の 1 つは、グリコシル化プロファイルである。トラスツズマブ及びアフコシル化抗 Her 2 抗体産物におけるグリカンの分布をチェックするために、HILIC N - グリカンプロファイリング法により分析する。主要なグリカン、例えば G0、G1、G1'、G2、G0F、G1F、G1F'、及び G2F 等を、トラスツズマブ及びアフコシル化抗 Her 2 抗体産物について、下記の表 17 に列挙する。トラスツズマブ及びアフコシル化抗 Her 2 抗体試料におけるアフコシル化グリカンの全体的な割合は、それぞれ 8.95% 及び 100% である。トラスツズマブ及びアフコシル化抗 Her 2 抗体におけるグリカンプロファイルを、図 22 に示す。

【表 17】

表 17-グリカンプロファイルの結果

試料名		トラスツズマブ	アフコシル化 抗 Her2 抗体
グリカン 変異体	G0	4.32%	55.83%
	G0F	41.61%	—
	MAN-5	2.95%	0.79%
	G1	1.97%	24.49%
	G1'	0.84%	13.73%
	G1F	27.63%	—
	G1F'	12.71%	—
	G2	0.58	5.17%
	G2F	7.39%	—
アフコシル化の%		10.66%	100%

【0347】

フローサイトメトリー

本方法は、フローサイトメトリーに基づくアッセイによって、乳がん細胞系の BT-474 上で発現する Her2 受容体のリガンド結合親和力を測定する手段を提供する。ビオチン化された抗体試料による受容体結合レベルを、FITC 標識ストレプトアビジンを用いてプロービングすること、及びフローサイトメーターを使用して蛍光レベルを測定することにより評価する。アフコシル化抗 Her2 抗体産物は、「非染色細胞のみ」の対照と比較して右側に寄ったピークシフトを示し、乳がん細胞上の Her2 受容体に対するこの試料の特異性を示す。トラスツズマブ及びアフコシル化抗 Her2 抗体のオーバーレイデータ（図 23）は同等であり、アフコシル化抗 Her2 抗体産物は、トラスツズマブと類似した結合親和力を有することを示唆する。またこれらの結果は、生成したアフコシル化抗 Her2 抗体産物の適切なフォールディング、正確な会合、及び生物活性も示す。

【0348】

SPR データ

SPR データ（図 24A）より、アフコシル化抗 Her2 抗体産物に対する HER2 の結合は、トラスツズマブに匹敵することが明らかである。アフコシル化抗 Her2 抗体に関する KD 値は、 4.21×10^{-9} (4.2 nM) であり、トラスツズマブの場合、 3.69×10^{-9} (3.6 nM) であることが判っている。会合及び解離 (k_a 及び k_d) 値から、アフコシル化抗 Her2 抗体は、HER2 リガンドに対して非常に強いアフィニティを有することが示される。しかし、FcγRIII 受容体 (CD16a リガンド) の場合、SPR センサーグラムは、トラスツズマブ及びアフコシル化抗 Her2 抗体産物との結合において顕著な差異を示す。データより、トラスツズマブは、一般的に FcγRIII 受容体 (CD16a リガンド) に対して非常に弱い結合を有し、HER2 リガンドとは強い結合を有することが示唆される。一方、本開示に記載するアフコシル化抗 Her2 抗体は、FcγRIII 受容体に対して有意に高レベルの結合を示す。反応速度データ（

図24B)は、アフコシル化抗Her2抗体(KD 4.00E-08M)の結合親和力は、トラスツズマブ(KD 1.08E-07M)よりも約3倍高いことを示唆する。

【0349】

抗増殖アッセイ

抗増殖アッセイ(図25)では、乳がん細胞系の細胞増殖を阻害する薬物の能力について調べた。アフコシル化抗Her2抗体は、トラスツズマブと比較して同等の細胞増殖抑制能力(がん細胞が増殖するのを阻止する薬物の能力)を示し、また相対的効力値は、トラスツズマブに対して85.2%を示す。抗増殖アッセイに関する効力の規格は、平行線定量法計算ソフトウェア(PLAソフトウェア)において、70~130%に設定する。

【0350】

PBMC試料による抗体依存性細胞傷害(ADCC)アッセイ

図26は、抗Her2抗体を過剰産生するCHO-S細胞系から開発され、FUT8遺伝子を標的とするCRISPR/Casシステムでトランスフォームされたアフコシル化抗Her2抗体産物の生物学的能力を示す。異なる薬物濃度における細胞傷害レベルをアッセイするのに、アフコシル化抗Her2抗体産物及びトラスツズマブを使用する。データ分析には、Graphpad prismソフトウェアを使用する。結果は、アフコシル化抗Her2抗体産物を用いると、ADCCが8倍を超えて改善されることを示唆する。このデータは、モノクローナル抗体のアフコシル化は、モノクローナル抗体の生物学的機能において直接的な影響を有することを立証する。

【0351】

多数の腫瘍抗原性の標的が、モノクローナル抗体が媒介する治療の可能性について現在試験中である。従来型のモノクローナル抗体治療薬は、フコース生合成経路を介して内因性のフコシル化活性を有するCHO-S細胞発現系において開発されている。

【0352】

したがって、本開示に記載する方法及びCRISPR/Casシステムは、新規製品開発アプローチをもたらし、そのようなアプローチでは、フコシル化に起因して不良な生物学的効率を有する任意のモノクローナル抗体産物が、モノクローナル抗体のアフコシル化バージョンを開発することにより有意に改善される。ここに記載する新規アプローチは、既存の高発現真核生物タンパク質発現プラットフォームから、アフコシル化モノクローナル抗体を開発するための新規製品開発ルートを切り開く。

10

20

30

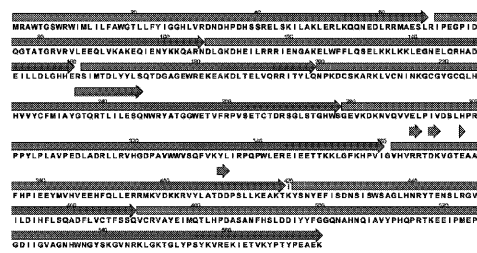
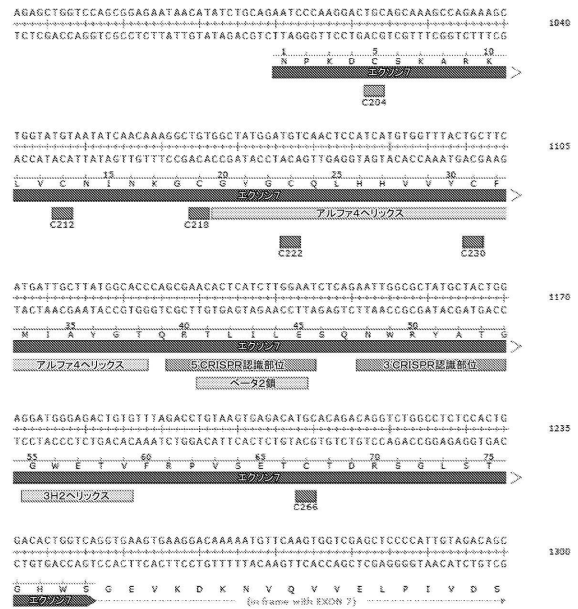
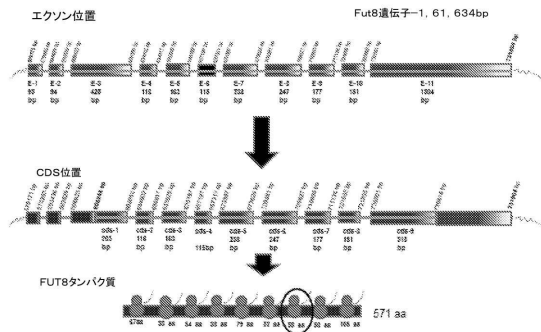


Figure 2

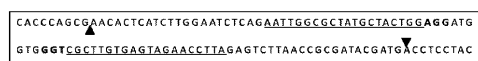
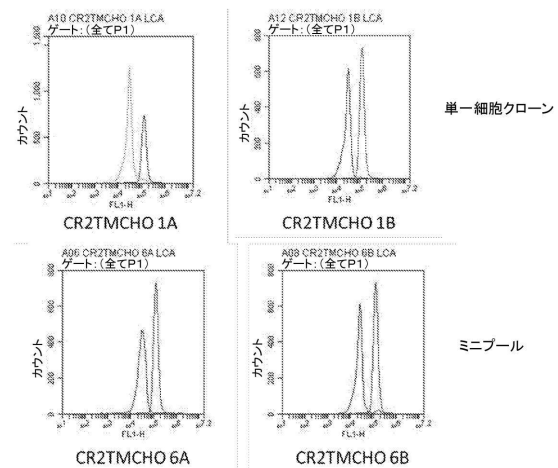
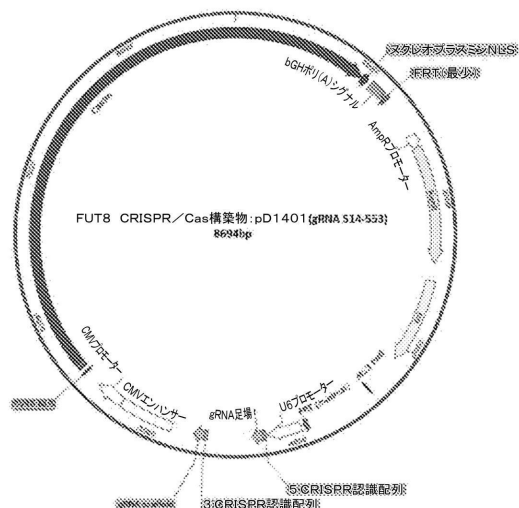
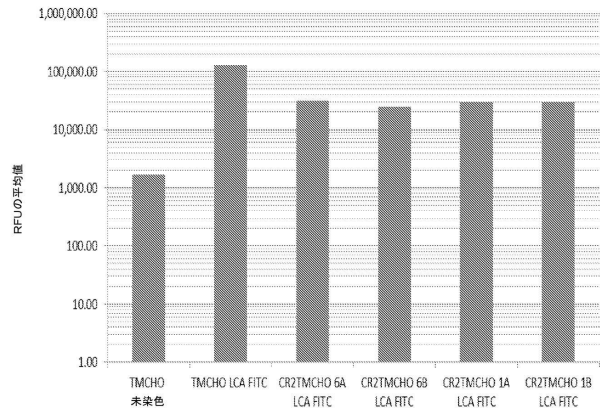


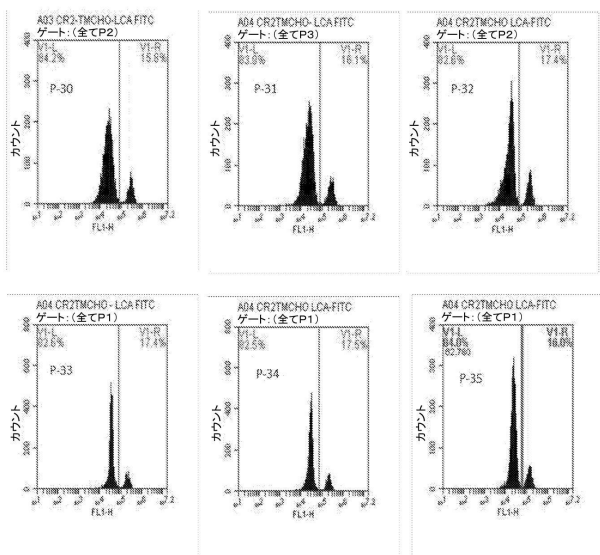
Figure 3B



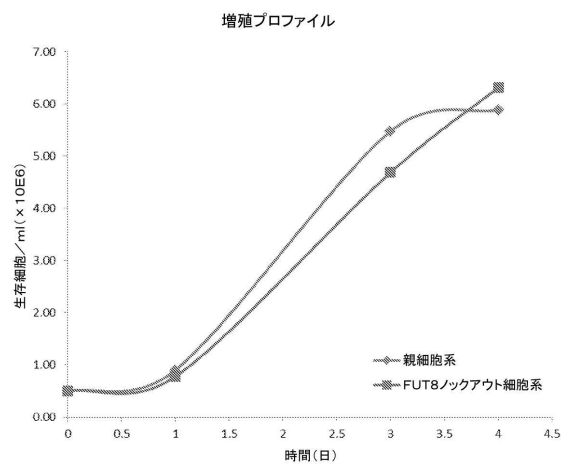
【図 5 B】



【図 6】



【図 7】



【図 8 A】

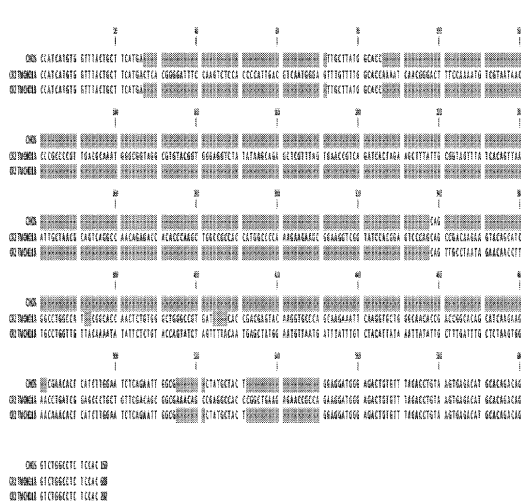
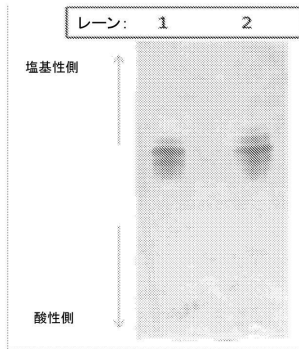


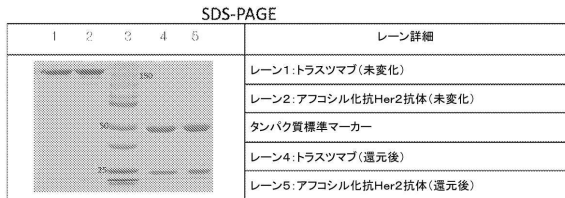
Figure 8A

【図 15】

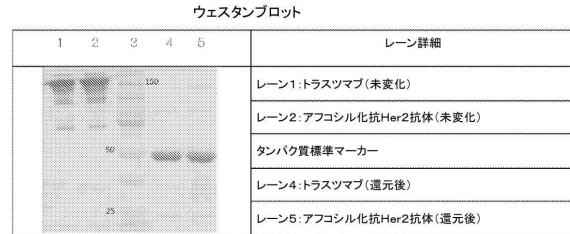


レーン1:トラスツマブ
レーン2:アフコシル化抗Her2抗体

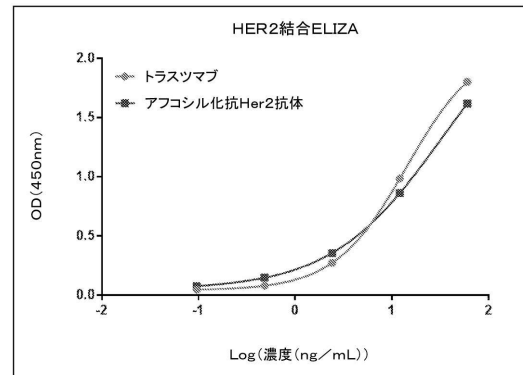
【図 16】



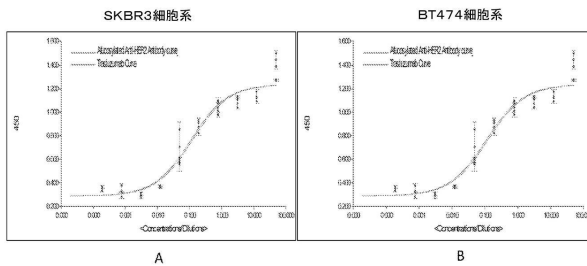
【図 17】



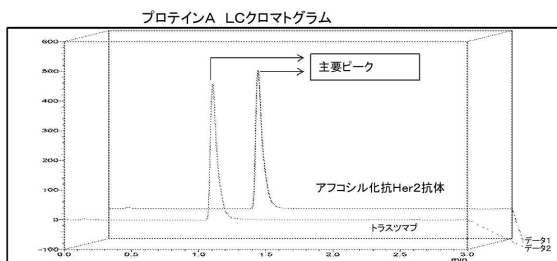
【図 18】



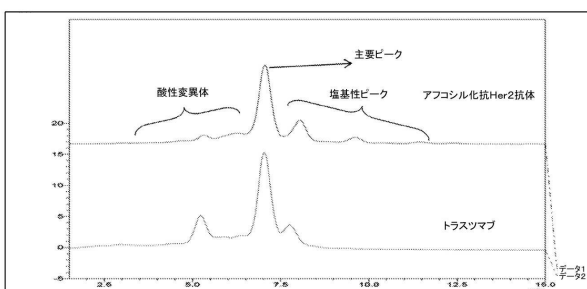
【図 19】



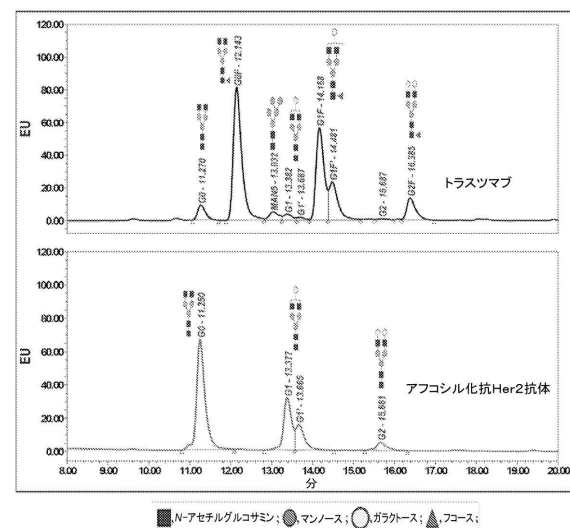
【図 20】



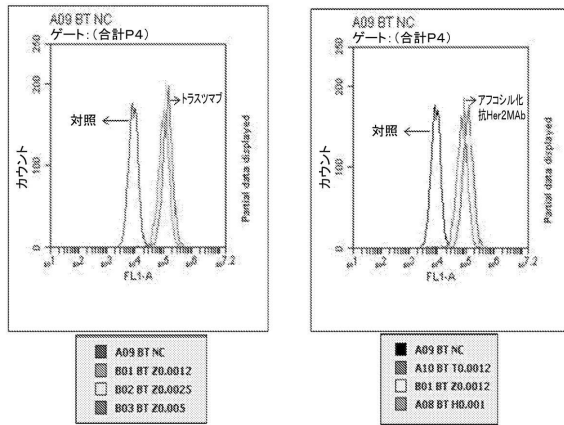
【図 21】



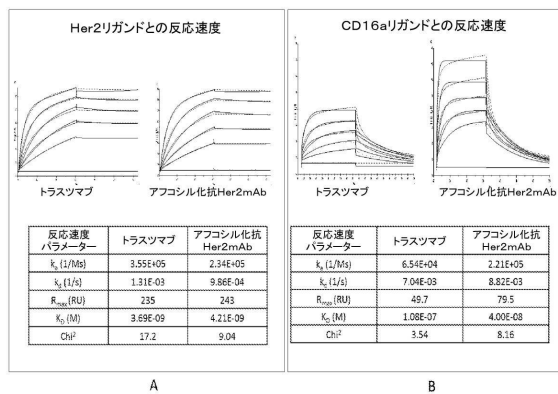
【図 22】



【図 2 3】



【図 2 4】



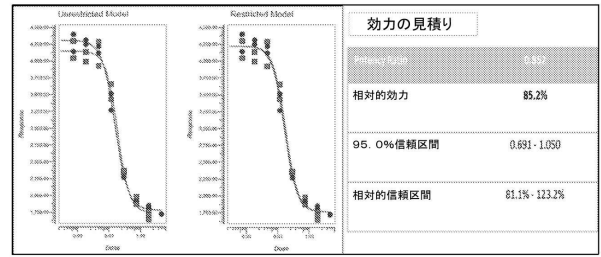
A

B

【配列表】

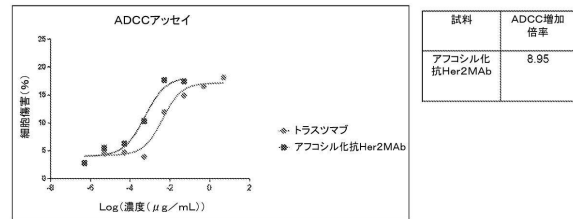
0006587696000001.app

【図 2 5】



■ トラスツマブ
■ アフコシル化抗Her2MAb

【図 2 6】



試料	ADCC増加倍率
アフコシル化抗Her2MAb	8.95

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 0 7 K	14/47	(2006.01)	C 0 7 K 14/47
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 P 37/06
A 6 1 P	31/12	(2006.01)	A 6 1 P 31/12
A 6 1 P	31/04	(2006.01)	A 6 1 P 31/04
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P 29/00
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K 39/395 D
C 0 7 K	16/28	(2006.01)	A 6 1 K 39/395 N
			C 0 7 K 16/28

- (72)発明者 ロドリゲス、カヴィサ イヤール
インド国、バンガロール、ロード、バナーガッタ、ソバー マグノリア、アパートメント ナンバー 121ビー
- (72)発明者 ゴーシュ、マロイ
インド国、バンガロール、イエラハンカ ニュー タウン、マンダラ クンテ 5 / 2、エヌシー
シー アーバン アスター パーク、ディー 903
- (72)発明者 マイティー、スニット
インド国、バンガロール、アンジャナブラ、ナインス フェイズ、ジェイピー ナガール、フェイズ 1、ナンディ ガーデン、8エイ / 25
- (72)発明者 ウンニクリシュマン、ディヴィヤ
インド国、バンガロール、ナンディニ レイアウト、フォース ブロック、フォース クロス、ナンバー 44
- (72)発明者 ハザリカ、ジャーナビ
インド国、バンガロール、ムルゲシュパリヤ ウィンド トンネル ロード、ゴルフ マナー ア
パートメンツ、ナンバー 302
- (72)発明者 バンガロール ムニラジュ、ヨゲンドラ マンジュナス
インド国、バンガロール、サード ブロック デヴァサンドラ、アールエムブイ セカンド ス
テージ、ファースト “シー” クロス ロード、ナンバー 85
- (72)発明者 ムルゲサン、サティヤバラ
インド国、バンガロール、ペーニャ ザ サード フェイズ、ラッグレ、ラジャゴブラル ナガ
ール、ドゥッガランマ レイアウト、フォース クロス ナンバー 52
- (72)発明者 ムクンダ、バヴィスラ
インド国、クンダブラ、フェリー ロード、ニア ブラバークール タイルズ、マスラ スムル
ティ、1-171-1エイ
- (72)発明者 ブラサド、バーガブ
インド国、チェンナイ、タミル ナードゥ、コドゥンガイユール、カンナダサン ナガール、サ
ード メイン ロード、ファースト ストリート 5 / 55、ニュー ナンバー 6
- (72)発明者 カマナゴウダ、ヴェーレシャ
インド国、バンガロール、ナンディニ レイアウト ポスト、カンテラヴァナガール、セカンド
ブロック、ナンバー 682
- (72)発明者 バークタチャルジー、サンガーミトラ
インド国、バンガロール、バンガロール ノース、ドールヴァニナガール、パイ レイアウト
ールド マドラス ロード、ニア コーポレイション パンク、イレブンス クロス、ファースト
メイン、ブルーミングデイル アパートメンツ、ジー - 07
- (72)発明者 ダクシナムルシー、ブラヴィン クマール
インド国、チェンナイ、タミル ナードゥ、ファースト ストリート ヴアラチェリー、エムジ
アール ナガール、ナンバー 32

- (72)発明者 ハラン、ヴィヴェク
インド国、アラヴェヌ、タミル ナードゥ、ザ ニルギリ、ジャカナライ、サンプール ヴィレ
ジ、ジャッカナライ、ナンバー 619
- (72)発明者 スリニヴァサン、サンカラナヤナン
インド国、バンガロール、ジャラハリ、エイチエムティー メイン ロード、ジャルヴァユ ハイ
ツ、イー504
- (72)発明者 ホラ、アヌラダー
インド国、シタプール、ウッタール プラデシュ、シヴィル ラインズ、チャーチ ロード、エイ
チ、ナンバー 706
- (72)発明者 ナタラジャン、バイラヴァバラクマール
インド国、チェンナイ、タミル ナードゥ、ヴェラサラヴァッカム、ヴェラン ナガール、175
エイ
- (72)発明者 ナイル、カルシカ
インド国、バンガロール、カルナタカ、インディアン エアー フォース、ジェイシー ナガール
ポスト、ヘッド クォーターズ トレーニング コマンド、シニア オフィサーズ エンクレイ
プ、ピー ー 6
- (72)発明者 サニガイヴェル、アスワニ
インド国、チェンナイ、タミル ナードゥ、アミンピカライ、セカンド フロア、ヴェラーラ ス
トリート、29
- (72)発明者 マリワラヴェ、アモル
インド国、バンガロール、カルナタカ、ケングリウパナガール、ナナパーラティ ピーオー、ヴァ
ラゲラハリ、ファースト ブロック、フィフス メイン、セカンド フロア、239
- (72)発明者 シェノイ、バーラス ラヴィンドラ
インド国、バンガロール、カルナタカ、パピュジナガール、フォース メイン、ナインス クロス
、ナンバー 74/94
- (72)発明者 ビーマ ラオ、サハナ
インド国、バンガロール、スリ ヴェンカテシュワラ クルパ レイアウト、サード クロス、ス
リ クルパ アパートメンツ、エフ1、ナンバー 109
- (72)発明者 チャクラバーティ、サブラ プラカシュ
インド国、バンガロール、カルナタカ、サハカー ナガール、カナラ バンク レイアウト、トゥ
ウェルフス メイン、フォース クロス、ブレマニラヤ、444、ナンバー 202
- (72)発明者 ダービー、アシュヴィニー クマール
インド国、バンガロール、ヴィドヤランヤブラ、カナラ バンク レイアウト、71/シー
- (72)発明者 ハーン、アミル
インド国、アリーガル、ウッター プラデシュ、パロリ ロード、パトワリ ナグラ、ストリー
ト ナンバー 7、ナンバー 1018
- (72)発明者 シャルマ、アンクリナ
インド国、バンガロール、マルズワラム、サーティーンス クロス、チャレット アプツ、フラッ
ト ナンバー 203

審査官 松田 芳子

- (56)参考文献 国際公開第2015/010114 (WO, A1)
国際公開第2003/085107 (WO, A1)
国際公開第2005/035778 (WO, A1)
国際公開第2002/031140 (WO, A1)
国際公開第2000/061739 (WO, A1)
国際公開第2016/129660 (WO, A1)
国際公開第2016/075662 (WO, A1)
国際公開第2013/169802 (WO, A1)

Biotechnol. Bioeng. , 2 0 0 4 年 , vol.87, no.5 , p.614-622

Cell , 2 0 1 3 年 , vol.154, no.6 , p.1380-1389

Biotechnol. Bioeng. , 2 0 1 4 年 , vol.111, no.8 , p.1604-1616

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 9

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / W P I D S / B I O S I S (S T N)