

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02012/081628

発行日 平成26年5月22日 (2014. 5. 22)

(43) 国際公開日 **平成24年6月21日 (2012. 6. 21)**

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 P 21/02 (2006. 01)	C 1 2 P 21/02 C	4 B O 2 4
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 6 4
C 1 2 N 5/10 (2006. 01)	C 1 2 N 5/00 1 O 2	4 B O 6 5
C 1 2 P 21/08 (2006. 01)	C 1 2 P 21/08	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 60 頁)

出願番号	特願2012-548816 (P2012-548816)	(71) 出願人	504202472 大学共同利用機関法人情報・システム研究 機構 東京都立川市緑町10番3号
(21) 国際出願番号	PCT/JP2011/078935	(71) 出願人	000001029 協和発酵キリン株式会社 東京都千代田区大手町1丁目6番1号
(22) 国際出願日	平成23年12月14日 (2011. 12. 14)	(74) 代理人	100090343 弁理士 濱田 百合子
(31) 優先権主張番号	特願2010-279849 (P2010-279849)	(74) 代理人	100129160 弁理士 古館 久丹子
(32) 優先日	平成22年12月15日 (2010. 12. 15)	(74) 代理人	100177460 弁理士 山崎 智子
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 タンパク質の生産方法

(57) 【要約】

本発明は、目的タンパク質をコードするDNAを含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を持つ発現ベクターを少なくとも1種類浮遊性の哺乳動物細胞に導入し、一对のトランスポゾン配列の間に挿入された目的タンパク質をコードするDNAを含む遺伝子断片を該哺乳動物細胞の染色体に組み込む方法、該目的タンパク質を生産する浮遊性の哺乳動物細胞を浮遊培養して該目的タンパク質を生産する方法、および該目的タンパク質を発現する浮遊性の哺乳動物細胞に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

目的タンパク質をコードする DNA を含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む少なくとも 1 種類の発現ベクターを浮遊性の哺乳動物細胞に導入し、一对のトランスポゾン配列の間に挿入された目的タンパク質をコードする DNA を含む遺伝子断片を該哺乳動物細胞の染色体に組み込み、該目的タンパク質を生産する浮遊性の哺乳動物細胞を得て、且つ該哺乳動物細胞を浮遊培養して該目的タンパク質を生産する方法。

【請求項 2】

以下の工程 (A) ~ (C) を含むことを特徴とする、目的タンパク質を生産する方法。
(A) 以下の発現ベクター (a) および (b) を浮遊性の哺乳動物細胞に同時に導入する工程

(a) 目的タンパク質をコードする DNA を含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む少なくとも 1 種類の発現ベクター

(b) トランスポゾン配列を認識し、且つ一对のトランスポゾン配列の間に挿入された遺伝子断片を染色体に転移させる活性を有するトランスポゼースをコードする DNA を含むベクター

(B) 工程 (A) で浮遊性の哺乳動物細胞に導入した発現ベクター (b) によりトランスポゼースを一過性発現させて、一对のトランスポゾン配列の間に挿入された目的タンパク質をコードする DNA を含む遺伝子断片を該哺乳動物細胞の染色体に組み込み、目的タンパク質を発現する浮遊性の哺乳動物細胞を得る工程

(C) 工程 (B) で得られた目的タンパク質を発現する浮遊性の哺乳動物細胞を浮遊培養して、目的タンパク質を生産させる工程

【請求項 3】

目的タンパク質をコードする DNA を含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む少なくとも 1 種類の発現ベクターを浮遊性の哺乳動物細胞に導入し、一对のトランスポゾン配列の間に挿入された目的タンパク質をコードする DNA を含む遺伝子断片を該哺乳動物細胞の染色体に組み込み、該目的タンパク質を生産する浮遊性の哺乳動物細胞を得る方法。

【請求項 4】

目的タンパク質をコードする DNA を含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクターの少なくとも 1 つが、目的タンパク質をコードする DNA および選択マーカー遺伝子を含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクターである、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

目的タンパク質をコードする DNA を含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクターに加えて、さらに選択マーカー遺伝子を含む遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクターを哺乳動物細胞に導入する請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

目的タンパク質をコードする DNA が抗体をコードする DNA である請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

抗体をコードする DNA が、抗体の H 鎖をコードする DNA および抗体の L 鎖をコードする DNA の少なくとも一方である請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

下記 (a) ~ (d) から選ばれる発現ベクターを浮遊性の哺乳動物細胞に導入する、請求項 4 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

(a) 抗体の H 鎖をコードする DNA を含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両

10

20

30

40

50

端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクター、抗体のL鎖をコードするDNAを含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクターおよび選択マーカ-遺伝子を含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクター。

(b) 抗体のH鎖をコードするDNAおよび選択マーカ-遺伝子を含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクター、並びに抗体のL鎖をコードするDNAを含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクター。

(c) 抗体のL鎖をコードするDNAおよび選択マーカ-遺伝子を含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクター、並びに抗体のH鎖をコードするDNAを含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクター。

(d) 抗体のH鎖、L鎖および選択マーカ-遺伝子をコードするDNAを含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクター。

【請求項9】

浮遊性の哺乳動物細胞が、無血清培養で生存および増殖可能な細胞である、請求項1~8のいずれか1項に記載の方法。

【請求項10】

浮遊性の哺乳動物細胞が、CHO細胞を浮遊培養に馴化した浮遊性のCHO細胞、PER.C6細胞、ラットミエロマ細胞YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20(またはYB2/0ともいう)および浮遊培養に馴化した浮遊性のマウスミエロマ細胞NS0から選ばれるいずれか1つの細胞である請求項1~9のいずれか1項に記載の方法。

【請求項11】

CHO細胞がCHO-K1、CHO-K1SV、DUKXB11、CHO/DG44、Pro-3およびCHO-Sから選ばれるいずれか1つの細胞である請求項10に記載の方法。

【請求項12】

選択マーカ-遺伝子がシクロヘキシミド耐性遺伝子である請求項4~11のいずれか1項に記載の方法。

【請求項13】

シクロヘキシミド耐性遺伝子がリボソームタンパク質である請求項12に記載の方法。

【請求項14】

一对のトランスポゾン配列が哺乳動物細胞で機能する一对のDNA型トランスポゾン由来の塩基配列である請求項1~13のいずれか1項に記載の方法。

【請求項15】

一对のDNA型トランスポゾン由来の塩基配列が、一对のTol1トランスポゾン由来の塩基配列またはTol2トランスポゾン由来の塩基配列である請求項14に記載の方法。

【請求項16】

一对のTol2トランスポゾン由来の塩基配列が、配列番号2で表される塩基配列および配列番号3で表される塩基配列である請求項15に記載の方法。

【請求項17】

一对のTol1トランスポゾン由来の塩基配列が、配列番号14で表される塩基配列および配列番号15で表される塩基配列である請求項15に記載の方法。

【請求項18】

目的タンパク質をコードするDNAを含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む少なくとも1種類の発現ベクター(a)、および該トランスポゾン配列を認識し、且つ一对のトランスポゾン配列の間に挿入された遺伝子断片を染色体に転移させる活性を有するトランスポゼ-ス(転移酵素)をコードするDNAを含む発現ベクター(b)を同時に導入されることで、該一对のトランスポゾン配列の間に

10

20

30

40

50

挿入された該遺伝子断片が染色体に組込まれ、且つ該目的タンパク質を生産する浮遊性の哺乳動物細胞。

【請求項 19】

目的タンパク質をコードする DNA を含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む少なくとも 1 種類の発現ベクター (a) が、目的タンパク質をコードする DNA および選択マーカー遺伝子を含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクターである、請求項 18 に記載の哺乳動物細胞。

【請求項 20】

発現ベクター (a) および (b) に加えて、さらに選択マーカー遺伝子を含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクター (c) を哺乳動物細胞に導入された細胞である、請求項 18 または 19 に記載の哺乳動物細胞。

10

【請求項 21】

目的タンパク質をコードする DNA が抗体をコードする DNA である請求項 18 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞。

【請求項 22】

抗体をコードする DNA が、抗体の H 鎖をコードする DNA および抗体の L 鎖をコードする DNA の少なくとも一方である請求項 21 に記載の哺乳動物細胞。

【請求項 23】

下記 (a) ~ (d) から選ばれる発現ベクターを導入された、請求項 18 ~ 22 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞。

20

(a) 抗体の H 鎖をコードする DNA を含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクター、抗体の L 鎖をコードする DNA を含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクターおよび選択マーカー遺伝子を含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクター。

(b) 抗体の H 鎖をコードする DNA および選択マーカー遺伝子を含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクター、並びに抗体の L 鎖をコードする DNA を含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクター。

30

(c) 抗体の L 鎖をコードする DNA および選択マーカー遺伝子を含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクター、並びに抗体の H 鎖をコードする DNA を含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクター。

(d) 抗体の H 鎖、L 鎖および選択マーカー遺伝子をコードする DNA を含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクター。

【請求項 24】

無血清培養で生存および増殖可能な浮遊性の哺乳動物細胞である、請求項 18 ~ 23 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞。

40

【請求項 25】

CHO 細胞を浮遊培養に馴化した浮遊性の CHO 細胞、PER.C6 細胞、ラットミエローマ細胞 YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 (または YB2/0 ともいう) および浮遊培養に馴化した浮遊性のマウスミエローマ細胞 NS0 から選ばれるいずれか 1 つの浮遊性の哺乳動物細胞である請求項 18 ~ 24 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞。

【請求項 26】

CHO 細胞が CHO-K1、CHO-K1SV、DUKXB11、CHO/DG44、Pro-3 および CHO-S から選ばれるいずれか 1 つの細胞である請求項 25 に記載の哺乳動物細胞。

50

【請求項 27】

選択マーカー遺伝子がシクロヘキシミド耐性遺伝子である請求項 19 ~ 26 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞。

【請求項 28】

シクロヘキシミド耐性遺伝子がヒトリボソームタンパク質の変異体をコードする遺伝子である請求項 27 に記載の哺乳動物細胞。

【請求項 29】

一对のトランスポゾン配列が哺乳動物細胞で機能する一对の DNA 型トランスポゾン由来の塩基配列である請求項 19 ~ 28 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞。

【請求項 30】

一对の DNA 型トランスポゾン由来の塩基配列が、一对の Tol1 トランスポゾン由来の塩基配列または Tol2 トランスポゾン由来の塩基配列である請求項 29 に記載の哺乳動物細胞。

【請求項 31】

一对の Tol2 トランスポゾン由来の塩基配列が、配列番号 2 で表される塩基配列および配列番号 3 で表される塩基配列である請求項 30 に記載の哺乳動物細胞。

【請求項 32】

一对の Tol1 トランスポゾン由来の塩基配列が、配列番号 14 で表される塩基配列および配列番号 15 で表される塩基配列である請求項 30 に記載の哺乳動物細胞。

【請求項 33】

目的タンパク質をコードする DNA を含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクター。

【請求項 34】

一对のトランスポゾン配列が一对の Tol1 トランスポゾン由来の塩基配列または Tol2 トランスポゾン由来の塩基配列である請求項 33 に記載の発現ベクター。

【請求項 35】

一对の Tol2 トランスポゾン由来の塩基配列が、配列番号 2 で表される塩基配列および配列番号 3 で表される塩基配列である請求項 34 に記載の発現ベクター。

【請求項 36】

一对の Tol1 トランスポゾン由来の配列が、配列番号 14 で表される塩基配列および配列番号 15 で表される塩基配列である請求項 34 に記載の発現ベクター。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、目的タンパク質をコードする DNA を含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクターを少なくとも 1 種類浮遊性の哺乳動物細胞に導入し、一对のトランスポゾン配列の間に挿入された遺伝子断片を該哺乳動物細胞の染色体に組み込む方法、該タンパク質を生産する浮遊性の哺乳動物細胞を浮遊培養して該タンパク質を生産する方法、該タンパク質を発現する浮遊性の哺乳動物細胞、および目的タンパク質をコードする DNA を含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクターに関する。

【背景技術】

【0002】

遺伝子組換え技術による外来タンパク質の生産は、医薬品および食品業界など様々な産業に利用されている。多くの場合、組換えタンパク質の生産は、目的タンパク質をコードする塩基配列を含む発現ベクターを、大腸菌、酵母、昆虫細胞、植物細胞および動物細胞などの宿主に導入し、該発現ベクターが染色体に組み込まれた形質転換株を選択し、さらに該形質転換株を適切な培養条件で培養して目的タンパク質を発現させることにより行われている。

【0003】

10

20

30

40

50

しかし、外来タンパク質を効率よく生産できる宿主を開発するためには、目的とするタンパク質ごとに生産性の良い宿主細胞を選定することが必要であり、個々の宿主における外来タンパク質生産技術においてさらなる技術革新が望まれている。

【0004】

大腸菌などの細菌および酵母の系では、動物細胞とは異なり糖鎖修飾など翻訳後修飾が困難であることが多く、活性を有するタンパク質を生産する上で問題となる。

【0005】

昆虫細胞の系は、生産されたタンパク質がリン酸化、糖鎖の付加など翻訳後修飾を受け、本来の生理活性を保持したまま発現させることができるというメリットを有する。しかし、分泌タンパク質の糖鎖構造は哺乳類由来の細胞のものとは異なることから、医薬品用途とするには抗原性などが問題となる。

10

【0006】

また、昆虫細胞の系は外来遺伝子の導入に組換えウイルスを用いることから、安全性の点から、その不活性化または封じ込めが必要であるという課題がある。

【0007】

動物細胞の系では、ヒトをはじめとする高等動物由来のタンパク質に対し、リン酸化、糖鎖付加およびフォールディングなどの翻訳後修飾を、より生体でつくられるものと同じように施すことが可能である。この正確な翻訳後修飾は、タンパク質の本来有する生理活性を組換えタンパク質で再現するために必要なものであり、そのような生理活性が必要とされる医薬品などには、哺乳動物細胞を宿主としたタンパク質生産系がよく用いられている。

20

【0008】

しかしながら、動物細胞を宿主としたタンパク質発現系の生産性は一般に低く、導入遺伝子の安定性にも問題がある場合が多い。哺乳動物培養細胞を宿主としたタンパク質の生産性向上は、治療用医薬品または診断薬などの製造において非常に重要であるばかりでなく、それらの開発研究にも多いに寄与している。そのため、哺乳動物培養細胞、特にチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞（CHO細胞）を宿主として、容易に高生産株の獲得を可能にする遺伝子発現系の開発は急務とされている。

【0009】

トランスポゾンとは、染色体のひとつの遺伝子座から別の遺伝子座へ移動しうる転位性遺伝要素である。トランスポゾンは、分子生物学または遺伝学の研究において強力なツールであり、昆虫または線虫（例えば、*Drosophila melanogaster* または *Caenorhabditis elegans*）および植物において、変異導入、遺伝子トラッピングおよびトランスジェニック個体の作製などの目的として利用されている。しかし、このような技術は、哺乳動物細胞を含む脊椎動物では開発が遅れていた。

30

【0010】

ところが近年、脊椎動物においても活性のあるトランスポゾンが報告され、そのいくつかはマウスやヒトなどの哺乳動物細胞でも活性をもつことが確認された。代表的なものに、メダカからクローニングされたトランスポゾン *Tol1*（特許文献1）、*Tol2*（非特許文献1）、サケ科魚類ゲノムに存在していた非自律性のトランスポゾンから再構築された *Sleeping Beauty*（非特許文献2）、カエル由来の人工トランスポゾン *Frog prince*（非特許文献3）および昆虫由来のトランスポゾン *piggy Bac*（非特許文献4）が挙げられる。

40

【0011】

これらのDNAトランスポゾンは、哺乳動物細胞のゲノムに新たな表現系を持ち込むための遺伝子導入ツールとして、変異導入、遺伝子トラッピング、トランスジェニック個体の作製および薬剤耐性タンパク質を発現させることなどに利用されるようになった（非特許文献5～12）。

【0012】

昆虫においては、鱗翅目昆虫由来のトランスポゾン *piggy Bac* を用いて、外来遺

50

伝子をカイコ染色体へ導入し、該外来遺伝子がコードするタンパクを発現させる方法が研究され、その技術を用いたタンパク質生産方法が開示されている（特許文献2）。

【0013】

しかし、発現させた目的タンパクの発現量が十分ではなく、且つ、カイコ全身に生産されるため、大量の夾雑タンパク質が存在する体液から発現させた外来タンパク質を高純度な形で回収するためには、高度な精製技術を必要とすることから、経済的に問題があった。

【0014】

また、メダカ由来Tol2トランスポゾンを用いて、哺乳動物細胞にG418耐性に関わるタンパク質を発現させた例が知られている（非特許文献12、非特許文献13）。

10

【0015】

医療用のタンパク質医薬品を哺乳動物由来の培養細胞で生産する場合、未知ウイルスまたは病原性ポリペプチドの予期せぬ混入を防ぐために、その生産工程において動物由来の成分を含まないことが重要である。CHO細胞はタンパク質医薬品を生産する動物細胞として、最も頻繁に用いられており、近年の研究により、血清または動物由来の成分を用いない安全な培地で培養可能な浮遊性のCHO細胞株も樹立されている。しかし、無血清・無タンパク質条件で遺伝子導入した株は、血清使用条件で遺伝子導入した株の半分の生産性に留まっており（非特許文献14）、無血清・無タンパク質条件での遺伝子導入は、技術的に難しいことが示されている。

【0016】

目的タンパク質を発現している細胞をスクリーニングするための選抜マーカーは、同一の遺伝子発現ベクター上に配置することが一般的である。これはゲノム中に存在する遺伝子が発現しやすい部位と発現しにくい部位があり（ポジション効果と呼ばれる、非特許文献15）、選抜マーカーが発現していれば、目的タンパク質も発現しているという仮説に基づくものである。

20

【0017】

一方、抗体などのように、目的タンパク質が複数のポリペプチドから構成される場合、それぞれを異なるベクターで発現させることも知られている。抗体の場合、抗体の重鎖の発現が軽鎖の発現よりも高いほど、生産性が高いことが示されている（非特許文献16）。同一のベクター上では、重鎖と軽鎖の発現は一定となることが予測され、高い生産性を得るために、意図的に重鎖と軽鎖を異なるベクターで発現させることで、結果的に最適な比で発現した細胞株を得ることが可能となる。しかし、複数の異なるベクターでタンパク質を発現させる場合、選抜マーカー遺伝子も複数必要となる。

30

【0018】

これを克服する手段として、本来1つのポリペプチド鎖から成るdhfr遺伝子を2つのポリペプチド鎖に分割し、片方を重鎖発現ベクター上に、もう一方を軽鎖発現ベクター上に配置した例が報告されている（非特許文献17）。

【0019】

しかし、非特許文献17に記載の細胞は、細胞は培地に添加したタンパク質成分依存性のCHO細胞であり、先に述べたように、無血清・無タンパク質条件での遺伝子導入の場合と異なり、遺伝子導入効率が高い可能性がある。依然として、ウイルス感染等の危険性がない安全性の高い無血清・無タンパク質条件での遺伝子導入時には、生産性の高い細胞の選抜が困難なことが予想される。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0020】

【特許文献1】国際公開第2008/072540号

【特許文献2】日本国特表2001-532188号公報

【非特許文献】

【0021】

50

- 【非特許文献1】Nature 383, 30 (1996)
- 【非特許文献2】Cell 91, 501 - 510 (1997)
- 【非特許文献3】Nucleic Acids Res, 31, 6873 - 6881 (2003)
- 【非特許文献4】Insect Mol. Biol. 5, 141 - 151 (1996)
- 【非特許文献5】Genetics. 166, 895 - 899 (2004)
- 【非特許文献6】PLOS Genet, 2, e169 (2006)
- 【非特許文献7】Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 10769 - 10773 (1998)
- 【非特許文献8】Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 6759 - 6764 (2001) 10
- 【非特許文献9】Nature 436, 221 - 226 (2005)
- 【非特許文献10】Nucleic Acids Res, 31, 6873 - 6881 (2003)
- 【非特許文献11】Nucleic Acids Res. 35, e87 (2007)
- 【非特許文献12】Proc Natl Acad Sci USA, 103, 15008 - 15013 (2006)
- 【非特許文献13】Plos Genetics, 2, 1715 - 1724 (2006)
- 【非特許文献14】Biotech. Bioeng. 96, 1118 - 1126 (2007) 20
- 【非特許文献15】Nature Biotech. 22, 1393 - 1398 (2004)
- 【非特許文献16】Biotech. Bioeng. 96, 337 - 348 (2007)
- 【非特許文献17】Biotech. Bioeng. 84, 439 - 444 (2003)
- 【発明の概要】
- 【発明が解決しようとする課題】
- 【0022】
- 目的タンパク質を生産、解析するためには、哺乳動物由来の培養細胞を用いて目的タンパク質を安定的に高発現する細胞株を選択しなければならないが、目的タンパク質を生産する細胞の作製および培養には、多大な労力と時間を要する。 30
- 【0023】
- また、これまでに、トランスポゾン配列を用いて哺乳動物細胞で目的タンパク質の発現を行うことは知られていたが、トランスポゾン配列を用いることで、タンパク質の生産系として利用できるような、目的タンパク質を高発現する細胞を作製すること、トランスポゾン配列を用いた目的タンパク質を高生産する哺乳動物細胞の作製方法および該細胞を用いたタンパク質の生産方法については何ら知られてない。
- 【0024】
- 上記のように哺乳動物培養細胞を用いて目的タンパク質を高発現するタンパク質生産系を効率的且つ短期間に作製し、目的のタンパク質を高生産することが従来求められていた。加えて、遺伝子導入から生産株の樹立まで一貫して、動物由来の成分を一切用いることのない生産細胞の樹立が求められていた。 40
- 【0025】
- 従って、本発明は、効率的に作製し得る目的タンパク質を高発現する細胞および該細胞を用いて目的タンパク質を生産する方法を提供することを目的とする。
- 【課題を解決するための手段】
- 【0026】
- 本発明者らは、上述した課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、目的タンパク質をコードするDNAを含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を持つ発現ベクターを少なくとも1種類浮遊性の哺乳動物細胞に導入し、一对(二つ)のトランスポゾン配列の間に挿入された遺伝子断片を該哺乳動物細胞の染色体に 50

組み込むことにより、該目的タンパク質を効率的に作製できることを見出した。更に、当該細胞を用いることにより、目的タンパク質を高効率で生産できることを見出し、本発明を完成させるに至った。

【 0 0 2 7 】

すなわち、本発明は以下のとおりである。

1. 目的タンパク質をコードするDNAを含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む少なくとも1種類の発現ベクターを浮遊性の哺乳動物細胞に導入し、一对のトランスポゾン配列の間に挿入された目的タンパク質をコードするDNAを含む遺伝子断片を該哺乳動物細胞の染色体に組み込み、該目的タンパク質を生産する浮遊性の哺乳動物細胞を得て、且つ該哺乳動物細胞を浮遊培養して該目的タンパク質を生産する方法。

10

2. 以下の工程(A)~(C)を含むことを特徴とする、目的タンパク質を生産する方法。

(A) 以下の発現ベクター(a)および(b)を浮遊性の哺乳動物細胞に同時に導入する工程

(a) 目的タンパク質をコードするDNAを含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む少なくとも1種類の発現ベクター

(b) トランスポゾン配列を認識し、且つ一对のトランスポゾン配列の間に挿入された遺伝子断片を染色体に転移させる活性を有するトランスポゼースをコードするDNAを含むベクター

20

(B) 工程(A)で浮遊性の哺乳動物細胞に導入した発現ベクター(b)によりトランスポゼースを一過性発現させて、一对のトランスポゾン配列の間に挿入された目的タンパク質をコードするDNAを含む遺伝子断片を該哺乳動物細胞の染色体に組み込み、目的タンパク質を発現する浮遊性の哺乳動物細胞を得る工程

(C) 工程(B)で得られた目的タンパク質を発現する浮遊性の哺乳動物細胞を浮遊培養して、目的タンパク質を生産させる工程

3. 目的タンパク質をコードするDNAを含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む少なくとも1種類の発現ベクターを浮遊性の哺乳動物細胞に導入し、一对のトランスポゾン配列の間に挿入された目的タンパク質をコードするDNAを含む遺伝子断片を該哺乳動物細胞の染色体に組み込み、該目的タンパク質を生産する浮遊性の哺乳動物細胞を得る方法。

30

4. 目的タンパク質をコードするDNAを含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクターの少なくとも1つが、目的タンパク質をコードするDNAおよび選択マーカー遺伝子を含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクターである、前項1~3のいずれか1に記載の方法。

5. 目的タンパク質をコードするDNAを含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクターに加えて、さらに選択マーカー遺伝子を含む遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクターを哺乳動物細胞に導入する前項1~4のいずれか1に記載の方法。

40

6. 目的タンパク質をコードするDNAが抗体をコードするDNAである前項1~5のいずれか1に記載の方法。

7. 抗体をコードするDNAが、抗体のH鎖をコードするDNAおよび抗体のL鎖をコードするDNAの少なくとも一方である前項6に記載の方法。

8. 下記(a)~(d)から選ばれる発現ベクターを浮遊性の哺乳動物細胞に導入する、前項4~7のいずれか1に記載の方法。

(a) 抗体のH鎖をコードするDNAを含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクター、抗体のL鎖をコードするDNAを含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクターおよび選択マーカー遺伝子を含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一

50

対のトランスポゾン配列を含む発現ベクター。

(b) 抗体のH鎖をコードするDNAおよび選択マーカー遺伝子を含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクター、並びに抗体のL鎖をコードするDNAを含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクター。

(c) 抗体のL鎖をコードするDNAおよび選択マーカー遺伝子を含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクター、並びに抗体のH鎖をコードするDNAを含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクター。

(d) 抗体のH鎖、L鎖および選択マーカー遺伝子をコードするDNAを含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクター。

9. 浮遊性の哺乳動物細胞が、無血清培養で生存および増殖可能な細胞である、前項1~8のいずれか1に記載の方法。

10. 浮遊性の哺乳動物細胞が、CHO細胞を浮遊培養に馴化した浮遊性のCHO細胞、PER.C6細胞、ラットミエロマ細胞YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20(またはYB2/0ともいう)および浮遊培養に馴化した浮遊性のマウスミエロマ細胞NS0から選ばれるいずれか1つの細胞である前項1~9のいずれか1に記載の方法。

11. CHO細胞がCHO-K1、CHO-K1SV、DUKXB11、CHO/DG44、Pro-3およびCHO-Sから選ばれるいずれか1つの細胞である前項10に記載の方法。

12. 選択マーカー遺伝子がシクロヘキシミド耐性遺伝子である前項4~11のいずれか1に記載の方法。

13. シクロヘキシミド耐性遺伝子がリボソームタンパク質である前項12に記載の方法。

14. 一对のトランスポゾン配列が哺乳動物細胞で機能する一对のDNA型トランスポゾン由来の塩基配列である前項1~13のいずれか1に記載の方法。

15. 一对のDNA型トランスポゾン由来の塩基配列が、一对のTol1トランスポゾン由来の塩基配列またはTol2トランスポゾン由来の塩基配列である前項14に記載の方法。

16. 一对のTol2トランスポゾン由来の塩基配列が、配列番号2で表される塩基配列および配列番号3で表される塩基配列である前項15に記載の方法。

17. 一对のTol1トランスポゾン由来の塩基配列が、配列番号14で表される塩基配列および配列番号15で表される塩基配列である前項15に記載の方法。

18. 目的タンパク質をコードするDNAを含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む少なくとも1種類の発現ベクター(a)、および該トランスポゾン配列を認識し、且つ一对のトランスポゾン配列の間に挿入された遺伝子断片を染色体に転移させる活性を有するトランスポゼース(転移酵素)をコードするDNAを含む発現ベクター(b)を同時に導入されることで、該一对のトランスポゾン配列の間に挿入された該遺伝子断片が染色体に組込まれ、且つ該目的タンパク質を生産する浮遊性の哺乳動物細胞。

19. 目的タンパク質をコードするDNAを含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む少なくとも1種類の発現ベクター(a)が、目的タンパク質をコードするDNAおよび選択マーカー遺伝子を含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクターである、前項18に記載の哺乳動物細胞。

20. 発現ベクター(a)および(b)に加えて、さらに選択マーカー遺伝子を含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクター(c)を哺乳動物細胞に導入された細胞である、前項18または19に記載の哺乳動物細胞。

21. 目的タンパク質をコードするDNAが抗体をコードするDNAである前項18~2

10

20

30

40

50

0 のいずれか 1 に記載の哺乳動物細胞。

22 . 抗体をコードする DNA が、抗体の H 鎖をコードする DNA および抗体の L 鎖をコードする DNA の少なくとも一方である前項 21 に記載の哺乳動物細胞。

23 . 下記 (a) ~ (d) から選ばれる発現ベクターを導入された、前項 18 ~ 22 のいずれか 1 に記載の哺乳動物細胞。

(a) 抗体の H 鎖をコードする DNA を含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクター、抗体の L 鎖をコードする DNA を含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクターおよび選択マーカー遺伝子を含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクター。

10

(b) 抗体の H 鎖をコードする DNA および選択マーカー遺伝子を含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクター、並びに抗体の L 鎖をコードする DNA を含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクター。

(c) 抗体の L 鎖をコードする DNA および選択マーカー遺伝子を含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクター、並びに抗体の H 鎖をコードする DNA を含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクター。

(d) 抗体の H 鎖、L 鎖および選択マーカー遺伝子をコードする DNA を含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクター。

20

24 . 無血清培養で生存および増殖可能な浮遊性の哺乳動物細胞である、前項 18 ~ 23 のいずれか 1 に記載の哺乳動物細胞。

25 . CHO 細胞を浮遊培養に馴化した浮遊性の CHO 細胞、PER . C6 細胞、ラットミエローマ細胞 YB2 / 3HL . P2 . G11 . 16Ag . 20 (または YB2 / 0 ともいう) および浮遊培養に馴化した浮遊性のマウスミエローマ細胞 NS0 から選ばれるいずれか 1 つの浮遊性の哺乳動物細胞である前項 18 ~ 24 のいずれか 1 に記載の哺乳動物細胞。

26 . CHO 細胞が CHO - K1、CHO - K1SV、DUKXB11、CHO / DG44、Pro - 3 および CHO - S から選ばれるいずれか 1 つの細胞である前項 25 に記載の哺乳動物細胞。

30

27 . 選択マーカー遺伝子がシクロヘキシミド耐性遺伝子である前項 19 ~ 26 のいずれか 1 に記載の哺乳動物細胞。

28 . シクロヘキシミド耐性遺伝子がヒトリボソームタンパク質の変異体をコードする遺伝子である前項 27 に記載の哺乳動物細胞。

29 . 一对のトランスポゾン配列が哺乳動物細胞で機能する一对の DNA 型トランスポゾン由来の塩基配列である前項 19 ~ 28 のいずれか 1 に記載の哺乳動物細胞。

30 . 一对の DNA 型トランスポゾン由来の塩基配列が、一对の Tol1 トランスポゾン由来の塩基配列または Tol2 トランスポゾン由来の塩基配列である前項 29 に記載の哺乳動物細胞。

31 . 一对の Tol2 トランスポゾン由来の塩基配列が、配列番号 2 で表される塩基配列および配列番号 3 で表される塩基配列である前項 30 に記載の哺乳動物細胞。

40

32 . 一对の Tol1 トランスポゾン由来の塩基配列が、配列番号 14 で表される塩基配列および配列番号 15 で表される塩基配列である前項 30 に記載の哺乳動物細胞。

33 . 目的タンパク質をコードする DNA を含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクター。

34 . 一对のトランスポゾン配列が一对の Tol1 トランスポゾン由来の塩基配列または Tol2 トランスポゾン由来の塩基配列である前項 33 に記載の発現ベクター。

35 . 一对の Tol2 トランスポゾン由来の塩基配列が、配列番号 2 で表される塩基配列および配列番号 3 で表される塩基配列である前項 34 に記載の発現ベクター。

36 . 一对の Tol1 トランスポゾン由来の配列が、配列番号 14 で表される塩基配列お

50

よび配列番号15で表される塩基配列である前項34に記載の発現ベクター。

【発明の効果】

【0028】

本発明のタンパク質の生産方法によれば、浮遊性の哺乳動物細胞を用いて目的タンパク質を効率よく生産することができる。また、本発明の細胞は、遺伝子組み換えタンパク質または遺伝子組換えポリペプチドを高効率で生産するための生産細胞として使用することができる。

【図面の簡単な説明】

【0029】

【図1】図1は、抗ヒトインフルエンザM2抗体発現トランスポゾンベクターの模式図を示す。Tol2-Lはleft end Tol2トランスポゾン(配列番号2)を、Tol2-Rはright end Tol2トランスポゾン(配列番号3)を、CMVはCMVプロモーターを、poly Aはポリアデニレーションサイトを、Hcはヒト抗体H鎖cDNAを、Lcはヒト抗体L鎖cDNAを、CHX-rはシクロヘキシミド耐性遺伝子を示す。

10

【図2】図2は、抗ヒトインフルエンザM2抗体発現ベクターの模式図を示す。CMVはCMVプロモーターを、poly Aはポリアデニレーションサイトを、Hcはヒト抗体H鎖cDNAを、Lcはヒト抗体L鎖cDNAを、CHX-rはシクロヘキシミド耐性遺伝子を示す。

【図3】図3は、Tol2トランスポゼース発現ベクターの模式図を示す。CAGGSはCAGGSプロモーターを、poly Aはポリアデニレーションサイトを、TPase cDNAはTol2トランスポゼースcDNAを示す。

20

【図4】図4は、抗ヒトインフルエンザM2抗体発現Tol2トランスポゾンベクターを用いた場合の、浮遊性のCHO-K1細胞および接着性のCHO-K1細胞における抗ヒトインフルエンザM2抗体の発現量を検討した結果を示す。図4Aは浮遊性のCHO-K1細胞、図4Bは接着性のCHO-K1細胞の結果を示す。いずれの図も縦軸は抗体産生量($\mu\text{g}/\text{mL}$)、横軸は各細胞の遺伝子導入クローン番号を示す。

【図5】図5は、抗ヒトインフルエンザM2抗体発現Tol1トランスポゾンベクターの模式図を示す。Tol1-Lはleft end Tol1トランスポゾン(配列番号14)を、Tol1-Rはright end Tol1トランスポゾン(配列番号15)を、CMVはCMVプロモーターを、poly Aはポリアデニレーションサイトを、Hcはヒト抗体H鎖cDNAを、Lcはヒト抗体L鎖cDNAを、CHX-rはシクロヘキシミド耐性遺伝子を示す。

30

【図6】図6は、Tol1トランスポゼース発現ベクターの模式図を示す。CAGGSはCAGGSプロモーターを、poly Aはポリアデニレーションサイトを、TPase cDNAはTol1トランスポゼースcDNAを示す。

【図7】図7は、抗ヒトインフルエンザM2抗体発現Tol1トランスポゾンベクターを用いた場合の、浮遊性のCHO-K1細胞における抗ヒトインフルエンザM2抗体の発現量を検討した結果を示す。縦軸は抗体産生量($\mu\text{g}/\text{mL}$)、横軸は各細胞の遺伝子導入クローン番号を示す。

40

【図8】図8は、抗ヒトCD98抗体重鎖発現トランスポゾンベクターの模式図を示す。Tol2-Lはleft end Tol2トランスポゾン(配列番号2)、Tol2-Rはright end Tol2トランスポゾン(配列番号3)、PmoはMoloney Murine Leukemia Virus プロモーター、poly Aはポリアデニレーションサイト、Hcは抗ヒトCD98抗体重鎖cDNA(配列番号18)

【図9】図9は、抗ヒトCD98抗体軽鎖発現トランスポゾンベクターの模式図を示す。Tol2-Lはleft end Tol2トランスポゾン(配列番号2)、Tol2-Rはright end Tol2トランスポゾン(配列番号3)、CMVはCMVプロモーター、poly Aはポリアデニレーションサイト、Lcは抗ヒトCD98抗体軽鎖cDNA(配列番号21)を示す。

50

【図10】図10は、シクロヘキシミド耐性遺伝子発現トランスポゾンベクターの模式図を示す。T o l 2 - Lはleft end T o l 2トランスポゾン（配列番号2）、T o l 2 - Rはright end T o l 2トランスポゾン（配列番号3）、C M VはC M Vプロモーター、p o l y Aはポリアデニレーションサイト、C H X - rはシクロヘキシミド耐性遺伝子（配列番号7）を示す。

【図11】図11は、T N F - C H Xタンデムベクターまたは、T N F H - C H XベクターならびにT N F Lベクターを、C H O - K 1細胞へ遺伝子導入した時の、抗ヒトT N F抗体産生量を示す。縦軸は、培地中に産生された抗体濃度（m g / m L）、対照区はコントロール、実験区はE x p .で示す。

【図12】図12は、C D 2 0 - C H Xタンデムベクターまたは、C D 2 0 H - C H XベクターならびにC D 2 0 Lベクターを、C H O - K 1細胞へ遺伝子導入した時の、抗ヒトC D 2 0抗体産生量を示す。縦軸は、培地中に産生された抗体濃度（m g / m L）、対照区はコントロール、実験区はE x p .で示す。

【図13】図13は、抗体発現ベクターAの構造を示す。図13中、T o l 2 - LはT o l 2 - L配列（配列番号2）からなるD N A断片を、T o l 2 - RはT o l 2 - R配列（配列番号3）からなるD N A断片を、C M VはC M Vプロモーターを、p o l y Aはポリアデニレーションサイトを、H cは抗ヒトC D 9 8抗体の重鎖遺伝子を、L cは抗ヒトC D 9 8抗体軽鎖遺伝子を、S OはS V 4 0プロモーターを、S VはS V 4 0ポリアデニレーションサイトを、N e o - rはネオマイシン耐性遺伝子を示す。

【発明を実施するための形態】

【0030】

本発明は、目的タンパク質をコードするD N Aを含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む少なくとも1種類の発現ベクターを哺乳動物細胞に導入し、一对（二つ）のトランスポゾン配列の間に挿入された目的タンパク質をコードするD N Aを含む遺伝子断片を浮遊性の哺乳動物細胞の染色体に組み込む方法、該タンパク質を生産する哺乳動物細胞を浮遊培養して該タンパク質を生産する方法、および該タンパク質を発現する浮遊性の哺乳動物細胞に関する。

【0031】

本発明の目的タンパク質を生産する方法（以下、本発明の方法ともいう。）としては、以下の工程（A）～（C）を含む、目的タンパク質を生産する方法を挙げることができる。

工程（A）以下の発現ベクター（a）および（b）を浮遊性の哺乳動物細胞に同時に導入する工程

（a）目的タンパク質をコードするD N Aを含む遺伝子断片を含み、該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む少なくとも1種類の発現ベクター

（b）トランスポゾン配列を認識し、且つ一对のトランスポゾン配列の間に挿入された遺伝子断片を染色体に転移させる活性を有するトランスポゼースをコードするD N Aを含むベクター

工程（B）工程（A）で浮遊性の動物細胞に導入した発現ベクター（b）によりトランスポゼースを一過性発現させて、一对のトランスポゾン配列の間に挿入された目的タンパク質をコードするD N Aを含む遺伝子断片を前記哺乳動物細胞の染色体に組み込み、目的タンパク質を発現する浮遊性の哺乳動物細胞を得る工程

工程（C）工程（B）で得られた目的タンパク質を発現する浮遊性の哺乳動物細胞を浮遊培養して、目的タンパク質を生産させる工程

【0032】

また、本発明は、目的タンパク質をコードするD N Aを含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む少なくとも1種類の発現ベクターが導入され、一对のトランスポゾン配列の間に挿入された該遺伝子断片が染色体に組み込まれ、且つ該目的タンパク質を生産する浮遊性の哺乳動物細胞に関する。

【0033】

本発明において、目的タンパク質とは1つ以上のポリペプチドからなるタンパク質であり、本発明の方法によれば少なくとも1種類の目的タンパク質を発現させること、および/または少なくとも1つのポリペプチドを発現させることのいずれも行なうことができる。

【0034】

目的タンパク質をコードするDNAを含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む少なくとも1種類の発現ベクターとは、1種類または2種類以上の該発現ベクターをいう。具体的には複数のポリペプチドからなる目的タンパク質を発現させるためには、各ポリペプチドをコードするDNAを含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む複数の発現ベクターを用いることとなる。

10

【0035】

より具体的には、例えば、上記複数のポリペプチドからなる目的タンパク質が抗体である場合には、抗体のH鎖およびL鎖を1種類の発現ベクターで発現させてもよいし、H鎖を発現するベクターおよびL鎖を発現するベクターの2種類の発現ベクターを用いて発現させてもよい。

【0036】

本発明の方法によれば、目的タンパク質をコードするDNAを含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む少なくとも1種類の発現ベクターが導入され、一对のトランスポゾン配列の間に挿入された該遺伝子断片が染色体に組込まれ、且つ該目的タンパク質を生産する浮遊性の哺乳動物細胞を用いて目的タンパク質を製造することができる。

20

【0037】

遺伝子挿入の指標とされる選択マーカー遺伝子は、目的タンパク質をコードするDNAが含まれる発現ベクターと同じベクター上に組み込まれていてもよいし、別のベクターに組み込まれていてもよい。

【0038】

すなわち、目的タンパク質をコードするDNAを含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクターの少なくとも1つを、目的タンパク質をコードするDNAおよび選択マーカー遺伝子を含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクターとしてもよい。

30

【0039】

また、目的タンパク質をコードするDNAを含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクターに加えて、さらに選択マーカー遺伝子を含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクターを哺乳動物細胞に導入してもよい。

【0040】

具体的には、本発明の目的タンパク質を生産する方法としては、以下の工程(A)~(C)を含む、目的タンパク質を生産する方法を挙げることができる。

工程(A)以下の発現ベクター(a)および(b)を浮遊性の哺乳動物細胞に同時に導入する工程

40

(a)目的タンパク質をコードするDNAと選択マーカー遺伝子を含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含むタンパク質発現ベクター

(b)トランスポゾン配列を認識し、且つ一对のトランスポゾン配列の間に挿入された遺伝子断片を染色体に転移させる活性を有するトランスポゼースをコードするDNAを含むベクター

工程(B)工程(A)で浮遊性の動物細胞に導入した発現ベクター(b)によりトランスポゼースを一過性発現させて、一对のトランスポゾン配列の間に挿入された前記遺伝子断片を該哺乳動物細胞の染色体に組込み、目的タンパク質を発現する浮遊性の哺乳動物細胞を得る工程

50

工程（Ｃ）工程（Ｂ）で得られた目的タンパク質を発現する浮遊性の哺乳動物細胞を浮遊培養して、目的タンパク質を生産させる工程

【００４１】

また、本発明の目的タンパク質を生産する方法としては、以下の工程（Ａ）～（Ｃ）を含む、目的タンパク質を生産する方法を挙げることができる。

工程（Ａ）以下の発現ベクター（ａ）、（ｂ）および（ｃ）を浮遊性の哺乳動物細胞に同時に導入する工程

（ａ）目的タンパク質をコードするＤＮＡを含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む少なくとも１種類の発現ベクター

（ｂ）選択マーカー遺伝子の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクター

（ｃ）トランスポゾン配列を認識し、且つ一对のトランスポゾン配列の間に挿入された遺伝子断片を染色体に転移させる活性を有するトランスポゼースをコードするＤＮＡを含むベクター

工程（Ｂ）工程（Ａ）で浮遊性の動物細胞に導入した発現ベクター（ｃ）によりトランスポゼースを一過性発現させて、一对のトランスポゾン配列の間に挿入された前記遺伝子断片を該哺乳動物細胞の染色体に組み込み、目的タンパク質を発現する浮遊性の哺乳動物細胞を得る工程

工程（Ｃ）工程（Ｂ）で得られた目的タンパク質を発現する浮遊性の哺乳動物細胞を浮遊培養して、目的タンパク質を生産させる工程

【００４２】

本発明は、目的タンパク質をコードするＤＮＡを含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む少なくとも１種類の発現ベクター、および選択マーカー遺伝子の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクターが導入され、一对のトランスポゾン配列の間に挿入された該遺伝子断片および選択マーカー遺伝子が染色体に組み込まれ、且つ該目的タンパク質を生産する浮遊性の哺乳動物細胞に関する。

【００４３】

また、本発明は、目的タンパク質をコードするＤＮＡおよび選択マーカー遺伝子を含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子の両端に一对のトランスポゾン配列を含むタンパク質発現ベクターが導入され、一对のトランスポゾン配列の間に挿入された該遺伝子断片が染色体に組み込まれ、且つ該目的タンパク質を生産する浮遊性の哺乳動物細胞に関する。

【００４４】

また、本発明の目的タンパク質を生産する哺乳動物細胞としては、目的タンパク質をコードするＤＮＡと選択マーカー遺伝子を含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含むタンパク質発現ベクター（ａ）、および該トランスポゾン配列を認識し、且つ一对のトランスポゾン配列の間に挿入された遺伝子断片を染色体に転移させる活性を有するトランスポゼース（転移酵素）をコードするＤＮＡを含むベクター（ｂ）が同時に導入されることで、該一对のトランスポゾン配列の間に挿入された該遺伝子断片が染色体に組み込まれ、且つ該目的タンパク質を生産する浮遊性の哺乳動物細胞が挙げられる。

【００４５】

本発明において、目的タンパク質をコードするＤＮＡを含む遺伝子断片を含み、該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む、浮遊性の哺乳動物細胞に導入する発現ベクターは、該哺乳動物細胞により目的のタンパク質が発現および製造可能であれば数は制限されないが、好ましくは１～２０種類の発現ベクター、より好ましくは２～１０種類の発現ベクターが挙げられ、例えば、３～８種類の発現ベクター、４～７種類の発現ベクター、１～６種類の発現ベクター、１～５種類の発現ベクター、１～４種類の発現ベクター、１～３種類の発現ベクターが好ましい。

【００４６】

また、本発明の態様としては、目的タンパク質をコードするＤＮＡを含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む少なくとも１種類のタ

10

20

30

40

50

ンパク質発現ベクター (a)、および該トランスポゾン配列を認識し、且つ一對のトランスポゾン配列の間に挿入された遺伝子断片を染色体に転移させる活性を有するトランスポゼースをコードする DNA を含むベクター (b) を浮遊性の哺乳動物細胞に同時に導入することで、該一對のトランスポゾン配列の間に挿入された該遺伝子断片の該哺乳動物細胞の染色体への組込みを増加させる方法、目的タンパク質をコードする DNA を該哺乳動物細胞の染色体に高頻度に組込む方法、および該方法により得られた目的タンパク質を生産する浮遊性の哺乳動物細胞が挙げられる。

【 0 0 4 7 】

本明細書において、「トランスポゾン」とは、転位性遺伝要素であり、一定の構造を保ったまま染色体上を、または染色体から別の染色体へ転位 (t r a n s p o s i t i o n) する遺伝子単位を意味する。

10

【 0 0 4 8 】

トランスポゾンは、遺伝子単位の両端に逆向きまたは同じ向きの繰り返しのトランスポゾン配列 [I n v e r t e d R e p e a t S e q u e n c e (I R 配列) または T e r m i n a l I n v e r t e d R e p e a t S e q u e n c e (T I R 配列) ともいう] および、該トランスポゾン配列を認識して、該トランスポゾン配列の間に存在する遺伝子を転移させるトランスポゼースをコードする塩基配列を含む。

【 0 0 4 9 】

トランスポゾンから翻訳されたトランスポゼースは、トランスポゾンの両端のトランスポゾン配列を認識し、一對のトランスポゾン配列の間に挿入された DNA 断片を切り出し、転移先へ挿入することで、DNA の転移を行うことができる。

20

【 0 0 5 0 】

本明細書において「トランスポゾン配列」とは、トランスポゼースによって認識されるトランスポゾンの塩基配列を意味し、I R 配列または T I R 配列と同義である。該塩基配列を含む DNA は、トランスポゼースの作用により転移 (ゲノム中のほかの位置に挿入) 可能であれば、不完全な繰り返し部分を含んでいてもよく、トランスポゼースに特異的なトランスポゾン配列が存在する。

【 0 0 5 1 】

本発明で用いるトランスポゾン配列は、DNA 型トランスポゾン由来の塩基配列が好ましく、トランスポゼースにより認識される、哺乳動物細胞内で転位可能な天然または人工の一對の DNA 型トランスポゾン由来の塩基配列がより好ましい。

30

【 0 0 5 2 】

DNA 型トランスポゾン由来の塩基配列としては、例えば、メダカ由来の T o l 1 トランスポゾントランスポゾンおよび T o l 2 トランスポゾン、サケ科魚類ゲノムに存在していた非自律性のトランスポゾンから再構築された S l e e p i n g B e a u t y、カエル由来の人工トランスポゾン F r o g P r i n c e 並びに昆虫由来のトランスポゾン P i g g y B a c 由来の塩基配列が挙げられる。

【 0 0 5 3 】

これらの中でも、配列表の配列番号 6 で表される塩基配列からなるメダカ由来 T o l 2 トランスポゾンおよび配列表の配列番号 1 3 で表される塩基配列からなるメダカ由来 T o l 1 トランスポゾン由来の塩基配列が好ましい。

40

【 0 0 5 4 】

一對の T o l 2 トランスポゾン由来の塩基配列としては、配列表の配列番号 6 で表される T o l 2 トランスポゾンの塩基配列の 1 番目から 2 2 2 9 番目の塩基配列および 4 1 4 8 番目から 4 6 8 2 番目の塩基配列が挙げられる。

【 0 0 5 5 】

一對の T o l 2 トランスポゾン由来の塩基配列としては、より好ましくは、配列表の配列番号 1 で表される T o l 2 トランスポゾンの塩基配列における、1 番目から 2 0 0 番目の塩基配列 (配列番号 2) (以下、「T o l 2 - L 配列」と記載する) と、2 2 8 5 番目から 2 7 8 8 番目の塩基配列 (配列番号 3) (以下、T o l 2 - R 配列と記載する) が挙

50

げられる。

【0056】

一对のT o l 1トランスポゾン由来のトランスポゾン配列としては、配列表の配列番号13で表されるT o l 1トランスポゾンの塩基配列の1番目から157番目の塩基配列および1748番目から1855番目の塩基配列が挙げられる。

【0057】

一对のT o l 1トランスポゾン由来のトランスポゾン配列としては、より好ましくは、配列表の配列番号13で表されるT o l 1トランスポゾンの塩基配列における、1番目から200番目の塩基配列（配列番号14）（以下、「T o l 1 - L配列」と記載する）と、1351番目から1855番目の塩基配列（配列番号15）の（以下、T o l 1 - R配列と記載する）が挙げられる。

10

【0058】

本発明に用いるトランスポゾン配列には、上記のトランスポゾン由来のトランスポゾン配列の部分配列を用いること、塩基配列の長さを調節すること、および塩基配列の付加、欠失または置換による改変を行うことにより、転移反応が制御されたトランスポゾン配列も含まれる。

【0059】

本発明の目的タンパク質を生産する方法としては、少なくとも2種類のトランスポゾン配列と少なくとも2種類のトランスポゼースを用いて、少なくとも1種類の目的タンパク質を製造することも含まれる。

20

【0060】

具体的には、例えば、2つのT o l 1トランスポゾン配列に挿入された1つ目の目的タンパク質をコードするDNAを含むベクター、2つのT o l 2トランスポゾン配列に挿入された2つ目の目的タンパク質をコードするDNAを含むベクター、T o l 1トランスポゼース発現ベクターおよびT o l 2トランスポゾン発現ベクターを同時に、または順番に浮遊性の哺乳動物細胞へ導入し、各々の目的タンパク質をコードするDNAを該哺乳動物細胞の染色体へ組み込み、2種類の目的のタンパク質を生産する哺乳動物細胞を取得する工程を含む、タンパク質の製造方法が挙げられる。

【0061】

また、1つ目の目的タンパク質と2つ目の目的タンパク質は同一でもよく、細胞に導入する遺伝子のコピー数を増加させることで、目的タンパク質の生産性を向上させることもできる。

30

【0062】

トランスポゾンの転移反応の制御は、トランスポゼースによるトランスポゾン配列の認識を促進または抑制することによって、転移反応を促進または抑制することができる。また、トランスポゾンの転移反応は、一对（二つ）のトランスポゾン配列の間に含まれる塩基配列の長さを短くすることでその転移反応を増加させることができ、長くすることで転移反応を低下させることができる。よって、複数のタンパク質からなる目的タンパク質を発現・製造する場合は、各タンパク質をコードするDNAを別々の発現ベクターに組み込み、該DNAを宿主細胞の染色体内に組み込み、且つ該目的タンパク質を生産する浮遊性の哺乳動物細胞を作製し、該細胞を用いて目的タンパク質を製造することができる。

40

【0063】

本明細書において「トランスポゼース」とは、トランスポゾン配列を有する塩基配列を認識して、該塩基配列の間に存在する遺伝子断片を染色体上、または染色体から別の染色体へ転位させる酵素を意味する。

【0064】

トランスポゼースとしては、例えば、メダカ由来のT o l 1およびT o l 2、サケ科魚類ゲノムに存在していた非自律性のトランスポゾンから再構築されたS l e e p i n g B e a u t y (S B)、S l e e p i n g B e a u t y 1 1 (S B 1 1)、カエル由来の人工トランスポゾンF r o g P r i n c e (F P)、または昆虫由来のトランスポ

50

ゾン Piggy Back (PB) 由来の酵素が挙げられる。

【0065】

トランスポゼースは、天然型の酵素を用いてもよく、トランスポゼースと同様の転位活性を保持していれば、その一部のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加されていてもよい。トランスポゼースの酵素活性を制御することで、トランスポゾン配列の間に存在する遺伝子断片の転移反応を制御することができる。

【0066】

トランスポゼースと同様の転移活性を保持するかを解析するには、日本国特開2003-235575号公報により開示されている2-コンポーネント解析システムにより測定することができる。

【0067】

具体的には、別々の、Tol2トランスポゼースを欠損したTol2トランスポゾン(Tol2由来非自律性トランスポゾン)を含むプラスミドとTol2トランスポゼースを含むプラスミドを用いて、トランスポゼースの作用により非自律性Tol2エレメントが哺乳動物細胞の染色体内に転移、挿入し得るかを解析することができる。

【0068】

本明細書において「非自律性トランスポゾン」とは、トランスポゾン内に存在するトランスポゼースを欠損し、自律的には転移し得ないトランスポゾンをいう。非自律性トランスポゾンは、トランスポゼースのタンパク質、トランスポゼースのタンパク質をコードするmRNAまたはトランスポゼースのタンパク質をコードするDNAを細胞内に同時に存在させることで、非自律性トランスポゾンのトランスポゾン配列の間に挿入されたDNAを、宿主細胞の染色体内に転移させることができる。

【0069】

トランスポゼース遺伝子とは、トランスポゼースをコードする遺伝子を意味する。哺乳動物細胞での発現効率を向上させるために、該遺伝子の翻訳開始コドンATGの上流に、kozakのコンセンサス配列[Kozak, M. Nucleic Acids Res., 12, 857-872 (1984)]、またはリボソーム結合配列であるシャイン・ダルガルノ(Shine-Dalgarno)配列と開始コドンとの間を適当な距離(例えば6~18塩基)に調節する配列が連結されてもよい。

【0070】

本発明の方法において、少なくとも1種類の発現ベクター中の目的タンパク質をコードするDNAを宿主細胞の染色体に組み込むためには、目的タンパク質をコードするDNAを含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクターを宿主細胞に導入し、該細胞内に導入された発現ベクターに含まれるトランスポゾン配列に対してトランスポゼースを作用させる。

【0071】

宿主細胞内に導入された発現ベクターに含まれるトランスポゾン配列に対してトランスポゼースを作用させるためには、トランスポゼースを該細胞内に注入してもよいし、トランスポゼースをコードするDNAを含む発現ベクターを、少なくとも1種類の目的タンパク質をコードするDNA、または目的タンパク質をコードするDNAおよび選択マーカー遺伝子を含む発現ベクターと共に宿主細胞へ導入してもよい。また、トランスポゼース遺伝子をコードするRNAを宿主細胞内に導入して、トランスポゼースを該細胞内で発現させてもよい。

【0072】

発現ベクターとしては特に限定はなく、トランスポゼース遺伝子を組み込んだ発現ベクターを導入する宿主細胞、用途などに応じて、当業者において知られている発現ベクターから適宜選択して使用することができる。

【0073】

本発明において、2種類以上のポリペプチドから構成される目的タンパク質、または2種類以上の目的タンパク質を生産する場合には、各タンパク質をコードするDNAを同一

10

20

30

40

50

の発現ベクターに組み込むか、またはそれぞれ異なる発現ベクターに組み込み、当該発現ベクターを宿主細胞に導入することにより、該DNAが該細胞の染色体に組み込まれたタンパク質生産細胞を作製することができる。

【0074】

トランスポゼースは、発現ベクターに組み込んで目的タンパク質と一緒に発現させてもよいし、発現ベクターとは別のベクターに組み込んで発現させてもよい。トランスポゼースは一過性に働かせてもよいし、継続的に働かせてもよいが、安定した産生細胞を作製するためにはトランスポゼースを一過性に働かせることが好ましい。

【0075】

トランスポゼースを一過性に働かせる方法としては、例えば、目的タンパク質をコードするDNAを含む発現ベクターとは別の発現ベクターにトランスポゼースをコードするDNAを組み込み、両発現プラスミドを宿主細胞に同時に導入する方法が挙げられる。

10

【0076】

本明細書において「発現ベクター」とは、哺乳動物細胞を形質転換させて目的タンパク質を発現させるために用いる発現ベクターを意味する。本発明で用いる発現ベクターは、発現カセットの両側に少なくとも一対のトランスポゾン配列が存在する構造を有する。

【0077】

本明細書において「発現カセット」とは、目的タンパク質を発現させるために必要な遺伝子発現制御領域および目的タンパク質をコードする配列を有する核酸配列を意味する。該遺伝子発現制御領域としては、例えば、エンハンサー、プロモーターおよびターミネーターなどが挙げられる。発現カセットには、選択マーカー遺伝子を含んでいてもよい。

20

【0078】

プロモーターとしては、哺乳動物細胞中で機能を発揮できるものであればいずれも用いることができる。例えば、サイトメガロウイルス(CMV)のIE(immediate early)遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、SRプロモーター、モロニーマウス白血病ウイルス(moloney murine leukemia virus)のプロモーターおよびエンハンサー等が挙げられる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

【0079】

「選択マーカー遺伝子」とは、プラスミドベクターが導入された細胞と該ベクターを欠く細胞とを区別するために使用することができる任意の他マーカー遺伝子を意味する。

30

【0080】

選択マーカー遺伝子としては、例えば、薬剤耐性遺伝子[ネオマイシン耐性遺伝子、ジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)遺伝子、ピューロマイシン耐性遺伝子、ブラストサイジン耐性遺伝子、ゼオシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子、シクロヘキシミド耐性遺伝子(日本国特開2002-262879号公報)]および蛍光または生体発光マーカー遺伝子(緑色蛍光タンパクGFPなど)などが挙げられる。

【0081】

本発明において、好ましい選択マーカーは薬剤耐性遺伝子であり、特に好ましい選択マーカーはシクロヘキシミド耐性遺伝子である。更に、選択マーカー遺伝子を遺伝子改変してアミノ酸改変体を作製すること、または選択マーカー遺伝子の転写または翻訳を調整すること(例えば、プロモーターの改変およびアミノ酸コドンの改変など)により、選択マーカータンパク質の薬剤耐性能および発光能を変えることもできる。更に、薬剤濃度を調整することで、薬剤耐性強度の異なる選択マーカー遺伝子導入細胞を選択することもできる。

40

【0082】

選択マーカータンパク質の薬剤耐性能および発光能を調整するためには、減弱化した選択マーカー遺伝子を用いることが好ましい。減弱化した選択マーカー遺伝子とは、選択マーカー遺伝子にコードされるタンパク質の細胞内における活性が低くなるように改変され

50

た選択マーカー遺伝子をいう。

【0083】

細胞内における活性が低くなるように改変された選択マーカー遺伝子としては、例えば、(A)選択マーカー遺伝子にコードされるタンパク質のアミノ酸配列の改変により当該タンパク質の細胞内における活性が低くなった選択マーカー遺伝子および(B)選択マーカー遺伝子の発現を制御する塩基配列の改変もしくは選択マーカー遺伝子のORF(Open Reading Frame)内の塩基配列の改変により当該タンパク質の細胞内での発現量が低下した選択マーカー遺伝子が挙げられる。

【0084】

選択マーカー遺伝子にコードされるタンパク質のアミノ酸配列の改変により当該タンパク質の細胞内における活性が低くなった選択マーカー遺伝子としては、例えば、Sauter et al. [Biotech. Bioeng. 89, 530-538 (2005)] または Chen et al. [Journal of Immunological Methods 295, 49-56 (2004)] に記載のネオマイシン耐性遺伝子を挙げることができる。

10

【0085】

選択マーカー遺伝子の発現を制御する塩基配列を改変することにより当該タンパク質の細胞内での発現量を低下させる方法としては、例えば、選択マーカー遺伝子の発現を制御するプロモーター配列、ターミネーター配列、エンハンサー配列、kozakのコンセンサス配列またはシャイン・ダルガルノ配列の配列を改変する方法が挙げられる。より具体的には、例えば、選択マーカー遺伝子の発現を制御するプロモーター配列を、より弱いプロモーター配列に置換する方法が挙げられる。

20

【0086】

選択マーカー遺伝子のORF内の塩基配列の改変により当該タンパク質の細胞内での発現量を低下させる方法としては、例えば、当該ORF内のコドンに当該細胞内での使用頻度がより低い同義語コドンに置換する方法を挙げることができる。

【0087】

本発明の減弱化した選択マーカー遺伝子としては、例えば、上記の当該遺伝子のORF内のコドンに当該細胞内での使用頻度がより低い同義語コドンに置換された選択マーカー遺伝子を挙げることができる。

30

【0088】

様々な生物種の細胞内において、各同義語コドンのうち使用頻度のより低い同義語コドンは、公知の文献またはデータベースなどに基き選択することができる。

【0089】

このような使用頻度の低い同義語コドンへの置換として具体的には、例えば、CHO細胞の場合、ロイシンのコドンをTTAに、アルギニンのコドンをCGAもしくはCGTに、アラニンのコドンをGCGに、パリンのコドンをGTAに、セリンのコドンをTCGに、イソロイシンのコドンをATAに、スレオニンのコドンをACGに、プロリンをCCGに、グルタミン酸のコドンをGAAに、チロシンのコドンをTATに、リジンのコドンをAAAに、フェニルアラニンのコドンをTTTに、ヒスチジンのコドンをCATに、グルタミンのコドンをCAAに、アスパラギンのコドンをAATに、アスパラギン酸のコドンをGATに、システインのコドンをTGTに、またはグリシンのコドンをGGTに、置換することをいう。

40

【0090】

減弱化した選択マーカー遺伝子において、改変前の選択マーカー遺伝子と比べて置換されるコドンの数は、タンパク質の生産細胞を効率的に取得しうる限り特に制限はないが、20個以上のアミノ酸残基に対応するコドンを置換することが好ましい。

【0091】

減弱化した選択マーカー遺伝子において、改変前の選択マーカー遺伝子と比べて改変される塩基の数は、特に制限はないが、選択マーカー遺伝子をコードする塩基配列の10%

50

以上を改変することが好ましい。

【0092】

また、減弱化した選択マーカー遺伝子において置換するコドンのコードするアミノ酸残基は、特に制限はないが、好ましくはロイシン、アラニン、セリンおよびバリンを挙げることができる。

【0093】

減弱化した選択マーカー遺伝子において、ロイシン残基に対応するコドンを置換する場合は、特に制限はないが、選択マーカー遺伝子に含まれる全てのロイシン残基に対応するコドンのうち、70%以上のロイシン残基に対応するコドンを置換することが好ましい。

【0094】

また減弱化した選択マーカー遺伝子において、アラニン残基に対応するコドンを置換する場合は、特に制限はないが、選択マーカー遺伝子に含まれる全てのアラニン残基に対応するコドンのうち、70%以上のアラニン残基に対応するコドンを置換することが好ましい。

【0095】

このような使用頻度の低い同義語コドンに置換することにより改変して得られる、減弱化した選択マーカー遺伝子の例として具体的には、配列番号37、38または39で表される塩基配列からなるネオマイシン耐性遺伝子、配列番号41、43または44で表される塩基配列からなるピューロマイシン耐性遺伝子、配列番号45または46で表される塩基配列からなるゼオシン耐性遺伝子、配列番号47または48で表される塩基配列からなるハイグロマイシン耐性遺伝子を挙げることができる。

【0096】

さらに、抗体生産細胞の作製において薬剤耐性細胞を選択する際の薬剤の濃度を通常用いられる濃度に比べ、著しく高くすること、もしくは薬剤耐性遺伝子が薬剤を代謝・分解する前に追加投与することなどによっても、選択マーカー遺伝子を減弱化することが可能である。

【0097】

シクロヘキシミド（以下、CHXと略記する場合もある）はタンパク質合成阻害剤であり、CHX耐性遺伝子を選択マーカーとした利用例としては、酵母[Kondo K. J. Bacteriol., 177, 24, 7171-7177 (1995)]、動物細胞（日本国特開2002-262879号公報）の例が知られている。

【0098】

動物細胞では、配列表の配列番号5で表される塩基配列でコードされるヒトリボソームタンパク質サブユニットのL36aの54位のプロリンがグルタミンに置換された、配列表の配列番号7で表される塩基配列でコードされるタンパク質を発現させた形質転換株が、シクロヘキシミドに対する耐性を付与することが明らかとなっている。また、シクロヘキシミド耐性マーカーとしては、例えば、ヒトリボソームタンパク質サブユニットL44の54位のプロリンがグルタミンに置換された変異ヒトリボソームタンパク質サブユニットL44が挙げられる。

【0099】

宿主細胞に、上記のトランスポゾン配列を含むタンパク質発現ベクター、トランスポゼースを発現するプラスミドベクターまたはRNAを導入する方法としては、特に限定はなく、例えば、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法、リボソーム法、ジーンガン法およびリポフェクション法などが挙げられる。

【0100】

トランスポゼースを直接タンパク質として導入する方法としては、例えば、マイクロインジェクション法およびエンドサイトーシスによる細胞への供給が挙げられる。遺伝子導入は、例えば、新遺伝子工学ハンドブック、村松正實・山本雅ノ編、羊土社、ISBN 9784897063737に記載の方法で実施できる。

【0101】

宿主細胞としては、継代培養が可能で安定的に目的タンパク質を発現することができる哺乳動物細胞が挙げられる。宿主細胞としては、例えば、PER.C6細胞、ヒト白血病細胞 Namalwa細胞、サル細胞COS細胞、ラットミエローマ細胞YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20（またはYB2/0ともいう）、マウスミエローマ細胞NS0、マウスミエローマ細胞SP2/0-Ag14、シリアンハムスター細胞BHK、HBT5637（日本国特開昭63-000299号公報）チャイニーズ・ハムスター卵巣細胞CHO細胞[Journal of Experimental Medicine, 108, 945 (1958); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 60 1275 (1968); Genetics, 55, 513 (1968); Chromosoma, 41, 129 (1973); Methods in Cell Science, 18, 115 (1996); Radiation Research, 148, 260 (1997); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216 (1980); Proc. Natl. Acad. Sci., 60, 1275 (1968); Cell, 6, 121 (1975); Molecular Cell Genetics, Appendix I, II (pp. 883-900)]、CHO/DG44、CHO-K1 (ATCC CCL-61)、DUKXB11 (ATCC CCL-9096)、Pro-5 (ATCC CCL-1781)、CHO-S (Life Technologies, Cat # 11619)、Pro-3およびCHO細胞の亜株が挙げられる。

10

【0102】

また、上記の宿主細胞は、染色体DNAの改変および外来性遺伝子の導入等により、タンパク質の生産に適するように改変して、本発明のタンパク質の生産方法に用いることもできる。

20

【0103】

更に、宿主細胞として、生産する目的タンパク質に結合した糖鎖構造を制御するために、レクチン耐性を獲得したLec13 [Somatic Cell and Molecular genetics, 12, 55 (1986)]、1,6-フコース転移酵素遺伝子が欠損したCHO細胞（国際公開第05/35586号、国際公開第02/31140号）、GDP-mannose 4,6-dehydratase (GMD) が欠損した細胞およびF_xタンパク質が欠損した細胞を用いることもできる。

30

【0104】

本発明において目的タンパク質とは、少なくとも1種類のポリペプチドからなるタンパク質、複数のポリペプチドまたはタンパク質からなる複合タンパク質何れをも含む。また、本発明においてタンパク質とポリペプチドは同義であるが、比較的分子量のタンパク分子または複合タンパク質を構成するタンパク質をポリペプチドとして定義することもある。

【0105】

本発明において目的タンパク質は、本発明の方法により発現可能であれば、いかなるタンパク質、ポリペプチドでもよい。具体的には、例えば、ヒト血清タンパク質、アルブミン結合タンパク質、ペプチドホルモン、増殖因子、サイトカイン、血液凝固因子、線溶系タンパク質、抗体、選択マーカータンパク質、膜タンパク質および各種タンパク質の部分断片などが挙げられる。具体的には、例えば、ヒト静脈イムノグロブリン (IVIg)、エリスロポイエチン (EPO)、アルブミン、成長ホルモン (GH)、卵巣刺激ホルモン (FSH)、肝細胞増殖因子 (HGF)、インスリン、インスリン様増殖因子-I (IGF-I)、インターフェロン (INF)、Fasリガンド、血液凝固因子 (II、VII、VIII、IX、X)、プロトロンビン、フィブリノーゲン、プロテインC、プロテインS、アンチトロンビンIII (ATIII)、組織プラスミノゲンアクチベーター (tPA)、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体および薬剤選択 (耐性) 遺伝子などが挙げられる。

40

【0106】

抗体とは、抗体重鎖 (H鎖) ポリペプチドと2本の抗体軽鎖 (L鎖) ポリペプチドから

50

なる分子であり、I g A、I g D、I g E、I g GおよびI g Mサブクラスが知られている。更にI g GはI g G 1、I g G 2、I g G 3およびI g G 4クラスに分類される。

【0107】

I g G抗体は2本のH鎖ポリペプチドと2本のL鎖ポリペプチドからなるヘテロテトラマー分子である。H鎖およびL鎖はそれぞれ抗原結合に關与する可変領域(V)および定常領域(C)からなり、VH、CH、VLまたはCLと呼ばれる。CH領域は更にCH1、CH2、CH3領域に分類され、CH2およびCH3領域を合わせてFc領域または単にFcと呼ばれる。

【0108】

抗体には、単一のエピトープに反応するモノクローナル抗体、複数のエピトープに反応するポリクローナル抗体、遺伝子組換え抗体が包含される。

10

【0109】

モノクローナル抗体とは、単一クローンの抗体産生細胞が分泌する抗体であり、ただ一つのエピトープ(抗原決定基ともいう)を認識し、モノクローナル抗体を構成するアミノ酸配列(1次構造)が均一である。

【0110】

ポリクローナル抗体とは、モノクローナル抗体の混合物であり、複数のエピトープに反応することができる。

【0111】

遺伝子組み換え抗体としては、例えば、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、Fc融合タンパク質、Fcアミノ酸改変抗体、多価抗体および該部分断片などが挙げられる。アミノ酸改変抗体は、可変領域または定常領域いずれの部分にアミノ酸残基改変が施されていてもよく、抗体の活性が制御されている。

20

【0112】

多価抗体には、1つの抗原上の2つ以上の異なるエピトープに反応する多価抗体、2つ以上の異なる抗原に反応する多価抗体等があるがいずれのものでもよい。また抗原への結合活性を維持した多価抗体であればいずれの構造の多価抗体でもよい(国際公開第2001/77342号、米国特許第7,612,181号明細書、国際公開第2009/131239号)。

【0113】

本発明の製造方法によれば、上述のいずれの目的タンパク質および/または目的ペプチドを発現、製造することができる。

30

【0114】

本発明の少なくとも1種類の目的タンパク質をコードするDNAが導入された細胞としては、以下の(A)および(B)の工程により製造にされる抗体産生細胞が挙げられる。工程(A) 以下の(a)~(c)から選ばれる1の発現ベクターの組み合わせまたは発現ベクター(d)、および発現ベクター(e)を浮遊性の哺乳動物細胞に同時に導入する工程

(a)抗体のH鎖をコードするDNAを含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクター、抗体のL鎖をコードするDNAを含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクターおよび選択マーカー遺伝子をコードするDNAを含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクター

40

(b)抗体のH鎖をコードするDNAおよび選択マーカー遺伝子をコードするDNAを含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクター、ならびに抗体のL鎖をコードするDNAを含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクター

(c)抗体のL鎖をコードするDNAおよび薬剤耐性遺伝子をコードするDNAを含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクター、ならびに抗体のH鎖をコードするDNAを含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断

50

片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクター

(d) 抗体のH鎖、L鎖および選択マーカー遺伝子をコードするDNAを含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクター

(e) トランスポゾン配列を認識し、且つ一对のトランスポゾン配列の間に挿入された遺伝子断片を染色体に転移させる活性を有するトランスポゼースをコードするDNAを含むベクター

工程(B) 工程(A)で浮遊性の哺乳動物細胞に導入した発現ベクター(e)によりトランスポゼースを一過性発現させて、一对のトランスポゾン配列の間に挿入された前記H鎖、L鎖および選択マーカー遺伝子が前記哺乳動物細胞の染色体に組み込まれた、抗体を発現する浮遊性の哺乳動物細胞を選択する工程

【0115】

本発明の抗体を製造する方法としては、以下の工程(A)~(C)を含む、目的タンパク質を生産する方法を挙げることができる。

工程(A) 以下の(a)~(c)から選ばれる1の発現ベクターの組み合わせまたは発現ベクター(d)、および発現ベクター(e)を浮遊性の哺乳動物細胞に同時に導入する工程

(a) 抗体のH鎖をコードするDNAを含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクター、抗体のL鎖をコードするDNAを含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクターおよび選択マーカー遺伝子をコードするDNAを含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクター

(b) 抗体のH鎖をコードするDNAおよび薬剤耐性遺伝子をコードするDNAを含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクター、ならびに抗体のL鎖をコードするDNAを含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクター

(c) 抗体のL鎖をコードするDNAおよび選択マーカー遺伝子をコードするDNAを含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクター、ならびに抗体のH鎖をコードするDNAを含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクター

(d) 抗体のH鎖、L鎖および選択マーカー遺伝子をコードするDNAを含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクター

(e) トランスポゾン配列を認識し、且つ一对のトランスポゾン配列の間に挿入された遺伝子断片を染色体に転移させる活性を有するトランスポゼースをコードするDNAを含むベクター

工程(B) 工程(A)で浮遊性の哺乳動物細胞に導入した発現ベクター(e)によりトランスポゼースを一過性発現させて、一对のトランスポゾン配列の間に挿入された前記H鎖、L鎖および選択マーカー遺伝子を前記哺乳動物細胞の染色体に組み込み、抗体を発現する浮遊性の哺乳動物細胞を得る工程工程(C) 工程(B)で得られた抗体を発現する浮遊性の哺乳動物細胞を浮遊培養して、抗体を生産させる工程

【0116】

また、本発明は、以下の(A)および(B)の工程を含む抗体高生産株の製造方法およびスクリーニング方法を含む。

工程(A) 以下の(a)~(c)から選ばれる1の発現ベクターの組み合わせまたは発現ベクター(d)、および発現ベクター(e)を浮遊性の哺乳動物細胞に同時に導入する工程

(a) 抗体のH鎖をコードするDNAを含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクター、抗体のL鎖をコードするDNAを含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクターおよび選択マーカー遺伝子をコードするDNAを含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクター

10

20

30

40

50

(b) 抗体のH鎖をコードするDNAおよび選択マーカー遺伝子をコードするDNAを含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクター、ならびに抗体のL鎖をコードするDNAを含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクター

(c) 抗体のL鎖をコードするDNAおよび選択マーカー遺伝子をコードするDNAを含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクター、ならびに抗体のH鎖をコードするDNAを含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクター

(d) 抗体のH鎖、L鎖および選択マーカー遺伝子をコードするDNAを含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクター

(e) トランスポゾン配列を認識し、且つ一对のトランスポゾン配列の間に挿入された遺伝子断片を染色体に転移させる活性を有するトランスポゼースをコードするDNAを含むベクター

工程(B) 工程(A)で浮遊性の哺乳動物細胞に導入した発現ベクター(e)によりトランスポゼースを一過性発現させて、一对のトランスポゾン配列の間に挿入された前記H鎖、L鎖および選択マーカー遺伝子が前記哺乳動物細胞の染色体に組み込まれ、抗体を高発現する浮遊性の哺乳動物細胞を選択する工程

【0117】

更に、本発明は、以下の(A)、(B)および(C)の工程を含む抗体製造方法を含む。

工程(A) 以下の(a)~(c)から選ばれる1の発現ベクターの組み合わせまたは発現ベクター(d)、および発現ベクター(e)を浮遊性の哺乳動物細胞に同時に導入する工程

(a) 抗体のH鎖をコードするDNAを含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクター、抗体のL鎖をコードするDNAを含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクターおよび選択マーカー遺伝子をコードするDNAを含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクター

(b) 抗体のH鎖をコードするDNAおよび選択マーカー遺伝子をコードするDNAを含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクター、ならびに抗体のL鎖をコードするDNAを含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクター

(c) 抗体のL鎖をコードするDNAおよび選択マーカー遺伝子をコードするDNAを含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクター、ならびに抗体のH鎖をコードするDNAを含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクター

(d) 抗体のH鎖、L鎖および選択マーカー遺伝子をコードするDNAを含む遺伝子断片を含み、且つ該遺伝子断片の両端に一对のトランスポゾン配列を含む発現ベクター

(e) トランスポゾン配列を認識し、且つ一对のトランスポゾン配列の間に挿入された遺伝子断片を染色体に転移させる活性を有するトランスポゼースをコードするDNAを含むベクター

工程(B) 工程(A)で浮遊性の哺乳動物細胞に導入した発現ベクター(e)によりトランスポゼースを一過性発現させて、一对のトランスポゾン配列の間に挿入された前記H鎖、L鎖および選択マーカー遺伝子を前記哺乳動物細胞の染色体に組み込み、抗体を発現する浮遊性の哺乳動物細胞を得る工程

工程(C) 工程(B)で得られた抗体を発現する浮遊性の哺乳動物細胞を浮遊培養して、抗体を生産させる工程

【0118】

本発明の少なくとも1種類の目的タンパク質をコードするDNAが導入された哺乳動物細胞としては、例えば、複数の異なる抗体遺伝子が導入されたポリクローナル抗体産生細胞

胞および複合体分子産生細胞などが挙げられる。

【0119】

ポリクローナル抗体産生細胞としては、例えば、1つの抗原に対する少なくとも2種類以上の異なるモノクローナル抗体遺伝子が導入された細胞、複数の抗原に対する複数のモノクローナル抗体遺伝子が導入された細胞、抗原が免疫された非ヒト動物由来抗体遺伝子ライブラリーが導入された細胞および患者由来抗体遺伝子ライブラリーが導入された細胞などが挙げられる。

【0120】

複合体分子生産細胞は、細胞内で共発現させた個々の分子が複合体分子を形成するタンパク質をコードするDNAが導入された細胞であればいずれのものでもよい。具体的には、例えば、FcRIII(CD16)とcommon鎖が共導入された細胞、neonatal Fc receptor(FcRn)と2マクログロブリンが共導入された細胞、およびCD98とLAT1が共導入された細胞(国際公開第2007/114496号)などが挙げられる。

10

【0121】

本発明の抗体製造方法によって製造される抗体はいずれの抗体でもよく、例えば、腫瘍関連抗原を認識する抗体、アレルギーまたは炎症に関連する抗原を認識する抗体、循環器疾患に関連する抗原を認識する抗体、自己免疫疾患に関連する抗原を認識する抗体、およびウイルスまたは細菌感染に関連する抗原を認識する抗体などが挙げられる。

【0122】

腫瘍関連抗原としては、例えば、CD1a、CD2、CD3、CD4、CD5、CD6、CD7、CD9、CD10、CD13、CD19、CD20、CD21、CD22、CD25、CD28、CD30、CD32、CD33、CD38、CD40、CD40 ligand(CD40L)、CD44、CD45、CD46、CD47、CD52、CD54、CD55、CD55、CD59、CD63、CD64、CD66b、CD69、CD70、CD74、CD80、CD89、CD95、CD98、CD105、CD134、CD137、CD138、CD147、CD158、CD160、CD162、CD164、CD200、CD227、adrenomedullin、angiopoietin related protein 4(ARP4)、aurora、B7-H1、B7-DC、integrin、bone marrow stromal antigen 2(BST2)、CA125、CA19.9、carbonic anhydrase 9(CA9)、cadherin、cc-chemokine receptor(CCR)4、CCR7、carcinoembryonic antigen(CEA)、cysteine-rich fibroblast growth factor receptor-1(CFR-1)、c-Met、c-Myc、collagen、CTA、connective tissue growth factor(CTGF)、CTLA-4、cytokeratin-18、DF3、E-cadherin、epidermal growth factor receptor(EGFR)、EGFRvIII、EGFR2(HER2)、EGFR3(HER3)、EGFR4(HER4)、endoglin、epithelial cell adhesion molecule(EpCAM)、endothelial protein C receptor(EPCR)、ephrin、ephrin receptor(Eph)、EphA2、endotheliasin-2(ET2)、FAM3D、fibroblast activating protein(FAP)、Fc receptor homolog 1(FcRH1)、ferritin、fibroblast growth factor-8(FGF-8)、FGF8 receptor、basic FGF(bFGF)、bFGF receptor、FGF receptor(FGFR)3、FGFR4、FLT1、FLT3、folate receptor、Frizzled homolog 10(FZD10)、frizzled receptor 4(FZD-4)、G250、G-CSF receptor、gangl

20

30

40

50

ioside (例えば、GD2、GD3、GM2およびGM3等)、globo H、gp75、gp88、GPR-9-6、heparanase I、hepatocyte growth factor (HGF)、HGF receptor、HLA antigen (例えば、HLA-DR等)、HM1.24、human milk fat globule (HMFG)、hRS7、heat shock protein 90 (hsp90)、idiotype epitope、insulin-like growth factor (IGF)、IGF receptor (IGFR)、interleukin (例えば、IL-6およびIL-15等)、interleukin receptor (例えば、IL-6RおよびIL-15R等)、integrin、immune receptor translocation associated-4 (IRTA-4)、kallikrein 1、KDR、KIR2DL1、KIR2DL2/3、KS1/4、lamp-1、lamp-2、laminin-5、Lewis y、sialyl Lewis x、lymphotoxin-beta receptor (LTBR)、LUNX、melanoma-associated chondroitin sulfate proteoglycan (MCSP)、mesothelin、MICA、Mullerian inhibiting substance type II receptor (MISIR)、mucin、neural cell adhesion molecule (NCAM)、Nectin-5、Notch 1、osteopontin、platelet-derived growth factor (PDGF)、PDGF receptor、platelet factor-4 (PF-4)、phosphatidylserine、Prostate Specific Antigen (PSA)、prostate stem cell antigen (PSCA)、prostate specific membrane antigen (PSMA)、Parathyroid hormone related protein/peptide (PTHrP)、receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL)、receptor for hyaluronic acid mediated motility (RHAMM)、ROBO1、SART3、semaphorin 4B (SEMA4B)、secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI)、SM5-1、sphingosine-1-phosphate、tumor-associated glycoprotein-72 (TAG-72)、transferin receptor (TfR)、TGF-beta、Thy-1、Tie-1、Tie2 receptor、T cell immunoglobulin domain and mucin domain 1 (TIM-1)、human tissue factor (hTF)、Tn antigen、tumor necrosis factor (TNF)、Thomsen-Friedenreich antigen (TF antigen)、TNF receptor、tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)、TRAIL receptor (例えば、DR4およびDR5等)、system ASC amino acid transporter 2 (ASCT2)、trkC、TROP-2、TWEAK receptor Fn14、type IV collagenase、urokinase receptor、vascular endothelial growth factor (VEGF)、VEGF receptor (例えば、VEGFR1、VEGFR2およびVEGFR3等)、vimentinおよびVLA-4等が挙げられ、これら抗原に対する抗体などが挙げられる。

【0123】

更に腫瘍関連抗原を認識する抗体としては、例えば、抗GD2抗体 [Anticancer Res., 13, 331 (1993)]、抗GD3抗体 [Cancer Immunol. Immunother., 36, 260 (1993)]、抗GM2抗体 [Can

cer Res., 54, 1511 (1994)]、抗CD52抗体 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 4285 (1992)]、抗MAGE抗体 [British J. Cancer, 83, 493 (2000)]、抗HM1.24抗体 [Molecular Immunol., 36, 387 (1999)]、抗副甲状腺ホルモン関連蛋白 (PTHrP)抗体 [Cancer, 88, 2909 (2000)]、抗bFGF抗体、抗FGF-8抗体 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 9911 (1989)]、抗bFGFR抗体、抗FGFR1抗体 (国際公開第2005/037235号)、抗FGF-8R抗体 [J. Biol. Chem., 265, 16455 (1990)]、抗IGF抗体 [J. Neurosci. Res., 40, 647 (1995)]、抗IGF-IR抗体 [J. Neurosci. Res), 40, 647 (1995)]、抗PSMA抗体 [J. Urology, 160, 2396 (1998)]、抗VEGF抗体 [Cancer Res), 57, 4593 (1997)、Avastin^(R)]、抗VEGFR抗体 [Oncogene, 19, 2138 (2000)、国際公開第96/30046号]、抗CD20抗体 [Curr. Opin. Oncol., 10, 548 (1998)、US5,736,137、Rituxan^(R)、Ocrelizumab、Ofatumumab]、抗EGFR抗体 (Erbix^(R)、Vectivix^(R))、抗HER2抗体 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 4285 (1992)、US5,725,856、Herceptin^(R)、Pertuzumab)、抗HER3抗体 (US2008/0124345)、c-Met抗体 (US6,468,529)、抗CD10抗体、抗EGFR抗体 (国際公開第96/402010号)、抗Apo-2R抗体 (国際公開第98/51793号)、抗ASCT2抗体 (国際公開第2010/008075号)、抗CEA抗体 [キャンサー・リサーチ (Cancer Res.), 55 (23 suppl): 5935s-5945s, (1995)]、抗CD38抗体、抗CD33抗体、抗CD22抗体、抗CD20アミノ酸改変抗体 (Immunology, 115, 4393, 2010.)、抗EpCAM抗体、抗A33抗体および抗葉酸受容体抗体 (MRAb-003)などが挙げられる。

【0124】

アレルギーまたは炎症に関連する抗原を認識する抗体としては、例えば、抗インターロイキン6抗体 [Immunol. Rev., 127, 5 (1992)]、抗インターロイキン6受容体抗体 [Molecular Immunol., 31, 371 (1994)、Actemura^(R)]、抗インターロイキン5抗体 [Immunol. Rev., 127, 5 (1992)]、抗インターロイキン5受容体抗体、抗インターロイキン4抗体 [Cytokine, 3, 562 (1991)]、抗インターロイキン4受容体抗体 [J. Immunol. Methods, 217, 41 (1998)]、抗腫瘍壊死因子抗体 [Hybridoma, 13, 183 (1994)、Humira^(R)]、抗腫瘍壊死因子受容体抗体 [Molecular Pharmacol., 58, 237 (2000)]、抗CCR4抗体 [Nature, 400, 776, (1999)]、抗ケモカイン抗体 (Periet al., J. Immunol. Meth., 174, 249-257, 1994)および抗ケモカイン受容体抗体 [J. Exp. Med., 186, 1373 (1997)]などが挙げられる。循環器疾患に関連する抗原を認識する抗体としては、例えば、抗GPIIb/IIIa抗体 [J. Immunol., 152, 2968 (1994)]、抗血小板由来増殖因子抗体 [サイエンス (Science), 253, 1129 (1991)]、抗血小板由来増殖因子受容体抗体 [J. Biol. Chem., 272, 17400 (1997)]、抗血液凝固因子抗体 [Circulation, 101, 1158 (2000)]、抗IgE抗体、抗V₃抗体およびV₄抗体などが挙げられる。

【0125】

ウイルスまたは細菌感染に関連する抗原を認識する抗体としては、例えば、抗gp120抗体 [Structure, 8, 385 (2000)]、抗CD4抗体 [J. Rheumatology, 25, 2065 (1998)]、抗CCR5抗体、抗ペロ毒素抗体 [

10

20

30

40

50

J. Clin. Microbiol., 37, 396 (1999)] および抗M2抗体 (日本国特開2003-235575号公報) などが挙げられる。

【0126】

本発明の方法により生産されるモノクローナル抗体のエフェクター活性は、種々の方法で制御することができる。例えば、抗体のFc領域の297番目のアスパラギン (Asn) に結合するN結合複合型糖鎖の還元末端に存在するN-アセチルグルコサミン (GlcNAc) に 1, 6 結合するフコース (コアフコースともいう) の量を制御する方法 (国際公開第05/035586号、国際公開第02/31140号、国際公開第00/61739号) および抗体のFc領域のアミノ酸残基を改変することで制御する方法などが知られている。本発明の方法により生産されるモノクローナル抗体にはいずれの方法を用いても、エフェクター活性を制御することができる。

10

【0127】

「エフェクター活性」とは、抗体のFc領域を介して引き起こされる抗体依存性の活性をいい、抗体依存性細胞傷害活性 (ADCC活性)、補体依存性傷害活性 (CDC活性)、またはマクロファージ若しくは樹状細胞などの食細胞による抗体依存性ファゴサイトーシス (Antibody-dependent phagocytosis、ADP活性) などが知られている。

【0128】

また、本発明の方法により生産されるモノクローナル抗体のFc領域のN結合複合型糖鎖のコアフコースの含量を制御することで、抗体のエフェクター活性を増加または低下させることができる。

20

【0129】

抗体のFc領域に結合しているN結合複合型糖鎖に結合するフコースの含量を低下させる方法としては、1, 6-フコース転移酵素遺伝子が欠損したCHO細胞を用いて抗体を発現することで、フコースが結合していない抗体を取得することができる。フコースが結合していない抗体は高いADCC活性を有する。

【0130】

一方、抗体のFcに結合しているN結合複合型糖鎖に結合するフコースの含量を増加させる方法としては、1, 6-フコース転移酵素遺伝子を導入した宿主細胞を用いて抗体を発現させることで、フコースが結合している抗体を取得できる。フコースが結合している抗体は、フコースが結合していない抗体よりも低いADCC活性を有する。

30

【0131】

また、抗体のFc領域のアミノ酸残基を改変することでADCC活性またはCDC活性を増加または低下させることができる。例えば、米国特許出願公開第2007/0148165号明細書に記載の抗体のFc領域のアミノ酸配列を用いることで、抗体のCDC活性を増加させることができる。

【0132】

また、米国特許第6,737,056号明細書、米国特許第7,297,775号明細書、または米国特許第7,317,091号明細書に記載のアミノ酸改変を行うことで、抗体のADCC活性またはCDC活性を、増加させることも低下させることもできる。

40

【0133】

本発明で用いられる「浮遊性の哺乳動物細胞」とは、マイクロビーズまたは組織培養用培養器 (組織培養または接着培養容器などともいう) などの、培養細胞が接着し易くコーティングされた細胞培養支持体に接着せずに、培養液中に浮遊して生存および増殖できる細胞のことをいう。

【0134】

細胞培養支持体に細胞が接着しなければ、培養液中において1つの細胞の状態で生存、増殖してもよく、または細胞同士が複数凝集した細胞塊の状態でも生存、増殖していても、いずれの状態でもよい。

【0135】

50

更に本発明で用いられる浮遊性の哺乳動物細胞としては、ウシ胎児血清 (f e t a l c a l f s e r u m、以下 F C S と記す) など含まれていない無血清培地中で、細胞培養支持体に接着せず培養液中に浮遊して生存および増殖できる細胞が好ましく、タンパク質が含まれていない無タンパク質培地中で、浮遊して生存および増殖できる哺乳動物細胞がより好ましい。

【 0 1 3 6 】

組織培養用培養器としては、接着培養用のコーティングがなされているフラスコ、シャーレ等であればいかなる培養器でもよい。具体的には、例えば、市販されている組織培養フラスコ (グライナー社製) および接着培養フラスコ (住友ベークライト社製) などを用いることで、浮遊性の哺乳動物細胞であることが確認できる。

10

【 0 1 3 7 】

本発明で用いられる浮遊性の哺乳動物細胞としては、元来浮遊性の性質を有する浮遊培養に馴化された細胞でもよいし、接着性の哺乳動物細胞を浮遊性の培養条件に馴化させた浮遊性の哺乳動物細胞いずれのものでもよい。

【 0 1 3 8 】

元来浮遊性の性質を有する哺乳動物細胞としては、例えば、 P E R . C 6 細胞、ラットミエローマ細胞 Y B 2 / 3 H L . P 2 . G 1 1 . 1 6 A g . 2 0 (または Y B 2 / 0 とともいう) および C H O - S 細胞 (I n v i t r o g e n 社製) など挙げることができる。

【 0 1 3 9 】

前記「接着性の哺乳動物細胞を浮遊性の培養条件に馴化させた浮遊性の哺乳動物細胞」は、 M o l . B i o t e c h n o l . 2 0 0 0 , 1 5 (3) , 2 4 9 - 5 7 記載の方法、または以下に示す方法などで作製することができ、浮遊培養馴化前と同様、または浮遊培養馴化前より優れた増殖および生存性を示す細胞を確立することで作製することができる [J . B i o t e c h n o l . 2 0 0 7 , 1 3 0 (3) , 2 8 2 - 9 0] 。

20

【 0 1 4 0 】

「浮遊培養馴化前と同等」とは、浮遊培養に馴化された細胞の生存率および増殖速度 (倍化時間) などが、浮遊培養馴化前の細胞と比べて実質的に同じであることを意味する。

【 0 1 4 1 】

本発明において接着性の哺乳動物細胞を浮遊性の培養条件に馴化させる方法としては、次の方法が挙げられる。血清含有の培地の血清含量を 1 / 1 0 に減らし、比較的高い細胞濃度で継代培養を繰り返し、哺乳動物細胞が生存および増殖できるようになった時点で、更に血清含量を斬減して、継代培養を繰り返す。この方法により、非血清下で生存、増殖可能な浮遊性の哺乳動物細胞を作製することができる。

30

【 0 1 4 2 】

また、培養液中に適当な非イオン性界面活性剤 P l u r o n i c - F 6 8 など添加して培養する方法によっても、浮遊性の哺乳動物細胞を作製することができる。

【 0 1 4 3 】

浮遊性の培養条件に馴化させることにより浮遊性となる接着性の哺乳動物細胞としては、例えば、マウスミエローマ細胞 N S 0 および C H O 細胞などが挙げられる。

【 0 1 4 4 】

本発明において、浮遊性の哺乳動物細胞が有する性質としては、該細胞を 2×10^5 細胞 / m L で浮遊培養した場合、3 ~ 4 日間後の培養終了時の細胞密度が、 5×10^5 細胞 / m L 以上であることが好ましく、 8×10^5 細胞 / m L 以上であることがより好ましく、 1×10^6 細胞 / m L 以上であることが特に好ましく、 1.5×10^6 細胞 / m L 以上であることが最も好ましい。

40

【 0 1 4 5 】

また、本発明の浮遊性の哺乳動物細胞の倍化時間としては、48 時間以下であることが好ましく、24 時間以下がより好ましく、18 時間以下が特に好ましく、11 時間以下が最も好ましい。

【 0 1 4 6 】

50

浮遊培地は、例えば、CD-CHO培地 (Invitrogen社)、EX-CELL 325-PF培地 (SARF Biosciences社) およびSFM4CHO培地 (HyClone社) などの市販の培地を用いることができる。また、哺乳動物細胞の培養に必要な糖類、アミノ酸類などを配合して調製することによっても得られる。

【0147】

浮遊性の哺乳動物細胞の培養は、浮遊培養が可能な培養容器を用いて、浮遊培養が可能な培養条件によって行うことができる。培養容器としては、例えば、細胞培養用の96穴プレート (コーニング社)、T-フラスコ (ベクトン・ディッキンソン社) および三角フラスコ (コーニング社) などを利用できる。

【0148】

培養条件としては、例えば、5% CO₂ 雰囲気中、培養温度37℃で静置培養などによって行うことができる。浮遊培養専用の培養設備であるWaveバイオリアクター (GEヘルスケアバイオサイエンス社) などの振とう培養装置などを用いることもできる。

【0149】

Waveバイオリアクター装置を用いた浮遊性の哺乳動物細胞の浮遊培養条件についてはGEヘルスケアバイオサイエンス社ホームページ http://www.gelifesciences.co.jp/tech_support/manual/pdf/cellcult/wave_03_16.pdf に記載の方法で行うことができる。

【0150】

振とう培養の他、バイオリアクターなどの巡回攪拌装置による培養も可能である。バイオリアクターでの培養は、Cytotechnology (2006) 52:199-207 に記載の方法などで行うことができる。

【0151】

本発明において浮遊性の哺乳動物細胞以外の細胞株を用いる場合、上記のような方法で浮遊培養に馴化させた哺乳動物細胞株であり、且つ本発明のタンパク質生産方法を用いることができる細胞株であれば、いずれの細胞株も用いることができる。

【0152】

浮遊性の哺乳動物細胞で生産した目的タンパク質の精製は目的タンパク質を含む培養液または細胞破砕液から目的タンパク質と目的タンパク質以外の不純物を分離することによって行う。分離の方法としては、例えば、遠心、透析、硫酸沈殿、カラムクロマトグラフィーおよびフィルターなどが挙げられ、目的タンパク質と不純物の物理化学的性質の違いまたはカラム単体への結合力の違いによって行うことができる。

【0153】

目的タンパク質を精製する方法は、例えば、タンパク質実験ノート (上) 抽出・分離と組換えタンパク質の発現 (羊土社、岡田雅人・宮崎香 / 編、ISBN 9784897069180) に記載の方法によって実施できる。

【0154】

本明細書において引用された、科学文献、特許、特許出願などの参考文献は、その全体が、各々具体的に記載されたのと同じ程度に本明細書において参考として援用される。

【0155】

以上、本発明を、理解の容易のために好ましい実施形態を示して説明してきた。以下に、実施例に基づいて本発明をさらに具体的に説明するが、上述の説明および以下の実施例は、例示の目的のみに提供され、本発明を限定する目的で提供したのではない。したがって、本発明の範囲は、本明細書に具体的に記載された実施形態にも実施例にも限定されず、請求の範囲によってのみ限定される。

【0156】

以降に記述するクローニング等、遺伝子組換えに関する各種実験技術については、J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis 著; モレキュラー クローニング第2版 (Molecular Cloning 2nd edition) 及び Frederick M. Ausubel 編、Current Protocol

10

20

30

40

50

s 発行、Current Protocols in Molecular Biology 等に記載の遺伝子工学的方法に準じて行った。

【実施例】

【0157】

[実施例1] 抗ヒトインフルエンザM2抗体発現トランスポゾンベクターの作製

タンパク質発現用プラスミドベクターには、一对のTol2トランスポゾン配列の間に挿入された任意のヒト抗体遺伝子および薬剤選択マーカー遺伝子を含む、哺乳動物細胞用遺伝子発現カセットを含むプラスミドを用いた。

【0158】

用いた遺伝子のDNAは既知の塩基配列をもとに、人工的に化学合成するか、またはその両端配列のプライマーを作製し、適当なDNAソースを鋳型としてPCRを行うことにより取得した。プライマーの端には後の遺伝子操作のために制限酵素切断部位を付加した。

【0159】

トランスポゾン配列は、日本国特開2003-235575号公報により開示されている非自律性Tol2トランスポソンの塩基配列(配列番号1)のうち、1番目から200番目の塩基配列(Tol2-L配列)(配列番号2)と、2285番目から2788番目の塩基配列(Tol2-R配列)(配列番号3)の塩基配列を用いた。

【0160】

次の方法により、それぞれ一对のトランスポゾン配列を含む合成DNA断片を作製した(タカラバイオ株式会社製)。Tol2-R配列の5'末端および3'末端の両方に制限酵素NruIの認識配列を連結した塩基配列を含むDNA断片を作製した。また、Tol2-L配列の5'末端には制限酵素FseIの認識配列を連結し、3'末端には制限酵素AscIの認識配列を連結した塩基配列を含むDNA断片を作製した。

【0161】

次に、作製したTol2-R配列およびTol2-L配列を含むDNA断片を、抗ヒトインフルエンザM2抗体Z3G1のアミノ酸配列をコードしている塩基配列を含む発現ベクターN5LG1__M2__Z3ベクター(国際公開第06/061723号)に挿入した。

【0162】

抗体遺伝子発現カセットには、CMVエンハンサー/プロモーター制御下に、抗ヒトインフルエンザM2抗体Z3G1(ATCC Deposit No. PTA-5968; deposited March 13, 2004, American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)のH鎖(配列番号10)をコードする塩基配列(配列番号9)およびL鎖(配列番号12)をコードする塩基配列(配列番号11)が挿入されたN5LG1__M2__Z3ベクター(国際公開第06/061723号)を用いた。

【0163】

M5LG1__M2__Z3ベクターの、抗体遺伝子発現カセットおよび選択マーカー遺伝子発現カセットを含む遺伝子断片の5'末端側に存在する制限酵素NruIサイトに、Tol2-R配列を含むDNA断片を挿入した。また、3'末端側に存在する制限酵素FseIおよびAscIサイトに、Tol2-L配列を含むDNA断片を挿入した。

【0164】

更にCMVエンハンサー/プロモーター制御下に、シクロヘキシミドに対する耐性遺伝子(ヒトリボソームタンパク質L36aの54位のプロリンがグルタミンに変異した遺伝子)をコードする塩基配列(配列番号5)が接続されたシクロヘキシミド耐性遺伝子発現カセットを、Tol2トランスポゾン配列が連結されたN5LG1__M2__Z3ベクターのFseI認識部位に挿入し、抗ヒトインフルエンザM2抗体トランスポゾン発現ベクターを構築した(図1)。

【0165】

10

20

30

40

50

一方、トランスポゾン配列を含まないベクターを抗ヒトインフルエンザM2抗体発現ベクターと命名し、コントロールベクターとして使用した(図2)。

【0166】

[実施例2] トランスポゼース発現ベクターの作製

トランスポゼースは、目的とする抗体の発現ベクターとは独立した発現ベクターを用いて発現させた。すなわち、pCAGGSベクター(Gene 108, 193-200, 1991)のCAGGSプロモーターの下流にメダカ由来のTol2トランスポゼースをコードする遺伝子(配列番号4)を挿入し、Tol2トランスポゼース発現ベクター(以下、Tol2ベクターと略記する)を作製した(図3)。

【0167】

[実施例3] 哺乳動物細胞を用いた形質転換体の作製(1)浮遊化CHO細胞の作製
10%血清(FCS)を添加したMEM培地(Invitrogen社)で培養した接着性CHO細胞を、トリプシン処理により剥離、回収し、新しい10% FCS添加MEM培地を用いて、5% CO₂インキュベータ内で、37℃にて振とう培養した。数日後、これらの細胞が増殖していることを確認したのち、5% FCS添加MEM培地に2×10⁵個/mLの濃度で播種し、振とう培養を行った。

【0168】

さらに数日後、5% FCS添加MEM培地を用いて同様の播種作業を行った。最終的に、血清を含まないMEM培地を用いて継代、振とう培養を繰り返し、血清存在下での培養と同様の増殖能を有していることを確認して、浮遊培養馴化株を作製した。

【0169】

(2)抗体を生産するCHO細胞の作製

発現ベクターとして、実施例1および実施例2の抗ヒトインフルエンザM2抗体発現トランスポゾンベクター(以下、トランスポゾンベクターと略記する)およびTol2ベクターpCAGGS-T2TP[図3、Kawakami K&Noda T. Genet. 166, 895-899(2004)]を用いた。また、コントロールとしてトランスポゾン配列を有していない抗ヒトインフルエンザM2抗体発現ベクターを用いた。

【0170】

前記発現ベクターを浮遊培養に馴化したCHO-K1細胞(American Type Culture Collection Cat. No. CCL-61)またはHEK293細胞(Invitrogen社FreeStyle 293F細胞)に導入し、シクロヘキシミドに対する耐性クローンが得られる頻度を比較した。

【0171】

各4×10⁶個の細胞を400μLのPBSに懸濁し、抗ヒトインフルエンザM2抗体発現トランスポゾンベクター(10μg)とTol2ベクター(25μg)を、電圧ポレーション法により環状DNAのまま共導入した。なお、Tol2ベクターは、Tol2トランスポゼースを一過性に発現させるため、宿主染色体への組込みを防ぐ目的で、環状DNAのまま導入した。

【0172】

また、コントロールとして、抗ヒトインフルエンザM2抗体発現ベクター(10μg)を、標準的な電圧ポレーションによる遺伝子導入法に従い、制限酵素により直鎖状にした後、各細胞に導入した。

【0173】

電圧ポレーションは、電圧ポレーター(Gene Pulser Xcell system(Bio-Rad社製))を用い、電圧300V、静電容量500μF、室温の条件で、gap幅4mmのキュベット(Bio-Rad社製)を使用して行った。

【0174】

電圧ポレーションによる遺伝子導入後、各々の細胞について3枚の96穴プレートに播種し、CHO細胞はSAFC Biosciences社 EX-CELL 32

10

20

30

40

50

5 - P F 培地を、H E K 2 9 3 細胞は f r e e S t y l e - 2 9 3 培地 (I n v i t r o g e n 社) を用いて、C O ₂ インキュベータ内で3日間培養した。

【 0 1 7 5 】

次に、遺伝子導入後4日後の培地交換から、3 μ g / m L のシクロヘキシミドを加え、シクロヘキシミド存在下で培養し、1週間毎に培地交換を行いながら、3週間培養した。

【 0 1 7 6 】

3週間培養後、シクロヘキシミド耐性コロニーが認められるウェル数をカウントした。その結果を表1および表2に示す。

【 0 1 7 7 】

【 表 1 】

10

表1 シクロヘキシミド耐性細胞数の比較 (CHO細胞)		
	トランスポゾンベクター	従来ベクター
実験1	155 / 288	0 / 288
実験2	100 / 288	0 / 288
実験3	94 / 288	0 / 288

【 0 1 7 8 】

【 表 2 】

20

表2 シクロヘキシミド耐性細胞数の比較 (NEK293 細胞)		
	トランスポゾンベクター	従来ベクター
実験1	0 / 288	0 / 288
実験2	0 / 288	0 / 288
実験3	0 / 288	0 / 288

【 0 1 7 9 】

表1に示すように、浮遊性のC H O - K 1 細胞に、抗ヒトインフルエンザM 2 抗体発現トランスポゾンベクターまたは抗ヒトインフルエンザM 2 抗体発現ベクターを導入したところ、抗ヒトインフルエンザM 2 抗体発現ベクターを導入した細胞からは、他の細胞株と同様に、シクロヘキシミド耐性の形質転換株が取得されなかったが、抗ヒトインフルエンザM 2 抗体発現トランスポゾンベクター導入細胞からは、シクロヘキシミド耐性の形質転換株が高頻度で得られた。

30

【 0 1 8 0 】

一方、表2に示すように、H E K 2 9 3 細胞に、抗ヒトインフルエンザM 2 抗体発現トランスポゾンベクターまたは抗ヒトインフルエンザM 2 抗体発現ベクターのいずれの発現ベクターを導入しても、シクロヘキシミド耐性の形質転換株は取得されなかった。

【 0 1 8 1 】

40

これらの結果から、浮遊性の哺乳動物細胞において、一対のトランスポゾン配列の間に挿入された目的タンパク質をコードする遺伝子およびシクロヘキシミド耐性遺伝子が、効率よく宿主細胞の染色体内に導入されることがわかった。

【 0 1 8 2 】

(3) 浮遊性C H O 細胞と接着性C H O 細胞における抗体生産の検討

浮遊性C H O 細胞または接着性C H O 細胞における抗体生産効率を検討するために、各細胞株における抗体の産生量を検討した。浮遊性C H O 細胞としては、浮遊培養に馴化した浮遊性C H O - K 1 細胞を用いた。また、接着性C H O 細胞としては浮遊培養馴化前の接着性C H O - K 1 細胞を用いた。

【 0 1 8 3 】

50

浮遊性CHO-K1細胞および接着性CHO-K1細胞に抗ヒトインフルエンザM2抗体発現トランスポゾンベクター(10 μ g)とTol2ベクター(25 μ g)をそれぞれ、エレクトロポレーションした。その後、浮遊性CHO-K1細胞と接着性CHO-K1細胞を、各々3枚の96穴プレートに播種した。

【0184】

浮遊性CHO-K1細胞は浮遊細胞用培地(SAFC Biosciences社EX-CELL 325-PF)を用い、接着性CHO-K1細胞は10%血清を添加したMEM培地(Invitrogen社)を用いた。各細胞をCO₂インキュベータ内で3日間培養し、エレクトロポレーションから4日後の培地交換から、3 μ g/mLのシクロヘキシミド存在下で3週間培養した。この際、1週間毎に培地交換を行った。

10

【0185】

浮遊性CHO-K1細胞は1 \times 10⁶個の細胞を6穴プレートに播種し、CO₂インキュベータ内で3日間振とう培養し、培養上清を用いて抗ヒトインフルエンザM2抗体のタンパク質量をHPLCにて測定した。

【0186】

接着性CHO-K1細胞は6穴プレートでコンフルエントに到達した後(2 \times 10⁶個)培地交換し、3日間静置培養した後、培養上清を用いて抗体タンパク質量をHPLCにて測定した。

【0187】

培養上清中の抗体濃度の測定はFEMS Yeast Res., 7, (2007), 1307-1316に記載の方法に従って行った。結果を図4に示す。

20

【0188】

図4Aに示すように、浮遊培養に馴化したCHO-K1細胞では、極めて高い抗体発現量を示す細胞が多数得られた。一方、図4Bに示すように、接着性のCHO-K1細胞では、HPLCの検出限界(5 μ g/mL)以下の発現量を示す細胞しか得られなかった。

【0189】

これらの結果から、トランスポゾンベクターを用いて目的タンパク質を発現させるためには、浮遊性の哺乳動物細胞を用いた場合に目的タンパク質を高発現できることを見出した。

【0190】

また、実施例1~3の結果より、本発明の方法は、浮遊培養に馴化した浮遊性の哺乳動物細胞を用いて外来遺伝子を高発現する生産細胞を効率的に作製し、目的タンパク質を生産する新規な方法として利用し得ることがわかった。

30

【0191】

[実施例4] Tol1トランスポゾンによる抗体発現細胞の造成および抗体製造(1)抗ヒトインフルエンザM2抗体発現Tol1トランスポゾンベクターの作製

実施例1と同様に、タンパク質発現用プラスミドベクターには、一対のTol1トランスポゾン配列の間に挿入された任意のヒト抗体遺伝子および薬剤選択マーカ遺伝子を含む、哺乳動物細胞用遺伝子発現カセットを含むプラスミドを用いた。

【0192】

用いた遺伝子のDNAは既知の配列情報をもとに、人工的に化学合成するか、またはその両端配列のプライマーを作製し、適当なDNAソースを鋳型としてPCRを行うことにより取得した。プライマーの端には後の遺伝子操作のために制限酵素切断部位を付加した。

40

【0193】

トランスポゾン配列は、配列表の配列番号13で表される非自律性Tol1トランスポゾンの塩基配列(国際公開第2008/072540号)のうち、1番目から200番目の塩基配列(Tol1-L配列)(配列番号14)と、1351番目から1855番目の塩基配列(Tol1-R配列)(配列番号15)を用いた。

【0194】

50

次の方法により、それぞれ一对のトランスポゾン配列を含む合成DNA断片を作製した。T o l 1 - R配列の5'末端および3'末端の両方に制限酵素N r u Iの認識配列を連結した塩基配列を含むDNA断片を作製した。また、T o l 1 - L配列の5'末端には制限酵素F s e Iの認識配列を連結し、3'末端には制限酵素A s c Iの認識配列を連結した塩基配列を含むDNA断片を作製した。

【0195】

次に、作製したT o l 1 - R配列およびT o l 1 - L配列を含むDNA断片を、N 5 L G 1 __ M 2 __ Z 3ベクターに挿入した。N 5 L G 1 __ M 2 __ Z 3ベクターの、抗体遺伝子発現カセットおよび選択マーカー遺伝子発現カセットを含む遺伝子断片の5'末端側に存在する制限酵素N r u Iサイトに、T o l 1 - R配列を含むDNA断片を、3'末端側に存在する制限酵素F s e IおよびA s c Iサイトに、T o l 1 - L配列を含むDNA断片を挿入した。

10

【0196】

更にCMVエンハンサー/プロモーター制御下に、シクロヘキシミドに対する耐性遺伝子(ヒトリボソームタンパク質L 3 6 aの54位のプロリンがグルタミンに変異した遺伝子)(配列番号7)が接続されたシクロヘキシミド耐性遺伝子発現カセットを、T o l 1トランスポゾン配列が連結されたN 5 L G 1 __ M 2 __ Z 3ベクターのF s e I認識部位に挿入し、抗ヒトインフルエンザM 2抗体T o l 1トランスポゾン発現ベクターを構築した(図5)。

20

【0197】

(2) T o l 1トランスポゼース発現ベクターの作製

トランスポゼースは目的抗体の発現ベクターとは独立した発現ベクターを用いて発現させた。すなわち、CMVエンハンサー/プロモーター制御下に、配列番号16で表される塩基配列からなるメダカ由来のT o l 1トランスポゼース(配列番号17)をコードするDNA断片が接続されたT o l 1トランスポゼース遺伝子発現カセットを、p B l u e s c r i p t I I S K (+)(S t r a t a g e n e社製)に挿入し、T o l 1トランスポゼース発現ベクターp T o l 1 a s eとして利用した(図6)。

【0198】

(3) 抗体を生産するCHO細胞の作製

上述(1)~(3)で作製した発現ベクターを用いて、実施例3と同様の方法によりT o l 1トランスポゾンによる発現ベクターの導入効果を検討した。その結果を表3に示す。

30

【表3】

Tol1 トランスポゾンベクター	
実験1	133 / 192
実験2	67 / 192
実験3	122 / 192

40

【0199】

表3に示すように、浮遊性のCHO-K 1細胞に、抗ヒトインフルエンザM 2抗体発現T o l 1トランスポゾンベクターを導入すると、抗ヒトインフルエンザM 2抗体発現T o l 2トランスポゾンベクターを導入した実施例3と同様に、シクロヘキシミド耐性の形質転換株が高頻度で得られた。

【0200】

この結果から、浮遊性の哺乳動物細胞において、T o l 1トランスポゾン由来の塩基配

50

列であるトランスポゾン配列を使用しても2つのトランスポゾン配列の間に挿入された抗体遺伝子およびシクロヘキシミド耐性遺伝子が、効率よく宿主細胞の染色体内に導入されることがわかった。

【0201】

(4) 浮遊性CHO細胞における抗体生産の検討

Tol1トランスポゾンを用いて、浮遊性CHO細胞における抗体生産効率を、実施例3の(3)と同様にして検討を行った。

【0202】

培養上清中の抗体濃度の測定はFEMS Yeast Res., 7, (2007)、1307-1316に記載の方法に従って行った。結果を図7に示す。

10

【0203】

図7に示すように、Tol1トランスポゾン由来の塩基配列であるトランスポゾン配列を用いた場合でもTol2と同様に、極めて高い抗体発現量を示す細胞が多数得られた。この結果から、トランスポゾン配列としてTol1トランスポゾン由来の塩基配列を用いた場合にも、Tol2トランスポゾン由来の塩基配列を用いた場合と同様に、目的タンパク質を高発現する浮遊性の哺乳動物細胞が得られることが明らかになった。

【0204】

[実施例5] 抗ヒトCD98抗体の作製

(1) 抗ヒトCD98抗体重鎖発現トランスポゾンベクターおよび抗ヒトCD98抗体軽鎖発現トランスポゾンベクターの作製

20

配列番号20および23のアミノ酸配列で表された可変領域H鎖およびL鎖を有する抗ヒトCD98抗体を作製するために、各抗体可変領域にヒトIgG1抗体定常領域のアミノ酸配列を連結させH鎖およびL鎖のアミノ酸配列を作製した。

【0205】

シグナル配列が連結した抗ヒトCD98抗体重鎖可変領域および軽鎖可変領域の遺伝子配列(配列番号18、21)は、日本国特許第4324637号公報に開示されている(N5KG1-Val C2IgG1NS/I117Lベクター)に組み込まれている配列を使用し、トランスポゾン配列、プロモーター等は実施例1と同様のものを用いて抗ヒトCD98抗体重鎖発現トランスポゾンベクター(CD98Hベクターと略記する)および抗ヒトCD98抗体軽鎖発現トランスポゾンベクター(CD98Lベクターと略記する)をそれぞれ構築した(図8、9)。

30

【0206】

使用したDNA断片は既知の配列をもとに、人工的に化学合成するか、あるいはその両端配列のプライマーを作製し、適当なDNAソースを鋳型としてPCRを行うことにより取得した。プライマーの端には後の組換え操作のために制限酵素切断部位を付加した。

【0207】

(2) シクロヘキシミド耐性遺伝子発現トランスポゾンベクターの作製

実施例1に記載のCMVエンハンサー/プロモーター制御下に、シクロヘキシミド耐性遺伝子をコードする配列(配列番号7)を接続し、該シクロヘキシミド耐性遺伝子発現カセットの両端に一对のトランスポゾン配列(Tol-2L、Tol2-R)を挿入し、シクロヘキシミド耐性遺伝子発現トランスポゾンベクター(以下、CHXベクターと略記する)を構築した(図10)。

40

【0208】

用いたDNA断片は既知の配列をもとに、人工的に化学合成するか、あるいはその両端配列のプライマーを作製し、適当なDNAソースを鋳型としてPCRを行うことにより取得した。プライマーの端には後の遺伝子操作のために制限酵素切断部位を付加した。

【0209】

(3) 抗ヒトCD98抗体を生産するCHO細胞の作製

上述(1)および(2)で作製したCD98Hベクター(図8)、CD98Lベクター(図9)、CHXベクター(図10)および実施例2で作製したTol2ベクター(図3

50

)を浮遊培養に馴化したCHO-K1細胞に導入し、抗体を高発現する細胞の出現数を比較した。

【0210】

実験区では、 4×10^6 個CHO-K1細胞を400 μ LのPBSに懸濁し、CD98Hベクター(10 μ g)、CD98Lベクター(10 μ g)、CHXベクター(10 μ g)およびTol2ベクター(10 μ g)を、エレクトロポレーション法により環状DNAのまま共導入した。Tol2ベクターは、Tol2トランスポゼースを一過性に発現させるため、宿主染色体への組込みを防ぐ目的で、環状DNAのまま導入した。エレクトロポレーションは、エレクトロポレーター(Gene Pulser XceII system(Bio-Rad社製))を用い、電圧300 V、静電容量500 μ F、室温の条件で、gap幅4mmのキュベット(Bio-Rad社製)を使用して行った。

10

【0211】

また、対照区では、CD98Hベクター(10 μ g)、CD98Lベクター(10 μ g)およびCHXベクター(10 μ g)を、それぞれ制限酵素PciI(タカラバイオ社)により直鎖状にした後、上述と同様にしてエレクトロポレーションを行なった。

【0212】

エレクトロポレーションによる遺伝子導入後、各々のキュベットの細胞は、0.5%大豆加水分解物を加えたCD OptiCHO培地(Invitrogen社)(以下、0.5CD培地と記す。)に懸濁して96穴プレート1枚に播種し、CO₂インキュベータ内で4日間培養した。次に、遺伝子導入後5日後の培地交換から、3 μ g/mLのシクロヘキシミド(Sigma-Aldrich社 C4859)を添加した0.5CD培地を用いて、シクロヘキシミド存在下で培養を行い、1週間毎に培地交換を行いながら、4週間培養した。

20

【0213】

4週間培養後、抗体の発現はFRET(蛍光共鳴エネルギー移動)を利用したサンドイッチ法(LENCE^TM、パーキンエルマー社)で定量した。抗体高発現細胞は、培養上清中の抗体濃度が5.0 μ g/mL以上発現しているクローンを、抗体が発現している細胞として計測したその結果を表4に示す。

【0214】

【表4】

30

	対照区	実験区
	抗体を発現しているウェル数	
プレート1	10/96	29/96
プレート1	20/96	49/96

40

【0215】

表4に示すように、浮遊性のCHO-K1細胞に、抗ヒトCD98抗体重鎖発現トランスポゾンベクター、抗ヒトCD98抗体軽鎖発現ベクターおよびシクロヘキシミド耐性遺伝子ベクターと共にTol2ベクターを共導入した実験区では、抗ヒトCD98抗体発現細胞が多数認められたが、Tol2ベクターを共導入していない対照区では、ベクターを線状化したにも関わらず、抗ヒトCD98抗体発現細胞を認められなかった。

【0216】

[実施例6]抗ヒトCD98抗体の製造(1)抗ヒトCD98抗体重鎖遺伝子断片、抗ヒトCD98抗体軽鎖遺伝子断片およびシクロヘキシミド耐性遺伝子を含む発現トランスポ

50

ゾンベクターの作製

実施例 5 (1) で作製した抗ヒト CD 9 8 抗体重鎖発現トランスポゾンベクターに、同実施例 5 (1) で作製した抗ヒト CD 9 8 抗体軽鎖発現遺伝子カセットおよび実施例 5 (2) で作製したシクロヘキシミド耐性遺伝子カセットをそれぞれ連結し、上述と同様合成 DNA、PCR 法を用いて抗ヒト CD 9 8 抗体重鎖遺伝子断片、抗ヒト CD 9 8 抗体軽鎖遺伝子断片およびシクロヘキシミド耐性遺伝子を含む発現トランスポゾンベクター (以下、CD 9 8 - CH X タンデムベクターと略記する) を構築した。

【 0 2 1 7 】

(2) 抗ヒト CD 9 8 抗体重鎖遺伝子断片およびシクロヘキシミド耐性遺伝子を含む発現トランスポゾンベクターの作製

実施例 5 (1) で作製した抗ヒト CD 9 8 抗体重鎖発現トランスポゾンベクターに、実施例 5 (2) に示したシクロヘキシミド耐性遺伝子カセットをそれぞれ連結し、上述と同様合成 DNA、PCR 法を用いて抗ヒト CD 9 8 抗体重鎖およびシクロヘキシミド耐性遺伝子を含む発現トランスポゾンベクター (CD 9 8 H - CH X 発現トランスポゾンベクターと略記する) を構築した。

【 0 2 1 8 】

(3) 抗ヒト CD 9 8 抗体を生産する CHO 細胞の作製

前記実施例 5 (1) および (2) ならびに前記実施例 6 (1) および (2) で作製した発現トランスポゾンベクターを用いて、抗ヒト CD 9 8 抗体の H 鎖および L 鎖を同一の発現ベクターで遺伝子導入した場合 (対照区)、抗ヒト CD 9 8 抗体の H 鎖、L 鎖またはシクロヘキシミド耐性遺伝子をそれぞれ別々の発現ベクターで遺伝子導入した場合 (実験区 1)、および H 鎖または L 鎖を別々の発現ベクターで遺伝子導入した場合 (実験区 2) の、抗 CD 9 8 抗体を高発現する細胞の出現数を比較した。

【 0 2 1 9 】

実験区 1 では、 4×10^6 個の CHO - K 1 細胞を 400 μ L の PBS に懸濁し、CD 9 8 H ベクター (10 μ g)、CD 9 8 L ベクター (10 μ g)、CH X ベクター (10 μ g)、および Tol 2 ベクター (10 μ g) を、エレクトロポレーション法により環状 DNA のまま共導入した。

【 0 2 2 0 】

実験区 2 では、 4×10^6 個 CHO - K 1 細胞を 400 μ L の PBS に懸濁し、CD 9 8 H - CH X ベクター (10 μ g)、CD 9 8 L ベクター (10 μ g) および Tol 2 ベクター (10 μ g) を、エレクトロポレーション法により環状 DNA のまま共導入した。

【 0 2 2 1 】

対照区では、 4×10^6 個 CHO - K 1 細胞を 400 μ L の PBS に懸濁し、CD 9 8 - CH X タンデムベクター (10 μ g)、Tol 2 ベクター (20 μ g) を、エレクトロポレーション法により環状 DNA のまま共導入した。また、全ての実験において Tol 2 ベクターは、Tol 2 トランスポゼースを一過性に発現させるためおよび宿主染色体への組込みを防ぐ目的で、環状 DNA のまま導入した。

【 0 2 2 2 】

以下の方法は実施例 5 (3) と同様の方法により、抗体生産細胞の出現率の確認を行った。抗体発現細胞は、培養上清中の抗体濃度が 3 . 0 μ g / mL 以上であるクローンを、抗体が発現している細胞として計測した。その結果を表 5 に示す。

【 0 2 2 3 】

10

20

30

40

【表 5】

	対照区	実験区1	実験区2
	抗体を発現しているウェル数		
プレート1	18/96	82/96	95/96
プレート2	21/96	85/96	96/96
合計	39/192	167/192	191/192

【0224】

10

CD98Hベクター、CD98LベクターおよびCHXベクターを導入した実験区1、ならびにCD98HベクターおよびCD98Lベクターを導入した実験区2では、抗ヒトCD98抗体を高発現している細胞の出現率が大きく増加していた。

【0225】

以上の結果は、抗体重鎖遺伝子と抗体軽鎖遺伝子とが同一の発現ベクター上に組み込まれた発現ベクターを浮遊性CHO細胞に導入することと比べて、抗体重鎖遺伝子と抗体軽鎖遺伝子とをそれぞれ別々のトランスポゾン配列間に挿入された発現ベクターを浮遊性CHO細胞に共導入する方が、抗体高生産株を容易に取得および製造できることを示している。また、実験区1と実験区2の結果から、導入するベクターが複数の場合でも、薬剤耐性遺伝子（選択マーカー遺伝子）は少なくとも1つで十分であることが明らかになった。更に、薬剤耐性遺伝子は、抗体重鎖遺伝子が組み込まれた発現ベクター上にあってもよいし、別の独立したベクター上であってもよいことが明らかになった。

20

【0226】

以上の結果は、従来困難であった浮遊性の哺乳動物細胞へ2つ以上のベクター上に配置した遺伝子を同時に効率よく細胞に導入する手段として、トランスポゾンベクターが有効であることを示している。更に、複数のポリペプチドから構成されるタンパク質および複数のタンパク質を高生産するために、それぞれのポリペプチドまたはタンパク質を異なるトランスポゾンベクターで細胞に導入することが有効であることを示している。

【0227】

(4) 抗ヒトCD98抗体を生産するCHO細胞の培養

30

上述実施例6(3)で得られたCD98-CHXタンデムベクターが導入された細胞ならびにCD98H-CHXベクターおよびCD98Lベクターが導入された細胞のそれぞれから、抗体発現量の高い上位3株について抗体発現量を比較した。実験の詳細を以下に示す。

【0228】

実施例6(3)で得られたシクロヘキシミド耐性で選抜され且つ抗ヒトCD98抗体を発現しているCHO-K1細胞を、96穴プレート、24穴プレート、6穴プレート(コーニング社)に順次拡大培養した。拡大培養後、培養上清中の抗体濃度を測定し抗ヒトCD98抗体を高発現するCHO細胞の上位3株を選抜した。次に、選択した3株をそれぞれ 2×10^5 個/mLになるように、0.5% CD培地(Invitrogen社)0.5% CD培地3mLに懸濁し、6穴プレートを用いて、37、5% CO₂の雰囲気中で5日間旋回培養した。5日間培養後の培地中の抗体量を、HPLC(Waters社)で定量した。その結果を表6に示す。

40

【0229】

【表 6】

	対照区由来の細胞			実験区2由来の細胞		
抗体発現量(mg/L)	70	67	41	196	87	67

【0230】

表 6 に示すように、CD98HベクターおよびCD98Lベクターが共導入されたCHO-K1細胞は、CD98-CHXタンデムベクターが導入されたCHO-K1細胞に比べて、抗体生産量が高いことが明らかになった。 10

【0231】

以上の結果は、抗体重鎖遺伝子と抗体軽鎖遺伝子とをそれぞれ別々の一对のトランスポゾン配列の間に挿入した発現ベクターを浮遊性CHO細胞に共導入することで、抗体高生産株を容易に取得および製造できるだけでなく、得られた細胞は高い抗体生産性を有することを示している。

【0232】

[実施例7] 抗ヒトtumor necrosis factor-alpha (TNF) 抗体の製造 (1) 抗ヒトTNF 抗体重鎖遺伝子断片、抗ヒトTNF 抗体軽鎖遺伝子断片およびシクロヘキシミド耐性遺伝子を含む発現トランスポゾンベクターの作製 20

配列番号26および29のアミノ酸配列を有する抗ヒトTNF 抗体を作製するために、実施例6(1)で作製した抗ヒトCD98抗体重鎖遺伝子断片、軽鎖遺伝子断片およびシクロヘキシミド耐性遺伝子を含む発現トランスポゾンベクター(CD98-CHXタンデムベクター)のVHおよびVL遺伝子断片を抗ヒトTNF 抗体由来VHおよびVLにそれぞれ置換し、抗ヒトTNF 抗体重鎖遺伝子断片、抗ヒトTNF 抗体軽鎖遺伝子断片およびシクロヘキシミド耐性遺伝子発現トランスポゾンベクター(以下、TNF-CHXタンデムベクターと略記する。)を構築した。

【0233】

抗ヒトTNF 抗体重鎖遺伝子および軽鎖遺伝子の配列は、ヒュミラ^(R)皮下注40mg 審査報告書(独立行政法人医薬品医療機器総合機構、平成20年2月14日)図2および図1に記載のアダリムマップ(遺伝子組換え)の重鎖可変領域サブユニットまたは軽鎖可変領域サブユニットのアミノ酸配列(配列番号25、28)にシグナル配列を連結させたアミノ酸配列(配列番号26、29)を作製し、アミノ酸配列が変わらないように塩基配列を決定し、合成DNAを用いて作製した(配列番号24、27)。人工配列の端には後の遺伝子操作のために制限酵素切断部位を付加した。 30

【0234】

(2) 抗ヒトTNF 抗体重鎖遺伝子断片およびシクロヘキシミド耐性遺伝子を含む発現トランスポゾンベクターの作製

実施例6(2)で作製した抗ヒトCD98抗体重鎖遺伝子断片およびシクロヘキシミド耐性遺伝子を含む発現トランスポゾンベクター(CD98H-CHXベクター)のVH遺伝子断片部位を、抗ヒトTNF 抗体VH遺伝子断片に改変し、抗ヒトTNF 抗体重鎖遺伝子断片およびシクロヘキシミド耐性遺伝子を含む発現トランスポゾンベクター(以下、TNF-H-CHXベクターと略記する)を構築した。抗ヒトTNF 抗体重鎖遺伝子は本項(1)に示した配列と同じ配列を用いた。 40

【0235】

(3) 抗ヒトTNF 抗体軽鎖遺伝子発現トランスポゾンベクターの作製

実施例6(1)で作製した抗ヒトCD98抗体軽鎖遺伝子発現トランスポゾンベクター(CD98Lベクター)の軽鎖遺伝子部位を、抗ヒトTNF 抗体軽鎖に改変し、抗ヒトTNF 抗体軽鎖遺伝子発現トランスポゾンベクター(以下、TNF-Lベクターと略記 50

する)を構築した。抗ヒトTNF 抗体VL遺伝子は本項(1)に示した配列と同じ配列を用いた。

【0236】

(4)抗ヒトTNF 抗体を生産するCHO細胞の作製

抗ヒトTNF 抗体を生産するCHO-K1細胞を作製するために、上述(1)で作製したTNF -CHXタンデムベクター(20μg)と実施例2で作製したTol2トランスポゼース発現ベクター(Tol2ベクター)(10μg)を、実施例3(1)で作製した浮遊培養に馴化したCHO-K1細胞へ導入した(対照区)。

【0237】

同様に、上述(2)および(3)で作製したTNF H-CHXベクター(10μg)、TNF Lベクター(10μg)、Tol2ベクター(10μg)を、それぞれ環状DNAのまま共導入した(実験区)。遺伝子導入細胞の培養を96ウェルプレート5枚について行なったこと以外、遺伝子導入、細胞培養等は実施例6と同様にして行い抗体を高発現する細胞の出現数を比較した。抗体高発現細胞は、培養上清中の抗体濃度が3.0μg/mL以上であるクローンを、抗体が発現している細胞として計測した。その結果を表7に示す。

10

【0238】

【表7】

20

	対照区	実験区
	抗体を発現しているウェル数	
プレート1	20/96	83/96
プレート2	22/96	76/96
プレート3	21/96	82/96
プレート4	20/96	79/96
プレート5	27/96	81/96
合計	110/480	401/480

30

【0239】

表7に示すように、実施例6で行った抗ヒトCD98抗体の生産細胞と同様に、TNF H-CHXベクターとTNF Lベクターとを共導入したCHO-K1細胞は、TNF -CHXタンデムベクターを導入したCHO-K1細胞と比べて、抗ヒトTNF 抗体を高発現している細胞の出現率が約4倍高かった。

40

【0240】

この結果は、何れの抗体に関しても、それぞれ別々の発現ベクターに組み込まれた一対のトランスポゾン配列の間に挿入された抗体重鎖遺伝子と抗体軽鎖遺伝子を浮遊性CHO細胞に共導入することで、抗体高生産株を容易に取得および製造できることを示している。

【0241】

(5)抗ヒトTNF 抗体を生産するCHO細胞の培養

上述(4)で得られたTNF -CHXタンデムベクターが導入された細胞ならびにTNF H-CHXベクターおよびTNF Lベクターが共導入された細胞から、シクロヘ

50

キシミド耐性で選抜され、且つ抗ヒトTNF 抗体を発現している細胞を選択し、96穴プレート、24穴プレート、次いで6穴プレートへ順次拡大培養した。拡大培養に成功したTNF - CHXタンデムベクターが導入された細胞4株ならびにTNF H - CHXベクターおよびTNF Lベクターが共導入された細胞52株を、培養期間が7日間である以外は実施例6(4)と同様にして細胞を培養し、抗体発現量を計測した。結果を図11に示す。

【0242】

その結果、TNF H - CHXベクターとTNF Lベクターとを共導入したCHO - K1細胞は、TNF - CHXタンデムベクターを導入したCHO - K1細胞と比べて、約2.4倍高い抗体生産量を示した。

10

【0243】

この結果は、実施例6(4)と同様に、抗体重鎖遺伝子と抗体軽鎖遺伝子をそれぞれ別々の一对のトランスポゾン配列の間に組込んだ発現ベクターを浮遊性CHO細胞に共導入することで、抗体高生産株を容易に取得および製造できるだけでなく、得られた細胞は高い抗体生産性を有することを示している。

【0244】

[実施例8] 抗ヒトCD20抗体の製造(1) 抗ヒトCD20抗体重鎖遺伝子断片、抗ヒトCD20抗体軽鎖遺伝子断片およびシクロヘキシミド耐性遺伝子を含む発現トランスポゾンベクターの作製

配列番号32および35のアミノ酸配列で表されるVHおよびVLを含む抗ヒトCD20抗体を作製するために、実施例6(1)で作製したCD98 - CHXタンデムベクターの抗体VHまたはVL遺伝子部位を、それぞれ抗ヒトCD20抗体由来VHまたはVLに置換し、抗ヒトCD20抗体重鎖遺伝子断片、抗ヒトCD20抗体軽鎖遺伝子断片およびシクロヘキシミド耐性遺伝子を含む発現トランスポゾンベクター(以下、CD20 - CHXタンデムベクターと略記する)を構築した。

20

【0245】

抗ヒトCD20抗体VH領域およびVL領域の遺伝子配列は、GenBank accession no. AR000013に記載の塩基配列およびリツキサン^(R)注10mg/mL 審査報告書(衛研発 第3395号、平成15年8月28日)別紙に記載のリツキシマブのVHおよびVLのアミノ酸配列(配列番号32、35)にシグナル配列を連結したアミノ酸配列(配列番号31、34)を作製し、アミノ酸配列が変化しないように塩基配列を決定し、合成DNAにより作製した(配列番号30、33)。人工配列の端には後の遺伝子操作のために制限酵素切断部位を付加した。

30

【0246】

(2) 抗ヒトCD20抗体重鎖遺伝子断片およびシクロヘキシミド耐性遺伝子を含む発現トランスポゾンベクターの作製

実施例6(2)で作製したCD98H - CHXベクター抗体VH遺伝子部位を、抗ヒトCD20抗体由来VHに改変し、抗ヒトCD20抗体重鎖遺伝子断片およびシクロヘキシミド耐性遺伝子を含む発現トランスポゾンベクター(以下、CD20H - CHXベクターと略記する)を構築した。抗ヒトCD20抗体重鎖遺伝子は上述(1)に示した配列と同じ配列を用いた。

40

【0247】

(3) 抗ヒトCD20抗体軽鎖遺伝子発現トランスポゾンベクターの作製

実施例6(1)で作製したCD98Lベクター抗体VL遺伝子部位を抗ヒトCD20抗体由来VLに改変し、抗ヒトCD20抗体軽鎖遺伝子発現トランスポゾンベクター(以下、CD20Lベクター)を構築した。抗ヒトCD20抗体重鎖遺伝子は上述(1)に示した配列と同じ配列を用いた。

【0248】

(4) 抗ヒトCD20抗体を生産するCHO細胞の作製

抗ヒトCD20抗体を生産するCHO - K1細胞を作製するために、上述(1)で作

50

製したCD20-CHXタンデムベクターと実施例2で作製したTol2トランスポゼー
ス発現ベクター(Tol2ベクター)を、実施例3(1)で作製した浮遊培養に馴化した
CHO-K1細胞へ導入した(対照区)。

【0249】

同様に、上述(2)および(3)で作製したCD20H-CHXベクター(10 μ g)
、CD20Lベクター(10 μ g)を、Tol2ベクター(10 μ g)と共にCHO-K
1細胞へ共導入した(実験区)。遺伝子導入細胞の培養を96ウェルプレート5枚につい
て行なったこと以外、遺伝子導入、細胞培養等は実施例6と同様にして行い抗体を高発現
する細胞の出現数を比較した。また、抗体濃度が3.0 μ g/mL以上を、抗体が発現し
ているウェルとして計測した。その結果を表8に示す。

【0250】

【表8】

	対照区	実験区
	抗体を発現しているウェル数	
プレート1	2/96	4/96
プレート2	2/96	9/96
プレート3	4/96	4/96
プレート4	1/96	8/96
プレート5	2/96	5/96
合計	11/480	30/480

【0251】

その結果、CD20H-CHXベクターとCD20Lベクターを共導入したCHO-K
1細胞は、CD20-CHXタンデムベクターを導入したCHO-K1細胞に比べて、抗
ヒトCD20抗体を高発現している細胞の出現率が約3倍高かった。

【0252】

この結果は、実施例6(3)または実施例7(3)で実施した抗ヒトCD98抗体、抗
ヒトTNF抗体と同様の結果であり、何れの抗体に関しても、抗体重鎖遺伝子と抗体軽
鎖遺伝子をそれぞれ別々のトランスポゾン配列間に組込んだ発現ベクターを浮遊性CHO
細胞に共導入することで、抗体高生産株を容易に取得および製造できることを示している
。

【0253】

(5) 抗ヒトCD20抗体を生産するCHO細胞の培養

上述(3)で得られたCD20-CHXタンデムベクターが導入された細胞ならびにC
D20H-CHXベクターおよびCD20Lベクターが共導入された細胞から、シクロヘ
キシミド耐性で選抜され且つ抗ヒトCD20抗体を発現している細胞を選択し、96穴プ
レート、24穴プレート、次いで6穴プレートへ順次拡大培養した。拡大培養に成功した
対照区細胞4株および実験区細胞50株を、培養期間が7日間である以外は実施例6(4
)と同様にして細胞を培養し、抗体発現量を計測した。結果を図12に示す。

【0254】

図12に示すように、CD20H-CHXベクターとCD20Lベクターとを共導入し
たCHO-K1細胞は、CD20-CHXタンデムベクターを導入したCHO-K1細胞

10

20

30

40

50

と比べて、約 1.6 倍高い抗体生産性を有することが明らかになった。

【0255】

この結果は、実施例 6 (4)、実施例 7 (5) で実施された抗ヒト CD98 抗体、抗ヒト TNF 抗体の生産性と同様な結果であり、抗体重鎖遺伝子と抗体軽鎖遺伝子をそれぞれ別々のトランスポゾン配列間に組み込んだ発現ベクターを浮遊性 CHO 細胞に共導入することで、抗体高生産株を容易に取得および製造できるだけでなく、得られた細胞は高い抗体生産性を有することを示している。

【0256】

[実施例 9] ネオマイシン耐性遺伝子および抗ヒト CD98 抗体を発現するトランスポゾンベクターの作製 (1) 野生型ネオマイシン耐性遺伝子および抗ヒト CD98 抗体を発現するトランスポゾンベクターの作製

10

タンパク質発現用プラスミドベクターには、一对の Tol2 由来の塩基配列の間に挿入された任意のヒト抗体遺伝子および薬剤耐性マーカー遺伝子を含む、哺乳動物細胞用遺伝子発現カセットを含むプラスミドを用いた。

【0257】

用いた遺伝子の DNA は既知の塩基配列をもとに、人工的に化学合成するか、またはその両端配列のプライマーを作製し、適当な DNA ソースを鋳型として PCR を行うことにより取得した。プライマーの端には後の遺伝子操作のために制限酵素切断部位を付加した。

【0258】

20

トランスポゾン配列は、日本国特開 2003-235575 号公報により開示されている非自律性 Tol2 トランスポゾンの塩基配列 (配列番号 1) のうち、1 番目から 200 番目の塩基配列 (Tol2-L 配列) (配列番号 2) と、2285 番目から 2788 番目の塩基配列 (Tol2-R 配列) (配列番号 3) の塩基配列を用いた。

【0259】

Tol2-R 配列または Tol2-L 配列を含む DNA 断片をそれぞれ合成して用いた。

【0260】

抗体重鎖遺伝子発現カセットとして、抗ヒト CD98 抗体 N5KG1-Val C2 IgG1NS/I117L ベクター (日本国特許第 4324637 号公報) をもとに増幅した、CMV プロモーター制御下に抗体 H 鎖をコードする塩基配列 (配列番号 18) を含む DNA 断片を、抗体軽鎖遺伝子発現カセットとして抗ヒト CD98 抗体 N5KG1-Val C2 IgG1NS/I117L ベクターをもとに増幅した、SV40 プロモーター制御下に抗体軽鎖をコードする塩基配列 (配列番号 21) を含む DNA 断片を調製した。

30

【0261】

ネオマイシン耐性遺伝子発現カセットとしては、SV40 プロモーター制御下にネオマイシン耐性遺伝子をコードする塩基配列からなる DNA (配列番号 36 および、Genbank Accession No. U47120.2 で表される塩基配列からなるネオマイシンホスホトランスフェラーゼをコードする DNA) を有する DNA 断片を調製した。

40

【0262】

上記の抗体重鎖遺伝子発現カセット、抗体軽鎖遺伝子発現カセットおよびネオマイシン耐性遺伝子発現カセットを連結し、さらにその両端に Tol2-R 配列を含む DNA 断片および Tol2-L 配列を含む DNA 断片を連結し、抗ヒト CD98 抗体発現ベクター A を作製した (図 13)。

【0263】

(2) 改変型ネオマイシン耐性遺伝子 1 を有する抗ヒト CD98 抗体発現トランスポゾンベクターの作製

(1) で得られた野生型ネオマイシン耐性遺伝子を有する抗ヒト CD98 抗体発現トランスポゾンベクター A のネオマイシン耐性遺伝子を、配列番号 37 で表される塩基配列が

50

らなる改変型ネオマイシン耐性遺伝子 1 に置換した抗ヒト CD 9 8 抗体発現トランスポゾンベクター B を作製した。

【 0 2 6 4 】

改変型ネオマイシン耐性遺伝子 1 は、野生型ネオマイシン耐性遺伝子と同一のアミノ酸配列をコードし、且つ全体の 2 2 % にあたる 1 6 7 塩基を改変した。具体的には、全 3 2 個のロイシン残基のうち、2 5 個のロイシン残基に対応するコドンを T A A となるように改変した。

【 0 2 6 5 】

(3) 改変型ネオマイシン耐性遺伝子 2 を有する抗ヒト CD 9 8 抗体発現トランスポゾンベクターの作製

(1) で得られた野生型ネオマイシン耐性遺伝子を有する抗ヒト CD 9 8 抗体発現トランスポゾンベクター A のネオマイシン耐性遺伝子を、配列番号 3 8 で表される塩基配列からなる改変型ネオマイシン耐性遺伝子 2 に置換した抗ヒト CD 9 8 抗体発現トランスポゾンベクター C を作製した。

【 0 2 6 6 】

改変型ネオマイシン耐性遺伝子 2 は、野生型ネオマイシン耐性遺伝子と同一のアミノ酸配列をコードし、且つ全体の 2 3 % にあたる 1 8 0 塩基を改変した。具体的には、全 3 2 個のロイシン残基のうち、2 8 個のロイシン残基に対応するコドンを T A A となるように改変している。

【 0 2 6 7 】

(4) 改変型ネオマイシン耐性遺伝子 3 を有する抗ヒト CD 9 8 抗体発現トランスポゾンベクターの作製

(1) で得られた野生型ネオマイシン耐性遺伝子を有する抗ヒト CD 9 8 抗体発現トランスポゾンベクター A のネオマイシン耐性遺伝子を、配列番号 3 9 で表される塩基配列からなる改変型ネオマイシン耐性遺伝子 3 に置換した抗ヒト CD 9 8 抗体発現トランスポゾンベクター D を作製した。

【 0 2 6 8 】

改変型ネオマイシン耐性遺伝子 3 は、野生型ネオマイシン耐性遺伝子と同一のアミノ酸配列をコードし、且つ全体の 2 6 % にあたる 2 0 3 塩基を改変している。具体的には、全 3 2 個のロイシン残基のうち、3 0 個のロイシン残基に対応するコドンを T A A となるように改変している。

【 0 2 6 9 】

[実施例 1 0] 改変型ネオマイシン耐性遺伝子を発現する抗体生産 CHO 細胞による抗体生産

実施例 9 (1) ~ (4) で作製した抗ヒト CD 9 8 抗体発現トランスポゾンベクター A ~ D を、配列番号 4 0 で表されるアミノ酸配列からなる T o l 2 トランスポゼースを発現するベクター p C A G G S - T 2 T P [K a w a k a m i K & N o d a T . G e n e t i c s . 1 6 6 , 8 9 5 - 8 9 9 (2 0 0 4)] とともに浮遊化 CHO - K 1 細胞にそれぞれ導入し、抗体生産細胞 A ~ D を作製した。

【 0 2 7 0 】

浮遊 CHO 細胞へのベクターの導入は、CHO 細胞 (4×10^6 個) を 4 0 0 μ L の P B S パッファーに懸濁し、環状 DNA のままの抗ヒト CD 9 8 抗体発現トランスポゾンベクター (1 0 μ g) および T o l 2 トランスポゼース発現ベクター p C A G G S - T 2 T P (2 0 μ g) を、エレクトロポレーション法により共導入することにより行った。

【 0 2 7 1 】

ここで、T o l 2 トランスポゼース発現ベクターもまた、T o l 2 トランスポゼースを一過性に発現させるため、環状 DNA のまま導入した。

【 0 2 7 2 】

また、T o l 2 トランスポゼースを用いないコントロールとして、実施例 1 9 (4) の抗ヒト CD 9 8 抗体発現トランスポゾンベクター D (1 0 μ g) を、制限酵素 P c i I (

10

20

30

40

50

タカラバイオ社)により直鎖状にした後、エレクトロポレーション法により、浮遊化CHO-K1細胞に導入した。

【0273】

エレクトロポレーションは、エレクトロポレーター[Gene Pulser Xcell system (Bio-Rad社製)]を用い、電圧300V、静電容量500μF、室温の条件で、gap幅4mmのキュベット(Bio-Rad社製)を使用して行った。

【0274】

エレクトロポレーションによる遺伝子導入後、各々のキュベットの細胞は、1枚の96穴プレートに播種し、5%大豆加水分解物を加えたCD OptiCHO培地(Invitrogen社)を用いて、CO₂インキュベータ内で3日間培養した。

【0275】

次に、遺伝子導入4日後の培地交換から、最終濃度500μg/mLになるようにG418(Geneticin^(R)、Invitrogen社)を加え、G418存在下で培養し、1週間毎に培地交換を行いながら、3週間培養した。

【0276】

培養後、抗体の発現を、FRET(蛍光共鳴エネルギー移動)を利用したサンドイッチ法により、LANCER^(R)アッセイ(パーキンエルマー社)で定量した。その結果を表9に示す。

【0277】

【表9】

	抗体生産細胞				コントロール細胞
	A (野生型)	B (改変1)	C (改変2)	D (改変3)	
最高の発現を示す細胞の抗体発現量(mg/L)	0.5	2.0	1.6	5.1	—
上位10細胞の平均抗体発現量(mg/L)	0.5	0.7	0.7	1.7	—

【0278】

表9に示すとおり、改変型ネオマイシン耐性遺伝子を発現する細胞B~Dでは、野生型ネオマイシン耐性遺伝子を発現する細胞Aに比べ、抗ヒトCD98抗体の発現量が高かった。

【0279】

特に、改変型ネオマイシン耐性遺伝子3を発現する抗ヒトCD98抗体生産細胞Dでは、野生型ネオマイシン耐性遺伝子を発現する抗ヒトCD98抗体生産細胞Aの10倍の発現を示す細胞株が得られた。

【0280】

また、改変型ネオマイシン耐性遺伝子3を用いても、Tol2トランスポゼース発現ベクターを共導入していないコントロール細胞では、ベクターを線状化したにも係わらず、抗ヒトCD98抗体発現細胞を得ることができなかった。

【0281】

[実施例11]ピューロマイシン耐性遺伝子および抗ヒトCD98抗体を発現するトランスポゾンベクターの作製(1)改変型ピューロマイシン耐性遺伝子1を有する抗ヒトCD98抗体発現トランスポゾンベクターの作製

実施例9(1)で得られた野生型ネオマイシン耐性遺伝子を有する抗ヒトCD98抗体発現トランスポゾンベクターAのネオマイシン耐性遺伝子を配列番号41で表される塩基配列からなる改変型ピューロマイシン耐性遺伝子1に置換した抗ヒトCD98抗体発現トランスポゾンベクターEを作製した。

【0282】

10

20

30

40

50

改変型ピューロマイシン耐性遺伝子1は、配列番号42で表される塩基配列からなる野生型ピューロマイシン耐性遺伝子(ピューロマイシン-N-アセチルトランスフェラーゼ遺伝子、Genbank Accession No. U07648.1に開示される塩基配列からなる)と同一のアミノ酸配列をコードし、且つ全体の3%にあたる17塩基を改変している。具体的には、ピューロマイシン耐性遺伝子に含まれる全28個のアラニン残基のうち、改変により17個のアラニン残基に対応するコドンをGCGとし、野生型で既にGCGであったコドンと併せて、全てのアラニン残基に対応するコドンをGCGとした。

【0283】

(2) 改変型ピューロマイシン耐性遺伝子2を有する抗ヒトCD98抗体発現トランスポゾンベクターの作製

実施例9(1)で得られた野生型ネオマイシン耐性遺伝子を有する抗ヒトCD98抗体発現トランスポゾンベクターAのネオマイシン耐性遺伝子を配列番号43で表される塩基配列からなる改変型ピューロマイシン耐性遺伝子2に置換した抗ヒトCD98抗体発現トランスポゾンベクターFを作製した。改変型ピューロマイシン耐性遺伝子2は、野生型ピューロマイシン耐性遺伝子と同一のアミノ酸配列をコードし、且つ全体の14%にあたる79塩基を改変している。具体的には、改変型ピューロマイシン耐性遺伝子1のアラニン残基に対応するコドンの改変に加え、ロイシン残基に対応するコドンをTAA、バリン残基に対応するコドンをGTA、セリンのコドンをTCGとした。

【0284】

[実施例12] 改変型ピューロマイシン耐性遺伝子を発現する抗体生産CHO細胞による抗体生産1

実施例11(1)の改変型ピューロマイシン耐性遺伝子1を有する抗ヒトCD98抗体発現トランスポゾンベクターE、実施例11(2)の改変型ピューロマイシン耐性遺伝子2を有する抗ヒトCD98抗体発現トランスポゾンベクターF、Tol2トランスポゼース発現ベクターpCAGGS-T2TPを浮遊化したCHO-K1細胞に導入し、抗体生産細胞EおよびFを作製した。

【0285】

浮遊性CHO細胞へのベクターの導入は、浮遊化CHO細胞(4×10^6 個)を400 μ LのPBSバッファーに懸濁し、環状DNAのままの改変型ピューロマイシン耐性遺伝子を有する抗ヒトCD98抗体発現トランスポゾンベクター(10 μ g)と、pCAGGS-T2TP(20 μ g)を、エレクトロポレーション法により共導入することにより行った。

【0286】

ここで、Tol2トランスポゼース発現ベクターpCAGGS-T2TPもまた、Tol2トランスポゼースを一過性に発現させるため、環状DNAのまま導入した。

【0287】

エレクトロポレーションは、エレクトロポレーター[Gene Pulser Xcell system (Bio-Rad社製)]を用い、電圧300V、静電容量500 μ F、室温の条件で、gap幅4mmのキュベット(Bio-Rad社製)を使用して行った。

【0288】

エレクトロポレーションによる遺伝子導入後、各々のキュベットの細胞は、1枚の96穴プレートに播種し、5%大豆加水分解物を加えたCD OptiCHO 培地(Invitrogen社)を用いて、CO₂インキュベータ内で3日間培養した。

【0289】

次に、遺伝子導入2日後の培地交換から、最終濃度5 μ g/mLになるようにピューロマイシン(P9620、Sigma-Aldrich社)を加え、1週間毎にピューロマイシンを含む培地に培地交換を行いながら、4週間培養した。

【0290】

10

20

30

40

50

培養後、抗体の発現量を、FRET（蛍光共鳴エネルギー移動）を利用したサンドイッチ法により、LANCER^(R)アッセイ（パーキンエルマー社）で定量した。その結果を表2に示す。

【0291】

【表10】

	抗体生産細胞	
	E (改変1)	F (改変2)
最高の発現を示す細胞の 抗体発現量(mg/L)	1.0	2.2
上位10細胞の 平均抗体発現量(mg/L)	0.7	1.6

10

【0292】

表10に示すとおり、改変型ピューロマイシン耐性遺伝子2を発現する抗体生産細胞Fは、改変型ピューロマイシン耐性遺伝子1を発現する抗体生産細胞Eの2倍以上の抗体生産量を示した。

【0293】

[実施例13] 改変型ピューロマイシン耐性遺伝子を発現する抗体生産CHO細胞による抗体生産2

実施例12で得られた改変型ピューロマイシン耐性遺伝子2を発現する抗体生産細胞Fを三角フラスコで培養し、抗ヒトCD98抗体を生産した。

【0294】

具体的には、抗体生産細胞Fを96穴プレートから24穴プレート、次いで6穴プレートと順次拡大培養した。細胞数が十分増えた抗体生産細胞F2株（細胞株1および細胞株2）を選抜し、それぞれ 2×10^5 個/mlになるように、5%大豆加水分解物を加えたCD OptiCHO培地（Invitrogen社）35mlに懸濁し、125ml容の三角フラスコ（ベントキャップ付き、コーニング社）を用いて、37℃、5%CO₂の雰囲気中で1週間旋回培養し、抗ヒトCD98抗体を生産した。

30

【0295】

培養後の培地中の抗体量を、HPLC（Waters社）で定量した。その結果を表11に示す。

【0296】

【表11】

	細胞株1	細胞株2
抗体発現量 (mg/L)	15.6	14.8

40

【0297】

以上の結果は、浮遊性のCHO細胞において、一対のトランスポゾン配列の間に挿入された抗体遺伝子、および、改変型薬剤耐性遺伝子が、効率よく宿主の染色体内に導入され、しかも高発現細胞の選抜に有効であることを示している。また、得られた細胞は拡大培養が可能であり、浮遊培養条件にて目的タンパク質の生産が可能であることがわかった。

【0298】

本発明を詳細にまた特定の実施態様を参照して説明したが、本発明の精神と範囲を逸脱することなく様々な変更や修正を加えることができることは当業者にとって明らかである。

本出願は、2010年12月15日出願の日本特許出願2010-279849に基づ

50

くものであり、その内容はここに参照として取り込まれる。

【産業上の利用可能性】

【0299】

本発明のタンパク質の生産方法により、目的タンパク質を浮遊性の哺乳動物細胞を用いて効率よく生産することができる。本発明の細胞は、遺伝子組み換えタンパク質を生産するためのタンパク質生産細胞として使用できる。

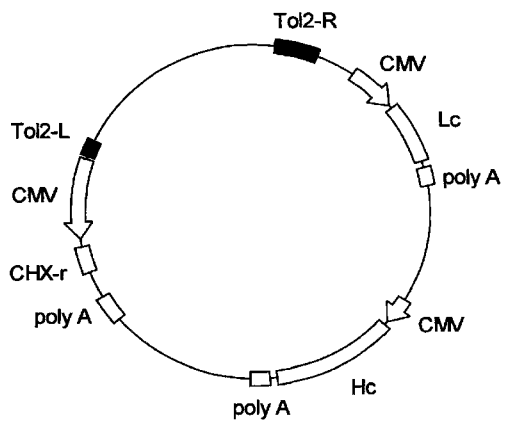
【配列表フリーテキスト】

【0300】

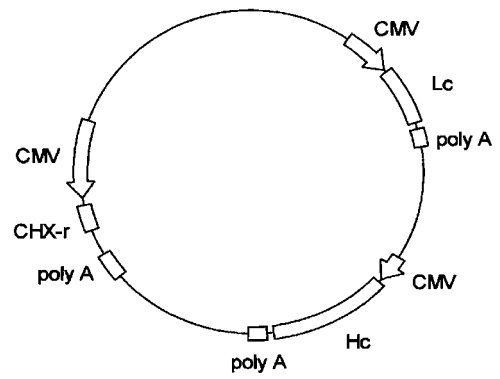
配列番号1 - 人工配列の説明；非自律性Tol2トランスポゾンの塩基配列	
配列番号2 - 人工配列の説明；Tol2-L配列	10
配列番号3 - 人工配列の説明；Tol2-R配列	
配列番号7 - 人工配列の説明；シクロヘキシミド耐性遺伝子の塩基配列	
配列番号8 - 人工配列の説明；シクロヘキシミド耐性遺伝子がコードするタンパク質のアミノ酸配列	
配列番号9 - 人工配列の説明；M2Z3抗体H鎖をコードする塩基配列	
配列番号10 - 人工配列の説明；M2Z3抗体H鎖のアミノ酸配列	
配列番号11 - 人工配列の説明；M2Z3抗体L鎖をコードする塩基配列	
配列番号12 - 人工配列の説明；M2Z3抗体L鎖のアミノ酸配列	
配列番号13 - 人工配列の説明；非自律性Tol1の塩基配列	
配列番号14 - 人工配列の説明；Tol1-L配列	20
配列番号15 - 人工配列の説明；Tol1-R配列	
配列番号18 - 人工配列の説明；CD98抗体重鎖可変領域をコードする塩基配列	
配列番号19 - 人工配列の説明；CD98抗体重鎖可変領域のアミノ酸配列	
配列番号20 - 人工配列の説明；CD98抗体重鎖可変領域のアミノ酸配列	
配列番号21 - 人工配列の説明；CD98抗体軽鎖可変領域をコードする塩基配列	
配列番号22 - 人工配列の説明；CD98抗体軽鎖可変領域のアミノ酸配列	
配列番号23 - 人工配列の説明；CD98抗体軽鎖可変領域のアミノ酸配列	
配列番号24 - 人工配列の説明；抗ヒトTNF抗体重鎖可変領域をコードする塩基配列	
配列番号25 - 人工配列の説明；抗ヒトTNF抗体重鎖可変領域のアミノ酸配列	
配列番号26 - 人工配列の説明；抗ヒトTNF抗体重鎖可変領域のアミノ酸配列	30
配列番号27 - 人工配列の説明；抗ヒトTNF抗体軽鎖可変領域をコードする塩基配列	
配列番号28 - 人工配列の説明；抗ヒトTNF抗体軽鎖可変領域のアミノ酸配列	
配列番号29 - 人工配列の説明；抗ヒトTNF抗体軽鎖可変領域のアミノ酸配列	
配列番号30 - 人工配列の説明；抗ヒトCD20抗体重鎖可変領域をコードする塩基配列	
配列番号31 - 人工配列の説明；抗ヒトCD20抗体重鎖可変領域のアミノ酸配列	
配列番号32 - 人工配列の説明；抗ヒトCD20抗体重鎖可変領域のアミノ酸配列	
配列番号33 - 人工配列の説明；抗ヒトCD20抗体軽鎖可変領域をコードする塩基配列	
配列番号34 - 人工配列の説明；抗ヒトCD20抗体軽鎖可変領域のアミノ酸配列	
配列番号35 - 人工配列の説明；抗ヒトCD20抗体軽鎖可変領域のアミノ酸配列	
配列番号36 - 人工配列の説明；野生型ネオマイシン耐性遺伝子の塩基配列	40
配列番号37 - 人工配列の説明；改変型ネオマイシン耐性遺伝子の塩基配列	
配列番号38 - 人工配列の説明；改変型ネオマイシン耐性遺伝子の塩基配列	
配列番号39 - 人工配列の説明；改変型ネオマイシン耐性遺伝子の塩基配列	
配列番号41 - 人工配列の説明；改変型ピューロマイシン耐性遺伝子の塩基配列	
配列番号42 - 人工配列の説明；野生型ピューロマイシン耐性遺伝子の塩基配列	
配列番号43 - 人工配列の説明；改変型ピューロマイシン耐性遺伝子の塩基配列	
配列番号44 - 人工配列の説明；改変型ピューロマイシン耐性遺伝子の塩基配列	
配列番号45 - 人工配列の説明；改変型ゼオシン耐性遺伝子の塩基配列	
配列番号46 - 人工配列の説明；改変型ゼオシン耐性遺伝子の塩基配列	
配列番号47 - 人工配列の説明；改変型ハイグロマイシン耐性遺伝子の塩基配列	50

配列番号 4 8 - 人工配列の説明；改変型ハイグロマイシン耐性遺伝子の塩基配列

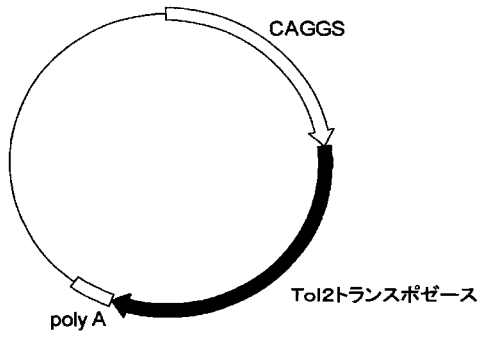
【 図 1 】



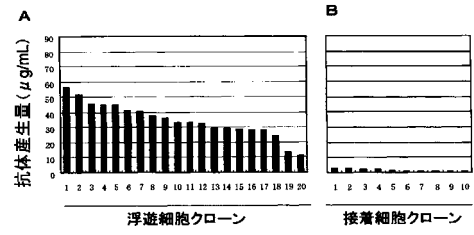
【 図 2 】



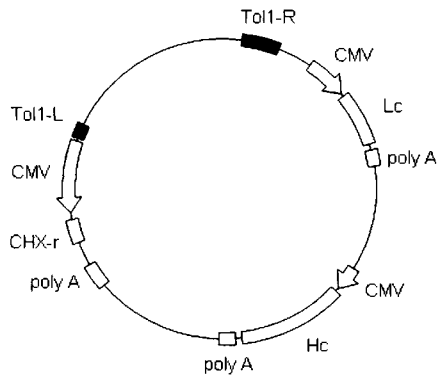
【 図 3 】



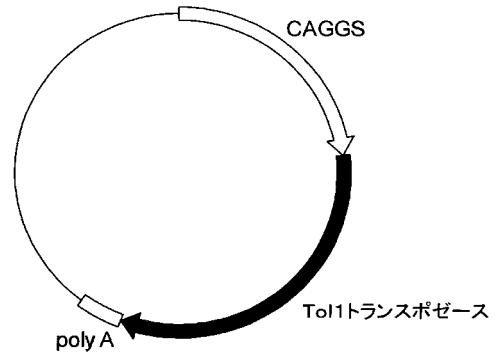
【 図 4 】



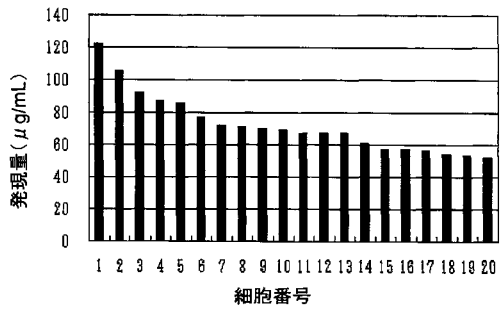
【 図 5 】



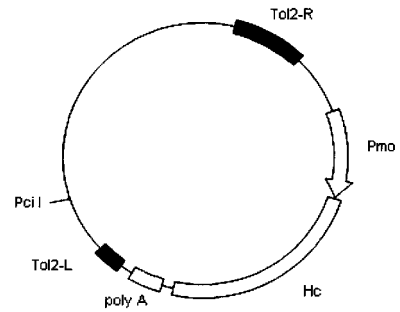
【 図 6 】



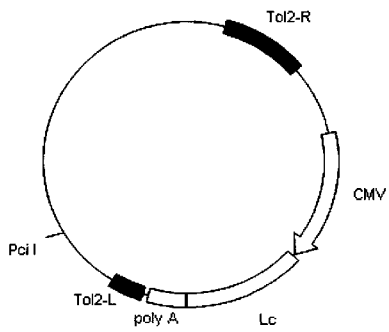
【 図 7 】



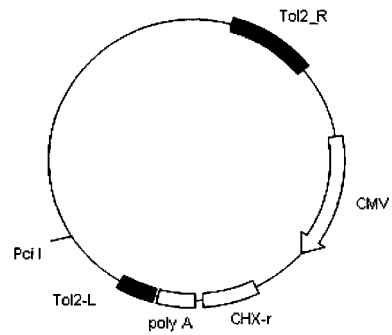
【 図 8 】



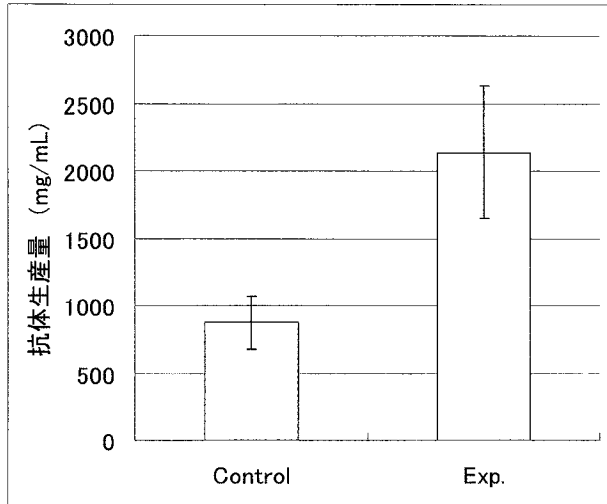
【 図 9 】



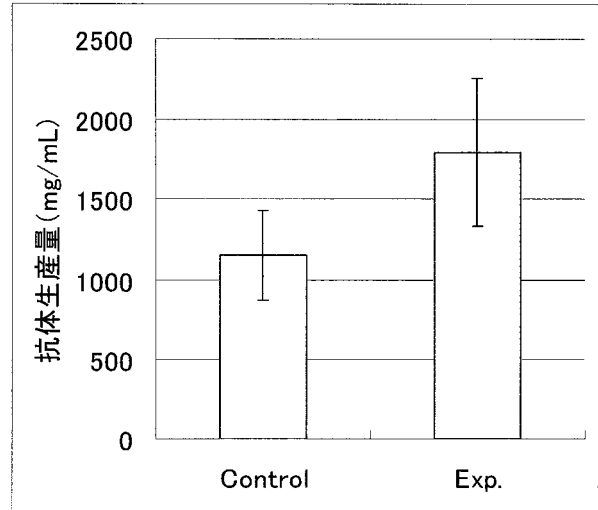
【 図 10 】



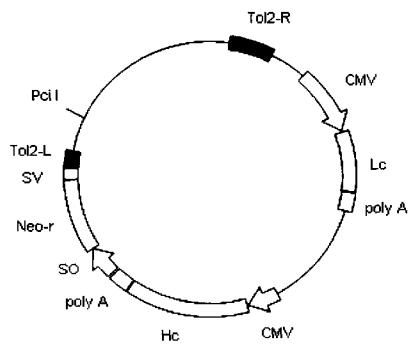
【 图 1 1 】



【 图 1 2 】



【 图 1 3 】



【配列表】

2012081628000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2011/078935
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N15/09(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12P21/02(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N15/09, C12N5/10, C12P21/02, C12P21/08 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2011 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2011 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2011 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA/BIOSIS/MEDLINE (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI, JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	US 2010/0311116 A1 (EXCELLGENE SA, Monthey (CH)), 09 December 2010 (09.12.2010), paragraphs [0072] to [0081] (Family: none)	1-11, 14, 18-26, 29, 33/ 1-36
Y	JP 2002-262879 A (Kirin Brewery Co., Ltd.), 17 September 2002 (17.09.2002), examples (Family: none)	1-36
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 28 December, 2011 (28.12.11)		Date of mailing of the international search report 17 January, 2012 (17.01.12)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/078935

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	Kenta SUMIYAMA, Koichi KAWAKAMI, "Tol2 Transposon o Mochiita Kakkiteki na Transgenic Mouse Sakuseiho", Experimental Medicine, 2010. 10, vol.28, no.16, pages 2653 to 2660, page 2653, right column, lines 8 to 14, page 2654, left column, lines 10 to 12, page 2656, lines 4, 5	33-35/1-16, 18-31,33-35
X/Y	WO 2008/072540 A1 (Nagoya University, Niigata University), 19 June 2008 (19.06.2008), paragraph [0005]; examples & US 2010/0129914 A1	33,34,36/ 1-15,17-30, 32-34,36
P,X	WO 2010/143698 A1 (Inter-University Research Institute Corporation Research Organization of Information and Systems, Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd.), 16 December 2010 (16.12.2010), & US 2011/0045532 A1	1-36
A	YAGITA, Kazuhiro et al., Real-time monitoring of circadian clock oscillations in primary cultures of mammalian cells using Tol2 transposon-mediated gene transfer strategy., BMC Biotechnol., 2010.01, Vol.10, p.1-7	1-36
A	WU, Sareina Chiung-Yuan et al., piggyBac is a flexible and highly active transposon as compared to sleeping beauty, Tol2, and Mos1 in mammalian cells., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 2006, Vol.103, No.41, p.15008-15013	1-36
A	URASAKI, Akihiro et al., Functional dissection of the Tol2 transposable element identified the minimal cis-sequence and a highly repetitive sequence in the subterminal region essential for transposition., Genetics, 2006, Vol.174, No.2, p.639-649	1-36

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 1 / 0 7 8 9 3 5												
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12P21/02(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)i														
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09, C12N5/10, C12P21/02, C12P21/08														
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2011年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2011年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2011年</td> </tr> </table>			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2011年	日本国実用新案登録公報	1996-2011年	日本国登録実用新案公報	1994-2011年				
日本国実用新案公報	1922-1996年													
日本国公開実用新案公報	1971-2011年													
日本国実用新案登録公報	1996-2011年													
日本国登録実用新案公報	1994-2011年													
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CA/BIOSIS/MEDLINE (STN), GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, WPI, JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)														
C. 関連すると認められる文献														
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号												
X/Y	US 2010/0311116 A1 (EXCELLGENE SA, Monthey(CH)) 2010.12.09, 【0072】 - 【0081】 (ファミリーなし)	1-11、1 4、18-2 6、29、3 3/1-36												
Y	JP 2002-262879 A (麒麟麦酒株式会社) 2002.09.17, 実施例 (ファミ リリーなし)	1-36												
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。														
<table border="0"> <tr> <td>* 引用文献のカテゴリー</td> <td>の日の後に公表された文献</td> </tr> <tr> <td>「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</td> <td>「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</td> </tr> <tr> <td>「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</td> <td>「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</td> </tr> <tr> <td>「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</td> <td>「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</td> </tr> <tr> <td>「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td>「&」同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</td> <td></td> </tr> </table>			* 引用文献のカテゴリー	の日の後に公表された文献	「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの	「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)	「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの	「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」同一パテントファミリー文献	「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	
* 引用文献のカテゴリー	の日の後に公表された文献													
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの													
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの													
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)	「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの													
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」同一パテントファミリー文献													
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願														
国際調査を完了した日 28.12.2011	国際調査報告の発送日 17.01.2012													
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 小倉 梢 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4 B 4504												

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 1 / 0 7 8 9 3 5
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X/Y	隅山健太、川上浩一, Tol2 トランスポゾンを用いた画期的なトランスジェニックマウス作製法, 実験医学, 2010.10, Vol. 28, No. 16, p. 2653-2660, 第 2653 頁右欄第 8-14 行、第 2654 頁左欄第 10-12 行、第 2656 頁第 4, 5 行	3 3 - 3 5 / 1 - 1 6、1 8 - 3 1、3 3 - 3 5
X/Y	WO 2008/072540 A1 (国立大学法人名古屋大学、国立大学法人新潟大学) 2008.06.19, 【0005】、実施例 & US 2010/0129914 A1	3 3、3 4、 3 6 / 1 - 1 5、1 7 - 3 0、3 2 - 3 4、3 6
P, X	WO 2010/143698 A1 (大学共同利用機関法人情報・システム研究機構、協和発酵キリン株式会社) 2010.12.16, & US 2011/0045532 A1	1 - 3 6
A	YAGITA, Kazuhiro et al., Real-time monitoring of circadian clock oscillations in primary cultures of mammalian cells using Tol2 transposon-mediated gene transfer strategy., BMC Biotechnol., 2010.01, Vol. 10, p. 1-7	1 - 3 6
A	WU, Sareina Chiung-Yuan et al., piggyBac is a flexible and highly active transposon as compared to sleeping beauty, Tol2, and Mos1 in mammalian cells., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 2006, Vol. 103, No. 41, p. 15008-15013	1 - 3 6
A	URASAKI, Akihiro et al., Functional dissection of the Tol2 transposable element identified the minimal cis-sequence and a highly repetitive sequence in the subterminal region essential for transposition., Genetics, 2006, Vol. 174, No. 2, p. 639-649	1 - 3 6

フロントページの続き

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

(72)発明者 川上 浩一

静岡県三島市谷田 1 1 1 1 大学共同利用機関法人情報・システム研究機構 国立遺伝学研究所内

(72)発明者 黒川 恵

東京都千代田区大手町一丁目 6 番 1 号 協和発酵キリン株式会社 本社内

(72)発明者 山口 恵奈

東京都千代田区大手町一丁目 6 番 1 号 協和発酵キリン株式会社 本社内

(72)発明者 小川 梨沙

東京都千代田区大手町一丁目 6 番 1 号 協和発酵キリン株式会社 本社内

(72)発明者 塚原 正義

東京都千代田区大手町一丁目 6 番 1 号 協和発酵キリン株式会社 本社内

(72)発明者 林 洋子

群馬県高崎市日高町 1 0 2 5 - 3 - 3 0 4

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA05 AA11 BA01 BA21 BA31 BA41 CA01 GA30 HA01
HA20

4B064 AG01 CA11 CA19 CC03 CC24 CD30 DA01 DA10 DA13

4B065 AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 BB32 CA24 CA41 CA44 CA46

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。