明　細　書

発明の名称 ： タンパク質の生産方法

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対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、一対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対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] 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。

[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。

[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。

[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、そのいくつかが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ｐｉｇｇｙＢａｃ（非特許文献４）が挙げられる。

[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ｐｉｇｇｙＢａｃを用いて、外来遺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）。

[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。

[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。

[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。

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] 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）

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）

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。

[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。

[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

片の両端に一対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、一対（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。

[0027] 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対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ＤＮＡを含む遺伝子断片を該哺乳動物細胞の染色体に組込み、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。

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対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、且つ一対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ＤＮＡを含む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

（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対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ＤＮＡを含む遺伝子断片を該哺乳動物細胞の染色体に組込み、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。

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対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対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対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対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。

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対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

一対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対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対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対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対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対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。

１４．一対のトランスポゾン配列が哺乳動物細胞で機能する一対の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。

１５．一対のＤＮＡ型トランスポゾン由来の塩基配列が、一対の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。

１６．一対の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。

１７．一対の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対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、且つ一対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、該一対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対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対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対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１８～２０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対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対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対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対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対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対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対のトランスポゾン配

列を含む発現ベクター。

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。

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。

２９．一対のトランスポゾン配列が哺乳動物細胞で機能する一対の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。

３０．一対のＤＮＡ型トランスポゾン由来の塩基配列が、一対の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。

３１．一対の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。

３２．一対の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対のトランスポゾン配列を含む発現ベクター。

３４．一対のトランスポゾン配列が一対の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。

３５．一対の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。

３６．一対の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。

[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。

[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（μｇ／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。

[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（μｇ／ｍＬ）、横軸は各細胞の遺伝子導入クローン番号を示す。

[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。

[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。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、ＣＨＸ－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、ＴＮＦα－ＣＨＸタンデムベクターまたは、ＴＮＦαＨ－ＣＨＸベクターならびにＴＮＦαＬベクターを、ＣＨＯ－Ｋ１細胞へ遺伝子導入した時の、抗ヒトＴＮＦα抗体産生量を示す。縦軸は、培地中に産生された抗体濃度（ｍｇ／ｍＬ）、対照区はコントロール、実験区はＥｘｐ．で示す。

[図12]図１２は、ＣＤ２０－ＣＨＸタンデムベクターまたは、ＣＤ２０Ｈ－ＣＨＸベクターならびにＣＤ２０Ｌベクターを、ＣＨＯ－Ｋ１細胞へ遺伝子導入した時の、抗ヒトＣＤ２０抗体産生量を示す。縦軸は、培地中に産生された抗体濃度（ｍｇ／ｍＬ）、対照区はコントロール、実験区はＥｘｐ．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、Ｔｏｌ２－ＬはＴｏｌ２－Ｌ配列（配列番号２）からなるＤＮＡ断片を、Ｔｏｌ２－ＲはＴｏｌ２－Ｒ配列（配列番号３）からなるＤＮＡ断片を、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は抗ヒトＣＤ９８抗体の重鎖遺伝子を、Ｌｃは抗ヒトＣＤ９８抗体軽鎖遺伝子を

、ＳＯはＳＶ４０プロモーターを、ＳＶはＳＶ４０ポリアデニレーションサイトを、Ｎｅｏｒ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対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、一対（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ＤＮＡ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ＤＮＡを含む遺伝子断片を含み、該遺伝子断片の両端に一対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、且つ一対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ＤＮＡを含む遺伝子断片を前記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

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対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、一対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対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対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。

[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対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、一対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。

[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対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対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。

[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対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対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

（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対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、且つ一対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、一対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

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対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対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、且つ一対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、一対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

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対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対のトランスポゾン配列を含む発現ベクターが導入され、一対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対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、一対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対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、且つ一対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、該一対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対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対のトランスポゾン配列を含む少なくとも１種類の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、且つ一対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、該一対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。

[0047] 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（ｔｒａｎｓｐｏｓｉｔｉｏｎ）する遺伝子単位を意味する。

[0048] 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［Ｉｎｖｅｒｔｅｄ Ｒｅｐｅａｔ Ｓｅｑｕｅｎｃｅ（ＩＲ配列）またはＴｅｒｍｉｎａｌ Ｉｎｖｅｒｔｅｄ Ｒｅｐｅａｔ Ｓｅｑｕｅｎｃｅ（ＴＩＲ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。

[0049] 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、一対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。

[0050] 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、ＩＲ配列またはＴＩＲ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。

[0051] 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対のＤＮＡ型トランスポゾン由来の塩基配列がより好ましい。

[0052] 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Ｔｏｌ１トランスポゾントランスポゾンおよびＴｏｌ２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Ｓｌｅｅｐｉｎｇ Ｂｅａｕｔｙ、カエル由来の人工トランスポゾンＦｒｏｇ Ｐｒｉｎｃｅ並びに昆虫由来のトランスポゾンＰｉｇｇｙＢａｃ由来の

塩基配列が挙げられる。

[0053] 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Ｔｏｌ２トランスポゾンおよび配列表の配列番号１３で表される塩基配列からなるメダカ由来Ｔｏｌ１トランスポゾン由来の塩基配列が好ましい。

[0054] 一対のＴｏｌ２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Ｔｏｌ２トランスポゾンの塩基配列の１番目から２２２９番目の塩基配列および４１４８番目から４６８２番目の塩基配列が挙げられる。

[0055] 一対のＴｏｌ２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Ｔｏｌ２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２）（以下、「Ｔｏｌ２－Ｌ配列」と記載する）と、２２８５番目から２７８８番目の塩基配列（配列番号３）（以下、Ｔｏｌ２－Ｒ配列と記載する）が挙げられる。

[0056] 一対のＴｏｌ１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Ｔｏｌ１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] 一対のＴｏｌ１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Ｔｏｌ１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、「Ｔｏｌ１－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、Ｔｏｌ１－Ｒ配列と記載する）が挙げられる。

[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。

[0060] 具体的には、例えば、２つのＴｏｌ１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Ｔｏｌ２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、Ｔｏｌ１トランスポゼース発現ベクターおよびＴｏｌ２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。

[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、一対（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込み、該ＤＮＡを宿主細胞の染色体内に組込み、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。

[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Ｔｏｌ１およびＴｏｌ２、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（ＳＢ）、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ　Ｂｅａｕｔｙ　１１（ＳＢ１１）、カエル由来の人工トランスポゾンＦｒｏｇ　Ｐｒｉｎｃｅ（ＦＰ）、または昆虫由来のトランスポゾンＰｉｇｇｙＢａｃ（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（１９８

４）］、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対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。

[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。

[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、ＳＲα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。

[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。

[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．　Ｂｉｏ

ｅｎｇ．　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。

[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。

[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内のコドンを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内のコドンを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。

[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づ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、バリンのコドンを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。

[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％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、リポソーム法、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／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，６０１２７５（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。

[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。

[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）］、α１，６－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Ｆｘタンパク質が欠損した細胞を用いることもできる。

[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、比較的低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）、卵胞刺激ホルモン（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）、組織プラスミノー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。

[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）ポリペプチドからなる分子であり、ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧおよびＩｇＭサブクラスが知られている。更にＩｇＧはＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３およびＩｇＧ４クラスに分類される。

[0107] ＩｇＧ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関与す

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。

[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。

[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。

[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対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対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対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対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対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対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対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、且つ一対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、一対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対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対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対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対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対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対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対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、且つ一対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、一対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対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対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対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対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対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対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対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、且つ一対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、一対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対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対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対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対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対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対のトランスポゾ

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対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、且つ一対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、一対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、ＦｃγＲＩＩＩ（ＣＤ１６）とｃｏｍｍｏｎγ鎖が共導入された細胞、ｎｅｏｎａｔａｌ　Ｆｃ　ｒｅｃｅｐｔｏｒ（ＦｃＲｎ）とβ２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。

[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、ｉｎｔｅｇｌｉｎ、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－ｃａｔｈｅｒｉｎ、ｅｐｉｄｅｒｍａｌ ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｔｅｒ ｒｅｃｅｐｔｏｒ（ＥＧＦＲ）、ＥＧＦＲｖＩＩＩ、ＥＧＦＲ２（ＨＥＲ２）、ＥＧＦＲ３（ＨＥＲ３）、ＥＧＦＲ４（ＨＥＲ４）、ｅｎｄｏｇｌｉｎ、ｅｐｉｔｈｅｌ

ial cell adhesion molecule(EpCAM)、endothelial protein C receptor (EPCR)、ephrin、ephrin receptor(Eph)、EphA2、endotheliase−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 homologue 10(FZD10)、frizzled receptor 4(FZD−4)、G250、G−CSF receptor、ganglioside(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 (MISIIR)、mucin、neural cell adhesion molecule (NCAM)、Necl−5、Notch1、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)、transferrin 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 fact

ｏｒ－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［Ｃａｎｃｅｒ 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（Ｅｒｂｉｔｕｘ(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（Ｐｅｒｉ　ｅｔ

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αＶβ３抗体およびα４β７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、抗ベロ毒素抗体［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α１，６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。

[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。

[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、α１，６－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、α１，６－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。

[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。

[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生存、増殖していても、いずれの状態でもよい。

[0135] 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（ｆｅｔａｌ　ｃａｌｆ　ｓｅｒｕｍ、以下ＦＣＳと記す）などが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。

[0136] 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。

[0137] 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。

[0138] 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、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ＣＨＯ－Ｓ細胞（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社製）などを挙げることができる。

[0139] 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、Ｍｏｌ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２０００，１５（３），２４９－５７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．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２００７，１３０（３），２８２－９０］。

[0140] 「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。

[0141] 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１／１０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。

[0142] また、培養液中に適当な非イオン性界面活性剤Ｐｌｕｒｏｎｉｃ－Ｆ６８などを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。

[0143] 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ＮＳ０およびＣＨＯ細胞などが挙げられる。

[0144] 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／ｍＬ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／ｍＬ以上であることが好ましく、８×１０^{5}細胞／ｍＬ以上であることがより好ましく、１×１０^{6}細胞／ｍＬ以上であることが特に好ましく、１．５×１０^{6}細胞／ｍＬ以上であることが最も好ましい。

[0145] 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。

[0146] 浮遊培地は、例えば、ＣＤ－ＣＨＯ培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）、ＥＸ－ＣＥＬＬ　３２５－ＰＦ培地（ＳＡＦＣ　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％ CO_2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旋回撹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、硫安沈殿、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．Ｆｒｉｓｃｈ，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ら編、Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ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、一対の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。

[0160] 次の方法により、それぞれ一対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] 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α－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α－ＭＥＭ培地を用いて、５％ CO_2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α－ＭＥＭ培地に２×１０^{5}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α－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α－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．Ｇｅｎｅｔｉｃｓ．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４×１０^{6}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、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。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、標準的なエレクトロ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] 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。

[0174] エレクトロ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 ３２５－ＰＦ培地を、ＨＥＫ２９３細胞はｆｒｅｅＳｔｙｌｅ－２９３培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）を用いて、CO_2インキュ

ベータ内で３日間培養した。

[0175] 次に、遺伝子導入後４日後の培地交換から、３μｇ／ｍＬ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。

[0176] 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。

[0177] [表1]

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

[0178] [表2]

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

[0179] 表１に示すように、浮遊性の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または抗ヒトインフルエンザＭ２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Ｍ２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Ｍ２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。

[0180] 一方、表２に示すように、ＨＥＫ２９３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または抗ヒトインフルエンザＭ２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。

[0181] 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。

[0182] （３）浮遊性ＣＨＯ細胞と接着性ＣＨＯ細胞における抗体生産の検討

浮遊性ＣＨＯ細胞または接着性ＣＨＯ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ＣＨＯ細胞としては、浮遊培養に馴化した浮遊性ＣＨＯ－Ｋ１細胞を用いた。また、接着性ＣＨＯ細胞としては浮遊培養馴化前の接着性ＣＨＯ－Ｋ１細胞を用いた。

[0183] 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（１０μｇ）とＴｏｌ２ベクター（２５μｇ）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α－ＭＥＭ培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）を用いた。各細胞をCO_2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、３μｇ／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。

[0185] 浮遊性ＣＨＯ－Ｋ１細胞は1×10^6個の細胞を６穴プレートに播種し、CO_2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（2×10^6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。

[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（５μｇ／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。

[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。

[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。

[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] 次の方法により、それぞれ一対のトランスポゾン配列を含む合成ＤＮＡ断片を作製した。Ｔｏｌ１－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、Ｔｏｌ１－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。

[0195] 次に、作製したＴｏｌ１－Ｒ配列およびＴｏｌ１－Ｌ配列を含むＤＮＡ断片を、Ｎ５ＬＧ１＿Ｍ２＿Ｚ３ベクターに挿入した。Ｎ５ＬＧ１＿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、Ｔｏｌ１－Ｒ配列を含むＤＮＡ断片を、３’末端側に存在する制限酵素ＦｓｅＩおよびＡｓｃＩサイトに、Ｔｏｌ１－Ｌ配列を含むＤＮＡ断片を挿入した。

[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Ｌ３６ａ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、Ｔｏｌ１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Ｔｏｌ１トランスポゾン発現ベクターを構築した（図５）。

[0197] （２）Ｔｏｌ１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Ｔｏｌ１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Ｔｏｌ１トランスポゼース遺伝子発現カセットを、ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔＩＩ　ＳＫ（＋）（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ社製）に挿入し、Ｔｏｌ１トランスポゼース

発現ベクターｐＴｏｌ１ａｓｅ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Ｔｏｌ１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。

[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

[0199] 表３に示すように、浮遊性のＣＨＯ－Ｋ１細胞に、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導入すると、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、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。

[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ＴｏＩ１トランスポゾン由来の塩基配列を用いた場合にも、ＴｏＩ２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

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）。

[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対のトランスポゾン配列（ＴｏＩ－２Ｌ、ＴｏＩ２－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）。

[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）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４００μＬのＰＢＳに懸濁し、ＣＤ９８Ｈベクター（１０μｇ）、ＣＤ９８Ｌベクター（１０μｇ）、ＣＨＸベクター（１０μｇ）およびＴｏｌ２ベクター（１０μｇ）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 ＸｃｅｌｌｓｙｓｔｅｍＢｉｏ－Ｒａｄ社製）を用い、電圧３００ Ｖ、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。

[0211] また、対照区では、ＣＤ９８Ｈベクター（１０μｇ）、ＣＤ９８Ｌベクター（１０μｇ）およびＣＨＸベクター（１０μｇ）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、CO_2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、３μｇ／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。

[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™、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５．０μｇ／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]

	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

[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ゾンベクターの作製

実施例５（１）で作製した抗ヒトＣＤ９８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ＣＤ９８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ゾンベクター（以下、ＣＤ９８－ＣＨＸタンデムベクターと略記する）を構築した。

[0217] （２）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の作製

実施例５（１）で作製した抗ヒトＣＤ９８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ＣＤ９８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（ＣＤ９８Ｈ－ＣＨＸ発現トランスポゾンベクターと略記する）を構築した。

[0218] （３）抗ヒトＣＤ９８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ＣＤ９８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ＣＤ９８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ＣＤ９８抗体を高発現する細胞の出現数を比較した。

[0219] 実験区１では、４×１０^{6}個のＣＨＯ－Ｋ１細胞を４００μＬのＰＢＳに懸濁し、ＣＤ９８Ｈベクター（１０μｇ）、ＣＤ９８Ｌベクター（１０μｇ）、ＣＨＸベクター（１０μｇ）、およびＴｏｌ２ベクター（１０μｇ）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。

[0220] 実験区２では、４×１０^{6}個ＣＨＯ－Ｋ１細胞を４００μＬのＰＢＳに懸濁し、ＣＤ９８Ｈ－ＣＨＸベクター（１０μｇ）、ＣＤ９８Ｌベクター（１０

μｇ）およびＴｏＩ２ベクター（１０μｇ）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。

[0221] 対照区では、４×１０^{6}個ＣＨＯ－Ｋ１細胞を４００μＬのＰＢＳに懸濁し、ＣＤ９８－ＣＨＸタンデムベクター（１０μｇ）、ＴｏＩ２ベクター（２０μｇ）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ＴｏＩ２ベクターは、ＴｏＩ２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。

[0222] 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３．０μｇ／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５に示す。

[0223] [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] ＣＤ９８Ｈベクター、ＣＤ９８Ｌベクターおよび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。

[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

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ぞれぞれから、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）０．５ＣＤ培地３ｍＬに懸濁し、６穴プレートを用いて、３７℃、５％　CO_2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。

[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。

[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対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（ＴＮＦα）抗体の製造（１）抗ヒトＴＮＦα抗体重鎖遺伝子断片、抗ヒトＴＮＦα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２６および２９のアミノ酸配列を有する抗ヒトＴＮＦα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ＴＮＦα抗体由来ＶＨおよびＶＬにそれぞれ置換し、抗ヒトＴＮＦα抗体重鎖遺伝子断片、抗ヒトＴＮＦα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、ＴＮＦα－ＣＨＸタンデムベクターと略記する。）を構築した。

[0233] 抗ヒトＴＮＦα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ブ（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。

[0234] （２）抗ヒトＴＮＦα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ＴＮＦα抗体ＶＨ遺伝子断片に改変し、抗ヒトＴＮＦα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、ＴＮＦαＨ－ＣＨＸベクターと略記する）を構築した。抗ヒトＴＮＦα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。

[0235] （３）抗ヒトＴＮＦα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ＴＮＦα抗体軽鎖に改変し、抗ヒトＴＮＦα抗体軽鎖遺伝子発現トランスポゾンベクター（以下、ＴＮＦαＬベクターと略記する）を構築した。抗ヒトＴＮＦα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ＴＮＦα抗体を生産するＣＨＯ細胞の作製

抗ヒトＴＮＦα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ＴＮＦα－ＣＨＸタンデムベクター（２０μｇ）と実施例２で作製したＴｏＩ２トランスポゼース発現ベクター（ＴｏＩ２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ＴＮＦαＨ－ＣＨＸベクター（１０μｇ）、ＴＮＦαＬベクター（１０μｇ）、ＴｏＩ２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。

[0238] [表7]

	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

[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、ＴＮＦαＨ－ＣＨＸベクターとＴＮＦαＬベクターとを共導入したＣＨＯ－Ｋ１細胞は、ＴＮＦα－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ＴＮＦα抗体を高発現している細胞の出現率が約４倍高かった。

[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ＴＮＦα抗体を生産するＣＨＯ細胞の培養

上述（４）で得られたＴＮＦα－ＣＨＸタンデムベクターが導入された細胞ならびにＴＮＦαＨ－ＣＨＸベクターおよびＴＮＦαＬ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ＴＮＦα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ＴＮＦα－ＣＨＸタンデムベクターが導入された細胞４株ならびにＴＮＦαＨ－ＣＨＸベクターおよびＴＮＦαＬ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、ＴＮＦαＨ－ＣＨＸベクターとＴＮＦαＬベクターとを共導入したＣＨＯ－Ｋ１細胞は、ＴＮＦα－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。

[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対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、ぞれぞれ抗ヒト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。

[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． ＡＲ０００００１３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。

[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。

[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抗体重軽遺伝子は上述（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）で作製したＣＤ２０－ＣＨＸタンデムベクターと実施例２で作製したＴｏＩ２トランスポゼース発現ベクター（ＴｏＩ２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（１０μｇ）、ＣＤ２０Ｌベクター（１０μｇ）を、ＴｏＩ２ベクター（１０μｇ）と共にＣＨＯ－Ｋ１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３．０μｇ／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－Ｋ１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ＴＮＦα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ＣＤ２０Ｈ－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ＴＮＦα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

タンパク質発現用プラスミドベクターには、一対のＴｏＩ２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] 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ＴｏＩ２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（ＴｏＩ２－Ｌ配列）（配列番号２）と、２２８５番目から２７８８番目の塩基配列（ＴｏＩ２－Ｒ配列）（配列番号３）の塩基配列を用いた。

[0259] ＴｏＩ２－Ｒ配列またはＴｏＩ２－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　Ｃ２ＩｇＧ１ＮＳ／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　Ｃ２ＩｇＧ１ＮＳ／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。

[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。

[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か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ＣＤ９８抗体発現トランスポゾンベクターＢを作製した。

[0264] 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２２％にあたる１６７塩基を改変した。具体的には、全３２個のロイシン残基のうち、２５個のロイシン残基に対応するコドンをＴＡＡとなるように改変した。

[0265] （３）改変型ネオ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

（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３８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ＣＤ９８抗体発現トランスポゾンベクターＣを作製した。

[0266] 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２３％にあたる１８０塩基を改変した。具体的には、全３２個のロイシン残基のうち、２８個のロイシン残基に対応するコドンをＴＡＡとなるように改変している。

[0267] （４）改変型ネオマイシン耐性遺伝子３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３９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ＣＤ９８抗体発現トランスポゾンベクターＤを作製した。

[0268] 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２６％にあたる２０３塩基を改変している。具体的には、全３２個のロイシン残基のうち、３０個のロイシン残基に対応するコドンをＴＡＡとなるように改変している。

[0269] ［実施例１０］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ＣＤ９８抗体発現トランスポゾンベクターＡ～Ｄを、配列番号４０で表されるアミノ酸配列からなるＴｏｌ２トランスポゼースを発現するベクターｐＣＡＧＧＳ－Ｔ２ＴＰ［Ｋａｗａｋａｍｉ　Ｋ＆Ｎｏｄａ　Ｔ．Ｇｅｎｅｔｉｃｓ．１６６，８９５－８９９（２００４）］とともに浮遊化ＣＨＯ－Ｋ１細胞にそれぞれ導入し、抗体生産細胞Ａ～Ｄを作製した。

[0270] 浮遊ＣＨＯ細胞へのベクターの導入は、ＣＨＯ細胞（４×１０^{6}個）を４００μＬのＰＢＳバッファーに懸濁し、環状ＤＮＡのままの抗ヒトＣＤ９８抗体発現トランスポゾンベクター（１０μｇ）およびＴｏｌ２トランスポゼース発現ベクターｐＣＡＧＧＳ－Ｔ２ＴＰ（２０μｇ）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。

[0271] ここで、Ｔｏｌ２トランスポゼース発現ベクターもまた、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。

[0272] また、Ｔｏｌ２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１９（４）の抗ヒトＣＤ９８抗体発現トランスポゾンベクターＤ（１０μｇ）を、制限酵素ＰｃｉＩ（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　ＸｃｅｌＩ　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、CO_2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、ＬＡＮＣＥ(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				
	A（野生型）	B（改変１）	C（改変２）	D（改変３）	コントロール細胞
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] 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、ＴｏＩ２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４００μＬ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（１０μｇ）と、ｐＣＡＧＧＳ－Ｔ２ＴＰ（２０μｇ）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。

[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、CO_2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５μｇ／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] 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、ＬＡＮＣＥ(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

[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％CO_2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。

[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

[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２０１０－２７９

８４９に基づくものであり、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

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

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ＴＮＦα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ＴＮＦα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ＴＮＦα抗体重鎖可変領域のアミノ酸配列

配列番号２７－人工配列の説明；抗ヒトＴＮＦα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ＴＮＦα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ＴＮＦα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

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

配列番号４８－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

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対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ＤＮＡを含む遺伝子断片を該哺乳動物細胞の染色体に組込み、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対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、且つ一対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ＤＮＡを含む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

（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対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ＤＮＡを含む遺伝子断片を該哺乳動物細胞の染色体に組込み、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対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対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対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対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端に一対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対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対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対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対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対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対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] 選択マーカー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] 一対のトランスポゾン配列が哺乳動物細胞で機能する一対の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] 一対のＤＮＡ型トランスポゾン由来の塩基配列が、一対の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] 一対の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] 一対の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対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、且つ一対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、該一対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。

[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対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対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対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。

［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。

（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対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対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対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対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対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対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対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。

[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。

[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] 一対のトランスポゾン配列が哺乳動物細胞で機能する一対の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] 一対のＤＮＡ型トランスポゾン由来の塩基配列が、一対の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] 一対の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] 一対の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対のトランスポゾン配列を含む発現ベクター

。

[請求項34] 一対のトランスポゾン配列が一対の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] 一対の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] 一対の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。