明　細　書

発明の名称 ： 標的特異的な外来遺伝子の導入方法

技術分野

[0001] 本開示は、動物細胞のゲノムに、外来性ＤＮＡを標的特異的に導入する方法、それを利用して得られる形質転換細胞、ならびに外来性ＤＮＡがコードするポリペプチドの製造方法に関する。

背景技術

[0002] サイトカインや抗体のようなポリペプチドを、遺伝子組み換え技術によって培養細胞に発現させ、大量に生産する方法が公知である。このようなポリペプチドの生産技術は、一般に、目的とするポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを発現可能な形で細胞に導入して形質転換細胞とし、その培養物に蓄積する目的のポリペプチドを回収する工程を含む。形質転換する細胞には、微生物、昆虫、植物、あるいは動物の細胞が広く利用されている。中でも動物細胞は、動物に由来するポリペプチドを得るために好適な宿主細胞として広く利用されている。動物細胞にポリペプチドを発現させることによって、ポリペプチドの糖化やホールディング等の翻訳後修飾が、実際の生体中で生産される環境に近くなると期待される。

[0003] 動物細胞に外来性のＤＮＡを発現させるときには、目的とするポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを組み込んだ発現ベクターで動物細胞を形質転換するのが一般的である。しかし、発現ベクターとして細胞に導入された外来性のＤＮＡは、ゲノムに導入した場合とは異なり一般的には複製されず、細胞分裂を介して受け継がれないため、形質が安定に保持されにくい。そのため、発現ベクターによる形質転換は、実験的な環境で一過性の発現のために利用するのには有用だが、工業的な生産に応用するには課題を残す。

[0004] 外来性のＤＮＡを、動物細胞のゲノム中に導入することで、発現ベクター由来の形質を安定に保持させることが可能となる。ゲノムに導入したポリヌクレオチドは、細胞分裂を介して複製されて安定に保持される可能性が高い

ためである。このような考え方に基づいて、多くの生体物質が動物細胞をプラットフォームとして工業的な規模で安定に生産できるようになった。

[0005] ところが、ゲノムへの外来性ＤＮＡの導入においても、必ずしも、発現レベルの高い形質転換細胞を得られるわけではないことがわかってきた。ゲノムに導入された外来性のＤＮＡは、導入された位置に依存して、発現レベルが異なるのが一般的で、所望の形質転換細胞を必ずしも効率的に選択できるわけではなかった。

[0006] ゲノムへの外来性ＤＮＡの導入における問題点を解消し得る技術の一つとして、標的組込み（Ｔａｒｇｅｔ Ｉｎｔｅｇｒａｔｉｏｎ；ＴＩ）が提案された（特許文献１－３）。ＴＩにおいては、外来性ＤＮＡの導入および発現に適したゲノム領域を予め同定しておき、発現させるべき外来性ＤＮＡが、同定したゲノム領域に部位特異的に組込まれる。TIは、ゲノムの部位特異的な組換え技術の向上に伴って生み出された新しい遺伝子組み換え技術と言える。TIの結果、得られる形質転換細胞の、外来性DNAの発現レベルなどの予測性が高まり、必要とする形質を備えた形質転換細胞の効率的な取得が期待できる。ＴＩにおいて、外来性ＤＮＡの導入に適したゲノム領域は、しばしばホットスポット（Ｈｏｔ Spot）と呼ばれる。これまでに、形質転換の宿主細胞として用いられている種々の細胞において、ゲノムの幅広い領域にホットスポットが見出されてきた。そして、TIを動物細胞によるモノクローナル抗体の産生に応用して、その生産に有用な形質転換細胞を得る試みも報告されている（特許文献４、非特許文献１－２）。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：国際公開公報ＷＯ２００８／１５１２１９

特許文献2：国際公開公報ＷＯ２０１３／１９００３２

特許文献3：国際公開公報ＷＯ２０１６／０６４９９９

特許文献4：国際公開公報ＷＯ２０１７／１８４８３１

非特許文献

[0008] 非特許文献1：Biotechnol. Prog., 2015, Vol. 31, No. 6, pp 1645-1656
非特許文献2：Methods 95 (2016) pp 3-12

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 本開示においては、標的組込み（ＴＩ）に有用な新たなホットスポットの提供を課題とする。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明者らは、抗体などのポリペプチドをコードする外来性ＤＮＡを動物細胞において高いレベルで発現させることが可能な領域の探索を続けた。これまでに報告されたTIによる形質転換細胞の作製においては、初期の発現レベルを長期間にわたって維持することができず、培養中にやがて発現レベルが低下することがあった（PLoS ONE, 2017 12(6): e0179902、Biotechnology Letters, 2018, Volume 40, Issue 8, pp 1209-1218）。このような形質転換細胞をポリペプチドの製造に用いると、発現産物の生産量が不安定となり、製造効率を低下させかねない。あるいは、形質転換細胞が工業的な生産レベルを維持できなくなれば、製造ラインの再構築が必要となる。本発明者らは、培養中のポリペプチドの発現レベルの低下が、外来性ポリヌクレオチドのゲノム導入位置に依存して起きている可能性を疑った。そこで、外来性ＤＮＡの発現レベルの長期にわたる維持を期待できるホットスポットの探索を試みた結果、本発明者らは新規のホットスポット見出すことに成功し本開示に至った。

[0011] 本開示は、具体的には以下に例示的に記載する態様を包含する。

〔１〕目的とするポリペプチドをコードする外来性DNAをＣＨＯ細胞に導入する方法であって、該方法が、前記外来性ＤＮＡを、ＣＨＯ細胞のNCBI accession number NW_003614838.1によって特定されるゲノム領域に導入する工程を含む方法。

〔２〕前記外来性ＤＮＡの導入部位が、NCBI accession number NW_003614838.1によって特定されるゲノム領域中のcoiled-coil domain-containing prot

ein 91(CCDC91)遺伝子およびそのプロモーター領域を含む領域から選択される〔１〕に記載の方法。

〔３〕前記外来性ＤＮＡの導入部位が、CCDC91遺伝子領域から選択される〔２〕に記載の方法。

〔４〕前記外来性ＤＮＡの導入部位が、CCDC91遺伝子の第1イントロンの中である〔３〕に記載の方法。

〔５〕前記外来性DNAを、相同組換え、組換え酵素を媒介した遺伝子置換（RMCE）、およびゲノム編集から選択されるいずれかの手法によって、前記ゲノム領域に部位特異的に導入する〔１〕～〔４〕のいずれかに記載の方法。

〔６〕前記目的とするポリペプチドが、抗原結合分子である〔１〕～〔５〕のいずれかに記載の方法。

〔７〕前記抗原結合分子が抗体である〔６〕に記載の方法。

[0012] 〔８〕ＣＨＯ細胞またはＣＨＯ細胞株の製造方法であって、該方法が、目的とするポリペプチドをコードする外来性DNAを、ＣＨＯ細胞のNCBI accession number NW_003614838.1によって特定されるゲノム領域に導入する工程を含む方法。

〔９〕前記外来性ＤＮＡの導入部位が、NCBI accession number NW_003614838.1によって特定されるゲノム領域中のcoiled-coil domain-containing protein 91(CCDC91)遺伝子およびそのプロモーター領域を含む領域から選択される〔８〕に記載の方法。

〔１０〕前記外来性ＤＮＡの導入部位が、CCDC91遺伝子領域から選択される〔９〕記載の方法。

〔１１〕前記外来性ＤＮＡの導入部位が、CCDC91遺伝子の第1イントロンの中である〔１０〕に記載の方法。

〔１２〕前記外来性DNAを、相同組換え、組換え酵素を媒介した遺伝子置換（RMCE）、およびゲノム編集から選択されるいずれかの手法によって、前記ゲノム領域に部位特異的に導入する〔８〕～〔１１〕のいずれかに記載の方法。

〔１３〕前記目的とするポリペプチドが、抗原結合分子である〔８〕～〔１２〕のいずれかに記載の方法。

〔１４〕前記抗原結合分子が抗体である〔１３〕に記載の方法。

[0013] 〔１５〕ＣＨＯ細胞またはＣＨＯ細胞株の製造方法であって、該方法が、外来性DNAを交換反応により導入するためのDNAカセットを、ＣＨＯ細胞のNCBI accession number NW_003614838.1によって特定されるゲノム領域に導入する工程を含む方法。

〔１６〕前記DNAカセットの導入部位が、NCBI accession number NW_003614838.1によって特定されるゲノム領域中のcoiled-coil domain-containing protein 91(CCDC91)遺伝子およびそのプロモーター領域を含む領域から選択される〔１５〕に記載の方法。

〔１７〕前記DNAカセットの導入部位が、CCDC91遺伝子領域から選択される〔１６〕に記載の方法。

〔１８〕前記DNAカセットの導入部位が、CCDC91遺伝子の第1イントロンの中である〔１７〕に記載の方法。

〔１９〕前記外来性DNAが、目的とする抗原結合分子をコードする外来性DNAである〔１５〕～〔１８〕のいずれかに記載の方法。

〔２０〕前記抗原結合分子が抗体である〔１９〕に記載の方法。

[0014] 〔２１〕NCBI accession number NW_003614838.1によって特定されるゲノム領域に導入された目的とするポリペプチドをコードする外来性DNAを含む、単離されたCHO細胞。

〔２２〕前記外来性ＤＮＡの導入部位が、NCBI accession number NW_003614838.1によって特定されるゲノム領域中のcoiled-coil domain-containing protein 91(CCDC91)遺伝子およびそのプロモーター領域を含む領域から選択される〔２１〕に記載のＣＨＯ細胞。

〔２３〕前記外来性ＤＮＡの導入部位が、CCDC91遺伝子領域から選択される〔２２〕に記載のＣＨＯ細胞。

〔２４〕前記外来性ＤＮＡの導入部位が、CCDC91遺伝子の第1イントロンの中

である〔２３〕に記載のＣＨＯ細胞。

〔２５〕前記外来性DNAを、相同組換え、組換え酵素を媒介した遺伝子置換（RMCE）、およびゲノム編集から選択されるいずれかの手法によって、前記ゲノム領域に部位特異的に導入する〔２１〕～〔２４〕のいずれかに記載のCHO細胞。

〔２６〕前記目的とするポリペプチドが、抗原結合分子である〔２１〕～〔２５〕のいずれかに記載のCHO細胞。

〔２７〕前記抗原結合分子が抗体である〔２６〕に記載のCHO細胞。

[0015] 〔２８〕NCBI accession number NW_003614838.1によって特定されるゲノム領域に、外来性DNAを交換反応により導入するためのDNAカセットを含む、単離されたCHO細胞。

〔２９〕前記DNAカセットの導入部位が、NCBI accession number NW_003614838.1によって特定されるゲノム領域中のcoiled-coil domain-containing protein 91(CCDC91)遺伝子およびそのプロモーター領域を含む領域から選択される〔２８〕に記載のＣＨＯ細胞。

〔３０〕前記DNAカセットの導入部位が、CCDC91遺伝子領域から選択される〔２９〕に記載のＣＨＯ細胞。

〔３１〕前記DNAカセットの導入部位が、CCDC91遺伝子の第1イントロンの中である〔３０〕に記載のＣＨＯ細胞。

〔３２〕前記外来性DNAが、目的とする抗原結合分子をコードする外来性DNAである〔２８〕～〔３１〕のいずれかに記載のCHO細胞。

〔３３〕前記抗原結合分子が抗体である〔３２〕に記載のCHO細胞。

[0016] 〔３４〕NCBI accession number NW_003614838.1によって特定されるゲノム領域に目的とするポリペプチドをコードする外来性DNAを導入したCHO細胞を用いた、ポリペプチドの製造方法。

〔３５〕前記外来性ＤＮＡの導入部位が、NCBI accession number NW_003614838.1によって特定されるゲノム領域中のcoiled-coil domain-containing protein 91(CCDC91)遺伝子およびそのプロモーター領域を含む領域から選択さ

れる〔３４〕に記載の方法。

〔３６〕前記外来性ＤＮＡの導入部位が、CCDC91遺伝子領域から選択される〔３５〕に記載の方法。

〔３７〕前記外来性ＤＮＡの導入部位が、CCDC91遺伝子の第1イントロンの中である〔３６〕に記載の方法。

〔３８〕前記外来性DNAを、相同組換え、組換え酵素を媒介した遺伝子置換（RMCE）、およびゲノム編集から選択されるいずれかの手法によって、前記ゲノム領域に部位特異的に導入する〔３７〕に記載の方法。

〔３９〕前記目的とするポリペプチドが、抗原結合分子である〔３４〕～〔３８〕のいずれかに記載の方法。

〔４０〕前記抗原結合分子が抗体である〔３９〕に記載の方法。

[0017] 〔４１〕以下の工程を含むポリペプチドの製造方法；

（１）目的とするポリペプチドをコードする外来性DNAをＣＨＯ細胞に導入する工程であって、前記外来性ＤＮＡを、ＣＨＯ細胞のゲノムのNCBI accession number NW_003614838.1によって特定されるゲノム領域に導入する工程；

(2) 外来性DNAの導入されたCHO細胞を培養する工程；および

(3) 目的とするポリペプチドを回収する工程。

〔４２〕前記外来性ＤＮＡの導入部位が、NCBI accession number NW_003614838.1によって特定されるゲノム領域中のcoiled-coil domain-containing protein 91(CCDC91)遺伝子およびそのプロモーター領域を含む領域から選択される〔４１〕に記載の方法。

〔４３〕前記外来性ＤＮＡの導入部位が、CCDC91遺伝子領域から選択される〔４２〕に記載の方法。

〔４４〕前記外来性ＤＮＡの導入部位が、CCDC91遺伝子の第1イントロンの中である〔４３〕に記載の方法。

〔４５〕目的とするポリペプチドをコードする外来性DNAをＣＨＯ細胞に導入する工程が、次の工程(i)-(ii)を含む〔４１〕に記載の方法；

（ｉ）外来性DNAを交換反応により導入するためのDNAカセットをＣＨＯ細胞

に導入する工程、および

（ｉｉ）(i)のDNAカセットを標的部位として認識する組み換え酵素によって、外来性ＤＮＡを、NCBI accession number NW_003614838.1によって特定されるゲノム領域に導入する工程。

〔４６〕前記目的とするポリペプチドが抗原結合分子である〔４１〕～〔４５〕のいずれかに記載の方法。

〔４７〕前記抗原結合分子が抗体である〔４６〕に記載の方法。

発明の効果

[0018] 本開示によって、TIによって形質転換された動物細胞の取得に好適なホットスポットが見出された。好ましい態様において、本開示が提供するホットスポットは、その領域に導入された外来性ＤＮＡがコードするポリペプチドの発現レベルを、長期にわたって安定に維持することができる。

図面の簡単な説明

[0019] [図1]図１は、ホットスポットの探索に利用したランディングパット（ｌａｎｄｉｎｇ　ｐａｄ）のマップを示す。形質転換細胞の選択マーカーであるジヒドロ葉酸レダクターゼ（ＤＨＦＲ）と、高発現細胞をスクリーニングするためのマーカーとなる緑色蛍光タンパク（ＧＦＲ）をコードする遺伝子が組み込まれている。これら2つの遺伝子の両端には、組換え酵素Ｃｒｅの認識配列（ｌｏｘＰ１とｌｏｘＰ２）が挿入されてＤＮＡカセットを構成している。

[図2]図２は、ゲノムに組み込まれたランディングパットのＤＮＡカセットとカセット交換反応するための組換えプラスミド（Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｔｉｏｎ　ｐｌａｓｍｉｄ）のマップを示す。選択マーカーＤＨＦＲと、軽鎖（Ｌ）と重鎖（Ｈ）をコードする各遺伝子の両端に組換え酵素認識配列ｌｏｘＰが配置され、ＤＮＡカセットを構成している。

[図3]図３は、ＴＩの後に樹立された抗体発現細胞クローンの、２週間の生産培養の結果を示す。横軸は樹立された抗体産生細胞クローンの名称、縦軸は培養液１リットル当たりの抗体生産レベル（ｍｇ／Ｌ）を示す。

[図4]図４は、抗体産生細胞クローンＴＩ－ＬおよびＴＩ－Ｊの、凍結溶解後

の抗体生産量の経時的な変化を示す。横軸は凍結保存細胞の溶解後の時間（日）、縦軸は培養液１リットル当たりの抗体生産レベル（ｍｇ／Ｌ）を示す。

[図5]図５は、図２の組換えプラスミドに異なる抗体の遺伝子を組込んで作成した別の抗体産生細胞クローンによる抗体生産レベルを示す。横軸は生産させた抗体の名称、縦軸は培養液１リットル当たりの抗体生産レベル（ｍｇ／Ｌ）を示す。

[図6]図６は、最も抗体生産レベルが高かった抗体産生細胞クローンの親細胞TI-L（ランディングパットを交換カセットで置換する前の形質転換細胞）のゲノム上におけるランディングパットの導入位置を模式的に示す。図中、「Integration site」で示した部分が、本開示において同定されたランディングパットの導入位置である。導入位置は、CCDC91遺伝子の（５’端）から6651 bp下流で、Intron1の上流（５’端）からは6454 bp下流に位置する。「Integration site」の上流（ゲノム配列における５’側）の５ｋｂと、下流（ゲノム配列における３’側）の５ｋｂの塩基配列をそれぞれ、配列番号：１および２に示した。

発明を実施するための形態

[0020] 以下、本発明の実施の形態についてより詳細に説明する。

[0021] 以下の定義および詳細な説明は、本明細書において説明する本開示の理解を容易にするために提供される。

[0022] 本明細書において、「抗原結合分子」は目的とする抗原に結合することのみで制限される。抗原結合分子は、目的とする抗原に結合するかぎりどのような構造のドメインも使用され得る。そのようなドメインの例として、それだけに限定するものではないが、例えば、抗体の重鎖可変領域（VH）および抗体の軽鎖可変領域（VL）、単ドメイン抗体（sdAb）、生体内に存在する細胞膜タンパクであるAvimerに含まれる35アミノ酸程度のAドメインと呼ばれるモジュール（国際公開WO2004/044011、WO2005/040229）、細胞膜に発現する糖たんぱく質であるfibronectin中のタンパク質に結合するドメインである10

Fn3ドメインを含むAdnectin（国際公開WO2002/032925）、ProteinAの58アミノ酸からなる3つのヘリックスの束（bundle）を構成するIgG結合ドメインをscaffoldとするAffibody（国際公開WO1995/001937）、33アミノ酸残基を含むターンと2つの逆並行ヘリックスおよびループのサブユニットが繰り返し積み重なった構造を有するアンキリン反復（ankyrin repeat：AR）の分子表面に露出する領域であるDARPins（Designed Ankyrin Repeat proteins）（国際公開WO2002/020565）、好中球ゲラチナーゼ結合リポカリン（neutrophil gelatinase-associated lipocalin（NGAL））等のリポカリン分子において高度に保存された8つの逆並行ストランドが中央方向にねじれたバレル構造の片側を支える4つのループ領域であるAnticalin等（国際公開WO2003/029462）、ヤツメウナギ、ヌタウナギなど無顎類の獲得免疫システムとしてイムノグロブリンの構造を有さない可変性リンパ球受容体（variable lymphocyte receptor（VLR））のロイシン残基に富んだリピート（leucine-rich-repeat（LRR））モジュールが繰り返し積み重なった馬てい形の構造の内部の並行型シート構造のくぼんだ領域（国際公開WO2008/016854）が挙げられる。

[0023] 本発明の抗原結合分子の好適な例として、当該抗原結合ドメインのみで構成される分子で抗原結合機能を発揮出来る抗原結合分子、連結されている他のペプチドから遊離した後に単独で抗原結合機能を発揮できる抗原結合分子等が挙げられる。そのような抗原結合分子の例として、それだけに限定されないが、単ドメイン抗体、scFv、Fv、Fab、Fab'、F(ab')2等が挙げられる。

[0024] 本発明の抗原結合分子の好適な例の一つとして、分子量60kDa以下の抗原結合分子が挙げられる。そのような抗原結合分子の例として、それだけに限定されないが、単ドメイン抗体、scFv、Fab、Fab'が挙げられる。分子量が60kDa以下である抗原結合分子は通常、単量体として血中に存在する時、腎臓によるクリアランスが発生する可能性が高い（J Biol Chem. 1988 Oct 15;263(29):15064-70参照）。

[0025] 抗体

本明細書で用語「抗体」は、最も広い意味で使用され、所望の抗原結合活

性を示す限りは、これらに限定されるものではないが、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）および抗体断片を含む、種々の抗体構造を包含する。

[0026] 抗体断片

「抗体断片」は、完全抗体が結合する抗原に結合する当該完全抗体の一部分を含む、当該完全抗体以外の分子のことをいう。抗体断片の例は、これらに限定されるものではないが、Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、$F(ab')_2$；ダイアボディ；線状抗体；単鎖抗体分子（例えば、scFv）；および、抗体断片から形成された多重特異性抗体を含む。以上のように、抗体や抗体断片は、抗原結合分子の代表的な例である。

[0027] Fc領域

本明細書で用語「Fc領域」は、少なくとも定常領域の一部分を含む免疫グロブリン重鎖のC末端領域を定義するために用いられる。この用語は、天然型配列のFc領域および変異体Fc領域を含む。一態様において、ヒトIgG重鎖Fc領域はCys226から、またはPro230から、重鎖のカルボキシル末端まで延びる。ただし、Fc領域のC末端のリジン（Lys447）またはグリシン－リジン（Gly446-Lys447）は、存在していてもしていなくてもよい。本明細書では別段特定しない限り、Fc領域または定常領域中のアミノ酸残基の番号付けは、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD 1991 に記載の、EUナンバリングシステム（EUインデックスとも呼ばれる）にしたがう。

[0028] 核酸／ポリヌクレオチド

「単離された」核酸は／ポリヌクレオチド、そのもともとの環境の成分から分離された核酸／ポリヌクレオチド分子のことをいう。単離された核酸／ポリヌクレオチドは、その核酸／ポリヌクレオチド分子を通常含む細胞の中に含まれた核酸／ポリヌクレオチド分子を含むが、その核酸／ポリヌクレオチドは染色体外に存在しているかまたは本来の染色体上の位置とは異なる染

色体上の位置に存在している。本開示において、核酸／ポリヌクレオチドが、人工的に構築されたものや、あるいは天然に存在したものであっても、宿主細胞（ｅｎｄｏｇｅｎｅｏｕｓ）以外の環境から得たものである場合、その核酸／ポリヌクレオチドは、当該宿主細胞にとって、外来性である。したがって、たとえば、核酸／ポリヌクレオチドが、ｃＤＮＡを含む場合、当該核酸／ポリヌクレオチドは、通常、宿主細胞にとっては外来性である。

[0029] 本開示の外来性核酸／ポリヌクレオチドが、DNAを含む場合、特に「外来性ＤＮＡ」（ｅｘｏｇｅｎｅｏｕｓ ＤＮＡ）と記載する。外来性ＤＮＡは、必要とされる遺伝情報を保持している限り、ＤＮＡ以外の成分を含むこともできる。たとえば、ウイルス粒子を構成するタンパク質やリポソーム等のＤＮＡ以外の成分と複合化したＤＮＡも、外来性ＤＮＡである。本開示においては、宿主細胞はＣｈｉｎｅｓｅ Ｈａｎｓｔｅｒ（チャイニーズハムスター；Cricetulus griseus、和名はモンゴルキヌネズミ）である。したがって、そのゲノムに通常は含まれていない塩基配列情報を含むＤＮＡを「外来性ＤＮＡ」ということができる。

[0030] チャイニーズハムスターのゲノムの塩基配列情報は、たとえばGenBankの参照配列（Reference Ｓｅｑｕｅｎｃｅ）として得ることができる。あるＤＮＡの塩基配列情報が、当該参照配列に部分的にであれ、一致しない塩基配列を含んでいれば、外来性ＤＮＡであることがわかる。たとえば、チャイニーズハムスター自身の遺伝情報を含みながら、その一部を他の生物種由来の遺伝情報や人為的な情報に組み替えたものは、外来性ＤＮＡに含まれる。このように、外来性ＤＮＡの多くは、人為的に構築された塩基配列情報を含むことによって、外来性となる。あるＤＮＡがアミノ酸配列をコードしているとき、ＤＮＡの塩基配列の変更後に元のアミノ酸配列情報が維持される場合も、人為的に構築されたＤＮＡである。あるいはチャイニーズハムスターの遺伝子から、ゲノム配列には含まれているイントロンが除去されたＤＮＡ（たとえばｃＤＮＡ）も、通常は外来性である。

[0031] ベクター

本明細書で用いられる用語「ベクター」は、それが連結されたもう1つの核酸を増やすことができる、核酸分子のことをいう。この用語は、自己複製核酸構造としてのベクター、および、それが導入された宿主細胞のゲノム中に組込まれるベクターを含む。あるベクターは、自身が動作的に連結された核酸の、発現をもたらすことができる。そのようなベクターは、本明細書では「発現ベクター」とも称される。

[0032] 宿主細胞

用語「宿主細胞」、「宿主細胞株」、および「宿主細胞培養物」は、相互に交換可能に用いられ、外来核酸を導入された細胞（そのような細胞の子孫を含む）のことをいう。宿主細胞は「形質転換体」および「形質転換細胞」を含み、これには初代の形質転換細胞および継代数によらずその細胞に由来する子孫を含む。子孫は、親細胞と核酸の内容において完全に同一でなくてもよく、変異を含んでいてもよい。オリジナルの形質転換細胞がスクリーニングされたまたは選択された際に用いられたものと同じ機能または生物学的活性を有する変異体子孫も、本明細書では含まれる。

[0033] 本開示は、ある態様において、目的とするポリペプチドをコードする外来性のＤＮＡをＣＨＯ細胞に導入する方法であって、該方法が、前記外来性ＤＮＡを、ＣＨＯ細胞のゲノムのNCBI accession number NW_003614838.1によって特定されるゲノム領域に部位特異的に導入する工程を含む方法を提供する。

ＣＨＯ細胞（Ｃｈｉｎｅｓｅ Ｈａｍｓｔｅｒ Ｏｖａｒｙ Ｃｅｌｌ）は、チャイニーズハムスターの卵巣から樹立された繊維芽細胞株の総称である。増殖能力に優れ、接着培養や浮遊培養によって人工的な培地中で培養することができる。ＣＨＯ細胞を宿主として、種々のポリペプチドが遺伝子組換えによって製造されている。たとえば、DHFR遺伝子を欠損したdhfr-CHO（Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, 4216-4220）や、CHO-K1（Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1968) 60, 1275）等は、遺伝子組換え技術において、宿主細胞として広く利用されている。これらのＣＨＯ細胞の変異株も、本開示にお

いてはＣＨＯ細胞に含まれる。その他にも、ＣＨＯ細胞に由来する細胞として、CHO-DG44やCHO-DXB11株が、宿主細胞として用いられている。これらＣＨＯ細胞に由来する公知の細胞株も、本開示においてはＣＨＯ細胞に含まれる。

[0034] 本開示を構成するCHO細胞は、ＡＴＣＣ等の細胞バンクや、商業的に流通している市販の細胞株として入手することができる。CHO細胞が、理論上、単一の細胞から樹立された細胞群からなる場合、特に「CHO細胞株」という。本開示においては、特に断りがなければ、「CHO細胞」は、CHO細胞株であってもよい。

[0035] 本開示において、ホットスポットとして同定されたゲノム領域は、ＣＨＯ細胞のゲノムのNCBI accession number NW_003614838.1によって特定される。NW_003614838.1は、ホールゲノムショットガンシーケンス法（whole genome shotgun sequence）によって明らかにされたＣＨＯ細胞のゲノム塩基配列で、約１７０．６ｋｂｐからなっている。したがって、本開示において、外来性のＤＮＡを導入する領域は、当該約１７０．６ｋｂｐ内の任意の場所であって良い。

[0036] 当該塩基配列中、本開示において、好ましい導入位置として、たとえば、ＬＯＣ１０３１６４２６２（coiled-coil domain-containing protein 91；ＣＣＤＣ９１）遺伝子とそのプロモーター上に存在する配列によって特定される領域を挙げることができる。ある態様において、この領域は、当該遺伝子とそのプロモーター領域を含む約１５９．４ｋｂｐからなる。あるいは別の態様において、この領域の、当該プロモーターを含まない約１２１．３ｋｂｐの塩基配列も、外来性のＤＮＡの導入位置として好ましい。たとえば、ＣＣＤＣ９１遺伝子を構成する塩基配列中、第１イントロンの上下流１０ｋｂｐを含む約２０ｋｂｐの範囲、あるいは、第１イントロンの上下流５ｋｂｐを含む約１０ｋｂｐの範囲は、本開示において外来性のＤＮＡを導入する領域として好ましい。その例として、第１イントロンの上下流各５ｋｂｐの塩基配列をそれぞれ配列番号：１および２に示す。したがって各配列番号と

導入位置の関係は、たとえば次のように示すことができる。

５’－（配列番号：１）－［導入位置（すなわちホットスポット）］－（配列番号：２）－３’

[0037] ここで、ゲノムの塩基配列上にＣＣＤＣ９１遺伝子を構成する塩基配列をマッピングすると、ゲノム配列から見て逆向き相補配列（すなわちアンチセンス配列）に位置している。そのため、ＣＣＤＣ９１遺伝子の塩基配列中、第１イントロンは、配列番号：２の５’末端を含む（配列番号：２中の１－６４５４位）から配列番号：１の３’、末端を含む領域（配列番号：１中の３１９０－５０４０）にかけて、マッピングされる。両者を連結した第１イントロンの塩基配列を配列番号：３に示した。したがって、本開示の好ましい態様において、外来性のＤＮＡの部位特異的な導入位置は、ＣＨＯ細胞ゲノム上の配列番号：３の塩基配列（逆向き相補配列）で特定される領域から選択することができる。

[0038] 本開示において、ある塩基配列によって特定される領域は、複数の塩基配列が相同（ｈｏｍｏｌｏｇｏｕｓ）である場合を含む。つまり、対象となる塩基配列Ｘが、いくつかの変異や改変を含んでいても、全体として塩基配列Ａと相同であれば、「塩基配列Ａによって特定される領域」である。複数の塩基配列が相同である場合、通常、それらは整列（ａｌｉｇｎｍｅｎｔ）させることができる。異なる塩基配列Ａと塩基配列Ｘを整列させることによって、塩基配列Ａの中の特定の位置に対応する位置を塩基配列Ｘ上で特定することができる。複数の塩基配列を整列させるためのアルゴリズムは公知である。たとえばＢＬＡＳＴＮは、塩基配列の整列のための一般的なツールの一つである。これらの公知のアルゴリズムに従って、NCBI accession number NW_003614838.1や、ＣＣＤＣ９１遺伝子とそのプロモーター、あるいは第1イントロン等と相同とみなしうる塩基配列は、本開示においては、「各塩基配列によって特定される領域」に他ならない。

[0039] 先に記載したようにＣＨＯ細胞には、薬剤耐性や栄養要求性等の性状が異なるいくつかの細胞株が知られている。これらの性状の相違がゲノムの塩基

配列情報の変異や改変としてもたらされていて、それが、本開示によって特定された領域に生じていても、領域を特定することができるのであれば、「各塩基配列によって特定される領域」である。ゲノム塩基配列情報の変異や改変には、塩基配列情報の付加、欠失、挿入、および置換が含まれる。あるいは、見かけ上の細胞形質の変化を伴わない、塩基配列情報の変化（多型等）も許容しうる。また、塩基配列情報が維持される限り、ＤＮＡのメチル化等のＤＮＡ間のエピジェネティックな修飾状態の違いも許容される。

[0040] 本開示において、外来性ＤＮＡは、公知の相同組換え技術やゲノム編集技術によって上記の領域に部位特異的に導入することができる。部位特異的とは、ゲノムを構成する塩基配列中の、ある塩基配列で特定される位置を導入するための位置として選択し、その場所を標的として目的のＤＮＡを導入することをいう。したがって「部位特異的」は、「標的化」（Ｔａｒｇｅｔｉｎｇ）と言うこともできる。本開示において、核酸／ポリヌクレオチドのゲノムへの導入は、標的部位にＤＮＡを挿入するか、あるいはゲノムの一部を導入すべきＤＮＡで置換することによって達成することができる。

[0041] TIによる外来性ＤＮＡの組込みに用いられる手法としては、例えば、次のような方法が知られている；

Homologous recombination（相同組換え）、

RMCE（recombinase-mediated cassette exchange）（組換え酵素を媒介した遺伝子置換）および

Gene editing（ゲノム編集）

Homologous recombination（相同組み換え）は、細胞が本来持つDNA修復機構を利用した手法である。ゲノム上の標的位置と相同な塩基配列をもつ外来性DNAを細胞に導入して、標的位置に存在するDNAと外来性DNAを置換する。相同組み換えにおいては、塩基配列を特異的に認識する特別な酵素を人工的に利用しないため、一般的に効率は非常に低い（約10^{-5} ～ 10^{-7} %）。

[0042] RMCEは本発明の実施例で用いた手法であり、組換え酵素とその認識塩基配列を利用した遺伝子導入方法である。ゲノム上の標的位置にあらかじめ組換

え酵素の認識塩基配列を導入しておき、同じく認識塩基配列をもつ外来性DNAを細胞に導入することで、標的位置に存在するDNAと外来性DNAを置換する。組換え酵素 /認識配列の組合せは「Cre / loxP」,「FLP / FRT」が代表的であるが、他にもいくつか存在する。

[0043] Gene editing（ゲノム編集）はゲノム上の標的位置を狙って切断できるゲノム編集技術を利用した遺伝子導入方法である。ゲノム上の標的位置を狙うようにデザインした酵素を細胞に導入し、標的位置を切断することで細胞のDNA修復を促す。この時、酵素とともに外来性DNAを導入することで外来性DNAが切断部位へ連結されやすくなる。ゲノム編集技術に用いられる酵素としては、CRISPR/Cas, TALEN, ZFNが代表的である。たとえば、代表的なゲノム編集ツールであるＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９は、ガイドＲＮＡと相補的な塩基配列を認識して２本鎖ＤＮＡ（すなわちゲノムＤＮＡ）を切断する。切断された２本鎖ＤＮＡが修復される過程で、ドナーベクターを共導入しておけば、ベクターに搭載した外来性ＤＮＡを２本鎖ＤＮＡに導入することができる。

したがって、上記の導入位置の塩基配列に応じたガイドＲＮＡを利用することによって、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９を利用して、位置特異的に外来性のＤＮＡを導入することができる。

[0044] さて、本開示において、外来性ＤＮＡの導入部位は、NCBI accession number NW_003614838.1によって特定される。更に導入位置の特定にあたり、NCBI accession number NW_003614838.1で参照される塩基配列に対して、相同な塩基配列の中から導入位置を同定できることも既に述べたとおりである。ここで、前記の相同な塩基配列に対して、外来性ＤＮＡを導入するためのガイドＲＮＡをデザインしようとするときには、あらかじめＤＮＡの導入を予定しているＣＨＯ細胞のゲノムの塩基配列を決定しておくことができる。ガイドＲＮＡの塩基配列を、参照配列のみならず、実際に導入を予定している特定のＣＨＯ細胞のゲノム塩基配列を考慮することによって、より特異的な塩基配列のデザインが可能となる。

[0045] 本開示のある態様において、ドナーベクターは導入すべき外来性ＤＮＡに

加えて選択マーカー等の任意の要素を含むことができる。選択マーカーには、抗生物質耐性遺伝子や代謝選択マーカーが含まれる。ゲノム編集後のCHO細胞を、選択マーカーに応じた培養条件に置くことにより、ドナーベクターに搭載した外来性ＤＮＡが発現可能な状態でゲノムに導入された細胞を選択的に維持増殖させることができる。以上のような工程を経て選択的に維持された細胞群は、ＣＨＯ細胞のゲノムの同じ位置に共通の外来性ＤＮＡが導入された細胞群を構成する。あるいは、得られる細胞群の外来性ＤＮＡの発現レベルを比較し、目的とする発現レベルを越える形質転換細胞をスクリーニングしてクローニングすれば、外来性ＤＮＡを本開示において同定されたホットスポットに組込まれた形質転換細胞を細胞株として樹立することもできる。本開示が提供する外来性ＤＮＡの導入方法は、ＣＨＯ細胞あるいはＣＨＯ細胞株の製造に有用である。

[0046] すなわち本開示は、ＣＨＯ細胞またはＣＨＯ細胞株の製造方法であって、該方法が、目的とするポリペプチドをコードする外来性DNAをＣＨＯ細胞のゲノムのNCBI accession number NW_003614838.1によって特定される領域に選択的に導入する工程を含む方法を提供する。本開示の方法は、さらに付加的に、導入された外来性DNAの発現レベルを決定する工程と、決定した発現レベルを比較する工程を含むことができる。発現レベルの比較の後、発現レベルの高かった細胞を選択してクローニングすることによって、より望ましい形質転換細胞を取得することができる。全ての形質転換細胞における外来性ＤＮＡの発現レベルをランキングし、たとえば上位２０％、あるいは１０％、好ましくは８％、より好ましくは５％以内に含まれる形質転換細胞を望ましい形質転換細胞として選択することができる。

[0047] 外来性ＤＮＡとしてシグナルを生成するポリペプチドをコードするＤＮＡを利用した場合、シグナル強度を指標としてその発現レベルを比較し、形質転換細胞をスクリーニングすることができる。シグナルを生成するポリペプチドには、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）やその誘導体が含まれる。あるいは、外来性ＤＮＡとして、選択マーカーを利用することもできる。選択マー

カーを利用した場合には、マーカーに応じた培養条件でＣＨＯ細胞を培養して、本開示によって同定されたホットスポットに外来性ＤＮＡが導入されたＣＨＯ細胞を選択することもできる。ドナーベクターからゲノムに組み込まれる選択マーカーやシグナル生成ポリペプチド等をコードする核酸／ポリヌクレオチドは連結して、ＤＮＡカセットを構成することもできる。

[0048] 本開示において、「Ｌａｎｄｉｎｇ ｐａｄ」とは前記「ＤＮＡカセット」を含むＤＮＡで、ゲノムに外来性ＤＮＡを導入する点で「ＤＮＡカセット」とは同義である。

[0049] 本開示にしたがってゲノムのホットスポットにドナーベクターのＤＮＡカセットを導入するとき、ＤＮＡカセットには、更に付加的に、組み換え酵素の認識配列を付加することができる。組換え酵素としてはＣｒｅリコンビナーゼやＦＬＰリコンビナーゼが知られている。これらの組換え酵素は、それぞれの認識配列であるＩｏｘＰやＦＲＴを認識する。したがって、ＤＮＡカセットの両端にこれらの認識配列を付加しておけば、ＤＮＡカセットによって導入された外来性核酸／ポリヌクレオチドを、組換え反応によって容易に、かつ選択的に他のＤＮＡに置換することができる。いったんゲノムに導入された外来性ＤＮＡを、異なるＤＮＡカセットと組み替える(置換する)ことを、交換反応という。そして、交換反応に携わる組み換え酵素が選択的に認識する塩基配列は、組み換え組み換え標的配列（ｒｅｃｏｍｂｉｎａｔｉｏｎ ｔａｒｇｅｔｉｎｇ ｓｅｑｕｎｅｓｅｑｕｅｎｃｅｓ）ということができる。

[0050] いったん樹立された本開示に基づく形質転換細胞は、ホットスポットに組込んだ外来性ＤＮＡを、任意の外来性ポリペプチドをコードするＤＮＡに置換することによって、任意のポリペプチドの発現が可能となる。そして、ＤＮＡカセットがホットスポットに導入され、かつ外来性ＤＮＡを高いレベルで発現することができる形質転換細胞においては、ＤＮＡカセットの外来性ＤＮＡを他の外来性ＤＮＡに置換した後も、置換前の外来性ＤＮＡと同等の高い発現レベルが期待できる。つまり、本開示に従って樹立された形質転換

細胞は、任意のポリペプチドの生産に応用することができるので、親細胞（Ｍａｓｔｅｒ　ｃｅｌｌ；マスターセル）として有用である。すなわち本開示は、ＣＨＯ細胞またはＣＨＯ細胞株の製造方法であって、該方法が、外来性DNAを交換反応により導入するためのDNAカセットを、ＣＨＯ細胞のNCBI accession number NW_003614838.1によって特定されるゲノム領域に導入する工程を含む方法を提供する。

[0051] また本開示は、ゲノムのNCBI accession number NW_003614838.1によって特定される領域に導入された外来性DNAを含む、単離されたCHO細胞に関する。本開示のＣＨＯ細胞は、好ましい態様において、外来性DNAが、任意のDNAを導入するための組換え標的部位を含むことができる。すなわち本開示は、NCBI accession number NW_003614838.1によって特定されるゲノム領域に、外来性DNAを交換反応により導入するためのDNAカセットを含む、単離されたCHO細胞に関する。ＣＨＯ細胞が保持しているゲノム中の特定の領域に外来性DNAが組み込まれていることは、たとえば当該領域を構成する塩基配列に特異的な塩基配列を含むプライマーでゲノムDNAを鋳型として増幅することにより確認することができる。増幅の結果、目的とする長さの塩基配列長を持つ産物が確認できれば、CHO細胞が、目的としている領域に外来性ＤＮＡが組み込まれたものであることを知ることができる。

本開示において、「単離された」は、その自然環境の少なくともいくつかの成分から分離された細胞または細胞集団、例えば実質的に均質な細胞集団をいう。「実質的に均質」とは、細胞集団に占める本開示の特徴を備えた細胞数の頻度が、1/20以上、好ましくは1/10以上、より好ましくは1/5以上、さらに好ましくは1/3以上、さらに好ましくは1/2以上、最も好ましくは1/1であることをいう。ここで、本開示の特徴を備えた細胞とは、通常、ゲノムのNCBI accession number NW_003614838.1によって特定される領域に導入された外来性DNAを含むことによって定義される。

[0052] ＤＮＡカセットとしてホットスポットに組込まれた外来性ＤＮＡは、その後、任意のポリペプチドの生産のために、任意のポリペプチドをコードする

ＤＮＡによって置換する。本開示において、生産を目的とするポリペプチドは任意である。たとえば、従来ＣＨＯ細胞の培養によって生産していた種々のポリペプチドを、本開示に応用することができる。したがって、本開示は、ある態様において、NCBI accession number NW_003614838.1によって特定されるゲノム領域に目的とするポリペプチドをコードする外来性DNAを導入したCHO細胞を用いた、ポリペプチドの製造方法を提供する。本開示において、ポリペプチドの製造方法は、好ましくは次の工程を含むことができる；

（１）目的とするポリペプチドをコードする外来性DNAをＣＨＯ細胞に導入する工程であって、前記外来性ＤＮＡを、ＣＨＯ細胞のゲノムのNCBI accession number NW_003614838.1によって特定されるゲノム領域に部位特異的に導入する工程；

（２）（１）で外来性DNAを導入したCHO細胞を培養する工程；および

（３）目的とするポリペプチドを回収する工程。

[0053] 本開示において、ＣＨＯ細胞のゲノムのNCBI accession number NW_003614838.1によって特定されるゲノム領域に部位特異的に導入する工程は、ゲノムの塩基配列特異的な組み換え反応に基づいている。塩基配列特異的な組み換え反応は、好ましい態様において、ゲノムの塩基配列から選択した標的部位に目的とする外来性ＤＮＡを部位特異的に導入することを意味する。本開示において、ゲノムへの部位特異的な外来性ＤＮＡの導入とは、外来性ＤＮＡのゲノム中への挿入を含む。あるいは、ゲノムを構成する塩基配列の一部を、外来性ＤＮＡで置換することで、目的とするＤＮＡを目的とする位置に導入することもできる。

本開示においては、いったん部位特異的に導入した外来性ＤＮＡを、更に別のＤＮＡと置換することもできる。置換用の組み換え酵素認識配列がホットスポットに導入された細胞は、本開示における親細胞（マスターセル）として有用である。

[0054] 親細胞（マスターセル）、あるいはそのゲノム中の外来性ＤＮＡを、生産を目的とするポリペプチドをコードする外来性DNAに置き換えた形質転換細胞

は、必要に応じて、ゲノムの塩基配列を解析し、もとのゲノム配列との照合によって、外来性DNAの組込み位置や方向を確認することができる。たとえば、標的（導入位置）として選択したゲノム領域を構成する塩基配列に特異的なプライマーによってゲノムＤＮＡをＰＣＲで増幅すると、外来性核酸／ポリヌクレオチドを選択的に増幅し、その存在を検出することができる。あるいは、増幅産物の塩基配列を決定して、目的とする外来性核酸／ポリヌクレオチドの導入を確認することもできる。

[0055] 親細胞（マスターセル）、あるいはそのゲノム中の外来性ＤＮＡを、生産を目的とするポリペプチドをコードする外来性DNAに置き換えた形質転換細胞は、拡大培養の後に小分けして分注し、凍結保存しておくことができる。また、凍結保存後に融解した形質転換細胞の外来性ＤＮＡの発現レベルや、その安定性を評価して、製造に有利な形質転換細胞を更に選択することもできる。あるいは本開示に従って得られた形質転換細胞を、ポリペプチドの製造条件に順化（ａｄａｐｔａｔｉｏｎ）させて、製造に有利な細胞を得ることもできる。

[0056] 本開示に基づく製造方法に応用することができるポリペプチドの例として、サイトカイン、ペプチドホルモン、成長因子、それらの受容体、抗体に代表される抗原結合分子や酵素などを挙げることができる。これらのポリペプチドは、必要に応じて、全長や断片をコードするポリヌクレオチドをゲノムに導入して発現させることができる。あるいは、任意のポリペプチドと融合させることもできる。部分的な改変や、複数の断片を人為的に結合させた分子として発現させることもできる。

[0057] 目的とするポリペプチドをコードする外来性ＤＮＡを導入したＣＨＯ細胞は、ＣＨＯ細胞に好適な条件で培養することができる。たとえば、市販の基礎培地（動物細胞培養用基礎培地）で培養するための条件が広く知られている。たとえば、動物細胞の培養液として、DMEM、MEM、RPMI1640、IMDM、Ｆ１０培地、Ｆ１２培地などが公知である。培地には動物血清を加えることもできるし、可能な場合には無血清培養を採用することもできる。ＣＨＯ細胞の

培養条件は、具体的には、気相のCO_2濃度が０－４０％、好ましくは、２－１０％の雰囲気下、３０－３９℃、好ましくは、３７℃程度で、１－１４日間培養するのが一般的である。あるいは目的とするポリペプチドの産生が継続している限り、さらに長期にわたり培養を継続することもできる。培養期間中には、必要に応じて培地の一部、あるいは全量を新しい培地に置換し培地を回収することができる

また、動物細胞培養用の各種の培養装置としては、例えば発酵槽型タンク培養装置、エアーリフト型培養装置、カルチャーフラスコ型培養装置、スピンナーフラスコ型培養装置、マイクロキャリアー型培養装置、流動層型培養装置、ホロファイバー型培養装置、ローラーボトル型培養装置、充填槽型培養装置等を用いて培養することができる。

[0058] 目的とするポリペプチドが培養物中に分泌されておれば、培養上清を分取することによってポリペプチドを回収することができる。ポリペプチドは、実質的に純粋で均一な状態に精製することができる。ポリペプチドの単離および精製は、通常の精製工程に使用されている単離／精製方法を応用することができる。例えば、カラムクロマトグラフィー、濾過、限外濾過、塩析、溶媒沈殿、溶媒抽出、蒸留、免疫沈降、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動法、透析、および再結晶等が適宜選択、組み合わされて抗体が好適に分離、および精製され得る。クロマトグラフィーとしては、親和性クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、および吸着クロマトグラフィー等が挙げられる。これらのクロマトグラフィーは、液体クロマトグラフィー、例えばHPLCおよびFPLCを用いて行われる。抗体のようなＦｃドメインを含むポリペプチドは、プロテインAカラムやプロテインGカラム等の親和性クロマトグラフィーにより精製することもできる。プロテインAカラムとして、Hyper D、POROS、Sepharose F. F. (Pharmacia製) 等が挙げられる。

実施例

[0059] 以下は、本発明の方法および組成物の実施例である。上述の一般的な記載に照らし、種々の他の態様が実施され得ることが、理解されるであろう。

[0060] 前述の発明は、明確な理解を助ける目的のもと、実例および例示を用いて詳細に記載したが、本明細書における記載および例示は、本発明の範囲を限定するものと解釈されるべきではない。本明細書で引用したすべての特許文献および科学文献の開示は、その全体にわたって、参照により明示的に本明細書に組み入れられる。

[0061] 〔実施例１〕Landing padプラスミドの作製

カセット交換反応時に目的遺伝子を導入するための標的位置として機能するDNAカセットを含む「Landing pad」を作成し、プラスミドに組込みんだ（図１）。このLanding padプラスミドには、CHO細胞ゲノム上の遺伝子高発現領域を特定するためのマーカー遺伝子として緑色蛍光タンパク(GFP)遺伝子が搭載されている。また、Landing padプラスミド導入後の選抜マーカーとしてジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)遺伝子を有する。DHFR遺伝子およびGFP遺伝子の2遺伝子の両端には組換え酵素Creによって認識されるDNA配列(loxP1およびloxP2)が挿入されている。この2種のloxP間に存在するDHFR遺伝子およびGFP遺伝子はカセット交換反応時に除去され、組換えプラスミドに搭載された製造すべきポリペプチドをコードする遺伝子に置換される。以下の実施例においては、抗体遺伝子に置換して、抗体の生産を試みた。

[0062] 〔実施例２〕組換えプラスミドの作製

CHO細胞ゲノム上に挿入されたLanding padのＤＮＡカセットとカセット交換反応させるための「組換えプラスミド」を作成した（図２）。組換えプラスミドにはDHFR遺伝子、重鎖・軽鎖からなる抗体遺伝子が搭載されており、これらの両端にはloxPが挿入されている。また、評価抗体としては1種類のIgG1抗体(mAb-A)および2種類のIgG2抗体(mAb-B, C)を用いた。各抗体は次のようにそれぞれ異なる抗原を認識する。

mAb-A : GYM329 / Anti latent myostatin antibody / IgG1

mAb-B : CIM331 / Anti IL-31 receptor antibody / IgG2 (WO2010/064697)

mAb-C : SA237 / Anti IL-6 receptor antibody / IgG2 (WO2016/027859)

尚、図2は１組の重鎖・軽鎖からなる抗体遺伝子を搭載した組換えプラスミドを用いているが、二重特異性抗体の場合には２組の重鎖・軽鎖からなる抗体遺伝子を搭載するなど、組換えプラスミドの構成は、発現させる抗体の種類により適宜変更することができる。

[0063] 〔実施例３〕Targeted integration(TI)宿主細胞の作製

宿主細胞（CHO-DXB11）へのLanding padプラスミドのトランスフェクションはLONZA社のNucleofector 2b（Nucleofector はLonza Cologne GmbHの登録商標）を用いて実施した。トランスフェクション時に使用するLanding padプラスミドは制限酵素EcoRVおよびSalIによって直鎖化したものを使用した。トランスフェクション実施4時間後に、ヒポキサン・チミジン不含培地に交換し、細胞の振とう培養を開始した。約2週間後にソニー社のセルソーターSH800を用いてシングルセルソーティングを実施した。ソーティング時には、GFP蛍光強度が高い上位2%以内の細胞集団をソーティングした。GFPの励起には488 nm半導体レーザーを使用した。シングルセルソーティングした細胞を拡大培養していき、各細胞クローンからゲノムDNAを抽出した。回収したゲノムDNAを用いて、各細胞クローンに導入されたGFP遺伝子のコピー数をBio-Rad社のQX200 Droplet Digital PCR システム（Droplet DigitalはBio-Rad Laboratories, Inc.の登録商標）により測定した。GFP遺伝子のコピー数を、その細胞がもつLanding padコピー数とし、1または2コピーのLanding padが導入された細胞クローンを選抜した。取得した各細胞クローンはTI宿主細胞候補として以後の実験に使用した。

[0064] 〔実施例４〕カセット交換反応によるTI宿主細胞への抗体遺伝子の導入および評価

実施例３にて樹立したTI宿主細胞候補を用いて抗体遺伝子の導入および評価を行った。Nucleofector 2bを用いてmAb-Aの抗体遺伝子（H鎖およびL鎖それぞれ1コピー）を搭載した組換えプラスミドおよびCre発現プラスミドを各TI宿主細胞へ共導入し、カセット交換反応を実施した。カセット交換反応によ

って、ＴＩ宿主細胞ゲノムに導入されていたDNAカセットは、mAb-Aの抗体遺伝子を含むＤＮＡカセットによって置換される。トランスフェクション実施4時間後に培地交換を行い、約2週間後にGFP蛍光を有さない細胞を分画取得して、各TI宿主由来の抗体発現細胞を樹立した。この時、いくつかのTI宿主細胞からはカセット交換反応後に生存細胞を得ることができかった。樹立した抗体発現細胞クローンを用いて2週間の生産培養を行い、抗体産生能を評価した。その結果、3種類のTI宿主由来（TI-J, LおよびM）の抗体発現細胞クローンが生産培養14日目において1000 mg/L以上の抗体産生量を示した（図３）。

[0065] 〔実施例５〕TI宿主由来の抗体発現細胞を用いた産生能の長期安定性評価

mAb-Aの抗体遺伝子（H鎖およびL鎖それぞれ2コピー）を搭載した組換えプラスミドを新たに作成し、2種類のTI宿主細胞（TI-JおよびL）に対して、実施例4と同様にカセット交換反応を実施した。得られた抗体発現細胞クローンを凍結保存し、融解後から約140日間の長期継代培養を行った。この期間において、約30日間隔で生産培養を実施し、細胞融解後の抗体産生能の変化を評価した。その結果、TI-JおよびTI-L細胞由来の各抗体発現クローンは140日の長期間にわたり高い抗体産生能を維持しており、140日間の平均値はそれぞれ約2400 および4200 mg/Lであった（図４）。

[0066] 〔実施例６〕異なる抗体遺伝子を用いたTI宿主細胞の産生能評価

mAb-A, BおよびCの3つの抗体遺伝子（H鎖およびL鎖それぞれ2コピー）をそれぞれ搭載した組換えプラスミドを新たに作成し、生産培養にて最も高い抗体産生能を有した細胞クローンの親細胞であるTI-L細胞に対して、実施例4と同様にカセット交換反応を実施した。その後、GFP蛍光を有さない細胞を分画取得し、TI宿主由来の3種類の抗体発現細胞を樹立した。2週間の生産培養の結果、mAb-A, BおよびCの異なる3抗体においても、TI-L細胞由来の抗体発現細胞は高い産生能を有していた（図５）。

[0067] 〔実施例7〕Landing padの導入サイトの同定

生産培養にて最も高い抗体産生能を有した細胞クローンの親細胞であるTI-L細胞からゲノムDNAを抽出した。Pacific Biosciences 社のPacBio Sequelシ

ステムおよびIllumina社のHiSeqシーケンスシステムの2つの次世代シークエンサーを用いてTI宿主細胞の全ゲノムシーケンスを行った。まず、PacBio Sequelシステムより得られた全リードデータからLanding padのDNA配列を有する8つのロングリードを抽出し、これらを公共のNucleotide Database上のCHO細胞ゲノム配列（CHO-K1[ATCC]_RefSeq_2014）に対してBlast検索した。検索結果から最も相同性の高いゲノム領域をLanding padプラスミドの導入サイトとして同定し、Landing padを含む導入サイトの理論ゲノム構造を設計した。設計した理論ゲノム構造に対して、HiSeqシーケンスシステムより得られた全リードデータをマッピング処理した結果、設計したゲノム構造に理論通りマッピングされていることを確認した。同定の結果、Landing padはCHOK1 RefSeq scaffold（2019年1月現在）に登録されているNW_003614838.1上のCCDC91(coiled-coil domain-containing protein 91)遺伝子（Gene symbol：LOC103164262）の1番目イントロン（配列番号：３）上に挿入されていた（図６）。なお実際には、CCDC91遺伝子は、NW_003614838.1のアンチセンス配列上にマッピングされる。そのため、配列番号：３の塩基配列も、NW_003614838.1のアンチセンス配列上にマッピングされる。また、CCDC91遺伝子の約32 kbp上流には、Mouseゲノム配列（GRCm38.p6）中のCCDC91遺伝子のプロモーターと相同性の高い領域が存在した。同定した導入サイトを中心として、ゲノム配列上の、５’側と３’側に位置する５ｋｂの塩基配列は、それぞれ配列番号：１および２のとおりである。したがって、各塩基配列とLanding padの位置関係は、次のとおりである。５’－（配列番号：１）－[Landing pad]－（配列番号：２）－３’

産業上の利用可能性

[0068] 本開示によって提供されるホットスポットは、動物細胞に外来性ＤＮＡを産生させるためのTIによる形質転換細胞の作製に有用である。たとえば本開示のホットスポットに抗体をコードするＤＮＡを導入した場合、抗体の産生に有用な形質転換細胞を高い確率で得ることができる。

請求の範囲

[請求項1] 目的とするポリペプチドをコードする外来性DNAをＣＨＯ細胞に導入する方法であって、該方法が、前記外来性ＤＮＡを、ＣＨＯ細胞のNCBI accession number NW_003614838.1によって特定されるゲノム領域に導入する工程を含む方法。

[請求項2] NCBI accession number NW_003614838.1によって特定されるゲノム領域に目的とするポリペプチドをコードする外来性DNAを導入したCHO細胞を用いた、ポリペプチドの製造方法。

[請求項3] 以下の工程を含むポリペプチドの製造方法；

（１）目的とするポリペプチドをコードする外来性DNAをＣＨＯ細胞に導入する工程であって、前記外来性ＤＮＡを、ＣＨＯ細胞のゲノムのNCBI accession number NW_003614838.1によって特定されるゲノム領域に導入する工程；

(2) 外来性DNAの導入されたCHO細胞を培養する工程；および

(3) 目的とするポリペプチドを回収する工程。

[請求項4] 目的とするポリペプチドをコードする外来性DNAをＣＨＯ細胞に導入する工程が、次の工程(i)-(ii)を含む請求項３に記載の方法；

（ｉ）外来性DNAを交換反応により導入するためのDNAカセットをＣＨＯ細胞に導入する工程、および

（ｉｉ）(i)のDNAカセットを標的部位として認識する組み換え酵素によって、外来性ＤＮＡを、NCBI accession number NW_003614838.1によって特定されるゲノム領域に導入する工程。

[請求項5] 前記外来性ＤＮＡの導入部位が、NCBI accession number NW_003614838.1によって特定されるゲノム領域中のcoiled-coil domain-containing protein 91(CCDC91)遺伝子およびそのプロモーター領域を含む領域から選択される請求項１～４のいずれかに記載の方法。

[請求項6] 前記外来性ＤＮＡの導入部位が、CCDC91遺伝子領域から選択される請求項５に記載の方法。

[請求項7] 前記外来性ＤＮＡの導入部位が、CCDC91遺伝子の第1イントロンの中である請求項６に記載の方法。

[請求項8] 前記目的とするポリペプチドが抗原結合分子である請求項１～４のいずれかに記載の方法。

[請求項9] 前記抗原結合分子が抗体である請求項８に記載の方法。

[請求項10] NCBI accession number NW_003614838.1によって特定されるゲノム領域に、外来性DNAを交換反応により導入するためのDNAカセットを含む、単離されたCHO細胞。

[請求項11] 前記DNAカセットの導入部位が、NCBI accession number NW_003614838.1によって特定されるゲノム領域中のcoiled-coil domain-containing protein 91(CCDC91)遺伝子およびそのプロモーター領域を含む領域から選択される請求項１０に記載のＣＨＯ細胞。

[請求項12] 前記DNAカセットの導入部位が、CCDC91遺伝子領域から選択される請求項１１に記載のＣＨＯ細胞。

[請求項13] 前記DNAカセットの導入部位が、CCDC91遺伝子の第1イントロンの中である請求項１２に記載のＣＨＯ細胞。

[請求項14] 前記外来性DNAが、目的とする抗原結合分子をコードする外来性DNAである請求項１０～請求項１３のいずれかに記載のCHO細胞。

[請求項15] 前記抗原結合分子が抗体である請求項１４に記載のCHO細胞。