

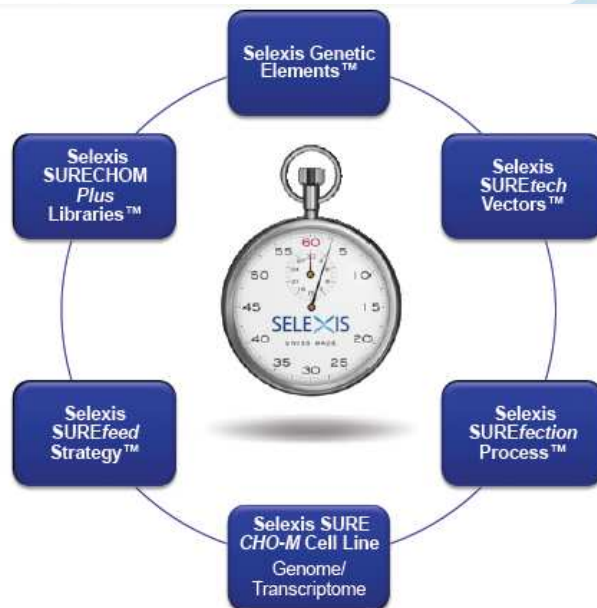
SELEXIS



SelexisTechnologies:
顧客ニーズに応じた組換え
タンパク質高効率発現のための
解決策を提案します

SUREtechnology Platform™

Selexis の要素技術群



SUREtechnology™の臨床応用が進行中

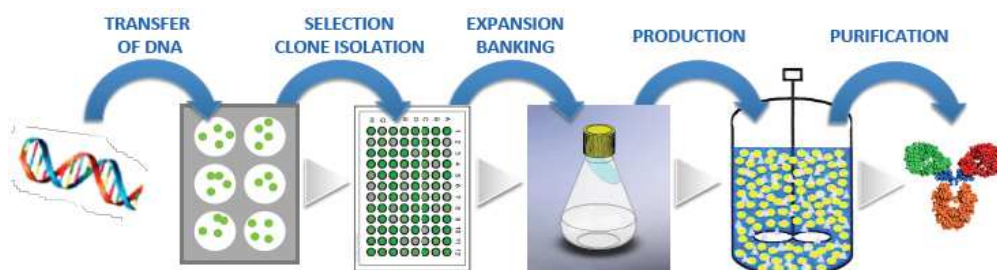


- 現在、米国で抗体医薬の約330のNBEs (new biological entities)の臨床開発が進行中。そのうち25のプロジェクトがSUREtechnology™を採用。
- SUREtechnology™に関する40以上の商用ライセンス契約締結。

SELEXIS

1

組換えたんぱく質の高効率産生系
樹立への挑戦

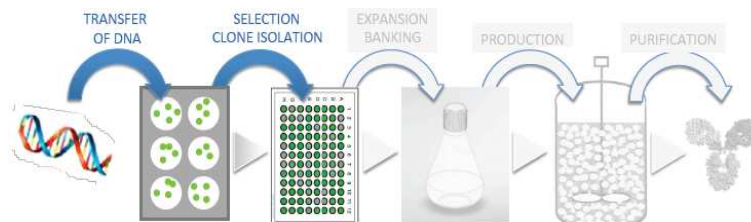


HIGH SPEED, YIELD and STABILITY

組換えたんぱく質の産生効率向上に関する主な課題

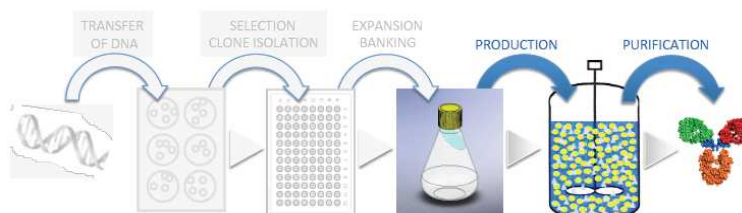
クローン最適化

- ・低い処理効率
- ・予測の難しさ

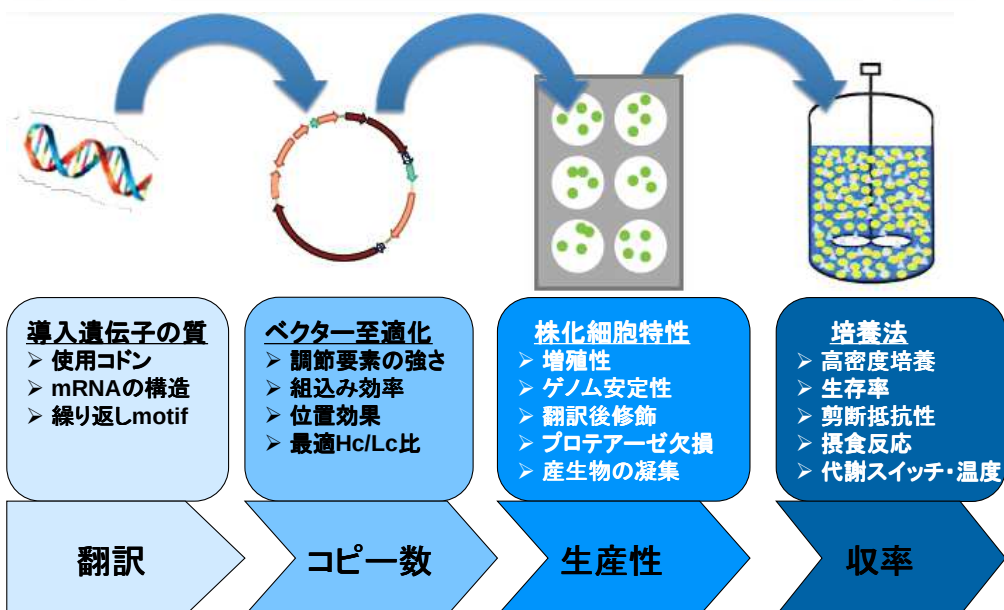


細胞培養の最適化

- ・細胞株別の培地・給餌法の選択



産生効率に影響を及ぼす変動因子



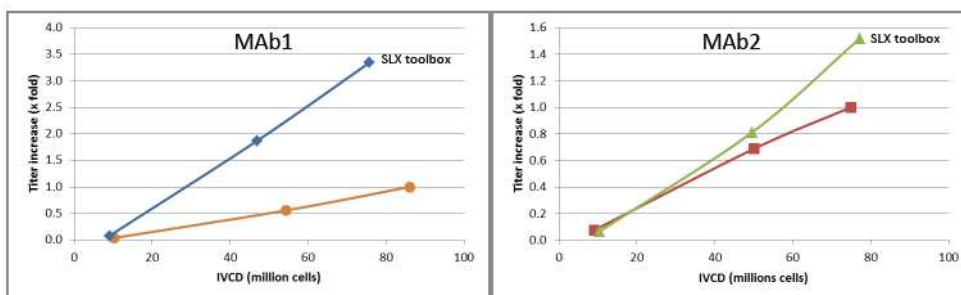


導入遺伝子の質(1)

発現効率向上に寄与するコドンの最適化

目標: 最大発現量を達成すること

1. 翻訳過程でtRNAが不足するという事態を引き起こさないこと
2. G-C/A-T比の調整で当該DNAの湾曲性を少なくする



Cell culture format: Stable pool, fed-batch culture

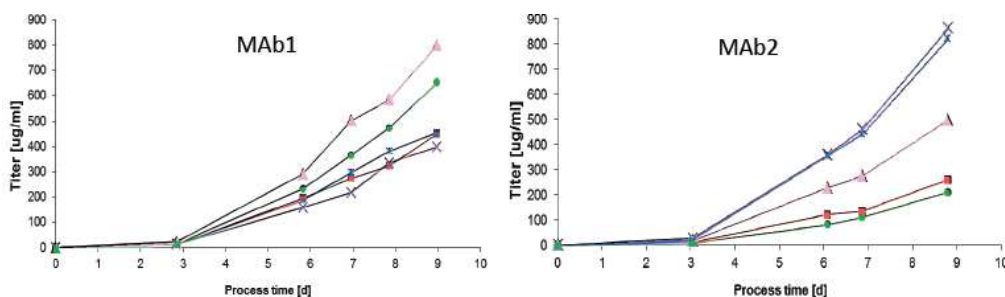


導入遺伝子の質(2)

シグナルペプチド(SP)の影響

目標値: たんぱく質輸送の向上

1. SPライブラリーの活用で最適のSPを選択
2. SPの交換試験



Cell culture format: Stable pool, fed-batch culture

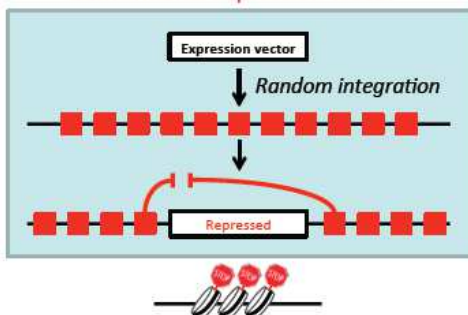


ベクター至適化: SUREtech Vector™

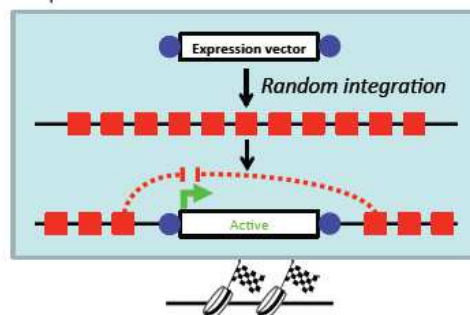
最適な発現ベクターの選択

1. 組込部位に依存しない発現効率
2. 経時的に発現が抑制されないこと
3. 発現量は組込みコピー数に比例すること
4. 発現量が高いこと

Conventional expression vector



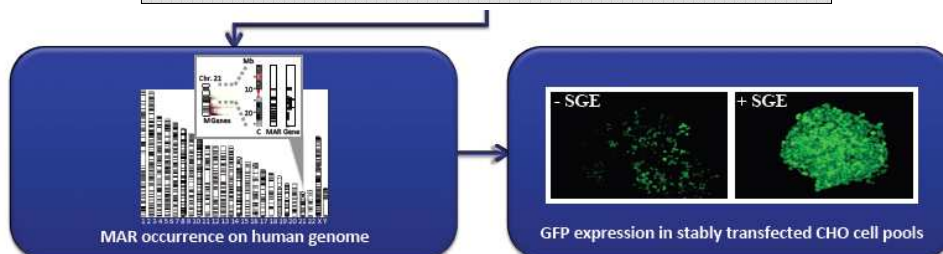
Expression vector + chromatin modifier



ベクター至適化: SUREtech Vector™

ユニークなクロマチン修飾因子の同定: SGEs™

たんぱく質発現を活性化するMARの機能的モチーフ群を単離
↓
バイオインフォマティクスを駆使し探索ツールを構築;
・湾曲部位・深い主溝部位・広い副溝・Tm・転写因子結合部位
↓
全ゲノム上の有望なSGEs (MARフラグメント) を特定



- ヒトゲノムに2から4kbpの大きさの約1600のSGEを同定
- SGEは遺伝子リッチな領域に密集し、非コード領域に存在。



ベクター至適化: SUREtech Vector™

SUREtech Vector™にはSGEが組込まれている

Selexis Genetic Elements(SGEs=MAR)

1. SGEsは様々なdA-dT配列モチーフの繰り返しからなる
2. SGEsは転写因子の結合部位を多く含む
3. SGEsはヌクレオソームの極めて少ない領域を形成する

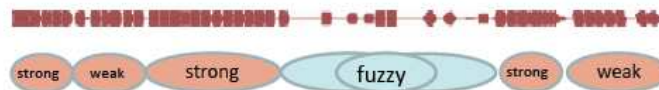
TF binding sites:



Plasmid map:



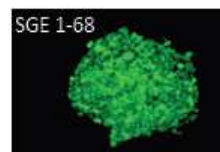
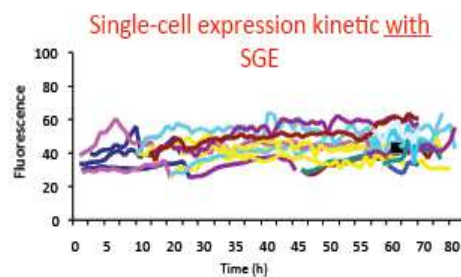
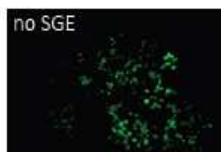
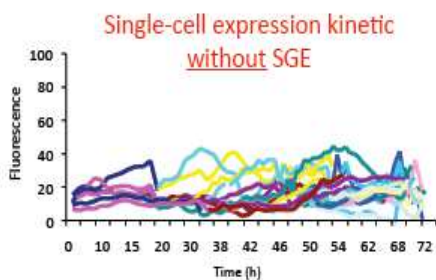
Nucleosome occupancy:



ベクター至適化: SUREtech Vector™

SGEsの介在により転写抑制が起こらない

短半減期GFPの発現動態をタイムラプス撮影で観察





ベクター至適化: SUREtech Vector™

SGEのその他の利点

1. SGEsの効果は細胞に依存しない(図1)
2. SGEsはプロモーターの活性に強く影響する(図2)

Allow high expression in a wide variety of cell types without any optimization

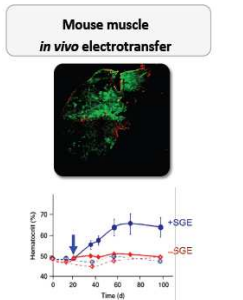
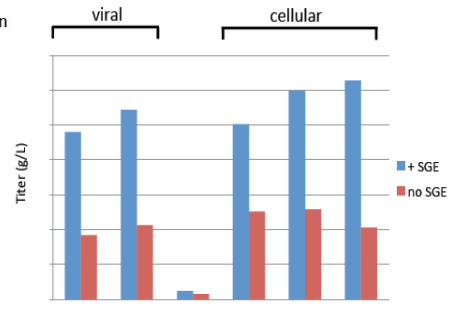
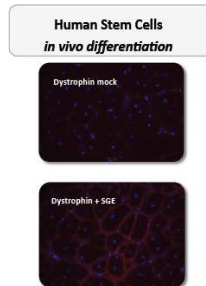


図1



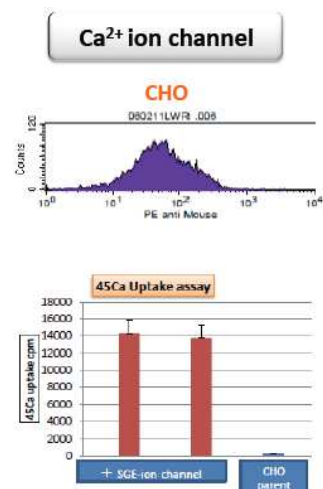
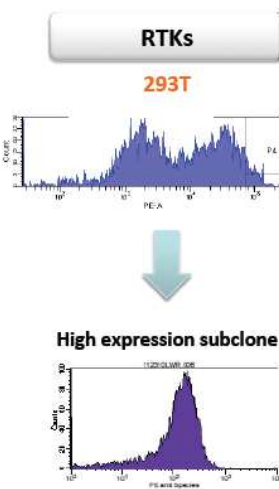
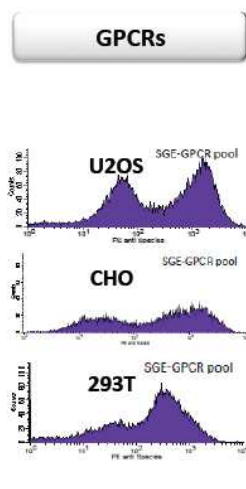
Cell culture format: Stable pool, fed-batch culture

図2



ベクター至適化: SUREtech Vector™

SUREtech Vectors™は創薬に有用

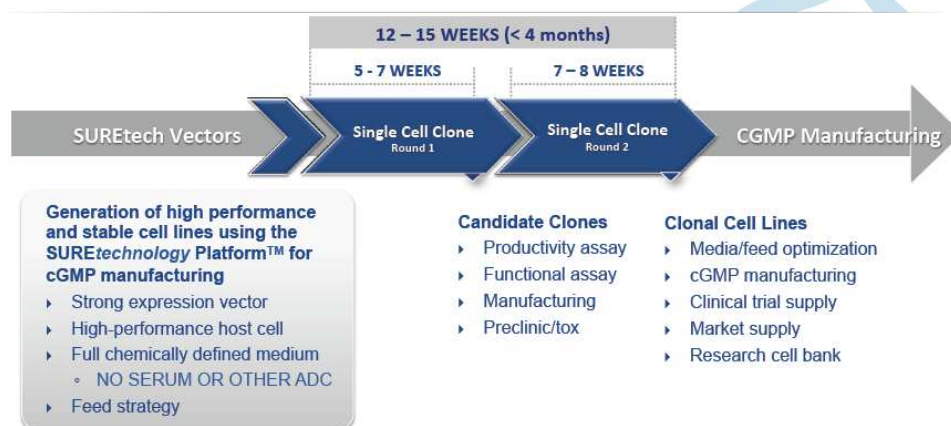




2

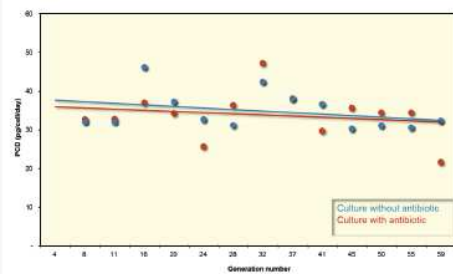
SUREtech Platform™ : 創薬から製造までの技術ニーズに応える完全統合型プラットフォーム

リードたんぱく質特定からセルバンクまで

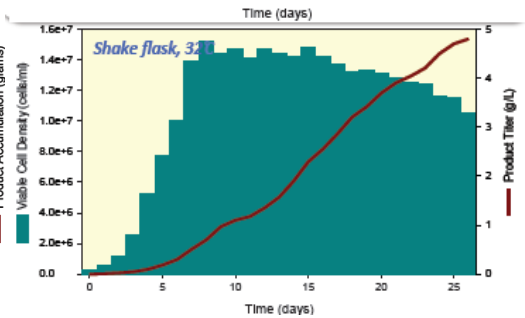
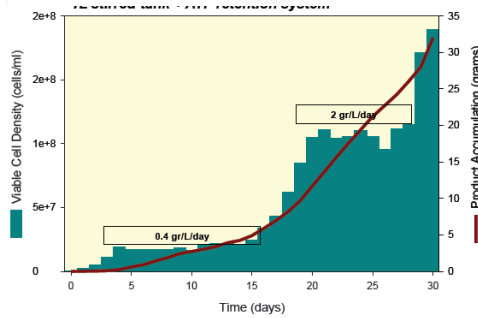
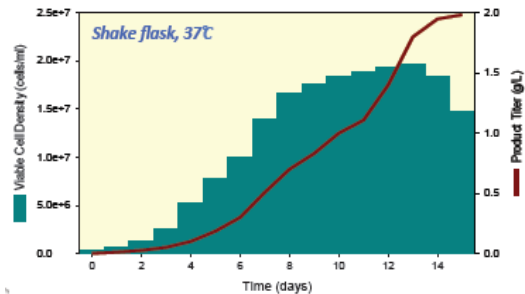


SUREtech Vectors™による製造用高発現系の確立

Stable expression and high biomass



High productivity above 2g/L



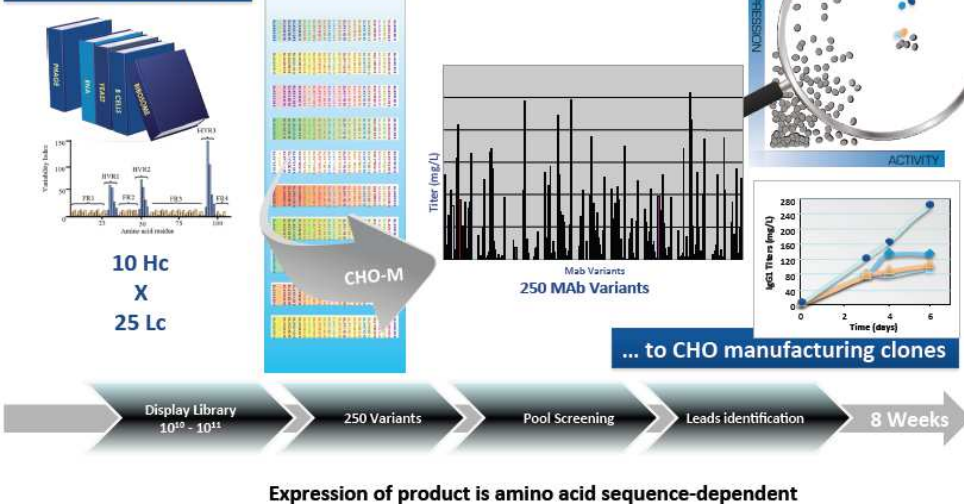
SELEXIS

3

難発現性たんぱく質
発現系樹立への挑戦

医薬品候補(リード)特定のための 変異体のスクリーニング

From drug discovery...



細胞表現型の改変

クローンの相性がたんぱく質の発現に影響する

転写レベル上昇はたんぱく質発現の一つの要因にすぎない



幾つかのたんぱく質は;

- 正常の折り畳み過程から排除されたり
- 高次構造がほどけた状態あるいは凝集体として蓄積



たんぱく質発現の達成度は宿主細胞株固有の
遺伝型と表現型によって規定されている。

細胞表現型の改変

CHO-M細胞の遺伝子工学

- 主要経路の解析
- 遺伝子発現の観察
- 律速となる遺伝子群の決定
- 改良の標的とする

発現対象のたんぱく質と宿主細胞株との相性の予測は可能か？

細胞表現型の改変

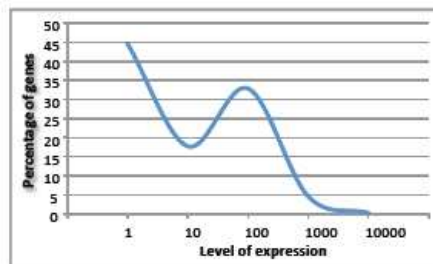
CHO-Mのゲノム配列とトランスクリプトミクス

- CHO-Mゲノムの23Gbの配列を統合解析 (N50>25Kb)
- Biosimilarを産生する8つの株のゲノム配列を決定した
- トランスクリプトームの配列決定と当該遺伝子の特定

Genome	CHO-M	CHO-K1
Total	2.48 Gb	2.32 Gb
%GC	41.2	41.4
# scaffolds	2,221,238	265,786
N50	25,070	39,362
%N	1.6	0
Min	100	50
mean	1,117	8,721
max	382,461	412,584

トランスクリプトームとゲノム分析

- mRNAの配列決定と16,289遺伝子中での発現レベル
- CHO-Mの5748遺伝子は通常発現抑制
- CHO-Mと-KIではCDSが98%共通

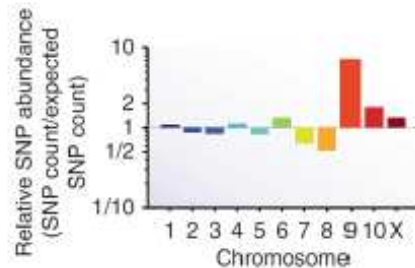
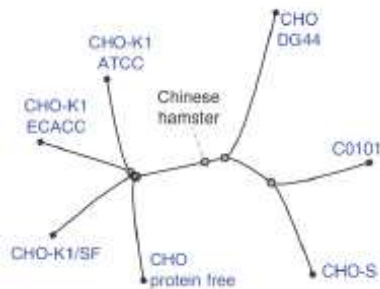


細胞表現型の改変

ゲノムの完全性が長期安定発現の鍵となる

広く増殖細胞におこる不安定性のメカニズム;

1. 組換え体のプロモーターに起こる特異的な抑制
2. CHO細胞のゲノムの不安定性

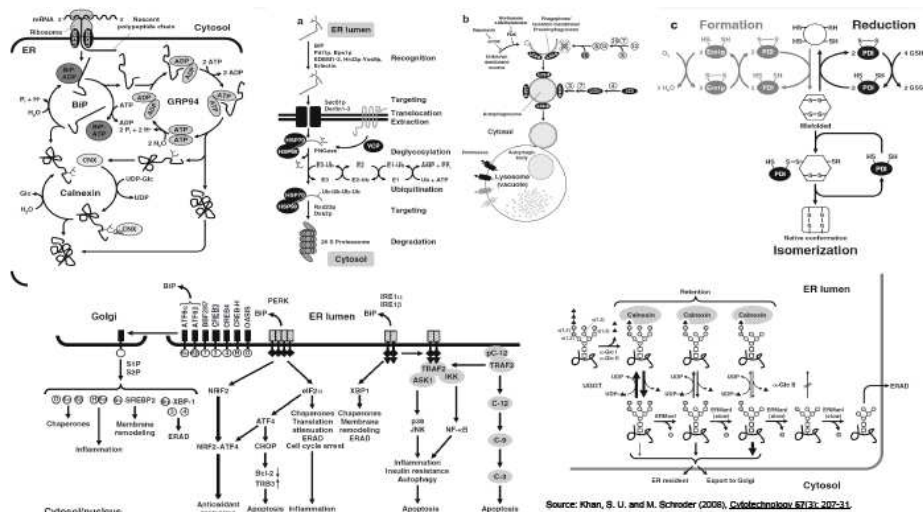


- CHO細胞は不安定な核型を示す
- CHO細胞では染色体再構成が高頻度におこる

細胞表現型の改変

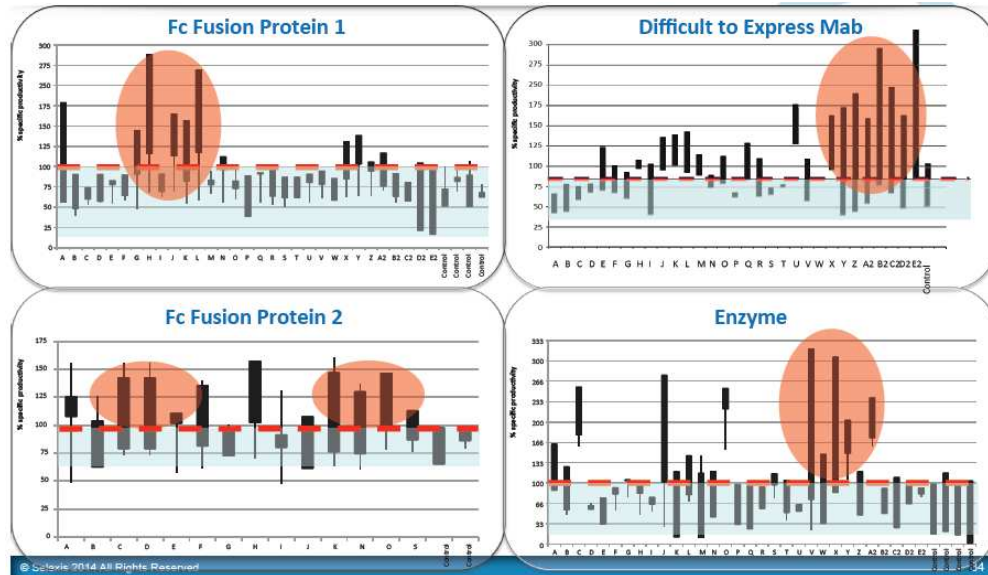
CHOM plus Libraries™; 表現型の改変

効率的生産の律速と推定される宿主細胞のたんぱく質品質管理システム
→ 多くの酵素・シャペロン群の協調した働き



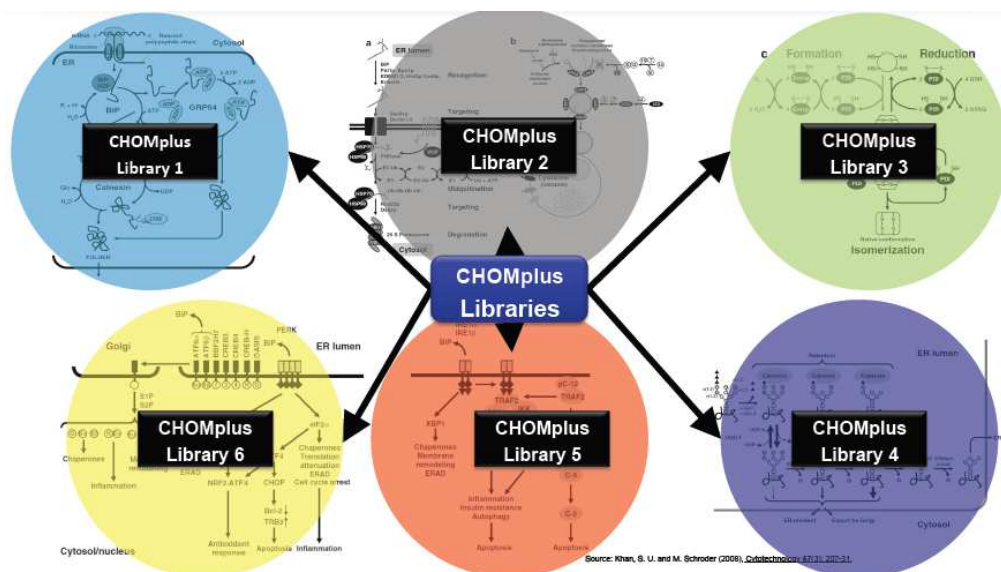
細胞表現型の改変

難発現性たんぱく質の発現と補助たんぱく質



CHOMplus Libraries™ 構築と選択

CHOMplus Libraries™の創出

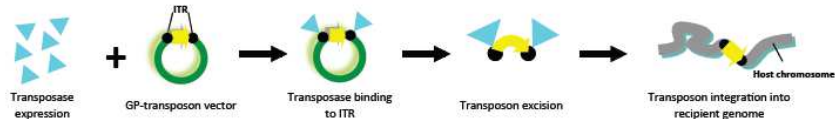


ライブラリー構築のツール

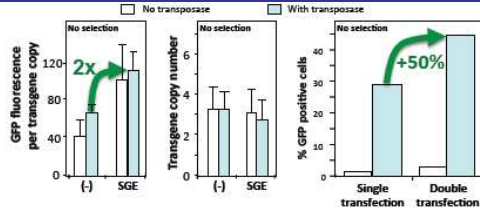
1. SGEs™を配したユニークなトランスポゾンベクター



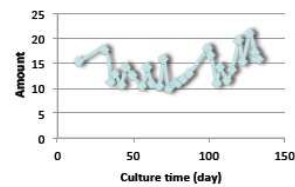
2. CHOMゲノムに各"gene pathway"を効率よく付与するプラットフォーム



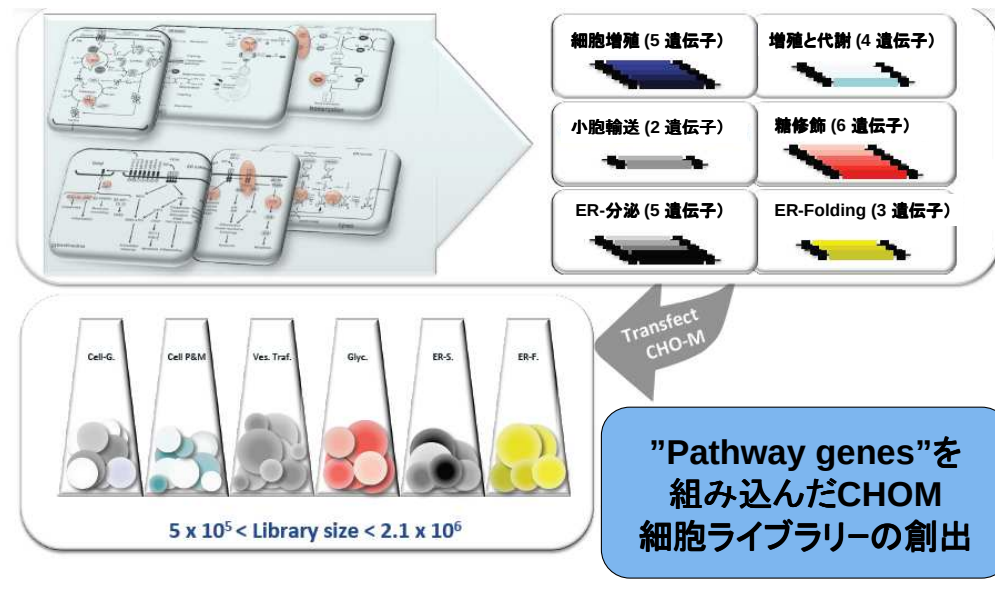
3. SGEs™含有トランスポゾンによる"gene pathway" 高い発現効率



3. SGEs™は"gene pathway" の安定発現に寄与する

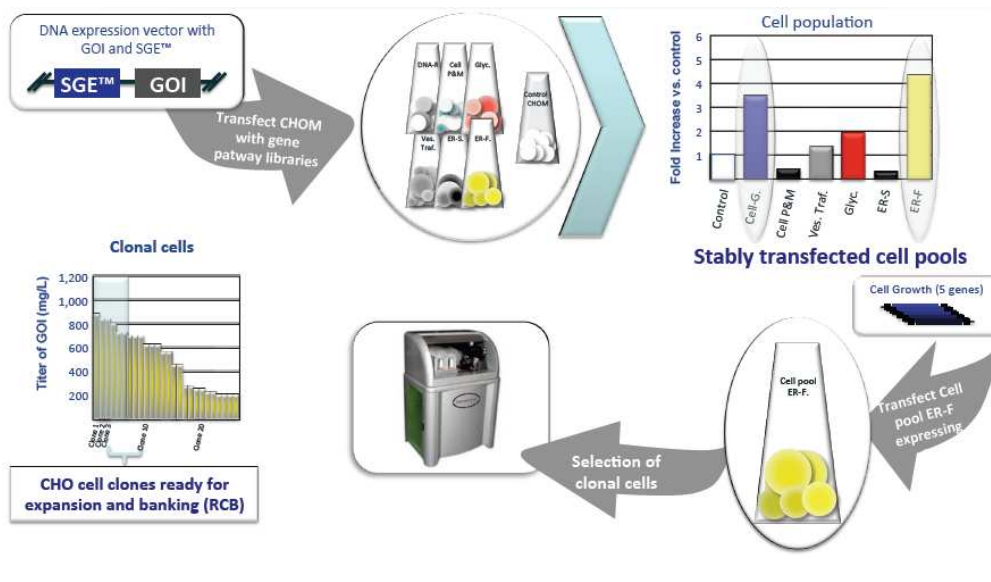


各種"Pathway gene"ライブラリー構築



CHOMplus Libraries™ 構築と選択

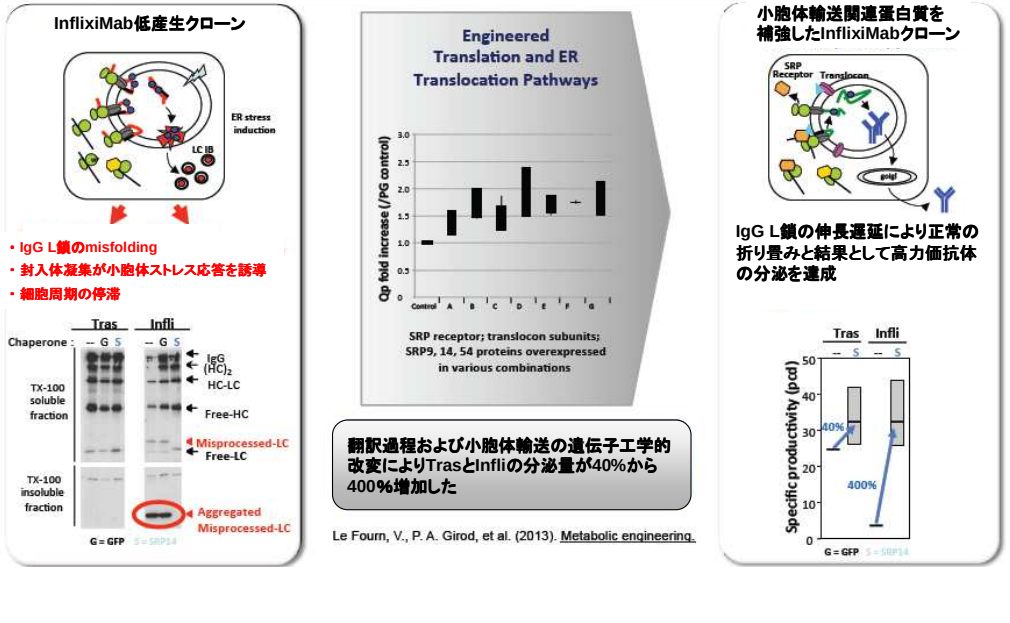
最適クローンの特定と選別



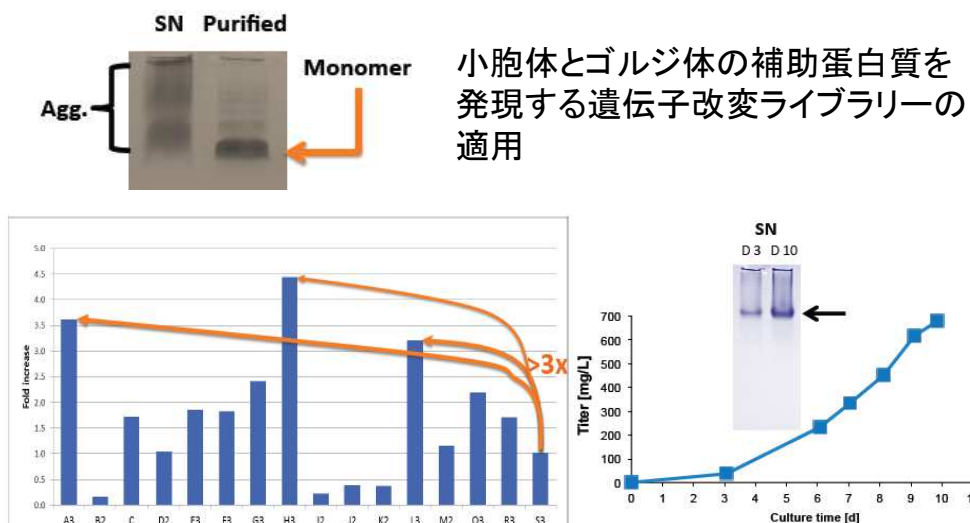
CHOMplus Libraries™ 構築と選択

<http://www.selexis.com/>

ケース1：小胞体輸送関連たんぱく質の過剰発現

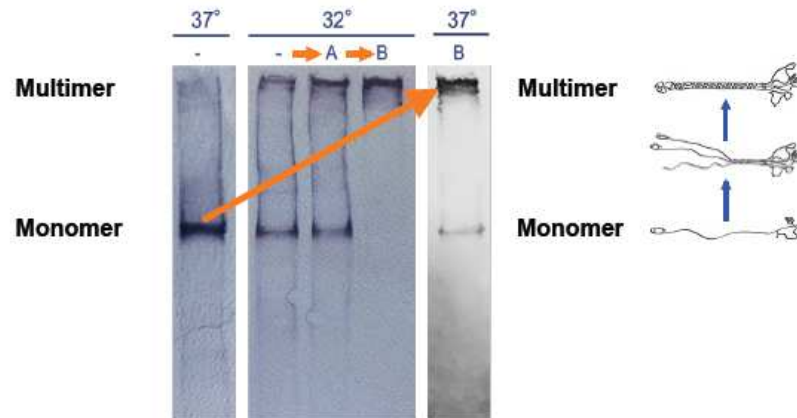


ケース2：凝集に関わるCHOMplus Libraries™



ケース3: 分子シャペロンの 相乗作用 構造蛋白質の例

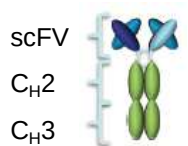
改変CHOM細胞株による37°Cでの産生物



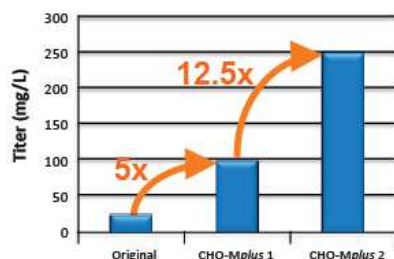
ケース4: 目的遺伝子の転写、コピー数に変化がない が産生量は増大

新規分子骨格

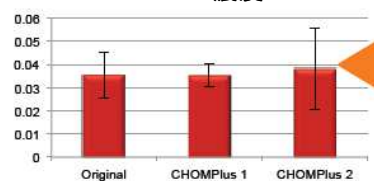
単鎖の可変領域 scFv(V_H - V_L)と
 F_C (C_H2 - C_H3)の融合



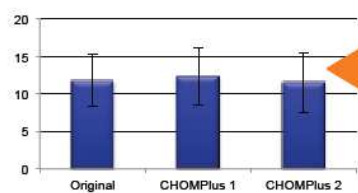
Productivity



mRNA濃度

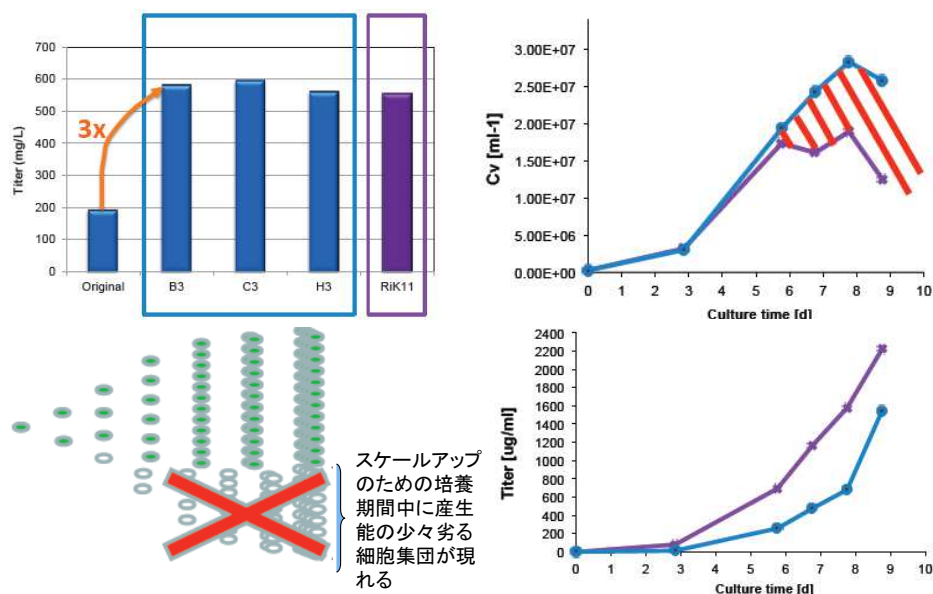


遺伝子コピー数



CHOMplus Libraries™ 応用例

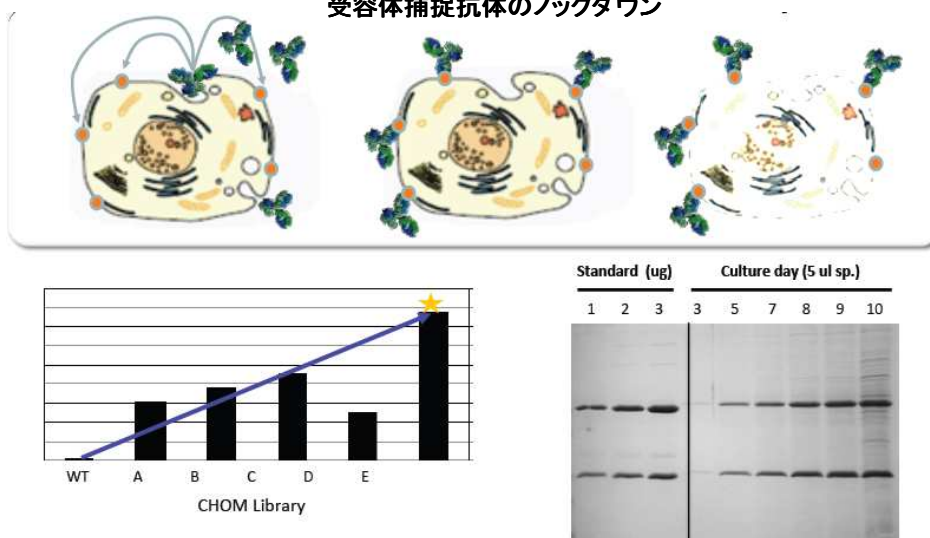
ケース5: ゲノム安定性への影響



CHOMplus Libraries™ 応用例

ケース6: shRNAライブラリーの発現

受容体捕捉抗体のノックダウン



4

CHOMゲノムの配列決定

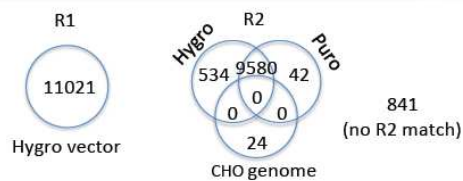
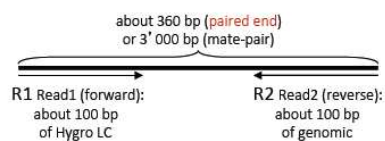
- ・ゲノム上の組込み部位を同定し導入遺伝子の完全性
- ・導入遺伝子のコピー数と正確な配列

- クローン選別の時期に早期に配列の正当性を確認
- "Adventitious agents"の迅速同定

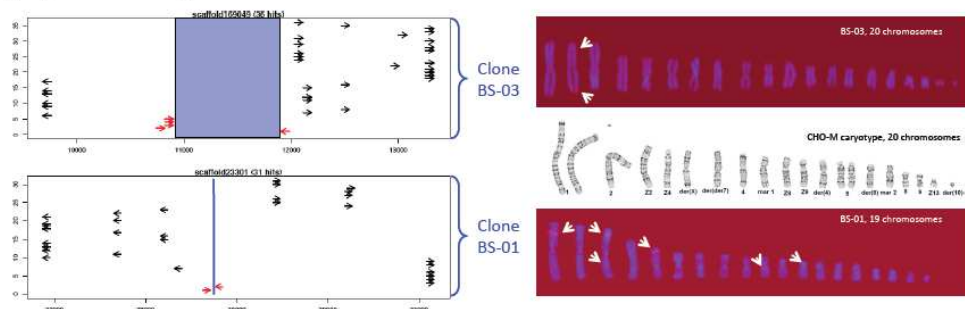
CHOMゲノムの配列決定

染色体上の組込み部位の検出

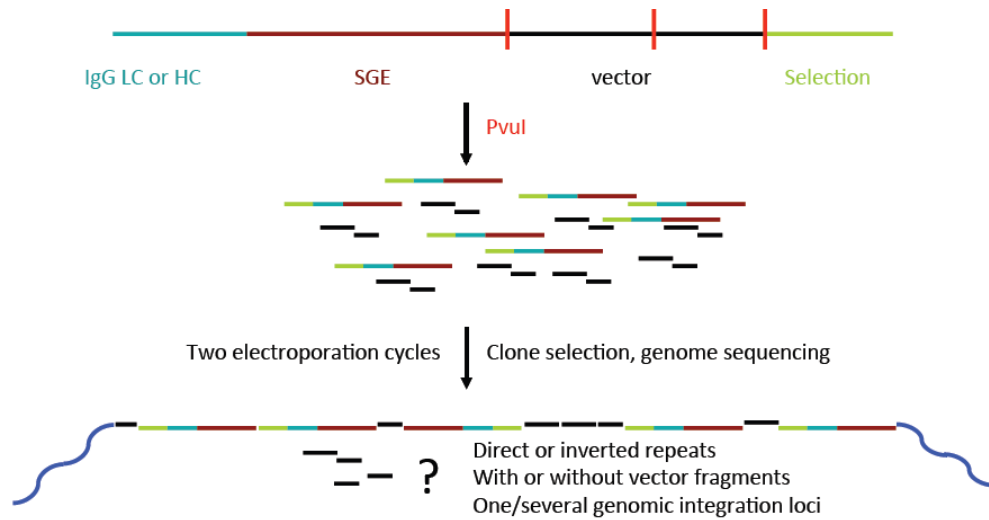
Identifying relevant reads:



Mapping reads on CHO-M genome scaffolds:

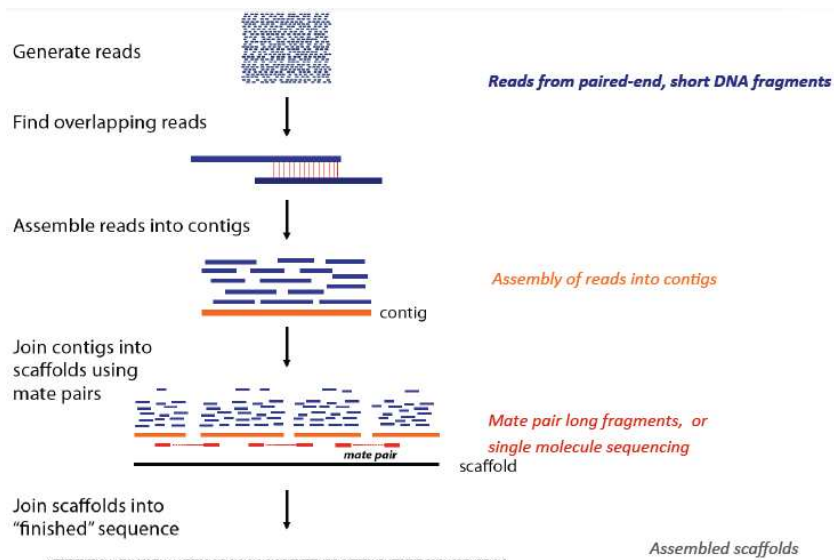


CHOM細胞クローンの樹立

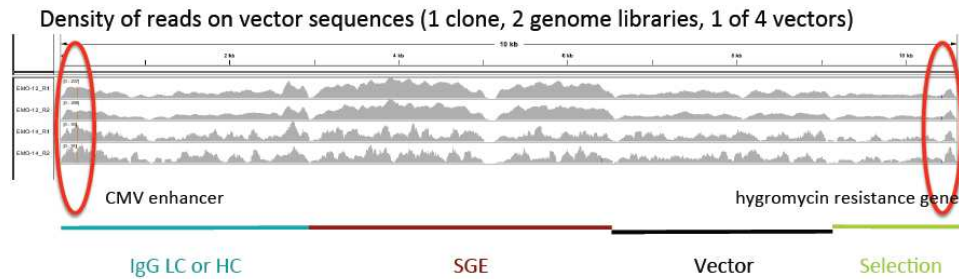


Deep Sequencingによる導入遺伝子の解析

(http://en.wikipedia.org/wiki/Deep_sequencing)



ベクター配列の変異の検出－1



期待された配列変化が検出された

(already present in vector, changes unknown to analysts)

ベクター配列の変異の検出－2

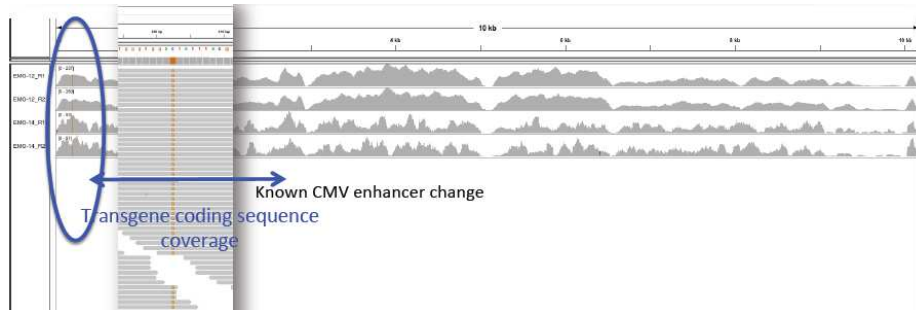


新たなmutationが検出されたのか？

このケースの場合、変異がひとつのライブラリーの同一read由来のため
ライブラリー構築過程でのartifactと考えられる

変異検出の時は、PCRで評価するかクローンを変えるなどで再評価が必要

目的遺伝子に変異のないクローンの選別



CMVエンハンサーに期待した変異が起こり、
目的遺伝子には配列変異はないクローン
II
更なる開発の候補クローン

結 語

Selexis SUREtechnology™は:

1. 堅牢かつ柔軟なプラットフォーム
2. SGEs付加によって高い安定的発現を実現
3. 目的たんぱく質に適したシャペロンの共発現により増強された蛋白質の折り畳み過程を実現
4. Genomic stability libraryから適合シャペロンを組み込んだ”SuperCHO-M株”を開発
5. 目的産物に適したCHO-Mのシステムチックな改変
6. CHO-Mゲノムの解析により阻害経路の特定とその不活性化が可能となった
7. Deep Sequencing等のDNA配列決定技術の活用でCHO候補クローン選別を推進
8. Adventitious agentsの迅速特定によるリスク軽減