

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-550459

(P2023-550459A)

(43)公表日 令和5年12月1日(2023.12.1)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/85 (2006.01)

C 1 2 N 15/85

Z

C 1 2 N 15/62 (2006.01)

C 1 2 N 15/62

C 1 2 N 15/13 (2006.01)

C 1 2 N 15/13

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全48頁)

(21)出願番号	特願2023-530543(P2023-530543)	(71)出願人	504389991
(86)(22)出願日	令和3年11月22日(2021.11.22)		ノバルティス アーゲー
(85)翻訳文提出日	令和5年7月18日(2023.7.18)		スイス国 バーゼル リヒトシュトラッセ
(86)国際出願番号	PCT/IB2021/060796		3 5
(87)国際公開番号	WO2022/107090	(74)代理人	100092783
(87)国際公開日	令和4年5月27日(2022.5.27)		弁理士 小林 浩
(31)優先権主張番号	63/117,379	(74)代理人	100095360
(32)優先日	令和2年11月23日(2020.11.23)		弁理士 片山 英二
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100120134
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA, RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR, GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く	(74)代理人	弁理士 大森 規雄
		(74)代理人	100186897
			弁理士 平川 さやか
		(72)発明者	チェラー, ダッタナンダ
			アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0
			2 1 3 9, ケンブリッジ, マサチューセ 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗体構築物の発現技術

(57)【要約】

本発明は、抗体構築物のための発現ベクター設計に関する。抗体構築物の異なるポリペプチド鎖は、同じオープンリーディングフレーム内にコードされ、2 Aペプチドリinkerによって互いに接続される。この発現ベクター設計は、抗体構築物の均一な発現及び正しい組み立てをもたらす。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも 3 つの異なるポリペプチド鎖を含む抗体構築物をコードする 1 つ以上のベクター核酸からなる核酸産物であって、
前記抗体構築物が、抗体重鎖を含み；
前記抗体構築物の少なくとも 2 つの異なるポリペプチド鎖が、同じオープンリーディングフレーム内にコードされ、
前記オープンリーディングフレーム内にコードされる連続するポリペプチド鎖が、2 A ペプチドを含むペプチドリンカーによって接続されている、核酸産物。

【請求項 2】

前記抗体構築物をコードする 1 つのベクター核酸からなる、請求項 1 に記載の核酸産物。

【請求項 3】

前記抗体重鎖が、同じオープンリーディングフレーム内にコードされる前記抗体構築物の前記少なくとも 2 つの異なるポリペプチド鎖のうちの 1 つであり、任意選択により、前記抗体重鎖が、前記オープンリーディングフレーム内にコードされる N 末端ポリペプチド鎖である、請求項 1 又は 2 に記載の核酸産物。

【請求項 4】

前記抗体構築物が、前記抗体重鎖に結合する抗体軽鎖を含み、前記抗体軽鎖が、任意選択により、

- ・前記オープンリーディングフレーム内にコードされる；及び／又は
 - ・前記抗体重鎖と一緒に前記オープンリーディングフレーム内にコードされる；及び／又は
 - ・軽鎖可変領域を含み、前記抗体重鎖が、重鎖可変領域を含み、前記重鎖可変領域及び前記軽鎖可変領域が抗原結合領域を形成する、
- 請求項 1 又は 3 に記載の核酸産物。

【請求項 5】

前記抗体構築物が、第 2 の抗体重鎖を含み、前記第 2 の抗体重鎖が、任意選択により、

- ・任意選択によりノブ・イントゥ・ホール技術を使用して、前記抗体構築物中の第 1 の抗体重鎖に結合する、及び／又は
- ・前記第 1 の重鎖と同じオープンリーディングフレーム内にコードされるか、若しくは前記第 1 の重鎖をコードする前記第 1 のオープンリーディングフレームとは異なる第 2 のオープンリーディングフレーム内にコードされる、

請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の核酸産物。

【請求項 6】

前記抗体構築物が、前記第 2 の抗体重鎖に結合する第 2 の抗体軽鎖を含み、前記第 2 の抗体軽鎖が、任意選択により、

- ・前記第 2 の重鎖と同じオープンリーディングフレーム内にコードされ、前記オープンリーディングフレームが、前記第 2 の重鎖の C 末端を前記第 2 の軽鎖の N 末端と接続する 2 A ペプチドを含むペプチドリンカーを含む、及び／又は
 - ・軽鎖可変領域を含み、前記第 2 の抗体重鎖が、重鎖可変領域を含み、前記重鎖可変領域及び前記軽鎖可変領域が抗原結合領域を形成する、
- 請求項 5 に記載の核酸産物。

【請求項 7】

前記抗体構築物の各重鎖が、独立して、次の特徴：

- (i) 天然ヒト抗体、特に、天然ヒト Ig G 抗体の γ 型重鎖に由来する、抗体ドメインを含む；
- (i i) 少なくとも 1 つの重鎖定常ドメイン (CH)、特に、少なくとも CH2 ドメイン又は CH3 ドメイン、特に、CH2 ドメイン及び CH3 ドメインを含む；
- (i i i) 別の抗体重鎖とホモ二量体及び／又はヘテロ二量体を形成することができる；

(i v) ヒンジ領域を含む；
 (v) C H 1 ドメインを含む；
 (v i) 重鎖可変ドメイン (V H) を含む；及び
 (v i i) 1 つ以上のさらなるポリペプチド部分を含む
 の 1 つ以上を有する、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の核酸産物。

【請求項 8】

前記抗体構築物の各軽鎖が、独立して、次の特徴：

(i) 天然ヒト抗体、特に、天然ヒト抗体の κ 型又は λ 型軽鎖に由来する、抗体ドメインを含む；

(i i) 軽鎖定常ドメイン (C L) を含む；

10

(i i i) 抗体重鎖とヘテロ二量体を形成することができる；

(i v) 軽鎖可変ドメイン (V L) を含む；及び

(v) 1 つ以上のさらなるポリペプチド部分を含む

の 1 つ以上を有する、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の核酸産物。

【請求項 9】

前記抗体構築物の前記第 1 の重鎖、特に、前記抗体構築物の各重鎖が、N 末端のシグナルペプチドでコードされる；及び／又は前記抗体構築物の前記第 1 の軽鎖、特に、前記抗体構築物の各軽鎖が、N 末端のシグナルペプチドでコードされる、請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の核酸産物。

【請求項 10】

20

1 つ以上のベクター核酸が、

(a) N 末端から C 末端の方向に、第 1 のオープンリーディングフレーム内に、

(i) シグナルペプチド；

(i i) 第 1 の重鎖可変領域を含む第 1 の重鎖；

(i i i) 2 A ペプチドを含むリンカーペプチド；

(i v) 任意選択により、シグナルペプチド；及び

(v) 第 1 の軽鎖可変領域を含む第 1 の軽鎖；並びに

N 末端から C 末端の方向に、第 2 のオープンリーディングフレーム内に、

(i) シグナルペプチド；

(i i) 第 2 の重鎖可変領域を含む第 2 の重鎖；

30

(i i i) 2 A ペプチドを含むリンカーペプチド；

(i v) 任意選択により、シグナルペプチド；及び

(v) 第 2 の軽鎖可変領域を含む第 2 の軽鎖；

をコードし、前記第 1 の重鎖可変領域及び前記第 1 の軽鎖可変領域が、第 1 の抗原に結合することができる抗原結合領域を形成し、

前記第 2 の重鎖可変領域及び前記第 2 の軽鎖可変領域が、第 2 の抗原に結合することができる抗原結合領域を形成し、

前記第 1 の重鎖と前記第 2 の重鎖が、ノブ・イントゥ・ホール技術を使用して互いに結合するか；又は

(b) N 末端から C 末端の方向に、同じオープンリーディングフレーム内に、

40

(i) シグナルペプチド；

(i i) 第 1 の重鎖可変領域を含む第 1 の重鎖；

(i i i) 2 A ペプチドを含むリンカーペプチド；

(i v) 任意選択により、シグナルペプチド；

(v) 第 1 の軽鎖可変領域を含む第 1 の軽鎖；

(v i) 2 A ペプチドを含むリンカーペプチド；

(v i i) 任意選択により、シグナルペプチド；

(v i i i) 第 2 の重鎖可変領域を含む第 2 の重鎖；

(i x) 2 A ペプチドを含むリンカーペプチド；

(x) 任意選択により、シグナルペプチド；及び

50

(x i) 第 2 の軽鎖可変領域を含む第 2 の軽鎖；
 をコードし、前記第 1 の重鎖可変領域及び前記第 1 の軽鎖可変領域が、第 1 の抗原に結合
 することができる抗原結合領域を形成し、
 前記第 2 の重鎖可変領域及び前記第 2 の軽鎖可変領域が、第 2 の抗原に結合することがで
 きる抗原結合領域を形成し、
 前記第 1 の重鎖と前記第 2 の重鎖が、ノブ・イントゥ・ホール技術を使用して互いに結合
 するか；又は

- (c) N 末端から C 末端の方向に、第 1 のオープンリーディングフレーム内に、
 - (i) シグナルペプチド；
 - (i i) 重鎖可変領域を含む第 1 の重鎖；
 - (i i i) 2 A ペプチドを含むリンカーペプチド；
 - (i v) 任意選択により、シグナルペプチド；及び
 - (v) 軽鎖可変領域を含む軽鎖；

をコードし、前記 1 つ以上のベクター核酸が、N 末端から C 末端の方向に、第 2 のオープ
 ンリーディングフレーム内に、

- (i) シグナルペプチド；及び
- (i i) 第 2 の重鎖；

をコードし、前記第 1 の重鎖の前記重鎖可変領域及び前記軽鎖可変領域が、第 1 の抗原に
 結合することができる抗原結合領域を形成し；

前記第 2 の重鎖が、第 2 の抗原に結合することができる抗原結合領域を含み；

前記第 1 の重鎖と前記第 2 の重鎖が、ノブ・イントゥ・ホール技術を使用して互いに結合
 するか；又は

- (d) N 末端から C 末端の方向に、第 1 のオープンリーディングフレーム内に、
 - (i) シグナルペプチド；
 - (i i) 第 1 の重鎖；
 - (i i i) 2 A ペプチドを含むリンカーペプチド；
 - (i v) 任意選択により、シグナルペプチド；及び
 - (v) 第 2 の重鎖；

をコードし、前記 1 つ以上のベクター核酸が、N 末端から C 末端の方向に、第 2 のオープ
 ンリーディングフレーム内に、

- (i) シグナルペプチド；及び
- (v) 軽鎖可変領域を含む軽鎖；

をコードし、前記第 1 の重鎖が、第 1 の抗原に結合することができる、前記軽鎖可変領域
 とともに抗原結合領域を形成する重鎖可変領域を含み；前記第 2 の重鎖が、第 2 の抗原に
 結合することができる抗原結合領域を含むか、又は前記第 1 の重鎖が、第 1 の抗原に結合
 することができる抗原結合領域を含み；前記第 2 の重鎖が、第 2 の抗原に結合することが
 できる、前記軽鎖可変領域とともに抗原結合領域を形成する重鎖可変領域を含み；

前記第 1 の重鎖と前記第 2 の重鎖が、ノブ・イントゥ・ホール技術を使用して互いに結合
 するか；又は

- (e) N 末端から C 末端の方向に、前記オープンリーディングフレーム内に、
 - (i) シグナルペプチド；
 - (i i) 第 1 の重鎖；
 - (i i i) 2 A ペプチドを含むリンカーペプチド；
 - (i v) 任意選択により、シグナルペプチド；
 - (v) 重鎖可変領域を含む第 2 の重鎖；
 - (v i) 2 A ペプチドを含むリンカーペプチド；
 - (v i i) 任意選択により、シグナルペプチド；及び
 - (v i i i) 軽鎖可変領域を含む軽鎖；

をコードし、前記第 1 の重鎖が、第 1 の抗原に結合することができる抗原結合領域を含み
 ；

前記第 2 の重鎖の前記重鎖可変領域及び前記軽鎖可変領域が、第 2 の抗原に結合することができる抗原結合領域を形成し；

前記第 1 の重鎖と前記第 2 の重鎖が、ノブ・イントゥ・ホール技術を使用して互いに結合する、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の核酸産物。

【請求項 1 1】

前記ペプチドリンカーが、次の特徴：

(i) 口蹄疫ウイルス、ウマ鼻炎 A ウイルス、ブタテシオウイルス－1、及びトセア・アシグナ (*Thosea asigna*) ウイルスからなる群から選択されるウイルスに由来する 2 A ペプチドを有する；

(i i) 前記 2 A ペプチドの N 末端にプロテアーゼ認識部位をさらに含み、前記プロテアーゼ認識部位が、特に、フューリン認識部位である；

(i i i) 配列番号 2 5 によるアミノ酸配列を含む

の 1 つ以上を有する、請求項 1 ～ 1 0 のいずれか一項に記載の核酸産物。

【請求項 1 2】

(i) 前記抗体構築物の各ポリペプチド鎖が別個のオープンリーディングフレーム内にコードされている、核酸産物を使用した前記抗体構築物の前記ポリペプチド鎖の細胞産生と比較して、前記抗体構築物の前記ポリペプチド鎖のより均一な細胞産生であって、任意選択により、前記細胞内の前記抗体の異なるポリペプチド鎖をコードする mRNA の量が、1 0 因子を超えて異ならない、細胞産生；及び／又は

(i i) 前記抗体構築物の各ポリペプチド鎖が別個のオープンリーディングフレーム内にコードされている、核酸産物を使用した前記抗体構築物の前記ポリペプチド鎖の発現後に正しく組み立てられた抗体構築物の相対量と比較してより高い、前記抗体構築物の前記ポリペプチド鎖の発現後に正しく組み立てられた抗体構築物の相対量であって、任意選択により、前記抗体構築物の前記ポリペプチド鎖の発現後に正しく組み立てられた抗体構築物の相対量が、各ポリペプチド鎖が別個のオープンリーディングフレーム内にコードされている、核酸産物を使用して正しく組み立てられた抗体構築物の相対量よりも、少なくとも 1 0 パーセントポイント高い、相対量

を提供する、請求項 1 ～ 1 1 のいずれか一項に記載の核酸産物。

【請求項 1 3】

前記抗体構築物の 2 つ以上のポリペプチド鎖をコードする前記オープンリーディングフレームが、前記オープンリーディングフレームの発現を可能にする発現カセットの一部である、請求項 1 ～ 1 2 のいずれか一項に記載の核酸産物。

【請求項 1 4】

前記ベクター核酸が、プラスミドである、請求項 1 ～ 1 3 のいずれか一項に記載の核酸産物。

【請求項 1 5】

請求項 1 ～ 1 4 のいずれか一項に記載の核酸産物を含む、宿主細胞。

【請求項 1 6】

哺乳動物細胞、特に、ヒト又は齧歯動物細胞、特に、CHO 細胞である、請求項 1 5 に記載の宿主細胞。

【請求項 1 7】

(a) 請求項 1 5 又は 1 6 による宿主細胞を提供するステップ、

(b) 抗体構築物の産生を可能にする条件下で、細胞培養物中で前記宿主細胞を培養するステップ、

(c) 前記細胞培養物から前記抗体構築物を取得するステップ、及び

(d) 任意選択により、前記抗体構築物を処理するステップ

を含む、前記抗体構築物を産生する方法。

【請求項 1 8】

・ステップ (c) が、前記抗体構築物を単離すること、及び／又は前記細胞培養物の残りの成分から前記抗体構築物を分離することを含む；及び／又は

・ステップ（d）が、前記抗体構築物を医薬組成物として製剤化することを含む、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

（i）前記抗体構築物の各ポリペプチド鎖が別個のオープンリーディングフレーム内にコードされている、核酸産物を使用した前記抗体構築物の前記ポリペプチド鎖の産生と比較して、前記抗体産物の前記ポリペプチド鎖が、より均一に産生され、任意選択により、前記細胞内の前記抗体構築物の異なるポリペプチド鎖をコードする mRNA の量が、10 因子を超えて異ならない；及び／又は

（ii）前記抗体構築物の各ポリペプチド鎖が別個のオープンリーディングフレーム内にコードされている、核酸産物を使用した前記抗体構築物の産生と比較して、正しく組み立てられた抗体構築物の相対量がより高く、任意選択により、正しく組み立てられた抗体構築物の相対量が、各ポリペプチド鎖が別個のオープンリーディングフレーム内にコードされている、核酸産物を使用して正しく組み立てられた抗体構築物の相対量よりも、少なくとも 10 パーセントポイント高い、請求項 17 又は 18 に記載の方法。

10

【請求項 20】

抗体構築物の産生のための、請求項 1～14 のいずれか一項に記載の核酸産物又は請求項 15 若しくは 16 に記載の宿主細胞の使用。

【請求項 21】

請求項 1～14 のいずれか一項に記載の核酸産物を宿主細胞に導入することを含む、請求項 15 又は 16 に記載の宿主細胞を産生する方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、組換えタンパク質産生の分野に関する。抗体構築物の新しい発現戦略が提供される。特に、いくつかの異なるポリペプチド鎖を有する抗体構築物の産生のための核酸産物が提供され、ここで、ポリペプチド鎖は、別個のポリペプチド鎖の生成をもたらす 2 A ペプチドによって分離された、同じオープンリーディングフレーム内にコードされる。これにより、抗体構築物の均一な発現及び正しい組み立てが達成される。

【背景技術】

30

【0002】

二重特異性抗体は、2つの別個のエピトープに結合する抗体である。最も一般的には、二重特異性抗体は、第1のエピトープに対する重鎖-軽鎖対と、第2のエピトープに対する別の重鎖-軽鎖対を対合させることで構築される。このような抗体構築物は、当技術分野で周知である。二重特異性抗体を生成するための1つのアプローチは、例えば Ridgway et al. (1996) Protein Engineering 9 (7) : 617-621 に記載されている、いわゆるノブ・イントゥ・ホール (K i H) 技術である。ここで、第1の重鎖は、より大きいアミノ酸をより小さいアミノ酸で置換することによってホール様構造を示すように修飾され、第2の重鎖は、より小さいアミノ酸がより大きいアミノ酸に置き換えられるアミノ酸置換を使用して、重鎖：重鎖界面の対応する部位にノブ様構造を示すように修飾される。ノブ重鎖とホール重鎖の対合が有利であるため、二重特異性抗体、すなわち、2つの異なる軽鎖及び2つの異なる重鎖からなるヘテロ四量体タンパク質が形成される。

40

【0003】

しかし、特に、軽鎖と間違っただ重鎖の誤対合、又は2つの同一の重鎖の対合、又は1つのポリペプチド鎖を欠いた不完全な構築物による、抗体の間違った組み立ては、依然として宿主細胞内で発生する。さらに、二重特異性抗体のポリペプチド鎖は、例えば、ポリペプチド鎖の発現カセットが異なる量で発現されるため、異なる量で発現されることが多く、不均衡な mRNA レベルにつながる。これにより、間違っただ組み立てられた抗体構築物の量が増加する。

50

【0004】

間違っ組み立てられた抗体は、産生プロセスの全収率を減少させ、精製プロセス中に除去するのが特に困難である。

【0005】

したがって、二重特異性抗体を生成する既存の方法では、臨床開発及び商業化に実現可能な規模での製造を可能にするのに十分に費用対効果の高い方法で、十分な全収率、純度及び製品品質が得られない可能性がある。さらに、タンパク質鎖の修飾は本質的に抗薬物抗体を誘導するリスクを高める。したがって、最小限のタンパク質工学のみを必要とするアプローチは、臨床的に有利である可能性がある。

【発明の概要】

【0006】

上記を考慮すると、当技術分野では、正しく組み立てられた抗体構築物の高い収率及び比率をもたらす、二重特異性抗体及び他の抗体構築物を産生するための改良された戦略を提供することが必要とされている。

【0007】

本発明者らは、二重特異性抗体又は抗体融合タンパク質などの3つ以上の異なるポリペプチド鎖を含む抗体構築物が、その異なるポリペプチド鎖の少なくとも一部が前記ポリペプチド鎖間の2Aペプチドなどの自己切断ペプチドリンカーを使用して同じオープンリーディングフレーム内にコードされている場合、有意に増加した有効性で産生され得ることを発見した。このアプローチは、mRNAレベルで均衡な発現を提供し、それにより、より均衡なタンパク質レベルにもつながることが本発明者らによって示された。さらに、1つのmRNAからの異なるポリペプチド鎖の翻訳は、宿主細胞内で近接して発生する。これにより、産生した抗体構築物は正しく組み立てられ、ポリペプチド鎖の望ましくない誤対合及び一部のポリペプチド鎖の過剰産生が防止される。したがって、本発明は、宿主細胞によって発現される正しく形成された抗体構築物の比率の増加、したがって所望の産物の全収率及び純度の増加を提供する。本発明者らは、いくつかの異なる抗体構築物について本発明によるアプローチの利点を実証することができ、それらはいずれも、従来のアプローチと比較して、正しく組み立てられたタンパク質のはるかに高い割合を示した。

【0008】

したがって、第1の態様では、本発明は、少なくとも3つの異なるポリペプチド鎖を含む抗体構築物をコードする1つ以上のベクター核酸からなる核酸産物を対象とし、ここで、抗体構築物は、抗体重鎖を含み、抗体構築物の少なくとも2つの異なるポリペプチド鎖は、同じオープンリーディングフレーム内にコードされ、前記オープンリーディングフレーム内にコードされる連続するポリペプチド鎖は、2Aペプチドを含むペプチドリンカーによって接続されている。

【0009】

第2の態様では、本発明は、第1の態様による核酸産物を含む宿主細胞を提供する。

【0010】

第3の態様では、本発明は、

- (a) 第2の態様による宿主細胞を提供するステップ、
 - (b) 抗体構築物の産生を可能にする条件下で、細胞培養物中で宿主細胞を培養するステップ、
 - (c) 細胞培養物から抗体構築物を取得するステップ、及び
 - (d) 任意選択により、抗体構築物を処理するステップ
- を含む、抗体構築物を産生する方法を提供する。

【0011】

第4の態様では、本発明は、抗体構築物の産生のための、第1の態様による核酸産物又は第2の態様による宿主細胞の使用を提供する。

【0012】

第5の態様では、本発明は、第1の態様による核酸産物を宿主細胞に導入することを含

10

20

30

40

50

む、第2の態様による宿主細胞を産生する方法を提供する。

【0013】

本発明の他の目的、特徴、利点及び態様は、当業者にとって以下の説明及び添付の特許請求の範囲から明らかになるであろう。しかし、本出願の好ましい実施形態を示す以下の説明、添付の特許請求の範囲、及び特定の実施例は、例示としてのみ与えられることを理解されたい。開示された発明の精神及び範囲内の様々な変更及び修正は、以下を読むことにより当業者にとって容易に明らかになるであろう。

【0014】

定義

本明細書で使用される場合、以下の表現は、それらが使用される文脈が別段の意味を示す場合を除き、一般に、好ましくは以下に示す意味を有することが意図される。

【0015】

本明細書で使用される「含む」という表現は、その文字通りの意味に加えて、「から本質的になる」及び「からなる」という表現も含み、具体的にそれらを指す。したがって、「含む」という表現は、具体的に列挙された要素を「含む」対象物がさらなる要素を含まない実施形態、並びに具体的に列挙された要素を「含む」対象物がさらなる要素を包含し得る、及び／又は実際に包含する実施形態を指す。同様に、「有する」という表現は「含む」という表現として理解されるべきであり、「から本質的になる」及び「からなる」という表現も含み、具体的にそれらを指す。「から本質的になる」という用語は、可能であれば、特に、対象物が、対象物がそれから本質的になる具体的に列挙された要素に加えて、20%以下、特に15%以下、10%以下、又は特に5%以下のさらなる要素を含む実施形態を指す。

【0016】

「核酸」という用語は、一本鎖及び二本鎖の核酸及びリボ核酸並びにデオキシリボ核酸を含む。これは、天然ヌクレオチド及び合成ヌクレオチドを含んでもよく、例えば、メチル化、5'-及び／又は3'-キャッピングによって、天然に又は合成的に修飾することができる。特定の実施形態では、核酸は、二本鎖デオキシリボ核酸を指す。

【0017】

本発明による「核酸産物」は、所望のポリペプチド又はタンパク質と一緒にコードする核酸、又は2つ以上の核酸のセットである。特に、2つ以上の異なるポリペプチド鎖から構成されるタンパク質をコードする核酸産物は、異なるポリペプチド鎖の全てをコードする1つの核酸からなる核酸産物、及び2つ以上の異なる核酸からなる核酸産物を含み、ここで、これらの核酸はそれぞれ、異なるポリペプチド鎖の少なくとも1つをコードし、核酸産物の全ての核酸は、一緒になってタンパク質の異なるポリペプチド鎖の全てをコードする。核酸産物の異なる核酸は、通常、互いに協調するように設計されている。例えば、トランスフェクトされた宿主細胞における各核酸の維持を制御できるように、異なる核酸は異なる選択マーカーを有し得る。

【0018】

「発現カセット」という用語は、特に、その中に導入されたコード核酸配列の発現を可能にし、調節することができる、核酸構築物を指す。発現カセットは、プロモーター、リボソーム結合部位、エンハンサー、及び遺伝子の転写又はmRNAの翻訳を調節する他の制御エレメントを含み得る。発現カセットの正確な構造は、種又は細胞型の機能として異なり得るが、一般的には、TATAボックス、キャッピング配列、CAAT配列などの、それぞれ転写及び翻訳の開始に関与する、5'-非転写配列、並びに5'-及び3'-非翻訳配列を含む。より具体的には、5'非転写発現制御配列は、作動可能に接続された核酸の転写制御のためのプロモーター配列を含む、プロモーター領域を含む。発現カセットはまた、エンハンサー配列又は上流アクチベーター配列を含んでもよい。

【0019】

本発明によると、「プロモーター」という用語は、発現される核酸配列の上流(5')に位置し、RNAポリメラーゼの認識及び結合部位を提供することによって配列の発現を

10

20

30

40

50

制御する、核酸配列を指す。「プロモーター」は、遺伝子の転写の調節に関与するさらなる因子のさらなる認識部位及び結合部位を含み得る。プロモーターは、原核生物又は真核生物遺伝子の転写を制御し得る。さらに、プロモーターは、「誘導性」、すなわち、誘導剤に応答して転写を開始するものであってもよく、転写が誘導剤によって制御されない場合は、「構成的」であってもよい。誘導性プロモーターの制御下にある遺伝子は、誘導剤が存在しない場合には発現しないか、わずかしき発現しない。誘導剤の存在下では、遺伝子のスイッチがオンになるか、又は転写のレベルが増加する。これは、一般に、特定の転写因子の結合によって媒介される。

【0020】

「ベクター」という用語は、本明細書ではその最も一般的な意味で使用され、例えば、前記核酸を原核細胞及び／又は真核細胞に導入し、適切な場合はゲノムに組み込むことを可能にする、核酸の任意の中間媒体を含む。この種のベクターは、好ましくは、細胞内で複製及び／又は発現される。ベクターには、プラスミド、ファージミド、バクテリオファージ又はウイルスゲノムが含まれる。本明細書で使用される「プラスミド」という用語は、一般に、染色体DNAとは独立して複製できる、染色体外遺伝物質の構築物、通常は環状DNA二本鎖に関する。本発明によるベクターは、環状又は線状の形態で存在し得る。本明細書で使用される「ベクター核酸」は、ベクターを形成する核酸、又はベクターの核酸部分である。

10

【0021】

「5'」及び「3'」という用語は、5'から3'方向に進むRNAポリメラーゼによる転写、又はリボソームによる翻訳など、遺伝要素の位置及び／又は事象の方向（5'から3'）に関連する核酸配列の特徴を記述するために使用される従来法である。同義語は、上流（5'）及び下流（3'）である。従来、DNA配列、遺伝子マップ、ベクターカード、及びRNA配列は、5'から3'を左から右に描くか、又は5'から3'の方向を矢印の先端が3'方向を指すように矢印で示す。したがって、この規則に従うと、5'（上流）は、左側に向かって位置する遺伝要素を示し、3'（下流）は、右側に向かって位置する遺伝要素を示す。

【0022】

「ポリペプチド」又は「ポリペプチド鎖」は、ペプチド結合によって互いに連結されたアミノ酸のポリマーを含む分子を指す。ポリペプチドには、タンパク質（例えば、50個を超えるアミノ酸を有する）及びペプチド（例えば、2～49個のアミノ酸を有する）を含む、任意の長さのポリペプチドが含まれる。特に、ポリペプチド又はポリペプチド鎖は、2つ以上のポリペプチド鎖からなるタンパク質の一部であり得る。ポリペプチドには、任意の活性又は生物活性を有するタンパク質及び／又はペプチドが含まれる。ポリペプチドは、薬学的若しくは治療的に活性な化合物、又はアッセイなどで利用される研究ツールであり得る。適切な例を以下に概説する。

30

【0023】

標的アミノ酸配列が参照アミノ酸配列とその全長にわたって少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも93%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%の同一性を共有する場合、標的アミノ酸配列は、参照アミノ酸配列に「由来する」か、又は「対応する」。特定の実施形態では、参照アミノ酸配列に「由来する」か、又はそれに「対応する」標的アミノ酸配列は、その全長にわたって参照アミノ酸配列と100%相同、又は特に100%同一である。同様に、標的ヌクレオチド配列が参照ヌクレオチド配列とその全長にわたって少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも93%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%の同一性を共有する場合、標的ヌクレオチド配列は、参照ヌクレオチド配列に「由来する」か、又はそれに「対応する」。特定の実施形態では、参照ヌクレオチド配列に「由来する」か、又はそれに「対応する」標的ヌクレオチド配列は、その全長にわたって参照ヌクレオチド配列と100%同一である。アミノ酸配列又はヌク

40

50

レオチド配列の「同一性」は、好ましくは、参照配列の全長にわたって本発明に従って決定される。

【0024】

「抗体」という用語は、特に、ジスルフィド結合によって接続された少なくとも2つの重鎖及び2つの軽鎖を含む抗体タンパク質を指す。各重鎖は、重鎖可変領域（VH）及び重鎖定常領域（CH）から構成される。各軽鎖は軽鎖可変領域（VL）及び軽鎖定常領域（CL）から構成される。重鎖定常領域は、3つ、又はIgM又はIgE型の抗体の場合は4つの重鎖定常ドメイン（CH1、CH2、CH3及びCH4）を含み、ここで、第1の定常ドメインCH1は、可変領域に隣接しており、ヒンジ領域によって第2の定常ドメインCH2に接続されてもよい。γ1型重鎖のヒトCH1、ヒンジ領域、CH2、CH3のアミノ酸配列をそれぞれ配列番号1～4に示し、ヒトγ1型重鎖の定常領域全体を配列番号5に示す。軽鎖定常領域は、1つの定常ドメインのみからなる。可変領域は、フレームワーク領域（FR）と呼ばれる、より保存された領域が点在する、相補性決定領域（CDR）と呼ばれる超可変領域にさらに細分することができ、ここで、各可変領域は、3つのCDR及び4つのFRを含む。重鎖及び軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含有する。重鎖定常領域は、γ型、δ型、α型、μ型、又はε型重鎖などの任意の型であり得る。好ましくは、抗体の重鎖は、γ鎖である。さらに、軽鎖定常領域は、κ型又はλ型軽鎖などの任意の肩であり得る。ヒトλ型及びκ型軽鎖の定常ドメインCLのアミノ酸配列を、それぞれ配列番号6及び7に示す。「γ（δ、α、μ又はε）型重鎖」及び「κ（λ）型軽鎖」という用語は、それぞれ抗体重鎖又は抗体軽鎖を指し、これらは、天然に存在する重鎖又は軽鎖定常領域アミノ酸配列、特にヒト重鎖又は軽鎖定常領域アミノ酸配列に由来する、定常領域アミノ酸配列を有する。抗体は、例えば、ヒト化、ヒト又はキメラ抗体であり得る。

10

20

【0025】

本明細書で使用される「抗体」という用語には、前記抗体の断片、誘導体及び移植片も含まれる。特に抗体の「断片又は誘導体」は、前記抗体に由来し、同じ抗原、特に抗体と同じエピトープに結合することができる、タンパク質又は糖タンパク質である。さらなる実施形態では、抗体の「断片又は誘導体」は、特に、抗体の1つ以上のFc領域を含み、抗原結合領域を含んでも含まなくてもよい、ポリペプチド又はタンパク質を指す。したがって、本明細書における抗体の断片又は誘導体は、一般に、抗体の機能が抗原の結合及び／又はFc受容体との相互作用である機能的断片又は誘導体を指す。抗体の「移植片」は、特に、異種ポリペプチドが抗体のCDR配列に導入されるか、又はそれを（部分的に）置換する、前記抗体を指す。例示的な抗体移植片は、米国特許出願公開第2017/0158747A1号明細書に記載されている。

30

【0026】

本明細書で使用される「抗体構築物」という用語は、抗体に由来する少なくとも1つのタンパク質ドメインを含む任意のタンパク質を指す。特に、抗体構築物は、人工タンパク質であり、少なくとも1つの抗体を含む、異なる天然又は遺伝子操作されたタンパク質の一部を含み得る。特に、抗体構築物は、抗体、特にヒトIgG抗体に由来する、少なくとも1つの免疫グロブリンドメインを含む。特定の実施形態では、抗体構築物は、CH2ドメイン又はCH3ドメイン、特に、CH2ドメイン及びCH3ドメインなどの、少なくとも抗体由来の定常免疫グロブリンドメインを含む。

40

【0027】

本明細書で特に言及される細胞は、宿主細胞である。本発明によると、「宿主細胞」という用語は、外因性核酸で形質転換又はトランスフェクトすることができる任意の細胞に関する。特に好ましいのは、ヒト、マウス、ハムスター、ブタ、ヤギ、又は霊長類からの細胞などの哺乳動物細胞である。細胞は、多数の組織型に由来し得、初代細胞及び細胞株を含む。核酸は、単一コピー又は2つ以上のコピーの形態で宿主細胞内に存在することができ、一実施形態では、宿主細胞内で発現される。

【0028】

50

ポリペプチド鎖の「均一な産生」とは、転写後に得られるコードmRNAの均衡なレベルによる、翻訳後に得られる同じオープンリーディングフレーム内にコードされるポリペプチド鎖の均衡なレベルを指す。

【0029】

「医薬組成物」又は「医薬製剤」という用語は特に、ヒト又は動物に投与するのに適した組成物、すなわち、薬学的に許容される成分を含む組成物を指す。好ましくは、医薬組成物は、活性化合物又はその塩若しくはプロドラッグを、担体、希釈剤、又は緩衝剤、保存剤及び等張性調整剤などの医薬賦形剤と一緒に含む。

【0030】

本明細書で与えられる数値は、好ましくは、おおよその数値として理解される。特に、数値は、好ましくは、最大10%高く且つ／又は低くてもよく、特に最大9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%又は1%高く且つ／又は低くてもよい。

【0031】

本明細書に記載される数値範囲には、その範囲を定義する数値が含まれる。本明細書で提供される見出しは、本明細書を全体として参照することによって読み取ることができる、本発明の様々な態様又は実施形態を制限するものではない。一実施形態によると、方法の場合に特定のステップを含むか、又は組成物の場合に特定の成分を含むとして本明細書に記載される対象物は、それぞれのステップ又は成分からなる対象物を指す。本明細書に記載される好ましい態様及び実施形態を選択し、組み合わせることが好ましく、好ましい実施形態のそれぞれの組み合わせから生じる特定の対象物も本開示に属する。

【0032】

発明の詳細な説明

本発明は、抗体構築物のための新しい発現ベクターの開発に基づく。抗体構築物の異なるポリペプチド鎖が、1つのオープンリーディングフレーム内のこれらのベクター上でコードされている。ポリペプチド鎖はそれぞれ、2Aペプチドを含むペプチドリンカーを介してこのオープンリーディングフレーム内で接続されている。2Aペプチドは、「自己切断」ペプチドであり、自動的に、翻訳後に別個のポリペプチド鎖を生じる。異なるポリペプチド鎖をコードするオープンリーディングフレームは、1つのmRNAに転写され、その後翻訳され、自動的に、異なるポリペプチド鎖へと切断される。

【0033】

N末端ポリペプチド鎖のC末端に残る2Aペプチドリンカーのアミノ酸は、任意選択により、N末端ポリペプチド鎖と2Aペプチドの間に特定のプロテアーゼ切断部位を組み込み、それぞれのプロテアーゼ、例えばフューリンを使用することによって、除去することができる。有利には、N末端ポリペプチド鎖は、抗体重鎖である。この場合、リンカーペプチドの残りのC末端アミノ酸は、重鎖の天然のC末端リジン残基が、細胞のカルボキシペプチダーゼによって切断されるときに除去される。

【0034】

C末端ポリペプチド鎖のN末端に残る2Aペプチドの残存アミノ酸を除去するために、前記ポリペプチド鎖は、シグナルペプチドを含めてコードされ得る。シグナルペプチドは、タンパク質成熟の細胞プロセスによって切断され、それにより、2Aペプチドの残留アミノ酸も除去される。

【0035】

上記のアプローチは、抗体構築物、特に、3つ以上の異なるポリペプチド鎖を含む構築物を産生するのに非常に有利である。本発明者らは、それぞれの発現構築物を使用することによって、均衡な発現が大幅に増加することを証明することができた。異なるポリペプチド鎖は同じmRNAから翻訳されるため、一般に等モル量で産生される。これにより、不均衡な発現による一部のポリペプチド鎖のみの望ましくない余剰産生を回避することができる。さらに、2Aペプチド技術を使用していくつかの異なるポリペプチド鎖をコードするmRNAを翻訳すると、これらのポリペプチド鎖は、同じリボソームによって産生されると考えられているため、細胞内で近接して産生される。これにより、正しい鎖の対合

及びタンパク質の組み立てが著しく強化され、正しく形成された抗体構築物の相対量が増加し、間違った又は欠落したポリペプチド鎖との複合体などの望ましくない副産物が減少する。これにより、所望の抗体構築物の精製が容易になり、最終的に、全収率が向上する。

【0036】

1. 抗体構築物をコードする核酸産物

これらの知見を考慮して、本発明は、第1の態様において、少なくとも3つの異なるポリペプチド鎖を含む抗体構築物をコードする1つ以上のベクター核酸からなる核酸産物を提供し、ここで、抗体構築物は、抗体重鎖を含み、抗体構築物の少なくとも2つの異なるポリペプチド鎖は、同じオープンリーディングフレーム内にコードされ、前記オープンリーディングフレーム内にコードされる連続するポリペプチド鎖は、2Aペプチドを含むペプチドリンカーによって接続されている。

10

【0037】

特に、核酸産物は、抗体構築物の各ポリペプチド鎖が別個のオープンリーディングフレーム内にコードされている、核酸産物を使用した抗体構築物のポリペプチド鎖の産生と比較して、抗体構築物のポリペプチド鎖のより均一な細胞産生を提供する。

【0038】

ポリペプチド鎖の細胞産物は、タンパク質レベル又はmRNAレベルで決定できる。ポリペプチド鎖のより均一な細胞産生は、特に、細胞によって産生される各ポリペプチド鎖の量の差がより小さいことを指す。特に、宿主細胞によって産生される抗体構築物のポリペプチド鎖の最大量をポリペプチド鎖の最小量で割った商は、本発明による核酸産物を使用する場合、抗体構築物の各ポリペプチド鎖が別個のオープンリーディングフレーム内にコードされている、核酸産物と比較して、より小さくなる。さらに、ポリペプチド鎖のより均一な細胞産生は、例えば、細胞によって産生される各ポリペプチド鎖をコードするmRNAの量の差がより小さいことを指す。特に、宿主細胞によって産生される抗体構築物のポリペプチド鎖をコードするmRNAの最大量を、ポリペプチド鎖をコードするmRNAの最小量で割った商は、本発明による核酸産物を使用する場合、抗体構築物の各ポリペプチド鎖が別個のオープンリーディングフレーム内にコードされている、核酸産物と比較して、より小さくなる。

20

【0039】

特定の実施形態では、細胞内の前記抗体構築物の異なるポリペプチド鎖の量は、20因子、特に10因子、8因子、又は5因子を超えて異ならない。さらなる実施形態では、細胞内の前記抗体の異なるポリペプチド鎖をコードするmRNAの量は、20因子、特に10因子、8因子、又は5因子を超えて異ならない。

30

【0040】

さらに、核酸産物は、特に、抗体構築物の各ポリペプチド鎖が別個のオープンリーディングフレーム内にコードされている、核酸産物を使用した抗体構築物のポリペプチド鎖の発現後に正しく組み立てられた抗体構築物の相対量と比較してより高い、抗体構築物のポリペプチド鎖の発現後に正しく組み立てられた抗体構築物の相対量を提供する。特定の実施形態では、各ポリペプチド鎖が別個のオープンリーディングフレーム内にコードされている、核酸産物を使用して正しく組み立てられた抗体構築物の相対量よりも、抗体構築物のポリペプチド鎖の発現後に正しく組み立てられた抗体構築物の相対量が、少なくとも5パーセントポイント、特に、少なくとも10パーセントポイント、少なくとも15パーセントポイント、少なくとも20パーセントポイント高い。

40

【0041】

各ポリペプチド鎖が別個のオープンリーディングフレーム内にコードされている核酸産物との比較は、特に、同じ又は非常に類似した条件及び産生手段を用いて、特に同じコード配列、同じプロモーター、同じ宿主細胞株を用いて、及び同じ培養条件で、行われる。

【0042】

1. 1 核酸産物

50

核酸産物は、抗体構築物の全てのポリペプチド鎖を一緒にコードする1つ以上のオープンリーディングフレームを包含する。抗体構築物のポリペプチド鎖が複数のオープンリーディングフレームによってコードされている場合、これらのオープンリーディングフレームは、同じベクター核酸上に存在しても、異なるベクター核酸上に存在してもよい。特定の実施形態では、核酸産物は、抗体構築物をコードする1つのベクター核酸からなる。これらの実施形態では、抗体構築物の全てのポリペプチド鎖をコードする1つ以上のオープンリーディングフレームが、このベクター核酸上に存在する。他の実施形態では、核酸産物は、抗体構築物をコードする2つ以上、特に2つのベクター核酸からなる。これらの実施形態では、抗体構築物のポリペプチド鎖は、一般に、2つ以上のベクター核酸上に存在する2つ以上のオープンリーディングフレームによってコードされる。1つのベクター核酸は、抗体構築物のポリペプチド鎖をコードする1つ以上のオープンリーディングフレームを含み得る。1つのみのベクター核酸の使用が好ましい。

10

【0043】

同じオープンリーディングフレーム内にコードされる抗体構築物の異なるポリペプチド鎖は、2Aペプチドを含むペプチドリinkerによって接続される。抗体構築物の2つを超えるポリペプチド鎖が同じオープンリーディングフレーム内にコードされる実施形態では、2Aペプチドを含むペプチドリinkerが、連続するポリペプチド鎖を接続する。

【0044】

特定の実施形態では、抗体構築物の2つ以上のポリペプチド鎖をコードするオープンリーディングフレームは、オープンリーディングフレームの発現を可能にする発現カセットの一部である。抗体構築物のポリペプチド鎖が複数のオープンリーディングフレームによってコードされている場合、異なるオープンリーディングフレームは、同じ発現カセットの一部であっても、別個の発現カセットの一部であってもよい。2つ以上のオープンリーディングフレームが同じ発現カセットの一部である実施形態では、連続するオープンリーディングフレームは、特に、内部リボソーム進入部位(IRES)によって接続される。

20

【0045】

特に、発現カセットは、オープンリーディングフレームに加えて、オープンリーディングフレームに作動可能に連結されたプロモーターを含む。発現カセットで使用されるプロモーターは、哺乳動物宿主細胞における発現を駆動するのに適した任意のプロモーターであり得る。プロモーターは、例えば、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーター、シミアンウイルス40(SV40)プロモーター、ユビキチンC(UBC)プロモーター、伸長因子1アルファ(EF1A)プロモーター、ホスホグリセリン酸キナーゼ(PGK)プロモーター、ラウス肉腫ウイルス(RSV)プロモーター、BROAD3プロモーター、マウスrosa26プロモーター、pCEFLプロモーター、及びβ-アクチンプロモーターからなる群から選択され得、任意選択により、CMV初期エンハンサー(CAGG)と結合される。プロモーターの具体例には、サイトメガロウイルス前初期プロモーター、シミアンウイルス40初期プロモーター、ヒトユビキチンCプロモーター、ヒト伸長因子1αプロモーター、マウスホスホグリセリン酸キナーゼ1プロモーター、ラウス肉腫ウイルス長末端反復プロモーター、及びCMV初期エンハンサーと結合したニワトリβ-アクチンプロモーターが含まれる。特定の実施形態では、プロモーターは、CMVプロモーターである。

30

40

【0046】

抗体構築物のポリペプチド鎖をコードするオープンリーディングフレームが複数の発現カセットによって発現される実施形態では、発現カセットは、好ましくは、同様の発現調節エレメント、特に、同様の強度を有するプロモーターを含む。異なるプロモーター又は同一のプロモーターを使用することができ、特に、同様の強度を有する異なるプロモーターが使用される。

【0047】

ベクター核酸は、マーカー遺伝子及び起点又は複製などのさらなるエレメントを含んでもよい。いくつかの実施形態では、ベクター核酸は、宿主細胞、特に、齧歯動物又はヒト

50

細胞などの哺乳動物宿主細胞、特にCHO細胞の安定なトランスフェクションに適している。特に、ベクター核酸は、プラスミドである。

【0048】

いくつかの実施形態では、核酸産物の各ベクター核酸は、少なくとも1つの選択マーカー遺伝子を含む。選択マーカー遺伝子は、特に、前記遺伝子を含む哺乳動物宿主細胞、したがってベクター核酸を含む哺乳動物宿主細胞の選択を可能にする、哺乳動物選択マーカー遺伝子である。

【0049】

哺乳動物選択マーカー遺伝子の非限定的な例には、例えば、G418；ハイグロマイシン(hyg又はhph、Life Technologies, Inc. Gaithersboro, Md. から市販)；ネオマイシン(neo、Life Technologies, Inc. Gaithersboro, Md. から市販)；ゼオシン(Sh Ble、Pharmingen, San Diego Calif. から市販)；ピューロマイシン(pac、ピューロマイシン-N-アセチルトランスフェラーゼ、Clontech, Palo Alto Calif. から入手可能)、ウアバイン(oua、Pharmingenから入手可能)及びブラストサイジン(Invitrogenから入手可能)に対する耐性を付与する、抗生物質耐性遺伝子が含まれる。さらに適切な選択マーカー遺伝子には、葉酸受容体アルファ遺伝子などの葉酸受容体遺伝子、又はGFP及びRFPなどの蛍光タンパク質をコードする遺伝子が含まれる。それぞれの哺乳動物選択マーカー遺伝子は周知であり、前記遺伝子を含む哺乳動物細胞、したがってベクターを含む細胞の選択を可能にする。葉酸受容体遺伝子を使用するシステムは、国際公開第2009/080759号パンフレット及び国際公開第2015/015419号パンフレットに記載されている。本明細書で使用される「遺伝子」という用語は、意図される耐性を提供する選択マーカーの機能的バリエーションをコードする天然又は合成のポリヌクレオチドも指す。したがって、野生型遺伝子の切断型若しくは変異型又は合成ポリヌクレオチドも、それらが意図される耐性を提供する限り、包含される。

【0050】

いくつかの実施形態では、哺乳動物選択マーカー遺伝子は、増幅可能であり、ベクター含有哺乳動物宿主細胞の選択及び遺伝子増幅を可能にし得る。増幅可能で選択可能な哺乳動物マーカー遺伝子の非限定的な例は、ジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)遺伝子である。現在使用されている他のシステムには、とりわけ、グルタミンシンセターゼ(gs)システム及びヒスチジノール駆動選択システムがある。これらの増幅可能なマーカーは選択マーカーでもあるため、ベクター核酸を得た細胞を選択するために使用できる。DHFRシステムなどの増幅可能なシステムでは、DHFRシステムの場合は葉酸拮抗剤(例えば、メトトレキサート(MTX))などの遺伝子増幅を促進する特定の薬剤に細胞を曝露することによって、組換えタンパク質の発現を増加させることができる。遺伝子増幅を促進するGSに適した阻害剤は、メチオニンスルホキシミン(MSX)である。MSXへの曝露も遺伝子増幅を生じる。

【0051】

核酸産物が2つ以上のベクター核酸を含む実施形態では、異なるベクター核酸は、特に、異なる選択マーカー遺伝子を含む。

【0052】

ベクター核酸は特に、宿主細胞のゲノムへの組み込みに適している。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、ベクター核酸で安定的にトランスフェクトされる。特定の実施形態では、ベクター核酸は、原核生物の選択マーカー遺伝子をさらに含む。前記原核生物選択マーカーは、例えば、アンピシリン、カナマイシン、テトラサイクリン及び／又はクロラムフェニコールなどの抗生物質に対する耐性を提供し得る。

【0053】

1. 2 抗体構築物

抗体構築物は、3つ以上の異なるポリペプチド鎖を含む任意のタンパク質であってもよ

10

20

30

40

50

く、ここで、これらのポリペプチド鎖の少なくとも1つは、抗体の重鎖である。したがって、抗体構築物の異なるポリペプチド鎖は、以下では第1の重鎖とも呼ばれる、少なくとも1つの抗体重鎖を包含する。

【0054】

特定の実施形態では、抗体重鎖は、同じオープンリーディングフレーム内にコードされる抗体構築物の少なくとも2つの異なるポリペプチド鎖のうちの1つである。特に、抗体重鎖は、核酸産物のオープンリーディングフレーム内にコードされるN末端ポリペプチド鎖である。

【0055】

残りのポリペプチド鎖は、一緒に組み立てて抗体構築物を形成することができる限り、任意のポリペプチド鎖であってよい。特定の実施形態では、さらなるポリペプチド鎖は、少なくとも1つの抗体軽鎖、及び／又は第1の重鎖とは異なる少なくとも1つのさらなる抗体重鎖を含む。特定の実施形態では、抗体構築物のポリペプチド鎖は全て抗体重鎖であり、任意選択により、抗体軽鎖である。抗体構築物の異なるポリペプチド鎖の例示的なセットには、2つの異なる抗体重鎖及び2つの異なる抗体軽鎖、2つの異なる抗体重鎖及び1つの抗体軽鎖、1つの抗体重鎖及び2つの異なる抗体軽鎖、並びに2つの異なる抗体重鎖及び3つの異なる抗体軽鎖が含まれる。

【0056】

特定の実施形態では、抗体構築物は、第1の重鎖に結合する抗体軽鎖を含む。この抗体軽鎖は、以下で第1の軽鎖とも呼ばれる。特定の実施形態では、第1の重鎖及び第1の軽鎖は、同じオープンリーディングフレーム内にコードされる。これらの実施形態では、第1の抗体重鎖は、好ましくは、前記オープンリーディングフレーム内にコードされるN末端ポリペプチド鎖である。特に、第1の軽鎖は、2Aペプチドを含むペプチドリンカーによって第1の重鎖が接続される、前記オープンリーディングフレーム内にコードされる、第2のポリペプチド鎖である。これらの実施形態では、オープンリーディングフレームは、好ましくは、ペプチドリンカーが重鎖のC末端を軽鎖のN末端に接続するように、翻訳方向に、最初に第1の重鎖をコードし、次いでペプチドリンカーをコードし、次いで第1の軽鎖をコードする。

【0057】

特定の実施形態では、第1の重鎖は重鎖可変領域を含み、第1の軽鎖は軽鎖可変領域を含む。これらの実施形態では、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域は、特に、抗原結合領域を形成し得る。抗原結合領域は、特に、抗原に特異的に結合することができる。

【0058】

特定の実施形態では、抗体構築物は、第2の抗体重鎖を含む。特に、第2の重鎖は、第1の重鎖とは異なる。好ましくは、第1の重鎖と第2の重鎖は、抗体構築物中で互いに結合する。特定の実施形態では、第1の重鎖と第2の重鎖は、ノブ・イントゥ・ホール技術を使用して互いに結合する。

【0059】

抗体構築物が第2の重鎖を含む実施形態では、第2の重鎖は、第1の重鎖と同じオープンリーディングフレーム内にコードされ得る。第1の重鎖、リンカーペプチド及び第2の重鎖は、5'から3'に向かってこの順序で連続してコードされ得る。このオープンリーディングフレームが第1の軽鎖などのさらなるポリペプチド鎖をコードする場合、前記さらなるポリペプチド鎖は、例えば、第1の重鎖と第2の重鎖の間、又は第2の重鎖の後にコードされ得る。

【0060】

抗体構築物が第2の重鎖を含む代替の実施形態では、第2の重鎖は、第1の重鎖をコードするオープンリーディングフレームとは異なる第2のオープンリーディングフレーム内にコードされる。これらの実施形態では、抗体構築物の1つ以上のさらなるポリペプチド鎖が、第2のオープンリーディングフレーム内にコードされ得る。この場合、前記第2のオープンリーディングフレーム内にコードされるN末端ポリペプチド鎖は、好ましくは、

2 A ペプチドを含むペプチドリinkerによって前記第 2 のオープンリーディングフレーム内にコードされるさらなるポリペプチド鎖に接続される第 2 の重鎖である。

【0061】

抗体構築物が第 2 の重鎖を含む実施形態では、第 1 の重鎖及び第 2 の重鎖は、特に、ノブ・イントゥ・ホール技術を使用して互いに結合する。

【0062】

特定の実施形態では、抗体構築物は、第 2 の抗体軽鎖を含む。抗体構築物が第 2 の抗体重鎖及び第 2 の抗体軽鎖を含む実施形態では、第 2 の軽鎖は、特に、第 2 の重鎖に結合する。これらの実施形態では、第 2 の重鎖及び第 2 の軽鎖は、好ましくは、これら 2 つのポリペプチド鎖を接続するペプチドリinkerを含む同じオープンリーディングフレーム内にコードされ、ペプチドリinkerは、2 A ペプチドを含む。特に、前記オープンリーディングフレームは、ペプチドリinkerが重鎖の C 末端を軽鎖の N 末端に接続するように、翻訳方向に、最初に第 2 の重鎖をコードし、次いでペプチドリinkerをコードし、次いで第 2 の軽鎖をコードする。

【0063】

特定の実施形態では、第 2 の重鎖は重鎖可変領域を含み、第 2 の軽鎖は軽鎖可変領域を含む。これらの実施形態では、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域は、特に、抗原結合領域を形成し得る。抗原結合領域は、特に、抗原に特異的に結合することができる。

【0064】

第 1 の重鎖及び軽鎖の重鎖及び軽鎖可変領域が第 1 の抗原結合領域を形成し、第 2 の重鎖及び軽鎖の重鎖及び軽鎖可変領域が第 2 の抗原結合領域を形成する実施形態では、第 1 の抗原結合領域は、特に、第 1 の抗原に特異的に結合することができ、第 2 の抗原結合領域は、特に、第 2 の抗原に特異的に結合することができる。

【0065】

1. 3 抗体重鎖

本明細書において「重鎖」又は「抗体重鎖」とも呼ばれる、本発明による抗体の重鎖は、抗体の重鎖定常領域の少なくとも一部、特に、CH1ドメイン、CH2ドメイン及びCH3ドメインなどの重鎖定常領域（重鎖定常ドメイン（CH）とも呼ばれる）の少なくとも 1 つの免疫グロブリンドメインを含む、ポリペプチド鎖である。

【0066】

好ましい実施形態では、抗体重鎖は、CH3ドメインを含む。特定の実施形態では、CH3ドメインは、その C 末端にリジン残基を含む。

【0067】

本明細書で使用される CH3ドメインは、天然ヒト抗体、特に、γ 型重鎖を有する天然ヒト IgG 抗体の CH3ドメインに由来する、抗体重鎖定常ドメインを指す。同様に、本明細書で使用されるさらなる免疫グロブリンドメイン（VH、CH1、CH2、VL、CL）は、天然ヒト抗体、特に γ 型重鎖及び κ 型又は λ 型軽鎖を有する天然ヒト IgG 抗体のそれぞれの免疫グロブリンドメインに由来する抗体重鎖又は軽鎖ドメインを指す。本明細書で使用されるヒンジ領域は、天然ヒト抗体、特に、γ 型重鎖を有する天然ヒト IgG 抗体のヒンジ領域に由来する、抗体重鎖ヒンジ領域を指す。この点において、「由来する」という用語は特に、免疫グロブリンドメインのアミノ酸配列が天然ヒト抗体のそれぞれの免疫グロブリンドメインと少なくとも 90% 同一、特に、少なくとも 95% 同一であることを意味する。VH、CH1、CH2、CH3、VL、CL 及びヒンジ領域などの抗体の免疫グロブリンドメイン及びヒンジ領域は、本明細書では集合的に抗体ドメインと呼ばれる。

【0068】

特定の実施形態では、抗体重鎖は、CH2ドメイン、特に、CH2ドメイン及びCH3ドメインを含む。特定の実施形態では、抗体重鎖は、ヒンジ領域、CH2ドメイン、及びCH3ドメインを含む。特に、抗体重鎖は、別の抗体重鎖に結合することができ、特に、同一の抗体重鎖とホモ二量体、又は別の抗体重鎖とヘテロ二量体を形成することができる

。

【0069】

特定の実施形態では、抗体重鎖は、それをノブ・イントゥ・ホール技術に適したものに
する1つ以上のアミノ酸置換を含む。この周知の技術によると、2つの異なる重鎖が突然
変異して、一方の重鎖に「ノブ」を形成し、もう一方の重鎖に対応する「ホール」を形成
する。これらのノブ及びホールは、抗体の互いに接触する位置に、大きく嵩高いアミノ酸
をノブとして、小さなアミノ酸をホールとして導入することによって形成される。適切な
「ノブ」アミノ酸は、例えば、チロシン及びトリプトファンであり、適切な「ホール」ア
ミノ酸は、例えば、アラニン、セリン、スレオニン及びバリンである。アミノ酸置換は、
一般に、CH3ドメインに存在する。これは、このドメインが抗体の2つの重鎖間の主要
な接触部位を提供するためである。2つ又は3つの「ノブ」及び対応する数の「ホール」
を使用することもでき、ここで、1つの重鎖は、少なくとも1つのノブ及び少なくとも1
つのホールの両方を含み得る。ノブ・イントゥ・ホール技術は周知であり、当技術分野で
確立されている（例えば、Ridgway et al. (1996) Protein
Engineering 9 (7) : 617-621を参照）。適切な変異には、ノブと
してT366W、T366Y及びT394W、ホールとしてT366S、L368A、F
405A、Y407V及びY407Tが含まれ、例示的なノブ／ホール対は、T366Y
／Y407T及びF405A／T394Wである。

10

【0070】

特定の実施形態では、抗体重鎖は、CH1ドメイン及び／又は重鎖可変ドメイン（VH）
を含む。特に、抗体重鎖は、CH2ドメイン、CH3ドメイン、及び任意選択によりヒ
ンジ領域に加えて、CH1ドメイン及び／又はVHドメインを含む。

20

【0071】

特に、重鎖の抗体ドメインは、存在する限りでは、天然抗体に見られるような天然の順
序、すなわち、VHドメイン、CH1ドメイン、ヒンジ領域、CH2ドメイン及びCH3
ドメインのN末端からC末端への順序で配置されている。

【0072】

特定の実施形態では、抗体重鎖は、抗体ドメインに加えて、1つ以上のさらなるポリペ
プチド部分を含む。これらのさらなるポリペプチド部分は、重鎖の任意の箇所、例えば、
N末端、C末端、又は2つの抗体ドメインの間に位置し得る。具体的には、さらなるポリ
ペプチド部分は、重鎖の別の重鎖又は軽鎖への結合に干渉しないように配置される。

30

【0073】

特定の実施形態では、抗体重鎖は、N末端でシグナルペプチドによってコードされる。
シグナルペプチドは、宿主細胞が産生されたポリペプチド鎖を分泌するためのシグナルで
あり、翻訳後に切断される。特に、抗体重鎖は、それがオープンリーディングフレーム内
にコードされる第1のポリペプチド鎖である場合、シグナルペプチドによってコードされ
る。

【0074】

抗体構築物が少なくとも2つの異なる抗体重鎖を含む実施形態では、これらの重鎖はそ
れぞれ独立して、上記の特徴の1つ以上を有し得る。異なる抗体重鎖は、少なくとも1つ
のアミノ酸が互いに異なっている。

40

【0075】

1.4 抗体軽鎖

本明細書において「軽鎖」又は「抗体軽鎖」とも呼ばれる、本発明による抗体の軽鎖は
、抗体の重鎖定常領域の少なくとも一部、特に、少なくとも軽鎖定常領域（軽鎖定常ドメ
イン（CL）とも呼ばれる）の免疫グロブリンドメインを含む、ポリペプチド鎖である。

【0076】

好ましい実施形態では、抗体軽鎖は、CLドメイン、特に、天然ヒト抗体、特に、κ型
又はλ型軽鎖を有する天然ヒト抗体のCLドメインに由来するCLドメインを含む。

【0077】

50

特定の実施形態では、抗体軽鎖は、軽鎖可変ドメイン（V L）を含む。特に、抗体軽鎖は、C Lドメインに加えてV Lドメインを含む。特に、抗体軽鎖は、抗体重鎖に結合することができ、特に、抗体重鎖とヘテロ二量体を形成することができる。

【0078】

特に、軽鎖の抗体ドメインは、存在する限りでは、天然抗体に見られるような天然の順序、すなわち、V Lドメイン及びC LドメインのN末端からC末端への順序で配置されている。

【0079】

抗体構築物が少なくとも2つの異なる抗体軽鎖及び少なくとも2つの異なる抗体重鎖を含む実施形態では、重鎖と軽鎖の正しい対合を増やすために、重鎖と軽鎖の間の界面にある1つ以上のアミノ酸残基が抗体重鎖及び／又は軽鎖において変異していてもよい。特に、軽鎖の一方若しくは両方、及び／又は重鎖の一方若しくは両方は、各軽鎖がその同族重鎖を強く選好するように操作される。それぞれの技術は、当技術分野で公知である。例えば、2つの重鎖の対合について本明細書に記載されるノブ・イントゥ・ホール技術を利用することができる。代替的又は追加的に、静電気ステアリング機構を使用することができ、ここで、軽鎖と重鎖の間の相互作用表面上の電荷分布は、静電気力の反発が軽鎖の間違った重鎖への結合を減少又は防止するように、アミノ酸置換によって操作される。特定の実施形態では、重鎖のV H及びC H 1ドメイン、並びに軽鎖のV L及びC Lドメインは、正しい鎖の対合が改善されるように操作される。別の実施形態では、重鎖のV H及びC H 1ドメイン、並びに軽鎖のV L及びC Lドメインは、正しい鎖の対合を改善するために操作されない。

【0080】

特定の実施形態では、抗体軽鎖は、抗体ドメインに加えて、1つ以上のさらなるポリペプチド部分を含む。これらのさらなるポリペプチド部分は、軽鎖の任意の箇所、例えば、N末端、C末端、又は2つの抗体ドメインの間に位置し得る。具体的には、さらなるポリペプチド部分は、軽鎖の重鎖への結合に干渉しないように配置される。

【0081】

特定の実施形態では、抗体軽鎖は、N末端でシグナルペプチドによってコードされる。

【0082】

抗体構築物が少なくとも2つの異なる抗体軽鎖を含む実施形態では、これらの軽鎖はそれぞれ独立して、上記の特徴の1つ以上を有し得る。異なる抗体軽鎖は、少なくとも1つのアミノ酸が互いに異なっている。

【0083】

1. 5 さらなるポリペプチド部分

抗体構築物の抗体重鎖及び抗体軽鎖は、任意の抗体ドメインに加えてさらなるポリペプチド部分を含み得る。これらのさらなるポリペプチド部分は、抗体ドメインに融合された任意のポリペプチドであってもよい。

【0084】

さらなるポリペプチド部分は、特に、標的分子への結合などの特定の機能を有する。さらなるポリペプチド部分の例には、ペプチドリンカーによって一緒に連結されて抗原結合部位を形成する重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインからなる単鎖F v断片（s c F v）などの単鎖抗体断片、並びに特にラクダ科動物に見られる重鎖抗体に由来する重鎖可変ドメインからなる単ドメイン抗体断片（s d A b）が含まれる。特に、さらなるポリペプチド部分は、抗原結合領域を提供し得る。ポリペプチド部分のさらなる例には、リガンド、インターロイキンなどのサイトカイン、細胞接着分子、成長因子、及びこれらの部分の機能的断片及び構成的活性変異体又はドミナントネガティブ変異体が含まれる。特定の実施形態では、さらなるポリペプチド部分は、T細胞などの免疫細胞に結合し、及び／又はそれを活性化若しくは阻害することができる。ポリペプチド部分はまた、小ペプチド、例えば、ペプチド毒素であってもよい。

【0085】

1. 6 ペプチドリンカー

同じオープンリーディングフレーム内にコードされるポリペプチド鎖は、2 A ペプチドを含むペプチドリンカーによって接続されている。ペプチドリンカーは、前のポリペプチド鎖の C 末端を次のポリペプチド鎖の N 末端に接続する。

【0086】

ペプチドリンカー中の 2 A ペプチドは、「自己切断」ペプチドである。「自己切断」は、翻訳と同時に発生し、翻訳後に N 末端ポリペプチド鎖及び C 末端ポリペプチド鎖が得られる。根底にある自己切断機構はまだ十分に理解されておらず、例えば、最初からペプチド結合が形成されないように、リボソームの翻訳又はスキッピング直後のペプチド結合の切断に基づいている可能性がある。特定の実施形態では、2 A ペプチドは、口蹄疫ウイルス、ウマ鼻炎 A ウイルス、ブタテシオウイルス-1、及びトセア・アシグナ (*Thosea asigna*) ウイルスからなる群から選択されるウイルスに由来する。さらなる実施形態では、2 A ペプチドは、ウニ (例えば、アメリカムラサキウニ (*Strongylocentrotus purpuratus*))、カイメン (例えば、アンフィメドンクイーンズランドイカ (*Amphimedon queenslandica*))、キボシムシ (例えば、クビナガギボシムシ (*Saccoglossus kowalevskii*)) 及びナメクジウオ (例えば、フロリダナメクジウオ (*Branchiostoma floridae*)) などの非ウイルス生物に由来する。特に、2 A ペプチドは、口蹄疫ウイルスに由来する。

10

20

【0087】

特定の実施形態では、2 A ペプチドは、コンセンサス配列 D X E X N P G P (配列番号 8)、特に、L X X X G D V E X N P G P (配列番号 9) を含む、アミノ酸配列を有する。2 A 切断部位は、C 末端のグリシン残基とプロリン残基の間に位置する。2 A ペプチドは特に、配列番号 10~21 によるアミノ酸配列の 1 つとその全長にわたって少なくとも 80% 同一であるアミノ酸配列を含み、ここで、特に、配列番号 8 のコンセンサス配列、特に、配列番号 9 のコンセンサス配列は、保存される。特定の実施形態では、2 A ペプチドは、配列番号 10~21 から選択されるアミノ酸配列、特に、配列番号 10 のアミノ酸配列、特に、配列番号 11 のアミノ酸配列を含むか、又はそれからなる。

【0088】

好ましい実施形態では、2 A ペプチドは、リンカーペプチドの C 末端に位置する。特に、C 末端ポリペプチド鎖は、2 A ペプチドの切断部位の C 末端プロリン残基に直接融合される。これにより、2 A ペプチドの自己切断後に、N 末端にプロリン残基のみが追加された C 末端ポリペプチド鎖が形成される。

30

【0089】

特定の実施形態では、ペプチドリンカーは、2 A ペプチドの N 末端にプロテアーゼ認識部位をさらに含む。特に、プロテアーゼ認識部位は、フューリン認識部位である。フューリン認識部位は、特に、R X (R/K) R (配列番号 22)、特に、R K R R 又は R R K R (配列番号 23 及び 24) のアミノ酸配列を有する。特定の実施形態では、プロテアーゼ認識部位は、リンカーペプチドの N 末端に位置する。

【0090】

プロテアーゼ認識部位は、2 A ペプチドに直接融合されていてもよく、又はさらなるリンカー配列がプロテアーゼ認識部位と 2 A ペプチドの間に存在してもよい。さらなるリンカー配列は、G S リンカー、例えば、アミノ酸配列 G S G などの共通リンカー配列と、2 A ペプチドの供給源に由来する配列とを含む、任意の配列であってよい。特定の実施形態では、プロテアーゼ認識部位は、2 A ペプチドに直接融合され、ペプチドリンカーは、プロテアーゼ認識部位及び 2 A ペプチドからなる。

40

【0091】

特に、プロテアーゼ認識部位は、抗体構築物の産生に使用される宿主細胞において本質的に発現されるプロテアーゼの認識部位である。特に、プロテアーゼは、哺乳動物細胞又は真核細胞にさえ普遍的に発現している。好ましくは、プロテアーゼは、ほぼ全ての真核

50

細胞、特に、タンパク質産生において宿主細胞として使用される任意の哺乳動物細胞で発現される、フューリンである。他の実施形態では、特定のプロテアーゼ認識部位が使用され、宿主細胞は、前記プロテアーゼ認識部位を認識するプロテアーゼを発現するように操作されるか、又は前記プロテアーゼ認識部位を認識するプロテアーゼが、その産生中又は産生後に抗体構築物に付加される。

【0092】

例えば、ペプチドリinkerは、配列番号25によるアミノ酸配列を含むか、又はそれからなり得る。

【0093】

ペプチドリinkerは、抗体構築物の異なるポリペプチド鎖を連結し、自己切断性2Aペプチド及び任意選択によりプロテアーゼ認識部位を含むのに適した、任意の長さを有し得る。特定の実施形態では、ペプチドリinkerは、60アミノ酸以下、特に、50アミノ酸以下、特に、40アミノ酸以下の長さを有する。

【0094】

核酸産物のオープンリーディングフレームが複数のペプチドリinkerをコードする実施形態では、これらのペプチドリinkerはそれぞれ独立して、上記の特徴の1つ以上を有し得、互いに異なっているとしてもよく、又は同一であってもよい。

【0095】

1.7 例示的な核酸産物

一実施形態では、核酸産物は、N末端からC末端の方向に、第1のオープンリーディングフレーム内に

(i) シグナルペプチド；

(ii) 第1の重鎖可変領域を含む第1の重鎖；

(iii) 2Aペプチドを含むリンカーペプチド；

(iv) 任意選択により、シグナルペプチド；及び

(v) 第1の軽鎖可変領域を含む第1の軽鎖；

をコードし、N末端からC末端の方向に、第2のオープンリーディングフレーム内に

(i) シグナルペプチド；

(ii) 第2の重鎖可変領域を含む第2の重鎖；

(iii) 2Aペプチドを含むリンカーペプチド；

(iv) 任意選択により、シグナルペプチド；及び

(v) 第2の軽鎖可変領域を含む第2の軽鎖；

をコードする、1つ以上のベクター核酸を含み、

ここで、第1の重鎖可変領域及び第1の軽鎖可変領域は、第1の抗原に結合することができる抗原結合領域を形成し；第2の重鎖可変領域及び第2の軽鎖可変領域は、第2の抗原に結合することができる抗原結合領域を形成し；第1の重鎖と第2の重鎖は、ノブ・イントゥ・ホール技術を使用して互いに結合する。

【0096】

一実施形態では、核酸産物は、N末端からC末端の方向に、同じオープンリーディングフレーム内に

(i) シグナルペプチド；

(ii) 第1の重鎖可変領域を含む第1の重鎖；

(iii) 2Aペプチドを含むリンカーペプチド；

(iv) 任意選択により、シグナルペプチド；

(v) 第1の軽鎖可変領域を含む第1の軽鎖；

(vi) 2Aペプチドを含むリンカーペプチド；

(vii) 任意選択により、シグナルペプチド；

(viii) 第2の重鎖可変領域を含む第2の重鎖；

(ix) 2Aペプチドを含むリンカーペプチド；

(x) 任意選択により、シグナルペプチド；及び

10

20

30

40

50

(x i) 第 2 の軽鎖可変領域を含む第 2 の軽鎖；

をコードする 1 つのベクター核酸を含み、

ここで、第 1 の重鎖可変領域及び第 1 の軽鎖可変領域は、第 1 の抗原に結合することができる抗原結合領域を形成し；第 2 の重鎖可変領域及び第 2 の軽鎖可変領域は、第 2 の抗原に結合することができる抗原結合領域を形成し；第 1 の重鎖と第 2 の重鎖は、ノブ・イントゥ・ホール技術を使用して互いに結合する。

【0097】

一実施形態では、核酸産物は、N 末端から C 末端の方向に、第 1 のオープンリーディングフレーム内に

(i) シグナルペプチド；

(i i) 重鎖可変領域を含む第 1 の重鎖；

(i i i) 2 A ペプチドを含むリンカーペプチド；

(i v) 任意選択により、シグナルペプチド；及び

(v) 軽鎖可変領域を含む軽鎖；

をコードし、N 末端から C 末端の方向に、第 2 のオープンリーディングフレーム内に

(i) シグナルペプチド；及び

(i i) 第 2 の重鎖；

をコードする、1 つ以上のベクター核酸を含み、

ここで、第 1 の重鎖の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域は、第 1 の抗原に結合することができる抗原結合領域を形成し；第 2 の重鎖は、第 2 の抗原に結合することができる抗原結合領域を含み；第 1 の重鎖と第 2 の重鎖は、ノブ・イントゥ・ホール技術を使用して互いに結合する。

【0098】

一実施形態では、核酸産物は、N 末端から C 末端の方向に、第 1 のオープンリーディングフレーム内に

(i) シグナルペプチド；

(i i) 第 1 の重鎖；

(i i i) 2 A ペプチドを含むリンカーペプチド；

(i v) 任意選択により、シグナルペプチド；及び

(v) 第 2 の重鎖；

をコードし、N 末端から C 末端の方向に、第 2 のオープンリーディングフレーム内に

(i) シグナルペプチド；及び

(v) 軽鎖可変領域を含む軽鎖；

をコードする、1 つ以上のベクター核酸を含み、ここで、

(a) 第 1 の重鎖は、第 1 の抗原に結合することができる、軽鎖可変領域とともに抗原結合領域を形成する重鎖可変領域を含み；第 2 の重鎖は、第 2 の抗原に結合することができる抗原結合領域を含むか；又は

(b) 第 1 の重鎖は、第 1 の抗原に結合することができる抗原結合領域を含み；第 2 の重鎖は、第 2 の抗原に結合することができる、軽鎖可変領域とともに抗原結合領域を形成する重鎖可変領域を含み；

第 1 の重鎖と第 2 の重鎖が、ノブ・イントゥ・ホール技術を使用して互いに結合する。

【0099】

一実施形態では、核酸産物は、N 末端から C 末端の方向に、オープンリーディングフレーム内に

(i) シグナルペプチド；

(i i) 第 1 の重鎖；

(i i i) 2 A ペプチドを含むリンカーペプチド；

(i v) 任意選択により、シグナルペプチド；

(v) 重鎖可変領域を含む第 2 の重鎖；

(v i) 2 A ペプチドを含むリンカーペプチド；

10

20

30

40

50

(v i i) 任意選択により、シグナルペプチド；及び
(v i i i) 軽鎖可変領域を含む軽鎖；

をコードする1つのベクター核酸を含み、

ここで、第1の重鎖は、第1の抗原に結合することができる抗原結合領域を含み；第2の重鎖の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域は、第2の抗原に結合することができる抗原結合領域を形成し；第1の重鎖と第2の重鎖は、ノブ・イントゥ・ホール技術を使用して互いに結合する。

【0100】

1. 8 さらなる核酸産物

さらなる態様において、本発明は、第1の抗体重鎖と、第1の抗体重鎖とは異なる第2の抗体重鎖とを含む抗体構築物をコードする1つ以上のベクター核酸からなる核酸産物を提供し、ここで、抗体構築物の少なくとも2つのポリペプチド鎖は、同じオープンリーディングフレーム内にコードされ、前記オープンリーディングフレーム内の連続するポリペプチド鎖は、2Aペプチドを含むペプチドリinkerで接続されている。

【0101】

第1の態様による核酸産物について上記で開示した特徴及び実施形態は、この核酸産物にも同様に適用される。特定の実施形態では、この態様の核酸産物は、2Aペプチドを含むペプチドリinkerで互いに接続された同じオープンリーディングフレーム内にコードされる第1及び第2の抗体重鎖からなる抗体構築物をコードする1つのベクター核酸からなる。

【0102】

2. 宿主細胞

第2の態様では、本発明は、本明細書に記載の核酸産物を含む宿主細胞を提供する。

【0103】

宿主細胞は、任意の細胞型であってもよく、特に、タンパク質を組換え産生するのに有用な細胞である。宿主細胞は、特に、抗体構築物を産生できる細胞である。特定の実施形態では、宿主細胞は、特に、哺乳動物細胞である。宿主細胞は、特に、齧歯動物細胞又はヒト細胞であり得る。特定の実施形態では、哺乳動物細胞は、限定されないが、COP、L、C127、Sp2/0、NS0、NS1、At20及びNIH3T3などのマウス；PC12、PC12h、GH3、MtT、YB2/0及びY0などのラット；BHK、CHO及びDHFR遺伝子欠損CHOなどのハムスター；COS1、COS3、COS7、CV1及びVeroなどのサル；及びHeLa、HEK293、CAP、網膜由来PERC6、二倍体線維芽細胞由来の細胞、骨髓腫細胞及びHepG2などのヒトに由来する細胞からなる群から選択される。特定の実施形態において、宿主細胞はチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞である。宿主細胞は、浮遊培養及び／又は付着培養に適しているともよく、特に、浮遊培養で使用するすることができる。

【0104】

ペプチドリinkerがプロテアーゼ認識部位を含む実施形態では、宿主細胞は、特に、前記プロテアーゼ認識部位を特異的に認識及び切断するプロテアーゼを発現する。特に、ペプチドリinkerは、フューリン認識部位を含み、宿主細胞は、フューリンを発現する。プロテアーゼは、宿主細胞によって本質的に発現され得るか、又はプロテアーゼを発現するように宿主細胞が操作され得る。好ましくは、プロテアーゼは、宿主細胞によって本質的に発現される。

【0105】

第5の態様では、本発明は、本明細書に記載の核酸産物を宿主細胞に導入することを含む、本発明による宿主細胞を産生する方法を提供する。核酸産物は、人工的に宿主細胞に導入される。特に、核酸産物は、トランスフェクションによって導入される。この点において、トランスフェクションは、一過性であっても安定的であってもよく、特に、安定的なトランスフェクションが使用される。したがって、特定の実施形態では、宿主細胞は、そのゲノムに安定的に組み込まれた核酸産物を含む。

【0106】

本発明はさらに、宿主細胞のトランスフェクションのための核酸産物の使用を提供する。特に、宿主細胞は、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞などの哺乳動物細胞である。

【0107】

3. 産生方法

第3の態様では、本発明は、

- (a) 本発明の第2の態様による宿主細胞を提供するステップ、
 - (b) 抗体構築物の産生を可能にする条件下で、細胞培養物中で宿主細胞を培養するステップ、
 - (c) 細胞培養物から抗体構築物を取得するステップ、及び
 - (d) 任意選択により、抗体構築物を処理するステップ
- を含む、抗体構築物を産生する方法を提供する。

【0108】

特定の実施形態では、方法は、ステップ（a）と（b）の間に、

- (a1) 細胞培養培地に宿主細胞を接種して、細胞培養物を提供するステップ、及び
 - (a2) 細胞培養物中の細胞数の増加を可能にする条件下で、細胞培養物中で宿主細胞を培養するステップ
- をさらに含む。

【0109】

宿主細胞を培養し、その細胞数を増加させ、抗体構築物を発現するための適切な条件は、本方法で使用される特定の宿主細胞、ベクター及び発現カセットに依存する。当業者は、適切な条件を容易に決定することができ、それらは複数の宿主細胞について当技術分野において既に公知である。特定の実施形態では、宿主細胞内の核酸産物は、1つ以上の選択マーカー遺伝子を含む。これらの実施形態では、ステップ（a2）及び／又は（b）の培養条件は、細胞培養培地中の対応する選択剤の存在を含んでもよい。

【0110】

ステップ（c）において細胞培養物から抗体構築物を得ることは、特に、細胞培養物から抗体構築物を単離することを含む。抗体構築物の単離は、特に、細胞培養物の残りの成分からの抗体構築物の分離を指す。本明細書で使用される「細胞培養」という用語には、特に、細胞培養培地及び細胞が含まれる。特定の実施形態では、抗体構築物は、宿主細胞によって分泌される。これらの実施形態では、抗体構築物は、細胞培養培地から単離される。細胞培養培地からの抗体構築物の分離は、例えば、クロマトグラフィー法によって実施され得る。抗体構築物を単離するための適切な方法及び手段は、当技術分野で公知であり、当業者であれば容易に適用することができる。

【0111】

得られた抗体構築物は、任意選択により、例えば、所望の品質及び組成で抗体構築物を産生するためのさらなる精製、修飾及び／又は製剤化ステップなどの、さらなる処理ステップに供されてもよい。このようなさらなる処理ステップ及び方法は、当技術分野において一般に公知である。適切な精製ステップには、例えば、アフィニティークロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、アニオン及び／又はカチオン交換クロマトグラフィー、親水性相互作用クロマトグラフィー及び逆相クロマトグラフィーが含まれる。さらなるステップは、ウイルスの不活化、限外濾過（ultrafiltration）及び透析濾過を含んでもよい。製剤化ステップは、緩衝液交換、製剤成分の添加、pH調整、及び濃度調整を含み得る。これらのステップ及びさらなるステップの任意の組み合わせを使用してもよい。

【0112】

特定の実施形態では、抗体構築物を生成する方法は、ステップ（d）又はステップ（d）の一部として、抗体構築物を含む医薬製剤を提供するステップをさらに含む。抗体構築物を含む医薬製剤を提供すること、又は抗体構築物を医薬組成物として製剤化することは

、特に、抗体構築物を含む組成物の緩衝液又は緩衝液成分を交換することを含む。さらに、このステップは、抗体構築物の凍結乾燥を含んでもよい。特に、抗体構築物は、薬学的に許容される成分のみを含む組成物中に移される。

【0113】

特定の実施形態では、抗体構築物の各ポリペプチド鎖が別個のオープンリーディングフレーム内にコードされている、核酸産物を使用した抗体構築物のポリペプチド鎖の産生と比較して、抗体産物のポリペプチド鎖が、より均一に産生される。特定の実施形態では、抗体構築物の各ポリペプチド鎖が別個のオープンリーディングフレーム内にコードされている、核酸産物を使用した抗体構築物の産生と比較して、正しく組み立てられた抗体構築物の相対量がより高い。

10

【0114】

第4の態様では、本発明はさらに、抗体構築物の産生のための、本明細書に記載の核酸産物又は本明細書に記載の宿主細胞の使用を提供する。本明細書に記載される抗体構築物を産生する方法の特徴及び実施形態は、同様にこの使用に適用される。

【0115】

4. 特定の実施形態

以下に、本発明の特定の実施形態を説明する。これらの実施形態は、本明細書に記載されるさらなる実施形態、特徴、及び例と組み合わせることができる。

【0116】

実施形態1. 少なくとも3つの異なるポリペプチド鎖を含む抗体構築物をコードする1つ以上のベクター核酸からなる核酸産物であって、抗体構築物が、抗体重鎖を含み；抗体構築物の少なくとも2つの異なるポリペプチド鎖が、同じオープンリーディングフレーム内にコードされ、前記オープンリーディングフレーム内にコードされる連続するポリペプチド鎖が、2Aペプチドを含むペプチドリンカーによって接続されている、核酸産物。

20

【0117】

実施形態2. 第1の抗体重鎖と、第1の抗体重鎖とは異なる第2の抗体重鎖とを含む抗体構築物をコードする1つ以上のベクター核酸からなる核酸産物であって、抗体構築物の少なくとも2つのポリペプチド鎖が、同じオープンリーディングフレーム内にコードされ、前記オープンリーディングフレーム内の連続するポリペプチド鎖が、2Aペプチドを含むペプチドリンカーによって接続されている、核酸産物。

30

【0118】

実施形態3. (第1の) 抗体重鎖が、同じオープンリーディングフレーム内にコードされる抗体構築物の少なくとも2つの異なるポリペプチド鎖のうちの1つである、実施形態1又は2に記載の核酸産物。

【0119】

実施形態4. 前記オープンリーディングフレーム内にコードされるN末端ポリペプチド鎖が、(第1の) 抗体重鎖である、実施形態3に記載の核酸産物。

【0120】

実施形態5. 抗体構築物をコードする1つのベクター核酸からなる、実施形態1～4のいずれか1つに記載の核酸産物。

40

【0121】

実施形態6. 抗体構築物が、重鎖に結合する抗体軽鎖を含む、実施形態1～5のいずれか1つに記載の核酸産物。

【0122】

実施形態7. 同じオープンリーディングフレーム内にコードされる少なくとも2つのポリペプチド鎖が、重鎖及び軽鎖を含む、実施形態6に記載の核酸産物。

【0123】

実施形態8. 軽鎖が、オープンリーディングフレーム内にコードされる第2のポリペ

50

チド鎖である、実施形態 7 に記載の核酸産物。

【0124】

実施形態 9 . ペプチドリinker が、重鎖の C 末端を軽鎖の N 末端に接続する、実施形態 8 に記載の核酸産物。

【0125】

実施形態 10 . 重鎖が、重鎖可変領域を含み、軽鎖が、軽鎖可変領域を含み、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域が抗原結合領域を形成する、実施形態 6 ~ 9 のいずれか 1 つに記載の核酸産物。

【0126】

実施形態 11 . 抗体構築物が、第 2 の抗体重鎖を含む、実施形態 1 ~ 10 のいずれか 1 つに記載の核酸産物。

10

【0127】

実施形態 12 . 第 1 の重鎖と第 2 の重鎖が、ノブ・イントゥ・ホール技術を使用して互いに結合する、実施形態 11 に記載の核酸産物。

【0128】

実施形態 13 . 同じオープンリーディングフレーム内にコードされる少なくとも 2 つのポリペプチド鎖が、第 1 の重鎖及び第 2 の重鎖を含む、実施形態 11 又は 12 に記載の核酸産物。

【0129】

実施形態 14 . 第 2 の重鎖が、第 1 の重鎖をコードする第 1 のオープンリーディングフレームとは異なる第 2 のオープンリーディングフレーム内にコードされる、実施形態 11 又は 12 に記載の核酸産物。

20

【0130】

実施形態 15 . 抗体構築物の少なくとも 2 つの異なるポリペプチド鎖が、第 2 のオープンリーディングフレーム内にコードされ、前記第 2 のオープンリーディングフレーム内にコードされる N 末端ポリペプチド鎖が、2 A ペプチドを含むペプチドリinker によって前記第 2 のオープンリーディングフレーム内にコードされるさらなるポリペプチド鎖に接続される第 2 の重鎖である、実施形態 14 に記載の核酸産物。

【0131】

実施形態 16 . 抗体構築物が、第 2 の重鎖に結合する第 2 の軽鎖を含む、実施形態 11 ~ 15 のいずれか 1 つに記載の核酸産物。

30

【0132】

実施形態 17 . 第 2 の重鎖及び第 2 の軽鎖が、これら 2 つのポリペプチド鎖を接続するペプチドリinker を含む同じオープンリーディングフレーム内にコードされ、ペプチドリinker が、2 A ペプチドを含む、実施形態 16 に記載の核酸産物。

【0133】

実施形態 18 . ペプチドリinker が、第 2 の重鎖の C 末端を第 2 の軽鎖の N 末端に接続する、実施形態 17 に記載の核酸産物。

【0134】

実施形態 19 . 第 2 の重鎖が、重鎖可変領域を含み、第 2 の軽鎖が、軽鎖可変領域を含み、第 2 の重鎖及び第 2 の軽鎖の鎖可変領域が、抗原結合領域を形成する、実施形態 16 ~ 18 のいずれか 1 つに記載の核酸産物。

40

【0135】

実施形態 20 . 抗体構築物の少なくとも 1 つの重鎖、特に、各重鎖が、少なくとも 1 つの重鎖定常ドメイン (CH)、特に、少なくとも CH2 又は CH3、特に、CH2 及び CH3 を含む、実施形態 1 ~ 19 のいずれか 1 つに記載の核酸産物。

【0136】

実施形態 21 . 抗体構築物の少なくとも 1 つの重鎖、特に、各重鎖が、別の抗体重鎖とホモ二量体及び／又はヘテロ二量体を形成することができる、実施形態 1 ~ 20 のいずれ

50

か 1 つに記載の核酸産物。

【0137】

実施形態 22. 抗体構築物の少なくとも 1 つの重鎖、特に、各重鎖が、ヒンジ領域を含む、実施形態 1～21 のいずれか 1 つに記載の核酸産物。

【0138】

実施形態 23. 抗体構築物の少なくとも 1 つの重鎖、特に、各重鎖が、CH1 ドメインを含む、実施形態 1～22 のいずれか 1 つに記載の核酸産物。

【0139】

実施形態 24. 抗体構築物の少なくとも 1 つの重鎖、特に、各重鎖が、重鎖可変ドメイン (VH) を含む、実施形態 1～23 のいずれか 1 つに記載の核酸産物。

10

【0140】

実施形態 25. 抗体構築物の少なくとも 1 つの重鎖、特に、各重鎖が、1 つ以上のさらなるポリペプチド部分を含む、実施形態 1～24 のいずれか 1 つに記載の核酸産物。

【0141】

実施形態 26. 抗体構築物の少なくとも 1 つの重鎖、特に、各重鎖が、抗原結合領域を含む、実施形態 1～25 のいずれか 1 つに記載の核酸産物。

【0142】

実施形態 27. 抗体構築物の少なくとも 1 つの軽鎖、特に、各軽鎖が、軽鎖定常ドメイン (CL) を含む、実施形態 1～26 のいずれか 1 つに記載の核酸産物。

【0143】

実施形態 28. 抗体構築物の少なくとも 1 つの軽鎖、特に、各軽鎖が、抗体重鎖とヘテロ二量体を形成することができる、実施形態 1～27 のいずれか 1 つに記載の核酸産物。

20

【0144】

実施形態 29. 抗体構築物の少なくとも 1 つの軽鎖、特に、各軽鎖が、軽鎖可変ドメイン (VL) を含む、実施形態 1～28 のいずれか 1 つに記載の核酸産物。

【0145】

実施形態 30. 抗体構築物の少なくとも 1 つの軽鎖、特に、各軽鎖が、1 つ以上のさらなるポリペプチド部分を含む、実施形態 1～29 のいずれか 1 つに記載の核酸産物。

【0146】

実施形態 31. 抗体構築物の少なくとも 1 つの軽鎖、特に、各軽鎖が、抗原結合領域を含む、実施形態 1～30 のいずれか 1 つに記載の核酸産物。

30

【0147】

実施形態 32. 抗体構築物の第 1 の重鎖が、N 末端でシグナルペプチドによってコードされる、実施形態 1～31 のいずれか 1 つに記載の核酸産物。

【0148】

実施形態 33. 抗体構築物の各重鎖が、N 末端でシグナルペプチドによってコードされる、実施形態 32 に記載の核酸産物。

【0149】

実施形態 34. 抗体構築物の第 1 の軽鎖が、N 末端でシグナルペプチドによってコードされる、実施形態 1～33 のいずれか 1 つに記載の核酸産物。

40

【0150】

実施形態 35. 抗体構築物の各軽鎖が、N 末端でシグナルペプチドによってコードされる、実施形態 34 に記載の核酸産物。

【0151】

実施形態 36. 1 つ以上のベクター核酸が、N 末端から C 末端の方向に、第 1 のオープンリーディングフレーム内に

(i) シグナルペプチド；

(ii) 第 1 の重鎖可変領域を含む第 1 の重鎖；

(iii) 2A ペプチドを含むリンカーペプチド；

(iv) 任意選択により、シグナルペプチド；及び

50

(v) 第 1 の軽鎖可変領域を含む第 1 の軽鎖；
をコードし、1 つ以上のベクター核酸が、N 末端から C 末端の方向に、第 2 のオープンリーディングフレーム内に

- (i) シグナルペプチド；
- (i i) 第 2 の重鎖可変領域を含む第 2 の重鎖；
- (i i i) 2 A ペプチドを含むリンカーペプチド；
- (i v) 任意選択により、シグナルペプチド；及び
- (v) 第 2 の軽鎖可変領域を含む第 2 の軽鎖；

をコードし、

第 1 の重鎖可変領域及び第 1 の軽鎖可変領域が、第 1 の抗原に結合することができる抗原結合領域を形成し、

第 2 の重鎖可変領域及び第 2 の軽鎖可変領域が、第 2 の抗原に結合することができる抗原結合領域を形成し、

第 1 の重鎖と第 2 の重鎖が、ノブ・イントゥ・ホール技術を使用して互いに結合する、実施形態 1 ～ 35 のいずれか 1 つに記載の核酸産物。

【0152】

実施形態 37. ベクター核酸が、N 末端から C 末端の方向に、同じオープンリーディングフレーム内に

- (i) シグナルペプチド；
- (i i) 第 1 の重鎖可変領域を含む第 1 の重鎖；
- (i i i) 2 A ペプチドを含むリンカーペプチド；
- (i v) 任意選択により、シグナルペプチド；
- (v) 第 1 の軽鎖可変領域を含む第 1 の軽鎖；
- (v i) 2 A ペプチドを含むリンカーペプチド；
- (v i i) 任意選択により、シグナルペプチド；
- (v i i i) 第 2 の重鎖可変領域を含む第 2 の重鎖；
- (i x) 2 A ペプチドを含むリンカーペプチド；
- (x) 任意選択により、シグナルペプチド；及び
- (x i) 第 2 の軽鎖可変領域を含む第 2 の軽鎖；

をコードし、

第 1 の重鎖可変領域及び第 1 の軽鎖可変領域が、第 1 の抗原に結合することができる抗原結合領域を形成し、

第 2 の重鎖可変領域及び第 2 の軽鎖可変領域が、第 2 の抗原に結合することができる抗原結合領域を形成し、

第 1 の重鎖と第 2 の重鎖が、ノブ・イントゥ・ホール技術を使用して互いに結合する、実施形態 1 ～ 35 のいずれか 1 つに記載の核酸産物。

【0153】

実施形態 38. 1 つ以上のベクター核酸が、N 末端から C 末端の方向に、第 1 のオープンリーディングフレーム内に

- (i) シグナルペプチド；
- (i i) 重鎖可変領域を含む第 1 の重鎖；
- (i i i) 2 A ペプチドを含むリンカーペプチド；
- (i v) 任意選択により、シグナルペプチド；及び
- (v) 軽鎖可変領域を含む軽鎖；

をコードし、1 つ以上のベクター核酸が、N 末端から C 末端の方向に、第 2 のオープンリーディングフレーム内に

- (i) シグナルペプチド；及び
- (i i) 第 2 の重鎖；

をコードし、

第 1 の重鎖の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域が、第 1 の抗原に結合することができる抗原

10

20

30

40

50

結合領域を形成し；

第2の重鎖が、第2の抗原に結合することができる抗原結合領域を含み；

第1の重鎖と第2の重鎖が、ノブ・イントゥ・ホール技術を使用して互いに結合する、実施形態1～35のいずれか1つに記載の核酸産物。

【0154】

実施形態39．1つ以上のベクター核酸が、N末端からC末端の方向に、第1のオープンリーディングフレーム内に

(i) シグナルペプチド；

(ii) 第1の重鎖；

(iii) 2Aペプチドを含むリンカーペプチド；

(iv) 任意選択により、シグナルペプチド；及び

(v) 第2の重鎖；

をコードし、1つ以上のベクター核酸が、N末端からC末端の方向に、第2のオープンリーディングフレーム内に

(i) シグナルペプチド；及び

(v) 軽鎖可変領域を含む軽鎖；

をコードし、

(a) 第1の重鎖は、第1の抗原に結合することができる、軽鎖可変領域とともに抗原結合領域を形成する重鎖可変領域を含み；第2の重鎖は、第2の抗原に結合することができる抗原結合領域を含むか；又は

(b) 第1の重鎖は、第1の抗原に結合することができる抗原結合領域を含み；第2の重鎖は、第2の抗原に結合することができる、軽鎖可変領域とともに抗原結合領域を形成する重鎖可変領域を含み；

第1の重鎖と第2の重鎖が、ノブ・イントゥ・ホール技術を使用して互いに結合する、実施形態1～35のいずれか1つに記載の核酸産物。

【0155】

実施形態40．ベクター核酸が、N末端からC末端の方向に、オープンリーディングフレーム内に

(i) シグナルペプチド；

(ii) 第1の重鎖；

(iii) 2Aペプチドを含むリンカーペプチド；

(iv) 任意選択により、シグナルペプチド；

(v) 重鎖可変領域を含む第2の重鎖；

(vi) 2Aペプチドを含むリンカーペプチド；

(vii) 任意選択により、シグナルペプチド；及び

(viii) 軽鎖可変領域を含む軽鎖；

をコードし、

第1の重鎖が、第1の抗原に結合することができる抗原結合領域を含み；

第2の重鎖の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域が、第2の抗原に結合することができる抗原結合領域を形成し；

第1の重鎖と第2の重鎖が、ノブ・イントゥ・ホール技術を使用して互いに結合する、実施形態1～35のいずれか1つに記載の核酸産物。

【0156】

実施形態41．2Aペプチドが、口蹄疫ウイルス、ウマ鼻炎Aウイルス、ブタテシオウイルス-1、及びトセア・アシグナ(Thosea asigna)ウイルスからなる群から選択されるウイルスに由来する、実施形態1～40のいずれか1つに記載の核酸産物。

【0157】

実施形態42．ペプチドリinkerが、2AペプチドのN末端にプロテアーゼ認識部位をさらに含む、実施形態1～41のいずれか1つに記載の核酸産物。

【0158】

実施形態43．プロテアーゼ認識部位が、フューリン認識部位である、実施形態42に記載の核酸産物。

【0159】

実施形態44．ペプチドリinkerが、配列番号25によるアミノ酸配列を含む、実施形態1～43のいずれか1つに記載の核酸産物。

【0160】

実施形態45．抗体構築物の各ポリペプチド鎖が別個のオープンリーディングフレーム内にコードされている、核酸産物を使用した抗体構築物のポリペプチド鎖の産生と比較して、抗体構築物のポリペプチド鎖のより均一な細胞産生を提供する、実施形態1～44のいずれか1つに記載の核酸産物。

10

【0161】

実施形態46．細胞内の前記抗体構築物の異なるポリペプチド鎖をコードするmRNAの量が、20因子を超えて異なる、実施形態45に記載の核酸産物。

【0162】

実施形態47．細胞内の前記抗体構築物の異なるポリペプチド鎖をコードするmRNAの量が、10因子を超えて異なる、実施形態45に記載の核酸産物。

【0163】

実施形態48．細胞内の前記抗体構築物の異なるポリペプチド鎖をコードするmRNAの量が、8因子を超えて異なる、実施形態45に記載の核酸産物。

20

【0164】

実施形態49．細胞内の前記抗体構築物の異なるポリペプチド鎖をコードするmRNAの量が、5因子を超えて異なる、実施形態45に記載の核酸産物。

【0165】

実施形態50．抗体構築物の各ポリペプチド鎖が別個のオープンリーディングフレーム内にコードされている、核酸産物を使用した抗体構築物のポリペプチド鎖の発現後に正しく組み立てられた抗体構築物の相対量と比較して、抗体構築物のポリペプチド鎖の発現後に正しく組み立てられた抗体構築物のより高い相対量を提供する、実施形態1～49のいずれか1つに記載の核酸産物。

【0166】

実施形態51．各ポリペプチド鎖が別個のオープンリーディングフレーム内にコードされている、核酸産物を使用して正しく組み立てられた抗体構築物の相対量よりも、抗体構築物のポリペプチド鎖の発現後に正しく組み立てられた抗体構築物の相対量が、少なくとも5パーセントポイント高い、実施形態50に記載の核酸産物。

30

【0167】

実施形態52．各ポリペプチド鎖が別個のオープンリーディングフレーム内にコードされている、核酸産物を使用して正しく組み立てられた抗体構築物の相対量よりも、抗体構築物のポリペプチド鎖の発現後に正しく組み立てられた抗体構築物の相対量が、少なくとも10パーセントポイント高い、実施形態50に記載の核酸産物。

【0168】

実施形態53．各ポリペプチド鎖が別個のオープンリーディングフレーム内にコードされている、核酸産物を使用して正しく組み立てられた抗体構築物の相対量よりも、抗体構築物のポリペプチド鎖の発現後に正しく組み立てられた抗体構築物の相対量が、少なくとも15パーセントポイント高い、実施形態50に記載の核酸産物。

40

【0169】

実施形態54．各ポリペプチド鎖が別個のオープンリーディングフレーム内にコードされている、核酸産物を使用して正しく組み立てられた抗体構築物の相対量よりも、抗体構築物のポリペプチド鎖の発現後に正しく組み立てられた抗体構築物の相対量が、少なくとも20パーセントポイント高い、実施形態50に記載の核酸産物。

【0170】

50

実施形態 55. 抗体構築物の 2 つ以上のポリペプチド鎖をコードするオープンリーディングフレームが、オープンリーディングフレームの発現を可能にする発現カセットの一部である、実施形態 1 ～ 54 のいずれか 1 つに記載の核酸産物。

【0171】

実施形態 56. ベクター核酸が、プラスミドである、実施形態 1 ～ 55 のいずれか 1 つに記載の核酸産物。

【0172】

実施形態 57. 実施形態 1 ～ 56 のいずれか 1 つに記載の核酸産物を含む、宿主細胞。

【0173】

実施形態 58. 哺乳動物細胞、特に、ヒト又は齧歯動物細胞、例えば、CHO 細胞である、実施形態 57 に記載の宿主細胞。

10

【0174】

実施形態 59. (a) 実施形態 57 又は 58 による宿主細胞を提供するステップ、
(b) 抗体構築物の産生を可能にする条件下で、細胞培養物中で宿主細胞を培養するステップ、
(c) 細胞培養物から抗体構築物を取得するステップ、及び
(d) 任意選択により、抗体構築物を処理するステップ
を含む、抗体構築物を産生する方法。

【0175】

実施形態 60. ステップ (c) が、抗体構築物を単離すること、及び／又は細胞培養物の残りの成分から抗体構築物を分離することを含む、実施形態 59 に記載の方法。

20

【0176】

実施形態 61. ステップ (d) が、抗体構築物を医薬組成物として製剤化することを含む、実施形態 59 又は 60 に記載の方法。

【0177】

実施形態 62. 抗体構築物の各ポリペプチド鎖が別個のオープンリーディングフレーム内にコードされている、核酸産物を使用した抗体構築物のポリペプチド鎖の産生と比較して、抗体産物のポリペプチド鎖が、より均一に産生される、実施形態 59 ～ 61 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0178】

実施形態 63. 細胞内の前記抗体構築物の異なるポリペプチド鎖をコードする mRNA の量が、20 因子を超えて異ならない、実施形態 62 に記載の方法。

30

【0179】

実施形態 64. 細胞内の前記抗体構築物の異なるポリペプチド鎖をコードする mRNA の量が、10 因子を超えて異ならない、実施形態 62 に記載の方法。

【0180】

実施形態 65. 細胞内の前記抗体構築物の異なるポリペプチド鎖をコードする mRNA の量が、8 因子を超えて異ならない、実施形態 62 に記載の方法。

【0181】

実施形態 66. 細胞内の前記抗体構築物の異なるポリペプチド鎖をコードする mRNA の量が、5 因子を超えて異ならない、実施形態 62 に記載の方法。

40

【0182】

実施形態 67. 抗体構築物の各ポリペプチド鎖が別個のオープンリーディングフレーム内にコードされている、核酸産物を使用した抗体構築物の産生と比較して、正しく組み立てられた抗体構築物の相対量がより高い、実施形態 51 ～ 54 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0183】

実施形態 68. 各ポリペプチド鎖が別個のオープンリーディングフレーム内にコードされている、核酸産物を使用して正しく組み立てられた抗体構築物の相対量よりも、正しく組み立てられた抗体構築物の相対量が、少なくとも 5 パーセントポイント高い、実施形態

50

67に記載の方法。

【0184】

実施形態69．各ポリペプチド鎖が別個のオープンリーディングフレーム内にコードされている、核酸産物を使用して正しく組み立てられた抗体構築物の相対量よりも、正しく組み立てられた抗体構築物の相対量が、少なくとも10パーセントポイント高い、実施形態67に記載の方法。

【0185】

実施形態70．各ポリペプチド鎖が別個のオープンリーディングフレーム内にコードされている、核酸産物を使用して正しく組み立てられた抗体構築物の相対量よりも、正しく組み立てられた抗体構築物の相対量が、少なくとも15パーセントポイント高い、実施形態67に記載の方法。

10

【0186】

実施形態71．各ポリペプチド鎖が別個のオープンリーディングフレーム内にコードされている、核酸産物を使用して正しく組み立てられた抗体構築物の相対量よりも、正しく組み立てられた抗体構築物の相対量が、少なくとも20パーセントポイント高い、実施形態67に記載の方法。

【0187】

実施形態72．抗体構築物の産生のための、実施形態1～56のいずれか1つに記載の核酸産物又は実施形態57若しくは58に記載の宿主細胞の使用。

【0188】

実施形態73．実施形態1～56のいずれか1つに記載の核酸産物を宿主細胞に導入することを含む、実施形態57又は58に記載の宿主細胞を産生する方法。

20

【図面の簡単な説明】

【0189】

【図1】二重特異性抗体構築物（bsAb）の発現のための標準2ベクター設定の原理と、ノブ・イントゥ・ホール（KIH）技術を使用したbsAbの構造を示す。

【図2】1つの発現カセットに2つの鎖を組み合わせた、2つのプラスミド及び2つのmRNAを含むベクター設定で、2A／フューリンリンカーペプチドを使用した場合に起こる、細胞メカニズムの原理を示す。

【図3】分子構造の概要と、二重特異性抗体の発現について試験した標準及び2A／フューリンベクター設定を示す。

30

【図4】図3に示した異なるベクター設定を使用した重鎖及び軽鎖の相対的なmRNAレベルを示す。

【図5】図3に示した異なるベクター設定を使用した二重特異性抗体のプール生産性を示す。

【図6】二重特異性抗体の発現について試験した2A／フューリンベクター設定を示す。

【図7】図6に示した異なるベクター設定を使用した重鎖及び軽鎖の相対的なmRNAレベルを示す。

【図8】図6に示した異なるベクター設定を使用した二重特異性抗体のプール生産性を示す。

40

【図9】三機能性抗体構築物（A）の標準（B）及びフューリン／2A（C）ベクター設定を示す。

【図10】図9に示す標準（A）及びフューリン／2A（B）ベクター設定を使用した、三機能性抗体構築物のSEC及びラボチップ（labchip）によるプール生産性及び品質分析を示す。それぞれSEC及びラボチップ（labchip）分析によって得られた抗体力価及び主要ピークのパーセンテージが示される。

【発明を実施するための形態】

【0190】

実施例

実施例1：標準ベクター設計と本発明によるベクター設計。

50

モノクローナル抗体と比較して、正しく組み立てられた二重特異性抗体構築物（b s A b）を発現する細胞株を開発する複雑さは、4つの鎖を発現する必要があるため、増加する。それぞれが別個の発現カセットで2つの軽鎖（L C）及び重鎖（H C）の1つを発現する2つの別個のプラスミドの同時トランスフェクション及び同時選択により、プラスミドが全く組み込まれていないか、又は1つ若しくは2つのプラスミドが組み込まれているか、又は2つのうち不均等な数のプラスミドが組み込まれている、不均一な細胞のプールが生じ得る。さらに、個々の鎖の転写及び翻訳効率が異なると、個々の鎖のm R N A及びタンパク質レベルの不均衡が生じる可能性がある。タンパク質鎖の不均一な分布は、正しいタンパク質の組み立てを妨げ、個々の鎖の接近により望ましくない種、例えば、誤対合した抗体構築物、半分組み立てられた二重特異性抗体、及びホモ二量体が生じ、精製プロセスが複雑になる。標準ベクター設定及び産生プロセスを図1に示す。

10

【0191】

新たに開発されたベクター設定では、二重特異性抗体の一方のアームの重鎖及び軽鎖が、フューリン認識部位及び2 A ペプチドを含むリンカーペプチドによって分離されて、1つのオープンリーディングフレーム内にコードされている。転写により、1つのプラスミドから鎖1－2 A F－鎖2（H C 1－ノブフューリン／2 A リンカー－L C 1）をコードする1つのm R N Aが生じ、第2のプラスミドから鎖3－2 A F－鎖4（H C 2－ホールフューリン／2 A リンカー－L C 2）をコードする別のm R N Aが生じる（図2を参照）。2 A ペプチドの切断（1）により、2 A ペプチドの翻訳後に2つの別個のタンパク質が得られる。1つのm R N Aから対応する軽鎖及び重鎖を同時翻訳することは、正しい鎖の対合及びタンパク質の組み立てに有利である。フューリン（2）は、ゴルジ体のN末端2 A ペプチドの残りのアミノ酸を切断する。カルボキシペプチダーゼD（3）は、重鎖のC末端リジン及び残りのフューリン切断部位を切断し、シグナルペプチドペプチダーゼ（4）は、軽鎖のシグナルペプチドと一緒に2 A ペプチドの残りのC末端プロリンを切断する。

20

【0192】

以下の例に示されるように、本発明のベクター設計は優れている：

- 1）1つのm R N Aからの個々の鎖の発現を組み合わせることで、均衡なm R N A及びタンパク質レベルがもたらされ、発現の不均衡が克服される。
- 2）プール生産性は同等である。
- 3）L C 1及びH C 1が1つの単一m R N Aにコードされ、L C 2及びH C 2が第2の単一m R N Aにコードされている場合、及び4つの鎖全てが1つの単一m R N Aにコードされている場合、正しい対合二重特異性抗体構築物の割合が増加する。
- 4）2つのタンパク質がH C－フューリン／2 A－L Cの順序で発現される場合、重鎖及び軽鎖のN末端及びC末端は正しく処理される。フューリン／2 A ペプチドが軽鎖のC末端にある場合、フューリン認識部位から残存する異なるアミノ酸伸長が観察された（R、R K、及びR K R）。
- 5）ノブ・イントゥ・ホール技術（K i H）による二重特異性抗体構築物の誤対合した種の割合が減少する。

30

【0193】

実施例2：標準及び異なるフューリン／2 A ベクター設計の比較。

単一のベクターは、いくつかの鎖をコードすることができ、これにより、2つの別個のプラスミドの同時トランスフェクションの代わりに、1つのプラスミドのトランスフェクション及び選択が可能になる。単一のプラスミドのトランスフェクション及び選択により、より均一な、すなわち、細胞にプラスミドが組み込まれているかいないかのいずれかである、プールが得られる可能性が高くなる。同時トランスフェクション及び同時選択により、より不均一な、すなわち、細胞にプラスミドが全く組み込まれていないか、又は1つ若しくは2つのプラスミドが組み込まれているか、又は2つのうち不均等な数のプラスミドが組み込まれている、プールが生じ得る。

40

【0194】

50

4つの異なるフューリン／2Aベクター設計を標準ベクター設計と比較した。標準設計によると、二重特異性抗体構築物の4つの異なるポリペプチド鎖のそれぞれは、別個のオープンリーディングフレームにコードされており、これにより、4つの別個のmRNAが生じる。二重特異性抗体の各アームの重鎖と軽鎖の対の発現カセットは、宿主細胞が2つのプラスミド（「2プラスミド、4mRNA」；図3「STD」を参照）でトランスフェクトされるように、単一のプラスミド上に存在する。

【0195】

4つのフューリン／2Aベクター設計のうちの2つでは、各重鎖と軽鎖の対が1つのオープンリーディングフレーム内にコードされ、最初に重鎖、次いでフューリン／2Aリンカー、その後、軽鎖をコードした。これら2つのオープンリーディングフレームは、別個のプラスミド（「2プラスミド、2mRNA」）又は同じプラスミド（「1プラスミド、2mRNA」）上に存在した。他の2つのフューリン／2Aベクター設計では、二重特異性抗体の全てのポリペプチド鎖は、同じオープンリーディングフレーム内に、HC1-フューリン／2A-LC1-フューリン／2A-HC2-フューリン／2A-LC2の順序でコードされる（「1プラスミド、1mRNA」；図3、「2A／フューリン」を参照）。2つの異なる設定では、二重特異性抗体の2つのアームのコード領域が切り替えられた。

10

【0196】

二重特異性抗体の産生のために、それぞれのプラスミドをCHO細胞に導入した。mRNAの発現、並びに正しく組み立てられた及び誤対合した二重特異性抗体構築物の産生を測定した。

20

【0197】

図4の結果は、標準ベクター設定では、異なるポリペプチド鎖のmRNAレベルが非常に不均衡であることを示す。「2プラスミド、2mRNA設定」では均衡が改善され、1プラスミドのみの設定は、さらに均衡なmRNAレベルを示した。1プラスミド設定では、生産性も著しく向上した（図5を参照）。1プラスミド、1mRNAベクター設計では、二重特異性抗体の異なるアームがオープンリーディングフレーム内にコードされる順序が生産性に影響し得る。

【0198】

二重特異性抗体構築物の正しい組み立て、並びに誤対合構築物、ホモ二量体、及び半抗体の形成を表1にまとめる。

30

【0199】

40

50

【表 1】

表1

			インタクト 配糖リコンビナント MS 分析					
			正しい** 二重特異性 (%)	誤対合 L1H1L1H2 (%)	ホモ二量体 L2H2L2H2 (%)	半mAb L2H2 (%)	他 (%)	LC 伸長
STD	2プラスミド, 4mRNA	pA1	28*	n.d.	58*	8*	6*	n.d.
		pA2						
2AF	2プラスミド, 2mRNA	pA3	44*	n.d.	34*	6*	17*	n.d.
		pA4						
	1プラスミド, 2mRNA	pA5	49*	n.d.	27*	14*	10*	n.d.
	1プラスミド, 1mRNA (Ab1-Ab2)	pA6	100*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	+RKR
	1プラスミド, 1mRNA (Ab2-Ab1)	pA7	77*	7*	n.d.	n.d.	16*	+RK +R

*全ての種の完全な分離(UV)は達成できないため、半定量のみ。

全ての値(%)は、UV領域及びMS強度を組み合わせる計算される。

**インタクトLC-MSによる正しい二重特異性は、完全にLC交換された種も含み得る

10

20

【0200】

表1は、標準ベクター設計(「STD」)及び異なるフューリン/2Aベクター設定(「2AF」)のプロテインA捕捉物質の質量分析データを示す。正しく組み立てられた二重特異性抗体の割合は、標準ベクター設定と比較して、全てのフューリン/2Aベクター設定で増加した。最も高い割合の正しく組み立てられた二重特異性抗体は、1つのmRNA及びベクター上の4つの鎖全てをコードするフューリン/2Aベクター設定で検出された。しかし、C末端にフューリン/2Aペプチドを有する軽鎖の軽鎖伸長が観察された。

【0201】

実施例3：1つのプラスミド上に2つのmRNAを有する様々なフューリン/2Aベクター設定を使用した二重特異性抗体構築物の生産の評価。

30

二重特異性抗体構築物は、標準ベクター設定及び「1プラスミド、2mRNA」フューリン/2Aベクター設定で、異なる設計を使用して生産された。二重特異性抗体の各アームは、N末端に重鎖を有し、その後にフューリン/2Aリンカーペプチド及び軽鎖が続く、1つのオープンリーディングフレームにコードされていた。2つのフューリン/2Aベクター設定を設計し、1つは、第1のアームをコードするオープンリーディングフレームが、第2アームをコードするオープンリーディングフレームの5'に位置し、もう1つは、逆の順序であった。

【0202】

異なるポリペプチド鎖のmRNAレベルは、一部の標準ベクター設定では非常に不均衡であった(図7、「STD 2プラスミド 4mRNA」を参照)。対照的に、フューリン/2Aベクター設定では、mRNAレベルは、良好に均衡であった。全てのベクター設定の生産性は同等であった(図8を参照)。

40

【0203】

二重特異性抗体構築物の正しい組み立て、並びに誤対合構築物、ホモ二量体、及び半抗体の形成を表2にまとめる。

【0204】

50

【表 2】

表2

		インタクト/脱グリコシル化MS分析				
		正しい** 二重特異性(%) 	誤対合 L1H1L1H2(%) 	ホモ二量体 L1H1L1H1(%) 	半mAb (%)	他 (%)
STD 2プラスミド, 4mRNA	AC1	52.4*	31.4*	4.9*	9.7* (L2H1)	1.6*
	AC2	33.2*	33.1*	n.d.	30.9* (L2H1 及びL1H1)	2.8*
2AF 1プラスミド, 2mRNA	AC1	81.4*	7.1*	n.d.	10.1* (L2H1)	1.4*
	AC2	87.1*	9.2*	n.d.	1.1* (L1H1)	2.6*

*全ての種の完全な分離(UV)は達成できないため、半定量のみ。

全ての値(%)は、UV領域及びMS強度を組み合わせで計算される。

**インタクトLC-MSによる正しい二重特異性は、完全にLC交換された種も含み得る

10

20

【0205】

表2は、異なる標準ベクター設定(「STD」)及びフューリン/2Aベクター設定(「2AF」)を比較した、プロテインA捕捉物質の質量分析データを示す。フューリン/2AF「1プラスミド、2mRNA」ベクター設定の発現により、試験した候補について、正しく組み立てられた二重特異性抗体の割合が増加し、誤対合の種の割合が減少した。この結果はまた、標準設定では30%を超える誤対合した軽鎖が産生したのに対し、これらの設定では10%であったため、正しい軽鎖の対合がフューリン/2Aベクター設定で達成されることも示す。この理由は、重鎖-軽鎖対が、同じmRNAによってコードされているため、細胞内で近接して産生されるためと推定される。

【0206】

誤対合の割合が低いと、精製プロセスに必要な労力が減り、精製プロセスでは除去できない完全に交換された軽鎖種の可能性が最小化される。

30

【0207】

実施例4：異なるフューリン/2Aベクター設定を使用した別の抗体構築物の産生の評価。

非標準抗体構築物も、新しいフューリン/2Aベクター設定での発現について試験した。例示的な抗体構築物は、第1の抗原(anti1)に特異的な正常な抗原結合領域を形成する重鎖及び軽鎖を有する1つのアームを含み、ここで、第2の抗原(anti2)に対するscFv断片は、CH1と重鎖のヒンジ領域の間に融合されている。第2のアームは、ヒンジ、CH2及びCH3を含む重鎖定常領域であり、ノブ・イントゥ・ホール技術を使用して第1のアームに結合し、細胞接着分子がヒンジ領域のN末端に融合されている(図9Aを参照)。これらの構築物のうち2つは、CH3ドメインのノブ及びホールの変異が異なるように設計された(抗体構築物AC3：アーム1-ノブ/アーム2-ホール、及び抗体構築物AC4：アーム1-ホール/アーム2-ノブ)。

40

【0208】

標準ベクター設定に従って、第1のアームの軽鎖及び重鎖の発現カセットを含む1つのプラスミドと、第2のアームの発現カセットを含む1つのプラスミドを使用した(図9Bを参照)。フューリン/2Aベクター設定では、1つの発現カセット又は2つの発現カセットを有する1つのプラスミドのみを使用した。オープンリーディングフレームを1つのみ有する設計では、コード領域は、HC2-フューリン/2A-HC1-フューリン/2

50

A-L C 1として5'から3'に順序付けられた。2つのオープンリーディングフレームを有する設計では、フューリン／2Aリンカーは、H C 2とH C 1の間、又はH C 1とL C 1の間のいずれかにあった（図9Cを参照）。

【0209】

異なるCHO細胞株にプラスミドをトランスフェクトし、標準条件下で抗体構築物を産生した。標準ベクター設定では、2つのプラスミドを1：1の比率及び1：2の比率でトランスフェクトした。標準ベクター設定のプール生産性は、トランスフェクション中のプラスミドの使用比率及び使用した宿主細胞株に応じて、両方の候補について0.5～0.75g/Lであった。品質は、SEC及びラボチップ（lab chip）によって分析され、主要ピークのパーセンテージが示される（図10Aを参照）。

10

【0210】

図10Bは、標準アプローチで生成されたプールと比較して、フューリン／2Aベクター設定のプール生産性が増加したことを示す。品質は、SEC及びラボチップ（lab chip）によって分析した。主要ピークの割合は、標準アプローチと比較して、フューリン／2Aベクター設定を使用した、第1のノブ・イントゥ・ホール設計では79%（SEC）及び87%（lab chip）に増加し、第2のノブ・イントゥ・ホール設計では最大79%（SEC）及び89%（lab chip）に増加した。

【0211】

これらのデータは、フューリン／2Aベクター設計を使用して、抗体構築物の生産性及び正しい組み立てが向上したことを示す。

20

【0212】

実施例5：材料及び方法。

実施例1～4において、以下の材料及び方法を使用した。

【0213】

1. 発現ベクター構築

実施例で使用されるベクターは、以下のエレメントからなる：抗体構築物の組み立てに必要な個々の遺伝子の発現を駆動するhCMVプロモーター／エンハンサー、ポリアデニル化シグナル（ポリA）、葉酸受容体及び選択マーカーとしてのDHFR遺伝子、大腸菌（E. coli）起源（CoIE ori）の複製、及び細菌内での増幅を可能にするアンピシリン（amp）耐性のためのベータラクタマーゼ遺伝子。異なるプラスミド設定を評価し、さらなる詳細を図中に提供する。

30

【0214】

2. 細胞株、培養、トランスフェクション、及び選択

2つの異なる親CHO細胞株を、抗体構築物の産生のための宿主細胞株として使用した。宿主細胞株は、CHO-K1細胞株に由来した。CHO株からの単一バイアルを使用して、組換え細胞株を調製した。CHO細胞株は、独自の既知組成培養培地に懸濁し、36.5℃で、150rpm、10%CO₂の非加湿振盪キャビネット内の振盪フラスコ内で培養した。細胞生存率及び増殖速度は、自動システム（VCell, Beckman Coulter）によってモニタリングした。細胞を週に2～3回新鮮培地に継代し、対数増殖期に維持した。

40

【0215】

抗体構築物をコードするSwaI線状化発現プラスミドを、エレクトロポレーションによってトランスフェクトした（Amaxa Nucleofection system, Lonza, Germany）。トランスフェクション反応は、製造業者の指示に従って、既知組成培養培地中で実施した。トランスフェクションに使用した親CHO細胞は、細胞生存率が95%を超える指数増殖期にあった。トランスフェクションは、トランスフェクションあたり5×10⁶個の細胞で実施した。トランスフェクション後直ちに、細胞を、既知組成培養培地を含有する振盪フラスコに移した。選択プロセスを開始する前に、細胞プールを36.5℃、10%CO₂で48時間インキュベートした。

【0216】

50

上述のように、個々の発現ベクターによってコードされる選択マーカーを使用して、選択手順を実行した。両方のタンパク質（F o I R及びD H F R）は同じ分子経路に關与している。F o I Rは葉酸及び葉酸類似体M T Xを細胞内に輸送し、D H F Rは葉酸をプリン及びメチオニン合成のための重要な前駆体に変換する。これらを選択原理として組み合わせると、両方の組換えタンパク質を発現する組換え細胞を濃縮するために、特定の強力な選択法をとることができる。

【0217】

低葉酸条件下でのトランスフェクション及び増殖の48時間後、既知組成培養培地に10 nM M T Xを加えることによって、追加の選択圧を適用した。プール回収後、細胞を培養培地中で凍結し、7.5% D M S Oを補充し、細胞ペレットを調製した。

10

【0218】

3. 定量的リアルタイムPCRによる遺伝子発現解析

R N A抽出は、Q i a g e n R N e a s y M i n i K i tを製造業者の指示に従って使用して実施した。リアルタイムqPCRでは、H i g h C a p a c i t y R N A - t o - c D N A M a s t e r M i x (A p p l i e d B i o s y s t e m s) を使用して200 ng / μ lの希釈R N Aからc D N Aを合成し、Q u a n t i F a s t S Y B R G r e e n P C R K i t (Q i a g e n) を使用して、10×希釈c D N Aを3回分析した。正規化のための内在性コントロールとして、G A P D Hを増幅した。増幅及び分析は、A B I P R I S M (登録商標) 7900HT配列検出システムを使用して実施した。サンプル比較のための遺伝子発現の相対量(RQ)の計算には、比較 $2^{-\Delta \Delta C_t}$ 法を使用し、データを正規化した。

20

【0219】

4. 上流処理

選択に続いて、材料は振盪フラスコ流加培養又はチューブスピンバイオリアクターのいずれかで産生された。流加培養物に細胞を4 E 5 v c / m lの播種密度で接種した(独自の流加溶液の添加を3日目から開始し、5日目に培養温度を33℃に変更した)。培養中、抗体構築物の濃度をモニタリングするために、インプロセス管理を実施した。個々の培養物は、14日間にわたって培養された。培養プロセスの最後に、さらなる下流処理の前に、遠心分離とその後の滅菌濾過によって、細胞を培養上清から分離した。選択したプールの体積生産性を細胞培養上清中のプロテインA H P L Cによって測定して、F c部分を保持する全ての種類の産物及び関連不純物を測定した。

30

【0220】

5. M a b S e l e c t (商標) S u R e (商標)でのアフィニティー液体クロマトグラフィーによる捕捉

F c部分を保持する抗体構築物及び潜在的な抗体構築物バリエーションは、M a b S e l e c t (商標) S u R e (商標)でのアフィニティー液体クロマトグラフィー(A L C)ステップによって、無細胞上清から捕捉された。

【0221】

クロマトグラフィーは、室温で実施した。充填する前に、カラムを20 mM N a₂ H P O₄ / N a H₂ P O₄、p H 7.0で平衡化した。宿主細胞タンパク質(H C P)、培地成分及びD N Aなどの非特異的結合不純物を産物(及び産物バリエーション)から枯渇させるために、クロマトグラフィーカラムを250 mMのアルギニン-H C l、1 MのN a C l、88 mMのN a O H、p H 9.0で洗浄し、続いて無細胞上清をA L Cカラムに充填した後、平衡化緩衝液で洗浄した。抗体構築物及び潜在的な抗体構築物バリエーションを、50 mM酢酸、p H 3.0を使用してクロマトグラフィーカラムから溶離した。A L C溶離液のp Hは、分析評価のためにそれぞれ2~8℃で保存する前に、0.1又は1 MのT r i s又は0.5 MのB i s - T r i sでp H約5.0に調整された。

40

【0222】

6. 分析的特性評価及び純度評価

プールからのプロテインA捕捉物質は、産物の特性及び品質パラメーターを判断するた

50

めに、異なる分析方法によって慎重に評価された。

【0223】

(a) インタクトな抗体構築物及びバリエーションの LC-MS スクリーニング

100 µg のプロテイン A 精製抗体構築物サンプルを 96 ウェルプレート中で凍結乾燥し、100 µl の 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) 緩衝液に溶解した。サンプルを、PNGase F (New England Biolabs) によって 37 °C で 18 時間脱グリコシル化した。サンプルは、Vion Q-TOF 質量分析計 (Waters) に接続された UPLC (Waters) で、MassPREP Micro Desalting カラム 2 1 × 5 mm (Waters) を使用して、80 °C で、LC-ESI-MS によって測定された。直線勾配を 0.3 ml / 分で適用し、移動相 A : 水中 0.1 % FA、移動相 B : アセトニトリル中 0.1 % FA : 0 ~ 2 分 5 % B、2 ~ 12 分 5 ~ 90 % B。MS パラメーター : ESI + 分解能モード、キャピラリー電圧 3 kV、サンプリングコーン 40 V、ソース温度 150 °C、脱溶媒和温度 400 °C。データは、GenData MS リファイナーソフトウェアによる自動 MaxEnt 1 デコンボリューションによって処理された。抗体構築種及び誤対合バリエーションの同定及び相対定量は、理論的質量との一致及びデコンボリューションされた質量スペクトルの対応する相対ピーク強度に基づく。

10

【0224】

(b) Labchip

非還元 Labchip の実行は、製造業者の指示に従って、Caliper Life Sciences の HT Protein Express Reagent Kit 及び HT Protein Express LabChip を使用して行われた。プロテイン A 精製サンプルは、35 µL の IAM 緩衝液 (3 mL の Protein Express サンプル緩衝液中 250 mM の IAM の 300 µL) を 5 µL のサンプル (1 mg / ml) に加えることによって調製した。サンプルを 70 °C で 10 分間加熱し、次いで、Caliper Life Sciences の LabChip GXII で Labchip を実行する前に、70 µL の水を加えた。

20

【0225】

(c) サイズ排除クロマトグラフィー

プロテイン A 精製サンプルを、Waters UPLC BEH200 (Waters #186005225、1.7 µm、4.6 mm × 150 mm) SEC カラム、孔径 200 Å に供した。移動相は、50 mM リン酸ナトリウム溶液、pH 6.0 であった。流量は、0 ~ 4 ml / 分であった。カラム温度は、30 °C であった。UV は、210 nm で記録された。データ取得及びピーク積分は、Chromeleon (商標) 7 (Thermo Scientific) を使用して実施した。

30

【0226】

40

50

【表 3】

配列表

配列番号	説明	配列
1	ヒトガンマ 1 型重鎖の CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV
2	ヒトガンマ 1 型重鎖のヒンジ領域	EPKSCDKTHTCP
3	ヒトガンマ 1 型重鎖の CH2	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
4	ヒトガンマ 1 型重鎖の CH3	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
5	ヒトガンマ 1 型重鎖の定常領域	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
6	ヒトラムダ型軽鎖の CL	GQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRYSQCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
7	ヒトカッパ型軽鎖の CL	RTVAAPSVFIFPPSPDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
8	2A ペプチドのコンセンサス配列	DXEXNPGP
9	2A ペプチドのコンセンサス配列	LXXXGDXEXNPGP
10	口蹄疫ウイルスの 2A ペプチド	APVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
11	口蹄疫ウイルスの 2A ペプチド	EARHKQKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
12	プタテシオウイルス-1 の 2A ペプチド	ATNFSLLKQAGDVEENPGP
13	ウマ鼻炎ウイルスの 2A ペプチド	QCTNYALLKLAGDVESNPGP
14	トセア・アシグナ(<i>Thosea asigna</i>)ウイルスの 2A ペプチド	EGRGSLLTCGDVEENPGP
15	トセア・アシグナ(<i>Thosea asigna</i>)ウイルスの 2A ペプチド	RAEGRGSLLTCGDVEENPGP

10

20

30

40

【 0 2 2 7 】

【表 4】

16	アメリカムラサキウニ (<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>)の 2A ペプチド	DGFCILYLLLLILLMRSQDVETNPGP
17	アンフィメドン クイーンズランドイカ (<i>Amphimedon queenslandica</i>)の 2A ペプチド	LLCFMLLLLLLSGDVELNPGP
18	アンフィメドン クイーンズランドイカ (<i>Amphimedon queenslandica</i>)の 2A ペプチド	HHFMFLLLLLLAGDIELNPGP
19	クビナガギボシムシ (<i>Saccoglossus kowalevskii</i>)の 2A ペプチド	WFLVLLSFILSGDIEVNPG
20	フロリダナメクジウオ (<i>Branchiostoma floridae</i>)の 2A ペプチド	KNCAMYMLLLSGDVETNPGP
21	フロリダナメクジウオ (<i>Branchiostoma floridae</i>)の 2A ペプチド	MVISQLMLKLAGDVEENPGP
22	フューリン認識部位の コンセンサス配列	RX (R/K) R
23	フューリン認識部位 RKRR	RKRR
24	フューリン認識部位 RRKR	RRKR
25	本発明の開示による フューリン/2A ペプチド リンカー	RKRREARHKQKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP

10

20

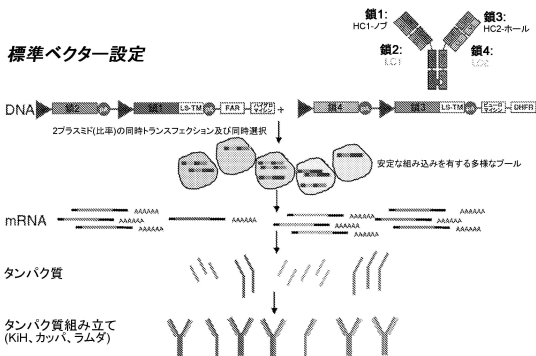
30

40

50

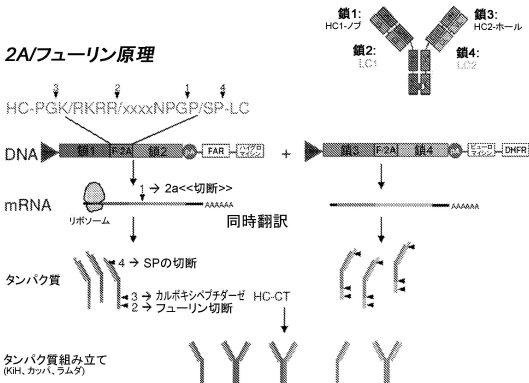
【図面】
【図 1】

図1



【図 2】

図2



10

20

【図 3】

【図 4】

30

図3

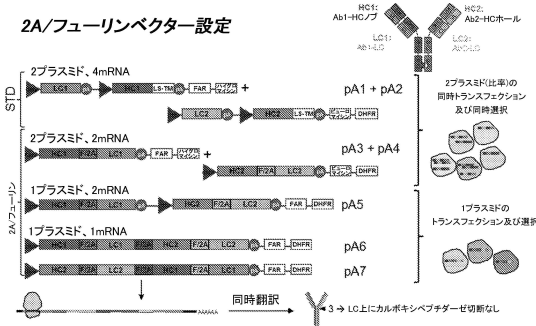
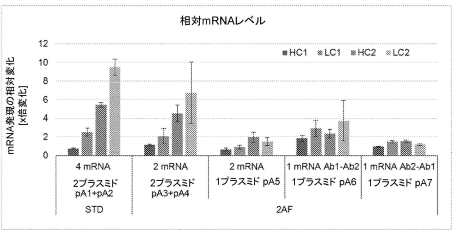


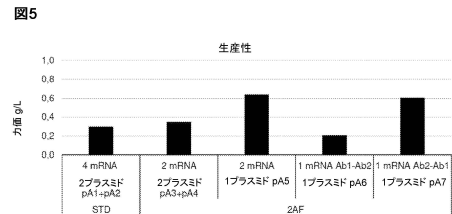
図4



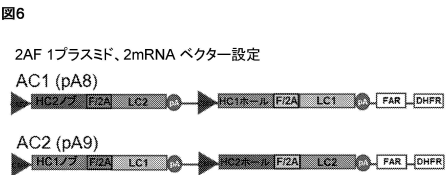
40

50

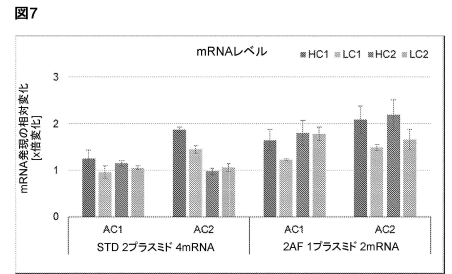
【 図 5 】



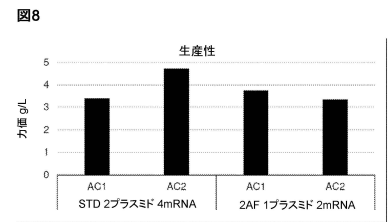
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2021/060796

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K16/46

ADD. C12N15/74

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K C40B C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2015/175639 A1 (UNIV PENNSYLVANIA [US]) 19 November 2015 (2015-11-19) example 3 figure 1 ----- -/--	1-9, 11-21

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 February 2022

Date of mailing of the international search report

02/03/2022

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Wagner, René

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2021/060796

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	PANINA A. A. ET AL: "Recombinant Bispecific Antibodies to the Human ErbB2 Receptor and Interferon-Beta", ACTA NATURAE, vol. 12, no. 2, 1 April 2020 (2020-04-01), pages 95-104, XP055891323, RU ISSN: 2075-8251, DOI: 10.32607/actanaturae.10903 Retrieved from the Internet: URL:https://europepmc.org/backend/ptpmcrender.fcgi?accid=PMC7385087&blobtype=pdf> page 100, left-hand column figure 3	1-21
Y	WANG TIAN-YUN ET AL: "Expression vector cassette engineering for recombinant therapeutic production in mammalian cell systems", APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, SPRINGER BERLIN HEIDELBERG, BERLIN/HEIDELBERG, vol. 104, no. 13, 6 May 2020 (2020-05-06), pages 5673-5688, XP037174486, ISSN: 0175-7598, DOI: 10.1007/S00253-020-10640-W [retrieved on 2020-05-06] page 5681, left-hand column - right-hand column	1-21
A	JIAN'ER LIN ET AL: "Impact of Signal Peptides on Furin-2A Mediated Monoclonal Antibody Secretion in CHO Cells", BIOTECHNOLOGY JOURNAL, vol. 12, no. 9, 1 September 2017 (2017-09-01), page 1700268, XP055533345, DE ISSN: 1860-6768, DOI: 10.1002/biot.201700268 the whole document	1-21
A	CHNG JAKE ET AL: "Cleavage efficient 2A peptides for high level monoclonal antibody expression in CHO cells", MABS, vol. 7, no. 2, 4 March 2015 (2015-03-04), pages 403-412, XP055804584, US ISSN: 1942-0862, DOI: 10.1080/19420862.2015.1008351 Retrieved from the Internet: URL:https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/19420862.2015.1008351?needAccess=true> the whole document	1-21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2021/060796

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2021/060796

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2015175639 A1	19-11-2015	AU 2015259188 A1	10-11-2016
		AU 2021204630 A1	29-07-2021
		BR 112016026092 A2	12-12-2017
		CA 2947614 A1	19-11-2015
		CL 2016002840 A1	05-05-2017
		CN 106470736 A	01-03-2017
		CR 20160519 A	27-01-2017
		DK 3142750 T3	14-09-2020
		EA 201692293 A1	28-04-2017
		EP 3142750 A1	22-03-2017
		ES 2833230 T3	14-06-2021
		HR P20201530 T1	11-12-2020
		HU E050609 T2	28-01-2021
		JP 6974943 B2	01-12-2021
		JP 2017515482 A	15-06-2017
		JP 2020141697 A	10-09-2020
		JP 2021121217 A	26-08-2021
		KR 20170002445 A	06-01-2017
		MA 39437 A1	31-01-2018
		MA 44179 A1	31-07-2019
		MX 365658 B	10-06-2019
		PE 20170261 A1	12-04-2017
		PH 12016502239 A1	09-01-2017
		PL 3142750 T3	08-03-2021
		PT 3142750 T	22-09-2020
		SG 11201609207S A	29-12-2016
		SI 3142750 T1	30-11-2020
		US 2017081392 A1	23-03-2017
		US 2019031740 A1	31-01-2019
		US 2019322725 A1	24-10-2019
		US 2020216520 A1	09-07-2020
		WO 2015175639 A1	19-11-2015

フロントページの続き

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,K
E,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,N
G,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,
TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

ツツ アベニュー 250, ノバルティス インスティテューツ フォー バイオメディカル リサー
チ, インコーポレイテッド内

(72)発明者 ヘスリング, マーティン

ドイツ連邦共和国 ビーベラッハ 88400, トゥネルヴェーク 2

(72)発明者 リッター, アネット

スイス国 バーゼル 4002, ポストファッハ, ノバルティス ファーマ アーゲー内