

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】令和2年5月28日(2020.5.28)

【公表番号】特表2019-515666(P2019-515666A)

【公表日】令和1年6月13日(2019.6.13)

【年通号数】公開・登録公報2019-022

【出願番号】特願2018-552794(P2018-552794)

【国際特許分類】

C 12 N 15/85 (2006.01)

C 12 N 5/10 (2006.01)

C 12 P 21/08 (2006.01)

【F I】

C 12 N 15/85 Z N A Z

C 12 N 5/10

C 12 P 21/08

【手続補正書】

【提出日】令和2年4月17日(2020.4.17)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

第一の発現強化座位内に統合された第一の外因性核酸と、第二の発現強化座位内に統合された第二の外因性核酸を備えた細胞であって、前記第一および第二の外因性核酸はともに抗原結合タンパク質をコードする、細胞。

【請求項2】

前記第一の外因性核酸が、第一の重鎖断片(H C F)をコードするヌクレオチド配列を備え、前記第二の外因性核酸が、軽鎖断片(L C F)をコードするヌクレオチド配列を備え、必要に応じて、前記抗原結合タンパク質が一特異性である、請求項1に記載の細胞。

【請求項3】

前記第二の外因性核酸が、第二のH C Fをコードするヌクレオチド配列をさらに備える、請求項2に記載の細胞。

【請求項4】

a) 前記第一および第二のH C Fが異なり、その結果、前記抗原結合タンパク質が二特異性である;または

b) 前記第一のH C Fをコードするヌクレオチド配列は、第一のC H 3ドメインをコードし、前記第二のH C Fをコードするヌクレオチド配列は、第二のC H 3ドメインをコードし、必要に応じて、

i) 前記第一および第二のC H 3ドメインが、少なくとも1つのアミノ酸位置で異なっている;もしくは

ii) 前記第一および第二のC H 3ドメインをコードするヌクレオチド配列が、前記ヌクレオチド配列のうちの1つがコドン改変されているという点で互いに異なっている、請求項3に記載の細胞。

【請求項5】

前記第一の外因性核酸が、第二のL C Fをコードするヌクレオチド配列をさらに備え、その結果、前記第一および第二のL C Fが同一である、請求項3に記載の細胞。

【請求項 6】

第一のリコンビナーゼ認識部位（RRS）と第二のRRSはそれぞれ、前記第一の外因性核酸に対して5' と3' に位置し、第三のRRSと第四のRRSはそれぞれ、前記第二の外因性核酸に対して5' と3' に位置しており、前記第一と第二のRRSは異なっており、前記第三と第四のRRSは異なっており、例えば、前記第一、第二、第三、および第四のRRSが、互いに異なっている、請求項2に記載の細胞。

【請求項 7】

第一の追加リコンビナーゼ認識部位（RRS）が、前記第一のLCFをコードするヌクレオチド配列と前記第二のHCFをコードするヌクレオチド配列の間に存在し、前記追加RRSが、前記第一、第二、第三、および第四のRRSの各々と異なっており、例えば、前記第一の追加RRSが、前記第一のLCFをコードするヌクレオチド配列と、前記第二のHCFをコードする隣接ヌクレオチド配列の間に存在する選択マーカー遺伝子のイントロン内に含有される、請求項3に記載の細胞。

【請求項 8】

第一のリコンビナーゼ認識部位（RRS）と第二のRRSはそれぞれ、前記第一の外因性核酸に対して5' と3' に位置し、第三のRRSと第四のRRSはそれぞれ、前記第二の外因性核酸に対して5' と3' に位置しており、前記第一と第二のRRSは異なっており、前記第三と第四のRRSは異なっており、必要に応じて、前記第一と第二のHCFは

a) 同一であり、前記第一と第二のLCFは同一であり、前記第一と第三のRRSが同一であり、前記第二と第四のRRSが同一である；または

b) 異なっており、前記第一と第二のLCFは同一であり、前記第一、第二、第三および第四のRRSが互いに異なり；

例えば、第一の追加RRSが、前記第二の外因性核酸中の前記第一のLCFをコードするヌクレオチド配列と前記第二のHCFをコードするヌクレオチド配列の間に存在し、前記第一の追加RRSは、前記第一、第二、第三、および第四のRRSと異なっており、結果として

a) 前記第一の追加RRSが、前記第二の外因性核酸中の前記第一のLCFをコードするヌクレオチド配列と、前記第二のHCFをコードするヌクレオチド配列の間に存在する第一の選択マーカー遺伝子のイントロン内に含有される；もしくは

b) 第二の追加RRSが、前記第二のLCFをコードするヌクレオチド配列と、前記第一のHCFをコードするヌクレオチド配列の間に存在し、この場合において前記第一および第二のRRSが、同一または異なっており、各々、前記第一、第二、第三および第四のRRSと異なっており、

必要に応じて、前記第一の追加RRSが、前記第二の外因性核酸中の前記第一のLCFをコードするヌクレオチド配列と、前記第二のHCFをコードするヌクレオチド配列の間に存在する第一の選択マーカー遺伝子のイントロン内に含有され、前記第二の追加RRSが、前記第二のLCFをコードするヌクレオチド配列と、前記第一のHCFをコードするヌクレオチド配列の間に存在する第二の選択マーカー遺伝子のイントロン内に含有され、前記第一および第二の選択マーカー遺伝子が異なっている、

請求項4に記載の細胞。

【請求項 9】

第一の発現強化座位内に統合される、5' から3' の方向に、第一のリコンビナーゼ認識部位（RRS）、第一の外因性核酸、および第二のRRS、

第二の発現強化座位内に統合される、5' から3' の方向に、第三のRRS、第二の外因性核酸、および第四のRRS、を備える細胞であって、

前記第一および第二のRRSが異なっており、前記第三および第四のRRSが異なっている、細胞。

【請求項 10】

前記第一の外因性核酸が、

a) 第一の選択マーカー遺伝子を備え、前記第二の外因性核酸が、第二の選択マーカー遺伝子を備え、前記第一と第二の選択マーカー遺伝子が異なっている、例えば、前記第一の外因性核酸が、第一の追加R R Sをさらに備え、前記第一の追加R R Sが、第一および第二のR R Sとは異なっており、その結果、前記第二の外因性核酸が、第二の追加R R Sをさらに備え、前記第二の追加R R Sが、前記第三および第四のR R Sとは異なっており、必要に応じて、前記第二の外因性核酸が、第二の選択マーカー遺伝子、第二の追加R R S、および第二の追加選択マーカー遺伝子を備え、前記第二の選択マーカー遺伝子および第二の追加選択マーカー遺伝子が互いに異なっており、ならびに前記第一の選択マーカー遺伝子および第一の追加選択マーカー遺伝子とも異なっており、前記第二の追加R R Sが、前記第三および第四のR R Sとは異なっている；または

b) 第一の選択マーカー遺伝子、第一の追加R S Sおよび第一の追加選択マーカー遺伝子を備え、前記第一および第一追加選択マーカー遺伝子が異なっており、前記第一追加R S Sが、前記第一および第二R S Sと異なっている、

請求項9に記載の細胞。

【請求項11】

前記細胞が、C H O細胞であり、必要に応じて、2つの発現強化座位のうちの1つは、配列番号1に対し少なくとも90%同一であるヌクレオチド配列、配列番号2に対し少なくとも90%同一であるヌクレオチド配列、および配列番号3に対し少なくとも90%同一であるヌクレオチド配列からなる群から選択される、請求項1～10のいずれかに記載の細胞。

【請求項12】

細胞において二特異性抗原結合タンパク質を発現するベクターセットであって、5'から3'の方向に、第一のリコンビナーゼ認識部位(R R S)、第一の重鎖断片(H C F)をコードするヌクレオチド配列を備えた第一の核酸、および第二のR R Sを備えた第一ベクター、

5'から3'の方向に、第三のR R S、第二のH C Fをコードするヌクレオチド配列を備えた第二の核酸、および第四のR R Sを備えた第二ベクター、

および前記第一ベクター中の前記第一の核酸内、または前記第一および第二ベクターとは異なる第三ベクター中のいずれかにある、第一のL C Fをコードするヌクレオチド配列を備え、

この場合において前記第一、第二、第三、および第四のR R Sが異なっており、

ならびに前記二特異性抗原結合タンパク質が、前記第一のH C F、前記第二のH C F、および前記第一の軽鎖断片(L C F)を備え、ならびに前記第一および第二のH C Fが異なっている、ベクターセット。

【請求項13】

a) 前記第一のL C Fをコードするヌクレオチド配列が、前記第一ベクター中の前記第一の核酸内にある；

b) 前記第一の核酸が、第一の選択マーカー遺伝子をさらに備える；

c) 前記第一のL C Fをコードするヌクレオチド配列は、前記第三ベクター中にあり、および5'R R Sと3'R R Sに隣接され、この場合において(i)前記3'R R Sは前記第一のR R Sと同じであり、前記5'R R Sは前記第一のR R Sおよび第二のR R Sとは異なっているか、または(ii)前記5'R R Sは前記第二のR R Sと同じであり、前記3'R R Sは前記第一のR R Sおよび第二のR R Sとは異なっており、その結果、前記第一および第三ベクターの間の共通R R Sは、前記第一および第三ベクターの内の1つの選択マーカー遺伝子の5'部分の3'末端に配置され、そして前記他方のベクターの選択マーカー遺伝子の残りの3'部分の5'末端に配置される；

d) 第二ベクター中の前記第二の核酸内、または前記第一、第二、および第三ベクターとは別の第四ベクター中のいずれかである、第二のL C Fをコードするヌクレオチド配列をさらに備え、例えば、前記第一および第二のL C Fが同一であり、その結果、

i) 前記第一のL C Fをコードするヌクレオチド配列が、前記第一ベクター中の前記第

ーの核酸内であり、前記第二のVLをコードするヌクレオチド配列が、前記第四ベクター上にあり、必要に応じて、前記第四ベクター上の前記第二のLCFをコードするヌクレオチド配列は、5'RRSと3'RRSに隣接され、この場合において(i)前記3'RRSは、前記第三のRRSと同一であり、前記5'RRSは、前記第三のRRSおよび第四のRRSとは異なっているか、もしくは(ii)前記5'RRSは前記第四のRRSと同一であり、前記3'RRSは、前記第三のRRSおよび第四のRRSとは異なっている、例えば、前記第二および第四ベクターの間の前記共通RRSは、前記第二および第四ベクターの内の1つの選択マークー遺伝子の5'部分の3'末端に配置され、そして前記他方のベクターの選択マークー遺伝子の残りの3'部分の5'末端に配置される；

(i) 前記第一のLCFをコードするヌクレオチド配列が、前記第一ベクター中の前記第一の核酸内であり、前記第二のVLをコードするヌクレオチド配列が、前記第二ベクター上の前記第二の核酸内である；もしくは

(ii) 前記第一のLCFをコードするヌクレオチド配列が、前記第三ベクター上にあり、前記第二のVLをコードするヌクレオチド配列が、前記第四ベクター上にある、例えば、前記第三ベクター上の第一のLCFをコードするヌクレオチド配列は、5'RRSおよび3'RRSに隣接され、この場合において(i)前記第三ベクター上の前記3'RRSは、前記第一のRRSと同一であり、前記第三ベクター上の前記5'RRSは、前記第一および第二のRRSとは異なっているか、もしくは(ii)前記第三ベクター上の前記5'RRSは、前記第二のRRSと同一であり、前記第三ベクター上の前記3'RRSは、前記第一および第二のRRSとは異なっており、およびこの場合において前記第四ベクター上の前記第二のLCFをコードするヌクレオチド配列は、5'RRSおよび3'RRSに隣接され、この場合において(i)前記第四ベクター上の前記3'RRSは、前記第三のRRSと同一であり、前記第四ベクター上の前記5'RRSは、前記第三および第四のRRSとは異なっているか、もしくは(ii)前記第四ベクター上の前記5'RRSは、前記第四のRRSと同一であり、前記第四ベクター上の前記3'RRSは、前記第三および前記第四のRRSとは異なっている；

(e) 前記第一のHCFをコードするヌクレオチド配列は、第一のCH3ドメインをコードし、前記第二のHCFをコードするヌクレオチド配列は、前記第二のCH3ドメインをコードする、例えば、

(i) 前記第一および第二のCH3ドメインが、少なくとも1つのアミノ酸で異なっている；もしくは

(ii) 前記第一および第二のCH3ドメインをコードするヌクレオチド配列が、前記ヌクレオチド配列のうちの1つがコドン改変されているという点で異なっている；

(f) 可変領域をコードするヌクレオチド配列の各々が、独立してプロモーターに連結されている；または

(g) 前記第一および第二のRRS、ならびに/もしくは前記第三および第四のRRSを認識するリコンビナーゼをコードするヌクレオチド配列をさらに備える、

請求項1_2に記載のベクターセット。

【請求項1_4】

細胞およびベクターセットを備えるシステムであって、
前記細胞が、

第一の発現強化座位内に統合される、5'から3'の方向に、第一のリコンビナーゼ認識部位(RRS)、第一の外因性核酸、および第二のRRS、

第二の発現強化座位内に統合される、5'から3'の方向に、第三のRRS、第二の外因性核酸、および第四のRRS、を備え、

この場合において前記第一および第二のRRSが異なっており、前記第三および第四のRRSが異なっており、ならびにこの場合において前記第一および第二の発現強化座位が異なっており、

前記ベクターセットが、

5'から3'の方向に、第一ベクターの5'RRS、第一の核酸、および第一ベクター

の 3' R R S を備えた第一ベクターであって、前記第一ベクターの 5' R R S と 3' R R S は異なっている、第一ベクター、

5' から 3' の方向に、第二ベクターの 5' R R S、第二の核酸、および第二ベクターの 3' R R S を備えた第二ベクターであって、前記第二ベクターの 5' R R S と 3' R R S は異なっている、第二ベクター、

第一の重鎖断片 (H C F)をコードするヌクレオチド配列と第一の軽鎖断片 (L C F)をコードするヌクレオチド配列であって、前記ヌクレオチド配列の内の 1 つは、前記第一の核酸中にあり、他方のヌクレオチド配列は前記第二の核酸中にあり、この場合において前記第一の H C F と前記第一の L C F は、抗原結合タンパク質の領域である、ヌクレオチド配列、を備え、

この場合において前記ベクターが前記細胞内に導入されると、前記ベクター中の前記第一および第二の核酸がそれぞれ、前記 R R S により介在される組み換えを介して前記第一の発現強化座位内と前記第二の発現強化座位内に統合する、システム。

【請求項 15】

前記抗原結合タンパク質が、一特異性抗原結合タンパク質であり、必要に応じて、

a) 前記第一および第三の R R S は同一であり、前記第二および第四の R R S は同一であり、その結果、第一の追加 R R S は、前記第一座位中の前記第一の R R S および第二の R R S の間に存在し、例えば前記第一ベクターの 5' R R S は、前記第一の R R S および第三の R R S と同一であり、前記第一ベクターの 3' R R S、前記第二ベクターの 5' R R S、および前記第一の追加 R R S は同一であり、ならびに前記第二ベクターの 3' R R S は、前記第二および第四の R R S と同一であり、必要に応じて、

i) 前記 V L をコードするヌクレオチド配列は、前記第一ベクター中にあり、前記 H C F をコードするヌクレオチド配列は、前記第二ベクター中にある；もしくは

i i) 前記第一ベクターの 3' R R S は、選択マーカー遺伝子の 5' 部分の 3' 末端に配置され、前記第二ベクターの 5' R R S は、前記選択マーカー遺伝子の残りの 3' 部分の 5' 末端に配置される；

b) 前記第一ベクターの 5' R R S は、前記第一の R R S と同一であり、前記第一ベクターの 3' R R S は、前記第二の R R S と同一であり、およびこの場合において前記第二ベクターの 5' R R S は、前記第三の R R S と同一であり、前記第二ベクターの 3' R R S は、前記第四の R R S と同一である；

c) 前記抗原結合タンパク質が、二特異性抗原結合タンパク質であり、必要に応じて、前記第一の H C F とは異なる第二の H C F をコードするヌクレオチド配列をさらに備え、その結果、

i) 前記第一の L C F をコードするヌクレオチド配列と、前記第二の H C F をコードするヌクレオチド配列は両方とも、前記第一ベクター中の前記第一核酸内に含まれ、および前記第一の H C F をコードするヌクレオチド配列は、前記第二ベクター中にあり、例えば、前記第一ベクターの 5' R R S は、前記第一の R R S と同一であり、前記第一ベクターの 3' R R S は、前記第二の R R S と同一であり、およびこの場合において前記第二ベクターの 5' R R S は、前記第三の R R S と同一であり、前記第二ベクターの 3' R R S は、前記第四の R R S と同一である；

i i) 前記第二の H C F をコードするヌクレオチド配列は、別個の第三ベクター上にあり、第三ベクターの 5' R R S と第三ベクターの 3' R R S に隣接されており、例えば、前記第一の L C F をコードするヌクレオチド配列は、前記第一ベクター中にあり、前記第一の H C F をコードするヌクレオチド配列は、前記第二ベクター中にあり、前記第一ベクターの 5' R R S は、前記第一の R R S と同一であり、前記第一ベクターの 3' R R S は、前記第二ベクターの 5' R R S、および第一の追加 R R S と同一であり、前記第二ベクターの 3' R R S は、前記第二の R R S と同一であり、前記第三ベクターの 5' R R S は、前記第三の R R S と同一であり、前記第三ベクターの 3' R R S は、前記第四の R R S と同一であり、この場合において前記第一の追加 R R S は、前記第一と第二の R R S の間の前記第一の座位中に含まれ、その結果、前記第一ベクターの 3' R R S は、前記第一ベ

クターに含まれる選択マーカー遺伝子の 5' 部分の 3' 末端に配置され、前記第二ベクターの 5' RRS は、前記第二ベクターに含まれる前記残りの選択マーカー遺伝子の 5' 末端に配置される；もしくは

i i i) 第一の HCF をコードするヌクレオチド配列が、第一の CH3 ドメインをコードし、第二の HCF をコードするヌクレオチド配列が、第二の CH3 ドメインをコードし、その結果、

a) 前記第一および第二の CH3 ドメインが、少なくとも 1 つのアミノ酸で異なる；もしくは

b) 前記第一および第二の CH3 ドメインをコードするヌクレオチド配列が、そのヌクレオチド配列のうちの 1 つがコドン改変されているという点で、互いに異なる；

d) 前記第一の HCF をコードするヌクレオチド配列および前記第一の LCF をコードするヌクレオチド配列の各々は、プロモーターに動作可能に連結される；または

e) 前記細胞は CHO 細胞であり、その結果、2 つの発現強化座位は、配列番号 1 のヌクレオチド配列を含有する座位、および配列番号 2 のヌクレオチド配列を含有する座位を含む、

請求項 14 に記載のシステム。

【請求項 16】

第二の LCF をコードするヌクレオチド配列をさらに備え、必要に応じて、前記第一および第二の LCF が同一であり、その結果、前記第二の LCF をコードするヌクレオチド配列が、

a) 前記第二ベクターの前記第二の核酸中にあり、この場合において前記第一ベクターの 5' RRS は、前記第一の RRS と同一であり、前記第一ベクターの 3' RRS は、前記第二の RRS と同一であり、前記第二ベクターの 5' RRS は、前記第三の RRS と同一であり、および前記第二ベクターの 3' RRS は、前記第四の RRS と同一である；または

b) 別個の第三ベクター中にあり、第三ベクターの 5' RRS と第三ベクターの 3' RRS に隣接され、必要に応じて、前記第一ベクターの 5' RRS と 3' RRS はそれぞれ、前記第一の座位中の前記第一の RRS と第二の RRS と同一であり；前記第三ベクターの 5' RRS は、前記第三の RRS と同一であり、前記第三ベクターの 3' RRS は、前記第二ベクターの 5' RRS 、および前記第二の座位中の前記第三の RRS と第四の RRS の間に存在する追加 RRS と同一であり、前記第二ベクターの 3' RRS は、前記第四の RRS と同一であり、その結果、前記第三ベクターの 3' RRS は、前記第三ベクター中に含まれる選択マーカー遺伝子の 5' 部分の 3' 末端に配置され、前記第二ベクターの 5' RRS は、前記第二ベクター中に含まれる選択マーカー遺伝子の前記残りの 3' 部分の 5' 末端に配置される、

請求項 17 の (c) (i) に記載のシステム。

【請求項 17】

(i) 請求項 14 ~ 16 のいずれか 1 項に記載のシステムを提供すること、

(ii) 前記細胞内に、前記ベクターを、トランスフェクションにより導入すること、および、

(iii) 前記ベクター中の前記核酸が、前記 RRS により介在される組み換えを介して前記第一および第二の発現強化座位内に統合されている、トランスフェクト細胞を選択すること、を含む方法であって、必要に応じて、

(iv) 前記選択されたトランスフェクト細胞から前記抗原結合タンパク質を発現および取得すること、
をさらに含む方法。

【請求項 18】

抗原結合タンパク質を作製する方法であって、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の細胞を提供すること、ならびに前記細胞から前記抗原結合タンパク質を発現および取得すること、を含む、方法。

【手続補正2】**【補正対象書類名】明細書****【補正対象項目名】0055****【補正方法】変更****【補正の内容】****【0055】**

別の実施形態では、当該方法は、本明細書において上述される細胞を単純に利用するものであり、当該細胞は、2つの発現強化座位で統合された外因性核酸を含有し、それら外因性核酸は抗原結合タンパク質をコードし、当該細胞から当該抗原結合タンパク質を発現させる。

特定の実施形態では、例えば以下の項目が提供される。

(項目1)

第一の発現強化座位内に統合された第一の外因性核酸と、第二の発現強化座位内に統合された第二の外因性核酸を備えた細胞であって、前記第一および第二の外因性核酸はともに抗原結合タンパク質をコードする、細胞。

(項目2)

前記第一の外因性核酸が、第一のHCFをコードするヌクレオチド配列を備え、前記第二の外因性核酸が、LCFをコードするヌクレオチド配列を備える、項目1に記載の細胞。

(項目3)

前記第二の外因性核酸が、第二のHCFをコードするヌクレオチド配列をさらに備える、項目2に記載の細胞。

(項目4)

前記第一および第二のHCFが異なっている、項目3に記載の細胞。

(項目5)

前記第一のHCFをコードするヌクレオチド配列は、第一のCH3ドメインをコードし、前記第二のHCFをコードするヌクレオチド配列は、第二のCH3ドメインをコードする、項目3に記載の細胞。

(項目6)

前記第一および第二のCH3ドメインが、少なくとも1つのアミノ酸位置で異なっている、項目5に記載の細胞。

(項目7)

前記第一および第二のCHドメインをコードするヌクレオチド配列が、前記ヌクレオチド配列のうちの1つがコドン改変されているという点で互いに異なっている、項目5に記載の細胞。

(項目8)

前記第一の外因性核酸が、第二のLCFをコードするヌクレオチド配列をさらに備える、項目3に記載の細胞。

(項目9)

前記第一および第二のLCFが同一である、項目8に記載の細胞。

(項目10)

HCFまたはLCFをコードする前記ヌクレオチド配列の各々が、プロモーターに動作可能に連結されている、項目2、3、8のいずれかに記載の細胞。

(項目11)

第一のRRSと第二のRRSはそれぞれ、前記第一の外因性核酸に対して5' と3'に位置し、第三のRRSと第四のRRSはそれぞれ、前記第二の外因性核酸に対して5' と3'に位置しており、前記第一と第二のRRSは異なっており、前記第三と第四のRRSは異なっている、項目2に記載の細胞。

(項目12)

前記第一、第二、第三、および第四のR R Sが、互いに異なっている、項目11に記載の細胞。

(項目13)

第一の追加R R Sが、前記第一のL C Fをコードするヌクレオチド配列と前記第二のH C Fをコードするヌクレオチド配列の間に存在し、前記追加R R Sが、前記第一、第二、第三、および第四のR R Sの各々と異なっている、項目3に記載の細胞。

(項目14)

前記第一の追加R R Sが、前記第一のL C Fをコードするヌクレオチド配列と、前記第二のH C Fをコードする隣接ヌクレオチド配列の間に存在する選択マーカー遺伝子のイントロン内に含有される、項目13に記載の細胞。

(項目15)

第一のR R Sと第二のR R Sはそれぞれ、前記第一の外因性核酸に対して5' と3'に位置し、第三のR R Sと第四のR R Sはそれぞれ、前記第二の外因性核酸に対して5' と3'に位置しており、前記第一と第二のR R Sは異なっており、前記第三と第四のR R Sは異なっている、項目8に記載の細胞。

(項目16)

前記第一と第二のH C Fは同一であり、前記第一と第二のL C Fは同一であり、前記第一と第三のR R Sが同一であり、前記第二と第四のR R Sが同一である、項目15に記載の細胞。

(項目17)

前記第一と第二のH C Fは異なっており、前記第一と第二のL C Fは同一であり、前記第一、第二、第三および第四のR R Sが互いに異なる、項目15に記載の細胞。

(項目18)

第一の追加R R Sが、前記第二の外因性核酸中の前記第一のL C Fをコードするヌクレオチド配列と前記第二のH C Fをコードするヌクレオチド配列の間に存在し、前記第一の追加R R Sは、前記第一、第二、第三、および第四のR R Sと異なっている、項目16または17に記載の細胞。

(項目19)

前記第一の追加R R Sが、前記第二の外因性核酸中の前記第一のL C Fをコードするヌクレオチド配列と、前記第二のH C Fをコードするヌクレオチド配列の間に存在する第一の選択マーカー遺伝子のイントロン内に含有される、項目18に記載の細胞。

(項目20)

第二の追加R R Sが、前記第二のL C Fをコードするヌクレオチド配列と、前記第一のH C Fをコードするヌクレオチド配列の間に存在し、この場合において前記第一および第二のR R Sが、同一または異なっており、各々、前記第一、第二、第三および第四のR R Sと異なっている、項目18に記載の細胞。

(項目21)

前記第一の追加R R Sが、前記第二の外因性核酸中の前記第一のL C Fをコードするヌクレオチド配列と、前記第二のH C Fをコードするヌクレオチド配列の間に存在する第一の選択マーカー遺伝子のイントロン内に含有され、前記第二の追加R R Sが、前記第二のL C Fをコードするヌクレオチド配列と、前記第一のH C Fをコードするヌクレオチド配列の間に存在する第二の選択マーカー遺伝子のイントロン内に含有され、前記第一および第二の選択マーカー遺伝子が異なっている、項目20に記載の細胞。

(項目22)

前記抗原結合タンパク質が、一特異性である、項目2に記載の細胞。

(項目23)

前記抗原結合タンパク質が、二特異性である、項目4に記載の細胞。

(項目24)

第一の発現強化座位内に統合される、5'から3'の方向に、第一のR R S、第一の外因性核酸、および第二のR R S、

第二の発現強化座位内に統合される、5'から3'の方向に、第三のR R S、第二の外因性核酸、および第四のR R S、を備える細胞であって、

前記第一および第二のR R Sが異なっており、前記第三および第四のR R Sが異なっている、細胞。

(項目25)

前記第一の外因性核酸が、第一の選択マーカー遺伝子を備え、前記第二の外因性核酸が、第二の選択マーカー遺伝子を備え、前記第一と第二の選択マーカー遺伝子が異なっている、項目24に記載の細胞。

(項目26)

前記第一の外因性核酸が、第一の追加R R Sをさらに備え、前記第一の追加R R Sが、第一および第二のR R Sとは異なっている、項目25に記載の細胞。

(項目27)

前記第二の外因性核酸が、第二の追加R R Sをさらに備え、前記第二の追加R R Sが、前記第三および第四のR R Sとは異なっている、項目26に記載の細胞。

(項目28)

前記第一の外因性核酸が、第一の選択マーカー遺伝子、第一の追加R R S、および第一の追加選択マーカー遺伝子を備え、前記第一の選択マーカー遺伝子および第一の追加選択マーカー遺伝子が異なっており、前記第一の追加R R Sが、前記第一のR R Sおよび第二のR R Sとは異なっている、項目24に記載の細胞。

(項目29)

前記第二の外因性核酸が、第二の選択マーカー遺伝子、第二の追加R R S、および第二の追加選択マーカー遺伝子を備え、前記第二の選択マーカー遺伝子および第二の追加選択マーカー遺伝子が互いに異なっており、ならびに前記第一の選択マーカー遺伝子および第一の追加選択マーカー遺伝子とも異なっており、前記第二の追加R R Sが、前記第三および第四のR R Sとは異なっている、項目27に記載の細胞。

(項目30)

前記細胞が、CHO細胞である、項目1～29のいずれかに記載の細胞。

(項目31)

2つの発現強化座位のうちの1つは、配列番号1に対し少なくとも90%同一である又クレオチド配列、配列番号2に対し少なくとも90%同一であるヌクレオチド配列、および配列番号3に対し少なくとも90%同一であるヌクレオチド配列からなる群から選択される、項目30に記載の細胞。

(項目32)

細胞において二特異性抗原結合タンパク質を発現するベクターセットであって、

5'から3'の方向に、第一のR R S、第一のH C Fをコードするヌクレオチド配列を備えた第一の核酸、および第二のR R Sを備えた第一ベクター、

5'から3'の方向に、第三のR R S、第二のH Cをコードするヌクレオチド配列を備えた第二の核酸、および第四のR R Sを備えた第二ベクター、

および前記第一ベクター中の前記第一の核酸内、または前記第一および第二ベクターとは異なる第三ベクター中のいずれかにある、第一のL Cをコードするヌクレオチド配列を備え、

この場合において前記第一、第二、第三、および第四のR R Sが異なっており、

ならびに前記二特異性抗原結合タンパク質が、前記第一のH C F、前記第二のH C F、および前記第一のL C Fを備え、ならびに前記第一および第二のH C Fが異なっている、ベクターセット。

(項目33)

前記第一のL C Fをコードするヌクレオチド配列が、前記第一ベクター中の前記第一の核酸内にある、項目32に記載のベクターセット。

(項目34)

前記第一の核酸が、第一の選択マーカー遺伝子をさらに備える、項目34に記載のベク

ターセット。

(項目35)

前記第一のLCFをコードするヌクレオチド配列は、前記第三ベクター中にあり、および5'RRSと3'RRSに隣接され、この場合において(i)前記3'RRSは前記第一のRRSと同じであり、前記5'RRSは前記第一のRRSおよび第二のRRSとは異なっているか、または(ii)前記5'RRSは前記第二のRRSと同じであり、前記3'RRSは前記第一のRRSおよび第二のRRSとは異なっている、項目32に記載のベクターセット。

(項目36)

前記第一および第三ベクターの間の共通RRSは、前記第一および第三ベクター内の1つの選択マーカー遺伝子の5'部分の3'末端に配置され、そして前記他方のベクターの選択マーカー遺伝子の残りの3'部分の5'末端に配置される、項目35に記載のベクターセット。

(項目37)

第二ベクター中の前記第二の核酸内、または前記第一、第二、および第三ベクターとは別の第四ベクター中のいずれかである、第二のLCFをコードするヌクレオチド配列をさらに備える、項目32に記載のベクターセット。

(項目38)

前記第一および第二のLCFが同一である、項目37に記載のベクターセット。

(項目39)

前記第一のLCFをコードするヌクレオチド配列が、前記第一ベクター中の前記第一の核酸内であり、前記第二のVLをコードするヌクレオチド配列が、前記第四ベクター上にある、項目38に記載のベクターセット。

(項目40)

前記第四ベクター上の前記第二のLCFをコードするヌクレオチド配列は、5'RRSと3'RRSに隣接され、この場合において(i)前記3'RRSは、前記第三のRRSと同一であり、前記5'RRSは、前記第三のRRSおよび第四のRRSとは異なっているか、または(ii)前記5'RRSは前記第四のRRSと同一であり、前記3'RRSは、前記第三のRRSおよび第四のRRSとは異なっている、項目39に記載のベクターセット。

(項目41)

前記第二および第四ベクターの間の前記共通RRSは、前記第二および第四ベクター内の1つの選択マーカー遺伝子の5'部分の3'末端に配置され、そして前記他方のベクターの選択マーカー遺伝子の残りの3'部分の5'末端に配置される、項目40に記載のベクターセット。

(項目42)

前記第一のLCFをコードするヌクレオチド配列が、前記第一ベクター中の前記第一の核酸内であり、前記第二のVLをコードするヌクレオチド配列が、前記第二ベクター上の前記第二の核酸内である、項目38に記載のベクターセット。

(項目43)

前記第一のLCFをコードするヌクレオチド配列が、前記第三ベクター上にあり、前記第二のVLをコードするヌクレオチド配列が、前記第四ベクター上にある、項目38に記載のベクターセット。

(項目44)

前記第三ベクター上の第一のLCFをコードするヌクレオチド配列は、5'RRSおよび3'RRSに隣接され、この場合において(i)前記第三ベクター上の前記3'RRSは、前記第一のRRSと同一であり、前記第三ベクター上の前記5'RRSは、前記第一および第二のRRSとは異なっているか、または(ii)前記第三ベクター上の前記5'RRSは、前記第二のRRSと同一であり、前記第三ベクター上の前記3'RRSは、前記第一および第二のRRSとは異なっており、およびこの場合において前記第四ベクター

上の前記第二の L C F をコードするヌクレオチド配列は、5' R R S および 3' R R S に隣接され、この場合において(i)前記第四ベクター上の前記 3' R R S は、前記第三の R R S と同一であり、前記第四ベクター上の前記 5' R R S は、前記第三および第四の R R S とは異なっているか、または(i i)前記第四ベクター上の前記 5' R R S は、前記第四の R R S と同一であり、前記第四ベクター上の前記 3' R R S は、前記第三および前記第四の R R S とは異なっている、項目 4 3 に記載のベクターセット。

(項目 4 5)

前記第一の H C F をコードするヌクレオチド配列は、第一の C H 3 ドメインをコードし、前記第二の H C F をコードするヌクレオチド配列は、前記第二の C H 3 ドメインをコードする、項目 3 2 に記載のベクターセット。

(項目 4 6)

前記第一および第二の C H 3 ドメインが、少なくとも 1 つのアミノ酸で異なっている、項目 4 5 に記載のベクターセット。

(項目 4 7)

前記第一および第二の C H 3 ドメインをコードするヌクレオチド配列が、前記ヌクレオチド配列のうちの 1 つがコドン改変されているという点で異なっている、項目 4 5 に記載のベクターセット。

(項目 4 8)

可変領域をコードするヌクレオチド配列の各々が、独立してプロモーターに連結されている、項目 3 2 に記載のベクターセット。

(項目 4 9)

前記第一および第二の R R S 、ならびに / または前記第三および第四の R R S を認識するリコンビナーゼをコードするヌクレオチド配列をさらに備える、項目 3 2 に記載のベクターセット。

(項目 5 0)

細胞の第一の発現強化座位内への統合のための 5' 相同アームと 3' 相同アームに隣接される、第一の核酸を備える第一ベクター、および

前記細胞の第二の発現強化座位内への統合のための 5' 相同アームと 3' 相同アームに隣接される、第二の核酸を備える第二ベクター、を備えるベクターセットであって、

前記第一および第二の核酸がともに抗原結合タンパク質をコードする、ベクターセット。

(項目 5 1)

細胞およびベクターセットを備えるシステムであって、

前記細胞が、

第一の発現強化座位内に統合される、5' から 3' の方向に、第一の R R S 、第一の外因性核酸、および第二の R R S 、

第二の発現強化座位内に統合される、5' から 3' の方向に、第三の R R S 、第二の外因性核酸、および第四の R R S 、を備え、

この場合において前記第一および第二の R R S が異なっており、前記第三および第四の R R S が異なっており、ならびにこの場合において前記第一および第二の発現強化座位が異なっており、

前記ベクターセットが、

5' から 3' の方向に、第一ベクターの 5' R R S 、第一の核酸、および第一ベクターの 3' R R S を備えた第一ベクターであって、前記第一ベクターの 5' R R S と 3' R R S は異なっている、第一ベクター、

5' から 3' の方向に、第二ベクターの 5' R R S 、第二の核酸、および第二ベクターの 3' R R S を備えた第二ベクターであって、前記第二ベクターの 5' R R S と 3' R R S は異なっている、第二ベクター、

第一の H C F をコードするヌクレオチド配列と第一の L C F をコードするヌクレオチド配列であって、前記ヌクレオチド配列の内の 1 つは、前記第一の核酸中にあり、他方のヌ

クレオチド配列は前記第二の核酸中にあり、この場合において前記第一の H C F と前記第一の L C F は、抗原結合タンパク質の領域である、ヌクレオチド配列、を備え、

この場合において前記ベクターが前記細胞内に導入されると、前記ベクター中の前記第一および第二の核酸がそれぞれ、前記 R R S により介在される組み換えを介して前記第一の発現強化座位内と前記第二の発現強化座位内に統合する、システム。

(項目 5 2)

前記抗原結合タンパク質が、一特異性抗原結合タンパク質である、項目 5 1 に記載のシステム。

(項目 5 3)

前記第一および第三の R R S は同一であり、前記第二および第四の R R S は同一である、項目 5 2 に記載のシステム。

(項目 5 4)

第一の追加 R R S は、前記第一座位中の前記第一の R R S および第二の R R S の間に存在する、項目 5 3 に記載のシステム。

(項目 5 5)

前記第一ベクターの 5' R R S は、前記第一の R R S および第三の R R S と同一であり、前記第一ベクターの 3' R R S 、前記第二ベクターの 5' R R S 、および前記第一の追加 R R S は同一であり、ならびに前記第二ベクターの 3' R R S は、前記第二および第四の R R S と同一である、項目 5 4 に記載のシステム。

(項目 5 6)

前記 V L をコードするヌクレオチド配列は、前記第一ベクター中にあり、前記 H C F をコードするヌクレオチド配列は、前記第二ベクター中にある、項目 5 5 に記載のシステム。

(項目 5 7)

前記第一ベクターの 3' R R S は、選択マーカー遺伝子の 5' 部分の 3' 末端に配置され、前記第二ベクターの 5' R R S は、前記選択マーカー遺伝子の残りの 3' 部分の 5' 末端に配置される、項目 5 5 に記載のシステム。

(項目 5 8)

前記第一ベクターの 5' R R S は、前記第一の R R S と同一であり、前記第一ベクターの 3' R R S は、前記第二の R R S と同一であり、およびこの場合において前記第二ベクターの 5' R R S は、前記第三の R R S と同一であり、前記第二ベクターの 3' R R S は、前記第四の R R S と同一である、項目 5 2 に記載のシステム。

(項目 5 9)

前記抗原結合タンパク質が、二特異性抗原結合タンパク質である、項目 5 2 に記載のシステム。

(項目 6 0)

前記第一の H C F とは異なる第二の H C F をコードするヌクレオチド配列をさらに備える、項目 5 9 に記載のシステム。

(項目 6 1)

前記第一の L C F をコードするヌクレオチド配列と、前記第二の H C F をコードするヌクレオチド配列は両方とも、前記第一ベクター中の前記第一核酸内に含まれ、および前記第一の H C F をコードするヌクレオチド配列は、前記第二ベクター中にある、項目 6 0 に記載のシステム。

(項目 6 2)

前記第一ベクターの 5' R R S は、前記第一の R R S と同一であり、前記第一ベクターの 3' R R S は、前記第二の R R S と同一であり、およびこの場合において前記第二ベクターの 5' R R S は、前記第三の R R S と同一であり、前記第二ベクターの 3' R R S は、前記第四の R R S と同一である、項目 6 1 に記載のシステム。

(項目 6 3)

前記第二の H C F をコードするヌクレオチド配列は、別個の第三ベクター上にあり、第

三ベクターの 5' RRS と第三ベクターの 3' RRS に隣接されている、項目 60 に記載のシステム。

(項目 64)

前記第一の LCF をコードするヌクレオチド配列は、前記第一ベクター中にあり、前記第一の HCF をコードするヌクレオチド配列は、前記第二ベクター中にあり、前記第一ベクターの 5' RRS は、前記第一の RRS と同一であり、前記第一ベクターの 3' RRS は、前記第二ベクターの 5' RRS、および第一の追加 RRS と同一であり、前記第二ベクターの 3' RRS は、前記第二の RRS と同一であり、前記第三ベクターの 5' RRS は、前記第三の RRS と同一であり、前記第三ベクターの 3' RRS は、前記第四の RRS と同一であり、この場合において前記第一の追加 RRS は、前記第一と第二の RRS の間の前記第一の座位中に含まれる、項目 63 に記載のシステム。

(項目 65)

前記第一ベクターの 3' RRS は、前記第一ベクターに含まれる選択マーカー遺伝子の 5' 部分の 3' 末端に配置され、前記第二ベクターの 5' RRS は、前記第二ベクターに含まれる前記残りの選択マーカー遺伝子の 5' 末端に配置される、項目 64 に記載のシステム。

(項目 66)

第二の LCF をコードするヌクレオチド配列をさらに備える、項目 61 に記載のシステム。

(項目 67)

前記第一および第二の LCF が同一である、項目 66 に記載のシステム。

(項目 68)

前記第二の LCF をコードするヌクレオチド配列は、前記第二ベクターの前記第二の核酸中にあり、この場合において前記第一ベクターの 5' RRS は、前記第一の RRS と同一であり、前記第一ベクターの 3' RRS は、前記第二の RRS と同一であり、前記第二ベクターの 5' RRS は、前記第三の RRS と同一であり、および前記第二ベクターの 3' RRS は、前記第四の RRS と同一である、項目 67 に記載のシステム。

(項目 69)

前記第二の LCF をコードするヌクレオチド配列は、別個の第三ベクター中にあり、第三ベクターの 5' RRS と第三ベクターの 3' RRS に隣接されている、項目 67 に記載のシステム。

(項目 70)

前記第一ベクターの 5' RRS と 3' RRS はそれぞれ、前記第一の座位中の前記第一の RRS と第二の RRS と同一であり、前記第三ベクターの 5' RRS は、前記第三の RRS と同一であり、前記第三ベクターの 3' RRS は、前記第二ベクターの 5' RRS、および前記第二の座位中の前記第三の RRS と第四の RRS の間に存在する追加 RRS と同一であり、前記第二ベクターの 3' RRS は、前記第四の RRS と同一である、項目 69 に記載のシステム。

(項目 71)

前記第三ベクターの 3' RRS は、前記第三ベクター中に含まれる選択マーカー遺伝子の 5' 部分の 3' 末端に配置され、前記第二ベクターの 5' RRS は、前記第二ベクター中に含まれる選択マーカー遺伝子の前記残りの 3' 部分の 5' 末端に配置される、項目 70 に記載のシステム。

(項目 72)

前記第一の HCF をコードするヌクレオチド配列は、第一の CH3 ドメインをコードし、前記第二の HCF をコードするヌクレオチド配列は、第二の CH3 ドメインをコードする、項目 60 に記載のシステム。

(項目 73)

前記第一および第二の CH3 ドメインが、少なくとも 1 つのアミノ酸で異なっている、項目 72 に記載のシステム。

(項目74)

前記第一および第二のC H 3 ドメインをコードするヌクレオチド配列が、前記ヌクレオチド配列のうちの1つがコドン改変されているという点で異なっている、項目72に記載のシステム。

(項目75)

前記第一のH C F をコードするヌクレオチド配列と、前記第一のL C F をコードするヌクレオチド配列が各々プロモーターに動作可能に連結されている、項目51に記載のシステム。

(項目76)

前記細胞が、C H O 細胞である、項目51に記載のシステム。

(項目77)

前記2つの発現強化座位が、配列番号1のヌクレオチド配列を備える座位と、配列番号2のヌクレオチド配列を備える座位を含む、項目76に記載のシステム。

(項目78)

(i) 項目51～77のいずれか1項に記載のシステムを提供すること、

(ii) 前記細胞内に、前記ベクターを、トランスフェクションにより導入すること、および、

(iii) 前記ベクター中の前記核酸が、前記R R S により介在される組み換えを介して前記第一および第二の発現強化座位内に統合されている、トランスフェクト細胞を選択すること、を含む方法。

(項目79)

(iv) 前記選択されたトランスフェクト細胞から前記抗原結合タンパク質を発現および取得すること、をさらに含む、項目78に記載の方法。

(項目80)

抗原結合タンパク質を作製する方法であって、項目1～23のいずれか1項に記載の細胞を提供すること、ならびに前記細胞から前記抗原結合タンパク質を発現および取得すること、を含む、方法。