

【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 1 2 N 15/85 (2006.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 P 21/08 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/85 Z N A Z

C 1 2 N 5/10

C 1 2 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

i i) 前記第一および第二の C H 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 (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 は異なっており、例えば、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、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 (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 の各々と異なっており、例えば、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、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 (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 は異なっており、必要に応じて、前記第一と第二の H C F は、

a) 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；または

b) 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 が互いに異なり；

例えば、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 と異なっており、結果として

a) 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；もしくは

b) 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 と異なっており、

必要に応じて、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、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 (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。

【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 1 1】

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 9 0 % 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 9 0 % 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 9 0 % 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 ~ 1 0 のいずれかに記載の細胞。

【請求項 1 2】

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 1 3】

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 (i i) 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

一の核酸内であり、前記第二の V L 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 L C F をコードするヌクレオチド配列は、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、前記第三の R R S と同一であり、前記 5' R R S は、前記第三の R R S および第四の R R S とは異なっているか、もしくは (i i) 前記 5' R R S は前記第四の R R S と同一であり、前記 3' R R S は、前記第三の R R S および第四の R R S 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 R R S は、前記第二および第四ベクターの内の 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；

i 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一の核酸内であり、前記第二の V L 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

i i i) 前記第一の L C F をコードするヌクレオチド配列が、前記第三ベクター上にあり、前記第二の V L 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 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) 前記第三ベクター上の前記 3' R R S は、前記第一の R R S と同一であり、前記第三ベクター上の前記 5' R R S は、前記第一および第二の R R S とは異なっているか、もしくは (i i) 前記第三ベクター上の前記 5' R R S は、前記第二の R R S と同一であり、前記第三ベクター上の前記 3' R R S は、前記第一および第二の R R S 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、もしくは (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；

e) 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、例えば、

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 つのアミノ酸で異なっている；もしくは

i i) 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；

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 R R S 、ならびに / もしく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、

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 (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－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、前記第二ベクターに含まれる前記残りの選択マーカ－遺伝子の 5' 末端に配置される；もしくは

i i i) 第一の H C F をコードするヌクレオチド配列が、第一の C H 3 ドメインをコードし、第二の H C F をコードするヌクレオチド配列が、第二の C H 3 ドメインをコードし、その結果、

a) 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る；もしくは

b) 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、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 H C F をコードするヌクレオチド配列および前記第一の L C F 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 C H O 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 1 4 に記載のシステム。

【請求項 1 6】

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、必要に応じて、前記第一および第二の L C F が同一であり、その結果、前記第二の L C F 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' 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、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、および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；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' R R S と第三ベクターの 3' R R S に隣接され、必要に応じて、前記第一ベクターの 5' R R S と 3' R R S はそれぞれ、前記第一の座位中の前記第一の R R S と第二の 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、前記第二ベクターの 5' R R S、および前記第二の座位中の前記第三の R R S と第四の R R S の間に存在する追加 R R S と同一であり、前記第二ベクターの 3' R R S は、前記第四の R R S と同一であり、その結果、前記第三ベクターの 3' R R S は、前記第三ベクター中に含まれる選択マーカ－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、前記第二ベクター中に含まれる選択マーカ－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 1 7 の (c) (i) に記載のシステム。

【請求項 1 7】

(i) 請求項 1 4 ~ 1 6 のいずれか 1 項に記載のシステムを提供すること、

(i i) 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、

(i i i) 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、を含む方法であって、必要に応じて、

(i v) 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 1 8】

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 1 1 に記載の細胞。

(項目 1 3)

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 1 4)

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 1 3 に記載の細胞。

(項目 1 5)

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 1 6)

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 1 5 に記載の細胞。

(項目 1 7)

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 1 5 に記載の細胞。

(項目 1 8)

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 1 6 または 1 7 に記載の細胞。

(項目 1 9)

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 1 8 に記載の細胞。

(項目 2 0)

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 1 8 に記載の細胞。

(項目 2 1)

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 2 0 に記載の細胞。

(項目 2 2)

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 2 3)

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 2 4)

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。

(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RRSをさらに備え、前記第一の追加RRSが、第一および第二のRRS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RRSをさらに備え、前記第二の追加RRSが、前記第三および第四のRRS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RRS、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RRSが、前記第一のRRSおよび第二のRRS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RRS、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RRSが、前記第三および第四のRRS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、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RRS、第一のHCF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RRSを備えた第一ベクター、

5'から3'の方向に、第三のRRS、第二のHC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RRS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LC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RRS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HCF、前記第二のHCF、および前記第一のLCFを備え、ならびに前記第一および第二のHCFが異なっている、ベクターセット。

(項目33)

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 3 5)

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 (i i) 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 とは異なっている、項目 3 2 に記載のベクターセット。

(項目 3 6)

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、項目 3 5 に記載のベクターセット。

(項目 3 7)

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る、項目 3 2 に記載のベクターセット。

(項目 3 8)

前記第一および第二の L C F が同一である、項目 3 7 に記載のベクターセット。

(項目 3 9)

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であり、前記第二の V L 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 3 8 に記載のベクターセット。

(項目 4 0)

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 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、前記第三の R R S と同一であり、前記 5 ' R R S は、前記第三の R R S 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 5 ' R R S は前記第四の R R S と同一であり、前記 3 ' R R S は、前記第三の R R S および第四の R R S とは異なっている、項目 3 9 に記載のベクターセット。

(項目 4 1)

前記第二および第四ベクターの間の前記共通 R R S は、前記第二および第四ベクターの内の 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、項目 4 0 に記載のベクターセット。

(項目 4 2)

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であり、前記第二の V L 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 3 8 に記載のベクターセット。

(項目 4 3)

前記第一の L C F をコードするヌクレオチド配列が、前記第三ベクター上にあり、前記第二の V L 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 3 8 に記載のベクターセット。

(項目 4 4)

前記第三ベクター上の第一の 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) 前記第三ベクター上の前記 3 ' R R S は、前記第一の R R S と同一であり、前記第三ベクター上の前記 5 ' R R S は、前記第一および第二の R R S とは異なっているか、または (i i) 前記第三ベクター上の前記 5 ' R R S は、前記第二の R R S と同一であり、前記第三ベクター上の前記 3 ' R R S は、前記第一および第二の R R S 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 7 4)

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 7 2 に記載のシステム。

(項目 7 5)

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 5 1 に記載のシステム。

(項目 7 6)

前記細胞が、C H O 細胞である、項目 5 1 に記載のシステム。

(項目 7 7)

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 7 6 に記載のシステム。

(項目 7 8)

(i) 項目 5 1 ~ 7 7 のいずれか 1 項に記載のシステムを提供すること、

(i i) 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、

(i i i) 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 7 9)

(i v) 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 7 8 に記載の方法。

(項目 8 0)

抗原結合タンパク質を作製する方法であって、項目 1 ~ 2 3 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。