

明 細 書

発明の名称：抗体の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、抗体の製造方法に関する。

背景技術

[0002] 遺伝子組換え技術を用いて医薬として有用な組換え抗体を生産する際に、哺乳動物細胞を用いると、原核細胞が行い得ないような複雑な翻訳後修飾やフォールディングが可能となるため、哺乳動物細胞は組換え抗体産生のための宿主細胞として多用されている。宿主細胞への遺伝子導入は、抗体産生遺伝子をプラスミドに組み込んで発現ベクターを作製し、発現ベクターを哺乳動物細胞に導入することにより行われる。

[0003] 抗体医薬は免疫グロブリン骨格を利用して作られる。免疫グロブリンには、IgG、IgM、IgD、IgE、IgAという5つの主要なクラスがあるが、これまでに承認されている抗体医薬は、ほぼ全てIgG由来の配列を持つ。IgG型抗体分子には、4つのポリペプチド鎖（2つのH鎖および2つのL鎖）が含まれる。これらのポリペプチド鎖は、非共有結合性の相互作用と鎖間の共有結合性ジスルフィド結合を組み合わせることによって、左右対称のY字型構造を形成する。IgG型抗体分子は γ 鎖として知られるH鎖を有する。L鎖は、 κ 鎖と λ 鎖の2種類のいずれかであり得る。

[0004] 組換え抗体を生産するための細胞を作製する際には、通常、その抗体のH鎖をコードするDNAを1コピーとL鎖をコードするDNAを1コピーずつ宿主細胞に導入する。これに対し、WO 2009/051108（特許文献1）には、組換え抗体のH鎖をコードするDNAを1コピーとL鎖をコードするDNAを2コピー含む発現ベクターを導入した宿主細胞を用いる抗体の製造方法が記載されている。

[0005] WO 2006/060769（特許文献2）には、ヘテロ2量体またはヘテロ多量体のタンパク質の生産のために、それぞれ異なるポリペプチド鎖をコードする2種類の発現ベクターを用いる方法が記載されている。タンパク質が免疫グロ

ブリンである場合、第1ベクターは重鎖（H鎖）をコードし、第2ベクターは軽鎖（L鎖）をコードする。最大の抗体生産性のために最適な重鎖プラスミドと軽鎖プラスミドの比を検討したことが記載されている。

[0006] IgG型抗体分子の基本構造は、2つの同一のH鎖および2つの同一のL鎖から構成され、両方のアーム上（F(ab)領域の先端部）で同じ結合特異性を有する、単一特異性の分子である。これに対し、近年、一つの抗体分子が複数の異なる標的に結合できるようにした多重特異性抗体が創出されている（例えば、W02006/109592（特許文献3））。多重特異性抗体には、二つの抗原に結合するバイスペシフィック抗体（bispecific antibody; BsAb；二重特異性抗体）や、さらに抗原結合部位を増やしたマルチスペシフィック抗体（多重特異性抗体）が含まれる。

[0007] 二重特異性抗体は、2つの異なる抗原特異性を有する。通常、IgG型二重特異性抗体には、2つの異なるH鎖および2つの異なるL鎖が含まれる。これらの4種類のポリペプチド鎖を細胞内で発現させると、H鎖とL鎖のランダムな会合により様々な異なる抗体種が生じるため、所望の組み合わせの他に9種類の不純抗体が形成され得る。不純抗体の形成は、所望の二重特異性抗体の収率を低下させるのみにとどまらない。形成された10種の抗体間の特性の類似性から、抗体医薬製造に用いられる通常的手法では不純抗体の分離除去が困難であることも、工業製造上の大きな問題となる。

[0008] 二重特異性抗体のH鎖またはL鎖を共通化する場合には、発現産物の組み合わせは3通り（2種の単一特異性抗体および1種の二重特異性抗体）となるので、収率の向上が可能となる。目的とする二重特異性抗体の収率をさらに向上させ、且つ高純度に精製する技術が求められている。

[0009] WO 2016/146594（特許文献4）には、共通H鎖による二重特異性抗体を抗体の混合物から精製する方法が記載されている。この二重特異性抗体は、単一のH鎖と2つの異なるL鎖から構築される。抗体産生用の宿主細胞は、共通H鎖をコードするDNAと、第一のL鎖をコードするDNAと、第二のL鎖をコードするDNAを1つずつ含む発現ベクター（3遺伝子発現ベクター）で形質転換される

。

- [0010] Transient and Stable CHO Expression, Purification and Characterization of Novel Hetero-Dimeric Bispecific IgG Antibodies: Biotechnol. Prog., 2017, Vol. 33, No. 2, P469-477 (非特許文献1) には、CHO細胞で単一のプラスミドベクターを用いて所定の二重特異性抗体を産生するために、共通L鎖60%、各H鎖が20%ずつという比率が最適であったことが記載されている。
- [0011] Optimizing assembly and production of native bispecific antibodies by codon de-optimization MABS 2017, VOL. 9, NO. 2, P231-P2397 (非特許文献2) には、共通H鎖を用いた二重特異性抗体の作製において、コドンの最適化によって発現の悪いアームの発現量を増やしても、目的の二重特異性抗体の収率が向上しなかった旨が記載されている。
- [0012] Tuning Relative Polypeptide Expression to Optimize Assembly, Yield and Downstream Processing of Bispecific Antibodies ; Antibodies 2018, 7, 29 (非特許文献3) には、共通H鎖を用いた二重特異性抗体の作製において、L鎖の比率を様々に変化させてみたことが記載されている。

先行技術文献

特許文献

- [0013] 特許文献1 : WO 2009/051108 (特許第4976502号)
特許文献2 : WO 2006/060769 (特表2008-522589)
特許文献3 : WO 2006/109592 (特許第4917024号)
特許文献4 : WO 2016/146594 (特許第6894843号)

非特許文献

- [0014] 非特許文献1 : Transient and Stable CHO Expression, Purification and Characterization of Novel Hetero-Dimeric Bispecific IgG Antibodies: Biotechnol. Prog., 2017, Vol. 33, No. 2, P469-477
非特許文献2 : Optimizing assembly and production of native bispecific antibodies by codon de-optimization MABS 2017, VOL. 9, NO. 2, P231-P2

397

非特許文献3: Tuning Relative Polypeptide Expression to Optimize Assembly, Yield and Downstream Processing of Bispecific Antibodies ; Antibodies 2018, 7, 29

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0015] 本発明は、生産効率の高い二重特異性抗体の製造方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0016] 本発明者らは、共通L鎖を有する二重特異性抗体の作製において、二種類の発現ベクターを用いることにより目的の二重特異性抗体であるヘテロ体の産生量と選択性が向上することを見出し、本発明を完成した。

[0017] すなわち、本発明は、二重特異性抗体のような多重特異性結合分子を産生するために二種類の組み換えベクターで宿主細胞を形質転換して細胞株を構築すること、並びに得られた細胞株を用いて、目的とする組み合わせのポリペプチド鎖で構成される多重特異性結合分子を製造することに関する。より具体的には、本発明を以下のように表現することができる。

[0018] (1) 多重特異性結合分子を産生する細胞の作製方法であって、細胞に第一のベクターと第二のベクターを導入する工程を含み、第一のベクターは多重特異性結合分子を構成するすべてのポリペプチド鎖の遺伝子を含み、第二のベクターは発現が低いポリペプチド鎖の遺伝子を含むことを特徴とする細胞の作製方法。

[0019] (2) 前記多重特異性結合分子が抗原結合分子または抗体であり、多重特異性抗原結合分子または抗体は共通L鎖または共通H鎖を有する二重特異性抗体であってもよく、二重特異性抗体はH鎖またはL鎖が共通化されたIgG型抗体であってもよい、(1)の作製方法。

[0020] (3) 共通L鎖を有する二重特異性抗体を産生する細胞の作製方法であって、細胞に第一のベクターと第二のベクターを導入する工程を含み、第一のベク

ターは二重特異性抗体を構成するすべてのポリペプチド鎖の遺伝子を含み、第二のベクターは二重特異性抗体の発現が低いポリペプチド鎖の遺伝子を含むことを特徴とする細胞の作製方法。

- [0021] (4) 発現が低いポリペプチド鎖が2種類の異なるH鎖のうち的一方であり、第二のベクターが当該H鎖をコードする核酸配列および共通L鎖をコードする核酸配列を含む、(3)の作製方法。
- [0022] (5) 第二のベクターが、L鎖のポリペプチドをコードする核酸配列をH鎖のポリペプチドをコードする核酸配列よりも多く含むことを特徴とする、(4)の作製方法。
- [0023] (6) 第一のベクターが、第一のH鎖をコードする核酸配列と、第二のH鎖をコードする核酸配列と、共通L鎖をコードする核酸配列とを、1 : 1 : 1の比率または1 : 1 : 2の比率で含み、第二のベクターが、発現が低い方のH鎖をコードする核酸配列と共通L鎖をコードする核酸配列を1 : 2の比率で含む、(5)の作製方法。
- [0024] (7) 第一のベクターが、第一のH鎖をコードする核酸配列を1コピー、第二のH鎖をコードする核酸配列を1コピー、共通L鎖をコードする核酸配列を1または2コピー含み、第二のベクターが、発現が低い方のH鎖(第一または第二のH鎖のいずれか)をコードする核酸配列を1コピー、共通L鎖をコードする核酸配列を2コピー以上含む、(4)の作製方法。
- [0025] (8) 抗原結合分子を産生する細胞であって、細胞は第一のベクターと第二のベクターを含み、第一のベクターは抗原結合分子を構成するすべてのポリペプチド鎖の遺伝子を含み、第二のベクターは発現が低いポリペプチド鎖の遺伝子を含み、抗原結合分子は多重特異性であってもよく、H鎖またはL鎖が共通化された二重特異性抗体であってもよい、前記細胞。
- [0026] (9) 共通L鎖を有する二重特異性抗体を産生する細胞であって、細胞は第一のベクターと第二のベクターを含み、第一のベクターは二重特異性抗体を構成するすべてのポリペプチド鎖の遺伝子を含み、第二のベクターは二重特異性抗体の発現が低いポリペプチド鎖の遺伝子を含む、前記細胞。

- [0027] (10) 第二のベクターが、発現が低い方のH鎖の遺伝子を含み、さらに共通L鎖の遺伝子を含み、第二のベクターは、共通L鎖の遺伝子をH鎖の遺伝子よりも多いコピー数で含んでいてもよい、(9)の細胞。
- [0028] (11) 第一のベクターが、第一のH鎖の遺伝子を1コピー、第二のH鎖の遺伝子を1コピー、共通L鎖の遺伝子を1または2コピー含み、第二のベクターが、発現が低い方のH鎖の遺伝子を1コピー、共通L鎖の遺伝子を2コピー以上含む、(9)に記載の細胞。
- [0029] (12) 上述の(1)から(11)のいずれかの細胞を用いた抗原結合分子または二重特異性抗体の製造方法。
- [0030] (13) 細胞が抗FIX(a)/FX二重特異性抗体を産生する、例えばエミシズマブを産生する、上述の細胞の作製方法、細胞、または製造方法。
- [0031] (14) 細胞が動物細胞であり、例えば哺乳動物細胞であり、好ましくはCHO細胞である、上述の細胞の作製方法、細胞、または製造方法。
- [0032] (15) 上述の方法で製造された抗原結合分子または二重特異性抗体を含有する医薬品を製造する方法。
- [0033] 上述の細胞の作製方法において、方法が、共通L鎖を有する二重特異性抗体を産生する細胞を作製する方法である場合、「発現が低いポリペプチド」は、H鎖がホモである2種類の単一特異性抗体（すなわち、不純抗体）のうち、発現量が少ない単一特異性抗体を構成するポリペプチドである。
- [0034] 上述の細胞の作製方法は、第一のベクターと第二のベクターを細胞に導入した後に、さらに、目的遺伝子が高発現するクローンを選抜する選抜工程を含む方法であってもよい。
- [0035] 上述の抗原結合分子または二重特異性抗体の製造方法は、上述の細胞の作製方法により得られたクローン細胞（すなわち、目的の抗原結合分子または二重特異性抗体の産生株）を培養する培養工程を含む。さらに、本発明における抗原結合分子または二重特異性抗体の産生方法は、クローン細胞の培養工程によって得られた培養物から目的の抗原結合分子または二重特異性抗体を精製する精製工程を含む方法であってもよい。

[0036] 本発明は、上述の細胞の作製方法によって得られた形質転換細胞も包含する。形質転換細胞は、上述の第一のベクターと第二のベクターを含む。例えば、共通L鎖を有する二重特異性抗体を産生するように形質転換された細胞は、第一のベクターと第二のベクターを含み、第一のベクターは二重特異性抗体を構成するすべてのポリペプチド鎖をコードする外来DNAを含む発現ベクターであり、第二のベクターは二重特異性抗体の発現が低いポリペプチド鎖をコードする外来DNAを含む発現ベクターであり、第二のベクターはさらに別のポリペプチド鎖をコードする外来DNAを含んでいてもよい。

発明の効果

[0037] 本発明により、二重特異性抗体の発現量を増やしつつ、不純抗体である2種の単一特異性抗体の発現量も均衡するため、精製時の取り扱いも容易となる。本発明を用いて二重特異性抗体の製造に適した細胞を作製し、抗体医薬品製造のための生産効率の高い細胞株として樹立することができる。

図面の簡単な説明

[0038] [図1]3種類それぞれのプラスミドにおける各鎖配置の模式図を示す。
[図2]3種類それぞれのプラスミドを導入した細胞プールのヘテロ体産生割合を示す。

発明を実施するための形態

[0039] 1. 多重特異性結合分子

多重特異性結合分子とは、2つ以上の複数の異なる標的と結合することができる分子である。多重特異性結合分子は、異なる標的を認識する標的結合部位をそれぞれ含む異なるポリペプチド鎖を含む。多重特異性結合分子の例として、2種類のポリペプチド鎖、3種類のポリペプチド鎖、4種類のポリペプチド鎖、またはそれ以上の数の複数種のポリペプチド鎖を含むタンパク質分子が挙げられる。

[0040] 多重特異性結合分子の例には、抗原結合分子が含まれる。一つの抗原結合分子は、複数のポリペプチド鎖から構成される。多重特異性結合分子は、第一の抗原を認識する第一の抗原結合部位と、第二の抗原を認識する第二の抗

原結合部位と、を少なくとも有する多重特異性抗原結合分子であることができる。好ましい多重特異性抗原結合分子として、少なくとも2つの異なる抗原に特異的に結合することができる多重特異性抗体を挙げることができる。多重特異性抗体は、第一の抗原結合部位と第二の抗原結合部位と、場合により第三の抗原結合部位と、を含み得る。

[0041] 本発明において、「異なる抗原」とは必ずしも抗原自体が異なる必要はなく、エピトープが異なる場合等も「異なる抗原」に含まれる。従って、例えば、単一分子内の異なるエピトープも「異なる抗原」に含まれる。

[0042] 本発明における好ましい多重特異性抗体として、2つの異なる抗原に対して特異的に結合することができる二重特異性抗体（二種特異性抗体と呼ばれる場合もある）を挙げることができる。

[0043] 二重特異性抗体は、例えば、2つの異なるH鎖（重鎖）および2つの異なるL鎖（軽鎖）、すなわち4種類のポリペプチド鎖、から構成されるIgG型抗体分子であることができる。あるいは、二重特異性抗体は、例えば、H鎖またはL鎖が共通化されたIgG型抗体分子であることができる。

[0044] 本発明の一態様において、二重特異性抗体のL鎖は、異なるものであっても良いが、共通のL鎖（「共通L鎖」と称する）を有していることが好ましい。「共通L鎖」は、異なる2種以上のH鎖と会合し、それぞれの抗原に対して結合能を示し得る。ここで、「異なるH鎖」とは、好ましくは異なる抗原に対する抗体のH鎖を指すが、それに限定されず、アミノ酸配列が互いに異なっているH鎖を意味する。共通L鎖は、例えばW02006/109592（特許文献3）に記載の方法に従って取得することができる。

[0045] 二重特異性抗体は、2つの異なる抗原に対して特異性を有する免疫グロブリン分子である。抗体を構成するポリペプチド鎖の由来は特に限定されず、ヒト、マウス、ラットなどに由来することができ、異なる動物種由来のH鎖とL鎖が共存していてもよい。各ポリペプチド鎖が、遺伝子組換え技術を用いてキメラ状態に改変されていてもよく、合成された免疫グロブリン鎖であってもよい。一態様において、本発明における二重特異性抗体は、遺伝子組換え

技術を用いて改変された抗体である。一態様において、本発明における二重特異性抗体は、天然型抗体である。本発明における二重特異性抗体は、IgG型の全長抗体であることが好ましい。

[0046] 「全長抗体」、「完全抗体」、および「全部抗体」は、本明細書では相互に交換可能に用いられ、天然型抗体構造に実質的に類似した構造を有する抗体のことをいう。全長抗体は、Fc領域を含む重鎖を有する。

[0047] 天然型抗体は、天然に生じる様々な構造を伴う免疫グロブリン分子のことをいう。一般的な例として、天然型IgG抗体は、ジスルフィド結合している2つの同一の軽鎖（L鎖）と2つの同一の重鎖（H鎖）から構成される約150,000ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。N末端からC末端に向かって、各重鎖は、可変重鎖ドメインまたは重鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域（VH）を有し、それに3つの定常ドメイン（CH1、CH2、およびCH3）が続く。同様に、N末端からC末端に向かって、各軽鎖は、可変軽鎖ドメインまたは軽鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域（VL）を有し、それに定常軽鎖（CL）ドメインが続く。抗体の軽鎖は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ（ κ ）およびラムダ（ λ ）と呼ばれる、2つのタイプの1つに帰属させられてよい。2つの同一の軽鎖（L鎖）と2つの同一の重鎖（H鎖）から構成される天然型IgG抗体は、単一特異性の分子であり、本発明における「多重特異性結合分子」ではない。

[0048] 2. 多重特異性結合分子を産生する細胞株の構築

本発明は、2つのベクターを用いる、多重特異性結合分子を産生する細胞の作製方法を提供する。該方法は、細胞に第一のベクターと第二のベクターを導入する工程を含み、第一のベクターは多重特異性結合分子を構成するすべてのポリペプチド鎖の遺伝子を含み、第二のベクターは発現が低いポリペプチド鎖の遺伝子を含む。

[0049] 本発明において、「発現が低いポリペプチド鎖」とは、同一の細胞に多重特異性結合分子を構成する複数のポリペプチド鎖の遺伝子が導入されたとき、他のポリペプチド鎖と比べて発現量が少ないポリペプチド鎖である。例え

ば、共通L鎖を有する二重特異性抗体においては所望の二重特異性抗体以外に形成される、同一のポリペプチド鎖同士（すなわと、同一のH鎖同士と共通L鎖）により会合されたホモ抗体の量を比較することにより発現が低いポリペプチド鎖が確認（identify）できる。共通L鎖を有する二重特異性抗体の場合、第二のベクターは、発現が低いH鎖および共通L鎖をコードする遺伝子を含むベクターである。

[0050] 用語「ベクター」は、それが連結されたもう1つの核酸を増やすことができる核酸分子のことをいう。この用語は、一般的に、自己複製核酸構造としてのベクター、および、それが導入された宿主細胞のゲノム中に組み入れられるベクターを含む。あるベクターは、自身が作動可能に連結された遺伝子核酸の発現をもたらすことができる。そのようなベクターは、「発現ベクター」とも称される。

[0051] 本発明において、ポリペプチド鎖の遺伝子を含むベクターとは、当該ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む発現ベクターである。そのようなベクターを任意の適当な宿主細胞と接触させることにより、目的のポリペプチドをコードする外来遺伝子が導入されて、細胞は当該ポリペプチドを産生可能な形質転換細胞となる。

[0052] 細胞が各ベクターに含まれる遺伝子によってコードされるポリペプチドを発現するように、細胞とベクターを接触させるために、任意の適当な方法を用いることができる。細胞が特定のポリペプチドを発現するように改変されるように、細胞を接触させる方法は、当該分野において周知である。細胞を接触させる適当な方法には、例えば、ウイルスベクターでの感染、塩化カルシウム法、リポフェクション試薬、カチオン性ポリマー、DEAE、又はリン酸カルシウムを用いるトランスフェクション、及びエレクトロポレーションが含まれる。宿主細胞とベクターを接触させることにより、ベクターが宿主細胞へと導入される。

[0053] 細胞と、2つのベクターを接触させて、これらのベクターを細胞に導入する工程において、接触させる順番は任意である。細胞と2つのベクターを接

触させるために、細胞を、逐次方式（例えば、第一のベクターの後に第二のベクターを細胞と接触させる、または第一のベクターの前に第二のベクターを細胞と接触させる）で、第一のベクター及び第二のベクターと接触させても、あるいは、細胞を第一のベクター及び第二のベクターと同時に接触させてもよい。

[0054] 本発明において、多重特異性結合分子であるタンパク質を産生する目的のためにベクターと接触させる細胞、すなわち、多重特異性結合分子を構成するポリペプチド鎖の遺伝子が導入されて、当該多重特異性結合分子を産生する宿主細胞株となる細胞の由来は特に限定されない。細胞は接着細胞又は浮遊細胞（すなわち、懸濁液中で増殖する細胞）であり得る。細菌、糸状菌または酵母などの真核性の微生物、多細胞生物（無脊椎生物および脊椎生物）に由来する細胞のいずれも、宿主細胞として使用可能である。無脊椎生物細胞の例は、植物および昆虫細胞を含む。

[0055] 本発明において、脊椎動物細胞は、宿主として好適に使用できる。例えば、浮遊状態で増殖するように適応された哺乳動物細胞株は、有用であろう。タンパク質産生のための細胞株構築に好適な哺乳動物細胞は、当該分野において公知であり、SV40で形質転換されたサル腎CV1株(COS-7)；ヒト胎児性腎株 (Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)などに記載の293細胞)；仔ハムスター腎細胞(BHK)；マウスセルトリ細胞 (Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)などに記載のTM4細胞)；サル腎細胞(CV1)；アフリカミドリザル腎細胞(VERO-76)；ヒト子宮頸部癌細胞(HELA)；イヌ腎細胞(MDCK)；Buffalo系ラット肝細胞(BRL 3A)；ヒト肺細胞(W138)；ヒト肝細胞(Hep G2)；マウス乳癌(MMT 060562)；TRI細胞（例えば、Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)に記載）；MRC5細胞；および、FS4細胞などが挙げられる。他の有用な哺乳動物宿主細胞株は、DHFR- CHO細胞(Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980))を含むチャイニーズハムスター卵巢 (CHO) 細胞；およびY0、NS0、およびSp2/0などの骨髓腫細胞株を含む。抗体産生に好適な特定の哺乳動物宿主細胞株の総説として、例えば、Yaz

aki and Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003) を参照できる。

[0056] IgG全長の骨格を持つ抗体医薬品の製造のための好適な宿主細胞の例として、上述のヒト細胞またはヒト以外の哺乳動物の細胞が挙げられる。他方、組換え発現ベクターを増幅又は複製する（クローニングする）目的のために用いる宿主細胞としては、原核細胞（例えば、大腸菌）が好適に使用される。

[0057] 用語「宿主細胞」、「宿主細胞株」、および「宿主細胞培養物」は、相互に交換可能に用いられ、外来核酸を導入された細胞（そのような細胞の子孫を含む）のことをいう。宿主細胞は「形質転換体」および「形質転換細胞」を含み、これには初代の形質転換細胞および継代数によらずその細胞に由来する子孫を含む。子孫は、親細胞と核酸の内容において完全に同一でなくてもよく、変異を含んでいてもよい。宿主細胞には、オリジナルの形質転換細胞がスクリーニングされたまたは選択された際に用いられたものと同じ機能または生物学的活性を有する変異体子孫も含まれる。

[0058] 一般的に、組換え抗体は、それをコードするDNAをハイブリドーマ、または抗体を産生する感作リンパ球等の抗体産生細胞からクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主細胞に導入し産生させることにより得ることができる。IgG型二重特異性抗体は、目的の2種のIgGを構成するL鎖及びH鎖の遺伝子、合計4種の遺伝子を細胞に導入して共発現させることによって産生することが出来る。二重特異性抗体が共通のL鎖を有する場合、この共通L鎖と両H鎖遺伝子、合計3種の遺伝子を細胞に導入することによってIgGを発現させることで、二重特異性IgGの発現が可能となる。

[0059] 共通L鎖と両H鎖の発現量が等しいと仮定すれば、第一のH鎖をコードするDNAと、第二のH鎖をコードするDNAと、共通L鎖をコードするDNAを、1 : 1 : 2の比率で含むベクターを用いる場合、そのままの比率で発現した3種のポリペプチド鎖が会合することにより、目的の（すなわち、H鎖がヘテロである）二重特異性IgGが50%、同一H鎖が会合した単一特異性IgGが各25%の比率で得られる筈である。しかしながら、二重特異性抗体を構成する全てのポリ

ペプチド鎖が同レベルで発現しない場合もある。例えば、2種のH鎖のうち一方の発現量が、もう一方のH鎖の発現量よりも少ないことにより、2種類のホモ体の産生量が異なることがある。

[0060] 一態様において、本発明は、共通L鎖を有する二重特異性抗体を産生する細胞の新規な作製方法を提供する。該方法は、細胞に第一のベクターと第二のベクターを導入する工程を含む。第一のベクターは二重特異性抗体を構成する全てのポリペプチド鎖の遺伝子を含むベクターである。したがって、第一のベクターは二重特異性抗体の、第一のH鎖と、第二のH鎖と、共通L鎖とをそれぞれコードする3つの遺伝子を全て含む。例えば、第一のベクターは、二重特異性抗体の、第一のH鎖と、第二のH鎖と、共通L鎖とをそれぞれコードする3つの遺伝子のコピー数を、例えば1 : 1 : 1の比率で、または1 : 1 : 2の比率で、含む。例えば、第一のベクターは、第一のH鎖の遺伝子を1コピー、第二のH鎖の遺伝子を1コピー、および共通L鎖の遺伝子を1コピーまたは2コピー含む。第二のベクターは二重特異性抗体の発現が低いポリペプチドの遺伝子を含むベクターである。共通L鎖を有する二重特異性抗体を構成するポリペプチドのうち、発現が低いポリペプチドは、第一のH鎖または第二のH鎖の何れかであり得る。したがって、第二のベクターは、第一のH鎖または第二のH鎖の何れか一方をコードする遺伝子を含む。

[0061] 必要に応じて、第二のベクターは、さらに共通L鎖をコードする遺伝子を含んでいてもよい。第二のベクターは、共通L鎖をコードする遺伝子を、H鎖をコードする遺伝子よりも多く含んでいてもよい。例えば、第二のベクターは、第一のH鎖または第二の何れかのH鎖をコードする遺伝子と、共通L鎖をコードする遺伝子のコピー数を、1 : 1の比率で、または1 : 2の比率で含むことができる。例えば、第二のベクターは、発現量が少ない方のH鎖の遺伝子を1コピー、および共通L鎖の遺伝子を1コピーまたは2コピーまたは2以上のコピー数で含むことができる。

[0062] 本発明の一態様において、共通L鎖を有する二重特異性抗体を産生する細胞は、第一のベクターと第二のベクターで形質転換されており、第一のベクタ

ーは二重特異性抗体を構成する全てのポリペプチド鎖をコードするベクターであり、第二のベクターは、L鎖のポリペプチドをコードする核酸配列をH鎖のポリペプチドをコードする核酸配列よりも多く含むことができる。例えば、第二のベクターは、何れかのH鎖をコードする遺伝子を1コピーと、共通L鎖をコードする遺伝子を2コピーまたは2以上のコピー数で含むことができる。

[0063] 本発明において、共通L鎖を有する二重特異性抗体を産生する細胞は、医薬品として使用される組換えタンパク質の製造に適した細胞であることが好ましい。組換えタンパク質産生のための細胞株構築に好適な哺乳動物細胞については、既に説明したとおりである。

[0064] 本発明において、多重特異性結合分子または二重特異性抗体を産生する細胞を作製するために用いられる2つのベクター（すなわち、第一のベクターと第二のベクター）は、例えば、プラスミドベクターまたはウイルスベクターであることができる。本発明において、例えば、ベクターは、必要に応じて、転写及び翻訳の開始及び終結コドンのような（宿主に応じた）制御配列、適切なプロモーター、外来遺伝子が導入された宿主の選抜を可能とするマーカー遺伝子等を含み得る。さらに、例えば、ベクターは、細胞外環境への抗体の分泌を促進する抗体シグナル配列を含み得る。本発明において、例えば、ベクターは、一過性発現または安定発現を目的として設計され得る。当業者であれば、組換え発現ベクターの構築は、目的に応じて、公知の標準的な技術を用いて適宜実施することができるであろう。

[0065] 本発明において、第一のベクターと第二のベクターは、独立に任意のタイプのベクターであり得る。第一のベクターと第二のベクターは、同一の制御配列、適切なプロモーター、マーカー遺伝子等を有するが、そこに含まれる組換えポリペプチドコード配列のみが異なっているもよい。

[0066] 本発明において使用できるベクターについて、さらに具体的に説明する。例えば、大腸菌を宿主とする場合には、ベクターを大腸菌（例えば、JM109、DH5 α 、HB101、XL1Blue）などで大量に増幅させ大量調製するために、大腸菌

で増幅されるための「ori」をもち、さらに形質転換された大腸菌の選抜遺伝子（例えば、なんらかの薬剤（アンピシリンやテトラサイクリン、カナマイシン、クロラムフェニコール）により判別できるような薬剤耐性遺伝子）を有することが好ましい。ベクターの例としては、M13系ベクター、pUC系ベクター、pBR322、pBluescript、pCR-Scriptなどが挙げられる。また、cDNAのサブクローニング、切り出しを目的とした場合、上記ベクターの他に、例えば、pGEM-T、pDIRECT、pT7などが挙げられる。

[0067] 多重特異性結合分子または二重特異性抗体を生産する目的においてベクターを使用する場合には、特に、発現ベクターが有用である。発現ベクターとしては、例えば、大腸菌での発現を目的とした場合は、ベクターが大腸菌で増幅されるような上記特徴を持つほかに、宿主をJM109、DH5 α 、HB101、XL1-Blueなどの大腸菌とした場合においては、大腸菌で効率よく発現できるようなプロモーター、例えば、lacZプロモーター（Wardら, Nature (1989) 341, 544-546 ; FASEB J. (1992) 6, 2422-2427）、araBプロモーター（Betterら, Science (1988) 240, 1041-1043）、またはT7プロモーターなどを持っていることが好ましい。このようなベクターとしては、上記ベクターの他にpGEX-5X-1（Pharmacia社製）、「QIAexpress system」（Qiagen社製）、pEGFP、またはpET（この場合、宿主はT7 RNAポリメラーゼを発現しているBL21が好ましい）などが挙げられる。

[0068] ベクターには、ポリペプチド分泌のためのシグナル配列が含まれていてもよい。ポリペプチド分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに産生させる場合、pelBシグナル配列（Lei, S. P. et al J. Bacteriol. (1987) 169, 4379）を使用すればよい。

[0069] 大腸菌を宿主とする場合以外にも、例えば、本発明の方法で利用できるベクターとしては、哺乳動物由来の発現ベクター（例えば、pcDNA3（Invitrogen社製）や、pEGF-BOS（Nucleic Acids. Res.1990, 18(17),p5322）、pEF、pCDM8やINPEP4(Biogen-IDEC社製))、昆虫細胞由来の発現ベクター（例えば「Bac-to-BAC baculovirus expression system」（GIBCO BRL社製）、pBacPAK8

）、植物由来の発現ベクター（例えばpMH1、pMH2）、動物ウイルス由来の発現ベクター（例えば、pHSV、pMV、pAdexLcw）、レトロウイルス由来の発現ベクター（例えば、pZIpneo）、酵母由来の発現ベクター（例えば、「Pichia Expression Kit」（Invitrogen社製）、pNV11、SP-Q01）、枯草菌由来の発現ベクター（例えば、pPL608、pKTH50）などが挙げられる。

[0070] CHO細胞、COS細胞、NIH3T3細胞等の動物細胞での発現を目的とした場合には、細胞内で発現させるために必要なプロモーター、例えばSV40プロモーター（Mulliganら、Nature（1979）277, 108）、MMLV-LTRプロモーター、EF1 α プロモーター（Mizushimaら、Nucleic Acids Res.（1990）18, 5322）、CMVプロモーター（Niwaら、Gene.（1991）108, 193）、マウス β グロビンプロモーター（mBGP）、CAGプロモーター（Niwaら、Gene.（1991）108, 193, Miyazakiら、Gene（1989）79, 269）などを持っていることが好ましく、細胞への形質転換を選抜するための遺伝子（例えば、薬剤（ネオマイシン、G418など）により判別できるような薬剤耐性遺伝子）を有すればさらに好ましい。このような特性を有するベクターとしては、例えば、pMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV、pOP13などが挙げられる。polyAを持つmRNAは細胞内で安定する事が知られており、polyAを遺伝子に付加させるために必要なポリAシグナル、例えばマウス β グロビンpolyAシグナル、ウシ成長ホルモンpolyAシグナル（rBG-pA）、SV40 polyAシグナルなどを持っていることが好ましい。

[0071] 本発明の一態様において、CHO細胞での発現のために、ネオマイシン耐性遺伝子、CAGプロモーターと rBG-pA等が好適に使用され得る。CHO細胞を用いて造られた組換えタンパク質は医薬品として使用できる安全性が確認されており、現在、一般的な手法となっている。本発明を用いて医薬品の有効成分としての二重特異性抗体を製造する場合の好ましい一態様は、CHO細胞を用いた組換えタンパク質発現系である。

[0072] 細胞内に遺伝子を送達する手段は当分野で周知であり、宿主として使用する細胞に合わせて適宜選択すればよく、市販の遺伝子導入システムを用いてもよい。ベクターを哺乳動物細胞に導入する方法としては、エレクトロポレ

ーション、リポフェクション等のトランスフェクション試薬を用いる方法、ウイルスベクターを用いる方法等が挙げられる。外来遺伝子を哺乳動物細胞のホストゲノムへ挿入する方法としては、ランダムインテグレーション、Targeted Integration（配列特異的な組換え酵素であるリコンビナーゼを用いた部位特異的遺伝子挿入）、トランスポゾンベクター、部位特異的ヌクレアーゼを用いる方法等が挙げられる。ホストゲノムの特定の位置への部位特異的遺伝子導入法は、目的のタンパク質の生産量や継代安定性が優れた細胞を効率よく取得する方法として期待されている。

[0073] 本発明の細胞は、一過性発現系(Transient Expression)で抗原結合分子（抗体）が発現されていてもよいし、恒常的発現系(Stable Expression)で発現されていてもよいが、恒常的発現系で発現されているものが好ましい。

[0074] 一過性発現系とは、環状プラスミドをリン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法、リポフェクション法などにより細胞内に取り込ませ発現させる方法である。環状プラスミドは染色体に挿入される効率が低く、目的遺伝子が染色体外に存在する事が多い。このため環状プラスミドからの目的遺伝子の発現は長期間維持することが難しい。

[0075] 恒常的発現系とは、制限酵素処理などにより作成した直鎖上プラスミドをリン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法、リポフェクション法などにより細胞内に取り込ませ発現させる方法である。直鎖状プラスミドは環状プラスミドより染色体に挿入される効率がよく、目的遺伝子が染色体上に維持される効率も高くなる。このため目的遺伝子の発現を長期間維持することが可能である。またプラスミドへの薬剤耐性遺伝子の導入を行えば薬剤選抜が可能となり、目的遺伝子が染色体上に維持された細胞を効率的に選択することが出来るようになる。恒常的発現系で用いる動物細胞としては、CHO細胞、NS0細胞、SP2/0細胞などが挙げられ、CHO細胞が好ましい。

[0076] さらに、遺伝子を安定的に発現させ、かつ、細胞内での遺伝子のコピー数の増幅を目的とする場合には、核酸合成経路を欠損したCHO細胞にそれを相補するDHFR遺伝子を有するベクター（例えば、pCHOIなど）を導入し、メトトレ

キセート (MTX) により増幅させる方法が挙げられ、また、遺伝子の一過性の発現を目的とする場合には、SV40 T抗原を発現する遺伝子を染色体上に持つCOS細胞を用いてSV40の複製起点を持つベクター (pcDなど) で形質転換する方法が挙げられる。複製開始点としては、また、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、ウシパピローマウィルス (BPV) 等の由来のものを用いることもできる。さらに、宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは選択マーカーとして、アミノグリコシドトランスフェラーゼ (APH) 遺伝子、チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子、大腸菌キサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Ecogpt) 遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素 (dhfr) 遺伝子等を含むことができる。

[0077] 3. 抗原結合分子の産生 (培養工程)

本発明は、さらに、上述した多重特異性結合分子を産生する細胞または共通L鎖を有する二重特異性抗体を産生する細胞を用いて、目的の抗原結合分子を製造する方法を提供する。

[0078] 抗原結合分子の製造は、上述の細胞を、抗体の産生に適した条件で培養することにより、行うことができる。細胞培養の方法は当該分野において公知である。細胞が培養される条件は、細胞のタイプによって変わる。該条件には、環境の温度、細胞を含む培養容器、細胞培養雰囲気又は環境を構成する、様々なガス (例えば、CO₂) の組成、培地、細胞密度、培地を新しい培地に交換するスケジュールなどが含まれる。これらのパラメータは当該分野においては公知であるか、経験的に決定されうる。例えば、細胞に接触させたベクターによりコードされるポリペプチドを細胞が発現する (及び、場合によっては、分泌する) ように、細胞を培地中で培養するための任意の方法を用いることができる。

[0079] 細胞の培養には、通常の細胞 (好ましくは、動物細胞) 培養で使用されている培地を用いることができる。例えば、動物細胞の培養液として、例えば、DMEM、MEM、RPMI1640、IMDMを使用することができる。市販の動物細胞培養用培地、例えば、D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)、D-MEM/F-12

1:1 Mixture (Dulbecco's Modified Eagle Medium : Nutrient Mixture F-12)、RPMI1640、CHO-S-SFM II(Invitrogen社)、CHO-SF (Sigma-Aldrich社)、EX-CELL 301 (JRH biosciences社)、CD-CHO (Invitrogen社)、IS CHO-V (Irvin e Scientific社)、PF-ACF-CHO (Sigma-Aldrich社)などの培地を用いることもできる。これらの培地に、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできるし、無血清培養してもよい。

[0080] 培地は、通常、アミノ酸、ビタミン類、脂質因子、エネルギー源、浸透圧調節剤、鉄源、pH緩衝剤、さらに場合により、例えば、微量金属元素、界面活性剤、増殖補助因子、ヌクレオシドなどを含む。これらの成分の含量は、通常、アミノ酸は0.05-1500mg/L、ビタミン類は0.001-10mg/L、脂質因子は0-200mg/L、エネルギー源は1-20g/L、浸透圧調節剤は0.1-10000mg/L、鉄源は0.1-500mg/L、pH緩衝剤は1-10000mg/L、微量金属元素は0.00001-200mg/L、界面活性剤は0-5000mg/L、増殖補助因子は0.05-10000 μ g/Lおよびヌクレオシドは0.001-50mg/Lの範囲が適当であるが、これらに限定されず、培養する細胞の種類、目的の抗原結合分子の種類などにより適宜決定できる。

[0081] さらに具体的には、例えば、L-アラニン、L-アルギニン、L-アスパラギン、L-アスパラギン酸、L-システイン、L-シスチン、L-グルタミン、L-グルタミン酸、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン、L-メチオニン、L-オルニチン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン等、好ましくはL-アラニン、L-アルギニン、L-アスパラギン、L-アスパラギン酸、L-シスチン、L-グルタミン、L-グルタミン酸、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン等のアミノ酸類； γ -イノシトール、ビオチン、葉酸、リボ酸、ニコチンアミド、ニコチン酸、p-アミノ安息香酸、パントテン酸カルシウム、塩酸ピリドキサル、塩酸ピリドキシン、リボフラビン、塩酸チアミン、ビタミンB12、アスコルビン酸等、好ましくはビオチン、葉酸、リボ酸、ニコチン酸ア

ミド、パントテン酸カルシウム、塩酸ピリドキサル、リボフラビン、塩酸チアミン、ビタミンB12、アスコルビン酸等のビタミン類；塩化コリン、酒石酸コリン、リノール酸、オレイン酸、コレステロール等、好ましくは塩化コリン等の脂質因子；グルコース、ガラクトース、マンノース、フルクトース等、好ましくはグルコース等のエネルギー源；塩化ナトリウム、塩化カリウム、硝酸カリウム等、好ましくは塩化ナトリウム等の浸透圧調節剤；EDTA鉄、クエン酸鉄、塩化第一鉄、塩化第二鉄、硫酸第一鉄、硫酸第二鉄、硝酸第二鉄等、好ましくは塩化第二鉄、EDTA鉄、クエン酸鉄等の鉄源類；炭酸水素ナトリウム、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、HEPES、MOPS等、好ましくは炭酸水素ナトリウム等のpH緩衝剤を含む培地を例示できる。

[0082] 培地は、上記成分のほか、例えば、硫酸銅、硫酸マンガン、硫酸亜鉛、硫酸マグネシウム、塩化ニッケル、塩化スズ、塩化マグネシウム、亜ケイ酸ナトリウム等、好ましくは硫酸銅、硫酸亜鉛、硫酸マグネシウム等の微量元素；Tween80、プルロニック（登録商標）F68等の界面活性剤；および組換え型インスリン、組換え型IGF-1、組換え型EGF、組換え型FGF、組換え型PDGF、組換え型TGF- α 、塩酸エタノールアミン、亜セレン酸ナトリウム、レチノイン酸、塩酸プトレッシン等、好ましくは亜セレン酸ナトリウム、塩酸エタノールアミン、組換え型IGF-1、塩酸プトレッシン等の増殖補助因子；デオキシアデノシン、デオキシシチジン、デオキシグアノシン、アデノシン、シチジン、グアノシン、ウリジン等のヌクレオシドなどを添加してもよい。なお上記培地の好適例においては、ストレプトマイシン、ペニシリンGカリウム及びゲンタマイシン等の抗生物質や、フェノールレッド等のpH指示薬を含んでも良い。

[0083] 培地のpHは培養する細胞により異なるが、約6～8であるのが好ましく、一般的にはpH6.8～7.6、多くの場合pH7.0～7.4が適当である。培養は、通常、約30～40℃で約15～200時間行い、必要に応じて培地の交換、通気、攪拌を加える。

[0084] 細胞がCHO細胞である場合、CHO細胞の培養は当業者に公知の方法を用いて

行うことができる。例えば、通常、気相のCO₂濃度が0–40%、好ましくは、2–10%の雰囲気下、30–39℃、好ましくは37℃程度で、培養することが可能である。所望の抗原結合分子（抗体またはその断片）を産生するために適当な細胞の培養期間は、通常1日～3ヶ月であり、好ましくは1日～2ヶ月、さらに好ましくは1日～1ヶ月である。

[0085] 動物細胞培養用の各種の培養装置としては、例えば発酵槽型タンク培養装置、エアリフト型培養装置、カルチャーフラスコ型培養装置、スピナーフラスコ型培養装置、マイクロキャリア型培養装置、流動層型培養装置、ホロファイバー型培養装置、ローラーボトル型培養装置、充填槽型培養装置等を用いることができる。

[0086] 培養は、バッチ培養(batch culture)、流加培養(fed-batch culture)、連続培養(continuous culture)などのいずれの方法を用いてもよいが、流加培養又は連続培養が好ましく、流加培養がより好ましい。

[0087] 医薬品の有効成分としての二重特異性抗体を製造する場合、細胞を培養することにより、培地中に目的の二重特異性抗体が分泌されることが望ましい。そして、抗体産生細胞の培養物中で、L鎖とH鎖の会合が自然に進むことが望ましい。

[0088] 抗体分子を構成するH鎖ポリペプチドとL鎖ポリペプチドはBiP (Immunoglobulin heavy chain binding protein)のサポートでアSEMBルし、その後foldingすることにより完全な抗体構造を完成する。このアSEMBル過程はL鎖ポリペプチド依存性である(Molecular Biology of the Cell, 1999, 10, 2209)。従ってL鎖遺伝子数比を高めL鎖ポリペプチドの比率を高める事によりH鎖ポリペプチドとL鎖ポリペプチドのアSEMBルが促進し、産生量が増加するものと考えられる。

[0089] 4. 抗原結合分子の産生（精製工程）

動物細胞の培養上清中には、目的の抗原結合分子（狭義には抗体）以外の、生産細胞から分泌される成分等の不純物が混在している。そこで、不純物を除去し目的のタンパク質を取り出すための精製を行う。これらの培養工程

・精製工程を経て得られた、純度の高いタンパク質は「原薬」と呼ばれ、その後、製剤化工程（添加物の添加、無菌濾過、その他）や充填・包装工程を経て、製品としての医薬品となる。

[0090] 精製は、細胞を培養した後の任意の時点で行うことができる。培養液もしくは培養上清中からタンパク質を精製する方法は、当該分野において公知である。適当な精製方法には、例えば、クロマトグラフィー、電気泳動などが含まれる。

[0091] 抗体などの抗原結合分子の分離、精製は通常のポリペプチドで使用されている分離、精製方法を使用すればよい。例えば、アフィニティークロマトグラフィー等のクロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、透析、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動等を適宜選択、組み合わせれば、抗体を分離、精製することができる(Antibodies : A Laboratory Manual, Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988) が、これらに限定されるものではない。上記で得られた抗体の濃度測定は吸光度の測定又は酵素結合免疫吸着検定法(Enzyme-linked immunosorbent assay ; ELISA) 等により行うことができる。

[0092] アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、プロテイン A カラム、プロテイン G カラムが挙げられる。例えば、プロテイン A カラムを用いたカラムとして、Hyper D, POROS, Sepharose F. F. (Pharmacia) 等が挙げられる。

[0093] アフィニティークロマトグラフィー以外のクロマトグラフィーとしては、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が挙げられる(Strategies for Protein Purification and Characterization : A Laboratory Course Manual, Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996)。これらのクロマトグラフィーはHPLC、FPLC等の液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。これらのクロマトグラフィーを用いた精製を行うことにより、抗体医薬品原薬が得られる。

- [0094] なお、ポリペプチドを精製前又は精製後に適当なポリペプチド修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、部分的にペプチドを除去したりすることもできる。ポリペプチド修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、リシルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グルコシダーゼなどが用いられる。
- [0095] 本発明の細胞を用いることにより、産生される抗体型分子の量の比率が一定となるため、不純抗体の分離除去が容易となり、目的の多重特異性を有する抗原結合分子（抗体）を高純度で得ることができる。典型的な例として、目的の抗原結合分子は、共通L鎖を有するIgG型抗体分子であり、3種類のポリペプチド鎖（すなわち、共通L鎖と異なる2種のH鎖）を含む分子である。2種のH鎖が同一である組み合わせは、不純抗体である。
- [0096] 5. 特定の二重特異性抗体
- エミシズマブ（Emicizumab；またはAce910；または製品名：ヘムライブラ（登録商標））は、活性型血液凝固第IX因子（F IX(a)）と血液凝固第X因子（F X）に対する遺伝子組換えヒト化二重特異性モノクローナル抗体である。抗体の片方のアームでF IX(a)に、もう片方のアームでFXに結合して、F IX(a)およびF Xを精緻に架橋することによって、血友病Aで欠損または機能異常を来している活性型血液凝固第VIII因子（FVIIIa）の機能を代替する医薬として使用される（Sampei, et al. PLoS ONE 2013; 8(2): e57479; Kitazawa, et al. Nature Medicine 2012; 18(10): 1570）。
- [0097] エミシズマブは共通L鎖を有する抗FIX(a)/FX二重特異性抗体である。エミシズマブは、F IX(a)を認識する抗原結合部位を含むH鎖ポリペプチド、F Xを認識する抗原結合部位を含むH鎖ポリペプチド、および共通のL鎖ポリペプチドを含む。これらのポリペプチドの配列は公知である（W02012/067176の配列番号：20がFIX側の重鎖、配列番号：25がFX側の重鎖、配列番号：32が共通L鎖）。
- [0098] 本発明者らは、これまで、抗体の各鎖の電荷制御及び共通L鎖の採用により、ヘテロ体（抗FIX(a)/FX二重特異性抗体）の産生割合を多くすることに成功

していた。しかしながら、F IXを認識するH鎖、F Xを認識するH鎖、共通L鎖をコードするプラスミドでは、F IXホモ体（抗F IX抗体）が多く、F Xのホモ体（抗F X抗体）が少なくなる。

[0099] 今般、製造段階のWCB（ワーキングセルバンク）の作製においてヘテロ体の産生量としてより向上した細胞株の取得のため、種々の検討を行った結果、F IX H鎖：FX H鎖：共通L鎖を1：1：2で導入したプラスミド+ホモ体の産生量が少ない側（抗F X抗体）のH鎖：共通L鎖を1：2で導入したSecondaryプラスミドを用いて株構築を行うことにより、高い産生量と、ヘテロ体の選択性を両立させる細胞株構築方法を見出した。

[0100] したがって、本発明の好適な実施態様では、細胞に第一のベクターと第二のベクターを導入する工程を含む、エミシズマブを産生する細胞の作製方法が提供される。この方法において、第一のベクターはエミシズマブを構成するすべてのポリペプチド鎖、すなわちFIX H鎖とFX H鎖と共通L鎖の遺伝子をそれぞれ1：1：1または1：1：2のコピー数で含み、第二のベクターはFX H鎖の遺伝子、および任意に（optionally）共通L鎖の遺伝子を含んでもよい。例えば、第二のベクターは、FX H鎖の遺伝子と共通L鎖の遺伝子を、1：1または1：2のコピー数で含むことができる。特定の態様において、第一のベクターはFIX H鎖の遺伝子を1コピー、FX H鎖の遺伝子を1コピー、および共通L鎖の遺伝子を2コピー含み、第二のベクターはFX H鎖の遺伝子を1コピー、および共通L鎖の遺伝子を2コピーまたはそれ以上含む。

[0101] 6. 医薬品の製造

本発明の方法により製造された抗原結合分子または二重特異性抗体が医薬として利用可能な生物学的活性を有する場合には、この抗原結合分子または二重特異性抗体を医薬的に許容される担体又は添加剤と混合して製剤化することにより、医薬品を製造することができる。

[0102] 医薬的に許容される担体及び添加剤の例として、水、医薬的に許容される有機溶剤、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリア

クリル酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、メチルセルロース、エチルセルロース、キサンタンガム、アラビアゴム、カゼイン、寒天、ポリエチレングリコール、ジグリセリン、グリセリン、プロピレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン（HSA）、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、医薬添加物として許容される界面活性剤等が挙げられる。

[0103] 実際の添加物は、医薬品の剤型に応じて上記の中から単独で又は適宜組み合わせで選ばれるが、もちろんこれらに限定するものではない。例えば、注射用製剤として使用する場合、精製されたポリペプチドを溶剤、例えば生理食塩水、緩衝液、ブドウ糖溶液等に溶解し、これに吸着防止剤、例えば Tween 80、Tween 20、ゼラチン、ヒト血清アルブミン等を加えたものを使用することができる。あるいは、使用前に溶解再構成する剤形とするために凍結乾燥したものであってもよく、凍結乾燥のための賦形剤としては、例えば、マンニトール、ブドウ糖等の糖アルコールや糖類を使用することができる。

[0104] 以下、本発明を実施例によって具体的に説明する。なお、これらの実施例は、本発明を説明するためのものであって、本発明の範囲を限定するものではない。

実施例

[0105] 実施例 1：各 1 種類のプラスミドによる遺伝子導入

エミシズマブ FIX H鎖、FX H鎖及び共通L鎖のそれぞれの構造遺伝子上流に CAGプロモーターを結合し、更に下流にrBG-pAを結合した FIX H鎖発現ユニット、FX H鎖発現ユニット及び共通L鎖発現ユニットを作成した。ネオマイシン耐性遺伝子を組み込んだpBluescriptIIに FIX H鎖発現ユニット、FX H鎖発現ユニット及び共通L鎖発現ユニットを結合し、FIX H鎖 1 copy、FX H鎖 1 copy、共通L鎖 1 copyで構成されるIX1X1L1プラスミド、L鎖の位置を入れ替えた L1IX1X1プラスミド、FIX H鎖1 copy、FX H鎖 1 copy、共通L鎖 2 copyで

構成されるIX1X1L2プラスミドを作成し(図1)、CHO細胞DXB11由来宿主細胞にエレクトロポレーションにより導入した。エレクトロポレーションはNucleofector (登録商標) を使用して行った。引き続き細胞を15 nmol/LのMTX存在下で培養することで、発現プラスミドが導入された細胞を選抜した。

[0106] IX1X1L1プラスミド導入細胞プール、L1IX1X1プラスミド導入細胞プール、IX1X1L2プラスミド導入細胞プールを取得し、24-well plateを用いた流加(フエドバッチ)培養で比較を行った。培養は培養液量0.8 mL、培養温度37℃、振とう速度 160 rpmの条件で実施した。培養開始後14日目に培養液中の抗体濃度の測定、および IEC による目的とするヘテロ体産生割合の評価を実施した。その結果、IX1X1L2プラスミド導入細胞プールの抗体産生量並びに目的とするヘテロ体産生割合は、IX1X1L1プラスミドまたは L1IX1X1プラスミド導入細胞プールより高いという結果が得られた(図2)。この結果は、共通L鎖遺伝子が1 copy では発現量が不足しており、そのコピー数を増加させることによって、gene dosage 効果により各抗体鎖の発現バランスが調製され、抗体産生量や目的とするヘテロ体産生割合に優位に働いた可能性を示唆するものである。

[0107] 実施例2 : Secondary プラスミド (X1 L2) を用いた遺伝子導入

実施例1の図2ではFX H鎖のホモ体のピークがほとんど観察されなかったことから、FX H鎖の発現量が不足している可能性がある。また、共通L鎖の発現量もまだ上乘せの余地がある可能性がある。そこで次にFX H鎖 1 copy、共通L鎖 2 copyで構成されるX1L2プラスミドを作成してIX1X1L2プラスミド導入細胞に追加導入し、IX1X1L2プラスミドのみを導入した細胞と比較した。

[0108] まず、IX1X1L2プラスミドをCHO細胞DXB11由来宿主細胞にエレクトロポレーションにより導入し、15 nmol/L MTX 存在下で培養することで、15 nmol/L MTX耐性を示す細胞プールを得た。この細胞プールに、新たに作成したX1L2プラスミドをエレクトロポレーションにより追加導入し、15 nmol/L MTX および 200 µg/mL Hygromycin 存在下で一旦培養した後、100 nmol/L MTX 存在下で培養することにより、100 nmol/L MTX 耐性を示す細胞プールを得た。

- [0109] こうして得られた細胞プールのうち、IX1X1L2プラスミドのみ導入された細胞プール 2種類 (A01 および A07) と、それらの細胞プールにX1L2プラスミドが追加導入された細胞プールをフェドバッチ培養で比較した。フェドバッチ培養は 96-well plate を使用し、培養液量培養液量 80 μ L、培養温度37℃、振とう速度 250 rpmの条件で実施した。培養開始後14日目の培養液中の目的とするヘテロ体産生割合を IEC で評価した結果、IX1X1L2プラスミドに追加して X1L2プラスミドを導入して得られた細胞プールのヘテロ体産生割合は、IX1X1L2プラスミドのみを導入した細胞プールより高いという結果が得られた。具体的には、細胞プール A01にX1L2プラスミドを追加導入したところ、追加導入によって得られた 17 細胞プールのうち15細胞プールは、目的とするヘテロ体産生割合がA01より高かった。同様に、細胞プール A07 にX1L2プラスミドを追加導入したところ、追加導入によって得られた 10 細胞プールすべての目的とするヘテロ体産生割合がA07より高かった。この結果より、FX H鎖と共通L鎖の各遺伝子を追加導入することにより、各抗体遺伝子の発現バランスが改善されることが示唆された。
- [0110] 本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

請求の範囲

- [請求項1] 多重特異性結合分子を産生する細胞の作製方法であって、細胞に第一のベクターと第二のベクターを導入する工程を含み、第一のベクターは多重特異性結合分子を構成するすべてのポリペプチド鎖の遺伝子を含み、第二のベクターは発現が低いポリペプチド鎖の遺伝子を含み、多重特異性結合分子は多重特異性抗体であってもよい、方法。
- [請求項2] 前記多重特異性結合分子が二重特異性抗体であり、二重特異性抗体はH鎖またはL鎖が共通化されたIgG型抗体である、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 共通L鎖を有する二重特異性抗体を産生する細胞の作製方法であって、細胞に第一のベクターと第二のベクターを導入する工程を含み、第一のベクターは二重特異性抗体を構成するすべてのポリペプチド鎖の遺伝子を含み、第二のベクターは二重特異性抗体の発現が低いポリペプチド鎖の遺伝子を含むことを特徴とする、方法。
- [請求項4] 発現が低いポリペプチド鎖が2種類の異なるH鎖のうち的一方であり、第二のベクターが当該H鎖をコードする核酸配列を含み、第二のベクターは共通L鎖をコードする核酸配列をさらに含む、請求項3に記載の方法。
- [請求項5] 第二のベクターが、共通L鎖をコードする核酸配列を、H鎖をコードする核酸配列よりも多く含む、請求項4に記載の方法。
- [請求項6] 第一のベクターが、第一のH鎖をコードする核酸配列を1コピー、第二のH鎖をコードする核酸配列を1コピー、共通L鎖をコードする核酸配列を1または2コピー含む、第二のベクターが、発現が低い方のH鎖をコードする核酸配列を1コピー、共通L鎖をコードする核酸配列を2コピー以上含む、請求項5に記載の作製方法。
- [請求項7] 抗原結合分子を産生する細胞であって、細胞は第一のベクターと第二のベクターを含み、第一のベクターは抗原結合分子を構成するすべてのポリペプチド鎖の遺伝子を含み、第二のベクターは発現が低いポ

リペプチド鎖の遺伝子を含み、抗原結合分子は多重特異性であってもよく、多重特異性抗原結合分子はH鎖またはL鎖が共通化された二重特異性抗体であってもよい、細胞。

[請求項8] 共通L鎖を有する二重特異性抗体を産生する細胞であって、細胞は第一のベクターと第二のベクターを含み、第一のベクターは二重特異性抗体を構成するすべてのポリペプチド鎖の遺伝子を含み、第二のベクターは発現が低い方のH鎖および共通L鎖の遺伝子を含む、細胞。

[請求項9] 第二のベクターが、共通L鎖の遺伝子をH鎖の遺伝子よりも多いコピー数で含む、請求項8に記載の細胞。

[請求項10] 第一のベクターが、第一のH鎖の遺伝子を1コピー、第二のH鎖の遺伝子を1コピー、共通L鎖の遺伝子を1または2コピー含み、第二のベクターが、発現が低い方のH鎖の遺伝子を1コピー、共通L鎖の遺伝子を2コピー以上含む、請求項9に記載の細胞。

[請求項11] 請求項7の細胞を用いて抗原結合分子を産生させることを含む抗原結合分子の製造方法、または請求項8の細胞を用いて二重特異性抗体を産生させることを含む二重特異性抗体の製造方法。

[請求項12] 細胞が哺乳動物細胞である、請求項1から6のいずれかに記載の細胞の作製方法または請求項11に記載の製造方法。

[請求項13] 二重特異性抗体が抗FIX(a)/FX二重特異性抗体である、請求項3から6のいずれかに記載の細胞の作製方法または請求項11に記載の製造方法。

[請求項14] 二重特異性抗体がエミシズマブである、請求項13に記載の方法。

[請求項15] 請求項11に記載の方法で製造された抗原結合分子または二重特異性抗体を含有する医薬品を製造する方法。