

【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】平成27年6月18日 (2015.6.18)

【公表番号】特表2013-509867(P2013-509867A)  
 【公表日】平成25年3月21日 (2013.3.21)  
 【年通号数】公開・登録公報2013-014  
 【出願番号】特願2012-537239(P2012-537239)  
 【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 P 21/02 (2006.01)

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 P 21/02 Z N A C

A 6 1 K 39/395 J

【誤訳訂正書】  
 【提出日】平成27年4月20日 (2015.4.20)  
 【誤訳訂正 1】  
 【訂正対象書類名】特許請求の範囲  
 【訂正対象項目名】全文  
 【訂正方法】変更  
 【訂正の内容】  
 【特許請求の範囲】  
 【請求項 1】

抗体の製造方法であって、前記方法が、(1) T I R が D s b A 変異共翻訳原核生物分泌シグナル配列を含む、抗体重鎖をコードするポリヌクレオチドに作用可能に連結される 第一の翻訳開始領域 (T I R) ; 及び、(2) 第二の T I R が共翻訳又は翻訳後 原核生物分泌シグナル配列を含む、抗体軽鎖をコードするポリヌクレオチドに作用可能に連結される 第二の T I R を含むポリヌクレオチドを含む宿主細胞の培養を含み、これによって、宿主細胞中の抗体の発現において、重鎖と軽鎖が生物学的に活性な抗体を形成するように折りたたまれ集合する方法。

【請求項 2】

第一の翻訳開始領域が配列番号 3 6 から 4 2 の一つの配列を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

第二の翻訳開始領域が S T I I、D s b A、M a l E 又は P h o A 変異シグナル配列を含む、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

第二の翻訳開始領域が P h o A 又は M a l E 変異シグナル配列をコードするポリヌクレオチドを含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

第二の翻訳開始領域が配列番号 1 から 4 2 の一つの配列を含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 6】

宿主細胞が更に (3) F c ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに 作用可能に連結される 第三の翻訳開始領域を含む、請求項 1 から 5 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 7】

第三の翻訳開始領域が S T I I、P h A、M a l E 又は D s b A 変異シグナル配列を

含む、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

第三の翻訳開始領域が P h A 又は D s b A 変異シグナル配列を含む、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 9】

第三の翻訳開始領域が配列番号 1 から 4 2 の一つの配列を含む、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 10】

第三の翻訳開始領域が配列番号 2 3、2 4、2 6 から 3 9、4 1 及び 4 2 の一つの配列を含む、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 11】

第一と第二の翻訳開始領域がほぼ同じ翻訳強度を示す、請求項 1 から 10 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 12】

相対翻訳強度が約 1 又は 2 である、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

第一、第二及び第三の翻訳開始領域がほぼ同じ翻訳強度を示す、請求項 6 から 10 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 14】

相対翻訳強度が約 1 又は 2 である、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

宿主細胞中のポリヌクレオチドが更にプロモーターを含む、請求項 1 から 14 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 16】

プロモーターが p h o A、t a c、l p p、l a c - l p p、l a c、a r a、及び T 7 プロモーターからなる群から選択される原核生物プロモーターである、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

宿主細胞が原核細胞である、請求項 1 から 16 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 18】

原核細胞が大腸菌である、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

大腸菌が内在性プロテアーゼ活性の欠損株である、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

大腸菌の遺伝子型が、d e g P 及び p r c 遺伝子を欠損し、変異 s p r 遺伝子を有する、請求項 18 又は 19 に記載の方法。

【請求項 21】

宿主細胞が D s b A、D s b C、D s b G 及び F k p A からなる群から選択される原核生物ポリペプチドの少なくとも一つをコードするポリヌクレオチドを更に含む、請求項 1 から 20 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 22】

ポリヌクレオチドが D s b A と D s b C の双方をコードする、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

宿主細胞が抗体を共同でコードする一又は複数のポリヌクレオチドを含む、請求項 1 から 22 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 24】

方法が宿主細胞培養物から抗体を回収することを更に含む、請求項 1 から 23 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 25】

抗体が宿主細胞培養培地から回収される、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 6】

方法が回収された抗体と薬学的に許容可能な担体、賦形剤、又は抗体を含む薬学的製剤を調製するための担体とを混合することを更に含む、請求項 2 4 又は 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 7】

形成されるイムノグロブリンポリペプチド複合体の少なくとも 5 0 % が抗体である、請求項 2 4 又は 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 8】

形成されるイムノグロブリンポリペプチド複合体の少なくとも 7 0 % が抗体である、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 2 9】

抗体がモノクローナル抗体である、請求項 1 から 2 8 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 3 0】

抗体がキメラ抗体、親和性成熟抗体、二重特異的抗体、ヒト化抗体、抗体断片又はヒト抗体である、請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 1】

抗体断片が、一アーム抗体である、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 2】

抗体が c - m e t に結合する、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 3】

抗体が二重特異的抗体である、請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 4】

( 1 ) D s b A 変異共翻訳原核生物分泌シグナル配列を含み、抗体重鎖をコードするポリヌクレオチドに作用可能に連結される第一の T I R ; 及び ( 2 ) 共翻訳又は翻訳後原核生物分泌シグナル配列を含み、抗体軽鎖をコードするポリヌクレオチドに作用可能に連結される第二の T I R を含み、これによって、宿主細胞中の抗体の発現において、重鎖と軽鎖が折りたたまれ、集合して生物学的に活性な抗体を形成する、ポリヌクレオチド。

【請求項 3 5】

第一の翻訳開始領域 ( T I R ) が配列番号 3 6 から 4 2 の一つの配列を含む、請求項 3 4 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 3 6】

第二の翻訳開始領域 ( T I R ) が S T I I 、 D s b A 、 M a l E 又は P h o A 変異シグナル配列を含む、請求項 3 4 又は 3 5 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 3 7】

第二の翻訳開始領域 ( T I R ) が P h A 又は M a l E 変異シグナル配列をコードするポリヌクレオチドを含む、請求項 3 6 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 3 8】

第二の翻訳開始領域 ( T I R ) が配列番号 1 から 4 2 の一つの配列を含む、請求項 3 6 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 3 9】

第二の T I R が配列番号 1 、 2 、 8 、 9 、 1 1 、 1 3 、 2 9 、 3 6 、 3 7 及び 4 0 の一つの配列を含む、請求項 3 6 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 4 0】

前記宿主細胞が、 ( 3 ) F c ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作用可能に連結される第三の T I R を更に含む、請求項 3 4 から 3 9 の何れか一項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 4 1】

前記第三の翻訳開始領域 ( T I R ) が S T I I 、 P h A 、 M a l E 又は D s b A 変異シグナル配列を含む、請求項 4 0 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 4 2】

前記第三の翻訳開始領域 ( T I R ) が P h A 又は D s b A 変異シグナル配列を含む、請求項 4 0 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 4 3】

前記第三の翻訳開始領域 ( T I R ) が配列番号 1 から 4 2 の一つの配列を含む、請求項 4 0 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 4 4】

前記第一及び第二の翻訳開始領域 ( T I R ) がほぼ同じ翻訳強度を示す、請求項 3 4 から 4 3 の何れか一項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 4 5】

相対翻訳強度が約 1 又は 2 である、請求項 4 4 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 4 6】

前記第一、第二及び第三の翻訳開始領域がほぼ同じ翻訳強度を示す、請求項 4 0 から 4 3 の何れか一項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 4 7】

相対翻訳強度が約 1 又は 2 である、請求項 4 6 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 4 8】

前記宿主細胞中のポリヌクレオチドがプロモーターを更に含む、請求項 3 4 から 4 7 の何れか一項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 4 9】

プロモーターが、p h o A、t a c、l p p、l a c - l p p、l a c、a r a、及び T 7 プロモーターからなる群から選択される原核生物プロモーターである、請求項 4 8 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 5 0】

前記宿主細胞が原核細胞である、請求項 3 4 から 4 9 の何れか一項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 5 1】

前記原核細胞が大腸菌である、請求項 5 0 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 5 2】

前記大腸菌が内在性プロテアーゼ活性の欠損株である、請求項 5 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 5 3】

前記大腸菌の遺伝子型が d e g P 及び p r c 遺伝子を欠損し、変異 s p r 遺伝子を有する、請求項 5 1 又は 5 2 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 5 4】

宿主細胞が D s b A、D s b C、D s b G 及び F k p A からなる群から選択される原核生物ポリペプチドの少なくとも一つをコードするポリヌクレオチドを更に含む、請求項 3 4 から 5 4 の何れか一項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 5 5】

前記ポリヌクレオチドが D s b A と D s b C の双方をコードする、請求項 5 4 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 5 6】

抗体がモノクローナル抗体である、請求項 3 4 から 5 5 の何れか一項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 5 7】

抗体がキメラ抗体、親和性成熟抗体、二重特異的抗体、ヒト化抗体、抗体断片又はヒト抗体である、請求項 3 4 から 5 5 の何れか一項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 5 8】

抗体断片が一アーム抗体である、請求項 5 7 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 5 9】

抗体が c - m e t に結合する、請求項 5 8 に記載のポリヌクレオチド。

## 【請求項 6 0】

抗体が二重特異的抗体である、請求項 5 7 に記載 のポリヌクレオチド。

## 【請求項 6 1】

抗体重鎖が一又は複数の変異 T 3 6 6 A、L 3 6 8 A、Y 4 0 7 V 及び / 又は T 3 6 6 W を含む、請求項 5 8 又は 6 0 に記載 のポリヌクレオチド。

## 【請求項 6 2】

F c ポリペプチドが一又は複数の変異 T 3 6 6 A、L 3 6 8 A、Y 4 0 7 V 及び / 又は T 3 6 6 W を含む、請求項 5 8 に記載 のポリヌクレオチド。

## 【請求項 6 3】

請求項 1 から 3 3 の何れか一項に記載の抗体の製造方法を含む、抗体を含む医薬を製造するための方法。

## 【請求項 6 4】

請求項 3 4 から 6 2 の何れか一項に記載のポリヌクレオチドを含む宿主細胞。

## 【請求項 6 5】

前記宿主細胞が原核細胞である、請求項 6 4 に記載の宿主細胞。

## 【請求項 6 6】

前記原核細胞が大腸菌である、請求項 6 5 に記載の宿主細胞。

## 【請求項 6 7】

前記大腸菌が内在性プロテアーゼ活性の欠損株である、請求項 6 6 に記載の宿主細胞。

## 【請求項 6 8】

前記大腸菌の遺伝子型が d e g P 及び p r c 遺伝子を欠損し、変異 s p r 遺伝子を有する、請求項 6 6 又は 6 7 に記載の宿主細胞。

## 【請求項 6 9】

前記宿主細胞が原核生物シャペロンタンパク質をコードするポリヌクレオチドを更に含む、請求項 6 4 から 6 8 の何れか一項に記載の宿主細胞。

## 【請求項 7 0】

前記原核生物シャペロンタンパク質が D s b A 及び / 又は D s b C である、請求項 6 9 に記載の宿主細胞。

## 【誤訳訂正 2】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0 0 1 0

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0 0 1 0】

本発明は、共翻訳分泌シグナルペプチド（共翻訳様式での転座を指示するシグナルペプチド）を含む T I R 変異及び / 又は翻訳後分泌シグナルペプチド（翻訳後様式での転座を指示するシグナルペプチド）を含む T I R 変異を含む、新規の翻訳開始領域（T I R）変異の使用を含む異種タンパク質の産生の増加のための新規の方法を提供する。更に、ここで示されるのは、ピーク発現のための、共翻訳又は翻訳後分泌シグナルペプチドを含む T I R に作用可能に連結される抗体軽鎖と共翻訳分泌シグナルペプチドを含む T I R に作用可能に連結される抗体重鎖を含むベクターを用いた増加された抗体の産生である。新規の T I R 変異体がまたここで提供される。

## 【誤訳訂正 3】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0 0 1 1

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0 0 1 1】

一態様では、本発明は、翻訳開始領域を提供する。幾つかの実施態様では、変異体は変異翻訳開始領域（幾つかの実施態様では、原核生物翻訳後分泌シグナル配列又は原核生物

共翻訳分泌シグナル配列)を含む。幾つかの実施態様では、変異体は、P h o A、M a l E、D s b A又はS T I Iのような分泌シグナル配列の核酸変異を含む。幾つかの実施態様では、変異体は更にM l a I、B s s H I I又はX b a I制限サイトを含む。幾つかの実施態様では、変異体は、表2に示す配列を含む翻訳開始領域変異を含む。

【誤訳訂正4】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0 0 1 2

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0 0 1 2】

一態様では、本発明は変異分泌シグナル配列を提供する。幾つかの実施態様では、分泌シグナル配列は原核生物翻訳後分泌シグナル配列又は原核生物共翻訳分泌シグナル配列である。幾つかの実施態様では、変異体はP h o A、M a l E、D s b A又はS T I I分泌シグナル配列の核酸変異体である。幾つかの実施態様では、変異体は表2に示す分泌シグナル配列を含む。本発明の変異分泌シグナル配列は、例えば、ここに開示する任意の方法における使用に適している。

【誤訳訂正5】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0 0 1 3

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0 0 1 3】

別の態様では、本発明は本発明の翻訳開始領域を含むポリペプチドを提供する。幾つかの実施態様では、翻訳開始領域は、表2に示す配列(例えば、配列番号1から42の一つ)を含む。幾つかの実施態様では、翻訳開始領域は、配列番号1から14、16から24、26から39、41から42の一つを含む。ポリヌクレオチドは、例えば、ここに開示する任意の方法における使用に適している。

【誤訳訂正6】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0 0 1 4

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0 0 1 4】

別の態様では、本発明は、本発明の分泌シグナル配列を含むポリヌクレオチドを提供する。幾つかの実施態様では、分泌シグナル配列は、表2に示す配列を含む。(例えば、配列番号1から42の一つ)。幾つかの実施態様では、翻訳開始領域は、配列番号1から14、16から24、26から39、41から42の一つを含む。ポリヌクレオチドは、例えば、ここに開示する任意の方法における使用に適している。

【誤訳訂正7】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0 0 1 5

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0 0 1 5】

別の態様では、本発明は、異種ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作用可能に連結される本発明の翻訳開始領域を含むポリヌクレオチドであって、これによって、宿主(例えば、原核生物宿主細胞、例えば、大腸菌細胞)における異種ポリペプチドの発現において、異種ポリペプチドが折りたたまれ、集合して生物学的に活性な異種ポリペプチドを形成するポリヌクレオチドを提供する。異種ポリペプチドの例を更にここに開示する。幾つかの実施態様では、異種ポリペプチドは、抗体重鎖である。幾つかの実施態様では

、異種ポリペプチドは、抗体軽鎖である。幾つかの実施態様では、異種ポリペプチドは、Fcポリペプチドである。幾つかの実施態様では、異種ポリペプチドは、多量体ポリペプチドである。幾つかの実施態様では、異種ポリペプチドは、異種多量体である。幾つかの実施態様では、翻訳開始領域は、ここに開示する任意の翻訳開始領域、例えば、表2に示す配列を含む翻訳開始領域である。幾つかの実施態様では、翻訳開始領域は、配列番号1から42の一つの配列を含む。幾つかの実施態様では、翻訳開始領域は、配列番号1から14、36から39、41から42の一つの配列を含む。幾つかの実施態様では、翻訳開始領域は、変異STII、DsbI、PhoA、又はMalEシグナル配列を含む。

【誤訳訂正8】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0016

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0016】

別の態様では、本発明は、(1)TIRが共翻訳原核生物シグナル配列を含む、第一の異種ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作用可能に連結される第一の翻訳開始領域(TIR)；及び、(2)第二のTIRが共翻訳又は翻訳後原核生物分泌シグナル配列を含む、第二の異種をコードするポリヌクレオチドに作用可能に連結される第二のTIRを含むポリヌクレオチドであって、これによって、宿主細胞中の抗体の発現において、第一と第二の異種ポリペプチドが生物学的に活性な抗体を形成するように折りたたまれ集合するポリヌクレオチドを提供する。

【誤訳訂正9】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0017

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0017】

別の態様では、本発明は、(1)抗体重鎖をコードするポリヌクレオチドに作用可能に連結される本発明の第一の翻訳開始領域、及び、(2)抗体軽鎖をコードするポリヌクレオチドに作用可能に連結される第二の翻訳開始領域を含むポリヌクレオチドであって、これによって、宿主細胞(例えば、原核生物宿主細胞、例えば、大腸菌宿主細胞)中の抗体の発現において、重鎖と軽鎖が生物学的に活性な抗体を形成するように折りたたまれ集合するポリヌクレオチドを提供する。

【誤訳訂正10】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0018

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0018】

幾つかの実施態様では、第一の翻訳開始領域は、共翻訳原核生物分泌シグナル配列(例えば、シグナル認識ペプチドを介する翻訳を指示するシグナル配列)を含む。幾つかの実施態様では、第一の翻訳開始領域は、STII又はDsbAシグナル配列を含む。幾つかの実施態様では、第一の翻訳開始領域はDsbAシグナル配列を含む。幾つかの実施態様では、第一の翻訳開始領域は、PhoA又はMalEシグナル配列を含む。幾つかの実施態様では、第一の翻訳開始領域は、配列番号：1から10及び36から29及び41及び42の一つの配列を含む。幾つかの実施態様では、第一の翻訳開始領域は、配列番号1から42の一つの配列を含む。幾つかの実施態様では、第一の翻訳開始領域は、配列番号1から14、16から24、26から39、41から42の一つの配列を含む。

【誤訳訂正11】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】 0 0 1 9

【訂正方法】 変更

【訂正の内容】

【 0 0 1 9 】

幾つかの実施態様では、第二の翻訳開始領域は ( i ) 共翻訳原核生物分泌シグナル配列又は翻訳後原核生物分泌シグナル配列 ( 例えば、s e c 経路を介する翻訳を指示するシグナル配列 ) を含む。幾つかの実施態様では、第二の翻訳開始領域は、S t I I、D s b A、M a l E 又は P h o A シグナル配列を含む。幾つかの実施態様では、第二の翻訳開始領域は、P h o A 又は M a l E シグナル配列を含む。幾つかの実施態様では、第二の翻訳開始領域は、配列番号 1 から 4 2 の一つの配列を含む。幾つかの実施態様では、第二の翻訳開始領域は、配列番号 1 から 1 4、1 6 から 2 4、2 6 から 3 9、4 1 から 4 2 の一つの配列を含む。

【誤訳訂正 1 2】

【訂正対象書類名】 明細書

【訂正対象項目名】 0 0 2 0

【訂正方法】 変更

【訂正の内容】

【 0 0 2 0 】

幾つかの実施態様では、抗体をコードするポリヌクレオチドは、( 3 ) F c ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作用可能に連結される第三の翻訳開始領域を更に含む。幾つかの実施態様では、第三の翻訳開始領域は、S T I I、P h o A 又は D s b A シグナル配列を含む。幾つかの実施態様では、第三の翻訳開始領域は、D s b A シグナル配列を含む。幾つかの実施態様では、第三の翻訳開始領域は、P h o A シグナル配列を含む。

【誤訳訂正 1 3】

【訂正対象書類名】 明細書

【訂正対象項目名】 0 0 2 1

【訂正方法】 変更

【訂正の内容】

【 0 0 2 1 】

別の態様では、本発明は、( 1 ) T I R が共翻訳原核生物分泌シグナル配列を含み、抗体重鎖をコードするポリヌクレオチドに作用可能に連結される第一の翻訳開始領域 ( T I R ) ; 及び ( 2 ) 第二の T I R が共翻訳又は翻訳後原核生物分泌シグナル配列を含み、抗体軽鎖をコードするポリヌクレオチドに作用可能に連結された第二の T I R を含み、これにより、宿主細胞中の抗体発現において、重鎖及び軽鎖が折りたたまれ、集合して生物学的に活性な抗体を形成する、ポリヌクレオチドを提供する。

【誤訳訂正 1 4】

【訂正対象書類名】 明細書

【訂正対象項目名】 0 0 2 2

【訂正方法】 変更

【訂正の内容】

【 0 0 2 2 】

別の態様では、本発明は、抗体断片 ( 例えば、一価抗体断片 ) をコードするポリヌクレオチドを提供し、前記ポリヌクレオチドは ( 1 ) 抗体重鎖をコードするポリヌクレオチドに作用可能に連結される本発明の第一の翻訳開始領域 ; ( 2 ) 抗体軽鎖をコードするポリヌクレオチドに作用可能に連結される第二の翻訳開始領域 ; 及び ( 3 ) F c ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作用可能に連結される第三の翻訳開始領域を含み、これにより、宿主細胞 ( 例えば、原核生物宿主細胞 ) 中の抗体発現における、重鎖、軽鎖及び F c ポリペプチドが折りたたまれ、集合して生物学的に活性な抗体 ( 例えば、一アーム抗体 ) を形成する。幾つかの実施態様では、第三の翻訳開始領域は、共翻訳原核生物分泌シグナル配列又は翻訳後原核生物分泌シグナル配列を含む。幾つかの実施態様では、第三の



翻訳開始領域は S T I I、P h o A、M a l E、又は D s b A シグナル配列を含む。幾つかの実施態様では、第三の翻訳開始領域は、D s b A シグナル配列を含む。幾つかの実施態様では、第三の翻訳開始領域は、P h o A シグナル配列を含む。幾つかの実施態様では、第三の翻訳開始領域は、配列番号 1 から 4 2 の一つの配列を含む。幾つかの実施態様では、第三の翻訳開始領域は、配列番号 1 から 1 4、1 6 から 2 4、2 6 から 3 9、4 1 から 4 2 の一つの配列を含む。

【誤訳訂正 1 5】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0 0 2 3

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0 0 2 3】

別の態様では、本発明は、抗体をコードするポリヌクレオチドを提供し、前記ポリヌクレオチドは ( 1 ) 第一の翻訳開始領域が S T I I 又は D s b A シグナル配列を含み、抗体重鎖をコードするポリヌクレオチドに作用可能に連結される本発明の第一の翻訳開始領域 ; ( 2 ) 第二の翻訳開始領域が S T I I、D s b A、M a l E 又は P h o A シグナル配列を含み、抗体軽鎖をコードするポリヌクレオチドに作用可能に連結される第二の翻訳開始領域を含み、これにより、宿主細胞 ( 例えば、原核生物宿主細胞 ) 中の抗体発現における、軽鎖及び重鎖が折りたたまれ、集合して生物学的に活性な抗体を形成する。幾つかの実施態様では、第一の翻訳開始領域は D s b A シグナル配列を含み、第二のほんやくは、M a l E 又は P h o A シグナル配列を含む。幾つかの実施態様では、抗体をコードするポリヌクレオチドは更に ( 3 ) F c ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作用可能に連結される第三の翻訳開始領域を含む。幾つかの実施態様では、第三の翻訳開始領域は S T I I、P h o A 又は D s b A シグナル配列を含む。幾つかの実施態様では、第三の翻訳開始領域は、P h o A シグナル配列を含む。幾つかの実施態様では、第三の翻訳開始領域は、D s b A シグナル配列を含む。

【誤訳訂正 1 6】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0 0 2 5

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0 0 2 5】

幾つかの実施態様では、本発明のポリヌクレオチドは、異種ポリペプチドと作用可能に連結されるプロモーターを更に含む。幾つかの実施態様では、プロモーターは p h o A、t a c、l p p、l a c - l p p、l a c、a r a、t r p、及び T 7 プロモーターからなる群から選択される原核生物プロモーターである。幾つかの実施態様では、プロモーターは p h o A プロモーターである。抗体重鎖及び軽鎖の発現に関する幾つかの実施態様では、ポリヌクレオチドは更に ( a ) 第一のプロモーターが軽鎖と作用可能に連結される、第一のプロモーター及び ( b ) 第二のプロモーターが重鎖と作用可能に連結される、第二のプロモーターを含む。幾つかの実施態様では、第一及び第二のプロモーターは双方共に p h o A プロモーターである。抗体重鎖及び軽鎖と F c ポリペプチドの発現に関する幾つかの実施態様では、ポリヌクレオチドは ( c ) 第三のプロモーターが F c ポリペプチドと作用可能に連結される第三のプロモーターを更に含む。幾つかの実施態様では、第三のプロモーターは F c ポリペプチドである。

【誤訳訂正 1 7】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0 0 2 9

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0 0 2 9】

一態様では、本発明は本発明のポリヌクレオチド又はベクターを含む宿主細胞を提供する。幾つかの実施態様では、宿主細胞は抗体（幾つかの実施態様では、二重特異的又は一アーム抗体）をコードする本発明のポリヌクレオチドを含む。宿主細胞は集散的に抗体をコードする一以上のポリヌクレオチドを含み得る。ベクターは任意の型、例えば、発現ベクターのような組換えベクターであり得る。種々の宿主細胞の任意のものを使用し得る。一実施態様では、宿主細胞は、原核生物細胞、例えば、大腸菌である。幾つかの実施態様では、大腸菌は内在性プロテアーゼ活性を欠損する株である。幾つかの実施態様では、大腸菌の遺伝子型は *degP* 及び *prc* 遺伝子を欠損し、変異 *spr* 遺伝子を有する。

【誤訳訂正 18】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0030

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0030】

幾つかの実施態様では、宿主細胞は更に原核生物シャペロンタンパク質（例えば、*Dsb* タンパク質（*DsbA*、*DsbB*、*DsbC*、*DsbD*、*FkpA* 及び / 又は *DsbG*））をコードするポリヌクレオチドを含む。幾つかの実施態様では、シャペロンタンパク質は、宿主細胞中で過剰発現する。幾つかの実施態様では、シャペロンタンパク質は *DsbA* 及び / 又は *DsbC* である。

【誤訳訂正 19】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0037

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0037】

本発明はまた本発明の変異 *TIR* 及びシグナル配列を用いた方法を提供する。ここに開示される変異 *TIR*、シグナル配列及びポリヌクレオチドは何れも、例えば、ここに開示される本発明の方法のような、方法における使用に適している。更なる態様では、本発明は本発明の異種ポリペプチドを作製する方法を提供する。例えば、本発明は異種ポリペプチド（例えば、ここに定義される通り、全長抗体及びその断片を含む抗体）を調製する方法を提供し、前記方法はポリヌクレオチドが発現するための、本発明のポリヌクレオチド（例えば、翻訳開始領域を含むポリヌクレオチド）を含む宿主細胞の培養を含み、これにより、宿主細胞（例えば、原核生物宿主細胞）中の前記ポリヌクレオチドの発現において、異種ポリペプチドが折りたたまれ、生物学的に活性な異種ポリペプチドを形成する。抗体の発現に関する実施態様では、宿主細胞中の前記ポリヌクレオチドの発現において、軽鎖及び重鎖が折りたたまれ、集合して生物学的に活性な抗体を形成する。幾つかの実施態様では、方法は更に宿主細胞培養からの異種ポリペプチド（例えば、抗体）の回収を含む。幾つかの実施態様では、異種ポリペプチドは宿主細胞培養から回収される。幾つかの実施態様では、発明は更に回収した異種ポリペプチド（例えば、抗体）と薬学的に許容可能な担体、賦形剤、又は異種ポリペプチド（例えば、抗体）を含む薬学的製剤を製造するための担体とを組み合わせることを含む。

【誤訳訂正 20】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0057

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0057】

「作用可能に連結される」とは、そのように記載された成分が意図された様式で機能することを許容する関係にある、2以上の成分の並置を指す。例えば、連結された配列の翻訳制御又は調整のためにそれがシスで機能する場合、プロモーターはコーディング配列に

作用可能に連結される。一般的に、必ずしもそうではないが、「作用可能に連結される」DNA配列は連続しており、2個のタンパク質コード配列を連結する必要があるか又は分泌リーダーの場合、連続的で且つ読取り枠内にある。しかしながら、作用可能なプロモーターは一般的にコード配列の上流に位置しているが、必ずしも連続しているというわけではない。作用可能なエンハンサーは、コード配列の上流の中及びプロモーターからかなりの距離の上流に位置し得る。連結は、当該分野で知られている組換え方法、例えば、PCR法を用いるか、アニーリングによるか、又は都合の良い制限サイトにおけるライゲーションによって達成される。都合の良い制限サイトが存在しない場合、合成オリゴヌクレオチドアダプタまたはリンカーが、慣用法に従って使用される。

【誤訳訂正 2 1】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0 0 5 9

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0 0 5 9】

「プロモーター」は、それが作用可能に連結した遺伝子又は配列の転写を制御するポリヌクレオチド配列を意味する。プロモーターは、RNAポリメラーゼ結合及び転写開始のシグナルを含む。使用されるプロモーターは、選択された配列の発現が考えられる宿主細胞の細胞型において機能し得る。様々な異なった供給源からの構成的、誘導性及び抑制性プロモーターを含む多数のプロモーターが当該分野においてよく知られており（またGenBankのようなデータベースにおいて同定され）、クローン化ポリヌクレオチドとして（例えばATCCのような寄託期間並びに他の商業的又は個人の供給源から）入手できる。誘導プロモーターでは、プロモーターの活性は、例えば誘導剤のようなシグナルに応答して増加又は減少する。

【誤訳訂正 2 2】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0 1 2 9

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0 1 2 9】

細菌性のSecretransロカーゼは、原核生物におけるタンパク質輸送を容易にする。分泌タンパク質は、2つの異なる機構、即ち、共翻訳及び翻訳後標的化によってSecretransロカーゼに対して標的化され得る。後者において、分泌タンパク質を含むシグナル配列は、その合成時にリボソームから完了した状態で放出され、Secretransロカーゼに向けられる。種々のグラム陰性菌において、分泌タンパク質は、転移能を有し、折りたたまれていない状態のこれらのタンパク質を維持する分泌特異的シャペロンSecBによってSec-トランスロカーゼに誘導される。共翻訳標的化の間、シグナル認識粒子（SRP）は、それがリボソームから出現し、SRP/リボソーム/新生の分泌タンパク質鎖の全三元複合体が、Sec-トランスロカーゼに標的化される一方で、分泌タンパク質のシグナル配列に結合する。

【誤訳訂正 2 3】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0 1 3 2

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0 1 3 2】

典型的には、TIR変異体は、関心のある遺伝子発現のための適切な要素を有するプラスミドベクター中で提供されるであろう。例えば、典型的なコンストラクトは、シグナル配列の5'のプロモーター、関心のある遺伝子又はレポーター遺伝子挿入のための、シグナル配列の3'の制限酵素認識サイト、及び得られたプラスミドで形質転換した細菌の選

択及び／又は維持のための、薬剤耐性マーカーのような選択可能なマーカーを含むであろう。プラスミドベクターを更にここに記載し例示する。原核生物宿主と共に使用するための適切なプロモーターは、当該分野で知られており、幾つかをここに例示し記載する。

【誤訳訂正 24】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0172

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0172】

抗原をコードするDNA分子の構築に続いて、そのDNA分子は、プラスミド等の発現ベクターの発現コントロール配列と作用可能に連結し、このコントロール配列は、そのベクターで形質転換した宿主細胞によって認識される。一般的に、プラスミドベクターは、その宿主細胞と適合する種から誘導された複製及びコントロール配列を有する。このベクターは、通常は、形質転換細胞で表現型の選択を提供することが可能なタンパク質をコードする配列だけでなく複製部位を有する。原核宿主細胞及び真核宿主細胞での発現に好適なベクターは当分野で公知であり、さらにそのいくつかを本明細書に記載する。酵母菌などの真核生物、又は哺乳動物などの多細胞生物由来の細胞が用いられうる。

【誤訳訂正 25】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0173

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0173】

場合によっては、抗原をコードするDNAは宿主細胞によって培地中への発現産物の分泌を生じさせる分泌リーダー配列に作用可能に連結される。分泌リーダー配列の例には、stII、エコチン(ecotin)、IamB、ヘルペスGD、Ipp、アルカリホスファターゼ、インベルターゼ、及びアルファ因子が含まれる。ここでの使用にまた適しているのはプロテインAの36アミノ酸リーダー配列である(Abrahmsen等, EMBO J., 4:3901(1985))。