【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22年5月20日(2010.5.20)

【公表番号】特表2009-510998(P2009-510998A)
【公表日】平成21年3月19日(2009.3.19)
【年通号数】公開・登録公報2009-011
【出願番号】特願2008-522802(P2008-522802)
【国際特許分類】
Ｃ１２Ｎ　15/09　(2006.01)
Ｃ１２Ｐ　21/08　(2006.01)
Ｃ４０Ｂ　40/10　(2006.01)
Ｃ１２Ｎ　 1/21　(2006.01)
Ｃ１２Ｐ　21/02　(2006.01)
Ｃ０７Ｋ　16/18　(2006.01)
【ＦＩ】
Ｃ１２Ｎ　15/00　ＺＮＡＡ
Ｃ１２Ｐ　21/08
Ｃ４０Ｂ　40/10
Ｃ１２Ｎ　 1/21
Ｃ１２Ｐ　21/02　Ｃ
Ｃ０７Ｋ　16/18

【手続補正書】
【提出日】平成22年3月25日(2010.3.25)
【手続補正１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００６６
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００６６】
本明細書において、「足場」という用語は、異種結合ドメイン、またはリガンドに結合特異性を付与する改変型アミノ酸配列を構成し、方向づけ、および収容するために用いられる支持ポリペプチドフレームワークを意味するものとする。足場は、結合特異性を付与するアミノ酸配列から構造的に分離可能であってもよい。足場の構造的に分離可能な部分は、例えば、β－サンドイッチ型、β－シート型、α－ヘリックス型、β－バレル型、コイルドコイル型、およびその他当技術分野においてよく知られているポリペプチドの２次元および３次元の構造など、さまざまな異なった構造モチーフを含むことができる。また、本発明の足場は、支持フレームワーク構造の安定性を実質的に低下させずに、アミノ酸配列の中で変化させることができる１つ以上の領域も含む。変化させることができる領域の例は、β－サンドイッチまたはβ－シートの２つの鎖を結合させるループ領域のセグメントなどである。足場の構造的に分離した部分に対応するアミノ酸残基を、本明細書においては、足場フレームワークと呼ぶ。本発明の足場を含む免疫グロブリン様ドメインは、ヒト免疫グロブリンの可変重鎖または軽鎖のフレームワークアミノ酸配列と約５０％よりも低いアミノ酸同一性を示す。通常、足場を含む免疫グロブリン様ドメインは、ヒト免疫グロブリンの可変重鎖または軽鎖のフレームワークアミノ酸配列に対し、例えば、約４５％、約４０％、約３０％、約２０％、約１５％、または約１０％よりも低いアミノ酸配列同一性を示すだろう。変化させることができる足場の残基は、ループ領域など、その構造的特性に関連して、あるいは、それが、改変された残基に適合できることに関連して、本明細書に記載されている。したがって、変化させることができる足場領域は、例えば、足

場の可変領域、易変領域、交換領域、改変可能領域、または交換可能領域と呼ばれる。２次元および３次元の構造特性を付与する残基は、足場の全体構造が維持されるかぎり、保持、改変、または保存することができる。当業者は、どの残基がポリペプチド足場の構造的安定性に関して機能するか、および、そのような残基はどの程度まで改変することができるかを知っているか、決定することができる。

【手続補正２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０１９５
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０１９５】
【図１】図１は、変異体Ｆ２８６Ｙおよび１４０８Ｎ（ｐｒｌＡ４）の大腸菌ＳｅｃＹタンパク質のアミノ酸配列であり、変異したアミノ酸を太字にし、下線を付けて示した（配列番号１）。
【図２】図２は、シグナルペプチドなしに大腸菌で抗体断片に対する重鎖および軽鎖の遺伝子を発現させるために使用したベクターのプラスミドマップを表したものである。このプラスミドは、クロラムフェニコール耐性を付与するためのクロラムフェニコール－アセチルトランスフェラーゼ遺伝子、および遺伝子発現を調節するためのｌａｃリプレッサーを発現するｌａｃＩｑ遺伝子を有する。軽鎖遺伝子および重鎖遺伝子は、それぞれｔａｃプロモーターの制御下にあり、ラクトースまたはＩＰＴＧによって発現が誘導される。
【図３】図３は、プラスミドＫＢ５２４６で形質転換されたＳＥ６００４のペリプラズム画分における集合体Ｆａｂ　１Ａ８の分泌を示すウエスタンブロット解析結果を示している。Ｆａｂの発現は、ＩＰＴＧ（配列番号２）を図に示した濃度（μＭ単位）で加えて誘導した。試料を、非還元条件下でＳＤＳ－ＰＡＧＥゲル上で泳動し、ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼに結合した抗ヒトκ特異的抗体を用いてプローブした。
【図４】図４は、ＳＥ６００４細胞のペリプラズム画分に存在するＦａｂ断片の抗原結合活性を示すＥＬＩＳＡの結果を表したものである。プラスミドＫＢ５２４６で形質転換された細胞のペリプラズム抽出物の連続希釈液、またはその抽出物の１０倍希釈液（５２４６　１０％）の連続希釈液を、ＰｃｒＶ抗原に対する結合について、分泌を指示するためのシグナルペプチドを有する野生型大腸菌株で発現された抗ＰｃｒＶ　Ｆａｂを含む標準的ペリプラズム抽出物（１１５０）、またはその１０倍希釈液（１１５０　１０％）と比較して解析する。ＰｃｒＶ結合は、ＨＲＰ合成抗体によってＴＭＢ基質が着色生成物へと酵素作用で変化する結果、４５０ｎｍにおける吸光度の増加として明らかになる。
【図５】図５は、ペリプラズム抽出物で確認した、ＳＥ６００４細胞およびＴｏｐ１０Ｆ’細胞由来のＦａｂの分泌効率を比較したものである。Ｆａｂは、ＩＰＴＧ（配列番号２）誘導を用いて、シグナルペプチドを利用せずにＳＥ６００４細胞（ｐｒｌＡ）で示された濃度で発現させた。発現を、野生型菌株（ＴＯＰ１０Ｆ）に由来する同じＦａｂのシグナル依存型発現と比較する。ペリプラズム抽出物に存在するＦａｂを、抗ヒトκ検出試薬を用いてウエスタンブロット解析により検出する。
【図６】図６は、変異体ＳｅｃＹを過剰発現させるためのＫＢ５２８２プラスミドのマップである。ｐｒｌＡ４変異型ＳｅｃＹ遺伝子が、ｐＴｒｃプロモーターから発現される。ＮＰＴ２遺伝子がカナマイシン耐性を付与している。
【図７】図７は、ｐｒｌＡ４変異型菌株ＳＥ６００４、野生型ＳｅｃＹを発現するＴｏｐ１０Ｆ’細胞、およびｐｒｌＡ４変異型ＳｅｃＹ遺伝子で同時形質転換されたＤＨ５α細胞に由来するＦａｂ　１Ａ８の分泌効率を比較したウエスタンブロット解析結果である。非変性ＳＤＳ－ＰＡＧＥのブロットを、抗ヒトκ抗体を用いて調べた結果、培地中に分泌された抗体関連タンパク質が検出された。