

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2022年9月22日(22.09.2022)



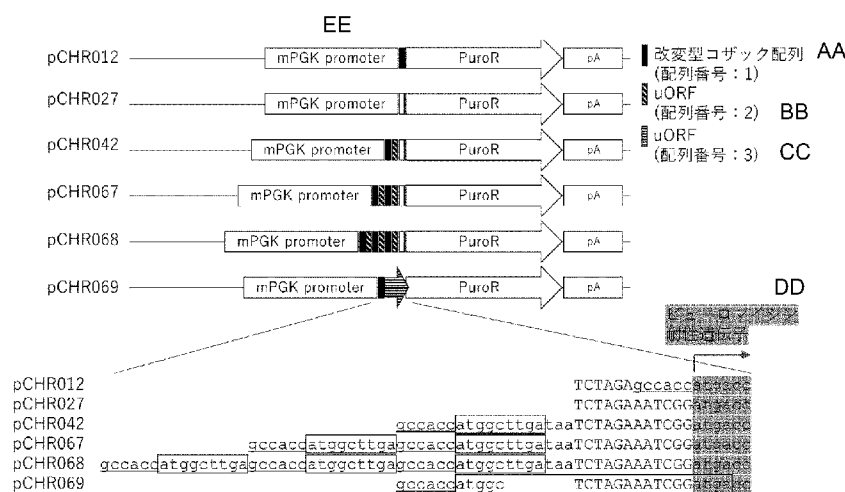
(10) 国際公開番号

WO 2022/196245 A1

- (51) 国際特許分類:  
C12N 15/11 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2022/006667
- (22) 国際出願日: 2022年2月18日(18.02.2022)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2021-041250 2021年3月15日(15.03.2021) JP
- (71) 出願人: 株式会社 c h r o m o c e n t e r (CHROMOCENTER INC.) [JP/JP];  
〒6830823 鳥取県米子市加茂町二丁目  
1 8 0 番地 Tottori (JP).
- (72) 発明者: 松岡 ▲隆▼之(MATSUOKA, Takashi);  
〒6830823 鳥取県米子市加茂町二丁目 1 8 0 番地  
株式会社 c h r o m o c e n t e r 内 Tottori (JP). 林 武志(HAYASHI, Takeshi);  
〒6830823 鳥取県米子市加茂町二丁目 1 8 0 番地 株式会  
社 c h r o m o c e n t e r 内 Tottori (JP).
- (74) 代理人: S K 特 許 業 務 法 人, 外  
(SK INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM  
et al.); 〒1500012 東京都渋谷区広尾 3 - 1 2  
- 4 0 広尾ビル4階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保  
護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL,  
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC,  
EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR,

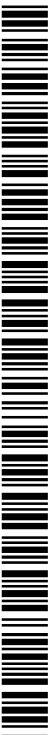
(54) Title: SELECTION MARKER EXPRESSION CASSETTE

(54) 発明の名称: 選択マーカー発現カセット



AA Modified Kozak sequence (SEQ ID NO: 1)  
 BB (SEQ ID NO: 2)  
 CC (SEQ ID NO: 3)  
 DD Puromycin-resistant gene  
 EE mPGK promoter

(57) Abstract: There has been a problem that the translation efficiency of a downstream ORF cannot be reduced to a practical level even when an upstream ORF is present. The purpose of the present invention is to provide a selection marker expression cassette comprising expression regulation sequence DNA, in which the expression regulation sequence DNA includes at least one expression regulation sub-sequence DNA, the expression regulation sub-sequence DNA includes modified Kozak sequence DNA and upstream ORF sequence DNA located downstream of the modified Kozak sequence DNA, and the nucleotide sequence for the expression regulation sub-sequence DNA includes only one nucleotide sequence



WO 2022/196245 A1

HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

---

for an initiation codon.

(57) 要約：上流ORFが存在していても、下流のORFの翻訳効率を実用的な水準で低下させることができない問題が存在していた。本発明の目的は、発現調節配列DNAを備え、上記発現調節配列DNAは、1又は複数の副発現調節配列DNAを備え、上記副発現調節配列DNAは、改変型Kozak配列DNAと上記改変型Kozak配列DNAの下流に上流ORF配列DNAとを備え、上記副発現調節配列DNAの塩基配列は、開始コドンの塩基配列を1つだけ備える、選択マーカ－発現カセットを提供することである。

## 明 細 書

発明の名称： 選択マーカー発現カセット

### 技術分野

[0001] 本発明は、選択マーカー発現カセット、特に、目的タンパク質を高発現する動物培養細胞を効率的に選抜することが可能な選択マーカー発現カセットに関する。

### 背景技術

[0002] これまで目的タンパク質を高レベルで発現する細胞を効率的に選抜することを目的に、選択マーカーの発現や機能を減弱化することに基づく様々な方法が開発されてきた。選択マーカーの発現や機能を減弱化する方法としては、転写活性の弱いプロモーターを利用する方法、選択マーカーの発現カセットにmRNA不安定化配列を導入する方法、選択マーカーのコード配列に変異を導入して選択マーカータンパク質自体の機能を減弱化する方法などが挙げられる。

[0003] 不必要なタンパク質の発現や機能を減弱化する方法の一つに、Upstream open reading frame (上流ORF又はuORF)を利用した方法が存在する。上流ORFは、mRNAの5'非翻訳領域に存在し、下流のORFの翻訳を様々な機構で制御するが、一般に上流ORFの翻訳は下流のORFの翻訳効率を低下させることが知られている(非特許文献1及び2)。

### 先行技術文献

#### 非特許文献

[0004] 非特許文献1: Calvo SE, Pagliarini DJ, Mootha VK, "Upstream open reading frames cause widespread reduction of protein expression and are polymorphic among humans" Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Proceedings of the National Academy of Sciences, May 2009, 106 (18): 7507-12.

非特許文献2: Joshua P Ferreira, William L Noderer, Alexander J Diaz d

e Arce & Clifford L Wang, "Engineering ribosomal leaky scanning and upstream open reading frames for precise control of protein translation", Bioengineered, 2014, 5:3, 186-192, DOI: 10.4161/bioe.27607

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0005] しかしながら、上流ORFが存在する場合、上流ORFの開始コドンがリボソームによって認識されて翻訳される場合（パターン1）とリボソームが上流ORFを通過する場合（パターン2）が存在していた。

[0006] パターン1は、以下のサブクラスに分類される。

パターン1-1：上流ORFの翻訳終了後、リボソームがmRNAから離れ、下流ORFが翻訳されない。

パターン1-2：上流ORFの翻訳終了後、リボソームがmRNAから離れることなく下流ORFの開始コドンを認識して翻訳が開始される。

パターン1-4：上流ORFの翻訳終了後、リボソームがmRNAから離れないが、下流ORFの開始コドンを通過するため、下流ORFは翻訳されない。

[0007] パターン2は、以下のサブクラスに分類される。

パターン2-1：下流ORFの開始コドンを認識して翻訳を開始する。

パターン2-2：下流ORFの開始コドンも通過するため、下流ORFは翻訳されない。

[0008] このように、上流ORFが存在していても、下流のORFの翻訳効率を実用的な水準で低下させることができない問題が存在していた。即ち、この技術では、目的タンパク質を高レベルで発現することを目的に、選択マーカーの発現や機能を効果的に減弱化することができなかった。

### 課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは、下流ORFの翻訳効率を低下させるために、（1）上流ORFの開始コドンの認識効率を高め且つ（2）下流ORFの開始コドンの認識効率を低下させる技術を研究した。その結果、改変型Kozak配列DNA及び短いORF（上流ORF）配列DNAを、発現を減弱化させたい遺伝子の上流に挿入することによっ

て、選択マーカー遺伝子の発現を効果的に減弱化することに成功し、本発明は完成した。

[0010] 本発明の目的は、  
発現調節配列DNAを備え、  
上記発現調節配列DNAは、1又は複数の副発現調節配列DNAを備え、  
上記副発現調節配列DNAは、改変型Kozak配列DNAと上記改変型Kozak配列DNAの下流に上流ORF配列DNAとを備え、  
上記副発現調節配列DNAの塩基配列は、開始コドンの塩基配列を1つだけ備える、  
選択マーカー発現カセット  
を提供することである。

[0011] 本発明にかかる選択マーカー発現カセットを用いることで、選択マーカーの発現を減弱化させ、選択マーカー遺伝子の翻訳効率を低下させることができる。

[0012] 上記1又は複数の副発現調節配列DNAは、1つ、2つ又は3つの副発現調節配列DNAであってもよい。

[0013] 上記上流ORF配列DNAは、配列番号：1又は2で表される塩基配列、又は  
その塩基配列と、  
1) 95%以上の配列相同性を有する塩基配列、又は、  
2) 1または数塩基が欠失、置換、付加されている塩基配列、又は、  
3) 相補的な配列とストリンジентな条件下でハイブリダイズすることができる塩基配列  
からなるものであってもよい。

[0014] 上記改変型Kozak配列DNAは、配列番号：3で表される塩基配列、又は、  
その塩基配列と、  
1) 95%以上の配列相同性を有する塩基配列、又は、

- 2) 1 または数塩基が欠失、置換、付加されている塩基配列、又は、  
3) 相補的な配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができる塩基配列  
からなるものであってもよい。

- [0015] 本発明の別の目的は、  
上記選択マーカ発現カセットを備える、  
発現ベクターを提供することである。
- [0016] 本発明にかかる発現ベクターを用いることで、選択マーカ発現を減弱化させ、選択マーカ遺伝子の翻訳効率を低下させることができる。
- [0017] 上記発現ベクターは、2つの末端tDNAインシュレーターを更に備えていてもよい。上記選択マーカ発現カセットは、上記2つの末端tDNAインシュレーターの上に位置してもよい。
- [0018] 上記発現ベクターは、1又は複数の目的タンパク質発現カセットを更に備えていてもよい。上記1又は複数の目的タンパク質発現カセットは、上記2つの末端tDNAインシュレーターの上に位置してもよい。
- [0019] 上記発現ベクターは、更に、1又は複数の中間tDNAインシュレーターを備えていてもよい。上記1又は複数の目的タンパク質発現カセットは、複数の目的タンパク質発現カセットであってもよい。少なくとも1の上記中間tDNAインシュレーターが、上記複数の目的タンパク質発現カセットのうちの1つと隣接する目的タンパク質発現カセットとの間に存在していてもよい。
- [0020] 上記中間tDNAインシュレーターは、マウスtRNA遺伝子由来の塩基配列を有してもよい。
- [0021] 上記末端tDNAインシュレーターは、マウスtRNA遺伝子由来の塩基配列を有してもよい。
- [0022] 上記選択マーカ発現カセットは、選択マーカ遺伝子を更に備えていてもよい。上記選択マーカ遺伝子は、上記発現調節配列DNAの下流に位置してもよい。
- [0023] 上記上流ORF配列DNAの塩基配列が配列番号：2からなる場合、上記選択マ

ーカー遺伝子の開始コドン配列は、上記上流ORF配列DNAの塩基配列中に含まれていてもよい。

### 図面の簡単な説明

[0024] [図1]図1は、本実施例で使用する発現ベクター作製用プラスミド（pCHR002）の模式図を示している。

[図2]図2は、本実施例で使用する第2遺伝子クローニング用プラスミド（pCHR006）の模式図を示している。

[図3]図3は、発現ベクター作製用プラスミド（pCHR002）にハーセプチン軽鎖遺伝子が導入されたベクタープラスミド（pCHR002-Lc）の模式図を示している。

[図4]図4は、第2遺伝子クローニング用プラスミド（pCHR006）にハーセプチン重鎖遺伝子が導入されたベクタープラスミド（CHR008）の模式図を示している。

[図5]図5は、図3に示すベクタープラスミド（pCHR002-Lc）に、図4に示すベクタープラスミド（pCHR008）由来のハーセプチン重鎖遺伝子を含む断片が導入されたハーセプチン発現ベクター（pCHR012）の模式図を示している。

[図6]図6は、本実施例で使用するベクタープラスミドにおける改変型コザック配列及び上流ORFの位置並びに改変型コザック配列（下線）及び上流ORF（四角枠）の塩基配列を整列配置した模式図を示している。

[図7]図7は、Mammalian PowerExpress System（登録商標）（TOYOBO）にハーセプチン遺伝子を導入したハーセプチン発現ベクター（pELC2+HC）の模式図を示している。

[図8]図8は、pCHR012、pCHR042、pCHR067、pCHR068、pCHR069及びpELC2+HCを導入した各細胞から分泌されたハーセプチン量のグラフを示している。

[図9]図9は、pELC2+HC、pCHR042、pCHR069を導入した各細胞から分泌されたハーセプチン量のグラフを示している。

### 発明を実施するための形態

[0025] 以下、本発明の実施形態について説明する。以下の実施形態は、例示であ

って、本発明の範囲は、以下の実施形態で示すものに限定されない。なお、同様な内容については繰り返しの煩雑をさけるために、摘示説明を省略する。

[0026] 定義

便宜上、本願で使用される特定の用語は、ここに集めている。別途規定されない限り、本願で使用される全ての技術用語及び科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者が一般的に理解するのと同じ意味を有する。文脈で別途明記されない限り、単数形「a」、「an」及び「the」は複数の言及を含む。

[0027] 本発明で示す数値範囲及びパラメーターは、近似値であるが、特定の実施例に示されている数値は可能な限り正確に記載している。しかしながら、いずれの数値も本質的に、それぞれの試験測定値に見られる標準偏差から必然的に生じる特定の誤差を含んでいる。また、本明細書で使用する「約」という用語は、一般に、所与の値又は範囲の10%、5%、1%又は0.5%以内を意味する。或いは、用語「約」は、当業者が考慮する場合、許容可能な標準誤差内にあることを意味する。

[0028] 本明細書、図面及び配列表の塩基配列は、別途規定されない限り、5'末端から3'末端の順番で記載している。例えば、「100番目の塩基」は、5'末端から100番目の塩基を意味する。用語「逆相補配列」は、ある配列に対して逆相補の関係にある配列を意味する。例えば、5'-AAATTCGG-3'配列の逆相補配列は、5'-CCGAATTT-3'である。また、「上流」は、5'末端方向を指し、「下流」は、3'末端方向を意味する。

[0029] 開始コドンは、タンパク質の合成開始を指定するコドンを指し、通常は、塩基配列ATG又はAUGで表される。

[0030] 本実施形態にかかる核酸分子(例えば、DNA、領域、カセット、ゲノム及びベクタープラスミド)の塩基配列は、その塩基配列と、

- 1) 95%以上の配列相同性を有する塩基配列である、または、
- 2) 1または数塩基が欠失、置換、付加されている塩基配列である、または、

3) 相補的な配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができる塩基配列であっても良い。

[0031] なお、本明細書において同一性・相同性を示す値は、BLASTなどの公知のプログラムを利用することにより算出することができる。配列番号に示される塩基配列と配列相同性を有する塩基配列は、95%以上の配列相同性を有していればよく、例えば、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上、99.5%以上、99.8%以上であっても良い。

[0032] 本明細書において、「1または数塩基が欠失、置換、付加されている塩基配列」における「数塩基」は、例えば、2~10塩基、2~9塩基、2~8塩基、2~7塩基、2~6塩基、2~5塩基、2~4塩基、2~3塩基、2塩基である。欠失、置換、付加した塩基の数は、一般的に少ないほど好ましい。塩基の欠失、置換、付加のうち2種以上が同時に生じてもよい。なお、塩基の欠失、置換、付加については、公知の技術を用いることができる。

[0033] 本明細書において、「ストリンジェントな条件」とは、例えば以下の(1)(2)などが挙げられる。

(1) イオン強度が低く洗浄温度が高い状態として、たとえば0.015MのNaCl/0.0015Mのクエン酸ナトリウム(チトラート)/0.1%SDSで温度50℃が挙げられる。あるいは

(2) ハイブリッド形成中にホルムアミド等の変性剤を使用して、たとえば、50%(vol/vol)ホルムアミドに、0.1%ウシ血清アルブミン/0.1% Ficoll / 0.1% polyvinylpyrrolidone / 50mMリン酸ナトリウムバッファpH6.5、750mM NaCl、75mMクエン酸ナトリウムで温度42℃とすることが挙げられる。別の例としては、50%ホルムアミド、5×SSC(0.75M NaCl, 0.075Mクエン酸ナトリウム)、50mMリン酸ナトリウム(pH6.8)、0.1%ピロリン酸ナトリウム、5×デンハルト液、超音波処理されたサーモン sperm DNA(50μg/ml)、0.1%SDS、10%硫酸デキストラン、温度42度、洗浄温度42℃、0.2×SSC、0.1%SDSが挙げられる。

また、当業者であれば、クリアで検出可能なハイブリダイゼーションシグナルを得るべく、ストリンジントな条件を適宜変更できることは、明らかである。

[0034] なお、本明細書において、分子生物学の手法（例えば、クローニング、プラスミド抽出、DNA断片の切断、連結、ハイブリダイゼーション、部位特異的変異導入法、PCR法、ウエスタンブロット法等々の手法）は、当業者によく知られている通常の方法を採用することができる。これらの方法は、Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T., "Molecular Cloning A Laboratory Manual, Second Edition", Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989)等を参照することができる。

[0035] 実施形態

選択マーカ発現カセット

本実施形態にかかる選択マーカ発現カセットは、  
発現調節配列DNAを備え、  
上記発現調節配列DNAは、1又は複数の副発現調節配列DNAを備え、  
上記副発現調節配列DNAは、改変型Kozak配列DNAと上記改変型Kozak配列DNAの下流に上流ORF配列DNAとを備え、  
上記副発現調節配列DNAの塩基配列は、開始コドンの塩基配列を1つだけ備える。

[0036] Kozak配列DNAの塩基配列は、真核生物のmRNAに出現する共通配列であり、主に翻訳の開始に関与している。ただし厳密な共通配列ではなく、不一致のあることも非常に多い。脊椎動物のKozak配列は、(gcc)gccRccAUGG（配列番号：39）と表され、なかでも開始コドン(AUG)の3塩基上流のR（プリン塩基、アデニン又はグアニン）と開始コドンの次のGが重要な役割を果たすと考えられている（Kozak M. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res.* 1987;15(20):8125-8148. doi:10.1093/nar/15.20.8125）。Kozak配列において、（1）小文字は、塩基が変わり得るが、その位置でのもっとも一般的な塩基を表示し、（2）「AUG

G] 配列は、高度に保存された塩基を指し示し、(3) 括弧中の配列(gcc)は不確かな意義(uncertain significance)のものである。

[0037] 本実施形態における改変型Kozak配列DNAは、Kozak配列DNAとは異なる塩基配列を有する。上記改変型Kozak配列DNAは、配列番号：3で表される塩基配列(GCCACC)、又は、その変異型塩基配列

(その塩基配列と、

- 1) 95%以上の配列相同性を有する塩基配列、又は、
- 2) 1または数塩基が欠失、置換、付加されている塩基配列、又は、
- 3) 相補的な配列とストリンジントな条件下でハイブリダイズすることができる塩基配列)

からなるであってもよい。

上記改変型Kozak配列DNAの塩基配列には、開始コドンとしての役割を果たすATG配列が含まれない。

[0038] 本実施形態における上流ORF配列DNAは、改変型Kozak配列DNAの下流に位置する。上流ORF配列DNAは、開始コドン(ATG)を1つだけ備える。言い換えれば、副発現調節配列DNAは、開始コドンを1つだけ備える。ある実施形態において、上流ORF配列DNAの開始コドン(ATG)は、その5'末端に位置する。上流ORF配列DNAの塩基配列は、開始コドン(ATG)の下流に、上流ORFの開始コドンとしての役割を果たさないATG配列を備えていてもよい。

[0039] 上記上流ORF配列DNAは、配列番号：1(ATGGCTTGA)又は配列番号：2(ATGGCTCTAGAAATCGGATGA)で表される塩基配列、又は、その変異型塩基配列

(その塩基配列と、

- 1) 95%以上の配列相同性を有する塩基配列、又は、
- 2) 1または数塩基が欠失、置換、付加されている塩基配列、又は、
- 3) 相補的な配列とストリンジントな条件下でハイブリダイズすることができる塩基配列)

からなるであってもよい。

上流ORF配列DNAの塩基配列には、配列番号：3で表される塩基配列もその

変異型塩基配列も含まれない。

- [0040] ある実施形態において、上流ORF配列DNAは、改変型Kozak配列DNAに直接連結している（言い換えれば、いかなる塩基も上流ORF配列DNAと改変型Kozak配列DNAとの間に存在しない）。別の実施形態において、上流ORF配列DNAは、スペーサーDNAを介して改変型Kozak配列DNAに連結している。スペーサーDNAは、1、2、3、4又は5つの任意の塩基からなってもよい。スペーサーDNAは、開始コドンとしての役割を果たすATG配列を備えない。
- [0041] 選択マーカー発現カセットは、発現調節配列DNAに加えて、プロモーター（例えば、マウスPGKプロモーター）及び/又はポリAシグナル（例えば、BGHポリAシグナル）を備えていてもよい。また、選択マーカー発現カセットは、蛍光選択マーカー遺伝子（例：緑色蛍光タンパク質（GFP）をコードするDNA）、薬剤選択マーカー遺伝子（例えば、ピューロマイシン耐性遺伝子及びネオマイシン耐性遺伝子）及び/又は栄養選択マーカー遺伝子（例：グルタミン合成酵素遺伝子）を含む選択マーカー遺伝子を備えていてもよい。ある実施形態において、選択マーカー発現カセットは、プロモーター、発現調節配列DNA、選択マーカー遺伝子及びポリAシグナルを備えていてもよい。
- [0042] 「選択マーカー遺伝子」の発現量は、本実施形態の構成を採用していない（発現抑制を受けていない）「選択マーカー遺伝子」の発現量と比較して、0.5%、1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%又は99%以上減弱している。
- [0043] 発現調節配列DNAは、1又は複数の副発現調節配列DNAを備える。ある実施形態において、発現調節配列DNAが複数の副発現調節配列DNAを備える場合、ある副発現調節配列DNAは、隣接する副発現調節配列DNAと直接接続している。別の実施形態において、発現調節配列DNAが複数の副発現調節配列DNAを備える場合、ある副発現調節配列DNAは、スペーサーDNAを介して隣接する副発現調節配列DNAと直接接続している。スペーサーDNAは、1、2、3、4又は5つの任意の塩基からなってもよい。スペーサーDNAは、開始コドンとしての役割を果たすATG配列を備えない。ある実施形態において、1又は複数の

副発現調節配列DNAは、1つ、2つ又は3つの副発現調節配列DNAである。

[0044] 上記上流ORF配列DNAの塩基配列が配列番号：2からなる場合、発現調節配列DNAは、1つの副発現調節配列DNAを備えていてもよい。上記上流ORF配列DNAの塩基配列が配列番号：2からなる場合、上記選択マーカ－遺伝子の開始コドン配列は、上記上流ORF配列DNAの塩基配列中に含まれて（存在して）いてもよい。また、上記上流ORF配列DNAの塩基配列が配列番号：2からなる場合、上記上流ORF配列DNAの読み枠は、上記選択マーカ－遺伝子の開始コドンとオーバーラップしてもよい。

[0045] Kozak配列、改変型Kozak配列及びそれらの変異型塩基配列は、選択マーカ－遺伝子と隣接する上流ORF配列の間には存在しない。

[0046] 発現ベクター

本実施形態にかかる発現ベクターは、選択マーカ－発現カセットを備える。

[0047] 本実施形態における発現ベクターは、クローニングベクターに、選択マーカ－発現カセットを挿入等することで作成することができる。上記のクローニングベクターとしては、例えば、プラスミド、ファージ、ファージミド、コスミド、フォスミドまたは、人工染色体などがあげられる。具体的には大腸菌由来のプラスミド（例えばpBR322、pBR325、pUC12、pUC13）、酵母由来プラスミド（例えばpSH19、pSH15）、枯草菌由来のプラスミド（例えばpUB110、pTP5、pC194）、動物細胞発現プラスミド（例えばpA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pcDNA1/Neo）、λファージなどのバクテリオファージ、HIV、アデノウイルス、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどのウイルス由来のベクターや人工染色体などを用いることができる。

[0048] 本実施形態にかかる発現ベクターは、2つの末端tDNAインシュレーターを更に備えていてもよい。本実施形態にかかる発現ベクターが2つの末端tDNAインシュレーターを備えている場合、上記選択マーカ－発現カセットは、上

記2つの末端tDNAインシュレーターの間位置することが好ましい。末端tDNAインシュレーターは、プロモーター干渉、サイレンシングを低減させ、遺伝子発現安定化に関与する、遺伝子の発現単位を区切ることが可能な塩基配列からなるDNAであり、例えば、マウスtRNA遺伝子の塩基配列からなるDNAを挙げることができる。

[0049] 本実施形態にかかる発現ベクターは、1又は複数の目的タンパク質発現カセットを備えることができる。本実施形態にかかる発現ベクターが1又は複数の目的タンパク質発現カセットを備える場合、上記1又は複数の目的タンパク質発現カセットは、上記2つの末端tDNAインシュレーターの間位置することが好ましい。目的タンパク質発現カセットは、目的タンパク質を発現する遺伝子を備える。一実施形態において、目的タンパク質発現カセットは、目的タンパク質を発現する遺伝子に加えて、プロモーター（例えば、ヒトEF1 $\alpha$ プロモーター）、翻訳効率を高める因子（例えば、 $\beta$ グロビンリーダー配列）、mRNAを安定化する因子（例えば、Woodchuck hepatitis virus Post-transcriptional Regulatory Element (WPRE) 配列及びポリAシグナル (SV40ポリAシグナル) からなる群より選択される少なくとも1つを備えていてもよい。

[0050] 「目的タンパク質」は、「選択マーカー遺伝子」の発現量を減弱化させることで、その発現量を増加させたいタンパク質を指す。本実施形態の構成中における「目的タンパク質」の発現量は、本発明の構成を採用していない（選択マーカーが発現抑制を受けていない）「目的タンパク質」の発現量と比較して、1.5倍、2.0倍、2.5倍、3.0倍、3.5倍、4.0倍、4.5倍又は5.0倍以上増加する。

[0051] 本実施形態にかかる発現ベクターは、1又は複数の中間tDNAインシュレーターを備えることができる。本実施形態にかかる発現ベクターが複数の目的タンパク質発現カセットを備える場合、少なくとも1の上記中間tDNAインシュレーターが、上記複数の目的タンパク質発現カセットのうちの1つと隣接する目的タンパク質発現カセットとの間に存在することが好ましい。中間tDNA

Aインシュレーターは、中間tDNAインシュレーターと同じであってもよく、例えば、マウスtRNA遺伝子の塩基配列からなるDNAを挙げることができる。

## 実施例

### [0052] 実施例 1

発現ベクター作製用プラスミド (pCHR002) および第2遺伝子クローニング用プラスミド (pCHR006) の構築

VectorBuilder社のオンラインプラットフォーム上で利用可能な標準コンポーネントで構成され、VectorBuilder社によって構築されたプラスミド (ベクターID: VB900085-9593ncv及び VB190621-1088bqm) および人工合成したtDNAを含むプラスミド (Ebersole T, Kim JH, Samoshkin A, et al. tRNA genes protect a reporter gene from epigenetic silencing in mouse cells. *Cell Cycle*. 2011;10(16):2779-2791.を参照) を用意した。これらのプラスミドに基づいて、図1に表示する制限酵素サイトが付加されるように表1に示すコンポーネントをPCR法によって増幅した。

### [0053] [表1]

コンポーネント	配列番号
tDNA	27
ヒト elongation factor 1 alpha (EF-1 $\alpha$ ) promoter	28
シアミンウイルス 40 後期ポリ A 付加シグナル (SV40 late pA)	29
Mouse phosphoglycerate kinase 1 (mPGK) promoter	30
ピューロマイシン耐性遺伝子 (PuroR)	31
ウシ成長ホルモンポリ A 付加シグナル (BGH pA)	32

[0054] 各コンポーネントは、表2に示すプライマーを使用してPCR法によって増幅させた。

### [0055]

[表2]

	Fプライマー	Rプライマー
コンポーネント	配列番号	配列番号
tDNA (AscI-EcoRI)	4	5
ヒト elongation factor 1 alpha (EF-1 $\alpha$ ) promoter	6	7
シアミンウイルス 40 後期ポリ A 付加シグナル (SV40 late pA)	8	9
Mouse phosphoglycerate kinase 1 (mPGK) promoter	10	11
ピューロマイシン耐性遺伝子 (PuroR)	12	13
ウシ成長ホルモンポリ A 付加シグナル (BGH pA)	14	15
tDNA (BsiWI-NotI)	16	17

[0056] これらのコンポーネントをNEBuilder HiFi DNA Assembly (New England Biolabs) を用いて結合させた。結合DNA断片は、AscI\_tDNA-F2 (配列番号: 18) とNotI\_tDNA-R2 (配列番号: 19) のプライマーセットを用いてPCRによって増幅させた。増幅させた結合DNA断片を、VectorBuilder社によって構築されたプラスミド(VB900085-9593ncv)骨格の制限酵素AscI、NotIサイトへ導入し、新しい発現ベクター作製用プラスミドpCHR002を構築した(図1)。pCHR002は、tDNA、ヒトEF-1 $\alpha$  promoter、SV40 late pA、mPGK promoter、PuroR、BGH pA、細菌複製起点(pUC ori)、アンピシリン耐性マーカー(AmpR)を含有する。

[0057] 同様に、tDNA、ヒトEF-1 $\alpha$  promoter、SV40 late pA、pUC ori、AmpRを含有する、第2遺伝子クローニング用プラスミドpCHR006を構築した(図2)。各コンポーネントは、表3に示すプライマーを使用してPCR法によって増幅させた。

[0058]

[表3]

	Fプライマー	Rプライマー
コンポーネント	配列番号	配列番号
tDNA (AscI_MluI_NdeI-EcoRI)	20	5
ヒト elongation factor 1 alpha (EF-1 $\alpha$ ) promoter	6	7
シアミンウイルス 40 後期ポリ A 付加シグナル (SV40 late pA)	8	21

[0059] これらのコンポーネントをNEBuilder HiFi DNA Assembly (New England Biolabs) を用いて結合させた。結合DNA断片は、AscI\_MluI\_NdeI\_tDNA-F (配列番号: 20) とNotI\_PacI\_EcoT22I\_SV40pA-R (配列番号: 21) のプライマーセットを用いてPCRによって増幅させた。増幅させた結合DNA断片を、VectorBuilder社によって構築されたプラスミド(VB900085-9593ncv)骨格の制限酵素AscI、NotIサイトへ導入し、pCHR006を構築した。

[0060] ハーセプチン発現ベクターの構築

人工合成したハーセプチン遺伝子を含むプラスミド (pELC2+HC (TOYOBO, Mammalian PowerExpress System (登録商標))) に基づいて、ハーセプチン軽鎖遺伝子 (配列番号: 33) 及びハーセプチン重鎖遺伝子 (配列番号: 34) をPCRによって増幅した。使用したプライマーは表4に示す。

[0061] [表4]

	Fプライマー	Rプライマー
コンポーネント	配列番号	配列番号
ハーセプチン軽鎖遺伝子	22	23
ハーセプチン重鎖遺伝子	24	25

[0062] ハーセプチン軽鎖遺伝子をHindIII及びSalI制限酵素サイトを付加するようにPCRによって増幅した。増幅したハーセプチン軽鎖遺伝子をpCHR002のHindIII及びSalIサイトへ導入することで、pCHR002-Lcを構築した (図3)。同様に、ハーセプチン重鎖遺伝子をHindIII及びSbfI制限酵素サイトを付加するようにPCRによって増幅した。増幅したハーセプチン重鎖遺伝子をpCHR006のHindI

II及びSbfIサイトへ導入することで、pCHR008を構築した（図4）。次に、pCHR008からハーセプチン重鎖遺伝子を含む断片を制限酵素MluI及びNsiIによって切り出した。切り出した断片をpCHR002-LcのMluI及びNsiIサイトへ導入することで、ハーセプチン発現ベクターpCHR012を構築した（図5）。

[0063] マーカー減弱化ハーセプチン発現ベクター（pCHR027、pCHR042、pCHR067、pCHR068、pCHR069）の構築

pCHR012を鋳型にPacI-YB\_TATA-B-X-ΔK-PuroR-F（配列番号：26）とBamHI\_PuroR-R（配列番号：13）のプライマーセットで増幅したPCR産物を、pCHR012のXbaI及びBamHIサイトへ導入した。これによって、ピューロマイシン耐性遺伝子のコザック配列に変異を入れたpCHR027を構築した（図6）。

[0064] pCHR027を鋳型にPacI\_mPGKpro-F（配列番号：10）とXbaI-K-uORF-mPGK-R（配列番号：35）のプライマーセットで増幅したPCR産物を、pCHR027のPacI及びXbaIサイトへ導入した。これによって、ピューロマイシン耐性遺伝子に上流ORFを挿入したpCHR042を構築した（図6）。同様に、表5に示すプラスミドを、対応するプライマーセットを用いて増幅させたPCR産物をpCHR027のPacI及びXbaIサイトへ導入することで作成した。

[0065] [表5]

	Fプライマー	Rプライマー
発現ベクター	配列番号	配列番号
pCHR067	10	36
pCHR068	10	37
pCHR069	10	38

[0066] 図6に示す通り、pCHR067は、ピューロマイシン耐性遺伝子に上流ORFが2つ挿入され、pCHR068は、ピューロマイシン耐性遺伝子に上流ORFが3つ挿入され、pCHR069は、ピューロマイシン耐性遺伝子の開始コドンにオーバーラップするように上流ORFが挿入されている。

[0067] pCHR012、pCHR042、pCHR067、pCHR068、pCHR069、pELC2+HGの細胞導入

浮遊培養に馴化させた $3 \times 10^5$  cells/mLのチャイニーズハムスター卵巢由来細胞CHO-G1（株式会社chromocenterが樹立）を12ウェルプレートに1 mLずつ

播種した。一晩接着培養して、トランスフェクション用のCHO-G1細胞を準備した。5% FBSを加えたProCHO4培地 (HT Supplement (1×) (GIBCO製)、L-Glutamine (2 mM) (GIBCO製)、Penicillin-Streptomycin (100 U/mL) (GIBCO製) を添加したProCHO4 Protein-free CHO Medium (LONZA製) ) を培地として使用した。

[0068] プラスミドとしてpCHR012、pCHR042、pCHR067、pCHR068、pCHR069、pELC2+HC (図7、TOYOBO, Mammalian PowerExpress System (登録商標) に人工合成したハーセプチン遺伝子を導入したハーセプチン発現ベクター) を使用した。トランスフェクションは、以下の方法で行った。1.6  $\mu\text{g}$ のプラスミドベクターを100  $\mu\text{L}$  Opti-MEM I Reduced Serum Medium (GIBCO製) で希釈した。4  $\mu\text{L}$  Lipofectamine 2000 Transfection Reagent (Invitrogen製) を100  $\mu\text{L}$  Opti-MEM I Reduced Serum Medium (GIBCO製) で希釈した。5分間放置した後、プラスミドの希釈液とLipofectamine 2000の希釈液を混合し、20分間放置した。その後、上記CHO-G1細胞 (培地をOpti-MEM I Reduced Serum Mediumに置き換えた細胞) に混合液を加え、24時間インキュベートした。インキュベーション後、細胞をAccumax (Innovative Cell Technologies製) で処理して分散させた。分散させた細胞を $\phi$  93×19.2 mm細胞培養ディッシュに移し、ProCHO4培地+5% FBSで培養した。翌日、細胞を培養している培地にPuromycin (Sigma-Aldrich製) を7.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で添加し、6-12日間の薬剤選抜接着培養を行った。選抜培養中、3-4日ごとに培地交換、あるいは適当な細胞密度で継代培養を行った。細胞が十分増殖した時点で5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Puromycinを含むProCHO4培地で浮遊静置培養に移行した。浮遊静置培養でさらに1週間程度細胞を培養し、ハーセプチン安定発現CHO-G1ヘテロセルプールを得た。

[0069] ハーセプチン生産性の評価

pCHR012、pCHR042、pCHR067、ppCHR068、CHR069、pELC2+HCの各発現ベクターを導入したそれぞれのハーセプチン安定発現CHO-G1ヘテロセルプールを5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Puromycinを含む新鮮なProCHO4培地で $2 \times 10^5$  cells/mLに調整した。2 mLのセルプールを6ウェルプレートに播種して37°Cで浮遊静置培養した。5日

後の培養上清を回収し、4000 rpmで5分間遠心して上清を回収することで生産ハーセプチンのサンプルとした。ハーセプチンの定量はAlphaLISA human IgG kit (PerkinElmer製) を用いてEnsign Multimode Plate Reader (PerkinElmer製) で測定した。

[0070] 図8は、pCHR012、pCHR042、pCHR067、pCHR068、pCHR069、pELC2+HCの各発現ベクターを導入したそれぞれのハーセプチン安定発現CHO-G1ヘテロセルプールの培養上清におけるハーセプチン定量の結果を示す。ピューロマイシン耐性遺伝子に上流ORFを挿入したベクター (pCHR042) は、上流ORFを挿入しないベクター (pCHR012) と比較して、ハーセプチン生産量が約3倍に増加した。また、上流ORFを2コピー搭載したベクター(pCHR067)は、ベクター (pCHR042) と比較して、さらにハーセプチン生産量が増加した。同様に、ピューロマイシン耐性遺伝子の開始コドンにオーバーラップするように上流ORFが挿入されているベクター(pCHR069)もベクター(pCHR067)と同程度のハーセプチン生産量であった。

#### [0071] 実施例 2

pELC2+HC、pCHR042、pCHR069のCHO-K1細胞への導入

CHO-K1細胞 (JCRB細胞バンク、IF050414) を株式会社chromocenterにて浮遊培養に馴化した。上記CHO-G1細胞と同様の方法を用いて、トランスフェクション用のCHO-K1細胞を準備し、pELC2+HC、pCHR042、pCHR069のトランスフェクションを行った。また、上記CHO-G1細胞と同様の方法を用いて、7日間の薬剤選抜接着培養を行い、細胞が十分増殖した時点で5  $\mu$ g/mL Puromycinを含むProCHO4培地で浮遊静置培養に移行した。浮遊静置培養でさらに2週間程度の細胞培養を行い、ハーセプチン安定発現CHO-K1ヘテロセルプールを得た。

#### [0072] ハーセプチン生産性の評価

上記CHO-G1細胞と同様の方法を用いて、pELC2+HC、pCHR042及びpCHR069の各発現ベクターを導入したそれぞれのハーセプチン安定発現CHO-K1ヘテロセルプールのハーセプチン生産量を測定した。図9は、pELC2+HC、pCHR042及びpCHR

R069の各発現ベクターを導入したそれぞれのハーセプチン安定発現CH0-K1ヘテロセルプールの培養上清におけるハーセプチン定量の結果を示す。この結果、pELC2+HCと比較して、pCHR042は約2.8倍、pCHR069は約4.5倍のハーセプチン生産量を示した。

## 請求の範囲

- [請求項1] 発現調節配列DNAを備え、  
前記発現調節配列DNAは、1又は複数の副発現調節配列DNAを備え、  
前記副発現調節配列DNAは、改変型Kozak配列DNAと前記改変型Kozak配列DNAの下流に上流ORF配列DNAとを備え、  
前記副発現調節配列DNAの塩基配列は、開始コドンの塩基配列を1つだけ備える、  
選択マーカー発現カセット。
- [請求項2] 前記1又は複数の副発現調節配列DNAは、1つ、2つ又は3つの副発現調節配列DNAである、  
請求項1に記載の選択マーカー発現カセット。
- [請求項3] 前記上流ORF配列DNAは、配列番号：1又は2で表される塩基配列、又は  
その塩基配列と、  
1) 95%以上の配列相同性を有する塩基配列、又は、  
2) 1または数塩基が欠失、置換、付加されている塩基配列、又は、  
3) 相補的な配列とストリンジントな条件下でハイブリダイズすることができる塩基配列  
からなる  
請求項1又は2に記載の選択マーカー発現カセット。
- [請求項4] 前記改変型Kozak配列DNAは、配列番号：3で表される塩基配列、又は、  
その塩基配列と、  
1) 95%以上の配列相同性を有する塩基配列、又は、  
2) 1または数塩基が欠失、置換、付加されている塩基配列、又は、  
3) 相補的な配列とストリンジントな条件下でハイブリダイズすることができる塩基配列  
からなる

- 請求項 1 から 3 のいずれかに記載の選択マーカ発現カセット。
- [請求項5] 請求項 1 から 4 のいずれかに記載の選択マーカ発現カセットを備える、  
発現ベクター。
- [請求項6] 2つの末端tDNAインシュレーターを更に備え、  
前記選択マーカ発現カセットは、前記2つの末端tDNAインシュレーターの間位置する、  
請求項5に記載の発現ベクター。
- [請求項7] 1又は複数の目的タンパク質発現カセットを更に備え、  
前記1又は複数の目的タンパク質発現カセットは、前記2つの末端tDNAインシュレーターの間位置する、  
請求項6に記載の発現ベクター。
- [請求項8] 更に、1又は複数の中間tDNAインシュレーターを備え、  
前記1又は複数の目的タンパク質発現カセットは、複数の目的タンパク質発現カセットであり、  
少なくとも1の前記中間tDNAインシュレーターが、前記複数の目的タンパク質発現カセットのうちの1つと隣接する目的タンパク質発現カセットとの間に存在する、  
請求項7に記載の発現ベクター。
- [請求項9] 前記中間tDNAインシュレーターは、マウスtRNA遺伝子由来の塩基配列を有する、  
請求項8に記載の発現ベクター。
- [請求項10] 前記末端tDNAインシュレーターは、マウスtRNA遺伝子由来の塩基配列を有する、  
請求項6から9に記載の発現ベクター。
- [請求項11] 前記選択マーカ発現カセットは、選択マーカ遺伝子を更に備え、  
前記選択マーカ遺伝子は、前記発現調節配列DNAの下流に位置す

る、

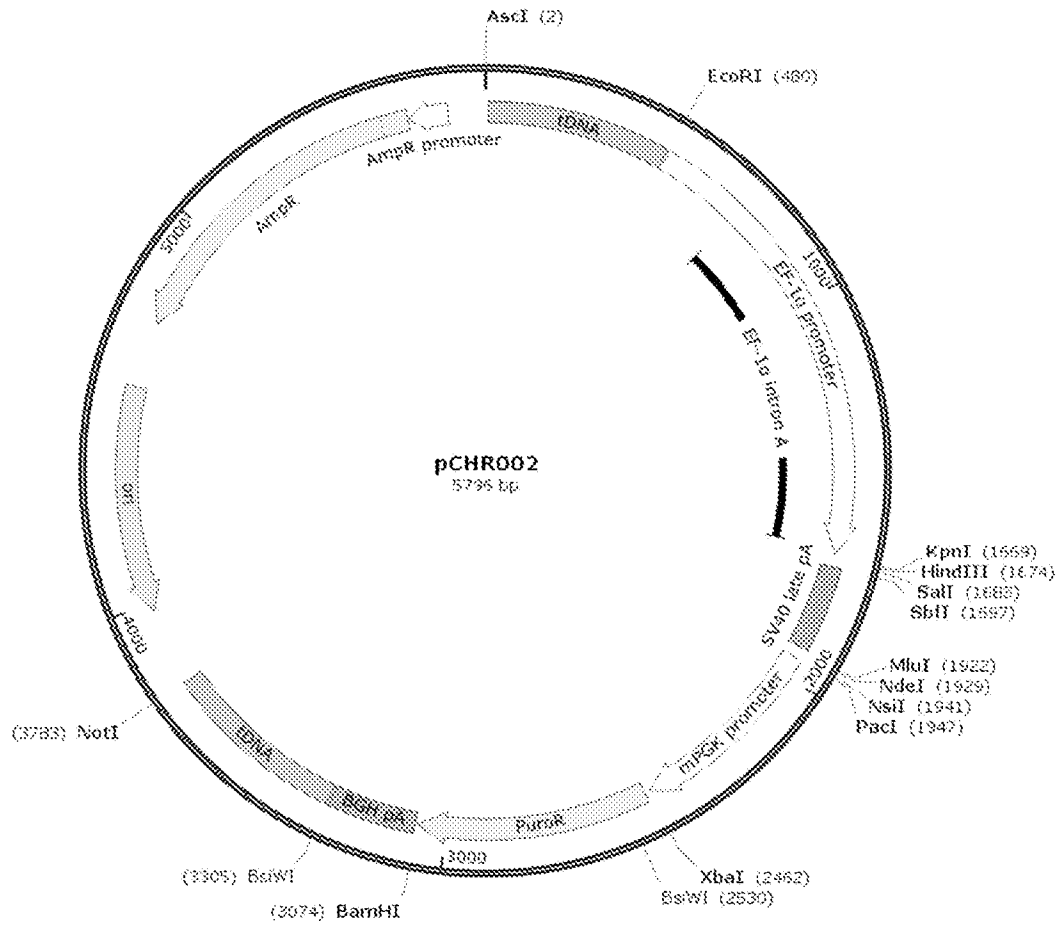
請求項5から10のいずれかに記載の発現ベクター。

[請求項12]

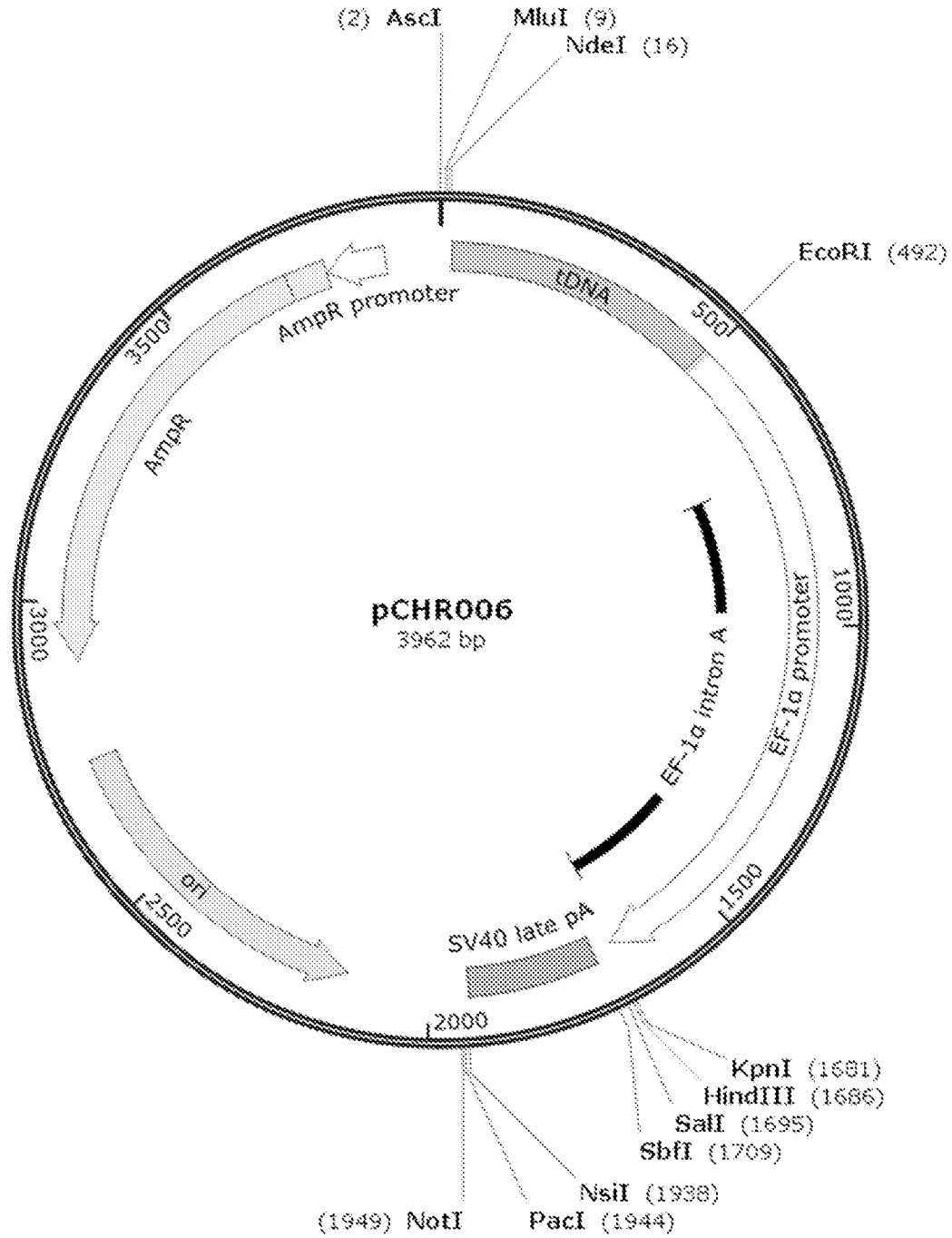
前記上流ORF配列DNAの塩基配列が配列番号：2からなる場合、前記選択マーカ遺伝子の開始コドン配列は、前記上流ORF配列DNAの塩基配列中に含まれる、

請求項11に記載の発現ベクター。

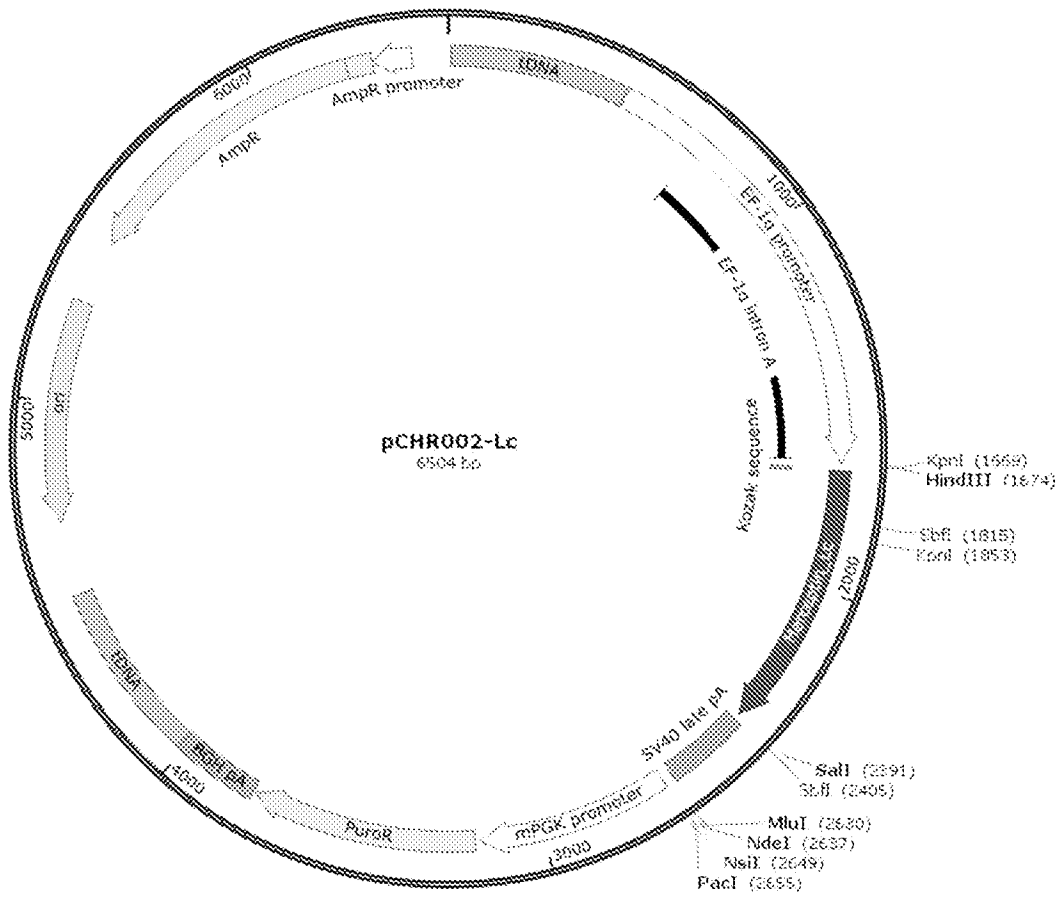
[図1]



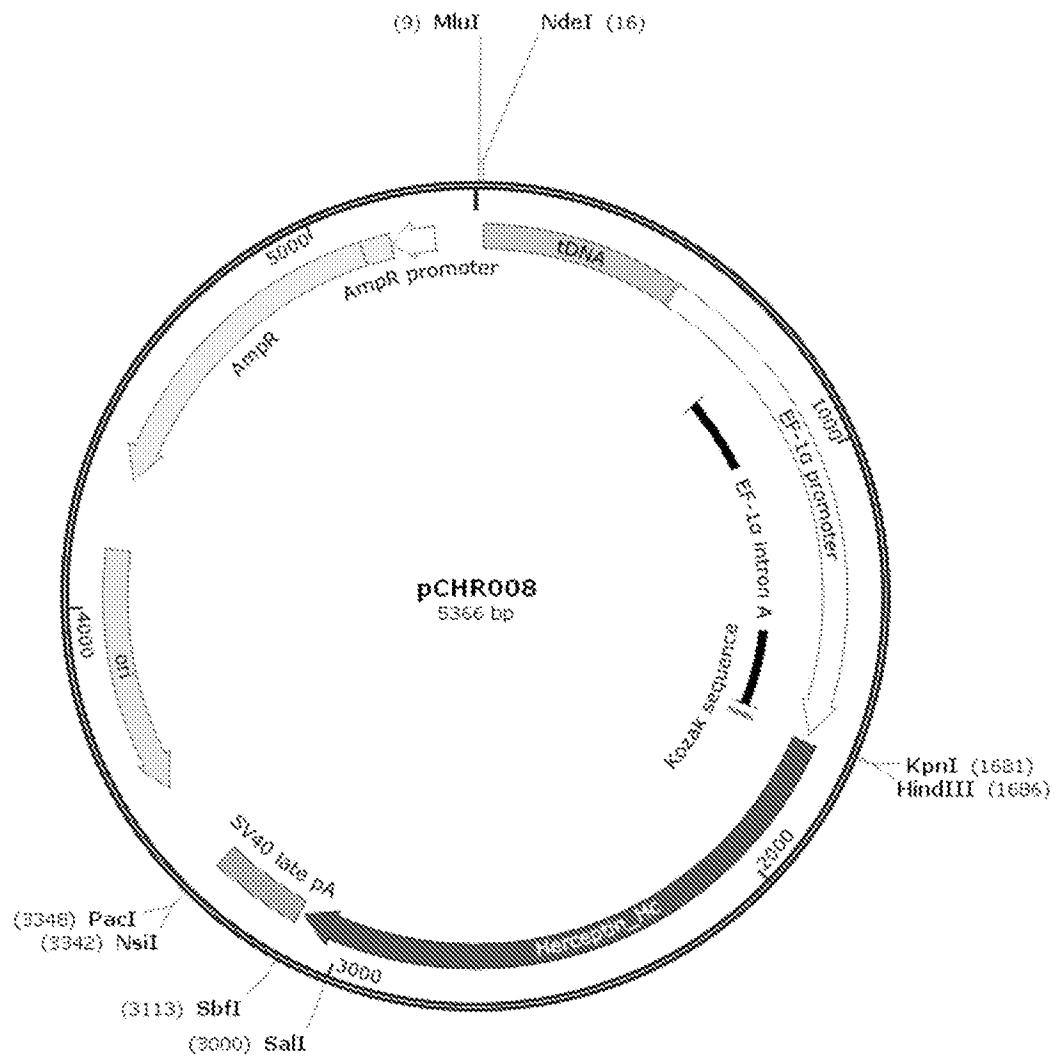
[図2]



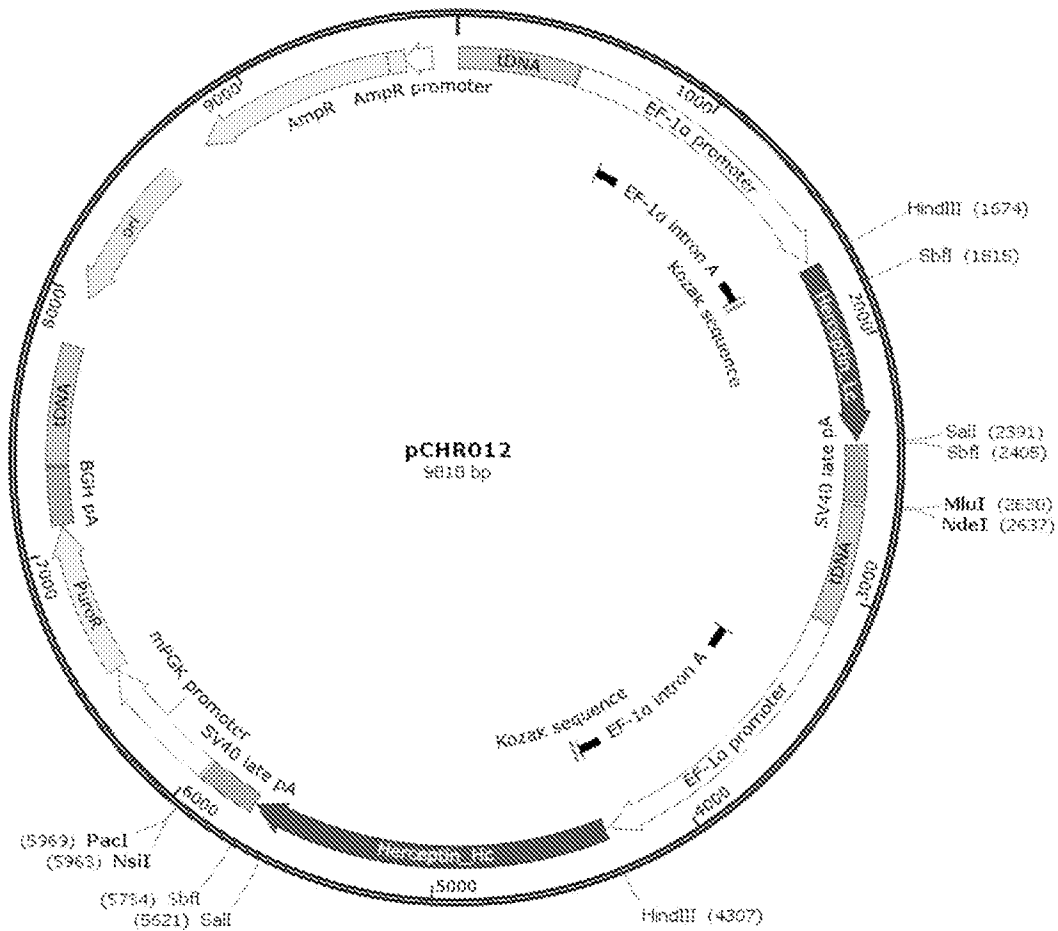
[圖3]



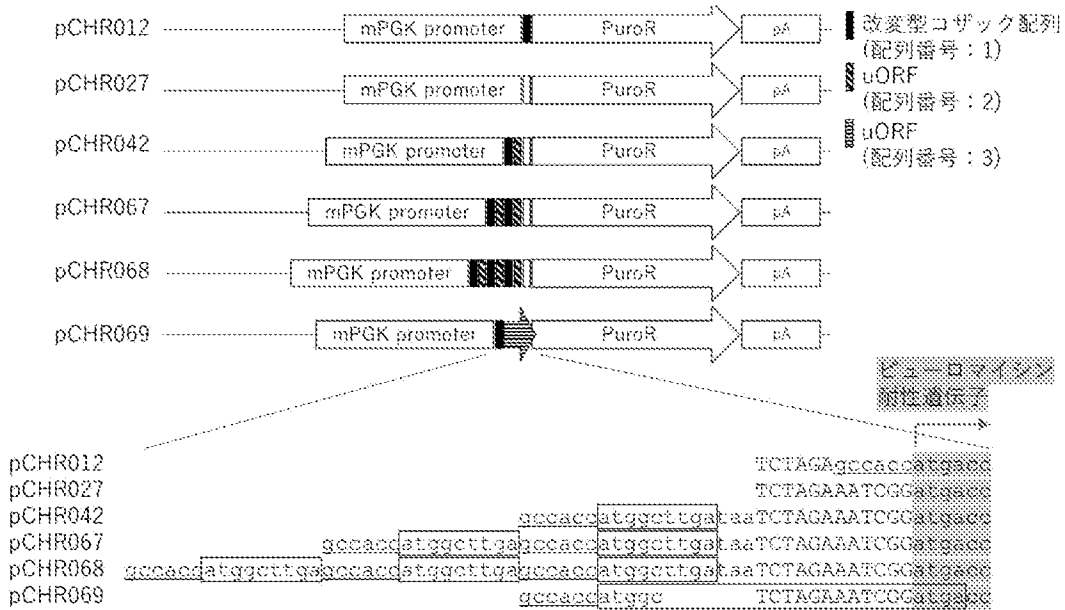
[図4]



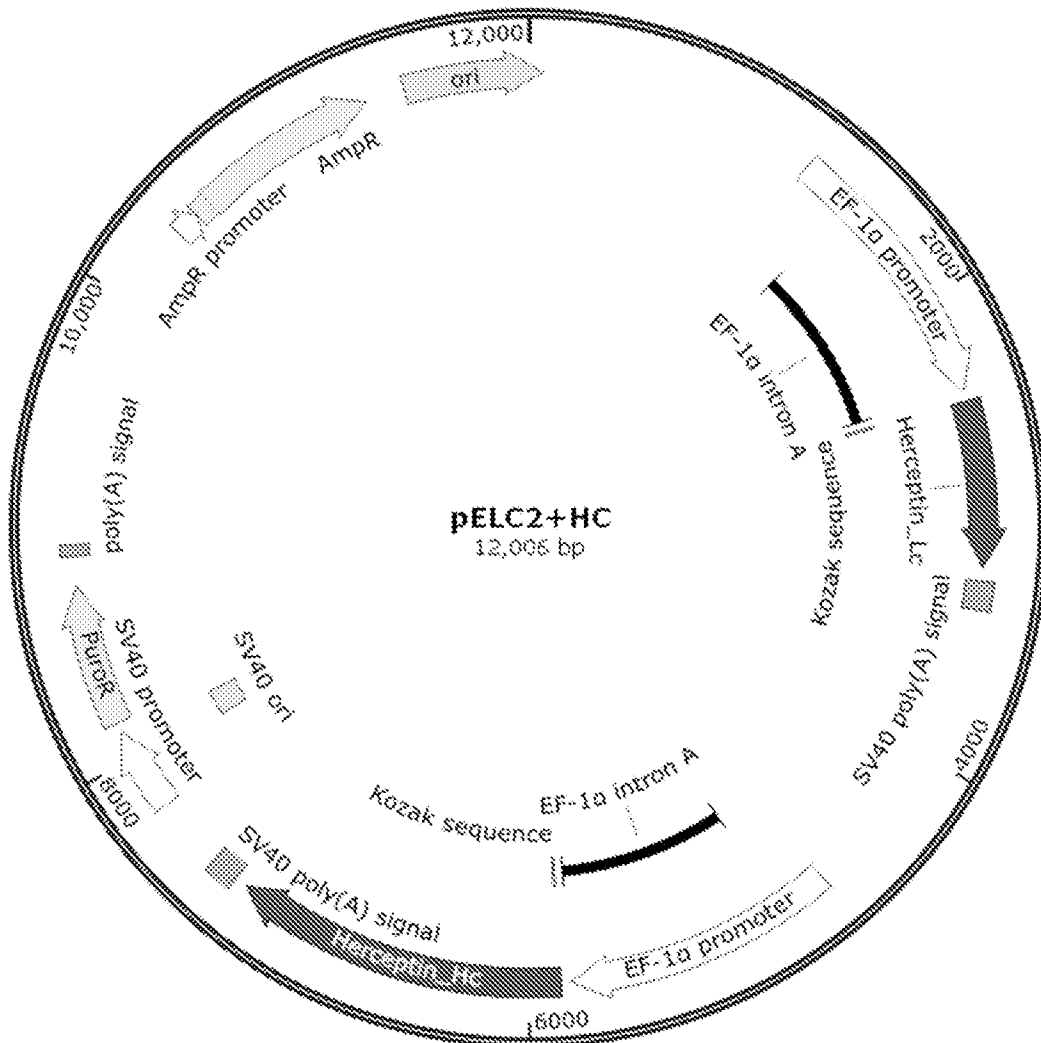
[図5]



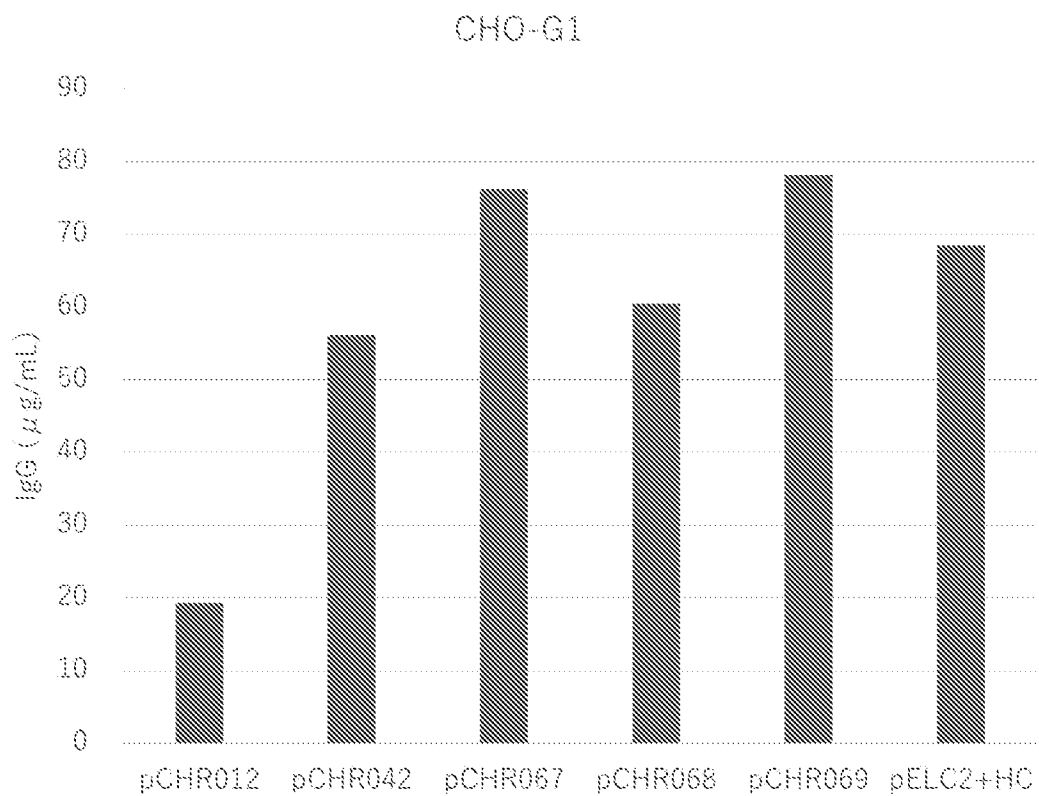
[図6]



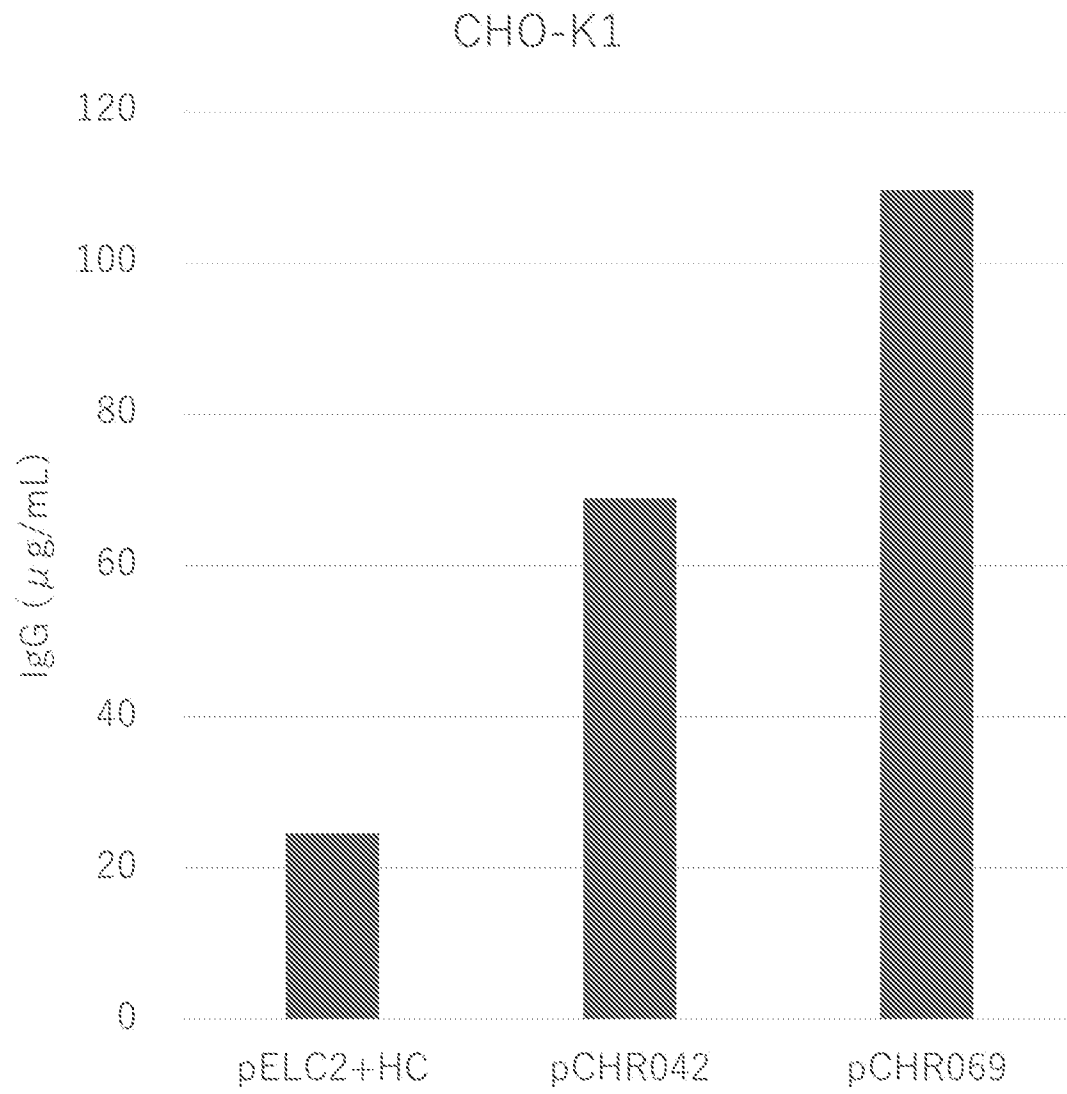
[ 7 ]



[ 8 ]



[図9]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/006667

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
<i>C12N 15/11</i> (2006.01)i; <i>C12N 15/63</i> (2006.01)i FI: C12N15/11 Z ZNA; C12N15/63 Z		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N15/11; C12N15/63		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2022 Registered utility model specifications of Japan 1996-2022 Published registered utility model applications of Japan 1994-2022		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAlus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); GenBank/EMBL/DDBJ/ GeneSeq		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FERREIRA, Joshua P et al., Engineering ribosomal leaky scanning and upstream open reading frames for precise control of protein translation, <i>Bioengineered</i> , 2014, vol. 5, issue 3, pp. 186-192	1-5, 11, 12
Y	abstract, fig. 5, p. 189, left column, paragraph 2 abstract, fig. 5, p. 189, left column, paragraph 2	1-12
X	GATHER, Fabian et al., Regulation of human inducible nitric oxide synthase expression by an upstream open reading frame, <i>Nitric Oxide</i> , 2019, vol. 88, pp. 50-60 & Supplemental Figures	1-5, 11, 12
Y	abstract, fig. 1, 6, S6 abstract, fig. 1, 6, S6	1-12
Y	NADERI, Fatemeh et al., The Augmenting Effects of the tDNA Insulator on Stable Expression of Monoclonal Antibody in Chinese Hamster Ovary Cells, <i>MONOCLONAL ANTIBODIES IN IMMUNODIAGNOSIS AND IMMUNOTHERAPY</i> , 2018, vol. 37, no. 5, pp. 200-206	1-12
Y	abstract, fig. 1 WO 2009/107775 A1 (HOKKAIDO UNIVERSITY) 03 September 2009 (2009-09-03) claims	1-12
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search <b>07 April 2022</b>		Date of mailing of the international search report <b>26 April 2022</b>
Name and mailing address of the ISA/JP <b>Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan</b>		Authorized officer  Telephone No.



**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
  - a.  forming part of the international application as filed:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
    - on paper or in the form of an image file.
  - b.  furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
  - c.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
    - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/JP2022/006667**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2009/107775	A1	03 September 2009	US	2011/0123993	A1	
				claims			
				EP	2258843	A1	
				CN	102016025	A	
				KR	10-2010-0135755	A	
US	2012/0301919	A1	29 November 2012	AU	2012203048	A1	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12N 15/11(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i FI: C12N15/11 Z ZNA; C12N15/63 Z		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） C12N15/11; C12N15/63 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2022年 日本国実用新案登録公報 1996-2022年 日本国登録実用新案公報 1994-2022年		
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); GenBank/EMBL/DBJ/ GeneSeq		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	FERREIRA Joshua P et al., Engineering ribosomal leaky scanning and upstream open reading frames for precise control of protein translation, Bioengineered, 2014, Vol.5, issue3, p.186-192 要約・図5・189頁左欄第2段落	1-5, 11, 12
Y	要約・図5・189頁左欄第2段落	1-12
X	GATHER Fabian et al., Regulation of human inducible nitric oxide synthase expression by an upstream open reading frame, Nitric Oxide, 2019, Vol.88, p.50-60 & Supplemental Figures 要約・図1・図6・図S6	1-5, 11, 12
Y	要約・図1・図6・図S6	1-12
Y	NADERI Fatemeh et al., The Augmenting Effects of the tDNA Insulator on Stable Expression of Monoclonal Antibody in Chinese Hamster Ovary Cells, MONOCLONAL ANTIBODIES IN IMMUNODIAGNOSIS AND IMMUNOTHERAPY, 2018, Vol.37, No.5, p.200-206 要約・図1	1-12
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	07.04.2022	国際調査報告の発送日 26.04.2022
名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員（特許庁審査官）  原 大樹 4B 5278  電話番号 03-3581-1101 内線 3488	

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	WO 2009/107775 A1 (国立大学法人北海道大学) 03.09.2009 (2009 - 09 - 03) [特許請求の範囲]	1-12
Y	US 2012/0301919 A1 (YANG Yuansheng) 29.11.2012 (2012 - 11 - 29) [特許請求の範囲][0005]	1-12

## 第 I 欄      ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。
- a.  出願時における国際出願の一部を構成する配列表
- 附属書C/ST.25テキストファイル形式
- 紙形式又はイメージファイル形式
- b.  国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c.  国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
- 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))
- 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)
2.  さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。
3. 補足意見:

国際調査報告  
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号  
 PCT/JP2022/006667

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
WO	2009/107775	A1	03.09.2009	US	2011/0123993	A1	
					[特許請求の範囲]		
				EP	2258843	A1	
				CN	102016025	A	
				KR	10-2010-0135755	A	
-----							
US	2012/0301919	A1	29.11.2012	AU	2012203048	A1	
-----							