

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

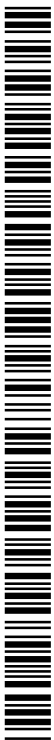
(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2014年10月30日(30.10.2014)



(10) 国際公開番号
WO 2014/175164 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) *C12P 21/08* (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2014/060941
- (22) 国際出願日: 2014年4月17日(17.04.2014)
- (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 2013-092862 2013年4月25日(25.04.2013) JP
特願 2013-221703 2013年10月25日(25.10.2013) JP
- (71) 出願人: 株式会社カネカ(KANEKA CORPORATION) [JP/JP]; 〒5308288 大阪府大阪市北区中之島二丁目3番18号 Osaka (JP).
- (72) 発明者: 西山 陶三(NISHIYAMA Tozo); 〒6768688 兵庫県高砂市高砂町宮前町1-8 株式会社カネカ内 Hyogo (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人特許事務所サイクス(SIKS & CO.); 〒1040031 東京都中央区京橋一丁目8番7号 京橋日殖ビル8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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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, 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))



WO 2014/175164 A1

(54) Title: FD CHAIN GENE OR L CHAIN GENE EACH CAPABLE OF INCREASING SECRETION AMOUNT OF FAB-TYPE ANTIBODY

(54) 発明の名称: F a b型抗体の分泌量を増大できるF d鎖遺伝子又はL鎖遺伝子

(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide a method for producing an antibody having a reduced molecular weight, such as a Fab-type antibody, using yeast as a host, whereby it becomes possible to produce the antibody having a reduced molecular weight with high productivity. According to the present invention, a gene is provided, in which a nucleotide sequence encoding an amino acid residue or an amino acid sequence each capable of increasing the secretion amount of a Fab-type antibody is contained at the 3'-terminal of a nucleotide sequence encoding an amino acid sequence for an Fd chain or an L chain of an antibody.

(57) 要約: 本発明の目的は、酵母を宿主として用いたF a b型抗体等の低分子化抗体の製造方法において、低分子化抗体を高い生産性で製造できる方法を提供することである。本発明によれば、抗体のF d鎖又はL鎖のアミノ酸配列をコードする塩基配列の3'末端に、F a b型抗体の分泌量を増大できるアミノ酸又はアミノ酸配列をコードする塩基配列を含有する、遺伝子が提供される。

明 細 書

発明の名称：

F a b型抗体の分泌量を増大できるF d鎖遺伝子又はL鎖遺伝子

技術分野

[0001] 本発明は、抗体のF d鎖又はL鎖のアミノ酸配列をコードする塩基配列の3'末端に、F a b型抗体の分泌量を増大できるアミノ酸又はアミノ酸配列をコードする塩基配列を含有する、遺伝子に関する。本発明はさらに、前記鎖遺伝子を含む組み換えベクター、前記組み換えベクターを有する形質転換体、前記形質転換体を用いたF a b型抗体の製造方法、並びに抗体のF d鎖及び／又はL鎖のアミノ酸配列のC末端に、F a b型抗体の分泌量を増大できるアミノ酸又はアミノ酸配列を有する、F a b型抗体に関する。

背景技術

[0002] 遺伝子組換え技術を用いてタンパク質を生産するためには、そのタンパク質の発現に適切な宿主が使用される。宿主としては、例えば、CHO細胞等の動物細胞、カイコ等の昆虫及び昆虫細胞、ニワトリや牛などの動物、並びに大腸菌又は酵母などの微生物などが用いられている。上記の中でも酵母は、安価な培地で大規模な高密度培養が可能であり、タンパク質を低コストで生産することができる。また、分泌シグナルペプチド等を利用すれば培養液中への分泌生産も可能なため、タンパク質の精製も容易となる。上記したような宿主を用いて生産するタンパク質としては、次世代タンパク医薬品であるs c F vやF a b型抗体等の低分子化抗体が注目されている。しかし、宿主として酵母を用いてこれらの低分子化抗体を発現させた場合、抗体の生産性が低いという問題があり、さらに炭素源によって生産物に影響を及ぼす場合があることが懸念されている。

[0003] 上記した問題を解消するための手段としては、炭素源による生産物への影響を回避するための宿主として、コマガタエラ (Komagataella) 属酵母、オガタエア (Ogataea) 属酵母及びキャンディダ (Candida) 属酵母等のメタノー

ル資化性酵母が用いることが報告されている。さらにタンパク質の生産性を向上させるために、通常のプロモーターと比較して数倍の活性を有するメタノールオキシダーゼ (Methanol oxidase) やアルコールオキシダーゼ (Alcohol oxidase) 等のプロモーターの下流に F a b 型抗体をコードする塩基配列を配置して、F a b 型抗体を生産する方法が報告されている (非特許文献 1)。しかしながら、上記のような強力なプロモーターを用いて F a b 型抗体のような高次構造を持つタンパク質を発現させた場合、立体構造が正しくホールディングされない F a b 型抗体が小胞体内で蓄積し、小胞体ストレスと呼ばれるストレスを菌体に与えるといった問題がある。

[0004] 上記した通り、宿主として酵母を用いて F a b 型抗体等の低分子化抗体を低コストで生産するためには、通常より活性の高いプロモーターを用いる方法が知られているが、小胞体ストレスを引き起こす等の問題がある。そのため、通常より活性の高いプロモーターを用いる方法は、高生産の観点から見て効率的であるとはいえず、問題は未だ解決されていない。

先行技術文献

非特許文献

[0005] 非特許文献1 : Biotechnology and Bioengineering, vol94, 353-361, 2006

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明は、酵母を宿主として用いた F a b 型抗体等の低分子化抗体の製造方法において、低分子化抗体を高い生産性で製造できる方法を提供することを解決すべき課題とした。具体的には、本発明は、活性の高いプロモーターを用いることなく、酵母を宿主として用いて F a b 型抗体等の低分子化抗体を高い生産性で製造できる方法を提供することを解決すべき課題とした。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、前記課題を解決すべく鋭意研究を行った結果、F d 鎖又は L 鎖のアミノ酸配列をコードする塩基配列の 3' 末端に 1 ~ 10 残基のアミ

ノ酸をコードする塩基配列を連結し、これを酵母において発現させることによって、F a b型抗体の生産性が向上することを見出し、本発明を完成するに至った。

[0008] すわなち、本発明によれば、以下の発明が提供される。

(1) 抗体のF d鎖又はL鎖のアミノ酸配列をコードする塩基配列の3'末端に、F a b型抗体の分泌量を増大できるアミノ酸又はアミノ酸配列をコードする塩基配列を含有する、遺伝子。

(2) 前記F a b型抗体の分泌量を増大できるアミノ酸又はアミノ酸配列が、1～30個のアミノ酸からなるものである、(1)に記載の遺伝子。

(3) 前記F a b型抗体の分泌量を増大できるアミノ酸又はアミノ酸配列が、A s p、G l y、A l a、V a l、L e u、I l e、C y s、M e t、S e r、T h r、T y r、P h e、T r p、P r o、G l u、A s n、G l n、L y s、A r g、H i s、A s p-L y s、A s p-L y s-T h r、A s p-L y s-T h r-H i s、A s p-L y s-T h r-H i s-T h r、又はG l y-G l y-G l y-G l y-S e r-M e t-V a l-S e r-L y s-G l y-G l u-G l u-L e u-P h e-T h r-G l y-V a l-V a l-P r o-I l e-L e u-V a l-G l u-L e u-A s p-G l y-A s p-V a l-A s n-G l yの何れかである、(1)又は(2)に記載の遺伝子。

[0009] (4) (1)から(3)の何れかに記載の遺伝子を含有する組換えベクター。

(5) 以下の何れかである、(4)に記載の組み換えベクター。

(a) 抗体のF d鎖のアミノ酸配列をコードする塩基配列の3'末端に、F a b型抗体の分泌量を増大できるアミノ酸又はアミノ酸配列をコードする塩基配列を含有するF d鎖遺伝子と、抗体のL鎖遺伝子とを含有する、組み換えベクター；

(b) 抗体のL鎖のアミノ酸配列をコードする塩基配列の3'末端に、F a b型抗体の分泌量を増大できるアミノ酸又はアミノ酸配列をコードする塩基

配列を含有するL鎖遺伝子と、抗体のFd鎖遺伝子とを含有する、組み換えベクター；及び

(c) 抗体のFd鎖のアミノ酸配列をコードする塩基配列の3'末端に、Fab型抗体の分泌量を増大できるアミノ酸又はアミノ酸配列をコードする塩基配列を含有するFd鎖遺伝子と、抗体のL鎖のアミノ酸配列をコードする塩基配列の3'末端に、Fab型抗体の分泌量を増大できるアミノ酸又はアミノ酸配列をコードする塩基配列を含有するL鎖遺伝子とを含有する組み換えベクター。

[0010] (6) 以下の何れかである、組換えベクターの組み合わせ。

(A) 抗体のFd鎖のアミノ酸配列をコードする塩基配列の3'末端に、Fab型抗体の分泌量を増大できるアミノ酸又はアミノ酸配列をコードする塩基配列を含有するFd鎖遺伝子を含有する組み換えベクターと、抗体のL鎖遺伝子を含有する組み換えベクターとの組み合わせ；

(B) 抗体のL鎖のアミノ酸配列をコードする塩基配列の3'末端に、Fab型抗体の分泌量を増大できるアミノ酸又はアミノ酸配列をコードする塩基配列を含有するL鎖遺伝子を含有する組み換えベクターと、抗体のFd鎖遺伝子を含有する組み換えベクターとの組み合わせ；及び

(C) 抗体のFd鎖のアミノ酸配列をコードする塩基配列の3'末端に、Fab型抗体の分泌量を増大できるアミノ酸又はアミノ酸配列をコードする塩基配列を含有するFd鎖遺伝子を含有する組み換えベクターと、抗体のL鎖のアミノ酸配列をコードする塩基配列の3'末端に、Fab型抗体の分泌量を増大できるアミノ酸又はアミノ酸配列をコードする塩基配列を含有するL鎖遺伝子を含有する組み換えベクターとの組み合わせ；

[0011] (7) (4) 又は (5) に記載の組換えベクター又は (6) に記載の組換えベクターの組み合わせにより宿主を形質転換することにより得られる形質転換体。

(8) 宿主が酵母である、(7) に記載の形質転換体。

(9) 酵母がオガタエア属またはコマガタエラ属酵母である、(7) 又は

(8)に記載の形質転換体。

[0012] (10) オガタエア属またはコマガタエラ属酵母が、オガタエア・ポリモルファまたはコマガタエラ・パストリスである、(9)に記載の形質転換体。

(11) 形質転換体を培養してF a b型抗体を生産させた場合の、培養上清中のF a b型抗体分泌生産量が2.0mg/mL以上である、(7)から(10)の何れかに記載の形質転換体。

(12) (7)から(11)の何れかに記載の形質転換体を培養し、F a b型抗体を回収する工程を含むF a b型抗体の製造方法。

[0013] (13) 抗体のF d鎖及び／又はL鎖のアミノ酸配列のC末端に、F a b型抗体の分泌量を増大できるアミノ酸又はアミノ酸配列を有する、F a b型抗体。

(14) 前記F a b型抗体の分泌量を増大できるアミノ酸又はアミノ酸配列が、1~10個のアミノ酸からなるものである、(13)に記載のF a b型抗体。

(15) 前記F a b型抗体の分泌量を増大できるアミノ酸又はアミノ酸配列が、Asp、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Cys、Met、Ser、Thr、Tyr、Phe、Trp、Pro、Glu、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp-Lys、Asp-Lys-Thr、Asp-Lys-Thr-His、Asp-Lys-Thr-His-Thr、又はGly-Gly-Gly-Gly-Ser-Met-Val-Ser-Lys-Gly-Glu-Glu-Leu-Phe-Thr-Gly-Val-Val-Pro-Ile-Leu-Val-Glu-Leu-Asp-Gly-Asp-Val-Asn-Glyの何れかである、(13)又は(14)に記載のF a b型抗体。

発明の効果

[0014] 本発明によれば、抗体のF d鎖又はL鎖のアミノ酸配列をコードする塩基

配列の3'末端に、F a b型抗体の分泌量を増大できるアミノ酸又はアミノ酸配列をコードする塩基配列を連結させるだけで、F a b型抗体の生産性を向上させることができる。本発明によれば、通常より活性の高いプロモーターを用いる必要がないことにより、小胞体ストレスを菌体に与えるという懸念がない。また、本発明によるF a b型抗体の製造方法においては、高密度培養が可能な酵母を宿主として用いることが可能であることから抗体の製造コストを削減できる。本発明は、抗体医薬の開発に有用である。

発明を実施するための形態

[0015] 以下、本発明の実施の形態についてさらに詳細に説明する。

本発明における抗体のF d鎖とは、I g G抗体のH鎖からヒンジ部位とFc領域を除いた部分であり、H鎖のN末端から、L鎖のC末端のシステインとS-S結合するシステイン残基までの部分を指す。

[0016] 本発明におけるF d鎖又はL鎖のアミノ酸配列をコードする塩基配列とは、F d鎖又はL鎖のアミノ酸配列をコードするDNA断片であれば特に限定されない。

[0017] 本発明で用いるF d鎖又はL鎖が由来する抗体の種類は、特に限定されず、例えばヒト抗体、ヒト化抗体、マウス抗体、イヌ抗体、ネコ抗体、ウマ抗体、ウシ抗体、ブタ抗体、ニワトリ抗体、又はこれらを融合したキメラ抗体などが挙げられる。

[0018] 本発明で用いるF d鎖又はL鎖が由来する抗体が結合する抗原も特に限定されないが、好ましくは創薬のターゲットとして知られるCD20、HER2、IL2R、CD33、CD52、EGFR、VEGF、CD3、CD25、TNF α 、CD11、IgE、CD2、 α 4 integrin、CD80、CD86、IL6R、C5a、GP11b/IIIa、RSV F Protein、VEGF-A、GM-CSFなどの抗原が挙げられる。

[0019] F d鎖のアミノ酸配列をコードする塩基配列の具体例としては、配列番号16又は配列番号60に示す塩基配列である。

[0020] 本発明におけるL鎖遺伝子とは、F d鎖遺伝子と共に発現させた場合にF

a b型抗体が生産されるものであればよく、I g G抗体のL鎖のアミノ酸配列をコードする塩基配列である。L鎖遺伝子の具体例としては、配列番号17又は配列番号59に示す塩基配列である。

[0021] 本発明の遺伝子においては、抗体のF d鎖又はL鎖のアミノ酸配列をコードする塩基配列の3'末端に、F a b型抗体の分泌量を増大できるアミノ酸又はアミノ酸配列をコードする塩基配列を含有する。

F a b型抗体の分泌量を増大できるアミノ酸又はアミノ酸配列としては、F a b型抗体の分泌量を増大できるという作用を発揮する限り、特に限定されず、アミノ酸の個数も特に限定されないが、好ましくは1~30個であり、より好ましくは1~10個又は1~5個である。

[0022] F a b型抗体の分泌量を増大できるアミノ酸又はアミノ酸配列の具体例としては、A s p、G l y、A l a、V a l、L e u、I l e、C y s、M e t、S e r、T h r、T y r、P h e、T r p、P r o、G l u、A s n、G l n、L y s、A r g、H i s、A s p-L y s、A s p-L y s-T h r、A s p-L y s-T h r-H i s（配列番号1）、A s p-L y s-T h r-H i s-T h r（配列番号2）、A s p-L y s-T h r-H i s-T h r-A s p-L y s-T h r-H i s-T h r（配列番号69）、又はG l y-G l y-G l y-G l y-S e r-M e t-V a l-S e r-L y s-G l y-G l u-G l u-L e u-P h e-T h r-G l y-V a l-V a l-P r o-I l e-L e u-V a l-G l u-L e u-A s p-G l y-A s p-V a l-A s n-G l y（配列番号74）の何れかである。また、上記のアミノ酸又はアミノ酸配列の中から複数のものを選択して、組み合わせたものでもよい。但し、複数個（例えば6~10個程度など）のH i sからなるヒスチジンタグをコードする塩基配列を、抗体のF d鎖又はL鎖のアミノ酸配列をコードする塩基配列の3'末端に含む態様は、本発明から除外される。同様に、A s p-L y s-T h r-H i s-T h r（配列番号2）、A s p-L y s-T h r-H i s-L e u（配列番号72）A s p-L y s-T h r-H i s-T h r-C y s-A l a-A l a（配列番号73

) をコードする塩基配列を、抗体の F d 鎖又は L 鎖のアミノ酸配列をコードする塩基配列の 3' 末端に含む態様も、本発明から除外される。

[0023] 上記した F a b 型抗体の分泌量を増大できるアミノ酸又はアミノ酸配列をコードする塩基配列は、各アミノ酸コドンでコードする塩基配列を組み合わせるが、各アミノ酸コドンは、F d 鎖遺伝子又は L 鎖遺伝子を発現させる宿主内で利用できるコドンの中から任意で選ぶことができる。具体的には、A s p の場合は、g a c、A s p - L y s の場合は、g a c a a g、A s p - L y s - T h r の場合は、g a c a a g a c c、A s p - L y s - T h r - H i s (配列番号 1) の場合は、g a c a a g a c c c a c (配列番号 3)、A s p - L y s - T h r - H i s - T h r (配列番号 2) の場合は、g a c a a g a c c c a c a c c (配列番号 4) の塩基配列、A s p - L y s - T h r - H i s - T h r - A s p - L y s - T h r - H i s - T h r (配列番号 69) の場合は、g a c a a g a c c c a c a c c g a c a a g a c c c a c a c c (配列番号 70)、G l y - G l y - G l y - G l y - S e r - M e t - V a l - S e r - L y s - G l y - G l u - G l u - L e u - P h e - T h r - G l y - V a l - V a l - P r o - I l e - L e u - V a l - G l u - L e u - A s p - G l y - A s p - V a l - A s n - G l y (配列番号 74) の場合は、g g a g g t g g c g g a t c c a t g g t g a g c a a g g g c g a g g a g c t g t t c a c c g g g g t g g t g c c c a t c c t g g t c g a g c t g g a c g g c g a c g t a a a c g g c (配列番号 75) が挙げられるが、特にこれらに限定されるものではない。

[0024] 上述の A s p、G l y、A l a、V a l、L e u、I l e、C y s、M e t、S e r、T h r、T y r、P h e、T r p、P r o、G l u、A s n、G l n、L y s、A r g、H i s はそれぞれ、アスパラギン酸残基、グリシン残基、アラニン残基、バリン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、システイン残基、メチオニン残基、セリン残基、スレオニン残基、チロシン残基、フェニルアラニン残基、トリプトファン残基、プロリン残基、グルタミ

ン酸残基、アスパラギン残基、グルタミン残基、リジン残基、アルギニン残基、およびヒスチジン残基を指す。また、塩基配列を示すTはチミン、Aはアデニン、Gはグアニン、Cはシトシンを指す。

[0025] 上述のF d鎖のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする塩基配列の3'末端に、g a c、g a c a a g、g a c a a g a c c、g a c a a g a c c c a c（配列番号3）、又はg a c a a g a c c c a c a c c（配列番号4）のいずれかを含有し、さらにその3'末端に終止コドンとしてt a a、t g aおよびt a gからなる塩基配列を含有してもよい。

[0026] 配列番号5は配列番号16の塩基配列の3'末端に、g a cの塩基配列と終止コドンt a aの塩基配列を連結させた遺伝子である、

配列番号6は配列番号16の塩基配列の3'末端に、g a c a a gの塩基配列と終止コドンt a aの塩基配列を連結させた遺伝子である。

配列番号7は配列番号16の塩基配列の3'末端に、g a c a a g a c cの塩基配列と終止コドンt a aの塩基配列を連結させた遺伝子である。

配列番号8は配列番号16の塩基配列の3'末端に、g a c a a g a c c c a c（配列番号3）の塩基配列と終止コドンt a aの塩基配列を連結させた遺伝子である。

配列番号9は配列番号16の塩基配列3'末端に、g a c a a g a c c c a c a c c（配列番号4）の塩基配列と終止コドンt a aの塩基配列を連結させた遺伝子である。

[0027] 本発明における組換えベクターとは、形質転換後の宿主細胞において、上記したF d鎖遺伝子が発現する機能を有する核酸分子のことを意味する。組み換えベクターは、発現カセットに加えて、組み込み相同領域、栄養要求性相補遺伝子または薬剤耐性遺伝子などの選択マーカー遺伝子、自律複製配列などを有していてもよい。

[0028] 本発明において宿主に形質転換された後のベクターは、形質転換体の染色体に組み込まれている状態でも良く、自律複製型として存在している状態でも良い。自律複製型ベクターの例としては、Y E pベクター、Y R pベクター

一、Y C pベクターなどが挙げられる。コマガタエラ属の場合は p P I C H O L I、p H I P、p H R P、p H A R Sなどが挙げられるが、特にこれらに限定されるものではない。

[0029] 本発明における「発現カセット」とは、プロモーターおよび発現する目的タンパク質遺伝子より構成され、ターミネーター遺伝子を含んでも良く、例えば、p U C 1 9等のプラスミド上に構築することもできるし、PCR法によっても作成することができる。

[0030] 本発明における組み込み相同領域とは、本発明の組換えベクターが形質転換後の宿主細胞の染色体上に相同組換えで組み込まれるための領域を指す。本領域は、宿主細胞の染色体の一部を任意で利用できるが、栄養要求性相補遺伝子や、発現カセット内のプロモーターやターミネーターなどを利用することもできる。

[0031] 本発明における栄養要求性相補遺伝子は、宿主細胞のアミノ酸や核酸などの栄養要求性を相補する遺伝子であれば特に限定されない。具体的な例としては、U R A 3 遺伝子、L E U 2 遺伝子、A D E 1 遺伝子、H I S 4 遺伝子などが挙げられ、それぞれウラシル、ロイシン、アデニン、ヒスチジンの栄養要求性株において原栄養株表現型の回復により選択することができる。

[0032] 本発明における薬剤耐性遺伝子などの選択マーカー遺伝子は、宿主細胞が保有していない薬剤耐性を付与する遺伝子であれば特に限定されない。具体的な例としては、G418耐性遺伝子、ゼオシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子などが挙げられ、それぞれG 4 1 8、ゼオシン、ハイグロマイシンを含む培地上における耐性により選択することができる。なお、酵母宿主を作成するときに用いた栄養要求性選択マーカーは、該選択マーカーが破壊されていない場合は、用いることができない。この場合、該選択マーカーを回復させればよく、方法は当業者において公知の方法を用いることができる。

[0033] 本発明における自律複製配列とは、宿主細胞において、本発明の組換えベクターの複製起点として作用し、自律的な複製を可能とする配列のことを指

す。

[0034] 本発明の組み換えベクターは、本明細書に記載した本発明の F d 鎖遺伝子又は L 鎖遺伝子を含む組換えベクターであるが、好ましくは、F d 鎖遺伝子と L 鎖遺伝子の両方を含むものである。本発明の組み換えベクターの具体例としては、

(a) 抗体の F d 鎖のアミノ酸配列をコードする塩基配列の 3' 末端に、F a b 型抗体の分泌量を増大できるアミノ酸又はアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む F d 鎖遺伝子と、抗体の L 鎖遺伝子とを含む、組み換えベクター；

(b) 抗体の L 鎖のアミノ酸配列をコードする塩基配列の 3' 末端に、F a b 型抗体の分泌量を増大できるアミノ酸又はアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む L 鎖遺伝子と、抗体の F d 鎖遺伝子とを含む、組み換えベクター；及び

(c) 抗体の F d 鎖のアミノ酸配列をコードする塩基配列の 3' 末端に、F a b 型抗体の分泌量を増大できるアミノ酸又はアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む F d 鎖遺伝子と、抗体の L 鎖のアミノ酸配列をコードする塩基配列の 3' 末端に、F a b 型抗体の分泌量を増大できるアミノ酸又はアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む L 鎖遺伝子とを含む組み換えベクター；

を挙げることができる。

[0035] 本発明の組み換えベクターに含まれる各構成要素の 5' 側から 3' 側への並び方について好ましい例を以下に挙げる。

(1) 第 1 のプロモーター配列－第 1 のシグナル配列－L 鎖遺伝子－第 2 のプロモーター配列－第 2 のシグナル配列－F d 鎖遺伝子－ターミネーター配列；

(2) 第 1 のプロモーター配列－第 1 のシグナル配列－F d 鎖遺伝子－第 2 のプロモーター配列－第 2 のシグナル配列－L 鎖遺伝子－ターミネーター配列；

(3) (第1のプロモーター配列-第1のシグナル配列-L鎖遺伝子-第1のターミネーター配列)を含む発現ベクターと、(第2のプロモーター配列-第2のシグナル配列-Fd鎖遺伝子-第2のターミネーター配列)を含む発現ベクターとの組み合わせ;

[0036] (1)~(3)において、第1のプロモーターと第2のプロモーターは同一であっても異なってもよい。第1及び第2のプロモーターは、好ましくは、ハンゼヌラ・ポリモルファ(好ましくは宿主であるハンゼヌラ・ポリモルファ)のMOXプロモーター又はGAPプロモーターである。

[0037] (1)~(3)において、第1のシグナル配列と第2のシグナル配列は同一であっても異なってもよい。第1及び第2のシグナル配列は、好ましくは、サッカロマイセス・セレビスエのMating Factor α (MF α)プレプロシグナルである。

[0038] (3)において、第1のターミネーター配列と第2のターミネーター配列は同一であっても異なってもよい。第1及び第2のターミネーター配列は、好ましくは、ハンゼヌラ・ポリモルファのMOX遺伝子のターミネーター配列である。

[0039] 本発明における宿主とは、本発明のFd鎖遺伝子及び/又はL鎖遺伝子を含む組換えベクターを導入し、Fab型抗体を生産できれば、特に限定されないが、好ましくは酵母、カビ、動物細胞、トランスジェニック動物、大腸菌、無細胞タンパク質合成系などが挙げられる。中でも酵母が好ましく、メタノール資化性酵母がより好ましく、オガタエア属(Ogataea)やコマガタエラ属(Komagataeella)に属するメタノール資化性酵母がさらに好ましい。オガタエア属に属するメタノール資化性酵母の中でも、オガタエア・ポリモルファ(Ogataea polymorpha)、オガタエア・ミニュータ(Ogataea minuta)が好ましく、コマガタエラ属に属するメタノール資化性酵母では、コマガタエア・パストリス(Komagataeella pastoris)が好ましい。

[0040] 本発明における形質転換体とは、本発明の組換えベクターが宿主に導入さ

れたものを意味する。本発明の形質転換体は、組換えベクターに含まれる栄養要求性相補遺伝子や薬剤耐性遺伝子により得られる表現型を指標にして、選択的に得ることができる。

[0041] 本発明のF a b型抗体の製造方法としては、上記した形質転換体を培養して、生産したF a b型抗体を回収することで得られる。生産する方法としては、上記の形質転換体を培養し、その培養上清中に蓄積させる分泌方法等が挙げられる。

[0042] 本発明における分泌生産とは、形質転換体を液体培養して、菌体内部でなく培養上清にF a b型抗体を蓄積させることを指す。分泌生産は、F a b型抗体のF d鎖および/またはL鎖を、分泌シグナルを融合したタンパク質として発現させることにより行う。分泌シグナルの融合としては、例えば、F a b型抗体のF d鎖および/またはL鎖をコードする塩基配列の5'末端にシグナル配列をコードする塩基配列を導入することにより行うことができる。

[0043] 本発明におけるシグナル配列をコードする塩基配列は、宿主細胞がF a b型抗体を分泌発現できるシグナル配列であれば特に限定されないが、サッカロマイセス・セレピシアエ (*Saccharomyces cerevisiae*) のMating Factor α (MF α) や、オガタエア・ポリモルファやコマガタエラ・パストリスの酸ホスファターゼ (PHO1)、サッカロマイセス・セレピシアエのインベルターゼ (SUC2)、サッカロマイセス・セレピシアエのPLB1、牛血清アルブミン (BSA)、ヒト血清アルブミン (HSA)、免疫グロブリンのシグナル配列をコードする塩基配列等が挙げられる。

[0044] 本発明における形質転換体の培地は、通常宿主細胞が資化する栄養源を含む培地であれば何でも使用でき、上記栄養源としては、グルコース、シュークロース、マルトース等の糖類、乳酸、酢酸、クエン酸、プロピオン酸等の有機酸類、メタノール、エタノール、グリセロール等のアルコール類、パラフィン等の炭化水素類、大豆油、菜種油等の油脂類、またはこれらの混合物等の炭素源、硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウム、尿素、酵母エキス、

肉エキス、ペプトン、コーンスチープリカー等の窒素源、更に、その他の無機塩、ビタミン類等の栄養源を適宜混合・配合した通常の培地を用いることができるが、特にグリセロールやメタノールを炭素源として用いることが好ましい。また、培養方法としてバッチ培養、連続培養またはドーム型培養のいずれでも培養可能である。

[0045] 培養は通常一般の条件により行なうことができ、例えば、pH 2.5～10.0、温度範囲10℃～48℃の範囲で、好氣的に10時間～10日間培養することにより行うことができる。

[0046] 本発明の形質転換体は、好ましくは、形質転換体を培養してFab型抗体を生産させた場合の培養上清中のFab型抗体分泌生産量が2.0mg/mL以上（さらに好ましくは2.5mg/mL以上）である。形質転換体を培養してFab型抗体を生産させた場合の培養上清中のFab型抗体分泌生産量が2.0mg/mL以上（さらに好ましくは2.5mg/mL以上）である形質転換体とは、実施例1に示したFab型抗体の遺伝子を含む発現ベクターを用い、それを実施例2に示す方法で酵母に形質転換し、得られた形質転換体を、実施例3及び4に示す方法で、培養して得られた培養上清中のFab型抗体分泌生産量を解析した場合に、そのFab型抗体の濃度が2.0mg/L以上（又は2.5mg/mL以上）になる形質転換体を意味する。

[0047] 本発明のFab型抗体を回収する方法は、分泌生産の場合、培養液から遠心分離等で培養上清を調製する工程や、培養上清から任意の方法でFab型抗体を単離精製する工程を含む。培養上清からの単離精製は、公知のタンパク質精製法を適宜に組み合わせて用いることにより実施できる。例えば、形質転換体を適当な培地で培養し、培養液の遠心分離、あるいは、濾過処理により培養上清から菌体を除き、得られた培養上清を、塩析（硫酸アンモニウム沈殿、リン酸ナトリウム沈殿など）、溶媒沈殿（アセトンまたはエタノールなどによる蛋白質分画沈殿法）、透析、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、限外濾過等の手法で、該培養

上清からF a b型抗体を回収することができる。上記回収したF a b型抗体は、そのまま使用することもできるが、その後P E G化等の薬理学的な変化をもたらす修飾、酵素やアイソトープ等の機能を付加する修飾を加えて使用することもできる。また、各種の製剤化処理を使用しても良い。

実施例

[0048] 以下の実施例により本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらにより限定されるものではない。なお、以下の実施例において用いた組換えD N A技術に関する詳細な操作方法などは、次の成書に記載されている：Molecular Cloning 2nd Edition (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)、Current Protocols in Molecular Biology (Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience)、Current Protocols in Molecular Biology (Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience)。

[0049] また、以下の実施例において取得したプラスミドは、大腸菌E. coli DH5 α コンピテントセル（タカラバイオ社製）を用いて、これに記載の条件で行うことにより取得した形質転換体を用いて増幅している。

[0050] P C RにはPrime STAR HS DNA Polymerase（タカラバイオ社製）を用い、反応条件は添付のマニュアルに記載の方法で行った。

[0051] (実施例1) pUC-L E U 2 - P m M f T mの構築

抗体発現ベクターの構築において利用した、M O Xプロモーター（配列番号18）、M O Xターミネーター（配列番号19）、L E U 2遺伝子（配列番号20）はハンゼヌラ・ポリモルファ 8 V株のゲノムD N AをテンプレートにしてP C Rで調製した。M a t i n g F a c t o r α プレプロシグナル（M F α 、配列番号21）は、サッカロマイセス・セレビスシアエS 2 8 8 c株のゲノムD N AをテンプレートにしてP C Rで調製した。抗体遺伝子は、完全ヒト型化抗T N F - α 抗体（a d a l i m u m a b ; H U M I R A（登録商標））の公開配列情報に基づいて、L鎖（配列番号22）、H鎖（配列番号23）を化学合成した（特開2009-082033）ものをテンプレートにしてP C Rで調製した。

[0052] HindIII-NotI-BamHI-SpeI-BglII-XbaI-EcoRIのサイトをもつ遺伝子断片（配列番号24）を全合成し、これをpUC19のHindIII-EcoRIサイトに挿入してpUC-1を調製した。LEU2遺伝子の両側にHindIIIサイトをつけた遺伝子断片を、プライマー1および2（配列番号25および26）を用いたPCRにより調製し、HindIII処理後にpUC-1のHindIIIサイトに挿入した（pUC-LEU2）。次に、MOXプロモーターの両側にBamHIサイトをつけた遺伝子断片を、プライマー3および4（配列番号27および28）を用いたPCRにより調製し、BamHI処理後にpUC-LEU2のBamHIサイトへ挿入した（pUC-LEU2-Pm）。MF α の5'側にSpeIサイトを、3'側にBglIIサイトをつけた遺伝子断片をプライマー5および6（配列番号29および30）を用いたPCRにより調製し、SpeIおよびBglII処理後にpUC-LEU2-PmのSpeI-BglIIサイトへ挿入した（pUC-LEU2-PmMf）。MOXターミネーターの両側にXbaIサイトをつけた遺伝子断片を、プライマー7および8（配列番号31および32）を用いたPCRにより調製し、XbaI処理後にpUC-LEU2-PmMfのXbaIサイトに挿入した（pUC-LEU2-PmMfTm）。

[0053]（比較例1）Fab型抗体発現組換えベクターの構築

L鎖の両側にBglIIサイトをつけた遺伝子断片を、プライマー9および10（配列番号33および34）を用いたPCRにより調製した。本遺伝子断片をBglII処理後、pUC-LEU2-PmMfTmのBglIIサイトに挿入し、pUC-LEU2-PmMfLTmを構築した。Fd鎖の両側にBglIIサイトをつけた遺伝子断片を、プライマー11および12（配列番号35および36）を用いたPCRにより調製した。本遺伝子断片をBglII処理後、pUC-LEU2-PmMfTmのBglIIサイトに挿入し、pUC-LEU2-PmMfFTmを構築した。pUC-LEU2-PmMfLTmをテンプレートにして、MOXプロモーター、MF α 、L鎖、MOXターミネーターの一部が連結した遺伝子断片の両側にEcoR

I サイトをつけた遺伝子断片を、プライマー 13 および 14（配列番号 37 および 38）を用いた PCR により調製した。本遺伝子断片を EcoRI 処理後、pUC-LEU2-PmMfFTm の EcoRI サイトに挿入し、pUC-LEU2-PmMfFTm-PmMfLtm を構築した。本発現ベクターは、Fab 型抗体の L 鎖および Fd 鎖がそれぞれ別々の MOX プロモーター制御下で発現するように設計されている。

[0054]（比較例 2）形質転換体の取得

比較例 1 で構築した Fab 型抗体発現ベクターを MOX ターミネーター内の EcoRV サイトで切断して直鎖状にした。本断片を実施例 3 記載の方法を用いてオガタエア・ポリモルファを形質転換した。

[0055]（比較例 3）形質転換体の培養および培養上清の調製

比較例 2 で取得した Fab 型抗体発現ベクター導入株の培養上清の調製は実施例 4 に記載の方法と同様に実施した。

[0056]（比較例 4）Fab 型抗体の定量

比較例 3 で取得した培養上清中の Fab 型抗体の分泌生産量は、実施例 5 と同様にサンドイッチ ELISA（Enzyme-Linked Immunosorbent Assay）法により解析した。

[0057] 本発明の各 Fd 鎖遺伝子（配列番号 5～9）は、上記の pUC-LEU2-PmMfFTm をテンプレートにして PCR により調製した。

[0058]（実施例 2）各 Fab 型抗体発現組換えベクターの構築

Fd 鎖をコードする塩基配列、Asp、Asp-Lys、Asp-Lys-Thr、Asp-Lys-Thr-His および Asp-Lys-Thr-His-Thr の何れかのアミノ酸配列をコードする塩基配列、終止コドンコードする塩基配列を融合させた断片は、PCR により調製した。

[0059] Asp をコードする塩基配列を融合した Fd 鎖遺伝子断片はプライマー 15（配列番号 10）とプライマー 16（配列番号 11）を、Asp-Lys をコードする塩基配列を融合した Fd 鎖遺伝子断片はプライマー 15 とプライマー 17（配列番号 12）を、Asp-Lys-Thr をコードする塩基配

列を融合したF d鎖遺伝子断片はプライマー1とプライマー18(配列番号13)を、Asp-Lys-Thr-His(配列番号1)をコードする塩基配列を融合したF d鎖遺伝子断片はプライマー15とプライマー19(配列番号14)を、Asp-Lys-Thr-His-Thr(配列番号2)をコードする塩基配列を融合したF d鎖遺伝子断片はプライマー15とプライマー20(配列番号15)を、それぞれ用いてPCRを行い、各断片を得た。各断片をBglIII処理して、実施例1記載のpUC-LEU2-PmMfTmのBglIIIサイトに挿入して、Asp、Asp-Lys、Asp-Lys-Thr、Asp-Lys-Thr-His(配列番号1)およびAsp-Lys-Thr-His-Thr(配列番号2)の何れかをコードする塩基配列を含有するF d鎖遺伝子を含む各プラスミドを構築した。pUC-LEU2-PmMfLTmをテンプレートにして、MOXプロモーター、MF α 、L鎖、MOXターミネーターの一部が連結した遺伝子断片の両側にEcoRIサイトをつけた遺伝子断片を、プライマー13および14(配列番号37および38)を用いたPCRにより調製した。本遺伝子断片をEcoRI処理後、上述のAsp、Asp-Lys、Asp-Lys-Thr、Asp-Lys-Thr-His(配列番号1)およびAsp-Lys-Thr-His-Thr(配列番号2)の何れかをコードする塩基配列を含有するF d鎖遺伝子を含む各プラスミドのEcoRIサイトに挿入し、Asp、Asp-Lys、Asp-Lys-Thr、Asp-Lys-Thr-His(配列番号1)およびAsp-Lys-Thr-His-Thr(配列番号2)の何れかをコードする塩基配列を含有するF d鎖遺伝子を含む各Fab型抗体発現ベクターを構築した。

[0060] (実施例3) 形質転換体の取得

実施例2で構築した各種のFab型抗体発現組換えベクターを、MOXターミネーター内のEcoRVサイトで切断して直鎖状にした。本断片を用いてオガタエア・ポリモルファを形質転換した。具体的には、オガタエア・ポリモルファBY4329(NCYC495由来、leu1-1)を3mlのYPD培地(1% yeast extract

bacto (Difco社製), 2% tryptone bacto (Difco社製), 2% glucose) に接種し、37°Cで一晩振とう培養して、前培養液を得た。得られた前培養液500 μ lを50mlのYPD培地に接種し、OD600が1~1.5になるまで30°Cで振とう培養後、集菌(3000 \times g、10分、20°C)した。菌体を10mlの50mMリン酸カリウムバッファー(25mM DTTを含む、pH7.5)に懸濁し、懸濁液を37°Cで15分インキュベートした。集菌(3000 \times g、10分、4°C)した後、氷冷した50mlのSTMバッファー(270mMスクロース, 10mM Tris-HCl, 1mM塩化マグネシウム, pH7.5)で菌体を再懸濁した。集菌(3000 \times g、10分、4°C)後、菌体を25mlの氷冷したSTMバッファーで再懸濁した。集菌(3000 \times g、10分、4°C)した後、菌体を250 μ lの氷冷したSTMバッファーに懸濁し、これをコンピテントセル溶液とした。このコンピテントセル溶液60 μ lと直鎖状の各プラスミド溶液3 μ l(DNA量0.5~1 μ g)を混合し、エレクトロポレーション用キュベット(ディスポキュベット電極, 電極間隔2mm; ビーエム機器社製)に移し入れ、7.5kV/cm、10 μ F、900 Ω の条件でエレクトロポレーションした。その後、菌体をYPD培地1mlで懸濁し、37°Cで1時間静置した。集菌(3000 \times g、5分、室温)し、1mlの生理食塩水で菌体を洗浄し、再度集菌(3000 \times g、5分、室温)した。菌体を適当量の生理食塩水で懸濁後、SD培地寒天プレート(0.67% yeast nitrogen base (Difco社製), 1% glucose)に塗布し、30°C、3日間の静置培養で生育する株を選択し、各種Fab型抗体発現株を取得した。

[0061] (実施例4) 形質転換体の培養および培養上清の調製

培養上清の調製は以下のように実施した。即ち、実施例3で得られた各Fab型抗体発現株を2mlのBMGMY培地(1% yeast extract bacto, 2% peptone, 1.34% yeast nitrogen base, 0.4mg/l Biotin, 100mMリン酸カリウム(pH6.0), 1% Glycerol, 1% Methanol)に植菌し、30°Cで72時間振とう培養後、遠心分離(15,000rpm、1分、4°C)により培養上清を調製した。

[0062] (実施例5) Fab型抗体の定量

F a b型抗体の培養上清への分泌生産量は、サンドイッチELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 法により解析した。

サンドイッチELISAは、ELISA用プレート (マキシソープ; NUNC社製) に固定化バッファー (0.1M 炭酸ナトリウムバッファー、pH9.6) にて2500倍希釈したAnti IgG(F d) , Human (Sheep) (The Binding Site Group社製) を50 μ l / ウェルで添加し、終夜で4 $^{\circ}$ C インキュベートした。インキュベート後、ウェル中の溶液を除去し、5倍希釈したイムノブロック (大日本住友製薬社製) を250 μ l / ウェルで加え、室温で1時間静置し、ブロッキングした。各ウェルをPBST (PBS(タカラバイオ社製)+0.1% Tween20) で3回洗浄後、系列希釈した標準Fab型抗体 (Anti-Human IgGFab; rockland社製) と培養上清の希釈液を50 μ l / ウェルで加え、室温で1時間反応した。ウェル中の溶液を除去し、PBSTで2回洗浄後、PBSTIB (PBST + 2% イムノブロック) 溶液にて8000倍希釈したAnti-Human IgG (Fab SPECIFIC) PEROXIDASE CONJUGATE Antibody developed in Goat Affinity Isolated Antibody (SIGMA社製) を50 μ l / ウェルで加え、室温で1時間反応させた。ウェル中の溶液を除去し、PBSTで4回洗浄後、TMB 1-Component Microwell Peroxidase Substrate, SureBlue (KPL社製) を100 μ l / ウェルで添加し、室温で20分静置した。TMB Stop Solution (KPL社製) を100 μ l / ウェルで添加して反応を停止させた後、マイクロプレートリーダー (BenchMark Plus; Bio-Rad社製) で450 nmの吸光度を測定した。培養上清中のF a b型抗体の定量は、標準タンパク質の検量線を用いて行った結果を表1に示す。表1の通り、A s p、A s p - L y s、A s p - L y s - T h r、A s p - L y s - T h r - H i s およびA s p - L y s - T h r - H i s - T h rの何れかを融合したF a b型抗体の生産量は、融合していないF a b型抗体の5倍程度向上していることが明らかとなった。

[0063]

[表1]

fusion peptide	TOD600	Fab (mg/L)
none(control)	40.5	0.55
Asp	39.7	2.83
Asp-Lys	40.8	2.77
Asp-Lys-Thr	40.8	2.90
Asp-Lys-Thr-His	40.5	2.70
Asp-Lys-Thr-His-Thr	41.7	2.67

[0064] (実施例6) 各Fab型抗体発現ベクターの構築2

Fd鎖をコードする塩基配列、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Cys、Met、Ser、Thr、Tyr、Phe、Trp、Pro、Glu、Asn、Gln、Lys、Arg、Hisの何れかのアミノ酸をコードする塩基配列、終止コドンにコードする塩基配列を融合させた断片は、PCRにより調製した。

[0065] Glyをコードする塩基配列を融合したFd鎖遺伝子断片はプライマー15とプライマー21(配列番号39)を、Alaをコードする塩基配列を融合したFd鎖遺伝子断片はプライマー15とプライマー22(配列番号40)を、Valをコードする塩基配列を融合したFd鎖遺伝子断片はプライマー15とプライマー23(配列番号41)を、Leuをコードする塩基配列を融合したFd鎖遺伝子断片はプライマー15とプライマー24(配列番号42)を、Ileをコードする塩基配列を融合したFd鎖遺伝子断片はプライマー15とプライマー25(配列番号43)を、Cysをコードする塩基配列を融合したFd鎖遺伝子断片はプライマー15とプライマー26(配列番号44)を、Metをコードする塩基配列を融合したFd鎖遺伝子断片はプライマー15とプライマー27(配列番号45)を、Serをコードする塩基配列を融合したFd鎖遺伝子断片はプライマー15とプライマー28(配列番号46)を、Thrをコードする塩基配列を融合したFd鎖遺伝子断片はプライマー15とプライマー29(配列番号47)を、Tyrをコードする塩基配列を融合したFd鎖遺伝子断片はプライマー15とプライマー30(配列番号48)を、Pheをコードする塩基配列を融合したFd鎖遺伝子断片はプライマー15とプライマー31(配列番号49)を、Trpをコードする塩基配列を融合したFd

鎖遺伝子断片はプライマー15とプライマー32（配列番号50）を、Proをコードする塩基配列を融合したFd鎖遺伝子断片はプライマー15とプライマー33（配列番号51）を、Gluをコードする塩基配列を融合したFd鎖遺伝子断片はプライマー15とプライマー34（配列番号52）を、Asnをコードする塩基配列を融合したFd鎖遺伝子断片はプライマー15とプライマー35（配列番号53）を、Glnをコードする塩基配列を融合したFd鎖遺伝子断片はプライマー15とプライマー36（配列番号54）を、Lysをコードする塩基配列を融合したFd鎖遺伝子断片はプライマー15とプライマー37（配列番号55）を、Argをコードする塩基配列を融合したFd鎖遺伝子断片はプライマー15とプライマー38（配列番号56）を、Hisをコードする塩基配列を融合したFd鎖遺伝子断片はプライマー15とプライマー39（配列番号57）を、それぞれ用いてPCRを行い、各断片を得た。各断片をBglIII処理して、実施例1記載のpUC-LEU2-PmMfTmのBglIIIサイトに挿入して、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Cys、Met、Ser、Thr、Tyr、Phe、Trp、Pro、Glu、Asn、Gln、Lys、Arg、Hisの何れかをコードする塩基配列を含有するFd鎖遺伝子を含む各プラスミドを構築した。pUC-LEU2-PmMfLTmをテンプレートにして、MOXプロモーター、MF α 、L鎖、MOXターミネーターの一部が連結した遺伝子断片の両側にEcoRIサイトをつけた遺伝子断片を、プライマー13および14（配列番号37および38）を用いたPCRにより調製した。本遺伝子断片をEcoRI処理後、上述のGly、Ala、Val、Leu、Ile、Cys、Met、Ser、Thr、Tyr、Phe、Trp、Pro、Glu、Asn、Gln、Lys、Arg、Hisの何れかをコードする塩基配列を含有するFd鎖遺伝子を含む各プラスミドのEcoRIサイトに挿入し、Ile、Ala、Val、Leu、Ile、Cys、Met、Ser、Thr、Tyr、Phe、Trp、Pro、Glu、Asn、Gln、Lys、Arg、Hisの何れかをコードする塩基配列を含有するFd鎖遺伝子を含む各Fab型抗体発現ベク

ターを構築した。

[0066] (実施例7) 各Fab型抗体発現ベクターの構築3

L鎖をコードする塩基配列、A_{sp}ののアミノ酸をコードする塩基配列、終止コドンにコードする塩基配列を融合させた断片は、PCRにより調製した。

A_{sp}をコードする塩基配列を融合したL鎖遺伝子断片はプライマー9とプライマー40(配列番号58)を用いてPCRを行い、断片を得た。本断片をB_{gl}III処理して、実施例1記載のpUC-LEU2-PmMfTmのB_{gl}IIIサイトに挿入し、A_{sp}をコードする塩基配列を含有するL鎖遺伝子を含むベクターを構築した。本ベクターをテンプレートにして、MOXプロモーター、MF α 、A_{sp}をコードする塩基配列を含有するL鎖、MOXターミネーターの一部が連結した遺伝子断片の両側にEcoRIサイトをつけた遺伝子断片を、プライマー13および14(配列番号37および38)を用いたPCRにより調製した。本遺伝子断片をEcoRI処理後、実施例2記載のpUC-LEU2-PmMfFTmのEcoRIサイトに挿入し、A_{sp}をコードする塩基配列を含有するL鎖遺伝子を含む各Fab型抗体発現ベクターを構築した。

[0067] (実施例8) 形質転換体の培養および培養上清の調製

実施例6および7で構築した各種のFab型抗体発現組換えベクターを、MOXターミネーター内のEcoRVサイトで切断して直鎖状にした。本断片を実施例2に記載の方法を用いてオガタエア・ポリモルファを形質転換し、各種Fab型抗体発現株を取得した。

[0068] (実施例9) 形質転換体の培養および培養上清の調製

実施例8で得られた各種Fab型抗体発現株の培養上清の調製は実施例3と同様に実施して取得した。

[0069] (実施例10) Fab型抗体の定量

実施例9で取得したFab型抗体の培養上清への分泌生産量は、実施例4に記載の方法により解析した。

[0070] 培養上清中のFab型抗体の定量は、標準タンパク質の検量線を用いて行った結果を表2に示す。表2の通り、Fd鎖にGly、Ala、Val、Leu、Ile、Cys、Met、Ser、Thr、Tyr、Phe、Trp、Pro、Glu、Asn、Gln、Lys、Arg、Hisの何れかを融合したFab型抗体の生産量、L鎖にAspを融合したFab型抗体の生産量は、融合していないFab型抗体の4～6倍程度向上していることが明らかとなった。

[0071] [表2]

fusion amino acid	monomer	TOD600	Fab (mg/L)
none(control)	-	40.5	0.55
Gly	Fd	42.3	2.30
Ala	Fd	40.8	2.14
Val	Fd	41.8	2.03
Leu	Fd	41.1	2.18
Ile	Fd	40.9	2.22
Cys	Fd	41.6	2.09
Met	Fd	40.6	2.20
Ser	Fd	41.3	2.17
Thr	Fd	42.2	2.23
Tyr	Fd	40.4	2.47
Phe	Fd	41.6	2.86
Trp	Fd	42.3	3.19
Pro	Fd	42.0	2.44
Glu	Fd	40.6	2.35
Asn	Fd	40.9	2.48
Gln	Fd	40.9	2.45
Lys	Fd	40.4	2.49
Arg	Fd	40.4	2.49
His	Fd	40.2	2.60
Asp	L	41.5	2.83

[0072] (比較例5) レミケード由来のFab型抗体発現ベクターの構築

レミケード由来のFab型抗体遺伝子は、レミケード (Infliximab ; Remicade (登録商標)) の公開配列情報に基づいて、L鎖 (配列番号59)、Fd鎖 (配列番号60) を化学合成し、これをテンプレートにしてPCRで調製した。

[0073] レミケード由来L鎖の両側にBglIIサイトをつけた遺伝子断片を、プライマー41および42 (配列番号61および62) を用いたPCRにより調製した。本遺伝子断片をBglII処理後、実施例1記載のpUC-LE

U2-PmMfTmのBgIIIサイトに挿入し、pUC-LEU2-PmMfrLTmを構築した。レミケード由来Fd鎖の両側にBgIIIサイトをつけた遺伝子断片を、プライマー43および44（配列番号63および64）を用いたPCRにより調製した。本遺伝子断片をBgIII処理後、pUC-LEU2-PmMfTmのBgIIIサイトに挿入し、pUC-LEU2-PmMfrFTmを構築した。pUC-LEU2-PmMfrLTmをテンプレートにして、MOXプロモーター、MF α 、レミケード由来L鎖、MOXターミネーターの一部が連結した遺伝子断片の両側にEcoRIサイトをつけた遺伝子断片を、プライマー13および14（配列番号37および38）を用いたPCRにより調製した。本遺伝子断片をEcoRI処理後、pUC-LEU2-PmMfrFTmのEcoRIサイトに挿入し、pUC-LEU2-PmMfrFTm-PmMfrLtmを構築した。本発現ベクターは、レミケード由来のFab型抗体のL鎖およびFd鎖がそれぞれ別々のMOXプロモーター制御下で発現するように設計されている。

[0074]（比較例6）形質転換体の取得

比較例5で構築したレミケード由来Fab型抗体発現ベクターをMOXターミネーター内のEcoRVサイトで切断して直鎖状にした。本断片を実施例3記載の方法を用いてオガタエア・ポリモルファを形質転換した。

[0075]（比較例7）形質転換体の培養および培養上清の調製

比較例6で取得したレミケード由来Fab型抗体発現ベクター導入株の培養上清の調製は実施例13に記載の方法と同様に実施した。

[0076]（比較例8）Fab型抗体の定量

比較例7で取得した培養上清中のFab型抗体の分泌生産量は、実施例5と同様にサンドイッチELISA（Enzyme-Linked Immunosorbent Assay）法により解析した。結果を表3に示す。

[0077]（実施例11）レミケード由来各Fab型抗体発現ベクターの構築

Aspをコードする塩基配列を融合したレミケード由来Fd鎖遺伝子断片はプライマー43とプライマー45（配列番号65）を用いてPCRを行い

、断片を得た。本断片をBglIII処理して、実施1記載のpUC-LEU2-PmMfTmのBglIIIサイトに挿入して、Aspをコードする塩基配列を含有するレミケード由来Fd鎖遺伝子を含むベクターを構築した。比較例2記載のpUC-LEU2-PmMfrLTmをテンプレートにして、MOXプロモーター、MF α 、レミケード由来L鎖、MOXターミネーターの一部が連結した遺伝子断片の両側にEcoRIサイトをつけた遺伝子断片を、プライマー13および14（配列番号37および38）を用いたPCRにより調製した。本遺伝子断片をEcoRI処理後、上述のAspをコードする塩基配列を含有するレミケード由来Fd鎖遺伝子を含むベクターのEcoRIサイトに挿入し、Aspをコードする塩基配列を含有するレミケード由来Fab鎖遺伝子を含むレミケード由来Fab型抗体発現組換えベクターを構築した。

[0078]（実施例12）形質転換体の取得

実施例11で構築したレミケード由来Fab型抗体発現組換えベクターを、MOXターミネーター内のEcoRVサイトで切断して直鎖状にした。本断片を実施例2に記載の方法を用いてオガタエア・ポリモルファを形質転換し、レミケード由来Fab型抗体発現株を取得した。

[0079]（実施例13）形質転換体の培養および培養上清の調製

培養上清の調製は以下のように実施した。即ち、実施例12で得られたレミケード由来Fab型抗体発現株を2mlのBMGMY培地（1% yeast extract bacto, 2% peptone, 1.34% yeast nitrogen base, 0.4mg/l Biotin, 100mMリン酸カリウム(pH6.0), 1% Glycerol, 1% Methanol）に植菌し、30℃で60時間振とう培養後、Methanolを20mg添加し、さらに30℃で24時間振とう培養した。その後、遠心分離（15,000rpm、1分、4℃）により培養上清を調製した。

[0080]（実施例14）Fab型抗体の定量

実施例13で取得したレミケード由来Fab型抗体の培養上清への分泌生産量は、実施例4に記載の方法により解析した。

培養上清中のレミケード由来Fab型抗体の定量は、標準タンパク質の検

量線を用いて行った結果を表3に示す。表3の通り、F d鎖にA s pを融合したレミケード由来F a b型抗体の生産量は、融合していないレミケード由来F a b型抗体の5倍程度向上しており、F a b型抗体の種類に因らず、効果があることが明らかとなった。

[0081] [表3]

fusion peptide	TOD600	Fab (mg/L)
none(control)	55.3	0.006
Asp	56.7	0.032

[0082] (比較例9) ピキア用F a b型抗体ベクターの構築

実施例2記載のpUC-LEU2-PmMfLTm-PmMfFtmをHindIIIで処理した後に、F a b型抗体遺伝子を含むベクター断片をアガロースゲルから精製した。その後、本ベクター断片のHindIIIサイトに、実施例15に記載のG418耐性遺伝子を挿入し、pUC-G418-PmMfLTm-PmMfFtmを構築した。

[0083] (比較例10) ピキアの形質転換体の取得

比較例9で構築したベクターを、ピキア酵母野生株Y-11430株に形質転換した。方法は実施例16に記載の方法にて実施した。

[0084] (比較例11) 形質転換体の培養および培養上清の調製

比較例10で取得したF a b型抗体発現ベクター導入ピキア株の培養上清の調製は実施例4に記載の方法と同様に実施した。

[0085] (比較例12) F a b型抗体の定量

比較例11で取得した培養上清中のF a b型抗体の分泌生産量は、実施例5と同様にサンドイッチELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 法により解析した。結果を表4に示す。

[0086] (実施例15) ピキア用F a b型抗体ベクターの構築

オガタエア・ポリモルファ酵母のGAPプロモーター制御下で発現するように設計したG418耐性遺伝子(配列番号66)を全合成し、PCRのテンプレートとした。このG418耐性遺伝子の両側にHindIIIサイト

を付加した遺伝子断片を、プライマー46および47（配列番号67および68）を用いてPCRで調製し、HindIII処理をした。実施例2記載のA_{sp}をコードする塩基配列を含有するFd鎖遺伝子を含む各Fab型抗体発現ベクターをHindIIIで処理した後に、Fab型抗体遺伝子を含むベクター断片をアガロースゲルから精製した。その後、本ベクター断片のHindIIIサイトに上述のG418耐性遺伝子を挿入し、G418耐性遺伝子を選択マーカーとするA_{sp}をコードする塩基配列を含有するFd鎖遺伝子を含む各Fab型抗体発現ベクターを構築した。

[0087]（実施例16）ピキアの形質転換体の取得

実施例15で構築したG418耐性遺伝子を選択マーカーとするA_{sp}をコードする塩基配列を含有するFd鎖遺伝子を含む各Fab型抗体発現ベクターを、ピキア酵母野生株Y-11430株に形質転換した。方法は実施例3に記載の方法において、ハンゼヌラ酵母をピキア酵母に変更して実施した。

形質転換後の菌体をG418含有のSD培地寒天プレート（0.17% Bacto Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids and Ammonium Sulfate(Difco社製), 0.1% sodium glutamate, 1% glucose, 0.25g/L G418) に塗布し、30°C、3日間の静置培養で生育する株を選択し、Fab型抗体発現株を取得した。

[0088]（実施例17）形質転換体の培養および培養上清の調製

実施例16で取得したピキア酵母のFab型抗体発現ベクター導入株の培養上清の調製は実施例4に記載の方法と同様に実施した。

[0089]（実施例18）Fab型抗体の定量

実施例17で取得した培養上清中のFab型抗体の分泌生産量は、実施例5と同様にサンドイッチELISA（Enzyme-Linked Immunosorbent Assay）法により解析した。

[0090] 培養上清中のFab型抗体の定量は、標準タンパク質の検量線を用いて行った結果を表4に示す。表4の通り、Fd鎖にA_{sp}を融合したFab型抗体の生産量は、融合していないFab型抗体の2倍程度向上しており、複数の

酵母種において、効果があることが明らかとなった。

[0091] [表4]

fusion peptide	TOD600	Fab (mg/L)
none(control)	64.8	3.3
Asp	62.6	6.4

[0092] (実施例19) 各Fab型抗体発現ベクターの構築3

Fd鎖をコードする塩基配列、Asp-Lys-Thr-His-Thr-Asp-Lys-Thr-His-Thr (配列番号69) のペプチドをコードする塩基配列 (配列番号70)、終止コドンにコードする塩基配列を融合させた断片は、PCRにより調製した。Asp-Lys-Thr-His-Thr-Asp-Lys-Thr-His-Thrをコードする塩基配列を融合したFd鎖遺伝子断片はプライマー15とプライマー48 (配列番号71) を用いて、実施例2にて調製したAsp-Lys-Thr-His-Thrをコードする塩基配列を含有するFd鎖遺伝子を含むFab型抗体発現ベクターをテンプレートに用いてPCRを行い、断片を得た。本断片をBglII処理して、実施例1記載のpUC-LEU2-PmMfTmのBglIIサイトに挿入して、Asp-Lys-Thr-His-Thr-Asp-Lys-Thr-His-Thrをコードする塩基配列を含有するFd鎖遺伝子を含むプラスミドを構築した。pUC-LEU2-PmMfLTmをテンプレートにして、MOXプロモーター、MF α 、L鎖、MOXターミネーターの一部が連結した遺伝子断片の両側にEcoRIサイトをつけた遺伝子断片を、プライマー13および14を用いたPCRにより調製した。本遺伝子断片をEcoRI処理後、Asp-Lys-Thr-His-Thr-Asp-Lys-Thr-His-Thrをコードする塩基配列を含有するFd鎖遺伝子を含むプラスミドのEcoRIサイトに挿入し、Asp-Lys-Thr-His-Thr-Asp-Lys-Thr-His-Thrをコードする塩基配列を含有するFd鎖遺伝子を含むFab型抗体発現ベクターを構築した。

[0093] (実施例 20) 形質転換体の取得

実施例 19 で構築した Fab 型抗体発現組換えベクターを、MOXターミネーター内のEcoRVサイトで切断して直鎖状にした。本断片を実施例 2 に記載の方法を用いてオガタエア・ポリモルファを形質転換し、Fab型抗体発現株を取得した。

[0094] (実施例 21) 形質転換体の培養および培養上清の調製

実施例 20 で得られたFab型抗体発現株の培養上清の調製は実施例3と同様に実施して取得した。

[0095] (実施例 22) Fab型抗体の定量

実施例 21 で取得した Fab 型抗体の培養上清への分泌生産量は、実施例 4 に記載の方法により解析した。

培養上清中の Fab 型抗体の定量は、標準タンパク質の検量線を用いて行った結果を表 5 に示す。表 5 の通り、Fd鎖に10残基のペプチドを融合した Fab 型抗体の生産量は、融合していない Fab 型抗体の 5 倍程度向上していることが明らかとなった。

[0096] [表5]

fusion peptide	TOD600	Fab (mg/L)
none(control)	40.5	0.55
Asp-Lys-Thr-His-Thr-Asp-Lys-Thr-His-Thr	38.8	2.64

[0097] (実施例 23) Fab型抗体発現ベクターの構築 4

Fd鎖をコードする塩基配列、30残基のペプチド(配列番号74)をコードする塩基配列(配列番号75)、終止コドンコードする塩基配列を融合させた断片は、PCRにより調製した。

配列番号74のペプチドをコードする塩基配列を融合したFd鎖遺伝子断片は、プライマー49(配列番号76)とプライマー50(配列番号77)を用いてpEGFP-F(クローンテック社製)などをテンプレートに用いてPCRを行い、断片を得た。本断片をBglIIIおよびBamHI処理して、実施例1記載のpUC-LEU2-PmMfTmのBglIIIサイトに挿入し、配列番号74のペ

プチドをコードする塩基配列の一部を含むプラスミドを得た。次に、プライマー15とプライマー51（配列番号78）を用いてPCRを行い、Fd鎖遺伝子断片を得た。本断片をBglIIIおよびBamHI処理し、上述の配列番号74のペプチドをコードする塩基配列の一部を含むプラスミドのBglIIIサイトに挿入して、配列番号74のペプチドをコードする塩基配列を融合したFd鎖遺伝子を含むベクターを構築した。pUC-LEU2-PmMfLTmをテンプレートにして、MOXプロモーター、MF α 、L鎖、MOXターミネーターの一部が連結した遺伝子断片の両側にEcoRIサイトをつけた遺伝子断片を、プライマー13および14を用いたPCRにより調製した。本遺伝子断片をEcoRI処理後、配列番号74のペプチドをコードする塩基配列を融合したFd鎖遺伝子を含むベクターのEcoRIサイトに挿入し、配列番号74のペプチドをコードする塩基配列を含有するFd鎖遺伝子を含むFab型抗体発現ベクターを構築した。

[0098]（実施例24）形質転換体の取得

実施例23で構築したFab型抗体発現組換えベクターを、MOXターミネーター内のEcoRVサイトで切断して直鎖状にした。本断片を実施例2に記載の方法を用いてオガタエア・ポリモルファを形質転換し、Fab型抗体発現株を取得した。

[0099]（実施例25）形質転換体の培養および培養上清の調製

実施例24で得られたFab型抗体発現株の培養上清の調製は実施例3と同様に実施して取得した。

[0100]（実施例26）Fab型抗体の定量

実施例25で取得したFab型抗体の培養上清への分泌生産量は、実施例4に記載の方法により解析した。

培養上清中のFab型抗体の定量は、標準タンパク質の検量線を用いて行った結果を表6に示す。表6の通り、Fd鎖に30残基のペプチドを融合したFab型抗体の生産量は、融合していないFab型抗体の4倍程度向上していることが明らかとなった。

[0101] [表6]

fusion peptide	TOD600	Fab (mg/L)
none(control)	40.5	0.55
Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Met-Val-Ser-Lys-Gly-Glu-Glu-Leu-Phe-Thr-Gly-Val-Val-Pro-Ile-Leu-Val-Glu-Leu-Asp-Gly-Asp-Val-Asn-Gly	40.4	2.09

請求の範囲

- [請求項1] 抗体のF d鎖又はL鎖のアミノ酸配列をコードする塩基配列の3'末端に、F a b型抗体の分泌量を増大できるアミノ酸又はアミノ酸配列をコードする塩基配列を含有する、遺伝子。
- [請求項2] 前記F a b型抗体の分泌量を増大できるアミノ酸又はアミノ酸配列が、1～30個のアミノ酸からなるものである、請求項1に記載の遺伝子。
- [請求項3] 前記F a b型抗体の分泌量を増大できるアミノ酸又はアミノ酸配列が、A s p、G l y、A l a、V a l、L e u、I l e、C y s、M e t、S e r、T h r、T y r、P h e、T r p、P r o、G l u、A s n、G l n、L y s、A r g、H i s、A s p-L y s、A s p-L y s-T h r、A s p-L y s-T h r-H i s、A s p-L y s-T h r-H i s-T h r-A s p-L y s-T h r-H i s-T h r、又はG l y-G l y-G l y-G l y-S e r-M e t-V a l-S e r-L y s-G l y-G l u-G l u-L e u-P h e-T h r-G l y-V a l-V a l-P r o-I l e-L e u-V a l-G l u-L e u-A s p-G l y-A s p-V a l-A s n-G l yの何れかである、請求項1又は2に記載の遺伝子。
- [請求項4] 請求項1から3の何れか1項に記載の遺伝子を含有する組換えベクター。
- [請求項5] 以下の何れかである、請求項4に記載の組み換えベクター。
- (a) 抗体のF d鎖のアミノ酸配列をコードする塩基配列の3'末端に、F a b型抗体の分泌量を増大できるアミノ酸又はアミノ酸配列をコードする塩基配列を含有するF d鎖遺伝子と、抗体のL鎖遺伝子とを含有する、組み換えベクター；
- (b) 抗体のL鎖のアミノ酸配列をコードする塩基配列の3'末端に、F a b型抗体の分泌量を増大できるアミノ酸又はアミノ酸配列をコードする塩基配列を含有するL鎖遺伝子と、抗体のF d鎖遺伝子とを

含有する、組み換えベクター；及び

(c) 抗体のF d鎖のアミノ酸配列をコードする塩基配列の3'末端に、F a b型抗体の分泌量を増大できるアミノ酸又はアミノ酸配列をコードする塩基配列を含有するF d鎖遺伝子と、抗体のL鎖のアミノ酸配列をコードする塩基配列の3'末端に、F a b型抗体の分泌量を増大できるアミノ酸又はアミノ酸配列をコードする塩基配列を含有するL鎖遺伝子とを含有する組み換えベクター。

[請求項6]

以下の何れかである、組換えベクターの組み合わせ。

(A) 抗体のF d鎖のアミノ酸配列をコードする塩基配列の3'末端に、F a b型抗体の分泌量を増大できるアミノ酸又はアミノ酸配列をコードする塩基配列を含有するF d鎖遺伝子を含有する組み換えベクターと、抗体のL鎖遺伝子を含有する組み換えベクターとの組み合わせ；

(B) 抗体のL鎖のアミノ酸配列をコードする塩基配列の3'末端に、F a b型抗体の分泌量を増大できるアミノ酸又はアミノ酸配列をコードする塩基配列を含有するL鎖遺伝子を含有する組み換えベクターと、抗体のF d鎖遺伝子を含有する組み換えベクターとの組み合わせ；及び

(C) 抗体のF d鎖のアミノ酸配列をコードする塩基配列の3'末端に、F a b型抗体の分泌量を増大できるアミノ酸又はアミノ酸配列をコードする塩基配列を含有するF d鎖遺伝子を含有する組み換えベクターと、抗体のL鎖のアミノ酸配列をコードする塩基配列の3'末端に、F a b型抗体の分泌量を増大できるアミノ酸又はアミノ酸配列をコードする塩基配列を含有するL鎖遺伝子を含有する組み換えベクターとの組み合わせ；

[請求項7]

請求項4又は5に記載の組換えベクター又は請求項6に記載の組換えベクターの組み合わせにより宿主を形質転換することにより得られる形質転換体。

- [請求項8] 宿主が酵母である、請求項7に記載の形質転換体。
- [請求項9] 酵母がオガタエア属またはコマガタエラ属酵母である、請求項7又は8に記載の形質転換体。
- [請求項10] オガタエア属またはコマガタエラ属酵母が、オガタエア・ポリモルファまたはコマガタエラ・パストリスである、請求項9に記載の形質転換体。
- [請求項11] 形質転換体を培養してF a b型抗体を生産させた場合の、培養上清中のF a b型抗体分泌生産量が2.0mg/mL以上である、請求項7から10の何れか1項に記載の形質転換体。
- [請求項12] 請求項7から11の何れか1項に記載の形質転換体を培養し、F a b型抗体を回収する工程を含むF a b型抗体の製造方法。
- [請求項13] 抗体のF d鎖及び／又はL鎖のアミノ酸配列のC末端に、F a b型抗体の分泌量を増大できるアミノ酸又はアミノ酸配列を有する、F a b型抗体。
- [請求項14] 前記F a b型抗体の分泌量を増大できるアミノ酸又はアミノ酸配列が、1～10個のアミノ酸からなるものである、請求項13に記載のF a b型抗体。
- [請求項15] 前記F a b型抗体の分泌量を増大できるアミノ酸又はアミノ酸配列が、Asp、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Cys、Met、Ser、Thr、Tyr、Phe、Trp、Pro、Glu、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp-Lys、Asp-Lys-Thr、Asp-Lys-Thr-His、Asp-Lys-Thr-His-Thr-Asp-Lys-Thr-His-Thr、又はGly-Gly-Gly-Gly-Ser-Met-Val-Ser-Lys-Gly-Glu-Glu-Leu-Phe-Thr-Gly-Val-Val-Pro-Ile-Leu-Val-Glu-Leu-Asp-Gly-Asp-Val-Asn-Glyの何れかである、請求項13又は14に記載のF a b型抗体。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2014/060941

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N15/09(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N15/09, C12N1/19, C12P21/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2014
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2014	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2014

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN),
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2012/102171 A1 (Kaneka Corp.), 02 August 2012 (02.08.2012), claim 1; paragraphs [0001], [0033] to [0036]; examples & EP 2669375 A1	1-15
Y	JP 2009-508486 A (Wyeth), 05 March 2009 (05.03.2009), paragraph [0106] & US 2007/0066806 A1 & EP 1934242 A1 & WO 2007/035283 A1	1-15
Y	JP 2007-215471 A (Kao Corp.), 30 August 2007 (30.08.2007), claims 1, 6; paragraph [0011] (Family: none)	1-15

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 03 July, 2014 (03.07.14)	Date of mailing of the international search report 15 July, 2014 (15.07.14)
---	--

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/060941

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2006-320220 A (Kaneka Corp.), 30 November 2006 (30.11.2006), paragraph [0005] (Family: none)	1-15

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)i		
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)) Int.Cl. C12N15/09, C12N1/19, C12P21/08		
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 1971-2014年 日本国実用新案登録公報 1996-2014年 日本国登録実用新案公報 1994-2014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) CAplus/REGISTRY/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)		
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
Y	WO 2012/102171 A1 (株式会社カネカ) 2012.08.02, 請求項1、 段落【0001】、【0033】～【0036】、実施例 & EP 2669375 A1	1-15
Y	JP 2009-508486 A (ワイズ) 2009.03.05, 段落【0106】 & US 2007/0066806 A1 & EP 1934242 A1 & WO 2007/035283 A1	1-15
Y	JP 2007-215471 A (花王株式会社) 2007.08.30, 請求項1、6、 段落【0011】 (ファミリーなし)	1-15
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input 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、一般的な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矛盾するものではなく、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 03.07.2014	国際調査報告の発送日 15.07.2014	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 吉岡 沙織 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B 3646

C (続き) . 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
Y	JP 2006-320220 A (株式会社カネカ) 2006. 11. 30, 段落【0005】 (ファミリーなし)	1-15