

【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7月8日(2010.7.8)

【公表番号】特表2010-506586(P2010-506586A)

【公表日】平成22年3月4日(2010.3.4)

【年通号数】公開・登録公報2010-009

【出願番号】特願2009-533241(P2009-533241)

【国際特許分類】

C 1 2 N	15/09	(2006.01)
C 1 2 N	1/15	(2006.01)
C 1 2 N	1/19	(2006.01)
C 1 2 N	1/21	(2006.01)
C 1 2 N	5/10	(2006.01)
C 1 2 P	21/02	(2006.01)

【F I】

C 1 2 N	15/00	Z N A A
C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/00	A
C 1 2 P	21/02	C

【手続補正書】

【提出日】平成22年5月17日(2010.5.17)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

ジヒドロ葉酸還元酵素をコードする塩基配列、および該塩基配列に連結された、一つ以上のC C G C C C 繰り返し配列が除去されたジヒドロ葉酸還元酵素プロモーターの塩基配列を含む、高発現誘導力セット。

【請求項2】

前記ジヒドロ葉酸還元酵素のプロモーターが1つ以下のC C G C C C 繰り返し配列を含む、請求項1に記載の高発現誘導力セット。

【請求項3】

配列番号7～10よりなる群から選ばれる塩基配列を有する、請求項1に記載の高発現誘導力セット。

【請求項4】

請求項1～3のいずれか1項の高発現誘導力セットを含む発現ベクター。

【請求項5】

生理活性ポリペプチドをコードする遺伝子をさらに含む、請求項4に記載の発現ベクター。

【請求項6】

前記生理活性ポリペプチドがヒトのエリトロポエチンであることを特徴とする、請求項5に記載の発現ベクター。

【請求項7】

配列番号 1 ~ 4 よりなる群から選ばれる塩基配列を有する、請求項 6 に記載の 発現ベクター。

【請求項 8】

配列番号 5 または 6 の塩基配列を有する、請求項 4 に記載の発現ベクター。

【請求項 9】

請求項 8 の発現ベクターによって形質転換された細胞株。

【請求項 10】

受託番号が K C T C 1 0 9 9 1 B P または K C T C 1 0 9 9 2 B P である、請求項 9 に記載の細胞株。

【請求項 11】

請求項 5 ~ 7 のいずれか 1 項の発現ベクターによって形質転換された細胞株。

【請求項 12】

前記細胞株が C H O 細胞株であることを特徴とする、請求項 11 に記載の細胞株。

【請求項 13】

前記 C H O 細胞株はジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子が欠損したものであることを特徴とする、請求項 12 に記載の細胞株。

【請求項 14】

受託番号が K C T C 1 0 9 9 3 B P 、 K C T C 1 0 9 9 4 B P または K C T C 1 0 9 9 5 B P である、請求項 12 に記載の細胞株。

【請求項 15】

(a) C C G C C C 繰り返し配列が一部または全部除去されたプロモーターと、組み換えタンパク質をコードする遺伝子とを含む、ジヒドロ葉酸還元酵素をコードする遺伝子を含む発現ベクターで動物細胞株を形質転換する段階と、

(b) ジヒドロ葉酸還元酵素阻害剤の存在下に、前記形質転換された動物細胞株を培養する段階とを含む、組み換えタンパク質の製造方法。

【請求項 16】

組み換えタンパク質がヒトのエリトロポエチンである、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

シアル酸高含有のエリトロポエチンを精製する段階をさらに含む、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

発現ベクターが図 1 に記載の発現ベクターである、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 19】

段階 (a) の動物細胞株がジヒドロ葉酸還元酵素欠損 C H O 細胞株であることを特徴とする、請求項 15 または 16 に記載の方法。

【請求項 20】

段階 (b) の形質転換された動物細胞株が受託番号 K C T C 1 0 9 9 3 B P 、 K C T C 1 0 9 9 4 B P または K C T C 1 0 9 9 5 B P の動物細胞株である、請求項 15 に記載の方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 1 9

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 1 9】

本発明の別の様態では、本発明に係る G C - r i c h 配列が一部または全部除去されたプロモーターと、組み換えタンパク質をコードする遺伝子とを含む、ジヒドロ葉酸還元酵素をコードする遺伝子を含む本発明の動物細胞用発現ベクターで動物細胞株を形質転換する段階と、前記形質転換された動物細胞株を培養する段階とを含む、組み換えタンパク質の製造方法を提供する。

本発明において、動物細胞株への「形質転換」は、核酸を有機体、細胞、組織または器官に導入するいずれの方法も含み、当分野における公知の動物細胞株に応じて適切な標準技術を選択して行うことができる。細胞壁がない哺乳動物細胞の場合、リン酸カルシウム沈殿法を使用することができる(Graham et al., 1978, *Virology*, 52:456-457)。哺乳動物宿主細胞への形質転換の一般的な方法および特徴は、米国特許第4,399,216号に記載されている。具体的に、本発明では、組み換えタンパク質を発現させるベクターをリポフェクタミンを用いてCHO細胞内に取り込んだ。また、本発明において、動物細胞株の培養は当業界における公知の適切な培地と培養条件に応じて行われ得る。このような培養過程は、当業者であれば、選択される動物細胞株に応じて容易に調整して使用することができる。細胞の成長方式によって、懸濁培養または付着培養を回分培養式、流加培養式および連続培養式の方法で行う。培養に使用される培地は、特定細胞株の要求条件を適切に満足させなければならない。