

【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28年6月30日(2016.6.30)

【公表番号】特表2015-519892(P2015-519892A)

【公表日】平成27年7月16日(2015.7.16)

【年通号数】公開・登録公報2015-045

【出願番号】特願2015-509459(P2015-509459)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 9/04 (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 Q 1/32 (2006.01)

C 1 2 M 1/34 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 N 9/04 Z N A D

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 5/00 1 0 1

C 1 2 Q 1/32

C 1 2 M 1/34 E

【手続補正書】

【提出日】平成28年5月2日(2016.5.2)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) グリコシル化されている配列番号 2 をもつ修飾フラビンアデニンジヌクレオチド依存性グルコース脱水素酵素であるが、成熟型アスペルギルス オリゼ由来 F A D - G D H の野生型配列、配列番号 2 (野生型)における N 2 ; N 1 6 8 および N 3 4 6 からなる群より選択される少なくとも一つのアスパラギン残基が、グリコシル化に適していない—または二以上のアミノ酸によって置換されており、そしてこれによってこの位置における潜在的なグリコシル部位がそれぞれ排除、または不活性化されているグリコシル化されている修飾フラビンアデニンジヌクレオチド依存性グルコース脱水素酵素、および

(b) (a) 記載の、配列番号 2 をもつ前記修飾フラビンアデニンジヌクレオチド依存性グルコース脱水素酵素に対して 8 0 % またはそれ以上のアミノ酸配列相同性を示す、グリコシル化されている修飾フラビンアデニンジヌクレオチド依存性グルコース脱水素酵素であって、成熟型アスペルギルス オリゼ由来 F A D - G D H の野生型配列、配列番号 2 における N 2 ; N 1 6 8 および N 3 4 6 からなる群より選択される少なくとも一つのアスパラギン残基が、グリコシル化に適していない—または二以上のアミノ酸によって置換されており、そしてこれによってこの位置における潜在的なグリコシル部位がそれぞれ排除、

または不活性化されており、類似性が決定される領域が (a) 記載の修飾 F A D - G D H の全配列であり、および、(a) 記載の F A D - G D H の前記配列が参照配列であるグリコシル化されている修飾フラビンアデニンジヌクレオチド依存性グルコース脱水素酵素、および

(c) (a) または (b) 記載の修飾フラビンアデニンジヌクレオチド依存性グルコース脱水素酵素の活性フラグメント

からなる群より選択される、グリコシル化されている修飾フラビンアデニンジヌクレオチド依存性グルコース脱水素酵素であって、

(b) 記載の F A D - G D H または (c) 記載のフラグメントにおいて、前記潜在的なグリコシル化部位を排除するまたは不活性化する前記置換が、(a) 記載の修飾フラビンアデニンジヌクレオチド依存性グルコース脱水素酵素と比較した場合に保存されており、および

(b) 記載のフラビンアデニンジヌクレオチド依存性グルコース脱水素酵素または (c) 記載のフラグメントが、(a) 記載の F A D - G D H の酵素活性の少なくとも 80 % の酵素活性を示しており、かつ、(a) 記載の F A D - G D H の乾燥条件下での温度安定性の少なくとも 80 % の温度安定性を示しており、

ここで、「乾燥条件下での温度安定性を示す」との表現が、

1) 凍結乾燥、および、凍結乾燥された酵素の 80 で 8 日間、モレキュラーシーブ (3 A、M S 5 5 1、G r a c e) 上でのインキュベーション

の後に算出され、およびストレス無負荷の凍結乾燥物と比較された、凍結乾燥された修飾フラビンアデニンジヌクレオチド依存性グルコース脱水素酵素 (F A D - G D H) 自身の、および、凍結乾燥された組成物中に含まれる場合凍結乾燥された組成物中の残存活性を意味している、グリコシル化されている修飾フラビンアデニンジヌクレオチド依存性グルコース脱水素酵素。

【請求項 2】

前記修飾フラビンアデニンジヌクレオチド依存性グルコース脱水素酵素が、グリコシル化されている配列番号 1 の F A D - G D H と比較して、乾燥条件下での改良された温度安定性を示し、前記配列番号 1 の F A D - G D H がアスペルギルス オリゼでの発現によって得られ得る、請求項 1 記載の修飾フラビンアデニンジヌクレオチド依存性グルコース脱水素酵素またはその活性フラグメント。

【請求項 3】

50 % 未満であるグリコシル化の程度、および / または、1.02 未満である M w / M n の比を示す請求項 1 または 2 記載の修飾フラビンアデニンジヌクレオチド依存性グルコース脱水素酵素またはその活性フラグメント。

【請求項 4】

N 2 ; N 1 6 8 および N 3 4 6 からなる群より選択されるただ一つのアスパラギン残基のみが、グリコシル化に適していない—または二以上のアミノ酸によって置換されており、そしてこれによってこの位置における潜在的なグリコシル部位がそれぞれ排除、または不活性化されている請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の修飾フラビンアデニンジヌクレオチド依存性グルコース脱水素酵素またはその活性フラグメント。

【請求項 5】

アスペルギルス オリゼ由来 F A D - G D H の野生型配列、配列番号 2 (野生型) 由来の前記修飾フラビンアデニンジヌクレオチド依存性グルコース脱水素酵素またはその活性フラグメントが、—または二以上の以下の置換 : N 2 S、N 1 6 8 P、N 1 6 8 S P および N 3 4 6 D を有する請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の修飾フラビンアデニンジヌクレオチド依存性グルコース脱水素酵素またはその活性フラグメント。

【請求項 6】

アスペルギルス オリゼ由来 F A D - G D H の野生型配列、配列番号 2 (野生型) 由来の前記修飾フラビンアデニンジヌクレオチド依存性グルコース脱水素酵素またはその活性フラグメントが、以下の置換 N 2 S (配列番号 3) を有する請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に

記載の修飾フラビンアデニンジヌクレオチド依存性グルコース脱水素酵素またはその活性フラグメント。

【請求項 7】

50%未満であるグリコシル化の程度、および/または、1.02未満である M_w/M_n の比を示す請求項1～6のいずれか1項に記載の修飾フラビンアデニンジヌクレオチド依存性グルコース脱水素酵素またはその活性フラグメントを含む組成物。

【請求項 8】

請求項1～6のいずれか1項に記載の修飾フラビンアデニンジヌクレオチド依存性グルコース脱水素酵素またはその活性フラグメントをエンコードする単離ポリヌクレオチドであって、N168K、N168P、N168YまたはN168Wからなる群より選択される単一の置換を有する、アスペルギルスオリゼ由来FAD-GDHの野生型配列、配列番号2(野生型)由来の修飾フラビンアデニンジヌクレオチド依存性グルコース脱水素酵素またはその活性フラグメントをエンコードしない単離ポリヌクレオチド。

【請求項 9】

請求項8記載の単離ポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項 10】

請求項1～6のいずれか1項に記載の修飾フラビンアデニンジヌクレオチド依存性グルコース脱水素酵素またはその活性フラグメントをエンコードしている単離ポリヌクレオチドを含む請求項9記載の発現ベクターを含む宿主細胞であって、前記単離ポリヌクレオチドがN168K、N168P、N168YまたはN168Wからなる群より選択される単一の置換を有する、アスペルギルスオリゼ由来FAD-GDHの野生型配列、配列番号2(野生型)由来の修飾フラビンアデニンジヌクレオチド依存性グルコース脱水素酵素またはその活性フラグメントをエンコードせず、前記宿主細胞が、内因性のグリコシル化酵素を有することによってグリコシル化、特にN-結合型グリコシル化を行うことができ、かつ、大腸菌株ではない宿主細胞。

【請求項 11】

請求項10記載の形質転換体を培養する工程を含む、修飾フラビンアデニンジヌクレオチド依存性グルコース脱水素酵素またはその活性フラグメントを産生するための方法。

【請求項 12】

グリコシル化を行うことのできる宿主細胞中で、請求項11記載の方法によって得られる請求項1～6のいずれか1項に記載の修飾フラビンアデニンジヌクレオチド依存性グルコース脱水素酵素またはその活性フラグメント。

【請求項 13】

請求項1～6のいずれか1項もしくは請求項12記載の修飾フラビンアデニンジヌクレオチド依存性グルコース脱水素酵素またはその活性フラグメント、または、請求項7記載の組成物を用いた、エキスピボサンプル中のグルコースを検出、決定または測定する方法であって、前記検出、決定または測定が、エキスピボサンプルを前記修飾フラビンアデニンジヌクレオチド依存性グルコース脱水素酵素またはその活性フラグメントとそれぞれ接触させることを含む方法。

【請求項 14】

前記グルコースの検出、決定または測定がセンサーまたはテストストリップ素子を用いて行われる請求項13記載の方法。

【請求項 15】

請求項1～6のいずれか1項もしくは請求項12記載の修飾フラビンアデニンジヌクレオチド依存性グルコース脱水素酵素またはその活性フラグメント、または、請求項7記載の組成物を含むエキスピボサンプル中のグルコースの検出、決定または測定のための装置。