【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３部門第２区分
【発行日】平成24年8月9日(2012.8.9)

【公開番号】特開2011-173911(P2011-173911A)
【公開日】平成23年9月8日(2011.9.8)
【年通号数】公開・登録公報2011-036
【出願番号】特願2011-98711(P2011-98711)
【国際特許分類】
Ｃ０７Ｋ　14/535　(2006.01)
Ｃ１２Ｎ　15/09　(2006.01)
Ｃ０７Ｋ　1/107　(2006.01)
【ＦＩ】
Ｃ０７Ｋ　14/535　ＺＮＡ
Ｃ１２Ｎ　15/00　Ａ
Ｃ０７Ｋ　1/107

【手続補正書】
【提出日】平成24年6月22日(2012.6.22)
【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】
単離ヒト顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）システイン・ムテインであって、
システイン残基が、Ｇ－ＣＳＦ成熟タンパク質のＴ１（１番目の位置のスレオニン：以下同様に、アルファベットはアミノ酸の一文字記号を指し、数字は成熟タンパク質内の置換されるアミノ酸の位置を指す）Ｐ２、Ｌ３、Ａ６、Ｓ７、Ｗ５８、Ａ６８、Ｅ９３、Ａ１２９、Ｑ１３１、Ｔ１３３、Ｑ１３４、Ａ１３６、Ａ１３９、Ａ１４１およびＱ１７３から選択されたアミノ酸と置換されているか、または
システイン残基が、Ｇ－ＣＳＦ成熟タンパク質の最初のアミノ酸の前かまたは最後のアミノ酸の後に付加されており、
前記ムテインはヒトＧ－ＣＳＦに応答して増殖する細胞系統を用いたインビトロ増殖バイオアッセイで１００ｐｇ／ｍＬ以下のEC_{50}を有する、単離ヒト顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）システイン・ムテイン。
【請求項２】
前記システイン残基にポリエチレングリコールが取り付けられている
請求項１に記載の単離ヒト顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）システイン・ムテイン。
【請求項３】
前記システイン残基は、前記Ｇ－ＣＳＦ成熟タンパク質の最初のアミノ酸の前かまたは最後のアミノ酸の後に付加されている
請求項１または２に記載の単離ヒト顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）システイン・ムテイン。
【請求項４】
前記システイン残基は、前記Ｇ－ＣＳＦ成熟タンパク質のＴ１、Ｐ２、Ｌ３、Ａ６、およびＳ７から選択されたアミノ酸と置換されている
請求項１または２に記載の単離ヒト顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）システイン

・ムテイン。
【請求項５】
前記システイン残基は、前記Ｇ－ＣＳＦ成熟タンパク質のＷ５８およびＡ６８から選択されたアミノ酸と置換されている
請求項１または２に記載の単離ヒト顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）システイン・ムテイン。
【請求項６】
前記システイン残基は、前記Ｇ－ＣＳＦ成熟タンパク質のＥ９３およびＱ１７３から選択されたアミノ酸と置換されている
請求項１または２に記載の単離ヒト顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）システイン・ムテイン。
【請求項７】
前記システイン残基は、前記Ｇ－ＣＳＦ成熟タンパク質のＡ１２９、Ｑ１３１、Ｔ１３３、Ｑ１３４、Ａ１３６およびＡ１３９から選択されたアミノ酸と置換されている
請求項１または２に記載の単離ヒト顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）システイン・ムテイン。
【請求項８】
前記システイン残基は、Ａ１４１と置換されている
請求項１または２に記載の単離ヒト顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）システイン・ムテイン。
【請求項９】
１７番目の位置のシステインは、アラニンおよびセリンから選択されたアミノ酸に置換されている
請求項１から８のいずれか１項に記載の単離ヒト顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）システイン・ムテイン。
【請求項１０】
請求項１から９のいずれか１項に記載の単離ヒト顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）システイン・ムテインを調製する方法であって、
（ａ）大腸菌ｓｔＩＩシグナル配列が融合されたＧ－ＣＳＦシステイン・ムテインをコードするＤＮＡで形質転換された大腸菌宿主細胞を得る工程と、
（ｂ）前記大腸菌宿主細胞が前記Ｇ－ＣＳＦシステイン・ムテインを発現するとともに該Ｇ－ＣＳＦシステイン・ムテインを該大腸菌宿主細胞の周辺質中に分泌する条件下で、該大腸菌宿主細胞を培養する工程と、
（ｃ）前記宿主細胞を溶解する工程と、
（ｄ）溶解された前記宿主細胞から不溶性の前記Ｇ－ＣＳＦシステイン・ムテインを単離する工程と、
（ｅ）不溶性の前記Ｇ－ＣＳＦシステイン・ムテインを変性且つ還元する工程と、
（ｆ）前記Ｇ－ＣＳＦシステイン・ムテインを生物学的に活性な形にリフォールディングする工程と、
（ｇ）リフォールディングされた前記Ｇ－ＣＳＦシステイン・ムテインを単離する工程とを含む方法。
【請求項１１】
前記大腸菌宿主細胞は、大腸菌Ｗ３１１０である
請求項１０に記載の方法。
【請求項１２】
前記（ｆ）工程において、システイン・ブロッキング剤の存在下で前記Ｇ－ＣＳＦシステイン・ムテインをリフォールディングする
請求項１０に記載の方法。