

【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26年4月17日(2014.4.17)

【公表番号】特表2013-529064(P2013-529064A)

【公表日】平成25年7月18日(2013.7.18)

【年通号数】公開・登録公報2013-038

【出願番号】特願2013-502705(P2013-502705)

【国際特許分類】

C 1 2 P 21/02 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 R 1/39 (2006.01)

【F I】

C 1 2 P 21/02 Z N A C

C 1 2 P 21/02 C

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 P 21/02 C

C 1 2 R 1:39

【手続補正書】

【提出日】平成26年2月28日(2014.2.28)

【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】

シュードモナス菌宿主細胞における組み換え型毒素タンパク質を生成する方法であって、前記方法は：

発現ベクターへ、毒素タンパク質をコード化するヌクレオチド配列を連結する工程；

発現ベクターによりシュードモナス菌宿主細胞を形質転換する工程；及び

組み換え型毒素タンパク質の発現に適している培地において、形質転換されたシュードモナス菌宿主細胞を培養する工程を含み；

前記組み換え型毒素タンパク質は、CRM197、クロストリジウムディフィシレ毒素 B、破傷風毒素フラグメント C、緑膿菌外毒素 A、コレラ毒素 B、ジフテリア毒素、コレラホロトキシン、および、百日咳毒素から選択される、ことを特徴とする方法。

【請求項 2】

前記組換え型タンパク質は、1 リットル当たり 0.2 グラム乃至 1 リットル当たり約 12 グラムの可溶性の及び／又は活性な毒素タンパク質の収量で生成されることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

1 リットル当たり約 0.2 グラム乃至 1 リットル当たり約 12 グラムの可溶性の及び／又は活性な毒素タンパク質の収量は、約 0.2 g/L、約 0.3 g/L、約 0.4 g/L、約 0.5 g/L、約 0.6 g/L、約 0.7 g/L、約 0.8 g/L、約 0.9 g/L、約 1 g/L、約 1.5 g/L、約 2 g/L、約 2.5 g/L、約 3 g/L、約 3.5 g/L、約 4 g/L、約 4.5 g/L、約 5 g/L、約 5.5 g/L、約 6 g/L、約 6.5 g/L、約 7 g/L、約 7.5 g/L、約 8 g/L、約 8.5 g/L、約 9 g/L、約 9.5 g/L、約 10 g/L、約 10.5 g/L、約 11 g/L、約 12 g/L、約 0.2 g/L 乃至約 0.5 g/L、約 0.2 g/L 乃至約 1 g/L、約 0.2 乃至約 2 g/L

、約 0.3 g/L 乃至約 0.6 g/L、約 0.3 g/L 乃至約 1 g/L、約 0.3 乃至約 2 g/L、約 0.4 乃至約 0.7 g/L、約 0.4 乃至約 1 g/L、約 0.4 乃至約 2 g/L、約 0.4 乃至約 3 g/L、約 0.5 g/L 乃至約 1 g/L、約 0.5 g/L 乃至約 2 g/L、約 0.5 g/L 乃至約 3 g/L、約 0.5 g/L 乃至約 4 g/L、約 0.5 g/L 乃至約 5 g/L、約 0.5 g/L 乃至約 6 g/L、約 0.5 g/L 乃至約 7 g/L、約 0.5 g/L 乃至約 8 g/L、約 0.5 g/L 乃至約 9 g/L、約 0.5 g/L 乃至約 10 g/L、約 0.5 g/L 乃至約 11 g/L、約 0.5 g/L 乃至約 12 g/L、約 1 g/L 乃至約 2 g/L、約 1 g/L 乃至約 3 g/L、約 1 g/L 乃至約 4 g/L、約 1 g/L 乃至約 5 g/L、約 1 g/L 乃至約 6 g/L、約 1 g/L 乃至約 7 g/L、約 1 g/L 乃至約 8 g/L、約 1 g/L 乃至約 9 g/L、約 1 g/L 乃至約 10 g/L、約 1 g/L 乃至約 11 g/L、約 1 g/L 乃至約 12 g/L、約 2 g/L 乃至約 3 g/L、約 2 g/L 乃至約 4 g/L、約 2 g/L 乃至約 5 g/L、約 2 g/L 乃至約 6 g/L、約 2 g/L 乃至約 7 g/L、約 2 g/L 乃至約 8 g/L、約 2 g/L 乃至約 9 g/L、約 2 g/L 乃至約 10 g/L、約 2 g/L 乃至約 11 g/L、約 2 g/L 乃至約 12 g/L、約 3 g/L 乃至約 4 g/L、約 3 g/L 乃至約 5 g/L、約 3 g/L 乃至約 6 g/L、約 3 g/L 乃至約 7 g/L、約 3 g/L 乃至約 8 g/L、約 3 g/L 乃至約 9 g/L、約 3 g/L 乃至約 10 g/L、約 3 g/L 乃至約 11 g/L、約 3 g/L 乃至約 12 g/L、約 4 g/L 乃至約 5 g/L、約 4 g/L 乃至約 6 g/L、約 4 g/L 乃至約 7 g/L、約 4 g/L 乃至約 8 g/L、約 4 g/L 乃至約 9 g/L、約 4 g/L 乃至約 10 g/L、約 4 g/L 乃至約 11 g/L、約 4 g/L 乃至約 12 g/L、約 5 g/L 乃至約 6 g/L、約 5 g/L 乃至約 7 g/L、約 5 g/L 乃至約 8 g/L、約 5 g/L 乃至約 9 g/L、約 5 g/L 乃至約 10 g/L、約 5 g/L 乃至約 11 g/L、約 5 g/L 乃至約 12 g/L、約 6 g/L 乃至約 7 g/L、約 6 g/L 乃至約 8 g/L、約 6 g/L 乃至約 9 g/L、約 6 g/L 乃至約 10 g/L、約 6 g/L 乃至約 11 g/L、約 6 g/L 乃至約 12 g/L、約 7 g/L 乃至約 8 g/L、約 7 g/L 乃至約 9 g/L、約 7 g/L 乃至約 10 g/L、約 7 g/L 乃至約 11 g/L、約 7 g/L 乃至約 12 g/L、約 8 g/L 乃至約 9 g/L、約 8 g/L 乃至約 10 g/L、約 8 g/L 乃至約 11 g/L、約 8 g/L 乃至約 12 g/L、約 9 g/L 乃至約 10 g/L、約 9 g/L 乃至約 11 g/L、約 9 g/L 乃至約 12 g/L、約 10 g/L 乃至約 11 g/L、約 10 g/L 乃至約 12 g/L、又は約 11 g/L 乃至約 12 g/L であることを特徴とする、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記毒素タンパク質をコード化する前記ヌクレオチド配列が、発現される時に毒素タンパク質のペリプラズムへの輸送を誘導する分泌シグナルコード配列に融合されることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記宿主細胞は、少なくとも 1 つのプロテアーゼの発現を欠き、又は前記宿主細胞は、少なくとも 1 つのフォールディングモジュレータ、又はその組み合わせを過剰発現させることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記組み換え型毒素タンパク質は CRM197 であり、前記宿主細胞は、Hs1U、Hs1V、Prcl、DegP1、DegP2、及び AprA の発現を欠くことを特徴とする、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記組み換え型毒素タンパク質は CRM197 であり、前記組み換え型毒素タンパク質は、Azul、IbpS31A、CupA2、PbpA20V、又は Pbp である分泌リーダーに融合されることを特徴とする、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 8】

前記組み換え型毒素タンパク質が CRM197 であり、宿主細胞が、セラリシン、Hs1U、Hs1V、Prcl、DegP1、DegP2、AprA、又はそれらの任意の組み合わせの発現を欠き、又は宿主細胞が、DsbA、DsbB、DsbC、及び DsbD

を過剰発現し、及び更に、前記組み換え型毒素タンパク質がA z u、P b p、又は自然の分泌リーダーに融合されることを特徴とする、請求項5に記載の方法。

【請求項9】

前記宿主細胞がD s b A、D s b B、D s b C、及びD s b Dを過剰発現し、前記組み換え型毒素タンパク質は分泌リーダーA z uに融合されることを特徴とする、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

前記宿主細胞がセラリシンの発現を欠き、前記組み換え型毒素タンパク質が分泌リーダーP b p又はA z uに融合されることを特徴とする、請求項8に記載の方法。

【請求項11】

前記宿主細胞がH s l U及びH s l Vの発現を欠き、前記組み換え型毒素タンパク質が分泌リーダーP b p又はA z uに融合されることを特徴とする、請求項8に記載の方法。

【請求項12】

前記組み換え型毒素タンパク質がC R M 1 9 7であり、前記宿主細胞が野生型であり、前記組み換え型毒素タンパク質が分泌リーダーP b p又はA z uに融合されることを特徴とする、請求項4に記載の方法。

【請求項13】

前記組み換え型毒素タンパク質がその自然の分泌リーダーに融合されることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項14】

活性アッセイにおける前記組み換え型毒素タンパク質の活性を測定する工程をさらに含み、生成された可溶性毒素タンパク質の約40%乃至約100%が活性であると決定されることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項15】

前記活性アッセイが、免疫学アッセイ、受容体結合アッセイ、又は酵素アッセイであることを特徴とする、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

前記発現ベクターが、タンパク質コード配列に操作可能に連結されたl a c誘導体プロモータを含み、前記培養する工程が、約0.02乃至約1.0mMの濃度でIPTGを使用するプロモータの誘発を含み、誘発時の細胞密度が、約40乃至約200の吸光度単位(AU)の光電密度であり、培養のpHが約6乃至約7.5であり、成長温度が約20乃至約35℃であることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項17】

前記宿主細胞が、シュードモナス菌細胞であることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項18】

前記宿主細胞が緑膿菌であることを特徴とする、請求項17に記載の方法。

【請求項19】

前記ヌクレオチド配列がシュードモナス菌宿主細胞における発現のために最適化されたことを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項20】

前記発現ベクターが分泌シグナルのためのコード配列に隣接しているタグ配列をさらに含むことを特徴とする、請求項3に記載の方法。

【請求項21】

前記発現ベクターが、毒素タンパク質のためのコード配列に隣接しているタグ配列をさらに含むことを特徴とする、請求項1に記載の方法。