【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20年1月17日(2008.1.17)

【公表番号】特表2007-512028(P2007-512028A)
【公表日】平成19年5月17日(2007.5.17)
【年通号数】公開・登録公報2007-018
【出願番号】特願2006-541651(P2006-541651)
【国際特許分類】
Ｃ１２Ｎ　15/09　(2006.01)
Ｃ１２Ｎ　1/21　(2006.01)
Ｃ０７Ｋ　14/21　(2006.01)
Ｃ１２Ｐ　21/02　(2006.01)
【ＦＩ】
Ｃ１２Ｎ　15/00　ＺＮＡＡ
Ｃ１２Ｎ　1/21
Ｃ０７Ｋ　14/21
Ｃ１２Ｐ　21/02　Ｃ

【手続補正書】
【提出日】平成19年11月21日(2007.11.21)
【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】
リン酸結合タンパク質(pbp)分泌シグナル、外膜ポーリンＥ(OprE)分泌シグナル、Ｌｙｓ－Ａｒｇ－Ｏｒｎ結合タンパク質分泌シグナル、アズリン分泌シグナル、鉄（ＩＩＩ）結合タンパク質分泌シグナルおよびリポタンパク質Ｂ分泌シグナルからなる群より選択されるシュードモナス・フルオレッセンス(Pseudomonas fluorescens)のＳｅｃ系分泌ペプチドについての分泌シグナルのコード配列か、またはそのコード配列と実質的に相同な配列を含む、単離された核酸配列。
【請求項２】
ｐｂｐ分泌シグナル、ＯｐｒＥ分泌シグナル、Ｌｙｓ－Ａｒｇ－Ｏｒｎ結合タンパク質分泌シグナル、アズリン分泌シグナル、鉄（ＩＩＩ）結合タンパク質分泌シグナルおよびリポタンパク質Ｂ分泌シグナルからなる群より選択される、シュードモナス・フルオレッセンスのＳｅｃ系分泌ペプチドをコードする核酸の分泌シグナル配列；その分泌シグナル配列と実質的に相同な配列；またはその分泌シグナル配列にハイブリダイズする配列を含む、組換えベクター。
【請求項３】
ｐｂｐ分泌シグナル、ＯｐｒＥ分泌シグナル、Ｌｙｓ－Ａｒｇ－Ｏｒｎ結合タンパク質分泌シグナル、アズリン分泌シグナル、鉄（ＩＩＩ）結合タンパク質分泌シグナルおよびリポタンパク質Ｂ分泌シグナルからなる群より選択されるシュードモナス・フルオレッセンスのＳｅｃ系分泌ペプチドをコードする核酸分泌シグナル配列；その分泌シグナル配列と実質的に相同な配列；もしくは分泌シグナル配列にハイブリダイズする配列、またはそのコード配列と実質的に相同な配列を含む、組換え細胞。
【請求項４】
ｐｂｐ分泌シグナル、ＯｐｒＥ分泌シグナル、Ｌｙｓ－Ａｒｇ－Ｏｒｎ結合タンパク質

分泌シグナル、アズリン分泌シグナル、鉄（ＩＩＩ）結合タンパク質分泌シグナルおよびリポタンパク質Ｂ分泌シグナルからなる群より選択されるシュードモナス・フルオレッセンスのＳｅｃ系分泌ペプチドをコードするアミノ酸配列か、またはそのシグナル配列と実質的に相同な配列を含む、単離されたペプチド。

【請求項５】

組換えタンパク質またはペプチドを発現させるための発現系であって：

ａ．宿主細胞；ならびに

ｂ．ｐｂｐ分泌シグナル、ＯｐｒＥ分泌シグナル、Ｌｙｓ－Ａｒｇ－Ｏｒｎ結合タンパク質分泌シグナル、アズリン分泌シグナル、鉄（ＩＩＩ）結合タンパク質分泌シグナルおよびリポタンパク質Ｂ分泌シグナルからなる群より選択されるシュードモナス・フルオレッセンスのＳｅｃ系分泌シグナル、またはその分泌シグナル配列と実質的に相同な配列に、機能できるように結合している組換えタンパク質またはペプチドを含むベクター

を含む発現系。

【請求項６】

ｐｂｐ分泌シグナル、ＯｐｒＥ分泌シグナル、Ｌｙｓ－Ａｒｇ－Ｏｒｎ結合タンパク質分泌シグナル、アズリン分泌シグナル、鉄（ＩＩＩ）結合タンパク質分泌シグナルおよびリポタンパク質Ｂ分泌シグナルからなる群より選択されるシュードモナス・フルオレッセンスのＳｅｃ系分泌シグナル、またはそのシグナル配列と実質的に相同な配列に、機能できるように結合している組換えタンパク質またはペプチドをコードするベクターを含む細胞を提供する工程、ならびにその組換えタンパク質またはペプチドの発現を実現する条件下でその細胞を培養する工程を含む、宿主細胞内で組換えタンパク質またはペプチドを発現させるための方法。

【請求項７】

組換えＳｅｃ系分泌シグナル配列に機能できるように結合している組換えタンパク質またはペプチドをコードするベクターを含むシュードモナス・フルオレッセンス細胞を提供する工程、ならびにそのタンパク質またはペプチドの発現を実現する条件下でその細胞を培養する工程を含む、シュードモナス・フルオレッセンス宿主細胞内での組換えタンパク質の改良された発現のための方法。

【請求項８】

以下：

(a) pbp分泌シグナルをコードする群から選択され、かつ：

１．配列番号：２と少なくとも８０％同一、少なくとも８５％同一、少なくとも９０％同一、少なくとも９５％同一、または少なくとも９５％同一な配列であるか；または

２．配列番号：２にハイブリダイズする

配列；

(b) 外膜ポーリンＥ(OprE)分泌シグナルをコードする群から選択され、かつ：

１．配列番号：４と少なくとも８０％同一、少なくとも８５％同一、少なくとも９０％同一もしくは少なくとも９５％同一であるか；または

２．配列番号：４にハイブリダイズする

配列；

(c) Ｌｙｓ－Ａｒｇ－Ｏｒｎ結合タンパク質分泌シグナルをコードする群から選択され、かつ：

１．配列番号：６と少なくとも８０％同一、少なくとも８５％同一、少なくとも９０％同一もしくは少なくとも９５％同一であるか；または

２．配列番号：６にハイブリダイズする

配列；

(d) アズリン分泌シグナルをコードする群から選択され、かつ：

１．配列番号：８と少なくとも８０％同一、少なくとも８５％同一、少なくとも９０％同一もしくは少なくとも９５％同一であるか；または

２．配列番号：８にハイブリダイズする

配列；
(e) 鉄（ＩＩＩ）結合タンパク質分泌シグナルをコードする群から選択され、かつ：
1. 配列番号：１０と少なくとも８０％同一、少なくとも８５％同一、少なくとも９０％同一もしくは少なくとも９５％同一であるか；または
2. 配列番号：１０にハイブリダイズする
配列；あるいは
(f) リポタンパク質Ｂ分泌シグナルをコードする群から選択され、かつ：
1. 配列番号：１２と少なくとも８０％同一、少なくとも８５％同一、少なくとも９０％同一もしくは少なくとも９５％同一であるか；または
2. 配列番号：１２にハイブリダイズする
配列；
である、請求項１～７に記載の核酸、組換えベクター、組換え細胞、発現系または発現方法。
【請求項９】
配列番号：２、配列番号：４、配列番号：６、配列番号：８、配列番号：１０および配列番号：１２からなる群より選択される核酸配列を含み、核酸配列を発現するように選択される宿主細胞生物のコドン優先度を反映するように調節される、請求項１～８に記載の核酸、組換えベクター、組換え細胞、発現系または発現方法。
【請求項１０】
細胞が目的のタンパク質またはペプチドを発現し、核酸によりコードされる分泌シグナルペプチドに機能可能に連結される、請求項１～９に記載の核酸、組換えベクター、組換え細胞、発現系または発現方法。
【請求項１１】
目的のタンパク質またはペプチドが細胞のペリプラズム区画内に発現される、請求項１０に記載の核酸、組換えベクター、組換え細胞、発現系または発現方法。
【請求項１２】
細胞中の酵素が目的のタンパク質またはペプチドからシグナルペプチドを切断する、請求項１０～１１に記載の核酸、組換えベクター、組換え細胞、発現系または発現方法。
【請求項１３】
組換えタンパク質または組換えペプチドがシュードモナス（Pseudomonad）に由来する、請求項１～１２に記載の核酸、組換えベクター、組換え細胞、発現系または発現方法。
【請求項１４】
組換えタンパク質または組換えペプチドがシュードモナス・フルオレッセンスに由来する、請求項１３に記載の核酸、組換えベクター、組換え細胞、発現系または発現方法。
【請求項１５】
核酸、組換えベクター、組換え細胞、発現系または発現方法がさらに、エシェリキア・コリ(E.coli)生物またはシュードモナス・フルオレッセンスに基づくプロモーターを含む、請求項１～１２に記載の核酸、組換えベクター、組換え細胞、発現系または発現方法。
【請求項１６】
シグナルペプチド配列および組換えタンパク質配列または組換えペプチド配列の間に連結配列をさらに含み、該連結配列がシグナルペプチダーゼによって切断可能である、請求項１～１５に記載の核酸、組換えベクター、組換え細胞、発現系または発現方法。
【請求項１７】
組換えタンパク質配列または組換えペプチド配列が第二のシグナル配列に機能可能に連結される、請求項１～１６に記載の核酸、組換えベクター、組換え細胞、発現系または発現方法。
【請求項１８】
第二のシグナル配列が外膜分泌シグナルにターゲット化される配列を含む、請求項１７に記載の核酸、組換えベクター、組換え細胞、発現系または発現方法。
【請求項１９】

ベクターがさらにプロモーターを含む、請求項１～１８に記載の核酸、組換えベクター、組換え細胞、発現系または発現方法。
【請求項２０】
プロモーターが誘導性プロモーター、ｌａｃプロモーター、およびｌａｃプロモーター誘導体からなる群より選択される、請求項１９に記載の核酸、組換えベクター、組換え細胞、発現系または発現方法。
【請求項２１】
アミノ酸配列が、配列番号：１のアミノ酸２～２４または配列番号：３のアミノ酸２～２１に対して少なくとも９０％同一、少なくとも９５％同一、または少なくとも９８％同一である、請求項４に記載のペプチド。
【請求項２２】
さらに発酵培地を含む、請求項５～２０に記載の発現系または発現方法。
【請求項２３】
発酵培地がケミカルインデューサーを含む、請求項２２に記載の発現系または発現方法。
【請求項２４】
細胞が無機塩培地において培養される、請求項５～２０および２２～２３に記載の発現系または発現方法。
【請求項２５】
細胞が高細胞密度で培養される、請求項５～２０および２２～２４に記載の発現系または発現方法。
【請求項２６】
細胞が少なくとも２０g/Ｌの細胞密度で培養される、請求項５～２０および２２～２５に記載の発現系および方法。
【請求項２７】
組換えタンパク質を精製することをさらに含む、請求項５～２０および２２～２６に記載の発現系または発現方法。
【請求項２８】
少なくとも１つのジスルフィド結合が細胞内で組換えタンパク質において形成される、請求項５～２０および２２～２７に記載の発現系または発現方法。
【請求項２９】
組換えタンパク質の少なくとも５０％、少なくとも８０％、または少なくとも９０％が天然のアミノ末端を含む、請求項５～２０および２２～２８に記載の発現系または発現方法。
【請求項３０】
少なくとも５０％、少なくとも８０％、または少なくとも９０％の組換えタンパク質が活性である、請求項５～２０および２２～２９の発現系または発現方法。
【手続補正２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０２１６
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０２１６】
ｐｂｐ－ｓｃＦｖベクターの構築：オーバーラップエクステンション（ＳＯＥ）ＰＣＲを利用して、シュードモナス・フルオレッセンスのｏｐｒＦおよびリン酸結合タンパク質（ｐｂｐ）の推定されるシグナル配列を、Ｇａｌ２コード配列の一部と＋２位の位置で融合した。プライマーsig-pbp-for(gctctagagg aggtaactta tgaaactgaa acg ；配列番号：１７） およびpbp-gal2SOE-rev(ctgcacctgg gcggccaccg cgtt；配列番号：１８）(pbp-gal2SOE-forのリバース補足部 (aacgcggtgg ccgcccaggt gcag；配列番号：１９)を含む)を利用して、シュードモナス・フルオレッセンスのｐｂｐ分泌シグナルペプチドを鋳型とし

て用いてＰＣＲを実施した。この結果、ｐｂｐシグナルペプチドのコード配列と、ｇａｌ２単鎖抗体（ｓｃＡｂまたはｓｃＦｖ）の５’末端についてのコード配列とを含むオリゴヌクレオチド断片が生産された。

【手続補正３】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０２２９
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０２２９】
シュードモナス・フルオレッセンスのｐｂｐシグナル配列のクローンを鋳型とし、sig-pbp-for(配列番号：17)プライマーおよびpbp-hgh(gggaatggtt gggaaggcca ccgcgttggc；配列番号：21)プライマーを用いて、ｐｂｐシグナル配列コード領域のＰＣＲ増幅を行い、次いで、ゲルで精製した。この結果、ｐｂｐシグナルペプチドコード配列とｈＧＨの成熟ドメインの５’末端についてのコード配列とを含むオリゴヌクレオチド断片が生産された。

【手続補正４】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０２３０
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０２３０】
プライマーELVIfor(agagaactag taaaaaggag aaatccatgg ctacaggctc ccggacgtcc；配列番号：22)およびELVIrev(agagactcga gtcattagaa gccacagctg ccctccac；配列番号：23)とを用いて、ヒト下垂体のｃＤＮＡライブラリー(Clontech、 Palo Alto CA)からヒト成長ホルモンをコードするｃＤＮＡをＰＣＲ増幅した。これらのプライマーはｈＧＨの成熟ドメインのみを増幅するように設計されていた。これをｐＭＹＣ１８０３／ＳｐｅＩ　ＸｈｏＩにクローニングし、ｐＤＯＷ２４００を形成した。プライマーpbp-hgh-revcomp(gccaacgcgg tggccttccc aaccattccc；配列番号：24)およびhgh-rev(agagactcga gtcattagaa gccacagctg ccctccacag agcggcac；配列番号：25)を用いて、成熟hGH遺伝子をpDOW2400から増幅し、次いでＳｔｒａｔａｐｒｅｐカラム(Stratagene社)で精製してプライマーおよびその他の反応成分を除去した。ｐｂｐ－ｈＧＨ融合体をコードするポリヌクレオチドを作製するために、二つの小片が結合するように、二つのPCR反応物を合わせて、sig-pbp-for(配列番号：１７）およびｈｇｈ＿ｒｅｖ（配列番号：２５）を用いて再び増幅した。この断片をｐＤＯＷ１２６９に連結してｐＤＯＷ１３２３－１０を作製し、ｐｂｐ－ｈＧＨをｔａｃプロモータのコントロール下に置いた。連結混合物でシュードモナス・フルオレッセンスを形質転換した。この融合体のＤＮＡ配列およびアミノ酸配列を、それぞれ(配列番号：26)および(配列番号：27)で提示する。

【表９】

リン酸結合タンパク質 分泌リーダー－ヒト成長ホルモン融合体 核酸配列（配列番号：２６）
atg aaa ctg aaa cgt ttg atg gcg gca atg act ttt gtc gct gct ggc gtt gcg acc gcc aac gcg gtg gcc ttc cca acc att ccc tta tcc agg cct ttt gac aac gct atg ctc cgc gcc cat cgt ctg cac cag ctg gcc ttt gac acc tac cag gag ttt gaa gaa gcc tat atc cca aag gaa cag aag tat tca ttc ctg cag aac ccc cag acc tcc ctc tgt ttc tca gag tct att ccg aca ccc tcc aac agg gag gaa aca caa cag aaa tcc aac cta gag ctg ctc cgc atc tcc ctg ctg ctc atc cag tcg tgg ctg gag ccc gtg cag ttc ctc agg agt gtc ttc gcc aac agc ctg gtg tac ggc gcc tct gac agc aac gtc tat gac ctc cta aag gac cta gag gaa ggc atc caa acg ctg atg ggg agg ctg gaa gat ggc agc ccc cgg act ggg cag atc ttc aag cag acc tac agc aag ttc gac aca aac tca cac aac gat gac gca cta ctc aag aac tac ggg ctg ctc tac tgc ttc agg aag gac atg gac aag gtc gag aca ttc ctg cgc atc gtg cag tgc cgc tct gtg gag ggc agc tgt ggc ttc taa
アミノ酸配列（配列番号：２７）
Met Lys Leu Lys Arg Leu Met Ala Ala Met Thr Phe Val Ala Ala Gly Val Ala Thr Ala Asn Ala Val Ala Phe Pro Thr Ile Pro Leu Ser Arg Pro Phe Asp Asn Ala Met Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys Phe Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe