

【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2013-524775(P2013-524775A)

【公表日】平成25年6月20日(2013.6.20)

【年通号数】公開・登録公報2013-032

【出願番号】特願2012-556223(P2012-556223)

【国際特許分類】

C 12 P 21/02 (2006.01)

C 12 N 15/00 (2006.01)

C 07 K 14/555 (2006.01)

【F I】

C 12 P 21/02 Z N A F

C 12 N 15/00

C 07 K 14/555

【手続補正書】

【提出日】平成26年2月27日(2014.2.27)

【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】

組換え1型インターフェロンタンパク質を產生する方法であつて、該方法は、

発現構築物を含むPseudomonasまたはE.coliの宿主細胞の培養によって組換えインターフェロンタンパク質を発現する工程であつて、前記発現構築物が、宿主細胞における発現のために最適化された組換え1型インターフェロンタンパク質のコード配列を含む核酸を含む、工程と、

培養した宿主細胞を溶解する工程と、
溶解した宿主細胞から不溶画分および可溶画分を得る工程と、
両性イオン界面活性剤またはオクチルグルコピラノシドを含む非変性の抽出条件に不溶画分をさらすことによって不溶画分を抽出する工程と、

抽出した不溶画分から抽出ペレットおよび抽出上清を得る工程と、

を含み、抽出上清中の組換えタンパク質は、さらに再生または再折り畳みの工程にさらさざれずに、可溶形態、活性形態またはその組み合わせで存在することを特徴とする方法。

【請求項2】

組換え1型インターフェロンタンパク質のコード配列が、lac誘導プロモーターに操作可能に連結され、

培養は、

約80～約160までのOD₆₀₀まで、約25～約33の温度で、かつ約5.

7～約6.5のpHで、宿主細胞を成長させる工程と、

約0.08mM～約0.4mMのIPTG濃度で宿主細胞を誘導する工程、

を含むことを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記両性イオン界面活性剤が、Zwittergent 3-08、Zwittergent 3-10、Zwittergent 3-12、Zwittergent 3-14、または、CHAPSであることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項 4】

前記非変性の抽出条件が、約0.5%から約2%のZwittergent 3-14を含むことを特徴とする請求項3に記載の方法。

【請求項 5】

前記非変性の抽出条件が、カオトロピック剤およびコスマトロピック塩をさらに含むことを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項 6】

前記カオトロピック剤が、尿素または塩酸グアニジウムであり、および前記コスマトロピック塩が、NaCl、KClまたは(NH₄)₂SO₄であることを特徴とする請求項5に記載の方法。

【請求項 7】

前記非変性の抽出条件が、約0.5～約2%のZwittergent 3-14、約0～約2Mの尿素、約0～約2MのNaClを含み、およびpHは約6.5～約8.5であることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項 8】

前記非変性の抽出条件が、1%のZwittergent 3-14、約2Mの尿素、約2MのNaClを含み、およびpHは約8.2であることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項 9】

前記非変性の抽出条件が、さらに約1%乃至約40%w/vの固体を含むことを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項 10】

前記非変性の抽出条件が、さらに約5%w/vの固体を含むことを特徴とする請求項9に記載の方法。

【請求項 11】

前記組換え1型インターフェロンタンパク質が、インターフェロン-α、インターフェロン-β、インターフェロン-γ、またはインターフェロン-δであることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項 12】

前記組換え1型インターフェロンタンパク質が、インターフェロン-αであり、前記インターフェロン-αは、ヒトイインターフェロン-1bおよびヒトイインターフェロン-1b C17Sからなる群から選択されるか、あるいは、前記組換え1型インターフェロンタンパク質が、インターフェロン-αであり、前記インターフェロン-αは、ヒトイインターフェロン-2aおよびヒトイインターフェロン-2bからなる群から選択されることを特徴とする請求項11に記載の方法。

【請求項 13】

不溶画分のサンプル中の組換え1型インターフェロンタンパク質の量を測定する工程であって、不溶画分の前記サンプルが不溶画分の抽出前に得られる、工程と、抽出上清画分のサンプル中の組換え1型インターフェロンタンパク質の量を測定する工程であって、抽出上清画分の前記サンプルが不溶画分の抽出後に得られる、工程とをさらに含み、

不溶画分の抽出後に得られた抽出上清画分の前記サンプル中で検出される組換えインターフェロンタンパク質の量が、不溶画分の抽出前に得られる不溶画分のサンプル中で測定された組換えインターフェロンタンパク質の量の約10%～約95%であることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項 14】

抽出上清画分のサンプル中の組換えインターフェロンタンパク質の活性を測定する工程であって、抽出上清画分の前記サンプルが不溶画分の抽出後に得られる、工程をさらに含み、

不溶画分の抽出後に得られた抽出上清画分の前記サンプルに存在する組換えインターフェロンタンパク質の約40%～約100%が活性であると測定されるか、あるいは、不溶

画分の抽出後に得られた抽出上清画分の前記サンプルに存在する組換えインターフェロンタンパク質の約75%～約100%は、不溶画分の抽出後に得られた抽出上清画分の前記サンプルとして、同じ量の組換えインターフェロンタンパク質を含む標準的なサンプルに存在する活性なインターフェロンタンパク質の量と比較すると、活性であると測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】

前記組換え1型インターフェロンタンパク質が、インターフェロン-₁であり、活性な組換えタンパク質の量は、ブルーセファロースアフィニティカラムクロマトグラフィー、受容体結合アッセイ、抗ウイルス活性アッセイまたは細胞変性効果アッセイによって測定されることを特徴とする請求項14に記載の方法。

【請求項16】

抽出上清中の組換え1型インターフェロンタンパク質が、約0.3g/L～約10g/Lの濃度で存在す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、lon hslUVプロテアーゼ欠失株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】

前記組換え1型インターフェロンが、前記宿主細胞の細胞質において発現されることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項19】

前記組換え1型インターフェロンが、ヒトインターフェロン-_{1b}またはヒトインターフェロン-_{1b}C17Sであり、および、前記ヒトインターフェロン-_{1b}またはヒトインターフェロン-_{1b}C17Sが、前記宿主細胞の細胞質において発現されることを特徴とする請求項12に記載の方法。