

【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 1 2 P 21/02 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 (2006.01)

C 0 7 K 14/555 (2006.01)

【F I】

C 1 2 P 21/02 Z N A F

C 1 2 N 15/00

C 0 7 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トパク質を産生する方法であって、該方法は、
発現構築物を含む P s e u d o m o n a s または E . c o l i の宿主細胞の培養によ
って組換えインターフェロントパク質を発現する工程であって、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トパク質のコー
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ベ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トパク質のコード配列が、l a c 誘導プロモーターに操
作可能に連結され、

培養は、

約 8 0 ~ 約 1 6 0 までの O D₆₀₀ まで、約 2 5 ~ 約 3 3 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 . 0 8 m M ~ 約 0 . 4 m M の I P T G 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、Z w i t t e r g e n t 3 - 0 8、Z w i t t e r g
e n t 3 - 1 0、Z w i t t e r g e n t 3 - 1 2、Z w i t t e r g e n t 3 -
1 4、または、C H A P S 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モ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、および前記コスモトロピック塩が、NaCl、KCl または $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 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 2 M の尿素、約 0 ~ 約 2 M 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 2 M の尿素、約 2 M 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トパク質が、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トパク質が、インターフェロン- α であり、前記インターフェロン- α は、ヒトインターフェロン- α 1b およびヒトインターフェロン- α 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トパク質が、インターフェロン- β であり、前記インターフェロン- β は、ヒトインターフェロン- β 2a およびヒトインターフェロン- β 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ト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ト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トパク質の量が、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トパク質の量の約 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ト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トパク質の約 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トタンパク質の約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ト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ト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トタンパク質が、インターフェロン- γ 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トタンパク質が、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、lonhslUV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- γ 1bまたはヒトインターフェロン- γ 1bC17Sであり、および、前記ヒトインターフェロン- γ 1bまたはヒトインターフェロン- γ 1bC17S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。