(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2017-520261
(P2017-520261A)
(43)公表日　平成29年7月27日(2017.7.27)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	4B064
C12P 21/08	(2006.01)	C12P	21/08		

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 19 頁）

(21)出願番号　特願2017-500849 (P2017-500849)
(86)(22)出願日　平成27年7月9日 (2015.7.9)
(85)翻訳文提出日　平成29年3月2日 (2017.3.2)
(86)国際出願番号　PCT/IB2015/055189
(87)国際公開番号　WO2016/005931
(87)国際公開日　平成28年1月14日 (2016.1.14)
(31)優先権主張番号　2245/MUM/2014
(32)優先日　平成26年7月9日 (2014.7.9)
(33)優先権主張国　インド(IN)

(71)出願人　516257291
ルピン・リミテッド
インド国　ムンバイ　４０００５５　サンタクルズ（イースト）　オフ　ウェスタン　エクスプレス　ハイウェイ　サード　フロア　カルパタル　インスパイア
(74)代理人　110000578
名古屋国際特許業務法人
(72)発明者　サルンクへ　シャーダル
インド国　プーネ　４１２　１１５　ムルシ　タルカ　ゴータワデ　ビレッジ　ゲート　ナンバー　１１５６　ルピン・リミテッド　（バイオテクノロジー　ディビジョン）

最終頁に続く

(54)【発明の名称】二重シストロン細菌発現システム

(57)【要約】
本発明は、細菌Ｅ．Ｃｏｌｉ．において形成される不溶性の封入体として発現される対象のタンパク質およびペプチドの生産のための、単一のベクターにおける二重の独立したシストロン発現システムに関する。本発明は、前記二重シストロンのベクターを用いて対象のタンパク質を発現するための工程も提供する。
【選択図】図１

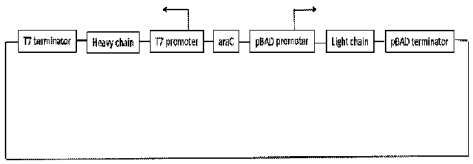


Figure 1

【特許請求の範囲】
【請求項１】
二重シストロン発現システムであって、
ａ）対象のタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列と操作可能に連結されるプロモーターを含む第一のシストロン、
ｂ）対象のタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列と操作可能に連結されるプロモーターを含む第二のシストロン、
を含み、
ここで、前記第一および第二のシストロンは、単一のベクター中に配置され、宿主細胞において形成される封入体として前記対象のタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を発現する、システム。
【請求項２】
前記第一のシストロンおよび第二のシストロンは、Ｔ７プロモーター、アラビノースプロモーターｐｈｏＡ、ｔａｃ、ｌｐｐ、ｌａｃ－ｌｐｐ、ｌａｃ、ｔｒｐ、およびｔｒｃから選択されるプロモーターを含む、請求項１に記載の二重シストロン発現システム。
【請求項３】
前記第一のおよび第二のシストロンは、異なるプロモーターを含む請求項１または請求項２に記載の二重シストロン発現システム。
【請求項４】
前記第一のシストロンは、Ｔ７プロモーターまたはアラビノースプロモーターを含む請求項２に記載の二重シストロン発現システム。
【請求項５】
前記第二のシストロンは、Ｔ７プロモーターまたはアラビノースプロモーターを含む請求項２に記載の二重シストロン発現システム。
【請求項６】
前記対象のタンパク質は、タンパク質およびペプチドから選択される、請求項１に記載の二重シストロン発現システム。
【請求項７】
前記タンパク質は、ＧＣＳＦ、ＥＰＯ、ＦＳＨ、ＩＦＮ、ＰＴＨ（１－８４ａａ）、インスリン、ＬＨ、ＲＨ、抗体、またはそれらの断片から選択される、請求項６に記載の二重シストロン発現システム。
【請求項８】
前記抗体断片は、抗体の軽鎖、抗体の重鎖、ｓｃＦｖ、ＦＡＢ、二量体、三量体、四量体、ビス－ｓｃＦｖ、ミニボディ、Ｆａｂ２（二重特異性）抗体、およびＦａｂ３（三重特異性）抗体から選択される、請求項７に記載の二重シストロン発現システム。
【請求項９】
前記抗体断片はＦａｂである、請求項８に記載の二重シストロン発現システム。
【請求項１０】
前記抗体のＦａｂ断片は、ラニビズマブ（Ｒａｎｉｂｉｚｕｍａｂ）である、請求項９に記載の二重シストロン発現システム。
【請求項１１】
前記ペプチドは、リラグルチド（Ｌｉｒａｇｌｕｔｉｄｅ）、エキサネチド（ｅｘａｎｅｔｉｄｅ）、ＰＴＨ（１－３４ａａ）、およびテヅグルチド（ｔｅｄｕｇｌｕｔｉｄｅ）から選択される、請求項６に記載の二重シストロン発現システム。
【請求項１２】
請求項１～請求項１１のいずれか一項に記載の二重シストロン発現システムであって、
ａ）抗体の重鎖をコードするポリヌクレオチド配列と操作可能に連結されるＴ７プロモーターを含む第一のシストロン、
ｂ）抗体の軽鎖をコードするポリヌクレオチド配列と操作可能に連結されるアラビノースプロモーターを含む第二のシストロン、

を含み、
ここで、前記第一および第二のシストロンは、単一のベクター中に配置され、宿主細胞において形成される封入体として前記抗体の重鎖および軽鎖を発現する、システム。
【請求項１３】
前記抗体の重鎖は、配列ＩＤ　ｎｏ１に記述されるヌクレオチド配列、または配列ＩＤ　ｎｏ３に記述されるアミノ酸配列を含む、請求項１２に記載の二重シストロン発現システム。
【請求項１４】
前記抗体の軽鎖は、配列ＩＤ　ｎｏ２に記述されるヌクレオチド配列、または配列ＩＤ　ｎｏ４に記述されるアミノ酸配列を含む、請求項１２に記載の二重シストロン発現システム。
【請求項１５】
前記重鎖および軽鎖は、適切な比率でクローン化され、前記重鎖および軽鎖の等モル発現を得るために、前記重鎖は、前記軽鎖と等しい、またはより高い比率を有する、請求項１２に記載の二重シストロン発現システム。
【請求項１６】
前記抗体の重鎖および軽鎖は、ＶＥＧＦに親和性を有する、請求項１～請求項１５のいずれか一項に記載の二重シストロン発現システム。
【請求項１７】
請求項１～請求項１６のいずれか一項に記載の二重シストロン発現システムであって、
ａ）ペプチドをコードするポリヌクレオチド配列と操作可能に連結されるＴ７プロモーターを含む第一のシストロン、
ｂ）ペプチドをコードするポリヌクレオチド配列と操作可能に連結されるアラビノースプロモーターを含む第二のシストロン、
を含み、
ここで、前記第一および第二のシストロンは、単一のベクター中に配置され、宿主細胞において形成される封入体としてペプチドを発現する、システム。
【請求項１８】
前記ペプチドは、ＧＬＰ－１類似体、ＧＬＰ－２類似体から選択される、請求項１７に記載の二重シストロン発現システム。
【請求項１９】
前記ペプチドは、配列ＩＤ　ｎｏ６に記述されるヌクレオチド配列、または配列ＩＤ　ｎｏ７に記述されるアミノ酸配列を含む、請求項１７に記載の二重シストロン発現システム。
【請求項２０】
前記ＧＬＰ－１アゴニストペプチドは、リラグルチド（Ｌｉｒａｇｌｕｔｉｄｅ）である、請求項１８に記載の二重シストロン発現システム。
【請求項２１】
前記ペプチド、またはタンパク質は融合タグと組み合わせて発現される、請求項１～請求項２０のいずれか一項に記載の二重シストロン発現システム。
【請求項２２】
前記融合タグは、配列ＩＤ　８に記述されるヌクレオチド配列を含むスタフィロキナーゼ（ＳＡＫ）遺伝子である、請求項２１に記載の二重シストロン発現システム。
【請求項２３】
対象のタンパク質の発現を高めるためのレギュレーターをコードするポリヌクレオチド配列、宿主細胞のペリプラズム空間における対象のタンパク質の発現を調節するための単一のペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、および選択マーカーから成る群から選択される任意の一つ以上の要素をさらに含む、請求項１～請求項２２のいずれか一項に記載の二重シストロン発現システム。
【請求項２４】

前記レギュレーターは、抗体の軽鎖の発現を高める、請求項２３に記載の二重シストロン発現システム。
【請求項２５】
前記レギュレーターはＡｒａＣ遺伝子である、請求項２３に記載の二重シストロン発現システム。
【請求項２６】
前記単一のペプチドはＰｅｌＢである、請求項２３に記載の二重シストロン発現システム。
【請求項２７】
前記選択マーカーはアンピシリンである、請求項２３に記載の二重シストロン発現システム。
【請求項２８】
前記宿主細胞はＥ．Ｃｏｌｉ．である、請求項１～請求項２７のいずれか一項に記載の二重シストロン発現システム。
【請求項２９】
対象のタンパク質を生産する工程であって、次のステップ：
（ｉ）宿主細胞を、請求項１～請求項２８のいずれか一項に記載の二重シストロン発現システムからなる単一ベクターを用いて基本的に形質転換させること、
（ｉｉ）対象のタンパク質を発現するために、適切な培地中で形質転換細胞を培養すること、ここで、第一および第二のシストロンは、封入体において対象のタンパク質を発現し、
（ｉｉｉ）前記封入体の可溶化を行うこと、
（ｉｖ）前記対象のタンパク質の再折りたたみを行うこと、
を含む、工程。
【請求項３０】
配列ＩＤ　ｎｏ１９に記述されるヌクレオチド配列を含む、請求項１～請求項２８のいずれか一項に記載の二重シストロン発現システム。
【発明の詳細な説明】
【発明の詳細な説明】
【０００１】
［発明の分野］
本発明は、対象のタンパク質の生産のために、単一のベクターにおける二重の独立したシストロン発現システムに関し、対象のタンパク質は、細菌Ｅ．Ｃｏｌｉ．において形成される不溶性の封入体として発現される抗体の組換え型Ｆａｂ断片または他の断片、ペプチドおよびタンパク質を含む。本発明は、前記二重シストロンベクターを用いて対象のタンパク質を発現するための工程も提供する。
【０００２】
［発明の背景］
組換えＤＮＡ技術（ｒＤＮＡ）は、治療薬を調製する方法に革命を起こしている。必要なタンパク質は、今、外来細胞の内部で作られ、精製される。
翻訳後修飾（ＰＴＭ）を有するタンパク質は、哺乳類または酵母のシステムにおいて組換え分子として一般的に発現される。ピキア（Ｐｉｃｈｉａ）およびサッカロマイセス（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）のような酵母発現系は、ＰＴＭの面で哺乳類システムに近いが、ピキアの場合、高マンノースグリカンのようなグリコシル化の型がまだ異なっており、ヒト使用のための組換え型タンパク質の発現には不適切である。
【０００３】
モノクローナル抗体（ｍＡｂｓ）、抗体、融合蛋白質、ｍＡｂのＦａｂ断片は、治療薬として使用される。ｒＤＮＡ技術は、治療タンパク質の生産のために特別なベクターおよび発現システムを使用する。発現システムは、細菌、酵母、昆虫、または哺乳類発現系から主に成る。最初は、組換え型タンパク質のほとんどは、宿主としてＥ．Ｃｏｌｉを用い

る細菌発現システムにおいて発現された。発現宿主としてＥ．Ｃｏｌｉを用いることは、クローニングの容易さ、発現の容易さ、短いタイムライン、短いインキュベーション期間および非常に高い収率のようないくつかの利点がある。したがって、任意のＰＴＭを必要としないタンパク質をＥ．Ｃｏｌｉにおいて安全に発現することができる。

【０００４】

Ｆａｂは、ｍＡｂの抗原結合断片部分であり、抗体のＦｃ部分において存在するグリコシル化部位を含まないような哺乳類系においては、Ｆａｂは発現される必要はない。したがって、Ｆａｂは、Ｅ．Ｃｏｌｉ系において通常発現される。１９８０年代～９０年代の間では、数人の研究者は、Ｅ．ＣｏｌｉにおけるＦａｂ発現を試みた。ＰｌｕｃｋｔｈｕｎＡ らは（１９９０Ｂｅｈｒｉｎｇ Ｉｎｓｔ．Ｍｉｔｔ．（８７）：４８－５５）、Ｅ．ＣｏｌｉからのＦａｂ抗体の分泌を報告した研究者で、より早期のいく人かの研究者である。Ｗｉｌｌｉａｍｓｏｎ Ｒ．Ａ．ｅｔ．ａｌ．，１９９１ Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｊ．２７７（Ｐｔ ２）：５６１－３は、Ｅ．ＣｏｌｉにおけるＦａｂ分子の発現のための、バクテリオファージラムダベクターの使用を報告した。ファージは、Ｅ．ＣｏｌｉにおけるＦａｂ、二価抗体、またはキメラ抗体断片の生産のためのシステムを示す。

【０００５】

さらに、Ｆａｂは、誤って折りたたまれた封入体としてＥ．Ｃｏｌｉにおいても生産され、その後、機能的分子を得るために再折りたたまれることによって、抗体の収率の４０％増加が得られた。

【０００６】

上述の研究のほとんどは、重鎖および軽鎖の両方の発現を起動するために単一のプロモーター、すなわち、ｐｈｏＡを使用した。リボソーム結合部位（ｒｂｓ）は、重鎖および軽鎖の両方に存在し、第二の遺伝子の転写および翻訳を起動する。

【０００７】

ＵＳ５６４８２３７は、分泌産物を得るために、Ｅ．ＣｏｌｉにおいてＦａｂ遺伝子を発現するために、同様の単一プロモーター（ｐｈｏＡ）戦略も使用した。上記戦略の主な欠点は、第二の遺伝子の発現レベルが、第一の遺伝子より一般的により低くなり、したがって、機能的Ｆａｂの収率を制限することである。

【０００８】

特許ＷＯ０３０１８７７１号は、二つの分離した翻訳ユニットによって抗体を生産する工程を開示し、前記抗体または断片の軽鎖および重鎖をそれぞれコードし、ここで、両鎖は、逐次的方法で発現されることにより、軽鎖及び重鎖の生産を特異的に分離し、軽鎖および重鎖を集合させる。

【０００９】

特許ＥＰ１３５６０５２Ｂ１は、原核細胞において完全な抗体を生産するための方法を開示する。免疫グロブリン軽鎖を生産するための第一のプロモーター、および第一のシストロン並びに、免疫グロブリン重鎖を生産するための第二のプロモーター、および第二のシストロンがあり、ここで両鎖は、生物学的に活性な免疫グロブリンを形成するために折り畳まれ、集められる。

【００１０】

［発明の要旨］

実施形態において、本発明は、細菌細胞において不溶性の封入体として発現される組換え型タンパク質およびペプチドを生産するための、単一のベクターにおける二重の独立したシストロン発現システムに関する。

【００１１】

他の実施形態において、本発明は、細菌細胞において不溶性の封入体として発現される組換え型タンパク質およびペプチドを生産するための、二つの異なるプロモーターを有する単一のベクターにおける二重の独立したシストロン発現システムの調製工程に関する。

【００１２】

他の実施形態において、本発明は、細菌細胞において不溶性の封入体として発現される

抗体断片を生産するための、二つの異なるプロモーターを有する単一のベクターにおける二重の独立したシストロン発現システムに関する。

【００１３】

他の実施形態において、本発明は、細菌細胞において不溶性の封入体として発現される抗体の組換え型Ｆａｂ断片を生産するための、二つの異なるプロモーターを有する単一のベクターにおける二重の独立したシストロン発現システムに関する。

【００１４】

他の実施形態において、本発明は、細菌細胞において不溶性の封入体として発現される組換え型ペプチドを生産するための、二つの異なるプロモーターを有する単一のベクターにおける二重の独立したシストロン発現システムに関する。

【００１５】

他の実施形態において、二重シストロン発現システムは、

ａ）対象のタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列と操作可能に連結されるプロモーターを含む第一のシストロン、

ｂ）対象のタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列と操作可能に連結されるプロモーターを含む第二のシストロン、

を含み、

ここで、第一および第二のシストロンは、単一のベクター中に配置され、細菌細胞において封入体として対象のタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を発現する。

【００１６】

他の実施形態において、本発明は、対象の遺伝子、リボソーム結合部位、およびターミネーターを含む複数のクローン化部位に操作可能に連結されるプロモーターを含む二重シストロンベクターに関する。

【００１７】

さらに他の実施形態において、本発明は、二重シストロン発現システムを用いて対象のタンパク質を生産するための工程に関する。

以下に記述される本発明の一つ以上の実施形態の詳細は、本質的に説明のためだけであり、本発明の範囲を制限することを意図しない。本発明の他の特徴、目的、および利点は、明細書から明らかになるだろう。

【図面の簡単な説明】

【００１８】

【図１】図１は、二重シストロンベクターの式を説明する。

【図２】図２は、クローンｐＥＴ２１ａ－ＨＣ－ＬＣのベクター地図を説明する。

【図３】図３は、コントロールおよび対照産物と共にＥ．Ｃｏｌｉ　ＢＬ２１Ａ１クローンの不溶性ペレット画分のＳＤＳ　ＰＡＧＥ分析を説明する。

【図４】図４は、減少したＦａｂ分子と比較して、クローンにおいて観察されるＬＣおよびＨＣピークを有する可溶化されたＩＢサンプルのＲＰ－ＨＰＬＣを説明する。

【図５】図５は、他のタンパク質から重鎖ピークを分離するためのＨＰＬＣ実行結果を説明する

【図６】図６は、Ｅ．Ｃｏｌｉ　ＢＬ２１Ａ１細胞系列の単一のシストロンクローンと比較して、二重シストロン構成体におけるＳＡＫ－Ｌｉｒａクローンの発現の重大な増加を説明する。

【図７】図７は、ベクター地図ｐＢＡＤ２４Ｍ－ＬＣを説明する。

【発明を実施するための形態】

【００１９】

［発明の詳細な説明］

定義：

本願に使用される用語「対象のタンパク質」は、本願において生物学的医薬品産業に、または診断もしくは研究目的のために使用されるタンパク質およびペプチドを含む任意のポリペプチドに関する。

【００２０】
本願に使用される用語「対象のタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列」は、本願において、遺伝子、好ましくはポリペプチドを発現する異種遺伝子をコードするＤＮＡを含む。
【００２１】
本願に使用される用語「組換え型タンパク質およびペプチド」は、生細胞内で組換え型ＤＮＡを発現することによって生産されるタンパク質またはペプチドに関する。
【００２２】
本願に使用される用語「Ｆａｂ」および「抗体」は、抗体が、二つの部分、すなわち、ＦａｂおよびＦｃ領域を含むので交換可能に使用される。
本願に使用される用語「ベクター」は、細菌細胞に外来の遺伝的物質を人工的に運ぶためのビヒクルとして使用されるＤＮＡ分子に関し、細菌細胞において当該ＤＮＤＡ分子は、複製され、発現されることができる。
【００２３】
本願に使用される用語「シストロン」は、単一のポリペプチドのための遺伝暗号を含むＤＮＡ断片に関し、遺伝的な単位として機能する。
本願に使用される用語「二重の独立したシストロン発現」は、二つの別々のシストロンに関し、独立して二つの同じ、または異なるタンパク質を発現するために使用される。
【００２４】
本願に使用される用語「同じ」は、同一または類似と交換できる。
本願に使用される用語「二重シストロン発現システム」は、発現されるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を、およびプロモーターおよび任意にエンハンサー配列のような当該発現を制御する配列を含む。本発明のプロモーターは、発現される遺伝子、すなわち転写単位に操作可能に連結される、または例えば、異種遺伝子の５’－非翻訳領域によってなどのようにＤＮＡを介在することによって発現される遺伝子から分離される。好ましくは、発現システムは、ベクターへの発現カセットの挿入、および／またはベクターからの当該切除を可能にするために一つ以上の適切な制限部位によって隣接される。したがって、本発明に係る発現システムは、発現ベクター、特に細菌の発現ベクターの構成のために使用されてもよい。
【００２５】
本願に使用される用語「プロモーター」は、通常、遺伝子の上流に位置し、調節される遺伝子転写のための制御部位を提供するＤＮＡの調節領域に関する。
本願に使用される用語「操作可能に連結される」は、二つ以上のＤＮＡ断片、特に、発現される遺伝子配列、およびそれらの発現を制御する配列との間の機能的関係に関する。
【００２６】
本願に使用される用語「小さいペプチド」または「ペプチド」は、生物学的医薬品産業において、リラグルチド（Ｌｉｒａｇｌｕｔｉｄｅ）、エキサネチド（ｅｘａｎｅｔｉｄｅ）、ＰＴＨなどのような、診断および研究目的において使用される２ｋＤａ～１０ｋＤａの範囲のペプチドに関する。
【００２７】
本発明は、対象の様々な組換え型タンパク質の生産のための二重シストロン発現システムを提供する。特定の実施形態において、二重シストロン発現システムは、対象のタンパク質およびターミネーターをコードするポリヌクレオチド配列と操作可能に連結されるプロモーターを有する二つのシストロンを含む。
【００２８】
特定の実施形態において、二重シストロン発現システムは、対象のタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を発現する二つのシストロンを含み、２つのシストロンは、単一のベクターにおいて配置される。
【００２９】
実施形態において、二重シストロン発現システムは、

ａ）対象のタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列と操作可能に連結されるプロモーターを含む第一のシストロン、
ｂ）対象のタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列と操作可能に連結されるプロモーターを含む第二のシストロン、
を含み、
ここで、第一および第二のシストロンは、単一のベクター中に配置され、宿主細胞において形成される封入体として対象のタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を発現する。

【００３０】

実施形態において、プロモーターは、Ｔ７プロモーター、アラビノースプロモーターｐｈｏＡ、ｔａｃ、ｌｐｐ、ｌａｃ－ｌｐｐ、ｌａｃ、ｔｒｐ、ｔｒｃから選択されてもよく、好ましくは、Ｔ７プロモーター、およびアラビノースプロモーターである。特定の実施形態において、二重シストロン発現システムは、二つのプロモーターの制御下で対象のタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を発現する二つのシストロンを含む。一つの実施形態において、プロモーターは共に、同じ対象のタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列の発現を制御する。他の実施形態において、プロモーターは共に、アミノ酸の長さ、または物理化学的性質の異なる対象のタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列の発現を制御する。

【００３１】

特定の実施形態において、対象のタンパク質は、ペプチドおよびタンパク質から選択されてもよい。

いくつかの実施形態において、タンパク質は、二重シストロンベクターにおいて発現されてもよい。タンパク質は、抗体または抗体断片を含む。抗体断片は、二重シストロン発現システムにおいて発現されてもよい。抗体断片は、抗体のＦａｂ重鎖および軽鎖、または、例えばｓｃＦｖ、二量体、三量体、四量体、ビス－ｓｃＦｖ、ミニボディ、Fab_2（二重特異性）、Ｆａｂ３（三重特異性）などのような他の抗体断片から選択されてもよい。好ましい実施形態において、二重シストロン発現システムは、Ｆａｂ抗体を形成する抗体の重鎖および軽鎖をコードするポリヌクレオチド配列を発現する。当該実施形態において、Ｆａｂ抗体は、ＶＥＧＦ受容体に親和性を示し、前記Ｆａｂ抗体は、ラニビズマブ（Ｒａｎｉｂｉｚｕｍａｂ）である。

【００３２】

他の実施形態において、タンパク質は、Ｇ－ＣＳＦ、ＩＦＮ、エリスロポイエチン、インスリン、および当該変異体、ＰＴＨ（１－８４ａａ）、ＦＳＨ、ＬＨ、ＧＨ、およびプロテインジスルフィドイソメラーゼ（ＰＤＩ）から選択されてもよいが制限されない。

【００３３】

いくつかの実施形態において、ペプチドは二重シストロンベクターにおいて発現される。ペプチドは、少なくとも４０個未満のアミノ酸、または好ましくは、３１個未満のアミノ酸、またはより好ましくは、１０個未満のアミノ酸から選択されるアミノ酸配列を含む。特定の実施形態において、ペプチドの分子量は、約２ｋＤａ～約１０ｋＤａから選択される。ペプチドは、リラグルチド（Ｌｉｒａｇｌｕｔｉｄｅ）のようなＧＬＰ－１ペプチド類似体、またはテヅグルチド（ｔｅｄｕｇｌｕｔｉｄｅ）のようなエキセンジノール（Ｅｘｅｎｄｉｎｏｒ） ＧＬＰ－２ペプチド、およびＰＴＨ（１－３４ａａ）およびインスリンから選択されてもよいが制限されない。他の好ましい実施形態において、二重シストロン発現システムは、ＧＬＰ－１アゴニストペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を発現する。当該実施形態において、ＧＬＰ－１ペプチドは、リラグルチド（Ｌｉｒａｇｌｕｔｉｄｅ）である。

【００３４】

他の実施形態において、プロモーターは共に独立して、アミノ酸の長さ、および物理化学的性質の異なる抗体の重鎖または軽鎖のような異なる対象のタンパク質の発現を制御する。

【００３５】
実施形態において、二重シストロン発現システムは、
ａ）抗体の重鎖をコードするポリヌクレオチド配列と操作可能に連結されるＴ７プロモーターを含む第一のシストロン、
ｂ）抗体の軽鎖をコードするポリヌクレオチド配列と操作可能に連結されるアラビノースプロモーターを含む第二のシストロン、
を含み、
ここで、第一および第二のシストロンは、単一のベクター中に配置され、宿主細胞において形成される封入体として抗体の重鎖および軽鎖を発現する。
【００３６】
当該実施形態において、抗体の重鎖および軽鎖は、ヌクレオチド配列ＩＤ　ｎｏ．１および配列ＩＤ　ｎｏ．２、またはアミノ酸配列ＩＤ　ｎｏ．３および配列ＩＤ　ｎｏ．４を含む。いくつかの実施形態において、第一および第二のシストロンの位置は交換可能であり、ここで、第二のシストロンは、第一のシストロンの位置でベクターにおいてクローン化されてもよく、第一のシストロンは、第二のシストロンの場所に位置されてもよい。抗体の重鎖および軽鎖は、封入体として独立して発現し、ＶＥＧＦ受容体に親和性を示すＦａｂ抗体を得るためにさらに処理されてもよく、前記Ｆａｂ抗体は、ラニビズマブ（Ｒａｎｉｂｉｚｕｍａｂ）である。
【００３７】
特定の実施形態において、抗体の重鎖および軽鎖は、単一のペプチド、好ましくはｐｅｌＢと組み合わせて任意に発現される。単一のペプチドは、宿主細胞のペリプラズム空間におけるタンパク質の発現を指示する。
【００３８】
実施形態において、単一ベクターにおける二重シストロン発現システムは、二つの異なるプロモーターであるアラビノースおよびＴ７プロモーターを有し、アラビノースおよびＴ７プロモーターは、それぞれ、組換え型Ｆａｂ断片の重鎖および軽鎖の生産を調節し、共に、Ｅ．Ｃｏｌｉのペリプラズム空間において不溶性の封入体として生産されるｐｅｌＢタグを有する。
【００３９】
特定の実施形態において、抗体の重鎖または軽鎖は、タンパク質の発現をさらに増加させるために、レギュレーター、好ましくはＡｒａＣ遺伝子と組み合わせて任意に発現される。
【００４０】
二重シストロン発現システムは、対象のタンパク質の等モル発現を提供する。等モル発現は、適切な質および量で対象のタンパク質を得るために、非常に望ましい。等モル発現は、重鎖および軽鎖の比率、またはベクター中にクローン化されるポリペプチドのサブユニットの比率次第である。特定の実施形態において、重鎖および軽鎖は、適切な比率でクローン化され、重鎖および軽鎖の等モル発現を得るために、重鎖は少なくとも軽鎖と同じ、または軽鎖より高い比率である。重鎖および軽鎖は、１．３：０．８、１．２：０．９、１．２：１、１：１を含む、１．５：０．７～１：１から選択される比率でクローン化される。
【００４１】
実施形態において、二重シストロン発現システムは、配列ＩＤ　ｎｏ．１９で記述されるヌクレオチド配列を含む。
他の実施形態において、二重シストロン発現システムは、
ａ）ペプチドをコードするポリヌクレオチド配列と操作可能に連結されるＴ７プロモーターを含む第一のシストロン、
ｂ）ペプチドをコードするポリヌクレオチド配列と操作可能に連結されるアラビノースプロモーターを含む第二のシストロン、
を含み、

ここで、第一および第二のシストロンは、単一のベクター中に配置され、宿主細胞において形成される封入体としてペプチドを発現する。

【００４２】

当該実施形態において、ペプチドは、ＧＬＰ－１類似体であり、ＧＬＰ－１アゴニストペプチドをコードする配列ＩＤ　ｎｏ．６に記述されるヌクレオチド配列を含み、ＧＬＰ－１アゴニストペプチドは、配列ＩＤ　ｎｏ．７のアミノ酸配列を有するリラグルチド（Ｌｉｒａｇｌｕｔｉｄｅ）である。

【００４３】

特定の実施形態において、ペプチドは、当業者に公知のシグナルペプチド、またはレギュレーター／エンハンサーを用いて任意に発現されてもよい。

特定の実施形態において、ペプチドは、ペプチドの分解を防ぐために、融合パートナーと共に、または融合タグと共に任意に発現されてもよい。融合パートナーは、３０個のアミノ酸～３００個のアミノ酸のアミノ酸配列を含む。融合パートナーは、約５０個のアミノ酸、１００個のアミノ酸、約１３６個のアミノ酸、約１７５個のアミノ酸、約２５０個のアミノ酸、３００個のアミノ酸、好ましくは約１３６個のアミノ酸から選択されるアミノ酸配列を含む。融合タグは、ヒスチジン－タグ、グルタチオン－ｓ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）、マルトース結合タンパク質、ＮｕｓＡ、チオレドキシン（ＴＲＸ）、ポリヒスチジン（ＨＩＳ）、低分子ユビキチン様修飾因子（ＳＵＭＯ）、およびユビキチン（Ｕｂ）およびスタフィロキナーゼ（ＳＡＫ）遺伝子から選択されてもよいが制限されない。好ましい実施形態において、融合タグは、ＳＡＫ遺伝子である。融合タグとしてＳＡＫ遺伝子の対象のタンパク質との使用の詳細は、ＵＳ８８５３３８０に開示されており、本願において参照として組み込まれる。

【００４４】

いくつかの実施形態において、二重シストロン発現システムは、選択マーカーをさらに含み、選択マーカーは、アンピシリン、カナマイシンから選択され、好ましくはアンピシリンである。

【００４５】

他の実施形態において、本発明は、次のステップ：

（ｉ）宿主細胞を、二重シストロン発現システムからなる単一ベクターを用いて基本的に形質転換させること、

（ｉｉ）対象のタンパク質を発現するために、適切な培地中で形質転換細胞を培養すること、ここで、第一および第二のシストロンは、封入体において対象のタンパク質を発現し、

（ｉｉｉ）封入体の可溶化を行うこと、

（ｉｖ）対象のタンパク質の再折りたたみを行うこと、

を含む、対象のタンパク質を生産する工程を提供する。

【００４６】

実施形態において、二重シストロン発現システムは、対象のタンパク質を発現するために適切な細菌宿主細胞において形質転換される。適切な細菌宿主細胞は、Ｅ．Ｃｏｌｉであり、Ｅ．Ｃｏｌｉにおいて、対象のタンパク質は、封入体の形態で発現される。封入体は、Ｅ．Ｃｏｌｉのペリプラズムまたは細胞質において形成される不溶性の物質である。封入体は、単離され、可溶化されてもよく、対象のタンパク質は、当該技術分野においてよく知られた技術によって活性形態で回収されてもよい。

【００４７】

実施形態において、抗体のＦａｂ重鎖および軽鎖、または、例えばｓｃＦｖ、二量体、三量体、四量体、ビス－ｓｃＦｖ、ミニボディ、$Ｆａｂ_{2}$（二重特異性）、Ｆａｂ３（三重特異性）などのような他の抗体断片は、二つの異なるプロモーターであるアラビノースおよびＴ７プロモーターを有する単一のベクターにおいて二つの独立したシストロンを構成することによって、Ｅ．Ｃｏｌｉのペリプラズム空間に不溶性の封入体として発現された。二つの異なるプロモーター、すなわち、Ｔ７プロモーターおよびアラビノースプロモ

ーターは、それぞれＦａｂ分子の重鎖および軽鎖の発現を助けた。抗体の重鎖および軽鎖は、細菌細胞、すなわち、Ｅ．Ｃｏｌｉの非官能性封入体として生産され、続いて抽出、再折りたたみ、および精製される。

【００４８】

本発明の実施形態において、シストロンは、各遺伝子（重鎖および軽鎖）が単一のベクターにおいてそれ自身のプロモーターおよびターミネーターを有することになるようなものを含む。重鎖がＴ７プロモーターの制御下でクローン化され、一方、軽鎖は、アラビノースプロモーターの制御下でクローン化された。両方の鎖は、細菌膜のペリプラズム空間において産物を得るために、シグナル配列ｐｅｌＢタグを先に付けた。

【００４９】

二重シストロン発現システムの利点は、アラビノースおよびＴ７は共に強いプロモーターであることであり、軽鎖および重鎖の両方の高発現が、軽鎖および重鎖クローンと発酵物を分離する代わりに単一の発酵工程から得られる。二重シストロン発現システムは、軽鎖および重鎖のクローンのための細胞バンクを分離する代わりに単一の細胞バンクを特徴付けし維持することをより簡単にする。さらに、こうして得られる封入体は、細菌細胞のペリプラズム空間から抽出される場合、相対的に純粋である。封入体として得られる軽鎖および重鎖の高レベル発現およびより純粋な形態は、エクスビボ（ｅｘ　ｖｉｖｏ）で機能性Ｆａｂに折り畳むことを相対的により簡単にし、これにより、産物の収率を大いに向上させる。

【００５０】

本発明におけるシステムの他の利点は、対象のタンパク質を、アラビノースおよびＴ７プロモーター下でクローン化され、発現されてもよく、タンパク質の発現レベルを重大に向上させてもよい。

以下に開示される実施例は、本発明の実例となることを目的とするだけであり、本発明を限定することを意図するものではない。

【００５１】

実施例１：ｐＥＴ２１ａベクターにおける重鎖のクローニング

Ｆａｂ断片における重鎖および軽鎖のクローニングのために使用されるＤＮＡ配列は、ＩＤ　ｎｏ．１およびｎｏ．２でそれぞれ与えられる。挿入された重鎖を、遺伝子特異的プライマーを用いて合成ＤＮＡから増幅した。プライマーは当該技術分野でよく知られた方法に従って設計される。重鎖ＰＣＲ産物は、その後、ＮｄｅＩ－ＨｉｎｄＩＩＩ酵素を用いて消化され、同じ酵素を用いて消化されるｐＥＴ２１ａベクターにライゲーションされた。クローンをコロニーＰＣＲによってスクリーニングし、制限分析によって確認した。結果として生じるクローンをｐＥＴ２１ａ－ＨＣと呼んだ。組換え体ベクターを、ＢＬ２１Ａ１細胞系列に導入し、重鎖の発現を確認した。

【００５２】

実施例２：ｐＢＡＤ２４Ｍベクターにおける軽鎖のクローニング

挿入された軽鎖を、遺伝子特異的プライマーを用いて合成ＤＮＡから増幅した。プライマーは当該技術分野でよく知られた方法に従って設計される。増幅された軽鎖は、ＮｄｅＩ－ＨｉｎｄＩＩＩ酵素を用いて消化され、同じ部位で消化されるｐＢＡＤ２４Ｍベクター（実験室で利用できる）にライゲーションされた。クローンをコロニーＰＣＲによってスクリーニングし、制限分析によって確認した。結果として生じるクローンをｐＢＡＤ２４Ｍ－ＬＣと呼んだ。組換え体ベクターを、ＢＬ２１Ａ１細胞系列に導入し、軽鎖の発現を確認した。

【００５３】

実施例３：同じベクターにおける二つの独立したシストロンの構築

プライマーは、アラビノースプロモーター、ターミネーター、およびａｒａＣ遺伝子と一緒に軽鎖を増幅するために設計された。プライマーは当該技術分野でよく知られた方法に従って設計される。プライマーは、増幅された産物に対してＢＧｌＩＩリンカーを加えた。ｐＥＴ２１ａベクターは、Ｔ７プロモーターの上流に単一のＢＧｌＩＩ部位を有した

。軽鎖発現カセットを、ベクター特異的プライマーを用いて鋳型ｐＢＡＤ２４Ｍから増幅し、ＢＧｌＩＩ部位でｐＥＴ２１ａ－ＨＣクローンにクローン化した。クローンを制限消化およびシーケンスによって確認した。最終的なクローンをｐＥＴ２１ａ－ＨＣ－ＬＣと呼び、適切なクローンを発現に基づいてショートリストした。ｐＥＴ２１ａ－ＨＣ－ＬＣのクローン地図を、図２に示す。

そのように生成されたクローンは、重鎖および軽鎖の両方の独立した制御および発現のために必要とされる全ての断片を含む。

【００５４】

実施例４：発現分析

Ｅ．ｃｏｌｉＢＬ２１　Ａ１細胞系列を発現ホストとして使用した。ＢＬ２１　Ａ１とは別に、ゲノムにおいてＴ７プロモーターを含むＢＬ２１　ＤＥ３、または任意の他の細胞系列を使用する。ＢＬ２１　Ａ１細胞を、コントロールとしてｐＥＴ２１ａ－ＨＣおよびｐＢＡＤ２４Ｍ－ＬＣと一緒に上記の選択されたクローンを用いて形質転換した。重鎖は、ＩＰＴＧによって誘導され、軽鎖は、アラビノースによって誘導された。インデューサー濃度は、１３ｍＭアラビノースおよび１ｍＭ　ＩＰＴＧであり、誘導は、培養OD_{600}が～１になった時に行われた。細胞を、誘導後、４時間で採取した。実験を振とうフラスコ中で行った。得られた採取物を、ビーズ溶解し、可溶性および不溶性画分を分離するために遠心分離した。発現を確認するために、試料を１２％ＳＤＳ　ＰＡＧＥゲルに載せた。ＳＤＳ　ＰＡＧＥゲル分析を図３に示す。減少した軽鎖および重鎖の発現を確認するために、減じたラニビズマブを、図３のレーン５において載せた。

【００５５】

ＳＤＳ　ＰＡＧＥ分析は、不溶性のペレット画分において両鎖の発現を示し、同じことをＲＰ－ＨＰＬＣによって確認した。ここで、参照産物の軽鎖および重鎖の保持時間は、自家産物の保持時間に相当した。使用されるコントロールは、Ｆａｂ分子（参照産物）、並びにｐＥＴ２１ａ－ＨＣクローンおよびｐＢＡＤ２４Ｍクローン産物を減少させた。したがって、単一のクローンからの重鎖および軽鎖の両方の発現を確認した。ＲＰ－ＨＰＬＣ分析を図４および図５に示す。ＲＰ－ＨＰＬＣにおいて、二重シストロンクローンの可溶化された、および減少したＩＢは、減少したラニビズマブ（ＲＭＰ）と比較され、クローンは、重鎖および軽鎖、すなわちｐＥＴ２１ａ－ＨＣおよびｐＢＡＤ２４ＭＬＣを別々に発現していた。

【００５６】

軽鎖のみを発現するｐＢＡＤ２４ＭＬＣの可溶化されたＩＢの主なピークの保持時間（ＲＴ）は、減少したＲＭＰの軽鎖のＲＴと一致する。ＲＴ１３分での不純物ピークは、重鎖の保持時間と一致し、そのことは、同様の疎水性を有すること示した。したがって、不純物は、ＬＣ－ＭＳ／ＭＳによって特徴付けられ、最終的に、ＲＴ１７分で、宿主細胞のタンパク質ＯＭＰ　Ｃ、および非切断リード配列を有する軽鎖として注釈付けした。ｐＥＴ２１ａ－ＨＣによって発現された重鎖は、参照の標準重鎖と一致した。プロファイルもＲＴ１９分でポストピークを示し、そのことは非切断リード配列を有する重鎖と特徴付けられた。ＬＣおよびＨＣの両方を発現する二重シストロンクローンｐＥＴ２１ａ＿ＨＣ＿ＬＣは、二つの主なピークを有し、参照標準のＬＣおよびＨＣの保持時間と同等の保持時間を有する。しかし、ＯＭＰ　Ｃは、重鎖と共溶出するので、逆相の試験方法がより良く分解することになり、これを図４に示す。

【００５７】

Ｚｏｒｂａｘ　Ｃ８　ＲＰカラムにおける既存の方法を、Ａｅｒｉｓｗｉｄｅｐｏｒｅ　Ｃ８カラムに変更し、共溶出種を分解した。Ａｅｒｉｓｗｉｄｅｐｏｒｅ　Ｃ８カラムにおけるｐＥＴ２１ａ＿ＨＣ＿ＬＣの可溶化されたＩＢは、明確なＬＣ、ＨＣ、およびＯＭＰ　Ｃピークを示し、図５で明らかなようにＩＢにおいて個々のサブユニットの同定、および正確な定量化を可能にした。

【００５８】

特定の実施形態および実施例を、上記の詳細に記載しているけれども、多くの変更がそ

の教示から逸脱することがなく実施形態および実施例において可能であることを、当業者は明らかに理解するだろう。

【００５９】

実施例ｎｏ５：ｐＥＴ２４ａベクターにおいてスタフィロキナーゼ（ＳＡＫ）融合タグを有する小ペプチド（リラグルチド）のクローニング

ＳＡＫおよびリラグルチド遺伝子を、遺伝子特異的プライマーを用いて合成ＤＮＡから増幅した。プライマーは、当該技術分野でよく知られた方法に従って設計され、ＰＣＲ産物を、ＮｄｅＩ－ＢａｍＨＩおよびＢａｍＨＩ－ＨｉｎｄＩＩＩ酵素を用いて消化し、ＮｄｅＩ－ＨｉｎｄＩＩＩ部位で消化されたｐＥＴ２４ａベクターにライゲーションした。クローンを、コロニーＰＣＲによってスクリーニングし、制限分析によって確認した。結果として生じるクローンを、ｐＥＴ２４ａ－ＳＡＫ－Ｌｉｒａとして設定した。

【００６０】

実施例ｎｏ６：ｐＢＡＤ２４Ｍベクターにおいてスタフィロキナーゼ融合タグを有する小ペプチド（リラグルチド）のクローニング

実施例ｎｏ６において与えらえるように、ＳＡＫタグを有するリラグルチドを、ｐＢＡＤ２４Ｍベクターにクローン化した。クローンを、ｐＢＡＤ２４Ｍ－ＳＡＫ－Ｌｉｒａとして設定した。

【００６１】

実施例ｎｏ７：ＳＡＫ－Ｌｉｒａ融合ペプチドを発現する二つのシストロンを有する同じのベクターにおける二つの独立したシストロンの構築

実施例ｎｏ．３において使用されるクローン設計戦略を、リラグルチドの二重シストロンクローンを構築するために使用し、ここで、二重シストロン構築を構築するために、アラビノース発現カセットと共にＳＡＫ－Ｌｉｒａ融合遺伝子を、ｐＢＡＤ２４Ｍ－ＳＡＫ－Ｌｉｒａクローンから増幅し、ｐＥＴ２４ａ－ＳＡＫ－Ｌｉｒａクローンにクローン化した。クローンを、ｐＥＴ－ａｒａ－ＳＡＫ－Ｌｉｒａとして標識化した。

【００６２】

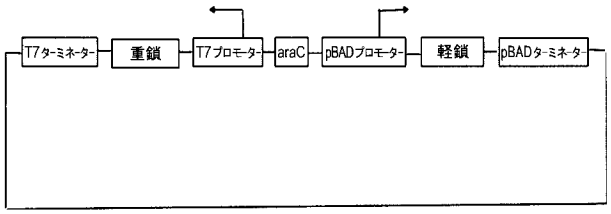
実施例ｎｏ８：ＳＡＫ－Ｌｉｒａ融合タンパク質を有する二重シストロンクローンの発現分析

Ｅ．ｃｏｌｉＢＬ２１　Ａ１細胞系列を発現ホストとして使用した。ＢＬ２１　Ａ１とは別に、ゲノムにおいてＴ７プロモーターを含むＢＬ２１　ＤＥ３、または任意の他の細胞系列を使用する。ＢＬ２１　Ａ１細胞を、上記の単一のおよび二重のシストロン構築物を用いて形質転換した。クローンを、ＩＰＴＧおよびアラビノースによって誘導した。インデューサー濃度は、１３ｍＭアラビノースおよび１ｍＭ　ＩＰＴＧであり、誘導は、培養OD_{600}が～１になった時に行われた。細胞を、誘導後、４時間で採取した。実験を振とうフラスコ中で行った。得られた採取物を、ビーズ溶解し、可溶性および不溶性画分を分離するために遠心分離した。発現を確認するために、試料を１２％ＳＤＳ　ＰＡＧＥゲルにロードした。

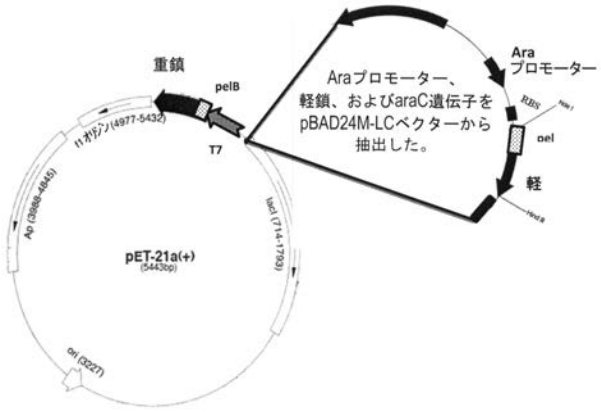
【００６３】

ＳＤＳ　ＰＡＧＥゲル分析は、単一のシストロンｐＥＴ２４ａ－ＳＡＫ－Ｌｉｒａクローン（図６レーン３）と比較して、二重シストロンクローン（図６レーン２）においてＳＡＫ－Ｌｉｒａ融合タンパク質の発現の上昇を明確に示す。

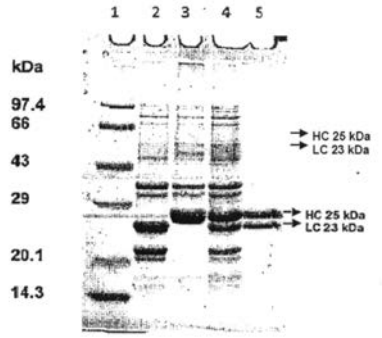
【図１】



【図２】



【図３】



レーンNo	レーン説明
1	タンパク質分子量マーカー
2	軽鎖pBAD／BL21 A1
3	重鎖pET21a／BL21A1
4	二重シストロンクローンpET21a−HC−LC／BL21 A1
5	ラニビズマブ(Ranibizumab)標準

【図４】

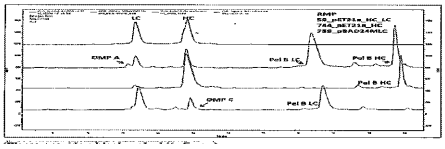


Figure 4

【図５】

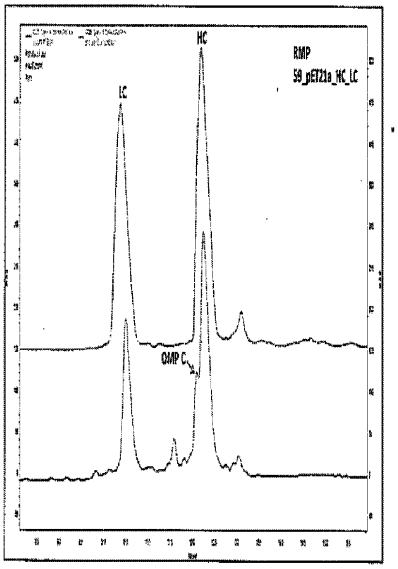
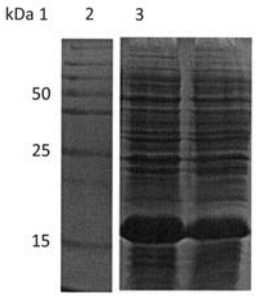


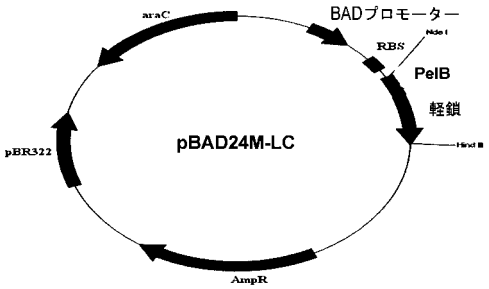
Figure 5

【図６】



レーンNo	レーン説明
1	タンパク質分子量マーカー
2	二重シストロンクローンpET−ara−SAK−Lira／BL21 A1
3	単一シストロンクローンpET−SAK−Lira

【図７】



【配列表】
2017520261000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2015/055189

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N15/67 C12N15/70 C12N15/74
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, PAJ, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03/018771 A2 (GENENTECH INC [US]; ANDERSEN DANA C [US]; SIMMONS LAURA C [US]) 6 March 2003 (2003-03-06) cited in the application abstract; claims 1-57; figure 8 -----	1-30
X	KIM K-J ET AL: "TWO-PROMOTER VECTOR IS HIGHLY EFFICIENT FOR OVERPRODUCTION OF PROTEIN COMPLEXES", PROTEIN SCIENCE, WILEY, US, vol. 13, no. 6, 1 June 2004 (2004-06-01), pages 1698-1703, XP008045869, ISSN: 0961-8368, DOI: 10.1110/PS.04644504 the whole document ----- -/--	1-30

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
22 September 2015	02/10/2015

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Weinberg, Suzanna

2

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2015/055189

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SAMPALI BANERJEE ET AL: "Over-expression of proteins using a modified pBAD24 vector in E. coli expression system", BIOTECHNOLOGY LETTERS, SPRINGER NETHERLANDS, DORDRECHT, vol. 31, no. 7, 29 March 2009 (2009-03-29) , pages 1031-1036, XP019670357, ISSN: 1573-6776 the whole document -----	1-30
A	SLETTA H ET AL: "The presence of N-terminal secretion signal sequences leads to strong stimulation of the total expression levels of three tested medically important proteins during high-cell-density cultivations of Escherichia coli.", APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY FEB 2007, vol. 73, no. 3, February 2007 (2007-02), pages 906-912, XP002744772, ISSN: 0099-2240 abstract -----	23-26

2

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/IB2015/055189

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03018771 A2	06-03-2003	AT 382053 T	15-01-2008
		CA 2454731 A1	06-03-2003
		CN 1549821 A	24-11-2004
		DE 60224291 T2	11-12-2008
		EP 1427744 A2	16-06-2004
		JP 4461210 B2	12-05-2010
		JP 2005517385 A	16-06-2005
		KR 20040031011 A	09-04-2004
		MX PA04001566 A	17-05-2004
		NZ 530852 A	30-11-2006
		US 2003077739 A1	24-04-2003
		US 2006246542 A1	02-11-2006
		US 2007015244 A1	18-01-2007
		US 2007224664 A1	27-09-2007
		US 2011244517 A1	06-10-2011
		US 2014120580 A1	01-05-2014
		WO 03018771 A2	06-03-2003

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(72)発明者 バーシュニー ブラジェス
インド国 プーネ ４１２ １１５ ムルシ タルカ ゴータワデ ビレッジ ゲート ナンバー １１５６ ルピン・リミテッド （バイオテクノロジー ディビジョン）
(72)発明者 ソーラパネニ スダヒーバブ
インド国 プーネ ４１２ １１５ ムルシ タルカ ゴータワデ ビレッジ ゲート ナンバー １１５６ ルピン・リミテッド （バイオテクノロジー ディビジョン）

Ｆターム(参考) 4B064 AG27 CA02 CA19 CC24 DA01 DA20