

【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31年1月10日(2019.1.10)

【公表番号】特表2017-536835(P2017-536835A)

【公表日】平成29年12月14日(2017.12.14)

【年通号数】公開・登録公報2017-048

【出願番号】特願2017-530121(P2017-530121)

【国際特許分類】

C 1 2 N	15/09	(2006.01)
C 1 2 N	9/48	(2006.01)
C 1 2 P	21/00	(2006.01)
C 1 2 N	1/21	(2006.01)
C 0 7 K	14/46	(2006.01)
C 0 7 K	14/475	(2006.01)
C 0 7 K	14/52	(2006.01)
C 0 7 K	14/575	(2006.01)
C 0 7 K	14/745	(2006.01)

【F I】

C 1 2 N	15/00	A
C 1 2 N	9/48	Z N A
C 1 2 P	21/00	C
C 1 2 P	21/00	E
C 1 2 P	21/00	K
C 1 2 P	21/00	F
C 1 2 N	1/21	
C 0 7 K	14/46	
C 0 7 K	14/475	
C 0 7 K	14/52	
C 0 7 K	14/575	
C 0 7 K	14/745	

【手続補正書】

【提出日】平成30年11月22日(2018.11.22)

【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】

組み換え融合タンパク質であって、

(i) 完全長のP. f l u o r e s c e n s D n a J様タンパク質；完全長のP. f l u o r e s c e n s F k l Bタンパク質またはそのC末端切断；完全長のP. f l u o r e s c e n s F r n Eタンパク質またはそのC末端切断；完全長のP. f l u o r e s c e n s F k b Pタンパク質またはそのC末端切断；および完全長のP. f l u o r e s c e n s E c p Dタンパク質またはそのC末端切断から選択される、N末端融合パートナーと、  
(i i) 対象のポリペプチドと、  
(i i i) N末端融合パートナーと対象のポリペプチドとの間の切断部位を含むリンカー

と

を含む、組み換え融合タンパク質。

【請求項 2】

N末端融合パートナーは、完全長の P. fluorescens FklBタンパク質がC末端から1～200のアミノ酸を取り除くために切断したP. fluorescens FklBタンパク質、完全長の P. fluorescens EcPDタンパク質がC末端から1～200のアミノ酸を取り除くために切断したP. fluorescens EcPDタンパク質、または完全長の P. fluorescens FrnEタンパク質がC末端から1～180のアミノ酸を取り除くために切断したP. fluorescens FrnEタンパク質である、請求項1に記載の組み換え融合タンパク質。

【請求項 3】

対象のポリペプチドは、小ペプチドまたは急速に分解するペプチドと、容易に分解するN末端を備えたタンパク質と、典型的には不溶性形態の細菌発現系で発現するタンパク質とから選択される、発現することが困難なタンパク質である、請求項1または2に記載の組み換え融合タンパク質。

【請求項 4】

対象のポリペプチドは小ペプチドまたは急速に分解するペプチドであり、ここで、対象のポリペプチドは、hPTH1-34、Glp1、Glp2、IGF-1エキセナチド(SEQ ID NO: 37)、テデュグルチド(SEQ ID NO: 39)、プラムリンチド(SEQ ID NO: 40)、ジコノチド(SEQ ID NO: 41)、ベカブレルミン(SEQ ID NO: 42)、エンフビルチド(SEQ ID NO: 43)、ネシリチド(SEQ ID NO: 44)から選択される、請求項1-3のいずれかに記載の組み換え融合タンパク質。

【請求項 5】

対象のポリペプチドは容易に分解するN末端を備えたタンパク質であり、ここで、対象のポリペプチドはN-met-GCSFまたはP. falci parum スポロゾイト周囲タンパクである、請求項1-3のいずれかに記載の組み換え融合タンパク質。

【請求項 6】

対象のポリペプチドは、非可溶性タンパク質として細菌発現系で一般的に発現されるタンパク質であり、ここで、対象のポリペプチドは、インスリンまたはインスリンアナログ、N-met-GCSF、GCSF、またはIFN-ヘとプロセシングされるプロインスリンである、請求項1-3のいずれかに記載の組み換え融合タンパク質。

【請求項 7】

対象のポリペプチドはプロインスリンであり、プロインスリンはインスリンまたはインスリンアナログへとプロセシングされ、プロインスリンはSEQ ID NO: 97; SEQ ID NO: 98; SEQ ID NO: 99; または、SEQ ID NO: 100から選択されるアミノ酸配列を有するCペプチドを含む、請求項6に記載の組み換え融合タンパク質。

【請求項 8】

インスリンアナログは、インスリングラルギン、インスリンアスパルト、リスプロ、グルリジン、デテミル、またはデグルデクである、請求項6または7に記載の組み換え融合タンパク質。

【請求項 9】

N末端融合パートナーは、SEQ ID NO: 2で説明されるアミノ酸配列を有するP. fluorescens DnaJ様タンパク質である、請求項1に記載の組み換え融合タンパク質。

【請求項 10】

N末端融合パートナーは、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 61、またはSEQ ID NO: 62で説明されるアミノ酸配列を有

する *P. fluorescens* FklB タンパク質である、請求項 1 に記載の組み換え融合タンパク質。

【請求項 1 1】

N 末端融合パートナーは、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 63、または SEQ ID NO: 64 で説明されるアミノ酸配列を有する *P. fluorescens* Fne タンパク質である、請求項 1 に記載の組み換え融合タンパク質。

【請求項 1 2】

N 末端融合パートナーは、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 65、SEQ ID NO: 66、または SEQ ID NO: 67 で説明されるアミノ酸配列を有する *P. fluorescens* EcPD タンパク質である、請求項 1 に記載の組み換え融合タンパク質。

【請求項 1 3】

切断部位は、エンテロキナーゼ、トリプシン、因子 Xa、および、フューリンからなる群の中の切断酵素によって認識される、請求項 1 - 1 2 のいずれかに記載の組み換え融合タンパク質。

【請求項 1 4】

リンカーはアフィニティータグを含む、請求項 1 - 1 3 のいずれかに記載の組み換え融合タンパク質。

【請求項 1 5】

リンカーは、  
a. (G 4 S) 1、(G 4 S) 2、(G 4 S) 3、(G 4 S) 4、および(G 4 S) 5 から選択されるスペーサー；  
b. マルトース結合タンパク質タグ、ポリヒスチジンタグ、FLAG タグ、Myctag、HA タグ、およびNus タグから選択されるアフィニティータグ；および  
c. エンテロキナーゼ、トリプシン、キモトリプシン、因子 Xa、およびフューリンから選択されるプロテアーゼ切断部位  
 を含む、請求項 1 - 1 4 のいずれかに記載の組み換え融合タンパク質。

【請求項 1 6】

リンカーは、N 末端から C 末端に、(G 4 S) 2 スペーサー配列 (SEQ ID NO: 59)、ヘキサヒスチジンアフィニティータグ (SEQ ID NO: 242)、およびプロテアーゼ切断部位 DDDDK (SEQ ID NO: 13)；N 末端から C 末端に、(G 4 S) 2 スペーサー配列 (SEQ ID NO: 59)、ヘキサヒスチジンアフィニティータグ (SEQ ID NO: 242)、およびプロテアーゼ切断部位 RKR；N 末端から C 末端に、(G 4 S) 2 スペーサー配列 (SEQ ID NO: 59)、ヘキサヒスチジンアフィニティータグ (SEQ ID NO: 242)、およびプロテアーゼ切断部位 RRR；N 末端から C 末端に、(G 4 S) 2 スペーサー配列 (SEQ ID NO: 59)、ヘキサヒスチジンアフィニティータグ (SEQ ID NO: 242)、およびプロテアーゼ切断部位 LVPRL；および、SEQ ID NO: 226 から選択されるアミノ酸配列を有する、請求項 1 - 1 5 のいずれかに記載の組み換え融合タンパク質。

【請求項 1 7】

対象のポリペプチドは hPTH1 - 34 であり、組み換え融合タンパク質は、SEQ ID NO: 45、SEQ ID NO: 46、および、SEQ ID NO: 47 から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 1、1 3、1 4、1 5、または 1 6 のいずれかに記載の組み換え融合タンパク質。

【請求項 1 8】

請求項 1 - 1 7 のいずれかに記載の組み換え融合タンパク質の発現のための発現ベクターであって、前記組み換え融合タンパク質をコードするスクレオチド配列を含む、発現ベクター。

【請求項 1 9】

対象のポリペプチドを产生する方法であって、

前記方法は、

( i ) 発現構築物を含む発現ベクターを用いて形質転換された微生物の宿主細胞を培養する工程であって、ここで、発現構築物は請求項1-17のいずれかに記載の組み換え融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、工程と、

( i i ) 組み換え融合タンパク質を発現するために工程 ( i ) の宿主細胞を誘導する工程と、

( i i i ) 工程 ( i i ) の誘導された宿主細胞中で発現した組み換え融合タンパク質を精製する工程と、

( i v ) 対象のポリペプチドを放出するためのリinker中の切断部位を認識する切断酵素を用いるインキュベーションによって工程 ( i i i ) の精製された組み換え融合タンパク質を切断する工程であって、それによって対象のポリペプチドを得る工程、を含む、方法。

#### 【請求項 20】

工程 ( i i ) で発現した組み換え融合タンパク質の発現レベルを測定する工程、工程 ( i i i ) で精製された組み換え融合タンパク質の量を測定する工程、または適切に放出された工程 ( i v ) で得られた対象のポリペプチドの量を測定する工程、あるいはこれらの組み合わせをさらに含む、請求項 19 に記載の方法。

#### 【請求項 21】

工程 ( i i i ) または工程 ( i v ) で得られた対象のポリペプチドの量は、約 0.1 g / L から約 25 g / L である、請求項 20 に記載の方法。

#### 【請求項 22】

得られた適切に放出された対象のポリペプチドは溶解可能であり、無傷であり、またはその両方である、請求項 21 に記載の方法。