

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7358347号
(P7358347)

(45)発行日 令和5年10月10日(2023.10.10)

(24)登録日 令和5年9月29日(2023.9.29)

(51)国際特許分類		F I		
C 1 2 N	9/82 (2006.01)	C 1 2 N	9/82	Z N A
C 1 2 N	15/55 (2006.01)	C 1 2 N	15/55	
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	
請求項の数 19 (全58頁)				
(21)出願番号	特願2020-523340(P2020-523340)	(73)特許権者	517192537	
(86)(22)出願日	平成30年10月17日(2018.10.17)		フェネックス インク.	
(65)公表番号	特表2021-500892(P2021-500892 A)		アメリカ合衆国 9 2 1 2 1 カリフォルニア州 サンディエゴ ローゼル・ストリート 1 0 7 9 0	
(43)公表日	令和3年1月14日(2021.1.14)	(74)代理人	100145403	
(86)国際出願番号	PCT/US2018/056375		弁理士 山尾 憲人	
(87)国際公開番号	WO2019/083794	(74)代理人	100122301	
(87)国際公開日	令和1年5月2日(2019.5.2)		弁理士 富田 憲史	
審査請求日	令和3年10月6日(2021.10.6)	(74)代理人	100157956	
(31)優先権主張番号	62/578,302		弁理士 稲井 史生	
(32)優先日	平成29年10月27日(2017.10.27)	(74)代理人	100170520	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 笹倉 真奈美	
前置審査		(74)代理人	100221545	
			弁理士 白江 雄介	
				最終頁に続く

(54)【発明の名称】 組み換え E . c o l i アスパラギナーゼの製造のための方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

培養培地中で P s e u d o m o n a d a l e s 宿主細胞を培養すること、および P s e u d o m o n a d a l e s 宿主細胞のペリプラズム中で組み換え I I 型アスパラギナーゼをコードする核酸を含む発現構築物から組み換え I I 型アスパラギナーゼを発現させることを含み、ここで、該発現構築物が、製造される組み換え I I 型アスパラギナーゼの宿主細胞のペリプラズムへの転移を誘導する分泌リーダーをさらにコードし、該分泌リーダーが、A n s B および 8 4 8 4 から選択され、該組み換え I I 型アスパラギナーゼが、配列番号 1 と少なくとも 9 0 % 同一なアミノ酸配列を含み、該組み換え I I 型アスパラギナーゼが、該ペリプラズム中で可溶性形態で 3 1 % から 6 0 % 総細胞タンパク質 (T C P) の収量で製造され、かつ該宿主細胞が、I 型アスパラギナーゼおよび I I 型アスパラギナーゼの発現を欠損している、組み換え I I 型アスパラギナーゼを製造する方法。

【請求項2】

可溶性組み換え I I 型アスパラギナーゼがペリプラズム中で 1 0 g / L から 3 8 g / L の収量で製造される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項3】

製造される組み換え I I 型アスパラギナーゼの量の活性を活性アッセイを使用して測定することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項4】

組み換え I I 型アスパラギナーゼをコードする核酸が宿主細胞中での発現のために最適

化される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

組み換え I I 型アスパラギナーゼが *Escherichia coli* L-アスパラギナーゼ I I 型である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

組み換え I I 型アスパラギナーゼをコードする核酸が配列番号 2 または配列番号 4 と少なくとも 90% 同一な配列を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

組み換え I I 型アスパラギナーゼが配列番号 1 に記載されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

Pseudomonadales 宿主細胞が *Pseudomonas fluorescens* 細胞である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

宿主細胞が 1 以上のプロテアーゼの発現を欠損している、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

宿主細胞が 1 以上のフォールディングモジュレーターを過剰発現する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

宿主細胞が、

- a) *LepB* を過剰発現する宿主細胞；
 - b) *Tig* を過剰発現する宿主細胞；
 - c) *DsbAC-Skp* を過剰発現する宿主細胞；
 - d) *Lon*、*HslUV*、*DegP1*、*DegP2*、*Prc*、*AprA*、*DegP2 S219A*、*Prc1*、または *AprA* を欠損している宿主細胞；
 - e) *AspG1* を欠損している宿主細胞；
 - f) *AspG2* を欠損している宿主細胞；
 - g) フォールディングモジュレーターを過剰発現せず、かつ、プロテアーゼを欠損していない宿主細胞；
 - h) フォールディングモジュレーターを過剰発現せず、プロテアーゼを欠損せず、かつ、*AspG1* を欠損していない宿主細胞；
 - i) フォールディングモジュレーターを過剰発現せず、プロテアーゼを欠損せず、かつ、*AspG2* を欠損していない宿主細胞；および
 - j) フォールディングモジュレーターを過剰発現せず、プロテアーゼを欠損せず、かつ、*AspG1* または *AspG2* を欠損していない宿主細胞
- から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

宿主細胞が、

- a) *Lon* および *HslUV* を欠損している宿主細胞；
- b) *Lon*、*DegP1*、*DegP2*、*Prc*、および *AprA* を欠損している宿主細胞；
- c) *Lon*、*DegP1*、*DegP2 S219A*、*Prc1*、および *AprA* を欠損し、かつ、*DsbAC-Skp* を過剰発現する宿主細胞；
- d) *AspG1* および／または *AspG2* を欠損している宿主細胞；
- e) *AspG1* および／または *AspG2* を欠損し、かつ、*Tig* を過剰発現する宿主細胞；
- f) *AspG1* および／または *AspG2* を欠損し、かつ、*LepB* を過剰発現する宿主細胞；
- g) *AspG1* および／または *AspG2* を欠損し、かつ、*Lon* および *HslUV* を欠損している宿主細胞
- h) *AspG1* および／または *AspG2* を欠損し、かつ、*Lon*、*DegP1*、*Deg*

10

20

30

40

50

P 2、P r c、およびA p r Aを欠損している宿主細胞；および
i) A s p G 1および／またはA s p G 2、L o n、D e g P 1、D e g P 2、P r c 1、およびA p r Aを欠損し、かつ、D s b A C－S k pを過剰発現する宿主細胞から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

製造される組み換え I I 型アスパラギナーゼの測定された活性を対照 I I 型アスパラギナーゼの同じ量における測定された活性と同じ活性アッセイを使用して比較することをさらに含み、ここで製造される組み換え I I 型アスパラギナーゼの測定された活性は対照 I I 型アスパラギナーゼの活性と比較可能である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 1 4】

製造された組み換え I I 型アスパラギナーゼは、患者における半減期を増加させるように修飾される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 5】

発現構築物から発現される組み換え I I 型アスパラギナーゼが、組み換え E . c o l i I I 型アスパラギナーゼであり、核酸が、P . f l u o r e s c e n s A n s B 分泌リーダーに作動可能に連結された組み換え E . c o l i I I 型アスパラギナーゼをコードし、組み換え E . c o l i I I 型アスパラギナーゼが、同じ方法によりペリプラズム中で製造される組み換え P . f l u o r e s c e n s I I 型アスパラギナーゼのものより 2 0 % から 1 0 0 % 大きい収量でペリプラズム中で製造され、P . f l u o r e s c e n s I I 型アスパラギナーゼが、P . f l u o r e s c e n s A n s B 分泌リーダーに作動可能に連結された組み換え P . f l u o r e s c e n s I I 型アスパラギナーゼをコードする核酸を含む第 2 の発現構築物から発現される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 6】

第 2 の発現構築物が、配列番号 5 5 として記載されるアミノ酸配列をコードする核酸を含む、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

組み換え I I 型アスパラギナーゼが、腫瘍性状態を有する患者の処置のために使用される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 8】

腫瘍性状態が、急性リンパ芽球性白血病、急性骨髄性白血病、および非ホジキンリンパ腫から選択される、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 9】

組み換え I I 型アスパラギナーゼが、ペグ化により修飾される、請求項 1 4 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願への相互参照

この出願は、参照により本願明細書中に組み込まれる 2 0 1 7 年 1 0 月 2 7 日に提出された米国仮出願番号 6 2 / 5 7 8 , 3 0 2 の利益を主張する。

【0 0 0 2】

配列表

本出願は、A S C I I 形式で電子的に提出され、参照によりその全体が本願明細書に組み込まれる配列表を含有する。2 0 1 8 年 1 0 月 1 6 日に作成された該 A S C I I コピーの名前は 3 8 1 9 4 - 7 5 1 _ 6 0 1 _ S L . t x t で、サイズは 5 4 , 8 4 6 バイトである。

【背景技術】

【0 0 0 3】

本願の背景

L - アスパラギナーゼは、L - アスパラギンの L - アスパラギン酸への変換を触媒する

10

20

30

40

50

。細菌 *E. coli* からの L-アスパラギナーゼ II 型は、開裂可能な分泌シグナル配列で製造される四量体高親和性ペリプラズム酵素である。それは L-アスパラギンアミドヒドロラーゼとしても知られ、急性リンパ芽球性白血病 (ALL) を有する患者の処置に適応された商業的に承認された医薬品中の有効成分である。例えば、米国において ALL 処置のために承認される *Elspar* (登録商標) は、有効成分 *E. coli* L-アスパラギナーゼ II 型を有する。 *Oncaspar* (登録商標) (*pegaspargase*) は、モノメトキシポリエチレングリコール (mPEG) に共有結合した L-アスパラギナーゼ (L-アスパラギンアミドヒドロラーゼ) を含有する。 *Oncaspar* は、ファーストライン ALL 並びに天然 *E. coli* アスパラギナーゼに対する ALL および過敏症の処置について、米国において承認される。 *E. coli* L-アスパラギナーゼ II 型は、他の腫瘍性状態の処置にも使用される。 *E. coli* アスパラギナーゼは、 *E. coli* の培養物から精製されて、薬物物質、例えば天然アスパラギナーを欠損している遺伝的に修飾された *E. coli* を生じることができる。いくつかの場合において、それは異種の分泌シグナルペプチドとの遺伝子融合から発現される。

10

【0004】

アスパラギナーゼのペリプラズム局在は、封入体の減少した製造、減少したタンパク質分解、および真正のタンパク質 N 末端の生成を含む、異なる発現系における利点を提供することができる。分泌経路補因子の限定された可用性および／またはペリプラズム空間の空間的制限のため、発現収量は低くなることができる。組み換えアスパラギナーゼの細胞質発現は、細菌宿主細胞細胞質環境がアスパラギナーゼ単量体の可溶性、分解、およびミ

20

【発明の概要】

【0005】

組み換え II 型アスパラギナーゼの製造方法が、本願明細書中で提供される。いくつかの実施形態において、該方法は、培養培地中で *Pseudomonadales* 宿主細胞を培養し、ペリプラズム中で約 31% から約 60% T C P 可溶性アスパラギナーゼの収量で製造される組み換えアスパラギナーゼをコードする核酸を含む発現構築物からの *Pseudomonadales* 宿主細胞のペリプラズム中に組み換えアスパラギナーゼを発現させることを含む。いくつかの実施形態において、可溶性組み換えアスパラギナーゼは、ペリプラズム中で約 10 g/L から約 38 g/L の収量で製造される。いくつかの実施形態において、該方法はさらに、活性アッセイを使用して、製造される組み換え II 型アスパラギナーゼの量の活性を測定することを含む。いくつかの実施形態において、組み換えアスパラギナーゼをコードする核酸は、宿主細胞中での発現に最適化される。いくつかの実施形態において、アスパラギナーゼは *Escherichia coli* L-アスパラギナーゼ II 型である。いくつかの実施形態において、組み換えアスパラギナーゼをコードする核酸は、配列番号 1 または 3 と少なくとも 85% 相同である。いくつかの実施形態において、組み換えアスパラギナーゼは、配列番号 2 と少なくとも 85% 相同である。いくつかの実施形態において、組み換えアスパラギナーゼの発現は、培養培地への IPTG の添加で誘導される。いくつかの実施形態において、IPTG は、培養培地中で約 0.14 mM から約 0.3 mM の濃度である。いくつかの実施形態において、*Pseudomonad* 宿主細胞が約 0.05 g/g から約 0.4 g/g の湿潤細胞重量まで成長すると、組み換えアスパラギナーゼの発現が誘導される。いくつかの実施形態において、*Pseudomonadales* 宿主細胞は約 5.0 から約 8.0 の pH で培養される。いくつかの実施形態において、*Pseudomonadales* 宿主細胞は約 22 °C から約 33 °C の温度で培養される。いくつかの実施形態において、*Pseudomonadales* 宿主細胞は、約 3 g/L から約 8 g/L のマンニトールを含む培地中で培養される。実施形態において、*Pseudomonadales* 宿主細胞は、マンニトールを含まない培地中で培養される。いくつかの実施形態において、*Pseudomonadales* 宿主細胞は、約 0.1 mM から約 1 mM の CaCl_2 を含む培地中で培養される。いくつか

30

40

50

の実施形態において、*Pseudomonadales* 宿主細胞は *Pseudomonas fluorescens* 細胞である。いくつかの実施形態において、*Pseudomonadales* 宿主細胞は、1 以上のアスパラギナーゼの発現を欠損している。いくつかの実施形態において、*Pseudomonadales* 宿主細胞は、1 以上の天然アスパラギナーゼの発現を欠損している。いくつかの実施形態において、発現欠損した天然アスパラギナーゼは、I 型アスパラギナーゼである。いくつかの実施形態において、発現欠損した天然アスパラギナーゼは、II 型アスパラギナーゼである。いくつかの実施形態において、*Pseudomonadales* 宿主細胞は 1 以上のプロテアーゼの発現を欠損している。いくつかの実施形態において、*Pseudomonadales* 宿主細胞は 1 以上のフォールディングモジュレーターを過剰発現する。いくつかの実施形態において、*Pseudomonadales* 宿主細胞は、以下の少なくとも 1 つから選択される：LepB を過剰発現する宿主細胞；Tig を過剰発現する宿主細胞；DsbA、DsbC、および Skp (DsbAC-Skp) を過剰発現する宿主細胞；Lon、HslUV、DegP1、DegP2、Prc、AprA、DegP2 S219A、Prc1、または AprA を欠損している宿主細胞；AspG1 を欠損している宿主細胞；AspG2 を欠損している宿主細胞；フォールディングモジュレーターを過剰発現せず、かつプロテアーゼを欠損していない宿主細胞；フォールディングモジュレーターを過剰発現せず、プロテアーゼを欠損せず、かつ AspG1 を欠損していない宿主細胞；フォールディングモジュレーターを過剰発現せず、プロテアーゼを欠損せず、かつ AspG2 を欠損していない宿主細胞；およびフォールディングモジュレーターを過剰発現せず、プロテアーゼを欠損せず、かつ AspG1 または AspG2 を欠損していない宿主細胞。いくつかの実施形態において、*Pseudomonadales* 宿主細胞は、以下から選択される：Lon および HslUV を欠損している宿主細胞；Lon、DegP1、DegP2、Prc、および AprA を欠損している宿主細胞；Lon、DegP1、DegP2 S219A、Prc1、および AprA が欠損し、かつ DsbAC-Skp を過剰発現する宿主細胞；AspG1 および／または AspG2 を欠損している宿主細胞；AspG1 および／または AspG2 が欠損し、かつ Tig を過剰発現する宿主細胞；AspG1 および／または AspG2 が欠損し、かつ LepB を過剰発現する宿主細胞；AspG1 および／または AspG2 が欠損し、かつ Lon および HslUV を欠損している宿主細胞；AspG1 および／または AspG2 が欠損し、かつ Lon、DegP1、DegP2、Prc、および AprA を欠損している宿主細胞；および AspG1 および／または AspG2 Lon、DegP1、DegP2、Prc1、および AprA が欠損し、かつ DsbAC-Skp を過剰発現する宿主細胞。いくつかの実施形態において、発現構築物は分泌リーダーを構成する。いくつかの実施形態において、分泌リーダーは、*Pseudomonadales* 分泌リーダー AnsB、8484、IBP-S31A、pbp、8584、LAO、Azul、PbpA20V、CupC2 および *Escherichia coli* K-12 AnsB 分泌リーダーを含む群から選択される。いくつかの実施形態において、分泌リーダーは、*Pseudomonadales* 宿主細胞のペリプラズムに製造される組み換えアスパラギナーゼの転移を誘導する。いくつかの実施形態において、該方法はさらに、製造される組み換え II 型アスパラギナーゼの測定された活性を、同じ活性アッセイを使用して同じ量の対照 II 型アスパラギナーゼで測定された活性と比較することを含む。いくつかの実施形態において、対照 II 型アスパラギナーゼは、患者における使用が商業的に承認されている *E. coli* II 型アスパラギナーゼを含む。いくつかの実施形態において、製造される組み換え II 型アスパラギナーゼは、対照 II 型アスパラギナーゼの活性の約 80% から約 120% を有する患者における使用のために選択される。いくつかの実施形態において、製造された組み換え II 型アスパラギナーゼは、患者における半減期を増加させるように修飾される。いくつかの実施形態において、製造された組み換え II 型アスパラギナーゼは、患者における半減期を増加させるように修飾される。いくつかの実施形態において、発現構築物から発現される組み換え II 型アスパラギナーゼは、組み換え *E. coli* II 型アスパラギナーゼであり、ここで核酸は、*P. fluoresce*

10

20

30

40

50

ns Ans B分泌リーダーに作動可能に連結された組み換えE. coli II型アスパラギナーゼをコードし、そしてここで組み換えE. coli II型アスパラギナーゼは、同じ方法によりペリプラズム中で製造された組み換えP. fluorescens II型アスパラギナーゼの収量より約20%から約100%大きい収量でペリプラズム中で製造され、ここでP. fluorescens II型アスパラギナーゼは、P. fluorescens Ans B分泌リーダーに作動可能に連結された組み換えP. fluorescens II型アスパラギナーゼをコードする核酸を含む第2の発現構築物から発現される。いくつかの実施形態において、第2の発現構築物は、配列番号55として記載されるアミノ酸配列をコードする核酸を含む。

【0006】

参照による組み込み

本願明細書中で言及されているすべての出版物、特許、および特許出願は、あたかも個々の出版物、特許、または特許出願が参照により組み込まれることが特異的かつ個別に示されているのと同程度に、参照により本願明細書中に組み込まれる。

【0007】

本開示の新規の特徴は、添付の特許請求の範囲に詳細に記載される。本開示の特徴および利点のより良い理解は、本開示の原理が利用される説明的な実施形態を示す以下の詳細な説明および添付の図面を参照することにより得られるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1】図1. SDS-CGEゲル様画像-ティア1発現プラスミドスクリーン。可溶性（上部パネル）および不溶性（下部パネル）のアスパラギナーゼ小規模（0.5ml）成長全ブロスソニケートを還元SDS-CGEで分析した。左端のレーンは、分子重量マーカーラダー（上部パネルMWラダー119kDa、68kDa、48kDa、29kDa、21kDa、16kDa）下部パネルMWラダー119kDa、68kDa、48kDa、29kDa、21kDa、16kDa）を示し、右端のレーンは同じラダーを示す。左から右に、ラダー1のすぐ右から順に、ヌル、STR55467、STR55689、STR55559、STR55561、STR55569、STR55575、STR55555、STR55571、STR55560、STR55570、STR55572、STR55601、STR55585、STR55592、STR55501、および対照：Sigma E. coli L-アスパラギナーゼ1000μg/ml、Sigma E. coli L-アスパラギナーゼ500μg/ml、Sigma E. coli L-アスパラギナーゼ250μg/ml、Sigma E. coli L-アスパラギナーゼ125μg/ml、およびSigma E. coli L-アスパラギナーゼ62.5μg/mlにおいて観察される発現パターンを示すレーンである。ゲル画像の右側の矢印は、アスパラギナーゼ標的タンパク質（35kDa）の移動を示す。

【0009】

【図2】図2. SDS-CGEゲル様画像振とうフラスコ発現分析。可溶性（上部パネル）および不溶性（下部パネル）アスパラギナーゼ振とうフラスコ発現ソニケートを還元SDS-CGEで分析した。左端のレーンは、分子重量マーカーラダー（上部パネルMWラダー68kDa、48kDa、29kDa、21kDa、16kDa：下部パネルMWラダー68kDa、58kDa、29kDa、21kDa、16kDa）、14番目のレーンおよび右端のレーンは同じラダーを示す。左から右に、ラダー1のすぐ右から順に、以下の株の可溶性画分中で観察された発現パターンを示すレーンである：I0でのSTR55976、I24でのSTR55976、I24でのSTR55976、I24でのSTR55976、I0でのSTR55977、I24でのSTR55977、I24でのSTR55977、I24でのSTR55977、I0でのSTR55982、I24でのSTR55982、I24でのSTR55982、I24でのSTR55982、ここでI0試料は誘導時に得られ、I24試料は誘導の24時間後に得られる。左から右に、ラダー2のすぐ右から順に、Sigma E. coli L-アスパラギナーゼ1000μ

10

20

30

40

50

g/ml、Sigma E. coli L-アスパラギナーゼ500 µg/ml、Sigma E. coli L-アスパラギナーゼ250 µg/ml、Sigma E. coli L-アスパラギナーゼ125 µg/ml、およびSigma E. coli L-アスパラギナーゼ62.5 µg/mlである。ゲル画像の右側の矢印は、アスパラギナーゼ標的タンパク質(35 kDa)の移動を示す。Sigma E. coliアスパラギナーゼを対照標準曲線として実行した。

【0010】

【図3】図3. マススペクトロメトリーデータ振とうフラスコ発現分析。左のパネルは、STR55976についてのLC-MSデータを示し、右のパネルは、STR55977についてのデータを示す。

【発明を実施するための形態】

【0011】

発明の詳細な説明

概要

Pseudomonas 宿主細胞中で、可溶性組み換えアスパラギナーゼを製造する方法が、本願明細書中で開示される。全細胞タンパク質のパーセンテージとしてのアスパラギナーゼ製造の高いレベル、例えば60%までのTCPアスパラギナーゼ、例えば、検出可能な分解なく活性な四量体を形成することができるアスパラギナーゼ単量体が本願明細書中で記載される。アスパラギナーゼ製造の高い力価、例えば、アスパラギナーゼ1リットルあたり20グラムまで、例えば、検出可能な分解なく活性な四量体を形成することができるアスパラギナーゼ単量体が、本願発明の方法を用いて得られる。アスパラギナーゼを製造するための宿主細胞は、*Pseudomonas*、例えば*Pseudomonas fluorescens*を含むが、これらに限定されない。アスパラギナーゼ発現構築物は、選択した宿主株に応じてコドン最適化されることができる。

【0012】

本願発明の方法において有用な核酸構築物は、分泌リーダー-アスパラギナーゼ融合タンパク質の発現を結果として生じる分泌シグナル(分泌リーダー)、例えば*P. fluorescens*に天然なペリプラズム分泌リーダーをコードする核酸配列に作動可能に連結されたアスパラギナーゼ遺伝子をコード化することができる。いくつかの実施形態において、ペリプラズムの分泌リーダーは、1以上のF1gI、8484、DsBC、Ibp-S31A、または5193を含む。実施形態において、宿主細胞は、プロテアーゼの不活性化を結果として生じる1以上のプロテアーゼコーディング遺伝子中の変異を有する。プロテアーゼまたは任意の他の遺伝子産物の不活性化を結果として生じる変異は、遺伝子のコード配列または調節配列のいずれかにおける置換、挿入、または欠失変異を含むがそれらに限定されないタンパク質不活性化を引き起こすかまたはタンパク質発現を妨げるとして当該技術分野において既知の任意のタイプの変異であることができることが理解される。フォールディングモジュレーターの過剰発現は、フォールディングモジュレーター遺伝子のプラスミド発現または染色体組み込みなど、任意の方法を使用して達成できることが理解される。実施形態において、宿主細胞は、少なくとも1つのプロテアーゼ不活性化を有し、少なくとも1つのフォールディングモジュレーターを過剰発現する。

【0013】

実施形態において、分泌リーダーは、可溶性アスパラギナーゼを宿主細胞のペリプラズムに輸送する。他の実施形態において、アスパラギナーゼは細胞質中に保持される。実施形態において、アスパラギナーゼ精製プロセスは、アスパラギナーゼ可溶化およびその後のリフォールディングを必要としない。実施形態において、アスパラギナーゼの少なくとも一部は封入体中で発現されない。実施形態において、組み換えアスパラギナーゼは、精製のためのいかなるペプチドタグを含まずに発現され、精製時に追加の処理を必要としない。分泌リーダーがアスパラギナーゼタンパク質に融合される実施形態において、分泌リーダーは可溶的に発現されたアスパラギナーゼから効率的に処理される。他の実施形態において、アスパラギナーゼのペリプラズム製造のための発現プラスミドは、選択および維

10

20

30

40

50

持のためにいかなる抗生物質耐性マーカー遺伝子も利用せず、ゆえに、バイオ医薬品の製造に必要なプラスミドDNAのその後の除去のための複雑なプロセスを排除する。他の実施形態において、発酵条件は大容量製造に拡張可能である。本願明細書中で提供される方法は、高いレベルの可溶性、活性なアスパラギナーゼを生じる。

【0014】

当業者にとって既知のように、アミノ酸配列は、遺伝子コードにおける重複のために、異なるヌクレオチド配列によりコードされることができる。ゆえに、本願発明は、同じアミノ酸配列を有するが異なるヌクレオチド配列によりコードされるペプチドまたはタンパク質の使用を含む。

【0015】

アスパラギナーゼ

II型L-アスパラギナーゼを含むアスパラギナーゼは、L-アスパラギンのL-アスパラギン酸およびアンモニアへの加水分解を触媒する酵素である（L-アスパラギン+H₂O=L-アスパラギン酸+NH₃）。II型L-アスパラギナーゼは、ALLおよびいくつかの他の癌を処置するためのマルチ薬剤化学治療のレジメンの一部として使用される。正常細胞はアスパラギンを合成することができるが、特定の癌細胞はアスパラギン合成酵素の欠如のためにアスパラギンを合成することができない。したがって、アスパラギナーゼの患者への投与は、可溶性アスパラギンの加水分解および循環アスパラギンを結果として生じる。これは、正常細胞に対するより少ない効果効果を有する癌細胞の死につながる可能性がある。アスパラギナーゼは、例えば、参照により本願明細書中に組み込まれる、「Drug Discovery and Design: Medical Aspects」、IOS Press, Matsoukas, J., およびMavromoustakos, T., 編における、Pritsa およびKyriakidis, 2002、「L-Asparaginase: Structure, Properties, and Anti-Tumor Activity」中に記載される。

【0016】

Elspar（登録商標）（生物製剤ライセンス申請101063）は、患者におけるすべての処置について米国で商業的に承認されたE. coli L-アスパラギナーゼII型産物である。その活性な成分は、E. coli L-アスパラギナーゼII型である（参照により本明細書中で組み込まれるElspar（登録商標）パッケージインサートを参照）。Oncaspar（登録商標）（生物製剤ライセンス申請103411）中の活性成分は、モノメトキシポリエチレングリコール（mPEG）に共有結合したE. coli L-アスパラギナーゼII型である（参照により本明細書中で組み込まれるOncaspar（登録商標）パッケージインサートを参照）。Oncasparは、ファーストラインALL並びに天然E. coli アスパラギナーゼに対するALLおよび過敏症の処置について、米国において承認される。

【0017】

E. coli は、2のアスパラギナーゼ、L-アスパラギナーゼI型およびL-アスパラギナーゼII型を製造する。アスパラギンへの低い親和性を有するL-アスパラギナーゼI型は細胞質中に位置する。L-アスパラギナーゼII型は、開裂可能な分泌リーダー配列で製造される、アスパラギンに対して高い親和性を有する四量体ペリプラズム酵素である。米国特許出願番号U.S. 2016/0060613、参照により全体が組み込まれる「ペグ化L-アスパラギナーゼ」は、細菌ソースからの既知のL-アスパラギナーゼの共通の構造的特徴を記載する。US 2016/0060613によれば、すべてが2つの隣接するN末端ドメインおよびC末端ドメインの間に4つの活性な部位を有するホモ四量体であり、すべてが三次および四次構造において高い類似性を有し、L-アスパラギナーゼの触媒部位の配列は、Erwinia chrysanthemi、Erwinia carotovora、およびE. coli L-アスパラギナーゼIIの間で高度に保存されている。

【0018】

実施形態において、E. coli A-1-3 L-アスパラギナーゼII型（本願明細書中で配列番号1に記載されるアミノ酸配列；配列番号6-13は、分泌リーダー配列を含む）は、本願発明の方法を使用して製造される。このアスパラギナーゼは、例えば、参照によりその全体が本願明細書中に組み込まれる米国特許番号7,807,436、「Recombinant host for producing L-Asparaginase II」に記載され、ここで該配列は配列番号1として記載される。E. coli A-1-3 L-アスパラギナーゼII型はまた、参照により本願明細書中に組み込まれるNakamura, N., et al., 1972、「On the Productivity and Properties of L-Asparaginase from Escherichia coli A-L-3」、Agricultural and Biological Chemistry, 36:12, 2251-2253にも記載される。E. coli A-1-3は、参照により本願明細書中に組み込まれるRoberts, J., et al., 1968、「New Procedures for Purification of L-Asparaginase with High Yield from Escherichia coli」、Journal of Bacteriology, 95:6, 2117-2123に記載される高いレベルのアスパラギナーゼを製造するE. coli HAP株に由来する。

【0019】

実施形態において、本願発明の方法を使用して製造されるL-アスパラギナーゼII型タンパク質は、E. coli K-12 L-アスパラギナーゼII型酵素であり、これは、両方が参照により本願明細書中に組み込まれるJennings et al., 1990, J. Bacteriol. 172: 1491-1498 (GenBank No. M34277)により記載されたansB遺伝子によりコードされるアミノ酸配列を有する（天然分泌リーダー配列を含む配列番号3および分泌リーダー配列を含まない配列番号5として記載されるアミノ酸配列）。

【0020】

米国特許番号7,807,436は、Merck & Co., Inc.からのL-アスパラギナーゼII型酵素（Elspar（登録商標））およびKyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.からのL-アスパラギナーゼII型酵素に対して、E. coli K12酵素サブユニットは、Ala27の代わりにVal27、Asp64の代わりにAsn64、Thr252の代わりにSer252およびAsn263の代わりにThr263を有することを報告する。

【0021】

実施形態において、本願発明の方法を使用して製造されたL-アスパラギナーゼII型は、参照により本願明細書中に組み込まれるMaita, T., et al., Dec. 1974、「Amino acid sequence of L-Asparaginase from Escherichia coli」、J. Biochem. 76(6):1351-4により示されるアミノ酸配列を有する。

【0022】

実施形態において、本願発明の方法を使用して製造されるL-アスパラギナーゼII型は、E. coli A-1-3 L-アスパラギナーゼII型またはE. coli K-12 L-アスパラギナーゼII型酵素の変異体であり、ここで、変異体は、E. coli A-1-3 L-アスパラギナーゼII型またはE. coli K-12 L-アスパラギナーゼII型酵素のL-アスパラギナーゼII型活性の約80%から約120%、またはそれを超える、約85%から約120%、約90%から約120%、約95%から約120%、約98%から約120%、約100%から約120%、約80%から約100%、約80%から約90%、約85%から約115%、約90%から約110%、約95%から約155%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、または少なくとも約100%を有する。

【0023】

実施形態において、*E. coli* L-アスパラギナーゼII型は、配列を有する核酸によりコードされ、ここでコドンは宿主細胞中での発現のために所望のように最適化される。

【0024】

実施形態において、本願発明の方法を使用して製造される組み換えアスパラギナーゼは、野生型*E. coli*アスパラギナーゼ遺伝子と少なくとも約70%同一である核酸配列によりコードされる。実施形態において、組み換えアスパラギナーゼは、野生型*E. coli*アスパラギナーゼと少なくとも約70%同一のアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態において、組み換えアスパラギナーゼは、野生型*E. coli*アスパラギナーゼ核酸配列と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一の核酸配列を有する。いくつかの実施形態において、組み換えアスパラギナーゼは、野生型*E. coli*アスパラギナーゼと少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一のアミノ酸配列を有する。本願明細書中でパーセンテージとして表現される「同一性」または「相同性」は、2つの配列間の類似性の尺度を記載する。いくつかの実施形態において、2つの配列間の同一性の程度は、技術分野において既知のコンピュータープログラムおよび数学アルゴリズムを使用して確認される。パーセント配列同一性（相同性）を計算するかかるアルゴリズムは一般に、比較領域にわたる配列のギャップおよび不一致を説明する。例えば、BLAST（例えば、BLAST2.0）検索アルゴリズム（例えば、NCBIを通じて公的に入手可能な入手可能なAltschulet al., J. Mol. Biol. 215:403 (1990)を参照）は、以下のような例示的な検索パラメータを有する：Mismatch-2；ギャップオープン5；ギャップ拡張2。ポリペプチド配列比較について、典型的に、BLASTPアルゴリズムは、PAM100、PAM250、BLOSUM62、またはBLOSUM50などのスコアリングマトリックスと組み合わせて使用される。FASTA（例えば、FASTA2およびFASTA3）およびSEARCH配列比較プログラムは、同一性の程度を定量化するためにも使用される（Pearson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988)；Pearson, Methods Mol Biol. 132:185 (2000)；およびSmith et al., J. Mol. Biol. 147:195 (1981)）。

【0025】

*E. coli*からの組み換えII型アスパラギナーゼはまた、Colaspase（登録商標）、Elspar（登録商標）、Kidrolase（登録商標）、Leunase（登録商標）、およびSpectrila（登録商標）なる名前で既知である。Pegaspargase（登録商標）は、*E. coli*アスパラギナーゼのペグ化バージョンの名前である。アスパラギナーゼは、急性リンパ芽球性白血病、急性骨髄性白血病、非ホジキンリンパ腫の患者に、静脈内、筋肉内、または皮下注射により投与される。

【0026】

患者の使用が商業的に承認されたアスパラギナーゼII型産物は、各国の薬物承認機関から入手可能なアスパラギナーゼ産物の産物情報にアクセスすることにより同定できる。例えば、産物情報および承認記録は、例えばアメリカ食品医薬品局からのElspar（*E. coli* L-アスパラギンアミドヒドロラーゼ、EC-2型；BLA#101063）およびErwinaze（登録商標）（アスパラギナーゼErwinia chrysanthemi、BLA#125359）について米国において公的に入手可能であり、参照により本願明細書中に組み込まれる（10903 New Hampshire Avenue, Silver Spring, MD 20993、およびFDAウェブサイトでのオンライン）。欧州における産物情報は、欧州医薬品庁（30 Churchill Place, Canary Wharf, London E14 5EU, United Kingdom、およびEMAウェブサイトでのオンライン）から入手可能である（例えば、それぞれが本願明細書中で参照により組み込まれるOncaspar：ペグ化*E. coli*

LiL-アスパラギナーゼに関する最初に2016年1月19日に公開されたEPAR産物情報；Spectrila：最初に2016年1月28日に公開されたEPAR産物情報；および国家承認医薬品のリスト、2016年4月27日、欧州医薬品庁を参照）。

【0027】

いくつかの実施形態において、アスパラギナーゼの修飾されたバージョンが生成される。一般に、アミノ酸配列に関して、「修飾」なる語は、置換、挿入、伸長、欠失、および誘導体化を単独または組み合わせて含む。特定の実施形態において、アスパラギナーゼの修飾されたバージョンは、患者に投与されるとき増加した半減期などの増強される特性を有する。いくつかの実施形態において、半減増加された半減期を有するアスパラギナーゼの修飾されたバージョンがペプチド化される。いくつかの実施形態において、ペプチドは、「非必須」アミノ酸残基の1以上の修飾を含んでもよい。この文脈において、「非必須」アミノ酸残基は、ペプチド（例えば、アナログペプチド）の活性（例えば、アゴニスト活性）を廃止または実質的に減少させることなく、新規アミノ酸配列において変更、例えば欠失、置換、または誘導体化できる残基である。いくつかの実施形態において、ペプチドは、「必須」アミノ酸残基の1以上の修飾を含んでもよい。この文脈において、「必須」アミノ酸残基は、新規アミノ酸配列において変更、例えば欠失、置換、または誘導体化されると、参照ペプチドの活性が実質的に減少または廃止される残基である。必須アミノ酸残基が変更されるかかの実施形態において、修飾されたペプチドは、提供される方法で目的のアスパラギナーゼの活性を所有してもよい。置換、挿入、および欠失は、N末端またはC末端であっても、タンパク質の内部であってもよい。例として、タンパク質は、ペプチド分子全体に連続的な様式でまたは間隔をあけての両方で1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれを超える置換を含んでもよい。単独でまたは置換と組み合わせて、ペプチドは、連続した方法でまたはペプチド分子全体の空間に配置されてのいずれかで1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれを超える挿入を含んでもよい。ペプチドは、単独でまたは置換および／または挿入と組み合わせて、連続した方法でまたはペプチド分子全体の空間に配置されてのいずれかで1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれを超える欠失を含んでもよい。ペプチドは、単独でまたは置換、挿入、および／または欠失と組み合わせて、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれを超えるアミノ酸付加を含んでもよい。

【0028】

置換は、保存的アミノ酸置換を含む。「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が、類似の側鎖または物理化学的特性（例えば、静電、水素結合、等配電子、疎水性の特徴）を有するアミノ酸残基で置き換えられるものである。アミノ酸は、天然または非天然であってもよい。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは当該技術分野において既知である。これらのファミリーは、塩基性側鎖（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、メチオニン、システイン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン）、β分岐側鎖（例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン）および芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を有するアミノ酸を含む。置換は、非保存的変化をも含んでもよい。

【0029】

発現系

いくつかの場合において、本願明細書中の方法は、発現構築物からの組み換えアスパラギナーゼをPseudomonas宿主細胞中で発現させることを含む。いくつかの場合において、発現構築物はプラスミドである。いくつかの実施形態において、アスパラギナーゼ配列をコードするプラスミドは選択マーカーを含む、プラスミドを維持する宿主細胞は選択的な条件で成長する。いくつかの実施形態において、プラスミドは選択マーカーを含まない。いくつかの実施形態において、発現構築物は宿主細胞ゲノム中に組み込まれる。いくつかの実施形態において、発現構築物は、アスパラギナーゼをペリプラズムに誘導

する分泌シグナルに融合したアスパラギナーゼをコードする。いくつかの実施形態において、分泌シグナルは宿主細胞中で開裂される。いくつかの実施形態において、発現構築物は、アスパラギナーゼを細胞質に誘導する分泌シグナル無しにアスパラギナーゼをコードする。

【0030】

Pseudomonas 宿主株を含む宿主株において、本願発明の方法において有用な調節配列（例えば、プロモーター、分泌リーダー、およびリボソーム結合部位）を含む異種タンパク質を発現するための方法が、例えば、それぞれが参照によりその全体が本願明細書中に組み込まれる米国特許番号 7,618,799、「Bacterial leader sequences for increased expression」、米国特許番号 7,985,564、「Expression systems with Sec-system secretion」、ともに「Method for Rapidly Screening Microbial Hosts to Identify Certain Strains with Improved Yield and/or Quality in the Expression of Heterologous Proteins」なるタイトルの米国特許番号 9,394,571 および 9,580,719、米国特許番号 9,453,251、「Expression of Mammalian Proteins in *Pseudomonas fluorescens*」、米国特許番号 8,603,824、「Process for Improved Protein Expression by Strain Engineering」、および米国特許番号 8,530,171、「High Level Expression of Recombinant Toxin Proteins」において記載される。実施形態において、本願発明との関連で使用される分泌リーダーは、米国特許番号 7,618,799、7,985,564、9,394,571、9,580,719、9,453,251、8,603,824 および 8,530,171 のいずれかにおいて開示される分泌リーダーである。これらの特許は、異種タンパク質発現を増加させるために、フォールディングモジュレーターを過剰発現するように操作されているか、または異種プロテアーゼ変異が導入されている、本願明細書中の方法の実践において有用な細菌宿主株をも記載する。

【0031】

実施形態において、本願発明の方法において使用される発現株は、表 11 に列挙されるような実施例 3 に記載される任意の発現株である。実施形態において、本願発明の方法において使用される発現株は、表 11 に列挙されるような実施例 3 において記載される発現株の背景表現型を有する微生物発現株であり、ここで株は、表 11 に列挙されるようなそれぞれの分泌リーダーとの融合において組み換えアスパラギナーゼを発現する。実施形態において、本願発明の方法において使用される発現株は、発現株がフォールディングモジュレーターオーバーエクスプレッサーでないことを除いて、表 11 に列挙されるような実施例 3 において記載される発現株 STR57864、STR57865、STR57866、STR57860、STR57861、STR57862、STR57863 の背景表現型を有する微生物発現株である。実施形態において、本願発明の方法において使用される発現株は、マンニトール無しで培養される、表 11 に列挙されるような実施例 3 に記載される発現株 STR57864、STR57865、STR57866、STR57860、STR57861、STR57862、STR57863 の背景表現型を有する微生物発現株である。

【0032】

プロモーター

本願明細書中の方法に従って使用されるプロモーターは、構成的プロモーターまたは制御されたプロモーターであることができる。有用な制御されたプロモーターの共通の例は、*lac* プロモーター（すなわち、*lacZ* プロモーター）、特に米国特許番号 4,551,433 において記載される *tac* および *trc* プロモーターから DeBoer 並びに

P t a c 1 6、P t a c 1 7、P t a c I I、P l a c U V 5およびT 7 l a cプロモーターに由来するファミリーのものを含む。1つの実施形態において、プロモーターは宿主細胞生物に由来しない。特定の実施形態において、プロモーターはE . c o l i 生物由来である。

【0033】

誘導性プロモーター配列は、本願明細書中の方法に従ってアスパラギナーゼの発現を制御するために使用される。実施形態において、本願明細書中の方法において有用な誘導性プロモーターは、l a cプロモーター（すなわち、l a c Zプロモーター）、特に米国特許番号4, 551, 433において記載されるt a cおよびt r cプロモーターからD e B o e r並びにP t a c 1 6、P t a c 1 7、P t a c I I、P l a c U V 5およびT 7 l a cプロモーターまでに由来するファミリーのものを含む。1つの実施形態において、プロモーターは宿主細胞生物に由来しない。特定の実施形態において、プロモーターはE . c o l i 生物に由来する。いくつかの実施形態において、l a cプロモーターはプラスミドからのアスパラギナーゼの発現を制御するために使用される。l a cプロモーター誘導体またはファミリーメンバー、例えばt a cプロモーターの場合、インデューサーはI P T G（「イソプロピルチオガラクトシド」とも呼ばれるイソプロピル-β-D-1-チオガラクトピラノシド）である。特定の実施形態において、P s e u d o m o n a s 宿主細胞中でl a cプロモーターからのアスパラギナーゼの発現を誘導するために培養にI P T Gが添加される。

【0034】

本願明細書中の方法に従った発現系において有用な非l a c型プロモーターの共通の例は、例えば、表1に列挙されたものを含む。

【表1】

表1. 非 l a c プロモーターの例

プロモーター	インデューサー
P _R	高い温度
P _L	高い温度
P _m	アルキルまたはハロー安息香酸塩
P _u	アルキルまたはハロートルエン
P _{sal}	サリチル酸塩
P _{BAD}	アラビノース

【0035】

例えば、全て本願明細書中で参照により組み込まれるJ . S a n c h e z - R o m e r o & V . D e L o r e n z o, 1999, M a n u a l o f I n d u s t r i a l M i c r o b i o l o g y a n d B i o t e c h n o l o g y (A . D e m a i n & J . D a v i e s, e d s .) p p . 460-74 (A S M P r e s s, W a s h i n g t o n, D . C .) ; H . S c h w e i z e r, 2001, C u r r e n t O p i n i o n i n B i o t e c h n o l o g y, 12:439-445; R . S l a t e r & R . W i l l i a m s, 2000, M o l e c u l a r B i o l o g y a n d B i o t e c h n o l o g y (J . W a l k e r & R . R a p l e y, e d s .) p p . 125-54 (T h e R o y a l S o c i e t y o f C h e m i s t r y, C a m b r i d g e, U K) ; およびL - M . G u z m a n, e t a l ., 1995, J . B a c t e r i o l . 177(14): 4121-4130を参照のこと。選択された細菌宿主細胞に対して天然なプロモーター、例えば、P s e u d o m o n a s アントラニル酸塩または安息香酸オペロンプロモーター（P a n t、P b e n）のヌクレオチド配列を有するプロモーターは、標的ポリペプチドをコードする導入遺伝子の発現をコントロールするために使用されてもよい。同じ配列内であっても異なる配列内であっても、また同じ生物に由来しても異なる生物に由来しても、1を超えるプロモーターが別のものに共有結合しているタンデム

プロモーター、例えば P a n t - P b e n タンデムプロモーター（インタープロモーターハイブリッド）または P l a c - P l a c タンデムプロモーターを使用してもよい。

【0036】

制御されたプロモーターは、プロモーターが一部である遺伝子の転写をコントロールするためにプロモーター調節タンパク質を利用する。制御されたプロモーターが本願明細書中で使用される場合、対応するプロモーター調節タンパク質も、本願明細書中の方法に従う発現系の一部であるだろう。プロモーター調節タンパク質の例は以下を含む：アクチベータータンパク質、例えば大腸菌カタボライトアクチベータータンパク質、M a l T タンパク質；A r a C ファミリー転写アクチベーター；リプレッサータンパク質、例えば E . c o l i L a c I タンパク質；および、二重機能調節タンパク質、例えば、E . c o l i N a g C タンパク質。多くの制御されたプロモーター／プロモーター調節タンパク質ペアは当該技術分野において既知である。1つの実施形態において、目的の標的タンパク質および異種タンパク質の発現構築物は、同じ調節要素のコントロール下にある。

【0037】

プロモーター調節タンパク質は、エフェクター化合物、すなわち、調節タンパク質と可逆的または不可逆的に相互作用して、該タンパク質が放出またはプロモーターのコントロール下にある遺伝子の少なくとも1つのDNA転写調節領域に結合するのを可能にし、それにより該遺伝子の転写の開始においてトランスクリプターゼ酵素の作用を許可またはブロックする化合物と相互作用する。エフェクター化合物はインデューサーまたはコリプレッサーのいずれかに分類され、これらの化合物は天然エフェクター化合物および無償性インデューサー化合物を含む。多くの制御されたプロモーター／プロモーター調節タンパク質／エフェクター化合物トリオは当該技術分野において既知である。いくつかの場合において、エフェクター化合物は細胞培養または発酵全体で使用されるが、制御されたプロモーターが使用される1つの実施形態において、宿主細胞バイオマスの所望の量または密度の成長後、適するエフェクター化合物は培養に添加され、目的のタンパク質またはポリペプチドをコードする所望の遺伝子の発現を直接的にまたは直接的に結果として生じる。

【0038】

l a c ファミリープロモーターが利用される実施形態において、l a c I 遺伝子は時にシステム中に存在する。通常構成的に発現される遺伝子である l a c I 遺伝子は、L a c ファミリープロモーターの l a c オペレーターに結合する L a c リプレッサータンパク質である L a c I タンパク質をコードする。ゆえに、l a c ファミリープロモーターが利用されると、l a c I 遺伝子も時に発現系中に含まれて発現される。

【0039】

P s e u d o m o n a s において有用なプロモーターシステムは、文献、例えば上記でも参照される米国特許出願公開番号 2 0 0 8 / 0 2 6 9 0 7 0 に記載される。

【0040】

他の調節要素

実施形態において、可溶性組み換えアスパラギナーゼは、製造中に細胞の細胞質またはペリプラズムのいずれかに存在する。タンパク質、例えばアスパラギナーゼの標的化に有用な分泌リーダーは、本願明細書中の他の場所で、および上記で参照される米国特許出願公開番号 2 0 0 8 / 0 1 9 3 9 7 4、米国特許出願公開番号 2 0 0 6 / 0 0 0 8 8 7 7 および米国特許出願 S e r . N o . 1 2 / 6 1 0 , 2 0 7 に記載される。いくつかの実施形態において、アスパラギナーゼを P s e u d o m o n a s 細胞のペリプラズムに輸送する分泌リーダーに融合したアスパラギナーゼをコードする発現構築物が提供される。いくつかの実施形態において、分泌リーダー分泌リーダーはアスパラギナーゼタンパク質から開裂される。いくつかの実施形態において、分泌リーダーは、可溶性アスパラギナーゼの製造を容易にする。

【0041】

本明細書中の方法の実践において有用な発現構築物は、タンパク質コード配列に加えて

、それに作動可能に連結された以下の調節要素：プロモーター、リボソーム結合部位（RBS）、転写ターミネーター、および翻訳スタートおよびストップシグナルを含む。

【0042】

実施形態において、発現ベクターは、最適ナリボソーム結合配列を含有する。目的のタンパク質の翻訳開始領域を変更することにより翻訳強度を調整することは、あまりにも速い翻訳速度により主に封入体として蓄積する異種細胞質の製造を改善するために使用できる。異種タンパク質の細菌細胞のペリプラズム空間への分泌は、翻訳速度がタンパク質分泌速度と同期するように、タンパク質翻訳レベルを最大化するのではなく最適化することにより増強されることもできる。

【0043】

翻訳開始領域は、リボソーム結合部位（RBS）のすぐ上流から開始コドンのおよそ20ヌクレオチド下流まで延びる配列として定義されている（参照によりその全体が本願明細書中に組み込まれるMcCarthy et al. (1990) Trends in Genetics 6:78-85）。原核生物において、代替RBS配列は、ShineおよびDalgarno (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71:1342-1346, 1974)により記載されるカノニカル、またはコンセンサス、RBS配列（AGGAGG；配列番号45）を使用して翻訳レベルに関して減少する翻訳速度を提供することにより、異種タンパク質の翻訳レベルを最適化するために利用できる。「翻訳速度」または「翻訳効率」により、細胞内のタンパク質へのmRNA翻訳率が意図される。ほとんどの原核生物において、Shine-Dalgarno配列は、16SリボソームRNAのピリミジンに富む領域との相互作用を通じて、mRNA上の開始コドンに対して30Sリボソーム成分の結合および配置を支援する。（本願明細書中でShine-Dalgarno配列とも呼ばれる）RBSは、転写の開始から下流および翻訳の開始から上流、典型的に開始コドンの4から14ヌクレオチド上流、より典型的に開始コドンの8から10ヌクレオチド上流のmRNA上に位置する。翻訳におけるRBS配列の役割のため、翻訳の効率およびRBS配列の効率（または強度）の間には直接的な関係がある。

【0044】

いくつかの実施形態において、RBS配列の修飾は、異種タンパク質の翻訳速度の減少を結果として生じる。翻訳速度のこの減少は、製造されるタンパク質のグラムあたり、または宿主タンパク質のグラムあたりの適切に処理されるタンパク質またはポリペプチドのレベルの増加に対応してもよい。減少した翻訳速度は、組み換え1グラムあたり、または宿主細胞タンパク質1グラムあたりの、製造される回復可能なタンパク質またはポリペプチドの増加したレベルとも相関することができ。減少した翻訳速度は、増加した発現、増加した活性、増加した溶解性、または増加した転座（例えば、ペリプラズムの区画へまたは細胞外空間に分泌される）のいずれの組み合わせにも対応できる。この実施形態において、「増加した」なる語は、目的のタンパク質またはポリペプチドが同じ条件、または実質的に同じ条件下で発現される時の、製造される、適切に処理される、可溶性の、および／または回復可能なタンパク質またはポリペプチドのレベルに対し、ここでポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、カノニカルRBS配列を含む。同じように、「減少した」なる語は、目的のタンパク質またはポリペプチドの翻訳速度に対し、ここで、タンパク質またはポリペプチドをコードする遺伝子は、カノニカルRBS配列を含む。翻訳速度は、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、少なくとも約75%またはそれを超えて、または少なくとも約2倍、約3倍、約4倍、約5倍、約6倍、約7倍またはそれを超えて減少できる。

【0045】

いくつかの実施形態において、本願明細書中で記載されたRBS配列変異体は、高い、中程度、または低い翻訳効率を結果として生じるとして分類できる。1つの実施形態において、配列は、カノニカルRBS配列の翻訳活性と比較して、翻訳活性のレベルに従って

10

20

30

40

50

ランク付けされる。高いRBS配列は、カノニカル配列の活性の約60%から約100%を有する。中程度のRBS配列は、カノニカル配列の活性の約40%から約60%を有する。低いRBS配列は、カノニカル配列の活性の約40%未満を有する。

【0046】

RBS配列の例が表2に示される。レポーター遺伝子としてCOP-GFPを使用して翻訳強度について配列がスクリーニングされ、コンセンサスRBS蛍光のパーセンテージに従ってランク付けされた。各RBS変異体は、3つの一般的な蛍光ランクの1つに配置された：高い（「Hi」-100%コンセンサスRBS蛍光）、中程度（「Med」-46-51% of コンセンサスRBS蛍光）、および低い（「Lo」-16-29%コンセンサスRBS蛍光）。

【表2】

表2.RBS配列			
RBS	配列	強度	配列番号
コンセンサス	AGGAGG	高い	45
RBS2	GGAGCG	中程度	46
RBS34	GGAGCG	中程度	47
RBS41	AGGAGT	中程度	48
RBS43	GGAGTG	中程度	49
RBS48	GAGTAA	低い	50
RBS1	AGAGAG	低い	51
RBS35	AAGGCA	低い	52
RBS49	CCGAAC	低い	53

【0047】

有用なRBSは、例えば米国特許出願公開番号2008/0269070および米国特許出願、Ser. No. 12/610,207に従って、発現系中で宿主細胞として有用ないずれかの種から得られる。多くの具体的で多様なコンセンサスRBS、例えば、D. Frishman et al., Gene 234 (2): 257-65 (8 Jul. 1999); およびB. E. Suzek et al., Bioinformatics 17 (12): 1123-30 (December 2001)に記載され、参照されるものは既知である。加えて、天然または合成いずれかのRBS、例えばEP 0207459 (合成RBS); O. Ikehata et al., Eur. J. Biochem. 181 (3): 563-70 (1989)に記載されるものは使用してもよい。さらに、方法、パラメーター、および翻訳と転写要素、および本願明細書中の方法において有用な他の要素の例は、例えば、米国特許番号5,055,294からGilroyおよび米国特許番号5,128,130からGilroy et al.; 米国特許番号5,281,532からRammler et al.; 米国特許番号4,695,455および4,861,595からBarnes et al.; 米国特許番号4,755,465からGray et al.; および米国特許番号5,169,760からWilcoxに記載される。

【0048】

宿主株

Pseudomonadsを含む細菌宿主、および密接に関連する細菌生物は、本願明細書中の方法の実践における使用のために検討される。特定の実施形態において、Pseudomonad宿主細胞はPseudomonas fluorescensである。いくつかの場合において、宿主細胞はE. coli細胞である。

【0049】

本願明細書中の方法の実践において有用な宿主細胞および構築物は、当該技術分野において既知の試薬および方法を用いて同定または作成され、文献、例えば、参照によりその

全体が本願明細書中に組み込まれる米国特許出願公開番号2009/0325230、「タンパク質発現系」に記載される。この公開は、染色体 *lacI* 遺伝子インサートを含む栄養要求性の *Pseudomonas fluorescens* 宿主細胞中への核酸構築物の導入による組み換えポリペプチドの製造を記載する。核酸構築物は、宿主細胞中の核酸の発現を誘導することができるプロモーターに作動可能に連結された組み換えポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含み、また栄養要求性選択マーカーをコードするヌクレオチド配列も含む。栄養要求性選択マーカーは、栄養要求性宿主細胞に原栄養性を回復させるポリペプチドである。実施形態において、細胞はプロリン、ウラシル、またはそれらの組み合わせに対して栄養要求性である。実施形態において、宿主細胞はMB101 (ATCC 寄託 PTA-7841) に由来する。両方が本願明細書中で参照によりその全体が組み込まれる米国特許出願公開番号2009/0325230、「Protein Expression Systems」、および Schneider, et al., 2005、「Auxotrophic markers *pyrF* and *proC*, in some cases, replace antibiotic markers on protein production plasmids in high-cell-density *Pseudomonas fluorescens* fermentation」、Biotechnol. Progress 21 (2): 343-8 は、株MB101中の *pyrF* 遺伝子を欠失させることにより構築されたウラシルに対して栄養要求性の製造宿主株を記載する。*pyrF* 遺伝子は、株MB214 (ATCC 寄託 PTA-7840) からクローン化され、*pyrF* 欠失を補完して原栄養性を回復するプラスミドを生成した。特定の実施形態において、*P. fluorescens* 宿主細胞中の *pyrF-proC* 二重栄養要求性選択マーカーシステムが使用される。記載される *pyrF* 欠失製造宿主株は、本願明細書中の方法の実践において有用であるとして本願明細書中で記載されるものを含む他の所望のゲノム変化を導入するための背景としてしばしば使用される。

【0050】

実施形態において、本願発明の方法に有用な宿主細胞は、少なくとも1つのプロテアーゼの発現を欠損している、少なくとも1つのフォールディングモジュレーターを過剰発現する、またはその両方である。実施形態において、宿主細胞はプロテアーゼの発現を欠損せず、フォールディングモジュレーターを過剰発現せず、したがってプロテアーゼおよびフォールディングモジュレーター発現に関して野生型である。これらの実施形態のいずれにおいても、加えて、宿主細胞は天然L-アスパラギナーゼを欠損している。実施形態において、天然L-アスパラギナーゼの欠損は、当該技術分野において既知の任意の適切な方法を使用して、天然L-アスパラギナーゼ遺伝子を欠失または他の方法で不活性化することにより生成される。実施形態において、宿主細胞は、天然I型L-アスパラギナーゼ、天然II型L-アスパラギナーゼ、またはその両方を欠損している。実施形態において、宿主細胞は、プロテアーゼおよびフォールディングモジュレーター発現に関して野生型であり、天然I型L-アスパラギナーゼおよびII型L-アスパラギナーゼを欠損している。例えば、本願発明の方法において有用な宿主細胞は、既知の方法を使用して、MB101から当業者により生成できる。実施形態において、宿主細胞は、MB101中のI型L-アスパラギナーゼ遺伝子、II型L-アスパラギナーゼ遺伝子、またはその両方を欠失または他の方法で不活性化することにより生成される。

【0051】

本願発明の方法において有用な製造宿主株は、当該技術分野において既知のおよび文献に記載の多くの適する方法のいずれかを使用して、例えば、*pyrF* 遺伝子、および／またはI型L-アスパラギナーゼ遺伝子、および／またはII型L-アスパラギナーゼ遺伝子を不活性化することにより、公的に入手可能な宿主細胞、例えば、*P. fluorescens* MB101を使用して生成できることは、当業者には理解されるだろう。原栄養性回復プラスミドは、株、例えば株MB214からの *pyrF* 遺伝子を保有するプラスミドに、当該技術分野において既知のおよび文献に記載される多くの適する方法のいずれ

かを使用して形質転換できることもまた理解される。加えて、かかる株において、当該技術分野で周知の方法を使用して、プロテアーゼは不活性化され、フォールディングモジュレーター過剰発現構築物は導入することができる。

【0052】

実施形態において、宿主細胞は、*Pseudomonadales*目である。宿主細胞が*Pseudomonadales*目である場合、それは*Pseudomonas*属を含むファミリー*Pseudomonadaceae*のメンバーであってもよい。ガンマプロテオバクテリア宿主は、*Escherichiacoli*種のメンバーおよび*Pseudomonas fluorescens*種のメンバーを含む。*Pseudomonadales*目、ファミリー*Pseudomonadaceae*、または*Pseudomonas*属の宿主細胞は、当業者により同定可能であり、文献に記載される（例えば、*Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*（オンライン公開、2015））。

他の*Pseudomonas*生物も有用であってもよい。*Pseudomonads*および密接に関連する種は、*Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*（オンライン公開、2015）に記載されるファミリーおよび／または属に属するプロテオバクテリアの群を含むグラム陰性プロテオバクテリア亜群1を含む。表3は、生物のこれらのファミリーおよび属を示す。

【表3】

表 3. (<i>Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria</i> (オンライン公開、2015)における)パート「Gram-Negative Aerobic Rods and Cocci」に列挙されるファミリーおよび属	
ファミリーI. <i>Pseudomonaceae</i>	<i>Gluconobacter</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Xanthomonas</i> <i>Zoogloea</i>
ファミリーII. <i>Azotobacteraceae</i>	<i>Azomonas</i> <i>Azotobacter</i> <i>Beijerinckia</i> <i>Derxia</i>
ファミリーIII. <i>Rhizobiaceae</i>	<i>Agrobacterium</i> <i>Rhizobium</i>
ファミリーIV. <i>Methylomonadaceae</i>	<i>Methylococcus</i> <i>Methylomonas</i>
ファミリーV. <i>Halobacteriaceae</i>	<i>Halobacterium</i> <i>Halococcus</i>
他の属	<i>Acetobacter</i> <i>Alcaligenes</i> <i>Bordetella</i> <i>Brucella</i> <i>Francisella</i> <i>Thermus</i>

【0053】

*Pseudomonas*および密接に関連する細菌は、一般に「Gram (−) プロテオバクテリア亜群1」または「グラム陰性好気性桿菌および球菌」(*Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (オンライン公開、2015))として定義される群の一部である。*Pseudomonas*宿主株は、文献、例えば上記で引用される米国特許出願公開番号2006/00

40352に記載される。

【0054】

「グラム陰性プロテオバクテリア亜群1」はまた、分類において使用される基準に従ってこの見出しに分類されるであろうプロテオバクテリアを含む。見出しはまた、*Acidovorax*、*Brevundimonas*、*Burkholderia*、*Hydrogenophaga*、*Oceanimonas*、*Ralstonia*、および *Stenotrophomonas* 属、*Xanthomonas* 属に属する生物の再群化により生み出される *Sphingomonas* 属（およびそれ由来の *Blastomonas* 属）、*Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*（オンライン公開、2015）において定義される *Acetobacter* に属する生物を再群化することにより生み出された *Acidomonas* 属などの以前にこのセクションに分類されていたが、もはや分類されていない群を含む。加えて宿主は、それぞれ *Alteromonas haloplankti*、*Alteromonas nigrifaciens*、および *Alteromonas putrefaciens* として分類される *Pseudomonas*、*Pseudomonas enalia* (ATCC 14393)、*Pseudomonas nigrifaciens* (ATCC 19375)、および *Pseudomonas putrefaciens* (ATCC 8071) 属からの細胞を含む。同じように、例えば *Pseudomonas acidovorans* (ATCC 15668) および *Pseudomonas testosteronei* (ATCC 11996) は、それぞれ *Comamonas acidovorans* および *Comamonas testosteronei* として再分類されており；*Pseudomonas nigrifaciens* (ATCC 19375) および *Pseudomonas piscicida* (ATCC 15057) は、それぞれ *Pseudoalteromonas nigrifaciens* および *Pseudoalteromonas piscicida* として再分類されている。「グラム陰性プロテオバクテリア亜群1」はまた、ファミリー：*Pseudomonadaceae*、（今はしばしば *Pseudomonadaceae* の「*Azotobacter* 群」なる異名により呼ばれる）*Azotobacteraceae*、*Rhizobiaceae*、および（今はしばしば「*Methylococcaceae*」なる異名により呼ばれる）*Methylobacteriaceae* のいずれかに属するものとして分類されたプロテオバクテリアも含む。結果として、本願明細書中で他の方法で記載された属に加えて、「グラム陰性プロテオバクテリア亜群1」に含まれるプロテオバクテリア1属は、さらに以下を含む：1) *Azorhizophilus* 属のアゾトバクター群細菌；2) 細胞ビブリオ、*Oligella*、および *Teredinibacter* 属の *Pseudomonadaceae* ファミリー細菌；3) *Chelatobacter*、*Ensifer*、（「*Candidatus Liberibacter*」とも呼ばれる）*Liberibacter*、および *Sinorhizobium* 属の *Rhizobiaceae* ファミリー細菌；4) *Methylobacter*、*Methylocaldum*、*Methylobacterium*、*Methylosarcina*、および *Methylosphaera* 属の *Methylococcaceae* ファミリー細菌。

【0055】

いくつかの場合において、宿主細胞は、「グラム陰性プロテオバクテリア亜群16」から選択される。「グラム陰性プロテオバクテリア亜群16」は、（括弧中に示される例示的な株の ATCC または他の寄託番号を有する）以下の *Pseudomonas* 種のプロテオバクテリアの群として定義される：*Pseudomonas abietaniphila* (ATCC 700689)；*Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145)；*Pseudomonas alcaligenes* (ATCC 14909)；*Pseudomonas anguilliseptica* (ATCC 33660)；*Pseudomonas citronellolis* (ATCC 13674)；*Pseudomonas flavescens* (ATCC 5

10

20

30

40

50

1555) ; *Pseudomonas mendocina* (ATCC 25411) ; *Pseudomonas nitroreducens* (ATCC 33634) ; *Pseudomonas oleovorans* (ATCC 8062) ; *Pseudomonas pseudoalcaligenes* (ATCC 17440) ; *Pseudomonas resinovorans* (ATCC 14235) ; *Pseudomonas straminea* (ATCC 33636) ; *Pseudomonas agarici* (ATCC 25941) ; *Pseudomonas alcaliphila* ; *Pseudomonas alginovora* ; *Pseudomonas andersonii* ; *Pseudomonas asplenii* (ATCC 23835) ; *Pseudomonas azelaica* (ATCC 27162) ; *Pseudomonas beyerinckii* (ATCC 19372) ; *Pseudomonas borealis* ; *Pseudomonas boreopolis* (ATCC 33662) ; *Pseudomonas brassicacearum* ; *Pseudomonas butanovora* (ATCC 43655) ; *Pseudomonas cellulosa* (ATCC 55703) ; *Pseudomonas aurantiaca* (ATCC 33663) ; *Pseudomonas chlororaphis* (ATCC 9446, ATCC 13985, ATCC 17418, ATCC 17461) ; *Pseudomonas fragi* (ATCC 4973) ; *Pseudomonas lundensis* (ATCC 49968) ; *Pseudomonas taetrolens* (ATCC 4683) ; *Pseudomonas cissicola* (ATCC 33616) ; *Pseudomonas coronafaciens* ; *Pseudomonas diterpeniphila* ; *Pseudomonas elongata* (ATCC 10144) ; *Pseudomonas flectens* (ATCC 12775) ; *Pseudomonas azotoformans* ; *Pseudomonas brenneri* ; *Pseudomonas cedrella* ; *Pseudomonas corrugata* (ATCC 29736) ; *Pseudomonas extremorientalis* ; *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 35858) ; *Pseudomonas gessardii* ; *Pseudomonas libanensis* ; *Pseudomonas mandelii* (ATCC 700871) ; *Pseudomonas marginalis* (ATCC 10844) ; *Pseudomonas migulae* ; *Pseudomonas mucidolens* (ATCC 4685) ; *Pseudomonas orientalis* ; *Pseudomonas rhodesiae* ; *Pseudomonas synxantha* (ATCC 9890) ; *Pseudomonas tolaasii* (ATCC 33618) ; *Pseudomonas veronii* (ATCC 700474) ; *Pseudomonas frederiksbergensis* ; *Pseudomonas geniculata* (ATCC 19374) ; *Pseudomonas gingeri* ; *Pseudomonas graminis* ; *Pseudomonas grimontii* ; *Pseudomonas halodenitrificans* ; *Pseudomonas halophila* ; *Pseudomonas hibiscicola* (ATCC 19867) ; *Pseudomonas huttiensis* (ATCC 14670) ; *Pseudomonas hydrogenovora* ; *Pseudomonas jessenii* (ATCC 700870) ; *Pseudomonas kilonensis* ; *Pseudomonas lanceolata* (ATCC 14669) ; *Pseudomonas lini* ; *Pseudomonas marginata* (ATCC 25417) ; *Pseudomonas mephitica* (ATCC 33665) ; *Pseudomonas denitrificans* (ATCC 19244) ; *Pseudomonas pertucinogena* (ATCC 190) ; *Pseudomonas*

10

20

30

40

50

pictorum (ATCC 23328); *Pseudomonas psychrophila*; *Pseudomonas filva* (ATCC 31418); *Pseudomonas monteilii* (ATCC 700476); *Pseudomonas mosselii*; *Pseudomonas oryzihabitans* (ATCC 43272); *Pseudomonas plecoglossicida* (ATCC 700383); *Pseudomonas putida* (ATCC 12633); *Pseudomonas reactans*; *Pseudomonas spinosa* (ATCC 14606); *Pseudomonas balearica*; *Pseudomonas luteola* (ATCC 43273); *Pseudomonas stutzeri* (ATCC 17588); *Pseudomonas amygdali* (ATCC 33614); *Pseudomonas avellanae* (ATCC 700331); *Pseudomonas carica papayae* (ATCC 33615); *Pseudomonas cichorii* (ATCC 10857); *Pseudomonas ficuserectae* (ATCC 35104); *Pseudomonas fuscovaginae*; *Pseudomonas meliae* (ATCC 33050); *Pseudomonas syringae* (ATCC 19310); *Pseudomonas viridiflava* (ATCC 13223); *Pseudomonas thermocarboxydovorans* (ATCC 35961); *Pseudomonas thermotolerans*; *Pseudomonas thivervalensis*; *Pseudomonas vancouverensis* (ATCC 700688); *Pseudomonas wisconsinensis*; および *Pseudomonas xiamenensis*。1つの実施形態において、アスパラギナーゼの発現のための宿主細胞は、*Pseudomonas fluorescens*である。

【0056】

いくつかの場合において、宿主細胞は、「グラム陰性プロテオバクテリア亜群17」から選択される。「グラム陰性プロテオバクテリア亜群17」は、例えば以下の*Pseudomonas* 種に属するものを含む「*fluorescent Pseudomonads*」として当該技術分野において既知のプロテオバクテリアの群として定義される：*Pseudomonas azotoformans*; *Pseudomonas brenneri*; *Pseudomonas cedrella*; *Pseudomonas cedrina*; *Pseudomonas corrugata*; *Pseudomonas extremorientalis*; *Pseudomonas fluorescens*; *Pseudomonas gessardii*; *Pseudomonas libanensis*; *Pseudomonas mandelii*; *Pseudomonas marginalis*; *Pseudomonas migulae*; *Pseudomonas mucidolens*; *Pseudomonas orientalis*; *Pseudomonas rhodesiae*; *Pseudomonas synxantha*; *Pseudomonas tolaasii*; および *Pseudomonas veronii*。

【0057】

プロテアーゼ

1つの実施形態において、本願明細書中で提供される方法は、1以上のプロテアーゼ遺伝子中の1以上の変異（例えば、部分的または完全な欠失）を含む*Pseudomonas* 宿主細胞を使用して、組み換えアスパラギナーゼタンパク質を製造することを含む。いくつかの実施形態において、プロテアーゼ遺伝子中の変異は、組み換えアスパラギナーゼタンパク質の生成を促進する。

【0058】

例示的な標的プロテアーゼ遺伝子は、以下のように分類されるそれらのプロテアーゼを含む：アミノペプチダーゼ；ジペプチダーゼ；ジペプチジルペプチダーゼおよびトリペプ

チジルペプチダーゼ；ペプチジルジペプチダーゼ；セリン型カルボキシペプチダーゼ；メ
 タロカルボキシペプチダーゼ；システイン型カルボキシペプチダーゼ；オメガペプチダー
 ゼ；セリンプロテイナーゼ；システインプロテイナーゼ；アスパラギン酸プロテイナーゼ
 ；メタロプロテイナーゼ；または未知のメカニズムのプロテイナーゼ。

【0059】

アミノペプチダーゼは、サイトゾルアミノペプチダーゼ（ロイシルアミノペプチダーゼ
 ）、膜アラニルアミノペプチダーゼ、シスチニルアミノペプチダーゼ、トリペプチドアミ
 ノペプチダーゼ、プロリルアミノペプチダーゼ、アルギニルアミノペプチダーゼ、グルタ
 ミルアミノペプチダーゼ、x-プロアミノペプチダーゼ、細菌性ロイシルアミノペプチダ
 ーゼ、好熱性アミノペプチダーゼ、クロストリジウムアミノペプチダーゼ、サイトゾルア
 ラニルアミノペプチダーゼ、リシルアミノペプチダーゼ、x-trpアミノペプチダーゼ、
 トリプトファニルアミノペプチダーゼ、メチオニルアミノペプチダーゼ、d-立体特異
 的アミノペプチダーゼ、アミノペプチダーゼeyを含む。ジペプチダーゼは、x-his
 ジペプチダーゼ、x-argジペプチダーゼ、x-methyl-hisジペプチダーゼ、
 cys-glyジペプチダーゼ、glu-gluジペプチダーゼ、プロ-xジペプチダ
 ーゼ、x-プロジペプチダーゼ、met-xジペプチダーゼ、非立体特異的ジペプチダー
 ゼ、サイトゾル非特異的ジペプチダーゼ、膜ジペプチダーゼ、ベターala-hisジ
 ペプチダーゼを含む。ジペプチジルペプチダーゼおよびトリペプチジルペプチダーゼは、
 ジペプチジルペプチダーゼi、ジペプチジルペプチダーゼii、ジペプチジルペプチダー
 ゼiii、ジペプチジルペプチダーゼiv、ジペプチジルジペプチダーゼ、トリペプチジ
 ルペプチダーゼI、トリペプチジルペプチダーゼIIを含む。ペプチジルジペプチダーゼ
 は、ペプチジルジペプチダーゼaおよびペプチジルジペプチダーゼbを含む。セリン型カル
 ボキシペプチダーゼは、リソソームプロ-xカルボキシペプチダーゼ、セリン型D-a
 la-D-a laカルボキシペプチダーゼ、カルボキシペプチダーゼC、カルボキシペプ
 チダーゼDを含む。メタロカルボキシペプチダーゼは、カルボキシペプチダーゼa、カル
 ボキシペプチダーゼB、リジン（アルギニン）カルボキシペプチダーゼ、gly-Xカル
 ボキシペプチダーゼ、アラニンカルボキシペプチダーゼ、ムラモイルペンタペプチドカル
 ボキシペプチダーゼ、カルボキシペプチダーゼh、グルタミン酸カルボキシペプチダーゼ
 、カルボキシペプチダーゼM、ムラモイルテトラペプチドカルボキシペプチダーゼ、z i
 n c d-a la-d-a laカルボキシペプチダーゼ、カルボキシペプチダーゼA2、
 膜プロ-xカルボキシペプチダーゼ、チューブリニル-tyrカルボキシペプチダーゼ、
 カルボキシペプチダーゼtを含む。オメガペプチダーゼは、アシルアミノアシルーペプチ
 ダーゼ、ペプチジル-グリシンアミダーゼ、ピログルタミル-ペプチダーゼI、ベター
 アスパルチル-ペプチダーゼ、ピログルタミル-ペプチダーゼII、n-ホルミルメチオ
 ニル-ペプチダーゼ、プテロイルポリー [ガンマ] -グルタミン酸カルボキシペプチダー
 ゼ、ガンマー-gly-Xカルボキシペプチダーゼ、アシルムラモイル-a laペプチダー
 ゼを含む。セリンプロテイナーゼは、キモトリプシン、キモトリプシンc、メトリジン、
 トリプシン、トロンビン、凝固因子Xa、プラスミン、エンテロペプチダーゼ、アクロシ
 ン、アルファー溶菌プロテアーゼ、グルタミル、エンドペプチダーゼ、カテプシンG、凝
 固因子v i i a、凝固因子i x a、ククミシ、プロリルオリゴペプチダーゼ、凝固因子x
 i a、ブラキウリン、血漿カリクレイン、組織カリクレイン、腓エラスターゼ、白血球エ
 ラスターゼ、凝固因子x i i a、キマーゼ、補体成分c 1 r 5 5、補体成分c 1 s 5 5、
 古典的補体経路c 3 / c 5変換酵素、補体因子I、補体因子D、代替補体経路c 3 / c 5
 変換酵素、セレピン、ヒポデルミンC、リシルエンドペプチダーゼ、エンドペプチダー
 ゼ1 a、ガンマーレニ、ベノピンa b、ロイシルエンドペプチダーゼ、トリプターゼ、ス
 クテラリン、ケキシン、サブチリシン、オリジン、エンドペプチダーゼk、サーモマイコ
 リン、テルミターゼ、エンドペプチダーゼSO、T-プラスミノーゲンアクチベーター、
 プロテインC、腓エンドペプチダーゼE、腓エラスターゼi i、IGA特異的セリンエン
 ドペプチダーゼ、U-プラスミノーゲン、アクチベーター、ベノピンA、フリン、ミエロ
 プラスチン、セメノゲラーゼ、グランザイムAまたは細胞毒性Tリンパ球プロテイナーゼ

10

20

30

40

50

1、グランザイムBまたは細胞毒性Tリンパ球プロテイナーゼ2、ストレプトグリシンA、トレプトグリシンB、グルタミルエンドペプチダーゼII、オリゴペプチダーゼB、リムルス凝固因子c、リムルス凝固因子、リムルス凝固酵素、オムブチン、リプレッサーlexa、細菌リーダーペプチダーゼI、トガビリン、フラビリンを含む。システインプロテイナーゼは、カテプシンB、パパイン、フィシン、キモパパイン、アスクレパイン、クロストリパイン、ストレプトパイン、アクチニド、カテプシン1、カテプシンH、カルパイン、カテプシント、グリシル、エンドペプチダーゼ、癌プロコアグラント、カテプシンS、ピコルナイン3C、ピコルナイン2A、カリカイン、アナナイン、ステムプロメライン、フルートプロメライン、レグマイン、ヒストリセイン、インターロイキン1-ベータ変換酵素を含む。アスパラギン酸プロテイナーゼは、ペプシンA、ペプシンB、ガストリクシン、キモシン、カテプシンD、ネオペンテシン、レニン、レトロペプシン、プロ-オピオメラノコルチン変換酵素、アスペルギロペプシンI、アスペルギロペプシンII、ペニシロペプシン、リゾプスベプシン、エンドチアペプシン、ムコロペプシン、カンジダペプシン、サッカロペプシン、ロドトルラペプシン、フィサロペプシン、アクロシリンドロペプシン、ポリポロペプシン、ピクノポロペプシン、シタリドペプシンa、シタリドペプシンb、キサントモナペプシン、カテプシンe、バリアペプシン、細菌リーダーペプチダーゼI、シュードモナペプシン、プラスメプシンを含む。メタロプロテイナーゼは、アトロリジンa、微生物コラゲナーゼ、ロイコリシン、間質性コラゲナーゼ、ネプリライシン、エンベリシン、iga特異的メタロエンドペプチダーゼ、プロコラーゲンN-エンドペプチダーゼ、チメットオリゴペプチダーゼ、ニューロリシン、ストロメライン1、メプリンA、プロコラーゲンC-エンドペプチダーゼ、ペプチジル-lysメタロエンドペプチダーゼ、アスタシン、ストロメライン2、マトリリシンゼラチナーゼ、エアロモノリシン、プソイドリシン、サーモリシン、バシロリシン、オーレオリシン、コッコリシン、ミコリシン、ベーター溶解メタロエンドペプチダーゼ、ペプチジル-aspmメタロエンドペプチダーゼ、好中球コラゲナーゼ、ゼラチナーゼB、リーシュマノリシン、サッカロリシン、オートリシン、ジュウテロリシン、セラリシン、アトロリシンB、アトロリシンC、アトロキサナーゼ、アトロリシンE、アトロリシンF、アダマリシン、ホリリシン、ルベリシン、ボトロパシン、ボロリシン、オフィオリシン、トリメレリシンI、トリメトリシンII、ムコロリシン、ピトリリシン、インシュリシン、O-シアロ糖タンパク質エンドペプチダーゼ、ルセリシン、ミトコンドリア媒介ペプチダーゼ、ダクチリシン、ナルジリシン、マグノリシン、メプリンB、ミトコンドリア処理ペプチダーゼ、マクロファージエラスターゼ、コリオリシン、トキシリシンを含む。未知のメカニズムのプロテイナーゼは、サーモプシンおよび多触媒エンドペプチダーゼ複合体を含む。

【0060】

特定のプロテアーゼは、プロテアーゼおよびシャペロン様活性の両方を有する。これらのプロテアーゼがタンパク質収量および／または質に悪影響を及ぼしている場合、それらのプロテアーゼ活性を特異的に欠失させることはしばしば有用であり、それらのシャペロン活性がタンパク質収量および／または質にプラスの影響を与えてもよい場合、それらは過剰発現される。これらのプロテアーゼは、Hsp100 (Clp/Hsl) ファミリーメンバーRXF04587.1 (clpA)、RXF08347.1、RXF04654.2 (clpX)、RXF04663.1、RXF01957.2 (hslU)、RXF01961.2 (hslV)；ペプチジル-プロリルシス-トランスイソメラーゼファミリーメンバーRXF05345.2 (ppiB)；メタロペプチダーゼM20ファミリーメンバーRXF04892.1 (アミノヒドロラーゼ)；メタロペプチダーゼM24ファミリーメンバーRXF04693.1 (メチオニンアミノペプチダーゼ) およびRXF03364.1 (メチオニンアミノペプチダーゼ)；およびセリンペプチダーゼS26シグナルペプチダーゼIファミリーメンバーRXF01181.1 (シグナルペプチダーゼ)を含むが、これらに限定されない。

【0061】

実施形態において、アスパラギナーゼ、例えばE.coliアスパラギナーゼII型を

発現するのに有用な宿主株は、本願発明の方法において、（例えば、欠失、部分的欠失、またはノックアウトから結果として生じる）プロテアーゼ欠損または不活性化を有するおよび／または、例えばプラスミドまたは細菌染色体からのフォールディングモジュレーターを過剰発現する *Pseudomonas* 宿主株、例えば、*P. fluorescens* である。実施形態において、宿主株は、*Lon*、*HslUV*、*DegP1*、*DegP2*、*Prc*、*AprA*、*DegP2 S219A*、*Prc1*、および *AprA* から選択された少なくとも1つのプロテアーゼを欠損している。実施形態において、宿主株は、*LepB*、*Tig*、および *DsbAC-Skp* から選択されたフォールディングモジュレーターを過剰発現する（つまり、*DsbA*、*DsbC*、および *Skp* の組み合わせ；*Skp* は本願明細書中で配列番号 57 として記載されるコード配列の例とともに配列番号 56 として記載される *OmpHRXF4702.1* である）。*DsbAC-Skp* オーバーエクプレッサー宿主において、フォールディングモジュレーター *DsbA*、*DsbC*、および *Skp*（それぞれ米国特許番号 9,394,571 の配列番号 25 および 26 および本願明細書中の配列番号 57）は、オペロンから発現できる。実施形態において、宿主株は、*Lon*、*HslUV*、*DegP1*、*DegP2*、*Prc*、*AprA*、*DegP2 S219A*、*Prc1*、および *AprA* から選択された少なくとも1つのプロテアーゼが欠損し、*LepB*、*Tig*、および *DsbAC-Skp* から選択された少なくとも1つのフォールディングモジュレーターを過剰発現する。上記実施形態のいずれかにおいて、宿主株は栄養要求性マーカー *pyrF* および *proC* を発現し、プロテアーゼ欠損を有する、および／またはフォールディングモジュレーターを過剰発現する。実施形態において、宿主株は当該技術分野において既知の任意の他の適当な選択マーカーを発現する。上記実施形態のいずれかにおいて、アスパラギナーゼ、例えば、天然 I 型および／または II 型アスパラギナーゼは、宿主株中で不活性化されている。実施形態において、宿主株は以下の *Pseudomonadales* 宿主細胞である：*Lon* および *HslUV* を欠損している；*Lon*、*DegP1*、*DegP2*、*Prc*、および *AprA* を欠損している；*Lon*、*DegP1*、*DegP2 S219A*、*Prc1*、および *AprA* が欠損し、かつ *DsbAC-Skp* を過剰発現する；*AspG1* および／または *AspG2* を欠損している；*AspG1* および／または *AspG2* が欠損し、かつ *Tig* を過剰発現する；*AspG1* および／または *AspG2* が欠損し、かつ *LepB* を過剰発現する；*AspG1* および／または *AspG2* が欠損し、かつ *Lon* および *HslUV* を欠損している；*AspG1* および／または *AspG2* が欠損し、かつ *Lon*、*DegP1*、*DegP2*、*Prc*、および *AprA* を欠損している宿主細胞；または、*AspG1* および／または *AspG2 Lon*、*DegP1*、*DegP2*、*Prc1*、および *AprA* が欠損し、かつ *DsbAC-Skp* を過剰発現する宿主細胞。*DsbAC-Skp* オーバーエクプレッサー宿主において、フォールディングモジュレーター *DsbA*、*DsbC* および *Skp*（本願明細書中で配列番号 56 および 57）はオペロンから発現できる。*HslUV*（*HslVU* とも呼ばれる）は、*HslV* プロテアーゼおよび *HslU ATPase* の複合体である。*HslU* および *V* 機能および構造は、例えば、それぞれ参照によりその全体が本願明細書中に組み込まれる *Bochtler et al.*, 1997, *PNAS* 94:6070-6074; *Ramachandran et al.*, 2002, *PNAS* 99(11): 7396-7401; および *Wang et al.*, 2001, *Structure* 9:177-184 による文献に記載される。

【0062】

これらおよび他のプロテアーゼおよびフォールディングモジュレーターは、当該技術分野において既知であり、文献、例えば米国特許番号 8,603,824 に記載される。例えば、特許の表 D は *Tig* (*tig*、トリガーファクター、FKBP タイプ *ppase* (ec 5.2.1.8) *RXF04655*、*UniProtKB-P0A850* (*TIG_E.COLI*)) を記載する。「Method for Rapidly Screening Microbial Hosts to Identify Certain Strains with Improved Yield and/or Quality

10

20

30

40

50

in the Expression of Heterologous Proteins」と題され、本願明細書中でその全体が参照により組み込まれるWO2008/134461は、Tig (RXF04655.2、そこで配列番号34)、LepB (RXF01181.1、そこで配列番号56)、DegP1 (RXF01250、そこで配列番号57)、AprA (RXF04304.1、そこで配列番号86)、Prc1 (RXF06586.1、そこで配列番号120)、DegP2、(RXF07210.1、そこで配列番号124)、Lon (RXF04653、そこで配列番号92) ; DsbA (RXF01002.1、そこで配列番号25)、およびDsbC (RXF03307.1、そこで配列番号26) を記載する。これらの配列および他のプロテアーゼおよびフォールディングモジュレーターのものも、米国特許番号9,580,719 (そこで93-98列中の配列番号の表) に記載される。例えば、米国特許番号9,580,719は、HsLU (RXF01957.2) およびHsLV (RXF01961.2) をコードする配列を、それぞれ配列番号18および19として提供する。

【0063】

コドン最適化

1つの実施形態において、本願明細書中の方法は、目的の株におけるコドンの使用のために最適化された構築物からの組み換えアスパラギナーゼの発現を含む。実施形態において、株は、Pseudomonas 宿主細胞、例えば、Pseudomonas fluorescensである。細菌宿主中での発現を改善するためにコドンを最適化する方法は、当該技術分野において既知であり、文献に記載される。例えば、Pseudomonas 宿主株中での発現のためのコドンの最適化は、参照によりその全体が本願明細書中に組み込まれる米国特許出願公開番号2007/0292918、「Codon Optimization Method」に記載される。

【0064】

異種発現系において、最適化工程は、宿主が外来タンパク質を製造する能力を改善してもよい。タンパク質発現は、転写、mRNA処理、および翻訳の安定性および開始に影響を与える因子を含む因子の宿主により支配される。ポリヌクレオチド最適化工程は、宿主が外来タンパク質を製造する能力を改善する工程、ならびに研究者が発現構築物を効率的に設計するのを支援する工程を含んでもよい。最適化戦略は、例えば、翻訳開始領域の修飾、mRNA構造要素の変更、および異なるコドンバイアスの使用を含んでもよい。細菌宿主における異種タンパク質の発現を改善するために核酸配列を最適化する方法は、当該技術分野において既知であり、文献に記載される。例えば、Pseudomonas 宿主株中での発現のためのコドンの最適化は、例えば、参照によりその全体が本願明細書中に組み込まれる米国特許出願公開番号2007/0292918、「Codon Optimization Method」に記載される。

【0065】

最適化は、異種遺伝子の多数の配列特徴のいずれにも対処する。特定の例として、まれなコドン誘導翻訳の一時停止は、しばしば、減少した異種タンパク質発現を結果として生じる。まれなコドン誘導翻訳の一時停止は、宿主生物においてはほとんど使用されず、入手可能なtRNAプールに欠損しているためタンパク質翻訳に負の効果を有してもよい目的のポリヌクレオチド内のコドンの存在を含む。宿主生物における最適な翻訳を改善する1つの方法は、合成ポリヌクレオチド配列から除去されるまれな宿主コドンを時に結果として生じるコドン最適化を実施することを含む。

【0066】

代替の翻訳開始はまた、減少した非同一のタンパク質発現の減少を時に結果として生じる。代替の翻訳開始は、リボソーム結合部位(RBS)として機能することができるモチーフを誤って含有する合成ポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの場合において、これらの部位は、遺伝子内部部位から切断されたタンパク質の翻訳の開始を結果として生じる。精製中に除去することがしばしば困難な切断されたタンパク質の製造の可能性を減少させる1つの方法は、最適化されたポリヌクレオチド配列から推定内部RBS配列を排除す

ることを含む。

【0067】

反復誘発性のポリメラーゼのずれは、減少した異種タンパク質発現をしばしば結果として生じる。反復誘発性のポリメラーゼのずれは、フレームシフト変異を時に結果として生じるDNAポリメラーゼのずれまたは途絶を引き起こすことが示されているヌクレオチド配列の反復を含む。かかる反復はまた、RNAポリメラーゼのずれをしばしば引き起こす。高いG+C含量バイアスを有する生物において、GまたはCヌクレオチド反復から構成されるより高い程度の反復が時にある。したがって、RNAポリメラーゼのずれを誘発する可能性を減少させる1つの方法は、GまたはCヌクレオチドの拡張反復を変更することを含む。

10

【0068】

二次構造への干渉はまた、減少した異種タンパク質発現を時に結果として生じる。二次構造は、RBS配列または開始コドンをしばしば隔離し、タンパク質発現の減少に関連される。ステムループ構造はまた、転写の休止および減衰にしばしば関与する。最適化されたポリヌクレオチド配列は通常、RBSおよびヌクレオチド配列の遺伝子コード領域内の最小限の二次構造を含有し、改善された転写および翻訳を可能にする。

【0069】

異種タンパク質発現に時に影響する別の特徴は、制限部位の存在である。宿主発現ベクターへの転写ユニットの後続のサブクロニングに干渉する制限部位を除去することにより、ポリヌクレオチド配列が最適化される。

20

【0070】

例えば、最適化プロセスはしばしば、宿主により非相同に発現される所望のアミノ酸配列を同定することにより始まる。アミノ酸配列から候補ポリヌクレオチドまたはDNAが設計される。合成DNA配列の設計中、コドンの使用頻度は、宿主発現生物のコドンの使用と比較され、まれな宿主コドンは合成配列から除去される。加えて、合成候補DNA配列は、望ましくない酵素の制限部位を除去するおよび任意の所望のシグナル配列、リンカーまたは非翻訳領域を加えるかまたは除去するために、時に修飾される。合成DNA配列は、G/C反復およびステムループ構造など、翻訳プロセスに干渉してもよい二次構造の存在について、しばしば分析される。候補DNA配列を合成する前に、最適化された配列設計は、しばしばチェックされて、配列が所望のアミノ酸配列を正しくコードすることを確認する。最終的に、候補DNA配列は、当該技術分野において既知の技術などのDNA合成技術を使用して合成される。

30

【0071】

本願明細書の別の実施形態において、*P. fluorescens*などの宿主生物における一般的なコドンの使用は、異種ポリヌクレオチド配列の発現を最適化するためにしばしば利用される。宿主発現系における特定のアミノ酸にとって好ましいとはめったに考えられないコドンのパーセンテージおよび分布が評価される。5%および10%使用の値は、まれなコドンの決定のためのカットオフ値としてしばしば使用される。例えば、表4に列挙されるコドンは、*P. fluorescens* MB214ゲノム中で5%未満の計算された出現を有し、*P. fluorescens* 宿主中で発現される最適化された遺伝子において一般に回避される。

40

【表 4】

表 4. <i>P. fluorescens</i> MB214 中で 5 %未満で出現するコドン		
アミノ酸	使用されるコドン	% 出現
G Gly	GGA	3.26
I Ile	ATA	3.05
L Leu	CTA	1.78
	CTT	4.57
	TTA	1.89
R Arg	AGA	1.39
	AGG	2.72
	CGA	4.99
S Ser	TCT	4.28

10

【0072】

本開示は、使用されている *Pseudomonas* 宿主細胞における発現のために最適化された任意の配列を含む、任意のアスパラギナーゼコード配列の使用を検討する。使用のために検討された配列は、限定されないが、以下を除くように最適化を含む、所望の任意の程度でしばしば最適化される：*Pseudomonas* 宿主細胞中で 5 %未満で出現するコドン、*Pseudomonas* 宿主細胞中で 10 %未満で出現するコドン、まれなコドン誘導翻訳休止、推定上の内部 RBS 配列、G または C ヌクレオチドの拡張反復、干渉二次構造、制限部位、またはそれらの組み合わせ。

20

【0073】

さらに、本願明細書中で提供された方法の実践において有用な任意の分泌リーダーのアミノ酸配列は、任意の適する核酸配列によりコードされる。*E. coli* 中での発現のためのコドン最適化は、例えば、Welch, et al., 2009, PLoS One, 「Design Parameters to Control Synthetic Gene Expression in *Escherichia coli*」、4 (9) : e7002, Ghane, et al., 2008, Krishna R. et al., (2008) Mol Biotechnology 「Optimization of the AT-content of Codons Immediately Downstream of the Initiation Codon and Evaluation of Culture Conditions for High-level Expression of Recombinant Human G-CSF in *Escherichia coli*」、38 : 221-232 により記載される。

30

【0074】

高いスループットスクリーン

いくつかの実施形態において、高いスループットスクリーンは、可溶性組み換えアスパラギナーゼを発現するための最適な条件を決定するためにしばしば行われる。スクリーンにおいて変化する条件は、例えば、宿主細胞、宿主細胞の遺伝的背景（例えば、異なるプロテアーゼの欠失）、発現構築物中のプロモーターのタイプ、コードされたアスパラギナーゼに融合した分泌リーダーのタイプ、成長の温度、誘導性プロモーターを使用した場合の誘導の OD、追加されたインデューサーの量（例えば、lacZ プロモーターまたはその誘導体を使用した場合の誘導に使用される IPTG の量）、タンパク質誘導の持続時間、培養物への誘導剤の添加に続く成長の温度、培養の攪拌速度、プラスミド維持のための選択の方法、容器内の培養の体積、および細胞溶解の方法を含む。

40

【0075】

いくつかの実施形態において、宿主株のライブラリー（または「アレイ」）が提供され、ここで、ライブラリー中の各株（または「宿主細胞の集団」）は、宿主細胞内の 1 以上の標的遺伝子の発現を調節するために遺伝的に修飾されている。「最適な宿主株」または「最適な発現系」は、アレイ中の表現型上で別個の宿主細胞の他の集団と比較して目的の

50

発現されたタンパク質の量、質、および／または場所に基づいて、しばし同定または選択される。ゆえに、最適な宿主株は、希望の仕様に従って目的のポリペプチドを製造する株である。所望の仕様は、製造されるポリペプチドに応じて変化するが、仕様は、タンパク質の質および／または量、タンパク質が隔離されているか分泌されているか、タンパク質のフォールディングなどを含む。例えば、最適な宿主株または最適な発現系は、可溶性異種タンパク質の量、回復可能な異種タンパク質の量、適切に処理される異種タンパク質の量、適切にフォールディングされた非同一のタンパク質の量、活性な非同一のタンパク質の量、および／または指標株、すなわち比較のために使用される株により製造されるものに対する特定の絶対レベルまたは特定のレベルの異種タンパク質の総量により特徴付けられる収量を製造する。

10

【0076】

異種タンパク質の発現において改善された収量および／または質を有する株を同定するために微生物宿主をスクリーニングする方法は、例えば、米国特許出願公開番号20080269070に記載される。

【0077】

細菌成長条件

本願明細書中の方法において有用な成長条件は、約4℃から約42℃の温度および約5.7から約8.8のpHをしばしば含む。lacZプロモーターまたはその誘導体を有する発現構築物を使用する場合、培養物に終濃度約0.01mMから約1.0mMでIPTGを加えることにより発現がしばしば誘導される。

20

【0078】

培養物のpHは、pH緩衝液および当業者に既知な方法を使用して時に維持される。培養中のpHのコントロールは、アンモニア水を使用してしばしば達成される。実施形態において、培養物のpHは約5.7から約8.8である。特定の実施形態において、pHは約5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、または8.8である。他の実施形態においてs、pHは約5.7から5.9、5.8から6.0、5.9から6.1、6.0から6.2、6.1から6.3、6.2から6.5、6.4から6.7、6.5から6.8、6.6から6.9、6.7から7.0、6.8から7.1、6.9から7.2、7.0から7.3、7.1から7.4、7.2から7.5、7.3から7.6、7.4から7.7、7.5から7.8、7.6から7.9、7.7から8.0、7.8から8.1、7.9から8.2、8.0から8.3、8.1から8.4、8.2から8.5、8.3から8.6、8.4から8.7、または8.5から8.8である。さらに他の実施形態において、pHは約5.7から6.0、5.8から6.1、5.9から6.2、6.0から6.3、6.1から6.4、または6.2から6.5である。特定の実施形態において、pHは約5.7から約6.25である。

30

【0079】

実施形態において、成長温度は約4℃から約42℃に維持される。特定の実施形態において、成長温度は約4℃、約5℃、約6℃、約7℃、約8℃、約9℃、約10℃、約11℃、約12℃、約13℃、約14℃、約15℃、約16℃、約17℃、約18℃、約19℃、約20℃、約21℃、約22℃、約23℃、約24℃、約25℃、約26℃、約27℃、約28℃、約29℃、約30℃、約31℃、約32℃、約33℃、約34℃、約35℃、約36℃、約37℃、約38℃、約39℃、約40℃、約41℃、または約42℃である。他の実施形態において、成長温度は約25℃から約27℃、約25℃から約28℃、約25℃から約29℃、約25℃から約30℃、約25℃から約31℃、約25℃から約32℃、約25℃から約33℃、約26℃から約28℃、約26℃から約29℃、約26℃から約30℃、約26℃から約31℃、約26℃から約32℃、約27℃から約29℃、約27℃から約30℃

40

50

C、約27°Cから約31°C、約27°Cから約32°C、約26°Cから約33°C、約28°Cから約30°C、約28°Cから約31°C、約28°Cから約32°C、約29°Cから約31°C、約29°Cから約32°C、約29°Cから約33°C、約30°Cから約32°C、約30°Cから約33°C、約31°Cから約33°C、約31°Cから約32°C、約30°Cから約33°C、または約32°Cから約33°Cに維持される。他の実施形態において、温度は培養中に変化する。特定の実施形態において、目的のポリペプチドまたはタンパク質をコードする構築物からの発現を誘導する薬剤が培養に加えられる前に温度が約30°Cから約32°Cに維持され、発現を誘導する薬剤の添加、例えばIPTGが培養に加えられる後に、温度が約25°Cから約27°Cに下げられる。1つの実施形態において、目的のポリペプチドまたはタンパク質をコードする構築物からの発現を誘導する薬剤を培養に加える前に温度が約30°Cに維持され、発現を誘導する薬剤の添加後、温度が約25°Cに下げられる。

【0080】

誘導

本願明細書中で他に記載されるように、誘導性プロモーターは、組み換えアスパラギナーゼ、例えば、lacプロモーターの発現をコントロールするために発現構築物中でしばしば使用される。lacプロモーター誘导体またはファミリーメンバー、例えばtacプロモーターの場合、エフェクター化合物は、PTG様無償性インデューサー（「イソプロピルチオガラクトシド」とも呼ばれるイソプロピルーβ-D-1-チオガラクトピラノシド）などのインデューサーである。実施形態において、lacプロモーター誘导体が使用され、細胞密度が約25から約160のOD₅₇₅により同定されるレベルに達したときに、IPTGの約0.01mMから約1.0mMの終濃度への添加により、アスパラギナーゼ発現が誘導される。実施形態において、アスパラギナーゼの培養誘導時のOD₅₇₅は、約25、約50、約55、約60、約65、約70、約80、約90、約100、約110、約120、約130、約140、約150、約160、約170、約180である。他の実施形態において、OD₅₇₅は、約80から約100、約100から約120、約120から約140、約140から約160である。他の実施形態において、OD₅₇₅は約80から約120、約100から約140、または約120から約160である。他の実施形態において、OD₅₇₅は約80から約140、または約100から160である。細胞密度は他の方法でしばしば測定され、他の単位で、例えば単位体積あたりの細胞数で表される。例えば、Pseudomonas fluorescens培養物の約25から約160のOD₂₅は、1mLあたりおよそ 4×10^{10} から約 1.6×10^{11} のコロニー形成単位または11から70g/L乾燥細胞重量と同等である。実施形態において、アスパラギナーゼ発現は、細胞密度が約0.05g/gから約0.4g/gの湿潤細胞重量に達したときに、IPTGの約0.01mMから約1.0mMの終濃度への添加により誘導される。実施形態において、湿潤細胞重量は、約0.05g/g、約0.1g/g、約0.15g/g、約0.2g/g、約0.25g/g、約0.30g/g、約0.35g/g、約0.40g/g、約0.05g/gから約0.1g/g、約0.05g/gから約0.15g/g、約0.05g/gから約0.20g/g、約0.05g/gから約0.25g/g、約0.05g/gから約0.30g/g、約0.05g/gから約0.35g/g、約0.1g/gから約0.40g/g、約0.15g/gから約0.40g/g、約0.20g/gから約0.40g/g、約0.25g/gから約0.40g/g、約0.30g/gから約0.40g/g、または約0.35g/gから約0.40g/gである。実施形態において、培養誘導時の細胞密度は、細胞密度または測定の単位の決定のために使用される方法にかかわらず、OD₅₇₅での吸光度により本願明細書中で特定された細胞密度と同等である。当業者は、任意の細胞培養に適する変換を行う方法を知っているであろう。

【0081】

実施形態において、培養の最終IPTG濃度は、約0.01mM、約0.02mM、約0.03mM、約0.04mM、約0.05mM、約0.06mM、約0.07mM、約

0.08mM、約0.09mM、約0.1mM、約0.2mM、約0.3mM、約0.4mM、約0.5mM、約0.6mM、約0.7mM、約0.8mM、約0.9mM、または約1mMである。他の実施形態において、培養物の最終IPTG濃度は、約0.08mMから約0.1mM、約0.1mMから約0.2mM、約0.2mMから約0.3mM、約0.3mMから約0.4mM、約0.2mMから約0.4mM、約0.08から約0.2mM、または約0.1から1mMである。

【0082】

非lac型プロモーターが使用される実施形態において、本願明細書中でおよび文献で記載されるように、他のインデューサーまたはエフェクターがしばしば使用される。1つの実施形態において、プロモーターは構成的プロモーターである。

10

【0083】

誘導剤の添加後、培養物は、その間組み換えアスパラギナーゼが発現される一定期間、例えば約24時間しばしば成長される。誘導剤の添加後、培養物は、約1時間、約2時間、約3時間、約4時間、約5時間、約6時間、約7時間、約8時間、約9時間、約10時間、約11時間、約12時間、約13時間、約14時間、約15時間、約16時間、約17時間、約18時間、約19時間、約20時間、約21時間、約22時間、約23時間、約24時間、約36時間、または約48時間、しばしば成長される。培養物に誘導剤を添加した後、培養物は約1から48時間、約1から24時間、約10から24時間、約15から24時間、または約20から24時間成長される。細胞培養物はしばしば、遠心分離により濃縮され、培養ペレットは、その後の溶解手順に適する緩衝液または溶液に再懸濁される。

20

【0084】

実施形態において、細胞は、高圧機械的細胞破壊のための装置（例えば、Microfluidics Microfluidizer、Constant Cell Disruptor、Niro-SoaviホモジナイザーまたはAPV-Gaulinホモジナイザーである商業的に入手可能なもの）を使用して破壊される。アスパラギナーゼを発現する細胞は、例えば超音波処理を使用して、しばしば破壊される。細胞を溶解するための当該技術分野において既知の任意の適する方法は、可溶性画分を放出するためにしばしば使用される。例えば、実施形態において、細胞壁溶解酵素およびEDTAなどの化学および／または酵素細胞溶解試薬がしばしば使用される。冷凍または以前に保存された培養物の使用も、本願明細書中の方法において検討される。培養物は時に、溶解前にOD正規化される。例えば、細胞は、約10、約11、約12、約13、約14、約15、約16、約17、約18、約19、または約20のOD600にしばしば正規化される。

30

【0085】

遠心分離は、任意の適する装置および方法を使用して実施される。不溶性画分から不溶性画分を分離する目的での細胞培養またはライセートの遠心分離は、当該技術分野において周知である。例えば、溶解された細胞は時に、20,800×gで20分間（4°Cで）遠心分離され、手動または自動液体処理を使用して上清が除去される。ペレット（不溶性）画分は、緩衝化溶液、例えば、リン酸緩衝化生理食塩水（PBS）、pH7.4に再懸濁される。再懸濁はしばしば、例えば、オーバーヘッドミキサーに接続されたインペラー、磁気攪拌棒、ロッキングシェーカーなどの装置を使用して行われる。

40

【0086】

「可溶性画分」、すなわちライセートの遠心分離後に得られる可溶性上清、および「不溶性画分」、すなわちライセートの遠心分離後に得られるペレットは、培養物の溶解および遠心分離の結果である。

【0087】

発酵形式

1つの実施形態において、発酵は組み換えアスパラギナーゼの製造方法において使用される。本開示による発現系は、任意の発酵形式において培養される。例えば、バッチ、フェッドバッチ、半連続、および連続発酵モードは、本願明細書中で採用されてもよい。

50

【0088】

実施形態において、発酵培地は、富栄養培地、最少培地、およびミネラル塩培地から選択されてもよい。他の実施形態において、最少培地またはミネラル塩培地のいずれかが選択される。特定の実施形態において、ミネラル塩培地が選択される。

【0089】

ミネラル塩培地は、ミネラル塩および、グルコース、スクロース、またはグリセロールなどの炭素源からなる。ミネラル塩培地の例は、例えば、M9培地、Pseudomonas培地(ATCC179)、およびDavisおよびMingoli培地(B. Davis & E. Mingoli (1950) J. Bact. 60:17-28を参照)を含む。ミネラル塩培地を作るために使用されるミネラル塩は、例えば、リン酸カリウム、硫酸アンモニウムまたは塩化アンモニウム、硫酸マグネシウムまたは塩化マグネシウム、および塩化カルシウム、ホウ酸塩、および鉄、銅、マンガンおよび亜鉛の硫酸塩などの微量ミネラルから選択されるものを含む。典型的に、ミペプトン、トリプトン、アミノ酸、または酵母エキスなどの有機窒素源は、ミネラル塩培地中に含まれていない。代わりに、無機窒素源が使用され、これは、例えば、アンモニウム塩、アンモニア水、およびガス状アンモニアの中から選択されてもよい。ミネラル塩培地は典型的に、炭素源としてグルコースまたはグリセロールを含有する。ミネラル塩培地と比較して、最少培地は、ミネラル塩および炭素ソースをしばしば含有するが、例えば、アミノ酸、ビタミン、ペプトン、または他の成分を、最小限のレベルで添加されるものの、低いレベルで、しばしば補足される。培地は、当該技術分野、例えば、上記で参照され、参照により組み込まれる米国特許出願公開番号2006/0040352に記載される方法を使用してしばしば調製される。本願明細書中の方法において有用な培養手順およびミネラル塩培地の詳細は、Riesenberg, D et al., 1991, 「High cell density cultivation of Escherichia coli at controlled specific growth rate」、J. Biotechnol. 20 (1): 17-27により記載される。

【0090】

発酵は、任意の規模で実施してもよい。本開示による発現系は、任意の規模での組み換えタンパク質発現に有用である。ゆえに、例えば、マイクロリットル規模、ミリリットル規模、センチリットル規模、およびデシリットル規模の発酵体積を使用してよく、1リットル規模およびより大きな発酵体積がしばしば使用される。

【0091】

実施形態において、発酵体積は、約1リットル以上である。実施形態において、発酵体積は約0.5リットルから約100リットルである。実施形態において、発酵体積は、約1リットル、約2リットル、約3リットル、約4リットル、約5リットル、約6リットル、約7リットル、約8リットル、約9リットル、または約10リットルである。実施形態において、発酵体積は約0.5リットルから約2リットル、約0.5リットルから約5リットル、約0.5リットルから約10リットル、約0.5リットルから約25リットル、約0.5リットルから約50リットル、約0.5リットルから約75リットル、約10リットルから約25リットル、約25リットルから約50リットル、または約50リットルから約100リットルである。他の実施形態において、発酵体積は、5リットル、10リットル、15リットル、20リットル、25リットル、50リットル、75リットル、100リットル、200リットル、500リットル、1,000リットル、2,000リットル、5,000リットル、10,000リットル、または50,000リットル以上である。

【0092】

タンパク質分析

実施形態において、本願明細書中で提供される方法により製造される組み換えアスパラギナーゼタンパク質が分析される。組み換えアスパラギナーゼは時に、例えばバイオレイヤー干渉法、SDS-PAGE、ウェスタンブロット、ファーウェスタンブロット、EL

ISA、吸光度、またはマスペクトロメトリー（例えばタンデムマスペクトロメトリー）により分析される。

【0093】

いくつかの実施形態において、生成される組み換えアスパラギナーゼタンパク質の濃度および／または量は、例えば、Bradfordアッセイ、吸光度、クマシー染色、マスペクトロメトリーなどにより決定される。

【0094】

本明細書中で記載される不溶性画分および可溶性画分におけるタンパク質収量は、当業者に既知の方法、例えば、キャピラリーゲル電気泳動（CGE）、およびウェスタンブロット分析によりしばしば決定される。可溶性画分は、例えばバイオレイヤー干渉法を使用してしばしば評価される。

【0095】

アスパラギナーゼ単量体は、例えば、細胞ライセート、細胞ソニケートにおいて、およびさらなる精製の際、活性な四量体を形成することができる。細菌発現系、例えば、E. coliまたはPseudomonas宿主株における組み換えアスパラギナーゼの発現に続き、組み換えタンパク質は、当該技術分野において既知の任意の適切な方法を使用して、例えば、宿主細胞タンパク質を除去するために精製できる。精製方法は、例えば、陽イオン交換クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、高性能液体クロマトグラフィー（HPLC）、またはこれらの組み合わせおよび／または他の既知の方法を含む。アスパラギナーゼタンパク質精製は、文献、例えばそれぞれが参照によりその全体が本願明細書中に組み込まれる米国特許番号5,310,670、「Method for the purification of Erwinia Lasparaginase」および米国特許番号8,323,948、「Asparaginases and uses thereof」に記載される。発現実験に基づいて、P. fluorescens中で発現されたII型アスパラギナーゼは、ソニケートにおける活性な四量体のアスパラギナーゼ酵素として存在する。

【0096】

実施形態において、未精製または精製されたアスパラギナーゼ試料の量の測定可能な特性（例えば、活性なおよび／またはインタクトなタンパク質を示す活性、サイズ、長さ、または他の特性）を、アスパラギナーゼ標準試料（例えば、商業的に得られたアスパラギナーゼ）の同じ量の測定可能な特性と比較される。試料中のアスパラギナーゼタンパク質の量は、タンパク質測定のための当該技術分野において既知の任意の適当なアッセイにより決定できると理解される。

【0097】

タンパク質収量の有用な尺度は、例えば、培養体積あたりの組み換えタンパク質の量（例えば、タンパク質のグラムまたはミリグラム／培養のリットル）、溶解後に得られた不溶性ペレット中で測定される組み換えタンパク質のパーセントまたは画分（例えば、抽出上清中の組み換えタンパク質の量／不溶性画分中のタンパク質の量）、活性なタンパク質のパーセントまたは画分（例えば、活性なタンパク質の量／アッセイ中で使用されるタンパク質の量）、総細胞タンパク質（t c p）のパーセントまたは画分、タンパク質／細胞の量、およびパーセント乾燥バイオマスを含む。

【0098】

実施形態において、本願明細書中の方法は、約20%から約90%の可溶性組み換えアスパラギナーゼタンパク質、例えば単量体または四量体II型アスパラギナーゼの収量を得るために使用される。特定の実施形態において、可溶性組み換えアスパラギナーゼの収量は、約20%総細胞タンパク質、約25%総細胞タンパク質、約30%総細胞タンパク質、約31%総細胞タンパク質、約32%総細胞タンパク質、約33%総細胞タンパク質、約34%総細胞タンパク質、約35%総細胞タンパク質、約36%総細胞タンパク質、約37%総細胞タンパク質、約38%総細胞タンパク質、約39%総細胞タンパク質、約40%総細胞タンパク質、約41%総細胞タンパク質、約42%総細胞タンパク質、約4

10

20

30

40

50

3 %総細胞タンパク質、約 4 4 %総細胞タンパク質、約 4 5 %総細胞タンパク質、約 4 6 %総細胞タンパク質、約 4 7 %総細胞タンパク質、約 4 8 %総細胞タンパク質、約 4 9 %総細胞タンパク質、約 5 0 %総細胞タンパク質、約 5 1 %総細胞タンパク質、約 5 2 %総細胞タンパク質、約 5 3 %総細胞タンパク質、約 5 4 %総細胞タンパク質、約 5 5 %総細胞タンパク質、約 5 6 %総細胞タンパク質、約 5 7 %総細胞タンパク質、約 5 8 %総細胞タンパク質、約 5 9 %総細胞タンパク質、約 6 0 %総細胞タンパク質、約 6 5 %総細胞タンパク質、約 7 0 %総細胞タンパク質、約 7 5 %総細胞タンパク質、約 8 0 %総細胞タンパク質、約 8 5 %総細胞タンパク質、または約 9 0 %総細胞タンパク質である。いくつかの実施形態において、可溶性組み換えアスパラギナーゼの収量は、約 2 0 %から約 2 5 %総細胞タンパク質、約 2 0 %から約 3 0 %総細胞タンパク質、約 2 0 %から約 3 5 %総細胞タンパク質、約 2 0 %から約 4 0 %総細胞タンパク質、約 2 0 %から約 4 5 %総細胞タンパク質、約 2 0 %から約 5 0 %総細胞タンパク質、約 2 0 %から約 5 5 %総細胞タンパク質、約 2 0 %から約 6 0 %総細胞タンパク質、約 2 0 %から約 6 5 %総細胞タンパク質、約 2 0 %から約 7 0 %総細胞タンパク質、約 2 0 %から約 7 5 %総細胞タンパク質、約 2 0 %から約 8 0 %総細胞タンパク質、約 2 0 %から約 8 5 %総細胞タンパク質、約 2 0 %から約 9 0 %総細胞タンパク質、約 2 5 %から約 9 0 %総細胞タンパク質、約 3 0 %から約 9 0 %総細胞タンパク質、約 3 5 %から約 9 0 %総細胞タンパク質、約 4 0 %から約 9 0 %総細胞タンパク質、約 4 5 %から約 9 0 %総細胞タンパク質、約 5 0 %から約 9 0 %総細胞タンパク質、約 5 5 %から約 9 0 %総細胞タンパク質、約 6 0 %から約 9 0 %総細胞タンパク質、約 6 5 %から約 9 0 %総細胞タンパク質、約 7 0 %から約 9 0 %総細胞タンパク質、約 7 5 %から約 9 0 %総細胞タンパク質、約 8 0 %から約 9 0 %総細胞タンパク質、約 8 5 %から約 9 0 %総細胞タンパク質、約 3 1 %から約 6 0 %総細胞タンパク質、約 3 5 %から約 6 0 %総細胞タンパク質、約 4 0 %から約 6 0 %総細胞タンパク質、約 4 5 %から約 6 0 %総細胞タンパク質、約 5 0 %から約 6 0 %総細胞タンパク質、約 5 5 %から約 6 0 %総細胞タンパク質、約 3 1 %から約 5 5 %総細胞タンパク質、約 3 1 %から約 5 0 %総細胞タンパク質、約 3 1 %から約 4 5 %総細胞タンパク質、約 3 1 %から約 4 0 %総細胞タンパク質、約 3 1 %から約 3 5 %総細胞タンパク質、約 3 5 %から約 5 5 %総細胞タンパク質、または約 4 0 %から約 5 0 %総細胞タンパク質である。

【0099】

実施形態において、本願明細書中の方法は、約 2 0 %から約 9 0 %総細胞タンパク質の、可溶性組み換えアスパラギナーゼタンパク質、例えば単量体または四量体 I I 型アスパラギナーゼの収量を得るために使用される。特定の実施形態において、可溶性組み換えアスパラギナーゼの収量は、約 1 グラム／リットル、約 2 グラム／リットル、約 3 グラム／リットル、約 4 グラム／リットル、約 5 グラム／リットル、約 6 グラム／リットル、約 7 グラム／リットル、約 8 グラム／リットル、約 9 グラム／リットル、約 1 0 グラム／リットル、約 1 1 グラム／リットル、約 1 2 グラム／リットル、約 1 3 グラム／リットル、約 1 4 グラム／リットル、約 1 5 グラム／リットル、約 1 6 グラム／リットル、約 1 7 グラム／リットル、約 1 8 グラム／リットル、約 1 9 グラム／リットル、約 2 0 グラム／リットル、約 2 1 グラム／リットル、約 2 2 グラム／リットル、約 2 3 グラム／リットル、約 2 4 グラム／リットル、約 2 5 グラム／リットル、約 2 6 グラム／リットル、約 2 7 グラム／リットル、約 2 8 グラム／リットル、約 3 0 グラム／リットル、約 3 5 グラム／リットル、約 4 0 グラム／リットル、約 4 5 グラム／リットル、約 5 0 グラム／リットル、約 1 グラム／リットルから約 5 グラム／リットル、約 1 グラムから約 1 0 グラム／リットル、約 1 0 グラム／リットルから約 1 2 グラム／リットル、約 1 0 グラム／リットルから約 1 3 グラム／リットル、約 1 0 グラム／リットルから約 1 4 グラム／リットル、約 1 0 グラム／リットルから約 1 5 グラム／リットル、約 1 0 グラム／リットルから約 1 6 グラム／リットル、約 1 0 グラム／リットルから約 1 7 グラム／リットル、約 1 0 グラム／リットルから約 1 8 グラム／リットル、約 1 0 グラム／リットルから約 1 9 グラム／リットル、約 1 0 グラム／リットルから約 2 0 グラム／リットル、約 1 0 グラム／リットルから約 2 1 グラム／リットル、約 1 0 グラム／リットルから約 2 2 グラム／リットル、約 1 0 グラム／

10

20

30

40

50

リットルから約 23 グラム／リットル、約 10 グラム／リットルから約 24 グラム／リットル、約 10 グラム／リットルから約 25 グラム／リットル、約 10 グラム／リットルから約 30 グラム／リットル、約 10 グラム／リットルから約 40 グラム／リットル、約 10 グラム／リットルから約 50 グラム／リットル、約 10 グラム／リットルから約 12 グラム／リットル、約 12 グラム／リットルから約 14 グラム／リットル、約 14 グラム／リットルから約 16 グラム／リットル、約 16 グラム／リットルから約 18 グラム／リットル、約 18 グラム／リットルから約 20 グラム／リットル、約 20 グラム／リットルから約 22 グラム／リットル、約 22 グラム／リットルから約 24 グラム／リットル、約 23 グラム／リットルから約 25 グラム／リットル、約 10 グラム／リットルから約 25 グラム／リットル、約 11 グラム／リットルから約 25 グラム／リットル、約 12 グラム／リットルから約 25 グラム／リットル、約 13 グラム／リットルから約 25 グラム／リットル、約 14 グラム／リットルから約 25 グラム／リットル、約 15 グラム／リットルから約 25 グラム／リットル、約 16 グラム／リットルから約 25 グラム／リットル、約 17 グラム／リットルから約 25 グラム／リットル、約 18 グラム／リットルから約 25 グラム／リットル、約 19 グラム／リットルから約 25 グラム／リットル、約 20 グラム／リットルから約 25 グラム／リットル、約 21 グラム／リットルから約 25 グラム／リットル、約 22 グラム／リットルから約 25 グラム／リットル、約 23 グラム／リットルから約 25 グラム／リットル、または約 24 グラム／リットルから約 25 グラム／リットルである。実施形態において、可溶性組み換えタンパク質収量は、約 10 g r a m／リットルから約 13 グラム／リットル、約 12 グラム／リットルから約 14 グラム／リットル、約 13 グラム／リットルから約 15 グラム／リットル、約 14 グラム／リットルから約 16 グラム／リットル、約 15 グラム／リットルから約 17 グラム／リットル、約 16 グラム／リットルから約 18 グラム／リットル、約 17 グラム／リットルから約 19 グラム／リットル、約 18 グラム／リットルから約 20 グラム／リットル、約 20 グラム／リットルから約 22 グラム／リットル、約 22 グラム／リットルから約 24 グラム／リットル、または約 23 グラム／リットルから約 25 グラム／リットルである。実施形態において、可溶性組み換えタンパク質収量は、約 10 グラム／リットルから約 25 グラム／リットル、約 12 グラム／リットルから約 24 グラム／リットル、約 14 グラム／リットルから約 22 グラム／リットル、約 16 グラム／リットルから約 20 グラム／リットル、または約 18 グラム／リットルから約 20 グラム／リットルである。実施形態において、抽出されたタンパク質収量は、約 5 グラム／リットルから約 15 グラム／リットル、約 5 グラム／リットルから約 25 グラム／リットル、約 10 グラム／リットルから約 15 グラム／リットル、約 10 グラム／リットルから約 25 グラム／リットル、約 15 グラム／リットルから約 20 グラム／リットル、約 15 グラム／リットルから約 25 グラム／リットル、または約 18 グラム／リットルから約 25 グラム／リットルである。

【0100】

実施形態において、可溶性画分中に検出される組み換えアスパラギナーゼ、例えば単量体または四量体ⅠⅠ型アスパラギナーゼの量は、製造される総組み換えアスパラギナーゼの量の約 10 % から約 100 % である。実施形態において、この量は、製造される総組み換えアスパラギナーゼの量の約 10 %、約 15 %、約 20 %、約 25 %、約 30 %、約 35 %、約 40 %、約 45 %、約 50 %、約 55 %、約 60 %、約 65 %、約 70 %、約 75 %、約 80 %、約 85 %、約 90 %、約 95 % または約 99 %、または約 100 % である。実施形態において、この量は、製造される総組み換えアスパラギナーゼの量の約 10 % から約 20 %、20 % から約 50 %、約 25 % から約 50 %、約 25 % から約 50 %、約 25 % から約 95 %、約 30 % から約 50 %、約 30 % から約 40 %、約 30 % から約 60 %、約 30 % から約 70 %、約 35 % から約 50 %、約 35 % から約 70 %、約 35 % から約 75 %、約 35 % から約 95 %、約 40 % から約 50 %、約 40 % から約 95 %、約 50 % から約 75 %、約 50 % から約 95 %、約 70 % から約 95 %、または約 80 % から約 100 % である。

【0101】

いくつかの実施形態において、可溶性組み換えアスパラギナーゼ、例えば単量体または四量体ⅡⅡ型アスパラギナーゼの量は、培養物中の製造される総可溶性タンパク質のパーセンテージとして表される。所与の細胞密度での細胞培養の組み換えアスパラギナーゼタンパク質の重量／体積で表されるデータは、総細胞タンパク質のパーセント組み換えタンパク質として表されるデータに変換できる。例えば、所与の細胞密度での細胞培養の体積あたりの総細胞タンパク質の量を知って、体積タンパク質収量を%総細胞タンパク質に変換することは、当業者の能力の範囲内である。この数は、1) 所与の細胞密度での培養の細胞重量／体積、および2) 総タンパク質に含まれる細胞重量のパーセントがわかっている場合に決定できる。例えば、OD550が1.0の場合、E. coliの乾燥細胞重量は0.5グラム／リットルであると報告される(「Production of Heterologous Proteins from Recombinant DNA Escherichia coli in Bench Fermentors」、Lin, N. S., および Swartz, J. R., 1992, METHODS: A Companion to Methods in Enzymology 4: 159-168)。細菌細胞は、多糖類、脂質、核酸、ならびにタンパク質で構成される。E. coli細胞は、タンパク質がE. coli細胞の重量で52.4%を占めると評価するDa Silva, N. A., et al., 1986, 「Theoretical Growth Yield Estimates for Recombinant Cells」、Biotechnology and Bioengineering, Vol. XXVIII: 741-746、およびE. coli中のタンパク質含量を乾燥細胞重量で55%と報告するChief Frederick C. Neidhardt, Vol. 1, pp. 3-6における「Escherichia coli and Salmonella typhimurium Cellular and Molecular Biology」、1987, 編を含むがこれらに限定されない参照により、約52.4%から55%タンパク質であると報告される。上記の測定値(つまり、乾燥細胞重量0.5グラム／リットル、および55%細胞重量のタンパク質)を使用して、E. coliについて1.0のA550での細胞培養の体積あたりの総細胞タンパク質の量は、275 µg 総細胞タンパク質／ml／A550として計算される。湿潤細胞重量に基づく細胞培養の体積あたりの総細胞タンパク質の計算は、例えば、E. coliについての1.0のA600が、1.7グラムの湿潤細胞重量／リットル、および0.39グラムの乾燥細胞重量／リットルを結果として生じるというGlazyrinaら(参照により本願明細書中に組み込まれるMicrobial Cell Factories 2010, 9: 42)による決定を使用することができる。例えば、乾燥細胞重量比較のためにこの湿潤細胞重量、および上記の55%乾燥細胞重量としてのタンパク質を使用して、E. coliについて1.0のA600での細胞培養の体積あたりの総細胞タンパク質の量は、215 µg 総細胞タンパク質／ml／A600として計算できる。Pseudomonas fluorescensについて、所与の細胞密度での細胞培養の体積あたりの総細胞タンパク質の量は、E. coliで見出されたものに類似する。P. fluorescensは、E. coliと同様に、グラム陰性の桿菌である。Edwards, et al., 1972, 「Continuous Culture of Pseudomonas fluorescens with Sodium Maleate as a Carbon Source」、Biotechnology and Bioengineering, Vol. XIV, 123-147ページにより報告されたP. fluorescens ATCC 11150の乾燥細胞重量は、0.5グラム／リットル／A500である。これは、A550が1.0のE. coliについて、Linらにより報告された重量と同じである。500 nmおよび550 nmで行われた光散乱測定は非常に類似すると予想される。P. fluorescens HK 44についての総細胞タンパク質に含まれる細胞重量のパーセントは、例えば、Yarwood, et al., July 2002, 「Noninvasive Quantitative Measurement of Bacterial Growth in Porous Media under

10

20

30

40

50

Unsaturated-Flow Conditions」、Applied and Environmental Microbiology 68 (7) : 3597-3605 により 55% として記載される。このパーセンテージは、上記の参照による E. coli について所与のものと類似または同じである。

【0102】

実施形態において、製造される可溶性組み換えアスパラギナーゼ、例えば単量体または四量体 II 型アスパラギナーゼの量は、培養物中の製造される総可溶性タンパク質の約 0.1% から約 95% である。実施形態において、この量は、培養物中の製造される総可溶性タンパク質の約 0.1%、0.5%、1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または 95% を超える。実施形態において、この量は、培養物中の製造される総可溶性タンパク質の約 0.1%、0.5%、1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または 95% である。実施形態において、この量は、培養物中の製造される総可溶性タンパク質の約 5% から約 95%、約 10% から約 85%、約 20% から約 75%、約 30% から約 65%、約 40% から約 55%、約 1% から約 95%、約 5% から約 30%、約 1% から約 10%、約 10% から約 20%、約 20% から約 30%、約 30% から約 40%、約 40% から約 50%、約 50% から約 60%、約 60% から約 70%、または約 80% から約 90% である。

10

【0103】

実施形態において、製造される可溶性組み換えアスパラギナーゼ、例えば単量体または四量体 II 型アスパラギナーゼの量は、乾燥細胞重量 (DCW) の約 0.1% から約 50% である。実施形態において、この量は、DCW の約 0.1%、0.5%、1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、45%、または 50% を超える。実施形態において、この量は、DCW の約 0.1%、0.5%、1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、45%、または 50% である。実施形態において、この量は、培養物中で製造される総可溶性タンパク質の約 5% から約 50%、約 10% から約 40%、約 20% から約 30%、約 1% から約 20%、約 5% から約 25%、約 1% から約 10%、約 10% から約 20%、約 20% から約 30%、約 30% から約 40%、または約 40% から約 50% である。

20

30

【0104】

溶解性および活性

タンパク質の「溶解性」および「活性」は、関連する性質であるが、一般に異なる手段により決定される。タンパク質、特に疎水性タンパク質の溶解性は、疎水性アミノ酸残基がフォールディングされたタンパク質の外側に不適切に配置されていることを示す。例えば以下に記載されるような異なる方法を使用してしばしば評価されるタンパク質活性は、適切なタンパク質コンフォメーションの別の指標である。本明細書中で使用される「可溶性、活性な、または両方」は、当業者に既知の方法により、可溶性、活性な、または可溶性および活性両方であると決定されるタンパク質を指す。

【0105】

活性アッセイ

アスパラギナーゼ活性を評価するためのアッセイは、当該技術分野において既知であり、蛍光測定法、比色分析、化学発光法、分光光度法、および当業者に入手可能な他の酵素アッセイを含むが、これらに限定されない。これらのアッセイは、アスパラギナーゼ調製物の活性または有効性を商業的なまたは他のアスパラギナーゼ調製物と比較するために使用できる。

40

【0106】

実施形態において、活性または有効性は、アッセイされた総量と比較して、抽出物上清中のパーセント活性なタンパク質により表される。これは、アッセイにより使用されるタンパク質の総量に対する、アッセイにより活性であると決定されるタンパク質の量に基づ

50

く。他の実施形態において、活性または有効性は、標準または対照タンパク質と比較したタンパク質の%活性または有効性レベルにより表される。これは、標準試料中の活性なタンパク質の量に対する、上清抽出試料中の活性なタンパク質の量に基づく（ここでアッセイにおいて各試料からの同じ量のタンパク質が使用される）。

【0107】

実施形態において、製造される組み換えⅡⅡ型アスパラギナーゼとの比較のために活性または有効性アッセイにおいて使用される標準または対照タンパク質は、E l s p a r（登録商標）中の活性な成分、または臨床使用のために承認され、当該技術分野において既知の任意の組み換えⅡⅡ型アスパラギナーゼ産物中の活性な成分である。実施形態において、製造される組み換えⅡⅡ型アスパラギナーゼの測定された活性または有効性は、ⅡⅡ型アスパラギナーゼ活性または有効性を測定する同じ方法を使用して、標準または対照ⅡⅡ型アスパラギナーゼの同じ量中で測定された活性または有効性と比較される。実施形態において、製造された組み換えⅡⅡ型アスパラギナーゼの測定された活性または有効性は、患者における使用のために商業的に承認された対照ⅡⅡ型アスパラギナーゼの同じ量において測定される活性または有効性と比較される。

【0108】

実施形態において、組み換えアスパラギナーゼタンパク質の約40%から約100%は、活性、可溶性、またはその両方であると決定される。実施形態において、組み換えアスパラギナーゼタンパク質の約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、または約100%は、活性であると決定される。実施形態において、組み換えアスパラギナーゼタンパク質の約40%から約50%、約50%から約60%、約60%から約70%、約70%から約80%、約80%から約90%、約90%から約100%、約50%から約100%、約60%から約100%、約70%から約100%、約80%から約100%、約40%から約90%、約40%から約95%、約50%から約90%、約50%から約95%、約50%から約100%、約60%から約90%、約60%から約95%、約60%から約100%、約70%から約90%、約70%から約95%、約70%から約100%、または約70%から約100%は、活性、可溶性、またはその両方であると決定される。

【0109】

他の実施形態において、組み換えアスパラギナーゼの約75%から約100%は、活性、可溶性、またはその両方であると決定される。実施形態において、組み換えアスパラギナーゼの約75%から約80%、約75%から約85%、約75%から約90%、約75%から約95%、約80%から約85%、約80%から約90%、約80%から約95%、約80%から約100%、約85%から約90%、約85%から約95%、約85%から約100%、約90%から約95%、約90%から約100%、または約95%から約100%は、活性、可溶性、またはその両方であると決定される。

【0110】

実施形態において、本願明細書中で記載される組み換えⅡⅡ型アスパラギナーゼを製造または発現する方法は、製造される組み換えⅡⅡ型アスパラギナーゼの活性または有効性を測定すること、および製造される組み換えⅡⅡ型アスパラギナーゼの測定される活性または有効性を同じアッセイを使用して同じ量の対照ⅡⅡ型アスパラギナーゼ中で測定された活性または有効性と比較することをさらに含み、ここで製造される組み換えⅡⅡ型アスパラギナーゼの測定された活性または有効性は、対照ⅡⅡ型アスパラギナーゼの活性または有効性と比較可能である。実施形態において、比較可能な活性または有効性は100%として定義される（1.0とも表せる）、つまり、製造される組み換えⅡⅡ型アスパラギナーゼおよび対照ⅡⅡ型アスパラギナーゼの活性または有効性が等しい。実施形態において、対照ⅡⅡ型アスパラギナーゼと比較される製造される組み換えⅡⅡ型アスパラギナーゼの活性または有効性は、約80%から約120%である。実施形態において、活性または有効性は約85%から約115%である。実施形態において、活性または有効性は約90%から約110%である。実施形態において、活性または有効性は約70%から約130%である。

0 %である。実施形態において、活性または有効性は約 6 5 %から約 1 3 5 %である。実施形態において、対照 I I 型アスパラギナーゼと比較される製造される組み換え I I 型アスパラギナーゼの活性または有効性は、約または少なくとも約 6 5 %、約または少なくとも約 6 6 %、約または少なくとも約 6 7 %、約または少なくとも約 6 8 %、約または少なくとも約 6 9 %、約または少なくとも約 7 0 %、約または少なくとも約 7 1 %、約または少なくとも約 7 2 %、約または少なくとも約 7 3 %、約または少なくとも約 7 4 %、約または少なくとも約 7 5 %、約または少なくとも約 7 5 %、約または少なくとも約 7 6 %、約または少なくとも約 7 7 %、約または少なくとも約 7 8 %、約または少なくとも約 7 9 %、約または少なくとも約 8 0 %、約または少なくとも約 8 1 %、約または少なくとも約 8 2 %、約または少なくとも約 8 3 %、約または少なくとも約 8 4 %、約または少なくとも約 8 5 %、約または少なくとも約 8 6 %、約または少なくとも約 8 7 %、約または少なくとも約 8 8 %、約または少なくとも約 8 9 %、約または少なくとも約 9 0 %、約または少なくとも約 9 1 %、約または少なくとも約 9 2 %、約または少なくとも約 9 3 %、約または少なくとも約 9 4 %、約または少なくとも約 9 5 %、約または少なくとも約 9 6 %、約または少なくとも約 9 7 %、約または少なくとも約 9 8 %、約または少なくとも約 9 9 %、約または少なくとも約 1 0 0 %、約または少なくとも約 1 0 1 %、約または少なくとも約 1 0 2 %、約または少なくとも約 1 0 3 %、約または少なくとも約 1 0 4 %、約または少なくとも約 1 0 5 %、約または少なくとも約 1 0 6 %、約または少なくとも約 1 0 7 %、約または少なくとも約 1 0 8 %、約または少なくとも約 1 0 9 %、約または少なくとも約 1 1 0 %、約または少なくとも約 1 1 1 %、約または少なくとも約 1 1 2 %、約または少なくとも約 1 1 3 %、約または少なくとも約 1 1 4 %、約または少なくとも約 1 1 5 %、約または少なくとも約 1 1 6 %、約または少なくとも約 1 1 7 %、約または少なくとも約 1 1 8 %、約または少なくとも約 1 1 9 %、約または少なくとも約 1 2 0 %、約または少なくとも約 1 2 1 %、約または少なくとも約 1 2 2 %、約または少なくとも約 1 2 3 %、約または少なくとも約 1 2 4 %、約または少なくとも約 1 2 5 %、約または少なくとも約 1 2 6 %、約または少なくとも約 1 2 7 %、約または少なくとも約 1 2 8 %、約または少なくとも約 1 2 9 %、約または少なくとも約 1 3 0 %、約または少なくとも約 1 3 1 %、約または少なくとも約 1 3 2 %、約または少なくとも約 1 3 3 %、約または少なくとも約 1 3 4 %、または約または少なくとも約 1 3 5 %である。実施形態において、対照 I I 型アスパラギナーゼと比較される製造される組み換え I I 型アスパラギナーゼの活性または有効性は、約 6 8 %から約 1 3 2 %、約 7 0 %から約 1 3 0 %、約 7 2 %から約 1 2 8 %、約 7 5 %から約 1 2 5 %、約 8 0 %から約 1 2 0 %、約 8 5 %から約 1 1 5 %、約 6 5 %から約 1 1 0 %、約 6 8 %から約 1 1 0 %、約 7 0 %から約 1 1 0 %、約 7 2 %から約 1 1 0 %、約 7 8 %から約 1 1 0 %、約 8 0 %から約 1 1 0 %、約 9 0 %から約 1 1 0 %、約 9 5 %から約 1 0 5 %、約 8 5 %から約 1 1 0 %、約 9 0 %から約 1 1 0 %、約 9 5 %から約 1 1 0 %、約 9 6 %から約 1 1 0 %、約 9 7 %から約 1 1 0 %、約 9 8 %から約 1 1 0 %、約 9 9 %から約 1 1 0 %、約 1 0 0 %から約 1 1 0 %、約 6 5 %から約 1 0 5 %、約 6 8 %から約 1 0 5 %、約 7 0 %から約 1 0 5 %、約 7 2 %から約 1 0 5 %、約 8 0 %から約 1 0 5 %、約 8 5 %から約 1 0 5 %、約 9 0 %から約 1 0 5 %、約 9 5 %から約 1 0 5 %、約 9 6 %から約 1 0 5 %、約 9 7 %から約 1 0 5 %、約 9 8 %から約 1 0 5 %、約 9 9 %から約 1 0 5 %、約 1 0 0 %から約 1 0 5 %、約 6 5 %から約 1 0 0 %、約 6 8 %から約 1 0 0 %、約 7 0 %から約 1 0 0 %、約 7 2 %から約 1 0 0 %、約 7 5 %から約 1 0 0 %、約 7 8 %から約 1 0 0 %、約 8 0 %から約 1 0 0 %、約 8 1 %から約 1 0 0 %、約 8 2 %から約 1 0 0 %、約 8 3 %から約 1 0 0 %、約 8 4 %から約 1 0 0 %、約 8 5 %から約 1 0 0 %、約 8 6 %から約 1 0 0 %、約 8 7 %から約 1 0 0 %、約 8 8 %から約 1 0 0 %、約 8 9 %から約 1 0 0 %、約 9 0 %から約 1 0 0 %、約 9 1 %から約 1 0 0 %、約 9 2 %から約 1 0 0 %、約 9 3 %から約 1 0 0 %、約 9 4 %から約 1 0 0 %、約 9 5 %から約 1 0 0 %、約 9 6 %から約 1 0 0 %、約 9 7 %から約 1 0 0 %、約 9 8 %から約 1 0 0 %、約 9 9 %から約 1 0 0 %、約 9 5 %から約 9 9 %、約 9 6 %から約 9 9 %、約 9 7 %から約 9 9 %、約 7 0 %から約 1 3 5 %、約 7 5 %から約 1 3 5 %、約 8

10

20

30

40

50

0%から約135%、約85%から約135%、約90%から約135%、約75%から約130%、約80%から約130%、約85%から約130%、約90%から約130%、約80%から約125%、約85%から約125%、約90%から約125%、約85%から約120%、約90%から約120%、または約95%から約120%である。

【0111】

実施例

以下の実施例は、本開示の種々の実施形態を説明する目的のために与えられ、いかなる形でも本開示を限定することは意図されない。本実施例は、本願明細書中に記載され方法とともに、現在代表的な実施形態であり、例示的であり、範囲を制限することは意図されない。そこでの変化および特許請求の範囲により定義される開示の精神の範囲内に包含される他の使用は、当業者に発生するだろう。

【実施例1】

【0112】

実施例1：アスパラギナーゼ発現構築物の調製

E. coli A-1-3 L-アスパラギナーゼII遺伝子を、*P. fluorescens*における発現のために最適化して、細胞質およびペリプラズム発現のための発現ベクターのセットにクローン化した。使用されるアミノ酸配列を、本願明細書中で配列番号1として開示する。使用される核酸配列を、本願明細書中で配列番号2として開示する。

【0113】

発現を、一連の分泌リーダー配列を使用して評価し、一部を高RBS配列で、そして一部を中程度のRBS配列で評価した。さらに、リーダーを使用せずに細胞質発現を評価した。

【0114】

各構築物を*P. fluorescens*宿主株DC454 (*pyrF*欠損、PDまたはFMO無し)およびDC441 (*pyrF*、*Lon*、および*HslUV*欠損)に形質転換し、結果として生じた発現株を、0.5mL培養物中で*E. coli* A-1-3 L-アスパラギナーゼII製造について評価した。全ブロスを超音波処理し、遠心分離し、そして可溶性画分をCGEにより分析した。

【0115】

9.6 ウェル形式における成長および発現

発現プラスミドスクリーニングのために、*E. coli* A-1-3 L-アスパラギナーゼII発現プラスミドのそれぞれについてのライゲーション混合物を、以下のように*P. fluorescens*宿主株DC454およびDC441細胞に形質転換した。コンピテント細胞の25マイクロリットルを解凍し、96マルチウェルNucleovette (登録商標)プレート (*Lonza* VHNP-1001)に移し、各ウェルにライゲーション混合物を加えた。NucleofectorTM 96ウェルShuttleTM システム (*Lonza* AG)を使用して、細胞を電気穿孔した。次いで、細胞を、400μLのM9塩1%グルコース培地および微量元素を有する96ウェルディープウェルプレートに移した。96ウェルプレート (シードプレート) を、30℃で48時間振とうしながらインキュベートした。シード培養の10マイクロリットルを、96ウェルディープウェルプレート中に二重で移し、各ウェルは、微量元素および5%グリセロールを補足された500μLのHTP培地を含有し、以前のように24時間インキュベートされた。イソプロピル-β-D-1-チオガラクトピラノシド (IPTG) を24時間の時点で各ウェルに0.3mMの終濃度で添加して、標的タンパク質の発現を誘導した。マンニトール (*Sigma*、M1902) を、各ウェルに1%の終濃度で添加して、フォールディングモジュレーター過剰発現株中でフォールディングモジュレーターの発現を誘導した。細胞密度を、誘導後24時間で、600nm (OD600) での光学密度により測定し、成長をモニターした。誘導後24時間で、細胞を採取し、400μLの最終体積に1XPBS中で1:3に希釈し、次いで凍結した。試料を、以下に記載されるように調製し、分析した。

【0116】

上位発現プラスミドについての発現結果を表 5 および 6 に示す。

【表 5】

表 5:DC454 における発現プラスミドスクリーニング		
試料名	リーダー	結果 (mg/L)
STR55304-2	Lao	2052
STR55312-2	Pbp	2016
STR55305-2	Ibp-S31A	1413
STR55334-2	8484	1322
STR55333-2	リーダーR	1073
STR55313-2	PbpA20V	1068
STR55302-2	Azu	884
STR55317-2	リーダーD	819
STR55315-2	リーダーB	764
STR55310-2	CupC2	751

【表 6】

表 6:DC441 宿主における発現プラスミドスクリーニング		
試料名	リーダー	結果-Bkg (I0) ug/mL
STR55382-2	Azu	993
STR55384-2	Lao	1422
STR55385-2	Ibp-S31A	1048
STR55392-2	Pbp	1305
STR55393-2	PbpA20V	997
STR55397-2	リーダーD	698
STR55413-2	リーダーR	1005
STR55414-2	8484	1199

【0117】

宿主株スクリーニングについて、発現プラスミドスクリーニング結果に基づいて選択された発現プラスミドをそれぞれ、アレイにおいて、野生型 (WT) または親 DC454 株、プロテアーゼ欠失 (PD) 株、フォールディングモジュレーター過剰発現 (FMO) 株およびプロテアーゼ欠失プラスフォールディングモジュレーターオーバーエクスプレッサー (PD/FMO) 株を含む 24 の *P. fluorescens* 宿主株のそれぞれに形質転換した。*P. fluorescens* アスパラギナーゼ分泌リーダー (AnsB) に融合した *E. coli* アスパラギナーゼは、アレイ中に含まれた (配列番号 14 として記載されるアミノ酸配列; 配列番号 15 として記載されるコード配列)。フォールディングモジュレーターは存在する場合、第 2 のプラスミド上でコードされ、発現は *P. fluorescens* 天然マンニトール誘導性プロモーターにより駆動された。宿主株スクリーニング形質転換を次のように実施した。*P. fluorescens* 宿主株コンピテント細胞の 25 マイクロリットルを解凍し、96 マルチウェル Nucleovette (登録商標) プレート中に移し、10 μ l プラスミド DNA (10 ng) を各ウェルに添加した。上記のプラスミド発現スクリーニングについて記載されるように、細胞を電気穿孔し、培養し、HTP 形式で誘導し、採取した。試料を、下記に記載されるように調製して分析した。

【0118】

分析のための試料の調製

超音波処理およびそれに続く遠心分離により、可溶性画分を調製した。培養ブロス試料（400 μ L）を、24プローブチップホーンを有するCell Lysis Automated Sonication System（CLASS、Scinomix）で、以下の設定で超音波処理した。パルスあたり10秒でウェルあたり20パルス、および各パルス間10秒で60%パワー（Sonics Ultra-Cell）。ライセートを5,500 $\times$ gで15分間遠心分離し（4°C）、上清を収集した（可溶性画分）。

【0119】

SDS-CGE分析

タンパク質試料を、HT Protein Expressチップおよび対応する試薬（それぞれ部品番号760528およびCLS760675、PerkinElmer）を有するLabChip GXII機器（PerkinElmer）を使用してマイクロチップSDSキャピラリーゲル電気泳動により分析した。試料を、製造者のプロトコル（Protein User Guide Document No. 450589, Rev. 3）に従って調製した。簡単には、96ウェルポリプロピレンコニカルウェルPCRプレート中で、4 μ Lの試料を14 μ Lのサンプルバッファーおよび70mM DTT還元剤と混合し、加熱した。

【0120】

誘導後24時間にサンプリングされた全ブロスを、上記で記載されるように処理し、可溶性画分をSDS-CGEにより分析した。

【0121】

商業的に入手可能なL-アスパラギナーゼ活性アッセイキット（Sigma）は、ヌル試料と比較した場合、上位収量株STR55382（Laorリーダー）からのHTP培養ライセート試料中の有意なL-アスパラギナーゼ活性を検出した。

【0122】

アレイ中でスクリーニングされたプラスミドおよび対応する分泌リーダーは以下を含んだ：

【0123】

p742-006 (Azu)

【0124】

p742-008 (LAO)

【0125】

p742-009 (Ibp-S31A)

【0126】

p742-016 (Pbp)

【0127】

p742-017 (PbpA20V)

【0128】

p742-021 (リーダーD)

【0129】

p742-037 (リーダーR)

【0130】

p742-038 (8484)

【0131】

p742-041 (P. fluorescens AnsB)

【0132】

上記で記載されるように発現株を培養し、誘導した。可溶性および不溶性画分のSDS-CGE分析は、アスパラギナーゼの高レベル発現を示した（図1）。表7に記載されるものを含む発現株において、高い力価を観察した。

【表 7】

表 7: 宿主株スクリーニング					
発現株 ID	プラスミド (リーダー)	宿主株	可溶性 I24 (ug/ml)	不溶性 I24 (ug/ml)	全細胞 I24 (ug/ml)
STR55467	p742-041 (AnsB)	DC454 (pyrF、PD 無し、FMO 無し)	3603	268	3871
STR55689	p742-009 (Ibp-S31A)	DC542 (pyrF proC、 FMO lepB (RXF01181.1))	2503	152	2655
STR55559	p742-009 (Ibp-S31A)	PF1201 (pyrF proC、プロテ ア ー ゼ Lon (RXF04653.1) 、 DegP1(RXF01250.2) DegP2 S219A (S219A 置換を有す る RXF07210.1) 、 Prc1(RXF06586.1)、 お よ び AprA(RXF04304.1) 欠損)	2491	174	2665
STR55561	p742-016 (Pbp)	PF1201	2070	484	2554
STR55555	p742-038 (8484)	DC549 (pyrF proC、 FMO tig-RXF04655)	1772	94	1865

【実施例 2】

【0133】

実施例 2：L-Asp1 および L-Asp2 欠損宿主株の振とうフラスコ発現分析

野生型宿主株 DC454 に基づいて、L-Asp1 および L-Asp2 を欠損する *P. fluorescens* 宿主株 PF1433 を生成した。E. coli A-1-3 アスパラギナーゼ II 型の発現分析を、200 mL 振とうフラスコ培養物中で実施した（表 8）。示される値は、10 の異なる超音波処理可溶性画分反復実験から得られた平均である。SDS-CGE 定量を、Sigma E. coli L-Asp2 標準曲線を使用して行った。1 g/L を超える可溶性単量体の製造を観察した。5×希釈試料の例示的な SDS-CGE 画像を図 2 に提供する。

【0134】

表 8 の最後の行は、同じ実験においてアッセイされた、*P. fluorescens* AnsB 分泌リーダーを有する天然 *P. fluorescens* AnsB を発現する株についての発現結果を示す。*P. fluorescens* リーダー-E. coli アスパラギナーゼ構築物は、*P. fluorescens* リーダー-*P. fluorescens* アスパラギナーゼを含む構築物よりも実質的に多くのタンパク質を発現した。

【表 8】

表 8:L-Asp1 および L-Asp2 欠損宿主株の振とうフラスコ発現分析						
発現株 ID	プラスミド (リーダー)	宿主株	Avg Sol 還元 された(μg/ml)	%CV	Avg Insol 還元され た (μg/ml)	%CV
STR55976 (<i>E.coli</i> A-1-3 アスパラギナーゼ II 型)	p742-041 (AnsB)	PF1433 (PyrF 、 AspG1 、 AspG2 欠損)	1011	5	129	41
STR55977 (<i>E.coli</i> A-1-3 アスパラギナーゼ II 型)	p742-009 (Ibp ⁻ S31A)	PF1433	1514	9	253	56
STR55981 (<i>P.fluorescens</i> AnsB)	p744-001 (AnsB)	PF1433	677	12	200	49

【0135】

振とうフラスコ発現の活性分析もまた決定した(表9)。振とうフラスコ発現株のそれぞれから生成された可溶性超音波処理試料を、製造者の指示に従って、Sigmaから購入した市販のキット(Asparaginase Activity Assay Kit)を使用してアスパラギナーゼ活性について分析した。このキットは、生成されたアスパラギン酸に比例する比色最終産物を製造する結合酵素反応を使用して活性を測定する。Sigmaからの*E. coli*アスパラギナーゼII型(A3809)を、陽性対照としてSTR55982ヌルライセート中にスパイクした(最後の行)。活性を、単一の可溶性超音波処理試料の2のアッセイ反復実験から計算した。ライセートの1:25,000希釈では、いずれのヌルソニケートにおいても活性を検出しなかった。1:25,000希釈での742(*E. coli*)およびSigma L-Asp(*E. coli*)標準スパイクインライセートは、比較可能な活性を示した。

10

20

30

40

50

【表 9】

表 9: 振とうフラスコ発現活性分析					
試料説明	試料 ID	可溶性ソニケート力価 (還元 SDS- CGE μ g/ml)	試料希釈係 数	Δ A570 (TF-T0) 20 分	生成され たアスパ ラギン酸 (nmol)
AnsB リーダー	STR55976 -5	202	25,000	0.03	0.36
Ibp-S31A リーダー	STR55977 -5	303	25,000	0.04	0.74
AspG ⁻ ヌル	STR55982 -5	0	25,000	0.00	0.00
AspG ⁺ ヌル	DC432- 657	0	25,000	0.00	0.00
250 μ g/ml へのヌ ルスパイク	AspG2 Sigma	250	25,000	0.03	0.03

【0136】

振とうフラスコ発現の LC-MS 分析も行った (表 10)。調べられた 742 のタンパク質について、予想通りインタクトな質量を観察した。例示的なマスマススペクトロメトリデータを図 3 に提供する。予測された分子重量および観測された分子重量の間には有意差を検出しなかった。

【表 10】

表 10: 振とうフラスコ発現 LC-MS 分析				
試料 ID	Theor. MW (Da) -シ グナル	観察された MW (Da)	観察された Theor. MW (Da)	
STR55976 742- 041	34591.96	34591	-0.96	
STR55977 742- 009		34591	-0.96	
742 Sigma AspG2	34591.96	34591	-0.96	

【0137】

存在する同定された四量体 (活性) タンパク質形態を、サイズ排除クロマトグラフィーによりさらに評価した。可溶性超音波処理試料を、分析の前にイオン交換スピンカラムにより脱塩した。サイズ排除クロマトグラフィーは、E. coli L-Asp2 標準 (Sigma) と一致する、可溶性ソニケートにおいて観察される四量体の予想される MW に相関するピークを示した。

【実施例 3】

【0138】

実施例 3: *P. fluorescens* アスパラギナーゼ欠損宿主株の構築

P. fluorescens アスパラギナーゼ遺伝子ノックアウトプラスミドの構築

アスパラギナーゼタンパク質アミノ酸配列をインプットとして使用した *P. fluorescens* MB214 ゲノム配列の BLAST 検索は、以下の有意なアラインメントを示す 2 のタンパク質コード遺伝子 (ペグ) のアウトプットを結果として生じた: ペグ. 3886 (L-アスパラギナーゼ EC 3.5.1.1 II 型、配列番号 54) および

ペグ、5048（*L*-アスパラギナーゼEC 3.5.1.1、配列番号55）。各天然 *L*-アスパラギナーゼ遺伝子についてクローン化された欠失構築物を、欠失について標的化された遺伝子の開始および終止コドンのみを残す各遺伝子についての上流および下流隣接領域の融合を含有するDNA配列断片を合成することによって開始した。これらのフラグメントは、次いで、ベクターpDOW1261-24のSrfI部位中に平滑末端ライゲートされ、それぞれ欠失プラスミドpFNX3970およびpFNX3969を製造した。

【0139】

その後、ライゲーション反応を*E. coli* DH5アルファ細胞（Thermo Scientific）に形質転換して、コロニーを分離し、正常にクローニングされた欠失プラスミドDNAを精製した。

【0140】

天然*L*-アスパラギナーゼ欠損宿主株の構築

以下の方法を使用して、選択された宿主株中で、各遺伝子の染色体欠失を順次実施した。欠失プラスミドを、ウラシル（ピリミジン）生合成に関与するpyrF遺伝子中に染色体欠失を含有する*P. fluorescens*宿主株中に電気穿孔した。欠失プラスミドは、PyrFコード配列を含有するが、*P. fluorescens*細胞中では複製できない。電気穿孔した細胞を、1%グルコースおよび250 μg/mLプロリン（宿主株がプロリン栄養要求性の場合）を補足したM9塩寒天プレート上に播種した。結果として生じるクローンは、欠失プラスミド全体をゲノム内の2つの相同な領域の1つにある染色体中に組換えさせる組み込み事象により、ウラシルを合成することができる。組み込まれたプラスミドおよび染色体の間で第2の相同組換えを実行し、それにより欠失を残す細胞を選択するために、プラスミド組み込み株を、250 μg/mLウラシルおよび250 μg/mLプロリン（宿主株がプロリン栄養要求性の場合）を補足した3 mL LB培地中で定常期まで成長させた。次いで、細胞を、500 μg/mLの5-フルオロオロチン酸（5-FOA）（Zymo Research）をも含有するLBウラシル（250 μg/mL）プラス250 μg/mLプロリン（宿主株がプロリン栄養要求株の場合）寒天培地上に播種した。組み換えにより組み込まれたプラスミドを失う細胞はまた、pyrF遺伝子も失い、したがって細胞成長を妨げる毒性化合物に他の方法で変換される5-FOAに耐性があると予想される。次いで、5-FOA（500 μg/mL）の存在下で良好な成長を示す単一コロニーを採取し、250 μg/mLウラシルおよび250 μg/mLプロリン（宿主株がプロリン栄養要求性の場合）を補足した1%グルコースを含有する3 mL液体M9最少培地中で成長させ、グリセロールストックとしておよび診断用PCRおよびシーケンシング反応のためのテンプレートとしての保存用培養物を生成した。

【0141】

天然*L*-アスパラギナーゼ遺伝子の染色体欠失の確認

診断用PCR反応を使用して、ノックアウトプラスミドにクローン化された合成された遺伝子欠失配列の外側の染色体領域にアニールするプライマーを利用して、所望の天然*L*-アスパラギナーゼ遺伝子染色体欠失をスクリーンした。生成されたPCR産物のDNAシーケンシングを使用して、所望の天然*L*-アスパラギナーゼ遺伝子欠失が、不所望の変異またはDNA再構成を伴わずに予想通り発生したことを決定した。

【0142】

下記の*P. fluorescens*アスパラギナーゼKO宿主株を作製した。

【0143】

PF1433（PyrF、AspG1、およびAspG2欠損）を、宿主株DC454（PyrF欠損）中のaspG2およびaspG1遺伝子の順次欠失により構築した。

【0144】

PF1434（PyrF、ProC、AspG1、およびAspG2欠損）を、宿主株DC455（pyrF proC）中のaspG1およびaspG2遺伝子の順次欠失により構築した。DC455株は、DC542およびDC549両方の親株である。

【0145】

PF1442 (PyrF、ProC、AspG1、AspG2Lon、DegP1、DegP2 S219A、Prc1、およびAprA欠損)を、宿主株PF1201 (PyrF、ProC、プロテアーゼLon、DegP1、DegP2 S219A、Prc1、およびAprA欠損)中のaspG2およびaspG1の順次欠失により構築した。

【0146】

PF1443 (PyrF、ProC、AspG1、およびAspG2欠損；pDOW3700におけるFMO LepB)を、LepBコードFMOプラスミドpDOW3700をPF1434に形質転換することにより構築した。

【0147】

PF1444 (PyrF、ProC、AspG1、およびAspG2欠損；pDOW3707におけるFMO Tig)を、TigコードFMOプラスミドpDOW3703をPF1434に形質転換することにより構築した。

【0148】

PF1445 (PyrF、ProC、AspG1、AspG2Lon、DegP1、DegP2、S219A、Prc1、およびAprA欠損；pFNX4142におけるFMO DsbAC-Skp)を、DsbAC-SkpコードプラスミドpFNX4142でのPF1442の形質転換により構築した。

【0149】

使用された株を、表11に記載する。

【表11】

表 11: アスパラギナーゼ欠損発現株の宿主背景				
発現株 ID	宿主株	発現プラスミド	背景表現型*	分泌リーダー
STR57867	PF1433	p742-041	野生型	AnsB
STR57864	PF1445	p742-009	PD/FMO	Ibp-S31A
STR57865	PF1445	p742-016	PD/FMO	Pbp
STR57866	PF1445	p742-041	PD/FMO	AnsB
STR57860	PF1443	p742-041	FMO	AnsB
STR57861	PF1444	p742-041	FMO	AnsB
STR57862	PF1443	p742-009	FMO	Ibp-S31A
STR57863	PF1444	p742-038	FMO	8484

*プロテアーゼ欠損/欠失およびフォールディングモジュレーター過剰発現に関して。

【実施例4】

【0150】

実施例4：選択された発現株の2L発酵および可溶性%TCPの計算

実施例3に記載された株STR57863およびSTR57860を、2L発酵にスクリーニングし、それぞれ最大8の異なる発酵条件下でスクリーニングした。2L規模の発酵（およそ1Lの最終発酵体積）のための接種材料を、酵母抽出物およびグリセロールを補足した化学的に定義された培地600mLを含有する振とうフラスコを選択された株の凍結培養ストックで接種することにより生成した。30°Cで振とうしながら16から24時間インキュベートした後、次いで、各振とうフラスコ培養の等分を、高いバイオマスを支持するように設計された化学的に定義された培地を含有する8ユニットのマルチプレックス発酵システムのそれぞれに無菌で移した。2L発酵槽において、培養物を、グリセロールフェッドバッチモードで、pH、温度、および溶存酸素についてコントロールされた条件で操作した。ファッドバッチ高細胞密度発酵プロセスは、成長期、次いで、培養が標

的バイオマス（湿潤細胞重量）に達するとIPTGの添加により開始される誘導期で構成された。誘導期中の条件は、実験設計に従って変化した。発酵の誘導期はおよそ24時間進行させた。分析試料を、発酵槽から回収し、細胞密度（575nmでの光学密度）を決定し、次いで、その後の分析のために凍結され、標的遺伝子の発現レベルを決定した。誘導後24時間の最終時点で、各容器の全発酵ブロス、15,900xgで60から90分間、遠心分離により採取した。細胞ペーストおよび上澄みを分離し、ペーストを保持して-80°Cで凍結した。

【0151】

表12は、いくつかの発酵条件下での株STR57863およびSTR57860での発現結果を示す。示されるように、初期株／発酵条件組み合わせのいくつかは、>30% TCPアスパラギナーゼ発現を結果として生じた。総細胞タンパク質を以下のように計算した：

【0152】

$0.55 \text{ DCW総細胞タンパク質} \times A_{550} \text{での} 500 \mu\text{g/mL DCW} = A_{550} = 1 \text{ での総細胞タンパク質} 275 \mu\text{g/mL (またはmg/L)}$

【0153】

最終時点（I24）でのTCP = $OD_{575} \times 275 \text{ mg/L TCP}$

【0154】

可溶性%TCP = $100 \times (\text{可溶性力価} / \text{TCP})$

【0155】

10

20

30

40

50

【表 1 2】

表 12:2L 発酵発現結果

株名	誘導セットポイント			最終 OD 575	I24で の TCP (mg/ L)	可 溶 性 力 価 (mg/ L)	Insol ・ 力 価 (mg/ L)	総 力 価 (mg/ L)	% 可溶 性力価	% 可 溶 性 TCP
	wcwg/g	pH	IPTG (mM)							
STR57863	0.4	6.5	0.2	197	5417 5	4652	745	5397	86.2	8.59
	0.4	7.2	0.08	218	5995 0	3879	756	4635	83.7	6.47
	0.2	7.2	0.2	217	5967 5	8518	1565	1008 3	84.5	14.27
	0.2	6.5	0.2	189	5197 5	2465 8	2329	2698 7	91.4	47.44
	0.2	6.5	0.08	221	6077 5	2863	837	3700	77.4	4.71
	0.4	7.2	0.2	221	6077 5	1424 5	1206	1545 1	92.2	23.44
	0.4	6.5	0.08	201	5527 5	8226	1137	9363	87.9	14.88
	0.4	6.5	0.2	233	6407 5	1850 8	2166	2067 4	89.5	28.88
STR57860	0.4	7.2	0.08	218	5995 0	1524 1	1404	1664 5	91.6	25.42
	0.2	7.2	0.2	245	6737 5	2144 5	4700	2614 5	82.0	31.83
	0.2	6.5	0.08	168	4620 0	1547 8	3357	1883 5	82.2	33.50
	0.4	7.2	0.2	206	5665 0	3428 3	2226	3650 9	93.9	60.52
	0.2	7.2	0.08	228	6270 0	3530 1	2387	3768 8	93.7	56.30
	0.4	6.5	0.08	198	5445 0	3028 4	1903	3218 7	94.1	55.62

【実施例 5】

【0156】

実施例 5：さらなる発現株の 2 L 発酵および可溶性 % T C P の計算

本明細書中で記載されるように構築されたさらなる株、例えば、実施例 3 に記載されるさらなる株を、2 L 発酵にスケーリングし、実施例 4 に記載されるものと類似の方法で異なる発酵条件下でそれぞれスクリーニングする。

10

20

30

40

50

【表 13 - 1】

表 13: 列挙される配列の表		
タンパク質または核酸	配列	配列番号
成熟 <i>E. coli</i> A-1-3 L-アスパラギナーゼ II 型 アミノ酸配列 (分泌リーダー配列無し)	LPNITILATGGTIAGGGDSATKSNYTAGKVGVENLVNAVLPQLKDIANVKGEQVVNIGSQDMNDDVWLTAKKINTDCDKTDGFEVITHGTDMEETAYFLDLTVKCDKPVVMVGAMRPSTSMSADGPFNLYNAVVTAAADKASANRGVLVVMNDTVLDGRDVTKTNTTVDVATFKSVNYGPLYIHNGKIDYQRTIPARKHTSDTPFDVSKLNELPKVGIVVNYANASDLPAKALVDAGYDGIVSAGVGNNGNLYKTVFDTLATAAKNGTAVVRSSRVPTGATTQDAEVDDAKYGFVASGTLNPPQKARVLLQLALTQTKDPQQIQQIFNQY	1
配列番号 1 の成熟 <i>E. coli</i> A-1-3 L-アスパラギナーゼ II 型アミノ酸配列をコードする最適化された核酸	CTCCCTAACATTACTATTCTGGCCACTGGCGGTACGATTGCAGGCGGCGGTGACTCAGCCACCAAGTCGAATTACACCGCCGGTAAGGTGCGGTGTCGAAAACCTCGTCAACGCCGTGCCGCAGCTGAAAGATATCGCCAACTCAAGGGCGAGCAAGTGGTGAACATCGGCTCCCAAGATATGAACGATGACGTGTGGCTGACGCTGGCCAAAGAAAATCAACACCGATTGCGACAGACGGACGGGTTTGTTCATCACCACCGCACCGACACTATGGAAGAGACTGCCTACTTCCTCGACCTCAGGTGAAGTGCATATAACCGGTAGTGATGGTGGGCGCCATGCGCCGAGCACCTCGATGAGCGCGGACGGCCCGTTCAATCTGTACAACGCCGTGGTAACCGCAGCGGACAAGGCGTCCGCGAACCAGCGGTGTATTGGTAGTGTGAACGATACGGTGCTCGATGGCGCGATGTGAACCAAGACCAATACCACTGATGTGGCCACCTTCAAGAGCGTGAACCTATGGCCCGCTGGGCTACATCCATAACGGCAAGATCGATTACCGAGCTACTCCCGCCCGGAAGCACACCTCGGACACCCCTTCGACGTGTGAAACTGAACGAAGTGCCTCAAGGTGCGCATCGTCTACAACTACGCCAATGCGAGCGATCTGCGCGCGAAGGCCCTGGTGGACGCGCGCTACGACGGGATCGTATCGGCGGGTGTGGGCAATGGTAACCTGTACAAAGCCGTGTTTGACACCCTGGCGACGGCGCGGAAGAAGCGCACCGCCGTGGTCCGAGCAGCCCGTGGCCACTGGGGCGACACCCCAAGACGCCGAGGTGCGACGCGGAAGTACGGCTTCGTAGCCAGCGGCACCCCTGAACCCGCAAAAGGCCCGGGTCTGCTGCGAGCTGGCGCTCACGCGAGACGAAGGACCCGCGAGCAAATCCAACAGATCTTCAACAGTAC	2
<i>E. coli</i> K-12L-アスパラギナーゼ II 型 アミノ酸配列 (下線を引かれた天然分泌リーダーを含む) (GenBank M34277)	MEFFKKTALAAALVMGFSGAALALPNITILATGGTIAGGGDSATKSNTVKGKVGVENLVNAVLPQLKDIANVKGEQVVNIGSQDMNDDVWLTAKKINTDCDKTDGFEVITHGTDMEETAYFLDLTVKCDKPVVMVGAMRPSTSMSADGPFNLYNAVVTAAADKASANRGVLVVMNDTVLDGRDVTKTNTTVDVATFKSVNYGPLYIHNGKIDYQRTIPARKHTSDTPFDVSKLNELPKVGIVVNYANASDLPAKALVDAGYDGIVSAGVGNNGNLYKTVFDTLATAAKNGTAVVRSSRVPTGATTQDAEVDDAKYGFVASGTLNPPQKARVLLQLALTQTKDPQQIQQIFNQY	3

10

20

30

40

50

【表 13-2】

<i>E. coli</i> K-12 アスパラギナ ーゼ II 型核酸 配列 (配列番 号 3 をコード する; 天然分 泌リーダーコ ード配列を含 む)	ATGGAGTTTTTCAAAAAGACGGCACTTGCCGCACTGGTTATGGGTTT TAGTGGTGCAGCATTGGCATTACCCAATATCACCATTITAGCAACCG GCGGGACCATTTGCCGGTGGTGGTGAATCCGCAACCAATCTAACTAC ACAGTGGGTAAAGTTGGCGTAGAAAATCTGGTTAATGCGGTGCCGCA ACTAAAAGACATTGCGAACGTTAAAGGCGAGCAGGTAGTGAATATCG GCTCCAGGACATGAACGATAATGTCTGGCTGACACTGGCGAAAAAA ATTAAACACCGACTGCGATAAGACCGACGGCTTCGTCTATTACCCACGG TACCGACACGATGGAAGAACTGCTTACTTCCTCGACCTGACGGTGA AATGCGACAAACCGGTGGTGGTGGTGGCGCAATGCGTCCGTCCACG TCTATGAGCGCAGACGGTCCATTCAACCTGTATAACGCGGTAGTGAC CGCAGCTGATAAAGCCTCCGCCAACCGTGGCGTGGTGGTGGTGGTGG ATGACACCGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG GACGTAGCGACCTTCAAGTCTGTAACTACGGTCTCTGGGTTACAT TCACAACGGTAAGATTGACTACCAGCGTACCCCGGCACGTAAGCATA CCAGCGACACGCCATTTCGATGTCTCTAAGCTGAATGAAGTGGCGAAA GTCGGCATTGTTTATAACTACGCTAACGCATCCGATCTTCCGGGTAA AGCACTGGTAGATGCGGGCTATGATGGCATCGTTAGCGCTGGTGGTGG GTAACGGCAACCTGTATAAATCTGTGTTTCGACACGCTGGCGACCGCC GCGAAAACCGGTACTGCGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG CGCTACCACTCAGGATGCCGAAGTGGATGATGCGAAATACGGCTTCG TCGCCTCTGGCACGCTGAACCCGCAAAAAGCGCGCTTCTGCTGCAA CTGGCTCTGACGCAAAACCAAGATCCGCAGCAGATCCAGCAGATCTT CAATCAGTACTAA	4
<i>E. coli</i> K-12 アスパラギナ ーゼ II 型ア ミノ酸配列 (分泌リーダ ーを除く)	LPNITILATGGTIAGGGDSATKSNYTVGKVGVENLVNAVPLKDIAN VKGEQVNVNIGSQDMNDNVWLTLAKKINTDCDKTDGFVITHGDTMEE TAYFLDLTVKCDKPVVMVGAMRPSTSMSADGPFNLNAVVTAAADKAS ANRGVLVVMNDTVLDGRDVTIKNTTDDVATFKSVNYGPLGYIHNGKID YQRTIPARKHTSDTPFDVSKLNEPKVGIVYNYANASDLPAKALVDAG YDGIVSAGVGNLYKSVFDLATAAKTGTAVVRSRVPTGATTQDA EVDDAKYGFVASGTLNPQKARVLLQLALTQTKDPQIQIIFNQY	5
<i>E. coli</i> A-1-3 アスパラギナ ーゼ II 型ア ミノ酸配列 (下線を引か れた <i>P. fluorescens</i> <i>AnsB</i> 分泌リ ーダー配列を 含む)	MKSALKNVIPGALALLLLFPVAAQALPNITILATGGTIAGGGDSATK SNYTAGKVGVENLVNAVPLKDIANVKGEQVNVNIGSQDMNDNVWLTL AKKINTDCDKTDGFVITHGDTMEETAYFLDLTVKCDKPVVMVGAMR PSTSMSADGPFNLNAVVTAAADKASANRGVLVVMNDTVLDGRDVTKT NTTDDVATFKSVNYGPLGYIHNGKIDYQRTIPARKHTSDTPFDVSKLNE LPKVGIVYNYANASDLPAKALVDAGYDGIVSAGVGNLYKTVFDL ATAAKNGTAVVRSRVPTGATTQDAEVDDAKYGFVASGTLNPQKARV LLQLALTQTKDPQIQIIFNQY	6

10

20

30

40

50

【表 1 3 - 3】

<i>E.coli</i> A-1-3 アスパラギナ ーゼ II 型 アミ ノ 酸 配 列 (下 線を引かれた 8484 分泌リ ーダー 配列 を含む)	MRQLFFCLMLMVS ~~SLTAHALPNITILATGGTIAGGGDSATKS~~ NYTAGK VGVENLVNAV ~~PQLKDIANVKGEQVVNIGSQDMNDDVWLT~~ LAKKINTD CDKTDG ~~FVITHGTD~~ TMEETAYFLDLTVKCDKPVVMVGAMRPSTMSA DGPFFNLYNAV ~~VTAADKASANRGVLVVMNDTVLDGRDVT~~ TKNTTDVAT FKSVNYG ~~PGLGYIHNGKIDYQRT~~ PARKHTSDTPFDVSKLNELPKVGIV YNYANASDLPAKALVDAGYDGIVSAGVGNGNLYKT ~~VFDTLATAAKNG~~ TAVVRSSRVPTGATTQDAEVDDAKYGFVASGTLN ~~PQKARVLLQLALT~~ QTKDPQIQIQIFNQY	7
<i>E.coli</i> A-1-3 アスパラギナ ーゼ II 型 ア ミ ノ 酸 配 列 (下線を引か れた Ibp- S31A 分泌リ ーダー配列を 含む)	MIRDNR ~~LKTSLLRGLTLLSLTLLSPAHALPNITILATGGTIAGG~~ GDSATKS ~~NYTAGKVGVENLVNAV~~ PQLKDIANVKGEQVVNIGSQDMND DVWLT ~~LAKKINTDCDKTDG~~ FVITHGTDMEETAYFLDLTVKCDKPVV MVGAMRPSTMSADG ~~PFFNLYNAV~~ VTAADKASANRGVLVVMNDTVLDG RDVT ~~TKNTTDVAT~~ FKSVNYG ~~PGLGYIHNGKIDYQRT~~ PARKHTSDTPFD VSKLNELPKVGIV ~~YNYANASDLPAKALVDAGYDGIVSAGVGNGNLYK~~ TVFDTLATAAKNGTAVVRSSRVPTGATTQDAEVDDAKYGFVASGTLN PQKARVLLQLALTQTKDPQIQIQIFNQY	8
<i>E.coli</i> A-1-3 アスパラギナ ーゼ II 型 アミ ノ 酸 配 列 (下 線を引かれた pbp 分泌リ ーダー配列を 含む)	MKLKRLMAAMTFVAAGVATANAVALPNITILATGGTIAGGGDSATKS NYTAGKVGVENLVNAV ~~PQLKDIANVKGEQVVNIGSQDMNDDVWLT~~ LA KKINTDCDKTDG ~~FVITHGTD~~ TMEETAYFLDLTVKCDKPVVMVGAMRP STMSADG ~~PFFNLYNAV~~ VTAADKASANRGVLVVMNDTVLDGRDVT ~~TKN~~ TTDVATFKSVNYG ~~PGLGYIHNGKIDYQRT~~ PARKHTSDTPFDVSKLNEL PKVGIV ~~YNYANASDLPAKALVDAGYDGIVSAGVGNGNLYKT~~ VFDTLA TAAKNGTAVVRSSRVPTGATTQDAEVDDAKYGFVASGTLN ~~PQKARVL~~ LQLALTQTKDPQIQIQIFNQY	9

【表 1 3 - 4】

<i>E.coli</i> A-1-3 アスパラギナ ーゼ II 型 アミ ノ 酸 配 列 (下 線を引かれた LAO 分泌リ ーダー配列を 含む)	MQNYKKFLLAAVSM ~~AFS~~ SATAMALPNITILATGGTIAGGGDSATKS NYTAGKVGVENLVNAV ~~PQLKDIANVKGEQVVNIGSQDMNDDVWLT~~ LAK KINTDCDKTDG ~~FVITHGTD~~ TMEETAYFLDLTVKCDKPVVMVGAMRPS TSMSADG ~~PFFNLYNAV~~ VTAADKASANRGVLVVMNDTVLDGRDVT ~~TKNT~~ TDVATFKSVNYG ~~PGLGYIHNGKIDYQRT~~ PARKHTSDTPFDVSKLNELP KVGIV ~~YNYANASDLPAKALVDAGYDGIVSAGVGNGNLYKT~~ VFDTLAT AAKNGTAVVRSSRVPTGATTQDAEVDDAKYGFVASGTLN ~~PQKARVLL~~ QLALTQTKDPQIQIQIFNQY	10
<i>E.coli</i> A-1-3 アスパラギナ ーゼ II 型 ア ミ ノ 酸 配 列 (下線を引か れた Azurin 分泌リーダ ー配列を含む)	MFAKLVA ~~VSL~~ LLASGQ ~~LLAL~~ PNITILATGGTIAGGGDSATKS ~~NYTA~~ GKVGVENLVNAV ~~PQLKDIANVKGEQVVNIGSQDMNDDVWLT~~ LAKKIN TDCDKTDG ~~FVITHGTD~~ TMEETAYFLDLTVKCDKPVVMVGAMRPSTSM SADG ~~PFFNLYNAV~~ VTAADKASANRGVLVVMNDTVLDGRDVT ~~TKNTTDV~~ ATFKSVNYG ~~PGLGYIHNGKIDYQRT~~ PARKHTSDTPFDVSKLNELPKVG IVYNYANASDLPAKALVDAGYDGIVSAGVGNGNLYKT ~~VFDTLATAAK~~ NGTAVVRSSRVPTGATTQDAEVDDAKYGFVASGTLN ~~PQKARVLLQLA~~ LTQTKDPQIQIQIFNQY	11
<i>E.coli</i> A-1-3 アスパラギナ ーゼ II 型 アミ ノ 酸 配 列 (下 線を引かれた PbpA20V 分 泌リーダ配 列を含む)	MKLKRLMAAMTFVAAGVATVNAVALPNITILATGGTIAGGGDSATKS NYTAGKVGVENLVNAV ~~PQLKDIANVKGEQVVNIGSQDMNDDVWLT~~ LA KKINTDCDKTDG ~~FVITHGTD~~ TMEETAYFLDLTVKCDKPVVMVGAMRP STMSADG ~~PFFNLYNAV~~ VTAADKASANRGVLVVMNDTVLDGRDVT ~~TKN~~ TTDVATFKSVNYG ~~PGLGYIHNGKIDYQRT~~ PARKHTSDTPFDVSKLNEL PKVGIV ~~YNYANASDLPAKALVDAGYDGIVSAGVGNGNLYKT~~ VFDTLA TAAKNGTAVVRSSRVPTGATTQDAEVDDAKYGFVASGTLN ~~PQKARVL~~ LQLALTQTKDPQIQIQIFNQY	12

10

20

30

40

50

【表 1 3 - 5】

<i>E.coli</i> A-1-3 アスパラギナーゼ II 型アミノ酸配列 (下線を引かれた CupC2 分泌リーダー配列を含む)	MPPRSIAACLGLLGLLMATQAAALPNITILATGGTIAGGGDSATKSN YTAGKVGVENLVNAVLPQLKDIANVKGEQVNVNIGSQDMNDDVWLTAK KINIDCDKTDGFVITHGTDMEETAYFLDLTVKCDKPVVMVGAMRPS TMSADGPFNLVNAVVTAAADKASANRGVLVVMNDTVLDGRDVTKTNT TDVATFKSVNYGPLGYIHNGKIDYQRTIPARKHTSDTPFDVSKLNELP KVGIVYNYANASDLPAKALVDAGYDGIVSAGVGNLKYKTVFDTLAT AAKNGTAVVRSRVPTGATTQDAEVDDAKYGFVASGTLNPQKARVLL QLALTQTKDPQQIQQIFNQY	13
AnsB 分泌リーダー アミノ酸配列 (<i>P.fluorescens</i> アスパラギナーゼ II 型天然分泌リーダー)	MKSALKNVIPGALALLLLFPVAAQA	14
AnsB 分泌リーダー 核酸配列 (<i>P.fluorescens</i> アスパラギナーゼ II 型天然分泌リーダー)	ATGAAATCTGCATTGAAGAACGTTATTCGGGGCGCCCTGGCCCTTCT GCTGCTATTCCCGTCGCCGCCAGGCA	15

【表 1 3 - 6】

8484 分泌リーダー アミノ酸配列 (<i>P.fluorescens</i>)	MRQLFFCLMLMVSLTAHA	16
8484 分泌リーダー 核酸配列 (<i>P.fluorescens</i>)	ATGCGACAACACTATTTTTCTGTTTGATGCTGATGGTGTGCTCACGGC GCACGCC	17
Ibp-S31A 分泌リーダー アミノ酸配列 (<i>P.fluorescens</i>)	MIRDNRLKTSLLRGLTLTLLSLTLLSPRAHA	18
Ibp-S31A 分泌リーダー 核酸配列 (<i>P.fluorescens</i>)	ATGATCCGTGACAACCGACTCAAGACATCCCTTCTGCGCGGCCTGAC CCTCACCCCTACTCAGCCTGACCCTGCTCTCGCCCGCGGCCCATGCC	19

【表 1 3 - 7】

Pbp 分泌リーダー アミノ酸配列 (<i>P.fluorescens</i>)	MKLKRLMAAMTFVAAGVATANAVA	20
Pbp 分泌リーダー 核酸配列 (<i>P.fluorescens</i>)	ATGAAACTGAAACGTTTGATGGCGGCAATGACTTTTGTGCTGCTGG CGTTGCGACCGCCAACGCGGTGGCC	21
LAO 分泌リーダー アミノ酸配列 (<i>P.fluorescens</i>)	MQNYKKFLLAAVSMAFSATAMA	22
LAO 分泌リーダー 核酸配列 (<i>P.fluorescens</i>)	ATGCAGAACTATAAAAAATTCCTTCTGGCCGCGGCCGTCTCGATGGC GTTGAGCGCCACGGCCATGGCA	23

【表 1 3 - 8】

Azurin 分泌リーダー アミノ酸配列 (<i>P.fluorescens</i>)	MFAKLVAVSLTLASGQLLA	24
Azurin 分泌リーダー 核酸配列 (<i>P.fluorescens</i>)	ATGTTTGCCAACTCGTTGCTGTTTCCCTGCTGACTCTGGCGAGCGG CCAGITGCTTGCT	25
PbpA20V 分泌リーダー アミノ酸配列 (<i>P.fluorescens</i>)	MKLKRLMAAMTFVAAGVATVNAVA	26
PbpA20V 分泌リーダー 核酸配列 (<i>P.fluorescens</i>)	ATGAAACTGAAACGTTTGATGGCGGCAATGACTTTTGTGCTGCTGG CGTTGCGACCGTCAACGCGGTGGCC	27

10

20

30

40

50

【表 1 3 - 9】

CupC2 分泌 リーダー ア ミノ酸配列 (<i>P.fluorescen</i> <i>s</i>)	MPPRSIAACLGLLGLMATQAAA	28
CupC2 分泌 リーダー 核 酸配列 (<i>P.fluorescen</i> <i>s</i>)	ATGCCGCCTCGTTCTATCGCCGCATGTCTGGGGCTGCTGGGCTTGCT CATGGCTACCCAGGCCGCCGCC	29
<i>E.coli</i> K-12 AnsB 分泌リ ーダー アミ ノ酸配列	MEFFKKTALAALVMGFSGAALA	30
Ttg2C 分泌リーダー アミノ酸配列 (<i>P.fluorescen</i> <i>s</i>)	MQNRTVEIGVGLFLLAGILALLLLALRVSGLSA	31
Ttg2C 分泌 リーダー 核 酸配列 (<i>P.fluorescen</i> <i>s</i>)	ATGCAAAACCGCACTGTGGAAATCGGTGTGGGCCITTTCTTGCTGGC TGGCATCCTGGCTTTACTGTTGTTGGCCCTGCGAGTCAGCGGCCCTTT CGGCC	32

【表 1 3 - 1 0】

Tpr 分泌リ ーダー アミノ 酸配列 (<i>P.fluorescen</i> <i>s</i>)	MNRSSALLLAFVFLSGCQAMA	33
Tpr 分泌リ ーダー 核酸配 列 (<i>P.fluorescen</i> <i>s</i>)	ATGAATAGATCTTCGCGTTGCTCCTCGCTTTTGTCTTCCTCAGCGG CTGCCAGGCCATGGCC	34
DsbC 分泌リ ーダー アミ ノ酸配列 (<i>P.fluorescen</i> <i>s</i>)	MRLTQIIAAAAIALVSTFALA	35
DsbC 分泌リ ーダー 核酸配 列 (<i>P.fluorescen</i> <i>s</i>)	ATGCGCTTGACCCAGATTATTGCCGCCGCGCCATTGCGTTGGTTTC CACCTTTGCGCTCGCC	36
5193 分泌リ ーダー アミ ノ酸配列 (<i>P.fluorescen</i> <i>s</i>)	MQSLPFSALRLLGLVLAVMCVLLTTPARA	37
5193 分泌リ ーダー 核酸配 列 (<i>P.fluorescen</i> <i>s</i>)	ATGCAAAGCCTGCCGTTCTCTGCGTTACGCCTGCTCGGTGTGCTGGC AGTCATGGTCTGCGTGCTGTTGACGACGCCAGCCCGTGCC	38

10

20

30

40

50

【表 1 3 - 1 1】

DsbA 分泌リーダー アミノ酸配列 (<i>P.fluorescens</i>)	MRNLILSAALVTASLFGMTAQA	39
DsbA 分泌リーダー 核酸配列 (<i>P.fluorescens</i>)	ATGCGTAATCTGATCCTCAGCGCCGCTCTCGTCACTGCCAGCCTCTT CGGCATGACCGCACAGCT	40
TolB 分泌リーダー アミノ酸配列 (<i>P.fluorescens</i>)	MRNLLRGMLVVICCMAGIAAA	41
TolB 分泌リーダー 核酸配列 (<i>P.fluorescens</i>)	ATGAGAAACCTTCTTCGAGGAATGCTTGTCTGTTATTGCTGTATGGC AGGGATAGCGGCGGCG	42
CupB2 分泌リーダー アミノ酸配列 (<i>P.fluorescens</i>)	MLFRILLASLTFAVIAGLPSTAH	43
CupB2 分泌リーダー 核酸配列 (<i>P.fluorescens</i>)	ATGCTTTTTCGCACATTACTGGCGAGCCTTACCTTTGCTGTCATCGC CGGCTTACCGTCCACGGCCACGCG	44
コンセンサス RBS (高い結合強度)	AGGAGG	45

10

20

30

40

50

【表 13-12】

RBS2	GGAGCG	46
RBS34	GGAGCG	47
RBS41	AGGAGT	48
RBS43	GGAGTG	49
RBS48	GAGTAA	50
RBS1	AGAGAG	51
RBS35	AAGGCA	52
RBS49	CCGAAC	53
AspG1 アミノ酸配列 (<i>P.fluorescens</i> : RXF08567; peg5048)	MQSANNVMVLYTGTTIGMQASANGLAPASGFVVRMREQFAGADLP RFQEMSPLIDSANMNPAYWQRLRSVVEAVDAGCDVLIHGTDTLA YSAAAMSFQLLGLPAPVVFTGSMLPAGVPDSDAWENVSGALTALGEG LKPGVHLYFHGALMAPTRCAKIRSFGRNPFAALQRNGGVALADKLPA ALAYRNDKAPANVGVLPLVPGIAAAQLDALIDSGIQALVLECFGSGT GPSDNPAFLASLKRAQDQEVVVVAITQCHEGGVELDVYEAGSRLRSV GVLSGGGMTREAAFGKLNALIGAGLDSAEIRRLVELDLGELS	54
AspG2 アミノ酸配列 (<i>P.fluorescens</i> : (RXF05674; peg3886)(配 列は、下線を 引かれた <i>P.fluorescens</i> AnsB 分泌リ ーダー配列 を含む)	<u>MKSALKNVIPGALALLLFPVAAQAKEVESKTKLSNVVILATGGTIA</u> GAGASAANSATYQAAKVGIEQLIAGVPELSQIANVRGEQVMQIASES INNENLLQLGRRVAELADNKDVGIVITHGTDITLEETAYFLNLVEKT DKPIVVVGSMRPGTAMSADGMLNLYNAVAVAGSKEARGKGVLTMMND EIQSGRDVSKMINIKTEAFKSPWGPMPGMVVEGKSYWFLPAKRHTMD SEFDIKTIKSLPDVEIAYGYGNVSDTAYKALAQAQAKAIIHAGTGNG SVSSKVVPALVELRKQGVQIIRSSHVNAGGMVLRNAEQPDDKYDWVA ALDLNPQKARILAMVALTKTQDSKELQRIFWEY	55
Skp (ompH) RXF04702.1 アミノ酸配列 (<i>P.fluorescens</i> s)	VRKLTQLVLLATVLVTTTFAEMKIAVLNYQMALLESDAAKRYAVDA EKKFGPQLTKLTLESSAKGIQDRLVAGGDKMQQGERERLELEFKQK ARDYQFQSKELNEAKAVADREMLKQLKPKLDSAVEEVIKKGAFDLVF ERGAVIDVKPQYDITRQVIERMNLK	56
Skp (ompH) RXF04702.1 核酸配列 (<i>P.fluorescens</i> s)	GTGCGTAAGTTGACTCAATTGGTCTTGCTGGCCACTGTGCTGGTCAC CACCOCGGCCTTCGCCGAAATGAAAATCGCCGTTCTGAACTATCAGA TGGCCTGCTGGAATCCGATGCGGCCAAGCGATACGCCGTGGATGCC GAGAAGAAGTTCCGTCGCACTGACCAAGCTCAAGACACTGGAAAG CAGCGCCAAAGGCATCCAGGACCGCCTGGTAGCCGGTGGCGACAAGA TGCAGCAAGGCGAGCGCGAGCGTCTGGAGCTTGAATTCAAGCAAAAG GCCCGTGACTACCAGTTCCAATCCAAGGAGCTGAACGAAGCCAAGGC TGTGGCCGACCGGAAATGCTCAAGCAGCTCAAGCCTAAATTGGACA GCGCTGTGGAAGAAGTCATCAAGAAGGGTGCCCTTTGACCTGGTGTTC GAGCGTGGCGCGGTGATCGACGTCAAGCCTCAATACGACATCACCCG CCAGGTGATCGAGCGCATGAACCAGCTGAAGTGA	57

【0157】

本開示の好ましい実施形態が本願明細書中で示され記載される一方、かかる実施形態は、例としてのみ提供される。開示から逸脱することなく、多数のバリエーション、変化、および置換が当業者に発生するだろう。本願明細書中で記載される開示の実施形態に対する種々の代替物は本願明細書中の方法の実践において採用されてもよいことが理解されるべきである。以下の特許請求の範囲が発明の範囲を定義し、これらの特許請求の範囲内の方法および構造およびそれらの同等物がそれによりカバーされることが意図される。

10

20

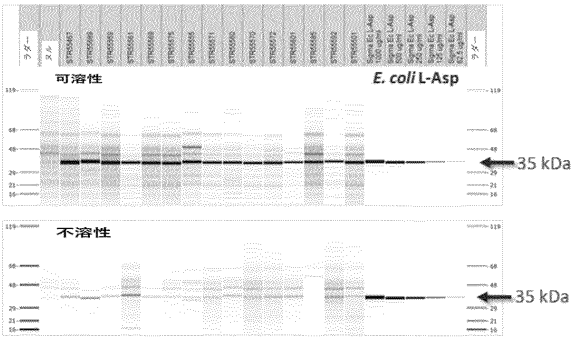
30

40

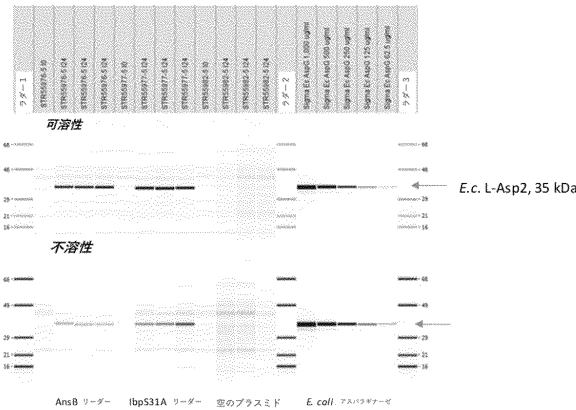
50

【図面】

【図 1】

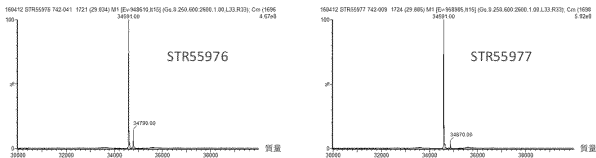


【図 2】



10

【図 3】



20

【配列表】

0007358347000001.app

30

40

50

フロントページの続き

(72)発明者 ラッセル・ジェイ・コールマン

アメリカ合衆国 92121 カリフォルニア州サンディエゴ、ローゼル・ストリート 10790 番

(72)発明者 トーベン・ブルック

アメリカ合衆国 92121 カリフォルニア州サンディエゴ、ローゼル・ストリート 10790 番

審査官 松原 寛子

(56)参考文献 特表 2009-542219 (JP, A)

特表 2010-524506 (JP, A)

特表 2010-517532 (JP, A)

特表 2013-529064 (JP, A)

特表 2008-507294 (JP, A)

Protein expression and purification, 2012年, Vol.81, p.157-165

FEMS Microbiology Letters, 1999年, vol.178, p.327-335

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C12N 9/82

C12N 15/55

C12N 1/21

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

UniProt/GeneSeq