

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】令和2年5月28日(2020.5.28)

【公表番号】特表2019-516371(P2019-516371A)

【公表日】令和1年6月20日(2019.6.20)

【年通号数】公開・登録公報2019-023

【出願番号】特願2018-558148(P2018-558148)

【国際特許分類】

C 1 2 N	15/62	(2006.01)
C 0 7 K	19/00	(2006.01)
C 1 2 P	21/02	(2006.01)
C 0 7 K	7/06	(2006.01)
C 1 2 N	15/31	(2006.01)
C 1 2 N	15/67	(2006.01)
C 1 2 N	15/70	(2006.01)
C 1 2 P	21/08	(2006.01)
C 0 7 K	14/245	(2006.01)

【F I】

C 1 2 N	15/62	Z N A Z
C 0 7 K	19/00	
C 1 2 P	21/02	C
C 0 7 K	7/06	
C 1 2 N	15/31	
C 1 2 N	15/67	Z
C 1 2 N	15/70	Z
C 1 2 P	21/08	
C 0 7 K	14/245	

【手続補正書】

【提出日】令和2年4月14日(2020.4.14)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の配列：(a) 配列MGRISGG (配列番号1) 又は1、2若しくは3個のアミノ酸置換、欠失若しくは挿入により配列が異なるその変異体、及び(b) (a)に対してC末端の異種シグナル配列を含む、組み換えシグナル配列ペプチド。

【請求項2】

以下の配列：(a) 請求項1に記載の前記組み換えシグナル配列ペプチド；及び(b) (a)に対してC末端の異種組み換えタンパク質を含む、組み換え融合タンパク質。

【請求項3】

請求項1に記載の前記組み換えシグナル配列ペプチド又は請求項2に定義される通りの組み換え融合タンパク質をコードする組み換え核酸。

【請求項4】

請求項3に記載の組み換え核酸であって、該核酸の配列は、宿主細胞での発現に関してコドン最適化されている、上記組み換え核酸。

【請求項 5】

前記コドン最適化された核酸配列が、配列MGRISSGGMMFKAITTVAALVIATSAMA（配列番号34）、又は1~10個のアミノ酸置換、欠失若しくは挿入により配列が異なるその変異体を含むシグナル配列をコードする、請求項4に記載の組み換え核酸。

【請求項 6】

前記コドン最適化された核酸配列が、配列MGRISSGGMKKTAIAIAVALAGFATVAQQA（配列番号55）、又は1~10個のアミノ酸置換、欠失若しくは挿入により配列が異なるその変異体を含むシグナル配列をコードする、請求項4に記載の組み換え核酸。

【請求項 7】

前記核酸の配列が、宿主細胞での発現に関してコドン最適化されており、かつ0.40以上のコドン適合化指数（CAI）を有する、請求項3~6のいずれか1項に記載の組み換え核酸。

【請求項 8】

請求項3~7のいずれか1項に記載の核酸を含む組み換え発現ベクター。

【請求項 9】

前記シグナル配列が、前記組み換えタンパク質に機能的に連結されている、請求項8に記載の組み換え発現ベクター。

【請求項 10】

以下のステップ：

(a) 宿主細胞中に存在する請求項8又は9に記載の組み換え発現ベクターからの組み換えタンパク質の発現を可能にする条件下で宿主細胞を培養するステップ；及び

(b) 該組み換えタンパク質を回収するステップを含む、宿主細胞中で組み換えタンパク質を生成するための方法。

【請求項 11】

以下のステップ：

組み換えタンパク質の発現を可能にする条件下で宿主細胞を培養するステップであって、該宿主細胞が、以下の配列：(i) 配列MGRISSGG（配列番号1）又は1、2若しくは3個のアミノ酸置換、欠失若しくは挿入により配列が異なるその変異体を含む組み換えシグナル配列、及び(ii) 組み換えタンパク質、をコードする組み換え核酸配列を含む、上記ステップ

を含む、組み換えタンパク質を発現する宿主細胞培養液の粘度を制御するための方法。

【請求項 12】

誘導前条件下で宿主細胞を培養するステップを含む、宿主細胞培養液により発現される組み換えタンパク質の基底発現を制御するための方法であって、

該宿主細胞が、(i) 以下の配列：配列MGRISSGG（配列番号1）又は1、2若しくは3個のアミノ酸置換、欠失若しくは挿入により配列が異なるその変異体を含む組み換えシグナル配列、及び(ii) 組み換えタンパク質、をコードする組み換え核酸配列を含む、上記方法。

【請求項 13】

前記核酸配列が、請求項3~7のいずれか1項に定義されるものである、請求項11又は12に記載の方法。

【請求項 14】

前記組み換えタンパク質が、ペリプラズム又は細胞外培地から回収される、請求項10~13のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 15】

前記シグナル配列が、前記組み換えタンパク質に機能的に連結されている、請求項10~14のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 16】

前記組み換えタンパク質の誘導前発現レベルが0.5g/L以下であり；かつ/又は該組み換えタンパク質の誘導後発現レベルが5g/L以上である、請求項10~15のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 17】

前記シグナル配列が前記組み換えタンパク質から切断される、請求項10～16のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 18】

前記組み換えタンパク質が抗原結合性タンパク質である、請求項10～17のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 19】

前記宿主細胞が、ペリプラズムを有する微生物細胞である、請求項10～18のいずれか1項に記載の方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0084

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0084】

組み換えタンパク質の精製

組み換えタンパク質は、培養培地から直接回収され得る。組み換えタンパク質の回収に続いて、組み換えタンパク質の十分な純度を確保するための精製が行われる。1つ以上のクロマトグラフィーステップ、例えば1つ以上のクロマトグラフィー樹脂；及び/又は1つ以上のろ過ステップが、精製に使用され得る。例えば、プロテインA又はLなどの樹脂を使用するアフィニティーコロマトグラフィーを用いて、組み換えタンパク質を精製し得る。あるいは、又はこれに加えて、陽イオン交換などのイオン交換樹脂を用いて、組み換えタンパク質を精製し得る。

本発明は、例えば以下の実施形態を包含する：

【実施形態 1】以下の配列：(a) 配列MGRISSGG (配列番号1) 又は1、2若しくは3個のアミノ酸置換、欠失若しくは挿入により配列が異なるその変異体、及び(b) (a)に対してC末端の異種シグナル配列を含む、組み換えシグナル配列。

【実施形態 2】以下の配列：(a) 実施形態1に記載の前記組み換えシグナル配列；及び(b) (a)に対してC末端の異種組み換えタンパク質を含む、組み換え融合タンパク質。

【実施形態 3】実施形態1に記載の前記組み換えシグナル配列又は実施形態2に定義される通りの組み換え融合タンパク質をコードする組み換え核酸配列。

【実施形態 4】配列MGRISSGG (配列番号1) を含むシグナル配列をコードする組み換え核酸配列であって、該核酸配列は、宿主細胞での発現に関してコドン最適化されている、上記組み換え核酸配列。

【実施形態 5】前記コドン最適化された核酸配列が、以下の配列：配列MGRISSGG (配列番号1) 又は1、2若しくは3個のアミノ酸置換、欠失若しくは挿入により配列が異なるその変異体、及び(b) (a)に対してC末端の異種シグナル配列、を含む組み換えシグナル配列をコードする、実施形態4に記載の組み換え核酸配列。

【実施形態 6】前記コドン最適化された核酸配列が、配列MGRISSGGMMFKAITTVAALVIATSAMA (配列番号34)、又は1～10個のアミノ酸置換、欠失若しくは挿入により配列が異なるその変異体を含むシグナル配列をコードする、実施形態4に記載の組み換え核酸配列。

【実施形態 7】前記コドン最適化された核酸配列が、配列MGRISSGGMKKTAIAIAVALAGFATVAQ A (配列番号55)、又は1～10個のアミノ酸置換、欠失若しくは挿入により配列が異なるその変異体を含むシグナル配列をコードする、実施形態4に記載の組み換え核酸配列。

【実施形態 8】前記核酸配列が、宿主細胞での発現に関してコドン最適化されており、かつ0.40以上のコドン適合化指数(CAI)を有する、実施形態3～7のいずれかに記載の組み換え核酸配列。

【実施形態 9】実施形態3～8のいずれかに記載の前記核酸配列を含む組み換え発現ベクター。

【実施形態 10】前記シグナル配列が、前記組み換えタンパク質に機能的に連結されてい

る、実施形態9に記載の組み換え発現ベクター。

[実施形態11]以下のステップ：

(a) 宿主細胞中に存在する実施形態9又は10に記載の前記組み換え発現ベクターからの前記組み換えタンパク質の発現を可能にする条件下で宿主細胞を培養するステップ；及び

(b) 該組み換えタンパク質を回収するステップ

を含む、宿主細胞中で組み換えタンパク質を生成するための方法。

[実施形態12]以下のステップ：

組み換えタンパク質の発現を可能にする条件下で宿主細胞を培養するステップであって、該宿主細胞が、以下の配列：(i) 配列MGRISSGG（配列番号1）又は1、2若しくは3個のアミノ酸置換、欠失若しくは挿入により配列が異なるその変異体を含む組み換えシグナル配列、及び(ii) 組み換えタンパク質、をコードする組み換え核酸配列を含む、上記ステップ

を含む、組み換えタンパク質を発現する宿主細胞培養液の粘度を制御するための方法。

[実施形態13]誘導前条件下で宿主細胞を培養するステップを含む、宿主細胞培養液により発現される組み換えタンパク質の基底発現を制御するための方法であって、

該宿主細胞が、(i) 以下の配列：配列MGRISSGG（配列番号1）又は1、2若しくは3個のアミノ酸置換、欠失若しくは挿入により配列が異なるその変異体を含む組み換えシグナル配列、及び(ii) 組み換えタンパク質、をコードする組み換え核酸配列を含む、上記方法。

[実施形態14]前記核酸配列が、実施形態3～8のいずれかに定義されるものである、実施形態12又は13に記載の方法。

[実施形態15]前記組み換えタンパク質が、ペリプラズム又は細胞外培地から回収される、実施形態11～14のいずれかに記載の方法。

[実施形態16]前記シグナル配列が、前記組み換えタンパク質に機能的に連結されている、実施形態11～15のいずれかに記載の方法。

[実施形態17]前記組み換えタンパク質の誘導前発現レベルが0.5g/L以下であり；かつ/又は該組み換えタンパク質の誘導後発現レベルが5g/L以上である、実施形態11～16のいずれかに記載の方法。

[実施形態18]前記シグナル配列が前記組み換えタンパク質から切断される、実施形態11～17のいずれかに記載の方法。

[実施形態19]前記組み換えタンパク質が抗原結合性タンパク質である、実施形態11～18のいずれかに記載の方法。

[実施形態20]前記宿主細胞が、ペリプラズムを有する微生物細胞である、実施形態11～19のいずれかに記載の方法。