【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7月9日(2020.7.9)

【公表番号】特表2019-526272(P2019-526272A)
【公表日】令和1年9月19日(2019.9.19)
【年通号数】公開・登録公報2019-038
【出願番号】特願2019-515786(P2019-515786)
【国際特許分類】
Ｃ１２Ｐ　21/00　(2006.01)
Ｃ１２Ｎ　5/10　(2006.01)
Ｃ１２Ｎ　5/09　(2010.01)
Ｃ０７Ｋ　14/715　(2006.01)
Ａ６１Ｐ　43/00　(2006.01)
Ａ６１Ｐ　19/10　(2006.01)
Ａ６１Ｐ　19/00　(2006.01)
Ａ６１Ｐ　21/00　(2006.01)
Ａ６１Ｐ　25/00　(2006.01)
Ａ６１Ｐ　25/28　(2006.01)
Ａ６１Ｐ　13/12　(2006.01)
Ａ６１Ｐ　13/02　(2006.01)
Ａ６１Ｐ　25/32　(2006.01)
Ａ６１Ｐ　3/10　(2006.01)
Ａ６１Ｐ　3/12　(2006.01)
Ａ６１Ｐ　9/00　(2006.01)
Ａ６１Ｐ　9/10　(2006.01)
Ａ６１Ｐ　9/12　(2006.01)
Ａ６１Ｐ　35/00　(2006.01)
Ａ６１Ｐ　3/00　(2006.01)
Ａ６１Ｐ　11/00　(2006.01)
Ａ６１Ｐ　17/00　(2006.01)
Ａ６１Ｐ　25/16　(2006.01)
Ａ６１Ｐ　29/00　(2006.01)
Ａ６１Ｐ　19/02　(2006.01)
Ａ６１Ｐ　27/02　(2006.01)
Ａ６１Ｐ　27/06　(2006.01)
Ａ６１Ｐ　1/04　(2006.01)
Ａ６１Ｐ　3/04　(2006.01)
Ａ６１Ｐ　7/00　(2006.01)
Ａ６１Ｐ　1/12　(2006.01)
Ａ６１Ｋ　38/16　(2006.01)
Ｃ１２Ｎ　15/12　(2006.01)
【ＦＩ】
Ｃ１２Ｐ　21/00　ＺＮＡＣ
Ｃ１２Ｎ　5/10
Ｃ１２Ｎ　5/09
Ｃ０７Ｋ　14/715
Ａ６１Ｐ　43/00　１１１
Ａ６１Ｐ　19/10
Ａ６１Ｐ　19/00

Ａ６１Ｐ	21/00	
Ａ６１Ｐ	25/00	
Ａ６１Ｐ	25/28	
Ａ６１Ｐ	43/00	１０５
Ａ６１Ｐ	13/12	
Ａ６１Ｐ	13/02	
Ａ６１Ｐ	25/32	
Ａ６１Ｐ	3/10	
Ａ６１Ｐ	3/12	
Ａ６１Ｐ	9/00	
Ａ６１Ｐ	9/10	
Ａ６１Ｐ	9/12	
Ａ６１Ｐ	35/00	
Ａ６１Ｐ	3/00	
Ａ６１Ｐ	11/00	
Ａ６１Ｐ	17/00	
Ａ６１Ｐ	25/16	
Ａ６１Ｐ	29/00	１０１
Ａ６１Ｐ	19/02	
Ａ６１Ｐ	27/02	
Ａ６１Ｐ	27/06	
Ａ６１Ｐ	1/04	
Ａ６１Ｐ	3/04	
Ａ６１Ｐ	7/00	
Ａ６１Ｐ	1/12	
Ａ６１Ｋ	38/16	
Ｃ１２Ｎ	15/12	

【手続補正書】
【提出日】令和2年6月1日(2020.6.1)
【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】
好ましくは、（ｉ）ジヒドロ葉酸還元酵素（ＤＨＦＲ）欠損ＣＨＯ細胞、より好ましくはＣＨＯ－Ｓ細胞、または
（ｉｉ）グルタミン合成酵素（ＧＳ）欠損ＣＨＯ細胞、より好ましくはＧＳ－／－ＣＨＯ細胞である、複数のチャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞を含む、細胞株であって、
外因性核酸を含有する前記ＣＨＯ細胞が、プロモーターを含み、かつ
組換えヒトアルファ可溶性クロトータンパク質を含むポリペプチドであって、前記ポリペプチドの少なくとも一部分が、配列番号２～配列番号７０のうちの１つと少なくとも８５％のアミノ酸配列同一性を有する、ポリペプチドと、
任意選択的に、機能性ジヒドロ葉酸還元（ＤＨＦＲ）酵素、または機能性グルタミン合成（ＧＳ）酵素と、をコードする、細胞株。
【請求項２】
前記ＣＨＯ細胞が、細胞当たり、少なくとも約２～１０コピー、好ましくは少なくとも

約１０～２０コピー、より好ましくは少なくとも約２０～３０コピー、さらにより好ましくは少なくとも約３０～５０コピーの前記外因性核酸を含有するか、または含有するように選択される、請求項１に記載の細胞株。

【請求項３】

前記核酸が、

（ａ）配列番号２～配列番号７０のうちの１つと、少なくとも９０％、好ましくは少なくとも９５％、より好ましくは少なくとも９８％、さらにより好ましくは少なくとも９９％、最も好ましくは１００％のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドをコードするか、あるいは

（ｂ）配列番号７７～配列番号８８のうちの１つまたは配列番号９１～配列番号９６のうちの１つと、好ましくは少なくとも８５％、より好ましくは少なくとも９０％、さらにより好ましくは少なくとも９５％、なおより好ましくは少なくとも９８％、なおより好ましくは少なくとも９９％、最も好ましくは１００％の核酸配列同一性を有する導入遺伝子またはｃＤＮＡを含む、請求項１または２に記載の細胞株。

【請求項４】

複数のＣＨＯ細胞を含む細胞株であって、複数のＣＨＯ細胞の各々が組換えヒトアルファ可溶性クロトータンパク質、タンパク質断片、またはタンパク質多様体をコードする外因性核酸構築物またはベクターを有する、細胞株。

【請求項５】

（ａ）前記核酸が配列番号８９、９０、または１００のうちの１つの配列を含むか；

（ｂ）前記核酸が配列番号９９または１０１の一方の配列を含むか；

（ｃ）前記組換えヒトアルファ可溶性クロトータンパク質が配列番号７１または７２の一方の配列を含むか；または

（ｄ）前記組換えヒトアルファ可溶性クロトータンパク質が配列番号７４または７５の一方の配列を含む、請求項１～４のいずれか一項に記載の細胞株。

【請求項６】

液体培地、好ましくは無血清および／または動物タンパク質成分を含まない液体培地であって、前記液体培地が、好ましくは炭素源、窒素源、および１つ以上のビタミン、ミネラル、塩、アミノ酸、補充剤、または添加剤を含み、より好ましくは、前記液体培地が、ヒポキサンチン、チミジン、および／またはグルタミンを欠く、液体培地と、

前記ＣＨＯ細胞が前記核酸によってコードされた前記ポリペプチドを発現するよう前記液体培地中で増殖する請求項１～４のいずれか１項に記載の細胞株と、を含み、前記ポリペプチドが、組換えクロトータンパク質を含み、任意選択で、前記タンパク質が、それに結合した１つ以上のグリカンを含む、懸濁細胞培養物。

【請求項７】

前記ＣＨＯ細胞が、前記タンパク質を濃縮することなく、液体培地１リットル当たり、好ましくは２００～５００ｍｇのタンパク質の濃度まで、より好ましくは５００～２０００ｍｇのタンパク質の濃度まで、なおより好ましくは２０００～５０００ｍｇのタンパク質の濃度まで前記タンパク質を前記液体培地中に分泌し、および／または前記タンパク質が、前記タンパク質を濃縮せずに、液体培地１リットル当たり、２００～５００ｍｇのタンパク質の濃度で、より好ましくは５００～２０００ｍｇのタンパク質の濃度まで、なおより好ましくは２０００～５０００ｍｇのタンパク質の濃度まで、前記液体培地中に存在すし、任意選択で、前記タンパク質が、それに結合した１つ以上のグリカンを含む、請求項６に記載の懸濁細胞培養物。

【請求項８】

前記液体培地が、有効量のメトトレキサート（ＭＴＸ）および／またはメチオニンスルホキシミン（ＭＳＸ）を、好ましくは約１ｎＭ～１μＭの濃度で、より好ましくは約１０ｎＭ～１００ｎＭの濃度でさらに含む、請求項６または７に記載の懸濁細胞培養物。

【請求項９】

前記タンパク質が、配列番号２～配列番号７０のうちの１つと、少なくとも８５％、好

ましくは少なくとも９０％、より好ましくは少なくとも９５％、さらにより好ましくは少なくとも９８％、なおより好ましくは少なくとも９９％、最も好ましくは１００％のアミノ酸配列同一性を有する、請求項６～８のいずれか１項に記載の懸濁細胞培養物。

【請求項１０】

組換えクロトータンパク質を製造する方法であって、

請求項１～５のいずれか一項に記載の細胞株中の組換えクロトータンパク質を産生することを含み、

前記タンパク質が、配列番号２～配列番号７０のうちの１つと少なくとも８５％のアミノ酸配列同一性を有し、任意選択で、前記タンパク質が、それに結合した１つ以上のグリカンを含む、方法。

【請求項１１】

前記組換えクロトータンパク質を産生することが、前記核酸によってコードされた前記ポリペプチドを発現させることを含む、請求項１０に記載の方法。

【請求項１２】

好ましくはトランスフェクションを介して前記外因性核酸を前記ＣＨＯ細胞に導入するステップ、ならびに

液体培地、好ましくは無血清および／または動物タンパク質成分を含まない培地中で前記ＣＨＯ細胞を増殖させるステップであって、前記液体培地が、好ましくは炭素源、窒素源、および１つ以上のビタミン、ミネラル、塩、アミノ酸、補充剤、または添加剤を含み、より好ましくは、前記液体培地が、ヒポキサンチン、チミジン、および／またはグルタミンを欠く、増殖させるステップ、から選択される１つ以上のステップをさらに含む、請求項１１に記載の方法。

【請求項１３】

（ａ）前記タンパク質が、前記タンパク質を濃縮することなく、液体培地１リットル当たり、好ましくは２００～５００ｍｇのタンパク質の濃度まで、より好ましくは５００～２０００ｍｇのタンパク質の濃度まで、なおより好ましくは２０００～５０００ｍｇのタンパク質の濃度まで、前記ＣＨＯ細胞から前記液体培地に分泌されるか、または、

（ｂ）有効量のメトトレキサート（ＭＴＸ）および／またはメチオニンスルホキシミン（ＭＳＸ）を、好ましくは約１ｎＭ～１μＭの濃度まで、より好ましくは約１０～１００ｎＭの濃度まで前記液体培地に導入することをさらに含む、請求項１２に記載の方法。

【請求項１４】

前記液体培地中で増殖する生存ＣＨＯ細胞の懸濁培養物を選択することをさらに含み、前記選択された懸濁培養物の前記培地中の前記タンパク質濃度が、前記タンパク質を濃縮することなく、少なくとも２００ｍｇ／Ｌ、好ましくは少なくとも５００ｍｇ／Ｌ、より好ましくは少なくとも１０００ｍｇ／Ｌ、さらにより好ましくは少なくとも２０００ｍｇ／Ｌ、なおより好ましくは少なくとも５０００ｍｇ／Ｌであり、任意選択で、前記選択された懸濁培養物の前記生存ＣＨＯ細胞が、細胞当たり、少なくとも約２～１０コピー、好ましくは少なくとも約１０～２０コピー、より好ましくは少なくとも約２０～３０コピー、さらにより好ましくは少なくとも約３０～５０コピーの前記外因性核酸を含有する、請求項１２に記載の方法。

【請求項１５】

前記ＣＨＯ細胞、液体培地、またはそれらの両方からの組換えクロトータンパク質含有抽出物を精製することをさらに含み、前記抽出物が、好ましくは、

乾燥重量で少なくとも約９８％の前記タンパク質、および／または

約１～１００ｐｐｍ未満のＣＨＯ宿主細胞タンパク質（ＨＣＰ）を含み、任意選択で、前記抽出物を精製することが、前記タンパク質のグリコシル化を維持する、請求項１２に記載の方法。