

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】平成27年1月8日 (2015.1.8)

【公表番号】特表2014-500019(P2014-500019A)

【公表日】平成26年1月9日 (2014.1.9)

【年通号数】公開・登録公報2014-001

【出願番号】特願2013-540368(P2013-540368)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 9/10 (2006.01)

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 P 19/28 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 N 9/10 Z N A

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 5/00 1 0 1

C 1 2 P 19/28

【手続補正書】

【提出日】平成26年11月13日 (2014.11.13)

【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】

N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ活性を有するリコンビナントタンパク質であって、アクセプター性グリカンの末端 M a n 3 残基への N - アセチルグルコサミンの転移を触媒し、かつ末端 M a n 6 残基への N - アセチルグルコサミンの転移を触媒し、そして少なくとも 2 種の異なる酵素由来の触媒ドメインを含む、リコンビナントタンパク質。

【請求項 2】

N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I 触媒ドメインおよび N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ II 触媒ドメインを含む融合タンパク質である、請求項 1 記載のリコンビナントタンパク質。

【請求項 3】

N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I 触媒ドメインおよび N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ II 触媒ドメインがヒト酵素に由来する、請求項 2 記載のリコンビナントタンパク質。

【請求項 4】

N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I 触媒ドメインが、配列番号 1 のアミノ酸残基 105 ~ 445 と少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少

なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または 100% 同一の配列を含む、請求項 3 記載のリコンビナントタンパク質。

【請求項 5】

N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I I 触媒ドメインが、配列番号 21 のアミノ酸残基 30 ~ 447 と少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または 100% 同一の配列を含む、請求項 3 または請求項 4 記載のリコンビナントタンパク質。

【請求項 6】

N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I I 触媒ドメインが、N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I 触媒ドメインに対して N 末端側にある、請求項 2 ~ 5 のいずれか一項記載のリコンビナントタンパク質。

【請求項 7】

さらに、N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I 触媒ドメインと N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I I 触媒ドメインの間にスペーサーを含む、請求項 2 ~ 6 のいずれか一項記載のリコンビナントタンパク質。

【請求項 8】

スペーサーがステムドメイン由来の配列を含む、請求項 7 記載のリコンビナントタンパク質。

【請求項 9】

スペーサーが、配列番号 118、配列番号 120、配列番号 122、および配列番号 124 から成る群より選択される配列を含む、請求項 7 または請求項 8 記載のリコンビナントタンパク質。

【請求項 10】

さらに、触媒ドメインの N 末端に結合したターゲティングペプチドを含む、請求項 2 ~ 9 のいずれか一項記載のリコンビナントタンパク質。

【請求項 11】

ターゲティングペプチドが、ステムドメイン、ステムドメインの N 末端に結合した膜貫通ドメイン、及び、場合により、ステムドメインの N 末端に結合した細胞質ドメインを含む、請求項 10 記載のリコンビナントタンパク質。

【請求項 12】

ターゲティングペプチド、ステムドメイン、膜貫通ドメイン及び/又は細胞質ドメインが、マンノシダーゼ、マンノシルトランスフェラーゼ、グリコシルトランスフェラーゼ、2 型ゴルジ体タンパク質、MNN 2、MNN 4、MNN 6、MNN 9、MNN 10、MNS 1、KRE 2、VAN 1、および OCH 1 から成る群より選択されるタンパク質に由来するか又は表 1 のタンパク質に由来する、請求項 8 または請求項 11 記載のリコンビナントタンパク質。

【請求項 13】

タンパク質が、アクレモニウム属 (Acremonium)、アスペルギルス属 (Aspergillus)、アウレオバシジウム属 (Aureobasidium)、クリプトコッカス属 (Cryptococcus)、クリソスポリウム属 (Chrysosporium)、クリソスポリウム・ラクノウェンス (Chrysosporium lucknowense)、フィリバシジウム属 (Filibasidium)、フザリウム属 (Fusarium)、ジベレラ属 (Gibberella)、ヒュミコラ属 (Humicola)、マグナポルテ属 (Magnaporthe)、ムコール属 (Mucor)、ミセリオフソラ属 (Myceliophthora)、ミロセシウム属 (Myrothecium)、ネオカリマススティクス属 (Neocallimastix)、ニューロスボラ属 (Neurospora)、ペシロミセス属 (Paecilomyces)、ペニシリウム属 (Penicillium)、ピロミセス属 (Piromyces)、シゾフィラム属 (Schizophyllum)、タラロミセス属 (Talaromyces)、サーモアスカス属 (Thermoascus)、チエラビア属 (Thielavia)、トリボクラジウム属 (Tolypocladium)、およびトリコデルマ属 (Trichoderma) から成る群より選択される生

物に由来する、請求項 1 2 記載のリコンビナントタンパク質。

【請求項 1 4】

ヒト N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I I 触媒ドメインおよびヒト N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I 触媒ドメイン、ここで、N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I I 触媒ドメインは N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I 触媒ドメインの N 末端側に位置する、触媒ドメインの間に位置するヒト N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I ステムドメイン由来の配列を含むスペーサー配列、ならびに N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I I 触媒ドメインに対して N 末端側に位置するターゲティングペプチド、ここで、ターゲティングペプチドは、ヒト N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I I 由来の細胞質ドメイン、膜貫通ドメイン、およびステムドメインを含む、を含む請求項 1 または 2 記載のリコンビナントタンパク質。

【請求項 1 5】

配列番号 9 5 に少なくとも 7 0 %、少なくとも 7 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、または 1 0 0 % 同一の配列を含む、請求項 1 または 2 記載のリコンビナントタンパク質。

【請求項 1 6】

ヒト N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I I 触媒ドメインおよび N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I 触媒ドメイン、ここで、N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I I 触媒ドメインは、N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I 触媒ドメインの N 末端側に位置する；触媒ドメインの間に位置するスペーサー、ここで、スペーサーは、配列番号 1 1 8、配列番号 1 2 0、配列番号 1 2 2、および配列番号 1 2 4 から成る群より選択される配列を含む；ならびに N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I I 触媒ドメインに対して N 末端側に位置するターゲティングペプチド、ここで、ターゲティングペプチドは、ヒト N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I I 由来の細胞質ドメイン、膜貫通ドメイン、およびステムドメインを含む、を含む請求項 1 または 2 記載のリコンビナントタンパク質。

【請求項 1 7】

スペーサーが、配列番号 1 1 8、配列番号 1 2 0、および配列番号 1 2 4 から成る群より選択される配列を含む、請求項 1 6 記載のリコンビナントタンパク質。

【請求項 1 8】

請求項 1 ~ 1 7 のいずれか一項記載のリコンビナントタンパク質をコードする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 1 9】

プロモーターに作動可能に連結された請求項 1 8 記載の単離されたポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項 2 0】

請求項 1 9 記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

【請求項 2 1】

複合 N - グリカンを製造する方法であって、

( 1 ) N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I 触媒ドメインおよび N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I I 触媒ドメインを含む融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞を提供すること；そして

( 2 ) アクセプター性グリカンの末端 M a n 3 残基への N - アセチルグルコサミンの転移および末端 M a n 6 残基への N - アセチルグルコサミンの転移を触媒して複合 N - グリカン製造する融合タンパク質が発現されるように宿主細胞を培養することを含む、方法。

【請求項 2 2】

アクセプター性グリカンが、異種ポリペプチドに結合している、請求項 2 1 記載の方法

。

【請求項 23】

複合 N - グリカンが、 $GlcNAc_2Man_3(GlcNAc_2Man_6)Man_4GlcNAc_4GlcNAc$  である、請求項 21 または請求項 22 記載の方法

。

【請求項 24】

ホスト細胞が、トリコデルマ属種 (*Trichoderma* sp.)、アクレモニウム属 (*Acremonium*)、アスペルギルス属 (*Aspergillus*)、アウレオバシジウム属 (*Aureobasidium*)、クリプトコッカス属 (*Cryptococcus*)、クリソスポリウム属 (*Chrysosporium*)、クリソスポリウム・ラクノウェンス (*Chrysosporium lucknowense*)、フィリバシジウム属 (*Filibasidium*)、フザリウム属 (*Fusarium*)、ジベレラ属 (*Gibberella*)、マグナポルテ属 (*Magnaporthe*)、ムコール属 (*Mucor*)、ミセリオフソラ属 (*Myceliophthora*)、ミロセシウム属 (*Myrothecium*)、ネオカリマスティクス属 (*Neocallimastix*)、ニューロスポラ属 (*Neurospora*)、ペシロミセス属 (*Paecilomyces*)、ペニシリウム属 (*Penicillium*)、ピロミセス属 (*Piromyces*)、シゾフィラム属 (*Schizophyllum*)、タラロミセス属 (*Talaromyces*)、サーモアスカス属 (*Thermoascus*)、チエラビア属 (*Thielavia*)、およびトリボクラジウム属 (*Tolypocladium*) から成る群より選択される糸状菌細胞である、請求項 21 ~ 23 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 25】

ホスト細胞が、さらに、UDP -  $GlcNAc$  トランスポーターをコードするポリヌクレオチドを含む、請求項 21 ~ 24 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 26】

ホスト細胞が、野生型ホスト細胞における活性レベルに比べて低下した活性レベルのドリキル - P -  $Man : Man(5)GlcNAc(2) - PP$  - ドリキルマンノシルトランスフェラーゼを有するか又は  $alg3$  遺伝子が、ホスト細胞から欠失されている、請求項 21 ~ 25 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 27】

ホスト細胞が、野生型ホスト細胞における活性又は発現レベルに比べて低下した活性レベルの - 1, 6 - マンノシルトランスフェラーゼ又は低下した発現レベルの  $och1$  遺伝子を有する、請求項 21 ~ 26 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 28】

ホスト細胞が、さらに、

- i) - 1, 2 - マンノシダーゼをコードするポリヌクレオチド；
- ii) - 1, 4 - ガラクトシルトランスフェラーゼをコードするポリヌクレオチド；および/または、
- iii) シアリルトランスフェラーゼをコードするポリヌクレオチドを含む、請求項 21 ~ 27 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 29】

複合 N - グリカンを製造する方法であって、

(1) 野生型ホスト細胞における発現レベルに比べて低下した発現レベルの  $alg3$  遺伝子を有するトリコデルマ属 (*Trichoderma*) ホスト細胞であって、N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I 触媒ドメインをコードする第 1 のポリヌクレオチドおよび N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ II 触媒ドメインをコードする第 2 のポリヌクレオチドを含むトリコデルマ属 (*Trichoderma*) ホスト細胞を提供すること；ならびに

(2) ホスト細胞を培養して複合 N - グリカンを製造することを含む、方法。

【請求項 30】

野生型糸状菌細胞における発現レベルに比べて低下した発現レベルの  $alg3$  遺伝子を有するか又は  $alg3$  遺伝子が欠失している、請求項 2 ~ 17 のいずれか一項記載のリコ

ンピナントタンパク質を含む糸状菌細胞。

【請求項 3 1】

さらに、UDP - GlcNAc トランスポーターをコードするポリヌクレオチドを含む、請求項 3 0 記載の糸状菌細胞。

【請求項 3 2】

野生型糸状菌細胞における活性レベルに比べて低下した活性レベルの - 1 , 6 - マンノシルトランスフェラーゼを有する、請求項 3 0 ~ 3 1 のいずれか一項記載の糸状菌細胞。

【請求項 3 3】

野生型糸状菌細胞における発現レベルに比べて低下した発現レベルの och 1 遺伝子を有する、請求項 3 0 ~ 3 2 記載の糸状菌細胞。

【請求項 3 4】

さらに、

- i ) - 1 , 2 - マンノシダーゼをコードするポリヌクレオチド ;
  - i i ) - 1 , 4 - ガラクトシルトランスフェラーゼをコードするポリヌクレオチド ; および / または、
  - i i i ) シアリルトランスフェラーゼをコードするポリヌクレオチド
- を含む、請求項 3 0 ~ 3 3 のいずれか一項記載の糸状菌細胞。

【請求項 3 5】

トリコデルマ属種 (Trichoderma sp. )、アクレモニウム属 (Acremonium)、アスペルギルス属 (Aspergillus)、アウレオバシジウム属 (Aureobasidium)、クリプトコッカス属 (Cryptococcus)、クリソスポリウム属 (Chrysosporium)、クリソスポリウム・ラクノウェンス (Chrysosporium lucknowense)、フィリバシジウム属 (Filibasidium)、フザリウム属 (Fusarium)、ジベレラ属 (Gibberella)、マグナボルテ属 (Magnaporthe)、ムコール属 (Mucor)、ミセリオフソラ属 (Myceliophthora)、ミロセシウム属 (Myrothecium)、ネオカリマスティクス属 (Neocallimastix)、ニューロスボラ属 (Neurospora)、ペシロミセス属 (Paecilomyces)、ペニシリウム属 (Penicillium)、ピロミセス属 (Piromyces)、シゾフィラム属 (Schizophyllum)、タラロミセス属 (Talaromyces)、サーモアスカス属 (Thermoascus)、チエラビア属 (Thielavia)、およびトリボクラジウム属 (Tolypocladium) から成る群より選択される、請求項 3 0 ~ 3 4 のいずれか一項記載の糸状菌細胞。