

【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Man 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Man 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 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 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 2 1 のアミノ酸残基 3 0 ~ 4 4 7 と少なくとも 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 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 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 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、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 1 0 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、マンノシリルトランスフェラーゼ、グリコシリルトランスフェラーゼ、2 型ゴルジ体タンパク質、M N N 2、M N N 4、M N N 6、M N N 9、M N N 1 0、M N S 1、K R E 2、V A N 1、およびO C H 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 1 1 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*)、クリソスポリウムス属 (*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 (*Mycrothecium*)、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*)、トリポクラジウム属 (*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14】

ヒト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II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II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II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15】

配列番号95に少なくとも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1または2記載のリコンビナントタンパク質。

【請求項16】

ヒト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II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；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II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II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17】

スペーサーが、配列番号118、配列番号120、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1_6記載のリコンビナントタンパク質。

【請求項18】

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19】

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20】

請求項1_9記載の発現ベクターを含むホスト細胞。

【請求項21】

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II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ホスト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Man 3残基へのN-アセチルグルコサミンの転移および末端Man 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-グリカンを製造する融合タンパク質が発現されるようにホスト細胞を培養することを含む、方法。

【請求項22】

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 2 3】

複合N - グリカンが、G 1 c N A c 2 M a n 3 (G 1 c N A c 2 M a n 6) M a n 4 G 1 c N A c 4 G 1 c N A c である、請求項2 1または請求項2 2記載の方法。

【請求項 2 4】

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*)、クリソスポリウムス属 (*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 (*Filobasidium*)、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*)、およびトリポクラジウム属 (*Tolypocladium*) から成る群より選択される糸状菌細胞である、請求項2 1 ~ 2 3のいずれか一項記載の方法。

【請求項 2 5】

ホスト細胞が、さらに、U D P - G 1 c N A c 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2 1 ~ 2 4のいずれか一項記載の方法。

【請求項 2 6】

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 - M a n : M a n (5) G 1 c N A c (2) - P P - 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 a l g 3 遺伝子が、ホスト細胞から欠失されている、請求項2 1 ~ 2 5のいずれか一項記載の方法。

【請求項 2 7】

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 o c h 1 遺伝子を有する、請求項2 1 ~ 2 6のいずれか一項記載の方法。

【請求項 2 8】

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；
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2 1 ~ 2 7のいずれか一項記載の方法。

【請求項 2 9】

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 a l g 3 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 3 0】

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 a l g 3 遺伝子を有するか又は a l g 3 遺伝子が欠失している、請求項 2 ~ 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含む糸状菌細胞。

【請求項 3 1】

さらに、U D P - G l c N A c 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 o c h 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) 、クリソスボリウムス属 (Chrysosporium) 、クリソスボリウム・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) 、およびトリポクラジウム属 (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。