【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31年4月4日(2019.4.4)

【公表番号】特表2018-506295(P2018-506295A)
【公表日】平成30年3月8日(2018.3.8)
【年通号数】公開・登録公報2018-009
【出願番号】特願2017-545231(P2017-545231)
【国際特許分類】
Ｃ１２Ｎ　15/09　(2006.01)
Ｃ１２Ｎ　1/15　(2006.01)
Ｃ１２Ｎ　1/19　(2006.01)
Ｃ１２Ｎ　1/21　(2006.01)
Ｃ１２Ｎ　5/10　(2006.01)
Ｃ０７Ｋ　14/435　(2006.01)
Ｃ１２Ｐ　21/08　(2006.01)
【ＦＩ】
Ｃ１２Ｎ　15/00　ＺＮＡＡ
Ｃ１２Ｎ　1/15
Ｃ１２Ｎ　1/19
Ｃ１２Ｎ　1/21
Ｃ１２Ｎ　5/10
Ｃ０７Ｋ　14/435
Ｃ１２Ｐ　21/08

【手続補正書】
【提出日】平成31年2月22日(2019.2.22)
【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】
ホスホリパーゼB様2(PLBD2)タンパク質をコードするポリヌクレオチドのコード配列中に改変を含み、該改変が、改変を欠いた細胞におけるPLBD2タンパク質の発現レベルと比べてPLBD2タンパク質の発現レベルを低下させる、組換え宿主細胞であって、検出可能なPLBD2タンパク質を発現せず、かつ関心対象の外来性タンパク質をコードするポリヌクレオチドをさらに含む、組換え宿主細胞。
【請求項２】
ホスホリパーゼB様2(PLBD2)タンパク質をコードするポリヌクレオチドのコード配列の対立遺伝子すべてが改変を含む、請求項1記載の宿主細胞。
【請求項３】
改変が、PLBD2タンパク質をコードするポリヌクレオチドのコード配列のエキソン1内のヌクレオチドの挿入または欠失を含む、請求項1または2記載の宿主細胞。
【請求項４】
PLBD2タンパク質が、SEQ ID NO:32のアミノ酸配列全体と少なくとも80％同一であるアミノ酸配列を含む、請求項1～3のいずれか一項記載の宿主細胞。
【請求項５】
PLBD2タンパク質が、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、およびSEQ ID NO:3

6からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項1～3のいずれか一項記載の宿主細胞。
【請求項６】
改変が、SEQ ID NO:47内のヌクレオチドの挿入または欠失を含む、請求項1～5のいずれか一項記載の宿主細胞。
【請求項７】
関心対象の外来性タンパク質が、抗体重鎖、抗体軽鎖、抗原結合断片、およびFc融合タンパク質からなる群より選択される、請求項1記載の宿主細胞。
【請求項８】
検出可能なエステラーゼ活性を有していないプロテインA結合画分を産生する、請求項1～7のいずれか一項記載の宿主細胞。
【請求項９】
(a)ホスホリパーゼB様2(PLBD2)タンパク質の発現を低下または消失させるために、宿主細胞を改変する段階、
(b)関心対象の外来性タンパク質をコードするポリヌクレオチドを該宿主細胞にトランスフェクトする段階、
(c)該宿主細胞から該関心対象のタンパク質を含むタンパク質画分を抽出する段階、
(d)該タンパク質画分を、プロテインAアフィニティー(PA)、陽イオン交換(CEX)、および陰イオン交換(AEX)からなる群より選択されるクロマトグラフィーカラムと接触させる段階、
(e)該関心対象のタンパク質を該カラムから回収する段階、ならびに
(f)該関心対象のタンパク質を脂肪酸エステル、任意で緩衝液および熱安定剤と混合する段階
を含む、タンパク質製剤中のエステラーゼ活性を低下させるための方法。
【請求項１０】
ホスホリパーゼB様2(PLBD2)タンパク質の発現を低下または消失させるために、宿主細胞を改変する段階が、少なくとも1つのヌクレオチドを、該PLBD2タンパク質をコードするポリヌクレオチドのエキソン1内に挿入することまたはエキソン1内で欠失させることを含む、請求項9記載の方法。
【請求項１１】
PLBD2タンパク質をコードするポリヌクレオチドが、SEQ ID NO:33のヌクレオチド配列全体と少なくとも80％同一である核酸配列を含む、請求項10記載の方法。
【請求項１２】
PLBD2遺伝子改変が両アレル改変を含む、請求項1～7のいずれか一項記載の宿主細胞。
【請求項１３】
PLBD2遺伝子改変が、PLBD2遺伝子の1個もしくは複数の塩基対、2個もしくはそれ以上の塩基対、3個もしくはそれ以上の塩基対、4個もしくはそれ以上の塩基対、5個もしくはそれ以上の塩基対、6個もしくはそれ以上の塩基対、7個もしくはそれ以上の塩基対、8個もしくはそれ以上の塩基対、9個もしくはそれ以上の塩基対、10個もしくはそれ以上の塩基対、11個もしくはそれ以上の塩基対、12個もしくはそれ以上の塩基対、13個もしくはそれ以上の塩基対、14個もしくはそれ以上の塩基対、15個もしくはそれ以上の塩基対、16個もしくはそれ以上の塩基対、17個もしくはそれ以上の塩基対、18個もしくはそれ以上の塩基対、19個もしくはそれ以上の塩基対、または20個もしくはそれ以上の塩基対の欠失を含む、請求項1～7のいずれか一項記載の宿主細胞。
【請求項１４】
PLBD2遺伝子改変が、翻訳されるPLBD2タンパク質のフレームシフトをもたらす、請求項1～7のいずれか一項記載の宿主細胞。
【請求項１５】
改変が、標的部位における標的破壊であり、該標的部位は、SEQ ID NO:33の37～56、44～56、33～62、40～69、110～139、198～227、182～211、および242～271番の位置にまた

がるヌクレオチドからなる群より選択される、請求項1～7のいずれか一項記載の宿主細胞。
【請求項１６】
真核細胞である、請求項1～7のいずれか一項記載の宿主細胞。
【請求項１７】
真核細胞が哺乳動物細胞である、請求項16記載の宿主細胞。
【請求項１８】
真核細胞が、CHO K1細胞、DXB-11 CHO細胞、ベジーCHO細胞、COS-7細胞、Vero細胞、CV1細胞、HEK293細胞、293EBNA細胞、MSR293細胞、MDCK細胞、HaK細胞、BHK21細胞、HeLa細胞、HepG2細胞、WI38細胞、MRC5細胞、Colo25細胞、HB8065細胞、HL-60細胞、ジャーカット(Jurkat)細胞、ダウディ(Daudi)細胞、A431細胞、U937細胞、3T3細胞、L細胞、C127細胞、SP2/0細胞、NS-0細胞、およびMMT細胞からなる群より選択される、請求項16記載の宿主細胞。
【請求項１９】
CHO細胞である、請求項1～7のいずれか一項記載の宿主細胞。
【手続補正２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００４６
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００４６】
[本発明1001]
ホスホリパーゼB様2(PLBD2)タンパク質をコードするポリヌクレオチドのコード配列中に改変を含み、該改変が、改変を欠いた細胞におけるPLBD2タンパク質の発現レベルと比べてPLBD2タンパク質の発現レベルを低下させる、組換え宿主細胞。
[本発明1002]
ホスホリパーゼB様2(PLBD2)タンパク質をコードするポリヌクレオチドのコード配列の対立遺伝子すべてが改変を含む、本発明1001の宿主細胞。
[本発明1003]
検出可能なホスホリパーゼB様2タンパク質を発現しない、本発明1001または1002の宿主細胞。
[本発明1004]
改変が、PLBD2タンパク質をコードするポリヌクレオチドのコード配列のエキソン1内のヌクレオチドの挿入または欠失を含む、本発明1001～1003のいずれかの宿主細胞。
[本発明1005]
PLBD2タンパク質が、SEQ ID NO:32と少なくとも80％同一であるアミノ酸配列を含む、本発明1001～1004のいずれかの宿主細胞。
[本発明1006]
PLBD2タンパク質が、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、およびSEQ ID NO:36からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、本発明1001～1004のいずれかの宿主細胞。
[本発明1007]
改変が、SEQ ID NO:47内のヌクレオチドの挿入または欠失を含む、本発明1001～1006のいずれかの宿主細胞。
[本発明1008]
関心対象の外来性タンパク質をコードするポリヌクレオチドをさらに含む、本発明1001～1007のいずれかの宿主細胞。
[本発明1009]
関心対象の外来性タンパク質が、抗体重鎖、抗体軽鎖、抗原結合断片、抗原結合タンパク質、およびFc融合タンパク質からなる群より選択される、本発明1008の宿主細胞。

[本発明1010]
検出可能なエステラーゼ活性を有していないプロテインA結合画分を産生する、本発明1001～1009のいずれかの宿主細胞。
[本発明1011]
(a)未改変細胞と比べて低下したレベルのエステラーゼを産生するように改変された宿主細胞から、組換えタンパク質および複数の宿主細胞タンパク質を含む試料を得て;
(b)該試料を少なくとも1回の精製段階に供して、少なくとも1種の宿主細胞タンパク質を除去し、
組換えタンパク質を作製する方法。
[本発明1012]
複数の宿主細胞タンパク質が、検出可能な量のホスホリパーゼB様2(PLBD2)タンパク質を含まない、本発明1011の方法。
[本発明1013]
宿主細胞が、ホスホリパーゼB様2(PLBD2)タンパク質をコードするポリヌクレオチドのコード配列中に改変を含む、本発明1011または1012の方法。
[本発明1014]
精製段階が、プロテインAアフィニティー(PA)クロマトグラフィー、陽イオン交換(CEX)クロマトグラフィー、および陰イオン交換(AEX)クロマトグラフィーからなる群より選択される、本発明1011～1013のいずれかの方法。
[本発明1015]
精製段階が疎水性相互作用クロマトグラフィーを含まない、本発明1011～1014のいずれかの方法。
[本発明1016]
(a)ホスホリパーゼB様2(PLBD2)タンパク質の発現を低下または消失させるために、宿主細胞を改変する段階、(b)関心対象のタンパク質をコードするポリヌクレオチドを該宿主細胞にトランスフェクトする段階、(c)該宿主細胞から該関心対象のタンパク質を含むタンパク質画分を抽出する段階、(c)該タンパク質画分を、プロテインAアフィニティー(PA)媒体、陽イオン交換(CEX)媒体、および陰イオン交換(AEX)媒体からなる群より選択されるクロマトグラフィー媒体と接触させる段階、(d)該関心対象のタンパク質を該媒体から回収する段階、ならびに(e)該関心対象のタンパク質を脂肪酸エステル、任意で緩衝液および熱安定剤と混合する段階を含む、タンパク質製剤中のエステラーゼ活性を低下させるための方法。
[本発明1017]
ホスホリパーゼB様2(PLBD2)タンパク質の発現を低下または消失させるために、宿主細胞を改変する段階が、少なくとも1つのヌクレオチドを、該PLBD2タンパク質をコードするポリヌクレオチドのエキソン1内に挿入することまたはエキソン1内で欠失させることを含む、本発明1016の方法。
[本発明1018]
PLBD2タンパク質をコードするポリヌクレオチドが、SEQ ID NO:32と少なくとも80％同一である核酸配列を含む、本発明1017の方法。
[本発明1019]
改変されたPLBD2遺伝子を含む、組換え宿主細胞。
[本発明1020]
コード領域の破壊によってPLBD2遺伝子が改変されている、本発明1019の組換え宿主細胞。
[本発明1021]
PLBD2遺伝子改変が両アレル改変を含む、本発明1018または1019の組換え宿主細胞。
[本発明1022]
PLBD2遺伝子改変が、PLBD2遺伝子の1個もしくは複数の塩基対、2個もしくはそれ以上の塩基対、3個もしくはそれ以上の塩基対、4個もしくはそれ以上の塩基対、5個もしくはそ

れ以上の塩基対、6個もしくはそれ以上の塩基対、7個もしくはそれ以上の塩基対、8個もしくはそれ以上の塩基対、9個もしくはそれ以上の塩基対、10個もしくはそれ以上の塩基対、11個もしくはそれ以上の塩基対、12個もしくはそれ以上の塩基対、13個もしくはそれ以上の塩基対、14個もしくはそれ以上の塩基対、15個もしくはそれ以上の塩基対、16個もしくはそれ以上の塩基対、17個もしくはそれ以上の塩基対、18個もしくはそれ以上の塩基対、19個もしくはそれ以上の塩基対、または20個もしくはそれ以上の塩基対の欠失を含む、本発明1019～1021のいずれかの組換え宿主細胞。

他の目的および利点は、以下の詳細な説明を再検討することによって明らかになると考えられる。