

【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30年1月11日(2018.1.11)

【公開番号】特開2017-131225(P2017-131225A)

【公開日】平成29年8月3日(2017.8.3)

【年通号数】公開・登録公報2017-029

【出願番号】特願2017-19727(P2017-19727)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

A 0 1 H 5/00 (2018.01)

C 1 2 N 9/24 (2006.01)

C 1 2 P 21/00 (2006.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

A 6 1 K 38/00 (2006.01)

A 6 1 K 39/00 (2006.01)

A 6 1 K 36/81 (2006.01)

A 6 1 P 37/04 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

A 0 1 H 5/00 A

C 1 2 N 9/24

C 1 2 P 21/00 C

C 1 2 N 5/10

A 6 1 K 37/02

A 6 1 K 39/00 H

A 6 1 K 36/81

A 6 1 P 37/04

【手続補正書】

【提出日】平成29年11月21日(2017.11.21)

【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】

遺伝的に改変されたニコチアナ・タバクム(Nicotiana tabacum)の植物細胞、又は前記遺伝的に改変されたニコチアナ・タバクムの植物細胞を含むニコチアナ・タバクムの植物であって、

前記遺伝的に改変されたニコチアナ・タバクムの植物細胞が、ゲノム領域内にアルファ-マンノシダーゼIのコード配列を含む4つの標的ヌクレオチド配列と、前記4つの標的ヌクレオチド配列の各々にゲノム編集技術を用いて導入した改変を含み、

前記4つのアルファ-マンノシダーゼIが、NtMNS1a、NtMNS1b、NtMNS2及びNtMan1.4から成る群から選択され、かつ前記アルファ-マンノシダーゼIをコードするヌクレオチド配列が以下を有し：

a) i. 5'及び3'非翻訳領域を含むNtMNS1a遺伝子のゲノムクローンの配列を表す配列番号：1と少なくとも90%の配列同一性、若しくは5'及び3'非翻訳領域を含まないNtMNS1a遺伝子のゲノムクローンの配列を表す配列番号：2と少なくとも90%の配列同一性、又は

- ii. 5'及び3'非翻訳領域を含むNtMNS1b遺伝子のゲノムクローンの配列を表す配列番号：32と少なくとも90%の配列同一性、若しくは5'及び3'非翻訳領域を含まないNtMNS1b遺伝子のゲノムクローンの配列を表す配列番号：33と少なくとも90%の配列同一性、又は
- iii. 5'及び3'非翻訳領域を含むNtMNS2遺伝子のゲノムクローンの配列を表す配列番号：63と少なくとも90%の配列同一性、若しくは5'及び3'非翻訳領域を含まないNtMNS2遺伝子のゲノムクローンの配列を表す配列番号：64と少なくとも90%の配列同一性、又は
- b) i. NtMNS1a遺伝子の対立遺伝子変種を表す配列番号：30と少なくとも90%の配列同一性、若しくはNtMNS1a遺伝子の対立遺伝子変種を表す配列番号：94と少なくとも90%の配列同一性、又は
- ii. NtMNS1b遺伝子の対立遺伝子変種を表す配列番号：61と少なくとも90%の配列同一性、若しくはNtMNS1b遺伝子の対立遺伝子変種を表す配列番号：96と少なくとも90%の配列同一性、又は
- iii. NtMNS2遺伝子の対立遺伝子変種を表す配列番号：92と少なくとも90%の配列同一性、又は
- iv. NtMan1.4遺伝子のcDNAを表す配列番号：98と少なくとも90%の配列同一性、又は
- c) 配列番号：31、配列番号：95、配列番号：62、配列番号：97、配列番号：93、若しくは配列番号：99のポリペプチドをそれぞれコードするヌクレオチド配列と少なくとも95%の配列同一性、又は
- d) 遺伝暗号の縮退によって、上記a)-c)のいずれかにおいて定義されたヌクレオチド配列から派生する配列、及び、アルファ・マンノシダーゼIをコードする配列を含む前記4つの標的ヌクレオチドが互いに異なっており、改変植物細胞における各アルファ・マンノシダーゼIの活性又は発現が、非改変植物細胞と対比して低下している、上記遺伝的に改変されたニコチアナ・タバクムの植物細胞又は遺伝的に改変されたニコチアナ・タバクムの植物細胞を含むニコチアナ・タバクムの植物。

【請求項2】

請求項1に記載の遺伝的に改変されたニコチアナ・タバクムの植物の子孫であって、前記子孫植物が請求項1に規定の標的配列の少なくとも1つに改変を含み、アルファ・マンノシダーゼIの活性又は発現が、非改変植物細胞と対比して低下している、前記子孫。

【請求項3】

以下の工程を含む、異種タンパク質を製造する方法：

- (a) 異種糖タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む発現構築物を、請求項1又は2に規定の改変ニコチアナ・タバクムの植物細胞又は植物に導入する工程、及び、
- (b) 前記発現構築物を含む改変植物細胞を、前記異種糖タンパク質が生成されるように培養する工程であって、前記糖タンパク質が、非改変植物細胞から得られる糖タンパク質と比較してそのN-グリカンにアルファ-1,3-結合フコース及びベータ-1,2-結合キシロースを実質的に欠いている、前記工程、及び
- (c) 場合によって前記植物細胞から植物を再生し、さらに前記植物及び/又はその子孫を生育させる工程、及び
- (d) 場合によって前記糖タンパク質を採集する工程。

【請求項4】

NtMNS1aポリヌクレオチド、NtMNS1bポリヌクレオチド、NtMNS2ポリヌクレオチド及びNtMan1.4ポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドの混合物であって、前記各ポリヌクレオチドが以下からなる群より選択される配列を有し：

a) 下記ヌクレオチド配列：

- i. 5'及び3'非翻訳領域を含むNtMNS1a遺伝子のゲノムクローンの配列を表す配列番号：1、若しくは5'及び3'非翻訳領域を含まないNtMNS1a遺伝子のゲノムクローンの配列を表す配列番号：2、又は
- ii. 5'及び3'非翻訳領域を含むNtMNS1b遺伝子のゲノムクローンの配列を表す配列番号

：32、若しくは5'及び3'非翻訳領域を含まないNtMNS1b遺伝子のゲノムクローンの配列を表す配列番号：33、又は

iii. 5'及び3'非翻訳領域を含むNtMNS2遺伝子のゲノムクローンの配列を表す配列番号：63、若しくは5'及び3'非翻訳領域を含まないNtMNS2遺伝子のゲノムクローンの配列を表す配列番号：64、

b) 下記ヌクレオチド配列：

i. 各々がNtMNS1a遺伝子の対立遺伝子変種を表す、配列番号：30若しくは配列番号：94、又は

ii. 各々がNtMNS1b遺伝子の対立遺伝子変種を表す、配列番号：61若しくは配列番号：96、又は

iii. NtMNS2遺伝子の対立遺伝子変種を表す配列番号：92、又は

iv. NtMan1.4遺伝子のcDNAを表す配列番号：98、

c) 配列番号：31、配列番号：95、配列番号：62、配列番号：97、配列番号：93若しくは配列番号：99で表される配列を含むポリペプチドをコードする配列；及び

d) a) - c)のいずれかに規定のヌクレオチド配列から遺伝暗号の縮退により派生する配列、

前記ヌクレオチド配列がマンノース加水分解活性を示すポリペプチドをコードする、上記混合物。

【請求項5】

NtMNS1aポリペプチド、NtMNS1bポリペプチド、NtMNS2ポリペプチド及びNtMan1.4ポリペプチドを含むポリペプチド混合物であって、それぞれがマンノース加水分解活性を有し、前記ポリペプチドが以下から成る群から選択されるポリペプチドである上記混合物：

(i) 配列番号：31、配列番号：95、配列番号：62、配列番号：97、配列番号：93若しくは配列番号：99に示す配列のいずれかで表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(ii) 請求項1のa) - d)のいずれかに記載のヌクレオチド配列によって発現されるポリペプチド；及び

(iii) 配列番号：2、配列番号：30、配列番号：33、配列番号：94、配列番号：61、配列番号：64、配列番号：96、配列番号：92若しくは配列番号：98に示されるヌクレオチド配列によって発現されるポリペプチド。

【請求項6】

ゲノム領域内のアルファ-マンノシダーゼIのコード配列を含む前記4つの標的ヌクレオチド配列内の標的部位を同定して改変するための請求項4若しくは5に規定のポリヌクレオチド混合物の使用であって、前記改変が、非改変植物細胞と対比して当該改変を含む改変植物細胞内のアルファ-マンノシダーゼIの活性又は発現が低下するような改変である、前記使用。

【請求項7】

請求項1に規定の改変植物細胞を含む植物から入手し得る異種糖タンパク質を含む植物組成物であって、前記糖タンパク質が、未改変植物細胞から入手し得る糖タンパク質と比較して、そのN-グリカンにアルファ-1,3-結合フコース及びベータ-1,2-結合キシロースを実質的に欠く、前記植物組成物。

【請求項8】

以下の工程を含む、ヒト化糖タンパク質を生成することができる改変植物細胞を含むニコチアナ・タバクムの植物細胞又はニコチアナ・タバクムの植物を作出する方法：

(i) ニコチアナ・タバクムの植物細胞のゲノムにおいて、アルファ-マンノシダーゼIのコード配列を含む4つの標的ヌクレオチド配列の各々をゲノム編集技術を用いて改変する工程であって、

前記4つのアルファ-マンノシダーゼIが、NtMNS1a、NtMNS1b、NtMNS2及びNtMan1.4から成る群から選択され、かつ前記アルファ-マンノシダーゼIをコードするヌクレオチド配列が以下を有し：

a) i. 5'及び3'非翻訳領域を含むNtMNS1a遺伝子のゲノムクローンの配列を表す配列番号

：1と少なくとも90%の配列同一性、若しくは5'及び3'非翻訳領域を含まないNtMNS1a遺伝子のゲノムクローンの配列を表す配列番号：2と少なくとも90%の配列同一性、又は

ii. 5'及び3'非翻訳領域を含むNtMNS1b遺伝子のゲノムクローンの配列を表す配列番号：32と少なくとも90%の配列同一性、若しくは5'及び3'非翻訳領域を含まないNtMNS1b遺伝子のゲノムクローンの配列を表す配列番号：33と少なくとも90%の配列同一性、又は

iii. 5'及び3'非翻訳領域を含むNtMNS2遺伝子のゲノムクローンの配列を表す配列番号：63と少なくとも90%の配列同一性、若しくは5'及び3'非翻訳領域を含まないNtMNS2遺伝子のゲノムクローンの配列を表す配列番号：64と少なくとも90%の配列同一性、又は

b) i. NtMNS1a遺伝子の対立遺伝子変種を表す配列番号：30と少なくとも90%の配列同一性、若しくはNtMNS1a遺伝子の対立遺伝子変種を表す配列番号：94と少なくとも90%の配列同一性、又は

ii. NtMNS1b遺伝子の対立遺伝子変種を表す配列番号：61と少なくとも90%の配列同一性、若しくはNtMNS1b遺伝子の対立遺伝子変種を表す配列番号：96と少なくとも90%の配列同一性、又は

iii. NtMNS2遺伝子の対立遺伝子変種を表す配列番号：92と少なくとも90%の配列同一性、又は

iv. NtMan1.4遺伝子のcDNAを表す配列番号：98と少なくとも90%の配列同一性、又は

c) 配列番号：31、配列番号：95、配列番号：62、配列番号：97、配列番号：93、若しくは配列番号：99のポリペプチドをそれぞれコードするヌクレオチド配列と少なくとも95%の配列同一性、又は

d) 遺伝暗号の縮退によって、上記a)-c)のいずれかにおいて定義されたヌクレオチド配列から派生する配列、

及び、アルファ・マンノシダーゼIをコードする配列を含む前記4つの標的ヌクレオチドが互いに異なっており、改変植物細胞における各アルファ・マンノシダーゼIの活性又は発現が、非改変植物細胞と対比して低下している、上記工程

(ii) 前記4つの標的ヌクレオチド配列の各配列内に前記改変を含む改変植物又は植物細胞を同定し、さらに場合によって選別する工程；及び

(iii) さらに場合によって前記改変植物を別のニコチアナ植物とともに繁殖させる工程。

【請求項9】

ニコチアナ・タバクムの植物又は植物細胞のゲノムの改変が以下の工程を含む、請求項8に記載の方法：

(a) ニコチアナ・タバクムの植物又は植物細胞の前記4つの標的ヌクレオチド配列の各配列内において、さらに場合によって少なくとも1つのその対立遺伝子変種において、標的部位を同定する工程；

(b) 前記標的部位を認識し、さらに前記標的部位で又はその近くで結合することができる変異原性オリゴヌクレオチドを、請求項4又は5に規定のヌクレオチド配列を土台にしてデザインする工程；及び

(c) 前記ゲノムが改変される条件下で、前記変異原性オリゴヌクレオチドをニコチアナ・タバクムの植物又は植物細胞のゲノム内の前記4つの標的ヌクレオチド配列の各配列と結合させる工程。