

【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29年4月13日 (2017.4.13)

【公表番号】特表2016-511005(P2016-511005A)

【公表日】平成28年4月14日 (2016.4.14)

【年通号数】公開・登録公報2016-023

【出願番号】特願2016-501560(P2016-501560)

【国際特許分類】

C 1 2 P 21/02 (2006.01)

C 1 2 P 21/08 (2006.01)

C 1 2 N 5/16 (2006.01)

C 1 2 N 1/00 (2006.01)

【F I】

C 1 2 P 21/02 Z N A C

C 1 2 P 21/08

C 1 2 N 5/16

C 1 2 N 1/00 F

【手続補正書】

【提出日】平成29年3月9日 (2017.3.9)

【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】

哺乳動物細胞培養物において組換えポリペプチドを生産する方法であって、以下：

(a) 抑制された miRNA - let - 7 a 活性を有する哺乳動物細胞を培養して、組換えポリペプチドを産生するステップ；及び

(b) ポリペプチドを回収するステップ
を含む方法。

【請求項 2】

前記 miRNA - let - 7 a 活性が、microRNA 阻害剤によって抑制される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記 microRNA 阻害剤が、miRNA - let - 7 a のアンチセンスオリゴヌクレオチド阻害剤を含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記オリゴヌクレオチド阻害剤が、ヌクレアーゼ耐性を改善し、RISC による miRNA 特異的切断に対する耐性を高め、及び / 又は結合親和性を増大するように、化学的に修飾される、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記哺乳動物細胞が、miRNA - let - 7 a のアンチセンスオリゴヌクレオチド阻害剤をコードする発現ベクターでトランスフェクトされる、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記哺乳動物細胞が、miRNA - let - 7 a のアンチセンスオリゴヌクレオチド阻害剤で安定的に又は一過的にトランスフェクトされる、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記

載の方法。

【請求項 7】

前記哺乳動物細胞が、以下：チャイニーズハムスター卵巢（CHO）細胞、マウス骨髓腫（NS0）、ヒト胎児由来腎臓（HEK293）、ベビーハムスター腎（BHK）細胞、ペロ（Vero）細胞、HeLa細胞、メイディン・ダービー・イヌ腎（MDCK）細胞、CV1サル腎細胞、3T3細胞、骨髓腫細胞株、PC12、WI38細胞、サル腎線維芽細胞のCOS-7株、及びC127からなる群から選択される、請求項1～6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記哺乳動物細胞が、チャイニーズハムスター卵巢細胞である、請求項7に記載の方法。

【請求項 9】

前記哺乳動物細胞が、miRNA-let-7a遺伝子ノックアウトを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 10】

前記組換えポリペプチドが、抗体又はその結合断片を含む、請求項1～9のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

前記抗体又はその結合断片が、多重特異性抗体、完全ヒト型抗体、ヒト化抗体、ラクダ化抗体、キメラ抗体、CDR移植抗体、単鎖Fv（scFv）、ジスルフィド結合Fv（sdFv）、Fab断片、F（ab'）断片、及び抗イディオタイプ（抗Id）抗体から選択される、請求項10に記載の方法。

【請求項 12】

前記組換えポリペプチドが、非抗体タンパク質を含み、前記組換えポリペプチドが、融合タンパク質、受容体、細胞表面タンパク質のリガンド、分泌タンパク質又は酵素を含んでもよい、請求項1～9のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

前記細胞培養物が、miRNA-let-7a活性が抑制されていない対照細胞培養物と比較して、少なくとも約25%増大した比生産性を有する、請求項1～12のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

前記細胞培養物が、miRNA-let-7a活性が抑制されていない対照細胞培養物と比較して、少なくとも約25%増大した最大生産性を有し、これは、ピーク生存細胞密度（VCD）で決定される、請求項1～12のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

前記細胞培養物が、miRNA-let-7a活性が抑制されていない対照細胞培養物と比較して、1%～30%の相対生存細胞密度を有する、請求項1～12のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

前記哺乳動物細胞が、対照細胞培養物と比較して、miR-10a、miR-21、及びそれらの組み合わせから選択される第2のmicroRNAの増大した活性を有するか、又は前記哺乳動物細胞が、miR-16、miR-101、miR-145、及びそれらの組み合わせから選択される第2のmicroRNAの低減した活性を有する、請求項2に記載の方法。

【請求項 17】

組換えポリペプチドを発現するように設計された哺乳動物細胞株であって、抑制されたmiRNA-let-7a活性を有する哺乳動物細胞株。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0013

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0013】

さらに、組換えポリペプチドを発現するように設計された哺乳動物細胞株であって、抑制されたmiRNA-let-7a活性を有する哺乳動物細胞；miRNA-let-7aのアンチセンスmicroRNA阻害剤をコードする1つ又は複数のベクターと、組換えタンパク質をコードするヌクレオチド配列とを含む発現系；miRNA-let-7aのアンチセンス阻害剤を含む細胞培地；並びにmiRNA-let-7aのアンチセンスmicroRNA阻害剤でトランスフェクトした哺乳動物細胞を含む哺乳動物細胞培養物から産生される組換えポリペプチドも開示される。

本発明はまた、以下に関する。

[項目1]

哺乳動物細胞培養物において組換えポリペプチドを生産する方法であって、以下：

(a) 抑制されたmiRNA-let-7a活性を有する哺乳動物細胞を得るステップ

；

(b) 前記哺乳動物細胞を培養して、組換えポリペプチドを生産するステップ；及び

(c) タンパク質を回収するステップ

を含む方法。

[項目2]

前記miRNA-let-7a活性が、microRNA阻害剤によって抑制される、項目1に記載の方法。

[項目3]

前記microRNA阻害剤が、miRNA-let-7aのアンチセンスオリゴヌクレオチド阻害剤を含む、項目2に記載の方法。

[項目4]

前記哺乳動物細胞培養物が、miRNA-let-7aの合成アンチセンスオリゴヌクレオチド阻害剤でトランスフェクトされた哺乳動物細胞を含む、項目3に記載の方法。

[項目5]

前記オリゴヌクレオチド阻害剤が、ヌクレアーゼ耐性を改善し、RISCによるmiRNA特異的切断に対する耐性を高め、及び/又は結合親和性を増大するように、化学的に修飾される、項目4に記載の方法。

[項目6]

前記哺乳動物細胞培養物が、miRNA-let-7aのアンチセンスオリゴヌクレオチド阻害剤をコードする発現ベクターでトランスフェクトされた哺乳動物細胞を含む、項目1に記載の方法。

[項目7]

前記哺乳動物細胞培養物が、miRNA-let-7aのアンチセンスオリゴヌクレオチド阻害剤で安定的にトランスフェクトされた哺乳動物細胞を含む、項目1に記載の方法。

。

[項目8]

前記哺乳動物細胞培養物が、miRNA-let-7aのアンチセンスオリゴヌクレオチド阻害剤で一過的にトランスフェクトされた哺乳動物細胞を含む、項目1に記載の方法。

。

[項目9]

前記哺乳動物細胞培養物が、以下：チャイニーズハムスター卵巢(CHO)細胞、マウス骨髓腫(NS0)、ヒト胎児由来腎臓(HEK293)、ベビーハムスター腎(BHK)細胞、ベロ(Ver0)細胞、HeLa細胞、メイディン・ダービー・イヌ腎(MDCK)細胞、CV1サル腎細胞、3T3細胞、骨髓腫細胞株、PC12、WI38細胞、サル腎線維芽細胞のCOS-7株、及びC127から選択される哺乳動物細胞を含む、項目1に記載の方法。

[項目 1 0]

前記哺乳動物細胞が、チャイニーズハムスター卵巣細胞を含む、項目 1 に記載の方法。

[項目 1 1]

前記哺乳動物細胞が、miRNA-let-7a 遺伝子ノックアウトを含む、項目 1 に記載の方法。

[項目 1 2]

前記組換えポリペプチドが、抗体又はその結合断片を含む、項目 1 に記載の方法。

[項目 1 3]

前記抗体又はその結合断片が、多重特異性抗体、完全ヒト型抗体、ヒト化抗体、ラクダ化抗体、キメラ抗体、CDR 移植抗体、単鎖 Fv (scFv)、ジスルフィド結合 Fv (sdFv)、Fab 断片、F(ab') 断片、及び抗イディオタイプ (抗 Id) 抗体から選択される、項目 1 2 に記載の方法。

[項目 1 4]

前記抗体又はその結合断片が、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA 及び IgY から選択されるアイソタイプを含む、項目 1 3 に記載の方法。

[項目 1 5]

前記抗体が、IgG1、IgG2、IgG3 及び IgG4 から選択されるアイソタイプを含む、項目 1 3 に記載の方法。

[項目 1 6]

前記組換えポリペプチドが、非抗体タンパク質を含む、項目 1 に記載の方法。

[項目 1 7]

前記組換えポリペプチドが、融合タンパク質を含む、項目 1 に記載の方法。

[項目 1 8]

前記組換えポリペプチドが、受容体を含む、項目 1 に記載の方法。

[項目 1 9]

前記組換えポリペプチドが、細胞表面タンパク質のリガンドを含む、項目 1 に記載の方法。

[項目 2 0]

前記細胞表面タンパク質が、受容体を含む、項目 1 9 に記載の方法。

[項目 2 1]

前記組換えポリペプチドが、分泌タンパク質を含む、項目 1 に記載の方法。

[項目 2 2]

前記組換えポリペプチドが、酵素を含む、項目 1 に記載の方法。

[項目 2 3]

前記細胞培養物が、miRNA-let-7a 活性が抑制されていない対照細胞培養物と比較して、少なくとも約 25% 増大した比生産性を有する、項目 1 に記載の方法。

[項目 2 4]

前記細胞培養物が、miRNA-let-7a 活性が抑制されていない対照細胞培養物と比較して、少なくとも約 25% 増大した最大生産性を有し、これは、ピーク生存細胞密度 (VCD) で決定される、項目 1 に記載の方法。

[項目 2 5]

前記細胞培養物が、miRNA-let-7a 活性が抑制されていない対照哺乳動物細胞培養物と比較して、増大した比生産性を有する、項目 1 に記載の方法。

[項目 2 6]

前記細胞培養物の比生産性が、少なくとも 10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70% 又は 75% 増大している、項目 1 に記載の方法。

[項目 2 7]

前記細胞培養物が、miRNA-let-7a 活性が抑制されていない対照細胞培養物と比較して、約 1% ~ 約 30% の相対生存細胞密度を有する、項目 1 に記載の方法。

[項目 2 8]

アポトーシス、タンパク質翻訳又は細胞代謝の少なくとも1つの媒介因子の発現が、*miRNA-let-7a* 活性が抑制されていない対照細胞培養物と比較して増大している、項目1に記載の方法。

[項目 2 9]

HMG A2、*MYC*、*NF2*、*NIRF*、*RAB40C*、及び*eIF4a* から選択される *miRNA-let-7a* の少なくとも1つの標的の発現が、*miRNA-let-7a* 活性が抑制されていない対照細胞培養物と比較して細胞培養物中で増大している、項目24に記載の方法。

[項目 3 0]

前記哺乳動物細胞が、対照細胞培養物と比較して、*miR-10a*、*miR-21*、及びそれらの組み合わせから選択される第2の *microRNA* の増大した活性を有する、項目2に記載の方法。

[項目 3 1]

前記哺乳動物細胞が、*miR-10a*、*miR-21*、又はそれらの組み合わせを発現することができる第2の発現ベクターでトランスフェクトされる、項目30に記載の方法。

[項目 3 2]

前記哺乳動物細胞が、*miR-16*、*miR-101*、*miR-145*、及びそれらの組み合わせから選択される第2の *microRNA* の低減した活性を有する、項目2に記載の方法。

[項目 3 3]

前記第2の *microRNA* の活性が、第2の *microRNA* 阻害剤によって抑制される、項目32に記載の方法。

[項目 3 4]

前記第2の *microRNA* 阻害剤が、第2のアンチセンスオリゴヌクレオチド阻害剤を含む、項目33に記載の方法。

[項目 3 5]

前記哺乳動物細胞培養物が、第2のアンチセンスオリゴヌクレオチド阻害剤でトランスフェクトされた哺乳動物細胞を含む、項目33に記載の方法。

[項目 3 6]

前記第2のオリゴヌクレオチド阻害剤が、ヌクレアーゼ耐性を改善し、*RISC* による *miRNA* 特異的切断に対する耐性を高め、及び/又は結合親和性を増大するように化学的に修飾されている、項目35に記載の方法。

[項目 3 7]

前記哺乳動物細胞培養物が、前記アンチセンスオリゴヌクレオチド阻害剤をコードする第2の発現ベクターでトランスフェクトされた哺乳動物細胞を含む、項目34に記載の方法。

[項目 3 8]

組換えポリペプチドを発現するように設計された哺乳動物細胞株であって、抑制された *miRNA-let-7a* 活性を有する哺乳動物細胞株。

[項目 3 9]

miRNA-let-7a 遺伝子ノックアウトを含む、項目38に記載の哺乳動物細胞株。

[項目 4 0]

前記哺乳動物細胞が、*miRNA-let-7a* のアンチセンスオリゴヌクレオチド阻害剤でトランスフェクトされている、項目38に記載の哺乳動物細胞株。

[項目 4 1]

前記哺乳動物細胞が、*miRNA-let-7a* の前記アンチセンスオリゴヌクレオチド阻害剤をコードする発現ベクターでトランスフェクトされている、項目39に記載の哺乳動物細胞株。

乳動物細胞株。

[項目 4 2]

前記細胞株が、miRNA - let - 7 a の前記アンチセンスオリゴヌクレオチド阻害剤で安定的にトランスフェクトされる、項目 4 0 に記載の哺乳動物細胞株。

[項目 4 3]

前記細胞株が、miRNA - let - 7 a の前記アンチセンスオリゴヌクレオチド阻害剤で一過的にトランスフェクトされる、項目 4 0 に記載の哺乳動物細胞株。

[項目 4 4]

前記ベクターが、ウイルスベクターを含む、項目 4 1 に記載の哺乳動物細胞株。

[項目 4 5]

前記ベクターが、レトロウイルスベクターを含む、項目 4 4 に記載の哺乳動物細胞株。

[項目 4 6]

前記レトロウイルスベクターが、レンチウイルスベクターから選択される、項目 4 5 に記載の哺乳動物細胞株。

[項目 4 7]

前記ベクターが、パキウウイルスベクターを含む、項目 4 4 に記載の哺乳動物細胞株。

[項目 4 8]

前記ベクターが、アデノウイルスベクターを含む、項目 4 4 に記載の哺乳動物細胞株。

[項目 4 9]

前記哺乳動物細胞が、以下：チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、ヒト胎児由来腎（HEK293）細胞、ペロ（Vero）細胞、ベビーハムスター腎（BHK）細胞、HeLa細胞、CV1サル腎細胞、メイディン・ダービー・イヌ腎（MDCK）細胞、3T3細胞、骨髄腫細胞株、COS細胞、PC12、WI38細胞から選択される、項目 3 8 に記載の哺乳動物細胞株。

[項目 5 0]

前記哺乳動物細胞が、チャイニーズハムスター卵巣細胞を含む、項目 3 8 に記載の哺乳動物細胞株。

[項目 5 1]

前記組換えタンパク質が、抗体又はその結合断片を含む、項目 3 8 に記載の哺乳動物細胞株。

[項目 5 2]

前記抗体又はその結合断片が、多重特異性抗体、完全ヒト型抗体、ヒト化抗体、ラクダ化抗体、キメラ抗体、CDR移植抗体、単鎖Fv（scFv）、ジスルフィド結合Fv（sdFv）、Fab断片、F（ab'）断片、及び抗イディオタイプ（抗Id）抗体から選択される、項目 5 1 に記載の哺乳動物細胞株。

[項目 5 3]

前記抗体又はその結合断片が、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA及びIgYから選択されるアイソタイプを含む、項目 5 1 に記載の哺乳動物細胞株。

[項目 5 4]

前記抗体又はその結合断片が、IgG1、IgG2、IgG3及びIgG4から選択されるアイソタイプを含む、項目 5 1 に記載の哺乳動物細胞株。

[項目 5 5]

前記組換えポリペプチドが、非抗体タンパク質を含む、項目 3 8 に記載の哺乳動物細胞株。

[項目 5 6]

前記組換えタンパク質が、融合タンパク質を含む、項目 5 5 に記載の哺乳動物細胞株。

[項目 5 7]

前記組換えタンパク質が、受容体を含む、項目 5 5 に記載の哺乳動物細胞株。

[項目 5 8]

前記組換えタンパク質が、細胞表面タンパク質のリガンドを含む、項目 5 5 に記載の哺乳動物細胞株。

[項目 5 9]

前記細胞表面タンパク質が、受容体を含む、項目 5 5 に記載の哺乳動物細胞株。

[項目 6 0]

前記組換えタンパク質が、分泌タンパク質を含む、項目 5 5 に記載の哺乳動物細胞株。

[項目 6 1]

前記組換えタンパク質が、酵素を含む、項目 5 5 に記載の哺乳動物細胞株。

[項目 6 2]

miRNA - let - 7 a のアンチセンス microRNA 阻害剤をコードする 1 つ又は複数のベクターと、組換えタンパク質をコードするヌクレオチド配列とを含む発現系。

[項目 6 3]

miRNA - let - 7 a のアンチセンス阻害剤を含む細胞培地。

[項目 6 4]

miRNA - let - 7 a のアンチセンス microRNA 阻害剤でトランスフェクトした哺乳動物細胞を含む哺乳動物細胞培養物から産生される組換えポリペプチド。