

【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25年11月7日(2013.11.7)

【公表番号】特表2013-505735(P2013-505735A)

【公表日】平成25年2月21日(2013.2.21)

【年通号数】公開・登録公報2013-009

【出願番号】特願2012-531516(P2012-531516)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (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 N 9/14 (2006.01)

C 1 2 P 19/00 (2006.01)

C 1 2 P 21/02 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A 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 N 9/14

C 1 2 P 19/00

C 1 2 P 21/02 C

【手続補正書】

【提出日】平成25年9月20日(2013.9.20)

【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】

オリゴ糖におけるマンノース-6-リン酸残基をキャップ除去するための方法であって

a) マンノース-1-ホスホ-6-マンノース結合を有する該オリゴ糖を提供するステップと、

b) 該オリゴ糖を、該マンノース-1-ホスホ-6-マンノース残基をホスホ-6-マンノースに加水分解することのできるマンノシダーゼと接触させるステップと、  
を含み、ここで、該マンノシダーゼが、グリコシルヒドロラーゼファミリー92のメンバーである、方法。

【請求項2】

以下に列挙する特徴のうち1つ以上を有する、請求項1に記載の方法：

(I) 前記マンノシダーゼが、以下の特徴のうち1つ以上を有する：

a) 該マンノシダーゼが、配列番号50の残基1~774に対して、または配列番号50に対して少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を含む；

b) 該マンノシダーゼが、配列番号50の残基1~774に対して、または配列番号50

に対して少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含む；

c) 該マンノシダーゼが、配列番号50の残基1～774に対して、または配列番号50に対して少なくとも98%の同一性を有するアミノ酸配列を含む；

d) 該アミノ酸配列が、配列番号50の残基1～774または配列番号50を含み、必要に応じてここで、該アミノ酸配列が、配列番号50の残基1～774のN末端または配列番号50のN末端に、配列番号15の残基1～15をさらに含む；

e) 該マンノシダーゼは、図33における等価原子の座標の1.5 偏差内に収まる、最小触媒中心に位置するアミノ酸側鎖中の原子の三次元タンパク質座標を有する；

f) 該マンノシダーゼが、(i) GVGXXGXGGモチーフ(式中、XはGly、Ala、Ser、ThrまたはCysである)、(ii) VRXEモチーフ(式中、XはPro以外の任意のアミノ酸である)、(iii) X<sub>1</sub>YQGX<sub>2</sub>モチーフ(式中、X<sub>1</sub>はLeu、Ile、Val、Ala、Phe、TyrまたはMetであり、X<sub>2</sub>はThr、SerまたはAsnである)または(iv) GD XGN(式中、XはPro以外の任意のアミノ酸であり得る)を有するアミノ酸配列を含む；

g) 該マンノシダーゼが、ターゲティング配列を含む；

(II) 前記接触させるステップが、精製されたマンノシダーゼ、組換えマンノシダーゼ、該組換えマンノシダーゼを含有する細胞溶解産物または該組換えマンノシダーゼを含有する真菌細胞を用いて行われる；

(III) 前記オリゴ糖がタンパク質に連結している；

(IV) (III)の前記タンパク質が、真菌生物において発現されるヒトタンパク質である；

(V) (IV)の該真菌生物が、

a) *Yarrowia lipolytica*または*Arxula adeninivorans*；

b) メチロトロフ酵母(例えば、ここで、該メチロトロフ酵母が、*Pichia pastoris*、*Pichia methanolica*、*Oogataea minuta*または*Hansenula polymorpha*である)；および

c) 糸状菌(例えば、該糸状菌が

【数9】

*Aspergillus caesiellus*, *Aspergillus candidus*, *Aspergillus carneus*,

*Aspergillus clavatus*, *Aspergillus deflectus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*,

*Aspergillus glaucus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*,

*Aspergillus oryzae*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus penicilloides*, *Aspergillus*

*restrictus*, *Aspergillus sojae*, *Aspergillus sydowi*, *Aspergillus tamari*, *Aspergillus terreus*,

*Aspergillus ustus*, または *Aspergillus versicolor*

である)

から選択される；

(VI) (III)または(IV)の該タンパク質が、病原体タンパク質、リソソームタンパク質、増殖因子、サイトカイン、ケモカイン、抗体もしくはその抗原結合性断片または融合タンパク質である；

(VII) (VI)の該リソソームタンパク質がリソソーム酵素である；

(VIII) (VII)の該リソソーム酵素がリソソーム貯蔵障害(LSD)に関連する；

(IX) (VIII)の該リソソーム貯蔵障害(LSD)が、ファブリ病、ムコ多糖症I型、ファーバー病、ゴーシェ病、GM1ガングリオシドーシス、テイ・サックス病、サンドホフ病、GM2活性化因子疾患、クラッペ病、異染性白質ジストロフィー、ニーマン・

ピック病、シャイエ病、ハンター病、サンフィリポ病、モルキオ病、マロトー・ラミー病、ヒアルロニダーゼ欠損症、アスパルチルグルコサミン尿症、フコシドーシス、マンノシドーシス、シンドラー病、シアリドーシス1型、ポンペ病、濃化異骨症、セロイドリポフスチン沈着症、コレステロールエステル貯蔵病、ウォルマン病、多種スルファターゼ欠損症、ガラクトシアリドーシス、ムコリピドーシス、シスチン症、シアル酸貯蔵病、マリネスコ・シェーグレン症候群を伴うカイロミクロン停滞病、ヘルマンスキー・ブドラック症候群、チェディアック・東症候群、ダノン病または幸福顔貌骨異形成症である；

(X)(VII)の該リソソーム貯蔵障害(LSD)がポンペ病またはファブリ病である。

**【請求項3】**

キャップ除去されたホスホ-6-マンノース残基を有する標的タンパク質を生産する方法であって、

マンノース-1-ホスホ-6-マンノース残基をホスホ-6-マンノースに加水分解することのできるマンノシダーゼをコードする核酸を含みそして発現するように遺伝的に操作されている真菌細胞を提供するステップと、

該細胞に、標的タンパク質をコードする核酸を導入するステップと、  
を含み、該細胞が、該細胞において発現された該発現されたマンノシダーゼによって該標的上のマンノース-1-ホスホ-6-マンノース残基がホスホ-6-マンノース残基に変換された該標的タンパク質を生産する、方法。

**【請求項4】**

以下に列挙した特徴のうちの1つ以上を有する、請求項3に記載の方法：

(I)前記マンノシダーゼが、a)配列番号50のアミノ酸1~774に対して、もしくは配列番号50に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列、またはb)(i)GVGXGXGGモチーフ(式中、XはGly、Ala、Ser、ThrまたはCysである)、(ii)VRXEモチーフ(式中、XはPro以外の任意のアミノ酸である)、(iii)X<sub>1</sub>YQGX<sub>2</sub>モチーフ(式中、X<sub>1</sub>はLeu、Ile、Val、Ala、Phe、TyrまたはMetであり、X<sub>2</sub>はThr、SerまたはAsnである)もしくは(iv)GD XGN(式中、XはPro以外の任意のアミノ酸であり得る)を有するアミノ酸配列を含む；

(II)(I)の該マンノシダーゼに関して、最小触媒中心に位置するアミノ酸側鎖中の原子の三次元タンパク質座標が図33における等価原子の座標の1.5偏差内に収まる；

(III)前記真菌細胞が、マンノシルリン酸化を促進することのできるポリペプチドをコードする核酸をさらに含む；

(IV)該真菌細胞が、OCH1活性を欠損するように遺伝的に操作されている；

(V)該マンノシダーゼが、C. cellulans、Streptomyces coelicolorまたはStreptomyces lividansのマンノシダーゼである。

**【請求項5】**

真菌生物においてキャップ除去されたホスホ-6-マンノース残基を有する標的タンパク質を生産する方法であって、

a)マンノース-1-ホスホ-6-マンノースをホスホ-6-マンノースに加水分解することのできるマンノシダーゼをコードする核酸を含みそして発現するように遺伝的に操作されており、標的タンパク質をコードする核酸をさらに含む真菌細胞を提供し、ここで、該細胞において発現された該発現されたマンノシダーゼによって該標的上のマンノース-1-ホスホ-6-マンノース残基がホスホ-6-マンノース残基に変換されているステップと、

b)該キャップ除去されたホスホ-6-マンノース残基を有する該標的タンパク質を単離するステップと、  
を含む、方法。

## 【請求項 6】

以下に列挙した特徴のうちの一つ以上を有する、請求項 5 に記載の方法：

(I) 前記マンノシダーゼが、(a) 配列番号 50 のアミノ酸 1 ~ 774 に対して、もしくは配列番号 50 に対して少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列、または (b) (i) G V G X X G X G G モチーフ (式中、X は G l y、A l a、S e r、T h r または C y s である)、(i i) V R X E モチーフ (式中、X は P r o 以外の任意のアミノ酸である)、(i i i) X<sub>1</sub> Y Q G X<sub>2</sub> モチーフ (式中、X<sub>1</sub> は L e u、I l e、V a l、A l a、P h e、T y r または M e t であり、X<sub>2</sub> は T h r、S e r または A s n である) もしくは (i v) G D X G N (式中、X は P r o 以外の任意のアミノ酸であり得る) を有するアミノ酸配列を含む；

(I I) (I) の該マンノシダーゼに関して、最小触媒中心に位置するアミノ酸側鎖中の原子の三次元タンパク質座標が図 33 における等価原子の座標の 1.5 偏差内に収まる；

(I I I) 前記標的タンパク質および該マンノシダーゼが前記細胞により分泌される。

## 【請求項 7】

キャップ除去されたホスホ - 6 - マンノース残基を含む糖タンパク質を生産するように遺伝的に操作されている単離された真菌細胞であって、マンノシダーゼをコードする核酸を含み、該真菌細胞における前記マンノシダーゼの発現が、該キャップ除去されたホスホ - 6 - マンノース残基を含む糖タンパク質の生産をもたらし、ここで、該マンノシダーゼが、グリコシルヒドロラーゼファミリー 92 のメンバーである、真菌細胞。

## 【請求項 8】

以下に列挙した特徴のうちの一つ以上を有する、請求項 7 に記載の真菌細胞：

(I) 前記マンノシダーゼが、a) 配列番号 50 のアミノ酸 1 ~ 774 に対して、もしくは配列番号 50 のアミノ酸配列に対して少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列、または b) (i) G V G X X G X G G モチーフ (式中、X は G l y、A l a、S e r、T h r または C y s である)、(i i) V R X E モチーフ (式中、X は P r o 以外の任意のアミノ酸である)、(i i i) X<sub>1</sub> Y Q G X<sub>2</sub> モチーフ (式中、X<sub>1</sub> は L e u、I l e、V a l、A l a、P h e、T y r または M e t であり、X<sub>2</sub> は T h r、S e r または A s n である) もしくは (i v) G D X G N (式中、X は P r o 以外の任意のアミノ酸であり得る) を有するアミノ酸配列を含む；

(I I) (I) の該マンノシダーゼに関して、最小触媒中心に位置するアミノ酸側鎖中の原子の三次元タンパク質座標が図 33 における等価原子の座標の 1.5 偏差内に収まる；

(I I I) 該真菌細胞が、マンノシルリン酸化を促進することのできるポリペプチドをコードする核酸をさらに含む；

(I V) 該真菌細胞が、O C H 1 (外鎖伸長) 活性を欠損するように遺伝的に操作されている；

(V) 該真菌細胞が、マンノシルリン酸化を促進することのできるポリペプチドをコードする核酸を含み、O C H 1 活性を欠損するように遺伝的に操作されている；

(V I) 該真菌細胞が、糖タンパク質である標的タンパク質をコードする核酸をさらに含む；

(V I I) (V I) の該標的タンパク質がヒトタンパク質である；

(V I I I) (V I) または (V I I) の該標的タンパク質が、病原体タンパク質、リソソームタンパク質、増殖因子、サイトカイン、ケモカイン、抗体もしくはその抗原結合性断片または融合タンパク質である；

(I X) 該リソソームタンパク質がリソソーム酵素である；

(X) (I X) の該リソソーム酵素が酸性アルファグルコシダーゼまたはアルファガラクトシダーゼである；

(X I) (V I) から (X) の該標的タンパク質が、L S D に関連するタンパク質である；

(XII)(XI)の該LSDが、ファブリ病、ムコ多糖症I型、ファーバー病、ゴーシェ病、GM1ガングリオシドーシス、テイ・サックス病、サンドホフ病、GM2活性化因子疾患、クラッペ病、異染性白質ジストロフィー、ニーマン・ピック病、シャイエ病、ハンター病、サンフィリポ病、モルキオ病、マロトー・ラミー病、ヒアルロニダーゼ欠損症、アスパルチルグルコサミン尿症、フコシドーシス、マンノシドーシス、シンドラー病、シアリドーシス1型、ポンペ病、濃化異骨症、セロイドリポフスチン沈着症、コレステロールエステル貯蔵病、ウォルマン病、多種スルファターゼ欠損症、ガラクトシアリドーシス、ムコリピドーシス、シスチン症、シアル酸貯蔵病、マリネスコ・シェーグレン症候群を伴うカイロミクロン停滞病、ヘルマンスキー・ブドラック症候群、チェディアック・東症候群、ダノン病または幸福顔貌骨異形成症である；

(XIII)該真菌細胞が、*Yarrowia lipolytica*または*Arxula adeninivorans*細胞である；

(XIV)マンノシルリン酸化を促進することのできる(III)の該ポリペプチドが、MNN4ポリペプチドである；

(XV)(XIV)の該MNN4ポリペプチドが、*Yarrowia lipolytica*、*S. cerevisiae*、*Ogataea minuta*、*Pichia pastoris*または*C. albicans*のポリペプチドである；

(XVI)マンノシルリン酸化を促進することのできる(III)の該ポリペプチドが、*P. pastoris* PNO1ポリペプチドである；

(XVII)該マンノシダーゼが、*C. cellulans*、*Streptomyces coelicolor*または*Streptomyces lividans*のマンノシダーゼである；

(XVIII)該マンノシダーゼが分泌シグナルを含む；

(XIX)該マンノシダーゼが、該マンノシダーゼを細胞内区画にターゲティングするためのターゲティングシグナルを含む；

(XX)該マンノシダーゼが、分泌シグナルおよび該マンノシダーゼを細胞内区画にターゲティングするためのターゲティングシグナルを含む；

(XXI)該真菌細胞が、単離された形態にある。

**【請求項9】**

*Yarrowia lipolytica*、*Pichia pastoris*、*Hansenula polymorpha*、*Arxula adeninivorans*、*Pichia methanolica*、*Ogataea minuta*または*Aspergillus niger*の細胞を含む実質的に純粋な培養物であって、該細胞は、キャップ除去されたホスホ-6-マンノース残基を含む糖タンパク質を生産するように遺伝的に操作されており、マンノース-1-ホスホ-6-マンノースをホスホ-6-マンノースに加水分解することのできるマンノシダーゼをコードする核酸を含み、ここで、該マンノシダーゼが、グリコシルヒドロラーゼファミリー92のメンバーである、培養物。

**【請求項10】**

以下に列挙した特徴のうちの1つ以上を有する、請求項9に記載の培養物：

(I)前記マンノシダーゼが、a)配列番号50のアミノ酸1~774に対して、もしくは配列番号50のアミノ酸配列に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列、またはb)(i)GVGXGXGGモチーフ(式中、XはGly、Ala、Ser、ThrまたはCysである)、(ii)VRXEモチーフ(式中、XはPro以外の任意のアミノ酸である)、(iii)X<sub>1</sub>YQGX<sub>2</sub>モチーフ(式中、X<sub>1</sub>はLeu、Ile、Val、Ala、Phe、TyrまたはMetであり、X<sub>2</sub>はThr、SerまたはAsnである)もしくは(iv)GDxGN(式中、XはPro以外の任意のアミノ酸であり得る)を有するアミノ酸配列を含む；

(II)該マンノシダーゼに関して、最小触媒中心に位置するアミノ酸側鎖中の原子の三次元タンパク質座標が図33における等価原子の座標の1.5 偏差内に収まる；

(III)該細胞が、マンノシルリン酸化を促進することのできるポリペプチドをコード

する核酸をさらに含む；

( I V ) 該細胞が、O C H 1 活性を欠損するように遺伝的に操作されている。

【請求項 1 1】

請求項 1 ~ 6 のうちいずれか一項に記載の方法によって生産された、キャップ除去されたホスホ - 6 - マンノース残基を含む糖タンパク質 ( 例えば、ここで、該糖タンパク質は、単離された形態にある ) 。

【請求項 1 2】

糖タンパク質を含む組成物であって、該糖タンパク質における N - グリカンの少なくとも 4 7 % ( 例えば、少なくとも 5 0 %、少なくとも 7 5 % または少なくとも 9 0 % ) が、キャップ除去されたホスホ - 6 - マンノース残基を有する、組成物。

【請求項 1 3】

配列番号 5 0 の残基 1 ~ 7 7 4 に対して、または配列番号 5 0 に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、該ポリペプチドは、マンノース - 1 - ホスホ - 6 - マンノースをホスホ - 6 - マンノースに加水分解することができ；例えば、ここで、該ポリペプチドは、以下の特徴のうちの 1 つ以上を有する、ポリペプチド：

( I ) 該アミノ酸配列が、配列番号 5 0 の残基 1 ~ 7 7 4 に対して、または配列番号 5 0 に対して少なくとも 9 5 % の同一性を有する；

( I I ) 該アミノ酸配列が、配列番号 5 0 の残基 1 ~ 7 7 4 に対して、または配列番号 5 0 に対して少なくとも 9 8 % の同一性を有する；

( I I I ) 該アミノ酸配列が、配列番号 5 0 の残基 1 ~ 7 7 4 または配列番号 5 0 を含む；

( I V ) ( I I I ) の該配列は、配列番号 5 0 の残基 1 ~ 7 7 4 の N 末端または配列番号 5 0 の N 末端に、配列番号 1 5 の残基 1 ~ 1 5 をさらに含む；

( V ) 該ポリペプチドの最小触媒中心に位置するアミノ酸側鎖中の原子の三次元タンパク質座標が図 3 3 における等価原子の座標の 1 . 5 偏差内に収まる；

( V I ) 該ポリペプチドが、( i ) G V G X X G X G G モチーフ ( 式中、X は G l y、A l a、S e r、T h r または C y s である )、( i i ) V R X E モチーフ ( 式中、X は P r o 以外の任意のアミノ酸である )、( i i i ) X<sub>1</sub> Y Q G X<sub>2</sub> モチーフ ( 式中、X<sub>1</sub> は L e u、I l e、V a l、A l a、P h e、T y r または M e t であり、X<sub>2</sub> は T h r、S e r または A s n である ) または ( i v ) G D X G N ( 式中、X は P r o 以外の任意のアミノ酸であり得る ) を有するアミノ酸配列を含む。

【請求項 1 4】

核酸であって、

( a ) 請求項 1 3 に記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；または

( b ) 該ヌクレオチド配列の相補体

を含む、核酸；例えば、ここで：

( I ) 該ヌクレオチド配列が、配列番号 5 0 の残基 1 ~ 7 7 4 または配列番号 5 0 をコードする；または

( I I ) 該ヌクレオチド配列が、配列番号 1 4 のヌクレオチド 4 6 ~ 2 3 2 2 または配列番号 1 4 のヌクレオチド 4 6 ~ 4 9 9 5 を含み；該配列は必要に応じて、配列番号 1 4 のヌクレオチド 4 6 ~ 2 3 2 2 の 5 ' または配列番号 1 4 のヌクレオチド 4 6 ~ 4 9 9 5 の 5 ' に、配列番号 1 4 のヌクレオチド 1 ~ 4 5 をさらに含む。

【請求項 1 5】

請求項 1 4 に記載の核酸を含む発現ベクター；または該発現ベクターを含む宿主細胞；またはポリペプチドを作製する方法であって、該宿主細胞を培養するステップと、該培養物から該ポリペプチドを単離するステップとを含む、方法。