

【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3月16日(2017.3.16)

【公表番号】特表2016-516412(P2016-516412A)

【公表日】平成28年6月9日(2016.6.9)

【年通号数】公開・登録公報2016-035

【出願番号】特願2016-503404(P2016-503404)

【国際特許分類】

C 12 P 21/00 (2006.01)

C 12 P 21/08 (2006.01)

C 12 N 9/04 (2006.01)

【F I】

C 12 P 21/00 Z N A C

C 12 P 21/08

C 12 N 9/04 E

C 12 N 9/04

【手続補正書】

【提出日】平成29年2月1日(2017.2.1)

【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】

所望のタンパク質を生成する方法であつて、

(a) 第1の温度で、前記所望のタンパク質の発現を提供する、1つ以上の遺伝子を含む、真核細胞を培養することと、

(b) 第2の温度で前記真核細胞を培養し、前記真核細胞が前記所望のタンパク質を生成することを可能にすることと、を含み、

前記第2の温度は、前記第1の温度とは異なる、前記方法。

【請求項2】

以下：

(i) 前記第1の温度は、約20～約32、約24～約31.5、約27～約31、約27.5～約30、約20～約29.5、約24～約29、約27～約28.5、または約27.5～約28.5である；

(ii) 前記第2の温度は、前記第1の温度よりも約1～約6高い、前記第1の温度よりも約1～約3高い、前記第1の温度よりも約2～約4高い、または前記第1の温度よりも約2～約3高い；

(iii) 前記第2の温度は、約30～約34、約30～約32、または約30～約31.5である；

(iv) 前記第1の温度は、約28であり、前記第2の温度は、約30または約31である；

(v) 前記第1の温度は、約27.5～約28.5であり、前記第2の温度は、約30～約31である；および/または

(vi) 前記第2の温度は、前記第1の温度よりも高い；の1つまたはそれより多くを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記所望のタンパク質は、マルチサブユニット複合体、抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、またはIL-6、TNF、CGRP、PCSK9、HGF、もしくはNGFに特異的な、任意にヒト化もしくは任意にヒト抗体を含む、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

以下：

(i) 前記方法は、前記所望のタンパク質の収率を増加させる；

(ii) 前記方法は、前記第1の温度と前記第2の温度との間の差なしで達成される同じ方法に対して、1つ以上の産物関連変異体の相対存在量を減少させる；

(iii) 前記方法は、前記第1の温度と前記第2の温度との間の差なしで達成される同じ方法に対して、サイズ排除クロマトグラフィまたはゲル電気泳動によって検出されるような、前記所望のマルチサブユニット複合体よりも高いまたは低い見かけの分子量を有する、産物関連変異体の相対存在量を減少させる；

(iv) 前記方法は、前記第1の温度と前記第2の温度との間の差なしで達成される同じ方法に対して、異常なジスルフィド結合を有する複合体の相対存在量を減少させる；

(v) 前記方法は、前記第1の温度と前記第2の温度との間の差なしで達成される同じ方法に対して、減少したシステインを有する複合体の相対存在量を減少させる；

(vi) 前記方法は、前記第1の温度と前記第2の温度との間の差なしで達成される同じ方法に対して、異常なグリコシル化を有する複合体の相対存在量を減少させる；

(vii) 前記方法は、前記第1の温度と前記第2の温度との間の差なしで達成される同じ方法に対して、1つ以上の産物関連変異体の相対存在量を減少させる；

(viii) 前記真核細胞は、酵母細胞、メチロトローフ酵母を含み、メチロトローフ酵母は、ピキア・パストリスなどのピキア属のものであるか、またはピキア・アンガスター、ピキア・ギリエルモンディイ、ピキア・メタノリカ、及びピキア・イノシトベラからなる群より選択される酵母である；

(ix) 前記所望のタンパク質の発現を提供する前記遺伝子は、1つ以上のゲノム遺伝子座に組み込まれ、任意に前記ゲノム遺伝子座のうちの少なくとも1つは、pGAP遺伝子座、3'AOXTT遺伝子座；PpURA5；OCH1；AOX1；HIS4；GAP；pGAP；3'AOXTT；ARG；及びHIS4TT遺伝子座からなる群より選択される；および/または

(x) 前記所望のタンパク質の前記サブユニットをコードする前記遺伝子のうちの少なくとも1つは、誘導性または構成的プロモータの制御下で発現され、任意に前記誘導性プロモータは、AOX1、CUP1、テトラサイクリン誘導性、チアミン誘導性、及びFLD1プロモータからなる群より選択される；

の1つまたはそれより多くを含む、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】

ステップ(a)は、グリセロールが枯渇するまで、前記グリセロールを炭素源として含む培養培地の中で、前記真核細胞を培養することを含む、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】

前記所望のタンパク質は、CUP1、AOX1、ICL1、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAP)、FLD1、ADH1、アルコールデヒドロゲナーゼII、GAL4、PHO3、PHO5、及びPykプロモータ、テトラサイクリン誘導性プロモータ、チアミン誘導性プロモータ、それから得られるキメラプロモータ、酵母プロモータ、哺乳類プロモータ、昆虫プロモータ、植物プロモータ、爬虫類プロモータ、両生類プロモータ、ウイルスプロモータ、及び鳥類プロモータからなる群より選択される、プロモータの制御下で発現される、請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7】

前記真核細胞は、1倍体、2倍体、4倍体細胞、または倍数体細胞である、請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項8】

前記真核細胞から、または培養培地から前記所望のタンパク質を精製することをさらに含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

前記所望のタンパク質は、前記真核細胞の細胞内成分、細胞質、核質、または膜から精製される、請求項 8 に記載の前記方法。

【請求項 10】

前記真核細胞は、前記所望のタンパク質を培養培地中に分泌する、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の前記方法。

【請求項 11】

以下：

(i) ステップ(a)は、バッヂ相を含み、任意に前記バッヂ相は、炭素源を含む培地中で前記真核細胞を培養することを含み、任意に前記バッヂ相の終了は、前記培養培地中の前記炭素源の枯渇によって決定される；

(i i) ステップ(b)は、フェドバッヂ相を含む；
の 1 つまたはそれより多くを含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

前記所望のタンパク質をコードする前記遺伝子または複数の遺伝子の転写を調節する、前記プロモータまたは複数のプロモータは、温度誘導性ではない、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の前記方法。