

【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11月30日(2017.11.30)

【公開番号】特開2017-60528(P2017-60528A)

【公開日】平成29年3月30日(2017.3.30)

【年通号数】公開・登録公報2017-013

【出願番号】特願2017-348(P2017-348)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 P 21/02 (2006.01)

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 0 7 K 14/435 (2006.01)

C 1 2 P 21/08 (2006.01)

C 1 2 N 1/20 (2006.01)

C 1 2 N 9/10 (2006.01)

C 1 2 N 9/14 (2006.01)

C 1 2 N 9/16 (2006.01)

C 1 2 N 9/20 (2006.01)

C 1 2 N 9/24 (2006.01)

C 1 2 N 9/26 (2006.01)

C 1 2 N 9/38 (2006.01)

C 1 2 N 9/50 (2006.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 0 7 K 19/00 (2006.01)

A 6 1 K 38/00 (2006.01)

A 6 1 P 3/00 (2006.01)

A 6 1 P 3/06 (2006.01)

A 6 1 P 7/06 (2006.01)

A 6 1 P 25/00 (2006.01)

A 6 1 P 3/10 (2006.01)

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 29/00 (2006.01)

A 6 1 K 38/46 (2006.01)

【 F I 】

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 P 21/02 Z N A C

C 1 2 N 1/15

C 0 7 K 14/435

C 1 2 P 21/02 H

C 1 2 P 21/08

C 1 2 N 1/20

C 1 2 N 9/10

C 1 2 N 9/14

C 1 2 N 9/16

C 1 2 N 9/20

C 1 2 N 9/24

C 1 2 N 9/26

C 1 2 N 9/38

C 1 2 N 9/50
 C 1 2 N 5/10
 C 1 2 N 1/21
 C 0 7 K 19/00
 A 6 1 K 37/02
 A 6 1 P 3/00
 A 6 1 P 3/06
 A 6 1 P 7/06
 A 6 1 P 25/00
 A 6 1 P 3/10
 A 6 1 P 35/00
 A 6 1 P 29/00
 A 6 1 K 37/54

【手続補正書】

【提出日】平成29年10月17日(2017.10.17)

【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】

改変N-グリコシル化形態のターゲットタンパク質を生産する方法であって、小胞体にターゲティングされたアルファ-1,2-マンノシダーゼポリペプチドを発現するように遺伝子操作された *Yarrowia lipolytica* または *Arxula adenivorans* 細胞を提供する工程；および

前記細胞にターゲットタンパク質をコードする核酸を導入する工程であって、前記細胞が改変N-グリコシル化形態の前記ターゲットタンパク質を生産する、工程を含む、方法。

【請求項2】

前記細胞が外鎖伸長部(OCH1)活性の欠失を含むようにさらに遺伝子操作される、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記改変N-グリコシル化形態を有する前記ターゲットタンパク質のN-グリカン構造のうちの少なくとも90%が $Man_5GlcNAc_2$ である、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

前記アルファ-1,2-マンノシダーゼがMNS1であるか；または前記アルファ-1,2-マンノシダーゼが *Saccharomyces cerevisiae* MNS1ポリペプチドもしくはR273L、R269SおよびS272Gからなる群から選択される1つ以上のアミノ酸置換を含む *S.cerevisiae* MNS1ポリペプチドであるか；または

前記アルファ-1,2-マンノシダーゼが *Trichoderma reesei* アルファ-1,2-マンノシダーゼである、請求項1~3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項5】

前記アルファ-1,2-マンノシダーゼポリペプチドが、HDEL小胞体貯留ペプチドに融合された前記アルファ-1,2-マンノシダーゼポリペプチドを含むか；または前記アルファ-1,2-マンノシダーゼポリペプチドが、アルファ-1,2-マンノシ

ダーゼおよびHDEL小胞体貯留ペプチドを含む融合タンパク質である、
請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】

前記改変N-グリコシル化形態の前記ターゲットタンパク質を単離する工程をさらに含む、
請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

前記ターゲットタンパク質が外因性タンパク質であるか；あるいは
前記ターゲットタンパク質が内因性タンパク質であるか；あるいは
前記ターゲットタンパク質が哺乳動物タンパク質であるか；あるいは
前記ターゲットタンパク質がヒトタンパク質であるか；あるいは
前記ターゲットタンパク質が病原体タンパク質、リソソームタンパク質、成長因子、サイトカイン、ケモカイン、抗体もしくはその抗原結合フラグメント、または融合タンパク質であるか；あるいは

前記ターゲットタンパク質が融合タンパク質であり、前記融合タンパク質が病原体タンパク質、リソソームタンパク質、成長因子、サイトカインまたはケモカインと抗体またはその抗原結合フラグメントの融合体である、

請求項1～6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項8】

前記ターゲットタンパク質がリソソーム貯蔵障害(LSD)に関連したタンパク質であるか；または

前記ターゲットタンパク質がグルコセレブロシダーゼ、アルファ-ガラクトシダーゼもしくはガラクトセレブロシダーゼであるか；または

前記ターゲットタンパク質がアルファ-L-イズロニダーゼ、ベータ-D-ガラクトシダーゼ、ベータ-グルコシダーゼ、ベータ-ヘキソサミニダーゼ、ベータ-D-マンノシダーゼ、アルファ-L-フコシダーゼ、アリアルスルファターゼB、アリアルスルファターゼA、アルファ-N-アセチルガラクトサミニダーゼ、アスパルチルグルコサミニダーゼ、イズロネート-2-スルファターゼ、アルファ-グルコサミニド-N-アセチルトランスフェラーゼ、ベータ-D-グルコロニダーゼ、ヒアルロニダーゼ、アルファ-L-マンノシダーゼ、アルファ-ノイラミニダーゼ、ホスホトランスフェラーゼ、酸性リパーゼ、酸性セラミダーゼ、スフィンゴミエリナーゼ、チオエステラーゼ、カテプシンK、およびリポタンパク質リパーゼからなる群から選択される、

請求項1～7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項9】

その改変N-グリコシル化形態の前記ターゲットタンパク質の追加のプロセッシングをさらに含む、
請求項1～8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項10】

前記追加のプロセッシングがインビトロで行われるか；または

前記追加のプロセッシングがインビボで行われるか；または

前記追加のプロセッシングが修飾糖タンパク質への異種部分の付加を含むか；または

前記追加のプロセッシングが修飾糖タンパク質への異種部分の付加を含み、前記異種部分がポリマーまたは担体であるか；または

前記追加のプロセッシングが前記改変N-グリコシル化形態の前記ターゲットタンパク質の酵素的または化学的処理を含むか；または

前記追加のプロセッシングがマンノシダーゼ、マンナーゼ、ホスホジエステラーゼ、グルコシダーゼもしくはグリコシルトランスフェラーゼでの前記改変N-グリコシル化形態の前記ターゲットタンパク質の処理を含むか；または

前記追加のプロセッシングがフッ化水素酸での前記改変N-グリコシル化形態の前記ターゲットタンパク質の処理を含むか；または

前記追加のプロセッシングが前記改変N-グリコシル化形態の前記ターゲットタンパク質のリン酸化を含む、

請求項 9 に記載の方法。

【請求項 1 1】

小胞体にターゲティングされたアルファ - 1 , 2 - マンノシダーゼポリペプチドを発現するように遺伝子操作された、単離された *Yarrowia lipolytica* または *Arxula adeninivorans* 細胞。

【請求項 1 2】

前記細胞が外鎖伸長部 (O C H 1) 活性の欠失を含むようにさらに遺伝子操作される、請求項 1 1 に記載の単離された細胞。

【請求項 1 3】

前記細胞がターゲットタンパク質をコードする核酸をさらに含み、その結果前記細胞が改変 N - グリコシル化形態の前記ターゲットタンパク質を生産する、請求項 1 1 または 1 2 に記載の単離された細胞。

【請求項 1 4】

前記改変 N - グリコシル化形態を有する前記ターゲットタンパク質の N グリカン構造のうち少なくとも 9 0 % が $Man_5GlcNAc_2$ である、請求項 1 3 に記載の単離された細胞。

【請求項 1 5】

前記アルファ - 1 , 2 - マンノシダーゼが M N S 1 であるか ; または
前記アルファ - 1 , 2 - マンノシダーゼが *Saccharomyces cerevisiae* M N S 1 ポリペプチドもしくは R 2 7 3 L 、 R 2 6 9 S および S 2 7 2 G からなる群から選択される 1 つ以上のアミノ酸置換を含む *S . cerevisiae* M N S 1 ポリペプチドであるか ; または
前記アルファ - 1 , 2 - マンノシダーゼが *Trichoderma reesei* アルファ - 1 , 2 - マンノシダーゼである、
請求項 1 1 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の単離された細胞。

【請求項 1 6】

前記アルファ - 1 , 2 - マンノシダーゼポリペプチドが、H D E L 小胞体貯留ペプチドに融合された前記アルファ - 1 , 2 - マンノシダーゼポリペプチドを含むか ; または
前記アルファ - 1 , 2 - マンノシダーゼポリペプチドが、アルファ - 1 , 2 - マンノシダーゼおよび H D E L 小胞体貯留ペプチドを含む融合タンパク質である、
請求項 1 1 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の単離された細胞。

【請求項 1 7】

改変 N - グリコシル化形態のターゲットタンパク質を生産する方法であって、
ターゲットタンパク質を、小胞体にターゲティングされたアルファ - 1 , 2 - マンノシダーゼポリペプチドを発現するように遺伝子操作された *Yarrowia lipolytica* または *Arxula adeninivorans* 細胞から調製された細胞溶解産物と接触させる工程であって、前記細胞溶解産物と前記ターゲットタンパク質の接触が結果として、改変された N - グリコシル化形態の前記ターゲットタンパク質を生じさせる、工程
ターゲットタンパク質を N - グリコシル化活性を有する 1 つ以上のタンパク質と接触させる工程であって、N - グリコシル化活性を有する前記 1 つ以上のタンパク質は、小胞体にターゲティングされたアルファ - 1 , 2 - マンノシダーゼポリペプチドを発現するように遺伝子操作された *Yarrowia lipolytica* または *Arxula adeninivorans* 細胞から得られ、N - グリコシル化活性を有する前記 1 つ以上のタンパク質と前記ターゲットタンパク質の接触が結果として、改変された N - グリコシル化形態の前記ターゲットタンパク質を生じさせる、工程
を含む、方法。

【請求項 1 8】

前記細胞が外鎖伸長部 (O C H 1) 活性の欠失を含むようにさらに遺伝子操作される、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 19】

前記改変 N - グリコシル化形態を有する前記ターゲットタンパク質の N グリカン構造のうち少なくとも 90% が $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ である、請求項 17 または 18 に記載の方法。

【請求項 20】

小胞体にターゲティングされたアルファ - 1 , 2 - マンノシダーゼポリペプチドを発現するように遺伝子操作された *Yarrowia lipolytica* または *Arxula adeninivorans* 細胞の培養物。

【請求項 21】

前記細胞が外鎖伸長部 (OCH1) 活性の欠失を含むようにさらに遺伝子操作される、請求項 20 に記載の培養物。

【請求項 22】

前記細胞がターゲットタンパク質をコードする核酸をさらに含み、その結果前記細胞が改変 N - グリコシル化形態の前記ターゲットタンパク質を生産する、請求項 20 または 21 に記載の培養物。

【請求項 23】

前記改変 N - グリコシル化形態を有する前記ターゲットタンパク質の N グリカン構造のうち少なくとも 90% が $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ である、請求項 22 に記載の培養物

。