

【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26年11月13日(2014.11.13)

【公表番号】特表2013-538581(P2013-538581A)

【公表日】平成25年10月17日(2013.10.17)

【年通号数】公開・登録公報2013-057

【出願番号】特願2013-530818(P2013-530818)

【国際特許分類】

C 1 2 P 21/00 (2006.01)

C 1 2 N 9/26 (2006.01)

【F I】

C 1 2 P 21/00 Z N A Z

C 1 2 N 9/26 Z

【手続補正書】

【提出日】平成26年9月22日(2014.9.22)

【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】

糖タンパク質におけるリン酸化N-グリカンを脱マンノシル化するための方法であって、
基礎をなすマンノースがリン酸化されている末端-1,2マンノース結合を含む糖タンパク質を、基礎をなすマンノースがリン酸化される場合に末端-1,2マンノース結合を加水分解する、マンノシダーゼまたは該マンノシダーゼの生物学的に活性な断片と接触させる工程

を含み、ここで、該接触させる工程が、該末端-1,2マンノース結合の加水分解をもたらして、脱マンノシル化糖タンパク質を生成する、方法。

【請求項2】

脱マンノシル化されたリン酸化N-グリカンを含む糖タンパク質を生成する方法であって、真菌細胞に、該糖タンパク質をコードする核酸を導入する工程を含み、そして該糖タンパク質は、基礎をなすマンノースがリン酸化されている末端-1,2マンノース結合を含み、ここで、該真菌細胞は、該基礎をなすマンノースがリン酸化される場合に末端-1,2マンノース結合を加水分解して脱マンノシル化された糖タンパク質を生成する、マンノシダーゼまたは該マンノシダーゼの生物学的に活性な断片をコードする核酸を含むように遺伝子操作されている、方法。

【請求項3】

前記マンノシダーゼはAspergillus satoii由来であるか、または前記マンノシダーゼはCellulosimicrobium cellulans由来である、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

前記マンノシダーゼは、配列番号5と少なくとも85%同一であるアミノ酸配列を含むか、または

前記マンノシダーゼは、配列番号5と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含むか、または

前記マンノシダーゼは、配列番号5と少なくとも98%同一であるアミノ酸配列を含むか、または

前記マンノシダーゼは、配列番号 5 を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記マンノシダーゼは、GH47ファミリーのマンノシダーゼである、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記マンノシダーゼは、配列番号 4 に少なくとも 85% 同一である核酸によってコードされるアミノ酸配列を含むか、または

前記マンノシダーゼは、配列番号 4 に少なくとも 95% 同一である核酸によってコードされるアミノ酸配列を含むか、または

前記マンノシダーゼは、配列番号 4 と少なくとも 98% 同一である核酸によってコードされるアミノ酸配列を含むか、または

前記マンノシダーゼは、配列番号 4 によってコードされるアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記マンノシダーゼは、GH92ファミリーのマンノシダーゼである、請求項 1 ~ 3 および 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記脱マンノシル化された糖タンパク質を単離する工程をさらに含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記糖タンパク質は、ヒトタンパク質である、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記接触させる工程が、真菌内で起こる、請求項 1、3 ~ 9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 11】

前記真菌が、*Yarrowia lipolytica* または *Arxula adenivorans* である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記真菌が、メチロトロフの酵母であり、例えば、*Pichia pastoris*、*Pichia methanolica*、*Oogataea minuta* および *Hansenula polymorpha* からなる群より選択されるメチロトロフの酵母などであるか、または

前記真菌が、糸状菌、例えば、*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*、*Aspergillus versicolor*、*Neurospora*、*Trichoderma*、*Fusarium* および *Chrysosporium* からなる群より選択される糸状菌などである、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 13】

前記糖タンパク質は、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断片、または融合タンパク質である、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

前記リソソームタンパク質は、リソソーム酵素、例えば、リソソーム蓄積障害（LSD）、例えば、ファブリー病、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、シェイエ病、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、フコース蓄積症、マンノース蓄積症、シンドラー病、1型シアリドーシス、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、多発性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、シアル酸蓄積障害、マリネスコ・シェーグレン症候群を伴うカイロミクロン蓄積症、ヘルマンスキー・パドラック症候群、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などに関連したリソソーム酵素などである、請求項13に記載の方法。

【請求項 15】

基礎をなすマンノースがリン酸化される場合に、末端 - 1, 2 マンノース結合を加水分解する、マンノシダーゼまたは該マンノシダーゼの生物学的に活性な断片を発現するように遺伝子操作された単離された真菌細胞。

【請求項 16】

真菌細胞の実質的に純粋な培養物であって、該真菌細胞のかなりの数が、基礎をなすマンノースがリン酸化される場合に、末端 - 1, 2 マンノース結合を加水分解する、マンノシダーゼまたは該マンノシダーゼの生物学的に活性な断片を発現するように遺伝子操作されている、培養物。

【請求項 17】

前記マンノシダーゼは、*Aspergillus satoui*由来であるか、または前記マンノシダーゼが*Cellulosimicrobium cellulans*由来である、請求項15に記載の真菌細胞または請求項16に記載の培養物。

【請求項 18】

前記マンノシダーゼは、配列番号5と少なくとも85%同一であるアミノ酸配列を含むか
前記マンノシダーゼは、配列番号5と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含むか
、または
前記マンノシダーゼは、配列番号5と少なくとも98%同一であるアミノ酸配列を含むか
、または
前記マンノシダーゼは、配列番号5を含む、請求項15もしくは17に記載の真菌細胞、または請求項16もしくは17に記載の培養物。

【請求項 19】

前記マンノシダーゼは、GH47ファミリーのマンノシダーゼである、請求項15、17および18のいずれか一項に記載の真菌細胞、または請求項16、17および18のいずれか一項に記載の培養物。

【請求項 20】

前記マンノシダーゼは、配列番号4と少なくとも85%同一である核酸によってコードされるアミノ酸配列を含むか、または
前記マンノシダーゼは、配列番号4と少なくとも95%同一である核酸によってコードされるアミノ酸配列を含むか、または
前記マンノシダーゼは、配列番号4と少なくとも98%同一である核酸によってコードされるアミノ酸配列を含むか、または
前記マンノシダーゼは、配列番号4によってコードされるアミノ酸配列を含む、請求項15もしくは17に記載の真菌細胞、または請求項16もしくは17に記載の培養物。

【請求項 21】

前記マンノシダーゼはGH92ファミリーのマンノシダーゼである、請求項15、17お

よび20のいずれか一項に記載の真菌細胞、または請求項16、17および20のいずれか一項に記載の培養物。

【請求項22】

前記真菌細胞は、Yarrowia lipolyticaまたはArxula adenivoransの細胞である、請求項15および17～21のいずれか一項に記載の真菌細胞、または請求項16～21のいずれか一項に記載の培養物。

【請求項23】

前記真菌細胞は、メチロトロフの酵母、例えば、Pichia pastoris、Pichia methanolica、Oogataea minutaおよびHansenula polymorphaからなる群より選択されるメチロトロフの酵母などの細胞であるか、または

前記真菌細胞は、糸状菌、例えば、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 tamaris、Aspergillus terreus、Aspergillus ustus、Aspergillus versicolor、Neurospora、Trichoderma、FusariumおよびChrysosporiumからなる群より選択される糸状菌などの細胞である、請求項15および17～21のいずれか一項に記載の真菌細胞、または請求項16～21のいずれか一項に記載の培養物。

【請求項24】

前記細胞もしくは前記培養物のかなりの数の細胞は、マンノシルリン酸化を促進することができるポリペプチドをコードする核酸をさらに含むか、または

前記細胞もしくは前記培養物のかなりの数の細胞が、OCH1活性が欠損するように遺伝子操作されているか、または

前記細胞もしくは前記培養物のかなりの数の細胞は、マンノシルリン酸化を促進することができるポリペプチドをコードする核酸をさらに含む、かつ該細胞がOCH1活性が欠損するように遺伝子操作されている、

請求項15および17～23のいずれか一項に記載の真菌細胞、または請求項16～23のいずれか一項に記載の培養物。

【請求項25】

前記細胞または前記培養物のかなりの数の細胞は、標的糖タンパク質、例えば、ヒトタンパク質である標的糖タンパク質などをコードする核酸をさらに含む、請求項15および17～24のいずれか一項に記載の真菌細胞、または請求項16～24のいずれか一項に記載の培養物。

【請求項26】

前記標的糖タンパク質は、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断片、または融合タンパク質である、請求項25に記載の真菌細胞または培養物。

【請求項27】

前記リソソームタンパク質は、リソソーム酵素である、請求項26に記載の真菌細胞または培養物。

【請求項28】

前記標的糖タンパク質は、LSD、例えば、ファブリー病、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、シェイエ病、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、フコース蓄積症、マンノース蓄積症、シンドラ病、1型シアリドーシス、ボンベ病、濃化異骨症、セロイドリボフスチン沈着症、コレステロールエステル貯蔵病、ウォルマン病、多発性スルファターゼ欠損症、ガラクトシアリドーシス、ムコリビドーシス、シスチン症、シアル酸蓄積障害、マリネスコ・シェーグレン症候群を伴うカイロミクロン蓄積症、ヘルマンスキー・パドラック症候群、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などに関連したタンパク質である、請求項25～27のいずれか一項に記載の真菌細胞または培養物。

【請求項29】

前記マンノシルリン酸化を促進することができるポリペプチドは、MNN4ポリペプチド、例えば、*Yarrowia lipolytica*ポリペプチド、*Saccharomyces cerevisiae*ポリペプチド、*Ogataea minuta*ポリペプチド、*Pichia pastoris*ポリペプチドもしくは*Candida albicans*ポリペプチドであるMNN4ポリペプチドなどであるか、または前記マンノシルリン酸化を促進することができるポリペプチドは、*P. pastoris* PNO1ポリペプチドである、請求項24に記載の真菌細胞または培養物。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0016

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0016】

本発明の他の特色および利点は、以下の詳細な記載から、および特許請求の範囲から明らかである。

特定の実施形態では、例えば以下が提供される：

(項目1)

糖タンパク質におけるリン酸化N-グリカン₁を脱マンノシル化するための方法であって、

a)リン酸化N-グリカン₁を有する該糖タンパク質を提供する工程、および

b)該糖タンパク質を、基礎をなすマンノースがリン酸化される場合に末端-1,2マンノース結合を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工程を含む、方法。

(項目2)

前記マンノシダーゼは*Aspergillus satoii*由来である、項目1に記載の方法。

(項目3)

前記マンノシダーゼは*Cellulosimicrobium cellulans*由来である、項目1に記載の方法。