

【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7月10日(2014.7.10)

【公表番号】特表2013-531978(P2013-531978A)

【公表日】平成25年8月15日(2013.8.15)

【年通号数】公開・登録公報2013-043

【出願番号】特願2013-512251(P2013-512251)

【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	15/113	(2010.01)
C 1 2 P	21/02	(2006.01)
C 1 2 P	21/08	(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	15/00	G
C 1 2 P	21/02	C
C 1 2 P	21/08	

【手続補正書】

【提出日】平成26年5月23日(2014.5.23)

【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】

培養細胞における乳酸生産を低下させる方法であって、乳酸脱水素酵素(LDH)に特異的な低分子干渉RNA(siRNA)をコードする第一異種性核酸配列、及びピルビン酸脱水素酵素キナーゼ(PDHK)に特異的なsiRNAをコードする第二異種性核酸配列を含んでなる細胞を培養することを含んでなり、第一異種性核酸配列は第一プロモーターに作動的に連結され、第二異種性核酸配列は第二プロモーターに作動的に連結されている方法。

【請求項2】

LDHがLDHaである請求項1に記載の方法。

【請求項3】

培養細胞が、第二PDHKに特異的なsiRNAをコードする第三異種性核酸配列を更に含み、第三異種性核酸配列は第三プロモーターに作動的に連結されている請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】

培養細胞が、第三PDHKに特異的なsiRNAをコードする第四異種性核酸配列を更

に含み、第四異種性核酸配列は第四プロモーターに作動的に連結されている請求項3に記載の方法。

【請求項5】

培養細胞が、第五PDKに特異的なsiRNAをコードする第五異種性核酸配列を更に含み、第五異種性核酸配列は第五プロモーターに作動的に連結されている請求項4に記載の方法。

【請求項6】

PDKが、PDK1、PDK2、PDK3、及びPDK4から成る群から選択される請求項1、2、3、4、及び5の何れか一項に記載の方法。

【請求項7】

PDKが、PDK1、PDK2、及びPDK3から成る群から選択される請求項1、2、3、及び4の何れか一項に記載の方法。

【請求項8】

PDKが、PDK1及びPDK2から成る群から選択される請求項1～3の何れか一項に記載の方法。

【請求項9】

PDKが、PDK1及びPDK3から成る群から選択される請求項1～3の何れか一項に記載の方法。

【請求項10】

PDKが、PDK2及びPDK3から成る群から選択される請求項1～3の何れか一項に記載の方法。

【請求項11】

LDHがLDHaであり、第一PDKがPDK1であり、第二PDKがPDK2であり、第三PDKがPDK3である請求項4に記載の方法。

【請求項12】

培養細胞が異種性ポリペプチドを生産する請求項1～11の何れか一項に記載の方法。

【請求項13】

異種性ポリペプチドが抗体である請求項12に記載の方法。

【請求項14】

培養細胞の平均乳酸生産速度が、約ネガティブ0.02mg/10⁶細胞/日未満である請求項1～13の何れか一項に記載の方法。

【請求項15】

培養細胞が、PDK及びLDHを含んでなる異種性核酸配列を持たない培養細胞より、少なくとも約75%高い比生産性を有する請求項1～14の何れか一項に記載の方法。

【請求項16】

培養細胞が、約300mosm未満のオスモル濃度を有する請求項1～15の何れか一項に記載の方法。

【請求項17】

培養細胞が、PDK及びLDHを含んでなる異種性核酸配列を持たない培養細胞より、少なくとも約68%高いポリペプチド生産性を有する請求項1～16の何れか一項に記載の方法。

【請求項18】

培養細胞が哺乳類細胞である請求項1～17の何れか一項に記載の方法。

【請求項19】

培養細胞における乳酸脱水素酵素(LDH)及びピルビン酸脱水素酵素キナーゼ(PDK)転写をサイレンシング又は下方制御する方法であって、LDHに特異的な低分子干渉RNA(siRNA)をコードする第一異種性核酸配列、及びPDKに特異的なsiRNAをコードする第二異種性核酸配列を含んでなるベクターを細胞に導入する工程を含んでなり、第一異種性核酸配列は第一プロモーターに作動的に連結され、第二異種性核酸配列は第二プロモーターに作動的に連結されており、siRNA

が発現され、それによってLDH及びPDHKの遺伝子転写がサイレンシング又は下方制御される方法。

【請求項20】

培養において低下された乳酸生産を呈する細胞を作成する方法であって、LDHに特異的な低分子干渉RNA(siRNA)をコードする第一異種性核酸配列、及びPDHKに特異的なsiRNAをコードする第二異種性核酸配列を含んでなるベクターを細胞に導入する工程を含んでなり、第一異種性核酸配列は第一プロモーターに作動的に連結され、第二異種性核酸配列は第二プロモーターに作動的に連結されている方法。

【請求項21】

約ネガティブ0.02mg/10⁶細胞/日未満の平均乳酸生産率を有する培養物中における細胞。

【請求項22】

一又は複数のPDHK及びLDHを含んでなる一又は複数の異種性核酸配列を持たない培養細胞より、少なくとも約75%高い比生産性を有する培養物中における細胞。

【請求項23】

約300mOsm未満のオスモル濃度を有する培養物中における細胞。

【請求項24】

乳酸脱水素酵素(LDH)に特異的な第一低分子干渉RNA(siRNA)をコードする第一異種性核酸配列、及びピルビン酸脱水素酵素キナーゼ(PDHK)に特異的な第二siRNAをコードする第二異種性核酸配列を含んでなり、第一異種性核酸配列は第一プロモーターに作動的に連結され、第二異種性核酸配列は第二プロモーターに作動的に連結されている、培養物中における細胞。

【請求項25】

細胞が、第二PDHKに特異的なsiRNAをコードする第三異種性核酸配列を更に含み、第三異種性核酸配列が第三プロモーターに作動的に連結されている請求項24に記載の細胞。

【請求項26】

細胞が、第三PDHKに特異的なsiRNAをコードする第四異種性核酸配列を更に含み、第四異種性核酸配列は第四プロモーターに作動的に連結されている請求項25に記載の細胞。

【請求項27】

細胞が、第五PDHKに特異的なsiRNAをコードする第五異種性核酸配列を更に含み、第五異種性核酸配列は第五プロモーターに作動的に連結されている請求項26に記載の細胞。

【請求項28】

PDHKが、PDHK1、PDHK2、PDHK3、及びPDHK4から成る群から選択される請求項24、25、26、及び27の何れか一項に記載の細胞。

【請求項29】

PDHKが、PDHK1、PDHK2、及びPDHK3から成る群から選択される請求項24、25、及び26の何れか一項に記載の細胞。

【請求項30】

PDHKが、PDHK1及びPDHK2から成る群から選択される請求項24又は25に記載の細胞。

【請求項31】

PDHKが、PDHK1及びPDHK3から成る群から選択される請求項24又は25に記載の細胞。

【請求項32】

PDHKが、PDHK2及びPDHK3から成る群から選択される請求項24又は25に記載の細胞。

【請求項33】

L D H が L D H a であり、第一 P D H K が P D H K 1 であり、第二 P D H K が P D H K 2 であり、第三 P D H K が P D H K 3 である請求項 2 6 に記載の細胞。

【請求項 3 4】

細胞が異種性ポリペプチドを生産する請求項 2 1 ~ 3 3 の何れか一項に記載の細胞。

【請求項 3 5】

異種性ポリペプチドが抗体である請求項 3 4 に記載の細胞。

【請求項 3 6】

細胞が約ネガティブ 0 . 0 2 m g / 1 0 ⁶ 細胞 / 日未満の平均乳酸生産率を有する請求項 2 2 ~ 3 5 の何れか一項に記載の細胞。

【請求項 3 7】

細胞が、L D H 及び P D H K を含んでなる異種性核酸配列を持たない細胞より、少なくとも約 7 5 % 高い比生産性を有する請求項 2 3 ~ 3 6 の何れか一項に記載の細胞。

【請求項 3 8】

細胞が、約 3 0 0 m O s m 未満のオスモル濃度を有する請求項 2 4 ~ 3 7 の何れか一項に記載の細胞。

【請求項 3 9】

細胞が、L D H 及び P D H K を含んでなる異種性核酸配列を持たない細胞より、少なくとも約 6 8 % 高いポリペプチド生産性を有する請求項 2 3 ~ 3 6 及び 3 8 の何れか一項に記載の細胞。

【請求項 4 0】

細胞が哺乳類細胞である請求項 2 1 ~ 3 9 の何れか一項に記載の細胞。

【請求項 4 1】

乳酸脱水素酵素 (L D H) に特異的な低分子干渉 R N A (s i R N A) をコードする第一異種性核酸配列、及び ピルビン酸脱水素酵素キナーゼ (P D H K) に特異的な s i R N A をコードする第二異種性核酸配列を含んでなり、第一異種性核酸配列は第一プロモーターに作動的に連結され、第二異種性核酸配列は第二プロモーターに作動的に連結されているベクター。

【請求項 4 2】

培養細胞における乳酸生産を低減させる方法であって、a) 乳酸脱水素酵素 (L D H) に特異的な低分子干渉 R N A (s i R N A)、及び b) ピルビン酸脱水素酵素キナーゼ (P D H K) に特異的な s i R N A を発現する細胞を培養することを含んでなる方法。

【請求項 4 3】

培養細胞が、第二 P D H K に特異的な s i R N A を更に発現する請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 4】

培養細胞が、第三 P D H K に特異的な s i R N A を更に発現する請求項 4 3 に記載の方法。

【請求項 4 5】

培養細胞が、第四 P D H K に特異的な s i R N A を更に発現する請求項 4 3 又は 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 6】

培養細胞が、L D H 及び P D H K に特異的な s i R N A を持たない培養細胞より、少なくとも約 6 8 % 高いポリペプチド生産性を有する請求項 4 2 ~ 4 5 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 4 7】

培養細胞において異種性ポリペプチドを生産する方法であって、

前記培養細胞における乳酸の生産を減少させる工程を含んでなり、前記細胞は、乳酸脱水素酵素 (L D H) に特異的な低分子干渉 R N A (s i R N A) をコードする第一異種性核酸配列、及び ピルビン酸脱水素酵素キナーゼ (P D H K) に特異的な s i R N A をコードする第二異種性核酸配列を含み、第一異種性核酸配列は第一プロモーターに作動的に連結され、

第二異種性核酸配列は第二プロモーターに作動的に連結されている方法。

【請求項 4 8】

培養細胞において乳酸を生産する方法であつて、

前記培養細胞における、乳酸脱水素酵素(LDH)発現、及びピルビン酸脱水素酵素キナーゼ(PDHK)発現を促進する工程を含む方法。