

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6959942号
(P6959942)

(45) 発行日 令和3年11月5日(2021.11.5)

(24) 登録日 令和3年10月12日(2021.10.12)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02 Z N A C
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10
C 1 2 N 15/53 (2006.01)	C 1 2 N 15/53
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12

請求項の数 18 (全 75 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-557851 (P2018-557851)	(73) 特許権者	391003864 ロンザ リミテッド LONZA LIMITED スイス国、3930 フィスプ、ロンザシ ェトラーセ (番地なし)
(86) (22) 出願日	平成29年5月3日(2017.5.3)	(74) 代理人	110000855 特許業務法人浅村特許事務所
(65) 公表番号	特表2019-514399 (P2019-514399A)	(72) 発明者	バッジ、ジェームズ イギリス国、ケント、カンタベリー、ザ ユニヴァーシティ オブ ケント、ザ レ ジストリ
(43) 公表日	令和1年6月6日(2019.6.6)	(72) 発明者	スメールズ、クリストファー マーク イギリス国、ケント、カンタベリー、エゼ ルベルト ロード 37
(86) 国際出願番号	PCT/EP2017/060484		
(87) 国際公開番号	W02017/191165		
(87) 国際公開日	平成29年11月9日(2017.11.9)		
審査請求日	令和2年5月1日(2020.5.1)		
(31) 優先権主張番号	62/330,973		
(32) 優先日	平成28年5月3日(2016.5.3)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 タンパク質生成のための脂質代謝のモジュレーション

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞内で組換えポリペプチドを生産する方法であって、

- i) ステアロイル - C o A デサチュラーゼ - 1 (S C D 1) またはその機能的断片若しくはアイソフォームを含む第 1 の脂質代謝モジュレータ (L M M) をコードする第 1 の外因性核酸と、前記組換えポリペプチドをコードする外因性核酸とを含む真核細胞を準備し、
- ii) 前記第 1 の L M M 及び前記組換えポリペプチドを発現する条件下で前記細胞を培養し、

それにより組換えポリペプチドを生産する方法であり、

前記ポリペプチドは、

- i) 治療用ポリペプチド、
- ii) 抗体若しくはその断片、モノクローナル抗体、または二重特異的分子、および/または
- iii) ホルモン、血液凝固もしくは凝固因子、サイトカイン若しくは成長因子、融合タンパク質およびタンパク質ワクチンから選択される、方法。

【請求項 2】

前記第 1 の L M M が、前記第 1 の L M M を有していない細胞と比較して、前記組換えポリペプチドの生成量又は生成速度を増加する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記第 1 の L M M が、前記第 1 の L M M を有さない細胞と比較して、誤って折り畳まれ

たか、折り畳まれてない組換えポリペプチドに対する適切に折り畳まれた生成物の比を増加する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記第 1 の L M M のアミノ酸配列は、配列番号 3 のアミノ酸配列と少なくとも 90% の同一性を有するか；あるいは、配列番号 3 のアミノ酸配列と 1 つ以上 30 以下のアミノ酸残基が異なる、請求項 1 ~ 3 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

前記細胞は、ステロール調節エレメント結合因子 1 (S R E B F 1) またはその機能的断片若しくはアイソフォームを含む第 2 の L M M をコードする第 2 の外因性核酸を含み、工程 i i) で前記細胞を、前記第 2 の L M M が発現する条件下で培養する、請求項 1 ~ 4 の何れか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 6】

前記第 2 の L M M のアミノ酸配列は、配列番号 1、34、26、27、または36 のアミノ酸配列と少なくとも 90% の同一性を有するか；配列番号 1、34、26、27、または36 のアミノ酸配列と 1 以上 30 以下のアミノ酸残基が異なる、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記第 2 の L M M が、前記第 2 の L M M を有さない細胞と比較して、前記組換えポリペプチドの生成量又は生成速度を増加する、請求項 5 または 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記組換えポリペプチドの生成が、前記第 1 の L M M を有さない細胞によって生産された組換えポリペプチドのレベルまたは量と比較して、2 倍、5 倍、10 倍、20 倍、50 倍、または 100 倍増加する、請求項 1 ~ 7 の何れか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 9】

前記第 1 の L M M をコードする核酸が、前記細胞の染色体ゲノムに組み込まれ、L M M が安定して発現される、請求項 1 ~ 8 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

前記細胞が哺乳動物細胞である、請求項 1 ~ 9 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

前記組換えポリペプチドを少なくとも 1 つの細胞成分または培地成分から分離することをさらに含む、請求項 1 ~ 10 の何れか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 12】

前記組換えポリペプチドをコードする外因性核酸は、前記第 1 の L M M をコードする前記第 1 の外因性核酸を導入した後に導入される、請求項 1 ~ 11 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

第 1 の脂質代謝モジュレーター (L M M) をコードする第 1 の外因性核酸であって、前記第 1 の L M M は、ステアロイル C o A デサチュラーゼ - 1 (S C D 1) またはその機能的断片若しくはアイソフォームを含む、外因性核酸と、

組換えポリペプチドをコードする外因性核酸とを含む真核細胞であって、

40

前記第 1 の外因性核酸は、前記細胞の染色体のゲノムに組み込まれており、前記組換えポリペプチドは、

i) 治療用ポリペプチド、

ii) 抗体若しくはその断片、モノクローナル抗体、または二重特異的分子、および/または

iii) ホルモン、血液凝固若しくは凝固因子、サイトカイン若しくは増殖因子、抗体分子、融合タンパク質およびタンパク質ワクチンから選択される、真核細胞。

【請求項 14】

前記細胞は、哺乳動物細胞である、請求項 13 に記載の細胞。

【請求項 15】

50

CHO細胞である、請求項14に記載の細胞。

【請求項16】

前記第1のLMMが、前記第1のLMMを有さない細胞と比較して、前記組換えポリペプチドの生成量又は生成速度を増加する、請求項13から15の何れか1項に記載の細胞。

【請求項17】

前記第1のLMMが、前記第1のLMMを有さない細胞と比較して、誤って折り畳まれたか、折り畳まれてない組換えポリペプチドに対する適切に折り畳まれた生成物の比を増加する、請求項13から15のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項18】

目的の治療用の組換えポリペプチドの製造における、請求項13から17の何れか1項に記載の細胞の使用。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2016年5月3日に出願の米国特許出願第62/330973号に基づく優先権を主張するものであり、その全内容は参照により本明細書に完全に組み込まれる。

【0002】

本開示は、生成物、例えば組換えタンパク質の生成のために、細胞の脂質代謝経路をモジュレートし、細胞及び細胞系を工学操作するための方法及び組成物に関する。

20

【背景技術】

【0003】

組換え治療的タンパク質は、細胞発現系、例えば哺乳動物の細胞発現系で一般的に発現される。2014年に、市場に承認されたバイオ医薬品の総数は212であって、FDAによって市販のために承認された治療的製品の56%は哺乳動物細胞系で生産される。しかし、生産に伴う高い費用は、包括的な保健医療費の増加の原因となる。

【0004】

さらに、次世代融合タンパク質、多量体の糖タンパク質又は次世代抗体などの次世代タンパク質生物製剤(NGB)は、しばしば複雑な及び/又は非天然の構造を有し、モノクローナル抗体などの分子より発現させるのがより困難であることが証明されつつある。現在の宿主細胞系はNGBの効率的な合成及び分泌のための経路を進化させておらず、増殖の著しい低減、低い生産性をもたらす、不良な生成物品質属性の生成物をしばしばもたらす。したがって、これらのNGBは発現させるのが困難と考えられており、生産性及び生成物の品質は臨床上の及び市場の要求を満たさない。

30

【0005】

したがって、最終生成物の品質を維持しつつ、組換えバイオ治療薬を速やかに、効率的に、経済的に、開発及び生産する必要性が高まっている。

【発明の概要】

40

【課題を解決するための手段】

【0006】

本開示は、1つ又は複数の脂質代謝経路の構成成分の過剰発現による脂質代謝経路のモジュレーションが、組換えポリペプチド生成物を生成する細胞の生産性及び生成物品質を増加させるという発見に一部基づく。本明細書で、例えば1つ又は複数の脂質代謝経路をモジュレートすることによる脂質代謝のモジュレーションが、生成物のより高い収量及び向上した品質の生成物を生成する細胞及び無細胞系を工学操作するために使用することができることが実証される。重要なことに、本開示は、脂質代謝に関連した2つ以上のプロセス又は経路をモジュレートする包括的調節因子を使用することによる、脂質代謝の包括的な調節を特徴とし、それによって、向上した生成物生成及び品質を達成する下流の複数

50

の効果をもたらす。本明細書に記載される方法及び組成物は、特に組換え生成物又は次世代生物製剤（例えば、融合タンパク質、二重特異的又はマルチフォーマット抗体分子、多量体タンパク質及びグリコシル化タンパク質）の向上した生産のために、及び、そのような生成物の生成のためのより効率的な系（例えば、細胞系又は無細胞系）の開発のために有益である。

【 0 0 0 7 】

一態様では、本開示は、細胞において本明細書に記載される生成物を生成する方法を特徴とする。一実施形態では、生成物はポリペプチド、例えば組換えポリペプチドである。一実施形態では、本方法は、脂質代謝をモジュレートする改変を含む細胞を提供するステップ、及び細胞を、例えば改変による脂質代謝のモジュレーションに適する条件の下で、培養するステップを含み、それによって生成物を生成する。

10

【 0 0 0 8 】

別の態様では、本開示は、無細胞系において生成物、例えばポリペプチド、例えば組換えポリペプチドを生成する方法であって、脂質代謝をモジュレートする改変を含む無細胞系、例えば脂質代謝をモジュレートする改変を含む細胞又は細胞系に由来する無細胞系を準備するステップ、及び生成物の生成に適する条件の下に無細胞系を置くステップを含み、それによって、生成物、例えばポリペプチド、例えば組換えポリペプチドを生成することを特徴とする。一実施形態では、無細胞系は、脂質代謝をモジュレートする改変を含む細胞又は細胞系に由来する。一実施形態では、無細胞系は、脂質代謝をモジュレートする改変を含む細胞又は細胞系からの1つ又は複数の構成成分、例えばオルガネラ又はオルガネラの部分を含む。一部の実施形態では、改変は、脂質代謝モジュレータ（LMM）をコードする外因性核酸を含み、細胞又は細胞系は、LMM、例えば、SREBF1、SREBF2、SCD1、SCD2、SCD3、SCD4、SCD5又はそれらの機能的断片からなる群から選択されるLMMを発現する。一部の実施形態では、LMMは、以下からなる群から選択される無細胞系の1つ又は複数の特性を変更する：生成される生成物、例えばポリペプチド、例えば組換えポリペプチド（NGB）の生成、例えば、生成の収率及び速度を増加させる；並びに、品質を増加させる、例えば、凝集を減少させる、グリコシル化の不均一性を減少させる、断片化を減少させる、及び生成物の適切に折り畳まれた対誤って折り畳まれたか、又は折り畳まれていない生成物の比を増加させる。

20

【 0 0 0 9 】

本明細書に記載される方法又は組成物のいずれかを使用して生成することができる生成物の例には、組換え生成物、又は少なくとも一部若しくは一部分が遺伝子操作の結果である生成物が含まれる。本明細書に記載される組換え生成物は、診断又は治療目的のために役立つことができる。一実施形態では、生成物は、ポリペプチド、例えば抗体分子（例えば、二重特異的若しくはマルチフォーマット抗体分子）、融合タンパク質又はタンパク複合体；核酸分子（例えば、DNA又はRNA分子）；或いは脂質封入粒子（例えば、エクソソーム又はウイルス様粒子）を含む。本明細書に記載される方法及び組成物は、例えば多量に又は市販用若しくは治療用のために十分な品質で、生産するのが困難である生成物、例えば次世代生物製剤（例えば、融合タンパク質、二重特異的又はマルチフォーマット抗体分子、多量体タンパク質及びグリコシル化タンパク質）のために特に有益である可能性がある。一実施形態では、例えば生成物を生成するための本明細書に記載される細胞は、生成物を発現する。一実施形態では、細胞は、本明細書に記載される生成物、例えば表2又は3から選択されるポリペプチドをコードする外因性核酸を含む。生成物のさらなる例は、「生成物」というタイトルのセクションに記載される。

30

40

【 0 0 1 0 】

脂質代謝をモジュレートする本明細書に開示される改変は、脂質代謝モジュレータ（LMM）の発現を増加若しくは減少させるか、又は脂質代謝経路の構成成分の発現若しくは活性を増加若しくは減少させる薬剤若しくは分子を含む。一実施形態では、改変は、核酸、例えばLMMをコードする核酸、又はLMMの発現を阻害するか若しくは減少させる阻害性核酸である。

50

【 0 0 1 1 】

一実施形態では、改変は、LMMの発現を増加させ、LMMをコードする外因性核酸を含む。一実施形態では、本方法は、LMM又は外因性LMMをコードする外因性核酸を細胞の中で形成するステップを含む。一実施形態では、形成するステップは、脂質代謝モジュレータをコードする外因性核酸を導入することを含む。一実施形態では、形成するステップは、LMMをコードする内因性核酸の発現を増加させる外因性核酸を導入することを含む。本明細書に記載される方法及び組成物のいずれかで使用するのに適するLMMの例は、「脂質代謝のモジュレーション」及び「脂質代謝モジュレータ」というタイトルのセクションでさらに記載する。

【 0 0 1 2 】

一実施形態では、細胞は1つ又は複数の改変を含む。一実施形態では、細胞は、1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10個の改変を含む。一部の実施形態では、細胞は、2つ以上の改変を含む。一部の実施形態では、細胞は、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9又は10個の改変を含む。一実施形態では、細胞は、脂質代謝をモジュレートする1つ又は複数の第2の改変を含む。一実施形態では、第2の改変は、第2のLMM、例えば第1の改変のLMMと異なるLMMをコードする第2の外因性核酸を含む。一実施形態では、第2の外因性核酸及び第1の外因性核酸は、同じ核酸分子の上に配置される。一実施形態では、第2の外因性核酸及び第1の外因性核酸は、異なる核酸分子の上に配置される。一実施形態では、第2の改変は、第2の改変を有していない細胞と比較して、生成物の生成の増加又は品質の向上を提供する。一実施形態では、本方法は、第2のLMM又は第2の外因性LMMをコードする第2の外因性核酸を細胞の中で形成するステップを含む。一実施形態では、形成するステップは、第2のLMMをコードする第2の外因性核酸を導入することを含む。一実施形態では、形成するステップは、LMMをコードする内因性核酸の発現を増加させる第2の外因性核酸を導入することを含む。

【 0 0 1 3 】

本明細書に記載される方法又は組成物のいずれかによって脂質代謝をモジュレートすることは、以下のいずれか1つ又は複数を変更すること、例えば増加若しくは減少させることを含むか又はもたらすことができる：

- i) 脂質代謝経路に関与する構成成分の発現（例えば、転写及び/又は翻訳）；
- ii) 脂質代謝経路に関与する構成成分の活性（例えば、酵素活性）；
- iii) 細胞に存在する脂質（例えば、リン脂質又はコレステロール）の量；
- iv) 脂質ラフトの量又は脂質ラフト形成の速度；
- v) 細胞膜（例えば、原形質膜、小胞膜又はオルガネラ膜）の流動性、透過性及び/又は厚さ；
- vi) 不飽和脂質への飽和脂質の変換又は飽和脂質への不飽和脂質の変換；
- vii) 飽和脂質又は不飽和脂質、例えば一価不飽和脂質の量；
- viii) ER活性を増加させる良好な組成を達成するための、細胞の中の脂質の組成；
- ix) ERの拡張（例えば、ERのサイズ、ER膜表面、又はERを構成する及び/若しくはその中に存在するタンパク質及び脂質の量）；
- x) ゴルジの拡張（例えば、ゴルジの数及びサイズ、ゴルジ表面、又はゴルジの中に存在するタンパク質及び分子の数若しくは量）；
- xi) 分泌小胞の量又は分泌小胞の形成；
- xii) 生成物の分泌の量又は速度；
- xiii) 増殖能力、例えば増殖速度；
- xiv) 培養生存度又は細胞生存；
- xv) 膜受容体の活性化；
- xvi) 折り畳まれてないタンパク質の応答（UPR）；
- xvii) 生成物の収率又は生成速度；
- xviii) 生成物の品質（例えば、凝集、グリコシル化不均一性、断片化、適切な折

10

20

30

40

50

畳み又はアセンブリ、翻訳後修飾又はジスルフィド結合スクランブル)；並びに/或いは $\times i \times$) 細胞成長/増殖又は細胞比増殖速度。

そのような実施形態では、細胞の前述の特性のいずれかの増加又は減少は、改変を有していない細胞との比較によって判定することができる。

【0014】

本明細書に記載される方法及び組成物は、改変を有していない細胞と比較して、生成物の生成の増加をもたらす。生成の増加は、細胞によって生成される生成物の増加する量、収率若しくは量及び/又は生成速度の増加によって特徴付けることができ、ここで、生成速度は生成物の経時的な量と同等である。一実施形態では、生成物、例えば組換えポリペプチドの生成は、例えば脂質代謝のモジュレーションのない細胞による生成と比較して、10%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、85%若しくは100%又はそれより多く；或いは、例えば脂質代謝のモジュレーションのない細胞による生成と比較して、1倍、2倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍増加する。

【0015】

本明細書に記載される方法及び組成物は、改変を有していない細胞と比較して、生成物の品質(すなわち生成物品質)の向上をもたらすこともできる。生成物の品質(すなわち生成物品質)の向上は、以下の1つ又は複数によって特徴付けることができる：凝集(例えば、凝集体又は凝集の減少)；適切な折畳み又はアセンブリ(例えば、誤って折り畳まれた若しくは折り畳まれてない生成物；又は、部分的に組み立てられた若しくはばらばらの生成物の減少)；翻訳後修飾(例えば、グリコシル化不均一性の増加及び減少、所望の又は所定の翻訳後修飾のより高い百分率)；断片化(例えば、断片化の減少)；ジスルフィド結合スクランブル(例えば、ジスルフィド結合スクランブルによる望ましくないアイソフォーム又は構造の減少)。一実施形態では、生成物、例えば組換えポリペプチドの品質は、例えば脂質代謝のモジュレーションのない細胞による生成と比較して、例えば1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、85%若しくは100%；又は、例えば脂質代謝のモジュレーションのない細胞によって生成される生成物の品質と比較して、1倍、2倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍増加する。

【0016】

実施形態では、本明細書に記載される生成物を生成する方法は、1つ又は複数のさらなるステップを含むことができ、それには、限定されるものではないが：ERプロセッシング能力(ER拡張)又は分泌を増加させる改変を細胞に導入するステップ；細胞、又は細胞の子孫、又は細胞若しくは細胞の子孫で馴化させた培地から、生成物を得るステップ；生成物を少なくとも1つの細胞又は培地の構成成分から分離するステップ；及び/或いは例えば構造部分の活性について又はその存在について、生成物を分析するステップが含まれる。一実施形態では、本方法は、PDI、BiP、ERO又はXBP1をコードする核酸を導入することによってERプロセッシング能力(又は、ER拡張)を増大させるステップをさらに含む。一実施形態では、本方法は、例えばSNARE構成成分をコードする核酸を導入することによって、分泌経路に関与するSNARE機構又は他の機構をモジュレートすることによって、分泌能力又は分泌速度を増大させるさらなるステップをさらに含む。

【0017】

脂質代謝のモジュレーション

本開示は、脂質代謝をモジュレートする方法及び組成物を特徴とする。一実施形態では、改変は、1つ又は複数の脂質代謝経路をモジュレートする、例えば増加させることをもたらし、それには、限定されるものではないが以下のものが含まれる：新たな脂質生成、脂肪酸の再エステル化、脂肪酸の飽和又は不飽和化、脂肪酸伸長、及びリン脂質合成。

【0018】

脂質代謝をモジュレートするのに適する、本明細書に記載される改変は、脂質代謝経路

若しくはLMMの構成成分の発現若しくは活性を増加若しくは減少させる外因性核酸、LMMポリペプチド、又は脂質代謝経路の構成成分の発現若しくは活性を増加若しくは減少させる他の分子の導入を含む。本開示は、例えば、脂質代謝に関連した構成成分の発現又は活性を増加又は減少させることによって脂質代謝をモジュレートする、脂質代謝モジュレータの使用を特徴とする。一実施形態では、LMMは、本明細書に記載される包括的な調節因子である。

【0019】

一実施形態では、脂質代謝をモジュレートする変化は、例えば包括的な調節因子の発現又は活性を増加又は減少させることによって、脂質代謝の包括的な調節をもたらす。そのような包括的な調節因子は、それが、複数の下流の作用に影響すること、例えば異なる脂質代謝過程又は経路の1つを超える、例えば2、3、4、5、又はそれより多くの構成成分の発現又は活性を増加させることができるように、1つ又は複数の経路において十分に上流にある分子である。脂質代謝過程又は経路の構成成分には、限定されるものではないが、酵素、補因子、又は脂質分子の合成、分解、伸長若しくは構造的立体配座に関する他の分子を含めることができる。

10

【0020】

一実施形態では、本明細書に記載される包括的な調節因子は、脂質代謝の構成成分、例えば表1から選択される脂質代謝遺伝子生成物の発現を上方制御する、例えば増加させる転写因子である。例として、包括的な調節因子は、2つ以上の脂質関連遺伝子生成物、例えば、脂質生合成に関与する酵素及び脂質分子の飽和レベルに関与する酵素の発現を増加させる。

20

【0021】

本明細書に記載される方法又は組成物のいずれでも、LMMは以下のいずれかを含む：脂質代謝の包括的な調節因子、例えば、脂質代謝遺伝子を上方制御する転写因子、又は新たな脂質生成、脂肪酸再エステル化、脂肪酸の飽和若しくは不飽和化、脂肪酸伸長、又はリン脂質生合成経路で役割を果たす構成成分（例えば、酵素、補因子又は分子）。

【0022】

一実施形態では、脂質代謝モジュレータは、脂質代謝遺伝子生成物の発現を媒介する、例えば上方制御する、転写調節因子、例えば転写因子を含む。脂質代謝遺伝子生成物の例には、限定されるものではないが、表1に提供されるもの、脂質代謝の包括的な調節因子、例えば脂質代謝遺伝子を上方制御する転写因子が含まれる。

30

【0023】

一実施形態では、LMMは、SREBF1若しくはSREBF2、又はそれらの機能的断片若しくは類似体を含む。一実施形態では、脂質代謝モジュレータは、SREBF1のアミノ酸配列、例えば配列番号1若しくは34、又はそれらの機能的断片、例えば、配列番号26、配列番号27若しくは配列番号36と、少なくとも60、70、80、90、95、98、99又は100%の同一性；或いは、SREBF1のアミノ酸配列、例えば配列番号1若しくは34、又はそれらの機能的断片、例えば、配列番号26、配列番号27若しくは配列番号36から、1、2若しくは3以上のアミノ酸残基で且つ50、40、30、20、15若しくは10以下のアミノ酸残基の差異を含む。一実施形態では、脂質代謝モジュレータをコードする核酸は、配列番号2若しくは32から選択される核酸配列、又は配列番号26、配列番号27若しくは配列番号36をコードする核酸のいずれかと、少なくとも60、70、80、90、95、98、99又は100%の同一性を含む。

40

【0024】

一実施形態では、LMMは、SCD1、SCD2、SCD3、SCD4若しくはSCD5、又はそれらの機能的断片若しくは類似体を含む。一実施形態では、脂質代謝モジュレータは、SCD1のアミノ酸配列、例えば配列番号3、若しくはそれらの機能的断片と、少なくとも60、70、80、90、95、98、99若しくは100%の同一性；又は、SCD1のアミノ酸配列、例えば配列番号3若しくはそれらの機能的断片から1、2、若しくは3個以上のアミノ酸残基で且つ50、40、30、20、15若しくは10個以

50

下のアミノ酸残基の差異を含む。一実施形態では、脂質代謝モジュレータをコードする核酸は、配列番号4から選択される核酸配列のいずれかと、少なくとも60、70、80、90、95、98、99又は100%の同一性を含む。

【0025】

一実施形態では、LMMは、表1で提供される構成成分又はその機能的断片のいずれかを含む。一実施形態では、LMMは、表1で提供される構成成分若しくはその機能的断片のいずれかのアミノ酸配列と、少なくとも60、70、80、90、95、98、99若しくは100%の同一性を含み、又は、表1で提供される構成成分若しくはその機能的断片のいずれかのアミノ酸配列から1、2、若しくは3個以上のアミノ酸残基で且つ50、40、30、20、15若しくは10個以下のアミノ酸残基の差異を含む。一実施形態では、脂質代謝モジュレータをコードする核酸は、表1で提供される構成成分又はその機能的断片のいずれかをコードする核酸配列と、少なくとも60、70、80、90、95、98、99又は100%の同一性を含む。

10

【0026】

一実施形態では、改変は、脂質代謝遺伝子生成物、例えば表1から選択される脂質代謝遺伝子生成物をコードする核酸の発現を増加させる*cis*又は*trans*調節エレメントを含む。

【0027】

一実施形態では、脂質代謝モジュレータをコードする核酸は、プラスミド又はベクターを含む。

20

【0028】

一実施形態では、脂質代謝モジュレータをコードする核酸は、トランスフェクション(例えば、エレクトロポレーション)、形質導入又は本明細書に記載される任意の他の送達方法によって細胞に導入される。

【0029】

一実施形態では、脂質代謝モジュレータをコードする核酸は、細胞の染色体ゲノムに組み入れられる。一実施形態では、LMMは、安定して発現される。

【0030】

一実施形態では、脂質代謝モジュレータをコードする核酸は、細胞の染色体ゲノムに組み入れられない。一実施形態では、LMMは一時的に発現される。

30

【0031】

生成物

本明細書に記載される生成物には、ポリペプチド、例えば組換えタンパク質；核酸分子、例えばDNA又はRNA分子；多量体のタンパク質又は複合体；脂質封入粒子、例えばウイルス様粒子、小胞又はエクソソーム；又は他の分子、例えば脂質が含まれる。一実施形態では、生成物は、ポリペプチド、例えば組換えポリペプチドである。例えば、組換えポリペプチドは、発現困難なタンパク質、又は、複合及び/若しくは非天然の構造を有するタンパク質、例えば次世代生物製剤、例えば、二重特異的抗体分子、融合タンパク質若しくはグリコシル化タンパク質であってよい。

【0032】

本明細書に記載される方法のいずれでも、生成物を生成する方法は、生成物、例えばポリペプチド、例えば組換えポリペプチドをコードする外因性核酸を細胞に導入するステップをさらに含む。

40

【0033】

一実施形態では、組換えポリペプチドをコードする外因性核酸は、脂質代謝をモジュレートする改変を含む細胞を提供した後に導入される。別の実施形態では、組換えポリペプチドをコードする外因性核酸は、例えば改変による脂質代謝のモジュレーションに適する条件の下で、細胞を培養した後に導入される。

【0034】

一実施形態では、生成物、例えば組換えポリペプチドをコードする外因性核酸は、脂質

50

代謝をモジュレートする改変を含む細胞を提供する前に導入される。別の実施形態では、組換えポリペプチドをコードする外因性核酸は、例えば改変による脂質代謝のモジュレーションに適する条件の下で、細胞を培養する前に導入される。

【0035】

本明細書に記載される組成物、調製物又は方法のいずれでも、生成物、例えば組換えポリペプチドは、治療的ポリペプチド又は抗体分子、例えば抗体若しくはその抗体断片である。一実施形態では、抗体分子は、モノクローナル抗体である。一実施形態では、抗体分子は、二重特異的抗体分子、例えば、BiTE（二重特異的T細胞誘導抗体）、DART（二重親和性再標的化又は転送T細胞）である。

【0036】

一実施形態では、生成物、例えば組換えポリペプチドは、表2又は3から選択される。

【0037】

実施形態では、生成物は、細胞によって安定して発現される。一実施形態では、生成物、例えば組換えポリペプチドをコードする外因性核酸は、細胞の染色体ゲノムに組み入れられる。代わりに、生成物は、細胞によって一時的に発現される。一実施形態では、生成物、例えば組換えポリペプチドをコードする外因性核酸は、細胞の染色体ゲノムに組み入れられない。

【0038】

宿主細胞

本明細書に記載される生成物を生成するための細胞、及びそのような細胞を工学操作する方法が本明細書で提供される。

【0039】

本明細書に記載される組成物、調製物又は方法のいずれでも、細胞は真核細胞である。一実施形態では、細胞は、哺乳動物細胞、酵母細胞、昆虫細胞、藻類細胞又は植物細胞である。一実施形態では、細胞は、げっ歯動物の細胞である。一実施形態では、細胞は、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞である。CHO細胞の例には、限定されるものではないが、CHO-K1、CHOK1SV、Potelligent CHOK1SV（FUT8-KO）、CHO GS-KO、Exceed（CHOK1SV GS-KO）、CHO-S、CHO DG44、CHO DXB11、CHOZN又はCHO由来細胞が含まれる。

【0040】

本明細書に記載される組成物、調製物又は方法のいずれでも、細胞は、HeLa、HEK293、H9、HepG2、MCF7、Jurkat、NIH3T3、PC12、PER.C6、BHK、VERO、SP2/0、NS0、YB2/0、EB66、C127、L細胞、COS、例えばCOS1及びCOS7、QC1-3、CHO-K1、CHOK1SV、Potelligent CHOK1SV（FUT8-KO）、CHO GS-KO、Exceed（CHOK1SV GS-KO）、CHO-S、CHO DG44、CHO DXB11及びCHOZNからなる群から選択される。

【0041】

一実施形態では、細胞は、哺乳動物細胞以外の真核細胞、例えば、昆虫、植物、酵母又は藻類の細胞である。一実施形態では、細胞は、原核細胞である。

【0042】

一態様では、本開示は、増加した生産能力及び/又は向上した生産品質（例えば、1つ又は複数の向上した生成物品質を有する生成物を生成する）を有する細胞を工学操作する方法であって、脂質代謝モジュレータをコードする外因性核酸を細胞に導入するか又は細胞中に形成するステップを含み、それによって、増加した生産能力及び/又は向上した生産品質を有する細胞を工学操作する、方法の特徴とする。一実施形態では、脂質代謝モジュレータをコードする外因性核酸は、トランスフェクション、形質導入、例えばウイルス性形質導入、エレクトロポレーション、ヌクレオフェクション又はリポフェクションによって細胞に導入される。一実施形態では、脂質代謝モジュレータをコードする外因性核酸

10

20

30

40

50

は、細胞の染色体ゲノムに組み入れられる。一実施形態では、本方法は、組換えポリペプチドをコードする外因性核酸を細胞に導入するステップをさらに含む。一実施形態では、組換えポリペプチドをコードする外因性核酸は、LMMをコードする外因性核酸を導入する前に導入される。一実施形態では、組換えポリペプチドをコードする外因性核酸は、LMMをコードする外因性核酸を導入した後に導入される。

【0043】

一態様では、本開示は、細胞を提供し、本明細書に記載されるLMMを細胞に導入すること、例えばLMMをコードする外因性核酸を導入することによって生成される細胞を特徴とする。

【0044】

一態様では、本開示は、本明細書に記載されるLMMをコードする外因性核酸を含む細胞を特徴とする。

【0045】

一態様では、本開示は、LMMを生成するように工学操作された細胞を特徴とし、ここで、LMMは、生成物、例えば本明細書に記載される次世代生物製剤(NGB)の発現をモジュレートする。一実施形態では、細胞は、CHO細胞である。

【0046】

一態様では、本開示は、LMMを生成するように工学操作されたCHO細胞を特徴とし、ここで、LMMは、生成物、例えば本明細書に記載される次世代生物製剤(NGB)の発現をモジュレートする。

【0047】

一態様では、本開示は、LMM及びNGBを発現するように工学操作されたCHO細胞を特徴とし、ここで、集団は、NGBの高レベル発現のために選択されている。

【0048】

一態様では、本開示は、LMMを発現するように工学操作されたCHO細胞を特徴とし、ここで、LMMはCHO細胞の1つ又は複数の特性をモジュレートし、工学操作されたCHO細胞は、以下からなる群から選択される1つ又は複数の特性のモジュレーションに基づいて選択される、

- i) 脂質代謝経路に關与する構成成分の発現(例えば、転写及び/又は翻訳);
- ii) 脂質代謝経路に關与する構成成分の活性(例えば、酵素活性);
- iii) 細胞に存在する脂質(例えば、リン脂質又はコレステロール)の量;
- iv) 脂質ラフトの量又は脂質ラフト形成の速度;
- v) 細胞膜(例えば、原形質膜、小胞膜又はオルガネラ膜)の流動性、透過性及び/又は厚さ;
- vi) 不飽和脂質への飽和脂質の変換又は飽和脂質への不飽和脂質の変換;
- vii) 飽和脂質又は不飽和脂質、例えば一価不飽和脂質の量;
- viii) ER活性を増加させる良好な組成を達成するための、細胞の中の脂質の組成;
- ix) ERの拡張(例えば、ERのサイズ、ER膜表面、又はERを構成する及び/若しくはその中に存在するタンパク質及び脂質の量);
- x) ゴルジの拡張(例えば、ゴルジの数及びサイズ、ゴルジ表面又はゴルジの中に存在するタンパク質及び分子の数若しくは量);
- xi) 分泌小胞の量又は分泌小胞の形成;
- xii) 生成物の分泌の量又は速度;
- xiii) 増殖能力、例えば増殖速度;
- xiv) 培養生存度又は細胞生存;
- xv) 膜受容体の活性化;
- xvi) 折り畳まれてないタンパク質の応答(UPR);
- xvii) 生成物の生成の収率又は速度;
- xviii) 生成物の品質(例えば、凝集、グリコシル化不均一性、断片化、適切な折

10

20

30

40

50

畳み又はアセンブリ、翻訳後修飾又はジスルフィド結合スクランブル) ; 並びに / 或いは $\times i \times$) 細胞成長 / 増殖又は細胞比増殖速度。

【0049】

本明細書に記載される方法又は細胞、例えば工学操作された細胞のいずれにおいても、細胞は、SREBF1、SREBF2、SCD1、SCD2、SCD3、SCD4及びSCD5からなる群から選択されるLMM、又はそれらの機能的断片を発現するか又は含む。

【0050】

本明細書に記載される方法又は細胞、例えば工学操作された細胞のいずれにおいても、細胞は、生成物、例えば組換え生成物、例えば二重特異的抗体、融合タンパク質又はグリコシル化タンパク質からなる群から選択される次世代生物製剤を発現するか又は含む。

10

【0051】

本明細書に記載される方法又は細胞、例えば工学操作された細胞のいずれにおいても、細胞は、CHO-K1、CHOK1SV、Potelligent CHOK1SV (FUT8-KO)、CHO GS-KO、Exceed (CHOK1SV GS-KO)、CHO-S、CHO DG44、CHO DXB11、CHOZN、又はCHO由来細胞からなる群から選択されるCHO細胞である。

【0052】

組成物及び調製物

一態様では、本開示は、本明細書に記載される方法によって作製される、本明細書に記載される生成物の調製物も特徴とする。一実施形態では、重量又は数に基づき、調製物中の生成物の少なくとも70%、80%、90%、95%、98%又は99%は、適切に折り畳まれるか又は組み立てられる。一実施形態では、重量又は数に基づき、調製物中の生成物の50%未満、40%、30%、25%、20%、15%、10%又は5%は、凝集している。一実施形態では、重量又は数に基づき、調製物中の生成物の50%未満、40%、30%、25%、20%、15%、10%又は5%は、生成物の断片である。

20

【0053】

一部の実施形態では、本開示は、本明細書に記載される方法によって作製されるポリペプチド、例えば、表2又は表3のポリペプチドの調製物を特徴とする。一部の実施形態では、本方法で使用される細胞は、CHOK1、CHOK1SV、Potelligent CHOK1SV、CHO GSノックアウト、CHOK1SV GS-KO、CHOS、CHO DG44、CHO DXB11、CHOZN、又はCHO由来細胞からなる群から選択されるCHO細胞である。

30

【0054】

一態様では、本開示は、本明細書に記載される細胞、例えば脂質代謝をモジュレートする改変を含む細胞、及び細胞によって生成される生成物を含む混合物を特徴とする。一実施形態では、混合物は、生成物の重量又は数に基づき、改変なしで見られるであろうものより高い濃度、例えば少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%又は30%高い濃度で、生成物を含む。一実施形態では、重量又は数に基づき、混合物中の生成物の少なくとも70%、80%、90%、95%、98%又は99%は、適切に折り畳まれるか又は組み立てられる。一実施形態では、重量又は数に基づき、混合物中の生成物の50%未満、40%、30%、25%、20%、15%、10%又は5%は、凝集している。一実施形態では、重量又は数に基づき、混合物中の生成物の50%未満、40%、30%、25%、20%、15%、10%又は5%は、生成物の断片である。一部の実施形態では、生成物は、組換えポリペプチド、例えば表2又は表3の組換えポリペプチドである。

40

【0055】

一態様では、本開示は、本明細書に記載される細胞の培養によって馴化させた培地の調製物を特徴とし、ここで、細胞は、脂質代謝をモジュレートする改変を含む。一実施形態では、生成物は、重量又は数に基づき、改変なしで見られるであろうものより高い濃度、

50

例えば少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%又は30%高い濃度で、調製物中に存在する。一実施形態では、重量又は数に基づき、調製物中の生成物の少なくとも70%、80%、90%、95%、98%又は99%は、適切に折り畳まれるか又は組み立てられる。一実施形態では、重量又は数に基づき、調製物中の生成物の50%未満、40%、30%、25%、20%、15%、10%又は5%は、凝集している。一実施形態では、重量又は数に基づき、調製物中の生成物の50%未満、40%、30%、25%、20%、15%、10%又は5%は、生成物の断片である。一部の実施形態では、生成物は、組換えポリペプチド、例えば表2又は表3の組換えポリペプチドである。

【0056】

特に定義されない限り、本明細書で使用される全ての専門用語及び科学用語は、この発明が属する分野の当業技術者が通常理解するのと同じ意味を有する。本明細書に記載されるものと類似する又は均等である方法及び材料を本発明の実施又は試験で使用方法が、適する方法及び材料を以下に記載する。本明細書で指摘される全ての刊行物、特許出願、特許及び他の参考文献は、その全体が参照により組み込まれる。さらに、材料、方法及び実施例は例示されるだけであり、限定することが目的ではない。見出し、小見出し又は番号若しくは文字の付いた要素、例えば、(a)、(b)、(i)などは、読みやすさのためにのみ提示される。この文書における見出し又は番号若しくは文字を付けた要素の使用は、ステップ若しくは要素がアルファベット順に実行されること、又はステップ若しくは要素が必ずしもお互いから分離していることを必要としない。本発明の他の特徴、目的及び利点は、記載及び図面、並びに請求項から明らかとなる。

【図面の簡単な説明】

【0057】

【図1】対照発現ベクター(Ctrl)、又はそのC末端でV5エピトープタグに融合したSCD1(SCD1-V5)、若しくはそのC末端でV5エピトープタグに融合したSREBF1(SREBF1-V5)をコードするもので別々にトランスフェクトした、Flp-In CHO工学操作細胞プールで得られた一連の免疫蛍光画像である。プールは抗V5一次抗体及び二次抗マウスFITC抗体(中央の画像)並びにDAPI(左の画像)で画像化され、左と中央の両画像のオーバーレイ(右側の欄)が示される。画像は、ライカ共焦点顕微鏡を使用して生成した。

【図2】対照発現ベクター(対照)又はSCD1-V5若しくはSREBF1-V5をコードするもののいずれかでトランスフェクトした、CHOK1SVグルタミンシンターゼノックアウト(GS-KO)細胞プールで得られた一連の免疫蛍光画像を示す。プールは抗V5一次及び抗マウス二次TRITC抗体(中央の画像)並びにDAPI(左の画像)で画像化され、左と中央の両画像のオーバーレイ(右側の欄)も示される。画像は、ライカ共焦点顕微鏡を使用して生成した。

【図3A】発現困難な組換えFc融合タンパク質(Fc融合タンパク質又はFPとも呼ばれる)をコードするプラスミドによる一時的トランスフェクションの後の、CHO Flp-In(商標)細胞プールで発現された外因性のSCD1-V5及びSREBF1-V5の判定を示す図である。Fc融合タンパク質、並びに示したV5タグ付きの脂質代謝モジュレーター(LMM)、SCD1又はSREBF1だけを発現する細胞プールによるエレクトロポレーションの96時間後に得られた細胞溶解物で、ウェスタンブロット分析を実行した。抗V5一次抗体及び抗マウスHRPコンジュゲート二次抗体を、V5タグ付きのLMM及び抗-アクチン又は抗L7a(示したように)の発現を検出するために使用し、続いて、それぞれ抗マウス及び抗ウサギHRPコンジュゲート二次抗体による曝露をLMM検出のための負荷対照として使用した。

【図3B】eGFPをコードするプラスミドによる一時的トランスフェクションの後の、CHO Flp-In(商標)細胞プールで発現された外因性のSCD1-V5及びSREBF1-V5の判定を示す図である。Fc融合タンパク質、並びに示したV5タグ付きの脂質代謝モジュレーター(LMM)、SCD1又はSREBF1だけを発現する細胞プー

10

20

30

40

50

ルによるエレクトロポレーションの96時間後に得られた細胞溶解物で、ウェスタンブロット分析を実行した。抗V5一次抗体及び抗マウスHRPコンジュゲート二次抗体を、V5タグ付きのLMM及び抗-アクチン又は抗L7a(示したように)の発現を検出するために使用し、続いて、それぞれ抗マウス及び抗ウサギHRPコンジュゲート二次抗体による曝露をLMM検出のための負荷対照として使用した。

【図3C】CHO Flp-In(商標)を安定して発現するトランスフェクトされていない細胞プールで発現された、外因性のV5タグ付きのSCD1及びSREBF1の判定を示す図である。Fc融合タンパク質、並びに示したV5タグ付きの脂質代謝モジュレーター(LMM)、SCD1又はSREBF1だけを発現する細胞プールによるエレクトロポレーションの96時間後に得られた細胞溶解物で、ウェスタンブロット分析を実行した。抗V5一次抗体及び抗マウスHRPコンジュゲート二次抗体を、V5タグ付きのLMM及び抗-アクチン又は抗L7a(示したように)の発現を検出するために使用し、続いて、それぞれ抗マウス及び抗ウサギHRPコンジュゲート二次抗体による曝露をLMM検出のための負荷対照として使用した。

10

【図4】Vice1細胞カウンターを使用して判定したときの、eGFP含有構築物JB3.3によるトランスフェクションの後に、LMM SCD1-V5及びSREBF1-V5を安定して過剰発現するように工学操作されたCHO Flp-In細胞プールの生存可能な細胞濃度を示す図である(n=2)。

【図5A】CHOK1SVGS-KO細胞プールを過剰発現する対照、SCD1-V5、SREBF1-V5及びSREBF410-V5のeGFP含有プラスミドによるトランスフェクションから24、48、72及び96時間後の細胞培養濃度を示す図である。図5Aは、細胞濃度を示す。下のカラムは生存可能な細胞の濃度を表し、全体のカラムは細胞の全体の濃度を表す；下のエラーバーは生存可能な細胞の標準偏差を表し、上のエラーバーは全体の細胞濃度のそれを表す。統計的有意性は、特定の時点の対照値と比較した両側t検定を使用して計算した：*両側t検定[p<0.05]を使用した生存可能な細胞の濃度の有意性。+両側t検定[p<0.05]を使用した全体の細胞濃度の有意性(n=3)。

20

【図5B】CHOK1SVGS-KO細胞プールを過剰発現する対照、SCD1-V5、SREBF1-V5及びSREBF410-V5のeGFP含有プラスミドによるトランスフェクションから24、48、72及び96時間後の培養生存度を示す図である。図5Bは、図5Aに概説されるデータに基づく培養生存度を示す。エラーバーは、標準偏差を表す。統計的有意性は、特定の時点の対照値と比較した両側t検定を使用して計算した：*両側t検定[p<0.05]を使用した生存可能な細胞の濃度の有意性。+両側t検定[p<0.05]を使用した全体の細胞濃度の有意性(n=3)。

30

【図6A】FACSCalibur機器(BDBiosciences)を使用したフローサイトメトリー生成データを示す図である。中央値は、eGFP含有プラスミドによるトランスフェクションから24、48、72及び96時間後に得られ、ここで、試料は、Flp-In CHO細胞プールを過剰発現する、対照、SCD1-V5又はSREBF1-V5からとられた(n=2)。

【図6B】FACSCalibur機器(BDBiosciences)を使用したフローサイトメトリー生成データを示す図である。幾何平均値は、eGFP含有プラスミドによるトランスフェクションから24、48、72及び96時間後に得られ、ここで、試料は、Flp-In CHO細胞プールを過剰発現する、対照、SCD1-V5又はSREBF1-V5からとられた(n=2)。

40

【図6C】FACSCalibur機器(BDBiosciences)を使用したフローサイトメトリー生成データを示す図である。算術平均値は、eGFP含有プラスミドによるトランスフェクションから24、48、72及び96時間後に得られ、ここで、試料は、Flp-In CHO細胞プールを過剰発現する、対照、SCD1-V5又はSREBF1-V5からとられた(n=2)。

【図7A】FACSCalibur機器(BDBiosciences)を使用したフ

50

ローサイトメトリー生成データを示す図である。中央値は、eGFP含有プラスミドによるトランスフェクションから24、48、72及び96時間後に得られ、ここで、試料は、CHOK1SV GS-KO由来細胞を過剰発現する、対照、SCD1-V5、SREBF1-V5又はSREBF410-V5からとられた。エラーバーは、標準偏差を示す。統計的有意性は、特定の時点の対照値と比較した両側t検定を使用して計算した(n=3)。*は、統計的に有意な値[p<0.05]を示す。データは、FACSCalibur(BDBiosciences)を使用して生成した。

【図7B】FACSCalibur機器(BDBiosciences)を使用したフローサイトメトリー生成データを示す図である。幾何平均値は、eGFP含有プラスミドによるトランスフェクションから24、48、72及び96時間後に得られ、ここで、試料は、CHOK1SV GS-KO由来細胞を過剰発現する、対照、SCD1-V5、SREBF1-V5又はSREBF410-V5からとられた。エラーバーは、標準偏差を示す。統計的有意性は、特定の時点の対照値と比較した両側t検定を使用して計算した(n=3)。*は、統計的に有意な値[p<0.05]を示す。データは、FACSCalibur(BDBiosciences)を使用して生成した。

10

【図7C】FACSCalibur機器(BDBiosciences)を使用したフローサイトメトリー生成データを示す図である。図7Cは、測定した算術平均蛍光に全体の細胞濃度($\times 10^6 / \text{ml}$)を掛けることによって計算した、培養1mlあたりの全体の蛍光を示す図である。エラーバーは、標準偏差を示す。統計的有意性は、特定の時点の対照値と比較した両側t検定を使用して計算した(n=3)。*は、統計的に有意な値[p<0.05]を示す。データは、FACSCalibur(BDBiosciences)を使用して生成した。

20

【図8A】抗体Aの重鎖及び軽鎖をコードする核酸構築物の一時的トランスフェクションの後にSCD1-V5及びSREBF1-V5を安定して過剰発現するCHO Flp-In細胞における抗体Aの生成を示す図である。図8Aは、抗重鎖一次抗体及び抗ウサギHRPコンジュゲート二次抗体を使用して検出したときの、抗体Aに対応したバンドを示すウェスタンブロットである。

【図8B】抗体Aの重鎖及び軽鎖をコードする核酸構築物の一時的トランスフェクションの後にSCD1-V5及びSREBF1-V5を安定して過剰発現するCHO Flp-In細胞における抗体Aの生成を示す図である。図8Bは、プロテインA HPLCによって判定したときの、対照細胞プールから生成された値と比較した、LMM工学操作細胞プールにおける抗体生成の平均変化倍率を示す図である。

30

【図9A】Fc融合タンパク質をコードする核酸構築物の一時的トランスフェクションの後にSCD1-V5及びSREBF1-V5を安定して過剰発現するCHO Flp-In細胞プールにおけるFc融合タンパク質の生成を示す図である。図9Aは、抗重鎖一次抗体及び抗ウサギHRPコンジュゲート二次抗体を使用して検出したときの、Fc融合タンパク質を表すバンドを示すウェスタンブロットである。

【図9B】Fc融合タンパク質をコードする核酸構築物の一時的トランスフェクションの後にSCD1-V5及びSREBF1-V5を安定して過剰発現するCHO Flp-In細胞プールにおけるFc融合タンパク質の生成を示す図である。図9Bは、プロテインA HPLCによって判定したときの、対照細胞プールから生成された値と比較した、LMM工学操作細胞プールにおけるFc融合タンパク質生成の平均変化倍率を示す図である。

40

【図10A】トランスフェクションから48、72及び96時間後の、抗体Aの重鎖及び軽鎖をコードする核酸構築物の一時的トランスフェクションの後にSCD1-V5、SREBF1-V5及びSREBF410-V5を安定して過剰発現するCHO GSKO細胞プールにおいて良好に発現された抗体Aの生成を、対照、又ルCHOK1SV GS-KO細胞プール(選択GS遺伝子だけを発現し、LMM因子のない空のプラスミドを使用して生成された細胞の対照プール)と並べて示す図である。図10Aは、抗重鎖一次抗体及び抗ウサギHRPコンジュゲート二次抗体を使用して検出したときの、抗体Aを表すバ

50

ンドを示すウェスタンブロットである。

【図10B】トランスフェクションから48、72及び96時間後の、抗体Aの重鎖及び軽鎖をコードする核酸構築物の一時的トランスフェクションの後にSCD1-V5、SREBF1-V5及びSREBF410-V5を安定して過剰発現するCHO GSKO細胞プールにおいて良好に発現された抗体Aの生成を、対照、ヌルCHOK1SV GSKO細胞プール（選択GS遺伝子だけを発現し、LMM因子のない空のプラスミドを使用して生成された細胞の対照プール）と並べて示す図である。図10Bは、プロテインA HPLCによって判定したときの、対照細胞プール中で生成された値と比較した、LMM工学操作細胞プールにおける抗体生成の平均変化倍率を示す図である。

【図11A】Fc融合タンパク質をコードする核酸構築物の一時的トランスフェクションの後にSCD1-V5及びSREBF1-V5を安定して過剰発現するCHOK1SV GSKO細胞プール又は対照細胞プールにおける発現困難なFc融合タンパク質の相対的な生成を示す図である。図11Aは、抗重鎖一次抗体、続く抗ウサギHRPコンジュゲート二次抗体による曝露を使用して検出したときの、一時的に生成された融合タンパク質のウェスタンブロットを示す。

【図11B】Fc融合タンパク質をコードする核酸構築物の一時的トランスフェクションの後にSCD1-V5及びSREBF1-V5を安定して過剰発現するCHOK1SV GSKO細胞プール又は対照細胞プールにおける発現困難なFc融合タンパク質の相対的な生成を示す図である。図11Bは、プロテインA HPLCによって判定したときの、対照細胞プールと比較した、LMM工学操作細胞プールにおけるFc融合タンパク質生成の平均変化倍率を示す。

【図12A】対照（空）、SCD1-V5、SREBF1-V5又はSREBF410-V5遺伝子のいずれかを含有するプラスミド構築物で一時的にトランスフェクトされている、抗体Aを安定して発現するCHO細胞系からの、48及び72時間後に収集した上清からの抗体A生成の分析を示す図である。図12Aは、細胞からの上清のウェスタンブロットを示す；抗体Aは、抗重鎖一次抗体、続く抗ウサギHRPコンジュゲート二次抗体による曝露を使用して検出された。

【図12B】対照（空）、SCD1-V5、SREBF1-V5又はSREBF410-V5遺伝子のいずれかを含有するプラスミド構築物で一時的にトランスフェクトされている、抗体Aを安定して発現するCHO細胞系からの、48及び72時間後に収集した上清からの抗体A生成の分析を示す図である。図12Bは、トランスフェクションから168時間後に上清に存在する抗体Aの相対的なレベルをバンドが示す、クーマシー分析を示す。

【図13】対照（空）、SCD1-V5、SREBF1-V5又はSREBF410-V5遺伝子のいずれかを含有するプラスミド構築物で一時的にトランスフェクトされた、抗体Aを安定して発現するCHO細胞系からの、48、72、96及び144時間後に収集した上清からの抗体A生成の分析を示す図であり、容積測定抗体濃度を判定するために、プロテインA八重項分析が使用された（n=2）。

【図14】対照（空）、SCD1-V5、SREBF1-V5又はSREBF410-V5遺伝子のいずれかを含有するプラスミド構築物で一時的にトランスフェクトされた、抗体Aを安定して発現するCHO細胞系からの、48、72、96及び144時間後に収集した上清試料からのFc融合タンパク質の分析を示す図であり、Fc融合タンパク質の比生産性を判定するために、生存可能な細胞数及びプロテインA力価の測定が使用された。エラーバーは、標準偏差を示す（n=3）。

【図15A】対照、SCD1-V5又はSREBF1-V5含有ベクターを安定して組み入れ、その後抗体A構築物を安定して組み入れたCHO細胞プールから、48、72、96及び144時間後に収集した上清試料からの抗体A生成の分析を示す図である。図15Aは容積測定抗体濃度を示す。エラーバーは、標準偏差を示す（n=3）。

【図15B】対照、SCD1-V5又はSREBF1-V5含有ベクターを安定して組み入れ、その後抗体A構築物を安定して組み入れたCHO細胞プールから、48、72、9

10

20

30

40

50

6 及び 144 時間後に収集した上清試料からの抗体 A 生成の分析を示す図である。図 15 B は抗体 A の比生産性を示す。エラーバーは、標準偏差を示す (n = 3)。

【図 16 A】対照、SCD1 - V5、SREBF1 - V5 又は SREBF410 - V5 含有ベクターを安定して組み入れ、その後 FC 融合タンパク質構築物を安定して組み入れた CHO 細胞プールから、48、72、96 及び 144 時間後に収集した上清試料からの FC 融合タンパク質生成の分析を示す図である。図 16 A は容積測定 FC 融合タンパク質濃度を示す。エラーバーは、標準偏差を示す (n = 3)。

【図 16 B】対照、SCD1 - V5、SREBF1 - V5 又は SREBF410 - V5 含有ベクターを安定して組み入れ、その後 FC 融合タンパク質構築物を安定して組み入れた CHO 細胞プールから、48、72、96 及び 144 時間後に収集した上清試料からの FC 融合タンパク質生成の分析を示す図である。図 16 B は FC 融合タンパク質の比生産性を示す。エラーバーは、標準偏差を示す (n = 3)。

【図 17 A】トランスフェクションの 48 及び 96 時間後の、イムノサイトカイン及び無 LMM (対照)、SCD1、SREBF1 又は SREBF411 遺伝子のいずれかの発現に適切な遺伝子をコードする核酸構築物の一時的トランスフェクションの後の、CHO GSKO 細胞からのイムノサイトカイン発現のウェスタン分析を示す図である。上清試料は低減され、存在するバンドは、抗重鎖一次抗体、続く抗ウサギHRPコンジュゲート二次抗体への曝露を使用して検出された。下のバンドは天然の重鎖抗体を表し、上のバンドはサイトカインに融合している重鎖分子を示す。

【図 17 B】トランスフェクションの 96 時間後に得られた試料の相対的なイムノサイトカイン存在度を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0058】

現在及び次世代の生物製剤の両方は、患者での治療有用性が増加し続けているので、治療的使用のための高いグレードの品質を有する多量の次世代生物製剤品に対する要求並びに生産のための効率的な手段及び生産細胞系の効率的な開発に対する要求は拡大している。さらに、多くの次世代生物製剤は、当技術分野で公知の従来の発現技術を使用して、従来の細胞系において発現させ、生成するのが困難である。現在の方法は、臨床使用のために必要とされる大きな量で及び高いグレードの品質で、これらの生成物を生成するのに十分でない。このように、本開示は、現在の生成方法から得られる収量及び品質と比較して向上した品質を有する生成物、例えば次世代生物学的製剤のより高い収量を得るための方法及び組成物を特徴とする。本明細書に記載される方法及び組成物は、組換え生成物を生成するために現在使用される細胞発現系と比較して、向上した生産性、生成物品質、堅牢性及び/又は培養生存度を有する細胞又は細胞系を工学操作するためにも有益である。

【0059】

定義

本明細書で特に定義されない限り、本明細書で使用される全ての専門用語及び科学用語は、本発明が属する分野の当業技術者が一般に理解するのと同じ意味を有する。本明細書に記載されるものと類似する又は均等であるいかなる方法及び材料も本発明の実施で及び/又は試験のために使用することができるが、好ましい材料及び方法を本明細書に記載する。本発明の記載及び請求において、以下の専門用語は、定義が提供される場合、それが定義される通りに使用される。

【0060】

本明細書で用いられる用語は、特定の実施形態を記載することのみが目的であり、限定するものではないことも理解されたい。

【0061】

冠詞「1つの(a)」及び「1つの(an)」は、本明細書でその冠詞の文法上の目的語の1つ又は複数(すなわち、少なくとも1つ)を指すために使用される。例として、「細胞」は、1つの細胞又は1つを超える細胞を意味することができる。

【0062】

本明細書で用いる「脂質代謝経路の構成成分」は、直接的又は間接的に、脂質を合成する、脂質を分解する、1つの脂質種から別の脂質種に脂質を変換する、又は脂質を改変する、分子、ポリペプチド又は酵素を指す。一実施形態では、構成成分は、酵素基質、酵素反応生成物又は酵素補因子であってよい。一実施形態では、脂質代謝経路の構成成分は、LMMである。一実施形態では、脂質代謝経路の構成成分は、表1に提供される。

【0063】

本明細書で用いる「内因性」は、生物体、細胞、組織若しくは系からの又はその中に天然に生成される任意の物質を指す。

【0064】

本明細書で用いる「外因性」は、生物体、細胞、組織若しくは系に導入される又はその外で生成される任意の物質を指す。したがって、「外因性核酸」は、生物体、細胞、組織若しくは系に導入される又はその外で生成される核酸を指す。一実施形態では、外因性核酸の配列は、外因性核酸が導入される生物体、細胞、組織若しくは系の中で天然に生成されないか、又は天然に見出すことができない。実施形態では、天然に存在しない生成物又は天然に存在しない部分を含有する生成物は、本明細書に記載される宿主細胞に関して外因性物質である。

【0065】

本明細書で用いる「形成すること」は、細胞に導入すること、細胞の中で合成すること、又はLMM若しくは外因性LMMをコードする核酸が細胞の中に位置することをもたらす任意の他の過程を指す。

【0066】

本明細書で用いる「異種」は、異なる種から生物体、細胞、組織又は系に導入されるときの、1つの種からの任意の物質を指す。実施形態では、異種物質は、1つ又は複数の種からの部分又は天然に存在しない部分を含む物質も包含する。例として、一実施形態では、融合タンパク質の一部がヒトであり、融合タンパク質の一部が細菌であり、融合タンパク質の一部が天然に存在せず、核酸がヒト細胞に導入される融合タンパク質をコードする核酸は、異種核酸である。

【0067】

本明細書で用いる「脂質代謝経路」は、脂質若しくは脂質関連分子の合成、脂質若しくは脂質関連分子の伸長、脂質若しくは脂質関連分子の分解、脂質若しくは脂質関連分子の膜への組込み、脂質若しくは脂質関連分子の飽和の状態（例えば、飽和若しくは不飽和）、又は、脂質若しくは脂質関連分子の化学構造の変換若しくは改変（例えば、再エステル化）に関連した過程を指す。一実施形態では、脂質代謝経路は、脂質合成、脂質伸長、脂質分解、膜の組成若しくは流動性の変化、脂質ラフトの形成若しくはモジュレーション、又は脂質の改変若しくは変換（例えば、脂質の飽和若しくは不飽和化又は脂質の再エステル化）をもたらす。脂質代謝経路の例には、限定されるものではないが、以下が含まれる：新たな脂質生成、脂肪酸の再エステル化、脂肪酸の飽和、脂肪酸の不飽和化、脂肪酸伸長及びリン脂質合成、及び折り畳まれていないタンパク質の応答。

【0068】

本明細書で用いる「脂質代謝モジュレータ」又は「LMM」は、以下の1つ又は複数をもジュレートする、例えば増加又は減少させる、分子、遺伝子生成物、ポリペプチド又は酵素を指す：脂質代謝経路に参与する構成成分の発現（例えば、転写又は翻訳）；脂質代謝経路に参与する構成成分、例えば遺伝子生成物の活性（例えば、酵素活性）；細胞に存在する脂質のレベル又は量；脂質ラフトのレベル若しくは量又は脂質ラフト形成の速度；細胞膜、例えば、原形質膜又はオルガネラ膜の流動性、透過性又は厚さ；不飽和脂質への飽和脂質の変換又はその逆；細胞中の飽和脂質又は不飽和脂質、例えば一価不飽和脂質のレベル又は量；ERの活性に好ましい影響を及ぼす好ましい脂質組成を達成する脂質組成；ERの拡張；ゴルジの拡張；分泌小胞のレベル若しくは量又は分泌小胞の形成；分泌のレベル又は速度；膜受容体の活性化又は不活性化（例えば、ATR（例えば、多価不飽和脂肪酸残基を含有する細胞膜ホスファチジルコリンの増加はATRの活性化を通してp5

10

20

30

40

50

3のリン酸化を誘導する(The increase of cell-membranous phosphatidylcholines containing polyunsaturated fatty acid residues induces phosphorylation of p53 through activation of ATR)。Zhang XH、Zhao C、Ma ZA。J Cell Sci。2007年12月1日；120(Pt 23)：4134～43ページ PMID：18032786；ATR(血管拡張性失調症突然変異 - 及びRad3 - 関連キナーゼ)は、哺乳動物の細胞における軽度の低体温によって活性化され、その後p53を活性化する(ATR(ataxia telangiectasia mutated - and Rad3-related kinase) is activated by mild hypothermia in mammalian cells and subsequently activates p53)。Roobol A、Roobol J、Carden MJ、Bastide A、Willis AE、Dunn WB、Goodacre R、Smales CM。Biochem J。2011年4月15日；435(2)：499～508ページ。doi：10.1042/BJ20101303。PMID：21284603を参照)及び、SREPB(例えば、Int J Biol Sci。2016年3月21日；12(5)：569～79ページ。doi：10.7150/ijbs.14027。eCollection 2016。低密度リポタンパク質受容体経路の調節不全は、脂質障害媒介器官損傷に關与する(Dysregulation of the Low-Density Lipoprotein Receptor Pathway Is Involved in Lipid Disorder-Mediated Organ Injury)。Zhang Y、Ma KL、Ruan XZ、Liu BCを参照)；及びさらなる受容体、例えば、Biochim Biophys Acta。2016年3月17日。pii：S1388～1981(16)30071～3ページ。doi：10.1016/j.bbailip.2016.03.019を参照)の活性化又は不活性化；並びに/又は折り畳まれてないタンパク質の応答(UPR)。一実施形態では、LMMはポリペプチドを含む。一実施形態では、LMMは、転写調節因子、例えば転写因子を含む。一実施形態では、LMMは、SREBF1又はその機能的断片(例えば、SREBF-410)を含む。一実施形態では、LMMは酵素を含む。一実施形態では、LMMは、SCD1又はその機能的断片を含む。

【0069】

本明細書で「脂質代謝をモジュレートする改変」という表現の中で用いる「改変」は、本明細書に記載される脂質代謝経路の構成成分、例えば遺伝子生成物の発現又は活性の増加若しくは減少を実行することが可能である因子を指す。実施形態では、改変は、例えば改変の不在下での構成成分の発現又は活性と比較して、脂質代謝経路の構成成分の発現又は活性の増加、例えば、脂質代謝経路の構成成分の発現又は活性における、1%、2%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、1倍、2倍、5倍、10倍、20倍、50倍又は100倍以上の増加をもたらす。実施形態では、改変は、例えば改変の不在下での構成成分の発現又は活性と比較して、脂質代謝経路の構成成分の発現又は活性の減少、例えば、脂質代謝経路の構成成分の発現又は活性における、1%、2%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、1倍、2倍、5倍、10倍、20倍、50倍又は100倍以上の減少をもたらす。脂質代謝経路の構成成分の発現又は活性が減少する一部の実施形態では、構成成分は、脂質代謝経路の負の調節因子である。一実施形態では、改変は、脂質代謝モジュレータをコードする異種又は外因性の核酸配列を含む。一実施形態では、改変は、例えば、細胞の脂質代謝をモジュレートするために分子又はポリペプチドの存在下で細胞を培養することによる、細胞に導入することができる外因性脂質代謝モジュレータ、例えば、

低分子又はポリペプチドである。

【0070】

本明細書で互換的に使用される用語「核酸」、「ポリヌクレオチド」及び「核酸分子」は、デオキシリボ核酸(DNA)若しくはリボ核酸(RNA)、又はDNA若しくはそのRNAの組合せ、及び一本鎖、二本鎖又は三本鎖形態のそのポリマーを指す。用語「核酸」には、遺伝子、cDNA又はmRNAが含まれるが、これらに限定されない。一実施形態では、核酸分子は合成であり(例えば、化学合成され若しくは人工的であり)、又は組換えである。特に限定されない限り、この用語は、参照核酸に類似した結合特性を有し、天然に存在する又は存在しないヌクレオチドに類似の様式で代謝される、天然ヌクレオチドの類似体又は誘導体を含む分子を包含する。特に指示されない限り、特定の核酸配列は、明示的に示される配列だけでなく、保存的に改変されたその変異体(例えば、変性コドン置換)、対立遺伝子、オルソログ、SNP、及び相補的な配列も暗に包含する。具体的には、変性コドン置換は、1つ又は複数の選択される(又は全ての)コドンの第3位が混合基及び/又はデオキシイノシン残基で置換される配列を生成することによって達成することができる(Batzer等、Nucleic Acid Res. 19:5081ページ(1991); Ohtsuka等、J. Biol. Chem. 260:2605~2608ページ(1985); 及びRossolini等、Mol. Cell. Probes 8:91~98ページ(1994))。

10

【0071】

本明細書に互換的に使用される「ペプチド」、「ポリペプチド」及び「タンパク質」は、ペプチド結合によって、又はペプチド結合以外の手段によって共有結合されるアミノ酸残基で構成される化合物を指す。タンパク質又はペプチドは少なくとも2つのアミノ酸を含有しなければならず、タンパク質又はペプチドの配列を構成することができるアミノ酸の最大数に限界はない。一実施形態では、タンパク質は、1を超える、例えば、2、3、4、5又はそれより多いポリペプチドを含むことができ、ここで、各ポリペプチドは共有又は非共有結合/相互作用によって別のポリペプチドに会合している。ポリペプチドは、ペプチド結合によって又はペプチド結合以外の手段によって互いに連結される2つ以上のアミノ酸を含む任意のペプチド又はタンパク質を含む。本明細書で用いる本用語は、当技術分野で一般的に例えばペプチド、オリゴペプチド及びオリゴマーとも呼ばれる短い鎖、並びに、当技術分野で多くのタイプがあるタンパク質と一般的に呼ばれるより長い鎖の両方を指す。「ポリペプチド」には、とりわけ、例えば、生物学的に活性な断片、実質的に相同的なポリペプチド、オリゴペプチド、ホモダイマー、ヘテロダイマー、ポリペプチドの変異体、改変されたポリペプチド、誘導体、類似体、融合タンパク質が含まれる。

20

30

【0072】

「組換え生成物」は、細胞又は無細胞系によって生成することができる生成物を指す。生成物は、分子、核酸、ポリペプチド又はそれらの任意のハイブリッドであってよい。組換え生成物とは、生成物の少なくとも1つの構成成分又は生成物の生成若しくは発現を制御する配列の少なくとも1つのヌクレオチドが、遺伝子操作によって形成されたものである。組換え生成物又は組換え生成物をコードする構築物を生成するために本明細書で用いられる遺伝子操作は、当技術分野で公知の組換えDNA発現技術(例えば、分子生物学における現在のプロトコル(Current Protocols in Molecular Biology)に記載されている); 部位特異的、スクランニング又はランダム突然変異誘発; CRISPRをベースとした戦略を用いるゲノム改変戦略; 及び、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)をベースとした戦略を包含する。例として、組換え生成物が核酸である実施形態では、組換え核酸の少なくとも1つのヌクレオチド、又は組換え核酸の生成、例えば転写を制御する配列の少なくとも1つのヌクレオチドは、遺伝子操作によって形成された。一実施形態では、組換え生成物は、組換えポリペプチドである。一実施形態では、組換え生成物は、天然に存在する生成物である。一実施形態では、組換え生成物は、天然に存在しない生成物、例えば合成生成物である。一実施形態では、組換え生成物の一部は天然に存在するが、組換え生成物の別の部分は天然に存在しない。別の

40

50

実施形態では、組換え生成物の第1の部分は天然に存在する分子であるが、組換え生成物の別の部分は第1の部分と異なる別の天然に存在する分子である。

【0073】

「組換えポリペプチド」は、本明細書に記載される細胞によって生成することができるポリペプチドを指す。組換えポリペプチドとは、ポリペプチドをコードする配列の少なくとも1つのヌクレオチド又はポリペプチドの発現を制御する配列の少なくとも1つのヌクレオチドが、遺伝子操作又は人為操作（細胞又は前駆細胞の）によって形成されたものである。例えば、少なくとも1つのヌクレオチドが変更された、例えば、それは細胞に導入された、又はそれは遺伝子操作された再配列の生成物である。一実施形態では、組換えポリペプチドの配列は、ポリペプチド又はタンパク質の天然に存在する又は天然に存在しないアイソフォームと異ならない。一実施形態では、組換えポリペプチドのアミノ酸配列は、ポリペプチド又はタンパク質の天然に存在する又は存在しないアイソフォームの配列と異なる。一実施形態では、組換えポリペプチド及び細胞は、同じ種に由来する。一実施形態では、組換えポリペプチドのアミノ酸配列は、細胞の内因性ゲノムによってコードされるポリペプチドと同じであるか、実質的に同じであるか、又は、1%以下、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%又は99%異なる。一実施形態では、組換えポリペプチド及び細胞は同じ種に由来する、例えば、組換えポリペプチドはヒトポリペプチドであり、細胞はヒト細胞である。一実施形態では、組換えポリペプチド及び細胞は異なる種に由来する、例えば、組換えポリペプチドはヒトポリペプチドであり、細胞は非ヒト、例えば、げっ歯動物、例えばCHO、他の哺乳動物細胞、昆虫細胞、植物細胞、真菌細胞、ウイルス細胞又は細菌細胞である。一実施形態では、組換えポリペプチドは細胞に外因性である、言い換えると、細胞は第1の種に由来し、組換えポリペプチドは第2の種に由来する。一実施形態では、ポリペプチドは合成ポリペプチドである。一実施形態では、ポリペプチドは、天然に存在しない供給源に由来する。一実施形態では、組換えポリペプチドは、ヒトポリペプチド又はタンパク質の天然に存在する又は天然に存在しないアイソフォームとアミノ酸配列が異ならない、ヒトポリペプチド又はタンパク質である。一実施形態では、組換えポリペプチドは、ヒトポリペプチド又はタンパク質の天然に存在する又は天然に存在しないアイソフォームと、1以下、2、3、4、5、10、15又は20アミノ酸残基で異なる。一実施形態では、組換えポリペプチドは、ヒトポリペプチドの天然に存在するアイソフォームと、そのアミノ酸残基の1%以下、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%又は15%で異なる。組換えポリペプチドの一部がヒトポリペプチドの天然に存在する又は天然に存在しないアイソフォームの一部に由来する配列を含む実施形態では、組換えポリペプチドのその部分は、天然に存在する又は天然に存在しないアイソフォームの対応する部分と、1以下、2、3、4、5、10、15若しくは20アミノ酸残基、又はそのアミノ酸残基の1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%若しくは15%異なる。

【0074】

本明細書で用いる「相長的」、「同一性」又は「類似性」は、2つのポリマー分子の間の、例えば2つの核酸分子、例えば2つのDNA分子若しくは2つのRNA分子の間の、又は2つのポリペプチド分子の間のサブユニット配列同一性を指す。2つの分子の両方におけるサブユニット位置が同じモノマーサブユニットによって占有されるとき、例えば、2つのDNA分子の各々における位置がアデニンによって占有されるならば、それらはその位置で相同性又は同一である。2つの配列の間の相同性は、一致する又は相長的位置の数の一次関数である；例えば、2つの配列中の位置の半分（例えば、長さが10サブユニットのポリマー中の5つの位置）が相同性であるならば、2つの配列は50%相同性である；位置の90%（例えば、10のうちの9つ）が一致するか又は相同性であるならば、2つの配列は90%相同性である。

【0075】

本明細書で用いる用語「次世代生物製剤」又は「NGB」は、細胞を含む生物学的組成

10

20

30

40

50

物又は細胞によって生成される組成物を指す。生物学的組成物は、少なくとも1つの天然の構成成分による組成物、少なくとも1つの天然の構成成分及び少なくとも1つの非天然の構成成分による組成物、並びに少なくとも1つの天然の構成成分及び少なくとも1つの非天然の構成成分による組成物、又はそれらの任意の組合せからなる群から選択される。次世代生物製剤は、複合体及び/又は非天然の構造物をしばしば含む。次世代生物製剤の例には、限定されるものではないが、融合タンパク質、酵素又は組換え酵素、タンパク質又は組換えタンパク質、延長された半減期を有する組換え因子、長時間作用性の治療法による成長ホルモン、多量体の糖タンパク質、次世代抗体、抗体断片又は抗体様タンパク質（ALP）、ベシクル、エクソソーム、リポソーム、ウイルス及びウイルス様粒子、ムチン、ナノ粒子、細胞抽出物、及び試薬として使用される細胞が含まれる。

10

【0076】

本明細書で引用される全ての特許、特許出願及び刊行物の開示は、ここに参照により本明細書に完全に組み込まれる。本発明を具体的態様に関して開示されたが、本発明の真の精神及び範囲を逸脱しない範囲で、本発明の他の態様及び変形を当業者が考案することができることは明らかである。添付の特許請求の範囲は、全てのそのような態様及び均等な変形を含むと解釈されるものとする。

【0077】

脂質代謝のモジュレーション

本開示は、例えば、脂質代謝のモジュレーションをもたらす改変を細胞又は無細胞系に導入することによって、細胞又は無細胞系において脂質代謝をモジュレートするための、方法及び組成物を特徴とする。実施形態では、本開示は、脂質代謝に關与する経路又は過程の複数の態様、例えば、新たな脂質生成、脂肪酸の再エステル化、脂肪酸の飽和又は不飽和化、脂肪酸伸長及びリン脂質生合成経路に影響する、包括的な調節因子の使用を特徴とする。例として、包括的な調節因子は、1つ又は複数の脂質代謝経路又は過程の上流にあり、そのために、包括的な調節因子は脂質代謝のいくつかの、例えば2つ以上の下流の過程又は下流の構成成分に影響を与える。一実施形態では、包括的な調節因子は、異なる脂質代謝過程又は経路に關与する1つを超える、例えば2つ以上の標的遺伝子の発現を活性化することができる転写因子である。したがって、いかなる理論にも束縛されることを望むことなく、本明細書に記載される包括的な調節因子の使用は、脂質代謝の単一の標的

20

30

【0078】

本明細書に記載される脂質代謝経路は、脂質又は脂質関連分子の合成、分解、変換又は改変に關する過程を指す。脂質分子には、限定されるものではないが、脂肪酸、グリセロ脂質、グリセロリン脂質、リン脂質、糖脂質、スフィンゴ脂質及びステロール脂質、例えばコレステロール及びポリケチドが含まれる。脂質代謝経路の例には、限定されるものではないが以下が含まれる：新たな脂質生成、脂肪酸の再エステル化、脂肪酸の飽和、脂肪酸の不飽和化、脂肪酸伸長及びリン脂質生合成。一実施形態では、本明細書に記載される方法は、脂質代謝をモジュレートする改変を含む細胞を提供する。脂質代謝をモジュレートする改変は、脂質代謝に關与する構成成分の発現を増加又は減少させる因子であってよい。一部の実施形態では、脂質代謝をモジュレートする改変は、脂質代謝モジュレータ（LMM）をコードする外因性核酸を含む。そのような実施形態では、LMMをコードする外因性核酸は、本明細書に記載される核酸送達方法又は技術、例えば、形質導入又はトランスフェクションのいずれかによって細胞に導入される。

40

【0079】

一実施形態では、本明細書に記載される方法は、脂質代謝をモジュレートする1つ又は

50

複数、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10個の改変を含む細胞を提供する。脂質代謝をモジュレートする2つ以上の改変を細胞が含む実施形態では、脂質代謝をモジュレートする各改変は、LMMをコードする外因性核酸を含む。一実施形態では、LMMをコードする2つ以上の外因性核酸の各々は、同じ核酸分子の中に位置することができるか、又は2つ以上の異なる核酸分子上に置かれる。LMMをコードする2つ以上の核酸配列を細胞が含むそのような実施形態では、LMMは互いに異なる、例えば、異なるポリペプチド配列をコードするか又は異なる機能を有する。

【0080】

実施形態では、例えば、本明細書に記載されるLMMをコードする外因性核酸を導入して発現させることによる細胞での脂質代謝のモジュレーションは、以下の1つ又は複数を変更する、例えば増加又は減少させる：

- i) 脂質代謝経路に關与する構成成分の発現（例えば、転写及び/又は翻訳）；
- ii) 脂質代謝経路に關与する構成成分の活性（例えば、酵素活性）；
- iii) 細胞に存在する脂質（例えば、リン脂質又はコレステロール）の量；
- iv) 脂質ラフトの量又は脂質ラフト形成の速度；
- v) 細胞膜（例えば、原形質膜、小胞膜又はオルガネラ膜）の流動性、透過性及び/又は厚さ；
- vi) 不飽和脂質への飽和脂質の変換又は飽和脂質への不飽和脂質の変換；
- vii) 飽和脂質又は不飽和脂質、例えば一価不飽和脂質の量；
- viii) ER活性を増加させる良好な組成を達成するための、細胞中の脂質の組成；
- ix) ERの拡張（例えば、ERのサイズ、ER膜表面、又はERを構成する及び/若しくはその中に存在するタンパク質及び脂質の量）；
- x) ゴルジの拡張（例えば、ゴルジの数及びサイズ、ゴルジ表面又はゴルジの中に存在するタンパク質及び分子の数若しくは量）；
- xi) 分泌小胞の量又は分泌小胞の形成；
- xii) 生成物の分泌の量又は速度；
- xiii) 増殖能力、例えば、増殖速度；
- xiv) 培養生存度又は細胞生存；
- xv) 膜受容体の活性化；
- xvi) 折り畳まれてないタンパク質の応答（UPR）；
- xvii) 生成物の生成の収率又は速度；
- xviii) 生成物の品質（例えば、凝集、グリコシル化不均一性、断片化、適切な折り畳み又はアセンブリ、翻訳後修飾又はジスルフィド結合スクランブル）；並びに/或いは
- lix) 細胞成長/増殖又は細胞比増殖速度。

【0081】

一実施形態では、脂質代謝のモジュレーションは、脂質代謝のモジュレーションなしの細胞と比較して、上記の特性のいずれかにおける増加、例えば、上記の特性のいずれかにおける、1%、2%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%若しくは99%、又はそれより多い、或いは、少なくとも1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、50倍若しくは100倍以上の増加をもたらす。一実施形態では、脂質代謝のモジュレーションは、脂質代謝のモジュレーションなしの細胞と比較して、上記の特性のいずれかの減少、例えば、上記の特性のいずれかにおける、1%、2%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%若しくは99%、又はそれより多い、或いは、少なくとも1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、50倍若しくは100倍以上の減少をもたらす。

【0082】

一実施形態では、脂質代謝をモジュレートする改変は、1つ又は複数の脂質代謝経路に關与する構成成分の発現又は活性を増加又は減少する。脂質代謝をモジュレートする改変が脂質代謝経路の構成成分の発現、例えば転写若しくは翻訳の増加、又はその活性の増加

10

20

30

40

50

をもたらす実施形態では、構成成分は、脂質代謝経路の正の調節因子である。脂質代謝をモジュレートする改変が脂質代謝経路の構成成分の発現、例えば転写若しくは翻訳の減少、又はその活性の減少をもたらす実施形態では、構成成分は、脂質代謝経路の負の調節因子である。脂質代謝経路の遺伝子の発現、例えば転写及び/又は翻訳を定量化するためのアッセイは当技術分野で公知であり、遺伝子をコードするmRNAの量を定量化すること；又は遺伝子生成物若しくはポリペプチドの量を定量化すること；PCRをベースとしたアッセイ、例えば定量的リアルタイムPCR；ノーザンブロット；又はマイクロアレイを含む。脂質代謝経路の構成成分、例えば脂質代謝経路の酵素の活性を定量化するためのアッセイは、脂質代謝経路の特定の構成成分に特異的である。

【0083】

細胞の脂質代謝のモジュレーションが細胞中の脂質のレベル又は量の増加をもたらす実施形態では、細胞中の脂質の全体のレベル又は全体の量を増加させることができる。別の実施形態では、細胞中の1種又は複数種の脂質、例えばリン脂質又はコレステロールのレベル又は量を増加させることができる。細胞中の脂質（例えば、全体の又は選択された脂質種）のレベル又は量の増加は、脂質代謝をモジュレートする改変を含まない細胞と比較して、脂質代謝のモジュレーションの後の細胞、例えば生細胞中の脂質のレベル又は量の1%、2%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、若しくはそれより多い、又は1倍、2倍、3倍、4倍若しくは5倍、10倍、20倍、50倍若しくは100倍の増加を含む。細胞中の脂質のレベル又は量を定量化するためのアッセイは当技術分野で公知であり、酵素アッセイ及び酸化アッセイ、並びに特定のコンパートメント（例えば、オルガネラ）中の又は全細胞からの脂質構成成分の質量分析による測定が含まれる。

【0084】

一実施形態では、脂質代謝をモジュレートする改変は、細胞生存の増加をもたらす。例えば、細胞生存は、細胞アポトーシス、例えば、死滅させられたか又は死滅した細胞の数又は量を判定又は定量化することによって測定することができる。細胞生存の増加は、脂質代謝をモジュレートする改変を含まない細胞と比較して、脂質代謝のモジュレーションの後の細胞、例えば生細胞の数の1%、2%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、若しくはそれより多い、又は1倍、2倍、3倍、4倍若しくは5倍、10倍、20倍、50倍若しくは100倍の増加を含む。代わりに、細胞生存の増加は、例えば、脂質代謝のモジュレーションのない細胞と比較して、脂質代謝のモジュレーションの後のアポトーシス細胞の数の1%、2%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、又はそれより多い減少を含む。細胞生存又はアポトーシスを検出するための方法、例えばアネキシンVアッセイは当技術分野で公知であり、本明細書で実施例に記載される。

【0085】

一実施形態では、脂質代謝をモジュレートする改変は、培養生存度の増加をもたらす。例えば、培養生存度は、生の細胞、例えば、培養若しくは細胞集団の中の生細胞、又は生存可能であることに関する特性、例えば、増殖マーカー、インタクトなDNAを有するか、又はアポトーシスマーカーを提示しない細胞の数又は量を判定又は定量化することによって測定することができる。培養生存度の増加は、例えば、脂質代謝のモジュレーションのない細胞と比較して、脂質代謝のモジュレーションの後の細胞、例えば生細胞の数の1%、2%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、若しくはそれより多い、或いは、1倍、2倍、3倍、4倍若しくは5倍、10倍、20倍、50倍若しくは100倍、又はそれより多い増加を含む。培養生存度を判定するための方法は当技術分野で公知であり、本明細書で例3に記載する。培養生存度を評価するため

10

20

30

40

50

他の方法には、限定されるものではないが、トリパンプルー排除方法と、続く血球計数器又はVi-CELL細胞(Beckman-Coulter)を使用した計数が含まれる。生存可能なバイオマスを判定するための他の方法には、高周波インピーダンス又はキャパシタンスを使用した方法(例えば、Carvell and Dowd、2006、Cytotechnology、50:35~48ページ)、又はラマン分光法を使用した方法(例えば、Moretto等、2011、American Pharmaceutical Review、Vol.14)が含まれる。

【0086】

一実施形態では、脂質代謝をモジュレートする変化は、細胞増殖の増加をもたらす。例えば、細胞の増殖する能力は、細胞の数、細胞倍加又は細胞の増殖速度を定量化又は計数することによって測定することができる。代わりに、増殖する細胞は、例えば、フローサイトメトリー分析による細胞のゲノム含有量(例えば、複製DNA)の分析によって、又は増殖マーカー、例えばKi67、細胞周期に關与するリン酸化サイクリン-CDK複合体の存在によって同定することができる。増殖する能力の増加は、脂質代謝のモジュレーションの後の細胞の数、又は増殖マーカーを発現する細胞の数の、1%、2%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、若しくはそれより多い、又は、1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、50倍若しくは100倍、若しくはそれより多い増加を含む。代わりに、増殖する能力の増加は、脂質代謝のモジュレーションの後の細胞の倍加又は増殖速度の、1%、2%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%若しくはそれより多い、或いは、1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、50倍若しくは100倍、又はそれより多い増加を含む。細胞計数は細胞計数機を使用して、又は血球計数器の使用によって実行することができる。

【0087】

一実施形態では、脂質代謝をモジュレートする変化は、生成能力、例えば、生成される生成物の総量、量若しくは収量、又は生成速度の増加をもたらす。生成される生成物の総量、量又は収量の増加は、例えば、脂質代謝のモジュレーションなしの細胞によって生成される生成物の総量、量又は収量と比較して、脂質代謝のモジュレーションの後に生成される生成物の総量、量又は収量の1%、2%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、若しくはそれより多い、又は1倍、2倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍以上の増加を含む。生成速度の増加は、例えば、脂質代謝のモジュレーションなしの細胞の生成速度と比較して、脂質代謝のモジュレーションの後に生成される生成物の総量、量又は収量の、1%、2%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、若しくはそれより多い、又は1倍、2倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍、若しくはそれより多い増加を含む。一実施形態では、生成速度は、特定の時間単位において生成される生成物の総量、量又は収量を判定することによって決定される。

【0088】

一実施形態では、脂質代謝をモジュレートする変化は、生成物の品質、例えば、凝集、グリコシル化状態若しくは不均一性、断片化、適切な折畳み若しくはアセンブリ、翻訳後修飾又はジスルフィド結合スクランブルの増加をもたらす。生成物の品質の増加は、例えば、脂質代謝のモジュレーションなしの細胞で観察されるものと比較して、脂質代謝のモジュレーションの後の、1%、2%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、若しくはそれより多い、又は1倍、2倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍以上の非凝集生成物の総量若しくは量の増加、非

10

20

30

40

50

凝集生成物の凝集生成物に対する比の増加、又は凝集生成物の総量若しくは量の減少を含む。生成物の品質の増加は、例えば、脂質代謝のモジュレーションなしの細胞で観察されるものと比較して、脂質代謝のモジュレーションの後の、1%、2%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、若しくはそれより多い、又は1倍、2倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍以上の、適切に折り畳まれた若しくは組み立てられた生成物の総量若しくは量の増加、適切に折り畳まれた若しくは組み立てられた生成物対誤って折り畳まれた、折り畳まれてない、部分的に組み立てられた、若しくは組み立てられてない生成物の比の増加、又は誤って折り畳まれた、折り畳まれてない、部分的に組み立てられた、若しくは組み立てられてない生成物の総量若しくは量の減少を含む。生成物の品質の増加は、例えば、脂質代謝のモジュレーションなしの細胞で観察されるものと比較して、脂質代謝のモジュレーションの後の、1%、2%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、若しくはそれより多い、又は1倍、2倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍以上の、断片化していない若しくは完全長の生成物の総量若しくは量の増加、又は断片化生成物の総量若しくは量の減少を含む。生成物の品質の増加は、例えば、脂質代謝のモジュレーションなしの細胞で観察されるものと比較して、脂質代謝のモジュレーションの後の、1%、2%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、若しくはそれより多い、又は1倍、2倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍以上の、機能的生成物の総量若しくは量の増加、又は非機能的若しくは機能障害生成物の総量若しくは量の減少を含む。生成物の品質の増加は、例えば、脂質代謝のモジュレーションなしの細胞で観察されるものと比較して、脂質代謝のモジュレーションの後の、1%、2%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、若しくはそれより多い、又は1倍、2倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍以上の、グリカン不均一性の増加又は減少を含む。生成物の品質の増加は、例えば、脂質代謝のモジュレーションなしの細胞で観察されるものと比較して、脂質代謝のモジュレーションの後の、1%、2%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、若しくはそれより多い、又は1倍、2倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍以上の、機能的生成物の総量若しくは量の増加、又は非機能的若しくは機能障害生成物の総量若しくは量の減少を含む。

【0089】

脂質代謝モジュレータ

本明細書に記載されるように、脂質代謝のモジュレーションは、LMMを発現させるか若しくは導入することによって、又はLMMの調節を変更することによって達成することができる。一実施形態では、例えば、LMMをコードする外因性核酸を導入することによって、又は、プロモーターエレメント若しくは他の調節転写エレメントを導入することによって発現を増加させることによって、LMMは細胞で過剰発現される。別の実施形態では、LMMの発現又は活性は、例えば、LMMの阻害剤又は外因性阻害性核酸、例えばRNA干渉剤を導入することによって阻害又は減少される。阻害性核酸の例には、LMM、例えばLMMをコードするmRNAを標的にする、ショートインタフィアリングRNA (siRNA) 及びショートヘアピンRNA (shRNA) が含まれる。一実施形態では、LMM活性又は発現を調節する翻訳後修飾又は他の内因性調節機構を変更することによって、LMMの活性又は発現を増加又は減少する。リン酸化、SUMO化、ユビキチン化、アセチル化、メチル化又はグリコシル化を含む(但し、これらに限定されない)翻訳後修飾による調節は、LMMの発現又は活性を増加又は減少させることができる。例として、

10

20

30

40

50

翻訳後修飾の調節は、LMMを改変する酵素若しくは分子のモジュレーションを通して、或いは翻訳後修飾が起こることができないような又はより頻繁に若しくは構成的に起こるようなLMMの改変を通して、達成することができる。LMMの調節は、LMMの発現又は活性を増加又は減少させる、例えば、miRNA調節、タンパク質切断、特異的アイソフォームの発現、選択的スプライシング及び分解の1つ又は複数を増加又は減少させることができる、内因性調節機構をモジュレートすることを含むこともできる。

【0090】

一実施形態では、LMMは、脂質代謝経路の構成成分の発現、例えば転写、又は活性をモジュレートする、例えば増加又は減少させる。別の実施形態では、LMMは、脂質又は脂質関連分子の合成、分解、伸長又は構造的立体配座（例えば、飽和若しくは不飽和化、又はエステル化）をモジュレートする、例えば増加又は減少させる。脂質代謝経路の例示的なLMM及び/又は構成成分は、表1に掲載されるが、掲載のものに限定されない。

【表 1 - 2】

脂肪酸脱飽和	SCD1(ステアロイル CoA デサチュラーゼ-1) SCD2(ステアロイル CoA デサチュラーゼ-2) SCD3(ステアロイル CoA デサチュラーゼ-3) SCD4(ステアロイル CoA デサチュラーゼ-4) SCD5(ステアロイル CoA デサチュラーゼ-5) PED(プラスマニルエタノールアミンデサチュラーゼ)
SREBF1 及び他の経路の調節	S1P(部位 1 プロテアーゼ) S2P(部位 2 プロテアーゼ) SCAP(SREBF 切断活性化タンパク質) INSIG1(インスリン誘導遺伝子 1) INSIG2(インスリン誘導遺伝子 2) HMG CoA 還元酵素(2-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル CoA レダクターゼ) PPAR 受容体、例えば、PPAR α 、PPAR γ

10

【0091】

一実施形態では、LMMは、例えば表1に提供される脂質代謝経路に關与する構成成分、例えば遺伝子生成物と少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、若しくは100%のアミノ酸配列同一性又は相同性を含む；又は、例えば表1に提供される脂質代謝経路に關与する構成成分、例えば遺伝子生成物のアミノ酸配列から、1、2若しくは3以上のアミノ酸残基異で且つ50、40、30、20、15若しくは10以下のアミノ酸残基が異なる。

20

【0092】

一実施形態では、LMMは、例えば表1に提供される脂質代謝経路に關与する構成成分の機能的断片を含む。本明細書に記載されるLMMの機能的断片は、LMMの1つ又は複数の機能的ドメインを含むことができる。例として、転写因子であるLMMの機能的断片は、DNA結合性ドメイン及びトランス活性化ドメインを含む。例として、酵素であるLMMの機能的断片は、酵素活性を有するドメインを含む。本明細書に記載されるLMMの機能的断片は、機能的活性を、例えば、完全長LMMの機能的活性の少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%又は90%保持する。LMMの機能的断片は、当業者が実験的に判定することができるか、又は、機能的ドメインの配列相同性に基づくアルゴリズムを使用して予測することができる。例示的なLMMは、以下でさらに記載される。

30

【0093】

本明細書に記載される方法の実施形態のいずれでも、LMMは転写調節因子である。一実施形態では、LMMは、DNAに結合するか又はDNAに結合する複合体の中で会合し、脂質代謝に關与する1つ又は複数の遺伝子生成物の転写のためのRNAポリメラーゼを動員するか又はRNAポリメラーゼを動員する複合体の中で会合する、転写因子又は転写活性化因子である。一実施形態では、LMMは、ステロール結合性エレメント及び/又はEボックスプロモーター配列に結合する。一実施形態では、LMMは、ステロール調節エレメント結合性因子1(SREBF1)又はステロール調節エレメント結合性因子2(SREBF2)又はその機能的断片若しくはアイソフォームを含む。

40

【0094】

一実施形態では、LMMは、包括的な転写活性化因子又は転写因子を含む。一実施形態では、LMMは、例えば、表1に提供される脂質代謝経路の2つ以上、例えば、2、3、4、5、6、又はそれより多い構成成分の転写をモジュレートすることが可能である。別の実施形態では、LMMは、2つ以上の脂質代謝経路の1つ又は複数、例えば、1、2、

50

3、4若しくは5、又はそれより多い構成成分、例えば表1に提供される構成成分及び経路の転写をモジュレートすることが可能である。

【0095】

ステロール調節エレメント結合性因子1 (SREBF1)は、標的遺伝子のプロモーター領域に存在するステロール調節エレメント (SRE) 及びEボックスプロモーター配列 (Hagen, Rodriguez - Cuenca等、2010) に結合することによって脂質生成、脂肪酸の再エステル化、脂肪酸の不飽和化及び伸長、並びにリン脂質生合成に参与する遺伝子の転写を上方制御する包括的な転写活性化因子である。SREBF1遺伝子自体の転写は、遺伝子のプロモーター領域中の転写調節エレメントの中でもステロール調節エレメント (SRE) の存在によって内因的に調節される。これに加えて、リン酸化、ユビキチン化、SUMO化、アセチル化、脂肪酸媒介改変及びタンパク分解性プロセッシングを含む多数の翻訳後調節機構が、SREBF1周囲に固定されているタイトに制御されているが適応性が高いホメオスタシス系に寄与する。

10

【0096】

完全長SREBF1は合成されて、主に小胞体 (ER) に局在化する。膜一体化SREBF1は、ゴルジへのSREBF1の移動を促進することができるSREBF切断活性化タンパク質 (SCAP) と複合体を形成する。しかし、高いステロールレベル (特にコレステロール) が存在する場合は、SCAPの立体配置変化が誘導され、それは、膜一体化タンパク質insig (インスリン誘導遺伝子) への結合を助け、したがってこの複合体の移動を阻害する。ステロールの不在下では、insigはSCAPに結合せず、したがって、COPII媒介小胞形成、及びゴルジへのSREBF:SCAP複合体の以降の移動を可能にする。逐次的なタンパク分解性切断は、細胞質に直ちに存在するが核に移動する、SREBF1のN末端の塩基性ヘリックスループヘリックスロイジンジッパー (bHLH1z) を遊離する部位1プロテアーゼ (S1P) 及び部位2プロテアーゼ (S2P) タンパク質によって媒介されて、ゴルジにおいて起こる。切断されたSREBF1の上存在するリジン残基は26Sプロテアソームによってユビキチン化され、分解されるが、このユビキチン化は、核への移動を可能にするリジン残基のアセチル化を通して阻害することができる。最後に、核SREBF1は、新たな脂質生成 (脂肪酸シンターゼ (FAS) 及びアセチルCoAカルボキシラーゼ (ACC))、脂肪酸の再エステル化 (ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ (DGAT)、グリセロール-3-リン酸 (GPAT) 及びリポタンパク質リパーゼ (LPL))、リン脂質生合成 (CTP:ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼ (CCT))、脂肪酸脱飽和 (ステアロイル-CoAデサチュラーゼ1 (SCD1)) の役割を担ういくつかの遺伝子の上流の、ステロール調節エレメント (SRE) 配列に結合することができる。核SREBF1は、完全長SREBF1遺伝子自体の転写を活性化することも可能であるが、これは同じく遺伝子の上流に位置する肝臓X受容体 (LXR) プロモーター配列の活性化にも依存する (Brown, Goldstein 1997 - BROWN, M. S. 及びGOLDSTEIN, J. L.、1997。SREBP経路:膜結合転写因子のタンパク質分解によるコレステロール代謝の調節 (The SREBP Pathway: Regulation of Cholesterol Metabolism by Proteolysis of a Membrane-Bound Transcription Factor)。Cell、89 (3)、331~340ページ) (Hagen, Rodriguez - Cuenca - Hagen, R. M.、Rodriguez - CUENCA, S. 及びVIDAL - PUIG, A.、2010。SREBP1による膜脂質組成物のアロスタティック制御 (An allostatic control of membrane lipid composition by SREBP1)。FEBS letters、584 (12)、2689~2698ページ)。

20

30

40

【0097】

一実施形態では、LMMは、SREBF1、そのアイソフォーム、又は機能的断片を含む。SREBF1のアミノ酸配列は、以下で提供される:

50

MDELAFGEAALEQTLAEMCELDTAVLNDI EDMLQL INNQSDDFPGLFDAPYAGGETGDTGPSSPGANSPEFSSASLASS
 LEAFLGGPKVTPAPLSPPPSAPAALKMYPSPVSPFSPGPGI KEEPVPLTI LQPAAPQPSPGTLLPPSFPAPPVQLSPAPVL
 GYSSLPSGFSGLPGNTQQPPSSLPLAPAPGVLPALHTQVQSLASQQPLPASAAPRTNTVTSQVQQVPVVLQPHFI KA
 DLLLLTAVKTDAGATVKTAGI STLAPGTAVQAGPLQTLVSGGTI LATVPLVVDTKLPI HRLAAGSKALGSAQSRGEKRT
 AHNAIEKRYRSSI INDKI VELKDLVVGTEAKLNKSAVLRKAIDYIRFLQHSNQKQENLTLRSAHKSLSKDLVSACGSG
 GGTDVSMEGMKPEVVETLTPPPSDAGSPSQSSPLSFGSRASSSGSDSEPDSPAFEDSQVKAQRLPSHSRGM LDRSR LAL
 CVLAFLCLTCNPLASLFGWGI LTPSDATGTHRSSGRSMLEAESRDGSNWTQWLLPPLVWLANGLLVLACLALLFVYGE
 TRPHSGPAVHFWRHRKQADLDLARGDFPQAAQQLWLALQALGRPLPTSNLDLACSLWNLIRHLLQRLWVGRWLAGQAGG
 LLRDRGLRKDARASARDAAVVYHKLHQLHAMGKYTGGH LAASN LALSALNLAECAGDAI SMATLAEIYVAAALRVKTS
 LPRALHFLTRFFLSSARQACLAQSGSVPLAMQWLCHPVGHRFFVDGDWAVHGAPPESLYSVAGNPVDPLAQVTRLFREHLL
 RALNCIAQPSGAADGDREFS DALGYLQLLNCSDAAGAPACSFVSSSMAATTGPDPAKWWASLTAVVIHWLRRDEEA
 AERLYPLVEHI PQVLQDTERPLPRAALYSFKAARALLDHRKVESSPASLAI CEKASGYLRDSLASTPTGSSI DKAMQLL
 CDLLL VARTSLWQRQSPASVQVAHGTSNGPQASALELRGFQHDLSLRLRAQSFRPAMRRVFLHEATARLMAGASPART
 HQLLDRSLRRRAGSSGKGGTTAELEPRPTWREHTEALLLASCYLPPAFLSAPGQRMSMLAEAAARTVEKLGDRHLLLDCCQ
 MLLRLGGGTTVTSS (配列番号 1) 。

10

【 0 0 9 8 】

S R E B F 1 のヌクレオチド配列は、以下に提供する：

atggacgagctggccttcggtgagggcggctctggaacagacactggccgagatgtgcgaactggacacagcggttttgaa
 cgacatcgaagacatgctccagctcatcaacaaccaagacagtgacttcccgggctgtttgacgccccatgctgggg
 gtgagacaggggacacaggccccagcagcccagggtgccaaactctcctgagagcttctctctgcttctctggcctcctct
 ctggaagccttctgggaggacccaaggtagacaccgcacccttgtccctccaccatcggcaccgcgtgctttaagat
 gtaccggtccgtgctcccccttttccccctgggctgggatacaagaggagccagtgccactcaccatcctacagcctgcag
 cgccacagccgtcaccggggaccctcctgcctccgagcttccccgcaccaccggtacagctcagccctgcgccccgtgctg
 ggttacfcgagcctgccttcaggcttctcagggaccctccaggaaacactcagcagccaccatctagcctgccgtggc
 ccctgcaccaggagctctgcccacccctgcccgcacaccagggtccaaagctggcctcccagcagccgctgccagcct
 cagcagcccc tagaacaacac t g t g a c c t c a c a g g t c c a g c a g g t c c c a g t g t a c t g c a g c c a c a c t t c a t c a a g g c a
 g a c t c a c t g c t g c t g a c a g c t g t g a a g a c a g a t g c a g g a g c c a c c g t g a a g a c t g c a g g c a t c a g c a c c t g g c t c c t g g
 c a c a g c c g t g c a g g c a g g t c c c c t g c a g a c c c t g g t g a g t g g a g g g a c c a t c t t g g c c a c a g t a c c t t t g g t t g t g g a c a
 c a g a c a a a c t g c c c a t c c a c c g a c t c g c a g c t g g c a g c a a g g c c c t a g g c t c a g c t c a g a g c c g t g g t g a g a a g c g c a c a
 g c c c a c a a t g c c a t t g a g a a g c g t a c c g g t c t t c t a t c a a t g a c a a g a t t g t g g a g c t c a a a g a c c t g g t g g t g g g c a c
 t g a a g c a a a g c t g a a t a a a t c t g c t g t c t t g c g c a a g g c c a t c g a c t a c a t c c g c t t c t t g c a g c a c a g c a a c c a g a a g c
 t c a a g c a g g a g a a c c t g a c c c t a c g a a g t g c a c a c a a a a g c a a a t c a c t g a a g g a c c t g g t g t c a g c t t g t g g c a g t g g a
 g g a g g c a c a g a t g t g t c t a t g g a g g g c a t g a a a c c c g a a g t g g t g g a g a c g c t t a c c c t c c a c c c t c a g a c g c c g g c t c
 a c c c t c c c a g a g t a g c c c c t g t c t t t g g c a g c a g a g c t a g c a g c a g t g g t g g t a g t g a c t c t g a g c c c g a c a g t c c a g
 c c t t t g a g g a t a g c c a g g t c a a g c c c a g c g g c t g c c t t c a c a c a g c c g a g g c a t g c t g g a c c g c t c c c g c c t g g c c c t g
 t g t g t a c t g g c c t t t c t g t g t c t g a c c t g c a a t c c t t t g g c c t c g c t t t c g g c t g g g g c a t t c t c a c t c c c t c t g a t g c
 t a c g g g t a c a c a c c g t a g t t c t g g g c g c a g c a t g c t g g a g g c a g a g a g c a g a t g g c t c t a a t t g g a c c c a g t g g t t g c
 t g c c a c c c c t a g t c t g g c t g g c c a a t g g a c t a c t a g t g t g g c c t g c t t g g c t c t t c t t t g t c t a t g g g g a a c c t g t g
 a c t a g g c c a c a c t c t g g c c c g g c t g t a c a c t t c t g g a g a c a t c g a a a c a a g c t g a c c t g g a t t t g g c c c g g g g a g a t t t
 c c c c a g g c t g c t c a a c a g c t g t g g c t g g c c c t g c a a g c g c t g g g c c g g c c c t g c c c a c c t c a a a c c t g g a t c t g g c c t
 g c a g t c t g c t t t g g a a c c t c a t c c g c c a c c t g c t c c a g c g t c t c t g g g t g g g c c g c t g g c t g g c a g g c c a g g c c g g g g g c
 c t g c t g a g g g a c c g t g g g c t g a g g a a g g a t g c c c g t g c c a g t g c c c g g g a t g c g g c t g t g t c t a c c a t a a g c t g c a c c a
 g c t g c a t g c c a t g g g c a a g t a c a c a g g a g g a c a t c t t g c t g c t t c t a a c c t g g c a c t a a g t g c c c t c a a c c t g g c t g a g t
 g c g c a g g a g a t g c t a t c t c c a t g g c a a c a c t g g c a g a g a t c t a t g t g g c a g c g g c c t g a g g g t c a a a a c c a g c c t c c c a
 a g a g c c c t g c a c t t c t t g a c a c g t t t c t t c c t g a g c a g c g c c c g c a g g c c t g c c t a g c a c a g a g c g g c t c g g t g c c t c t
 t g c c a t g c a g t g g c t c t g c c a c c c t g t a g g t c a c c g t t t c t t t g t g g a c g g g g a c t g g g c c g t g c a c g g t g c c c c c c c g g
 a g a g c c t g t a c a g c g t g g c t g g g a a c c c a g t g g a t c c g c t g g c c a g g t g a c c c g g c t a t t c c g t g a a c a t c t c c t a g a g
 c g a g c g t t g a a c t g t a t t g c t c a g c c c a g c c c a g g g g c a g c t g a c g g a g a c a g g g a g t t c t c a g a t g c c c t t g g a t a t c t
 g c a g t t g c t a a a t a g c t g t t c t g a t g c t g c c g g g g c t c c t g c t t g c a g t t t c t c t g t c a g c t c c a g c a t g g c t g c c a c c a
 c t g g c c c a g a c c c a g t g g c c a a g t g g t g g g c c t c a c t g a c a g c t g t g g t g a t c c a c t g g c t g a g g c g g g a t g a a g a g g c a

20

30

40

50

gctgagcgttgtaccactggtagagcatatccccagggtgctgcaggacactgagagaccctgccagggcagctctgtactccttcaaggctgcccgggctctgctggaccacagaaaggtggaatctagcccagccagcctggccatctgtgagaaggccagtgggtacctgcccgggacagcttagcctctacaccaactggcagttccatgacaaggccatgcagctgctcctgtgtgatctacttctgtggccccgtaccagctctgtggcagcggcagcagctcaccagcttcagctccaggtagctcacggtaccagcaatggaccccaggcctctgctctggagctgctgtggtttccaacatgacctgagcagcctgcccgggtggcacagagcttccggcctgctatgaggagggtattcctacatgaggccacagctcggctgatggcaggagcaagtctgccgggacacaccagctcctggatcgagctctgaggaggaggcaggtccagtggaaggaggcactacagctgagctggagccacggcccacatggcgggagcacaccgaggccctgctgttggcatcctgctatctgccccctgcttccctgtcggctcctgggagcgcaatgagcatgctggccgaggcggcagcaccgtagagaagcttggcgatcaccggctactgctggactgccagcagatgctcctgcgctgggcccgggaaccaccgctcacttccagctag (配列番号 2) 。

10

【 0 0 9 9 】

一実施形態では、LMMは、SREBF1のアミノ酸配列、例えば配列番号1と、少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の同一性；或いは、SREBF1のアミノ酸配列、例えば配列番号1から、1、2若しくは3以上のアミノ酸残基で且つ50、40、30、20、15若しくは10以下のアミノ酸残基の差異を含む。

【 0 1 0 0 】

SREBF1のアイソフォームは当技術分野で公知であり、アイソフォームa及びアイソフォームb、並びに種又は細胞特異的、例えばCHO細胞特異的アイソフォーム、例えばアイソフォームcを含む。SREBF1アイソフォームaのアミノ酸配列 (GenBank 受託番号NP_001005291.2) を、以下に提供する。

20

MDEPPFSEAALEQALGEPCLDAALLTDIEGEVAGRGRANGLDAPRAGADRGAMDCTFEDMLQLINNQDSDFPGLFDPPYAGSGAGGTDSPASPDTSPPGSLSPPPATLSSSLEAFLSGPQAAPSPLSPPQPAPTPLKMYPSMPAFSPGPGIKEESVPLSLIQTPTPQPLPGALLPQSFPAPAPPQFSSTPVLGYSPPPGGFSTGSPPGNTQQPLPLPLASPPGVVPSLHTQVQSVVPQQLLTVTAAPTAAPVTTTTSQIQQVPVLLQPHFIKADSLLLTAMKTDGATVKAAGLSPLVSGTTVQTGPLPTLVSGGTILATVPLVVDAEKLPINRLAAGSKAPASAQSRGEKRTAHNAIEKRYRSSINDKIIELKDLVVGTEAKLNKSAVLRKADYIRFLQHSNQKQENLSLRTAVHKSLSKDLVSACGSGGNTDVLMEGVKTEVEDTLTPPPSDAGSPFQSSPLSLGSRGSGSGGSDSEPDSPVFEDSKAKPEQRPSLHRSMLDRSRLALCTLVFLCLSCNPLASLLGARGLPSPDTSVYHSPGRNVLGTESRDGPGWAQWLLPPVWLLNGLLVLSLVLLFVYGEVTRPHSGPAVYFWRHRKQADLDLARGDFAQAAQQLWLALRALGRPLPTSHLDLACSLLNWLI RHLLQRLWVGRWLAGRAGGLQQDCALRVDASASARDAA LVYHKLHQLHTMGKHTGGHLTATNLALSALNLAECAGDAVSVATLAEIYVAAALRVKTSLPRALHFLTRF FLSSARQACLAQSGSVPPAMQWLCHPVGHRFFVDGDWSVLSTPWESLYSLAGNPVDPLAQVTQLFREHLL ERALNCVTQPNPSPGSADGDKEFSDALGYLQLLNSCSDAAGAPAYSFSISSMATTTGVDPAKWWWASLT AVVIHWLRRDEEAERLCLPVEHLPRVLQESERPLPRAALHSFKAARALLGCAKAESGPASLTI CEKASG YLQDSLATTPASSIDKAVQLFLCDLLL VVRTSLWRQQPPAPAPAAQGTSSRPQASALELRGFQRDLS LRRLAQSFRRPAMRRVFLHEATARLMAGASPTRTHQLLDRSLRRRAGPGGKGGAVAELEPRPTRREHAEAL LLASCYLPPGFLSAPGQRVGMLEAAARTLEKLGDRRLHDCQMLMRLGGGTTVTSS (配列番号 2 8)

30

【 0 1 0 1 】

SREBF1アイソフォームaの核酸配列、又はmRNA配列 (GenBank 受託番号NM_001005291.2) を、以下に提供する。

40

AGCAGAGCTGCGGCCGGGGGAACCCAGTTTTCCGAGGAACTTTTGCGCCGGCGCCGGCCGCTCTGAGGCCAGGGCAGGACACGAACGCGCGGAGCGCGCGCGGCGACTGAGAGCCGGGGCCGCGCGCGCTCCCTAGGAGGGCCGTACGAGGCGCGGGCCCGCGGGCTCCCGGAGGAGCGGCTGCGCCATGGACGAGCCACCCTTCAGCGAGCGGCTTTGGAGCAGGCGCTGGGCGAGCCGTGCGATCTGGACGCGGCGCTGCTGACCGACATCGAAGGTGAAGTCGGCGCGGGGAGGGGTAGGGCCAACGGCTGGACGCCCAAGGGCGGGCGCAGATCGCGGAGCCATGGATTGCACTTTTCAAGACATGCTTCAGCTTATCAACAACCAAGACAGTGACTTCCCTGGCTATTTGACCCACCCTATGCTGGGAGTGGGGCAGGGGGCACAGACCCTGCCAGCCCCGATACCAGCTCCCCAGGCAGCTTGCTCCACCTCTGCCACATTGAGCTCCTCTTGAAGCCTTCTGAGCGGGCCGAGGCA GCGCCCTACCCCTGTCCCCTCCCAGCCTGCACCCACTCCATTGAAGATGTACCCGTCATGCCCGCTT

50

TCTCCCCTGGGCTGGTATCAAGGAAGAGTCAGTGCCACTGAGCATCCTGCAGACCCCCACCCACAGCC
CCTGCCAGGGGCCCTCCTGCCACAGAGCTTCCAGCCCCAGCCCCACCGCAGTTCCAGTCCACCCCTGTG
TTAGGCTACCCAGCCCTCCGGGAGGCTTCTCTACAGGAAGCCCTCCCGGAACACCCAGCAGCCGCTGC
CTGGCCTGCCACTGGCTTCCCCGCCAGGGGTCCCGCCGCTCCTTGCACACCCAGGTCCAGAGTGTGGT
CCCCAGCAGCTACTGACAGTCACAGCTGCCCCACGGCAGCCCTGTAACGACCACTGTGACCTCGCAG
ATCCAGCAGGTCCCGTCTGTGTCAGCCCCACTTCATCAAGGCAGACTCGCTGCTTCTGACAGCCATGA
AGACAGACGGAGCCACTGTGAAGGCGCAGGTCTCAGTCCCCTGGTCTCTGGCACCCTGTGACAGACAGG
GCCTTTGCCGACCCCTGGTGAGTGGCGGAACCATCTTGGCAACAGTCCCACTGGTCGTAGATGCGGAGAAG
CTGCCTATCAACCGGCTCGCAGCTGGCAGCAAGGCCCGGCCCTCTGCCAGAGCCGTGGAGAGAAGCGCA
CAGCCCACAAGCCATTGAGAAGCGTACCGCTCCTCCATCAATGACAAAATCATTGAGCTCAAGGATCT
GGTGGTGGGCACTGAGGCAAAGCTGAATAAATCTGCTGTCTTGCGCAAGGCCATCGACTACATTCGCTTT
CTGCAACACAGCAACCAGAACTCAAGCAGGAGAACCTAAGTCTGCGCACTGCTGTCCACAAAAGCAAAT
CTCTGAAGGATCTGGTGTGGCCCTGTGGCAGTGGAGGGAACACAGACGTGCTCATGGAGGGCGTGAAGAC
TGAGGTGGAGGACACACTGACCCACCCCTCGGATGCTGGCTCACCTTTCAGAGCAGCCCTTGTCC
CTTGGCAGCAGGGCAGTGGCAGCGGTGGCAGTGGCAGTACTCGGAGCCTGACAGCCAGTCTTTGAGG
ACAGCAAGGCAAAGCCAGAGCAGCGCCGTCTCTGCACAGCCGGGCATGCTGGACCGCTCCCGCTGGC
CCTGTGCACGCTCGTCTTCTGCTGTCTGCAACCCCTTGGCCTCCTTGTGGGGCCCGGGGGCTT
CCCAGCCCTCAGATACCACAGCGTCTACCATAGCCCTGGGCGCAACGTGCTGGGCACCCGAGAGCAGAG
ATGGCCCTGGCTGGGCCAGTGGTGTCTGCCCCAGTGGTCTGGCTGCTCAATGGGCTGTTGGTGTCTGT
CTCCTTGGTGTCTCTTTGTCTACGGTGAAGCAGTACACGGCCCACTCAGGCCCGCCGTGACTTTC
TGGAGGCATCGCAAGCAGGCTGACCTGGACCTGGCCCGGGGAGACTTTGCCAGGCTGCCAGCAGCTGT
GGCTGGCCCTGCGGGCACTGGGCCGGCCCTGCCACCTCCCACCTGGACCTGGCTTGTAGCCTCCTCTG
GAACCTCATCCGTACCTGCTGCAGCGTCTCTGGGTGGGCCGTGGCTGGCAGGCCGGCAGGGGGCTG
CAGCAGGACTGTGCTCTGCGAGTGGATGCTAGCGCCAGCGCCGAGACGCAGCCCTGGTCTACCATAAGC
TGCACCAGCTGCACACCATGGGGAAGCACACAGGCGGGCACCTCACTGCCACCAACCTGGCGCTGAGTGC
CCTGAACCTGGCAGAGTGTGCAGGGATGCCGTGTCTGTGGCGACGCTGGCCGAGATCTATGTGGCGGCT
GCATTGAGAGTGAAGACCAGTCTCCACGGGCTTGCATTTTCTGACACGCTTCTTCTGAGCAGTGCCC
GCCAGGCTGCCTGGCACAGAGTGGCTCAGTGCCTCCTGCCATGCAGTGGCTCTGCCACCCCGTGGGCCA
CCGTTTCTTCGTGGATGGGACTGGTCCGTGCTCAGTACCCCATGGGAGAGCCTGTACAGCTTGGCCGGG
AACCCAGTGGACCCCTGGCCAGGTGACTCAGCTATTCCGGGAACATCTCTTAGAGCGAGCACTGAACT
GTGTGACCCAGCCCAACCCAGCCCTGGGTCAGCTGATGGGACAAGGAATTCTCGGATGCCCTCGGGTA
CCTGCAGCTGCTGAACAGCTGTTCTGATGCTGCGGGGGCTCCTGCCTACAGCTTCTCCATCAGTTCCAGC
ATGGCCACCACCACCGGCTAGACCCGGTGGCCAAGTGGTGGCCCTCTCTGACAGCTGTGGTGTACTACT
GGCTGCGGCGGGATGAGGAGGCGGCTGAGCGGCTGTGCCGCTGGTGGAGCACCTGCCCGGGTGTGCA
GGAGTCTGAGAGACCCCTGCCAGGGCAGCTCTGCACTCCTCAAGGCTGCCCGGGCCCTGCTGGGCTGT
GCCAAGGCAGAGTCTGGTCCAGCCAGCCTGACCATCTGTGAGAAGGCCAGTGGGTACCTGCAGGACAGCC
TGGCTACCACACCAGCCAGCAGCTCCATTGACAAGGCCGTGCAGCTGTTCTGTGTGACCTGCTTCTTGT
GGTGCACACCAGCCTGTGGCGGCAGCAGCAGCCCCGGCCCCGCCCCAGCAGCCAGGGCACCCAGCAGC
AGGCCCCAGGCTTCCGCCCTTGGCTGCGTGGCTTCCAACGGGACCTGAGCAGCCTGAGGCGGCTGGCAC
AGAGCTTCCGGCCCGCCATGCGGAGGGTGTCTCTACATGAGGCCACGGCCCGGCTGATGGCGGGGGCCAG
CCCCACACGGACACACCAGCTCCTCGACCGCAGTCTGAGGCGGCGGGCAGGCCCGGTGGCAAAGGAGGC
GCGGTGGCGGAGCTGGAGCCGCGGCCACCGCGCGGGAGCACGCGGAGGCCCTTGTGCTGGCCTCCTGCT
ACCTGCCCCCGGCTTCTGTGCGCGCCCGGGCAGCGCGTGGCATGCTGGCTGAGGCGGCGGCACACT
CGAGAAGCTTGGGATCGCCGGCTGCTGCACGACTGTCAGCAGATGCTCATGCGCCTGGGCGGTGGGACC
ACTGTCACTTCCAGCTAGACCCCGTGTCCCCGGCCTCAGCACCCCTGTCTCTAGCCACTTTGGTCCCGTG
CAGCTTCTGTCTGCGTGAAGCTTTGAAGGCCGAAGGCAGTGAAGAGACTCTGGCCTCCACAGTTTGA
CCTGCGGCTGCTGTGTGCCCTTCGCGGTGAAGGCCCGAGGGCGCGATCTTACCCTAAGACCGGCGGCC
ATGATGGTGTGACCTCTGGTGGCCGATCGGGGCACTGCAGGGCCGAGCCATTTGGGGGGCCCCCTC
CTTGCTCTGCAGCACCTTAGTGGCTTTTTTCTCCTGTGTACAGGGAAGAGAGGGGTACATTTCCCTGT
GCTGACGGAAGCCAACTTGGCTTCCCGGACTGCAAGCAGGGCTCTGCCCCAGAGGCCCTCTCTCCGTC

10

20

30

40

50

GTGGGAGAGAGACGTGTACATAGTGTAGGTCAGCGTGCTTAGCCTCCTGACCTGAGGCTCCTGTGCTACT
 TTGCCTTTTGCAAACTTTATTTTCATAGATTGAGAAGTTTTGTACAGAGAATTAATAAATGAAATTATTTA
 TAATCTGGGTTTTGTGTCTTCAGCTGATGGATGTGCTGACTAGTGAGAGTGCTTGGGCCCTCCCCAGCA
 CCTAGGGAAAGGCTTCCCCTCCCCCTCCGGCCACAAGGTACACAACCTTTAACTTAGCTCTTCCCGATGT
 TTGTTTGTAGTGGGAGGAGTGGGGAGGGCTGGCTGTATGGCTCCAGCCTACCTGTTCCCCTGCTCCC
 AGGGCACATGGTTGGGCTGTGTCAACCCTTAGGGCTCCATGGGGTCAGTTGTCCCTTCTCACCTCCCAG
 CTCTGTCCCATCAGGTCCCTGGGTGGCAGGGAGGATGGACTGACTTCCAGGACCTGTTGTGTGACAGG
 AGCTACAGCTTGGGTCTCCCTGCAAGAAGTCTGGCACGTCTCACCTCCCCATCCCGGCCCTGGTCATC
 TCACAGCAAAGAAGCCTCCTCCCTCCCGACCTGCCGCCACACTGGAGAGGGGGCACAGGGGGGGGGAGG
 TTTCTGTTCTGTGAAAGGCCGACTCCCTGACTCCATTCATGCCCCCCCCCAGCCCTCCCTTCATTC
 CCATTCCCAACCTAAAGCCTGGCCCGGCTCCAGCTGAATCTGGTCGGAATCCACGGGCTGCAGATTTT
 CAAAACAATCGTTGTATCTTTATTGACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGAATGCAATGACTGTTTTTTAC
 TCTTAAGGAAAATAAACATCTTTTAGAAACAAAAA (配列番号 2 9)

10

【 0 1 0 2 】

S R E B F 1 アイソフォーム b のアミノ酸配列 (G e n B a n k 受託番号 N P _ 0 0 4
 1 6 7 . 3) を、以下に提供する。

MDEPPFSEAALEQALGEPCLDAALLTDIEDMLQLINNQSDFPGLFDPYAGSGAGGTDSPASPDTSSPG
 SLSPPPATLSSSLEAFLSGPQAAPSPLSPQPAPTPLKMYSPMPAFSPGPGIKEESVPLSILQTPTPQPL
 PGALLPQSFAPAPPQFSSTPVLGYSPPPGGFSTGSPGNTQQPLPGLPLASPPGVPPVSLHTQVQSVVP
 QQLLTVTAAPTAAPVTTTTSQIQQVPVLLQPHFIKADSLLLTAMKTDGATVKAAGLSPLVSGTTVQTGP
 LPTLVSGGTILATVPLVDAEKLPINRLAAGSKAPASAQSRGEKRTAHNAIEKRYRSSINDKIELKDLV
 VGTEAKLNKSAVLRKADYIRFLQHSNQKLKQENLSLRTAHVHKSLSKDLVSACGSGGNTDVLMEGVKTE
 VEDTLTPPPSDAGSPFQSSPLSLGSRGSGSGSDSEPDSPVFEFSKAKPEQRPSLSHRGMLDRSRLAL
 CTLVFLCLSCNPLASLLGARGLPSPDTSVYHSPGRNVLGTESRDGPGWAQWLLPPVWLLNGLLVLS
 LVLLFVYGEVTRPHSGPAVYFWRHRKQADLDLARGDFAQAAQQLWLALRALGRPLPTSHLDLACSLWN
 LIRHLLQRLWVGRWLAGRAGGLQQDCALRVDASASARDAALVYHKLHQLHTMGKHTGGHLTATNLALSAL
 NLAECAGDAVSVATLAEIYVAAALRVKTSLPRALHFLTRFFLSSARQACLAQSGSVPPAMQWLCHPVGHR
 FFVDGDWSVLSTPWESLYSLAGNPVDPLAQVTQLFREHLLERALNCVTQPNPSPGSADGDKFEFDALGYL
 QLLNSCSDAAGAPAYSFSISSMATTTGVDPAKWWASLTAVVIHWLRRDEEAERLCPLVEHLPRVLQE
 SERPLPRAALHSFKAARALLGCAKAESGPASLICEKASGYLQDSLATTPASSIDKAVQLFLCDLLLV
 RTSLWRQQPPAPAPAAQGTSSRPQASALELRGFQRDLSLRRLAQSFRPAMRRVFLHEATARLMAGASP
 TRTHQLLDRSLRRRAGPGGKGGVAELEPRPTRREHAEALLLASCYLPPGFLSAPGQRVGMLAEARTLE
 KLGDRLHDCQMLMRLGGGTTVTSS (配列番号 3 0)

20

30

【 0 1 0 3 】

S R E B F 1 アイソフォーム b の核酸配列、又はmRNA配列 (G e n B a n k 受託番
 号 N M _ 0 0 4 1 7 6 . 4) を、以下に提供する。

AGCAGAGCTGCGGCCGGGGAAACCGATTTCCGAGGAACTTTTGCGCGCGCCGGGCCCTCTGAGGCC
 AGGGCAGGACACGAACGCGCGGAGCGGGCGGCGACTGAGAGCCGGGGCCGGCGGCGCTCCCTAGGA
 AGGGCCGTACGAGGCGGGCCCGGGCGGCGCTCCCGGAGGAGCGGCTGCGCCATGGACGAGCCACCCT
 TCAGCGAGCGGCTTTGGAGCAGGCGCTGGGCGAGCCGTGCGATCTGACGCGGCGCTGCTGACCGACAT
 CGAAGACATGCTTCAGCTTATCAACAACCAAGACAGTACTTCCCTGGCCTATTTGACCCACCCTATGCT
 GGGAGTGGGGCAGGGGGCACAGACCCTGCCAGCCCCGATACCAGCTCCCCAGGCAGCTTGTCTCCACCTC
 CTGCCACATTGAGCTCCTCTCTTGAAGCCTTCTGAGCGGGCCGAGGCAGCGCCCTACCCCTGTCCCC
 TCCCCAGCTGCACCCACTCCATTGAAGATGTACCCGTCCATGCCGCTTTCTCCCCTGGGCTGGTATC
 AAGGAAGAGTCAGTGCCACTGAGCATCCTGCAGACCCCCACCCACAGCCCCTGCCAGGGGCCCTCCTGC
 CACAGAGCTTCCAGCCCCAGCCCCACCGCAGTTCAGCTCCACCCCTGTGTTAGGCTACCCAGCCCTCC
 GGGAGGCTTCTCTACAGGAAGCCCTCCCGGAACACCCAGCAGCCGCTGCCTGGCCTGCCACTGGCTTCC
 CCGCCAGGGTCCCGCCGTCTCCTTGACACCCAGGTCCAGAGTGTGGTCCCCAGCAGCTACTGACAG
 TCACAGTGCACCCACGGCAGCCCTGTAACGACCACTGTGACCTCGCAGATCCAGCAGGTCGGGTCCT
 GCTGCAGCCCCACTTCATCAAGGCAGACTCGCTGCTTCTGACAGCCATGAAGACAGACGGAGCCACTGTG

40

50

AAGGCGGCAGGTCTCAGTCCCCTGGTCTCTGGCACCCTGTGCAGACAGGGCCTTTGCCGACCCTGGTGA
 GTGGCGGAACCATCTTGGAACAGTCCCCTGGTCTGATAGTGCAGGAGAAGCTGCCTATCAACCGGCTCGC
 AGCTGGCAGCAAGGCCCGGCTCTGCCAGAGCCGTGGAGAGAAGCGCACAGCCCACAACGCCATTGAG
 AAGCGTACCGCTCCTCCATCAATGACAAAATCATTGAGCTCAAGGATCTGGTGGTGGGCACTGAGGCAA
 AGCTGAATAAATCTGCTGTCTTGCGCAAGGCCATCGACTACATTGCTTTTCTGCAACACAGCAACCAGAA
 ACTCAAGCAGGAGAACCTAAGTCTGCGCACTGCTGTCCACAAAAGCAAATCTCTGAAGGATCTGGTGTG
 GCCTGTGGCAGTGGAGGGAACACAGACGTGCTCATGGAGGGCGTGAAGACTGAGGTGGAGGACACACTGA
 CCCCACCCCTCGGATGCTGGCTCACCTTTCCAGAGCAGCCCTTGTCCCTTGGCAGCAGGGGCGAGTGG
 CAGCGGTGGCAGTGGCAGTACTCGGAGCCTGACAGCCAGTCTTTGAGGACAGCAAGGCAAAGCCAGAG
 CAGCGGCGTCTCTGCACAGCCGGGCGATGCTGGACCGCTCCCGCTGGCCCTGTGCACGCTCGTCTTCC
 TCTGCCTGTCTGCAACCCCTTGGCTCCTTGTGGGGGCCGGGGGCTTCCAGCCCTCAGATACCAC
 CAGCGTCTACCATAGCCCTGGGCGCAACGTGCTGGGACCGAGAGCAGAGATGGCCCTGGCTGGGCCAG
 TGGCTGCTGCCCCAGTGGTCTGGCTGCTCAATGGGCTGTTGGTGTCTCGTCTCCTTGGTGTCTCTTTG
 TCTACGGTGAGCCAGTACACGGCCCCACTCAGGCCCGCCGTGTACTTCTGGAGGCATCGCAAGCAGGC
 TGACCTGGACCTGGCCCGGGGAGACTTTGCCAGGCTGCCAGCAGCTGTGGCTGGCCCTGCGGGCACTG
 GGCCGGCCCTGCCACCTCCACCTGGACCTGGCTTGTAGCCTCCTCTGGAACCTCATCCGTCACCTGC
 TGCAGCGTCTCTGGGTGGCCGCTGGCTGGCAGGCCGGGAGGGGGCCTGCAGCAGGACTGTGCTCTGCG
 AGTGGATGCTAGCGCCAGCGCCGAGACGCAGCCCTGGTCTACCATAAGCTGCACCAGCTGCACACCATG
 GGAAGCACACAGGCGGGCACCTACTGCCACCAACCTGGCGTGTAGTGCCTGAACCTGGCAGAGTGTG
 CAGGGGATGCCGTGTCTGTGGCGACGCTGGCCGAGATCTATGTGGCGGCTGCATTGAGAGTGAAGACCAG
 TCTCCCAGGGCCTTGCATTTTCTGACACGCTTCTTCTGAGCAGTGCCCGCCAGGCCTGCCTGGCACAG
 AGTGGCTCAGTGCCTCCTGCCATGCAGTGGCTCTGCCACCCGTGGGCCACCGTTTCTTCGTGGATGGG
 ACTGGTCCGTGCTCAGTACCCATGGGAGAGCCTGTACAGCTTGGCCGGGAACCCAGTGGACCCCTGGC
 CCAGGTGACTCAGCTATTCCGGGAACATCTCTTAGAGCGAGCACTGAACTGTGTGACCAGCCCAACCCC
 AGCCCTGGGTGAGCTGATGGGGACAAGGAATTCTCGGATGCCCTCGGGTACCTGCAGCTGCTGAACAGCT
 GTTCTGATGCTGCGGGGGCTCCTGCCTACAGCTTCTCCATCAGTTCCAGCATGGCCACCACCACCGGCGT
 AGACCCGGTGGCCAAGTGGTGGCCCTCTCTGACAGCTGTGGTGATCCACTGGCTGCGGCGGGATGAGGAG
 GCGGCTGAGCGGCTGTGCCCGCTGGTGGAGCACCTGCCCGGGTGTGTCAGGAGTCTGAGAGACCCCTGC
 CCAGGGCAGCTCTGCACTCCTTCAAGGCTGCCCGGGCCCTGCTGGGCTGTGCCAAGGCAGAGTCTGGTCC
 AGCCAGCCTGACCATCTGTGAGAAGGCCAGTGGGTACCTGCAGGACAGCCTGGCTACCACACCAGCCAGC
 AGCTCCATTGACAAGGCCGTGCAGCTGTTCTGTGTGACCTGCTTCTTGTGGTGGCACCAGCCTGTGGC
 GGCAGCAGCAGCCCCGGCCCCGGCCCCAGCAGCCAGGGCACCAGCAGCAGGCCCCAGGCTTCCGCCCT
 TGAGCTGCGTGGCTTCCAACGGGACCTGAGCAGCCTGAGGCGGCTGGCACAGAGCTTCCGGCCCCGCATG
 CGGAGGGTGTCTACATGAGGCCACGGCCGGCTGATGGCGGGGGCCAGCCCCACACGGACACACCAGC
 TCCTCGACCGCAGTCTGAGGCGGGGGCAGGCCCGGTGGCAAAGGAGGCGGGTGGCGGAGCTGGAGCC
 GCGGCCACGCGGGGGAGCACGCGGAGGCCTTGTGCTGGCTCCTGCTACCTGCCCCCGGCTTCTGT
 TCGGCGCCCGGGCAGCGCGTGGGCATGCTGGCTGAGGCGGCGCGCACACTCGAGAAGCTTGGCGATCGCC
 GGCTGCTGCACGACTGTGAGCAGATGCTCATGCGCTGGGCGGTGGGACCACTGTCACTTCCAGCTAGAC
 CCCGTGTCCCCGGCTCAGCACCCCTGTCTCTAGCCACTTTGGTCCCGTGCAGCTTCTGTCTGCGTGA
 AGCTTTGAAGGCCGAAGGCAGTGAAGAGACTCTGGCCTCCACAGTTGACCTGCGGCTGCTGTGTGCT
 TCGCGGTGGAAGGCCCGAGGGGCGGATCTTGACCCTAAGACCGGCGGCCATGATGGTGTGACCTCTGG
 TGGCCGATCGGGGCACTGCAGGGGCGGACCATTTTGGGGGGCCCCCTCCTTGTCTGCAGGCACCTTA
 GTGGCTTTTTCTCCTGTGTACAGGAAGAGAGGGGTACATTTCCCTGTGCTGACGGAAGCCAACCTTGG
 CTTTCCCGGACTGCAAGCAGGGCTCTGCCCCAGAGCCCTCTCTCCGTGCTGGGAGAGAGAGCTGTACA
 TAGTGTAGTGCAGCGTGTAGCCTCCTGACCTGAGGCTCCTGTGCTACTTTGCCTTTTGCAAACCTTAT
 TTTATAGATTGAGAAGTTTTGTACAGAGAATTAATAATGAAATATTTATAATCTGGGTTTTGTGCTT
 CAGCTGATGGATGTGCTGACTAGTGAAGTGTGGGCCCTCCCCAGCACCTAGGGAAGGCTTCCCCT
 CCCCCTCGGCCACAAGGTACACAACTTTTAACTTAGCTTCCCGATGTTTGTGTTAGTGGGAGGAG
 TGGGAGGGGCTGGCTGTATGGCCTCCAGCCTACCTGTTCCCCCTGCTCCAGGGCACATGGTTGGGCTGT
 GTCAACCCTTAGGGCCTCCATGGGTCAGTTGTCCCTTCTCACCTCCAGCTCTGTCCCATCAGGTCCC

10

20

30

40

50

TGGGTGGCACGGGAGGATGGACTGACTTCCAGGACCTGTTGTGTGACAGGAGCTACAGCTTGGGTCTCCC
 TGCAAGAAGTCTGGCACGTCTCACCTCCCCATCCCCGGCCCCTGGTCATCTCACAGCAAAGAAGCCTCCT
 CCCTCCCGACTGCCGCCACTGGAGAGGGGGCACAGGGGCGGGGAGGTTTCTGTTCTGTGAAAGGC
 CGACTCCCTGACTCCATTATGCCCCCCCCCCAGCCCCCTCCCTTCAATCCCAATCCCAACCTAAAGCC
 TGGCCCCGCTCCAGCTGAATCTGGTCGGAATCCACGGGCTGCAGATTTTCAAACAATCGTTGTATCT
 TTATTGACTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGAATGCAATGACTGTTTTTTACTCTTAAGGAAAATAAACATC
 TTTTAGAAACAAAAA (配列番号 3 1)

【 0 1 0 4 】

S R E B F 1 アイソフォーム c の核酸配列、又は C D S (G e n B a n k 受託番号 N M
 _ 0 0 1 2 4 4 0 0 3) を、以下に提供する。

ATGGACGAGCTGCCTTTCGGTGAGGCGGCTGTGGAACAGGCGCTGGACGAGCTGGGCGAACTGGACGCCGCACTGCTGAC
 CGACATCCAAGACATGCTTCAGCTCATCAACAACCAAGACAGTACTTCCCTGGCCTGTTTGATTCCCCCTATGCAGGGG
 GCGGGGCAGGAGACACAGAGCCCACCAGCCCTGGTGCCAACTCTCCTGAGAGCTTGCTTCTCCTGCTTCCCTGGGTTCC
 TCTCTGGAAGCCTTCTGGGGAAACCAAGGCAACACCTGCATCCTTGTCCCCTGTGCCGTCTGCATCCACTGCTTTAAA
 GATGTACCCGTCTGTGCCCCCTTCTCCCTGGGCTGGAATCAAAGAAGAGCCAGTGCCACTCACCATCCTGCAGCCCC
 CAGCAGCACAGCCATCACCAGGGACCCTCCTGCCTCCGAGTTTCCCTCCACCACCCTGCAGCTCAGCCCCGGCTCCTGTG
 CTGGGGTATTCTAGCCTTCTTTCAGGCTTCTCAGGGACCCTTCTGGAAATACCCAACAGCCACCATCTAGCCTGTCACT
 GGCCTCTGCACCAGGAGTCTCGCCATCTCTTTACACACCCAGGTCCAGAGCTCAGCCTCCCAGCAGCCACTGCCAGCCT
 CAACAGCCCCTAGAACAACCACTGTGACCTCACAGATCCAGCGGGTCCCAGTCTGACTGCAGCCACATTTTCATCAAGGCA
 GATCACTGCTACTGACAACGTAAAAACAGATACAGGAGCCACGATGAAGACGGCTGGCATCAGTACCTTAGCCCTGG
 CACAGCCGTGCAGGCAGGCCCTTGCAGACCCTGGTGAGTGGTGGGACCATCCTGGCCACAGTACCATTGGTTGTGGATA
 CAGACAACTGCCATCCATCGACTGGCAGCTGGCAGCAAGGCCCTGGGCTCAGCTCAGAGCCGTGGTGAGAAGCGCACA
 GCCACAATGCCATTGAGAAGCGCTACCGTTCTCTATCAATGACAAGATTGTGGAGCTCAAAGACCTGGTGGTGGGCAC
 TGAGGCAAAGCTGAATAAATCTGCCGTCTTGCGAAGGCCATCGACTATATCCGTTCTTACAGCACAGCAACCAGAAGC
 TCAAGCAGGAGAACCTGGCCCTGCGAAATGCCGCTCACAAAAGCAAATCCCTGAAGGACCTGGTGTGCGCCTGTGGCAGT
 GCAGGAGGCACAGATGTGGCTATGGAGGGTGTGAAGCCTGAGTGGTGGATACGCTGACCCCTCCACCCTCAGACGCTGG
 CTCGCCCTCCAGAGTAGCCCTTGTCCCTCGGCAGCAGAGGTAGCAGCAGTGGTGGCAGTACTCGGAGCCTGCAGCC
 CAGTCTTTGAGGATAGCCAGGTGAAAGCCCAACGGCTGCACAGTCATGGCATGCTGGACCCTCCCGCCTAGCCCTGTGT
 GCGCTGGTCTTCTGTGTCTGACCTGCAACCCCTTGGCATCACTGTTTGGCTGGGGCATCCCCGGTCCCTCCAGTGCCTC
 TGGTGCACACCACAGCTCTGGCGTAGCATGCTGGAGGCCGAGAGCAGAGATGGCTCTAATTGGACCCAGTGGTTGCTGC
 CACCCCTAGTCTGGCTGGCCAATGGACTACTAGTGTGGCCTGCCTGGCTCTTCTCTTTGTCTATGGGGAACCTGTGACC
 CGGCCACACACTAGCCAGCTGTACACTTCTGGAGACATCGAAAACAGGCTGACCTGGACTTGGCTCGGGGAGATTTTGC
 CCAGGCTGCTCAGCAGCTGTGGCTGGCCCTGCAGGCATTGGGACGGCCCCTGCCACCTCGAACCTAGACTTGGCCTGCA
 GCCTGCTTTGGAACCTCATCCGCCACCTGCTGCAGCGTCTCTGGGTTGGCCGCTGGCTGGCAGGCCGGGCTGGGGCTTG
 CGGAGAGACTGTGGACTGAGAATGGATGCACGTGCCAGTGTCTCGAGATGCGGCTCTCGTCTACCATAAGCTGCACCAGCT
 GCATGCCATGGGCAAATACACAGGAGGGCACCTCATTGCTTCTAACCTGGCACTGAGTGCCCTGAACCTGGCCGAGTGCG
 CAGGAGATGCTGTATCCATGGCAACGCTGGCAGAGATCTATGTGGCTGCTGCCCTGAGGGTCAAGACCAGTCTCCCAAGA
 GCCTTGCACTTTTTGACACGTTTTCTTCTGAGTAGTGCCCGCCAGGCCTGCCTGGCACAGAGTGGCTCAGTGCCTCTTGC
 CATGCAGTGGCTCTGCCACCCTGTAGGCCACCGTTTTCTTCTGGATGGGGACTGGGCTGTGCATGGTGCCCCACAGGAGA
 GCCTGTACAGCGTGGCTGGGAACCCAGTGGATCCCTCGCCCAGGTGACTCGACTATTCTGCGAACATCTCTTGGAGAGA
 GCACTGAACTGTATTGCTCAACCCAGCCCGGGACAGCTGATGGAGACAGGGAGTTCTCTGACGCACTTGGATACCTGCA
 GTTGCTAAATCGCTGCTCTGATGCTGCGGACTCCTGCCTGCAGTTCTCTGTGAGCTCCAGCATGGCTTCCACCACCG
 GCACAGACCAGTGGCAAAGTGGTGGCCTCACTGACGGCTGTGGTATCCACTGGCTGCGGCGGGATGAAGAGGCAGCT
 GAGCGCTATACCCGCTGGTAGAGCGTATGCCCCACGTGCTGCAGGAGACTGAGAGACCCCTGCCAAAGGCAGCTCTGTA
 CTCTTCAAAGGCTGCCCGGGCTCTGCTGGACCACAGAAAAGTGGAGTCTGGCCAGCCAGCCTGGCCATCTGTGAGAAGG
 CCAGCGGGTACTTGGCGGACAGCTTAGCCGCTCCACCAACTGGCAGCTCCATTGACAAGGCCATGCAGCTGCTCCTGTGT
 GATCTACTTCTTGTGGCCCGCACTAGTATGTGGCAGCGCCAGCAGTACCAGCCTCAGCCAGGTAGCTCACAGTGCAG
 CAATGGATCTCAGGCCTCCGCTTTGGAGCTTTCGAGGTTTCAAACAGGACCTGAGCAGCCTGAGGCGCTTGGCACAGA
 AACTTCCGGCCTGCTATGAGGAGAGTGTCTTACACAGGGCCACAGCTCGGCTGATGGCAGGGGCAAGTCTGCCGGACAC
 CAGCTCCTGGACCGAAGTCTGCGGAGGCGGGCCGGCTCCAGTGCCAAAGGAGGCACTGTAGCTGAGCTGGAGCCTCGACC

10

20

30

40

50

CACATGGCGGGAGCACACAGAGGCCTTGCTGCTGGCCTCCTGCTATCTGCCACCTGCCTTCTGTGGCCCTGGACAGC
AAATGAGCATGTTGGCTGAGGCAGCACGCACTGTAGAGAAGCTTGGTGATCATCGGCTACTGCTTGGACTGCCAGCAGATG
CTTCTGCGCCTGGGCGGTGGGACCACTGTCACTTCCAGCTAA (配列番号 3 2)

【 0 1 0 5 】

S R E B F 1 アイソフォーム c の核酸配列、又は mRNA 配列 (G e n B a n k 受託番
号 N M _ 0 0 1 2 4 4 0 0 3) を、以下に提供する。

CTCCTGCGAAGCCTGGCGGGCGCCGCCCATGGACGAGCTGCCTTTCGGTGAGGCGGCTGTGGAACAGGCGCTGGACGA
GCTGGGCGAACTGGACGCCGCACTGCTGACCGACATCCAAGACATGCTTCAGCTCATCAACAACCAAGACAGTGACTTCC
CTGGCCTGTTTTGATTCCTCCCTATGCAGGGGGCGGGGAGGAGACACAGAGCCCACCAGCCCTGGTGCCAACCTCCTCTGAG
AGCTTGTCTTCTCCTGCTTCCCTGGGTTCTCTCTGGAAGCCTTCTGGGGGAACCAAGGCAACACCTGCATCCTTGTG
CCCTGTGCCGTCTGCATCCACTGCTTTAAAGATGTACCCGCTGTGCCCCCTTCTCCCTGGGCTGGAATCAAAGAAG
AGCCAGTGCCACTCACCATCCTGCAGCCCCAGCAGCACAGCCATCACCAGGGACCCTCCTGCCTCCGAGTTTCCCTCCA
CCACCCCTGCAGCTCAGCCCGGCTCCTGTGCTGGGGTATTCTAGCCTTCTTCAGGCTTCTCAGGGACCCTTCTGGAAA
TACCAACAGCCACCATCTAGCCTGTCACTGGCCTCTGCACCAGGAGTCTCGCCATCTCTTTACACACCCAGGTCCAGA
GCTCAGCCTCCAGCAGCCACTGCCAGCCTCAACAGCCCTAGAACAACCACTGTGACCTCACAGATCCAGCGGGTCCCA
GTCGTA CTGCAGCCACATTTTCATCAAGGCAGATTCACTGCTACTGACAACCTGTAAAAACAGATACAGGAGCCACGATGAA
GACGGCTGGCATCAGTACCTTAGCCCTGGCACAGCCGTGCAGGCAGGCCCTTGCAGACCCTGGTGAGTGGTGGGACCA
TCCTGGCCACAGTACCATTGGTTGTGGATACAGACAACTGCCCATCCATCGACTGGCAGCTGGCAGCAAGGCCCTGGGC
TCAGCTCAGAGCCGTGGTGAGAAGCGCACAGCCACAATGCCATTGAGAAGCGCTACCGTTCTCTATCAATGACAAGAT
TGTGGAGCTCAAAGACCTGGTGGTGGGCACTGAGGCAAAGCTGAATAAATCTGCCGCTTTCGCAAGGCCATCGACTATA
TCCGTTCTTACAGCACAGCAACCAGAAGCTCAAGCAGGAGAACCTGGCCCTGCGAAATGCCGCTCACAAAAGCAAATCC
CTGAAGGACCTGGTGTGGCCTGTGGCAGTGCAGGAGGCACAGATGTGGCTATGGAGGGTGTGAAGCCTGAGGTGGTGG
TACGCTGACCCCTCCACCCTCAGACGCTGGCTCGCCCTCCCAGAGTAGCCCTTGTCCCTCGGCAGCAGAGGTAGCAGCA
GTGGTGGCAGTGA CTGCGGAGCCTGACAGCCAGTCTTTGAGGATAGCCAGGTGAAAGCCCAACGGCTGCACAGTCATGGC
ATGCTGGACCGCTCCCGCTAGCCCTGTGTGCGCTGGTCTTCTGTGTCTGACCTGCAACCCCTTGGCATCACTGTTTTGG
CTGGGCATCCCCGGTCCCTCCAGTGCCTCTGGTGCACACCACAGCTCTGGGCGTAGCATGCTGGAGGCCGAGAGCAGAG
ATGGCTTAATTTGGACCCAGTGGTTGCTGCCACCCCTAGTCTGGCTGGCCAATGGACTACTAGTGTGGCCTGCCTGGCT
CTTCTCTTTGTCTATGGGGAACCTGTGACCCGGCCACACACTAGCCAGCTGTACACTTCTGGAGACATCGCAAACAGGC
TGACCTGGACTTGGCTCGGGGAGATTTTGGCCAGGCTGCTCAGCAGCTGTGGCTGGCCCTGCAGGCATTGGGACGGCCCC
TGCCACCTCGAACCTAGACTTGGCCTGCAGCCTGCTTTGGAACCTCATCCGCACCTGCTGCAGCGTCTCTGGGTTGGC
CGCTGGCTGGCAGGCCGGGCTGGGGCTTGGGAGAGACTGTGGACTGAGAATGGATGCACGTGCCAGTGTCTCGAGATGC
GGCTCTCGTCTACCATAAGCTGCACCAGCTGCATGCCATGGGCAAATACACAGGAGGGCACCTCATTGCTTCTAACCTGG
CACTGAGTGCCCTGAACCTGGCCGAGTGCAGGAGATGCTGTATCCATGGCAACGCTGGCAGAGATCTATGTGGCTGCT
GCCCTGAGGGTCAAAGACCAGTCTCCAAGAGCCTTGCACTTTTTGACACGTTTTCTTCTGAGTAGTGGCCGCCAGGCCTG
CCTGGCACAGAGTGGCTCAGTGCCTCTTGCATGCAGTGGCTCTGCCACCCTGTAGGCCACCGTTTTCTTCTGGATGGGG
ACTGGGCTGTGCATGGTGGCCACAGGAGAGCCTGTACAGCGTGGCTGGGAACCCAGTGGATCCCCTCGCCAGGTGACT
CGACTATTCTGCGAACATCTCTTGAGAGAGACTGAACTGTATTGCTCAACCCAGCCGGGGACAGCTGATGGAGACAG
GGAGTTCTCTGACGCACTTGGATACCTGCAGTTGCTAAATCGTCTGCTCTGATGCTGTGCGGACTCCTGCCTGCAGCTTCT
CTGTGAGCTCCAGCATGGCTTCCACCACCGGCACAGACCCAGTGGCCAAGTGGTGGGCTCACTGACGGCTGTGGTGTGATC
CACTGGCTGCGGCGGGATGAAGAGGCAGCTGAGCGCCTATACCCGCTGGTAGAGCGTATGCCCCACGTGCTGCAGGAGAC
TGAGAGACCCCTGCCAAGGCAGCTCTGTACTCCTTCAAGGCTGCCGGGCTCTGCTGGACCACAGAAAAGTGGAGTCTG
GCCAGCCAGCCTGGCCATCTGTGAGAAGGCCAGCGGTTACTTGGGGACAGCTTAGCCGCTCCACCAACTGGCAGCTCC
ATTGACAAGGCCATGCAGCTGCTCCTGTGTGATCTACTTCTTGTGGCCGCACTAGTATGTGGCAGCGCCAGCAGTCAAC
AGCCTCAGCCAGGTAGCTCACAGTGCCAGCAATGGATCTCAGGCCTCCGCTTTGGAGCTTTCAGAGTTTCCAACAGGACC
TGAGCAGCCTGAGGCGCTTGGCACAGAACTTCCGGCCTGCTATGAGGAGAGTGTTCCTACACGAGGCCACAGCTCGGCTG
ATGGCAGGGGCAAGTCTGCCCGGACACACCAGCTCCTGGACCGAAGTCTGCGGAGGCGGGCCGGCTCCAGTGGCAAAGG
AGGCACTGTAGCTGAGCTGGAGCCTCGACCCACATGGCGGGAGCACACAGAGGCCCTTGTGCTGGCCTCCTGCTATCTGC
CACCTGCCTTCTGTGCGCCCTGGACAGCAAATGAGCATGTTGGCTGAGGCAGCACGCACTGTAGAGAAGCTTGGTGTGAT
CATCGGCTACTGCTTGGACTGCCAGCAGATGCTTCTGCGCCTGGGCGGTGGGACCACTGTCACTTCCAGCTAAACCTTGG
TGGTCTCCCAGTATTAGAGGCCCTTAAGGACCTTTGTCACTGGCTGTGGTCTCCAGAGAGGGTGAGCCTGACAAGCAA

10

20

30

40

50

TCAGGATCATGCCGACCTCTAGTGACAAATCTAGAAATTGCAGAGGCTGCACTGGCCCAATGCCACCCTCTTGCTCTGTA
GGCACCTTTTTCTGTCTATGGAAGAAGCACTTTCCCCTAGCTGAGGGCCACCCTGTCTGAGGCTCTCACCCACTCT
GGAAGACTTGTATATAGTGTAGATCCAGCTGAGCCAGTTTCTGTGCAGGCTCATGTACTACTTTAACTTTTGCAAACCT
TATTTTCATAGTTGAGAAATTTGTACAGAAAATTAAGTAAATTATTATA (配列番号 3 3)

【 0 1 0 6 】

S R E B F 1 アイソフォーム c のアミノ酸配列 (G e n B a n k 受託番号 N M _ 0 0 1
2 4 4 0 0 3) を、以下に提供する。

MDELPGEEAAVEQALDELGELDAALLTDIQDMLQLINNQSDPFPLFDSPYAGGGAGDTEPTSPGANSPELSSPASLGS
SLEAFLGEPKATPASLSPVPSASTALKMYPVPPFSPGPGIKEEPVPLTLQPPAAQPSPGTLLPPSFPPPLQLSPAPV
LGYSSLPSPGFSGLPGNTQQPPSSLSLASAPGVSPISLHTQVQSSASQQPLPASTAPRTTIVTSQIQRVVVLQPHFIKA
DSLLLLTTVKTDGATMKTAGISTLAPGTAVQAGPLQTLVSGGTILATVPLVVDTKLPIHRLAAGSKALGSAQSRGEKRT
AHNAIEKRYRSSINDKIVELKDLVVGTEAKLNKSAVLRKADYIRFLQHSNQKLQENLALRNAAHKSKSLKDLVSACGS
AGGTDVAMEGVKPEVVDLTPPPSDAGSPSQSSPLSLGSRGSSSGSDSEPDSPVFEDSQVKAQRLHSHGMLDRSRLALC
ALVFLCLTCNPLASLFGWGI PGPSASGSAHSSGRSMLEAESRDGSNWTQWLLPPLVWLANGLLVLACLALLFVYGEPT
RPHTSPAVHFWHRKQADLDLARGDFAQAAQQLWLALQALGRPLPTSNLDLACSLWNLIRHLLQRLWVGRWLAGRAGGL
RRDCGLRMDARASARDAALVYHKLHQLHAMGKYTGHLIASNLALSALNLAECAGDAVSMATLAEIYVAAALRVKTSLPR
ALHFLTRFFLSSARQACLAQSGSVPLAMQWLCHPVGHRFFVDGDWAVHGAPQESLYSVAGNPVDPLAQVTRLFCEHLLER
ALNCIAQPSPGTADGDFSDALGYLQLLNRCSDAVGTPACFSVSSMASTTGTDPVAKWWWASLTAVVIHWLRRDEEAA
ERLYPLVERMPHVLETERPLPKAALYSFKAARALLDHRKVESGPASLAICEKASGYLRDSLAAAPTGSSIDKAMQLLLC
DLLLLVARTSMWQRQSPASQVAHSASNGSQASALELRGFQDLSLRLRAQNFRRPAMRRVFLHEATARLMAGASPARTH
QLLDRSLRRRAGSSGKGGTVAELEPRPTWREHTEALLASCYLPPAFLSAPGQQMSMLAEAAARTVEKLGDRHLLLDCCQM
LLRLGGTTVTSS (配列番号 3 4)

10

20

【 0 1 0 7 】

トランケーションされた S R E B F 1 アイソフォーム c の核酸配列、又は m R N A 配列
(G e n B a n k 受託番号 N M _ 0 0 1 2 4 4 0 0 3)、例えば S R E B 4 1 1 を、以下
に提供する。

atggacgagctgccttctcggtagggcgctgtggaacagggcctggacgagctggcggaactggacgccgactgctgac
cgacatccaagacatgcttcagctcatcaacaaccaagacagtgacttccctggcctgtttgattccccctatgcagggg
gcggggaggagacacagagcccaccagccctggcgcaactctcctgagagctgtcttctcctgcttccctgggttcc
tctctggaagccttctcgggggaaccaaggcaacacctgcatccttgtcccctgtgccgtctgcatccactgctttaa
gatgtaccgctctgtgcccccttctcccctgggctggaaatcaaagaagagccagtgccactcaccatcctgcagccc
cagcagcacagccatcaccaggaccctcctgcctccgagtttccctccaccaccctgcagctcagcccggctcctgtg
ctggggtattctagccttcttcaggcttctcaggacccttctggaaataccaacagccaccatctagcctgtcact
ggcctctgcaccaggagtctcgcccatctctttacacaccagggtccagagctcagcctcccagcagccactgccagcct
caacagcccctagaacaaccactgtgacctcacagatccagcgggtcccagctgtactgcagccacatttcatcaaggca
gattcacgtctactgacaactgtaaaaacagatacaggagccacgatgaagacggctggcatcagtaaccttagccccgg
cacagccgtgcaggcaggccccctgcagaccctggtagtggtgggacctcctggccacagtaccattggttgtggata
cagacaaactgcccatccatcgactggcagctggcagcaaggccctgggctcagctcagagccgtggtgagaagcgaca
gcccacaatgccattgagaagcgtaccgttctctatcaatgacaagattgtggagctcaaagacctggtggtgggac
tgaggcaaagctgaataaacttgccgtcttgcgcaaggccatcgactatatccgcttcttacagcacagcaaccagaagc
tcaagcaggagaacctggccctgcgaaatgccgctcacaaaagcaaatccctgaaggacctgggtgctcgccctgtggcag
gcaggaggcacagatgtggctatggagggtgtg (配列番号 3 5)

30

40

【 0 1 0 8 】

トランケーションされた S R E B F 1 アイソフォーム c のアミノ酸配列 (G e n B a n
k 受託番号 N M _ 0 0 1 2 4 4 0 0 3)、例えば S R E B 4 1 1 を、以下に提供する。

MDELPGEEAAVEQALDELGELDAALLTDIQDMLQLINNQSDPFPLFDSPYAGGGAGDTEPTSPGANSPELSSPASLGS
SLEAFLGEPKATPASLSPVPSASTALKMYPVPPFSPGPGIKEEPVPLTLQPPAAQPSPGTLLPPSFPPPLQLSPAPV
LGYSSLPSPGFSGLPGNTQQPPSSLSLASAPGVSPISLHTQVQSSASQQPLPASTAPRTTIVTSQIQRVVVLQPHFIKA
DSLLLLTTVKTDGATMKTAGISTLAPGTAVQAGPLQTLVSGGTILATVPLVVDTKLPIHRLAAGSKALGSAQSRGEKRT
AHNAIEKRYRSSINDKIVELKDLVVGTEAKLNKSAVLRKADYIRFLQHSNQKLQENLALRNAAHKSKSLKDLVSACGS

50

AGGTDVAMEGV (配列番号 36)

【0109】

一実施形態では、LMMは、SREBF1のアイソフォームのアミノ酸配列、例えば配列番号28、30、34若しくは36と、少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%の同一性；又は、SREBF1のアイソフォームのアミノ酸配列、例えば配列番号28、30、34若しくは36から、1、2若しくは3以上のアミノ酸残基で且つ50、40、30、20、15若しくは10以下のアミノ酸残基の差異を含む。

【0110】

一実施形態では、LMMは、SREBF1のアミノ酸配列、例えば配列番号34と、少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%の同一性；又は、SREBF1のアミノ酸配列、例えば配列番号34から、1、2若しくは3以上のアミノ酸残基で且つ50、40、30、20、15若しくは10以下のアミノ酸残基の差異を含む。

【0111】

別の実施形態では、LMMは、SREBF1又はそのアイソフォームの機能的断片、例えばトランケーションされたSREBF1を含む。一実施形態では、LMMは、SREBF1の機能的断片、例えば配列番号1若しくは34の機能的断片、又はSREBF1アイソフォーム、例えば配列番号28、30若しくは36の機能的断片を含む。一実施形態では、LMMは、SREBF1の機能的ドメイン、例えばSREBF1のトランス活性化ドメインを含む。一実施形態では、LMMは、SREBF1のヘリックス-ループ-ヘリックス(HLH)ドメインを含む。一実施形態では、LMMは、核に転位することが可能であり及び/又はSREBF1標的遺伝子の転写を開始することが可能である、SREBF1の機能的断片を含む。

【0112】

一実施形態では、LMMは、SREBF1のN末端410アミノ酸(本明細書でSREBF410とも呼ばれる)、例えば配列番号1のアミノ酸1~410を含む。SREBF1のN末端410アミノ酸のアミノ酸配列を、以下に提供する：

MDELAFGEAALEQTLAEMCELDTAVLNDIEDMLQLINNQSDSDFPLFDAPYAGGETGDTGPSSPGANSPEFSSASLASS
LEAFLGGPKVTPAPLSPPPSAPAALKMYPSPVSPFSPGPGIKEEPVPLTILQPAAPQPSPGTLLPPSFPAPPVQLSPAPVL
GYSSLPSGFSGLTPGNTQQPPSSLPLAPAPGVLPTPALHTQVQSLASQQPLPASAAPRTNTVTSQVQQVPVVLQPHFIKA
DSLLLLTAVKTDAGATVKTAGISTLAPGTAVQAGPLQTLVSGGTILATVPLVVDTDKLPILHRLAAGSKALGSAQSRGEKRT
AHNAIEKRYRSSINDKIVELKDLVVGTEAKLNKSAVLRKAIIDYIRFLQHSNQKQENLTLRSAHKSLSLKDLSVACGSG
GGTDVSMEGM (配列番号 26)

【0113】

一実施形態では、LMMは、SREBF1のN末端410アミノ酸のアミノ酸配列、例えば配列番号26と、少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、若しくは100%の同一性；又は、SREBF1のN末端410アミノ酸のアミノ酸配列、例えば配列番号26から、1、2若しくは3以上のアミノ酸残基で且つ50、40、30、20、15若しくは10以下のアミノ酸残基の差異を含む。

【0114】

別の実施形態では、LMMは、SREBF1のアミノ酸91~410、例えば配列番号1のアミノ酸91~410を含む。SREBF1の91~410位のアミノ酸のアミノ酸配列を、以下に提供する：

MPAPLSPPPSAPAALKMYPSPVSPFSPGPGIKEEPVPLTILQPAAPQPSPGTLLPPSFPAPPVQLSPAPVLGYSSLPSGFS
GTLPGNTQQPPSSLPLAPAPGVLPTPALHTQVQSLASQQPLPASAAPRTNTVTSQVQQVPVVLQPHFIKADSLTAVKTD
DAGATVKTAGISTLAPGTAVQAGPLQTLVSGGTILATVPLVVDTDKLPILHRLAAGSKALGSAQSRGEKRTAHNAIEKRYR
SSINDKIVELKDLVVGTEAKLNKSAVLRKAIIDYIRFLQHSNQKQENLTLRSAHKSLSLKDLSVACGSGGGTDVSMEGM
(配列番号 27)

10

20

30

40

50

【 0 1 1 5 】

一実施形態では、LMMは、SREBF1の91～410位のアミノ酸配列、例えば配列番号27と、少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、若しくは100%の同一性；又は、SREBF1の91～410位のアミノ酸配列、例えば配列番号27から、1、2若しくは3若以上のアミノ酸残基で且つ50、40、30、20、15若しくは10以下のアミノ酸残基の差異を含む。一実施形態では、LMMは、SREBF1又はその機能的断片をコードする、例えば、アミノ酸配列番号1又はその機能的断片をコードする核酸配列と、少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の同一性を含む。一実施形態では、LMMは、配列番号2の核酸と、少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の同一性を含む。

10

【 0 1 1 6 】

別の実施形態では、LMMは、SREBF2若しくはその機能的断片と、少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、若しくは100%の同一性；又は、SREBF2若しくはその機能的断片から、1、2若しくは3以上のアミノ酸残基で且つ50、40、30、20、15若しくは10以下のアミノ酸残基の差異を含む。

20

【 0 1 1 7 】

一実施形態では、LMMは酵素を含む。一実施形態では、LMMは、飽和脂肪酸を不飽和脂肪酸に変換する酵素を含む。一実施形態では、LMMは、飽和脂肪酸を一不飽和脂肪酸、例えば、1つの二重結合を有する脂肪酸に変換する酵素を含む。一実施形態では、LMMは、飽和脂肪酸を多価不飽和脂肪酸、例えば、1つを超える、例えば2、3、4、5、又はそれより多い二重結合を有する脂肪酸に変換する酵素を含む。一実施形態では、LMMは、ステアロイルCoAデサチュラーゼ1 (SCD1)、ステアロイルCoAデサチュラーゼ2 (SCD2)、ステアロイルCoAデサチュラーゼ3 (SCD3)、ステアロイルCoAデサチュラーゼ4 (SCD4)、ステアロイルCoAデサチュラーゼ5 (SCD5)、そのアイソフォーム又はその機能的断片を含む。

30

【 0 1 1 8 】

SCD1は、一不飽和脂肪酸(MUFA)への飽和脂肪酸(SFA)の変換の役割を担う、律速酵素である。その遺伝子の発現を、増加する細胞生存、増殖及び腫瘍形成特性に関連付ける研究のために、近年SCD1が益々注目されている(Angelucci, Maulucci等、2015)(Igal 2011)。SCD1は、細胞代謝速度制御及び全体的脂質生成の両方において鍵となる役割を演ずることも示された。後者は、主要な生合成経路調節因子アセチルCoAカルボキシラーゼ(ACC)との直接的相互作用、並びに、SFAはACCを阻害することが知られているので、脂質生合成を増加させる酵素機能を促進するMUFAへのSFAの変換を通して制御される(Igal 2010)。SCD1の主な調節は、転写活性化を通すものであり、それによって、SREBF1などの転写因子は遺伝子のプロモーター領域中のSRE配列に結合する。SCD1は、膜一体化タンパク質としてERに内因的に位置し、ここで、SCD1はMUFAへのSFAの変換を触媒するその酵素機能を実行する。MUFAへのSFAの変換(例えば、MUFAのSFAに対する比の上方制御)におけるその役割は、脂質ラフトドメインの減少を調節することができ、それは膜流動性の増加を次にもたらすことができる。膜流動性及び膜脂質組成におけるこの変化は、小胞形成、したがって細胞情報交換及びERのサイズ又は形態(例えば、ER拡張)との関連性を有することもできる。SCD1遺伝子のノックダウンは、折り畳まれてないタンパク質の応答を上方制御することも示されている(Ariyama, Kono等、2010)。さらに、SCD1は、次に、ACCの強力な負の調節因子である細胞パルミチン酸を負に調節する。SCD1はAMP活性化プロテインキナーゼ(AMPK)のリン酸化状態も制御し、結果として、脂質合成過程における律速酵素A

40

50

CCをリン酸化し、したがって阻害するその能力を低減する。最後に、SFAの不飽和化は、細胞死を引き起こすことができるその蓄積を防止する。このように、SCD1のモジュレーションは、増加する脂質生合成、細胞生存及び増殖速度をもたらす。(Hagen, Rodriguez-Cuencas等)、(Scaglia, Chisholm等、2009)。

【0119】

一実施形態では、LMMはSCD1を含む。SCD1のアミノ酸配列を、以下に提供する：

MPAHMLQEISSYTTTTTITAPPSGNEREKVKTVPLHLEEDIRPEMKEDIHDPTYQDEEGPPPKLEYVWRNIILMVLLHLGGLYGIILVPSCKLYTCLFGIFYMTSALGITAGAHRLWSHRTYKARLPLRIFLIANTMAFQNDVYEWARHRAHHKFSETHADPHNSRRGFFFSHVGWLLVRKHPAVKEKGGKLDMSDLKAEKLVMFQRRYYKPGLLLMCFILPTLVWPYCWGETFVNSLFVSTFLRYTLVLNATWLVNSAAHLYGYRKYDKNIQSRENIIVSLGAVGEGFHNYHHTFPFDYSASEYRWHINFTTFFIDCMAALGLAYDRKKVSKATVLARIKRTGDGSHKSS(配列番号3)

10

【0120】

SCD1のヌクレオチド配列を、以下に提供する：

atgccggccacatgctccaagagatctccagttcttacacgaccaccaccaccatcactgcacctccctccggaatgacgagagaaggtgaagacggtgccctccacctggaagaagacatccgtcctgaaatgaaagaagatatcaccgaccccaacctatcaggatgaggaggacccccgcccaagctggagtacgtctggaggaacatcatctcatggctcctgctgcacttggaggcctgtacgggatcatactggttccctcctgcaagctctacacctgcctcttcgggatcttctactacatgaccagcgctctgggcatcacagccggggtcatcgctctggagccacagaacttacaaggcacggctgccctgcggatcttcccttatcatgccaacacccatggcgttccagaatgacgtgtacgaatgggcccagatcaccgcgccaccacaagttctcagaaacacacgccgacctcacaattcccgcctggcttcttctctcacgtgggtggctgctgtgcgcaaacacccggctgtcaaagagaagggcggaactggacatgtctgacctgaaagccgagaagctggatgttccagaggaggactacaagcccggcctcctgctgattgcttcatcctgccacgctgggcccctggctgctggggcgagactttgtgaaacagcctgttcgttagcacctcttgcgatacactctgggtgctcaacgccacctggctggatgaacagtgccgcgcatctctatggatatcgcccctacgacaagaacatccaatcccgggagaatatcctggtttccctgggtgccgtgggagggcttccacaactaccaccacaccttccccttcgactactctgccagtgagtaccgctggcacatcaacttaccacgttcttcatcgactgcatggctgccctgggctggcttacgaccggaagaagtttctaaggctactgtcttagccaggattaagagaactggagacgggagtcacaagagtagctga

20

(配列番号4)

30

【0121】

一実施形態では、LMMは、SCD1のアミノ酸配列、例えば配列番号3と、少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、若しくは100%の同一性；又は、SCD1のアミノ酸配列、例えば配列番号3から、1、2、若しくは3以上のアミノ酸残基で且つ50、40、30、20、15若しくは10以下のアミノ酸残基の差異を含む。一実施形態では、LMMは、SCD1の機能的断片、例えば、配列番号3の機能的断片を含む。

【0122】

一実施形態では、LMMは、SCD1又はその機能的断片をコードする、例えば、アミノ酸配列番号3又はその機能的断片をコードする核酸配列と、少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の同一性を含む。一実施形態では、LMMは、配列番号4の核酸と、少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の同一性を含む。

40

【0123】

別の実施形態では、LMMは、SCD2、SCD3、SCD4、SCD5若しくはその機能的断片のアミノ酸配列と、少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、若しくは100%の同一性；又は、SCD2、SCD3、SCD4、SCD5、若しくはその機能的

50

断片のアミノ酸配列から、1、2、若しくは3以上のアミノ酸残基で且つ50、40、30、20、15若しくは10以下のアミノ酸残基の差異を含む。別の実施形態では、LMMは、少なくとも含む。

【0124】

別の実施形態では、LMMは、SCD1、SCD2、SCD3、SCD4又はSCD5の機能的断片、例えば、トランケーションされたSCD1、SCD2、SCD3、SCD4又はSCD5を含む。一実施形態では、LMMは、SCD1、SCD2、SCD3、SCD4又はSCD5の機能的断片、例えば、配列番号3の機能的断片を含む。一実施形態では、LMMは、SCD1、SCD2、SCD3、SCD4又はSCD5の機能的ドメイン、例えば、飽和脂肪酸を一不飽和脂肪酸に変換する酵素活性を有するドメインを含む。

10

【0125】

2つ以上のアミノ酸又は核酸配列との関連でパーセント同一性とは、同じである2つ以上の配列を指す。2つの配列が同じであるアミノ酸残基又はヌクレオチドの指定された百分率（例えば、以下の配列比較アルゴリズムの1つを使用して測定して又は手動アラインメント及び目視検査によって測定して、比較ウィンドウ又は指定領域にわたる最大対応について比較し整理させたとき、指定された領域にわたって又は指定されていないときは全体の配列にわたって、60%の同一性、任意選択で70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%の同一性）を有するならば、2つの配列は「実質的に同一である」。一部の実施形態では、アラインメントはギャップ又は挿入配列をもたらすことができ、そこでは、ギャップ若しくは挿入配列に隣接している指定された領域のために配列類似性を判定することができるか、又はギャップ若しくは挿入配列を含む領域にわたって配列類似性を判定することができる。任意選択で、同一性は、長さが少なくとも約50のアミノ酸又はヌクレオチド、100のアミノ酸又はヌクレオチド、150のアミノ酸又はヌクレオチドである領域にわたって存在する。より好ましくは、同一性は、長さが約200以上のアミノ酸若しくはヌクレオチド、又は約500若しくは1000以上のアミノ酸若しくはヌクレオチドである領域にわたって存在する。

20

【0126】

配列比較のために、一般的に1つの配列が参照配列としての働きをし、それに対して1つ又は複数の試験配列が比較される。配列比較アルゴリズムを使用する場合、試験及び参照配列がコンピュータに入力され、必要に応じて部分配列座標が指定され、配列アルゴリズムプログラムパラメータが指定される。デフォルトプログラムパラメータを使用することができ、又は代替パラメータを指定してもよい。次いで、配列比較アルゴリズムは、プログラムパラメータに基づいて参照配列と比較した試験配列のパーセント配列同一性を次に計算する。比較のための配列のアラインメント方法は、当技術分野で周知である。比較のための配列の最適なアラインメントは、例えば、Smith and Waterman、(1970) Adv. Appl. Math. 2: 482cのローカルホモロジーアルゴリズムによって、Needleman及びWunsch、(1970) J. Mol. Biol. 48: 443ページの相同性アラインメントアルゴリズムによって、Pearson及びLipman、(1988) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85: 2444ページの類似性検索方法によって、これらのアルゴリズム(Wisconsin Genetics Software Package、Genetics Computer Group、575 Science Dr., Madison, WI、の中のGAP、BESTFIT、FASTA及びTFASTA)のコンピュータ化された実行によって、又は、手動アラインメント及び目視検査（例えば、Brent等、(2003) 分子生物学における現在のプロトコル(Current Protocols in Molecular Biologyを参照)）によって実行することができる。ClustalW、Clustal Omega、及びMAFFTなどのアルゴリズムによって、複数の配列アラインメントを実行することができる。2つ以上の配列の間の

30

40

50

関係を比較するための他のアルゴリズムには、ヒドンマルコフモデルが含まれる。ヒドンマルコフモデルは、別の後に特定のヌクレオチド（又は、アミノ酸）タイプを有する確率（隠されている確率経路）を記載するモデルである。それは、実際には確率論のモデルであって、アルゴリズムではない。アルゴリズム（又は、アルゴリズムを実行するプログラム）の例は、HMMER (<http://hmmer.org/>) であり得る。

【0127】

パーセント配列同一性及び配列類似性を判定するのに適するアルゴリズムの2つの例は、BLAST及びBLAST 2.0アルゴリズムであり、それらは、Altschul等(1977) *Nuc. Acids Res.* 25:3389~3402ページ；及びAltschul等、(1990) *J. Mol. Biol.* 215:403~410ページにそれぞれ記載される。BLAST分析を実施するためのソフトウェアは、National Center for Biotechnology Information (NCBI) を通して公開されている。

10

【0128】

生成物

高収率の生成物及び/又は向上した生成物品質を生成することが可能な細胞又は無細胞発現系を工学操作するか又は作製するための方法及び組成物が本明細書で提供される。本明細書に記載される生成物には、ポリペプチド、例えば、組換えタンパク質；核酸分子、例えば、DNA若しくはRNA分子；多量体のタンパク質若しくは複合体；脂質封入粒子、例えばウイルス様粒子、小胞若しくはエクソソーム；又は他の分子、例えば脂質が含まれる。一実施形態では、生成物は、ポリペプチド、例えば組換えポリペプチドである。一実施形態では、生成物はエクソソームである。例えば、組換えポリペプチドは、発現困難なタンパク質、又は、複合及び/若しくは非天然の構造を有するタンパク質、例えば次世代生物製剤、例えば、二重特異的抗体分子、融合タンパク質若しくはグリコシル化タンパク質であってよい。

20

【0129】

実施形態では、本明細書に記載される方法又は組成物によって生成される細胞又は細胞系は、医学的な状態、障害又は疾患の処置に有益である生成物、例えば、組換えポリペプチドを生成する。医学的な状態、障害又は疾患の例には、限定されるものではないが、代謝性の疾患又は障害（例えば、代謝性酵素欠乏症）、内分泌障害（例えば、ホルモン欠乏症）、止血の調節不全、血栓症、造血障害、肺障害、胃腸障害、自己免疫性疾患、免疫調節不全（例えば、免疫欠損）、不妊症、移植、がん及び感染性の疾患が含まれる。

30

【0130】

実施形態では、生成物は、外因性タンパク質、例えば、細胞によって天然に発現されないタンパク質である。一実施形態では、タンパク質は1つの種に由来するが、細胞は様々な種に由来する。別の実施形態では、タンパク質は、天然に存在しないタンパク質である。

【0131】

他の実施形態では、生成物は、細胞によって内因的に発現されるタンパク質である。一実施形態では、生成物は、細胞によって内因性又は天然のレベルで内因的に発現されるタンパク質である。本明細書に記載される本方法及び組成物は、内因性生成物、例えば、細胞によって天然に生成される天然に存在する生成物の生成及び品質を増加させるために使用される。別の実施形態では、生成物、例えばタンパク質をコードする外因性核酸は、細胞に導入され、発現される。別の実施形態では、細胞によって内因的に発現される生成物の発現を増加させる外因性核酸が細胞に導入される。例として、外因性核酸は、細胞の内因性生成物の発現を制御するプロモーター（例えば、SRFプロモーター配列、例えば、転写因子Ap-1はCHO細胞においてサル20-ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼプロモーター活性を調節するを参照 (*The transcription factor Ap-1 regulates monkey 20-hydroxysteroid dehydrogenase promoter activity in*

40

50

CHO cells)。Nanjidsuren T、Min KS。BMC Biotechnol. 2014 Jul 30; 14: 71 ページ。doi: 10.1186/1472-6750-14-71。PMID: 25073972 を参照) を活性化する配列を含む。

【0132】

組換え生成物は、例えば薬物スクリーニングのために有益である、治療用生成物又は診断用生成物であってよい。治療用又は診断用の生成物には、限定されるものではないが、抗体分子、例えば抗体若しくは抗体断片、融合タンパク質、ホルモン、サイトカイン、増殖因子、酵素、糖タンパク質、リポタンパク質、リポータータンパク質、治療ペプチド、或いはこれらのいずれかの構造的及び/若しくは機能的断片又は混成物を含めることができる。他の実施形態では、治療用又は診断用の生成物は、合成ポリペプチドである、例えば、ここで、全体のポリペプチド又はその部分は、いずれの天然に存在するポリペプチド、例えば上記の天然に存在するポリペプチドに由来しないか、又はそれと任意の配列若しくは構造類似性を有する。

10

【0133】

一実施形態では、組換え生成物は、抗体分子である。一実施形態では、組換え生成物は、治療用抗体分子である。別の実施形態では、組換え生成物は、診断用の抗体分子、例えば、画像化技術又は診断検査のために有益なモノクローナル抗体である。

【0134】

本明細書で用いる抗体分子は、抗原と特異的に結合する免疫グロブリン分子に由来する、タンパク質又はポリペプチド配列である。一実施形態では、抗体分子は、完全長抗体又は抗体断片である。抗体及びマルチフォーマットタンパク質は、ポリクローナル若しくはモノクローナル、多重若しくは単一の鎖、又はインタクトな免疫グロブリンであってよく、天然の供給源又は組換え供給源に由来することができる。抗体は、免疫グロブリン分子のテトラマーであってよい。一実施形態では、抗体は、モノクローナル抗体である。抗体は、ヒトの又はヒト化抗体であってよい。一実施形態では、抗体は、IgA、IgG、IgD又はIgE抗体である。一実施形態では、抗体は、IgG1、IgG2、IgG3又はIgG4抗体である。

20

【0135】

「抗体断片」は、インタクトな抗体又はその組換えバリエーションの少なくとも1つの部分を指し、抗原結合性ドメイン、例えば、抗原などの標的への抗体断片の認識及び特異的結合性を付与するのに十分である、インタクトな抗体の抗原性判定可変領域を指す。抗体断片の例には、限定されるものではないが、Fab、Fab'、F(ab')₂及びFv断片、scFv抗体断片、直鎖状抗体、単ドメイン抗体、例えばsdAb (VL又はVH)、ラクダのVHHドメイン、並びに、ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって連結された2つのFab断片を含む二価の断片、及び単離したCDR又は抗体の他のエピトープ結合性断片などの抗体断片から形成される多重特異的抗体が含まれる。抗原結合性断片は、単ドメイン抗体、マキシボディ、ミニボディ、ナノボディ、イントラボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、v-NAR及びビス-scFvに組み込むこともできる(例えば、Hollinger及びHudson、Nature Biotechnology 23: 1126~1136 ページ、2005を参照)。抗原結合性断片は、フィブロネクチンIII型(Fn3)などのポリペプチドに基づく足場に接ぐこともできる(フィブロネクチンポリペプチドミニボディを記載する、米国特許第6,703,199号を参照)。

30

40

【0136】

本明細書に記載される方法を用いて生成することができる例示的な組換え生成物には、限定されるものではないが、下の表に提供されるものが含まれる。

【表 2 - 1】

表 2. 例示的な組換え生成物

治療用 タンパク質 タイプ	治療薬	商標名	
ホルモン	エリスロポイエチン、エポエイン- α ダーベポエチン- α	Epogen, Procrit Aranesp	10
	インスリン 成長ホルモン(GH)、 ソマトロピン	Humulin, Novolin Genotropin , Humatrope, Norditropin, NovIVitropin, Nutropin, Omnitrope, Protropin, Siazan, Serostim, Valtropin	
ホルモン	ヒト濾胞刺激ホルモン(FSH) ヒト絨毛ゴナドトロピン ルトロピン- α グルカゴン 成長ホルモン放出ホルモン(GHRH) セクレチン	Gonal-F, Follistim Ovidrel Luveris GlucaGen	20
	甲状腺刺激ホルモン(TSH)、 チロトロピン	Geref ChiRhoStim (human peptide), SecreFlo (porcine peptide) Thyrogen	
血液凝固/ 凝固因子	第 VIIa 因子 第 VIII 因子	NovoSeven Bioclote, Helixate, Kogenate, Recombinante, ReFacto	30
	第 IX 因子 抗トロンピン III(AT-III) プロテイン C 濃縮物	Benefix Thrombate III Ceprotin	
サイトカイン/ 増殖因子	I 型アルファインターフェロン インターフェロン- α n3(IFN α n3) インターフェロン- β 1a(rIFN- β) インターフェロン- β 1b(rIFN- β) インターフェロン- γ 1b(IFN γ) アルデスロイキン(インターロイキン 2(IL2)、表皮 thymocyte 活性化因子; ETAF パリフェルミン(ケラチノサイト増殖因子; KGF) ベカプレミン(血小板由来増殖因子; PDGF) アナキンラ(組換え IL1 アンタゴニスト)	Infergen Alferon N Avonex, Rebif Betaseron Actimmune Proleukin Kepivance RegranexAnril, Kineret	40

【表 2 - 2】

抗体分子	ベバシズマブ(VEGFA mAb) セツキシマブ(EGFR mAb) パニツムマブ(EGFR mAb) アレムツズマブ(CD52 mAb) リツキシマブ(CD20 キメラ Ab) トラスツズマブ(HER2/Neu mAb) アバタセプト(CTLA Ab/Fc 融合) アダリムマブ(TNF α mAb) インフリキシマブ(TNF α キメラ mAb) アレファセプト(CD2 融合タンパク質) エファリズマブ(CD11a mAb) ナタリズマブ(インテグリン α 4 サブ ユニット mAb) エクリズマブ(C5mAb) ムロモナブ-CD3	Avastin Erbitux Vectibix Campath Rituxan Herceptin Orencia Humira Remicade Amevive Raptiva Tysabri Soliris Orthoclone, OKT3	10
他: 融合タンパク質/ タンパク質 ワクチン/ ペプチド	B 型肝炎表面抗原(HBsAg) HPV ワクチン OspA 抗アカゲザル(Rh)免疫グロブリン G エンフュービルタイト クモの糸、例えばフィブリオン エタナーセプト(TNF 受容体/Fc 融合) セルグツズマブ アムナロイキン	Engerix, Recombivax HB Gardasil LYMERix Rhophylac Fuzeon QMONOS Enbrel	20

【表 3 - 1】

表 3. さらなる例示的な組換え生成物:二重特異的フォーマット

名称 (他の名称、 スポンサー組織)	BsAb フォーマット	標的	提案された 作用機構	開発段階	疾患(又は、 健康なボラ ンティア)
カツマキソマブ (Removab(登録商標), Fresenius Biotech, Trion Pharma, Neopharm)	BsIgG: トリオマブ	CD3, EpCAM	腫瘍への T細胞の 再標的化、 Fc 媒介 エフェクター 機能	EU で承認	EpCAM 陽性腫瘍に おける悪性 の腹水
エルツマキソマ (Neovii Biotech, Fresenius Biotech)	BsIgG: トリオマブ	CD3, HER2	腫瘍への T細胞の 再標的化	フェーズ I/II	進行した固 形腫瘍
ブリナツモマブ (Blincyto(登録商標), AMG 103, MT 103, MEDI 538, Amgen)	BiTE	CD3, CD19	腫瘍への T細胞の 再標的化	USA で承認 フェーズ II 及び III フェーズ II フェーズ I	前駆体 B細胞 ALL ALL DLBCL NHL
REGN1979 (Regeneron)	BsAb	CD3, CD20			
ソリトマブ (AMG 110, MT110, Amgen)	BiTE	CD3, EpCAM	腫瘍への T細胞の 再標的化	フェーズ I	固形腫瘍
MEDI 565 (AMG 211, MedImmune, Amgen)	BiTE	CD3, CEA	腫瘍への T細胞の 再標的化	フェーズ I	胃腸腺癌
RO6958688 (Roche)	BsAb	CD3, CEA			
BAY2010112 (AMG 212, Bayer; Amgen)	BiTE	CD3, PSMA	腫瘍への T細胞の 再標的化	フェーズ I	前立腺がん

10

20

30

40

【表 3 - 2】

名称 (他の名称、 スポンサー組織)	BsAb フォーマット	標的	提案された 作用機構	開発段階	疾患(又は、 健康なボラ ンティア)
MGD006 (Macrogenics)	DART	CD3, CD123	腫瘍への T 細胞の 再標的化	フェーズ I	AML
MGD007 (Macrogenics)	DART	CD3, gpA33	腫瘍への T 細胞の 再標的化	フェーズ I	結腸直腸 がん
MGD011 (Macrogenics)	DART	CD19, CD3			
SCORPION (Emergent Biosolutions, Trubion)	BsAb	CD3, CD19	腫瘍への T 細胞の 再標的化		
AFM11 (Affimed Therapeutics)	TandAb	CD3, CD19	腫瘍への T 細胞の 再標的化	フェーズ I	NHL 及び ALL
AFM12 (Affimed Therapeutics)	TandAb	CD19, CD16	腫瘍細胞へ の NK 細胞 の再標的化		
AFM13 (Affimed Therapeutics)	TandAb	CD30, CD16A	腫瘍細胞へ の NK 細胞 の再標的化	フェーズ II	ホジキン リンパ腫
GD2 (Barbara Ann Karmanos Cancer Institute)	BsAb を プレロード した T 細胞	CD3, GD2	腫瘍への T 細胞の 再標的化	フェーズ I/II	神経芽 細胞腫及び 骨肉腫
pGD2 (Barbara Ann Karmanos Cancer Institute)	BsAb を プレロード した T 細胞	CD3, Her2	腫瘍への T 細胞の 再標的化	フェーズ II	転移性 乳がん

10

20

30

【表 3 - 3】

名称 (他の名称、 スポンサー組織)	BsAb フォーマット	標的	提案された 作用機構	開発段階	疾患(又は、 健康なボラ ンティア)
EGFRBi 武装自己 活性化 T 細胞 (Roger Williams Medical Center)	BsAb を プレロード した T 細胞	CD3, EGFR	EGFR 陽性 腫瘍への 自己活性化 T 細胞	フェーズ I	肺及び他の 固形腫瘍
抗 EGFR 武装活性化 T 細胞 (Barbara Ann Karmanos Cancer Institute)	BsAb を プレロード した T 細胞	CD3, EGFR	EGFR 陽性 腫瘍への 自己活性化 T 細胞	フェーズ I	結腸及び 膵臓のがん
rM28 (University Hospital Tubingen)	タンデム scFv	CD28, MAPG	腫瘍への T 細胞の 再標的化	フェーズ II	転移性 メラノーマ
IMCgp100 (Immunocore)	ImmTAC	CD3、 ペプチド MHC	腫瘍への T 細胞の 再標的化	フェーズ I/II	転移性 メラノーマ
DT2219ARL (NCI, University of Minnesota)	ジフテリア 毒素に連結 された 2 つ の scFv	CD19, CD22	腫瘍への タンパク質 毒素の 標的化	フェーズ I	B 細胞 白血病又は リンパ腫
XmAb5871 (Xencor)	BsAb	CD19, CD32b			
NI-1701 (NovImmune)	BsAb	CD47, CD19			
MM-111 (Merrimack)	BsAb	ErbB2, ErbB3			
MM-141 (Merrimack)	BsAb	IGF-1R, ErbB3			
NA (Merus)	BsAb	HER2, HER3			
NA (Merus)	BsAb	CD3, CLEC12A			

10

20

30

40

【表 3 - 4】

名称 (他の名称、 スポンサー組織)	BsAb フォーマット	標的	提案された 作用機構	開発段階	疾患(又は、 健康なボラ ンティア)
NA (Merus)	BsAb	EGFR, HER3			
NA (Merus)	BsAb	PD1、 非開示			
NA (Merus)	BsAb	CD3、 非開示			
ヅリゴツズマブ (MEHD7945A, Genentech, Roche)	DAF	EGFR, HER3	2つの受容 体の遮断、 ADCC	フェーズ I 及び II フェーズ II	頭頸部がん 結腸直腸 がん
LY3164530 (Eli Lilly)	非開示	EGFR, MET	2つの受容 体の遮断	フェーズ I	進行した 又は転移性 のがん
MM-111 (Merrimack Pharmaceuticals)	HSA ボディ	HER2, HER3	2つの受容 体の遮断	フェーズ II フェーズ I	胃及び食道 がん 乳がん
MM-141, (Merrimack Pharmaceuticals)	IgG-scFv	IGF-1R, HER3	2つの受容 体の遮断 フェーズ I	フェーズ I	進行した 固形腫瘍
RG7221 (RO5520985, Roche)	CrossMab	Ang2, VEGF A	2つの血管 新生促進剤 の遮断	フェーズ I	固形腫瘍
RG7716 (Roche)	CrossMab	Ang2, VEGF A	2つの血管 新生促進剤 の遮断	フェーズ I	湿性の AMD
OMP-305B83 (OncoMed)	BsAb	DLL4/ VEGF			
TF2 (Immunomedics)	ドック及び ロック	CEA, HSG	PET 又は 放射性画像 化のための 腫瘍のプリア ターゲットイン グ	フェーズ II	結腸直腸、 乳房及び 肺のがん

10

20

30

40

【表 3 - 5】

名称 (他の名称、 スポンサー組織)	BsAb フォーマット	標的	提案された 作用機構	開発段階	疾患(又は、 健康なボラ ンティア)
ABT-981 (AbbVie)	DVD-Ig	IL-1 α , IL-1 β	2つの炎症 誘発性サイト カインの遮断	フェーズ II	変形性 関節炎
ABT-122 (AbbVie)	DVD-Ig	TNF, IL-17A	2つの炎症 誘発性サイト カインの遮断	フェーズ II	関節 リウマチ
COVA322	IgG- fynomer	TNF, IL17A	2つの炎症 誘発性 サイトカイン の遮断	フェーズ I/II	プラーク型 乾癬
SAR156597 (Sanofi)	四価の二重 特異的タン デム IgG	IL-13, IL-4	2つの炎症 誘発性 サイトカイン の遮断	フェーズ I	特発性 肺線維症
GSK2434735 (GSK)	二重標的化 ドメイン	IL-13, IL-4	2つの炎症 誘発性 サイトカイン の遮断 フェーズ I	フェーズ I	(健康な ボランティア)
オゾラリズマブ (ATN103, Ablynx)	ナノボディ	TNF, HSA	炎症誘発性 サイトカイン の遮断、HSA に結合して 半減期を 増加させる	フェーズ II	関節 リウマチ
ALX-0761 (Merck Serono, Ablynx)	ナノボディ	IL-17A/F, HSA	2つの炎症 誘発性 サイトカイン の遮断、HSA に結合して 半減期を 増加させる	フェーズ I	(健康な ボランティア)

10

20

30

40

【表 3 - 6】

名称 (他の名称、 スポンサー組織)	BsAb フォーマット	標的	提案された 作用機構	開発段階	疾患(又は、 健康なボラ ンティア)
ALX-0061 (AbbVie, Ablynx;	ナノボディ	IL-6R, HSA	炎症誘発性 サイトカイン の遮断、HSA に結合して 半減期を 増加させる	フェーズ I/II	関節 リウマチ
ALX-0141 (Ablynx, Eddingpharm)	ナノボディ	RANKL, HSA	骨再吸収の 遮断、HSA に結合して 半減期を 増加させる	フェーズ I	閉経後 骨減少
RG6013/ACE910 (Chugai, Roche)	ART-Ig	第 IXa 因子 、第 X 因子	血漿凝固	フェーズ II	血友病

10

20

【 0 1 3 7 】

一実施形態では、生成物は、表 2 又は 3 のポリペプチドから、1 以下、2 以下、3 以下、4 以下、5 以下、10 以下、15 以下、20 以下、25 以下、30 以下、35 以下、40 以下、45 以下又は 50 以下のアミノ酸残基で異なる。別の実施形態では、生成物は、表 2 又は 3 のポリペプチドから、そのアミノ酸残基の 1% 以下、2% 以下、3% 以下、4% 以下、5% 以下、6% 以下、7% 以下、8% 以下、9% 以下、10% 以下又は 15% 以下で異なる。

【 0 1 3 8 】

一実施形態では、生成物は、核酸分子、例えば DNA 若しくは RNA 分子、又はそのハイブリッドである。一実施形態では、生成物は、オリガミ核酸分子、例えばオリガミ DNA であり、ここで、核酸分子は所定の二次、三次又は四次構造を有する。一実施形態では、オリガミ核酸分子は、機能的活性を有する。一実施形態では、生成物は、脂質膜に封入されたオリガミ核酸分子を含む。一実施形態では、脂質膜は、それを生成した宿主細胞の細胞膜又は細胞膜の構成成分を含む。一実施形態では、脂質封入 DNA は、「覆い隠された DNA ナノデバイスはパイロット任務を生き延びる (Cloaked DNA nanodevices survive pilot mission)」、4月22日、2014年、Wyss Institute for Biologically Inspired Engineering at Harvard University website に記載の通りである。

30

【 0 1 3 9 】

他の組換え生成物は、非抗体足場又は代替タンパク質足場、例えば、限定されるものではないが、DARPin、アフィボディ及びアドネクチンを含む。

40

【 0 1 4 0 】

他の例示的な治療又は診断用のタンパク質には、限定されるものではないが、Leader 等、「タンパク質治療薬：概要及び薬理学的分類 (Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification)」、Nature Reviews Drug Discovery、2008、7: 21~39 ページの表 1~10、及び、Walsh、「バイオ医薬品ベンチマーク 2014 (Biopharmaceutical benchmarks 2014)」、Nature Biotechnology、2014、32: 992

50

～ 1000 ページ（各々参照により本明細書に組み込まれる）に記載される任意のタンパク質；又は、本明細書に記載される組換えポリペプチドの任意のコンジュゲート、バリエーション、類似体若しくは機能的断片が含まれる。

【0141】

核酸

本明細書に記載される脂質代謝モジュレーター及び組換え生成物をコードする核酸、例えば、外因性核酸も本明細書で提供される。所望の LMM 又は組換え生成物、例えば組換えポリペプチドをコードする核酸配列は、当技術分野で公知の組換え方法を使用して、例えば、所望の核酸配列、例えば遺伝子を発現する細胞に由来するライブラリーをスクリーニングすることによって、それを含むことが知られているベクターから核酸配列を導くこと
10
によって、又は標準の技術を使用してそれを含有する細胞及び組織から直接的に単離することによって得ることができる。代わりに、LMM 又は組換えポリペプチドをコードする核酸は、クローニングするより、合成的に生成することができる。組換え DNA 技術及びテクノロジーは高度に進歩し、当技術分野で十分に確立されている。したがって、本明細書に記載される組換えポリペプチドのアミノ酸配列についての知識を有する当業者は、LMM 又は組換えポリペプチドをコードするであろう核酸配列を容易に想定又は生成することができる。

【0142】

LMM SREBF1 及び SCD1 をコードする例示的な核酸配列を、本明細書においてそれぞれ配列番号 3 及び配列番号 4 として提供する。
20

【0143】

所望のポリペプチド、例えば、LMM 又は組換えポリペプチドの発現は、所望のポリペプチド又はその部分をコードする核酸を作動可能にプロモーターに連結し、構築物を発現ベクターに組み込むことによって一般的に達成される。ベクターは、複製及び真核細胞又は原核細胞への組み入れのために適する可能性がある。典型的なクローニングベクターは、他の調節エレメント、例えば、転写及び翻訳ターミネーター、開始配列、プロモーター、選択マーカー、又は所望の核酸配列の発現の調節若しくは同定のために有益なタグを含有する。

【0144】

LMM 又は組換えポリペプチドをコードする核酸配列は、いくつかの種類のベクターにクローニングすることができる。例えば、核酸は、限定されるものではないが、プラスミド、ファージミド、ファージ誘導体、動物ウイルス及びコスミドを含むベクターに、クローニングすることができる。特に重要なベクターには、発現ベクター、複製ベクター、プロンプ生成ベクター及び配列決定ベクターが含まれる。実施形態では、発現ベクターは、ウイルスベクターの形で細胞に提供することができる。ウイルスベクターテクノロジーは当技術分野で周知であり、例えば、Sambrook 等、2012、分子クローニング：実験室マニュアル（MOLECULAR CLONING：A LABORATORY
30
MANUAL）、1～4 巻、Cold Spring Harbor Press、NY、及び他のウイルス学及び分子生物学マニュアルに記載されている。ベクターとして有益であるウイルスには、限定されるものではないが、レトロウイルス、アデノウイルス、ア
40
デノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス及びレンチウイルスが含まれる。一般に、適するベクターは、少なくとも 1 つの生物体において機能的である複製開始点、プロモーター配列、都合のよい制限エンドヌクレアーゼ部位、及び 1 つ又は複数の選択マーカーを含有する（例えば、国際公開 01/96584 号；国際公開第 01/29058 号；及び米国特許第 6,326,193 号）。ウイルスに由来するベクターは、娘細胞における導入遺伝子の長期の安定した組み入れ及びその増殖を可能にするので、長期の遺伝子導入を達成するのに適するツールである。

【0145】

本明細書に記載される実施形態のいずれでも、ベクターは以下の 1 つ又は複数を含むこともできる：分泌を促進するシグナル配列、ポリアデニル化シグナル、転写ターミネータ
50

ー（例えば、ウシ成長ホルモン（BGH）遺伝子に由来する）、エピソームの複製及び原核生物における複製を可能にするエレメント（例えばSV40起点及びColE1、又は当技術分野で公知の他のもの）、及び/又は選択を可能にするエレメント、例えば、選択マーカー若しくはリポーター遺伝子。

【0146】

ー実施形態では、ポリペプチド、例えば、LMM又は組換えポリペプチドをコードする核酸配列を含むベクターは、ポリペプチド、例えば、LMM又は組換えポリペプチドの発現のために転写開始を可能にするための、ポリメラーゼの動員の役割を担うプロモーター配列をさらに含む。ー実施形態では、本明細書に記載される方法に適するプロモーター配列は、多量の転写を促進し、したがって標的外因性mRNAの大量のコピーを送達するエンハンサーと通常関連する。ー実施形態では、プロモーターは、サイトメガロウイルス（CMV）主要極初期プロモーター（Xia、Bringmann等、2006）及びSV40プロモーター（Chernajovsky、Mory等、1984）を含み、両方もそれらの同名のウイルス又はそれに由来するプロモーターに由来する。ラウス肉腫ウイルス長末端反復配列（RSV-LTR）及びモロニーマウス白血病ウイルス（MoMLV）LTRを含め、哺乳動物細胞において発現ベクターへの組み入れによって転写を促進するために、いくつかの他のより一般的でないウイルスプロモーターが首尾よく用いられた（Papadakis、Nicklin等、2004）。別の実施形態では、目的の遺伝子の構成的転写を促進するために、特異的な内因性哺乳動物プロモーターを利用することができる（Pontiller、Gross等、2008）。CHO特異的チャイニーズハムスター伸長因子1-アルファ（CHEF1）プロモーターは、ウイルスベースの配列の代替物を高収量でもたらした（Deer、Allison、2004）。

【0147】

非哺乳動物の細胞、例えば、真菌類、昆虫及び植物細胞における発現のために適する他のプロモーターも、当技術分野で公知である。真菌又は酵母宿主細胞において転写を誘導するのに適するプロモーターの例には、限定されるものではないが、トリコデルマ・リーゼイ（*Trichoderma Reesei*）、メタノール誘導性アルコールオキシダーゼ（AOXプロモーター）、偽巢性コウジ菌（*Aspergillus nidulans*）トリプトファン生合成（trpCプロモーター）、アスペルギルス・ニガー（*Aspergillus niger*）var. awamori flucoamylase（glA）、サッカロマイセス・セレビスエ（*Saccharomyces cerevisiae*）ガラクトキナーゼ（GAL1）、クルイベロマイセス・ラクティス（*Kluyveromyces lactis*）Plac4-PBIプロモーター、又はPCIT国際公開第2005/100573号に記載されているそれらの真菌遺伝子から得られるプロモーターが含まれる。昆虫細胞において転写を誘導するのに適するプロモーターの例には、限定されるものではないが、T7ラックプロモーター及びポリヘドリンプロモーターが含まれる。植物細胞において転写を誘導するのに適するプロモーターの例には、限定されるものではないが、カリフラワーモザイクウイルスプロモーターCaMV35Sが含まれる。原核生物の宿主細胞、例えば細菌細胞において本発明の核酸構築物の転写を誘導するのに適するプロモーターの例は、大腸菌（*E. coli*）ラックオペロンから得られるプロモーター、大腸菌tacプロモーター（ハイブリッドプロモーター、DeBoer等、PNAS、1983、80:21~25ページ）、大腸菌recA、大腸菌araBAD、大腸菌tetA及び原核生物のベータ-ラクタマーゼである。適するプロモーターの他の例には、ウイルスのプロモーター、例えば、T7プロモーター、T5プロモーター、T3プロモーター、M13プロモーター及びSP6プロモーターを含む、バクテリオファージに由来するプロモーターが含まれる。

【0148】

プロモーターに加えて、本明細書に記載されるベクターは、上記のエンハンサー領域；転写の速度を上方制御するために転写因子を動員することができる、コアプロモーターに近い特異的ヌクレオチドモチーフ領域をさらに含むことができる（Riethoven、

10

20

30

40

50

2010)。プロモーター配列と同様に、これらの領域はしばしばウイルスに由来し、hCMV及びSV40エンハンサー配列などのプロモーター配列の中に包含され、又は、アデノウイルス由来配列のようにさらに含まれてもよい(Gaillet、Gilbert等、2007)。

【0149】

一実施形態では、本明細書に記載されるポリペプチド、例えば、LMM又は組換え生成物をコードする核酸配列を含むベクターは、選択マーカーをコードする核酸配列をさらに含む。一実施形態では、選択マーカーは、グルタミンシンターゼ(GS)；ジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)、例えばメトトレキセート(MTX)への耐性を付与する酵素；又は、抗生物質マーカー、例えば、ハイグロマイシン、ネオマイシン(G418)、ゼオシン、ピューロマイシン又はブラストサイジンなどの抗生物質への耐性を付与する酵素を含む。

10

【0150】

一実施形態では、本明細書に記載される組換え生成物をコードする核酸配列を含むベクターは、本明細書に記載される組換え生成物をコードする核酸を含有する1つ又は複数の細胞の同定で有益である選択マーカーを含む。別の実施形態では、選択マーカーは、本明細書に記載される組換え生成物をコードする核酸配列のゲノムへの組み入れを含有する、1つ又は複数の細胞を同定又は選択することにおいて有益である。組換えタンパク質をコードする核酸配列を組み入れた1つ又は複数の細胞の同定は、生成物を安定して発現する細胞又は細胞系の選択及び工学操作に有益である可能性がある。

20

【0151】

一実施形態では、本明細書に記載されるLMMをコードする核酸配列を含むベクターは、LMMをコードする核酸配列の部位特異的組み入れのための機構を含む。例えば、ベクターは、Flp-In(商標)系に適合し、Flpリコンビナーゼの存在下で、Flp-In細胞、例えばFlp-In CHO細胞のゲノムに存在する所望の部位で、例えば2つのFRT部位の間で、所望の配列、例えばLMMをコードする核酸配列の組換え及び以降の組み入れを誘導する2つのFRT部位(特異的ヌクレオチド配列を含む)を含む。所望の生成物をコードする核酸の部位特異的組み入れのために使用される他の系は、例えば、Cre-loxリコンビナーゼ系又はCRISPR/CAS媒介戦略など、当技術分野において公知である。

30

【0152】

使用に適するベクターは市販されており、Lonza Biologics, Incから入手可能なGS Expression Systems(商標)、GS Xceed(商標)遺伝子発現系、又はPotelligent(登録商標)CHOK1SVテクノロジーに関連したベクター、例えばpConベクターが含まれる。さらなるベクターには、限定されるものではないが、他の市販ベクター、例えば、pcDNA3.1/Zeo、pcDNA3.1/CAT、pcDNA3.3TOPO(Thermo Fisher、以前はInvitrogen)；pTarget、HaloTag(Promega)；pUC57(Genscript)；pFLAG-CMV(Sigma-Aldrich)；pCMV6(Origene)；又は、pBK-CMV/pCMV-3Tag-7/pCMV-Tag2B(Stratagene)が含まれる。

40

【0153】

細胞及び細胞培養

一態様では、本開示は、生成物、例えば、本明細書に記載される組換えポリペプチドを生成する細胞又は細胞系を工学操作又は作製するための方法及び組成物に関する。別の態様では、本開示は、向上した、例えば増加した生産性及び生成物品質を有する細胞又は細胞系を工学操作又は作製するための方法及び組成物に関する。向上した生産性及び生成物品質に関連した特性については、本明細書において、例えば「脂質代謝のモジュレーション」というタイトルのセクションに記載する。

【0154】

50

実施形態では、細胞は、哺乳動物又は非哺乳動物の細胞、例えば、昆虫細胞、酵母細胞、真菌細胞、植物細胞、古細菌細胞、例えば、古細菌 (*Archaea*) の種に由来する細胞、又は細菌細胞である。一実施形態では、細胞は、ヒト、マウス、ラット、チャイニーズハムスター、シリアンハムスター、サル、類人猿、イヌ、カモ、ウマ、オウム、フェレット、魚類又はネコに由来する。一実施形態では、細胞は、動物細胞である。実施形態では、細胞は、哺乳動物の細胞、例えば、ヒト細胞又はげっ歯動物細胞、例えば、ハムスター細胞、マウス細胞又はラット細胞である。一実施形態では、細胞は、原核細胞、例えば細菌細胞である。一実施形態では、細胞は、アクチノバクテリア (*Actinobacteria*) の種、例えば結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) である。

10

【0155】

一実施形態では、細胞は、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞である。一実施形態では、細胞は、CHO K1、CHOK1SV、Potelligent CHOK1SV (FUT8-KO)、CHO GS-KO、Exceed (CHOK1SV GS-KO)、CHO S、CHO DG44、CHO DXB11、CHOZN、又はCHO由来細胞である。CHO FUT8ノックアウト細胞は、例えば、Potelligent (登録商標) CHOK1 SV (Lonza Biologicals, Inc.) である。

【0156】

別の実施形態では、細胞は、HeLa、HEK293、HT1080、H9、HepG2、MCF7、Jurkat、NIH3T3、PC12、PER.C6、BHK (ベビーハムスター腎臓細胞)、VERO、SP2/0、NS0、YB2/0、Y0、EB66、C127、L細胞、COS、例えばCOS1及びCOS7、QC1-3、CHO K1、CHOK1SV、Potelligent CHOK1SV (FUT8-KO)、CHO GS-KO、Exceed (CHOK1SV GS-KO)、CHO S、CHO DG44、CHO DXB11、CHOZN、若しくはCHO由来細胞、又はそれらに由来する任意の細胞である。一実施形態では、細胞は、幹細胞である。一実施形態では、細胞は、本明細書に記載される細胞のいずれかの分化形態である。一実施形態では、細胞は、培養物における任意の一次細胞に由来する細胞である。

20

【0157】

一実施形態では、細胞は、生成物、例えば本明細書に記載される生成物を生成する、本明細書に記載される細胞のいずれか1つである。一実施形態では、細胞は、組換えポリペプチドをコードする外因性核酸を含む、例えば、組換えポリペプチド、例えば表2又は3から選択される組換えポリペプチドを発現する、本明細書に記載される細胞のいずれか1つである。

30

【0158】

一実施形態では、細胞培養は、バッチ培養、流加培養、ドローストック培養又は連続培養として実行される。一実施形態では、細胞培養は、接着性の培養である。一実施形態では、細胞培養は、懸濁培養である。一実施形態では、細胞又は細胞培養は、組換えポリペプチドの発現のために *in vivo* に置かれる、例えば、モデル生物体又はヒト対象に置かれる。

40

【0159】

一実施形態では、培地は、無血清である。

例えば米国特許第5,633,162号に記載の通りに、哺乳動物細胞系のための他の適する培地及び培養方法は、当技術分野で周知である。実験室フラスコ又は低比重細胞培養のための、及び特定の細胞型のニーズに適合した標準の細胞培養培地の例は、例えば以下の通りである: Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640培地 (Morre, G., *The Journal of the American Medical Association*, 199, p. 519f, 1967)、L-15培地 (Leibovitz, A. 等, *Amer. J. of Hyg*

50

iene、78、1p.173ff、1963)、ダルベッコの改変イーグル培地(DMEM)、イーグルの最少必須培地(MEM)、ハムのF12培地(Ham, R.等、Proc. Natl. Acad. Sc. 53、p288ff、1965)又は、アルブミン、トランスフェリン及びレシチンを欠いているIscovesの改変DMEM(Iscoves等、J. Exp. med. 1、p.923ff、1978)。例えば、ハムのF10又はF12培地は、CHO細胞培養のために特別に設計された。CHO細胞培養に特別に適應させた他の培地は、EP-481791に記載されている。他の適する培養方法は当業者に公知であり、利用した組換えポリペプチド生成物及び宿主細胞に依存することができる。細胞によって発現される生成物、例えば組換えポリペプチドの発現及び生成のために適する条件を決定又は最適化することは、当業者の技術の範囲内である。

10

【0160】

細胞の工学操作及び生成物の生成のための方法

本明細書に記載される方法及び組成物は、向上した生産性及び向上した生成物品質を有する細胞又は細胞系を工学操作するのに有益である。実施形態では、細胞は、細胞の脂質代謝がモジュレートされるように改変される。例えば、LMMをコードする外因性核酸が、細胞に導入される。細胞は、LMMの発現及び脂質代謝のLMM媒介モジュレーションに適する条件の下で、その後培養される。その脂質代謝がモジュレートされる細胞の特性については、本明細書で、例えば「脂質代謝のモジュレーション」というタイトルのセクションに記載する。

【0161】

20

一部の実施形態では、細胞は、生成物、例えば組換えポリペプチドをコードする外因性核酸をさらに含む。別の実施形態では、細胞は、内因性生成物の発現を増加させる外因性核酸をさらに含む。そのような実施形態のいずれでも、生成物をコードするか又は内因性生成物の発現を増加させる外因性核酸は、脂質代謝の改変、例えば、本明細書に記載されるLMMをコードする外因性核酸の導入などの前に導入される。代わりに、他の実施形態では、生成物をコードするか又は内因性生成物の発現を増加させる外因性核酸は、脂質代謝の改変、例えば、本明細書に記載されるLMMをコードする外因性核酸の導入などの後に導入される。実施形態のいずれでも、生成物は、治療又は診断用のタンパク質である。実施形態のいずれでも、生成物は、表2又は3から選択される。

【0162】

30

所望のポリペプチド又はタンパク質、例えば本明細書に記載されるLMM又は本明細書に記載される生成物を発現するように細胞を遺伝子改変又は工学操作するための方法は、当技術分野で周知であり、例えば、トランスフェクション、形質導入(例えば、ウイルス形質導入)又はエレクトロポレーションが含まれる。

【0163】

核酸、例えば、本明細書に記載される外因性核酸又はベクターを宿主細胞に導入するための物理的方法には、リン酸カルシウム沈殿、リポフェクション、微粒子銃、マイクロインジェクション、エレクトロポレーションなどが含まれる。ベクター及び/又は外因性核酸を含む細胞を生成する方法は、当技術分野で周知である。例えば、Sambrook等、2012、分子クローニング：実験室マニュアル(MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL)、1~4巻、Cold Spring Harbor Press、NYを参照。

40

【0164】

核酸、例えば、本明細書に記載される外因性核酸又はベクターを宿主細胞に導入するための化学的手段は、コロイド分散系、例えば、巨大分子複合体、ナノカプセル、マイクロスフェア、ビーズ、並びに、水中油型乳剤、ミセル、混合ミセル及びリポソームを含む脂質をベースとした系を含む。in vitro及びin vivoで送達ビヒクルとして使用するための例示的なコロイド系は、リポソーム(例えば、人工膜小胞)である。標的化ナノ粒子又は他の適するサブミクロンの大きさの送達系によるポリヌクレオチドの送達などの、核酸の最新技術の標的化送達の他の方法が利用可能である。

50

【0165】

所望のポリペプチド、例えば、本明細書に記載されるLMM及びノ又は生成物の配列を含有する核酸は細胞に送達され、組換えを通してそのゲノムに組み入れることができる。生じた組換え細胞は、所望のポリペプチド、例えば、本明細書に記載されるLMM及びノ又は生成物の安定した発現が次に可能であり、このように、長期間にわたって一貫した、効率的なタンパク質生成を可能にする。目的の遺伝子は宿主の染色体で同時に複製されるので、長期にわたる発現を誘導するために単一のDNA送達過程のみが必要とされるという事実を含む、いくつかの利点が目的の遺伝子の安定した組み入れに付随する；これは、さらなる機構を必要とせず遺伝子が1つの世代から次の世代に移されることを意味する。理論的には、これは、バッチからバッチへの発酵にわたってより一貫した生成物及び収量をもたらす。これと一致して、安定した発現方法は、本明細書に記載される脂質代謝をモジュレートする改変、例えばLMMをコードする外因性核酸の導入なしで生成されるものと比較して、高い生成物収量を生成することが可能である。

10

【0166】

所望のポリペプチド、例えば、本明細書に記載されるLMM及びノ又は生成物を安定して過剰発現させる組換え細胞系を確立するプロトコールは、ランダムな組換えによって容易にされる宿主ゲノムへのランダムな部位での線状化DNA（通常、プラスミドをベースにした）の組み入れを一般的に含む。宿主ゲノムの特異的領域で発現カセットの組み入れを促進する、部位特異的プロトコールも開発され、実行されている（O'Gorman、Fox等、1991）。これらのプロトコールは、部位特異的組換えが可能なりコンビナーゼをしばしば活用し、限定されるものではないが、Flp-In（商標）系（例えば、Flp-In CHO細胞を利用する）、CHOK1SV Flp細胞系（Lonza）（Zhang L.等（2015）、Biotechnol. Prog. 31:1645~5ページに記載されている；参照により本明細書に完全に組み込まれる）、又は、Cre-lox系が含まれる。

20

【0167】

上記のように、一部の実施形態では、生成物及びノ又はLMMをコードする核酸を含むベクターは、トランスフェクトされたプールからの首尾よく発現する細胞の選択を容易にするために、選択マーカーをさらに含む（Browne、Al-Rubeai 2007）。多数の選択方法が市販されているが、これらの中で最も一般的に使用されるものはメトトレキセート（MTX）及びLonzaのグルタミンシンターゼ（GS）系である（Bebington、Renner等、1992、Lai、Yang等、2013）。ジヒドロ葉酸レダクターゼ（DHFR）は、テトラヒドロ葉酸への葉酸の変換の役割を担うタンパク質であり、グリシン、プリン及びチミジル酸を生成する必須の生合成経路のために必要である。DHFR活性を阻害するためにMTXを使用することができ、したがって、安定して組み入れられた細胞の選択のために、安定してトランスフェクトされた培養へのDHFRの組み入れを使用することができる；十分な組換えDHFRを首尾よく発現する細胞だけが、MTXを使用した選択を生き延びる（Cacciatore、Chasin等、2010）。一般的に用いられる別の選択方法は、グルタミン酸及びアンモニアからのグルタミンの合成の役割を担う酵素GSの使用であるが、グルタミンは哺乳動物細胞の生存のために不可欠であるので、十分なGSを欠いている細胞は培養で生存できない。最初は、GSの阻害剤メチオニンスルフォキシミン（MSX）の追加は、CHOK1SV細胞における内因性のGSの存在が細胞生存を維持するのに十分でないことを確実にし、したがって、組換え構築物の安定した組み入れを通してもたらされたさらなるGSを発現する細胞だけが、選択過程を生き延びる。Lonza及び他は、培地中の外因性グルタミンの存在なしで目的の構築物が首尾よく組み入れられていない全ての細胞が消滅するように内因性GS遺伝子がノックダウン/ノックアウトされた、CHO宿主細胞系を今や確立した（Fan、Kadura等、2012）。耐性遺伝子を抱える細胞だけが選択過程を生き延びるように特定の選択薬剤への耐性を導き出す、多くの他の選択方法が利用可能である；これらには、ハイグロマイシン、ネオマイシン、プラストサイジン及びゼオシン

30

40

50

が含まれる (Browne, Al-Rubeai, 2007)。実施形態では、LMMをコードする外因性核酸を含むベクター及び生成物、例えば本明細書に記載される組換えポリペプチドをコードする外因性核酸を含むベクターは、種々の選択マーカーをさらに含む。

【0168】

安定して発現する細胞プールの良好な回収の後、単一の細胞を起源とする個々のクローンの単離は、高い生成物収量及び品質が可能である細胞系、又は高い生成物収量及び高品質生成物の最も高い能力を有する細胞系の選択を容易にする。細胞特性の差は、細胞で観察される不均一性、及び組換えDNAの数と特異的組込み部位(単数又は複数)の両方に関連する可能性がある。したがって、複数のクローンを迅速に評価し、高度発現細胞をその後選択するために、クローンスクリーニング特性が開発された。蛍光活性化細胞分取(FACS)は、蛍光強度に基づいて細胞を迅速に分類することができる方法であり、したがって、高度発現クローンを選択するために用いることができる。目的のタンパク質の蛍光性タグ付け(Powell, Weaver, 1990)、組換え遺伝子と同時発現される細胞表面分子の蛍光性タグ付け(Holmes, Al-Rubeai, 1999)及び目的の遺伝子と同時発現されるeGFP発現に基づく蛍光強度の検出(Meng, Liang等, 2000)を含む、いくつかのプロトコルが確立された。これらの方法で観察される高い蛍光強度は、高レベルの組換えタンパク質生成を示唆し、したがって、これらの細胞は組換え細胞プールから優先的に選択することができる。高度発現組換えクローンを単離するFACSベースの選択方法は、細胞と会合したままである組換え生成物により適しており、また、哺乳動物で発現されるバイオ治療組換えタンパク質生成物が分泌されるので、分泌される組換えタンパク質のためのクローンの選択にとってより適当である方法が開発された。例えば、ClonePixは、コロニー周囲の培地への組換え生成物の分泌、及びフルオレシニンイソチオシアネート(FITC)との関連付け、したがってコロニー周囲の蛍光性ハロの形成に基づいて、半固体培地の上に増殖するクローンを選び出す、自動化されたコロニー選択方法である(Lee, Ly等, 2006)。クローンは、コロニーを囲んでいるハロの蛍光強度に基づいて選択される。生産性に特に関心を置いて所望の生物学的特性に基づいて組換え細胞を迅速に単離する、多くの他のクローン選択プロトコルが確立され、Browne及びAl-Rubeai(Browne, Al-Rubeai, 2007)でレビューされている。本明細書に記載される通りに選択されるクローンの拡張は、細胞系の生成をもたらす。

【0169】

一実施形態では、本明細書に記載される方法は、生産性が向上した細胞を生成する。細胞の向上した生産性又は生成能力には、生成される生成物のより高い収量若しくは量及び/又は増加した生成速度(単位時間にわたって生成される生成物の収量又は量によって判定される)が含まれる。一実施形態では、細胞の生産性、例えば生成物を生成する能力の向上は、例えば、脂質代謝経路がモジュレートされていない細胞によって生成される生成物の総量、レベル又は量と比較して、生成される生成物の総量、レベル又は量の増加、例えば、1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%若しくは99%の増加;或いは、1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、50倍若しくは100倍、又はそれより多い増加をもたらす。一実施形態では、細胞の生産性、例えば生成物の生成速度の向上は、例えば、脂質代謝経路がモジュレートされていない細胞によって生成される生成物の生成速度と比較して、生成物の生成速度の増加、例えば、1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%若しくは99%の増加;又は、1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、50倍若しくは100倍、若しくはそれより多い増加をもたらす。

【0170】

細胞を工学操作するための本明細書に記載される方法は、高生産細胞又は高生産細胞系を生成する。高生産細胞又は細胞系は、参照細胞又は本明細書に記載される方法によって選択若しくは工学操作されていない細胞と比較して、より高い収量の組換えポリペプチド生成物を生成することが可能である。一実施形態では、高生産細胞系は、100 mg/L、200 mg/L、300 mg/L、400 mg/L、500 mg/L、600 mg/L、700 mg/L、800 mg/L、900 mg/L、1 g/L、2 g/L、3 g/L、4 g/L、5 g/L、10 g/L、15 g/L、20 g/L、25 g/L、30 g/L、35 g/L、40 g/L、45 g/L、50 g/L、55 g/L、60 g/L、65 g/L、70 g/L、75 g/L、80 g/L、90 g/L、95 g/L、又は100 g/L以上の生成物、例えば組換えポリペプチド生成物を生成することが可能である。一実施形態では、高生産細胞系は、100 mg/L、200 mg/L、300 mg/L、400 mg/L、500 mg/L、600 mg/L、700 mg/L、800 mg/L、900 mg/L、1 g/L、2 g/L、3 g/L、4 g/L、5 g/L、10 g/L、15 g/L、20 g/L、25 g/L、30 g/L、35 g/L、40 g/L、45 g/L、50 g/L、55 g/L、60 g/L、65 g/L、70 g/L、75 g/L、80 g/L、85 g/L、90 g/L、95 g/L、又は100 g/L以上の生成物、例えば組換えポリペプチド生成物を生成する。生成される生成物の量は、細胞型、例えば種、及び発現させる生成物、例えば組換えポリペプチドによって異なることができる。例として、モノクローナル抗体を発現する高生産CHO細胞は、少なくとも1 g/L、2 g/L、5 g/L、10 g/L、15 g/L、20 g/L又は25 g/Lのモノクローナル抗体を生成することが可能である。

10

20

【0171】

現在当技術分野で公知の従来の方法を使用して細胞又は無細胞系において発現又は生成するのが困難である生成物の発現のために特に有益である可能性がある、方法及び組成物が本明細書に記載される。このように、そのような発現困難な生成物、例えば本明細書に記載される次世代生物製剤を生成する生産細胞系は、少なくとも1 mg/L、5 mg/L、10 mg/L、15 mg/L、20 mg/L、25 mg/L、30 mg/L、35 mg/L、40 mg/L、45 mg/L、50 mg/L、55 mg/L、60 mg/L、65 mg/L、70 mg/L、75 mg/L、80 mg/L、85 mg/L、90 mg/L、95 mg/L、又は100 mg/L以上を生成することができる。発現困難なタンパク質のための本明細書に記載される方法及び組成物によって達成される生成能力（例えば、生成物の収量、総量若しくは量、又は生成物の生成速度）は、本明細書に記載される脂質代謝をモジュレートする改変を有しない細胞又は系の生成能力と比較して、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%、若しくはそれより多く、又は、1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、50倍若しくは100倍以上増加させることができる。

30

【0172】

生成又は分泌される、例えば培養培地に分泌される生成物の総量、レベル又は量を定量化するためのアッセイには、タンパク質定量化アッセイ、例えばブラッドフォードタンパク質アッセイ、SDS-PAGE分析、イムノブロットング、例えばウェスタンブロット、及び、例えばナノドロップ装置を使用する自動化された手段が含まれる。増加したタンパク質生成を測定するための他の方法は、当業者に周知である。例えば、組換えタンパク質生成の増加は、ELISAによって組織培養培地中の濃度を測定することによって、小規模で判定される可能性がある（Smalles等、2004、Biotechnology Bioengineering、88：474～488ページ）。それは、例えば培地中の組換えモノクローナル抗体（mAb）濃度のハイスループット判定のためにForteBioオクテットによって（Mason等、2012、Biotechnology Progress、28：846～855ページ）、又はプロテインA HPLCによってより大規模で（Stansfield等、2007、Biotechnology Bioengineering、97：410～424ページ）定量的に判定すること

40

50

もできる。生成物、例えば本明細書に記載される組換えポリペプチドの生成を判定するための他の方法は、細胞中の生成物、特に組換えポリペプチドの比生産速度（ qP ）、及び/又は生存可能な細胞の濃度（ IVC ）の時間積分を指すことができる。一実施形態では、生成を判定するための方法は、 qP 及び IVC の判定の組合せを含む。培養培地におけるポリペプチドの濃度として規定されて、組換えポリペプチド生成又は生産性はこれらの2つのパラメータ（ qP 及び IVC ）の機能である。そして、Porter等による計算される。（Porter等、2010、Biotechnology Progress、26：1446～1455ページ）。タンパク質生成を測定するための方法は、本明細書で提供される実施例においてもさらに詳細に記載される。

【0173】

一実施形態では、本明細書に記載される方法は、生成物品質が向上した細胞を生成する。一実施形態では、生成物の品質の向上は、例えば、脂質代謝経路がモジュレートされていない細胞によって生成される生成物の総量、レベル又は品質と比較して、生成物品質の増加、例えば、生成物品質の1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、若しくは99%、又はそれより多くの増加；或いは、1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、50倍、若しくは100倍、又はそれより多い増加をもたらす。生成物品質におけるそのような増加は、例えば、以下の1つ又は複数によって例示することができる：

i) 非凝集生成物の総量若しくは量の増加（又は凝集生成物の総量若しくは量の減少）；

ii) 適切に折り畳まれたか若しくは組み立てられた生成物の総量若しくは量の増加（又は、誤って折り畳まれた、折り畳まれていない、部分的に組み立てられた、若しくは組み立てられていない、生成物の総量若しくは量の減少）、或いは、適切に折り畳まれた又は組み立てられた生成物対折り畳まれていない、誤って折り畳まれた、部分的に組み立てられた、又は組み立てられていない生成物の比の増加；

iii) 完全長生成物の総量若しくは量の増加（又は生成物の断片化の減少）；

iv) 所望の翻訳後修飾の増加（又は、未改変の若しくは誤って改変された生成物の減少）；

v) グリカン不均一性（例えば、グリコシル化された生成物の）の増加又は減少；

vi) 機能的生成物の総量若しくは量の増加（又は非機能的若しくは機能障害生成物の総量若しくは量の減少）、或いは、機能的対非機能的若しくは機能障害生成物の比の増加；並びに/或いは

vii) ジスルフィド結合スクランブルの増加又は減少（例えば、例えば抗体分子生成物のジスルフィド結合スクランブルの増加又は減少の結果としての所望のアイソフォーム又は構造体の増加又は減少）。

【0174】

本明細書に記載される通りに生成される細胞又は細胞系の生成物品質、例えば生成物品質の向上を測定するための方法は、当技術分野で公知である。一実施形態では、発現される組換えポリペプチド生成物の一次配列の忠実度を判定するための方法は、例えば質量分析など当技術分野で公知である。適切に折り畳まれた生成物、例えば発現される組換えポリペプチドの量又は濃度の増加は、円二色性によって、又は発現される組換えポリペプチドの固有の蛍光を評価することによって判定することができる。機能的生成物の量又は濃度の増加は、組換え生成物、例えば組換えポリペプチドのアイデンティティに依って様々な機能的アッセイを使用して試験することができる。例えば、抗体は、ELISA又は他の免疫親和性アッセイによって試験することができる。生成物品質の増加を判定するための、例えば凝集、翻訳後修飾、ジスルフィド結合スクランブルを判定するための他の方法は、サイズ排除クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、動的光散乱（DLS）アプローチ、及びタンパク質電気泳動（PAGE）方法によって評価することができる。

10

20

30

40

50

【0175】

一実施形態では、例えば本明細書に記載されるような生成物を生成するための方法は、上記のような脂質代謝をモジュレートする改変を含むように工学操作された細胞を提供することを含む。一実施形態では、脂質代謝をモジュレートする改変を含む細胞は、生成物、例えば本明細書に記載される組換えポリペプチドをコードする外因性核酸をさらに含む。一実施形態では、生成物、例えば本明細書に記載される組換えポリペプチドをコードする外因性核酸は、脂質代謝をモジュレートする改変を含む工学操作細胞に導入される。別の実施形態では、生成物、例えば本明細書に記載される組換えポリペプチドをコードする外因性核酸は、本明細書に記載される LMM をコードする外因性核酸の導入の前に細胞に導入される。生成物をコードする外因性核酸は、本明細書に記載される生成物を安定して発現する、例えば過剰発現する細胞の効率的な選択のために、選択マーカーをさらに含む。

10

【0176】

一部の実施形態では、生成物の発現、例えば、生成物の転写、翻訳及び/若しくは分泌、又は生成物の品質、例えば一次配列の適切な折畳み及び/若しくは忠実度を向上させるために、さらなるステップを実行することができる。そのようなさらなるステップは、生成物発現又は生成物品質を向上させる薬剤を導入することを含む。一実施形態では、生成物発現又は生成物品質を向上させる薬剤は、低分子、ポリペプチド、又はタンパク質の折畳み、例えばシャペロンタンパク質の折畳みを向上させるポリペプチドをコードする核酸であってよい。一実施形態では、タンパク質の折畳みを助ける薬剤は、シャペロンタンパク質、例えば、BiP、PD1又はERO1をコードする核酸を含む (Chakravarthi & Bulleid 2004; Borth 等、2005; Davis 等、2000)。生成物の収量及び品質を向上させる他のさらなるステップは、XBP1及びATF6などの転写因子 (Tiggess & Fussenegger, 2006; Cain 等、2013; Ku 等、2008)、並びにカルネキシン及びカルレティキュリンなどのレクチン結合性シャペロンタンパク質 (Chung 等、2004) の過剰発現を含む。本明細書に記載されるタンパク質の折畳み、生成物品質及び生成物収量を助けるか又は向上させる薬剤の過剰発現は、薬剤をコードする外因性核酸の導入によって達成することができる。別の実施形態では、生成物発現又は生成物品質を向上させる薬剤は、生成物の発現又は生成物の品質を増加させるために細胞培養に加えることができる低分子、例えば、DM

20

30

【0177】

本明細書に記載される方法のいずれも、高い生産性を有するか又は高品質の生成物を生成する細胞を同定するための、さらなる選択ステップをさらに含むことができる。例えば、所望の特徴、例えばタンパク質折畳みタンパク質、例えばシャペロンのより高い発現を有する特異的細胞を選択するために、FACS 選択を利用することができる。

【0178】

一態様では、本開示は、組換えポリペプチド生成物を回収するか又は取り出すためのステップを含む方法を提供する。組換えポリペプチドが細胞から分泌される実施形態では、本方法は、細胞、細胞集団、又は細胞が培養された培養培地から、組換えポリペプチドを取り出す、収集する又は分離するためのステップを含むことができる。組換えポリペプチドが細胞の中にある実施形態では、組換えポリペプチド生成物の精製は、細胞によって生成される組換えポリペプチドの以下のいずれかの1つ又は複数からの分離を含む：宿主細胞タンパク質、宿主細胞核酸、宿主細胞脂質及び/又は宿主細胞に由来する他のデブリ。

40

【0179】

実施形態では、本明細書に記載される方法は、実質的に純粋なタンパク質生成物を提供する。本明細書で用いる「実質的に純粋な」は、発熱性物質が実質的に含まれない、核酸が実質的に含まれない、並びに/又は宿主細胞に由来する内因性の細胞性タンパク質酵素

50

及び構成成分、例えばポリメラーゼ、リボソームタンパク質及びシャペロンタンパク質が実質的に含まれないことを意味する。実質的に純粋なタンパク質生成物は、例えば25%、20%、15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%又は1%未満の、混入する、宿主細胞に由来する内因性のタンパク質、核酸又は他の巨大分子を含有する。

【0180】

生成物、例えば組換えポリペプチドの回収及び精製のための方法は、当技術分野で十分確立されている。組換えポリペプチド生成物を回収するために、物理的若しくは化学的又は物理的化学的方法が使用される。物理的若しくは化学的又は物理的化学的方法は、濾過方法、遠心分離方法、超遠心方法、抽出方法、凍結乾燥方法、沈殿方法、クロマトグラフィー方法又はそれらの2つ以上の方法の組合せであってよい。一実施形態では、クロマトグラフィー方法は、サイズ排除クロマトグラフィー（又は、ゲル濾過）、イオン交換クロマトグラフィー、例えば、アニオン若しくはカチオン交換クロマトグラフィー、親和性クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー及び/又は多モードクロマトグラフィーのうちの1つ又は複数を含む。

10

【実施例】

【0181】

本発明を、以下の実施例を参照して詳細にさらに説明する。これらの実施例は例示だけのために提供され、特記しない限り限定するものではない。したがって、本発明は、いかなる場合も以下の実施例に限定されると解釈されるべきではなく、むしろ、本明細書で提供される教示の結果として明白になるあらゆる変形を包含するものと解釈されるべきである。

20

【0182】

さらなる記載がなくても、当業者は、前述の記載及び以下の例示的な実施例を使用して、本発明の化合物を作製、利用することができ、特許請求される方法を実施することができると考えられる。以下の実施例は、本発明の様々な態様を具体的に示しており、本開示の残りをいかなる形であれ限定するものと解釈されるべきではない。

【0183】

(例1)

脂質代謝モジュレータを過剰発現する安定した細胞の生成

30

CHO細胞における2つの脂質代謝モジュレータSCD1及びSREBF1の過剰発現の作用を調査するために、これらの遺伝子を首尾よくクローニングし、部位特異的アプローチを使用して接着性のCHOFlp-In細胞に、及びランダム組み入れアプローチを使用して懸濁GSノックアウト(GSKO)CHO細胞に安定して組み入れた。

【0184】

SCD1及びSREBF1含有FRTベクターの分子クローニング

各タンパク質のC末端のV5/Hisタグの有り無し両方でSCD1及びSREBF1タンパク質の発現を促進するFRTベースのベクターを生成するために、分子クローニングを実行した。ThermoFisherの市販されているFlp-In宿主CHO細胞プールとこれらのベクターの併用は、安定したCHO接着細胞プールを生成するために、目的の遺伝子の部位特異的組み入れを可能にした。表4でも詳述されている制限部位に隣接して二本鎖DNA断片が生成されるように、これらの遺伝子を増幅するためのPhusion（登録商標）ポリメラーゼをベースとしたPCR反応において、表4に記載されるプライマーを使用した。マウスP19由来のcDNA及びOrigeneマウスcDNAクローン(NCBI受託番号NM_011480)から、SCD1及びSREBF1遺伝子をそれぞれ増幅させた。

40

【0185】

標的遺伝子の良好な増幅の後、適当な制限酵素を用いて二重制限消化をFRT-V5ベクターにおいて、並びに以前に生成された目的の遺伝子のPCR生成物において行った。以降の形質転換の前にライゲーションを一晩インキュベートし、生じたコロニーの上でミ

50

ニプレップ精製を実行した。

【0186】

接着性のFlp-In CHO細胞を過剰発現するSCD1及びSREBF1の生成

安定した細胞プールを生成するために、前述のFRTをベースとした構築物をThermo Fisherの市販の接着性Flp-In CHO細胞と併用した。目的の遺伝子を含むFRTベクター及び空のFRT構築物(対照の細胞プールを生成するために使用された)を、リコンビナーゼ含有pOG44ベクターと一緒にFlp-In細胞に同時トランスフェクトさせた。FRTベクター及びFlp-In CHOゲノムに存在するリコンビナーゼ部位は部位特異的組換えを開始し、選択薬剤としてハイグロマイシンを使用して良好なクローンを単離することができる。部位特異的様式で安定して発現する組換えCHO接着細胞プールは、製造業者の説明書に従って、例えば、例えばThermo Fisherの参考文献及びプロトコールウェブサイトから入手可能である、Thermo FisherのFlp-Inマニュアルに記載の通りに生成された。この方法は、対照、SCD1-V5及びSREBF1-V5 Flp-In CHOポリクローナル細胞プールを生成し、回収するために使用された。

10

【0187】

p c DNA 3.1ベクターへのSCD1及びSREBF1の分子クローニング

SCD1、SREBF1又はランケーションされたSREBF1遺伝子の1つにより工業的に重要なCHO懸濁細胞において安定して組み入れ、したがって過剰発現させるために、発現ベクターを生成した。p c DNA 3.1 V5-His/TOPOベクターは、目的の遺伝子の発現を促進する、適当なCMVプロモーター及び下流の複数のクローニング部位からなり、さらに、ゲノムへのDNAの組み入れの後に良好なクローンの選択のために利用することができるネオマイシン遺伝子の発現を可能にするエレメントも含む。

20

【0188】

最初に、表4に示すプライマーを使用してSCD1、SREBF1及びSREBF1トランケーションを増幅するために、生じたPCR生成物の側面に制限部位が同時に加えられるように設計された、Phusion(登録商標)PCRプロトコールを使用した。以前に生成されたSCD1-FRTベクターは、SCD1遺伝子を増幅するための鋳型として使用し、OrigeneマウスcDNA(NCBI受託番号NM_011480)は、SREBF1遺伝子及びそのトランケーションを増幅するために使用した。ここでSREB410と呼ばれるSREBF1トランケーションは、SREBF1のヘリックス-ループ-ヘリックス(HLH)ドメインを含む、410アミノ酸の長いポリペプチド配列をコードする。このドメインは、完全長タンパク質から内因的に切断され、既に概説した通り、核へのこの断片の移動及び以降の遺伝子転写活性化を可能にする。核に直接的に位置するタンパク質(この配列によってコードされる)を発現させ、したがって、内因性プロセッシングを必要とせずに転写活性化因子としてのその機能を実行する目的で、この領域を増幅するようにプライマーを設計した。

30

【0189】

適当な場合は精製されたPCR生成物(表4を参照する)で、及びp c DNA 3.1/V5-His/TOPOで二重制限消化を実行し、ここで、V5及びHisタグをコードするインフレーム配列への読み通しを可能にするために、プライマーは終止コドンのない遺伝子を増幅した。V5-Hisタグを有するSCD1、SREBF1又はSREB410遺伝子を含むベクターを得るために、生じたDNA断片をライゲーションした。これらの反応を形質転換させ、生じたコロニーのいくつかでミニプレップを実行した。制限消化を実行し、生じたDNA断片をアガロースゲルにかけて、どの試料が良好であるか確認した。

40

【0190】

懸濁GSKO CHO細胞を過剰発現するSCD1及びSREBF1の生成

工業的に重要な細胞系に挿入された遺伝子の構成的発現の作用を調査するために、化学的に定義された、以前に合成されたp c DNA 3.1 V5-His/TOPO由来の構築

50

物で安定してトランスフェクトさせた、タンパク質無血清培地で増殖させた懸濁 CHO K1SV GS-KO 細胞プールを生成した。これを達成するために、Lonza の CHO K1SV GS-KO 宿主細胞系を使用して安定した組み入れを実行した。最初に、SCD1-V5、SREBF1-V5、SREB410-V5 及び対照 (空の pcDNA3.1V5-His/TOPO) 構築物を、PvuI 制限酵素 (NEB) による一晩の消化によって線状化した。線状化の後、エタノール沈殿を使用して DNA を精製し、20 µg の DNA 及び 1×10^7 の生存可能な細胞を使用して CHO K1SV GS-KO 細胞をエレクトロポレーションし、その直後に 37 °C で CD-CHO 培地 (Thermo Fisher) を含有する T75 フラスコに移し、20 mL の最終容積にした。フラスコは、空気雰囲気中の 5% CO₂ を含む 37 °C の加湿静止インキュベーターの中に 24 時間置いた。G418 (Melford) 選択薬剤の濃縮保存液を CD-CHO 培地に希釈し、この保存液の 5 mL を T75 フラスコに加えて静かに混合し、25 mL の総量に 750 µg/mL の最終濃度を与えた。増殖及び培養生存度を判定するために 3~4 日おきに細胞計数を実行し、CD-CHO 培地中の 750 µg/mL の G418 を遠心分離及び再懸濁によって概ね 6 日おきに更新した。細胞が 1 mL につき 2×10^5 の生存可能な細胞数の濃度に到達したならば、細胞を 125 mL エーレンマイヤーフラスコに移し、ルーチンの懸濁細胞培養を確立した。

【表 4】

表 4: プライマー配列の概要

プライマー名称	プライマー配列(5'-3')	制限部位	配列番号
eGFP SV40 For	TAT GCTAGC GGTACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGA	NheI , KpnI *	5
SREBF1 For FRT	TAT GGTACC ATGGACGAGCT	KpnI	6
SREBF1 Rev FRT	ATA GGGCCC TTAGCTGGAA	ApaI	7
SREBF1 V5 For FRT	TAT GCGGCCGC ATGGACGAG	NotI	8
SREBF1 V5 Rev FRT	ATA CTCGAG CGGCTACTCTT	ApaI	9
SCD1 For FRT	TAT GGTACC ATGCCGGCC	KpnI	10
SCD1 Rev FRT	ATA CTCGAG TCAGCTACTCTTGT	XhoI	11
SCD1 V5 For FRT	TAT GGTACC ATGCCGGCC	KpnI	12
SCD1 V5 Rev FRT	ATA CTCGAG CGGCTACTCTT	XhoI	13
SREBF1 For 3.1	TAT GCGGCCGC ATGGACGAG	NotI	14
SREBF1 Rev 3.1	ATA TCTAGA CTAGCTGGAAGTGACGGTGGTTCC	XbaI	15
SREBF1 V5 For 3.1	TAT GCGGCCGC ATGGACGAG	NotI	16
SREBF1 V5 Rev 3.1	ATA TCTAGA CTGCTGGAAGTGACGGTGGTTCC	XbaI	17
SREB410 For 3.1	TAT GCGGCCGC ATGGACGAG	NotI	18
SREB410 Rev 3.1	ATA TCTAGA TCACATGCCCTCCATAGACACATCTGTG	XbaI	19
SREB410 V5 For 3.1	TAT GCGGCCGC ATGGACGAG	NotI	20
SREB410 V5 Rev 3.1	ATA TCTAGA CTCATGCCCTCCATAGACACATCTGTG	XbaI	21
SCD1 For 3.1	TAT GGTACC ATGCCGGCC	KpnI	22
SCD1 Rev 3.1	ATA CTCGAG TCAGCTACTCTTGT	XhoI	23
SCD1 V5 For 3.1	TAT GGTACC ATGCCGGCC	KpnI	24
SCD1 V5 Rev 3.1	ATA CTCGAG CGGCTACTCTT	XhoI	25

【 0 1 9 1 】

(例 2)

LMMを過剰発現する安定した細胞におけるLMMの発現分析

対照(空のp c D N A 5 F R T)、S C D 1 - V 5又はS R E B F 1 V 5を安定して組み入れた、安定したF l p - I n C H O細胞プールの確立の後に、外因性の安定して組み入れられた遺伝子の発現及びさらに発現タンパク質の細胞内位置を確認するために、免疫蛍光法を行った。10% F B Sを補充したハム栄養ミックスF 1 2培地に、対照、S C D 1 - V 5及びS R E B F 1 - V 5細胞系を24ウェルプレートの1ウェルにつき 2×10^5 の生存可能な細胞で播種した。試料をメタノールで固定し、先ず抗V5抗体(マウスで生成 - S i g m a V 8 0 1 2)に、続いて抗マウスF I T C二次コンジュゲート(ヤギで生成 - S i g m a F 0 2 5 7)に曝露させた。さらに、細胞性DNAを染色し、こうして核を強調するために、細胞をD A P I染色($10 \mu\text{g}/\text{mL}$ の有効保存液)に曝露させた。生じた免疫蛍光画像を、図1に示す。

10

【0192】

S C D 1 - V 5及びS R E B F 1 - V 5細胞系におけるF I T C染色の存在は、外因性/組換え遺伝子が首尾よく発現されたこと、さらに、S C D 1 - V 5及びS R E B F 1 - V 5タンパク質の細胞内局在化が明白だったことを示す。構成的に発現されたS C D 1 - V 5タンパク質は細胞全体に存在し、豊富だったが、画像はそれらの局在化が細胞質及びE Rにあることを示している。反対に、S R E B F 1 - V 5タンパク質は大いにより少ない量で発現されたが、それは非常に顕著に核の周囲に位置し、核の周囲に環を形成した。V5エピトープ配列が遺伝子の3'末端に加えられること、及び、S R E B F 1の天然の調節のために、特異的ドメインが切断されて細胞の中に再配置されることを考慮することが重要である。成熟した、切断されたb H L H(塩基性のヘリックスループヘリックス)領域は、それが脂質合成及び立体配座に関連して多くの遺伝子の転写活性化の役割を担っているため、きわめて重要である。この領域は遺伝子の5'末端でコードされるので、この領域は3'のV5タグの染色により検出されないだろう。したがって、翻訳されたタンパク質の構成的に発現された、切断された部分のいずれかが画像化された細胞に存在するかどうかを判定するのは不可能である。

20

【0193】

工学操作C H O K 1 S V G S - K O懸濁細胞系においてS C D 1 - V 5及びS R E B F 1 - V 5の存在を判定するために、細胞内のV5タグ付きの安定タンパク質の染色を実行した。24ウェルプレートの中のカバーグラスにこれらの細胞を接着させるために、カバーグラスをポリ-L-リシンで先ず処理し、1ウェルにつき細胞数 2×10^5 で細胞を播種し、5% C O ₂環境の静止加湿インキュベーターの中で、37°Cで一晩インキュベートさせた。メタノール固定及び透過性化に続いて、抗V5(マウスで生成 - S i g m a V 8 0 1 2)を抗マウスT R I T C(ヤギで生成 - T 5 3 9 3)二次抗体とコンジュゲートした。生じた画像を図2に示す。

30

【0194】

抗V5抗体、抗マウスH R Pコンジュゲート二次抗体を使用してウェスタンブロットを実行し、適当な検出系を使用してV5タグで脂質構築物の発現をさらに確認した。総タンパク(ブラッドフォードアッセイを使用して判定される)の等量をS D S - P A G Eのために加え、その後、ニトロセルロース上でのウェスタンブロットティングを行った。生じたブロットを図3A、3B及び3Cに示すが、V5タグはS C D 1構築物を発現する細胞だけで検出された。しかし、S R E B F 1構築物で達成された低レベル発現は、この構築物を発現する細胞系におけるV5の検出の欠如を説明することができる。

40

【0195】

(例3)

LMMを過剰発現する安定した細胞の増殖特性

この例では、LMM、C H O F l p - I n(商標)及びC H O K 1 S V G S - K O(L o n z a B i o l o g i c s)細胞系を過剰発現するように工学操作された2つの異なる細胞系において、生細胞数、細胞数及び培養生存率などの増殖特性を評価した。LMM工学操作細胞系は、例1に記載の通りに生成された。対照細胞系は、空のV5タグ付

50

き発現ベクターを発現するように工学操作された。eGFPをコードする発現ベクターを、エレクトロポレーションによってLMM工学操作細胞系にトランスフェクトさせた。1 × 10⁷の生存可能なLMM工学操作Flp-In CHO細胞又はCHOK1SVGS-KO細胞、及び20 μgのプラスミドDNA (eGFPコード発現ベクター) を使用して、エレクトロポレーションを実行し、これらの細胞を、ハムの栄養ミックスF12培地中に、約20又は32 mLの最終容積に希釈した。eGFPコード発現ベクターのトランスフェクションから24、48、72及び96時間後に、生存可能な細胞の濃度をViCell細胞カウンターで判定し、記録した。

【0196】

SCD1及びSREBF1を発現するように工学操作されたFlp-In (商標) 細胞の結果は、図4に示す。SCD1及びSREBF1を過剰発現する細胞は、対照細胞と比較して全ての時点にわたって生存可能な細胞濃度の多少の増加を一般的に示した。

10

【0197】

SCD1、SREBF1及びSREBF410を発現するように工学操作されたCHOK1SVGS-KO細胞の結果を図5A及び5Bに示す。全体の細胞濃度と比較した生存可能な細胞の濃度を図5Aに示すが、生存可能な細胞の濃度は下方のカラムに表し、カラム全体は計数した細胞の総数を表す。図5Aに示すように、LMM (SCD1及びSREBF1) の発現は、全ての時点にわたって生存可能な及び全体の細胞数の一般的な増加をもたらす。48、72及び96時間目までに、生存可能な及び全体の細胞濃度は、SCD1及びSREBF1で工学操作された細胞において有意により高かった。96時間目に、SCD1及びSREBF1で工学操作された細胞の生存可能な細胞数は、対照細胞より1 mLにつき1 × 10⁶細胞を超えて高かった。培養生存度も計算し、図5Bに示す。LMMで工学操作された細胞は、対照細胞と比較して培養生存度における増加を一般的に示した。

20

【0198】

(例4)

LMMを過剰発現する安定した細胞におけるeGFP誘導蛍光の増加

この例では、組換えタンパク質を生成する生成能力を、例1に記載の通りに、LMMを安定して発現するように工学操作されたCHO-Flp-In (商標) 及びCHOK1SVGS-KO細胞系において評価した。例3に記載の通りに、LMMで工学操作された細胞をeGFPコード発現ベクターでトランスフェクトさせ、トランスフェクションから24、48、72及び96時間後にフローサイトメトリーによって生成されたeGFPの量を測定することによって、生成能力を評価した。細胞のeGFP媒介蛍光を測定し、ここに示すデータを生成するために、FACSCalibur (BD Biosciences) 機器を使用した。

30

【0199】

eGFPの生成は、V5タグ付きのSCD1及びSREBF1を発現するように工学操作されたFlp-In細胞で測定した。図6A、6B及び6Cは、指定された時点でフローサイトメトリーを使用して記録した、LMM工学操作Flp-In細胞の蛍光中央値、幾何平均蛍光及び算術平均蛍光をそれぞれ示す。蛍光中央値、幾何平均蛍光及び算術平均蛍光のこれらの値はSCD1過剰発現細胞で増加し、それによって、SCD1を安定して発現する細胞が対照細胞と比較してより多くのeGFPを生成することが可能なことを実証する。

40

【0200】

eGFPの生成は、V5タグ付きのSCD1、SREBF1及びSREBF410を発現するように工学操作されたCHOK1SVGS-KO細胞で測定した。蛍光中央値を図7Aに示し、幾何平均蛍光を図7Bに示す。SREBF1を過剰発現するように工学操作された細胞で、増加した蛍光中央値及び幾何平均蛍光が観察された。

【0201】

CHOK1SVGS-KO由来細胞系で観察された細胞濃度及び増殖特性の差を説明

50

するために、測定した算術平均蛍光に全体の細胞濃度 ($\times 10^6 / \text{mL}$) を掛けることによって培養 1 mL あたりの全体の蛍光を計算し、計算値を図 7 C に示す。図 7 C に示すように、SCD1 過剰発現細胞は、対照細胞と比較してトランスフェクションの 24 時間後に組換えタンパク質 (eGFP) の有意に増加した量を生成した。SREBF1 過剰発現細胞は、対照細胞と比較して試験した全ての時点で eGFP の増加した量を、並びにトランスフェクションから 72 及び 96 時間後には有意に増加した量を一般的に生成した。

【0202】

一括して、これらのデータは、SCD1 及び SREBF1 などの LMM を発現するように細胞を工学操作することは、eGFP などの一時的に発現される組換えタンパク質の生成能力を増加させることを示す。さらに、測定した蛍光によって実証されるように、脂質代謝をモジュレートする改変を有しなかった細胞と比較して、細胞は増加した正しく折り畳まれている機能的 eGFP を生成し、それによって、脂質代謝のモジュレーションが生成収量及び品質の両方を増加させることを実証した。

【0203】

(例 5)

LMM を過剰発現する安定した細胞における生産性の向上

例 4 に記載される実験と同様に、異なる生成物、例えばモデル IgG4 抗体分子 (本明細書で抗体 A と呼ぶ) 及び融合タンパク質 (本明細書で Fc 融合タンパク質又は FP と呼ぶ) の生成能力について、LMM を安定して発現する細胞系を評価した。

【0204】

V5 タグ付きの SCD1 及び SREBF1 を安定して発現する Flp-In 細胞 (例 1 に記載の通りに工学操作される) を、抗体 A 又は Fc 融合タンパク質をコードする発現ベクターでエレクトロポレーションした。エレクトロポレーションの後、培養上清中の組換え抗体 A 及び FP の量を、エレクトロポレーションの 24、48、72 及び 96 時間後にウェスタンブロッティングによって判定した。抗体 A (図 8 A) 及び Fc 融合タンパク質 (図 9 A) を検出するために、抗重鎖一次抗体、抗ウサギ-HRP コンジュゲート二次抗体及び適当な検出試薬を使用した。抗体 A 及び Fc 融合タンパク質の生成の平均変化倍率を、プロテイン A HPLC によって判定し、それぞれを図 8 B 及び 9 B に示す。外因性 SCD1 を発現する細胞系は、両組換えタンパク質の対照細胞系と比較して増加した生産性を実証した。さらに、この作用は、分析した 24、48、72 及び 96 時間の時点にわたって一貫していた。

【0205】

SCD1、SREBF1 及び SREBF410 構築物を安定して発現する Lonza の CHOK1SV GS-KO (Xceed (商標)) 細胞 (例 1 に記載の通りに工学操作される) を、2 つの組換えタンパク質、モデル IgG4 (抗体 A) 及び Fc 融合タンパク質で一時的にトランスフェクトした。エレクトロポレーションの後、培養上清中の組換え抗体 A 及び FP の量を、抗重鎖一次抗体、抗ウサギ-HRP コンジュゲート二次抗体及び適当な検出試薬を使用して 24 時間ごとに 96 時間までウェスタンブロッティングによって判定した (図 10 A 及び 11 A)。抗体 A 及び Fc 融合タンパク質の生成の平均変化倍率を、プロテイン A HPLC によって判定し、それぞれを図 10 B 及び 11 B に示す。外因性 SCD1、SREBF1 及び SREBF410 を発現する CHOK1SV GS-KO 細胞系は、両組換えタンパク質の対照細胞系と比較して増加した生産性を実証した (図 10 B 及び 11 B)。さらに、この作用は、分析した 48、72 及び 96 時間の時点にわたって一貫していた。

【0206】

SCD1、SREBF1 及び SREBF410 構築物を安定して発現する Lonza の CHOK1SV GS-KO (Xceed (商標)) 細胞 (例 1 に記載の通りに工学操作される) を、2 つの組換えタンパク質、モデル IgG4 (抗体 A) 及び Fc 融合タンパク質で安定してトランスフェクトした。図 15 A 及び 16 A は、1 mL につき 0.2×10^6 の生存可能な細胞数での最初の播種から 48、96、144 及び 192 時間後の、抗体

10

20

30

40

50

A及びFC融合タンパク質の容量生産性をそれぞれ示す。結果は、SCD1過剰発現細胞プールが、両組換え分子の絶対収率を向上させることを示す。さらに、細胞数を含むように計算した後、両組換え分子の比生産性も、SCD1過剰発現細胞プールで大いに増加した(図15B及び16B)。

【0207】

これらの結果は、SCD1、SREBF1及びSREBF1の機能的断片(SREBF410)などのLMMを発現するように細胞を工学操作することは、抗体分子及び融合タンパク質などの一時的に発現させた組換えタンパク質の生成能力を増加させることを一括して示す。

【0208】

(例6)

樹立された生成細胞系の改良

例4及び5は、LMMを安定して発現する細胞系は、組換え生成物、例えばGFP、抗体分子又は融合タンパク質を一時的に発現するとき、向上した生成を有することを実証する。この例では、樹立細胞系における組換え生成物の既存の安定した収率の増強に及ぼすLMMの影響を判定するために、分析を実行した。

【0209】

モデルIgG4抗体分子(抗体A)を安定して発現するように以前に工学操作されたCHO121細胞を使用した。V5タグ付きのSCD1、SREBF1及びトランケーションされたSREBF1(SREBF410)をコードする構築物を、抗体Aを安定して発現する細胞の中で一時的に発現させた。対照細胞は、空のV5タグベクターでトランスフェクトさせた。細胞からの上清を、48、72及び168時間目に収集した。抗重鎖一次抗体(Sigma 19764)、続いて抗ウサギHRPコンジュゲート二次抗体(Sigma A6154)を使用して、生成された抗体Aの量を判定するためにウェスタンブロット分析を実行し、結果を図12Aに示す。示されるように、LMM SCD1及びSREBF410の発現は、対照と比較して、LMMの導入の48及び72時間後に細胞によって生成される抗体Aの量の増加をもたらした。LMMの導入の168時間後に生成された抗体Aの量を示すために、細胞からの上清をクーマシー分析にかけ、LMMの一時的発現(SCD1及びSREBF410)は組換えタンパク質の生成の向上をもたらしたことを実証する(図12B)。図13は、トランスフェクションから48、72、96及び144時間後の、SCD1及びSREBF410含有プラスミドによる一時的トランスフェクションの後の平均生成物力価の顕著な増加を強調している、プロテインA HPLCを使用した抗体Aの定量的分析を示す。図14は、生成物力価を判定するためにプロテインA分析を、及び比生産性を判定するために生存可能な細胞数を使用した、FC融合タンパク質の定量的分析を示す。このデータは、LMMエレメントを含有するベクターで一時的にトランスフェクトさせた細胞の平均比生産性の増加を示し、SREBF1含有構築物が最も高い平均値を与える。

【0210】

これらの結果は、樹立細胞系における脂質代謝のモジュレーションが、確立された収量と比較して生成能力をさらに向上させることができることを示す。

【0211】

(例7)

組換え遺伝子及びLMMの同時導入による向上した生産性

例示的なイムノサイトカインと、対照(LMMがない)、SCD1、SREBF1又はSREBF411のいずれかとの両方の適当な発現のための遺伝子を含む、プラスミド/構築物を生成した(SREBF1由来の配列は、CHO特異的であった; NM_001244003、配列番号34及び36)。これらの構築物は、LonzaのCHOK1SVGS-KO細胞を一時的にトランスフェクトするために、次に使用した。図17Aは、トランスフェクションの48及び96時間後に収集した上清のウェスタン分析を示す。使用した上清試料を低減し、固有の重鎖(下方のバンド)及びサイトカイン融合重鎖(上方の

10

20

30

40

50

バンド)を強調するために、抗重鎖一次抗体及びHRPコンジュゲート抗ウサギ二次でプローピングすることによって一時的生成物を検出した。トランスフェクトされた構築物へのSCD1、SREBF1及びSREBF1遺伝子の組み入れは、トランスフェクションの48及び96時間後の両バンド強度の増加をもたらした。さらに、図17Bは、プロテインA分析を使用した、トランスフェクションの96時間後に得られた試料の定量的分析を示す。イムノサイトカインの相対的存在度は、ウェスタン分析で提供されたデータを裏付ける(図17A)。

【0212】

これらのデータは、SCD1、SREBF1及びSREBF1の機能的断片(SREBF411)などのLMMと組換え生成物遺伝子との同時組み入れが、生成能力を向上させることができることを示す。

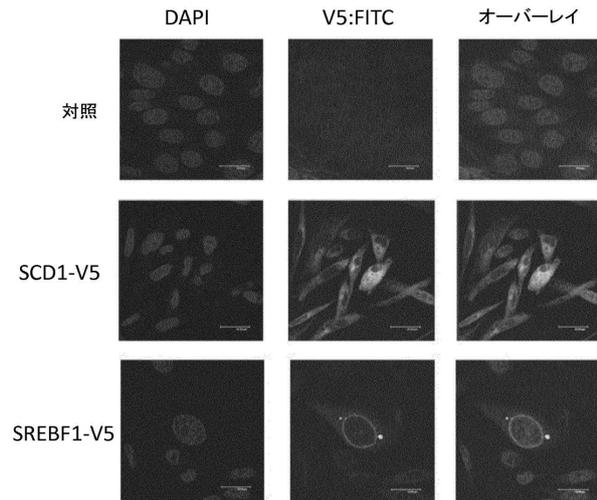
【配列表フリーテキスト】

【0213】

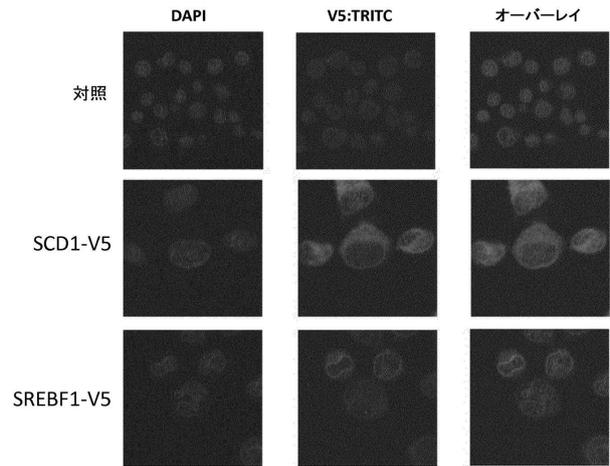
配列番号5~25 : <223>/注 = 「人工配列の記載：合成プライマー」

10

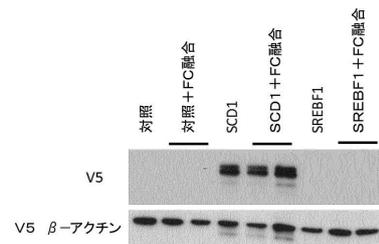
【図1】



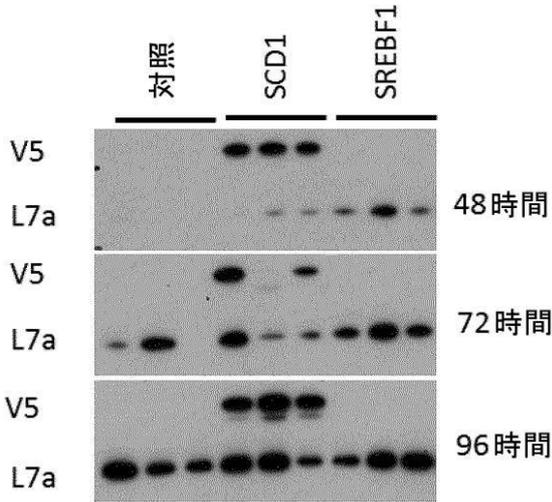
【図2】



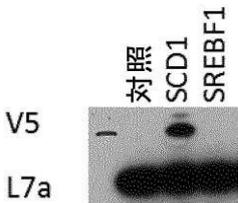
【図3A】



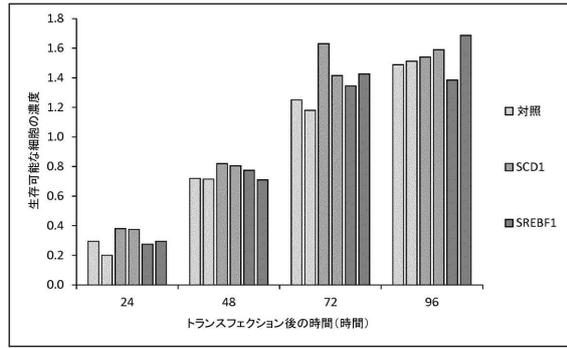
【図3B】



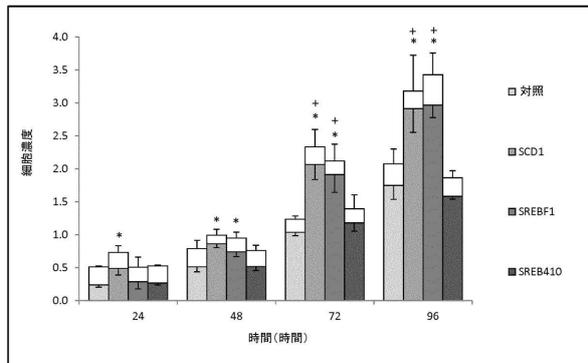
【図3C】



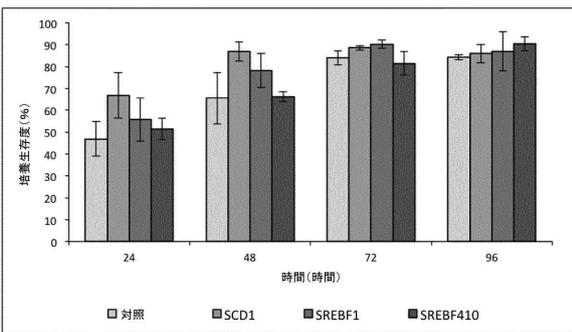
【図4】



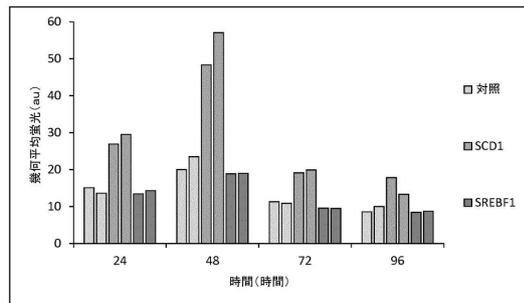
【図5A】



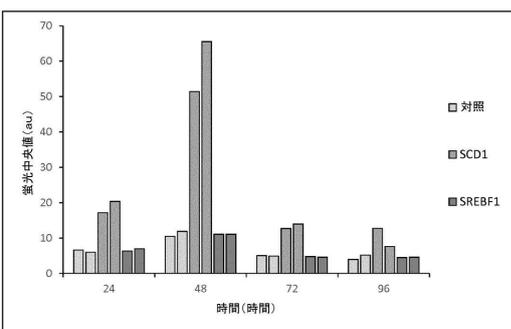
【図5B】



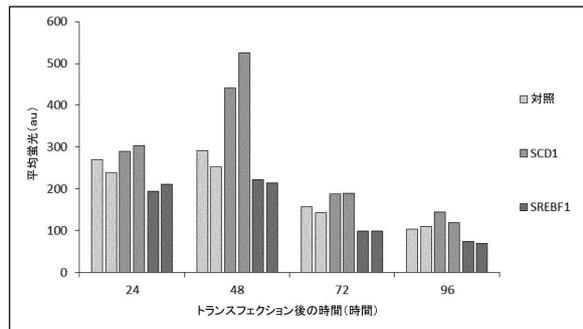
【図6B】



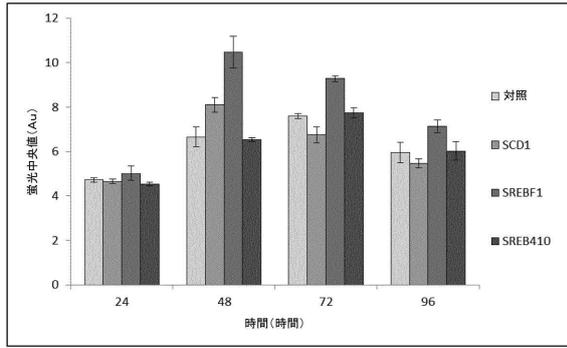
【図6A】



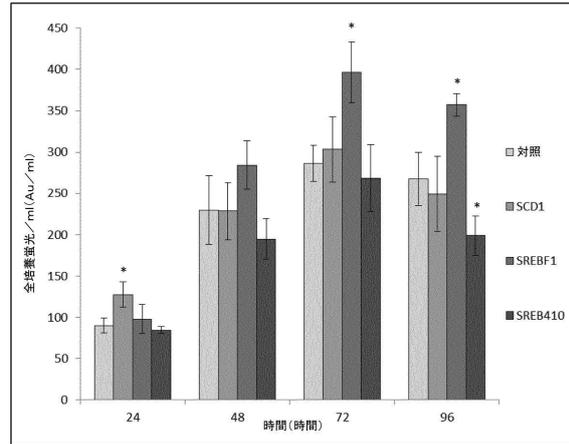
【図6C】



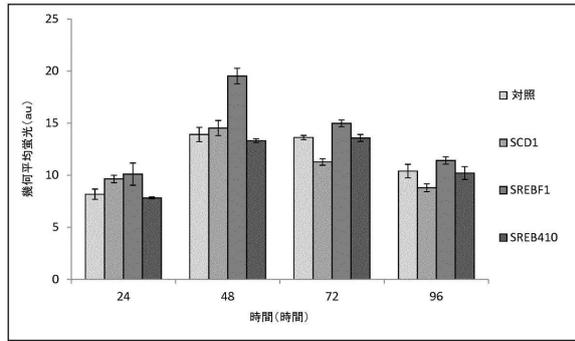
【図 7 A】



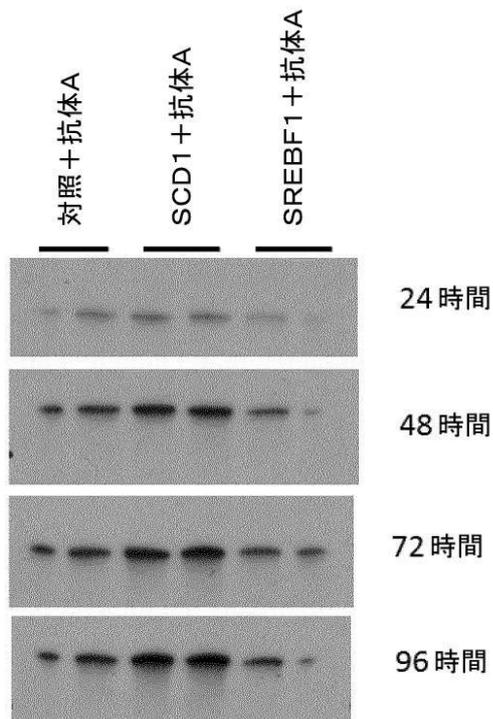
【図 7 C】



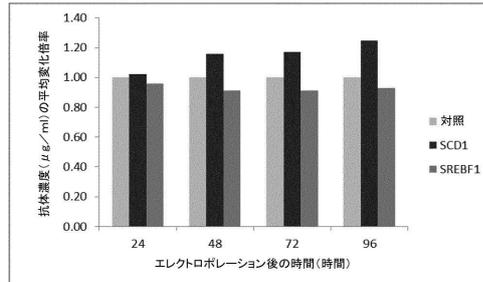
【図 7 B】



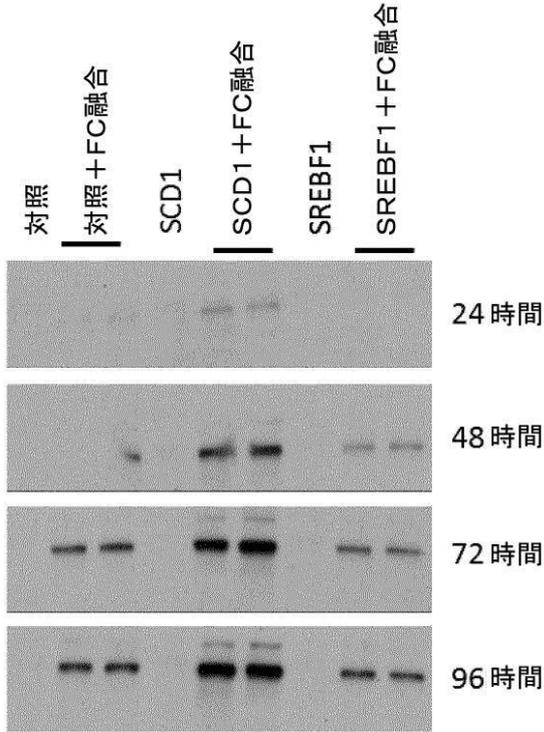
【図 8 A】



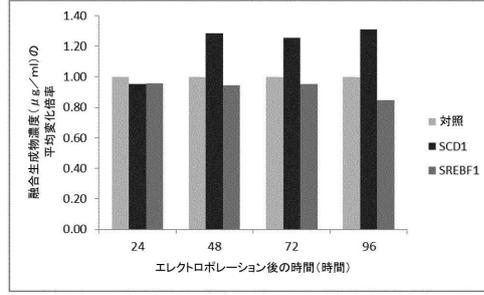
【図 8 B】



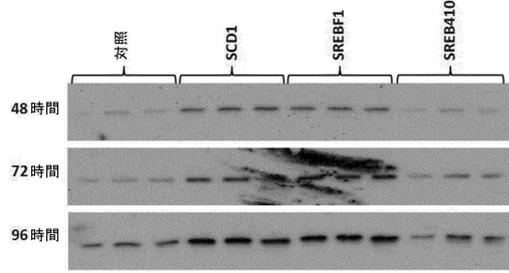
【 図 9 A 】



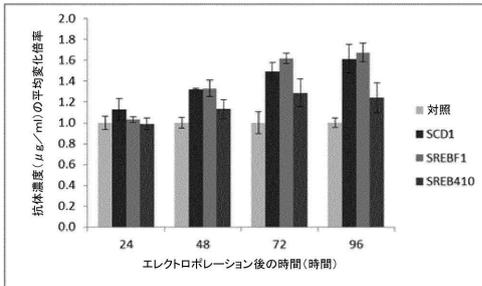
【 図 9 B 】



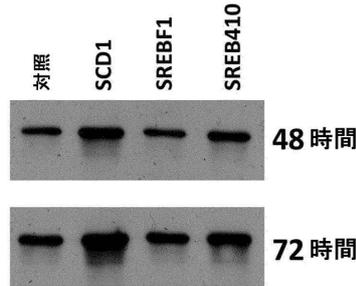
【 図 10 A 】



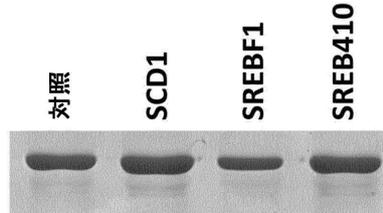
【 図 10 B 】



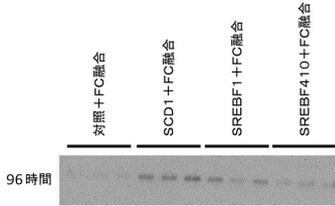
【 図 12 A 】



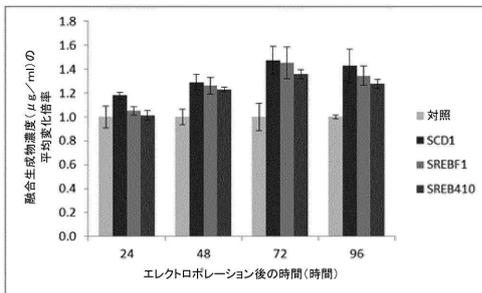
【 図 12 B 】



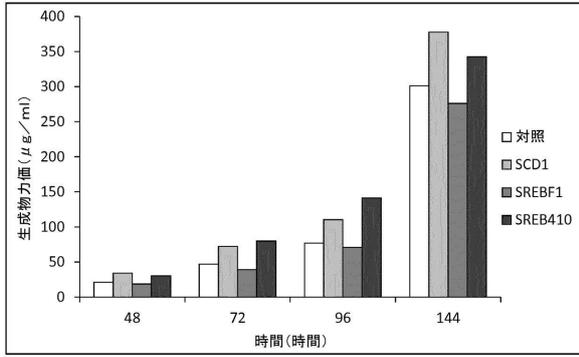
【 図 11 A 】



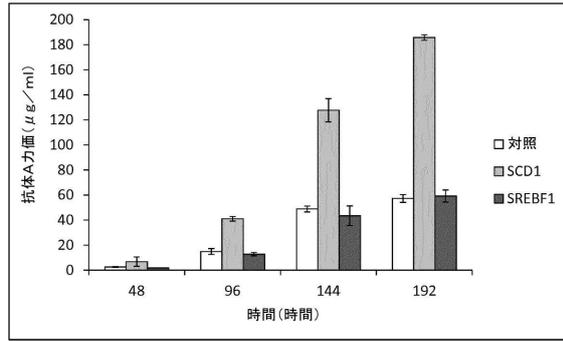
【 図 11 B 】



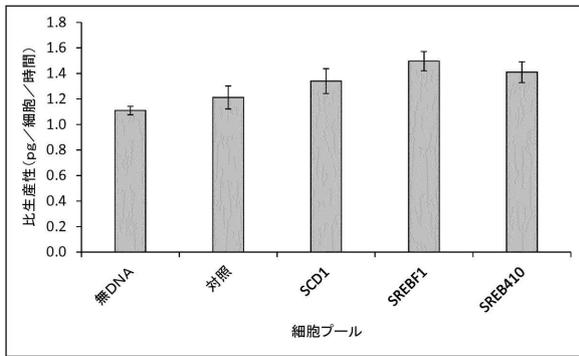
【図13】



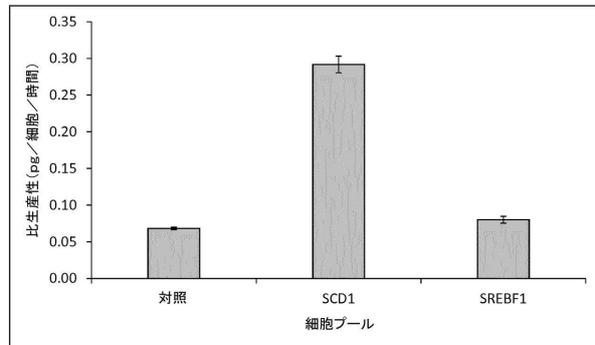
【図15A】



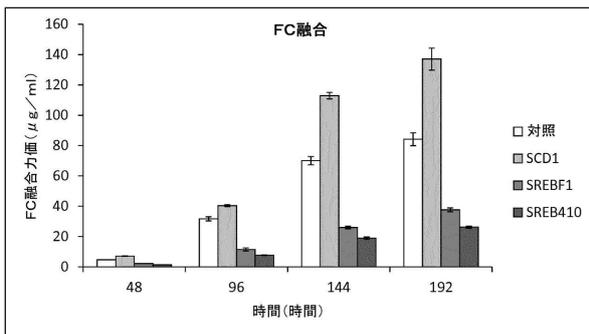
【図14】



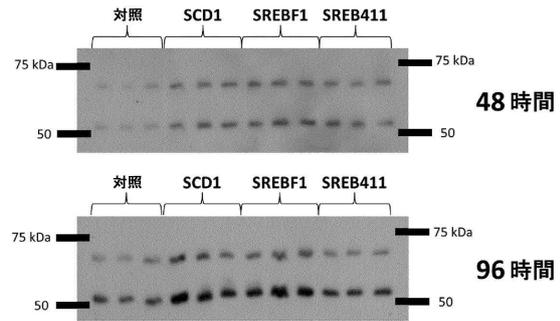
【図15B】



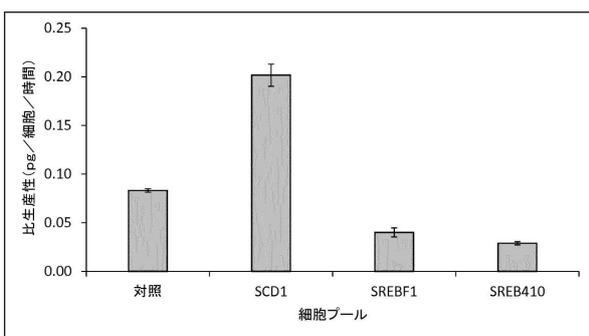
【図16A】



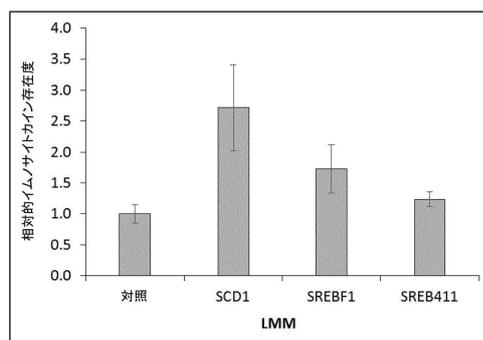
【図17A】



【図16B】



【図17B】



【配列表】

0006959942000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
C 1 2 N 15/13	(2006.01)	C 1 2 N 15/13
C 1 2 N 15/19	(2006.01)	C 1 2 N 15/19
C 1 2 N 9/02	(2006.01)	C 1 2 N 9/02
C 0 7 K 14/00	(2006.01)	C 0 7 K 14/00
C 0 7 K 14/435	(2006.01)	C 0 7 K 14/435
C 0 7 K 14/52	(2006.01)	C 0 7 K 14/52
C 0 7 K 16/00	(2006.01)	C 0 7 K 16/00
C 0 7 K 16/46	(2006.01)	C 0 7 K 16/46
C 0 7 K 19/00	(2006.01)	C 0 7 K 19/00

(72)発明者 ナイト、タンヤ
イギリス国、ケント、ケント、ヘルネ ベイ、キングス ロード 32

(72)発明者 ヤング、ロバート
イギリス国、パークシャー、スラウ、バス ロード 228、ロンザ バイオロジクス ピーエル
シー、リサーチ アンド テクノロジー

審査官 小林 薫

(56)参考文献 国際公開第2009/062789(WO, A1)
国際公開第2004/111194(WO, A2)
国際公開第02/095008(WO, A2)
国際公開第2015/018703(WO, A1)
特表2008-539773(JP, A)
J. Biol. Chem., 2003, Vol.278, No.8, pp.5813-5820
J. Cell Sci., 2006, Vol.119, pp.2342-2353
J. Biol. Chem., 1988, Vol.263, No.33, pp.17291-17300

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 / 0 0 - 7 / 0 8
C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0
C 1 2 P 1 / 0 0 - 4 1 / 0 0
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S (S T N)
U n i P r o t / G e n e S e q