

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-504024
(P2025-504024A)

(43)公表日 令和7年2月6日(2025.2.6)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15	Z N A	4 B 0 6 4
C 1 2 P	21/02 (2006.01)	C 1 2 P	21/02	C	4 B 0 6 5
C 1 2 N	9/24 (2006.01)	C 1 2 N	9/24		
C 1 2 N	9/10 (2006.01)	C 1 2 N	9/10		
C 1 2 N	9/00 (2006.01)	C 1 2 N	9/00		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全50頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-544911(P2024-544911)			(71)出願人	524280658
(86)(22)出願日	令和5年1月26日(2023.1.26)				ダイアディク インターナショナル (ユーエスエー) , インコーポレイテッド
(85)翻訳文提出日	令和6年9月18日(2024.9.18)				アメリカ合衆国, フロリダ州 3 3 4 7
(86)国際出願番号	PCT/IB2023/050667				7, ジュピター, スイート 2 0 1 , 1
(87)国際公開番号	WO2023/144739				0 4 4 ノース ユー. エス. ハイウェイ
(87)国際公開日	令和5年8月3日(2023.8.3)				ワン
(31)優先権主張番号	63/303,517			(74)代理人	100114775
(32)優先日	令和4年1月27日(2022.1.27)				弁理士 高岡 亮一
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)			(74)代理人	100121511
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV			(74)代理人	100202751
	最終頁に続く				弁理士 小田 直
				(74)代理人	100208580
					弁理士 岩堀 明代
				(74)代理人	100208580
					弁理士 三好 玲奈
					最終頁に続く

(54)【発明の名称】 THERMOTHELOMYCES HETEROThALLICAの糖鎖工学

(57)【要約】

a l g 3 遺伝子の欠失又は破壊と、E R 標的化マンノシダーゼ 1 (アルファー 1 , 2 -マンノシダーゼ) の発現と、E R 標的化グルコシダーゼ 2 アルファーサブユニットの発現と、を含む、哺乳動物タンパク質 (特に、ヒト、愛玩動物、及び他の動物のタンパク質) のN-グリカンを含む糖タンパク質を産生するように遺伝的に改変されたThermothelomyces heterothallica (旧称Myceliophthora thermophila) が提供される。Th. heterothallicaはまた、異種GlcNAcトランスフェラーゼ 1 (GNT1) 、GlcNAcトランスフェラーゼ 2 (GNT2) 、異種オリゴサッカリルトランスフェラーゼのSTT3サブユニット、及びガラクトシルトランスフェラーゼを更に含み得る。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

哺乳動物 N-グリカンをも有する糖タンパク質を産生するように遺伝子的に改変された *Thermothelomyces heterothallica* であって、遺伝子改変が、

(i) *Th. heterothallica* が機能的なアルファ-1, 3-マンノシルトランスフェラーゼを産生しないような、*alg3* 遺伝子の欠失又は破壊、

(ii) ER 標的化マンノシダーゼ 1 (アルファ-1, 2-マンノシダーゼ) の発現、及び

(iii) ER 標的化グルコシダーゼ 2 アルファ-サブユニットの発現、を含む、*Thermothelomyces heterothallica*。 10

【請求項 2】

前記マンノシダーゼ 1 が、*Trichoderma reesei* マンノシダーゼである、請求項 1 に記載の *Th. heterothallica*。

【請求項 3】

前記グルコシダーゼ 2 アルファ-サブユニットが、*Th. heterothallica* グルコシダーゼ 2 アルファ-サブユニットである、請求項 1 又は 2 に記載の *Th. heterothallica*。

【請求項 4】

前記遺伝子改変が、異種 *GlcNAc* トランスフェラーゼ 1 (*GNT1*) 及び *GlcNAc* トランスフェラーゼ 2 (*GNT2*) の発現を更に含む、請求項 1～3 のいずれか一項に記載の *Th. heterothallica*。 20

【請求項 5】

前記異種 *GNT1* 及び *GNT2* が、動物由来である、請求項 4 に記載の *Th. heterothallica*。

【請求項 6】

動物由来 *GNT1* が、ヒト *GNT1* である、請求項 5 に記載の *Th. heterothallica*。

【請求項 7】

前記動物由来 *GNT1* が、*Th. heterothallica* ゴルジ局在化シグナルを更に含むヒト *GNT1* である、請求項 6 に記載の *Th. heterothallica*。 30

【請求項 8】

前記 *Th. heterothallica* ゴルジ局在化シグナルが、C1 タンパク質 *KRE2* からのものである、請求項 7 に記載の *Th. heterothallica*。

【請求項 9】

前記 C1 タンパク質 *KRE2* からの前記ゴルジ局在化シグナルを含む前記ヒト *GNT1* が、配列番号 6 に記述されるアミノ酸配列を含む、請求項 8 に記載の *Th. heterothallica*。

【請求項 10】 40

前記 C1 タンパク質 *KRE2* からの前記ゴルジ局在化シグナルを含む前記ヒト *GNT1* が、配列番号 5 に記述される配列を含む前記 *Th. heterothallica* に導入された外因性ポリヌクレオチドによってコードされる、請求項 9 に記載の *Th. heterothallica*。

【請求項 11】

動物由来 *GNT1* が、ウシ *GNT1* である、請求項 5 に記載の *Th. heterothallica*。

【請求項 12】

前記動物由来 *GNT1* が、*Th. heterothallica* ゴルジ局在化シグナルを含むウシ *GNT1* である、請求項 11 に記載の *Th. heterothallica*。 50

【請求項 13】

前記ウシGNT1が、配列番号10に記述されるアミノ酸配列を含むTh. heterothallicaタンパク質KRE2からの前記ゴルジ局在化シグナルを含む、請求項12に記載のTh. heterothallica。

【請求項 14】

Th. heterothallicaタンパク質KRE2からの前記ゴルジ局在化シグナルを含む前記ウシGNT1が、配列番号9に記述される配列を含む前記Th. heterothallicaに導入された外因性ポリヌクレオチドによってコードされる、請求項12に記載のTh. heterothallica。

【請求項 15】

動物由来GNT2が、ラットGNT2である、請求項5に記載のTh. heterothallica。

【請求項 16】

前記ラットGNT2が、配列番号15に記述されるアミノ酸配列を含む、請求項15に記載のTh. heterothallica。

【請求項 17】

前記ラットGNT2が、配列番号16に記述される配列を含む前記Th. heterothallicaに導入された外因性ポリヌクレオチドによってコードされる、請求項15に記載のTh. heterothallica。

【請求項 18】

動物由来GNT1が、Th. heterothallicaタンパク質KRE2からのゴルジ局在化シグナルを含むヒトGNT1であり、動物由来GNT2が、ラットGNT2である、請求項5に記載のTh. heterothallica。

【請求項 19】

動物由来GNT1が、Th. heterothallicaタンパク質KRE2からのゴルジ局在化シグナルを含むウシGNT1であり、動物由来GNT2が、ラットGNT2である、請求項5に記載のTh. heterothallica。

【請求項 20】

前記遺伝子改変が、内因性フリッパーゼの過剰発現又は異種フリッパーゼの発現を更に含む、請求項1～19のいずれか一項に記載のTh. heterothallica。

【請求項 21】

外因性フリッパーゼを発現するように遺伝子的に改変され、前記フリッパーゼが、Th. heterothallica RFT1フリッパーゼである、請求項20に記載のTh. heterothallica。

【請求項 22】

前記Th. heterothallica RFT1フリッパーゼが、配列番号8に記述されるアミノ酸配列を含む、請求項21に記載のTh. heterothallica。

【請求項 23】

前記Th. heterothallica RFT1フリッパーゼが、配列番号7に記述される配列を含む前記Th. heterothallicaに導入された外因性ポリヌクレオチドによってコードされる、請求項21に記載のTh. heterothallica。

【請求項 24】

内因性Th. heterothallica RFT1フリッパーゼを過剰発現するように遺伝子的に改変された、請求項20に記載のTh. heterothallica。

【請求項 25】

前記遺伝子改変が、異種オリゴサッカリルトランスフェラーゼのSTT3サブユニットの発現を更に含む、請求項1～24のいずれか一項に記載のTh. heterothallica。

10

20

30

40

50

【請求項 26】

前記 *STT3* が、*Leishmania major STT3* である、請求項 25 に記載の *Th. heterothallica*。

【請求項 27】

前記 *Leishmania major STT3* が、配列番号 12 に記述されるアミノ酸配列を含む、請求項 26 に記載の *Th. heterothallica*。

【請求項 28】

前記 *Leishmania major STT3* が、配列番号 11 に記述される配列を含む前記 *Th. heterothallica* に導入された外因性ポリヌクレオチドによってコードされる、請求項 26 に記載の *Th. heterothallica*。

10

【請求項 29】

前記遺伝子改変が、異種ガラクトシルトランスフェラーゼの発現を更に含む、請求項 1～28 のいずれか一項に記載の *Th. heterothallica*。

【請求項 30】

前記異種ガラクトシルトランスフェラーゼが、動物由来ガラクトシルトランスフェラーゼである、請求項 29 に記載の *Th. heterothallica*。

【請求項 31】

前記動物由来ガラクトシルトランスフェラーゼが、ヒトガラクトシルトランスフェラーゼである、請求項 30 に記載の *Th. heterothallica*。

【請求項 32】

S. cerevisiae KRE2 ゴルジ局在化シグナルを含む前記ヒトガラクトシルトランスフェラーゼが、配列番号 14 に記述されるアミノ酸配列を含む、請求項 31 に記載の *Th. heterothallica*。

20

【請求項 33】

S. cerevisiae KRE2 ゴルジ局在化シグナルを含む前記ヒトガラクトシルトランスフェラーゼが、配列番号 13 に記述される配列を含む前記 *Th. heterothallica* に導入された外因性ポリヌクレオチドによってコードされる、請求項 31 に記載の *Th. heterothallica*。

【請求項 34】

前記 *Th. heterothallica* が、*Th. heterothallica C1* であり、前記 *C1* が、内因性プロテアーゼをコードする 1 つ以上の遺伝子を欠失させるように改変された株である、請求項 1～33 のいずれか一項に記載の *Th. heterothallica*。

30

【請求項 35】

前記 *Th. heterothallica* が、*Th. heterothallica C1* であり、前記 *C1* が、内因性キチナーゼをコードする遺伝子を欠失させるように改変された株である、請求項 1～34 のいずれか一項に記載の *Th. heterothallica*。

【請求項 36】

前記 *Th. heterothallica* が、*Th. heterothallica C1* であり、前記 *C1* が、野生型 *C1* 寄託番号 VKM F-3500 D、UV13-6 寄託番号 VKM F-3632 D、NG7C-19 寄託番号 VKM F-3633 D、UV18-25、寄託番号 VKM F-3631 D、W1L#100I (prt- Δ alp1 Δ chi1 Δ alp2 Δ pyr5) 寄託番号 CBS141153、UV18-100f (prt- Δ alp1、 Δ pyr5) 寄託番号 CBS141147、W1L#100I (prt- Δ alp1 Δ chi1 Δ pyr5) 寄託番号 CBS141149、及び UV18-100f (prt- Δ alp1 Δ pep4 Δ alp2 Δ prt1 Δ pyr5) 寄託番号 CBS141143 からなる群から選択される株である、請求項 1～35 のいずれか一項に記載の *Th. heterothallica*。

40

【請求項 37】

50

異種哺乳動物糖タンパク質を発現するように更に遺伝子的に改変された、請求項 1～36 のいずれか一項に記載の *Th. heterothallica*。

【請求項 38】

前記異種哺乳動物糖タンパク質が、抗体又はその抗原結合断片である、請求項 37 に記載の *Th. heterothallica*。

【請求項 39】

哺乳動物 N-グリカンをも有する糖タンパク質を産生する *Th. heterothallica* を生成するための方法であって、

(a) 前記 *Th. heterothallica* が機能的なアルファ-1, 3-マンノシルトランスフェラーゼを産生しないように、前記 *Th. heterothallica* の *alg3* 遺伝子を欠失させるか又は破壊することと、

(b) 前記 *Th. heterothallica* に、ER 標的化マンノシダーゼ 1 (アルファ-1, 2-マンノシダーゼ) 及び ER 標的化グルコシダーゼ 2 アルファ-サブユニットをコードする外因性ポリヌクレオチドを導入することと、を含む、方法。

【請求項 40】

前記 *Th. Heterothallica* に、前記 *Th. Heterothallica* における内因性フリッパーゼの過剰発現を誘導するための、前記内因性フリッパーゼをコードする外因性ポリヌクレオチド、又は前記 *Th. Heterothallica* における異種フリッパーゼの発現を誘導するための、前記異種フリッパーゼをコードする外因性ポリヌクレオチド、を導入することを更に含む、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 41】

哺乳動物 N-グリカンをも有する糖タンパク質を産生するための方法であって、

(a) 請求項 1～40 のいずれか一項に記載の遺伝子的に改変された *Th. heterothallica* を提供することと、

(b) *Th. heterothallica* を、前記糖タンパク質を発現させるのに好適な条件下で培地培養することと、

(c) 前記糖タンパク質を回収することと、を含む、方法。

【請求項 42】

前記糖タンパク質が、前記 *Th. heterothallica* において組換え的に発現された異種哺乳動物糖タンパク質である、請求項 41 に記載の方法。

【請求項 43】

異種哺乳動物糖タンパク質が、*Th. heterothallica* において組換え的に発現されたヒト糖タンパク質である、請求項 41 に記載の方法。

【請求項 44】

異種哺乳動物糖タンパク質が、抗体又はその抗原結合断片である、請求項 41 に記載の方法。

【請求項 45】

請求項 1～39 のいずれか一項に記載の遺伝子的に改変された *Th. heterothallica* によって産生された組換え糖タンパク質であって、前記糖タンパク質が、 $GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$ (G0) グリカンを含む、組換え糖タンパク質。

【請求項 46】

請求項 1～39 のいずれか一項に記載の遺伝子的に改変された *Th. heterothallica* によって産生された組換え糖タンパク質であって、前記糖タンパク質が、 $Gal_1GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$ (G1) グリカン、 $Gal_2GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$ (G2) グリカン、又はそれらの組み合わせを含む、組換え糖タンパク質。

【請求項 47】

前記糖タンパク質が、医薬品グレードのものである、請求項 45 又は 46 に記載の組換え糖タンパク質。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、哺乳動物タンパク質、特にヒトタンパク質のN-グリカンに類似したN-グリカンを含むタンパク質を産生するために、タンパク質グリコシル化経路が内因性遺伝子の破壊を最小限にして操作されている、遺伝子的に改変された*Thermothelomyces heterothallica*（旧称*Myceliophthora thermophila*）に関する。

【背景技術】

【0002】

ほとんどの治療用タンパク質は、適したフォールディング、機能、及び活性を確実にするためにグリコシル化を必要とする。治療用タンパク質のグリコシル化はまた、それらの免疫原性にとって特に重要である。したがって、そのようなタンパク質は、必要なグリコシル化機構を欠く標準的な原核生物発現系において産生することができない。グリコシル化及び他の翻訳後改変は、治療用糖タンパク質に必須であるため、それらのほとんどは、現在、哺乳動物細胞において産生されている。しかしながら、哺乳動物細胞培地培養（例えば、CHO、マウス、又はヒト細胞）に基づく発酵プロセスは、典型的には、非常に遅く、高価な栄養素及び補因子（例えば、ウシ胎仔血清又は特異的な成長因子）を必要とし、多くの場合、低い産物力価を生じ、また、得られるタンパク質産物を汚染し得る感染を受けやすい。したがって、無血清発現系への移行が進んでいる。具体的には、酵母及び真菌は、代替的なタンパク質発現系として開発されている。

【0003】

真核性生物、酵母、及び真菌は、N-及びO-グリコシル化を含む翻訳後改変を行うことができるが、酵母及び真菌におけるタンパク質グリコシル化は、哺乳動物細胞におけるものとはかなり異なる。これらの問題を克服するために、特に、異種タンパク質の産生に最も頻繁に使用される種（例えば、*S. cerevisiae*、*Pichia pastoris*、*Yarrowia lipolytica*、*Hansenula polymorpha*、並びに*Aspergillus*及び*Trichoderma*種）において、N-グリコシル化経路を再操作する可能性が調査されてきた。しかしながら、タンパク質収率は依然として改善を必要とし、特に、産生されたタンパク質が高いパーセンテージで所望のグリコフォーム、つまり、哺乳動物（特に、ヒト及び愛玩動物）タンパク質のグリコフォームを持つように、グリコシル化パターンを改善する必要がある。

【0004】

Parsaie Nasab et al., 2013, Appl Environ Microbiol., 79 (3): 997-1007は、*Saccharomyces cerevisiae*においてヒトN-グリカンを持つ組換えタンパク質を産生するための合成N-グリコシル化経路を説明している。 $\Delta alg3 \Delta alg11$ 二重変異体株を使用し、これを更に遺伝的に改変して、人工フリッパーゼ、原生動物オリゴサッカリルトランスフェラーゼ、並びにゴルジ標的化ヒトN-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼI及びIIを発現させた。結果は、変異体株において組換え的に発現された分泌モノクローナル抗体上の複合ヒトN-グリカン構造GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂の存在を確認した。しかしながら、ゴルジ装置局在化マンノシルトランスフェラーゼの干渉により、N-結合型グリカンの不均一性が観察された。

【0005】

Parsaie Nasabらによるこの研究はまた、米国特許出願公開第2011/0207214号で説明されており、1つのマンノース残基、2つのマンノース残基、及び3つのマンノース残基を含むLLOを細胞質側から細胞内小器官の内腔側にフリップすることができる脂質結合型糖鎖（lipid-linked oligosaccharide、LLO）フリッパーゼ活性を発現するように改変された細胞を開示しており、De Wachter et al., 2018, Engineering of Yeast Glycoprotein Expression. In: Advances in Biochemical

Engineering/Biotechnology. Springer, Berlin, Heidelbergにおける他の関連研究とともに更に再考察されている。

【0006】

米国特許第7,029,872号、同第7,326,681号、同第7,629,163号、同第7,981,660号は、ヒトにおける糖タンパク質の処理を模倣する、一連の酵素反応を実行することを可能にする遺伝子的に改変されたグリコシル化経路を有する細胞株を開示している。通常、高マンノース含有N-グリカンを生産する、単細胞及び多細胞の真菌などの真核生物を改変して、ヒトグリコシル化経路に沿ってMan₅GlcNAc₂又は他の構造などのN-グリカンを生産する。

【0007】

米国特許第7,449,308号、同第7,935,513号は、一連のグリコシルトランスフェラーゼ、糖輸送体、及びマンノシダーゼの異種発現によって更に改変されて、哺乳動物、例えばヒトの治療用糖タンパク質の生産のための宿主株となり得る、改変されたオリゴ糖を有する真核宿主細胞を開示している。操作された宿主細胞中に作製されたN-グリカンは、Man₅GlcNAc₂コア構造を有し、次いで、これは、1つ以上の酵素、例えば、グリコシルトランスフェラーゼ、糖輸送体、及びマンノシダーゼの異種発現によって更に改変されて、ヒト様糖タンパク質を生じさせ得る。

【0008】

米国特許第7,795,002号は、末端β-ガラクトース残基を有し、本質的にフコース及びシアル酸残基を欠くことを特徴とするヒト様糖タンパク質を生産する酵母及び糸状菌などの真核宿主細胞を開示している。更に、組換え真核宿主細胞においてUDP-ガラクトースから受容体基質上へのガラクトース残基の転移を触媒するための方法が開示され、これは治療用糖タンパク質として使用することができる。

【0009】

米国特許第8,986,949号は、より多くのヒト様グリカンパターンを得ることを全体的な目標として、N-結合型グリカン構造の処理を強化するために、触媒的に活性なエンドマンノシダーゼ遺伝子を発現する非哺乳動物真核生物の遺伝子的に操作された株を開示している。加えて、新規なヒト及びマウスエンドマンノシダーゼのクローニング及び発現が開示されている。

【0010】

米国特許第9,359,628号は、より小さいグリカンを生産することができるPichiaの遺伝子的に操作された株を開示している。具体的には、遺伝子的に操作された株は、α-1,2-マンノシダーゼ及びグルコシダーゼIIのいずれか又は両方を発現することができる。遺伝子的に操作された株は、OCH1遺伝子が破壊されるように更に改変することができる。Pichiaのそのような遺伝子的に操作された株を使用して、より小さいグリカンを生産する糖タンパク質を生産する方法も提供される。

【0011】

米国特許第9,695,454号は、低減したプロテアーゼ活性を有し、フコシル化経路を発現する、Trichoderma真菌細胞などの糸状菌細胞を含む組成物を開示している。更に、遺伝子的に改変された糸状菌細胞、例えばTrichoderma真菌細胞を発現系として使用して、フコシル化N-グリカンを生産する糖タンパク質を生産するための方法が説明されている。

【0012】

Thermothelomyces heterothallica (Th. heterothallica) 株C1 (近年、Myceliophthora thermophilaから改名され、これはChrysosporium lucknowenseから改名された) は、高レベルのセルラーゼを生産する耐熱性子囊菌糸状菌であり、これは、商業規模でのこれら及び他の酵素の生産にとって魅力的である。

【0013】

例えば、米国特許第 8, 268, 585 号及び同第 8, 871, 493 号は、異種タンパク質又はポリペプチドを発現及び分泌するための糸状菌宿主の分野における形質転換系を開示している。また、大量のポリペプチド又はタンパク質を経済的な様式で産生するためのプロセスも開示されている。この系は、*Chrysosporium* 属、より具体的には、*Chrysosporium lucknowense* の形質転換又は遺伝子導入された真菌株、及びその変異体又は誘導体を含む。また、*Chrysosporium* コード配列及び *Chrysosporium* 遺伝子の発現調節配列を含有する形質転換体も開示されている。

【0014】

野生型 C1 は、ブダペスト条約に従って、番号 VKM F-3500 D、寄託日 1996 年 8 月 29 日で寄託された。高セルラーゼ (High Cellulase、HC) 及び低セルラーゼ (Low Cellulase、LC) 株もまた、例えば、米国特許第 8, 268, 585 号で説明されるように寄託されている。例えば、株 UV13-6、寄託番号 VKM F-3632 D、株 NG7C-19、寄託番号 VKM F-3633 D、株 UV18-25、寄託番号 VKM F-3631 D。

【0015】

寄託されている追加の改善された C1 株としては、(i) HC 株 UV18-100f ($\Delta alp1 \Delta pyr5$) - 寄託番号 CBS141147、(ii) HC 株 UV18-100f ($\Delta alp1 \Delta pep4 \Delta alp2 \Delta pyr5 \Delta prt1$) 寄託番号 CBS141143、(iii) LC 株 W1L#100I ($\Delta chi1 \Delta alp1 \Delta alp2 \Delta pyr5$) - 寄託番号 CBS141153、及び (iv) LC 株 W1L#100I ($\Delta chi1 \Delta alp1 \Delta pyr5$) - 寄託番号 CBS141149 が挙げられる。

【0016】

欧州特許第 2505651 号は、低いプロテアーゼ活性を有するように変異又は選択された単離真菌を開示しており、この真菌は、変異されていない真菌と比較して、50% 未満のプロテアーゼ活性を有する。この真菌は、*Chrysosporium* 属のものであり、好ましくは、*Chrysosporium lucknowense* の株である。

【0017】

本発明の出願人に対する国際公開第 2021/094935 号は、ヒトの N-グリカンに類似した N-グリカンを有するタンパク質を産生するようにタンパク質グリコシル化経路が操作された、遺伝子的に改変された *Thermothelomyces heterothallica* を開示している。国際公開第 2021/094935 号は、alg3 及び alg11 遺伝子の欠失又は破壊、フリッパーゼの過剰発現、並びに異種 GlcNAc トランスフェラーゼ 1 (GlcNAc transferase 1、GNT1) 及び GlcNAc トランスフェラーゼ 2 (GlcNAc transferase 2、GNT2) の発現を開示している。

【0018】

タンパク質がヒト、愛玩動物、及び他の哺乳動物における治療用途に好適であるように、哺乳動物タンパク質、特にヒト及び愛玩動物タンパク質の N-グリカンを有する糖タンパク質を高収率で産生することができる組換えヒト、愛玩動物、及び他の哺乳動物タンパク質を産生するための追加の代替的な発現系が必要とされている。

【発明の概要】

【0019】

本発明は、哺乳動物タンパク質の N-グリカン、特にヒトタンパク質の N-グリカンに類似した N-グリカンを有する糖タンパク質を産生するように遺伝子的に改変された *Thermothelomyces heterothallica* を提供する。本発明の *Th. heterothallica* の遺伝子改変は、alg3 遺伝子の欠失又は破壊、ER 標的化マンノシダーゼ 1 (アルファー 1, 2-マンノシダーゼ) 及び ER 標的化グルコシダーゼ 2 アルファーサブユニットの異種発現又は過剰発現を含む。*Th. heterothallica* の遺伝子改変はまた、異種 GlcNAc トランスフェラーゼ 1 (GNT1) 及び GlcNAc トランスフェラーゼ 2 (GNT2) の発現を更に含み得る。いくつかの実施形態では、遺伝

10

20

30

40

50

子改変は、異種オリゴサッカリルトランスフェラーゼ (oligosaccharyltransferase、OST) のSTT3サブユニットの発現を更に含む。追加の実施形態では、遺伝子改変は、異種ガラクトシルトランスフェラーゼの発現を更に含む。いくつかの実施形態では、遺伝子改変は、内因性フリッパーゼの過剰発現又は異種フリッパーゼの発現を更に含む。

【0020】

本発明は、本明細書に開示される遺伝子的に改変された *Th. heterothallica* が糖タンパク質を産生し、この糖タンパク質において、所望の哺乳動物／ヒトN-グリカンが糖タンパク質上に見出されたN-グリカンの90%超、場合によってはこのN-グリカンの95%超、又は98%超を構成するという発見に部分的に基づいている。加えて、異種哺乳動物糖タンパク質（例えば、抗体）を発現するように更に改変される場合、本明細書に開示される遺伝子的に改変された *Th. heterothallica* は、そのN-グリカンの90%超を構成する所望の哺乳動物／ヒトN-グリカンを持つ高レベルの異種糖タンパク質を産生する。これは、得られたN-グリカンに大きな変異を生じさせるこれまでに説明された発現系とは対照的である。注目すべきことに、細胞生存率に対する深刻な悪影響は、行われた改変のうちのいずれにも観察されなかった。

【0021】

ER標的化マンノシダーゼ1（アルファ-1，2-マンノシダーゼ）及びER標的化グルコシダーゼ2アルファサブユニットの発現が、細胞生存率又は異種糖タンパク質の産生レベルを悪化させないことが更に開示される。ここで、予想外に、産生された糖タンパク質における所望の哺乳動物／ヒトN-グリカンが、内因性アルファ-1，2-マンノシルトランスフェラーゼ（ALG11）の発現を妨害する必要なく達成されたことが開示される。

【0022】

Th. heterothallica は、ほとんどの真菌及び酵母菌とは異なり、最大50個のマンノース残基を含有し得る高マンノシル化N-グリカンを持つが、むしろ、3～9個のマンノース残基を含有する「オリゴマンノース」N-グリカン、並びにマンノース及びHexNAc残基を含有するハイブリッド型N-グリカンを持つ、この構造は完全には特徴付けられていないことが留意される。ハイブリッドN-グリカンの構造及び合成経路が完全には特徴付けられていないため、本明細書で説明される遺伝子改変を使用して、そのようなグリカンを除くことができるかどうかは不明であった。驚くべきことに、本発明による遺伝子改変は、これらの構造の本質的な排除をもたらすのに十分であり、N-グリコフォームの90%超が所望の哺乳動物／ヒトN-グリカンであり、alg11の発現を低減する必要がない。

【0023】

有利には、本発明の *Th. heterothallica* 細胞は、高収量のタンパク質を産生する。本発明の *Th. heterothallica* 細胞を使用して得られるタンパク質レベルは、例えば酵母を使用して得られるものよりもはるかに高い。

【0024】

したがって、本発明は、ヒトにおける治療用途に好適な所望のN-グリカンを持つ糖タンパク質を産生するための効率的な系を提供する。

【0025】

一態様によれば、本発明は、哺乳動物N-グリカンを持つ糖タンパク質を産生するように遺伝子的に改変された *Thermothelomyces heterothallica* を提供し、この遺伝子改変は、

(i) *Th. heterothallica* が機能的なアルファ-1，3-マンノシルトランスフェラーゼを産生しないような、alg3遺伝子の欠失又は破壊、

(ii) ER標的化マンノシダーゼ1（アルファ-1，2-マンノシダーゼ）の発現、及び

(iii) ER標的化グルコシダーゼ2アルファサブユニットの発現、を含む。

【0026】

いくつかの実施形態では、マンノシダーゼ1は、*Trichoderma reesei* マンノシダーゼ1である。他の実施形態では、マンノシダーゼ1は、*Th. heterothallica* マンノシダーゼ1である。いくつかの実施形態では、グルコシダーゼ2アルファサブユニットは、*Th. Heterothallica*、*T. reesei*、及び *Aspergillus niger* グルコシダーゼ2アルファサブユニットからなる群から選択される。追加の実施形態では、遺伝子改変は、グルコシダーゼベーターサブユニットの発現を更に含む。

【0027】

いくつかの実施形態では、ER標的化 *Trichoderma reesei* マンノシダーゼ1は、配列番号2に記述されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、ER標的化 *Trichoderma reesei* マンノシダーゼ1は、配列番号1に記述される配列を含む *Th. heterothallica*、又は少なくとも90%の配列同一性を有するその類似体若しくは誘導体に導入された外因性ポリヌクレオチドによってコードされる。

10

【0028】

いくつかの実施形態では、ER標的化 *Th. heterothallica* グルコシダーゼ2アルファサブユニットは、配列番号4に記述されるアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、ER標的化された *Th. heterothallica* グルコシダーゼ2アルファサブユニットは、配列番号3に記述される配列を含む *Th. heterothallica*、又は少なくとも90%の配列同一性を有するその類似体若しくは誘導体に導入された外因性ポリヌクレオチドによってコードされる。

20

【0029】

いくつかの実施形態では、ER標的化マンノシダーゼ1（アルファ-1，2-マンノシダーゼ）及び／又はER標的化グルコシダーゼ2アルファサブユニットは、*Th. Heterothallica* ゲノム内の *alp3* プロテアーゼ遺伝子座に統合される。ある特定の実施形態では、ER標的化マンノシダーゼ1（アルファ-1，2-マンノシダーゼ）及びER標的化グルコシダーゼ2アルファサブユニットは両方とも、*Th. Heterothallica* ゲノム内の *alp3* プロテアーゼ遺伝子座に統合される。

【0030】

いくつかの実施形態では、遺伝子改変は、異種 *GlcNAc* トランスフェラーゼ1（*GNT1*）及び *GlcNAc* トランスフェラーゼ2（*GNT2*）の発現を更に含む。

30

【0031】

いくつかの実施形態では、本発明による異種 *GNT1* 及び *GNT2* は、動物由来である。

【0032】

いくつかの実施形態では、本発明による動物由来 *GNT1* は、異種ゴルジ局在化シグナルを含む。

【0033】

いくつかの実施形態では、本発明による動物由来 *GNT1* は、ヒト *GNT1* である。いくつかの実施形態では、本発明による動物由来 *GNT1* は、異種ゴルジ局在化シグナルを含むヒト *GNT1* である。

40

【0034】

いくつかの実施形態では、本発明による動物由来 *GNT1* は、ウシ *GNT1* である。いくつかの実施形態では、本発明による動物由来 *GNT1* は、異種ゴルジ局在化シグナルを含むウシ *GNT1* である。

【0035】

いくつかの実施形態では、本発明による異種ゴルジ局在化シグナルは、*Th. heterothallica* ゴルジ局在化シグナルである。いくつかの実施形態では、*Th. heterothallica* ゴルジ局在化シグナルは、*Th. heterothallica* タンパク質 *KRE2* からのものである。

50

【0036】

他の実施形態では、本発明による異種ゴルジ局在化シグナルは、酵母ゴルジ局在化シグナルである。いくつかの実施形態では、酵母ゴルジ局在化シグナルは、酵母タンパク質 KRE2 からのものである。

【0037】

いくつかの実施形態では、本発明による動物由来 GNT2 は、ラット GNT2 である。他の実施形態では、本発明による動物由来 GNT2 は、ヒト GNT2 である。

【0038】

いくつかの実施形態では、動物由来 GNT1 はヒト GNT1 であり、動物由来 GNT2 はラット GNT2 である。いくつかの実施形態では、ヒト GNT1 は、Th. heterothallica ゴルジ局在化シグナルを含む。いくつかの実施形態では、Th. heterothallica ゴルジ局在化シグナルは、C1 Th. heterothallica タンパク質 KRE2 からのものである。他の実施形態では、ヒト GNT1 は、酵母ゴルジ局在化シグナルを含む。

10

【0039】

いくつかの実施形態では、動物由来 GNT1 はヒト GNT1 であり、動物由来 GNT2 はラット GNT2 である。いくつかの実施形態では、ヒト GNT1 は、Th. heterothallica ゴルジ局在化シグナルを含む。いくつかの実施形態では、Th. heterothallica ゴルジ局在化シグナルは、C1 タンパク質 KRE2 からのものである。他の実施形態では、ヒト GNT1 は、酵母ゴルジ局在化シグナルを含む。

20

【0040】

いくつかの実施形態では、本発明による Th. heterothallica は、内因性 Th. heterothallica RFT1 フリッパーゼを過剰発現させるために遺伝子的に改変される。

【0041】

他の実施形態では、本発明による Th. heterothallica は、異種フリッパーゼを発現するように遺伝子的に改変され、異種フリッパーゼは、酵母 FLC2p フリッパーゼである。

【0042】

いくつかの実施形態では、本発明による遺伝子改変は、異種オリゴサッカリルトランスフェラーゼの STT3 サブユニット（異種 STT3）の発現を更に含む。いくつかの実施形態では、本発明による異種 STT3 は、Leishmania major STT3 である。

30

【0043】

いくつかの実施形態は、本発明による遺伝子改変は、異種ガラクトシルトランスフェラーゼの発現を更に含む。いくつかの実施形態では、異種ガラクトシルトランスフェラーゼは、動物由来ガラクトシルトランスフェラーゼである。

【0044】

いくつかの実施形態では、動物由来ガラクトシルトランスフェラーゼは、ヒトガラクトシルトランスフェラーゼである。いくつかの実施形態では、本発明による動物由来ガラクトシルトランスフェラーゼは、例えば Th. heterothallica KRE2 ゴルジ局在化シグナルを含む異種ゴルジ局在化シグナルを含むヒトガラクトシルトランスフェラーゼである。

40

【0045】

追加の実施形態では、動物由来ガラクトシルトランスフェラーゼは、Xenopus tropicalis ガラクトシルトランスフェラーゼである。いくつかの実施形態では、本発明による動物由来ガラクトシルトランスフェラーゼは、例えば S. cerevisiae KRE2 ゴルジ局在化シグナルを含む異種ゴルジ局在化シグナルを含む Xenopus tropicalis ガラクトシルトランスフェラーゼである。

【0046】

50

いくつかの実施形態では、*Th. heterothallica*は、*Th. heterothallica* C1である。

【0047】

いくつかの実施形態では、C1は、内因性プロテアーゼをコードする1つ以上の遺伝子を欠失させるように改変された株である。

【0048】

いくつかの実施形態では、C1は、内因性キチナーゼをコードする遺伝子を欠失させるように改変された株である。

【0049】

いくつかの実施形態では、C1は、野生型C1寄託番号VKM F-3500 D、UV13-6寄託番号VKM F-3632 D、NG7C-19寄託番号VKM F-3633 D、UV18-25、寄託番号VKM F-3631 D、W1L#100I (prt-Δalp1Δchi1Δalp2Δpyr5)寄託番号CBS141153、UV18-100f (prt-Δalp1、Δpyr5)寄託番号CBS141147、W1L#100I (prt-Δalp1Δchi1Δpyr5)寄託番号CBS141149、及びUV18-100f (prt-Δalp1Δpep4Δalp2Δprt1Δpyr5)寄託番号CBS141143からなる群から選択される株である。各可能性は、本発明の個別の実施形態を表す。ある特定の実施形態によれば、C1株は、少なくとも8個、少なくとも9個、少なくとも10個、少なくとも11個、少なくとも12個、少なくとも13個、少なくとも14個、若しくはそれ以上のプロテアーゼの発現及び／又は活性を低減している。ある特定の例示的な実施形態によれば、C1株は、ALP1、ALP2、PEP4、PRT1、SRP1、ALP3、PEP1、及びMTP2 (ΔalpΔalp2Δpep4Δprt1Δsrp1Δalp3Δpep1Δmtp2)の発現又は活性を低減している。

【0050】

いくつかの実施形態によれば、*Th. heterothallica*は、上記糖タンパク質上に見出されたN-グリカンの90%、95%、又は98%超を構成する哺乳動物／ヒトN-グリカンを含む異種哺乳動物糖タンパク質を産生することができる。

【0051】

いくつかの実施形態では、*Th. heterothallica*は、異種哺乳動物糖タンパク質を発現するように更に遺伝子的に改変される。いくつかの実施形態では、異種哺乳動物糖タンパク質は、抗体又はその抗原結合断片である。

【0052】

いくつかの実施形態によれば、異種哺乳動物糖タンパク質は、その全N-グリカンの90%超を構成する哺乳動物／ヒトN-グリカンを含む。いくつかの実施形態によれば、異種哺乳動物糖タンパク質は、その全N-グリカンの92%、94%、96%、98%、又は99%超を構成する哺乳動物／ヒトN-グリカンを含む。

【0053】

いくつかの実施形態によれば、異種哺乳動物糖タンパク質は、哺乳動物／ヒト細胞によって産生された同じ糖タンパク質に見出されたN-グリカンの量の少なくとも80%、85%、90%、95%、又はそれ以上である、ある量の哺乳動物／ヒトN-グリカンを含む。

【0054】

別の態様によれば、本発明は、哺乳動物N-グリカンを含む糖タンパク質を産生する*Th. heterothallica*を生成するための方法を提供し、

(a) *Th. heterothallica*が機能的なアルファ-1, 3-マンノシルトランスフェラーゼを産生しないように、*Th. heterothallica*のalg3遺伝子を欠失させるか又は破壊することと、

(b) *Th. heterothallica*に、ER標的化マンノシダーゼ1 (アルファ-1, 2-マンノシダーゼ) をコードする外因性ポリヌクレオチドを導入することと、

(c) *Th. heterothallica*に、ER標的化グルコシダーゼ2アルファサブユニットをコードする外因性ポリヌクレオチドを導入することと、を含む。

【0055】

いくつかの実施形態によれば、この方法は、*Th. Heterothallica*に、*Th. Heterothallica*における内因性フリッパーゼの過剰発現を誘導するための、上記内因性フリッパーゼをコードする外因性ポリヌクレオチド、又は*Th. Heterothallica*における異種フリッパーゼの発現を誘導するための、上記異種フリッパーゼをコードする外因性ポリヌクレオチド、を導入する工程を更に含む。

【0056】

いくつかの実施形態によれば、ER標的化マンノシダーゼ1（アルファ-1，2-マンノシダーゼ）及びER標的化グルコシダーゼ2アルファサブユニットは、両方の酵素をコードする単一の外因性ポリヌクレオチドを使用して導入される。

【0057】

いくつかの実施形態では、マンノシダーゼ1は、*Trichoderma reesei*マンノシダーゼ1である。いくつかの実施形態では、グルコシダーゼ2アルファサブユニットは、*Th. heterothallica*グルコシダーゼ2アルファサブユニットである。

【0058】

更なる態様によれば、本発明は、哺乳動物N-グリカンを含む糖タンパク質を産生するための方法であって、

(a) 本発明による遺伝子的に改変された*Th. heterothallica*を提供することと、

(b) *Th. heterothallica*を、糖タンパク質を発現させるのに好適な条件下で培地培養することと、

(c) 糖タンパク質を回収することと、を含む、方法を提供する。

【0059】

いくつかの実施形態では、糖タンパク質は、*Th. heterothallica*において組換え的に発現された異種哺乳動物糖タンパク質である。いくつかの特定の実施形態では、糖タンパク質は、*Th. heterothallica*において組換え的に発現されたヒトタンパク質である。他の実施形態では、糖タンパク質は、*Th. heterothallica*において組換え的に発現された愛玩動物のタンパク質である。いくつかの実施形態では、異種哺乳動物糖タンパク質は、その抗体又は抗原結合断片である。

【0060】

いくつかの実施形態によれば、異種哺乳動物糖タンパク質は、その全N-グリカンの90%、92%、94%、96%、98%、又は99%超を構成する哺乳動物／ヒトN-グリカンを含む。追加の実施形態によれば、異種哺乳動物糖タンパク質は、哺乳動物／ヒト細胞によって産生された同じ糖タンパク質中に見出されたN-グリカンの量の少なくとも80%、85%、90%、95%、又はそれ以上である、ある量の哺乳動物／ヒトN-グリカンを含む。

【0061】

更なる態様によれば、本発明は、本発明による遺伝子的に改変された*Th. heterothallica*によって産生された組換え糖タンパク質を提供し、糖タンパク質が、 $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ (G0) グリカンを含む。

【0062】

更なる態様によれば、本発明は、本発明による遺伝子的に改変された*Th. heterothallica*によって産生された組換え糖タンパク質を提供し、糖タンパク質が、 $\text{Gal}_1\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ (G1) グリカン、 $\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ (G2) グリカン、又はそれらの組み合わせを含む。

【0063】

いくつかの実施形態では、本発明による遺伝子的に改変された*Th. heteroth*

10

20

30

40

50

a l l i c aによって産生された組換え糖タンパク質は、医薬品グレードの糖タンパク質である。

【0064】

いくつかの実施形態によれば、異種哺乳動物糖タンパク質は、その全N-グリカンの90%、92%、94%、96%、98%、又は99%超を構成する哺乳動物／ヒトN-グリカンを含む。追加の実施形態によれば、異種哺乳動物糖タンパク質は、哺乳動物／ヒト細胞によって産生された同じ糖タンパク質中に見出されたN-グリカンの量の少なくとも80%、85%、90%、95%、又はそれ以上である、ある量の哺乳動物／ヒトN-グリカンを含む。

【0065】

本明細書に開示される態様及び実施形態の各々の任意の組み合わせは、本発明の開示内に明示的に包含されることを理解されたい。

【0066】

本発明のこれらの及び更なる態様及び特徴は、以下の詳細な説明、実施例及び特許請求の範囲から明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0067】

【図1A】糖改変された株からのプロテインAアフィニティ精製されたニボルマブの放出されたN-グリカンの分析。各形質転換からの1つのクロマトグラムを例として示す。本文中で説明される全ての株についての主なN-グリカンについての結果を、クロマトグラムの下方にある対応する表に示す。図1A－振盪フラスコ中で培養された株M4855及びM4856（T. reesei Mns1-HDEL及びC1 gls2a-HDEL発現を有するM3291ベースの株）。M4855のクロマトグラム、並びにM4855及びM4856の両方についての主な放出されたN-グリカンの表を示す。図1B～図1D－振盪フラスコ中で培養されたG1／2株M5129～M5132（G1／2機構の発現を有するM4855ベースの株）。M5130（図1B）及びM5132（図1C）のクロマトグラム、並びにM5129～M5132についての主な放出されたN-グリカンの表（図1D）を示す。

【図1B】糖改変された株からのプロテインAアフィニティ精製されたニボルマブの放出されたN-グリカンの分析。各形質転換からの1つのクロマトグラムを例として示す。本文中で説明される全ての株についての主なN-グリカンについての結果を、クロマトグラムの下方にある対応する表に示す。図1A－振盪フラスコ中で培養された株M4855及びM4856（T. reesei Mns1-HDEL及びC1 gls2a-HDEL発現を有するM3291ベースの株）。M4855のクロマトグラム、並びにM4855及びM4856の両方についての主な放出されたN-グリカンの表を示す。図1B～図1D－振盪フラスコ中で培養されたG1／2株M5129～M5132（G1／2機構の発現を有するM4855ベースの株）。M5130（図1B）及びM5132（図1C）のクロマトグラム、並びにM5129～M5132についての主な放出されたN-グリカンの表（図1D）を示す。

【図1C】糖改変された株からのプロテインAアフィニティ精製されたニボルマブの放出されたN-グリカンの分析。各形質転換からの1つのクロマトグラムを例として示す。本文中で説明される全ての株についての主なN-グリカンについての結果を、クロマトグラムの下方にある対応する表に示す。図1A－振盪フラスコ中で培養された株M4855及びM4856（T. reesei Mns1-HDEL及びC1 gls2a-HDEL発現を有するM3291ベースの株）。M4855のクロマトグラム、並びにM4855及びM4856の両方についての主な放出されたN-グリカンの表を示す。図1B～図1D－振盪フラスコ中で培養されたG1／2株M5129～M5132（G1／2機構の発現を有するM4855ベースの株）。M5130（図1B）及びM5132（図1C）のクロマトグラム、並びにM5129～M5132についての主な放出されたN-グリカンの表（図1D）を示す。

【図 1 D】糖改変された株からのプロテイン A アフィニティ精製されたニボルマブの放出された N-グリカンの分析。各形質転換からの 1 つのクロマトグラムを例として示す。本文中で説明される全ての株についての主な N-グリカンについての結果を、クロマトグラムの下方にある対応する表に示す。図 1 A-振盪フラスコ中で培養された株 M 4 8 5 5 及び M 4 8 5 6 (T. reesei Mns1-HDEL 及び C1 gls2a-HDEL 発現を有する M 3 2 9 1 ベースの株)。M 4 8 5 5 のクロマトグラム、並びに M 4 8 5 5 及び M 4 8 5 6 の両方についての主な放出された N-グリカンの表を示す。図 1 B~図 1 D-振盪フラスコ中で培養された G 1 / 2 株 M 5 1 2 9 ~ M 5 1 3 2 (G 1 / 2 機構の発現を有する M 4 8 5 5 ベースの株)。M 5 1 3 0 (図 1 B) 及び M 5 1 3 2 (図 1 C) のクロマトグラム、並びに M 5 1 2 9 ~ M 5 1 3 2 についての主な放出された N-グリカンの表 (図 1 D) を示す。

10

【図 2】振盪フラスコ中で培養された株 M 5 1 2 9 ~ M 5 1 3 2 (G 1 / 2 機構の発現を有する M 4 8 5 5 ベースの株) によって産生されたニボルマブの放出された N-グリカンの量の比較。放出された N-グリカンの量は、分析のために各試料に添加された一定量の内部標準物質を使用して、試料間で正規化されている。応答%は、参照タンパク質オプジーボについて 100%に設定される。

【図 3 A】3 つの糖改変された株の発酵試料からのプロテイン A アフィニティ精製ニボルマブの放出された N-グリカンの分析。本文中で説明される全ての株についての主な N-グリカンについての結果を、クロマトグラムの下方にある対応する表に示す。図 3 A-a l g 3 欠失のみを有する出発株 M 3 2 9 1。発酵条件からの M 3 2 9 1 のクロマトグラム及び主な放出された N-グリカンの表を示す。図 3 B~図 3 D-G 1 / 2 株 M 5 1 3 0 及び M 5 1 3 2。発酵条件からの、M 5 1 3 0 (図 3 B) 及び M 5 1 3 2 (図 3 C) のクロマトグラム並びに主な放出された N-グリカンの表 (図 3 D) を示す。

20

【図 3 B】3 つの糖改変された株の発酵試料からのプロテイン A アフィニティ精製ニボルマブの放出された N-グリカンの分析。本文中で説明される全ての株についての主な N-グリカンについての結果を、クロマトグラムの下方にある対応する表に示す。図 3 A-a l g 3 欠失のみを有する出発株 M 3 2 9 1。発酵条件からの M 3 2 9 1 のクロマトグラム及び主な放出された N-グリカンの表を示す。図 3 B~図 3 D-G 1 / 2 株 M 5 1 3 0 及び M 5 1 3 2。発酵条件からの、M 5 1 3 0 (図 3 B) 及び M 5 1 3 2 (図 3 C) のクロマトグラム並びに主な放出された N-グリカンの表 (図 3 D) を示す。

30

【図 3 C】3 つの糖改変された株の発酵試料からのプロテイン A アフィニティ精製ニボルマブの放出された N-グリカンの分析。本文中で説明される全ての株についての主な N-グリカンについての結果を、クロマトグラムの下方にある対応する表に示す。図 3 A-a l g 3 欠失のみを有する出発株 M 3 2 9 1。発酵条件からの M 3 2 9 1 のクロマトグラム及び主な放出された N-グリカンの表を示す。図 3 B~図 3 D-G 1 / 2 株 M 5 1 3 0 及び M 5 1 3 2。発酵条件からの、M 5 1 3 0 (図 3 B) 及び M 5 1 3 2 (図 3 C) のクロマトグラム並びに主な放出された N-グリカンの表 (図 3 D) を示す。

【図 3 D】3 つの糖改変された株の発酵試料からのプロテイン A アフィニティ精製ニボルマブの放出された N-グリカンの分析。本文中で説明される全ての株についての主な N-グリカンについての結果を、クロマトグラムの下方にある対応する表に示す。図 3 A-a l g 3 欠失のみを有する出発株 M 3 2 9 1。発酵条件からの M 3 2 9 1 のクロマトグラム及び主な放出された N-グリカンの表を示す。図 3 B~図 3 D-G 1 / 2 株 M 5 1 3 0 及び M 5 1 3 2。発酵条件からの、M 5 1 3 0 (図 3 B) 及び M 5 1 3 2 (図 3 C) のクロマトグラム並びに主な放出された N-グリカンの表 (図 3 D) を示す。

40

【図 4】発酵条件下で培養された株 M 5 1 3 0 及び M 5 1 3 2 によって産生されたニボルマブの放出された N-グリカンの量の比較。放出された N-グリカンの量は、分析のために各試料に添加された一定量の内部標準物質を使用して、試料間で正規化されている。応答%は、参照タンパク質オプジーボについて 100%に設定される。

【図 5 A】糖改変された株からの全分泌タンパク質の放出された N-グリカンの分析。各形質転換からの 1 つのクロマトグラムを例として示す。本文中で説明される全ての株につ

50

いての主なN-グリカンについての結果を、表(図5C)及びクロマトグラム(図5A～図5B)に示す。M6589及びM6596は、TrMns1-HDELがユビキチン様タンパク質プロモータ下にあるG1/2機構を有する株であるのに対して、M6590及びM6597は、TrMns1-HDELがbgl8プロモータ下にあるG1/2機構を有する株である。

【図5B】糖改変された株からの全分泌タンパク質の放出されたN-グリカンの分析。各形質転換からの1つのクロマトグラムを例として示す。本文中で説明される全ての株についての主なN-グリカンについての結果を、表(図5C)及びクロマトグラム(図5A～図5B)に示す。M6589及びM6596は、TrMns1-HDELがユビキチン様タンパク質プロモータ下にあるG1/2機構を有する株であるのに対して、M6590及びM6597は、TrMns1-HDELがbgl8プロモータ下にあるG1/2機構を有する株である。

10

【図5C】糖改変された株からの全分泌タンパク質の放出されたN-グリカンの分析。各形質転換からの1つのクロマトグラムを例として示す。本文中で説明される全ての株についての主なN-グリカンについての結果を、表(図5C)及びクロマトグラム(図5A～図5B)に示す。M6589及びM6596は、TrMns1-HDELがユビキチン様タンパク質プロモータ下にあるG1/2機構を有する株であるのに対して、M6590及びM6597は、TrMns1-HDELがbgl8プロモータ下にあるG1/2機構を有する株である。

20

【発明を実施するための形態】

【0068】

本発明は、哺乳動物タンパク質のN-グリカン、特にヒト、愛玩動物、及び他の哺乳動物のタンパク質のN-グリカンを有する糖タンパク質を産生するための、真菌*Thermothelomyces heterothallica*、特に株C1の遺伝子改変を対象とする。

【0069】

本明細書で説明されるように遺伝子的に改変された*Th. heterothallica*によって産生された糖タンパク質は、ヒト、イヌ、ネコ、及びウマなどの愛玩動物、並びに他の哺乳動物における治療用途に好適である。

【0070】

タンパク質グリコシル化、つまり、細胞において新たに合成されたポリペプチド鎖の側鎖へのオリゴ糖の共有結合は、糖部分を連続的に付加及び除去する一連の酵素を伴う真核細胞における順序付けられたプロセスである。N-グリコシル化は、オリゴ糖がアスパラギン残基、特に配列Asn-Xaa-Ser/Thr(ここで、Xaaは、Proを除く任意のアミノ酸を表す)中で起こるアスパラギンの側鎖に付着するプロセスである。

30

【0071】

N-グリコシル化は、小胞体(endoplasmic reticulum、ER)で始まり、ここで、オリゴ糖Glc₃Man₉GlcNAc₂は、脂質担体であるドリコールピロホスフェート上で組み立てられ、その後、ERの内腔に入ったポリペプチドの選択されたアスパラギン残基に転移される。脂質結合型オリゴ糖の生合成は、いくつかの特異的グリコシルトランスフェラーゼ(例えば、ALG1、ALG2、及びALG3)の活性を必要とする。この生合成は、ER膜の細胞質側で始まり、内腔で終わり、ここで、オリゴサッカリルトランスフェラーゼ(OST)は、新生ポリペプチドのN-X-S/Tシークオン(sequence)を選択し、アスパラギンの側鎖アミドとオリゴ糖との間にN-グリコシド結合を生成する。ERの外側から内側への脂質結合型オリゴ糖のフリッピングは、ER膜に位置するフリッパーゼによって行われる。新生ポリペプチドへの転移に続いて、オリゴ糖は、典型的には、グルコシダーゼ及びマンノシダーゼによってトリミングされ、次いで、新生糖タンパク質は、更なる処理のためにゴルジ装置に転移される。

40

【0072】

ドリコールピロホスフェート結合オリゴ糖の合成は、本質的に、全ての既知の真核生物

50

中で保たれている。しかしながら、糖タンパク質が分泌経路に沿って移動するときのオリゴ糖の更なる処理は、真菌又は酵母などの下等真核生物と動物及び植物などの高等真核生物との間で大きく変動する。したがって、糖側鎖の最終組成は、様々な生物の間で異なり、宿主に依存する。

【0073】

酵母などの微生物において、典型的には、追加のマンノース及び／又はマンノシルホスフェート糖が添加され、最大30～50個のマンノース残基を含有し得る「高マンノース」型N-グリカンをもたらす。

【0074】

ヒト、愛玩動物、及び他の哺乳動物細胞を含む動物細胞において、新生糖タンパク質は、ゴルジ装置に転移され、ここで、マンノース残基は、ゴルジ特異的1, 2-マンノシダーゼによって除去される。特定の糖残基を付加及び除去するN-アセチルグルコサミントランスフェラーゼ (GnT I、GnT II、GnT III、GnT IV、GnT V、GnT VI)、マンノシダーゼII、及びフコシルトランスフェラーゼを含む多数の改変酵素によってタンパク質がゴルジを通して進行するときに、処理は継続する。最後に、N-グリカンはガラクトシルトランスフェラーゼ (galactosyl transferase、GalT) 及びシアリルトランスフェラーゼ (sialyltransferase、ST) によって作用され、完成した糖タンパク質がゴルジ装置から放出される。動物糖タンパク質のN-グリカンは、二分岐、三分岐、又は四分岐構造を有し、典型的には、ガラクトース、フコース、及びN-アセチルグルコサミンを含み得る。一般的に、N-グリカンの末端残基は、シ

10

20

【0075】

Th. heterothallica は、ほとんどの真菌及び酵母とは異なり、高マンノシル化N-グリカンを有さず、むしろ「オリゴマンノース」グリカン ($\text{Man}_3 \sim \text{Man}_9$)、並びにMan残基及びHexNAc残基の両方を含有するハイブリッド型グリカン ($\text{Man}_3\text{HexNAc} - \text{Man}_8\text{HexNAc}$) を有する。これらのハイブリッドグリカンの正確な構造は完全には知られていない。ハイブリッドグリカンは、典型的なマンノース残基を有するが、加えて、まだ特徴付けられていない結合を介して付着した未知のHexNAcを有する。

【0076】

ハイブリッドグリカンの構造及び合成経路は完全には特徴付けられていないため、本明細書で説明される遺伝子改変を使用して、そのようなグリカンを排除することができるかどうかは不明であった。驚くべきことに、本発明による遺伝子改変は、これらの構造の本質的な排除をもたらし、N-グリコフォームの90%超、多くの場合、98%超が所望の哺乳動物／ヒトグリカンであった。

30

【0077】

本発明は、 $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ (「G0」)、 $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ (Fuc) (「FG0」)、 $\text{Gal}_{1-2}\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ (「G1」／「G2」)、及び $\text{Gal}_{1-2}\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ (Fuc) (「FG1」／「FG2」) などの、哺乳動物N-グリカン、特にヒトN-グリカンを有する糖タンパク質を高いパーセンテージで産生するような、*Th. heterothallica* におけるN-グリコシル化経路の遺伝子改変を対象とする。

40

【0078】

具体的には、いくつかの実施形態では、*Th. heterothallica* におけるN-グリコシル化経路の遺伝子改変は、以下を含む：

1. C1alg3遺伝子の欠失 (アルファ-1, 3-マンノシルトランスフェラーゼをコードする)、
2. ER標的化*Trichoderma reesei* マンノシダーゼ1 (アルファ-1, 2-マンノシダーゼ) の発現、
3. ER標的化C1グルコシダーゼ2アルファ-サブユニットの発現、

50

4. 異種GlcNAcトランスフェラーゼ1 (GNT1) の発現

5. 異種GlcNAcトランスフェラーゼ2 (GNT2) の発現、及び

6. 異種ガラクトシルトランスフェラーゼ1 (Galactosyltransferase 1、GalT1) の発現。

【0079】

alg3の欠失は、1つ又は2つの末端グルコースを有するMan₅GlcNAc₂のN-グリカン前駆体の合成を終結させる。このグリカンは、*Th. heterothallica*に導入されるGNT1及びGNT2のための基質として働く。追加の遺伝子改変は、ガラクトシルトランスフェラーゼ及び／又はフコシルトランスフェラーゼなどのヒト、愛玩動物、並びに他の哺乳動物のグリコシル化経路からの追加の酵素の導入を含み得る。

10

【0080】

上述の異種酵素は、発現した酵素が特定の細胞区画に標的化されるように、標的ペプチドとともに発現される。

【0081】

本明細書で使用されるとき、酵素が言及される場合、それは、その酵素的に活性な断片及びその酵素的に活性なバリエーションを包含する。

【0082】

本発明は、特に、*Th. heterothallica*のN-グリコシル化経路の操作を対象とする。O-グリカンは、存在し得るか、又は*Th. heterothallica*の更なる遺伝子改変によって除去若しくは改変され得ることが留意される。

20

【0083】

本発明による遺伝子改変は、遺伝子的に改変された*Th. heterothallica*がその意図される用途に好適な十分な速度で成長することができるようなものであることを理解されたい。

【0084】

本明細書で使用されるとき、「C1」又は「*Thermothelomyces heterothallica* C1」又は「*Th. heterothallica* C1」は全て、*Thermothelomyces heterothallica*株C1を指す。*Thermothelomyces*属及びその種の記載は、例えば、Marin-Felix Y (2015, *Mycologica* 107 (3): 619-632) 及び van den Brink J et al. (2012, *Fungal Diversity* 52 (1): 197-207) に見出すことができる。

30

【0085】

上記の著者ら (Marin-Felix et al., 2015) は、最適な成長温度、分生子の形態、及び有性生殖サイクルの詳細における差に基づく *Myceliophthora* 属の分割を提案していることに留意されたい。提案された基準によれば、C1は、明らかに、非耐熱性種を含んだままの *Myceliophthora* 属ではなく、以前の耐熱性 *Myceliophthora* 種を含有する新たに確立された *Thermothelomyces* 属に属する。C1は反対の交配型を有する他の *Thermothelomyces* (旧称 *Myceliophthora*) 株と子嚢胞子を形成することができるため、C1は、*Th. thermophila* C1ではなく、*Th. heterothallica* 株C1として分類するのが最適である。

40

【0086】

真菌分類は過去にも絶えず動いており、そのため、上に列挙した現在の名称は、*Myceliophthora thermophila* 以外にも種々のより古い名称が先行する場合があることも理解されなければならない (van Oorschot, 1977, *Persoonia* 9 (3): 403)、これは、現在同義語とみなされている。例えば、*Thermothelomyces heterothallica* (Marin-Felix et al., 2015, *Mycologica*, 3: 619-63) は、

50

Corynascus heterothallica (von Arx et al., 1983)、*Thielavia heterothallica* (von Klopotek, 1976. Archives of Microbiology 107 (2), 223–224)、*Chrysosporium lucknowense* 及び *thermophile* (von Klopotek, 1974. Archives of Microbiology 98 (1), 365–369)、並びに *Sporotrichium thermophile* (Alpinis 1963. Nova Hedwigia 5: 74) と同義である。

【0087】

本発明は、配列番号22に対して99%以上の相同性を示すリボソームDNA (ribosomal DNA、rDNA) 配列を含有する任意の株を包含し、全てのこれらの株は、*Thermothelomyces heterothallica* と同種であるとみなされることを更に明確に理解されたい。

【0088】

配列番号22は、*Th. heterothallica* / *thermophila* (*Myceliophthora thermophila* として列挙される) ATCC 42464 rDNA 配列 (ncbi.nlm.nih.gov / nucleotide / CP003008.1) の7番染色体上に見出されるrDNA配列と99.98%同一である。

【0089】

Th. heterothallica 株C1 (*Chrysosporium lucknowense* 株C1としての) は、ブダペスト条約に従って、番号VKM F-3500 D、寄託日1996年8月29日で寄託された。

【0090】

上記の用語はまた、野生型株に由来する遺伝子的に改変された亜株を包含し、これは、ランダムな若しくは指示された手法を使用して、例えば、UV変異導入を使用して、又は1つ以上の内因性遺伝子を欠失させることによって変異されている。例えば、C1株は、内因性プロテアーゼをコードする1つ以上の内因性遺伝子及び／又は内因性キチナーゼをコードする1つ以上の遺伝子を欠失させるように改変された野生型株を指し得る。例えば、本発明によって包含されるC1株 (亜株) としては、UV18-25、寄託番号VKM F-3631 D、株NG7C-19、寄託番号VKM F-3633 D；及び株UV13-6、寄託番号VKM F-3632 Dが挙げられる。本発明の教示に従って使用され得る更なるC1株としては、HC株UV18-100f 寄託番号CBS141147、HC株UV18-100f 寄託番号CBS141143、LC株W1L#100I 寄託番号CBS141153；及びLC株W1L#100I 寄託番号CBS141149が挙げられる。

【0091】

一般に *Th. heterothallica* 真菌、及び特にC1株は、好適な条件下で成長させた場合に酵母株と比較して、より高いバイオマス産生を示す。*Th. heterothallica* 真菌は、大量の三次元 (3 dimensions、3D) 液体培養物中並びに固体培地上で成長することができる。本発明の出願人によって開発されたいくつかの株は、従来の酵母及び他の真菌と比較して、炭素源として真菌成長培地中に存在するグルコース及び他の発酵性糖によるフィードバック抑制に対して感受性が低く、高収率につながる炭素源の高供給速度に耐えることができる。更に、これらの株のうちのいくつかは、市販の発酵槽内で成長させる場合、グルコースが抑制されていない野生型 *Th. heterothallica* 真菌、又はタンパク質産生に使用されることが知られている他の糸状菌で得られる高い粘度と比較して、培地粘度が大幅に低減する。低い粘度は、親株における長くて高度に絡み合った菌糸を有するものから、開発された株における短くてあまり絡み合っていないものへの株の形態学的変化に起因し得る。低い培地粘度は、発酵槽における大規模工業生産において非常に有利である。例えば、グルコース抑制に対して低下した感

受性を示す *Th. heterothallica* C1株UV18-25、寄託番号VKM F-3631 Dは、100,000リットルを超える量の組換え酵素を産生するために工業的に成長される。

【0092】

いくつかの実施形態では、本発明のC1株は、内因性プロテアーゼをコードする複数（すなわち、少なくとも2個）の遺伝子を欠失させるように改変された株である。いくつかの実施形態では、C1株は、内因性プロテアーゼをコードする少なくとも4個の遺伝子を欠失させるように改変された株である。追加の実施形態では、C1株は、内因性プロテアーゼをコードする少なくとも5個の遺伝子を欠失させるように改変された株である。いくつかの特定の実施形態では、C1株は、内因性プロテアーゼをコードする少なくとも6個の遺伝子を欠失させるように改変された株である。追加の特定の実施形態では、C1株は、内因性プロテアーゼをコードする少なくとも8個の遺伝子を欠失させるように改変された株である。追加の特定の実施形態では、C1株は、内因性プロテアーゼをコードする少なくとも8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、又はそれ以上の遺伝子を欠失させるように改変された株である。ある特定の例示的な実施形態では、C1株は、内因性プロテアーゼをコードする少なくとも13個又は14個の遺伝子を欠失させるように改変された株である。

10

【0093】

本発明の教示は、*Th. heterothallica* C1株の変異体、誘導体、子孫、クローン、及び類似体を包含するが、本発明の教示に従って遺伝子的に改変される場合、これらの誘導体、子孫、クローン、及び類似体が、本明細書で説明されるN-グリカンを含むタンパク質を成長及び産生することができる場合に限ることを明確に理解されたい。

20

【0094】

真菌系統に関する「誘導体」という用語は、本明細書で説明されるように、哺乳動物タンパク質、特にヒト、愛玩動物、及び他の哺乳動物タンパク質のN-グリカンを含む異種タンパク質を産生するためのツールとして、産物収率、効率、若しくは効力に正の影響を及ぼすか、又は真菌誘導体を改善する任意の形質に影響を及ぼす、改変を有する任意の真菌親系統を包含することを明確に理解されたい。本明細書で使用されるとき、「子孫」という用語は、細胞からの細胞などの、親真菌系統からの改変されていない子孫（descendant）を指す。

30

【0095】

本明細書で使用されるとき、「グリカン」とは、アミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、脂質、又は還元末端コンジュゲートなどの担体に連結することができるオリゴ糖鎖を指す。本発明は、特に、アスパラギン残基（asparagine、Asn）の側鎖アミド窒素へのN-結合によって-Asn-Xxx-Ser/Thr-などのポリペプチドN-グリコシル化部位にコンジュゲートされたN-結合型グリカン（「N-グリカン」）に関し、ここで、Xxxは、Proを除く任意のアミノ酸残基である。本発明は更に、真核細胞の小胞体中のN-結合型グリカンの前駆体である、ドリコール-ホスホオリゴ糖（Dol-P-OS）前駆体脂質構造の一部としてのグリカンに関し得る。前駆体オリゴ糖は、それらの還元末端によって、ドリコール脂質上の2つのホスフェート残基に結合される。

40

【0096】

哺乳動物糖タンパク質に見出されたN-グリカンを典型的に構成する単糖としては、限定されないが、N-アセチルグルコサミン（N-acetylglucosamine）（「GlcNAc」と略記される）、マンノース（mannose）（「Man」と略記される）、グルコース（glucose）（「Glc」と略記される）、ガラクトース（galactose）（「Gal」と略記される）、シアル酸（sialic acid）（「Neu5Ac」と略記される）、及びフコース（fucose）（「Fuc」と略記される）が挙げられる。

【0097】

N-グリカンは、「コア」構造Man₃GlcNAc₂（「Man₃」と略記される）

50

と称される共通の五糖類を共有する。本発明の重要な標的グリカン構造は、コア構造の末端1, 3マンノースアーム上に1つのGlcNAc残基を有し、コア構造の末端1, 6マンノースアーム上に1つのGlcNAc残基を有するN-グリカンを含む。そのようなN-グリカンとしては、 $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ (「G0」グリコフォームと呼ばれる)、 $\text{Gal}_{1-2}\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ (ガラクトース残基の数に従って「G1」又は「G2」グリコフォームと呼ばれる)、並びにそれらのコアフコシル化グリコフォーム： $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc})$ (「G0F」又は「FG0」) 及び $\text{Gal}_{1-2}\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc})$ (「G1F」及び「G2F」、又は「FG1」及び「FG2」) が挙げられる。

【0098】

「alg3遺伝子」という用語は、アルファ-1, 3-マンノシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子を指す。「アルファ-1, 3-マンノシルトランスフェラーゼ」という用語は、ドリキル-P-Man:Man₅GlcNAc₂-PP-ドリコールアルファ-1, 3-マンノシルトランスフェラーゼ (EC 2.4.1.258) を指し、これは、以下の反応を触媒するER常在酵素である。

ドリキルベータ-D-マンノシルホスフェート + D-Man-アルファ-(1→2)-D-Man-アルファ-(1→2)-D-Man-アルファ-(1→3)-[D-Man-アルファ-(1→6)]-D-Man-ベータ-(1→4)-D-GlcNAc-ベータ-(1→4)-D-GlcNAc-ジホスホドリコール

【0099】

【数1】

→

D-Man-アルファ-(1→2)-D-Man-アルファ-(1→2)-D-Man-アルファ-(1→3)-[D-Man-アルファ-(1→3)-D-Man-アルファ-(1→6)]-D-Man-ベータ-(1→4)-D-GlcNAc-ベータ-(1→4)-D-GlcNAc-ジホスホドリコール + ドリキルホスフェート

【0100】

いくつかの特定の実施形態では、「alg3遺伝子」は、C1のアルファ-1, 3-マンノシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子 (JGI M. thermophila ゲノムのオルソログ (mycocosm.jgi.doe.gov) アクセッション番号 2310419) である。

【0101】

本発明のTh.heterothallicaは、Th.heterothallicaが機能的なアルファ-1, 3-マンノシルトランスフェラーゼを産生しないような、alg3遺伝子の欠失又は破壊によって遺伝子的に改変される。本発明のTh.heterothallicaは、検出可能なアルファ-1, 3-マンノシルトランスフェラーゼ活性を示さない。

【0102】

「マンノシダーゼ1 (Mannosidase 1)」 (アルファ-1, 2-マンノシダーゼ) という用語は、「MDS1」又は「MNS1」と略記され、以下の反応を触媒する：

$3 \times \text{H}_2\text{O} + \text{N4} - (\alpha\text{-D-Man} - (1 \rightarrow 2) - \alpha\text{-D-Man} - (1 \rightarrow 2) - \alpha\text{-D-Man} - (1 \rightarrow 3) - [\alpha\text{-D-Man} - (1 \rightarrow 3) - [\alpha\text{-D-Man} - (1 \rightarrow 2) - \alpha\text{-D-Man} - (1 \rightarrow 6)] - \alpha\text{-D-Man} - (1 \rightarrow 6)] - \beta\text{-D-Man} - (1 \rightarrow 4) - \beta\text{-D-GlcNAc} - (1 \rightarrow 4) - \alpha\text{-D-GlcNAc}) - \text{L-アスパラギン} - [\text{タンパク質}]$ (N-グルカンマンノース異性体 8A1, 2, 3B1, 3)

【0103】

【数2】

→

10

20

30

40

50

$3\beta\text{-D-マンノース} + \text{N4-(}\alpha\text{-D-Man-(1}\rightarrow\text{3)-[}\alpha\text{-D-Man-(1}\rightarrow\text{3)-[}\alpha\text{-D-Man-(1}\rightarrow\text{6)]-}\alpha\text{-D-Man-(1}\rightarrow\text{6)]-}\beta\text{-D-Man-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-D-GlcNAc-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-D-GlcNAc)-L-アスパラギニル-[タンパク質]} \text{(N-グルカンマンノース異性体5A1, 2)}.$

【0104】

アルファ-1, 2-マンノシダーゼの例示されるアクセッション番号は、UniProt Q9P8T8である。

【0105】

「グルコシダーゼ2アルファ-サブユニット」(GLS2-アルファ又はGLS2 α)という用語は、未成熟糖タンパク質のGlc2Man9GlcNAc2オリゴ糖前駆体からの最も内側の2つのアルファ-1, 3-結合型グルコース残基を連続的に切断する酵素を指す。

10

【0106】

「フリッパーゼ」(EC 7.6.2.1)という用語は、脂質結合型グリカン前駆体を、ERにおけるその合成中に、ERの細胞質側から内腔側に転移させる酵素を指す。

【0107】

「GlcNAcトランスフェラーゼ1」という用語は、「GNT1」(また、「GnTI」)と略記され、アルファ-1, 3-マンノシル-糖タンパク質2-ベーター-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ(EC 2.4.1.101)を指し、これは、GlcNAc残基をUDP-GlcNAcから受容体基質Man₅GlcNAc₂に転移させて、GlcNAcMan₅GlcNAc₂を産生するゴルジ常在酵素である。本発明において、N-グリカン前駆体の合成は、alg3の欠失並びにアルファ-1, 2-マンノシダーゼ及びグルコシダーゼ2アルファ-サブユニットの発現を考慮してMan₃GlcNAc₂を生成し、したがって、グリカンMan₃GlcNAc₂は、GNT1のための基質として働いて、GlcNAcMan₃GlcNAc₂を産生する。

20

【0108】

「GlcNAcトランスフェラーゼ2」という用語は、「GNT2」(また、「GnTII」)と略記され、アルファ-1, 6-マンノシル-糖タンパク質2-ベーター-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ(EC 2.4.1.143)を指し、これは、GlcNAc残基をUDP-GlcNAcからGlcNAcMan₃GlcNAc₂中の遊離末端マンノース残基に転移させて、GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂を産生するゴルジ常在酵素である。

30

【0109】

「オリゴサッカリルトランスフェラーゼのSTT3サブユニット」、「STT3タンパク質」、又は単に「STT3」という用語は、ドリキル-ジホスホオリゴ糖-タンパク質グリコシルトランスフェラーゼサブユニット(EC: 2.4.99.18)を指すために、本明細書において互換的に使用される。このSTT3サブユニットは、オリゴサッカリルトランスフェラーゼ(OST)複合体の触媒サブユニットであり、これは、脂質担体ドリコール-ピロホスフェートから、新生ポリペプチド鎖中のAsn-X-Ser/Thrコンセンサスモチーフ内のアスパラギン残基への規定されたグリカン(真核生物中のGlc₃Man₉GlcNAc₂)の初期転移を触媒する(タンパク質N-グリコシル化における最初の工程)。STT3タンパク質は、以下の反応を触媒する。

40

ドリキルジホスホオリゴ糖 + L-アスパラギニル-[タンパク質]

【0110】

【数3】

→

ドリキルジホスフェート + H⁺ + N⁴-(オリゴ糖-(1→4)-N-アセチル-β-D-グルコサミニル-(1→4)-N-アセチル-β-D-グルコサミニル)-L-アスパラギニル-[タンパク質]

50

【0111】

「ガラクトシルトランスフェラーゼ」(EC 2.4.1.38)という用語は、β結合型ガラクトシル残基を末端N-アセチルグルコサミンに転移させるゴルジ常在酵素を指す。

【0112】

「異種」という用語は、細胞内局在化シグナルなどの遺伝子、酵素、タンパク質、又はペプチド配列を指す場合、本明細書では、自然に見出されないか、若しくはC1において発現されない遺伝子、酵素、タンパク質、又はペプチド配列を説明するために使用される。細胞内局在化シグナルを指す場合、この用語はまた、それぞれのタンパク質に自然に見出されるものとは異なる細胞内局在化シグナルを説明している。

10

【0113】

「内因性」という用語は、細胞内局在化シグナルなどの遺伝子、酵素、タンパク質、又はペプチド配列を指す場合、C1に自然に存在する遺伝子、酵素、タンパク質、又はペプチド配列を指す。

【0114】

「外因性」という用語は、ポリヌクレオチドを指す場合、形質転換を介してC1に外因的に導入される合成ポリヌクレオチドを説明するために本明細書において使用される。外因性ポリヌクレオチドは、リボ核酸(ribonucleic acid、RNA)分子、その後、ポリペプチド分子を産生するように、安定的又は一時的な様式でC1に導入され得る。

【0115】

20

発現構築物及びベクター

「発現構築物」、「DNA構築物」、又は「発現カセット」という用語は、本明細書において互換的に使用され、目的のタンパク質をコードする核酸配列を含み、かつ目的のタンパク質が標的宿主細胞において発現されるように組み立てられる、人工的に組み立てられた又は単離された核酸分子を指す。発現構築物は、典型的には、目的のタンパク質をコードする核酸配列に作動可能に連結された適切な調節配列を含む。発現構築物は、選択マーカーをコードする核酸配列を更に含み得る。

【0116】

「核酸配列」、「ヌクレオチド配列」、及び「ポリヌクレオチド」という用語は、デオキシリボヌクレオチド(deoxyribonucleotide、DNA)、リボヌクレオチド(ribonucleotide、RNA)、及び別個の断片の形態の又はより大きな構築物の成分としてのそれらの改変された形態のポリマーを指すために本明細書において使用される。核酸配列は、コード配列、すなわち、タンパク質などの細胞内の最終産物をコードする配列であり得る。核酸配列はまた、例えばプロモータなどの調節配列であり得る。

30

【0117】

「ペプチド」、「ポリペプチド」、及び「タンパク質」という用語は、アミノ酸残基のポリマーを指すために本明細書において使用される。「ペプチド」という用語は、典型的には、2~50個のアミノ酸からなるアミノ酸配列を示し、一方、「タンパク質」は、50個を超えるアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を示す。

【0118】

40

参照配列に対して「相同」である配列(核酸配列及びアミノ酸配列などの)は、本明細書において、配列間の同一性パーセントを指し、同一性パーセントは、少なくとも75%、好ましくは、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、又は少なくとも99%である。各可能性は、本発明の個別の実施形態を表す。本明細書で説明される配列の相同体は、本発明に包含される。タンパク質相同体は、それらが元のタンパク質の活性を維持する限り包含される。相同核酸配列は、コドン使用頻度及び遺伝コードの縮重に関連する変異を含む。配列同一性は、当技術分野で知られているように、ヌクレオチド/アミノ酸配列比較アルゴリズムを使用して決定され得る。

【0119】

50

本発明のポリペプチドをコードする核酸配列は、発現のために最適化され得る。このような配列改変の例としては、一般的にコドン最適化と称される、*Th. heterothallica*に典型的に見出されるものにより近づくように変更されたG/C含有量、及びこの真菌に非典型的に見出されるコドンの削除が挙げられるが、これらに限定されない。

【0120】

「コドン最適化」とは、構造遺伝子又はその断片内で、目的の生物内でのコドン使用頻度に近づく適切なDNAヌクレオチドの選択、及び／又は天然配列の少なくとも1つのコドン（例えば、約若しくは約1、2、3、4、5、10、15、20、25、50個を超える、又はそれ以上のコドン）を、天然アミノ酸配列を維持しながらその宿主細胞の遺伝子においてより頻繁に又は最も頻繁に使用されるコドンで置換することによって、目的の宿主細胞における発現を強化するために核酸配列を改変するプロセスを指す。様々な種が、特定のアミノ酸のある特定のコドンに対して特定のバイアスを示す。コドンバイアス（生物間でのコドン使用頻度の差）は、多くの場合、メッセンジャーRNA（messenger RNA、mRNA）の翻訳の効率性と相関し、これは、とりわけ、翻訳されるコドンの特性及び特定のトランスファーRNA（transfer RNA、tRNA）分子の利用可能性に依存すると考えられる。細胞における選択されたtRNAの優勢性は、一般に、タンパク質合成において最も頻繁に使用されるコドンの反映である。したがって、遺伝子は、コドン最適化に基づいて所与の生物における最適な遺伝子発現のために調整することができる。したがって、最適化された遺伝子又は核酸配列は、天然又は自然に発生する遺伝子のヌクレオチド配列が、生物内で統計的に好ましい又は統計的に好まれるコドンを利用するために改変されている遺伝子を指す。本発明は、本明細書に開示される目的の酵素をコードするポリヌクレオチドを明確に包含し、これは、*Th. heterothallica*における発現のために最適化されたコドンである。

【0121】

「調節配列」という用語は、プロモータ及びターミネータなどのコード配列の発現（転写）を制御するDNA配列を指す。

【0122】

「プロモータ」という用語は、インピボ又はインビトロで別のDNA配列の転写を制御又は指示する調節DNA配列を対象とする。通常、プロモータは、転写された配列の5'領域に位置する（つまり、先行する、上流に位置する）。プロモータは、それらの全体が天然源に由来するか、又は自然の中に見出される異なるプロモータに由来する異なるエレメントで構成されるか、又は更には合成ヌクレオチドセグメントを含み得る。プロモータは、構成的（すなわち、プロモータ活性化が誘導剤によって調節されず、したがって、転写速度が一定である）、又は誘導性（すなわち、プロモータ活性化が誘導剤によって調節される）であり得る。ほとんどの場合には、調節配列の正確な境界は完全に画定されておらず、場合によっては、完全に画定することができないため、いくつかの変異のDNA配列は同一のプロモータ活性を有し得る。

【0123】

「ターミネータ」という用語は、転写終結を調節する別の調節DNA配列を対象とする。ターミネータ配列は、転写される核酸配列の3'末端に作動可能に連結される。

【0124】

「*Th. heterothallica*プロモータ」及び「*Th. heterothallica*ターミネータ」という用語は、*Th. heterothallica*での使用に好適な、すなわち、*Th. heterothallica*における遺伝子発現を指示することができるプロモータ配列及びターミネータ配列を示す。いくつかの特定の実施形態では、C1プロモータ及びC1ターミネータが使用され、これらは、C1における遺伝子発現を指示することができるプロモータ配列及びターミネータ配列を示す。

【0125】

いくつかの実施形態によれば、*Th. heterothallica*プロモータ／ター

ミネータは、*Th. heterothallica*の内因性遺伝子に由来する。他の実施形態によれば、*Th. heterothallica*プロモータ／ターミネータは、*Th. heterothallica*に対して外因性の遺伝子に由来する。

【0126】

好適な構成的プロモータ及びターミネータとしては、例えば、ホスホグリセレートキナーゼ遺伝子 (phosphoglycerate kinase gene、PGK) (Uniprot: G2QLD8、NCBI参照配列: XM__003665967)、グリセルアルデヒド3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase、GPD) (Uniprot: G2QPQ8、NCBI参照配列: XM__003666768)、ホスホフルクトキナーゼ (phosphofructokinase、PFK) (Uniprot: G2Q605、NCBI参照配列: XM__003659879) などのC1解糖系遺伝子のもの、又はβ-グルコシダーゼ1遺伝子**bg11** (アクセッション番号: XM__003662656)、又はトリオースホスフェートイソメラーゼ (triose phosphate isomerase、TPI) (Uniprot: G2QBR0、NCBI参照配列: XM__003663200)、又はアクチン (actin、ACT) (Uniprot: G2Q7Q5、NCBI参照配列: XM__003662111)、又はC1**cbh1**プロモータ (GenBank AX284115) 若しくはC1**chi1**プロモータ (GenBank HI550986) が挙げられる。使用することができる追加のプロモータは、*Aspergillus nidulans* **gpdA**プロモータ、及び*Rantasa* **et al.** (2018 NAR 46 (18): e111) で説明される合成プロモータである。本発明とともに使用することができる合成プロモータは、国際公開第2017/144777号で更に説明されている。例示的なターミネータとして、C1キチナーゼ1遺伝子**chi1** (GenBank HI550986)、セロビオヒドロラーゼ1**cbh1** (GenBank AX284115) のターミネータ、又は酵母菌**adh1**ターミネータを使用することができる。

【0127】

例示的なプロモータ及びターミネータ配列、並びにプロモータ／ターミネータ対は、以下の実施例セクションに提供される。いくつかの実施形態では、本発明とともに使用するためのプロモータ配列は、以下に例示されるように、プロモーター-8、**bg18**プロモータ、プロモーター-9、プロモーター-3、プロモーター-1、及びTEF1Aプロモータからなる群から選択される。各可能性は、本発明の個別の実施形態を表す。

【0128】

「作動可能に連結された」という用語は、調節エレメントが、選択された核酸配列の発現を調節することを可能にするために、選択された核酸配列が調節エレメント (プロモータ又はターミネータ) に近接していることを意味する。

【0129】

「局在化シグナル」、「局在化配列」、「細胞内標的ペプチド／シグナル／配列」などという用語は、本明細書において互換的に使用され、タンパク質を細胞内の特定の細胞内局在化へと指示するタンパク質配列 (典型的には、N末端などのタンパク質の1つの末端に存在する) 内に含まれる短いペプチド配列 (通常、5～30アミノ酸長) を指す。例えば、ゴルジ局在化シグナルは、タンパク質をゴルジ装置に標的化する。「異種局在化シグナル」、例えば、「異種ゴルジ局在化シグナル」は、タンパク質において自然に見出されるものではない局在化シグナルを示す。いくつかの実施形態では、「異種」は、別の生物からの局在化シグナルを指す。

【0130】

いくつかの実施形態では、本発明による*Th. heterothallica*において発現されたタンパク質の局在化シグナルは、*Th. heterothallica*の内因性遺伝子に由来する。例えば、いくつかの実施形態では、C1タンパク質KRE2a (JGI M. thermophilaゲノムのオルソログ (mycocosm.jgi.doe.gov) アクセッション番号2300989) からのゴルジ局在化シグナルが使用

される。

【0131】

他の実施形態では、本発明による *Th. heterothallica* において発現されたタンパク質の局在化シグナルは、*Th. heterothallica* に対して外因性の遺伝子（異種局在化シグナル）に由来する。例えば、いくつかの実施形態では、本発明による *Th. heterothallica* において発現される動物由来酵素は、それら自体の天然発生ゴルジ局在化シグナルとともに発現される。別の例として、いくつかの実施形態では、*S. cerevisiae* タンパク質 KRE2（GenBank アクセション番号 CAA44516）などの酵母タンパク質からのゴルジ局在化シグナルが使用される。

10

【0132】

いくつかの実施形態によれば、*Th. heterothallica* において発現されたタンパク質は、ER 標的配列を含む。ある特定の実施形態では、ER 標的配列は、配列 HDEL である。

【0133】

本明細書で使用されるとき、「インフレーム」という用語は、1つ以上の核酸配列を指す場合、これらの配列が、それらの正確なリーディングフレームが保たれるように連結されることを示す。

【0134】

本発明のいくつかの実施形態による発現構築物は、フリッパーゼ、GNT1、又は GNT2 などの酵素をコードする核酸配列に作動可能に連結された *Th. heterothallica* プロモータ配列及び *Th. heterothallica* ターミネータ配列を含む。いくつかの特定の実施形態では、本発明の発現構築物は、フリッパーゼ、GNT1、又は GNT2 などの酵素をコードする核酸配列に作動可能に連結された C1 プロモータ配列及び C1 ターミネータ配列を含む。

20

【0135】

特定の発現構築物は、ポリメラーゼ連鎖反応（polymerase chain reaction、PCR）、制限エンドヌクレアーゼ消化、インビトロ及びインビボアセンブリ法、並びに遺伝子合成法、又はそれらの組み合わせなどの従来の分子生物学法を含む、種々の異なる方法によって組み立てられ得る。例示的な発現構築物及びそれらを構築するための方法は、以下の実施例セクションに提供される。

30

【0136】

a lg 3 の欠失

遺伝子欠失技法は、遺伝子の部分的又は完全な除去を可能にし、それによって、その発現を排除する。そのような方法において、遺伝子の欠失は、遺伝子に隣接する 5' 及び 3' 領域を連続的に含むように構築されたプラスミドを使用する相同組換えによって実現され得る。

【0137】

遺伝子欠失はまた、本明細書において欠失構築物とも呼ばれる破壊的核酸構築物を遺伝子に挿入することによって行われ得る。破壊的構築物は、単に、遺伝子に対して相対的な 5' 及び 3' 領域を伴う選択可能なマーカー遺伝子であり得る。選択可能なマーカーは、破壊された遺伝子を含む形質転換体の同定を可能にする。代替的に又は追加的に、破壊的核酸構築物は、宿主細胞において発現される異種タンパク質をコードする1つ以上のポリヌクレオチドを含み得る。

40

【0138】

a lg 3 についての例示的な欠失構築物及び欠失を実施するための手順は、例えば、国際公開第 2021/094935 号で説明されている。欠失は、破壊的構築物に隣接する適切なプライマを用いた PCR を使用して確認することができる。

【0139】

いくつかの実施形態では、本発明の *Th. heterothallica* は、異種フリ

50

ッパーゼを発現するように遺伝子的に改変される。いくつかの特定の実施形態では、異種フリッパーゼは、酵母フリッパーゼである。追加の特定の実施形態では、酵母フリッパーゼは、*S. cerevisiae* 変異体フリッパーゼ *FLC2p* であり、これは、*S. cerevisiae* ER局在化フリッパーゼ *FLC2* のC末端が切断されたバージョンである。

【0140】

追加の実施形態では、本発明の *Th. heterothallica* は、内因性 *Th. heterothallica* *RFT1* フリッパーゼを過剰発現するように遺伝子的に改変される。いくつかの特定の実施形態では、*Th. heterothallica* *C1* は、内因性 *C1* *RFT1* フリッパーゼを過剰発現するように遺伝子的に改変される。本発明による *Th. heterothallica* における *RFT1* の過剰発現は、*Th. heterothallica* において作動可能な調節配列に作動可能に連結された *RFT1* をコードする核酸配列を含む、*RFT1* をコードする外因性ポリヌクレオチドの導入によって行われ得る。*rft1* の例示的なヌクレオチド配列は、配列番号7に記述されている。*rft1* の例示的なアミノ酸配列は、配列番号8に記述されている。

10

【0141】

いくつかの例示的な実施形態では、*Th. Heterothallica* は、*alg3* を欠失させるか又は破壊して、マンノシダーゼ1（アルファ-1，2-マンノシダーゼ）及びER標的化 *C1* グルコシダーゼ2アルファ-サブユニットを発現し、内因性 *Th. heterothallica* *RFT1* フリッパーゼを過剰発現するように遺伝子的に改変され、更に、異種ゴルジ局在化シグナルを含む動物由来 *GNT1*、及び動物由来 *GNT2* を発現する、例えば、酵母タンパク質 *KRE2* からのゴルジ局在化シグナルを含むヒト *GNT1*、及びヒト *GNT2* を発現するように遺伝子的に改変される。

20

【0142】

いくつかの例示的な実施形態では、*Th. heterothallica* は、*alg3* を欠失させるか又は破壊して、マンノシダーゼ1（アルファ-1，2-マンノシダーゼ）及びグルコシダーゼ2アルファ-サブユニットを発現し、酵母 *FLC2p* フリッパーゼを発現するように遺伝子的に改変され、更に、異種ゴルジ局在化シグナルを含む動物由来 *GNT1*、及び動物由来 *GNT2* を発現する、例えば、*Th. heterothallica* タンパク質 *KRE2* からのゴルジ局在化シグナルを含むヒト *GNT1*、及びラット *GNT2* を発現するように遺伝子的に改変される。

30

【0143】

追加の例示的な実施形態では、*Th. heterothallica* は、*alg3* の欠失又は破壊、マンノシダーゼ1（アルファ-1，2-マンノシダーゼ）及びER標的化 *C1* グルコシダーゼ2アルファ-サブユニットの発現、内因性 *Th. heterothallica* *RFT1* フリッパーゼの過剰発現、*Th. heterothallica* *KRE2* aゴルジ局在化シグナルを含むヒト *GNT1*、及びラット *GNT2* の発現、並びに *Leishmania major* *STT3* の発現によって遺伝的に改変される。いくつかの実施形態では、そのような *Th. heterothallica* は、ヒトガラクトシルトランスフェラーゼ又は *Xenopus tropicalis* ガラクトシルトランスフェラーゼの発現によって更に遺伝的に改変される。

40

【0144】

追加の例示的な実施形態では、*Th. heterothallica* は、*alg3* の欠失又は破壊、マンノシダーゼ1（アルファ-1，2-マンノシダーゼ）及びER標的化 *C1* グルコシダーゼ2アルファ-サブユニットの発現、内因性 *Th. heterothallica* *RFT1* フリッパーゼの過剰発現、*Th. heterothallica* *KRE2* ゴルジ局在化シグナルを含むウシ *GNT1*、及びラット *GNT2* の発現、並びに *Leishmania major* *STT3* の発現によって遺伝的に改変される。

【0145】

マンノシダーゼ1（アルファ-1，2-マンノシダーゼ）及びグルコシダーゼ2アルフ

50

アーサブユニット

いくつかの実施形態によれば、ER標的化マンノシダーゼ1（アルファ-1，2-マンノシダーゼ）及びER標的化C1グルコシダーゼ2アルファ-サブユニットの発現構築物は、*Thermothelomyces heterothallica*のalp3プロテアーゼ遺伝子座に組み込まれる。

【0146】

ER標的化*Trichoderma reesei*マンノシダーゼ1の例示的なヌクレオチド配列は、配列番号1に記述されている。ER標的化*Trichoderma reesei*マンノシダーゼ1の例示的なアミノ酸配列は、配列番号2に記述されている。

【0147】

ER標的化C1グルコシダーゼ2アルファ-サブユニット（gls2a-HDEL）の例示的なヌクレオチド配列は、配列番号3に記述されている。ER標的化C1グルコシダーゼ2アルファ-サブユニットの例示的なアミノ酸配列は、配列番号4に記述されている。

【0148】

GNT1及びGNT2

いくつかの実施形態では、本発明の*Th. heterothallica*は、異種のGNT1及びGNT2を発現するように遺伝子的に改変される。いくつかの実施形態では、異種GNT1及びGNT2は、動物由来である。本明細書で使用されるとき、「動物由来」は、例えば、イヌ及びネコなどの愛玩動物、並びにウマなどの追加の哺乳動物を含む、哺乳動物起源を包含する。本明細書において以下に例示されるように、動物由来は、例えばラット起源を含む。「動物由来」という用語は、以下に更に例示されるように、ヒト由来を更に包含する。

【0149】

異種GNT1及びGNT2は、*Th. heterothallica*において作動可能な調節配列に作動可能に連結されたGNT1及びGNT2をコードする核酸配列を含む、GNT1及びGNT2をコードする1つ以上の外因性ポリヌクレオチドの導入によって、本発明による*Th. heterothallica*において発現され得る。いくつかの実施形態では、GNT1及びGNT2をコードする核酸配列は、*Th. heterothallica*に導入される単一のポリヌクレオチドに含まれる。他の実施形態では、GNT1及びGNT2をコードする核酸配列は、*Th. heterothallica*に導入される2つの異なるポリヌクレオチドに含まれる。

【0150】

いくつかの実施形態では、GNT1は、それ自体の自然発生ゴルジ局在化シグナルを有する*Th. heterothallica*において発現される。他の実施形態では、GNT1は、異種ゴルジ局在化シグナルを有する*Th. heterothallica*において発現される。

【0151】

いくつかの実施形態では、異種ゴルジ局在化シグナルは、酵母ゴルジ局在化シグナルである。いくつかの特定の実施形態では、異種ゴルジ局在化シグナルは、酵母タンパク質KRE2アルファ-1，2-マンノシルトランスフェラーゼからのものである。いくつかの例示的な実施形態では、異種ゴルジ局在化シグナルは、*S. cerevisiae*のKRE2からのものである。

【0152】

他の実施形態では、異種ゴルジ局在化シグナルは、糸状菌からのものである。いくつかの実施形態では、異種ゴルジ局在化シグナルは、*Th. heterothallica*からのものである。いくつかの特定の実施形態では、異種ゴルジ局在化シグナルは、酵母タンパク質KRE2のC1相同体からのものである。

【0153】

いくつかの実施形態では、GNT1は、ヒトGNT1である。いくつかの実施形態では

10

20

30

40

50

、*Th. heterothallica*に導入されるヒトGNT1は、異種ゴルジ局在化シグナルを含む。いくつかの実施形態では、GNT1は、酵母ゴルジ局在化シグナルを含むヒトGNT1である。いくつかの特定の実施形態では、GNT1は、*S. cerevisiae*のタンパク質KRE2からのゴルジ局在化シグナルを含むヒトGNT1である。KRE2シグナルーGNT1の例示的なヌクレオチド配列は、配列番号5に記述されている。KRE2シグナルーGNT1の例示的なアミノ酸配列は、配列番号6に記述されている。

【0154】

いくつかの実施形態では、GNT2は、ラットGNT2である。GNT2は、典型的には、それ自体の自然発生ゴルジ局在化シグナルで発現される。ラットGNT2のアミノ酸配列は、配列番号16に記述されている。ラットGNT2をコードする本発明による使用のためのポリヌクレオチドの例示的な核酸配列は、配列番号15に記述されている。

10

【0155】

他の実施形態では、GNT2は、ヒトGNT2である。GNT2は、典型的には、それ自体の自然発生ゴルジ局在化シグナルで発現される。

【0156】

本発明によるGNT1及びGNT2の例示的であるが限定されない組み合わせとしては、

、
－酵母KRE2ゴルジ局在化シグナルを有するヒトGNT1、及びヒトGNT2、
－酵母KRE2ゴルジ局在化シグナルを有するヒトGNT1、及びラットGNT2、
－C1 KRE2aゴルジ局在化シグナルを有するヒトGNT1、及びヒトGNT2、
－C1 KRE2aゴルジ局在化シグナルを有するヒトGNT1、及びラットGNT2、
－C1 KRE2aゴルジ局在化シグナルを有するウシGNT1、及びラットGNT2
が挙げられる。

20

【0157】

各組み合わせは、本発明の個別の実施形態を表す。

【0158】

ガラクトシルトランスフェラーゼ

いくつかの実施形態では、本発明の*Th. Heterothallica*は、異種ガラクトシルトランスフェラーゼを発現するように遺伝子的に改変される。いくつかの実施形態では、異種ガラクトシルトランスフェラーゼは、動物由来である。

30

【0159】

ガラクトシルトランスフェラーゼは、*Th. heterothallica*において作動可能な調節配列に作動可能に連結されたガラクトシルトランスフェラーゼをコードする核酸配列を含む、ガラクトシルトランスフェラーゼをコードする外因性ポリヌクレオチドの導入によって、本発明による*Th. heterothallica*において発現することができる。

【0160】

いくつかの実施形態では、ガラクトシルトランスフェラーゼは、それ自体の自然発生ゴルジ局在化シグナルを有する*Th. heterothallica*において発現される。他の実施形態では、ガラクトシルトランスフェラーゼは、異種ゴルジ局在化シグナルを有する*Th. heterothallica*において発現される。

40

【0161】

いくつかの実施形態では、ガラクトシルトランスフェラーゼは、ヒトガラクトシルトランスフェラーゼ(huGalT1)である。いくつかの実施形態では、*Th. heterothallica*に導入されるヒトガラクトシルトランスフェラーゼは、異種ゴルジ局在化シグナルを含む。いくつかの特定の実施形態では、ヒトガラクトシルトランスフェラーゼは、*S. cerevisiae* KRE2ゴルジ局在化シグナルを含む。*S. cerevisiae*のタンパク質KRE2からのゴルジ局在化シグナルを有するヒトガラクトシルトランスフェラーゼのアミノ酸配列は、配列番号14に記述されている。*S. cer*

50

*evisiae*のタンパク質KRE2からのゴルジ局在化シグナルを有するヒトガラクトシルトランスフェラーゼをコードする本発明に従って使用されるポリヌクレオチドの例示的な核酸配列は、配列番号13に記述されている。

【0162】

他の実施形態によれば、ガラクトシルトランスフェラーゼは、*Xenopus tropicalis* (XtGalT1) からのものである。いくつかの実施形態では、*Th. heterothallica*に導入される*Xenopus tropicalis*からのガラクトシルトランスフェラーゼは、異種ゴルジ局在化シグナルを含む。いくつかの特定の実施形態では、*Xenopus tropicalis*からのガラクトシルトランスフェラーゼは、*S. cerevisiae*のタンパク質KRE2からのゴルジ局在化シグナルを含む。

10

【0163】

STT3オリゴサッカリルトランスフェラーゼ

いくつかの実施形態では、本発明の*Th. heterothallica*は、オリゴサッカリルトランスフェラーゼの異種STT3サブユニットを発現するように遺伝子的に改変される。いくつかの特定の実施形態では、異種STT3は、*Leishmania major* STT3である。*Leishmania major* STT3のアミノ酸配列は、配列番号12に記述されている。*Leishmania major* STT3は、*Th. heterothallica*において作動可能な調節配列に作動可能に連結された*Leishmania major* STT3をコードする核酸配列を含む、*Leishmania major* STT3をコードする外因性ポリヌクレオチドの導入によって、本発明による*Th. heterothallica*において発現することができる。本発明に従って使用するための*Leishmania major* STT3をコードする例示的な核酸配列は、配列番号11に記述されている。

20

【0164】

遺伝子的に操作された*Th. heterothallica*

本発明による哺乳動物タンパク質（特に、ヒト及び愛玩動物タンパク質）のNグリカンに糖タンパク質を産生するように遺伝子的に操作された*Th. heterothallica*細胞は、遺伝子が機能的なタンパク質を産生しないように、*Th. heterothallica* *alg3*の内因性遺伝子を改変（欠失などの）し、様々な酵素をコードする外因性ポリヌクレオチドを発現することによって生成される。

30

【0165】

本明細書に開示される*Th. heterothallica*の遺伝子改変は、哺乳動物タンパク質（特に、ヒト及び愛玩動物のタンパク質）のN-グリカンに糖タンパク質の産生の本明細書に開示される所望の成果が得られる限り、遺伝子的に改変された*Th. heterothallica*のありとあらゆる細胞を改変することを必ずしも必要としないことを理解されたい。

【0166】

いくつかの実施形態では、*Th. heterothallica*は、異種哺乳動物糖タンパク質を発現するように更に遺伝子的に改変される。いくつかの実施形態では、異種哺乳動物糖タンパク質は、抗体又はその抗原結合断片である。

40

【0167】

いくつかの例示的な実施形態では、*Th. heterothallica*は、ニボルマブ又はその抗原結合断片を発現するように遺伝子的に改変される。追加の例示的な実施形態では、*Th. heterothallica*は、*Th. heterothallica* CBH1シグナル配列を有するニボルマブ軽鎖及び*Th. heterothallica* CBH1シグナル配列を有するニボルマブ重鎖を発現するように遺伝子的に改変される。

【0168】

いくつかの実施形態では、本発明は、本明細書に開示されるように遺伝子的に改変された*Th. heterothallica*細胞を提供する。

50

【0169】

外因性ポリヌクレオチドの発現は、C1において発現されるタンパク質をコードする核酸を含む発現構築物を、Th. heterothallica細胞、特にTh. heterothallica細胞の核に導入することによって実施される。具体的には、本発明による遺伝子改変は、宿主ゲノムへの発現構築物の組み込みを意味する。

【0170】

Th. heterothallica細胞への発現構築物の導入、すなわちTh. heterothallicaの形質転換は、糸状菌を形質転換するための方法によって行うことができる。

【0171】

形質転換された細胞の容易な選択を促進するために、選択マーカーは、Th. heterothallica細胞に形質転換され得る。「選択マーカー」は、抗生物質抵抗性（抵抗性マーカー）、ある特定の資源を利用する能力（利用／栄養要求性マーカー）、又は例えばスペクトル測定によって検出することができるレポータータンパク質の発現などの、形質転換されていない細胞中に存在しない特定のタイプの表現型を付与する遺伝子産物をコードするポリヌクレオチドを示す。栄養素要求性マーカーは、典型的には、食品又は医薬品業界における選択の手段として好ましい。選択マーカーは、発現構築物と同時形質転換された別個のポリヌクレオチド上、又は発現構築物の同じポリヌクレオチド上にあり得る。形質転換に続いて、陽性形質転換体は、例えば、選定された選択マーカーによる選択培地上でC1細胞を培地培養することによって選択される。場合によっては、選択マーカーが、2つのプラスミドに分割され、機能的な選択マーカーが、2つのプラスミドが同時形質転換され、かつ相同組換えを介して一緒に接合された場合にのみ形成される分割マーカー系が使用される。

【0172】

合成発現系が使用される場合、好適な合成転写因子（synthetic transcription factor, sTF）をコードする発現カセットが宿主細胞に導入される。

【0173】

形質転換されたDNAは、相同組換え又は非相同末端結合を通してTh. heterothallica染色体に統合することができる。ゲノム中の特定の遺伝子座への標的化統合を促進するために、標的遺伝子座に対応する配列が発現構築物と同じポリヌクレオチドに組み込まれる。

【0174】

次いで、選択されたクローンを成長させ、所望のN-グリコフォームを有するタンパク質の産生について調査する。遺伝子的に改変されたTh. heterothallicaは、好適な条件下で培地培養される。ある特定の実施形態によれば、真菌を約20℃～約45℃の範囲の温度及び約4.0～約8.0の培地pHで成長させる。特定の培地タイプは、最終産物の規制要件に従って選択され得る。産生された糖タンパク質は、単離及び分析され得る。

【0175】

Th. heterothallicaにおけるGNT1、GNT2、及び任意選択的に、ガラクトシルトランスフェラーゼなどの追加の酵素の発現は、C1によって産生されたN-グリカンの構造分析によって決定され得る。

【0176】

本発明による遺伝子的に改変されたTh. heterothallicaは、最終N-グリカン構造又は中間N-グリカン構造としてG0（Man₃GlcNAc₂）を産生する。

【0177】

いくつかの実施形態では、alg3の欠失又は破壊、ER標的化Trichoderma reeseiマンノシダーゼ1（アルファ-1, 2-マンノシダーゼ）及びER標的化C1グルコシダーゼ2アルファ-サブユニットの発現、任意選択的に、異種フリッパー

10

20

30

40

50

ゼの発現又は内因性フリッパーゼの過剰発現、異種 G N T 1 及び G N T 2 の発現、並びに任意選択的に、異種 S T T 3 オリゴサッカリルトランスフェラーゼの発現によって遺伝子的に改変された *Th. heterothallica* は、分泌された糖タンパク質を産生し、G 0 は、分泌された糖タンパク質上の N-グリカンの少なくとも 80 %、好ましくは、分泌された糖タンパク質上の N-グリカンの少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、又は更には少なくとも 95 % を構成する。各値は、本発明の個別の実施形態を表す。

【0178】

いくつかの実施形態では、異種ガラクトシルトランスフェラーゼを発現するように更に遺伝子的に改変される *Th. heterothallica* は、分泌された糖タンパク質を産生し、G 1 及び G 2 (G 1 及び G 2 の両方の合計) は、分泌された糖タンパク質上の N-グリカンの少なくとも 75 %、好ましくは、分泌された糖タンパク質上の N-グリカンの少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、又は更には少なくとも 95 % を構成する。各値は、本発明の個別の実施形態を表す。

【0179】

いくつかの実施形態では、*Th. heterothallica* の遺伝子改変は、異種オリゴサッカリルトランスフェラーゼ (O S T) の発現を含まない。

【0180】

以下の実施例は、本発明のある特定の実施形態をより完全に例示するために提示される。しかしながら、それらは決して本発明の広い範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。当業者は、本発明の範囲から逸脱することなく、本明細書に開示された原理の多くの変形例及び修正を容易に考案することができる。

【実施例】

【0181】

実施例 1-ヒト化 G 1 / 2 グリカンを用いた 3 つの工程においてニボルマブ産生株を生成すること

ヒト型ガラクトシル化グリカンを生産する *Thermothelomyces heterothallica* C 1 株を生成する際の第 1 の工程は、8 つのプロテアーゼ遺伝子の欠失を持ち、かつニボルマブを発現する株からの *alg 3* 遺伝子の欠失であった (国際公開第 2021 / 094935 号で説明されている)。*alg 3* 欠失後、次の C 1 糖鎖工学工程は、グリカン前駆体をヒト型グリカンの合成に好適である *DolP-GlcNAc₂-Man₃* にトリミングするために、E R 標的化 *Trichoderma reesei* マンノシダーゼ 1 (アルファ-1, 2-マンノシダーゼ) 及び E R 標的化 C 1 グルコシダーゼ 2 アルファ-サブユニットを、*alp 3* プロテアーゼ遺伝子座に統合することであった。その後、ヒト又はウシ G N T 1 (*GlcNAc* トランスフェラーゼ I)、ラット G N T 2 (*GlcNAc* トランスフェラーゼ II)、C 1 フリッパーゼ R F T 1、*Leishmania major* からのオリゴサッカリルトランスフェラーゼ S T T 3、及びヒト *GalT 1* (ガラクトシルトランスフェラーゼ I) を含有する発現カセットを、*alp 6* プロテアーゼ遺伝子座に統合した。これらの遺伝子の発現は、G 0 (*GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂*) グリカンをもたらす *GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂* グリカンの両方の分岐上への *GlcNAc* 残基の付加、続いて G 1 (*GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂Gal*) 及び G 2 (*GlcNAc₂Man₃MlcNAc₂Gal₂*) グリカンの産生をもたらす G 0 グリカンの一方又は両方の分岐へのガラクトース残基の付加をもたらす。

【0182】

第 1 の形質転換工程において、*alp 3* 遺伝子座 (*JGI M. thermophila* ゲノムデータベース ID 2306020) に統合され、*T. reesei* (*Tr*) *mns 1-HDEL* (*JGI T. reesei* ゲノムデータベース ID 45717) 及び *C 1 gls 2a-HDEL* (*JGI M. thermophila* ゲノムデータベース ID 2125259) を同時に発現するように設計された DNA 構築物を、2 つの別個のプラ

スミドへと2つの部分に構築した。HDELは、4つのアミノ酸C末端ER局在化シグナルである。第1のプラスミドは、統合のためのalp3 5' 隣接領域断片、遺伝子がC1 bgl8プロモータとターミネータ(JGI M. thermophila ゲノムデータベースID115968)との間にあるTr mns1-HDELのための発現カセット、合成転写因子(sTF、3' プラスミドにおける合成プロモータのための)、C1 cbh1ターミネータ(JGI M. thermophilaゲノムデータベースID109566)への直列反復、及びamdSマーカー遺伝子の最初の2/3(Aspergillus nidulansのアセトアミダーゼをコードする)を含有していた。第2のプラスミドは、amdSマーカーの最後の2/3、sTFカセットの末端に標的化された直列反復断片(組換えによるamdSマーカー除去のための)、合成AnSESプロモータ(Rantasalo A et al. 2018, A universal gene expression system for fungi. Nucl. Acids Research 46(18):e111)とchi1ターミネータ(JGI M. thermophilaゲノムデータベースID50608)との間のC1 gls2a-HDELのための発現カセット、及び統合のためのalp3 3' 隣接領域断片を含有していた。これらの2つのプラスミド中のamdSマーカー断片は互いに重なっており、この領域は、5' 及び3' 隣接領域断片がalp3 遺伝子の両側でゲノムDNAと組換えられるのと同時に、プラスミド間のC1において相同組換えを受ける。選択マーカー断片間の組換えは、マーカー遺伝子を機能的にし、形質転換体が選択下で成長することを可能にする。

10

20

【0183】

alp3 5' 隣接領域断片、Tr mns1-HDELのための発現カセット、sTF、及びamdSマーカーの最初の2/3を含有する構築物は、配列番号17(pMYT1288)に記述されている。5' 隣接配列は、配列番号17の9~1196位に対応する。bgl8プロモータ配列は、配列番号17の1202~2593位に対応する。人工HDEL ER保留シグナルを有するゲノムTrichoderma reeseiマンノシダーゼ1をコードする核酸配列は、配列番号17の2594~4420位に対応する。HDELシグナルを有するT. reesei MNS1をコードする核酸配列はまた、配列番号1(Tr mns1-HDEL nt)として記述され、アミノ酸配列は、配列番号2(Tr MNS1-HDEL aa)として記述されている。bgl8ターミネータ配列は、配列番号17の4421~4887位に対応する。合成転写因子カセットのための核酸配列は、配列番号17の4901~6550位に対応する。amdSマーカー遺伝子の最初の2/3は、配列番号17の7060~9126位に対応する。断片をPCRによって産生し、アガロースゲル中で分離し、精製し、Gibson Assembly(NEBuilder(登録商標)HiFi DNA Assembly Cloning Kit、New England Biolabs)法によって骨格ベクターpRS426にクローニングして、配列決定によって検証した5' アーム発現ベクターpMYT1288を得た。

30

【0184】

amdSマーカーの最後の2/3、C1 gls2a-HDELのための発現カセット、及び統合のためのalp3 3' 隣接領域断片を含有する構築物は、配列番号18(pMYT0721)に記述されている。amdSマーカー遺伝子の2/3は、配列番号18の17~1738位に対応する。合成AnSESプロモータ配列は、配列番号18の2255~2747位に対応する。人工HDEL ER保留シグナルを有するC1グルコシダーゼ2アルファをコードする配列は、配列番号18の2748~5760位に対応する。HDELシグナルを有するC1 GLS2アルファをコードする核酸配列はまた、配列番号3(C1 gls2a-HDEL nt)として記述され、アミノ酸配列は、配列番号4(C1 GLS2A-HDEL aa)として記述されている。chi1ターミネータ配列は、配列番号18の5761~6406位に対応する。alp3 3' 隣接配列は、配列番号18の6415~7548位に対応する。断片をPCRによって産生し、アガロ

40

50

ースゲル中で分離し、精製し、Gibson Assembly (NEBuilder (登録商標) HiFi DNA Assembly Cloning Kit、New England Biolabs) 法によって骨格ベクター pRS426 にクローニングして、配列決定によって検証した 3' アーム発現ベクター pMYT0721 を得た。

【0185】

第2の形質転換工程については、alp6 遺伝子座 (JGI M. thermophila ゲノムデータベース ID94536) に統合され、GNT1 と GNT2、及び RFT1 と STT3 と GalT1 とを同時に発現するように設計された DNA 構築物を、2つの別個のプラスミドへと2つの部分に構築した。第1のプラスミドは、統合のための alp6 5' 隣接領域断片、ヒト GNT1 遺伝子又はウシ GNT1 遺伝子のいずれかが C1 bgl8 プロモータと bgl8 ターミネータとの間の C1 KRE2 ゴルジ局在化シグナル (JGI M. thermophila ゲノムデータベース ID2300989) に融合された GNT1 のための発現カセット、ユビキチン様タンパク質遺伝子のプロモータとターミネータ (JGI M. thermophila ゲノムデータベース ID2315548) との間の C1 フリップパーゼ RFT1 (JGI M. thermophila ゲノムデータベース ID2307799)、及び C1 pyr4 マーカー遺伝子 (JGI M. thermophila ゲノムデータベース ID2311494) の最初の 2/3 を含有していた。第2のプラスミドは、C1 pyr4 マーカー遺伝子の最後の 2/3、pyr4 カセットの始端に標的化された直列反復断片 (組換えによる pyr4 マーカー除去のための)、C1 仮説タンパク質 (JGI M. thermophila ゲノムデータベース ID2315630) のプロモータとターミネータとの間の Leishmania major からの STT3 のための逆発現カセット、ユビキチン様タンパク質遺伝子のプロモータと bgl8 ターミネータとの間の Saccharomyces cerevisiae KRE2 ゴルジ局在化シグナルに融合されたヒト GalT1 のための逆発現カセット、翻訳伸長因子 1A (JGI M. thermophila ゲノムデータベース ID2298136) のプロモータと C1 仮説タンパク質 (JGI M. thermophila ゲノムデータベース ID114107) のターミネータとの間のラットからの GNT2 遺伝子、及び最後に、統合のための alp6 3' 隣接領域断片を含有していた。これらの2つのプラスミド中の C1 pyr4 マーカー断片は互いに重なっており、この領域は、5' 及び 3' 隣接領域断片が alp6 遺伝子の両側でゲノム DNA と組換えられるのと同様に、プラスミド間の C1 において相同組換えを受ける。選択マーカー断片間の組換えは、マーカー遺伝子を機能的にし、形質転換体が選択下で成長することを可能にする。

【0186】

alp6 5' 隣接領域断片、ヒト GNT1 のための発現カセット、C1 RFT1、及び C1 pyr4 マーカー遺伝子の最初の 2/3 を含有する第1の 5' 構築物は、配列番号 19 (pMYT1451) として記述されている。5' 隣接配列は、配列番号 19 の 8~1156 位に対応する。bgl8 プロモータ配列は、配列番号 19 の 1165~2556 位に対応する。C1 KRE2 ゴルジ局在化シグナルに融合されたヒト GNT1 をコードする核酸配列は、配列番号 19 の 2557~4042 位に対応し、ここで、2557~2821 位は C1 KRE2 局在化シグナルをコードし、2822~4042 位はヒト GNT1 をコードする。C1 KRE2 ゴルジ局在化シグナルに融合されたヒト GNT1 をコードする核酸配列はまた、配列番号 5 (C1 kre2-huGNT1 nt) として記述されている。ヒト GNT1 をコードする核酸配列を、M. thermophila C1 についてコドン最適化し、GenScript (USA) が合成した。合成した配列において、ヒト GNT1 のアミノ酸 1~100 の領域を、C1 KRE2 ゴルジ局在化シグナル (アミノ酸 1~70) によって置換した。C1 KRE2-GNT1 の完全なアミノ酸配列は、配列番号 6 (C1 kre2-huGNT1 aa) として記述されている。bgl8 ターミネータ配列は、配列番号 19 の 4046~4512 位に対応する。ユビキチン様タンパク質プロモータ配列は、配列番号 19 の 4513~5532 位に対応する。C1 フリップパーゼ rft1 遺伝子は、配列番号 19 の 5533~7449 位に対応する

。C1 RFT1をコードする核酸配列はまた、配列番号7 (C1 r f t 1 n t)として記述され、アミノ酸配列は、配列番号8 (C1 RFT1 a a)として記述されている。ユビキチン様タンパク質ターミネータ配列は、配列番号19の7458～7953位に対応する。C1 pyr4マーカー遺伝子の最初の2/3は、配列番号19の7969～9748位に対応する。

【0187】

a l p 6 5' 隣接領域断片、ウシGNT1のための発現カセット、C1 RFT1、及びC1 pyr4マーカー遺伝子の最初の2/3を含有する第2の5' 構築物は、配列番号20 (pMYT1452)として記述されている。5' 隣接配列は、配列番号20の8～1156位に対応する。b g l 8プロモータ配列は、配列番号20の1165～2556位に対応する。C1 KRE2ゴルジ局在化シグナルに融合されたウシGNT1をコードする核酸配列は、配列番号20の2557～4051位に対応し、ここで、2557～2821位はC1 KRE2局在化シグナルをコードし、2822～4051位はウシGNT1をコードする。C1 KRE2ゴルジ局在化シグナルに融合されたウシGNT1をコードする核酸配列はまた、配列番号9 (C1 k r e 2 - b o GNT1 n t)として記述されている。ウシGNT1をコードする核酸配列を、M. t h e r m o p h i l a C1についてコドン最適化し、GenScript (USA) が合成した。合成した配列において、ウシGNT1のアミノ酸1～38の領域を除去し、発現プラスミドのクローニング時にC1 KRE2ゴルジ局在化シグナル (アミノ酸1～70) によって置換した。C1 KRE2-GNT1の完全なアミノ酸配列は、配列番号10 (C1 KRE2-b o GNT1 a a)として記述されている。b g l 8ターミネータ配列は、配列番号20の4052～4518位に対応する。ユビキチン様タンパク質プロモータ配列は、配列番号20の4524～5543位に対応する。pMYT1451について説明されたC1フリッパーゼRFT1遺伝子は、配列番号20の5544～7460位に対応する。ユビキチン様タンパク質ターミネータ配列は、配列番号20の7469～7964位に対応する。C1 pyr4マーカー遺伝子の最初の2/3は、配列番号20の7980～9759位に対応する。5' プラスミドのための断片をPCRによって産生し、アガロースゲル中で分離し、精製し、Gibson Assembly (NEBuilder (登録商標) HiFi DNA Assembly Cloning Kit、New England Biolabs) 法によって骨格ベクターpRS426にクローニングして、配列決定によって検証した5' アーム発現ベクターpMYT1451及びpMYT1452を得た。

【0188】

C1 pyr4マーカー遺伝子の最後の2/3、Leishmania majorからのSTT3のための逆発現カセット、ヒトGalT1のための逆発現カセット、ラットGNT2遺伝子のための逆発現カセット、及び統合のためのa l p 6 3' 隣接領域断片を含有する構築物は、配列番号21 (pMYT1453)に記述されている。C1 pyr4マーカー遺伝子の2/3は、配列番号21の17～1273位に対応する。仮説タンパク質 (ID2315630) プロモータ配列は、配列番号21の5965～4957位に対応する。M. t h e r m o p h i l a C1についてコドン最適化し、GenScript (USA) が合成した、Leishmania majorからのSTT3をコードする配列は、配列番号21の4956～2383位に対応する。Leishmania major STT3遺伝子をコードする核酸配列はまた、配列番号11 (LmSTT3 n t)として記述されている。L. major STT3の完全なアミノ酸配列は、配列番号12 (LmSTT3 a a)として記述されている。仮説タンパク質 (ID2315630) ターミネータ配列は、配列番号21の2374～1795位に対応する。S c KRE2ゴルジ局在化シグナルに融合されたヒトGalT1をコードする配列は、配列番号21の7704～6439位に対応し、ここで、7704～7405位はS c KRE2局在化シグナルをコードし、7404～6439位はヒトGalT1をコードする。ユビキチン様タンパク質プロモータ配列は、配列番号21の8724～7705位に対応す

る。Sc KRE2ゴルジ局在化シグナルに融合されたヒトGalT1をコードするヌクレオチド配列はまた、配列番号13 (Sckre2-huGalT1 nt) として記述されている。ヒトGalT1をコードする核酸配列を、M. thermophila C1についてコドン最適化し、GenScript (USA) が合成した。合成した配列において、ヒトGalT1のアミノ酸1~77の領域を除去し、発現プラスミドのクローニング時にSc KRE2ゴルジ局在化シグナル (アミノ酸1~100) によって置換した。Sc KRE2-GalT1の完全なアミノ酸配列は、配列番号14 (ScKRE2-huGalT1 aa) として記述されている。bgl8ターミネータ配列は、配列番号21の6438~5972位に対応する。翻訳伸長因子1Aプロモータ配列は、配列番号21の11618~10562位に対応する。M. thermophila C1についてコドン最適化し、GenScript (USA) が合成した、ラットGNT2をコードする配列は、配列番号21の10561~9233位に対応する。ラットGNT2をコードする核酸配列はまた、配列番号15 (ラットGNT2 nt) として記述されている。ラットGNT2の完全なアミノ酸配列は、配列番号16 (ラットGNT2 aa) として記述されている。仮説タンパク質 (ID114107) ターミネータ配列は、配列番号21の9232~8729位に対応する。alp6 3' 隣接配列は、配列番号21の11626~12681位に対応する。断片をPCRによって産生し、アガロースゲル中で分離し、精製し、Gibson Assembly (NEBuilder (登録商標) HiFi DNA Assembly Cloning Kit、New England Biolabs) 法によって骨格ベクターpRS426にクローニングして、配列決定によって検証した3' アーム発現ベクターpMYT1453を得た。

10

20

30

40

50

【0189】

G1/2 N-グリカン有するニボルマブ産生株を得るために、上述の発現プラスミドを、pyr4-マイナスニボルマブ産生alg3欠失株M3291に連続して形質転換した (国際公開第2021/094935号で説明されている)。各形質転換において、(MssIを有する発現プラスミド骨格から切り出された) 1つの5' アーム発現ベクターと1つの3' アーム発現ベクターとの対を使用した。これらの対は、以下であった。

・第1のラウンド：配列番号17 (pMYT1288) (alp3 5' 隣接領域-TrMns1-HDELカセット-STFカセット-2/3 amdS) + 配列番号18 (pMYT0721) (2/3 amdS-C1 gls2a-HDELカセット-alp3 3' 隣接断片)

・第2のラウンド：配列番号19 (pMYT1451) 又は配列番号20 (pMYT1452) (alp6 5' 隣接領域-ヒト又はウシGNT1カセット-C1 RFT1カセット-2/3 pyr4) + 配列番号21 (pMYT1453) (2/3 pyr4-LmSTT3カセット-ヒトGalT1カセット-ラットGNT2カセット-alp6 3' 隣接断片)

【0190】

C1形質転換及び形質転換体選択を、本質的に国際公開第2021/094935号で説明されるように行った。形質転換の第1のラウンドについては、選択は機能的なamdS遺伝子に基づいており、第2のラウンドについては、機能的なpyr4遺伝子に基づいていた。形質転換体をPCRによってスクリーニングして、alp3欠失部位 (第1のラウンド) 又はalp6遺伝子 (第2のラウンド) が構築物によって置換されたクローンを見出した。

【0191】

形質転換体ゲノムへのプラスミド/遺伝子の正確な統合を、特異的プライマー (primer) を用いて検証した。発現構築物の正確な統合及びalp3遺伝子座の更なる欠失を有する第1のラウンドの形質転換体を、M4855及びM4856として保存した。株M4855を、形質転換の第2のラウンドに使用した。構築物の正確な統合及びalp6遺伝子の欠損を有する第2のラウンドの形質転換体を、それぞれM5129及びM5130 (ヒトGNT1を有する) として、かつM5131及びM5132 (ウシGNT1を有す

る)として保存した。

【0192】

両方の形質転換ラウンドから構築されたC1株を、国際公開第2021/094935号において親株M3291の振盪フラスコ培養について説明されているように、250mLの振盪フラスコ内、50mLの液体培地中で成長させた。培地培養を、35℃、約200RPMで4日間実施した。菌糸体を遠心分離によって除去し、培養からの上清を、製造業者(Cytiva)の取扱説明書に従って、AKTA Start自動HPLCシステム(Cytiva)、及び1mLカラムをプレパックされたHiTrap MabSelect Sure又はHiTrap MabSelect Prismaを使用して、ニボルマブのタンパク質Aアフィニティ精製に使用した。全ての試料からのピーク画分を、国際公開第2021/094935号の実施例1で説明されるように、放出されたN-グリカンの分析に供した。結果を全ての株について図1に要約する。図1Aは、Tr MN S1-HDEL及びC1 GLS2A-HDELの両方を発現させることによって、ニボルマブ上の主なN-グリカンがほぼ90%の量のMan3(M3)であり、一方、より高次のマンノース構造(GlcNAc2Man4、GlcNAc2Man5)がほとんどなく、G0以降へのN-グリカン改変を遮断すると考えられるHex6(GlcNAc2Man5Glc)が実質的にないことを示す。図1B~図1Dは、この実施例で説明されるalp6標的化発現ベクターを使用することによって、標的mAb上で非常に高いG1(GlcNAc2Man3GlcNAc2Gal)及びG2(GlcNAc2Man3GlcNAc2Gal2)N-グリカンレベルに到達することを示す。ヒト型G1/2N-グリカンへの変換は、88~98%、すなわち、この手法によるヒト型グリカンへのほぼ完全な変換である。非常に高いレベルのヒト型N-グリカンに加えて、図2は、分析のために各試料に添加された一定量の内部標準物質を使用して、試料間で正規化されている放出されたN-グリカンの量を示す。異なるニボルマブ試料から放出されたN-グリカンのパーセンテージは、参照オブジーボ(哺乳動物系において産生された市販のニボルマブ、Bristol-Myers Squibb)とほぼ同じレベルであり、グリコシル化をヒト化するためのこの手法が、N-グリコシル化部位占有率に悪影響を及ぼさないことを示唆している。

【0193】

次に、C1株M3291、M5130、及びM5132を、有機窒素源として酵母抽出物及び炭素源としてグルコースを有する培地中で流加プロセスを使用して、amb r250又は1Lバイオリアクター内で培養した。培地培養を38℃で7日間行った。培養終了後、4000gで20分間の遠心分離によって菌糸体を除去し、得られた培地培養上清中のプロテアーゼ活性を阻害するためにフェニルメチルスルホニルフルオリド(phenylmethanesulfonyl fluoride、PMSF)を1~2mMの濃度で添加し、試料を-80℃で保存した。振盪フラスコ試料の精製について上述したものと本質的に同じプロテインAアフィニティ精製方法を使用して、ニボルマブを7日目の発酵試料から精製した。全ての試料からのピーク画分を、放出されたN-グリカン分析に供した。結果を全ての3つの株について図3に要約する。図3Aは、親株M3291が80%超の望ましい前駆体Man3(M3)を有するが、N-グリカンのヒト化(G0への変換及び更なる改変)及びいくつかのより高次のマンノース構造(Man4、Man5)を阻止すると考えられる3.5%超のHex6(M6)も有することを示す。図3B~図3Dは、標的mAb上の放出されたN-グリカンがほぼ完全にヒト化されている、すなわち、検出されたN-グリカンの99%以上がG0~G2種に属することを示す。図4は、分析のために各試料に添加された一定量の内部標準物質(シアリルグリカンペプチド)を使用して、試料間で正規化されている放出されたN-グリカンの量を示す。振盪フラスコと同様に、ヒト化N-グリカン有する2つのニボルマブ株から放出されたN-グリカンのパーセンテージは、参照オブジーボ(哺乳動物系において産生された市販のニボルマブ)と同じレベルであるように見え、N-グリカン部位占有率に対する悪影響がないことを更に確認する。

【0194】

実施例 2－ヒト化 G1／2 グリカンを用いた 1 つの工程において空株を生成すること

この第 2 の手法では、実施例 1 で説明された、ヒト型ガラクトシル化グリカンを生産する *Thermothelomyces heterothallica* C1 株を生み出すのに必要な 3 つの糖鎖改変 (glycomodification) 工程全てを組み合わせた。簡潔に言えば、より弱いプロモータ下での 14 個のプロテアーゼ遺伝子及び *kex2* プロテアーゼ遺伝子の欠失を持つ株からの *alg3* 遺伝子の欠失を、*alg3* 遺伝子座への ER 標的化 *Trichoderma reesei* マンノシダーゼ 1 (アルファ-1, 2-マンノシダーゼ)、ER 標的化 C1 グルコシダーゼ 2 アルファ-サブユニット、ヒト GNT1 (GlcNAc トランスフェラーゼ I)、ラット GNT2 (GlcNAc トランスフェラーゼ II)、*Leishmania major* からのオリゴサッカリルトランスフェラーゼ STT3、及びヒト GalT1 (ガラクトシルトランスフェラーゼ I) の統合と組み合わせた。これらの遺伝子の発現は、最初に、グリカン前駆体をヒト型グリカンの合成に好適である DolP-GlcNAc2-Man₃ のトリミング、その後、G0 (GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂) グリカンをもたらし GlcNAc₂Man₃ グリカンの両方の分岐上への GlcNAc 残基の付加、続いて、G1 (GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂Gal) 及び G2 (GlcNAc₂Man₃MlcNAc₂Gal₂) グリカンの産生をもたらし G0 グリカンの一方又は両方の分岐へのガラクトース残基の付加をもたらし。

10

【0195】

alg3 遺伝子座 (JGI *M. thermophila* ゲノムデータベース ID 2310419) に統合され、*T. reesei* (Tr) *mns1-HDEL* (JGI *T. reesei* ゲノムデータベース ID 45717)、C1 *gls2a-HDEL* (JGI *M. thermophila* ゲノムデータベース ID 2125259)、ヒト GNT1、ラット GNT2、並びに *Leishmania major* (Lm) STT3 及びヒト GalT1 を同時に発現するように設計された DNA 構築物を、2 つの別個のプラスミドへと 2 つの部分に構築した。HDEL は、4 つのアミノ酸 C 末端 ER 局在化シグナルを表す。

20

【0196】

第 1 のプラスミドは、統合のための *alg3* 5' 隣接領域断片、ヒト GNT1 遺伝子が C1 *bg18* プロモータと *bg18* ターミネータ (JGI *M. thermophila* ゲノムデータベース ID 115968) との間の C1 *KRE2* ゴルジ局在シグナル (JGI *M. thermophila* ゲノムデータベース ID 2300989) に融合された GNT1 のための発現カセット、ユビキチン様タンパク質遺伝子のプロモータ (JGI *M. thermophila* ゲノムデータベース ID 2315548) と C1 仮説タンパク質のターミネータ (JGI *M. thermophila* ゲノムデータベース ID 2302731) との間の *Saccharomyces cerevisiae* *KRE2* ゴルジ局在化シグナルに融合されたヒト GalT1 のための発現カセット、合成 *AnSES* プロモータ (Rantasalo A et al. 2018, A universal gene expression system for fungi. *Nucleic Acids Research* 46 (18): e111) と *chi1* ターミネータ (JGI *M. thermophila* ゲノムデータベース ID 50608) との間の C1 *gls2a-HDEL* のための発現カセット、合成転写因子 (*STF*、C1 *gls2a-HDEL* の合成プロモータのための) のための発現カセット、及び *pyr4* マーカー遺伝子 (JGI *M. thermophila* ゲノムデータベース ID 2311494) の最初の 2/3 を含有していた。

30

40

【0197】

第 2 のプラスミドは、C1 *pyr4* マーカー遺伝子の最後の 2/3、*pyr4* カセットの始端に標的化された直列反復断片 (組換えによる *pyr4* マーカー除去のための)、C1 仮説タンパク質のプロモータとターミネータ (JGI *M. thermophila* ゲノムデータベース ID 2315630) との間の *Leishmania major* か

50

らのSTT3のための逆発現カセット、遺伝子がC1 bgl8プロモータ(JGI M. thermophilaゲノムデータベースID115968)又はユビキチン様タンパク質遺伝子のプロモータ(JGI M. thermophilaゲノムデータベースID2315548)のいずれかとユビキチン様タンパク質遺伝子ターミネータ(JGI M. thermophilaゲノムデータベースID2315548)との間にあるTrmns1-HDELのための逆発現カセット、翻訳伸長因子1Aのプロモータ(JGI M. thermophilaゲノムデータベースID2298136)とC1仮説タンパク質のターミネータ(JGI M. thermophilaゲノムデータベースID114107)との間のラットからのGNT2遺伝子のための逆発現カセット、及び最後に、統合のためのalg3 3'隣接領域断片を含有していた。これらの2つのプラスミド中のC1 pyr4マーカー断片は互いに重なっており、この領域は、5'及び3'隣接領域断片がalg3遺伝子の両側でゲノムDNAと組換えられるのと同時に、プラスミド間のC1において相同組換えを受ける。選択マーカー断片間の組換えは、マーカー遺伝子を機能的にし、形質転換体が選択下で成長することを可能にする。

10

20

30

40

50

【0198】

alg3 5'隣接領域断片、ヒトGNT1、ヒトGalT1、C1 gls2a-HDEL、sTF、及びpyr4マーカーの最初の2/3のための発現カセットを含有する構築物は、配列番号23(pMYT1974)に記述される。alg3 5'隣接配列は、配列番号23の9~1010位に対応する。bgl8プロモータ配列は、配列番号23の1018~2409位に対応する。C1 KRE2ゴルジ局在化シグナルに融合されたヒトGNT1をコードする核酸配列は、配列番号23の2410~3898位に対応し、ここで、2410~2674位はC1 KRE2局在化シグナルをコードし、2675~3898位はヒトGNT1をコードする。C1 KRE2ゴルジ局在化シグナルに融合されたヒトGNT1をコードする核酸配列はまた、配列番号5(C1 kre2-huGNT1 nt)として記述されている。ヒトGNT1をコードする核酸配列を、M. thermophila C1についてコドン最適化し、GenScript(USA)が合成した。合成した配列において、ヒトGNT1のアミノ酸1~100の領域を、C1 KRE2ゴルジ局在化シグナル(アミノ酸1~70)によって置換した。C1 KRE2-GNT1の完全なアミノ酸配列は、配列番号6(C1 KRE2-huGNT1 aa)として記述されている。bgl8ターミネータ配列は、配列番号23の3899~4365位に対応する。ユビキチン様タンパク質プロモータ配列は、配列番号23の4374~5393位に対応する。Sc KRE2ゴルジ局在化シグナルに融合されたヒトGalT1をコードする配列は、配列番号23の5394~5693位に対応し、ここで、5394~5693位はSc KRE2局在化シグナルをコードし、5694~6659位はヒトGalT1をコードする。Sc KRE2ゴルジ局在化シグナルに融合されたヒトGalT1をコードするヌクレオチド配列はまた、配列番号13(Sc kre2-huGalT1 nt)として記述されている。ヒトGalT1をコードする核酸配列を、M. thermophila C1についてコドン最適化し、GenScript(USA)が合成した。合成した配列において、ヒトGalT1のアミノ酸1~77の領域を除去し、発現プラスミドのクローニング時にSc KRE2ゴルジ局在化シグナル(アミノ酸1~100)によって置換した。Sc KRE2-GalT1の完全なアミノ酸配列は、配列番号14(Sc KRE2-huGalT1 aa)として記述されている。仮説タンパク質のターミネータ配列(ID2302731)は、配列番号23の6660~7065位に対応する。合成AnSESプロモータ配列は、配列番号23の7073~7565位に対応する。人工HDEL ER保留シグナルを有するC1グルコシダーゼ2アルファをコードする配列は、配列番号23の7566~10578位に対応する。HDELシグナルを有するC1 GLS2アルファをコードする核酸配列はまた、配列番号3(C1 gls2a-HDEL nt)として記述され、アミノ酸配列は、配列番号4(C1 GLS2A-HDEL aa)として記述されている。chi1ターミネータ配列は、配列番号23の10579~11224位に対応する。合成転写因子カセットのための核酸配列は、配

列番号 23 の 11225～12874 位に対応する。C1 pyr4 マーカー遺伝子の最初の 2/3 は、配列番号 23 の 12888～14667 位に対応する。断片を PCR によって産生し、アガロースゲル中で分離し、精製し、段階的に酵母組換え法を使用して、骨格ベクター pRS426 にクローニングして、配列決定によって検証した最終的な 5' アーム発現ベクター pMYT1974 を得た。

【0199】

C1 pyr4 マーカー遺伝子の最後の 2/3、マーカー除去のための直列反復、Leishmania major からの STT3 のための逆発現カセット、Tr Mns1-HDEL のための逆発現カセット、ラット GNT2 遺伝子のための逆発現カセット、及び統合のための alg3 3' 隣接領域断片を含有する 2 つの並列構築物は、配列番号 24 (pMYT1963) 及び配列番号 25 (pMYT1964) に記述されている。C1 pyr4 マーカー遺伝子の最後の 2/3 は、配列番号 24 の 17～1273 位に対応する。pyr4 カセットの始まりに対して標的化された直列反復断片は、配列番号 24 の 1290～1786 位に対応する。仮説タンパク質 (ID2315630) プロモータ配列は、配列番号 24 の 5965～4957 位に対応する。T. heterothallica C1 についてコドン最適化し、GenScript (USA) が合成した、Leishmania major からの STT3 をコードする配列は、配列番号 24 の 4956～2383 位に対応する。Leishmania major STT3 遺伝子をコードする核酸配列はまた、配列番号 11 (LmSTT3 nt) として記述されている。L. major STT3 の完全なアミノ酸配列は、配列番号 12 (LmSTT3 aa) として記述されている。仮説タンパク質 (ID2315630) ターミネータ配列は、配列番号 24 の 2374～1795 位に対応する。ユビキチン様タンパク質プロモータ配列は、配列番号 24 の 9316～8297 位に対応する。人工 HDEL ER 保留シグナルを有するゲノム Trichoderma reesei マンノシダーゼ 1 をコードする核酸配列は、配列番号 24 の 8296～6470 位に対応する。HDEL シグナルを有する T. reesei MNS1 をコードする核酸配列はまた、配列番号 1 (Tr mns1-HDEL nt) として記述され、アミノ酸配列は、配列番号 2 (Tr MNS1-HDEL aa) として記述されている。ユビキチン様タンパク質ターミネータ配列は、配列番号 24 の 6469～5974 位に対応する。翻訳伸長因子 1A プロモータ配列は、配列番号 24 の 12210～11154 位に対応する。T. heterothallica C1 についてコドン最適化し、GenScript (USA) が合成した、ラット GNT2 をコードする配列は、配列番号 24 の 11153～9825 位に対応する。ラット GNT2 をコードする核酸配列はまた、配列番号 15 (ラット GNT2 nt) として記述されている。ラット GNT2 の完全なアミノ酸配列は、配列番号 16 (ラット GNT2 aa) として記述されている。仮説タンパク質 (ID114107) ターミネータ配列は、配列番号 24 の 9824～9321 位に対応する。alg3 3' 隣接配列は、配列番号 24 の 12218～13217 位に対応する。断片を PCR によって産生し、アガロースゲル中で分離し、精製し、段階的に酵母組換え法を使用して、骨格ベクター pRS426 にクローニングして、配列決定によって検証した最終的な 3' アーム発現ベクター pMYT1963 を得た。

【0200】

配列番号 25 (pMYT1964) において、C1 pyr4 マーカー遺伝子の最後の 2/3 は、17～1273 位に対応する。pyr4 カセットの始まりに対して標的化された直列反復断片は、配列番号 25 の 1290～1786 位に対応する。仮説タンパク質 (ID2315630) プロモータ配列は、配列番号 25 の 5965～4957 位に対応する。T. heterothallica C1 についてコドン最適化し、GenScript (USA) が合成した、Leishmania major からの STT3 をコードする配列は、配列番号 25 の 4956～2383 位に対応する。Leishmania major STT3 遺伝子をコードする核酸配列はまた、配列番号 11 (LmSTT3 nt) として記述されている。L. major STT3 の完全なアミノ酸配列は、配列

10

20

30

40

50

番号12 (LmSTT3 aa)として記述されている。仮説タンパク質 (ID2315630) ターミナータ配列は、配列番号25の2374~1795位に対応する。bgl8プロモータ配列は、配列番号25の9688~8297位に対応する。人工HDELER保留シグナルを有するゲノムTrichoderma reeseiマンノシダーゼ1をコードする核酸配列は、配列番号25の8296~6470位に対応する。HDELSiグナルを有するT. reesei MNS1をコードする核酸配列はまた、配列番号1 (Tr mns1-HDEL nt)として記述され、アミノ酸配列は、配列番号2 (Tr MNS1-HDEL aa)として記述されている。ユビキチン様タンパク質ターミナータ配列は、配列番号25の6469~5974位に対応する。翻訳伸長因子1Aプロモータ配列は、配列番号25の12584~11528位に対応する。M. thermophilus C1についてコドン最適化し、GenScript (USA) が合成した、ラットGNT2をコードする配列は、配列番号25の11527~10199位に対応する。ラットGNT2をコードする核酸配列はまた、配列番号15 (ラットGNT2 nt)として記述されている。ラットGNT2の完全なアミノ酸配列は、配列番号16 (ラットGNT2 aa)として記述されている。仮説タンパク質 (ID114107) ターミナータ配列は、配列番号25の10198~9695位に対応する。alg3 3'隣接配列は、配列番号25の12592~13591位に対応する。断片をPCRによって産生し、アガロースゲル中で分離し、精製し、段階的に酵母組換え法を使用して、骨格ベクターpRS426にクローニングして、配列決定によって検証した最終的な3'アーム発現ベクターpMYT1964を得た。

10

20

【0201】

G1/2N-グリカンを有する2つの異なる空株 (異種哺乳動物糖タンパク質を発現しない) を得るために、上述の発現プラスミドを、単一工程で、より弱いプロモータ下で14個のプロテアーゼ遺伝子及びkex2プロテアーゼ遺伝子の欠失を持つpyr4-マイナス株に形質転換した。各形質転換において、(MssIを有する発現プラスミド骨格から切り出された) 1つの5'アーム発現ベクターと1つの3'アーム発現ベクターとの対を使用した。これらの対は、配列番号23 (pMYT1974; alg3 5'隣接断片-ヒトGNT1カセット-ヒトGalT1カセット-C1 gls2a-HDELCカセット-sTFカセット-2/3 pyr4) + 配列番号24 (pMYT1963) 又は配列番号25 (pMYT1964) (2/3 pyr4-DR-LmSTT3カセット-Tr mns1-HDELCカセット-ラットGNT2カセット-alg3 3'隣接断片) であった。C1形質転換及び形質転換体選択を、本質的に国際公開第2021/094935号で説明されるように行った。形質転換選択は、機能的なpyr4遺伝子に基づいていた。形質転換体をPCRによってスクリーニングして、alg3遺伝子が構築物によって置換されたクローンを見出した。形質転換体ゲノムへのプラスミド/遺伝子の正確な統合を、特異的プライマを用いて検証した。構築物の正確な統合及びalg3遺伝子の欠損を有する形質転換体を、それぞれ、M6589及びM6596 (Tr mns1-HDELCのためのユビキチン様タンパク質プロモータを有する) として、かつM6590及びM6597 (Tr mns1-HDELCのためのbgl8プロモータを有する) として保存した。

30

【0202】

両方の形質転換から構築されたC1株を、国際公開第2021/094935号において株の培養について説明されるように、24ウェルのディープウェルプレート内、3.5mLの液体培地中で成長させた。培地培養を、35℃、800RPM、湿度80%で4日間実施した。菌糸体を遠心分離によって除去し、培養物からの上清を、国際公開第2021/094935号の実施例1で説明されるように、放出されたN-グリカンの分析に供した。結果を4つ全ての株について図5に要約する。図5は、alg3遺伝子座からのグリカン構造に影響を及ぼす6つ全ての遺伝子が発現させることによって、全分泌タンパク質上の主なN-グリカンが、ヒト型 (G0~G2種に属するN-グリカン) の80%超であり、G0及びそれ以降へのN-グリカン改変を遮断すると考えられる検出可能なHex6 (GlcNAc₂Man₅Glc) がないことを示す。また、注目すべきは、多量の最

40

50

終 G 2 N-グリカンである。全分泌タンパク質上のヒト型 N-グリカンの量 (%) は、実施例 1 におけるニボルマブのような任意の精製された標的タンパク質上で観察されたものよりも常に少ないことが見出された。

【0203】

配列

配列番号 1-T. reesei mns1-HDEL nt (コード配列、すなわち、除去されたイントロン、1684 bp)

配列番号 2-T. reesei MNS1-HDEL aa (527 aa)

配列番号 3-C1 gls2a-HDEL nt (コード配列、すなわち、除去されたイントロン、2961 bp)

配列番号 4-C1 GLS2A-HDEL aa (986 aa)

配列番号 5-C1 kre2-huGNT1 nt (コード配列、すなわち、除去されたイントロン、1434 bp)

配列番号 6:C1 KRE2-huGNT1 aa (477 aa)

配列番号 7-C1 rft1 nt (コード配列、すなわち、除去されたイントロン、1839 bp)

配列番号 8-C1 RFT1 aa (612 aa)

配列番号 9-C1 kre2-boGNT1 nt (コード配列、すなわち、除去されたイントロン、1440 bp)

配列番号 10-C1 KRE2-boGNT1 aa (479 aa)

配列番号 11-LmSTT3 nt (2574 bp)

配列番号 12:LmSTT3 aa (857 aa)

配列番号 13-Sckre2-huGalT1 nt (1266 bp)

配列番号 14-ScKRE2-huGalT1 aa (421 aa)

配列番号 15-ラットGNT2 nt (1329 bp)

配列番号 16-ラットGNT2 aa (442 aa)

配列番号 17-pMYT1288 (14648 bp)

配列番号 18-pMYT0721 (13062 bp)

配列番号 19-pMYT1451 (15270 bp)

配列番号 20-pMYT1452 (15281 bp)

配列番号 21-pMYT1453 (18195 bp)

配列番号 22-Thermothelomyces heterothallica C1のrDNA

配列番号 23-pMYT1974 (20189 bp)

配列番号 24-pMYT1963 (18731 bp)

配列番号 25-pMYT1964 (19105 bp)

【0204】

特定の実施形態の前述の説明は、本発明の一般的な性質を完全に明らかにするため、他の者は、現在の知識を適用することにより、過度の実験なしに、及び一般的な概念から逸脱することなく、かかる特定の実施形態の様々な用途に容易に修正及び／又は適合でき、したがって、かかる適合及び変更は、開示された実施形態の均等物の意味及び範囲内で理解されるべきであり、そのように意図されている。本明細書で使用する表現又は用語は、説明を目的としたものであり、限定を目的としたものではないことを理解されたい。開示された様々な化学構造及び機能を実施するための手段、材料、及び工程は、本発明から逸脱することなく、様々な代替形態をとることができる。

10

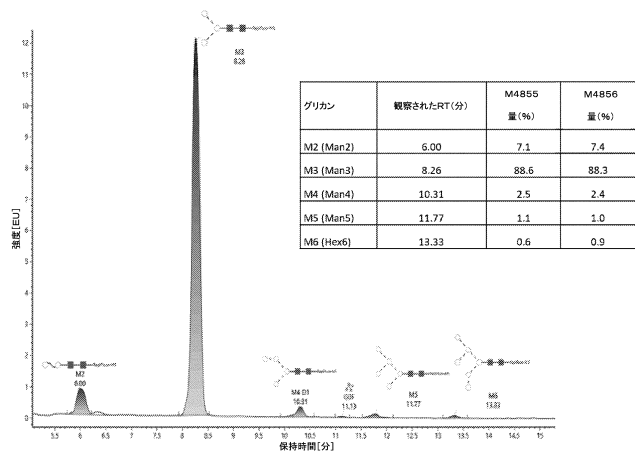
20

30

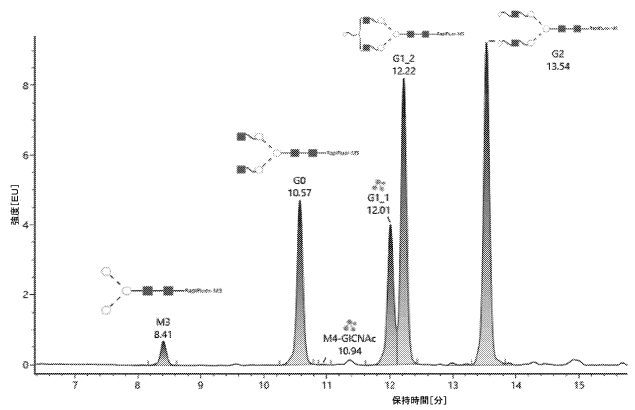
40

50

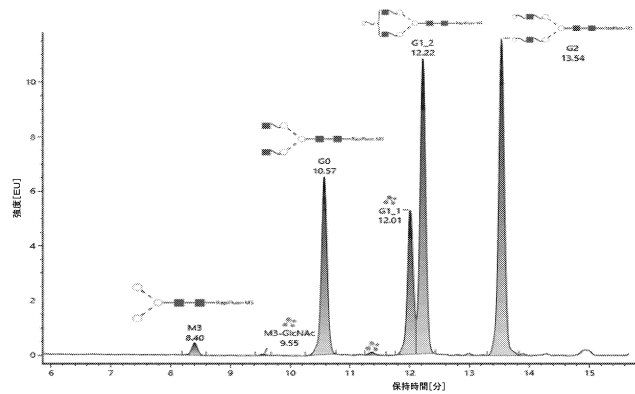
【図面】
【図 1 A】



【図 1 B】



【図 1 C】



【図 1 D】

グリカン	観察されたRT(分)	M5129 量(%)	M5130 量(%)	M5131 量(%)	M5132 量(%)
M3 (Man3)	8.39	6.6	2.6	1.4	1.4
M3-GlcNAc	9.54	0.4		0.3	0.2
G0	10.56	14.6	17.4	17.0	18.6
M3-Gal-GlcNAc	11.34	5.0		0.4	0.4
G1_1	12.00	15.2	15.8	15.4	15.6
G1_2	12.21	25.1	29.4	30.2	30.2
G2	13.53	33.1	34.8	35.3	33.7
合計ヒト型N-グリカン(G0～G2、%)		88.0	97.4	98.0	98.1

10

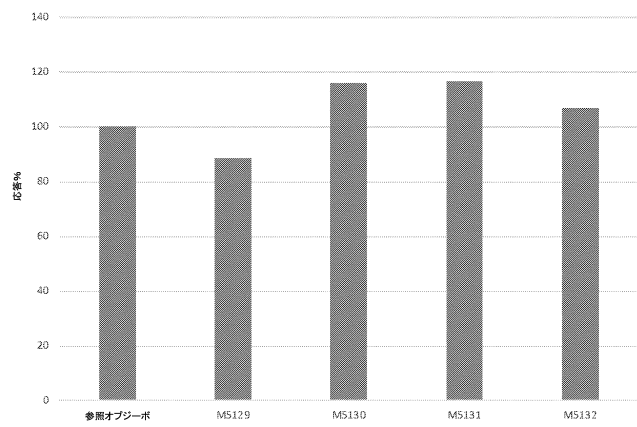
20

30

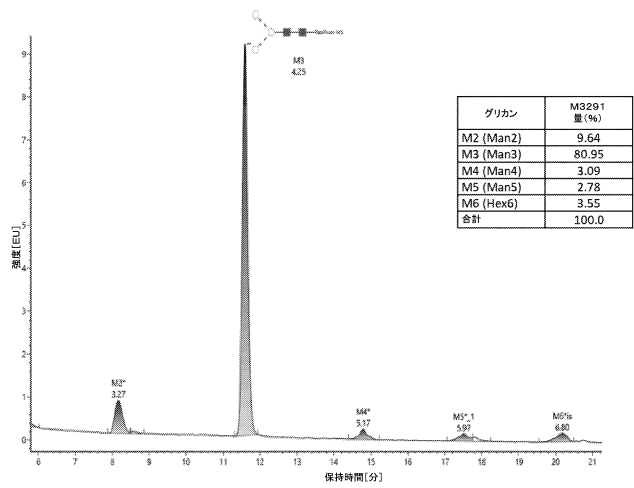
40

50

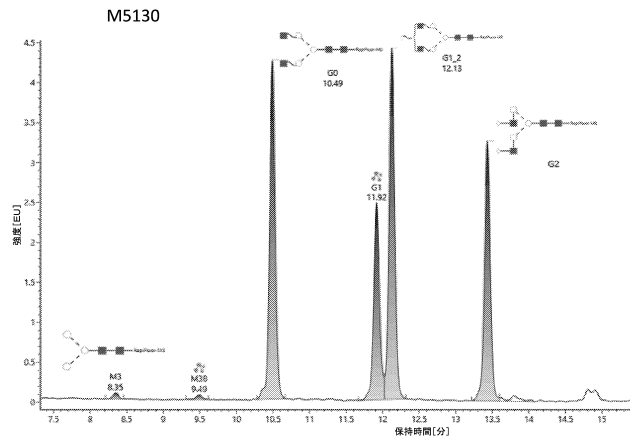
【図 2】



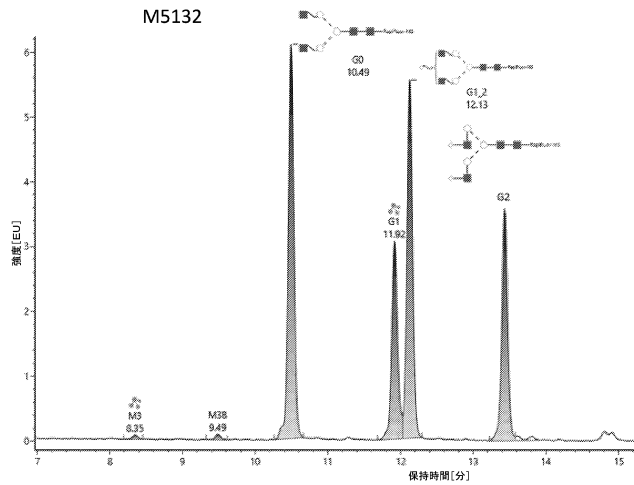
【図 3 A】



【図 3 B】



【図 3 C】



10

20

30

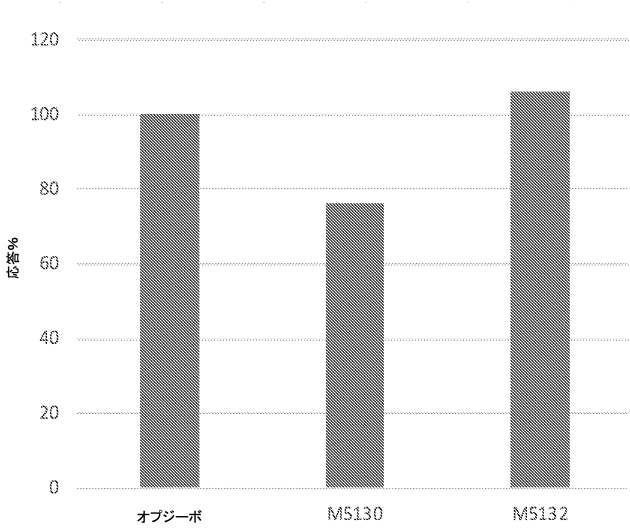
40

50

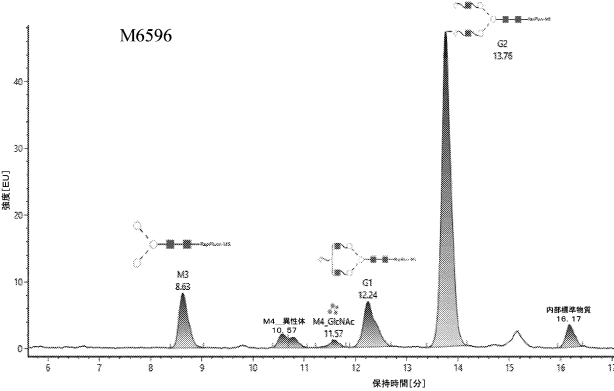
【図 3 D】

グリカン	観察されたRT (分)	M5130 量 (%)	M5132 量 (%)
M3 (Man3)	8.35	0.51	0.35
M3B	9.49	0.46	0.45
G0	10.49	28.67	32.54
G1	11.92	17.56	17.21
G1_2	12.13	29.77	29.51
G2	13.43	23.02	19.94
合計ヒト型N-グリカン (G0~G2、%)		99.0	99.2

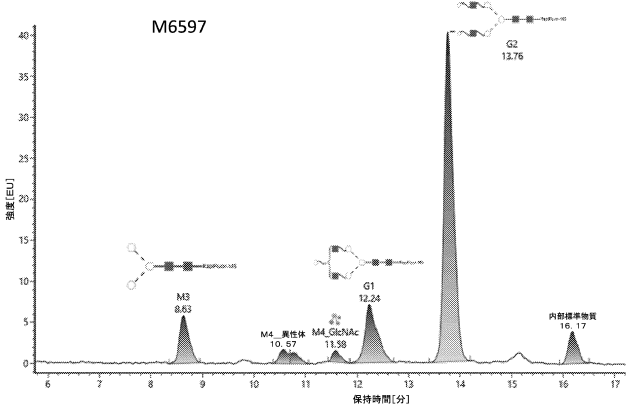
【図 4】



【図 5 A】



【図 5 B】



10

20

30

40

50

【図 5 C】

グリカン	観察されたRT(分)	M6589 量、%	M6596 量、%	M6597 量、%	M6590 量、%
M3	8,63	11,92	11,87	9,91	11,24
M4_異性体	10,57	3,26	2,55	2,76	2,56
G0	10,78	2,52	2,18	2,15	2,33
M4_GlcNAc	11,58	1,62	1,57	2,08	2,46
G1	12,24	14,34	12,97	15,82	16,07
G2	13,76	66,35	68,86	67,28	65,35
ヒト型N-グリカン(G0~G2)、%		83,20	84,01	85,25	83,75

【配列表】

202550402400001.xml

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/IB2023/050667
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>C12P 21/00</i> (2023.01)i; <i>C12N 9/10</i> (2023.01)i; <i>C07K 14/37</i> (2023.01)i; <i>C12N 15/80</i> (2023.01)i CPC:C12P 21/005; C12Y 302/01113; C12Y 204/99018; C07K 2317/14; C07K 2317/41; C12N 9/1081; C07K 14/37; C12N 15/80 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12P 21/00; C12N 9/10; C07K 14/37; C12N 15/80 CPC:C12P 21/005; C12Y 302/01113; C12Y 204/99018; C07K 2317/14; C07K 2317/41; C12N 9/1081; C07K 14/37; C12N 15/80 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Databases consulted: PATENTSCOPE, Orbit, Similari (AI-based) Search terms used: (MANNOSIDASE I); ((GLUCOSIDASE 2 ALPHA-SUBUNIT); (GLUCOSIDASE II ALPHA-SUBUNIT) OR GANAB OR G2AN OR GIA OR PKD3 OR GLUII); (alg3 or CDG1D or CDGS4 or CDGS6 or Not56 or NOT56L or D16Erttd36e)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
D,Y	WO 2021094935 A1 (DYADIC INTERNATIONAL (USA), INC) 20 May 2021 (2021-05-20) claims 1-6, 13-14, 16, 21-22, 26, 28-29, 32, 35-40, 45, 47-53, 59-61; example 6, SEQ ID NO: 77	1-47
Y	US 2017159094 A1 (GLYKOS FINLAND O) 08 June 2017 (2017-06-08) CLAIMS 1,2,7-8; paras.126,227-228,231,519,530,712	1-47
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 24 April 2023		Date of mailing of the international search report 24 April 2023
Name and mailing address of the ISA/IL Israel Patent Office Technology Park, Bldg.5, Malcha, Jerusalem, 9695101, Israel Israel Telephone No. 972-73-3927232 Email: pectoffice@justice.gov.il		Authorized officer RAVEH Eli Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/IB2023/050667
Box No. I	Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)	
1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing: a. ☒ forming part of the international application as filed. b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)), ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed. 2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing. 3. Additional comments:		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/IB2023/050667

Patent document cited in search report				Publication date (day/month/year)				Patent family member(s)				Publication date (day/month/year)			
WO	2021094935	A1		20 May 2021	WO	2021094935	A1	20 May 2021							
US	2017159094	A1		08 June 2017	US	2017159094	A1	08 June 2017							
					US	10513724	B2	24 December 2019							
					AU	2015293949	A1	02 February 2017							
					AU	2015293949	B2	25 July 2019							
					CA	2954974	A1	28 January 2016							
					CN	108064266	A	22 May 2018							
					EP	3172333	A1	31 May 2017							
					EP	3172333	B1	13 May 2020							
					SG	11201700446X	A	27 February 2017							
					WO	2016012468	A1	28 January 2016							

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/54 (2006.01)	C 1 2 N 15/54	
C 1 2 N 15/52 (2006.01)	C 1 2 N 15/52	Z
C 1 2 N 15/57 (2006.01)	C 1 2 N 15/57	
C 1 2 N 15/56 (2006.01)	C 1 2 N 15/56	
,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT, JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW		
(74)代理人	100227329 弁理士 延原 愛	
(72)発明者	フスコネン, アン フィンランド国, 0 2 1 5 0 エスポー, 2 1 テクニカンティエ ストリート, テクノロジアン トゥツキムスケスクス ブイティーティー オーワイ内	
(72)発明者	チェレット, ローネン ハンガリー国, 1 1 1 2 ブダペスト, 1 4 ファセメト ウトカ	
(72)発明者	エマルファープ, マーク アーロン アメリカ合衆国, フロリダ州 3 3 4 7 7, ジュピター, 1 9 3 スパイグラス コート	
(72)発明者	ヴァルブエナ クレスポ, ノエリア スペイン国, 4 1 0 8 9 セビリア セビリア, バスコ ヌニェス デ バルボア 1 3	
(72)発明者	サロヘイモ, マルク フィンランド国, 0 2 1 5 0 エスポー, 2 1 テクニカンティエ ストリート, テクノロジアン トゥツキムスケスクス ブイティーティー オーワイ内	
F ターム (参考)	4B064 AG27 CA05 CA19 CC24 DA01 4B065 AA58X AB01 AC14 BA02 CA25 CA44	