

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-532406

(P2014-532406A)

(43) 公表日 平成26年12月8日(2014.12.8)

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 P 21/02	(2006.01)	C 1 2 P	21/02	C	4 B O 6 4
C 1 2 N 1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19		4 B O 6 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 62 頁)

(21) 出願番号 特願2014-538873 (P2014-538873)  
 (86) (22) 出願日 平成24年10月23日 (2012.10.23)  
 (85) 翻訳文提出日 平成26年6月20日 (2014.6.20)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2012/061432  
 (87) 国際公開番号 W02013/062940  
 (87) 国際公開日 平成25年5月2日 (2013.5.2)  
 (31) 優先権主張番号 61/552, 674  
 (32) 優先日 平成23年10月28日 (2011.10.28)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 596129215  
 メルク・シャープ・アンド・ドーム・コーポレーション  
 Merck Sharp & Dohme Corp.  
 アメリカ合衆国、ニュー・ジャージー・07065-0907 ローウェイ、イースト・リンカーン・アベニュー・126  
 126 East Lincoln Avenue, Rahway, New Jersey 07065-0907 U. S. A.

(74) 代理人 100114188  
 弁理士 小野 誠

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組換えタンパク質発現のための操作された下等真核宿主株

(57) 【要約】

本発明は、異種タンパク質を発現させるための新規の操作された下等真核宿主細胞およびそのような株の製造方法に関する。

【選択図】 図 1 B



FIG. 1A

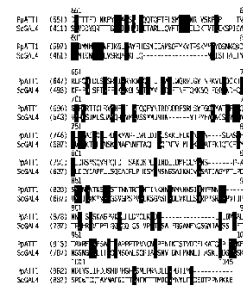


FIG. 1B

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

A T T 1 遺伝子の活性を低減または排除するように修飾されている操作された下等真核宿主細胞。

## 【請求項 2】

( i ) A T T 1 遺伝子またはポリペプチドの発現を低減または排除することにより、または ( i i ) A T T 1 遺伝子の突然変異形態を発現させることにより、A T T 1 遺伝子の活性が低減または排除されている、請求項 1 記載の宿主細胞。

## 【請求項 3】

プロテアーゼ活性、アルファ - 1 , 6 - マンノシルトランスフェラーゼ活性、アルファ - 1 , 2 - マンノシルトランスフェラーゼ活性、マンノシルリン酸トランスフェラーゼ活性、 - マンノシルトランスフェラーゼ活性、O - マンノシルトランスフェラーゼ ( P M T ) 活性および / またはドリコール - P - M a n 依存性アルファ ( 1 - 3 ) マンノシルトランスフェラーゼ活性をコードする 1 以上の遺伝子の突然変異、破壊または欠失を更に含む、請求項 1 または 2 記載の宿主細胞。

10

## 【請求項 4】

グリコシダーゼ、マンノシダーゼ、ホスホマンノシダーゼ、ホスファターゼ、ヌクレオチド糖輸送体、ヌクレオチド糖エピメラーゼ、マンノシルトランスフェラーゼ、N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ、C M P - シアル酸シンターゼ、N - アセチルノイラミン酸 - 9 - リン酸シンターゼ、ガラクトシルトランスフェラーゼ、シアリルトランスフェラーゼおよびオリゴサッカリルトランスフェラーゼからなる群から選択される 1 以上のグリコシル化酵素をコードする 1 以上の核酸を更に含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項記載の宿主細胞。

20

## 【請求項 5】

組換えタンパク質をコードする核酸を更に含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項記載の宿主細胞。

## 【請求項 6】

組換えタンパク質が、抗体 ( I g A、I g G、I g M または I g E )、抗体フラグメント、ヒトプラスミノーゲンのクリングルドメイン、エリスロポエチン、サイトカイン、凝固因子、可溶性 I g E 受容体 鎖、ウロキナーゼ、キマーゼ、尿素トリプシンインヒビター、I G F 結合性タンパク質、上皮増殖因子、成長ホルモン放出因子、アネキシン V 融合タンパク質、アンジオスタチン、血管内皮増殖因子 - 2、骨髄前駆体抑制因子 - 1、オステオプロテゲリン、 - 1 アンチトリプシン、D N アーゼ I I、 - フェトプロテイン、インスリン、F c 融合体および H S A 融合体からなる群から選択されるものである、請求項 5 記載の宿主細胞。

30

## 【請求項 7】

細胞が、類似培養条件下の A T T 1 ナイーブ親宿主細胞と比較して培養安定性、耐熱性の増強および / または発酵頑強性の改善を示す、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項記載の宿主細胞。

## 【請求項 8】

細胞が、3 2 の培養において少なくとも 8 0 時間の発酵にわたって最小限度の細胞溶解を伴って生存しうる、請求項 7 記載の宿主細胞。

40

## 【請求項 9】

宿主細胞が糖操作されている、前記の請求項のいずれか 1 項記載の宿主細胞。

## 【請求項 10】

宿主細胞が O C H 1 活性を欠いている、前記の請求項のいずれか 1 項記載の宿主細胞。

## 【請求項 11】

宿主細胞が真菌宿主細胞である、前記の請求項のいずれか 1 項記載の宿主細胞。

## 【請求項 12】

宿主細胞が酵母宿主細胞である、前記の請求項のいずれか 1 項記載の宿主細胞。

50

## 【請求項 13】

宿主細胞がピチア属種 (*Pichia* sp.) 宿主細胞である、前記の請求項のいずれか 1 項記載の宿主細胞。

## 【請求項 14】

宿主細胞がピチア・パストリス (*Pichia pastoris*) である、請求項 13 記載の宿主細胞。

## 【請求項 15】

A T T 1 遺伝子が、配列番号 7 に記載されているアミノ酸配列を含むポリペプチドまたは該ポリペプチドの自然変異体 (多形) をコードしている、請求項 14 記載の宿主細胞。

## 【請求項 16】

宿主細胞がハンゼヌラ・ポリモルファ (*Hansenula polymorpha*) である、請求項 13 記載の宿主細胞。

## 【請求項 17】

A T T 1 遺伝子が、配列番号 23 に記載されているアミノ酸配列を含むポリペプチドまたは該ポリペプチドの自然変異体 (多形) をコードしている、請求項 16 記載の宿主細胞。

## 【請求項 18】

宿主細胞が、A T T 1 ポリペプチドまたはその断片をコードする核酸配列を発現するように更に修飾されている、前記の請求項のいずれか 1 項記載の宿主細胞。

## 【請求項 19】

野生型 A T T 1 遺伝子をその天然ゲノム状態で有し、A T T 1 ポリペプチドまたはその断片の発現を増強するように修飾されている、操作された下等真核宿主細胞。

## 【請求項 20】

プロテアーゼ活性、アルファ - 1, 6 - マンノシルトランスフェラーゼ活性、アルファ - 1, 2 - マンノシルトランスフェラーゼ活性、マンノシルリン酸トランスフェラーゼ活性、 $\beta$  - マンノシルトランスフェラーゼ活性、O - マンノシルトランスフェラーゼ (P M T) 活性および/またはドリコール - P - M a n 依存性アルファ (1 - 3) マンノシルトランスフェラーゼ活性をコードする 1 以上の遺伝子の突然変異、破壊または欠失を更に含む、請求項 19 記載の宿主細胞。

## 【請求項 21】

グリコシダーゼ、マンノシダーゼ、ホスホマンノシダーゼ、ホスファターゼ、ヌクレオチド糖輸送体、マンノシルトランスフェラーゼ、N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ、U D P - N - アセチルグルコサミン輸送体、ガラクトシルトランスフェラーゼ、シアリルトランスフェラーゼおよびオリゴサッカリルトランスフェラーゼからなる群から選択される 1 以上のグリコシル化酵素をコードする 1 以上の核酸を更に含む、請求項 19 または 20 のいずれか 1 項記載の宿主細胞。

## 【請求項 22】

組換えタンパク質をコードする核酸を更に含む、請求項 19 ~ 21 のいずれか 1 項記載の宿主細胞。

## 【請求項 23】

組換えタンパク質が、抗体 (I g A、I g G、I g M または I g E)、抗体フラグメント、ヒトプラスミノゲンのクリングルドメイン、エリスロポエチン、サイトカイン、凝固因子、可溶性 I g E 受容体鎖、ウロキナーゼ、キマーゼ、尿素トリプシンインヒビター、I G F 結合性タンパク質、上皮増殖因子、成長ホルモン放出因子、アネキシン V 融合タンパク質、アンジオスタチン、血管内皮増殖因子 - 2、骨髄前駆体抑制因子 - 1、オステオプロテゲリン、 $\alpha$  - 1 アンチトリプシン、D N アーゼ I I、 $\alpha$  - フェトプロテイン、インスリン、F c 融合体および H S A 融合体からなる群から選択される、請求項 22 記載の宿主細胞。

## 【請求項 24】

細胞が、類似培養条件下の A T T 1 ナイーブ親宿主細胞と比較して培養安定性、耐熱性

10

20

30

40

50

の増強および/または発酵頑強性の改善を示す、請求項 19 ~ 23 のいずれか 1 項記載の宿主細胞。

【請求項 25】

細胞が、32 の培養において少なくとも 80 時間の発酵にわたって最小限度の細胞溶解を伴って生存しうる、請求項 24 記載の宿主細胞。

【請求項 26】

宿主細胞が糖操作されている、請求項 19 ~ 25 のいずれか 1 項記載の宿主細胞。

【請求項 27】

宿主細胞が OCH1 活性を欠いている、請求項 19 ~ 26 のいずれか 1 項記載の宿主細胞。

10

【請求項 28】

宿主細胞が酵母宿主細胞である、請求項 19 ~ 27 のいずれか 1 項記載の宿主細胞。

【請求項 29】

宿主細胞がピチア属種 (*Pichia* sp.) 宿主細胞である、請求項 19 ~ 28 のいずれか 1 項記載の宿主細胞。

【請求項 30】

宿主細胞がピチア・パストリス (*Pichia pastoris*) である、請求項 29 記載の宿主細胞。

【請求項 31】

A T T 1 遺伝子が、配列番号 7 に記載されているアミノ酸配列を含むポリペプチドまたは該ポリペプチドの自然変異体 (多形) または該ポリペプチドの断片をコードしている、請求項 30 記載の宿主細胞。

20

【請求項 32】

断片が、配列番号 7 のアミノ酸 1 - 31 および 1 - 164 からなる群から選択される、請求項 30 記載の宿主細胞。

【請求項 33】

宿主細胞がハンゼヌラ・ポリモルファ (*Hansenula polymorpha*) である、請求項 29 記載の宿主細胞。

【請求項 34】

A T T 1 遺伝子が、配列番号 23 に記載されているアミノ酸配列を含むポリペプチドまたは該ポリペプチドの自然変異体 (多形) をコードしている、請求項 32 記載の宿主細胞。

30

【請求項 35】

(a) 請求項 1 ~ 34 のいずれか 1 項記載の宿主細胞内に、異種ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを導入し、(b) 異種ポリペプチドの発現に適した条件下、該宿主細胞を培養し、そして、所望により、(c) 異種ポリペプチドを該宿主細胞から単離することを含む、操作された下等真核宿主細胞における異種ポリペプチドの製造方法。

【請求項 36】

野生型または突然変異 A T T 1 遺伝子またはその断片をコードする単離された核酸。

【請求項 37】

核酸を発現する単離された宿主細胞が、類似条件下の A T T 1 ナイーブ親宿主細胞と比較して培養安定性、耐熱性の増強および/または発酵頑強性の改善を示す、請求項 36 記載の単離された核酸。

40

【請求項 38】

a . 配列番号 7 またはその断片をコードするヌクレオチド配列、  
 b . 配列番号 8 またはその断片をコードするヌクレオチド配列、  
 c . 配列番号 9 またはその断片をコードするヌクレオチド配列、  
 d . 配列番号 10 またはその断片をコードするヌクレオチド配列、および  
 e . 配列番号 23 またはその断片をコードするヌクレオチド配列からなる群から選択される、請求項 36 または 37 記載の核酸。

50

## 【請求項 39】

断片が配列番号 7 の残基 1 - 31 または 1 - 164 を含む、請求項 37 記載の核酸。

## 【請求項 40】

請求項 36 ~ 39 のいずれか 1 項記載の核酸を含む単離されたベクター。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、異種タンパク質を発現させるための新規の操作された下等真核宿主細胞およびそのような株の製造方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

下等真核宿主細胞は、異種タンパク質を産生するように操作されうる。更に、下等真核宿主細胞は、N - または O - 結合グリコシル化がそれらの天然形態から修飾されている糖タンパク質を産生するように糖操作されうる。

## 【0003】

操作されたピチア (*Pichia*) 株は、ヒト様グリコシル化を有する組換え糖タンパク質を製造するための代替宿主系として使用されている。しかし、甚だしい遺伝的修飾は、多数の糖操作酵母株における細胞壁構造の基本的変化をも引き起こしており、発酵中の細胞溶解および細胞頑強性の低減をこれらの株の幾つかが受ける傾向を強めている。ある糖操作株は細胞生存性の相当な低減および発酵プロセス中への細胞内プロテアーゼ漏出の顕著な増加を示し、組換え産物の収率および質の両方における低下を示す。

## 【0004】

頑強 (ロウバスト) な糖操作産生株を特定するための現在の方法は、大規模 (40 L 以上) 発酵プロセスに適したクローンを実験的に特定するために 96 深ウェルプレート、5 ml 小規模発酵槽および 1 L 規模のバイオリクターのような種々の形態を使用して多数のクローンをスクリーニングすることに大きく依存している (Barnard ら, 2010)。1 g/L を超える収率で組換えモノクローナル抗体を産生しうる幾つかのピチア (*Pichia*) 宿主を特定するためにハイスループットスクリーニングが成功裏に用いられているが (Potgieter ら, 2009; Zhang ら, 2011)、これらの大規模スクリーニングアプローチは非常に資源集約的であり、長時間を要し、細胞頑強性の増大を伴うクローンしか特定できないことが多い。

## 【0005】

したがって、頑強性の改善およびヒト様グリカンを有する高品質タンパク質を産生する能力を示す下等真核宿主株は貴重であり、当分野において関心が持たれている。本発明において、本発明者らは、適切なバイオプロセス条件下で生存性、安定性およびタンパク質産生の改善を示す、新規遺伝子 ATT1 (耐熱性獲得体) における欠失、トランケート化またはナンセンス突然変異を有する操作されたピチア (*Pichia*) 宿主株を提供する。驚くべきことに、適切なバイオプロセス条件下で ATT1 またはその断片を過剰発現する操作されたピチア (*Pichia*) 宿主株は、生存性、安定性およびタンパク質産生の改善をも示す。これらの株は異種遺伝子発現に特に有用である。

## 【発明の概要】

## 【0006】

## 発明の概括

本発明は、ATT1 遺伝子の活性を低減または排除するように修飾されている操作された下等真核宿主細胞に関する。ATT1 遺伝子の活性は任意の手段により低減されうる。1 つの実施形態においては、ATT1 遺伝子の活性は、ATT1 遺伝子の発現を低減または排除することにより (例えば、干渉性 RNA またはアンチセンス RNA を使用することにより) 低減または排除される。もう 1 つの実施形態においては、ATT1 遺伝子の活性は、ATT1 遺伝子またはその産物を突然変異させることにより低減または排除される。もう 1 つの実施形態においては、ATT1 遺伝子の活性は、ATT1 ポリペプチドを分解

10

20

30

40

50

させることにより低減または排除される。もう一つの実施形態においては、A T T 1 遺伝子の活性は、A T T 1 のインヒビター、例えば小分子インヒビターまたは抗体インヒビターを使用することにより低減または排除される。本発明は、転写、翻訳または翻訳後における手段（例えば、抑制性プロモーター、干渉性RNA、アンチセンスRNA、誘導性タンパク質分解など）を含む、A T T 1 遺伝子またはそのタンパク質を不活性化する任意の手段を含む。一つの実施形態においては、下等真核細胞は、糖操作された下等真核宿主細胞である。一つの実施形態においては、下等真核細胞は、O C H 1 活性を欠く下等真核宿主細胞である。一つの実施形態においては、下等真核宿主細胞は、O C H 1 活性を欠く真核宿主細胞である。一つの実施形態においては、下等真核宿主細胞は、O C H 1 活性を欠く酵母宿主細胞である。一つの実施形態においては、下等真核宿主細胞は、O C H 1 活性を欠く酵母宿主細胞である。一つの実施形態においては、下等真核宿主細胞は、ピチア属種（*P i c h i a* s p .）である。一つの実施形態においては、下等真核細胞は、O C H 1 活性を欠くピチア属種（*P i c h i a* s p .）宿主細胞である。もう一つの実施形態においては、宿主細胞はピチア・パストリス（*P i c h i a* p a s t o r i s）であり、A T T 1 遺伝子は、配列番号7のアミノ酸を含むポリペプチドまたはその多形をコードしている。もう一つの実施形態においては、宿主細胞はハンゼヌラ・ポリモルファ（*H a n s e n u l a* p o l y m o r p h a）であり、A T T 1 遺伝子は、配列番号23のアミノ酸配列を含むポリペプチドまたはその多形をコードしている。

10

20

#### 【0007】

他の実施形態においては、本発明は、A T T 1 遺伝子の突然変異形態を発現するように修飾された操作された下等真核宿主細胞に関する。突然変異は単一ヌクレオチド突然変異、フレームシフト突然変異、挿入、ランケート化（末端切断）または1以上のヌクレオチドの欠失でありうるであろう。一つの実施形態においては、突然変異は、全A T T 1 遺伝子の欠失である。もう一つの実施形態においては、突然変異は、A T T 1 遺伝子の断片の欠失である。一つの実施形態においては、下等真核細胞は、糖操作された下等真核宿主細胞である。一つの実施形態においては、下等真核宿主細胞は、O C H 1 活性を欠く下等真核宿主細胞である。一つの実施形態においては、下等真核宿主細胞は、O C H 1 活性を欠く真核宿主細胞である。一つの実施形態においては、下等真核宿主細胞は、O C H 1 活性を欠く酵母宿主細胞である。一つの実施形態においては、下等真核宿主細胞は、O C H 1 活性を欠く酵母宿主細胞である。一つの実施形態においては、下等真核宿主細胞は、O C H 1 活性を欠く酵母宿主細胞である。一つの実施形態においては、下等真核宿主細胞は、O C H 1 活性を欠くピチア属種（*P i c h i a* s p .）である。一つの実施形態においては、下等真核細胞は、O C H 1 活性を欠くピチア属種（*P i c h i a* s p .）宿主細胞である。もう一つの実施形態においては、宿主細胞は、ピチア・パストリス（*P i c h i a* p a s t o r i s）であり、A T T 1 遺伝子は、配列番号7のアミノ酸を含むポリペプチドまたはその多形をコードしている。一つの実施形態においては、A T T 1 遺伝子の突然変異形態は、配列番号7のアミノ酸32 - 995を含む断片の欠失である。一つの実施形態においては、A T T 1 遺伝子の突然変異形態は、配列番号7のアミノ酸165 - 995を含む断片の欠失である。もう一つの実施形態においては、A T T 1 遺伝子の突然変異形態は、配列番号7のアミノ酸277 - 995を含む断片の欠失である。もう一つの実施形態においては、A T T 1 遺伝子の突然変異形態は、配列番号7のアミノ酸540 - 995を含む断片の欠失である。もう一つの実施形態においては、A T T 1 遺伝子の突然変異形態は、配列番号7のアミノ酸729 - 995を含む断片の欠失である。もう一つの実施形態においては、A T T 1 遺伝子の突然変異形態は、配列番号7をコードする核酸における挿入またはフレームシフト突然変異である。もう一つの実施形態においては、A T T 1 遺伝子の突然変異形態は、配列番号7をコードする核酸配列における単一ヌクレオチド突然変異である。もう一つの実施形態においては、A T T 1 遺伝子の突然変異形態は、配列番号7における単一アミノ酸変化を引き起こす。もう一つの実施形態においては、宿主細胞は、ハンゼヌラ・ポリモルファ（*H a n s e n u l a* p o l y m o r p h a）であり、A T T 1 遺伝子は、配列番号23のアミノ酸配列を

30

40

50

含むポリペプチドまたはその多形をコードしている。

【0008】

幾つかの実施形態においては、本発明の操作された下等真核宿主細胞は、類似培養条件下の A T T 1 ナイーブ親宿主細胞と比較して、培養安定性、耐熱性の増強および/または発酵頑強性の改善を示す。1つの実施形態においては、前記の操作された宿主細胞は、少なくとも32の培養において80時間の発酵にわたって最小限度の細胞溶解を伴って生存しうる。1つの実施形態においては、前記の操作された宿主細胞は、誘導(例えばメタノール誘導)後に、32の培養において少なくとも80時間の発酵にわたって最小限度の細胞溶解を伴って生存しうる。1つの実施形態においては、前記の操作された宿主細胞は、32の培養において少なくとも100時間の発酵にわたって最小限度の細胞溶解を伴って生存しうる。1つの実施形態においては、前記の操作された宿主細胞は、誘導後に32の培養において少なくとも100時間の発酵にわたって最小限度の細胞溶解を伴って生存しうる。

10

【0009】

幾つかの実施形態においては、本発明の操作された下等真核宿主細胞は更に、機能的遺伝子産物の1以上の、突然変異、破壊または欠失を含む。1つの実施形態においては、宿主細胞は、プロテアーゼ活性、アルファ-1,6-マンノシルトランスフェラーゼ活性、アルファ-1,2-マンノシルトランスフェラーゼ活性、マンノシルリン酸トランスフェラーゼ活性、-マンノシルトランスフェラーゼ活性、O-マンノシルトランスフェラーゼ(PMT)活性および/またはドリコール-P-Man依存性アルファ(1-3)マンノシルトランスフェラーゼ活性をコードする1以上の遺伝子の突然変異、破壊または欠失を含む。1つの実施形態においては、宿主細胞は、OCH1遺伝子における突然変異、破壊または欠失を含む。1つの実施形態においては、宿主細胞は、BMT1、BMT2、BMT3およびBMT4遺伝子における突然変異、破壊または欠失を含む。1つの実施形態においては、宿主細胞は、PNO1、MNN4およびMNN4L1遺伝子における突然変異、破壊または欠失を含む。1つの実施形態においては、宿主細胞は、PEP4およびPRB1遺伝子における突然変異、破壊または欠失を含む。もう1つの実施形態においては、宿主細胞は、ALG3遺伝子の突然変異、破壊または欠失を含む(米国特許公開第US2005/0170452号に記載されているとおり)。1つの実施形態においては、宿主細胞は、以下の遺伝子の全ての突然変異、破壊または欠失を更に含む: OCH1、BMT1、BMT2、BMT3、BMT4、PNO1、MNN4およびMNN4L1。1つの実施形態においては、宿主細胞は、以下の遺伝子の全ての突然変異、破壊または欠失を更に含む: OCH1、BMT1、BMT2、BMT3、BMT4、PNO1、MNN4、MNN4L1、PEP4およびPRB1。1つの実施形態においては、宿主細胞は、以下の遺伝子の全ての突然変異、破壊または欠失を更に含む: OCH1、BMT1、BMT2、BMT3、BMT4、PNO1、MNN4、MNN4L1、ALG3、PEP4およびPRB1。1つの実施形態においては、本発明の操作された下等真核宿主細胞は、SSK2、RRT12、SDS23、NOT5、DRS1、CRZ1、CTK1、RGD2、AVO2、YMR196W、PEX1、TYW1、POM152、YPR84、MAK5、AZF1からなる群から選択される遺伝子の突然変異、破壊または欠失を更に含む。

20

30

40

【0010】

更にもう1つの実施形態においては、本発明の操作された下等真核宿主細胞は、関心のある1以上の核酸配列を更に含む。ある実施形態においては、関心のある核酸配列は1以上のグリコシル化酵素をコードしている。ある実施形態においては、グリコシル化酵素は、グリコシダーゼ、マンノシダーゼ、ホスホマンノシダーゼ、ホスファターゼ、ヌクレオチド糖輸送体、ヌクレオチド糖エピメラーゼ、マンノシルトランスフェラーゼ、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ、CMP-シアル酸シターゼ、N-アセチルノイラミン酸-9-リン酸シターゼ、ガラクトシルトランスフェラーゼ、シアリルトランスフェラーゼおよびオリゴサッカリルトランスフェラーゼからなる群から選択される。更にもう1つの実施形態においては、本発明の操作された下等真核宿主細胞は、1以上の組

50

換えタンパク質をコードする核酸配列を更に含む。1つの実施形態においては、組換えタンパク質は治療用タンパク質である。治療用タンパク質はオリゴ糖を含有すること又は欠いていることが可能である。ある実施形態においては、治療用タンパク質は、抗体(IgA、IgG、IgMまたはIgE)、抗体フラグメント、ヒトプラスミノゲンのクリングルドメイン、エリスロポエチン、サイトカイン、凝固因子、可溶性IgE受容体鎖、ウロキナーゼ、キマーゼ、尿素トリプシンインヒビター、IGF結合性タンパク質、上皮増殖因子、成長ホルモン放出因子、アネキシンV融合タンパク質、アンジオスタチン、血管内皮増殖因子-2、骨髄前駆体抑制因子-1、オステオプロテゲリン、 $\alpha$ -1アンチトリプシン、DNアーゼII、 $\alpha$ -フェトプロテイン、インスリン、Fc融合体、HSA融合体、ウイルス抗原および細菌抗原からなる群から選択される。1つの実施形態においては、治療用タンパク質は抗体またはそのフラグメントである。1つの実施形態においては、治療用タンパク質は、N-グリカンを含む抗体または抗体フラグメント(Fc含有ポリペプチド)である。1つの実施形態においては、N-グリカンは、NANA(1-4)Gal(1-4)Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub>を主に含む。1つの実施形態においては、N-グリカンは、NANA<sub>2</sub>Gal<sub>2</sub>Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub>を主に含む。

#### 【0011】

本発明は更に、ゲノムDNAにおけるATT1遺伝子の破壊、欠失または突然変異を含み、そして更に、ATT1ポリペプチドまたはその断片をコードする核酸を含む操作された下等真核宿主細胞を提供する。1つの実施形態においては、下等真核細胞は糖操作されている(glyco-engineered)。1つの実施形態においては、下等真核細胞はOCH1活性を欠く。1つの実施形態においては、下等真核宿主細胞は真菌宿主細胞である。1つの実施形態においては、下等真核細胞は、OCH1活性を欠く真菌宿主細胞である。1つの実施形態においては、下等真核宿主細胞は酵母宿主細胞である。1つの実施形態においては、下等真核細胞は、OCH1活性を欠く酵母宿主細胞である。1つの実施形態においては、下等真核宿主細胞はピチア属種(Pichia sp.)である。1つの実施形態においては、下等真核細胞は、OCH1活性を欠くピチア属種(Pichia sp.)宿主細胞である。1つの実施形態においては、断片はATT1の「機能的断片」またはATT1の「ドミナントネガティブ断片」である。本明細書中で用いるATT1遺伝子またはポリペプチドの「機能的断片」は、ATT1活性を有する断片を意味する。ATT1遺伝子またはポリペプチドの「ドミナントネガティブ断片」は、内因性ナイーブATT1遺伝子の存在下でさえも、そのような断片が、宿主細胞の細胞培養安定性、耐熱性を増強しおよび/または発酵頑強性を改善しうるような、無傷ATT1遺伝子またはそのポリペプチド産物の機能に負に干渉する断片(例えば、実施例11における断片1-31aaおよび1-164aa)を意味する。1つの実施形態においては、宿主細胞はピチア・パストリス(Pichia pastoris)であり、ATT1ポリペプチドは配列番号7のアミノ酸またはその多形を含む。1つの実施形態においては、宿主細胞はピチア・パストリス(Pichia pastoris)であり、機能的断片は配列番号7のアミノ酸1-296を含むか又はそれからなる。1つの実施形態においては、宿主細胞はピチア・パストリス(Pichia pastoris)であり、ドミナントネガティブ断片は配列番号7のアミノ酸1-31を含むか又はそれからなる。1つの実施形態においては、宿主細胞はピチア・パストリス(Pichia pastoris)であり、ドミナントネガティブ断片は配列番号7のアミノ酸1-164を含むか又はそれからなる。1つの実施形態においては、宿主細胞はハンゼヌラ・ポリモルファ(H. polymorpha)であり、ATT1ポリペプチドは配列番号23のアミノ酸配列またはその多形を含む。幾つかの実施形態においては、前記の操作された宿主細胞は、配列番号7またはポリペプチドの自然変異体(多形)をコードする核酸配列を含む過剰発現カセットを含む。

#### 【0012】

本発明はまた、宿主細胞がATT1ポリペプチドまたはその断片をコードする核酸配列の発現を増強するように修飾されている、操作された下等真核宿主細胞に関する。1つの実施形態においては、下等真核宿主細胞は糖操作されている。1つの実施形態においては

10

20

30

40

50



、下等真核細胞はOCH1活性を欠く。1つの実施形態においては、下等真核宿主細胞は真菌宿主細胞である。1つの実施形態においては、下等真核細胞は、OCH1活性を欠く真菌宿主細胞である。1つの実施形態においては、下等真核宿主細胞は酵母宿主細胞である。1つの実施形態においては、下等真核細胞は、OCH1活性を欠く酵母宿主細胞である。1つの実施形態においては、下等真核宿主細胞はピチア属種 (*Pichia* sp.) である。1つの実施形態においては、下等真核細胞は、OCH1活性を欠くピチア属種 (*Pichia* sp.) 宿主細胞である。1つの実施形態においては、宿主細胞はピチア・パストリス (*Pichia pastoris*) であり、ATT1ポリペプチドは配列番号7のアミノ酸配列またはその多形を含む。1つの実施形態においては、宿主細胞はピチア・パストリス (*Pichia pastoris*) であり、機能的断片は配列番号7のアミノ酸1-296を含むか又はそれからなる。1つの実施形態においては、宿主細胞はピチア・パストリス (*Pichia pastoris*) であり、ドミナントネガティブ断片は配列番号7のアミノ酸1-31を含むか又はそれからなる。1つの実施形態においては、宿主細胞はピチア・パストリス (*Pichia pastoris*) であり、ドミナントネガティブ断片は配列番号7のアミノ酸1-164を含むか又はそれからなる。1つの実施形態においては、宿主細胞はハンゼヌラ・ポリモルファ (*H. polymorpha*) であり、ATT1ポリペプチドは配列番号23のアミノ酸配列またはその多形を含む。幾つかの実施形態においては、前記の操作された宿主細胞は、配列番号7またはポリペプチドの自然変異体 (多形) をコードする核酸配列を含む過剰発現カセットを含む。

10

20

#### 【0013】

ある実施形態においては、ATT1またはその断片の発現を増強するように修飾されている本発明の操作された下等真核宿主細胞は更に、1以上の機能的遺伝子産物の突然変異、破壊または欠失を含む。1つの実施形態においては、宿主細胞は、プロテアーゼ活性、アルファ-1,6-マンノシルトランスフェラーゼ活性、アルファ-1,2-マンノシルトランスフェラーゼ活性、マンノシルリン酸トランスフェラーゼ活性、 $\alpha$ -マンノシルトランスフェラーゼ活性、O-マンノシルトランスフェラーゼ (PMT) 活性および/またはドリコール-P-Man依存性アルファ(1-3)マンノシルトランスフェラーゼ活性をコードする1以上の遺伝子の突然変異、破壊または欠失を含む。1つの実施形態においては、宿主細胞はOCH1遺伝子における突然変異、破壊または欠失を含む。1つの実施形態においては、宿主細胞は、BMT1、BMT2、BMT3およびBMT4遺伝子における突然変異、破壊または欠失を含む。1つの実施形態においては、宿主細胞は、PNO1、MNN4およびMNN4L1遺伝子における突然変異、破壊または欠失を含む。1つの実施形態においては、宿主細胞は、PEP4およびPRB1遺伝子における突然変異、破壊または欠失を含む。もう1つの実施形態においては、宿主細胞は、ALG3遺伝子の突然変異、破壊または欠失を含む (米国特許公開第US2005/0170452号に記載されているとおり)。1つの実施形態においては、宿主細胞は、以下の遺伝子の全ての突然変異、破壊または欠失を更に含む: OCH1、BMT1、BMT2、BMT3、BMT4、PNO1、MNN4およびMNN4L1。1つの実施形態においては、宿主細胞は、以下の遺伝子の全ての突然変異、破壊または欠失を更に含む: OCH1、BMT1、BMT2、BMT3、BMT4、PNO1、MNN4、MNN4L1、PEP4およびPRB1。1つの実施形態においては、宿主細胞は、以下の遺伝子の全ての突然変異、破壊または欠失を更に含む: OCH1、BMT1、BMT2、BMT3、BMT4、PNO1、MNN4、MNN4L1、ALG3、PEP4およびPRB1。1つの実施形態においては、本発明の操作された下等真核宿主細胞は、SSK2、RRT12、SDS23、NOT5、DRS1、CRZ1、CTK1、RGD2、AVO2、YMR196W、PEX1、TYW1、POM152、YPR84、MAK5、AZF1からなる群から選択される遺伝子の突然変異、破壊または欠失を更に含む。更にもう1つの実施形態においては、ATT1またはその断片の発現を増強するように修飾されている本発明の操作された下等真核宿主細胞は、関心のある1以上の核酸配列を更に含む。ある実施形態においては、関心

30

40

50

のある核酸配列は1以上のグリコシル化酵素をコードしている。更にもう1つの実施形態においては、グリコシル化酵素は、グリコシダーゼ、マンノシダーゼ、ホスホマンノシダーゼ、ホスファターゼ、ヌクレオチド糖輸送体、マンノシルトランスフェラーゼ、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ、UDP-N-アセチルグルコサミン輸送体、ガラクトシルトランスフェラーゼ、シアリルトランスフェラーゼおよびオリゴサッカリルトランスフェラーゼからなる群から選択される。

【0014】

更にもう1つの実施形態においては、関心のある核酸配列は1以上の組換えタンパク質をコードしている。1つの実施形態においては、組換えタンパク質は治療用タンパク質である。ある実施形態においては、治療用タンパク質は、抗体(IgA、IgG、IgMまたはIgE)、抗体フラグメント、ヒトプラスミノーゲンのクリングルドメイン、エリスロポエチン、サイトカイン、凝固因子、可溶性IgE受容体鎖、ウロキナーゼ、キマーゼ、尿素トリプシンインヒビター、IGF結合性タンパク質、上皮増殖因子、成長ホルモン放出因子、アネキシンV融合タンパク質、アンジオスタチン、血管内皮増殖因子-2、骨髄前駆体抑制因子-1、オステオプロテゲリン、 $\alpha$ -1アンチトリプシン、DNアーゼII、 $\alpha$ -フェトプロテイン、インスリン、Fc融合体、HSA融合体、ウイルス抗原および細菌抗原からなる群から選択される。1つの実施形態においては、治療用タンパク質は、抗体またはそのフラグメントである。1つの実施形態においては、治療用タンパク質は、N-グリカンを含む抗体または抗体フラグメント(Fc含有ポリペプチド)である。1つの実施形態においては、N-グリカンはNANA<sub>1-4</sub>Gal<sub>1-4</sub>Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub>を主に含む。1つの実施形態においては、N-グリカンはNANA<sub>2</sub>Gal<sub>2</sub>Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub>を主に含む。

10

20

【0015】

他の追加的な実施形態においては、ATT1またはその断片の発現を増強するように修飾されている本発明の操作された下等真核宿主細胞は、類似培養条件下のATT1ナイーブ親宿主細胞と比較して、培養安定性、耐熱性の増強または発酵頑強性の改善を示す。1つの実施形態においては、宿主細胞は32<sup>+</sup>の培養において少なくとも80時間の発酵にわたって最小限度の細胞溶解を伴って生存しうる。1つの実施形態においては、宿主細胞は、誘導(例えばメタノール誘導)後に32<sup>+</sup>の培養において少なくとも80時間の発酵にわたって最小限度の細胞溶解を伴って生存しうる。1つの実施形態においては、宿主細胞は、32<sup>+</sup>の培養において少なくとも100時間の発酵にわたって最小限度の細胞溶解を伴って生存しうる。1つの実施形態においては、宿主細胞は、誘導後に32<sup>+</sup>の培養において少なくとも100時間の発酵にわたって最小限度の細胞溶解を伴って生存しうる。

30

【0016】

本発明はまた、配列番号23のATT1遺伝子の活性を低減または排除するように修飾されている操作されたハンゼヌラ・ポリモルファ(H. polymorpha)宿主細胞を提供する。1つの実施形態においては、本発明は、配列番号23をコードする核酸、その自然変異体またはその断片の発現を低減または排除するように修飾されているハンゼヌラ・ポリモルファ(H. polymorpha)宿主細胞を提供する。本発明はまた、配列番号23をコードするATT1遺伝子の突然変異形態を発現するように修飾されているハンゼヌラ・ポリモルファ(H. polymorpha)宿主細胞を提供する。

40

【0017】

本発明はまた、配列番号23をコードする核酸、その自然変異体またはその断片の発現を増強するように宿主細胞が修飾されている操作されたハンゼヌラ・ポリモルファ(H. polymorpha)宿主細胞を提供する。

【0018】

ある実施形態においては、本発明はまた、ATT1遺伝子のコード配列、ATT1遺伝子のプロモーター領域、ATT1の3'非翻訳領域(UTR)、ピチア・パストリス(P. pastoris)ATT1遺伝子のコード配列の縮重変異体である核酸配列ならびに関連核酸配列および断片からなる群から選択される核酸配列の破壊、欠失または突然変異

50

(例えば、単一ヌクレオチド突然変異、挿入突然変異または欠失突然変異)を含む操作された下等真核宿主細胞を提供し、ここで、宿主細胞は、破壊、欠失または突然変異を伴わない宿主細胞と比較された場合、培養安定性、耐熱性の増強または発酵頑強性の改善を有する。

【0019】

本発明はまた、異種ポリペプチドおよび他の代謝産物を製造するための、本発明の操作された下等真核宿主細胞の使用方法に関する。1つの実施形態においては、本発明は、前記のピチア属種 (*Pichia* sp.) 宿主細胞のいずれかにおける異種ポリペプチドの製造方法であって、異種ポリペプチドの発現に適した条件下で宿主細胞を培養し、所望により、異種ポリペプチドを宿主細胞から単離することを含む製造方法を提供する。

10

【0020】

本発明はまた、(a)ピチア・パストリス (*Pichia pastoris*) A T T 1 遺伝子に対するオルソログである A T T 1 遺伝子の活性を低減または排除するように修飾されている操作された宿主細胞内に、異種ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを導入し、(b)異種ポリペプチドの発現に適した条件下、宿主細胞を培養し、そして、所望により、(c)異種ポリペプチドを宿主細胞から単離することを含む、操作された下等真核宿主細胞における異種ポリペプチドの製造方法を含む。1つの実施形態においては、下等真核宿主細胞は糖操作されている。1つの実施形態においては、下等真核細胞は O C H 1 活性を欠く。1つの実施形態においては、下等真核宿主細胞は真菌宿主細胞である。1つの実施形態においては、下等真核細胞は、O C H 1 活性を欠く真菌宿主細胞である。1つの実施形態においては、下等真核宿主細胞は酵母宿主細胞である。1つの実施形態においては、下等真核細胞は、O C H 1 活性を欠く酵母宿主細胞である。1つの実施形態においては、下等真核宿主細胞はピチア属種 (*Pichia* sp.) である。1つの実施形態においては、下等真核細胞は、O C H 1 活性を欠くピチア属種 (*Pichia* sp.) 宿主細胞である。1つの実施形態においては、宿主細胞はピチア・パストリス (*Pichia pastoris*) であり、A T T 1 遺伝子は、配列番号7のアミノ酸配列を含むポリペプチドまたはその多形をコードしている。もう1つの実施形態においては、宿主細胞はハンゼヌラ・ポリモルファ (*Hansenula polymorpha*) であり、A T T 1 遺伝子は、配列番号23のアミノ酸配列を含むポリペプチドまたはその多形をコードしている。

20

30

【0021】

本発明はまた、(a)配列番号7のピチア・パストリス (*Pichia pastoris*) A T T 1 遺伝子に対するオルソログである A T T 1 遺伝子を過剰発現するように修飾されている操作された宿主細胞内に、異種ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを導入し、(b)異種ポリペプチドの発現に適した条件下、宿主細胞を培養し、そして、所望により、(c)異種ポリペプチドを宿主細胞から単離することを含む、操作された下等真核宿主細胞における異種ポリペプチドの製造方法を含む。1つの実施形態においては、異種ポリペプチドはメタノール誘導プロモーターに機能的に連結されることが可能であり、宿主細胞は、メタノール存在下の異種ポリペプチドの発現に適した条件下で培養される。1つの実施形態においては、下等真核宿主細胞は糖操作されている。1つの実施形態においては、下等真核細胞は、O C H 1 活性を欠く下等真核宿主細胞である。1つの実施形態においては、下等真核宿主細胞は真菌宿主細胞である。1つの実施形態においては、下等真核細胞は、O C H 1 活性を欠く真菌宿主細胞である。1つの実施形態においては、下等真核宿主細胞は酵母宿主細胞である。1つの実施形態においては、下等真核細胞は、O C H 1 活性を欠く酵母宿主細胞である。1つの実施形態においては、下等真核宿主細胞はピチア属種 (*Pichia* sp.) である。1つの実施形態においては、下等真核細胞は、O C H 1 活性を欠くピチア属種 (*Pichia* sp.) 宿主細胞である。もう1つの実施形態においては、宿主細胞はピチア・パストリス (*Pichia pastoris*) であり、A T T 1 遺伝子は、配列番号7のアミノ酸配列を含むポリペプチドまたはその多形をコードしている。もう1つの実施形態においては、宿主細胞はハンゼヌラ・ポ

40

50

リモルファ (*Hansenula polymorpha*) であり、ATT1 遺伝子は、配列番号 23 のアミノ酸配列を含むポリペプチドまたはその多形をコードしている。

【0022】

本発明はまた、(a) 配列番号 23 をコードする核酸、その自然変異体またはその断片の発現を低減または排除するように修飾されている操作されたハンゼヌラ・ポリモルファ (*H. polymorpha*) 宿主細胞内に、異種ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを導入し、(b) 異種ポリペプチドの発現に適した条件下、細胞を培養し、そして、所望により、(c) 異種ポリペプチドを宿主細胞から単離することを含む、操作されたハンゼヌラ・ポリモルファ (*H. polymorpha*) 宿主細胞における異種ポリペプチドの製造方法を提供する。

10

【0023】

本発明はまた、(a) 配列番号 23 をコードする核酸、その自然変異体またはその断片の発現を増強するように修飾されている操作されたハンゼヌラ・ポリモルファ (*H. polymorpha*) 宿主細胞内に、異種ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを導入し、(b) 異種ポリペプチドの発現に適した条件下、細胞を培養し、そして、所望により、(c) 異種ポリペプチドを宿主細胞から単離することを含む、操作されたハンゼヌラ・ポリモルファ (*H. polymorpha*) 宿主細胞における異種ポリペプチドの製造方法を提供する。

【0024】

本発明はまた、内因性 ATT1 遺伝子と相同組換えし、内因性 ATT1 遺伝子を部分的または完全に欠失させ、あるいは内因性 ATT1 遺伝子を破壊する細胞内に異種ポリヌクレオチドを導入することを含む、本発明の宿主細胞のいずれかの製造方法を提供する。

20

【0025】

また、本発明は、宿主細胞のゲノム DNA 内の ATT1 遺伝子の破壊、欠失または突然変異を含む、宿主細胞内への異種核酸配列の遺伝的組込みのための方法を提供する。これらの方法は、ピチア・パストリス (*P. pastoris*) ATT1 遺伝子のコード配列、ピチア・パストリス (*P. pastoris*) ATT1 遺伝子のコード配列の縮重変異体である核酸配列ならびに関連核酸配列および断片からなる群から選択される配列に由来する破壊された、欠失した又は突然変異した核酸配列を含む宿主細胞内に、関心のある配列を導入する工程を含む。

30

【0026】

本発明はまた、ピチア・パストリス (*P. pastoris*) ATT1 遺伝子またはピチア・パストリス (*P. pastoris*) ATT1 遺伝子の断片またはピチア・パストリス (*P. pastoris*) ATT1 遺伝子のオルソログもしくは多形 (自然変異体) をコードする単離されたポリヌクレオチドを提供する。本発明はまた、ATT1 遺伝子の突然変異体 (単一ヌクレオチド突然変異、フレームシフト突然変異、挿入、トランケート化または欠失) をコードする単離されたポリヌクレオチドを提供する。本発明はまた、これらの単離されたポリヌクレオチドまたはこれらのポリヌクレオチドの断片を含むベクターおよび宿主細胞を提供する。本発明は更に、ピチア・パストリス (*P. pastoris*) ATT1 遺伝子、ピチア・パストリス (*P. pastoris*) ATT1 遺伝子の断片またはピチア・パストリス (*P. pastoris*) ATT1 遺伝子のオルソログもしくは多形によりコードされるポリペプチド配列を含むか又はそれらからなる単離されたポリペプチドを提供する。本発明の単離されたポリペプチドに特異的に結合する抗体も本発明に含まれる。

40

【0027】

1つの実施形態においては、本発明は、配列番号 7 またはその断片をコードするヌクレオチド配列、配列番号 8 またはその断片をコードするヌクレオチド配列、配列番号 9 またはその断片をコードするヌクレオチド配列、配列番号 10 またはその断片をコードするヌクレオチド配列、および配列番号 23 またはその断片をコードするヌクレオチド配列からなる群から選択される野生型または突然変異 ATT1 遺伝子をコードする核酸を含む発現

50

ベクターを含む。1つの実施形態においては、単離核酸は、配列番号7の残基1 - 296、1 - 31または1 - 164を含む又は実質的にそれらからなるポリペプチドをコードしている。1つの実施形態においては、本発明は、配列番号24またはその断片、配列番号25またはその断片、配列番号26またはその断片、配列番号27またはその断片、配列番号28またはその断片、配列番号29またはその断片、配列番号30またはその断片、配列番号31またはその断片および配列番号32またはその断片からなる群から選択される野生型または突然変異A T T 1遺伝子をコードする核酸を含む発現ベクターを含む。1つの実施形態においては、核酸を発現する単離された宿主細胞は、類似条件下のA A T 1タイプ親宿主細胞と比較された場合、培養安定性、耐熱性の増強および/または発酵頑強性の改善を示す。本発明はまた、本発明の核酸を含むベクターおよび宿主細胞、ならびにこれらの核酸によりコードされるポリペプチドを含む。

10

## 【0028】

## 発明の詳細な説明

## 分子生物学

本発明においては、当該技術の範囲内の通常の分子生物学、微生物学および組換えDNA技術が用いられる。本明細書中に特に定められていない限り、本発明に関して用いられている科学技術用語は、当業者に一般に理解されている意味を有する。更に、文脈に矛盾しない限り、単数形用語は複数形を含むものとし、複数形用語は単数形を含むものとする。一般に、本明細書に記載されている生化学、酵素学、分子細胞生物学、微生物、遺伝学ならびにタンパク質および核酸の化学およびハイブリダイゼーションに関して用い

る用語ならびにそれらの技術は、当技術分野においてよく知られており一般に用いられているものである。一般に、本発明の方法および技術は、特に示されていない限り、当技術分野でよく知られている通常の方法に従いならびに本明細書の全体にわたって引用され記載されている種々の全般的およびより具体的な参考文献に記載されているとおりに行われる。例えば、以下のものを参照されたい：James M. Cregg (編集者), *Pichia Protocols (Methods in Molecular Biology)*, Humana Press (2010), Sambrookら, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989); Ausubelら, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates (1992, および2002に対する補遺); HarlowおよびLane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990); TaylorおよびDrickamer, *Introduction to Glycobiology*, Oxford Univ. Press (2003); Worthington *Enzyme Manual*, Worthington Biochemical Corp., Freehold, N.J.; *Handbook of Biochemistry: Section A Proteins, Vol I*, CRC Press (1976); *Handbook of Biochemistry: Section A Proteins, Vol II*, CRC Press (1976); *Essentials of Glycobiology*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1999), *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney編, (1986)); *Immobilized Cells And Enzymes* (IRL Press, (1986)); B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984)。

20

30

40

## 【0029】

「ポリヌクレオチド」および「核酸」は、一本鎖形態、二本鎖形態などのDNAおよび

50

R N A を含む。

【 0 0 3 0 】

「ポリヌクレオチド配列」または「ヌクレオチド配列」は、D N A または R N A のような核酸における一連のヌクレオチド塩基（「ヌクレオチド」とも称される）であり、一連の 2 以上のヌクレオチドを意味する。本明細書に記載されているヌクレオチド配列（例えば、本発明のプロモーター）を含む任意のポリヌクレオチドが本発明の一部を構成する。

【 0 0 3 1 】

「コード配列」または発現産物（例えば、R N A またはポリペプチド）を「コードする」配列は、発現されると産物（例えば、配列番号 7 または配列番号 7 の断片を含むポリペプチド）の産生をもたらすヌクレオチド配列（例えば、異種ポリヌクレオチド）である。

【 0 0 3 2 】

「タンパク質」、「ペプチド」または「ポリペプチド」（例えば、異種ポリペプチド、例えば、配列番号 7、あるいは免疫グロブリン重鎖および/または軽鎖）は、2 以上のアミノ酸の連続鎖を含む。

【 0 0 3 3 】

「タンパク質配列」、「ペプチド配列」または「ポリペプチド配列」または「アミノ酸配列」は、タンパク質、ペプチドまたはポリペプチドにおける一連の 2 以上のアミノ酸を意味する。

【 0 0 3 4 】

「単離されたポリヌクレオチド」または「単離されたポリペプチド」なる語は、細胞において若しくは組換え D N A 発現系またはいずれかの他の混入物において通常見出される他の成分から部分的または完全に分離された、それぞれポリヌクレオチドまたはポリペプチドを含む。これらの成分には、細胞膜、細胞壁、リボソーム、ポリメラーゼ、血清成分および外来性ゲノム配列が含まれるが、これらに限定されるものではない。本発明の範囲は、本明細書に記載されている単離されたポリヌクレオチド、例えば、本明細書に記載されているプロモーター、およびそれに関連した方法（例えば、本明細書に記載されているもの）を含む。

【 0 0 3 5 】

単離されたポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、好ましくは、実質的に均一な分子組成物であるが、ある程度の不均一性を伴いうる。

【 0 0 3 6 】

一般に、「プロモーター」または「プロモーター配列」は、細胞内で（例えば、直接的に又は他のプロモーター結合タンパク質もしくは物質を介して）R N A ポリメラーゼに結合し、それが機能的に連結しているコード配列の転写を開始させうる D N A 調節領域である。

【 0 0 3 7 】

コード配列（例えば、異種ポリヌクレオチド、例えばレポーター遺伝子または免疫グロブリン重鎖および/または軽鎖のコード配列）が転写および翻訳制御配列（例えば、本発明のプロモーター）に、「機能的に連結されている」、「制御下にある」、「機能的に結合されている」または「作動的に結合されている」といえるのは、配列が、R N A、好ましくは m R N A へのコード配列の R N A ポリメラーゼ媒介性転写を導き、ついで R N A が（それがイントロンを含有する場合には）スプライシングされることが可能であり、所望により、コード配列によりコードされるタンパク質へと翻訳されうる場合である。

【 0 0 3 8 】

本発明は、野生型 A T T 1 または突然変異 A T T 1 コード領域（A T T 1 遺伝子における単一ヌクレオチド突然変異、フレームシフト突然変異、挿入、トランケート化および欠失を含む）をコードする核酸を含むベクターまたはカセットを含む。本発明はまた、過剰発現した場合に培養安定性、耐熱性を増強し及び/又は発酵頑強性を改善しうる A T T 1 または A T T 1 の断片の過剰発現を引き起こすベクターを含む。「ベクター」なる語は、D N A または R N A 配列を宿主細胞内に導入して、該宿主を形質転換し、所望により、導

10

20

30

40

50

入配列の発現および/または複製を促進しうるビヒクル(例えば、プラスミド)を含む。本発明で使用される適当なベクターには、プラスミド、組込み可能なDNA断片、および宿主細胞(例えば、ピチア・パストリス(*Pichia pastoris*))のゲノム内への核酸の導入を促進しうる他のビヒクルが含まれる。プラスミドは、最も一般に用いられるベクター形態であるが、類似機能を果たし当技術分野で公知である又は公知となる全ての他のベクター形態が本発明における使用に適している。例えば、Pouwelsら, Cloning Vectors: A Laboratory Manual, 1985および補遺, Elsevier, N.Y., ならびにRodriguezら(編), Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, 1988, Butterworth, Boston, MAを参照されたい。

10

## 【0039】

プロモーターに機能的に連結されたポリヌクレオチド(例えば、異種ポリヌクレオチド、例えば、免疫グロブリン重鎖および/または軽鎖をコードする異種ポリヌクレオチド)は、発現系において発現されうる。「発現系」なる語は、ベクターにより運ばれ宿主細胞に導入されたタンパク質または核酸を適当な条件下で発現しうる宿主細胞および適合性ベクターを意味する。一般的な発現系には、真菌宿主細胞(ピチア・パストリス(*Pichia pastoris*))およびプラスミドベクター、昆虫宿主細胞およびバキュロウイルスベクター、ならびに哺乳類宿主細胞およびベクターが含まれる。

20

## 【0040】

一般に、「誘導条件」は、宿主細胞におけるポリヌクレオチド(例えば、異種ポリヌクレオチド)の発現の増強をもたらす成長条件を意味する。メタノール誘導なる語は、宿主細胞をメタノールにさらすことによる、本発明の宿主細胞におけるメタノール誘導性プロモーターに機能的に連結されたポリヌクレオチド(例えば、異種ポリヌクレオチド)の発現の増強を意味する。

## 【0041】

BLASTアルゴリズムに関する以下の参考文献を参照により本明細書に組み入れることとする: BLASTアルゴリズム: Altschul, S.F.ら, *J. Mol. Biol.* (1990) 215: 403-410; Gish, W.ら, *Nature Genet.* (1993) 3: 266-272; Madden, T.L.ら, *Meth. Enzymol.* (1996) 266: 131-141; Altschul, S.F.ら, *Nucleic Acids Res.* (1997) 25: 3389-3402; Zhang, J.ら, *Genome Res.* (1997) 7: 649-656; Wootton, J.C.ら, *Comput. Chem.* (1993) 17: 149-163; Hancock, J.ら, *Comput. Appl. Biosci.* (1994) 10: 67-70; アライメント・スコアリング・システム: Dayhoff, M.O.ら, "A model of evolutionary change in proteins", Atlas of Protein Sequence and Structure. (1978) vol. 5, suppl. 3. M.O. Dayhoff(編), pp. 345-352, Natl. Biomed. Res. Found., Washington, DC; Schwartz, R.M.ら, "Matrices for detecting distant relationships", Atlas of Protein Sequence and Structure. (1978) vol. 5, suppl. 3. "M.O. Dayhoff(編), pp. 353-358, Natl. Biomed. Res. Found., Washington, DC; Altschul, S.F., *J. Mol. Biol.* (1991) 219: 555-565; States, D.J.ら, *Methods* (1991) 3: 66-70; Henikoff, S.ら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1992) 89: 10915-10919; Altschul, S.F.ら, *J. Mol. Evol.* (1993) 36: 290-300; アライメント統計学: Karlin, S.ら, *Proc. Natl. Acad.*

30

40

50

Sci. USA (1990) 87:2264-2268; Karlin, S. S., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) 90:5873-5877; Dembo, A. S., Ann. Prob. (1994) 22:2022-2039; および Altschul, S. F. "Evaluating the statistical significance of multiple distinct local alignments". Theoretical and Computational Methods in Genome Research (S. Suhai 編), (1997) pp. 1-14, Plenum, New York.

【0042】

#### 宿主細胞

本発明は、ATT1 遺伝子の活性を低減または排除するために修飾されている操作された下等真核宿主細胞に関する。1つの実施形態においては、下等真核宿主細胞は糖操作されている。1つの実施形態においては、下等真核細胞はOCH1活性を欠く。1つの実施形態においては、下等真核宿主細胞は真菌宿主細胞である。1つの実施形態においては、下等真核宿主細胞は、OCH1活性を欠く真菌宿主細胞である。もう1つの実施形態においては、下等真核宿主細胞は酵母宿主細胞である。もう1つの実施形態においては、下等真核宿主細胞は、OCH1活性を欠く酵母宿主細胞である。1つの実施形態においては、下等真核宿主細胞はピチア属種 (*Pichia* sp.) である。1つの実施形態においては、下等真核宿主細胞は、OCH1活性を欠くピチア属種 (*Pichia* sp.) である。1つの実施形態においては、真菌宿主細胞は、以下のものからなる群から選択される：ピチア・パストリス (*Pichia pastoris*)、ピチア・アングスタ (*Pichia angusta*) (ハンゼヌラ・ポリモルファ (*Hansenula polymorpha*))、ピチア・フィンランドイカ (*Pichia finlandica*)、ピチア・トレハロフィラ (*Pichia trehalophila*)、ピチア・コクラメ (*Pichia koclamae*)、ピチア・メンブラネファシエンス (*Pichia membranaefaciens*)、ピチア・ミヌタ (*Pichia minuta*) (オガタエア・ミヌタ (*Ogataea minuta*))、ピチア・リンドネリ (*Pichia lindneri*)、ピチア・オープンチエ (*Pichia opuntiae*)、ピチア・テルモトレランス (*Pichia thermotolerans*)、ピチア・サリクタリア (*Pichia salictaria*)、ピチア・グエルクウム (*Pichia guercuum*)、ピチア・ピエペリ (*Pichia pipperi*)、ピチア・スティプティス (*Pichia stiptis*)、ピチア・メタノリカ (*Pichia methanolica*)、ヤロウイア・リポリチカ (*Yarrowia lipolytica*)、クライベロミセス・ラクチス (*Kluyveromyces lactis*)、ザイゴサッカロミセス・ロウキシイ (*Zygosaccharomyces rouxii*)、ザイゴサッカロミセス・バイリイ (*Zygosaccharomyces bailii*)、シュワンニオマイセス・オクシデンタリス (*Schwanniomyces occidentalis*)、クライベロミセス・マルキシアヌス (*Kluyveromyces marxianus*)、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*)、アルクスラ・アデニニボランス (*Arxula adeninivorans*)、アスペルギルス・ニデュランス (*Aspergillus nidulans*)、アスペルギルス・ウエンティイ (*Aspergillus wentii*)、アスペルギルス・アウレウス (*Aspergillus aureus*)、アスペルギルス・フラブス (*Aspergillus flavus*)、アシビア・ゴシッピー (*Ashbya gossypii*)、メチロフィルス・メチロトロフス (*Methylophilus methylotrophus*)、シゾサッカロミセス・ボンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、カンジダ・ボイディニイ (*Candida boidinii*)、カンジダ・ウチリス (*Candida utilis*)、リゾプス・オリゼ (*Rhizopus oryzae*)、デバロミセス・ハンゼニイ (*Debaromyces hansenii*) およびサッカロミセス・セレビ

10

20

30

40

50



シエ (*Saccharomyces cerevisiae*)。もう1つの実施形態においては、真菌宿主細胞はピチア・パストリス (*Pichia pastoris*) である。もう1つの実施形態においては、真菌宿主細胞はハンゼヌラ・ポリモルファ (*Hansenula polymorpha*) である。

【0043】

本明細書中で用いる低減した A T T 1 遺伝子活性を有する又は A T T 1 遺伝子活性を欠く宿主細胞は、類似培養条件下の A T T 1 ナイーブ親宿主細胞と比較して、培養安定性、耐熱性の増強および/または発酵頑強性の改善を示す細胞を意味する。遺伝子が A T T 1 活性を有するかどうかを決定するために、遺伝子を糖操作宿主細胞において欠失させることが可能であり (例えば、O C H 1 マイナス下等真核宿主細胞)、バイオリクター内の 3 2 の培養内で細胞が生存する能力を決定し、もし、細胞が A T T 1 ナイーブ細胞と比較して培養安定性、耐熱性の増強および/または頑強性の改善を示した場合には、遺伝子は A T T 1 活性を有する。

10

【0044】

本明細書中で用いる「A T T 1 ナイーブ宿主細胞」は、野生型 A T T 1 遺伝子をその天然ゲノム状態で含む宿主細胞を意味する。例えば、1つの実施形態においては、A T T 1 ナイーブ宿主細胞は、その天然ゲノム状態で配列番号7のポリペプチドまたはその自然変異体 (多形) をコードする A T T 1 遺伝子を含むピチア・パストリス (*Pichia pastoris*) 株を意味する。

【0045】

本明細書中で用いる「操作された細胞」は、遺伝的操作技術を用いて改変されている細胞を意味する。本明細書中で用いる「糖操作された」細胞は、N - または O - 結合グリコシル化が、それらの天然形態から遺伝子の不活性化もしくは欠失によりまたはグリコシルトランスフェラーゼもしくはグリコシダーゼの異種発現により、修飾されている糖タンパク質を産生するように遺伝的に操作された細胞を意味する。

20

【0046】

本明細書中で用いる「耐熱性」は、温度抵抗性 (すなわち、少なくとも約 3 2 の温度までの培養において増殖する能力) の増強を意味する。

【0047】

本明細書中で用いる「発酵頑強性の改善 (改善された発酵頑強性)」は、発酵中の細胞生存性の増加または細胞溶解の低下を意味する。

30

【0048】

本発明は、ピチア・パストリス (*Pichia pastoris*) A T T 1 遺伝子のオルソログである A T T 1 遺伝子の活性を低減または排除するように修飾されている任意の操作された下等真核宿主細胞を含み、ここで、該細胞は、A T T 1 ナイーブ親宿主細胞と比較して培養安定性、耐熱性の増強および/または発酵頑強性の改善を示す。

【0049】

本発明はまた、( i ) ピチア・パストリス (*Pichia pastoris*) A T T 1 遺伝子のオルソログである A T T 1 遺伝子またはポリペプチドの発現を低減または排除するように、( i i ) ピチア・パストリス (*Pichia pastoris*) A T T 1 遺伝子のオルソログである A T T 1 遺伝子の突然変異形態を発現するように、あるいは ( i i i ) ピチア・パストリス (*Pichia pastoris*) A T T 1 遺伝子のオルソログである A T T 1 遺伝子または該遺伝子の断片を過剰発現するように修飾されている操作された下等真核宿主細胞に関するものであり、ここで、該細胞は、A T T 1 ナイーブ親宿主細胞と比較して培養安定性、耐熱性の増強および/または発酵頑強性の改善を示す。1つの実施形態においては、本発明は、ピチア・パストリス (*Pichia pastoris*) A T T 1 遺伝子のオルソログである A T T 1 遺伝子またはポリペプチドの発現を低減または排除するように、あるいはピチア・パストリス (*Pichia pastoris*) A T T 1 遺伝子のオルソログである A T T 1 遺伝子の突然変異形態を発現するように修飾されている操作された下等真核宿主細胞に関するものであり、ここで、該細胞は

40

50

、 A T T 1 ナイーブ親宿主細胞と比較して培養安定性、耐熱性の増強および/または発酵頑強性の改善を示す。もう1つの実施形態においては、本発明は、ピチア・パストリス ( *Pichia pastoris* ) A T T 1 遺伝子のオルソログである A T T 1 遺伝子または該遺伝子の機能的もしくはドミナントネガティブ断片を過剰発現するように修飾されている下等真核宿主細胞に関するものであり、ここで、該細胞は、 A T T 1 ナイーブ親宿主細胞と比較して培養安定性、耐熱性の増強および/または発酵頑強性の改善を示す。

【 0 0 5 0 】

本明細書中で用いるピチア・パストリス ( *Pichia pastoris* ) A T T 1 遺伝子に対するオルソログは、ピチア・パストリス ( *Pichia pastoris* ) A T T 1 遺伝子に対して配列類似性を有し A T T 1 活性を有する遺伝子である。1つの実施形態においては、配列類似性は少なくとも 25% である。当業者であれば、単なる通常の実験を用いて、そのようなオルソログを特定することが可能であろう。例えば、ハンゼヌラ・ポリモルファ ( *H. polymorpha* ) A T T 1 オルソログは、実施例 9 に記載されているとおりに特定された。他の真菌/酵母オルソログは、例えば、相互 B L A S T 分析を用いて同様に特定されうるであろう。以下の遺伝子はピチア・パストリス ( *Pichia pastoris* ) A T T 1 遺伝子の潜在的オルソログとして特定されている。

【 0 0 5 1 】

真菌宿主細胞：配列 / GenBank アクセッション番号

ピチア・スチピチス ( *Pichia stipitidis* ) : 配列番号 24 ( X P \_ \_ 0 0 1 3 8 5 0 9 2 . 2 )

ピチア・グイリエルモンジイ ( *Pichia guilliermondii* ) : 配列番号 25 ( X P \_ \_ 0 0 1 4 8 2 3 6 4 . 1 )

クライベロミセス・ラクチス ( *Kluyveromyces lactis* ) : 配列番号 26 ( X P \_ \_ 4 5 3 6 2 7 . 1 )

アスペルギルス・ニガー ( *Aspergillus niger* ) : 配列番号 27 ( E H A 1 9 9 9 9 . 1 )

アスペルギルス・ニデュランス ( *Aspergillus nidulans* ) : 配列番号 28 ( C B F 7 6 7 8 6 . 1 )

アスペルギルス・フラブス ( *Aspergillus flavus* ) : 配列番号 29 ( X P \_ \_ 0 0 2 3 7 8 6 1 9 . 1 )

デバリオミセス・ハンゼニイ ( *Debaryomyces hansenii* ) : 配列番号 30 ( X P \_ \_ 4 5 8 1 7 1 . 2 )

ザイゴサッカロミセス・ロウキシイ ( *Zygosaccharomyces rouxii* ) : 配列番号 31 ( X P \_ \_ 0 0 2 4 9 9 2 8 5 . 1 )

サッカロミセス・セレビスイ ( *Saccharomyces cerevisiae* ) : 配列番号 32 ( C A A 9 7 9 6 9 . 1 ) 。

【 0 0 5 2 】

本発明の宿主細胞は、一倍体、二倍体または倍数体状態でありうるであろう。更に、本発明は、ただ1つの内因性染色体 A T T 1 遺伝子が突然変異、破壊、トランケート化または欠失している二倍体細胞を含む。

【 0 0 5 3 】

1つの実施形態においては、本発明の操作された下等真核宿主細胞は、以下のものからなる群から選択される：ピチア・パストリス ( *Pichia pastoris* )、ピチア・アングスタ ( *Pichia angusta* ) (ハンゼヌラ・ポリモルファ ( *Hansenula polymorpha* ) )、ピチア・フィンランドイカ ( *Pichia finlandica* )、ピチア・トレハロフィラ ( *Pichia trehalophila* )、ピチア・コクラメ ( *Pichia koclamae* )、ピチア・メンブランエファシエンス ( *Pichia membranaefaciens* )、ピチア・ミヌタ ( *Pichia minuta* ) (オガタエア・ミヌタ ( *Ogataea minuta* ) )

、ピチア・リンドネリ (*Pichia lindneri*)、ピチア・オープンチエ (*Pichia opuntiae*)、ピチア・テルモトレランス (*Pichia thermotolerans*)、ピチア・サリクタリア (*Pichia salictaria*)、ピチア・グエルクウム (*Pichia guercuum*)、ピチア・ピエペリ (*Pichia pijperi*)、ピチア・スチプティス (*Pichia stiptis*)、ピチア・メタノリカ (*Pichia methanolica*)、ヤロウシア・リポリチカ (*Yarrowia lipolytica*)、クライベロミセス・ラクチス (*Kluyveromyces lactis*)、ザイゴサッカロミセス・ロウキシイ (*Zygosaccharomyces rouxii*)、ザイゴサッカロミセス・バイリイ (*Zygosaccharomyces bailii*)、シュワンニオマイセス・オクシデンタリス (*Schwanniomyces occidentalis*)、クライベロミセス・マルキシアヌス (*Kluyveromyces marxianus*)、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*)、アルクスラ・アデニニボランス (*Arxula adeninivorans*)、アスペルギルス・ニデュランス (*Aspergillus nidulans*)、アスペルギルス・ウェンティイ (*Aspergillus wentii*)、アスペルギルス・アウレウス (*Aspergillus aureus*)、アスペルギルス・フラブス (*Aspergillus flavus*)、アシビア・ゴシッピー (*Ashbya gossypii*)、メチロフィルス・メチロトロフス (*Methylophilus methylotrophus*)、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、カンジダ・ボイディニイ (*Candida boidinii*)、カンジダ・ウチリス (*Candida utilis*)、リゾプス・オリゼ (*Rhizopus oryzae*) およびデバロミセス・ハンゼニイ (*Debaromyces hansenii*)。本発明の1つの実施形態においては、宿主細胞は、ピチア (*Pichia*) 細胞、例えばピチア・パストリス (*Pichia pastoris*)、ピチア・アングスタ (*Pichia angusta*) (ハンゼヌラ・ポリモルファ (*Hansenula polymorpha*))、ピチア・フィンランドイカ (*Pichia finlandica*)、ピチア・トレハロフィラ (*Pichia trehalophila*)、ピチア・コクラメ (*Pichia koclamae*)、ピチア・メンブラネファシエンス (*Pichia membranaefaciens*)、ピチア・ミヌタ (*Pichia minuta*) (オガタエア・ミヌタ (*Ogataea minuta*))、ピチア・リンドネリ (*Pichia lindneri*)、ピチア・オープンチエ (*Pichia opuntiae*)、ピチア・テルモトレランス (*Pichia thermotolerans*)、ピチア・サリクタリア (*Pichia salictaria*)、ピチア・グエルクウム (*Pichia guercuum*)、ピチア・ピエペリ (*Pichia pijperi*)、ピチア・スチプティス (*Pichia stiptis*) およびピチア・メタノリカ (*Pichia methanolica*) からなる群から選択される。1つの実施形態においては、宿主細胞は、操作されたピチア・パストリス (*Pichia pastoris*) 宿主細胞であり、ATT1 遺伝子は、配列番号7のアミノ酸配列を含むポリペプチドまたは該ポリペプチドの自然変異体をコードしている。もう1つの実施形態においては、宿主細胞は、操作されたハンゼヌラ・ポリモルファ (*H. polymorpha*) 宿主細胞であり、ATT1 遺伝子は、配列番号23のアミノ酸配列を含むポリペプチドまたは該ポリペプチドの自然変異体をコードしている。1つの実施形態においては、宿主細胞は、操作されたピチア・スチプティス (*Pichia stiptis*) 宿主細胞であり、ATT1 遺伝子は、配列番号24のアミノ酸配列を含むポリペプチドまたは該ポリペプチドの自然変異体をコードしている。もう1つの実施形態においては、宿主細胞は、操作されたピチア・グイリエルモンジイ (*Pichia guilliermondii*) 宿主細胞であり、ATT1 遺伝子は、配列番号25のアミノ酸配列を含むポリペプチドまたは該ポリペプチドの自然変異体をコードしている。もう1つの実施形態においては、宿主細胞は、操作されたクライベロミセス・ラクチス (*Kluyveromyces lact*

i s) 宿主細胞であり、A T T 1 遺伝子は、配列番号 2 6 のアミノ酸配列を含むポリペプチドまたは該ポリペプチドの自然変異体をコードしている。もう 1 つの実施形態においては、宿主細胞は、操作されたアスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) 宿主細胞であり、A T T 1 遺伝子は、配列番号 2 7 のアミノ酸配列を含むポリペプチドまたは該ポリペプチドの自然変異体をコードしている。もう 1 つの実施形態においては、宿主細胞は、操作されたアスペルギルス・ニデュランス (*Aspergillus nidulans*) 宿主細胞であり、A T T 1 遺伝子は、配列番号 2 8 のアミノ酸配列を含むポリペプチドまたは該ポリペプチドの自然変異体をコードしている。もう 1 つの実施形態においては、宿主細胞は、操作されたアスペルギルス・フラブス (*Aspergillus flavus*) 宿主細胞であり、A T T 1 遺伝子は、配列番号 2 9 のアミノ酸配列を含むポリペプチドまたは該ポリペプチドの自然変異体をコードしている。もう 1 つの実施形態においては、宿主細胞は、操作されたデバリオミセス・ハンゼニイ (*Debaryomyces hansenii*) 宿主細胞であり、A T T 1 遺伝子は、配列番号 3 0 のアミノ酸配列を含むポリペプチドまたは該ポリペプチドの自然変異体をコードしている。もう 1 つの実施形態においては、宿主細胞は、操作されたザイゴサッカロミセス・ロウキシイ (*Zygosaccharomyces rouxii*) 宿主細胞であり、A T T 1 遺伝子は、配列番号 3 1 のアミノ酸配列を含むポリペプチドまたは該ポリペプチドの自然変異体をコードしている。もう 1 つの実施形態においては、宿主細胞は、操作されたサッカロミセス・セレビスエ (*Sacchromyces cerevisiae*) 宿主細胞であり、A T T 1 遺伝子は、配列番号 3 2 のアミノ酸配列を含むポリペプチドまたは該ポリペプチドの自然変異体をコードしている。

【 0 0 5 4 】

1 つの実施形態においては、本発明の操作された下等真核宿主細胞は更に、1 以上の遺伝子の突然変異、破壊または欠失を含む。1 つの実施形態においては、本発明の操作された下等真核宿主細胞は、プロテアーゼ活性、アルファ - 1 , 6 - マンノシルトランスフェラーゼ活性、アルファ - 1 , 2 - マンノシルトランスフェラーゼ活性、マンノシルリン酸トランスフェラーゼ活性、 - マンノシルトランスフェラーゼ活性、O - マンノシルトランスフェラーゼ ( P M T ) 活性および / またはドリコール - P - M a n 依存性アルファ ( 1 - 3 ) マンノシルトランスフェラーゼ活性をコードする 1 以上の遺伝子の突然変異、破壊または欠失を含む。1 つの実施形態においては、本発明の操作された下等真核宿主細胞は、O C H 1 遺伝子における突然変異、破壊または欠失を含む。1 つの実施形態においては、本発明の操作された下等真核宿主細胞は、B M T 1、B M T 2、B M T 3 および B M T 4 遺伝子における突然変異、破壊または欠失を含む。1 つの実施形態においては、本発明の操作された下等真核宿主細胞は、P N O 1、M N N 4 および M N N 4 L 1 遺伝子における突然変異、破壊または欠失を含む。1 つの実施形態においては、本発明の操作された下等真核宿主細胞は、P E P 4 および P R B 1 遺伝子における突然変異、破壊または欠失を含む。もう 1 つの実施形態においては、本発明の操作された下等真核宿主細胞は、A L G 3 遺伝子の突然変異、破壊または欠失を含む ( 米国特許公開第 U S 2 0 0 5 / 0 1 7 0 4 5 2 号に記載されているとおり ) 。 1 つの実施形態においては、本発明の操作された下等真核宿主細胞は、以下の遺伝子の全ての突然変異、破壊または欠失を含む : O C H 1、B M T 1、B M T 2、B M T 3、B M T 4、P N O 1、M N N 4 および M N N 4 L 1。1 つの実施形態においては、本発明の操作された下等真核宿主細胞は、以下の遺伝子の全ての突然変異、破壊または欠失を含む : O C H 1、B M T 1、B M T 2、B M T 3、B M T 4、P N O 1、M N N 4、M N N 4 L 1、P E P 4 および P R B 1。1 つの実施形態においては、本発明の操作された下等真核宿主細胞は、以下の遺伝子の全ての突然変異、破壊または欠失を更に含む : O C H 1、B M T 1、B M T 2、B M T 3、B M T 4、P N O 1、M N N 4、M N N 4 L 1、A L G 3、P E P 4 および P R B 1。幾つかの実施形態においては、本発明の宿主細胞は、1 以上の P m t p インヒビターを含む培地内で培養される。P m t p インヒビターには、ベンジリデンチアゾリジンジオンが含まれるが、これに限定されるものではない。ベンジリデンチアゾリジンジオンの例としては、5 - [ [ 3、

4 - ビス(フェニルメトキシ)フェニル]メチレン] - 4 - オキソ - 2 - チオキソ - 3 - チアゾリジン酢酸、5 - [[3 - (1 - 25 フェニルエトキシ) - 4 - (2 - フェニルエトキシ)]フェニル]メチレン] - 4 - オキソ - 2 - チオキソ - 3 - チアゾリジン酢酸、および5 - [[3 - (1 - フェニル - 2 - ヒドロキシ)エトキシ) - 4 - (2 - フェニルエトキシ)]フェニル]メチレン] - 4 - オキソ - 2 - チオキソ - 3 - チアゾリジン酢酸が挙げられる。

【0055】

1つの実施形態においては、本発明の操作された下等真核宿主細胞は、OCH1活性を欠く。1つの実施形態においては、本発明は、(i)ATT1遺伝子またはポリペプチドの発現を低減または排除するように、(ii)ATT1遺伝子の突然変異形態を発現するように、あるいは(iii)ATT1遺伝子または該ATT1の断片を過剰発現するように修飾されている下等真核宿主細胞(例えば、ピチア属種(*Pichia sp.*))を含み、ここで、細胞はOCH1活性を欠く。OCH1活性を欠く下等真核宿主細胞は当分野において記載されており、温度感受性であることが示されている。例えば、Choiら, 2003; Batesら, *J. Biol. Chem.* 281(1):90-98(2006); Woog Kimら, *J. Biol. Chem.* 281(10):6261-6272(2006); Yoko-ora, *FEBS Letters* 489(1):75-80(2001); および Nakayamaら, *EMBO J* 11(7):2511-2519(1992)を参照されたい。したがって、OCH1活性を欠く細胞を、それらを耐熱性にするために修飾することが望ましい。

10

20

【0056】

本発明の1つの実施形態においては、本発明の操作された下等真核宿主細胞は更に、アルファ-1,2-マンノシダーゼを分泌へと導くシグナルペプチドを有するアルファ-1,2-マンノシダーゼをコードする核酸を含むように遺伝的に操作される。例えば、本発明の1つの実施形態においては、本発明の宿主細胞は、5.1~8.0、好ましくは5.9~7.5の最適pHを有する外因性アルファ-1,2-マンノシダーゼ酵素を発現するように操作される。本発明の1つの実施形態においては、外因性酵素は、宿主細胞の小胞体またはゴルジ装置に標的化され、この部位において、それは例えばMan<sub>8</sub>GlcNAc<sub>2</sub>のようなN-グリカンを切断してMan<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>を与える。米国特許第7,029,872号を参照されたい。そのようなアルファ-1,2-マンノシダーゼ活性を発現する下等真核宿主細胞は当分野において記載されている。例えば、Choiら, 2003を参照されたい。1つの実施形態においては、本発明の糖操作された下等真核宿主細胞は、OCH1活性を欠き、アルファ1,2マンノシダーゼを含む。

30

【0057】

もう1つの実施形態においては、(i)ATT1遺伝子またはポリペプチドの発現を低減または排除するように、(ii)ATT1遺伝子の突然変異形態を発現するように、または(iii)ATT1遺伝子または該ATT1の断片を過剰発現するように修飾されている本発明の操作された下等真核宿主細胞(例えば、ピチア属種(*Pichia sp.*))は更に、ベータ-マンノシルトランスフェラーゼ遺伝子(例えば、BMT1、BMT2、BMT3およびBMT4)の1以上を欠失させ又は破壊することにより(米国特許第7,465,577号を参照されたい)、あるいは干渉性RNA、アンチセンスRNAなどを使用してベータ-マンノシルトランスフェラーゼの1以上をコードするRNAの翻訳を妨げることにより、アルファ-マンノシダーゼ耐性N-グリカンを有する糖タンパク質を排除するために遺伝的に操作される。

40

【0058】

幾つかの実施形態においては、(i)ATT1遺伝子またはポリペプチドの発現を低減または排除するように、(ii)ATT1遺伝子の突然変異形態を発現するように、または(iii)ATT1遺伝子または該ATT1の断片を過剰発現するように修飾されている本発明の操作された下等真核宿主細胞(例えば、ピチア属種(*Pichia sp.*))は更に、例えばホスホマンノシルトランスフェラーゼ遺伝子(すなわち、PNO1、M

50

NN4およびMNN4L1)の1以上を欠失させ又は破壊することにより(例えば、米国特許第7,198,921号および第7,259,007号を参照されたい)あるいは干渉性RNA、アンチセンスRNAなどを使用してホスホマンノシルトランスフェラーゼの1以上をコードするRNAの翻訳を妨げることにより、ホスホマンノース残基を有する糖タンパク質を排除するために遺伝的に操作される。

#### 【0059】

また、(i)ATT1遺伝子またはポリペプチドの発現を低減または排除するように、(ii)ATT1遺伝子の突然変異形態を発現するように、または(iii)ATT1遺伝子または該ATT1の断片を過剰発現するように修飾されている本発明の操作された下等真核宿主細胞(例えば、ピチア属種(*Pichia sp.*)は更に、リーシュマニア属種(*Leishmania sp.*)単一サブユニットオリゴサッカリルトランスフェラーゼSTT3Aタンパク質、STT3Bタンパク質、STT3Cタンパク質、STT3Dタンパク質またはそれらの組合せ(例えば、WO2011/06389に記載されているもの)をコードする核酸を含むように遺伝的に操作されうる。

10

#### 【0060】

幾つかの実施形態においては、本発明の操作された下等真核宿主細胞は、異種ポリペプチド(例えば、レポーターまたは免疫グロブリン重鎖および/または軽鎖)をコードするポリヌクレオチドに機能的に連結されたプロモーターを更に含む。本発明は更に、本発明の宿主細胞の使用方法、例えば、宿主細胞において異種ポリペプチドを発現させるための方法を含む。本発明の操作された下等真核宿主細胞はまた、そのような細胞内で発現されるポリペプチド上の特定のグリコシル化パターンを発現するように遺伝的に操作されうる。例えば、本発明の宿主細胞は、N-グリカンを含むポリペプチドを産生するように修飾されうる。1つの実施形態においては、本発明の宿主細胞は、高マンノース、ハイブリッドまたは複合型N-グリカンを産生するように操作されうる。

20

#### 【0061】

本明細書中で用いる「N-グリカン」および「グリコフォーム(糖形態)」なる語は互換的に用いられ、N-結合オリゴ糖を意味し、例えば、ポリペプチドのアスパラギン残基にアスパラギン-N-アセチルグルコサミン結合により結合していることを意味する。N-結合糖タンパク質は、タンパク質中のアスパラギン残基のアミド窒素に結合したN-アセチルグルコサミン残基を含有する。糖タンパク質上で見出される主な糖としては、グルコース、ガラクトース、マンノース、フコース、N-アセチルガラクトサミン(*GalNAc*)、N-アセチルグルコサミン(*GlcNAc*)およびシアル酸(例えば、N-アセチル-ノイラミン酸(*NANA*))が挙げられる。

30

#### 【0062】

N-グリカンは、 $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ の共通の五糖コアを有する(「Man」はマンノースを意味し、「Glc」はグルコースを意味し、「NAc」はN-アセチルを意味し、*GlcNAc*はN-アセチルグルコサミンを意味する)。N-グリカンは、「トリマンノースコア」、「五糖コア」または「小マンノース(*paucimannose*)コア」とも称される $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ (「 $\text{Man}_3$ 」)コア構造に付加される末梢糖(例えば、*GlcNAc*、ガラクトース、フコースおよびシアル酸)を含む分枝(アンテナ)の数に関して異なる。N-グリカンは、それらの分枝構成に従い分類される(例えば、高マンノース、複合またはハイブリッド)。「高マンノース」型N-グリカンは5以上のマンノース残基を有する。「複合」型N-グリカンは、典型的には、「トリマンノース」コアの1,3マンノース・アームに結合した少なくとも1つの*GlcNAc*、および1,6マンノース・アームに結合した少なくとも1つの*GlcNAc*を有する。複合N-グリカンはまた、シアル酸または誘導体(例えば、「*NANA*」または「*NeuAc*」;ここで、「*Neu*」はノイラミン酸を意味し、「*Ac*」はアセチルを意味する)で修飾されていてもよいガラクトース(「*Gal*」)またはN-アセチルガラクトサミン(「*GalNAc*」)残基を有しうる。複合N-グリカンはまた、「二分岐(*bisecting*)」*GlcNAc*およびコア・フコース(「*Fuc*」)を含む鎖内置換を有しうる。複合N-

40

50

グリカンはまた、「トリマンノースコア」上に複数のアンテナを有することが可能であり、これは、しばしば、「多アンテナグリカン」と称される。「ハイブリッド」N-グリカンは、トリマンノースコアの1, 3マンノース・アームの末端に少なくとも1つのGlcNAcを、そしてトリマンノースコアの1, 6マンノース・アーム上に0個以上のマンノースを有する。これらの種々のN-グリカンは「グリコフォーム」とも称される。「PNGアーゼ」または「グリカナーゼ」はペプチドN-グリコシダーゼF (EC 3.2.2.18)を意味する。

#### 【0063】

本発明の1つの実施形態においては、(i)ATT1遺伝子またはポリペプチドの発現を低減または排除するように、(ii)ATT1遺伝子の突然変異形態を発現するように、あるいは(iii)ATT1遺伝子または該ATT1の断片を過剰発現するように修飾されている本発明の操作された下等真核宿主細胞(例えば、ピチア属種(*Pichia* sp.))は更に、複合N-グリカン、ハイブリッドN-グリカンおよび高マンノースN-グリカンからなる群から選択されるN-グリカンを主に有する糖タンパク質を産生するように遺伝的に修飾される。1つの実施形態においては、高マンノースN-グリカンは、 $Man_6GlcNAc_2$ 、 $Man_7GlcNAc_2$ 、 $Man_8GlcNAc_2$ および $Man_9GlcNAc_2$ からなる群から選択される。1つの実施形態においては、本発明の宿主細胞は、主に $Man_{8-10}GlcNAc_2$  N-グリカンを有する糖タンパク質を産生するように操作される(実施例13)。1つの実施形態においては、N-グリカンは、 $Man_5GlcNAc_2$ (実施例13)、 $GlcNAcMan_5GlcNAc_2$ 、 $GalGlcNAcMan_5GlcNAc_2$ および $NANA GalGlcNAcMan_5GlcNAc_2$ からなる群から選択される。1つの実施形態においては、N-グリカンは、 $Man_3GlcNAc_2$ 、 $GlcNAc_{(1-4)}Man_3GlcNAc_2$ 、 $NANA_{(1-4)}GlcNAc_{(1-4)}Man_3GlcNAc_2$ および $NANA_{(1-4)}Gal_{(1-4)}Man_3GlcNAc_2$ からなる群から選択される。1つの実施形態においては、N-グリカンは $Man_3GlcNAc_2$ 構造を主に含む。1つの実施形態においては、N-グリカンは $NANA_{(1-4)}Gal_{(1-4)}Man_3GlcNAc_2$ を主に含む。1つの実施形態においては、N-グリカンは $NANA_2Gal_2Man_3GlcNAc_2$ を主に含む。1つの実施形態においては、本発明の宿主細胞は、ガラクトシル化N-グリカンを有する糖タンパク質を産生するように操作される(実施例1)。1つの実施形態においては、本発明の宿主細胞は、シアル酸化N-グリカンを有する糖タンパク質を産生するように操作される(実施例2およびWO2011/149999)。

#### 【0064】

ピチア・パストリスATT1の特徴づけ

新規ピチア・パストリス(*Pichia pastoris*)遺伝子ATT1(配列番号1; サッカロミセス・セレビスエ(*S. cerevisiae*)GAL4転写因子に対してオルソログである耐熱性獲得体(acquiring thermal tolerance))内の突然変異はATT1タンパク質産物の未熟トランケート化をもたらし、耐熱性の増強を示す一組のピチア(*Pichia*)突然変異体において特定された。これらの突然変異は、これらの突然変異を含有するピチア(*Pichia*)宿主株に関して、温度抵抗性(すなわち、少なくとも約35の温度に対する培養内の安定性)における有意な増強および発酵頑強性の改善をもたらした(すなわち、ATT1突然変異ピチア(*Pichia*)株は、細胞溶解の低下、誘導/産生期の延長を示し、タンパク質分解の低下および所望のグリコシル化パターンを伴う異種タンパク質産物を産生した)。

#### 【0065】

株の質を広範に改善するために、有意に改善した発酵頑強性を有する幾つかの耐熱性ピチア・パストリス(*P. pastoris*)突然変異株を一組の耐熱性突然変異体から特定した。未突然変異誘発糖操作親株は、典型的に、ペトリ皿上で培養された場合に温度感受性表現型を示し(Choiら, 2003)、一般に、バイオリアクター内で培養された場合に32でのMeOH誘導の24時間以内に高レベルの細胞溶解を示すが、本明細書

に記載されている A T T 1 突然変異株は、細胞溶解の明らかな徴候を示すことなく、バイオリアクター内で培養された場合に 32 での誘導後に 100 時間以上にわたって生存可能である。この延長した誘導期は、複数の組換えタンパク質の収率および質の有意な改善、異種タンパク質（例えば、抗体および非抗体治療用物質）の産生のための望ましい形質を可能にする。

【0066】

いずれかの酵母宿主株へと改変操作された場合の A T T 1 におけるそのような突然変異は、発酵頑強性を改善し、組換えタンパク質収率を改善し、タンパク質産物のタンパク質分解を低減するのに役立つであろう。

【図面の簡単な説明】

10

【0067】

【図1A】図1A～Bは、サッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) GAL4 およびピチア・パストリス (*Pichia pastoris*) A T T 1 アミノ酸配列の間の配列アライメントを示す。

【図1B】図1A～Bは、サッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) GAL4 およびピチア・パストリス (*Pichia pastoris*) A T T 1 アミノ酸配列の間の配列アライメントを示す。

【図2A】図2A～Dは、4つの株 Y G L Y 1 7 1 0 8 (図2A)、Y G L Y 1 7 1 7 7 (図2B)、Y G L Y 2 2 8 3 5 (図2C) および Y G L Y 1 7 1 5 9 (図2D) からの分泌性および全細胞タンパク質を使用した場合の N - グリカン M A L D I - T O F 質量分析トレースを示す。

20

【図2B】図2A～Dは、4つの株 Y G L Y 1 7 1 0 8 (図2A)、Y G L Y 1 7 1 7 7 (図2B)、Y G L Y 2 2 8 3 5 (図2C) および Y G L Y 1 7 1 5 9 (図2D) からの分泌性および全細胞タンパク質を使用した場合の N - グリカン M A L D I - T O F 質量分析トレースを示す。

【図2C】図2A～Dは、4つの株 Y G L Y 1 7 1 0 8 (図2A)、Y G L Y 1 7 1 7 7 (図2B)、Y G L Y 2 2 8 3 5 (図2C) および Y G L Y 1 7 1 5 9 (図2D) からの分泌性および全細胞タンパク質を使用した場合の N - グリカン M A L D I - T O F 質量分析トレースを示す。

【図2D】図2A～Dは、4つの株 Y G L Y 1 7 1 0 8 (図2A)、Y G L Y 1 7 1 7 7 (図2B)、Y G L Y 2 2 8 3 5 (図2C) および Y G L Y 1 7 1 5 9 (図2D) からの分泌性および全細胞タンパク質を使用した場合の N - グリカン M A L D I - T O F 質量分析トレースを示す。

30

【図3A】図3A～Bは p G L Y 8 0 4 5 および p G L Y 6 3 9 1 のプラスミド地図を示す。

【図3B】図3A～Bは p G L Y 8 0 4 5 および p G L Y 6 3 9 1 のプラスミド地図を示す。

【図4A】図4A～Gは p G L Y 5 9 3 3 ~ 5 9 3 6 (それぞれ、図4A～D) および p G L Y 5 9 4 7 ~ p G L Y 5 9 4 9 (それぞれ、図4E～G) のプラスミド地図を示す。

【図4B】図4A～Gは p G L Y 5 9 3 3 ~ 5 9 3 6 (それぞれ、図4A～D) および p G L Y 5 9 4 7 ~ p G L Y 5 9 4 9 (それぞれ、図4E～G) のプラスミド地図を示す。

40

【図4C】図4A～Gは p G L Y 5 9 3 3 ~ 5 9 3 6 (それぞれ、図4A～D) および p G L Y 5 9 4 7 ~ p G L Y 5 9 4 9 (それぞれ、図4E～G) のプラスミド地図を示す。

【図4D】図4A～Gは p G L Y 5 9 3 3 ~ 5 9 3 6 (それぞれ、図4A～D) および p G L Y 5 9 4 7 ~ p G L Y 5 9 4 9 (それぞれ、図4E～G) のプラスミド地図を示す。

【図4E】図4A～Gは p G L Y 5 9 3 3 ~ 5 9 3 6 (それぞれ、図4A～D) および p G L Y 5 9 4 7 ~ p G L Y 5 9 4 9 (それぞれ、図4E～G) のプラスミド地図を示す。

【図4F】図4A～Gは p G L Y 5 9 3 3 ~ 5 9 3 6 (それぞれ、図4A～D) および p G L Y 5 9 4 7 ~ p G L Y 5 9 4 9 (それぞれ、図4E～G) のプラスミド地図を示す。

【図4G】図4A～Gは p G L Y 5 9 3 3 ~ 5 9 3 6 (それぞれ、図4A～D) および p

50



G L Y 5 9 4 7 ~ p G L Y 5 9 4 9 (それぞれ、図 4 E ~ G) のプラスミド地図を示す。

【図 5】図 5 は、温度抵抗性および発酵頑強表現型を試験するための非突然変異誘発ピチア (*P i c h i a*) 株における内因性 A T T 1 遺伝子を置換するために用いた D N A 構築物および組込み法を示す。

【図 6 A】図 6 A ~ C は、対照宿主細胞の増殖と比較した、改善されたピチア・パストリス (*P i c h i a p a s t o r i s*) A T T 1 突然変異体の増殖を示す写真 (図 6 A ~ B) および相関表 (図 6 C) を示す。

【図 6 B】図 6 A ~ C は、対照宿主細胞の増殖と比較した、改善されたピチア・パストリス (*P i c h i a p a s t o r i s*) A T T 1 突然変異体の増殖を示す写真 (図 6 A ~ B) および相関表 (図 6 C) を示す。

【図 6 C】図 6 A ~ C は、対照宿主細胞の増殖と比較した、改善されたピチア・パストリス (*P i c h i a p a s t o r i s*) A T T 1 突然変異体の増殖を示す写真 (図 6 A ~ B) および相関表 (図 6 C) を示す。

【図 7】図 7 は、y G L Y 6 9 0 3 から y G L Y 1 7 1 0 8 までの株系列を示す。

【図 8】図 8 は、y G L Y 1 7 1 0 8 (G F I 5 . 0) バックグラウンドからの A T T 1 突然変異体系列を示す。

【図 9】図 9 は、y G L Y 6 9 0 3 から y G L Y 2 2 8 3 5 および y G L Y 1 7 1 5 9 までの株系列を示す。

【図 10】図 10 は、p G L Y 8 3 6 9 のプラスミド地図を示す。

【図 11】図 11 は、p G L Y 9 9 5 9 のプラスミド地図を示す。

【図 12】図 12 は、p G L Y 5 8 8 3 のプラスミド地図を示す。

【図 13】図 13 は、N R R L 1 1 4 3 0 から y G L Y 1 3 9 7 9 までの株系列を示す。

【図 14 A】図 14 A ~ H は、プラスミド地図を示す。図 A 4 A ~ D は、それぞれ、p G L Y 9 9 5 5 ~ p G L Y 9 9 5 8 のプラスミド地図を示す。図 14 E ~ H は、それぞれ、p G L Y 9 9 6 0 ~ p G L Y 9 9 6 3 のプラスミド地図を示す。

【図 14 B】図 14 A ~ H は、プラスミド地図を示す。図 A 4 A ~ D は、それぞれ、p G L Y 9 9 5 5 ~ p G L Y 9 9 5 8 のプラスミド地図を示す。図 14 E ~ H は、それぞれ、p G L Y 9 9 6 0 ~ p G L Y 9 9 6 3 のプラスミド地図を示す。

【図 14 C】図 14 A ~ H は、プラスミド地図を示す。図 A 4 A ~ D は、それぞれ、p G L Y 9 9 5 5 ~ p G L Y 9 9 5 8 のプラスミド地図を示す。図 14 E ~ H は、それぞれ、p G L Y 9 9 6 0 ~ p G L Y 9 9 6 3 のプラスミド地図を示す。

【図 14 D】図 14 A ~ H は、プラスミド地図を示す。図 A 4 A ~ D は、それぞれ、p G L Y 9 9 5 5 ~ p G L Y 9 9 5 8 のプラスミド地図を示す。図 14 E ~ H は、それぞれ、p G L Y 9 9 6 0 ~ p G L Y 9 9 6 3 のプラスミド地図を示す。

【図 14 E】図 14 A ~ H は、プラスミド地図を示す。図 A 4 A ~ D は、それぞれ、p G L Y 9 9 5 5 ~ p G L Y 9 9 5 8 のプラスミド地図を示す。図 14 E ~ H は、それぞれ、p G L Y 9 9 6 0 ~ p G L Y 9 9 6 3 のプラスミド地図を示す。

【図 14 F】図 14 A ~ H は、プラスミド地図を示す。図 A 4 A ~ D は、それぞれ、p G L Y 9 9 5 5 ~ p G L Y 9 9 5 8 のプラスミド地図を示す。図 14 E ~ H は、それぞれ、p G L Y 9 9 6 0 ~ p G L Y 9 9 6 3 のプラスミド地図を示す。

【図 14 G】図 14 A ~ H は、プラスミド地図を示す。図 A 4 A ~ D は、それぞれ、p G L Y 9 9 5 5 ~ p G L Y 9 9 5 8 のプラスミド地図を示す。図 14 E ~ H は、それぞれ、p G L Y 9 9 6 0 ~ p G L Y 9 9 6 3 のプラスミド地図を示す。

【図 14 H】図 14 A ~ H は、プラスミド地図を示す。図 A 4 A ~ D は、それぞれ、p G L Y 9 9 5 5 ~ p G L Y 9 9 5 8 のプラスミド地図を示す。図 14 E ~ H は、それぞれ、p G L Y 9 9 6 0 ~ p G L Y 9 9 6 3 のプラスミド地図を示す。

【図 15】図 15 は、A T T 1 欠失を伴うピチア (*P i c h i a*) 株に関する細胞溶解の低減を示すグラフを示す。

【図 16】図 16 は、ピチア (*P i c h i a*) A T T 1 過剰発現株 y G L Y 1 3 9 7 9 +

10

20

30

40

50

T E F - A T T 1 1 - 6 5 5 に関するタンパク質力価を示すグラフを示す。

【図 1 7】図 1 7 は、種々の A T T 1 操作ピチア (*P i c h i a*) 宿主株に関する誘導時間、株細胞溶解およびタンパク質力価を示す表を示す。

【図 1 8 - 1】図 1 8 は、サッカロミセス・セレビスエ (*S . c e r e v i s i a e*) およびハンゼヌラ・ポリモルファ (*H . p o l y m o r p h a*) A T T 1 のアライメントを示す。

【図 1 8 - 2】図 1 8 は、サッカロミセス・セレビスエ (*S . c e r e v i s i a e*) およびハンゼヌラ・ポリモルファ (*H . p o l y m o r p h a*) A T T 1 のアライメントを示す。

【図 1 8 - 3】図 1 8 は、サッカロミセス・セレビスエ (*S . c e r e v i s i a e*) およびハンゼヌラ・ポリモルファ (*H . p o l y m o r p h a*) A T T 1 のアライメントを示す。

【図 1 9 A】図 1 9 A および 1 9 B は、細胞頑強性および産物力価に対する種々の A T T 1 トランケート化の効果を示す。

【図 1 9 B】図 1 9 A および 1 9 B は、細胞頑強性および産物力価に対する種々の A T T 1 トランケート化の効果を示す。

【図 2 0】図 2 0 は、1 5 L バイオリクター内での細胞溶解における種々の A T T 1 修飾の効果を示す。

【図 2 1】図 2 1 は、プラスミド p G L Y 5 9 5 2 の制限地図を示す。大腸菌 (*E . c o l i*) / ピチア・パストリス (*P . p a s t o r i s*) シャトルベクターは、それが大腸菌 (*E . c o l i*) 内で維持されている場合には、円状で示される。プラスミドは、細菌維持のための p U C 1 9 配列、ならびに選択マーカールとしてのサッカロミセス・セレビスエ (*S . c e r e v i s i a e*) A R R 3 遺伝子 (ピチア・パストリス (*P . p a s t o r i s*) R P L 1 0 プロモーターにより駆動される) に隣接しているピチア・パストリス (*P . p a s t o r i s*) A T T 1 遺伝子の 5 ' および 3 ' 領域を含有する。ピチア・パストリス (*P . p a s t o r i s*) 内への導入のために、プラスミドを、線状化および p U C 1 9 領域の除去のために S f i I で消化し、1 ~ 3 m M 亜ヒ酸ナトリウムを含有する培地上で選択して、P C R により選別された正しい組込み体 (すなわち、a t t 1 株) での A T T 1 遺伝子座における置換組込みを促す。

【図 2 2】図 2 2 は、G F I 2 . 0 A T T 1 野生型および a t t 1 発酵上清の S D S - P A G E を示す。G F I 2 . 0 A T T 1 野生型および a t t 1 株の発酵サンプルを ~ 2 4 時間ごとに採取し、清澄化上清を 1 3 0 0 0 x g の遠心分離により得た。サンプルを S D S - P A G E 上で分離し、ゲルをクーマシーブルーにより染色した。分子量マーカー、B i o r a d B r o a d R a n g e S D S - P A G E 標準。

【図 2 3】図 2 3 は、G F I 2 . 0 A T T 1 野生型および a t t 1 発酵上清の上清 D N A 定量を示す。G F I 2 . 0 A T T 1 野生型および a t t 1 株の発酵サンプルを ~ 2 4 時間ごとに採取し、清澄化上清を 1 3 0 0 0 x g の遠心分離により得た。上清 D N A 負荷を決定することにより、細胞溶解を測定した。サンプルを、P i c o g r e e n ( I n v i t r o g e n ) 蛍光 D N A 株を使用して分析し、プレートリーダーを使用して定量した (既に報告されているとおり ( B a r n a r d , 2 0 1 0 ) に行った)。

【図 2 4】図 2 4 は、G F I 2 . 0 A T T 1 野生型および a t t 1 発酵上清の S D S - P A G E を示す。G F I 1 . 0 A T T 1 野生型および a t t 1 株の発酵サンプルを ~ 2 4 時間ごとに採取し、清澄化上清を 1 3 0 0 0 x g の遠心分離により得た。サンプルを S D S - P A G E 上で分離し、ゲルをクーマシーブルーにより染色した。分子量マーカー、B i o r a d B r o a d R a n g e S D S - P A G E 標準。

【図 2 5】図 2 5 は、G F I 1 . 0 A T T 1 野生型および a t t 1 発酵上清の上清 D N A 定量を示す。G F I 1 . 0 A T T 1 野生型および a t t 1 株の発酵サンプルを ~ 2 4 時間ごとに採取し、清澄化上清を 1 3 0 0 0 x g の遠心分離により得た。上清 D N A 負荷を決定することにより、細胞溶解を測定した。サンプルを、P i c o g r e e n ( I n v i t r o g e n ) 蛍光 D N A 株を使用して分析し、プレートリーダーを使用して定量

10

20

30

40

50

した（既に報告されているとおり（Barnard, 2010）に行った）。

#### 【0068】

##### 実験方法

フェッドバッチ発酵、IgG精製、N-グリカンの特徴づけ、および全ての他の分析アッセイは、既に記載されているとおりに行った（Barnardら, 2010; Jiangら, 2011; Potgieterら, 2009; Winston F 2008）。特に示されている場合を除き、本出願に記載されている全ての1Lバイオリアクター発酵の実施は、100~120時間のMeOH誘導の後に終了するように計画される。しかし、過剰の細胞溶解が観察されれば、発酵の実施はより早く終了するであろう。細胞溶解は、顕微鏡検査により、または上清中に遊離した核DNAの量を測定することにより判定される（Barnard, 2010）。本出願の場合、過剰な細胞溶解は、80%を超える細胞が顕微鏡検査により細胞溶解したこと、あるいは上清中で30マイクログラム/mlを超えるDNA濃度がピコグリーン（Picogreen）アッセイにより測定されることにより定義される。Winston（Winston 2008）により記載されているとおりに、UV突然変異誘発を行った。簡潔に説明すると、ピチア（*Pichia*）株を40mlのYSD液体培地内で24で一晚増殖させた。5のOD<sub>600</sub>に達したら、10<sup>6</sup>~10<sup>7</sup>細胞のアリコートをして100mm YSD寒天ペトリ皿の表面上に移し、蓋を取った状態で、5mJ/cm<sup>2</sup>のUV照射で処理した。UV処理後、ペトリ皿を直ちにアルミホイルで覆い（光誘発性DNA修復を防ぐため）、突然変異誘発細胞を暗所にて24で18時間にわたって回復させた。ついで、これらの回復した細胞を、温度抵抗性突然変異体を選択するために35のインキュベータに移した。35での7~10日間のインキュベーションの後、コロニーを拾い、新鮮なYSDプレート上に再ストリークし、35でインキュベートし、再ストリークに際して温度抵抗性表現型を示すクローンのみを温度抵抗性突然変異体として保管した。

10

20

#### 【0069】

##### 実施例1

温度抵抗性突然変異体は発酵頑強性および生産性の実質的な改善を示した

2つの温度感受性糖操作空（empty）宿主株YGLY17108およびYGLY22835を、本明細書に記載されているとおりにUV突然変異誘発に付して、増強した発酵頑強性を有するピチア（*Pichia*）宿主株を特定した。宿主株YGL17108は、Gal2GlcNAc2Man3GlcNAc2 N-グリカンを中心に有するガラクトシル化糖タンパク質を産生するように操作されている（Bobrowiczら, 2004および米国特許第7,795,002号）。宿主株YGL22835は、NANA2Gal2GlcNAc2Man3GlcNAc2 N-グリカンを中心に有するシアル酸化糖タンパク質を産生するように操作されている（Hamiltonら, 2006およびWO2012/115904）。糖操作宿主株YGLY17108は、初めはWO2011/06389に記載されている一連の修飾によりNRL-Y11430株から誘導され、株YGLY7965を与える。YGLY6903から宿主株YGLY17108までの追加的修飾株に関する遺伝的バックグラウンドおよび株系列を図7に示す。YGLY6903からYGLY22835およびyGLY17159までの遺伝的バックグラウンドおよび株系列を図9に示す。UV突然変異誘発実験から得られた株の概要を図8に示す。

30

40

#### 【0070】

温度抵抗性コロニーを選択し、1.0L DasGipバイオリアクターにおける標準的なMeOHフェッドバッチ法を用いて発酵させて、発酵プロセス中の株の頑強性を評価した（Hopkinsら, 2011）。徹底的な発酵スクリーニングの後、劇的に増強した発酵頑強性を示す4つの突然変異体YGLY17172、YGLY17177、YGLY17178およびYGLY17159を特定した（表1）。未突然変異誘発親株YGLY17108およびYGLY22835は共に、32の誘導の24時間以内に著しい細胞溶解および細胞生存性の著しい低下を受けた（大量の細胞溶解を示す5の細胞溶解スコアとして表1に示されている）。これとは対照的に、4つの温度抵抗性突然変異体（YG

50

LY17172、YGLY17177、YGLY17178およびYGLY17159)は全て、劇的に改善した発酵頑強性を示し、細胞溶解はほとんど観察されず、32℃での誘導後に100時間以上にわたって生存可能であった(表1に示されているとおり、5のうちの2未満の細胞溶解スコアを示した)。顕微鏡観察に基づいて、0.5~5.0の細胞溶解スコアを割り当てた。0.5の細胞溶解スコアは最小細胞溶解(95%超が無傷細胞)を示し、5の細胞溶解スコアは高い細胞溶解(10%未満が無傷細胞)を示す。

【表1】

表1: 単離された突然変異体は発酵頑強性の改善を示した

1L バイオリアクターMeOH 誘導期		32℃における細胞溶解スコア			
		第1日	第2日	第3日	第4日
YGLY17108	GFI5.0 対照	5*	回収		
YGLY17172	GFI5.0 突然変異体	0.5	0.5	1/1.5	2/2.5
YGLY17177	GFI5.0 突然変異体	0.5	0.5	1	1
YGLY17178	GFI5.0 突然変異体	0.5	1	1	2
YGLY22835	GFI6.0 対照	5*	回収		
YGLY17159	GFI6.0 突然変異体	0.5	0.5	0.5/1	1

\* 細胞溶解スコア: 0~5 (5は最大量の細胞溶解を示す)

10

20

【0071】

実施例2

耐熱性および発酵頑強性の増強を引き起こす原因突然変異を特定するためのゲノム配列決定

耐熱性および発酵頑強性の増強を引き起こす突然変異を特定し特徴づけるために、4つの独立して単離された突然変異体および親株に関してゲノム配列決定を行った。突然変異体およびそれらの対応親体との間のゲノムワイドな比較の後、1~9個の非同義ヌクレオチド改変(表2において「+」により示される)を、これらの4つの突然変異体のそれぞれにおいて特定した。これらの非同義突然変異のほとんどは、YGLY17159突然変異体において見出される5bpの挿入の1つの例外を除き、単一ヌクレオチド変異体により引き起こされる。1つの突然変異体YGLY17178はただ1つの非同義SNVを含有し、これは、ATT1(acquiring thermal tolerance)と命名された特徴づけられていない転写因子における単一ナンセンス突然変異である。その他の3つの突然変異体においてもATT1遺伝子におけるナンセンスまたはフレームシフト突然変異が特定されており、このことは、この転写因子の突然変異が温度抵抗性および発酵頑強性表現型に関連していることを示している。

30

【表 2】

表2. ゲノム配列決定により特定された非同義ヌクレオチド改変

染色体	位置	YGLY17108	YGLY17172	YGLY17177	YGLY17178	YGLY22835	YGLY17159	参照対立遺伝子	突然変異対立遺伝子	SNV型	遺伝子-id	参照コドン	突然変異コドン	参照AA	突然変異AA	遺伝子記号
chr1	160070	-	-	-	-	-	+	T	TGAATC	挿入	Pp01g00680				frame-shift	ATT1
chr1	160305	-	-	-	+	-	-	C	T	非同義	Pp01g00680	CAG	TAG	Q	終止	ATT1
chr1	160476	-	-	+	-	-	-	A	T	非同義	Pp01g00680	AAA	TAA	K	終止	ATT1
chr1	161949	-	+	-	-	-	-	C	T	非同義	Pp01g00680	CGA	TGA	R	終止	ATT1
chr1	279682	-	-	-	-	-	+	T	A	非同義	Pp01g01360	ATC	TTC	I	F	AIP1
chr1	981612	-	-	-	-	-	-	A	G	非同義	Pp01g05170	TAC	TGC	Y	C	SSK2
chr1	1029402	-	-	+	-	-	-	C	T	非同義	Pp01g05460	AGA	AAA	R	K	RRT12
chr1	1084421	-	+	-	-	-	-	A	G	非同義	Pp01g05760	AAG	GAG	K	E	SDS23
chr1	1203497	-	-	+	-	-	-	A	G	非同義	Pp01g06460	AAA	GAA	K	E	NOT5
chr1	1308858	-	+	-	-	-	-	A	G	非同義	Pp01g07000	TTA	TCA	L	S	DPS1
chr2	386047	-	-	-	-	-	+	T	C	非同義	Pp02g02120	TTC	TCC	F	S	CRZ1
chr2	1391195	-	-	+	-	-	-	A	G	非同義	Pp02g07550	TTG	TCG	L	S	CTK1
chr2	1401784	-	+	-	-	-	-	T	A	非同義	Pp02g07600	TAT	TTT	Y	F	RGD2
chr2	1941747	-	-	+	-	-	-	T	C	非同義	Pp02g10670	TCA	CCA	S	P	AVO2
chr3	139943	-	-	-	-	-	+	A	T	非同義	Pp03g00790	AAA	TAA	K	終止	YMR196W
chr3	230758	-	+	-	-	-	-	G	A	非同義	Pp03g01260	GAA	AAA	E	K	PEX1
chr3	640255	-	-	-	-	-	+	C	T	非同義	Pp03g03550	TCT	TTT	S	F	TYW1
chr3	875268	-	-	+	-	-	-	A	G	非同義	Pp03g04770	CTG	CCG	L	P	POM152
chr3	973319	-	-	+	-	-	-	C	T	非同義	Pp03g05310	CCT	CTT	P	L	YPR084W
chr3	1586501	-	-	-	-	-	+	A	G	非同義	Pp03g08800	TAT	CAT	Y	H	
chr3	2123889	-	-	+	-	-	-	A	G	非同義	Pp03g11890	TTA	TCA	L	S	
chr4	704482	-	-	+	-	-	-	T	A	非同義	Pp05g04100	AAT	ATT	N	I	MAK5
chr4	1374513	-	-	-	-	-	+	A	G	非同義	Pp05g07960	CTA	CCA	L	P	AZF1

10

20

【 0 0 7 2 】

4つ全ての突然変異（3つのナンセンス突然変異および1つのフレームシフト挿入）が、アミノ酸31、107、164または655の後の未熟遺伝子産物トランケート化を引き起こした（図1A～B）。図1A～BはScGal4とPpAtt1との間の配列相同性を示す。アミノ酸31における記号「#」は、YGLY17159において見出される5bpの挿入の位置を示し、記号「@」は、YGL17178（アミノ酸107におけるもの）、YGL17177（アミノ酸164）およびYGLY17172（アミノ酸655）から特定された終止コドン突然変異を示す。ScGal4は、パン酵母におけるガラクトース代謝酵素の調節に關与する鍵転写因子である（Travençoloら, 2006）。ピチア・パストリス（*Pichia pastoris*）はガラクトースを代謝せず、したがって、ピチアにおけるこのATT1遺伝子の生物学的機能は、本出願が出願された時点では未知であった。

30

【 0 0 7 3 】

ピチア（*Pichia*）ATT1遺伝子（配列番号1）は995アミノ酸のタンパク質産物（配列番号7）をコードしており、これは、図1A～Bにおけるアライメントに示されているとおり、サッカロミセス・セレビスエ（*S. cerevisiae*）Gal4 DNA結合ドメインに高度に相同であるN末端ドメイン（アミノ酸残基39-114）、アミノ酸残基351-519における保存された真菌特異的転写因子ドメイン、およびサッカロミセス・セレビスエ（*S. cerevisiae*）Gal4遺伝子産物のC末端に対して低レベルの保存性を共有するC末端領域を含有する。

40

【 0 0 7 4 】

突然変異体YGL17172、YGL17177およびYGL17178の3つは、末端ガラクトースを有する複合N-グリカン形態を産生するように操作されている親宿主株YGL17108から誘導される（Bobrowiczら, 2004および米国特許第7

50

、795,002号)。第4の突然変異体であるYGL17159は宿主株YGL22835から誘導され、これは完全シアル酸化N-グリカンを生産する(Hamiltonら,2006および米国特許出願第61/446,853号)。単離突然変異体から得られたN-グリカンプロファイルの、それらのそれぞれの親のものとの比較は、突然変異体から単離されたN-グリカン組成がそれらの未突然変異誘発親株から得られたN-グリカンプロファイルとは実質的に区別できないことを示しており、このことは、4つ全ての突然変異体が複合ヒトグリカンを産生するそれらの能力を保有していたことを証明している。YGL17108、YGL17177、YGLY22835およびYGLY17159の代表的なN-グリカンMALDIトレースを図2A~Dに示す。突然変異体YGLY17172およびYGLY17178のN-グリカンプロファイルは突然変異体YGL17177のものと同様に区別できない。

### 【0075】

#### 実施例3

#### 突然変異体YGLY17159における組換えタンパク質発現

増強した発酵頑強性表現型が組換えタンパク質の製造(例えば、異種タンパク質の製造)中に保有されることを例証するために、2つの異なる組換えタンパク質(IgG4 mAbおよびFc融合タンパク質)を突然変異株YGLY17159内に形質転換した。AOX1プロモーターの制御下で、プラスミドpGLY8045(図3A)を1F11 IgG4重鎖およびカップ軽鎖の両方と共にYGLY17159のTRP2遺伝子座内にエレクトロポレーションにより組込むことにより、mAb発現株を構築した。同様に、AOX1p駆動性TNFR-Fc融合遺伝子を含むプラスミドpGLY6391(図3B)をYGL17159のTHR1遺伝子座内に組込むことにより、Fc融合発現株を作製した。1L DasGipバイオリアクター内での24および32の標準的なプラットフォーム条件下(Hopkinsら,2011)での発酵後、親体および突然変異体の両方から分泌された組換えタンパク質産物を精製し、評価した。

### 【表3】

表3. 突然変異体YGLY17159における組換え産物発現

1Lバイオリアクター内の1F11 IgG4形質転換体			誘導中の細胞溶解				回収時のプロス力価(mg/リットル)
			第1日	第2日	第3日	第4日	
D104125	24C	Y22835 親	0.5	3.5/4	回収		894
D104129		Y17159 突然変異体	0.5/1	0.5	0.5/1	1.5	1813
D104134	32C	Y17159 突然変異体	0.5	1	2.5	h	411
1Lバイオリアクター内のTNFR Fc融合形質転換体			誘導中の細胞溶解				回収時のプロス力価(mg/リットル)
			第1日	第2日	第3日	第4日	
D104503	24C	Y22835 親	0.5	3	回収		234
D104501		Y17159 突然変異体	0.5	0.5/1	1	1.5/2	405
D104511	32C	Y22835 親	5	回収			
D104509		Y17159 突然変異体	0.5	1	1	2	188

\* 細胞溶解スコア: 0~5 (5は最大量の細胞溶解、すなわち、最悪の細胞溶解を示す)

### 【0076】

表3における結果は、組換えタンパク質を発現する突然変異体が、誘導期中の優れた頑強性および延長した株安定性を保有していたことを示しており、これは、親株におけるこれらの特性と比較された場合、有意な産物収率改善をもたらすものであると解釈される。24において突然変異株は、類似条件下の親対照細胞における発現と比較して、突然変異株におけるIgG4抗体に関する約100%の力価増加およびFc融合体に関する約70%の力価増加を示した。

### 【0077】

#### 実施例4

#### 直接的株操作による表現型の確認

突然変異体のそれぞれにおける同一遺伝子内の独立した突然変異は、この A T T 1 転写因子のトランケート化が、観察された温度抵抗性および発酵頑強性表現型をもたらすことを強く示した。この結論を確認するために、A T T 1 O R F を完全に欠失させ、あるいは内因性 A T T 1 遺伝子を、5 F O A 対抗選択により Y G L Y 1 7 1 0 8 から誘導された未突然変異誘発 *ura5* 栄養要求性ピチア (*Pichia*) 株である Y G L Y 2 1 2 0 3 において、図 5 に示されているトランケート化形態で置換した。

#### 【0078】

プラスミド p G L Y 5 9 3 3 (図 4 A) を、A L G 3 ターミネーターの前方の A T T 1 O R F の直上流に 2 k b のゲノム DNA 断片をクローニングし、*lacZ-URA5-lacZ* *URAb1* *aster* が続き、そして、A T T 1 O R F (配列番号 1) の最後の 2 8 5 b p と下流領域の 1 . 6 k b とを含有する 1 . 9 k b のゲノム DNA 断片に接続することにより構築した。S f i I 消化後、この A T T 1 - 上流 - *URAb1* *aster* - A T T 1 - 下流 DNA 断片を、未突然変異誘発宿主株 (例えば、Y G L Y 1 7 1 0 8) 内に形質転換した。A T T 1 上流および下流領域の両方における相同組換えにより、この *URAb1* *aster* - カセットが内因性 A T T 1 遺伝子に取って代わって A T T 1 のコード領域の 9 0 % が欠失して、完全 A T T 1 ノックアウト突然変異体を与えた。A T T 1 O R F の置換が正しく行われたことを確認するために、以下のオリゴを P C R プライマーとして使用して、ゲノム DNA ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) アッセイを行った：遺伝子置換の 5' 結合部を確認するための “ T T T C G A A A G T G G C T T G G A A T ” (配列番号 1 2 ; A T T 1 開始部位の 2 3 7 0 b p 上流) および “ T G G G G A G A A G G T A C C G A A G ” (配列番号 1 3 ; A L G 3 ターミネーターの内部) ; 遺伝子置換の 3' 結合部を確認するための “ C A C T A C G C G T A C T G T G A G C C ” (配列番号 1 4 ; *lacZ* 内) および “ G C T T G G T A C G G T A G C C T C A A ” (配列番号 1 5 ; A T T 1 終止コドンの 2 0 1 4 b p 下流) ; ならびに野生型 A T T 1 O R F の非存在を確認するための “ A G T C T G C G C T T T C C A T G T C T ” (配列番号 1 6 ; A T T 1 開始部の 3 6 5 b p 上流) および “ G G C C T G G A G A T A T T G G G A T T ” (配列番号 1 7 ; A T T 1 O R F 内、開始部の 1 0 7 0 b p 後方)。

#### 【0079】

プラスミド p G L Y 5 9 4 7 (図 4 E) を、A L G 3 ターミネーター配列の前方に 2 . 3 k b DNA 断片 (2 . 0 k b 上流領域、A T T 1 O R F の最初の 3 2 1 b p、および 2 つの終止コドン) をクローニングし、*lacZ-URA5-lacZ* *URAb1* *aster* が続き、そして、A T T 1 O R F の最後の 2 8 5 b p と下流領域の 1 . 6 k b とを含有する 1 . 9 k b のゲノム DNA 断片に接続することにより構築した。

#### 【0080】

p G L Y 5 9 4 7 (図 4 E) の S f i I 断片と染色体 A T T 1 領域との間の相同組換え媒介性二重交差は、内因性 A T T 1 O R F を、最初の 1 0 7 アミノ酸残基のみを有する A T T 1 のトランケート化形態で置換した。同様に、プラスミド p G L Y 5 9 4 8 (図 4 F) および p G L Y 5 9 4 9 (図 4 G) は、それぞれ、A T T 1 O R F (配列番号 1) の最初の 4 9 2 b p または 1 9 6 5 b p を含有し、相同組換え媒介性二重交差は、内因性 A T T 1 O R F を、トランケート化 1 - 1 6 4 (配列番号 1 0) または 1 - 6 5 5 アミノ酸 (配列番号 1 1) をコードする A T T 1 のトランケート化領域で置換するであろう。

#### 【0081】

プラスミド p G L Y 5 9 3 4 (図 4 B) は、それが A T T 1 O R F の第 3 1 アミノ酸残基の後に 5 b p (T G A A T C ; 配列番号 1 8) のフレームシフト挿入をも含有すること以外は、p G L Y 5 9 4 7 とほぼ同一であり、プラスミド p G L Y 5 9 3 5 (図 4 C) は、それが A T T 1 (配列番号 7) の第 3 1 アミノ酸の後に同じ 5 b p (T G A A T C ; 配列番号 1 8) のフレームシフト挿入を含有して配列番号 8 の A T T 1 断片をコードしていること以外は、p G L Y 5 9 4 8 (図 4 F) とほぼ同一である。

#### 【0082】

D N A 構築物が内因性 A T T 1 遺伝子に対応欠失体またはトランケート化体で正しく置

10

20

30

40

50

換していることを確認した後、35 におけるそれらの増殖能を調べた。これらのATT1 トランケート化および欠失突然変異体は、UV突然変異誘発により単離された元の突然変異体から観察されたものに非常に類似した温度抵抗性表現型を示すことが確認された(図6A~C)。

【0083】

次に、トランケート化および欠失突然変異体を、標準的なDasGip MeOHフェッドバッチ発酵法(Hopkinsら, 2011)に付して、それらが発酵頑強性の増強を示すかどうかを決定した。これらの株の発酵頑強性を決定するために、32 での一定時間の誘導の後、それらの細胞溶解スコアを測定した。顕微鏡検査に基づいて、0.5~5.0の細胞溶解スコアを割り当てた。0.5の細胞溶解スコアは最小細胞溶解(95%超が無傷細胞)を示し、5の細胞溶解スコアは高い細胞溶解(10%未満が無傷細胞)を示す。既に観察されているとおり、YGLY17108対照株は著しい細胞溶解を示し、32 でのMeOH誘導の24時間以内に生存不能になった。これとは対照的に、ATT1遺伝子の完全な欠失および種々のトランケート化を含有する株は発酵頑強性の顕著な増強を示し、4日間のMeOH誘導を成功裏に完了した(表4)。ATT1(1-164aa、配列番号10)およびATT1(1-655aa、配列番号11)トランケート化突然変異体は誘導期の後期段階中に僅かに高い度合の細胞溶解(2.5または3の細胞溶解スコア)を示した(表3を参照されたい)。完全な欠失およびATT1フレームシフト(31aaにおける5bpの挿入)突然変異体を含有する株は最高レベルの発酵頑強性を示し、4日間の誘導期の全体にわたって0.5の細胞溶解スコアを示した。31aaに5bpの挿入を含有する株がATT1欠失突然変異体と同じ頑強性を示したという知見は、5bpフレームシフト突然変異がATT1遺伝子産物の機能の完全破壊をもたらす可能性があることを示した。一方、ATT1トランケート化形態のATT1(1-164aa、配列番号10;配列番号4によりコードされている)およびATT1(1-655aa、配列番号11;配列番号5によりコードされている)は、転写活性の幾らかの残留レベルを尚も保有しうるのであろう。なぜなら、これらのトランケート化を含有する突然変異体は、中間的な表現型、すなわち親対照より劇的に頑強であるが欠失突然変異体の場合ほど強力ではない表現型を示した。これらの特異的遺伝子置換株により示される表現型は、対応するUV誘導突然変異体により示されるものに酷似していたが(例えば、表4および図6A~Cにおいて、YGL27601をYGL17159と、YGLY27608をYGL17177と、YGLY27610をYGLY17172と比較されたい)、このことは、ATT1遺伝子内の突然変異がUV誘導突然変異体から観察された耐熱性および発酵頑強性の改善をもたらしたことを示している。

【表4】

表4. 32°Cで発酵されたPpATT1欠失およびトランケート化株と親対照との

細胞溶解スコアの比較

1L バイオリアクターMeOH 誘導期		32°Cでの細胞溶解			
		第1日	第2日	第3日	第4日
YGLY17108	空親対照	5*	回収		
YGLY27611	ATT1 完全 KO	0.5	0.5	0.5	0.5
YGLY27601	31aa に 5bp 挿入を有する ATT1	0.5	0.5	0.5	0.5
YGLY27624	31aa に 5bp 挿入を有する ATT1	0.5	1	1/1.5	1/1.5
YGLY27630	ATT1(1-164aa)断片	0.5	0.5	0.5	0.5
YGLY27608	ATT1(1-164aa)断片	0.5/1	1	1/1.5	2
YGLY27610	ATT1(1-655aa)断片	0.5/1	1/1.5	2/2.5	3
YGLY27633	ATT1(1-655aa)断片	0.5	1.5	1.5/2	3

\* 細胞溶解スコア: 0~5 (5は最大量の細胞溶解、すなわち、最悪の細胞溶解を示す)



## 【0084】

## 実施例5

ピチア・パストリスATT1 ORFおよびトランケート化対立遺伝子を過剰発現させるためのプラスミドの構築

ピチア・パストリス (*P. pastoris*) TEFプロモーター (配列番号6) を、オリゴヌクレオチドおよびGenscript (Piscataway, NJ) により記載されている製造業者の方法を用いて合成し、制限部位BglII/EcoRIを使用してプラスミドpGLY8369 (図10) 内にクローニングして、プラスミドpGLY9959 (図11) を得た。プラスミドpGLY8369は、ピチア・パストリス (*P. pastoris*) AOX1プロモーターと亜ヒ酸に対する耐性を付与する選択マーカーとしてのサッカロミセス・セレビスエ (*S. cerevisiae*) ARR3遺伝子とを含むロールイン (roll-in) 大腸菌 (*Escherichia coli*) /ピチア・パストリス (*P. pastoris*) シャトルプラスミドである。ピチア・パストリス (*P. pastoris*) 野生型ATT1オープンリーディングフレーム (Pp01g00680, 配列番号1) を、Genscriptによるオリゴヌクレオチドおよび製造業者の方法を用いて合成し、制限部位EcoRI/FseIを使用してpGLY8369 (図10) およびpGLY9959 (図11) 内に挿入して、それぞれ、プラスミドpGLY9955 (図14A) およびpGLY9960 (図14E) を得た。ついで、配列番号7の最初の107アミノ酸 (1-107aa、配列番号3)、配列番号7の最初の164アミノ酸 (1-164aa、配列番号4) および配列番号7の最初の655アミノ酸 (1-655aa、配列番号5) をコードするATT1のトランケート化形態または断片を、それぞれpGLY9956 (図14B)、pGLY9957 (図14C)、pGLY9958 (図14D) と称されるAOX1駆動性ATT1トランケート化対立遺伝子含有プラスミドを得るためにpGLY9955 (図14A) から作製し、そして、それぞれpGLY9961 (図14F)、pGLY9962 (図14G)、pGLY9963 (図14H) と称されるTEF駆動性ATT1トランケート化対立遺伝子含有プラスミドを得るためにpGLY9960 (図14E) から作製した。

## 【0085】

## 実施例6

糖操作ピチア・パストリスにおける抗Her2モノクローナル抗体の作製

トラスツズマブ (Trastuzumab) 抗HER2モノクローナル抗体 (Carter, 1992) の および 鎖をコードするDNA配列をピチア・パストリス (*P. pastoris*) AOX1プロモーターに個々に融合させることにより、プラスミドpGLY5883を作製し、それを図12に示す。このプラスミドからのDNAを、DNAを線状化するためにSpeIで消化し、末端 - 1, 4 - ガラクトースを有する複合型ヒトN-グリカンを生産するように修飾されているピチア・パストリス (*P. pastoris*) 糖操作株YGLY8316 (GFI5.0として記載されている; Davidson 米国特許第7, 795, 002号) (図13に示されている株系列) 内に、標準的なエレクトロポレーション法 (Pichiaキット, Invitrogen, Carlsbad, CA) により形質転換した。クローンをゼオシン含有培地上で選択し、96深ウェルプレートおよび0.5L Sixfors多重発酵 (multifermentation) 発酵槽 (ATR Biotech, Laurel, MD; Barnard, 2010) 内での標準的な培養により更にスクリーニングした。1個の陽性発現クローンを選択し、YGLY13979 (図13に示されている株系列) と命名した。

## 【0086】

## 実施例7

ピチア・パストリスATT1オープンリーディングフレームおよびトランケート化対立遺伝子の過剰発現は株生存およびタンパク質力価の改善をもたらす

プラスミドpGLY9955、pGLY9956、pGLY9957、pGLY9958、pGLY9960、pGLY9961、pGLY9962およびpGLY9963 (

それぞれ、図14A~H)をSpeIで線状化し、エレクトロポレーションにより株YGLY13979内に形質転換し、1mMおよび3mM 亜ヒ酸ナトリウムを含有するYSD培地上でクローンを選択した。ATT1の完全長および種々のトランケート化形態を過剰発現するクローンをYSD培地上で更に単離し、ついで、AOX1駆動性構築物の場合にはプライマーRCD1019(配列番号19:5'-CAGATCTTCCACAACATTCGTACACG-3')およびAOX1seq(配列番号20:5'-GCTTACTTTTCATAATTGCGACTGGTTC-3')を、そしてTEF駆動性構築物の場合にはRCD1019およびTEFseq(配列番号21:5'-CGCAGTCCACACACGCACTCGTACATG-3')を使用するPCRにより、所望のATT1発現構築物を含有することを確認した。

10

#### 【0087】

PCR陽性クローンを選択し、親株YGLY13979(図13;同様に同じ抗HER2 mAbを発現する)と共にApplikon(Foster City, CA)マイクロ24 5ml 小型発酵装置の修飾形態において培養した。リン酸カリウムバッファーでpH6.0に緩衝化された3.5mlの4% BMGY培地(Invitrogen, Carlsbad, CA)を含有するWhatman 24-ウェル Uniplate(10ml,天然ポリプロピレン)にYSDプレートからの株を接種することにより、種培養を調製した。種培養を24 および650rpmの振とうの温度制御シェーカー内で約65~72時間培養した。ついで1ミリリットルの24ウェルプレート培養種培養および4.0mlの4% BMGY培地を使用して、Micro24プレート(Type:REG2)の各ウェルに接種した。30マイクロリットルのAntifoam 204(1:25希釈, Sigma Aldrich)を各ウェルに加えた。Micro24は微好気性(Microaerobic)1モードで使用され、発酵は200%溶存酸素、6.5のpH、24の温度および800rpmの撹拌で制御された。誘導期は、メタノール供給溶液(100%[w/w]メタノール、5mg/l ビオチンおよび12.5ml/l PTM2塩)(午前中に50μlおよび午後125μl)のボラスショットを加えることにより、増殖期の後の溶存酸素(DO)スパイクの観察の直後に開始させた。約72時間のメタノール誘導の後、無細胞培養上清をベックマン旋回バケツ(Beckman swinging bucket)遠心機内での2500xgの遠心分離により回収し、標準方法(Jiang, 2011)によりプロテインA精製に付した。抗体を逆相HPLCにより定量し、1リットル当たりのものとして計算した。また、上清を、細胞破壊または細胞溶解を定量的に測定するための方法としてのピコグリーン(Picogreen)(Invitrogen, Carlsbad, Ca)二重標準DNA定量アッセイに付した。

20

30

#### 【0088】

野生型完全長ATT1と1-655aa ATT1トランケート化体との過剰発現を比較する実験において、1-655 ATT1トランケート化体のTEFおよびAOX1プロモーター形態を含むそれぞれの6つのクローンを評価した。6つの野生型ATT1過剰発現株のうち2つは、YGLY13979対照株より有意に大量の抗体を産生した(図16)。対照株は587.5+/-70mg/Lの抗体を産生し、一方、2つのAOX1-ATT1完全長過剰発現株は、それぞれ、806および934mg/Lを産生した(図16)。同様に、AOX1-ATT1-655過剰発現株の2つも、有意に、より大量の分泌性mAb(それぞれ、906および1098mg/L)を産生した。更に、AOX1-ATT1完全長およびAOX1-ATT1-655過剰発現株の全てにおいて、ピコグリーンアッセイにより決定された細胞溶解は、対照株と比較して低減した(図15)。最後に、1-655 ATT1トランケート化体をTEFプロモーターの制御下で発現させたところ、細胞溶解は影響されず、または潜在的に増加し(図15)、一方、クローンの全ては、増大したレベルの分泌性mAbを尚も産生した(図16~17)。

40

#### 【0089】

実施例 8

50

タンパク質生産性および細胞溶解に対する A T T 1 完全長過剰発現の影響は規模拡大性である

抗体生産性に対する A T T 1 完全長 O R F の過剰発現の影響は微量発酵 ( m i c r o f e r m e n t a t i o n ) モデルにおいて明らかに実証される。しかし、これらのモデルは、容器サイズ、細胞に対するせん断および酸化ストレスならびに炭素源供給の方法 ( ボーラス供給と限定的または過剰な供給との対比 ) を含む幾つかの重要な点において、完全規模の発酵培養とは異なる。A T T 1 過剰発現の規模拡大性 ( s c a l a b i l i t y ) を実証するために、A T T 1 完全長 O R F ( F L と称される ) を過剰発現する 6 つのピチア ( P i c h i a ) 株 ( Y G L Y 2 7 9 2 7 、 Y G L Y 2 7 9 2 8 、 Y G L Y 2 7 9 2 9 、 Y G L Y 2 7 9 3 0 、 Y G L Y 2 7 9 3 1 および Y G L Y 2 7 9 3 2 ) ならびに親 ( Y G L Y 1 3 9 7 9 ) および A T T 1 ノックアウト ( Y G L Y 2 7 6 3 8 ) 対照抗 H E R 2 発現株を、グリセロールフィードバッチおよびそれに続く 2 4 での限定的メタノール供給誘導プロセス ( 既に記載されているとおり ( H o p k i n s ら , 2 0 1 1 ) ) を用いて、1 L フェッドバッチ・プロ ( F e d b a t c h P r o ) 発酵槽 ( D A S G I P B i o t o o l s , S h r e w s b u r y , M A ) 内で培養した。メタノール誘導を、各株に関して続行できないほどに細胞溶解が激しくなるまで ( 1 1 3 時間まで ) 継続し、ついで無細胞培養上清をベックマン旋回バケツ ( B e c k m a n s w i n g i n g b u c k e t ) 遠心機内での 2 5 0 0 x g の遠心分離により回収し、標準的な方法 ( J i a n g , 2 0 1 1 ) によりプロテイン A 精製に付した。抗体を逆相 H P L C により定量し、1 リットル当たりのものとして計算した。Y G L Y 1 3 9 7 9 親対照株は 6 7 1 m g / L の分泌性 m A b を産生したが、6 6 時間の誘導の後では非常に高い細胞溶解を伴っていた ( 図 1 7 ) 。

10

20

#### 【 0 0 9 0 】

一方、A T T 1 ノックアウト株は、最小の細胞溶解を伴って、1 0 6 時間の誘導の後、1 2 5 6 m g / L を産生し ( 図 1 7 ) 、これは従来の結果に合致していた。同様に、そしてより小規模のマイクロ 2 4 発酵の結果に合致して、2 つの A O X 1 - A T T 1 過剰発現クローンは、1 1 2 時間の誘導の後、それぞれ、1 9 7 4 および 1 9 6 0 m g / L を産生したが、これは、驚くべきことに、A T T 1 O R F の過剰発現が、より大きな規模において、延長した誘導の後、頑強性および生産性に正の影響を及ぼしうることを示している ( 図 1 7 ) 。また、6 つの A T T 1 過剰発現クローンのうちの 3 つは、Y G L Y 1 3 9 7 9 対照と比較して低減した細胞溶解を示し、一方、もう 1 つのクローンは 1 0 0 時間以上の誘導の後で細胞溶解を示したに過ぎない ( 図 1 7 ) 。これらの結果は、組換えタンパク質を産生するピチア株における m A b 生産性に対する A T T 1 過剰発現の影響が規模に非依存的なものであり、培養および誘導プロトコールにおける標準的な変動によっては影響されないことを示している。

30

#### 【 0 0 9 1 】

糖操作株の頑強性に対する A O X - A T T 1 過剰発現の影響を更に例証するために、2 つの高 m A b 発現株 Y G L Y 2 7 9 2 9 および Y G L Y 2 7 9 3 0 を、2 4 ではなく 3 2 で行うこと以外は同じプロトコールを用いて、同じ 1 L フェッドバッチ・プロ ( F e d b a t c h P r o ) 発酵槽内で再び培養した。これまでの実験に基づけば、親株 Y G L Y 1 3 9 7 9 は、典型的には 2 4 ~ 4 8 時間のメタノール誘導の後で生じる発泡および激しい細胞溶解による完全な喪失を伴い、高温では発酵不能である。3 2 で 5 0 時間のメタノール誘導の後、2 つの過剰発現株 Y G L Y 2 7 9 2 9 および Y G L Y 2 7 9 3 0 は 4 7 3 および 4 5 8 m g / L の抗 H E R 2 m A b を産生し、一方、A T T 1 ノックアウト株は 8 4 2 m g / L を産生した ( 7 3 時間の誘導後 ) 。過剰発現株の細胞溶解は、A T T 1 ノックアウト株と比較して僅かに増加したが、ほどほどの細胞溶解を伴う 5 0 時間の誘導までの生存は親糖操作抗 H E R 2 発現株に対する有意な改善を表し、この遺伝子の欠失 / トランケート化と共に、A T T 1 の過剰発現の有用性を実証している。

40

#### 【 0 0 9 2 】

実施例 6 ~ 8 に記載されている株は全て、尚も無傷である A T T 1 の染色体コピーを有

50

する。内因性 A T T 1 O R F が欠失している株における完全長 A T T 1 または A T T 1 トランケート化体（共に A O X 1 - および T E F - プロモーター駆動性）の過剰発現は、実施例 6 ~ 8 に示されているとおり細胞頑強性および生産性における同様の改善をもたらすと予想される。

#### 【 0 0 9 3 】

##### 実施例 9

ハンゼヌラ・ポリモルファ A T T 1 オルソログはピチア・パストリスにおける A T T 1 ヌル突然変異を機能的に相補する

GenBank 非重複タンパク質データベースに対して B L A S T 配列類似性検索を行うことにより、ハンゼヌラ・ポリモルファ (*H. polymorpha*) A T T 1 オルソログ (GenBank EFW98022.1) を特定した。図 18 はサッカロミセス・セレビスエ (*S. cerevisiae*) Gal 4、ピチア・パストリス (*P. pastoris*) A T T 1 およびハンゼヌラ・ポリモルファ (*H. polymorpha*) A T T 1 のアライメントを示す。

10

#### 【 0 0 9 4 】

ハンゼヌラ・ポリモルファ (*H. polymorpha*) はオガタエア・パラポリモルファ (*Ogataea parapolymorpha*) またはピチア・アングスタ (*Pichia angusta*) としても公知であるが、異種組換えタンパク質を発現させるために一般に使用されるメチロトロフィック酵母である。ピチア・パストリス (*P. pastoris*) と同様に、ハンゼヌラ・ポリモルファ (*H. polymorpha*) も炭素源としてガラクトースを利用するその能力を喪失している。なぜなら、それは、ガラクトース代謝に関与する遺伝子のほとんどを喪失しているからである。本発明者らは、B L A S T により GenBank 非重複タンパク質データベースを検索した際に、タンパク質の全長に対して 41% のアミノ酸配列同一性を示すハンゼヌラ・ポリモルファ (*H. polymorpha*) A T T 1 オルソログ (GenBank EFW98022.1) を特定した。ハンゼヌラ・ポリモルファ (*H. polymorpha*) A T T 1 オルソログ (Hp A T T 1) が P p A T T 1 に類似した機能を果たすかどうかを評価するために、天然 P p A T T 1 プロモーターの下流に Hp A T T 1 オープンリーディングフレーム (O R F) をクローニングし、この D N A 構築物を、内因性 A T T 1 が既に欠失している Y G L Y 3 0 5 4 7 の U R A 6 遺伝子座に安定に組込んだ。比較のために、本発明者らは、同様にして、Y G L 3 0 5 4 7 の U R A 6 遺伝子座にサッカロミセス・セレビスエ (*S. cerevisiae*) A T T 1 オルソログ (S c G A L 4) O R F をも組込んだ。P p A T T 1 遺伝子欠失により引き起こされる温度抵抗性表現型に対してこれらの A T T 1 オルソログがどのような影響を及ぼすかを試験するために、本発明者らは、Hp A T T 1 または S c G A L 4 遺伝子のいずれかを含有する独立した形質転換体を無作為に選択し、通常の Y P D 寒天プレート上にそれらをパッチ (p a t c h) し、許容性の 2 4 および非許容性の 3 5 において、それらの増殖をモニターした。

20

30

#### 【 0 0 9 5 】

全ての S c G A L 4 含有クローンは、親 Y G L Y 2 7 6 1 1 の場合と全く同様に温度抵抗性のままであった。これらの結果は、この実験で用いた試験条件下では、S c G A L 4 はピチア・パストリス (*P. pastoris*) における P p A T T 1 の機能に取って代わることができないことを示した。これとは対照的に、Hp A T T 1 含有形質転換体は 3 5 では増殖できず、したがって、Y G L Y 3 0 5 4 7 の温度抵抗性表現型を温度感受性に復帰させた。これらの結果は、Hp A T T 1 がインビボで P p A T T 1 の活性に機能的に取って代わることが可能であることを実証した。

40

#### 【 0 0 9 6 】

##### 実施例 10

発酵頑強性の改善のための P p A T T 1 トランケート化体のスクリーニング

細胞頑強性に対する A T T 1 トランケート化の効果をもっと研究するために、本発明者らは、内因性 A T T 1 O R F が欠失しており、A T T 1 遺伝子の種々の長さの N 末端部分

50

をコードするDNAカセットにより置換されている一連の新規株を構築した。DNAカセットは、配列番号7のATT1タンパク質のN末端1-143aa、1-196aa、1-216aa、1-276aa、1-296aa、1-341aa、1-539aa、1-622aa、1-655aa、1-728aa、1-802aaまたは1-828aaをコードするDNA断片をそれらの5'交差領域にそれらが含有すること以外は実施例4に記載されているpGLY5948またはpGLY5949に非常に類似した方法で構築された。比較のために、完全ATT1欠失株、およびATT1のN末端1-31aa、1-164aa断片を含有する株(実施例4に記載されている)をも試験した。

#### 【0097】

これらのランケート化ATT1断片が産物力価にどのように影響を及ぼすのかをも調べるために、抗HER2 mAbを発現する前記のGLY13979株のURA5-マイナス誘導体であるGLY19315内に、これらのDNA構築物を形質転換した。ATT1欠失またはランケート化を含有するこれらの株を、実施例4に記載されているメタノール限定フェッドバッチ発酵法を用いて、32の1Lバイオリアクター内で培養した。細胞溶解を顕微鏡検査により、毎日モニターし、過剰の細胞溶解が観察されたら発酵を終了させた。細胞溶解レベルが低い場合、100~120時間のメタノール誘導まで発酵を行った。各発酵の実施の終了時に、無細胞上清を集め、実施例7に記載されているとおり、プロテインAに基づくHPLC法を用いて、mAb力価を決定した。

#### 【0098】

これらの実験の結果を図19Aおよび19Bに示す。対照株は完全長ATT1遺伝子を含有するものであるが、32で40時間までのメタノール誘導を生き延びたに過ぎなかった(図19A)。ATT1欠失株は80時間を超える誘導を生き延び、このことは、ATT1活性の不活性化が発酵中の発酵頑強性を劇的に改善したことを示している。驚くべきことに、ATT1(1-296aa)断片は発酵中の頑強性保護を全くもたらさなかった。全ての他のATT1ランケート化体は種々の度合で発酵頑強性を明らかに改善し、1-216aa、1-341aa、1-655aa、1-802aaおよび1-828aa断片はほどほどのレベルの改善を示し、1-31aa、1-143aa、164aa、1-196aa、1-276aa、1-539aa、1-622aaおよび1-728aa断片は大きな改善を示した。ランケート化体の全てのなかで、ATT1(1-164aa)断片を含有する株がこれらの発酵の実施中で最高レベルの頑強性を示しているようであった。産物力価(図19B)に関しては、1-828aa ATT1断片のみがmAb力価を~100mg/リットルへと有意に低減し、一方、他のATT1断片を含有する株は~600から1200mg/リットルのmAbを与え、これは、いずれのATT1修飾をも有さない株で観察された~1000mg/リットルの力価と有意には異なる。

#### 【0099】

##### 実施例11

ATT1(1-31aa)および(1-164aa)断片は完全長ATT1遺伝子の存在下でドミナントである

実施例10において示されたとおり、ATT1(1-164aa)断片を含有する株は最も頑強な表現型を示した。1-164aa断片は完全なDNA結合および二量体形成領域を含有するが、タンパク質のいずれの転写活性化領域をも欠いているため、1-164aa断片は不活性二量体として標的遺伝子のプロモーターに結合し、これらの標的遺伝子を活性化しうる他の転写因子が結合するのを妨げて転写抑制をもたらさうであろう。これが事実であれば、1-164aa ATT1断片はプロモーター結合に関して完全長ATT1タンパク質と競合し、ATT1の正常な転写活性を妨げるはずだと予想されうであろう。この仮定を実証するために、本発明者らは、ATT1(1-164aa)含有DNA構築物を、完全長ATT1遺伝子を含有する株GLY13979内に導入し、1Lバイオリアクターを使用して発酵中の細胞頑強性に対するその効果を調べた。対照として、ATT1(1-31aa)含有DNA構築物をもGLY13979内に導入した。1-31aa ATT1断片はDNA結合および二量体形成ドメインの上流に位置する(そ

10

20

30

40

50

してScGAL4タンパク質を欠いている)ため、本発明者らは、それが、YGLY13979宿主内に存在する完全長ATT1遺伝子のDNA結合および転写機能を妨げないと予想した。図19Aおよび19B(下の2つの棒グラフ)に示されているとおり、(1-164aa断片+ATT1完全長)および(1-31aa断片+ATT1完全長)を含有する株は100時間を超える32のメタノール誘導を生き延びたが、このことは、1-164aaおよび1-31aa断片が共に、ドミナント様態(すなわち、野生型完全長ATT1の存在下)で細胞頑強性保護をもたらしたことを示している。1-164aaATT1断片のドミナント性は前記の仮定と合致している。しかし、1-31aa断片も野生型ATT1完全長遺伝子に対してドミナントネガティブ効果を示したという観察は驚くべきことであった。

10

#### 【0100】

##### 実施例12

ATT1欠失およびランケート化は15Lバイオリアクターにおける株頑強性を改善した

これまでの全ての実施例においては、発酵頑強性は全て、1リットルの実験室規模のバイオリアクターを使用して評価された。ATT1修飾がより大きなバイオリアクターにおいて同じ頑強性改善をもたらすかどうかを調べるために、完全ATT1欠失または異なるATT1ランケート化を含有する幾つかの株を選択し、Potgieterら, 2009に記載されているとおりに、24の15Lバイオリアクター内でメタノール限定フェッドバッチ発酵を行った。細胞溶解、細胞増殖および産物力価を発酵プロセスの全体にわたってモニターし、細胞増殖が停止し、細胞溶解が過剰になったら、発酵の実施を終了した。

20

#### 【0101】

図20に示されているとおり、無傷の野生型ATT1遺伝子を含有する対照株(YGLY13979)は、通常、約120時間の誘導を生き延び、その約120時間の時点で、続行できないほどに細胞溶解が激しくなった。

#### 【0102】

ATT1(1-164aa)断片および完全長ATT1遺伝子を同時に含有するYGLY30539の場合、それは対照株より有意に頑強になり、150時間を超える誘導を生き延びることが可能であった。この知見は、1-164aa断片が完全長ATT1遺伝子の存在下であっても細胞頑強性を改善しうることを証明した。

30

#### 【0103】

完全長ATT1過剰発現カセットを含有する株もほぼ同じレベルの頑強性改善を示し、誘導後約170時間にわたって生存可能であった。

#### 【0104】

1-655aaATT1断片を含有する株はより顕著な発酵頑強性を示し、誘導後200時間以上にわたって生存可能であった。

#### 【0105】

完全ATT1欠失または1-31aa断片を含有する株はより一層の頑強性保護をもたらし、どちらも250時間を超える誘導を生き延びた。

40

#### 【0106】

注目すべきことに、1-164aa断片含有株は最高レベルの細胞頑強性を示し、15Lバイオリアクターにおける24で340時間を超える誘導を生き延びた。

#### 【0107】

総合すると、これらの結果は、前記のATT1欠失、ランケート化、および過剰発現の選択形態が、1Lの小規模バイオリアクターにおいてだけでなく15Lの規模のバイオリアクターにおいても、発酵実施中の細胞頑強性を劇的に改善しうることを示した。これらの知見は、細胞頑強性に対するこれらのATT1修飾の効果が容易に規模拡大性であり、十中八九、より大きな発酵規模(すなわち、パイロットプラントまたは製造規模)においても同じままであることを強く示唆した。

50

## 【0108】

## 実施例13

AT T 1 欠失は他のピチア株においても細胞頑強性を改善する

ピチア・パストリス (*P. pastoris*) 糖操作株 Y G L Y 2 3 5 0 6 は、 $Man_5GlcNAc_2$  N-グリカンを主に有するタンパク質を分泌する G F I 2 . 0 株である ( $Man_5GlcNAc_2$  を分泌しうる他のピチア株の構築は Ch o i ら, 2 0 0 3 において既に記載されている)。この宿主株系列は、酵母 O C H 1 遺伝子、ならびに 4 つの B M T - マンノシルトランスフェラーゼ遺伝子およびホスホマンノシルトランスフェラーゼを含むマンノシルトランスフェラーゼファミリーの幾つかの他のメンバーのノックアウトにより順次修飾されている。この株操作はまた、アルファ - 1, 2 - マンノシダーゼの発現を含み、これは均一な  $Man_5GlcNAc_2$  形態へのコア  $Man_8GlcNAc_2$  N-グリカンの切断をもたらす。この特定の株はまた、H I V gp 1 2 0 の N 末端 H 9 G 3 ヒスチジンタグ付き可溶性形態を、サッカロミセス・セレビスエ (*S. cerevisiae*) アルファ因子プレプロシグナルペプチドに融合したアミノ酸 3 3 - 5 5 6 を含有する株 J R - F L (Varadarajan, 2005; Pang, 1991; Genbank A A B 0 5 6 0 4 . 1) から分泌するように操作されている。

10

## 【0109】

ついで株 Y G L Y 2 3 5 0 6 を、標準的なエレクトロポレーションを用いて、P p a t t 1 : : A r s R ノックアウトプラスミドであるプラスミド p G L Y 5 9 5 2 ( 図 2 1 ) で形質転換し、クローンを、1 m M 亜ヒ酸ナトリウムを含有する Y S D 培地上で選択した。前記のとおり、P C R により陽性ノックアウトクローンを特定した。P C R は、Y G L Y 3 0 4 4 7、Y G L Y 3 0 4 4 8、Y G L Y 3 0 4 4 9 および Y G L Y 3 0 4 5 0 が、Y G L Y 2 3 5 0 6 から誘導された G F I 2 . 0 a t t 1 クローンとして保存されたことを証明した。

20

## 【0110】

ピチア・パストリス (*P. pastoris*) 糖操作株 Y G L Y 2 3 5 1 2 は、 $Man_{8-10}GlcNAc_2$  N-グリカンを主に有するタンパク質を分泌する G F I 1 . 0 株である ( $Man_{8-10}GlcNAc_2$  を分泌しうる他のピチア株の構築は Ch o i ら, 2 0 0 3 において既に記載されている)。この宿主株系列は、Y G L Y 2 3 5 0 6 に類似した酵母 N-グリコシル化装置のノックアウトにより修飾されているが、この株はアルファ - マンノシダーゼを発現しない。この特定の株はまた、株 Y G L Y 2 3 5 0 6 に類似した H I V gp 1 2 0 の N 末端 H 9 G 3 ヒスチジンタグ付き可溶性形態 (この場合は、サッカロミセス・セレビスエ (*S. cerevisiae*) アルファ因子プレシグナルペプチドに融合している) を分泌するように操作されている。株 Y G L Y 2 3 5 1 2 を、標準的なエレクトロポレーションを用いて、P p a t t 1 : : A r s R ノックアウトプラスミドであるプラスミド p G L Y 5 9 5 2 ( 図 2 1 ) で形質転換し、クローンを、1 m M 亜ヒ酸ナトリウムを含有する Y S D 培地上で選択した。前記のとおり、P C R により陽性ノックアウトクローンを特定した。P C R は、Y G L Y 3 0 4 5 1、Y G L Y 3 0 4 5 2、Y G L Y 3 0 4 5 3 および Y G L Y 3 0 4 5 4 が、Y G L Y 2 3 5 1 2 から誘導された G F I 1 . 0 a t t 1 クローンとして保存されたことを証明した。

30

40

## 【0111】

株 Y G L Y 2 3 5 0 6、Y G L Y 2 3 5 1 2、およびこれらの株の a t t 1 形態を 1 L の発酵において培養して、これらの G F I 2 . 0 および G F I 1 . 0 糖操作株の頑強性を評価した。

## 【0112】

発酵の実施は S a r t o r i u s の 1 L (実効体積 0 . 7 5 L) バイオリアクターにおいて行った。1 L 系は、pH、温度および溶存酸素濃度の閉ループ制御を伴う S a r t o r i u s B i o s t a t Q コントローラーにより制御された。振とうフラスコ培養物を 4 8 時間にわたり振とうしながら 2 4 にて 1 . 0 L 隔壁付きフラスコ内で 4 % B S G Y 培地内で成長させた。ついで振とうフラスコ培養物を、2 までの初期 O D 6 0 0 で

50

、0.75 LのBSGY培地を含有する1.0 L Sartorius容器内に無菌的に移した。既に記載されているとおりに(Potgieterら, 2008)、標準的なピチア培地成分を含む標準的なグリセロール/メタノール フェッドバッチ法を行った。転移段階の終了時に、2.5 mg/mL ペプスタチンAおよび1.59 mg/mL キモスタチン、0.64 mg/mL PMT14を含有する1.33 mL/Lの用量のメタノールをメタノール誘導前に加えた。培養温度をpt100センサーにより測定し、 $24 \pm 0.5$  に制御した。30% NH<sub>4</sub>OHを使用して、pHを、バッチおよびフェッドバッチ期には $6.0 \pm 0.1$ に、そして誘導期には $5.0 \pm 0.1$ に制御した。酸添加は行わず、30% NH<sub>4</sub>OHを使用して、接種する前にpHを設定点に到達させた。気流を1 Lに関して0.7 vvmに制御した。一定の気流速度となるようにO<sub>2</sub>添加と連携した攪拌速度(450~1200 rpm)により、20%(大気圧条件で空気での飽和に対するもの; 1.7 mg/L)のDO設定点を実施の全体にわたって維持した。初期バッチ培地にける消泡剤(Antifoam 204, Sigma-Aldrich)の添加により発泡を制御した。0.128 g/Lの初期仕込み量の消泡剤を、接種前に培地に加えた。転移段階の後、一定の供給速度(1.5 g/L/時間)で、PTM2およびピオチンを含有する100%メタノールの一定供給を開始した。pHを120分間で6から5へと徐々に減少させた(60分間で6.5への、そして60分間で7への直線増加)。温度を24 に維持した。24時間の誘導のたびに、2.5 mg/mL ペプスタチンAおよび1.59 mg/mLのキモスタチンを含有する1.33 mL/Lのメタノールを加えた。誘導の終了時に、全ての制御およびポンプを停止させた。室温で回収を行った。ついで一次清澄化を遠心分離により行った。全細胞ブロス800 mLの遠心ボトル内に移し、13,000 × g (8500 RPM)で4 で30分間遠心分離した。

#### 【0113】

5 mLのブロスを取り出し、卓上遠心機内で遠心分離し、分析のために上清を取り出すことにより、誘導前から約24時間ごとに、各発酵槽からサンプルを採取した。

#### 【0114】

株YGLY23506、分泌性HIV gp120を発現する親ATT1 WT GF I 2.0、ならびに株YGLY30447、YGLY30448、YGLY30449およびYGLY30450、YGLY23506のatt1 クローンからの発酵培養上清をSDS-PAGE上で分離し、標準的な手段によりクーマシー染色した。染色SDS-PAGEゲルを図22に示す。18時間の誘導の後の上清タンパク質の重い負荷から明らかとなっており、親株が激しい細胞溶解を開始した場合に、メタノール誘導を開始した後では特に、att1 ノックアウト株において視認可能な上清タンパク質は親GF I 2.0株と比較して有意に低減している。この発酵は、66時間の誘導の後で激しい細胞溶解のために終了した。逆に、att1 株は、YGLY23506親株の18時間と比較して、80時間を超える誘導の後で、ほどほどの上清タンパク質負荷を尚も示したに過ぎなかった(図22)。

#### 【0115】

SDS-PAGEに加えて、既に記載されているとおりに(Barnard, 2010)、ピコグリーン(Picogreen)試薬(Invitrogen)を使用する上清DNAの定量により、発酵上清を分析した。SDS-PAGEの結果と同様に、上清DNAアッセイは、YGLY23506が類似時点においてatt1 クローンと比較して有意に大量のDNAを蓄積していることを示した。更に、att1 クローンは、192時間の発酵(159時間の誘導)の後、ほどほどの上清DNA負荷を維持していたが、このことは、GF I 2.0においては、att1 クローンが、標準的なピチア発酵プロセス中に親ATT1野生型GF I 2.0比較対象より有意に頑強であることを示している(図23)。

#### 【0116】

前記のGF I 2.0株と同様に、株YGLY23512、分泌性HIV gp120を発現する親ATT1 WT GF I 1.0、ならびにYGLY30451、YGLY30



452、YGLY30453およびYGLY30454、YGLY23512のatt1クローンからの発酵培養上清をSDS-PAGE上で分離し、標準的な手段によりクーマシー染色した。染色SDS-PAGEゲルを図24に示す。上清タンパク質の重い負荷から明らかなどおり、親株が激しい細胞溶解を開始した場合に、メタノール誘導を開始した後では特に、att1ノックアウト株において視認可能な上清タンパク質は、親GFI1.0株と比較して有意に低減している。この発酵は49時間のメタノール誘導の後で激しい細胞溶解のために終了した。逆に、att1株は、YGLY23512親株が非常に早い誘導時点においてであるのと比べて、90時間を超える誘導の後で非常に低い乃至ほどほどの上清タンパク質負荷を示し続けた(図24)。

#### 【0117】

GFI2.0株の場合と同様に、SDS-PAGEに加えて、上清DNAの定量により、発酵上清を分析した。ピコグリーンアッセイは、親ATT1野生型株YGLY23512が、類似時点においてatt1クローンと比較して有意に大量の上清DNAを蓄積していることを示した(図25)。更に、att1クローンは、193時間の発酵(165時間の誘導)の後、ほどほどの上清DNA負荷を維持していたが、このことは、GFI1.0においては、att1クローンが標準的なピチア発酵プロセス中に親ATT1野生型GFI1.0比較対象より有意に頑強であることを示している(図25)。

#### 【0118】

##### 要約

ナイーブピチア(Pichia)温度感受性株におけるATT1における欠失またはトランケート化は、耐熱性および発酵頑強性の両方における有意な増強をもたらした。実施例1~4に記載されている結果は、ピチアATT1遺伝子の機能喪失が、これらの糖操作ピチア株における耐熱性および発酵頑強性の改善のための遺伝的基礎であることを例証している。ATT1遺伝子はいずれのピチア株においても欠失またはトランケート化されることが可能であり、レシピエント株を発酵誘導期中に高度に頑強性にして、所望の属性が発酵中の株頑強性および生存性の増強、産物収率の改善または組換え産物のタンパク質分解の低減を含む任意の異種タンパク質発現ピチア宿主株に関する広範な有用性をもたらす。

#### 【0119】

驚くべきことに、実施例5~8および11は、妥当なバイオプロセス条件下でATT1を過剰発現する操作されたピチア宿主株が、生存性、安定性およびタンパク質産生の改善をも示すことを例示している(図15~17)。

#### 【0120】

現在、市販の生物学的治療用物質のほとんどは、哺乳類細胞宿主を使用して製造されている。過去30年間にわたり、バイオテクノロジーおよび生物医薬産業の努力の蓄積により、哺乳類細胞培養の比生産性は、mAbの製造に関しては、~50mg/リットルから~5g/リットルの範囲へと、100倍以上改善している。そのような収率改善の寄与因子は、哺乳類細胞培養を非常に高い細胞密度( $10^5 \sim 10^7$ 細胞/ml)まで増殖させることにおける進歩、そしてより重要なことには、高レベルの細胞生存性を長時間(~100時間から~400時間)にわたって維持させることであると考えられている(Wurm 2004)。ATT1過剰発現、欠失またはトランケート化を操作することによるピチア宿主株における細胞頑強性および生存性の改善は、組換えタンパク質治療用物質の、より高い製造収率を可能にし、組換えタンパク質製造プラットフォームとしての糖操作ピチアの使用を促進させる。

#### 【0121】

##### 用語解説

ScSUC2: サッカロミセス・セレビスエ(S. cerevisiae)インベルターゼ

OCH1: アルファ-1,6-マンノシルトランスフェラーゼ

K1MNN2-2: クライベロミセス・ラクチス(K. lactis)UDP-GlcN

10

20

30

40

50

## A c 輸送体

B M T 1 : ベータ - マンノース - 転移 ( ベータ - マンノース除去 )

B M T 2 : ベータ - マンノース - 転移 ( ベータ - マンノース除去 )

B M T 3 : ベータ - マンノース - 転移 ( ベータ - マンノース除去 )

B M T 4 : ベータ - マンノース - 転移 ( ベータ - マンノース除去 )

M N N 4 L 1 : M N N 4 様 1 ( 電荷除去 )

M m S L C 3 5 A 3 : U D P - G l c N A c 輸送体のマウスオルソロゲ

P N O 1 : N - 結合オリゴ糖のホスホマンノシル化 ( 電荷除去 )

M N N 4 : マンノシルトランスフェラーゼ ( 電荷除去 )

S c G A L 1 0 : U D P - グルコース 4 - エピメラーゼ

10

X B 3 3 : S c K R E 2 リーダーに融合したトランケート化 H s G a l T 1

D m U G T : U D P - ガラクトース輸送体

K D 5 3 : S c M N N 2 リーダーに融合したトランケート化 D m M N S I I

T C 5 4 : S c M N N 2 リーダーに融合したトランケート化 R n G N T I I

N A 1 0 : P p S E C 1 2 リーダーに融合したトランケート化 H s G N T I I

F B 8 : S c S E C 1 2 リーダーに融合したトランケート化 M m M N S 1 A

C i M N S 1 : 分泌性コクシジオイデス・イミチス マンノシダーゼ I

S T E 1 3 : ゴルジジペプチジルアミノペプチダーゼ

D A P 2 : 液胞ジペプチジルアミノペプチダーゼ

A L G 3 : ドリコール - P - M a n 依存性アルファ ( 1 - 3 ) マンノシルトランスフェラーゼ

20

P O M G N T 1 : タンパク質 O - マンノース ベータ - 1 , 2 - N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ

L m S T T 3 D : リーシュマニア・メジャー ( L e i s h m a n i a m a j o r ) オリゴサッカリルトランスフェラーゼサブユニット D

【 0 1 2 2 】

参考文献

## 【表 5】

- [00146] Barnard GC, Kull AR, Sharkey NS, Shaikh SS, Rittenhour AM, Burnina I, Jiang Y, Li F, Lynaugh H, Mitchell T, Nett JH, Nysten A, Potgieter TI, Prinz B, Rios SE, Zha D, Sethuraman N, Stadheim TA, Bobrowicz P (2010) High-throughput screening and selection of yeast cell lines expressing monoclonal antibodies. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 37(9):961-71.
- [00147] Bobrowicz P, Davidson RC, Li H, Potgieter TI, Nett JH, Hamilton SR, Stadheim TA, Miele RG, Bobrowicz B, Mitchell T, Rausch S, Renfer E, Wildt S (2004) Engineering of an artificial glycosylation pathway blocked in core oligosaccharide assembly in the yeast *Pichia pastoris*: production of complex humanized glycoproteins with terminal galactose. *Glycobiology* 14(9):757-66. 10
- [00148] Carter P, Presta L, Gorman CM, Ridgway JB, Henner D, Wong WL, Rowland AM, Kotts C, Carver ME, Shepard HM. Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 May 15;89(10):4285-9. PubMed PMID: 1350088
- [00149] Choi BK, Bobrowicz P, Davidson RC, Hamilton SR, Kung DH, Li H, Miele RG, Nett JH, Wildt S, Gerngross TU (2003) Use of combinatorial genetic libraries to humanize N-linked glycosylation in the yeast *Pichia pastoris*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(9):5022-7.
- [00150] Hamilton SR, Davidson RC, Sethuraman N, Nett JH, Jiang Y, Rios S, Bobrowicz P, Stadheim TA, Li H, Choi BK, Hopkins D, Wischnewski H, Roser J, Mitchell T, Strawbridge RR, Hoopes J, Wildt S, Gerngross TU (2006) Humanization of yeast to produce complex terminally sialylated glycoproteins. *Science* 313(5792):1441-3. 20
- [00151] Hopkins D, Gomathinayagam S, Rittenhour AM, Du M, Hoyt E, Karaveg K, Mitchell T, Nett JH, Sharkey NJ, Stadheim TA, Li H, Hamilton SR. Elimination of {beta}-mannose glycan structures in *Pichia pastoris*. *Glycobiology*. 2011 Aug 12. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 21840970.
- [00152] Jiang Y, Li F, Zha D, Potgieter TI, Mitchell T, Moore R, Cukan M, Houston-Cummings NR, Nysten A, Drummond JE, McKelvey TW, d'Anjou M, Stadheim TA, Sethuraman N, Li H. Purification process development of a recombinant monoclonal antibody expressed in glycoengineered *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif.* 2011 Mar;76(1):7-14. Epub 2010 Nov 11. PubMed PMID: 21074617.
- [00153] Li H, Sethuraman N, Stadheim TA, Zha D, Prinz B, Ballew N, Bobrowicz P, Choi BK, Cook WJ, Cukan M, Houston-Cummings NR, Davidson R, Gong B, Hamilton SR, Hoopes JP, Jiang Y, Kim N, Mansfield R, Nett JH, Rios S, Strawbridge R, Wildt S, Gerngross TU (2006) Optimization of humanized IgGs in glycoengineered *Pichia pastoris*. *Nat Biotechnol.* 24(2):210-5. 30
- [00154] Pang S, Vinters HV, Akashi T, O'Brien WA, Chen IS. HIV-1 env sequence variation in brain tissue of patients with AIDS-related neurologic disease. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 1991;4(11):1082-92. PubMed PMID: 1684385.

[00155] Potgieter TI, Cukan M, Drummond JE, Houston-Cummings NR, Jiang Y, Li F, Lynaugh H, Mallem M, McKelvey TW, Mitchell T, Nylen A, Rittenhour A, Stadheim TA, Zha D, d'Anjou M. (2009) Production of monoclonal antibodies by glycoengineered *Pichia pastoris*. *J. Biotechnol.* 139(4):318-25.

[00156] Traven A, Jelacic B, Sopta M. (2006) Yeast *GAL4*: a transcriptional paradigm revisited. *EMBO Rep.* 7(5):496-9.

[00157] Varadarajan R, Sharma D, Chakraborty K, Patel M, Citron M, Sinha P, Yadav R, Rashid U, Kennedy S, Eckert D, Geleziunas R, Bramhill D, Schleif W, Liang X, Shiver J. Characterization of gp120 and its single-chain derivatives, gp120-CD4D12 and gp120-M9: implications for targeting the CD4i epitope in human immunodeficiency virus vaccine design. *J Virol.* 2005 Feb;79(3):1713-23. 10

[00158] Winston F (2008) EMS and UV Mutagenesis in Yeast. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 82:13.3B.1-13.3B.5

[00159] Wurm FM. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat Biotechnol.* 2004 Nov;22(11):1393-8. Review. PubMed PMID: 15529164.

[00160] Zhang N, Liu L, Dan Dumitru C, Cummings NR, Cukan M, Jiang Y, Li Y, Li F, Mitchell T, Mallem MR, Ou Y, Patel RN, Vo K, Wang H, Burnina I, Choi BK, Huber HE, Stadheim TA, Zha D. Glycoengineered *Pichia* produced anti-HER2 is comparable to trastuzumab in preclinical study. *MAbs.* 2011 May 1;3(3). [Epub ahead of print] PubMed PMID: 21487242. 20

【表 6】

表 5	配列表および簡単な説明
配列番号 1	P. pastoris 野生型 ATT1 ORF
配列番号 2	92 位に 5bp の挿入を有する突然変異 P. pastoris ATT1 はアミノ酸 31 における トランケート化をもたらす
配列番号 3	322 位にミスセンス突然変異を有する突然変異 P. pastoris ATT1 はアミノ酸 107 におけるトランケート化をもたらす
配列番号 4	493 位にミスセンス突然変異を有する突然変異 P. pastoris ATT1 は 164aa 位に おけるトランケート化をもたらす
配列番号 5	1966 位にミスセンス突然変異を有する突然変異 P. pastoris ATT1 はアミノ酸 655aa におけるトランケート化をもたらす
配列番号 6	P. pastoris TEF プロモーター
配列番号 7	P. pastoris 野生型 ATT1 アミノ酸配列
配列番号 8	5bp の挿入から生じた P. pastoris トランケート化突然変異体 att1(アミノ酸 1-31 att1 + 突然変異挿入アミノ酸)
配列番号 9	P. pastoris トランケート化突然変異体 att1p 1-107
配列番号 10	P. pastoris トランケート化突然変異体 att1p 1-164
配列番号 11	P. pastoris トランケート化突然変異体 att1p 1-655
配列番号 12	ATT1 開始部位の 2370bp 上流に位置する P. pastoris プライマー
配列番号 13	遺伝子置換の 5'結合部を確認するための ALG3 ターミネーター内の P. pastoris プライマー
配列番号 14	lacZ 内のプライマー
配列番号 15	遺伝子置換を 3'結合部を確認するための ATT1 開始コドンの 2014bp 下流に 位置する P. pastoris プライマー
配列番号 16	ATT1 開始部位の 365bp 上流に位置する P. pastoris プライマー
配列番号 17	野生型 ATT1 ORF の非存在を確認するための開始部位の 1070bp 後方の ATT1 ORF 内の P. pastoris プライマー
配列番号 18	ATT1 ORF の第 31 アミノ酸残基の後の P. pastoris フレームシフト挿入
配列番号 19	ATT1 ORF の ATG 開始コドンの 1081bp 下流に位置する P. pastoris プライマ ー
配列番号 20	AOX1 プロモーター内に位置する P. pastoris プライマー
配列番号 21	TEF プロモーター内に位置する P. pastoris プライマー
配列番号 22	P. pastoris AOX1 プロモーター
配列番号 23	H. polymorpha ATT1 ポリペプチド
配列番号 24	Pichia stipitis ATT1 ポリペプチド
配列番号 25	Pichia guilliermondii ATT1 ポリペプチド
配列番号 26	Kluyveromyces lactis ATT1 ポリペプチド
配列番号 27	Aspergillus niger ATT1 ポリペプチド
配列番号 28	Aspergillus nidulans ATT1 ポリペプチド
配列番号 29	Aspergillus flavus ATT1 ポリペプチド
配列番号 30	Debaryomyces hansenii ATT1 ポリペプチド
配列番号 31	Zygosaccharomyces rouxii ATT1 ポリペプチド
配列番号 32	Sachharomyces cerevisiae ATT1 ポリペプチド

10

20

30

40

## 【 0 1 2 4 】

本出願の全体にわたって特許、特許出願、刊行物、製品説明書およびプロトコールが引用されているが、それらの開示の全体を、あらゆる目的で、参照により本明細書に組み入れることとする。本明細書中に引用されている全ての参考文献を、各個の刊行物、データベースエントリー（例えば、GenBank 配列または GeneID エントリー）、特許出願または特許が参照により本明細書に組み入れられると具体的かつ個別に示されているのと同様に、参照により本明細書に組み入れることとする。参照により組み入れるというこの陳述は、そのような引用が、参照により組み入れるという宣誓陳述の直前直後にない場合であっても、37 C.F.R. § 1.57 (b) (1) に従い、各個の刊行物、デ

50

ータベースエントリー（例えば、Genbank 配列または GeneID エントリー）、特許出願または特許 [ それらのそれぞれは 37 C.F.R. § 1.57 (b) (2) に従い明らかに特定されるものである ] に関連づけることを出願人が意図しているものである。参照により組み入れるという宣誓陳述が明細書に含まれている場合、それは、参照により組み入れるというこの一般的 ( general ) 陳述を何ら弱めるものではない。本明細書における参考文献の引用は、参考文献が関連先行技術であると自認するものではなく、また、それは、これらの刊行物または文書の内容または日付に関して何ら自認するものでもない。

【 0 1 2 5 】

本発明は、本明細書に記載されている特定の実施形態により範囲において限定されるものではなく、本明細書中に具体的に記載されている実施形態は、必ずしも包括的であると意図されない。実際、本明細書に記載されているものに加えて、本発明の種々の修飾が前記説明および添付図面から当業者に明らかとなるであろう。そのような修飾は添付の特許請求の範囲の範囲に含まれるものと意図される。

【 0 1 2 6 】

前記の明細書は、当業者が本発明を実施することを可能にするのに十分なものであるとみなされる。本明細書に示され記載されているものに加えて、本発明の種々の修飾が前記説明から当業者に明らかとなり、添付の特許請求の範囲の範囲内に含まれる。

10

【 図 1 A 】

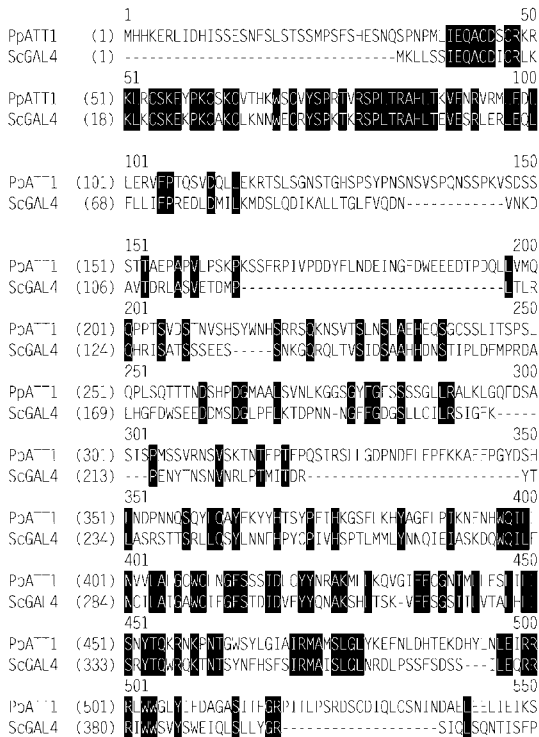


FIG.1A

【 図 1 B 】

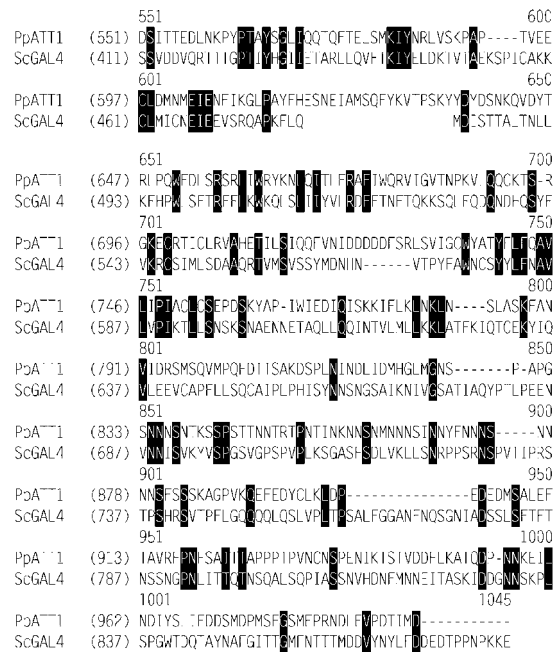
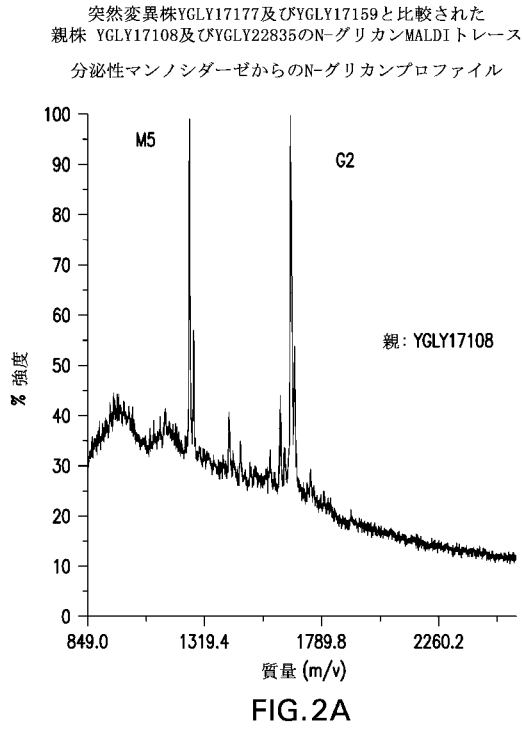
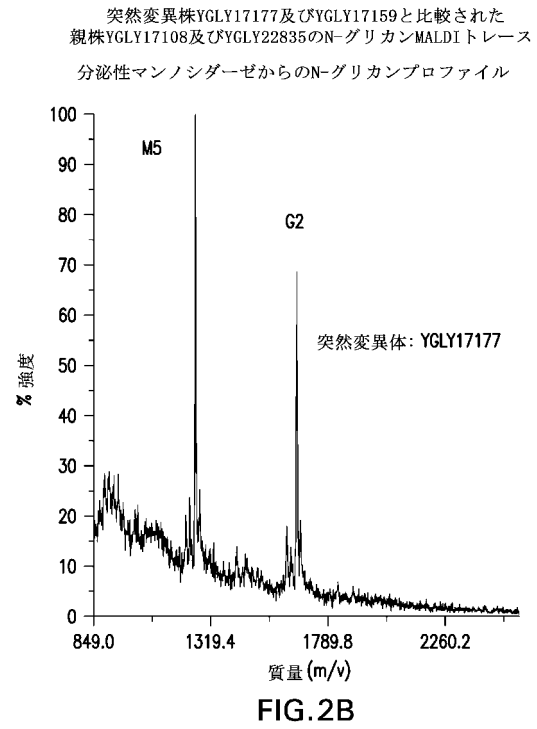


FIG.1B

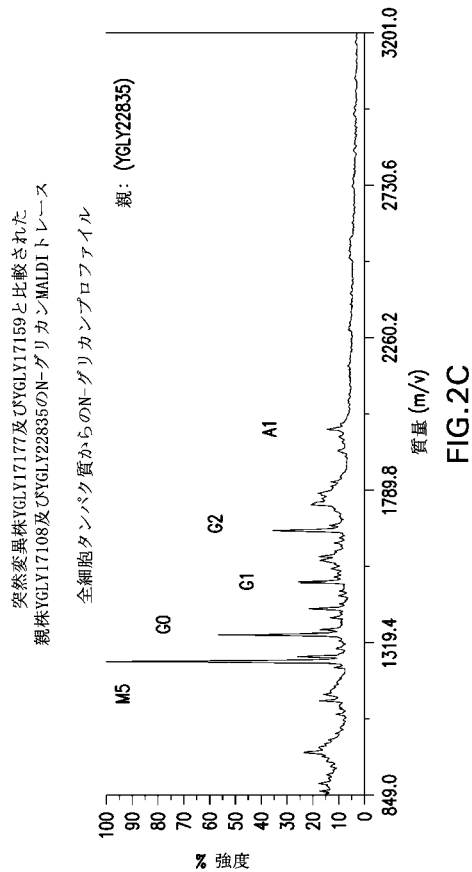
【 図 2 A 】



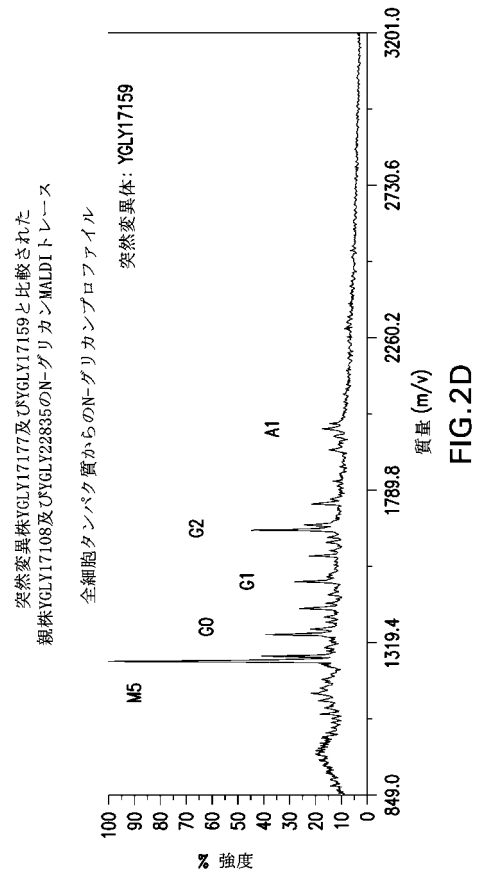
【 図 2 B 】



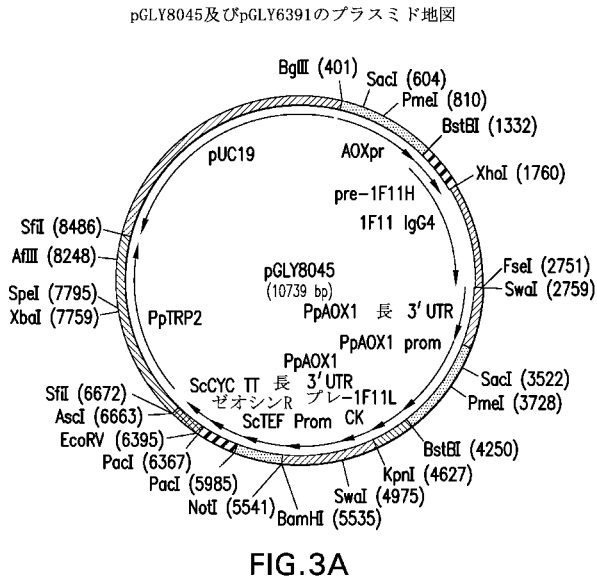
【 図 2 C 】



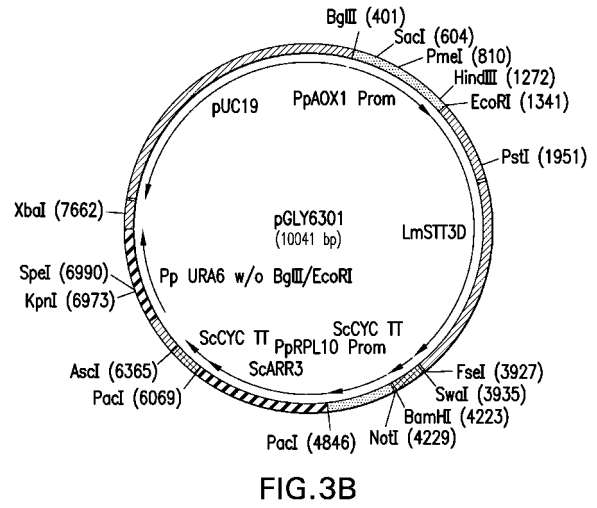
【 図 2 D 】



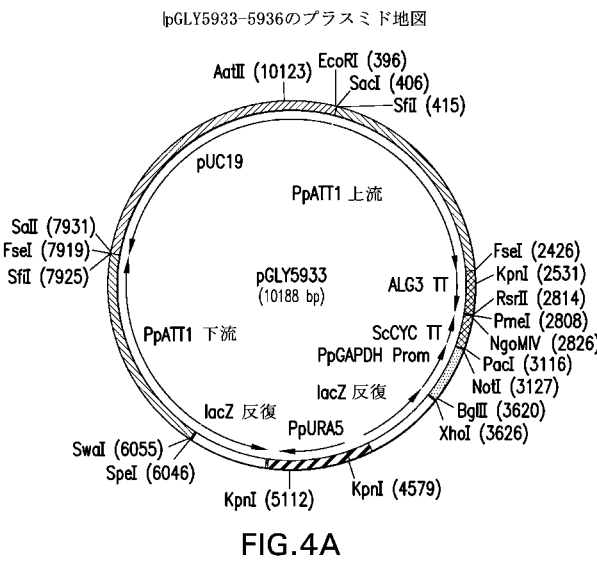
【 図 3 A 】



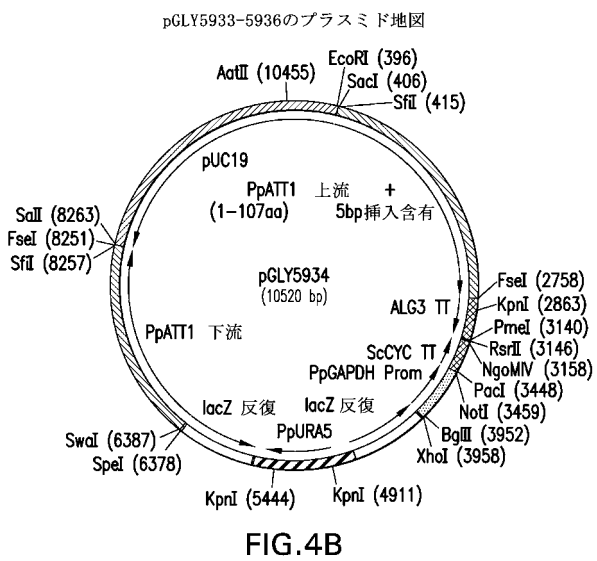
【 図 3 B 】



【 図 4 A 】



【 図 4 B 】





【 図 4 C 】

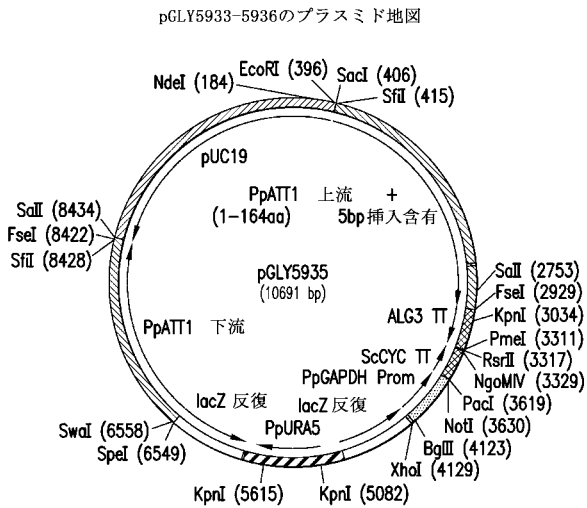


FIG.4C

【 図 4 D 】

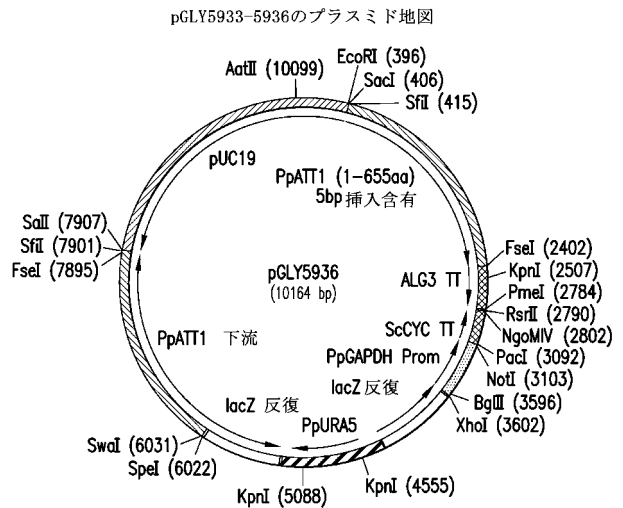


FIG.4D

【 図 4 E 】

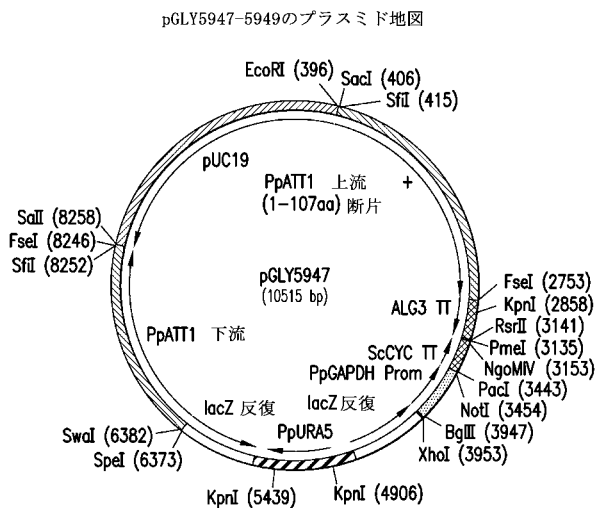


FIG.4E

【 図 4 F 】

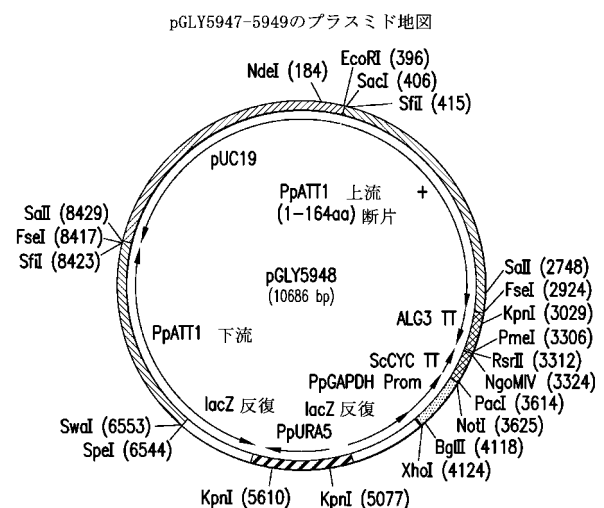
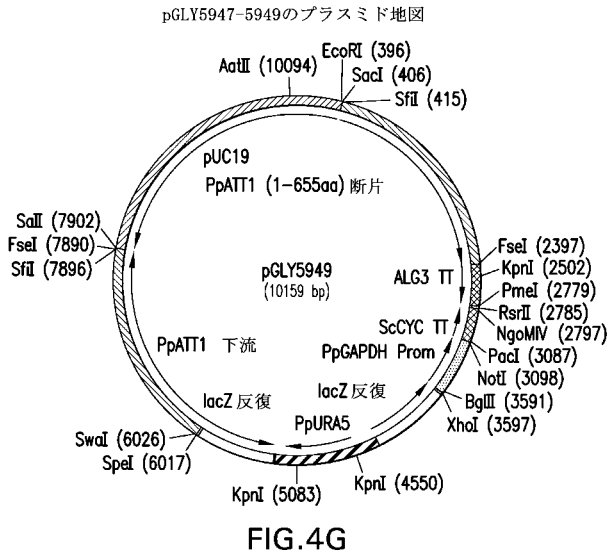
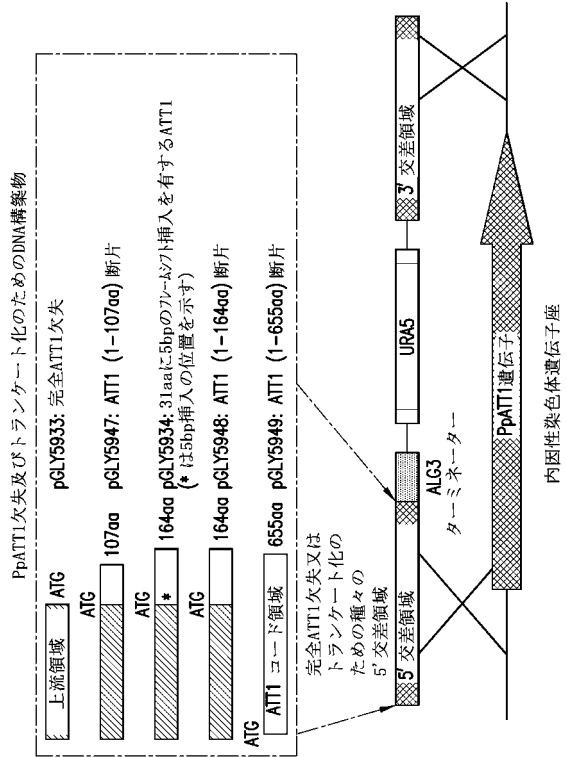


FIG.4F

【 図 4 G 】

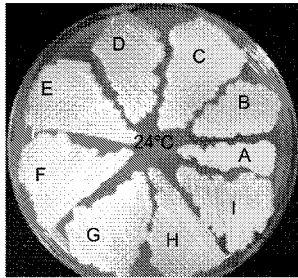


【 図 5 】



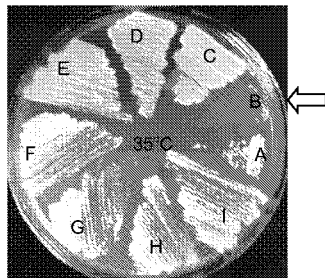
【 図 6 A 】

トランケート化のPpATT1欠失は耐熱性の増強をもたらした



【 図 6 B 】

トランケート化のPpATT1欠失は耐熱性の増強をもたらした



【 図 6 C 】

トランケート化のPpATT1欠失は耐熱性の増強をもたらした

A	YGLY17172	PpATT1 UV 誘導突然変
B	YGLY1708	WT PpATT1対照 (温度感受性)
C	YGLY27611	ATT1 完全欠失
D	YGLY27601	ATT1 (1-107aa + 31aaでの5bp挿入 )
E	YGLY27602	ATT1 (1-164aa + 31aaでの5bp挿入 )
F	YGLY27603	ATT1 (1-655aa + 31aaでの5bp挿入 )
G	YGLY27606	ATT1 (1-107aa) 断片
H	YGLY27608	ATT1 (1-164aa) 断片
I	YGLY27610	ATT1 (1-655aa) 断片

FIG.6C

【 図 7 】

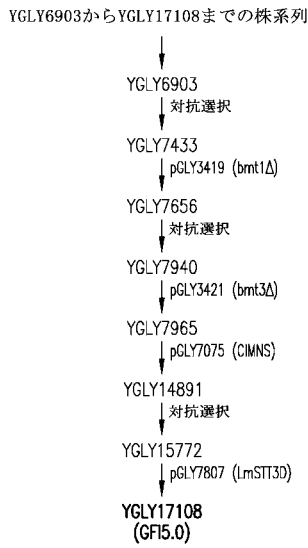


FIG.7

【 図 8 】

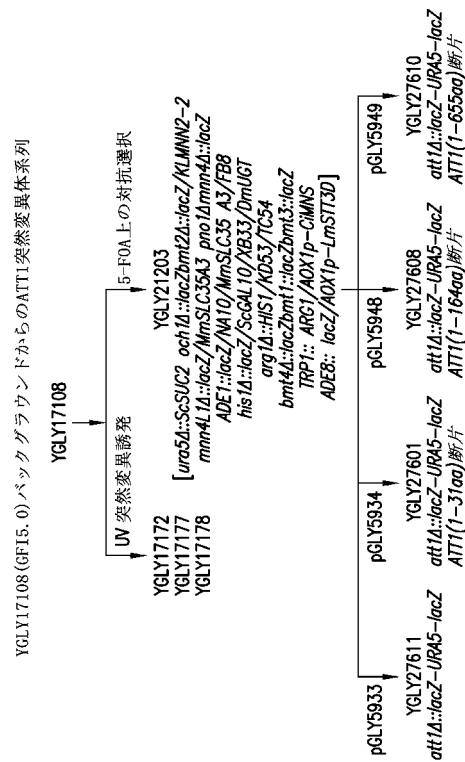


FIG.8

【 図 9 】

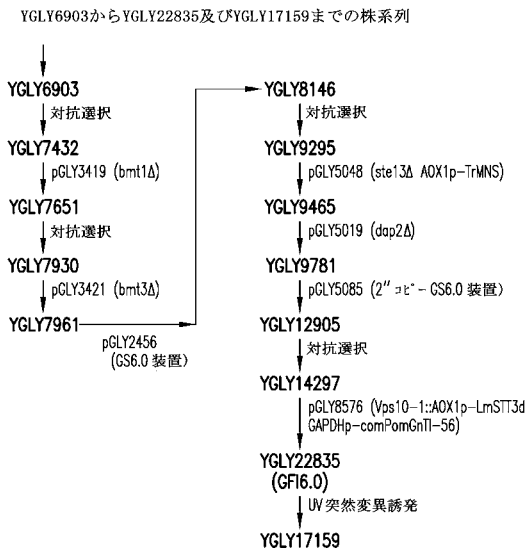


FIG.9

【 図 10 】

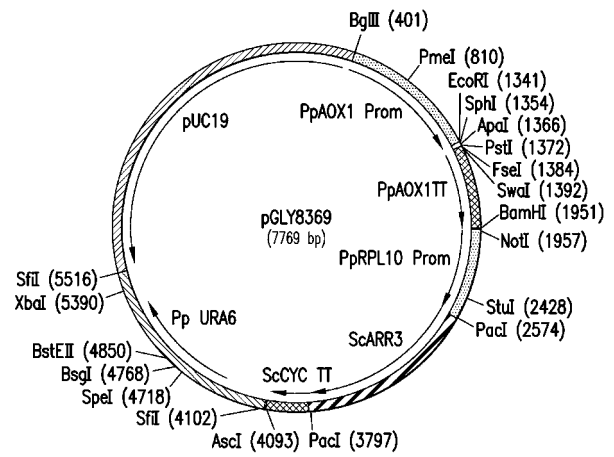


FIG.10

【 図 1 1 】

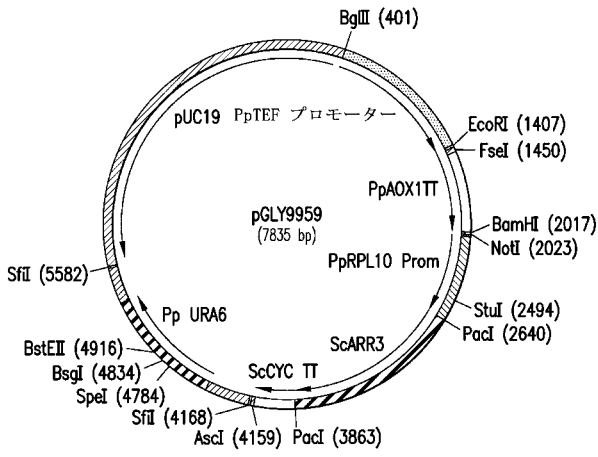


FIG.11

【 図 1 2 】

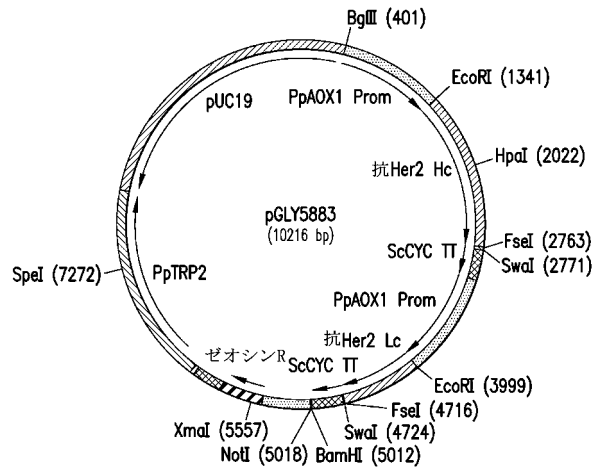


FIG.12

【 図 1 3 】

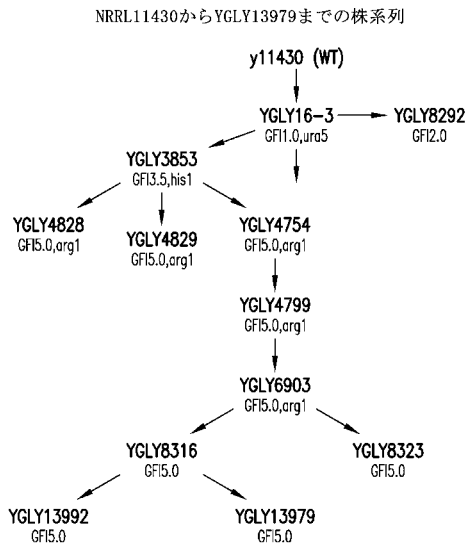


FIG.13

【 図 1 4 A 】

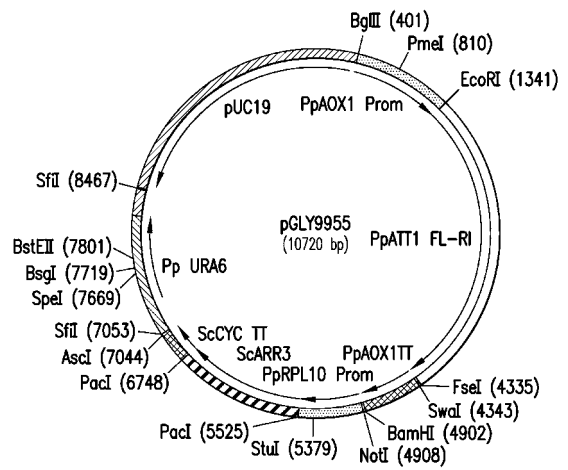


FIG.14A

【 図 1 4 B 】

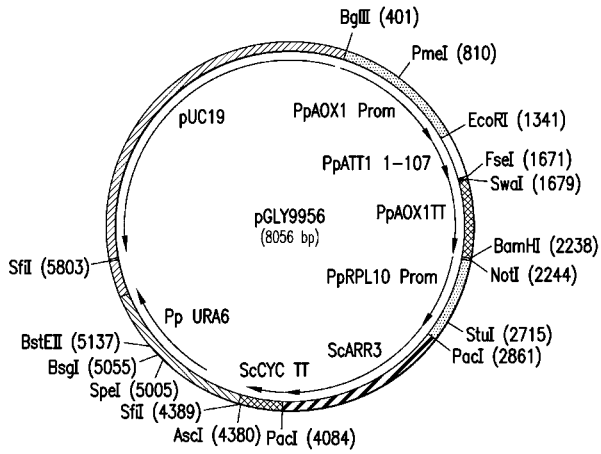


FIG. 14B

【 図 1 4 C 】

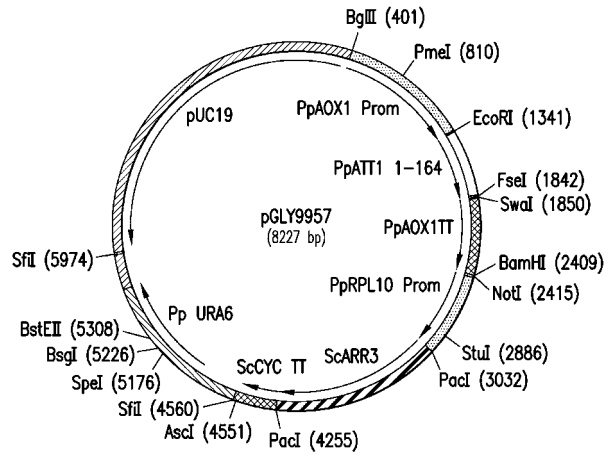


FIG. 14C

【 図 1 4 D 】

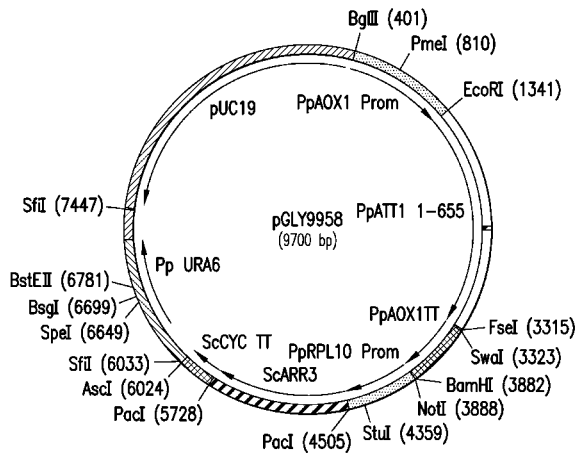


FIG. 14D

【 図 1 4 E 】

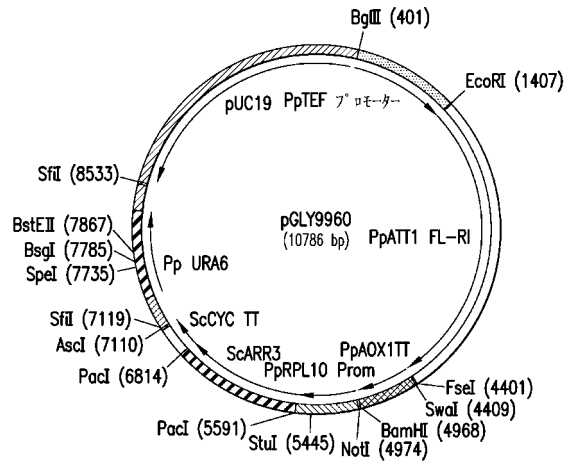


FIG. 14E

【 図 1 4 F 】

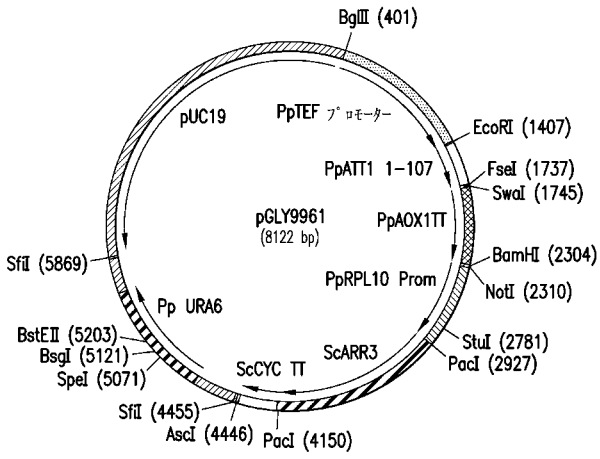


FIG. 14F

【 図 1 4 G 】

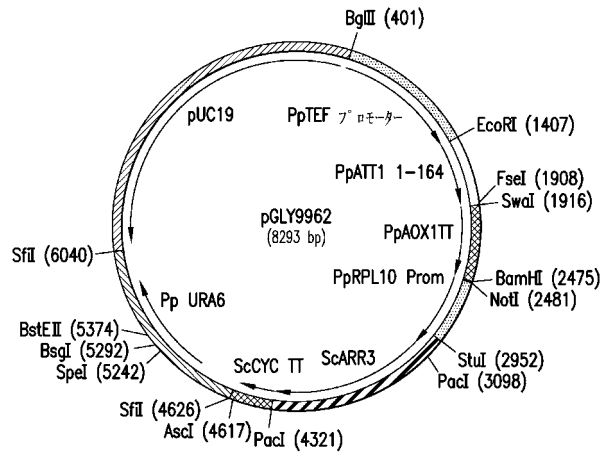


FIG. 14G

【 図 1 4 H 】

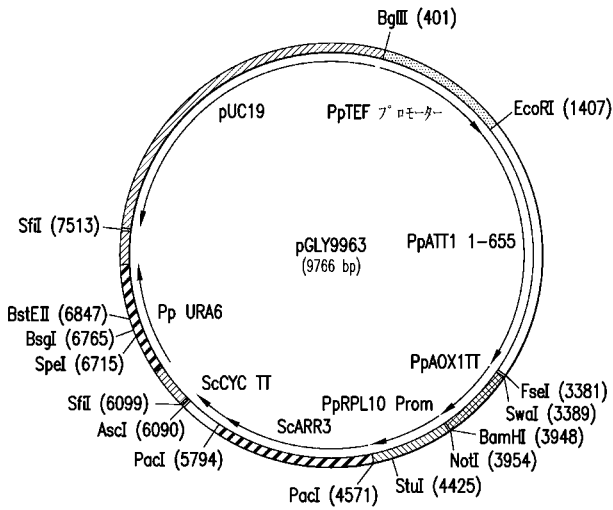


FIG. 14H

【 図 1 5 】

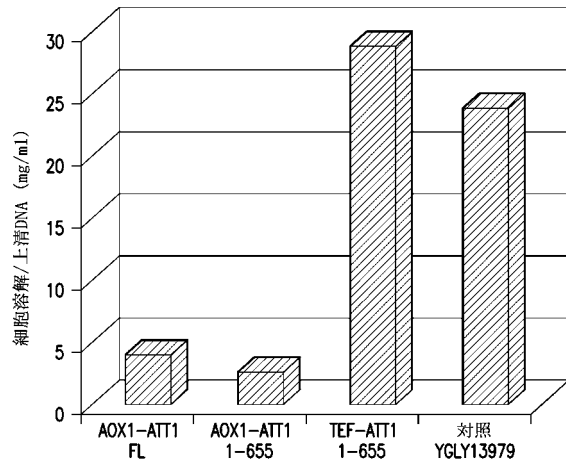


FIG. 15

【 図 1 6 】

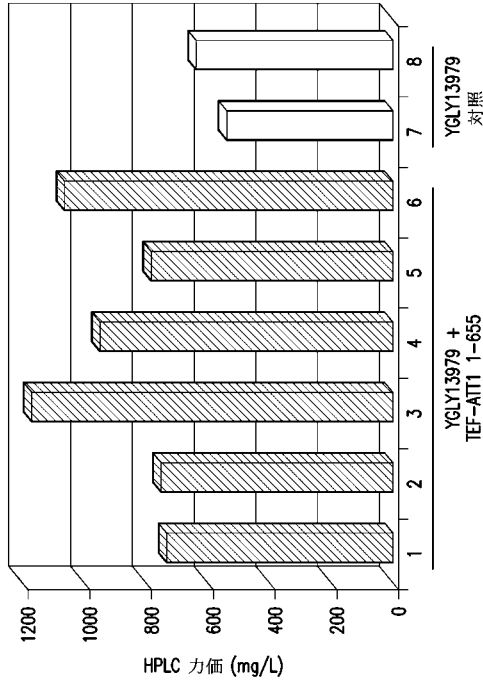


FIG. 16

【 図 1 7 】

実施例	株	M24クローン	説明	誘導時間(時間)	細胞濃度	PicoGreen	HPLC	力価
D113325	YGLY27927	M1130-06 A1	YGLY13979 + AOX1-AIT1	111	2.5	23	707	
D113326	YGLY27928	M1130-06 A2	YGLY13979 + AOX1-AIT1	64	4.25	28	605	
D113327	YGLY27929	M1130-06 A3	YGLY13979 + AOX1-AIT1	112	1.25	4.5	1974	
D113328	YGLY27930	M1130-06 A4	YGLY13979 + AOX1-AIT1	113	1	5.2	1960	
D113329	YGLY27931	M1130-06 A5	YGLY13979 + AOX1-AIT1	67	3.5	7.4	648	
D113330	YGLY27932	M1130-06 A6	YGLY13979 + AOX1-AIT1	66	4.25	38.9	837	
D113331	YGLY13979	N/A	YGLY13979	66	4.25	26	671	
D113332	YGLY27636	N/A	YGLY13979 att1::URA5	106	0.75	1.2	1256	

FIG. 17

【 図 1 8 - 1 】

サッカーロミセス転写因子 GAL4 及び OH<sub>2</sub> polYmorpha AIT1 様に相応な PpATT1

```

100
(1) MEGISKPGFGENKEMAKRELSDLELVLESRLESASSALINSPPSPQNSMLSNHSHIKPTISRTISSSSYYHQHTPSIHGSHRHLHIFHNNSY
(1) -----MHHKERL-----
(1) MHHKERL
(1) -----MHHKERL-----

200
(101) FPGRTIKRPPSSLEDDIAEEAGYVENSIRKPIIEQAGDSRFRKIKRKEIKKCSKQDHEVMSVSRWRSPLTRALTKVENRKAQETLIK
PpATT1 00 (6) IDHISS-ESMSLSISSMSPSHESNSP-NPMLIEQAGDSRFRKIKRKEIKKCSKQDHEVMSVSRWRSPLTRALTKVENRKAQETLIK
SgAL4 00 (1) -----MKLSSIEQAGDIPRLKIKRKEIKKCSKQDHEVMSVSRWRSPLTRALTKVENRKAQETLIK-----
(101) IDHISS-ESMSLSISSMSPSHESNSP NPMLIEQAGDSRFRKIKRKEIKKCSKQDHEVMSVSRWRSPLTRALTKVENRKAQETLIK

300
(201) AFFREDLEMLGCRSTRSESSIGSLOKFNMSAYSLEKRNKONTSSTOTMOVFSLSSSTSFKKEITPQQLSPLPEFEMTILSNITFDWSEDFEE
PpATT1 00 (104) VFTQSDQQLL-EKRTLSNSHGSPNSNSVSPON-SSPKVSDSSSTIAEPAPVPSKPKSSRPVDPDYFLNDEIN-EFDWEEDTFE
SgAL4 00 (71) IFFREDLMLKMSLQDILKLLTG-----LTYQNNM-----QAVT
(201) VFTQSDQQLL EKRTLSNSHGSPNSNSVSPON SSPKSDSSSTIAEPAPVPSKPKSSRPVDPDYFLNDEIN GFDWEEDTFE

400
(301) REKGLMAGSFPSSSTSLHEPKNSVTSNSLDHLHISQAKSSTISTIKNSKSLTSPILPAPVAFSIFDGMGNPTKSSFLVGSSSSFLRWKIDK
PpATT1 00 (194) DQLLWQO-P-PTVSQSTNSVSHRRSRKNSVTSLSLAELHEQSGSSLTSPSLOP-SQITINDSHPDGMALSWNLKGGSG
SgAL4 00 (109) DRLASLMDP-----TLRFRIGATSSSEBSKWRQRLIVSLSAHHIDSLIPIIDPFRDALHGDSWEDDMSGLPFLKTDPA
(301) DQLLWQO P PTVSQSTNSVSHRRSRKNSVTSLSLAELHEQSGSSLTSPSLOP-SQITINDSHPDGMALSWNLKGGSG
  
```

FIG. 18-1

【 図 1 8 - 2 】

```

500
(401) IDEEDVAFVNSADIDDFVADDTFLSNNSSSETRCKMSPPVNTMFLKQVYVGLKRGKEMKNGEELQQLMKRSTDEFLQSTIRYHTST
PpATT1 00 (279) -----YFGSSSGLLRALKLGGDSASISPKNSVNSKNTPEPOSTRSLGLGPNDFLE-PEKKAFFPYDSHLNDPNNSQYQAVTKYHTSY
SgAL4 00 (193) -----NCHFGCSLLELHSLGKPEVINSWNRPIIMLDRYLAS-----RSTISRLQSLNHFHYC
(401) YFGSSSGLLRALKLGGDSASISPKNSVNSKNTPEPOSTRSLGLGPNDFLE PEKKAFFPYDSHLNDPNNSQYQAVTKYHTSY

600
(501) FFKHETFKHTRKQKPMVAHQILMFLNMLALCKWGLHGHHTIDLYAFKAKKANTCANFEEDNMLLSLINSFKRKNPNSWMLGJAV
PpATT1 00 (373) FFKHGSFLKHYAGELPKNEHMQILNVALALCKWGLHGHHTIDLYAFKAKKANTCANFEEDNMLLSLINSFKRKNPNSWMLGJAV
SgAL4 00 (256) FFKHSPILMLINNGELKASQKQGLFNGLLASHAGLIEEESPIIDFYGQWASHLTSKV-FEESGILMVALLSRITMOKRKNPNSWMLGJAV
(501) FFKHGSFLKHYAGELPKNEHMQILNVALALCKWGLHGHHTIDLYAFKAKKANTCANFEEDNMLLSLINSFKRKNPNSWMLGJAV

700
(601) RVALSGLMKKEFNCSNSRETKEDLNLEIKRRIMWGLYFDAGASITFPRPILPPEPVMKMSNINDFESQITIAMOCONIVTEENKPPFLL
PpATT1 00 (472) RVALSGLMKKEFNCSNSRETKEDLNLEIKRRIMWGLYFDAGASITFPRPILPPEPVMKMSNINDFESQITIAMOCONIVTEENKPPFLL
SgAL4 00 (354) RVALSGLMKKEFNCSNSRETKEDLNLEIKRRIMWGLYFDAGASITFPRPILPPEPVMKMSNINDFESQITIAMOCONIVTEENKPPFLL
(601) RVALSGLMKKEFNCSNSRETKEDLNLEIKRRIMWGLYFDAGASITFPRPILPPEPVMKMSNINDFESQITIAMOCONIVTEENKPPFLL

800
(701) YSGLIQQOQFTELSMKNRYSKPPAP-----IIVVEELDMAMELENFKGLPAYHESNEJANSQFYKYPKSYDSDSNKQVDYTRLPQWDLRSRSLW
PpATT1 00 (426) YSGLIQQOQFTELSMKNRYSKPPAP-----IIVVEELDMAMELENFKGLPAYHESNEJANSQFYKYPKSYDSDSNKQVDYTRLPQWDLRSRSLW
SgAL4 00 (701) YSGLIQQOQFTELSMKNRYSKPPAP IVEECLDMAMELENFKGLPAYHESNEJANSQFYKYPKSYDSDSNKQVDYTRLPQWDLRSRSLW
(701) YSGLIQQOQFTELSMKNRYSKPPAP IVEECLDMAMELENFKGLPAYHESNEJANSQFYKYPKSYDSDSNKQVDYTRLPQWDLRSRSLW
  
```

FIG. 18-2

【 18 - 3 】

900  
 HbATT1 aa (792) RYKMLQILFRPFIWRIKGLIS-NPEMESEKLEKWERRTCIWAESTIKSTIDKTY---KNGEHLSTIILAWYATVLEQAVLIPFACLQSSSS-S  
 PpATT1 aa (862) RYKMLQILFRPFIWRIKGLIS-NPKYLQCKTSRRCRTIOLRWAEHLISLQDFWIDDQDFSRISYIGCCQYATVLEQAVLIPFACLQSSSS-S  
 SgGAL4 aa (508) KQLSLIILVDFDFNF-TOKKSQLEQQDQI-QSTVEWAGCSIMLSDWAKGMSMSYM---DHHNVPYFANGSLEFLWAVLIPFACLQSSSS-S  
 コンヤチス (801) RYKMLQILFRPFIWRIKGLIS-NPKYLQCKTSRRCRTIOLRWAEHLISLQDFWIDDQDFSRISYIGCCQYATVLEQAVLIPFACLQSSSS-S  
 K  
 1000  
 HbATT1 aa (886) FSIWMDIINRANALIMRNSNSKSLKLVNKLQKRS---TPSSKQIPSEKQ-----FASYPVAVNS---ISSDDELSHIPS  
 PpATT1 aa (760) YAPWTEIDIQSKKFKLKLNSLASKANVDRSGMMPQDTSAKQSLNIND---LDMHFLGNSPAPGCSNNINNTKSSP  
 SgGAL4 aa (602) ENNETAQLQDQIVMLLKLAFKIQIGEKYQVLEFGAPFLSDCAPIPLHUSYMSGSAIKNI-VGSAIQAQPTLPEEN---VNIISKYYSP  
 コンヤチス (901) YAPWTEIDIQSKKFKLKLNSLASKANVDRSGMMPQDTSAKQSLNIND---LDMHFLGNSPAPGCSNNINNTKSSP  
 LDMHFLGNSPAPGCSNNINNTKSSP  
 1100  
 HbATT1 aa (964) SCAFARIPITVSDGSKAKLIF---PSKFNINVEDISAKNIEFVSLEYLVNLDITNPDSAMFDFEKRRKLSNEMKPFSSSLELNTGHTT  
 PpATT1 aa (844) STINRTRPNTINKNSMNNNS---INNFNNNSNN---NSFSSSKAGPKQEFEDYCLKIDPEDEMSALEFVAWRFPNSATITAPPTVNG  
 SgGAL4 aa (898) GSKGSPVPLKSGASPSFQIKLISRPPSPSPVTPRSTPSHSVYFPLGGQQQLSIVLPLPSALFGANFAGSSNIADSSLPTITKSSNQPLIIT  
 コンヤチス (1001) STINRTRPNTINKNSMNNNS---INNFNNNSNN---NSFSSSKAGPKQEFEDYCLKIDPEDEMSALEFVAWRFPNSATITAPPTVNG  
 1198  
 HbATT1 aa (1060) SA---SASVALINNFIDLRPTLHKQKQNS---NKKELLNITYSMLDFEITDFWAFSV  
 PpATT1 aa (935) NS---PENIKISTVDFELKAKQDF---NIKELLNINSLIFDSDMPPNSFGSMERNDILEVPTDTMD  
 SgGAL4 aa (798) QINSAQLSQTASSNINNFNNNETASKIDGQNSKPLSPRWTDQAYNAFGITTGMTTITMDVYVLEDFEITDFWAFSV  
 コンヤチス (1101) NS---PENIKISTVDFELKAKQDF---NIKELLNINSLIFDSDMPPNSFGSMERNDILEVPTDTMD  
 NNKELLNINSLIFDSDMPPNSFGSMERNDILEVPTDTMD

FIG. 18-3

【 19 A 】

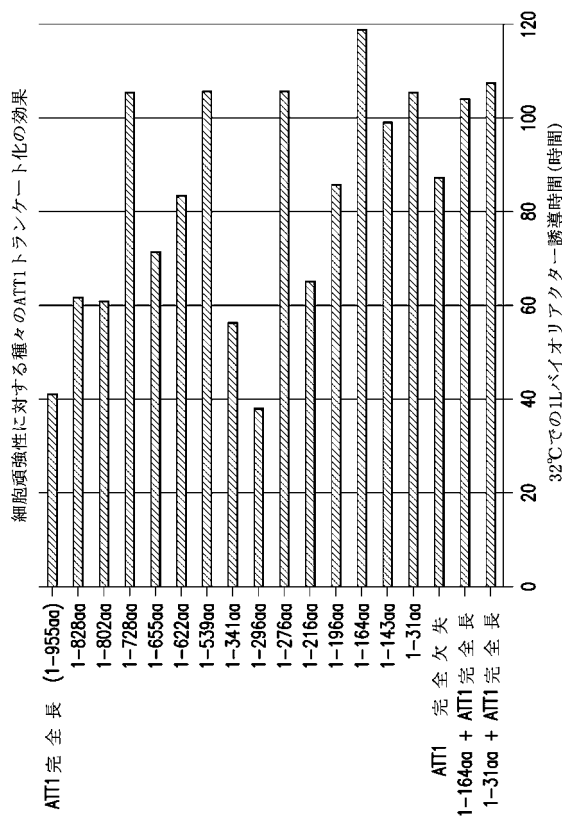


FIG. 19A

【 19 B 】

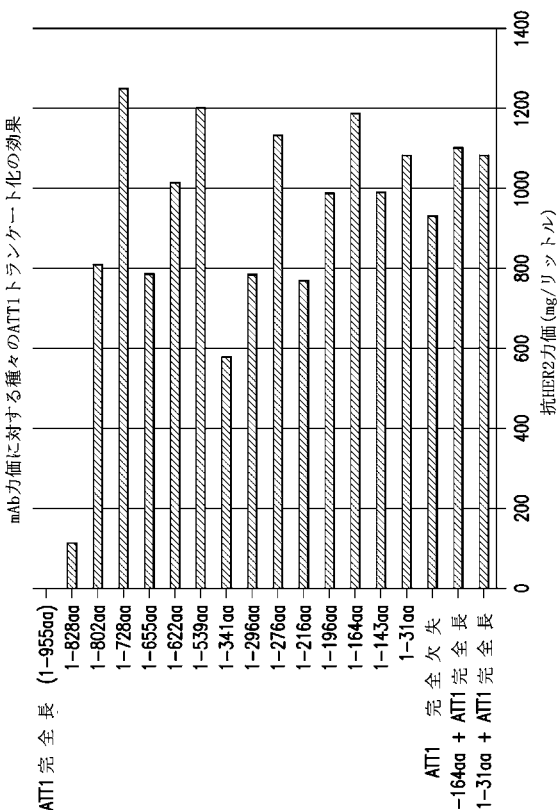


FIG. 19B

【 20 】

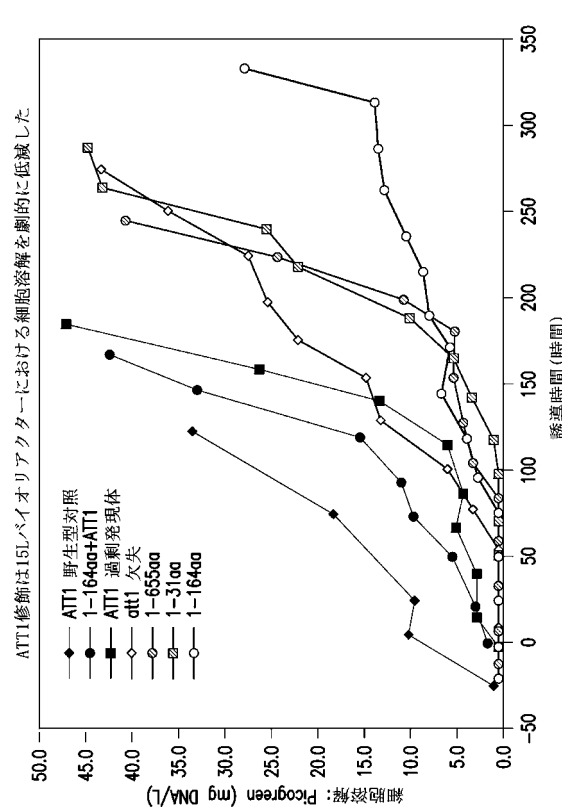


FIG. 20



【 図 2 1 】

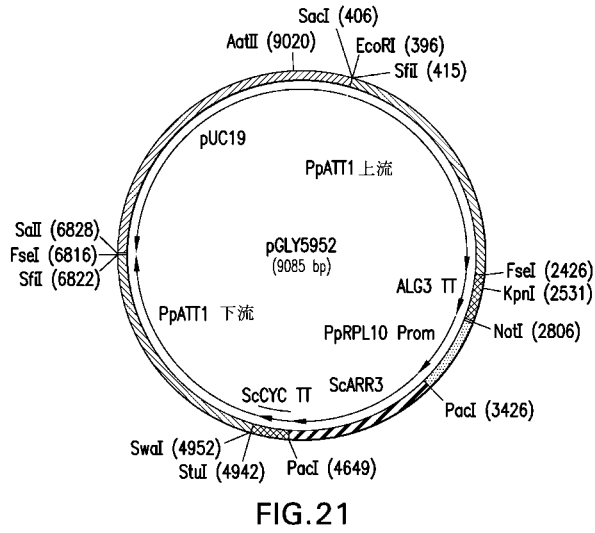


FIG.21

【 図 2 2 】

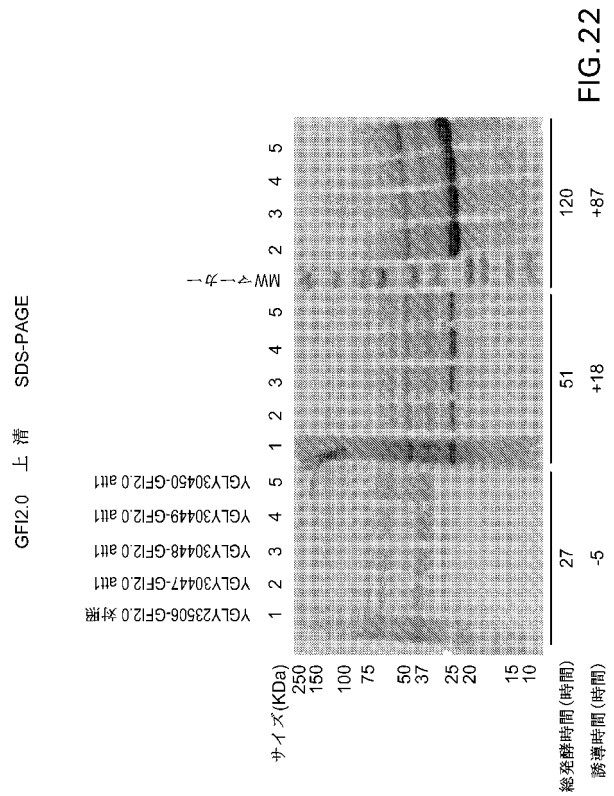


FIG.22

【 図 2 3 】

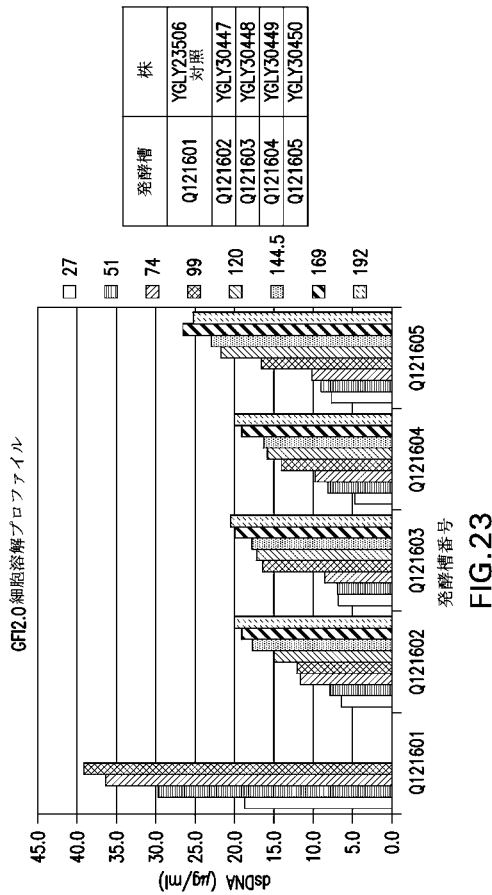


FIG.23

【 図 2 4 】

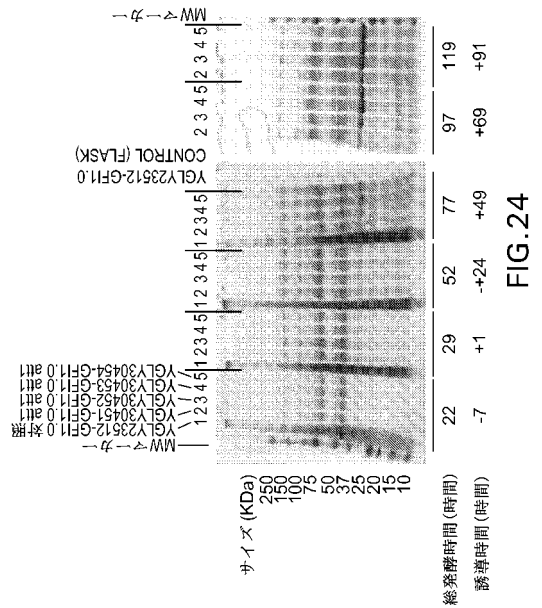


FIG.24

【 図 2 5 】

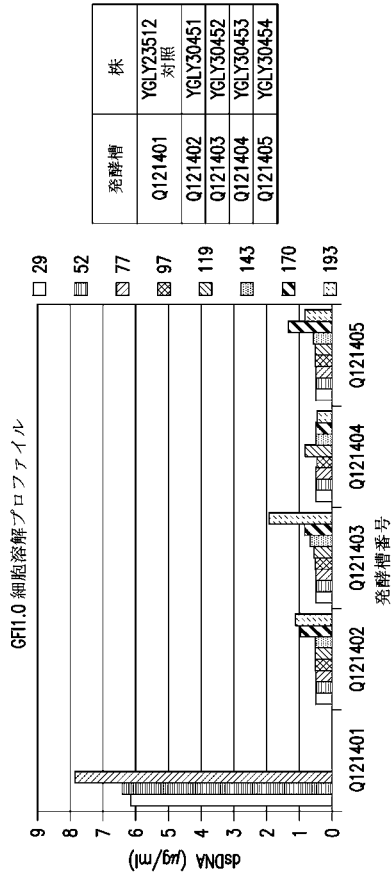


FIG.25

【 配列表 】

[2014532406000001.app](#)

【 国際調査報告 】

PCT/US2012/061432 07.01.2013

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US 12/61432

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - C12N 15/09, C07H 21/04 (2012.01) USPC - 435/471, 536/23.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) - C12N 15/09, C07H 21/04 (2012.01) USPC - 435/471, 536/23.1 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC: 435/254.11, 255.1, 257.2, 471; 536/23.1 (keyword limited; terms below) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatBase; PubWEST (PGPB, USPT, USOC, EPAB, JPAB); Google and PubMed. Search Terms: ATT1, LAC9, KIGAL4, acquiring thermal tolerance, Pichia pastoris, Kluyveromyces lactis, knockout, antibody, SEQ ID NO:7																
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>																
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X ---</td> <td>KUBERL, A. et al. Pichia pastoris CBS 7435 chromosome 1, complete replicon sequence. GenBank Accession No. FR839628 [online]. 25 July 2011 [Retrieved on 13 December 2012]. Retrieved from the internet: &lt;URL: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/328349772">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/328349772</a>&gt;; nucleotides 2727144-2730131</td> <td>36 and 38/(36) 1-3, 19-20, 21/(19,20), 37, 38/(37) and 39</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>ZACHARIAE, W. et al. Glucose repression of lactose/galactose metabolism in Kluyveromyces lactis is determined by the concentration of the transcriptional activator LAC9 (K1GAL4). Nucleic Acids Res. 1993, Vol. 21, No. 1, pages 69-77: abstract; pg 71, para 2; pg 74, para 7</td> <td>1-3, 19-20, 21/(19,20), 37, 38/(37) and 39</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 2006/0211085 A1 (BOBROWICZ) 21 September 2006 (21.09.2006) para [0004], [0009], [0011]-[0012], [0038], [0094].</td> <td>3, 20 and 21/(19,20)</td> </tr> <tr> <td>A,P</td> <td>KRIJGER, J.J. et al. A novel, lactase-based selection and strain improvement strategy for recombinant protein expression in Kluyveromyces lactis. Microb. Cell Fact. 20 August 2012, Vol. 11:112, pages 1-12, entire document.</td> <td>1-3, 19-20, 21/(19,20), 36-37, 38/(36,37) and 39</td> </tr> </tbody> </table>	Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X ---	KUBERL, A. et al. Pichia pastoris CBS 7435 chromosome 1, complete replicon sequence. GenBank Accession No. FR839628 [online]. 25 July 2011 [Retrieved on 13 December 2012]. Retrieved from the internet: <URL: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/328349772">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/328349772</a> >; nucleotides 2727144-2730131	36 and 38/(36) 1-3, 19-20, 21/(19,20), 37, 38/(37) and 39	Y	ZACHARIAE, W. et al. Glucose repression of lactose/galactose metabolism in Kluyveromyces lactis is determined by the concentration of the transcriptional activator LAC9 (K1GAL4). Nucleic Acids Res. 1993, Vol. 21, No. 1, pages 69-77: abstract; pg 71, para 2; pg 74, para 7	1-3, 19-20, 21/(19,20), 37, 38/(37) and 39	Y	US 2006/0211085 A1 (BOBROWICZ) 21 September 2006 (21.09.2006) para [0004], [0009], [0011]-[0012], [0038], [0094].	3, 20 and 21/(19,20)	A,P	KRIJGER, J.J. et al. A novel, lactase-based selection and strain improvement strategy for recombinant protein expression in Kluyveromyces lactis. Microb. Cell Fact. 20 August 2012, Vol. 11:112, pages 1-12, entire document.	1-3, 19-20, 21/(19,20), 36-37, 38/(36,37) and 39	<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.														
X ---	KUBERL, A. et al. Pichia pastoris CBS 7435 chromosome 1, complete replicon sequence. GenBank Accession No. FR839628 [online]. 25 July 2011 [Retrieved on 13 December 2012]. Retrieved from the internet: <URL: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/328349772">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/328349772</a> >; nucleotides 2727144-2730131	36 and 38/(36) 1-3, 19-20, 21/(19,20), 37, 38/(37) and 39														
Y	ZACHARIAE, W. et al. Glucose repression of lactose/galactose metabolism in Kluyveromyces lactis is determined by the concentration of the transcriptional activator LAC9 (K1GAL4). Nucleic Acids Res. 1993, Vol. 21, No. 1, pages 69-77: abstract; pg 71, para 2; pg 74, para 7	1-3, 19-20, 21/(19,20), 37, 38/(37) and 39														
Y	US 2006/0211085 A1 (BOBROWICZ) 21 September 2006 (21.09.2006) para [0004], [0009], [0011]-[0012], [0038], [0094].	3, 20 and 21/(19,20)														
A,P	KRIJGER, J.J. et al. A novel, lactase-based selection and strain improvement strategy for recombinant protein expression in Kluyveromyces lactis. Microb. Cell Fact. 20 August 2012, Vol. 11:112, pages 1-12, entire document.	1-3, 19-20, 21/(19,20), 36-37, 38/(36,37) and 39														
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "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 27 December 2012 (27.12.2012)	Date of mailing of the international search report <b>07 JAN 2013</b>															
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774															

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

PCT/US2012/061432 07.01.2013

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 12/61432

Box No. 1 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 filed or furnished:

a. (means)

on paper

in electronic form

b. (time)

in the international application as filed

together with the international application in electronic form

subsequently to this Authority for the purposes of search

2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

GenCore 6.4.1: SEQ ID NO: 7.

PCT/US2012/061432 07.01.2013

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 12/61432

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.: 4-18, 22-35, and 40  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

## フロントページの続き

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, 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, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, 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, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(74) 代理人 100119253

弁理士 金山 賢教

(74) 代理人 100124855

弁理士 坪倉 道明

(74) 代理人 100129713

弁理士 重森 一輝

(74) 代理人 100137213

弁理士 安藤 健司

(74) 代理人 100146318

弁理士 岩瀬 吉和

(74) 代理人 230105223

弁護士 城山 康文

(72) 発明者 ジアーン, ボー

アメリカ合衆国、ニュー・ハンプシャー・03766、レバノン、ラファイエット・ストリート・21、スイート・200

(72) 発明者 アーギロス, レベツカ, デイ

アメリカ合衆国、ニュー・ハンプシャー・03766、レバノン、ラファイエット・ストリート・21、スイート・200

(72) 発明者 ネルソン, ステファニー

アメリカ合衆国、ニュー・ハンプシャー・03766、レバノン、ラファイエット・ストリート・21、スイート・200

(72) 発明者 デイビッドソン, ロバート, シー

アメリカ合衆国、ニュー・ハンプシャー・03766、レバノン、ラファイエット・ストリート・21、スイート・200

(72) 発明者 チエン, ローンファ

アメリカ合衆国、マサチューセッツ・02115-5727、ボストン、アベニュー・ルイス・パスツール・33

(72) 発明者 ジュアーン, ジュイン

アメリカ合衆国、マサチューセッツ・02115-5727、ボストン、アベニュー・ルイス・パスツール・33

F ターム(参考) 4B024 AA20 BA41 CA03 CA20 EA04 GA14 HA01

4B064 AG01 AG27 CA06 CA19 CC24

4B065 AA72X AA76X AA77X AB01 AC14 BA03 CA24 CA25 CA26