

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載
 【部門区分】第1部門第1区分
 【発行日】令和2年8月6日(2020.8.6)

【公表番号】特表2018-522565(P2018-522565A)
 【公表日】平成30年8月16日(2018.8.16)
 【年通号数】公開・登録公報2018-031
 【出願番号】特願2018-506219(P2018-506219)
 【国際特許分類】

C 1 2 N 15/11 (2006.01)

C 1 2 N 15/81 (2006.01)

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 P 21/02 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/11 Z

C 1 2 N 15/81 Z N A Z

C 1 2 N 1/15

C 1 2 P 21/02 C

【手続補正書】

【提出日】令和2年6月29日(2020.6.29)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

単離および/または人工 p G 1 - x プロモーターであって、p G 1 - x プロモーターは、以下のプロモーター領域：

a) 少なくとも2つのコア調節プロモーター領域、ここで、前記各コア調節プロモーター領域は配列番号2および配列番号3のヌクレオチド配列を含み、かつ、前記コア調節プロモーター領域は配列番号1のヌクレオチド配列内の対応する領域と少なくとも80%の配列同一性を有する；ならびに

b) 前記少なくとも2つのコア調節プロモーター領域以外の、p G 1 - x プロモーター配列内の任意の領域である非コア調節プロモーター領域、ここで、前記非コア調節プロモーター領域は配列番号1のヌクレオチド配列内の対応する領域と少なくとも50%の配列同一性を有する、

を含み、

前記 p G 1 - x プロモーターは、配列番号1で表される p G 1 プロモーターの 2 9 3 b p と少なくとも80%同一であり；かつ、

前記 p G 1 - x プロモーターは、前記 p G 1 プロモーターと比較して、プロモーター強度の増加、および/または誘導比の増加を特徴とし、この場合、

・前記プロモーター強度の増加が、誘導状態において、前記 p G 1 プロモーターと比較して、少なくとも1.1倍増大しており、かつ

・前記誘導比の増加が、前記 p G 1 プロモーターと比較して、少なくとも1.1倍増大している、

p G 1 - x プロモーター。

【請求項2】

配列番号2および/または配列番号3のヌクレオチド配列が、1つ以上の転写因子結合

性部位 (TFBS) を含む、請求項 1 に記載の pG1-x プロモーター。

【請求項 3】

前記コア調節プロモーター領域の少なくとも 1 つが、(i) 配列番号 4 のヌクレオチド配列、または (ii) 配列番号 2 および配列番号 3 のヌクレオチド配列を含み、配列番号 4 のヌクレオチド配列と少なくとも 80% の配列同一性を有する配列番号 4 のヌクレオチド配列の機能的変異体を含み、前記コア調節プロモーター領域は 1 つ以上の TFBS を含む、請求項 1 に記載の pG1-x プロモーター。

【請求項 4】

前記コア調節プロモーター領域の少なくとも 1 つが、(i) 配列番号 5 のヌクレオチド配列、または (ii) 配列番号 2 および配列番号 3 のヌクレオチド配列を含み、配列番号 5 のヌクレオチド配列と少なくとも 80% の配列同一性を有する配列番号 5 のヌクレオチド配列の機能的変異体を含む主要調節領域に組み込まれ、前記コア調節プロモーター領域は 1 つ以上の TFBS を含む、請求項 1 に記載の pG1-x プロモーター。

【請求項 5】

グルコース輸送転写調節因子 (Rgt1)、垂鉛クラスター転写活性化因子 1 (Cat8-1)、および垂鉛クラスター転写活性化因子 2 (Cat8-2) からなる群から選択される転写因子に対する TFBS を含む、請求項 1 に記載の pG1-x プロモーター。

【請求項 6】

前記コア調節プロモーター領域の少なくとも 1 つが、配列番号 2 および配列番号 3 のヌクレオチド配列を含み、配列番号 2 のヌクレオチド配列と配列番号 3 のヌクレオチド配列との間に、1 つ以上のヌクレオチドの欠失を含む、請求項 1 に記載の pG1-x プロモーター。

【請求項 7】

前記主要調節領域の少なくとも 2 つのコピーを含む、請求項 4 に記載の pG1-x プロモーター。

【請求項 8】

配列番号 12 ~ 29 のヌクレオチド配列のうちの何れか 1 つにより特定される、少なくとも 1 つまたは少なくとも 2 つのチミン (T) モチーフを含む、請求項 1 に記載の pG1-x プロモーター。

【請求項 9】

前記 T モチーフが、前記少なくとも 1 つのまたは両方のコア調節プロモーター領域の上流に配置される、請求項 8 に記載の pG1-x プロモーター。

【請求項 10】

前記 T モチーフが、前記少なくとも 1 つのまたは両方のコア調節プロモーター領域の下流に配置される、請求項 8 に記載の pG1-x プロモーター。

【請求項 11】

a) 配列番号 37 ~ 44、または配列番号 45 ~ 76 のうちの何れか；
b) 配列番号 77 ~ 80、または配列番号 81 ~ 112 のうちの何れか；
c) 配列番号 113 ~ 114、または配列番号 115 ~ 130 のうちの何れか；
d) 配列番号 131 ~ 132、または配列番号 133 ~ 148 のうちの何れか；または
e) 配列番号 185 ~ 186、または配列番号 187 ~ 202 のうちの何れか；
f) 前出のいずれかと少なくとも 80% の配列同一性を有し、少なくとも 2 つのコア調節プロモーター領域を含むヌクレオチド配列であって、前記各コア調節プロモーター領域は配列番号 2 および配列番号 3 のヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含むかまたはこれらからなる、単離および/または人工 pG1-x プロモーター。

【請求項 12】

前記ヌクレオチド配列は、配列番号 45 ~ 76 のヌクレオチド配列の何れかと少なくとも 80% の配列同一性を有し、以下：

a) 前記配列が、1 つ以上の TFBS を含み、前記 1 つ以上の TFBS が、Rgt1、

Cat 8 - 1、およびCat 8 - 2からなる群から選択される転写因子のうちの何れかに対するTFBSであること；

b) 前記コア調節プロモーター領域の少なくとも1つが、配列番号4のヌクレオチド配列、または1つ以上のTFBSを含む、配列番号4のヌクレオチド配列と少なくとも80%の配列同一性を有するその機能的変異体を含むこと；

c) 前記コア調節プロモーター領域の少なくとも1つが、配列番号5のヌクレオチド配列、または1つ以上のTFBSを含む、配列番号5のヌクレオチド配列と少なくとも80%の配列同一性を有するその機能的変異体を含む主要調節領域に組み込まれていること；

d) 前記コア調節プロモーター領域の少なくとも1つが、配列番号2および配列番号3のヌクレオチド配列を含み、配列番号2のヌクレオチド配列と配列番号3のヌクレオチド配列との間に、1つ以上のヌクレオチドの欠失を含むこと；

e) 前記配列が、配列番号5のヌクレオチド配列、または配列番号5のヌクレオチド配列と少なくとも80%の配列同一性を有するその機能的変異体を含む、主要調節領域を少なくとも2つ含むこと；

f) 前記配列が、配列番号12～29のヌクレオチド配列のうちの何れか1つにより特定される、少なくとも1つまたは少なくとも2つのTモチーフを含むこと；

g) 前記配列が、翻訳開始部位の少なくとも一部を含む、3'末端のヌクレオチド配列を含むこと；

h) 前記配列は、最大で2000bpの長さを有すること

のうちの1つ以上を含む、請求項11に記載のpG1-xプロモーター。

【請求項13】

請求項1に記載のpG1-xプロモーターを含む、単離pG1-xプロモーター核酸、またはその相補的配列を含む核酸。

【請求項14】

対象のタンパク質(POI:protein of interest)をコードするヌクレオチド配列に、作動可能に連結されており、前記POIをコードするヌクレオチド配列と、天然では会合しない、請求項13に記載のpG1-xプロモーター核酸。

【請求項15】

請求項13に記載の核酸を含む発現構築物。

【請求項16】

請求項15に記載の発現構築物を含む組換え宿主細胞。

【請求項17】

請求項16に記載の組換え宿主細胞系を培養すること(culturing)により、POIを作製する方法であって、

a) 前記POIを発現させる条件下で、前記細胞系を培養する(cultivating)工程と、

b) 前記POIを回収する工程とを含む方法。

【請求項18】

培養が、

a) 基本炭素供給源を使用することでpG1-xプロモーターを抑制する、第1の工程と、これに続く

b) 補充炭素供給源を使用しないか、または限定量の補充炭素供給源を使用することで前記pG1-xプロモーターの抑制を解除して、前記POIの産生を誘導する第2の工程と

を含む、請求項17に記載の方法。

【請求項19】

前記pG1-xプロモーターが、配列番号37～44のヌクレオチド配列のうちの何れかである、請求項18に記載の方法。

【請求項20】

前記 p G 1 - x プロモーターが、配列番号 3 9 のヌクレオチド配列により特徴付けられる、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記宿主細胞が真核細胞である、請求項 1 6 に記載の組換え宿主細胞。

【請求項 2 2】

前記真核細胞が酵母細胞または糸状真菌細胞である、請求項 2 1 に記載の組換え宿主細胞。

【請求項 2 3】

前記真核細胞がサッカロミセス (Saccharomyces) 属またはピキア (Pichia) 属の酵母細胞である、請求項 2 1 に記載の組換え宿主細胞。

【請求項 2 4】

前記少なくとも 2 つのコア調節プロモーター領域が同一である、請求項 1 に記載の p G 1 - x プロモーター。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 3 4 7

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 3 4 7】

【表 6】

	pG1 (P _{GTH1})	pG1- Δ8	pG1-Δ9	pG1- T16	pG1- T18	pG1- T20	pG1- D1240	pG1- D1427
抑制	6.1	5.8	9.4	5.4	6.7	5.3	5.3	5.5
誘導	15.3	11.0	21.4	17.0	20.8	16.2	21.6	22.9
発現レベル	1.00	0.72	1.40	1.11	1.36	1.06	1.41	1.49
誘導比	2.52	1.89	2.27	3.12	3.10	3.03	4.05	4.18

以下に、出願当初の特許請求の範囲に記載された発明を付記する。

[1] 配列番号 1 により特定される、メタノール資化酵母 (Pichia pastoris) の、炭素供給源により調節可能な p G 1 プロモーターの機能的変異体である、単離および/または人工 p G 1 - x プロモーターであって、その p G 1 - x プロモーターは、少なくとも 2 9 3 b p の長さを有する配列番号 1 の少なくとも一部からなるかまたはこれを含み、以下のプロモーター領域：

a) 配列番号 2 および配列番号 3 のヌクレオチド配列を含む、少なくとも 1 つのコア調節領域；ならびに

b) 前記コア調節領域以外の、p G 1 - x プロモーター配列内の任意の領域である非コア調節領域、を特徴とし、

前記 p G 1 - x プロモーターが、前記プロモーター領域のうちの何れかにおける、少なくとも 1 つの突然変異と、配列番号 2 および配列番号 3 における、少なくとも 8 0 % の配列同一性と、配列番号 2 または配列番号 3 以外の任意の領域における、少なくとも 5 0 % の配列同一性とを含み；さらに、

前記 p G 1 - x プロモーターが、前記 p G 1 プロモーターと比較して、同じであるかまたは増大させた、プロモーター強度および誘導比を特徴とし、この場合、

・前記プロモーター強度が、誘導状態において、前記 p G 1 プロモーターと比較して、少なくとも 1 . 1 倍増大しており、かつ/または

・前記誘導比が、前記 p G 1 プロモーターと比較して、少なくとも 1 . 1 倍増大している、

p G 1 - x プロモーター。

[2] 配列番号 2 および/または配列番号 3 が、1 つ以上の転写因子結合性部位 (T F

B S) を含む、 [1] に記載の p G 1 - x プロモーター。

[3] 前記コア調節領域が、配列番号 4 のヌクレオチド配列、または 1 つ以上の T F B S を含む、その機能的変異体、好ましくは、少なくとも 8 0 % の配列同一性を伴う機能的変異体を含む、 [1] または [2] に記載の p G 1 - x プロモーター。

[4] 前記コア調節領域を、配列番号 5、または前記 1 つ以上の T F B S を含む、その機能的変異体、好ましくは、少なくとも 8 0 % の配列同一性を伴う機能的変異体により表される主要調節領域へと組み込んだ、 [1] ~ [3] の何れか一つに記載の p G 1 - x プロモーター。

[5] 前記 1 つ以上の T F B S が、R g t 1、C a t 8 - 1、および C a t 8 - 2 からなる群から選択される転写因子のうちの何れかに対する T F B S である、 [1] ~ [4] の何れか一つに記載の p G 1 - x プロモーター。

[6] p G 1 配列の 5 ' 端において、1 つ以上のヌクレオチドの欠失を含む前記 p G 1 プロモーターの機能的変異体であって、好ましくは、前記 p G 1 配列の 3 ' 側領域、または前記 3 ' 側領域の機能的変異体のうちの、少なくとも 2 9 3 ヌクレオチドを残す、 [1] ~ [5] の何れか一つに記載の p G 1 - x プロモーター。

[7] 前記コア調節領域が、配列番号 2 のヌクレオチド配列と配列番号 3 のヌクレオチド配列との間に、1 つ以上のヌクレオチドの欠失を含む、 [1] ~ [6] の何れか一つに記載の p G 1 - x プロモーター。

[8] 前記コア調節領域または主要調節領域の、少なくとも 2 つのコピーを含む、 [1] ~ [7] の何れか一つに記載の p G 1 - x プロモーター。

[9] 配列番号 1 2 ~ 2 9 のうちの何れかにより特定される、少なくとも 1 つまたは少なくとも 2 つの T モチーフを含む、 [1] ~ [8] の何れか一つに記載の p G 1 - x プロモーター。

[1 0] T モチーフが、前記コア調節領域の上流に配置され、任意に、主要調節領域の上流に配置される、 [1] ~ [9] の何れか一つに記載の p G 1 - x プロモーター。

[1 1] T モチーフが、前記コア調節領域の下流に配置され、任意に、主要調節領域の下流に配置される、 [1] ~ [9] の何れか一つに記載の p G 1 - x プロモーター。

[1 2] 翻訳開始部位の少なくとも一部を含む、3 ' 末端のヌクレオチド配列を含む、 [1] ~ [1 1] の何れか一つに記載の p G 1 - x プロモーター。

[1 3] 2 0 0 0 b p 以下の長さを有する、 [1] ~ [1 2] の何れか一つに記載の p G 1 - x プロモーター。

[1 4] a) 配列番号 3 7 ~ 4 4、好ましくは、配列番号 4 5 ~ 7 6 のうちの何れか ;

b) 配列番号 7 7 ~ 8 0、好ましくは、配列番号 8 1 ~ 1 1 2 のうちの何れか ;

c) 配列番号 1 1 3 ~ 1 1 4、好ましくは、配列番号 1 1 5 ~ 1 3 0 のうちの何れか ;

d) 配列番号 1 3 1 ~ 1 3 2、好ましくは、配列番号 1 3 3 ~ 1 4 8 のうちの何れか ;

e) 配列番号 1 4 9 ~ 1 5 0、好ましくは、配列番号 1 5 1 ~ 1 6 6 のうちの何れか ;

f) 配列番号 1 6 7 ~ 1 6 8、好ましくは、配列番号 1 6 9 ~ 1 8 4 のうちの何れか ;

g) 配列番号 1 8 5 ~ 1 8 6、好ましくは、配列番号 1 8 7 ~ 2 0 2 のうちの何れか ;

h) 配列番号 2 0 3 ~ 2 0 4、好ましくは、配列番号 2 0 5 ~ 2 2 0 のうちの何れか ;

i) 配列番号 2 2 1 ~ 2 2 2、好ましくは、配列番号 2 2 3 ~ 2 3 8 のうちの何れか ;

j) 配列番号 2 3 9 ~ 2 4 0、好ましくは、配列番号 2 4 1 ~ 2 5 6 のうちの何れか ;

および

k) 配列番号 3 2 ~ 3 6 もしくは配列番号 2 5 7 ~ 2 5 9 ;

のうちの何れかからなる群から選択されるヌクレオチド配列を含むかまたはこれらからなる ;

または

l) 上記 a) ~ k) のうちの何れかの機能的変異体である、単離および / または人工 p G 1 - x プロモーターであって、

配列番号 1 により特定される、メタノール資化酵母 (Pichia pastoris) の、炭素供給源により調節可能な p G 1 プロモーターの機能的変異体である機能的変異体である、 p G

1 - x プロモーター。

[1 5] 前記ヌクレオチド配列のうちの何れかの機能的変異体、好ましくは、配列番号 4 5 ~ 7 6 のうちの何れかの機能的変異体であって、以下の特色：

a) 前記配列が、プロモーター配列の 5 ' 端において、1 つ以上のヌクレオチドの欠失を含み、好ましくは、前記プロモーター配列の 3 ' 側領域、または前記 3 ' 側領域の機能的変異体のうちの、少なくとも 2 9 3 ヌクレオチドを残す、上記 a) ~ k) の前記 p G 1 - x プロモーターのうちの何れかのプロモーター配列の機能的変異体であること；

b) 前記配列が、1 つ以上の T F B S を含み、好ましくは、前記 T F B S が、R g t 1、C a t 8 - 1、および C a t 8 - 2 からなる群から選択される転写因子のうちの何れかに対する T F B S であること；

c) コア調節領域が、配列番号 4 のヌクレオチド配列、または 1 つ以上の T F B S を含む、その機能的変異体、好ましくは、少なくとも 8 0 % の配列同一性を伴う機能的変異体を含むこと；

d) 前記コア調節領域を、配列番号 5、または前記 T F B S を含む、その機能的変異体、好ましくは、少なくとも 8 0 % の配列同一性を伴う機能的変異体により表される主要調節領域へと組み込んでいること；

e) 前記コア調節領域が、配列番号 2 のヌクレオチド配列と配列番号 3 のヌクレオチド配列との間に、1 つ以上のヌクレオチドの欠失を含むこと；

f) 前記配列が、前記コア調節領域または前記主要調節領域の、少なくとも 2 つのコピーを含むこと；

g) 前記配列が、配列番号 1 2 ~ 2 9 のうちの何れかにより特定される、少なくとも 1 つまたは少なくとも 2 つの T モチーフを含み、好ましくは、前記 T モチーフが、前記コア調節領域の上流または下流に配置され、任意に、前記主要調節領域の上流または下流に配置されること；

h) 前記配列が、翻訳開始部位の少なくとも一部を含む、3 ' 末端のヌクレオチド配列を含むこと；

i) 前記配列を、2 0 0 0 b p 以下の長さへと伸長させていること

のうちの 1 つ以上を特徴とする機能的変異体である、[1 4] に記載の p G 1 - x プロモーター。

[1 6] [1] ~ [1 5] の何れか一つに記載の p G 1 - x プロモーターを含む、単離 p G 1 - x プロモーター核酸、または相補的配列を含む核酸。

[1 7] 対象のタンパク質 (P O I : protein of interest) をコードするヌクレオチド配列に、作動可能に連結されており、前記 P O I をコードする前記ヌクレオチド配列と、天然では会合しない、[1 6] に記載の p G 1 - x プロモーター核酸。

[1 8] 前記 P O I の分泌を可能とするシグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列をさらに含み、好ましくは、前記シグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列が、前記 P O I をコードする前記ヌクレオチド配列の 5 ' 端に隣接して配置される、[1 7] に記載の核酸。

[1 9] [1 6] ~ [1 8] の何れか一つに記載の核酸を含む発現構築物、好ましくは、自己複製ベクターもしくは自己複製プラスミド、または宿主細胞の染色体 DNA へと組み込まれる、ベクターもしくはプラスミドである発現構築物。

[2 0] [1 9] に記載の発現構築物を含む組換え宿主細胞、好ましくは、真核細胞、より好ましくは、酵母細胞または糸状真菌細胞、より好ましくは、サッカロミセス (Sacc haromyces) 属またはピキア (Pichia) 属の酵母細胞である、組換え宿主細胞。

[2 1] [2 0] に記載の組換え宿主細胞系を培養すること (culturing) により、P O I を作製する方法であって、

a) 前記 P O I を発現させる条件下で、前記細胞系を培養する (cultivating) 工程と

、
b) 前記 P O I を回収する工程と
を含む方法。

[2 2] 培養が、

a) 基本炭素供給源を使用することで $pG1-x$ プロモーターを抑制する、第1の工程と、これに続く

b) 補充炭素供給源を使用しないか、または限量の補充炭素供給源を使用することで前記 $pG1-x$ プロモーターの抑制を解除して、前記 POI の産生を誘導する第2の工程とを含む、[2 1] に記載の方法。

[2 3] 前記第2の工程 b) が、増殖制限量の前記補充炭素供給源を供給して、比増殖速度を、 $0.001 h^{-1} \sim 0.2 h^{-1}$ 、好ましくは、 $0.005 h^{-1} \sim 0.15 h^{-1}$ の範囲内に保つ、フィード培地を援用する、[2 2] に記載の方法。

[2 4] a) 前記基本炭素供給源を、グルコース、グリセロール、エタノール、これらの混合物、および複合栄養物材料からなる群から選択し；

b) 前記補充炭素供給源が、ヘキソース、たとえば、グルコース、果糖、ガラクトースもしくはマンノース、二糖、たとえば、サッカロース、アルコール、たとえば、グリセロールもしくはエタノール、または前出のうちの何れかの混合物である、

[2 2] または [2 3] に記載の方法。

[2 5] 前記培養を、バイオリアクター内で、前記第1の工程としての回分期で始め、前記第2の工程としての流加期または連続培養期を後続させて実施する、[2 2] ~ [2 4] の何れか一つに記載の方法。

[2 6] 前記基本炭素供給源を、前記細胞系が消費するまで、前記回分期を実施する、[2 5] に記載の方法。

[2 7] 前記回分期が、酸素分圧 (pO_2) シグナルの持続的減少を特徴とし、前記回分期の終点が、 pO_2 の増大を特徴とする、[2 5] または [2 6] に記載の方法。

[2 8] 回分期中に、前記 pO_2 を、65%未満または低飽和へと減少させるのに続き、回分の終点では、65%を上回る増大または高飽和をもたらす、[2 7] に記載の方法。

[2 9] 前記回分期を、約20~36時間にわたり実施する、[2 5] ~ [2 8] の何れか一つに記載の方法。

[3 0] 前記回分期を、回分培地1L中45gのグリセロールを使用して実施し、培養を、25 で、約27~30時間にわたり、または30 で、約23~36時間にわたり実施する、[2 5] ~ [2 9] の何れか一つに記載の方法。

[3 1] 前記流加期中の前記培養を、約15~80時間、約15~70時間、約15~60時間、約15~50時間、約15~45時間、約15~40時間、約15~35時間、約15~30時間、約15~35時間、約15~25時間、または約15~20時間；好ましくは、約20~40時間のうちの何れかにわたり実施する、[2 5] ~ [3 0] の何れか一つに記載の方法。

[3 2] 前記流加期中の前記培養を、約80時間、約70時間、約60時間、約55時間、約50時間、約45時間、約40時間、約35時間、約30時間、約25時間、約20時間、または約15時間のうちの何れかにわたり実施する、[2 5] ~ [3 1] の何れか一つに記載の方法。

[3 3] 前記第2の工程 b) が、増殖制限量の前記補充炭素供給源を供給して、比増殖速度を、 $0.04 h^{-1} \sim 0.2 h^{-1}$ の範囲内に保つフィード培地を流加期において援用する、[2 5] ~ [3 2] の何れか一つに記載の方法。

[3 4] 約30 $mg (L h)^{-1}$ の空時収量を達成する、[2 5] ~ [3 3] の何れか一つに記載の方法。

[3 5] 前記流加期中の前記培養を、約30時間にわたり実施する、[3 4] の何れか一つに記載の方法。

[3 6] 組換え宿主細胞が、サッカロミセス (*Saccharomyces*) 属またはピキア (*Pichia*) 属またはコマガタエラ (*Komagataella*) 属のうちの何れかの酵母、好ましくは、メタノール資化酵母 (*Pichia pastoris*) またはコマガタエラ・パストリス (*Komagataella pa*

storis)である、[2 5] ~ [3 5]の何れか一つに記載の方法。

[3 7] 前記 p G 1 - x プロモーターが、配列番号 3 7 ~ 4 4 のうちの何れか、好ましくは、配列番号 4 5 ~ 7 6 のうちの何れかである、[2 5] ~ [3 6]の何れか一つに記載の方法。

[3 8] 前記 p G 1 - x プロモーターが、配列番号 3 9、好ましくは、配列番号 4 9 により特徴付けられる、[3 7]に記載の方法。

[3 9] 前記 P O I を、前記細胞の天然 p G A P プロモーターと比較して、少なくとも 1 5 % の転写速度で作製する、[2 1] ~ [3 8]の何れか一つに記載の方法。

[4 0] 前記 P O I が、好ましくは、抗体もしくはその断片、酵素およびペプチド、タンパク質抗生剤、毒素融合タンパク質、炭水化物 - タンパク質コンジュゲート、構造タンパク質、調節タンパク質、ワクチンおよびワクチン様タンパク質もしくは粒子、プロセッシング酵素、増殖因子、ホルモン、ならびにサイトカイン、または P O I の代謝物を含む治療用タンパク質から選択される異種タンパク質である、[2 1] ~ [3 9]の何れか一つに記載の方法。

【**手続補正 3**】

【**補正対象書類名**】明細書

【**補正対象項目名**】配列表

【**補正方法**】変更

【**補正の内容**】

【**配列表**】

2018522565000001.app