

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6085605号  
(P6085605)

(45) 発行日 平成29年2月22日(2017.2.22)

(24) 登録日 平成29年2月3日(2017.2.3)

(51) Int. Cl.			F I		
<b>C 1 2 P</b>	<b>21/02</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 P	21/02	C
<b>C 1 2 N</b>	<b>15/09</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N	15/00	Z N A A
<b>C 1 2 N</b>	<b>1/19</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N	1/19	

請求項の数 24 (全 34 頁)

(21) 出願番号	特願2014-527671 (P2014-527671)
(86) (22) 出願日	平成24年8月31日(2012.8.31)
(65) 公表番号	特表2014-525255 (P2014-525255A)
(43) 公表日	平成26年9月29日(2014.9.29)
(86) 国際出願番号	PCT/EP2012/066949
(87) 国際公開番号	W02013/030329
(87) 国際公開日	平成25年3月7日(2013.3.7)
審査請求日	平成27年8月28日(2015.8.28)
(31) 優先権主張番号	11179496.2
(32) 優先日	平成23年8月31日(2011.8.31)
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者	504135837
	ベーリンガー インゲルハイム エルツェーファウ ゲゼルシャフト ミット ベシユレンクテル ハフツング ウント コンパニー コマンディトゲゼルシャフト
	オーストリア アー1121 ヴィーン
	ドクトル ベーリンガー ガッセ 5-11
(73) 特許権者	516257822
	ヴェーテナー・テクノロジー・ゲーエムベーハー
	VTU Technology GmbH
	オーストリア国、アー8074 グラム
	バッハ、パルクリング 18

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 タンパク質発現

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の工程を含む、対象とする組換えタンパク質またはポリペプチドを生産する方法：

- 以下を含む遺伝子改変酵母細胞を提供する工程：

a) 対象とするタンパク質またはポリペプチドをコードする組換え核酸分子を含む分泌カセット、および

b) 宿主細胞のゲノムにおいて天然に生じ、かつ、前記細胞内におけるポリペプチドまたはタンパク質の生合成を支援するポリペプチドまたはタンパク質をコードする少なくとも1つの遺伝子と作動可能に連結した少なくとも1つの組換えプロモーターであって、前記少なくとも1つの遺伝子が遺伝的に改変されていない野生型酵母細胞の前記少なくとも1つの遺伝子の生来のゲノム座位に位置しており、該生合成を支援するポリペプチドまたはタンパク質をコードする少なくとも1つの遺伝子の天然のプロモーターが前記天然のプロモーター内の少なくとも1つの突然変異によって不活化されている、組換えプロモーター、

- 対象とするタンパク質またはポリペプチド、および該生合成を支援するポリペプチドまたはタンパク質をコードする少なくとも1つの遺伝子の発現を可能にする条件下において、前記遺伝子改変酵母細胞を培地中で培養する工程、ならびに

10

20

- 対象とするタンパク質またはポリペプチドを培地から単離する工程。

【請求項 2】

前記少なくとも 1 つの組換えプロモーターにより、遺伝子改変酵母細胞が遺伝的に改変されていない野生型酵母細胞と比較して少なくとも 100% より多くのポリペプチドまたはタンパク質の生合成を支援するポリペプチドまたはタンパク質を生産することが可能になることを特徴とする、請求項 1 の方法。

【請求項 3】

前記細胞内におけるポリペプチドまたはタンパク質の生合成を支援するポリペプチドまたはタンパク質をコードする少なくとも 1 つの遺伝子がシャペロンであることを特徴とする、請求項 1 または 2 の方法。

10

【請求項 4】

シャペロンが、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ、結合性タンパク質 Kar2/BiP およびカルネキシンからなる群より選択されることを特徴とする、請求項 3 の方法。

【請求項 5】

組換えプロモーターが、遺伝的に改変された又は改変されていない、誘導性の酵母プロモーターであることを特徴とする、請求項 1 ~ 4 のいずれかの方法。

【請求項 6】

酵母プロモーターが、AOX1 プロモーター、GAL1 プロモーター、PGK プロモーター、ADH プロモーター、FDH プロモーターおよび FLD プロモーターからなる群より選択されることを特徴とする、請求項 5 の方法。

20

【請求項 7】

酵母プロモーターが、配列番号1のヌクレオチド 170 から 235、または 694 から 723、または 694 から 723 および 737 から 738 の中における少なくとも 1 つの突然変異を含む AOX1 プロモーターであることを特徴とする、請求項 6 の方法。

【請求項 8】

酵母細胞が、メチロトロフ酵母細胞であることを特徴とする、請求項 1 ~ 7 のいずれかの方法。

【請求項 9】

酵母細胞が、ピキア・パストリス、カンジダ・ボイジニイおよびハンゼヌラ・ポリモルファからなる群より選択される、請求項 1 ~ 7 のいずれかの方法。

30

【請求項 10】

生合成を支援するポリペプチドまたはタンパク質をコードする少なくとも 1 つの遺伝子の天然のプロモーターの少なくとも 1 つの突然変異が欠失であることを特徴とする、請求項 1 ~ 9 のいずれかの方法。

【請求項 11】

生合成を支援するポリペプチドまたはタンパク質をコードする少なくとも 1 つの遺伝子の天然のプロモーターの少なくとも 50 個のヌクレオチドが欠失していることを特徴とする、請求項 10 の方法。

【請求項 12】

以下を含む遺伝子改変酵母細胞：

40

- 前記細胞内におけるポリペプチドまたはタンパク質の生合成を支援するポリペプチドまたはタンパク質をコードする少なくとも 1 つの遺伝子と作動可能に連結した少なくとも 1 つの組換えプロモーターであって、前記少なくとも 1 つの遺伝子が遺伝的に改変されていない野生型酵母細胞の生来のゲノム座位に位置しており、該生合成を支援するポリペプチドまたはタンパク質をコードする少なくとも 1 つの遺伝子の天然のプロモーターが前記天然のプロモーター内の少なくとも 1 つの突然変異によって不活化されている、組換えプロモーター、および

- 対象とするタンパク質またはポリペプチドをコードする組換え核酸分子を含む分泌カセット。

【請求項 13】

50

前記少なくとも1つの組換えプロモーターにより、遺伝子改変酵母細胞が遺伝的に改変されていない野生型酵母細胞と比較して少なくとも100%より多くの、ポリペプチドまたはタンパク質の生合成を支援するポリペプチドまたはタンパク質を生産することが可能になることを特徴とする、請求項12の細胞。

【請求項14】

前記細胞内におけるポリペプチドまたはタンパク質の生合成を支援するポリペプチドまたはタンパク質をコードする少なくとも1つの遺伝子がシャペロンであることを特徴とする、請求項12または13の細胞。

【請求項15】

シャペロンが、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ、結合性タンパク質 Kar2/BiP およびカルネキシンからなる群より選択されることを特徴とする、請求項14の細胞。

10

【請求項16】

組換えプロモーターが、遺伝的に改変された又は改変されていない、誘導性の酵母プロモーターであることを特徴とする、請求項12～15のいずれかの細胞。

【請求項17】

酵母プロモーターが、AOX1 プロモーター、GAL1 プロモーター、PGK プロモーター、ADH プロモーター、FDH プロモーターおよび FLD プロモーターからなる群より選択されることを特徴とする、請求項16の細胞。

【請求項18】

酵母プロモーターが、配列番号1のヌクレオチド 170 から 235、または 694 から 723、または 694 から 723 および 737 から 738 の中における少なくとも1つの突然変異を含む AOX1 プロモーターであることを特徴とする、請求項17の細胞。

20

【請求項19】

酵母細胞が、メチロトロフ酵母細胞であることを特徴とする、請求項12～18のいずれかの細胞。

【請求項20】

酵母細胞が、ピキア・パストリス、カンジダ・ボイジニイおよびハンゼヌラ・ポリモルファからなる群より選択される、請求項12～18のいずれかの方法。

【請求項21】

生合成を支援するポリペプチドまたはタンパク質をコードする少なくとも1つの遺伝子の天然のプロモーターの少なくとも1つの突然変異が欠失であることを特徴とする、請求項12～20のいずれかの細胞。

30

【請求項22】

生合成を支援するポリペプチドまたはタンパク質をコードする少なくとも1つの遺伝子の天然のプロモーターの少なくとも50個のヌクレオチドが欠失していることを特徴とする、請求項21の細胞。

【請求項23】

対象とするタンパク質またはポリペプチドをコードする核酸分子が、ベクターの部分であるかまたはゲノム中に組み込まれていることを特徴とする、請求項12～22のいずれかの細胞。

40

【請求項24】

組換えタンパク質またはポリペプチドを生産するための、請求項12～23のいずれかの細胞の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、遺伝子改変酵母細胞であって、該細胞内におけるポリペプチドまたはタンパク質の生合成を支援する少なくとも1つのポリペプチドまたはタンパク質を過剰発現することができる遺伝子改変酵母細胞に関する。

【背景技術】

50

## 【 0 0 0 2 】

シャペロン、特にタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ(PDI)は、特に真核生物の小胞体において生じる周知の酵素である。シャペロンは、細胞内におけるタンパク質およびポリペプチドのような高分子構造のフォールディングもしくはアンフォールディングおよび集合もしくは脱集合 (assembly or disassembly) を補助する。例えば、PDIは、タンパク質およびポリペプチド内のシステイン残基間のジスルフィド結合の形成、切断および再構成を触媒することができる。PDI は、真核細胞において発現するジスルフィド架橋を含むタンパク質の正しいフォールディングに参与しているため、タンパク質発現において重要な役割を果たすものである。大腸菌(*E. coli*)を含む、組換えタンパク質発現に通常用いられる多くの原核生物が PDI 活性を欠いている。

10

## 【 0 0 0 3 】

ジスルフィド結合を含む正しくフォールドされたポリペプチドおよびタンパク質を発現させるために、対象のポリペプチドまたはタンパク質に次いで PDI をも発現させることが当該技術分野において提案されている。組換え宿主細胞における PDI の共発現は、正しくフォールドされた生産物をもたらすのみならず、PDI を発現しないかまたは PDI を共発現する細胞と比較して少ない量で PDI を発現する細胞と比較して高い生産物収量にも寄与する(例えばWO 94/08012を参照)。さらに、PDI を天然に発現する真核細胞における PDI の形成の増大は、Butz JA et al. (*Biotech Bioeng* 84(2003):292-304)に報告される例外はあるものの、対象のタンパク質またはポリペプチドの有意に増大した生合成をもたらすことが見出された。

20

## 【 0 0 0 4 】

WO 93/25676 において、PDI をコードする遺伝子を含む組換え発現カセットを宿主細胞、特に酵母細胞のゲノムに組み込むことが提案されている。例えば、かかる発現カセットの酵母細胞のゲノムへの組み込みは平凡なものではない。組み込みの過程において、発現カセットはゲノム中に1回よりも多く、且つ潜在的には異なる部位に組み込まれる可能性が高い。したがって、同じ性質を有する酵母細胞を常に作成できる訳ではない。さらに、酵母細胞のゲノム中に組み込まれた核酸分子の発現効率が組み込み部位によって大きく左右されることも、当該技術分野において公知である。この事は、ある細胞内の一つの座位における発現カセットの組み込みが、該発現カセットがゲノム内の別の部位に組み込まれている細胞と比較して異なる結果をもたらす可能性が非常に高いことを意味する。かかる組換え PDI 発現カセットを含む酵母細胞は、そのコード遺伝子が該細胞内に天然に見出される PDI を依然として生産する。したがって、かかる細胞は、一方で発現カセットから PDI を発現し、他方で該細胞の遺伝子に天然に存在する PDI を発現する。これは、培養過程における該細胞内での PDI レベルの変動をもたらす得る。さらに、標的タンパク質の生産は、組換え発現カセットから PDI を過剰発現させることにより、転写または翻訳についての代謝的競合に起因する負の影響を受け得る(Butz JA et al., *Biotech Bioeng* 84(2003):292-304)。

30

## 【 0 0 0 5 】

WO 93/25676 において提案されている組換え発現カセットの使用のさらなる重要な不利益は、1つが PDI をコードする遺伝子を保有し、別の1つが宿主細胞内で発現させる少なくとも1つの対象タンパク質をコードする少なくとも1つの遺伝子を含む、少なくとも2つの核酸コンストラクトを用いて酵母細胞を同時形質転換(co-transform)することである(Gupta CS et al., *J Mol Endocrin* 22(1999):273-283)。同時形質転換は、一度に少なくとも2つの異なる選択マーカーの提供を必要とし、それは実際にはクローン選択の過程における偽陽性クローンの問題をしばしばもたらす。あるいは、別々の形質転換、例えば PDI をコードする遺伝子を保有する核酸コンストラクトの第一の形質転換、および宿主細胞内において発現させる少なくとも1つの対象タンパク質をコードする少なくとも1つの遺伝子を保有する核酸コンストラクトの第二の形質転換を用いる、逐次形質転換(serial transformation)の戦略が必要となり得る(Payne MS et al., *Gene* 194(1997):179-182)。これにより、クローン変異が生じやすい。PDI をコードする遺伝子および宿

40

50

主細胞内で発現させる少なくとも1つの対象タンパク質をコードする少なくとも1つの遺伝子の両方を保有する1つの核酸コンストラクトの形質転換は、実際には、分子量の大きい核酸コンストラクトに起因する低い形質転換効率の制約をもたらす。さらに、組み込まれた形態であっても染色体外の形態であっても、潜在的なプラスミドの不安定性による困難が生じる(Finnis CJA et al., *Microbial Cell Factories* 9(2010):87)。

【0006】

Subramanian et al. (PNAS 103(2006): 939-944) は、転写欠如の結果およびその後の pbn1 遺伝子によってコードされるタンパク質の利用可能性 (availability) を研究するための、pbn1 遺伝子のプロモーターの置換について報告している。該著者らは、小胞体の内腔タンパク質の分解に Pbn1p が必要であることを見出している。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明の一つの目的は、当該技術分野において公知の方法と比較してずっと高い収量で対象のポリペプチドまたはタンパク質を合成することを可能にする手段および方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0008】

したがって、本発明は、以下の工程を含む、対象とする組換えタンパク質またはポリペプチドを生産する方法に関する：

20

- 以下を含む遺伝子改変酵母細胞を提供する工程、

a) 対象とするタンパク質またはポリペプチドをコードする組換え核酸分子を含む分泌カセット、および

b) 前記細胞内におけるポリペプチドまたはタンパク質の生合成を支援 (support) するポリペプチドまたはタンパク質をコードする少なくとも1つの遺伝子と作動可能に連結した少なくとも1つの組換えプロモーターであって、前記少なくとも1つの遺伝子が遺伝的に改変されていない野生型酵母細胞の生来の (native) ゲノム座位に位置しており、該生合成を支援するポリペプチドまたはタンパク質をコードする少なくとも1つの遺伝子の天然の (naturally occurring) プロモーターが前記天然のプロモーター内の少なくとも1つの突然変異によって不活化されている、組換えプロモーター、

30

- 対象とするタンパク質またはポリペプチド、および該生合成を支援するポリペプチドまたはタンパク質をコードする少なくとも1つの遺伝子の発現を可能にする条件下で、前記遺伝子改変酵母細胞を培地中で培養する工程、ならびに

- 対象とするタンパク質またはポリペプチドを培地から単離する工程。

【0009】

本発明はまた、以下を含む遺伝子改変酵母細胞に関する：

40

- 前記細胞内におけるポリペプチドまたはタンパク質の生合成を支援するポリペプチドまたはタンパク質をコードする少なくとも1つの遺伝子と作動可能に連結した少なくとも1つの組換えプロモーターであって、前記少なくとも1つの遺伝子が遺伝的に改変されていない野生型酵母細胞の生来のゲノム座位に位置しており、該生合成を支援するポリペプチドまたはタンパク質をコードする少なくとも1つの遺伝子の天然のプロモーターが前記天然のプロモーター内の少なくとも1つの突然変異によって不活化されている、組換えプロモーター、および

50

- 対象とするタンパク質またはポリペプチドをコードする組換え核酸分子を含む分泌カセット。

【0010】

本発明のさらなる側面は、前記細胞内におけるポリペプチドまたはタンパク質の生合成を支援するポリペプチドまたはタンパク質をコードする少なくとも1つの遺伝子と作動可能に連結した少なくとも1つの組換えプロモーターを含む遺伝子改変酵母細胞であって、前記少なくとも1つの遺伝子が遺伝的に改変されていない野生型酵母細胞の生来のゲノム座位に位置しており、該生合成を支援するポリペプチドまたはタンパク質をコードする少なくとも1つの遺伝子の天然のプロモーターが前記天然のプロモーター内の少なくとも1つの突然変異によって不活化されている、遺伝子改変酵母細胞に関する。

10

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】図1は、天然のタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ(PDI)プロモーターと PDI 遺伝子の間における、特異的に突然変異誘発した(specifically mutated) AOX1 プロモーターのプロモーター組み込みカセットの“フリッパーコンストラクト(Flipper construct)”のプラスミドマップを示す。

【図2】図2は、PDI プロモーターのプロモーター組み込み戦略の図表を示す。

【図3】図3は、特異的に突然変異誘発した AOX1 プロモーターによる天然のタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ(PDI)プロモーターのプロモーター置換カセットの“フリッパーコンストラクト”のプラスミドマップを示す。

20

【図4】図4は、PDI プロモーターのプロモーター置換戦略の図表を示す。

【図5】図5は、それぞれトランスフェリン発現株 CBS7435 muts(実線)および CBS7435 muts PDI プラットフォーム(破線)の(直接アプライした)上清の電気泳動図オーバーレイ(GXII、Caliper Life Sciences、USA)を示す。

【図6】図6は、それぞれ非グリコシル化トランスフェリン発現株 CBS7435 muts(実線)および CBS7435 muts PDI プラットフォーム(破線)の(直接アプライした)上清の電気泳動図オーバーレイ(GXII、Caliper Life Sciences、USA)を示す。

【図7】図7は、それぞれ HSA-インターフェロン(アルファ2a)発現株 CBS7435 muts (点線)、組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ(1コピー存在; CBS7435 muts PDI プラットフォーム株と同じプロモーターを使用した)を共発現する CBS7435 muts 株(実線)、および CBS7435 muts PDI プラットフォーム株(菱形付き実線)の(直接アプライした)上清の電気泳動図オーバーレイ(GXII、Caliper Life Sciences、USA)を示す。

30

【図8】図8は、それぞれ Fab発現株 CBS7435 muts(実線)、組換え Kar2 (1コピー存在; CBS7435 muts Kar2 プラットフォーム株と同じプロモーターを使用した)を共発現する CBS7435 muts 株(点線)、および CBS7435 muts Kar2 プラットフォーム株(円付き実線)の(直接アプライした)上清の電気泳動図オーバーレイ(GXII、Caliper Life Sciences、USA)を示す。

【発明を実施するための形態】

【0012】

驚くべきことに、宿主細胞のゲノムにおいて天然に生じ、かつ、前記細胞内における組換えポリペプチドまたはタンパク質の生合成を支援するポリペプチドまたはタンパク質をコードする少なくとも1つの遺伝子と作動可能に連結した組換えプロモーターを含む細胞が、天然のプロモーターが依然として活性であるか(転写され且つ/または翻訳された遺伝子産物を測定することによって決定されるその生来の(native)活性の、最大で 10%、好ましくは最大で 5%、より好ましくは最大で 2%、よりいっそう好ましくは最大で少なくとも 1%)または少なくとも新たに導入されるプロモーターの上流において完全長で存在する場合に、対象とする組換えタンパク質またはポリペプチドを生産することができないか、または少なくとも同等の(comparable)宿主細胞より低い程度でしか生産できないことが判明した。したがって、天然のプロモーターを、前記プロモーターを突然変異させることによって不活化する必要がある。かかる不活化は、本発明の最も好ましい態様において、該ブ

40

50

ロモーターと天然に連結している遺伝子の測定可能な転写および/または翻訳の消失をもたらす。しかし、“不活化された”の用語は、その生来の活性の最大で 10%、好ましくは最大で 5%、より好ましくは最大で 2%、よりいっそう好ましくは最大で少なくとも 1% の残存プロモーター活性をも含む。プロモーター活性は、当該技術分野において公知の方法を用いて転写された遺伝子および/または翻訳された遺伝子産物を測定することにより、容易に決定することができる。

【0013】

本発明において、酵母細胞は、前記細胞内におけるポリペプチドまたはタンパク質の生合成を支援するポリペプチドまたはタンパク質をコードする 1 つ以上の天然の遺伝子と作動可能に連結した、1 つ以上の、好ましくは 1 つの組換えプロモーターを含み得る。1 種類 10 の同じ(one and the same)プロモーターを、細胞内におけるポリペプチドまたはタンパク質の生合成を支援するポリペプチドまたはタンパク質をコードする 1 つより多くの(即ち、異なる)天然の遺伝子と作動可能に連結させることができる。他方、ポリペプチドまたはタンパク質の生合成を支援するポリペプチドまたはタンパク質をコードし、1 コピーより多くの 1 種類の同じプロモーターが作動可能に連結している 1 つ以上の天然の遺伝子を含む細胞を提供することもできる。これは、本発明の酵母細胞が、例えば、ポリペプチドまたはタンパク質の生合成を支援するポリペプチドまたはタンパク質をコードする 1 つの遺伝子と作動可能に連結した 1 つのプロモーターと、ポリペプチドまたはタンパク質の生合成を支援するポリペプチドまたはタンパク質をコードする別の遺伝子と作動可能に連結した別のプロモーターを含み得ることを意味する。当然、1 つの特定のプロモーターを 20 、ポリペプチドまたはタンパク質の生合成を支援するポリペプチドまたはタンパク質をコードする 1 つより多くの遺伝子と作動可能に連結させることもできる。

【0014】

“ポリペプチドまたはタンパク質の生合成を支援するポリペプチドまたはタンパク質をコードする遺伝子”とは、細胞内におけるポリペプチドおよびタンパク質の組換え発現および/または天然の発現を積極的に支援するポリペプチドまたはタンパク質をコードする 30 遺伝子である。該ポリペプチドまたはタンパク質が発現しないか又は基準の細胞(例えば野生型細胞)と比較して低い程度で発現する場合、天然および/または組換え型のタンパク質またはポリペプチドは、全く発現もしくは分泌されないか、又はこれらの発現もしくは分泌を支援するポリペプチドもしくはタンパク質が正常なレベルで存在している細胞と比較してずっと低い程度で発現もしくは分泌される。

【0015】

本明細書において用いる場合、“組換えプロモーター”の用語は、宿主細胞内における組換えポリペプチドまたはタンパク質の生合成を支援するポリペプチドまたはタンパク質をコードする遺伝子の上流領域における、該遺伝子の転写を制御するための、ゲノム中に天然には存在しないプロモーターを意味する。組換えプロモーターは、宿主細胞において該組換えプロモーターが機能的である(即ち、該プロモーターと作動可能に連結した遺伝子の転写を制御することができる)限り、同一のもしくは別の酵母細胞に由来するプロモーターであってもよく、他のいずれかの源に由来する異種性プロモーターであってもよい。当然、“プロモーター”の用語には野生型プロモーターの断片も含まれるが、該断片が 40 該プロモーター断片と作動可能に連結した遺伝子の転写速度を制御できるものであることが条件となる。

【0016】

“生来のゲノム座位”とは、天然のゲノム配列を意味する。

【0017】

“作動可能に連結”の用語は、転写調節因子およびいずれかの翻訳調節因子が、コード配列に対し、宿主細胞において且つ該宿主細胞の作用によって該調節因子が該コード遺伝子の発現を指示(direct)できる配置で該コード配列と共有結合しているあらゆる構成を意味する。

【0018】

10

20

30

40

50

本明細書において用いる場合、“カセット”の用語は、その中に存在する1つ以上の調節配列と作動可能に連結するよう特定の遺伝子を挿入した場合に該遺伝子を発現させることができるヌクレオチド配列を意味する。したがって、例えば、発現カセットは、グルコース誘導を介して発現させることを望む異種性遺伝子を含み得る。したがって、本発明の発現カセットは、誘導によって任意の数の異種性遺伝子の発現を促進するのに有用である。さらに、本発明のカセットは、それと融合したポリペプチドまたはタンパク質の分泌を可能にするシグナルペプチドをコードする核酸伸長(stretch)を含む。本発明において、かかるカセットは“分泌カセット”であることが意図される。分泌シグナル配列は、酵母細胞において分泌シグナルとして用いられるか又は当該技術分野において通常知られているあらゆる配列であり得る(例えば、因子または成熟因子)。本発明の特に好ましい態様において、前記少なくとも1つの組換えプロモーターは、遺伝子改変酵母細胞が遺伝的に改変されていない野生型酵母細胞と比較して少なくとも100%より多く、好ましくは少なくとも200%より多く、より好ましくは少なくとも300%より多くの、ポリペプチドまたはタンパク質の生合成を支援するポリペプチドまたはタンパク質を生産することを可能にする。

10

**【0019】**

前記細胞内におけるポリペプチドまたはタンパク質の生合成を支援するポリペプチドまたはタンパク質をコードする少なくとも1つの遺伝子に作動可能に連結した少なくとも1つの組換えプロモーターは、(酵母細胞における)誘導性プロモーターまたは構成的プロモーターであり得る。それぞれのプロモーターは当該技術分野において周知である。本発明において使用し得る適切なプロモーターは、細胞内におけるポリペプチドまたはタンパク質の生合成を支援するポリペプチドまたはタンパク質をコードする少なくとも1つの遺伝子と結合した天然のプロモーターを含む野生型酵母細胞の少なくとも100%(200%、300%、400%、500%、...)より多くの前記ポリペプチドまたはタンパク質を細胞が生産することを可能にする。

20

**【0020】**

細胞内における特定のタンパク質またはポリペプチドの発現速度を同定する方法は、当該技術分野において周知であり、細胞の破壊および前記少なくとも1つのタンパク質またはポリペプチドに特異的に結合する抗体が挙げられる。

**【0021】**

上で定義した核酸分子を保有する本発明の酵母細胞は、常套の且つ確立された栄養培地を使用する常套の方法を用いて培養することができる。対象とする組換えタンパク質またはポリペプチドを生産するために、細胞を前記ポリペプチドおよびタンパク質の“発現を可能にする条件下で”培養する必要がある。これは、ポリペプチドもしくはタンパク質の生合成を支援するポリペプチドもしくはタンパク質および/または対象とするタンパク質もしくはポリペプチドをコードする遺伝子に作動可能に連結したプロモーターを活性化するために、物質を培地に添加し、又は培地から除去し得ることを意味する(物質の除去は培地を交換することにより行い得る)。

30

**【0022】**

本発明の好ましい態様において、前記細胞内における(天然および/または組換えの)ポリペプチドまたはタンパク質の生合成を支援するポリペプチドまたはタンパク質をコードする少なくとも1つの遺伝子は、シャペロンである。

40

**【0023】**

本明細書において用いる場合、“シャペロン”とは、他の高分子タンパク質性構造のフォールディングもしくはアンフォールディングおよび集合もしくは脱集合を補助するが、フォールディングおよび/または集合の過程を完了した該構造がその通常の生物学的機能を発揮している場合にはこれらの構造において生じないポリペプチドおよびタンパク質を意味する。シャペロンの1つの主要な機能は、新たに合成されたポリペプチド鎖および集合したサブユニットの両方が凝集して非機能的構造となるのを防止することである。本発明における“シャペロン”には、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ等の“タンパク質

50

フォールダーゼ(protein foldase) ”も包含される。本発明のシャペロンは、好ましくは適切な細胞区画(例えば小胞体(ER)および/またはゴルジ体および/または分泌される組換えタンパク質の分泌経路に沿う小胞)内に存在する。

【0024】

有利なことに、野生型シャペロンプロモーターおよびポリペプチドまたはタンパク質の生合成を支援するポリペプチドまたはタンパク質をコードする少なくとも1つの遺伝子の他のプロモーターの不活化は、遺伝子改変酵母細胞の生存度に負の影響を与えない。前記プロモーターの不活化が致死的であるかまたは宿主細胞の生存度を有意に減少させるものである場合には、当然、シャペロンプロモーターは本明細書において記載する方法で改変すべきではない。

10

【0025】

“シャペロンプロモーターが不活化される”とは、野生型シャペロンプロモーターのインピボの活性が、野生型宿主細胞のプロモーター活性の最大で10%まで、好ましくは最大で5%まで、より好ましくは最大で2%まで減少することを意味する。プロモーター活性を測定する方法は当該技術分野において周知であり、特定のマーカートンパク質またはポリペプチドの使用を含み得る。しかし、本発明の遺伝子改変細胞における野生型シャペロンプロモーターは、細胞内においてプロモーター活性が測定できないよう完全に不活化することが特に好ましい。

【0026】

本発明の好ましい態様において、シャペロンは、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ、結合性タンパク質 Kar2/BiP およびカルネキシンからなる群より選択され、ジスルフィドイソメラーゼが特に好ましい。

20

【0027】

本発明の別の好ましい態様において、組換えプロモーターは、遺伝的に改変された又は改変されていない、誘導性の酵母プロモーターである。

【0028】

酵母細胞内におけるポリペプチドまたはタンパク質の生合成を支援するポリペプチドまたはタンパク質、好ましくはタンパク質ジスルフィドイソメラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子の発現速度を制御するために、誘導性プロモーターを用いるのが有利である。当然、酵母細胞においてそれと作動可能に連結した遺伝子の転写を制御することができるものである限り、あらゆる種類のプロモーターを用いることが可能である。しかし、酵母細胞に由来するプロモーターを用いることが特に好ましい。

30

【0029】

本発明において用いるプロモーターは、それぞれの源から直接的に得られる非改変の野生型プロモーターであり得る。当然、少なくとも1つの突然変異を含むプロモーターを用いることも可能である。かかるプロモーターは、該プロモーター内における突然変異の導入によりインピボの転写調節活性を改変することが可能になり、それが培養の特定の点においてそれぞれの野生型プロモーターと比較して低いまたは高い活性を有するプロモーターをもたらすという利点を有する。したがって、本明細書において用いる場合、“遺伝子改変プロモーター”とは、いずれかの適切な、当該技術分野において周知の、常套の又は分子生物学的方法によって、DNA技術、例えば部位特異的突然変異誘発、欠失または挿入によって、または化学物質または照射(irradiation)を用いる常套の突然変異誘発によって、さらにその後の転写機構が改変された細胞のスクリーニングまたは選択によって、改変されたプロモーターを意味する(例えば、WO2006/089329を参照)。

40

【0030】

あるいは、宿主細胞において構成的に作用するプロモーターを用いることも当然可能である。組換えプロモーターを用いるシャペロンの構成的発現は、対象とするタンパク質またはポリペプチドの形成の増大をももたらす場合がある。酵母細胞用の構成的プロモーターは、当該技術分野において周知である。

【0031】

50

本発明の別の好ましい態様において、前記細胞内におけるポリペプチドまたはタンパク質の生合成を支援するポリペプチドまたはタンパク質、好ましくは PDI をコードする少なくとも1つの遺伝子と作動可能に連結させる酵母プロモーターは、AOX1 プロモーター、GAL1 プロモーター、PGK プロモーター、FDH プロモーター、FLD プロモーター、ADH プロモーターおよび HIS4 プロモーターからなる群より選択される。

【0032】

変異導入されていないか又は変異導入された AOX1 プロモーターの使用が特に好ましい。

【0033】

プロモーター内における突然変異、特に誘導性プロモーターの突然変異は、野生型プロモーターと比較して変化した性質を示す遺伝子改変プロモーターをもたらす得る。特定の突然変異は、誘導条件下において非改変プロモーターよりも高い活性を示す(即ち、それと作動可能に連結した遺伝子の転写速度を増大させる)プロモーターをもたらす得る。当然、逆の効果を示す突然変異を提供することも可能である。遺伝的に改変するのに特に好ましい AOX1 プロモーターの部分は、Inan M et al. (Biotechnol Bioeng 2006; 93: 771-778)および特に WO 2006/089329 (参照により本明細書に取り込まれている)において示される。

【0034】

本発明において用いる野生型 AOX1 プロモーター(配列番号1)の好ましい変異体は、以下からなる群より選択される部位およびヌクレオチド範囲における少なくとも1つの突然変異(例えば欠失、挿入、ヌクレオチド交換)を含む:

a) 転写因子結合部位(TFBS)、

b) 配列番号1のヌクレオチド 170 から 235、ヌクレオチド 170 から 191、ヌクレオチド 192 から 213、ヌクレオチド 192 から 210、ヌクレオチド 207 から 209、ヌクレオチド 214 から 235、ヌクレオチド 304 から 350、ヌクレオチド 364 から 393、ヌクレオチド 434 から 508、ヌクレオチド 509 から 551、ヌクレオチド 552 から 560、ヌクレオチド 585 から 617、ヌクレオチド 621 から 660、ヌクレオチド 625 から 683、ヌクレオチド 736 から 741、ヌクレオチド 737 から 738、ヌクレオチド 726 から 755、ヌクレオチド 784 から 800 またはヌクレオチド 823 から 861、およびそれらの組合せ、ここで、上記の転写因子結合部位(TFBS)を含むプロモーター伸長は、配列番号1のヌクレオチド 54 から 58 である Hap1、配列番号1のヌクレオチド 142 から 149 および 517 から 524 である Hsf、配列番号1のヌクレオチド 196 から 200、206 から 210 および 668 から 672 である Hap234、配列番号1のヌクレオチド 219 から 224 である abaA、配列番号1のヌクレオチド 281 から 285 である Stre、配列番号1のヌクレオチド 335 から 339 である Rap1、配列番号1のヌクレオチド 371 から 377 である Adr1、配列番号1のヌクレオチド 683 から 687 である Mat1MC、配列番号1のヌクレオチド 702 から 706 である Gcr1、および配列番号1のヌクレオチド 747 から 761 である QA-1F を含む。

【0035】

配列番号1: ピキア・パストリス(*Pichia pastoris*)の AOX1 プロモーター

10

20

30

## 【化 1】

ggtaccagatctaacatccaaagacgaaagggttgaatgaaacctttttgccatccgacatccac  
 aggtccattctcacacataagtgccaaacgcaacaggaggatacactagcagcagaccggttg  
 caaacgcaggacctccactcctctctcctcaacacccactttttgccatcgaaaaaccagccca  
 gttattgggcttgattggagctcgctcattccaattccttctattaggctactaacacatgac  
 tttattagcctgtctatcctggccccctggcgagggttcattgtttgtttatccgaatgcaac  
 aagctccgcattacaccggaacatcaactccagatgagggctttctgagtgtggggtcaaatagt  
 ttcattgttccccaaatggcccaaaactgacagtttaaacgctgtcttggaacctaatatgacaa  
 aagcgtgatctcatccaagatgaactaagtttgggttcggttgaaatgctaacggccagttgggtca  
 aaaagaaacttccaaaagtgcgcataccggttggcttgggttggattgattgacgaatgctcaa  
 aaataatctcattaatgcttagcgcagtctctctatcgcttctgaacccccgggtgcacctgtgcc  
 gaaacgcaaattggggaaacacccgctttttggatgattatgcattgtctccacattgtatgctt  
 ccaagattctgggtgggaatactgctgatagcctaacggttcattgatcaaaaatttaactgttctaa  
 cccctacttgacagcaatatataaacagaaggaagctgcctgtcttaaacctttttttttatc  
 atcattattagcttactttcataattgcgactgggttccaattgacaagcttttgattttaacga  
 cttttaacgacaacttgagaagatcaaaaaacaactaattattgaaagaattcaacc

10

## 【0036】

20

酵母プロモーターは、好ましくは、配列番号1のヌクレオチド 170 から 235 または 694 から 723 または 694 から 723 および 737 から 738 の中における少なくとも1つの突然変異を含むAOX1 プロモーターである。

## 【0037】

配列番号1のヌクレオチド 170 から 235 の中に少なくとも1つの突然変異を含む AOX1 プロモーターは、メタノール誘導条件下において野生型 AOX1 プロモーターと比較してずっと高い発現速度を示す。配列番号1のヌクレオチド 694 から 723 または 694 から 723 および 737 から 738 の中における少なくとも1つの突然変異を含む AOX1 プロモーターは、抑制解除条件(derepression conditions)下において野生型 AOX1 プロモーターと比較してずっと高い発現速度を示す(例えば WO 2006/089329 を参照)。

30

## 【0038】

AOX1 プロモーターの突然変異は、好ましくは、野生型 AOX1 プロモーターの上記のヌクレオチド中における欠失、置換、挿入、逆位および/または重複(multiplication)である。

## 【0039】

ピキア・パストリスの野生型 AOX1 プロモーターの特性を改変するために、いくつかの突然変異の型が可能である。上記の領域ならびに以下の転写因子結合部位(TFBS)：配列番号1のヌクレオチド 54 から 58 を含む Hap1、配列番号1のヌクレオチド 142 から 149 および 517 から 524 を含む Hsf、配列番号1のヌクレオチド 196 から 200、206 から 210 および 668 から 672 を含む Hap234、配列番号1のヌクレオチド 219 から 224 を含む abaA、配列番号1のヌクレオチド 281 から 285 を含む Stre、配列番号1のヌクレオチド 335 から 339 を含む Rap1、配列番号1のヌクレオチド 371 から 377 を含む Adr1、配列番号1のヌクレオチド 683 から 687 を含む Mat1MC、配列番号1のヌクレオチド 702 から 706 を含む Gcr1 および配列番号1のヌクレオチド 747 から 761 を含む QA-1F の1つ以上を含むプロモーター伸長を、部分的もしくは完全に欠失させ、部分的もしくは完全に他のヌクレオチドもしくは核酸配列で置換し、単一のヌクレオチドもしくは核酸配列の挿入によって破壊し、部分的もしくは完全に逆転させ、または重複させ得る。構造的特徴および/または認識/結合部位、例えば転写因子の認識/結合部位は前記突然変異によって影響を受けるため、これらの全ての突然変異はプロモーター活性の変化をもたらす。しかし、これらの変化は、野生型プロモーターと比較して増大または減少したプロモーター

40

50

の活性をもたらし得る。

【0040】

本発明の特別の態様において、酵母細胞は、ピキア(Pichia)属の種、ハンゼヌラ(Hansenula)属の種、例えばハンゼヌラ・ポリモルファ(Hansenula polymorpha)、サッカロマイセス(Saccharomyces)属の種、シゾサッカロマイセス(Schizosaccharomyces)属の種、ヤロウイア(Yarrowia)属の種、例えばヤロウイア・リポリティカ(Yarrowia lipolytica)、クリベロマイセス(Kluyveromyces)属の種およびアスペルギルス(Aspergillus)属の種からなる群より選択される。

【0041】

本発明の特に好ましい態様において、酵母細胞は、メチロトローフ酵母細胞であり、好ましくはピキア属の酵母、好ましくはピキア・パストリス、カンジダ・ボイジニイ(Candida boidinii)およびハンゼヌラ・ポリモルファからなる群より選択されるメチロトローフ酵母細胞である。

10

【0042】

生合成を支援するポリペプチドまたはタンパク質をコードする少なくとも1つの遺伝子の天然のシャペロンプロモーターの少なくとも1つの突然変異は、好ましくは欠失である。

【0043】

宿主細胞内における天然のプロモーターの不活化は、様々な方法によって生じ得る。例えば、前記プロモーター内に点突然変異を導入することが可能である。適切な突然変異は、前記プロモーター内に可能性のある突然変異を導入し、次いで該プロモーターの活性をインビボで試験することにより、容易に同定することができる。しかし、宿主細胞内においてプロモーターを不活化する最も効率的な方法は、該プロモーターの少なくとも一部の欠失である。したがって、宿主細胞において天然に存在するプロモーターを少なくとも部分的に欠失させることが特に好ましい。欠失は、プロモーターのいずれの部分に存在してもよく、生合成を支援するポリペプチドまたはタンパク質をコードする遺伝子の開始コドンの隣に見出される部分(即ち、該遺伝子の5'領域)を欠失させることが特に好ましい。

20

【0044】

本発明の特に好ましい態様において、前記細胞内におけるポリペプチドまたはタンパク質の生合成を支援するポリペプチドまたはタンパク質、好ましくはタンパク質ジスルフィドイソメラーゼをコードする天然の少なくとも1つの遺伝子のプロモーターの少なくとも50個のヌクレオチド、好ましくは少なくとも100個のヌクレオチド、より好ましくは少なくとも200個のヌクレオチド、よりいっそう好ましくは少なくとも500個のヌクレオチドを欠失させる。

30

【0045】

生合成を支援するポリペプチドまたはタンパク質をコードする遺伝子の開始コドンの上流領域(即ち、該遺伝子の5'末端)における少なくとも最初の50個、好ましくは少なくとも最初の100個、より好ましくは少なくとも最初の200個、よりいっそう好ましくは少なくとも最初の500個の、連続するヌクレオチドを欠失させることが特に好ましい。

【0046】

酵母細胞内において対象とするタンパク質またはポリペプチドを発現させるために、該細胞は、プロモーター、好ましくは誘導性プロモーターと作動可能に連結した対象とするタンパク質またはポリペプチドをコードする核酸分子をさらに含む。

40

【0047】

生合成を支援するポリペプチドまたはタンパク質をコードする遺伝子と作動可能に連結したプロモーターは、対象とするタンパク質またはポリペプチドをコードする核酸分子と作動可能に連結したプロモーターと同じのものであってもよい。しかし、生合成を支援するポリペプチドまたはタンパク質をコードする少なくとも1つの遺伝子と、対象とするタンパク質またはポリペプチドをコードする遺伝子は、異なるプロモーターによって制御されることが好ましい。この点に関し、“異なるプロモーター”の用語は、プロモーターの活

50

性が同一ではなく互いに異なることを意味する。したがって、それを含む細胞を培養した場合に変化した効果を示す、同じ野生型プロモーター由来の改変および非改変プロモーターを用いることが可能である。これは、生合成を支援するポリペプチドまたはタンパク質の発現と、対象とするタンパク質またはポリペプチドの発現を独立に調節することを可能にする。生合成を支援するポリペプチドまたはタンパク質の発現と対象とするタンパク質またはポリペプチドの発現の独立した調節は、対象とするタンパク質またはポリペプチドの発現速度の最適化を可能にするため、有利である。

【0048】

本発明の好ましい態様において、対象とするタンパク質またはポリペプチドをコードする核酸分子は、ベクターの部分であるか、またはゲノム中に組み込まれている。

10

【0049】

対象とするタンパク質またはポリペプチドをコードする核酸分子は、当業者に周知のそれぞれの手段および方法を用いることによって、ベクターの部分とするか又はゲノム中に組み込むことができる。用いる手段および方法は、宿主細胞にも依存するものであり、それに応じて選択する必要がある(例えば“Pichia Protocols”、Cregg JM、Humana Press; 2nd edition (August 8、2007)を参照)。

【0050】

本発明の核酸分子は、細胞を培養する培地の上清への対象とするタンパク質またはポリペプチドの分泌を可能にするシグナル配列をも含む。

【0051】

本明細書において用いる場合、“シグナル配列”の用語は、生物学的に活性な分子の分泌を指示するセグメントを意味する。本発明において用いるシグナル配列は、小胞体(ER)の膜を横切るタンパク質の輸送を惹起(ignite)するアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドであり得る。シグナル配列の非限定的な例は、MF (接合因子 シグナル配列)、K1 キラートキシシグナル、インベルターゼ分泌シグナルペプチド、クリベロマイセス・ラクティス(*Kluyveromyces lactis*)のキラートキシシグナル配列、ピキア・アカシエ(*Pichia acacia*)のキラートキシシグナル配列、ハンゼニアスポラ・ウバルム(*Hanseniaspora uvarum*)のキラートキシシグナル配列、およびピキア(ハンゼヌラ)・アノマラ(*Pichia (Hansenula) anomala*)のキラートキシシグナル配列である。本発明の好ましいシグナル配列は、MF (接合因子 シグナル配列)である。好ましくは、標的タンパク質の正しいフォールディングおよび転位置のために、MF シグナルペプチドを導入する。MF は、因子のプレプロ領域であり、19 アミノ酸のシグナル配列(プレ領域)およびプロ領域ならびにそれに続く成熟した 13 アミノ酸の因子配列の4つのタンデムリピートを含む 165 個のアミノ酸を有するタンパク質であるプレプロ-因子をコードする。特に好ましい態様において、該シグナル配列は、以下のアミノ酸配列(配列番号11)を含むか又は該アミノ酸配列からなるものである：

20

【化2】

MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYSDLEGDFDVAVLPPFSNSTNNGLL  
FINTTIASIAAKEEGVSLEKREAEA

40

【0052】

前記シグナル配列をコードする核酸は、以下のヌクレオチド配列(配列番号12)に対して少なくとも 95%、好ましくは少なくとも 98%、よりいっそう好ましくは 100% の同一性を有する：

## 【化3】

atgagattcccatctatttttcaccgctgtcttggttcgctgcctcctctgcattgggtgcccctg  
 ttaacaactaccactgaagaacgagactgctcaaattccagctgaagcagttatcgggtactctac  
 cttgaggggtgatttcgacgtcgctgttttgcctttctctaactccactaacaacgggttggttgt  
 tcattaacaccactatcgcttccattgctgctaaggaagaggggtgtctctctcgagaagaagag  
 gccgaagct

## 【0053】

10

本明細書において用いる場合、“ベクター”の用語は、宿主細胞内に導入され、宿主細胞のゲノム内に組み込まれるか又はエピソーム DNA として自律的に複製することができるヌクレオチド配列を含むあらゆる核酸分子を意味すると理解される。かかるベクターとしては、直鎖状核酸、プラスミド、ファージミド、コスミド、RNA ベクター、ウイルスベクター等が挙げられる。適切な発現ベクターは、発現調節因子、例えばプロモーター、開始コドン、終止コドン、ポリアデニル化シグナル、エンハンサーおよび選択マーカーを含み得る。

## 【0054】

本発明の核酸分子の酵母細胞への形質転換は、当該技術分野において公知の方法によって行うことができ、該方法は宿主細胞に応じて適切に選択し得る。これらの方法としては、以下に限定されないが、エレクトロポレーション、プロトプラスト融合法、リン酸カルシウム沈殿および塩化カルシウム沈殿、炭化ケイ素繊維を用いる攪拌、ならびにPEG媒介、デキストラン硫酸媒介およびリポフェクタミン媒介形質転換が挙げられる。

20

## 【0055】

本発明の別の側面は、対象とする組換えタンパク質またはポリペプチドを生産するための本発明の細胞の使用に関する。

## 【0056】

本発明の別の側面は、本発明の宿主細胞において少なくとも1つの組換えタンパク質またはポリペプチドを生産する方法であって、前記宿主細胞が少なくとも1つの組換えタンパク質またはポリペプチドをコードする少なくとも1つの遺伝子を含み、組換えもしくは天然のポリペプチドもしくはタンパク質の生合成を支援するポリペプチドもしくはタンパク質または前記宿主細胞において天然に存在するシャペロンをコードする少なくとも1つの遺伝子の発現が野生型宿主細胞と比較して増大している方法に関する。

30

## 【0057】

本発明のさらに別の側面は、本発明の細胞を培養する工程を含む、組換えもしくは天然のタンパク質またはポリペプチドを生産する方法に関する。

## 【0058】

組換えタンパク質またはポリペプチドを生産する方法は、当該技術分野において周知である。本発明の遺伝子改変酵母細胞は、組換えポリペプチドまたはタンパク質の生合成を支援するポリペプチドまたはタンパク質、好ましくはシャペロン、より好ましくは PDI、ならびに対象とするタンパク質およびポリペプチドをコードする少なくとも1つの遺伝子の発現速度をずっと効率的な方法で制御することを可能にするので、かかるタンパク質およびポリペプチドを発現させるのに特に適する。特に、少なくとも1つのシャペロン、好ましくは PDI の発現速度を様々な培養段階において制御し、その結果として細胞内における該少なくとも1つのシャペロンのレベルが所定の量に到達する時点を決定的にすることが可能である。

40

## 【0059】

本発明の方法は、対象とするタンパク質またはポリペプチドが細胞から分泌される場合には、対象とするタンパク質またはポリペプチドを培地の上清から単離する工程をも含み得る。

50

## 【 0 0 6 0 】

本発明の細胞は、公知のいずれかの培養方法、例えばバッチ培養、連続培養および流加培養 (fed-batch culture) を用いて培養することができる。選択された酵母株に適した培養条件は、当業者によって容易に調整され得る。通常、用いる培地には、細胞の増殖および生存に必須の全ての栄養分を含有させるべきである。

## 【 0 0 6 1 】

以下の図および実施例において本発明をさらに説明するが、本発明はそれらに限定されるものではない。

## 【 0 0 6 2 】

図 1 は、天然のタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ (PDI) プロモーターと PDI 遺伝子の間における、特異的に突然変異誘発した (specifically mutated) AOX1 プロモーターのプロモーター組み込みカセットの “フリッパーコンストラクト (Flipper construct)” のプラスミドマップを示す。

10

## 【 0 0 6 3 】

図 2 は、PDI プロモーターのプロモーター組み込み戦略の図表を示す。

## 【 0 0 6 4 】

図 3 は、特異的に突然変異誘発した AOX1 プロモーターによる天然のタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ (PDI) プロモーターのプロモーター置換カセットの “フリッパーコンストラクト” のプラスミドマップを示す。

## 【 0 0 6 5 】

図 4 は、PDI プロモーターのプロモーター置換戦略の図表を示す。

20

## 【 0 0 6 6 】

図 5 は、それぞれトランスフェリン発現株 CBS7435 muts (実線) および CBS7435 muts PDI プラットフォーム (破線) の (直接アプライした) 上清の電気泳動図オーバーレイ (GXII、Caliper Life Sciences、USA) を示す。

## 【 0 0 6 7 】

図 6 は、それぞれ非グリコシル化トランスフェリン発現株 CBS7435 muts (実線) および CBS7435 muts PDI プラットフォーム (破線) の (直接アプライした) 上清の電気泳動図オーバーレイ (GXII、Caliper Life Sciences、USA) を示す。

## 【 0 0 6 8 】

図 7 は、それぞれ HSA-インターフェロン (アルファ 2a) 発現株 CBS7435 muts (点線)、組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ (1 コピー存在; CBS7435 muts PDI プラットフォーム株と同じプロモーターを使用した) を共発現する CBS7435 muts 株 (実線)、および CBS7435 muts PDI プラットフォーム株 (菱形付き実線) の (直接アプライした) 上清の電気泳動図オーバーレイ (GXII、Caliper Life Sciences、USA) を示す。

30

## 【 0 0 6 9 】

図 8 は、それぞれ Fab 発現株 CBS7435 muts (実線)、組換え Kar2 (1 コピー存在; CBS7435 muts Kar2 プラットフォーム株と同じプロモーターを使用した) を共発現する CBS7435 muts 株 (点線)、および CBS7435 muts Kar2 プラットフォーム株 (円付き実線) の (直接アプライした) 上清の電気泳動図オーバーレイ (GXII、Caliper Life Sciences、USA) を示す。

40

## 【 実施例 】

## 【 0 0 7 0 】

実施例:

戦略:

以下の特定の実施例において使用した形質転換 DNA コンストラクトは、相同なプロモーターの最初の 700-1000 bp および Flp リコンビナーゼの発現を駆動する強く調節される特異的に突然変異誘発された AOX1 プロモーター、その後続く転写ターミネーターおよび抵抗性マーカーカセット、さらにその後続く異なった調節をされる特異的に突然変異誘発された AOX1 プロモーターならびに該相同な遺伝子の最初の 500-1000 bp からな

50

る。リコンビナーゼ認識部位は、該相同なプロモーターの最初の 100-300 bp (天然の PD1 プロモーターがおよそ 1000 bp からなり得るとの仮定に基づく)の後であって、且つ第2の特定の AOX1 プロモーターのすぐ上流(且つ制限マーカークセットの下流)に位置している。

【0071】

予想される(envisaged)座位(相同な隣接領域(flanking region)によって事前に決定される)における形質転換コンストラクトのゲノム挿入の後、上流の強力な誘導性プロモーターによって調節されるリコンビナーゼ遺伝子の転写を誘導するため、コロニーをメタノール含有培地に供する。Flp リコンビナーゼは、Flp リコンビナーゼ認識部位に作用し、それにより、相同なプロモーターのほとんど、強力な誘導性 AOX1 プロモーター変異体ならびに抵抗性マーカークセット全体を切除し、相同なプロモーターの残余画分(residual fraction)および対象とする相同な遺伝子を駆動する異なった調節をされる特異的に突然変異誘発された AOX1 プロモーターを残す。

10

【0072】

上記の戦略を用いる PDI 遺伝子転写産物のレベルの有意な増大の検証のために、ヒト血清トランスフェリンならびに N-グリコシル化モチーフを有さない突然変異誘発された変異体非グリコシル化トランスフェリンの合成遺伝子は、理想的なモデルタンパク質であった: 組換え発現カセットからの PDI の共発現がなければ、いずれのタンパク質も分泌され得ない。この原因は、天然の ER抵抗性 PDI タンパク質によっては十分に触媒されない、分泌を受容できるインタクトなタンパク質に関して形成される 19 個という非常に多数のジスルフィド結合である可能性が非常に高い。明らかに、異種性過剰発現によって追加の酵素を供給すると、ER におけるトランスフェリンおよび非グリコシル化トランスフェリンの翻訳後修飾は、正しくフォールディングされたタンパク質の分泌を可能にする程度に機能する。

20

【0073】

株

Ausubel, F.M., et al. (2003) Current Protocols in Molecular Biology; John Wiley & Sons, New York, US に従って標準的な分子生物学的手法を実施した。

【0074】

全ての大腸菌クローニング実験において大腸菌(E. coli) DH5 (NEB、USA) を用いた。

30

【0075】

mutS表現型(aox1遺伝子型)を有するピキア・パストリス株 CBS7435 を、全ての酵母実験において宿主として用いた(例えば Cregg and Madden in Stewart, Russell, Klein and Hiebsch (Eds) Biological Research on Industrial Yeast, vol II (1987), CRC Press, pp 1-18 を参照)。

【0076】

化合物および培地

特に断りの無い限り、全ての化合物は Carl Roth GmbH (ドイツ) および Becton, Dickinson and Company (USA) からそれぞれ購入した。滅菌水は Fresenius Kabi (オーストリア) から購入した。

40

【0077】

具体的に言及しない限り、全ての培地および成分は Pichia タンパク質発現キット(Invitrogen、USA)のプロトコールに従って調製した。

【0078】

ピキア・パストリス(P. pastoris)の形質転換、Pichia の生育条件および陽性クローンの選択

“Pichia 発現キット”(Invitrogen)に従い、標準的エレクトロポレーションプロトコールを用いてピキア・パストリスを形質転換した。ピキア・パストリスのゲノムへの発現プラスミドの付加のために、制限酵素、例えば BglIII または SacI(いずれも NEB、USA

50

から購入したものを)を用いてプラスミドDNA(1-10 µg)を直鎖化し、室温で60 分間、滅菌水に対しニトロセルロースフィルター(0.0025 µm、Millipore、USA)を用いる透析によって脱塩した。

#### 【0079】

形質転換の後、分注した 100 µl を、100 µg/ml のゼオシンが補充された YPD 寒天プレート上に播種し、30 °C で 2日間インキュベートした。

#### 【0080】

ピキア・パストリスのゲノム中における発現カセットの存在をコロニー PCR によって確認した。ゼオシン抵抗性クローンを、コロニー PCR 解析のために、非選択性培地上に再度プレATINGした。単一のコロニーを 100 µl の滅菌水に再懸濁させ、95 °C まで 5 分間加熱し、卓上遠心機において最高速度で 1 分間遠心した。10 µl の上清を、0.2 mM dNTPs、1x反応バッファー(Qiagen、Germany)、1.2 U の HotStar Taq ポリメラーゼ(Qiagen)、各々 200 nM のプライマー PPD15\_for (5'-ccaaaaccaggtgtgtcaatc-3') および PDIgene\_rev (5'-cgactggtctgagtgctagg-3') を含む 50 µl の反応の鑄型として用いた。PCR には以下のプログラムを用いた: 95 °C で 15 分、95 °C で 30 秒を 30 サイクル、61 °C で 1 分および 72 °C で 3.5 分、その後 72 °C で 10 分の最終伸長工程。得られた PCR 産物の正体を DNA 配列決定によって検証した。

#### 【0081】

(Weis et al、FEMS YR 2004)に従って、酵母培養を、YPD 培地 (1% w/v 酵母抽出物、2 % w/v ペプトンおよび 2% w/v グルコース)、最小デキストロース(MD)培地 (1.34% Yeast Nitrogen Base YNB、4 x 10<sup>-5</sup> ピオチンおよび 1% グルコース)、最小メタノール(MM)培地 (1.34% YNB、4 x 10<sup>-5</sup> ピオチンおよび 0.5% メタノール)、緩衝MD(BMD)培地 (200 mM リン酸ナトリウムバッファー pH 6.0 を含有)または MMと比較して2倍濃度(1%メタノールを含むBMM2)もしくは10倍濃度(5%メタノールを含むBMM10)のメタノールを有する緩衝MM培地のいずれかにおいて生育させた。プレート用培地は、1.5% w/v まで寒天を添加することにより凝固させた。

#### 【0082】

##### スケールアップ

Cino, J. High Yield Protein Production from Pichia pastoris Yeast: A Protocol for Benchtop Fermentation, New Brunswick Scientific, Edison, NJ. に記載されているプロトコールと同様にしてピキア・パストリスの発酵を行った。グリセロールの供給(feed)の終了時に、供給速度を調整することによってメタノール濃度(オフライン(off-line)メタノール解析)を 1% 前後に保つ目的でメタノール供給を開始した。あるいは、メタノールを供給する代わりに、プロセス時間全体において、メタノール誘導発酵の古典的なグリセロール流加(fed-batch)期間と同じ速度でグリセロールを供給した。pH値を 5.5 に設定し、アンモニアによって制御した。溶存酸素を、主として攪拌機の数によって制御し、通気速度(aeration rate)によって補助することで 30% より高く維持した。温度を 20-28 °C に設定した。細胞の乾燥重量を Whittaker, M.M. and Whittaker, J.M. (2000) Protein, Expr. Purif. 20, 105-111 に記載されている通りに決定した。

#### 【0083】

##### 分泌された標的タンパク質の測定

それぞれマイクロスケール(microscale)またはバイオリアクターにおける培養の後、上清サンプル(遠心により細胞を分離することによって得たもの)を、製造者の説明書に従って微少流体(microfluidic)キャピラリー電気泳動(GXII、Caliper Life Sciences、USA)によって解析した。内部および外部標準との標的タンパク質ピークの比較により、培養上清における標的タンパク質の収量を得た。

#### 【0084】

**実施例 1:** 天然のタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ(PDI)プロモーターと PDI 遺伝子の間における特異的に突然変異誘発された AOX1 プロモーターのプロモーター同時組み込み(co-integration)カセットの構築

形質転換される DNA コンストラクトは、相同な PDI プロモーターの最初の 500 bp (3' 末端から)(天然の PDI プロモーターがおおよそ 1000 bp からなり得るとの仮定に基づく)、および Flp リコンビナーゼの発現を駆動する、特異的に調節される突然変異誘発された AOX1 プロモーター(WO 2006/089329; 配列番号1に由来)、その後続く CYC1 転写ターミネーターおよびゼオシン抵抗性カセット(大腸菌においては EM72 プロモーターにより、ピキア・パストリスにおいては ILV5 プロモーターおよび AOD 転写ターミネーターにより機能的である)、さらにその後続く相同な PDI 遺伝子の最初の 500 bp からなる。リコンビナーゼの認識部位は、該特異的 AOX1 プロモーターの後であって、且つ相同な PDI 遺伝子のすぐ上流に位置している(図1)。この DNA 断片を、合成により作成される DNA として DNA2.0 (Menlo Park, USA) に注文した。

10

## 【 0 0 8 5 】

実施例 2: CBS7435 muts へのプロモーター組み込みコンストラクトの形質転換、ゲノム配置(genomic constellation)の確認、メタノール培地上での増殖、ならびにカセットの切除および確認

形質転換および寒天プレート上での選択の後、コロニー PCR により、20 個のコロニーが、組み込まれた形質転換カセットを正しいゲノム上の配向で保有していることを確認した。

## 【 0 0 8 6 】

クローンを 5 日間(大きな単一のコロニーが形成されるまで)、最小メタノール寒天プレートに移し、これを全部で 3 回連続して行った。その後、FRT 部位の間の DNA 領域(相同なプロモーター領域のほとんどの部分、強力な誘導性 AOX1 プロモーターおよび Flp リコンビナーゼ、抵抗性マーカーカセット)の切除を、選択マーカー(ゼオシン)を含む Y PhyD プレート上での逆再ストリーク(counter-restreaking)によってチェックした: 陽性クローン、即ち切除が起こったクローンはこれらのプレート上で生育することができなかった。コロニー PCR により、残存している FRT 部位および(インタクトな)PDI 遺伝子がこれに続く特異的に突然変異誘発された AOX1 プロモーターの上流における、相同な PDI プロモーターの存在が証明された(図2、配列番号2)。

20

## 【 0 0 8 7 】

配列番号 2: ゲノム PDI 座位について得られた配列

太字: 天然の PDI プロモーター領域 (非改変株における天然の PDI 遺伝子の 1000 bp 上流)

イタリック体: 突然変異誘発された AOX1 プロモーター

標準書体: 5' kozak 配列を有する天然の PDI 遺伝子 (最初の 892 塩基)

下付き文字: FRT 部位

30

## 【化 4】

aagggagacataattcggctattgtttactttgcgccacagtagcgttaagaacattgtttgt  
tcgatttattgggctgttgataaaattcaattgattacgttcgcatactagctatcataaactaa  
gcaccaccttacaccactttctcactgaagattttcgacatcaaatttctcttggatcaccatc  
aaccttgtgtctacatgtccttgtctttgaacctaaatcagatagccgtgcggggttgtgggcat  
attgcctcgtattccggagattcacattgccattcctaataatTTTTcagcgacgcaccgaagct  
tctacagagactcacgatcctcgcatactagagctgatagaaaatctacaggatgccagggttc  
ctccattcttcatgtataacgggtatactttaaagcagcaccaaaaagaaggtttctcatatgaa  
aagacgccagaatttatatggtccaggaaaaaacaactctctttactacaaaatttgaacagg  
tgtcctgcctgcggaaactacaaacgatcacacaccctctgcattgctgtaggacaaatca  
ggagacattggaacgactctgttctcaacaggaggcatttctgtgaagagttgttaactcttt  
ggatgagaagattctttatccaggaaagaagaactgccgatgaacgaactttacgtaagaag  
gagtggtgaagagaagacccgaacactcctgttgaatagaacacgaacactgtaaatagaa  
taaaagaaaacttggatagtagaacttcaatgtagtgtttctattgtcttacgggctcttttag  
attgcaatcccagaatggaatcgtcctctttctcaaccactcaaagataatctaccagaca  
tacctagccctccatcccagcaccagctcggatcaccctaaaactcaataattgaacacg  
tactgatttccaaaccttcttcttctctatctataagaagatctaacatccaaagacgaaag  
gttgaatgaaaccttttggcatccgacatccacaggtccattctcacacataagtgcacaaacg  
caacaggaggggatacactagcagcagaccgttgcaaacgcaggacctcactcctctctctct  
caacacccacttttggcatcgaaaaaccagcccagttattgggcttgattggagctcgtcatt  
ccaattccttctattaggctactaacaccatgactttattagcctgtctatcctggccccctg  
gagaggttcatgtttgtttatttccgaatgcaacaagctccgattacaccggaacatcactcc  
agatgagggcttctgagtggtgggtcaaatagtttcatgttccccaaatggccaaaactgac  
agtttaaacgctgtcttggaaactaatatgacaaaagcgtgatctcatccaagatgaaactaagt  
ttgggtcgttgaatgctaacggccagttggtcaaaaagaaacttccaaaagtcggcataccgt  
ttgtcttgtttggtattgattgacgaatgctcaaaaaataatctcattaatgcttagcgcagtct  
ctctatcgcttctgaaccccggtgcacctgtgcccgaacgcaaatggggaaacaccccgcttttt  
ggatgattatgcattgtctccacactgctgatagcctaacttcatgatcaaaatTTAACTGTT  
ctaaacccctacttgacagcaatataaaacagaaggaagctgcccgtctttaaaccttttttt  
tatcatcattattagcttactttcataattgogactggtccaattgacaagcttttgatttta  
acgacttttaacgacaacttgagaagatcaaaaaacaactaattattgaaa<sup>gaagttcctatactttct</sup>  
agagaataggaacttcGaaacgatgcaattcaactggaatattaaaactgtggcaagtattttgtcc  
gctctcacactagcacaagcaagtgatcaggaggctattgctccagaggactctcatgtctca  
aattgactgaagccacttttgagtctttcatcaccagtaatoctcacgttttggcagagttttt  
tgccccttgggtggtcactgtaagaagttgggcccctgaacttgtttctgctgcccagatctta  
aaggacaatgagcagggttaagattgctcaaatgattgtacggaggagaaggaattatgtcaag  
gotacgaaattaaagggtatcctactttgaaggtgttccatgggtgaggttgaggtcccgaagtga  
ctatcaaggtcaaagacagagccaaagcattgtcagctatatgctaaagcagagtttaacccct  
gtcagtgaaatcaatgcaaccaaaagatttagacgacacaatcgccgaggcaaaagagcccgtga  
ttgtgcaagtactaccggaagatgcacccaacttggaaatcaacaccacattttacggagttgc  
cgtactctcagagagaaattcacttttgtctccactaagtctactgattatgccccaaatac  
actagcagactcagactcctgctatattgcttgcagacctggogaggaaacctagtgtttactctg  
gtgaggagttagatgagactcatttgggtcactggattgatattgagtcocaaacctctatttgg  
agacattgacggatccacctcaaatcatatgctgaagtaaacatcccttttagcctactatctc  
tatgagaacgaagaacaacgtgctgctgctgcccgatattattaaccttttgcataaagacaaac  
gtggcaaaattaact

## 【0088】

**実施例 3:** マイクロスケールにおける、メタノール誘導条件下での相同な PDI の上昇したレベルを有する株におけるトランスフェリンの分泌生産

トランスフェリン(配列番号3)および非グリコシル化トランスフェリン(配列番号4; 両方の N-グリコシル化モチーフを突然変異させる部位特異的二重突然変異誘発によって作成された非グリコシル化トランスフェリン)をコードする遺伝子を、WO 2006/089329 において同定されている配列番号 1 のヌクレオチド 170 から 235 の欠失を含む特異的に突

然変異誘発された AOX1 プロモーター(WO 2006/089329)の制御下にある未処理の宿主 CBS 7435 muts および上記の相同な PDI の上昇したレベルを有する可能性がある対応する株のゲノムに組み込んだ。両方のトランスフェリン変異体の遺伝情報の存在をコロニー PCR (PAOX1 と結合するフォワードプライマー、最初の 80 bp 以内において両方のトランスフェリン遺伝子と結合するリバースプライマー) によって証明した。マイクロスケールにおいて培養すると、基本の株である CBS7435 muts 宿主および相同な PDI の上昇したレベルを有する可能性がある対応する株のいずれも、いかなる形態においても(微量流体キャピラリー電気泳動によって検出できるレベルまで)トランスフェリンを分泌することができなかった。

【 0 0 8 9 】

プライマー配列 (配列番号8)

5' CAGCACACCATCTAACAG 3'

【 0 0 9 0 】

配列番号3: トランスフェリン

【化5】

```

gttccagataaagactggttagatgggtgtgctgtttcagagcatgaggctactaaatgtcaatcctt
ttagagatcacatgaagtctgtcatcccatctgatggccatccgtggcttgtgtgaagaaagc
ttcttaccttgattgtatccgggccatcgtgctaacgaagctgacgcagtcaccttggacgcg
ggtttagtgtaacgacgcataatctagcccaaaacaacttaaagccagttgtcgctgagttttacg
gtagcaaggaagatccacagacattctactacgcctgctggttgtgaaaaaggactccggttt
tcaaatgaaccagcttagagggaaagaagtcattgtcataccggacttggaaagatcagctgggtgg
aacattccaatcgggttggctgatttgcgatcttccagagccacggaagccttgggagaaggctg
ttgctaatttctttctggttcatgtgctcctgtgcccagcggtagccacttccacagttgtg
ccagctgtgtccaggctgocggttgttcaacattaaaccaataacttcggttactccggtgocggtc
aagtgccttaaggacgggtgctgggtgatgttgcggttggtaaacattccactattttcgagaacc
tggcaataaagcagatagagatcaatacgaactggttatgcctagataaacactagaaaaacctgt
tgacgagtacaaggactgtcaccttgcccaagtgccatctcacactgttgttgccagatcgatg
ggtggtaaaagaggaccttatttgggagttgctgaaccaagctcaagaacacttcggaaaggaca
agtcaaaaggaatttcaattgttttctctcctcaccgaaaggatttggctttttaaggattctgc
tcatgggttcttgaaggtcccaccaagaatggatgcaaaaatgtaccttgggttacgagtacgta
actgocgattagaaatttaagagaaggtagctgtccagaagcccccaactgatgaatgtaagccag
ttaaattgggtgctcattgtctcaccacgaaagattgaagtgtgacgaatggctctgtgaactcagt
tggtaaaaattgagtgtgtgctggccgaaactacggaagattgtattgcaaagatcatgaacgga
gaagcagatgccatgtcactcagcggaggtttcgtgtatattgcccgttaagtgtggccttgttc
cagttttggcagagaactacaacaaatccgataactgtgaagacactcctgaggctggctactt
cgcagttgctgttggtaaaaagtctgcttcggacctaacctgggacaacctgaagggttaagaag
tcttgtcacaccgcagtcgggagaaccgcaggatggaacatcccaatgggtcttctttacaata
agatcaaccactgtaggtttgaocgagttcttttctgaaggttgtgctcctggatctaagaagga
ctcctctcttgttaaactgtgtatgggatctgggttgaactgtgctgagccaaacaacaagaa
ggttattacggttacacocggagcttttagatgtttgggtgaaaaggagacggttgccttcgtca
aacacaaaactgtgcctcagaacactgggtggaagaaccccgatccttgggcaaagaatttgaa
cgagaaggattacgagttattatgtttggacggtagccgtaaaccagttgaagaatacgcacaat
tgtcacttggctagagcaccacacgcctcgtgactagaaaagataaggaggcttgtgttc
acaagatttgcgtcaacaacaacatttgtttggatctaacggttactgattgttctggtaactt
ctgtttgttcctgtagcagactaaggatctgttatttagggacgacaccggttgcctggccaag
ttgcacgaccgtaaacacttacgagaagatttaggagaggaatacgtgaaggccgttggcaatt
tgagaaagtgtctacctcttctctttttagaagcctgtacctttagaagaccttaa

```

【 0 0 9 1 】

配列番号4: 非グリコシル化トランスフェリン

10

20

30

40

## 【化 6】

```

gttccagataagactggttagatgggtgtgctgtttcagagcatgaggctactaaatgtcaatcct
ttagagatcacatgaagtctgtcatcccatctgatgggtccatccgtggcttgtgtgaagaaagc
ttcttaccttgattgtatccggccatcgctgctaacgaagctgacgcagtcaccttggagcgcg
ggtttagtgtacgacgcatactagccccaaacaacttaaagccagttgtogctgagttttacg
gtagcaaggaagatccacagacattctactacgcccgtcgctgttgtgaaaaggactccggttt
tcaaatgaaccagcttagaggggaagaagtcagtgcataccggacttggagatcagctggttgg
aacattccaatcgggttctgtgattgcatcttccagagccacggaagcctttggagaaggctg
ttgctaatttcttttctggttcatgtgctccctgtgcccagcggtagccgactttccacagtgtg
ccagctgtgtccaggctgoggttgttcaacattaaaccaataacttccggttactccggtgogttc
aagtgccttaaggacgggtgctgggtgatgttgcggttggtaaacattccactattttccgagaacc
tggcaataaagcagatagagatcaatacgaactgttatgcctagataaacactagaaaacctgt
tgacgagtacaaggactgtcaccttgcocaaagtgcctctcacactgttgttggcagatcgatg
gggtgtaagaggaccttatttgggagttgctgaaccaagctcaagaacacttccggaaggaca
agtcaaaaggaatttcaattgttttcttctcctcacgaaaggatttgccttttaaggattctgc
tcatggtttcttgaaggtcccaccaagaatggatgcaaaaatgtaccttgggttacgagtacgta
actgcgattagaaatttaagagaaggtagctgtccagaagccccaaactgatgaatgtaagccag
ttaaattgggtgctattgtctcaccacgaaagattgaagtgtgacgaatggctgtgaaactcagt
tggtaaaattgagtggtgtgctggccgaaactacggaagattgtattgcaaagatcatgaaocgga
gaagcagatgccatgtcactcgacggaggttctcggtatattgcccgttaagtgtggccttgttc
cagttttggcagagaactacccaaaatccgataaactgtgaagacactcctgaggctggctactt
cgcagttgctgttggtaaaaagtctgcttcggacctaacctgggacaacctgaagggttaagaag
tcttgtcacaccgcagtcgggagaaccgcaggatggaacatcccaatgggtcttctttacaata
agatcaaccactgtaggtttgacgagttcttttctgaaggttgtgctcctggatctaagaagga
ctcctctcttggtaaaactgtgtatgggatctgggttgaactgtgctgagccaaacaacaaggaa
ggttattacgggttacaccggagcttttagatgttgggtgaaaaggagacggttgccttcgtca
aacaccaaactgtgctcagaacactgggtggaagaaccccgatccttgggcaagaatttgaa
cgagaaggattacgagttattatgttggacgggtaccctgaaaccagttgaagaatacggcaat
tgctacttggctagagcaccacacgcgcgtcgctgactagaaaagataaggaggcttgtgttc
acaagattttgcgtcaacaacaacatttgtttggatctcaagttactgattgttctggtaactt
ctgtttgttccgtagcgagactaaggatctgttatttagggacgacaccggttgcctggccaag
ttgacagaccgtaaacacttaocgagaagatttaggagaggaatacgtgaaggccggttggcaatt
tgagaaagtgtctactcttctcttttagaagcctgtacctttagaagaccttaa

```

## 【 0 0 9 2】

**実施例 4:** 特異的に突然変異誘発された AOX1 プロモーターによる天然のタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ(PDI)プロモーターのプロモーター置換カセットの構築

形質転換される DNA コンストラクトは、相同な PDI プロモーターの最初の 1000 bp (天然の PDI プロモーターがおよそ 1000 bp からなり得るとの仮定に基づく)、および Flp リコンビナーゼの発現を駆動する特異的に調節される突然変異誘発された AOX1 プロモーター(WO 2006/089329)、その後続く CYC1 転写ターミネーターおよびゼオシン抵抗性カセット(大腸菌においては EM72 プロモーターにより、ピキア・パストリスにおいては ILV5 プロモーターおよび AOD 転写ターミネーターにより機能的である)、さらにその後続く異なった調節をされる特異的に突然変異誘発された AOX1 プロモーター(WO 2006/089329)および相同な PDI 遺伝子の最初の 500 bp からなる。リコンビナーゼの認識部位は、相同なプロモーターの最初の 300 bp の後であって、且つ第 2 の特異的 AOX1 プロモーターのすぐ上流に位置している(図3)。この DNA 断片を、合成により作成される DNA として DNA2.0 (Menlo Park、USA) に注文した。

## 【 0 0 9 3】

**実施例 5:** CBS7435 muts へのコンストラクトの形質転換、ゲノム配置の確認、メタノール培地上での増殖、ならびにカセットの切除および確認

形質転換および寒天プレート上での選択の後、コロニー PCR により、20 個のコロニー

が、組み込まれた形質転換カセットを正しいゲノム上の配向で保有していることを確認した。

【0094】

クローンを5日間(大きな単一のコロニーが形成されるまで)、最小メタノール寒天プレート上に移し、これを全部で3回連続して行った。その後、FRT 部位の間の DNA 領域(相同なプロモーター領域のほとんどの部分、強力な誘導性 AOX1 プロモーターおよび FLP リコンビナーゼ、抵抗性マーカーカセット)の切除を、選択マーカー(ゼオシン)を含む YPhyD プレート上での逆再ストリークによってチェックした: 陽性クローン、即ち切除が起こったクローンはこれらのプレート上で生育することができなかった。コロニー PCR により、相同なプロモーターの上流部分のみ、ならびに隣接する特異的 AOX1 プロモーターおよび相同な PDI 遺伝子の存在が証明された(図4、配列番号5)。

10

【0095】

配列番号5: ゲノム PDI 座位について得られた配列

太字: 切断された天然の PDI プロモーター領域(天然の PDI 遺伝子の 1000 bp 上流にある元の位置の塩基から開始)、残り 333 bp

イタリック体: 突然変異誘発された AOX1 プロモーター

標準書体: 5' kozak 配列を有する天然の PDI 遺伝子(最初の 892 塩基)

下付き文字: FRT 部位

## 【化7】

```

aaggagacatattcggtattgtttactttgcgccacagtagcgtaagaacattgtttgt
tcgatttattgggctgttgataaattcaattgattacgttgcatactagctatcataaactaa
gcaccaccttacaccactttctcactgaagattttcgacatcaaattttctcttgatcaccatc
aaccttgtgtctacatgtccttgtctttgaaacctaaatcagatagccgtgcggttgtgggcat
attgcctcgtattccggagattcacattgccattcctaataatcttttcagcgacgcaccgaagct
tctacagagactcgaagttcctatactttctagagaataggaacttcagatcctaacaatccaaagacgaaagg
ttgaatgaaacctttttgcatccgacatccacaggtccattctcacacataagtgcacaaacgc
aacaggaggggatacactagcagcagacogttgcaaacgcaggacctccactcctctctctc
aacacccacttttgccatcgaaaaaccagcccagttattgggcttgattggagctcgcctcattc
caattcctctctattaggctactaacaccatgactttattagcctgtctatcctggccccctgg
cgaggttcatgtttgtttatttccgaatgcaacaagctccgcattacaccgaacatcactcca
gatgagggtctctgagtggtgggtcaaatagtttcatgttccccaaatggcccaaaactgaca
gtttaaaccgtctcttggaaacctaatatgacaaaagcgtgatctcatccaagatgaactaagtt
tggttcgttgaaatgctaaccggcagttggtaaaaaagaaactccaaaagtccgcataaccgtt
tgtcttgtttggtattgattgacgaatgctcaaaaaataatctcattaatgcttagcgcagtctc
tctatcgcttctgaaccccggtgcacctgtgcccgaacgcaaattggggaaacaccogctttttg
gatgattatgcatgtctccacactgctgatagcctaacgttcatgatcaaaatttaactgttc
taacccctacttgacagcaatataaaacagaaggaagctgcctgtcttaaaccctttttttt
atcatcattattagcttactttcataattgcgactggttccaattgacaagcttttgattttaa
cgacttttaacgacaacttgagaagatcaaaaaacaactaattattgaaatccgaaacgatgca
attcaactggaatattaaaactgtggcaagtattttgtccgctctcacactagcacaagcaagt
gatcaggaggctattgctccagaggactctcatgtcgtcaaattgactgaagccacttttgagt
ctttcatcaccagtaatcctcaogttttggcagagttttttgccccttggtgtggctcactgtaa
gaagttgggcccctgaacttgtttctgctgccgagattttaaaggacaatgagcaggttaagatt
gctcaaatgattgtacggaggagaaggaattatgtcaaggctacgaaattaaagggtatoccta
ctttgaaggtgtccatggtgaggttgaggtoocaaagtactatcaaggtcaaaagacagagcca
aagcattgtcagctatatgctaagcagagtttaccocctgtcagtgaaatcaatgcaacccaaa
gatttagacgacacaatcgccgaggcaaaagagcccgtgattgtgcaagtactacctgcagcgg
aagatgcatccaacttggaatctaaccacacattttacggagttgcccgtactctcagagagaa
attcacttttgtctccactaagtctactgattatgccccaaaatacactagcgaactcgactcct
gctatattgcttgcagacctggcgaggaaacctagtgtttactctggtgaggagttagatgaga
ctcatttgggtgcaactggattgatattgagtcacaaacctctatattggagacattgaaggatccac
cttcaaatcatatgctgaagctaacatcccttttagcctactatttctatgagaacgaagaacaa
cgtgctgctgctgccgatattattaaccttttgctaaagagcaacgtggcaaaattaactt

```

## 【0096】

抵抗性カセットの切除により、この抗生物質上での逆選択(counter-selection)は、負の生育挙動(即ち、抗生物質に対する抵抗性の欠如)によって陽性株を明らかにした。さらに、コロニー PCR により、意図したゲノム配置が確認された。陽性株の1つを選択し、CBS7435 muts PDI プラットフォームと命名した。

## 【0097】

**実施例 6:** マイクロスケールにおける、メタノール誘導条件下での相同な PDI の上昇したレベルを有する株におけるトランスフェリンの分泌生産 40

トランスフェリンおよび非グリコシル化トランスフェリン(実施例3を参照)をコードする遺伝子を、特異的に突然変異誘発された AOX1 プロモーター(WO 2006/089329)の制御下にある未処理の宿主 CBS7435 muts および上記の相同な PDI の上昇したレベルを有する可能性がある対応する株のゲノムに組み込んだ。両方のトランスフェリンの遺伝情報の存在を、コロニー PCR (PAOX1 と結合するフォワードプライマー、最初の 80 bp 以内において両方のトランスフェリン遺伝子と結合するリバースプライマー)によって証明した。マイクロスケールにおいて培養すると、基本の株である CBS7435 muts 宿主はいかなる形態においても(微量流体キャピラリー電気泳動によって検出できるレベルまで)トランスフェリンを分泌することができなかったが、相同な PDI の上昇したレベルを有する可能性 50

がある株は、上清において検出可能な両方のトランスフェリン変異体を生産した(表1、図5および6)。この事は、基本の株とは反対に、特異的に突然変異誘発された PAOX1 によって PDI 活性を両方のトランスフェリン変異体のフォールディング/分泌を促進するのに十分な高さに増大させたことを示すものである。

【 0 0 9 8 】

【表 1】

株	トランスフェリン mg/L	非グリコシル化トランスフェリン mg/L
CBS7435 muts	0	0
CBS7435 muts PDI プラットフォーム	20	40

10

表 1: それぞれ CBS7435 muts 株および CBS7435 muts PDI プラットフォーム株により生産されるトランスフェリンおよび非グリコシル化トランスフェリンについての、マイクロスケール培養上清中の標的タンパク質の力価。

20

【 0 0 9 9 】

実施例 7: バイオリアクター培養における、メタノール誘導条件下での相同な PDI の上昇したレベルを有する株におけるトランスフェリンおよび非グリコシル化トランスフェリンの分泌生産

組み込まれたトランスフェリンおよび非グリコシル化トランスフェリン発現カセットならびに証明された分泌速度(非分泌型 CBS7435 muts 株と比較して)を有する CBS7435 muts PDI プラットフォーム株を、1L のバイオリアクターにおいて制御された条件下で培養した。109 時間の全プロセス時間(90時間のメタノール誘導)の後、発酵上清を微量流体キャピラリー電気泳動によってアッセイした。希釈系列の作成ならびに内部および外部標準との比較の後、高い濃度の両方のタンパク質を検出することができた(表2)。

30

【 0 1 0 0 】

【表 2】

株	トランスフェリン g/L	非グリコシル化トランスフェリン g/L
CBS7435 muts PDI プラットフォーム	5.4	5.2

表 2: CBS7435 muts PDI プラットフォーム株により生産されるトランスフェリンおよび非グリコシル化トランスフェリンについての、バイオリアクター培養上清中の標的タンパク質の推定力価。

40

【 0 1 0 1 】

実施例 8: 基本の CBS7435 muts 株および相同な PDI の潜在的に上昇したレベルを有する株における相同な PDI の転写産物レベルの測定

転写産物のレベル(存在する mRNA とハイブリダイズした特異的プライマーに基づく)を、回分段階(batch phase)(グリセロールが大量に存在)、グリセロール流加段階(fed-batch phase)(グリセロールが抑制解除量で存在)およびメタノール誘導段階(組換えタンパク

50

質の生産段階)中のいくつかの時点における発酵サンプルから解析した (PlexPress、Helsinki、Finland)。等しいバイオマス量の CBS7435 muts および組み込まれた組換え発現カセットを有さない CBS7435 muts PDI プラットフォーム。代謝的に活性な細胞と関連させるため、ハウスキーピング遺伝子の発現レベルとの比較によってさらに標準化を行った。

【 0 1 0 2 】

回分段階(高グリセロール)の間、天然の PDI1 遺伝子の mRNA レベルは CBS7435 muts 株において上昇したが(CBS7435 muts PDI プラットフォーム株における PDI1 遺伝子の発現を調節する特異的 AOX1 プロモーターに対するグリセロールの抑制効果のため)、抑制解除条件下(グリセロール流加)およびメタノール誘導(組換えタンパク質の生産段階)の全工程においては、天然の PDI1 遺伝子の mRNA レベルは、CBS7435 muts とは反対に、CBS 7435 muts PDI プラットフォーム株において 60 倍増大した。

10

【 0 1 0 3 】

実施例 9: マイクロスケールにおけるメタノール誘導条件下およびバイオリクター条件下における、相同な PDI の上昇したレベルを有する株におけるインターロイキン-2 およびヒト血清アルブミン(HSA)の分泌生産

トランスフェリンおよび非グリコシル化トランスフェリンに関する上記の実施例と同様に、インターロイキン-2 (配列番号6) または HSA (配列番号7) 用の発現カセットを、特異的に突然変異誘発された AOX1 プロモーター(WO 2006/089329)の制御下にある未処理の宿主 CBS7435 muts および上記の相同な PDI の上昇したレベルを有する対応する株のゲノムに形質転換した。両方の遺伝子の遺伝情報の存在を、コロニー PCR (PAOX1 と結合するフォワードプライマー、最初の 80 bp 以内においてインターロイキン-2 または HSA 遺伝子と結合するリバースプライマー) によって証明した。

20

【 0 1 0 4 】

マイクロスケールにおいて培養すると、両方の株(基本株 CBS7435 muts および相同な PDI の上昇したレベルを有する株)がインターロイキン-2 または HSA を分泌したが、バイオリクター条件下では、CBS7435 muts PDI プラットフォーム株によって、ほぼ 2倍高い HSA の収量および 4倍高いインターロイキン-2 の収量が達成された。

【 0 1 0 5 】

プライマー HSA (配列番号9)

30

5' GGCCTTGAATCTATGAG 3'

プライマー IL2 (配列番号10)

5' CGTAGAAGAAGAGGTTGG 3'

【 0 1 0 6 】

配列番号 6 IL-2

【化 8】

```
gcaccaacctcttcttctctacgaaaaagactcagcttcaattggagcaccttttactggacttgc
aaatgatcctgaacggtatcaacaactacaaaaaccctaaacttactagaatggtgaccttcaa
gttttacatgccaaagaaggctaccgaattgaagcacttgcaatgtctggaggaggaggtgaag
ccattggaagaagttttgaacttggcacagtcgaagaacttccaccttagacctagagacttga
tttctaacatcaacgtcatcgtcctggagcttaaggggtccgagactactttcatgtgtgagta
cgctgacgagacagcgactattgtcgagttcttgaatagatggatcactttcgcccaatccatt
atctccaccttaacctaa
```

40

【 0 1 0 7 】

配列番号 7 HSA

50

## 【化9】

gatgcacacaaatcagaagttgctcatagattcaaggacctcggagaagagaacttcaaggctc  
ttgtccttatcgcttttcgctcaataccttcagcaatgtccttttgaggaccacgttaagttggt  
gaacgaagttaccgagttcgctaaaacttgctgtagctgacgaatctgctgagaactgtgacaag  
tcacttcacactctttttgggtgacaagctttgtactgtcgtacccttcgtgaaacctacggcg  
aaatggccgattgctgtgctaagcaggaacctgaaagaaacgaatgtttcttgcagcacaagga  
cgataacccccaatcttcctcgctttgggttcgctcctgaggtcgacgcttatgtgcaccgcttttcat  
gacaacgaagagactttcttaagaaatacctttacgaaatcgctcgctcaccataacttct  
acgctccagagctggttcttcgcaaagagatataaggctgctttcactgagtggtgccaagc  
tgctgacaaggcagcttgctctattgcttaagcttgacgaattgctgagatgagggtaaagcatct  
tccgccaagcagagattgaaatgctgcttcttcgacagaagtttggtgagcgagctttcaagcct  
gggccgtggctaggttgagccaacgcttttcctaaagctgagttcgctgaagtttotaagttggt  
tactgatcttactaaggtgcacactgaatggtgccaacggtgaccttctggagtgtgctgatgac  
cgtgcagatttggctaagtataattgtgaaaaccaagattctatttcttctaaactaaaggaat  
ggtgtgaaaagccacttcttgagaaaagtcactgtatcgctgaggtggagaacgacgagatgcc  
agctgaccttcctagcctggctgctgatttcgcttgaatctaaggacgtatgcaagaattaogca  
gaggccaaggatgttttcttgcatgtttttgtacgagtagcctagaagacacctgactact  
ccgtagttctcttgctgaggttgcaaaagacctacgagactacctagagaagtgttgcgcccgc  
agctgatcctcacgagtggttatgctaaagtttttgatgagtttaaacctttgggtgaggagcca  
caaaacttgattaagcagaactgagcttttcgaacaattgggggaatacaagttccaaaatg  
ccttgctagtcaggtacacccaaaaggtccctcaggtcagcaccaccaaccttagtcgaggtgtc  
cagaaatttgggcaaagttggttctaaatggtgcaagcaccagaagctaagaggatgccatgt  
gccgaagactaccttccgctgcttctgaaccaactctgtgttttgcaacgaaaagactccagtct  
cagaccgtgtcacgaaatggtgtaccgagctctctgggttaacagaagacctgtttctctgcttt  
ggaagttgacgaaacttacgtcccaaaggagttcaacgcggagactttcaccttccacgcccgc  
atgtgtacacttccgagaaggaaagacaaaatcaagaagcaaacccgactagttgaattgggtta  
aacataagcctaaggctaccaaagaacaattgaaagcagttatggatgattttgcggctttcgt  
ggaaaagtgttgtaaggctgatgacaaggaaacctgttttcgcccgaagaaggttaagaagttagtc  
gccgcctctcaggctgctcttgactgtaa

10

20

30

## 【0108】

## 要約:

PDI プロモーター(5'相同性)および PDI 遺伝子の始めの部分(3'相同性)における組換えカセットの正しい二重交差は、天然の PDI プロモーターと天然の PDI 遺伝子の間におけるリコンビナーゼ発現カセット、抵抗性カセットおよび特異的 AOX1 プロモーター変異体の挿入組み込みをもたらした。グリセロールまたはグルコース上における継続的生育は、リコンビナーゼの発現を駆動する AOX1 プロモーター変異体からの転写を強く抑制し、そのため、かかる条件下では切除は起こらなかった。

40

## 【0109】

メタノール含有培地上で生育させると、リコンビナーゼ遺伝子の転写が始まり、続いて2つの Flp リコンビナーゼ認識部位の間の DNA 断片の切除がもたらされ、それにより天然の PDI プロモーターの大部分、リコンビナーゼ発現カセットおよび抵抗性カセットが切除され、天然の PDI 遺伝子のすぐ上流の特異的に突然変異誘発された AOX1 プロモーターのみが残る。

## 【0110】

天然の PDI プロモーターと PDI 遺伝子の間における特異的に突然変異誘発された PAOX1 の直接組み込みを用いる別のアプローチにおいては、トランスフェリンおよび非グリ

50

コシル化トランスフェリンの発現は不可能であった。これは、上流の天然の PDI プロモーターによってもたらされる抑制効果、または突然変異誘発された AOX1 プロモーターと PDI 遺伝子の間に残存する FRT 部位によってもたらされる突然変異誘発された PAOX1 からの PDI 遺伝子の非効率の転写に起因し得る。

【 0 1 1 1 】

抵抗性カセットの切除により、この抗生物質上での逆選択は、負の生育挙動(即ち、抗生物質に対する抵抗性の欠如)によって陽性株を明らかにした。さらに、コロニー PCR により、意図したゲノム配置が確認された。陽性株の 1 つを選択し、CBS7435 muts PDI プラットフォームと命名した。

【 0 1 1 2 】

親株である CBS7435 muts および新たに作成した CBS7435 muts PDI プラットフォームを、組換え発現カセットからのいかなる標的遺伝子の異種性発現をも伴わず、1L のバイオリアクターにおいて、制御された古典的なメタノール誘導条件下で培養した。培養の異なる時点における両方の株の天然の PDI の転写産物レベルにより、グリセロール回分条件下において、PDI1 遺伝子の mRNA の存在が CBS7435 muts PDI プラットフォームと比較して親株においてより高いことが明らかとなった。低レベルのグリセロールを供給した場合ならびにメタノール誘導条件下においては、CBS7435 muts と比較して CBS7435 muts PDI プラットフォーム株において有意に多い mRNA (60倍) が存在していた。

【 0 1 1 3 】

トランスフェリンおよび/または非グリコシル化トランスフェリンの分泌発現のための、増大したレベルの天然の PDI の必要量を検証するため、両方の遺伝子を、両方の株、即ち CBS7435 muts および CBS7435 muts PDI プラットフォームに(別々に)形質転換した。マイクロスケール培養の後、上清を微量流体キャピラリー電気泳動によって解析した。CBS7435 muts においては標的タンパク質を検出できなかったが、CBS7435 muts PDI プラットフォームは、明らかに、両方のタンパク質を効率的に分泌するのに十分な天然の PDI を(導入された AOX1 プロモーター変異体の転写過剰調節(over-regulation)によって)生産した(図5および6)。制御されたメタノール誘導条件下におけるバイオリアクター培養により、高度にジスルフィド結合した(highly disulfide-bonded)両方の標的タンパク質の高濃度での存在が確認された。

【 0 1 1 4 】

メタノールを含まない条件下におけるトランスフェリンおよび非グリコシル化トランスフェリンの増大した生産への特異的 AOX1 プロモーター変異体(WO 2006/089329)の適用も、発現のために CBS7435 muts PDI プラットフォーム株を用いるマイクロスケールおよびバイオリアクター条件において効率的に機能することが証明された。

【 0 1 1 5 】

CBS7435 muts 株、即ち天然の PDI の増大または異種性 PDI の過剰生産を伴わない株によっても高レベルで生産される標的タンパク質、例えばヒト血清アルブミン(HSA)に対しても、CBS7435 muts PDI プラットフォーム株は生産レベルを増大させる手段を提供する。CBS7435 muts において培養上清中に 8g/L の HSA が生産された一方、CBS7435 muts PDI プラットフォームは、使用したプロモーター、組み込まれた発現カセットのコピー数および培養条件に関して同一の条件下で 14g/L の HSA を分泌した。

【 0 1 1 6 】

HSA は 17 個のジスルフィド結合の形成を必要とするものであるため、その天然のフォールディングのために 1 個のみのジスルフィド結合が形成されることを要するさらなるモデルタンパク質を試験した。インターロイキン-2 は、バイオリアクターにおいて制御された条件下で、CBS7435 muts PDI プラットフォーム株から、CBS7435 muts 株と比較して 4 倍高い収量で発現した。

【 0 1 1 7 】

実施例 10: 組換え発現される 1 コピーの“天然の” PDI を有する株および改変を有さない野生型株における分泌生産との直接比較における、マイクロスケールにおけるメタノ

10

20

30

40

50

ール誘導条件下での、相同な PDI の上昇したレベルを有する株における HSA融合タンパク質(HSA-インターフェロン(アルファ2a))の分泌生産。

上記の実施例と同様に、特異的に突然変異誘発された AOX1 プロモーター(WO 2006/089 329)の制御下にある HSA-インターフェロン(アルファ2a)(配列番号16)の発現カセットを、未処理の宿主 CBS7435 muts および上記の相同な PDI の上昇したレベルを有する対応する株のゲノムに形質転換した。さらに、HSA-インターフェロン(アルファ2a)の発現カセット、ならびに相同な PDI の上昇したレベルを有する株において天然の PDI 遺伝子の発現を制御している同一の突然変異誘発された AOX1 プロモーターの制御下にある天然の PDI 遺伝子の発現カセットを有する異なるプラスミドの両方を用いて、未処理の宿主株 CBS7435 muts を形質転換した。導入された全ての遺伝子の遺伝情報の存在を、コロニー PCR (PAOX1 と結合するフォワードプライマー、最初の 80 bp 以内においてインターフェロン(アルファ2a)または HSA 遺伝子と結合するリバースプライマー)によって証明した。組換えにより導入された天然の PDI 遺伝子の遺伝情報の存在を、コロニー PCR (天然の PDI 遺伝子と結合するフォワードプライマー、ジェネティシンに対する抵抗性マーカーと結合するリバースプライマー)によって証明した。

10

【 0 1 1 8 】

マイクロスケールで培養すると、3 つ全ての株 (基本の株 CBS7435 muts、相同な PDI の上昇したレベルを有する株、および組換えによって天然の PDI をも共発現する基本の株) が HSA-インターフェロン(アルファ2a)を分泌した。組換えによる天然の PDI 遺伝子の共発現は、基本の株 CBS7435 muts と比較して HSA-インターフェロン(アルファ2a)の分泌レベルを ~60%増大させたが、相同な PDI の上昇したレベルを有する株は、組換えにより天然の PDI をも共発現する基本の株と比較してさらに力価を 57% 増強させた(図7)。

20

【 0 1 1 9 】

プライマー インターフェロン(アルファ2a) (配列番号13)

5' CTTGAACCCAATGAGTGTG 3'

プライマー 天然の PDI (配列番号14)

30

5' GAAGCTGAAGAAGAAGCTG 3'

プライマー 抵抗性マーカー (配列番号15)

5' GATTGTCGCACCTGATTGCC 3'

【 0 1 2 0 】

配列番号16 HSA-インターフェロン(アルファ2a)

標準書体: HSA

下線付き: インターフェロン(アルファ2a)

## 【化 1 0】

gatgcacacaaaatcagaagttgctcatagattcaaggacctcggagaagagaacttcaaggctc  
 ttgtccttatcgctttcgctcaataccttcagcaatgtccttttgaggaccacgttaagtgggt  
 gaacgaagttaccogagttogctaaaaacttgcgtagctgacgaatctgctgagaactgtgacaag  
 tcaacttcacactcttttgggtgacaagctttgtactgtcgtacccttcgtgaaacctacggcg  
 aaatggccgattgctgtgctaagcaggaacctgaaagaaacgaatgtttcttgcagcacaagga  
 cgataaccccaatcttctcctgctttgggtcgtcctgaggtcgaacttatgtgcaccgcttttcat  
 gacaacgaagagactttcttaagaaatacctttacgaaatcgctcgtcgtcaccatacttct  
 acgctccagagctgttgttctogcaaaagagatataaggctgctttcactgagtggttccaagc  
 tgctgacaaggcagcttgtctattgcctaagcttgacgaattgacgagatgagggtaaaagcatct  
 tccgccaagcagagattgaaatgcgcttcttgcagaagtttgggtgagcagctttcaaagcct  
 gggcctggttaggttgagccaacgttttctaaagctgagttcgtgaaagtcttaagtgggt  
 tactgatcttactaaggtgcacactgaatgttgcacggtgaccttctggagtgtgctgatgac  
 cgtgcagatttggctaaagtataatttgtgaaaaccaagattctatttcttctaaactaaaggaat  
 gttgtgaaaaagccacttcttgagaaaagtcaactgtatcgtcgtgaggtggagaacgacgagatgcc  
 agctgaccttcttagcctggctgctgatttctggtgaatctaaggacgtatgcaagaattacgca  
 gaggccaaggatgttttcttggcatgttttgtacgagtagcctagaagacacctgactact  
 ccgtagttctcttgcgtgaggttggcaaacctacgagactacctagagaagtgttgcgcgcg  
 agctgatcctcagcagtgattatgctaaagttttggatgagtttaaacctttgggtgagggagcca  
 caaaacttgattaagcagaactgcgagcttttogaacaattgggggaatacaagtccaaaaatg  
 ccttgcctagtcaggtacaccaaaaaggctcctcaggtcagcaccaccaacttagtcgaggtgtc  
 cagaaatttgggcaaaagtgggttctaaatgttgcaagcaccagaagctaagaggatgcoatgt  
 gccgaagactaccttctcgtcgttctgaaccaactctgtgttttgacgaaaagactccagctc  
 cagaccgtgtcagcaaatgttgtagcaggtctctgggttaacagaagacctgtttctctgcttt  
 ggaagttagcgaacttacgtoccaaaggagttaacgcggagactttcaccttccacgcgcgac  
 atttgtacactttccgagaaggaaagacaaatcaagaagcaaacgcactagttgaattgggtta  
 aacataagcctaaggctaccaaaagaacaattgaaagcagttatggatgattttgcgcttctcgt  
 ggaaaagtgttgaaggctgatgacaaggaaacctgtttcgcgaagaaggttaagaagttagtc  
 gccgctctcaggtgctcttggactgtgcgacttgcctcaaacacactcattgggttcaagac  
gtactttaatgcttctcgtcagatgagaaagatttctctgttctcttcttctaaaggaccgtca  
cgacttccggttttccacaagaggaatttggaaaaccaattccaaaaagctgagactattcccgtt  
ttacacgaaatgatccaacagattttcaaccttttcttactaaggattcttccgctgcatggg  
acgaaactttgctcagcaaatcttacaccgaaactttaccaacagcttaatgacctagaagcctg  
cgtgatacagggcgtcgggtgcacagaaacgccattgatgaaggaggatagcatcttggccgtg  
cgtaagtatttccaaagaattactttgtaccttaaggaaaagaaatactccttctgtgcttggg  
aagtagtcagagctgaaattatgagatccttttcccttttctactaacttgcaagagctccttaag  
atcgaaggaataa

## 【 0 1 2 1】

**実施例 11:** 組換え発現される 1 コピーの “天然の” Kar を有する株および改変を有さない野生型株における分泌生産との直接比較における、マイクロスケールにおけるメタノール誘導条件下での相同な Kar2 の上昇したレベルを有する株における Fab(抗原結合性断片)分子の分泌生産。

上記の実施例と同様に、特異的に突然変異誘発された AOX1 プロモーター (WO 2006/089 329) の制御下にある Fab の軽鎖 (配列番号 20) および Fab の重鎖 (配列番号 21) の発現カセットを、未処理の宿主 CBS7435 muts および相同な Kar2 の上昇したレベルを有する対応する株のゲノムに形質転換した。さらに、軽鎖および重鎖の発現カセット、ならびに相同な Kar2 の上昇したレベルを有する株において天然の Kar2 遺伝子の発現を制御している同一の突然変異誘発された AOX1 プロモーターの制御下にある天然の Kar2 遺伝子の発現カセットを有する異なるプラスミドを用いて、未処理の宿主株 CBS7435 muts を形質転換した。導入された全ての遺伝子の遺伝情報の存在を、コロニー PCR (PAOX1 と結合するフォワードプライマー、最初の 80 bp 以内において軽鎖および重鎖遺伝子と結合するリバースプライマー) によって証明した。組換えにより導入された天然の Kar2 遺伝子の遺伝

10

20

30

40

50

情報の存在を、コロニー PCR (天然の PDI 遺伝子と結合するフォワードプライマー、ジェネテシに対する抵抗性マーカーと結合するリバースプライマー)によって証明した。

## 【 0 1 2 2 】

マイクロスケールで培養すると、3 つ全ての株 (基本の株 CBS7435 muts、相同な Kar2 の上昇したレベルを有する株、および組換えにより天然の Kar2 をも共発現する基本の株) が Fab を分泌した。組換えによる天然の Kar2 遺伝子の共発現は、基本の株 CBS7435 muts と比較して Fab の分泌レベルを ~47%増大させたが、相同な Kar2 の上昇したレベルを有する株は、組換えにより天然の Kar2 をも共発現する基本の株と比較してさらに力価を 27% 増強させた(図8)。

## 【 0 1 2 3 】

プライマー Fab 軽鎖 (配列番号17)

5' CAGAAACGGAAGGAGGTTG 3'

プライマー Fab 重鎖 (配列番号18)

5' CTGACTTCAGCTCCAGATTG 3'

プライマー Kar2 (配列番号19)

5' GTACTCCACCTGGTGGTC 3'

## 【 0 1 2 4 】

配列番号 20 Fab 軽鎖

## 【化 1 1】

```
caatccgtcctgacccaacctccttcogtcttctgctgctcctgggtcaaaaggtcaccatttctct
gttctggatcttcatctaacattggaaagaattacgtttcctgggtaccaacagttaccaggtgc
tgcacctaaagtacttatctttgatgacactcaaagaccatccggaatcccagacagattctct
ggttctaagctggtaacttccgcaaccctggccatcaccggattgcagactgggtgatgaggccg
actactattgoggacttgggactcttctctgtctactgggtcaacttttcggagggtggtaacaa
attgaccggttttgggtcagcctaaggctgctccatctgttactctttttcctccatcttcagag
gaattgcaggccaacaaggctactcttggtttgatttctgacttctaccctgggtgcagtca
ctgtggcatggaaagctgattcatctccagtcxaaagctgggtgtggagactaccactccatctaa
gcaatctaacaacaatacgcagcttcatcctatttgtctttgaccccagagcagtggaagtcc
caccgttcatactcctgtcaagttacccatgaggggttctactggttgaaaagactatggccccag
ctgaatgctcctaa
```

## 【 0 1 2 5 】

配列番号 21 Fab 重鎖

10

20

30

40

【化 1 2】

```

caagtgcaagttggttcaatctggagctgaagtcagaaagccaggagcttctgttaaagtgtcat
gtaaagtttctggtttcactttgaccggtttatccattcactgggttagacaagcacctggtaa
aggtttggaatggatgggtggatttgggtccagaggaaaatgagattatctatgctcaaaagttc
cagggtagagtctccatgaccgaggacacttccaccaatactgcatacatggaattgtcctctc
ttagatcagaagatactgctgtctactattgtgctactgggtggaactattacaacttgtggac
tggttactacccttttagcttactggggtcaggggtactctggttactgtctcttcagcctctact
aagggaccatctgttttccacttgtcccttccctctaagtcacacctctggtggaaccgctgcac
tgggttgtttgggtcaaggattacttccagagccagttaccgtgtcttggaaactctgggtgcct
tacttctgggtgtccataccttcccagccgtttgcagtcacatctggactttactccctttcctct
gttgtcactgttcccttccctcttgggaaactcaaacctacatctgcaacgttaaccacaagc
cttctaacaccaaggttgacaaaaaggtggagcctaagtcttgctaa

```

10

【 図 1 】

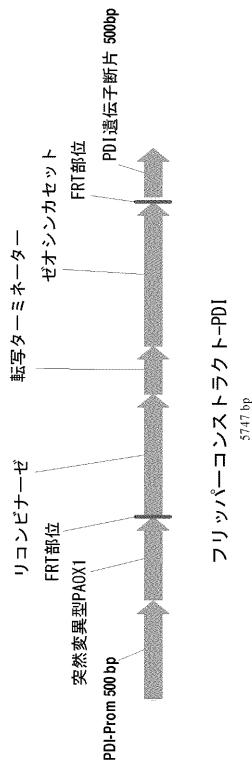


Fig. 1

【 図 2 】

基本の株 (CBS7435 mut<sup>s</sup>)

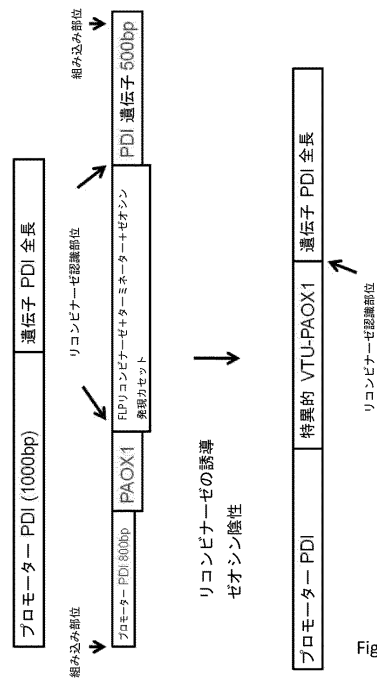


Fig. 2

【 図 3 】

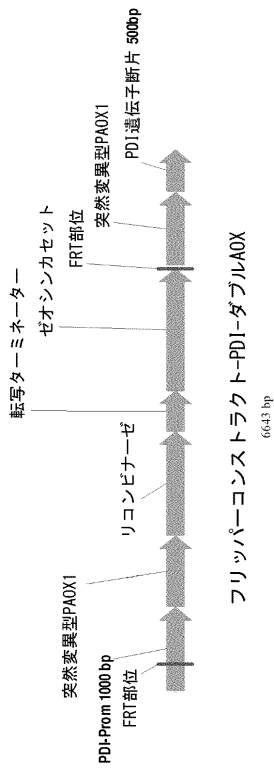


Fig. 3

【 図 4 】

### 基本の株 (CBS7435 mut's)

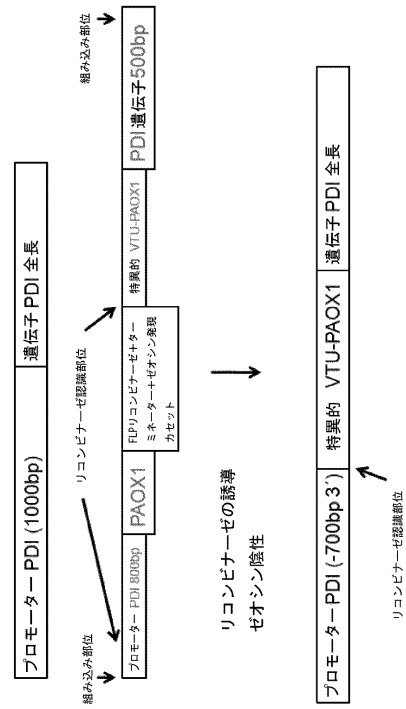


Fig. 4

【 図 5 】

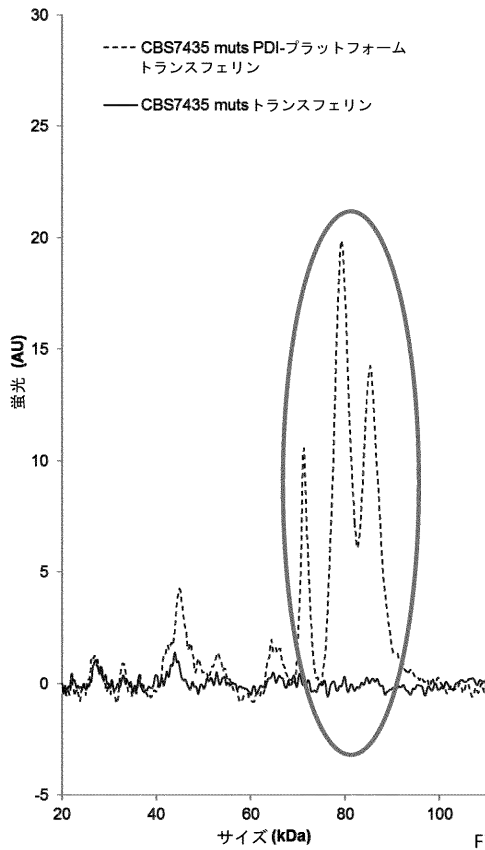


Fig. 5

【 図 6 】

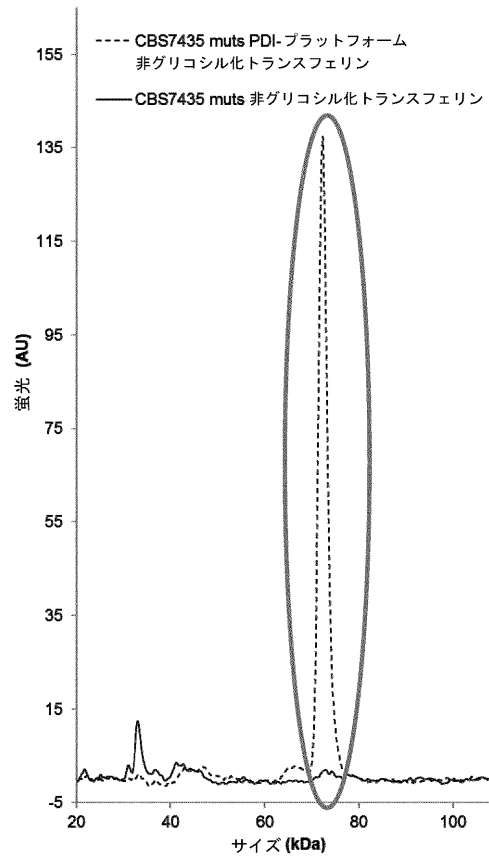


Fig. 6

【 図 7 】

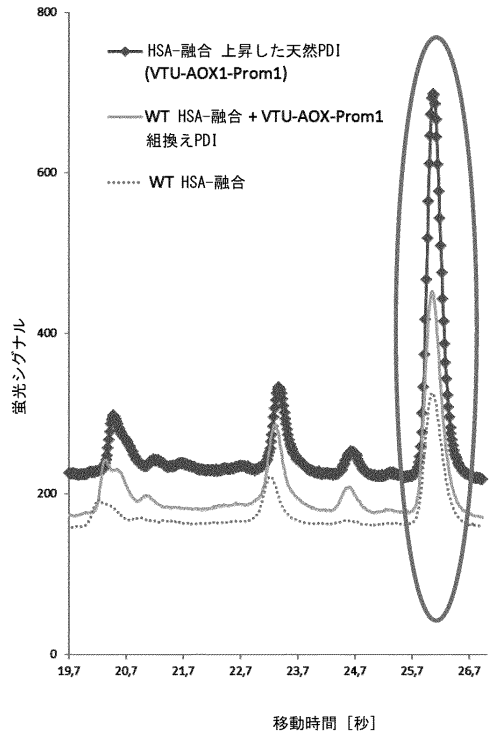


Fig. 7

【 図 8 】

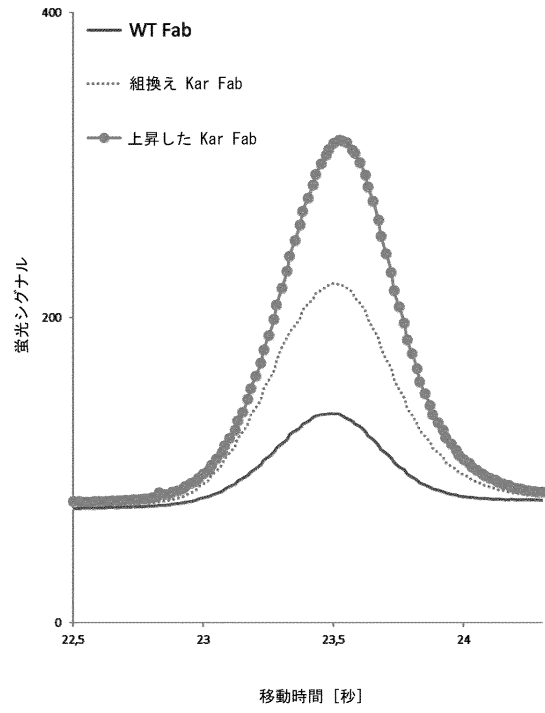


Fig. 8

【 配列表 】

0006085605000001.app

## フロントページの続き

(74)代理人 110001508

特許業務法人 津国

(72)発明者 ローラント・ヴァイス

オーストリア、アー - 8 0 7 4 グラムバッハ、パルクリング 1 8 番

(72)発明者 トーマス・ブルカートファー

オーストリア、アー - 8 0 7 4 グラムバッハ、パルクリング 1 8 番

審査官 吉田 知美

(56)参考文献 特表 2 0 0 7 - 5 1 5 9 6 2 ( J P , A )

特表 2 0 0 8 - 5 3 1 0 0 0 ( J P , A )

特表 2 0 1 1 - 5 1 4 1 5 7 ( J P , A )

国際公開第 9 4 / 0 0 8 0 1 2 ( W O , A 1 )

国際公開第 2 0 0 5 / 1 1 3 7 6 8 ( W O , A 1 )

特表平 0 7 - 5 0 8 8 8 1 ( J P , A )

Shoba Subramanian , PNAS , 2 0 0 6 年 1 月 2 4 日 , vol . 103 , no . 4 , pp . 939-944

ROBINSON ANNE S . , BIO/TECHNOLOGY , 1 9 9 4 年 4 月 1 日 , V12 , P381-384

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

P u b M e d