



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101365783 B

(45) 授权公告日 2013. 07. 17

(21) 申请号 200680042590. 8

C12N 1/19 (2006. 01)

(22) 申请日 2006. 11. 10

A61K 38/00 (2006. 01)

(30) 优先权数据

60/737, 108 2005. 11. 15 US

(56) 对比文件

CN 1578838 A, 2005. 02. 09,

CN 1592786 A, 2005. 03. 09,

(85) PCT申请进入国家阶段日

2008. 05. 15

审查员 孙彦珂

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2006/043535 2006. 11. 10

(87) PCT申请的公布数据

W02007/061631 EN 2007. 05. 31

(73) 专利权人 格利科菲公司

地址 美国新罕布什尔州

(72) 发明人 P · 博布罗维奇 J · W · 库克

W · 克特

(74) 专利代理机构 中国专利代理 (香港) 有限公

司 72001

代理人 程淼 刘玥

(51) Int. Cl.

C12N 1/15 (2006. 01)

C12N 1/16 (2006. 01)

权利要求书2页 说明书23页

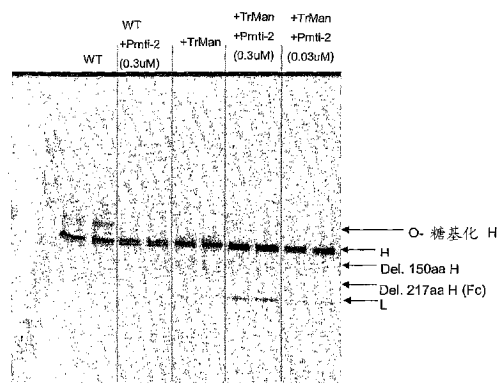
序列表11页 附图1页

(54) 发明名称

具有降低的 O- 糖基化的糖蛋白的产生

(57) 摘要

描述了生产具有降低的 O- 连接的糖基化数量的蛋白质组合物的方法。所述方法包括在存在 Pmt 介导的 O- 连接的糖基化的抑制物的情况下和 / 或在存在一种或多种 α -1,2- 甘露糖苷酶的情况下培养的细胞中生产蛋白质。



1. 一种生产具有降低的 O- 连接的糖基化的蛋白质的方法, 包括:
 - (a) 提供与可诱导启动子可操作地连接的、编码蛋白质的核酸;
 - (b) 将所述核酸导入酵母宿主细胞或丝状真菌宿主细胞中来提供所述宿主细胞的培养物;
 - (c) 所述培养物生长足够的时间以提供大量的具有所述核酸的所述宿主细胞, 之后用 Pmt- 介导的 O- 连接的糖基化的一种或多种抑制物接触所述培养物; 和
 - (d) 所述培养物与所述启动子的诱导物接触来诱导所述蛋白质的表达一定时间, 之后或同时用所述 Pmt- 介导的 O- 连接的糖基化的一种或多种抑制物接触所述培养物,
 - (e) 分离在存在所述一种或多种抑制物的情况下所述宿主细胞产生的糖蛋白来产生具有降低的 O- 连接的糖基化的蛋白质。
2. 权利要求 1 的方法, 其中所述一种或多种抑制物是苯亚甲基噻唑烷二酮。
3. 权利要求 2 的方法, 其中所述一种或多种抑制物选自 5-[[3, 4- 二(苯基甲氧基)苯基]亚甲基]-4-氧代-2-硫代-3-噻唑烷乙酸; 5-[[3-(1-苯基乙氧基)-4-(2-苯基乙氧基)]苯基]亚甲基]-4-氧代-2-硫代-3-噻唑烷乙酸; 和 5-[[3-(1-苯基-2-羟基)乙氧基)-4-(2-苯基乙氧基)]苯基]亚甲基]-4-氧代-2-硫代-3-噻唑烷乙酸构成的组。
4. 权利要求 1 的方法, 其中所述宿主细胞是 *Pichia pastoris* 或 *Saccharomyces cerevisiae*。
5. 权利要求 1 的方法, 其中所述宿主细胞已经被遗传修饰来产生具有主要 N- 聚糖糖形式的糖蛋白, 所述主要 N- 聚糖糖形式的糖蛋白选自 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{GalGlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Gal}(\text{GlcNAc})_2\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 、 $(\text{GalGlcNAc})_2\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{NANAGalGlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{NANA}_2\text{Gal}_2\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$ 和 $\text{GalGlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$ 。
6. 权利要求 1 的方法, 其中所述宿主细胞已经被遗传修饰来产生糖蛋白, 在所述糖蛋白中 N- 糖基化模式是像人类的或人源化的。
7. 权利要求 1 的方法, 其中以至少 100 mg/ 升培养基的产量生产所述糖蛋白。
8. 一种生产具有降低的 O- 连接的糖基化的蛋白质的方法, 包括:
 - (a) 提供与可诱导启动子可操作连接的、编码蛋白质的核酸;
 - (b) 将所述核酸导入酵母宿主细胞或丝状真菌宿主细胞中, 并使含有所述核酸的宿主细胞来产生所述宿主细胞的培养物生长足够的时间以提供大量的具有所述核酸的所述宿主细胞, 之后用所述 Pmt- 介导的 O- 连接的糖基化的一种或多种抑制物接触所述培养物;
 - (c) 用 Pmt- 介导的 O- 连接的糖基化的一种或多种抑制物和任选地一种或多种 α -1, 2- 甘露糖苷酶接触所述培养物; 以及
 - (d) 分离在存在所述一种或多种抑制物和所述一种或多种 α -1, 2- 甘露糖苷酶的情况下所述宿主细胞产生的糖蛋白来产生具有降低的 O- 连接的糖基化的蛋白质。
9. 权利要求 8 的方法, 其中所述培养物在存在 Pmt- 介导的 O- 连接的糖基化的一种或多种抑制物的情况下生长。
10. 权利要求 8 的方法, 其中所述培养物在存在一种或多种 α -1, 2- 甘露糖苷酶的情况下生长。
11. 权利要求 8 的方法, 其中提供编码所述一种或多种 α -1, 2- 甘露糖苷酶的第二核酸

并将所述第二核酸导入所述宿主细胞中。

12. 权利要求 8 的方法,其中提供与可诱导启动子可操作连接的、编码所述一种或多种 α -1, 2-甘露糖苷酶的第二核酸并将所述第二核酸导入所述宿主细胞中。

13. 权利要求 12 的方法,其中所述培养物生长足够的时间以提供大量的所述宿主细胞,之后诱导所述蛋白质和所述一种或多种 α -1, 2-甘露糖苷酶的表达来产生具有降低的 O-连接的糖基化的蛋白质。

14. 权利要求 12 的方法,其中所述蛋白质的表达被诱导一定时间,之后诱导所述一种或多种 α -1, 2-甘露糖苷酶的表达来产生所述具有降低的 O-连接的糖基化的蛋白质。

15. 权利要求 8 的方法,其中所述一种或多种抑制物是苯亚甲基噻唑烷二酮。

16. 权利要求 8 的方法,其中所述一种或多种抑制物选自自由 5-[[3, 4-二(苯基甲氧基)苯基]亚甲基]-4-氧代-2-硫代-3-噻唑烷乙酸;5-[[3-(1-苯基乙氧基)-4-(2-苯基乙氧基)]苯基]亚甲基]-4-氧代-2-硫代-3-噻唑烷乙酸;和 5-[[3-(1-苯基-2-羟基)乙氧基)-4-(2-苯基乙氧基)]苯基]亚甲基]-4-氧代-2-硫代-3-噻唑烷乙酸构成的组。

17. 权利要求 8 的方法,其中所述 α -1, 2-甘露糖苷酶来自 *Trichoderma reesei*、*Saccharomyces* sp. 或 *Aspergillus* sp.

18. 权利要求 8 的方法,其中所述 α -1, 2-甘露糖苷酶来自 *Trichoderma reesei*。

19. 权利要求 8 的方法,其中所述宿主细胞包括与可诱导启动子可操作连接的第二核酸,其编码 α -1, 2-甘露糖苷酶。

20. 权利要求 8 的方法,其中所述宿主细胞选自自由 *K. lactis*、*Pichia pastoris*、*Pichia methanolica* 和 *Hansenula* 构成的组。

21. 权利要求 8 的方法,其中所述宿主细胞是 *Pichia pastoris* 或 *Saccharomyces cerevisiae*。

22. 权利要求 8 的方法,其中所述宿主细胞已经被遗传修饰来产生具有主要 N-聚糖糖形式的糖蛋白,所述主要 N-聚糖糖形式的糖蛋白选自 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{GalGlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Gal}(\text{GlcNAc})_2\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 、 $(\text{GalGlcNAc})_2\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{NANAGalGlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{NANA}_2\text{Gal}_2\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$ 和 $\text{GalGlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$ 。

23. 权利要求 8 的方法,其中所述宿主细胞已经被遗传修饰来产生糖蛋白,在所述糖蛋白中 N-糖基化模式是像人类的或人源化的。

具有降低的 O- 糖基化的糖蛋白的产生

[0001] 发明背景

[0002] (1) 发明领域

[0003] 本发明涉及生产具有特定糖基化模式的蛋白质的组合物和方法。特别地,本发明涉及生产具有降低的 O- 连接的糖基化的蛋白质的组合物和方法。

[0004] (2) 相关技术的说明

[0005] 糖蛋白在人类和其他哺乳动物中介导许多必需的功能,包括催化、信号转导、细胞-细胞通信,以及分子识别和缔合。在真核生物中糖蛋白构成了非胞质蛋白的主要部分 (Lis and Sharon, 1993, Eur. J. Biochem. 218 :1-27)。在最近的二十年,许多糖蛋白已经被采用用于治疗目的,天然发生的糖蛋白的重组版本成为生物技术工业的主要部分。用作治疗剂的重组糖基化蛋白质的实例包括促红细胞生成素 (EPO)、治疗性单克隆抗体 (mAbs)、组织纤溶酶原激活物 (tPA)、干扰素- β (IFN- β)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 和人绒毛膜促性腺激素 (hCH) (Gumming et al., 1991, Glycobiology 1 : 115-130)。随着作为潜在的预防试剂和治疗试剂产生的重组蛋白接近临床,重组生产的糖蛋白的糖基化模式中的变化近来在科学界是大量关注的主题。

[0006] 一般地,糖蛋白低聚糖的糖基化结构将取决于用来生产它们的宿主物种细胞而变化。在非人类宿主细胞中产生的治疗性蛋白可能含有非人类糖基化,其可能在人类中引发免疫原性反应,例如,酵母中的超甘露糖基化 (Ballou, 1990, Methods Enzymol. 185 : 440-470); 植物中的 α (1,3)-海藻糖和 β (1,2)-木糖 (Cabanès-Macheteau et al., 1999, Glycobiology, 9 :365-372); 中国仓鼠卵巢细胞中的 N-乙酰神经氨酸 (Noguchi et al., 1995, J. Biochem. 117 :5-62); 以及,小鼠中的 Gal α -1,3Gal 糖基化 (Borrebaeck et al., 1993, Immun. Today, 14 :477-479)。在动物细胞中与蛋白质结合的碳水化合物链包括与蛋白质中天冬酰胺 (Asn) 残基结合的 N-糖苷键型碳水化合物链 (也称为 N-聚糖;或 N-连接的糖基化) 以及与蛋白质中丝氨酸 (Ser) 或苏氨酸 (Thr) 残基结合的 O-糖苷键型碳水化合物链 (也称为 O-聚糖;或 O-连接的糖基化)。

[0007] 因为非人类哺乳动物产生的糖蛋白的低聚糖结构倾向于与人类糖蛋白的那些更紧密地相关,所以大多数商业的糖蛋白是在哺乳动物细胞中生产的。然而,哺乳动物细胞作为蛋白质生产的宿主细胞具有几个重要的缺点。除了费用高之外,在哺乳动物细胞中表达蛋白质的过程产生了糖形式的异质性群体,具有低的体积滴度,并且需要进行中的病毒防范和大量时间来产生稳定的细胞系。

[0008] 要理解的是,蛋白质上的特定糖形式 (glycoform) 可能深刻地影响蛋白质的性质,包括它的药物动力学、药效、受体相互作用和组织特异性靶向性质 (Graddis et al., 2002, Curr Pharm Biotechnol. 3 :285-297)。例如,已经显示了 Ig 的不同糖基化模式与不同的生物学性质相关联 (Jefferis and Lund, 1997, Antibody Eng. Chem. Immunol., 65 : 111-128; Wright and Morrison, 1997, Trends Biotechnol., 15 :26-32)。进一步显示的是,糖蛋白的半乳糖基化可能随细胞培养条件而改变,其取决于糖蛋白上的特定半乳糖模式可能使得某些糖蛋白组合物是免疫原性的 (Patel et al., 1992, Biochem J. 285 :839-845)。

然而,由于不知道哪个特定的糖形式对期望的生物学功能做贡献,富集糖蛋白上的特定糖形式的能力是高度期望的。由于不同的糖形式与不同的生物学性质相关,富集具有特定糖形式的糖蛋白的能力可以用于阐明糖蛋白的特定糖形式和特定生物学功能之间的关系。并且,富集具有特定糖形式的糖蛋白的能力允许产生具有特定特性的治疗性糖蛋白。因而,产生对于特定糖形式富集的糖蛋白组合是高度期望的。

[0009] 虽然 N-连接的糖基化的途径已经成为大量分析的目标, O-连接的糖基化的过程和功能还没有很好地了解。然而,已知的是,与 N-连接的糖基化相比, O-糖基化是翻译后事件,其在 cis-高尔基体中发生 (Varki, 1993, *Glycobiol.*, 3 :97-130)。虽然如同 N-连接的糖基化那样对于 O-连接的糖基化的共有受体序列看起来似乎不存在,几种糖蛋白的许多 O-连接的糖基化位点周围氨基酸序列的比较显示了相对于糖基化残基的位置 -1 和 +3 处脯氨酸残基的提高了的频率以及丝氨酸、苏氨酸和丙氨酸残基的显著提高 (Wilson et al., 1991, *Biochem. J.*, 275 :529-534)。在糖蛋白中丝氨酸和苏氨酸残基的延伸也可能是 O-糖基化的潜在位点。

[0010] 在 O-连接的糖基化中起作用的一个基因家族是编码 Dol-P-Man :蛋白 (Ser/Thr) 甘露糖基转移酶 (Pmt) 的基因。这些高度保守的基因已经在高等真核生物例如人类、啮齿动物、昆虫等等和低等真核生物例如真菌等等中鉴定。酵母例如 *Saccharomyces cerevisiae* 和 *Pichia pastoris* 编码多达七种编码 Pmt 同源物的 PMT 基因 (在 Wilier et al. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2003Oct ;13(5) :621-30 中综述)。在酵母中, O-连接的糖基化开始于由七种 O-甘露糖基转移酶基因之一在内质网中从多萜醇磷酸甘露糖向新生糖蛋白的丝氨酸或苏氨酸残基添加起始的甘露糖。虽然在酵母中似乎有七种编码 Pmt 同源物的 PMT 基因,在酵母中分泌的真菌蛋白和异源蛋白的 O-甘露糖基化主要取决于编码 Pmt1 和 Pmt2 的基因, Pmt1 和 Pmt2 看起来作为异二聚体起作用。PMT1 和 PMT2 以及它们分别的蛋白产物 Pmt1 和 Pmt2 看起来在物种之间是高度保守的。

[0011] Tanner 等人在美国专利 No. 5, 714, 377 中描述了 *Saccharomyces cerevisiae* (酿酒酵母) 的 PMT1 和 PMT2 基因,以及使用真菌细胞生产具有降低的 O-连接的糖基化的重组蛋白质的方法,在所述真菌细胞中一个或多个 PMT 基因被遗传地修饰,从而产生具有降低的 O-连接的糖基化的重组蛋白质。

[0012] Ng 等人在美国公开的专利申请 NO. 20020068325 中公开了通过使用反义或共抑制、或通过酵母宿主菌株的工程化来抑制 O-糖基化,所述酵母宿主菌株具有与 O-连接的糖基化相关的基因、特别是一个或多个 PMT 基因方面的功能丧失突变体。

[0013] UDP-N-乙酰基- α -D-半乳糖胺 :多肽 N-乙酰基半乳糖基氨基转移酶 (GalNAc-转移酶) 涉及高等真核生物中发现的粘蛋白型 O-连接的糖基化。这些酶启动了蛋白质中特定丝氨酸和苏氨酸氨基酸的 O-糖基化,通过向这些氨基酸的羟基添加 N-乙酰半乳糖胺,因而在所述羟基上甘露糖残基可以以分步的方式被添加。Clausen 等人美国专利 No. 5, 871, 990 和美国公开的专利申请 NO. 20050026266 中公开了编码 UDP-N-乙酰基- α -D-半乳糖胺 :多肽 N-乙酰基半乳糖基氨基转移酶 (GalNAc-转移酶) 的核酸家族。Clausen 在美国公开的专利申请 NO. 20030186850 中公开了使用 GalNAc- β -苯甲基来选择性地抑制多肽 GalNAc-转移酶的凝集素,并且不充当 O-聚糖生物合成中涉及的其他糖基转移酶的底物,因而抑制 O-糖基化。

[0014] 已经描述了 O- 连接的糖基化的抑制物。例如, Orchard 等人在美国专利 No. 7, 105, 554 中描述了苯亚甲基噻唑烷二酮类(thiazolidinediones) 和它们作为抗霉菌剂, 例如抗真菌剂的用途。这些苯亚甲基噻唑烷二酮被报告抑制 Pmt1 酶, 阻止 O- 连接的甘露蛋白质的形成并损害真菌细胞壁的完整性。最后结果是细胞肿胀和最终通过破裂而死亡。

[0015] Konrad 等人在美国公开的专利申请 NO. 20020128235 中公开了通过药理学地抑制组织或细胞中 O- 连接的蛋白质糖基化来治疗或预防糖尿病的方法。该方法依靠用结合 O- 连接的 N- 乙酰葡萄糖胺转移酶并因而抑制 O- 连接的糖基化的 (Z)-1-[N-(3- 氨基丙基)-N-(n- 丙基) 氨基] diazen-ium-1,2diolate 或其衍生物治疗糖尿病个体。

[0016] Kojima 等人在美国专利 No. 5, 268, 364 中公开了利用化合物例如苯基- α -N- 乙酰半乳糖胺用于抑制 O- 糖基化的治疗组合物, 所述化合物抑制 O- 糖基化的延伸, 引起 O- α -GalNAc 的积累, 来阻断白细胞或肿瘤细胞的 SLex 或 SLea 表达, 从而抑制这些细胞对内皮细胞和血小板的粘附。

[0017] Boime 等人在美国专利 No. 6, 103, 501 中公开了激素的变体, 其中通过修饰糖基化位点处的氨基酸序列改变的 O- 连接的糖基化。

[0018] 本发明人发现, 对于真菌一般地是致命的、作为 Pmt 蛋白质的抑制物的特定化合物, 可以以对于宿主细胞不致命的方式来使用, 用于产生具有降低的 O- 连接的糖基化的重组蛋白质。这使得由真菌和酵母细胞产生的蛋白质的 O- 连接的糖基化可以被控制。发明人认为是 PMT 酶的非致命抑制物的其他类别的化合物, 对于产生具有降低的 O- 连接的糖基化的改善的糖蛋白也是有用的。本发明人进一步发现了, 单独地或与 Pmt 蛋白质的化学抑制剂组合地, 向宿主细胞或细胞培养物添加某些种类的酶, 即, α -1,2- 甘露糖苷酶引起了 O- 糖基化的进一步的降低。

[0019] 发明概述

[0020] 本发明提供了生产具有特定糖基化模式的蛋白质和糖蛋白的方法。特别地, 本发明提供了在宿主细胞中产生重组蛋白质组合物的方法, 其中通过用所述宿主细胞中蛋白质的 Pmt 介导 /O- 连接的糖基化的一种或多种抑制物接触所述宿主细胞, 或用一种或多种 α -1,2- 甘露糖苷酶接触所述宿主细胞或所述重组蛋白质, 或通过这两者, 重组蛋白质的 O- 连接的糖基化被降低。与不存在所述抑制物的情况下所述宿主细胞中产生的重组蛋白质或糖蛋白的 O- 连接的糖基化的数量相比, 重组蛋白或糖蛋白的 O- 连接的糖基化的数量被降低。

[0021] Pmt- 介导的 O- 连接的糖基化是指一种 O- 连接的糖基化, 其中甘露糖残基向蛋白质的丝氨酸或苏氨酸残基的转移由 PMT 基因或其同源物编码的蛋白-O-D- 甘露糖基转移酶(Pmt) 或同源物介导。Pmt- 介导的 O- 连接的糖基化的抑制物包括抑制任何一种 PMT 基因的同源物的抑制物。在当前优选的方面中, 所述抑制物至少抑制真菌和酵母的 Pmt1 和 / 或 Pmt2 活性, 或在其他有机体, 包括但不限于哺乳动物、植物和昆虫中相应同源物的活性。

[0022] 当前, 优选的是, O- 连接的糖基化的数量通过使用化学抑制物, 例如称为苯亚甲基噻唑烷二酮的化学物质种类所涵盖的化学抑制物来降低。在特定的实施方式中, 所述化学抑制物选自 5-[[3,4- 二(苯基甲氧基) 苯基] 亚甲基]-4- 氧代-2- 硫代-3- 噻唑烷乙酸; 5-[[3-(1- 苯基乙氧基)-4-(2- 苯基乙氧基)] 苯基] 亚甲基]-4- 氧代-2- 硫

代-3-噻唑烷乙酸;3-羟基-4-(2-苯基乙氧基)苯甲醛;3-(1-苯基乙氧基)-4-(2-苯基乙氧基)-苯甲醛;5-[[3-(1-苯基-2-羟基)乙氧基)-4-(2-苯基乙氧基)]苯基]亚甲基]-4-氧代-2-硫代-3-噻唑烷乙酸构成的组。

[0023] 在进一步的方面,提供的是产生具有降低的O-连接的糖基化的重组蛋白质组合物的方法,其使用O-连接的糖基化中涉及的Pmt蛋白质的一种或多种抑制物和/或一种或多种 α -1,2-甘露糖苷酶来产生具有降低的O-连接的糖基化的蛋白质。当前优选的 α -1,2-甘露糖苷酶可以分离自真核细胞,包括哺乳动物和酵母细胞。在当前优选的实施方式中, α -1,2-甘露糖苷酶是由*Trichoderma reesei*、*Saccharomyces* sp. 或*Aspergillus* sp. 产生的那些。在其他当前优选的实施方式中, α -1,2-甘露糖苷酶可以从嵌合构建体产生,所述嵌合构建体包含编码 α -1,2-甘露糖苷酶的催化结构域的核酸序列,所述核酸序列与编码通常不与所述催化结构域相连的细胞靶向信号肽的核酸序列可操作地连接。在其他实施方式中, α -1,2-甘露糖苷酶可以单独地产生并添加到细胞培养物中,或可以通过与重组糖蛋白共表达 α -1,2-甘露糖苷酶来产生。

[0024] 在该方法的特定的方面,所述重组蛋白质组合物包含具有N-连接的糖基化的糖蛋白,其中所述重组糖蛋白包括至少一个主要N-糖形式(predominantN-glycoform)并具有降低的O-连接的糖基化。因此,进一步提供的是糖蛋白组合物,其包含主要种类的N-聚糖结构,并且与没有在Pmt-介导的O-连接的糖基化的抑制物或 α -1,2-甘露糖苷酶的情况下孵育的宿主细胞中产生的糖蛋白的组合物相比,具有降低的O-连接的糖基化,所述 α -1,2-甘露糖苷酶能够从聚糖结构上修整(trimming)超过一个甘露糖残基。在特定的方面,糖蛋白组合物包含具有选自 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{GalGlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Gal}(\text{GlcNAc})_2\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 、 $(\text{GalGlcNAc})_2\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{NANAGalGlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{NANA}_2\text{Gal}_2\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$ 和 $\text{GalGlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$ 糖形式构成的组的主要N-聚糖结构的糖蛋白。所述方法的一个重要的方面是,它提供了包含降低的O-连接的糖基化并主要包含特定N-连接的糖形式的糖蛋白组合物,其中相对于从哺乳动物细胞培养物例如CHO细胞产生的相同糖蛋白的组合物,该重组糖蛋白可以展现提高的生物学活性和/或降低的非期望免疫原性。产生包含降低的O-连接的糖基化和主要N-连接的糖形式的糖蛋白组合物的其他益处是,它避免了产生非期望的或无活性的糖形式和异质混合物,其可能诱导非期望的效果和/或稀释更有效的糖形式。因而,主要包含,例如, $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{GalGlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Gal}(\text{GlcNAc})_2\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 、 $(\text{GalGlcNAc})_2\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{NANAGalGlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{NANA}_2\text{Gal}_2\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$ 和 $\text{GalGlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$ 糖形式,并具有降低的O-连接的糖基化的糖蛋白分子的治疗性药物组合物也可能在更低的剂量有效,因而具有更高的效力/效价。

[0025] 因而,提供的是生产具有降低的O-连接的糖基化的蛋白质的方法,包括提供编码蛋白质的核酸;将所述核酸导入宿主细胞中来提供宿主细胞的培养物;用Pmt介导的O-连接的糖基化的一种或多种抑制物接触所述培养物;以及分离在存在所述抑制物的情况下宿主细胞产生的糖蛋白来产生具有降低的O-连接的糖基化的蛋白质。

[0026] 在所述方法的特定的方面,所述培养物生长足够的时间以提供具有所述核酸的大

量宿主细胞 (a multiplicity of the host cells), 之后用 Pmt 介导的 O- 连接的糖基化的一种或多种抑制物接触所述培养物, 或者在培养物被建立之时在存在 Pmt 介导的 O- 连接的糖基化的一种或多种抑制物的情况下生长所述培养物。

[0027] 在所述方法的进一步的方面, 编码蛋白质的核酸与可诱导的启动子可操作地连接。然后, 所述培养物生长足够的时间以提供具有所述核酸的大量宿主细胞, 之后用 Pmt 介导的 O- 连接的糖基化的一种或多种抑制物和所述启动子的诱导物接触所述培养基以诱导所述蛋白质的表达, 并分离在存在所述一种或多种抑制物和诱导物的情况下宿主细胞产生的蛋白质以产生具有降低的 O- 连接的糖基化的蛋白质, 或者所述培养物与所述启动子的诱导物接触来诱导所述蛋白质的表达一定时间, 之后用 O- 连接的糖基化的一种或多种抑制物接触所述培养物, 并分离在存在所述抑制物和诱导物的情况下所述宿主细胞产生的蛋白质以产生具有降低的 O- 连接的糖基化的蛋白质。

[0028] 进一步提供的是生产具有降低的 O- 连接的糖基化的蛋白质的方法, 包括提供编码蛋白质的核酸; 将所述核酸导入宿主细胞中来提供宿主细胞的培养物; 用一种或多种 (one or more) α -1,2-甘露糖苷酶接触所述培养物; 以及分离在存在所述一种或多种 α -1,2-甘露糖苷酶的情况下宿主细胞产生的蛋白质来产生具有降低的 O- 连接的糖基化的糖蛋白。

[0029] 在所述方法的特定的方面, 所述培养物生长足够的时间以提供具有所述核酸的大量宿主细胞, 之后用一种或多种 α -1,2-甘露糖苷酶接触所述培养物。在其他方面, 所述培养物在存在一种或多种 α -1,2-甘露糖苷酶的情况下生长。

[0030] 在所述方法的进一步的方面, 提供编码一种或多种 α -1,2-甘露糖苷酶的第二核酸并将所述第二核酸导入所述宿主细胞中。在特定的方面, 提供可操作地连接到可诱导启动子的编码一种或多种 α -1,2-甘露糖苷酶的第二核酸, 将所述第二核酸导入所述宿主细胞中, 所述培养物生长足够的时间以提供大量宿主细胞, 之后诱导所述蛋白质和所述一种或多种 α -1,2-甘露糖苷酶的表达来产生具有降低的 O- 连接的糖基化的蛋白质, 或者所述蛋白质的表达被诱导一定时间, 之后诱导所述一种或多种 α -1,2-甘露糖苷酶的表达来产生具有降低的 O- 连接的糖基化的蛋白质, 或者所述一种或多种 α -1,2-甘露糖苷酶的表达被诱导一定时间, 之后诱导所述蛋白质的表达来产生具有降低的 O- 连接的糖基化的蛋白质。

[0031] 进一步提供的是生产具有降低的 O- 连接的糖基化的蛋白质的方法, 包括提供与可诱导启动子可操作连接的编码蛋白质的核酸; 将所述核酸导入宿主细胞中并生长含有所述核酸的宿主细胞来产生宿主细胞的培养物; 用 Pmt 介导的 O- 连接的糖基化的一种或多种抑制物和一种或多种 α -1,2-甘露糖苷酶接触所述培养物; 以及分离在存在所述一种或多种抑制物和所述一种或多种 α -1,2-甘露糖苷酶的情况下所述宿主细胞产生的糖蛋白来产生具有降低的 O- 连接的糖基化的蛋白质。

[0032] 在所述方法的特定的方面, 所述培养物生长足够的时间以提供具有所述核酸的大量宿主细胞, 之后用 O- 连接的糖基化的一种或多种抑制物接触所述培养物, 或者在培养物被建立之时在存在 Pmt 介导的 O- 连接的糖基化的一种或多种抑制物的情况下生长所述培养物。

[0033] 在所述方法的进一步的方面, 编码蛋白质的核酸与可诱导的启动子可操作地连

接。然后,所述培养物生长足够的时间以提供具有所述核酸的大量宿主细胞,之后用 Pmt 介导的 O- 连接的糖基化的一种或多种抑制物和所述启动子的诱导物接触所述培养基以诱导所述蛋白质的表达,并分离在存在所述一种或多种抑制物和诱导物的情况下宿主细胞产生的蛋白质以产生具有降低的 O- 连接的糖基化的蛋白质,或者所述培养物与所述启动子的诱导物接触来诱导所述蛋白质的表达一定时间,之后用 O- 连接的糖基化的一种或多种抑制物接触所述培养物,并分离在存在所述抑制物和诱导物的情况下所述宿主细胞产生的蛋白质以产生具有降低的 O- 连接的糖基化的蛋白质。

[0034] 在所述方法的特定的方面,所述培养物生长足够的时间以提供具有所述核酸的大量宿主细胞,之后用一种或多种 α -1,2- 甘露糖苷酶接触所述培养物。在其他方面,所述培养物在存在一种或多种 α -1,2- 甘露糖苷酶的情况下生长。

[0035] 在所述方法的进一步的方面,提供编码一种或多种 α -1,2- 甘露糖苷酶的第二核酸并将所述第二核酸导入所述宿主细胞中。在特定的方面,提供可操作地连接到可诱导启动子的编码一种或多种 α -1,2- 甘露糖苷酶的第二核酸,将所述第二核酸导入所述宿主细胞中,所述培养物生长足够的时间以提供大量宿主细胞,之后诱导所述蛋白质和所述一种或多种 α -1,2- 甘露糖苷酶的表达来产生具有降低的 O- 连接的糖基化的蛋白质,或者所述蛋白质的表达被诱导一定时间,之后诱导所述一种或多种 α -1,2- 甘露糖苷酶的表达来产生具有降低的 O- 连接的糖基化的蛋白质,或者所述一种或多种 α -1,2- 甘露糖苷酶的表达被诱导一定时间,之后诱导所述蛋白质的表达来产生具有降低的 O- 连接的糖基化的蛋白质。

[0036] 在使用 Pmt 蛋白的一种或多种抑制物的上述方法的进一步的方面,当前,优选的是,所述一种或多种抑制物选自包含苯亚甲基噻唑烷二酮的分子种类。当前,优选的是,所述一种或多种抑制物选自 5-[[3,4- 二(苯基甲氧基)苯基]亚甲基]-4- 氧代-2- 硫代-3- 噻唑烷乙酸;5-[[3-(1- 苯基乙氧基)-4-(2- 苯基乙氧基)]苯基]亚甲基]-4- 氧代-2- 硫代-3- 噻唑烷乙酸;和 5-[[3-(1- 苯基-2- 羟基)乙氧基]-4-(2- 苯基乙氧基)]苯基]亚甲基]-4- 氧代-2- 硫代-3- 噻唑烷乙酸构成的组。

[0037] 在使用 α -1,2- 甘露糖苷酶的上述方法的特定的方面,当前优选的是,所述 α -1,2- 甘露糖苷酶选自 *Trichoderma reesei*、*Saccharomyces* sp. 和 *Aspergillus* sp. 构成的组。当前,优选的是, α -1,2- 甘露糖苷酶来自 *Trichoderma reesei*。做为选择,除了编码蛋白质或糖蛋白的第一核酸之外,宿主细胞可以包括与可诱导启动子可操作连接的第二核酸,其编码 α -1,2- 甘露糖苷酶。 α -1,2- 甘露糖苷酶和蛋白质或糖蛋白的表达可以同时地诱导,或在 α -1,2- 甘露糖苷酶的表达之前诱导蛋白质或糖蛋白的表达,或者反之。

[0038] 虽然所述方法可以使用产生具有 O- 连接的糖基化的蛋白质的任何宿主细胞来进行,在当前优选的方面中,所述宿主细胞是低等真核细胞,优选的是真菌细胞或酵母细胞。当前,优选的是,所述宿主细胞选自来自 *K. lactis*、*Pichia pastoris*、*Pichia methanolica* 和 *Hansenula* 的细胞构成的组。具体地,在产生重组糖蛋白的进一步的实施方式中,所述宿主细胞是酵母或丝状真菌细胞,其已经被遗传修饰来产生主要具有特定 N- 聚糖结构的糖蛋白。在特别优选的方面,所述宿主细胞被遗传地修饰,从而它们表达重组糖蛋白,其中糖基化模式是像人类 (human-like) 的或人源化的。特别地,所述宿主细胞可以被修饰,从而它们表达主要具有特定的期望 N- 聚糖结构的重组糖蛋白。在此当与糖基化分布

型 (glycosylation profiles) 连同地使用时,低等真核宿主细胞是指任何真核细胞,其通常生产含有高量甘露糖的 N- 连接的聚糖,并因而包括最典型的低等真核细胞,包括单细胞和多细胞的真菌和藻类细胞。

[0039] 在此提及的所有公开物、专利、专利申请和其他参考文献通过引用将它们完整地合并。

[0040] 附图的简要说明

[0041] 附图 1 说明了在 *Pichia pastoris* 中 Pmt 抑制物对分泌的重组报告蛋白质的 O- 糖基化的影响。Pmt 的化学抑制物将 O- 糖基化降低到与缺乏 PMT1 的菌株中观察的相类似的水平。利用抗多组氨酸抗体的 Western 印迹被用于检测野生型 (泳道 1-3) 和 pmt1 (泳道 4-5) 菌株的生长培养基中人类血纤蛋白溶解酶原的 His 标签的人类 Kringle 1-3 结构域 (K1-3)。更慢的迁移条带 (在泳道 1 中对于 K1-3 作为更高分子量的弥散所见) 表明 O- 糖基化的蛋白质。Pmti-1, PMT 抑制物 1。

[0042] 附图 2 显示了 Western 印迹,其展现了 *T. reesei* α -甘露糖苷酶和化学抑制物 Pmti-2 对免疫球蛋白轻链和重链多肽的 O- 糖基化的影响。*T. reesei* α -甘露糖苷酶和化学物质 Pmt 抑制物都降低了 O- 糖基化的水平。

[0043] 发明的详细说明

[0044] 本发明提供了在特定的宿主细胞中表达对于 O- 连接的糖基化敏感的重组蛋白质 (包括多肽和糖蛋白) 的方法,在该细胞类型中具有降低的 O- 连接的糖基化数量 (包括没有 O- 连接的糖基化)。本发明的方法涉及在蛋白质的表达被诱导之时,在存在一种或多种 Do1-P-Man : 蛋白质 (Ser/Thr) 甘露糖基转移酶 (Pmt) 蛋白或一种或多种 α -1,2-甘露糖苷酶、或这两者的情况下,在宿主细胞中诱导感兴趣的蛋白质的表达,在所述宿主细胞中所述蛋白质对于 O- 连接的糖基化是敏感的,所述 Do1-P-Man : 蛋白质 (Ser/Thr) 甘露糖基转移酶 (Pmt) 蛋白涉及细胞中甘露糖向蛋白质的丝氨酸或苏氨酸残基的转移。与如果在缺乏所述抑制物或一种或多种 α -1,2-甘露糖苷酶、或这两者的情况下产生的蛋白质上将存在的 O- 连接的糖基化数量相比,在存在所述抑制物或一种或多种 α -1,2-甘露糖苷酶的情况下表达的蛋白质具有降低的 O- 连接的糖基化数量。所述方法是特别有用的,因为它提供了在宿主细胞例如低等真核生物,例如酵母和细菌中产生治疗相关的蛋白质的手段,其中期望的是所述蛋白质具有降低的 O- 糖基化数量,所述宿主细胞通常产生具有 O- 连接的聚糖、具有降低数量的 O- 连接的聚糖的蛋白质。然而,虽然所述方法特别适合于在低等真核生物中表达具有降低的 O- 连接的糖基化的蛋白质,所述方法也可以在高等真核生物和细菌中实践。

[0045] 对于在蛋白质对 O- 连接的糖基化敏感的宿主细胞中产生具有降低的 O- 连接的糖基化的蛋白质,所述方法与现有技术相比有改进。例如, Tanner 等在美国专利 No. 5, 714, 377 中描述了利用真菌细胞例如酵母细胞产生重组的具有降低的 O- 连接的糖基化的蛋白质的方法,在所述细胞中编码 Pmt 蛋白的一种或多种 PMT 基因被遗传地修饰,从而产生具有降低的 O- 连接的糖基化的重组蛋白质。虽然在真菌宿主细胞中删除 PMT1 或 PMT2 基因之一允许在真菌宿主细胞中产生重组的具有降低的 O- 连接的糖基化的蛋白质, PMT1 和 PMT2 基因的表达对于宿主细胞生长是重要的,任何一个单独的删除都不利地影响真菌宿主细胞生长的能力,因而使他难以产生足够数量的宿主细胞或具有降低的 O- 连接的糖

基化数量的重组蛋白质。两个基因的删除看起来对于真菌宿主细胞是致命的。因此,在宿主细胞中 PMT1 和 PMT2 基因的遗传学消除似乎将是产生重组的具有降低的 O- 连接的糖基化的蛋白质的非期望的手段。

[0046] 相比之下,在本发明的方法中使用的宿主细胞中 PMT 基因没有被修饰或删除,其允许宿主细胞 O- 糖基化那些对于细胞生长重要的蛋白质,直到 Pmt 蛋白的活性被抑制之时。一般地,这允许宿主细胞生长到与如果删除 PMT 基因获得的水平相比更高的水平。此外,在特定的实施方式中,重组蛋白质在宿主细胞中的表达由可诱导的启动子控制,宿主细胞中的 Pmt 活性不被抑制,或添加一种或多种 α 1,2- 甘露糖苷酶,或这两者,直到重组蛋白质的表达被诱导。这允许在诱导重组蛋白质的表达和添加 Pmt 抑制物和 / 或一种或多种 α 1,2- 甘露糖苷酶之前在培养物中产生含有编码重组蛋白质的核酸的大量宿主细胞。与已经删除一种或多种 PMT 基因以及在培养中不良生长的宿主细胞所发生的相比,这允许在更短的时间内在培养物中产生更大数量的具有降低的 O- 连接的糖基化的重组蛋白质。

[0047] 相对先有技术的这种改进还便于在已经被遗传地修饰以产生主要具有特定 N- 连接的聚糖结构的糖蛋白、但也 O- 糖基化该糖蛋白的宿主细胞中产生具有降低的 O- 连接的糖基化的糖蛋白。产生主要具有特定的 N- 连接的糖形式的各种各样糖蛋白的方法以及在美国专利 No. 7, 029, 872 和美国公开的申请 NO. 20050170452、20050260729、20040230042、20050208617、20050208617、20040171826、20060160179、20060040353 和 20060211085 中公开。在前述专利和专利申请中描述的任何一种宿主细胞都可以用于利用在此公开的方法产生主要具有特定 N- 连接的聚糖结构、并具有降低的 O- 连接的糖基化的糖蛋白。已经发现,与没有被修饰的宿主细胞相比,某些被遗传地修饰以产生主要具有特定 N- 连接的聚糖结构的糖蛋白的宿主细胞在特定条件下在培养物中生长得不那么好。例如,与没有遗传修饰的真菌或酵母细胞相比,特别是其中涉及超甘露糖基化的基因被删除、添加了产生特定哺乳动物或人类样 N- 连接的聚糖结构所需的其他基因的真菌和酵母细胞生长得没有那么好。在这些遗传修饰的真菌或酵母细胞中,进一步引入 PMT1 或 PMT2 基因的删除对于细胞都是致命的,或者不利地影响细胞在培养物中生长到足够数量的能力。通过在诱导重组糖蛋白表达和添加 Pmt 蛋白活性的抑制物或一种或多种 α 1,2- 甘露糖苷酶或这两者之前允许细胞在培养物中生长到足够的数量,来产生主要具有特定 N- 连接的聚糖结构和降低的 O- 连接的糖基化的重组糖蛋白,此处的方法避免了删除 PMT1 和 PMT2 基因的潜在有害影响。

[0048] 因而,所述方法的一个重要的方面是,它提供了包含降低的 O- 连接的糖基化并主要包含特定 N- 连接的糖形式的糖蛋白组合物,其中相对于从哺乳动物细胞培养物例如 CHO 细胞产生的相同糖蛋白的组合物,所述重组糖蛋白可以展现提高的生物学活性和 / 或降低的非期望免疫原性。产生包含降低的 O- 连接的糖基化和主要 N- 连接的糖形式的糖蛋白组合物的其他益处是,它避免了产生非期望的或无活性的糖形式和异质混合物,这可能诱导非期望的效果和 / 或稀释更有效的糖形式。因而,主要包含,例如, $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{GalGlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Gal}(\text{GlcNAc})_2\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 、 $(\text{GalGlcNAc})_2\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{NANA}\text{GalGlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{NANA}_2\text{Gal}_2\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$ 和 $\text{GalGlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$ 糖形式,并具有降低的 O- 连接的糖基化的糖蛋白分子的治疗性药物组合物也可能在更低的剂量有效,因而具有更高的效力 / 效价。

[0049] 一般地,生产具有降低的 O- 连接的糖基化的蛋白质的方法包括用编码重组蛋白质或异源蛋白质的核酸转化宿主细胞,其中期望的是产生具有降低的 O- 连接的糖基化的蛋白质。编码所述重组蛋白质的核酸与容许重组蛋白质的表达的调节序列可操作地连接。这样的调节序列包括可诱导的启动子,任选地包括编码融合蛋白的核酸的上游或 5' 的增强子,以及编码重组蛋白质的核酸的 3' 或下游的转录终止位点。核酸一般地还编码具有核糖体结合位点的 5' UTR 区域和 3' 非翻译区。所述核酸通常是载体的部分,所述载体在表达重组蛋白质的细胞中是可复制的。载体也可以含有标记物以容许识别转化的细胞。然而,某些细胞类型,特别是酵母,可以用缺乏外来载体序列的核酸成功地转化。

[0050] 编码期望的重组蛋白质的核酸可以从几个来源获得。可以使用针对保守区域的引物从已知表达该蛋白质的细胞系扩增 cDNA 序列(参见,例如 Marks et al., J. Mol. Biol. 581-596(1991))。核酸也可以根据科学文献中的序列从头合成。核酸也可以通过跨越期望序列的重叠寡核苷酸的延伸来合成(参见,例如 Caldas et al., Protein Engineering, 13, 353-360(2000))。

[0051] 在一个方面,编码蛋白质的核酸与可诱导启动子可操作地连接,所述启动子容许蛋白质的表达在期望时被诱导。在另一个方面,编码蛋白质的核酸与组成型启动子可操作地连接。为了便于表达的蛋白质的分离,当前优选的是,蛋白质包括信号序列,所述信号序列指导蛋白质分泌到细胞培养介质中,因而在其中蛋白质可以被分离。在第一个方面,在向培养基添加 O- 连接的糖基化的一种或多种抑制物之前,转化的宿主细胞被培养足够的时间来产生足以产生期望数量的蛋白质的期望的大量宿主细胞。诱导物和抑制物可以同时地添加到培养物中,或者在添加一种或多种 Pmt 抑制物之前向培养物添加诱导物,或者在添加诱导物之前向培养物添加一种或多种 Pmt 抑制物。产生具有降低的 O- 连接的糖基化的诱导的蛋白质,可以从培养基中回收,或者对于不具有信号序列的蛋白质,通过裂解从宿主细胞中回收。在第二个方面,其中编码蛋白质的核酸与组成型启动子可操作地连接,在培养物被建立的同时向培养基中添加 O- 连接的糖基化的一种或多种抑制物,产生的具有降低的 O- 连接的糖基化的蛋白质可以从培养基中回收,或对于不具有信号序列的蛋白质,通过裂解从宿主细胞中回收。说明利用可诱导启动子的方法的实例在实施例 2 中示出,说明利用组成型启动子的方法的实例在实施例 3 中示出。

[0052] 对于产生具有降低的 O- 连接的糖基化的蛋白质有用的抑制物是抑制一种或多种 Pmt 蛋白质的活性的化学物质或组合物。当宿主细胞是低等真核生物例如真菌或酵母时,期望的是所述抑制物抑制至少 Pmt1 或 Pmt2、或这两者的活性。在高等真核生物中,期望的是所述抑制物抑制该高等真核生物中相应于 Pmt1 或 Pmt2 的同源物的活性。可以使用的化学抑制物包括在美国专利 No. 7, 105, 554 中鉴定的噻唑烷二酮类,其包括 5-[[3,4-二(苯基甲氧基)苯基]亚甲基]-4-氧代-2-硫代-3-噻唑烷乙酸;5-[[3-(1-苯基乙氧基)-4-(2-苯基乙氧基)]苯基]亚甲基]-4-氧代-2-硫代-3-噻唑烷乙酸;3-羟基-4-(2-苯基乙氧基)苯甲醛;3-(1-苯基乙氧基)-4-(2-苯基乙氧基)-苯甲醛;以及,5-[[3-(1-苯基-2-羟基)乙氧基)-4-(2-苯基乙氧基)]苯基]亚甲基]-4-氧代-2-硫代-3-噻唑烷乙酸。可能有用的其他化合物是 Voss 等在 WO 94/29287 中公开的结构上相似的化合物,其公开了产生亚芳基-4-氧代-2-硫代-3-噻唑烷羧酸类的方法,公开了它们在糖尿病的晚期影响的预防和治疗以及动脉粥样硬化(atherosclerosis and arteriosclerosis)和动脉硬化的

预防和治疗中是有用的,以及 Esswein 等在美国专利 No. 6, 673, 816 中公开的结构上相似的化合物,其公开了产生若单宁羧酸 (rhodaninecarboxylic acids) 的衍生物的方法和它们用于代谢性骨骼失调的治疗的用途。

[0053] 在实施例中,选自由 5-[3,4-二(苯基甲氧基)苯基]亚甲基]-4-氧代-2-硫代-3-噻唑烷乙酸;5-[3-(1-苯基乙氧基)-4-(2-苯基乙氧基)]苯基]亚甲基]-4-氧代-2-硫代-3-噻唑烷乙酸;和 5-[3-(1-苯基-2-羟基)乙氧基)-4-(2-苯基乙氧基)]苯基]亚甲基]-4-氧代-2-硫代-3-噻唑烷乙酸构成的组的化学抑制物被显示在具有完整的、功能性 PMT1 和 PMT2 基因的 *Pichiapastoris* 菌株中产生具有降低的 O-连接的糖基化的重组蛋白质方面是有效的。实施例 2 的表 1 显示了上述三种 Pmt 化学抑制物的任何一种在重组蛋白质的表达被诱导时添加到重组 *Pichia pastoris* 的培养物中,所述重组 *Pichia pastoris* 具有完整的功能性 PMT1 和 PMT2 基因并用编码重组可分泌 Kringle 1-3 蛋白质、与可诱导启动子可操作连接的核酸转化,与含有 PMT1 或 PMT2 基因之一的删除的 *Pichia pastoris* 细胞所见的 O-连接的糖基化相比,产生了具有降低的 O-连接的糖基化水平的重组蛋白质。上述 Pmti 抑制物已经以约 0.03 μ M 到 20 μ M 的数量使用来产生与缺乏 Pmti 抑制物的类似宿主细胞培养物中产生的蛋白质上的 O-连接的糖基化数量相比、具有降低的 O-连接的糖基化的蛋白质。在实施例 3 中显示的结果进一步显示了宿主细胞培养物可以在存在一定数量 Pmti 抑制物的情况下生长,所述数量足以抑制 O-连接的糖基化而不杀死所述宿主细胞。

[0054] 所述方法可以包括向含有一种或多种 Pmt 抑制物的培养基中添加一种或多种 α -1,2-甘露糖苷酶来产生具有降低的 O-连接的糖基化的重组蛋白质。 α -1,2-甘露糖苷酶是用于 N-聚糖的成熟的真核酶的保守家族,其能够在酵母中将 $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ 修整成 $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ 。(Vallee et al., 2000, EMBO J., 19:581-588)。 α -1,2-甘露糖苷酶也称为 I 类 α -甘露糖苷酶,其已经在哺乳动物、低等真核物种和昆虫细胞中鉴定 (Kawar et al., 2000, Glycobiology 10:347-355)。哺乳动物细胞已知具有几种 I 类 α -甘露糖苷酶,其中一些能够修整多种甘露糖残基 (Moremen et al., 1994, Glycobiology 4:113-125),而酵母看起来具有更少的、更专门的 α -1,2-甘露糖苷酶。例如,已经公开了 *Saccharomyces* 具有由 MNN1 编码的单个 α -1,2-甘露糖苷酶,其移除一个特定的甘露糖残基 (例如, $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ 到 $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$) (Herscovics, 1999, Biochim Biophys Acta., 1473:96-107)。因而,在许多低等真核生物例如真菌和酵母中存在、并且不能从聚糖结构上除去多个甘露糖残基的内源的 α -1,2-甘露糖苷酶,不能够允许具有降低的 O-连接的糖基化的蛋白质的产生。因此,此处的方法需要向含有宿主细胞的培养基中引入能够从 O-连接的聚糖上修整多个甘露糖残基的 α -1,2-甘露糖苷酶,或向宿主细胞中引入编码能够从 O-连接的聚糖上修整多个甘露糖残基的 α -1,2-甘露糖苷酶的核酸。此处的 α -1,2-甘露糖苷酶包括完整的、天然的 α -1,2-甘露糖苷酶;被修饰以提高其 α -1,2-甘露糖苷酶活性的 α -1,2-甘露糖苷酶;被修饰以降低其 α -1,2-甘露糖苷酶活性的 α -1,2-甘露糖苷酶;以及,至少包含具有 α -1,2-甘露糖苷酶活性的催化结构域的重组 α -1,2-甘露糖苷酶 (例如,包含具有 α -1,2-甘露糖苷酶活性的催化结构域、融合到异源蛋白质、多肽或肽的融合蛋白)。

[0055] 在特定的实施方式中,能够从 O-连接的聚糖上修整多个甘露糖残基并被添加到细胞培养物中的 α -1,2-甘露糖苷酶由 *Trichoderma* sp.、*Saccharomyces* sp.、或

Aspergillus sp. 产生。当前, 优选的 α -1,2-甘露糖苷酶获自 *Trichoderma reesei*、*Aspergillus niger* 或 *Aspergillus oryzae*。*T.reesei* 也称为 *Hypocrea jecorina*。在实施例 3 中, 包含表达重组 α -1,2-甘露糖苷酶的表达盒的转化的酵母被用于产生具有降低的 O-连接的糖基化的重组蛋白质, 所述重组 α -1,2-甘露糖苷酶包含与 *Saccharomyces cerevisiae* α -MAT 前信号序列 (pre signal sequence) 融合的 *Trichoderma reesei* α -1,2-甘露糖苷酶催化结构域。可以用于此处的方法来产生具有降低的 O-连接的糖基化的蛋白质的重组 α -1,2-甘露糖苷酶的另一个实例是在 Maras et al., 2000, J. Biotechnol. 77 :255-263 中公开的重组 *Trichoderma reesei* α -1,2-甘露糖苷酶, 其中 *Trichoderma reesei* α -1,2-甘露糖苷酶催化结构域被融合到 *Saccharomyces cerevisiae* α -MAT 前原信号肽 (prepro-signal peptide)。

[0056] α -1,2-甘露糖苷酶也可以从嵌合核酸产生, 所述嵌合核酸包含至少编码能够从 O-连接的聚糖上修整多个甘露糖残基的 α -1,2-甘露糖苷酶的催化结构域、与编码通常不与所述催化结构域相关的细胞靶向信号肽的核酸序列可操作连接的核酸序列。所述嵌合核酸可以与组成型启动子或可诱导启动子可操作地连接。嵌合核酸被转化到宿主细胞中来产生 α -1,2-甘露糖苷酶, 其然后被分离并在异源蛋白质的表达被诱导之时添加到含有细胞的细胞培养介质中, 所述细胞用编码异源蛋白质的核酸转化。做为选择, 用编码 α -1,2-甘露糖苷酶的嵌合核酸和编码重组蛋白质的核酸转化宿主细胞, 同时共表达所述 α -1,2-甘露糖苷酶和重组蛋白质。在特定的实施方式中, 边 α -1,2-甘露糖苷酶的嵌合核酸和编码重组蛋白质的核酸都与可诱导启动子可操作地连接。在其他实施方式中, 所述启动子之一或两者是组成型的。实施例 3 说明了所述方法, 其中编码 α -甘露糖苷酶和重组蛋白质的核酸可操作地连接到组成型启动子, 被导入宿主细胞中, 然后在存在一种或多种 Pmt 抑制物的情况下孵育宿主细胞的培养物来产生具有降低的 O-连接的糖基化的重组蛋白质。实施例 3 进一步显示了, Pmt1 抑制物和 α -1,2-甘露糖苷酶适合协同地降低 O-连接的糖基化的数量, 与存在单独的任一种的情况下 O-连接的糖基化的数量相比。

[0057] 在特定的方面, 降低的 O-连接的糖基化可以通过向培养基仅添加一种或多种 α -1,2-甘露糖苷酶而非一种或多种 Pmt 抑制物来实现。在一个方面, 编码重组蛋白质的核酸与可诱导启动子可操作地连接, 其容许所述重组蛋白质的表达在期望时被诱导。在另一个方面, 编码蛋白质的核酸与组成型启动子可操作地连接。为了便于表达的重组蛋白质的分离, 当前优选的是, 所述蛋白质包括信号序列, 所述信号序列指导重组蛋白质分泌到细胞培养介质中, 因而在其中重组蛋白质可以被分离。

[0058] 在第一个方面, 在向培养基添加一种或多种 α -1,2-甘露糖苷酶之前, 转化的宿主细胞被培养足够的时间来产生足以产生期望数量的重组蛋白质的期望的大量宿主细胞。诱导物和一种或多种 α -1,2-甘露糖苷酶可以同时地添加到培养物中, 或者在添加一种或多种 α -1,2-甘露糖苷酶之前向培养物添加诱导物, 或者在添加诱导物之前向培养物添加一种或多种 α -1,2-甘露糖苷酶。产生具有降低的 O-连接的糖基化的诱导的重组蛋白质, 可以从培养基中回收, 或者对于不具有信号序列的蛋白质, 通过裂解从宿主细胞中回收。

[0059] 在第二个方面, 其中编码重组蛋白质的核酸与组成型启动子可操作地连接, 在培养物被建立的同时向培养基中添加一种或多种 α -1,2-甘露糖苷酶, 产生的具有降低的 O-连接的糖基化的重组蛋白质可以从培养基中回收, 或对于不具有信号序列的重组蛋白

质,通过裂解从宿主细胞中回收。

[0060] 在不使用 Pmt 介导的 O- 连接的糖基化的抑制物生产具有降低的 O- 连接的糖基化的蛋白质的再进一步的方面,用编码 α -1,2-甘露糖苷酶的嵌合核酸和编码重组蛋白质的核酸转化宿主细胞,共表达 α -1,2-甘露糖苷酶和所述重组蛋白质来产生降低的 O- 连接的糖基化的重组蛋白质。在特定的实施方式中,编码 α -1,2-甘露糖苷酶的嵌合核酸和编码重组蛋白质的核酸都与可诱导启动子可操作地连接。在其他实施方式中,所述启动子之一或两者是组成型的。对于可诱导启动子来说,在诱导 α -1,2-甘露糖苷酶和/或重组蛋白质的表达之前生长宿主细胞来产生期望的大量宿主细胞。实施例 3 说明了所述方法,其中编码 α -1,2-甘露糖苷酶和重组蛋白质的核酸与组成型启动子可操作地连接,被导入宿主细胞中,然后孵育所述宿主细胞的培养物一定时间来产生重组蛋白质,与在缺乏 α -1,2-甘露糖苷酶的细胞中产生的重组蛋白质相比,所述重组蛋白质具有降低的 O- 连接的糖基化。

[0061] II. 宿主细胞

[0062] 虽然用于此处的方法的宿主细胞包括高等真核生物细胞和低等真核生物细胞,低等真核生物细胞例如丝状真菌或酵母细胞当前对于蛋白质的表达是优选的,因为它们可以被经济地培养,得到高产量的蛋白质,当适当地修饰时能够产生具有适合的糖基化模式的蛋白质。低等真核生物细胞包括酵母、真菌、环-鞭毛虫、小孢子虫、alveolates(例如,甲藻)、stramenopiles(例如,褐藻、原生动物)、红藻门(例如,红藻)、植物(例如,绿藻、植物细胞、苔藓)和其他原生生物。酵母和真菌包括但不限于:Pichia sp.(例如 Pichia pastoris、Pichia finlandica、Pichia trehalophila、Pichiakocclamae、Pichia membranaefaciens、Pichia minuta(Ogataea minuta、Pichia lindneri)、Pichia opuntiae、Pichia tkermotolerans、Pichia salictaria、Pichia guercuum、Pichia pijperi、Pichia stiptis、Pichia methanolica)、Saccharomyces sp.(f 例如 Saccharomyces cerevisiae)、Hansenulapolyomorpha、Kluyveromyces sp.(例如, Kluyveromyces lactis)、Candidaalbicans、Aspergillus sp(例如, Aspergillus nidulans、Aspergillus niger、Aspergillus oryzae)、Trichoderma reesei、Chrysosporium lucbiowense、Fusarium sp.(例如, Fusarium gramineum、Fusarium venenatum)、Physcomitrella patens 和 Neurospora crassa。特别地,酵母是当前优选的,因为酵母提供了确定的遗传学,容许快速转化、测试的蛋白质定位策略、以及便于基因敲除技术。适合的载体具有表达控制序列,例如启动子,包括 2- 磷酸甘油酸激酶或其他糖酵解酶,复制起点、终止序列,等等,如所期望的。

[0063] 各种酵母,例如 K. lactis、Pichia pastoris、Pichia methanolica 和 Hansenula polymorpha 对于细胞培养是当前优选的,因为它们能够生长到高细胞密度并分泌大量的重组蛋白质。同样地,丝状真菌,例如 Aspergillus niger、Fusarium sp、Neurospora crassa 等等可以用于以工业规模产生重组蛋白质。

[0064] 低等真核生物,特别是丝状真菌和酵母,以被遗传地修饰,从而它们表达蛋白质或糖蛋白,其中糖基化模式是像人类的或人源化的。这可以通过消除选定的内源糖基化酶和/或补充外源酶来实现,如 Gerngross 等在美国专利 No. US7029872 中、以及美国公开的专利申请 Nos. 20040018590、20050170452、20050260729、20040230042、20050208617、20040171826、20050208617、20060160179、20060040353 和 20060211085 中所描述的。因而,

宿主细胞可以另外地或可选择地被工程化来表达一种或多种酶或酶活性,其允许以高产量产生特定的 N- 聚糖结构。这样的酶可以被靶向宿主亚细胞器,在其中所述酶将具有最佳活性,例如,通过通常不与所述酶相关的信号肽的方式。宿主细胞也可以被修饰来表达糖核苷酸转运蛋白和 / 或核苷酸焦磷酸酶。转运蛋白和二磷酸酶改善了工程化的糖基化步骤的效力,通过在合适的区室中提供糖基化酶合适底物、降低竞争性产物抑制作用、以及促进二磷酸核苷的消除。参见,例如 Gerngross et al. 的美国公开的专利申请 No. 20040018590 以及 Hamilton, 2003, Science 301 :1244-46 和上述美国专利和专利申请。

[0065] 举例来说,宿主细胞(例如,酵母或真菌)可以被选择或工程化来耗尽 1,6- 甘露糖基转移酶活性,其将在糖蛋白的 N- 聚糖上另外添加甘露糖残基,以及进一步包括用于 α -1,2 甘露糖苷酶活性的异位表达的核酸,其允许产生具有大于 30 摩尔百分比的 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{N-}$ 聚糖的重组糖蛋白。当根据在此描述的方法在宿主细胞中产生糖蛋白时,所述宿主细胞将产生主要具有 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{N-}$ 聚糖结构、以及与在另外的细胞中产生的糖蛋白相比降低的 O- 糖基化的糖蛋白。在进一步的方面,所述宿主细胞被工程化以进一步包括用于 GlcNAc 转移酶 I 活性的异位表达的核酸,其允许产生主要具有 $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2\text{N-}$ 聚糖结构的糖蛋白。当根据在此描述的方法在宿主细胞中产生糖蛋白时,所述宿主细胞将产生主要具有 $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2\text{N-}$ 聚糖结构、以及与在另外的细胞中产生的糖蛋白相比降低的 O- 糖基化的糖蛋白。在再进一步的方面,所述宿主细胞被工程化以进一步包括用于甘露糖苷酶 II 活性的异位表达的核酸,其允许产生主要具有 $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2\text{N-}$ 聚糖结构的糖蛋白。

[0066] 当根据在此描述的方法在宿主细胞中产生糖蛋白时,所述宿主细胞将产生主要具有 $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2\text{N-}$ 聚糖结构、以及与在另外的细胞中产生的糖蛋白相比降低的 O- 糖基化的糖蛋白。在再进一步的方面,所述宿主细胞被工程化以进一步包括用于 GlcNAc 转移酶 II 活性的异位表达的核酸,其允许产生主要具有 $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{N-}$ 聚糖结构的糖蛋白。当根据在此描述的方法在宿主细胞中产生糖蛋白时,所述宿主细胞将产生主要具有 $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{N-}$ 聚糖结构、以及与在另外的细胞中产生的糖蛋白相比降低的 O- 糖基化的糖蛋白。在再进一步的方面,上述宿主细胞可以被进一步工程化来产生特定的杂交或复合的 N- 聚糖或人类样 N- 聚糖结构,通过以任意组合进一步包括涉及 N- 连接的糖基化的一种或多种高等真核生物基因,所述基因编码例如唾液酰基转移酶活性、II 类和 III 类甘露糖苷酶活性、GlcNAc 转移酶 II、III、IV、V、VI、IX 活性、和半乳糖转移酶活性。当前优选的是,所述细胞进一步包括编码 UDP 特异性二磷酸酶活性、GDP 特异性二磷酸酶活性和 UDP-GlcNAc 转运蛋白活性的一种或多种核酸。

[0067] 植物和植物细胞培养物可以用于表达在此教导的具有降低的 O- 连接的糖基化的蛋白质和糖蛋白(参见,例如, Larrick & Fry, 1991, Hum. Antibodies Hybridomas 2 : 172-89); Benvenuto et al., 1991, Plant Mol. Biol. 17 :865-74); Durin et al., 1990, Plant Mol. Biol. 15 :281-93); Hiatt et al., 1989, Nature 342 :76-8)。优选的植物宿主包括,例如, Arabidopsis、Nicotiana tabacum、Nicotiana rustica 和 Solarium tuberosum。

[0068] 昆虫细胞培养物也可以用于生产在此教导的具有降低的 O- 连接的糖基化的糖蛋白蛋白质和糖蛋白,例如基于杆状病毒的表达系统(参见,例如, Putlitz et al., 1990, Bio/Technology 8 :651-654)。

[0069] 虽然当前不像低等真核生物和原核生物那样经济地培养,哺乳动物组织细胞培养物也可以用于表达和产生在此教导的具有降低的 O- 连接的糖基化的蛋白质和糖蛋白(参见 Winnacker, From Genes to Clones (VCH Publishers, NY, 1987)。适合的宿主包括 CHO 细胞系、各种 COS 细胞系、HeLa 细胞,优选的骨髓瘤细胞系等等,或转化的 B 细胞或杂交瘤。这些细胞的表达载体可以包括表达控制序列,例如复制起点、启动子、增强子 (Queen et al., 1986I, Immunol. Rev. 89 :49-68) 和必需的加工信息位点,例如核糖体结合位点、RNA 剪接位点、多聚腺苷酸位点和转录终止子序列。表达控制序列是来自免疫球蛋白基因、SV40、腺病毒、牛乳头状瘤病毒、巨细胞病毒等等的启动子。一般地,可选择标记,例如 neoR 表达盒被包括在表达载体中。

[0070] 编码要表达的蛋白质的核酸可以通过常规方法转移到宿主细胞中,其取决于细胞宿主的种类而变。例如,磷酸钙处理、原生质体融合、自然孵育、脂转染、基因枪、基于病毒的转导或电穿孔可以用于细胞宿主。钨颗粒弹丸转基因对于植物细胞和组织是优选的。(一般地参见 Maniatis et al., Molecular Cloning :A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, 1982))。

[0071] 一旦被表达,具有降低的 O- 连接的糖基化的蛋白质或糖蛋白可以根据本领域的标准方法来纯化,包括硫酸铵沉淀、亲和柱、柱层析、凝胶电泳等等。(一般地,参见, Scopes, R., Protein Purification (Springer-Verlag, N. Y., 1982))。对于药物用途,至少约 90 到 95% 均质性的基本上纯的糖蛋白是优选的,98 到 99% 或更为均质是最优选的。一旦被纯化,如所期望的部分地纯化或纯化到均质,所述蛋白质可以治疗地使用(包括体外地 (extracorporeally)),或在开发或进行分析步骤、免疫荧光法染色等等方面使用。(一般地参见, Immunological Methods, Vols. I and II (Lefkovits and Pernis, eds., Academic Press, NY, 1979 and 1981))。

[0072] 因此,进一步提供的是糖蛋白组合物,其包含主要种类的 N- 聚糖结构,并且与没有 Pmt 介导的 O- 连接的糖基化的抑制物或 α -1,2-甘露糖苷酶或这两者的情况下孵育的宿主细胞中产生的糖蛋白的组合物相比,具有降低的 O- 连接的糖基化,所述 α -1,2-甘露糖苷酶能够从聚糖结构上修整超过一个甘露糖残基。在特定的方面,所述糖蛋白组合物包括具有选自 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{GalGlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Gal}(\text{GlcNAc})_2\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 、 $(\text{GalGlcNAc})_2\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{NANAGalGlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{NANA}_2\text{Gal}_2\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$ 和 $\text{GalGlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$ 糖形式的主要 N- 聚糖结构的糖蛋白。

[0073] III. 药物组合物

[0074] 具有降低的 O- 连接的糖基化的蛋白质和糖蛋白可以被掺入药物组合物中,所述药物组合物包含糖蛋白作为活性治疗试剂和多种其他药学上可接受的成分(参见 Remington's Pharmaceutical Science (15th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 1980)。优选的形式取决于施用和治疗应用的预期方式。取决于期望的制剂,组合物也可以包括药学上可接受的、无毒的载体或稀释剂,其被定义为通常用于配制用于动物或人类施用的药物组合物的媒介物。选择稀释剂从而不影响组合的生物学活性。这些稀释剂的实例是蒸馏水、生理学磷酸盐缓冲盐水、Ringer's 溶液、葡萄糖溶液和 Hank's 溶液。此外,药物组合物或制剂也可以包括其他载体、佐剂,或无毒的、非治疗性、非免疫原

性的稳定剂,等等。

[0075] 用于肠胃外施用的药物组合物是无菌的、基本上等渗的、无热原的,并根据美国食品与药物管理局或类似机构的GMP来制备。糖蛋白可以作为在生理学地可接受的稀释剂中物质的溶液或悬浮液的可注射剂量来施用,具有可以是无菌液体例如水、油、盐水、甘油或乙醇的药物载体。另外,辅助剂物质,例如湿润剂或乳化剂、表面活性剂、pH值缓冲剂等等可以存在于组合物中。药物组合物的其他部分是石油、动物、植物或合成来源的那些,例如,花生油、豆油和矿物油。一般地,乙二醇例如丙二醇或聚乙二醇是优选的液体载体,特别是对于可注射溶液。糖蛋白可以以储库注射或植入物制品的形式施用,其可以以允许活性成分的持续释放的方式来配制。一般地,这种组合物被制备为可注射的,作为液体溶液或悬浮液;也可以制备为在注射之前适合于溶解于或悬浮于液体媒介物的固体形式。制品还可以乳化或密封在脂质体或微粒中,例如聚交酯、聚乙交酯或共聚物,用于增强的佐剂效果,如以上讨论的。(参见Langer,Science 249,1527(1990)and Hanes,Advanced DrugDelivery Reviews 28,97-119(1997)。

[0076] 除非在此另外定义,与本发明关联使用的科学和技术术语和用语具有本领域普通技术人员通常理解的含义。进一步的,除非上下文另外需要,单数的术语应当包括复数,复数的术语应当包括单数。一般地,相关使用的命名,以及在此描述的生物化学、酶学、分子和细胞生物学、微生物学、遗传学以及蛋白质和核酸化学和杂交的技术是本领域公知和通常使用的。根据本领域公知的常规方法以及如各种一般的和更具体的参考文献的描述一般地进行本发明的方法和技术,除非另有陈述这些参考文献在本说明书中被引证和讨论。参见,例如,Sambrook et al.Molecular Cloning:A Laboratory Manual, 2d ed., Cold Spring HarborLaboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989); Ausubel et al., CurrentProtocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates(1992, andSupplements to 2002); Harlow and Lane, Antibodies :A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990); Taylor and Drickamer, Introduction to Glycobiology, Oxford Univ. Press(2003); Worthington Enzyme Manual, Worthington Biochemical Corp., Freehold, NJ; Handbook of Biochemistry ;Section A Proteins, Vol I, CRCPress(1976); Handbook of Biochemistry ;Section A Proteins, Vol n, CRCPress(1976); Essentials of Glycobiology, Cold Spring Harbor LaboratoryPress(1999)。

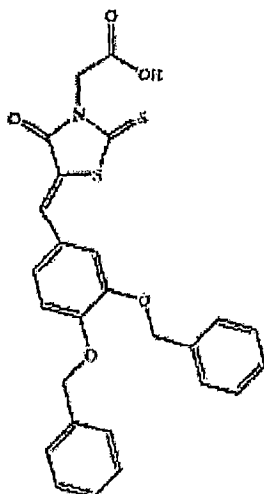
[0077] 以下实施例意图促进本发明的进一步理解。

[0078] 实施例 1

[0079] 这个实施例提供了制备各种Pt抑制物的方法。除非另外规定,所有的材料获自Sigma-Aldrich Chemical Co. (St.Louis,MO) 并按所收到的使用。所有中间物和最终产物的¹H NMR光谱与所公开的数据一致。

[0080] Pmti-1(5-[3,4-二(苯基甲氧基)苯基]亚甲基)-4-氧代-2-硫代-3-噻唑烷乙酸)的制备,如下。

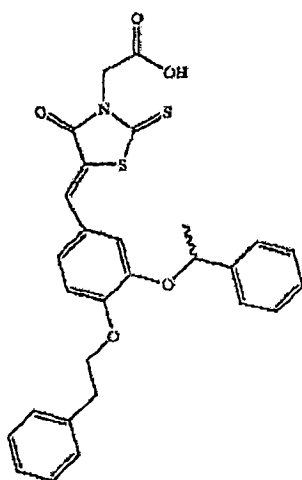
[0081]



[0082] 操作改编自 Orchard 等人美国专利 No. 7, 105, 554 中的。绕丹宁-3-乙酸 (1g, 5.20mmol, 1eq.)、3,4-二苄氧基苯甲醛 (2.04g, 6.25mmol, 1.2eq.) 和醋酸钠 (1.3g, 15.6mmol, 3eq.) 在乙酸 (30mL) 中的溶液被加热到回流, 搅拌过夜。随着反应混合物冷却到室温, 产物被沉淀、过滤, 并用乙酸、然后用石油醚洗涤。残余物溶于热 DMSO 中, 过滤, 通过添加水来沉淀。在冷却之时, 沉淀物被过滤并从乙酸乙酯和石油醚中再结晶, 来得到产物, 产物被悬浮在水中并在真空中冻干过夜来得到蓬松黄色粉末的最终产物。

[0083] Pmti-2, 2(5-[[3-(1-苯基乙氧基)-4-(2-苯基乙氧基)]苯基]亚甲基]-4-氧代-2-硫代-3-噻唑烷乙酸) 的制备如下。

[0084]

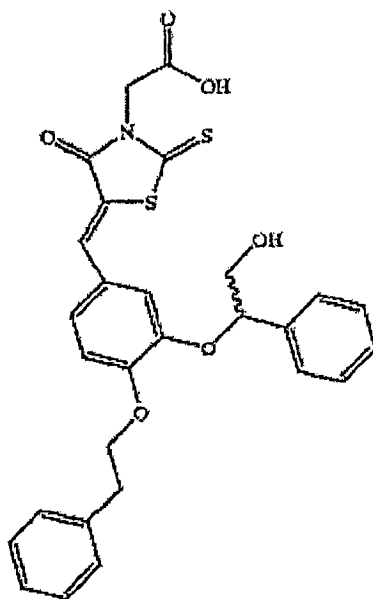


[0085] 根据 Orchard 等在美国专利 No. 7, 105, 554 中的指导合成这种产物。绕丹宁-3-乙酸 (375mg, 1.96mmol, 1eq.)、3-(1-苯基乙氧基)-4-(2-苯基乙氧基) 苯甲醛 (680mg, 1.96mmol, 1eq.) 和乙酸铵 (453mg, 3eq.) 的溶液加热到 70°C 十分钟, 然后冷却到室温并用乙酸乙酯 (100mL) 稀释。有机溶液用 1M HCl (2×200mL) 和盐水 (200mL) 洗涤, 然后在硫酸钠上干燥并蒸发。使用填充了 35-75 μm C18 (Alltech Associates, Deerfield, IL) 的 10×2.5cm 玻璃柱的液相色谱纯化产物。采用梯度洗脱。缓冲液 A 是 0.1% 乙酸, 缓冲液 B 是 80% 乙腈。梯度包括 20% B 三分钟、在 40 分钟内提高到 75% B。流速是 8mL/分钟。检测在 280nm 进行。合适的级分被合并, 浓缩, 并在真空中冻干来得到蓬松黄色粉末的产物。

[0086] Pmti-3, (5-[[3-(1-苯基-2-羟基)乙氧基)-4-(2-苯基乙氧基)]苯基]亚甲基]-4-氧代-2-硫代-3-噻唑烷乙酸), (Orchard et al. 美国专利 No. 7, 105, 554) 的制

品在以下三个步骤中合成。

[0087]



[0088] 步骤 1 : (+)-(S)-2-乙酰基-1-溴-1-苯乙烷的产生。冷的 HBr-乙酸在约五分钟内 (12.4g, 52.2mmol) 滴加到 (-)-(R)-1-苯乙烷-1,2-二醇 (2.4g, 17.4mmol) 中, 混合物在室温下搅拌 40 分钟。添加水 (25mL), 用碳酸钠中和该溶液, 用醚 (3×30mL) 提取。组合的提取物被干燥和蒸发来得到 (+)-(S)-2-乙酰基-1-溴-1-苯乙烷 (3.93mg, 93%), ($d_{25} 1.415\text{g/mL}$, $[\alpha]_{24} +93.5^\circ$ (CCl₄ 中 $c 5.63$) 2.72 (5H, s), 4.98 (aH, dd, 6.7 和 7.0Hz) 和 5.56 (2H, d)。这个产物不被蒸馏。通过与 1,2-双乙酰基-1-苯乙烷比较 nmr 光谱 (没有 PhCH*OAc 共振) 来确定同分异构均质性。(注意到, 外消旋试剂被所列的光学异构体替代)。

[0089] 步骤 2 : 3-[(1-苯基-2-羟基)乙氧基]-4-(2-苯基乙氧基)-苯甲醛的生产。(2-乙酰基-1-溴乙基)苯 (3.32g, 13.67mmol, 1.2eq) (步骤 1 的产物) 搅拌下添加到 3-羟基-4-(2-苯基乙氧基)-苯甲醛 (2.76g, 11.39mmol, 1eq.) 和碳酸铯 (2.97g, 9.11mmol, 0.8eq.) 在 N,N-二甲基甲酰胺 (15mL) 中的溶液中。溶液在室温下搅拌 19 小时, 然后在 80°C 搅拌 21 小时。通过在乙酸乙酯和水之间分配来开动反应 (添加盐水来帮助破坏所形成的乳液)。再用水、盐水洗涤有机层两次, 然后在硫酸钠上干燥并蒸发来得到深色油。残余物通过在硅胶上层析和用二乙基醚洗脱纯化来得到橙色油。这种油溶于甲醇 (100mL) 中, 向该溶液添加氢氧化钠的水溶液 (7mL, 1M)。30 分钟之后, 混合物被蒸发 (以除去甲醇), 在二氯甲烷和水之间分配残余物。有机层在硫酸钠上干燥并蒸发。残余物通过色谱法在硅胶上纯化, 用石油醚: 二乙基醚 (1 : 2) 洗脱, 得到产物为米色的粉末。

[0090] 步骤 3 : Pmti-3 的产生。绕丹宁-3-乙酸 (158mg, 0.828mmol, 1eq.)、3-(1-苯基-2-羟基)乙氧基)-4-(2-苯基乙氧基)苯甲醛 (300mg, 0.828mmol, 1eq.) (步骤 2 的产物) 和乙酸铵 (191mg, 3eq) 在甲苯 (10mL) 中的溶液加热到回流 3.5 小时, 冷却到室温, 用乙酸乙酯 (50mL) 稀释。有机溶液用 1M HCl (2×200mL) 和盐水 (200mL) 洗涤, 然后在硫酸钠上干燥并蒸发。在处理之后, 残余物通过层析在硅胶上纯化。使用乙酸乙酯洗脱得到黄色胶, 其从二乙基醚和石油醚中再结晶来得到黄色粉末的产物。

[0091] 实施例 2

[0092] 这个实施例显示了用编码 kringle 1-3 标记糖蛋白的表达载体转化并用 Pmt 抑制物处理的 *Pichia pastoris* 产生具有降低的 O-糖基化的糖蛋白。

[0093] 编码 His 标签的报告糖蛋白的质粒 DNA 被转化到野生型 *Pichiapastoris* 中来产生菌株 yJC53, 所述质粒 DNA 由处在 *Pichia pastoris* 醇氧化酶 1(AOX1) 启动子控制下的人类血纤蛋白溶解酶原结构域 K1、K2 和 K3(Kringle 1-3 蛋白质) 构成。由结构域 K1、K2、K3 和 K4 构成的 Kringle 报告蛋白质已经在 Duman et al. *Biotechnol. Appl. Biochem.* (1998), v. 28, p. 39-45 and only domain K3 in Choi et al., 2003, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (9) :5022-5027 中讨论了。在该实施例中使用的 Kringle 1-3 蛋白质的氨基酸序列是

[0094]

```
SECKTGNGKNYRGTMSTKNGITCQKWSSTSPHRPRFSPATHPSEGLEENYCRNPDNDPQGPWCYTDDPE  
KRYDYCDILECEEECMHCSGENYDGKISKTMGLECQAWDSQSPHAHGYPKFPNKNLKKNYCRNPDRE  
LRPWCFTTDPNKRWELCDIPRCTTPPPSSGPTYQCLKGTGENYRGNVAVTVSGHTCQHWSAQTPHTHSRT  
PENFPCKNLDENYCRNPDGKRAPWCHTTNSQVRWEYCKIPSCDSSPVSTEQLAPTAPPELTPVVQDGGGH  
HHHHHHHH(SEQ ID NO :1).
```

[0095] Kringle 1-3 蛋白在 -1 和 +3 含有符合声称的共有序列 P 的至少两个潜在的哺乳动物 O-糖基化位点: O-糖基化的丝氨酸残基, 在氨基酸序列“PPPSsgp”中是大写的, 以及 O-糖基化的苏氨酸残基, 在氨基酸序列“lapTapp”中是大写的。在以上氨基酸序列中 O-糖基化位点是下划线的。潜在的哺乳动物 O-糖基化位点位于 K1 和 K2 结构域以及 K2 和 K3 结构域之间。然而, 如在表 1 中所示, 在酵母中, 蛋白质具有约 20 个 O-连接的糖基化位点。因而, 没有通过此处的方法所示抑制 O-连接的糖基化的情况下, O-连接的糖基化可能是在酵母中生产蛋白质的显著缺点。N-糖基化位点存在于 K3 结构域中, 其通过用丝氨酸替换 SEQ ID NO :1 的位置 208 处的天冬酰胺来除去。因此, 在 Kringle 1-3 蛋白质上仅有的聚糖将是 O-糖基化的结果。

[0096] 含有编码 Kringle 1-3 蛋白质的 DNA 的质粒使用正向引物 K1-3/UP5' -CGGAA TTCTC AGAGT GCAAG ACTGG GAATA GAA-3' (SEQ IDNO :2) 和反向引物 K1-3/LP1(反向引物, 3Gly+2His, 与 K1-3/UP 配对) 5' -ATGAT GATGA CCACC ACCGT CCTGG ACCAC AGGGGTTAG-3' (SEQ ID NO :3) 制备来产生 PCR 产物, 其然后使用反向引物 K1-3/LP2(反向引物, 3Gly+9His+ 终止密码子, 与 K1-3/UP 配对) 5' -TTAATGATGA TGATG ATGAT GATGA TGATG ACCAC CACC-3' (SEQ IDNO :4) PCR 扩增。PCR 条件如下: 在作为变性步骤的 95°C 2 分钟 1 个循环之后, PCR 反应进行 95°C 30 秒、60°C 30 秒、72°C 1 分钟的 30 个循环, 然后 72°C 10 分钟的 1 个循环。在 PCR 反应和 PCR 产物的柱纯化之后, PCR 产物的核苷酸 A 突出物使用 ExTaq 来产生 (72°C 15 分钟 1 个循环)。产生的 PCR 产物用于第二个 PCR 反应作为 PCR 模板, 其中引物 K1-3/UP 和 K1-3/LP2 被用于扩增野生型 Kringle 1-3+3Gly+9His, 其被克隆到 pCR2.1 质粒载体 (Invitrogen) 中来产生 pBK105。然后以下 PCR 引物用于产生 Kringle 1-3 蛋白质中位置 208 处的 Asn 到 Ser 突变来从氨基酸序列 SRTP 产生氨基酸序列 NRTP: 正向引物 K3f (Asn 到 Ser) 5' -ACCCCTCACACACATTCTAGGACACCAGAAAACCTTC-3' (SEQ ID NO :5) 和反向引物 K3r 5' -CTGTGCACTCCAGTGCTGACAGGTGTG-3' (SEQ ID NO :6)。然后通过

反向 PCR 在 pBK105 中产生 Asn 到 Ser 突变。PCR 条件如下：在作为变性步骤的 95℃ 2 分钟 1 个循环之后，PCR 反应进行 95℃ 30 秒、60℃ 30 秒、72℃ 5 分钟的 30 个循环，然后 72℃ 10 分钟的 1 个循环。连接产生的 PCR 产物来生产质粒 pBK118，其被测序以确认突变。

[0097] 质粒 pBK118 用 EcoRI 消化，DNA 片段被凝胶纯化并克隆到 pPICZaA (Invitrogen, La Jolla, CA) 的 EcoRI 位点来产生 pBK119 (Pichia 表达质粒)。质粒 pPICZaA 含有 α -因子分泌信号，其容许大多数蛋白质从 *Pichia pastoris* 的有效的分泌；5' -AOX，含有 AOX1 启动子的 942bp 片段，其容许 *Pichia pastoris* 中可甲醇诱导的和高水平的表达；以及，ZEOCIN 抗性基因，用于在 *E. coli* 和 *Pichia pastoris* 中的正选择。在转化到 *Pichia pastoris* 菌株之前，质粒 pBK119 用 PmeI 线性化。质粒 pBK 被转化到 *Pichia pastoris* 菌株 yJC53、野生型菌株和各种 PMT 敲除菌株中。

[0098] PMT 敲除酵母菌株根据 Gentzsch and Tanner, EMBO J. 1996 Nov 1; 15(21): 25752-5759 中对于 *Saccharomyces cerevisiae* 所列的操作在 *Pichia pastoris* 中创建。*Pichia pastoris* PMT 基因利用 *Saccharomyces cerevisiae* PMT 基因的核苷酸序列通过同源性检索在获自 Integrated Genomics, Chicago, IL 的 *Pichia pastoris* 基因组的核苷酸序列中鉴定。*Pichia pastoris* PMT (PpPMT) 基因的删除如下。通过 PCR 重叠方法产生 PpPMT 删除等位基因 (参见, 例如 Davidson et al., 2004, Glycobiology 14: 399-407; Ho et al., 1989, Gene 77: 51-9; Horton et al., 1989, Gene 77: 61-8)。在第一 PCR 反应中, 包含 PMT 基因的 5' 和 3' 侧翼区域和 NAT 或 HYG 抗性标记物 (Goldstein and McCusker, 1999, Yeast 14: 1541-1553; Goldstein et al., 1999, Yeast 15: 507-110) 的核苷酸序列的 DNA 被 PCR 扩增。侧翼于 PMT 基因的区域引物序列使用获自 Integrated Genomics, Chicago, IL 的 *Pichia pastoris* 基因组核苷酸序列作为指导来设计。*Pichia pastoris* 基因组 DNA 被用作 PpPMT 侧翼区域 PCR 扩增的模板, 而 NAT 和 HYG 片段使用 (Goldstein, and McCusker, 1999, ibid.; Goldstein et al., 1999, ibid.) 中描述的质粒作为模板进行 PCR 扩增。然后, 在第二 PCR 反应中, 所有三种第一轮 PCR 产物被用作模板来产生含有所有三种片段的重叠产物作为单个的线性等位基因。然后直接采用最终的 PCR 产物用于转化。在含有 200 μ g/mL 匀霉素或 100 μ g/mL 诺尔丝菌素的 YPD 培养基上选择转化体。在每种情况下, 通过 PCR 确认突变体等位基因的正确整合。创建的 PMT 敲除菌株是 yJC51 (pmt3 Δ , pmt5 Δ , pmt6 Δ ,), yJC55 (pmt1 Δ), yJC66 (pmt2 Δ), 和 yJC65 (pmt4 Δ)。PMT 敲除菌株各自用编码上述 Kringle 1-3 蛋白质的质粒 pBK119 转化。

[0099] 转化的酵母菌株的 Kringle 1-3 蛋白质表达在摇瓶中在 24℃ 使用缓冲的甘油-复合物培养基 (BMGY) 进行, 所述培养基由 1% 酵母提取物、2% 蛋白胨、100mM 硫酸钾缓冲液 pH 6.0、1.34% 酵母氮源、 4×10^{-5} % 生物素和 1% 甘油组成。用于蛋白质表达的诱导培养基是缓冲的甲醇-复合物培养基 (BMMY), 其由 BMGY 中 1% 甲醇代替甘油组成。甲醇中的 Pmt 抑制物 Pmti-1、Pmti-2 或 Pmti-3 添加到生长培养基中到达 0.2 μ M、2 μ M 或 20 μ M 的终浓度, 此时添加诱导培养基。收获细胞, 在 2,000rpm 离心五分钟。Pmt 抑制物 Pmti-1、Pmti-2 和 Pmti-3 是基本上可互换的, 在使用的容易度上具有很小的变化。例如, 在所描述的细胞培养条件下, Pmti-3 的溶解度大于 Pmti-1 和 Pmti-2, 因而是三者中最期望的。

[0100] 来自用 Pmti-1 处理的 yJC53 培养物或 yJC55 的 7 μ L 上清液根据 Laemmli, U. K. (1970) Nature 227, 680-685 通过聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离, 然后在

硝化纤维膜 (Schleicher & Schuell(现在 Whatman, Inc., Florham Park, NJ) 上电印迹。Kringle 1-3 蛋白质使用来自 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA) 的抗 His 抗体 (H-15) 在 Western 印迹上检测, 使用 ImmunoPure Metal Enhanced DAB SubstrateKit (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) 显色。如在附图 1 所示的 Western 印迹的泳道 1 所示, 来自未处理的 *Pichia pastoris* 的 Kringle 1-3 蛋白质由于 O- 糖基化的存在跑动为弥散。然而, 相比之下, 来自 yJC53 的 Kringle1-3 蛋白质 (用 2 或 20 μ M Pmti-1 处理的 *Pichia pastoris*, 分别为泳道 2 和 3) 由于缺乏 O- 糖基化展现了不同的条带, 类似于从 yJC55 表达的 Kringle 1-3 (*Pichia pastoris* 的 pmt1 Δ 敲除突变体) (泳道 4 和 5)。附图 1 进一步显示了 Pmti-1 降低的 O- 糖基化达到缺乏 Pmt1 的菌株中所观察到的类似水平。

[0101] 为了测量 Pmt 抑制物的 O- 糖基化降低, 使用镍螯合层析从生长培养基纯化 Kringle 1-3 蛋白质 (Choi et al., 2003, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100 (9) : 5022-5027), 通过碱消除 (β -消除) (Harvey, 1999 MassSpectrometry Reviews 18, 349-451) 从 Kringle 1-3 蛋白质释放和分离 O- 聚糖。这种处理也降低了对甘露醇释放的 O- 聚糖 (寡甘露糖或甘露糖) 的新形成的还原末端。甘露醇基团因而充当了每个 O- 聚糖的独特的指示物。在 100 μ L 体积 PBS 缓冲液中含有的 0.5nmole 或更多的 Kringle 1-3 蛋白质是 β 消除所需的。样品用 25 μ L 碱性氢硼化物试剂处理, 在 50 $^{\circ}$ C 孵育 16 小时。添加约 20 μ L 阿拉伯醇内标准, 随后添加 10 μ L 冰醋酸。样品然后离心穿过含有 SEPABEADS 和 AG 50W-X8 树脂并用水冲洗的 Millipore 过滤器。样品, 包括洗出物, 转移到塑料自动进样器小瓶中, 在离心蒸发器中蒸发到干燥。150 μ L 1% AcOH/MeOH 添加到样品中, 样品在离心蒸发器中蒸发到干燥。这个最后的步骤再重复五次。添加 200 μ L 水, 通过高 pH 阴离子交换层析伴随着脉冲电化学检测 -DionexHPLC (HPAEC-PAD) 来分析 100 μ L 样品。根据回收的甘露醇的数量测量平均 O- 聚糖占用。结果在表 1 中概述, 其显示了在含有完整 PMT1 和 PMT2 基因的 *Pichia pastoris* 菌株中任一种 Pmt 化学抑制物将分泌的 Kringle 1-3 蛋白质的 O- 连接的糖基化降低到一定水平, 所述水平与含有 PMT1 或 PMT2 基因的删除的细胞所见的 O- 连接的糖基化的水平是可比较的。表 1 还显示了虽然该蛋白质具有两个潜在的哺乳动物 O- 连接的糖基化位点, 在酵母中该蛋白质保持了约 20 个 O- 连接的糖基化位点。

[0102] 表 1

[0103]

菌株	相关的基因型	处理	O-聚糖占用 ¹
yJC53	野生型	0	20
		2 μM Pmti-1	9
yJC51	<i>pmtΔ3, Δ5, 或 Δ6</i>	0	17
		2 μM Pmti-1	6
		20 μM Pmti-1	4
		0.2 μM Pmti-2	3
		2 μM Pmti-2	2
		0.2 μM Pmti-3	6
		2 μM Pmti-3	4
yJC55	<i>pmtΔ1</i>	0	3
		2 μM Pmti-1	2
		20 μM Pmti-1	2
yJC66	<i>pmtΔ2</i>	0	4
		2 μM Pmti-1	4
		20 μM Pmti-1	4
yJC65	<i>pmtΔ4</i>	0	18
		2 μM Pmti-1	7
		20 μM Pmti-1	4

¹ 每个蛋白质的 O-连接的甘露糖链的平均数目

[0104] 实施例 3

[0105] 在这个实施例中,用编码 *T. reesei* α -甘露糖苷酶的 DNA 转化的酵母细胞引起了具有降低的 O-糖基化的蛋白质的产生,当细胞还在存在 Pmt 抑制物的情况下孵育时 O-糖基化被进一步降低。

[0106] 抗 Her2 单克隆抗体的 H+L 链在 *Pichia pastoris* 菌株 GS115(WT) 和遗传工程化以共表达 *T. reesei* α -甘露糖苷酶 (+Trman) 的 GS 115 中表达。GS115 可从 Invitrogen(Carlsbad, CA) 获得,除了 HIS4 突变以允许 his4 选择之外,具有基本上野生型的表型。H+L 链作为来自质粒 pJC284 的两个独立的基因来表达,质粒 pJC284 来源于 Invitrogen 质粒 pA0815。

[0107] H+L 基因使用获自 GenBank 的抗 Her2 抗体序列产生。L 链的 GenBank 登记号码是 1N8Z A, H 链可变区加 CHI 结构域的 GenBank 登记号码是 1N8Z B。H 链 Fc 区域的 GenBank 登记号码是 BC092518。H 和 L 链 DNA 序列都根据 *Pichia pastoris* 密码子利用率进行密码子优化以提高在 *Pichia pastoris* 中的翻译。在 *Pichia* sp. 中使用的密码子的优化是

本领域公知的,已经在例如 Outchkourov et al.,2002, Protein Expr.Purif. 24:18-24; Sharp and Li,1987, Nucleic Acids Res.15:1281-95;Woo JH, Liu et al.,2002, Protein Expression and Purification 25:270-282 和 Nakamura, et al.,2000, Nucleic Acids Res. 28:292 中描述。H 链(人类 IgG1)和 L 链(人类 Kappa)的恒定区由 GeneArt Inc., Regensburg, Germany 合成。可变区利用购自 IDT Inc. (Coralville, IA) 的寡核苷酸以叠盖 PCR 方法自己制造。全长 H 和 L 链通过重叠 PCR 合成,产生的 H 和 L 链克隆到 pCR2.1TOPO 载体 (Invitrogen, La Jolla, CA) 中来分别产生 pDX344 和 pDX349。来自 pDX344 和 pDX349 的 H+L 链与 GAPDH 启动子和 AOX1 终止子序列组合在载体 pDX580(主干来自 Invitrogen 载体 pGAPZA)中。最后, H+L 链表达盒从 pDX580 亚克隆到载体 pJC284 中。编码轻链的密码子优化的 DNA 的核苷酸序列在 SEQ ID NO:7 中示出,编码重链的密码子优化的 DNA 的核苷酸序列在 SEQ ID NO:8 中示出。质粒 pJC284 具有 GAPDH 启动子,用于表达 H+L 基因,和完整的 his4 基因,用于在菌株 GS 115 和 GS115(+Trman) 中选择转化体。酵母菌株 GS115 和 GS115(+Trman) 用 pJC285 转化,具有在 his4 基因座整合到基因组中的质粒的转化体被分离来产生生产抗 Her2 抗体的菌株。

[0108] 菌株 GS115(+Trman) 的构建如下。Trichoderma reesei α -1,2-甘露糖苷酶从质粒 pJC285 中的表达盒表达。质粒 pJC285 衍生自 Invitrogen 载体 pGAPZA, 其具有 Zeocin 抗性基因作为可选择标记,含有包含 DNA 的表达盒,所述 DNA 编码 T. reesei α -1,2-甘露糖苷酶催化结构域(SEQ ID NO:9),编码其信号序列的前 84 个碱基对被编码 Saccharomyces cerevisiae α MAT 前信号序列的 DNA(SEQ ID NO:10) 替换,其仅编码 ER 靶向氨基酸,所述 DNA 在 5' 末端与包含 Pichia pastoris GAPDH 启动子(SEQ ID NO:11) 的 DNA、在 3' 末端与包含 Pichia pastoris AOX1 转录终止序列(SEQ ID NO:12) 的 DNA 可操作地连接。完整表达盒的核苷酸序列在 SEQ ID NO:13 中列出。酵母菌株 GS 115 用 pJC285 转化,具有在 GAPDH 基因座整合到基因组中的质粒的转化体被分离来产生菌株 GS 115(+Trman)。

[0109] 菌株的双份培养物在 200mL 缓冲的葡萄糖-复合物培养基(BMDY)中培养,所述培养基由 1%酵母提取物、2%蛋白胨、100mM 硫酸钾 pH6.0、1.34%酵母氮源、.00004%生物素、2%葡萄糖以及有或没有 0.3 或 0.03 μ M 的 Pmti-2 组成。在生长 72 小时之后,收集培养物上清液,离心除去酵母细胞。在剩余的上清液(约 200mL)级分中的抗体在蛋白 A 柱上纯化,并经历如实施例 2 所描述的 O-聚糖分析。除了甘露醇分析之外,O-连接的甘露糖链的平均长度通过色谱分析在没有水解作用的情况下测量。结果在表 2 中概述。

[0110] 在抗体上存在 14 个酵母 O-聚糖位点。当在野生型 GS 115 菌株中产生抗体时,所有 14 个 O-聚糖位点都具有聚糖结构,8%的位点仅有一个甘露糖,39%具有二甘露糖链,43%具有三甘露糖链,9%具有四甘露糖链(参见表 2)。然而,当抗体在用化学抑制物 Pmti-2 处理的野生型细胞中生产时,14 个 O-聚糖位点的仅两个被占据,对于这两个位点中的 76%,甘露糖链仅有一个甘露糖残基。两个位点中都没有三或四甘露糖残基的甘露糖链。要注意的是,该分析不能确定 14 个位点的哪两个被占据。每个抗体分子的两个 O-聚糖位点的任何组合被占据,或者特定的 O-聚糖位点被优先地占据。在后者的情况中,为了提供完全缺少 O-聚糖的抗体(或其他蛋白质),包含优选的 O-聚糖位点的氨基酸序列可以被修饰成消除了所述位点的 O-连接的糖基化的氨基酸序列。

[0111] 表 2 进一步显示了当在包括编码 *Tricoderma reesei* α -1,2-甘露糖苷酶的 DNA 的细胞 (菌株 GS115(+Trman)) 中产生抗体时, 14 个 O-聚糖位点的仅四个被占据, 对于这四个位点的 95%, 甘露糖链仅有一个甘露糖残基。四个位点都没有三或四甘露糖残基的甘露糖链。如果特定的位点被优先地 O-糖基化, 为了提供完全缺少 O-聚糖的抗体 (或其他蛋白质), 包含优选的 O-聚糖位点的氨基酸序列可以被修饰成消除了这些位点处的 O-糖基化的氨基酸序列。

[0112] 最后, 表 2 显示了当抗体在包括编码 *Tricoderma reesei* α -1,2-甘露糖苷酶的 DNA 的细胞中、在存在 Pmti-2 的情况下产生时, 14 个 O-聚糖位点的仅一个被占据, 对于 91% 的该位点, 甘露糖链仅具有一个甘露糖残基。没有甘露糖链具有三或四甘露糖残基。如果仅有一个或仅有少数位点被优先地 O-糖基化, 为了提供完全没有 O-聚糖的抗体 (或其他蛋白质), 包含所述优选的 O-聚糖位点的氨基酸序列可以被修饰成在该位点消除了 O-糖基化的氨基酸序列。

[0113] 表 2 进一步显示了 0.3 μ M 的 Pmti 抑制物足够降低占用约 86%, 76% 的分子的链长度为一个甘露糖, 同时容许培养物生长。包括入 *Tricoderma reesei* α -1,2-甘露糖苷酶容许 Pmti 抑制物的数量降低 10 倍, 占用 (occupancy) 降低到 93%, 87% 的分子的链长度为一个甘露糖。这些结果显示, 使用不杀死细胞的数量 Pmti 抑制物足够产生具有降低的 O-连接的糖基化的糖蛋白。这些结果进一步显示, Pmti 抑制物和 α -甘露糖苷酶看来似乎协同地降低 O-连接的糖基化的数量。

[0114] 表 2

[0115]

菌株	占用	Man1	Man2	Man3	Man4
GS115	14	8	39	43	9
GS115+0.3 μ M Pmti-2	2	76	24	0	0
GS115(+Trman)	4	95	5	0	0
GS115(+Trman)+0.3 μ M Pmti-2	1	91	9	0	0
GS115(+Trman)+0.03 μ M Pmti-2	1	87	13	0	0

[0116] 上述每一种的 7 μ L 上清液被还原并经历 SDS-PAGE 和 Western 印迹, 使用 HRP 结合的抗人类 IgG(H & L) 来检测 H 和 L 链。结果在附图 2 中示出。超 O-糖基化的 H 链是附图 2 中第一对泳道中可见的迁移最慢的条带。附图 2 显示了当抗体与 *Tricoderma reesei* α -1,2-甘露糖苷酶共表达时、或表达抗体的细胞在存在 Pmti-2 抑制物的情况下孵育时、或当抗体与 *Tricoderma reesei* α -1,2-甘露糖苷酶共表达并且表达两种蛋白质的细胞在存在 Pmti-2 抑制物的情况下孵育时, 存在着 O-糖基化的重链数量的降低。

[0117] 虽然在此参考说明性实施方式描述了本发明, 要理解的是本发明不限于此。具有本领域的普通技术并且接受此处的教导的人员将认识到其他修改和实施方式处于其范围内。因而, 本发明仅由此处附随的权利要求限制。

序列表

<110>GlycoFi, Inc.

Bobrowiza, Piotr

Cook, James W.

Kett, Warren

<120> 具有降低的 O-糖基化的糖蛋白的产生

<130>PCT GF0005Y

<150>60/737, 108

<151>2005-11-15

<160>13

<170>FastSEQ for Windows Version 4.0

<210>1

<211>288

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>Kringle 1-3 蛋白

<400>1

Ser Glu Cys Lys Thr Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Arg Gly Thr Met Ser

1 5 10 15

Lys Thr Lys Asn Gly Ile Thr Cys Gln Lys Trp Ser Ser Thr Ser Pro

20 25 30

His Arg Pro Arg Phe Ser Pro Ala Thr His Pro Ser Glu Gly Leu Glu

35 40 45

Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Pro Gln Gly Pro Trp Cys

50 55 60

Tyr Thr Thr Asp Pro Glu Lys Arg Tyr Asp Tyr Cys Asp Ile Leu Glu

65 70 75 80

Cys Glu Glu Glu Cys Met His Cys Ser Gly Glu Asn Tyr Asp Gly Lys

85 90 95

Ile Ser Lys Thr Met Ser Gly Leu Glu Cys Gln Ala Trp Asp Ser Gln		
100	105	110
Ser Pro His Ala His Gly Tyr Ile Pro Ser Lys Phe Pro Asn Lys Asn		
115	120	125
Leu Lys Lys Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Arg Glu Leu Arg Pro Trp		
130	135	140
Cys Phe Thr Thr Asp Pro Asn Lys Arg Trp Glu Leu Cys Asp Ile Pro		
145	150	155
Arg Cys Thr Thr Pro Pro Pro Ser Ser Gly Pro Thr Tyr Gln Cys Leu		
165	170	175
Lys Gly Thr Gly Glu Asn Tyr Arg Gly Asn Val Ala Val Thr Val Ser		
180	185	190
Gly His Thr Cys Gln His Trp Ser Ala Gln Thr Pro His Thr His Ser		
195	200	205
Arg Thr Pro Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Asp Glu Asn Tyr Cys		
210	215	220
Arg Asn Pro Asp Gly Lys Arg Ala Pro Trp Cys His Thr Thr Asn Ser		
225	230	235
Gln Val Arg Trp Glu Tyr Cys Lys Ile Pro Ser Cys Asp Ser Ser Pro		
245	250	255
Val Ser Thr Glu Gln Leu Ala Pro Thr Ala Pro Pro Glu Leu Thr Pro		
260	265	270
Val Val Gln Asp Gly Gly Gly His His His His His His His His		
275	280	285

<210>2

<211>33

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 正向引物 K1-3/UP

<400>2

cggaattctc agagtgcaag actgggaata gaa

33

<210>3

<211>39

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反向引物 K1-3/LP1

<400>3

atgatgatga ccaccaccgt cctggaccac aggggttag 39

<210>4

<211>39

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反向引物 K1-3/LP2

<400>4

ttaatgatga tgatgatgat gatgatgatg accaccacc 39

<210>5

<211>36

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 正向引物 K3f (Asn 到 Ser)

<400>5

accctcaca cacattctag gacaccagaa aacttc 36

<210>6

<211>27

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反向引物 K3r

<400>6

ctgtgcactc cagtgtgtgac aggtgtg 27

<210>7

<211>645

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码轻链的密码子优化序列

<400>7

```
gacattcaga tgacacagtc tccatcttct ttgtccgctt ccgtcgggtga tagagttact 60
atcacctgta gagcttccca agacgtcaac accgctgtcg cctgggtacca acagaagcca 120
ggtaaggctc caaaactttt gatctactct gcctctttct tgtactccgg tgttccatcc 180
agattttctg gttctagatc cggtagccgac ttacacctga ccatctcttc cttgcaacca 240
gaagacttcg ctacctacta ctgtcaacaa cactacacta ctccctccaac tttcgggtcaa 300
ggaactaagg ttgagattaa gagaactggt gctgtctccat ccgttttcat tttcccacca 360
tccgacgaac aattgaagtc tggtagagct tccgttggtt gtttggtgaa caacttctac 420
ccaagagagg ctaaggttca gtggaagggt gacaacgctt tgcaatccgg taactcccaa 480
gaatccgtta ctgagcagga ttctaaggat tccacttact ccttgctctc cactttgact 540
ttgtccaagg ctgattacga gaagcacaag gtttacgcat gcgagggttac acatcagggt 600
ttgtcctccc cagttactaa gtccttcaac agaggagagt gttaa 645
```

<210>8

<211>1353

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码重链的密码子优化序列

<400>8

```
gagggtccaat tgggtgaatc tgggtggaggt ttgggtccaac cagggtggatc tctgagactt 60
tcttgtgctg cctctgggtt caacattaag gatacttaca tccactgggt tagacagget 120
ccaggtaagg gtttgaggtg ggttgctaga atctacccaa ccaacgggtta caccagatac 180
gctgattccg ttaagggtag attcaccatt tccgctgaca cttccaagaa cactgcttac 240
ttgcaaatga actctttgag agctgaggac actgccgtct actactgttc cagatgggggt 300
gggtacgggtt tctacgccat ggactactgg ggtcaaggta ccttggttac tgtctcttcc 360
gcttctacta agggaccatc cgtttttcca ttggctccat cctctaagtc tacttccgggt 420
gggtactgctg ctttggggatg ttggttaag gactacttcc cagagcctgt tactgtttct 480
```

tggaactccg gtgctttgac ttctgggtgtt cacactttcc cagctgtttt gcaatcttcc 540
 ggtttgtact ccttgtectc cggttggtact gttccatcct ctcccttggg tactcagact 600
 tacatctgta acgttaacca caagccatcc aacactaagg ttgacaagaa ggttgagcca 660
 aagtcctgtg acaagacaca tacttgtecca ccatgtccag ctccagaatt gttgggtggt 720
 ccatccgttt tcttgttccc accaaagcca aaggacactt tgatgatctc cagaactcca 780
 gaggttacat gtgttggtgt tgacgtttct cacgaggacc cagagggttaa gttcaactgg 840
 tacgttgacg gtgttgaagt tcacaacgct aagactaagc caagagagga gcagtacaac 900
 tccacttaca gagttgttct cgttttgact gttttgcacc aggattgggt gaacggaaag 960
 gagtacaagt gtaaggtttc caacaaggct ttgccagctc caatcgaaaa gactatctcc 1020
 aaggctaagg gtcaaccaag agagccacag gtttacactt tgccaccatc cagagatgag 1080
 ttgactaaga accaggtttc ctgacttgt ttggttaaag gattctaccc atccgacatt 1140
 gctgttgagt gggaatctaa cggtaacca gagaacaact acaagactac tccaccagtt 1200
 ttggattctg acggttccct cttcttgtag tccaagttga ctgttgacaa gtccagatgg 1260
 caacagggtg acgttttctc ctgttccgtt atgcatgagg ctttgcacaa ccactacact 1320
 caaaagtcct tgtctttgtc cccaggtaaag taa 1353

<210>9

<211>500

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>Pichia pastoris GAPDH 启动子

<400>9

agatcttttt ttagaaatg tcttggtgtc ctctccaat caggtagcca tctctgaaat 60
 atctggctcc gttgcaactc cgaacgacct gctggcaacg taaaattctc cggggtaaaa 120
 cttaaagtgt gagtaatgga accagaaacg tctcttccct tctctctcct tccaccgccc 180
 gttaccgtcc ctaggaaatt ttactctgct ggagagcttc ttctacggcc cccttgacg 240
 aatgctcttc ccagcattac gttgcgggta aaacggaggt cgtgtaccgc acctagcagc 300
 ccagggatgg aaaagtcccg gccgtcgctg gcaataatag cgggcggacg catgtcatga 360
 gattattgga aaccaccaga atcgaatata aaaggcgaac acctttccca attttggttt 420
 ctctgaccc aaagacttta aatttaattt atttgcctt atttcaatca attgaacaac 480
 tatttcgaaa cgagggaatt 500

<210>10

<211>57

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>Saccharomyces cerevisiae alpha-MAT 前信号序列

<400>10

atgagatttc cttcaatttt tactgctggt ttattcgcag catcctccgc attagct 57

<210>11

<211>1494

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>Tricoderma reesei alph-1,2- 甘露糖苷酶催化结构域

<400>11

cgcgccggat ctccaaccc tacgagggcg gcagcagtcaggccgcatt ccagacgtcg 60
 tggaacgctt accaccattt tgcctttccc catgacgacc tccacccgggt cagcaacagc 120
 tttgatgatg agagaaacgg ctggggctcg tcggcaatcg atggcttgga cacggctatc 180
 ctcatggggg atgcccagat tgtgaacacg atccttcagt atgtaccgca gatcaacttc 240
 accacgactg cggttgcca ccaaggcatc tccgtgttcg agaccaacat tcggtacctc 300
 ggtggcctgc tttctgccta tgacctgttg cgaggctcct tcagctcctt ggcgacaaac 360
 cagaccctgg taaacagcct tctgaggcag gctcaaacac tggccaacgg cctcaagggt 420
 gcgttcacca ctcccagcgg tgccccggac cctaccgtct tcttcaaccc tactgtccgg 480
 agaagtgggt catctagcaa caacgtcgct gaaattggaa gcctgggtgct cgagtggaca 540
 cggttgagcg acctgacggg aaacccgcag tatgcccagc ttgcgcagaa gggcgagtcg 600
 tatctcctga atccaaaggg aagcccggag gcatggcctg gcctgattgg aacgtttgtc 660
 agcacgagca acggtacctt tcaggatagc agcggcagct ggtccggcct catggacagc 720
 ttctacgagt acctgatcaa gatgtacctg tacgacccgg ttgcgtttgc aactacaag 780
 gatcgctggg tccttgctgc cgactcgacc attgcgcac tcgcctctca cccgtcgacg 840
 cgcaaggact tgaccttttt gtcttcgtac aacggacagt ctacgtcgcc aaactcagga 900
 catttgcca gttttgccgg tggcaacttc atcttgggag gcattctcct gaacgagcaa 960
 aagtacattg actttggaat caagcttgcc agctcgact ttgccacgta caaccagacg 1020
 gcttctggaa tcggccccga aggcttcgcg tgggtggaca gcgtgacggg cgccggcggc 1080
 tcgccgccct cgtcccagtc cgggttctac tcgtcggcag gattctgggt gacggcaccg 1140
 tattacatcc tgcggccgga gacgtggag agcttgact acgcataccg cgtcacgggc 1200
 gactccaagt ggcaggacct ggcgtgggaa gcgttcagtg ccattgagga cgcacgccgc 1260
 gccggcagcg cgtactcgtc catcaacgac gtgacgcagg ccaacggcgg ggggtgcctct 1320
 gacgatattg agagcttctg gtttgccgag gcgtcaagt atgcgtacct gatctttgcg 1380
 gaggagtcgg atgtgcaggt gcaggccaac ggccgggaaca aatttgtctt taacacggag 1440

gcgcaccct ttagcatcgc ttcacatca cgacggggcg gccaccttgc ttaa	1494
<210>12	
<211>486	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223>Pichia pastoris AOX1 转录终止序列	
<400>12	
aagggcgaat tcaattcacg tggcccagcc ggccgtctcg gatcgggtacc tcgagccgcg	60
gcggccgcca gcttgggccc gaacaaaaac tcatctcaga agaggatctg aatagcgccg	120
tcgaccatca tcatcatcat cattgagttt tagccttaga catgactgtt ctcagttca	180
agttgggcac ttacgagaag accggtcttg ctagattcta atcaagagga tgtcagaatg	240
ccatttgctt gagagatgca ggcttcattt ttgatacttt tttatttgta acctatatag	300
tataggattt tttttgtcat ttgttttctt ctcgtacgag cttgtctctg atcagcctat	360
ctcgcagctg atgaatatct tgttgtaggg gtttgggaaa atcattcgag tttgatgttt	420
ttcttggtat tteccactcc tcttcagagt acagaagatt aagtgagacc ttcgtttgtg	480
cggatc	486
<210>13	
<211>2550	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223>Tricoderma reesei alpha-1,2- 甘露糖苷酶表达盒	
<221> 启动子	
<222>(1)... (507)	
<223>GAPDH 启动子序列	
<221>sig_peptide	
<222>(508)... (564)	
<223> 编码 Saccharomyces cerevisiea alpha-MAT 前信号序列	
<221>CDS	
<222>(565)... (2058)	
<223> 编码 Tricoderma reesei alpha-1,2- 甘露糖苷酶催化结构域	

<221> 终止子

<222> (2065)... (2550)

<223> Pichia pastoris AOX1 转录终止序列

<400> 13

```

agatcttttt tgtagaaatg tcttggtgtc ctcgtccaat caggtagcca tctctgaaat 60
atctggctcc gttgcaactc cgaacgacct gctggcaacg taaaattctc cggggtaaaa 120
cttaaagtgt gagtaatgga accagaaacg tctcttcctt tctctctcct tccaccgccc 180
gttaccgtcc ctaggaaatt ttactctgct ggagagcttc ttctacggcc cccttgccgc 240
aatgctcttc ccagcattac gttgcgggta aaacggaggt cgtgtacccg acctagcagc 300
ccagggatgg aaaagtcctc gccgtcgtcg gcaataatag cgggcggacg catgtcatga 360
gattattgga aaccaccaga atcgaatata aaaggcgaac acctttccca attttggttt 420
ctcctgaccc aaagacttta aatttaattt atttgcctt atttcaatca attgaacaac 480
tatttcgaaa cgagggaatt cgaaacg atg aga ttt cct tca att ttt act gct 534
Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala
-15
gtt tta ttc gca gca tcc tcc gca tta gct cgc gcc gga tct ccc aac 582
Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser Ala Leu Ala Arg Ala Gly Ser Pro Asn
-10 -5 1 5
cct acg agg gcg gca gca gtc aag gcc gca ttc cag acg tcg tgg aac 630
Pro Thr Arg Ala Ala Ala Val Lys Ala Ala Phe Gln Thr Ser Trp Asn
10 15 20
gct tac cac cat ttt gcc ttt ccc cat gac gac ctc cac ccg gtc agc 678
Ala Tyr His His Phe Ala Phe Pro His Asp Asp Leu His Pro Val Ser
25 30 35
aac agc ttt gat gat gag aga aac ggc tgg ggc tcg tcg gca atc gat 726
Asn Ser Phe Asp Asp Glu Arg Asn Gly Trp Gly Ser Ser Ala Ile Asp
40 45 50
ggc ttg gac acg gct atc ctc atg ggg gat gcc gac att gtg aac acg 774
Gly Leu Asp Thr Ala Ile Leu Met Gly Asp Ala Asp Ile Val Asn Thr
55 60 65 70
atc ctt cag tat gta ccg cag atc aac ttc acc acg act gcg gtt gcc 822
Ile Leu Gln Tyr Val Pro Gln Ile Asn Phe Thr Thr Thr Ala Val Ala
75 80 85
aac caa ggc atc tcc gtg ttc gag acc aac att cgg tac ctc ggt ggc 870
Asn Gln Gly Ile Ser Val Phe Glu Thr Asn Ile Arg Tyr Leu Gly Gly
90 95 100
ctg ctt tct gcc tat gac ctg ttg cga ggt cct ttc agc tcc ttg gcg 918

```

Leu	Leu	Ser	Ala	Tyr	Asp	Leu	Leu	Arg	Gly	Pro	Phe	Ser	Ser	Leu	Ala	
105					110					115						
aca	aac	cag	acc	ctg	gta	aac	agc	ctt	ctg	agg	cag	gct	caa	aca	ctg	966
Thr	Asn	Gln	Thr	Leu	Val	Asn	Ser	Leu	Leu	Arg	Gln	Ala	Gln	Thr	Leu	
120					125					130						
gcc	aac	ggc	ctc	aag	gtt	gcg	ttc	acc	act	ccc	agc	ggt	gtc	ccg	gac	1014
Ala	Asn	Gly	Leu	Lys	Val	Ala	Phe	Thr	Thr	Pro	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	
135					140					145					150	
cct	acc	gtc	ttc	ttc	aac	cct	act	gtc	cgg	aga	agt	ggt	gca	tct	agc	1062
Pro	Thr	Val	Phe	Phe	Asn	Pro	Thr	Val	Arg	Arg	Ser	Gly	Ala	Ser	Ser	
155					160					165						
aac	aac	gtc	gct	gaa	att	gga	agc	ctg	gtg	ctc	gag	tgg	aca	cgg	ttg	1110
Asn	Asn	Val	Ala	Glu	Ile	Gly	Ser	Leu	Val	Leu	Glu	Trp	Thr	Arg	Leu	
170					175					180						
agc	gac	ctg	acg	gga	aac	ccg	cag	tat	gcc	cag	ctt	gcg	cag	aag	ggc	1158
Ser	Asp	Leu	Thr	Gly	Asn	Pro	Gln	Tyr	Ala	Gln	Leu	Ala	Gln	Lys	Gly	
185					190					195						
gag	tcg	tat	ctc	ctg	aat	cca	aag	gga	agc	ccg	gag	gca	tgg	cct	ggc	1206
Glu	Ser	Tyr	Leu	Leu	Asn	Pro	Lys	Gly	Ser	Pro	Glu	Ala	Trp	Pro	Gly	
200					205					210						
ctg	att	gga	acg	ttt	gtc	agc	acg	agc	aac	ggt	acc	ttt	cag	gat	agc	1254
Leu	Ile	Gly	Thr	Phe	Val	Ser	Thr	Ser	Asn	Gly	Thr	Phe	Gln	Asp	Ser	
215					220					225					230	
agc	ggc	agc	tgg	tcc	ggc	ctc	atg	gac	agc	ttc	tac	gag	tac	ctg	atc	1302
Ser	Gly	Ser	Trp	Ser	Gly	Leu	Met	Asp	Ser	Phe	Tyr	Glu	Tyr	Leu	Ile	
235					240					245						
aag	atg	tac	ctg	tac	gac	ccg	gtt	gcg	ttt	gca	cac	tac	aag	gat	cgc	1350
Lys	Met	Tyr	Leu	Tyr	Asp	Pro	Val	Ala	Phe	Ala	His	Tyr	Lys	Asp	Arg	
250					255					260						
tgg	gtc	ctt	gct	gcc	gac	tcg	acc	att	gcg	cat	ctc	gcc	tct	cac	ccg	1398
Trp	Val	Leu	Ala	Ala	Asp	Ser	Thr	Ile	Ala	His	Leu	Ala	Ser	His	Pro	
265					270					275						
tcg	acg	cgc	aag	gac	ttg	acc	ttt	ttg	tct	tcg	tac	aac	gga	cag	tct	1446
Ser	Thr	Arg	Lys	Asp	Leu	Thr	Phe	Leu	Ser	Ser	Tyr	Asn	Gly	Gln	Ser	
280					285					290						
acg	tcg	cca	aac	tca	gga	cat	ttg	gcc	agt	ttt	gcc	ggt	ggc	aac	ttc	1494
Thr	Ser	Pro	Asn	Ser	Gly	His	Leu	Ala	Ser	Phe	Ala	Gly	Gly	Asn	Phe	
295					300					305					310	
atc	ttg	gga	ggc	att	ctc	ctg	aac	gag	caa	aag	tac	att	gac	ttt	gga	1542

Ile	Leu	Gly	Gly	Ile	Leu	Leu	Asn	Glu	Gln	Lys	Tyr	Ile	Asp	Phe	Gly									
315				320				325																
atc	aag	ctt	gcc	agc	tcg	tac	ttt	gcc	acg	tac	aac	cag	acg	gct	tct	1590								
Ile	Lys	Leu	Ala	Ser	Ser	Tyr	Phe	Ala	Thr	Tyr	Asn	Gln	Thr	Ala	Ser									
330				335				340																
gga	atc	ggc	ccc	gaa	ggc	ttc	gcg	tgg	gtg	gac	agc	gtg	acg	ggc	gcc	1638								
Gly	Ile	Gly	Pro	Glu	Gly	Phe	Ala	Trp	Val	Asp	Ser	Val	Thr	Gly	Ala									
345				350				355																
ggc	ggc	tcg	ccg	ccc	tcg	tcc	cag	tcc	ggg	ttc	tac	tcg	tcg	gca	gga	1686								
Gly	Gly	Ser	Pro	Pro	Ser	Ser	Gln	Ser	Gly	Phe	Tyr	Ser	Ser	Ala	Gly									
360				365				370																
ttc	tgg	gtg	acg	gca	ccg	tat	tac	atc	ctg	cgg	ccg	gag	acg	ctg	gag	1734								
Phe	Trp	Val	Thr	Ala	Pro	Tyr	Tyr	Ile	Leu	Arg	Pro	Glu	Thr	Leu	Glu									
375				380				385				390												
agc	ttg	tac	tac	gca	tac	cgc	gtc	acg	ggc	gac	tcc	aag	tgg	cag	gac	1782								
Ser	Leu	Tyr	Tyr	Ala	Tyr	Arg	Val	Thr	Gly	Asp	Ser	Lys	Trp	Gln	Asp									
395				400				405																
ctg	gcg	tgg	gaa	gcg	ttc	agt	gcc	att	gag	gac	gca	tgc	cgc	gcc	ggc	1830								
Leu	Ala	Trp	Glu	Ala	Phe	Ser	Ala	Ile	Glu	Asp	Ala	Cys	Arg	Ala	Gly									
410				415				420																
agc	gcg	tac	tcg	tcc	atc	aac	gac	gtg	acg	cag	gcc	aac	ggc	ggg	ggt	1878								
Ser	Ala	Tyr	Ser	Ser	Ile	Asn	Asp	Val	Thr	Gln	Ala	Asn	Gly	Gly	Gly									
425				430				435																
gcc	tct	gac	gat	atg	gag	agc	ttc	tgg	ttt	gcc	gag	gcg	ctc	aag	tat	1926								
Ala	Ser	Asp	Asp	Met	Glu	Ser	Phe	Trp	Phe	Ala	Glu	Ala	Leu	Lys	Tyr									
440				445				450																
gcg	tac	ctg	atc	ttt	gcg	gag	gag	tcg	gat	gtg	cag	gtg	cag	gcc	aac	1974								
Ala	Tyr	Leu	Ile	Phe	Ala	Glu	Glu	Ser	Asp	Val	Gln	Val	Gln	Ala	Asn									
455				460				465				470												
ggc	ggg	aac	aaa	ttt	gtc	ttt	aac	acg	gag	gcg	cac	ccc	ttt	agc	atc	2022								
Gly	Gly	Asn	Lys	Phe	Val	Phe	Asn	Thr	Glu	Ala	His	Pro	Phe	Ser	Ile									
475				480				485																
cgt	tca	tca	tca	cga	cgg	ggc	ggc	cac	ctt	gct	taa	ttaaggaagg				2068								
Arg	Ser	Ser	Ser	Arg	Arg	Gly	Gly	His	Leu	Ala	*													
490				495																				
gcgaattcaa				ttcacgtggc				ccagccggcc				gtctcggatc				ggtacctcga				gccgcggcgg				2128
ccgccagctt				gggcccgaac				aaaaactcat				ctcagaagag				gatctgaata				gcgccgtcga				2188
ccatcatcat				catcatcatt				gagtttttagc				cttagacatg				actgttctctc				agttcaagtt				2248
gggcacttac				gagaagaccg				gtcttgctag				attctaataca				agaggatgtc				agaatgccat				2308

ttgcctgaga gatgcaggct tcatttttga tactttttta tttgtaacct atatagtata	2368
ggattttttt tgtcattttg tttcttctcg tacgagcttg ctctgatca gcctatctcg	2428
cagctgatga atatcttggtg gtaggggttt gggaaaatca ttcgagtttg atgtttttct	2488
tggtatttcc cactctcttt cagagtacag aagattaagt gagaccttcg tttgtgcgga	2548
tc	2550

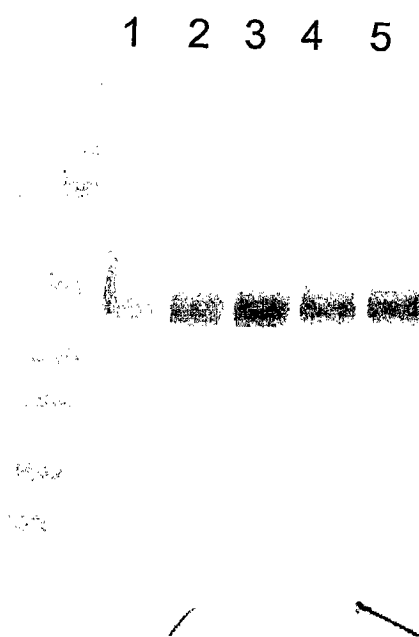


图 1

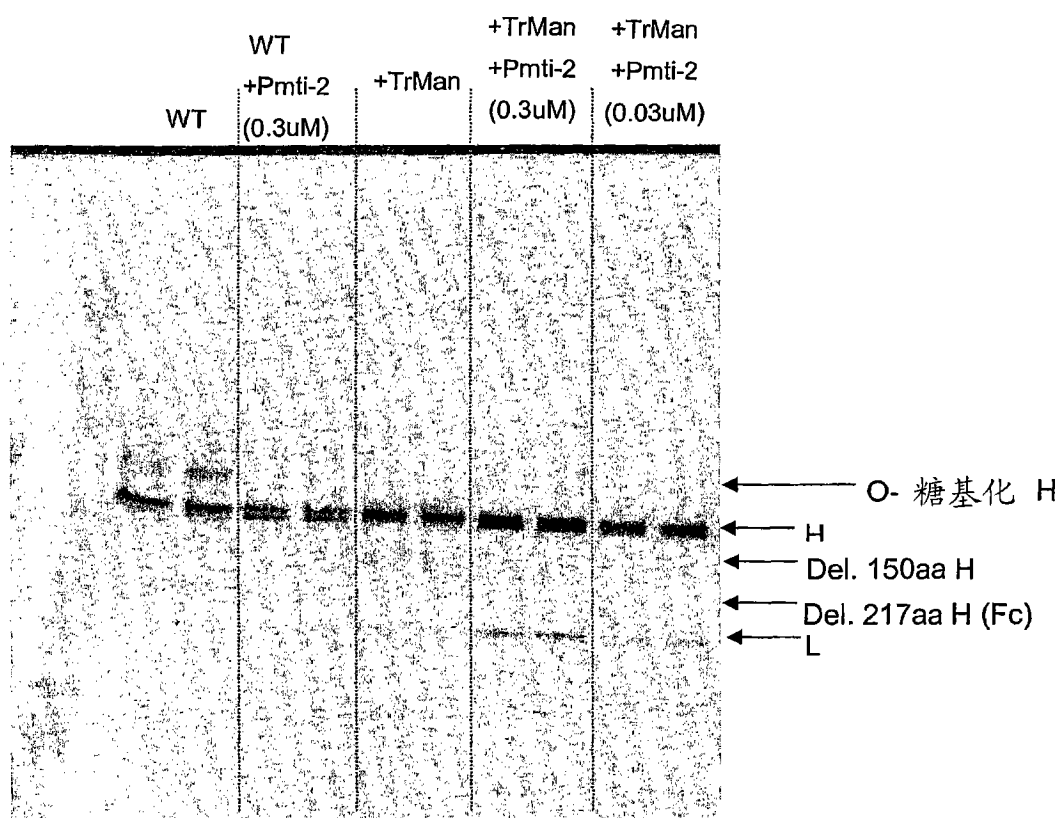


图 2