

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-509970

(P2009-509970A)

(43) 公表日 平成21年3月12日(2009.3.12)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00 D	4 B 0 2 4
A 6 1 K 39/21 (2006.01)	A 6 1 K 39/21 Z N A	4 B 0 6 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C 0 8 5
C 0 7 K 16/10 (2006.01)	C 0 7 K 16/10	4 H 0 4 5
A 6 1 P 31/18 (2006.01)	A 6 1 P 31/18	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 91 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2008-532483 (P2008-532483)	(71) 出願人	508086896
(86) (22) 出願日	平成18年9月22日 (2006.9.22)		プロサイ インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成20年5月1日 (2008.5.1)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 902
(86) 国際出願番号	PCT/US2006/037302		64, ポーウェイ, フリント プレイ
(87) 国際公開番号	W02007/035930		ス 12170
(87) 国際公開日	平成19年3月29日 (2007.3.29)	(74) 代理人	100078282
(31) 優先権主張番号	60/719, 952		弁理士 山本 秀策
(32) 優先日	平成17年9月22日 (2005.9.22)	(74) 代理人	100062409
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 安村 高明
		(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹
		(72) 発明者	ジェン, ユー
			アメリカ合衆国 カリフォルニア 921
			31, サン ディエゴ, コーハンシー
			ロード 11614
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 酵母突然変異体において産生されるグリコシル化ポリペプチドおよびその使用方法

(57) 【要約】

本発明は、ワクチン処方では有用な種々の高マンノースグリコシル化ポリペプチドを提供する。また、本発明は、そのようなグリコシル化ポリペプチドの製法、およびH I V-中和抗体を誘導することにおけるその使用も提供する。本発明により、抗体2 G 1 2によって認識される少なくとも2つのN-結合高マンノースオリゴ糖を含む単離されたグリコシル化ポリペプチド、および医薬上許容される賦形剤を含む組成物であって、ここで、該ポリペプチド上のN-結合グリカンの50%を超えるものは高マンノースオリゴ糖であり、ここで、該高マンノースオリゴ糖はMan₉GlcNAc₂、Man₈GlcNAc₂またはその組合せであることを特徴とする、対象において抗体2 G 1 2によって認識されるエピトープを含む蛋白質に特異的な抗体を誘導するための組成物が、提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗体 2 G 1 2 によって認識される少なくとも 2 つの N-結合高マンノースオリゴ糖を含む単離されたグリコシル化ポリペプチド、および医薬上許容される賦形剤を含み、ここで、該ポリペプチド上の N-結合グリカンの 50 % を超えるものは高マンノースオリゴ糖であり、ここで、該高マンノースオリゴ糖は $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ またはその組合せである、対象において抗体 2 G 1 2 によって認識されるエピトープを含む蛋白質に特異的な抗体を誘導するための組成物。

【請求項 2】

前記ポリペプチドが少なくとも 3 つの N-結合高マンノースオリゴ糖を含む請求項 1 記載の組成物。

10

【請求項 3】

前記ポリペプチドが gp 1 2 0 のアミノ酸配列、またはその断片を含む請求項 1 記載の組成物。

【請求項 4】

前記ポリペプチドが真菌糖蛋白質のアミノ酸配列、またはその断片を含む請求項 1 記載の組成物。

【請求項 5】

前記ポリペプチドが、酵母糖蛋白質のアミノ酸配列、またはその断片を含む請求項 1 記載の組成物。

20

【請求項 6】

前記酵母が *Saccharomyces cerevisiae* である請求項 5 記載の組成物。

【請求項 7】

前記酵母糖蛋白質が、PST 1、ECM 3 3、Gas 1、Gas 5、GP 3 8、および YJL 1 7 1 c よりなる群から選択される請求項 6 記載の組成物。

【請求項 8】

前記酵母が *Pichia pastoris* である請求項 5 記載の組成物。

【請求項 9】

前記酵母が *Candida albicans* である請求項 5 記載の組成物。

30

【請求項 10】

前記ポリペプチドが、*Saccharomyces cerevisiae* の PST 1、ECM 3 3、Gas 1、Gas 5、GP 3 8、または YJL 1 7 1 c に対するホモログである真菌糖蛋白質のアミノ酸配列を含む請求項 4 記載の組成物。

【請求項 11】

前記ポリペプチド上の N-結合グリカンの少なくとも 90 % が $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ 、またはその組合せである請求項 1 記載の組成物。

【請求項 12】

前記ポリペプチド上の N-結合グリカンの少なくとも 90 % が $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ である請求項 1 記載の組成物。

40

【請求項 13】

前記医薬上許容される賦形剤がアジュバントである請求項 1 記載の組成物。

【請求項 14】

Saccharomyces cerevisiae の破壊された pmr 1 遺伝子、または *Saccharomyces cerevisiae* の pmr 1 遺伝子の破壊されたホモログ遺伝子を有する突然変異体真菌から単離されたグリコシル化ポリペプチドであって、ここで、該グリコシル化ポリペプチドは抗体 2 G 1 2 によって認識されるグリコシル化ポリペプチド、および医薬上許容される賦形剤を含み、対象において抗体 2 G 1 2 によって認識されるエピトープを有する蛋白質に特異的な抗体を誘導するための組成物。

【請求項 15】

50

前記突然変異体真菌が突然変異体酵母である請求項 1 4 記載の組成物。

【請求項 1 6】

前記突然変異体酵母が破壊された *pmr 1* 遺伝子を有する *Saccharomyces cerevisiae* である請求項 1 5 記載の組成物。

【請求項 1 7】

前記グリコシル化ポリペプチドが *PST 1* のアミノ酸配列、またはその断片を含む請求項 1 6 記載の組成物。

【請求項 1 8】

Saccharomyces cerevisiae の破壊された *pmr 1* および *mnn 1* 遺伝子、または *Saccharomyces cerevisiae* の *pmr 1* および *mnn 1* 遺伝子の破壊されたホモログ遺伝子を有する突然変異体真菌から単離されたグリコシル化ポリペプチドであって、ここで、該グリコシル化ポリペプチドは抗体 2 G 1 2 によって認識されるグリコシル化ポリペプチド、および医薬上許容される賦形剤を含む、対象において抗体 2 G 1 2 によって認識されるエピトープを有する蛋白質に特異的な抗体を誘導するための組成物。

10

【請求項 1 9】

前記突然変異体真菌が突然変異体酵母である請求項 1 8 記載の組成物。

【請求項 2 0】

前記突然変異体酵母が破壊された *pmr 1* および *mnn 1* 遺伝子を有する *Saccharomyces cerevisiae* である請求項 1 9 記載の組成物。

20

【請求項 2 1】

前記グリコシル化ポリペプチドが、*PST 1* のアミノ酸配列、またはその断片を含む請求項 2 0 記載の組成物。

【請求項 2 2】

Saccharomyces cerevisiae の破壊された *och 1* および *mnn 1* 遺伝子、または *och 1*、*mnn 1*、および *mnn 4* 遺伝子、あるいは *Saccharomyces cerevisiae* の *och 1* および *mnn 1*、または *och 1*、*mnn 1*、および *mnn 4* 遺伝子の破壊されたホモログ遺伝子を有する突然変異体真菌から単離されたグリコシル化ポリペプチド、ここで、該グリコシル化ポリペプチドは抗体 2 G 1 2 によって認識され、および医薬上許容される賦形剤を含む、対象において抗体 2 G 1 2 によって認識されるエピトープを有する蛋白質に特異的な抗体を誘導するための組成物。

30

【請求項 2 3】

a) 突然変異体真菌を発酵させる工程であって、ここで、該突然変異体真菌はグリコシル化ポリペプチドを生産するように突然変異されており、ここで、該グリコシル化ポリペプチドは、抗体 2 G 1 2 によって認識される少なくとも 2 つの N-結合高マンノースオリゴ糖、および医薬上許容される賦形剤を含み、ここで、該グリコシル化ポリペプチド上の N-結合グリカンの 50 % を超えるものが高マンノースオリゴ糖である、および該高マンノースオリゴ糖は $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ 、またはその組合せである、工程；

b) 突然変異体真菌細胞溶解物または上清からグリコシル化ポリペプチドを精製する工程；次いで

40

c) 該グリコシル化ポリペプチドを医薬上許容される賦形剤と共に処方する工程を含む、対象において抗体 2 G 1 2 によって認識されるエピトープを含む蛋白質に特異的な抗体を誘導するための組成物を調製する方法。

【請求項 2 4】

前記突然変異体真菌が突然変異体酵母である請求項 2 3 記載の方法。

【請求項 2 5】

前記突然変異体酵母が破壊された *och 1*、*mnn 1*、および *mnn 4* 遺伝子を有する *Saccharomyces cerevisiae* である請求項 2 4 記載の方法。

【請求項 2 6】

50

前記突然変異体酵母が破壊された *pmr1* および *mnn1* 遺伝子を有する *Saccharomyces cerevisiae* である請求項 24 記載の方法。

【請求項 27】

前記突然変異体酵母が破壊された *och1* および *mnn1* 遺伝子を有する *Saccharomyces cerevisiae* である請求項 24 記載の方法。

【請求項 28】

前記突然変異体酵母が破壊された *och1* 遺伝子を有する *Pichia pastoris* である請求項 24 記載の方法。

【請求項 29】

前記突然変異体酵母が破壊された *och1* 遺伝子を有する *Candida albicans* である請求項 24 記載の方法。 10

【請求項 30】

前記グリコシル化ポリペプチドが酵母糖蛋白質またはその断片である請求項 23 記載の方法。

【請求項 31】

前記酵母糖蛋白質が *Saccharomyces cerevisiae* の PST1、ECM33、Gas1、Gas5、GP38、および YJL171c よりなる群から選択される請求項 30 記載の方法。

【請求項 32】

前記酵母糖蛋白質が *Saccharomyces cerevisiae* の PST1、ECM33、Gas1、Gas5、GP38、または YJL171c のホモログである請求項 30 記載の方法。 20

【請求項 33】

前記突然変異体真菌が、工程 a) 前に、前記グリコシル化ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むベクターで形質転換されている請求項 23 記載の方法。

【請求項 34】

前記ヌクレオチド配列が *gp120* またはその断片をコードする請求項 33 記載の方法。

【請求項 35】

gp120 をコードするヌクレオチド配列、または少なくとも 2 つの N-グリコシル化部位を含むその断片を含むポリヌクレオチドを含む突然変異体真菌細胞であって、該突然変異体酵母細胞は *gp120*、または抗体 2G12 によって認識される少なくとも 2 つの N-結合高マンノースオリゴ糖を含む断片を生産することができ、ここで、該高マンノースオリゴ糖は $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ またはその組合せである突然変異体真菌細胞。 30

【請求項 36】

前記突然変異体真菌が破壊された *och1*、*mnn1*、および *mnn4* 遺伝子を有する *Saccharomyces cerevisiae* である請求項 35 記載の突然変異体真菌細胞。

【請求項 37】

前記突然変異体真菌が、破壊された *pmr1* および *mnn1* 遺伝子を有する *Saccharomyces cerevisiae* である請求項 35 記載の突然変異体真菌細胞。 40

【請求項 38】

前記突然変異体真菌が、破壊された *och1* および *mnn1* 遺伝子を有する *Saccharomyces cerevisiae* である請求項 35 記載の突然変異体真菌細胞。

【請求項 39】

前記突然変異体真菌が、破壊された *och1* を有する *Pichia pastoris* である請求項 35 記載の突然変異体真菌細胞。

【請求項 40】

有効量の請求項 1 記載の組成物を対象に投与することを含む、対象において、抗体 2G12 によって認識されるエピトープを含む蛋白質に特異的な抗体を創製する方法。 50

【請求項 4 1】

有効量の請求項 1 4 記載の組成物を対象に投与することを含む、対象において、抗体 2 G 1 2 によって認識されるエピトープを含む蛋白質に特異的な抗体を創製する方法。

【請求項 4 2】

有効量の請求項 1 8 記載の組成物を対象に投与することを含む、対象において、抗体 2 G 1 2 によって認識されるエピトープを含む蛋白質に特異的な抗体を創製する方法。

【請求項 4 3】

有効量の請求項 2 2 記載の組成物を対象に投与することを含む、対象において、抗体 2 G 1 2 によって認識されるエピトープを含む蛋白質に特異的な抗体を創製する方法。

【請求項 4 4】

有効量の請求項 1 記載の組成物を投与することを含む、対象において、病原体に対する中和抗体を誘導する方法。

【請求項 4 5】

前記病原体が H I V である請求項 4 4 記載の方法。

【請求項 4 6】

有効量の請求項 1 4 記載の組成物を対象に投与することを含む、対象において病原体に対する中和抗体を誘導する方法。

【請求項 4 7】

前記病原体が H I V である請求項 4 6 記載の方法。

【請求項 4 8】

有効量の請求項 1 8 記載の組成物を対象に投与することを含む、対象において病原体に対する中和抗体を誘導する方法。

【請求項 4 9】

前記病原体が H I V である請求項 4 8 記載の方法。

【請求項 5 0】

有効量の請求項 2 2 記載の組成物を対象に投与することを含む、対象において病原体に対する中和抗体を誘導する方法。

【請求項 5 1】

前記病原体が H I V である請求項 5 0 記載の方法。

【請求項 5 2】

有効量の請求項 1 記載の組成物を対象に投与することを含む、対象において、病原体によって誘導される疾患を予防または治療する方法。

【請求項 5 3】

前記病原体が H I V である請求項 5 2 記載の方法。

【請求項 5 4】

有効量の請求項 1 4 記載の組成物を対象に投与することを含む、対象において、病原体によって誘導される疾患を予防または治療する方法。

【請求項 5 5】

前記病原体が H I V である請求項 5 4 記載の方法。

【請求項 5 6】

有効量の請求項 1 8 記載の組成物を対象に投与することを含む、対象において、病原体によって誘導される疾患を予防または治療する方法。

【請求項 5 7】

前記病原体が H I V である請求項 5 6 記載の方法。

【請求項 5 8】

有効量の請求項 2 2 記載の組成物を対象に投与することを含む、対象において、病原体によって誘導される疾患を予防または治療する方法。

【請求項 5 9】

前記病原体が H I V である請求項 5 8 記載の方法。

【請求項 6 0】

10

20

30

40

50

抗体 2 G 1 2 によって認識される少なくとも 2 つの N-結合高マンノースオリゴ糖、および医薬上許容される賦形剤を含むグリコシル化ポリペプチドに対する抗体の結合を検出することを含み、ここで、該グリコシル化ポリペプチド上の N-結合グリカンの 50 % を超えるものは高マンノースオリゴ糖であり、および、ここで、該高マンノースオリゴ糖は $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ またはその組合せである、N-結合高マンノースオリゴ糖に特異的に結合する抗体を同定する方法。

【請求項 6 1】

前記抗体が HIV によって感染される対象の血清中にある請求項 6 0 記載の方法。

【請求項 6 2】

前記グリコシル化ポリペプチドが突然変異体酵母細胞溶解物である請求項 6 0 記載の方法

10

【請求項 6 3】

Saccharomyces cerevisiae の破壊された och1 および mnn1、または och1、mnn1 および mnn4 遺伝子、あるいは *Saccharomyces cerevisiae* の och1 および mnn1、または och1、mnn1、および mnn4 遺伝子の破壊されたホモログ遺伝子を有する突然変異体真菌において生産されたグリコシル化ポリペプチドに対する抗体の結合を検出することを含み、ここで、該グリコシル化ポリペプチドは抗体 2 G 1 2 によって認識される、N-結合高マンノースオリゴ糖に特異的に結合する抗体を同定する方法。

【請求項 6 4】

前記抗体が HIV によって感染される対象の血清中にある請求項 6 3 記載の方法。

20

【請求項 6 5】

突然変異体酵母の全細胞、および医薬上許容される賦形剤を含み、ここで、該突然変異体酵母は *Saccharomyces cerevisiae* の破壊された pmr1 および mnn1 遺伝子、och1 および mnn1 遺伝子、または och1、mnn1、および mnn4 遺伝子、あるいは *Saccharomyces cerevisiae* の pmr1 および mnn1 遺伝子、och1 および mnn1 遺伝子、または och1、mnn1、および mnn4 遺伝子の破壊されたホモログ遺伝子を有する、組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

30

【0001】

(関連出願の引用)

本出願は、米国仮特許出願第 60/719,952 号 (2005 年 9 月 22 日出願) に対する優先権を主張し、その内容は本明細書中でその全体が参考として援用される。

【0002】

(技術分野)

本発明は、免疫学および薬学の分野に関する。より詳細には、本発明は、有効な免疫応答を誘発するために有用なグリコシル化抗原を産生する方法およびそのような抗原を使用するワクチン接種戦略に関する。

【0003】

(連邦政府の支援を受けた研究および開発に関する宣言)

本発明は、National Institutes of Health 助成金番号 A I 5 1 9 0 3 および A I 5 8 7 2 4 の下で、米国政府支援によって行われた。米国政府は、本発明に対し一定の権利を有し得る。

【背景技術】

【0004】

(発明の背景)

いくつかの病原体によって発現された複合糖質は宿主免疫応答の回避を容易とし、*Streptococcus pneumoniae*、*Neisseria meningitidis*、*Haemophilus influenza*、*Salmonella*

50

t y p h i、およびヒト免疫不全ウイルス（「H I V」）のような生物での感染に続いての破壊的続発症に貢献する。特に、糖蛋白質の炭水化物リッチな領域は免疫原性が貧弱である。免疫原性のこの欠如に貢献する因子は、炭水化物ミクロ不均一性による単一抗原性応答の希釈、および高度に免疫原性の蛋白質エピトープとの立体的干渉を含む。例えば、Ruddら、*Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 32:1-100 (1997); Woodsら、*Nature Struct. Biol.* 1:499-501 (1994) 参照。加えて、ウイルスは、細胞グリコシル化マシーナリーを用いて、宿主が既にそれに対して寛容化されている内因性グリカンを発現することによって宿主免疫系をしばしば騙す。

【0005】

H I V病原性における糖蛋白質の役割、特に、g p 1 2 0のそれは、保護的宿主免疫応答を誘導するにおいて複合糖質の困難性および重要性を例示する。全てのウイルスのように、H I Vは、宿主において首尾よくそれ自体を増殖させるのに、細胞の転写および翻訳マシーナリーを必要とする。H I Vは、特異的細胞受容体との相互作用を介して細胞に進入することによってこれを達成する。特に、H I Vビリオンは、そのウイルスエンベロップ蛋白質（「E n v」）と、初期感染の間における細胞C D 4受容体およびC C R 5細胞共受容体との相互作用を介して、および感染後期のC D 4受容体-C X C R 4共受容体複合体を介して、細胞、通常、Tリンパ球に進入する。例えば、Pohlmannら、*J. Virol.* 75:4664-72 (2001); Teunisら、*Cell* 100:587-97 (2000) 参照。E n v蛋白質はg p 1 2 0として知られた糖蛋白質である。H I Vビリオンの表面では、g p 1 2 0の3つの分子がもう1つの細胞表面蛋白質g p 4 1に非共有結合により連結している。例えば、Zolla-Pazner, *Nature Rev. Immunol.* 4:199-210 (2004) 参照。g p 4 1は、ウイルスエンベロップにおけるホモトリマー複合体として発見された膜貫通糖蛋白質である。このg p 1 2 0-g p 4 1複合体は、最初に、C D 4 / 共受容体複合体に結合し、ついで、引き続いて、立体配座変化を受け、その結果、ウイルスの細胞への進入を媒介するウイルス融合ペプチドの暴露をもたらす、H I Vビリオン上でヘテロオリゴマースパイクを形成する。

【0006】

最近の証拠は、C D 4 / 共受容体相互作用から区別される第二の相互作用も、特に最も初期の段階においてH I V伝達および感染に対して重要であることを示唆する。樹状細胞（D C）、高度に特殊化された抗原提示細胞は、感染に際してH I Vによって標的とされる最初の細胞である。Geijtenbeekら、*Cell* 100:587-97 (2000) 参照。粘膜におけるD Cは粘膜表面からのH I Vを捕獲し、内部化し、g p 1 2 0、およびD C上の細胞表面分子であるD C-S I G Nの間の相互作用を介して遠くのリンパ節に輸送する。次いで、D Cによる無傷ウイルスの送達の結果、C D 4 + T-リンパ球の感染がもたらされる。Bashirovaら、*J. Exp. Med.* 193:671-78 (2001) 参照。換言すれば、D C-S I G NはH I VによるC D 4 + 細胞の効果的な感染を媒介するようにイン・トランス作用する。Pohlmannら、*J. Virol.* 75:4664-72 (2001) 参照。より後の研究は、D C-S I G Nは、また、イン・シス作用して、効果的なウイルス感染を促進することを示した。例えば、Leeら、*J. Virol.* 75:12028-38 (2001) 参照。

【0007】

感染された細胞を排除するにおける困難性を仮定すれば、免疫応答は、もし誘導された応答がウイルスの細胞への進入を邪魔すれば、最も効果的なようである。現在、そのような保護的応答を誘導する試みは、g p 1 2 0の貧弱な免疫原性によって妨げられてきた。g p 1 2 0は、広いグリコシル化、および臨界的なg p 1 2 0エピトープ、すなわち、ウイルスの進入をブロックすることができ、またはウイルスを中和することができる抗体からの受容体 / 共受容体複合体と相互作用するエピトープに対する物理的遮蔽として作用するより保存された機能的に拘束された領域が散在する高度に可変なループを含有する。例

えば、Garberら、Lancet Infect. Dis. 4:397-413 (2004) 参照。しかしながら、天然で誘導される中和抗体は同定されており、効果的な中和応答に対する潜在能力を確認する。例えば、Burtonら、Nature Immunol. 5:233-36 (2004) 参照。

【0008】

HIV-1 一次単離体の広域スペクトルに対する中和抗体を誘導するための HIV/HIV-1 ワクチンの開発は、依然として、AIDS の発見から 25 年たっても、かなり挑戦的な努力である。効果的なワクチンを開発するための挑戦は、中和抗体が宿主で誘導されるように免疫学的に提示され得る適当な抗原性エピトープの同定にある。成功した HIV ワクチンを開発するにおける挑戦は、一次 HIV 単離体におけるかなりの多様性によってさらに複雑化される。例えば、Gaschenら、Science 296:2354-60 (2002) 参照。現在、ワクチン設計に対する伝統的なアプローチでは、中和抗体応答の誘導における成功が示されていない。HIV ワクチンのほぼ 30 の臨床試験の中では、中和抗体を広く誘導できるものはない。主な挑戦の内の 1 つは、抗原の表面に露出され、HIV-1 の殆どまたは全てのサブタイプにおいて高度に保存された中和エピトープを持つ抗原の適切な設計の欠如である。Pantophlet Rら、Annu Rev Immunol. 24:739-69, 2006。現在までに、広くかつ優れた中和活性を持つ唯 4 つのモノクローナル抗体 (MAb) が HIV-1 感染ヒトから単離された。Douek DCら、Cell 124:677-81 (2006)。それらのいずれも、動物の全てのテストされた種において複製できない。4 つの MAb の中で、1 つは HIV-1 env gp120 上の立体配座エピトープを標的とし、2 つは gp41 を認識し、1 つは 2G12 を認識し、gp120 上の高マンノース型炭水化物に結合する。

【0009】

HIV 感染についての最も初期の標的細胞は樹状細胞 (DC) であり、従って、最も優れたワクチンは、宿主において DC を標的とする HIV の能力を破壊するものである。gp120 の高マンノースオリゴ糖は、HIV-DC 相互作用に対して必須のエピトープを提供し、かくして、適当なワクチン標的を提供する。高マンノースオリゴ糖は DC-SIGN および gp120 の間の相互作用を媒介する。Geijtenbeekら、Cell 100:587-97 (2000) 参照。しかしながら、天然に生じる gp120 は約 20 % の $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ (Man_8) および 10 % $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (Man_9) を発現するに過ぎない。Scalanら、J. Virol. 76:7306-21 (2002) 参照。シアノビリン-N (CV-N)、シアノバクテリア蛋白質は gp120 の高マンノースオリゴ糖に結合し、 $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (Man_9) 上の $\text{Man}\alpha 1, 2\text{-Man}$ 構造、および $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ (Man_8) の D1D3 異性体の特異的に認識し、この相互作用を介して、HIV に対する優れた殺微生物剤として作用する。Bewleyら、J. Am. Chem. Soc. 123:3982-902 (2001) ; Sandstromら、Biochem. 43:13926-31 (2004) 参照。さらに、天然に生じる中和抗体の 1 つは、gp120 の $\text{Man}\alpha 1, 2\text{-Man}$ 高マンノースオリゴ糖のクラスターを特異的に認識する。Scanlanら、J. Virol. 76:7306-21 (2002) 参照。2G12 抗体として知られたこの抗体は、DC および CD4+T 細胞との HIV ビリオン相互作用を阻害することによって、HIV-1 一次単離体の広い範囲を潜在的に中和する。例えば、Trkolaら、J. Virol. 70:1100-08 (1996) ; Sandersら、J. Virol. 76:7293-305 (2002) 参照。

HIV-1 ワクチンについての標的としての高マンノース型グルカン

炭水化物ベースの HIV ワクチンの開発は、予防ワクチンのための新規なアプローチの 1 つであると考えられる。非特許文献 1。いくつかの系列の証拠は、 $\text{Man}_8\text{NAcGlc}$ の D1 および D3 アーム上で見出される末端 $\text{Man}\alpha 1, 2\text{-Man}$ 構造 ($\alpha 1, 2\text{-結合マンノース}$) は gp120 糖蛋白質上の新規な標的を提示することを示しており、異なる株およびサブタイプからの HIV-1 に対する優れた中和抗体を誘導する可能性が

存在する。

【0010】

gp120上の高マンノースグリカンは、広く中和するMAb 2G12によって認識される。げっ歯類において作られ、HIV-1感染ヒトから単離されたgp120に対する数百のMAbの中では、2G12は、ウイルス炭水化物を認識し、広い範囲のHIV-1一次単離体を潜在的に中和する唯一つのものである。それは、HIV-1とDCおよびCD4⁺T細胞との相互作用を阻害することによってそれを行う。Trkolaら、J. Virol. 70(2):1100-08, 1996; Scanlanら、J. Virol. 76(14):7306-21, 2002; Sandersら、J. Virol. 76(14):7293-305, 2002。2G12の結合部位は、HIV-1 gp120糖蛋白質上の高マンノース型グリカンとして同定されている。より特異的には、2G12 MAbは、少なくとも3つの高マンノースグリカンからの末端α1, 2-結合マンノース残基のクラスターに結合する(Scanlanら、J. Virol. 76(14):7306-21, 2002)。それは、異なる末端結合、α1, 3-結合またはα1, 6-結合マンノースを持つ他の炭水化物またはマンノース残基を認識しない。

10

【0011】

高マンノースグリカン上のManα1, 2-Man構造もまた優れたHIV-1阻害剤に対する結合部位である。シアノビリン-N(CV-N)と呼ばれるシアノバクテリア蛋白質は、HIV-1、HIV-2およびSIVの実験室株および一次単離体の多様なアレイを不活化することができる。Boydら、Antimicrob Agents Chemother. 41(7):1521-30, 1997。該蛋白質は、CD4および共受容体とのHIV-1 gp120相互作用をブロックし、ウイルス-対-細胞融合を妨げ、および細胞の感染を停止させることもできる。Esserら、J. Virol. 73(5):4360-71, 1999。Deyら、J. Virol. 74(10):4562-9, 2000。CV-Nのこれらの優れた特性は、極端に高い親和性をもって、gp120上の高マンノースオリゴ糖に結合するその能力に帰される。具体的には、該阻害剤は、Man₉GlcNAc₂(Man₉)上のManα1, 2-Man構造、およびMan₈GlcNAc₂(Man₈)のD1D3異性体を認識するが、Man₇、Man₆、およびMan₅を含めた高マンノースの他の形態を認識しない。Bewleyら、J. Am Chem Soc. 123(17):3892-902, 2001; Sandstromら、Biochemistry. 43(44):13926-13931, 2004。HIV感染を阻害するCV-Nのこの能力は、これらの末端グリカン構造に結合することができるそのような分子の潜在能力の証拠を提供する。

20

30

【0012】

樹状細胞は、DC-SIGNと、gp120上の高マンノースグリカンとの相互作用を介して感染を増強させることが示されている。最近、DCは、身体中のHIVによって標的とされる最初の細胞型であることが判明した。粘膜におけるDCは、HIVを捕獲し、内部化し、遠くのリンパ節へ輸送し、そこで、それは無傷ウイルスをCD4⁺T-リンパ球に送達する。Geijtenbeekら、Cell. 100:587-97, 2000。HIV-1、HIV-2、SIVおよびSHIVの全てのテストされた株はDCに結合し、DC-SIGNはこのプロセスにおいて重要な役割を演じることが見出された。Pohlmannら、J. Virol. 75(10):4664-72, 2001。HIVおよびDC-SIGNの間の相互作用は、gp120上の高マンノースグリカンによって媒介される。Geijtenbeekら、Cell. 100:587-97, 2000。事実、合成高マンノースオリゴ糖は、DC-SIGNに結合し、引き続いてのHIV相互作用を妨げることができる。Feinbergら、Science. 294(5549):2163-6, 2001。

40

【0013】

HIV-1のgp120蛋白質は重くグリコシル化されており、平均して25のN-結

50

合グリコシル化部位を含有する。それらのほぼ半分は、高マンノース型またはハイブリッド型グリカンによって占められ、(Leonardら、J Biol Chem. 265(18):10373-82, 1990)、高マンノースグリカンは異なる結合部位を介して2G12、CV-N、およびDC-SIGNと相互作用する。MAb 2G12は、少なくとも3つのMan9またはMan8残基からのD1アームのクラスターに結合し、CV-Nは高い親和性をもって、単一のMan9およびMan8残基からのD1およびD3アームに結合し、DC-SIGNはそのテトラマーを介して数個のマンノース残基に結合する。

【0014】

一緒にすると、これらの結果は、高マンノースグリカン上で見出されたMan α 1, 2-Man構造に対する高度に特異的な中和抗体でHIVに感染の初期段階を阻害する強い可能性を示す。主な挑戦は、末端 α 1, 2-結合マンノース構造を持つ厳格に高いマンノースを含有し、gp120に対して交差反応できるこのエピトープに対する免疫原性応答を誘導する抗原を開発することである。

【0015】

2つのアプローチが、糖ペプチドベースのHIVワクチンを確立するための均一HIV-1糖ペプチドを構築するためにとられた。非特許文献1。これらのアプローチは、ハイブリッド型または高マンノース型N-グリカンいずれかを運ぶHIV-1 gp120糖ペプチドの全くの化学的合成、および種々のHIV-1糖ペプチドを構築するための化学酵素アプローチである。非特許文献2；およびGengら、Angew. Chem. Int. Ed. 43:2562-2565, 2004；Singhら、Bioorg. Med. Chem. Lett. 13:327-330, 2003；Wangら、Chem BioChem. 6:1068-1074 (2005)；Zengら、J. Am. Chem. Soc. 127:9692-9693, 2005；Liら、J. Org. Chem. 70:9990-9996, 2005参照。しかしながら、これらの合成糖ペプチドは、動物モデルにおいてその免疫原性についてさらに評価される必要がある。

【非特許文献1】Wang, Curr. Opin. Drug Discov. Devel. 9(2):194-206, 2006

【非特許文献2】Mandalら、Angew. Chem. Int. Ed. 43:2557-2561, 2004

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0016】

(発明の要旨)

ウイルス単離体の広域スペクトルに対する中和抗体を誘導することができる効果的なHIVワクチンは、HIV流行病を制御するための最良の希望である。あいにく、Env糖蛋白質の貧弱な免疫原性、ウイルス抗原多様性および免疫回避を含めた、主な障害が、そのようなワクチンの開発を継続的に妨げている。これらの挑戦に対する応答において、本明細書中で提供される組成物は、HIVの宿主細胞への進入に対して臨界的な多数の複合糖質エピトープを備えた区別される組換え抗原を提供する。増大された数の炭水化物エピトープは、中和抗体を誘導するためのワクチン組成物におけるこれらのエピトープの免疫原性およびその相対的能力を最大化させる。

【0017】

例えば、本明細書中で提供されるgp120は、末端 α 1-2グリカンを持つ実質的に均一なマンノースオリゴ糖、例えば、マンノース-9-N-アセチルグルコサミン-2(「Man₉GlcNAc₂」)またはMan₈GlcNAcを発現する。高マンノースgp120組成物を作成し、効果的な抗-HIV中和抗体応答を誘導するための得られた組成物の使用方法も本明細書中で記載される。

【0018】

従って、本明細書中において、実質的に均一にグリコシル化された組換え蛋白質が提供

10

20

30

40

50

され、ここで、末端グリカン₁は末端 α 1-2グリカン構造である。該組換え蛋白質は、該蛋白質をコードするヌクレオチド配列での *Saccharomyces cerevisiae* 変種の形質転換、形質転換された細胞の発酵、および細胞または培養上清からの蛋白質の単離によって得ることができる。いくつかの実施形態において、該蛋白質はビルレンス因子である。該蛋白質はウイルス蛋白質であり得る。特別な実施形態において、該ウイルス蛋白質は表面蛋白質である。1つの実施形態において、該蛋白質はヒト免疫不全ウイルスの gp120 である。該末端グリカンはマンノースであり得る。いくつかの実施形態において、該グリカンはオリゴマンノースである。いくつかの実施形態において、該末端 α 1-2構造は $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ または $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ 、またはその組合せの上にある。

10

【0019】

さらに、本明細書中において、a) 当該蛋白質をコードするヌクレオチド配列を含むベクターを共し；b) 蛋白質グリコシル化における欠陥で細胞を形質転換し；c) 形質転換された細胞を発酵し；次いで、d) 細胞上清から分泌された組換え蛋白質を精製することを含む、不均一にグリコシル化された組換え蛋白質を調製する方法が提供され、ここで、末端グリカンは末端 α 1-2グリカン構造である。いくつかの実施形態において、ヌクレオチド配列は、その天然状態においてはグリコシル化されている蛋白質をコードする。ヌクレオチド配列はビルレンス因子である蛋白質をコードすることができる。特別な実施形態において、ヌクレオチド配列は gp120 蛋白質をコードする。いくつかの実施形態において、細胞は大いに $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ または $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ を持つ gp120 蛋白質を発現する。本発明の方法の細胞は、*S. cerevisiae mns1* Δ または *S. cerevisiae pmr1* Δ のような酵母細胞であり得る。ベクターは YEpL であり得るが、いくつかの実施形態においては、GAL1 プロモーターを含むことができる。いくつかの実施形態において、糖蛋白質は His タグを用いて精製される。

20

【0020】

また、本明細書中において、末端 α 1-2グリカン構造を含む蛋白質に特異的に結合する抗体を調製する方法が提供され、該方法は、本明細書中に開示された方法または蛋白質によって作製された組換え蛋白質を含む有効量の組成物で動物を免疫化することを含む。該組成物は、さらに、アジュバント、担体または双方をさらに含むことができる。

30

【0021】

本明細書中において、本明細書中に開示された方法によって生じた単離された抗体、ならびに単離された抗体を生産するハイブリドーマが提供される。

【0022】

また、本明細書中において、抗体 2G12 によって認識される少なくとも2つのN-結合高マンノースオリゴ糖を含む単離されたグリコシル化ポリペプチド、および医薬上許容される賦形剤を含む、対象において抗体 2G12 によって認識されるエピトープを含む蛋白質に特異的な抗体を誘導するための組成物が提供され、ここで、グリコシル化ポリペプチド上のN-結合グリカンの50%を超えるものは高マンノースオリゴ糖であり、ここで、該高マンノースオリゴ糖は $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ 、または $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ 、またはその組合せである。

40

【0023】

さらに、本明細書中において、*Saccharomyces cerevisiae* の破壊された *pmr1* 遺伝子、または *Saccharomyces cerevisiae* の *pmr1* 遺伝子の破壊されたホモログ遺伝子を有する突然変異体真菌から単離されたグリコシル化ポリペプチド、ここで、該グリコシル化ポリペプチドは抗体 2G12 によって認識され、および医薬上許容される賦形剤を含む、対象において抗体 2G12 によって認識されるエピトープを有する蛋白質に特異的な抗体を誘導するための組成物が提供される。

【0024】

50

さらに、本明細書中において、*Saccharomyces cerevisiae*の破壊された`pmr1`および`mnn1`遺伝子、または*Saccharomyces cerevisiae*の`pmr1`および`mnn1`遺伝子の破壊されたホモログ遺伝子を有する突然変異体真菌から単離されたグリコシル化ポリペプチド、ここで、該グリコシル化ポリペプチドは抗体2G12によって認識され、および医薬上許容される賦形剤を含む、対象において抗体2G12によって認識されるエピトープを有する蛋白質に特異的な抗体を誘導するための組成物が提供される。

【0025】

さらに、本明細書中において、*Saccharomyces cerevisiae*の破壊された`och1`および`mnn1`遺伝子、または`och1`、`mnn1`、および`mnn4`遺伝子、または*Saccharomyces cerevisiae*の`och1`および`mnn1`遺伝子、または`och1`、`mnn1`、および`mnn4`遺伝子の破壊されたホモログ遺伝子を有する突然変異体真菌から単離されたグリコシル化ポリペプチド、ここで、該グリコシル化ポリペプチドは抗体2G12によって認識され、および医薬上許容される賦形剤を含む、対象において抗体2G12によって認識されるエピトープを有する蛋白質に特異的な抗体を誘導するための組成物が提供される。

【0026】

さらに、本明細書中において、対象において抗体2G12によって認識されるエピトープを含む蛋白質に特異的な抗体を誘導するための組成物を調製する方法が提供され、該方法はa)突然変異体真菌を発酵させ、ここで、該突然変異体真菌はグリコシル化ポリペプチドを生産するように突然変異されており、ここで、該グリコシル化ポリペプチドは、抗体2G12によって認識される少なくとも2つのN-結合高マンノースオリゴ糖、および医薬上許容される賦形剤を含み、ここで、グリコシル化ポリペプチド上のN-結合グリカンの50%を超えるものが高マンノースオリゴ糖であり、ここで、該高マンノースオリゴ糖は $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ 、またはその組合せであり；次いで、b)突然変異体真菌細胞溶解物または上清からグリコシル化ポリペプチドを精製することを含む。いくつかの実施形態において、該方法は、さらに、医薬上許容される賦形剤でグリコシル化ポリペプチドを処方する工程を含む。いくつかの実施形態において、突然変異体真菌は破壊された`och1`、`mnn1`、および`mnn4`遺伝子を有する*Saccharomyces cerevisiae*、破壊された`och1`および`mnn1`遺伝子を有する*Saccharomyces cerevisiae*、破壊された`pmr1`および`mnn1`遺伝子を有する*Saccharomyces cerevisiae*、または破壊された`och1`遺伝子を有する*Pichia pastoris*または*Candida albicans*である。

【0027】

さらに、本明細書中において、対象において抗体2G12によって認識されるエピトープを含む蛋白質に特異的な抗体を誘導するための組成物を調製する方法であり、該方法は：a)突然変異体真菌を発酵し、ここで、該突然変異体真菌は*Saccharomyces cerevisiae*の`pmr1`遺伝子の破壊されたホモログ遺伝子を有し；次いで、b)突然変異体真菌細胞から、抗体2G12によって認識されるグリコシル化ポリペプチドを単離することを含む。該方法は、さらに、医薬上許容される賦形剤で、単離されたグリコシル化ポリペプチドを処方する工程を含むことができる。いくつかの実施形態において、突然変異体真菌は*Saccharomyces cerevisiae*または*Pichia pastoris*であり、ここで、`pmr1`遺伝子は破壊されている。いくつかの実施形態において、突然変異体真菌は、工程a)前にグリコシル化ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むベクターで形質転換されている。いくつかの実施形態において、グリコシル化ポリペプチドはHIV gp120、またはその断片である。

【0028】

さらに、本明細書中において、対象において抗体2G12によって認識されるエピトープを含む蛋白質に特異的な抗体を誘導するための組成物を調製する方法が提供され、該方

法は：a) 突然変異体真菌を発酵させ、ここで、該突然変異体真菌は *Saccharomyces cerevisiae* の *pmr1* および *mnn1* 遺伝子の破壊されたホモログ遺伝子を有し；次いで、b) 突然変異体真菌の細胞から抗体 2G12 によって認識されるグリコシル化ポリペプチドを単離することを含む。該方法は、さらに、医薬上許容される賦形剤で単離されたグリコシル化ポリペプチドを処方する工程を含んでもよい。いくつかの実施形態において、該突然変異体真菌は *Saccharomyces cerevisiae* であり、ここで、*pmr1* および *mnn1* 遺伝子は破壊されている。いくつかの実施形態において、該突然変異体真菌は、工程 a) の前に、グリコシル化ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むベクターで形質転換されている。いくつかの実施形態において、グリコシル化ポリペプチドは HIV gp120 またはその断片である。

10

【0029】

さらに、本明細書中において、対象において抗体 2G12 によって認識されるエピトープを含む蛋白質に特異的な抗体を誘導するための組成物を調製する方法が提供され、該方法は：a) 突然変異体真菌を発酵させ、ここで、該突然変異体真菌は *Saccharomyces cerevisiae* の *och1* および *mnn1* 遺伝子、または *och1*、*mnn1*、および *mnn4* 遺伝子の破壊されたホモログ遺伝子を有し；次いで、b) 突然変異体真菌細胞から抗体 2G12 によって認識されるグリコシル化ポリペプチドを単離することを含む。該方法は、さらに、医薬上許容される賦形剤でグリコシル化ポリペプチドを処方する工程を含んでもよい。いくつかの実施形態において、該突然変異体真菌は破壊された *och1*、*mnn1*、および *mnn4* 遺伝子を有する *Saccharomyces cerevisiae*、または破壊された *och1* および *mnn1* 遺伝子を有する *Saccharomyces cerevisiae* である。いくつかの実施形態において、該突然変異体真菌は、工程 a) 前にグリコシル化されたポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むベクターで形質転換されている。いくつかの実施形態において、グリコシル化されたポリペプチドは HIV gp120 またはその断片である。

20

【0030】

さらに、本明細書中において、少なくとも 2 つの N-グリコシル化部位を含む gp120 をコードするヌクレオチド配列またはその断片を含むポリヌクレオチドを含む突然変異体真菌細胞が提供され、ここで、該突然変異体酵母細胞は、抗体 2G12 によって認識される少なくとも 2 つの N-結合高マンノースオリゴ糖を含む gp120 または該断片を生産することができ、ここで、該高マンノースオリゴ糖は $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ 、またはその組合せである。いくつかの実施形態において、該突然変異体真菌は、破壊された *och1*、*mnn1*、および *mnn4* 遺伝子を有する *Saccharomyces cerevisiae*、破壊された *och1* および *mnn1* 遺伝子を有する *Saccharomyces cerevisiae*、または破壊された *och1* 遺伝子を有する *Pichia pastoris* または *Candida albicans* である。いくつかの実施形態において、該突然変異体真菌は、破壊された *pmr1* および *mnn1* 遺伝子を有する *Saccharomyces cerevisiae* である。いくつかの実施形態において、該突然変異体真菌は、破壊された *pmr1* 遺伝子を有する *Saccharomyces cerevisiae* または *Pichia pastoris* である。

30

40

【0031】

さらに、本明細書中において、突然変異体酵母の全細胞、および医薬上許容される賦形剤を含む組成物であり、ここで、該突然変異体酵母は、*Saccharomyces cerevisiae* の破壊された *pmr1* および *mnn1* 遺伝子、*och1* および *mnn1* 遺伝子、または *och1*、*mnn1*、および *mnn4* 遺伝子、または *Saccharomyces cerevisiae* の *pmr1* および *mnn1* 遺伝子、*och1* および *mnn1* 遺伝子、または *och1*、*mnn1*、および *mnn4* 遺伝子の破壊されたホモログ遺伝子を有する。

【0032】

50

さらに、本明細書中において、有効量の本明細書中に記載された組成物のいずれかを対象に投与することを含む、対象において抗体 2 G 1 2 によって認識されるエピトープを含む蛋白質に特異的な抗体を生じさせる方法が提供される。

【0033】

さらに、本明細書中において、有効量の本明細書中に記載された組成物のいずれかを対象に投与することを含む、対象において（H I V のような）病原体に対する中和抗体を誘導する方法が提供される。

【0034】

さらに、本明細書中において、本明細書中において提供された蛋白質、または本明細書中において提供される方法によって調製される蛋白質、および適当な賦形剤を含む有効量の医薬組成物を投与することを含む、それを必要とする対象において病原体に対する中和抗体を誘導する方法が提供される。いくつかの実施形態において、該方法は、さらに、アジュバントを投与することを含む。特別な実施形態において、病原体は H I V である。

【0035】

さらに、本明細書中において、有効量の本明細書中に記載された組成物のいずれかを対象に投与することを含む、対象において病原体によって誘導される疾患を予防または治療する方法が提供される。

【0036】

さらに、本明細書中において、本明細書中で提供された蛋白質、または本明細書中に提供された方法によって調製された蛋白質、および適当な賦形剤を含む有効量の医薬組成物を投与することを含む、それを必要とする対象において病原体によって誘導される疾患を予防または治療する方法が提供される。いくつかの実施形態において、該方法は、さらに、アジュバントを投与することを含む。特別な実施形態において、病原体は H I V である。1 つの実施形態において、該蛋白質は g p 1 2 0 である。いくつかの実施形態において、医薬組成物は、さらに、異なる H I V 株からの多数の g p 1 2 0 蛋白質を含む。

【0037】

さらに、抗体 2 G 1 2 によって認識される少なくとも 2 つの N-結合高マンノースオリゴ糖および医薬上許容される賦形剤を含むグリコシル化ポリペプチドへの抗体の結合を検出することを含み、ここで、グリコシル化ポリペプチド上の N-結合グリカンの 50 % を超えるものが高マンノースオリゴ糖であって、ここで、該高マンノースオリゴ糖が M a n₉ G l c N A c₂、M a n₈ G l c N A c₂、またはその組合せであることを特徴とする、N-結合高マンノースオリゴ糖に特異的に結合する抗体を同定する方法が提供される。

【0038】

さらに、*Saccharomyces cerevisiae* の破壊された p m r 1 遺伝子、または *Saccharomyces cerevisiae* の p m r 1 遺伝子の破壊されたホモログ遺伝子を有する突然変異体真菌で生産される糖蛋白質への抗体の結合を検出することを含み、ここに該糖蛋白質は抗体 2 G 1 2 によって認識されることを特徴とする、N-結合高マンノースオリゴ糖に特異的に結合する抗体を同定する方法が提供される。

【0039】

さらに、*Saccharomyces cerevisiae* の破壊された p m r 1 および m n n 1 遺伝子、または *Saccharomyces cerevisiae* の p m r 1 および m n n 1 遺伝子の破壊されたホモログ遺伝子を有する突然変異体真菌で生産されるグリコシル化ポリペプチドへの抗体への結合を検出することを含み、ここで、該糖蛋白質が抗体 2 G 1 2 によって認識されることを特徴とする、N-結合高マンノースオリゴ糖に特異的に結合する抗体を同定する方法が提供される。

【0040】

さらに、*Saccharomyces cerevisiae* の破壊された o c h 1 および m n n 1 遺伝子、または o c h 1、m n n 1、および m n n 4 遺伝子、または S a c

10

20

30

40

50

charomyces cerevisiae の *och1* および *mnn1* 遺伝子、または *och1*、*mnn1*、および *mnn4* 遺伝子の破壊されたホモログ遺伝子を有する突然変異体真菌で生産されたグリコシル化ポリペプチドへの抗体の結合を検出することを含み、ここで、該糖蛋白質は抗体 2G12 によって認識されることを特徴とする、N-結合高マンノースオリゴ糖に特異的に結合する抗体を同定する方法が提供される。

【0041】

いくつかの実施形態において、該抗体は HIV によって感染される対象の血清中にある。いくつかの実施形態において、グリコシル化ポリペプチドは突然変異体酵母細胞溶解物中にある。

【0042】

さらに、a) 第一の細胞を、CD4+ および CD8+ を発現する第二の細胞と接触させ、ここで、該第一の細胞は樹状細胞-特異的 C 型レクチン (DC-SIGN) を発現し、b) 該第一および第二の細胞を感染性ウイルス粒子と共に培養し；c) 共培養を、請求項 20 記載の方法によって調製された候補抗体と接触させ；次いで、d) 相対的感染性を決定することを含み、それにより、中和抗体は、感染性ウイルス粒子による第二の細胞の相対的感染性を低下させ、または無くするものであることを特徴とする、HIV 伝播につき中和モノクローナル抗体を同定する方法が提供される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0043】

(発明を実施するための形態)

HIV 感染を阻害する CV-N および 2G12 の能力は、Man9、Man8、または双方に対する中和抗体応答の誘導は、HIV 伝播に対する効果的な免疫性を供するであろうことを示唆する。しかしながら、今日、特異的グリコシル化プロフィールを持つ gp120 抗原を供するための再現性がある方法はない。かくして、本明細書中で提供される組換え高マンノース gp120 組成物は、HIV 感染に対する保護的免疫性の優れたインデューサーを提供する。

【0044】

開示の明瞭性のために、限定されるものではないが、本発明の詳細な記載を以下のサブセクションに分ける。

A. 定義

特に断りのない限り、本明細書中で用いる全ての技術的および科学的用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって通常理解されるのと同じの意味を有する。全ての特許、公開された特許出願および他の刊行物、GenBank からの配列、および本明細書中で言及する他のデータベースはここに引用してその全体を援用する。もしこのセクションに記載される定義が、ここに引用して援用する特許、公開された特許出願および他の刊行物、および GenBank からの配列、および他のデータベースに記載された定義と反対であるか、またはそうでなければ合致しないならば、本セクションに記載された定義が、引用して援用された定義よりも優先する。

【0045】

本発明の他の特徴および利点は、詳細な記載から、および特許請求の範囲から明らかであろう。

【0046】

本明細書中で用いる、「ある」は「少なくとも 1」または「1 以上」を意味する。

【0047】

本明細書中で用いるように、用語「アジュバント」とは、免疫原性剤に加えられた場合に、混合物への曝露に際して受容体宿主における該剤への免疫応答を非特異的に高め、または増強させる物質をいう。アジュバントは、例えば、水中油型エマルジョン、油中水型エマルジョン、ミョウバン（例えば、水酸化アルミニウム／リン酸塩）、リボソームおよびマイクロ粒子を含むことができる。例示的なアジュバントは、限定されるものではないが、スクワレン混合物 (SAF-1)、ムラミルペプチド、サポニン誘導体、マイコバクテ

10

20

30

40

50

リウム細胞壁調製物、モノホスホリル脂質A、ミコール酸誘導体、非イオン性ブロックコポリマー界面活性剤、Quil A、コレラトキシンBサブユニット、ポリホスファゼン、および誘導体、免疫刺激複合体 (ISCOM)、およびサイトカインを含む。例えば、Vogelら、Immunological Adjuvants IN VACCINES 69-79 (Plotkinら、eds., 4th Ed. Saunders (2004)) 参照。動物用途のため、および動物における抗体の生産のために、フロイントアジュバント (完全および不完全双方) のマイトジェン成分を用いることもできる。

【0048】

本明細書中で用いるように、「AIDS」とはHIV感染の兆候的相をいい、後天性免疫不全症候群 (通常AIDSとして知られている) およびAIDS-関連合併症 (「ARC」) を共に含む。例えば、Kilbyら、Natural History of HIV-1 Disease IN TEXTBOOK OF AIDS MEDICINE 49-58 (Merriganら、eds., Williams & Wilkins 2nd Ed. 1999) 参照。AIDSの免疫学のおよび臨床的発現は当該分野でよく知られており、例えば、免疫不全に由来する日和見感染および癌を含む。

【0049】

本明細書中で用いるように、用語「抗体」とは、抗原またはエピトープに特異的に結合することができる、免疫グロブリン遺伝子または免疫グロブリン複数遺伝子、またはその断片に由来する、それをモデル化した、または実質的にそれによってコードされたペプチドまたはポリペプチドのいずれの形態もいう。例えば、FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY (W. E. Paul, ed., 5th Ed., Lippincott, Williams & Wilkins (2003)); CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY (Coliganら、eds., John Wiley & Sons, 最新版); ANTIBODY ENGINEERING: A PRACTICAL APPROACH (J. McCaffertyら、eds., Oxford University Press 1996) 参照。抗体断片の例は抗原-結合を保持するものであり、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、およびFv断片; ダイアボディー; 線状抗体; 一本鎖抗体分子、例えば、scFvおよびV_{HH}; ミニボディー; ナノボディー; および抗体断片から形成された多特異的抗体を含む。典型的には、結合断片または誘導体はその結合活性の少なくとも50%を保持する。好ましくは、結合断片または誘導体はその生物学的活性の少なくとも60%、70%、80%、90%、95%、99%または100%を保持する。抗体またはその抗原-結合断片は、その結合および/または生物学的活性を実質的に変化させない保存的アミノ酸置換を含むことができる。かくして、用語「抗体」は最も広い意味で用いられ、具体的には、モノクローナル (全長モノクローナル抗体を含む)、ポリクローナル、多特異的 (例えば、二特異的)、ヘテロコンジュゲート、キメラ、ヒト化、ヒト、ネズミ、および合成抗体、ならびに所望の抗原に特異的に結合し、所望の結合および/または生物学的活性を呈する抗体断片をカバーする。

【0050】

用語「抗原」とは、抗体によって特異的に認識され、結合されるいずれの分子もいう。生物内での特異的抗体の生産によって証明されるように、生物において免疫応答を誘導する抗原を「免疫原」という。抗体によって結合される抗原または免疫原の特異的部分は「結合エピトープ」または「エピトープ」といわれる。抗体は、それが抗原に選択的に結合し、それにより、それを他の抗原から区別する場合、特定の抗原に対して特異的である。好ましくは、抗体は無関係な抗原への有意な結合を欠如する。

【0051】

本明細書中で用いるように、用語「発現カセット」とは、当該配列に適合する宿主において構造遺伝子 (すなわち、本明細書中で提供される抗体のような蛋白質コーディング配列) の発現に影響し得るヌクレオチド配列をいう。発現カセットは、ポリペプチドコーディング配列に; および、所望により、他の配列、例えば、転写終止シグナルと操作可能に

10

20

30

40

50

連結された少なくともプロモーターを含む。本明細書中で用いるように、用語「プロモーター」は、細胞、例えば、哺乳動物または植物細胞においてコーディング配列の転写を駆動できる全ての配列を含む。かくして、本発明の構築体で用いられるプロモーターは、遺伝子の転写のタイミングおよび／または速度を調節し、または変調するのに関与するシスー作用転写制御エレメントおよび調節配列を含む。例えば、プロモーターは、転写調節に関与する、エンハンサー、プロモーター、転写ターミネーター、複製起点、染色体組込み配列、5'および3'非翻訳領域、イントロン配列を含めたシスー作用性転写制御エレメントであり得る。プロモーターは構成的または誘導性であり得る。発現を行うのに必要な、またはその助けとなるさらなる因子、例えば、エンハンサーも用いることができる。プロモーターは、もしそれが適当な宿主細胞または他の発現系におけるコーディング配列の転写を刺激し、またはそれを変調するならば、本発明の核酸のようなコーディング配列に操作可能に連結されている。一般には、転写された配列に操作可能に連結されたプロモーター転写調節配列は、転写された配列に対して物理的に連続しており、すなわち、それらはシスー作用性である。しかしながら、いくつかの転写調節配列、例えば、エンハンサーは物理的に連続していたり、またはその転写をそれらが高めるコーディング配列に近接して位置する必要はない。発現カセットは、プラスミド、発現ベクター、組換えウィルス、組換えの「裸のDNA」ベクターのいずれかの形態なども含む。

10

【0052】

用語「単離された」は、その元の環境、例えば、もしそれが天然に生じるならば天然環境から取り出された物質を含む。例えば、単離されたポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、天然系において共存する物質のいくつかまたは全てから分離されたものである。そのようなポリヌクレオチドはベクターの一部であり得、および／またはそのようなポリヌクレオチドまたはポリペプチドは組成物の一部であり得、そのようなベクターまたは組成物がその天然環境の一部ではない点で依然として単離されている。

20

【0053】

フレーズ「核酸」または「核酸配列」は、オリゴヌクレオチド、ヌクレオチド、ポリヌクレオチド、またはこれらのいずれかの断片、本発明の抗体、またはその生物学的に活性な断片の抗体をコードする一本鎖または二本鎖であってよいゲノムまたは合成起源のDNAまたはRNA（例えば、mRNA、rRNA、tRNA）を含む。該用語は、天然ヌクレオチドの公知のアナログを含有する核酸、すなわち、オリゴヌクレオチドを含む。該用語は合成骨格を持つ核酸様構造も含む。例えば、Mata, Toxicol. Appl. Pharmacol. 144:189-97 (1997); Strauss-Soukup, Biochemistry 36:8692-98 (1997); および Samstag, Antisense Nucleic Acid Drug Dev 6:153-56 (1996) 参照。

30

【0054】

「組換え」ポリペプチドまたは蛋白質は、例えば、所望のポリペプチドまたは蛋白質をコードする外因性DNA構築体によって形質転換された細胞から生産された、組換えDNA技術によって生産されたポリペプチドまたは蛋白質をいう。例えば、CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubelら、eds., John Wiley & Sons, 最新版) 参照。

40

【0055】

用語「ポリペプチド」、「オリゴペプチド」、「ペプチド」および「蛋白質」は、いずれかの長さのアミノ酸のポリマーをいうのに本明細書中においては相互交換的に用いる。ポリマーは線状または分岐状であってよく、それは修飾されたアミノ酸を含んでもよく、それは非アミノ酸によって中断されていてもよい。該用語は、天然で、または介入；例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化、あるいは標識成分とのコンジュゲーションのようないずれかの他の操作または修飾によって修飾されているアミノ酸ポリマーも含む。また、例えば、（例えば、非天然アミノ酸などを含めた）アミノ酸の1以上のアナログを含有するポリペプチド、ならびに当該分野で公知の他

50

の修飾も該定義に含まれる。本発明のポリペプチドは抗体に基づく故に、該ポリペプチドは一本鎖または会合した鎖として起こり得ると理解される。

【0056】

用語「ホモログ」は、共通した起源、およびもう1つの種からの遺伝子と同一の機能を有する1つの種からの遺伝子、または遺伝子の産物をいうのに用いられる。例えば、*S. cerevisiae*の*pmr1*遺伝子の真菌ホモログ遺伝子とは、共通の起源を有し、*S. cerevisiae*の*pmr1*遺伝子と同一の機能を有する蛋白質をコードする真菌遺伝子を用いる。

【0057】

「ベクター」は、細胞に感染し、それをトランスフェクトし、それを一過的にまたは永久的に形質導入できる核酸を含む。ベクターは裸の核酸、または蛋白質または脂質と複合体化した核酸であり得ることは認識されるであろう。ベクターは、所望により、ウィルスまたは細菌核酸および／または蛋白質および／または膜（例えば、細胞膜、ウィルス脂質エンベロープなど）を含んでもよい。

【0058】

本明細書中で用いるように、用語「相乗化」とは、第二の剤の抗一病原または中和効果を増大させる1つの剤の能力をいう。相乗効果は、かくして、限定されるものではないが、剤が別々に用いられる場合に観察されない、2つの剤と一緒に用いる増大した生物学的効果（例えば、より優れたまたはより長い継続）、より効果的な生物学的効果、例えば、単一の剤の投与で達成できない多数のタイプの毒性の排除、または単一の剤で観察される生物学的効果を達成するのに投与で必要な剤の量の低下を含む。

【0059】

用語「病原体」とは、望まない兆候または病気状態を誘導し、または誘発するいずれの生物もいう。病原体は細菌、ウィルス、または真菌であってよい。

【0060】

本明細書中で使用するように、用語「対象」は、ヒト、ならびに例えば、イヌ、ネコ、ウシ、ブタ、げっ歯類等のような他の動物種を含む。病原体または病気を有する対象は本発明の抗体によって標的とされることは当業者に理解されるであろう。

【0061】

本明細書中で用いるように、用語「軽減する、治療する、または予防する」は、感染または他の障害に伴う1以上の兆候の遅延、発生するであろう、または発生すると予測されるそのような兆候の重症度の低下、またはそのような兆候の完全な排除を含む。これらの用語は、さらに、現存する病原体一関連兆候の軽減、病気の持続の低下、さらなる兆候の予防、ひどい続発症の軽減または予防、死亡の予防、または逆行、および病原体の伝播の低下または予防を含む。かくして、該用語は、有益な結果が、病原体を持つ、またはそのような病原体への暴露の可能性を持つ対象に付与されてきたことを示す。特に、軽減、治療または予防は、例えば、HIVに暴露された個体の初期感染の予防；HIVに感染した個体におけるウィルス負荷の低下；HIV感染の無症候相の延長；AIDSを持つ個体における総じての健康または生活の質の向上；およびAIDSを持つ個体の余命の延長を含む。臨床医は、免疫化の効果を、処置に先立って患者の状態と、または未処置患者の予測される状態と比較して、処置がAIDSを阻害するのに効果的か否かを判断することができる。

【0062】

本明細書中で用いるように、「有効量」は、病原体の伝播、患者の身体内または上でのビルレンス因子の作用に関連する他の兆候を部分的にまたは全体的に阻害し、または予防するのに、あるいはそのような兆候のさらなる進行を予防し、または低下させるのに十分な量である。有効成分単独を投与された個体に適用される場合、有効な用量とは、その成分単独で必要な用量をいう。活性剤の組合せに適用される場合、有効な用量とは、組み合わせ、系列的に、または同時に投与されたかを問わず、治療効果をもたらす有効成分の組み合わせた量をいう。用語「治療的に有効な量」および「有効量」は相互交換可能に使

用される。

【0063】

本明細書中で用いるように、用語「生物活性剤」とは、所望の生物学的効果を増強し、または媒介して、特定の生物の感染性または病原性を低下させ、またはそれを無くするいずれの合成または天然に生じる化合物もいう。生物活性剤は、例えば、化学療法薬物、殺生物薬物、抗ウイルス薬物、トキシン、サイトカイン、リガンド、抗体、またはそのいくつかの組合せのような薬剤を含む。

【0064】

本明細書中で用いるように、「生産的相互作用を予防する」は、抗体またはその生物学的に活性な断片無くして起こるであろう量と比較して、相互作用の量は低下することを意味する。相互作用は、限定されるものではないが、ビルレンス因子上の相互作用領域のマスキングまたは改変、およびビルレンス因子の発現、凝集、立体配座、または会合状態の改変を含めたいずれかの手段によって低下させ、または予防することができる。

【0065】

本明細書中で用いるように、用語「治療する」とは、病気または障害の回復、治癒、軽減、救済、改変、治療、軽減、改善または影響を目的として、病気または障害、病気または障害の兆候、または病気または障害に向けての素因を有する、対象への治療剤の適用または投与、またはそのような対象からの単離された組織または細胞系への治療剤の適用または投与をいう。

B. 組成物

本明細書中において、均一にグリコシル化された組換え蛋白質が提供され、ここで、末端糖は末端 α 1-2-マンノース構造である。組換え蛋白質は、蛋白質をコードするヌクレオチド配列での *Saccharomyces cerevisiae* 変種の形質転換、形質転換された細胞の発酵、および細胞または培養上清からの蛋白質の単離によって得ることができる。いくつかの実施形態において、該蛋白質はビルレンス因子である。該蛋白質はウイルス蛋白質であり得る。特別な実施形態において、ウイルス蛋白質は表面蛋白質である。1つの実施形態において、該蛋白質はヒト免疫不全ウイルスの gp120 である。いくつかの実施形態において、該グリカンオリゴマンノースである。1つの実施形態において、末端 α 1-2-マンノース構造は $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ または $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ 上にある。

【0066】

いずれの適当なビルレンス因子も本明細書中に開示された組成物で使用するすることができる。ビルレンス因子は、適当な条件下で宿主において病気を引き起こす微生物の能力を媒介する、またはそれに参画するいずれかの糖蛋白質である。例えば、ビルレンス因子は接着因子、被覆蛋白質、浸入因子、カプセル、エキソトキシン、またはエンドトキシンであり得る。糖蛋白質ビルレンス因子を発現する例示的な生物は、限定されるものではないが、レンチウイルス（例えば、HIV）、エボラウイルス、グラム陰性細菌（例えば、*Campylobacter jejuni*、*Campylobacter coli*、*Neisseria meningitidis*、*Helicobacter pylori*、*Escherichia coli*、*Haemophilus influenzae*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Mycobacteria tuberculosis*、*Mycobacteria bovis*、*Borrelia burgdorferi*、*Chlamydia* spp.、および *Streptococcus parasanguis*）を含む。

【0067】

蛋白質ビルレンス因子のグリコシル化はN-結合またはO-結合することができる。グリカンは、グリコシド結合によって相互に連結された約5を超える単糖残基よりなる多糖である。代表的なグリカンはマンノースを含む。蛋白質ビルレンス因子の実質的に均一なグリコシル化とは、単一のグリコ形態での70%、80%、90%または100%を超えるグリコシル化をいう。

【0068】

1つの態様において、本明細書中に提供される組成物は、末端 $\alpha 1-2$ -Man構造を有する、 $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ 、またはそのいくつかの組合せで実質的に均一にグリコシル化されたgp120である。本明細書中で用いるように、用語「実質的に均一に」とは、gp120上のグリカンの70%を超えるものが $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ 、またはそのいくつかの組合せであることをいう。特別な実施形態において、本明細書中で提供されるグリコシル化gp120組成物は、90%を超える $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ または $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ 、好ましくは100%の $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ または $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ を有する。用語「高マンノース」とは、他の種類の末端糖のない5~9のマンノース残基のグリカンを用いる。例えば、図1参照。哺乳動物細胞表面および血清糖蛋白質は、稀に、末端マンノース残基を含有する。例えば、Weisら、Immunol Rev. 163:19-34 (1998) 参照。哺乳動物糖蛋白質は、少数の Man_5 または Man_6 を持つ最も複雑なタイプのオリゴ糖を含有し、他方、HIV-1 gp120蛋白質は非常に多数の Man_7-9 を含有し、HIV-1 ウイルス上の高マンノース、およびヒト糖蛋白質が量および質において有意に異なることを示す。例えば、Scanlanら、J Virol. 76:7306-21 (2002) ; Cutaloraら、J Am Soc Mass Spectrom. 15:1545-55 (2000) 参照。

10

【0069】

また、本明細書中において、抗体2G12によって認識される少なくとも2つのN-結合高マンノースオリゴ糖を含む単離されたグリコシル化ポリペプチド、および医薬上許容される賦形剤を含む組成物が提供され、ここで、グリコシル化ポリペプチド上のN-結合グリカンの50%を超えるものが高マンノースオリゴ糖であり、高マンノースオリゴ糖は $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ 、またはその組合せである。

20

【0070】

さらに、本明細書中において、*Saccharomyces cerevisiae*の破壊されたpmr1遺伝子、または*Saccharomyces cerevisiae*のpmr1遺伝子の破壊されたホモログ遺伝子を有する突然変異体真菌から単離されたグリコシル化ポリペプチドを含む組成物が提供され、ここで、該グリコシル化ポリペプチドは抗体2G12によって認識される。

30

【0071】

さらに、本明細書中において、*Saccharomyces cerevisiae*の破壊されたpmr1およびmnn1遺伝子、または*Saccharomyces cerevisiae*のpmr1およびmnn1遺伝子の破壊されたホモログ遺伝子を有する突然変異体真菌から単離されたグリコシル化ポリペプチドを含む組成物が提供され、ここで、該グリコシル化ポリペプチドは抗体2G12によって認識される。

【0072】

さらに、本明細書中において、*Saccharomyces cerevisiae*のoch1、mnn1、および/またはmnn4遺伝子の破壊されたいずれかの組合せ、または*Saccharomyces cerevisiae*のoch1、mnn1、および/またはmnn4遺伝子のホモログ遺伝子の破壊されたいずれかの組合せを有する突然変異体真菌から単離されたグリコシル化ポリペプチドを含む組成物が提供され、ここで、該グリコシル化ポリペプチドは抗体2G12によって認識される。

40

【0073】

グリコシル化ポリペプチドは少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、または少なくとも10のN-結合高マンノースオリゴ糖を含むことができる。グリコシル化ポリペプチドは(酵母のような)真菌、または非真菌糖蛋白質またはその断片であってよい。例えば、グリコシル化ポリペプチドは、*S. cerevisiae*のPST1、ECM33、Gas1、Gas5、GP38、またはYJL171c、またはこれらの蛋白質のいずれかのホモログである。

50

グリコシル化ポリペプチドはビルレンス因子であってよい。いくつかの実施形態において、グリコシル化ポリペプチドはウイルス蛋白質またはその断片である。いくつかの実施形態において、グリコシル化ポリペプチドはHIV gp120またはその断片である。

【0074】

いくつかの実施形態において、グリコペプチド上のN-結合グリカンの少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、または少なくとも95%はMan₉GlcNAc₂、Man₈GlcNAc₂、またはその組合せである。

【0075】

本発明の組成物は、Wang, Curr. Opin. Drug Discov. Dev. 9 (2) : 194-206, 2006; Mandalら、Angew. Chem. Int. Ed. 43 : 2557-2561, 2004; Gengら、Angew. Chem. Int. Ed. 43 : 2562-2565, 2004; Singhら、Bioorg. Med. Chem. Lett. 13 : 327-330, 2003; Wangら、ChemBioChem. 6 : 1068-1074 (2005); Zengら、J. Am. Chem. Soc. 127 : 9692-9693, 2005; およびLiら、J. Org. Chem. 70 : 9990-9996, 2005に記載されたグリコシル化ポリペプチドのいずれも排除する。

【0076】

さらに、本明細書中において、突然変異体酵母の全細胞、および医薬上許容される賦形剤を含む組成物が提供され、ここで、該突然変異体酵母はSaccharomyces cerevisiaeの破壊されたpmr1およびmnn1遺伝子、och1およびmnn1遺伝子、またはoch1、mnn1、およびmnn4遺伝子、またはSaccharomyces cerevisiaeのpmr1およびmnn1遺伝子、och1およびmnn1遺伝子、またはoch1、mnn1、およびmnn4遺伝子の破壊されたホモログ遺伝子を有する。酵母全細胞は生きていてもまたは死んでいてもよい。該組成物は治療または予防ワクチン（例えば、HIV用ワクチン）で用いることができる。

【0077】

本明細書中に記載される組成物は医薬上許容される賦形剤を含む。凍結乾燥された処方または水性溶液の形態の、いずれの医薬上許容される担体、賦形剤または安定化剤（Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. (2000) Lippincott Williams and Wilkins, Ed. K. E. Hoover.）も用いることができる。許容される担体、賦形剤または安定化剤は用量および濃度において受容者に対して非毒性であり、リン酸塩、クエン酸塩、および他の有機酸のような緩衝液；アスコルビン酸およびメチオニンを含めた抗酸化剤；（塩化オクタデシルジメチルベンジルアンモニウム；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチルまたはベンジルアルコール；メチルまたはプロピルパラベンのようなアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；およびm-クレゾールのような）保存剤；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリンのような蛋白質；ポリビニルピロリドンのような親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、またはリシンのようなアミノ酸；グルコース、マンノース、またはデキストランを含めた単糖、二糖、および他の炭水化物；EDTAのようなキレート化剤；ショ糖、マンニトール、トレハロースまたはソルビトールのような糖類；ナトリウムのような塩形成対イオン；金属錯体（例えば、Zn-蛋白質錯体）；および／またはTWEENTM、PLURONICSTMまたはポリエチレングリコール（PEG）のような非イオン性界面活性剤を含むことができる。いくつかの実施形態において、医薬上許容される賦形剤はアジュバントである。アジュバントを含む組成物はワクチンとして用いることができる。

【0078】

さらに、本明細書中において、a) 蛋白質をコードするヌクレオチド配列を含むベクターを供し；b) 蛋白質グリコシル化における欠点で細胞を形質転換し；c) 形質転換された細胞を発酵し；次いで、d) 細胞上清から分泌された組換え蛋白質を精製することを含む、均一にグリコシル化された組換え蛋白質を調製する方法が提供され、ここで、末端グリカン₁は末端 α 1-2-Man構造である。いくつかの実施形態において、ヌクレオチド配列は、その天然状態においてグリコシル化される蛋白質をコードする。該ヌクレオチド配列はビルレンス因子である蛋白質をコードすることができる。いくつかの実施形態において、突然変異した細胞は、大いにMan₉GlcNAc₂またはMan₈GlcNAc₂を持つ糖蛋白質を発現する。特別な実施形態において、ヌクレオチド配列はgp120蛋白質をコードする。いくつかの実施形態において、細胞は大いにMan₉GlcNAc₂またはMan₈GlcNAc₂を持つgp120蛋白質を発現する。本発明の方法の細胞は、*S. cerevisiae mns1Δ*または*S. cerevisiae pmr1Δ*のような酵母細胞であり得る。ベクターはYEpLとすることができ、いくつかの実施形態においては、GAL1プロモーターを含むことができる。いくつかの実施形態において、糖蛋白質はHisタグを用いて精製される。

【0079】

さらに、本明細書中において、突然変異体真菌を発酵させ、ここで、該突然変異体真菌はグリコシル化ポリペプチドを生産するように突然変異されており；該グリコシル化ポリペプチドを単離または精製し；次いで、該ポリペプチドを医薬上許容される賦形剤と組み合わせ、組成物を形成することによって、本明細書中に記載された組成物のいずれかを調製する方法が提供される。全酵母細胞を含む組成物は、突然変異体酵母を発酵させ；医薬上許容される賦形剤と共に全酵母細胞を調製して、組成物を形成することによって調製することができる。

【0080】

いずれの適当な細胞も使用することができる。好ましくは、細胞は、グリカンを切形またはそうでなければグリカンの典型的な細胞内プロセッシングを変調する欠陥を有する。いくつかの実施形態において、細胞は真菌細胞（例えば、酵母または黴細胞）である。特別な実施形態において、該細胞は酵母細胞である。例えば、米国特許第5,919,651号、第5,705,616号参照。分泌された酵母蛋白質の外側鎖グリコシル化は高（または長）マンノース型オリゴ糖鎖である。かくして、酵母生産は、時々「高グリコシル化」と示される、高マンノース型のこの酵母—特異的外側鎖グリコシル化を持つ異種蛋白質を提供する。簡単に述べれば、酵母蛋白質のO-グリコシド炭水化物構造は、1～5のマンノース残基の未分岐マンノース鎖よりなる。O-グリコシル化はER（第一のマンノース残基の移動）で始まり、ゴルジ装置で完了する。N-グリコシル化はN-アセチルグルコサミンのコアユニットで始まり、マンノースおよびグルコースは、引き続いて、小胞体において蛋白質のアスパラギン（Asn）残基に移動される脂質担体中間体で形成される。次いで、蛋白質—結合コアユニットは特異的グルコースおよびマンノース残基で切断され、続いて、ゴルジ装置において多糖が延長され、その結果、「外側鎖」グリコシル化をもたらす。

【0081】

多数の酵母株を使用して、本明細書中で提供される組成物を生産することができる。*Saccharomyces cerevisiae*の細胞が典型的には用いられるが、*Pichia pastoris*および*Schizosaccharomyces pombe*のそれもまた異種蛋白質の生産のために商業的に入手可能である。例えば、Tuiteら、Expressing Cloned Genes in the Yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris* IN PROTEIN EXPRESSION: A PRACTICAL APPROACH 61-100 (Higginsら、eds., Oxford University Press 1999)；Hitzemanら、Methods Enzymol. 185:421-440 (1990)；Barrら、Vaccine 5:

90-101 (1987); Liuら、Clin. Diagn. Lab. Immunol. 5: 592-94 (1998) 参照。Mns1pまたはPmr1pにおいて欠陥を持つ酵母株が有用である。Msn1pはERに局所化される $\alpha 1, 2$ マンノシダーゼであり、ERにおいて、それは、 $\alpha 1, 2$ -結合マンノースの中央アームを除去することによってMan9をMan8の単一異性体にトリミングする。従って、*S. cerevisiae* mns1p突然変異体株Mns1 Δ はMan9のみでグリコシル化された蛋白質を生産する。蛋白質Pmr1pは、 Ca^{++} のERからゴルジへの輸送について重要であるカルシウム-依存性ATPaseである。Herscovics, Biochim. Biophys. Acta 1426: 275-85 (1999); Camirandら、J. Biol. Chem. 266: 15120-27 (1991) 参照。*S. cerevisiae* pmr1p突然変異体株pmr1 Δ は、ERにおいてマンノシダーゼIによってMan9からトリミングされたMan8のみからなる糖蛋白質を分泌する。例えば、Harmesenら、Gene 125: 115-23 (1993) 参照。しかしながら、N-グリコシル化における適当な欠陥を持ついずれの酵母株を使用して本明細書中に提供される組成物を生産することができる。例えば、米国特許第5,705,616号、第5,798,226号参照。

10

【0082】

Saccharomyces cerevisiae、*Candida albicans*および*Pichia pastoris*の破壊されたpmr1遺伝子、破壊されたpmr1およびmnn1遺伝子、破壊されたoch1遺伝子、mnn1、mns1、およびmnn4遺伝子の1以上と組み合わせた破壊されたoch1遺伝子、破壊されたoch1およびmnn1遺伝子、または破壊されたoch1、mnn1、およびmnn4遺伝子を持つ酵母株、または破壊されたホモログ遺伝子を持つ他の酵母株を用いて、グリコシル化ポリペプチド、全酵母細胞組成物を生産することができる。

20

【0083】

突然変異体真菌細胞を生じさせる方法は当該分野で知られている。本発明の実施例は、数個の突然変異体酵母細胞の生成の詳細を提供する。例えば、Chibaraら、J. Biol. Chem. 273: 26298-26304, 1998; Rudolphら、Cell 58: 133-145, 1989; Nakanishi-Shindoら、J. Biol. Chem. 268: 26338-26345, 1993 参照。

30

【0084】

いずれの適当なベクターを使用しても、突然変異体細胞をトランスフェクトして、組換えグリコシル化ポリペプチドを生産することもできる。酵母細胞は、典型的には、プラスミドベースのベクターを使用する。ベクターは自立マルチコピープラスミド（例えば、YEpまたはYRp）、自立単一コピープラスミド（例えば、YCp）、または組込み（通常、単一コピー）プラスミド（例えば、YIp）であり得る。例えば、Yeast Vectors (Unit 13.4) IN CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (Ausebelら、eds. John Wiley & Sons, 最新版) 参照。1つの実施形態において、ベクターはYEpLまたはpYES2-CTである。形質転換細胞における異種蛋白質生産をもたらす当該分野で公知のいずれのプロモーターも使用することができる。酵母細胞では、天然および作製されたプロモーターが入手可能である。そのようなプロモーターは、限定されるものではないが、PGK、GAP、TEF1、GAL1、ADH2、PHO5、CUP1、MF α 1、TRP1、PAL、GAP/GAL、GAP/ADH2、CYC1/GRE、およびPGK/AREを含む。1つの実施形態において、プロモーターはGAL1である。例えば、米国特許第5,139,936号参照。ベクターは、複製起点および異種ビルレンス因子、例えば、gp120の精製で有用な種々のタグ配列のようなさらなる配列を含むこともできる。

40

【0085】

細胞をビルレンス因子-コーディングベクターで形質転換し、当該分野においてよく知

50

られた方法を用いて発酵する。酵母では、細胞は、酢酸リチウム、スフェロプラスト形質転換、またはエレクトロポレーションを用いて形質転換し、続いて、標準的な発酵を行うことができる。例えば、Yeast (Unit 13) IN CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (Ausubelら、eds. John Wiley & Sons, 最新版) 参照。

【0086】

例示的なビルレンス因子は、限定されるものではないが、gp120、エボラウイルスエンベロープ蛋白質、または他のグリコシル化ウイルスエンベロープ蛋白質またはウイルス蛋白質を含む。例えば、米国特許第6,630,144号、第6,713,069号参照。

10

【0087】

1つの態様において、いずれかの適当なgp120ヌクレオチド配列を本明細書中で提供された組成物で 사용할 ことができる。gp120分子はN-結合グリコシル化によってかなり修飾され、それにより、その見掛けの分子量を120kDを増大させる60kDのポリペプチドコアよりなる。例えば、Zolla-Paznerら、Nature Rev. Immunol. 4:199-209 (2004) 参照。gp120のアミノ酸配列は、5つの超可変ドメインが散在する5つの比較的保存されたドメインを含有する。gp120一次配列における18のシステイン残基の位置、およびgp120配列中のほぼ24のN-結合グリコシル化部位の13の位置は全てのgp120配列に共通している。Modrowら、J. Virol. 61:570-78 (1987) 参照。超可変ドメインは、かなりのアミノ酸置換、挿入および欠失を含有する。これらのドメインにおける配列変種の結果、種々のウイルス単離体からのgp120分子の間での30%の総じての配列変位をもたらす。例えば、Gaschenら、Science 296:2354-60 (2000) 参照。それにもかかわらず、gp120配列は、ウイルス受容体CD4およびDC-SIGNに結合するウイルスの能力を維持する。例示的な配列は、限定されるものではないが、Ratnerら、Nature 313:227 (1985); Muesingら、Nature 313:450-58 (1985); McCutchanら、AIDS Res. Human Retroviruses 8:1887-95 (1992); Gurgorら、Virol. 164:531-36 (1988); および the HIV SEQUENCE COMPENDIUM 1987-PRESENT (Meyersら、eds., Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM) に開示されたものを含む。新しく単離された株からの配列を用いることもできる。例えば、Oura、Science 256:1165-71 (1992); Zhangら、AIDS 5:675-81 (1991); および Wolinsky, Science 255:1134-37 (1992) 参照。

20

30

【0088】

いずれの適当な精製およびグリコシル化分析方法も、本明細書中で提供された(均一にグリコシル化されたような)グリコシル化ポリペプチドで使用する ことができる。例えば、組換えgp120からの蛍光標識N-グリカンのNP-HPLCはHPLCでのエキソグリコシダーゼ消化を使用して、グリカンの種々の形態を同定する。例えば、Scallanら、J. Virol. 76:7306-21 (2002) 参照。別法として、発現レベルは、例えば、2G12抗体のようなグリカン特異的抗体を用いるフローサイトメトリー分析、ELISA、またはウエスタンブロット分析を用いて決定することができる。他の例示的な方法はレクチンベースのアッセイ、ロケット親和性電気泳動、二次元電気泳動、フルオロフォア-援助炭水化物電気泳動(FACE)、毛細管電気泳動、核磁気共鳴、質量分析、質量分析と連結したガス-液体クロマトグラフィー(GLC/MS)、速原子衝撃(FAB)、およびエレクトロスプレーイオン化(ESI)を含む。例えば、Brooksら、FUNCTIONAL & MOLECULAR GLYCOBIOLOGY (Bios Scientific Publishers Ltd 2002) 参照。

40

50

【0089】

本明細書中で提供された（均一にグリコシル化された蛋白質のような）グリコシル化ポリペプチドは、病原体、例えば、H I Vに対する中和抗体の存在を検出するためのアッセイで用いることもできる。そのようなアッセイにおいて、蛋白質は、通常、アッセイで用途を見出す種々の標識の1つで標識する。これらの標識は特許および技術文献でかなり報告されており、放射性核種、蛍光体、酵素、酵素基質、粒子、小分子等を含む。

【0090】

ビルレンス因子の野生型蛋白質血清型は使用する必要がない。というのは、関連結合特性、グリコシル化部位、および他の関連免疫学的特性が保持される限り、1以上のアミノ酸を付加し、欠失し、または置換することができるからである。かくして、アミノ酸の少なくとも90%、通常少なくとも95%、より通常には少なくとも99%は正しいアミノ酸であり、正しい配列中にある。通常、いずれの変化も、0~5のアミノ酸が異なってもよいN-末端にある。

【0091】

1つの実施形態において、本明細書中で提供される均一にグリコシル化されたg p 1 2 0は、一次H I V-1単離体を中和することができる高度に中和性の抗体を誘導する立体配座エピトープを提示する。いくつかの実施形態において、好ましい蛋白質は、2以上の異なるクレード（例えば、クレードA、B、C、D、およびEの2以上）における一次単離体を中和する抗体を誘導することができる。中和は本明細書中に開示されたように決定される。

【0092】

本発明は、本明細書中に記載された組成物のいずれか、例えば、均一にグリコシル化された蛋白質を含むキットを提供する。該キットは、本明細書中に記載されたように、本発明の方法および産業的使用を教示する指示材料を含有することもできる。

【0093】

具体的には、本明細書中には、1以上の容器、ここで、第一の容器は本発明の方法によって作成された1以上の抗体を含み、および以下の：洗浄試薬、組成物の投与に必要な、または組成物に特異的な抗体の存在を検出することができる試薬の1以上を含む1以上の他の容器を含む区画キットが提供される。該容器はガラス、プラスチックまたはプラスチックまたは紙のストリップであり得る。検出試薬のタイプは標識された二次抗体、他の標識された二次結合剤、あるいは別法として、もし一次抗体が標識されているならば、標識された抗体と反応できる酵素または抗体結合試薬を含む。そのような方法を実行するのを助けるための、またはそれを可能とする補助的材料を本明細書中に提供されたキット内に含めることができる。

C. グリコシル化ポリペプチドまたは全突然変異体酵母細胞を用いるワクチン

本明細書中において、有効量の本明細書中に記載された組成物のいずれかを対象に投与することを含む、対象において（H I Vのような）病原体に対する抗体の中和を誘導する方法が提供される。

【0094】

本明細書中において、a) 蛋白質をコードするヌクレオチド配列を含むベクターを供し；b) 蛋白質グリコシル化における欠陥で細胞を形質転換し；c) 形質転換された細胞を発酵し；次いで、d) 本明細書中に開示された細胞上清から分泌された組換え蛋白質を精製することを含む、均一にグリコシル化された組換え蛋白質、ここで、末端グリカンは、末端 α 1-2グリカン構造、または均一にグリコシル化された組換え蛋白質を調製する方法によって調製された蛋白質であり、ここで、該グリカンは末端 α 1-2グリカン構造を持つオリゴマンノースであり、および適当な賦形剤を含む有効量の医薬組成物を投与することを含む、それを必要とする対象において病原体に対する抗体の中和を誘導する方法が提供される。該方法は、さらに、アジュバントを投与することを含むことができる。1つの実施形態において、該病原体はH I Vである。特別な実施形態において、該均一にグリコシル化された組換え蛋白質はM a n₉ G l c N A c₂ g p 1 2 0またはM a n₈ G l c

NAc₂gp120である。

【0095】

また、本明細書中において、有効量の本明細書中に記載された組成物のいずれかを対象に投与することを含む、対象において（HIV－誘導のような）病原体によって誘導される疾患を予防または治療する方法が提供される。

【0096】

また、本明細書中において、a) 蛋白質をコードするヌクレオチド配列を含むベクターを供し；b) 蛋白質グリコシル化における欠陥で細胞を形質転換し；c) 形質転換された細胞を発酵し；次いで、d) 本明細書中に開示された細胞上清から分泌された組換え蛋白質を精製することを含む、均一にグリコシル化された組換え蛋白質、ここで、末端グリカン10は末端α1－2グリカン構造、または均一にグリコシル化された組換え蛋白質を調製する方法によって調製された蛋白質であり、ここで、該グリカンは末端α1－2グリカン構造を持つオリゴマンノースであり、および適当な賦形剤を含む有効量の医薬組成物を投与することを含む、それを必要とする対象において病原体によって誘導される疾患を予防または治療する方法が提供される。該方法は、さらに、アジュバントを投与することを含むことができる。1つの実施形態において、該病原体はHIVである。特別な実施形態において、均一にグリコシル化された組換え蛋白質はMan₉GlcNAc₂gp120またはMan₈GlcNAc₂gp120である。

【0097】

いくつかの実施形態において、本明細書中に提供された医薬組成物は、さらに、異なるHIV株からの多数のgp120蛋白質を含む。20

【0098】

本発明のワクチン組成物は、限定されるものではないが、鼻腔内、経口、目、胃腸、直腸、膣、尿生殖器経路を含めた、粘膜の表面への適用によるような、臨床的に示されたいずれかの経路によって投与することができる。別法として、静脈内、皮下、腹腔内、または筋肉内のような非経口投与形態を用いることもできる。いくつかの実施形態において、蛋白質は経皮または経粘膜投与される。

【0099】

典型的には、HIV感染に対するワクチン保護は、粘膜免疫応答、全身免疫応答、または双方を誘導する。投与のための有用な経路は、限定されるものではないが、皮下、皮内、静脈内、筋肉内、経口、粘膜または鼻腔内投与を含めた非経口または非一非経口経路を含むことができる。30

【0100】

本発明によるワクチンは、当該分野で公知のいずれかの適当な方法に従って処方することができ、いずれかの適当なかつ適合する希釈剤、担体、保存剤、医薬賦形剤または他の成分を含有することができる。例えば、REMYINGTON: THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY 20th Ed. (Gennaroら(eds.)), University of Sciences 2000参照。静脈内、腹腔内、筋肉内、経粘膜（例えば、鼻腔内、直腸、膣、口腔）、経皮、皮下投与あるいはいずれかの他の投与経路のための適当な医薬担体は当該分野で良く知られており、本発明で用いることが考えられる。例えば、Robinsonら(eds.)), VACCINE PROTOCOLS 2nd. Ed. (Humana Press 2003)；Powellら(eds.)), VACCINE DESIGN: THE SUBUNIT AND ADJUVANT APPROACH (Plenum Press 1995)；Plotkinら(eds.)) VACCINES 4th Ed. (Saunders 2004)；米国特許第4, 235, 877号；第4, 372, 945号；および第4, 474, 757号参照。アジュバントを含むことができる適当な処方を経験的に決定することができる。40

【0101】

投与されるワクチンの量は、当業者によって判断されるように、使用される特別なワク

10

20

30

40

50

チン抗原およびいずれかのアジュバント、投与の態様および頻度、受容者の年齢および体重、および所望の効果（例えば、予防および／または治療）に依存する。ワクチン用量中の蛋白質の量は、典型的なワクチンにおける有意な有害副作用なくして免疫保護応答を誘導する量として選択される。そのような量は、いずれ特定の免疫原が用いられるかに依存して変化するであろう。一般には、各用量は1 μ g および100mgの間の蛋白質、時々、2～200 μ gの間、および他の場合には4～40 μ gの間を含むであろうと期待される。特定のワクチンのための最適な量は、抗体力価および対象における他の応答の観察を含む標準的な実験によって確認することができる。

【0102】

投与は、当業者によって必要であると判断されるように反復することができる。多くの場合、通常、6ワクチン接種を超えない、より通常には、4ワクチン接種を超えない、好ましくは1以上、通常約3ワクチン接種の複数投与を有するのが望ましいであろう。ワクチン接種は、通常、2～12週間の間隔、より通常には3～5週間の間隔であり、1～5年の間隔における任意の周期的ブースターを伴う。免疫化のコースに続いて、病原体に対する抗体、例えば、HIV gp120抗体についてのアッセイを行うことができる。

【0103】

本発明の活性なワクチンが単独で、あるいは限定されるものではないが、関連するビルレンス因子、ウイルスの減弱化または殺した形態、またはアジュバントを含めた生物活性剤と組み合わせて用いることができる。そのようなさらなる剤は、同一または直接的投与経路を介して同時または順次に投与することができる。いくつかの実施形態において、投与される蛋白質は、同一または関連する病原体の異なる血清型に由来する。1つの実施形態において、生物活性剤は、本明細書中に提供されるグリコシル化蛋白質と相乗作用して、病原体に対する効果的な免疫応答を刺激する。

【0104】

いくつかの実施形態において、本明細書中で提供される（均一にグリコシル化された組換え蛋白質のような）グリコシル化蛋白質はアジュバントと共に投与される。本発明で用いるワクチンの処方において、アジュバント組成物は体液性応答またはTh2応答を誘導するのが好ましい。そのようなアジュバントは、IL-4、IL-6、および／またはIL-10生産を誘導するもの、ならびにT-独立性抗原の免疫原性を増強させる他の手段を含むことができる。例えば、Mondら、Annual Reviews 13:655-92 (1995); Lesinskiら、J. Microbiol. Methods 47:135-49 (2001) 参照。しかしながら、細胞応答を含めた他の応答は、特に、もし他のビルレンス因子がワクチン養生法で共投与されるならば、排除されないことは理解されるであろう。従って、CpGオリゴデオキシヌクレオチド、破傷風トキソイド、サポニン、リポペプチド、およびIL-12のようなよく知られたアジュバントも考えられる。特別な実施形態において、本明細書中で提供されるグリコシル化蛋白質は、破傷風トキシンの刺激性エピトープにコンジュゲートされる。例えば、Kumatra、J. Immunol. 148:1499-505 (1992) 参照。

【0105】

本明細書中で提供される蛋白質は、同時にまたは順次に、アジュバントと共に、またはアジュバントとは別々に処方にて送達することができる。適当なアジュバントは水酸化アルミニウムゲル（ミョウバン）またはリン酸アルミニウムのようなアルミニウム塩を含むが、カルシウム、鉄または亜鉛の塩であってもよく、あるいはアシル化されたチロシン、またはアシル化された糖、カチオンのまたはアニオンの誘導体化された多糖、またはポリホスファゼンの不溶性懸濁液であってもよい。例えば、Robinsonら (eds.), VACCINE PROTOCOLS 2nd. Ed. (Humana Press 2003); Powellら (eds.), VACCINE DESIGN: THE SUBUNIT AND ADJUVANT APPROACH (Plenum Press 1995); Plotkinら (eds.) VACCINES 4th Ed. (Saunders 2004); 米国特許第6,797,276号; 第6,596,27

10

20

30

40

50

8号；第6，491，919号；第4，894，229号；第5，814，321号；第5，679，355号；および第4，803，070号参照。いくつかの実施形態において、アジュバントはフロイントの不完全アジュバント（IFA）またはミョウバンである。使用されるアジュバントの量は、アジュバントの性質に依存して広く変化することができ、一般には免疫原の重量の0.1～100倍、より通常には約1～10倍の範囲である。

【0106】

いくつかの実施形態において、本明細書中に記載された全突然変異体酵母細胞（例えば、生きたものまたは殺したもの）は、予防的または治療的ワクチンで用いることができる。例えば、全突然変異体酵母細胞は、経口、経、または直腸投与のためのカプセル、丸剤、ゲル、またはクリームに処方される。

10

【0107】

誘導された抗体の中和能力は、ルーチン的方法を用いて評価することができる。かくして、HIVを中和する抗体は以下の：ウイルス付着、共受容体従事、膜融合、またはいくつかの生産的相互作用のうちの1以上を阻害することができると考えられる。例えば、米国特許第6，391，567号；Linら、Virology 77:1337（2003）；Leeら、J. Virol. 75:12028（2001）；Geijtenbeekら、Cell 100:587（2000）；Brewleyら、J. Am. Chem. Soc. 123:3892-3902（2001）；米国特許出願第20030096221号；第20050064390号；第20040259785号；第20040228869号および第20040096823号。細胞融合は、HIV-1のような哺乳動物細胞またはウイルスで見出される脂質二層膜の接合または一体化を含む。このプロセスは、HIV-1の標的細胞への付着から区別できる。1つの実施形態において、付着は、HIV-1外部糖蛋白質のヒトCD4受容体への結合によって媒介される。相互反応は、限定されるものではないが、CCR5，CXCR4，CCR2，CCR3，CCR8，STRL33，GPR-15，CX3CR1およびAPJを含めた共受容体も含むことができる。例えば、Oppermanら、Cell Signal. 16:1201-10（2004）；Philpottら、Curr. HIV Res. 1:217-27（2003）参照。特別な実施形態において、中和抗体は、グリコシル化gp120のDC-SIGNへの結合を予防し、または阻害するものである。例えば、米国特許第6，391，567号；Linら、J. Virol. 77:1337-46（2003）；Mitchellら、J. Biol. Chem. 276:31:28939-45（2001）参照。

20

30

【0108】

中和抗体はいずれかのイソタイプであり得る。いくつかの実施形態において、抗体はIgG抗体である。より特別には、抗体はIgG₁，IgG₂，IgG₃またはIgG₄抗体であり得る。

D. 実質的に均一にグリコシル化された組成物に特異的な抗体を作成し、同定する方法。

【0109】

また、本明細書中において、末端α1-2グリカン構造を含む蛋白質に特異的に結合する抗体を調製する方法であり、該方法は、有効量の本明細書中に記載された組成物（例えば、該方法によって作成された組換え蛋白質、または本明細書中に開示された蛋白質を含む組成物）で動物を免疫化することを含む。該組成物は、さらに、アジュバント、担体、または双方を含むことができる。本明細書中において、本明細書中に開示された方法によって生成した単離された抗体、ならびに該単離された抗体を生産するハイブリドーマが提供される。1つの実施形態において、該抗体はMan₉GlcNAc₂gp120およびMan₈GlcNAc₂gp120に特異的であり、好ましくは、ヒト糖蛋白質との実質的交差反応を有しない。

40

【0110】

本明細書中で提供されたグリコシル化蛋白質に特異的な抗体を生じさせるいずれかの適

50

当な方法を使用することができる。抗体（ポリクローナルおよびモノクローナル）を免疫化し、生産し、および単離する方法は当業者に公知であり、科学および特許文献に記載されている。例えば、Coligan, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY (John Wiley 2005); Stites (eds.), BASIC AND CLINICAL IMMUNOLOGY (9th ed.) (Lange Medical Publications 1998); Goding, MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLE AND PRACTICE (3RD ED. (Academic Press 1996); Harlow, ANTIBODIES; A LABORATORY MANUAL, (Cold Spring Harbor 1998) 参照。

10

【0111】

本明細書中で提供される抗体は、天然源から単離されたもの、合成のもの、または当該分野で公知の方法を用いて組換え的に生じさせたポリペプチドであり得る。抗体はイン・ビトロまたはイン・ビボで組換えにより発現させることができる。例えば、Caruthers (1980) Nucleic Acids Res. Symp. Ser. 215-223; Hom (1980) Nucleic Acids Res. Symp. Ser. 225-232; Banga, A. K., THERAPEUTIC PEPTIDES AND PROTEINS, FORMULATION, PROCESSING AND DELIVERY SYSTEMS (1995) Technomic Publishing Co., Lancaster, Pa 参照。例えば、抗体合成は種々の固相技術を用いて行うことができ（例えば、Roberge (1995) Science 269: 202; Merrifield (1997) Methods Enzymol. 289: 3-13 参照）、自動合成は、例えば、製造業者によって供される指示書に従って、ABI 431A ペプチドシンセサイザー (Perkin Elmer) を用いて達成することができる。抗体の創製および生産の組換え手段の例示的記載は、Delves, ANTIBODY PRODUCTION: ESSENTIAL TECHNIQUES (Wiley, 1997); Shephardら、MONOCLONAL ANTIBODIES (Oxford University Press, 2000); Goding, MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND PRACTICE (Academic Press, 1993); CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY (John Wiley & Sons 最新版) を含む。また、抗体は、例えば、限定されるものではないが、遺伝子工学作成動物を含めた動物を用いる伝統的なイン・ビボ方法に加えて、ファージディスプレイライブラリーを発現する組換え抗体結合部位を用いてイン・ビトロで生じさせることもできる。例えば、Hoogenboom Trends Biotechnol. 15: 62-70 (1997); Katz (1997) Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 26: 27-45 (1997); Fishwildら、Nat. Biotech. 14: 845 (1996); Mendezら、Nat. Genet. 15: 146 (1997); 米国特許第 6, 632, 976 号参照。

20

30

【0112】

一旦生成されたならば、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体は、例えば、Ausubelら、supra に記載されているように、標準的方法によるウエスタンブロットまたは免疫沈澱分析によってグリコシル化蛋白質の特異的認識につきテストされる。いくつかの実施形態において、抗体はヒト化することができる。米国特許第 5, 585, 089 号; 米国特許第 5, 693, 761; および WO 90/07861。

40

【0113】

実質的に均一なグリコシル化を持つ抗原は、本明細書中に提供される方法を用いて生産される。誘導性抗原は単一エпитープ、多数エпитープ、または全蛋白質単独、あるいは当該分野で公知の 1 以上の免疫原性増強剤と組み合わせたものであってよい。該誘導性抗原は、単離された全長蛋白質、（例えば、抗原の少なくとも一部でトランスフェクトされ

50

た細胞で免疫化する)細胞表面蛋白質、または(例えば、蛋白質の細胞外ドメイン部分のみで免疫化する)可溶性蛋白質であってよい。

【0114】

特許請求される発明の抗体は、IgG、IgM、IgD、IgE、またはIgA抗体であり得る。いくつかの実施形態において、抗体はIgG抗体である。より特別には抗体はIgG₁、IgG₂、IgG₃、およびIgG₄抗体であり得る。いずれかの適当な源も抗体で用いることができる。例えば、抗体はヒト、ネズミ、ラット、ウサギ、ウシ、ラクダ、リヤマ、ヒトコブラクダ、またはサル抗体であり得る。一旦、適当な抗原結合領域が同定されたならば、例えば、イン・ビトロ、イン・ビボまたは双方にて中和する抗体からのCDRが同定されるならば、該抗体はいずれかの適当な方法で修飾して、その治療効果を増強させることができる。特許請求される発明の抗体における修飾は、抗体のアミノ酸配列における少なくとも1つの突然変異を含む。例えば、1以上の突然変異は、抗体の1以上の特性を改変するための抗体をコードする核酸に対する修飾、付加または欠失によって導入することができる。本発明の抗体は、いずれかの適当な方法で修飾して、所望のエフェクター機能または物理的特徴を付与し、または増強することができる。例えば、米国特許第6,737,056号;およびUS2004/0132101参照。かくして、本発明の方法によって修飾された抗体をコードする核酸は、いずれかの適当な手段によって改変することができる。

10

【0115】

従って、抗体はヒト化抗体、キメラ抗体、二特異的抗体、融合蛋白質、またはその生物学的に活性な断片であり得る。いくつかの実施形態において、抗体(またはその生物学的に活性な断片)は融合蛋白質である。融合蛋白質は、精製または生産を単純化するさらなるペプチド配列を含むことができる。融合蛋白質は、抗体の活性を補充する方法で生物学的に活性なドメインおよび/または全ポリペプチドを含むことができる。例えば、抗体をサイトカイン、リガンド、接着分子、ペプチド、受容体、酵素、治療蛋白質、色素、小有機分子、またはいずれかのその生物学的に活性な部分に融合させることができる。

20

【0116】

いずれかの適当な手段を用いて、本発明の抗体の結合親和性を決定することができる。1つの例において、親和性は、表面プラズモン共鳴(Biacore)によって決定される。本発明の抗体をさらに修飾して、当該分野で公知の方法を用いて結合親和性を増大させることもできる。例えば、米国特許第6,350,861号参照。

30

【0117】

本明細書中で提供される抗体は、免疫アッセイで適当なものであり得る。特定のアッセイはELISAアッセイ、サンドイッチアッセイ、ラジオイムノアッセイ、およびウエスタンブロットを含む。例えば、ANTIBODY ENGINEERING: A PRACTICAL APPROACH (Oxford University Press, 1996)参照。これらのモノクローナル抗体は、通常はELISAによって測定して、通常、少なくとも、約1 μ M、より通常には少なくとも約300nM、典型的には少なくとも約30nM、好ましくは少なくとも約10nM、より好ましくは少なくとも約3nMまたはそれよりも良好なK_dにて結合するであろう。

40

【0118】

いずれの適当な方法を使用して、ビルレンス因子の存在下で抗体の生物学的活性を決定することもできる。1つの実施形態において、もし抗体が、少なくとも、20%、少なくとも、50%、60%、70%、80%、90%、または100%だけ、生物の病原性および/またはビルレンス因子の毒性を低下させるならば、抗体は抗ビルレンス因子活性を有する。もう1つの実施形態において、もし抗体が、1以上の他の抗ビルレンス因子の存在において、少なくとも、20%、少なくとも、50%、60%、70%、80%、90%、または100%だけ、生物の病原性および/またはビルレンス因子の毒性を低下させるならば、本発明の方法の抗体は抗ビルレンス活性を有する。

【0119】

50

本発明の抗体は、いずれかの適当なグリコシル化ビルレンス因子に特異的に結合することができる。ビルレンス因子は、接着因子、被覆蛋白質、侵入因子、カプセル、エキソトキシン、またはエンドトキシンであり得る。抗体の抗一病原性効果は、ビルレンス因子に結合する抗体、該因子のクリアランス、該因子の不活性化などに由来することができる。

【0120】

もう1つの態様において、本発明は、ここに開示された抗体をコードする配列を含む単離されたまたは組換え核酸、コーディング核酸を含むベクター、および該コーディング核酸、または該コーディング核酸を含むベクターを含む細胞を提供する。典型的には、ベクターは、指名された宿主細胞における発現に適したプロモーターに操作可能に連結された抗体-コーディング核酸を含む。本発明の核酸、発現カセットおよびベクターを発現させるための宿主細胞は細菌、酵母、真菌、植物細胞、昆虫細胞および哺乳細胞を含む。かくして、本発明は、コドン-改変核酸によって作成されたこれらの細胞、コドン-改変核酸およびポリペプチドの全てにおけるコドン用法を最適化するための方法を提供する。例示的な宿主細胞は、*Escherichia coli* および *Pseudomonas fluorescens* のようなグラム陰性細菌；*Streptomyces diversa*、*Lactobacillus gasserii*、*Lactococcus lactis*、*Lactococcus cremoris*、および *Bacillus subtilis* のようなグラム陽性菌を含む。例示的な宿主細胞は真核生物、例えば、*Saccharomyces cerevisiae*、*Schizosaccharomyces pombe*、*Pichia pastoris*、および *Kluyveromyces lactis* を含めた *Saccharomyces spp.* のような種々の酵母、*Hansenula polymorpha*、*Aspergillus niger*、および哺乳動物細胞および細胞系、および昆虫細胞および細胞系も含む。かくして、本発明は、これらの生物および種における発現について最適化された抗体およびそれらをコードする核酸も含む。例えば、米国特許第5,795,737号；Baca (2000) *Int. J. Parasitol.* 30:113-118；Hale (1998) *Protein Expr. Purif.* 12:185-188；Narum (2001) *Infect. Immun.* 69:7250-7253；Outchkourov (2002) *Protein Expr. Purif.* 24:18-24；Feng (2000) *Biochemistry* 39:15399-15409；and Humphreys (2000) *Protein Expr. Purif.* 20:252-264 参照。

【0121】

1つの態様において、本発明は、本発明の抗体、および治療剤として投与される適当な賦形剤を含む医薬組成物を提供する。1つの態様において、本発明は、本発明の作成された抗体、および適当な賦形剤を含む医薬組成物を提供する。本発明は、前記した少なくとも1つのモノクローナル抗体、および適当な賦形剤を含む医薬組成物を提供する。医薬組成物で有用な処方および賦形剤は、当該分野で良く知られたものである。（限定されるものではないが、組換え源からを含めた、いずれの源に由来するものでも）本発明の方法で有用な抗体は、それ自体で、あるいはそれが適当な担体または賦形剤と混合された医薬組成物にて、種々の障害を治療または軽減するための用量で必要とする対象に投与することができる。例えば、REMYN TON: THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY (最新版) 参照。そのような組成物は（蛋白質または担体以外に）希釈剤、充填剤、塩、緩衝液、安定化剤、可溶化剤、および当該分野で良く知られた他の物質を含有することもできる。用語「医薬上許容される」は、有効成分の生物学的活性の有効性と干渉しない非一毒性物質を含む。担体の特徴は、投与の経路に依存する。本発明の医薬組成物は、望ましいそのようなサイトカインまたは抗微生物剤のような他の抗一病原体を含有することもできる。

【0122】

本発明の抗体を1以上の生物学的に活性な剤と共に投与する場合、本明細書中で提供される抗体は生物学的に活性な剤と同時に、または順次に投与することができる。順次に投

与するのであれば、主治医は、生物学的に活性な剤と組み合わせた、本発明の蛋白質を投与する適当な配列について決定するであろう。

【0123】

そのような抗体の毒性および治療効果は、ルーチン的な方法を用いて決定することができる。正確な処方、投与の経路、および用量は患者の状態に鑑みて個々の医師が選択することができる。例えば、Fingler、THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS 1（最新版）参照。

【0124】

さらに、本明細書中において、本明細書中に提供された蛋白質を含む医薬組成物、または本明細書中で提供された方法によって調製された蛋白質の有効量を投与することを含む、それを必要とする対象において病原体に対する抗体の中和を誘導する方法が提供される。いくつかの実施形態において、該方法はさらにアジュバントを投与することを含む。特別な実施形態において、病原体はHIVである。

10

【0125】

なおさらに、本明細書中において、本明細書中で提供される蛋白質、または本明細書中で提供される方法によって調製された蛋白質、および適当な賦形剤を含む医薬組成物の有効量を投与することを含む、それを必要とする対象において病原体によって誘導される疾患を予防または治療する方法が提供される。いくつかの実施形態において、該方法はさらにアジュバントを投与することを含む。特別な実施形態において、病原体はHIVである。1つの実施形態において、蛋白質はgp120である。いくつかの実施形態において、医薬組成物は、さらに、異なるHIV株からの多数のgp120蛋白質を含む。

20

【0126】

さらに、a) 第一の細胞を、CD4+およびCCR5+を発現する第二の細胞と接触させ、ここで、該第一の細胞は樹状細胞-特異的C-タイプレクチン(DC-SIGN)を発現し、b) 該第一および第二の細胞を感染性ウイルス粒子と共培養し；c) 請求項20記載の方法によって調製された候補抗体と共培養とを接触させ；次いで、d) 相対的感染性を決定することを含み、それにより、中和抗体は、感染性ウイルス粒子による第二の細胞の相対的感染性を低下させ、または排除するものであることを特徴とする、HIV伝播につき中和モノクローナル抗体を同定する方法が提供される。例えば、米国特許第6,391,567号；Bashirovaら、J. Exp. Med. 193:671(2001) Leeら、J. Virol. 75:12028(2001) 参照。

30

【0127】

さて、本発明を一般的に記載してきたが、それは説明のために掲げ、かつ特記しない限り本発明を限定することを意図しない以下の実施例を参照してより容易に理解されるであろう。

【実施例】

【0128】

実施例1

発現系の選択。Pmr1p蛋白質、ERからゴルジへのCa⁺⁺の輸送で重要なカルシウム-依存性ATPaseを欠乏するS. cerevisiaeの株を選択した(55, 56)。pmr1Δ株は異種蛋白質のいわゆるスーパーセクレターであり、ほとんど100%の異種蛋白質を分泌する(57~58)。この株は、いくつかの蛋白質について報告されているように、ERにおけるマンノシダーゼIによってMan₉GlcNAc₂からトリミングされたMan₈GlcNAc₂のみを持つ糖蛋白質を分泌する(58~60)。

40

【0129】

分泌された糖蛋白質を発現するためのHIV-1 gp120遺伝子のクローニング。S. cerevisiae α接合因子(MFα)のシグナル配列を発現ベクターpYES2/CT(Invitrogen)にクローン化した。MFαについてのコーティング配列は、PCRによって全酵母DNAから増幅した。PCRプライマーはKpnIおよび

50

BamH I 部位を含有した。250bp断片を増幅し、精製し、pGEM-T (Promega) に連結した。形質転換およびミニプレブ同定の後に、陽性クローンを同定した。pGEM-T-MF α およびpYES2/CTプラスミドを、次いで、同時にBamH I およびKpn I で消化した。MF α バンドおよびpYES2バンドの精製の後に、プラスミドを連結し、NovaBlueコンピテント細胞に形質転換し、LB-アンピシリンプレートに播種した。MF α を含有する陽性クローンを同定し、それを用いてgp120をクローン化した。

【0130】

JR-FL、JR-CSFおよびYU2の株からのHIV-1 gp120蛋白質をコードする配列を、鋳型としてそれらの対応するプラスミド (AIDS Research and Reference Reagent Program, ARRRP) を用いるPCRによって増幅した。PCR増幅gp120 DNA断片を、EcoR I およびXba I 部位を含有するpYES2/CT-MF α プラスミドにクローン化した。次いで、3つのpYES2/CT-MF α -gp120プラスミドをNovaBlueコンピテント細胞に形質転換し、陽性クローンをミニプレブの消化分析によって同定した。これらのプラスミドを、迅速酢酸リチウム形質転換プロトコルを用いるジブroid酵母株pmr1 Δ (Invitrogen) への形質転換で用いた。pYES2/CTベクターは、誘導性GAL1プロモーターを含有し、ガラクトースでの誘導に続いての組換え蛋白質の高発現レベルを可能とした。gp120を生産し、それを培養基に分泌させるために、形質転換された酵母細胞を-Ura/ラフィノース培地中にて30℃で一晩成長させた。遠心分離の後に、細胞を、gp120発現の誘導のために-Ura/ガラクトース培地で再懸濁させた。

【0131】

均一にグリコシル化されたHIV-1 Env蛋白質の発現、精製、および分析。pmr1 Δ 株は温度感受性であり、許容される温度にてゆっくりと成長する。従って、gp120発現を異なる温度および時点で調べて、これらの酵母細胞が最高レベルの蛋白質を発現でき、それらを最も効果的に培養基に分泌できる条件を決定した。pmr1 Δ 酵母細胞は25℃にて7~14日間、最大量のgp120蛋白質を分泌した (図2A)。gp120蛋白質は1日の培養後に検出され、培養基中で少なくとも14日間継続して蓄積され、これは、酵母細胞が異種蛋白質の生産および分泌を継続したことを示す。また、グリコシル化gp120蛋白質が室温で安定であることも示された。もしpmr1 Δ 株で生産されたgp120糖蛋白質がMan₈GlcNAc₂オリゴ糖のみを含有したならば、該蛋白質は、各々、JR-CSF、JR-FL、およびYU2について99603Da、96385Da、および99621Daの予測される分子量を有した。ウエスタンブロットは、蛋白質はSDS-PAGEにおいてこれらの予測されるサイズで移動したことを示した。ブロットを、pmr1 Δ 株で生産されたgp120蛋白質を容易に検出したMAb 2G12でプローブした (図2A)。

【0132】

精製手法は単純であった。なぜならば、培養基は蛋白質が貧弱だったからである。マンノース結合レクチンアフィニティークロマトグラフィーおよびゲル濾過の組合せは、95%を超える純度を得るのに十分であった。簡単に述べれば、14日における培養上清を濃縮し、透析緩衝液 (1mM CaCl₂ および1mM MnCl₂) に対して4℃にて16時間透析した。4℃にて30分間における40,000gにおける遠心分離の後、興味のない蛋白質を含有する沈殿を除去した。次いで、アガロース-Con-Aカラム (Vector Laboratories, CA) を用いて、これらのgp120蛋白質を精製した。gp120蛋白質を含有する上清を、予め平衡化させたCon-Aアガロースカラムに負荷し4℃にて16時間インキュベートした。次いで、カラムを透析緩衝液で洗浄し、結合した蛋白質を溶出緩衝液 (500mM α -メチルマンノシド、250mM NaCl、20mM トリスCl、1mM CaCl₂ および1mM MnCl₂, pH 6) で溶出させた。精製した物質は、主として100kDaおよび160kDa蛋白質を

含有した。次いで、ゲル濾過を用いて、160 kDa 蛋白質を除去した。Sephacryl S-100 HRの予めパッキングされたカラム (Amersham, Pharmacia Biotech) を洗浄緩衝液 (50 mM イミダゾール、100 mM NaCl、10 mM リン酸ナトリウム、pH 8.0) で洗浄した。結合した蛋白質を溶出緩衝液 (500 mM イミダゾール、100 mM NaCl、10 mM リン酸ナトリウム、pH 8.0) で溶出し、1 ml 画分を集めた。画分をSDS-PAGE、続いて、クーマシーブルー染色によって分析した (図2B)。

【0133】

精製に続き、PGNase F 消化および質量分析を用いて炭水化物のタイプを分析した。典型的には、Manの90%を超えたものはMan8またはman9であろう。

10

【0134】

gp120および汚染物の量を見積もるために、精製された蛋白質を、高マンノースおよびハイブリッドタイプの炭水化物を切断することが知られている酵素エンドグリコシダーゼH (Endo H) で消化した。図3からの結果は、圧倒的なバンドは55~60 kDa 蛋白質であることを示し、gp120ポリペプチドのサイズと相関する。図3からのデータに基づき、見積もられたgp120純度は90%よりも大であった。より後の実験において、このバンドはさらにほとんどが酵母蛋白質であるPST1であると同定された。図15参照。

【0135】

グリコシル化gp120蛋白質に特異的な抗体。マンノース-特異的に抗体が誘導でき、HIV-1 Env蛋白質と反応するか否かをテストするために、ウサギを、 β -グリカンおよび α -マンナンを含有する、酵母細胞壁抽出物であるザイモサンAで免疫化した。これらのマンノース-リッチの構造は、gp120で通常見出されるような、少数の α 1, 2構造と共に、ほとんどが末端 α 1, 3および α 1, 6結合を含有した。2つのウサギを、0週においてCFAを含有する200 μ gのザイモサンAで免疫化し、2および4週および、そのうち、4週毎に、IFAを含有する100 μ gの抗原をブースター注射した。免疫血清を各ブースター後5週および1週に集めた。抗原は、ザイモサンAまたはプレートに捕獲されたマンナンいずれかを用い、ELISA分析によって測定して良好な抗体応答を誘導した (図4A)。注目すべきは、免疫血清は、テストされたgp120糖蛋白質のいくらかをやはり認識した (図4B)。抗-マンナン血清は、比較的低いレベルであるが広いクラスE (ChenMaiおよび93TH975)、C (CN54および96ZM651)、およびクラスBの1つ (LAV) に対する反応性を示した。対照的に、2G12 MAbsはクラスB (ADA、JR-FL、BAL、LAV) 株と主として反応したが、クラスC (CN54および96ZM651) に対して応答を有さず、テストされたクラスE株 (93TH975およびChenMai) に対してほとんど応答を有しなかった。クラスE Chen株に対する抗体の高い力価は、さらに、ウェスタンブロットおよび反復されたELISAによって確認された。これらの結果は、マンノースに対する抗体が動物において誘導でき、およびHIV gp120に対する反応性を得ることができることを示唆する。これらの知見は、我々の新規なマンノース-リッチなgp120免疫原に対して順方向に移動する強力な合理性を提供する。

20

30

40

【0136】

pmr1 Δ 酵母細胞で発現された株YU2、JR-FLおよびJR-CSFからのgp120蛋白質は22~24のMan8構造を含み、他方、同一HIV株からの哺乳動物細胞で発現されたものは、約半分のMan5-9および半分の複合糖質構造を含有した。酵母で発現されたgp120蛋白質がマンナンならびに2G12に対する抗体によってより効果的に認識されるかを判断するために、我々は、酵母からのYU2株からの精製されたgp120蛋白質を用いて、哺乳動物細胞で発現されたYU2と比較した。このELISA分析からの結果 (図4C) は、酵母からのgp120蛋白質は、哺乳動物細胞からのそれよりも抗-マンナン抗体に対してかなりより高い抗原性を有することを示す。またこの図面は、抗-マンナン抗体がMan9-BSAコンジュゲートを認識したが、BSA単独

50

を認識しなかったことを示した。

【0137】

Man 9の単離、およびMan 9のBSAへのコンジュゲーション。抗- $\alpha 1, 2$ -Man構造抗体に対するスクリーニングツールとしてMan₉GlcNAc₂を用いるために、Man 9を植物蛋白質から単離し、BSAにコンジュゲートした。具体的には、California San Diego大学(UCSD)の糖生物学中枢施設によって大豆アグルチニン(SBA, EY labs)からMan 9グリカン単離した。簡単に述べれば、精製されたSBA上のN-グリカンPNGase Fを用いて放出させ、TCA沈殿を用いて精製して、蛋白質を除去した。上清をSep-Pak C18カートリッジを通して、残存する洗剤を除去し、グリカンを多孔性黒鉛化炭素カートリッジで精製した。単糖分析は、収率が25mgの蛋白質から0.2mgであることを示した。グリカンはHPAEC-PADによって分析し、低下したMan₉GlcNAc₂標準および低下したRNAse Bグリカンと比較した。グリカンの見積もられた90%は、事実、Man₉GlcNAc₂あり、Man₈GlcNAc₂に対するMan₉GlcNAc₂の比率は9:1であった。アリコートMALDI-TOF質量分析に付した。より少量のグリカンも低量で観察されたが、主な種はHex₉HexNAc₂であった。

10

【0138】

次いで、スルホ-SMCC(Pierce Biochemicals)方法を用いてBSAにMan₉GlcNAc₂をコンジュゲートさせた。簡単に述べれば、Man₉GlcNAc₂を2-アミノエタンチオール-HClと85℃にて30分間反応させた。反応混合物を水に対して透析して、反応試薬および塩を除去し、次いで、真空乾燥した。次いで、Man 9誘導体を100μlのSMCC反応緩衝液(0.1Mリン酸ナトリウム、50mM EDTA、pH 7.4)に溶解させた。BSAを、反応緩衝液中のスルホ-SMCCで2時間活性化させた。過剰のSMCCを、Sephacrose G25カラムを通じて反応混合物を通すことによって除去した。BSA-SMCCを含有する画分を合わせ、濃縮した。100μgのBSA-SMCCを50μgの誘導されたMan 9と30分間反応させた。反応を0.5Mシステインの添加によって停止させ、リン酸緩衝生理食塩水に対して透析した。溶液を真空乾燥し、BSA-Man 9コンジュゲートを0.1mlの水で溶解させて、1mg/mlにおいてBSAの濃度を有するようにした。図5は、BSA-SMCCおよび非-コンジュゲートドBSAに比較したBSA-Man 9のコンジュゲートの移動シフトを示す。

20

30

【0139】

DC-SIGN抗体および組換え蛋白質の調製。DC-SIGNに対する抗体を用いて、組換えDC-SIGN蛋白質の発現をモニターした。2つの抗体を合成ペプチドを用いてウサギにおいて生産させた。免疫アフィニティークロマトグラフィーによって、免疫血清を精製した。ペプチド抗体の双方は、ヒト粘膜組織からの溶解物における44kDaバンドを認識した。このバンドは抗原性ペプチドによってブロックされ、これは、これらの2つの抗体が特異的であることを示す。

【0140】

DC-SIGNのクローニングおよび発現。gp120-DC-SIGN結合アッセイを行い、誘導された抗体の中和活性をテストするために、DC-SIGNの細胞外ドメインをクローン化し、発現させた。DC-SIGNのcDNA断片をPCR増幅によって調製し、pET100ベクター(Invitrogen)に連結させた。BL21(DE3)細菌を用いて、0.5M IPTGの存在下で組換え蛋白質を発現させた。細菌細胞を4時間のIPTG誘導後に収穫した。細菌溶解物を可溶性および不溶性画分に分離し、SDS-PAGEによって分析した。組換えECD蛋白質は不溶性画分に見出され、Ni-NTAカラムを用いて精製した(図6A)。

40

【0141】

細菌封入体からのDC-SIGNの再折り畳みおよび精製。封入体中の不溶性蛋白質は正しくなく折り畳まれた。変性した蛋白質を再度折り畳んで、生物学的に機能的な蛋白質

50

が得られ、再度折り畳まれた蛋白質をNi-NTAおよびD-マンノースアフィニティークロマトグラフィーで精製した。簡単に述べれば、細菌細胞を、1 mg/ml リゾチウムおよび5 μg/ml のDNAse Iを含有する溶解緩衝液(50 mM Tris-Cl、150 mM NaCl、5 mM 2 ME、pH 7.45)で溶解させて、封入体および可溶性蛋白質を放出させた。封入体を遠心分離によって沈殿させ、徹底的に洗浄して、可溶性蛋白質を除去した。封入体を、8 M尿素を含有する再折り畳み緩衝液(20 mM Tris、10 mM 2 ME、10 mM DTT、1 mM グリシン、1 mM GSH、0.1 mM GSSG、1 mM EDTA、pH 10.5)中で溶解させた。尿素の濃度を再折り畳み緩衝液で希釈し、溶液を1 N HClで順次pH 9.0、8.8、8.5および8.0に調製した。再折り畳み溶液を40,000 gで30分間遠心分離して、不溶性物質を除去した。次いで、再折り畳み蛋白質をNi-NTAアガロースカラムで精製し、500 mMイミダゾールを含有する溶解緩衝液で溶出させた。精製されたECD蛋白質の量および純度をSDS-PAGE、続いて、クーマシーブルー染色で分析した。図6Aは、再度折り畳まれた蛋白質がNi-NTA精製後に90%を超える純度を有したことを示す。ECD蛋白質を含有するNi-NTAカラムからの溶出物を、さらに、負荷緩衝液で予め平衡化させたD-マンノースアガロースカラムを用いて精製して、蛋白質成分を選択して、リガンドに結合させた。カラムを負荷緩衝液で洗浄し、結合した蛋白質を50 mM α-D-マンノースで溶出させた。画分をSDS-PAGE、続いて、クーマシーブルー染色によって分析した。図6Bにおける結合アッセイは、この組換え蛋白質はポリクローナル抗体に対する同様な親和性をもってgp120に結合するので、それは機能的であることを示す。

【0142】

DC-SIGN-gp120相互作用の結合アッセイ。DC-SIGN活性をテストするために、DC-SIGN-gp120の結合アッセイを行う。対照としての異なる濃度の2G12 MA bでの免疫血清の異なる希釈を200 ngのgp120蛋白質でインキュベートして、IC₅₀値を決定する。哺乳動物細胞および酵母細胞において生産されたYU2およびJR-FL株からのgp120蛋白質を平行して用いて、比較する。次いで、ウェルを抗-gp120ポリクローナル抗体(US Biological)と共に、続いて、ヤギ抗-ウサギIgG-HRPコンジュゲートと共にインキュベートした。各条件は二連である。DC-SIGNに結合したgp120の量は、gp120濃度およびOD値に基づいて作成された標準曲線を用いて決定される。与えられた抗体濃度におけるパーセント阻害は、[(抗体の不存在下におけるgp120の量-与えられた抗体濃度の存在下におけるgp120の量)/抗体の不存在下におけるgp120の量]×100として表される。阻害能力、すなわち、50%(IC₅₀および90% IC₉₀阻害用量が決定される。各抗体の広く中和する反応性をテストするために、クレードA、BおよびCからの組換えgp120糖蛋白質を用いる。

【0143】

500 ng/ウェルの精製されたECD蛋白質を用いて、マイクロウェルプレートに16時間被覆する。ウェルを、0.1% BSAを含有するTBS-Tweenでブロックした。哺乳動物細胞において生産されたYU2株からのgp120蛋白質を用いて、固定化された蛋白質に対して結合させる。次いで、ウェルを抗-gp120-MNポリクローナル抗体、続いて、ヤギ抗-ウサギIgG-HRPコンジュゲートと共にインキュベートする。基質での発色の後に、光学密度(OD₄₅₀)をマイクロウェルリーダーで読む。各条件は二連で設定する。

【0144】

2つのポリクローナル抗体以外に、精製されたECD蛋白質に対するMA bも開発されている。ELISAを用いる培養上清の最初のスクリーニング、および陽性クローンの拡大培養後に、ウェスタンブロットを用いてハイブリドーマをさらにスクリーニングした(図7)。これらのMA bは高い特異性を示した。というのは、フィルムのより長い暴露(30分)は、他の検出可能なバンドを示さなかった。

10

20

30

40

50

【0145】

組換え gp120 蛋白質および中和アッセイ。異なるクレードからの gp120 蛋白質を用いて、免疫血清およびハイブリドーマ上清の一次スクリーニングを行う。蛋白質は理想的には哺乳動物細胞で発現されて、十分にグリコシル化される。これらの蛋白質の多くは商業的源から入手可能である。1mg 未満の各蛋白質がスクリーニングで必要であろう。HIV 中和アッセイは、典型的には、Binley ら、J. Virol. 78:13232-52 (2004), Li ら、J. Virol. 79:10108-25 (2005) ; Masciola ら、J. Virol. 79:10103-7 (2005) に記載されているように行われる。簡単に述べると、レトロウイルスプラスミド pHIV-gpt および gp160 env pHXB2 は Cos-7 細胞の共トランスフェクション後に高力価シュードウイルスを生産する。このシュードウイルスは、Bright-Glo ルシフェラーゼアッセイキット (Promega) および最近購入された Veritas ルミノメーター (Tuner Biosystem) を用いてルシフェラーゼ活性によって測定して、インジケータ細胞系 LuSIV を非常によく感染させる。この系を用いて、我々の研究室で最近生成された抗-HIV-1 ポリクローナル抗体をテストした (図8)。2つのポリクローナル抗体は、用量依存性中和活性を用いた。Trim5α ポリクローナル抗体を陰性対照として用い、ヒトMAb (2F5、4E10、および2G12) を陽性対照として用いた。

10

【0146】

免疫刺激体にコンジュゲートされた gp120 の調製。均一にグリコシル化された gp120 の免疫原性を増強するために、破傷風トキシンからのユニバーサル T 細胞エпитープを含有する多重抗原ペプチド (MAP) を合成し、異なるカップリング手法を用いて、gp120-破傷風トキソイドおよび gp120-MAP のコンジュゲートを調製し、カップリング効率および抗原性について分析する。簡単に述べると、p2 配列 (p24) の4分岐を持つ多重抗原性ペプチド (MAP) は、よく確立されたペプチド会社 (AnaSpec, Inc.) によって合成される。MAP ペプチドは HPLC によると 90% を超える純度で精製され、質量分析によって分析される。コアマトリックスに添加されたシステイン残基を用いることによって、MAP ペプチドは gp120 蛋白質に共有結合によりカップリングされるであろう。システインスルフィドリル基は架橋されて、SMCC 方法を用いて gp120 蛋白質上のアミノ基を遊離させて、かくして、我々がそれに対して抗体を開発することを希望する炭水化物構造を修飾すべきではない。簡単に述べると、10mg/ml の gp120 蛋白質は、カップリング緩衝液 (1x PBS、0.1M EDTA、pH 7.2) 中で 10mg/ml のスルホ-SMCC (Pierce) 溶液と 2 時間反応させる。反応溶液を Sephadex G-25 カラムを通して、過剰の SMCC を除去する。蛋白質を含有する画分を集める。合成 MAP ペプチドを 10mg/ml にてカップリング緩衝液に溶解させ、30:1 モル比率で活性化された抗原と混合し、それは、gp120 蛋白質上の遊離アミン基のほとんどをカップリングさせる。架橋反応は 2 時間進行する。全ての反応は室温で行われる。

20

30

【0147】

gp120-破傷風トキソイドコンジュゲートは同様なアプローチを用いて調製される。それらの遊離アミノ基を通じての架橋によって、破傷風トキソイド蛋白質 (TT, Statens Serum Institute, Denmark) を gp120 にカップリングさせる。簡単に述べると、100 倍モラー過剰の新鮮なグルタルアルデヒドは、自己-コンジュゲートを妨げるために、50mM ホウ酸緩衝液、pH 8.0 中の TT と反応する。遊離グルタルアルデヒドは、Sephadex G-25 カラムを通すことによって除去される。次いで、TT-グルタルアルデヒドを gp120 にカップリングさせる。遊離アルデヒド基は 1M グリシンの添加によってブロックされる。反応混合物を Sephadex G-25 カラムを再度通過させる。TT-gp120 コンジュゲートを含有させる画分を集め、PBS に対して透析する。

40

【0148】

50

カップリング効率は、ゲルシフトアッセイを用いて分析する。簡単に述べると、コンジュゲートは、4～20%グラジエントSDS-PAGE、続いて、クーマシーブルー染色、およびgp120に対する抗体を用いるウェスタンブロットで分析される。コンジュゲートは、非コンジュゲート蛋白質よりも遅く移動する。コンジュゲートのサイズ変化は、gp120蛋白質にカップリングされたMAPペプチドおよび蛋白質分子の数に依存する。コンジュゲートの抗原性は、マンナンおよび2G12 MA bに対するポリクローナル抗体でのELISAを用いて、非コンジュゲートgp120蛋白質に対する比較によってテストされる。

【0149】

イン・ビボにおけるgp120蛋白質およびそれらのコンジュゲートの免疫原性のスクリーニング。5～6週齢の6匹のBALB/cマウスの6つの群を免疫化する(表1)。抗原を示した用量で皮下注射する。一次免疫化から14日後、およびその後3週間毎にマウスを同一用量の抗原でブースター注射する。各ブースター注射から1週間後にそれらから採血する。かくして、マウスを週0、2、5、8および11において免疫化し、免疫血清を週0、3、6、9および12で集める。YU2およびJR-FLの双方を使用して、Man α 1, 2-manエпитープを有するようにし、より多くの数の広く中和するMA bを開発することができる。

【0150】

(表1)

(免疫化の群)

【0151】

【表1】

群	gp120/ コンジュゲート	アジュバント	有意性
1.	10 μ g	無し	アジュバント対照無し
2.	10 μ g	CFA/IFA	対照としての CFA/IFA アジュバントと gp120 との共投与
3.	20 μ g	gp120-TT	TT の効果を CFA/IFA と比較。
4.	50 μ g	gp120-TT	コンジュゲートの用量効果を比較する。
5.	20 μ g	gp120-MAP	TT-MAP の効果を CFA/IFA と比較する。
6.	50 μ g	gp120-MAP	コンジュゲートの用量効果を比較する。

gp120抗原被覆マイクロウェルプレートでのELISAを用い、抗体力価をテストする。ELISA手法を簡単に記載する。Costarマイクロウェルプレートを、100 μ lの50mM炭酸塩(pH9.5)中の300ngの抗原/ウェルで24時間コーティングする。ウェルを200 μ lのブロッキング緩衝液(PBS中1%BSA、0.02%チメロザール)で2時間ブロックする。洗浄の後、100 μ lの系列希釈免疫血清を、抗原-被覆ウェルと共に2時間インキュベートする。PBS-Tweenでの5回の洗浄の後、ウェルを、ブロッキング緩衝液中の1:5000の100 μ lのヤギ抗マウスIgG-HRPコンジュゲート(Sigma)と共に2時間インキュベートする。洗浄の後、ウェルを100 μ lのHRP基質TMB溶液(BD Bioscience)と共に10分間インキュベートし、100 μ lの1N HClの添加によって反応を停止させる。光学密度をマイクロウェルリーダーによってA₄₅₀で読む。全ての反応を室温で行う。

【0152】

異なるクレードからのgp120蛋白質に対する交差反応性抗体についての免疫血清のスクリーニング。12クレードまでのHIV-1単離体が世界中で報告されており、クレードA(27%)、B(12%)およびC(42%)は全てのHIV-1感染の80%を超えるものを含む。高マンノースオリゴ糖のMan9およびMan8形態が、全てのHIV-1株および単離体で高度に保存されている。かくして、Man α 1, 2-Man構造

に対する抗体は、単一Man 8またはMan 9からのエピトープ、またはこれらのグリカンの2または3によって形成された立体配座エピトープを認識できるであろう。従って、Man α 1, 2-Man エピトープに対する抗体はほとんどのH I V-1株および単離体を認識できよう。

【0153】

広く中和する活性を持つMAbを開発するために、我々は、クレードA（例えば、Q 2 3 1 7、B 2 5 3 9およびQ 1 7 6 9）、B（例えば、A D A、Y U 2、J R-F L、8 9. 6、B a L、S F 1 6 2）、およびC（例えば、D U 1 2 3、D U 4 2 2、D U 1 7 9および9 8 I N 0 1 2）の株からのg p 1 2 0糖蛋白質で免疫化されたマウスおよびハイブリドーマ上清をスクリーニングする。加えて、高マンノースMan 8構造に対する抗体をテストすることができる。Man 8は酵母で生産されたg p 1 2 0蛋白質から単離され、本明細書中で開示されたスルホ-S M C C方法を用いてB S Aにコンジュゲートされる。B S A-Man 8を用いて、マイクロウェルプレートに被覆し、Man α 1, 2-M a n エピトープに対する抗体について免疫血清をスクリーニングする。

【0154】

免疫原に対して $\leq 1:10$ 、000および異なるクレードおよびB S A-Man 8からのg p 1 2 0蛋白質120蛋白質に対して $\geq 1:1,000$ の血清力価を持つマウスを、ハイブリドーマの作成で選択する。簡単に述べれば、マウスを融合から3日前に同一用量の抗原でブースター注射し、その後、それらを犠牲にし、脾臓を無菌的に収穫する。細胞懸濁液を、20 mlの滅菌完全無血清DMEM（C S F D）の脾臓への注射によって調製する。同時に、ミエローマ細胞S P 2 / 0-A g 1 4（A T C C）の培養を収穫する。脾臓細胞およびミエローマ細胞をDMEMで3回洗浄し、10 mlのC S F D中に別々に再度懸濁させる。細胞生存性を評価した後、それらを1:1比率で混合し、30 mlのDMEMを補足し、遠心分離によってペレット化する。1 mlの50%ポリエチレングリコール（P E G 4 0 0, R o c h e）を各滴下後に攪拌しつつゆっくりと加えることによって、細胞ペレットを再懸濁させる。滅菌C S F Dを、攪拌しつつ、滴下によって混合物に加えて、最終容量を10 mlとする。融合された細胞を遠心分離し、完全DMEM-20 / H E P E S / ピルベート / H A Tで再度懸濁させる。細胞懸濁液を 2.5×10^6 合計細胞/mlに調製する。融合細胞を96-ウェルプレートに蒔き、湿潤化された37℃、5% C O₂ インキュベーター中で7日間インキュベートする。次いで、培地を完全DMEM-20 / H E P E S / ピルベート / H Tで交換する。12~15日に、目に見えるハイブリドーマコロニーによって証明されるように、ハイブリドーマはスクリーニングの準備ができています。典型的には、脾臓当たりほぼ 1×10^8 胞を10の96-ウェルプレートに蒔き、融合において $\geq 80\%$ 効率を得る。

【0155】

目に見えるコロニーを含むウェル中の上清を、免疫原と共にE L I S Aを用いてスクリーニングする。手法は、抗原-被覆ウェルを100 μlの非-希釈ハイブリドーマ上清でプローブする以外は、スクリーニング免疫血清と同一である。陽性ウェル中の候補ハイブリドーマ細胞は、DMEM-20 / H E P E S / ピルベートおよびクローニング/拡大培養培地にて24ウェルに移し、3~5日間拡大培養する。前記したように、上清を異なるクレードおよびB S A-Man 8からのg p 1 2 0で再度スクリーニングする。全てのまたはほとんどのテストされたg p 1 2 0蛋白質、およびB S A-Man 8に対して陽性を示すウェルにおける細胞を、ウェル当たり1および3細胞を平板培養することによってクローニングに付す。細胞を7~10日間培養し、前記したのと同じ抗原のパネルを用いて候補クローンを再度スクリーニングする。サブクローニングおよびスクリーニングを、注目する安定なハイブリドーマ細胞系が確立されるまで反復する。

【0156】

非常に多数のH I V-1株および一次単離体に対するこれらのMAbの中和活性をテストするために、MAbをマウスにおいて生産し、プロテインAアフィニティークロマトグラフィーで精製する。

10

20

30

40

50

【0157】

広い範囲のHIV-1株および一次単離体を潜在的に中和することができるMAbの同定。培養上清およびMAbのHIV中和アッセイは、相同HIV株を中和する能力についてテストされる。かくして、酵母で生産されたYU2またはJR-FL gp120で免疫化された動物からのハイブリドーマ培養上清を、YU2またはJR-FL Env蛋白質を担うHIVシュードタイプ、ならびにルシフェラーゼレポーター遺伝子を中和する能力についてテストする。上清およびMAbを、CD4およびCCR5（またはX4ウイルス株を用いる場合はCXCR4）を担うU87細胞上のp24-正規化ウイルスストックの感染を中和する能力についてテストする。ウイルスシュードタイプを、まず、感染に1時間先立って、非-希釈上清またはMAbの系列希釈と共にインキュベートする。感染された細胞で生産されたルシフェラーゼの量は48〜72時間後に測定する。中和活性は、抗体-陰性対照と比較した、各抗体希釈におけるウイルス複製（ルシフェラーゼ活性）のパーセント阻害として示される：%阻害 $\{1[\text{ルシフェラーゼAbルシフェラーゼAb}]\}$ 100。力価は、50%阻害(IC₅₀)を付与するMAb希釈の逆数として計算される。次いで、上清、および相同ウイルスを中和するMAbを、種々の一次HIV-1株を中和する能力についてテストする。

実施例2〜4で用いる材料および方法

二重および三重酵母突然変異体の創製：

酵母株および培地。本実験で用いる4つの酵母欠失株はOpen BioSystem sから獲得した：MAT α , his3 Δ 1, leu2 Δ 0, lys2 Δ 0, ura3 Δ 0, mnn1:kanMX4(10322)；MAT α , his3 Δ 1, leu2 Δ 0, met15 Δ 0, ura3 Δ 0, mnn4:kanMX4(7034)；MAT α , his3 Δ 1, leu2 Δ 0, met15 Δ 0, ura3 Δ 0, och1:kanMX4(4406)；および MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ 0 pmr1:kanMX4(14534)。2つの親酵母株は、接合型MAT α 、trp1 Δ 63（指名：BY4710）およびMAT α 、trp1 Δ 63（指名：BY4711）の証明およびスクリーニングのためにATCCから獲得した。野生型ジプロイド酵母株INVSc1はInvitrogenから得た。示された遺伝子のノックアウトは、MNN1、OCH1、MNN4、およびPMR1遺伝子（http://www.sequence.stanford.edu/group/yeast_deletion_projectにおけるYeast Deletion Projectにおける配列参照）に対して、およびKanMX4カセット（KanB、5'-CTGCAGCGAGGAGCCGTAAT-3'（配列番号：8）およびKanC、5'-TGATTTTGTATGACGAGCGTAAT-3'（配列番号：9））に特異的な合成されたプライマーを用いてPCRによって証明した。JumpStart TaqDNAポリメラーゼ（Sigma）を用い、コロニーPCRを記載されたように行った（Giaever, 2002）。全ての酵母培養は、示されたように、200 μ g/ml G418（Invitrogen）を補足した、YPD（1%Bacto-酵母抽出物、2%Bacto-ペプトン、2%グルコース）またはYPD+0.3M KCl中で成長させた。ジプロイドおよびハプロイドの選択は、20 μ g/ml L-メチオニン（CMS-lys）または50 μ g/ml L-リシン-HCl（CSM-met）を補足した、CSM-met-lysプレート（アミノ酸無しの、6.7%酵母窒素塩基、0.07%CSM-met-lysドロップアウトミックス、2%グルコース、2%Bacto-寒天）を用いて行った。CSM-met-lysドロップアウトミックスは、QBioGeneから得た。酵母接合型テストでは、株をSDプレート（アミノ酸無しの0.67%酵母窒素塩基、2%グルコース、2%Bacto-寒天）上で選択した。

【0158】

酵母接合。酵母株10322(Δ mnn1)を株7034(Δ mnn4)、4406(Δ och1)、および14534(Δ pmr1)と接合させて、ジプロイド株DIP-mnn1mnn4(MAT α / α ; his3 Δ 1/his3 Δ 1; leu2 Δ 0/leu2

$\Delta 0$; LYS2 / lys2 $\Delta 0$; met15 $\Delta 0$ / MET15; ura3 $\Delta 0$ / ura3 $\Delta 0$; mnn4 : kanMX4 / MNN4; MNN1 / Mnn1 : kanMX4)、DIP-mnn1 och1 (MATa / α ; his3 $\Delta 1$ / his3 $\Delta 1$; leu2 $\Delta 0$ / leu2 $\Delta 0$; met15 $\Delta 0$ / MET15; LYS2 / lys2 $\Delta 0$; ura3 $\Delta 0$ / ura3 $\Delta 0$; och1 : kanMX4 / OCHI; MNN1 / mnn1 : kanMX4) および DIP-mnn1 pmr1 (MATa / α ; his3 $\Delta 1$ / his3 $\Delta 1$; leu2 $\Delta 0$ / leu2 $\Delta 0$; LYS2 / lys2 $\Delta 0$; met15 $\Delta 0$ / MET15; ura3 $\Delta 0$ / ura3 $\Delta 0$; pmr1 : kanMX4 / PMR1; MNN1 / mnn1 : kanMX4) を形成させた。ジプロイドは、CSM-met-lys 上で選択し、記載されたように胞子形成した (Giaevert, 2002)。胞子形成ジプロイドの子嚢をザイモリアーゼ 100T (US Biological) で消化し、Current Protocols in Molecular Biology に記載されたようにランダム胞子分析を行った。DIP-mnn1mnn4 および DIP-mnn1pmr1 からの胞子を YPD 上で平板培養し、他方、DIP-mnn1 och1 からの胞子を YPD + 0.3M KCl 上で平板培養した。得られたハプロイド胞子を、SD 上の親株 (BY4710 および BY4711) と交差させることによって接合タイプにつき、CSM-met および CSM-lys へのレプリカ平板培養によって栄養要求要件について選択した。 Δ och1 突然変異を、37℃にて YPD 上でゆっくりとした成長によってスクリーニングし、他方、全ての ORF ノックアウトをスクリーニングし、コロニー PCR を用いて確認した。最終二重突然変異体は Δ mnn1 Δ mnn4-9 (MATa, his3 $\Delta 1$, leu2 $\Delta 0$, met15 $\Delta 0$, ura3 $\Delta 0$, mnn1 : kanMX4, mnn4 : kanMX4) Δ mnn1 Δ och1-3 (Mat α , his3 $\Delta 1$, leu2 $\Delta 0$, lys2 $\Delta 0$, ura3 $\Delta 0$, mnn1 : kanMX4, och1 : kanMX4) および Δ mnn1 Δ pmr1-5 (MATa, his3 $\Delta 1$, leu2 $\Delta 0$, lys2 $\Delta 0$, ura3 $\Delta 0$, mnn1 : kanMX4, pmr1 : kanMX4) であった。

【0159】

ハプロイド二重突然変異体、 Δ mnn1 Δ mnn4-9 および Δ mnn1 Δ och1-3 を接合させて、ジプロイド株 DIP-mnn1mnn4 och1 (MATa / α ; his3 $\Delta 1$ / his3 $\Delta 1$; leu2 $\Delta 0$ / leu2 $\Delta 0$; met15 $\Delta 0$ / MET15; LYS2 / lys2 $\Delta 0$; ura3 $\Delta 0$ / ura3 $\Delta 0$; , mnn1 : kanMX4 / mnn1 : kanMX4; mnn4 : kanMX4 / MNN4; OCHI / och1 : kanMX4) を形成し、続いて、前記したように、胞子形成、消化、ランダム胞子分析、および選択を行った。最後の三重突然変異体ハプロイドは： Δ mnn1 Δ mnn4 Δ och1-1-2、 Δ mnn1 Δ mnn4 Δ och1-1-3、および Δ mnn1 Δ mnn4 Δ och1-2-5 (MATa, his3 $\Delta 1$, leu2 $\Delta 0$, met15 $\Delta 0$, ura3 $\Delta 0$, mnn1 : kanMX4, mnn4 : kanMX4, och1 : kanMX4); Δ mnn1 Δ mnn4 och1-2-4 および Δ mnn1 Δ mnn4 Δ och1-2-6 (MATa, his3 $\Delta 1$, leu2 $\Delta 0$, lys2 $\Delta 0$, ura3 $\Delta 0$, mnn1 : kanMX4, mnn4 : kanMX4, och1 : kanMX4); および Δ mnn1 Δ mnn4 Δ och1-2-2 (MATa, his3 $\Delta 1$, leu2 $\Delta 0$, lys2 $\Delta 0$, ura3 $\Delta 0$, mnn1 : kanMX4, mnn4 : kanMX4, och1 : kanMX4) であった。全てのクローンは、3' および 5' 末端において、PCR によって各 ORF の KanMX ノックアウトについて確証した (Giaevert, 2002)。

【0160】

2つのハプロイド三重突然変異体 Δ mnn1 Δ mnn4 Δ och1-2-4 および Δ mnn1 Δ mnn4 Δ och1-2-5 を接合させて、ジプロイド三重突然変異体、 Δ mnn1 Δ mnn4 Δ och1-DIP (MATa / α ; his3 $\Delta 1$ / his3 $\Delta 1$; leu2 $\Delta 0$ / leu2 $\Delta 0$; met15 Δ / MET15; LYS2 / lys2 $\Delta 0$; ura3 $\Delta 0$ / ura3 $\Delta 0$; mnn1 : kanMX4 / mnn1 : kanMX4; mnn4 : kanMX4 / mnn4 : kanMX4; och1 : kanMX4 / och1 : kanM

X 4) を形成した。

免疫血清の調製：

酵母ザイモサンに対する抗体。野生型酵母の β -グルカンおよび α -マンナンから構成される、酵母細胞壁抽出物であるザイモサン A を用いてウサギを免疫化した。二匹のウサギを、週 0 において、C F A を含有する $200 \mu\text{g}$ のザイモサン A で免疫化し、週 2 および 4 において、その後、4 週間毎に、I F A を含有する $100 \mu\text{g}$ の抗原でブースター注射した。免疫血清を 5 週、および各ブースターから 1 週間後に集めた。得られた血清をブールし、プロテイン A-アガロースで精製した。

【0161】

酵母糖蛋白質に対する抗体。合成ペプチドを用いて、注目する酵母蛋白質に対するウサギにおいて免疫血清を生じさせた。加速された免疫化スケジュールを用い、開始時における $200 \mu\text{g}$ の初期免疫化、および週 2、4、6 および 10 における $100 \mu\text{g}$ 免疫化で、週 5、7、8 および 11 においてテスト採血を行った。用いたペプチドの配列をリストする：P S T 1 についての

【0162】

【数 1】

CDSLESITDSLNLQSLT

(配列番号：10)、E C M 3 3 についての

【0163】

【数 2】

CDSIKKITGDLNMQE

(配列番号：11)、G p 3 8 についての

【0164】

【数 3】

CAVNGVTSKSALESIFP

(配列番号：12)、G a s 1 についての

【0165】

【数 4】

CTPKEQLSFVMNLYYEKSGGSKSD

(配列番号：13)、および

【0166】

【数 5】

CPATGKYWSAATELPPTPNG

(配列番号：14)、G a s 5 についての

【0167】

【数 6】

CPAMPSAASAYFTSGAGSPMGTGIATQQS

(配列番号：15)、および

【0168】

【数 7】

CEIKGNAFFNSESGERFYIRGVVDYQPGGS

(配列番号：16)、および Y J L 1 7 1 c についての

【0169】

【数 8】

CSGPQSYQKLDFTNVGFTGS

10

20

30

40

50

(配列番号：17) および

【0170】

【数9】

CEVGDRVWFSGKNAPLADY

(配列番号：18)。抗原性ペプチドカップルドSulfoLinkゲル(Pierce)を用いる免疫アフィニティークロマトグラフィーによって、抗原特異的抗体を精製した。

【0171】

$\alpha 1, 3$ -結合マンノースに特異的な抗体。 $\alpha 1, 3$ -結合マンノース残基に特異的な免疫血清は、わずかに変形して、従前に記載されているように調製した(Raschkeら、J. Biol. Chem. 248(13):4660-6, 1973およびBallou, J. Biol. Chem. 245-1197-1203, 1970)。簡単に述べれば、 3.0×10^7 細胞/mlで0.9%NaClに懸濁させたlog相INVScl細胞を70℃にて90分間加熱-殺傷した。ウサギに、各々、週1、週2、週3および週4につき、0.25ml、0.5ml、0.75mlおよび1.0mlにて一週間につき3回、耳縁静脈にこの懸濁液を注射した。最後の注射から3日後に、ウサギから採血した。次いで、得られた血清を $\Delta mnn1$ 酵母細胞に吸着させた。各5mlの血清を、50mlの0.9%NaCl中の5g(湿潤重量)の加熱-殺傷 $\Delta mnn1$ 酵母と共にインキュベートした。アジ化ナトリウムを0.2%まで加え、回転混合しつつ、懸濁液を室温にて一晩インキュベートした。細胞を6,000gにおいて20分間遠心分離することによって除去し、吸着を反復した。最終血清を0.9%NaClに対して透析し、0.2ミクロンフィルターで滅菌した。

【0172】

酵母全細胞についての炭水化物型の決定

材料。2G12モノクローナル抗体は、Polymun Scientific Inc(Forschung GmbH)から購入した。プロテインA-Sepharose 4BコンジュゲートはInvitrogen(Carlsbad, CA)から購入した。ヤギ抗-ウサギIgG HRPはJackson ImmunoResearch(West Grove, PA)から購入した。

【0173】

免疫蛍光。YPD+0.3M KCL中で30℃にて成長させたlog-相 $\Delta mnn1$ $\Delta mnn4$ $\Delta och1$ -DIPおよびINVScl細胞を1mlの新鮮な4%パラホルムアルデヒドで1時間固定し、遠心分離によってペレット化した。細胞をPBSで1回洗浄し、ポリリシン-被覆スライドに移した。風乾の後、細胞を室温(RT)にて0.5%SDSと共に15分間インキュベートした。単一染色では、ウサギ抗-ザイモサン抗体を10 μ g/mlまで希釈し、 $\alpha 1, 3$ -結合マンノース抗-血清を1:500希釈で用いた。これらの抗体を細胞と共に室温にて1時間インキュベートした。スライドを洗浄し、二次抗体、Alexa Fluor 568-コンジュゲートドヤギ抗-ウサギIgG(Molecular Probe, USA)と共に室温にて1時間インキュベートした。細胞をPBSで洗浄し、スライド上に設置した。共-局所化染色では、抗-ザイモサンおよび2G12抗体を、各々、10 μ g/mlおよび20 μ g/mlに希釈し、細胞と共に1時間インキュベートした。スライドを洗浄し、プローブし、Alexa Fluor 568-コンジュゲートドヤギ抗-ヒトIgGおよびAlexa Fluor 488-コンジュゲートドヤギ抗-ウサギIgGを二次抗体として用いて前記したようにスライド上に設置した。イメージは、Zeiss Axioskope 蛍光顕微鏡(McBain, USA)を用いて得た。

【0174】

全-細胞ELISA。酵素-結合免疫吸着検定法(ELISA)を加熱-殺傷全酵母細胞で行った。log-相 $\Delta mnn1$ $\Delta mnn4$ $\Delta och1$ -DIPおよびINVScl細胞を、0.9%NaCl中で70℃にて1時間加熱-殺傷し、ELISAプレートをコー

ティングするためにPBS中に 5.0×10^7 細胞/mlまで希釈した。SF162株 (ARRRP) からのHIV-1 gp120、および野生型酵母マンナン (Sigma) を50mM炭酸緩衝液、pH9.5中に $5 \mu\text{g/ml}$ まで希釈した。100マイクロリットルの抗原を各ウェル中で室温にて一晚インキュベートした。ウェルをELISAブロッキング緩衝液 (PBS、0.1%BSA、0.02%チメロザール) でブロックし、湿潤チャンパー中で室温にて2時間インキュベートした。2回の dH_2O すすぎの後、2G12および抗- $\alpha 1$, 3-マンノース抗体を、ブロッキング緩衝液中での3倍系列希釈にて $10 \mu\text{g/ml}$ で加え、室温にて一晚インキュベートした。ウェルをELISA洗浄緩衝液 (PBS、0.05%Tween20、0.02%チメロザール) で洗浄し、各々、2G12または抗- $\alpha 1$, 3-マンノースについて、ヤギ抗-ヒトIgG-HRPまたはヤギ抗-ウサギIgG-HRP (Jackson ImmunoResearch) の1:10,000希釈と共に37℃にて1時間インキュベートした。ウェルを前記したように洗浄し、発色のためにTMBと共にインキュベートし、HClで停止させた。EMaxマイクロプレートリーダー (Molecular Devices) を用い、HRP活性を450nmにおける吸光度によって読んだ。

10

【0175】

グリカンプロファイリング。30℃にて成長させたlog-相 Δmnn1 Δmnn4 Δoch1 -DIP細胞を、0.9%NaCl中で $\sim 3.0 \times 10^7$ で細胞/mlまで希釈した。細胞を70℃にて1時間加熱-殺傷した。細胞からのN-結合グリカン PNGase F消化によって放出した。放出されたN-結合グリカンをペルメチル化し、UCSDにおけるGlycotechnology Core ResourceによるMaldi-TOF Mass Spectrometry (MS) によって分析した。

20

【0176】

2G12交差反応性糖蛋白質の同定および確認

ウェスタンブロット。INVSc1、 Δmnn1 、 Δmnn4 、 Δoch1 、 Δmnn1 Δmnn4 、 $\Delta\text{mnn1 och1}$ および Δmnn1 Δmnn4 Δoch1 の株からの酵母細胞を、YPD+0.3M KCl中で30℃にて3.0のOD₆₀₀まで成長させた。酵母細胞を14,000gにおいて2分間遠心分離した。2-容量の氷冷アセトンと共に-80℃にて30分間インキュベートすることによって、培養上清をアセトン沈殿に付した。試料を14,000gにおいて15分間遠心分離し、上清を除去した。15分間の風乾の後、ペレットを、元の試料容量の1/10の2× Laemmli SDS-試料緩衝液で5分間煮沸した。

30

【0177】

RIPA緩衝液に溶解させることによって、酵母細胞溶解物を調製した。簡単に述べれば、各1mlの細胞ペレットを、100μlの氷冷RIPA緩衝液 (150mM NaCl、10mM Tris pH7.4、1mM EDTA pH8.0、1% Triton X-100、1%DOC、0.1%SDS、1mM PMSF、 $1 \mu\text{g/ml}$ アプロチニン、および $1 \mu\text{g/ml}$ ロイペプチン) に再懸濁させ、酸-洗浄ガラスビーズ (Sigma) で10分間ボルテックスすることによって細胞壁を破壊した。得られた溶解物を13,000gにおいて30分間遠心分離して、いずれのデブリスも除去し、各々の蛋白質濃度を希釈緩衝液 (50mM Tris pH7.4、1mM EDTA pH8.0、 $1 \mu\text{g/ml}$ アプロチニン、 $1 \mu\text{g/ml}$ ロイペプチン、および0.1%SDS) 中で0.3mg/mlまで希釈した。Laemmli SDS-緩衝液を1回加え、0.24mg/ml蛋白質を含有する試料を5分間煮沸した。

40

【0178】

上清および細胞溶解物画分を4~20%グラジエントゲル上でのSDS-PAGE分離に付し、250mAのニトロセルロース膜に2時間で移した。示された希釈の、MAb 2G12、および前記したようにウサギで生起させたポリクローナル抗体を含めた一次抗体、続いて、二次抗体、ヤギ抗-ヒトIgG-HRPおよびヤギ抗-ウサギIgG-HRP (Jackson ImmunoResearch) を用い、ウェスタンブロッティン

50

グを行った。ECL (GE Biosciences) を用い、ケミルミネセント検出を使用した。

【0179】

2G12 交差反応性蛋白質の部分的精製。Current Protocols in Cell Biology に記載されたように、分別遠心分離を用い、内因性酵母蛋白質の細胞下位置を見積もった。INVSc1 および $\Delta mnn1 \Delta mnn4 \Delta och1 - D$ IP 株からの log-相細胞を前記したように 3.0 の OD₆₀₀ まで成長させた。各 1 ml の細胞ペレットを、100 μ l のスクロース溶解緩衝液 (0.4 M スクロース、2 mM EDTA、25 mM イミダゾール、pH 7.0、1 mM PMSF、1 μ g/ml アプロチニン、および 1 μ g/ml ロイペプチン) に再懸濁させた。等容量の酸-洗浄ガラスビーズ (Sigma) を加え、15 分間の高速ボルテックスおよび氷浴インキュベーションを交互に行って細胞壁を破壊した。溶解物を 500 g にて 5 分間遠心分離して、未溶解細胞および大きな凝集物をペレット化し、上清を 22,000 g にて 30 分間遠心分離した。細胞質、ゴルジ複合体およびエンドソーム蛋白質を含有する得られた上清を分析用に貯蔵した。大部分の空胞、核、ER および原形質膜蛋白質を含有するペレットを同様な容量の PBS + 1.0% Triton に再懸濁させて、膜蛋白質を可溶化させた。画分を前記したように遠心分離して、可溶性および不溶性膜画分を分離した。

10

【0180】

レクチンアフィニティークロマトグラフィー。コンカナバリン A (ConA) レクチンアフィニティークロマトグラフィーのために、9.5 ml の Triton-可溶性膜画分を、5 ml の Triton 洗浄緩衝液 (20 mM Tris、pH 7.0、50 mM NaCl、10 mM CaCl₂、および 1% Triton X-100) 中の 1 ml の ConA-アガロース (Vector Labs) と共に 4°C にて一晩インキュベートした。カラムを Triton 洗浄緩衝液で徹底的に洗浄した。ConA-結合蛋白質を溶出するために、0.5 M メチルマンノーピラノシドを含む 5 ml の Triton 洗浄緩衝液をカラムに加え、続いて、0.2 mM EDTA および 1.0% SDS を含む 5 ml の Triton 洗浄緩衝液を加えた。

20

【0181】

培養上清からの精製のために、10 mM CaCl₂ を含む 300 ml の $\Delta mnn1 \Delta mnn4 \Delta och1 - 2 - 5$ 酵母上清を 5 ml の ConA-アガロースカラム (Vector Labs) に負荷し、ConA 洗浄緩衝液 (20 mM Tris、pH 7.0、50 mM NaCl、10 mM CaCl₂)、続いて、0.5 M メチルマンノーピラノシドを含む ConA 洗浄緩衝液で十分に洗浄した。ConA-結合蛋白質を溶出させるために、5 ml の 2 $\times$ SDS 負荷緩衝液をカラムに加えて 5 分間煮沸した。

30

【0182】

2 次元ゲル電気泳動および質量分析。ConA-アガロース精製蛋白質画分を TCA で沈殿させ、200 μ l の尿素/チオ尿素再水和溶液 (7 M 尿素、2 M チオ尿素、2% CHAPS、60 mM DTT; 1% Ampholytes pH 3-10; 0.01% ブロモフェノールブルー) 中で再可溶化させた。IPG ZOOM 4-7 IPG ストリップ (Invitrogen) をシプロルビーゲルでは、120 μ l の試料および 20 μ l の再水和緩衝液 (7 M 尿素、2 M チオ尿素、2% CHAPS、60 mM DTT、1% Ampholytes pH 3-10、0.01% ブロモフェノールブルー)、およびウエスタンブロットでは、80 μ l の試料および 60 μ l の再水和緩衝液で一晩再水和させた。ストリップを ZOOM IPG Runner (Invitrogen) に負荷し、以下のようにフォーカスした: 30 分間の 200 V、25 分間の 450 V、25 分間の 750 V、および 60 分間の 2000 V。

40

【0183】

第二の次元では、軌道シェーカーにて、DTT を含有する LDS-平衡緩衝液中で IPG ストリップを 15 分間で 2 回還元した。次いで、ストリップを、ヨードアセトアミドを含有する LDS-平衡緩衝液中で 15 分間アルキル化し、MES 泳動緩衝液にて、4~1

50

2 % グラジエントアクリルアミドゲルを用いる I P G Z O O M システムで電気泳動に付した。ゲルは、色素前方部がゲルの底からほぼ 0 . 3 c m まで移動するまで電気泳動に付した。

【0184】

シプロルビー染色では、ゲルを 4 0 % メタノール、1 0 % 酢酸中で 1 時間固定し、シプロルビー蛍光染色にて一晚染色した。脱色溶液を 1 回交換してゲルを 1 0 % メタノール、6 % 酢酸中で 1 2 0 分間脱色し、以下のパラメーターで：5 3 2 n m の励起波長、6 0 5 n m の発光波長、および 1 0 0 μ m の分解能にて、M o l e c u l a r I m a g e r P h a r o x F X レーザーイメージャーで解像した。

【0185】

ウェスタンブロットでは、第二の次元の泳動直後に、ゲルを移動緩衝液 (I n v i t r o g e n) に浸漬した。蛋白質をニトロセルロースに移し、1 μ g / m l において 2 G 1 2 でプローブした。

【0186】

2 G 1 2 によって検出された 2 D プロット上の蛋白質は、シプロルビーで染色されたスポットに合致した。合致するスポットをスライスし、トリプソンでのゲル中で消化に付した。消化されたペプチドを N a n o - L C M S / M S によって分析した。前記実験は、P r o t e o m i c R e s e a r c h S e r v i c e s I n c o r p o r a t e d によって行った。

【0187】

免疫沈澱。培養上清および細胞溶解物は、前記したように、l o g - 相 Δ m n n 1 Δ m n n 4 Δ o c h 1 - 2 - 5 から調製した。これらの試料は、プロテイン A - S e p h a r o s e 4 B コンジュゲートとの室温での 2 時間のインキュベーションによって予め清澄化した。抗原 - 抗体複合体の形成では、1 0 μ g の 2 G 1 2 を細胞溶解物または培地試料いずれかに加え、シェーカーにて室温にて 1 時間インキュベートした。インキュベーションの後、2 0 μ l のプロテイン A - S e p h a r o s e 4 B コンジュゲートを抗原 - 抗体複合体に加え、シェーカーにて室温にて 1 時間再度インキュベートした。試料を 1 0 , 0 0 0 g で 5 分間回転させ、上清を吸引した。ビーズを 8 0 0 μ l の P B S で 2 回洗浄し、4 0 μ l の 1 $\times$ S D S 試料緩衝液と共に沸騰させることによって、結合した蛋白質を溶出させた。全ての試料を 4 ~ 2 0 % グラジエント S D S - P A G E ゲルに負荷し、E C M 3 3、P S T 1、G P 3 8、Y J L 1 7 1 C、G a s 1 および G a s 5 を含めた同定された酵母糖蛋白質に対する抗体を用いてウェスタン分析用にブロットした。

【0188】

N - 結合および O - 結合グリコシル化部位の生物情報分析

N - 結合グリコシル化部位の分析。酵母 S . c e r e v i s i a e ゲノムにおける、および実験で同定された糖蛋白質上の N - 結合グリコシル化部位を、我々が最近開発したソフトウェアを用いて分析した。

【0189】

O - 結合グリコシル化部位の分析。 <http://www.cbs.dtu.dk/services/netoglyc> で利用可能な、T e c h n i c a l U n i v e r s i t y o f D e n m a r k の生物学配列分析センター (C B S) によって開発されたソフトウェア N e t O G l y c 3 . 1 を用い、S . c e r e v i s i a e ゲノムにおけるいくつかの蛋白質上の、および実験で同定された糖蛋白質上の O - 結合グリコシル化部位を分析した。

【0190】

酵母三重突然変異体で生産された g p 1 2 0 のクローニング、発現、特徴付け

試薬。p Y E S 2 / C T ベクターは I n v i t r o g e n から入手し、p J R - F L s y n g p 1 2 0 および p Y U - 2 プラスミドは A I D S R e s e a r c h a n d R e f e r e n c e P r o g r a m (A R R R P) から入手した。アミノ酸無しの酵母窒素塩基および - U r a D r o p o u t ミックスは、U . S . B i o l o g i c a l から入

10

20

30

40

50

手した。H I V-1_{I I I B}からのg p 1 2 0に対するウサギポリクローナル抗体（抗-g p 1 2 0-I I I B）はV i r o s t a t I n c. から入手した。H I V-1_{Y U-2}に対するもう一つのウサギポリクローナル抗体（抗-g p 1 2 0-Y U₂）は合成されたペプチド、C E Q M H E D I I S L W D Q S L K（配列番号：19）を用いてイン・ハウス製造し、S u l f o l i n k ゲル（P i e r c e）にカップリングされたペプチドを用いてアフィニティー精製した。

【0191】

α-接合因子およびg p 1 2 0のP C R クローニング。S. c e r e v i s i a e アルファ-接合因子（M F α）のシグナル配列を、p Y E S 2 / C T ベクターのマルチクローニング部位（M C S）の上流に付加した。M F αは、各々、K p n I およびB a m H I 部

10

【0192】

【数10】

5'-ATGGTACCAAAGAATGAGATTTCCTTCAATT-3'

（配列番号：20））、およびM F α 1 - B a m - 3（

【0193】

【数11】

5'-ATGGATCCAGCTTCAGCCTCTCTTTTATC-3'

（配列番号：21））を用いるP C R によって、（I N V S c 1 から抽出された）全酵母D N A からクローン化した。この断片は、g p 1 2 0 からシグナル配列を除去するためのK e x 2 切断部位を含有する。P C R は、製造業者のプロトコルに従い、T 4 D N A ポリメラーゼ（S i g m a）を用いて行った。標準的な分子生物学技術を用い、P C R 産物を精製し、B a m H I およびK p n I で消化し、同様に消化されたp Y E S 2 / C T プラスミドに連結した。得られたプラスミドはp Y E S 2 / C T - αであった。

20

【0194】

J R - F L についてのコーディング配列は、各々、E c o R I およびX b a I 部位を付加した、プライマーJ R F L - E c o - 5（

【0195】

【数12】

5'-TGGAATTCTGTGGGTGACTGTATACTAT

（配列番号：22））およびJ R F L - X b a - 3（

【0196】

【数13】

5'-TATCTAGACCCACAGCGCGCTTCTCCCT-3'

（配列番号：23））を用いるP C R によってp J R - F L s y n g p 1 2 0 から増幅した。Y U - 2 についてのコーディング配列は、各々、E c o R I およびX b a I 部位を付加した、プライマーY U 2 - E c o 5（

【0197】

【数14】

5'-TGGAATTCTGTTGTGGGTCACAGTCTATTAT-3'

（配列番号：24））およびY U 2 - X b a 3（

【0198】

【数15】

5'-ATTCTAGATTCTCTTTGCACCACTCTTCT-3'

（配列番号：25））を用いてp Y U - 2 から増幅した。g p 1 2 0 P C R 産物を、前記したように、E c o R I およびX b a I での消化にて、p Y E S 2 / C T - α にクローン化した。最終プラスミドはp Y E S 2 / C T - α - J R F L（p J R F L - g p 1 2 0）およびp Y E S 2 / C T - α - Y U 2（p Y U 2 - g p 1 2 0）であった。

50

【0199】

$\Delta mnn1 \Delta mnn4 \Delta och1-2-5$ 酵母の酢酸リチウム形質転換。プラスミド pJRF L-gp120 および pYU2-gp120 を用いて、 $\Delta mnn1 \Delta mnn4 \Delta och1-2-5$ 酵母細胞を形質転換した。簡単に述べれば、YPD+0.3M KCl 中で成長させた酵母の一晩培養物 1.5ml をペレット化した。~50 μ l を除いた全ての上清を除去し、細胞を再懸濁させた。次いで、2 μ l の 10mg/ml 単一標準サケ精子 DNA (Sigma)、続いて、1 μ g の pJRF L-gp120 または pYU2-gp120 を加えた。ボルテックス後、500 μ l の PLATE 混合物 (40% PEG-4000、100mM LiAc、10mM Tris、pH7.5、1mM EDTA)、および 20 μ l の 1M DTT を加え、混合物を室温にて 4 時間インキュベートした。細胞に 42 $^{\circ}$ C で 10 分間熱ショックを与え、細胞をペレット化し、100 μ l の滅菌 dH₂O に再懸濁させた。細胞を ura/グルコース (2% グルコース、アミノ酸を含まない 0.67% 酵母窒素塩基、0.2% -Ura Dropout ミックス、2% Bacto-寒天) 上で平板培養した。コロニーが出現するまでプレートを 30 $^{\circ}$ C にてインキュベートした。PCR をコロニーに対して直接用いて、pJRF L-gp120 形質転換体についてはプライマー MF α 1-Kpn-5 および JRF L-Xba-3、および pYU2-gp120 については MF α 1-Kpn-5 および YU2-Xba-3 を用いて各プラスミドの存在を確認した。

10

【0200】

$\Delta mnn1 \Delta mnn4 \Delta och1$ 酵母における gp120 蛋白質の発現。pJRF L-gp120 および pYU2-gp120 で形質転換された三重突然変異体酵母細胞を、ura/グルコース培地 (2% グルコース、アミノ酸を含まない 0.67% 酵母窒素塩基、0.2% -Ura Dropout ミックス) 中で log 相まで成長させた。細胞を遠心分離し、ura/ガラクトース培地 (2% ガラクトース、アミノ酸を含まない 0.67% 酵母窒素塩基、0.2% -Ura Dropout ミックス) で 2 回洗浄し、OD₆₀₀ = 0.4 において -ura/ガラクトースに再懸濁させた。細胞を 30 $^{\circ}$ C で成長させ、培地の試料を異なる時点で採取して、蛋白質誘導についてテストした。

20

【0201】

酵母発現糖蛋白質の精製

硫酸アンモニウム沈殿。 $\Delta mnn1 \Delta pmr1$ からの酵母培養上清中の PST1 蛋白質、および形質転換された $\Delta mnn1 \Delta mnn4 \Delta och1$ で発現された gp120 を集め、3000g にて 4 $^{\circ}$ C において 10 分間遠心分離 (Beckman Coulter, AllegraTM 64R, ローター F0650) して、いずれの不溶性粒子も除去した。上清をきれいなビーカーに移し、10mM EDTA を加え、1M Tris 塩基を用いて pH を pH7.4 に調整した。4 $^{\circ}$ C にて 55% 飽和の最終濃度に到達するまで攪拌しつつ、硫酸アンモニウムをゆっくり加えた。溶液をさらに 30 分間攪拌し、15,000 $\times$ g において 4 $^{\circ}$ C で 30 分間遠心分離した。ペレットを 2ml の PBS に再懸濁させ、15,000 $\times$ g における 4 $^{\circ}$ C での 1 時間の遠心分離によって不溶性物質を除去した。この物質を AS55 沈殿と命名した。4 $^{\circ}$ C における 90% 飽和の最終濃度に到達するまで攪拌しつつ、硫酸アンモニウムを 55% AS4 上清にゆっくり加えた。ペレットを 2ml の PBS に再懸濁させ、15,000 $\times$ g における 4 $^{\circ}$ C での 1 時間の遠心分離によって不溶性物質を除去した。この物質を AS90 沈殿と命名した。5ml の HiTrap 脱塩カラム (GE Life Science) を用いて、AS55 および AS90 沈殿を 5mM リン酸ナトリウム、pH7.5 に脱塩し、蛋白質濃度を 1mg/ml に調整した。

30

40

【0202】

酵母発現 gp120 の免疫アフィニティー精製。1ml ゲル当たり 5mg 抗体にて、製造業者のプロトコルに従い、抗-gp120-IIB を臭化シアノー活性化 Sepharose 4B (Sigma) にコンジュゲートした。PBS でカラムを十分に洗浄した後、 $\Delta mnn1 \Delta mnn4 \Delta och1$ 細胞からの AS55 試料を免疫アフィニティーカラムにて室温で 2 時間インキュベートした。フールスローを集め、カラムを PBS で再度洗

50

浄した。結合した蛋白質を、100mMグリシン、pH2.5で、50 μ lの1M Tris、pH9.5を含有する1ml画分に溶出させた。2G12および抗-gp120-YU2を用いるウエスタンブロットによって、これらの画分をgp120についてテストした。gp120含有画分をプールし、AS55-APと命名した。

【0203】

カチオン交換クロマトグラフィー。別々のクロマトグラフィーを異なる試料について、gp120精製で用いるAS55-APにて、およびPST1精製で用いるAS90にて行った。5mlのHiTrap SP FFカラム (GE Life Science) を5mMリン酸ナトリウム、pH7.5で平衡化した。試料を1ml/分でカラムに負荷し、15mlの5mMリン酸ナトリウム、pH7.5で洗浄した。1ml/分の流速にて、蛋白質を、5mMリン酸ナトリウムpH7.5中の0~500mM NaClの80-mlグラジエントで溶出させた。2mlの画分を徹底的に集め、ドットブロットアッセイを使用して、3 μ lの試料を所望の糖蛋白質の存在についてテストした。有意な量の蛋白質を呈する画分をプールし、GP-IEC-55およびGP-IEC-90と命名した。これらの画分を、前記したように、糖蛋白質のConA精製を用いてさらに精製した。蛋白質を、60分間のインキュベーションにて、1Mメチルマンノピラノシドに溶出させた。

【0204】

糖蛋白質のゲル濾過クロマトグラフィー。最終工程として、2つのGP-IEC-55およびGP-IEC-90画分を負荷緩衝液 (50mM Tris、150mM NaCl、5mM 2-bME、pH7.5) に脱塩し、Amicon (登録商標) Centricon (登録商標) 30 (Millipore) によって~1mg/mlの最終濃度まで濃縮した。150mlのSephacryl S-HR-200 (GE Life Science) を同一緩衝液で平衡化させ、GP-IECプールをカラムに負荷した。蛋白質を0.3ml/分の流速にて負荷緩衝液で溶出させ、2mlの画分を集め、ドットブロットアッセイを使用して、各画分の3 μ l試料を糖蛋白質の存在についてテストした。有意な量の糖蛋白質を呈する画分をプールし、集合的にGP-SHR200-55およびGP-SHR200-90と命名した。以下の標準を用い、濾過カラムから共溶出させた: IgG (MW150kD)、AP (MW140kD)、卵白アビジン (MW68) およびストレプトアビジン (MW53)。

【0205】

グリカンプロファイリング。各々、精製されたgp120 PST1を含有するGP-SHR200-55およびGP-SHR200-90画分をPNGase Fで消化して、すべてのN-結合グリカンを放出させた。これらのグリカンをペルメチル化し、UCSDにおけるGlycotechnology Core Research FacilityによるMaldi-TOF質量分析 (MS) によって分析した。

【0206】

免疫化、および $\alpha 1$, 2-結合末端マンノースに特異的な抗体の調製

酵母全細胞を用いる $\alpha 1$, 2-結合マンノースに対する抗体の生起。三重突然変異体 (Raschkeら、J. Biol. Chem. 248 (13): 4660-6, 1973; およびBallou, J. Biol. Chem. 245: 1197-1203, 1970) を用い、 $\alpha 1$, 2-結合マンノース残基に特異的な免疫血清を調製した。簡単に述べれば、0.9% NaCl中に 3.0×10^7 細胞/mlで懸濁させたlog相 $\Delta mnn1 \Delta mnn4 \Delta och-DIP$ を70 $^{\circ}$ Cにて90分間加熱殺傷した。ウサギに、この懸濁液を、各々、週1、週2、週3および週4において、0.25ml、0.5ml、0.75mlおよび1.0mlにて一週間に3回耳縁静脈に注射した。週2、3および4についての最後の注射から3日後にウサギから採血した。残りの4週間後、ウサギに、週9、週10、および週11にて0.5ml、0.75mlおよび1.0mlで一週間に3回耳縁静脈に同一懸濁液を注射した。4回目の最後の採血は、最後の注射から3日後に集めた。得られた血清を、ELISAおよびウエスタンブロットによってgp120についてテスト

した。

【0207】

酵母細胞抽出物を用いる $\alpha 1, 2$ -結合マンノースに対する抗体の生起。三重突然変異体の膜画分を用いて $\alpha 1, 2$ -結合マンノース残基に特異的な免疫血清を調製した。 $\Delta m n n 1 \Delta m n n 4 \Delta o c h 1-D I P$ 株からのlog-相細胞を酸-洗浄ガラスビーズ (Sigma) を用い、スクロース溶解緩衝液 (0.4 M スクロース、2 mM EDTA、23 mM イミダゾール、pH 7.0、1 mM PMSF、 $1 \mu g / m l$ アプロチニンおよび $1 \mu g / m l$ ロイペプチン) 中に溶解させた。溶解物を500 gにて5分間遠心分離して、未溶解細胞および大きな凝集体をペレット化し、上清を22,000 gで30分間遠心分離した。ほとんどの空胞、核、ERおよび原形質膜蛋白質を含有する得られたペレットを同様な容量のPBS+1.0% Tritonに再懸濁させて、膜蛋白質を可溶化させた。画分を前記したように遠心分離して、Triton-可溶性および不溶性膜画分を分離した。2匹のウサギの4つの群をこれらの画分で免疫化し、一つの群は野生型 (INVScl) のTriton-可溶性画分で、2つの群は三重突然変異体のTriton-可溶性画分で、および一つの群は三重突然変異体のTriton-不溶性画分で免疫化した。加速された免疫化スケジュールを用い、開始時には、200 μg の初期免疫化、および週2、4、6および10においては100 μg 免疫化であり、週5、7、8および11においてはテスト採血を行った。得られた血清をELISAおよびウエスタンブロットによってgp120結合についてテストした。

【0208】

加熱-殺傷全細胞酵母に対する抗血清の吸着。 $\alpha 1, 2$ 結合マンノース残基に特異的な抗体を豊富とするために、次いで、gp120結合を示したいずれの血清も $\Delta o c h 1$ およびINVScl (WT) 酵母細胞に吸着させた。各1 mlの血清を、5 mlの0.9% NaCl中で、1.0~2.0 g (湿潤重量) の加熱-殺傷 $\Delta o c h 1$ および/またはWT酵母と共にインキュベートした。アジ化ナトリウムを0.2%まで加え、懸濁液を回転混合しつつ、室温にて一晩インキュベートした。細胞を20分間の6,000 gでの遠心分離によって取り出し、吸着を反復した。最終血清を0.9% NaClに対して透析し、0.2 μm フィルターで滅菌した。次いで、抗体をプロテインA-アガロース (Invitrogen) で精製し、ELISAおよびウエスタンブロットによってgp120結合について再度テストした。

【0209】

$\alpha 1, 2$ -結合マンノース残基に対する抗体のアフィニティー精製。 $\alpha 1, 2$ -結合マンノース残基に特異的な抗体をさらに精製するために、ELISAによってgp120結合を示したいずれかの吸着された抗体からの血清を、三重突然変異体からのConA-溶出蛋白質を用いて精製した。簡単に述べると、 $\Delta m n n 1 \Delta m n n 4 \Delta o c h 1-2-5$ 細胞からの培養上清、および細胞溶解物を、前記したように、ConAレクチンアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製した。各画分 (上清および溶解物) からの蛋白質を、1 mg ゲル当たり10 mg 合計蛋白質にて、製造業者のプロトコルに従い、臭化シアニル-活性化Sephacrose 4B (Sigma) に別々にコンジュゲートさせた。PBSでのカラムの十分な洗浄の後に、選択された血清の10~20 mlを濾過滅菌し、5 ml 当たり2時間、室温にて培地と共にインキュベートした。フロースルーを集め、カラムをPBSで再び洗浄した。50 μl の1 M Tris、pH 9.5を含有する1 ml 画分へ、結合した抗体を100 mM グリシン、pH 2.5で溶出した。PBSに対する透析の後、これらの抗体をELISAおよびウエスタンブロットによってgp120結合についてテストした。

【0210】

gp120反応性およびシュードウイルス中和についての免疫血清の分析

gp120に対するELISA。酵素-結合免疫吸着検定法 (ELISA) を行って、抗- $\alpha 1, 2$ -結合マンノース血清のgp120特異性についてテストした。(Dr. Domsの研究所、ARRRPおよび商業的会社を含めた種々の源からの) 異なるHIV-

10

20

30

40

50

1 gp120蛋白質を、50mM炭酸緩衝液、pH9.5中で3~5μg/mlまで希釈した。100マイクロリットルの抗原を各ウェル中で室温にて一晚インキュベートした。ウェルをELISAブロッキング緩衝液(PBS、0.1%BSA、0.02%チメロザール)でブロックし、湿潤チャンパー中で室温にて2時間インキュベートした。2回のdH₂Oすすぎの後、2G12、およびΔmnn1Δmnn4Δoch1-DIPに対する抗-血清をブロッキング緩衝液中で種々の希釈に加え、室温にて一晚インキュベートした。ウェルをELISA洗浄緩衝液(PBS、0.05%Tween20、0.02%チメロザール)で洗浄し、ヤギ抗-ヒトIgG-HRPまたはヤギ抗-ウサギIgG-HRP(Jackson ImmunoResearch)の1:10,000希釈と共に37℃にて1時間インキュベートした。ウェルを前記したように洗浄し、発色のためにTMBと共にインキュベートし、HClで停止させた。Emaxマイクロプレートリーダー(Molecular Devices)を用い、HRP活性を450nmにおける吸光度によって読んだ。CHO細胞で発現されたSF162gp120は、NIH AIDS Research and Reference Reagent Program(ARRRP)を通じて入手した。293T細胞で発現されたADA、JR-FL、およびYU2 gp120はUniversity of PhiladelphiaのDr. Domsから入手した。

10

【0211】

前記で用いたのと同様な方法で、哺乳動物細胞で発現されたgp120蛋白質の結合アフィニティーを、定量的ELISAによって発現された三重突然変異体酵母と比較した。異なる株からの、(Δmnn1Δmnn4Δoch1で発現された)gp120-酵母、および(293T細胞で発現された)gp120-293の同等量を用いて、マイクロウェルプレートを被覆する。次いで、2G12、抗-gp120-IIB、および抗-gp120-YU2を用いてプローブする。同等量の蛋白質を捕獲し、および結合抗体を連続的に希釈することによって、各gp120に対する結合アフィニティー2G12を計算し、比較する。

20

【0212】

中和アッセイ。293T/17細胞はAmerican Type Culture Collection(Manassas, VA)から購入し、10%胎児ウシ血清を含むダルベッコの修飾イーグル培地(DMEM)中で維持した。プラスミドpNL4-3. luc. R-EはDr. Landauの研究所から購入した。シュードウイルスを生産するのに用いた種々のHIV-1 env gp160プラスミドは、NIH AIDS Research Reference Reagent Program(NIH, ARRP)から入手した。シュードウイルス感染性で用いるCCR5およびCD4を発現するU87. CD4. CCR5およびU87. CD4. CXCR4細胞系は、University of PhiladelphiaのDr. Domsの贈物であった。

30

【0213】

シュードウイルスについては、製造業者の指示に従い(Invitrogen)、リン酸カルシウム方法を用い、70~80%密集293T/17細胞の10cm皿を、gp160 env-発現プラスミドおよび補充ウイルスゲノムレポーター遺伝子ベクター、pNL4-3. Luc. E-Rで共トランスフェクトした。Env蛋白質でシュードタイプ分けした組換えウイルスを含有する培養上清をトランスフェクションから48時間後に収穫し、遠心分離し、0.45μmフィルターを通して濾過し、-80℃で凍結した。シュードウイルス感染性を測定するために、収穫された上清のアリコートを用いて、CCR5(U87. CD4. CCR5)またはCXCR4(U87. CD4. CXCR4)発現細胞系の96ウェルプレート当たり10,000細胞を感染させた。単一ラウンドの感染した細胞からのルシフェラーゼ活性を、製造業者の指示に従って、Bright-Gol luciferaseアッセイシステム試薬(Promega, Madison, WI)およびVeritasマルチプレートルミノメーター(Turner Biosystems)機器を用いて細胞培養の72時間後に測定した。三連ウェルについての平均相対的光単

40

50

位 (RLU) を決定し、シュードウイルスストック $\geq 2 \times 10^5 \text{ rlu/ml}$ を引き続いての中和アッセイで用いた。

【0214】

中和アッセイでは、単一ラウンドのシュードタイプ・レポーター・アッセイを用い、動物血清または精製された抗体を、HIV-1 ウイルスに対する中和抗体 (NAb) 活性についてアッセイした。簡単に述べると、CCR5 (U87, CD4, CCR5) または CXCR4 (U87, CD4, CXCR4) を発現する細胞系を 96 平坦底プレートで 10,000 細胞/ウェルにおいて平板培養し、一晚培養した。血清でのテストでは、使用前に、試料を 56°C にて 45 分間加熱—不活化した。翌日、分離された 96 ウェル平坦底プレートにて、25 μl の適切に希釈されたシュードウイルス懸濁液を、三連にて、25 μl の系列希釈抗体試料と混合し (これは、最終抗体濃度を精製された抗体では 200 $\mu\text{g/ml}$ または 50 $\mu\text{g/ml}$ 、または血漿試料では 1:5 希釈とする)、37°C にて 1 時間インキュベートする。抗体/ウイルス混合物のインキュベーションの後に、培地を予めインキュベートされたプレート細胞から取り出し; 抗体混合物を細胞に加え、CO₂ インキュベーター中で 37°C にて 4 時間インキュベートした。インキュベーションの後、次いで、混合物を細胞から取り出し、新鮮な培地で交換した。等容量 (通常、50~100 μl) の Bright-Glo ルシフェラーゼアッセイシステム試薬 (Promega, Madison, WI) を培養細胞に加えることによって、細胞を感染から 72 時間後に収穫し、製造業者によって記載されているように、Veritas マイクロプレートルミノメーター (Turner Biosystems) を用いることによって (RLU で表す)、ルシフェラーゼ活性を測定した。阻害のパーセンテージは、以下の式: $[(\text{ウイルス対照ウェル}-\text{テスト試料ウェル}) / (\text{ウイルス対照ウェル}-\text{細胞対照}) \times 100]$ を用いて、テストされた試料ウェル (細胞/抗体/ウイルス)、ウイルス対照、(細胞/ウイルス)、および細胞対照 (細胞のみ) ウェルでルシフェラーゼ活性測定を平均することによって各試料について決定した。

【0215】

実施例 2 酵母糖蛋白質 PST1 は、破壊された pmr1 遺伝子、あるいは破壊された pmr1 および mnn1 の双方の遺伝子を含む *S. cerevisiae* 突然変異体株と交差反応する。

【0216】

酵母突然変異体株における 2G12 交差反応性蛋白質のスクリーニング。*S. cerevisiae* のグリコシル化経路は広く研究されている。*S. cerevisiae* ゲノムにおけるほとんど全ての ORF の欠失 (Winzeler ら、*Science* 285:901-906, 1999; Giaever ら、*Nature*, 418:387-391, 2002)、および各突然変異体株の入手可能性は、酵母におけるグリカンプロファイルの変化を調べる優れた機会を提供した。異なる突然変異体を、まず、2G12 を用い、突然変異体のいずれかにおける可能な交差反応性糖蛋白質についてスクリーニングした。図 10 に示すように、Mns1, Och1, Mnn9, または Pmr1 を含めた、ER およびゴルジでの炭水化物のプロセスに参与する酵素の欠失を持つ 5 つの単一突然変異体からの細胞溶解物および培養基をテストした。結果は、シグナルは、陽性対照として用いた HIV-1 gp120 糖蛋白質 (293T-発現) からのそれよりも弱かったが、ほぼ 100 および 120 kDa における 2 つの弱いバンドが Δpmr1 突然変異体の細胞溶解物で検出された。

【0217】

PMR1 遺伝子は、Ca²⁺ および Mn²⁺ のゴルジへの輸送に必要であって、および Ca²⁺ 依存性蛋白質ソーティングおよびプロセッシングに参与する高親和性 Ca²⁺/Mn²⁺ P-型 ATPase をコードする (Rudolph ら、*Cell*, 58:133-145, 1989)。PMR1 遺伝子の欠失は、ER からの直接的ないくらかの糖蛋白質野分泌を引き起こし、それにより、ゴルジ装置およびその中の全てのグリカンプロセッシングを迂回すると考えられる (Rudolph ら、*Cell*, 58:133-145

， 1989）。この結果、ポリマンノース外側鎖およびN-結合グリカン上の末端 α -1, 3-結合キャップの欠如をもたらすであろう（Verostekら、Glycobiology 5(7):671-81, 1995）。S. cerevisiaeアルファ-接合因子シグナル配列を含有する、YU-2株からのHIV-1 gp120遺伝子を用いて、 Δ pmr1酵母を形質転換した。図11Aに示すように、24時間の培養後の培地中のほぼ100kDa蛋白質がウエスタンブロットにおいて2G12によって認識された（本明細書中においては、YP100と呼ぶ）。平行成長条件において、2G12反応性YP100は形質転換された細胞からの培地中に示されたが、3～9日の培養後の非形質転換pmr1突然変異体細胞からの培地中では検出できなかった（図11B）。90～160kDaの範囲のいくつかのバンドはこの実験においては非形質転換および形質転換細胞で示されたが、他の実験では示されなかった。これらの結果は、gp120プラスミドの形質転換が、この蛋白質の発現または分泌の増加を引き起こすことを示唆する。

【0218】

gp120形質転換pmr1突然変異体における2G12反応性蛋白質（YP100）は、最初、以下の証拠のためgp120糖蛋白質であると考えられた：2G12検出可能なバンドはgp120プラスミドの形質転換によって誘導され（図2A、11A）、該バンドはgp120形質転換酵母細胞で検出されたが、非形質転換細胞では検出されず（図11B）、それは糖蛋白質の96～100kDaの予測されたサイズを示し、（図2Aおよび11）、それはグリコシル化無しのgp120と同様な分子量である～60kDaの予測されたEndo H消化蛋白質サイズを示した（図3）。さらなる実験は、誘導されたYP100蛋白質が事実gp120であるという疑いを提示した。というのは、gp120に対する抗体を用いて矛盾する結果が観察されたからである（データは示さず）。図10に示すように、 Δ pmr1酵母細胞溶解物における～100kDaおよび120kDaにおける2つの弱いバンドが2G12によって認識された。これらの結果は、2G12反応性100kDaバンドは、発現された外因性HIV-1 gp120または未知の内因性酵母蛋白質いずれかである可能性を有することを示す。

【0219】

Pmr1突然変異体における2G12交差反応性蛋白質の同定。2G12によって認識される蛋白質がgp120または酵母糖蛋白質であるかを決定するために、レクチンアフィニティークロマトグラフィー（図2Bおよび12）およびゲル濾過を用いて、Yp100を部分的に精製した。精製された物質中の蛋白質はNano-LC-MS-MSを用いて同定した。6つのペプチドは未知の酵母蛋白質、PST1に属すると同定された（図13）が、いくつかの他のペプチドはgp120および酵母蛋白質に合致した。PST1蛋白質はそのカルボキシ末端においてシグナリングペプチドおよびGP1アンカーを含有し、これは、それが細胞壁または膜蛋白質であり、分泌できることを示す。成熟蛋白質の400アミノ酸において15の潜在的N-結合糖蛋白質部位があり、これは、3.8%密度を占め、PST1がかなりグリコシル化されていることを示す。

【0220】

Yp100が事実PST1であることを確認するために、ポリクローナル抗体を合成ペプチドに対してウサギで生起させ、抗原免疫アフィニティークロマトグラフィーを用いて精製した。部分的に精製されたYp100蛋白質を2D、続いてクーマシーブルー染色およびウエスタンブロット分析によって分離した。図14Aは、100kDaの分子量、および9～10の等電点（PI）の圧倒的なスポットを示す。同一スポットは2G12（図14B）および抗-PST1ポリクローナル抗体（図14C）によって同一に認識された。PST1蛋白質は9.25の計算されたPIを有する。これらの全ての結果は合致し、2G12交差反応性糖蛋白質は酵母糖蛋白質PST1と非常に似ていることを示唆する。これらの結果は、HIV-特異的中和抗体、2G12に対する結合親和性を示す内因性酵母蛋白質の最初の証拠を示す。

【0221】

PST1の2G12特異性をさらに確認するために、高マンノース型のグリカンの特異

10

20

30

40

50

的に切断する酵素、エンドーL-N-アセチルグルコサミニダーゼH (Endo H) で Y P 1 0 0 を消化した。クーマシーブルーおよび抗-P S T 1 抗体染色によって図 1 5 に示されるように、消化の後、P S T 1 蛋白質の移動は~1 0 0 k D a から~6 0 k D a に変化した(レーン 2 および 4 をレーン 3 および 5 と比較)。P S T 1 蛋白質はEndo H 消化の後に抗-P S T 1 によって依然として認識されたが、それはもはや 2 G 1 2 によって認識されず(レーン 7)、これは、P S T 1 蛋白質上のN-グリカンが、H I V-1 中和M A b 2 G 1 2 によって認識されるエピトープであることを示唆する。S D S-P A G E におけるEndo H 消化の後におけるP S T 1 の分子量(~6 0 k D a)は、成熟蛋白質からのアミノ酸の計算された分子量(4 1 k D a)よりも高い。これはO-結合グリコシル化のためであり得る。というのは、P S T は潜在的なO-結合グリコシル化部位を含有するからである(図 3 3)。これらの結果は、さらに、図 2 および 1 1 に示された 2 G 1 2-反応性蛋白質が、現実には、未知の機能を持つ酵母糖蛋白質P S T 1 であることを確認した。この蛋白質は、外因性遺伝子、少なくともH I V-1 g p 1 2 0 E n v の形質転換によって誘導される。

【0 2 2 2】

二重突然変異体の創製、および二重突然変異体におけるP S T 1 の特徴付け。g p 1 2 0 上の 2 G 1 2 の結合部位は、少なくとも 3 つのN-結合グリカンのクラスターで見出される末端 α 1, 2-結合マンノース残基の立体配座として同定された。酵母における Δ p m r 1 突然変位はゴルジを迂回すると考えられ、かくして、酵母蛋白質上にはM a n 8 グリカンのみが残る。しかしながら、他の証拠は、この突然変異が初期ゴルジ区画を迂回できるに過ぎず、あるいはC a ⁺⁺ の得られた変化はゴルジに見出される酵素の効率に影響することを示唆する。これを踏まえると、ゴルジにおける 2 G 1 2 結合のための最も弱いグリコシル化酵素の 1 つはM n n 1 p であり、これは、 α 1, 2 残基の全ての末端 α 1, 3-結合マンノースキャッピングを担う(N a k a j i m a ら、P r o c N a t A c a d S c i U S A 7 2 : 3 9 1 2-3 9 1 6, 1 9 7 5)。P S T 1 のこのキャッピングを妨げるために、酵母二重突然変異体株 Δ m m n 1 Δ p m r 1 を作成した。M N N 1 およびP M R 1 遺伝子におけるO R F ノックアウトを持つ酵母欠失株を接合させ、胞子を形成させて、 Δ m m n 1 Δ p m r 1 ハプロイドを生じさせた。 Δ m m n 1 および Δ p m r 1 表現型の選択および確認のために、コロニーP C Rを行った。(データは示さず)。遺伝子欠失当たり 4 つのユニークなプライマーは、各O R F が完全に欠失しており、K a n M X 4 モジュールで置き換えられていることを確認した。

【0 2 2 3】

5 つの二重突然変異体株(Δ m m n 1 Δ p m r 1)を、2 G 1 2 でのウエスタンブロットを用いてスクリーニングした。予測されるように、従前の実験で見られた~1 0 0 k D a バンド(図 1 0 参照)は、全ての 5 つの突然変異体株において 2 G 1 2 によって検出された(図 1 6)。事実、シグナルの増強があるように見え、これは、末端 α 1, 3-M a n キャップの喪失およびその蛋白質上のより多くの α 1, 2-M a n の露出によるものらしい。この仮説は、図 1 7 および 1 8 に示される以下の実験的研究によって確認された。

【0 2 2 4】

グリコシル化経路に関与する遺伝子の欠失の効果を分析するために、他の酵母単一突然変異体と共に、この二重突然変異体におけるP S T 1 蛋白質でのサイズ変化を調べた。異なる株からの細胞溶解物(図 1 7 A、上部)および培養基(図 1 7 B、上部)を抗-P S T 1 ポリクローナル抗体でのウエスタンブロットを用いて分析した。P S T 1 は、 Δ m m n 1 Δ p m r 1 二重突然変異体の細胞溶解物でのみ検出された。培養基は、野生型株における $\geq$ 2 0 0 k D a での超グリコシル化P S T 1 の存在を示す。O c h 1 突然変異体におけるP S T 1 は、ほぼ 1 0 5 k D a への有意な移動シフトを示し、これは、p m r 1 単一突然変異体におけるそれと同様なサイズで移動した。これらの結果は、p m r 1 突然変異体におけるP S T 1 上の高マンノースの外側鎖は、o c h 1 突然変異体におけるように付加されていなかったことを示唆する。二重突然変異体におけるP S T 1 は、それがp m r 1 またはo c h 1 において移動したよりも速くさえ移動し、これは、二重突然変異体にお

けるMan₈GlcNAc₂コア上での末端α1, 3-Manの喪失を示唆する。

【0225】

PST1とは対照的に、もう1つの糖蛋白質GP38は、全てのテストした株からの細胞溶解物に存在した(図17A、下部)。この蛋白質のサイズは、株が突然変異するにつれて、劇的に変化した。野生型およびΔmnn1は、200kDaを超える大きな超グリコシル化サイズを示した。~90kDaにおけるバンドはΔoch1で示され、他方、~110kDaにおけるバンドはΔpmr1で示され、これは、各々、これらの2つの突然変異体における超グリコシル化の完全な喪失および切形を示唆する。pmr1mnn1二重突然変異体におけるGP38は、pmr1単一突然変異体におけるそれよりもわずかに小さなサイズを示し、これは、これらの2つの突然変異体で見られるPST1と合致するα1, 3-結合マンノースキャップの喪失を示す。加えて、GP38は、野生型からの、またはmnn1突然変異体からのいずれの培地においても検出できなかった(図17B、下部)。興味深いことには、それは、pmr1またはoch1の突然変異によって強く誘導された。これは、さらに、Pmr1pが、Och1pと同様に、少なくともいくつかの蛋白質においてグリコシル化で重要な役割を演じることを示す。しかしながら、Δoch1突然変異は、外側鎖開始を担う遺伝子の欠失による、超グリコシル化の喪失をほとんど保証し、他方、Δpmr1はそのような鎖の延長の効果に影響するように見える。これは、PST1のような、超グリコシル化の完全な喪失を有するいくつかの蛋白質、およびGp38のような、低下した超グリコシル化を有する他の蛋白質をもたらす。pmr1単一突然変異体およびpmr1mnn1二重突然変異体におけるGP38のサイズの変化は、これらの2つの突然変異体におけるPST1と同一パターンを示し、これは、ゴルジに加えられたα1, 3-Manの欠失を示す。

【0226】

mnn1p機能の喪失を確認するために、末端α1, 3-Manおよびα1, 2-Manの存在を、各構造に特異的な抗体でのウェスタンブロットによって分析した。図18の下方パネルは、pmr1単一突然変異体およびpmr1mnn1二重突然変異体におけるPST1発現のレベルが同様であることを示す。しかしながら、バンドは、pmr1単一突然変異体において抗-α1, 3-Man特異的ポリクローナル抗体によって検出され、他方、この活性は二重突然変異体において完全に喪失していた(図18、上部パネル)。対照的に、抗-α1, 2-Man MA b 2G12は、反対の結果を示した。二重突然変異体における2G12シグナルは、単一突然変異体におけるそれよりもかなり強かった(図18、中央パネル)。och1突然変異体においては、抗-α1, 2-Man (2G12)はそうではないが、抗-α1, 3-Man抗体は、70~150kDaを超える範囲の強力なスミアを検出し、これは、α1, 3-Man構造を持つ多数の糖蛋白質が抗-α1, 3-Man抗体によって検出されることを示す。部分的に精製されたYp100はPST1抗体および2G12に対して反応性を示したが、抗-α1, 3-Man抗体に対しては示さなかった。

【0227】

2G12 MA bは天然および変性したPST1糖蛋白質双方と交差反応する。2G12がPST1の天然形態上のグリカンを認識するか否かをテストするために、イムノブロットを行った。二重突然変異体からの培養基中の蛋白質を2G12で沈殿させ、続いて、抗-ヒトIgG-アガロースと共にインキュベートした。免疫複合体をSDS-試料緩衝液を用いて溶出させ、4~20% SDS-PAGEで分離した。ついで、ブロットを抗-PST1ポリクローナル抗体でプローブした。図19に示されるように、強力なシグナルは出発物質において抗-PST1によって検出され(レーン1)、プレクリアビートを通る流れで検出され(レーン2)、および流出で検出され(レーン6)、しかしながら、上清および洗浄液においては検出されないか、または弱く検出された(レーン3~5)。これらの結果は、2G12が天然PST1蛋白質を認識し、炭水化物エピトープに対して高い親和性を有することを示す。というのは、ほとんどのMA bは蛋白質を沈殿させないからである。

10

20

30

40

50

【0228】

PST1 遺伝子および蛋白質の背景情報

Pst1p (プロトプラスト分泌蛋白質1) はSPS2ファミリーに属する。それは、グリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) アンカーによって膜に付着され、かつ再生するプロトプラストによって分泌される蛋白質である。Pst1pは、Rlm1pによって媒介される細胞一体性経路の活性化に際してのそのアップレギュレーション、およびFks1pによって媒介される細胞壁損傷によるそのアップレギュレーションのため、細胞壁一体性で重要であると考えられる。

【0229】

遺伝子およびファミリー：その前駆体は、19アミノ酸の予測されたシグナリングペプチド、およびGPIアンカー結合のための25アミノ酸のC-末端ドメインを持つ444アミノ酸を有する。前駆体の分子量および等電点は、各々、45, 776 Daおよび9.91を有する。それは非常に多数のN-結合グリコシル化部位を有し、セリンおよびスレオニンが豊富であり、これはかなりO-グリコシル化されているようである。その成熟蛋白質は、41, 260 Daの予測される分子量、および9.25の等電点を持つ400アミノ酸を有する。PST1は15の潜在的N-結合グリコシル化部位を含有し、これは、該400アミノ酸の3.8%を占める。合計118のセリンおよびスレオニン残基があり、これは該400残基の29.5%を占める。これらのセリンおよびスレオニンのうちのいくつかは、O-結合グリコシル化部位である (図33)。

【0230】

PST1はEcm33に非常に似ており、全蛋白質にわたって58%同一性および79%同様性を示す。PST1およびEcm33のホモログが酵母および真菌の異なる種で見出されたが、哺乳動物、植物、昆虫、虫および鳥類を含めたいずれかの他の種では見出されていない (図20)。それらは同様なまたは重複する活性を有するが、それらは機能的には冗長ではない (Pardo M, Microbiology, 150: 4157-4170, 2004)

機能：PST1の分子機能は未知である。それは細胞壁の組織化および生物発生に関与する。PST1およびEcm33は共にGPI-アンカー細胞壁蛋白質であり、細胞表面に局所化される。

【0231】

発現、誘導、および分泌：PST1 (YDR055W) は、最初に、グルスラーゼ処理での再生条件でインキュベートして、プロトプラストが得られた*S. cerevisiae*の培養基で見出された (Padroら、Yeast, 15: 459-472, 1999) グルカンシンターゼのサブユニットの1つであるFKS1の破壊は、YDR055W RNAおよび蛋白質の発現レベルをアップレギュレートした (Terashimaら、Mol Gen Genet, 264-64-74, 2000)。そのmRNAの発現レベルは、MAPキナーゼ、Mpk1/Slt2の活性化、または酵母細胞壁の一体性に挑戦する環境ストレスを引き起こす上昇した温度によってアップレギュレートされることが見出された (Jungら、Mol. Microbiol. 34 (5): 1049-57, 1999)。

【0232】

考え併わせると、酵母糖蛋白質は、高マンノース型のグリカン上のMan α 1, 2-Manから構成されるエピトープに結合するHIV-1の広く中和するMAb 2G12と交差反応することが見出された。このかなりグリコシル化された蛋白質は、GPIアンカーを通じて結合された細胞壁または膜蛋白質であるPST1であると同定された。それは分泌蛋白質であって、グリコシル化経路に関与する遺伝子の形質転換または欠失後にアップレギュレートされる。

【0233】

実施例3 三重突然変異体の構築、Och1/Mnn1/Mnn4三重突然変異体における2G12交差反応性糖蛋白質の同定

10

20

30

40

50

I. 酵母三重突然変異体の構築および特徴付け：

酵母接合、および $\Delta mnn1 \Delta mnn4 \Delta och1$ 三重突然変異体の確認

g p 1 2 0 で見出されたものと同様な糖蛋白質を生産するために酵母を用いる可能性を探索するためには、グリコシル化経路を突然変異させなければならなかった。3つの蛋白質は、*S. cerevisiae* に特異的なN-結合グリカンを作り出すのに重要であり；OCH1pは超マンノシル化に必要な最初の $\alpha 1$ ，6マンノース残基を開始させ（Leehlerら、FEB S Lett.，370（1-2：41-5，1995）、MNN1pは $\alpha 1$ ，2残基の全ての末端 $\alpha 1$ ，3-結合マンノースのキャッピングを担い（Nakajimaら、Proc Nat Acad Sci USA，72：3912-3916，1975）、およびMNN4pはマンノシルリン酸化の陽性レギュレーターである（Jigamiら、Biochim Biophys Acta，1426（2）：335-45，1999）。これらの遺伝子のORFノックアウトを持つ酵母欠失株を接合させ、胞子を形成させて、 $\Delta mnn1 \Delta mnn4$ および $\Delta mnn1 \Delta och1$ ハプロイドを得た。 $\Delta och1$ 表現型（Leeら、Proc Natl Acad Sci，97（22）：12679-84，1999）によって呈される温度感受性のため、これらのクローンの選択は、37℃におけるYPDでのゆっくりとした成長によって決定した。 $\Delta mnn1$ および $\Delta mnn4$ 表現型の選択および確認のためにコロニーPCRを行った（データは示さず）。

【0234】

得られた二重突然変異体ハプロイドを接合させ、胞子形成させて、ハプロイド、三重突然変異体、 $\Delta mnn1 \Delta mnn4 \Delta och1$ を得た。 $\Delta mnn4$ および $\Delta och1$ 表現型のスクリーニングは、前記したように、 $\Delta och1$ については37℃におけるYPDでのゆっくりとした成長、および $\Delta mnn4$ および $\Delta och1$ についてはPCRを用いて行った。図23Aは、4つのクローンについてのコロニーPCRスクリーニングのサンプルを示し、3つのクローンは $\Delta mnn4$ および $\Delta och1$ 表現型双方の存在を示す。

【0235】

6つの推定三重突然変異体をPCRによってテストして、 $\Delta mnn1 \Delta mnn4 \Delta och1$ 遺伝子型を確認した。図21Bは、これらのクローンのうち2つ、 $\Delta mnn1 \Delta mnn4 \Delta och1-2-5$ および $\Delta mnn1 \Delta mnn4 \Delta och1-2-6$ についての結果を示す。遺伝子欠失当たり4つのユニークなORF-特異的プライマーにより、各遺伝子が完全に欠失されたことが確認された。内部ORF-特異的プライマー（MNN1B、MNN4B、OCH1B、MNN1C、MNN4CおよびOCH1C）、および上流または下流プライマー（MNN1A、MNN4A、OCH1A、MNN1D、MNN4DおよびOCH1D）の組合せの結果、もしORFが存在すればPCR産物が得られる（すなわち、MNN1A+MNN1B、MNN1C+MNN1Dなど）。図面で見られるように、双方のクローンは、MNN1、MNN4、およびOCH1に対する双方のプライマー対についてPCR産物を示さず、欠失遺伝子型が確認された。各ORF特異的プライマー対もまた、陽性対照としてのWTに対してテストした（結果は示さず）。

【0236】

対照的に、上流または下流プライマーおよび内部KanMX特異的プライマー（KanBおよびKanC）の組合せの結果、もしORFがKanMXモジュールで置き換えられていれば、PCR産物がもたらされる。図23Bに見られるように、遺伝子欠失当たり双方のプライマー対でテストした場合、これらのクローンの双方は予測されたサイズにおいてPCR産物を示す。

【0237】

ハプロイド三重突然変異体のうち2つ、 $\Delta mnn1 \Delta mnn4 \Delta och1-2-6$ および $\Delta mnn1 \Delta mnn4 \Delta och1-2-5$ を接合させて、ジプロイド三重突然変異体、 $\Delta mnn1 \Delta mnn4 \Delta och1-DIP$ を形成した。この株は、ELISA、免疫蛍光および免疫化を含めた、野生型ジプロイド株、INVSclに対するいずれかの将来の比較研究のために用いられるであろう。

【0238】

ELISAによる、三重突然変異体における、 $\alpha 1, 3$ -マンノースの喪失および2G12交差反応性の増加

$\Delta mnn1 \Delta mnn4 \Delta och1$ 突然変異体酵母株は、 $Man_8 GlcNAc_2$ グリカンの大部分を持つ糖蛋白質を生じることが予測される。これらのオリゴ糖の存在を間接的に確認するために、三重突然変異体を、2つのマンノース-特異的抗体、2G12および抗- $\alpha 1, 3$ -結合マンノース（抗- $\alpha 1, 3$ ）に対する交差反応性についてテストした。 $\alpha 1, 3$ -結合マンノース残基に特異的な免疫血清は、INVSc1全細胞でウサギを免疫化し、血清を $\Delta mnn1$ 細胞に吸着させることによって調製した。（Raschkeら、J Biol Chem, 248(13):4660-6, 1973; and Ballou, J Biol Chem, 245:1197-1203, 1970）得られた血清は、Mnn1pによって $\alpha 1, 2$ -結合残基をキャップするのに用いられる末端 $\alpha 1, 3$ -結合マンノース残基に特異的な抗体が豊富であることが予測される。対照的に、2G12は、そのような残基のクラスターに拘わらず、コアN-結合グリカンで見出される末端 $\alpha 1, 2$ -結合マンノース残基に対して特異的であることが知られている（Scanlanら、J Biol Chem, 276:7306-21, 2002）

WTについての無傷全酵母細胞（INVSc1）および $\Delta mnn1 \Delta mnn4 \Delta och1$ -DIP細胞を用いて、ELISAプレートを被覆し、2G12および $\alpha 1, 3$ 特異的Abを用いてプローブした。図22Aに見られるように、抗- $\alpha 1, 3$ 抗体は野生型細胞に対して高い親和性を示し、三重突然変異体は低い親和性を示す。SF162および野生型酵母マンナンは、各々、陰性および陽性対照として含めた。これらの結果は、三重突然変異体における末端 $\alpha 1, 3$ -結合マンノース残基の喪失を示す。三重突然変異体に対する抗- $\alpha 1, 3$ のいずれかの残存親和性は、吸着プロセスが完全には効果的でない事実に帰することができ；依然として存在する他の酵母-特異的抗体は、三重突然変異体上に暴露されたエピトープに結合することができる（すなわち、細胞壁蛋白質および β -グリカン）。

【0239】

図22Bは、2G12が、野生型への結合において交差反応無くして、三重突然変異体全細胞に結合することができたことを示す。この親和性は、 $10 \mu g/ml \sim 1 \mu g/ml$ の間で見られた。SF162および野生型酵母マンナンは、各々、陽性および陰性対照として含めた。これらの結果は、三重突然変異体における末端 $\alpha 1, 3$ -結合マンノース残基の喪失を確認するのみならず、コア Man_8 グリカンで見出される $\alpha 1, 2$ -結合マンノースの結果としての露出も示す。より重要なことには、2G12に結合する $\Delta mnn1 \Delta mnn4 \Delta och1$ 酵母能力は、酵母細胞壁で見出される1以上の蛋白質上の2G12-様エピトープの存在を示唆する。

【0240】

免疫蛍光による三重突然変異体での $\alpha 1, 3$ -マンノースの喪失、および2G12交差反応性の増加

酵母における末端 $\alpha 1, 3$ マンノース残基は $\alpha 1, 2$ -結合マンノース残基をキャップするのみならず、高度に免疫原性であり、それらを、HIV gp120上で見出されるグリカンから発散したものとする。 $\Delta mnn1 \Delta mnn4 \Delta och1$ 株における $\alpha 1, 3$ -結合マンノース残基の喪失をさらに確認するために、我々は、無傷全細胞での抗- $\alpha 1, 3$ -Manを用いて免疫蛍光を行った。図23（パネルAおよびC）に示されるように、野生型細胞壁は $\alpha 1, 3$ -結合マンノース残基に特異的な抗血清に対して強い反応を示し、他方、ジプロイド三重突然変異体は同一希釈においてシグナルを示さない。対照として、酵母細胞壁の共通の成分、 α -マンナンおよび β -グルカンを含む酵母ザイモサンに特異的な抗体は、免疫蛍光によると、INVSc1および $\Delta mnn1 \Delta mnn4 \Delta och1$ 全細胞双方に対して同様なシグナルを与えることが判明した（図23、パネルBおよびD）。これらの結果は、MNN1蛋白質に特異的な $\alpha 1, 3$ -マンノシルトランスフェラーゼ活性の喪失を示す。それらの喪失は、三重突然変異体の細胞壁で見出される全て

の糖蛋白質上に $\alpha 1, 2$ 結合末端マンノース残基をかなり厳格に残すであろう。

【0241】

三重突然変異体での $\alpha 1, 2$ マンノース残基のこの露出を確認するために、次いで、2G12を、免疫蛍光によって抗-ザイモサンとの共一局所化についてテストした。図24（パネルA、B、C）は、2G12が $\Delta mnn1 \Delta mnn4 \Delta och1$ DIP細胞に強く結合し、細胞壁上の抗-ザイモサンと共一局所化されることを示す。野生型酵母は抗-ザイモサンへの結合を示すに過ぎず、2G12についてシグナルが見られない（パネルD、E、F）。これらのデータは、全細胞ELISA結果と同様に、三重突然変異体で見出される糖蛋白質が、天然条件下で2G12に結合する能力を持つ露出された $\alpha 1, 2$ 結合マンノース構造を含有することを示す。三重突然変異体酵母細胞のサイズは野生型細胞のそれよりも顕著に大きいことに注意するのは興味深い。

10

【0242】

ウエスタンブロットによる三重突然変異体における、 $\alpha 1, 3$ マンノースの喪失、および糖蛋白質上の $\alpha 1, 2$ マンノースの露出

これらの2G12-反応性蛋白質は、 $\Delta mnn1 \Delta mnn4 \Delta och1$ 酵母の細胞壁に出現するが、野生型では存在しない。しかしながら、これは、2G12に対する親和性についての第一の理由として露出された $\alpha 1, 2$ 結合マンノース残基を直接的に示唆するものではない。ウエスタンブロットを用い、酵母グリコシル化突然変異体のパネルの中での2G12-反応性蛋白質の存在をテストした。図25左側パネルに見られるように、二重突然変異体 $\Delta mnn1 \Delta och1$ および三重突然変異体 $\Delta mnn1 \Delta mnn4 \Delta och1$ からの溶解物のみが、2G12によって検出される特異的蛋白質バンドを示した。事実、これらのグリコシル化突然変異体の双方は、2G12に対して反応性である同一数の蛋白質（ $\sim 4 \sim 5$ ）を有するようになる。これは、他の酵母突然変異体の中のシグナルの欠如と共に、 $\Delta mnn1 \Delta mnn4 \Delta och1$ および $\Delta mnn1 \Delta och1$ 突然変異体におけるコアMan8の存在が、これらの蛋白質に対する2G12の特異性において重要な役割を演じることを示唆する。加えて、多数の露出した $\alpha 1, 2$ 結合マンノース残基を持つ超グリコシル化N-結合グリカンを持つ $\Delta mnn1$ および $\Delta mnn1 \Delta mnn4$ 突然変異体で見られるシグナルの欠如は、さらに、2G12結合におけるMan8グリカンの唯一の役割を示唆する。

20

【0243】

酵母グリコシル化突然変異体のこのパネルを、抗- $\alpha 1, 3$ でやはりプローブして、 $\alpha 1, 3$ 結合マンノースキャップの存在または喪失を確認した。図25右側パネルは、抗- $\alpha 1, 3$ -Man血清が $\Delta mnn1 \Delta och1$ および三重突然変異体を含めた、 $\Delta mnn1$ 表現型を持ついずれの突然変異体上の蛋白質も検出しないことを示す。これは、さらに、2G12が認識しない、 $\Delta mnn1$ および $\Delta mnn1 \Delta mnn4$ 株と共に、三重突然変異体および $\Delta mnn1 \Delta och1$ 上の $\alpha 1, 2$ エピトープの露出を示唆する。第二の同一のウエスタンブロットを（一次抗体なくして）モックインキュベートし、株のいずれにおいても有意なシグナルを示さず、それにより、ヤギ抗-ヒト二次抗体との相互作用を排除した（結果は示さず）。

30

【0244】

2G12に対する三重突然変異体蛋白質の反応性が酵母株の遺伝子型によるものであることを確認し、補充的な機能を持つ他の蛋白質は発現されないことを確認するために、異なる三重突然変異体クローンを分析した。合計して6つの $\Delta mnn1 \Delta mnn4 \Delta och1$ 酵母株は、 $\Delta mnn1 \Delta mnn4 \times \Delta mnn1 \Delta och1$ 雑種から得た。各々はYPD+KC1プレートで成長する別々のハプロイドコロニーから拾い、3つの欠失を含むことを確認した（クローン2-5および2-6については図21参照）。図26においては、全ての6つのクローンは、ウエスタンブロットによる同一蛋白質に対する2G12反応性を示す。これは、2G12に対するこれらの蛋白質の反応性が、突然変異したグルカンをもたらす三重突然変異体の遺伝子型に最もよるものであることを示す。

40

【0245】

50

三重突然変異体でのグリカンの確認

$\Delta m n n 1 \Delta m n n 4 \Delta o c h 1$ 糖蛋白質に存在するオリゴ糖の最終確認として、MALDI-TOFおよびNP-HPLCプロファイリングを、全酵母細胞抽出物から抽出されたN-結合グリカンで行った。図26において、MALDI-TOFは、 $Man_8 GlcNAc_2$ が三重突然変異体抽出物において圧倒的なグリカンであり、非常に少量の $Man_9 GlcNAc_2$ および $Man_5 GluNAc_2$ が存在することを示す。 Man_8 グリカンのレベルは Man_9 または Man_5 いずれかのそれよりも20倍高く、従って、 $Man_8 GlcNAc_2$ は三重突然変異体における合計グリカンの90%を超えて表す。NP-HPLC結果はMALDI-TOFと合致するように見え、従って、 Man_8 は $\Delta m n n 1 \Delta m n n 4 \Delta o c h 1$ 細胞抽出物に存在する圧倒的なN-結合グリカンである。

10

【0246】

一緒にすると、これらの結果は、 $\Delta m n n 1 \Delta m n n 4 \Delta o c h 1$ 細胞に存在するグリカンの型は、コアN-結合グリカンで見出されるものと同様に、圧倒的に $Man_8 GlcNAc_2$ であることを確認する。これは、高度に免疫原性の末端 $\alpha 1, 3$ -結合マンノース残基の喪失のみならず、超マンノシル化外側鎖の喪失も示す。末端 $\alpha 1, 2$ -結合マンノース残基の得られた露出は、この突然変異体で見出された特異的細胞壁蛋白質に対する2G12の親和性の背後にある理由のもっともなものである。

【0247】

II. 酵母三重突然変異体における2G12交差反応性糖蛋白質の同定および確認

酵母細胞からの2G12-反応性蛋白質の2D分離

20

ELISA、免疫蛍光およびウエスタンブロットによって2G12に対する結合を示す $\Delta m n n 1 \Delta m n n 2 \Delta o c h 1$ 酵母におけるこれらの蛋白質は、2G12-様抗体の生産のための有望な抗原である。これは、N-結合グリカンのクラスターに見出される $\alpha 1, 2$ -結合マンノース残基の立体配座よりなる2G12エピトープを模倣する能力を持つ酵母で生産された最初のそのような抗原を表すであろう。かくして、この研究は、これらの蛋白質の部分的精製および同定で続けた。細胞壁および原形質膜における糖蛋白質の圧倒性のため、異なる遠心分離を用いて、細胞質蛋白質から膜-結合蛋白質をかなり分離した。log-相 $\Delta m n n 1 \Delta m n n 4 \Delta o c h 1$ -DIP細胞を溶解させ、遠心分離に付して、細胞質、ゴルジ複合体およびエンドソーム蛋白質を取り出した。ほとんどの空胞、核、ERおよび原形質膜蛋白質を含有するペレットを1% Triton X-100に再度可溶化させて、高度に不溶性の蛋白質を分離した。図28Aに見られるように、2G12-結合蛋白質は主として膜画分に見出され、これらの蛋白質の小さな割合はTritonに可溶性であることが判明した。これらの結果は、これらの蛋白質が主として細胞壁-または原形質膜-結合のように見える点で、全細胞ELISAおよび免疫蛍光と合致する。

30

【0248】

膜-結合に加えて、従前の結果は、これらの2G12-反応性蛋白質が高度にグリコシル化されていることも示唆した。従って、コンカナバリンA (ConA) レクチンアフィニティークロマトグラフィーを用いてTriton-可溶性画分に見出される2G12-反応性蛋白質を精製した。図28Bは、これらの蛋白質がConAに対して高い親和性を有し、かつ溶出させるのにより過酷な条件(1% SDS)を必要とする、(0, 5Mメチルマンノピラノシド)を用いる競合結合によって十分に溶出させることができないことを示す。

40

【0249】

ConA溶出物からの得られた蛋白質は、2G12に結合するものを含めた、 $\Delta m n n 1 \Delta m n n 4 \Delta o c h 1$ 細胞に見出される高度にグリコシル化された膜蛋白質を表す。同定のためにこれらの蛋白質を効果的に分離するのに、2-Dゲル電気泳動をこの画分で行った。2つの別々のアリコートでpH4.0~7.0のIPGストリップ上で泳動させ、続いて、4~12%グラジエントゲルでSDS-PAGE分離した。1つのゲルをシプロルビーによって染色し、他のゲルを2G12を用いるウエスタンブロット用のニトロセル

50

ロースに移した。図 28 C は、2 つの大きなスポットはウエスタンブロットによって同定されることを示し、これは、シプロルビー染色ゲルでの可視化された 2 つのスポットに対応した（示さず）。これらのスポットを、トリプシン消化およびナノ LC / MS / MS 同定のために切り出した。（～ 110 kDa における）より高い 2 D スポットは、3 つの酵母糖蛋白質、Gas5（5 ペプチド）ECM33（4 ペプチド）および Gas1（2 ペプチド）からのペプチドを同定した。（～ 95 kDa における）より低い 2 D スポットは、単一の酵母糖蛋白質 YJL171c からの 7 ペプチドを同定した。これらの蛋白質は、2 G12-反応性を持つより高い分子量の蛋白質の全てまたはほとんどを表す。同定されなかったこのサイズ範囲においてより多くのそのような蛋白質があり得るが、このスクリーニングで同定されなかった～ 35 kDa 蛋白質が明らかに存在する（図 25 および 28 参照）。この蛋白質の同一性は知られていないが、現在調査中である。

10

【0250】

培養上清からの 2 G12-反応性蛋白質の 1-D 分離

細胞溶解物に加えて、酵母三重突然変異体の培養上清は、2 G12-反応性を持つ糖蛋白質を含有することが判明した。INVScl および Δmn n1 Δmn n4 Δoch1 細胞からの培養基を、ウエスタンブロットによって 2 G12-反応性についてテストした。図 29 A は、三重突然変異体の培養基における 2 G12 MA b に対する強い反応性を持つ少なくとも 4 つのバンドの発現を示し、他方、野生型酵母上清はシグナルを示さない。

【0251】

培地中のこれらの 2 G12-反応性蛋白質は、天然による、あるいは三重突然変異体の細胞壁構造の変化により、分泌された糖蛋白質、または培地に放出された細胞壁蛋白質を表すことができる。事実、これらの 4 つの蛋白質のサイズは、細胞溶解物で見出された 2 G12-反応性蛋白質と同様に見え（図 25 A および 28 A 参照）、シグナルの圧倒性は 90～115 kDa で見られ、1 つのバンドは～ 37 kDa で見られる。これは、これらが細胞溶解物で見出された同一蛋白質であり得ることを示唆する。それにも拘わらず、これらの蛋白質は、2 G12 エピトープを模倣する他の抗原を表し得るという事実は、それらの同定を保証する。Δmn n1 Δmn n4 Δoch1 酵母からの上清を、糖蛋白質の部分的精製のために、ConA から直接適用した。培養上清中の蛋白質は、ConA に対して非常に高い親和性を示し、メチルマンノーピラノシドを用いる競合結合を介して溶出させることができなかった。従って、2 G12-反応性蛋白質は、ConA ビーズを SDS-PAGE 負荷緩衝液で煮沸することによって溶出させた（図 29 B）。この SDS 溶出物は、大規模な（10 cm × 16 cm）10 % SDS-PAGE ゲルを用いて分離した。ゲルのクーマシーブルー染色は 5 つの別々の蛋白質バンドを示し、その各々をゲルから切り出した（データは示さず）。これらのバンドは、SDS-PAGE ミニゲルに再度負荷し、ウエスタンブロットによって 2 G12 でプローブすることによって 2 G12 反応性についてテストした。（110 kDa および 95 kDa における）2 つの蛋白質バンドは、2 G12 に結合することが判明し（結果は示さず）、切り出した。これらの蛋白質はトリプシンで消化し、ペプチド同定のために、Micromass Q-ToF 2 でのナノ LC / MS / MS によって分析した。110 kDa バンドはゲルスライス中で唯一の蛋白質を同定し、4 ペプチドは ECM33 にマッチし、同一の蛋白質は膜画分において 110 kDa で 2 D によって同定された。95 kDa バンドはゲルスライスにおいて唯一の蛋白質を同定し、4 ペプチドは酵母糖蛋白質 Gp38 にマッチする。

20

30

40

【0252】

これらの 2 つの蛋白質は、おそらくは、培養基における 2 G12-反応性蛋白質の半分を表すに過ぎず（図 29 A 参照）；事実、培養上清に 2 G12-反応性であるように見える 4 つのバンドがある。これらの 2 つの同定されていない蛋白質は、細胞溶解物で見出されたものと同一であるらしく、あるいは Gp38 のように、2 G12 に結合する能力を持つ未知の蛋白質を表し得る。これらの同定されていない蛋白質は依然として調査中である。

。

【0253】

50

免疫沈澱による 2 G 1 2 - 反応性蛋白質の確証

2 G 1 2 - 反応性酵母糖蛋白質としての E C M 3 3、G a s 1、G a s 5、G P 3 8 および Y J L 1 7 1 c の同定は間接的に行った； L C / M S / M S を用いて、ウエスタンブロットニングによって、2 G 1 2 に結合したゲル電気泳動におけるバンドを同定した。2 G 1 2 に対するこれらの蛋白質の親和性を確認するために、 $\Delta m n n 1 \Delta m n n 4 \Delta o c h 1$ 細胞の細胞溶解物および培養基を 2 G 1 2 で免疫沈澱させ、これらの蛋白質に対する抗体で得られたウエスタンブロットをプローブした。図 3 0 A は、2 G 1 2 によって培養上清から沈殿した 4 つの蛋白質 G a s 1、E C M 3 3、Y J L 1 7 1 c、および G P 3 8 の同定を示す。G a s 1、E C M 3 3 および Y J L 1 7 1 c は 2 D 分離によって三重突然変異体の細胞溶解物によって同定され、双方の実験において同様なサイズ、各々、 $\sim 115 \text{ kDa}$ 、 $\sim 110 \text{ kDa}$ 、および $\sim 95 \text{ kDa}$ を示す。G B 3 8 は、元来、三重突然変異体の培養上清によって同定されたが、ここでは、2 G 1 2 によって細胞溶解物から沈殿させることもできることを示す。G a s 5 は比較的低い親和性でもって 2 G 1 2 でもやはり沈殿し（データは示さず）、これは、他の同定された蛋白質よりも N-結合グリカンのより少ない数およびより低い密度によるものであろう（図 3 8）。

【0254】

図 3 0 B は、イムノブロットでの 3 つの蛋白質、P S T 1、E C M 3 3、および G P 3 8 の同定を示す。これらの蛋白質は、2 G 1 2 によって培養上清から沈殿した。E C M 3 3 および G P 3 8 もまた、1 D 分離によって三重突然変異体の培養基で同定され、双方の実験において同様なサイズ、各々、 $\sim 110 \text{ kDa}$ および $\sim 95 \text{ kDa}$ を示す。興味深いことには、P S T 1 は、元来、 $\Delta p m r 1$ 酵母の培養上清において 2 G 1 2 - 結合蛋白質として同定された（実施例 2）。ここで、E C M 3 3 および G P 3 8 と比較すると、P S T 1 の発現レベルは三重突然変異体の上清において非常に低いことが理解でき（図 3 0 B、レーン 1）、これは、この蛋白質がなぜ元来はこの突然変異体で同定されなかったかを説明することができる。

【0255】

これらの結果は、この免疫沈澱実験の天然条件下で 2 G 1 2 に結合する E C M 3 3、G a s 1、G a s 5、G P 3 8、P S T 1 および Y J L 1 7 1 の能力を確認する。我々の従前の実験で分析すると、これらの酵母糖蛋白質は、H I V - 1 g p 1 2 0 糖蛋白質で見出された 2 G 1 2 エピトープを模倣する能力を有し、それにより、ウエスタンブロットニング、免疫沈澱、免疫蛍光および E L I S A による、この抗体への結合を引き起こすように見える。

【0256】

2 つの 2 G 1 2 - 反応性酵母蛋白質についての糖蛋白質サイズシフト

2 G 1 2 エピトープを模倣する潜在能力を持つ 6 つの酵母糖蛋白質の発見および同定はこれらの蛋白質についてのグリカン構造に関するさらなる調査を保証する。これらの蛋白質の 2 つ、E C M 3 3 および G P 3 8 は、ウエスタンブロットによって酵母グリコシル化突然変異体のパネルに対して分析した。E S M 3 3 は、細胞壁安定性で重要なグリコシルホスファチジルイノシトール (G P I) - アンカー蛋白質であり (P a r d o, M i c r o b i o l o g y 150:4157-70, 2004)、および g p 3 8 は細胞壁-関連分泌蛋白質である (D e s t r u e l l e, M o l. C e l l. B i o l. 14(4):2740-54, 1994)。図 3 1 (左側パネル) は結果を示す。細胞溶解物においてこれらの蛋白質の双方は、異なるレベルにおけるにも拘わらず、全ての株に存在する。加えて、これらの蛋白質は $\Delta o c h 1$ 遺伝子型を含まないいずれの株においても超マンノシル化されている。事実、 $\Delta o c h 1$ 遺伝子型は双方の蛋白質についての 80 kDa よりも大きなサイズの劇的なシフトを引き起こし、G P 3 8 はより有意な変化を示す。これらの株の綿密な分析は、双方の蛋白質において、 $\Delta o c h 1$ および $\Delta o c h 1 \Delta m n n 1$ 株の間で顕著なサイズのシフトがあることを示し、これは、末端 $\alpha 1$, 3-結合マンノース残基の喪失を示す。 $\Delta m n n 1 \Delta m n n 4 \Delta o c h 1$ 突然変異体における最終蛋白質サイズは、2 G 1 2 によって沈殿された蛋白質と同一のサイズのように見える；E C M 3 3

については～110kDaおよびGP38については～95kDa（図31参照）。 $\Delta mnn4$ 突然変異体におけるホスホマンノースの喪失によって引き起こされたいずれのサイズのシフトもSDS-PAGEゲルで見られず、これは、該変化が余りにもわずかであることを示唆する。

【0257】

培養上清において（図31、右側パネル）、OCH1遺伝子を持ついずれの株からの存在するGP38またはECM33はほとんどまたは全くない。 $\Delta och1$ 含有酵母突然変異体の弱い細胞壁の結果、これらの蛋白質の培地への放出がもたらされるようである。しかしながら、 $\Delta mnn1 \Delta mnn4$ 突然変異体で見出された～200kDa、および $\Delta och1$ 含有突然変異体で見出される110～115kDaバンドを比較することによって、同様なサイズのシフトがECM33で見ることができる。再度、これは外側鎖超マンノシル化の欠如を示す。また、 $\Delta mnn1$ 突然変異からの同様なサイズシフトは、 $\Delta och1$ および $\Delta och1 \Delta mnn1$ 突然変異体または三重突然変異体の間で見ることができる。

10

【0258】

一緒にすると、これらの結果は、我々が、酵母株が突然変異されるにつれて、超マンノシル化および $\alpha 1, 3$ -結合マンノースキャップの喪失を可視化するのを助ける。これらの結果を図25と比較することによって、グリカン構造におけるこれらの変化の双方が存在するのでなければ、2G12反応性は存在しない。かくして、Gas1、Gas5、YJL171c、およびPST1と共に、2G12に結合するECM33およびGP38の能力は、酵母三重突然変異体および $\Delta och1 \Delta mnn1$ 二重突然変異体において保存されたコアMan8オリゴ糖の存在に依存する。

20

【0259】

ELISAによると、gp120と交差反応するウサギにおける $\alpha 1, 2$ -マンノース特異的抗血清の生産

我々は、HIV MAbs 2G12に対する交差反応性を示す $\Delta mnn1 \Delta mnn4 \Delta och1$ 細胞から、少なくとも6つの酵母糖蛋白質、PST1、ECM33、Gas1、Gas5、GP38およびYJL171cを同定した。加えて、酵母三重突然変異体の細胞壁は、全細胞ELISAおよび免疫蛍光によると2G12と交差反応することができた。従って、それらが $\alpha 1, 2$ -結合末端マンノース糖に対して特異的なように、2G12と同様な抗体を誘導することを試みるために、全細胞、加熱一殺傷三重突然変異体細胞を用いて、ウサギを免疫化した。0、4、5および12週からの血清試料を、HIV Env-特異的全IgG抗体についてテストした。図32に示されるように、gp120に対して特異的な抗体のレベルは、週0～週5の有意な増加、および週12における引き続いての減少を示す。週0と比較した場合、週5からの血清におけるgp120結合の有意な増加（ $P < 0.001$ ）があり、他方、週12における結合は、力価はより低い、優位な増加をやはり示した（ $P < 0.05$ ）。

30

【0260】

比較のために、ウサギを全細胞、加熱一殺傷WT細胞で平行して免疫化した。これらの血清は、週0～週12におけるgp120特異的抗体のレベルの有意な増加はないことを示した（図32参照）。WTおよび三重突然変異体免疫化ウサギからの平行採血を比較することによって我々は、WTと比較した場合、特に週5において三重突然変異体でのgp120-特異的IgGの有意な増加を見る（ $P < 0.001$ ）。これらのP値の全てはスチューデントの両側t検定によって計算した。一緒にすると、これらの結果は、gp120上の $\alpha 1, 2$ -結合末端マンノース残基と交差反応できる動物における抗体の生産の最初の例を示すことができる。

40

【0261】

III. 酵母三重突然変異体における、2G12によって認識される糖蛋白質でのN-結合およびO-結合グリコシル化部位の生物情報分析

図33～38は、PST1、ECM33、GP38、YJL171c、Gas1、およ

50

びGas5の潜在的N-結合およびO-結合グリコシル化部位の分析を示す。以下の表2は、酵母突然変異体における同定された2G12-反応性糖蛋白質のまとめを示す。同定された2G12交差反応性糖蛋白質のいくつかの顕著な特徴がある。全てはN-結合および/またはO-結合グリコシル化部位の大きな数および高い密度を有する。中でも、PST1およびECM33は同一ファミリーに置けるメンバーであって、N-結合およびO-結合グリコシル化部位双方の大きな数および高い密度を有する。GP38およびYJL171cは、N-結合グリコシル化部位の大きな数および高い密度のみを有し、同一ファミリーにおけるGas1およびGas5はO-結合グリコシル化部位の大きな数および高い密度、およびグリカンからの分子量のより低いパーセンテージ（他の4つのほぼ50% vs 60%）を有する。

10

【0262】

（表2 酵母突然変異体における同定された2G12-反応性糖蛋白質のまとめ）

【0263】

【表2】

酵母突然変異体における2G12交差反応性糖蛋白質の特徴付け											
ID	名称	前駆体	成熟蛋白質			N-部位	O-部位	分子量 (kDa)			GPI
		アミノ酸数	アミノ酸数	MW	PI	数 (%)	数 (%)	PAGE	MW	グリカン (%)	
P38616	GP38	354	315	33,124	4.67	15 (4.8)	4 (1.3)	90	33	57 (63)	無し
P46992	YJL171c	396	349	37,723	4.69	11 (3.2)	0 (0)	90	38	52 (58)	有り
Q12355	PST1	444	399	41,260	9.25	15 (3.8)	14 (3.5)	100	41	59 (59)	有り
P38248	ECM33	469	386	39,628	4.68	13 (3.4)	21 (5.4)	100	40	60 (60)	有り
P22146	Gas1	559	506	54,325	4.37	10 (2.0)	26 (5.1)	105	54	51 (49)	有り
Q08193	Gas5	484	440	47,298	4.43	6 (1.4)	35 (8)	100	47	53 (53)	有り

20

以下の表3は、18ゲノム内での2G12交差反応性糖蛋白質のホモログを示す。6つの2G12交差反応性糖蛋白質の蛋白質配列を用いて、National Center for Biotechnology Information (NCBI)のHomoloGeneデータベース（リリース50.1）からの相同遺伝子をサーチした。HomoloGeneは、いくつかの完全に配列決定された真核生物ゲノムの注記された遺伝子の中でのホモログの自動検出用のシステムである。現在、HomoloGeneデータベースは、18の種からの165、820のHomoloGene群を含有する。注目するHomoloGeneは、NCBIホームページに蛋白質参照配列（RefSeq）番号をエンターすることによって得られる。HomoloGeneの多数整列は、clustalwプログラムによって行った。各遺伝子のホモログは、HomoloGeneデータベースサーチングから得られ、表にリストされる。6つの遺伝子のCandida glabrataにおけるホモログはNCBIデータベースで見出されたが、Candida glabrataのゲノムはHomoloGeneデータベースに含まれていない。

30

【0264】

（表3 18ゲノム内での2G12交差反応性糖蛋白質のホモログ）

【0265】

40

【表 3】

18ゲノム内での2G12交差反応性糖蛋白質のホモログ								
	ゲノム	種	PST1	ECM33	Gas1	Gas5	GP38	YJL171c
哺乳動物	Homo sapiens	ヒト	-	-	-	-	-	-
	Pan troglodytes	チンパンジー	-	-	-	-	-	-
	Canis familiaris	イヌ	-	-	-	-	-	-
	Mus musculus	ハウスマウス	-	-	-	-	-	-
	Rattus norvegicus	ラット	-	-	-	-	-	-
鳥類	Gallus gallus	ニワトリ	-	-	-	-	-	-
昆虫	Drosophila melanogaster	ハエ	-	-	-	-	-	-
	Anopheles gambiae	カ	-	-	-	-	-	-
虫 (Worm)	Caenorhabditis elegans	小土壌線虫	-	-	-	-	-	-
真菌	Saccharomyces cerevisiae	酵母	+	+	+	+	+	+
	Schizosaccharomyces pombe	酵母	+	+	+	+	-	-
	Kluyveromyces lactis	酵母	-	+	+	+	-	+
	Eremothecium gossypii	綿病原体	+	-	-	+	-	-
	Magnaporthe grisea	イモチ病真菌	-	+	+	-	-	-
	Neurospora crassa	赤パンカビ	-	+	+	+	-	-
	Arabidopsis thaliana	小開花植物	-	-	-	-	-	-
植物	Oryza sativa	日本米	-	-	-	-	-	-
寄生虫	Plasmodium falciparum	マラリア寄生虫	-	-	-	-	-	-

10

実施例4 Och1/Mnn1/Mnn4三重突然変異体における相同Man8型グリカンを持つHIV-1 gp120糖蛋白質の生産および特徴付け

20

哺乳動物発現系におけるのとは異なり、S. cerevisiaeで生産される糖蛋白質上の炭水化物はコアGlcNAc₂糖に形成されたマンノース残基のみを含有する。全長gp120蛋白質はS. cerevisiaeにおいて首尾よく発現されてきたが、それらは超グリコシル化されているように見える。厳密にMan₈GlcNAc₂を持つ酵母中のgp120蛋白質の創製には、グリコシル化経路を突然変異しなければならなかった。三つの蛋白質はS. cerevisiaeに特異的なN-結合グリカンを作成することを担い：OCH1pは超マンノシル化に必要な最初のα1, 6-マンノース残基を開始し(Lehleら、FEBS Lett., 370(1-2):41-5, 1995)、MNN1pはα1, 2-残基の全ての末端α1, 3-結合マンノースキャッピングを担い(Nakajimaら、Proc Nat Acad Sci USA, 3912-3916, 1975)、およびMNN4pはマンノシルリン酸化の陽性レギュレーターである(Jigamiら、Biochim Biophys Acta, 1426(2):335-45, 1999)。S. cerevisiaeにおいてこれらの3つの遺伝子を欠失することによって、厳密にMan8オリゴ糖を持つgp120の生産用の株を創製した。

30

【0266】

gp120がERにおいて効果的にグリコシル化され、培養基に分泌されるようにするために、我々は、まず、S. cerevisiaeアルファ-接合因子(MFα)のシグナル配列を、ガラクトース誘導に続いての組換え蛋白質の高レベル発現のためのGAL1プロモーターを含有するpYES2/CTベクター(Invitrogen)にクローン化した。次いで、JR-FLおよびYU2(ARRRP)の株からのHIV-1 gp120遺伝子をpYES2/CT-αプラスミドにPCRクローン化した。迅速酢酸リチウム形質転換プロトコルを用いて、得られたgp120発現プラスミドをハプロイド酵母株Δmnn1Δmnn4Δoch1に形質転換した。図40のパネルAに見られるように、pYU2-gp120またはpJRFL-gp120で形質転換されたΔmnn1Δmnn4Δoch1-2-5の4つの別々のクローンが、コロニーPCRによってそれらの各プラスミドを含有することを確認した。JRFL-gp120形質転換体は、724kBの予測されたPCR産物のサイズを示し、他方、YU2-gp120形質転換体は1697kBにおける産物を示す。

40

【0267】

50

pYU2-gp120およびpJRF1-gp120を含有するこれらの酵母形質転換体を、細胞をガラクトース含有培地に移すことによって、蛋白質発現について誘導した。抗-gp120-IIB (Virostat Inc.) および抗-gp120-YU2を用いるウエスタンブロッティングを用いて培地中でのgp120糖蛋白質の誘導および分泌を検出した。 $\Delta mnn1 \Delta mnn4 \Delta och1$ 酵母形質転換体は、30℃における6～9日間の成長によって最大量のgp120を分泌することが判明した(図39、パネルBおよびC)。ウエスタンブロットで見られるように、これらのgp120蛋白質がおもにMan8オリゴ糖を含有すると仮定するならば、それらは、各々、JR-FLおよびYU2-gp120について96.4および99.6 kDaのそれらの予測される分子量まで移動する。

10

【0268】

抗-gp120抗体に対して反応性であることに加えて、これらの発現されたgp120蛋白質は2G12に対する反応性を示す(図40)。(pYU2-gp120およびpJRF1-gp120を持つ)2つの $\Delta mnn1 \Delta mnn4 \Delta och1$ 形質転換体、および非-形質転換株を、非-形質転換体の培地ではウラシルを加えて平行して成長させた。そのうち1つは～110 kDaの分子量を有する $\Delta mnn1 \Delta mnn4 \Delta och1$ 細胞の培養上清における他の2G12-反応性蛋白質の存在のため、2G12でテストした場合に、gp120の誘導が間接的に見ることができに過ぎない。非-形質転換酵母は3～9日の間に定常的な基礎発現レベルを示し、これは、～110 kDaにおける基礎レベル蛋白質(ECM33)がこの期間に増加しないことを強く示唆する。対照的にgp120形質転換酵母の双方は、3～9日において、110 kDa蛋白質の発現の顕著な増加を示し、これは、2G12抗体によって認識されるgp120糖蛋白質の誘導を示唆する。

20

【0269】

(引用した文献)

【0270】

【化 1】

1. UN AIDS Report on Global AIDS Epidemic. 2004.
2. McMichael AJ, Hanke T. HIV vaccines 1983-2003. *Nat Med.* 2003;9(7):874-80.
3. Garber DA, Silvestri G, Feinberg MB. Prospects for an AIDS vaccine: three big questions, no easy answers. *Lancet Infect Dis.* 2004;4(7):397-413.
4. <http://www.niaid.nih.gov/daids/vaccine>
5. <http://www.iavi.org> 10
6. Gaschen B, Taylor J, Yusim K, Foley B, Gao F, Lang D, Novitsky V, Haynes B, Hahn BH, Bhattacharya T, Korber B. Diversity considerations in HIV-1 vaccine selection. *Science.* 2002;296(5577):2354-60.
7. Burton DR, Desrosiers RC, Doms RW, Koff WC, Kwong PD, Moore JP, Nabel GJ, Sodroski J, Wilson IA, Wyatt RT. HIV vaccine design and the neutralizing antibody problem. *Nat Immunol.* 2004;5(3):233-6.
8. Zolla-Pazner S. Identifying epitopes of HIV-1 that induce protective antibodies. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(3):199-210. 20
9. Geijtenbeek TB, Kwon DS, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Middel J, Cornelissen IL, Nottet HS, KewalRamani VN, Littman DR, Figdor CG, van Kooyk Y. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell.* 2000;100:587-97.
10. Pohlmann S, Baribaud F, Lee B, Leslie GJ, Sanchez MD, Hiebenthal-Millow K, Munch J, Kirchhoff F, Doms RW. DC-SIGN interactions with human immunodeficiency virus type 1 and 2 and simian immunodeficiency virus. *J Virol.* 2001;75(10):4664-72. 30
11. Pohlmann S, Soilleux EJ, Baribaud F, Leslie GJ, Morris LS, Trowsdale J, Lee B, Coleman N, Doms RW. DC-SIGNR, a DC-SIGN homologue expressed in endothelial cells, binds to human and simian immunodeficiency viruses and activates infection in trans. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98(5):2670-2675.
12. Curtis BM, Scharnowske S, Watson AJ. Sequence and expression of a membrane-associated C-type lectin that exhibits CD4-independent binding of human immunodeficiency virus envelope glycoprotein gp120. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992;89:8356-60. 40
13. Bashirova AA, Geijtenbeek TB, van Duijnhoven GC, van Vliet SJ, Eilering JB, Martin MP, Wu L, Martin TD, Viebig N, Knolle PA, KewalRamani VN, van Kooyk Y,

【 0 2 7 1 】

【化 2】

- Carrington M. A dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin (DC-SIGN)-related protein is highly expressed on human liver sinusoidal endothelial cells and promotes HIV-1 infection. *J Exp Med*. 2001;193(6):671-8.
14. Mitchell DA, Fadden AJ, Drickamer K. A novel mechanism of carbohydrate recognition by the C-type lectins DC-SIGN and DC-SIGNR. Subunit organization and binding to multivalent ligands. *J Biol Chem*. 2001;276(31):28939-45. 10
 15. Feinberg H, Mitchell DA, Drickamer K, Weis WI. Structural basis for selective recognition of oligosaccharides by DC-SIGN and DC-SIGNR. *Science*. 2001;294(5549):2163-6.
 16. Pohlmann S, Doms RW. Evaluation of current approaches to inhibit HIV entry. *Curr Drug Targets Infect Disord*. 2002;2(1):9-16.
 17. Trkola A, Purtscher M, Muster T, Ballaun C, Buchacher A, Sullivan N, Srinivasan K, Sodroski J, Moore JP, Katinger H. Human monoclonal antibody 2G12 defines a distinctive neutralization epitope on the gp120 glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*. 1996;70(2):1100-8. 20
 18. Scanlan CN, Pantophlet R, Wormald MR, Ollmann Saphire E, Stanfield R, Wilson IA, Katinger H, Dwek RA, Rudd PM, Burton DR. The broadly neutralizing anti-human immunodeficiency virus type 1 antibody 2G12 recognizes a cluster of alpha1-->2 mannose residues on the outer face of gp120. *J Virol*. 2002;76(14):7306-21.
 19. Sanders RW, Venturi M, Schiffner L, Kalyanaraman R, Katinger H, Lloyd KO, Kwong PD, Moore JP. The mannose-dependent epitope for neutralizing antibody 2G12 on human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp120. *J Virol*. 2002;76(14):7293-305. 30
 20. Shattock RJ, Moore JP. Inhibiting sexual transmission of HIV-1 infection. *Nat Rev Microbiol*. 2003;1(1):25-34.
 21. Boyd MR, Gustafson KR, McMahon JB, Shoemaker RH, O'Keefe BR, Mori T, Gulakowski RJ, Wu L, Rivera MI, Laurencot CM, Currens MJ, Cardellina JH 2nd, Buckheit RW Jr, Nara PL, Pannell LK, Sowder RC 2nd, Henderson LE. Discovery of cyanovirin-N, a novel human immunodeficiency virus-inactivating protein that binds viral surface envelope glycoprotein gp120: potential applications to microbicide development. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997 Jul;41(7):1521-30. 40
 22. Esser MT, Mori T, Mondor I, Sattentau QJ, Dey B, Berger EA, Boyd MR, Lifson JD. Cyanovirin-N binds to gp120 to interfere with CD4-dependent human

【 0 2 7 2 】

【化 3】

- immunodeficiency virus type 1 virion binding, fusion, and infectivity but does not affect the CD4 binding site on gp120 or soluble CD4-induced conformational changes in gp120. *J Virol.* 1999;73(5):4360-71.
23. Dey B, Lerner DL, Lusso P, Boyd MR, Elder JH, Berger EA. Multiple antiviral activities of cyanovirin-N: blocking of human immunodeficiency virus type 1 gp120 interaction with CD4 and coreceptor and inhibition of diverse enveloped viruses. *J Virol.* 2000;74(10):4562-9. 10
24. Tsai CC, Emau P, Jiang Y, Agy MB, Shattock RJ, Schmidt A, Morton WR, Gustafson KR, Boyd MR. Cyanovirin-N inhibits AIDS virus infections in vaginal transmission models. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2004;20(1):11-8.
25. Tsai CC, Emau P, Jiang Y, Tian B, Morton WR, Gustafson KR, Boyd MR. Cyanovirin-N gel as a topical microbicide prevents rectal transmission of SHIV89.6P in macaques. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2003;19(7):535-41. 20
26. Bewley CA, Otero-Quintero S. The potent anti-HIV protein cyanovirin-N contains two novel carbohydrate binding sites that selectively bind to Man(8) D1D3 and Man(9) with nanomolar affinity: implications for binding to the HIV envelope protein gp120. *J Am Chem Soc.* 2001;123(17):3892-902.
27. Sandstrom C, Berteau O, Gemma E, Oscarson S, Kenne L, Gronenborn AM. Atomic Mapping of the Interactions between the Antiviral Agent Cyanovirin-N and Oligomannosides by Saturation-Transfer Difference NMR. *Biochemistry.* 2004;43(44):13926-13931. 30
28. Li H, Wang LX. Design and synthesis of a template-assembled oligomannose cluster as an epitope mimic for human HIV-neutralizing antibody 2G12. *Org Biomol Chem.* 2004;2(4):483-8.
29. Wang LX, Ni J, Singh S, Li H. Binding of high-mannose-type oligosaccharides and synthetic oligomannose clusters to human antibody 2G12: implications for HIV-1 vaccine design. *Chem Biol.* 2004;11(1):127-34. 40
30. Lee HK, Scanlan CN, Huang CY, Chang AY, Calarese DA, Dwek RA, Rudd PM, Burton DR, Wilson IA, Wong CH. Reactivity-based one-pot synthesis of oligomannoses: defining antigens recognized by 2G12, a broadly neutralizing anti-HIV-1 antibody. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2004;43(8):1000-3.
31. Calarese DA, Scanlan CN, Zwick MB, Deechongkit S, Mimura Y, Kunert R, Zhu P, Wormald MR, Stanfield RL, Roux KH, Kelly JW, Rudd PM, Dwek RA, Katinger H,

【 0 2 7 3 】

【化 4】

- Burton DR, Wilson IA. Antibody domain exchange is an immunological solution to carbohydrate cluster recognition. *Science*. 2003;300(5628):2065-71.
32. Roux KH, Zhu P, Seavy M, Katinger H, Kunert R, Seamon V. Electron microscopic and immunochemical analysis of the broadly neutralizing HIV-1-specific, anti-carbohydrate antibody, 2G12. *Mol Immunol*. 2004;41(10):1001-11.
33. Veazey RS, Shattock RJ, Pope M, Kirijian JC, Jones J, Hu Q, Ketas T, Marx PA, Klasse PJ, Burton DR, Moore JP. Prevention of virus transmission to macaque monkeys by a vaginally applied monoclonal antibody to HIV-1 gp120. *Nat Med*. 2003;9(3):343-6. 10
34. Dacheux L, Moreau A, Ataman-Onal Y, Biron F, Verrier B, Barin F. Evolutionary Dynamics of the Glycan Shield of the Human Immunodeficiency Virus Envelope during Natural Infection and Implications for Exposure of the 2G12 Epitope. *J Virol*. 2004;78(22):12625-37.
35. Binley JM, Wrin T, Korber B, Zwick MB, Wang M, Chappey C, Stiegler G, Kunert R, Zolla-Pazner S, Katinger H, Petropoulos CJ, Burton DR. Comprehensive cross-clade neutralization analysis of a panel of anti-human immunodeficiency virus type 1 monoclonal antibodies. *J Virol*. 2004;78(23):13232-52. 20
36. Hindsgaul O. 1999. Protein-glycan interactions. In *Essentials of Glycobiology* (ed Varki A, *et al*), pp. 41-56, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
37. Winzeler EA, Shoemaker DD, Astromoff A, *et al*. Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science*. 1999;285(5429):901-6. 30
38. Muller WE, Schroder HC, Reuter P, Maidhof A, Uhlenbruck G, Winkler I. Polyclonal antibodies to mannan from yeast also recognize the carbohydrate structure of gp120 of the AIDS virus: an approach to raise neutralizing antibodies to HIV-1 infection in vitro. *AIDS*. 1990;4(2):159-62.
39. Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, Schroeder L, Aderem A. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(25):13766-71. 40
40. Sato M, Sano H, Iwaki D, Kudo K, Konishi M, Takahashi H, Takahashi T, Imaizumi H, Asai Y, Kuroki Y. Direct binding of Toll-like receptor 2 to zymosan, and zymosan-induced NF-kappa B activation and TNF-alpha secretion are down-regulated by lung collectin surfactant protein A. *J Immunol*. 2003;171(1):417-25.

【 0 2 7 4 】

【化 5】

41. Mond JJ, Lees A, Snapper CM. T cell-independent antigens type 2. *Annu Rev Immunol.* 1995;13:655-92.
42. Berland R, Wortis HH. Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:253-300.
43. Lesinski GB, Westerink MA. Novel vaccine strategies to T-independent antigens. *J Microbiol Methods.* 2001;47(2):135-49. 10
44. Lockhart S. Conjugate vaccines. *Expert Rev Vaccines.* 2003;2(5):633-48.
45. Ada G, Isaacs D. Carbohydrate-protein conjugate vaccines. *Clin Microbiol Infect.* 2003;9(2):79-85.
46. Weis WI, Taylor ME, Drickamer K. The C-type lectin superfamily in the immune system. *Immunol Rev.* 1998;163:19-34.
47. Cutalo JM, Deterding LJ, Tomer KB. Characterization of glycopeptides from HIV-I(SF2) gp120 by liquid chromatography mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom.* 200;15(11):1545-55. 20
48. Ji X, Gewurz H, Spear GT. Mannose binding lectin (MBL) and HIV. *Mol Immunol.* 2005;42(2):145-52.
49. Botos I, Wlodawer A. Proteins that bind high-mannose sugars of the HIV envelope. *Prog Biophys Mol Biol.* 2005;88(2):233-82.
50. Funatsu O, Sato T, Kotovuori P, Gahmberg CG, Ikekita M, Furukawa K. Structural study of N-linked oligosaccharides of human intercellular adhesion molecule-3 (CD50). *Eur J Biochem.* 2001;268(4):1020-9. 30
51. Herscovics A. Importance of glycosidases in mammalian glycoprotein biosynthesis. *Biochim Biophys Acta.* 1999 Dec 6;1473(1):96-107.
52. Hitzeman, R.A., Chen, C.Y., Dowbenko, D.J., Renz, M.E., Lui, C., Pai, R., Simpson, N.J., Kohr, W.J., Singh, A., Chisolm, V., Hamilton, R. and Chang, C.N. Use of heterologous and homologous signal sequences for secretion of heterologous proteins from yeast. *Methods Enzymol.* 1990;185:421-440. 40
53. Barr, P.J., Steimer, K.S., Sabin, E.A., Parkes, D., George-Nascimento, C., Stephans, J.C., Powers, M.A., Gyenes, A., Van Nest, G.A., Miller, E.T., Higgins, K.W. and Luciw, P.A. Antigenicity and immunogenicity of domains of the human immunodeficiency virus (HIV) envelope polypeptide expressed in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Vaccine* 1987;5:90-101.
54. Liu, W.F., Gao, D. and Wang, Z.N. Expression of the extracellular domain of the

【 0 2 7 5 】

【化 6】

- human immunodeficiency virus type 1 envelope protein and its fusion with β -galactosidase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Clin Diagn lab Immunol*. 1998;5:592-594.
55. Herscovics A. Processing glycosidases of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1426(2):275-85.
56. Camirand A, Heysen A, Grondin B, Herscovics A. Glycoprotein biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Isolation and characterization of the gene encoding a specific processing alpha-mannosidase. *J Biol Chem*. 1991;266(23):15120-7. 10
57. Smith, R.A., Duncan, M.J. and Moir, D.T. Heterologous protein secretion from yeast. *Science* 1985;229:1219-1224.
58. Rudolph, H.K., Antebi, A., Fink, G.R., Buckley, C.M., Dorman, T.E., LeVitre, J., Davidow, S., Mao, J., Moir, D.T. The yeast secretory pathway is perturbed by mutations in *PMR1*, a member of a Ca^{2+} ATPase family. *Cell*. 1989; 58:133-145.
59. Livi, G.P., Ferrara, A., Roskin, R., Simon, P.L. and Young P.R. Secretion of *N*-glycosylated human recombinant interleukin-1 α in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 1990; 88:297-301. 20
60. Harmsen, M.M., Langedijk, A.C., van Tuinen, E., Geerse, R.H., Raué, H.A. and Maat, J. Effect of a *pmr1* disruption and different signal sequences on the intracellular processing and secretion of *Cyamopsis tetragonoloba* α -galactosidase by *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 1993; 125:115-123.

【図面の簡単な説明】 30

【 0 2 7 6 】

【図 1】図 1 は、哺乳動物細胞における高マンノースの構造およびプロセッシングを示す。左側ボックスは、ERにおける前駆体からMan 8 へのグリカンのプロセスを示す。次いで、主としてMan 8 を持つ蛋白質はさらなるプロセッシングのためにゴルジに輸送される（頂部－右側ボックス、哺乳動物細胞における例）。酵母におけるPmr 1 遺伝子によるなどの、ERからゴルジへの蛋白質輸送がブロックされた場合、これらのグリカンはさらにプロセッシングされず、その結果、グリカンのMan 8 およびMan 9 形態のみを含有する糖蛋白質がもたらされる（右下）。

【図 2】図 2 は酵母におけるHIV-1 gp 120 糖蛋白質の発現を示す。A. $\Delta pmr 1$ における3つのHIV-1 株からのgp 120 蛋白質の発現は、示された日の間にガラクトースによって誘導された。培養上清中の蛋白質は2 G 12 で検出された。B. HIV_{YU2} gp 120 の精製。レーン1 は濃縮された酵母培養基を示し、レーン2 は透析および遠心分離後であり、レーン3 および4 は、各々、200 および400 ng でのGNL およびゲル濾過後であり、およびレーン5 および6 は200 および400 ng での293 T 細胞で生産されたHIV_{YU2} gp 120 である。 40

【図 3】図 3 は酵母で生産されたgp 120 蛋白質のEndo H 消化アッセイを示す。MS/MS 分析で用いた精製gp 120 蛋白質の同一ロットを、Endo H で消化した。次いで、非消化および消化蛋白質は、SDS-PAGE、続いてのクーマシーブルー染色によって分離した。レーン2 は200 ng における非消化であり、レーン3 は400 ng における消化であり、レーン4 は酵母で発現されたHIV_{SF2} からの非グリコシル 50

化 gp 1 2 0 である。

【図 4】図 4 は、マンノースに対する抗体を示す。(A) 2 匹のウサギを週 0 において C F A を含有する 2 0 0 μ g のザイモサン A で免疫化し、週 2 および 4 において、およびその後 4 週間毎に、フロイントの不完全アジュバント (「I F A」) を含有する 1 0 0 μ g の抗原をブースター注射した。週 5 および各ブースターから 1 週後に、免疫血清を収集した。ザイモサンおよび酵母マンナンを被覆したマイクロウェルプレート中での E L I S A を用い、抗体を二連でテストした。2 匹のウサギからの平均抗体力価を示した。(B) マンノースに対する抗体はテストした gp 1 2 0 糖蛋白質のいくつかに対して反応性である。マイクロウェルプレートを 5 μ g / m l の gp 1 2 0 蛋白質で被覆した。(C) このパネルは、抗マンナン抗体によってテストされた哺乳動物細胞における、および酵母細胞における Y U 2 株からの gp 1 2 0 蛋白質の抗原性の比較を示す。

10

【図 5】図 5 は、B S A - M a n 9 コンジュゲートの分析を示す。B S A - M a n 9 コンジュゲートを 1 0 % S D S - P A G E ゲル、続いてクーマシーブルー染色で分析した。レーン 1 は非コンジュゲートド B S A であり、レーン 2 は B S A - S M C C であり、レーン 3 は B S A - S M C C - M a n 9 である。

【図 6】図 6 A は D C - S I G N の E C D 組換え蛋白質の発現および精製を示す。D C - S I G N E C D 組換え蛋白質の発現および精製。E C D 蛋白質を I P T G の不存在下 (レーン 2) および存在下 (レーン 3) で 2 5 $^{\circ}$ C にて 4 時間、E . c o l i において発現させた。封入体を単離し (レーン 4)、不溶性画分からの再度折り畳まれた蛋白質を N i - N T A カラムを用いて精製した (レーン 5)。蛋白質を 1 2 % S D S - P A G E ゲルで分離し、クーマシーブルーで染色した。6 B は、D C - S I G N、および抗 gp 1 2 0 ポリクローナル抗体被覆マイクロウェルプレートを用いる E L I S A を示す。Y U 2 株の H I V - 1 gp 1 2 0 を用いて、コーティング蛋白質に結合させた。

20

【図 7】図 7 は、D C - S I G N M A b の開発を示す。精製された D C - S I G N E C D 蛋白質を用いて、B a l b / c マウスを免疫化した。良好な抗体応答を持つマウスからの脾細胞を細胞融合で用いた。培養上清の E L I S A スクリーニングの後、陽性ウェルからの細胞を拡大培養し、サブクローン化した。ウェスタンブロットを用いて、単一クローンでのウェルからの上清をスクリーニングした。各別々のレーンは、個々のクローンを示す。

【図 8】図 8 は中和アッセイを示す。p H X B 2 gp 1 2 0 を担持するシュードウイルスによって感染された L u S I V 細胞系を用いて、2 つのモノクローナル (P) 抗体の中和活性をテストした。3 つのよく知られた中和 M A b (M) を陽性対照として用いた。各抗体の 4 つの用量 (5 0、2 5、1 2 . 5 および 6 . 2 5 μ g / m l) を調べた。

30

【図 9】図 9 は、N-結合オリゴ糖の構造およびプロセッシングを示す。図 9 A は、E R における、M N S 1 による M a n ₉ G l c N A c ₂ から M a n ₈ G l c N A c ₂ へのグリカンのプロセスを示す。主として高マンノースコアの M a n ₈ G l c N A c ₂ 形態を持つ蛋白質はさらなるプロラッシングのためにゴルジに輸送される。図 9 B の下部ボックスは、主要 (太い矢印) 経路である超グリコシル化を示す。図 9 B 上部ボックスは、主要経路 (細い矢印) である、コアへの α 1, 3 - M a n の付加を示す。O c h 1、M n n 1 および M n n 4 の遺伝子を全て欠失すると、M a n ₈ G l c N A c ₂ へ糖は付加できず、その結果、グリカンのほとんど均一な M a n ₈ G l c N A c ₂ タイプがもたらされる (図 9 C)。

40

【図 10】図 10 は、ウェスタンブロットを用いる、酵母突然変異体株における 2 G 1 2 交差反応性蛋白質のスクリーニングを示す。A. 種々の突然変異体株からの酵母培養基を H I V - 1 M A b 2 G 1 2 (P o l y m u m S c i e n t i f i c I n c . F o r s c h u n g G m b H) でスクリーニングした。培養基中の分泌蛋白質をエテトンで沈殿させ、4 ~ 2 0 % グラジエント S D S - P A G E ゲルに負荷した。ブロットを 2 G 1 2 でプローブし、続いてホースラディッシュペルオキシダーゼ (H R P) 標識抗ヒト I g G と共にインキュベートした。シグナルを E C L で発生させ、X 線フィルムに暴露した。B. 細胞溶解物を、H I V - 1 gp 1 2 0 糖蛋白質の対照と共に、酵母突然変異体株

50

の同一組からスクリーニングした。

【図11】図11は、 $\Delta pmr1$ 酵母細胞における2G12交差反応性蛋白質の誘導を示す。A. gp120形質転換 $\Delta pmr1$ 酵母細胞を示した時点に培養した。培養基中の分泌蛋白質をエテトンで沈殿させ、4～20%グラジエントSDS-PAGEゲルに負荷した。プロットを2G12でプローブし、続いて、HRP-抗-ヒトIgGでインキュベートした。シグナルをECLで発生させ、X線フィルムに暴露した。B. 非-形質転換（レーン1～3）およびgp120形質転換（レーン4～6） $\Delta pmr1$ 細胞からの培養基中の蛋白質を、Aに記載したように、2G12で検出した。

【図12】図12は、2G12反応性糖蛋白質の精製および同定を示す。GNLレクチンアフィニティークロマトグラフィーを用いて、ほぼ100kDaの蛋白質（Yp100と命名）を部分的に精製した。培養基をアガロース結合GNLと共に16時間インキュベートした。出発物質（レーン1）、フロースルー（レーン2）、洗浄液（レーン3～6）、および溶出物（レーン7～11）の試料を4～20%SDS-PAGEゲルに付加した。移動された膜上の蛋白質をMAb 2G12でプローブした。

【図13】図13は、2G12反応性糖蛋白質の同定を示す。100kDaバンドにおける蛋白質をイン-ゲル消化に付した。消化されたペプチドを抽出し、ナノLC-MS/MSを用いて分析した。分析は、ナノエレクトロスプレー源でのMicromass Q-Dofハイブリッド四極/時間飛行マススペクトルメーターで行った。生ファイルをProteinLynxソフトウェア（Waters）で処理し、MASCOTサーチに付した。全部で6つのペプチドは、アクセションNP_010340および45, 749Daの質量にて、Saccharomyces cerevisiaeにおける酵母蛋白質PST1（配列番号：1）で同定される。N-末端における太文字はシグナリングペプチドと同定される。C-末端における太文字はGPIアンカーシグナルと同定される。単一下線は、質量分析による同定されたペプチドを示す。強調された文字は潜在的なN-結合グリコシル化部位である。

【図14】図14は、2Dゲルによる2G12交差反応性蛋白質の確認を示す。A. 部分的に精製されたYp100蛋白質を2Dゲルによって分離し、クーマシーブルー染色（A）、2G12 MAbでのウェスタンブロット（B）に付し、抗-PST1ポリクローナル抗体がウサギにおいて合成ペプチドに対して生起された。部分的に精製されたYp100蛋白質は酵母からの他の糖蛋白質による汚染を有するが、そのいずれもPST1がそうであるように同様なPIを有しない。

【図15】図15は、2G12交差反応性蛋白質PST1のグリカン分析を示す。A. 部分的に精製されたYp100蛋白質をEndo Hで消化し、非-消化（レーン2、4および6）および消化（レーン3、5および7）蛋白質をSDS-PAGEゲルによって分離し、クーマシーブルー染色（レーン1～3）、抗-PST1ポリクローナル抗体での（レーン4および5）、およびMAb 2G12（レーン6および7）でのウェスタンブロットに付した。これに続いて、HPR標識二次抗体、ECLと共にインキュベートし、X線フィルムに曝露した。

【図16】図16は、pmr1およびmn1二重突然変異体におけるPST1の2G12に対する交差反応性を示す。5つの異なる二重突然変異体株からの細胞溶解物を調製し、4～20%グラジエントSDS-PAGEで分離した。プロットをMAb 2G12でプローブし、続いて、HPR標識二次抗体、ECLと共にインキュベートし、X線フィルムに曝露した。

【図17】図17は、二重突然変異体におけるPST1のアップレギュレーションおよび移動シフトを示す。A. 酵母細胞溶解物中のPST1。異なる株からの細胞溶解物を4～20%グラジエントSDS-PAGEで分離した。野生型および突然変異体におけるPST1発現のレベルを抗-PST1ポリクローナル抗体でのウェスタンブロットを用いて分析した。レーン1野生型；レーン2、 $\Delta mn1$ ；レーン3、 $\Delta och1$ ；レーン4、 $\Delta pmr1$ ；レーン5、 $\Delta pmr1$ および $\Delta mn1$ 二重突然変異体。上部パネルは、PST1がpmr1およびmn1二重突然変異体の溶解物において検出されたに過ぎなかつ

10

20

30

40

50

たことを示す。下部パネルは、全ての5株で検出可能なもう1つのグリコシル化蛋白質GP38を示す。B. 酵母細胞培養基中のPST1。異なる株からの酵母細胞を豊富な培地中で24時間培養し、培地中の蛋白質をアセトンで沈殿させた。蛋白質分泌のレベルを抗-PST1抗体（上部パネル）および抗-GP38（下部パネル）でのウェスタンブロットを用いて検出した。

【図18】図18は、二重突然変異体におけるPST1上の $\alpha 1$, 3-Manおよび $\alpha 1$, 2-Manの分析を示す。pmr1単一突然変異体（レーン1）およびpmr1+mnn1二重突然変異体（レーン2）からの酵母細胞培養基を、抗- $\alpha 1$, 3-結合マンノースポリクロナル抗体および2G12を用いるウェスタンブロットによって末端 $\alpha 1$, 3-Manおよび $\alpha 1$, 2-Manについて検出した。Och1単一突然変異体および精製されたPST1を対照として用いた。培地中の蛋白質をアセトンで沈殿させ、4~20% SDS-PAGEグラジエントゲルに負荷した。ニトロセルロースへのブロッティングの後に、膜を、示された、2G12 MA bおよびウサギ抗- $\alpha 1$, 3Man抗体または抗-PST1抗体、続いて、各々、ヤギ抗-ヒトIgG-HRPおよびヤギ抗-ウサギIgG-HRPでプローブした。

【図19】図19は、イムノブロットによる二重突然変異体における2G12交差反応性蛋白質の確認を示す。二重突然変異体からの培養上清を遠心分離し、沈殿を捨てた。上清（レーン1）をアガロース（レーン2）で予め清浄した。次いで、試料をMA b 2G12と共に4℃にて16時間インキュベートした。免疫複合体をプロテインA-アガロースと共に室温にて1時間インキュベートした。試料を軽く遠心分離し、上清をフロースルーとして用いた（レーン3）。プロテインA-アガロース結合免疫複合体を2回洗浄した（レーン4および5）。結合した蛋白質をSDS試料緩衝液で溶出させた（レーン6）。試料を4~20%グラジエントゲルで分離し、抗-PST1ポリクロナル抗体でプローブした。

【図20】図20は、18種の中のPST1ホモログ遺伝子を示す。PST1（NP_010340）およびECM33（NP_009634）の蛋白質配列を用いて、National Center for Biotechnology Information（NCBI）のHomoloGeneデータベース（リリース50.1）からホモログ遺伝子をサーチした。HomoloGeneは、いくつかの完全に配列決定された真核生物ゲノムの注記された遺伝子の中のホモログの自動検出のためのシステムである。現在、HomoloGeneデータベースは18の種からの165,820のHomoloGene群を含有する。注目するHomoloGeneは、NCBIホームページ（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>）において蛋白質参照配列（RefSeq）番号をエンターすることによって得られる。HomoloGeneの多数の整理は、clustalwプログラムによって行った。PST1および3つのホモログ遺伝子（S. pombeおよびE. gossypiiの蛋白質はHomoloGeneデータベースサーチングから得られた。Candida glabrataからの蛋白質は、NCBI nr配列データベースに対するblastpサーチングを用いて得られた）。

【図21】図21は、PCRを用いる二重および三重突然変異体の分析を示す。三重突然変異体ハプロイドについての遺伝子型スクリーニングおよび確証。パネルAは、MNN4AおよびKanBプライマー（予測されるサイズは609bpであった）を用いる $\Delta mnn4$ 遺伝子型（頂部パネル）、およびOCH1AおよびKanBプライマー（697bp）を用いる $\Delta och1$ 遺伝子型（底部パネル）についての推定三重突然変異体のPCRスクリーニングでの1.5%アガロースゲルを示す。レーン1は、ハプロイドクローン2-2を含有する。レーン2はハプロイドクローン2-3を含有する。レーン3はハプロイドクローン2-4を含有する。レーン4はハプロイドクローン2-5を含有する。パネルBは、三重突然変異体ハプロイドクローン2-5および2-6（各々、頂部および底部パネル）についての $\Delta mnn1$, $\Delta mnn4$ および $\Delta och1$ 遺伝子型のPCR確証での1.5%アガロースゲルを示す。各レーンは、示したようにPCRプライマーの異なる対を含有する。内部ORF-特異的プライマー（MNN1B、MNN4B、OCH1B、MNN

10

20

30

40

50

1 C、MNN 4 CおよびOCH 1 C) および上流または下流プライマー (MNN 1 A、MNN 4 A、OCH 1 A、MNN 1 D、MNN 4 DおよびOCH 1 D) の組合せの結果、もしORFが欠失されているならば、PCR産物はもたらされない。レーン1はMNN 1 A + MNN 1 Bである。レーン2はMNN 4 A + MNN 4 Bである。レーン3はOCH 1 A + OCH 1 Bである。レーン4はMNN 1 C + MNN 1 Dである。レーン5はMNN 4 C + MNN 4 Dである。レーン6はOCH 1 C + OCH 1 Dである。対照的に、上流または下流プライマーおよび内部KanMX特異的プライマー (Kan BおよびKan C) の組合せの結果、もし欠失が存在すれば、PCR産物がもたらされる。レーン7はMNN 1 A + Kan B (591bpの予測されるサイズ) である。レーン8はMNN 1 D + Kan C (944bp) である。レーン9はMNN 4 D + Kan C (931bp) である。レーン10はOCH 1 D + Kan C (854bp) である。

【図22】図22は、全細胞ELISAを示す。ELISAを用いて、全細胞酵母に対する2G12、および $\alpha 1, 3$ -結合マンノース抗体の特異性をテストした。INVScl (ジプロイド) および $\Delta mnn1 \Delta mnn4 \Delta och1-DIP$ 酵母をPBS中で 5.0×10^7 細胞/mlまで希釈し、これを用いて、ELISAプレートを被覆した。SF162 gp120および野生型酵母マンナンを50mM炭酸緩衝液中で $5 \mu g/ml$ まで希釈した。2G12および抗- $\alpha 1, 3$ -マンノースを、ブロッキング緩衝液中の3倍系列希釈での捕獲のために $10 \mu g/ml$ で用いた。パネルAは、抗- $\alpha 1, 3$ 抗体が野生型細胞およびマンナンに対して高い親和性を有することを示し、三重突然変異体は低い親和性を示し、SF162は結合を示さない。対照的にパネルBは、三重突然変異体細胞およびSF162 gp120は、各々、末端 $\alpha 1, 2$ -結合マンノース残基に対して特異的である、2G12抗体に対して中程度および高い親和性を有することを示す。野生型細胞およびマンナンの双方は、2G12に対して結合を示さない。この実験は二連で行い、前記OD₄₅₀の読みは平均を示す。

【図23】図23は、三重突然変異体細胞における $\alpha 1, 3$ -Man反応性の喪失を示す。抗- $\alpha 1, 3$ -結合マンノース免疫血清および抗-ザイモサン抗体を用いる三重突然変異体および野生型酵母の免疫蛍光。log-相 $\Delta mnn1 \Delta mnn4 \Delta och1-DIP$ 細胞 (パネルA、C) およびINVScl細胞 (パネルB、D) を4%パラホルムアルデヒドで固定し、ポリリシン-被覆スライドに移した。細胞を0.5%SDSと共にインキュベートし、1:500希釈の $\alpha 1, 3$ -結合マンノース抗血清 (パネルA、B)、および $10 \mu g/ml$ の精製抗-ザイモサン (パネルC、D)、続いて、Alexa Fluor 568-コンジュゲートドヤギ抗-ウサギIgGで染色した。

【図24】図24は、三重突然変異体細胞における末端 $\alpha 1, 2$ -Manの曝露を示す。2G12および抗-ザイモサンを用いる三重突然変異体および野生型酵母の免疫蛍光。log-相 $\Delta mnn1 \Delta mnn4 \Delta och1-DIP$ 細胞 (パネルA、BおよびC) およびINVScl細胞 (パネルD、EおよびF) を4%パラホルムアルデヒドで固定し、ポリリシン-被覆スライドに移した。細胞を0.5%SDSと共にインキュベートし、各々、 $100 \mu g/ml$ の2G12 (パネルA、D)、および $10 \mu g/ml$ のウサギ抗-ザイモサン (パネルB、E)、続いて、Alexa Fluor 568-コンジュゲートドヤギ抗-ヒトIgGおよびAlexa Fluor 488-コンジュゲートドヤギ抗-ウサギIgGで染色した。パネルCおよびFは、抗体の共-局所化を示す。

【図25】図25は、酵母突然変異体の糖蛋白質上の $\alpha 1, 2$ -Manおよび $\alpha 1, 3$ -Manの分析を示す。全ての酵母グリコシル化突然変異体での2G12および $\alpha 1, 3$ -結合マンノース抗血清を用いるウェスタンブロット。log相酵母細胞をRIPA緩衝液中で溶解させ、 $2.4 \mu g$ /レーンで4~20%SDS-PAGEグラジエントゲルに負荷した。ニトロセルロースへのブロッティングの後に膜を、各々、2G12 MAbまたは $\alpha 1, 3$ Man抗血清、続いて、ヤギ抗-ヒトIgG-HRPおよびヤギ抗-ウサギIgG-HRPでプローブした。レーン1はINVScl野生型溶解物を含有する。レーン2は $\Delta mnn1$ 溶解物を含有する。レーン3は $\Delta och1$ 溶解物である。レーン4は $\Delta mnn4$ 溶解物を含有する。レーン5は $\Delta mnn1 \Delta mnn4$ 溶解物を含有する。レーン6

は $\Delta m n n 1 \Delta o c h 1$ 溶解物を含有する。レーン 7 は $\Delta m n n 1 \Delta m n n 4 \Delta o c h 1$ 溶解物を含有する。 $\Delta m n n 1 \Delta o c h 1$ および $\Delta m n n 1 \Delta o c h 1 \Delta m n n 4$ の細胞溶解物中に見出される 2 G 1 2 に強く結合する少なくとも 4 つの蛋白質がある（左側パネル）。対照的に、野生型酵母、および $\Delta m n n 1$ 遺伝子型なしの突然変異体のみが、 $\alpha 1, 3$ -結合マンノースに特異的な抗血清への結合を示す（右側パネル）。

【図 2 6】図 2 6 は、全ての単離された三重突然変異体における 2 G 1 2 反応性を示す。6 つの酵母三重突然変異体クローン上の 2 G 1 2 を用いるウェスタンブロット。log 相酵母三重突然変異体クローンを SDS 負荷緩衝液にそのまま溶解させ、4 ~ 20 % SDS-PAGE グラジエントゲルに負荷した。ニトロセルロースへのブロッティングの後に、膜を、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の 2 G 1 2、続いて、ヤギ抗-ヒト Ig G-HRP でプローブした。レーン 1 はハプロイドクローン 1-2 を含有する。レーン 2 はハプロイドクローン 1-3 を含有する。レーン 3 はハプロイドクローン 2-2 を含有する。レーン 4 はハプロイドクローン 2-4 を含有する。レーン 5 はハプロイドクローン 2-5 を含有する。レーン 6 はハプロイドクローン 2-6 を含有する。各三重突然変異体ハプロイドクローンの粗製細胞溶解物に見出される 2 G 1 2 に強く結合する少なくとも 4 つの蛋白質がある。

【図 2 7】図 2 7 は、酵母三重突然変異体細胞における高マンノースの Man 8 形態のホモログを示す。三重突然変異体酵母溶解物の MALDI-TOF 質量分析。log-相 $\Delta m n n 1 \Delta m n n 4 \Delta o c h 1$ -DIP 細胞を脂質抽出で均質化し、得られた溶解物を PNGase F で消化した。ペルメチル化後に、MALDI-TOF 質量分析によって、N-グリカンプロファイリングを行った。全グリカンの 90 % を超えて表す主なピークは Man₈ GlcNAc₂ であり、他方、Man₅ GlcNAc₂ および Man₉ GlcNAc₂ を代表する 2 つの主なピークがある。

【図 2 8】図 2 8 は、三重突然変異体酵母の細胞溶解物からの 2 G 1 2-反応性蛋白質の部分的精製および分離を示す。パネル A において、2 G 1 2-反応性蛋白質の細胞下局所化を、分別遠心を用いて見積もった。log-相 $\Delta m n n 1 \Delta m n n 4 \Delta o c h 1$ 細胞を、ガラスビーズを用いてスクロース溶解で溶解させた。未溶解細胞および大きな凝集体の除去の後に、蛋白質を 2 つの画分、22, 000 g 上清（レーン 1）および 22, 000 g ペレット（レーン 2）に分離した。この画分から、ペレットを 1.0 % Triton X-100 に再度可溶化させ、2 つのさらなる画分、Triton-可溶性ペレット（レーン 3）、および Triton-不溶性ペレット（レーン 4）に分離した。すべてのレーンは $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の 2 G 1 2 を用いるウェスタンブロットを表す。パネル B において、ConA-アガロースを用いて、2 G 1 2-反応性蛋白質を部分的に精製した。 $\Delta m n n 1 \Delta m n n 4 \Delta o c h 1$ 細胞からの Triton-可溶性画分（レーン 1）を ConA-アガロースビーズと共にインキュベートし、フロースルーを集めた（レーン 2）。結合緩衝液での洗浄（レーン 3）の後に、蛋白質を 0.5 M メチルマンノーピラノシド（レーン 4、5）または 2 mM EDTA + 1.0 % SDS（レーン 6）いずれかで溶出させた。全てのレーンは、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の 2 G 1 2 を用いるウェスタンブロットを表す。パネル C において、2 D 電気泳動を用いて、2 G 1 2-反応性蛋白質を分離した。ConA 精製からの溶出物画分（パネル B、レーン 4 ~ 6）を、Invitrogen IPG ZOOM 4-7 IPG ストリップ上泳動させ、続いて、4 ~ 12 % を用いて IPG ZOOM システムでサイズ分離した。 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の 2 G 1 2 を用いて、1 つのゲルをウェスタンブロッティングによって染色した。ウェスタンブロットによって陽性シグナルを示した 2 つの大きなスポットをシプロルビーゲルから切り出し、トリプシンで消化し、ペプチド同定のために、Micromass Q-ToF 2 にて nano LC/MS/MS によって分析した。上方スポットにおける 3 つの糖蛋白質（ECM33、Gas1、および Gas5）、および下方スポットにおける単一糖蛋白質（YJL171c）は、MS/MS を用いて同定した。

【図 2 9】図 2 9 は、三重突然変異体酵母の培養基における 2 G 1 2-反応性糖蛋白質の発現および部分的精製を示す。パネル A において、log 相 INVSc1 および $\Delta m n n 1 \Delta m n n 4 \Delta o c h 1$ 酵母からの 100 μl の培養上清を、2 倍の容量の氷冷アセトン

と共に -80°C で30分間インキュベートすることによってアセトン沈殿に付した。得られたペレットを $10\mu\text{l}$ のSDS試料緩衝液に再懸濁させ、4~20%SDS-PAGEグラジエントゲルに負荷した。ニトロセルロースへの移動の後に、蛋白質を、 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ の2G12でプローブした。三重突然変異体酵母は、2G12 MAbに対する強い反応性を持つ少なくとも4つの蛋白質を有し(レーン2)、他方、野生型酵母上清はシグナルを示さない(レーン1)。パネルBにおいて、ConA-アガロースを用い、2G12-反応性蛋白質を部分的に精製した。log-相 $\Delta\text{mnn1}\Delta\text{mnn4}\Delta\text{och1}$ 細胞からの培養上清(レーン1)をConA-アガロースビーズと共に直接的にインキュベートした。フロースルー(レーン2)を集め、ビーズを結合緩衝液で洗浄した(レーン3)。結合した2G12-反応性蛋白質(レーン4)は、ConAビーズをSDS-PAGE負荷緩衝液と共に煮沸することによって溶出させた。蛋白質は、 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ の2G12を用いるウェスタンブロットによって検出した。レーン4に示した2G12沈殿のアリコートからのMS/MSを用い、2つの糖蛋白質(ECM33およびGP38)を同定した。

【図30】図30は、2G12-反応性蛋白質の免疫沈澱を示す。三重突然変異体細胞の細胞溶解物および培養基を2G12で免疫沈澱させ、同定された2G12-反応性蛋白質に対する抗体でプロットした。 $\Delta\text{mnn1}\Delta\text{mnn4}\Delta\text{och1}$ 細胞(レーン1)からの細胞溶解物(パネルA)および培養基(パネルB)を、プロテインA-Sepharose 4Bと共にインキュベートすることによって予め清浄化した。2G12を試料に加え、1時間インキュベートし、続いて、プロテインA-Sepharoseを行った。未結合蛋白質を上清として除去し(レーン2)、PBSで洗浄した(レーン3)。 $40\mu\text{l}$ の $1\times\text{SDS}$ 試料緩衝液と共に煮沸することによって、結合蛋白質を溶出させた(レーン4)。すべての試料を4~20%グラジエントSDS-PAGEゲルに負荷し、抗-ECM33、抗-gp38、抗-YJL171C、抗-Gas1、および抗-PST1を用いるウェスタン分析のためにプロットした。

【図31】図31は、異なる遺伝子の突然変異体における糖蛋白質の移動シフトを示す。酵母細胞をlog相まで成長させ、細胞および培養基を収集した。細胞をRIPA緩衝液中で溶解させ、 $2.4\mu\text{g}/\text{レーン}$ にて、4~20%SDS-PAGEグラジエントゲルに負荷した。培養基をアセトンで沈殿させ、蛋白質を4~20%SDS-PAGEグラジエントゲルに負荷した。レーン1は野生型である。レーン2は Δmnn1 である。レーン3は Δoch1 である。レーン4は Δmnn4 である。レーン5は $\Delta\text{mnn1}\Delta\text{mnn4}$ である。レーン6は $\Delta\text{mnn1}\Delta\text{och1}$ である。レーン7は $\Delta\text{mnn1}\Delta\text{mnn4}\Delta\text{och1}$ である。ニトロセルロースへのブロッティングの後に、膜を抗-ECM33(上方パネル)または抗-GP38(下方パネル)、続いて、ヤギ抗-ウサギIgG-HRPでプローブした。

【図32】図32は、三重突然変異体酵母細胞で免疫化したウサギにおいて生起した $\alpha 1, 2$ -結合マンノースに対する抗体の分析を示す。ウサギを、*S. cerevisiae*の野生型(WT)および三重突然変異体(TM)からの全細胞で免疫化した。マイクロウェルプレートを、293T細胞において生じたJRF1株からの $5\mu\text{g}/\text{ml}$ のHIV-1 gp120で被覆した。免疫血清を1:500に希釈し、 $\alpha 1, 2$ -Manに対する抗体を2G12で検出した。

【図33】図33は、PST1の潜在的N-結合およびO-結合グリコシル化部位の分析を示す。パネルAは前駆体のアミノ酸配列を示す(配列番号:2)N-末端の太文字はシグナリングペプチドと同定される。C-末端の太文字はGPIアンカーシグナルと同定される。単一の下線は質量分析による同定されたペプチドを示し、他方、二重下線は、ペプチドが同一または異なる質量分析で2回同定されたことを示す。強調された文字は潜在的なN-結合グリコシル化部位である。パネルBは、公のウェブサイト<http://www.cbs.dtu.dk/services/netoglyc>. Julenius K., A. Molgaard, R. Gupta and S. Brunak. Prediction, conservation analysis and structural characterization of mammalian mucin-ty

10

20

30

40

50

pe O-glycosylation sites, Glycobiology, 15 : 153-164, 2005におけるTechnical University of DenmarkにおけるCenter for Biological Sequence Analysis (CBS)によって開発されたソフトウェアNetOGlyc 3.1を用いるO-結合グリコシル化部位の分析を示す。

【図34】図34は、ECM33の潜在的N-結合およびO-結合グリコシル化部位の分析を示す。パネルAは、前駆体のアミノ酸配列を示す(配列番号: 3)。N-末端の太文字はシグナリングペプチドと同定される。C-末端の太文字は、GPIアンカーシグナルと同定される。単一の下線は質量分析による同定されたペプチドを示し、他方、二重下線は、ペプチドが同一または異なる質量分析で2回同定されたことを示す。強調された文字は潜在的N-結合グリコシル化部位である。パネルBは、公のウェブサイト<http://www.cbs.dtu.dk/services/netoglyc>における、Technical University of DenmarkのCenter for Biological Sequence Analysis (CBS)によって開発されたソフトウェアNetOGlyc 3.1を用いるO-結合グリコシル化部位の分析を示す。

10

【図35】図35は、GP38の潜在的N-結合およびO-結合グリコシル化部位の分析を示す。パネルAは前駆体のアミノ酸配列を示す(配列番号: 4)。N-末端の太文字は、シグナリングペプチドと同定される。単一下線は質量分析による同定されたペプチドを示し、他方、二重下線は、ペプチドが同一または異なる質量分析において2回同定されたことを示す。強調された文字は潜在的N-結合グリコシル化部位である。パネルBは、公のウェブサイト<http://www.cbs.dtu.dk/services/netoglyc>における、Technical University of DenmarkのCenter for Biological Sequence Analysis (CBS)によって開発されたソフトウェアNetOGlyc 3.1を用いるO-結合グリコシル化部位の分析を示す。

20

【図36】図36は、YJL171Cの潜在的N-結合およびO-結合グリコシル化部位の分析を示す。パネルAは、前駆体のアミノ酸配列を示す(配列番号: 5)。N-末端の太文字はシグナリングペプチドと同定される。C-末端の太文字は、GPIアンカーシグナルと同定される。単一の下線は質量分析による同定されたペプチドを示し、他方、二重下線は、ペプチドが同一または異なる質量分析で2回同定されたことを示す。強調された文字は、潜在的N-結合グリコシル化部位である。パネルBは、公のウェブサイト<http://www.cbs.dtu.dk/services/netoglyc>における、Technical University of DenmarkのCenter for Biological Sequence Analysis (CBS)によって開発されたソフトウェアNetOGlyc 3.1を用いるO-結合グリコシル化部位の分析を示す。

30

【図37】図37は、Gas1の潜在的N-結合およびO-結合グリコシル化部位の分析を示す。パネルAは、前駆体のアミノ酸配列を示す(配列番号: 6)。N-末端の太文字は、シグナリングペプチドと同定される。C-末端の太文字は、GPIアンカーシグナルと同定される。単一の下線は質量分析による同定されたペプチドを示し、他方、二重下線は、ペプチドが同一または異なる質量分析で2回同定されたことを示す。強調された文字は潜在的N-結合グリコシル化部位である。パネルBは、公のウェブサイト<http://www.cbs.dtu.dk/services/netoglyc>における、Technical University of DenmarkのCenter for Biological Sequence Analysis (CBS)によって開発されたソフトウェアNetOGlyc 3.1を用いるO-結合グリコシル化部位の分析を示す。

40

【図38】図38は、Gas5の潜在的N-結合およびO-結合グリコシル化部位の分析を示す。パネルAは、前駆体のアミノ酸配列を示す(配列番号: 7)。N-末端の太文字

50

は、シグナリングペプチドと同定される。C-末端の太文字は、GPIアンカーシグナルと同定される。単一の下線は質量分析による同定されたペプチドを示し、他方、二重下線はペプチドが同一または異なる質量分析で2回同定されたことを示す。強調された文字は潜在的N-結合グリコシル化部位である。パネルBは、公のウェブサイト<http://www.cbs.dtu.dk/services/netoglyc>におけるTechnical University of DenmarkのCenter for Biological Sequence Analysis (CBS)によって開発されたソフトウェアNetOGlyc 3.1を用いるO-結合グリコシル化部位の分析を示す。

【図39】図39は、三重突然変異体酵母におけるgp120糖蛋白質のクローニングおよび発現を示す。パネルAは、1.0%アガロースゲル上で泳動させた酵母形質変換体についてのコロニーPCR結果を示す。 $\Delta mnn1 \Delta mnn4 \Delta och1$ の4つの別々の酵母クローンを、YU2-gp120またはJRFL-gp120で形質変換し、-ura/グルコースプレートから拾い、PCRマスターミックスと共にインキュベートした。PCR混合物は、pJRFL-gp120確証のためのプライマーMF α 1-Kpn-5およびJRFL-Xba-3、およびpYU-2-gp120のためのMF α 1-Kpn-5およびYU2-Xba-3を含有した。予測されるPCR産物のサイズは各々、JRFLおよびYU2で形質変換体については1724kBおよび1697kBであった。パネルBは、抗-gp120-IIIB (Virostat Inc.)を用いるgp120の検出を示す。-ura/ガラクトース培地における成長によって、各プラスミドの1つの $\Delta mnn1 \Delta mnn4 \Delta och1$ 形質転換体をgp120発現のために誘導した。培養基の試料を4つの異なる時点：0、3、6、および9日に収集した。蛋白質をアセトンで沈殿させ、4~20%SDS-PAGEゲル上で泳動させ、抗-gp120-IIIBを用いて検出した。パネルCは、抗-gp120-YU2を用いるgp120の検出を示す。同一 $\Delta mnn1 \Delta mnn4 \Delta och1$ 形質転換体を示した日の間に誘導した。蛋白質をアセトンで沈殿させ、4~20%SDS-PAGEゲルで泳動させ、抗-gp120-YU2を用いて検出した。双方の抗-gp120によって検出された得られた蛋白質は、6日~9日において最適発現にて~110kDaにおいて明瞭なバンドを示す。

【図40】図40は、2G12での発現されたgp120の検出を示す。各プラスミドの1つの $\Delta mnn1 \Delta mnn4 \Delta och1$ 形質転換体 (JRFL-gp120およびYU2-gp120)を、-ura/ガラクトース培地での成長によってgp120発現につき誘導し、非-形質転換 $\Delta mnn1 \Delta mnn4 \Delta och1$ の1つのクローンをSC/ガラクトース中で成長させた。培養基の試料を、示したように、3、6および9日に収集した。蛋白質をアセトンで沈殿させ、4~20%SDS-PAGEゲル上で泳動させ、2G12を用いて検出した。これらのgp120糖蛋白質は、各々、JRFL-gp120およびYU2-gp120について96.4および99.6kDaの予測された分子量を有する。

。

10

20

30

【図 1】

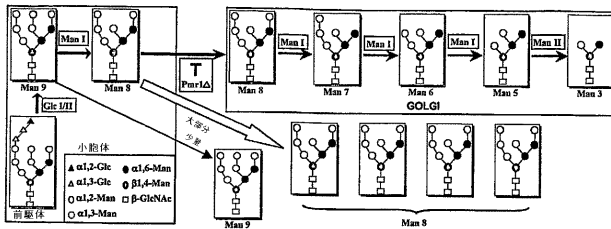
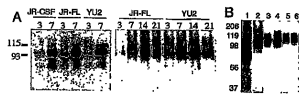


Figure 1

【図 2】

FIGURE 2



【図 3】

FIGURE 3



【図 4】

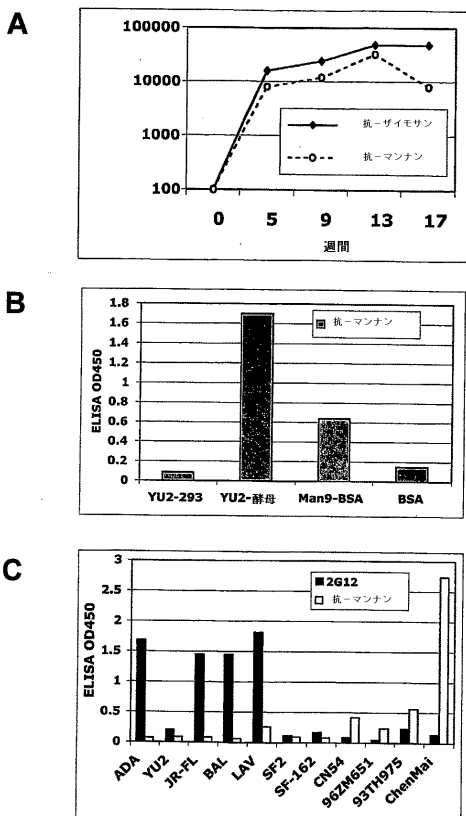
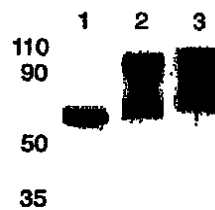


Figure 4

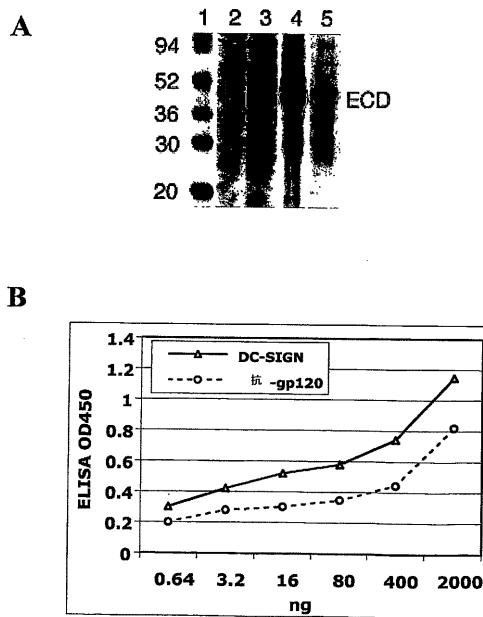
【図 5】

FIGURE 5



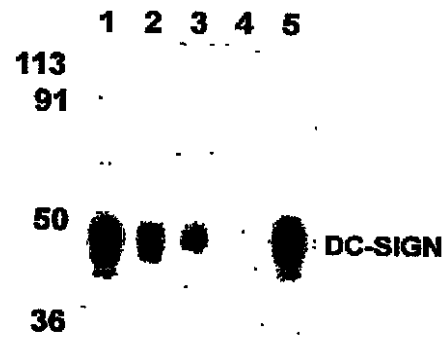
【図 6】

FIGURE 6



【図 7】

FIGURE 7



【図 8】

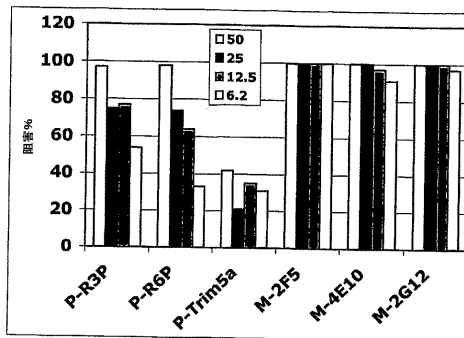
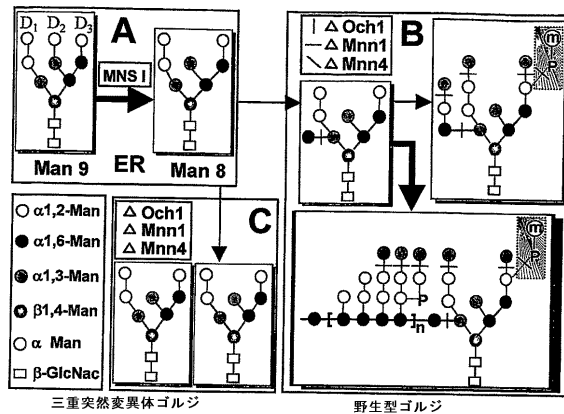


Figure 8

【図 9】

Figure 9



【 図 1 0 】
Figure 10

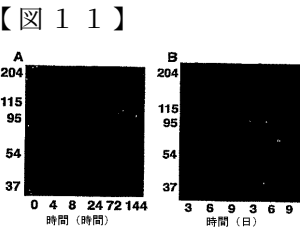
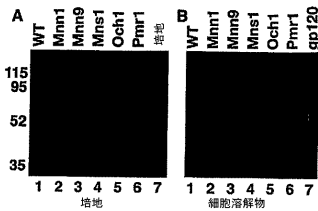


Figure 11

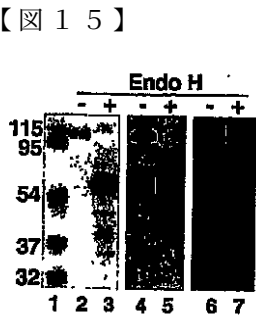


Figure 15

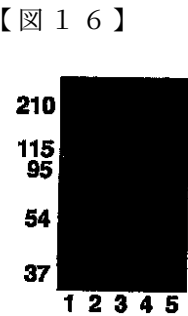


Figure 16

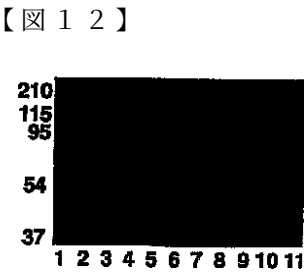


Figure 12

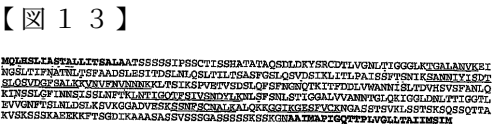


Figure 13

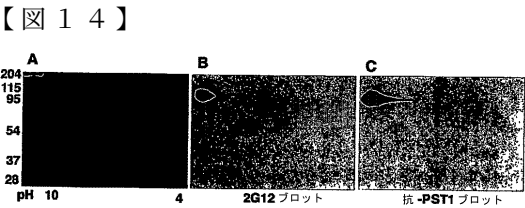


Figure 14

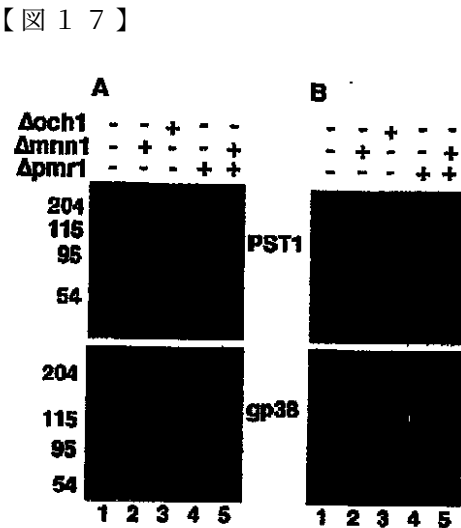


Figure 17

【図 18】



Figure 18

【図 19】

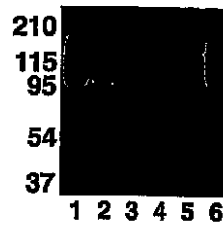


Figure 19

【図 20】

18 種内の PST1 HomoloGene	
哺乳動物	Homo sapiens ヒト
	Pan troglodytes チンパンジー
	Canis familiaris イヌ
	Mus musculus ハウスマウス
	Rattus norvegicus ラット
鳥類	Gallus gallus ニワトリ
昆虫	Drosophila melanogaster ハエ
	Anopheles gambiae カ
虫 (Worm)	Caenorhabditis elegans 小土壌線虫
真菌	Saccharomyces cerevisiae 酵母
	Schizosaccharomyces pombe 酵母
	Kluyveromyces fragilis 酵母
	Eremothecium gossypii 酵母
	Magnaporthe oryzae イネ病原菌
	Neurospora crassa アカパンカビ
植物	Arabidopsis thaliana 小葉花植物
	Oryza sativa 日本米
寄生虫	Plasmodium falciparum マラリア寄生虫

Figure 20

【図 21】

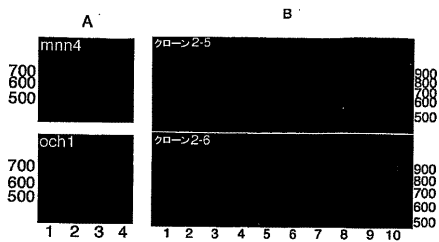


Figure 21

【図 22】

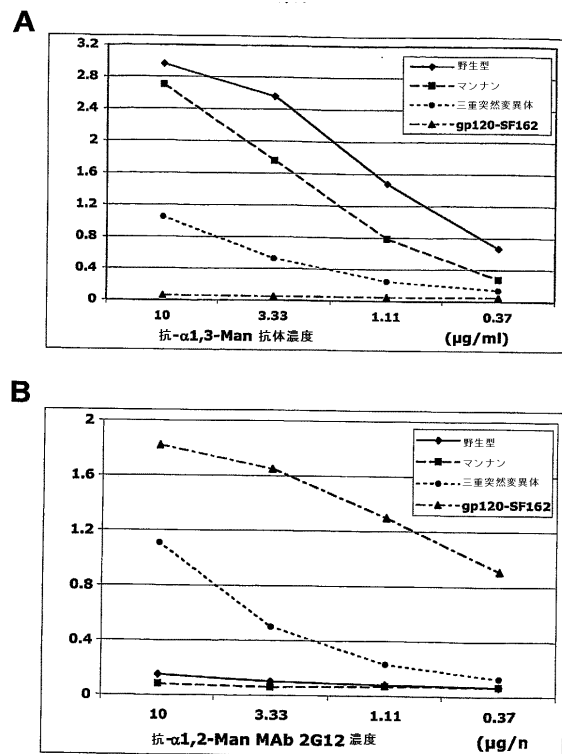


Figure 22

【図 23】

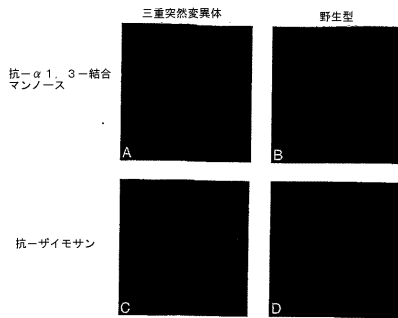


Figure 23

【図 24】

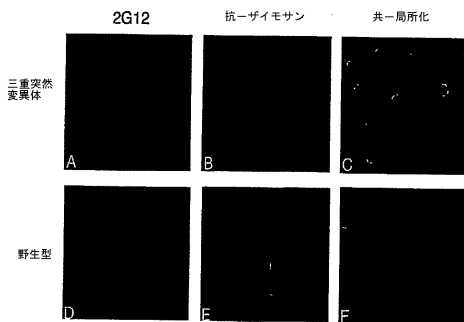


Figure 24

【図 27】

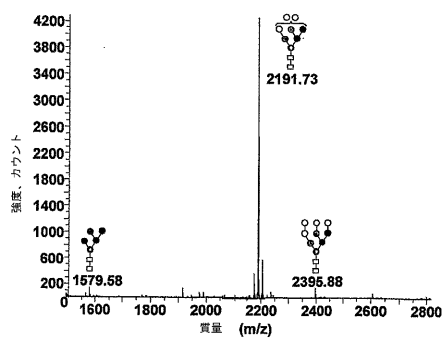


Figure 27

【図 25】

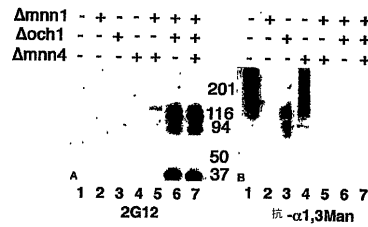


Figure 25

【図 26】

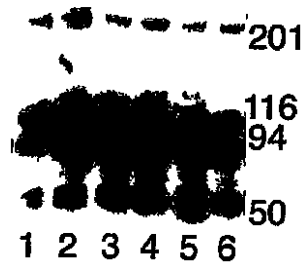


Figure 26

【図 28】

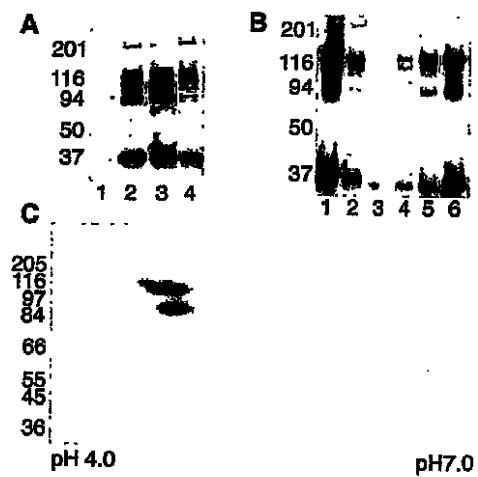


Figure 28

【図 29】

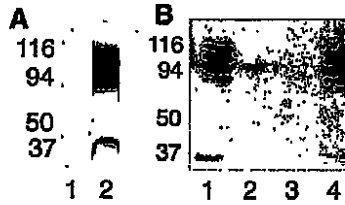


Figure 29

【図 31】

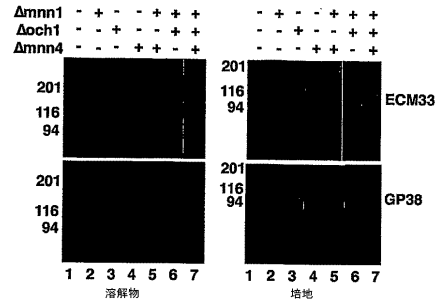


Figure 31

【図 30】

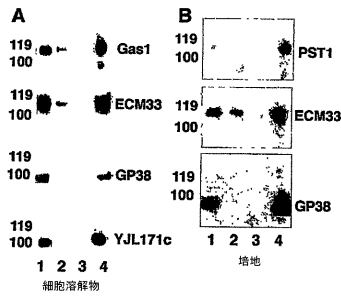


Figure 30

【図 32】

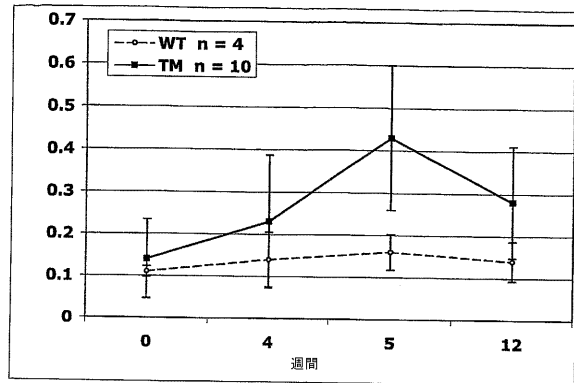


Figure 32

【図 33】

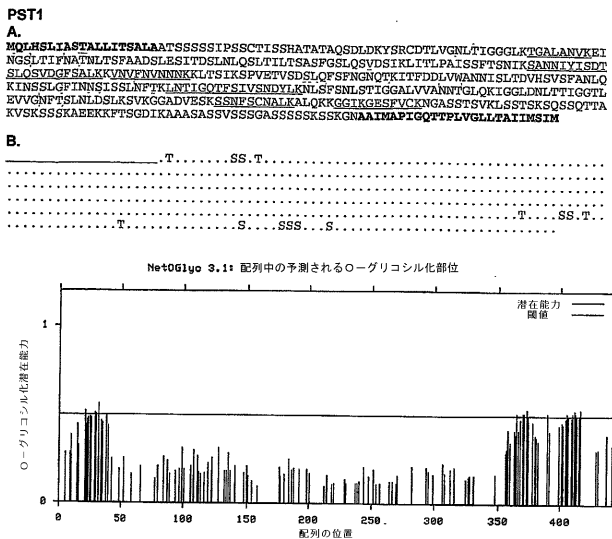


Figure 33

【図 34】

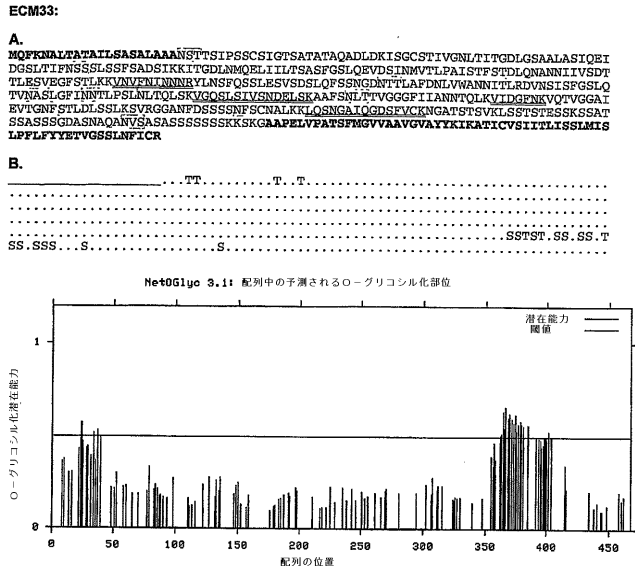


Figure 34

Figure 38

【図 39】

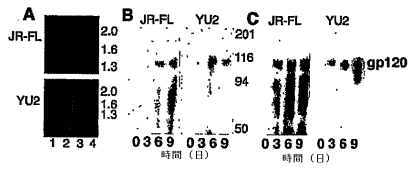


Figure 39

【図 40】

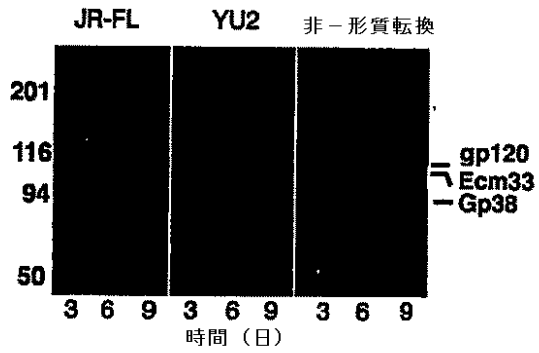


Figure 40

【手続補正書】

【提出日】平成20年6月11日(2008.6.11)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2009509970000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 06/37302

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - G01N 33/53 (2007.01)

USPC - 436/547

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
USPC - 436/547Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
USPC 436/547, 435/254.2, 435/69.9, 435/7.31, 435/7.1

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

PubWes(PGPUB, USPT, EPAB, JPAB), Google Scholar. Search Terms Used: yeast, fungus, mannose, 2G12, glycosylated, polypeptides, and antibody

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	Li et al. Design and synthesis of a template-assembled oligo mannose cluster as an epitome mimic for human HIV-neutralizing antibodies 2G12. Organic Biol. Chem., January 2004, Vol 2, pp 483-488. [online] [Retrieved 2007-07-30] Retrieved from http://www.rsc.org/delivery/_ArticleLinking/DisplayArticleForFree.cfm?doi=b314565d&JournalCode=OB , pg 483, col 1, para 1 to pg 484, col 1 para 1; 486, col 1, para 1; and, pg 488, col 1, para 3	1-4, 11-13, 40, 44-45, 52-53 and 60-61 5-10, 14-39, 41-43, 46-51, 54-59 and 62-64
Y	US 2004/0018588 A1 (CONTRERAS), 29 January 2004 (29.01.2004), para [0062], [0064], [0069], and [0136].	5-10
X — Y	Nakanishi-Shindo et al. Structure of the N-Linked Oligosaccharides That Show the Complete Loss of alpha-1,6-Polymannose Outer Chain from och 1, och 1 mnn 1, and och 1 mnn1 alg3 Mutants of Saccharomyces Cerevisiae. J. Biol. Chem., December 1993, Vol 268, No 35, pp 26338-26345 [online] [Retrieved 2007-07-30] Retrieved from the internet http://www.jbc.org/cgi/content/abstract/268/35/26338 , pg 26338, col 1, para 1 to col 2, para 1; and, pg 26339, col 1, para 1	65 14-39, 41-43, 46-51, 54-59 and 62-64

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 July 2007 (30.08.2007)

Date of mailing of the international search report

25 SEP 2007

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-3201

Authorized officer:

Lee W. Young

PCT Helpdesk: 571-272-4300
PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2007)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 06/37302

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

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

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

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

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

Group I: claims 1-34 and 40-64

Group II: claims 35-39

Group III: claim 65

Claims 1-34 of group I are directed to compositions for eliciting antibodies comprising glycosylated polypeptides, etc. (1-22), and related methods of preparing (23-34) and use (40-64) said compositions.

Claims 35-39 of group II are directed to mutant fungus cells, etc.

Claim 65 of group III is directed to a composition comprising a whole cell of a mutant yeast, etc.

It will be readily apparent that the claims of groups I-III form distinct inventive entities, as the compositions of polypeptides, mutant fungus cells, and a composition of a whole cell of a mutant yeast are separate and distinct entities that do not share any underlying unknown common feature. While antibody 2G12 is a common feature to the claims of groups I and II, said antibody is known in the art, and thus does not establish the necessary common unknown feature. It will be further noted that the composition of group III does not share any common feature, known or unknown, with the claims of groups I and II.

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

Remark on Protest

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

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	G 0 1 N 33/53		N
G 0 1 N 33/569	(2006.01)	G 0 1 N 33/569		H
A 6 1 P 31/00	(2006.01)	A 6 1 P 31/00		
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00		A

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 ルアレン, ロバート ジェームス
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1 0 3, サン ディエゴ, ジョージア ストリート
3 6 3 0, ナンバー 6

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA35 CA02 CA09 DA12 EA04 GA11 HA14
4B065 AA73X AA77X AA80X AA95Y AB01 AC14 BA02 BA09 CA45
4C085 AA03 BA65 CC08 DD33 DD62 EE01
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA53 CA05 DA75 EA22 FA74 GA26