(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2007-535317
(P2007-535317A)
(43)公表日　平成19年12月6日(2007.12.6)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	4B024
C12N 1/19	(2006.01)	C12N	1/19		4B064
C12N 1/15	(2006.01)	C12N	1/15		4B065
C12P 21/00	(2006.01)	C12P	21/00	C	4C084
C07K 14/435	(2006.01)	C07K	14/435		4H045

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 65 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2007-507921 (P2007-507921)
(86)(22)出願日　平成17年4月15日 (2005.4.15)
(85)翻訳文提出日　平成18年12月12日 (2006.12.12)
(86)国際出願番号　PCT/IB2005/051249
(87)国際公開番号　WO2005/100584
(87)国際公開日　平成17年10月27日 (2005.10.27)
(31)優先権主張番号　60/562,424
(32)優先日　平成16年4月15日 (2004.4.15)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　503007287
グライコフィ，　インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　ニューハンプシャー　０３７６６，　レバノン，　ラファイエッテ　ストリート　２１，　スイート　２００
(74)代理人　100062007
弁理士　川口　義雄
(74)代理人　100114188
弁理士　小野　誠
(74)代理人　100140523
弁理士　渡邊　千尋
(74)代理人　100119253
弁理士　金山　賢教
(74)代理人　100103920
弁理士　大崎　勝真

最終頁に続く

(54)【発明の名称】下等真核生物におけるガラクトシル化された糖タンパク質の産生

(57)【要約】
本発明は、末端β－ガラクトース残基を有すること及びフコース残基及びシアル酸残基を本質的に欠失していることを特徴とするヒト様糖タンパク質を産生する新規下等真核宿主細胞を提供する。本発明は、治療用糖タンパク質として使用できる、組換え型下等真核宿主細胞における受容体基質への、ＵＤＰ－ガラクトースからのガラクトース残基の転移を触媒するための方法も提供する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
末端β－ガラクトース残基を有すること及びヒト様糖タンパク質においてフコース残基及びシアル酸残基が本質的に欠失していることを特徴とするヒト様タンパク質を産生する組換え型下等真核宿主細胞。
【請求項２】
前記宿主細胞がβ１，４－ガラクトシルトランスフェラーゼ活性を発現する、請求項１に記載の宿主細胞。
【請求項３】
前記宿主細胞がＵＤＰ－ガラクトース輸送活性を発現する、請求項１に記載の宿主細胞。
【請求項４】
前記宿主細胞がＵＤＰ－ガラクトースの上昇したレベルを呈する、請求項１に記載の宿主細胞。
【請求項５】
β－ガラクトシルトランスフェラーゼ活性をコード化する単離された核酸分子と、ＵＤＰ－ガラクトース輸送活性、ＵＤＰ－ガラクトースＣ４エピメラーゼ活性又はガラクトキナーゼ活性又はガラクトース－１－リン酸ウリジルトランスフェラーゼ活性をコード化する少なくとも１つの単離された核酸分子とを含む、ヒト様糖タンパク質を産生する組換え型下等真核宿主細胞。
【請求項６】
前記ＵＤＰ－ガラクトース輸送活性がＳｐＵＧＴ、ｈＵＧＴ１、ｈＵＧＴ２及びＤｍＵＧＴからなる群から選択される遺伝子によってコード化されている、請求項３又は請求項５に記載の宿主。
【請求項７】
前記ＵＤＰ－ガラクトースＣ４エピメラーゼ活性がＳｐＧＡＬＥ、ＳｃＧＡＬ１０及びｈＧＡＬＥからなる群から選択される遺伝子によってコード化されている、請求項４又は請求項５に記載の宿主。
【請求項８】
ヒト様糖タンパク質を産生する組換え型下等真核宿主細胞であり、前記宿主細胞は末端ＧｌｃＮＡｃ残基を含む糖タンパク質のＮ結合したオリゴ糖分岐鎖へとβ－ガラクトース残基を転移でき、前記Ｎ－結合したオリゴ糖分岐鎖は、トリマンノース中心上にあるＧｌｃＮＡｃβ１，２－Ｍａｎα１，３、ＧｌｃＮＡｃβ１，４－Ｍａｎα１，３、ＧｌｃＮＡｃβ１，２－Ｍａｎα１，６、ＧｌｃＮＡｃβ１，４－Ｍａｎα１，６、及びＧｌｃＮＡｃβ１，６－Ｍａｎα１，６からなる群から選択される、前記宿主細胞。
【請求項９】
シアル酸に対する受容体基質である糖タンパク質を産生される、請求項１において生じる組換え型下等真核宿主細胞。
【請求項１０】
前記宿主細胞が、前記糖タンパク質上のグリカンに関して１，６マンノシルトランスフェラーゼ活性を惹起する点において弱められている、請求項１、請求項５又は請求項８のいずれか１項に記載の宿主。
【請求項１１】
前記宿主細胞が、ドリチル－Ｐ－Ｍａｎ：Ｍａｎ５ＧｌｃＮＡｃ２－ＰＰ－ドリチルα－１，３－マンノシルトランスフェラーゼ活性において低下されている又は欠失されている、請求項１、請求項５又は請求項８の何れか１項に記載の宿主。
【請求項１２】
該宿主細胞がα１，２－マンノシダーゼＩ活性、マンノシダーゼＩＩ活性、マンノシダーゼＩＩｘ活性及びクラスＩＩＩマンノシダーゼ活性から選択されるマンノシダーゼ活性を発現する、請求項１、請求項５又は請求項８のいずれか１項に記載の宿主。

【請求項１３】
該宿主細胞がＧｎＴＩ、ＧｎＴＩＩ、ＧｎＴＩＩＩ、ＧｎＴＩＶ、ＧｎＴＶ、ＧｎＴＶＩ及びＧｎＴＩＸからなる群から選択されるＧｎＴ活性を発現する、請求項１、請求項５又は請求項８のいずれか１項に記載の宿主。
【請求項１４】
前記宿主細胞が、ピキア・パストリス（Ｐｉｃｈｉａ ｐａｓｔｏｒｉｓ）、ピキアフィンランディカ（Ｐｉｃｈｉａ ｆｉｎｌａｎｄｉｃａ）、ピキア・トレハロフィラ（Ｐｉｃｈｉａ ｔｒｅｈａｌｏｐｈｉｌａ）、ピキア・コクラマエ（Ｐｉｃｈｉａ ｋｏｃｌａｍａｅ）、ピキア・メンブラナエファシエンス（Ｐｉｃｈｉａ ｍｅｍｂｒａｎａｅ ｆａｃｉｅｎｓ）、ピキア・ミニュータ（Ｐｉｃｈｉａ ｍｉｎｕｔａ）（オガタエア・ミニュータ（Ｏｇａｔａｅａ ｍｉｎｕｔａ）、ピキア・リンドネリ（Ｐｉｃｈｉａ ｌｉｎｄｎｅｒｉ））、ピキア・オプンティアエ（Ｐｉｃｈｉａ ｏｐｕｎｔｉａｅ）、ピキアサーモトレランス（Ｐｉｃｈｉａ ｔｈｅｒｍｏｔｏｌｅｒａｎｓ）、ピキア・サリクタリア（Ｐｉｃｈｉａ ｓａｌｉｃｔａｒｉａ）、ピキア・グエルキューム（Ｐｉｃｈｉａ ｇｕｅｒｃｕｕｍ）、ピキアピジュペリ（Ｐｉｃｈｉａ ｐｉｊｐｅｒｉ）、ピキア・スティプティス（Ｐｉｃｈｉａ ｓｔｉｐｔｉｓ）、ピキア・メタノリカ（Ｐｉｃｈｉａ ｍｅｔｈａｎｏｌｉｃａ）、ピキア種（Ｐｉｃｈｉａ ｓｐ．）、サッカロマイセス・セレビシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）、サッカロミセス種（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｓｐ．）、ハンゼヌラ・ポリモルファ（Ｈａｎｓｅｎｕｌａ ｐｏｌｙｍｏｒｐｈａ）、クルイベロミセス種（Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ ｓｐ．）、クルイベロミセス・ラクティス（Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ ｌａｃｔｉｓ）、カンジダ・アルビカンス（Ｃａｎｄｉｄａ ａｌｂｉｃａｎｓ）、アスペリギルス・ニドウランス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｎｉｄｕｌａｎｓ）、アスペリギルス・ニガー（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｎｉｇｅｒ）、アスペルギルス・オリゼ（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｓ ｏｒｙｚａｅ）、トリコデルマ・リーゼイ（Ｔｒｉｃｈｏｄｅｒｍａ ｒｅｅｓｅｉ）、クリソスポリウム・ラックノウエンス（Ｃｈｒｙｓｏｓｐｏｒｉｕｍ ｌｕｃｋｎｏｗｅｎｓｅ）、フサリウム種（Ｆｕｓａｒｉｕｍ ｓｐ．）、フザリウム・グラミネウム（Ｆｕｓａｒｉｕｍ ｇｒａｍｉｎｅｕｍ）、フザリウム・ベネナツム（Ｆｕｓａｒｉｕｍ ｖｅｎｅｎａｔｕｍ）、フィスコミトレラ・パテンス（Ｐｈｙｓｃｏｍｉｔｒｅｌｌａ ｐａｔｅｎｓ）及びノイロスポラ・クロッサ（Ｎｅｕｒｏｓｐｏｒａ ｃｒｏｓｓａ）からなる群から選択される、請求項１、請求項５又は請求項８のいずれか一項に記載の宿主。
【請求項１５】
末端β－ガラクトース残基を有し、前記糖タンパク質上にフコース残基及びシアル酸残基が本質的に欠失していることを特徴とするヒト様糖タンパク質を含む組成物。
【請求項１６】
前記糖タンパク質が、ＧａｌＧｌｃＮＡｃＭａｎ$_3$ＧｌｃＮＡｃ$_2$、ＧａｌＧｌｃＮＡｃ$_2$Ｍａｎ$_3$ＧｌｃＮＡｃ$_2$、Ｇａｌ$_2$ＧｌｃＮＡｃ$_2$Ｍａｎ$_3$ＧｌｃＮＡｃ$_2$、ＧａｌＧｌｃＮＡｃ$_3$Ｍａｎ$_3$ＧｌｃＮＡｃ$_2$、Ｇａｌ$_2$ＧｌｃＮＡｃ$_3$Ｍａｎ$_3$ＧｌｃＮＡｃ$_2$、Ｇａｌ$_3$ＧｌｃＮＡｃ$_3$Ｍａｎ$_3$ＧｌｃＮＡｃ$_2$、ＧａｌＧｌｃＮＡｃ$_4$Ｍａｎ$_3$ＧｌｃＮＡｃ$_2$、Ｇａｌ$_2$ＧｌｃＮＡｃ$_4$Ｍａｎ$_3$ＧｌｃＮＡｃ$_2$、Ｇａｌ$_3$ＧｌｃＮＡｃ$_4$Ｍａｎ$_3$ＧｌｃＮＡｃ$_2$、Ｇａｌ$_4$ＧｌｃＮＡｃ$_4$Ｍａｎ$_3$ＧｌｃＮＡｃ$_2$、ＧａｌＧｌｃＮＡｃＭａｎ$_5$ＧｌｃＮＡｃ$_2$、ＧａｌＧｌｃＮＡｃ$_2$Ｍａｎ$_5$ＧｌｃＮＡｃ$_2$、Ｇａｌ$_2$ＧｌｃＮＡｃ$_2$Ｍａｎ$_5$ＧｌｃＮＡｃ$_2$、ＧａｌＧｌｃＮＡｃ$_3$Ｍａｎ$_5$ＧｌｃＮＡｃ$_2$、Ｇａｌ$_2$ＧｌｃＮＡｃ$_3$Ｍａｎ$_5$ＧｌｃＮＡｃ$_2$及びＧａｌ$_3$ＧｌｃＮＡｃ$_3$Ｍａｎ$_5$ＧｌｃＮＡｃ$_2$からなる群から選択されるＮ結合したオリゴ糖を含む、請求項１５に記載の組成物。
【請求項１７】
前記糖タンパク質が、エリスロポエチン、例えば、サイトカイン、インターフェロン－ａ、インターフェロン－ｂ、インターフェロン－ｇ、インターフェロン－ｗ及び顆粒球－

ＣＳＦ、ＧＭ－ＣＳＦ、例えば、凝固因子、第ＶＩＩＩ因子、第ＩＸ因子及びヒトタンパク質Ｃ、抗トロンビンＩＩＩ、トロンビン、可溶性ＩｇＥ受容体ａ鎖、ＩｇＧ、ＩｇＧ断片、ＩｇＧ融合体、ＩｇＭ、インターロイキン、ウロキナーゼ、キマーゼ、及び尿素トリプシン阻害剤、ＩＧＦ結合タンパク質、上皮成長因子、成長ホルモン放出因子、アネキシンＶ融合タンパク質、アンジオスタチン、血管内皮増殖因子－２、骨髄系前駆体阻害因子－１、オステオプロテジェリン、ａ－１－抗トリプシン、ａ－胎児タンパク質、ＤＮａｓｅＩＩ、ヒトプラスミノーゲンのクリングル３、グルコセレブロシダーゼ、ＴＮＦ結合タンパク質１、卵胞刺激ホルモン、細胞傷害性Ｔリンパ球関連抗原４－Ｉｇ、膜貫通活性化因子及びカルシウム調節因子及びサイクロフィリンリガンド、可溶性ＴＮＦ受容体Ｆｃ融合体、グルカゴン様タンパク質１、ＩＬ－２受容体アゴニストからなる群から選択される、請求項１５に記載の組成物。

【請求項１８】

内在性レベルを上回ってＵＤＰ－ガラクトースを産生する段階を含む、下等真核宿主細胞におけるヒト様糖タンパク質を産生するための方法。

【請求項１９】

請求項１８に記載の方法によって作製された宿主細胞。

【請求項２０】

フコース残基及びシアル酸残基のない状態においてハイブリッド又は複雑な糖タンパク質上にガラクトース残基を転移させる段階を含む、下等真核宿主細胞においてヒト様糖タンパク質組成物を作製するための方法。

【請求項２１】

前記ガラクトース残基が、$GlcNAcMan_3GlcNAc_2$、$GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$、$GlcNAc_3Man_3GlcNAc_2$、$GlcNAc_4Man_3GlcNAc_2$、$GlcNAc_5Man_3GlcNAc_2$、$GlcNAc_6Man_3GlcNAc_2$、$GlcNAcMan_4GlcNAc_2$、$GlcNAcMan_5GlcNAc_2$、$GlcNAc_2Man_5GlcNAc_2$及び$GlcNAc_3Man_5GlcNAc_2$からなる群から選択される糖タンパク質上へ転移される、請求項２０に記載の方法。

【請求項２２】

前記転移段階が、β－ガラクトシルトランスフェラーゼ活性をコード化する遺伝子又はβ－ガラクトシルトランスフェラーゼの触媒作用活性のある断片を発現させることをさらに含む、請求項２０に記載の方法。

【請求項２３】

前記ガラクトシルトランスフェラーゼ活性がヒトＧａｌＴＩ、ＧａｌＴＩＩ、ＧａｌＴＩＩＩ、ＧａｌＴＩＶ、ＧａｌＴＶ、ＧａｌＴＶＩ、ＧａｌＴＶＩＩ、ウシＧａｌＴＩ、アフリカツメガエル（Ｘ．ｌｅａｖｉｓ）ＧａｌＴ及び線虫（Ｃ．ｅｌｅｇａｎｓ）ＧａｌＴＩＩからなる群から選択される、請求項２２に記載の方法。

【請求項２４】

前記転移段階が、ＵＤＰ－ガラクトース輸送活性を発現させることをさらに含む、請求項２０に記載の方法。

【請求項２５】

前記ＵＧＴがＳ．ホムベ（Ｓ．ｐｏｍｂｅ）ＵＧＴ、ヒトＵＧＴ１、ヒトＵＧＴ２、及びキイロショウジョウバエ（Ｄ．ｍｅｌａｎｏｇａｓｔｅｒ）ＵＧＴからなる群から選択される、請求項２４に記載の方法。

【請求項２６】

前記転移段階が、ＵＤＰ－ガラクトースＣ４エピメラーゼ活性をコード化する遺伝子を発現させることをさらに含む、請求項２０に記載の方法。

【請求項２７】

前記エピメラーゼ活性がＳ．ポムベ（Ｓ．ｐｏｍｂｅ）ＧａｌＥ、Ｓ．セレビシエ（Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）Ｇａｌ１０及びヒトＧａｌＥからなる群から選択される、請求項２６に記載の方法。

【請求項２８】
少なくとも３３％ガラクトシル化された糖タンパク質組成物が作製される、請求項２０ないし請求項２７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２９】
少なくとも６０％ガラクトシル化された糖タンパク質組成物が作製される、請求項２０ないし請求項２７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３０】
少なくとも９０％ガラクトシル化された糖タンパク質組成物が作製される、請求項２０ないし請求項２７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３１】
請求項２０ないし請求項２７の何れか１項によって作製された糖タンパク質組成物。
【請求項３２】
前記糖タンパク質組成物がシアル酸に対する受容体基質である、請求項２０ないし請求項２７の何れか１項によって作製される糖タンパク質組成物。
【請求項３３】
前記糖タンパク質がエリスロポエチン、サイトカイン、例えば、インターフェロン－ａ、インターフェロン－ｂ、インターフェロン－ｇ、インターフェロン－ｗ及び顆粒球－ＣＳＦ、ＧＭ－ＣＳＦ、凝固因子、例えば、第ＶＩＩＩ因子、第ＩＸ因子、及びヒトタンパク質Ｃ、抗トロンビンＩＩＩ、トロンビン、可溶性ＩｇＥ受容体ａ鎖、ＩｇＧ、ＩｇＧ断片、ＩｇＧ融合体、ＩｇＭ、インターロイキン、ウロキナーゼ、キマーゼ、及び尿素トリプシン阻害剤、ＩＧＦ結合タンパク質、上皮成長因子、成長ホルモン放出因子、アネキシンＶ融合タンパク質、アンジオスタチン、血管内皮増殖因子－２、骨髄系前駆体阻害因子－１、オステオプロテジェリン、ａ－１－抗トリプシン、ａ－胎児タンパク質、ＤＮａｓｅＩＩ、ヒトプラスミノーゲンのクリングル３、グルコセレブロシダーゼ、ＴＮＦ結合タンパク質１、卵胞刺激ホルモン、細胞傷害性Ｔリンパ球関連抗原４－Ｉｇ、膜貫通活性化因子及びカルシウム調節因子及びサイクロフィリンリガンド、可溶性ＴＮＦ受容体Ｆｃ融合体、グルカゴン様タンパク質１、ＩＬ－２受容体アゴニストからなる群から選択される、請求項３１によって作成される糖タンパク質組成物。
【請求項３４】
前記糖タンパク質が、ピキア・パストリス（Ｐｉｃｈｉａ ｐａｓｔｏｒｉｓ）、ピキア・フィンランディカ（Ｐｉｃｈｉａ ｆｉｎｌａｎｄｉｃａ）、ピキア・トレハロフィラ（Ｐｉｃｈｉａ ｔｒｅｈａｌｏｐｈｉｌａ）、ピキア・コクラマエ（Ｐｉｃｈｉａ ｋｏｃｌａｍａｅ）、ピキア・メンブラナエファシエンス（Ｐｉｃｈｉａ ｍｅｍｂｒａｎａｅｆａｃｉｅｎｓ）、ピキア・ミニュータ（Ｐｉｃｈｉａ ｍｉｎｕｔａ）（オガタエア・ミニュータ（Ｏｇａｔａｅａ ｍｉｎｕｔａ）、ピキア・リンドネリ（Ｐｉｃｈｉａ ｌｉｎｄｎｅｒｉ））、ピキア・オプンティアエ（Ｐｉｃｈｉａ ｏｐｕｎｔｉａｅ）、ピキア・サーモトレランス（Ｐｉｃｈｉａ ｔｈｅｒｍｏｔｏｌｅｒａｎｓ）、ピキア・サリクタリア（Ｐｉｃｈｉａ ｓａｌｉｃｔａｒｉａ）、ピキア・グエルキューム（Ｐｉｃｈｉａ ｇｕｅｒｃｕｕｍ）、ピキア・ピジュペリ（Ｐｉｃｈｉａ ｐｉｊｐｅｒｉ）、ピキア・スティプティス（Ｐｉｃｈｉａ ｓｔｉｐｔｉｓ）、ピキア・メタノリカ（Ｐｉｃｈｉａ ｍｅｔｈａｎｏｌｉｃａ）、ピキア種（Ｐｉｃｈｉａ ｓｐ．）、サッカロマイセス・セレビシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）、サッカロミセス種（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｓｐ．）、ハンゼヌラ・ポリモルファ（Ｈａｎｓｅｎｕｌａ ｐｏｌｙｍｏｒｐｈａ）、クルイベロミセス種（Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ ｓｐ．）、クルイベロミセス・ラクティス（Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ ｌａｃｔｉｓ）、カンジダ・アルビカンス（Ｃａｎｄｉｄａ ａｌｂｉｃａｎｓ）、アスペリギルス・ニドウランス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｎｉｄｕｌａｎｓ）、アスペリギルス・ニガー（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｎｉｇｅｒ）、アスペルギルス・オリゼ（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｓ ｏｒｙｚａｅ）、トリコデルマ・リーゼイ（Ｔｒｉｃｈｏｄｅｒｍａ ｒｅｅｓｅｉ）、クリソスポリウム・ラックノウエンス（Ｃｈｒｙｓｏｓｐｏｒｉｕｍ

ｌｕｃｋｎｏｗｅｎｓｅ）、フサリウム種（Ｆｕｓａｒｉｕｍ ｓｐ．）、フザリウム・グラミネウム（Ｆｕｓａｒｉｕｍ ｇｒａｍｉｎｅｕｍ）、フザリウム・ベネナツム（Ｆｕｓａｒｉｕｍ ｖｅｎｅｎａｔｕｍ）、フィスコミトレラ・パテンス（Ｐｈｙｓｃｏｍｉｔｒｅｌｌａ ｐａｔｅｎｓ）及びノイロスポラ・クロッサ（Ｎｅｕｒｏｓｐｏｒａ ｃｒｏｓｓａ）からなる群から選択される宿主細胞から産生される、請求項３１において作製される糖タンパク質組成物。

【請求項３５】

ＧａｌＮＡｃトランスフェラーゼ活性を発現する組換え型下等真核宿主細胞。

【請求項３６】

異種性ＵＤＰａｓｅ活性をコード化する遺伝子を発現する組換え型下等真核宿主細胞。

【請求項３７】

（ａ）配列番号１４、（ｂ）配列番号１３のドナーヌクレオチド結合部位のアミノ酸残基と少なくとも約９０％類似しているもの、（ｃ）配列番号１４と少なくとも９２％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％又は少なくとも９９．９％同一である核酸配列、（ｄ）配列番号１３のアミノ酸配列を有する保存されたポリペプチドをコード化する核酸配列、（ｅ）配列番号１３と少なくとも７８％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％又は少なくとも９９．９％同一のポリペプチドをコード化する核酸配列、（ｆ）緊縮な条件下で配列番号１３とハイブリダイズする核酸配列、及び（ｇ）長さにおいて少なくとも６０個の連続したヌクレオチドである（ａ）ないし（ｆ）のうちのいずれか１つの断片を含む核酸配列からなる群から選択される核酸配列を含むか又は前記核酸配列からなる単離されたポリヌクレオチド。

【請求項３８】

配列番号４８ないし配列番号５２の保存された領域からなる群から選択される核酸配列を含むか又は前記核酸配列からなり、コード化されたポリペプチドがガラクトシル化した糖タンパク質の産生のためのＵＤＰ－グルコース及びＵＤＰ－ガラクトースの相互変換を触媒することに関与している、修飾されたポリヌクレオチド。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

関連出願の相互参照

本願は、２００３年２月２０日に出願された米国特許出願第１０／３７１，８７７号の一部継続出願であり、前記特許出願は、米国特許法第１１９（ｅ）に基づいて、２０００年６月２８日に出願された米国仮出願第６０／２１４，３５８号、及び２００１年３月３０日に出願された米国仮出願第６０／２７９，９９７号の利益を主張する、２００１年６月２７日に出願された米国特許出願第０９／８９２，５９１号の一部継続出願であり、これらは各々、その全体を参照により本明細書に組み込まれる。本願は、２００１年１２月２７日に出願した米国仮出願第６０／３４４，１６９号の利益を主張する、２００２年１２月２４日に出願されたＰＣＴ／ＵＳ０２／４１５１０の一部継続出願であり、前記出願は各々、その全体を参照により本明細書に組み込まれる。本願は、２００４年４月１５日に出願した米国仮出願第６０／５６２，４２４号に対する優先権も主張し、前記出願は、その全内容が参考文献により本明細書に組み込まれる。

【０００２】

発明の分野

本発明は、下等真核生物におけるタンパク質のグリコシル化の分野、特に末端のガラクトース残基を有する糖タンパク質の産生に関する。本発明はさらに、グリカン上でのガラクトシル転移に関与する酵素をコード化する遺伝子を含む新規の宿主細胞及び、治療剤として特に有用な糖タンパク質の産生に関する。

【背景技術】

【０００３】

酵母及び糸状菌はいずれも、組換えタンパク質の細胞内産生及び分泌型産生の両者にうまく使用されてきた（Ｃｅｒｅｇｈｉｎｏ，Ｊ．Ｌ．及びＪ．Ｍ．Ｃｒｅｇｇ ２０００ ＦＥＭＳ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ Ｒｅｉｖｅｗｓ ２４（１）： ４５－６６；Ｈａｒｋｋｉ，Ａ．ほか １９８９ Ｂｉｏ－Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ７（６）： ５９６； Ｂｅｒｋａ，Ｒ．Ｍ．ほか １９９２ Ａｂｓｔｒ．Ｐａｐｅｒｓ Ａｍｅｒ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．２０３： １２１－ＢＩＯＴ； Ｓｖｅｔｉｎａ，Ｍ．ほか ２０００ Ｊ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．７６（２－３）： ２４５－２５１）。Ｋ．ラクティス（Ｋ．ｌａｃｔｉｓ）、ピキア・パストリス（Ｐｉｃｈｉａ ｐａｓｔｏｒｉｓ）、ピキア・メタノリカ（Ｐｉｃｈｉａ ｍｅｔｈａｎｏｌｉｃａ）及びハンゼヌラ・ポリモルファ（Ｈａｎｓｅｎｕｌａ ｐｏｌｙｍｏｒｐｈａ）などのさまざまな酵母は、高い細胞密度まで生育でき、多量の組換え型タンパク質を分泌できるため、真核生物発現系として特に重要な役割を担ってきた。同様に、アスペリギルス・ニガー（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｎｉｇｅｒ）、フザリウム種（Ｆｕｓａｒｉｕｍ ｓｐ。）、ノイロスポラ・クロッサ（Ｎｅｕｒｏｓｐｏｒａ ｃｒｏｓｓａ）及びその他の糸状菌は、産業スケールで糖タンパク質を効率よく産生するのに使用されてきた。しかしながら、これらの真核微生物のいずれかにおいて発現する糖タンパク質は、動物におけるそれとはＮ－グリカン構造において実質的に異なっている。このことは、グリコシル化した治療用タンパク質の産生のための宿主として酵母又は糸状菌の使用を妨げてきた。

【０００４】

目下のところ、酵母、糸状菌、植物、藻類及び昆虫の細胞系（下等真核生物）などの発現系は、哺乳類系よりも安全で迅速であり、かつより高い生成物力価を生じる治療用タンパク質の産生のために研究されてきている。これらの系は、Ｎ結合したオリゴ糖合成における共通の分泌経路を共有する。最近、Ｐ．パストリス（Ｐ．ｐａｓｔｏｒｉｓ）の分泌経路が遺伝子工学的に改変でき、ヒト及び他の高等哺乳類におけるＮ－グリカンの早期のプロセシングを模倣する連続したグリコシル化反応が実施できることが示された（Ｃｈｏｉほか、Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ ２００３年４月２９日号；１００（９）：５０２２－５０２７）。さらに、酵母Ｐ．パストリスにおける分泌経路を改変することを通じてガラクトースを欠失する複雑なＮ－グリカンを有するヒト糖タンパク質の産生が示された（Ｈａｍｉｌｔｏｎほか、Ｓｃｉｅｎｃｅ．２００３年８月２９日号；３０１（５６３７）：１２４４－１２４６）。哺乳類細胞においては、更なる成熟にはガラクトース転移が関与している。したがって、酵母及び下等真核生物からの複雑なグリコシル化経路の成熟は、β１，４－ガラクトシルトランスフェラーゼの機能的発現を必要とする。

【０００５】

ＵＤＰ－Ｇａｌ：βＧｌｃＮＡｃβ１，４－ガラクトシルトランスフェラーゼ（β１，４ＧａｌＴ）の組換え発現は哺乳類細胞、昆虫細胞（例、Ｓｆ－９）及び酵母細胞において示されてきた。（内在性ＩＩ型膜ドメインを欠失する）ヒトβ１，４－ガラクトシルトランスフェラーゼＩ（ＥＣ２．４．１．２２）の可溶性形態をコード化するｃＤＮＡもメチロトローフの酵母Ｐ．パストリスにおいて発現された（Ｍａｌｉｓｓａｒｄほか Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ Ｒｅｓ Ｃｏｍｍｕｎ ２０００年１月７日号；２６７（１）：１６９－１７３）。さらに、非常に低い変換効率で酵母ゴルジ体において前記酵素のある程度の活性を示す、ヒトβ１，４－ガラクトシルトランスフェラーゼ（Ｇａｌ－Ｔｆ）の触媒作用ドメインへ融合されたＳｃＭｎｔ１ｐをコード化する遺伝子融合体が発現された（Ｓｃｈｗｉｅｎｔｅｋほか、Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ １９９６年２月１６日号；２７１（７）：３３９８－３４０５）。したがって、末端ＧｌｃＮＡｃを含有するグリカンを産生する宿主の分泌経路へβ１，４－ガラクトシルトランスフェラーゼ（β１，４ＧａｌＴ）を向けることは、ある種のガラクトース転移が生じることが期待される。しかしながら、より高等の真核生物における複雑なグリカンの形成は、哺乳類細胞においてＧａｌＴＩと競合して作用することがわかっているマンノシダーゼＩＩの作用が関与している（Ｆｕｋｕｔａほか、Ａｒｃｈ Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ ２００１年８月１

日号；３９２（１）：７９－８６）。したがって、ＧａｌＴの成熟前の作用は、前記分泌経路における複雑なガラクトシル化糖タンパク質の形成を防止し、主としてハイブリッドグリカンを産生することが期待される。

【０００６】

哺乳類糖タンパク質のＮ－グリカンは、典型的にガラクトース、フコース及び末端シアル酸を含む。これらの糖は、酵母及び糸状菌において産生される糖タンパク質に関して通常見られない。ヒトにおいて、ヌクレオチド糖前駆体（例、ＵＤＰ－Ｎ－アセチルグルコサミン、ＵＤＰ－Ｎ－アセチルガラクトサミン、ＣＭＰ－Ｎ－アセチルノイラミン酸、ＵＤＰ－ガラクトース、ＧＤＰ－フコース等）がサイトゾル中で合成され、ゴルジ体へと輸送され、そこでこれらはグリコシルトランスフェラーゼによってＮ－グリカンへと組み込まれる（Ｓｏｍｍｅｒｓ及びＨｉｒｓｃｈｂｅｒｇ、１９８１ Ｊ．Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ ９１（２）： Ａ４０６－Ａ４０６； Ｓｏｍｍｅｒｓ及びＨｉｒｓｃｈｂｅｒｇ １９８２ Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２５７（１８）： ８１１－８１７； Ｐｅｒｅｚ及びＨｉｒｓｃｈｂｅｒｇ １９８７ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ １３８： ７０９－７１５）。

【０００７】

異種性のタンパク質発現系におけるグリコシル化エンジニアリングは、ヌクレオチド糖前駆体の合成に関与するさまざまな酵素の発現が関与していよう。酵素ＵＤＰ－ガラクトース４－エピメラーゼは、糖ヌクレオチドＵＤＰ－グルコースをＵＤＰ－ガラクトースへ、Ｃ４のエピマー化を介して変換する。前記酵素は唯一の炭素源としてガラクトースを使用できる生物体において見られる。最近、二機能性酵素であるＧａｌ１０ｐがＵＤＰ－グルコース４－エピメラーゼ及びアルドース１－エピメラーゼの両者の活性を有するサッカロミセス・セレビシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）において精製された（Ｍａｊｕｍｄａｒほか、Ｅｕｒ Ｊ Ｂｉｏｃｈｅｍ ２０００年2月号；２７１（４）： ７５３－７５９）。

【０００８】

ＵＤＰ－ガラクトース輸送体（ＵＧＴ）は、ＵＤＰ－ガラクトースをサイトゾルからゴルジ体の内腔まで輸送する。２つの異種性遺伝子である、シゾサッカロミイセス・ポムベ（Ｓｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｐｏｍｂｅ）からα１，２－ガラクトシルトランスフェラーゼ（α１，２ＧａｌＴ）をコード化するｇｍａｌ２（＋）及びヒトＵＤＰ－ガラクトース輸送体をコード化するｈＵＧＴ２は、ガラクトシル化に必要な細胞内条件を検討するために、Ｓ．セレビシエにおいて機能的に発現された。タンパク質ガラクトシル化とＵＤＰ－ガラクトース輸送活性との相関により、ＵＤＰ－Ｇａｌ輸送体の外来性の供給がＳ．セレビシエにおける効率的なガラクトシル化に重要な役割を果たすことが示された（Ｋａｉｎｕｍａ，１９９９ Ｇｌｙｃｏｂｉｏｌｏｇｙ ９（２）：１３３－１４１）。同様に、Ｓ．ポムベ由来のＵＤＰ－ガラクトース輸送体がクローニングされた（Ａｏｋｉ，１９９９ Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．１２６（５）：９４０－９５０； Ｓｅｇａｗａ，１９９９ Ｆｅｂｓ Ｌｅｔｔｅｒｓ ４５１（３）： ２９５－２９８）。

【０００９】

グリコシル転移反応は典型的に、ヌクレオシドの二リン酸塩又は一リン酸塩である副産物を生じる。一リン酸塩は対抗輸送メカニズムによってヌクレオシドの二リン酸塩糖と交換に直接輸送できるのに対し、二リン酸ヌクレオシド（例、ＧＤＰ）は、輸送される前に、リン酸分解酵素（例、ＧＤＰａｓｅ）によって開裂されてヌクレオシドの一リン酸塩及び無機リン酸塩が生じなければならない。この反応は、効率的なグリコシル化にとって重要であり、例えば、Ｓ．セレビシエ由来のＧＤＰａｓｅはマンノシル化に必要であることがわかっている。しかしながら、前記ＧＤＰａｓｅはＵＤＰに対して活性が９０％低下している（Ｂｅｒｎｉｎｓｏｎｅほか、１９９４ Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６９（１）： ２０７－２１１）。下等真核生物はゴルジ体ベースの糖タンパク質合成のためにＵＤＰ－糖前駆体を利用しないため、ゴルジ体においてＵＤＰ特異的ジリン酸分解酵素活性を典型的に欠いている。細胞壁の多糖類へ（ＵＤＰ－ガラクトースから）ガラクトース残基

を付加することがわかっているＳ．セレビシエは、特異的ＵＤＰａｓｅ活性を有することがわかっていて、このような酵素についての有力な必要性を示している（Ｂｅｒｎｉｎｓｏｎｅほか、１９９４）。

【００１０】

ＵＤＰはグリコシルトランスフェラーゼの有力な阻害剤であることが公知であり、このグリコシル化の副産物の除去はゴルジ体の内腔におけるグリコシルトランスフェラーゼの阻害を防止するのに重要であり得る（Ｋｈａｔａｒａほか、１９７４）。Ｂｅｒｎｉｎｓｏｎｅ，Ｐほか １９９５ Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７０（２４）： １４５６４－１４５６７； Ｂｅａｕｄｅｔ，Ｌ．ほか １９９８ Ａｂｃ Ｔｒａｎｓｐｏｒｔｅｒｓ： Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｅｌｌｕｌａｒ，ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ａｓｐｅｃｔｓ．２９２： ３９７－４１３を参照してほしい。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【００１１】

したがって、必要なことは、ＵＤＰ－ガラクトースの十分なプールから、治療用の糖タンパク質として使用するための好ましい受容体基質へのガラクトース残基の転移を触媒する方法である。

【課題を解決するための手段】

【００１２】

本発明は、末端β－ガラクトース残基を有すること及びヒト様糖タンパク質においてフコース残基及びシアル酸残基が本質的に欠失していることを特徴とするヒト様タンパク質を産生する新規の下等真核宿主細胞を提供する。

【００１３】

ある実施態様において、本発明は、β－ガラクトシルトランスフェラーゼ活性をコード化する単離された核酸分子と、ＵＤＰ－ガラクトース輸送活性、ＵＤＰ－ガラクトースＣ４エピメラーゼ活性又はガラクトキナーゼ活性又はガラクトース－１－リン酸ウリジルトランスフェラーゼをコード化する少なくとも１つの単離された核酸分子とを含む、ヒト様糖タンパク質を産生する組換え型下等真核宿主細胞を提供する。 本発明は、末端ＧｌｃＮＡｃ残基を含む糖タンパク質の、トリマンノース中心上にあるＧｌｃＮＡｃβ１，２－Ｍａｎα１，３、ＧｌｃＮＡｃβ１，４－Ｍａｎα１，３、ＧｌｃＮＡｃβ１，２－Ｍａｎα１，６、ＧｌｃＮＡｃβ１，４－Ｍａｎα１，６、及びＧｌｃＮＡｃβ１，６－Ｍａｎα１，６からなる群から選択されるＮ結合したオリゴ糖分岐鎖へと、β－ガラクトース残基を転移できる、ヒト様糖タンパク質を産生する組換え型下等真核宿主細胞も提供する。別の実施態様において、本発明は、シアル酸転移のための受容体基質である糖タンパク質を産生する組換え型下等真核宿主細胞を提供する。

【００１４】

本発明の別の態様において、本明細書は、末端β－ガラクトース残基を有すること及び前記糖タンパク質上にフコース残基及びシアル酸残基が本質的に欠失していることを特徴とするヒト様ヒト様糖タンパク質を含む組成物を提供する。ある実施態様において、前記糖タンパク質はＧａｌＧｌｃＮＡｃＭａｎ$_3$ＧｌｃＮＡｃ$_2$、ＧａｌＧｌｃＮＡｃ$_2$Ｍａｎ$_3$ＧｌｃＮＡｃ$_2$、Ｇａｌ$_2$ＧｌｃＮＡｃ$_2$Ｍａｎ$_3$ＧｌｃＮＡｃ$_2$、ＧａｌＧｌｃＮＡｃ$_3$Ｍａｎ$_3$ＧｌｃＮＡｃ$_2$、Ｇａｌ$_2$ＧｌｃＮＡｃ$_3$Ｍａｎ$_3$ＧｌｃＮＡｃ$_2$、Ｇａｌ$_3$ＧｌｃＮＡｃ$_3$Ｍａｎ$_3$ＧｌｃＮＡｃ$_2$、ＧａｌＧｌｃＮＡｃ$_4$Ｍａｎ$_3$ＧｌｃＮＡｃ$_2$、Ｇａｌ$_2$ＧｌｃＮＡｃ$_4$Ｍａｎ$_3$ＧｌｃＮＡｃ$_2$、Ｇａｌ$_3$ＧｌｃＮＡｃ$_4$Ｍａｎ$_3$ＧｌｃＮＡｃ$_2$、Ｇａｌ$_4$ＧｌｃＮＡｃ$_4$Ｍａｎ$_3$ＧｌｃＮＡｃ$_2$、ＧａｌＧｌｃＮＡｃＭａｎ$_5$ＧｌｃＮＡｃ$_2$、ＧａｌＧｌｃＮＡｃ$_2$Ｍａｎ$_5$ＧｌｃＮＡｃ$_2$、Ｇａｌ$_2$ＧｌｃＮＡｃ$_2$Ｍａｎ$_5$ＧｌｃＮＡｃ$_2$、ＧａｌＧｌｃＮＡｃ$_3$Ｍａｎ$_5$ＧｌｃＮＡｃ$_2$、Ｇａｌ$_2$ＧｌｃＮＡｃ$_3$Ｍａｎ$_5$ＧｌｃＮＡｃ$_2$及びＧａｌ$_3$ＧｌｃＮＡｃ$_3$Ｍａｎ$_5$ＧｌｃＮＡｃ$_2$からなる群から選択されるＮ結合したオリゴ糖を含む。

【００１５】

別の実施態様において、内在性レベルより高いＵＤＰ－ガラクトースを産生する段階を含む、下等真核宿主細胞におけるヒト様糖タンパク質を産生するための方法が提供される。

【００１６】

さらに別の実施態様において、フコース残基及びシアル酸残基のない状態においてハイブリッド又は複雑な糖タンパク質上にガラクトース残基を転移させる段階を含む、下等真核宿主細胞においてヒト様糖タンパク質組成物を作製するための方法が提供される。

【００１７】

本発明の方法にしたがって、少なくとも１０％、好ましくは３３％、より好ましくは６０％以上のガラクトシル化した糖タンパク質組成物が産生される。

【００１８】

本発明はさらに、ＧａｌＮＡｃトランスフェラーゼ活性を発現する組換え型下等真核宿主細胞を提供する。

【００１９】

本発明は、異種性のＵＤＰａｓｅ活性をコード化する遺伝子を発現する組換え型下等真核宿主細胞も提供する。

【００２０】

さらに、本発明は、（ａ）配列番号１４、（ｂ）配列番号１３のドナーヌクレオチド結合部位のアミノ酸残基と少なくとも約９０％類似しているもの、（ｃ）配列番号１４と少なくとも９２％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％又は少なくとも９９．９％同一である核酸配列、（ｄ）配列番号１３のアミノ酸配列を有する保存されたポリペプチドをコード化する核酸配列、（ｅ）配列番号１３と少なくとも７８％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％又は少なくとも９９．９％同一のポリペプチドをコード化する核酸配列、（ｆ）厳密な条件下で配列番号１３とハイブリダイズする核酸配列、及び（ｇ）長さにおいて少なくとも６０個の連続したヌクレオチドである（ａ）ないし（ｆ）のうちのいずれか１つの断片を含む核酸配列からなる群から選択される核酸配列を含むか又は前記核酸配列からなる単離されたポリヌクレオチドを提供する。

【００２１】

本明細書には、配列番号４８ないし配列番号５２の保存された領域からなる群から選択される核酸配列を含むか又は前記核酸配列からなり、前記コード化されたポリペプチドがガラクトシル化した糖タンパク質の産生のためにＵＤＰ－グルコース及びＵＤＰ－ガラクトースの相互変換を触媒することに関与している、修飾されたポリヌクレオチドも提供される。

【発明を実施するための最良の形態】

【００２２】

本明細書に特段の定義がなければ、本発明に関連して使用される科学用語及び技術用語は当業者によって共通して理解される意味を有するべきである。さらに、文脈によって必要とされない限り、単数形の用語は複数形を含むべきであり、複数形の用語は単数形を含むべきである。本発明の方法及び技術は、本分野で周知の従来の方法にしたがって一般に実施される。一般に、本発明に関連して使用される学名、及び本明細書に記載される生化学、酵素学、分子細胞生物学、微生物学、遺伝学並びにタンパク質及び核酸の化学及びハイブリダイゼーションの技術は、本分野で周知のものであり共通して使用される。本発明の方法及び技術は一般に、本分野で周知の従来の方法にしたがって、特段の記載がなければ、本明細書を通じて引用され論議される多様な一般的な及びより特定の参考文献において記載されるように実施される。例えば、ＳａｍｂｒｏｏｋほかＭｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ、第2版、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．（１９８９）；Ａｕｓｕｂｅｌほか、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｇｒｅｅｎｅ Ｐｕｂｌｉ

shing Associates（１９９２及び、２００２年までの補遺）；Harlow及びLane Antibodies：A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press，Cold Spring Harbor，N.Y.（１９９０）；Introduction to Glycobiology，Maureen E.Taylor，Kurt Drickamer，Oxford Univ.Press（２００３）；Worthington Enzyme Mannual，Worthington Biochemical Corp.Freehold，NJ；Handbook of Biochemistry：Section A Proteins 第1巻 １９７６ CRC Press；Handbook of Biochemistry：Section A Proteins 第2巻 １９７６ CRC Press；Essentials of Glycobiology，Cold Spring Harbor Laboratory Press（１９９９）を参照してほしい。本発明に関連して使用される学名、及び本明細書に記載の生化学及び分子生物学の実験室での手段及び技術は、本分野で周知のものであり、共通して使用される。

【００２３】

本明細書に記載のすべての刊行物、特許及び他の参考文献は、参照によりここに組み込まれる。

【００２４】

特段の記載がなければ、以下の用語は次の意味を有すると理解されるべきである。

【００２５】

本明細書で使用されるように、「Ｋ３」という語はヒトプラスミノーゲンのクリングル３ドメインを指す。

【００２６】

ここで使用されているように、「Ｎ－グリカン」は、Ｎ結合したオリゴ糖を指し、例えば、ポリペプチドのアスパラギン残基へのアスパラギン－Ｎ－アセチルグルコサミン結合によって結合されるものである。Ｎ－グリカンは、$Man_3GlcNAc_2$の共通の五糖類中心を有する（「Ｍａｎ」はマンノースを指し、「Ｇｌｃ」はグルコースを指し、「ＮＡｃ」はＮ－アセチルを指し、ＧｌｃＮＡｃはＮ－アセチルグルコサミンを指す。）。Ｎ－グリカンは、前記$Man_3GlcNAc_2$（「Ｍａｎ３」）中心構造へ付加された周辺の糖（例、ＧｌｃＮＡｃ、ガラクトース、フコース及びシアル酸）を含む分岐鎖（アンテナ）の数に関して異なる。Ｎ－グリカンは、それらの分岐した構成要素にしたがって分類される（例、高マンノース、複雑な又はハイブリッド）。「高マンノース」型のＮ－グリカンは５個以上のマンノース残基を有する。「複雑な」型のＮ－グリカンは典型的に、１，３マンノースに結合した少なくとも１つのＧｌｃＮＡｃ及び「トリマンノース」中心の１，６マンノースアームに結合した少なくとも１つのＧｌｃＮＡｃを有する。「トリマンノース中心」は、Ｍａｎ３構造を有する五糖類中心である。これはしばしば「マンノース欠乏（ｐａｕｃｉｍａｎｎｏｓｅ）」構造と呼ばれる。複雑なＮ－グリカンは、場合によりシアル酸又は誘導体（「ＮｅｕＡｃ」、「Ｎｅｕ」はノイラミン酸を指し、「Ａｃ」はアセチルを指す。）で修飾されたガラクトース（「Ｇａｌ」）残基も有し得る。複雑なＮ－グリカンは、また「二分している」ＧｌｃＮＡｃ及び中心フコース（「Ｆｕｃ」）を含む鎖内置換を有し得る。複雑なＮ－グリカンは、またしばしば「多重アンテナ性グリカン」と呼ばれる、「トリマンノース中心」上の複数のアンテナを有し得る。「ハイブリッド」Ｎ－グリカンは、トリマンノース中心の１，３マンノースアームの末端にある少なくとも１つのＧｌｃＮＡｃ、及びトリマンノース中心の１，６マンノースアームの０個以上のマンノースを有する。

【００２７】

本明細書で使用される略語は、本分野で共通して使用されるものであり、例えば前述の糖の略語を参照してほしい。他の共通の略語には、ペプチドＮ－グリコシダーゼＦ（ＥＣ３．２．２．１８）を指す「ＰＮＧａｓｅ」、ガラクトシルトランスフェラーゼを指す「

ＧａｌＴ」、ＵＤＰ－ガラクトース：β－Ｎ－アセチルグルコサミンβ１，４－ガラクトシルトランスフェラーゼを指す「β１，４ＧａｌＴ」が含まれる。さまざまな種からのβ－ガラクトシルトランスフェラーゼは、次のように省略される。すなわち、「ｈＧａｌ」はヒトβ１，４－ガラクトシルトランスフェラーゼを指し、「ｂＧａｌＴ」はウシβ１，４－ガラクトシルトランスフェラーゼを指し、「ＸｌＧａｌＴ」はアフリカツメガエル（Ｘｅｎｏｐｕｓ　ｌｅａｕｉｓ）β１，４－ガラクトシルトランスフェラーゼを指し、「ＣｅＣａｌＴ」は線虫（Ｃ．ｅｌｅｇａｎｓ）β１，４－ガラクトシルトランスフェラーゼを指す。「ＧａｌＮＡｃＴ」はＵＤＰ－ＧａｌＮＡｃ－ＧｌｃＮＡｃβ－１，４－Ｎ－アセチルがラクトサミニルトランスフェラーゼを指す。

【００２８】

ここで使用されているように、「ＵＧＴ」という語はＵＤＰ－ガラクトース輸送体を指す。「ＳｐＧａｌＥ」はＳ．ポムベＵＤＰ－ガラクトース４－エピメラーゼを指し、「ｈＧａｌＥ」はヒトＵＤＰ－ガラクトース４－エピメラーゼを指し、「ＳｃＧａｌ１０」はＳ．セレビシエＵＤＰ－ガラクトース４－エピメラーゼを指し、「ＥｃＧａｌＥ」は大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）ＵＤＰ－ガラクトース４－エピメラーゼを指す。

【００２９】

本明細書で使用されるように、「ＵＤＰ－Ｇａｌ」という語はＵＤＰ－ガラクトースを指し、「ＵＤＰ－ＧａｌＮＡｃ」という語はＵＤＰ－Ｎ－アセチルガラクトサミンを指す。

【００３０】

Ｎ結合した糖タンパク質は、前記タンパク質にあるアスパラギン残基のアミド窒素へ結合したＮ－アセチルグルコサミン残基を含有する。糖タンパク質で見つかった優勢な糖は、グルコース、ガラクトース、マンノース、フコース、Ｎ－アセチルガラクトサミン（ＧａｌＮＡｃ）、Ｎ－アセチルグルコサミン（ＧｌｃＮＡｃ）及びシアル酸（例、Ｎ－アセチルノイラミン酸（ＮＡＮＡ））である。前記糖群の加工は、小胞体の内腔で同時翻訳的に生じ、Ｎ結合した糖タンパク質に向けてゴルジ装置において続行する。

【００３１】

ここで使用されているように、「ヒト様」糖タンパク質という語は、ヒトのＮ結合したオリゴ糖合成において見つかった糖タンパク質に似たタンパク質に共有結合した修飾されたＮ－グリカンを指す。複雑なＮ－グリカン及びハイブリッドＮ－グリカンは、ヒトグリコシル化で見つかった中間体である。これらの中間体に共通なのは、マンノース欠乏（ｐａｕｃｉｍａｎｎｏｓｅ）中心、五糖類中心、又は単にＭａｎ３若しくはＭａｎ３とも呼ばれる$Man_3GlcNAc_2$中心構造である。それゆえ、ヒト様糖タンパク質は少なくともＭａｎ３中心構造を有する。

【００３２】

ここで使用されているように、「１，６マンノシルトランスフェラーゼ活性を惹起する（ｉｍｉｔｉａｔｅ）」という語は、Ｏｃｈ１ｐによってα１，６結合とともに惹起される外側鎖形成におけるトリマンノース中心のＭａｎα１，３アームへ典型的に付加された酵母特異的グリカン残基を指す。

【００３３】

ポジティブモードにおけるＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳによって測定されるＮ－グリカンへのガラクトース残基の転移モル％は、総中性Ｎ－グリカンのモル％に関するモル％ガラクトース転移を指す。K^+及びNa^+などの特定の陽イオン付加生成物は通常、個々の付加生成物の分子量だけ前記Ｎ－グリカンの重量を増加する溶出されたピークを伴っている。

【００３４】

ここで使用されているように、「分泌経路」という語は、細胞質から小胞体（ＥＲ）及びゴルジ装置の区画への生まれたてのポリペプチド鎖の分子の流れに次ぐ、脂質結合したオリゴ糖前駆体及びＮ－グリカン基質が連続的に露出される、多様なグリコシル化酵素の組み合せ系を指す。酵素は、この経路に沿って局在化されるといわれる。酵素Ｙの前の脂

質結合したグリカン又はＮ－グリカンに作用する酵素Ｘは、酵素Ｙに対して「上流」であるか又は「上流」に作用するといわれ、同様に、酵素Ｙは酵素Ｘから「下流」であるか又は「下流」に作用する。

【００３５】

本明細書で使用されるように、「変異」という語は、例えばグリコシル化関連酵素の遺伝子産物の核酸配列又はアミノ酸配列におけるいずれかの変化を指す。

【００３６】

「ポリヌクレオチド」又は「核酸分子」という語は、少なくとも長さ１０塩基のヌクレオチドのポリマー形態を指す。前記用語には、ＤＮＡ分子（例、ｃＤＮＡ又はゲノムＤＮＡ若しくは合成ＤＮＡ）及びＲＮＡ分子（例、ｍＲＮＡ又は合成ＲＮＡ）並びに非天然ヌクレオチドアナログ、非天然ヌクレオシド間結合又はその両者を含有するＤＮＡ若しくはＲＮＡのアナログが含まれる。前記核酸はトポロジー構造のいずれでもにありうる。例えば、前記核酸は、一本鎖、二本鎖、三本鎖、四本鎖、部分的に二本鎖、分岐鎖、ヘアピン状、環状又はパッドロックされた構造でありうる。前記用語には、ＤＮＡの一本鎖形態及び二本鎖形態が含まれる。

【００３７】

特段の記載がなければ、「配列番号Ｘを含む核酸」は、その少なくとも一部が（ｉ）配列番号Ｘの配列、又は（ｉｉ）配列番号Ｘと相補的な配列、のいずれかを有する核酸を指す。前記２つの間の選択は文脈によって指図される。例えば、もし前記核酸がプローブとして使用されれば、前記２つの間の選択は、前記プローブが望ましい標的に相補的である必要性によって必然的に決定する。

【００３８】

「単離された」若しくは「実質的に純粋な」核酸若しくはポリヌクレオチド（例、ＲＮＡ、ＤＮＡ又は混合されたポリマー）は、天然のポリヌクレオチドの宿主細胞において天然のポリヌクレオチドが天然において伴っている他の細胞内成分（例えば天然のポリヌクレオチドが天然において伴っているリボソーム、ポリメラーゼ及びゲノム配列）から実質的に分離されたものである。前記用語は、（１）天然にある環境から採取されている、（２）「単離されたポリヌクレオチド」が天然においてみられる、ポリヌクレオチドの全部又は一部を伴っていない、（３）天然において結合していないポリヌクレオチドに機能可能に結合されている、又は（４）天然において存在しない、核酸又はポリヌクレオチドを包む。「単離された」又は「実質的に純粋な」という語は、組換え体又はクローニングされたＤＮＡ単離物、化学的に合成されるポリヌクレオチドアナログ、又は異種性の系によって生物学的に合成されたポリヌクレオチドアナログに関しても使用できる。

【００３９】

しかしながら、「単離された」は、そのように記載された核酸又はポリヌクレオチドがそれ自体、その天然の環境から物理的に採取されたことを必ずしも必要としない。例えば、ある生命体のゲノムにおける内在性核酸配列は、異種性の配列（すなわち、この内在性核酸配列に天然において近接していない配列）が前記内在性核酸配列近くに置かれ、それによりこの内在性核酸配列の発現が変化する場合、本明細書において「単離された」とみなす。例として、非天然プロモーター配列はヒト細胞のゲノムにおける遺伝子の本来のプロモーターと置換でき、それによりこの遺伝子は発現パターンが変化する。この遺伝子は、それに本来隣接する配列の少なくとも一部から分離されたため、いまや「単離された」であろう。

【００４０】

核酸は、天然において生じていないゲノムにおける対応する核酸へのなんらかの修飾を含有する場合も、「単離された」とされる。例えば、内在性のコード化配列が例えばヒト介入によって人工的に導入された挿入、欠失又は点変異を含有する場合、「単離される」とされる。「単離された核酸」には、異種性部位で宿主細胞染色体に組み込まれた核酸、エピソームとして存在する核酸構築物も含まれる。さらに、「単離された核酸」は、実質的に他の細胞内材料が存在し得ないか、又は組換え技術によって生じる場合、培地が実質

的にありえないか、又は化学的に合成される場合、化学的前駆体又は他の化合物が実質的にありえない。

【００４１】

本明細書で使用されるように、基準核酸配列の「縮重変異体」という語句は、標準的な遺伝子コードにしたがって翻訳できて、基準核酸配列から翻訳されるものと同一のアミノ酸配列を提供する核酸配列を包含する。

【００４２】

核酸配列の文脈における「配列同一性％」又は「同一である％」という語は、最大の一致になるよう配列比較して、同一である２つの配列における残基を指す。配列同一性の比較の長さは、少なくとも約９個のヌクレオチドの鎖、通常少なくとも約２０個のヌクレオチド、より通常に少なくとも約２４個のヌクレオチド、典型的には少なくとも約２８個のヌクレオチド、より典型的には少なくとも約３２個のヌクレオチド、好ましくは少なくとも約３６個以上のヌクレオチドにわたり得る。ヌクレオチド配列同一性を測定するのに使用できる本分野で公知の多数の異なるアルゴリズムがある。例えば、ポリヌクレオチド配列はＷｉｓｃｏｎｓｉｎ Ｐａｃｋａｇｅ Ｖｅｒｓｉｏｎ １０．０，Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ（ＧＣＧ），Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷｉｓｃｏｎｓｉｎにおけるプログラムであるＦＡＳＴＡ、Ｇａｐ又はＢｅｓｔｆｉｔを使用して比較できる。ＦＡＳＴＡは、質問配列と検索配列の間の最良の重なりの領域に関する配列比較及び配列同一性％を提供する（Ｐｅａｒｓｏｎ，１９９０）。例えば、核酸配列間の配列同一性％は、そのデフォルト因子（６の言語サイズ及びスコアリングマトリクスについてのＮＯＰＡＭ因子）によるＦＡＳＴＡを使用して、又は本明細書に参照により組み込まれるＧＣＧ Ｖｅｒｓｉｏｎ ６．１により提供されるデフォルト因子によるＧａｐを使用して決定できる。

【００４３】

核酸又はその断片を指すとき、「実質的な相同性」又は「実質的な類似性」という語は、別の核酸（又はその相補的な鎖）と適切なヌクレオチドの挿入又は欠失と最適に配列比較して、前述のように、ＦＡＳＴＡ、ＢＬＡＳＴ又はＧａｐなどの配列同一性のいずれかの周知のアルゴリズムによって測定されるところの、前記ヌクレオチド塩基の少なくとも約５０％、より好ましくは６０％、通常前記ヌクレオチド塩基の少なくとも約７０％、より通常には少なくとも約８０％、好ましくは少なくとも約９０％、より好ましくは少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％又は９９％におけるヌクレオチド配列同一性があることを指す。

【００４４】

あるいは、核酸又はその断片が別の核酸、別の核酸の鎖又はその相補的な鎖と、緊密なハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズする場合、実質的な相同性又は類似性が存在する。核酸ハイブリダイゼーション実験の文脈における「緊密なハイブリダイゼーション条件」及び「緊密な洗浄条件」は、多くの異なる物理的因子に依存する。核酸ハイブリダイゼーションは、塩の濃度、温度、溶媒、ハイブリダイズする種の塩基組成、相補的領域の長さなどの条件によって影響を受けるであろうし、そのことは当業者によって簡単に正しく認識されるであろう。当業者は、ハイブリダイゼーションの特定の緊密性に達するためにこれらの因子をいかに変動させるかについて知っている。

【００４５】

一般に、「緊密なハイブリダイゼーション」は、条件の特定のセットの下で、特定のＤＮＡハイブリッドについて融点温度（T_m）から約２５℃低い温度で実施される。「緊密な洗浄」は、条件の特定のセットの下で、特定のＤＮＡハイブリッドについてのT_mよりも約５℃低い温度で実施される。前記T_mは、完全に符合したプローブへ標的配列の５０％がハイブリダイズする温度である。本明細書において参照により組み込まれる前述のＳａｍｂｒｏｏｋほか、９．５１ページを参照してほしい。本明細書の目的のため、「高い緊密性条件」は、６×ＳＳＣ（２０×ＳＳＣが３．０ＭＮａＣｌ及び０．３Ｍクエン酸ナトリウムを含有する場合）、６５℃で８時間ないし１２時間１％ＳＤＳにおける水性ハイ

ブリダイゼーション（すなわち、ホルムアミドなし）、その後、６５℃で２０分間０．２×ＳＳＣ、０．１％ＳＤＳにおける２回洗浄としての溶液相ハイブリダイゼーションについて定義される。６５℃でのハイブリダイゼーションが、ハイブリダイズしている配列の長さ及び同一性％を含む多くの因子によって、異なる割合で生じることは当業者によって正しく認識されるであろう。

【００４６】

本発明の核酸（ポリヌクレオチドとも呼ばれる。）は、ＲＮＡのセンス鎖及びアンチセンス鎖の両方、ｃＤＮＡ、ゲノムＤＮＡ並びに前述の合成形態及びこれらの混合されたポリマーを含み得る。これらは、当業者により容易に認識されるように、化学的または生化学的に修飾され得、または非天然の又は誘導体化されたヌクレオチド塩基を含有し得る。このような修飾には、例えば、ラベル、メチル化、天然に存在するヌクレオチドの一つ以上をアナログと置換、荷電されていない結合（例、リン酸メチル、ホスホトリエステル、ホスホールアミデート、カルバメート等）、荷電された結合（例、ホスホールチオエート、ホスホロジチオエート等）、ペンダント部分（例、ポリペプチド）などのヌクレオチド間修飾、介入物（例、アクリジン、プソラーレン、等）、キレート剤、アルキル化剤、及び修飾された結合（例、αアノマー核酸等）が含まれる。また、水素結合または他の化学的相互作用を介する指定配列への結合能においてポリヌクレオチドを真似ている合成分子を含む。このような分子は本分野で公知であり、これは例えば前記分子の主鎖におけるリン酸結合をペプチド結合に置換することを含む。

【００４７】

核酸配列へ適用される場合、「変異された」という語は、核酸配列におけるヌクレオチドが基準核酸配列と比較して挿入され、欠失され、又は荷電され得ることを意味する。単一の変化は座（点変異）でなされてもよく、又は複数のヌクレオチドが単一の座において挿入され、欠失され、又は荷電されてもよい。さらに、１つ以上の変化が、核酸配列内の遺伝子座のいずれの数でなされてもよい。核酸配列は本分野で公知のいずれかの方法によって変異されてよく、限定を加えるものではないが、「エラープローンＰＣＲ」（ＤＮＡポリメラーゼのコピー信頼性が低い場合、点変異の高い割合がＰＣＲ産物の全長に沿って得られるような条件下でＰＣＲを実施するためのプロセスであり、例えばＬｅｕｎｇ，Ｄ．Ｗ．ほか、Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅ、１、ｐｐ．１１－１５（１９８９）並びにＣａｌｄｗｅｌｌ，Ｒ．Ｃ．及びＪｏｙｃｅ　Ｇ．Ｆ．、ＰＣＲ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ａｐｐｌｉｃ．、２、ｐｐ．２８－３３（１９９２）を参照してほしい。）、及び「オリゴヌクレオチド指向型変異誘発」（興味の対象のいずれかのクローニングしたＤＮＡ断片における部位特異的変異の発生を可能にするプロセスであり、例えばＲｅｉｄｈａａｒ－Ｏｌｓｏｎ，Ｊ．Ｆ．及びＳａｕｅｒ，Ｒ．Ｔ．ほか、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２４１、ｐｐ．５３－５７（１９８８）を参照してほしい。）などの変異誘発が含まれる。

【００４８】

本明細書において使用される「ベクター」という語は、結合している別の核酸を輸送できる核酸分子を指すよう企図される。ベクターのあるタイプは「プラスミド」であり、さらなるＤＮＡセグメントが連結され得る環状二本鎖ＤＮＡループを指す。他のベクターには、コスミド、バクテリア人工染色体（ＢＡＣ）及び酵母人工染色体が含まれる。ベクターの別のタイプはウィルスベクターであり、さらなるＤＮＡセグメントがウィルスゲノムへと連結され得る（以下により詳細に論議される。）。ある種のベクターは、それが導入されている宿主細胞において自己複製できる（例、宿主細胞において機能する複製元を有するベクター）。他のベクターは、宿主細胞への導入に際し、前記宿主細胞のゲノムに組込まれ、それにより宿主ゲノムに沿って複製される。さらに、ある種の好ましいベクターは、それらが機能可能に結合された遺伝子の発現を指令できる。このようなベクターは本明細書へ「組換え型発現ベクター」（又は単に「発現ベクター」）として参照される。

【００４９】

「機能可能に結合された」発現調節配列は、前記発現調節配列が対象の遺伝子に近接して対象の遺伝子を制御する結合を、並びに、トランスで作用してまたは距離をおいて作用

して対象の遺伝子を調節する発現調節配列を言う。

【００５０】

本明細書で使用される「発現調節配列」という語は、機能可能に結合されたコード化配列の発現に影響を及ぼすのに必要なポリヌクレオチド配列を指す。発現調節配列は、核酸配列の転写、転写後事象及び翻訳を調節する配列である。発現調節配列には、適切な転写開始配列、終結配列、プロモーター配列及びエンハンサー配列、スプライシングシグナル及びポリアデニル化シグナルなどの効率よいＲＮＡプロセシングシグナル、細胞質ｍＲＮＡを安定化させる配列、翻訳効率性を強化する配列（例、リボソーム結合部位）、タンパク質安定性を強化する配列、及び望む場合、タンパク質分泌を強化する配列が含まれる。このような調節配列の性質は、宿主生命体によって異なっていて、原核生物においては、このような調節配列は一般に、プロモーター、リボソーム結合部位、転写終結配列を含む。「調節配列」という語は少なくとも、その存在が発現に不可欠である構成要素全部を含むよう企図され、その存在が有利である更なる構成要素（例えばリーダー配列及び融合パートナー配列）も含むことができる。

【００５１】

本明細書で使用される「組換え型下等真核宿主細胞」（又は単に「宿主細胞」）という語は、組換えベクターが導入される細胞を指すよう企図される。このような用語は特定の対象細胞を指すだけでなく、このような細胞の子孫も指すよう企図される。子孫の世代において、変異または環境の影響によりある種の修飾が起こり得るため、そのような子孫は、実際、親細胞と同一でないこともあり得るが、しかし、本明細書で使用される「宿主細胞」の範囲内になおも含まれる。組換え宿主細胞は、培養中に生育した、単離された細胞又は細胞系であり得、又は生組織若しくは器官に存在する細胞であり得る。組換え宿主細胞には、酵母、菌、カラー・フラゲラータ（ｃｏｌｌａｒ－ｆｌａｇｅｌｌａｔｅ、微胞子虫、アルベオラータ（ａｌｖｅｏｌａｔｅ）（例、渦鞭毛藻類）、ストラメノパイル（ｓｔｒａｍｅｎｏｐｉｌｅｓ）（例、褐色藻類、原生動物）、紅藻植物（例、赤色藻類）、植物（例、緑色藻類、植物細胞、コケ）及び他の原生生物が含まれる。

【００５２】

本明細書で使用される「ペプチド」という語は、短いポリペプチドを指し、例えば、典型的には長さ約５０アミノ酸未満であるもの、より典型的には長さ約３０アミノ酸未満であるものである。本明細書で使用される前記用語は、構造上の機能を模倣し、したがって生物学的機能を模倣するアナログ及び模倣体を包含する。

【００５３】

「ポリペプチド」という語は、天然に存在するタンパク質及び天然に存在しないタンパク質の両者、これらの断片、変異体、誘導体及びアナログを包含する。ポリペプチドは単量体又は重合体であってもよい。さらに、ポリペプチドは、１つ以上の異なる活性を各々有する多数の異なるドメインを含み得る。

【００５４】

「単離されたタンパク質」又は「単離されたポリペプチド」という語は、その由来又は出所によって、（１）元の状態において天然に伴っている成分を伴っていない、（２）純度を他の細胞物質の存在に関して判断して（例えば、同じ種からの他のタンパク質がない場合）、天然においてあり得ない純度で存在する、（３）異なる種の細胞によって発現される、又は（４）天然において存在しない（例えば、天然において見られるポリペプチドの断片であるか、又は天然において見られないアミノ酸アナログもしくは誘導体又は標準的なペプチド結合以外の結合を含む。）、タンパク質又はポリペプチドである。したがって、化学的に合成されたポリペプチド、またはポリペプチドが天然において存在する細胞とは別の細胞からの細胞システムにより合成されたポリペプチドは、天然において存在している成分から「単離されている」。ポリペプチド又はタンパク質は、本分野で周知のタンパク質精製技術を使用して、単離によって天然において存在する成分から実質的に単離し得る。このように定義されたように、「単離された」は、このように定義されたタンパク質、ポリペプチド、ペプチド又はオリゴペプチドが天然の環境から物理的に採取されて

いることを必須として要求しない。

【００５５】

本明細書で使用される「ポリペプチド断片」という語は、全長のポリペプチドと比較してアミノ末端及び／又はカルボキシ末端の除去を有するポリペプチドを指す。好ましい実施態様において、前記ポリペプチド断片は、前記断片のアミノ酸配列がその天然において存在している配列に対応する位置と同じである、連続した配列である。断片は典型的に、少なくとも５、６、７、８、９又は１０のアミノ酸長であり、好ましくは少なくとも１２、１４、１６又は１８アミノ酸長であり、より好ましくは少なくとも２０のアミノ酸長であり、より好ましくは少なくとも２５、３０、３５、４０又は４５のアミノ酸長であり、さらにより好ましくは少なくとも５０又は６０のアミノ酸長であり、さらにより好ましくは少なくとも７０のアミノ酸長である。

【００５６】

「修飾された誘導体」は、一次構造配列において実質的に相同であるポリペプチド又はその断片を指すが、これらのポリペプチド又はその断片は、例えばインビボもしくはインビトロでの化学的もしくは生化学的修飾を含み、又は天然のポリペプチドにおいて見つかっていないアミノ酸を組み込んでいる。このような修飾には、例えばアセチル化、カルボキシル化、リン酸化、グリコシル化、ユビキチン化、例えば放射性核種による標識化、および多様な酵素修飾が含まれ、これらは当業者によって容易に認識される。このような目的のために有用な、ポリペプチドを標識するための種々の方法及び種々の置換体又は標識がこの分野で知られていて、これらは、^{125}Ｉ、^{32}Ｐ、^{35}Ｓ、及び^{3}Ｈなどの放射性同位体、標識された抗リガンド（例えば抗体）に結合するリガンド、フルオロフォア、化学発光剤、酵素及び標識されたリガンドに対する特異的な結合対因子として機能できる抗リガンドを含む。標識の選択は、必要とされる感度、前記プライマーとの共役の簡便性、安定性の必要条件、及び入手可能な機器に依存している。ポリペプチドを標識するための方法は本分野で周知である。本明細書によって参照により組み込まれるＡｕｓｕｂｅｌほか、１９９２を参照。

【００５７】

「融合タンパク質」という語は、異種性のアミノ酸配列へ結合したポリペプチド又は断片を含むポリペプチドを指す。融合タンパク質は、それらが２つ以上の異なるタンパク質から２つ以上の望ましい機能要素を含有するよう構築できるため、有用である。融合タンパク質は対象のポリペプチド由来の少なくとも１０の連続したアミノ酸を含み、より好ましくは少なくとも２０又は３０のアミノ酸を、さらにより好ましくは少なくとも４０、５０又は６０のアミノ酸を、なおより好ましくは少なくとも７５、１００又は１２５のアミノ酸を含む。融合タンパク質は、異なるタンパク質又はペプチドをコード化する核酸配列と共にフレーム内においてポリペプチド又はその断片をコード化する核酸配列を構築し、この融合タンパク質を発現させることによって、組換え生産できる。あるいは、融合タンパク質は、前記ポリペプチド又はその断片を別のタンパク質へ架橋させることによって化学的に作製できる。

【００５８】

「非ペプチドアナログ」という語は、基準ポリペプチドのものと類似である特性を有する化合物を指す。非ペプチド性化合物は、「ペプチド擬態体」又は「ペプチド模倣体」とも呼び得る。例えば、Ｊｏｎｅｓ（１９９２）Ａｍｉｎｏ Ａｃｉｄ ａｎｄ Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ，Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ；Ｊｕｎｇ（１９９７）Ｃｏｍｂｉｎａｔｏｒｉａｌ Ｐｅｐｔｉｄｅ ａｎｄ Ｎｏｎｐｅｐｔｉｄｅ Ｌｉｂｒａｒｉｅｓ：Ａ Ｈａｎｄｂｏｏｋ Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ；Ｂｏｄａｎｓｚｋｙほか、（１９９３）Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ－Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ｔｅｘｔｂｏｏｋ，Ｓｐｒｉｎｇｅｒ Ｖｅｒｌａｇ；「Ｓｙｎｔｈｅｔｉｃ Ｐｅｐｔｉｄｅｓ：Ａ Ｕｓｅｒｓ Ｇｕｉｄｅ」、Ｇ．Ａ．Ｇｒａｎｔ編、Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ ａｎｄ Ｃｏ．、１９９２；Ｅｖａｎｓほか Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．３０：１２２９（１９８７）；Ｆａｕｃｈｅｒｅ、Ｊ．Ａｄｖ．Ｄｒｕｇ

Ｒｅｓ．１５：２９（１９８６）；ＶｅｂｅｒおよびＦｒｅｉｄｉｎｇｅｒ ＴＩＮＳ ｐ．３９２（１９８５）；および上記文献の各々に引用されている参考文献。これらは本明細書において参照により組み込まれる。このような化合物はしばしば、コンピューター化した分子モデリングの援助で開発される。本発明の有用なペプチドと構造上類似したペプチド模倣体は、等価の効果を生じるよう使用され得、それゆえ、本発明の一部であると構想される。

【００５９】

「ポリペプチド変異体」又は「変異体タンパク質」は、その配列が元の又は野生型のタンパク質のアミノ酸配列と比較して１つ以上のアミノ酸の挿入、複製、欠失、再編成又は置換を含有するポリペプチドを指す。変異タンパク質は、それぞれ天然に存在するタンパク質の配列に置いて、１つ又はそれ以上の点置換（ある位置の単一のアミノ酸が別のアミノ酸に変更されている。）、１つ又はそれ以上の挿入及び／又は削除（１つ又はそれ以上のアミノ酸が挿入され又は削除されている。）、及び／又はアミノ末端又はカルボキシ末端のいずれか又は両者におけるアミノ酸配列の切断を有し得る。変異タンパク質は、天然に存在するタンパク質と比較して、同一の生物活性を有し得るが、好ましくは異なる生物活性を有する。

【００６０】

変異タンパク質は、その野生型対応物と少なくとも７０％の全体的な配列相同性を有する。さらにより好ましくは、野生型タンパク質と８０％、８５％又は９０％の全体的な配列相同性を有する変異タンパク質である。さらにより好ましい実施態様において、変異タンパク質は９５％の配列同一性を示し、さらにより好ましくは９７％、さらにより好ましくは９８％及びさらにより好ましくは９９％、９９．５％又は９９．９％の全体的な配列同一性を示す。配列相同性は、ＧａｐまたはＢｅｓｔｆｉｔなどのいずれかの共通配列分析アルゴリズムによって測定し得る。

【００６１】

好ましいアミノ酸置換は、（１）タンパク質分解に対する敏感性を低下させ、（２）酸化に対する敏感性を低下させ、（３）タンパク質複合体を形成するための結合親和性を変化させ、（４）結合親和性又は酵素活性を変化させ、及び（５）このようなアナログの他の物理化学的特性又は機能的特性を付与又は修飾するものである。

【００６２】

本明細書で使用されているように、２０個の従来のアミノ酸及びそれらの略語は、従来の使用に従う。本明細書に参照によって組み込まれる、Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ－Ａ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ（第２版、Ｅ．Ｓ．ＧｏｌｕｂおよびＤ．Ｒ．Ｇｒｅｎ編、Ｓｉｎａｕｅｒ Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ、Ｓｕｎｄｅｒｌａｎｄ，Ｍａｓｓ．（１９９１））を参照してほしい。前記２０個の従来のアミノ酸、α，α－二置換したアミノ酸などの非天然アミノ酸、Ｎ－アルキルアミノ酸、及び他の非従来型アミノ酸の立体異性体（例、Ｄ型アミノ酸）も本発明のポリペプチドのための適切な構成要素であり得る。非従来型アミノ酸の例には、４－ヒドロキシプロリン、γ－カルボキシグルタミン酸塩、ε－Ｎ，Ｎ，Ｎ－トリメチルリジン、ε－Ｎ－アセチルリジン、Ｏ－ホスホセリン、Ｎ－アセチルセリン、Ｎ－ホルミルメチオニン、３－メチルヒスチジン、５－ヒドロキシリジン、ｓ－Ｎ－メチルアルギニン、及び他の類似したアミノ酸及びイミノ酸（例、４－ヒドロキシプロリン）が含まれる。本明細書で使用されるポリペプチドの表示法において、標準的な使用及び慣習にしたがって、左手方向はアミノ末端方向であり、右手方向はカルボキシ末端方向である。

【００６３】

タンパク質は、前記タンパク質をコード化する核酸配列が第二タンパク質をコード化する核酸配列と類似した配列を有する場合、前記第二タンパク質の「相同性」を有し、又は「相同的」である。あるいは、前記２つのタンパク質が「類似した」アミノ酸配列を有する場合、タンパク質は第二タンパク質との相同性を有する（したがって、「相同性タンパク質」という語は前記２つのタンパク質が類似したアミノ酸配列を有することを意味するよう定義される。）。好ましい実施態様において、相同的なタンパク質はその野生型タン

パク質に対して６０％の配列相同性を呈するものであり、より好ましくは７０％の配列相同性である。さらにより好ましくは前記野生型タンパク質に対して８０％、８５％又は９０％の配列相同性を呈する相同的なタンパク質である。本明細書で使用されるように、（特に推定される構造類似性に関する）アミノ酸配列の２つの領域間の相同性は、機能の上での類似性を包含するものと解釈される。

【００６４】

「相同的な」がタンパク質又はペプチドに関して使用される場合、同一でない残基位置が、しばしば保存されたアミノ酸置換によって異なっていることが認識される。「保存的なアミノ酸置換」は、似た化学特性（例えば電荷又は疎水性）を備えた側鎖（Ｒ基）を有する別のアミノ酸残基によってアミノ酸残基が置換されているものである。一般に、保存的なアミノ酸置換は、タンパク質の機能的特性を実質的に変化させない。２つ又はそれ以上のアミノ酸配列が保存的な置換だけで互いに異なっている場合、配列同一性％又は相同性の程度は、前記置換の保存的な性質を補償するよう上向きに調整され得る。この調整をなすための手段は当業者に周知である（例、本明細書に参照によって組み込まれるＰｅａｒｓｏｎほか、１９９４を参照してほしい。）。

【００６５】

次の６つの群は各々、互いに保存的な置換であるアミノ酸を含有する。すなわち、１）セリン（Ｓ）、スレオニン（Ｔ）；２）アスパラギン酸（Ｄ）、グルタミン酸（Ｅ）；３）アスパラギン（Ｎ）、グルタミン（Ｑ）；４）アルギニン（Ｒ）、リジン（Ｋ）；５）イソロイシン（Ｉ）、ロイシン（Ｌ）、メチオニン（Ｍ）、アラニン（Ａ）、バリン（Ｖ）、及び６）フェニルアラニン（Ｆ）、チロシン（Ｙ）、トリプトファン（Ｗ）である。

【００６６】

配列同一性％とも呼ばれるポリペプチドについての配列相同性は、配列分析ソフトウェアを使用して典型的に測定される。例えば、遺伝学コンピューターグループ（ｔｈｅ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ）（ＧＣＧ）の配列分析ソフトウェアパッケージ（ｔｈｅ Ｓｅｑｕｅｎｃｅ Ａｎａｌｙｓｉｓ Ｓｏｆｔｗａｒｅ Ｐａｃｋａｇｅ）、Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｃｅｎｔｅｒ，９１０ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ａｖｅｎｕｅ，Ｍａｄｉｓｏｎ，Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ ５３７０５を参照してほしい。タンパク質分析ソフトウェアは、多様な置換、欠失及び（保存的なアミノ酸置換を含む）他の修飾に割り当てられた相同性の測定を使用して、似た配列と比較する。例えば、ＧＣＧは、生物体の異なる種由来の相同的なポリペプチド又は野生型タンパク質及びその変異タンパク質の間での相同的なポリペプチドなどの密接に関連したポリペプチド間の配列相同性又は配列同一性を決定するために、デフォルト・パラメータを使用できる「Ｇａｐ」及び「Ｂｅｓｔｆｉｔ」などのプログラムを含む。例えば、ＧＣＧ 第６．１版を参照してほしい。

【００６７】

阻害分子配列を、異なる生物由来の多数の配列を含有するデータベースと比較する場合、好ましいアルゴリズムはコンピュータプログラムＢＬＡＳＴ（Ａｌｔｓｃｈｕｌ，Ｓ．Ｆ．ほか（１９９０）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２１５：４０３－４１０；Ｇｉｓｈ及びＳｔａｔｅｓ（１９９３）Ｎａｔｕｒｅ Ｇｅｎｅｔ．３：２６６－２７２；Ｍａｄｄｅｎ，Ｔ．Ｌ．ほか（１９９６）Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．２６６：１３１－１４１；Ａｌｔｓｃｈｕｌ，Ｓ．Ｆ．ほか（１９９７）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２５：３３８９－３４０２；Ｚｈａｎｇ，Ｊ．及びＭａｄｄｅｎ，Ｔ．Ｌ．（１９９７）Ｇｅｎｏｍｅ Ｒｅｓ．７：６４９－６５６）であり、特にｂｌａｓｔｐ又はｔｂｌａｓｔｎ（Ａｌｔｓｃｈｕｌほか、１９９７）である。ＢＬＡＳＴｐについての好ましい因子は、期待値：１０（初期設定）；フィルター：ｓｅｇ（初期設定）；間隙を開くためのコスト：１１（初期設定）；間隙を伸長するためのコスト：１（初期設定）；最大配列比較：１００（初期設定）；言語サイズ：１１（初期設定）；記載の番号：１００（初期設定）；罰則マトリクス：ＢＬＯＷＳＵＭ６２である。

【００６８】

相同性について比較されるポリペプチド配列の長さは、一般に少なくとも約１６個のアミノ酸残基、通常少なくとも約２０残基、より通常少なくとも約２４残基、典型的には少なくとも約２８残基、及び好ましくは約３５残基超である。大きな数の、異なる生物由来の配列を含有するデータベースを検索する場合、アミノ酸配列を比較することが好ましい。アミノ酸配列を使用するデータベース検索は、本分野で公知のｂｌａｓｔｐ以外のアルゴリズムによって測定できる。例えば、ポリペプチド配列は、ＧＣＧ第６．１版におけるプログラムであるＦＡＳＴＡを使用して比較できる。ＦＡＳＴＡは、質問配列と検索配列との最良の重なりの領域の配列比較及び配列同一性％を提供する（本明細書で参照によって組み込まれるＰｅａｒｓｏｎ，１９９０）。例えば、アミノ酸配列間の配列同一性％は、そのデフォルト・パラメータ（言語サイズ２及びＰＡＭ２５０のスコアリングマトリクス）を備えたＦＡＳＴＡを使用して決定でき、これは本明細書に参照によって組み込まれるＧＣＧ第６．１版において提供されている。

【００６９】

本明細書で使用される「ドメイン」という語は、生体分子の公知の機能又は予測される機能へ関与する生体分子の構造を指す。ドメインは、領域又はその一部と同一の広がりを有し得、ドメインは、生体分子の異なる非連続的な領域も含み得る。タンパク質ドメインの例には、これらに制限されるものではないが、Ｉｇドメイン、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、及び細胞質ドメインが含まれる。

【００７０】

本明細書で使用されているように、「分子」という語は、以下に限定するものではないが、小分子、ペプチド、タンパク質、糖、ヌクレオチド、核酸、脂質等を含むいずれかの化合物を意味し、このような化合物は天然化合物又は合成化合物でありうる。

【００７１】

本明細書及びその実施態様を通じて、「含む」という語又は「含有する」もしくは「含んでいる」などの変形は、記載されている整数又は整数の群を包含するが、いずれかの他の整数又は整数の群を排除しないことを指すものと理解される。

【００７２】

特段の定義がなければ、本明細書で使用される技術用語および科学用語はすべて、本発明の関する分野の当業者によって共通して理解されるのと同じ意味を有する。典型的な方法及び材料は以下に記載されるが、本明細書に記載されるものと同様の又は等価の方法及び材料も本発明の実施において使用でき、当業者に明らかである。本明細書に記載されたすべての刊行物及び他の参考文献は、参照によってその全部が組み込まれる。矛盾する場合、定義を含む本明細書が調節する。前記材料、方法、及び実施例は実例となるのみであり、限定を加えるよう意図されてはいない。

【００７３】

ヒト様ガラクトシル化した糖タンパク質を産生するための宿主の設計

本発明は、ヒト様糖タンパク質が末端β－ガラクトース残基を有し、フコース及びシアル酸を本質的に欠失することを特徴とする、前記糖タンパク質を産生する組換え型下等真核宿主細胞を提供する。ある実施態様において、本発明は、ＵＤＰ－ガラクトース輸送体をコード化する少なくとも第二の単離された核酸分子、ＵＤＰ－ガラクトース４－エピメラーゼをコード化する単離された核酸又はガラクトキナーゼ若しくはガラクトース－１－リン酸ウリジルトランスフェラーゼをコード化する単離された核酸との組み合わせでＵＤＰ－ガラクトース：β－Ｎ－アセチルグルコサミンβ１，４－ガラクトシルトランスフェラーゼ（β１，４ＧａｌＴ）をコード化する単離された核酸分子を含む下等真核宿主細胞を提供する。別の実施態様において、β１，４ＧａｌＴは、ＵＤＰ－ガラクトース輸送体をコード化する単離された核酸分子及びＵＤＰ－ガラクトース４－エピメラーゼをコード化する単離された核酸分子との組み合わせで発現する。前述の酵素をコード化する前記核酸配列の変異体及び断片、組換えＤＮＡ分子、及び形質転換向けの前記酵素をコード化する核酸配列も提供される。

【００７４】

本発明のある態様において、方法は、下等真核宿主細胞においてヒト様糖タンパク質を産生するために提供され、ＵＤＰ－ガラクトースからβ結合における受容体基質へのβ１，４ＧａｌＴ活性の発現による転移を触媒する段階と、宿主へＵＤＰ－ガラクトース４－エピメラーゼ活性、ガラクトキナーゼ活性、ガラクトース－１－リン酸ウリジルトランスフェラーゼ活性又はＵＤＰ－ガラクトース輸送活性を導入する段階とを含む。受容体基質は好ましくは、トリマンノース中心上の末端ＧｌｃＮＡｃ残基、例えばＧｌｃＮＡｃβ１，２－Ｍａｎα１，３；　ＧｌｃＮＡｃβ１，４－Ｍａｎα１，３；　ＧｌｃＮＡｃβ１，２－Ｍａｎα１，６；　ＧｌｃＮＡｃβ１，４－Ｍａｎα１，６；又はＧｌｃＮＡｃβ１，６－Ｍａｎα１，６分岐を含むオリゴ糖組成物である。

【００７５】

受容体基質は、より好ましくは対象のタンパク質に共有結合される（Ｎ結合される）複雑なグリカン（例、$GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$）、ハイブリッドグリカン（例、$GlcNAcMan_5GlcNAc_2$）又は複数のアンテナ性グリカン（例、$GlcNAc_4Man_3GlcNAc_2$）である。前記β－ガラクトース残基は、β－グリコシド結合を形成する２－アセトアミド－２－デオキシ－Ｄ－グルコース（ＧｌｃＮＡｃ）の炭素４でヒドロキシ基を含む受容体基質へと転移される。ガラクトース残基を受容できる末端ＧｌｃＮＡｃ残基を含むＮ結合した受容体基質には、$GlcNAcMAn_3GlcNAc_2$、$GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$、$GlcNAc_3Man_3GlcNAc_2$、$GlcNAc_4Man_3GlcNAc_2$、$GlcNAc_5Man_3GlcNAc_2$、$GlcNAc_6Man_3GlcNAc_2$、$GlcMAcMan_4GlcNAc_2$、$GlcNAcMan_5GlcNAc_2$、$GlcNAc_2Man_5GlcNAc_2$及び$GlcNAc_3Man_5GlcNAc_2$が含まれるが、これらに限定されない。

【００７６】

β１，４－ガラクトシルトランスフェラーゼ遺伝子のクローニング

ヒトｂ－１，４－ガラクトシルトランスフェラーゼＩ遺伝子（ｈＧａｌＴＩ、Ｇｅｎｂａｎｋ　ＡＨ００３５７５）を、プライマーＲＣＤ１９２（配列番号１）及びＲＣＤ１８６（配列番号２）を使用して、ヒト腎ｃＤＮＡ（マラソンレディｃＤＮＡ、Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）からＰＣＲ増幅した。このＰＣＲ産物を、クローニングし配列決定したｐＣＲ２．１（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）中にクローニングした。このクローンから、ＰＣＲ重複変異誘発を実施した。前記遺伝子のＮｏｔＩ部位までの５’末端を、プライマーＲＣＤ１９８（配列番号３）及びＲＣＤ２０１（配列番号４）を使用して増幅し、前記３’末端を、プライマーＲＣＤ２００（配列番号５）及びＲＣＤ１９９（配列番号６）を使用して増幅した。前記産物をプライマーＲＣＤ１９８（配列番号３）及びＲＣＤ１９９（配列番号６）と互いに重ねて、前記ＮｏｔＩ部位を除去しながら（４３個のアミノ酸のＮ末端欠失を除く）前記野生型アミノ酸配列を用いて前記ＯＲＦを再合成した。前記新たな切断したｈＧａｌＴＩ　ＰＣＲ産物をｐＣＲ２．１中にクローニングし、配列決定した。次に、導入したＡｓｃＩ／ＰａｃＩ部位を使用して、前記断片を、ｐＲＣＤ２６０を作製するＰｐＵＲＡ３／ＨＹＧ^{R}ロールインベクターであるプラスミドｐＲＣＤ２５９（図１）へとサブクローニングした（図１）（実施例４）。

【００７７】

同一の戦略を、ヒトβ１，４ＧａｌＴＩＩ及びヒトβ１，４ＧａｌＴＩＩＩをクローニングする上で適用した。実施例４は、ＰＣＲによってヒトβ１，４－ガラクトシルトランスフェラーゼＩＩ及びＩＩＩ遺伝子を増幅させるために遺伝子特異的プライマーを使用し、次にそれをベクターへとクローニングすることを記載する。

【００７８】

下等真核生物におけるβ１，４－ガラクトシルトランスフェラーゼの発現

β１，４ＧａｌＴ活性をコード化する遺伝子又はβ１，４－ガラクトシルトランスフェラーゼ活性をコード化する組換え型核酸分子、β１，４ＧａｌＴ活性をコード化する遺伝子融合体（例、ｐＸＢ５３）（図１）又はβ１，４－ガラクトシルトランスフェラーゼをコード化する核酸分子（Ｇｅｎｂａｎｋ　ＡＨ００３５７５）からの発現を下等真核宿主

細胞（例、Ｐ．パストリス（ｐａｓｔｏｒｉｓ））へ導入して発現させ、ガラクトシル化した糖タンパク質を産生した。あるいは、β－ガラクトシルトランスフェラーゼ活性の活性化によって、下等真核宿主細胞を遺伝子工学的に改変し、ガラクトシル化した糖形態を産生する。触媒活性のあるβ１，４－ガラクトシルトランスフェラーゼドメイン又はその一部は、ＵＤＰ－ガラクトースから、β１，４－Ｇａｌグリコシド結合を形成するオリゴ糖受容体基質（例、ＧｌｃＮＡｃ$_2$Ｍａｎ$_3$ＧｌｃＮＡｃ$_2$）の末端ＧｌｃＮＡｃ残基へのガラクトース残基の転移を触媒する。本発明に従って産生される複雑なガラクトシル化したＮ－グリカンはフコース及びシアル酸を本質的に欠失している（例、Ｇａｌ$_2$ＧｌｃＮＡｃ$_2$Ｍａｎ$_3$ＧｌｃＮＡｃ$_2$）。ガラクトシル化し、脱フコシル化し、脱シアル酸付加したこのような糖タンパク質組成物は、治療剤として有用である。

【００７９】

前記新規に形成された基質は、下等真核宿主において産生されるシアル酸付加した糖タンパク質の形成における好ましい前駆体でもある。本発明はしたがって、ヒト様糖タンパク質が下等真核生物におけるシアル酸転移のための受容体基質である末端ガラクトース残基を有することを特徴とする、前記糖タンパク質を産生するための方法を提供する。

【００８０】

β１，４－ガラクトシルトランスフェラーゼのコンビナトリアルＤＮＡライブラリ

本発明に関連する態様において、β１，４－ガラクトシルトランスフェラーゼ及び酵母指向性配列膜貫通ドメインのコンビナトリアルＤＮＡライブラリを作製し、ＷＯ０２／００８７９において記載されるていように下等真核宿主細胞において発現させる。

【００８１】

したがって、ＷＯ０２／００８７９に記載されているように、長さが短、中、長の指向性ペプチドのサブライブラリへと融合されたｈＧａｌＴＩ（例、Ｇｅｎｂａｎｋ受入番号Ｘ５５４１５）のサブライブラリが作成される。指向性ペプチドサブライブラリには、小胞体、ゴルジ体、又はトランスゴルジネットワーク内の特定の位置へのタンパク質の局在化を生じる指向性シグナルペプチドをコード化する核酸配列が含まれる。これらの指向性ペプチドは、遺伝子工学的に改変された宿主生物体から、他の関連した又は関連していない生物体からと同様、選択され得る。一般に、このような配列は３つのカテゴリーへと分類される。すなわち（１）ゴルジ体の内膜（内腔膜）へタンパク質を互いにまたは個々につなぐサイトゾル尾部（ｃｔ）、膜貫通ドメイン（ｔｍｄ）及びステム領域（ｓｒ）の一部又は全部をコード化するＮ末端配列、（２）ＨＤＥＬ又はＫＤＥＬテトラペプチドなどのＣ末端で一般にみられる修復シグナル、及び（３）ゴルジ体において局在化することが公知の多様なタンパク質、例えばヌクレオチド糖輸送体からの膜架橋領域、である。

【００８２】

指向性ペプチドは本明細書において、ＩＩ型膜タンパク質の一部に対して短（ｓ）、中（ｍ）、長（ｌ）と示される。短（ｓ）と示される指向性ペプチド配列は、膜結合タンパク質の膜貫通ドメイン（ｔｍｄ）に対応する。長（ｌ）と示される指向性ペプチド配列は、膜貫通ドメイン（ｔｍｄ）及びステム領域（ｓｒ）の長さに対応する。中（ｍ）と示される指向性ペプチド配列は、膜貫通ドメイン（ｔｍｄ）及び、ステム領域（ｓｒ）の長さのほぼ半分に対応する。触媒作用のあるドメイン領域は本明細書において、その野生型グリコシル化酵素に関してヌクレオチド欠失の数によって示される。

【００８３】

ある実施態様において、前記ライブラリをＰ．パストリス（ｐａｓｔｏｒｉｓ）へと形質転換し、前記形質転換体を、ハイグロマイシンを含有する最小培地上で選抜した。（以下に記載されるような）多様なリーダー配列へ融合したβ１，４－ガラクトシルトランスフェラーゼＩの活性を、ポジティブモードにおいてＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳを使用する読み取りとしてのガラクトシル化したＮ－グリカンの産生を介して分析した。

【００８４】

□－ガラクトシルトランスフェラーゼ融合構築物

（４８個のリーダー配列（ＷＯ０２／００８７９）からなる）単離された酵母指向性配

列膜貫通ドメインのライブラリを、ｈＧａｌＴＩ遺伝子の上流にあるｐＲＣＤ２６０上のＮｏｔＩ／ＡｓｃＩ部位に連結し、プラスミドｐＸＢ２０－ｐＸＢ６７を作製した（各プラスミドは１つのリーダー配列を有する。）。

【００８５】

本発明のコンビナトリアルＤＮＡライブラリ由来のＧａｌＴ融合構築物の代表例はｐＸＢ５３（図１）であり、ヒトβ１，４－ガラクトシルトランスフェラーゼＩ（Ｇｅｎｂａｎｋ　ＡＨ００３５７５）の４３Ｎ末端アミノ酸欠失ヘフレーム内連結した、切断したＳ．セレビシエＭｎｎ２（ｓ）指向性ペプチド（Ｇｅｎｂａｎｋ　ＮＰ＿００９５７１由来のＭＮＮ２の１ないし１０８ヌクレオチド）である。したがって、本明細書で使用される命名法は、グリコシル化酵素の指向性ペプチド／触媒作用ドメイン領域を、Ｓ．セレビシエＭｎｎ２（ｓ）／ｈＧａｌＴＩΔ４３とする。しかしながら、コード化した融合タンパク質単独では、図９Ａに示される主としてガラクトシル化したグリカンを有するＮ－グリカンを生じるのには不十分である。Ｎ－グリカン$Gal_1GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$［Ｂ］の集団と一致するピークが、Ｐ．パストリスにおけるｈＧａｌＴＩの導入で示されているが、前記試料のその後の切断によって、このピークがｂ－１，４－ガラクトシダーゼに不応性であることが示される（実施例７）。

【００８６】

さらに、β－１，４－ガラクトシルトランスフェラーゼ活性は、対象の特定のタンパク質に対して特異的であってもよい。したがって、対象の糖タンパク質に関する適切なグリコシル化を生じさせるために、指向性ペプチド／ガラクトシルトランスフェラーゼ触媒作用ドメイン融合構築物が必ずしもすべて等しく十分に機能するのではないということは、さらに理解されるべきである。したがって、対象のタンパク質は、前記タンパク質に最適なガラクトシルトランスフェラーゼ活性を発現する１つ以上の融合構築物を特定するために、コンビナトリアルＤＮＡライブラリで形質転換した宿主細胞へと導入され得る。当業者は、本明細書に記載のコンビナトリアルＤＮＡライブラリアプローチを使用して最適な融合構築物を作成及び選抜できるであろう。

【００８７】

さらに、局在化した活性のあるガラクトシルトランスフェラーゼ触媒作用ドメイン（又はより一般には、いずれかの酵素のドメイン）を呈する他のこのような融合構築物が本明細書に記載の技術を使用して作製され得ることは明白である。例えば、特定の宿主細胞へと導入される特定の発現ベクターにおける融合構築物のライブラリからの$Gal_2GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$産生を最適化するために本発明のコンビナトリアルＤＮＡライブラリを作製及び使用することは、当業者にとって決まりきった実験法の一内容である。

【００８８】

遺伝子改変のＰ．パストリスにおけるガラクトシル化したＮ－グリカンの産生

本発明の方法にしたがって産生されるヒト様ガラクトシル化糖タンパク質には、$GalGlcNAcMan_3GlcNAc_2$、$GalGlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$、$Gal_2GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$、$GalGlcNAc_3Man_3GlcNAc_2$、$Gal_2GlcNAc_3Man_3GlcNAc_2$、$Gal_3GlcNAc_3Man_3GlcNAc_2$、$GalGlcNAc_4Man_3GlcNAc_2$、$Gal_2GlcNAc_4Man_3GlcNAc_2$、$Gal_3GlcNAc_4Man_3GlcNAc_2$、$Gal_4GlcNAc_4Man_3GlcNAc_2$、$GalGlcNAcMan_5GlcNAc_2$、$GalGlcNAcMan_5GlcNAc_2$、$GalGlcNAc_2Man_5GlcNAc_2$、$Gal_2GlcNAc_2Man_5GlcNAc_2$、$GalGlcNacMan_5GlcNAc_2$、$GalGlcNAc_2Man_5GlcNAc_2$、$Gal_2GlcNAc_2Man_5GlcNAc_2$、$GalGlcNAc_3Man_5GlcNAc_2$、$Gal_2GlcNAc_3Man_5GlcNAc_2$及び$Gal_3GlcNAc_3Man_5GlcNAc_2$が含まれる。

【００８９】

本発明のある実施態様において、ＭＮＮ２（ｓ）／ｈＧａｌＴＩを含むプラスミドｐＸＢ５３を用いて、ＧｌｃＮＡｃ$_2$Ｍａｎ$_3$ＧｌｃＮＡｃ$_2$を産生する宿主であるＰ．パストリスＲＤＰ３０－１０を形質転換した（実施例５）。触媒活性のあるβ－ガラクトシルトランスフェラーゼドメインは、末端ＧｌｃＮＡｃ残基（例、ＧｌｃＮＡｃ$_2$Ｍａｎ$_3$ＧｌｃＮＡｃ$_2$）を有する受容体基質へガラクトース残基を転移するのを触媒し、ガラクトシル化した糖形態を生じる。ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳを使用して、Ｐ．パストリスＲＤＰ３７由来のリポータータンパク質から放出されたＮ－グリカンは、ＧａｌＧｌｃＮＡｃ$_2$Ｍａｎ$_3$ＧｌｃＮＡｃ$_2$［Ｂ］の質量に対応する１５０５ｍ／ｚでピークを示した（図８Ｂ）。ＧａｌＧｌｃＮＡｃ$_2$Ｍａｎ$_3$ＧｌｃＮＡｃ$_2$を生じた受容体基質ＧｌｃＮＡｃ$_2$Ｍａｎ$_3$ＧｌｃＮＡｃ$_2$への、ヒトサッカロミセス・セレビシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）Ｍｎｎ２（ｓ）／β１，４－ガラクトシルトランスフェラーゼを含む融合構築物によるガラクトース残基の転移は、約１０％ないし２０％であることを示した。図８Ｂは、１６６２ｍ／ｚ［Ｃ］でのＧａｌ$_2$ＧｌｃＮＡｃ$_2$Ｍａｎ$_3$ＧｌｃＮＡｃ$_2$の対応する質量を示す。それゆえ、Ｇａｌ$_2$ＧｌｃＮＡｃ$_2$Ｍａｎ$_3$ＧｌｃＮＡｃ$_2$を生じるＧｌｃＮＡｃ$_2$Ｍａｎ$_3$ＧｌｃＮＡｃ$_2$への２つのガラクトース残基の転移は明白であった。したがって、本発明の宿主は、ヒト様Ｎ－グリカン上のガラクトシル部分の少なくとも１０モル％を呈する。

【００９０】

ＧａｌＴＩが宿主の産生する複雑な（例、二アンテナ性）グリカンにおける第二末端ＧｌｃＮＡｃ残基を有する受容体基質へ第二ガラクトース残基を転移できることが認識される。例えば、グリカンＧｌｃＮＡｃ$_2$Ｍａｎ$_3$ＧｌｃＮＡｃ$_2$のＧｌｃＮＡｃβ１，２Ｍａｎα１，３アーム上のガラクトース残基で末端ＧｌｃＮＡｃをキャッピングできるＭａｎｎ２（ｓ）／ｈＧａｌＴＩ融合は、末端ＧｌｃＮＡｃ残基（例、ＧｌｃＮＡｃβ１，２Ｍａｎα１，６）とともに露出されたその他のアーム上での少なくとも１つのさらなるβ－グリコシド結合を形成でき、それにより、その後ガラクトシルトランスフェラーゼを発現させずにガラクトシル化した糖形態を生じる。図１２は、Ｇａｌ$_2$ＧｌｃＮＡｃ$_2$Ｍａｎ$_3$ＧｌｃＮＡｃ$_2$に対応する１６６３ｍ／ｚ［Ｃ］でのピークを呈するＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳを示す。本結果は、特定のβ１，４－ＧａｌＴに対する基質特異性が前記グリカンの指定されたアームのみにあるガラクトース残基の転移を触媒するよう制限されてはおらず、それゆえ第二ガラクトシルトランスフェラーゼが不要になるかもしれないことを示す。したがって、本発明のある実施態様において、たった１つのβ１，４－ＧａｌＴ活性が一本、二本、三本又は四本のアンテナ性のガラクトシル化した糖形態を生じうる。このような実施態様において、前記ガラクトース残基と前記グリカン上のＧｌｃＮＡｃ残基の間のグリコシド結合はすべて同一であろう。例えば、二アンテナ性グリカンを産生する宿主におけるｈＧａｌＴ１の発現は２つの末端Ｇａｌβ１，４－ＧｌｃＮＡｃβ１，２結合を呈するであろう。

【００９１】

あるいは、異なるβ－ガラクトシルトランスフェラーゼ活性（例、ｈＧａｌＴＩＩ）又はその触媒活性部分を下等真核宿主細胞において発現させる。ある実施態様において、ＭＮＮ２（ｓ）／ｈＧａｌＴＩＩ及びＳｐＧＡＬＥを含むベクターｐＲＣＤ４４０、及びＤｍＵＧＴを含むベクターｐＳＨ２６３（図３Ｂ）を宿主Ｐ．パストリス（ＹＳＨ－４４（図１２Ｂ）に形質転換した。前記形質転換体のＮ－グリカン分析によって、ｈＧａｌＴＩＩが前記受容体基質上へ両ガラクトース残基を転移させたことを示すＧａｌ$_2$ＧｌｃＮＡｃ$_2$Ｍａｎ$_3$ＧｌｃＮＡｃ$_2$の糖形態の産生が示された（図１２Ｂ）。二ガラクトシル化構造（Ｇａｌ$_2$ＧｌｃＮＡｃ$_2$Ｍａｎ$_3$ＧｌｃＮＡｃ$_2$）が支配的である。中性グリカン％に関するガラクトシル部分の転移は約７５％であった。

【００９２】

さらに別の実施態様において、ｈＧａｌＴＩＩＩをコード化する配列を下等真核宿主細胞において発現させる。図１２Ｃは、前記組み合わせた一ガラクトシル化したグリカン及び二ガラクトシル化したグリカンへのガラクトース転移が約５０モル％ないし６０モル％

であることを示す。ｈＧａｌＴＩ、ｈＧａｌＴＩＩ及びｈＧａｌＴＩＩＩの比較は、ガラクトース転移の多様なレベルを示す（図１２Ａないし図１２Ｃ）。Ｐ．パストリスＲＤＰ７１由来のＮ－グリカンプロファイルは、ｈＧａｌＴＩの発現によるガラクトース残基の転移がＫ３受容体タンパク質に対して最適である（約８０モル％）ことを示す。

【００９３】

さらなるβ１，４－ガラクトシルトランスフェラーゼの発現

別の実施態様において、ｈＧａｌＴＩ及びｈＧａｌＴＩＩは、順次に局在化し、中期ゴルジ体指向性配列及び後期ゴルジ体指向性配列をそれぞれ使用して発現される。例えば、前記ｈＧａｌＴＩは、中期ゴルジ体において局在化するのに対し、前記ｈＧａｌＴＩＩは後期ゴルジ体において局在化する。あるいは、別の実施態様においてマンノシダーゼＩＩとの基質競合を回避するため、後期ゴルジ体リーダーをβ－ガラクトシルトランスフェラーゼについて使用する。

【００９４】

ガラクトシルトランスフェラーゼ活性の発現は通常、一ガラクトシル化したグリカン及び二ガラクトシル化したグリカンの両者を生じる。一ガラクトシル化した糖形態に加えて複数アンテナ性のガラクトシル化した糖形態が、ガラクトシルトランスフェラーゼ活性を発現する宿主細胞において一般に生産される。

【００９５】

ガラクトシルトランスフェラーゼ活性及び、組換え型宿主細胞における多様なプロモーター及び多様な発現ベクターを使用することによって前記タンパク質をコード化する遺伝子の発現を最適化することは当業者にとって決まりきった実験法の事項である。

【００９６】

Ｎ－グリカンの産生における目的に合わせたガラクトシル化したグリコシド結合

本発明の別の特徴において、異なるＧａｌＴを使用する複数のアンテナ性のガラクトシル化した糖タンパク質の産生は、異なるβ－グリコシド結合を生じる。ある実施態様において、好ましい所望のβ－グリコシド結合が、下等真核宿主細胞において作成される。例えば、β１，４ＧａｌＴファミリーのいずれか１つ（例、ｈＧａｌＴＩ、ｈＧａｌＴ２、ｈＧａｌＴ３、ｈＧａｌＴ４、ｈＧａｌＴ５、ｈＧａｌＴ６、ｈＧａｌＴ７、ｂＧａｌＴＩ、ＸｌＣａｌＴ、ＣｅＧａｌＴＩＩ）を、β１，４Ｇａｌグリコシド結合を有することを特徴とするガラクトシル化した糖タンパク質の産生のために発現させる。

【００９７】

あるいは、β１，３ＧａｌＴ活性又はβ１，６ＧａｌＴ活性などの他のガラクトシルトランスフェラーゼ（酵素、ホモログ、変異体、誘導体及び触媒活性のあるそれらの断片）を下等真核宿主細胞（例、Ｐ．パストリス）において発現させることによって、特に望ましいβＧａｌグリコシド結合を形成する中間的なオリゴ糖受容体基質へとガラクトース残基を転移させる。多様な末端ガラクトース結合（例、β１，３、β１，４、又はβ１，６）を望ましいβ－ガラクトシルトランスフェラーゼ活性の発現の結果として形成する。

【００９８】

下等真核生物におけるＧａｌＮＡｃＴ発現

ＧａｌＮＡｃによりキャップしたグリカンは、ヒトにおける特定のタンパク質で観察されてきた。本発明の別の態様において、ＧａｌＮＡｃトランスフェラーゼ（ＧａｌＮＡｃＴ）をコード化する遺伝子を下等真核宿主細胞において発現させ、それが末端ＧｌｃＮＡｃ残基を有する基質へとＧａｌＮＡｃを転移させる。ある実施態様において、線虫ＧａｌＮＡｃＴをコード化する遺伝子（Ｇｅｎｂａｎｋ　ＡＮ　ＮＰ＿４９０８７２）は、宿主細胞において産生されるグリカンのオリゴ糖分岐鎖を伸長する末端ＧｌｃＮＡｃ残基を有する基質へのＧＡｌＮＡｃ残基の転移を触媒する。

【００９９】

強化したガラクトシル転移

図１２に示されるｈＧａｌＴＩ発現の比較は、β－ガラクトシルトランスフェラーゼ発現単独では下等真核生物における受容体基質上でのβＧａｌ－グリコシド結合の形成に十

分ではあり得ないことを示す。ガラクトース残基の転移は、エピメラーゼもしくはガラクトキナーゼ、ガラクトース－１－リン酸ウリジルトランスフェラーゼ、及び／又はＵＧＴをコード化する遺伝子の追加によって強化される。ガラクトシル化した糖形態（例、$Gal_2GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$）の十分量が治療用糖タンパク質として望ましい。したがって、輸送活性の追加の発現によってグリカンへのガラクトシル転移を強化し、及び／又は内在性ＵＤＰ－ガラクトースレベルを上昇させることは、本発明の特徴である。ある実施態様において、ＵＤＰ－ガラクトースレベルを強化させるため、宿主細胞にエピメラーゼ活性を導入する。別の実施態様において、ＵＤＰ－ガラクトースレベルの強化は、ガラクトキナーゼ又はガラクトース－１－リン酸ウリジルトランスフェラーゼ活性によって仲介される。本発明はそれゆえ、ＵＤＰ－ＧＡｌ輸送活性を使用して及び／又は、エピメラーゼ又はガラクトキナーゼ又はガラクトース－１－リン酸ウリジルトランスフェラーゼを介する内在性ＵＤＰ－ガラクトースレベルを上昇させることによってのいずれかとの組み合わせでβ－ガラクトシルトランスフェラーゼ活性を導入及び発現させることによって、ガラクトシル転移を強化する方法を提供する。

【０１００】

ヒト様糖タンパク質の産生における下等真核生物宿主でのＵＤＰ－ガラクトース輸送体（ＵＧＴ）のクローニング及び発現

本明細書には、ヒト様ガラクトシル化糖タンパク質の産生のための下等真核細胞（例、Ｐ．パストリス）におけるＵＤＰ－ガラクトース輸送体をコード化する遺伝子を導入及び発現する方法も開示される。

【０１０１】

Ｓ．ポムベＵＤＰ－ガラクトース輸送体のクローニング及び発現

遺伝子特異的プライマーをＳ．ポムベＵＤＰ－ガラクトース輸送体遺伝子（Ｇｅｎｂａｎｋ　ＡＬ０２２５９８）の相同性領域を補完するようデザインし、Ｓ．ポムベゲノムＤＮＡ（ＡＴＣＣ２４８４３）からＰＣＲ増幅し、単一イントロンを排除した。前記遺伝子の５’の９６塩基対を増幅するために、プライマーＲＣＤ１６４（配列番号７）及びＲＣＤ１７７（配列番号８）を使用した。前記３’の９６６塩基対を増幅するために、プライマーＲＣＤ１７６（配列番号９）及びＲＣＤ１６５（配列番号１０）を使用した。前記末端で導入されるＮｏｔＩ部位及びＰａｃＩ部位を有する１つの連続したオープン・リーディング・フレームを含有する単一ＰＣＲ断片へと前記２つの増幅した産物を重ねるために、プライマーＲＣＤ１６４（配列番号７）及びＲＣＤ１６５（配列番号１０）を使用した。前記ＰＣＲ産物をｐＣＲ２．１ＴＡ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）へとクローニングし、配列決定した。前記遺伝子産物を、Ｐ．パストリスＧＡＰＤＨプロモーターを含有するプラスミドｐＪＮ３３５へとサブクローニングした（実施例２）。

【０１０２】

したがって、ある実施態様において、Ｓ．ポムベＵＤＰ－ガラクトース輸送体をコード化するプラスミドｐＲＣＤ２５７（Ｇｅｎｂａｎｋ　ＡＢ０２３４２５）を構築し、宿主において発現させ、末端$GlcNAc$残基（Ｐ．パストリスＲＤＰ－２７（例、$GlcNAcMan_3GlcNAc_2$））を産生する。

【０１０３】

多様なＵＤＰ－ガラクトース輸送体のクローニング及び発現

好ましい実施態様において、キイロショウジョウバエ（Ｄ．ｍｅｌａｎｏｇａｓｔｅｒ）ＵＤＰ－ガラクトース輸送体をコード化する遺伝子を下等真核宿主細胞において導入及び発現させる。キイロショウジョウバエＵＧＴをキイロショウジョウバエｃＤＮＡライブラリ（ＵＣ　Ｂｅｒｋｅｌｅｙキイロショウジョウバエゲノムプロジェクト、卵巣λ－ＺＡＰライブラリ　ＧＭ）からＰＣＲ増幅し、ｐＣＲ２．１ＰＣＲクローニングベクターへとクローニングし、配列決定した。ＮｏｔＩ部位及びＰａｃＩ部位を導入する遺伝子を増幅するため、プライマーＤｍＵＧＴ－５’（配列番号１１）及びＤｍＵＧＴ－３’（配列番号１２）を使用した。ｐＳＨ２６３をつくるｐＲＣＤ３９３における前記ＮｏｔＩ部位及びＰａｃＩ部位でＰｐＯＣＨ１プロモーターの下流へ融合したこの遺伝子を増幅するた

め、前記ＮｏｔＩ部位及びＰａｃＩ部位を使用した（図３Ｂ）。実施例２は、多様な他のＵＤＰガラクトース輸送体のクローニングを示す。

【０１０４】

図１１は、ガラクトース転移の強化についての比較におけるＵＤＰ－輸送体活性を示す。本発明の最良のモードとして、キイロショウジョウバエから単離されたＵＤＰ－ガラクトース輸送体をＰ．パストリスにおいて発現させる。キイロショウジョウバエＵＤＰ－ガラクトース輸送体と同時発現するヒトＧａｌＴＩ遺伝子融合体の活性を図１１Ｅに示す。驚くべきことに、キイロショウジョウバエＵＧＴを発現する宿主細胞は、主としてガラクトシル化した糖形態を産生するのに対し、Ｓ．ポムベ（図１１Ｂ）、ヒトＩ（図１１Ｃ）及びヒトＩＩ（図１１Ｄ）由来のＵＧＴは最適な転移を下回ることを示した。二ガラクトシル化し、脱フコシル化し、脱シアル酸付加した糖形態$Gal_2GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$の産生における有意な強化が生じる。１６６４ｍ／ｚ［Ｃ］での単一形態のピークは、グリカン$Gal_2GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$の質量に対応する。ＤｍＵＧＴを発現する宿主細胞（例、Ｐ．パストリス（ｐａｓｔｏｒｉｓ））は、他のＵＤＰ－ガラクトース輸送体と比較して少なくとも９０モル％のガラクトース転移を呈する。

【０１０５】

ＵＤＰ－ガラクトース輸送体ポリペプチド

本発明は、下等真核宿主細胞（例、Ｐ．パストリス）において発現する輸送体－トランスフェラーゼ融合体の多様な組み合わせを提供する。したがって、ある実施態様において、本発明は、触媒活性のあるβ－ガラクトシルトランスフェラーゼドメインヘフレーム内に融合したＵＤＰ－ガラクトース輸送体を含む下等真核宿主を提供する。別の実施態様において、ヒト様等タンパク質を産生する宿主細胞は、ｈＧａｌＴＩ触媒ドメインヘフレーム内に融合したＳ．ポムベ及びＳ．セレビシエＭｎｎ２（ｓ）指向性ペプチドから単離されるＵＤＰ－ガラクトース輸送体を含む。

【０１０６】

ヒト様糖タンパク質の産生における下等真核宿主におけるＵＤＰ－ガラクトース４－エピメラーゼの発現

本発明の別の態様において、β１，４－ガラクトシルトランスフェラーゼ活性及び少なくともＵＤＰ－ガラクトース４－エピメラーゼ活性（酵素、ホモログ、変異体、誘導体及び触媒活性のあるそれらの断片）を発現させることによって下等真核生物（例、Ｐ．パストリス（ｐａｓｔｏｒｉｓ））においてヒト様糖タンパク質を産生するための方法が提供される。エピメラーゼは、ＵＤＰ－ガラクトース及びＵＤＰ－グルコースの相互変換を触媒する酵素である。本分野で周知の技術を使用して、エピメラーゼ遺伝子（例、ＳｃＧＡＬ１０、ＳｐＧＡＬＥ、ｈＧＡＬＥ）の相同性領域を補完するよう遺伝子特異的プライマーをデザインし、ＰＣＲ増幅する（実施例３）。ある実施態様において、Ｓ．セレビシエＧａｌ１０活性をコード化する遺伝子、又はエピメラーゼをコード化する組換え型核酸分子、又はエピメラーゼ活性をコード化する核酸分子からの発現を下等真核宿主細胞（例、Ｐ．パストリス）において導入及び発現させ、末端β－ガラクトース残基を有することを特徴とするヒト様糖タンパク質を産生させる。あるいは、エピメラーゼ活性の活性化によって、宿主細胞を遺伝子工学的に改変し、ガラクトシル化した糖形態のレベルを上昇させる。

【０１０７】

複雑なＮ－グリカンの産生におけるＵＤＰ－ガラクトース４－エピメラーゼの発現

ある実施態様において、ＵＤＰ－グルコースをＵＤＰ－ガラクトースへ変換するためにエピメラーゼ活性をコード化する遺伝子を発現させ、宿主細胞におけるガラクトシル転移のためにＵＤＰ－ガラクトースのレベルを上昇させる。β－１，４－ガラクトシルトランスフェラーゼ活性に加えてエピメラーゼ活性の発現は、ガラクトシル化したＮ－グリカンの産生を強化する。図９Ｂは、ＳｃＣａｌ１０をコード化するプラスミドであるｐＲＣＤ３９５と組み合わせたＭｎｎ２（ｓ）／ｈＧａｌＴＩ融合体で形質転換した複雑なグリカ

ンを産生する酵母系（例、Ｐ．パストリスＹＳＨ－４４）を示す。ＳｃＧａｌ１０エピメラーゼの付加は、ガラクトース転移のための入手可能なＵＤＰ－ガラクトースを上昇させる。１５０１ｍ／ｚ［Ｂ］でのピークは、グリカンＧｌｃＮＡｃ$_2$Ｍａｎ$_3$ＧｌｃＮＡｃ$_2$上の１つのガラクトース残基の転移に対応し、１６６３ｍ／ｚ［Ｃ］でのピークは、グリカンＧｌｃＮＡｃ$_2$Ｍａｎ$_3$ＧｌｃＮＡｃ$_2$上の２つのガラクトース残基の転移に対応する。好ましくはガラクトースの少なくとも６０モル％が中性グリカン全体の％に関して転移する。したがって、ある実施態様において、エピメラーゼ活性との組み合わせでのβ－１，４－ガラクトシルトランスフェラーゼ活性が、宿主細胞において発現され、ガラクトシル化した糖タンパク質を産生する（実施例７）。

【０１０８】

ハイブリッドＮ－グリカンの産生におけるＵＤＰ－ガラクトース４－エピメラーゼの発現

別の実施態様において、ＳｃＧＡＬ１０の導入及び発現は、下等真核生物におけるハイブリッド糖タンパク質に関するガラクトース転移を強化する（実施例６）。図１０Ａは、ハイブリッドガラクトシル化Ｎ－グリカンを生成するＳｃＧａｌ１０エピメラーゼと組み合わせてＭｎｎ２（ｍ）／ｈＧａｌＴＩ融合体を発現するＰ．パストリス株ＲＤＰ３９－６を示す。前記Ｎ－グリカン分析によって、１つのガラクトース残基の転移を確立するグリカンＧａｌＧｌｃＮＡｃＭＡｎ$_5$ＧｌｃＮＡｃ$_2$の質量に対応する１６２２ｍ／ｚ［Ｋ］でのピーク、及びハイブリッドグリカンＧｌｃＮＡｃＭａｎ$_5$ＧｌｃＮＡｃ$_2$の質量に対応する１４６０ｍ／ｚ［Ｈ］でのピークが示される。その後のβ１，４－ガラクトシダーゼ切断によって単一ガラクトース残基の存在が確立される（図１０Ｂ）。好ましくはガラクトース転移の少なくとも７０モル％が中性グリカン全体の％に関して検出される。

【０１０９】

ガラクトース転移を強化するため、さらに他のエピメラーゼを宿主細胞において発現させる。実施例３は、エピメラーゼ構築物の構築を示し、図１３は、ヒト様Ｎ－グリカンの生成における種々のエピメラーゼの活性を示す。図１３Ａにおける Ｍｎｎ２（ｓ）／ｈＧａｌＴＩ及びＤｍＵＧＴに沿ったＳｃＧａｌ１０の発現は、優勢な二ガラクトシル化した糖形態Ｇａｌ$_2$ＧｌｃＮＡｃ$_2$Ｍａｎ$_3$ＧｌｃＮＡｃ$_2$を示す。同様に、いずれかのオーダーにおけるＳｐＧａｌＥ、Ｍｎｎ２（ｓ）／ｈＧａｌＴＩ、前記ＤｍＵＧＴの形質転換は、二ガラクトシル化した糖形態の産生を生じる（図１３Ｂ及び図１３Ｃ）。ｈＧａｌＥの付加は同一の効果を有する（図１３Ｄ）。好ましくは、前記エピメラーゼは、Ｓ．セレビシエＵＤＰ－ガラクトース４－エピメラーゼ、Ｓ．ポムベＵＤＰ－ガラクトース４－エピメラーゼ、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）ＵＤＰ－ガラクトース４－エピメラーゼ、ヒトＵＤＰ－ガラクトース４－エピメラーゼからなる群から選択される。制限を加えることなく、他のエピメラーゼは同様に選択できかつ宿主細胞において発現できる。

【０１１０】

ＳｐＧＡＬＥをコード化する核酸配列

本発明はさらに、Ｓ．ポムベ由来のＧＡＬＥ遺伝子及びその変異体を含む単離された核酸分子を提供する。酵素ＵＤＰ－ガラクトース４－エピメラーゼをコード化するこの遺伝子についての全長の核酸配列はすでに配列決定されており、Ｇｅｎｂａｎｋ ＮＣ＿００３４２３に示されるように同定されている。Ｓ．ポムベゲノムｄＮＡからＳｐＧＡＬＥを増幅するのに使用されるプライマーは、除去された１７５塩基対のイントロンを明らかにした（実施例３）。前記クローニングしたゲノム配列内に含まれるのは、Ｓ．ポムベＵＤＰ－ガラクトース４－エピメラーゼについてのコード化配列である。前記コード化したアミノ酸配列は配列番号１３にも示される。前記ＳｐＧＡＬＥ遺伝子は、宿主細胞におけるＮ－グリカンへのガラクトース転移のためのＵＤＰ－ガラクトースの十分なプールを生じる上で特に有用である。下等真核生物におけるＳｐＧＡＬＥ遺伝子の発現は、Ｎ結合したオリゴ糖合成における強化された及び効率のよいガラクトース転移を提供する。

【０１１１】

ある実施態様において、本発明は、配列番号１４に示されるＳｐＧＡＬＥコード化配列

を含むか又はそれからなる核酸配列並びにそのホモログ、変異体及び誘導体を有する単離された核酸分子を提供する。更なる実施態様において、本発明は、野生型遺伝子と少なくとも５３％の同一性を有するＳｐＧＡＬＥ遺伝子の変異体である配列を含むか又はそれからなる核酸分子を提供する。核酸配列は野生型遺伝子と少なくとも７０％、７５％又は８０％の同一性を有しうる。さらにより好ましくは、前記核酸配列は、野生型遺伝子に対して８５％、９０％、９５％、９８％、９９％、９９．９％又はさらにより高い同一性を有しうる。

【０１１２】

別の実施態様において、本発明の核酸分子は配列番号１３のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコード化する。配列番号１３と少なくとも６０％同一であるポリペプチド配列をコード化する核酸分子も提供される。典型的に、本発明の核酸分子は、配列番号１３との少なくとも７０％、７５％又は８０％の同一性のポリペプチド配列をコード化する。好ましくは、前記コード化したポリペプチドは、配列番号１３と８５％、９０％又は９５％同一であり、前記同一性はさらにより好ましくは９８％、９９％、９９．９％又はさらにより高くありうる。

【０１１３】

ガラクトシル化した糖タンパク質の産生のためのＵＤＰ－グルコース及びＵＤＰ－ガラクトースの相互変換に関与するエピメラーゼの保存された領域

Ｓ．ポムベ、ヒト、大腸菌由来のエピメラーゼと、Ｓ．セレビシエの最初の３６２個のアミノ酸残基との配列比較は、いくつものモチーフ及び潜在的な活性部位の存在を示す非常に保存された領域を示す（図７）（実施例１１）。ある実施態様において、本発明は、潜在的なＵＤＰ－ガラクトース又はＵＤＰ－グルコース結合モチーフを以下の箇所で有する配列番号１３のアミノ酸配列を含むポリペプチドを包含する。すなわち、

９－ＶＬＶＴＧＧＸＧＹＩＧＳＨＴ－２２（配列番号４８）、

８３－ＶＩＨＦＡＧＬＫＡＶＧＥＳＸＱＸＰＬＸＹＹ－１０３（配列番号４９）、

１２７－ＦＳＳＳＡＴＶＹＧＸ－１３６（配列番号５０）、

１８４－ＬＲＹＦＮＰＸＧＡＨＸＳＧＸＸＧＥＤＰＸＧＩＰＮＮＬＸＰＹＸＸＱＶＡＸＧＲＸ－２２１（配列番号５１）、又は

２２４－ＬＸＸＦＧＸＤＹＸＸＸＤＧＴＸＸＲＤＹＩＨＶＸＤＬＡＸＸＨＸＸＡＸ－２５６（配列番号５２）

である。

【０１１４】

別の好ましい実施態様において、第一配列の位置１５にあるアミノ酸残基は、Ｓ及びＡからなる群から選択される。

【０１１５】

別の好ましい実施態様において、第二配列の位置９６にあるアミノ酸残基は、Ｔ及びＶからなる群から選択される。

【０１１６】

別の好ましい実施態様において、第二配列の位置９８にあるアミノ酸残基は、Ｖ、Ｋ及びＩからなる群から選択される。

【０１１７】

別の好ましい実施態様において、第二配列の位置１０１にあるアミノ酸残基は、Ｓ、Ｄ、Ｅ及びＲからなる群から選択される。

【０１１８】

別の好ましい実施態様において、第三配列の位置１３６にあるアミノ酸残基は、Ｄ及びＮからなる群から選択される。

【０１１９】

別の好ましい実施態様において、第四配列の位置１９０にあるアミノ酸残基は、Ｇ、Ｔ、Ｖ及びＩからなる群から選択される。

【０１２０】

別の好ましい実施態様において、第四配列の位置１９４にあるアミノ酸残基は、Ｐ及びＡからなる群から選択される。

【０１２１】

別の好ましい実施態様において、第四配列の位置１９７にあるアミノ酸残基は、Ｅ、Ｃ、Ｄ及びＬからなる群から選択される。

【０１２２】

別の好ましい実施態様において、第四配列の位置１９８にあるアミノ酸残基は、Ｌ、Ｉ及びＭからなる群から選択される。

【０１２３】

別の好ましい実施態様において、第四配列の位置２０３にあるアミノ酸残基は、Ｌ及びＱからなる群から選択される。

【０１２４】

別の好ましい実施態様において、第四配列の位置２１０にあるアミノ酸残基は、Ｌ及びＭからなる群から選択される。

【０１２５】

別の好ましい実施態様において、第四配列の位置２１３にあるアミノ酸残基は、Ｉ、Ｖ及びＭからなる群から選択される。

【０１２６】

別の好ましい実施態様において、第四配列の位置２１４にあるアミノ酸残基は、Ａ及びＳからなる群から選択される。

【０１２７】

別の好ましい実施態様において、第四配列の位置２１８にあるアミノ酸残基は、Ｖ及びＩからなる群から選択される。

【０１２８】

別の好ましい実施態様において、第四配列の位置２２１にあるアミノ酸残基は、Ｌ及びＲからなる群から選択される。

【０１２９】

別の好ましい実施態様において、第五配列の位置２２５にあるアミノ酸残基は、Ｎ、Ａ及びＹからなる群から選択される。

【０１３０】

別の好ましい実施態様において、第五配列の位置２２６にあるアミノ酸残基は、Ｖ及びＩからなる群から選択される。

【０１３１】

別の好ましい実施態様において、第五配列の位置２２９にあるアミノ酸残基は、Ｄ及びＮからなる群から選択される。

【０１３２】

別の好ましい実施態様において、第五配列の位置２３２にあるアミノ酸残基は、Ｐ及びＤからなる群から選択される。

【０１３３】

別の好ましい実施態様において、第五配列の位置２３３にあるアミノ酸残基は、Ｔ及びＳからなる群から選択される。

【０１３４】

別の好ましい実施態様において、第五配列の位置２３４にあるアミノ酸残基は、Ｓ、Ｅ及びＲからなる群から選択される。

【０１３５】

別の好ましい実施態様において、第五配列の位置２３８にあるアミノ酸残基は、Ｐ及びＧからなる群から選択される。

【０１３６】

別の好ましい実施態様において、第五配列の位置２３９にあるアミノ酸残基は、Ｉ及びＶからなる群から選択される。

【０１３７】
別の好ましい実施態様において、第五配列の位置２４６にあるアミノ酸残基は、Ｃ、Ｖ及びＭからなる群から選択される。
【０１３８】
別の好ましい実施態様において、第五配列の位置２５０にあるアミノ酸残基は、Ｅ、Ｋ及びＤからなる群から選択される。
【０１３９】
別の好ましい実施態様において、第五配列の位置２５１にあるアミノ酸残基は、Ａ及びＧからなる群から選択される。
【０１４０】
別の好ましい実施態様において、第五配列の位置２５３にあるアミノ酸残基は、Ｖ及びＩからなる群から選択される。
【０１４１】
別の好ましい実施態様において、第五配列の位置２５４にあるアミノ酸残基は、Ａ及びＶからなる群から選択される。
【０１４２】
別の好ましい実施態様において、第五配列の位置２５６にあるアミノ酸残基は、Ｌ及びＭからなる群から選択される。
【０１４３】
単離されたポリペプチド
本発明の別の態様にしたがって、本発明の核酸分子によってコード化される（変異タンパク質、対立形質、変異体、断片、誘導体、及びアナログを含む）単離されたポリペプチドが提供される。ある実施態様において、前記単離されたポリペプチドは、配列番号１３に対応するポリペプチド配列を含む。本発明のある代替的な実施態様において、前記単離されたポリペプチドは配列番号１３と少なくとも６０％同一のポリペプチド配列を含む。好ましくは、本発明の前記単離されたポリペプチドは配列番号１３との少なくとも７０％、７５％又は８０％同一性を有する。より好ましくは、前記同一性は８５％、９０％又は９５％であるが、配列番号１３との同一性は９８％、９９％、９９．９％又はさらにより高くありうる。
【０１４４】
本発明の他の実施態様にしたがって、前述のポリペプチド針悦の断片を含む単離されたポリペプチドが提供される。これらの断片には好ましくは少なくとも２０個の連続したアミノ酸、より好ましくは少なくとも２５個、３０個、３５個、４０個、４５個、５０個、６０個、７０個、８０個、９０個、１００個又はさらにより多くの連続したアミノ酸が含まれる。
【０１４５】
本発明のポリペプチドは、前述のポリペプチド配列と異種性のポリペプチドとの間の融合も含む。前記異種性の配列は、例えば組換えで発現されるタンパク質の精製及び／又は可視化を容易にするようデザインされた異種性の配列を含むことができる。タンパク質融合の他の制限のない例には、ファージ又は細胞の表面上でコード化されたタンパク質を表しうるもの、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）などの本質的に蛍光性のタンパク質への融合、及びＩｇＧ　Ｆｃ領域への融合が含まれる。
【０１４６】
ＵＤＰ－ガラクトース４－エピメラーゼ／β１，４－ガラクトシルトランスフェラーゼ融合ポリペプチド
本発明の更なる態様において、エピメラーゼ及びガラクトシルトランスフェラーゼ活性を含むポリペプチドをコード化する遺伝子融合が生成される。ある実施態様において、ＵＤＰ－ガラクトース４－エピメラーゼ及びβ１，４－ＧａｌＴＩを含む融合ポリペプチドが生成され、宿主細胞に導入される。より好ましい実施態様において、前記融合ポリペプチドはさらに、リーダー配列を含む。例えば、指向性ペプチドをコード化するリーダー配

列のライブラリが、ＳｐＧａｌＥ／ｈＧａｌＴＩ融合にフレーム内に連結される。さらにより好ましい実施態様において、前記融合ポリペプチドは、ＳｃＭｎｎ２（ｓ）リーダー、ＳｐＧａｌＥエピメラーゼ及びｈＧａｌＴＩを含む。前記融合ポリペプチドは、ＨＹＧマーカーを含む酵母組み込みプラスミドに挿入される。ｐＲＣＤ４６１と命名されるエピメラーゼ－ガラクトシルトランスフェラーゼ組み込みプラスミドの例は図５に示されている（実施例８）。前記エピメラーゼ－ガラクトシルトランスフェラーゼ融合形質転換体は、約７０％ガラクトシル化したヒト様糖タンパク質$Gal_2GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$を生成する（図１５Ｂ）。

【０１４７】

Ｂ１，４－ガラクトシルトランスフェラーゼ、ＵＤＰ－ガラクトース４－エピメラーゼ、ＵＤＰ－ガラクトース輸送体ポリペプチド

本発明の別の態様において、β－ガラクトシルトランスフェラーゼ、エピメラーゼ及びＵＤＰ－ガラクトース輸送体の活性を含むポリペプチドをコード化する単一構築物が生成される。ある実施態様において、ヒトβ１，４－ＧａｌＴ、ＳｐＧａｌＥ及びＤｍＵＧＴ（「三重」）を含むプラスミドを構築する（実施例９）。好ましい実施態様において、前記トランスフェラーゼポリペプチドはさらに、リーダー配列、例えばｈＧａｌＴＩへフレーム内に凍結されたＳｃＭｎｎ２（ｓ）を含む。３つのポリペプチドはすべて、好ましくは自らのプロモーター及び終結因子とともにＫＡＮＲマーカーを含有する酵母組み込みプラスミドへと挿入される。ｐＲＣＤ４６５と命名されるこの「三重」組み込みプラスミドの例は図４に示されている。ある実施態様において、前記融合ポリペプチドを含む「三重」組み込みプラスミドが、宿主細胞において導入及び発現され、末端ＧｌｃＮＡｃ残基を産生する。Ｐ．パストリスＹＳＨ－４４を前記「三重」組み込みプラスミドで形質転換し、ＲＤＰ８０と命名した。

【０１４８】

ＲＤＰ８０系において産生されるＮ－グリカンが、推定した$Gal_2GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$種であるかどうかを査定するため、ＲＤＰ８０から分泌され、精製したＫ３を、ＣＭＰ－ＮＡＮＡの存在下において試験管内でシアリルトランスフェラーゼとインキュベートし、生じたＮ－グリカンが放出された。前記Ｎ－グリカンのＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳ分析は、最終的にシアル酸付加したＮ－グリカン$NANA_2Gal_2GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$である複雑なものの質量に対応する２２２７ｍ／ｚ［Ｘ］での優勢なピークを示した（図１４Ｃ）。

【０１４９】

ＵＤＰ－Ｇａｌの代替的な生産

前述のように、ガラクトース残基のＮ－グリカンへの転移は、活性化されたガラクトース（ＵＤＰ－Ｇａｌ）のプールを要する。下等真核生物における内在性レベルを上回るこのようなプールを形成するある方法は、ＵＤＰ－ガラクトース４エピメラーゼの発現である。代替的な経路には、３つの個別の遺伝子（ＵＤＰ－ガラクトース４エピメラーゼのない状態での形質膜ガラクトースパーミアーゼ、ガラクトキナーゼ、及びガラクトース－１－リン酸ウリジルトランスフェラーゼ）の発現が含まれる。前記ＵＤＰ－ガラクトース４エピメラーゼのない状態で、ガラクトースの外来源を有するルロワ（ＬｅＬｏｉｒ）経路のその他の３つの遺伝子の発現は、ＵＤＰ－ガラクトースの内在性レベルを上昇するのに機能するであろう（Ｒｏｓｓほか、２００４）。さらに、本実施態様において、前記生じたＵＤＰ－ガラクトースがＮ－グリカンなどの基質への添加と離れては代謝できないため、ＵＤＰ－ガラクトース４エピメラーゼのないことによってＵＤＰ－ガラクトースのレベルは、ガラクトースの外来性濃縮を調節することで調節できるようになる。

【０１５０】

ガラクトースパーミアーゼは、形質膜ヘキソース輸送体であり、外来源からガラクトースを取り込む。ある実施態様において、Ｓ．セレビシエガラクトースパーミーゼ遺伝子、ＧＡＬ２（Ｇｅｎｂａｎｋ：　Ｍ８１８７９）、又はガラクトースを取り込むことのできる形質膜ヘキソース輸送体をコード化するいずれかの遺伝子を使用する。

【０１５１】
ガラクトキナーゼは、ガラクトース代謝の第一段階、すなわちガラクトースのガラクトース－１－リン酸へのリン酸化を触媒する酵素である。別の実施態様において、Ｓ．セレビシエ由来のＧＡＬ１遺伝子（Ｇｅｎｂａｎｋ：　Ｘ７６０７８）を使用する。
【０１５２】
ガラクトース－１－リン酸ウリジルトランスフェラーゼは、ＵＤＰ－ガラクトース及びガラクトース－１－リン酸のＵＤＰ－ガラクトース及びグルコース－１－リン酸への変換である、ガラクトース代謝の第二段階を触媒する。別の実施態様において、ガラクトース－１－リン酸ウリジルトランスフェラーゼ活性をコード化するいずれかの遺伝子を使用でき、これにはＳ．セレビシエＧＡＬ７（Ｇｅｎｂａｎｋ：　Ｍ１２３４８）が含まれる。
【０１５３】
好ましい実施態様において、ＵＤＰ－ガラクトース４エピメラーゼをコード化する遺伝子は、ルロワ（ＬｅＬｏｉｒ）経路を介してガラクトースを代謝できる下等真核生物から削除される。
【０１５４】
より好ましい実施態様において、ガラクトースパーミアーゼ、ガラクトキナーゼ及びガラクトース－１－リン酸ウリジルトランスフェラーゼをコード化する遺伝子を、ｇａｌ（－）でありルロワ（ＬｅＬｏｉｒ）経路の遺伝子を内在的に発現しない下等真核宿主細胞において発現させる（Ｈｉｔｔｉｎｇｅｒほか、２００４）。
【０１５５】
この代替実施態様の利点は、生育阻害濃度を下回るレベルでの外部ガラクトースの調節により、ＵＤＰ－ガラクトース４－エピメラーゼのないことで内部ＵＤＰ－ガラクトース濃度の特異的な調節が可能になることである。
【０１５６】
遺伝学的に変化した酵母細胞におけるガラクトシル化したＮ－グリカン産生の増加
酵母及び菌の宿主におけるヒト様Ｎ－グリカンを産生する方法は、ＷＯ００２００８７９Ａ３及びＷＯ０３０５６９１４Ａ１において提供され、本明細書に組み込まれる。当業者は、前述の方法と組み合わせて本明細書で開示された手段の決まりきった改変が対象の糖タンパク質の産生における改善された結果を提供し得ることを認識する。
【０１５７】
本発明の方法にしたがって、少なくともβ－ガラクトシルトランスフェラーゼ融合構築物ｐＸＢ５３で形質転換したＰ．パストリス（実施例４）（図１２）は、検出可能な部分において複雑によりガラクトシル化されたグリカンを生成する。ガラクトース残基の少なくとも１０％は宿主細胞において糖タンパク質へと転移される。エピメラーゼの発現は、ガラクトース転移のレベルも増加する（図１３）。好ましくは、ガラクトース残基の少なくとも６０％が宿主細胞における糖タンパク質へと転移される。ＵＧＴなどの別の異種性グリコシル化酵素の発現は、望ましいガラクトシル化した糖タンパク質の細胞内産生をさらに強化する。驚くべきことに、このような輸送体の一つであるＤｍＵＧＴの発現はガラクトース転移を劇的に増加させる（図１１）。本実施態様の最良のモードにおいて、ＤｍＵＧＴで形質転換した宿主細胞は、少なくとも９０％以上のガラクトース転移を示す。
【０１５８】
好ましくは、前記酵母宿主細胞の温度は、前記酵素の至適温度と符合させるため３７℃に維持される。
【０１５９】
さらに、前記方法にはこれらの糖タンパク質を単離することも含まれる。
【０１６０】
ＵＤＰａｓｅ活性の発現
ＷＯ０２／００８７９に記載されているように、ヒトにおいて、ヌクレオチド糖前駆体（例えばＵＤＰ－Ｎ－アセチルグルコサミン、ＵＤＰ－Ｎ－アセチルガラクトサミン、ＣＭＰ－Ｎ－アセチルノイラミン酸、ＵＤＰ－ガラクトース等）は、一般にサイトゾル中で

合成され、ゴルジ体へと輸送され、そこでヌクレオチド糖前駆体はグリコシルトランスフェラーゼによって中心オリゴ糖に結合する。このプロセスを下等真核生物において複製するため、糖ヌクレオシド特異的輸送体が、ヌクレオシド糖前駆体の適切なレベルを確実にするため、ゴルジ体において発現されなければならない（Ｓｏｍｍｅｒｓ，１９８１；Ｓｏｍｍｅｒｓ，１９８２；　Ｐｅｒｅｚ，１９８７）。糖のＮ－グリカンへの転移の副産物は、ヌクレオシド二リン酸又はヌクレオシド一リン酸のいずれかである。一リン酸塩がアンチポートメカニズムによってヌクレオシド三リン酸糖との交換において直接放出されることができる一方で、二リン酸ヌクレオシド（例えばＧＤＰ）は、放出される前に、リン酸分解酵素（例、ＧＤＰａｓｅ）によって開裂され、ヌクレオシド一リン酸及び無機リン酸が産生されなければならない。この反応は、Ｓ．セレビシエ由来のＧＤＰａｓｅがマンノシル化に必要であることがわかっているため、効率のよいグリコシル化に重要であるように見える。しかしながら、前記酵素はＵＤＰに対して活性が１０％しかない（Ｂｅｒｎｉｎｓｏｎｅ，１９９４）。下等真核生物は、ゴルジ体において糖タンパク質合成のためのＵＤＰ－糖前駆体を利用しないため、ゴルジ体においてＵＤＰ特異的ジホスファターゼ活性をしばしば有していない。

【０１６１】

遺伝子工学的に改変された酵母の系は、基質としてＵＤＰ－ＧｌｃＮＡｃ又はＵＤＰ－ガラクトースを利用する複数のトランスフェラーゼ酵素を含有する。このことは、殆んどの種においてこれらの基質を含有しない酵母ゴルジ体において、適切な基質プールの遺伝子工学的改変を要する。しかしながら、ＵＤＰ－ＧｌｃＮＡｃ又はＵＤＰ－ガラクトースを利用するトランスフェラーゼ反応の最終生成物には遊離ＵＤＰが含まれる。このＵＤＰは、これらの糖ヌクレオチドを利用する殆んどのトランスフェラーゼの強い阻害剤として作用する。Ｓ．セレビシエは、ヌクレオシドジホスファターゼ活性を有する２つのゴルジ体タンパク質を発現する。１つはＳｃＧＤＡ１であり、ＧＤＰに対して非常に特異的である（Ａｂｅｉｊｏｎほか、１９９３）。二番目はＳｃＹＮＤ１というアピラーゼであり、したがってヌクレオシド二リン酸と同様、ヌクレオシド三リン酸も加水分解でき、ＡＤＰ／ＡＴＰ、ＧＤＰ／ＧＴＰ及びＵＤＰ／ＵＴＰに対して等しく特異的である（Ｇａｏほか、１９９９）。しかしながら、野生型ゴルジ体におけるＵＤＰに結合した糖の欠失、及びＵＤＰを最終生成物として生成するトランスフェラーゼ酵素の同時欠失のため、遺伝子工学的に改変された酵母の系におけるＵＤＰの蓄積の起こりうる上昇が重大な関心事である。

【０１６２】

サイトゾルからゴルジ体へのガラクトース残基の転移がＵＤＰａｓｅの欠失によって阻害され得るので、ＵＤＰａｓｅを発現させるための遺伝子操作が下等真核宿主細胞において効率よいガラクトース転移のために必要であろう。したがって、本発明の別の態様において、ＵＤＰａｓｅをコード化する遺伝子を発現させる、好ましくは過剰発現させる方法が提供される。ＵＤＰａｓｅ活性をコード化する遺伝子の過剰発現により、ゴルジ体における受容体基質へのガラクトースの転移に必要な糖ヌクレオチドＵＤＰ－ガラクトースの利用可能性を増加させることが意図される。酵母のゴルジ体におけるＵＤＰａｓｅ活性のレベルを上昇させるためにはいくつかの可能性が存在する。ある実施態様において、ＵＤＰａｓｅ活性をコード化する遺伝子、例えばＵＤＰに対していくらかの活性（約１０％）のあるＳｃＧＤＡ１（ＮＰ＿０１０８７２）が過剰発現される。別の実施態様において、ヌクレオシドジホスファターゼ活性をコード化する遺伝子、例えばＧＤＰと比較してＵＤＰに対してより高い活性を有するＳｃＹＮＤ１（ＮＰ＿０１０９２０）（これは、しかし、ヌクレオチド二リン酸に特異的ではない。）が過剰発現される。さらに、別の実施態様において、Ｐ．パストリスにおけるより高いＵＰＤａｓｅ活性を得るという目標を達成するために、Ｓ．セレビシエＧＤＡ１又はＹＮＤ１が過剰発現される。又は、これらの遺伝子のＰ．パストリスのホモログ（これはＢＬＡＳＴ相同性検索を介して簡単に同定可能である。）が過剰発現される。

【０１６３】

さらに、これらの糖ヌクレオチドを利用する生物は、これら糖ヌクレオチドをＵＭＰへ、ＵＤＰに特異的なヌクレオチドジホスファターゼの作用を介して変換することができる。一例は、Ｗａｎｇ及びＧｕｉｄｏｔｔｉ（ＡＦ０１６０３２）によって特定されたヒトウリジンジホスファターゼ（ＵＤＰａｓｅ）である。しかしながら、このタンパク質は2つの推定膜貫通ドメインを含有し、１つはＣ末端に、１つはＮ末端にある。したがって、酵母ゴルジ体におけるこのタンパク質の局在化のためには、このタンパク質の触媒ドメインを酵母指向性ドメインと融合させる必要がある。

【０１６４】

Ｋ．ラクティス及びＳ．セレビシエを含む他の酵母は、それらのゴルジ体においてＵＤＰ－糖を利用し、ＧｌｃＮＡｃ及びガラクトースをそれぞれそれらのＮ－グリカンへと付加する。Ｋ．ラクティスもＳ．ポムベも、ＫｌＧＤＡ１（Ｌｏｐｅｚ－Ａｖａｌｏｓほか、２００１；　ＣＡＣ２１５７６）及びＳｐｇｄａＩ（Ｄ’Ａｌｅｓｓｉｏほか、２００３；　ＮＰ＿５９３４４７）とそれぞれ命名され、ＵＤＰａｓｅ活性も有する、ＳｃＧＤＡ１の相同体を発現する。ＵＤＰが遺伝子工学的に改変された酵母の系において蓄積し、前記遺伝子工学的に改変されたトランスフェラーゼに対して有害であることが示される場合、これらのいずれかのタンパク質又はより多くのタンパク質の発現はＵＤＰａｓｅ活性を許容可能なレベルまで押し上げるよう機能する。

【０１６５】

アシアロ糖タンパク質受容体（ＡＳＧＲ）に対する結合親和性

本発明の別の特徴は、脱シアル酸付加した糖タンパク質を除去し、循環器系における治療タンパク質の半減期を低下させることがわかっているＡＳＧＲに対する結合親和性の低下を提供する。先行研究により、二アンテナ性構造を有するグリカンは、三アンテナ性又は四アンテナ性構造を有するグリカンよりもあまり迅速には除去されないことが示されている（Ｓｔｏｃｋｅｒｔ、Ｐｈｙｓｉｏｌ　Ｒｅｖ．１９９５年7月号；７５（３）：５９１－６０９）。本発明のある態様において、末端ガラクトース残基を有することを特徴とする単一糖形態（例えば二アンテナ性構造）を有する対象のタンパク質上のグリカンを提供する。このような二アンテナ性構造は、三アンテナ性及び四アンテナ性分岐反応を触媒する他のＧｎＴのため、哺乳類細胞において容易に生成されない。ガラクトース残基を備えた末端ＧｌｃＮＡｃ残基を有する基質をキャッピングすることによって、ガラクトシル化した基質へのＧｌｃＮＡｃの転移を触媒する他のＧｎＴ（例、ＧｎＴ　ＩＶ、ＧｎＴ　Ｖ）は存在しない。したがって、本発明は、哺乳類宿主において産生される前記糖タンパク質と比較して、ＡＳＧＲに対する結合親和性がほとんどない脱シアル酸した糖タンパク質を生成するための方法を提供する。より好ましい実施態様において、脱シアル酸した糖タンパク質は、哺乳類において産生される異種性の糖タンパク質と比較して、増加した体内における循環上の半減期及び生物活性によって特徴付けられる。

【０１６６】

組み込み部位

例えば１，３マンノシルトランスフェラーゼ（例えばＳ．セレビシエにおけるＭＮＮ１）（Ｇｒａｈａｍ，１９９１）、１，２マンノシルトランスフェラーゼ（例えばＳ．セレビシエ由来のＫＴＲ／ＫＲＥファミリー）、１，６マンノシルトランスフェラーゼ（Ｓ．セレビシエ又はＰ．パストリス由来のＯＣＨ１）、マンノシルリン酸トランスフェラーゼ及びその制御因子（Ｓ．セレビシエ由来のＭＮＮ４、ＰＮＯ１及びＭＮＮ６）、細胞内プロテアーゼＡ（ＰＥＰ４）、細胞内プロテアーゼＢ（ＰＲＢ１）ＧＰＩにより固定されたアスパラギン酸プロテアーゼ（ＹＰＳ１）、及び異常で、免疫原性の（即ち、ヒト以外でのグリコシル化反応に関与する）他の酵素などのマンノシルトランスフェラーゼに対応する遺伝子座においてＵＧＴ、エピメラーゼ及びβ１，４ＧａｌＴをコード化する核酸を組み込むことが好ましい。

【０１６７】

破壊された遺伝子座を有する変異体は、酵素活性の低下した又は酵素活性が完全に排除された生存可能な表現型を生じる。好ましくは、惹起（ｉｎｉｔｉａｔｉｎｇ）するα－

１，６マンノシルトランスフェラーゼ活性をコード化する遺伝子座は、グリコシルトランスフェラーゼ活性をコード化する遺伝子の初期組み込みのための適した標的である。同じようにして、前記遺伝子座における遺伝子破壊事象に基づいて、（１）よりヒト様の様式でグリコシル化する細胞の能力を改善する、（２）タンパク質を分泌する細胞の能力を改善する、（３）外来タンパク質のタンパク質分解を低下させる、及び（４）精製を容易にするプロセス又は発酵プロセス自体の他の特徴を改善する、ことが期待される他の染色体の組み込み部位の範囲を選択できる。

【０１６８】

特に好ましい実施態様において、ライブラリＤＮＡは宿主染色体における望ましくない遺伝子の部位へ組み込まれ、前記遺伝子を破壊し又は除去される。例えば、ＯＣＨ１、ＭＮＮ１又はＭＮＮ４遺伝子の部位への組み込みによって、望ましいライブラリＤＮＡの発現が可能になる一方、酵母における糖タンパク質の過マンノシル化に関与する酵素の発現を防止する。他の実施態様において、ライブラリＤＮＡは、核酸分子、プラスミド、ベクター（例えばウィルスベクター又はレトロウィルスベクター）、染色体を介して宿主へと導入されてもよく、自立性核酸分子として、又は宿主ゲノムへの相同的又は無作為に組み込まれてもよい。いずれの場合においても、安定的に形質転換された宿主生物を容易に選別することを可能にするために、少なくとも１つの選択可能なマーカー遺伝子を各ライブラリＤＮＡ構築物に含むことが一般に望ましい。選択できるＵＲＡ５などの再利用可能なマーカー遺伝子（Ｙｅａｓｔ，２００３年１１月号；２０（１５）：　１２７９－１２９０）が特に適している。

【０１６９】

更なる配列多様性の作成

本実施態様の方法は、核酸、例えば宿主へ形質転換されるＤＮＡライブラリが多様な配列を含有するとき最も効果的であり、それにより少なくとも１つの形質転換体が望ましい表現型を呈する確率を増大させる。例えば、単一のアミノ酸突然変異が、糖タンパク質加工酵素の活性を劇的に変更させ得る（Ｒｏｍｅｒｏほか、２０００）。したがって、形質転換の前に、ＤＮＡライブラリ又はサブライブラリ成分は、更なる配列多様性を作成するための１つ以上の技術へ供され得る。例えば、遺伝子シャフリング、エラープロンＰＣＲ、試験管内変異誘発又は配列多様性を作成するための他の方法が、融合構築物のプール内で配列のより大きな多様性を得るために実施し得る。

【０１７０】

コドン最適化

本発明の核酸が、保存的なアミノ酸置換、付加、欠失又はその組み合わせなどの一次アミノ酸配列における１つ以上の変化を生じるようにコドンの最適化がされてもよいことも意図される。

【０１７１】

発現調節配列

各ライブラリ構築物を、前述のオープン・リーディング・フレーム配列に加えて、（例えばプロモーター、転写終結因子、エンハンサー、リボソーム結合部位、及び宿主生物体への融合構築物の形質転換に際し融合タンパク質の効果的な転写及び翻訳を確実にするのに必要であり得る他の機能的配列などの）発現調節配列と共に提供することが一般に好ましい。

【０１７２】

適切なベクター構成成分（例えば、選択可能なマーカー、発現調節配列（例、プロモーター、エンハンサー、終結因子等）及び必要に応じて宿主細胞における自律複製に必要な配列）は、選択された特定の宿主細胞の機能として選択される。特定の哺乳類宿主細胞又は下等真核宿主細胞に使用のための適切なベクター構成成分の選抜基準は日常的なものである。本発明の好ましい下等真核宿主細胞には、ピキアパストリス（Ｐｉｃｈｉａ　ｐａｓｔｏｒｉｓ）、ピキアフィンランディカ（Ｐｉｃｈｉａ　ｆｉｎｌａｎｄｉｃａ）、ピキアトレハロフィラ（Ｐｉｃｈｉａ　ｔｒｅｈａｌｏｐｈｉｌａ）、ピキアコクラマエ（

Ｐｉｃｈｉａ ｋｏｃｌａｍａｅ）、ピキアメンブラナエファシエンス（Ｐｉｃｈｉａ ｍｅｍｂｒａｎａｅｆａｃｉｅｎｓ）、ピキアミニュータ（Ｐｉｃｈｉａ ｍｉｎｕｔａ）（オガタエアミニュータ（Ｏｇａｔａｅａ ｍｉｎｕｔａ）、ピキアリンドネリ（Ｐｉｃｈｉａ ｌｉｎｄｎｅｒｉ））、ピキアオプンティアエ（Ｐｉｃｈｉａ ｏｐｕｎｔｉａｅ）、ピキアサーモトレランス（Ｐｉｃｈｉａ ｔｈｅｒｍｏｔｏｌｅｒａｎｓ）、ピキアサリクタリア（Ｐｉｃｈｉａ ｓａｌｉｃｔａｒｉａ）、ピキアグエルキューム（Ｐｉｃｈｉａ ｇｕｅｒｃｕｕｍ）、ピキアピジュペリ（Ｐｉｃｈｉａ ｐｉｊｐｅｒｉ）、ピキアスティプティス（Ｐｉｃｈｉａ ｓｔｉｐｔｉｓ）、ピキアメタノリカ（Ｐｉｃｈｉａ ｍｅｔｈａｎｏｌｉｃａ）、ピキア種（Ｐｉｃｈｉａ ｓｐ．）、サッカロマイセス・セレビシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）、サッカロミセス種（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｓｐ．）、ハンゼヌラ・ポリモルファ（Ｈａｎｓｅｎｕｌａ ｐｏｌｙｍｏｒｐｈａ）、クルイベロミセス種（Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ ｓｐ．）、クルイベロミセス・ラクティス（Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ ｌａｃｔｉｓ）、カンジダ・アルビカンス（Ｃａｎｄｉｄａ ａｌｂｉｃａｎｓ）、アスペリギルス・ニドウランス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｎｉｄｕｌａｎｓ）、アスペリギルス・ニガー（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｎｉｇｅｒ）、アスペルギルス・オリゼ（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｓ ｏｒｙｚａｅ）、トリコデルマ・リーゼイ（Ｔｒｉｃｈｏｄｅｒｍａ ｒｅｅｓｅｉ）、クリソスポリウム・ラックノウエンス（Ｃｈｒｙｓｏｓｐｏｒｉｕｍ ｌｕｃｋｎｏｗｅｎｓｅ）、フサリウム種（Ｆｕｓａｒｉｕｍ ｓｐ．）、フザリウム・グラミネウム（Ｆｕｓａｒｉｕｍ ｇｒａｍｉｎｅｕｍ）、フザリウム・ベネナツム（Ｆｕｓａｒｉｕｍ ｖｅｎｅｎａｔｕｍ）、フィスコミトレラ・パテンス（Ｐｈｙｓｃｏｍｉｔｒｅｌｌａ ｐａｔｅｎｓ）及びノイロスポラ・クロッサ（Ｎｅｕｒｏｓｐｏｒａ ｃｒｏｓｓａ）が含まれる。

【０１７３】

宿主がピキア・パストリスの場合、適切なプロモーターは、例えばＡＯＸ１、ＡＯＸ２、ＧＡＰＤＨ、ＯＣＨ１、ＳＥＣ４、Ｄ２及びＰ４０のプロモーターを含む。

【０１７４】

選択可能なマーカー

薬物耐性を付与し又は宿主の代謝上の破壊された部分を補完するための遺伝子などの、少なくとも１つの選択可能なマーカーを各構築物に提供することがまた好ましい。前記マーカーの存在は、形質転換体のその後の選択において有用であり、例えば酵母においては、ＵＲＡ５、ＵＲＡ３、ＨＩＳ４、ＳＵＣ２、Ｇ４１８、ＢＬＡ又はＳＨ ＢＬＥといった遺伝子が使用され得る。選択可能なマーカーの多くは公知であり、酵母、菌、植物、昆虫、哺乳類及びその他の真核宿主細胞において使用するために利用可能である。

【０１７５】

形質転換

酵母において、電気穿孔法、塩化リチウム法又はスフェロプラスト法などのＤＮＡ導入法のいずれかの従来の方法を使用し得る。糸状菌及び植物細胞において、従来の方法は、粒子照射、電気穿孔法及びアグロバクテリウムにより仲介される形質転換を含む。高密度培養（例えば酵母における発酵）に適した安定した株を作製するため、宿主染色体へ融合構築物に組み込むことが望ましい。好ましい実施態様において、組み込みは本分野で周知の技術を使用して相同的組換えを介して行われる。好ましくは、Ｐ．パストリスの安定した遺伝的修飾は、二重のクロスオーバー事象を介して行われる（Ｎｅｔｔほか、Ｙｅａｓｔ、２００３年１１月号；２０（１５）： １２７９－１２９０）。例えば、異種性の酵素活性は宿主生物の配列と相同的な側面配列によって提供され、次いで、単一マーカーを拾いだすことにより形質転換が行われる。このような方法により、組み込みが、再利用可能なマーカーを使用する宿主ゲノムの特定の部位において行われる。

【０１７６】

スクリーニングプロセス及び選択プロセス

宿主株を異種性の酵素で形質転換した後、望ましいグリコシル化表現型を示す形質転換

体が選択される。選択は、単一段階において又は多様なアッセイ又は検出方法のいずれかを使用する一連の表現型の濃縮段階及び／又は枯渇段階によって実施され得る。表現型の特徴付けは、手動で又は自動化した高処理量のスクリーニング装置を使用して実施し得る。共通して、宿主微生物は、細胞表面上にタンパク質Ｎ－グリカンを示し、それにより細胞表面上に多様な糖タンパク質が局在する。

【０１７７】

例えば、細胞表面上の末端ＧｌｃＮＡｃの最大濃度を有する細胞について、又は最大の末端ＧｌｃＮＡｃ含有量でタンパク質を分泌する細胞について、スクリーニングし得る。このようなスクリーニングは、染色手順、特定の末端ＧｌｃＮＡｃに結合する、抗体又はマーカーに結合したレクチン（このようなレクチンはＥ．Ｙ．Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ社、Ｓａｎ Ｍａｔｅｏ，ＣＡから入手可能である。）の結合能力、末端マンノース残基へ結合する特異的レクチンの低下した能力、インビボでの放射性標識した糖を組み込む能力、染色剤への又は荷電した表面への変化した結合のような可視化方法に基づき得、又はフルオロフォア標識したレクチン又は抗体と組み合わせたＦｌｕｏｒｅｓｃｅｎｃｅ Ａｓｓｉｔｅｄ Ｓｏｒｔｉｎｇ（ＦＡＣＳ）を使用することによって達成し得る（Ｇｕｉｌｌｅｎ，１９９８）。

【０１７８】

したがって、無傷細胞が、この細胞を望ましいＮ－グリカンへ特異的に結合するレクチン又は抗体に曝すことによって望ましいグリコシル化表現型についてスクリーニングされ得る。多様なオリゴ糖特異的レクチン（例えばＥＹ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｓａｎ Ｍａｔｅｏ，ＣＡから）が商業的に入手可能である。あるいは、ヒト又は動物Ｎ－グリカンに対して特異的な抗体は、商業的に入手可能であり、又は標準的な技術を使用して作製し得る。適切なレクチン又は抗体は、発色団、フルオロフォア、放射性同位体、又は色素生産性基質を有する酵素などのリポーター分子へ結合させ得る（Ｇｕｉｌｌｅｎほか、１９９８、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９５（１４）： ７８８８－７８９２）。

【０１７９】

次いで、スクリーニングは、分光測定、蛍光測定、蛍光標示式細胞分取、又はシンチレーション計数などの分析方法を使用して実施し得る。他の場合において、形質転換した細胞から単離した糖タンパク質又はＮ－グリカンを分析する必要があり得る。タンパク質の単離は、本分野で公知の技術によって実施し得る。好ましい実施態様において、リポータータンパク質は、培地へと分泌され、アフィニティークロマトグラフィー（例、Ｎｉ－アフィニティ又はグルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼアフィニティクロマトグラフィー）により精製される。単離されたＮ－グリカンが好ましい場合、エンド－ｂ－Ｎ－アセチルグルコサミニダーゼ（Ｇｅｎｚｙｍｅ社、Ｂｏｓｔｏｎ，ＭＡ； Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ，Ｂｅｖｅｒｌｙ，ＭＡ）などの酵素を使用して糖タンパク質から前記Ｎ－グリカンを切断してもよい。単離されたタンパク質又はＮ－グリカンは、次いで、液体クロマトグラフィー（例、ＨＰＬＣ）、質量分析又は他の適切な手段によって分析され得る。米国特許第５，５９５，９００号は、望ましい細胞外炭水化物構造を有する細胞を特定し得るいくつかの方法を教示している。好ましい実施態様において、ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ質量分析が前記切断したＮ－グリカンを分析するのに使用される。

【０１８０】

望ましい形質転換体の選抜の前に、望ましくない表現型を有する細胞の形質転換した集団を枯渇させることが望ましいこともあり得る。例えば、前記方法を使用して、機能的マンノシダーゼ活性を細胞へと遺伝子工学的に改変させるとき、望ましい形質転換体は、細胞内糖タンパク質において比較的低レベルのマンノースを有する。形質転換した手段を培地中のマンノースの致死量放射性同位体へ暴露することで、望ましくない表現型、つまり高レベルの組み込まれたマンノースを有する形質転換体の集団を枯渇させる（Ｈｕｆｆａｋｅｒ ＴＣ及びＲｏｂｂｉｎｓ ＰＷ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ．１９８３年１２月号；８０（２４）： ７４６６－７４７０）。あるいは、望まし

くないＮ－グリカンに対して指向する細胞毒性レクチン又は抗体が、望ましくない表現型の形質転換した集団を枯渇させるのに使用し得る（例、Ｓｔａｎｌｅｙ Ｐ及びＳｉｍｉｎｏｖｉｔｃｈ Ｌ．Ｓｏｍａｔｉｃ Ｃｅｌｌ Ｇｅｎｅｔ １９７７年７月号；３（４）：３９１－４０５）。米国特許第５，５９５，９００号は望ましい細胞外炭水化物構造を有する細胞を特定し得るいくつかの方法を教示している。この戦略を繰り返して実施することによって、下等真核生物におけるさらにより複雑なグリカンを順次行うことによって遺伝子工学的に改変できる。

【０１８１】

宿主細胞の表面上にヒト様Ｎ－グリカン中間体$Gal_2GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$の高い程度を有する前記細胞を検出するために、例えばインビトロ細胞アッセイにおいてＧａｌＴによるＵＤＰ－ガラクトースからのガラクトースへの最も効率的な転移を可能にする形質転換体を選択し得る。このスクリーニングは、アガープレート上で選択的な圧力の下で形質転換したライブラリを有する細胞を生育させ、個々のコロニーを９６穴マイクロタイタープレートへと転移することによって実施し得る。前記細胞を生育させた後、前記細胞を遠心分離し、緩衝液中に再懸濁し、ＵＤＰ－ガラクトース及びＧａｌＴの添加後のＵＤＰの放出をＨＰＬＣ又はＵＤＰについての酵素結合アッセイのいずれかによって測定する。あるいは、放射性標識したＵＤＰ－ガラクトース及びＧａｌＴを使用し、前記細胞を洗浄した後、β－ガラクトシダーゼによる放射性ガラクトースの放出について観察してもよい。このことはすべて、手動で実施してもよく又は高処理量のスクリーニング装置の使用を通じて自動化されてもよい。第一アッセイにおいてより多くのＵＤＰを放出する形質転換体、又は第二アッセイにおいてより放射性標識されたガラクトースを放出する形質転換体は、前記形質転換体の表面上に$Gal_2GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$のより高い程度を有すると期待され、したがって望ましい表現型を構成すると期待される。同様のアッセイが、同様に分泌されたタンパク質上のＮ－グリカンを観察するのに適応させ得る。

【０１８２】

あるいは、形質転換した細胞の表面上のグリコシル化パターンの変化を示すことのできるレクチン結合アッセイなどのその他の適切なスクリーニングを使用してもよい。この場合、末端マンノースに特異的なレクチンの結合の低下は、適切な選抜ツールであり得る。スノードロップ（Ｇａｌａｎｔｕｓ ｎｉｖａｌｉｓ）レクチンは、十分なマンノシダーゼＩＩ活性がゴルジ体に存在する場合低下すると期待される末端α－１，３マンノースへ特異的に結合する。又、高い末端マンノース含有量を有する細胞の除去を可能にするクロマトグラフィー分離段階を実施することによって、望ましい形質転換体を濃縮し得る。この分離段階は低い末端マンノース含有量を有する細胞を上回る、高い末端マンノース含有量を有する細胞に特異的に結合するレクチンカラムを使用して実施されるであろう（例、アガロースへ結合したスノードロップレクチン、Ｓｉｇｍａ，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）。

【０１８３】

宿主細胞

本発明はＰ．パストリスを宿主生物体として使用して例示するが、酵母宿主及び菌宿主の他の種を含む他の真核宿主細胞に、ヒト様糖タンパク質を産生するために、本明細書に記載されるように替えることができることが当業者によって理解される。このような宿主には、好ましくはピキアフィンランディカ（Ｐｉｃｈｉａ ｆｉｎｌａｎｄｉｃａ）、ピキアトレハロフィラ（Ｐｉｃｈｉａ ｔｒｅｈａｌｏｐｈｉｌａ）、ピキアコクラマエ（Ｐｉｃｈｉａ ｋｏｃｌａｍａｅ）、ピキアメンブラナエファシエンス（Ｐｉｃｈｉａ ｍｅｍｂｒａｎａｅｆａｃｉｅｎｓ）、ピキアミニュータ（Ｐｉｃｈｉａ ｍｉｎｕｔａ）（オガタエアミニュータ（Ｏｇａｔａｅａ ｍｉｎｕｔａ）、ピキアリンドネリ（Ｐｉｃｈｉａ ｌｉｎｄｎｅｒｉ））、ピキアオプンティアエ（Ｐｉｃｈｉａ ｏｐｕｎｔｉａｅ）、ピキアサーモトレランス（Ｐｉｃｈｉａ ｔｈｅｒｍｏｔｏｌｅｒａｎｓ）、ピキアサリクタリア（Ｐｉｃｈｉａ ｓａｌｉｃｔａｒｉａ）、ピキアグエルキューム（Ｐ

ｉｃｈｉａ ｇｕｅｒｃｕｕｍ）、ピキアピジュペリ（Ｐｉｃｈｉａ ｐｉｊｐｅｒｉ）、ピキアスティプティス（Ｐｉｃｈｉａ ｓｔｉｐｔｉｓ）、ピキアメタノリカ（Ｐｉｃｈｉａ ｍｅｔｈａｎｏｌｉｃａ）、ピキア種（Ｐｉｃｈｉａ ｓｐ．）、サッカロマイセス・セレビシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）、サッカロミセス種（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｓｐ．）、ハンゼヌラ・ポリモルファ（Ｈａｎｓｅｎｕｌａ ｐｏｌｙｍｏｒｐｈａ）、クルイベロミセス種（Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ ｓｐ．）、クルイベロミセス・ラクティス（Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ ｌａｃｔｉｓ）、カンジダ・アルビカンス（Ｃａｎｄｉｄａ ａｌｂｉｃａｎｓ）、アスペリギルス・ニドウランス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｎｉｄｕｌａｎｓ）、アスペリギルス・ニガー（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｎｉｇｅｒ）、アスペルギルス・オリゼ（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｓ ｏｒｙｚａｅ）、トリコデルマ・リーゼイ（Ｔｒｉｃｈｏｄｅｒｍａ ｒｅｅｓｅｉ）、クリソスポリウム・ラックノウエンス（Ｃｈｒｙｓｏｓｐｏｒｉｕｍ ｌｕｃｋｎｏｗｅｎｓｅ）、フサリウム種（Ｆｕｓａｒｉｕｍ ｓｐ．）、フザリウム・グラミネウム（Ｆｕｓａｒｉｕｍ ｇｒａｍｉｎｅｕｍ）、フザリウム・ベネナツム（Ｆｕｓａｒｉｕｍ ｖｅｎｅｎａｔｕｍ）、フィスコミトレラ・パテンス（Ｐｈｙｓｃｏｍｉｔｒｅｌｌａ ｐａｔｅｎｓ）及びノイロスポラ・クロッサ（Ｎｅｕｒｏｓｐｏｒａ ｃｒｏｓｓａ）が含まれる。

【０１８４】

望ましくない宿主細胞グリコシル化遺伝子、例えばＯＣＨ１の同定及び破壊のために本明細書に記載された技術は、他の酵母系及び菌系などの他の真核宿主細胞における望ましくない宿主細胞グリコシル化遺伝子及び／又他の相同の若しくは機能的に関連した遺伝子に適用可能であると理解される（ＷＯ０２／００８７９参照）。さらに、他の好ましい宿主細胞は、Ｄｏｌ－Ｐ－Ｍａｎ：$Man_5GlcNAc_2$－ＰＰ－Ｄｏｌマンノシルトランスフェラーゼ活性についてコード化するＡｌｇ３ｐにおいて欠乏している。

【０１８５】

好ましい宿主細胞は、酵母宿主及び糸状菌宿主であり、これらはβ１，４－ガラクトース結合、フコース及び末端シアル酸を本質的に欠失している。哺乳類糖タンパク質のＮ－グリカンとは異なり、これらの糖は酵母及び糸状菌において産生される糖タンパク質に関して通常見つかっていない。本発明は、糖タンパク質上にガラクトース残基を産生し、前記糖タンパク質上にフコース残基およびシアル酸残基を本質的に欠失する宿主細胞を遺伝子工学的に改変するための方法を提供する。別の実施態様において、フコース又はシアル酸を産生する該宿主細胞は、フコシルトランスフェラーゼ活性又はシアリルトランスフェラーゼ活性を低下させるか又は排除するよう修飾できる。本発明の宿主から産生される糖タンパク質組成物はそれゆえ、フコース残基及びシアル酸残基を本質的に欠失している。本発明の有意な利点は、前記宿主細胞がフコシダーゼ及びシアリダーゼ処理による生体外修飾をせずにガラクトシル化した、フコースのない、及びシアル酸のない糖タンパク質を産生することである。

【０１８６】

他の好ましい宿主細胞には、グリカンに関してマンノシルリン酸化を欠失する菌宿主が含まれる（ＵＳＳＮ１１／０２０，８０８）。さらに他の好ましい宿主細胞には、グリカンに関してβ－マンノシル化を欠失する菌宿主が含まれる（ＵＳＳＮ６０／５６６，７３６）。

【０１８７】

したがって、本発明の別の態様は、ヒト細胞によって作られるものと類似した修飾されたＮ－グリカンを含む糖タンパク質を発現するヒト以外の真核宿主系に関する。酵母細胞及び菌細胞以外の種において本発明の方法を実施することはしたがって、本発明により意図され包含される。本発明のコンビナトリアル核酸ライブラリがいずれかの真核宿主細胞系におけるグリコシル化経路を修飾する構築物を選択するために使用し得る。例えば、本発明のコンビナトリアルライブラリは、宿主細胞分泌経路に沿って望ましい位置においてグリコシル化酵素又はその触媒作用ドメインを含むタンパク質を局在化させるために、植

物、藻類及び昆虫において、並びに哺乳類細胞及びヒト細胞を含む他の真核宿主細胞においても使用し得る。好ましくは、グリコシル化酵素又は触媒作用ドメイン及びその類似体は、これらが機能でき、好ましくはこれらが最も効率よく機能するようデザインされ又は選択される宿主細胞分泌経路に沿って、細胞内の位置へと向かわされる。

【０１８８】

本発明のこの実施態様にしたがった方法を使用して影響を及ぼしうるグリコシル化への修飾の例は、（１）$Man_8GlcNAc_2$からマンノース残基を切断して$Man_5GlcNAc_2$ Ｎ－グリカンを生じるよう真核宿主細胞を遺伝子工学的に改変すること、（２）Ｎ－アセチルグルコサミン（ＧｌｃＮＡｃ）残基をＧｌｃＮＡｃトランスフェラーゼＩの作用により$Man_5GlcNAc_2$へ付加するよう真核宿主細胞を遺伝子工学的に改変すること、（３）Ｎ－アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ（ＧｎＴＩ、ＧｎＴＩＩ、ＧｎＴＩＩＩ、ＧｎＴＩＶ、ＧｎＴＶ、ＧｎＴＶＩ、ＧｎＴＩＸ）、マンノシダーゼＩＩ、フコシルトランスフェラーゼ（ＦＴ）、ガラクトシルトランスフェラーゼ（ＧａｌＴ）又はシアリルトランスフェラーゼ（ＳＴ）などの酵素を機能的に発現するよう真核宿主細胞を遺伝子工学的に改変すること、である。

【０１８９】

前記方法を繰り返すことによって、ますます複雑なグリコシル化経路が下等真核微生物などの標的宿主へと遺伝子工学的に改変できる。ある好ましい実施態様において、前記宿主生物体は、グリコシル化活性をコード化する配列を含むＤＮＡライブラリと２回以上形質変換される。望ましい表現型の選択は、形質転換の各ラウンド後、又はそれに替わるものとして何回もの形質転換が生じた後に実施され得る。複雑なグリコシル化経路はこの方法で迅速に遺伝子工学的に改変できる。

【０１９０】

指向性糖タンパク質

本明細書に記載の方法は、糖タンパク質、特にヒトにおいて治療上使用される糖タンパク質を産生するのに有用である。特異的糖形態を有する糖タンパク質は、例えば、治療用タンパク質の指向性において特に有用であり得る。例えば、マンノース－６－リン酸は、リソソームへタンパク質を指向することが示されており、マンノース－６－リン酸は、少しだけ述べれば、ゴーシェ病、ハンター病、ハーラー病、シャイエ病、ファブリー病及びテイ・サックス病などのリソソーム貯蔵疾患に関連したいくつもの酵素の適切な機能に不可欠であり得る。同様に、グリカン側鎖への１つ以上のシアル酸残基の付加は、投与後の生体内治療用糖タンパク質の寿命を延長させ得る。したがって、宿主細胞（例、下等真核細胞又は哺乳類細胞）は、前記細胞において発現される糖タンパク質中の末端シアル酸の程度を増大するよう遺伝子工学的に改変され得る。あるいは、シアル酸は、シアル酸トランスフェラーゼ及び適切な基質を使用する投与の前に、インビトロで対象のタンパク質に結合させてもよい。生育培地組成物の変化が、ヒトの形態をより密接に模倣する糖タンパク質を産生するために、ヒト様グリコシル化に関与する酵素活性の発現に加えて、採用されてもよい（Ｓ．Ｗｅｉｋｅｒｔほか、Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，１９９９，１７，１１１６－１１２１；Ｗｅｒｎｅｒ，Ｎｏｅほか １９９８ Ａｒｚｎｅｉｍｉｔｔｅｌｆｏｒｓｃｈｕｎｇ ４８（８）：８７０－８８０；Ｗｅｉｋｅｒｔ，Ｐａｐａｃほか、１９９９；Ａｎｄｅｒｓｅｎ及びＧｏｏｃｈｅｅ １９９４ Ｃｕｒ．Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．５：５４６－５４９；Ｙａｎｇ及びＢｕｔｌｅｒ ２０００ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．Ｂｉｏｅｎｇｉｎ．６８（４）：３７０－３８０）。モノクローナル抗体に特異的なグリカンの修飾（例、二分するＧｌｃＮＡｃの付加）は、抗体依存性細胞の細胞毒性を改善することが示されており（Ｕｍａｎａ Ｐ．ほか、１９９９）、このことは抗体又は他の治療用タンパク質の産生のために望ましいことであり得る。

【０１９１】

治療用タンパク質は、典型的には注入、経口的、肺経由、又は他の手段によって投与される。本発明にしたがって産生し得る適切な標的糖タンパク質の例には、以下に制限を加

えるものではないが、エリスロポエチン、インターフェロン－ａ、インターフェロン－ｂ、インターフェロン－ｇ、インターフェロン－ｗ、及び顆粒球－ＣＳＦ、ＧＭ－ＣＳＦなどのサイトカイン、第ＶＩＩＩ因子、第ＩＸ因子、及びヒトタンパク質Ｃ、抗トロンビンＩＩＩ、トロンビンなどの凝固因子、可溶性ＩｇＥ受容体ａ鎖、ＩｇＧ、ＩｇＧ断片、ＩｇＧ融合体、ＩｇＭ、インターロイキン、ウロキナーゼ、キマーゼ、及び尿素トリプシン阻害剤、ＩＧＦ結合タンパク質、上皮成長因子、成長ホルモン放出因子、アネキシンＶ融合タンパク質、アンジオスタチン、血管内皮増殖因子－２、骨髄系前駆体阻害因子－１、オステオプロテジェリン、ａ－１－抗トリプシン、ａ－胎児タンパク質、ＤＮａｓｅＩＩ、ヒトプラスミノーゲンのクリングル３、グルコセレブロシダーゼ、ＴＮＦ結合タンパク質１、卵胞刺激ホルモン、細胞傷害性Ｔリンパ球関連抗原４－Ｉｇ、膜貫通活性化因子及びカルシウム調節因子及びサイクロフィリンリガンド、可溶性ＴＮＦ受容体Ｆｃ融合体、グルカゴン様タンパク質１、ＩＬ－２受容体アゴニストが含まれる。

【０１９２】

分泌シグナル配列

分泌シグナルをコード化する核酸配列を、糖タンパク質をコード化する対象の配列と結合させることがまた好ましい。「分泌シグナル配列」という語は、より大きなポリペプチドの構成成分として、合成された細胞の分泌経路を通じてより大きなポリペプチドを向わせるポリペプチド（「分泌ペプチド」）をコード化するＤＮＡ配列を示す。前記より大きなポリペプチドは、分泌経路を通じての移行の間、前記分泌ペプチドを除去するよう共通して開裂される。宿主細胞の分泌経路へとポリペプチドを向わせるため、（リーダー配列、プレプロ配列又はプレ配列としても公知の）分泌シグナル配列が発現ベクターにおいて提供される。前記分泌シグナル配列は、制限を加えることなく、糖タンパク質に関連した野生型配列、Ｓ．セレビシエＳｕｃ２シグナル配列をコード化する配列、ピキアＰｈｏ２シグナル配列をコード化する配列、ピキアＰｒｃ１シグナル配列をコード化する配列、Ｓ．セレビシエα接合因子（αＭＦ）シグナル配列をコード化する配列、ウシリゾチームＣシグナル配列をコード化する配列の分泌シグナル配列であり得る。前記分泌シグナル配列は、核酸配列へ機能できるよう結合され、すなわち、前記２つの配列は正確な読み枠において接続され、新規に合成されるポリペプチドを宿主細胞の分泌経路へと向わせるよう置かれ得る。分泌シグナル配列は、興味の対象のポリペプチドをコード化するＤＮＡ配列に対して５’にどれも置かれるが、特定の分泌シグナル配列は、対象のＤＮＡ配列におけるほかのどこかに置かれてもよい（例、Ｗｅｌｃｈほか、米国特許第５，０３７，７４３号；Ｈｏｌｌａｎｄほか、米国特許第５，１４３，８３０号）。

【０１９３】

あるいは、本発明のポリペプチド中に含有される分泌シグナル配列は、分泌経路へと他のポリペプチドを向わせるのに使用される。本発明はこのような融合ポリペプチドについて提供する。本発明の融合ポリペプチドに含有される分泌シグナル配列は好ましくは、分泌経路へと更なるペプチドを向わせるために、更なるペプチドへアミノ末端で融合される。このような構築物は本分野で公知の数多くの適用を有する。例えば、これらの新規の分泌シグナル配列融合構築物は、受容体などの通常分泌されないタンパク質の活性部分の分泌を指示できる。このような融合物は、前記分泌経路を通じてペプチドを向わせるようインビボ又はインビトロで使用し得る。

【０１９４】

本発明の方法によって生産される糖タンパク質は、本分野で周知の技術によって単離できる。望ましい糖タンパク質は、分画、イオン交換、ゲルろ過、疎水性クロマトグラフィー及びアフィニティクロマトグラフィーなどの方法によって精製及び分離される。

【０１９５】

以下は、本発明の組成物及び方法を説明する例である。これらの例は制限を加えるものとして解釈されるべきではなく、前記例は、説明の目的のみのために含まれる。

【実施例１】

【０１９６】

プロモーターカセット及び発現ベクターの構築
ＰｐＯＣＨ１遺伝子についての８００塩基対プロモーターを、プライマーＲＣＤ４８（配列番号１５）（５’－ＴＡＴＧＣＧＧＣＣＧＣＧＧＣＴＧＡＴＧＡＴＡＴＴＴＧＣＴＡＣＧＡ－３’）及びプライマーＲＣＤ１３４（配列番号１６）（５’－ＣＣＴＣＴＣＧＡＧＴＧＧＡＣＡＣＡＧＧＡＧＡＣＴＣＡＧＡＡＡＣＡＧ－３’）を使用して増幅し、ＰｐＳＥＣ４遺伝子についての４００塩基対プロモーターを、プライマーＲＣＤ１５６（配列番号１７）（５’－ＣＴＴＣＴＣＧＡＧＧＡＡＧＴＡＡＡＧＴＴＧＧＣＧＡＡＡＣＴＴ－３’）及びプライマーＲＣＤ１５７（配列番号１８）（５’－ＣＴＴＡＧＣＧＧＣＣＧＣＧＡＴＴＧＴＴＣＧＴＴＴＧＡＧＴＡＧＴＴＴ－３’）を使用して増幅した。前記ＰＣＲ産物をｐＣＲ２．１クローニングベクター（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）へとクローニングし、配列決定した。次に、プラスミドｐＲＣＤ３６０及びプラスミドｐＲＣＤ３６２をそれぞれ作製するために導入されたＸｈｏＩ／ＮｏｔＩ制限部位を使用してＧＡＰＤＨプロモーターの替わりにベクターｐＪＮ２６１（Ｎｅｔｔほか、Ｙｅａｓｔ、２００３年１１月号；２０（１５）：　１２７９－１２９０）へとＯＣＨ１プロモーター及びＳＥＣ４プロモーターをサブクローニングした。

【０１９７】
ＰｐＨＩＳ３プロモーターを、プライマーＲＣＤ１５２（配列番号１９）（５’－ＣＴＴＣＴＣＧＡＧＧＧＣＡＴＴＣＡＡＡＧＡＡＧＣＣＴＴＧＧＧ－３’）及びプライマーＲＣＤ１５３（配列番号２０）（５’－ＣＴＴＡＧＣＧＧＣＣＧＣＴＧＡＧＴＧＧＴＣＡＴＧＴＧＧＧＡＡＣＴＴ－３’）を使用してＰＣＲ増幅し、プラスミドｐＣＲ２．１へとクローニングし、配列決定した。次に、ＰｐＰＭＡ１強力プロモーターをより弱いＰｐＨＩＳプロモーターと置換して、ＰｐＨＩＳ３プロモーターへと延びているＮＡＴ[R]プラスミドであるプラスミドｐＲＣＤ３５１を作製するため、前記ＰｐＨＩＳ３プロモーターをプラスミドｐＴＡ１８へとサブクローニングするようＸｈｏＩ／ＮｏｔＩ部位を使用した。

【０１９８】
前記ＰｐＨＩＳ３の一部を、プライマーＲＣＤ３０１（配列番号２１）（５’－ＣＣＴＧＧＡＴＣＣＡＡＣＡＧＡＣＴＡＣＡＡＴＧＡＣＡＧＧＡＧ－３’）及びプライマーＲＣＤ３０２（配列番号２２）（５’－ＣＣＴＧＣＡＴＧＣＣＴＣＧＡＧＣＴＴＧＣＣＧＧＣＧＴＣＴＡＡＡＴＡＧＣＣＧＴＴＧＡＡＧ－３’）を使用して増幅し、プラスミドｐＲＣＤ３９１を作製するため、ＢａｍＨＩ／ＳｐｈＩ制限部位を使用してｐＵＣ１９へと挿入した。このベクターは、プライマーＲＣＤ３０２（配列番号２２）へと遺伝子工学的に改変されるＸｈｏＩ部位及びＮｇｏＭＩＶ部位と同様、ＰｐＨＩＳ座の１．２Ｋｂ部分を含有する。ｐＲＣＤ３９２を作製するため、Ｇ４１８[R]遺伝子をＢｇｌＩＩ／ＳａｃＩ断片としてｐＵＧ６（Ｗａｃｈほか、１９９４）からｐＲＣＤ３９１のＢａｍＨＩ／ＳａｃＩ部位へと挿入した。

【０１９９】
ＰｐＴＲＰ１の１．２Ｋｂ部分を、プライマーＲＣＤ３０７（配列番号２３）（５’－ＣＣＴＧＴＣＧＡＣＧＣＴＧＣＣＧＧＣＡＡＧＣＴＣＧＡＧＴＴＴＡＡＧＣＧＧＴＧＣＴＧＣ－３’）及びプライマーＲＣＤ３０８（配列番号２４）（５’－ＣＣＴＧＧＡＴＣＣＴＴＴＧＧＣＡＡＡＡＡＣＣＡＧＣＣＣＴＧＧＴＧＡＧ－３’）を使用してＰ．パストリスゲノムＤＮＡから増幅した。プラスミドｐＲＣＤ３９９を作製するため、ＢａｍＨＩ／ＳａｌＩ部位を使用して、前記増幅した断片をｐＵＣ１９へと挿入した。フォスフィノスリシンに対する耐性を付与するＰＡＴ遺伝子を、ＢｇｌＩＩ／ＳａｃＩを使用してプラスミドｐＡＧ２９（Ｇｏｌｄｓｔｅｉｎ及びＭｃＣｕｓｋｅｒ、１９９９）から放出させ、プラスミドｐＲＣＤ４０１へ延びているＰｐＴＲＰ１／ＰＡＴを作製するため、ＢａｍＨＩ／ＳａｃＩで切断したｐＲＣＤ３９９へと挿入した。

【実施例２】
【０２００】
ガラクトース輸送体のクローニング
Ｓ．ポムベＵＤＰガラクトース輸送体

単一イントロンを除去するために、ＳｐＵＧＴと呼ばれるＵＤＰガラクトース輸送体をコード化するＳ．ポムベ遺伝子（ＳｐＧＭＳ１＋、Ｇｅｎｂａｎｋ　ＡＬ０２２５９８）を、Ｓ．ポムベゲノムＤＮＡ（ＡＴＣＣ２４８４３）から２つのピースへとＰＣＲ増幅した。前記遺伝子の５’の９６塩基対を増幅するために、プライマーＲＣＤ１６４（配列番号７）（５’－ＣＣＴＴＧＣＧＧＣＣＧＣＡＴＧＧＣＴＧＴＣＡＡＧＧＧＣＧＡＣＧＡＴＧＴＣＡＡＡ－３’）及びプライマーＲＣＤ１７７（配列番号８）（５’－ＡＴＴＣＧＡＧＡＡＴＡＧＴＴＡＡＧＴＧＴＣＡＡＡＡＴＣＡＡＴＧＣＡＣＴＡＴＴＴＴ－３’）を使用し、３’の９６６塩基対を増幅するために、プライマーＲＣＤ１７６（配列番号９）（５’－ＡＡＡＡＴＡＧＴＧＣＡＴＴＧＡＴＴＴＴＧＡＣＡＣＴＴＡＡＣＴＡＴＴＣＴＣＧＡＡＴ－３’）及びプライマーＲＣＤ１６５（配列番号１０）（５’－ＣＣＴＴＴＴＡＡＴＴＡＡＴＴＡＡＴＧＣＴＴＡＴＧＡＴＣＡＡＣＧＴＣＣＴＴＡＧＣ－３’）を使用した。その後、プライマーＲＣＤ１６４（配列番号７）及びプライマー１６５（配列番号１０）を使用して、これら２つの増幅した産物を重ね合わせ、１つの連続したオープン・リーディング・フレームを含み、末端に導入されたでＮｏｔＩ部位及びＰａｃＩ部位を有する単一のＰＣＲ断片とした。このＰＣＲ産物をｐＣＲ２．１ベクター（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）へとクローニングし、配列決定した。次に、ＮｏｔＩ部位及びＰａｃＩ部位を使用して、この遺伝子を、Ｐ．パストリスＧＡＰＤＨプロモーターの下流の遺伝子を融合しているカセットを含有するプラスミドｐＪＮ３３５へとサブクローニングした。次に、４００塩基対のＰｐＯＣＨ１転写終結因子を、プライマーＲＣＤ２０２（配列番号２５）（５’－ＴＣＣＴＴＡＡＴＴＡＡＡＧＡＡＡＧＣＴＡＧＡＧＴＡＡＡＡＴＡＧＡＴ－３’）及びプライマーＲＣＤ２０３（配列番号２６）（５’－ＴＣＣＣＴＣＧＡＧＧＡＴＣＡＴＧＴＴＧＡＴＣＡＡＣＴＧＡＧＡＣＣＧ－３’）を使用してＰＣＲ増幅し、ｐＣＲ２．１へとクローニングした。その後、プラスミドｐＲＣＤ２５７を作製するために、前記ＧＡＰＤＨプロモーター／ＳｐＵＧＴ遺伝子融合体をＸｈｏＩ／ＰａｃＩ断片として、及びＰｐＯＣＨ１－ＴＴをＰａｃＩ／ＸｈｏＩ断片としてプラスミドｐＴＡ１８における単一ＸｈｏＩ部位へと挿入するよう、三重ライゲーションを実施した。前記新規のプラスミドｐＲＣＤ２５７はＮＡＴ^{R}であり、このＮＡＴ^{R}はＧＡＰＤＨ－ＳｐＧＡＬＥ－ＯＣＨ１ＴＴ融合体を、ＰｐＰＭＡＩプロモーターによって駆動されるＳｃＶＡＮ１膜貫通ドメインへ融合されたヒトＧｎＴＩＩ遺伝子の切断バージョンを含有する第二カセットに沿って含有するベクターを含有している。

【０２０１】

プラスミドｐＲＣＤ３８５及びプラスミドｐＲＣＤ３８７をそれぞれ作製するため、ＯＣＨ１プロモーターを有するｐＲＣＤ３６０の、及びＳＥＣ４プロモーターを有するｐＲＣＤ３６２のＮｏｔ／ＰａｃＩ部位へとＳｐＵＧＴ遺伝子も挿入した。Ｐ．パストリスＨＩＳ３／Ｇ４１８^{R}ロールイン型の発現プラスミドｐＲＣＤ３９３及び発現プラスミドｐＲＣＤ３９４をそれぞれ作製するため、ＸｈｏＩ／ＮｇｏＭＩＶを使用して、ｐＲＣＤ３８５由来のP_{OCH1}－ＳｐＵＧＴ－ＰｐＣＹＣ１ＴＴカセット及びｐＲＣＤ３８７由来のP_{SEC4}－ＳｐＵＧＴ－ＰｐＣＹＣ１ＴＴカセットを、ｐＲＣＤ３９２ＨＩＳ３／Ｇ４１８^{R}ロールインベクターへと挿入した。

【０２０２】

キイロショウジョウバエＵＤＰガラクトース輸送体

ＤｍＵＧＴと呼ばれるＵＤＰガラクトース輸送体をコード化するキイロショウジョウバエ遺伝子（Ｇｅｎｂａｎｋ　ＢＡＢ６２７４７）を、キイロショウジョウバエｃＤＮＡライブラリ（ＵＣ　Ｂｅｒｋｅｌｅｙショウジョウバエゲノムプロジェクト、卵巣１－ＺＡＰライブラリＧＭ）からＰＣＲ増幅し、ｐＣＲ２．１ＰＣＲクローニングベクターへとクローニングし、配列決定した。５’末端及び３’末端でそれぞれＮｏｔＩ部位及びＰａｃＩ部位を導入した前記遺伝子を増幅するため、プライマーＤｍＵＧＴ－５’（配列番号１１）（５’－ＧＧＣＴＣＧＡＧＣＧＧＣＣＧＣＣＡＣＣＡＴＧＡＡＴＡＧＣＡＴＡＣＡＣＡＴＧＡＡＣＧＣＣＡＡＴＡＣＧ－３’）及びプライマーＤｍＵＧＴ－３’（配列番号１２）（５’－ＣＣＣＴＣＧＡＧＴＴＡＡＴＴＡＡＣＴＡＧＡＣＧＣＧＣＧＧＣＡＧＣＡＧ

ＣＴＴＣＴＣＣＴＣＡＴＣＧ－３’）を使用した。次に、プラスミドｐＳＨ２６３を作製するため、ｐＲＣＤ３９３においてＮｏｔＩ／ＰａｃＩ部位でＰｐＯＣＨ１及びプロモーターの下流へ融合した前記遺伝子をサブクローニングするため、ＮｏｔＩ部位及びＰａｃＩ部位を使用した。

【０２０３】

ヒトＵＤＰガラクトース輸送体

ｈＵＧＴ１及びｈＵＧＴ２とそれぞれ呼ばれるＵＤＰガラクトース輸送体１をコード化するヒト遺伝子（Ｇｅｎｂａｎｋ　ＢＡＡ９５６１５番）及びＵＤＰガラクトース輸送体２をコード化するヒト遺伝子（Ｇｅｎｂａｎｋ　ＢＡＡ９５６１４番）をヒト前立腺ｃＤＮＡ（マラソンレディｄＤＮＡ、Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）から増幅した。前記ＵＧＴ１遺伝子を、プライマーｈＵＧＴ１－５’（配列番号２７）（５’－ＧＧＣＴＣＧＡＧＣＧＧＣＣＧＣＣＡＣＣＡＴＧＧＣＡＧＣＧＧＴＴＧＧＧＧＣＴＧＧＴＧＧＴＴＣ－３’）及びｈＵＧＴ１－３’（配列番号２８）（５’－ＣＣＣＴＣＧＡＧＴＴＡＡＴＴＡＡＴＣＡＣＴＴＣＡＣＣＡＧＣＡＣＴＧＡＣＴＴＴＧＧＣＡＧ－３’）を使用して増幅し、ｈＵＧＴ２遺伝子を、プライマーｈＵＧＴ２－５’（配列番号２９）（５’－ＧＧＣＴＣＧＡＧＣＧＧＣＣＧＣＣＡＣＣＡＴＧＧＣＡＧＣＧＧＴＴＧＧＧＧＣＴＧＧＴＧＧＴＴＣ）及びプライマーｈＵＧＴ２－３’（配列番号３０）（５’－ＣＣＣＴＣＧＡＧＴＴＡＡＴＴＡＡＣＴＡＧＧＡＡＣＣＣＴＴＣＡＣＣＴＴＧＧＴＧＡＧＣＡＡＣ－３’）を使用して増幅した。前記ＰＣＲ産物をｐＣＲ２．１ベクター（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）へとクローニングし、配列決定した。その後、プラスミドｐＳＨ２６４及びプラスミドｐＳＨ２６２をそれぞれ作製するため、ＮｏｔＩ／ＰａｃＩを使用するＰｐＯＣＨ１プロモーターの下流のｐＲＣＤ３９３へと前記ｈＵＧＴ１遺伝子及びｈＵＧＴ２遺伝子を挿入した。

【実施例３】

【０２０４】

ＵＤＰ－ガラクトース－４－エピメラーゼ遺伝子のクローニング

Ｓ．セレビシエＵＤＰ－ガラクトース４－エピメラーゼ

ＵＤＰ－ガラクトース４－エピメラーゼをコード化するＳ．セレビシエ遺伝子（ＳｃＧＡＬ１０）を、プライマーＲＣＤ２７０（配列番号３１）（５’－ＴＡＧＣＧＧＣＣＧＣＡＴＧＡＣＡＧＣＴＣＡＧＴＴＡＣＡＡＡＧＴＧＡＡＡＧ－３’）及びＲＣＤ２７１（配列番号３２）（５’－ＣＧＴＴＡＡＴＴＡＡＴＣＡＧＧＡＡＡＡＴＣＴＧＴＡＧＡＣＡＡＴＣＴＴＧＧ－３’）を使用してＳ．セレビシエゲノムＤＮＡからＰＣＲ増幅した。生じたＰＣＲ産物をｐＣＲ２．１へとクローニングし、配列決定した。

【０２０５】

次に、プラスイドｐＲＣＤ３９５及びプラスミドｐＲＣＤ３９６をそれぞれ作製するため、ＮｏｔＩ／ＰａｃＩ部位を使用して前記ＳｃＧＡＬ１０をプラスミドｐＲＣＤ３９３及びｐＲＣＤ３９４へとサブクローニングし、又、プラスミドｐＲＣＤ４０４及びプラスミドｐＲＣＤ４０５を作製するため、プラスミドｐＲＣＤ４０２及びプラスミドｐＲＣＤ４０３へとサブクローニングした。プラスミドｐＲＣＤ４０２及びプラスミドｐＲＣＤ４０３は、Ｐ．パストリスＯＣＨ１プロモーター及びＳＥＣ４プロモーターをそれぞれ含有し、並びにＰｐＣＹＣ１終結因子及び簡便な制限部位（この制限部位はエピメラーゼとこれらのプロモーターと融合させ、別のプラスミドへと一体にして移動させ得るカセットを作製するために使用された。）を含有する発現ベクターである。

【０２０６】

ヒトＵＤＰ－ガラクトース４－エピメラーゼ

ｈＧＡＬＥと呼ばれるＵＤＰ－ガラクトース４－エピメラーゼをコード化するヒト遺伝子（Ｔｈｏｄｅｎほか、（２００１）ＪＢＣ，２７６巻（１８）　１５１３１－１５１３６）を、それぞれＮｏｔＩ部位及びＰａｃＩ部位を有するプライマーＧＤ７（配列番号３３）及びプライマーＧＤ８（配列番号３４）を使用して、ヒト腎ｃＤＮＡ（マラソンレディｃＤＮＡ、Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）からＰＣＲ増幅した。次に、プラスミドｐＲＣＤ４２７

及びプラスミドｐＲＣＤ４２８をそれぞれ作製するため、ＮｏｔＩ／ＰＡｃＩ部位を使用してプラスミドｐＲＣＤ４０６及びプラスミドｐＲＣＤ４０７へとｈＧＡＬＥ遺伝子をサブクローニングした。

【０２０７】

Ｓ．ポムベＵＤＰ－ガラクトース４－エピメラーゼ

Ｓ．ポムベ（ＡＴＣＣ２４８４３）ゲノムＤＮＡ由来のＳｐＧＡＬＥ遺伝子を増幅するため、プライマーＧＡＬＥ２－Ｌ（配列番号３５）及びプライマーＧＡＬＥ２－Ｒ（配列番号３６）を使用した。前記増幅した産物をｐＣＲ２．１へとクローニングし、配列決定した。配列決定は、＋６６の位置でのイントロン（１７５塩基対）の存在を明らかにした。

【０２０８】

前記イントロンを除去するため、上流のプライマーＧＤ１（配列番号３７）（９４塩基対）をデザインした。これはイントロンの６６塩基上流にＮｏｔＩ部位を有し、前記イントロンの先の２０塩基が続く。ＧＤ２（配列番号３８）は下流のプライマーであり、ＰａｃＩ部位を有する。ｐＣＲ２．１サブクローンからＳｐＧＡＬＥ無イントロン遺伝子を増幅するため、プライマーＧＤ１（配列番号３７）及びプライマーＧＤ２（配列番号３８）を使用し、前記産物を再度ｐＣＲ２．１へとクローニングし、配列決定した。

【実施例４】

【０２０９】

ｂ－１，４－ガラクトシルトランスフェラーゼ遺伝子のクローニング

ヒトｂ－１，４－ガラクトシルトランスフェラーゼＩ

ヒトｂ－１，４－ガラクトシルトランスフェラーゼＩ遺伝子（ｈＧａｌＴＩ、Ｇｅｎｂａｎｋ　ＡＨ００３５７５）を、プライマーＲＣＤ１９２（配列番号１）（５’－ＧＣＣＧＣＧＡＣＣＴＧＡＧＣＣＧＣＣＴＧＣＣＣＣＡＡＣ－３’）及びプライマーＲＣＤ１８６（配列番号２）（５’－ＣＴＡＧＣＴＣＧＧＴＧＴＣＣＣＧＡＴＧＴＣＣＡ－３’）を使用してヒト腎ｃＤＮＡ（マラソンレディｃＤＮＡ、Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）からＰＣＲ増幅した。このＰＣＲ産物をｐＣＲ２．１ベクター（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）へとクローニングし、配列決定した。このクローンから、ＰＣＲ重複変異誘発を次の３つの目的のために実施した。すなわち、１）野生型タンパク質配列を維持しながらオープン・リーティング・フレーム内のＮｏｔＩ部位を除去するため、２）内在性膜貫通ドメインのすぐ下流のタンパク質を切断するため、及び３）モジュールクローニングのために５’末端及び３’末端にＡｓｃＩ部位及びＰａｃＩ部位を導入するため、である。これを実施するため、前記ＮｏｔＩ部位までの前記遺伝子の５’末端を、プライマーＲＣＤ１９８（配列番号３）（５’－ＣＴＴＡＧＧＣＧＣＧＣＣＧＧＣＣＧＣＧＡＣＣＴＧＡＧＣＣＧＣＣＴＧＣＣＣ－３’）及びプライマーＲＣＤ２０１（配列番号４）（５’－ＧＧＧＧＣＡＴＡＴＣＴＧＣＣＧＣＣＣＡＴＣ－３’）を使用して増幅し、前記３’末端を、プライマーＲＣＤ２００（配列番号５）（５’－ＧＡＴＧＧＧＣＧＧＣＡＧＡＴＡＴＧＣＣＣＣ－３’）及びプライマーＲＣＤ１９９（配列番号６）（５’－ＣＴＴＣＴＴＡＡＴＴＡＡＣＴＡＧＣＴＣＧＧＴＧＴＣＣＣＧＡＴＧＴＣＣＡＣ－３’）を使用して増幅した。前記ＮｏｔＩ部位を除去しながら、前記オープン・リーディング・フレームを野生型アミノ酸配列で再合成するために、前記産物をプライマー１９８及びプライマー１９９を用いて重ね合せた。前記新規の切断したｈＧａｌＴＩ　ＰＣＲ産物をｐＣＲ２．１ベクター（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）へとクローニングし、配列決定した。次に、ｐＲＣＤ２６０を作製するため、ＰｐＵＲＡ３／ＨＹＧ^{R} ロールインベクターであるプラスミドｐＲＣＤ２５９へと前記断片をサブクローニングするため、前記導入したＡｓｃＩ／ＰａｃＩ部位を使用した。プラスミドｐＸＢ２０－ｐＸＢ６７を作製するため、参照によって組み込まれるＷＯ０２／００８７９に記載の酵母指向性配列膜貫通ドメインのライブラリを、ｈＧａｌＴＩ遺伝子の上流にあるＮｏｔＩ／ＡｓｃＩ部位に連結した。

【０２１０】

ヒトｂ－１，４－ガラクトシルトランスフェラーゼＩＩ

ヒトｂ－１，４－ガラクトシルトランスフェラーゼＩＩ遺伝子（ｈＧａｌＴＩＩ、Ｇｅｎｂａｎｋ　ＡＦ０３８６６０）の切断した形態を、プライマーＲＣＤ２９２（配列番号３９）（５’－ＣＴＴＡＧＧＣＧＣＧＣＣＣＡＧＣＡＣＣＴＧＧＣＣＴＴＣＴＴＣＡＧＣ－３’）及びプライマーＲＣＤ２９３（配列番号４０）（５’－ＣＴＴＧＴＴＡＡＴＴＡＡＴＣＡＧＣＣＣＣＧＡＧＧＧＧＧＣＣＡＣＧＡＣＧＧ－３’）を使用してヒト腎ｃＤＮＡ（マラソンレディｃＤＮＡ、Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）からＰＣＲ増幅し、プラスミドｐＣＲ２．１へとクローニングし、配列決定した。プラスミドｐＲＣＤ３７８を作製するため、Ｎ末端膜貫通ドメインをコード化する遺伝子の一部を除去したこの切断したクローンを、ｈＧａｌＴＩの替わりにベクターｐＸＢ５３へと導入されたＡｓｃＩ／ＰａｃＩ部位を使用してサブクローニングした。切断したｈＧａｌＴＩＩと、Ｓ．セレビシエＭＮＮ２遺伝子の膜貫通ドメイン／リーダー配列をコード化する部分との遺伝子融合物を含有する、このプラスミドは、ＰｐＧＡＰＤＨプロモーターにより駆動される。

【０２１１】

ヒトｂ－１，４－ガラクトシルトランスフェラーゼＩＩＩ

ヒトｂ－１，４－ガラクトシルトランスフェラーゼＩＩＩ遺伝子（ｈＧａｌＴＩＩＩ、Ｇｅｎｂａｎｋ　ＡＦ０３８６６１）の切断した形態を、プライマーＲＣＤ２９４（配列番号４１）（５’－ＣＴＴＡＧＧＣＧＣＧＣＣＣＧＡＡＧＴＣＴＣＡＧＴＧＣＣＣＴＡＴＴＴＧＧＣ－３’）及びＲＣＤ２９５（配列番号４２）（５’－ＣＴＴＧＴＴＡＡＴＴＡＡＴＣＡＧＴＧＴＧＡＡＣＣＴＣＧＧＡＧＧＧＣＴＧＴ－３’）を使用してヒト腎ｃＤＮＡ（マラソンレディｃＤＮＡ、Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）からＰＣＲ増幅し、プラスミドｐＣＲ２．１へとクローニングし、配列決定した。プラスミドｐＲＣＤ３８１を作製するため、ｈＧａｌＴＩの替わりにベクターｐＸＢ５３へと導入されたＡｓｃＩ／ＰａｃＩ部位を使用して、Ｎ末端膜貫通ドメインをコード化する遺伝子の一部を除去したこの切断したクローンをサブクローニングした。このプラスミドはいまや、前記切断したｈＧａｌＴＩＩＩと、ＰｐＧＧＡＰＤＨプロモーターによって駆動されるＳ．セレビシエＭＮＮ２遺伝子の膜貫通ドメイン／リーダー配列をコード化する部分との遺伝子融合を含有する。

【実施例５】

【０２１２】

複雑なＮ－グリカンを産生するにおけるＳｐＵＧＴを有するｈＧａｌＴＩの発現

ヒトＧｎＴＩＩ遺伝子及びＳｐＧＭＳ１＋遺伝子（ＳｐＵＧＴ）を含有するｐＲＣＤ２５７プラスミドをＲＤＰ２７株に導入した。ＲＤＰ２７は、Ｐ．パストリスの変異株であり、ｏｃｈ１及びａｌｇ３の欠失を有していて、プラスミドｐＳＨ４９及びプラスミドｐＰＢ１０４で形質転換されたものである。プラスミドｐＳＨ４９及びプラスミドｐＰＢ１０４は、それぞれマウスマンノシダーゼＩＢとびヒトＧｎＴＩとの活性ある融合構築物を含有し、またプラスミドｐＰＢ１０３を含有する。プラスミドｐＰＢ１０３は、Ｋ．ラクティスＵＰＤ－ＧｌｃＮＡｃトランスポーターを含有し及びリポータータンパク質Ｋ３（Ｃｈｏｉほか、２００３）を含有するプラスミドｐＢＫ６４を含有する。ナーセオスリシン（ｎｏｕｒｓｅｏｔｈｒｉｃｉｎ）上での選択後、１６個の形質転換体を選抜し、発現されたリポータータンパク質Ｋ１３のグリコシル化を測定した。これら形質転換株のうち２つにおいて、期待される複雑なヒトグリコシル化構造ＧｌｃＮＡｃ$_2$Ｍａｎ$_3$ＧｌｃＮＡｃ$_2$を観察し、これらの株をＲＤＰ３０－１０（図８Ａ）及びＲＤＰ３０－１３と命名した。ｈＧａｌＴＩ遺伝子／リーダー融合プラスミドライブラリの一部を、ＲＤＰ３０－１０株へと形質転換し、ハイグロマイシンを含有する最小培地上で形質転換株を選択した。生じた株によって分泌されたＫ３から放出されたＮ－グリカンをＭＡＬＤＩ－ＴＯＦＭＳで分析した。１個のガラクトース糖の追加に一致する質量における分子レベルのシフトを、２つの異なるリーダー構築物ｐＸＢ５３及びｐＸＢ６５の形質転換株由来のＮ－グリカンに関して観察した。第一のｐＸＢ５３は、ＳｃＭｎｎ２（ｓ）リーダーへ融合させた（本明細書でＳｃＭｎｎ２（ｓ）／ｈＧａｌＴＩと呼ばれる）ｈＧａｌＴＩからなり、もう一方はＳｃＭｎｎ１（ｍ）リーダーとの融合体であった。ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦによる

、ＲＤＰ３７（ｐＸＢ５３で形質転換したＲＤＰ３０－１０）からのＫ３から放出されたＮ－グリカンの分析は、約１０％ないし２０％の$GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$が$GalGlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$へ変換され、より少量（１％ないし２％）が$Gal_2GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$（ｐＸＢ５３，図８Ｂ）へ変換されることを示した。$GalGlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$への変換のより少量（３％ないし５％）が（しかし$Gal_2GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$はできなかった。）第二融合体（ｐＸＢ６５）で観察された。

【実施例６】

【０２１３】

ハイブリッドＮ－グリカンを産生する株におけるｈＧａｌＴＩ及びＳｃＧＡＬ１０の発現

ＮｏｔＩ／ＰａｃＩを用いて、ｈＧｎＴＩＩに替えて、NAT^RベクターｐＴＡ１８及びｐＲＣＤ３５１へ、ＵＤＰ－ガラクトース４－エピメラーゼをコード化するＳｃＧＡＬ１０遺伝子をサブクローニングした。これにより、強力なＰＭＡＩプロモーター及びより弱いＰｐＨＩＳ３プロモーターの前にエピメラーゼ遺伝子が挿入され、プラスミドｐＲＣＤ３３１（P_{PMAI}－ＳｃＧＡＬ１０）及びｐＲＣＤ３５２（P_{HIS3}－ＳｃＧＡＬ１０）がそれぞれ作製される。前記プラスミドを直鎖状にし（ＰｐＰＭＡ１プロモーターにおいてＳａｃＩを有するｐＲＣＤ３３１及びＰｐＨＩＳ３プロモーターにおいてＢｇｌＩＩを有するｐＲＣＤ３５２）、ＰＢＰ－３（米国特許出願第２００４００１８５９０号）へと形質転換した。ＰＢＰ－３株はＰ．パストリスの変異株である。この変異株は、Ｏｃｈ１の欠失を有しており、プラスミドｐＳＨ４９及びプラスミドｐＰＢ１０４で形質転換されている。プラスミドｐＳＨ４９及びプラスミドｐＰＢ１０４は、それぞれマウスマンノシダーゼＩＢとヒトＧｎＴＩとの活性融合構築物を含有し、またプラスミドｐＰＢ１０３を含有している。ｐＰＢ１０３は、Ｋ．ラクティスＵＤＰ－ＧｌｃＮＡｃトランスポーターを含有し、リポータータンパク質Ｋ３（Ｃｈｏｉほか）を含有するプラスミドｐＢＫ６４を含有している。この株は、分泌されたタンパク質上の構造$GlcNAcMan_5GlcNAc_2$のハイブリッドＮ－グリカンを産生する。ナーセオスリシンを含有するＹＰＤ培地上で選択された、得られた形質転換株を、プライマーＲＣＤ２８５（配列番号４３）（５’－ＴＡＣＧＡＧＡＴＴＣＣＣＡＡＡＴＡＴＧＡＴＴＣＣ－３’）及びプライマーＲＣＤ２８６（配列番号４４）（５’－ＡＴＡＧＴＧＴＣＴＣＣＡＴＡＴＧＧＣＴＴＧＴＴＣ－３’）を使用するＰＣＲによって、及び前記リポータータンパク質Ｋ３を発現させ、放出されたＮ－グリカンを分析して、前記株がハイブリッド$GlcNAcMan_5GlcNAc_2$グリカン構造を維持していることを確認することによって、分析した。ｐＲＣＤ３５２（P_{HIS3}－ＳｃＧＡＬ１０）構築物によって形質転換したある株をＲＤＰ３８－１８と命名した。この株をプラスミドｐＸＢ５３（Ｍｎｎ２（ｓ）ｈＧａｌＴＩ融合構築物並びにHYG^R遺伝子及びＰｐＵＲＡ３遺伝子を含有する。）により、ＳａｌＩ（ＰｐＵＲＡ３にある。）で直鎖状にした後、形質転換した。形質変換株を、ハイグロマイシンを有するＹＰＤ培地上で選択し、Ｋ３を発現させ、Ｎ－グリカンのサイズを決定することによってスクリーニングした。ＲＤＰ３９－６株（図１０Ａ）から精製され、Ｋ３から放出されたＮ－グリカンの大部分（～２／３）は、主として$GlcNAcMan_5GlcNAc_2$であるＲＤＰ３８－３８由来のものと比較して、１個の追加のヘキソース（$HexGlcNAcMan_5GlcNAc_2$）を含有していた。さらに、前記追加のヘキソース残基は、可溶性ｂ－１，４－ガラクトシダーゼとの（しかし、ａ－１，３－ガラクトシダーゼまたはａ－１，２－マンノシダーゼとではない。）その後のインキュベーションにより除去でき、このことは、特異的結合（ｂ－１，４）による、末端ＧｌｃＮＡｃへの単一ガラクトースの付加はこの株のｈＧａｌＴＩによって触媒されたことを示している。

【実施例７】

【０２１４】

複雑なＮ－グリカンを産生する系におけるｈＧａｌＴＩ及びＳｃＧＡＬ１０の発現

$GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$構造を有する複雑なＮ－グリカンを表示するＰ．パストリスＹＳＨ－４４株を構築した。ＹＳＨ－４４は、Ｐ．パストリスの変異株であり、ｏｃｈ１を欠失していて、プラスミドｐＳＨ４９、ｐＰＢ１０４、ｐＫＤ５３及びｐＴＣ５３で形質転換される。プラスミドｐＳＨ４９、ｐＰＢ１０４、ｐＫＤ５３及びｐＴＣ５３は、それぞれマウスマンノシダーゼＩＢ、ヒトＧｎＴＩ、キイロショウジョウバエマンノシダーゼＩＩ及びヒトＧｎＴＩＩの活性融合構築物を含有し、またｐＰＢ１０３を含有する。ｐＰＢ１０３は、Ｋ．ラクティス（ｌａｃｔｉｓ）ＵＤＰ－ＧｌｃＮＡｃトランスポーターを含有し、およびリポータータンパク質Ｋ３（Ｈａｍｉｌｔｏｎほか、Ｓｃｉｅｎｃｅ　２００３年８月２９日号；３０１（５６３７）：　１２４４－１２４６）を含有するプラスミドｐＢＫ６４を含有している。この株を、Ｍｎｎ２（ｓ）／ｈＧａｌＴＩ融合構築物を含有するｐＸＢ５３プラスミドで形質転換し、形質転換体を、ハイグロマイシンを有するＹＰＤ培地上で選択した。Ｋ３を精製し、ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳによって、放出されたＮ－グリカンを分析することによって、いくつかの形質転換株を分析した。分析した形質変換株のそれぞれは、$GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$構造を有するＮ－グリカンの主要部分及び単一ヘキソース追加と一致した少数部分（～５％）（ＹＳＨ－７１）を与えた。しかしながら、このピークは常にｈＧＡｌＴＩの導入と相関していたが、ｂ－１，４－ガラクトシダーゼに対して完全に不応性であった。次いで、これらの株のいくつかを、プラスミドｐＲＣＤ３９５及びプラスミドｐＲＣＤ３９６（P_{OCH_1}－ＳｃＧＡＬ１０及びP_{SEC4}－ＳｃＧＡＬ１０をそれぞれ含有するＰｐＨＩＳ３／Ｇ４１８^{R}プラスミド）で、ＢｇｌＩＩで直鎖状にした後、形質転換し、Ｇ４１８上で選択した、得られた株をそれぞれＹＳＨ－８３及びＹＳＨ－８４と命名した。分泌されたＫ３から放出されたＮ－グリカンをＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳにより分析した。得られた形質転換体を、Ｇ４１８を含有するＹＰＤ培地上で選択した。これらの株から分泌され精製されたＫ３から放出されたＮ－グリカンをＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳにより分析した。これらの形質転換体由来Ｎ－グリカンの大部分は、３つの構造、$Gal_2GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$（～０％ないし２５％）又は$GalGlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$（～４０％ないし５０％）からなり、残りのＮ－グリカンは、親ＹＳＨ－４４株により表示される$GlcNAcMan_3GlcNAc_2$構造を保持していた。Ｎ－グリカンの相対的な量は、前記ＳｃＧＡＬ１０エピメラーゼ遺伝子をＰｐＯＣＨ１プロモーター（ＹＳＨ－８３）又はＰｐＳＥＣ４プロモーター（ＹＳＨ－８４）によって駆動したかどうかとは無関係に変化しないままであった。図９Ｂは、ＹＳＨ－８４から放出されたＮ－グリカンのＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳを示す。

【実施例８】

【０２１５】

エピメラーゼ／トランスフェラーゼ融合構築物の構築

ＳｐＧＡＬＥ遺伝子を、プライマーＲＣＤ３２６（配列番号４５）（５’－ＣＴＴＧＧＣＧＣＧＣＣＡＴＧＡＣＴＧＧＴＧＴＴＣＡＴＧＡＡＧＧＧＡＣＴ）及びプライマーＲＣＤ３２９（配列番号４６）（５’－ＣＣＴＧＧＡＴＣＣＣＴＴＡＴＡＴＧＴＣＴＴＧＧＴＡＴＧＧＧＴＣＡＧ－３’）を使用して増幅し、ｐＣＲ２．１ベクター（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）へとクローニングし、配列決定した。最初の４３個のアミノ酸を除去するｈＧａｌＴＩ遺伝子の切断した部分（ｈＧａｌＴＩΔ４３）を、プライマーＲＣＤ３２８（配列番号４７）（５’－ＣＴＴＧＧＡＴＣＣＧＧＴＧＧＴＧＧＣＣＧＣＧＡＣＣＴＧＡＧＣＣＧＣＣＴＧＣＣＣ－３’）及びプライマーＲＣＤ１９９（配列番号４８）（５’－ＣＴＴＣＴＴＡＡＴＴＡＡＣＴＡＧＣＴＣＧＧＴＧＴＣＣＣＧＡＴＧＴＣＣＡＣ－３’）を使用して増幅し、ｐＣＲ２．１ベクター（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）へとクローニングし、配列決定した。次に、ＳｐＧＡＬＥクローンをＡｓｃＩ／ＢａｍＨＩで切断し、ｈＧａｌＴＩクローンをＢａｍＨＩ／ＰａｃＩで切断し、両者を、ＡｓｃＩ／ＰａｃＩで切断したｐＲＣＤ４５２へと挿入した。プラスミドｐＲＣＤ４５２は、Ｇ４１８耐性マーカー、及びＳｃＭＮＮ２（Ｓ）／ｈＧａｌＴＩ融合体を有するＧＡＰＤＨ／ＣＹＣ１カセットを含有している。ＡｓｃＩ／ＢａｍＨＩＳｐＧＡＬＥ断片及びＢａｍＨＩ／ＰａｃＩｈＧａｌＴＩ

Δ４３断片を、ＡｓｃＩ／ＰａｃＩにより放出されたｈＧａｌＴＩに置き換えて連結し、ｐＲＣＤ４６１を作製した。この新規プラスミドｐＲＣＤ４６１は、ＳｃＭＮＮ２（ｓ）／ＳｐＧＡＬＥ／ｈＧａｌＴＩ融合体を含有していて、ＳｐＧａｌＥタンパク質及びｈＧａｌＴＩタンパク質は、Ｂａｍ　ＨＩ部位を含有する４つのアミノ酸（ＧＳＧＧ）リンカーによって分離されていて、ＰｐＧＡＰＤＨプロモーターによって駆動される単一のポリペプチドにおいてコード化されている。

【実施例９】

【０２１６】

複雑なＮ－グリカンを産生する系におけるガラクトシルトランスフェラーゼ、エピメラーゼ及びトランスポーターの発現

活性のあるｈＧａｌＴＩ－５３遺伝子融合体を含有するプラスミドｐＸＢ５３、及びｈＧａｌＴＩＩ－５３融合体を含有するｐＲＣＤ３７８を、ＨＹＧ^{R}マーカー近くのＸｈｏＩで直鎖状にし、Ｔ４ＤＮＡポリメラーゼ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ，Ｂｅｖｅｒｌｙ，ＭＡ）で平滑末端化した。ｈＧａｌＴＩＩＩ－５３遺伝子融合体を含有するプラスミドｐＲＣＤ３８１をＵＲＡ３遺伝子近くのＨｉｎｄＩＩＩで直鎖状にし、Ｔ４ポリメラーゼで平滑末端化した。次に、３つのエピメラーゼ遺伝子ＳｃＧＡＬ１０、ＳｐＧＡＬＥ及びｈＧＡＬＥをプラスミドｐＲＣＤ４０４、ｐＲＣＤ４０６、及びｐＲＣＤ４２７からそれぞれＸｈｏＩ／ＳｐｈＩで切断し、Ｔ４ＤＮＡポリメラーゼで平滑末端化し、前記３つの直鎖状にしたトランスフェラーゼプラスミドへと挿入した。これにより９つの新規二重トランスフェラーゼ／エピメラーゼＨＹＧ^{R}プラスミドが生じた。すなわち、ｈＧａｌＴＩ－５３及びＳｃＧＡＬ１０を有するｐＲＣＤ４２４、ｈＧａｌＴＩ－５３及びＳｐＧＡＬＥを有するｐＲＣＤ４２５、ｈＧａｌＴＩ－５３及びｈＧＡＬＥを有するｐＲＣＤ４３８、ｈＧａｌＴＩＩ－５３及びＳｃＧＡＬ１０を有するｐＲＣＤ４３９、ｈＧａｌＴＩＩ－５３及びＳｐＧＡＬＥを有するｐＲＣＤ４４０、ｈＧａｌＴＩＩ５３及びｈＧＡＬＥを有するｐＲＣＤ４４１、ｈＧａｌＴＩＩＩ－５３及びＳｃＧＡＬ１０を有するｐＲＣＤ４４２、ｈＧａｌＴＩＩＩ－５３及びＳｐＧＡＬＥを有するｐＲＣＤ４４３並びにｈＧａｌＴＩＩＩ－５３及びｈＧＡＬＥを有するｐＲＣＤ４４７である。その後、ＹＳＨ４４系を、これらの（ＸｂａＩで直鎖状にした）二重ＨＹＧ^{R}プラスミド、及び（ＡｇｅＩで直鎖状にした）ＳｐＵＧＴ、ｈＵＧＴ２、ＤｍＵＧＴ及びｈＵＧＴ１　ＵＤＰ－Ｇａｌトランスポーターコード化遺伝子をそれぞれ含有するＧ４１８^{R}プラスミドｐＲＣＤ３９３、ｐＳＨ２６２、ｐＳＨ２６３及びｐＳＨ２６４で順次形質転換した。このように、一連の株は、それぞれがトランスフェラーゼ、エピメラーゼ及びトランスポーターの異なる組み合わせを含有するよう作製された。第一に、異なるＵＤＰ－Ｇａｌトランスポーターを、ｈＧａｌＴＩ－５３及びＳｐＧＡＬＥを含有する株において比較した。ＤｍＵＧＴ遺伝子の導入は、２つの末端ガラクトース残基（$Gal_2GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$）を有する複雑なグリカンをすべて実質的に生じたのに対し、その他の３つのトランスポーターは、前記トランスフェラーゼ及びエピメラーゼのみで得られたものと実質的に同一の複雑なグリカンの特性を生じた（図１１Ａないし図１１Ｅ）。第二に、前記エピメラーゼ遺伝子を、ｐＲＣＤ４２４、ｐＲＣＤ４２５又はｐＲＣＤ４３８と共にｐＳＨ２６３を株に導入することによって、ｈＧａｌＴＩ－５３融合体及び活性のあるＤｍＵＧＴ遺伝子を有する株において比較した。前記３つのそれぞれのエピメラーゼ遺伝子とＧａｌ遺伝子との組み合わせは、分泌されたＫ３に関して$Gal_2GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$の複雑なＮ－グリカンを生じる上で等価であった。最後に、前記３つのヒトトランスフェラーゼ融合構築物ｈＧａｌＴＩ－５３、ｈＧａｌＴＩＩ－５３及びｈＧａｌＴＩＩＩ－５３を、ｐＳＨ２６３で形質転換した株へｐＲＣＤ４２５、ｐＲＣＤ４４０及びｐＲＣＤ４４３を導入することによって、ＤｍＵＧＴ及びＳｐＧＡＫＥを有する株において比較した。ここで、ｈＧａｌＴＩＩ－５３は、Ｇａｌを転移させる上でわずかに効率がよくなく、ｈＧａｌＴＩ０５３を有する株における複雑なＮ－グリカンの約１０％であり、単一のがラクトース（$GalGlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$）のみを有していた一方、他の観察可能な、ｈＧａｌＴＩＩ－５３を有する株における複雑なＮ－グ

リカンは二ガラクトシル化した$Gal_2GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$であった（図１２Ａないし図１２Ｂ）。さらに、ｈＧａｌＴＩＩＩ－５３は、前記複雑なＮ－グリカンの６０％ないし７０％が０個ないし１個のガラクトース残基（$GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$又は$GalGlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$）を含有するのに対し、３０％ないし４０％は$Gal_2GlcNAc_2Man3GlcNAc_2$であり、ｈＧａｌＴＩ－５３又はｈＧａｌＴＩＩ－５３のいずれかよりも有意に効率が劣っていた（図１２Ａないし図１２Ｃ）。

【実施例１０】

【０２１７】

単一プラスミド構築物を使用するガラクトシルトランスフェラーゼ、エピメラーゼ及びトランスポーターの発現

P_{OCH1}－ＤｍＵＧＴを含有するＧ４１８^{R}プラスミドであるｐＳＨ２６３を、ＳａｃＩで切断することによって直鎖状にした後、Ｔ４ＤＮＡポリメラーゼ（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ）で平滑末端化した。P_{SEC4}－ＳｐＧＡＬＥ遺伝子をプラスミドｐＲＣＤ４０５からＸｈｏＩ／ＳｐｈＩ切り出し、Ｔ４ＤＮＡポリメラーゼで平滑末端化した。次に、平滑末端化したＳｐＧＡＬＥをｐＳＨ２６３の平滑末端化したＳａｃＩ部位へと挿入し、二重トランスポーター／エピメラーゼＧ４１８^{R}プラスミドであるプラスミドｐＲＣＤ４４６を作製した。次に、ｐＲＣＤ４４６をＥｃｏＲＩで直鎖状にし、Ｔ４ＤＮＡポリメラーゼで平滑末端化した。P_{GAPDH}ＳｃＭＮＮ２（ｓ）／ｈＧａｌＴＩ融合コンストラクトをｐＸＢ５３からＢｇｌＩＩ／ＢａｍＨＩにより放出させ、Ｔ４ＤＮＡポリメラーゼで平滑末端化した。次に、平滑末端化したＳｃＭＮＮ２（ｓ）／ｈＧａｌＴＩをｐＲＣＤ４４６の平滑末端化したＥｃｏＲＩ部位へと挿入し、ＳｃＭＮＮ２（ｓ）／ｈＧａｌＴＩ、ＳｐＧＡＬＥ及びＤｍＵＧＴを含有する三重Ｇ４１８^{R}プラスミドであるプラスミドｐＲＣＤ４６５を作製した。ｐＲＣＤ４６５で形質転換したＰ．パストリスＹＳＨ－４４をＲＤＰ８０と命名した。Ｎ－グリカン特性は$Gal_2GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$［Ｃ］の質量に対応する１６６３ｍ／ｚで単一のピークを示した（図１４Ａ）。

【０２１８】

ｈＧａｌＴＩ－５３及びＳｐＧＡＬＥを含有するＨＹＧ^{R}プラスミドであるｐＲＣＤ４２５をＡｆｌＩＩＩで直鎖状にし、Ｔ４ＤＮＡポリメラーゼで平滑末端化した。ＤｍＵＧＴ遺伝子をｐＳＨ２６３からＮｏｔＩ／ＰａｃＩで切り出し、ＮｏｔＩ／ＰａｃＩで切断したプラスミドｐＲＣＤ４０５へ挿入し、ｐＲＣＤ４６８を作製した。ｐＲＣＤ４６８は、単一カセットとして放出されることができるP_{SEC4}－ＤｍＵＧＴ－ＣＹＣ１－ＴＴ融合体を含有する。ｐＲＣＤ４６８をＸｈｏＩ／ＳａｌＩで切断し、前記ＤｍＵＧＴカセットを放出させ、Ｔ４ＤＮＡポリメラーゼで平滑末端化した。前記平滑末端化したＤｍＵＧＴをｐＲＣＤ４２５の前記平滑末端化したＡｆｌＩＩ部位へと挿入し、ｈＧａｌＴＩ－５３、ＳｐＧＡＬＥ及びＤｍＵＧＴを有するＨＹＧ^{R}三重プラスミドであるプラスミドｐＲＣＤ４６６を作製した。

【０２１９】

ｈＧａｌＴＩ－５３及びｈＧＡＬＥを含有するＨＹＧ^{R}プラスミドであるｐＲＣＤ４３８をＡｆｌＩＩＩで直鎖状にし、Ｔ４ＤＮＡポリメラーゼで平滑末端化した。ｐＲＣＤ４６８をＸｈｏＩ／ＳａｌＩで切断し、ＤｍＵＧＴカセットを放出させ、Ｔ４ＤＮＡポリメラーゼで平滑末端化した。平滑末端化したＤｍＵＧＴをｐＲＣＤ４３８の平滑末端化したＡｆｌＩＩ部位へと挿入し、ｈＧａｌＴＩ－５３、ｈＧＡＬＥ及びＤｍＵＧＴを有するＨＹＧ^{R}三重プラスミドであるプラスミドｐＲＣＤ４６７を作製した。

【０２２０】

インビトロｂ－ガラクトシダーゼ切断

Ｐ．パストリスＲＤＰ８０株由来のＮ－グリカン（２μｇ）を、５０ｍＭ NH_4HCO_3（ｐＨ６．０）中の３ｍＵ β１，４ガラクトシダーゼ（ＱＡ ｂｉｏ，Ｓａｎ Ｍａｔｅｏ，ＣＡ）とともに３７℃で１６時間ないし２０時間インキュベートした。図１４

BにおけるN－グリカン分析は、N－グリカン$GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$の質量に対応する１４３０ｍ／ｚ［Ａ］での優勢なピークを示し、図１４Ａにおいてガラクトース転移を確認する。

【０２２１】

インビトロシアリルトランスフェラーゼ反応

ＲＤＰ８０株から精製したＫ３（２００μｇ）を、５０ｍＭ NH_4HCO_3（ｐＨ６．０）中の５０ｍｇＣＭＰ－シアル酸及び１５ｍＵラット組換え型α（２，６－）－（Ｎ）－シアリルトランスフェラーゼ（Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ）とともに、３７℃で１６時間ないし２０時間インキュベートした。次に、N－グリカンをＰＮＧａｓｅＦ切断によって放出させ、ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳで検出した。前記グリカンのスペクトルは、ＲＤＰ８０由来のもの（図１４Ａ）と比較したとき、シアリルトランスフェラーゼ処置後の質量における増加を示した（図１４Ｃ）。図１４Ｃに示されるスペクトルは、N－グリカン$NANA_2Gal_2GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$の質量に対応する２２２７ｍ／ｚ［Ｘ］での優勢なピークを示し、ＲＤＰ８０株によって産生されたN－グリカンがヒト型$Gal_2GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$であることを確認する。

【実施例１１】

【０２２２】

エピメラーゼ配列比較

エピメラーゼの配列比較を、ＣＬＵＳＴＡＬを使用して実施した。ＧｅｎＢａｎｋ、ＳｗｉｓｓＰｒｏｔ、ＢＬＯＣＫＳ及びＰｉｍａＩＩのデータベースにおける配列を問い合わせるため、配列リストのヌクレオチド配列及び／又はアミノ酸配列を使用した。すでに同定され注釈のついた配列を含有するこれらのデータベースを、ＢＬＡＳＴ（Ｂａｓｉｃ Ｌｏｃａｌ Ａｌｉｇｎｍｅｎｔ Ｓｅａｒｃｈ Ｔｏｏｌ）を使用して相同性の領域について検索した（例、Ａｌｔｓｃｈｕｌ，Ｓ．Ｆ．（１９９３）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｅｖｏｌ　３６：　２９０－３００及びＡｌｔｓｃｈｕｌほか（１９９０）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２１５：　４０３－４１０を参照してほしい。）。ＢＬＡＳＴは、配列類似性を決定するためにヌクレオチド配列及びアミノ酸配列の両者の配列比較を生じた。一次配列パターン及び二次構造間隙罰則を取り扱う場合、他のアルゴリズムを使用できた（例、Ｓｍｉｔｈ，Ｔほか（１９９２）Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ　５：　３５－５１を参照してほしい。）。

【実施例１２】

【０２２３】

材料

ＭＯＰＳ、カコジル酸ナトリウム、塩化マンガン、ＵＤＰ－ガラクトース及びＣＭＰ－Ｎ－アセチルノイラミン酸はＳｉｇｍａ社製であった。ＴＦＡはＡｌｄｒｉｃｈ社製であった。ウシ乳由来のβ１，４－ガラクトシルトランスフェラーゼはＣａｌｂｉｏｃｈｅｍ社製であった。タンパク質N－グリコシダーゼＦ、マンノシダーゼ、及びオリゴ糖はＧｌｙｋｏ社（Ｓａｎ　Ｒａｆａｅｌ，ＣＡ）製であった。ＤＥＡＥトヨパール樹脂はＴｏｓｏＨａａｓ社製であった。金属キレート「ＨｉｓＢｉｎｄ」樹脂はＮｏｖａｇｅｎ社（Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）製であった。タンパク質結合９６穴プレートはＭｉｌｌｉｐｏｒｅ社（Ｂｅｄｆｏｒｄ，ＭＡ）製であった。塩及び緩衝剤はＳｉｇｍａ社（Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）製であった。ＭＡＬＤＩマトリクスはＡｌｄｒｉｃｈ社（Ｍｉｌｗａｕｋｅｅ，ＷＩ）製であった。

【０２２４】

振盪フラスコ培養

単一コロニーを、興味の対象の系を含有するＹＰＤプレート（２週齢未満）から拾い上げ、５０ｍｌ「ファルコン」遠心チューブの中のＢＭＧＹ培地の１０ｍｌへと接種した。前記培養物を２４℃で飽和するまで生育させた（約４８時間）。種培養物を、ＢＭＧＹ培地の１５０ｍｌを含有する５００ｍｌの調節されたメスフラスコへと移し、２４℃で５±２のOD_{600}になるまで生育させた（約１８時間）。前記細胞の生育速度を、時間に対

するOD$_{600}$の自然対数のプロットの傾斜として決定した。前記細胞を、３０００ｇで１０分間遠心分離することによって前記生育培地（ＢＭＧＹ）から回収し、ＢＭＭＹで洗浄し、２５０ｍｌの調節したメスフラスコ中のＢＭＭＹの１５ｍｌ中に懸濁した。２４時間後、前記発現培地フラスコを遠心分離（３０００ｇで１０分間）することによって回収し、前記上清をＫ３産生について分析した。

【０２２５】

バイオリアクター培養

ＢＭＧＹ培地の１５０ｍｌの入った５００ｍｌの調節されたメスフラスコを種培養物（フラスコ培養参照）の１ｍｌで接種した。前記接種体を２４℃で４ないし６のOD$_{600}$になるよう生育させた（約１８時間）。次に、前記接種培養物由来の細胞を遠心分離し、発酵培地（培地１ｌあたり：$CaSO_4 \cdot 2H_2O$ ０．３０ｇ、K_2SO_4 ６．００ｇ、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ５．００ｇ、グリセロール４０．０ｇ、PTM_1塩２．０ｍｌ、ビオチン4×10^{-3}ｇ、H_3PO_4（８５％）３０ｍｌ、１ｌあたりのＰＴＭ１塩：$CuSO_4 \cdot H_2O$ ６．００、ＮａＩ ０．０８ｇ、$MnSO_4 \cdot 7H_2O$ ３．００ｇ、$NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ ０．２０ｇ、H_3BO_3 ０．０２ｇ、$CoCl_2 \cdot 6H_2O$ ０．５０ｇ、$ZnCl_2$ ２０．０ｇ、$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ６５．０ｇ、ビオチン０．２０ｇ、H_2SO_4（９８％）５．００ｍｌ）の５０ｍｌへと再懸濁した。

【０２２６】

発酵を３ｌのくぼんだ底（１．５ｌの初期負荷容積）のＡｐｐｌｉｋｏｎバイオリアクターで実施した。前記発酵槽を２４℃の温度において流加培養モードで稼動させ、３０％水酸化アンモニウムを使用してｐＨを４．５±０．１に調節した。溶解した酸素を１気圧の空気による飽和に対して４０％を上回るよう、撹拌速度（４５０ｒｐｍないし９００ｒｐｍ）及び純酸素供給を調整することによって維持した。気流速度を１ｖｖｍに維持した。ＤＯの増加によって示される、バッチ相における初期グリセロール（４０ｇ／ｌ）が枯渇するとき、PTM_1塩の１２ｍｌ／ｌを含有する５０％グリセロール溶液を、望ましいバイオマス濃度に到達するまで１２ｍｌ／ｌ／時の供給速度で供給した。飢餓相の３０分後、メタノール供給（１２ｍｌ／ｌPTM_1を有する１００％メタノール）を開始する。メタノール供給速度を使用して、発酵槽におけるメタノール濃度を０．２％ないし０．５％に調節する。メタノール濃度をオンラインで、前記発酵槽からの気体流出口にあるＴＧＳガスセンサー（Ｆｉｇａｒｏ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ社製ＴＧＳ８２２）を使用して測定する。発酵槽から８時間ごとに試料採取し、バイオマス（OD$_{600}$、細胞湿重量及び細胞計数）、残余炭素源レベル（Ａｍｉｎｅｘ８７Ｈを使用するＨＰＬＣによるグリセロール及びメタノール）、及び（ＳＤＳ－ＰＡＧＥ及びＢｉｏ－Ｒａｄタンパク質アッセイによる）細胞外タンパク質含有量について分析した。

【０２２７】

リポータータンパク質の発現、精製、及びＮ結合したグリカンの放出

アルコールオキシダーゼ１（ＡＯＸ１）プロモーターの調節下でのＫ３ドメインをモデルタンパク質として使用し、６×ヒスチジンタグを使用してすでに報告されているように精製した（Ｃｈｏｉほか、Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ ２００３年４月２９日号；１００（９）： ５０２２－５０２７）。グリカンを糖タンパク質から、すでに報告された方法の修正によって放出させ及び分離した（Ｐａｐａｃ及びＢｒｉｇｇｓ １９９８）。前記タンパク質を還元及びカルボキシメチル化した後、膜をブロッキングし、ウェルを水で３回洗浄した。前記タンパク質を、Ｎ－グリカナーゼ（Ｇｌｙｋｏ）の１ミリ単位を含有する１０ｍＭ NH_4HCO_3、ｐＨ８．３の３０ｍｌの添加によって脱グリコシルした。３７℃で１６時間後、グリカンを含有する溶液を遠心分離によって除去し、乾燥させるために蒸発させた。

【０２２８】

タンパク質精製

Ｂｅｃｋｍａｎ ＢｉｏＭｅｋ２０００試料取り扱いロボット（Ｂｅｃｋｍａｎ／Ｃｏｕｌｔｅｒ Ｒａｎｃｈ Ｃｕｃａｍｏｎｇａ，ＣＡ）で９６穴フォーマットを使用して

クリングル３を精製した。Ｃ末端６－ヒスチジンタグを使用してクリングル３を発現培地から精製した。ロボット精製は、ＮｏｖａｇｅｎのＨｉｓＢｉｎｄ樹脂についてのＮｏｖａｇｅｎによって提供されるプロトコールの応用である。簡潔に説明すれば、樹脂の１５０μｌ（μｌ）に設定された容積を９６穴細胞溶解液結合プレートのウェルへと注入し、水の３容積で洗浄し、５０ｍＭ　$NiSO_4$の５容積を負荷し、結合緩衝液（５ｍＭイミダゾール、０．５Ｍ　ＮａＣｌ、２０ｍＭトリス－ＨＣｌ、ｐＨ７．９）の３容積で洗浄する。タンパク質発現培地を３：２の培地：ＰＢＳ（６０ｍＭ　ＰＯ４、１６ｍＭ　ＫＣｌ、８２２ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．４）に希釈し、カラムへ負荷する。排水後、前記カラムを結合緩衝液の１０容積及び洗浄緩衝液（３０ｍＭイミダゾール、０．５Ｍ　ＮａＣｌ、２０ｍＭトリス－ＨＣｌ、ｐＨ７．９）の６容積で洗浄し、前記タンパク質を溶出緩衝液（１Ｍイミダゾール、０．５Ｍ　ＮａＣｌ、２０ｍＭトリス－ＨＣｌ、ｐＨ７．９）の６容積で溶出する。前記溶出した糖タンパク質を凍結乾燥により乾燥するまで蒸発させる。

【０２２９】

Ｎ結合したグリカンの放出

グリカンをすでに報告された方法（Ｐａｐａｃほか、Ａ．Ｊ．Ｓ．（１９９８）Ｇｌｙｃｏｂｉｏｌｏｇｙ　８、４４５－４５４）の修正によって糖タンパク質から放出させ及び分離する。９６穴ＭｕｌｔｉＳｃｒｅｅｎ　ＩＰ（Ｉｍｍｏｂｉｌｏｎ　Ｐ膜）プレート（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）のウェルをメタノールの１００μｌで湿らせ、水の３×１５０μｌ及びＲＣＭ緩衝液（８Ｍ尿素、３６０ｍＭトリス、３．２ｍＭ　ＥＤＴＡ、ｐＨ８．６）の５０μｌで洗浄し、各添加後にゆるく真空にしながら排水する。前記乾燥したタンパク質試料をＲＣＭ緩衝液の３０μｌに溶解し、ＲＣＭ緩衝液の１０μｌを含有するウェルへと移す。前記ウェルを排水し、ＲＣＭ緩衝液で２回洗浄する。前記タンパク質をＲＣＭ緩衝液中の０．１Ｍ　ＤＴＴの６０μｌの３７℃での１時間の添加によって還元する。前記ウェルを水の３００μｌで３回洗浄し、０．１Ｍヨード酢酸の６０μｌの暗所における室温での３０分間の添加によってカルボキシメチル化する。前記ウェルを水で再度３回洗浄し、膜を水中の１％ＰＶＰ３６０の１００μｌの室温での１時間の添加によってブロッキングする。前記ウェルを排水し、水の３００μｌで３回洗浄し、Ｎ－グリカナーゼ（Ｇｌｙｋｏ）の１ミリ単位を含有する１０ｍＭ　NH_4HCO_3、ｐＨ８．３の３０μｌの添加によって脱グリコシルした。３７℃で１６時間後、前記グリカンを含有する溶液を遠心分離により除去し、乾燥するまで蒸発させた。

【０２３０】

種々：タンパク質をＬａｅｍｍｌｉ（Ｌａｅｍｍｌｉ　１９７０）にしたがってＳＤＳ－ＰＡＧＥにより分離した。

【０２３１】

飛行時間型質量分析法のマトリクス支援レーザー脱離イオン化時間

前記グリカンの分子量を、抽出の遅延を使用するＶｏｙａｇｅｒ　ＤＥ　ＰＲＯ線形ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）質量分析法を使用して決定した。各ウェル由来の乾燥したグリカンを水の１５μｌに溶解し、０．５μｌをステンレス鋼試料プレート上に点状に置き、Ｓ－ＤＨＢマトリクス（ジヒドロキシ安息香酸の９ｍｇ／ｍｌ、水とアセトニトリル０．１％ＴＦＡの１：１中の５－メトキシサリチル酸の１ｍｇ／ｍｌ）の０．５μｌと混合し、乾燥させた。

【０２３２】

イオンを４ナノ秒のパルス時間でパルス化された窒素レーザー（３３７ｎｍ）による照射によって発生させた。機器を１２５ナノ秒の遅延及び２０ｋＶの加速電位での抽出遅延モードにおいて稼動させた。格子電位は９３．００％であり、誘導ワイヤ電位は０．１０％であり、内部圧力は5×10^{-7}トルであり、低質量ゲートは８７５Ｄａであった。スペクトルを１００ないし２００のレーザーパルスの合計から生じ、２ＧＨｚのデジタイザーで獲得した。外部分子量標準物質として$Man_5GlcNAc_2$オリゴ糖を使用した。スペクトルはすべて陽イオンモードにおいて前記機器で生じた。前記スペクトルの概算さ

れた質量の精度は０．５％であった。

【図面の簡単な説明】

【０２３３】

【図１Ａ】ｈＧａｌＴＩをコード化する組み込みベクターｐＸＢ５３のプラスミドマップの構築を示す。

【図１Ｂ】ｈＧａｌＴＩをコード化する組み込みベクターｐＸＢ５３のプラスミドマップの構築を示す。

【図２】図２は、Ｓ．ポムベＧａｌエピメラーゼ（ＳｐＧａｌＥ）及びｈＧａｌＴＩをコード化する組み込みベクターｐＲＣＤ４２５のプラスミドマップの構築を示す。

【図３Ａ】キイロショウジョウバエＵＤＰ－ガラクトーストランスポーター（ＤｍＵＧＴ）をコード化する組み込みベクターｐＳＨ２６３のプラスミドマップの構築を示す。

【図３Ｂ】キイロショウジョウバエＵＤＰ－ガラクトーストランスポーター（ＤｍＵＧＴ）をコード化する組み込みベクターｐＳＨ２６３のプラスミドマップの構築を示す。

【図４】図４は、ｈＧａｌＴＩ、ＳｐＧａｌＥ及びＤｍＵＧＴをコード化する組み込みベクターｐＲＣＤ４６５のプラスミドマップの構築を示す。

【図５】図５は、ＳｃＭｎｎ２／ＳｐＧａｌＥ／ｈＧａｌＴＩ融合タンパク質をコード化する組み込みベクターｐＲＣＤ４６１のプラスミドマップの構築を示す。

【図６Ａ】ＳｐＧａｌＥのアミノ酸配列を示す。

【図６Ｂ】ＳｐＧＡＬＥのコード化配列を示す。

【図７】図７は、Ｓ．ポムベ、ヒト、大腸菌及びＳ．セレビシエのエピメラーゼの配列比較を示す。

【図８Ａ】Ｎ－グリカン$GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$の質量に対応する１３４２ｍ／ｚ［Ａ］でのピークを示すＲＤＰ３０－１０（ｐＲＣＤ２５７で形質転換されたＲＤＰ２７）において産生されたＫ３から放出されたＮ－グリカンのＭＡＬＴＩ－ＴＯＦ－ＭＳ分析である。

【図８Ｂ】Ｎ－グリカン$GalGlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$の質量に対応する１５０５ｍ／ｚ［Ｂ］でのピーク及び$Gal_2GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$の質量に対応する１６６２ｍ／ｚ［Ｃ］でのピークを示すＲＤＰ３７（ｐＸＢ５３で形質転換されたＲＤＰ３０－１０）において産生されたＫ３から放出されたＮ－グリカンのＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳ分析である。

【図９Ａ】Ｎ－グリカン$GalGlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$の質量に対応する及び$GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$の質量に対応する１５０１ｍ／ｚ［Ｂ］でのピークを示すｐＸＢ５３で形質転換されたＹＳＨ－４４において産生されたＫ３から放出されたＮ－グリカンのＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳ分析である。

【図９Ｂ】Ｎ－グリカン$GalGlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$の質量に対応する１５０１ｍ／ｚ［Ｂ］でのピーク、$Gal_2GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$の質量に対応する１６６３ｍ／ｚ［Ｃ］でのピーク、及び$GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$の質量に対応する１３３９ｍ／ｚ［Ａ］でのピークを示すｐＸＢ５３及びｐＲＣＤ３９５で形質転換されたＹＳＨ－４４において産生されたＫ３から放出されたＮ－グリカンのＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳ分析である。

【図１０Ａ】Ｎ－グリカン$GalGlcNAcMan_5GlcNAc_2$の質量に対応する１６２２ｍ／ｚ［Ｋ］での優勢なピーク及び$GlcNAcMan_5GlcNAc_2$の質量に対応する１４６０ｍ／ｚ［Ｈ］でのピークを示すｐＲＣＤ３５２及びｐＸＢ５３で形質転換されたＲＤＰ３９－６（Ｐ．パストリスＰＢＰ－３（米国特許出願第２００４０１８５９０号））において産生されたＫ３から放出されたＮ－グリカンのＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳである。

【図１０Ｂ】Ｎ－グリカン$GlcNAcMan_5GlcNAc_2$の質量に対応する１４６１ｍ／ｚ［Ｈ］での優勢なピークを示すα１，２及びβ１，４－ガラクトシダーゼによる切断後のＲＤＰ３９－６において産生されたＫ３から放出されたＮ－グリカンのＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＡＳ分析である。

【図１１】図１１は、ＵＤＰ－ガラクトース輸送活性を比較する多様なＰ．パストリス株において産生されたＫ３から単離されたＮ－グリカンのＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳ分析である。パネルＡは、ＲＤＰ５２と呼ばれる、Ｍｎｎ２（ｓ）／ｈＧａｌＴＩ及びＳｐＧａｌＥをコード化するベクターｐＲＣＤ４２５で形質転換したＰ．パストリスＹＳＨ－４４のＮ－グリカン特性を示す。パネルＢは、ＲＤＰ６９と呼ばれる、ＳｐＵＧＴをコード化するベクターｐＲＣＤ４２５及びｐＲＣＤ３９３で形質転換したＰ．パストリスＹＳＨ－４４のＮ－グリカン特性を示す。パネルＣは、ＲＤＰ７０と呼ばれる、ｈＵＧＴ２をコード化するベクターｐＲＣＤ４２５及びｐＳＨ２６２で形質転換したＰ．パストリスＹＳＨ－４４のＮ－グリカン特性を示す。パネルＤは、ＲＤＰ７１と呼ばれる、ｈＵＧＴＩをコード化するベクターｐＲＣＤ４２５及びｐＳＨ２６４で形質転換したＰ．パストリスＹＳＨ－４４のＮ－グリカン特性を示す。パネルＥは、ＲＤＰ５７と呼ばれる、ＤｍＵＧＴをコード化するベクターｐＲＣＤ４２５及びｐＳＨ２６３で形質転換したＰ．パストリスＹＳＨ－４４のＮ－グリカン特性を示す。

【図１２】図１２は、β－１，４－ガラクトシルトランスフェラーゼ活性を比較する種々のＰ．パストリス株において産生されたＫ３から放出されたＮ－グリカンのＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳ分析である。パネルＡは、ＲＤＰ５７と呼ばれる、ＤｍＵＧＴをコード化するベクターｐＲＣＤ４２５及びｐＳＨ２６３で形質転換したＰ．パストリスＹＳＨ－４４のＮ－グリカン特性を示す。パネルＢは、ＲＤＰ７２と呼ばれる、Ｍｎｎ２（ｓ）／ｈＧａｌＴＩ及びＳｐＧａｌＥをコード化するベクターｐＲＣＤ４４０及びＤｍＵＧＴをコード化するｐＳＨ２６３で形質転換したＰ．パストリスＹＳＨ－４４のＮ－グリカン特性を示す。パネルＣは、ＲＤＰ７３と呼ばれる、Ｍｎｎ２（ｓ）／ｈＧａｌＴＩＩＩ及びＳｐＧａｌＥをコード化するベクターｐＲＣＤ４４３及びＤｍＵＧＴをコード化するｐＳＨ２６３で形質転換したＰ．パストリスＹＳＨ－４４のＮ－グリカン特性を示す。

【図１３】図１３は、エピメラーゼ活性を比較する種々のＰ．パストリス株において産生されたＫ３から放出されたＮ－グリカンのＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳ分析である。パネルＡは、ＲＤＰ６５と呼ばれる、Ｍｎｎ２（ｓ）／ｈＧａｌＴＩ及びＳｃＧａｌ１０をコード化するベクターｐＲＣＤ４２４及びＤｍＵＧＴをコード化するｐＳＨ２６３で形質転換したＰ．パストリスＹＳＨ－４４のＮ－グリカン特性を示す。パネルＢは、ＲＤＰ５７と呼ばれる、ＤｍＵＧＴをコード化するベクターｐＳＨ２６３、及びｐＲＣＤ４２５で連続して形質転換したＰ．パストリスＹＳＨ－４４のＮ－グリカン特性を示す。パネルＣは、ＲＤＰ６３と呼ばれる、ベクターｐＲＣＤ４２５で及び次にＤｍＵＧＴをコード化するベクターｐＳＨ２６３で連続して形質転換したＰ．パストリスＹＳＨ－４４のＮ－グリカン特性を示す。パネルＤは、ＲＤＰ６７と呼ばれる、Ｍｎｎ２（ｓ）／ｈＧａｌＴＩ及びｈＧａｌＥをコード化するベクターｐＸＢ５３及びｐＲＣＤ４３８、及びＤｍＵＧＴをコード化するｐＳＨ２６３で形質転換したＰ．パストリスＹＳＨ－４４のＮ－グリカン特性を示す。

【図１４】図１４Ａは、Ｎ－グリカン$Gal_2GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$の質量に対応する１６６３ｍ／ｚ［Ｃ］での優勢なピークを示すＲＤＰ８０（ｐＲＣＤ４６５で形質転換されたＰ．パストリスＹＳＨ－４４）において産生されたＫ３から放出されたＮ－グリカンのＭＡＬＴＩ－ＴＯＦ－ＭＳ分析である。図１４Ｂは、Ｎ－グリカン$GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$の質量に対応する１３４０ｍ／ｚ［Ａ］での優勢なピークを示すβ１，４－ガラクトシダーゼ切断後のＲＤＰ８０（ｐＲＣＤ４６５で形質転換されたＰ．パストリスＹＳＨ－４４）において産生されたＫ３から放出されたＮ－グリカンのＭＡＬＴＩ－ＴＯＦ－ＭＳ分析である。図１４Ｃは、Ｎ－グリカン$NANA_2Gal_2GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$の質量に対応する２２２７ｍ／ｚ［Ｘ］での優勢なピークを示す、ＲＤＰ８０において産生され、試験管内でＣＭＰ－ＮＡＮＡの存在下でのシアリルトランスフェラーゼとインキュベートされたＮ－グリカンのＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳ分析である。

【図１５Ａ】Ｐ．パストリスＹＳＨ－４４（コントロール）において産生されたＫ３から放出されたＮリカン$GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$［Ａ］を示すＭＡＬＤＩ－Ｔ

ＯＦ－ＭＳ分析である。

【図１５Ｂ】Ｎ－グリカン$Gal_2GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$の質量に対応する、１６７９ｍ／ｚ［Ｃ］で優勢なピークを示すＲＤＰ８６（ｐＲＣＤ４６１（Ｍｎｎ２（ｓ）／ＳｐＧａｌＥ／ｈＧａｌＴＩ融合体）で形質転換されたＰ．パストリスＹＳＨ－４４）において産生されたＫ３から放出されたＮ－グリカンのＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳ分析である。

【図１Ａ】

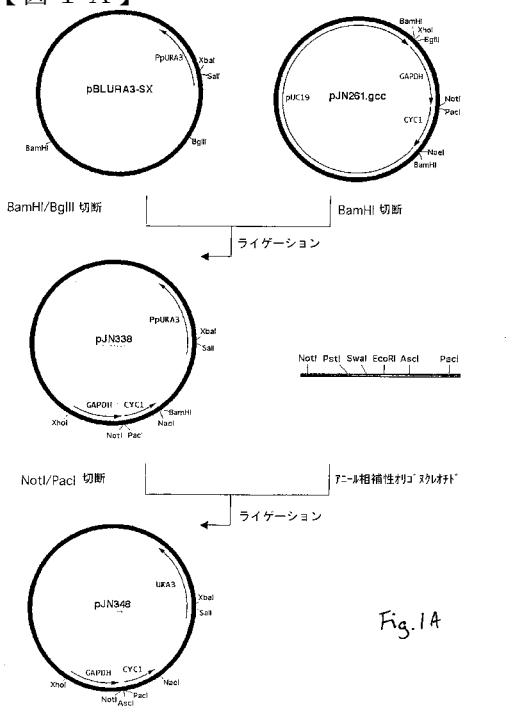


Fig.1A

【図１Ｂ】

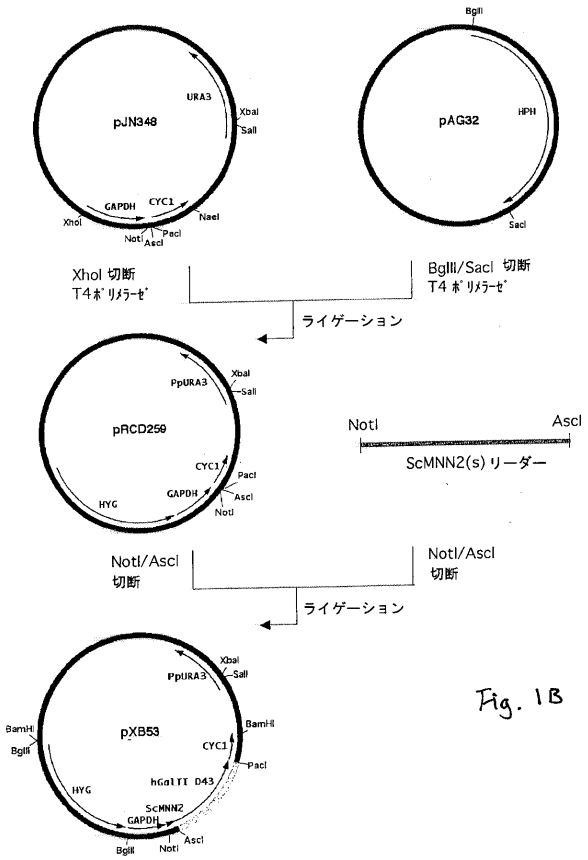


Fig. 1B

【図２】

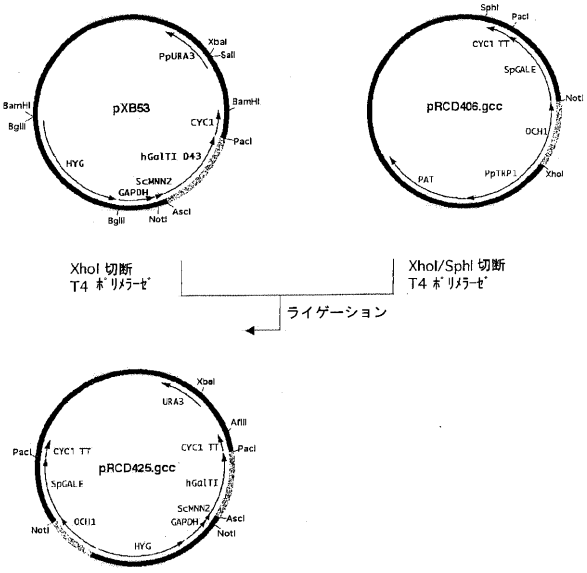


Fig. 2

【図３Ａ】

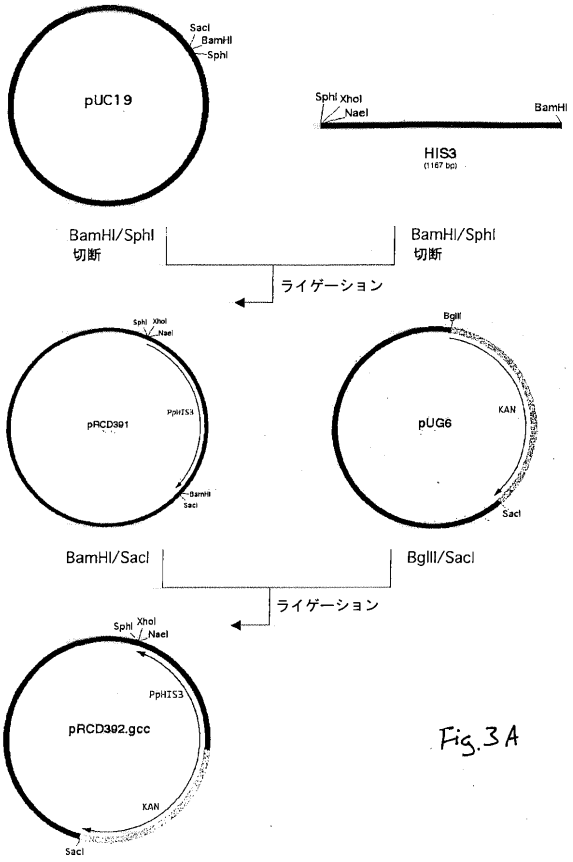


Fig. 3A

【図３Ｂ】

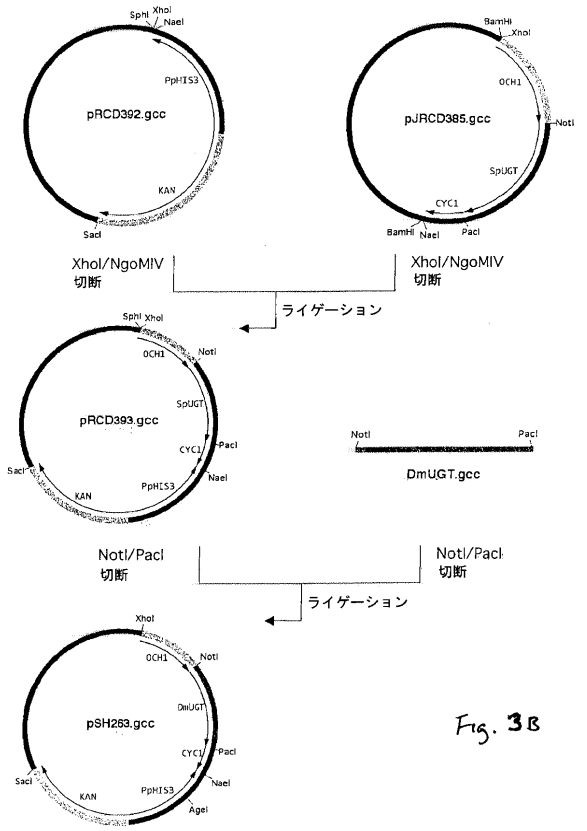


Fig. 3B

【図４】

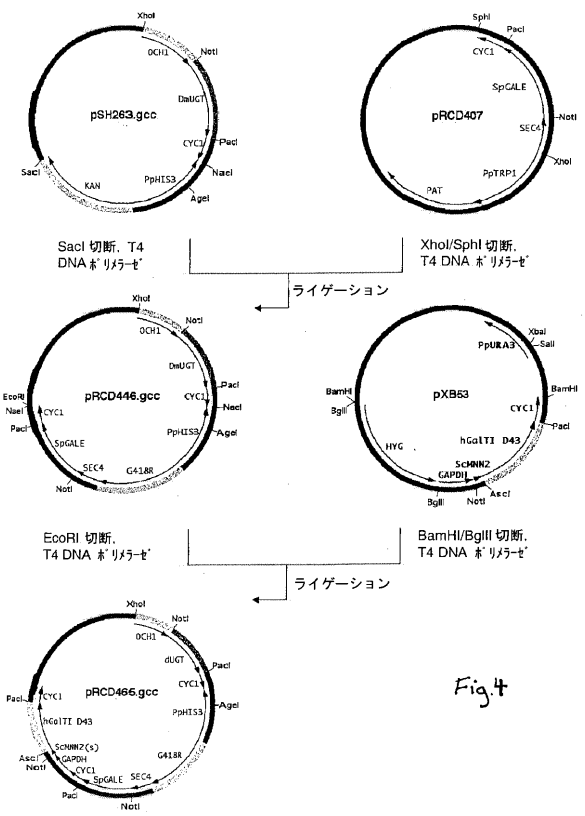


Fig. 4

【図５】

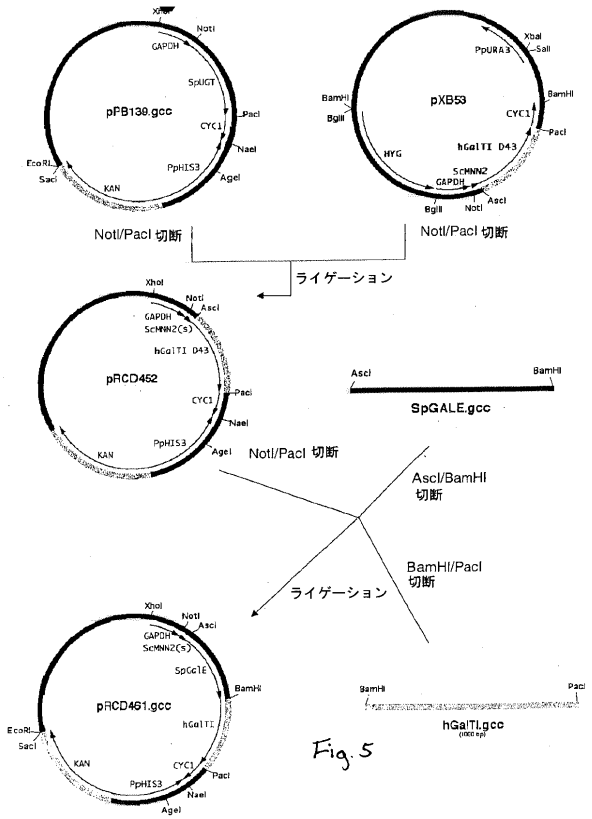


Fig. 5

【図６Ａ】

Figure 6A

SpGalE
アミノ酸配列

MTGVHEGTVLVTGGAGYIGSHTCVVLLEKGYDVVIVDNLCNSRVEAVHRIEK
LTGKKVIFHQVDLLDEPALDKVFANQNISAVIHFAGLKAVGESVQVPLSYYK
NNISGTINLIECMKKYNVRDFVFSSSATVYGDPTRPGGTIPIPESCPREGTS
PYGRTKLFIENIIEDETKVNKSLNAALLRYFNPGGAHPSGELGEDPLGIPNN
LLPYIAQVAVGRLDHLNVFGDDYPTSDGTPIRDYIHVCDLAEAHVAALDYLR
QHFVSCRPWNLGSGTGSTVFQVLNAFSKAVGRDLPYKVTPRRAGDVVNLTAN
PTRANEELKWKTSRSIYEICVDTWRWQQKYPYGFDLTHTKTYK

【図６Ｂ】

Figure 6B

SpGalE
1068bp 塩基対コード化配列

atgactggtgttcatgaagggactgtgttggttactggcggcgctggttatataggttctcatacgtgcgttgtttt
gttagaaaaaggatatgatgttgtaattgtcgataatttatgcaattctcgcgttgaagccgtgcaccgcattgaa
aaactcactgggaaaaaagtcatattccaccaggtggatttgcttgatgagccagctttggacaaggtcttcgc
aaatcaaaacatatctgctgtcattcattttgctggtctcaaagcagttggtgaatctgtacaggttcctttgagtta
ttacaaaaaataacatttccggtaccattaatttaatagagtgcatgaagaagtataatgtacgtgacttcgtctttc
ttcatctgctaccgtgtatggcgatcctactagacctggtggtaccattcctattccagagtcatgccctcgtgaa
ggtacaagcccatatggtcgcacaaagcttttcattgaaaatatcattgaggatgagacccaaggtgaacaaat
cgcttaatgcagctttattacgctattttaatcccggaggtgctcatccctctggtgaactcggtgaagatcctctt
ggcatccctaataacttgcttccttatatcgcgcaagttgctgtaggaagattggatcatttgaatgtatttggcg
acgattatcccacatctgacggtactccaattcgtgactacattcacgtatgcgatttggcagaggctcatgttg
ctgctctcgattacctgcgccaacattttgttagttgccgcccttggaatttgggatcaggaactggtagtactgt
ttttcaggtgctcaatgcgttttcgaaagctgttggaagagatcttccttataaggtcacccctagaagagcagg
ggacgttgttaacctaaccgccaaccccactcgcgctaacgaggagttaaaatggaaaaccagtcgtagcat
ttatgaaatttgcgttgacacttggagatggcaacagaagtatccctatggctttgacctgacccatacccaaga
catataagtaa

【図７】

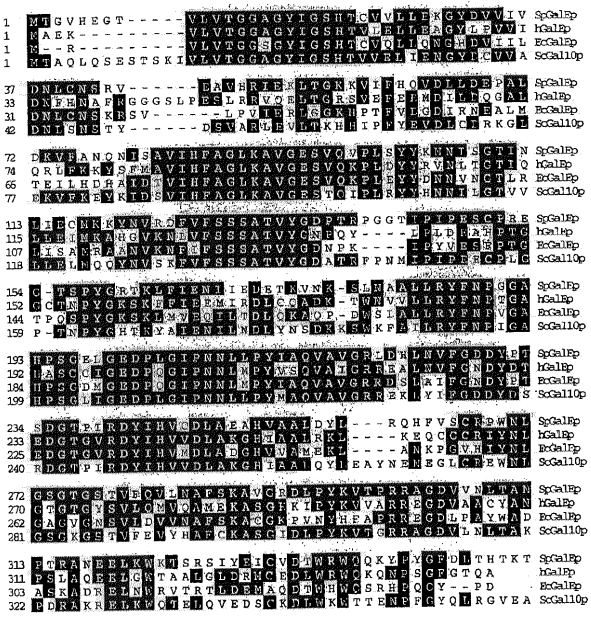


Fig. 7

【図８Ａ】

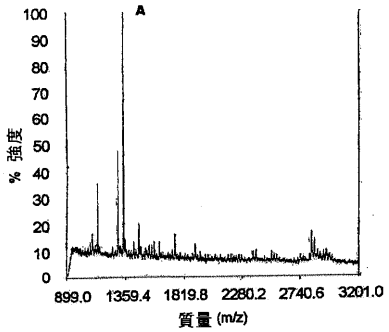


FIG. 8A

【図８Ｂ】

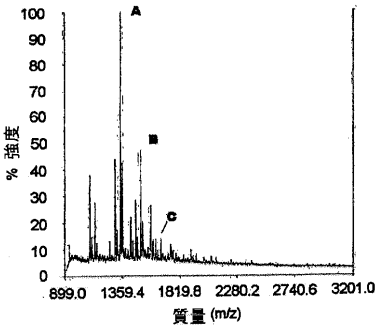


FIG. 8B

【図９Ａ】

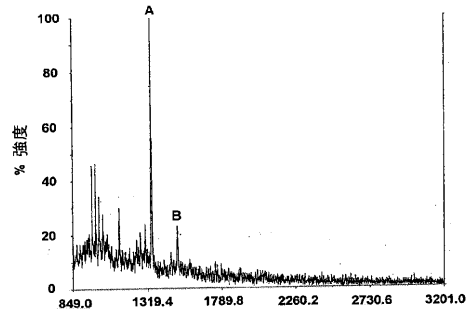


Fig. 9A

【図９Ｂ】

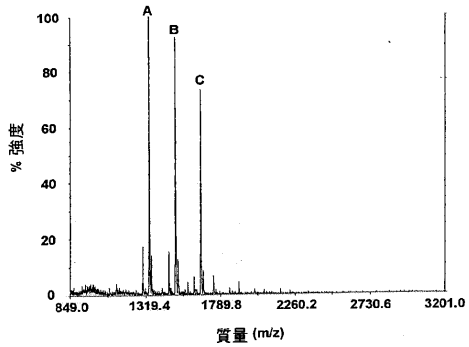


Fig. 9B

【図１０Ａ】

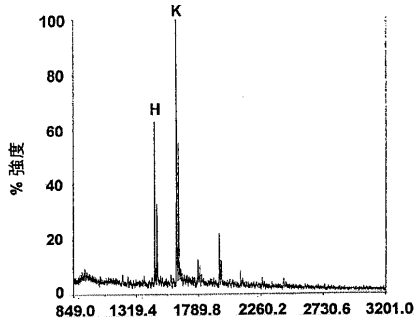


Fig. 10A

【図１０Ｂ】

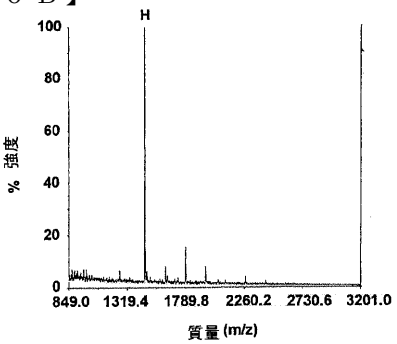


Fig. 10B

【図１１】

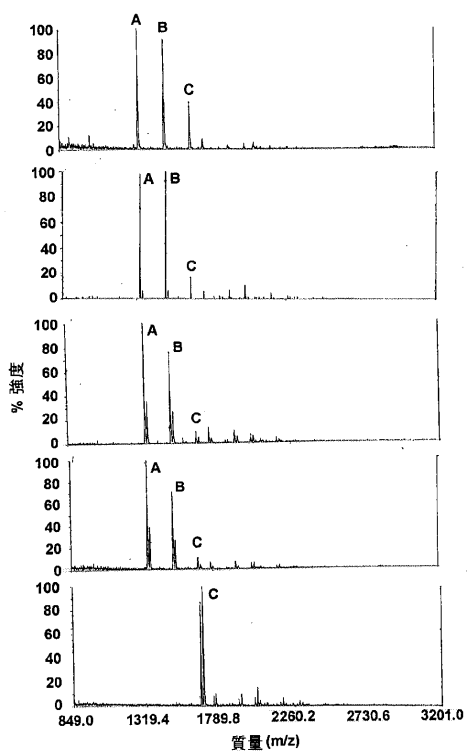


FIG. 11

【図１２】

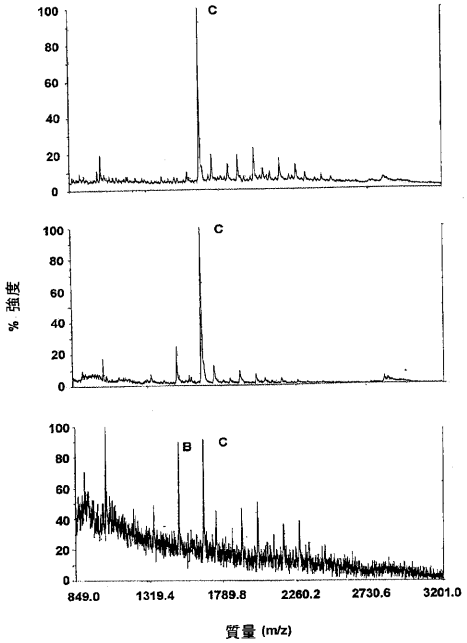
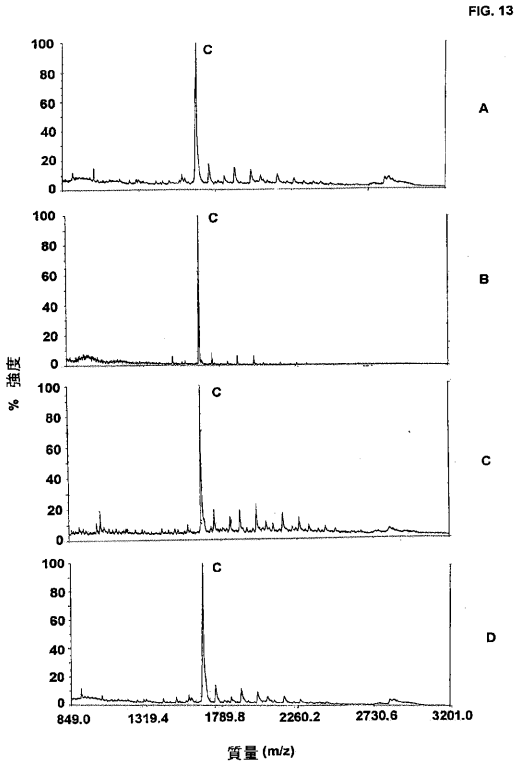
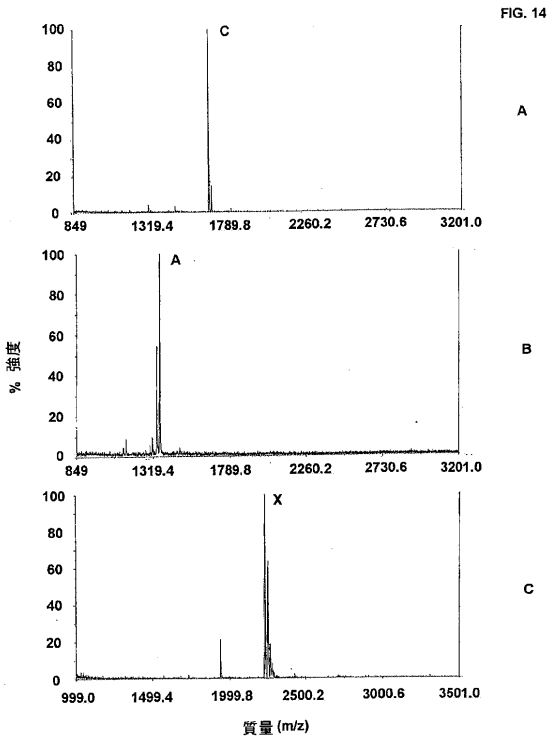


FIG. 12

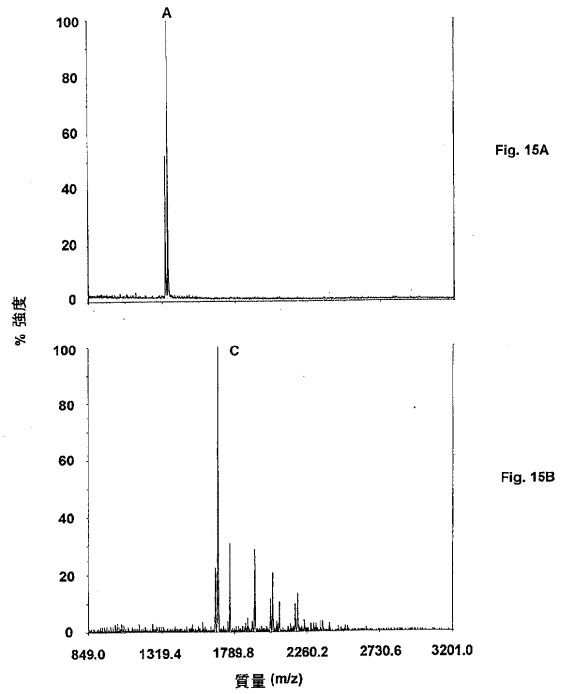
【図１３】



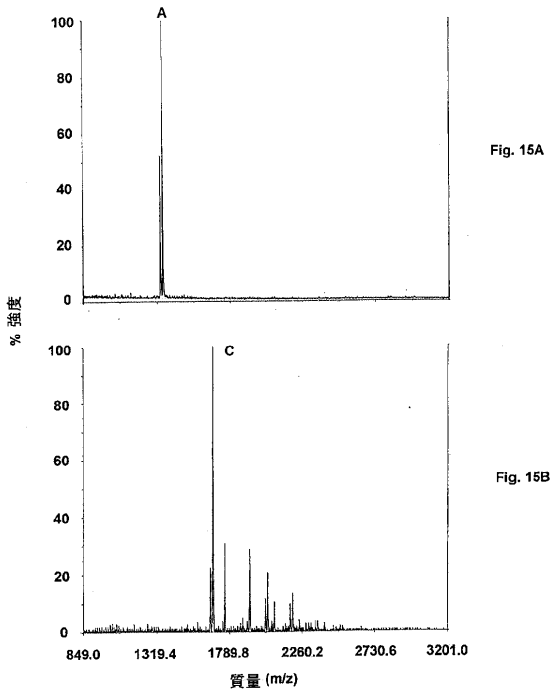
【図１４】



【図１５Ａ】



【図１５Ｂ】



【配列表】
2007535317000001.xml

【国際調査報告】

60700180036

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB05/51249

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC: C12N 1/19(2006.01);C12P 21/00(2006.01);C07K 16/00(2006.01)

USPC: 435/254.2,71.1;530/395
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)
U.S. : 435/254.2, 71.1; 530/395

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
STM: EMBASE BIOSIS CAPLUS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CHOI, BW. et al. Use of Combinational genetic libraries to humanize N-linked glycosylation in the yeast Pichia pastoris. PNAS. April 2003, Vol 100. No. 9, pages 5022-5027.	1-38

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* 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 published on or after the international filing date

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
24 July 2006 (24.07.2006)	18 OCT 2006
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 Celine X. Qian Ph.D. Telephone No. 571-273-8300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

27. 3. 2007

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ 38/00	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	37/02	
Ａ６１Ｋ 38/22	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	37/24	
Ａ６１Ｋ 38/21	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	37/66	
Ａ６１Ｋ 38/43	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	37/465	
Ａ６１Ｋ 38/48	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	37/547	
Ａ６１Ｋ 38/16	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	37/04	
Ａ６１Ｋ 38/45	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	37/52	
Ａ６１Ｋ 38/04	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	37/43	
Ａ６１Ｋ 38/46	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	37/54	
Ａ６１Ｋ 38/24	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	37/38	
Ａ６１Ｋ 38/26	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	37/28	
Ａ６１Ｐ 7/00	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	7/00	
Ａ６１Ｐ 7/02	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	7/02	
Ａ６１Ｐ 7/04	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	7/04	
Ａ６１Ｐ 1/00	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	1/00	
Ａ６１Ｐ 37/04	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	37/04	
Ａ６１Ｐ 5/10	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	5/10	
Ａ６１Ｐ 5/30	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	5/30	
Ａ６１Ｐ 35/00	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	35/00	
Ａ６１Ｐ 29/00	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	29/00	

(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,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,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NA,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100124855
弁理士 坪倉 道明
(72)発明者 ダビツドソン，ロバート
アメリカ合衆国、ニユーハンプシヤー・０３７４８、エンフイールド、ランデイング・ロード・３７、ナンバー・２
(72)発明者 ガーングロス，テイルマン
アメリカ合衆国、ニユーハンプシヤー・０３７５５、ハノーバー、パークウエイ・２
(72)発明者 ビルト，ステフアン
アメリカ合衆国、ニユーハンプシヤー・０３７６６、レバノン、パーカースト・ストリート・３２
(72)発明者 ツオイ，ビヨンークオン
アメリカ合衆国、バーモント・０５０５５、ノーリツチ、ヘイゼン・ストリート・２４
(72)発明者 ネツト，ユルゲン
アメリカ合衆国、ニユーハンプシヤー・０３７５３、グランサム、ピー・オー・ボツクス・８０８
(72)発明者 ボブローウイツ，ピヨートル
アメリカ合衆国、バーモント・０５００１、ホワイト・リバー・ジヤンクシヨン、ウツドヘブン・ドライブ・２９２・９・ビー
(72)発明者 ハミルトン，スティーブン
アメリカ合衆国、ニユーハンプシヤー・０３７４８、エンフイールド、アルゴンキン・ロード・９８

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 BA01 BA07 BA19 BA21 BA31 BA53 BA63 CA04 DA11
DA12 EA04 FA02 GA11 HA01
4B064 AG01 AG02 AG15 AG20 AG23 AG26 AG31 CC24 DA01
4B065 AA57X AA59X AA65X AA70X AA76X AA77X AA79X AA93Y AB01 BA01
CA24 CA25 CA27 CA44
4C084 AA01 AA02 AA07 BA01 BA08 BA22 BA23 BA34 CA18 CA25
DA01 DA12 DA19 DA21 DA22 DA23 DA39 DB14 DB26 DB35
DB52 DB53 DB56 DC01 DC02 DC05 DC10 DC15 DC16 DC50
NA14 ZA51 ZA53 ZA54 ZA66 ZB09 ZB11 ZB26 ZC04 ZC11
4H045 AA20 AA30 BA53 CA40 DA01 DA30 DA50 DA55 DA65 DA75
DA86 DA89 EA20 FA72 FA74