

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6650943号
(P6650943)

(45) 発行日 令和2年2月19日 (2020.2.19)

(24) 登録日 令和2年1月23日 (2020.1.23)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/12 (2006.01)

C 1 2 N 15/12 Z N A

C 1 2 N 15/56 (2006.01)

C 1 2 N 15/56

C 1 2 N 9/24 (2006.01)

C 1 2 N 9/24

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/19

請求項の数 30 (全 122 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-533453 (P2017-533453)
 (86) (22) 出願日 平成27年12月2日 (2015.12.2)
 (65) 公表番号 特表2018-500907 (P2018-500907A)
 (43) 公表日 平成30年1月18日 (2018.1.18)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2015/063329
 (87) 国際公開番号 W02016/105889
 (87) 国際公開日 平成28年6月30日 (2016.6.30)
 審査請求日 平成29年8月22日 (2017.8.22)
 (31) 優先権主張番号 62/095,313
 (32) 優先日 平成26年12月22日 (2014.12.22)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 62/216,452
 (32) 優先日 平成27年9月10日 (2015.9.10)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(73) 特許権者 502427921
 コデクシス、 インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
 63, レッドウッド シティ, ペノブ
 スコット ドライブ 200
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (72) 発明者 アガード, ニコラス ジェイ.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
 63, レッドウッド シティ, ペノブ
 スコット ドライブ 200

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒトα-ガラクトシダーゼバリエーション

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号 444、449、452、453、456、460、496、498、502、505、507、511、514、519、520、524、525、526、534、539、542、546、650、652～661、664～666、668、669、671～677、680、682、690、691、693、694、696～698、702、705、707、708、710、716、719、720、722、724、729、731 および 733 から選択されるポリペプチド配列を含む組換えαガラクトシダーゼA、ならびに／あるいは該組換えαガラクトシダーゼAの生物学的に活性な組換えαガラクトシダーゼAフラグメントであって、配列番号5と少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を含むアミノ酸配列を含む、生物学的に活性な組換えαガラクトシダーゼAフラグメント。

【請求項2】

ヒトαガラクトシダーゼAに由来する、請求項1に記載の組換えαガラクトシダーゼAおよび／または生物学的に活性な組換えαガラクトシダーゼAフラグメント。

【請求項3】

配列番号15、13、10、18、40、42、44、または46のポリペプチド配列を含む、組換えαガラクトシダーゼA。

【請求項 4】

配列番号 5 の α ガラクトシダーゼ A よりも熱安定性である、請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載の組換え α ガラクトシダーゼ A および／または生物学的に活性な組換え α ガラクトシダーゼ A フラグメント。

【請求項 5】

pH 7. 4 において、配列番号 5 の α ガラクトシダーゼ A よりも安定である、請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載の組換え α ガラクトシダーゼ A および／または生物学的に活性な組換え α ガラクトシダーゼ A フラグメント。

【請求項 6】

pH 4. 3 において、配列番号 5 の α ガラクトシダーゼ A よりも安定である、請求項 5 に記載の組換え α ガラクトシダーゼ A および／または生物学的に活性な組換え α ガラクトシダーゼ A フラグメント。

10

【請求項 7】

配列番号 5 の α ガラクトシダーゼ A よりも血清への曝露に対して安定である、請求項 5 に記載の組換え α ガラクトシダーゼ A および／または生物学的に活性な組換え α ガラクトシダーゼ A フラグメント。

【請求項 8】

脱免疫化 α ガラクトシダーゼ A および／または生物学的に活性な組換え α ガラクトシダーゼ A フラグメントである、請求項 1 ～ 7 のいずれかに記載の組換え α ガラクトシダーゼ A および／または生物学的に活性な組換え α ガラクトシダーゼ A フラグメント。

20

【請求項 9】

精製されている、請求項 1 ～ 8 のいずれかに記載の組換え α ガラクトシダーゼ A および／または生物学的に活性な組換え α ガラクトシダーゼ A フラグメント。

【請求項 10】

参照配列と比較して、i) 増強した触媒活性；i i) pH 7. 4 に対する増加した耐性；i i i) pH 4. 3 に対する増加した耐性；i v) 血清に対する増加した耐性；または v) 減少した免疫原性；または i)、i i)、i i i)、i v)、もしくは v) のいずれかの組み合わせから選択される少なくとも 1 つの改良された特性を示し、ここで、前記参照配列は配列番号 5 である、請求項 1 ～ 9 のいずれかに記載の組換え α ガラクトシダーゼ A。

30

【請求項 11】

請求項 1 ～ 10 のいずれかに記載の少なくとも 1 つの組換え α ガラクトシダーゼ A および／または生物学的に活性な組換え α ガラクトシダーゼ A フラグメントを含む、組成物。

【請求項 12】

請求項 1 ～ 10 のいずれかに記載の少なくとも 1 つの組換え α ガラクトシダーゼ A および／または生物学的に活性な組換え α ガラクトシダーゼ A フラグメントをコードする、組換えポリヌクレオチド。

【請求項 13】

コドン最適化されている、請求項 12 に記載の組換えポリヌクレオチド。

【請求項 14】

請求項 12 または 13 に記載の組換えポリヌクレオチドを含む、発現ベクター。

40

【請求項 15】

前記組換えポリヌクレオチドが調節配列を有するポリヌクレオチドに作動可能に連結されている、請求項 14 に記載の発現ベクター。

【請求項 16】

前記調節配列を有する前記ポリヌクレオチドがプロモーターである、請求項 15 に記載の発現ベクター。

【請求項 17】

前記プロモーターが異種プロモーターである、請求項 16 に記載の発現ベクター。

【請求項 18】

50

請求項 14～17 のいずれかに記載の発現ベクターを含む、宿主細胞。

【請求項 19】

真核生物である、請求項 18 に記載の宿主細胞。

【請求項 20】

α ガラクトシダーゼ A バリエントを生成する方法であって、組換えポリヌクレオチドによってコードされる前記 α ガラクトシダーゼ A が産生される条件下で、請求項 18 または 19 に記載の宿主細胞を培養する工程を含む、方法。

【請求項 21】

前記 α ガラクトシダーゼ A を回収する工程をさらに含む、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

前記 α ガラクトシダーゼ A を精製する工程をさらに含む、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

ファブリー病を処置するための医薬組成物であって、請求項 11 に記載の組成物を含む、医薬組成物。

【請求項 24】

薬学的に許容され得るキャリアおよび／または賦形剤をさらに含む、請求項 23 に記載の医薬組成物。

【請求項 25】

ヒトへの非経口注射または注入に適切である、請求項 23 または 24 に記載の医薬組成物。

【請求項 26】

被験体におけるファブリー病の症状を処置および／または予防するための請求項 23～25 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 27】

ファブリー病の前記症状を改善する、請求項 26 に記載の医薬組成物。

【請求項 28】

前記被験体が、ファブリー病の症状を示す被験体が必要とする食事よりも、その脂肪含有量の制限が少ない食事を摂ることができる、請求項 26 または 27 に記載の医薬組成物。

【請求項 29】

前記被験体が乳児または小児である、請求項 26～28 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 30】

前記被験体が成人または若年成人である、請求項 26～28 のいずれかに記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

この出願は、2014 年 12 月 22 日に提出された米国仮特許出願第 62/095313 号および 2015 年 9 月 10 日に提出された米国仮特許出願第 62/216452 号（これらの両方は、全ての目的のためにそれらの全体が参考として本明細書に援用される）への優先権を主張する。

【0002】

発明の分野

本発明は、操作されたヒト α-ガラクトシダーゼポリペプチドおよびその組成物を提供する。操作されたヒト α-ガラクトシダーゼポリペプチドは、酸性（pH<4.5）および塩基性（pH>7）の両方の条件下で、改良された安定性を提供するように最適化されている。本発明はまた、治療目的のための、操作されたヒト α-ガラクトシダーゼポリペプチドを含む組成物の使用に関する。

【0003】

10

20

30

40

50

配列表、表、またはコンピュータプログラムに関する言及

配列表の写しを、ファイル名「C X 7-1 4 7 W O 2 _ S T 2 5 . t x t」、作成日 2015 年 11 月 30 日、およびサイズ 2, 545, 851 バイトの A S C I I 形式のテキストファイルとして E F S - W e b から明細書と同時に提出している。E F S - W e b から提出した配列表は、本明細書の一部を構成し、その全体が本明細書中で参照によって組み込まれる。

【背景技術】

【0004】

発明の背景

ヒト α ガラクトシダーゼ（「G L A」；E C 3 . 2 . 1 . 2 2）は、糖脂質および糖タンパク質からの末端 α ガラクトシル部分の加水分解に関与するリソソーム糖タンパク質である。それは、一連のヒト組織内に存在する多くの基質に作用する。ファブリー病（びまん性体部被角血管腫、アンダーソン・ファブリー病、遺伝性異所性リポドーシス（*hereditary dystopic lipidosis*）、 α -ガラクトシダーゼ A 欠損症、G L A 欠損症およびセラミドトリヘキソシダーゼ欠損症とも称される）は、 α -ガラクトシダーゼ A の欠損または活性欠如に起因するスフィンゴ糖脂質異化の X 連鎖先天異常である。ファブリー病に罹患している患者は、血管、組織および器官の血漿および細胞リソソーム中に、グロボトリオシルセラミド（G b₃）および関連スフィンゴ糖脂質を蓄積する（例えば、Nance ら、*Arch. Neurol.*, 63: 453-457 [2006] を参照のこと）。患者が老化するにつれて、これらの脂質の蓄積により、血管は徐々に狭くなり、組織、特に皮膚、腎臓、心臓、脳および神経系における血流および栄養が減少する。したがって、ファブリー病は、腎不全、心疾患、脳血管疾患、小線維末梢神経障害および皮膚病変ならびに他の障害として症状発現する全身性障害である（例えば、Schiffmann, *Pharm. Ther.*, 122: 65-77 [2009] を参照のこと）。罹患患者は、手足の痛み、皮膚上の小さな暗赤色の斑点のクラスター、発汗能力の低下、角膜混濁、胃腸の問題、耳鳴りおよび難聴などの症状を示す。生命に関わる恐れのある合併症には、進行性腎損傷、心臓発作および脳卒中が含まれる。この疾患は、男性では推定で 40, 000 ~ 60, 000 人に 1 人が罹患しているが、女性でも起こる。実際、ファブリー病を有するヘテロ接合女性は、医療処置を必要とする重大な生命に関わる状態（神経系異常、慢性疼痛、疲労、高血圧、心臓病、腎不全および脳卒中を含む）を経験する（例えば、Want ら、*Genet. Med.*, 13: 457-484 [2011] を参照のこと）。ファブリー病の徴候は、乳児期以降の任意の時点で始まる可能性があり、徴候は通常、4 ~ 8 歳に現れ始めるが、一部の患者は、より軽度の遅発性疾患を示す。一般に、処置は支持的であり、ファブリー病の治療法はないので、安全で有効な処置が依然として必要である。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献 1】Nance ら、*Arch. Neurol.*, [2006] 63: 453 ~ 457

【非特許文献 2】Schiffmann, *Pharm. Ther.*, [2009] 122: 65 ~ 77

【非特許文献 3】Want ら、*Genet. Med.*, [2011] 13: 457 ~ 484

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明は、操作されたヒト α -ガラクトシダーゼポリペプチドおよびその組成物を提供する。操作されたヒト α -ガラクトシダーゼポリペプチドは、酸性（pH < 4.5）および塩基性（pH > 7）の両方の条件下で、改良された安定性を提供するように最適化され

10

20

30

40

50

ている。本発明はまた、治療目的のための、操作されたヒト α -ガラクトシダーゼポリペプチドを含む組成物の使用に関する。

本発明は、配列番号5と少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性を含むアミノ酸配列を含む組換え α -ガラクトシダーゼAおよび／または生物学的に活性な組換え α -ガラクトシダーゼAフラグメントを提供する。いくつかの実施形態では、 α -ガラクトシダーゼAは、表2. 1、2. 2、2. 4、および／または2. 5に提供した少なくとも1つの位置であって、配列番号5を参照してナンバリングされている位置において少なくとも1つの変異を含む。いくつかの実施形態では、 α -ガラクトシダーゼAは、表2. 3に提供した少なくとも1つの位置であって、配列番号10を参照してナンバリングされている位置において少なくとも1つの変異を含む。いくつかのさらなる実施形態では、組換え α -ガラクトシダーゼAは、ヒト α -ガラクトシダーゼAに由来する。いくつかのさらなる実施形態では、組換え α -ガラクトシダーゼAは、配列番号15、13、10、または18のポリペプチド配列を含む。またいくつかのさらなる実施形態では、組換え α -ガラクトシダーゼAは、配列番号5の α -ガラクトシダーゼAよりも熱安定性である。いくつかのさらなる実施形態では、組換え α -ガラクトシダーゼAは、pH7. 4において、配列番号5の α -ガラクトシダーゼAよりも安定であり、さらなる実施形態では、組換え α -ガラクトシダーゼAは、pH4. 3において、配列番号5の α -ガラクトシダーゼAよりも安定である。いくつかの実施形態では、組換え α -ガラクトシダーゼAは、pH7. 4およびpH4. 3において、配列番号5の α -ガラクトシダーゼAよりも安定である。またいくつかのさらなる実施形態では、組換え α -ガラクトシダーゼAは、脱免疫化 α -ガラクトシダーゼAである。いくつかの実施形態では、組換え α -ガラクトシダーゼAは、表7. 1に提供した脱免疫化 α -ガラクトシダーゼAである。またいくつかのさらなる実施形態では、組換え α -ガラクトシダーゼAは、精製されている。いくつかの実施形態では、組換え α -ガラクトシダーゼAは、参照配列と比較して、i) 触媒活性の増強；ii) pH7. 4に対する耐性の増加；iii) pH4. 3に対する耐性の増加；またはiv) 免疫原性の減少；またはi)、ii)、iii)、もしくはiv)のいずれかの組み合わせから選択される少なくとも1つの改良された特性を示す。いくつかの実施形態では、参照配列は配列番号5であり、いくつかの代替的な実施形態では、参照配列は配列番号10である。

【0007】

本発明はまた、本明細書中（例えば、表2. 1、2. 2、2. 3、2. 4、2. 5、および／または表7. 1）に提供した少なくとも1つの組換え α -ガラクトシダーゼAをコードする組換えポリヌクレオチド配列を提供する。いくつかの実施形態では、組換えポリヌクレオチド配列は、コドン最適化されている。

【0008】

本発明はまた、本明細書中（例えば、表2. 1、2. 2、2. 3、2. 4、2. 5、および／または表7. 1）に提供した少なくとも1つの組換え α -ガラクトシダーゼAをコードする組換えポリヌクレオチド配列を含む発現ベクターを提供する。いくつかの実施形態では、組換えポリヌクレオチド配列は、調節配列に作動可能に連結されている。いくつかのさらなる実施形態では、調節配列は、プロモーターである。いくつかのさらなる実施形態では、プロモーターは、異種プロモーターである。いくつかの実施形態では、発現ベクターは、本明細書中に提供したシグナル配列をさらに含む。

【0009】

本発明はまた、本明細書中に提供した少なくとも1つの発現ベクターを含む宿主細胞を提供する。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、本明細書中（例えば、表2. 1、2. 2、2. 3、2. 4、2. 5、および／または表7. 1）に提供した少なくとも1つの組換え α -ガラクトシダーゼAをコードする組換えポリヌクレオチド配列を含む発現ベクターを含む。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、真核生物である。

【0010】

本発明はまた、 α ガラクトシダーゼAバリエーションを生成する方法であって、組換えポリヌクレオチドによってコードされる α ガラクトシダーゼAが産生される条件下で、本明細書中に提供した宿主細胞を培養する工程を含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、該方法は、 α ガラクトシダーゼAを回収する工程をさらに含む。いくつかのさらなる実施形態では、該方法は、 α ガラクトシダーゼAを精製する工程をさらに含む。

【0011】

本発明はまた、本明細書中（例えば、表2. 1、2. 2、2. 3、2. 4、2. 5、および／または表7. 1）に提供した少なくとも1つの組換え α ガラクトシダーゼAを含む組成物を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、医薬組成物を提供する。いくつかのさらなる実施形態では、本発明は、ファブリー病を処置するための医薬組成物であって、本明細書中に提供した酵素組成物を含む医薬組成物を提供する。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、薬学的に許容され得るキャリアおよび／または賦形剤をさらに含む。いくつかのさらなる実施形態では、医薬組成物は、ヒトへの非経口注射または注入に適切である。

10

【0012】

本発明はまた、被験体におけるファブリー病の症状を処置および／または予防する方法であって、ファブリー病を有する被験体を提供する工程、および本明細書中（例えば、表2. 1、2. 2、2. 3、2. 4、2. 5、および／または表7. 1）に提供した少なくとも1つの組換え α ガラクトシダーゼAを含む少なくとも1つの医薬組成物組成物（*pharmaceutical composition compositions*）を提供する工程、および医薬組成物を被験体に投与する工程を含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、ファブリー病の症状は、被験体において改善される。いくつかのさらなる実施形態では、本発明の医薬組成物が投与された被験体は、ファブリー病の症状を示す被験体が必要とする食事よりも、その脂肪含有量の制限が少ない食事を摂ることができる。いくつかの実施形態では、被験体は乳児または小児であり、いくつかの代替的な実施形態では、被験体は成人または若年成人である。

20

【0013】

本発明はまた、本明細書中に提供した組成物の使用を提供する。

本発明の実施形態において、例えば以下の項目が提供される。

30

（項目1）

配列番号5と少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性を含むアミノ酸配列を含む、組換え α ガラクトシダーゼAおよび／または生物学的に活性な組換え α ガラクトシダーゼAフラグメント。

（項目2）

表2. 1、2. 2、2. 4、2. 5、2. 6、2. 7、2. 8、2. 9、および／または7. 1に提供した少なくとも1つの位置であって、配列番号5を参照してナンバリングされている位置において少なくとも1つの変異を含む、項目1に記載の組換え α ガラクトシダーゼA。

40

（項目3）

表2. 3に提供した少なくとも1つの位置であって、配列番号10を参照してナンバリングされている位置において少なくとも1つの変異を含む、項目2に記載の組換え α ガラクトシダーゼA。

（項目4）

ヒト α ガラクトシダーゼAに由来する、項目1～3のいずれかに記載の組換え α ガラクトシダーゼA。

（項目5）

50

配列番号 15、13、10、18、40、42、44、または 46 のポリペプチド配列を含む、組換え α ガラクトシダーゼ A。

(項目 6)

配列番号 5 の α ガラクトシダーゼ A よりも熱安定性である、項目 1～5 のいずれかに記載の組換え α ガラクトシダーゼ A。

(項目 7)

pH 7.4 において、配列番号 5 の α ガラクトシダーゼ A よりも安定である、項目 1～6 のいずれかに記載の組換え α ガラクトシダーゼ A。

(項目 8)

pH 4.3 において、配列番号 5 の α ガラクトシダーゼ A よりも安定である、項目 7 に記載の組換え α ガラクトシダーゼ A。

10

(項目 9)

配列番号 5 の α ガラクトシダーゼ A よりも血清への曝露に対して安定である、項目 7 に記載の組換え α ガラクトシダーゼ A。

(項目 10)

脱免疫化 α ガラクトシダーゼ A である、項目 1～9 のいずれかに記載の組換え α ガラクトシダーゼ A。

(項目 11)

表 7.1 に提供した脱免疫化 α ガラクトシダーゼ A である、項目 1～10 のいずれかに記載の組換え α ガラクトシダーゼ A。

20

(項目 12)

精製されている、項目 1～11 のいずれかに記載の組換え α ガラクトシダーゼ A。

(項目 13)

参照配列と比較して、i) 増強した触媒活性；i i) pH 7.4 に対する増加した耐性；i i i) pH 4.3 に対する増加した耐性；i v) 血清に対する増加した耐性；または v) 減少した免疫原性；または i)、i i)、i i i)、i v)、もしくは v) のいずれかの組み合わせから選択される少なくとも 1 つの改良された特性を示す、項目 1～12 のいずれかに記載の組換え α ガラクトシダーゼ A。

(項目 14)

前記参照配列が配列番号 5 または配列番号 10 である、項目 13 に記載の組換え α ガラクトシダーゼ A。

30

(項目 15)

項目 1～14 のいずれかに記載の少なくとも 1 つの組換え α ガラクトシダーゼ A を含む、組成物。

(項目 16)

項目 1～15 のいずれかに記載の少なくとも 1 つの組換え α ガラクトシダーゼ A をコードする、組換えポリヌクレオチド配列。

(項目 17)

コドン最適化されている、項目 16 に記載の組換えポリヌクレオチド配列。

(項目 18)

40

項目 16 および／または 17 に記載の組換えポリヌクレオチド配列を含む、発現ベクター。

(項目 19)

前記組換えポリヌクレオチド配列が調節配列に作動可能に連結されている、項目 18 に記載の発現ベクター。

(項目 20)

前記調節配列がプロモーターである、項目 19 に記載の発現ベクター。

(項目 21)

前記プロモーターが異種プロモーターである、項目 20 に記載の発現ベクター。

(項目 22)

50

項目 1 8 ～ 2 1 のいずれかに記載の発現ベクターを含む、宿主細胞。
 (項目 2 3)
 真核生物である、項目 2 2 に記載の宿主細胞。
 (項目 2 4)
 α ガラクトシダーゼ A バリエントを生成する方法であって、組換えポリヌクレオチドによってコードされる前記 α ガラクトシダーゼ A が産生される条件下で、項目 2 2 または 2 3 に記載の宿主細胞を培養する工程を含む、方法。
 (項目 2 5)
 前記 α ガラクトシダーゼ A を回収する工程をさらに含む、項目 2 4 に記載の方法。
 (項目 2 6)
 前記 α ガラクトシダーゼ A を精製する工程をさらに含む、項目 2 5 に記載の方法。
 (項目 2 7)
 ファブリー病を処置するための医薬組成物であって、項目 1 5 に記載の酵素組成物を含む、医薬組成物。
 (項目 2 8)
 薬学的に許容され得るキャリアおよび／または賦形剤をさらに含む、項目 2 7 に記載の医薬組成物。
 (項目 2 9)
 ヒトへの非経口注射または注入に適切である、項目 2 7 および／または 2 8 に記載の医薬組成物。
 (項目 3 0)
 被験体におけるファブリー病の症状を処置および／または予防するための方法であって、ファブリー病を有する被験体を提供する工程、および項目 2 7 ～ 3 9 のいずれかに記載の医薬組成物を前記被験体に提供する工程を含む、方法。
 (項目 3 1)
 ファブリー病の前記症状を改善する、項目 3 0 に記載の方法。
 (項目 3 2)
 前記被験体が、ファブリー病の症状を示す被験体が必要とする食事よりも、その脂肪含有量の制限が少ない食事を摂ることができる、項目 3 0 および／または 3 1 に記載の方法。
 (項目 3 3)
 前記被験体が乳児または小児である、項目 3 0 ～ 3 2 のいずれかに記載の方法。
 (項目 3 4)
 前記被験体が成人または若年成人である、項目 3 0 ～ 3 2 のいずれかに記載の方法。
 (項目 3 5)
 項目 1 5 および 2 7 ～ 2 9 のいずれかに記載の組成物の使用。
 【図面の簡単な説明】
 【0 0 1 4】
 【図 1】図 1 は、2 ～ 5 日間の培養後の *S. cerevisiae* における異なる GLA 構築物の相対活性を示すグラフを提供する。
 【0 0 1 5】
 【図 2】図 2 は、種々の pH におけるインキュベーション後の GLA バリエントの絶対（パネル A）および相対（パネル B）活性を示すグラフを提供する。
 【0 0 1 6】
 【図 3】図 3 は、種々の温度におけるインキュベーション後の GLA バリエントの絶対（パネル A）および相対（パネル B）活性を示すグラフを提供する。
 【0 0 1 7】
 【図 4-1】図 4 は、漸増量の血清を含有する緩衝液によるチャレンジ後の GLA バリエントの絶対（パネル A および B）および相対（パネル C および D）活性を示すグラフを提供する。

10

20

30

40

50

【図４－２】図４は、漸増量の血清を含有する緩衝液によるチャレンジ後のG L Aバリエーションの絶対（パネルAおよびB）および相対（パネルCおよびD）活性を示すグラフを提供する。

【0018】

【図５】図５は、H E K 2 9 3 T細胞において発現されたG L Aバリエーションの相対活性を示すグラフを提供する。

【0019】

【図６】図６は、H E K 2 9 3 T細胞において発現され、活性について正規化し、種々のp HでインキュベートしたG L Aバリエーションの絶対（パネルA）および相対（パネルB）活性を示すグラフを提供する。

10

【0020】

【図７】図７は、H E K 2 9 3 T細胞において発現され、活性について正規化し、種々の温度でインキュベートしたG L Aバリエーションの絶対（パネルA）および相対（パネルB）活性を示すグラフを提供する。

【0021】

【図８】図８は、酸性（パネルA）または塩基性（パネルB）溶液中におけるインキュベーション後に残存するG L Aバリエーション活性を示すグラフを提供する。

【0022】

【図９】図９は、G L Aバリエーションの投与後のラット血清中における回復したG L A活性を示すグラフを提供する。

20

【発明を実施するための形態】

【0023】

発明の説明

本発明は、操作されたヒト α -ガラクトシダーゼポリペプチドおよびその組成物を提供する。操作されたヒト α -ガラクトシダーゼポリペプチドは、酸性（p H < 4. 5）および塩基性（p H > 7）の両方の条件下で、改良された安定性を提供するように最適化されている。本発明はまた、治療目的のための、操作されたヒト α -ガラクトシダーゼポリペプチドを含む組成物の使用に関する。

【0024】

いくつかの実施形態では、操作されたヒト α -ガラクトシダーゼポリペプチドは、種々のレベルで改良された安定性を提供するように最適化されている。本発明はまた、治療目的のための、操作されたヒト α -ガラクトシダーゼポリペプチドを含む組成物の使用に関する。

30

【0025】

適格な個体については、ファブリー病の処置のための酵素補充療法（例えば、F a b r a z y m e（登録商標）アガルシダーゼベータ；G e n z y m e）が利用可能であり、検討される。現在使用されている酵素補充療法は、野生型ヒトG L Aの組換え発現形態である。静脈内投与したG L Aは循環し、エンドサイトーシスされて、標的器官のエンドソーム／リソソームに移動し、そこで、G b 3の蓄積を減少させることが公知である。神経因性疼痛および一過性虚血発作が低い割合で起こり続けるので、これらの薬物は、患者の症状を完全に排除くものではない。加えて、ほとんどの標的器官によるG L Aの取り込みは、肝臓と比較して乏しく、血液およびリソソームのp Hでは、この酵素は不安定である。したがって、利用可能な処置には依然として問題がある。加えて、患者は、免疫応答（投与した薬物を標的とするI g GおよびI g E抗体）を起こし、重度のアレルギー（アナフィラキシー）反応、重度の注入反応に苦しみ、さらには死に至り得る。本発明は、現在利用可能な処置と比較して、ファブリー病の処置に適切なより安定な酵素であって、副作用がより少なく、転帰が改善された酵素を提供することを意図する。実際、本発明は、血流中への注射時に酵素が遭遇する血液（p H 7. 4）中において、増加した安定性を有する組換えG L A酵素を提供することを意図する。加えて、該酵素は、リソソーム（すなわち、治療中に酵素が活性である場所）のp H（p H 4. 3）において、増加した安定性を

40

50

有する。したがって、所望の安定特性を有する新規GLAバリエーションを提供するために、多様な酵素バリエーションライブラリーのハイスループットスクリーニングを用いた、*Saccharomyces cerevisiae*において組換え発現されたヒトGLAの指向進化を使用した。加えて、減少した予測免疫原性を有する新規GLAバリエーションを同定するために、バリエーション酵素をスクリーニングし、それらのアミノ酸配列を決定した。増加したpH安定性および減少した免疫原性を有するGLAバリエーションを提供することによって、本発明は、患者の処置耐性を増加させ、患者転帰の改善のために投与および製剤化の柔軟性を提供することによって、患者における使用に適切な組成物および方法を提供する。

【0026】

10

略語および定義：

特に定義がない限り、本明細書中で使用する全ての技術用語および科学用語は、一般に、本発明が属する分野の当業者によって一般的に理解されているのと同じ意味を有する。一般に、本明細書中で使用する命名法ならびに下記の細胞培養、分子遺伝学、微生物学、生化学、有機化学、分析化学および核酸化学の実験手順は、当該分野で周知であり一般に用いられるものである。かかる技術は周知であり、当業者に周知の多数のテキストおよび参考文献に記載されている。標準的な技術またはその改変は、化学合成および化学分析に使用される。本明細書（上記および下記の両方）中で言及する全ての特許、特許出願、論文および刊行物は、本明細書中で参照によって明確に組み込まれる。

【0027】

20

本明細書中に記載のものと類似または同等の任意の適切な方法および材料が本発明の実施に使用されるが、いくつかの方法および材料が本明細書中に記載される。本発明は、記載する特定の метод論、プロトコールおよび試薬に限定されないが、それは、当業者によって使用される状況に応じてこれらが変動し得るためであることを理解すべきである。したがって、以下に直接定義する用語は、全体として本出願を参照することによってより詳細に説明される。本明細書（上記および下記の両方）中で言及する全ての特許、特許出願、論文および刊行物は、本明細書中で参照によって明確に組み込まれる。

【0028】

また、特に文脈上明確な指示がない限り、本明細書中で使用する場合、単数形「a」、「an」および「the」は、複数の指示対象を含む。

30

【0029】

数値範囲は、範囲を規定する数を含む。したがって、本明細書中に開示のあらゆる数値範囲は、より狭い数値範囲が全て本明細書中に明確に記述されているかのように、かかるより広い数値範囲内に含まれるあらゆるより狭い数値範囲を包含することを意図する。本明細書中に開示のあらゆる最大（または最小）数値限定は、より小さい（またはより大きい）数値限定が本明細書中に明確に記述されているかのように、あらゆるかかるより小さい（またはより大きい）数値限定を含むことも意図する。

【0030】

用語「約」は、特定の値に対する許容誤差を意味する。いくつかの場合では、「約」は、所定の値の範囲の0.05%、0.5%、1.0%、または2.0%内を意味する。いくつかの場合では、「約」は、所定の値の1、2、3または4標準偏差内を意味する。

40

【0031】

さらに、本明細書中に提供した見出しは、全体として本出願を参照することによってなされ得る本発明の種々の態様または実施形態の限定ではない。したがって、以下に直接定義する用語は、全体として本出願を参照することによってより詳細に説明される。それにもかかわらず、本発明の理解を容易にするために、いくつかの用語を以下に定義する。

【0032】

特に指示がない限り、それぞれ、核酸は、5'から3'方向で左から右に記述され；アミノ酸配列は、アミノからカルボキシ方向で左から右に記述される。

【0033】

50

本明細書中で使用する場合、用語「含む (comprising)」およびその同義語は、その包括的な意味で使用される (すなわち、用語「含む (including)」およびその対応する同義語と同等)。

【0034】

「EC」番号は、Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB) の酵素命名法をいう。IUBMB の生化学的分類は、酵素が触媒する化学反応に基づく酵素の数値分類体系である。

【0035】

「ATCC」は、American Type Culture Collection 10
nをいい、そのバイオレポジトリコレクションには、遺伝子および株が含まれる。

【0036】

「NCBI」は、National Center for Biological Informationおよびその中で提供されている配列データベースをいう。

【0037】

「タンパク質」、「ポリペプチド」、および「ペプチド」を、長さや翻訳後修飾 (例えば、グリコシル化またはリン酸化) と無関係にアミド結合によって共有結合した少なくとも2つのアミノ酸のポリマーを示すために本明細書中で互換的に使用する。

【0038】

「アミノ酸」は、本明細書中では、それらの一般的に公知の3文字記号によって、または IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission によって推奨される1文字記号のいずれかによって参照される。同様に、ヌクレオチドは、一般的に認められている1文字コードによって参照され得る。 20

【0039】

用語「操作された」、「組換えの」、「天然に存在しない」、および「バリエーション」は、細胞、ポリヌクレオチド、またはポリペプチドに関して使用する場合、材料、すなわち、本来は天然に存在しないと考えられる様式で改変された材料の天然または未変性の形態に対応する材料、または天然または未変性の形態に同一であるが、合成材料および/または組換え技術を使用した操作によって産生または誘導された材料をいう。

【0040】

本明細書中で使用される場合、「野生型」および「天然に存在する」は、天然に見出される形態をいう。例えば、野生型のポリペプチド配列またはポリヌクレオチド配列は、天然供給源から単離することができ、且つ人為的に意図的に改変されていない生物中に存在する配列である。

【0041】

「脱免疫化された」は、本明細書中で使用する場合、野生型または参照タンパク質ほど免疫原性でないと予測されるバリエーションを作るためのタンパク質配列の操作をいう。いくつかの実施形態では、バリエーションタンパク質が投与される患者において、バリエーションタンパク質が免疫応答を刺激しないと予測される点で、予測脱免疫化は完全なものである。この応答は、限定されないが、抗薬物抗体の存在もしくは存在量、中和抗体の存在もしくは存在量、アナフィラキシー応答の存在、主要組織適合複合体-I I (MHC-I I) タンパク質上のペプチド提示、またはタンパク質の投与時のサイトカイン放出の蔓延もしくは強度を含む種々の方法によって測定され得る。いくつかの実施形態では、バリエーションタンパク質は、野生型または参照タンパク質よりも低免疫原性である。いくつかの実施形態では、脱免疫化は、ヒト白血球抗原 (HLA) 受容体によって認識されるタンパク質の部分配列 (例えば、エピトープ) に対する改変を伴う。いくつかの実施形態では、かかる部分配列が HLA 受容体によってもはや認識されない脱免疫化バリエーションタンパク質を生成するために、これらのエピトープは、それらのアミノ酸配列を変化させることによって除去される。いくつかの他の実施形態では、これらのエピトープは、HLA 受容体に対する結合親和性を保持するが、提示されない。いくつかの実施形態では、脱免疫化タンパク質は 40 50

、ヒト免疫応答の生化学的および細胞生物学的予測因子（樹状細胞T細胞活性化アッセイまたは（HLA）ペプチド結合アッセイを含む）において、より低レベルの応答を示す。いくつかの実施形態では、エピトープがT細胞受容体によってもはや認識されない脱免疫化バリエーションタンパク質を生成するために、これらのエピトープは、それらのアミノ酸配列を変化させることによって除去される。また他の実施形態では、脱免疫化タンパク質は、その対応するT細胞のアネルギーを誘導し、T制御性細胞を活性化し、または認識B細胞のクローン除去をもたらす。

【0042】

「コード配列」は、タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸（例えば、遺伝子）の一部をいう。

【0043】

用語「パーセント（％）配列同一率」を、ポリヌクレオチド間およびポリペプチド間の比較をいうために本明細書中で使用し、比較ウィンドウにわたる2つの最適にアラインメントした配列の比較によって決定し、ここで、比較ウィンドウ中のポリヌクレオチド配列部分またはポリペプチド配列部分は、2配列の最適なアラインメントのために参照配列と比較した場合に付加または欠失（すなわち、ギャップ）を含み得る。同一の核酸塩基またはアミノ酸残基が両方の配列中に生じる位置の数を決定して一致した位置の数を得、一致した位置の数を比較ウィンドウ中の位置の総数で除し、結果に100を乗じて配列同一率を得ることによって百分率を計算することができる。あるいは、同一の核酸塩基またはアミノ酸残基が両方の配列中に生じるか、核酸塩基またはアミノ酸残基をギャップを用いてアラインメントした位置の数を決定して一致した位置の数を得、一致した位置の数を比較ウィンドウ中の位置の総数で除し、結果に100を乗じて配列同一率を得ることによって百分率を計算することができる。当業者は、2つの配列をアラインメントするために利用可能な確立されたアルゴリズムが多数存在すると認識する。比較のための配列の最適アラインメントを、例えば、Smith and Waterman (Smith and Waterman, Adv. Appl. Math., 2:482 [1981]) の局所相同性アルゴリズム、Needleman and Wunsch (Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol., 48:443 [1970]) の相同性アラインメントアルゴリズム、Pearson and Lipman (Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 [1988]) の類似性検索法、これらアルゴリズムのコンピュータ化された実行（例えば、GCG Wisconsin Software Package中のGAP、BESTFIT、FASTA、およびTFASTA）、または当技術分野において公知の通りの目視検査によって行うことができる。配列同一率および配列類似率の決定に適切なアルゴリズムの例として、Altschulら（それぞれ、Altschulら, J. Mol. Biol., 215:403-410 [1990] およびAltschulら, Nucleic Acids Res., 3389-3402 [1977] を参照のこと）による記載のBLASTアルゴリズムおよびBLAST 2.0アルゴリズムが挙げられるが、これらに限定されない。BLAST分析を実施するためのソフトウェアは、国立生物工学情報センターウェブサイトから公的に利用可能である。このアルゴリズムは、データベース配列中の同一の長さのワードとアラインメントした場合にいくつかの正の値の閾値スコアTと一致するか満たすクエリー配列中の長さWのショートワードの同定による高スコア配列対 (high scoring sequence pair) (HSP) の第1の同定を含む。Tを、隣接ワードスコア閾値 (neighborhood word score threshold) という (Altschulら、前出を参照のこと)。これらの最初の隣接ワードヒットは、これらのワードヒットを含むより長いHSPを見出すための検索開始のためのシードとして働く。次いで、ワードヒットを、累積アラインメントスコアを増加させることができるかぎり、各配列に沿って両方向に伸長させる。累積スコアを、ヌクレオチド配列についてはパラメーターM（一致する残基対のための報酬スコア；常に0超）およびN（ミスマッチ残基のためのペナルティスコア；常に0未満）を

10

20

30

40

50

使用して計算する。アミノ酸配列について、スコア行列を使用して、累積スコアを計算する。各方向でのワードヒットの伸長は、以下の場合に停止される：累積アラインメントスコアがその最大到達値から量Xだけ低下した場合；1つまたはそれを超える負スコアの残基アラインメントの蓄積によって累積スコアが0またはそれ未満に進行した場合；またはいずれかの配列の末端に到達した場合。BLASTアルゴリズムパラメーターW、T、およびXは、アラインメントの感度および速度を決定する。BLASTNプログラム（ヌクレオチド配列用）は、デフォルトとしてワードレングス（W）11、期待値（E）10、M=5、N=-4、および両鎖の比較を使用する。アミノ酸配列について、BLASTPプログラムは、デフォルトとしてワードレングス（W）3、期待値（E）10、およびBLOSUM62スコア行列（Henikoff and Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 [1989]を参照のこと）を使用する。例示的な配列アラインメントおよび配列同一率の決定には、提供されたデフォルトパラメーターを使用したGCG Wisconsinソフトウェアパッケージ（Accelrys, Madison WI）中のBESTFITプログラムまたはGAPプログラムを使用することができる。

【0044】

「参照配列」は、配列比較の基本として使用される定義された配列をいう。参照配列は、より大きな配列のサブセット（例えば、全長の遺伝子配列またはポリペプチド配列のセグメント）であり得る。一般に、参照配列は、少なくとも20ヌクレオチド長またはアミノ酸残基長、少なくとも25残基長、少なくとも50残基長、少なくとも100残基長、または核酸もしくはポリペプチドの全長である。2つのポリヌクレオチドまたはポリペプチドが、それぞれ、（1）2配列間で類似する配列（すなわち、完全配列の一部）を含むことができ、（2）2配列間で異なる配列をさらに含むことができるので、2つ（またはそれを超える）ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの間の配列比較を、典型的には、配列が類似する局所領域を同定および比較するための「比較ウィンドウ」にわたる2つのポリヌクレオチドまたはポリペプチドの配列の比較によって行う。いくつかの実施形態では、「参照配列」は一次アミノ酸配列に基づくことができ、ここで、参照配列は一次配列中に1つまたはそれを超える変化を有し得る配列である。「比較ウィンドウ」は、少なくとも約20個の連続するヌクレオチドの位置またはアミノ酸残基の概念的セグメントをいい、ここで、ある配列を少なくとも20個の連続するヌクレオチドまたはアミノ酸の参照配列と比較することができ、比較ウィンドウ中の配列の一部が2配列の最適なアラインメントのために参照配列（付加や欠失を含まない）と比較した場合に20%またはそれ未満の付加または欠失（すなわち、ギャップ）を含むことができる。比較ウィンドウは、20個の連続残基よりも長いことが可能であり、任意選択的に、30、40、50、100、またはそれより長いウィンドウが含まれる。

【0045】

「～に相当する」、「～に関する」、または「～に関連する」は、所与のアミノ酸配列またはポリヌクレオチド配列の付番の文脈で使用する場合、所与のアミノ酸配列またはポリヌクレオチド配列を参照配列と比較した場合に指定した参照配列の残基の付番をいう。換言すれば、所与のポリマーの残基番号または残基の位置を、所与のアミノ酸配列またはポリヌクレオチド配列内の残基の実際の番号の位置によるよりもむしろ参照配列に関して命名する。例えば、所与のアミノ酸配列（操作されたGLAのアミノ酸配列など）を、2配列間の残基マッチを最適にするためのギャップの導入によって参照配列とアラインメントすることができる。これらの場合、ギャップが存在するにもかかわらず、所与のアミノ酸配列またはポリヌクレオチド配列中の残基を、アラインメントした参照配列に関して付番する。

【0046】

「アミノ酸の相違」または「残基の相違」は、参照配列中の対応する位置のアミノ酸残基と比較したポリペプチド配列の位置のアミノ酸残基の相違をいう。アミノ酸の相違の位置を、一般に、本明細書中で「Xn」といい、ここで、nは残基の相違に基づいた参照配

10

20

30

40

50

列中の対応する位置をいう。例えば、「配列番号2と比較した場合のX93位の残基の相違」は、配列番号2の93位に対応するポリペプチドの位置でのアミノ酸残基の相違をいう。したがって、配列番号2の参照ポリペプチドが93位にセリンを有する場合、「配列番号2と比較した場合のX93位の残基の相違」は、配列番号2の93位に対応するポリペプチドの位置でのセリン以外の任意の残基のアミノ酸置換をいう。本明細書中のほとんどの例では、ある位置での特異的なアミノ酸残基の相違を「XnY」として示し、ここで、「Xn」は上記の対応する位置を指定し、「Y」は操作されたポリペプチド中に見出されるアミノ酸（すなわち、参照ポリペプチド中の残基と異なる残基）の一文字識別子である。いくつかの場合（例えば、表2.1、2.2、2.3、2.4、2.5および6.1中）、本開示はまた、従来の表示法「AnB」で示す特異的なアミノ酸の相違を提供し、ここで、Aは参照配列中の残基の一文字識別子であり、「n」は参照配列中の残基の位置の番号であり、Bは操作されたポリペプチド配列中の残基置換の一文字識別子である。いくつかの例では、本開示のポリペプチドは、参照配列と比較した1つまたはそれを超えるアミノ酸残基の相違を含むことができ、この相違は、参照配列と比較した場合に残基の相違が存在する特定の位置のリストによって示される。1つを超えるアミノ酸が、ポリペプチドの特定の残基の位置で使用され得るいくつかの実施形態では、使用され得る種々のアミノ酸残基は、「/」によって区切られる（例えば、X307H/X307PまたはX307H/P）。いくつかの実施形態では、酵素バリエーションは、1つを超える置換を含む。これらの置換は、読みやすさのために、スラッシュによって区切られる（例えば、C143A/K206A）。本出願は、保存的アミノ酸置換および非保存的アミノ酸置換のいずれか/または両方を含む1つまたはそれを超えるアミノ酸の相違を含む操作されたポリペプチド配列を含む。

【0047】

「保存的アミノ酸置換」は、ある残基の類似の側鎖を有する異なる残基との置換をいい、したがって、典型的には、ポリペプチド中のアミノ酸の同一または類似と定義されたアミノ酸クラス内のアミノ酸との置換を含む。制限されない例として、それぞれ、脂肪族側鎖を有するあるアミノ酸を、別の脂肪族アミノ酸（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、およびイソロイシン）と置換することができ；ヒドロキシル側鎖を有するあるアミノ酸を、ヒドロキシル側鎖を有する別のアミノ酸（例えば、セリンおよびトレオニン）と置換し；芳香族側鎖を有するあるアミノ酸を、芳香族側鎖を有する別のアミノ酸（例えば、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、およびヒスチジン）と置換し；塩基性側鎖を有するあるアミノ酸を、塩基性側鎖を有する別のアミノ酸（例えば、リジンおよびアルギニン）と置換し；酸性側鎖を有するあるアミノ酸を、酸性側鎖を有する別のアミノ酸（例えば、アスパラギン酸またはグルタミン酸）と置換し；かつ/またはある疎水性または親水性のアミノ酸を、別の疎水性または親水性のアミノ酸と置換する。

【0048】

「非保存的置換」は、ポリペプチド中のアミノ酸の有意に性質が異なる側鎖を有するアミノ酸との置換をいう。非保存的置換は、定義した群内よりもむしろ群間のアミノ酸を使用することができ、（a）置換領域中のペプチド骨格の構造（例えば、グリシンのプロリンへの置換）、（b）電荷または疎水性、または（c）側鎖の嵩高さに影響を及ぼす。制限されない例として、例示的な非保存的置換は、塩基性アミノ酸または脂肪族アミノ酸に置換された酸性アミノ酸；小アミノ酸に置換された芳香族アミノ酸；および疎水性アミノ酸に置換された親水性アミノ酸であり得る。

【0049】

「欠失」は、参照ポリペプチドからの1つまたはそれを超えるアミノ酸の除去によるポリペプチドの改変をいう。欠失は、操作された酵素の酵素活性を保持し、そして/またはその改良された性質を保持しながら、参照酵素を構成する1またはそれを超えるアミノ酸、2またはそれを超えるアミノ酸、5またはそれを超えるアミノ酸、10またはそれを超えるアミノ酸、15またはそれを超えるアミノ酸、または20またはそれを超えるアミノ酸、全アミノ酸数の10%まで、または全アミノ酸数の20%までを除去することができ

る。欠失は、ポリペプチドの内部および／または末端部が対象であり得る。種々の実施形態では、欠失は、連続的なセグメントを含むことができるか、不連続であり得る。

【0050】

「挿入」は、参照ポリペプチドに対する1つまたはそれを超えるアミノ酸の付加によるポリペプチドの改変をいう。ポリペプチドの内部またはカルボキシ末端もしくはアミノ末端に挿入することができる。本明細書中で使用される挿入には、当該分野で公知の融合タンパク質が含まれる。挿入は、アミノ酸の連続セグメントであり得るか、天然に存在するポリペプチド中で1つまたはそれを超えるアミノ酸によって分離され得る。

【0051】

本明細書中で互換的に使用する「機能的フラグメント」または「生物学的に活性なフラグメント」は、アミノ末端および／またはカルボキシ末端の欠失および／または内部欠失を有するが、残りのアミノ酸配列が、それが比較される配列（例えば、本発明の操作された全長GLA）中の対応する位置と同一であるポリペプチドであって、全長ポリペプチドの活性の実質的に全てを保持するポリペプチドをいう。

【0052】

「単離されたポリペプチド」は、ポリペプチドに天然に付随している他の夾雑物（例えば、タンパク質、脂質、およびポリヌクレオチド）から実質的に分離されたポリペプチドをいう。この用語は、その天然に存在する環境または発現系（例えば、宿主細胞または*in vitro*合成）から除去または精製されているポリペプチドを含む。組み換えGLAポリペプチドは、細胞内に存在することができるか、細胞培地中に存在することができるか、種々の形態（溶解物または単離された調製物など）で調製することができる。そのようなものとして、いくつかの実施形態では、組み換えGLAポリペプチドは、単離されたポリペプチドであり得る。

【0053】

「実質的に純粋なポリペプチド」は、ポリペプチド種が主に存在する種である（すなわち、モルベースまたは重量ベースで、組成物中の任意の他の個別の高分子種よりも豊富に存在する）組成物をいい、一般に、モルまたは重量％で存在する高分子種の少なくとも約50％を対象種が占める場合、実質的に精製された組成物である。一般に、実質的に純粋なGLA組成物は、モルまたは重量％で組成物に存在する全高分子種の約60％またはそれを超えて、約70％またはそれを超えて、約80％またはそれを超えて、約90％またはそれを超えて、約95％またはそれを超えて、および約98％またはそれを超えて含まれる。いくつかの実施形態では、対象種を、本質的に均一（すなわち、従来の検出方法によって組成物中の夾雑種を検出できない）まで精製し、ここで、組成物は、本質的に単一の高分子種からなる。溶媒種、小分子（500ダルトン未満）、および元素イオン種は、高分子種と見なさない。いくつかの実施形態では、単離された組み換えGLAポリペプチドは、実質的に純粋なポリペプチド組成物である。

【0054】

「改良された酵素特性」は、参照GLAポリペプチドおよび／または野生型GLAポリペプチドもしくは別の操作されたGLAポリペプチドと比較して、任意の酵素特性の改良を示す操作されたGLAポリペプチドをいう。改良された特性には、増加したタンパク質発現、増加した熱活性（*thermoactivity*）、増加した熱安定性、増加したpH活性、増加した安定性、増加した酵素活性、増加した基質特異性または親和性、増加した比活性、基質または最終生成物阻害に対する増加した抵抗性、増加した化学安定性、改良された化学選択性、改良された溶媒安定性、酸性または塩基性pHに対する増加した耐性、タンパク質分解活性に対する増加した耐性（すなわち、タンパク質分解に対する減少した感受性）、減少した凝集、増加した溶解度、減少した免疫原性、改良された翻訳後修飾（例えば、グリコシル化）、および変化した温度プロファイルなどの特性が含まれるが、これらに限定されない。

【0055】

「酵素活性の増加」または「触媒活性の向上」は、操作されたGLAポリペプチドの性

10

20

30

40

50

質の改良をいい、この酵素活性の増加を、参照G L A酵素と比較した場合の比活性（例えば、生成された生成物／時間／タンパク質重量）の増加または基質の生成物への変換率（例えば、特定の量のG L Aを使用した特定の時間における出発量の基質の生成物への変換率）の増加によって示すことができる。例示的な酵素活性の決定方法を、実施例に示す。酵素活性に関する任意の性質（その変化によって酵素活性が増加し得る K_m 、 V_{max} 、または k_{cat} の古典的な酵素の性質が含まれる）が影響を受け得る。酵素活性の改良は、対応する野生型酵素の酵素活性の約1.1倍から、G L Aポリペプチドが由来する天然に存在するG L Aまたは別の操作されたG L Aよりも酵素活性が2倍、5倍、10倍、20倍、25倍、50倍、75倍、100倍、150倍、200倍、またはそれを超えるまでであり得る。

10

【0056】

いくつかの実施形態では、操作されたG L Aポリペプチドは、少なくとも0.1／秒、少なくとも0.5／秒、少なくとも1.0／秒、少なくとも5.0／秒、少なくとも10.0／秒の、およびいくつかの好ましい実施形態では10.0／秒を超える k_{cat} を有する。いくつかの実施形態では、 K_m は、約1 μ M～約5mMの範囲内；約5 μ M～約2mMの範囲内；約10 μ M～約2mMの範囲内；または約10 μ M～約1mMの範囲内である。いくつかの特定の実施形態では、操作されたG L A酵素は、特定の条件への曝露後に、参照G L A酵素（例えば、野生型G L Aまたは任意の他の参照G L A）のものよりも1.5～10倍、1.5～25倍、1.5～50倍、1.5～100倍の範囲内またはそれを超える改良された酵素活性を示す。G L A活性は、当該分野で公知の任意の適切な方法（例えば、反応物質または生成物の分光光度特性の変化のモニタリングなどの標準的なアッセイ）によって測定され得る。いくつかの実施形態では、生成される生成物の量は、UV吸光度または直接的な蛍光検出またはその後のオーフタルジアルデヒド（OPA）誘導体化と組み合わせた高速液体クロマトグラフィ（HPLC）分離によって測定され得る。本明細書中にさらに詳述するように、酵素活性を、定義された酵素の調製、設定された条件下での定義されたアッセイ、および1つまたはそれを超える定義された基質を使用して比較する。一般に、溶解物を比較する場合、宿主細胞による酵素の生成量および溶解物中の酵素の存在量の変動を最小にするために同一の発現系および同一の宿主細胞も使用して細胞数およびタンパク質のアッセイ量を決定する。

20

【0057】

用語「酸性pHに対する改良された耐性」は、本発明の組換えG L Aが、参照G L Aまたは別の酵素と比較して増加した安定性を有する（酸性pHへの曝露後に、約pH4.8において、より高い活性が特定の期間（1時間、最大24時間）保持される）ことを意味する。

30

【0058】

「生理学的pH」は、本明細書中で使用する場合、被験体（例えば、ヒト）の血液中に一般に見出されるpH範囲を意味する。

【0059】

（例えば、塩基性pH条件に対する改良された安定性、または塩基性pHに対する増加した耐性に関して使用する）用語「塩基性pH」は、約7～11のpH範囲を意味する。

40

【0060】

（例えば、酸性pH条件に対する改良された安定性、または酸性pHに対する増加した耐性に関して使用する）用語「酸性pH」は、約1.5～4.5のpH範囲を意味する。

【0061】

「変換」は、基質の対応する生成物への酵素変化（または生物学的転換（*biotransformation*））をいう。「変換率」は、特定の条件下での時間内の生成物に変換した基質の百分率をいう。したがって、G L Aポリペプチドの「酵素活性」または「活性」を、特定の期間における基質の生成物への「変換率」として示すことができる。

【0062】

「ハイブリッド形成ストリンジェンシー」は、核酸のハイブリッド形成における洗浄条

50

件などのハイブリッド形成条件をいう。一般に、ハイブリッド形成反応を、低い方のストリンジェンシーの条件下で実施後、多様であるが高い方のストリンジェンシーで洗浄する。用語「中程度のストリンジェントなハイブリッド形成」は、標的-DNAが標的DNAに対して約60%同一、好ましくは約75%同一、約85%同一、標的-ポリヌクレオチドに対して約90%を超える同一性で相補核酸に結合可能な条件をいう。例示的な中程度にストリンジェントな条件は、42℃での50%ホルムアミド、5×デンハート液、5×SSPE、0.2%SDSでのハイブリッド形成後、42℃での0.2×SSPE、0.2%SDSでの洗浄に等価な条件である。「高ストリンジェンシーハイブリッド形成」は、一般に、定義されたポリヌクレオチド配列についての溶液条件下で決定した熱融解温度 T_m から約10℃またはそれ未満低い温度の条件をいう。いくつかの実施形態では、高ストリンジェンシー条件は、65℃で0.018M NaClにて安定なハイブリッドを形成する核酸配列のみがハイブリッド形成することが可能な条件をいう（すなわち、ハイブリッドが65℃の0.018M NaCl中で安定ではない場合、本明細書中で意図するように、高ストリンジェンシー条件下で安定でないであろう）。高ストリンジェンシー条件を、例えば、42℃の50%ホルムアミド、5×デンハート液、5×SSPE、0.2%SDS後、65℃で0.1×SSPE、および0.1%SDSでの洗浄に等価な条件でのハイブリッド形成によって提供することができる。別の高ストリンジェンシー条件は、65℃の0.1%（w:v）SDSを含む5×SSCでのハイブリッド形成および65℃の0.1%SDSを含む0.1×SSCの洗浄に等価な条件でのハイブリッド形成である。他の高ストリンジェンシーハイブリッド形成条件および中程度にストリンジェントな条件は、上記で引用した文献に記載されている。

【0063】

「コドン最適化」は、タンパク質をコードするポリヌクレオチドのコドンの、コードされたタンパク質が目的の生物中でより効率的に発現されるように特定の生物中で優先的に使用されるコドンへの変化をいう。ほとんどのアミノ酸がいくつかのコドンによって示されるという点で遺伝暗号が縮重している（「同義語」または「同義」コドンと呼ばれる）にもかかわらず、特定の生物によるコドン使用頻度が非ランダムであり、特定のコードトリプレットに偏っていることが周知である。このコドン使用頻度の偏りは、所与の遺伝子、共通の機能または起源となる祖先の遺伝子、低コピー数タンパク質に対する高発現タンパク質、および生物のゲノムの凝集タンパク質コード領域に関して高い可能性がある。いくつかの実施形態では、GLA酵素をコードするポリヌクレオチドを、発現のために選択された宿主生物からの最適な産生のためにコドン最適化することができる。

【0064】

「調節配列」は、本明細書中で、本出願のポリヌクレオチドおよび／またはポリペプチドの発現に必要であるか有利な全ての成分を含むことをいう。各調節配列は、ポリペプチドをコードする核酸配列に対して未変性または外来であり得る。かかる調節配列には、リーダー配列、ポリアデニル化配列、プロペプチド配列、プロモーター配列、シグナルペプチド配列、開始配列および転写ターミネーターが含まれるが、これらに限定されない。最小限でも、調節配列は、プロモーター、転写停止シグナル、および翻訳停止シグナルを含む。調節配列に、ポリペプチドをコードする核酸配列のコード領域内の調節配列のライゲーションを容易にする特異的な制限部位を導入するためのリンカーを提供することができる。

【0065】

「作動可能に連結された」は、本明細書中で、調節配列が目的のポリヌクレオチドおよび／またはポリペプチドの発現を指示または制御するように目的のポリヌクレオチドに関連する位置に調節配列が適切に（すなわち、機能的関係において）配置された構成と定義する。

【0066】

「プロモーター配列」は、目的のポリヌクレオチド（コード配列など）の発現のために宿主細胞によって認識される核酸配列をいう。プロモーター配列は、目的のポリヌクレオ

チドの発現を媒介する転写調節配列を含む。プロモーターは、最適な宿主細胞中で転写活性を示す任意の核酸配列であってよく（変異プロモーター、短縮プロモーター、およびハイブリッドプロモーターが含まれる）、宿主細胞と同種または異種のいずれかの細胞外または細胞内のポリペプチドをコードする遺伝子から得ることができる。

【0067】

「適切な反応条件」は、本出願のG L Aポリペプチドが基質を所望の生成物化合物に変換することができる酵素的変換反応溶液中の条件（例えば、酵素負荷、基質負荷、温度、p H、緩衝液、共溶媒の範囲など）をいう。例示的な「適切な反応条件」を、本出願中に示し、実施例で例示する。「化合物負荷」、または「酵素負荷」などにおける「負荷」は、反応開始時の反応混合物中の成分の濃度または量をいう。酵素的変換反応プロセスの文脈における「基質」は、G L Aポリペプチドが作用する化合物または分子をいう。酵素的変換プロセスの文脈中の「生成物」は、G L Aポリペプチドの基質に対する作用に起因する化合物または分子をいう。

10

【0068】

本明細書中で使用する場合、用語「培養する」は、（例えば、液体、ゲルまたは固体培地を使用した）任意の適切な条件下で、微生物細胞の集団を成長させることをいう。

【0069】

組換えポリペプチドは、当該分野で公知の任意の適切な方法を使用して生成され得る。目的の野生型ポリペプチドをコードする遺伝子は、プラスミドなどのベクターにクローニングされ、大腸菌、*S. cerevisiae*などの所望の宿主において発現され得る。組換えポリペプチドのバリエーションは、当該分野で公知の種々の方法によって生成され得る。実際、当業者に周知の多種多様な異なる変異誘発技術がある。加えて、変異誘発キットはまた、多くの商業的分子生物学供給業者から入手可能である。規定のアミノ酸における特異的置換（部位特異的）、遺伝子の局所領域における特異的もしくはランダム変異（領域特異的）、または遺伝子全体にわたるランダム変異誘発（例えば、飽和変異誘発）を行うための方法が利用可能である。酵素バリエーションを生成するための多数の適切な方法が当業者に公知であり、P C Rを使用した一本鎖D N Aまたは二本鎖D N Aの部位特異的変異誘発、カセット変異誘発、遺伝子合成、エラーブローンP C R、シャッフリング、および化学飽和変異誘発、または当該分野で公知の任意の他の適切な方法が含まれるが、これらに限定されない。D N Aおよびタンパク質工学に使用される方法の非限定的な例は、以下の特許：米国特許第6, 117, 679号；同第6, 420, 175号；同第6, 376, 246号；同第6, 586, 182号；同第7, 747, 391号；同第7, 747, 393号；同第7, 783, 428号；および同第8, 383, 346号に提供されている。バリエーションが生成された後、それらは、任意の所望の特性（例えば、高いもしくは増加した活性、または低いもしくは減少した活性、増加した熱活性、増加した熱安定性、および／または酸性p H安定性など）についてスクリーニングされ得る。いくつかの実施形態では、「組換えG L Aポリペプチド」（本明細書中では「操作されたG L Aポリペプチド」、「バリエーションG L A酵素」および「G L Aバリエーション」とも称される）が使用される。

20

30

【0070】

本明細書中で使用する場合、「ベクター」は、D N A配列を細胞に導入するためのD N A構築物である。いくつかの実施形態では、ベクターは、D N A配列中のコードされるポリペプチドの適切な宿主における発現を行うことができる適切な調節配列に作動可能に連結されている発現ベクターである。いくつかの実施形態では、「発現ベクター」は、宿主細胞における発現を駆動するためのD N A配列（例えば、導入遺伝子）に作動可能に連結されているプロモーター配列を有し、いくつかの実施形態では、転写終結配列も含む。

40

【0071】

本明細書中で使用する場合、用語「発現」は、ポリペプチドの産生に関与する任意の工程（転写、転写後修飾、翻訳、および翻訳後修飾が含まれるが、これらに限定されない）を含む。いくつかの実施形態では、この用語はまた、細胞からのポリペプチドの分泌を包

50

含する。

【0072】

本明細書中で使用する場合、用語「産生する」は、細胞によるタンパク質および／または他の化合物の産生をいう。この用語は、ポリペプチドの産生に参与する任意の工程（転写、転写後修飾、翻訳、および翻訳後修飾が含まれるが、これらに限定されない）を包含することを意図する。いくつかの実施形態では、この用語はまた、細胞からのポリペプチドの分泌を包含する。

【0073】

本明細書中で使用する場合、アミノ酸またはヌクレオチド配列（例えば、プロモーター配列、シグナルペプチド、終結配列など）は、2つの配列が天然では結合されていない場合、それが作動可能に連結されている別の配列に対して「異種」である。

10

【0074】

本明細書中で使用する場合、用語「宿主細胞」および「宿主株」は、本明細書中に提供したDNA（例えば、GLAバリエーションをコードするポリヌクレオチド）を含む発現ベクターのための適切な宿主をいう。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、当該分野で公知の組換えDNA技術を使用して構築されたベクターで形質転換またはトランスフェクトされた原核細胞または真核細胞である。

【0075】

用語「類似体」は、参照ポリペプチドと70%超100%未満の配列同一性（例えば、75%超、78%超、80%超、83%超、85%超、88%超、90%超、91%超、92%超、93%超、94%超、95%超、96%超、97%超、98%超、99%超の配列同一性）を有するポリペプチドを意味する。いくつかの実施形態では、類似体は、1つまたはそれを超える天然に存在しないアミノ酸残基（ホモアルギニン、オルニチンおよびノルバリンが含まれるが、これに限定されない）および天然に存在するアミノ酸を含むポリペプチドを意味する。いくつかの実施形態では、類似体はまた、1つまたはそれを超えるD-アミノ酸残基と、2つまたはそれを超えるアミノ酸残基間の非ペプチド結合とを含む。

20

【0076】

用語「治療薬」は、病状の徴候または症状を示す被験体に投与される化合物であって、有益なまたは望ましい医学的効果を有する化合物をいう。

30

【0077】

用語「医薬組成物」は、哺乳動物被験体（例えば、ヒト）における医薬用途に適切な組成物であって、薬学的に有効な量の本発明によって包含される操作されたGLAポリペプチドと、許容され得るキャリアとを含む組成物をいう。

【0078】

用語「有効量」は、所望の結果をもたらすために十分な量を意味する。当業者は、日常的な実験を使用することによって、有効量を決定し得る。

【0079】

用語「単離された」および「精製された」は、それが天然に結合している少なくとも1つの他の成分から取り出された分子（例えば、単離された核酸、ポリペプチドなど）または他の成分をいうために使用される。用語「精製された」は、絶対的な純度を必要とせず、むしろそれは、相対的な定義として意図される。

40

【0080】

用語「被験体」は、ヒト、非ヒト霊長類、家畜、コンパニオンアニマル、および実験動物（例えば、齧歯類およびウサギ類）などの哺乳動物を包含する。この用語は、雌および雄を包含することを意図する。

【0081】

本明細書中で使用する場合、用語「患者」は、疾患について評価されているか、疾患について処置されているか、または疾患を経験している任意の被験体を意味する。

【0082】

50

用語「乳児」は、生後1カ月～約1歳の期間の小児をいう。本明細書中で使用する場合、用語「新生児」は、出生～生後28日の期間の小児をいう。用語「未熟児」は、妊娠満20週後だが正常な妊娠期間完了前に生まれた乳児であって、一般に、体重が出生時に約500～約2499グラムの乳児をいう。「極低出生体重児」は、体重が出生時に1500g未満の乳児である。

【0083】

本明細書中で使用する場合、用語「小児」は、処置または研究手順の同意に関する法定年齢に達していない者をいう。いくつかの実施形態では、この用語は、出生時～青年期の者をいう。

【0084】

本明細書中で使用する場合、用語「成人」は、関連権限に関する法定年齢（例えば、米国では18歳）に達した者をいう。いくつかの実施形態では、この用語は、完全に成長して成熟した任意の生物をいう。いくつかの実施形態では、用語「若年成人」は、18歳未満だが性的成熟に達した者をいう。

【0085】

本明細書中で使用する場合、「組成物」および「製剤」は、少なくとも1つの本発明の操作されたGLAを含む製品であって、任意の適切な使用を目的とする製品（例えば、医薬組成物、食事／栄養サプリメント、飼料など）を包含する。

【0086】

組成物の「投与」および組成物を「投与する」という用語は、本発明の組成物を被験体（例えば、ファブリー病の影響に苦しんでいる者）に提供することを意味する。

【0087】

用語「キャリア」は、医薬組成物に関して使用する場合、標準的な医薬キャリア、緩衝液、および賦形剤（例えば安定剤、保存剤、およびアジュバント）のいずれかを意味する。

【0088】

用語「薬学的に許容され得る」は、いかなる望ましくない生物学的効果も引き起こさず、およびそれが含まれる成分のいずれかと有害な様式で相互作用せずに、被験体に投与され得る材料であって、所望の生物学的活性を有する材料を意味する。

【0089】

本明細書中で使用する場合、用語「賦形剤」は、活性医薬成分（API；例えば、本発明の操作されたGLAポリペプチド）以外の任意の薬学的に許容され得る添加剤、キャリア、希釈剤、アジュバント、または他の成分をいう。賦形剤は、典型的には、製剤化および／または投与目的で含められる。

【0090】

用語「治療有効量」は、疾患／状態の症状に関して使用する場合、疾患／状態の1つもしくはそれを超える症状を改善、軽減もしくは排除し、または症状の発症を予防もしくは遅延する化合物（例えば、操作されたGLAポリペプチド）の量および／または濃度をいう。

【0091】

用語「治療有効量」は、疾患／状態に関して使用する場合、疾患／状態を改善、軽減または排除する組成物（例えば、操作されたGLAポリペプチド）の量および／または濃度をいう。いくつかの実施形態では、この用語は、研究者、医師、獣医、または他の臨床医が求める組織、系または動物被験体による生物学的（例えば医学的）応答を誘発する組成物の量に関して使用される。

【0092】

用語「処置すること」、「処置する」および「処置」は、予防的（例えば、保護的）および緩和的処置を包含することを意図する。

【0093】

操作されたGLAの発現および活性：

10

20

30

40

50

酵母コドン最適化成熟ヒトGLAの分泌を促すために、酵母MF α シグナルペプチド(MF-SP)または83アミノ酸のより長いリーダー配列(MFリーダー)を使用して、分泌GLA発現のための2つの戦略を利用した。*S. cerevisiae*株INVSc1においてpYT-72ベクターからクローンを発現させた。両アプローチは、蛍光原基質4-メチルウンベリフェリル α -D-ガラクトピラノシド(4-MuGal)に対して測定可能な活性を有する上清を提供した。しかしながら、酵母MF α シグナルペプチドを有する構築物は、3倍高い活性を提供し、指向進化の開始配列として使用した。

【0094】

変異の多様性を同定するために、13位保存「ホモログ」コンビナトリアルライブラリーおよび192位部位飽和変異誘発ライブラリーを構築した。非チャレンジ条件(インキュベーションなし、pH4.8)で、または低pH(3.9~4.2)もしくは高pH(7.1~8.2)環境における1時間のインキュベーション後に、等容量の上清をスクリーニングした。GLA発現またはGLA比活性の増加による増加した活性を有するGLAバリエーションを、親GLAに対するそれらの改良の倍数に基づいて同定した。チャレンジ条件下で観察された改良の倍数を、非チャレンジ条件下で観察された改良の倍数で割ることによって、増加した安定性を有するGLAバリエーションを同定した。このアプローチは、極端なpHにおける比活性の変化を伴わない発現の増加に基づいてバリエーションを選択することに対するバイアスを減少させる。複合活性スコア(全3条件の改良の倍数の結果(product))および安定性(安定性スコアの結果)を使用して、後のGLAライブラリーに含めるための改良されたバリエーションの変異をランク付けした。

【0095】

操作されたGLA:

いくつかの実施形態では、改善された特性を示す操作されたGLAは、配列番号5との少なくとも約85%、少なくとも約88%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または約100%のアミノ酸配列同一性、および1つまたはそれより多くのアミノ酸位置に配列番号5と比較した場合のアミノ酸残基の差異(例えば、配列番号5と比較して1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15、20またはそれより多くのアミノ酸位置において、または配列番号5と少なくとも85%、少なくとも88%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%またはそれを超えるアミノ酸配列同一性を有する配列)を有する。いくつかの実施形態では、1つまたはそれより多くのアミノ酸位置における配列番号5と比較した場合の残基の差異は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれより多くの保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、操作されたGLAポリペプチドは、表2.1、2.2、2.4、2.5または表7.1に列挙されるポリペプチドである。

【0096】

いくつかの実施形態では、改善された特性を示す操作されたGLAは、配列番号10との少なくとも約85%、少なくとも約88%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または約100%のアミノ酸配列同一性、および1つまたはそれより多くのアミノ酸位置に配列番号10と比較した場合のアミノ酸残基の差異(例えば、配列番号10と比較して1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15、20またはそれより多くのアミノ酸位置において、または配列番号10と少なくとも85%、少なくとも88%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%またはそれを超えるアミノ酸配列同一性を有する配列)を

有する。いくつかの実施形態では、1つまたはそれより多くのアミノ酸位置における配列番号10と比較した場合の残基の差異は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれより多くの保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、操作されたGLAポリペプチドは、表2. 3に列挙されるポリペプチドである。

【0097】

いくつかの実施形態では、改善された特性を示す操作されたGLAは、配列番号5との少なくとも85%、少なくとも88%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、改善された特性を示す操作されたGLAは、配列番号10との少なくとも85%、少なくとも88%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有する。

10

【0098】

いくつかの実施形態では、操作されたGLAポリペプチドは、配列番号15、13、10および18から選択される。

【0099】

いくつかの実施形態では、操作されたGLAポリペプチドは、本発明に包含される操作されたGLAポリペプチドの機能的フラグメントを含む。機能的フラグメントは、それが由来する操作されたGLAポリペプチド（すなわち、親の操作されたGLA）の少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の活性を有する。機能的フラグメントは、操作されたGLAの親配列の少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%およびさらには99%を含む。いくつかの実施形態では、機能的フラグメントは、5未満、10未満、15未満、10未満、25未満、30未満、35未満、40未満、45未満および50未満のアミノ酸だけ短縮されている。

20

【0100】

操作されたポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、発現ベクター、および宿主細胞；

30

本発明は、本明細書中に記載の操作されたGLAポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供する。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドを、遺伝子発現を調節する1つまたはそれを超える異種制御配列に作動可能に連結してポリペプチドを発現することができる組換えポリヌクレオチドを作製する。操作されたGLAポリペプチドをコードする異種ポリヌクレオチドを含む発現構築物を適切な宿主細胞に導入して、対応するGLAポリペプチドを発現させることができる。

【0101】

当業者に明らかのように、種々のアミノ酸に対するタンパク質配列の利用可能性および対応するコドンの知識により、対象ポリペプチドをコードすることができる全てのポリヌクレオチドが説明される。同一のアミノ酸が代替コドンまたは同義コドンによってコードされる遺伝暗号の縮重により、非常に多数の核酸を作製することが可能であり、その核酸の全てが操作されたGLAポリペプチドをコードする。したがって、特定のアミノ酸配列の知識を有することにより、当業者は、タンパク質のアミノ酸配列を変えない方法で1つまたはそれを超えるコドンの配列を改変するだけでいくつもの異なる核酸を作製することができる。これに関して、本発明は、可能なコドンの選択に基づいた組み合わせの選択による本明細書中に記載のポリペプチドをコードする作製可能なポリヌクレオチドのそれぞれおよびあらゆる可能なバリエーションを具体的に意図し、全てのかかるバリエーションは、本明細書中に記載の任意のポリペプチド（表2. 1、2. 2、2. 3、2. 4、2.

40

50

5、および6．1に提供したバリエーションが含まれる）について具体的に開示されるとみなされるものとする。

【0102】

種々の実施形態では、タンパク質が生成される宿主細胞に適合するようにコドンを選択することが好ましい。例えば、細菌で使用される好ましいコドンは、細菌における発現のために使用される。その結果、操作されたG L Aポリペプチドをコードするコドン最適化ポリヌクレオチドは、全長コード領域の約40%、50%、60%、70%、80%または90%を超えるコドン位置において好ましいコドンを含む。

【0103】

いくつかの実施形態では、上記のように、ポリヌクレオチドは、本明細書中に開示の特性を有するG L A活性を有する操作されたポリペプチドをコードし、このポリペプチドは、配列番号5、および／もしくは10から選択される参照配列と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれを超える同一性を有するアミノ酸配列、または表2．1、2．2、2．3、2．4、2．5、もしくは6．1に開示の任意のバリエーションのアミノ酸配列、ならびに配列番号5、および／もしくは10の参照ポリペプチドと比較した場合に1つもしくはそれを超える残基の相違、または表2．1、2．2、2．3、2．4、2．5、もしくは6．1に開示の任意のバリエーションのアミノ酸配列（例えば、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個またはそれを超えるアミノ酸残基の位置）を含む。いくつかの実施形態では、参照配列は、配列番号5および／または10から選択される。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、本明細書中に開示の特性を有するG L A活性を有する操作されたポリペプチドをコードし、このポリペプチドは、配列番号5のポリペプチドと最適にアラインメントした場合に、配列番号5の参照配列と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれを超える配列同一性と、表2．1、2．2、2．4、2．5、または6．1に提供したものから選択される残基の位置において、配列番号5と比較した場合に1つまたはそれを超える残基の相違とを有するアミノ酸配列を含む。

【0104】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、本明細書中に開示の特性を有するG L A活性を有する操作されたポリペプチドをコードし、このポリペプチドは、配列番号10のポリペプチドと最適にアラインメントした場合に、配列番号10の参照配列と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれを超える配列同一性と、表2．3に提供したものから選択される残基の位置において、配列番号10と比較した場合に1つまたはそれを超える残基の相違とを有するアミノ酸配列を含む。

【0105】

いくつかの実施形態では、操作されたG L Aポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、配列番号10、13、15、18、21、および24をコードするポリヌクレオチド配列から選択されるポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたG L Aポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、配列番号8、9、11、12、14、16、17、19、20、22、および／または23と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、93%、95%、96%、97%、98%、99%のヌクレオチド残基同一性を有する。いくつかの実施形態では、操作されたG L Aポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、配列番号8、9、11、12、14、16、17、19、20、22、および23から選択されるポリヌクレオチド配列を含む。

【0106】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、高ストリンジェントな条件下で、配列番号 8、9、11、12、14、16、17、19、20、22、および 23 から選択される参照ポリヌクレオチド配列もしくはその相補物、または本明細書中に提供したバリエーション GLA ポリペプチドのいずれかをコードするポリヌクレオチド配列にハイブリダイズすることができる。いくつかの実施形態では、高ストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドは、表 2. 1、2. 2、2. 3、2. 4、2. 5、および／または 6. 1 に示されている任意の位置から選択される残基の位置において、配列番号 5 および／または 10 と比較した場合に 1 つまたはそれを超える残基の相違を有するアミノ酸配列を含む GLA ポリペプチドをコードする。

【0107】

10

いくつかの実施形態では、本明細書中に提供した操作された GLA ポリペプチドのいずれかをコードする単離されたポリヌクレオチドを、ポリペプチドを発現させる種々の方法で操作する。いくつかの実施形態では、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを、ポリヌクレオチドおよび／またはポリペプチドの発現を制御するための 1 つまたはそれを超える調節配列が存在する発現ベクターとして提供する。発現ベクターに応じて単離されたポリヌクレオチドをベクターへの挿入前に操作することが望ましいか必要かもしれない。組換え DNA 法を利用したポリヌクレオチドおよび核酸配列の改変技術は、当該分野で周知である。

【0108】

20

いくつかの実施形態では、調節配列には、とりわけ、プロモーター、リーダー配列、ポリアダニル化配列、プロペプチド配列、シグナルペプチド配列、および転写ターミネーターが含まれる。当該分野で公知のように、適切なプロモーターは、使用される宿主細胞に基づいて選択され得る。糸状菌宿主細胞のための例示的なプロモーターには、*Aspergillus oryzae* TAKA アミラーゼ、*Rhizomucor miehei* アスパラギン酸プロテイナーゼ、*Aspergillus niger* 中性 α -アミラーゼ、*Aspergillus niger* 酸安定性 α -アミラーゼ、*Aspergillus niger* または *Aspergillus awamori* グルコアミラーゼ (glaA)、*Rhizomucor miehei* リパーゼ、*Aspergillus oryzae* アルカリプロテアーゼ、*Aspergillus oryzae* トリオスリン酸イソメラーゼ、*Aspergillus nidulans* アセトアミダーゼ、および *Fusarium oxysporum* トリプシン様プロテアーゼ (例えば、WO 96/00787 号を参照のこと) の遺伝子から得たプロモーター、ならびに NA2-tpi プロモーター (*Aspergillus niger* 中性 α -アミラーゼおよび *Aspergillus oryzae* トリオスリン酸イソメラーゼの遺伝子由来のプロモーターのハイブリッド)、その変異プロモーター、短縮プロモーター、およびハイブリッドプロモーターが含まれる。例示的な酵母細胞プロモーターは、*Saccharomyces cerevisiae* エノラーゼ (ENO1)、*Saccharomyces cerevisiae* ガラクトキナーゼ (GAL1)、*Saccharomyces cerevisiae* アルコールデヒドロゲナーゼ／グリセルアルデヒド 3 リン酸デヒドロゲナーゼ (ADH2/GAP)、および *Saccharomyces cerevisiae* 3-ホスホグリセリン酸キナーゼの遺伝子に由来し得る。酵母宿主細胞のための他の有用なプロモーターは当該分野で公知である (例えば、Romanos ら、*Yeast* 8: 423-488 [1992] を参照のこと)。哺乳動物細胞における使用のための例示的なプロモーターには、サイトメガロウイルス (CMV)、シミアン空胞化ウイルス 40 (SV40) 由来のもの、*Homo sapiens* ホスホグリセリン酸キナーゼ (phosphoglycerate kinase)、ベータアクチン、伸長因子 1A もしくはグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ由来のもの、または *Gallus gallus* の β -アクチン由来のものが含まれるが、これらに限定されない。

30

40

【0109】

いくつかの実施形態では、調節配列はまた、適切な転写終結配列 (転写を終結させるた

50

めに宿主細胞によって認識される配列)である。終結配列は、ポリペプチドをコードする核酸配列の3'末端に作動可能に連結される。最適な宿主細胞で機能する任意のターミネーターを、本発明で使用する。例えば、糸状菌宿主細胞のための例示的な転写ターミネーターを、*Aspergillus oryzae* TAKAアミラーゼ、*Aspergillus niger* グルコアミラーゼ、*Aspergillus nidulans* アントラニル酸シンターゼ、*Aspergillus niger* の α -グルコシダーゼ、および *Fusarium oxysporum* トリプシン様プロテアーゼの遺伝子から得ることができる。酵母宿主細胞のための例示的なターミネーターを、*Saccharomyces cerevisiae* エノラーゼ、*Saccharomyces cerevisiae* シトクロムC (CYC1)、および *Saccharomyces cerevisiae* グリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼの遺伝子から得ることができる。酵母宿主細胞のための他の有用なターミネーターは、当該分野で公知である(例えば、Romanosら、前出を参照のこと)。哺乳動物細胞のための例示的なターミネーターには、サイトメガロウイルス(CMV)、サル空胞化ウイルス40(SV40)由来のもの、または *Homo sapiens* 成長ホルモン由来のものが含まれるが、これらに限定されない。

【0110】

いくつかの実施形態では、調節配列は、適切なリーダー配列(宿主細胞による翻訳に必要なmRNAの非翻訳領域)である。リーダー配列は、ポリペプチドをコードする核酸配列の5'末端に作動可能に連結される。最適な宿主細胞で機能する任意のリーダー配列を使用することができる。糸状菌宿主細胞のための例示的なリーダーを、*Aspergillus oryzae* TAKAアミラーゼおよび *Aspergillus nidulans* トリオースリン酸イソメラーゼの遺伝子から得る。酵母宿主細胞に適切なリーダーには、*Saccharomyces cerevisiae* エノラーゼ(ENO-1)、*Saccharomyces cerevisiae* 3-ホスホグリセリン酸キナーゼ、*Saccharomyces cerevisiae* α -因子、および *Saccharomyces cerevisiae* アルコールデヒドロゲナーゼ/グリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼ(ADH2/GAP)の遺伝子から得られるものが含まれるが、これらに限定されない。

【0111】

調節配列はまた、ポリアデニル化配列(核酸配列の3'末端に作動可能に連結され、転写時に転写されたmRNAにポリアデノシン残基を付加するためのシグナルとして宿主細胞によって認識される配列)であり得る。最適な宿主細胞で機能する任意のポリアデニル化配列を、本発明で使用する。糸状菌宿主細胞のための例示的なポリアデニル化配列には、*Aspergillus oryzae* TAKAアミラーゼ、*Aspergillus niger* グルコアミラーゼ、*Aspergillus nidulans* アントラニル酸シンターゼ、*Fusarium oxysporum* トリプシン様プロテアーゼ、および *Aspergillus niger* α -グルコシダーゼの遺伝子に由来するものが含まれるが、これらに限定されない。酵母宿主細胞のための有用なポリアデニル化配列もまた、当該分野で公知である(例えば、Guo and Sherman, Mol. Cell. Bio., 15: 5983-5990 [1995]を参照のこと)。

【0112】

いくつかの実施形態では、調節配列は、ポリペプチドのアミノ末端に連結したアミノ酸配列をコードし、コードされたポリペプチドを細胞の分泌経路に方向づけるシグナルペプチドコード領域である。核酸配列のコード配列の5'末端は、分泌されるポリペプチドをコードするコード領域のセグメントと共に翻訳読み枠中に天然に連結したシグナルペプチドコード領域を固有に含むことができる。あるいは、コード配列の5'末端は、コード配列に対して外来のシグナルペプチドコード領域を含むことができる。発現されたポリペプチドを最適な宿主細胞の分泌経路に方向づける任意のシグナルペプチドコード領域を、本

明細書中に提供した操作されたGLAポリペプチドの発現に使用する。糸状菌宿主細胞のための有効なシグナルペプチドコード領域には、*Aspergillus oryzae* TAKAアミラーゼ、*Aspergillus niger* 中性アミラーゼ、*Aspergillus niger* グルコアミラーゼ、*Rhizomucor miehei* アスパラギン酸プロテイナーゼ、*Humicola insolens* セルラーゼ、および *Humicola lanuginosa* リパーゼの遺伝子から得たシグナルペプチドコード領域が含まれるが、これらに限定されない。酵母宿主細胞のための有用なシグナルペプチドには、*Saccharomyces cerevisiae* α-因子および *Saccharomyces cerevisiae* インベルターゼの遺伝子に由来するものが含まれるが、これらに限定されない。哺乳動物宿主細胞のための有用なシグナルペプチドには、免疫グロブリンガンマ (IgG) の遺伝子由来のものが含まれるが、これらに限定されない。

10

【0113】

いくつかの実施形態では、調節配列は、ポリペプチドのアミノ末端に配置されたアミノ酸配列をコードするプロペプチドコード領域である。得られたポリペプチドは、「プロ酵素」または「プロポリペプチド」（または、いくつかの場合、「酵素原」）と呼ばれる。プロポリペプチドは、プロポリペプチドからのプロペプチドの触媒的切断または自己触媒的切断によって活性な成熟ポリペプチドに変換され得る。

【0114】

別の態様では、本発明はまた、操作されたGLAポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、および導入される宿主のタイプに応じて1つまたはそれを超える発現制御領域（プロモーターおよびターミネーターなど）、複製起点などを含む組換え発現ベクターを提供する。いくつかの実施形態では、上記の種々の核酸および調節配列を共に接合して組換え発現ベクターを産生し、この組換え発現ベクターは、1つまたはそれを超える都合の良い制限部位を含み、この制限部位は、かかる部位でのバリエーションGLAポリペプチドをコードする核酸配列の挿入または置換が可能である。あるいは、本発明のポリヌクレオチド配列を、ポリヌクレオチド配列または該ポリヌクレオチド配列を含む核酸構築物の、発現に適切なベクター内への挿入によって発現する。発現ベクターの作製では、コード配列が発現に適切な調節配列と作動可能に連結されるようにコード配列をベクター中に配置する。

20

30

【0115】

組換え発現ベクターは、組換えDNA手順に都合よく供することができ、且つバリエーションGLAポリヌクレオチド配列の発現をもたらすことができる任意のベクター（例えば、プラスミドまたはウイルス）であり得る。ベクターの選択は、典型的には、ベクターとベクターを導入する宿主細胞との適合性に依存するであろう。ベクターは、線状プラスミドまたは閉じた環状プラスミドであり得る。

【0116】

いくつかの実施形態では、発現ベクターは、その複製が染色体複製から独立している自己複製ベクター（すなわち、染色体外実体として存在するベクター）（例えば、プラスミド、染色体外エレメント、ミニ染色体、または人工染色体）である。ベクターは、自己複製を保証する任意の手段を含むことができる。いくつかの代替的な実施形態では、ベクターは、宿主細胞に導入された場合にゲノムに組み込まれ、既に組み込まれている染色体と共に複製されるベクターであり得る。さらに、単一のベクターまたはプラスミドまたは宿主細胞のゲノムに導入されるべきDNAの全てを共に含む2つまたはそれを超えるベクターまたはプラスミド、またはトランスポゾンを使用することができる。

40

【0117】

いくつかの実施形態では、発現ベクターは、形質転換した細胞を容易に選択することができる1つまたはそれを超える選択マーカーを含むことが好ましい。「選択マーカー」は、その産物が殺生物剤耐性またはウイルス耐性、重金属に対する耐性、および栄養素要求体に対する原栄養性などを提供する遺伝子である。酵母宿主細胞に適切なマーカーには、

50

ADE2、HIS3、LEU2、LYS2、MET3、TRP1、およびURA3が含まれるが、これらに限定されない。糸状菌宿主細胞で用いる選択マーカーには、amdS（アセトアミダーゼ）、argB（オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ）、bar（ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ）、hph（ハイグロマイシンホストランスフェラーゼ）、niaD（硝酸レダクターゼ）、pyrG（オロチジン5'-リン酸デカルボキシラーゼ）、sC（硫酸アデニルトランスフェラーゼ）、およびtrpC（アントラニル酸シンターゼ）、ならびにその等価物が含まれるが、これらに限定されない。別の態様では、本発明は、少なくとも1つの本出願の操作されたGLAポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞であって、このポリヌクレオチドが宿主細胞中で操作されたGLA酵素の発現のための1つまたはそれを超える調節配列に作動可能に連結されている、宿主細胞を提供する。本発明の発現ベクターによってコードされたポリペプチドの発現で用いる宿主細胞は、当該分野で周知であり、真菌細胞、例えば酵母細胞（例えば、*Saccharomyces cerevisiae*細胞および*Pichia pastoris*細胞〔例えば、ATCCアクセッション番号201178〕）；昆虫細胞（例えば、*Drosophila* S2細胞および*Spodoptera Sf9*細胞）、植物細胞、動物細胞（例えば、CHO、COSおよびBHK）およびヒト細胞（例えば、HEK293T、ヒト線維芽細胞、THP-1、JurkatおよびBowes黒色腫細胞株）である。

10

【0118】

したがって、別の態様では、本発明は、操作されたGLAポリペプチドを生成するための方法であって、ポリペプチドの発現に適切な条件下で、操作されたGLAポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを発現することができる宿主細胞を培養する工程を含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、該方法は、本明細書中に記載のGLAポリペプチドを単離および／または精製する工程をさらに含む。

20

【0119】

上記宿主細胞の適切な培養培地および成長条件は当該分野で周知である。GLAポリペプチド発現のためのポリヌクレオチドを、当該分野で公知の種々の方法によって細胞に導入することができる。技術には、とりわけ、エレクトロポレーション、遺伝子銃粒子衝突、リポソーム媒介トランスフェクション、塩化カルシウムトランスフェクション、およびプロトプラスト融合が含まれる。

30

【0120】

本明細書中に開示の特性を有する操作されたGLAは、天然に存在するまたは操作されたGLAポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを、当該分野で公知のおよび本明細書中に記載の変異誘発法および／または指向進化法に供することによって得ることができる。例示的な指向進化技術は、変異誘発および／またはDNAシャッフリングである（例えば、Stemmer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:10747-10751 [1994]；WO95/22625；WO97/0078；WO97/35966；WO98/27230；WO00/42651；WO01/75767および米国特許第6,537,746号を参照のこと）。使用され得る他の指向進化手順には、とりわけ、スタaggeredエクステンションプロセス（staggered extension process）（StEP）、インビトロ組換え（例えば、Zhaoら、Nat. Biotechnol., 16:258-261 [1998]を参照のこと）、変異誘発PCR（例えば、Caldwellら、PCR Methods Appl., 3:S136-S140 [1994]を参照のこと）、およびカセット変異誘発（例えば、Blackら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:3525-3529 [1996]を参照のこと）が含まれる。

40

【0121】

例えば、変異誘発法および指向進化法を、発現、スクリーニング、およびアッセイが可能なバリエーションライブラリーを生成するために、ポリヌクレオチドに容易に適用することができる。変異誘発法および指向進化法は当該分野で周知である（例えば、米国特許第5

50

， 605， 793号、同第5， 811， 238号、同第5， 830， 721号、同第5， 834， 252号、同第5， 837， 458号、同第5， 928， 905号、同第6， 096， 548号、同第6， 117， 679号、同第6， 132， 970号、同第6， 165， 793号、同第6， 180， 406号、同第6， 251， 674号、同第6， 277， 638号、同第6， 287， 861号、同第6， 287， 862号、同第6， 291， 242号、同第6， 297， 053号、同第6， 303， 344号、同第6， 309， 883号、同第6， 319， 713号、同第6， 319， 714号、同第6， 323， 030号、同第6， 326， 204号、同第6， 335， 160号、同第6， 335， 198号、同第6， 344， 356号、同第6， 352， 859号、同第6， 355， 484号、同第6， 358， 740号、同第6， 358， 742号、同第6， 365， 377号、同第6， 365， 408号、同第6， 368， 861号、同第6， 372， 497号、同第6， 376， 246号、同第6， 379， 964号、同第6， 387， 702号、同第6， 391， 552号、同第6， 391， 640号、同第6， 395， 547号、同第6， 406， 855号、同第6， 406， 910号、同第6， 413， 745号、同第6， 413， 774号、同第6， 420， 175号、同第6， 423， 542号、同第6， 426， 224号、同第6， 436， 675号、同第6， 444， 468号、同第6， 455， 253号、同第6， 479， 652号、同第6， 482， 647号、同第6， 489， 146号、同第6， 506， 602号、同第6， 506， 603号、同第6， 519， 065号、同第6， 521， 453号、同第6， 528， 311号、同第6， 537， 746号、同第6， 573， 098号、同第6， 576， 467号、同第6， 579， 678号、同第6， 586， 182号、同第6， 602， 986号、同第6， 613， 514号、同第6， 653， 072号、同第6， 716， 631号、同第6， 946， 296号、同第6， 961， 664号、同第6， 995， 017号、同第7， 024， 312号、同第7， 058， 515号、同第7， 105， 297号、同第7， 148， 054号、同第7， 288， 375号、同第7， 421， 347号、同第7， 430， 477号、同第7， 534， 564号、同第7， 620， 500号、同第7， 620， 502号、同第7， 629， 170号、同第7， 702， 464号、同第7， 747， 391号、同第7， 747， 393号、同第7， 751， 986号、同第7， 776， 598号、同第7， 783， 428号、同第7， 795， 030号、同第7， 853， 410号、同第7， 868， 138号、同第7， 873， 499号、同第7， 904， 249号、および同第7， 957， 912号、同第8， 383， 346号、同第8， 504， 498号、同第8， 849， 575号、同第8， 876， 066号、同第8， 768， 871号ならびに全ての関連する非米国対応物； Lingら、Anal. Biochem.， 254（2）：157-78 [1997]； Daleら、Meth. Mol. Biol.， 57：369-74 [1996]； Smith， Ann. Rev. Genet.， 19：423-462 [1985]； Botsteinら、Science， 229：1193-1201 [1985]； Carter， Biochem. J.， 237：1-7 [1986]； Kramerら、Cell， 38：879-887 [1984]； Wellsら、Gene， 34：315-323 [1985]； Minshullら、Curr. Op. Chem. Biol.， 3：284-290 [1999]； Christiansら、Nat. Biotechnol.， 17：259-264 [1999]； Cramer iら、Nature， 391：288-291 [1998]； Cramer i， ら、Nat. Biotechnol.， 15：436-438 [1997]； Zhangら、Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.， 94：4504-4509 [1997]； Cramer iら、Nat. Biotechnol.， 14：315-319 [1996]； Stemmer， Nature， 370：389-391 [1994]； Stemmer， Proc. Nat. Acad. Sci. USA， 91：10747-10751 [1994]； 米国特許出願公開第2008/0220990号、米国特許出願公開第2009/0312196号、米国特許出願公開第2014/0005057号、米国特許出願公開第2014/0214391号、米国特許出願公開第2014/0221216号； 米国特許

出願公開第2015/0050658号、米国特許出願公開第2015/0133307号、米国特許出願公開第2015/0134315号ならびに全ての関連する非米国対応物；WO95/22625号、WO97/0078号、WO97/35966号、WO98/27230号、WO00/42651号、WO01/75767号、およびWO2009/152336号（その全てが本明細書中で参照によって組み込まれる）を参照のこと）。

【0122】

いくつかの実施形態では、変異誘発処理後に得られた酵素バリエーションを規定の温度（または他のアッセイ条件）に供し、熱処理または他のアッセイ条件後に残存する酵素活性の量を測定することによってスクリーニングされる。次いで、GLAポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むDNAは、宿主細胞から単離され、配列決定されてヌクレオチド配列変化（存在する場合）が同定され、異なるまたは同じ宿主細胞において酵素を発現させるために使用される。発現ライブラリーからの酵素活性の測定は、当該分野で公知の任意の適切な方法（例えば、HPLC分析などの標準的な生化学技術）を使用して実施され得る。

10

【0123】

配列が既知の操作されたポリペプチドについては、酵素をコードするポリヌクレオチドを、公知の合成方法にしたがった標準的な固相法によって調製することができる。いくつかの実施形態では、約100塩基までのフラグメントを、個別に合成し、次いで、接合して（例えば、酵素学的もしくは化学的なライゲーション（*l i t i g a t i o n*）法、またはポリメラーゼ媒介法による）、任意の所望の連続配列を形成することができる。例えば、本明細書中に開示のポリヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチドを、自動化合成法で典型的に実施される古典的なホスホルアミダイト法（例えば、Beaucageら、*Tet r a . L e t t .* , 22:1859-69 [1981]；およびMatthesら、*EM B O J .* , 3:801-05 [1984]を参照のこと）を使用した化学合成によって調製することができる。ホスホルアミダイト法によれば、オリゴヌクレオチドを（例えば、自動DNA合成機で）合成し、精製し、アニーリングし、ライゲーションし、適切なベクター中にクローニングする。

20

【0124】

したがって、いくつかの実施形態では、操作されたGLAポリペプチドを調製するための方法は、（a）表2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、および／または6.1に提供した任意のバリエーションのアミノ酸配列ならびに配列番号10、13、15、18、21、および／または24から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを合成する工程、ならびに（b）ポリヌクレオチドによってコードされるGLAポリペプチドを発現させる工程を含み得る。方法のいくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列は、任意選択的に1つまたは数個の（例えば、3、4、5まで、または10までの）アミノ酸残基の欠失、挿入、および／または置換を有することができる。いくつかの実施形態では、アミノ酸配列は、任意選択的に、1～2、1～3、1～4、1～5、1～6、1～7、1～8、1～9、1～10、1～15、1～20、1～21、1～22、1～23、1～24、1～25、1～30、1～35、1～40、1～45、または1～50個のアミノ酸残基の欠失、挿入、および／または置換を有する。いくつかの実施形態では、アミノ酸配列は、任意選択的に、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、30、35、40、45、または50個のアミノ酸残基の欠失、挿入、および／または置換を有する。いくつかの実施形態では、アミノ酸配列は、任意選択的に、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、18、20、21、22、23、24、または25個のアミノ酸残基の欠失、挿入、および／または置換を有する。いくつかの実施形態では、置換は、保存的置換または非保存的置換であり得る。

30

40

【0125】

50

発現された操作されたG L Aポリペプチドは、当該分野で公知の任意の適切なアッセイ（本明細書中に記載のアッセイおよび条件が含まれるが、これらに限定されない）を使用して、任意の所望の改良された性質（例えば、活性、選択性、安定性、酸耐性、プロテアーゼ感受性など）について評価され得る。

【0126】

いくつかの実施形態では、宿主細胞において発現された操作されたG L Aポリペプチドのいずれかは、周知のタンパク質精製技術（とりわけ、リゾチーム処理、超音波処理、ろ過、塩析、超遠心分離、およびクロマトグラフィが含まれる）のいずれか1つまたはそれを超えるものを使用して、細胞および／または培養培地から回収される。

【0127】

G L Aポリペプチドの単離のためのクロマトグラフィ技術には、とりわけ、逆相クロマトグラフィ、高速液体クロマトグラフィ、イオン交換クロマトグラフィ、疎水性相互作用クロマトグラフィ、ゲル電気泳動、およびアフィニティークロマトグラフィが含まれる。特定の酵素を精製するための条件は、正味電荷、疎水性、親水性、分子量、分子形状などの要因に部分的に依存し、当業者には明らかであろう。いくつかの実施形態では、親和性技術は、改良されたバリエーションG L A酵素を単離するために使用され得る。アフィニティークロマトグラフィ精製を利用するいくつかの実施形態では、バリエーションG L Aポリペプチドに特異的に結合する任意の抗体が使用される。アフィニティークロマトグラフィ精製を利用するいくつかの実施形態では、G L Aに共有結合されているグリカンに結合するタンパク質が使用される。アフィニティークロマトグラフィ精製を利用するまた他の実施形態では、G L A活性部位に結合する任意の小分子が使用される。抗体の生成のために、種々の宿主動物（ウサギ、マウス、ラットなどが含まれるが、これらに限定されない）は、G L Aポリペプチド（例えば、G L Aバリエーション）またはそのフラグメントの注射によって免疫化される。いくつかの実施形態では、G L Aポリペプチドまたはフラグメントは、側鎖官能基または側鎖官能基に結合されているリンカーによって、B S Aなどの適切なキャリアに結合される。

【0128】

いくつかの実施形態では、操作されたG L Aポリペプチドは、操作されたG L Aポリペプチドの産生を促す条件下で、本明細書中に記載の操作されたG L Aポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞（例えば、*S. cerevisiae*、*Daucus carota*、*Nicotiana tabacum*、*H. sapiens*（例えば、HEK293T）、または*Cricetulus griseus*（例えば、CHO））を培養する工程、ならびに細胞および／または培養培地から操作されたG L Aポリペプチドを回収する工程を含む方法によって、宿主細胞において産生される。

【0129】

いくつかの実施形態では、本発明は、操作されたG L Aポリペプチドを生成する方法であって、配列番号5および／または10のアミノ酸配列と最適にアラインメントした場合に、配列番号5および／もしくは10の参照配列と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性、表2.1、2.2、2.4、2.5、および／もしくは6.1に提供したものから選択される配列番号5および／もしくは10と比較した場合に1つもしくはそれを超えるアミノ酸残基の相違、ならびに／またはそれらの組み合わせを有する操作されたG L Aポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む組換え真核細胞を、操作されたG L Aポリペプチドの産生を可能にするための適切な培養条件下で培養する工程、ならびに任意選択的に、培養物および／または培養細菌細胞から操作されたG L Aポリペプチドを回収する工程を含む方法を包含する。

【0130】

いくつかの実施形態では、組換え宿主細胞または細胞培養培地から操作されたG L Aポリペプチドが回収されたら、それらは、当該分野で公知の任意の適切な方法によってさらに精製される。いくつかのさらなる実施形態では、異なる適用および使用（例えば、医薬

組成物)に適切な操作されたG L Aポリペプチドを含む組成物および製剤を提供するために、精製されたG L Aポリペプチドは、他の成分および化合物と組み合わせられる。いくつかのさらなる実施形態では、精製されたG L Aポリペプチドまたは製剤化されたG L Aポリペプチドは、凍結乾燥される。

【0131】

組成物：

本発明は、種々の組成物およびフォーマット（下記のものが含まれるが、これらに限定されない）を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、医薬組成物および他の組成物（例えば、食事／栄養サプリメント）に使用するのに適切な操作されたG L Aポリペプチドを提供する。

10

【0132】

投与様式に応じて、治療有効量の本発明の操作されたG L Aを含むこれらの組成物は、固体、半固体または液体の形態である。いくつかの実施形態では、組成物は、希釈剤、緩衝液、賦形剤、塩、乳化剤、保存剤、安定剤、充填剤、および他の成分などの他の薬学的に許容され得る成分を含む。製剤化および投与のための技術の詳細は当該分野で周知であり、文献に記載されている。

【0133】

いくつかの実施形態では、操作されたG L Aポリペプチドは、医薬組成物における使用のために製剤化される。操作されたG L Aポリペプチドの送達に使用するための任意の適切なフォーマット（丸剤、錠剤、ゲルタブ（g e l t a b）、カプセル、ロゼンジ、糖衣錠、粉末、ソフトゲル、ゾルゲル、ゲル、エマルジョン、インプラント、パッチ、スプレー、軟膏、リニメント、クリーム、ペースト、ゼリー、ペイント、エアロゾル、チューインガム、粘滑剤、スティック、溶液、懸濁液（油性懸濁液、水中油型エマルジョンなどが含まれるが、これらに限定されない）、スラリー、シロップ、制御放出製剤、坐剤などが含まれるが、これらに限定されない）が、本発明において使用される。いくつかの実施形態では、操作されたG L Aポリペプチドは、注射または注入に適切なフォーマット（すなわち、注射可能な製剤）で提供される。いくつかの実施形態では、操作されたG L Aポリペプチドは、シリカ系（例えば、オキシシラン）ゾルゲルを含むゾルゲルなどの生体適合性マトリックスで提供される。いくつかの実施形態では、操作されたG L Aポリペプチドは、カプセル化される。いくつかの代替的な実施形態では、操作されたG L Aポリペプチドは、ナノ構造物（例えば、ナノチューブ（n a n o t u b e）、ナノチューブ（n a n o t u b u l e）、ナノカプセル、またはマイクロカプセル、マイクロスフェア、リポソームなど）中にカプセル化される。実際、本発明は、任意の特定の送達製剤および／または送達手段に限定されることを意図しない。操作されたG L Aポリペプチドは、当該分野で公知の任意の適切な手段（非経口、経口、局所、経皮、鼻腔内、眼内、髄腔内、インプラントによるなどを含むが、これらに限定されない）によって投与されることを意図する。

20

30

【0134】

いくつかの実施形態では、操作されたG L Aポリペプチドは、グリコシル化、化学架橋試薬、ペグ化（すなわち、ポリエチレングリコール [P E G] または活性化P E Gなどによる改変）または他の化合物（例えば、I k e d a, A m i n o A c i d s 29:283-287 [2005]；米国特許第7, 531, 341号、同第7, 534, 595号、同第7, 560, 263号、および同第7, 53, 653号；米国特許出願公開第2013/0039898号、米国特許出願公開第2012/0177722号などを参照のこと）によって化学的に改変される。実際、本発明は、任意の特定の送達方法および／または機構に限定されることを意図しない。

40

【0135】

いくつかのさらなる実施形態では、操作されたG L Aポリペプチドは、マトリックス安定化酵素結晶を含む製剤で提供される。いくつかの実施形態では、製剤は、操作された架橋結晶G L A酵素と、酵素結晶に付着する反応性部分を有するポリマーとを含む。本発明

50

はまた、ポリマーの操作されたG L Aポリペプチドを提供する。

【0136】

いくつかの実施形態では、本発明の操作されたG L Aポリペプチドを含む組成物は、1つまたはそれを超える一般的に使用されるキャリア化合物（糖（例えば、ラクトース、スクロース、マンニトールおよび／またはソルビトール）、デンプン（例えば、トウモロコシ、小麦、米、ジャガイモまたは他の植物デンプン）、セルロース（例えば、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム）、ゴム（例えば、アラビア、トラガカント、グアーなど）および／またはタンパク質（例えば、ゼラチン、コラーゲンなど）が含まれるが、これらに限定されない）を含む。

【0137】

いくつかの実施形態では、本発明は、血液、脳脊髄液などの流体中の糖脂質の濃度を減少させるのに使用するために適切な操作されたG L Aポリペプチドを提供する。操作されたG L Aポリペプチドの投与量は、状態または疾患、被験体の全身状態、および当業者に公知の他の要因に依存する。いくつかの実施形態では、組成物は、単回投与または複数回投与のためのものである。いくつかの実施形態では、ファブリー病を有するヒトに投与される組成物中の操作されたG L Aポリペプチドの濃度は、疾患（例えば、ファブリー病）を有効に処置および／または改善するのに十分であると考えられる。いくつかの実施形態では、操作されたG L Aポリペプチドは、他の医薬組成物および／または食事用組成物と組み合わせて投与される。

【実施例】

【0138】

実験

以下の実施例（達成された実験および結果が含まれる）を、例示のみを目的として提供し、この実施例は、本発明を制限すると解釈されない。

【0139】

以下に開示の実験では、以下の略語を適用する：p p m（百万分率）；M（モル濃度）；m M（ミリモル濃度）、u Mおよびμ M（マイクロモル濃度）；n M（ナノモル濃度）；m o l（モル）；g mおよびg（グラム）；m g（ミリグラム）；u gおよびμ g（マイクログラム）；Lおよびl（リットル）；m lおよびm L（ミリリットル）；c m（センチメートル）；m m（ミリメートル）；u mおよびμ m（マイクロメートル）；s e c（秒）；m i n（分）；hおよびh r（時間）；U（単位）；M W（分子量）；r p m（毎分回転数）；℃（摂氏）；C D S（コード配列）；D N A（デオキシリボ核酸）；R N A（リボ核酸）；大腸菌W 3 1 1 0（一般的に使用される研究用大腸菌株，t h e C o l i G e n e t i c S t o c k C e n t e r [C G S C]，N e w H a v e n，C Tから利用可能）；H P L C（高圧液体クロマトグラフィ）；M W C O（分子量カットオフ）；S D S - P A G E（ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動）；P E S（ポリエーテルスルホン）；C F S E（カルボキシフルオレセインスクシニミジルエステル）；I P T G（イソプロピルβ-D-1-チオガラクトピラノシド）；P M B S（硫酸ポリミキシンB）；N A D P H（ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸）；G I D H（グルタミン酸デヒドロゲナーゼ）；F I O P C（ポジティブコントロールに対する改良の倍数）；P B M C（末梢血単核細胞）；L B（L u r i aブロス）；M e O H（メタノール）；A t h e n s R e s e a r c h（A t h e n s R e s e a r c h T e c h n o l o g y，A t h e n s，G A）；P r o S p e c（P r o S p e c T a n y T e c h n o g e n e，E a s t B r u n s w i c k，N J）；S i g m a - A l d r i c h（S i g m a - A l d r i c h，S t. L o u i s，M O）；R a m S c i e n t i f i c（R a m S c i e n t i f i c，I n c.，Y o n k e r s，N Y）；P a l l C o r p.（P a l l，C o r p.，P t. W a s h i n g t o n，N Y）；M i l l i p o r e（M i l l i p o r e，C o r p.，B i l l e r i c a M A）；D i f c o（D i f c o L a b o r a t o r i e s，B D D i a g n o s t i c S y s t e m s，D e t r o i t，M I）；M o l e c u l a r D e v i c e

s (Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, CA) ; Kuhner (Adolf Kuhner, AG, Basel, Switzerland) ; Axygen (Axygen, Inc., Union City, CA) ; Toronto Research Chemicals (Toronto Research Chemicals Inc., Toronto, Ontario, Canada) ; Cambridge Isotope Laboratories, (Cambridge Isotope Laboratories, Inc., Tewksbury, MA) ; Applied Biosystems (Applied Biosystems, part of Life Technologies, Corp., Grand Island, NY) 、Agilent (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA) ; Thermo Scientific (part of Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) ; Corning (Corning, Inc., Palo Alto, CA) ; Megazyme (Megazyme International, Wicklow, Ireland) ; Enzo (Enzo Life Sciences, Inc., Farmingdale, NY) ; GE Healthcare (GE Healthcare Bio-Sciences, Piscataway, NJ) ; Pierce (Pierce Biotechnology (now part of Thermo Fisher Scientific), Rockford, IL) ; LI-COR (LI-COR Biotechnology, Lincoln, NE) ; Amicus (Amicus Therapeutics, Cranbury, NJ) ; Phenomenex (Phenomenex, Inc., Torrance, CA) ; Optimal (Optimal Biotech Group, Belmont, CA) ; および Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) 。

10

20

【0140】

以下のポリヌクレオチドおよびポリペプチド配列が本発明において使用される。(以下に示されているように)いくつかの場合では、ポリヌクレオチド配列の後に、コードされるポリペプチドが続く。

【化1】

30

完全長ヒトGLA cDNAのポリヌクレオチド配列(配列番号1):

ATGCAGCTGAGGAACCCAGAACTACATCTGGGCTGCGCGCTTGCGCTTCGCTTCCTGGCC
CTCGTTTCCTGGGACATCCCTGGGGCTAGAGCACTGGACAATGGATTGGCAAGGACGCCT
ACCATGGGCTGGCTGCACTGGGAGCGCTTCATGTGCAACCTTGACTGCCAGGAAGAGCC
AGATTCCTGCATCAGTGAGAAGCTCTTCATGGAGATGGCAGAGCTCATGGTCTCAGAAG
GCTGGAAGGATGCAGGTTATGAGTACCTCTGCATTGATGACTGTTGGATGGCTCCCCAAA
GAGATTCAGAAGGCAGACTTCAGGCAGACCCTCAGCGCTTTCCTCATGGGATTCGCCAGC
TAGCTAATTATGTTACAGCAAAGGACTGAAGCTAGGGATTTATGCAGATGTTGGAAAT
AAAACCTGCGCAGGCTTCCCTGGGAGTTTTGGATACTACGACATTGATGCCCAGACCTTT
GCTGACTGGGGAGTAGATCTGCTAAAATTTGATGGTTGTTACTGTGACAGTTTGGAAAAT
TTGGCAGATGGTTATAAGCACATGTCCTTGGCCCTGAATAGGACTGGCAGAAGCATTGTG
TACTCCTGTGAGTGGCCTCTTTATATGTGGCCCTTTCAAAAGCCCAATTATACAGAAATC
CGACAGTACTGCAATCACTGGCGAAATTTTGCTGACATTGATGATTCCTGGAAAAGTATA
AAGAGTATCTTGGACTGGACATCTTTTAACCAGGAGAGAATTGTTGATGTTGCTGGACCA

40

【化 2】

GGGGGTTGGAATGACCCAGATATGTTAGTGATTGGCAACTTTGGCCTCAGCTGGAATCAG
CAAGTAACTCAGATGGCCCTCTGGGCTATCATGGCTGCTCCTTTATTCATGTCTAATGACC
TCCGACACATCAGCCCTCAAGCCAAAGCTCTCCTTCAGGATAAGGACGTAATTGCCATCA
ATCAGGACCCCTTGGGCAAGCAAGGGTACCAGCTTAGACAGGGAGACAACTTTGAAGTG
TGGGAACGACCTCTCTCAGGCTTAGCCTGGGCTGTAGCTATGATAAACCGGCAGGAGATT
GGTGGACCTCGCTCTTATACCATCGCAGTTGCTTCCCTGGGTAAAGGAGTGGCCTGTAAT
CCTGCCTGCTTCATCACACAGCTCCTCCCTGTGAAAAGGAAGCTAGGGTTCTATGAATGG
ACTTCAAGGTTAAGAAGTCACATAAATCCCACAGGCACTGTTTTGCTTCAGCTAGAAAAT
ACAATGCAGATGTCATTAAAAGACTTACTTTAG (配列番号 1)

10

完全長ヒトGLAのポリペプチド配列:

MQLRNPELHLGCALALRFLALVSWDIPGARALDNGLARTPTMGWLHWERFMCNLDCQEEP
DSCISEKLFMEMAELMVSEGWKDAGYEYLCIDDCWMAPQRDSEGRQLQADPQRFPHGIRQLA
NYVHSGKLGKLGIVADVGNKTCAGFPGSFGYYDIDAQTFADWGVDLLKFDGICYCDSLENLAD
GYKHMSLALNRTGRSIVYSCEWPLYMWPFOKPNYTEIRQYCNHWRNFADIDDSWKSILSD
WTSFNQERIVDVAGPGGWNDPDMLVIGNFGLSWNQVQTQMALWAIMAAPLFMSNDLRHIS
PQAKALLQDKDVIAINQDPLGKQGYQLRQGDNFEVWERPLSGLAWAVAMINRQEIGGPRSY
TIAVASLGKGVACNPACFITQLLPVKRKLGFYEWTSRLRSHINPTGTVLLQLENTMQMSLKD
LL (配列番号 2)

成熟酵母コドン最適化(yCDS)ヒトGLAのポリヌクレオチド配列:

20

TTGGATAACGGGTTAGCCCGTACACCTACTATGGGTTGGCTTCACTGGGAAAGATTCATG
TGTAACCTTAGATTGCCAAGAAGAGCCTGACAGCTGTATCTCAGAGAACTATTCATGGA
GATGGCTGAACTAATGGTAAGTGAAGGATGGAAGGATGCTGGTTATGAATACCTATGTA
TTGATGATTGCTGGATGGCTCCACAGCGTGATTGAGAAGGTAGGTTACAAGCTGACCCCC
AGAGATTCCCACATGGCATAACGTCAGCTTGCAAACTACGTACACAGCAAGGGTCTAAAG
TTAGGCATCTACGCTGATGTCGGAAACAAGACATGTGCTGGTTTCCCAGGTTCAATCGGT
TACTATGACATAGATGCGCAGACGTTTGCTGATTGGGGTGTTGATTTGTTGAAGTTTGAT
GGATGCTACTGCGATTCCCTGGAGAACCTAGCCGATGGGTACAAACACATGAGTTTGGCT
CTAAACAGGACTGGTAGGAGCATCGTCTATAGTTGTGAATGGCCCTTGACATGTGGCCG
TTTCAGAAGCCAACTACACTGAGATAAGACAATACTGTAACCATTTGGCGTAACCTTGCT
GACATAGATGATTCATGGAAGTCAATCAAATCTATCTTGGATTGGACTTCTTTCAACCAG
GAAAGAATTGTTGATGTTGCAGGTCCAGGTGGATGGAATGACCCTGATATGCTTGTGATA
GGGAACTTTGGGCTATCATGGAATCAACAAGTTACACAAATGGCTTTGTGGGCGATCATG
GCCGCACCCCTATTCATGTCTAATGATCTACGTCACATATCACCCCAAGCAAAGGCTTTA
CTTCAAGATAAGGATGTCATAGCGATCAACCAAGATCCTCTTGGTAAACAAGGTTATCAA
TTGAGACAAGGTGACAACTTTGAAGTGTGGGAAAGACCATTGTCTGGACTTGCGTGGGC
TGTTGCTATGATCAACCGTCAAGAGATCGGAGGGCCAAGATCTTACACTATCGCGGTAGC
CTCTTTGGGTAAGGGTGTGCGTGCAATCCTGCCTGCTTCATTACACAATTGCTTCCAGTT
AAGAGAAAGTTGGGTTTCTATGAGTGGACATCTAGGCTAAGAAGTCACATCAATCCTACT
GGTACGGTATTGTTGCAATTGGAGAACACAATGCAAATGTCTTTGAAAGATTTGTGA
(配列番号 3)

30

成熟ヒトGLAのポリヌクレオチド配列(天然hCDS):

40

CTGGACAATGGATTGGCAAGGACGCCTACCATGGGCTGGCTGCACTGGGAGCGCTTCAT
GTGCAACCTTGACTGCCAGGAAGAGCCAGATTCCTGCATCAGTGAGAAGCTCTTCATGG
AGATGGCAGAGCTCATGGTCTCAGAAGGCTGGAAGGATGCAGGTTATGAGTACCTCTGC
ATTGATGACTGTTGGATGGCTCCCCAAAGAGATTCAGAAGGCAGACTTCAGGCAGACCC
TCAGCGCTTTCCTCATGGGATTCGCCAGCTAGCTAATTATGTTACAGCAAAGGACTGAA
GCTAGGGATTTATGCAGATGTTGGAAATAAAACCTGCGCAGGCTTCCCTGGGAGTTTTGG
ATACTACGACATTGATGCCAGACCTTTGCTGACTGGGGAGTAGATCTGCTAAAATTTGA

【化 3】

TGGTTGTTACTGTGACAGTTTGGAAAATTTGGCAGATGGTTATAAGCACATGTCCTTGGC
CCTGAATAGGACTGGCAGAAGCATTGTGTACTCCTGTGAGTGGCCTCTTTATATGTGGCC
CTTTCAAAGCCCAATTATACAGAAATCCGACAGTACTGCAATCACTGGCGAAATTTTGC
TGACATTGATGATTCCTGGAAAAGTATAAAGAGTATCTTGGACTGGACATCTTTTAACCA
GGAGAGAATTGTTGATGTTGCTGGACCAGGGGGTGGAAATGACCCAGATATGTTAGTGA
TTGGCAACTTTGGCCTCAGCTGGAATCAGCAAGTAACTCAGATGGCCCTCTGGGCTATCA
TGGCTGCTCCTTTATTCATGTCTAATGACCTCCGACACATCAGCCCTCAAGCCAAAGCTCT
CCTTCAGGATAAAGGACGTAATTGCCATCAATCAGGACCCCTTGGGCAAGCAAGGGTACC
AGCTTAGACAGGGAGACAACCTTGAAGTGTGGGAACGACCTCTCTCAGGCTTAGCCTGG
GCTGTAGCTATGATAAACCAGGAGATTGGTGGACCTCGCTCTTATACCATCGCAGTT
GCTTCCCTGGGTAAAGGAGTGGCCTGTAATCCTGCCTGCTTCATCACACAGCTCCTCCCT
GTGAAAAGGAAGCTAGGGTTCTATGAATGGACTTCAAGGTTAAGAAGTCACATAAATCC
CACAGGCACTGTTTTGCTTCAGCTAGAAAATACAATGCAGATGTCATTAAAAGACTTACT
T (配列番号 4)

10

成熟ヒトGLAのポリペプチド配列(配列番号5):

LDNGLARTPTMGWLHWERFMCNLDQCPEPDCISEKLFMEMAELMVSEGWKDAGYEYLCI
DDCWMAQRDSEGRQLQADPQRFPHGIRQLANYVHSGKLGKLYADVGNKTCAGFPGSFYGY
DIDAQTFADWGVDLLKFDGVCDSLENLADGYKHMSLALNRTGRSIVYSCEWPLYMWPFG
KPNYTEIRQYCNHWRNFADIDDSWKSISILDWTSFNQERIVDVAGPGGWNDPMLVIGNFG
LSWNQQVTQMALWAIMAAPLFMSNDRHISPAKALLQDKDVIAINQDPLGKQGYQLRQG
DNFEVWERPLSGLAWAVAMINRQEIGGPRSYTIAVASLGKGVACNPACFITQLLPVKRKLGF
YEWTSRLRSHINPTGTVLLQLENTMQMSLKDLL (配列番号 5)

20

pCK110900i *E. coli* 発現ベクターのポリヌクレオチド配列:

TCGAGTTAATTAAGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGC
ACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATA
ACAATTTACACAGGAAACGGCTATGACCATGATTACGGATTCACTGGCCGTCGTTTTAC
AATCTAGAGGCCAGCCTGGCCATAAGGAGATATACATATGAGTATTCAACATTTCCGTGT
CGCCCTTATTCCTTTTTCTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGTCTACCCAGAAACGCTG
GTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGA
TCTCAACAGCGGTAAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAGCGTTTTCCAATGATGAG
CACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTGTGACGCCGGCAAGAGCA
ACTCGGTCGCCGACATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTACAGAG
AAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGA
GTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACC
GTTTTTTTGCACACCATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTG
AATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTACAGCAATGGCAACAAC
GTTGCGCAAACCTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGA
CTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTG
GTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACT
GGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAA
CTATGGATGAACGTAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGG
GGCCAAACTGGCCACCATCACCATCACCATTAGGGAAGAGCAGATGGGCAAGCTTGACC
TGTGAAGTGAAAAATGGCGCACATTGTGCGACATTTTTTTTTTGAATTCTACGTAAAAAGC
CGCCGATACATCGGCTGCTTTTTTTTTTGATAGAGGTTCAAACCTTGTGGTATAATGAAATA
AGATCACTCCGGGGCGTATTTTTTTGAGTTATCGAGATTTTCAGGAGCTAAGGAAGCTAAA
ATGGAGAAAAAAATCACTGGATATACCACCGTTGATATATCCCAATGGCATCGTAAAGA
ACATTTTGAGGCATTTTCAGTCAGTTGCTCAATGTACCTATAACCAGACCGTTTCAGCTGGA
TATTACGGCCTTTTTTAAAGACCGTAAAGAAAAATAAGCACAAAGTTTTATCCGGCCTTTAT
TCACATTCTTGCCCGCCTGATGAATGCTCATCCGAGTTCCGTATGGCAATGAAAGACGG
TGAGCTGGTGATATGGGATAGTGTTACCCCTTGTTACACCGTTTTCCATGAGCAAACCTGA

30

40

【化 4】

AACGTTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATA
TTCGCAAGATGTGGCGTGTTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGA
GAATATGTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTCACCAGTTTTGATTTAAACGTG
GCCAATATGGACAACTTCTTCGCCCCCGTTTTTCACCATGGGCAAATATTATACGCAAGGC
GACAAGGTGCTGATGCCGCTGGCGATTTCAGGTTTCATCATGCCGTCTGTGATGGCTTCCAT
GTCGGCAGAATGCTTAATGAATTACAACAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGGCGTA
ACTGCAGGAGCTCAAACAGCAGCCTGTATTTCAGGCTGCTTTTTTCGTTTTGGTCTGCGCGT
AATCTCTTGCTCTGAAAACGAAAAAACCGCCTTGCAGGGCGGTTTTTCGAAGGTTCTCTG
AGCTACCAACTCTTTGAACCGAGGTAAGTGGCTTGGAGGAGCGCAGTCACCAAAACTTG
TCCTTTCAGTTTAGCCTTAACCGGCGCATGACTTCAAGACTAACTCCTCTAAATCAATTAC
CAGTGGCTGCTGCCAGTGGTGGCTTTTGCATGTCTTTCCGGGTTGGACTCAAGACGATAGT
TACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGACTGAACGGGGGGTTTCGTGCATACAGTCCAGCTTG
GAGCGAACTGCCTACCCGGAAGTGAAGTGCAGGCGTGGAATGAGACAAACGCGGCCATA
ACAGCGGAATGACACCGGTAAACCGAAAGGCAGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCC
GCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTGCGGTTTTCGCCACCACTGATTTGA
GCGTCAGATTTTCGTGATGCTTGTGAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGGCTTTGCCG
CGGCCCTCTCACTTCCCTGTAAAGTATCTTCCCTGGCATCTTCCAGGAAATCTCCGCCCCGT
TCGTAAGCCATTTCCGCTCGCCGAGTCGAACGACCGAGCGTAGCGAGTCAGTGAGCGA
GGAAGCGGAATATATCCTGTATCACATATTCTGCTGACGCACCGGTGCAGCCTTTTTTCT
CCTGCCACATGAAGCACTTCACTGACACCCTCATCAGTGAACCACCGCTGGTAGCGGTGG
TTTTTTTAGGCCTATGGCCTTTTTTTTTTTGTGGGAAACCTTTCGCGGTATGGTATTAAAGC
GCCCCGAAGAGAGTCAATTCAGGGTGGTGAATGTGAAACCAGTAACGTTATACGATGTC
GCAGAGTATGCCGGTGTCTCTTATCAGACCGTTTTCCCGCGTGGTGAACCAGGCCAGCCAC
GTTTCTGCGAAAACGCGGGAAAAAGTGGAAGCGGCGATGGCGGAGCTGAATTACATTCC
CAACCGCGTGGCACAACAAGTGGCGGGCAAACAGTCGTTGCTGATTGGCGTTGCCACCT
CCAGTCTGGCCCTGCACGCGCCGTCGCAAATTGTCGCGGCGATTAAATCTCGCGCCGATC
AACTGGGTGCCAGCGTGGTGGTGTGATGGTAGAACGAAGCGGCGTCGAAGCCTGTAAA
GCGGCGGTGCACAATCTTCTCGCGCAACGCGTCAGTGGGCTGATCATTAACTATCCGCTG
GATGACCAGGATGCCATTGCTGTGGAAGCTGCCTGCACTAATGTTCCGGCGTTATTTCTT
GATGTCTCTGACCAGACACCCATCAACAGTATTATTTTCTCCCATGAAGACGGTACGCGA
CTGGGCGTGGAGCATCTGGTCGCATTGGGTACCAGCAAATCGCGCTGTTAGCGGGCCC
ATTAAGTTCTGTCTCGGCGCGTCTGCGTCTGGCTGGCTGGCATAAATATCTCACTCGCAA
TCAAATTCAGCCGATAGCGGAACGGGAAGGCGACTGGAGTGCCATGTCCGGTTTTCAAC
AAACCATGCAAATGCTGAATGAGGGCATCGTTTCCACTGCGATGCTGGTTGCCAACGATC
AGATGGCGCTGGGCGCAATGCGCGCCATTACCGAGTCCGGGCTGCGCGTTGGTGCGGAC
ATCTCGGTAGTGGGATACGACGATACCGAAGACAGCTCATGTTATATCCCGCCGTTAACC
ACCATCAAACAGGATTTTCGCCTGCTGGGGCAAACAGCGTGGACCGCTTGTGCAACTC
TCTCAGGGCCAGGCGGTTAAGGGCAATCAGCTGTTGCCCGTCTCACTGGTGAAAAGAAA
AACCACCCTGGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCAATTAAT
GCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGGTACCCGATAAAA
GCGGCTTCCTGACAGGAGGCCGTTTTGTTC (配列番号 6)

10

20

30

pYT-72Bgl分泌酵母発現ベクターのポリヌクレオチド配列:

TTGTACAAATATCATA
AAAAAAGAGAATCTTTTAAAGCAAGGATTTCTTAACTTCTTCGGCGACAGCATCACCGA
CTTCGGTGGTACTGTTGGAACCACTAAATCACCAGTTCTGATACCTGCATCCAAAACCT
TTTTAACTGCATCTTCAATGGCTTTACCTTCTTCAGGCAAGTTCAATGACAATTTCAACAT
CATTGCAGCAGACAAGATAGTGGCGATAGGGTTGACCTTATTCTTTGGCAAATCTGGAGC
GGAACCATGGCATGGTTCGTACAAACCAAATGCGGTGTTCTTGTCTGGCAAAGAGGCCA
AGGACGCAGATGGCAACAAACCAAGGAGCCTGGGATAACGGAGGCTTCATCGGAGAT
GATATCACCAACATGTTGCTGGTGAATTATAATACCATTTAGGTGGGTTGGGTTCTTAAC
TAGGATCATGGCGGCAGAATCAATCAATTGATGTTGAACTTTCAATGTAGGGAATTCGTT
CTTGATGGTTTTCTCCACAGTTTTTCTCCATAATCTTGAAGAGGCCAAAACATTAGCTTTA

40

【化 5】

TCCAAGGACCAAATAGGCAATGGTGGCTCATGTTGTAGGGCCATGAAAGCGGCCATTCT
TGTGATTCTTTGCACTTCTGGAACGGTGTATTGTTCACTATCCCAAGCGACACCATCACCA
TCGTCTTCTTTCTCTTACCAAAGTAAATACCTCCCACTAATTCTCTAACAACAACGAAGT
CAGTACCTTTAGCAAATTGTGGCTTGATTGGAGATAAGTCTAAAAGAGAGTCGGATGCA
AAGTTACATGGTCTTAAGTTGGCGTACAATTGAAGTTCTTTACGGATTTTATAGTAAACCTT
GTTCAGGTCTAACACTACCGGTACCCCATTTAGGACCACCCACAGCACCTAACAAAACG
GCATCAGCCTTTTTGGAGGCTTCCAGCGCCTCATTTGGAAGTGGAACACCTGTAGCATCG
ATAGCAGCCCCCAATTAAATGATTTTCGAAATCGAACTTGACATTGGAACGAACATCA
GAAATAGCTTTAAGAACCTTAATGGCTTCGGCTGTGATTTCTTGACCAACGTGGTCACCT
GGCAAAACGACGATTTTTTTAGGGGCAGACATTACAATGGTATATCCTTGAAATATATAT
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATGCAGCTTCTCAATGATATTGGAATAC
GCTTTGAGGAGATACAGCCTAATATCCGACAACTGTTTTACAGATTACGATCGTACTT
GTTACCCATCATTGAATTTTGAACATCCGAACCTGGGAGTTTTCCCTGAAACAGATAGTA
TATTTGAACCTGTATAATAATATATAGTCTAGCGCTTTACGGAAGACAATGTATGTATTT
CGGTTCTGGAGAACTATTGCATCTATTGCATAGGTAATCTTGACGTCGCATCCCCGG
TTCATTTTCTGCGTTTTCCATCTTGCACTTCAATAGCATATCTTTGTAAACGAAGCATCTGT
GCTTCATTTTGTAGAACAAAAATGCAACGCGAGAGCGCTAATTTTTCAAACAAAGAATCT
GAGCTGCATTTTACAGAACAGAAATGCAACGCGAAAGCGCTATTTTACCAACGAAGAA
TCTGTGCTTCATTTTTGTAAAAACAAAAATGCAACGCGAGAGCGCTAATTTTTCAAACAAA
GAATCTGAGCTGCATTTTACAGAACAGAAATGCAACGCGAGAGCGCTATTTTACCAAC
AAAGAATCTATACTTCTTTTTTGTCTACAAAAATGCATCCCGAGAGCGCTATTTTTCTAA
CAAAGCATCTTAGATTACTTTTTTCTCTTTGTGCGCTCTATAATGCAGTCTCTTGATAA
CTTTTTGCACTGTAGGTCCGTTAAGGTTAGAAGAAGGCTACTTTGGTGTCTATTTTCTCTT
CCATAAAAAAAGCCTGACTCCACTTCCCGCGTTTACTGATTACTAGCGAAGCTGCGGGTG
CATTTTTTCAAGATAAAGGCATCCCCGATTATATTCTATACCGATGTGGATTGCGCATACT
TTGTGAACAGAAAGTGATAGCGTTGATGATTCTTCATTGGTCAGAAAATTATGAACGGTT
TCTTCTATTTTGTCTCTATACTACGTATAGGAAATGTTTACATTTTCGTATTGTTTTCGA
TTCACTCTATGAATAGTTCTTACTACAATTTTTTGTCTAAAGAGTAATACTAGAGATAAA
CATAAAAAATGTAGAGGTGAGTTTAGATGCAAGTTCAAGGAGCGAAAGGTGGATGGGT
AGGTTATATAGGGATATAGCACAGAGATATATAGCAAAGAGATACTTTTGAGCAATGTT
TGTGGAAGCGGTATTGCAATATTTTAGTAGCTCGTTACAGTCCGGTGCGTTTTTGGTTTT
TTGAAAGTGCGTCTTCAGAGCGCTTTTGGTTTTCAAAGCGCTCTGAAGTTCCTATACTTT
CTAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAACTTCAAAGCGTTTTCCGAAAACGAGCGCTTCC
GAAAATGCAACGCGAGCTGCGCACATACAGCTCACTGTTACGTCGCACCTATATCTGCG
TGTTGCCTGTATATATATATACATGAGAAGAACGGCATAGTGCGTGTTTATGCTTAAATG
CGTACTTATATGCGTCTATTTATGTAGGATGAAAGGTAGTCTAGTACCTCCTGTGATATTA
TCCCATTCCATGCGGGGTATCGTATGCTTCTTCAGCACTACCTTTAGCTGTTCTATATG
CTGCCACTCCTCAATTGGATTAGTCTCATCCTTCAATGCTATCATTTCCTTTGATATTGGA
TCATATGCATAGTACCGAGAACTAGTGCGAAGTAGTGATCAGGTATTGCTGTTATCTGA
TGAGTATACGTTGTCTGGCCACGGCAGAAGCACGCTTATCGCTCCAATTTCCACACA
TTAGTCAACTCCGTTAGGCCCTTCATTGAAAGAAATGAGGTCATCAAATGTCTTCCAATG
TGAGATTTTGGGCCATTTTTTATAGCAAAGATTGAATAAGGCGCATTTTTCTTCAAAGCTT
TATTGTACGATCTGACTAAGTTATCTTTTAATAATTGGTATTCTGTTTATTGCTTGAAGA
ATTGCCGGTCTTACTACTCGTTTTTAGGACTGGTTCAGAAATTCCTCAAAAATTCATCCAAA
TATACAAGTGATCGATGATAAGCTGTCAAACATGAGAATTCTTGAAGACGAAAGGGCC
TCGTGATACGCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTTCTTAGACGTCAGG
TGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCA
AATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGG
AAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTGCGCCCTTATTCCTTTTTTGGCGCATTTTGCC
TTCCTGTTTTTGTCTACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGG
GTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTC
GCCCCGAAGAACGTTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTAT
TATCCCGTGTGTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATG
ACTTGGTTGAGTACTACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGA
GAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACA

10

20

30

40

【化 6】

ACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAAC
TCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACA
CCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAAGTGGCGAACTACTT
ACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACC
ACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGA
GCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGT
AGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTG
AGATAGGTGCCTCACTGATTAAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATAC
TTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGA
TAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGT
AGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCA
AACAAAAAACACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTC
TTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCTTCTAGTGT
AGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGC
TAATCCTGTTACCACTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACT
CAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACA
CAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATG
AGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGG
GTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAG
TCCTGTCCGGTTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGG
CGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGG
CCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCG
CCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTG
AGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATT
TCACACCGCATATGGTGCACCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAG
TATACACTCCGCTATCGCTACGTGACTGGGTCTATGGCTGCGCCCCGACACCCGCCAACAC
CCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGA
CCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTGTCAGAGGTTTTACCGTCTATCACCGAAACGCGCGAGGC
AGCTGCGGTAAAGCTCATCAGCGTGGTCGTGAAGCGATTACAGATGTCTGCCTGTTTCAT
CCGCGTCCAGCTCGTTGAGTTTCTCCAGAAGCGTTAATGTCTGGCTTCTGATAAAGCGGG
CCATGTTAAGGGCGGTTTTTCTGTTTGGTCACTGATGCCTCCGTGTAAGGGGGATTCT
GTTTCATGGGGGTAATGATACCGATGAAACGAGAGAGGATGCTCACGATACGGGTACTG
ATGATGAACATGCCCGGTTACTGGAACGTTGTGAGGGTAAACAACCTGGCGGTATGGATG
CGGCGGGACCAGAGAAAAATCACTCAGGGTCAATGCCAGCGCTTCGTTAATACAGATGT
AGGTGTTCCACAGGGTAGCCAGCAGCATCCTGCGATGCAGATCCGGAACATAATGGTGC
AGGGCGCTGACTTCCGCGTTTCCAGACTTTACGAAACACGGAAACCGAAGACCATTTCAT
GTTGTTGCTCAGGTGCGCAGACGTTTTGCAGCAGCAGTCGCTTACGTTTCGCTCGCGTATC
GGTGATTCAATTCTGCTAACCAAGTAAGGCAACCCCGCCAGCCTAGCCGGGTCTCAACGAC
AGGAGCACGATCATGCGCACCCGTGGCCAGGACCAACGCTGCCCGAGATGCGCCGCGT
GCGGCTGCTGGAGATGGCGGACGCGATGGATATGTTCTGCCAAGGGTTGGTTTGCGCATT
CACAGTTCTCCGCAAGAATTGATTGGCTCCAATTCTTGGAGTGGTGAATCCGTTAGCGAG
GTGCCGCCGGCTTCCATTAGGTGAGGTGGCCCCGGCTCCATGCACCGCGACGCAACGC
GGGAGGCAGACAAGGTATAGGGCGGCGCCTACAATCCATGCCAACCCGATTCCATGTGC
TCGCCGAGGCGGCATAAATCGCCGTGACGATCAGCGGTCCAATGATCGAAGTTAGGCTG
GTAAGAGCCGCGAGCGATCCTTGAAGCTGTCCCTGATGGTCGTCATCTACCTGCCTGGAC
AGCATGGCCTGCAACGCGGGCATCCCGATGCCGCCGGAAGCGAGAAGAATCATAATGGG
GAAGGCCATCCAGCCTCGCGTCGCGAACGCCAGCAAGACGTAGCCAGCGCGTCGGCCG
CCATGCCGGCGATAATGGCCTGCTTCTCGCCGAAACGTTTGGTGGCGGGACCAGTGACG
AAGGCTTGAGCGAGGGCGTGCAAGATTCCGAATACCGCAAGCGACAGGCCGATCATCGT
CGCGCTCCAGCGAAAGCGGTCTCGCCGAAATGACCCAGAGCGCTGCCGGCACCTGTC
CTACGAGTTGCATGATAAAGAAGACAGTCATAAGTGCGGCGACGATAGTCATGCCCCGC
GCCACCGGAAGGAGCTGACTGGGTTGAAGGCTCTCAAGGGCATCGGTGAGGATCTGG
GCAAAACGTAGGGGCAAACAAACGAAAAATCGTTTCTCAAATTTTCTGATGCCAAGAA
CTCTAACCACTTATCTAAAAATTGCCTTATGATCCGTCTCTCCGGTTACAGCCTGTGTA
ACTGATTAATCCTGCCTTTCTAATCACCACTTCTAATGTTTTAATTAAGGGATTTTGTCTTC

10

20

30

40

【化 7】

ATTAACGGCTTTTCGCTCATAAAAATGTTATGACGTTTTGCCCGCAGGCGGGAAACCATCC
ACTTCACGAGACTGATCTCCTCTGCCGGAACACCGGGCATCTCCAACCTATAAGTTGGAG
AAATAAGAGAATTTTCAGATTGAGAGAATGAAAAAAAAAAAAAAAAAAGGCAGAGGAG
AGCATAGAAATGGGGTTCACTTTTTTGGTAAAGCTATAGCATGCCTATCACATATAAATAG
AGTGCCAGTAGCGACTTTTTTCACTCGAAATACTCTTACTACTGCTCTCTTGTGTTTT
TATCACTTCTTGTCTTCTTGGTAAATAGAATATCAAGCTACAAAAAGCATACAATCAA
CTATCAACTATTAACCTATATCGTAATACACAGGATCCACCATGAAGGCTGCTGCGCTTTC
CTGCCTCTTCGGCAGTACCTTGCCGTTGCAGGCGCCATTGAATCGAGAAAGGTTACCA
GAAGCCCCTCGCGAGATCTGAACCTTTTTACCCGTCGCCATGGATGAATCCCAACGCCAT
CGGCTGGGCGGAGGCCTATGCCAGGCCAAGTCCTTTGTCTCCCAAATGACTCTGCTAGA
GAAGGTCAACTTGACCACGGGAGTCGGCTGGGGGGAGGAGCAGTGCGTCGGCAACGTG
GGCGCGATCCCTCGCCTTGGACTTCGCAGTCTGTGCATGCATGACTCCCCTCTCGGCGTG
CGAGGAACCGACTACAACCTCAGCGTTCCCCTCTGGCCAGACCGTTGCTGCTACCTGGGAT
CGCGGTCTGATGTACCGTCGCGGCTACGCAATGGGCCAGGAGGCCAAAGGCCAAGGGCAT
CAATGTCCTTCTCGGACCACTCGCCGGCCCCCTTGCCCGCATGCCCGAGGGCGGTCTGTA
CTGGGAAGGCTTCGCTCCGGATCCCGTCTTACCGGCATCGGCATGTCCGAGACGATCAA
GGGCATTACAGGATGCTGGCGTCATCGCTTGTGCGAAGCACTTTATTGGAAACGAGCAGG
AGCACTTCAGACAGGTGCCAGAAGCCCAGGGATACGGTTACAACATCAGCGAAACCCCTC
TCCTCCAACATTGACGACAAGACCATGCACGAGCTCTACCTTTGGCCGTTTGGCGATGCC
GTCCGGGGCCGGCGTCCGCTCTGTCATGTGCTCGTACAACCAGGGCAACAACCTCGTACGCC
TGCCAGAACTCGAAGCTGCTGAACGACCTCCTCAAGAACGAGCTTGGGTTTCAGGGCTTC
GTCATGAGCGACTGGTGGGCACAGCACTGGCGCAGCAAGCGCCGTGGCTGGTCTCGA
TATGTCCATGCCGGGCGACACCATGGTCAACACTGGCGTCAGTTTCTGGGGCGCCAATCT
CACCCTCGCCGTCTCAACGGCACAGTCCCTGCCTACCGTCTCGACGACATGTGCATGCG
CATCATGGCCGCCCTCTTCAAGGTCACCAAGACCACCGACCTGGAACCGATCAACTTCTC
CTTCTGGACCCGCGACACTTATGGCCCGATCCACTGGGCGGCCAAGCAGGGCTACCAGG
AGATTAATTCCCACGTTGACGTCCGCGCCGACCACGGCAACCTCATCCGGAACATTGCCG
CCAAGGGTACGGTGCTGCTGAAGAATACCGGCTCTCTACCCCTGAACAAGCCAAAGTTC
GTGGCCGTCTCGGCGAGGATGCTGGGCGGAGCCCCAACGGGCCAACGGCTGCAGCGA
CCGCGGCTGTAACGAAGGCACGCTCGCCATGGGCTGGGGATCCGGCACAGCCAACTATC
CGTACCTCGTTTCCCCGACGCGCGCTCCAGGCGCGGGCCATCCAGGACGGCACGAGG
TACGAGAGCGTCTGTCCAACCTACGCCGAGGAAAATACAAAGGCTCTGGTCTCGCAGGC
CAATGCAACCGCCATCGTCTTCTGTCATGCGGACTCAGGCGAGGGCTACATCAACGTGG
ACGGTAACGAGGGGCGACCGTAAGAACCTGACTCTCTGGAACAACGGTGATACTCTGGTC
AAGAACGTCTCGAGCTGGTGCAGCAACACCATCGTCTGTCATCCACTCGGTCCGGCCCCGGTC
CTCTGACCGATTGGTACGACAACCCCAACATCACGGCCATTCTCTGGGCTGGTCTTCCG
GGCCAGGAGTCGGGCAACTCCATCACCGACGTGCTTTACGGCAAGGTCAACCCCGCCGC
CCGCTCGCCCTTCACTTGGGGCAAGACCCGCGAAAGCTATGGCGCGGACGTCTGTACA
AGCCGAATAATGGCAATTGGGCGCCCCAACAGGACTTCACCGAGGGCGTCTTCATCGAC
TACCGTACTTCGACAAGGTTGACGATGACTCGGTCTCTACGAGTTCGGCCACGGCCTG
AGCTACACCACCTTCGAGTACAGCAACATCCGCGTCGTCAAGTCCAACGTCAGCGAGTA
CCGGCCCACGACGGGCACCACGATTACGGCCCCGACGTTTGGCAACTTCTCCACCGACCT
CGAGGACTATCTTCCCCAAGGACGAGTTCCCCATACATCCCGCAGTACATCTACCCGTA
CCTCAACACGACCCCGGAGGGCCTCGGGCGATCCCCACTACGGCCAGACCCCGG
AGGAGTTCCTCCCGCCCCACGCCACCGATGACGACCCCCAGCCGCTCCTCCGGTCTCGG
GCGGAAACTCCCCCGGCGCAACCGCCAGCTGTACGACATTGTCTACACAATCACGGCC
GACATCACGAATACGGGCTCCGTTGTAGGCGAGGAGGTACCGCAGCTCTACGTCTCGCT
GGGCGGTCCCGAGGATCCCAAGGTGCAGCTGCGCGACTTTGACAGGATGCGGATCGAAC
CCGGCGAGACGAGGCAGTTACCGGCCGCTGACGCGCAGAGATCTGAGCAACTGGGAC
GTCACGGTGCAGGACTGGGTCTCAGCAGGTATCCCAAGACGGCATATGTTGGGAGGAG
CAGCCGGAAGTTGGATCTCAAGATTGAGCTTCTTGATAAGTCGACCTCGACTTTGTTCC
CACTGTACTTTTAGCTCGTACAAAATACAATATACTTTTCATTTCTCCGTAAACAACATGT
TTTCCCATGTAATATCCTTTTCTATTTTTCGTTCCGTTACCAACTTTACACATACTTTATAT
AGCTATTCACTTCTATACACTAAAAAACTAAGACAATTTTAATTTTGCTGCCTGCCATATT
TCAATTTGTTATAAATTCCTATAATTTATCCTATTAGTAGCTAAAAAAAGATGAATGTGA

10

20

30

40

【化 8】

ATCGAATCCTAAGAGAATTGGATCTGATCCACAGGACGGGTGTGGTCGCCATGATCGCG
TAGTCGATAGTGGCTCCAAGTAGCGAAGCGAGCAGGACTGGGCGGCGGCCAAAGCGGTC
GGACAGTGCTCCGAGAACGGGTGCGCATAGAAATTGCATCAACGCATATAGCGCTAGCA
GCACGCCATAGTGAAGTGGCGATGCTGTCGGAATGGACGATATCCCGCAAGAGGCCCGGC
AGTACCGGCATAACCAAGCCTATGCCTACAGCATCCAGGGTGACGGTGCCGAGGATGAC
GATGAGCGCATTGTTAGATTTTCATACACGGTGCTGACTGCGTTAGCAATTTAACTGTGA
TAACTACCGCATTAAAGCTTTTTCTTTCCAATTTTTTTTTTTTCGTCATTATAAAAAATCAT
TACGACCGAGATTCCCGGGTAATAACTGATATAAATAAATTGAAGCTCTAATTTGTGAGT
TTAGTATACATGCATTTACTTATAATACAGTTTTTTAGTTTTGCTGGCCGCATCTTCTCAA
ATATGCTTCCCAGCCTGCTTTTCTGTAACGTTACCCCTCTACCTTAGCATCCCTTCCCTTTG
CAAATAGTCCTCTTCCAACAATAATAATGTCAGATCCTGTAGAGACCACATCATCCACGG
TTCTATACTGTTGACCCAATGCGTCTCCCTTGTCTATCTAAACCCACACCGGGTGTCTAAT
CAACCAATCGTAACCTTCATCTCTTCCACCCATGTCTCTTTGAGCAATAAAGCCGATAAC
AAAATCTTTGTGCTCTTTCGCAATGTCAACAGTACCCTTAGTATATTCTCCAGTAGATAG
GGAGCCCTTGCATGACAATTCTGCTAACATCAAAGGCCCTCTAGGTTCTTTGTTACTTCT
TCTGCCGCTGCTTCAAACCGCTAACAATACCTGGGCCCACCACACCGTGTGCATTCTGTA
ATGTCTGCCCATTTCTGCTATTCTGTATACACCCGCAGAGTACTGCAATTTGACTGTATTAC
CAATGTCAGCAAATTTTCTGTCTTCGAAGAGTAAAAAATTGTAATTTGGCGGATAATGCCT
TTAGCGGCTTAACTGTGCCCTCCATGGAAAAATCAGTCAAGATATCCACATGTGTTTTTA
GTAAACAAATTTTGGGACCTAATGCTTCAACTAACTCCAGTAATTCCTTGGTGGTACGAA
CATCCAATGAAGCACACAAGTTTGTGTTTCTGTTTTCGTGCATGATATTAATAGCTTGGCAG
CAACAGGACTAGGATGAGTAGCAGCACGTTCCCTTATATGTAGCTTTTCGACATGATTTATC
TTCGTTTCTCTGCAGGTTTTTGTGTTCTGTGCAGTTGGGTTAAGAATACTGGGCAATTTTCATGT
TTCTTCAACACTACATATGCGTATATATACCAATCTAAGTCTGTGCTCCTTCCCTTCGTTCT
TCCTTCTGTTTCGGAGATTACCGAATCAAAAAAATTTCAAGGAAACCGAAATCAAAAAAA
AGAATAAAAAAATGATGAATTGAAAAGCTTATCGATCCTACCCCTTGCCTAAAGA
AGTATATGTGCCTACTAACGCTTGTCTTTGTCTCTGTCACTAAACACTGGATTATTACTCC
CAGATACTTATTTTGGACTAATTTAAATGATTTCCGATCAACGTTCTTAATATCGCTGAAT
CTTCCACAATTTGATGAAAGTAGCTAGGAAGAGGAATTGGTATAAAGTTTTTGTGTTTTGTA
AATCTCGAAGTATACTCAAACGAATTTAGTATTTTCTCAGTGATCTCCAGATGCTTTCAC
CCTCACTTAGAAGTGCTTTAAGCATTTTTTACTGTGGCTATTTCCCTTATCTGCTTCTTCC
GATGATTCGAAGTGAATTTGCAAACTACTTACAATATCAGTGATATCAGATTGATGTTTT
TGTCATAGTAAGGAATAATTGTAAATTTCCCAAGCAGGAATCAATTTCTTTAATGAGGCT
TCCAGAATTGTTGCTTTTTGCGTCTTGTATTTAACTGGAGTGATTTATTGACAATATCGA
AACTCAGCGAATTGCTTATGATAGTATTATAGCTCATGAATGTGGCTCTCTTGATTGCTGT
TCCGTTATGTGTAATCATCCAACATAAATAGGTTAGTTCAGCAGCACATAATGCTATTTT
CTCACCTGAAGGTCTTTCAAACCTTTCCACAACTGACGAACAAGCACCTTAGGTGGTGT
TTTACATAATATATCAAATTGTGGCATGCTTAGCGCCGATCTTGTGTGCAATTGATATCTA
GTTTCAACTACTCTATTTATCTTGATCTTGCAGTATTCAAACACGCTAACTCGAAAACT
AACTTTAATTGTCTGTTTGTCTCGCTTCTTTCGAAAAATGCACCGGCCGCGCATTTT
GTACTGCGAAAAATAATTGGTACTGCGGTATCTTCATTTTCATATTTAAAAATGCACCTTTG
CTGCTTTTCTTAATTTTTAGACGGCCCGCAGGTTCTGTTTTGCGGTACTATCTTGTGATAA
AAAGTTGTTTTGACATGTGATCTGCACAGATTTTATAATGTAATAAGCAAGAATACATTA
TCAAACGAACAATACTGGTAAAAGAAAACCAAAATGGACGACATTGAAACAGCCAAGA
ATCTGACGGTAAAAGCACGTACAGCTTATAGCGTCTGGGATGTATGTGGCTGTTTATTG
AAATGATTGCTCCTGATGTAGATATTGATATAGAGAGTAAACGTAAGTCTGATGAGCTAC
TCTTCCAGGATATGTCATAAGGCCCATGGAATCTCTCACAACCGGTAGGCCGTATGGTC
TTGATTCTAGCGCAGAAGATTCCAGCGTATCTTCTGACTCCAGTGCTGAGGTAATTTTGC
CTGCTGCGAAGATGGTTAAGGAAAGGTTTGATTTCGATTGGAAATGGTATGCTCTCTTTCAC
AAGAAGCAAGTCAGGCTGCCATAGATTTGATGCTACAGAATAACAAGCTGTTAGACAAT
AGAAAGCAACTATACAAATCTATTGCTATAATAATAGGAAGATTGCCCGAGAAAGACAA
GAAGAGAGCTACCGAAATGCTCATGAGAAAAATGGATTGTACACAGTTATTAGTCCCAC
CAGCTCCAACGGAAGAAGATGTTATGAAGCTCGTAAGCGTCGTTACCCAATTGCTTACTT
TAGTTCCACCAGATCGTCAAGCTGCTTTAATAGGTGATTTATTTCATCCCGGAATCTCTAA
AGGATATATTCAATAGTTTCAATGAACTGGCGGCAGAGAATCGTTTACAGCAAAAAAAG

10

20

30

40

【化 9】

AGTGAGTTGGAAGGAAGGACTGAAGTGAACCATGCTAATACAAATGAAGAAGTTCCTC
CAGGCGAACAAGAAGTAGAGACACAAATGCAAGAGGAGCATATAAATTACAAAACACC
ATCACTGAGGGCCCTAAAGCGGTTCCCACGAAAAAAGGAGAGTAGCAACGAGGGTAA
GGGGCAGAAAATCACGTAATACTTCTAGGGTATGATCCAATATCAAAGGAAATGATAGC
ATTGAAGGATGAGACTAATCCAATTGAGGAGTGGCAGCATATAGAACAGCTAAAGGGTA
GTGCTGAAGGAAGCATACGATACCCCGCATGGAATGGGATAATATCACAGGAGGTACTA
GACTACCTTTTCATCCTACATAAATAGACGCATATAAGTACGCATTTAAGCATAAACACGC
ACTATGCCGTTCTTCTCATGTATATATATATACAGGCAACACGCAGATATAGGTGCGACG
TGAACAGTGAGCTGTATGTGCGCAGCTCGCGTTGCATTTTCGGAAGCGCTCGTTTTCGGA
AACGCTTTGAAGTTCCTATTCCGAAGTTCCTATTCTCTAGAAAGTATAGGAACTTCAGAG
CGCTTTTGA AAAACCAAAGCGCTCTGAAGACGCACCTTTCAAAAACCAAACGCACCG
GACTGTAACGAGCTACTAAAATATTGCGAATACCGCTTCCACAAACATTGCTCAAAAGTA
TCTCTTTGCTATATATCTCTGTGCTATATCCCTATATAACCTACCCATCCACCTTTTCGCTCC
TTGAACTTGCATCTAAACTCGACCTCTACATCAACAGGCTTCCAATGCTCTTCAAATTTTA
CTGTCAAGTAGACCCATACGGCTGTAATATGCTGCTCTTCATAATGTAAGCTTATCTTTAT
CGAATCGTGTGAAAACTACTACCGCGATAAACCTTTACGGTTCCCTGAGATTGAATTAG
TTCCTTTAGTATATGATACAAGACACTTTTGAACCTTTGTACGACGAATTTTGAGGTTCCGC
ATCCTCTGGCTATTTCCAATTATCCTGTCGGCTATTATCTCCGCCTCAGTTTGATCTTCCGC
TTCAGACTGCCATTTTTCACATAATGAATCTATTTACCCCAACAATCCTTCATCCGCCTCC
GCATCTTGTTCCGTTAAACTATTGACTTCATGTTGTACATTGTTTAGTTACAGAGAAGGGT
CCTCTTCAGGCGGTAGCTCCTGATCTCCTATATGACCTTTATCCTGTTCTCTTTCCACAAA
CTTAGAAATGTATTCATGAATTATGGAGCACCTAATAACATTCTTCAAGGCGGAGAAGTT
TGGGCCAGATGCCCAATATGCTTGACATGAAAACGTGAGAATGAATTTAGTATTATTGTG
ATATTCTGAGGCAATTTTATTATAATCTCGAAGATAAGAGAAGAATGCAGTGACCTTTGT
ATTGACAAATGGAGATTCCATGTATCTAAAAAATACGCCTTTAGGCCTTCTGATACCTT
TCCCCTGCGGTTTAGCGTGCCTTTTACATTAATATCTAAACCCTCTCCGATGGTGGCCTTT
AACTGACTAATAAATGCAACCGATATAAACTGTGATAATTCTGGGTGATTTATGATTCTGA
TCGACAATTGTATTGTACACTAGTGCAGGATCAGGCCAATCCAGTTCTTTTTCAATTACC
GGTGTGTCGTCTGTATTTCAGTACATGTCCAACAAATGCAATGCTAACGTTTTGTATTTCT
TATAATTGTCAGGAACTGGAAAAGTCCCCCTTGTCGTCTCGATTACACACCTACTTTTCATC
GTACACCATAGGTTGGAAAGTGCTGCATAATACATTGCTTAATACAAGCAAGCAGTCTCTC
GCCATTTCATATTTTCAGTTATTTTCCATTACAGCTGATGTCAATTGTATATCAGCGCTGTAAA
AATCTATCTGTTACAGAAGGTTTTTCGCGGTTTTTATAAAACAAAACCTTTTCGTTACGAAATC
GAGCAATCACCCAGCTGCGTATTTGGAAATTCGGGAAAAAGTAGAGCAACGCGAGTTG
CATTTTTTACACCATAATGCATGATTAACCTTCGAGAAGGGATTAAGGCTAATTTCACTAG
TATGTTTCAAAAACCTCAATCTGTCCATTGAATGCCTTATAAAACAGCTATAGATTGCAT
AGAAGAGTTAGCTACTCAATGCTTTTTGTCAAAGCTTACTGATGATGATGTGTCTACTTTC
AGGCGGGTCTGTAGTAAGGAGAATGACATTATAAAGCTGGCACTTAGAATTCCACGGAC
TATAGACTATACTAGTATACTCCGTCTACTGTACGATACACTTCCGCTCAGGTCCCTGTCC
TTTAACGAGGCCTTACCACTCTTTTGTACTCTATTGATCCAGCTCAGCAAAGGCAGTGTG
ATCTAAGATTCTATCTTCGCGATGTAGTAAACTAGCTAGACCGAGAAAGAGACTAGAA
ATGCAAAAGGCACTTCTACAATGGCTGCCATCATTATTATCCGATGTGACGCTGCA (配列番号

7)

バリエーション番号73 yCDSのポリヌクレオチド配列:

TTGGATAACGGGTTAGCCCGTACACCTACTATGGGTTGGCTTCACTGGGAAAGATTTCATG
TGTAACCTTAGATTGCCAAGAAGAGCCTGACAGCTGTATCTCAGAGAAACTATTTCATGGA
GATGGCTGAACTAATGGTAAGTGAAGGATGGAAGGATGCTGGTTATGAATACCTATGTA
TTGATGATTGCTGGATGGCTCCACAGCGTGATTTCAGAAAGGTAGGTTACAAGCTGACCCCC
AGAGATTCCCACATGGCATACGTCAGCTTGCAAACTACGTACACAGCAAGGGTCTAAAG
TTAGGCATCTACGCTGATGTGCGAAACAAGACATGTGCTGGTTTCCCAGGTTTCATTCCGT
TACTATGACATAGATGCGCAGACGTTTGCTGATTGGGGTGTGATTTGTTGAAGTTTGAT
GGATGCTACTGCGATTCCCTGGAGAACCTAGCCGATGGGTACAAACACATGAGTTTGGCT

【化 1 0】

CTAAACAGGACTGGTAGGAGCATCGTCTATAGTTGTGAATGGCCCTTGTACATGTGGCCG
TTTCAGAAGCCAACTACACTGAGATAAGACAATACTGTAACCATTGGCGTAACTTTGCT
GACATAGATGATTCATGGGCTTCAATCAAATCTATCTTGGATTGGACTTCTTTCAACCAG
GAAAGAATTGTTGATGTTGCAGGTCCAGGTGGATGGAATGACCCTGATATGCTTGTGATA
GGGAACTTTGGGCTATCATGGAATCAACAAGTTACACAAATGGCTTTGTGGGCGATCATG
GCCGCACCCCTATTCATGTCTAATGATCTACGTACATATCACCCCAAGCAAAGGCTTTA
CTTCAAGATAAGGATGTCATAGCGATCAACCAAGATCCTCTTGGTAAACAAGGTTATCAA
TTGAGACAAGGTGACAACCTTTGAAGTGTGGGAAAGACCATTGTCTGGACTTGCCTGGGC
TGTTGCTATGATCAACCGTCAAGAGATCGGAGGGCCAAGATCTTACACTATCGCGGTAGC
CTCTTTGGGTAAGGGTGTGCGTGCAATCCTGCCTGCTTCATTACACAATTGCTTCCAGTT
AAGAGAAAGTTGGGTTTCTATGAGTGGACATCTAGGCTAAGAAGTCACATCAATCCTACT
GGTACGGTATTGTTGCAATTGGAGAACACAATGCAAATGTCTTTGAAAGATTTGTTA
(配列番号 8)

10

バリエント番号73のポリヌクレオチド配列:

CTGGACAATGGATTGGCAAGGACGCCTACCATGGGCTGGCTGCACTGGGAGCGCTTCAT
GTGCAACCTTGACTGCCAGGAAGAGCCAGATTCCCTGCATCAGTGAGAAGCTCTTCATGG
AGATGGCAGAGCTCATGGTCTCAGAAGGCTGGAAGGATGCAGGTTATGAGTACCTCTGC
ATTGATGACTGTTGGATGGCTCCCCAAAGAGATTCAGAAGGCAGACTTCAGGCAGACCC
TCAGCGCTTTCCTCATGGGATTCGCCAGCTAGCTAATTATGTTACAGCAAAGGACTGAA
GCTAGGGATTTATGCAGATGTTGGAAATAAAACCTGCGCAGGCTTCCCTGGGAGTTTTGG
ATACTACGACATTGATGCCAGACCTTTGCTGACTGGGGAGTAGATCTGCTAAAATTTGA
TGGTTGTTACTGTGACAGTTTGGAAAATTTGGCAGATGGTTATAAGCACATGTCCTTGGC
CCTGAATAGGACTGGCAGAAGCATTGTGTACTCCTGTGAGTGGCCTCTTTATATGTGGCC
CTTTCAAAGCCCAATTATACAGAAATCCGACAGTACTGCAATCACTGGCGAAATTTTGC
TGACATTGATGATTCCTGGGCGAGTATAAAGAGTATCTTGGACTGGACATCTTTTAACCA
GGAGAGAATTGTTGATGTTGCTGGACCAGGGGGTTGGAATGACCCAGATATGTTAGTGA
TTGGCAACTTTGGCCTCAGCTGGAATCAGCAAGTAACTCAGATGGCCCTCTGGGCTATCA
TGGCTGCTCCTTTATTCATGTCTAATGACCTCCGACACATCAGCCCTCAAGCCAAAGCTCT
CCTTCAGGATAAGGACGTAATTGCCATCAATCAGGACCCCTTGGGCAAGCAAGGGTACC
AGCTTAGACAGGGAGACAACCTTTGAAGTGTGGGAACGACCTCTCTCAGGCTTAGCCTGG
GCTGTAGCTATGATAAACCGGCAGGAGATTGGTGGACCTCGCTCTTATACCATCGCAGTT
GCTTCCCTGGGTAAAGGAGTGGCCTGTAATCCTGCCTGCTTCATCACACAGCTCCTCCCT
GTGAAAAGGAAGCTAGGGTTCTATGAATGGACTTCAAGGTTAAGAAGTCACATAAATCC
CACAGGCACTGTTTTGCTTCAGCTAGAAAATACAATGCAGATGTCATTAAAAGACTTACT
T (配列番号 9)

20

30

バリエント番号73のポリペプチド配列:

LDNGLARTPTMGWLHWERFMCNLDCQEEPDCISEKLFMEMAELMVSEGWKDAGYEYLCI
DDCWMAPQRDSEGRLQADPQRFPHGIRQLANYVHSKGLKLGİYADVGNKTCAGFPGSFGYY
DIDAQTFADWGVDLLKFDGICYCDSLENLADGYKHMSLALNRTGRSIVYSCEWPLYMWPFQ
KPNYTEIRQYCNHWRNFADIDDSWASIKSILDWTSFNQERIVDVAGPGGWNDPDMLVIGNFG
LSWNQQVTQMALWAIMAAPLFMSNDLRHISPQAKALLQDKDVIQNDPLGKQGYQLRQG
DNFEVWERPLSGLAWAVAMINRQEIGGPRSYTIAVASLGKGVACNPACFITQLLPVKRKLGF
YEWTSRLRSHINPTGTVLLQLENTMQMSLKDLL (配列番号 10)

40

【化 1 1】

バリエント番号218 yCDSのポリヌクレオチド配列:

TTGGATAACGGGTTAGCCCGTACACCTACTATGGGTTGGCTTCACTGGGAAAGATTCATG
TGTAACCTTAGATTGCCAAGAAGAGCCTGACAGCTGTATCTCAGAGAACTATTTCATGGA
GATGGCTGAACTAATGGTAAGTGAAGGATGGAAGGATGCTGGTTATGAATACCTATGTA
TTGATGATTGCTGGATGGCTCCACAGCGTGATTGAGAAGGTAGGTTACAAGCTGACCCCC
AGAGATTCCCACATGGCATAACGTCAGCTTGCAAACCTACGTACACAGCAAGGGTCTAAAG
TTAGGCATCTACGCTGATGTCGGAAACAAGACATGTGCTGGTTTCCCAGGTTCAATCGGT
TACTATGACATAGATGCGCAGACGTTTGCTGATTGGGGTGTTGATTTGTTGAAGTTTGAT
GGATGCTACTGCGATTCCCTGGAGAACCTAGCCGATGGGTACAAACACATGAGTTTGGCT
CTAAACAGGACTGGTAGGAGCATCGTCTATAGTTGTGAATGGCCCTTGATACATGTGGCCG
TTTCAGAAGCCAACTACACTGAGATAAGACAATACTGTAACCATTTGGCGTAACTTTGCT
GACATAGATGATTCATGGGCTTCAATCAAATCTATCTTGGATTGGACTTCTTTCAACCAG
GAAAGAATTGTTGATGTTGTCAGGTCCAGGTGGATGGAATGACCCTGATATGCTTGTCTATA
GGGAACTTTGGGCTATCATGGAATCAACAAGTTACACAAATGGCTTTGTGGGCGATCATG
GCCGCACCCCTATTCATGTCTAATGATCTACGTCACATATCACCCCAAGCAAAGGCTTTA
CTTCAAGATAAGGATGTCATAGCGATCAACCAAGATCCTCTTGGTAAACAAGGTTATCAA
TTGAGACAAGGTGACAACCTTTGAAGTGTGGGAAAGACCATTGTCTGGACTTGCGTGGGC
TGTTGCTATTATCAACCGTCAAGAGATCGGAGGGCCAAGATCTTACACTATCGCGGTAGC
CTCTTTGGGTAAAGGTGTTGCGTGCAATCCTGCCTGCTTCATTACACAATTGCTTCCAGTT
AAGAGAAAGTTGGGTTTCTATAACTGGACATCTAGGCTAAAAAGTCACATTAATCCTACT
GGTACGGTATTGTTGCAATTGGAGAACACAATGCAAATGTCTTTGAAAGATTTGTTA
(配列番号 11)

10

20

バリエント番号218 hCDSのポリヌクレオチド配列:

CTGGACAATGGATTGGCAAGGACGCCTACCATGGGCTGGCTGCACTGGGAGCGCTTCAT
GTGCAACCTTGACTGCCAGGAAGAGCCAGATTCCTGCATCAGTGAGAAGCTCTTCATGG
AGATGGCAGAGCTCATGGTCTCAGAAGGCTGGAAGGATGCAGGTTATGAGTACCTCTGC
ATTGATGACTGTTGGATGGCTCCCCAAAGAGATTCAGAAGGCAGACTTCAGGCAGACCC
TCAGCGCTTTCCTCATGGGATTCGCCAGCTAGCTAATTATGTTACAGCAAAGGACTGAA
GCTAGGGATTTATGCAGATGTTGGAAATAAAACCTGCGCAGGCTTCCCTGGGAGTTTGG
ATACTACGACATTGATGCCAGACCTTTGCTGACTGGGGAGTAGATCTGCTAAAATTTGA
TGGTTGTTACTGTGACAGTTTGGAAAATTTGGCAGATGGTTATAAGCACATGTCCTTGGC
CCTGAATAGGACTGGCAGAAGCATTGTGTACTCCTGTGAGTGGCCTCTTTATATGTGGCC
CTTTCAAAGCCCAATTATACAGAAATCCGACAGTACTGCAATCACTGGCGAAATTTGCG
TGACATTGATGATTCCTGGGCGAGTATAAAGAGTATCTTGGACTGGACATCTTTAACCA
GGAGAGAATTGTTGATGTTGCTGGACCAGGGGGTTGGAATGACCCAGATATGTTAGTGA
TTGGCAACTTTGGCCTCAGCTGGAATCAGCAAGTAACTCAGATGGCCCTCTGGGCTATCA
TGGCTGCTCCTTTATTCATGTCTAATGACCTCCGACACATCAGCCCTCAAGCCAAAGCTCT
CCTTCAGGATAAGGACGTAATTGCCATCAATCAGGACCCCTTGGGCAAGCAAGGGTACC
AGCTTAGACAGGGAGACAACCTTTGAAGTGTGGGAACGACCTCTCTCAGGCTTAGCCTGG
GCTGTAGCTATTATAAACCGGCAGGAGATTGGTGGACCTCGCTCTTATACCATCGCAGTT
GCTTCCCTGGGTAAAGGAGTGGCCTGTAATCCTGCCTGCTTCATCACACAGCTCCTCCCT
GTGAAAAGGAAGCTAGGGTTCTATAACTGGACTTCAAGGTTAAAAAGTCACATAAATCC
CACAGGCACTGTTTTGCTTCAGCTAGAAAATACAATGCAGATGTCATTAAAAGACTTACT
T (配列番号 12)

30

40

バリエント番号218のポリペプチド配列:

LDNGLARTPTMGWLHWERFMCNLDQEEPDCISEKLFMEMAELMVSEGWKDAGYEYLCI
DDCWMAPQRDSEGRQLADPQRFPHGIRQLANYVHSKGLKLGİYADVGNKTCAGFPGSFGYY
DIDAQTFADWGVDLLKFDGICYCDSLENLADGYKHMSLALNRTGRSIVYSCEWPLYMWPFQ
KPNYTEIRQYCNHWRNFADIDDSWASIKSILDWTSFNQERIVDVAGPGGWNDPMLVIGNFG

【化 1 2】

LSWNQQVTQMALWAIMAAPLFMSNDLRHISPAKALLQDKDVIINQDPLGKQGYQLRQG
DNFEVWERPLSGLAWAVAIINRQEIGGPRSYTIAVASLGKGVACNPACFITQLLPVKRKLGFY
NWT SRLKSHINPTGTVLLQLENTMQMSLKDLL (配列番号 13)

バリエーション番号326 yCDSのポリヌクレオチド配列:

TTGGATAACGGGTTAGCCCGTACACCTACTATGGGTTGGCTTCACTGGGAAAGATTCATG
TGTAACCTTAGATTGCCAAGAAGAGCCTGACAGCTGTATCTCAGAGAACTATTCATGGA
GATGGCTGAACGGATGGTAAGTGAAGGATGGAAGGATGCTGGTTATGAATACCTATGTA
TTGATGATTGCTGGATGGCTCCACAGCGTGATTGAGAAGGTAGGTTACAAGCTGACCCCC
AGAGATTCCACATGGCATAACGTCAGCTTGCAAACCTACGTACACAGCAAAGGTCTAAAG
TTAGGCATCTACGCTGATGTCGGAACAAGACATGTGCTGGTTTCCCAGGTTTCATTCGGT
TACTATGACATAGATGCGCAGACGTTTGCTGATTGGGGTGTGATTTGTTGAAGTTTGAT
GGATGCTACTGCGATTCCCTGGAGAACCTAGCCGATGGGTACAAACACATGAGTTTGGCT
CTAAACAGGACTGGTAGGAGCATCGTCTATAGTTGTGAATGGCCCTTGATCATGTGGCCG
TTTCAGAAGCCAACTACACTGAGATAAGACAATACTGTAACCATTTGGCGTAACTTTGCT
GACATAGATGATTCATGGGCTTCAATCAAATCTATCTTGGATTGGACTTCTCGTAACCAAG
GAAAGAATTGTTGATGTTGCAGGTCCAGGTGGATGGAATGACCTGATATGCTTGTGATA
GGGAACCTTTGGGCTATCATGGGACCAACAAGTTACACAAATGGCTTTGTGGGCGATCAT
GGCCGCACCCCTATTCATGTCTAATGATCTACGTCACATATCACCCCAAGCAAAGGCTTT
ACTTCAAGATAAGGATGTCATAGCGATCAACCAAGATCCTCTTGGTAAACAAGGTTATCA
ATTGAGAAAAGGTGACAACCTTTGAAGTGTGGGAAAGACCATTGTCTGGAGATGCGTGGG
CTGTTGCTATTATCAACCGTCAAGAGATCGGAGGGGCCAAGATCTTACACTATCCCGGTAG
CCTCTTTGGGTAAGGGTGTGCGTGCAATCCTGCCTGCTTCATTACACAATTGCTTCCAGT
TAAGAGACAATTGGGTTTCTATAACTGGACCTCTAGGCTAAAAAGTCACATTAATCCTAC
TGGTACGGTATTGTTGCAATTGGAGAACACAATGCAAATGTCTTTGAAAGATTTGTTA
(配列番号 14)

10

20

バリエーション番号326のポリペプチド配列:

LDNGLARTPTMGWLHWERFMCNLDCQEEPDCISEKLFMEMAERMVSEGWKDAGYEYLCI
DDCWMAPQRDSEGRQLQADPQRFPHGIRQLANYVHSKGLKLGİYADVGNKTCAGFPGSFGYY
DIDAQTFADWGVDLLKFDGICYCDSLENLADGYKHMSLALNRTGRSIVYSCEWPLYMWPFQ
KPNYTEIRQYCNHWRNFADIDDSWASIKSILDWTSRNQERIVDVAGPGGWNDPDM LVIGNF
GLSWDQQVTQMALWAIMAAPLFMSNDLRHISPAKALLQDKDVIINQDPLGKQGYQLRK
GDNFEVWERPLSGDAWAVAIINRQEIGGPRSYTIPVASLGKGVACNPACFITQLLPVKRQLGF
YNWTSRLKSHINPTGTVLLQLENTMQMSLKDLL (配列番号 15)

30

バリエーション番号206 yCDSのポリヌクレオチド配列:

TTGGATAACGGGTTAGCCCGTACACCTACTATGGGTTGGCTTCACTGGGAAAGATTCATG
TGTAACCTTAGATTGCCAAGAAGAGCCTGACAGCTGTATCTCAGAGAACTATTCATGGA
GATGGCTGAACCTAATGGTAAGTGAAGGATGGAAGGATGCTGGTTATGAATACCTATGTA
TTGATGATTGCTGGATGGCTCCACAGCGTGATTGAGAAGGTAGGTTACAAGCTGACCCCC
AGAGATTCCACATGGCATAACGTCAGCTTGCAAACCTACGTACACAGCAAAGGTCTAAAG
TTAGGCATCTACGCTGATGTCGGAACAAGACATGTGCTGGTTTCCCAGGTTTCATTCGGT
TACTATGACATAGATGCGCAGACGTTTGCTGATTGGGGTGTGATTTGTTGAAGTTTGAT
GGATGCTACTGCGATTCCCTGGAGAACCTAGCCGATGGGTACAAACACATGAGTTTGGCT
CTAAACAGGACTGGTAGGAGCATCGTCTATAGTTGTGAATGGCCCTTGATCATGTGGCCG
TTTCAGAAGCCAACTACACTGAGATAAGACAATACTGTAACCATTTGGCGTAACTTTGCT
GACATAGATGATTCATGGGCTTCAATCAAATCTATCTTGGATTGGACTTCTTTCAACCAAG
GAAAGAATTGTTGATGTTGCAGGTCCAGGTGGATGGAATGACCTGATATGCTTGTGATA
GGGAACCTTTGGGCTATCATGGAATCAACAAGTTACACAAATGGCTTTGTGGGCGATCATG

40

【化 1 3】

GCCGCACCCCTATTCATGTCTAATGATCTACGTACATATCACCCCAAGCAAAGGCTTTA
CTTCAAGATAAGGATGTCATAGCGATCAACCAAGATCCTCTTGGTAAACAAGGTTATCAA
TTGAGACAAGGTGACAACCTTTGAAGTGTGGGAAAGACCATTGTCTGGACTTGCGTGGGC
TGTTGCTATGATCAACCGTCAAGAGATCGGAGGGCCAAGATCTTACACTATCGCGGTAGC
CTCTTTGGGTAAGGGTGTTCGCTGCAATCCTGCCTGCTTCATTACACAATTGCTTCCAGTT
AAGAGAAAGTTGGGTTTCTATAATTGGACCTCTAGGCTAAGAAGTCACATCAATCCTACT
GGTACGGTATTGTTGCAATTGGAGAACACAATGCAAATGTCTTTGAAAGATTTGTTA
(配列番号 16)

バリエーション番号206 hCDSのポリヌクレオチド配列:

CTGGACAATGGATTGGCAAGGACGCCTACCATGGGCTGGCTGCACTGGGAGCGCTTCAT
GTGCAACCTTGACTGCCAGGAAGAGCCAGATTCCTGCATCAGTGAGAAGCTCTTCATGG
AGATGGCAGAGCTCATGGTCTCAGAAGGCTGGAAGGATGCAGGTTATGAGTACCTCTGC
ATTGATGACTGTTGGATGGCTCCCCAAAGAGATTCAGAAGGCAGACTTCAGGCAGACCC
TCAGCGCTTTCTCATGGGATTCGCCAGCTAGCTAATTATGTTACAGCAAAGGACTGAA
GCTAGGGATTTATGCAGATGTTGGAAATAAAACCTGCGCAGGCTTCCCTGGGAGTTTTGG
ATACTACGACATTGATGCCAGACCTTTGCTGACTGGGGAGTAGATCTGCTAAAATTTGA
TGGTTGTTACTGTGACAGTTTGGAAAATTTGGCAGATGGTTATAAGCACATGTCCTTGGC
CCTGAATAGGACTGGCAGAAGCATTGTGTACTCCTGTGAGTGGCCTCTTTATATGTGGCC
CTTTCAAAAGCCCAATTATACAGAAATCCGACAGTACTGCAATCACTGGCGAAATTTTGC
TGACATTGATGATTCCTGGGCGAGTATAAAGAGTATCTTGGACTGGACATCTTTTAACCA
GGAGAGAATTGTTGATGTTGCTGGACCAGGGGGTGGAAATGACCCAGATATGTTAGTGA
TTGGCAACTTTGGCCTCAGCTGGAATCAGCAAGTAACTCAGATGGCCCTCTGGGCTATCA
TGGCTGCTCCTTTATTCATGTCTAATGACCTCCGACACATCAGCCCTCAAGCCAAAGCTCT
CCTTCAGGATAAGGACGTAATTGCCATCAATCAGGACCCCTTGGGCAAGCAAGGGTACC
AGCTTAGACAGGGAGACAACCTTTGAAGTGTGGGAACGACCTCTCTCAGGCTTAGCCTGG
GCTGTAGCTATGATAAACCAGGAGATTGGTGGACCTCGCTCTTATACCATCGCAGTT
GCTTCCCTGGGTAAAGGAGTGGCCTGTAATCCTGCCTGCTTCATCACACAGCTCCTCCCT
GTGAAAAGGAAGCTAGGGTTCTATAACTGGACTTCAAGGTTAAGAAGTCACATAAATCC
CACAGGCACTGTTTTGCTTCAGCTAGAAAATACAATGCAGATGTCATTAAAAGACTTACT
T (配列番号 17)

バリエーション番号206のポリペプチド配列:

LDNGLARTPTMGWLHWERFMCNLDCQEEPDCISEKLFMEMAELMVSEGWKDAGYEYLCI
DDCWMAPQRDSEGRLQADPQRFPHGIRQLANYVHSGKGLKLGİYADVGNKTCAGFPGSFGYY
DIDAQTFADWGVDLLKFDGCYCDLENLADGYKHMSLALNRTGRSIVYSCEWPLYMWPFQ
KPNYTEIRQYCNHWRNFADIDDSWASIKSILDWTSFNQERIVDVAGPGGWNDPDMLVIGNFG
LSWNQQVTQMALWAIMAAPLFMSNDLRHISPQAKALLQDKDVIAINQDPLGKQGYQLRQG
DNFEVWERPLSGLAWAVAMINRQEIGGPRSYTIASVSLGKGVACNPACFITQLLPVKRKLGF
YNWTSRLRSHINPTGTVLLQLENTMQMSLKDLL (配列番号 18)

【化 1 4】

バリエント番号205 yCDSのポリヌクレオチド配列:

TTGGATAACGGGTTAGCCCGTACACCTACTATGGGTTGGCTTCACTGGGAAAGATTCATG
TGTAACCTTAGATTGCCAAGAAGAGCCTGACAGCTGTATCTCAGAGAACTATTTCATGGA
GATGGCTGAACTAATGGTAAGTGAAGGATGGAAGGATGCTGGTTATGAATACCTATGTA
TTGATGATTGCTGGATGGCTCCACAGCGTGATTGAGAAGGTAGGTTACAAGCTGACCCCC
AGAGATTCCCACATGGCATAACGTCAGCTTGCAAACCTACGTACACAGCAAGGGTCTAAAG
TTAGGCATCTACGCTGATGTCGGAAACAAGACATGTGCTGGTTTCCCAGGTTCAATCGGT
TACTATGACATAGATGCGCAGACGTTTGCTGATTGGGGTGTTGATTTGTTGAAGTTTGAT
GGATGCTACTGCGATTCCCTGGAGAACCTAGCCGATGGGTACAAACACATGAGTTTGGCT
CTAAACAGGACTGGTAGGAGCATCGTCTATAGTTGTGAATGGCCCTTGATACATGTGGCCG
TTTCAGAAGCCAACTACACTGAGATAAGACAATACTGTAACCATTGGCGTAACTTTGCT
GACATAGATGATTCATGGGCTTCAATCAAATCTATCTTGGATTGGACTTCTTTCAACCAG
GAAAGAATTGTTGATGTTGTCAGGTCCAGGTGGATGGAATGACCCTGATATGCTTGTCTATA
GGGAACTTTGGGCTATCATGGAATCAACAAGTTACACAAATGGCTTTGTGGGCGATCATG
GCCGCACCCCTATTCATGTCTAATGATCTACGTCACATATCACCCCAAGCAAAGGCTTTA
CTTCAAGATAAGGATGTCATAGCGATCAACCAAGATCCTCTTGGTAAACAAGGTTATCAA
TTGAGACAAGGTGACAACCTTTGAAGTGTGGGAAAGACCATTGTCTGGACTTGCGTGGGC
TGTTGCTATGATCAACCGTCAAGAGATCGGAGGGCCAAGATCTTACACTATCGCGGTAGC
CTCTTTGGGTAAGGGTGTGCGTGCAATCCTGCCTGCTTCATTACACAATTGCTTCCAGTT
AAGAGAAAGTTGGGTTTCTATGATTGGGACTCTAGGCTAAGAAGTCACATCAATCCTACT
GGTACGGTATTGTTGCAATTGGAGAACACAATGCAAATGTCTTTGAAAGATTTGTTA

(配列番号 19)

10

20

バリエント番号205 hCDSのポリヌクレオチド配列:

CTGGACAATGGATTGGCAAGGACGCCTACCATGGGCTGGCTGCACTGGGAGCGCTTCAT
GTGCAACCTTGACTGCCAGGAAGAGCCAGATTCCTGCATCAGTGAGAAGCTCTTCATGG
AGATGGCAGAGCTCATGGTCTCAGAAGGCTGGAAGGATGCAGGTTATGAGTACCTCTGC
ATTGATGACTGTTGGATGGCTCCCCAAAGAGATTCAGAAGGCAGACTTCAGGCAGACCC
TCAGCGCTTTCCTCATGGGATTCGCCAGCTAGCTAATTATGTTACAGCAAAGGACTGAA
GCTAGGGATTTATGCAGATGTTGGAAATAAAACCTGCGCAGGCTTCCCTGGGAGTTTGG
ATACTACGACATTGATGCCAGACCTTTGCTGACTGGGGAGTAGATCTGCTAAAATTTGA
TGGTTGTTACTGTGACAGTTTGGAAAATTTGGCAGATGGTTATAAGCACATGTCCTTGGC
CCTGAATAGGACTGGCAGAAGCATTGTGTACTCCTGTGAGTGGCCTCTTTATATGTGGCC
CTTTCAAAGCCCAATTATACAGAAATCCGACAGTACTGCAATCACTGGCGAAATTTGCG
TGACATTGATGATTCCTGGGCGAGTATAAAGAGTATCTTGGACTGGACATCTTTTAACCA
GGAGAGAATTGTTGATGTTGCTGGACCAGGGGGTTGGAATGACCCAGATATGTTAGTGA
TTGGCAACTTTGGCCTCAGCTGGAATCAGCAAGTAACTCAGATGGCCCTCTGGGCTATCA
TGGCTGCTCCTTTATTCATGTCTAATGACCTCCGACACATCAGCCCTCAAGCCAAAGCTCT
CCTTCAGGATAAGGACGTAATTGCCATCAATCAGGACCCCTTGGGCAAGCAAGGGTACC
AGCTTAGACAGGGAGACAACCTTTGAAGTGTGGGAACGACCTCTCTCAGGCTTAGCCTGG
GCTGTAGCTATGATAAACCGGCAGGAGATTGGTGGACCTCGCTCTTATACCATCGCAGTT
GCTTCCCTGGGTAAAGGAGTGGCCTGTAATCCTGCCTGCTTCATCACACAGCTCCTCCCT
GTGAAAAGGAAGCTAGGGTTCTATGATTGGGATTCAAGGTTAAGAAGTCACATAAATCC
CACAGGCACTGTTTTGCTTCAGCTAGAAAATACAATGCAGATGTCATTAAAAGACTTACT
T

(配列番号 20)

30

40

バリエント番号205のポリペプチド配列:

LDNGLARTPTMGWLHWERFMCNLDQEEPDCISEKLFMEMAELMVSEGWKDAGYEYLCI
DDCWMAPQRDSEGRQLADPQRFPHGIRQLANYVHSKGLKLGYYADVGNKTCAGFPGSFGYY
DIDAQTFADWGVDLLKFDGICYCDSLENLADGYKHMSLALNRTGRSIVYSCEWPLYMWPFG
KPNYTEIRQYCNHWRNFADIDDSWASIKSILDWTSFNQERIVDVAGPGGWNDPMLVIGNFG

【化 1 5】

LSWNQQVTQMALWAIMAAPLFMSNDLRHISPAKALLQDKDVIINQDPLGKQGYQLRQG
DNFEVWERPLSGLAWAVAMINRQEIGGPRSYTIAVASLGKGVACNPACFITQLLPVKRKLGF
YDWDSRLRSHINPTGTVLLQLENTMQMSLKDLL (配列番号 21)

バリエーション番号76 yGDSのポリヌクレオチド配列:

TTGGATAACGGGTTAGCCCGTACACCTACTATGGGTTGGCTTCACTGGGAAAGATTCATG
TGTAACCTTAGATTGCCAAGAAGAGCCTGACAGCTGTATCTCAGAGAACTATTCATGGA
GATGGCTGAACTAATGGTAAGTGAAGGATGGAAGGATGCTGGTTATGAATACCTATGTA
TTGATGATTGCTGGATGGCTCCACAGCGTGATTGAGAAGGTAGGTTACAAGCTGACCCCC
AGAGATTCCACATGGCATACGTCAGCTTGCAAACTACGTACACAGCAAGGGTCTAAAG
TTAGGCATCTACGCTGATGTCGGAACAAGACATGTGCTGGTTTCCCAGGTTTCATTCGGT
TACTATGACATAGATGCGCAGACGTTTGTGCTGATTGGGGTGTGATTTGTTGAAGTTTGAT
GGATGCTACTGCGATTCCCTGGAGAACCTAGCCGATGGGTACAAACACATGAGTTTGGCT
CTAAACAGGACTGGTAGGAGCATCGTCTATAGTTGTGAATGGCCCTTGTACATGTGGCCG
TTTCAGAAGCCAACTACACTGAGATAAGACAATACTGTAACCATTGGCGTAACTTTGCT
GACATAGATGATTCATGGAGGTCAATCAAATCTATCTTGGATTGGACTTCTTTCAACCAG
GAAAGAATTGTTGATGTTGCAGGTCCAGGTGGATGGAATGACCCCTGATATGCTTGTCTATA
GGGAACCTTTGGGCTATCATGGAATCAACAAGTTACACAAATGGCTTTGTGGGCGATCATG
GCCGCACCCCTATTCATGTCTAATGATCTACGTCACATATCACCCCAAGCAAAGGCTTTA
CTTCAAGATAAGGATGTCATAGCGATCAACCAAGATCCTCTTGGTAAACAAGGTTATCAA
TTGAGACAAGGTGACAACCTTTGAAGTGTGGGAAAGACCATTGTCTGGACTTGCCTGGGC
TGTTGCTATGATCAACCGTCAAGAGATCGGAGGGCCAAGATCTTACACTATCGCGGTAGC
CTCTTTGGGTAAGGGTGTGCGTGCAATCCTGCCTGCTTCATTACACAATTGCTTCCAGTT
AAGAGAAAGTTGGGTTTCTATGAGTGGACATCTAGGCTAAGAAGTCACATCAATCCTACT
GGTACGGTATTGTTGCAATTGGAGAACACAATGCAATGTCTTTGAAAGATTTGTTA
(配列番号 22)

バリエーション番号76 hCDSのポリヌクレオチド配列:

CTGGACAATGGATTGGCAAGGACGCCTACCATGGGCTGGCTGCACTGGGAGCGCTTCAT
GTGCAACCTTGACTGCCAGGAAGAGCCAGATTCCTGCATCAGTGAGAAGCTCTTCATGG
AGATGGCAGAGCTCATGGTCTCAGAAGGCTGGAAGGATGCAGGTTATGAGTACCTCTGC
ATTGATGACTGTTGGATGGCTCCCCAAAGAGATTCAGAAGGCAGACTTCAGGCAGACCC
TCAGCGCTTTCCTCATGGGATTCGCCAGCTAGCTAATTATGTTACAGCAAAGGACTGAA
GCTAGGGATTTATGCAGATGTTGGAAATAAAACCTGCGCAGGCTTCCCTGGGAGTTTGG
ATACTACGACATTGATGCCAGACCTTTGCTGACTGGGGAGTAGATCTGCTAAAATTTGA
TGGTTGTTACTGTGACAGTTTGGAAAATTTGCGAGATGGTTATAAGCACATGTCCTTGGC
CCTGAATAGGACTGGCAGAAGCATTGTGTACTCCTGTGAGTGGCCTCTTTATATGTGGCC
CTTTCAAAAGCCCAATTATACAGAAATCCGACAGTACTGCAATCACTGGCGAAATTTTGC
TGACATTGATGATTCCTGGCGTAGTATAAAGAGTATCTTGGACTGGACATCTTTTAACCA
GGAGAGAATTGTTGATGTTGCTGGACCAGGGGGTTGGAATGACCCAGATATGTTAGTGA
TTGGCAACTTTGGCCTCAGCTGGAATCAGCAAGTAACTCAGATGGCCCTCTGGGCTATCA
TGGCTGCTCCTTTATTCATGTCTAATGACCTCCGACACATCAGCCCTCAAGCCAAAGCTCT
CCTTCAGGATAAGGACGTAATTGCCATCAATCAGGACCCCTTGGGCAAGCAAGGGTACC
AGCTTAGACAGGGAGACAACTTTGAAGTGTGGGAACGACCTCTCTCAGGCTTAGCCTGG
GCTGTAGCTATGATAAACCGGCAGGAGATTGGTGGACCTCGCTCTTATACCATCGCAGTT
GCTTCCCTGGGTAAAGGAGTGGCCTGTAATCCTGCCTGCTTCATCACACAGCTCCTCCCT
GTGAAAAGGAAGCTAGGGTTCTATGAATGGACTTCAAGGTTAAGAAGTCACATAAATCC
CACAGGCACTGTTTGTCTCAGCTAGAAAATACAATGCAGATGTCATTAAAAGACTTACT
T (配列番号 23)

【化 1 6】

バリエーション番号76のポリペプチド配列:

LDNGLARTPTMGWLHWERFMCNLDCQEEPSCISEKLFMEMAELMVSEGWKDAGYEYLCI
DDCWMAPQRDSEGRQLQADPQRFPHGIRQLANYVHSGGLKLGYYADVGNKTCAGFPGSFGYY
DIDAQTFADWGVDLLKFDGICYCDSLENLADGYKHMSLALNRTGRSIVYSCEWPLYMWPFQ
KPNYTEIRQYCNHWRNFADIDDSWRSIKSILDWTSFNQERIVDVAGPGGWNDPDM LVIGNFG
LSWNQQVTQMALWAIMAAPLFMSNDLRHISPQAKALLQDKDVIQNDPLGKQGYQLRQG
DNFEVWERPLSGLAWAVAMINRQEIGGPRSYTIAVASLGKGVACNPACFITQLLPVKRKLGF
YEWTSRLRSHINPTGTVLLQLENTMQMSLKDLL (配列番号 24)

10

Mf α シグナルペプチドのポリヌクレオチド配列:

ATGAGATTTTCCTTCAATTTTTACTGCAGTTTTATTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCT (配列番号 25)

Mf α シグナルペプチドのポリペプチド配列:

MRFPSIFTAVLFAASSALA (配列番号 26)

MMO435のポリヌクレオチド配列:

ttaactatatacgtaatacacaggatccaccATGAGATTTTCCTTCAATTTTTACTG (配列番号 27)

20

MMO439のポリヌクレオチド配列:

AGTAGGTGTACGGGCTAACCCGTTATCCAAAGCTAATGCGGAGGATGC (配列番号 28)

MMO514のポリヌクレオチド配列:

TTTTACTGCAGTTTTATTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTTTGGATAACGGGT TAGCCCCG
(配列番号 29)

MMO481のポリヌクレオチド配列:

30

GAGCTAAAAGTACAGTGGGAACAAAGTCGAGGTCGACTTATAACAAATCTTTCAAAGAC
A (配列番号 30)

合成哺乳動物シグナルペプチドのポリヌクレオチド配列:

ATGGAATGGAGCTGGGTCTTTCTTCTTCTCCTGTCAGTAACGACTGGTGTCCACTCC (配列番号 31)

LAKE Fwのポリヌクレオチド配列:

40

CGATCGAAGCTTCGCCACCA (配列番号 32)

Brリバーズのポリヌクレオチド配列:

CTTGCCAATCCATTGTCCAGGGAGTGGACACCAGTCGTTA (配列番号 33)

【化 17】

Br Fwのポリヌクレオチド配列:

TAACGACTGGTGTCCACTCCCTGGACAATGGATTGGCAAG (配列番号 34)

hGLA Rvのポリヌクレオチド配列:

CGATCGGCGGCCGCTCAAAGTAAGTCTTTTAATGACA (配列番号 35)

SP-GLA (yGDS)のポリヌクレオチド配列:

ATGAGATTTCTTCAATTTTTACTGCAGTTTTATTTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTTTGG
ATAACGGGTAGCCCGTACACCTACTATGGGTTGGCTTCACTGGGAAAGATTCATGTGTA
ACTTAGATTGCCAAGAAGAGCCTGACAGCTGTATCTCAGAGAACTATTCATGGAGATG
GCTGAACTAATGGTAAGTGAAGGATGGAAGGATGCTGGTTATGAATACCTATGTATTGA
TGATTGCTGGATGGCTCCACAGCGTGATTCAGAAGGTAGGTTACAAGCTGACCCCCAGA
GATTCCCACATGGCATAACGTCAGCTTGCAAACCTACGTACACAGCAAGGGTCTAAAGTTA
GGCATCTACGCTGATGTCGGAAACAAGACATGTGCTGGTTTTCCAGGTTCAATTCGGTTAC
TATGACATAGATGCGCAGACGTTTGCTGATTGGGGTGTTGATTTGTTGAAGTTTGATGGA
TGCTACTGCGATTCCCTGGAGAACCTAGCCGATGGGTACAAACACATGAGTTTGGCTCTA
AACAGGACTGGTAGGAGCATCGTCTATAGTTGTGAATGGCCCTTGTACATGTGGCCGTTT
CAGAAGCCAACTACACTGAGATAAGACAATACTGTAACCATTGGCGTAACTTTGCTGA
CATAGATGATTCATGGAAGTCAATCAAATCTATCTTGGATTGGACTTCTTTCAACCAGGA
AAGAATTGTTGATGTTGCAGGTCCAGGTGGATGGAATGACCCTGATATGCTTGTATAGG
GAACTTTGGGCTATCATGGAATCAACAAGTTACACAAATGGCTTTGTGGGCGATCATGGC
CGCACCCCTATTCATGTCTAATGATCTACGTCACATATCACCCCAAGCAAAGGCTTTACT
TCAAGATAAGGATGTCATAGCGATCAACCAAGATCCTCTTGGTAAACAAGGTTATCAATT
GAGACAAGGTGACAACCTTTGAAGTGTGGGAAAGACCATTGTCTGGACTTGCGTGGGCTG
TTGCTATGATCAACCGTCAAGAGATCGGAGGGCCAAGATCTTACACTATCGCGGTAGCCT
CTTTGGGTAAAGGGTGTTGCGTGCAATCCTGCCTGCTTCATTACACAATTGCTTCCAGTTAA
GAGAAAGTTGGGTTTCTATGAGTGGACATCTAGGCTAAGAAGTCACATCAATCCTACTGG
TACGGTATTGTTGCAATTGGAGAACAATGCAAATGTCTTTGAAAGATTTGTTA (配列番号
36)

MFリーダー-GLA(yGDS)のポリヌクレオチド配列:

ATGAGATTTCTTCAATTTTTACTGCAGTTTTATTTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCTC
CAGTCAACACTACAACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCCGGCTGAAGCTGTCATCGGT
TACTTAGATTTAGAAGGGGATTTTCGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAAT
AACGGGTATTGTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTA
TCTTTGGATAAAAGATTGGATAACGGGTAGCCCGTACACCTACTATGGGTTGGCTTCAC
TGGGAAAGATTCATGTGTAACCTTAGATTGCCAAGAAGAGCCTGACAGCTGTATCTCAGA
GAACTATTTCATGGAGATGGCTGAACTAATGGTAAGTGAAGGATGGAAGGATGCTGGTT
ATGAATACCTATGTATTGATGATTGCTGGATGGCTCCACAGCGTGATTGAGAAGGTAGGT
TACAAGCTGACCCCCAGAGATTCCCACATGGCATAACGTCAGCTTGCAAACCTACGTACACA
GCAAGGGTCTAAAGTTAGGCATCTACGCTGATGTCGGAAACAAGACATGTGCTGGTTTCC
CAGGTTCAATTCGGTTACTATGACATAGATGCGCAGACGTTTGCTGATTGGGGTGTTGATT
TGTTGAAGTTTGATGGATGCTACTGCGATTCCCTGGAGAACCTAGCCGATGGGTACAAAC
ACATGAGTTTGGCTCTAAACAGGACTGGTAGGAGCATCGTCTATAGTTGTGAATGGCCCT
TGTACATGTGGCCGTTTTCAGAAGCCAACTACACTGAGATAAGACAATACTGTAACCATT
GGCGTAACTTTGCTGACATAGATGATTCATGGAAGTCAATCAAATCTATCTTGGATTGGA
CTTCTTTCAACCAGGAAAGAATTGTTGATGTTGCAGGTCCAGGTGGATGGAATGACCCTG
ATATGCTTGTATAGGGAACCTTTGGGCTATCATGGAATCAACAAGTTACACAAATGGCTT
TGTGGGCGATCATGGCCGCACCCCTATTCATGTCTAATGATCTACGTCACATATCACCCC
AAGCAAAGGCTTTACTTCAAGATAAGGATGTCATAGCGATCAACCAAGATCCTCTTGGTA

【化 1 8】

AACAAGGTTATCAATTGAGACAAGGTGACAACCTTTGAAGTGTGGGAAAGACCATTGTCT
GGACTTGCGTGGGCTGTTGCTATGATCAACCGTCAAGAGATCGGAGGGCCAAGATCTTA
CACTATCGCGGTAGCCTCTTTGGGTAAAGGTGTTGCGTGCAATCCTGCCTGCTTCATTAC
ACAATTGCTTCCAGTTAAGAGAAAGTTGGGTTTCTATGAGTGGACATCTAGGCTAAGAAG
TCACATCAATCCTACTGGTACGGTATTGTTGCAATTGGAGAACACAATGCAAATGTCTTT
GAAAGATTTGTTA (配列番号 37)

MFリーダーのポリペプチド配列:

MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYLDLEGDFDVAVLFPFSNSTNGLL
FINTTASIAAKEEGVSLDKR (配列番号 38)

10

バリエーション番号395 yGDSのポリヌクレオチド配列:

TTGGATAACGGGTTAGCCCGTACACCTACTATGGGTTGGCTTCACTGGGAAAGATTCATG
TGTAACCTTAGATTGCCAAGAAGAGCCTGACAGCTGTATCTCAGAGAACTATTCATGGA
GATGGCTGAACGGATGGTAAGTGAAGGATGGAAGGATGCTGGTTATGAATACCTATGTA
TTGATGATTGCTGGATGGCTCCACAGCGTGATTGAGAAGGTAGGTTACAAGCTGACCCCC
AGAGATTCCACATGGCATAACGTCAGCTTGCAAACCATGTACACAGCAAAGGTCTAAAG
TTAGGCATCTACGCTGATGTCGGAAACAAGACATGTGCTGGTTTCCCAGGTTCAATCGGT
TACTATGACATAGATGCGCAGACGTTTGTCTGATTGGGGTGTGATTTGTTGAAGTTTGAT
GGATGCTACTGCGATTCCCTGGAGAACCTAGCCGATGGGTACAAACACATGAGTTTGGCT
CTAAACAGGACTGGTAGGAGCATCGTCTATAGTTGTGAATGGCCCTTGTACATGTGGCCG
TTTCAGAAGCCAACTACACTGAGATAAGACAATACTGTAACCATTTGGCGTAACCTTGTCT
GACATAGATGATTCATGGGCTTCAATCAAATCTATCTTGGATTGGACTTCTCGTAACCAG
GAAAGAATTGTTGATGTTGCAGGTCCAGGTGGATGGAATGACCCTGATATGCTTGTCTATA
GGGAACCTTTGGGCTATCATGGGACCAACAAGTTACACAAATGGCTTTGTGGGCGATCAT
GGCCGCACCCCTATTCTATGTCTAATGATCTACGTCACATATCACCCCAAGCAAAGGCTTT
ACTTCAAGATAAGGATGTCATAGCGATCAACCAAGATCCTCTTGGTAAACAAGGTTATCA
ATTGAGAAAAGGTGACAACCTTTGAAGTGTGGGAAAGACCATTGTCTGGAGATGCGTGGG
CTGTTGCTATTATCAACCGTCAAGAGATCGGAGGGGCCAAGATCTTACACTATCCCGGTAG
CCTCTTTGGGTAAGGGTGTGCGTGCAATCCTGCCTGCTTCATTACACAATTGCTTCCAGT
TAAGAGACAATTGGGTTTCTATAACTGGACCTCTAGGCTAAAAAGTCACATTAATCCTAC
TGGTACGGTATTGTTGCAATTGGAGAACACAATGCAAATGTCTTTGAAAGATTTGTTA
(配列番号 39)

20

30

バリエーション番号395のポリペプチド配列:

LDNGLARTPTMGWLHWERFMCNLDCQEEPDCISEKLFMEMAERMVSEGWKDAGYEYLCI
DDCWMAPQRDSEGRQLQADPQRFPHGIRQLANHVHSGKGLKLGIVADVGNKTCAGFPGSFGYY
DIDAQTFADWGVDLLKFDGICYCDSLENLADGYKHMSLALNRTGRSIVYSCEWPLYMWPFQ
KPNYTEIRQYCNHWRNFADIDDSWASIKSILDWTSRNQERIVDVAGPGGWNDPDLVIGNF
GLSWDQQVTQMALWAIMAAPLFMSNDLRHISPQAKALLQDKDVIAINQDPLGKQGYQLRK
GDNFEVWERPLSGDAWAVAIINRQEIGGPRSYTIPVASLGKGVACNPACFITQLLPVKRQLGF
YNWTSRLKSHINPTGTVLLQLENTMQMSLKDLL (配列番号 40)

40

バリエーション番号402 yGDSのポリヌクレオチド配列:

TTGGATAACGGGTTAGCCCGTACACCTACTATGGGTTGGCTTCACTGGGAAAGATTCATG
TGTAACCTTAGATTGCCAAGAAGAGCCTGACAGCTGTATCTCAGAGAACTATTCATGGA
GATGGCTGAACGGATGGTAAGTGAAGGATGGAAGGATGCTGGTTATGAATACCTATGTA
TTGATGATTGCTGGATGGCTCCACAGCGTGATTGAGAAGGTAGGTTACAAGCTGACCCCC
AGAGATTCCACATGGCATAACGTCAGCTTGCAAACCTACGTACACAGCAAAGGTCTAAAG
TTAGGCATCTACGCTGATGTCGGAAACAAGACATGTGCTGGTTTCCCAGGTTCAATCGGT

【化 19】

TACTATGACATAGATGCGCAGACGTTTGTCTGATTGGGGTGTGATTGTTGAAGTTTGAT
GGATGCTACTGCGATTCCCTGGAGAACCTAGCCGATGGGTACAAACACATGAGTTTGGCT
CTAAACAGGACTGGTAGGCCGATCGTCTATAGTTGTGAATGGCCCTTGTACATGTGGCCG
TTTCAGAAGCCAACTACACTGAGATAAGACAATACTGTAACCATTGGCGTAACTTTGTCT
GACATAGATGATTCATGGGCTTCAATCAAATCTATCTTGGATTGGACTTCTCGTAACCAG
GAAAGAATTGTTGATGTTGCAGGTCCAGGTGGATGGAATGACCCTGATATGCTTGTCTATA
GGGAACTTTGGGCTATCATGGGACCAACAAGTTACACAAATGGCTTTGTGGGCGATCAT
GGCCGCACCCCTATTCTATGTCTAATGATCTACGTACATATCACCCCAAGCAAAGGCTTT
ACTTCAAGATAAAGGATGTCATAGCGATCAACCAAGATCCTCTTGGTAAACAAGGTTATCA
ATTGAGAAAAGGTGACAACCTTTGAAGTGTGGGAAAGACCATTGTCTGGAGATGCGTGGG
CTGTTGCTATTATCAACCGTCAAGAGATCGGAGGGGCCAAGATCTTACACTATCCCGGTAG
CCTCTTTGGGTAAGGGTGTGCGTGCAATCCTGCCTGCTTCATTACACAATTGCTTCCAGT
TAAGAGACAATTGGGTTTCTATAACTGGACCTCTAGGCTAAAAAGTCACATTAATCCTAC
TGGTACGGTATTGTTGCAATTGGAGAACACAATGCAAATGTCTTTGAAAGATTGTTA
(配列番号 41)

10

バリエーション番号402のポリペプチド配列:

LDNGLARTPTMGWLHWERFMCNLDCQEEPDCISEKLFMEMAERMVSEGWKDAGYEYLCI
DDCWMAPQRDSEGRQLQADPQRFPHGIRQLANYVHSGKGLKLGYYADVGNKTCAGFPGSFGYY
DIDAQTFADWGVDLLKFDGICYCDSLENLADGKYHMSLALNRTGRPIVYSCEWPLYMWPFQ
KPNYTEIRQYCNHWRNFADIDDSWASIKSILDWTSRNQERIVDVAGPGGWNDPMLVIGNF
GLSWDQQVTQMALWAIMAAPLFMSNDLRHISPQAKALLQDKDVIAINQDPLGKQGYQLRK
GDNFEVWERPLSGDAWAVAIINRQEIGGPRSYTIPVASLKGVCNPNACFITQLLPVKRQLGF
YNWTSRLKSHINPTGTVLLQLENTMQMSLKDLL (配列番号 42)

20

バリエーション番号625 yCDSのポリヌクレオチド配列:

TTGGATAACGGGTTAGCCCGTACACCTACTATGGGTTGGCTTCACTGGGAAAGATTCATG
TGTAACCTTAGATTGCCAAGAAGAGCCTGACAGCTGTATCTCAGAGAACTATTTCATGGA
GATGGCTGAACGGATGGTAACCGAAGGATGGAAGGATGCTGGTTATGAATACCTATGTA
TTGATGATTGCTGGATGGCTCCACAGCGTGATTGAGAAGGTAGGTTACAAGCTGACCCCG
AGAGATTCCACATGGCATAACGTCAGCTTGCAAACCATGTACACAGCAAAGGTCTAAAG
TTAGGCATCTACGCTGATGTCGGAAACAAGACATGTGCTGGTTTCCAGGTTTCATTCCGT
TACTATGACATAGATGCGCAGACGTTTGTCTGATTGGGGTGTGATTGTTGAAGTTTGAT
GGATGCTACTGCGATTCCCTGGAGAACCTAGCCGATGGGTACAAACACATGAGTTTGGCT
CTAAACAGGACTGGTAGGCCGATCGTCTATAGTTGTGAATGGCCCTTGTACATGTGGCCG
TTTCAGAAGCCAACTACACTGAGATAAGACAATACTGTAACCATTGGCGTAACTTTGTCT
GACATAGATGATTCATGGGCTTCAATCAAATCTATCTTGGATTGGACTTCTCGTAACCAG
GAAAGAATTGTTGATGTTGCAGGTCCAGGTGGATGGAATGACCCTGATATGCTTGTCTATA
GGGAACTTTGGGCTATCATGGGACCAACAAGTTACACAAATGGCTTTGTGGGCGATCAT
GGCCGCACCCCTATTCTATGTCTAATGATCTACGTGCGATATCACCCCAAGCAAAGGCTTT
ACTTCAAGATAAAGGATGTCATAGCGATCAACCAAGATCCTCTTGGTAAACAAGGTTATCA
ATTGAGAAAAGGTGACAACCTTTGAAGTGTGGGAAAGACCATTGTCTGGAGATGCGTGGG
CTGTTGCTATTATCAACCGTCAAGAGATCGGAGGGGCCAAGATCTTACACTATCCCGGTAG
CCTCTTTGGGTAAGGGTGTGCGTGCAATCCTGCCTGCTTCATTACACAATTGCTTCCAGT
TAAGAGACAATTGGGTTTCTATAACTGGACCTCTAGGCTAAAAAGTCACATTAATCCTAC
TGGTACGGTATTGTTGCAATTGGAGAACACAATGCAAACCTCTTTGAAAGATTGTTA
(配列番号 43)

30

40

バリエーション番号625のポリペプチド配列:

LDNGLARTPTMGWLHWERFMCNLDCQEEPDCISEKLFMEMAERMVTEGWKDAGYEYLCI
DDCWMAPQRDSEGRQLQADPQRFPHGIRQLANHVHSGKGLKLGYYADVGNKTCAGFPGSFGYY
DIDAQTFADWGVDLLKFDGICYCDSLENLADGKYHMSLALNRTGRPIVYSCEWPLYMWPFQ

【化 2 0】

KPNYTEIRQYCNHWRNFADIDDSWASIKSILDWTSRNQERIVDVAGPGGWNDPDMVLVIGNF
GLSWDQQVTQMALWAIMAAPLFMSNDLRAISPQAKALLQDKDVIAINQDPLGKQGYQLRK
GDNFEVWERPLSGDAWAVAIINRQEIGGPRSYTIPVASLGKGVACNPACFITQLLPVKRQLGF
YNWTSRLKSHINPTGTVLLQLENTMQTSLKDLL (配列番号 44)

バリエーション番号648 yCDSのポリヌクレオチド配列:

TTGGATAACGGGTTAGCCCGTACACCTCCGATGGGTTGGCTTCACTGGGAAAGATTCATG 10
TGTAACCTTAGATTGCCAAGAAGAGCCTGACAGCTGTATCTCAGAGAACTATTCGAAGA
GATGGCTGAACGGATGGTAACCGAAGGATGGAAGGATGCTGGTTATGAATACCTATGTA
TTGATGATTGCTGGATGGCTCCACAGCGTGATTGAGAAGGTAGGTTACAAGCTGACCCCC
AGAGATTCCCACATGGCATAACGTCAGCTTGCAAACCATGTACACAGCAAAGGTCTAAAG
TTAGGCATCTACGCTGATGTCGGAAACAAGACATGTGCTGGTTTCCCAGGTTTCATTCCGT
TACTATGACATAGATGCGCAGACGTTTGTGCTGATTGGGGTGTGATTTGTTGAAGTTTGAT
GGATGCTACTGCGATTCCCTGGAGAACCTAGCCGATGGGTACAAACACATGAGTTTGGCT
CTAAACAGGACTGGTAGGCCGATCGTCTATAGTTGTGAATGGCCCTTGTACATGTGGCCG
TTTCAGAAGCCAACTACACTGAGATAAGACAATACTGTAACCATTTGGCGTAACCTTGTCT
GACATAGATGATTCATGGGCTTCAATCAAATCTATCTTGGATTGGACTTCTCGTAACCAG 20
GAAAGAATTGTTGATGTTGCAGGTCCAGGTGGATGGAATGACCCTGATATGCTTGTGCATA
GGGAACCTTTGGGCTATCATGGGACCAACAAGTTACACAAATGGCTTTGTGGGCGATCAT
GGCCGGCCCCCTATTCATGTCTAATGATCTACGTGCGATATCACCCCAAGCAAAGGCTTT
ACTTCAAGATAAGGATGTCATAGCGATCAACCAAGATCCTCTTGGTAAACAAGGTTATCA
ATTGAGAAAAGGTGACAACCTTTGAAGTGTGGGAAAGACCATTGTCTGGAGATGCGTGGG
CTGTTGCTATTATCAACCGTCAAGAGATCGGAGGGCCAAGATCTTACACTATCCCGGTAG
CCTCTTTGGGTAAAGGGTGTGCGTGCAATCCTGCCTGCTTCATTACACAATTGCTTCCAGT
TAAGAGACAATTGGGTTTCTATAACGCAACCTCTAGGCTAAAAAGTCACATTAATCCTAC
TGGTACGGTATTGTTGCAATTGGAGAACACAATGCAAACCTCTTTGAAAGATTTGTTA
(配列番号 45)

10

20

30

バリエーション番号648のポリペプチド配列:

LDNGLARTPPMGWLHWERFMCNLDCQEEDSCISEKLFEEMAERMVTEGWKDAGYEYLCI
DDCWMAPQRDSEGRQLQADPQRFPHGIRQLANHVHSGKLKLGIVADVGNKTCAGFPGSFGYY
DIDAQTFADWGVDLLKFDGICYCDSLENLADGYKHMSLALNRTGRPIVYSCEWPLYMWPFQ
KPNYTEIRQYCNHWRNFADIDDSWASIKSILDWTSRNQERIVDVAGPGGWNDPDMVLVIGNF
GLSWDQQVTQMALWAIMAGPLFMSNDLRAISPQAKALLQDKDVIAINQDPLGKQGYQLRK
GDNFEVWERPLSGDAWAVAIINRQEIGGPRSYTIPVASLGKGVACNPACFITQLLPVKRQLGF
YNATSRLKSHINPTGTVLLQLENTMQTSLKDLL (配列番号 46)

【0141】

実施例 1

G L A 遺伝子の取得および発現ベクターの構築

Saccharomyces cerevisiae における最適化された遺伝子発現のために、WT ヒト G L A をコードする合成遺伝子 (配列番号 3) を設計し、アセンブルし、大腸菌発現ベクター p C K 1 0 0 9 0 0 i (配列番号 6) にサブクローニングした。

【0142】

成熟形態の酵母最適化 G L A に融合された 19 アミノ酸の *S. cerevisiae* M F α シグナルペプチドをコードするキメラ G L A 発現構築物を、以下のように、分泌発現のために設計した酵母発現ベクターで生成した。S 2 8 8 C ゲノム DNA 由来のオリゴヌクレオチド M M O 4 3 5 (配列番号 27) および M M O 4 3 9 (配列番号 28) を使用

40

50

してPCRによって、MF α シグナルペプチドをコードするフラグメント（配列番号25）を増幅し、プライマーMMO514（配列番号29）およびMMO481（配列番号30）を使用して、合成GLAをコードするフラグメント（配列番号3）を増幅した。これらのオリゴヌクレオチドの5'末端のさらなる配列は、線状化されたプラスミドpYT-72Bg1（配列番号7）で共形質転換する場合の酵母組換えクローニングのための相同性を提供する。得られたベクターにおいて、融合タンパク質SP-GLA（配列番号36）の発現は、ADH2プロモーターによって駆動される。GLA（配列番号37）にN末端融合された83アミノ酸のMF α リーダーペプチド（配列番号38）の融合物をコードする融合構築物を、同じ技術を使用してクローニングした。S. cerevisiae株INVSc1において、組換えクローニングおよび遺伝子発現を実施した。当業者に一般に公知の指向進化技術を使用して、このプラスミド構築物から遺伝子バリエーションのライブラリーを生成した（例えば、米国特許第8,383,346号およびWO2010/144103を参照のこと）。

【0143】

一過性トランスフェクションにおける分泌発現のための成熟ヒトGLAコード配列をコードする合成遺伝子に融合された合成シグナルペプチドをコードするキメラGLA発現構築物を、以下のように生成した。オリゴヌクレオチドPLEV113Fw（配列番号32）およびSPGLARv（配列番号33）を使用し、PCRを使用して、合成シグナルペプチドをコードするフラグメント（配列番号31）を増幅した。成熟形態のGLAの天然ヒトコード配列をコードする第2のフラグメント（配列番号4）を、オリゴヌクレオチドSPGLAFw（配列番号34）およびGLARv（配列番号35）を使用して増幅した。オーバーラップエクステンションPCRによるスプライシングを使用して、これらのフラグメントを組換え、得られたキメラフラグメントを、HindIII/NotIで線状化した哺乳動物発現ベクターpLEV113にライゲーションした。当業者に一般に公知の指向進化技術を使用して、このプラスミド構築物から特定の遺伝子バリエーションを生成した。

【0144】

実施例2

ハイスループット増殖アッセイ

GLAおよびGLAバリエーションのハイスループット（HTP）増殖

酢酸リチウム法を使用して、GLAおよびGLAバリエーションを発現するベクターで形質転換した酵母（INVSc1）細胞を、SD-Ura寒天プレート上で選択した。30℃で72時間インキュベートした後、6%グルコースを補充した200 μ l/ウェルのSD-Uraブロス（2g/L SD-Ura、6.8g/Lアミノ酸不含酵母ニトロゲンベース [Sigma Aldrich]）、3.06g/Lリン酸二水素ナトリウム、0.804g/Lリン酸水素二ナトリウム、pH6.0を充填したAxygen（登録商標）1.1ml 96ウェルディープウェルプレートのウェルに、コロニーを入れた。Kuhnerシェーカー（250rpm、30℃および相対湿度85%）中で、細胞を20~24時間成長させた。2%グルコースを補充した380 μ LのSD-uraブロスに、一晩培養したサンプル（20 μ L）を移した。Kuhnerシェーカー（250rpm、30℃および相対湿度85%）中で、プレートを66~84時間インキュベートした。次いで、細胞をペレット化し（4000rpm $\times$ 20分間）、上清を単離し、分析前に4℃で保存した。

【0145】

上清のHTP分析

4-メチルウンベリフェリル α -D-ガラクトピラノシド（MUGal）の加水分解を測定することによって、GLAバリエーション活性を決定した。このアッセイのために、上記のように生成した5~50 μ Lの酵母培養上清を、96ウェルブラック不透明底プレート中で、0~45 μ LのMcIlvaine緩衝液（McIlvaine, J. Biol.

Chem., 49:183-186 [1921]), pH4.8および50 μ Lの50 mMクエン酸塩中2 mM MUGal、200 mM KCl、pH4.6と混合した。反応物を短時間混合し、37°Cで30~180分間インキュベートしてから、100 μ Lの1 M炭酸ナトリウムでクエンチした。蛍光をモニタリングするSpectraMax (登録商標) M2マイクロプレートリーダー (励起355 nm、発光448 nm) を使用して、加水分解を分析した。

【0146】

酸で前処理した上清のHTP分析

リソソーム中でバリエーションが遭遇し得る極端なpHをシミュレートするために、酸性緩衝液でGLAバリエーションをチャレンジした。最初に、50 μ Lの酵母培養上清および50 μ LのMcIlvaine緩衝液 (pH3.3~4.3) を96ウェル丸底プレートのウェルに添加した。PlateLoc Thermal Microplate Sealer (Agilent) でプレートを密封し、37°Cで1~3時間インキュベートした。アッセイのために、10~50 μ Lの酸性pHチャレンジサンプルを、0~40 μ LのMcIlvaine緩衝液pH4.8、25 μ Lの1 Mクエン酸緩衝液pH4.3および25 μ LのMcIlvaine緩衝液pH4.8中4 mM MUGalと混合した。反応物を短時間混合し、37°Cで30~180分間インキュベートしてから、100 μ Lの1 M炭酸ナトリウムでクエンチした。蛍光をモニタリングするSpectraMax (登録商標) M2マイクロプレートリーダー (励起355 nm、発光448 nm) を使用して、加水分解を分析した。

【0147】

塩基で前処理した上清のHTP分析

患者への投与後に血液中でバリエーションが遭遇するpHをシミュレートするために、塩基性 (中性) 緩衝液でGLAバリエーションをチャレンジした。最初に、50 μ Lの酵母培養上清および50 μ LのMcIlvaine緩衝液 (pH7.0~8.2) または200 mM重炭酸ナトリウム (pH9.1~9.7) を96ウェル丸底プレートのウェルに添加した。プレートを密封し、37°Cで1~18時間インキュベートした。アッセイのために、10~50 μ Lの塩基性pHチャレンジサンプルを、0~40 μ LのMcIlvaine緩衝液pH4.8、25 μ Lの1 Mクエン酸緩衝液pH4.3および25 μ LのMcIlvaine緩衝液pH4.8中4 mM MUGalと混合した。反応物を短時間混合し、37°Cで30~180分間インキュベートしてから、100 μ Lの1 M炭酸ナトリウムでクエンチした。蛍光をモニタリングするSpectraMax (登録商標) M2マイクロプレートリーダー (励起355 nm、発光448 nm) を使用して、加水分解を分析した。

【0148】

ウシ血清で前処理した上清のHTP分析

患者への注入後にバリエーションが遭遇する条件をシミュレートするために、ウシ血清でGLAバリエーションをチャレンジした。最初に、20 μ Lの酵母培養上清および80 μ Lのウシ血清を96ウェル丸底プレートのウェルに添加した。プレートを密封し、37°Cで1時間インキュベートした。アッセイのために、50 μ Lの血清チャレンジサンプルを、25 μ Lの1 Mクエン酸緩衝液pH4.3および25 μ LのMcIlvaine緩衝液pH4.8中4 mM MUGalと混合した。反応物を短時間混合し、37°Cで180分間インキュベートしてから、100 μ Lの1 M炭酸ナトリウムでクエンチした。蛍光をモニタリングするSpectraMax (登録商標) M2マイクロプレートリーダー (励起355 nm、発光448 nm) を使用して、加水分解を分析した。

【表 2 - 1】

表2.1非チャレンジ(NC)または示されているpHでのチャレンジ後の GLAバリエーションの相対活性 ^{1,2}					
バリエーション#	NC	pH 4.3	pH 7.0	配列番号5と比べたアミノ酸の相違	配列 番号
1	+	+	+	A337S	47
2	+	+	+	E43D	48
3	+	+	+	E43D/E48D	49
4	+	+++	+	E43D/E48D/I208V/N247D/Q299R/Q302K/R373K/I376V	50
5	++	++	++	E43D/E48D/I208V/R373K	51
6	+	+++	+	E43D/E48D/I208V/R373K/I376V	52
7	+	++	+	E43D/E48D/N247D/Q299R/Q302K/R373K/I376V	53
8	++	+++	+++	E43D/E48D/N247D/Q302K/R373K	54
9	+	+++	+	E43D/E48D/Q302K/R373K/I376V	55
10	++	+++	++	E43D/I208V/N247D	56
11	+	+++	++	E43D/I208V/N247D/Q299R/R373K/I376V	57
12	+	++	+	E43D/I208V/Q299R/R373K/I376V	58
13	++	+++	++	E43D/N247D/R373K/I376V	59
14	+	+++	++	E43D/R373K/I376V	60
15	+	+	+	E48D/I208V/Q299R/Q302K/R373K	61
16	+	++	+	E48D/R373K/I376V	62
17	+	+	+	E48G/R373K	63
18	+	+	++	F217S	64
19	+	++	+	I208V/N247D/Q299R/Q302K/R373K/I376V	65
20	+	+++	++	I208V/N247D/Q299R/R373K/I376V	66
21	+	+++	++	I208V/N247D/R373K/I376V	67
22	+	+	+	I208V/Q299R/I376V	68
23	+	+++	++	I208V/Q302K/R373K/I376V	69
24	+	++	+	I376V	70
25	+	+	+	K36Q	71
26	+	+	+	P179S/R373K	72
27	+	+	+	Q299R/M322V/R373K	73
28	+	+	+	Q299R/Q302K/R373K	74
29	+	+	+	Q299R/Q302K/R373K/I376V	75
30	+	++	+	Q302K/I376V	76
31	+	+	+	R373K	77
32	+	++	+	R373K/I376V	78

1. バリエーションの活性/(配列番号3によってコードされる)WT GLA(配列番号5の活性として、相対活性を計算した。

2. += WT GLA(配列番号5)に対して0.5～1.5の相対活性;

++ = WT GLA(配列番号5)に対して1.5超～2.5の相対活性;および

+++ = WT GLA(配列番号5)に対して2.5超の相対活性。

【表 2 - 2】

表2.2 -非チャレンジ(NC)または示されているpHでのチャレンジ後の GLAバリエーションの相対活性 ^{1,2,3}					
バリエーション#	NC	pH 4.2	pH 7.1	配列番号5と比べたアミノ酸の相違	配列 番号
33	+	+	+	A199H/E367S	79
34	+	++	++	A337P	80
35	++	++	++	A339S	81
36	+	++	++	A350G	82
37	+	+	+	D105A	83
38	-	+	-	D105S	84
39	+	++	++	D124N/E147G/N161K/R162Q/T163V/R165A/I167S/V168I/Y169V/S170-/M177S/F217E	85
40	++	++	++	D396R	86
41	+	+	+	D396T	87
42	+++	+++	+++	E367N	88
43	+	+	+	E367T	89
44	+	++	+	E387K	90
45	++	++	++	E387Q	91
46	+	+++	+	E387R	92
47	+	++	+	E387T	93
48	+	+	+	E40D	94
49	+	+	+	F180R	95
50	++	++	++	F180S	96
51	++	++	+	F198S	97
52	++	+	++	F217D	98
53	+	++	++	F217R	99
54	+	+	+	F352I	100
55	++	+++	++	F352V/F365I	101
56	++	++	++	F365I	102
57	++	++	++	F365K	103
58	++	++	++	F365L	104
59	+	+	+	F365R	105
60	+	+	+	F365T	106
61	++	++	++	F365V	107
62	++	+	++	G303Q/R373V	108
63	+	+	++	H155A	109
64	+	+	++	H155L	110
65	+	+	+	H155R	111
66	+	+	+	H155T	112
67	++	+	++	H375E	113
68	+	++	+	H84S	114
69	+	+	+	I102L	115
70	+	+	+	I102L/L394V	116

10

20

30

40

【表 2 - 3】

表2.2 -非チャレンジ(NC)または示されているpHでのチャレンジ後の GLAバリエーションの相対活性 ^{1,2,3}					
バリエーション#	NC	pH 4.2	pH 7.1	配列番号5と比べたアミノ酸の相違	配列 番号
71	++	+	++	I123T/T369N	117
72	+	+	+	I167V	118
73	+	+++	++	K206A	10
74	+	+++	++	K206M	119
75	+	+++	++	K206Q	120
76	+	+++	++	K206R	24
77	+	++	+	K206T/V359S	121
78	++	++	++	K343D	122
79	++	++	++	K343G	123
80	+	+	+	K362Q	124
81	+	+	+	K362R	125
82	+	+	+	K36D	126
83	+	++	+	K36E	127
84	++	++	++	K395*	128
85	+	+	+	K395G	129
86	++	++	++	K395P	130
87	+	++	+	K395R	131
88	+	++	+	K395S	132
89	++	+	+	K395T	133
90	+	+	+	K96I	134
91	+	+	++	K96L	135
92	+	+	+	K96R	136
93	++	+++	+	K96R/L397V	137
94	+	+	+	L100F	138
95	+	+	+	L158A	139
96	+	+	+	L158I	140
97	+	+	+	L158M	141
98	+	+	+	L158R	142
99	+	+	+	L23M	143
100	+	+	+	L23T	144
101	+++	+++	+++	L316D	145
102	+++	+++	+++	L316E	146
103	++	++	++	L384F	147
104	++	++	++	L386V	148
105	+++	++	++	L394A	149
106	++	++	+++	L394R	150
107	+++	+++	+++	L394S	151
108	+++	+++	+++	L394T	152
109	++	++	+++	L397*	153

【表 2 - 4】

表2.2 -非チャレンジ(NC)または示されているpHでのチャレンジ後の GLAバリエーションの相対活性 ^{1,2,3}					
バリエーション#	NC	pH 4.2	pH 7.1	配列番号5と比べたアミノ酸の相違	配列 番号
110	+++	++	+++	L397D	154
111	++	++	++	L397H	155
112	+	++	+	L397I	156
113	++	+	+++	L397Q	157
114	++	++	++	L397R	158
115	++	++	+++	L397T	159
116	++	++	++	L398E	160
117	++	++	++	L398G	161
118	++	++	++	L398N	162
119	++	++	++	L398Q	163
120	++	++	++	L398R	164
121	+	++	++	L44R/L384F	165
122	++	++	++	L44T	166
123	-	+	-	M20D/Q302K	167
124	++	++	+	M253F	168
125	+	+	+	M322I	169
126	+++	+++	+++	M390D	170
127	++	++	++	M390R	171
128	+	+	+	M390T	172
129	+	++	++	M392G	173
130	+	++	+	M392P	174
131	++	+	++	M392S	175
132	+	+	+	M39Y	176
133	+	+	+	N388R	177
134	+	+	+	N91Q	178
135	++	+++	++	Q190S/T369D	179
136	+	+	+	Q249A	180
137	+	+	+	Q302A	181
138	++	++	++	Q385H	182
139	+	+	+	Q385I	183
140	++	++	++	Q385L	184
141	+	+	+	Q391G	185
142	+	+	+	Q80A	186
143	+	+	+	Q80H	187
144	+	++	+	Q80V	188
145	+	+	+	Q88A	189
146	+	+	+	Q88F	190
147	++	++	++	Q88H	191
148	+	++	+	Q88R	192

【表 2 - 5】

表2.2 -非チャレンジ(NC)または示されているpHでのチャレンジ後の GLAバリエーションの相対活性 ^{1, 2, 3}					
バリエーション#	NC	pH 4.2	pH 7.1	配列番号5と比べたアミノ酸の相違	配列 番号
149	++	+	++	Q88S	193
150	+	+	+	R162H	194
151	+	+	+	R162S	195
152	++	++	++	R221K/A350G	196
153	+	+	++	R221T	197
154	++	+	++	R301I/K362T	198
155	+	+	+	R301L	199
156	++	+	++	R371S	200
157	++	+	++	R371V	201
158	++	+	++	R87K	202
159	+	+	+	R87P/L398R	203
160	+	++	+	S166A	204
161	+	+	+	S166H	205
162	+	+	+	S166K	206
163	+	+	+	S31D	207
164	+	-	-	S34D/M392P	208
165	+	-	-	S34G	209
166	++	+	+	S34H/M390R	210
167	+	+	+	S34R	211
168	++	++	++	S374M	212
169	++	++	++	S374T	213
170	++	++	++	S393E	214
171	++	++	++	S393G	215
172	+	+	+	S393H	216
173	++	++	++	S393P	217
174	+	+	+	S47I	218
175	+	++	+	S47R	219
176	+	+	+	S47T	220
177	+	++	+	S95D	221
178	++	+++	++	S95E	222
179	+	+	+	S95Q	223
180	++	++	+++	T369D	224
181	+	+	+	T369S	225
182	++	+	+	T389S	226
183	+	+	+	V133I	227
184	++	+	+	V168A	228
185	+	++	+	V168L	229
186	++	++	+++	V345N	230
187	+	+	+	V345Y	231

10

20

30

40

【表 2 - 6】

表2.2 -非チャレンジ(NC)または示されているpHでのチャレンジ後の GLAバリエーションの相対活性 ^{1,2,3}					
バリエーション#	NC	pH 4.2	pH 7.1	配列番号5と比べたアミノ酸の相違	配列 番号
188	+	+	+	V359E	232
189	+	+	+	V93I	233
190	++	+	++	W178H	234
191	+	++	+	W178S	235

1. バリエーションの活性/(配列番号3によってコードされる)WT GLA(配列番号5の活性として、相対活性を計算した。
2. バリエーション# 73 (Rd2BB)は、配列番号8のポリヌクレオチド配列および配列番号10のポリペプチド配列を有する。
3. - = WT GLA(配列番号5)に対して0.5未満の相対活性;
 + = WT GLA(配列番号5)に対して0.5～1.5の相対活性;
 ++ = WT GLA(配列番号5)に対して1.5超～2.5の相対活性;および
 +++ = WT GLA(配列番号5)に対して2.5超の相対活性。

【表 2 - 7】

表2.3 -非チャレンジ(NC)または示されているpHでのチャレンジ後の GLAバリエーションの相対活性					
バリエーション#	NC	pH 4.2	pH 7.6	配列番号10と比べたアミノ酸の相違	配列 番号
192	+	+	+	A206E	236
193	+	+	+	A206G	237
194	++	++	++	A206R	238
195	+	+	+	A206S	239
196	+	+	+	A350G	240
197	++	++	++	A350G/K362Q/T369A	241
198	++	++	+++	A350G/T369D	242
199	++	++	++	A350G/T369S	243
200	+	+	+	C143A	244
201	+	+	+	C143T	245
202	+	+	+	C59A	246
203	++	++	+++	E367A/T369D	247
204	+	+	+	E367D	248
205	++	++	++	E367D/T369D	21
206	+++	+++	+++	E367N	18
207	++	+++	+++	E367N/R373K	249
208	++	+++	+++	E367N/R373K/I376V	250
209	+	+	+	E367P/T369D	251
210	++	++	++	F365L/E367N	252
211	++	++	++	F365L/E367N/I376V	253
212	++	++	++	F365L/E367N/R373K/I376V	254
213	+	-	-	H15Q/	255
214	+++	+++	+++	K343D/F365L/E367N	256
215	+	+	+	K343G	257
216	++	+++	+++	K343G/F365L/E367N/R373K	258
217	++	++	++	L316D	259
218	+++	+++	+++	M322I/E367N/R373K	13
219	+	+	+	M322I/R373K	260
220	+	+	++	M322V/R373K/I376V	261
221	+	+	+	M390I	262
222	++	++	+	P228Q/T369D	263
223	+	++	++	Q302K/A337P/A350G/K362Q	264
224	++	+++	+++	Q302K/M322V/E367N	265
225	+	+	+	R165S	266
226	+	+	++	R221T/F365L	267
227	-	-	-	R325H	268
228	+	+	+	R373K	269
229	+	-	+	R373K/I376V	270
230	+	-	+	S374R	271
231	++	++	++	T369D	272

10

20

30

40

【表 2 - 8】

表2.3 -非チャレンジ(NC)または示されているpHでのチャレンジ後の GLAバリエーションの相対活性					
バリエーション#	NC	pH 4.2	pH 7.6	配列番号10と比べたアミノ酸の相違	配列 番号
232	++	++	++	T369S	273

1. バリエーションの活性/Rd2BB(配列番号10)の活性として、相対活性を計算した。
2. バリエーション# 218 (Rd3BB)は、配列番号11のポリヌクレオチド配列および配列番号13のポリペプチド配列を有する。
3. - = Rd2BB(配列番号10)に対して0.5未満の相対活性;
 + = Rd2BB(配列番号10)に対して0.5～1.5の相対活性;
 ++ = Rd2BB(配列番号10)に対して1.5超～2.5の相対活性;および
 +++ = Rd2BB(配列番号10)に対して2.5超の相対活性。

【表 2 - 9】

表2.4 -非チャレンジ(NC)または示されているpHもしくは条件でのチャレンジ後のGLAバリエーションの 相対活性 ^{1, 2}						
バリエ アント#	NC	pH 4.2	pH 7.6	血清	配列番号5(WT GLA)と比べたアミノ酸の相違	配列 番号
233	+++	+++	+++	+++	K206A/F217R/N247D/L316D/A350G/E367D/T369D	274
234	+++	+++	+++	+++	K206A/F217R/N247D/Q302K/A350G/E367D/T369D	275
235	+++	+++	+++	+++	K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/A337P/A350G/E367D/T369D	276
236	+++	++	+++	++	K206A/F217R/Q302K/E367D/T369D	277
237	+++	+++	+++	+++	K206A/F217R/Q302K/L316D/A337P/A350G/E367D/T369D	278
238	++	+++	+++	++	K206A/I208V/M322V/K343G/F365L/R373K/I376V	279
239	+++	+++	+++	++	K206A/I208V/R221K/N247D/M322I/K343D/F365L/R373K/I376V	280
240	-	+	+	+	K206A/L269I/P349L/R373K	281
241	++	+++	+++	++	K206A/N247D/M322V/K343D/R373K/I376V	282
242	+++	+++	+++	+++	K206A/N247D/M322V/K343G/F365L/R373K	283
243	+++	+++	+++	+++	K206A/N247D/Q302K/A337P/K343G/A350G	284
244	+++	+++	+++	+++	K206A/N247D/Q302K/L316D/A350G	285
245	++	+++	+++	++	K206A/N247D/Q302K/M322V/F365L/R373K/I376V	286
246	+++	+++	+++	+++	K206A/Q302K/L316D/A337P	287
247	+++	+++	+++	+++	K206A/R221K/N247D/M322V/K343D/R373K	288
248	+	+	+	+	K206A/R221T/M322V/K343G/R373K	289
249	++	++	+++	++	K206A/R221T/M322V/R373K	290
250	+	+	+	+	K96I/K206A/F217R	291
251	++	+	++	+	K96I/K206A/F217R/N247D	292
252	+++	+++	+++	+++	K96I/K206A/F217R/N247D/A350G/E367D/T369D	293
253	+++	+++	+++	+++	K96I/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/A337P/E367D/T369D	294
254	+	+	+	+	L100F/K206A	295
255	+++	+++	+++	++	L100F/K206A/I208V/R221K/N247D/Q302K/M322I/K343D/F365L/I376V	296
256	++	+++	+++	+++	L100F/K206A/I208V/R221K/N247D/Q302K/M322V/K343D/F365L/I376V	297
257	++	++	++	++	L100F/K206A/I208V/R221T/N247D/K343D/F365L/I376V	298
258	+++	++	+++	++	L100F/K206A/I208V/R221T/Q302K/M322I/K343D/I376V	299
259	+	+	+	+	L100F/K206A/M322V/F365L/R373K/I376V	300
260	+	+	+	+	L100F/K206A/N247D/F365L/R373K/I376V	301
261	++	++	++	+	L100F/K206A/N247D/M322V/K343D/I376V	302
262	++	+++	+++	+++	L100F/K206A/R221K/N247D/Q302K/M322V/F365L/R373K/I376V	303
263	+	++	++	+++	L100F/K206A/R221K/N247D/Q302K/M322V/I376V	304

10

20

30

40

【表 2 - 1 0】

表2.4 -非チャレンジ(NC)または示されているpHもしくは条件でのチャレンジ後のGLAバリエーションの 相対活性 ^{1, 2}						
バリエーション#	NC	pH 4.2	pH 7.6	血清	配列番号5(WT GLA)と比べたアミノ酸の相違	配列 番号
264	++	++	+++	++	L100F/K206A/R221K/N247D/Q302K/M322V/K343D/R373K/I376V	305
265	+	+	+	+	L100F/K206A/R221K/R373K/I376V	306
266	++	++	+++	++	L100F/K206A/R221T/M322I/K343E/F365L/R373K	307
267	+++	+++	+++	+++	L100F/K206A/R221T/N247D/Q302K/K343D/F365L/R373K	308
268	+	+	+	+	L100F/K206A/R373K/I376V	309
269	-	+	+	+	L37I/K206A/R221K/N247D/M322I/R373K	310
270	+	+	+	+	L44R/C143Y/K206A/A337P/A350G	311
271	-	+	+	+	L44R/E187G/K206A/A337P/A350G	312
272	+	+	+	+	L44R/K206A	313
273	+	+	+	+	L44R/K206A/E367D/T369D	314
274	+	+	+	+	L44R/K206A/F217R/A350G	315
275	++	++	++	++	L44R/K206A/F217R/N247D/A337P	316
276	+++	+++	+++	+++	L44R/K206A/F217R/N247D/L316D/A337P/A350G/E367D/T369D	317
277	+++	+++	+++	+++	L44R/K206A/F217R/N247D/L316D/A337P/E367D/T369D	318
278	+++	+++	+++	+++	L44R/K206A/F217R/N247D/L316D/A350G/E367D/T369D	319
279	++	+++	+++	+++	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/A350G	320
280	+	+	+	+	L44R/K206A/F217R/Q302K/E367D/T369D	321
281	+	+	+	+	L44R/K206A/I208V/R221K/M322V/K343D/F365L/R373K	322
282	+	+	+	+	L44R/K206A/N247D/A337P	323
283	+++	+++	+++	+++	L44R/K206A/N247D/Q302K/A337P/A350G/E367D/T369D	324
284	+++	+++	+++	+++	L44R/K206A/R221T/N247D/M322I/K343D/F365L/I376V	325
285	+	+	++	+	L44R/K96I/K206A	326
286	+	+	++	+	L44R/K96I/K206A/F217R/N247D	327
287	+++	+++	+++	++	L44R/K96I/K206A/F217R/N247D/Q302K/A337P/A350G	328
288	+++	+++	+++	+++	L44R/K96I/K206A/F217R/N247D/Q302K/A337P/K343D/A350G/E367D/T369D	329
289	+	++	++	++	L44R/K96I/K206A/F217R/Q302K/A350G	330
290	+++	+++	+++	+++	L44R/K96I/K206A/N247D/L316D/A337P/A350G/E367D/T369D	331
291	+	+	+	+	L44R/L100F/K206A/F365L	332
292	+++	++	+++	++	L44R/L100F/K206A/I208V/Q219H/N247D/Q302K/M322V/K343D/R373K/I376V	333

10

20

30

40

【表 2 - 1 1】

表2.4 -非チャレンジ(NC)または示されているpHもしくは条件でのチャレンジ後のGLAバリエーションの相対活性 ^{1, 2}						
バリエーション#	NC	pH 4.2	pH 7.6	血清	配列番号5(WT GLA)と比べたアミノ酸の相違	配列番号
293	++	+	++	+	L44R/L100F/K206A/I208V/R221K/N247D/Q302K/M322V/F365L/I376V	334
294	++	++	+++	+	L44R/L100F/K206A/I208V/R221T/N247D/M322V/I376V	335
295	+++	+++	+++	+++	L44R/L100F/K206A/I208V/R221T/N247D/Q302K/M322I/K343D/F365L/R373K/I376V	336

1. バリエーションの活性/(配列番号8によってコードされる)Rd2BB(配列番号10の活性として、相対活性を計算した。

2. - = Rd2BB(配列番号10)に対して0.5未満の相対活性;

+ = Rd2BB(配列番号10)に対して0.5～1.5の相対活性;

++ = Rd2BB(配列番号10)に対して1.5超～2.5の相対活性;および

+++ = Rd2BB(配列番号10)に対して2.5超の相対活性。

【表 2 - 1 2】

表2.5 -非チャレンジ(NC)または示されているpHもしくは条件でのチャレンジ後の GLAバリエーションの相対活性 ^{1, 2, 3}						
バリエーション#	NC	pH 4.0	pH 8.2	血清	配列番号5(WT GLA)と比べたアミノ酸の相違	配列番号
296	+	-	-	+	A66T/K206A/F217R/L316D/M322I/A337P/K343G/A350G/E367N/R373K	337
297	-	-	-	-	K206A/F217R/G230V/N247D/Q302K/M322I/E367N/T369S/R373K	338
298	++	+++	+++	+++	K206A/F217R/N247D/L316D/M322I/A337P/A350G/K362Q/E367N/R373K	339
299	+	-	-	-	K206A/F217R/N247D/Q249H/Q302K/M322I/K343G/A350G/E367T/R373K/L397F	340
300	+	++	++	++	K206A/I208V/R221T/N247D/M322V/K343G/E367N/R373K	341
301	+	+	+	-	K206A/M322I/E367N/R373K	342
302	+	+	+	+	K206A/M322V/K343G/E367N/R373K	343
303	++	++	++	+	K206A/N247D/M322I/A337E/K343D/F365L/E367N/R373K/I376V	344
304	++	++	++	++	K206A/Q302K/L316D/M322I/A337P/A350G/K362Q/E367N/T369S/R373K	345
305	+	+	+	++	K206A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K343D/E367N/T369S/R373K	346
306	+	++	++	++	K206A/R221K/N247D/Q302K/M322I/E367N/R373K	347
307	+	+	+	+	K206A/R221K/Q302K/M322I/K343G/E367N/R373K/I376V	348
308	-	-	-	+	K96I/K206A/F217R/M322I/E367N/T369S/R373K	349
309	+	++	+++	++	K96I/K206A/F217R/N247D/Q302K/M322I/A337P/K343G/A350G/E367N/R373K	350
310	-	+	+	+	K96I/K206A/N247D/M322I/A350G/E367N/T369S/R373K	351
311	+	+	++	+	K96I/K206A/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/A350G/E367N/T369S/R373K	352
312	++	+++	+++	+++	K96I/K206A/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/A350G/K362Q/E367N/T369S/R373K	353
313	+	+	-	+	L100F/A125S/K206A/I208V/R221K/Q302K/M322I/K343G/E367N/R373K	354
314	+	++	++	+	L100F/K206A/I208V/N247D/Q302K/M322V/K343D/E367N/R373K/I376V	355

10

20

30

40

【表 2 - 1 3】

表2.5 -非チャレンジ(NC)または示されているpHもしくは条件でのチャレンジ後の GLAバリエーションの相対活性 ^{1, 2, 3}						
バリエーション#	NC	pH 4.0	pH 8.2	血清	配列番号5(WT GLA)と比べたアミノ酸の相違	配列番号
315	+	+	+	+	L100F/K206A/I208V/Q302K/M322V/F365L/E367N/R373K/I376V	356
316	+	+	+	+	L100F/K206A/I208V/R221K/M322V/K343D/E367N/R373K	357
317	+	+	-	-	L100F/K206A/I208V/R221K/M322V/K343D/F365L/E367N/R373K	358
318	+	+	++	+	L100F/K206A/I208V/R221T/M322V/E367N/R373K/I376V	359
319	+	+	+	+	L100F/K206A/M322I/E367N/R373K/I376V	360
320	+	+	+	+	L100F/K206A/N247D/Q302K/M322I/E367N/R373K	361
321	++	++	+++	+	L100F/K206A/R221K/N247D/M322I/K343G/E367N/R373K	362
322	+	+	++	+	L100F/K206A/R221T/Q302K/M322I/K343D/E367N/R373K	363
323	-	-	-	+	L100F/L160I/K206A/R221K/M322V/E367N/R373K	364
324	-	-	-	-	L23S/K206A/M322I/E367N/R373K	365
325	++	+++	+++	+++	L44R/K206A/F217R/N247D/L316D/M322I/A337P/K343G/K362Q/E367N/R373K	366
326	++	+++	+++	+++	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	367
327	++	+++	+++	+++	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/K343D/A350G/K362Q/E367N/R373K	368
328	+	+	+	+	L44R/K206A/F217R/Q302K/M322I/A337P/A350G/E367N/T369S/R373K	369
329	+	++	++	++	L44R/K206A/I208V/N247D/Q302K/M322I/K343D/E367N/R373K	370
330	++	++	+	+	L44R/K206A/I208V/R221K/M322I/K343D/E367N/R373K	371
331	+	++	++	+	L44R/K206A/I208V/R221K/N247D/Q302K/M322I/K343D/E367N/R373K/I376V	372
332	+	+	+	+	L44R/K206A/I208V/R221T/Q302K/M322I/K343G/F365L/E367N/R373K/I376V	373
333	++	++	++	+	L44R/K206A/L316D/M322I/A337P/A350G/E367N/T369S/R373K	374
334	+	++	+++	++	L44R/K206A/N247D/L316D/M322I/A350G/K362Q/E367N/T369S/R373K	375

10

20

30

40

【表 2 - 1 4】

表2.5 -非チャレンジ(NC)または示されているpHもしくは条件でのチャレンジ後の GLAバリエーションの相対活性 ^{1, 2, 3}						
バリエーション#	NC	pH 4.0	pH 8.2	血清	配列番号5(WT GLA)と比べたアミノ酸の相違	配列番号
335	++	+++	+++	+++	L44R/K206A/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K343G/A350G/K362Q/E367N/T369S/R373K	376
336	+	+	+	-	L44R/K206A/N247D/Q302K/M322I/A350G/E367N/T369S/R373K	377
337	+	++	++	++	L44R/K206A/N247D/Q302K/M322I/K343D/E367N/R373K	378
338	++	+++	+++	+++	L44R/K96I/K206A/F217R/N247D/L316D/M322I/A337P/A350G/K362Q/E367N/R373K	379
339	+	+	++	+	L44R/K96I/K206A/F217R/N247D/M322I/A350G/K362Q/E367N/R373K	380
340	+	+	+	+	L44R/K96I/K206A/F217R/N247D/M322I/A350G/K362Q/E367N/T369S/R373K	381
341	-	+	+	+	L44R/K96I/K206A/F217R/N247D/M322I/E367N/T369S/R373K	382
342	++	+++	+++	+++	L44R/K96I/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/E367N/R373K	383
343	+	+	+	+	L44R/K96I/K206A/F217R/N247D/Q302K/M322I/E367N/T369S/R373K	384
344	+	+	+	++	L44R/K96I/K206A/F217R/N247D/Q302K/M322I/K362Q/E367N/R373K	385
345	+	++	+++	+	L44R/K96I/K206A/F217R/Q219P/N247D/M253K/S266F/D284E/Q290P/L293F/Q302K/V308G/S314F/M322I/A337P/K343E/E367N/R373K	386
346	+	+	++	+	L44R/K96I/K206A/F217R/Q302K/M322I/A350G/K362Q/E367N/T369S/R373K	387
347	-	-	-	-	L44R/K96I/K206A/M322I/A337P/E367N/T369S/R373K	388
348	+	+	+	+	L44R/L100F/K206A/I208V/R221K/M322I/K343G/F365L/E367N/R373K	389
349	+	+	++	+	L44R/L100F/K206A/I208V/R221T/N247D/M322I/F365L/E367N/R373K	390
350	+	++	+++	+	L44R/L100F/K206A/I208V/R221T/N247D/M322V/E367N/R373K/I376V	391
351	+	+	++	+	L44R/L100F/K206A/I208V/R221T/Q302K/M322I/E367N/R373K/I376V	392
352	+	+	+	+	L44R/L100F/K206A/Q302K/M322I/E367N/R373K/I376V	393
353	-	-	-	+	L44R/L100F/K206A/R221K/M322I/F365L/E367N/R373K/I376V	394

10

20

30

40

【表 2 - 1 5】

表2.5 -非チャレンジ(NC)または示されているpHもしくは条件でのチャレンジ後の GLAバリエーションの相対活性 ^{1, 2, 3}						
バリエーション#	NC	pH 4.0	pH 8.2	血清	配列番号5(WT GLA)と比べたアミノ酸の 相違	配列 番号
354	-	+	+	+	L44R/L100F/K206A/R221T/M322I/F365L/E 367N/R373K	395
355	+	++	++	+	L44R/L100F/K206A/R221T/N247D/M322I/K 343D/E367N/R373K/I376V	396
356	+	+	++	+	L44R/L100F/K206A/R221T/N247D/Q302K/M 322I/E367N/R373K	397
357	+	++	+++	+	L44R/L100F/K206A/R221T/N247D/Q302K/M 322V/E367N/R373K/I376V	398
358	+	+	++	+	L44R/L100F/K206A/R221T/Q302K/M322I/E 367N/R373K	399
359	+	+	+++	+	L44R/L100F/Q181L/K206A/R221T/N247D/Q 302K/M322V/E367N/R373K/I376V	400

1. バリエーションの活性/(配列番号11によってコードされる)Rd3BB(配列番号13の活性として、相対活性を計算した。
2. バリエーション# 326 (Rd4BB)は、配列番号14のポリヌクレオチド配列および配列番号15のポリペプチド配列を有する。
3. - = Rd3BB(配列番号13)に対して0.5未満の相対活性;
+ = Rd3BB(配列番号13)に対して0.5～1.5の相対活性;
++ = Rd3BB(配列番号13)に対して1.5超～2.5の相対活性;および
+++ = Rd3BB(配列番号13)に対して2.5超の相対活性。

10

20

【表 2 - 1 6】

表2.6 -非チャレンジ(NC)または示されているpHもしくは条件でのチャレンジ後のGLAバリエーションの相対活性 ^{1, 2, 3, 4}					
バリエーション#	NC	pH 3.7	pH 9.65	配列番号5(WT GLA)と比べたアミノ酸の相違	配列番号
360	+	+	+	L44E/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	401
361	+	+	+	L44R/S47R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	402
362	+	+	+	L44C/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	403
363	+	+	+	L44R/S47D/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	404
364	+	+	-	M39H/L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	405
365	+	+	+	L44R/S47N/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	406
366	+	+	+	L44R/S47V/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	407
367	+	+	-	M39R/L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	408
368	+	+	+	L44A/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	409
369	+	+	-	L44S/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	410
370	+	++	+	L44Q/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	411
371	+	-	+	L44W/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	412
372	+	-	+	L44V/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	413
373	-	-	-	M41R/L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	414
374	+	+	+	L44M/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	415
375	+	+	+	L44R/S47I/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	416
376	-	-	-	M41P/L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	417
377	+	++	-	M39T/L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	418
378	+	-	+	L44T/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	419
379	+	++	+	L44R/S47T/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	420

【表 2 - 1 7】

表2.6 -非チャレンジ(NC)または示されているpHもしくは条件でのチャレンジ後のGLAバリエーションの相対活性 ^{1, 2, 3, 4}					
バリエーション#	NC	pH 3.7	pH 9.65	配列番号5(WT GLA)と比べたアミノ酸の相違	配列番号
380	+	+	-	L44R/Y92K/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	421
381	+	+	-	L44R/Y92S/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	422
382	-	-	-	L44R/H94N/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	423
383	+	-	-	L44R/Y92C/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	424
384	+	+	-	L44R/Y92V/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	425
385	+	+	-	L44R/Y92A/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	426
386	-	+	-	L44R/H94R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	427
387	+	+	-	L44R/V93T/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	428
388	+	-	+	L44R/V93L/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	429
389	+	+	-	L44R/V93S/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	430
390	+	+	-	L44R/Y92Q/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	431
391	+	+	-	L44R/Y92W/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/L397S	432
392	+	+	-	L44R/Y92T/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	433
393	+	-	-	L44R/Y92G/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	434
394	+	+	-	L44R/Y92R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	435
395	+	+	+	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	40
396	+	+	+	L44R/L158M/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	437
397	+	+	+	L44R/L158R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	438
398	+	++	-	L44R/A159S/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	439
399	+	+	+	L44R/R165K/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	440

10

20

30

40

【表 2 - 1 8】

表2.6 -非チャレンジ(NC)または示されているpHもしくは条件でのチャレンジ後のGLAバリエーションの相対活性 ^{1, 2, 3, 4}					
バリエーション#	NC	pH 3.7	pH 9.65	配列番号5(WT GLA) と比べたアミノ酸の相違	配列番号
400	+	+	-	L44R/L158C/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	441
401	+	+	-	L44R/T163S/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	442
402	+	++	+	L44R/S166P/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	42
403	+	+	+	L44R/S166G/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	444
404	+	+	-	L44R/S166F/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	445
405	+	++	+	L44R/L158E/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	446
406	+	+	+	L44R/R162K/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	447
407	+	+	-	L44R/L158H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	448
408	+	+	+	L44R/S166R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	449
409	+	+	-	L44R/R165H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	450
410	+	+	-	L44R/R162H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	451
411	+	+	+	L44R/S166A/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	452
412	+	++	+	L44R/S166H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	453
413	-	-	-	L44R/T163*/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	454
414	+	+	+	L44R/L158Q/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	455
415	+	+	+	L44R/S166D/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	456
416	+	+	-	L44R/R162G/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	457
417	+	+	-	L44R/R162S/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	458
418	+	+	-	L44R/N161E/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	459
419	+	+	+	L44R/S166E/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	460

10

20

30

40

【表 2 - 1 9】

表2.6 -非チャレンジ(NC)または示されているpHもしくは条件でのチャレンジ後のGLAバリエーションの相対活性 ^{1, 2, 3, 4}					
バリエーション#	NC	pH 3.7	pH 9.65	配列番号5(WT GLA) と比べたアミノ酸の相違	配列番号
420	+	++	-	L44R/S166T/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	461
421	+	+	-	L44R/R162Q/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	462
422	+	+	-	L44R/L158G/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	463
423	+	+	+	L44R/R162A/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	464
424	+	+	-	L44R/K206A/F217R/N247D/L255E/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	465
425	+	-	+	L44R/K206A/F217R/N247D/H271E/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	466
426	+	-	-	L44R/K206A/F217R/N247D/M259E/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	467
427	+	-	-	L44R/K206A/F217R/N247D/L263G/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	468
428	+	+	-	L44R/K206A/F217R/N247D/M259S/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	469
429	+	+	-	L44R/K206A/F217R/N247D/L255C/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	470
430	+	-	+	L44R/K206A/F217R/N247D/H271T/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	471
431	+	-	-	L44R/K206A/F217R/N247D/R270G/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	472
432	+	-	+	L44R/K206A/F217R/N247D/L255V/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	473
433	+	+	+	L44R/K206A/F217R/N247D/H271Q/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	474
434	+	-	-	L44R/K206A/F217R/N247D/R270D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	475
435	+	++	-	L44R/K206A/F217R/N247D/I258L/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	476
436	+	-	-	L44R/K206A/F217R/N247D/H271G/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	477
437	+	+	-	L44R/K206A/F217R/N247D/L263E/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	478
438	-	-	-	L44R/K206A/F217R/N247D/L255*/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	479
439	+	+	+	L44R/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	480

10

20

30

40

【表 2 - 2 0】

表2.6 -非チャレンジ(NC)または示されているpHもしくは条件でのチャレンジ後のGLAバリエーションの相対活性 ^{1, 2, 3, 4}					
バリエーション#	NC	pH 3.7	pH 9.65	配列番号5(WT GLA)と比べたアミノ酸の相違	配列番号
440	+	+	-	L44R/K206A/F217R/N247D/L263C/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	481
441	+	-	+	L44R/K206A/F217R/N247D/H271V/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	482
442	+	+	-	L44R/K206A/F217R/N247D/L255A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	483
443	+	+++	-	L44R/K206A/F217R/N247D/L255S/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	484
444	+	-	+	L44R/K206A/F217R/N247D/M259W/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	485
445	+	+	-	L44R/K206A/F217R/N247D/L263F/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	486
446	+	-	-	L44R/K206A/F217R/N247D/M259A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	487
447	+	-	-	L44R/K206A/F217R/N247D/L263W/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	488
448	+	-	-	L44R/K206A/F217R/N247D/R270Q/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	489
449	+	++	-	L44R/K206A/F217R/N247D/L255T/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	490
450	+	++	-	L44R/K206A/F217R/N247D/I258M/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	491
451	+	++	-	L44R/K206A/F217R/N247D/M259V/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	492
452	+	++	+	L44R/K206A/F217R/N247D/H271R/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	493
453	+	-	-	L44R/K206A/F217R/N247D/R270L/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	494
454	+	++	+	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M390P	495
455	+	+	+	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392D	496
456	+	+	+	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/T389M	497
457	+	+	+	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392A	498
458	+	+	+	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M390*	499
459	+	++	+	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M390H	500

【表 2 - 2 1】

表2.6 -非チャレンジ(NC)または示されているpHもしくは条件でのチャレンジ後のGLAバリエーションの相対活性 ^{1, 2, 3, 4}					
バリエーション#	NC	pH 3.7	pH 9.65	配列番号5(WT GLA)と比べたアミノ酸の相違	配列番号
460	+	+	+	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/L386T	501
461	+	+	+	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392Q	502
462	+	+	+	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/Q385L	503
463	+	+	+	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M390T	504
464	+	+	+	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392*	505
465	+	+	+	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M390Q	506
466	+	+	+	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392E	507
467	+	+	+	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/T389S	508
468	+	+	+	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/T389Q	509
469	+	+	+	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/Q385I	510
470	+	++	+	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392R	511
471	+	+	+	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/T389W	512
472	+	+	+	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392K	513
473	+	+	+	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392L	514
474	+	++	+	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/L386F	515
475	+	+	+	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/T389D	516
476	+	+	+	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M390E	517
477	+	-	+	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/L384W	518
478	+	++	+	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392S	519
479	+	+	+	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392F	520

10

20

30

40

【表 2 - 2 2】

表2.6 -非チャレンジ(NC)または示されているpHもしくは条件でのチャレンジ後のGLAバリエーションの相対活性 ^{1, 2, 3, 4}					
バリエーション#	NC	pH 3.7	pH 9.65	配列番号5(WT GLA)と比べたアミノ酸の相違	配列番号
480	+	+	+	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M390R	521
481	+	+	+	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M390G	522
482	+	+	+	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/Q385G	523
483	+	+	+	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392C	524
484	+	+	+	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392V	525
485	+	+	+	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392W	526
486	+	+	+	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M390C	527
487	+	+	+	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/T389G	528
488	+	+	+	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/T389N	529
489	+	+	+	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/T389I	530
490	+	+	+	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M390D	531
491	+	+	+	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M390W	532
492	+	+	+	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/T389C	533
493	+	+	+	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392P	534
494	+	+	+	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M390F	535
495	+	+	+	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/T389P	536
496	+	+	+	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M390V	537
497	+	++	+	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M390K	538
498	+	+	+	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392I	539
499	+	+	+	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/T389L	540

10

20

30

40

【表 2 - 2 3】

表2.6 -非チャレンジ(NC)または示されているpHもしくは条件でのチャレンジ後のGLAバリエーションの相対活性 ^{1, 2, 3, 4}					
バリエーション#	NC	pH 3.7	pH 9.65	配列番号5(WT GLA)と比べたアミノ酸の相違	配列番号
500	+	+	+	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M390A	541
501	+	++	+	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392G	542
502	-	+	-	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/L386S	543
503	+	+	+	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/Q385C	544
504	+	+	+	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M390S	545
505	+	+	+	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392N	546
506	+	+	-	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/Q385W	547
507	+	++	+	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	548
508	-	-	-	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/L384A	549
509	+	+	+	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/Q385T	550
510	+	-	+	L44R/A199G/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392R	551
511	+	+	+	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/L397*	552
512	+	+	+	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/K395*	553
513	+	+	+	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/D396*	554
514	+	+	+	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/S393*	555
515	+	+	+	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/L394*	556

1. バリエーションの活性/(配列番号14によってコードされる)Rd4BB(配列番号15の活性として、相対活性を計算した。

2. バリエーション# 395 (Rd5BB)は、配列番号39のポリヌクレオチド配列および配列番号40のポリペプチド配列を有する。

3. バリエーション# 402 (Rd6BB)は、配列番号41のポリヌクレオチド配列および配列番号42のポリペプチド配列を有する。

4. - = Rd4BB(配列番号15)に対して0.5未満の相対活性;

+ = Rd4BB(配列番号15)に対して0.5～1.5の相対活性;

++ = Rd4BB(配列番号15)に対して1.5超～2.5の相対活性;および

+++ = Rd4BB(配列番号15)に対して2.5超の相対活性。

【表 2 - 2 4】

表2.7 -非チャレンジ(NC)または示されているpHもしくは条件でのチャレンジ後の GLAバリエーションの相対活性					
バリエーション#	NC	pH 3.7	pH 9.7	配列番号5(WT GLA)と比べたアミノ酸の相違	配列 番号
516	+	+++	+	D2E/L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/Q326G/A337P/K362Q/E367N/R373K	557
517	+	+	+	D2Q/L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	558
518	+	+	++	E40D/L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	559
519	+	+	++	E40S/L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	560
520	+	+	+	L44R/A77S/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	561
521	+	+	++	L44R/D52N/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	562
522	+	+++	++	L44R/E56K/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	563
523	+	+	+	L44R/N91M/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	564
524	-	+	+	L44R/N91V/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	565
525	+	++	++	L44R/Q76H/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/W368A/R373K	566
526	+	+	++	L44R/R74H/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	567
527	+	+	++	L44R/Y92E/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	568
528	+	+	++	L44R/Y92H/D130Q/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	569
529	+	+	++	L44R/Y92H/K182A/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	570
530	+	+	++	L44R/Y92H/K182E/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	571
531	+	+	++	L44R/Y92H/K182H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	572
532	+	+	++	L44R/Y92H/K182M/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	573
533	+	+	++	L44R/Y92H/K182Q/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	574
534	+	+	++	L44R/Y92H/K182R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	575
535	+	+	++	L44R/Y92H/K182T/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	576
536	+	+	++	L44R/Y92H/K182V/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	577
537	+	+	++	L44R/Y92H/K182Y/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	578

【表 2 - 2 5】

表2.7 -非チャレンジ(NC)または示されているpHもしくは条件でのチャレンジ後の GLAバリエーションの相対活性					
バリエーション#	NC	pH 3.7	pH 9.7	配列番号5(WT GLA)と比べたアミノ酸の相違	配列 番号
				A337P/K362Q/E367N/R373K	
538	+	+	+	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/A287C/Q302K/L316D/M322I/ A337P/K362Q/E367N/R373K	579
539	+	+	++	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/A287H/Q302K/L316D/M322I/ A337P/K362Q/E367N/R373K	580
540	+	+	++	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/A287M/Q302K/L316D/M322I/ A337P/K362Q/E367N/R373K	581
541	+	+	++	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/K283A/Q302K/L316D/M322I/ A337P/K362Q/E367N/R373K	582
542	+	+	++	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/K283G/Q302K/L316D/M322I/ A337P/K362Q/E367N/R373K	583
543	+	+	+	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/K283M/Q302K/L316D/M322I/ A337P/K362Q/E367N/R373K	584
544	+	+	+	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/K283V/Q302K/L316D/M322I/ A337P/K362Q/E367N/R373K	585
545	+	+	++	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/K295A/Q302K/L316D/M322I/ A337P/K362Q/E367N/R373K	586
546	+	+++	++	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/K295E/Q302K/L316D/M322I/ A337P/K362Q/E367N/R373K	587
547	+	+	++	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/K295L/Q302K/L316D/M322I/ A337P/K362Q/E367N/R373K	588
548	+	+++	++	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/K295N/Q302K/L316D/M322I/ A337P/K362Q/E367N/R373K	589
549	+	++	++	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/K295Q/Q302K/L316D/M322I/ A337P/K362Q/E367N/R373K	590
550	+	+	++	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/K295S/Q302K/L316D/M322I/ A337P/K362Q/E367N/R373K	591
551	+	+	++	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/K295T/Q302K/L316D/M322I/ A337P/K362Q/E367N/R373K	592
552	+	+	++	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/A317D/M322I/ A337P/K362Q/E367N/R373K	593
553	+	+	++	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/A317Q/M322I/ A337P/K362Q/E367N/R373K	594
554	+	+	++	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/ A346G/K362Q/E367N/R373K	595
555	+	+	+	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/ G344A/K362Q/E367N/R373K	596
556	-	-	+	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/ G344D/K362Q/E367N/R373K	597
557	+	+	++	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/ G344S/K362Q/E367N/R373K	598
558	-	-	+	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/ I353L/K362Q/E367N/R373K	599
559	+	+	++	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/ 600	

10

20

30

40

【表 2 - 2 6】

表2.7 -非チャレンジ(NC)または示されているpHもしくは条件でのチャレンジ後の GLAバリエーションの相対活性					
バリエーション #	NC	pH 3.7	pH 9.7	配列番号5(WT GLA) と比べたアミノ酸の相違	配列 番号
				K362Q/E367N/L372W/R373K	
560	+	++	++	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/ K362Q/E367N/W368A/R373K	601
561	+	+	++	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/ K362Q/E367N/W368L/R373K	602
562	+	+	++	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/ K362Q/E367N/W368N/R373K	603
563	+	+	++	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/ K362Q/E367N/W368R/R373K	604
564	+	+	++	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/ K362Q/E367N/W368V/R373K	605
565	+	+	++	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/ N348E/K362Q/E367N/R373K	606
566	+	+	++	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/ N348M/K362Q/E367N/R373K	607
567	+	+	++	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/ N348Q/K362Q/E367N/R373K	608
568	+	+	++	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/ N348R/K362Q/E367N/R373K	609
569	+	+	++	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/ N348W/K362Q/E367N/R373K	610
570	+	+	++	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/ T354S/K362Q/E367N/R373K	611
571	+	+	++	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/N305K/L316D/M322I/ A337P/K362Q/E367N/R373K	612
572	+	+++	++	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/N305L/L316D/M322I/ A337P/K362Q/E367N/R373K	613
573	+	+	++	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/S314A/L316D/M322I/ A337P/K362Q/E367N/R373K	614
574	+	+	++	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/S314H/L316D/M322I/ A337P/K362Q/E367N/R373K	615
575	+	+	++	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/S314N/L316D/M322I/ A337P/K362Q/E367N/R373K	616
576	+	+	++	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/S314Y/L316D/M322I/ A337P/K362Q/E367N/R373K	617
577	+	+++	++	L44R/Y92H/K206A/F217R/W246A/N247D/Q302K/L316D/M322I/ A337P/K362Q/E367N/R373K	618
578	+	+++	++	L44R/Y92H/K206A/F217R/W246I/N247D/Q302K/L316D/M322I/ A337P/K362Q/E367N/R373K	619
579	+	+++	++	L44R/Y92H/K206A/F217R/W246P/N247D/Q302K/L316D/M322I/ A337P/K362Q/E367N/R373K	620
580	+	+++	++	L44R/Y92H/K206A/F217R/W246R/N247D/Q302K/L316D/M322I/ A337P/K362Q/E367N/R373K	621
581	+	++	++	L44R/Y92H/K206A/F217R/W246S/N247D/Q302K/L316D/M322I/ A337P/K362Q/E367N/R373K	622

10

20

30

40

【表 2 - 2 7】

表2.7 -非チャレンジ(NC)または示されているpHもしくは条件でのチャレンジ後の GLAバリエーションの相対活性					
バリエ ーション #	NC	pH 3.7	pH 9.7	配列番号5(WT GLA) と比べたアミノ酸の相違	配列 番号
				A337P/K362Q/E367N/R373K	
582	+	+	++	L44R/Y92H/K206A/S210A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/ A337P/A350T/K362Q/E367N/R373K	623
583	+	+	++	L44R/Y92H/K206A/S210A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/ A337P/K362Q/E367N/R373K	624
584	+	+	++	L44R/Y92H/K206A/S210E/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/ A337P/K362Q/E367N/R373K	625
585	+	+	++	L44R/Y92H/K206A/S210K/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/ A337P/K362Q/E367N/R373K	626
586	+	++	++	L44R/Y92H/K206A/S210N/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/ A337P/K362Q/E367N/R373K	627
587	+	+	++	L44R/Y92H/K206A/S210R/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/ A337P/K362Q/E367N/R373K	628
588	+	+	+	L44R/Y92H/K96A/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A 337P/K362Q/E367N/R373K	629
589	+	+	+	L44R/Y92H/K96W/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A 337P/K362Q/E367N/R373K	630
590	+	+	+	L44R/Y92H/P179M/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/ A337P/K362Q/E367N/R373K	631
591	+	+	++	L44R/Y92H/R189K/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/ A337P/K362Q/E367N/R373K	632
592	+	+	++	L44R/Y92H/R189V/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/ A337P/K362Q/E367N/R373K	633
593	+	+	++	L44R/Y92H/S95A/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A 337P/K362Q/E367N/R373K	634
594	+	+	++	L44R/Y92H/S95E/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A 337P/K362Q/E367N/R373K	635
595	+	+	+	L44R/Y92H/T186A/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/ A337P/K362Q/E367N/R373K	636
596	+	++	++	L44R/Y92H/T186G/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/ A337P/K362Q/E367N/R373K	637
597	+	-	+	L44R/Y92H/T186V/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/ A337P/K362Q/E367N/R373K	638
598	+	+	++	L44R/Y92H/Y120H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/ A337P/K362Q/E367N/R373K	639
599	+	+	++	L44R/Y92H/Y120S/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/ A337P/K362Q/E367N/R373K	640
600	+	+++	+	L44R/Y92H/Y120S/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/ A337P/L341F/K362Q/E367N/R373K	641
601	-	+	+	M39C/L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A 337P/K362Q/E367N/R373K	642
602	+	+	++	M39E/L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A 337P/K362Q/E367N/R373K	643
603	+	+	+	M39R/L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A	644

10

20

30

40

【表 2 - 2 8】

表2.7 -非チャレンジ(NC)または示されているpHもしくは条件でのチャレンジ後の GLAバリエーションの相対活性					
バリエ ーション #	NC	pH 3.7	pH 9.7	配列番号5(WT GLA) と比べたアミノ酸の相違	配列 番号
				337P/K362Q/E367N/R373K	
604	+	+	++	M39V/L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A 337P/K362Q/E367N/R373K	645
605	+	+++	++	T10P/L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A 337P/K362Q/E367N/R373K	646
606	+	+++	++	T10P;L44R;Y92H;R189L;K206A;F217R;N247D;Q302K;L316D;M 322I;A337P;K362Q;E367N;R373K	647
607	+	+	++	T8L;L44R;Y92H;K206A;F217R;N247D;Q302K;L316D;M322I;A3 37P;K362Q;E367N;R373K	648
608	+	+	+	T8Q;L44R;Y92H;K206A;F217R;N247D;Q302K;L316D;M322I;A3 37P;K362Q;E367N;R373K	649

1. バリエーションの活性/(配列番号11によってコードされる)Rd3BB(配列番号13)の活性として、相対活性を計算した。

2. - = Rd3BB(配列番号13)に対して1.5未満の相対活性;

+ = Rd3BB(配列番号13)に対して1.5～5の相対活性;

++ = Rd3BB(配列番号13)に対して5超～10の相対活性;および

+++ = Rd3BB(配列番号13)に対して10超の相対活性。

10

20

【表 2 - 2 9】

表2.8 -非チャレンジ(NC)または示されているpHもしくは条件でのチャレンジ後の GLAバリエーションの相対活性					
バリエーション#	NC	pH 3.3	pH 9.7	配列番号5(WT GLA) と比べたアミノ酸の相違	配列 番号
609	+	++	++	L44R/S166P/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/ K362Q/E367N/R373K	650
610	+	+	-	L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/M259E/Q302K/L3 16D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M390Q	651
611	+	+++	++	L44R/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A 337P/K362Q/E367N/R373K/M390Q	652
612	+	++	++	L44R/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A 337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	653
613	+	++	++	L44R/S47N/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/L3 16D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M390Q	654
614	+	++	++	L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M3 22I/A337P/K362Q/E367N/R373K	655
615	+	++	++	L44R/S47N/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M3 22I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M390H	656
616	+	+	++	L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/M259W/H271A/Q3 02K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M390Q	657
617	+	++	++	L44R/Y92H/L136V/S166P/K206A/F217R/N247D/M259A/Q302K/L 316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M390Q	658
618	+	++	++	L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/L3 16D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	659
619	+	++	++	L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/L3 16D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M390H	660
620	-	+	++	L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/L3 16D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M390Q	661
621	+	++	-	L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/M259E/H271A/Q3 02K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M390Q	662
622	+	-	++	L44R/S47N/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/M259W/H271A/Q3 02K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M390Q/M392T	663
623	+	+++	++	L44R/S47N/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/A276S/Q302K/L 316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	664
624	+	++	++	L44R/S47N/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/L316D/M 322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M390Q	665
625	+	++	++	L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/L3 16D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	44
626	+	++	++	L44R/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/L316D/M 322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M390Q	666
627	+	-	++	L44R/S47N/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/M259W/H271A/Q3 02K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M390H/M392T	667
628	+	+	++	L44R/S47N/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/L3 16D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M390H	668
629	+	++	++	L44R/S47T/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/L316D/M 322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M390Q	669
630	+	-	++	L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/M259W/H271A/Q3 02K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M390H	670

10

20

30

40

【表 2 - 3 0】

表2.8 -非チャレンジ(NC)または示されているpHもしくは条件でのチャレンジ後の GLAバリエーションの相対活性					
バリエ アント#	NC	pH 3.3	pH 9.7	配列番号5(WT GLA)と比べたアミノ酸の相違	配列 番号
631	+	+	++	L44R/S47T/A53S/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M390Q	671
632	+	++	++	L44R/S47N/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	672
633	+	++	++	E43D/L44R/Y92S/S166P/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	673
634	+	++	++	E43D/L44R/Y92E/S166P/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	674
635	+	++	++	E43D/L44R/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	675
636	+	+	++	E43D/L44R/Y92N/S166P/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	676
637	+	+	++	E43Q/L44R/Y92E/S166P/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	677

1. バリエーションの活性/(配列番号11によってコードされる)Rd3BB(配列番号13)の活性として、相対活性を計算した。
2. バリエーション# 625 (Rd7BB)は、配列番号43のポリヌクレオチド配列および配列番号44のポリペプチド配列を有する。
3. - = Rd3BB(配列番号13)に対して1.5未満の相対活性;
 + = Rd3BB(配列番号13)に対して1.5～5の相対活性;
 ++ = Rd3BB(配列番号13)に対して5超～10の相対活性;および
 +++ = Rd3BB(配列番号13)に対して10超の相対活性。

10

20

【表 2 - 3 1】

表2.9 -非チャレンジ(NC)または示されているpHもしくは条件でのチャレンジ後の GLAバリエーションの相対活性					
バリエーション#	NC	pH 3.5	pH 7.5	配列番号5(WT GLA) と比べたアミノ酸の相違	配列 番号
638	-	-	-	T10P/L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/A261G/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	678
639	-	-	-	M39E/L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247Y/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	679
640	+	+	+	T10P/M39E/E43D/L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	680
641	-	-	-	T10P/M39E/L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/S266P/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	681
642	+	+	+	T10P/E43D/L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/A261G/H271A/Q302K/N305L/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/W368A/R373K/M392T	682
643	+	-	+	T10P/L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/R325S/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	683
644	-	-	-	L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/L237P/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	684
645	+	+	-	L44R/S47T/Y92H/S166P/P174S/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	685
646	-	-	-	L44R/S47T/Y92H/G113C/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	686
647	-	-	-	L14F/L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	687
648	+	+	+	T10P/M39E/L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/A261G/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/W368A/R373K/M392T	46
649	+	+	+	T10P/M39E/L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/W246P/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	689
650	+	+	+	R7H/T10P/L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	690
651	+	+	+	T10P/L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	691
652	+	+	-	L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/W246P/N247D/A261G/H271A/Q302K/N305L/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	692
653	+	+	+	T10P/L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/W246P/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	693
654	+	+	+	R7S/L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	694
655	+	-	-	L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/W246P/N247D/A261G/H271A/Q302K/N305L/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/W368A/R373K/M392T	695
656	+	+	+	T10P/L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/W246P/N247D/A261G/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	696

10

20

30

40

【表 2 - 3 2】

表2.9 -非チャレンジ(NC)または示されているpHもしくは条件でのチャレンジ後の GLAバリエーションの相対活性					
バリエーション#	NC	pH 3.5	pH 7.5	配列番号5(WT GLA)と比べたアミノ酸の相違	配列 番号
				1G/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	
657	+	+	+	L44R/S47T/P67T/Y92H/S166P/K182N/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	697
658	+	+	+	M39E/L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/W246P/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	698
659	-	-	-	L44R/S47T/W64L/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	699
660	+	+	-	M39E/L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/A261G/H271A/Q302K/N305L/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	700
661	-	-	-	L44R/S47T/Y92H/S166P/W195C/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	701
662	+	+	+	L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/V238I/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	702
663	+	+	-	E43D/L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/A261G/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/W368A/R373K/M392T	703
664	-	-	-	T10P/L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/Q252H/M253R/A254E/A261G/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	704
665	+	+	+	R7C/L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/W368A/R373K/M392T	705
666	+	+	-	L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/P228L/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	706
667	+	+	+	D30G/L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	707
668	+	+	+	M39E/L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	708
669	+	-	-	L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/P262S/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	709
670	+	+	+	L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/N305L/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	710
671	++	++	+	T10P/L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/W368A/R373K/M392T	711
672	+	+	-	L44R/S47T/Y92H/D144Y/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	712
673	+	+	-	L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/N377Y/M392T	713
674	-	-	-	L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/P234H/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	714
675	+	+	-	L44R/S47T/M65V/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	715
676	+	+	+	M39E/L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/W368A/R373K/M392T	716

【表 2 - 3 3】

表2.9 -非チャレンジ(NC)または示されているpHもしくは条件でのチャレンジ後の GLAバリエーションの相対活性					
バリエ アント#	NC	pH 3.5	pH 7.5	配列番号5(WT GLA)と比べたアミノ酸の相違	配列 番号
677	+	+	-	L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/M253W/H271A/S273D/P274S/K277R/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	717
678	-	-	-	L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/M253W/A257G/H271A/K277R/Q281L/Q302K/L316D/A319D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	718
679	+	+	+	T10P/M39E/L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/N305L/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	719
680	+	+	+	T10P/M39E/L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	720
681	-	-	-	R7P/L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	721
682	+	+	+	L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/L316Y/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	722
683	+	+	-	M39E/E43D/L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/W246P/N247D/M253W/H271A/S273D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/W368A/R373K/M392T	723
684	+	+	+	L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/N305L/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/W368A/R373K/M392T	724
685	+	-	-	E43D/L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/M253W/A257G/H271A/Q302K/N305L/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/W368A/R373K/M392T	725
686	-	-	+	T10P/E17G/L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	726
687	+	-	-	L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/Q290R/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/W368A/R373K/M392T	727
688	+	+	-	L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/P228Q/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	728
689	+	+	+	L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/N305L/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	729
690	+	-	-	T10P/L44R/S47T/Y92H/M156V/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	730
691	+	+	+	T10P/L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	731
692	-	-	-	L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/W256L/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	732
693	+	+	+	L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/W368A/R373K/M392T	733

1. バリエーションの活性/(配列番号43によってコードされる)Rd7BB(配列番号44)の活性として、相対活性を計算した。
2. - = Rd7BB(配列番号44)に対して0.5未満の相対活性;
+ = Rd7BB(配列番号44)に対して0.5超～1.5の相対活性;および
++ = Rd7BB(配列番号44)に対して1.5超の相対活性;

【0149】

実施例 3

GLAバリエーションのインビトロ特徴付け

酵母におけるGLAの産生

10

20

30

40

50

GLA含有上清を産生するために、実施例2に記載されているように、GLAのレプリカHTP培養物を成長させた。さらなる分析の前に、レプリカ培養物由来の上清（n=12～36）を合わせた。

【0150】

HEK293T細胞におけるGLAの産生

哺乳動物細胞におけるGLAバリエーションの分泌発現を、HEK293細胞の一過性トランスフェクションによって実施した。N末端合成哺乳動物シグナルペプチドに融合されたGLAバリエーション（配列番号3、4、9、12、17、20、23、および41）で細胞をトランスフェクトし、実施例1に記載されているように、哺乳動物発現ベクターpLEV113にサブクローニングした。プラスミドDNAでHEK293細胞をトランスフェクトし、当業者に公知の技術を使用して4日間懸濁物中で成長させた。上清を回収し、4℃で保存した。

10

【0151】

実施例4

GLAバリエーションの精製

哺乳動物細胞上清からのGLAバリエーションの精製

基本的には当該分野で公知のように（Yasudaら、Prot. Exp. Pur., 37, 499-506 [2004]を参照のこと）、哺乳動物培養上清からGLAバリエーションを精製した。0.1M酢酸ナトリウム、0.1M NaCl、1mM MgCl₂、CaCl₂、およびMnCl₂ pH6.0（ConA結合緩衝液）でコンカナバリンA樹脂（Sigma Aldrich）を平衡化した。結合緩衝液で上清を1:1希釈し、カラムにロードした。15容量のコンカナバリンA結合緩衝液でカラムを洗浄し、0.9Mメチル-α-D-マンノピラノシドおよび0.9Mメチル-α-D-グルコピラノシドを含むコンカナバリンA結合緩衝液を添加することによって、サンプルを溶出した。溶出したタンパク質を濃縮し、10kDa分子量カットオフのCentricon（登録商標）Plus-20ろ過ユニット（Millipore）を使用して、ThioGal結合緩衝液（25mMクエン酸-リン酸（citrate-phosphate）、0.1M NaCl、pH4.8）に3回緩衝液交換した。緩衝液交換したサンプルを、ThioGal結合緩衝液で平衡化した固定化D-ガラクトース樹脂（Pierce）にロードした。6容量のThioGal結合緩衝液で樹脂を洗浄し、25mMクエン酸リン酸、0.1M NaCl、0.1M D-ガラクトース、pH5.5で溶出した。10kDa分子量カットオフのCentricon（登録商標）Plus-20ろ過ユニットを使用して、溶出したサンプルを濃縮した。ブラッドフォード定量に基づき、精製により、培養上清1ml当たり2.4～10μgの精製タンパク質が得られた。

20

30

【0152】

GLAバリエーションのSDS-PAGE分析

SDS-PAGEによって、酵母培養上清および哺乳動物細胞培養上清および精製GLAのサンプルを分析した。酵母上清では、GLAレベルは低過ぎて、この方法によって検出されなかった。哺乳動物細胞培養上清および精製GLAサンプルの両方において、約49kDaの予測GLA分子量に対応するバンドが見出された。

40

【0153】

GLAバリエーションのイムノブロット分析

イムノブロットによって、酵母上清および哺乳動物細胞培養上清のサンプルを分析した。簡潔に言えば、SDS-PAGEによって、サンプルを分離した。iBlotドライヴロットシステム（Life Technologies）を使用して、タンパク質をPVDF膜に転写した。オデッセイブロッキング緩衝液（TBS）（LI-COR）で膜を室温で1時間ブロッキングし、0.2%Tween（登録商標）20を含むオデッセイブロッキング緩衝液で1:250希釈したウサギα-GLA IgG（Thermo-Fischer）によって4℃で14時間プローブした。トリス緩衝食塩水+0.1%Tween（登録商標）20で膜を4×5分間洗浄し、0.2%Tween（登録商標）20およ

50

び0.01% SDSを含むオデッセイブロッキング緩衝液で1:5000希釈したIRDye 800CWロバα-ウサギIgG (LI-COR)によって室温で1時間プローブした。トリス緩衝食塩水+0.1% Tween (登録商標) 20で膜を4×5分間洗浄し、オデッセイイメージャー (LI-COR)を使用して分析した。哺乳動物細胞培養物および酵母上清の両方において、約49 kDaの予測GLA分子量に対応するバンドが見出された。S. cerevisiae発現サンプルでは、変異E367Nを含む変異体が、わずかに高い分子量に泳動した。この変異は、標準的なNXT N結合グリコシル化部位 (Xは、P以外の任意のアミノ酸である)を導入し、さらなるN結合グリカンの導入の可能性によってより高い分子量を説明することができる。

【0154】

10

実施例5

GLAバリエーションのインビトロ特徴付け

S. cerevisiaeによるGLAの分泌発現のためのシグナルペプチドの最適化Mfリーダー-GLA (配列番号7)、SP-GLA (配列番号36)またはベクターコントロールで形質転換したS. cerevisiaeを、実施例2に記載されているようにHTPで成長させた。実施例2に記載されているように、上清の回収および分析 (n=6)の前に、培養物を48~120時間成長させた。図1は、2~5日間の培養後のS. cerevisiaeにおける異なるGLA構築物の相対活性を示すグラフを提供する。この図に示されているように、3日間の成長後に、SP-GLA (配列番号36)は、飽和した高レベルの活性酵素を産生した。

20

【0155】

S. cerevisiaeにおいて発現されたGLAバリエーションのpH安定性

酵素の全体的な安定性を評価するために、異なる緩衝液でGLAバリエーションをチャレンジした。最初に、50 μLのGLAバリエーション酵母培養物由来上清および50 μLのMcIlvaine緩衝液 (pH 2.86~9.27)または200 mM炭酸ナトリウム (pH 9.69)を96ウェル丸底プレート (Costar #3798, Corning)のウェルに添加した。プレートを密封し、37℃で1時間インキュベートした。アッセイのために、50 μLのチャレンジ上清を、25 μLの1 Mクエン酸緩衝液 pH 4.3および25 μLのMcIlvaine緩衝液 pH 4.8中4 mM MUGalと混合した。反応物を短時間混合し、37℃で60~180分間インキュベートしてから、100 μLの1 M炭酸ナトリウムでクエンチした。蛍光をモニタリングするSpectraMax (登録商標) M2マイクロプレートリーダー (励起355 nm、発光448 nm)を使用して、加水分解を分析した。図2は、種々のpHにおけるインキュベーション後のGLAバリエーションの絶対 (パネルA)および相対 (パネルB)活性を示すグラフを提供する。

30

【0156】

S. cerevisiaeにおいて発現されたGLAバリエーションの熱安定性

酵素の全体的な安定性を評価するために、1 μM 1-デオキシガラクトノジリマイシン (Migalastat; Toronto Research Chemicals)の存在下および非存在下、種々の温度でGLAバリエーションをチャレンジした。最初に、50 μLのGLAバリエーション酵母培養物由来上清および50 μLのMcIlvaine緩衝液 (pH 7.65) + / - 2 mM 1-デオキシガラクトノジリマイシンを96ウェルPCRプレート (Biorad, HSP-9601)のウェルに添加した。プレートを密封し、サーモサイクラーの勾配プログラムを使用して30~54℃で1時間インキュベートした。アッセイのために、50 μLのチャレンジ上清を、25 μLの1 Mクエン酸緩衝液 pH 4.3および25 μLのMcIlvaine緩衝液 pH 4.8中4 mM MUGalと混合した。反応物を短時間混合し、37℃で90分間インキュベートしてから、100 μLの1 M炭酸ナトリウムでクエンチした。蛍光をモニタリングするSpectraMax (登録商標) M2マイクロプレートリーダー (励起355 nm、発光448 nm)を使用して、加水分解を分析した。図3は、種々の温度におけるインキュベーション後のGLAバリエーションの絶対 (パネルA)および相対 (パネルB)活性を示すグラフを提供する。

40

50

【0157】

*S. cerevisiae*において発現されたGLAバリエントの血清安定性

血液の存在下におけるバリエントの相対的な安定性を評価するために、サンプルを血清に曝露した。最初に、20 μ LのGLAバリエント酵母培養物由来上清および0~80 μ Lの水または0~80 μ Lのウシ血清を96ウェル丸底プレート (Costar #3798, Corning) のウェルに添加した。プレートを密封し、37℃で1時間インキュベートした。アッセイのために、50 μ Lのチャレンジ上清を、25 μ Lの1Mクエン酸緩衝液pH4.3および25 μ LのMcIlvaine緩衝液pH4.8中4mM MUGalと混合した。反応物を短時間混合し、37℃で90分間インキュベートしてから、100 μ Lの1M炭酸ナトリウムでクエンチした。蛍光をモニタリングするSpectraMax (登録商標) M2マイクロプレートリーダー (励起355nm、発光448nm) を使用して、加水分解を分析した。図4は、種々の割合の血清によるチャレンジ後のGLAバリエントの絶対 (パネルAおよびB) および相対 (パネルCおよびD) 活性を示すグラフを提供する。

10

【0158】

HEK293T細胞において発現されたGLAバリエントの相対活性

HEK293T細胞において発現されたGLAバリエント由来の上清を、非GLA発現酵母培養物由来の上清で2倍連続希釈した。希釈物 (50 μ L) を、Corning (登録商標) 96ウェルブラック不透明底プレート中で、25 μ LのMcIlvaine緩衝液pH4.8中4mM MUGalおよび25 μ Lの1Mクエン酸緩衝液pH4.3と混合した。反応物を短時間混合し、37℃で60分間インキュベートしてから、100 μ Lの1M炭酸ナトリウムでクエンチした。蛍光をモニタリングするSpectraMax (登録商標) M2マイクロプレートリーダー (励起355nm、発光448nm) を使用して、加水分解を分析した。図5は、HEK293T細胞において発現されたGLAバリエントの相対活性を示すグラフを提供する。バリエントGLA酵素でトランスフェクトした細胞由来の上清は、WT酵素と比較して顕著に高い加水分解酵素活性を示し、容量当たりの活性は、*S. cerevisiae*発現において見られたものよりもかなり高かった。

20

【0159】

HEK293T細胞において発現されたGLAバリエントのpH安定性

全体的な安定性を評価するために、異なる緩衝液でGLAバリエントをチャレンジした。非GLA発現培養物由来の上清による希釈によって、哺乳動物細胞培養物由来の上清を同等の活性に正規化した。正規化上清 (50 μ L) および50 μ LのMcIlvaine緩衝液 (pH4.06~8.14) を96ウェル丸底プレート (Costar #3798, Corning) のウェルに添加した。プレートを密封し、37℃で3時間インキュベートした。アッセイのために、50 μ Lのチャレンジ上清を、25 μ Lの1Mクエン酸緩衝液pH4.3および25 μ LのMcIlvaine緩衝液pH4.8中4mM MUGalと混合した。反応物を短時間混合し、37℃で3時間インキュベートしてから、100 μ Lの1M炭酸ナトリウムでクエンチした。蛍光をモニタリングするSpectraMax (登録商標) M2マイクロプレートリーダー (励起355nm、発光448nm) を使用して、加水分解を分析した。図6は、HEK293T細胞において発現され、活性について正規化し、種々のpHでインキュベートしたGLAバリエントの絶対 (パネルA) および相対 (パネルB) 活性を示すグラフを提供する。

30

40

【0160】

全ての酵素は、*S. cerevisiae*において発現されたWT GLAと比較した場合、pHチャレンジに対してより安定であることが見出された (図2との比較)。この相違はおそらく、発現宿主間の差示的なグリコシル化によるものである。しかしながら、本発明は、いかなる特定の機構にも理論にも限定されるものではない。変異体酵素は、HEK293Tにおいて発現されたWT酵素と比較してより広いpH安定性プロファイルを有していた。

50

【0161】

HEK293T細胞において発現されたGLAバリエーションの熱安定性

全体的な安定性を評価するために、 $1\text{ }\mu\text{M}$ 1-デオキシガラクトノジリマイシン (Migalastat) の存在下および非存在下、種々の温度でGLAバリエーションをチャレンジした。非GLA発現培養物由来の上清による希釈によって、哺乳動物細胞培養物由来の上清をほぼ同等の活性に正規化した。希釈上清を96ウェルPCRプレート (Biorad, HSP-9601) のウェルに添加した。プレートを密封し、サーモサイ클ラーの勾配プログラムを使用して $30\sim 54^{\circ}\text{C}$ で1時間インキュベートした。アッセイのために、 $20\text{ }\mu\text{L}$ のチャレンジ上清を、 $30\text{ }\mu\text{L}$ の 1M クエン酸緩衝液 $\text{pH}4.3$ および $50\text{ }\mu\text{L}$ のMcIlvaine緩衝液 $\text{pH}4.8$ 中 4mM MUGalと混合した。反応物を短時間混合し、 37°C で90分間インキュベートしてから、 $100\text{ }\mu\text{L}$ の 1M 炭酸ナトリウムでクエンチした。蛍光をモニタリングするSpectraMax (登録商標) M2マイクロプレートリーダー (励起 355 nm 、発光 448 nm) を使用して、加水分解を分析した。図7は、HEK293T細胞において発現され、活性について正規化し、種々の温度でインキュベートしたGLAバリエーションの絶対 (パネルA) および相対 (パネルB) 活性を示すグラフを提供する。この図に示されているように、全ての酵素は、S. cerevisiaeにおいて発現されたWT GLAと比較した場合、温度チャレンジ後においてより安定であったが (図2との比較)、これはおそらく、発現宿主間の差示的なグリコシル化によるものである。GLAバリエーション (配列番号10および13) では、酵素の T_m は、それぞれ 2°C および 4°C 増加した。Migalastatの添加は、 T_m を 5.5°C 増加させたが、アッセイにおける $0.2\text{ }\mu\text{M}$ の最終濃度では、Migalastat処理サンプルの活性は、約60%減少した。

10

20

【0162】

代替基質に対するWT GLAおよびGLAバリエーションの活性

改良されたMUGal加水分解活性が、より天然の基質に対応していたことを確認するために、基質としてN-ドデカノイル-NBD-セラミドトリヘキソシド (NBD-GB3) を使用して、哺乳動物細胞発現GLAバリエーションをアッセイした。HEK293T培養上清 ($10\text{ }\mu\text{L}$)、 100mM クエン酸ナトリウム $\text{pH}4.8$ ($80\text{ }\mu\text{L}$)、および10%エタノール中NBD-GB3 (0.1 mg/ml) ($10\text{ }\mu\text{L}$) を微小遠心管に添加した。サンプルを逆さにして混合し、 37°C で1時間インキュベートした。 $50\text{ }\mu\text{L}$ のメタノールの添加によって反応物をクエンチし、 $100\text{ }\mu\text{L}$ のクロロホルムで希釈し、ボルテックスし、分析のために有機層を単離した。有機相 ($10\text{ }\mu\text{L}$) をシリカプレート上にスポットし、 365 nm UVランプを使用して発生物質および生成物を検出する薄層クロマトグラフィ (クロロホルム:メタノール:水、 $100:42:6$) によって分析した。配列番号13の場合にのみ、有意な変換が観察されたが、これは、バリエーションが、WT-GLAと比較して改良された活性を示すことを確認している。

30

【0163】

GLAバリエーションの比活性

実施例4に記載されているように精製したGLAバリエーションを、それらの比活性について評価した。 $0\sim 0.25\text{ ng}$ の精製酵素を、McIlvaine緩衝液 $\text{pH}4.8$ (最終 $\text{pH}4.8$) 中 4mM MUGalに添加した。サンプルを 37°C で60分間インキュベートし、 $100\text{ }\mu\text{L}$ の 1M 炭酸ナトリウムの添加によってクエンチした。蛍光をモニタリングするSpectraMax (登録商標) M2マイクロプレートリーダー (励起 355 nm 、発光 448 nm) を使用して、加水分解を分析し、標準曲線の使用によって、4-メチルウンベリフェロンの絶対量と相関させた。

40

【0164】

時間をわたっての精製GLAバリエーションのpH安定性

精製GLAバリエーションが、酵母における発現後に観察された所望のpH安定性を示すことを確認するために、酸性または塩基性緩衝液中で、WT GLA (配列番号5) および配列番号42をインキュベートし、残存活性について分析した。GLAバリエーション (20

50

0 ng) を Mc I l v a i n e 緩衝液 pH 4. 1 または pH 7. 5 に添加し、37℃で0～24時間インキュベートした。25 μL の 1 M クエン酸 pH 4. 3 および 25 μL の Mc I l v a i n e 緩衝液 pH 4. 8 中 4 mM M U G a l の混合物にサンプル (50 μL) を添加し、37℃で1時間インキュベートした。100 μL の 1 M 炭酸ナトリウムでサンプルをクエンチし、1 M 炭酸ナトリウムで 1 : 4 希釈し、蛍光分光法 (励起 355 nm、発光 448 nm) によって分析した。酸性および塩基性チャレンジ条件下の両方において、配列番号 42 はかなり安定であったが、これは、酵母において開発された安定性の上昇が、哺乳動物細胞において発現されたタンパク質に転換したことを裏付けている (結果のグラフについては、図 8 を参照のこと)。

【0165】

HEK 293 T 細胞において発現された精製 GLA バリエーションの熱安定性

全体的な安定性を評価するために、WT GLA (配列番号 5) および配列番号 42 の熱安定性を決定した。実施例 4 に記載されているように精製した酵素を、1× Sypro Orange (Thermo Fischer Scientific) を含む 1× PBS で 20 μg/ml に希釈し、96 ウェル PCR プレート (Biorad, HSP-9601) に添加した。RT-PCR 装置によって、プレートを 0.5℃/分で 30℃～75℃に加熱し、Sypro Orange 蛍光をモニタリングした。これらの条件下では、WT GLA は 37℃で融解した一方、配列番号 42 は 55℃で融解した。

【0166】

実施例 6

GLA バリエーションのインビボ特徴付け

精製 GLA バリエーションの血清薬物動態

実施例 4 に記載されているように生成した精製 GLA バリエーションを、生存ラットの血清中における安定性について評価した。1 mg/ml の WT GLA (配列番号 5) または配列番号 42 を、3 匹のナイーブ頸静脈カニューレ挿入 Sprague-Dawley ラット (7～8 週齢) にそれぞれ静脈内投与した。投与前ならびに投与 5 分後、15 分後、30 分後、60 分後、120 分後、および 240 分後に、各ラットから 200 μL の血液を EDTA チューブに採取し、4℃および 6000 rpm で遠心分離して、1 サンプル当たり 80 μL 超の血清を生成した。サンプルを凍結し、分析前にドライアイス上で保存した。分析のために、血清 (10 μL) を 40 μL の Mc I l v a i n e 緩衝液 pH 4. 4 中 5 mM M U G a l に添加し、37℃で1時間インキュベートした。50 μL の 1 M 炭酸ナトリウムでサンプルをクエンチし、1 M 炭酸ナトリウムで 1 : 100 希釈し、蛍光分光法 (励起 355 nm、発光 448 nm) によって分析した。投与 4 時間後に、配列番号 42 は最大活性の 15.3% を保持していた一方、WT GLA は 0.66% しか保持していなかった (図 9 を参照のこと)。

【0167】

実施例 7

GLA の脱免疫化

本実施例では、GLA から予測 T 細胞エпитープを除去する多様性を同定するために行った実験を説明する。

【0168】

脱免疫化多様性の同定：

T 細胞エпитープを除去する変異多様性を同定するために、コンピュータによる方法を使用して、代表的な HLA 受容体に効率的に結合すると予測された GLA 部分配列を同定した。加えて、特に、(例えば、実施例 2 に記載されているアッセイにおいて) GLA 活性に影響を及ぼさない変異について、アミノ酸変異の実験的探索を行った。次いで、コンピュータによる方法を使用して、予測免疫原性について、活性バリエーションのアミノ酸配列を分析した。

【0169】

WT GLA における推定 T 細胞エпитープのコンピュータによる同定：

当該分野で公知の免疫エピトープデータベース（IEDB；免疫エピトープデータベースおよび分析リソースウェブサイト）ツールおよび独自の統計分析ツール（例えば、iedb.orgおよびVitaら、Nucl. Acids Res., 38 (Database issue) : D854-62 [2010]. Epub 2009 Nov 11]を参照のこと）を使用して、WT GLA（配列番号5）における推定T細胞エピトープを同定した。WT GLAを、考えられる全ての15マーの分析フレームに分解した（各フレームは、最後の14アミノ酸が重複する）。IEDBウェブサイトで推奨されている方法を使用して、合計でヒト集団の約95%をカバーする8つの一般的なクラスII HLA-DR対立遺伝子（DRB1*0101、DRB1*0301、DRB1*0401、DRB1*0701、DRB1*0801、DRB1*1101、DRB1*1301、およびDRB1*1501）（例えば、Southwoodら、J. Immunol., 160 : 3363-3373 [1998]を参照のこと）への予測結合について、9マーのコア領域をスコア化することによって、15マーの分析フレームを免疫原性について評価した。当該分野で公知の統計分析ツールを使用して、酵素内に含まれる潜在的なT細胞エピトープクラスタ（すなわち、GLA内に含まれる部分領域であって、免疫原性である可能性が非常に高い部分領域）を同定した。同定したT細胞エピトープクラスタを、公知のエピトープのIEDBデータベースに対してスクリーニングした。これらのスクリーニングによって、WT酵素における5つの推定T細胞エピトープを同定した。これらのエピトープは、以下でTCE-I、II、III、IV、およびVと称する。

【0170】

脱免疫化ライブラリーの設計：

最初に、実施例2で同定した活性GLA変異体の配列を、T細胞エピトープの存在について評価する。HLA-DR対立遺伝子への結合を潜在的に減少させると同定された変異を組換えライブラリーに組み込む。5つのT細胞エピトープ内の全ての単一アミノ酸の飽和変異誘発を使用して、さらなるライブラリーを調製する。これらのライブラリーからのヒットを、さらなる一連の飽和変異誘発、HTPスクリーニングおよび組換えに供して、考えられる全てのT細胞エピトープを除去する。

【0171】

脱免疫化ライブラリーの構築およびスクリーニング：

上記のように設計したコンビナトリアルおよび飽和変異誘発ライブラリーを、当該分野で公知の方法によって構築し、実施例2に記載されている非チャレンジアッセイにおいて、活性について試験した。活性バリエントを同定し、配列決定した。WT GLAと比べてそれらの活性および変異は、以下の表に提供されている。

【0172】

脱免疫化多様性の同定：

上記のように、8つの一般的なクラスII HLA-DR対立遺伝子への結合を評価することによって、予測免疫原性のレベルについて、活性バリエントを分析した。総免疫原性スコアおよび免疫原性ヒットカウントは、表7. 1に示されている。総免疫原性スコア（TIS）は、バリエントの全体的な予測免疫原性を反映する（すなわち、より高いスコアは、より高レベルの予測免疫原性を示す）。免疫原性「ヒットカウント」（IHC）は、免疫原性である可能性が非常に高い15マーの分析フレームの数を示す（すなわち、より高いスコアは、より高い免疫原性の可能性を示す）。参照配列のものよりも低い総免疫原性スコアおよび／または免疫原性ヒットカウントをもたらし変異を、潜在的な「脱免疫化変異」とみなした。最も脱免疫化する変異の収集物を組換えて、活性であり、かつWT GLAよりも有意に低免疫原性であると予測されたいくつかのバリエントを生成した。総免疫原性スコア（TIS）および免疫原性ヒットカウント（IHC）は、以下の表に提供されている。

【表 7 - 1】

表7.1 GLAバリエーションの総免疫原性スコア (TIS) および免疫原性ヒットカウント (IHC)				
バリエーション#	配列番号	活性変異	TIS	IHC
	5	WT GLA	450	38
33	79	A199H/E367S	468	47
34	80	A337P	444	38
1	47	A337S	449	38
35	81	A339S	450	38
36	82	A350G	450	38
296	337	A66T/K206A/F217R/L316D/M322I/A337P/K343G/A350G/E367N/R373K	429	38
200	244	C143A/K206A	429	38
201	245	C143T/K206A	429	38
202	246	C59A/K206A	427	38
37	83	D105A	458	38
38	84	D105S	462	38
39	85	D124N/E147G/N161K/R162Q/T163V/R165A/I167S/V168I/Y169V/S170-/M177S/F217E	425	35
516	557	D2E/L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/Q326G/A337P/K362Q/E367N/R373K	386	24
517	558	D2Q/L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	393	24
667	707	D30G/L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	345	8
40	86	D396R	451	38
41	87	D396T	452	38
42	88	E367N	462	43
43	89	E367T	462	45
44	90	E387K	460	38
45	91	E387Q	457	38
46	92	E387R	457	38
47	93	E387T	459	38
48	94	E40D	445	33
518	560	E40D/L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	390	24
519	561	E40S/L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	407	25
2	48	E43D	450	37
3	49	E43D/E48D	449	37
4	50	E43D/E48D/I208V/N247D/Q299R/Q302K/R373K/I376V	434	36
5	51	E43D/E48D/I208V/R373K	429	36
6	52	E43D/E48D/I208V/R373K/I376V	428	36
7	53	E43D/E48D/N247D/Q299R/Q302K/R373K/I376V	448	36
8	54	E43D/E48D/N247D/Q302K/R373K	442	36

10

20

30

40

【表 7 - 2】

表7.1 GLAバリエーションの総免疫原性スコア (TIS) および免疫原性ヒットカウント (IHC)				
バリエーション#	配列番号	活性変異	TIS	IHC
9	55	E43D/E48D/Q302K/R373K/I376V	442	36
10	56	E43D/I208V/N247D	435	37
11	57	E43D/I208V/N247D/Q299R/R373K/I376V	435	36
12	58	E43D/I208V/Q299R/R373K/I376V	436	36
663	703	E43D/L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/A261G/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/W368A/R373K/M392T	315	1
685	725	E43D/L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/M253W/A257G/H271A/Q302K/N305L/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/W368A/R373K/M392T	334	7
634	674	E43D/L44R/Y92E/S166P/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	362	21
635	375	E43D/L44R/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	378	21
636	376	E43D/L44R/Y92N/S166P/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	366	21
633	673	E43D/L44R/Y92S/S166P/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	365	21
13	59	E43D/N247D/R373K/I376V	442	36
14	60	E43D/R373K/I376V	443	36
637	377	E43Q/L44R/Y92E/S166P/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	370	21
15	61	E48D/I208V/Q299R/Q302K/R373K	437	37
16	62	E48D/R373K/I376V	443	37
17	63	E48G/R373K	444	37
49	95	F180R	454	38
50	96	F180S	449	38
51	97	F198S	450	38
52	98	F217D	450	38
53	99	F217R	450	38
18	64	F217S	452	38
54	100	F352I	450	38
55	101	F352V/F365I	447	38
56	102	F365I	447	38
57	103	F365K	446	38
58	104	F365L	448	38
59	105	F365R	447	38
60	106	F365T	436	38
61	107	F365V	447	38
62	108	G303Q/R373V	465	38
63	109	H155A	451	38
64	110	H155L	455	41
65	111	H155R	452	39

10

20

30

40

【表 7-3】

表7.1 GLAバリエーションの総免疫原性スコア (TIS) および免疫原性ヒットカウント (IHC)				
バリエーション#	配列番号	活性変異	TIS	IHC
66	112	H155T	449	38
213	255	H15Q/K206A	429	38
67	113	H375E	437	36
68	114	H84S	450	38
69	115	I102L	450	38
70	116	I102L/L394V	449	37
71	117	I123T/T369N	449	38
72	118	I167V	438	37
19	65	I208V/N247D/Q299R/Q302K/R373K/I376V	435	37
20	66	I208V/N247D/Q299R/R373K/I376V	435	37
21	67	I208V/N247D/R373K/I376V	428	37
22	68	I208V/Q299R/I376V	436	37
23	69	I208V/Q302K/R373K/I376V	429	37
24	70	I376V	443	37
73	10	K206A	429	38
196	240	K206A/A350G	429	38
197	241	K206A/A350G/K362Q/T369A	413	38
198	242	K206A/A350G/T369D	426	38
199	243	K206A/A350G/T369S	429	38
203	247	K206A/E367A/T369D	439	42
204	248	K206A/E367D	427	38
205	21	K206A/E367D/T369D	419	37
206	18	K206A/E367N	441	43
207	249	K206A/E367N/R373K	430	38
208	250	K206A/E367N/R373K/I376V	429	38
209	251	K206A/E367P/T369D	430	38
297	338	K206A/F217R/G230V/N247D/Q302K/M322I/E367N/T369S/R373K	453	42
233	274	K206A/F217R/N247D/L316D/A350G/E367D/T369D	416	37
298	339	K206A/F217R/N247D/L316D/M322I/A337P/A350G/K362Q/E367N/R373K	420	37
299	340	K206A/F217R/N247D/Q249H/Q302K/M322I/K343G/A350G/E367T/R373K/L397F	434	40
234	275	K206A/F217R/N247D/Q302K/A350G/E367D/T369D	418	37
235	276	K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/A337P/A350G/E367D/T369D	410	37
236	277	K206A/F217R/Q302K/E367D/T369D	419	37
237	278	K206A/F217R/Q302K/L316D/A337P/A350G/E367D/T369D	411	37
210	252	K206A/F365L/E367N	439	41
211	253	K206A/F365L/E367N/I376V	435	40
212	254	K206A/F365L/E367N/R373K/I376V	435	40
238	279	K206A/I208V/M322V/K343G/F365L/R373K/I376V	415	37
239	280	K206A/I208V/R221K/N247D/M322I/K343D/F365L/R373K/I376V	425	37
300	341	K206A/I208V/R221T/N247D/M322V/K343G/E367N/R373K	424	38

10

20

30

40

【表 7 - 4】

表7.1 GLAバリエーションの総免疫原性スコア (TIS) および免疫原性ヒットカウント (IHC)				
バリエーション#	配列番号	活性変異	TIS	IHC
214	256	K206A/K343D/F365L/E367N	433	41
215	257	K206A/K343G	424	38
216	258	K206A/K343G/F365L/E367N/R373K	431	40
240	281	K206A/L269I/P349L/R373K	428	42
217	289	K206A/L316D	427	38
218	13	K206A/M322I/E367N/R373K	442	38
301	342	K206A/M322I/E367N/R373K	442	38
219	260	K206A/M322I/R373K	435	37
302	343	K206A/M322V/K343G/E367N/R373K	425	38
220	261	K206A/M322V/R373K/I376V	422	37
221	262	K206A/M390I	414	33
303	344	K206A/N247D/M322I/A337E/K343D/F365L/E367N/R373K/I376V	440	40
241	282	K206A/N247D/M322V/K343D/R373K/I376V	415	37
242	283	K206A/N247D/M322V/K343G/F365L/R373K	415	37
243	284	K206A/N247D/Q302K/A337P/K343G/A350G	417	38
244	285	K206A/N247D/Q302K/L316D/A350G	426	38
245	286	K206A/N247D/Q302K/M322V/F365L/R373K/I376V	419	37
222	263	K206A/P228Q/T369D	426	38
223	264	K206A/Q302K/A337P/A350G/K362Q	408	38
246	287	K206A/Q302K/L316D/A337P	421	38
304	345	K206A/Q302K/L316D/M322I/A337P/A350G/K362Q/E367N/T369S/R373K	431	42
305	346	K206A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K343D/E367N/T369S/R373K	438	42
224	265	K206A/Q302K/M322V/E367N	441	43
247	288	K206A/R221K/N247D/M322V/K343D/R373K	416	37
306	347	K206A/R221K/N247D/Q302K/M322I/E367N/R373K	441	38
307	348	K206A/R221K/Q302K/M322I/K343G/E367N/R373K/I376V	436	38
226	267	K206A/R221T/F365L	427	38
248	289	K206A/R221T/M322V/K343G/R373K	418	37
249	290	K206A/R221T/M322V/R373K	423	37
227	268	K206A/R325H	429	38
228	269	K206A/R373K	423	37
229	270	K206A/R373K/I376V	422	37
230	271	K206A/S374R	433	40
231	272	K206A/T369D	426	38
232	273	K206A/T369S	429	38
192	236	K206E	429	38
193	237	K206G	429	38
74	119	K206M	458	44
75	120	K206Q	450	38
76	24	K206R	450	38
194	238	K206R	450	38

10

20

30

40

【表 7-5】

表7.1 GLAバリエーションの総免疫原性スコア(TIS)および免疫原性ヒットカウント(IHC)				
バリエーション#	配列番号	活性変異	TIS	IHC
195	239	K206S	429	38
77	121	K206T/V359S	437	44
78	122	K343D	444	38
79	123	K343G	445	38
80	124	K362Q	435	38
81	125	K362R	449	38
82	126	K36D	452	38
83	127	K36E	450	38
25	71	K36Q	450	38
84	128	K395*	432	34
85	129	K395G	448	37
86	130	K395P	448	37
87	131	K395R	451	38
88	132	K395S	450	38
89	133	K395T	448	37
90	134	K96I	433	36
250	291	K96I/K206A/F217R	412	36
308	349	K96I/K206A/F217R/M322I/E367N/T369S/R373K	434	40
251	292	K96I/K206A/F217R/N247D	411	36
252	293	K96I/K206A/F217R/N247D/A350G/E367D/T369D	401	35
253	294	K96I/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/A337P/E367D/T369D	393	35
309	350	K96I/K206A/F217R/N247D/Q302K/M322I/A337P/K343G/A350G/E367N/R373K	413	36
310	351	K96I/K206A/N247D/M322I/A350G/E367N/T369S/R373K	433	40
311	352	K96I/K206A/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/A350G/E367N/T369S/R373K	425	40
312	353	K96I/K206A/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/A350G/K362Q/E367N/T369S/R373K	413	40
91	135	K96L	434	36
92	136	K96R	443	37
93	137	K96R/L397V	442	36
94	138	L100F	442	38
313	354	L100F/A125S/K206A/I208V/R221K/Q302K/M322I/K343G/E367N/R373K	429	38
254	295	L100F/K206A	421	38
314	355	L100F/K206A/I208V/N247D/Q302K/M322V/K343D/E367N/R373K/I376V	414	38
315	356	L100F/K206A/I208V/Q302K/M322V/F365L/E367N/R373K/I376V	427	40
316	357	L100F/K206A/I208V/R221K/M322V/K343D/E367N/R373K	416	38
317	358	L100F/K206A/I208V/R221K/M322V/K343D/F365L/E367N/R373K	422	40
255	296	L100F/K206A/I208V/R221K/N247D/Q302K/M322I/K343D/F365L/I376V	417	37

10

20

30

40

【表 7 - 6】

表7.1 GLAバリエーションの総免疫原性スコア (TIS) および免疫原性ヒットカウント (IHC)				
バリエーション#	配列番号	活性変異	TIS	IHC
256	297	L100F/K206A/I208V/R221K/N247D/Q302K/M322V/K343D/F365L/I376V	405	37
318	359	L100F/K206A/I208V/R221T/M322V/E367N/R373K/I376V	421	38
257	298	L100F/K206A/I208V/R221T/N247D/K343D/F365L/I376V	405	37
258	299	L100F/K206A/I208V/R221T/Q302K/M322I/K343D/I376V	420	37
319	360	L100F/K206A/M322I/E367N/R373K/I376V	433	38
259	300	L100F/K206A/M322V/F365L/R373K/I376V	412	37
260	301	L100F/K206A/N247D/F365L/R373K/I376V	411	37
261	302	L100F/K206A/N247D/M322V/K343D/I376V	407	37
320	361	L100F/K206A/N247D/Q302K/M322I/E367N/R373K	433	38
321	362	L100F/K206A/R221K/N247D/M322I/K343G/E367N/R373K	428	38
262	303	L100F/K206A/R221K/N247D/Q302K/M322V/F365L/R373K/I376V	411	37
263	304	L100F/K206A/R221K/N247D/Q302K/M322V/I376V	413	37
264	305	L100F/K206A/R221K/N247D/Q302K/M322V/K343D/R373K/I376V	407	37
265	306	L100F/K206A/R221K/R373K/I376V	414	37
266	307	L100F/K206A/R221T/M322I/K343E/F365L/R373K	419	37
267	308	L100F/K206A/R221T/N247D/Q302K/K343D/F365L/R373K	406	37
322	363	L100F/K206A/R221T/Q302K/M322I/K343D/E367N/R373K	428	38
268	309	L100F/K206A/R373K/I376V	414	37
323	364	L100F/L160I/K206A/R221K/M322V/E367N/R373K	424	42
647	387	L14F/L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	345	8
95	139	L158A	437	35
96	140	L158I	458	42
97	141	L158M	450	40
98	142	L158R	431	35
99	143	L23M	450	38
324	365	L23S/K206A/M322I/E367N/R373K	442	38
100	144	L23T	450	38
101	145	L316D	448	38
102	146	L316E	448	38
269	310	L37I/K206A/R221K/N247D/M322I/R373K	434	37
103	147	L384F	448	35
104	148	L386V	436	31
105	149	L394A	449	37
106	150	L394R	450	38
107	151	L394S	450	38
108	152	L394T	449	37
109	153	L397*	442	36
110	154	L397D	449	37
111	155	L397H	450	38
112	156	L397I	449	37

【表 7-7】

表7.1 GLAバリエーションの総免疫原性スコア (TIS) および免疫原性ヒットカウント (IHC)				
バリエーション#	配列番号	活性変異	TIS	IHC
113	157	L397Q	449	37
114	158	L397R	449	37
115	159	L397T	449	37
116	160	L398E	449	37
117	161	L398G	450	38
118	162	L398N	449	37
119	163	L398Q	450	38
120	164	L398R	449	37
368	409	L44A/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	36
362	403	L44C/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	32
360	401	L44E/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	32
374	415	L44M/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	33
370	411	L44Q/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	36
398	439	L44R/A159S/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	34
520	561	L44R/A77S/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	393	24
270	311	L44R/C143Y/K206A/A337P/A350G	430	38
521	562	L44R/D52N/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	393	24
271	312	L44R/E187G/K206A/A337P/A350G	430	38
522	563	L44R/E56K/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	393	24
382	423	L44R/H94N/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	30
386	427	L44R/H94R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	34
272	313	L44R/K206A	436	38
273	314	L44R/K206A/E367D/T369D	426	37
274	315	L44R/K206A/F217R/A350G	436	38
275	316	L44R/K206A/F217R/N247D/A337P	429	38
439	480	L44R/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	36
425	466	L44R/K206A/F217R/N247D/H271E/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	36
436	477	L44R/K206A/F217R/N247D/H271G/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	36
433	474	L44R/K206A/F217R/N247D/H271Q/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	36

10

20

30

40

【表 7 - 8】

表7.1 GLAバリエーションの総免疫原性スコア (TIS) および免疫原性ヒットカウント (IHC)				
バリエーション#	配列番号	活性変異	TIS	IHC
452	493	L44R/K206A/F217R/N247D/H271R/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	36
430	471	L44R/K206A/F217R/N247D/H271T/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	36
441	482	L44R/K206A/F217R/N247D/H271V/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	36
435	476	L44R/K206A/F217R/N247D/I258L/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	34
450	491	L44R/K206A/F217R/N247D/I258M/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	36
442	483	L44R/K206A/F217R/N247D/L255A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	34
429	470	L44R/K206A/F217R/N247D/L255C/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	34
424	465	L44R/K206A/F217R/N247D/L255E/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	34
443	484	L44R/K206A/F217R/N247D/L255S/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	35
449	490	L44R/K206A/F217R/N247D/L255T/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	35
432	473	L44R/K206A/F217R/N247D/L255V/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	36
440	481	L44R/K206A/F217R/N247D/L263C/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	33
437	478	L44R/K206A/F217R/N247D/L263E/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	29
445	486	L44R/K206A/F217R/N247D/L263F/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	34
427	468	L44R/K206A/F217R/N247D/L263G/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	34
447	488	L44R/K206A/F217R/N247D/L263W/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	33
276	317	L44R/K206A/F217R/N247D/L316D/A337P/A350G/E367D/T369D	417	37
277	318	L44R/K206A/F217R/N247D/L316D/A337P/E367D/T369D	417	37
278	319	L44R/K206A/F217R/N247D/L316D/A350G/E367D/T369D	423	37
325	366	L44R/K206A/F217R/N247D/L316D/M322I/A337P/K343G/K362Q/E367N/R373K	422	37
446	487	L44R/K206A/F217R/N247D/M259A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	31
426	467	L44R/K206A/F217R/N247D/M259E/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	30
428	469	L44R/K206A/F217R/N247D/M259S/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	34
451	492	L44R/K206A/F217R/N247D/M259V/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	35

10

20

30

40

【表 7-9】

表7.1 GLAバリエーションの総免疫原性スコア (TIS) および免疫原性ヒットカウント (IHC)				
バリエーション#	配列番号	活性変異	TIS	IHC
444	485	L44R/K206A/F217R/N247D/M259W/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	30
279	320	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/A350G	435	38
326	367	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	427	37
513	554	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/D396*	N. D.	32
512	553	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/K395*	N. D.	32
508	549	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/L384A	N. D.	30
477	518	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/L384W	N. D.	34
474	515	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/L386F	N. D.	35
502	543	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/L386S	N. D.	30
460	501	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/L386T	N. D.	30
515	556	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/L394*	N. D.	32
511	552	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/L397*	N. D.	32
500	541	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M390A	N. D.	36
486	527	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M390C	N. D.	35
490	531	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M390D	N. D.	30
476	517	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M390E	N. D.	30
494	535	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M390F	N. D.	30
481	522	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M390G	N. D.	30
459	500	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M390H	N. D.	30
497	538	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M390K	N. D.	30
454	495	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M390P	N. D.	30
465	506	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M390Q	N. D.	30
480	521	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M390R	N. D.	30

10

20

30

40

【表 7 - 1 0】

表7.1 GLAバリエーションの総免疫原性スコア (TIS) および免疫原性ヒットカウント (IHC)				
バリエーション#	配列番号	活性変異	TIS	IHC
504	545	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E 367N/R373K/M390S	N. D.	32
463	504	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E 367N/R373K/M390T	N. D.	34
496	537	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E 367N/R373K/M390V	N. D.	32
491	532	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E 367N/R373K/M390W	N. D.	30
457	498	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E 367N/R373K/M392A	N. D.	34
483	524	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E 367N/R373K/M392C	N. D.	34
455	496	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E 367N/R373K/M392D	N. D.	35
466	507	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E 367N/R373K/M392E	N. D.	35
479	520	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E 367N/R373K/M392F	N. D.	30
501	542	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E 367N/R373K/M392G	N. D.	30
498	539	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E 367N/R373K/M392I	N. D.	34
472	513	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E 367N/R373K/M392K	N. D.	35
473	514	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E 367N/R373K/M392L	N. D.	33
505	546	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E 367N/R373K/M392N	N. D.	30
493	534	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E 367N/R373K/M392P	N. D.	30
461	502	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E 367N/R373K/M392Q	N. D.	35
478	519	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E 367N/R373K/M392S	N. D.	36
507	548	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E 367N/R373K/M392T	N. D.	30
484	525	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E 367N/R373K/M392V	N. D.	34
485	526	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E 367N/R373K/M392W	N. D.	30
503	544	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E 367N/R373K/Q385C	N. D.	30
482	523	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E 367N/R373K/Q385G	N. D.	30

10

20

30

40

【表 7-11】

表7.1 GLAバリエーションの総免疫原性スコア (TIS) および免疫原性ヒットカウント (IHC)				
バリエーション#	配列番号	活性変異	TIS	IHC
469	510	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/Q385I	N. D.	36
462	503	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/Q385L	N. D.	36
509	550	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/Q385T	N. D.	30
506	547	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/Q385W	N. D.	30
514	555	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/S393*	N. D.	31
492	533	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/T389C	N. D.	32
475	516	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/T389D	N. D.	30
487	528	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/T389G	N. D.	30
489	530	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/T389I	N. D.	36
499	540	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/T389L	N. D.	35
456	497	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/T389M	N. D.	35
488	529	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/T389N	N. D.	30
495	536	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/T389P	N. D.	34
468	509	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/T389Q	N. D.	30
467	508	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/T389S	N. D.	30
471	512	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/T389W	N. D.	30
327	368	L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/K343D/A350G/K362Q/E367N/R373K	427	37
434	475	L44R/K206A/F217R/N247D/R270D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	36
431	472	L44R/K206A/F217R/N247D/R270G/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	36
453	494	L44R/K206A/F217R/N247D/R270L/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	36
448	489	L44R/K206A/F217R/N247D/R270Q/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	36
280	321	L44R/K206A/F217R/Q302K/E367D/T369D	426	37
328	369	L44R/K206A/F217R/Q302K/M322I/A337P/A350G/E367N/T369S/R373K	452	42

10

20

30

40

【表 7-12】

表7.1 GLAバリエーションの総免疫原性スコア (TIS) および免疫原性ヒットカウント (IHC)				
バリエーション#	配列番号	活性変異	TIS	IHC
329	370	L44R/K206A/I208V/N247D/Q302K/M322I/K343D/E367N/R373K	442	38
330	371	L44R/K206A/I208V/R221K/M322I/K343D/E367N/R373K	443	38
281	322	L44R/K206A/I208V/R221K/M322V/K343D/F365L/R373K	422	37
331	372	L44R/K206A/I208V/R221K/N247D/Q302K/M322I/K343D/E367N/R373K/I376V	441	38
332	373	L44R/K206A/I208V/R221T/Q302K/M322I/K343G/F365L/E367N/R373K/I376V	449	40
333	374	L44R/K206A/L316D/M322I/A337P/A350G/E367N/T369S/R373K	450	42
282	323	L44R/K206A/N247D/A337P	429	38
334	375	L44R/K206A/N247D/L316D/M322I/A350G/K362Q/E367N/T369S/R373K	443	42
283	324	L44R/K206A/N247D/Q302K/A337P/A350G/E367D/T369D	419	37
335	376	L44R/K206A/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K343G/A350G/K362Q/E367N/T369S/R373K	432	42
336	377	L44R/K206A/N247D/Q302K/M322I/A350G/E367N/T369S/R373K	457	42
337	378	L44R/K206A/N247D/Q302K/M322I/K343D/E367N/R373K	442	38
284	325	L44R/K206A/R221T/N247D/M322I/K343D/F365L/I376V	432	37
285	326	L44R/K96I/K206A	419	36
286	327	L44R/K96I/K206A/F217R/N247D	418	36
338	379	L44R/K96I/K206A/F217R/N247D/L316D/M322I/A337P/A350G/K362Q/E367N/R373K	410	35
339	380	L44R/K96I/K206A/F217R/N247D/M322I/A350G/K362Q/E367N/R373K	418	35
340	381	L44R/K96I/K206A/F217R/N247D/M322I/A350G/K362Q/E367N/T369S/R373K	428	40
341	382	L44R/K96I/K206A/F217R/N247D/M322I/E367N/T369S/R373K	440	40
287	328	L44R/K96I/K206A/F217R/N247D/Q302K/A337P/A350G	412	36
288	329	L44R/K96I/K206A/F217R/N247D/Q302K/A337P/K343D/A350G/E367D/T369D	397	35
342	383	L44R/K96I/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/E367N/R373K	423	36
343	384	L44R/K96I/K206A/F217R/N247D/Q302K/M322I/E367N/T369S/R373K	440	40
344	385	L44R/K96I/K206A/F217R/N247D/Q302K/M322I/K362Q/E367N/R373K	418	35
345	386	L44R/K96I/K206A/F217R/Q219P/N247D/M253K/S266F/D284E/Q290P/L293F/Q302K/V308G/S314F/M322I/A337P/K343E/E367N/R373K	429	41
289	330	L44R/K96I/K206A/F217R/Q302K/A350G	419	36
346	387	L44R/K96I/K206A/F217R/Q302K/M322I/A350G/K362Q/E367N/T369S/R373K	429	40
347	388	L44R/K96I/K206A/M322I/A337P/E367N/T369S/R373K	435	40
290	331	L44R/K96I/K206A/N247D/L316D/A337P/A350G/E367D/T369D	400	35
291	332	L44R/L100F/K206A/F365L	426	38

10

20

30

40

【表 7 - 1 3】

表7.1 GLAバリエーションの総免疫原性スコア (TIS) および免疫原性ヒットカウント (IHC)				
バリエーション#	配列番号	活性変異	TIS	IHC
292	333	L44R/L100F/K206A/I208V/Q219H/N247D/Q302K/M322V/K343D/R373K/I376V	416	37
348	389	L44R/L100F/K206A/I208V/R221K/M322I/K343G/F365L/E367N/R373K	442	40
293	334	L44R/L100F/K206A/I208V/R221K/N247D/Q302K/M322V/F365L/I376V	418	37
349	390	L44R/L100F/K206A/I208V/R221T/N247D/M322I/F365L/E367N/R373K	446	40
350	391	L44R/L100F/K206A/I208V/R221T/N247D/M322V/E367N/R373K/I376V	427	38
294	335	L44R/L100F/K206A/I208V/R221T/N247D/M322V/I376V	420	37
295	336	L44R/L100F/K206A/I208V/R221T/N247D/Q302K/M322I/K343D/F365L/R373K/I376V	424	37
351	392	L44R/L100F/K206A/I208V/R221T/Q302K/M322I/E367N/R373K/I376V	440	38
352	393	L44R/L100F/K206A/Q302K/M322I/E367N/R373K/I376V	440	38
353	394	L44R/L100F/K206A/R221K/M322I/F365L/E367N/R373K/I376V	446	40
354	395	L44R/L100F/K206A/R221T/M322I/F365L/E367N/R373K	447	40
355	396	L44R/L100F/K206A/R221T/N247D/M322I/K343D/E367N/R373K/I376V	433	38
356	397	L44R/L100F/K206A/R221T/N247D/Q302K/M322I/E367N/R373K	440	38
357	398	L44R/L100F/K206A/R221T/N247D/Q302K/M322V/E367N/R373K/I376V	427	38
358	399	L44R/L100F/K206A/R221T/Q302K/M322I/E367N/R373K	441	38
359	400	L44R/L100F/Q181L/K206A/R221T/N247D/Q302K/M322V/E367N/R373K/I376V	429	38
400	441	L44R/L158C/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	34
405	446	L44R/L158E/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	34
422	463	L44R/L158G/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	34
407	448	L44R/L158H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	34
396	437	L44R/L158M/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	39
414	455	L44R/L158Q/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	34
397	438	L44R/L158R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	34
121	165	L44R/L384F	455	35
418	459	L44R/N161E/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	34

10

20

30

40

【表 7 - 1 4】

表7.1 GLAバリエーションの総免疫原性スコア (TIS) および免疫原性ヒットカウント (IHC)				
バリエーション#	配列番号	活性変異	TIS	IHC
523	564	L44R/N91M/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	396	28
524	565	L44R/N91V/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	398	27
525	566	L44R/Q76H/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	388	23
423	464	L44R/R162A/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	35
416	457	L44R/R162G/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	34
410	451	L44R/R162H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	34
406	447	L44R/R162K/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	34
421	462	L44R/R162Q/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	36
417	458	L44R/R162S/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	36
409	450	L44R/R165H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	36
399	440	L44R/R165K/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	36
526	567	L44R/R74H/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	393	24
411	452	L44R/S166A/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	34
415	456	L44R/S166D/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	34
419	460	L44R/S166E/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	34
404	445	L44R/S166F/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	36
403	444	L44R/S166G/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	35
412	453	L44R/S166H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	34
402	42	L44R/S166P/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	34
408	449	L44R/S166R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	36
420	461	L44R/S166T/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	34
363	404	L44R/S47D/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	36

10

20

30

40

【表 7 - 1 5】

表7.1 GLAバリエーションの総免疫原性スコア (TIS) および免疫原性ヒットカウント (IHC)				
バリエーション#	配列番号	活性変異	TIS	IHC
375	416	L44R/S47I/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	36
365	406	L44R/S47N/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	36
623	664	L44R/S47N/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/A276S/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	386	25
624	665	L44R/S47N/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M390Q	385	25
628	668	L44R/S47N/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M390H	350	12
613	654	L44R/S47N/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M390Q	351	12
632	672	L44R/S47N/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	352	12
627	667	L44R/S47N/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/M259W/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M390H/M392T	311	5
622	663	L44R/S47N/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/M259W/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M390Q/M392T	305	5
615	656	L44R/S47N/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M390H	352	13
361	402	L44R/S47R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	36
631	671	L44R/S47T/A53S/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M390Q	344	8
379	420	L44R/S47T/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	32
675	715	L44R/S47T/M65V/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	344	8
657	697	L44R/S47T/P67T/Y92H/S166P/K182N/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	338	8
629	669	L44R/S47T/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M390Q	378	21
659	699	L44R/S47T/W64L/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	345	8
672	712	L44R/S47T/Y92H/D144Y/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	351	8
646	686	L44R/S47T/Y92H/G113C/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	345	8
644	684	L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/L237P/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	338	8
687	727	L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/Q290R/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/W368A/R373K/M392T	340	7
618	659	L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	361	15

10

20

30

40

【表 7 - 1 6】

表7.1 GLAバリエーションの総免疫原性スコア (TIS) および免疫原性ヒットカウント (IHC)				
バリエーション#	配列番号	活性変異	TIS	IHC
619	660	L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M390H	343	8
620	661	L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M390Q	344	8
625	44	L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	345	8
673	713	L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/N377Y/M392T	331	7
693	733	L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/W368A/R373K/M392T	340	7
682	722	L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/L316Y/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	348	8
670	710	L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/N305L/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	345	8
689	729	L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/N305L/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	345	8
684	724	L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/N305L/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/W368A/R373K/M392T	340	7
678	718	L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/M253W/A257G/H271A/K277R/Q281L/Q302K/L316D/A319D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	339	7
677	717	L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/M253W/H271A/S273D/P274S/K277R/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	338	7
621	662	L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/M259E/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M390Q	307	1
610	651	L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/M259E/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M390Q	310	2
630	670	L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/M259W/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M390H	311	1
616	657	L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/M259W/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M390Q	312	1
669	709	L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/P262S/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	353	8
614	655	L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	363	16
692	732	L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/W256L/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	347	8
666	706	L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/P228L/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	345	8
688	728	L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/P228Q/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	345	8
674	714	L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/P234H/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	345	8

10

20

30

40

【表 7-17】

表7.1 GLAバリエーションの総免疫原性スコア (TIS) および免疫原性ヒットカウント (IHC)				
バリエーション#	配列番号	活性変異	TIS	IHC
662	702	L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/V238I/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	347	8
652	692	L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/W246P/N247D/A261G/H271A/Q302K/N305L/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	312	1
655	695	L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/W246P/N247D/A261G/H271A/Q302K/N305L/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/W368A/R373K/M392T	307	0
645	685	L44R/S47T/Y92H/S166P/P174S/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	340	8
661	701	L44R/S47T/Y92H/S166P/W195C/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	345	8
366	407	L44R/S47V/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	36
401	442	L44R/T163S/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	34
388	429	L44R/V93L/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	36
389	430	L44R/V93S/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	29
387	428	L44R/V93T/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	31
385	426	L44R/Y92A/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	25
383	424	L44R/Y92C/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	24
527	568	L44R/Y92E/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	377	24
393	434	L44R/Y92G/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	24
528	569	L44R/Y92H/D130Q/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	393	24
529	570	L44R/Y92H/K182A/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	386	24
530	571	L44R/Y92H/K182E/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	386	24
531	572	L44R/Y92H/K182H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	386	24
532	573	L44R/Y92H/K182M/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	386	24
533	574	L44R/Y92H/K182Q/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	386	24
534	575	L44R/Y92H/K182R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	386	24

10

20

30

40

【表 7 - 1 8】

表7.1 GLAバリエーションの総免疫原性スコア (TIS) および免疫原性ヒットカウント (IHC)				
バリエーション#	配列番号	活性変異	TIS	IHC
535	576	L44R/Y92H/K182T/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A3 37P/K362Q/E367N/R373K	386	24
536	577	L44R/Y92H/K182V/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A3 37P/K362Q/E367N/R373K	386	24
537	578	L44R/Y92H/K182Y/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A3 37P/K362Q/E367N/R373K	386	24
538	579	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/A287C/Q302K/L316D/M322I/A3 37P/K362Q/E367N/R373K	392	24
539	580	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/A287H/Q302K/L316D/M322I/A3 37P/K362Q/E367N/R373K	394	24
540	581	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/A287M/Q302K/L316D/M322I/A3 37P/K362Q/E367N/R373K	404	24
541	582	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/K283A/Q302K/L316D/M322I/A3 37P/K362Q/E367N/R373K	384	24
542	583	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/K283G/Q302K/L316D/M322I/A3 37P/K362Q/E367N/R373K	387	24
543	584	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/K283M/Q302K/L316D/M322I/A3 37P/K362Q/E367N/R373K	385	24
544	585	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/K283V/Q302K/L316D/M322I/A3 37P/K362Q/E367N/R373K	385	24
545	586	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/K295A/Q302K/L316D/M322I/A3 37P/K362Q/E367N/R373K	393	24
546	587	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/K295E/Q302K/L316D/M322I/A3 37P/K362Q/E367N/R373K	392	24
547	588	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/K295L/Q302K/L316D/M322I/A3 37P/K362Q/E367N/R373K	409	24
548	589	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/K295N/Q302K/L316D/M322I/A3 37P/K362Q/E367N/R373K	391	24
549	590	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/K295Q/Q302K/L316D/M322I/A3 37P/K362Q/E367N/R373K	393	24
550	591	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/K295S/Q302K/L316D/M322I/A3 37P/K362Q/E367N/R373K	393	24
551	592	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/K295T/Q302K/L316D/M322I/A3 37P/K362Q/E367N/R373K	392	24
552	593	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/A317D/M322I/A3 37P/K362Q/E367N/R373K	393	24
553	594	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/A317Q/M322I/A3 37P/K362Q/E367N/R373K	393	24
554	595	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/A3 46G/K362Q/E367N/R373K	388	24
555	596	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/G3 44A/K362Q/E367N/R373K	395	24
556	597	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/G3 44D/K362Q/E367N/R373K	388	24

10

20

30

40

【表 7 - 1 9】

表7.1 GLAバリエーションの総免疫原性スコア (TIS) および免疫原性ヒットカウント (IHC)				
バリエーション#	配列番号	活性変異	TIS	IHC
557	598	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/G344S/K362Q/E367N/R373K	388	24
558	599	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/I353L/K362Q/E367N/R373K	391	24
559	600	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/L372W/R373K	386	23
395	40	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	24
560	601	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/W368A/R373K	388	23
561	602	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/W368L/R373K	412	31
562	603	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/W368N/R373K	393	24
563	604	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/W368R/R373K	400	28
564	605	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/W368V/R373K	407	29
565	606	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/N348E/K362Q/E367N/R373K	393	24
566	607	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/N348M/K362Q/E367N/R373K	393	24
567	608	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/N348Q/K362Q/E367N/R373K	393	24
568	609	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/N348R/K362Q/E367N/R373K	393	24
569	610	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/N348W/K362Q/E367N/R373K	393	24
570	611	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/T354S/K362Q/E367N/R373K	391	24
571	612	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/N305K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	400	24
572	613	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/N305L/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	393	24
573	614	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/S314A/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	393	24
574	615	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/S314H/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	395	24
575	616	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/S314N/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	388	24
576	617	L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/S314Y/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	388	24
577	618	L44R/Y92H/K206A/F217R/W246A/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	395	24

10

20

30

40

【表 7 - 2 0】

表7.1 GLAバリエーションの総免疫原性スコア(TIS)および免疫原性ヒットカウント(IHC)				
バリエーション#	配列番号	活性変異	TIS	IHC
578	619	L44R/Y92H/K206A/F217R/W246I/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	399	24
579	620	L44R/Y92H/K206A/F217R/W246P/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	387	24
580	621	L44R/Y92H/K206A/F217R/W246R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	396	24
581	622	L44R/Y92H/K206A/F217R/W246S/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	402	24
582	623	L44R/Y92H/K206A/S210A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/A350T/K362Q/E367N/R373K	393	24
583	624	L44R/Y92H/K206A/S210A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	393	24
584	625	L44R/Y92H/K206A/S210E/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	393	24
585	626	L44R/Y92H/K206A/S210K/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	407	24
586	627	L44R/Y92H/K206A/S210N/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	393	24
587	628	L44R/Y92H/K206A/S210R/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	408	24
588	629	L44R/Y92H/K96A/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	380	24
589	630	L44R/Y92H/K96W/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	399	26
617	658	L44R/Y92H/L136V/S166P/K206A/F217R/N247D/M259A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M390Q	347	8
590	631	L44R/Y92H/P179M/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	414	29
591	632	L44R/Y92H/R189K/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	390	24
592	633	L44R/Y92H/R189V/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	398	24
626	666	L44R/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M390Q	358	13
611	652	L44R/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M390Q	360	14
612	953	L44R/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	361	14
593	634	L44R/Y92H/S95A/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	396	27
594	635	L44R/Y92H/S95E/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	375	24
595	636	L44R/Y92H/T186A/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	393	24

10

20

30

40

【表 7-21】

表7.1 GLAバリエーションの総免疫原性スコア (TIS) および免疫原性ヒットカウント (IHC)				
バリエーション#	配列番号	活性変異	TIS	IHC
596	637	L44R/Y92H/T186G/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	393	24
597	638	L44R/Y92H/T186V/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	401	24
598	639	L44R/Y92H/Y120H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	393	24
599	640	L44R/Y92H/Y120S/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	393	24
600	641	L44R/Y92H/Y120S/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/L341F/K362Q/E367N/R373K	388	24
380	421	L44R/Y92K/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	24
390	431	L44R/Y92Q/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	24
394	435	L44R/Y92R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	30
381	422	L44R/Y92S/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	24
392	433	L44R/Y92T/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	24
384	425	L44R/Y92V/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	35
369	410	L44S/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	36
122	166	L44T	456	37
378	419	L44T/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	36
372	413	L44V/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	36
371	412	L44W/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	32
123	167	M20D/Q302K	450	38
124	168	M253F	444	38
125	169	M322I	462	38
126	170	M390D	425	31
127	171	M390R	430	31
128	172	M390T	438	35
129	173	M392G	435	31
130	174	M392P	433	31
131	175	M392S	448	37
601	642	M39C/L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	367	19
683	723	M39E/E43D/L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/W246P/N247D/M253W/H271A/S273D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N	309	6

10

20

30

40

【表 7-22】

表7.1 GLAバリエーションの総免疫原性スコア (TIS) および免疫原性ヒットカウント (IHC)				
バリエーション#	配列番号	活性変異	TIS	IHC
		/W368A/R373K/M392T		
660	700	M39E/L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/A261G/H271A/Q302K/N305L/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	302	1
668	708	M39E/L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	329	8
676	716	M39E/L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/W368A/R373K/M392T	324	7
639	679	M39E/L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247Y/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	343	8
658	698	M39E/L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/W246P/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	323	8
602	643	M39E/L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	363	19
364	405	M39H/L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	32
367	408	M39R/L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	32
603	644	M39R/L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	368	19
377	418	M39T/L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	32
604	645	M39V/L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	393	24
132	176	M39Y	451	37
376	417	M41P/L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	35
373	414	M41R/L44R/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	N. D.	36
133	177	N388R	454	38
134	178	N91Q	438	32
26	72	P179S/R373K	430	37
135	179	Q190S/T369D	448	38
136	180	Q249A	449	38
27	73	Q299R/M322V/R373K	451	37
28	74	Q299R/Q302K/R373K	451	37
29	75	Q299R/Q302K/R373K/I376V	450	37
137	181	Q302A	450	38
30	76	Q302K/I376V	443	37
138	182	Q385H	435	32
139	183	Q385I	447	38
140	184	Q385L	445	38
141	185	Q391G	449	36

10

20

30

40

【表 7 - 2 3】

表7.1 GLAバリエーションの総免疫原性スコア (TIS) および免疫原性ヒットカウント (IHC)				
バリエーション#	配列番号	活性変異	TIS	IHC
142	186	Q80A	450	38
143	187	Q80H	450	38
144	188	Q80V	459	38
145	189	Q88A	448	38
146	190	Q88F	456	38
147	191	Q88H	448	38
148	192	Q88R	448	38
149	193	Q88S	448	38
150	194	R162H	446	35
151	195	R162S	450	37
225	226	R165S/K206A	427	39
152	196	R221K/A350G	450	38
153	197	R221T	450	38
154	198	R301I/K362T	449	41
155	199	R301L	450	38
156	200	R371S	456	39
157	201	R371V	452	40
31	77	R373K	444	37
32	78	R373K/I376V	443	37
665	705	R7C/L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/W368A/R373K/M392T	340	7
650	690	R7H/T10P/L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	345	8
681	721	R7P/L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	345	8
654	694	R7S/L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	345	8
158	202	R87K	435	32
159	203	R87P/L398R	423	31
160	204	S166A	440	35
161	205	S166H	447	35
162	206	S166K	441	35
163	207	S31D	450	38
164	208	S34D/M392P	439	31
165	209	S34G	450	38
166	210	S34H/M390R	430	31
167	211	S34R	450	38
168	212	S374M	454	40
169	213	S374T	439	37
170	214	S393E	447	37
171	215	S393G	447	37
172	216	S393H	454	38

【表 7-24】

表7.1 GLAバリエーションの総免疫原性スコア (TIS) および免疫原性ヒットカウント (IHC)				
バリエーション#	配列番号	活性変異	TIS	IHC
173	217	S393P	452	37
174	218	S47I	450	38
175	219	S47R	459	38
176	220	S47T	433	33
177	221	S95D	422	31
178	222	S95E	414	31
179	223	S95Q	446	36
686	728	T10P/E17G/L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	352	8
642	682	T10P/E43D/L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/A261G/H271A/Q302K/N305L/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/W368A/R373K/M392T	315	1
690	730	T10P/L44R/S47T/Y92H/M156V/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	333	8
638	678	T10P/L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/A261G/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	318	1
651	691	T10P/L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	345	8
691	731	T10P/L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	345	8
671	711	T10P/L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/W368A/R373K/M392T	340	7
643	683	T10P/L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/R325S/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	335	8
664	704	T10P/L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/Q252H/M253R/A254E/A261G/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	312	2
656	696	T10P/L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/W246P/N247D/A261G/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	312	1
653	693	T10P/L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/W246P/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	339	8
605	646	T10P/L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	393	24
606	647	T10P/L44R/Y92H/R189L/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	395	24
640	680	T10P/M39E/E43D/L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	329	8
648	46	T10P/M39E/L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/A261G/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/W368A/R373K/M392T	297	0
680	720	T10P/M39E/L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	329	8
679	719	T10P/M39E/L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/H271A	329	8

10

20

30

40

【表 7 - 2 5】

表7.1 GLAバリエーションの総免疫原性スコア (TIS)および免疫原性ヒットカウント (IHC)				
バリエーション#	配列番号	活性変異	TIS	IHC
		/Q302K/N305L/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T		
641	681	T10P/M39E/L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/N247D/S266P/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	313	8
649	689	T10P/M39E/L44R/S47T/Y92H/S166P/K206A/F217R/W246P/N247D/H271A/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K/M392T	323	8
180	224	T369D	447	38
181	225	T369S	450	38
182	226	T389S	436	31
607	648	T8L/L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	398	24
608	649	T8Q/L44R/Y92H/K206A/F217R/N247D/Q302K/L316D/M322I/A337P/K362Q/E367N/R373K	393	24
183	227	V133I	457	38
184	228	V168A	434	37
185	229	V168L	445	38
186	230	V345N	447	38
187	231	V345Y	449	38
188	232	V359E	429	38
189	233	V93I	443	37
190	234	W178H	448	38
191	235	W178S	442	38

N.D. -決定していない

【0173】

特定の実施形態を参照して本発明を説明したが、種々の変更を行うことができ、特定の状況、材料、物質組成、プロセス、プロセスステップまたはステップに適合させるために等価物に置き換え、それにより、特許請求の範囲から逸脱せずに本発明の利益を達成することができる。

【0174】

米国における全ての目的のために、本出願で引用した各々のおよびあらゆる刊行物および特許文献は、各々のかかる刊行物または文献が本明細書中で参照によって組み込まれると具体的且つ個別に示されているかのように、本明細書中で参照によって組み込まれる。刊行物および特許文献の引用は、かかる文献が関連先行技術であることを示すものではなく、その内容または日付に関する承認を構成するものでもない。

【図 1】

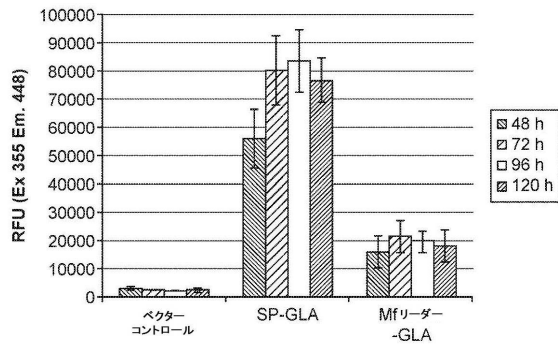


FIG. 1

【図 2】

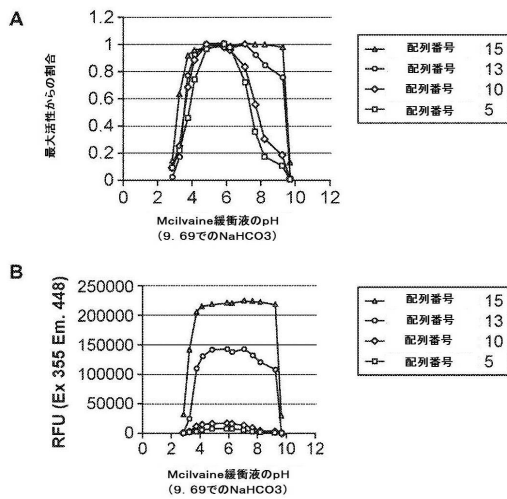


FIG. 2

【図 3】

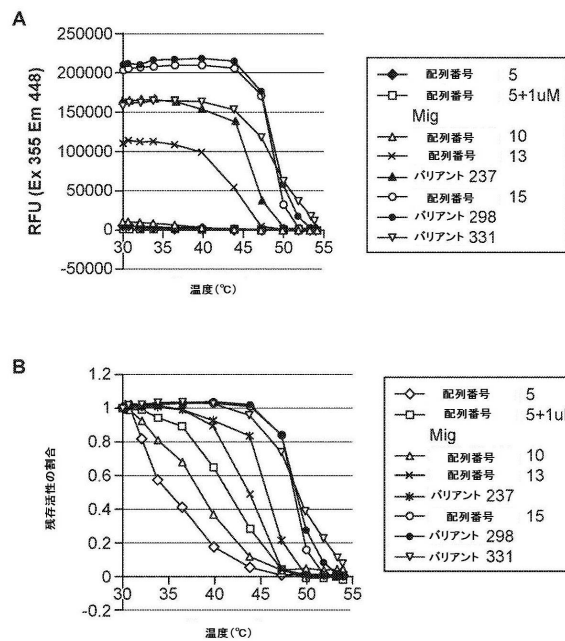


FIG. 3

【図 4 - 1】

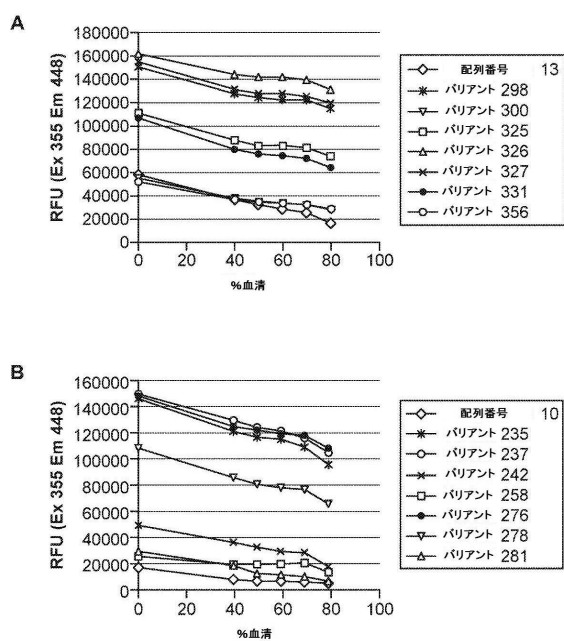


FIG. 4

【図 4 - 2】

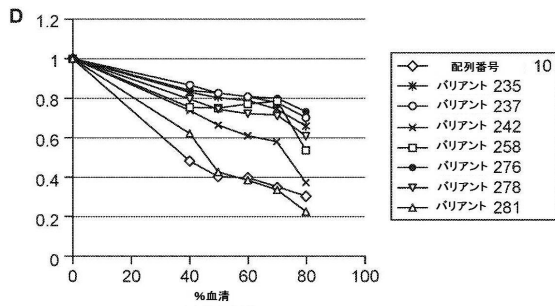
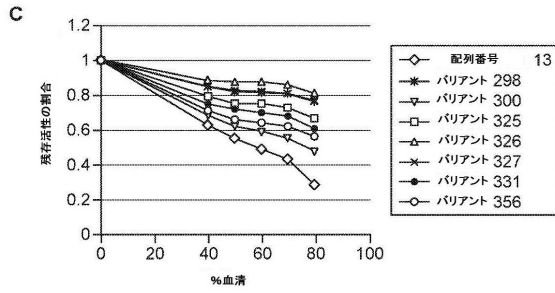


FIG. 4 (続き)

【図 5】

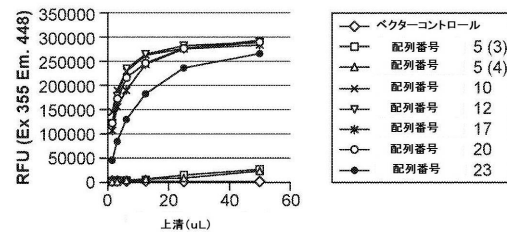


FIG. 5

【図 6】

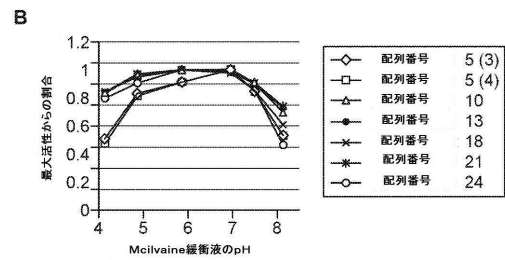
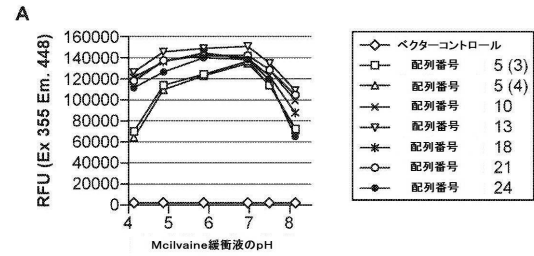


FIG. 6

【図 7】

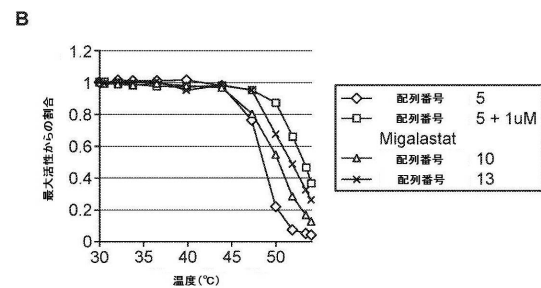
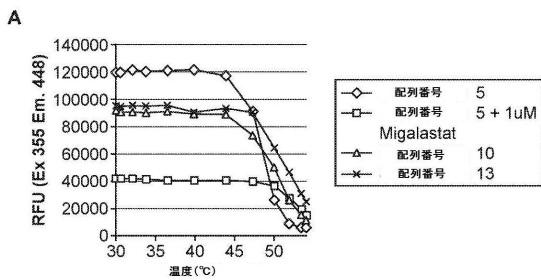


FIG. 7

【図 8】

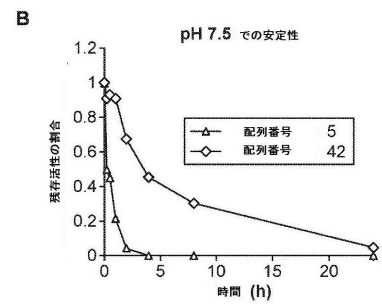
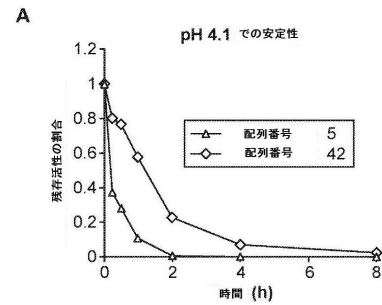


FIG. 8

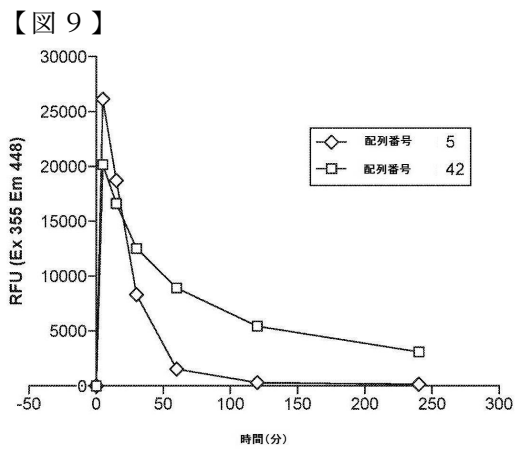


FIG. 9

【配列表】

0006650943000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 P	21/02	(2006.01)	C 1 2 P	21/02	C
A 6 1 P	3/06	(2006.01)	A 6 1 P	3/06	
A 6 1 K	38/47	(2006.01)	A 6 1 K	38/47	

前置審査

- (72)発明者 ミラー, マシュー ジー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94063, レッドウッド シティ, ペノブスコット ド
ライブ 200
- (72)発明者 ザン, シュン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94555, フリーモント, メイバード サークル 34
279
- (72)発明者 ユイスマン, ジャルト ダブリュー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94063, レッドウッド シティ, ペノブスコット ド
ライブ 200

審査官 鈴木 優志

- (56)参考文献 国際公開第2013/156552 (WO, A1)
特表2013-520986 (JP, A)
特表2001-504324 (JP, A)
Sugawara K et al., Journal of Human Genetics, 2008年, Vol.53, p.812-824
衛藤義勝, 日本内科学会雑誌, 2009年, Vol.98, No.4, p.163-170
小林秀行, 鯉淵研報, 2013年, Vol.29, p.3-12

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 1 2 N 9/00-9/99
C 1 2 N 15/00-15/90
C 1 2 P 1/00-41/00
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
CAplus/DWPI/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)
UniProt/GeneSeq